905

การโคลนยีนโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25

นางสาวดลนภา ตนุนาถ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-900-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 16203793

CLONING OF PROTEASE GENE FROM *Bacillus subtilis* TISTR 25

Miss Dolnapa Tanunat

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 974-632-900-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนยีนโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25

โดย นางสาวดลนภา ตนุนาถ

ภาควิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ดลนภา ศนุนาถ : การโคลนยีนโปรตีเอสจาก Bacillus subtilis TISTR 25 (CLONING OF PROTEASE GENE FROM Bacillus subtilis TISTR 25) อ.ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์นภา ศิวรังสรรค์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต, 94 หน้า, ISBN 974-632-900-6

Bacillus subtilis TISTR 25 เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินในประเทศไทย สามารถผลิตได้ทั้งนิวทรัลโปรตีเอสและแอลคาไลน์โปรตีเอส ในการโคลนยีนที่สร้างโปรตีเอสจาก Bacillus subtilis TISTR 25 ทำโดยย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมที่สกัดจากเชื้อนี้ ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sau3AI แบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) แล้วทำการเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ซึ่งย่อยด้วย BamHI จากนั้นทำการเคลื่อนย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้เข้าสู่เซลล์เจ้าเรือนคือ Escherichia coli JM109 ทำการตรวจหาเซลล์เจ้าเรือนที่ได้รับเอารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนโปรตีเอส โดยเลือกจากโคโลนีที่ให้วงใสรอบ ๆ โคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนมพร่องไขมัน (skim milk plate) ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนโปรตีเอสโดยให้ชื่อว่า pCSBC14 มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอจาก Bacillus subtilis TISTR 25 ประมาณ 4 กิโลเบส ทำการศึกษาแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC14 และทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสในการไฮโดรไลส์เคซีน โดยการทดลองได้ดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย เกษม (2536) พบว่ามีทั้งแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสและนิวทรัลโปรตีเอส จึงทำการตรวจสอบชนิดของยีนโปรตีเอสที่ได้ด้วยเทคนิคไฮบริไดซ์เชชัน โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่มียีนแอลคาไลน์โปรตีเอส คือ พลาสมิด pKWZ และดีเอ็นเอติดตามที่มียีนนิวทรัลโปรตีเอส คือ พลาสมิด pNC3 จากการวิเคราะห์สัญญาณการไฮบริไดซ์พบว่ายีนโปรตีเอสที่ได้นั้นมีความคล้ายคลึงกับยีนนิวทรัลโปรตีเอส และยีนแอลคาไลน์โปรตีเอส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต ดลนภา ศนุนาถ

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา นภา ศิวรังสรรค์

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พระจุลจอมเกล้า สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

##C525891 :MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: CLONING/PROTEASE/Bacillus subtilis TISTR 25

DOLNAPA TANUNAT : CLONING OF PROTEASE GENE FROM Bacillus subtilis TISTR 25. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. NAPA SIWARUNGSON, THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D., 94 pp. ISBN 974-632-900-6

Bacillus subtilis TISTR 25, isolated from soil in Thailand, produces both neutral and alkaline protease. The protease gene from Bacillus subtilis TISTR 25 has been cloned into Escherichai coli JM109 using plasmid vector pUC18. Partially Sau3AI-digested chromosomal DNA from Bacillus subtilis TISTR 25 was ligated to BamHI-digested pUC18 and transformed into E. coli JM109. Protease producing transformants were screened and isolated using skim milk plate. The clear zone around the colony indicates the presence of the protease gene. The recombinant plasmid pCSBC14 was isolated and analysed by agarose gel electrophoresis. Protease gene containing insert fragment was approximately 4 kb. DNA restriction mapping was performed and reported. Protease activity was assayed by casein hydrolysis as described by Kasem (1993). Characterization of protease gene type was studied by hybridization technique, using pNC3 and pKWZ (plasmids containing neutral protease gene and alkaline protease gene, respectively) as DNA probe. By comparison of the hybridization signals, the insert fragment was shown to be similar to both neutral and alkaline protease gene.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต ดลนภา ตานุนาถ

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา นภา ศิวรุ่งสรรค์

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ เป็นอย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ ให้โอกาสในการเรียนรู้ คำแนะนำ ความเข้าใจและกำลังใจ อันมีค่ายิ่งต่อผู้เขียนตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์ อาจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบและให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกๆท่านในภาควิชาชีวเคมี และหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม ที่ได้ให้ความกรุณาชี้แนะ และให้คำปรึกษา

ขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม และภาควิชาชีวเคมี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณคุณ สุรชัย ลีพิทักษ์รัตน์ นิสิตปริญญาโทภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านการถ่ายภาพ

ขอบคุณสมาชิกในหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมทุกคน รวมทั้งนิสิตปริญญาโทในภาควิชาชีวเคมีและเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ และความร่วมมือในด้านต่างๆ

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ ความร่วมมือ และอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆในระหว่างการทำงานวิจัย

ขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้กรุณาอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการวิจัยนี้

ท้ายสุดนี้ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ขอขอบคุณญาติพี่น้องและเรืออากาศเอก กิตติพงษ์ แก้วภา ที่ได้ให้ความรัก ความเข้าใจ ความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดจนกำลังใจอันมีค่ายิ่งต่อผู้เขียนตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ญ
สารบัญรูป.....ฏ
คำย่อ.....ฐ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. เครื่องมือ วัสดุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์
   2.1 เครื่องมือ.....15
   2.2 วัสดุภัณฑ์.....16
   2.3 เคมีภัณฑ์.....16
3. วิธีการทดลอง
   3.1 พลาสมิด.....18
   3.2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน.....18
   3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง.....19
   3.4 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์.....19
   3.5 เครื่องแก้วและสารละลาย.....19
   3.6 การเตรียมสารละลาย
      3.6.1 สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอ.....19
      3.6.2 สารละลายสำหรับสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ.....22
      3.6.3 สารละลายสำหรับทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....23
      3.6.4 สารละลายสำหรับการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน.....23
      3.6.5 สารละลายสำหรับการหาโปรตีเอสแอคติวิตี.....24

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

3.6.6 สารละลายสำหรับการทำไฮบริไดซ์เซชัน....25
3.7 การสกัดดีเอ็นเอ
3.7.1 การสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25....27
3.7.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวิธีอัลคาไลน์....28
3.8 การย่อยดีเอ็นเอด้วย Restriction endonucleases....30
3.9 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส....30
3.10 การโคลนยีนโปรตีเอสในพลาสมิด pUC18
3.10.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2-7 กิโลเบส สำหรับการโคลน....30
3.10.2 การเตรียมดีเอ็นเอพาหะ....31
3.10.3 การสร้างดีเอ็นเอลูกผสม....32
3.10.4 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน....32
3.10.4.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์....32
3.10.4.2 การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน....32
3.10.5 การคัดเลือกหาดีเอ็นเอลูกผสมที่มียีนโปรตีเอส....32
3.10.6 การวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์....33
3.11 เทคนิคทาง Nucleic acid hybridization
3.11.1 การติดฉลากดีเอ็นเอ....34
3.11.2 Dot-blot hybridization....35
3.11.3 Southern-blot hybridization....35
3.11.4 การตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นไนลอนเมมเบรน....36
3.11.5 Prehybridization และ hybridization....36
3.11.6 การวิเคราะห์สัญญาณการไฮบริด....36
4. ผลการทดลอง
4.1 การเตรียมดีเอ็นเอจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25....38
4.2 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอพาหะ....38

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

4.3 ผลการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ....39
4.4 ผลการทำทรานสฟอร์เมชัน....39
4.5 การคัดเลือกหาดีเอ็นเอลูกผสมที่มียีนโปรตีเอส....40
4.6 การหาขนาดของดีเอ็นเอลูกผสม....40
4.7 ผลการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์....40
4.8 ผลการทำแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด....41
4.9 การตรวจสอบยีนโปรตีเอสในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด....42
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง....73
รายการอ้างอิง....80
ภาคผนวก....85
ประวัติผู้เขียน....94

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงมูลค่าและส่วนแบ่งทางการตลาดของโปรตีเอสที่ได้จาก พืช สัตว์ และจุลชีพชนิดต่างๆ.....2
2. จุลชีพที่ใช้ผลิตโปรตีเอสในทางการค้า.....3
3. กลุ่มของจุลชีพพวก endopeptidase ที่ผลิตโปรตีเอสชนิดต่างๆ.....4
4. แสดงมูลค่าและส่วนแบ่งทางการตลาดของโปรตีเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ.....9
5. การใช้ประโยชน์ของโปรตีเอสในทางอุตสาหกรรม.....10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. ผลการสกัดดีเอ็นเอของ *Bacillus subtilis* TISTR 25.....44
2. ผลการย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR 25.....45
3. ผลการตรวจสอบขนาดของพลาสมิด pUC18 ตามแผนที่เรสทริกชัน.....46
4. ผลการหาปริมาณ *Bam*HI ที่เหมาะสมในการย่อยพลาสมิด pUC18.....47
5. ผลการเชื่อมต่อดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR 25 และพลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Bam*HI.....48
6. clear zone บนจานอาหารที่มีนมพร่องไขมันที่ได้จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนโปรตีเอส.....49
7. ผลการศึกษาขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวน 18 โคลน.....50
8. ผลการศึกษาขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14.....51
9. การเจริญของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium) สูตรที่ 1 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....52
10. เปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ได้จากเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ที่ pH 7.5 และ 10.5 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium) สูตรที่ 1 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....53
11. เปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ได้จากเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ที่ pH ต่างๆ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium) สูตรที่ 1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....54
12. การเจริญของเซลล์เจ้าเรือน *Escherichia coli* JM109 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร (M9 medium) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....55
13. เปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ได้จาก *Escherichia coli* JM109 ที่ pH ต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร (M9 medium) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....56
14. การเจริญของทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร (M9 medium) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....57
15. เปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ได้จากทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ที่ pH ต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร (M9 medium) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....58
16. เปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ได้จากทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 และเซลล์เจ้าเรือน *Escherichia coli* JM109 โดยเลี้ยงในอาหาร (M9 medium) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....59

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

17. ผลการศึกษาขนาดของชิ้น insert ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14.....60
18. ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 (1) 61
19. ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 (2).....62
20. ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 (3).....63
21. ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 (4).....64
22. ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 (5).....65
23. ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 (6).....66
24. ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 (7).....67
25. ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 (8).....68
26. แผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14.....69
27. ผลการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 และพลาสมิด pNC3, pUC18และ pUB110 ที่ใช้ในการทำ Southern-blot hybridization.....70
28. Southern-blot hybridization ระหว่างพลาสมิด pNC3 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14....71
29. Southern-blot hybridization ระหว่างพลาสมิด pKWZ และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14....72

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

Ap^r	=	Ampicillin resistance
ATP	=	Adenosine 5' triphosphate
BSA	=	Bovine serum albumin
$CaCl_2$	=	Calcium chloride
$CHCl_3$	=	Chloroform
CIP	=	Calf intestinal phosphatase
EDTA	=	Ethylene diamine tetraacetic acid
HCl	=	Hydrochloric acid
IPTG	=	Isopropylthio-β-D-galactoside
kb	=	Kilobase pair (10^3 base pair)
LB	=	Luria-Bertani
ml	=	millilitre (10^{-3} litre)
µl	=	microlitre (10^{-6} litre)
ng	=	nanogram (10^{-9} gram)
NaCl	=	Sodium chloride
OD	=	Optical Density
RNase	=	Ribonuclease
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
Tris	=	Tris (hydroxy methyl) aminomethane
X-gal	=	5-bromo-4 chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย