แผนที่เรสทริกชันและการหาตำแหน่งของยีนที่คาดว่าเป็นไซโคลเดกซ์ทริน ไกลโคซิลทรานสเฟอร์เรสซึ่งโคลนจาก *Bacillus* sp. A11

นางสาวสุพิศรา วรรณะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974 - 632 - 131 - 5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17880188

RESTRICTION MAP AND LOCALIZATION OF THE PRESUMED CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE GENE CLONED FROM *Bacillus* sp. A11

Miss Supissara Wanna

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974 - 632 - 131 - 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	แผนที่เรสทริกชันและการหาตำแหน่งของยีนที่คาดว่าเป็นไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอร์เรสซึ่งโคลนจาก *Bacillus* sp. A11
โดย	นางสาวสุพิศรา วรรณะ
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา มงคลกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สุพิศรา วรรณะ : แผนที่เรสทริกชันและการหาตำแหน่งของยีนที่คาดว่าเป็นไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอร์เรสซึ่งโคลนจาก Bacillus sp. A11 (RESTRICTION MAP AND LOCALIZATION OF THE PRESUMED CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE GENE CLONED FROM Bacillus sp. A11) อ.ที่ปรึกษา :อ.ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผ.ศ.ดร.พีรดา มงคลกุล, 80 หน้า,ISBN 974 - 632 - 131 - 5

เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอร์เรส (Cyclodextrin glycosyltransferase : CGTase ; E.C.2.4.1.19) เป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนแป้งให้เป็นไซโคลเดกซ์ทริน (Cyclodextrins ; CDs) ซึ่งเป็นสารที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย ได้มีผู้โคลนยีน CGTase จาก Bacillus sp. A11 ใส่ในดีเอ็นเอพาหะของ E. coli คือ pUC18 และ pSE411 ตั้งชื่อดีเอ็นเอลูกผสมที่มีแอคติวิตีของ CGTase ที่อยู่ในดีเอ็นเอพาหะทั้ง 2 ว่า pCSBC5 และ pCSBC8 ตามลำดับ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองศึกษาแผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 พบว่ามีแผนที่เรสทริกชันเหมือนกับใน pCSBC8 ที่ได้มีผู้ศึกษาไว้แล้ว แต่มีข้อแตกต่างคือชิ้นดีเอ็นเอ insert มีทิศทางตรงกันข้ามกัน และทางด้านปลาย 5' และ 3' ของ pCSBC5 จะมีตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์เพิ่มมาอีกหลายตำแหน่งคือ Kpn I Pst I Sma I Sal I และ Acc I ไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตีของ CGTase ในทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 ได้ แต่ตรวจพบ dextrinizing activity ซึ่งเป็นแอคติวิตีอย่างหนึ่งของ CGTase เมื่อทำการหาช่วงดีเอ็นเอ insertใน pCSBC5 ที่มี dextrinizing activity โดยการตัดช่วงดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ออกมา 5 บริเวณด้วยกัน แล้วทำการโคลนใส่ดีเอ็นเอพาหะของ E .coli คือ pUC118 ได้ดีเอ็นเอลูกผสม 5 ตัวคือ pCSBC9 10 11 12 และ 13 จากนั้นนำทรานสฟอร์แมนท์ของดีเอ็นเอลูกผสมนี้ไปทดสอบ dextrinizing activity เทียบกับทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ CSBC12 มี dextrinizing activity ใกล้เคียงกับทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 และดีเอ็นเอ insert ที่อยู่ใน pCSBC12 คือช่วงของดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 ที่ตำแหน่ง EcoR I ถึง Nde I ซึ่งมีขนาด 1.7 กิโลเบส และไม่อยู่ภายใต้การควบคุมของ lac promoter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C425826 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE / CGTase / Bacillus sp. A11

SUPISSARA WANNA : RESTRICTION MAP AND LOCALIZATION OF THE PRESUMED CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE GENE CLONED FROM Bacillus sp. A11. THESIS ADVISOR : VICHIEN RIMPHANITCHAYAKIT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. PEERADA MONGKOLKUL, Ph.D., 80 pp. ISBN 974-632-131-5

An enzyme cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase ; E.C.2.4.1.19) is able to convert starch to cyclodextrins (CDs), cyclic products that are known to be used in several industries. A CGTase gene from Bacillus sp. A11 had been cloned into an E. coli JM101 using E. coli vectors, pUC18 and pSE411. Recombinant plasmids with CGTase were named pCSBC5 and pCSBC8, respectively. Studing of the restriction map reveal that the DNA insert in pCSBC5 and pCSBC8 are similar, but they are opposite direction. The pCSBC5 also has several extra restriction sites at 3' and 5' ends of the DNA insert (Kpn I, Pst I, Sma I, Sal I and Acc I). No CGTase activity was measurable in transformant CSBC5. However, dextrinizing activity, part of CGTase activity was detected. By subcloning 5 DNA fragments from DNA insert of pCSBC5 into an E. coli vector pUC118, the recombinant plasmids pCSBC9, 10, 11, 12 and 13 were obtained. Transformants containing these plasmids were tested for dextrinizing activity, compare to that containing pCSBC5. The dextrinizing activity of transformant CSBC12 was more or less comparable to that of transformant CSBC5. The DNA insert in pCSBC12 was derived from an EcoR I to Nde I fragment of DNA insert in pCSBC5, which is 1.7 kilobase pair. The dextrinizing activity in transformant CSBC12 was not under the control of lac promoter.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

สถาบันวิทยบริการ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรดา มงคลกุลเป็นอย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษาให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ และความเข้าใจอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้เขียน ตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่ในภาควิชาชีวเคมี

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต และรองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา ชัยศิริ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแก่ผู้เขียนในเรื่องเกี่ยวกับการทดสอบทางแอนติบอดี

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมี ที่ได้ให้ความกรุณาให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ ตลอดระยะเวลาทำการวิจัย

ขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม และภาควิชาชีวเคมีที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี ตลอดระยะเวลาทำงานวิจัย

ขอบคุณสมาชิกในหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมทุกคน รวมทั้งนิสิตปริญญาโทชีวเคมี เทคโนโลยีชีวภาพ และชีววิทยา สำหรับความช่วยเหลือต่างๆและกำลังใจต่อผู้เขียน

ขอบคุณ คุณทิพสุภา มาลัย และคุณพรชัย แซ่กิม นิสิตปริญญาโทสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในด้านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 เพื่อใช้ในการทดลอง และขอขอบคุณคุณจิราพร โรจน์ทินกร ที่ได้ช่วยอนุเคราะห์แอนติบอดีของเอนไซม์ CGTase ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ในความช่วยเหลือเรื่องทั่วไประหว่างการทำงานวิจัย

ท้ายสุดนี้ผู้เขียนขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยสำหรับความช่วยเหลือด้านทุนวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ญ

สารบัญรูป.....ฏ

คำย่อ.....ฏ

บทที่

1. บทนำ.....1

2. เครื่องมือวัสดุ - เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....16

วัสดุภัณฑ์.....17

เคมีภัณฑ์.....18

ดีเอ็นเอพาหะและดีเอ็นเอมาตราฐาน.....18

จุลินทรีย์.....19

เครื่องแก้วและสารละลาย.....19

การสกัดดีเอ็นเอพาหะ.....19

1. การสกัดดีเอ็นเอพาหะปริมาณมาก.....19

2. การสกัดดีเอ็นเอพาหะปริมาณน้อย.....20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ(ต่อ)

บทที่ หน้า

การวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอพาหะ..... 21

การตัดดีเอ็นเอพาหะด้วยเรสทริกชันเอนไซม์..... 21

การแยกดีเอ็นเอพหะออกจากเจลโดยใช้วิธีอะกาโรสที่มีจุดหลอมเหลว

ต่ำ (low malting agarose)..... 21

การเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ..... 22

การทำทรานสฟอร์เมชัน..... 23

การศึกษาแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC5..... 24

การหาตำแหน่งของยีน CGTase ที่อยู่บนพลาสมิด pCSBC5..... 24

การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 โดยวิธี Southern

blot hybridization..... 25

การตรวจสอบแอคทิวิตีของเอนไซม์ CGTase..... 26

1. การตรวจสอบแอคทิวิตีของการย่อยแป้ง (Dextrinizing activity)..... 26

2. Cyclodextrin-Trichloroethylene assay..... 26

3. การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินด้วย High Performance

Liquid Chromatography (HPLC)..... 27

การตรวจสอบเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธี Immunodiffusion..... 27

3. ผลการทดลอง

การทดสอบดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ด้วยวิธี Southern blot

hybridization..... 29

การศึกษาแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC5..... 31

สารบัญ(ต่อ)

บทที่ หน้า

การตรวจสอบแอคทิวิตีของเอนไซม์ CGTase..... 35

การทดสอบ CGTase ด้วยวิธี Immunodiffusion..... 38

การหาตำแหน่งของดีเอ็นเอ insert ที่เกิด dextrinizing activity ในพลาสมิด pCSBC5..... 42

1. การ subclone ชิ้นดีเอ็นเอ insert ในพลาสมิด pCSBC5..... 42

2. การทดสอบขนาดและตำแหน่งของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการ subclone ของชิ้นดีเอ็นเอ insert ในพลาสมิด pCSBC5..... 45

การทดสอบ dextrinizing activity..... 50

1. การทดสอบ dextrinizing activity ของทรานสฟอร์แมนท์ต่างๆ..... 50

2. ผลการทดสอบอิทธิพลของ IPTG ต่อ dextrinizng activity ของทรานสฟอร์แมนท์ CSBC12..... 50

การสลับข้างของชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 และ pCSBC8 เพื่อหาแอคติวิตีของ CGTase..... 52

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 56

รายการอ้างอิง..... 65

ภาคผนวก..... 72

ประวัติผู้เขียน..... 80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. สมบัติของไซโคลเดกซ์ทรินบางประการ 3

2. การนำผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆใน ประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1984-1987..... 4

3. แสดงปริมาณการใช้ไซโคลเดกซ์ทรินในตลาดโลก..... 5

4. สรุปกลไกการทำงานของเอนไซม์ CGTase..... 8

5. การแบ่งกลุ่มแบคทีเรียตามชนิดของไซโคลเดกซ์ทริน..... 10

6. แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ CGTase ที่สร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ..... 11

7. Molecular cloning ของยีน CGTase..... 13

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. โครงสร้างไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α- β- และ γ- CD..... 2

2. ผลการทำ Southern blot hybridization ของ pCSBC5 และ pCSBC8..... 30

3. ผลของการศึกษาขนาดและตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆของ pCSBC5 และ pCSBC8..... 32

4. ผลของการศึกษาขนาดและตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆของ pCSBC5 และ pCSBC8..... 34

5. แผนที่เรสทริกชันของ pCSBC5..... 36

6. ผลการวิเคราะห์ไซโคลเดกซ์ทรินด้วยเครื่อง HPLC 39

7. ผลการทำ Immunodiffusion..... 41

8. แสดงชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 ที่นำมา subclone..... 43

9. ผลการตัด pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆเพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอออกมา subclone..... 44

10. ผลการตัดดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการ subclone ของดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ..... 47

11. Dextrinizing activity ของทรานสฟอร์แมนท์ต่างๆเมื่อเวลา 1-5 ชั่วโมง..... 51

12. การศึกษาอิทธิพลของ IPTG ต่อ dextrinizing activity ของทรานสฟอร์แมนท์ CSBC12 เมื่อเวลา 1-5 ชั่วโมง..... 53

13. ผลการตัด pCSBC5 และ pCSBC8 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆเพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอออกมา subclone..... 55

คำย่อ

$CaCl_2$	=	Calcium chloride
EDTA	=	Ethylene diamine tetraacetic acid
I_2	=	Iodine
IPTG	=	Isopropylthio-β-galactoside
kb	=	kilobase pair (10^3 base pair)
KI	=	Potassium iodide
LB	=	Luria-Bertani medium
NaCl	=	Sodium chloride
NaoAc	=	Sodium acetate
NaOH	=	Sodium hydroxide
RNase	=	Ribonuclease
SDS	=	Sodium dodesyl sulfate
Tris	=	Tris (hydroxy methyl) aminomethane
X-gal	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactoside

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย