การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อเพิ่มการผลิตไซแลเนส

นางสาวปาหนัน เริงสำราญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2535

ISBN 974-581-582-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018207 I15206047

Construction of Recombinant Plasmid(s) to Increase Xylanase Production

Miss Panan Rerngsamrarn

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University

1992

ISBN 974-581-582-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส
โดย	นางสาวปาหนัน เริงสำราญ
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

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

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปาหนัน เรืองสำราญ: การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อเพิ่มการผลิตไซแลเนส (CONSTRUCTION OF RECOMBINANT PLASMID(S) FOR XYLANASE PRODUCTION) อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร. ไพเราะ บุ่นพานิชการ. 103 หน้า. ISBN 974-581-582-9

งานวิจัยนี้ ได้สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส โดยตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แสดงแอคติวิตีของไซแลเนส ของ Streptomyces sp. 42-9 ขนาด 5.4 กิโลเบสจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII หรือ XbaI แล้วโคลนเข้ากับโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งอยู่บนพลาสมิดพาหะ pUC19 pT7-7 pIJ4083/3 และ pIJ4090 โดยให้แสดงออกใน Escherichia coli DS941 และ E. coli JM109 เมื่อมี pUC19 และ pT7-7 เป็นพลาสมิดพาหะ และให้แสดงออกใน Streptomyces lividans TK64 เมื่อมี pIJ4083/3 และ pIJ4090 เป็นพลาสมิดพาหะ

ผลการวิจัย ในระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น Streptomyces นั้น พบว่า รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มีขนาดเท่ากับพลาสมิดพาหะเดิม และ ไม่พบว่ามีโคลนใดให้ไซแลเนสแอคติวิตีสูงกว่า หรือ เท่ากับสายพันธุ์เดิมที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C สำหรับในระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น E. coli นั้น โคลนที่ได้จาก E. coli DS941 พบว่า ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่รับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 5.4 กิโลเบสเข้าไป คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1 p19C-2 และ p19C-3 เมื่อมี pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะ และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3 เมื่อมี pT7-7 เป็นพลาสมิดพาหะ ส่วนโคลนจาก E. coli JM109 ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4 เมื่อใช้ pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะและพบว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่รับเข้าไปมีการเปลี่ยนแปลง โดยพบเบื้องต้นว่ามีขนาดเล็กลงเป็น 5.2 กิโลเบส และสูญเสียจุดตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ XbaI ไป 1 แห่ง แต่อย่างไรก็ตาม ไม่พบว่ามีโคลนใดที่สามารถให้แอคติวิตีของไซแลเนสได้ นอกจากนี้ ยังได้ยืนยันด้วยการตรวจลอบรูปแบบของโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE เปรียบเทียบกับเซลล์เจ้าบ้าน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C125815 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD : RECOMBINANT PLASMID/XYLANASE

PANAN RERNGSAMRARN : CONSTRUCTION OF RECOMBINANT PLASMID(S) TO INCREASE XYLANASE PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 103 pp. ISBN 974-581-582-9

The present work reported an attempt to costruct recombinant plasmids with efficient expression of xylanase gene. DNA fragment of 5.4 Kb, an insert expressing xylanase from Streptomyces sp. 42-9, was excised from plasmid pPT6C by digesting with HindIII or XbaI. The fragment was then inserted into plasmids carrying strong promotor which were pUC19 or pT7-7 with Escherichia coli DS941 or E. coli JM109 as a host and pIJ4083/3 or pIJ4090 with S. lividans TK64 as a host.

Recombinant plasmids obtained from transformants using S. lividans TK64 as a host showed no difference in size when compared to those of corresponding vectors. Furthermore, no clone with comparable or higher xylanase activity than that with pPT6C was observed. With E. coli DS941 as a host, recombinant plasmids p19C-1 , p19C-2 and p19C-3 were obtained when pUC19 was used as a vector and p7C-3 was obtained with pT7-7 as a vector. All of these constructed plasmids carried 5.4 Kb insert. However, with E. coli JM109 as a host and pUC19 as a vector, recombinant plasmid p19C-4 was obtained with shorter insert size of 5.2 Kb. Slight modification of the insert was also observed as it lost one restriction site by XbaI. All clones carrying constructed plasmids showed no xylanase activity. SDS-PAGE analysis of the products from these clones also confirmed no expression of xylanase gene.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และ ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่งต่อ รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน ที่กรุณาให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Prof. D.A. Hopwood และ Dr. M.J.Bibb แห่ง John Innes Institute , Norwich , U.K. ที่กรุณาเอื้อเฟื้อให้จุลินทรีย์ *Streptomyces lividans* TK64 และ *S. lividans* TK24 ที่มีพลาสมิด pIJ4090 ขอขอบพระคุณ Dr. I.S. Hunter แห่ง University of Glasgow , U.K. ที่กรุณาเอื้อเฟื้อให้เรสตริกชันเอนไซม์ , *E. coli* DS941 และ *E. coli* DS941 ที่มีพลาสมิด pT7-7 หรือ pGP1-2

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่าน รวมทั้งพี่ เพื่อน และน้องทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ขอบคุณมาก สำหรับคุณอรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ที่กรุณาให้ข้อมูลและคำปรึกษา รวมถึงคุณวลัยรัตน์ เหล่าสินชัย ที่ได้ช่วยวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีน

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และ สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ทุนวิจัยบางส่วนสำหรับทำการวิจัย

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้องและญาติๆ ทุกคนที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จอย่างสมบูรณ์

สารบัญ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญรูป ..... ฌ

สัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฐ

บทที่

1. บทนำ 1

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 18

3. ผลการวิจัย 36

4. วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย 70

เอกสารอ้างอิง 81

ภาคผนวก 89

ประวัติผู้เขียน 103

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเรียงตัวของลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์	6
2	ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันของพลาสมิดพาหะเข้าสู่ *E. coli* และ *S. lividans* TK64	53
3	ผลการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างได้ เข้าสู่เซลล์ให้อาศัยที่เป็น *E. coli* และ *S. lividans* TK64	54
4	เปรียบเทียบแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ไซแลเนสจากโคลนต่างๆ กับ *Streptomyces* sp. 42-9 *Streptomyces lividans* TK64 *S. lividans* TK64/pPT6C *S. lividans* TK64/pIJ4083/3 และ *S. lividans* TK64/pIJ4090 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ	56
5	สรุปผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด	80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่		หน้า
1	แผนที่เรสตริกชันบางส่วนของพลาสมิด pUC19	8
2	แผนที่เรสตริกชันบางส่วนของพลาสมิด pT7-7	10
3	แผนที่เรสตริกชันบางส่วนของพลาสมิด pGP1-2	11
4	แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิด pIJ4083	13
5	แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิด pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 และ pIJ4083/4	14
6	แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิด pIJ4090	16
7	แผนที่เรสตริกชันบางส่วนของ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C เมื่อถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII	37
8	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสเพื่อเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C เมื่อตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII กับ พลาสมิดพาหะ pIJ699 เมื่อตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bgl*II และ *Bam*HI รวมทั้งผลการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนออกจากเจลโดยใช้ GENECLEAN II kit	40
9	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้ เมื่อตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bcl*I เปรียบเทียบกับ λDNA/*Hin*dIII	41
10	แผนที่เรสตริกชันบางส่วนของพลาสมิด pUC19 เมื่อถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII	42
11	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดพาหะ pUC19 ที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเอง หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้ว และ ผลการเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนเปรียบเทียบกับ λDNA/*Hin*dIII	43
12	แผนที่เรสตริกชันบางส่วนของพลาสมิด pT7-7 เมื่อถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII	44

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
13	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดพาหะ pT7-7 ที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเอง ภายหลังกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้ว และผลการเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนเปรียบเทียบกับ λDNA/*Hin*dIII	45
14	ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของโปรโมเตอร์ โดยการฉีดพ่นโคโลนีของ *S. lividans* TK64 ที่มีพลาสมิด pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 และ pIJ4083/4 ด้วยสารละลาย 0.5 โมลาร์ แคทีคอล	46
15	แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิด pIJ4083/3 เมื่อถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I	48
16	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดพาหะ pIJ4083/3 ที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเอง หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้ว และผลการเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนเปรียบเทียบกับ λDNA/*Hin*dIII	49
17	แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิด pIJ4090 เมื่อถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII	50
18	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดพาหะ pIJ4090 ที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเอง หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้ว และผลการเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนเปรียบเทียบกับ λDNA/*Hin*dIII	51
19	ตำแหน่งของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1 p19C-2 p19C-3 และ p19C-4 ก่อนตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน และพลาสมิดพาหะ pUC19	57

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
20	ตำแหน่งของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-1 p7C-2 p7C-3 และ p7C-4 ก่อนตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับพลาสมิด pGP1-2 และพลาสมิดพาหะ pT7-7	59
21	ผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1 p19C-2 และ p19C-3 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน และ พลาสมิดพาหะ pUC19 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII	60
22	ผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับ ชิ้นส่วนที่มีไซแลเนสยีน และ พลาสมิดพาหะ pUC19 ที่ตัดด้วย *Hin*dIII	61
23	ผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับ ชิ้นส่วนที่มีไซแลเนสยีน พลาสมิดพาหะ pT7-7 และ พลาสมิด pGP1-2	62
24	ผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2 และ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Xba*I โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับ λDNA/*Hin*dIII	64
25	รูปแบบโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DS941 และทรานสฟอร์แมนท์เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน	66
26	รูปแบบโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากสารสกัดแยกจากเซลล์ของ *E. coli* DS941 และทรานสฟอร์แมนท์เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน	67

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

27 รูปแบบโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากสารสกัดจากเซลล์ของ *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1 p19C-2 หรือ p19C-3 เมื่อเติม IPTG ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 68

28 รูปแบบโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากสารสกัดจากเซลล์ของ *E. coli* DS941 ที่มีพลาสมิด pT7-7+pGP1-2 และ *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-1 หรือ p7C-3 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเป็น 42 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 69

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ซม.	=	เซนติเมตร
%	=	เปอร์เซนต์
λDNA/*Hind*III	=	ดีเอ็นเอของแบคเทอริโอฝาจแลมด้า (λ) ที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย