การโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22

นาย เฉลิมพล คุ้มพิทักษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-127-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19807403

CLONING OF XYLANASE GENE FROM *Streptomyces* sp. PC22

Mr. Chalermpon Kumpitak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998

ISBN 974-332-127-6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22
โดย	นาย เฉลิมพล คุ้มพิทักษ์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ
ปีการศึกษา	2541

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เฉลิมพล คุ้มพิทักษ์ : การโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 (CLONING OF XYLANASE GENE FROM *Streptomyces* sp. PC22) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ : 90 หน้า. ISBN 974-332-127-6.

งานวิจัยนี้โคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 โดยใช้เซลล์เจ้าบ้านและพลาสมิดพาหะ 2 ระบบคือ *Streptomyces lividans* TK21 กับ pIJ699 หรือ pIJ702 และ *E.coli* DH5α กับ pUC18 ผลการวิจัยเมื่อใช้ *Streptomyces lividans* TK21 เป็นเซลล์เจ้าบ้านและ pIJ699 เป็นพลาสมิดพาหะ พบ 1 โคลนที่เสถียร ให้ชื่อโคลนนี้ว่า S-21 โดยให้แอคติวิตีของไซแลเนส 1.21 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเซลล์เจ้าบ้านประมาณ 2 เท่า แต่ไม่สามารถสกัด พลาสมิดได้ และเมื่อใช้ pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ พบ 1 โคลนที่ย่อยสลายไซแลนได้จากการคัดเลือกเบื้องต้นบนอาหารแข็ง แต่สูญเสียแอคติวิตีเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว และพลาสมิดที่สกัดได้มีขนาดเท่ากับ pIJ702 แสดงว่ายีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 และ *Streptomyces lividans* TK21 มีความคล้ายคลึงกันมาก จึงทำให้เกิดรีคอมบิเนชันและนำเข้าสู่โครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน หรือเกิดรีคอมบิเนชันและสูญเสียยีนไป ดังกรณีที่ใช้ pIJ699 และ pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะตามลำดับ เมื่อใช้ *E.coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบ 1 โคลน ให้ชื่อว่า E-8 มีแอคติวิตีของไซแลเนส 0.25 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าเซลล์เจ้าบ้านประมาณ 3 เท่า และพบ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดขนาดประมาณ 4.6 กิโลเบส โดยมีขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกประมาณ 1.9 กิโลเบส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อนิสิต เฉลิมพล คุ้มพิทักษ์
สาขาวิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อและบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เป็นการพิมพ์ถ่ายจากต้นฉบับเดิมที่ผู้ขอรับปริญญาส่งมอบให้บัณฑิตวิทยาลัย

C826461 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: *Streptomyces* sp. PC22 / XYLANASE / CLONING

CHALERMPON KUMPITAK : CLONING OF XYLANASE GENE FROM *Streptomyces* sp. PC22. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 90 pp. ISBN 974-332-127-6.

Xylanase gene from *Streptomyces* sp. PC22 was cloned by using two host-vector systems which were *Streptomyces lividans* TK21 and pIJ699 or pIJ702 and *E.coli* DH5α and pUC18. With *Streptomyces lividans* TK21 as a host a stable clone, namely S-21 was obtained with pIJ699 as a cloning vector. Clone S-21 had xylanase activity of 1.21 $U.ml^{-1}$ which was about 2 folds higher than that of the host. However, no plasmid was detected from this clone. With pIJ702 as a cloning vector, one clone showing clear zone on a selective xylan containing agar plate was obtained but it lost the xylanase activity upon cultivation in liquid medium. Futhermore, the plasmid from this clone showed similarity in size to pIJ702. The above results indicated that xylanase gene from *Streptomyces* sp. PC22 may be homologous to that of *Streptomyces lividans* TK21 causing recombination and integration or recombination and deletion as in the cases of pIJ699 and pIJ702 as cloning vectors, respectively. With *E.coli* DH5α as a host, a clone, namely E-8, showing narrow clear zone on a selective plate after exposing to chloroform was obtained. It had xylanase activity of 0.25 $U.mg^{-1}$ of protein which was about 3 folds higher than that of the host. Clone E-8 possessed a recombinant plasmid of about 4.6 kb which contained DNA insert of about 1.9 kb.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2541

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบ และให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกๆท่าน ตลอดจนเพื่อนๆพี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วนสำหรับงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ช
สารบัญรูป..... ฌ
สัญญลักษณ์และคำย่อ..... ฎ
บทที่
1. บทนำ..... 1
2. อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 16
3. ผลการทดลอง..... 32
4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 63
รายการอ้างอิง..... 70
ภาคผนวก..... 79
ประวัติผู้เขียน..... 90

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 ภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อและสมบัติเบื้องต้นของไซแลเนสที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC22 เมื่อเปรียบเทียบกับ *Streptomyces* อื่น..... 10

3.1 เปรียบเทียบแอคติวิตีของไซแลเนสระหว่าง *Streptomyces* sp. PC22 กับ *Streptomyceslividans* TK21..... 33

3:2 ผลการสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21..... 33

3.3 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ699 และ pIJ702 เข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21..... 36

3.4 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ699 และ pIJ702 เทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างจากพลาสมิดพาหะทั้งสอง เข้าสู่โปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21..... 43

3.5 เปรียบเทียบแอคติวิตีสูงสุดของไซแลเนสจากโคลน S-21 กับ *Streptomyces* sp. PC22 และ *Streptomyces. lividans* TK21/pIJ699 48

3.6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pUC18 กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างจาก pUC18 เข้าสู่ *E. coli* DH5α โดยวิธีอิเลคโทรพอเรชัน..... 56

3.7 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไซแลเนสจากโคลน E-8 กับ *E. coli* DH5α/pUC18 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก4) โดยเขย่าแบบ *rotary* ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 60

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน.....	2
1.2	ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง.....	3
1.3	การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน.....	5
1.4	ลักษณะการย่อยสลายไซแลนของ *Cryptococcus albidus*.....	6
3.1	ลักษณะโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า.....	34
3.2	ผลการรีเจนอเนอเรทโปรโตพลาสท์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ R2YE โดยแขวนลอยในบัฟเฟอร์ P (P) เปรียบเทียบกับการแขวนลอยใน 0.01% SDS โดยเจือจาง 10^4 เท่า.....	35
3.3	ผลการย่อยโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. PC22 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI แบบกึ่งสมบูรณ์ (partial digestion).....	38
3.4	แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pIJ699 เมื่อถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bgl*II และ *Bam*HI.....	39
3.5	แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pIJ702 เมื่อถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bgl*II.....	40
3.6	ภาพแสดงการเชื่อมตัวเองของชิ้นส่วนขนาด 5 กิโลเบส ของ pIJ699 ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะ หลังการกำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดระหว่างชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอกับพลาสมิดพาหะที่ผ่านการเชื่อมด้วย T4 DNA ligase บนอะกาโรสเจล.....	41
3.7	ภาพแสดงการเชื่อมตัวเองของพลาสมิดพาหะ pIJ702 ภายหลังการตัดด้วย *Bgl*II และกำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว (A) และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดระหว่างชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอกับ pIJ702 (B) ที่ผ่านการเชื่อมด้วย T4 DNA ligase บนอะกาโรสเจล.....	42

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.8 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของโคลน S-1, S-2, S-3 และ S-6 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. PC22 และ *Streptomyces lividans* TK21/ pIJ699 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ..... 45

3.9 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของโคลน S-21 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. PC22 และ *Streptomyces lividans* TK21/pIJ699 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ..... 46

3.10 เปรียบเทียบรูปแบบการสร้างไซแลเนส โดยโคลน S-21 กับ *Streptomyces* sp. PC22 และ *Streptomyces lividans* TK21/pIJ699 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก4) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าแบบ rotary ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-6 วัน..... 47

3.11 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของโคลน S-22 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. PC22 และ *Streptomyces lividans* TK21/pIJ702 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ..... 49

3.12 ภาพแสดงพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลน S-22..... 50

3.13 ภาพแสดงขนาดของพลาสมิดพาหะ pIJ702 และรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่สร้างจาก pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะหลังการทรานสฟอร์มเข้า *Streptomyces lividans* TK21..... 51

3.14 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC18 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI. 54

3.15 ภาพแสดงการตัดพลาสมิด pUC18 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI แล้วทดสอบการเชื่อมกันด้วยตัวเอง (self ligation) หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตและแสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมด้วย T4 DNA ligase บนอะกาโรสเจล..... 55

3.16 แสดงการคัดเลือกโคลน *E. coli* DH5α ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนไซแลเนสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง และผ่านการอบด้วยไอคลอโรฟอร์ม แล้วรดทับด้วยไซแลน และย้อมด้วยสี Congo red..... 58

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.17	แสดงไซแลเนสแอคติวิตีของโคลน E-8 ที่ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ...	59
3.18	ภาพแสดงขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลน E-8 เปรียบเทียบกับพลาสมิด pUC18 บนอะกาโรสเจล.....	61
3.19	ภาพแสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน (DNA insert) ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPC1 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันแอนไซม์ EcoRI และ *Hind*III บนอะกาโรสเจล.....	62

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญญลักษณ์และคำย่อ

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

µg = ไมโครกรัม

% = เปอร์เซนต์

U = unit

A = absorbance

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย