การโคลนยีนเอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์กำมะถัน ซึ่งแยกได้จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย

นางสาวศิรพรรณ สุคนธสิงห์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-516-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17134614

CLONING OF ATP SULFURYLASE GENE OF SULFUR-OXIDIZING BACTERIA ISOLATED FROM NATURAL SOURCES IN THAILAND

Miss Siraphan Sukonthasingh

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of The Requirements
for The Degree of Master of Science
Department of Microbiology
Graduated School
Chulalongkorn University
Academic Year 1996

ISBN 974-636-516-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนยีนเอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์กำมะถัน ซึ่งแยกได้จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย

โดย นางสาวศิรพรรณ สุคนธสิงห์

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัสญา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัสญา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศิรพรรณ สุคนธสิงห์ : การโคลนยีนเอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์กำมะถันซึ่งแยกได้จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย (CLONING OF ATP SULFURYLASE GENE OF SULFUR-OXIDIZING BACTERIA ISOLATED FORM NATURAL SOURCE IN THAILAND) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา, หน้า 69. ISBN 974-636-516-9

ได้ทำการโคลนยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสจาก แบคทีเรียสายพันธุ์ G02 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการออกซิไดซ์กำมะถันไพไรต์ไปเป็นกำมะถันซัลเฟต แยกได้จากดินในประเทศไทยสังเคราะห์ดีเอ็นเอติดตาม โดยวิธี polymerase chain reaction ใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ G02 เป็นแม่แบบใช้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากการทำนายลำดับเบสของบริเวณลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียที่อาศัยแบบภาวะที่ต้องพึ่งพา อยู่กับ *Riftia pachyptila* และของ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีความคล้ายคลึงกันสูงเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นได้โคโลนีทรานฟอร์แมนท์ที่มียีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลส โดยการใช้ดีเอ็นเอติดตามตรวจหายีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสจากธนาคารยีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ G02 โดยวิธี colony hybridization พิสูจน์ซ้ำโดยการสกัดเอาพลาสมิดลูกผสมมาทำ dot blot hybridization และตัดเอาชิ้น ดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิดลูกผสมข้างต้นมาทำ Southern hybridization กับดีเอ็นเอติดตาม

ภาควิชา ...จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ...จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา ...2539..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

#C626301 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD: ATP SULFURYLASE GENE, SULFUR OXIDIZING BACTERIA

SIRAPHAN SUKONTHASING: CLONING OF ATP SULFURYLASE GENE OF SULFER-OXIDIZING BACTERIA ISOLATED FROM NATURAL SOURCES IN THAILAND. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. ANCHARIDA AKARACHARANYA, Ph.D. 69 pp.

ISBN 974-636-516-9

Gene encoded ATP sulfurylase from bacteria G02, a high efficiency pyritic sulfur oxidizing bacteria isolated from soil in Thailand , was cloned. DNA probe was synthesized by polymerase chain reaction using chromosomal DNA of bacteria G02 as a template. Two oligonucleotides deduced from a high homology region of ATP sulfurylase amino acid sequence of *Riftia pachyptila* bacterial symbiont and *Saccharomyces cerevisiae* were synthesized and used as primers. Transformant harbouring ATP sulfurylase gene was obtained by screening of a genomic library of G02 with DNA probe by colony hybridization technique . Confirmation was done by dot blot hybridization of the extracted recombinant DNA, and by Southern hybridization of the inserted DNA.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และได้ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ คำแนะนำ ตลอดมาจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์นภาศิวรังสรรค์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา เจ้าหน้าที่ทุก ๆ ท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณการไฟฟ้าฝ่ายผลิตที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัย

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ที่คอยเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์อย่างเสมอมา

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือทุก ๆ สิ่ง อย่างหาที่สุดมิได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ฌ
คำย่อ.....ฐ
บทที่
1. บทนำ..... 1
2. เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และเชื้อจุลินทรีย์..... 8
3. วิธีการทดลอง.....11
4. ผลการทดลอง..... 27
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....50
เอกสารอ้างอิง..... 52
ภาคผนวก.....54
ประวัติผู้เขียน.....69

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างดิน ที่นำมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย ที่สามารถออกซิไดซ์ไพไรต์ไปเป็นซัลเฟต.....27
2. แสดงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถออกซิไดซ์ไพไรต์ไปเป็น ซัลเฟตมากกว่า 300 มก./ลิตร.....27
3. แสดงลักษณะทางสัญฐานวิทยา(Morphological Characteristics)ของแบคทีเรีย สายพันธุ์ GO2 49
4. แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี(Biological Characteristics) 49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. แสดงลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียที่อาศัยแบบภาวะที่ต้องพึ่งพาอยู่กับ *Riftia pachyptila* จากยีน *sopT* (Rs) และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งถอดรหัสมาจากยีน *MET 3* (Sc) บริเวณกรอบสี่เหลี่ยมเป็นบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันสูง 14
2. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *sopT* และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสของแบคทีเรียที่อาศัยแบบภาวะที่ต้องพึ่งพาในทางเดินอาหารของ *R. pachyptila*..... 15
3. แสดงประสิทธิภาพการออกซิไดซ์ไพไรต์ไปเป็นซัลเฟตของแบคทีเรียที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 30°ซ..... 28
4. แสดงผลการสกัดแยกดีเอ็นเอในรูปปลายปิด (covalently closed circular form) จากแบคทีเรียสายพันธุ์ A12 F19 และ GO2 29
5. ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ A12 F19 และ GO2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นสายโอลิโก-นิวคลีโอไทด์ตั้งต้น ในกระบวนการ Polymerase chain reaction 31
6. ผลการแยกดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ Polymerase chain reation เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ A12 F19 และ GO2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบออกจากเจลโดยชุดแยกยีน Prep-A-Gene 32
7. ผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอติดตาม GO2บริเวณขีดเส้นใต้คือบริเวณเกาะของสายโอลิโก-นิวโอไทด์ตั้งต้น 33
8. กรอบรหัสของโปรตีนของดีเอ็นเอติดตาม GO2 34-36
9. แผนที่เรสตริกชั่นของดีเอ็นเอติดตาม GO2..... 37
10. ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิสเพื่อตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 อย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Eco*RI *Pst I* และ *Bam* HI 39
11. ภาพออโตเรดิโอแกรมของผลการทำ Southern hybridization ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชั่นอย่างสมบูรณ์ โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม GO2 ที่ติดฉลาดด้วยสารปลอดรังสีเป็นดีเอ็นเอติดตาม 40

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

12. ภาพอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิสของการทำ Southern hybridization ระหว่างพลาสมิดพาหะ pBluescript SK$^-$ และ ดีเอ็นเอติดตาม GO2 42
13. ภาพออโตเรดิโอแกรมของการทำ Southern hybridization ระหว่างพลาสมิดพาหะ pBluescript SK$^-$ และ ดีเอ็นเอติดตาม GO2 43
14. ภาพออโตเรดิโอแกรมของผลการทำ Colony hybridization แสดงสัญญาณของการเกิดไฮบริดของโคโลนีทรานฟอร์แมนท์ หมายเลข 11/1 11/2 11/3 11/413/1 13/2 และ 13/3 45
15. ภาพออโตเรดิโอแกรมของผลการทำ Dot- blot hybridization
ก. พลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้จากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/1 11/2 11/3 11/4 13/1 13/2 13/3 พลาสมิดพาหะ pBluescript SK$^-$ (PB) และดีเอ็นเอติดตาม GO2
ข. พลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้จากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/3 และ 13/1พลาสมิดพาหะ pBluescript SK$^-$ (PB) และดีเอ็นเอติดตาม GO2 46
16. ภาพอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิสของการทำ Southern hybridization ระหว่างพลาสมิดลูกผสมที่สกัดจากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/3และดีเอ็นเอติดตาม GO2 47
17. ภาพออโตเรดิโอแกรมของการทำ Southern hybridization ระหว่างพลาสมิดลูกผสมที่สกัดจากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 11/3และดีเอ็นเอติดตาม GO2..... 48
18. กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกำมะถันซัลเฟตและค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร..... 58
19. แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิดพาหะ pBluescript SK$^-$ 67
20. แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิดพาหะ pCR^{TM} II 68
21. ภาพ TA cloning 68

สัญลักษณ์และคำย่อ

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

ชม. = ชั่วโมง

% = เปอร์เซ็นต์

^{0}C = องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย