การตรวจพบและสมบัติของเรสทริกชันเอนไซม์ใน *Azospirillum lipoferum* A_{12}

นางสาว กนกทิพย์ ภักดีบำรุง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2532

ISBN 974-576-916-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015712
T 1 ๗๕๑ ๗๙๗๗

Identification and Characterization of Restriction Enzymes in *Azospirillum lipoferum* A_{12}

Miss Kanoktip Packdibamrung

A Thesis Summited in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1989

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรวจพบและสมบัติของเรสทริกชันเอนไซม์ใน *Azospirillum lipoferum* A_{12}

โดย นางสาว กนกทิพย์ ภักดีบำรุง

ภาควิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

กนกทิพย์ ภักดีบำรุง : การตรวจหาและสมบัติของเรสทริกชันเอนไซม์ใน Azospirillum lipoferum A_{12} (IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RESTRICTION ENZYMES IN AZOSPIRILLUM LIPOFERUM A_{12}) อ.ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ลิทธิประณีต, 114 หน้า, ISBN 974-576-916-9

การวิจัยนี้ได้ตรวจพบเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดใหม่ 2 ชนิด จาก Azospirillum sp. A_{12} ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินเมืองไทยโดยกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ในตอนเริ่มต้นการวิจัยนี้ได้จำแนก Azospirillum sp. A_{12} โดยอาศัยลักษณะทางสรีรสมบัติและชีวเคมีสมบัติบางประการ พบว่าเป็น Azospirillum lipoferum สมบัติประการหนึ่งที่น่าสนใจก็คือมีความสามารถต้านยาปฏิชีวนะคานามัยซินและเททราไซคลินต่ำมาก คือ ประมาณ 2 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งระดับการต้านยาปฏิชีวนะที่กล่าวถึงจะมีประโยชน์ที่จะใช้เป็นเซลล์เจ้าเรือนในการทำทรานส์ฟอร์มของพลาสมิด pCK3 ซึ่งมียีนควบคุมการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจิเนสได้ ถ้าหากการทรานส์ฟอร์มบรรลุเป้าหมาย ลายพันธุ์ทรานส์ฟอร์แมนท์ที่แยกได้น่าจะมีการตรึงไนโตรเจนสูงขึ้น แต่พบว่าการทรานส์ฟอร์มที่ได้ทดลองหลายวิธีแบบไม่ประสบผล จึงตั้งสมมติฐานว่า ความล้มเหลวของการทรานส์-ฟอร์มน่าจะมีสาเหตุมาจากการที่มีเรสทริกชันเอนไซม์อยู่ภายในเซลล์ จากผลการทดลองเบื้องต้นบ่งชี้ว่าสมมติฐานที่ตั้งไว้น่าจะเป็นความจริง

เมื่อทำเรสทริกชันเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี เซลลูโลส พบว่ามีเรสทริก-ชันเอนไซม์ประเภทที่ 2 2 ชนิด ให้ชื่อว่า Ali I และ Ali II หลังจากที่ทำ Ali I ให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจนแทบไม่มีผลกระทบจาก nonspecific endonuclease โดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ได้ผลว่าเอนไซม์ชนิดที่ 1 สามารถตัดแลมดาดีเอ็นเอได้ 2 ตำแหน่ง ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 10, 19 และ 20 กิโลเบส, ตัด ϕx174 ดีเอ็นเอได้มากกว่า 6 ตำแหน่ง, ตัดพลาสมิด pBR322, pSA30 และ pCK3 ได้พลาสมิดละ 1 ตำแหน่ง สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาของเอนไซม์ชนิดนี้คือ pH เท่ากับ 7.5 อุณหภูมิในช่วง 30 - 37 องศาเซลเซียส และไม่ต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการทำปฏิกิริยา สำหรับ Ali II ได้ทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100 และคอลัมน์-ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ พบว่า เรสทริกชันเอนไซม์ชนิดที่ 2 ตัด ϕX174 ดีเอ็นเอได้ 1 ตำแหน่ง, ตัดพลาสมิด pBR322, pSA30 และ pCK3 ได้พลาสมิดละ 1 ตำแหน่ง แต่ไม่ตัดแลมดาดีเอ็นเอ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์นี้คือความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์, pH ในช่วง 8.0 - 8.5, อุณหภูมิในช่วง 37 - 50 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

KANOKTIP PACKDIBAMRUNG : IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RESTRICTION ENZYME IN AZOSPIRILLUM LIPOFERUM A_{12}. THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR, SIRIPORN SITTIPRANEED, PH.D., 144PP. ISBN 974-576-9169

Azospirillum sp. A_{12} was classified by morphological, physiological and biochemical properties. It was identified as Azospirillum lipoferum. One of the interesting properties of the bacteria is its low resistance to kanamycin and tetracyclin (2 and 6 µg/l respectively). Such property provided the advantage of using this bacteria as host cell to plasmid pCK3 which harbor nif A gene. The resulting transformants should have higher nitrogen fixing ability. However, effort to transform the bacteria by various methods was not successful. One of the possibilities is that the bacterial cell contains rectriction enzymes. Early investigation supported this hypothesis.

Restriction enzymes from A.lipoferum A_{12} were isolated and partially purified by DEAE cellulose column. It was found that there are 2 restriction enzymes and were named Ali I and Ali II respectively.

Ali I, when further purified through hydroxylapatite column until devoid of nonspecific endonuclease, produced 2 cuts on λ DNA, yielding DNA fragments of approximatedly 10, 19 and 20 kb. It could also cleave, ϕX174 at 6 sites, and cleaved pBR322, pSA30 and pCK3 at 1 site each. The optimum condition for this enzyme is, pH 7.5, 30-37°C

Ali II could be purified by Sephadex G-100 and hydroxylapatite columns. This enzyme cleaved ϕX174, pBR322, pSA30 and pCK3 at 1 site each, but could not cleave λ DNA. The optimum condition for this enzyme is 50 mM NaCl, pH 8.0-8.5 and 37-50°C.

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณิต ที่กรุณาเป็นผู้ควบคุมการวิจัย และให้คำแนะนำจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำอันเป็นประโยชน์อย่างมากในการวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรดา มงคลกุล ที่กรุณาให้การแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมีที่ได้ให้ความกรุณาและคำชี้แนะต่างๆตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่ในภาควิชาชีวเคมี

ขอบคุณหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม และภาควิชาชีวเคมี ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ อุปกรณ์เครื่องใช้ และสารเคมี ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ขอบคุณสมาชิกในหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม เพื่อนๆในภาควิชาชีวเคมี และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน

ขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป..... ฏ

คำย่อ..... ฑ

บทที่ 1. บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญของ *Azospirillum*..... 1

1.2 การปรับปรุง *Azospirillum* ให้ตรึงไนโตรเจนสูงขึ้น.... 1

1.3 เรสทริกชันเอนไซม์..... 7

1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 10

2. วัสดุและวิธีการทดลอง..... 11

2.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 11

2.2 แบคทีเรีย..... 13

2.3 อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย..... 13

2.4 การเตรียมสารละลาย..... 15

2.5 การเก็บแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง..... 17

2.6 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย..... 17

2.7 การศึกษาสัณฐานวิทยา(morphology)และสรีรวิทยา (physiology)และชีวเคมี (biochemisistry) ของ *Azospirillum* A_{12}..... 18

2.8 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกชนะอิเลคโทรโฟริซิส..... 24

2.9 การตรวจสอบระดับยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย..... 24

2.10 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry..... 25

หน้า

2.11 การสกัดและเก็บรักษาพลาสมิดดีเอ็นเอ..... 25
2.12 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโทรโฟริซิส..... 27
2.13 วิธีการทรานส์ฟอร์ม..... 27
2.14 การเตรียม cell free extract..... 29
2.15 การวิเคราะห์เรสทริกชันเอนไซม์..... 30
2.16 การตรวจหา nonspecific endonuclease..... 30
2.17 การตรวจดูระยะของเซลล์ที่เหมาะสมในการผลิตเรสทริกชันเอนไซม์..... 30
2.18 วิธีทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น..... 31
2.19 วิธีการและขั้นตอนการทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น. 33
2.20 การเก็บเรสทริกชันเอนไซม์..... 36
2.21 การศึกษาสมบัติของเรสทริกชันเอนไซม์..... 36
3. ผลการทดลอง..... 38
3.1 การจำแนกสปีชีส์ของ *Azospirillum* A_{12} 38
3.2 การทำทรานส์ฟอร์เมชันโดยพลาสมิด pCK3..... 46
3.3 การทดลองเพื่อหาสาเหตุความล้มเหลวในการแยกทรานส์ฟอร์แมนท์..... 48
3.4 การตรวจระยะของเซลล์ที่เหมาะสมในการศึกษาเรสทริกชันเอนไซม์ 50
3.5 การตรวจพบว่ามีเรสทริกชันเอนไซม์ 2 ชนิด 56
3.6 การทำเรสทริกชันเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดให้บริสุทธิ์..... 63
3.7 ความบริสุทธิ์ของเรสทริกชันเอนไซม์ที่เตรียมได้..... 68
3.8 สมบัติของ Ali I และ Ali II..... 74
4. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง..... 94
เอกสารอ้างอิง..... 104
ภาคผนวก..... 109

หน้า

1. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีลอรี..... 109
2. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณเอทิลีน..... 110
3. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 111
4. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ใน Tris บัฟเฟอร์ 112
5. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปแตสเซียมฟอสเฟต..... 113
ประวัติผู้เขียน..... 114

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	โปรตีนต่างๆจากจีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนสพร้อมทั้งหน้าที่ของ *Klebsiella pneumoniae* M5a1.....	4
2	ระดับความต้านทานปฏิชีวนะใน *Azospirillum spp*.....	39
3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และ ชีวเคมีของ *Azospirillum sp.*A_{12}.....	43
4	ผลการทรานส์ฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่ *Azospirillum spp*.....	49
5	การเปรียบเทียบสมบัติของ Ali I และ Ali II.....	92

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. จีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนสใน *Klebsiella pneumoniae* M5a1..... 3
2. การควบคุมการถอดรหัสจีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนส..... 5
3. แผนผังเรสทริกชันเอนไซม์ของพลาสมิด pCK 3..... 8
4. รูปแบบของการเจริญและแอคทิวิตีจำเพาะของอะเซทิลีนรีดัคชันของ *Azospirillum sp.* A_{12} ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน..... 40
5. รูปแบบการเจริญของ *Azospirillum spp.*ในอาหารเลี้ยงเชื้ออุดม NB. 42
6. รูปร่างของ *Azospirillum sp.*A_{12} เมื่อเจริญใน MPSS medium.... 44
7. รูปร่างของ *Azospirillum sp.*A_{12} เมื่อเจริญในอาหารที่ไม่มีแหล่งต้นตอไนโตรเจน..... 45
8. การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี rapid alkaline extraction..... 47
9. การตรวจสอบพลาสมิดดั้งเดิมใน *Azospirillum spp.* โดยการทำให้เซลล์แตกขณะอิเลคโทรโฟริซีส..... 51
10. การตรวจแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ของ *A. lipoferum* A_{12} โดยใช้pCK3 เป็นสับสเตรท..... 52
11. การเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการย่อย pCK3ด้วย EcoR1กับเอนไซม์ใน cell free extract..... 54
12. รูปแบบการเจริญ แอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ และแอคติวิตีของ nonspecific endonuclease ของ *A. lopoferum* A_{12}ในอาหารอุดม 55
13. การเปรียบเทียบแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ของ *A. lipoferum* A_{12} ในช่วงระยะเวลาการเจริญต่างๆกัน..... 57
14. การเปรียบเทียบแอคติวิตีของ nonspecific endonuclease ใน cell free extract ของ *A. lipoferum* A_{12} ในช่วงเวลาต่างๆกัน. 58

15-16 แสดงผลการทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอน

รูปที่ หน้า

แอมโมเนียมซัลเฟต..... 59
17. การแยกเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลส..... 62
18. การแยกเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส..... 64
19. ผลการวิเคราะห์หาเรสทริกชันเอนไซม์จากคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสโดยใช้ดีเอ็นเอเป็นสับสเตรต..... 65
20. ผลการวิเคราะห์หาเรสทริกชันเอนไซม์จากคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส โดยใช้พลาสมิดpBR 322เป็นสับสเตรต..... 66
21. ผลการแยกเรสทริกชันเอนไซม์ Ali I ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสโดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์..... 67
22. ผลการวิเคราะห์หาเรสทริกชันเอนไซม์ Ali I จากคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์..... 69
23. ผลการแยกเรสทริกชันเอนไซม์ Ali II จากคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสโดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี- 100..... 70
24. ผลการวิเคราะห์หาเรสทริกชันเอนไซม์ Ali II ที่บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100..... 71
25. ผลการแยกเรสทริกชันเอนไซม์ Ali II ที่แยกได้จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100โดยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์..... 72
26. ผลการวิเคราะห์หาเรสทริกชันเอนไซม์ Ali II ที่บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์..... 73
27. ผลการตรวจสอบผลกระทบของ nonspecific endonuclease ต่อการวัดแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ Ali I..... 75
28. ผลการตรวจสอบผลกระทบของ nonspecific endonuclease ต่อการวัดแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ Ali II..... 76
29. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเรสทริกชัน

เอนไซม์ Ali I..... 77
30. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเรสทริกชัน เอนไซม์ Ali II..... 78
31. ผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเรสทริกชันเอนไซม์ Ali I..... 79
32. ผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเรสทริกชันเอนไซม์ Ali II..... 80
33. ผลของ pH ต่อความเสถียรของเรสทริกชันเอนไซม์ Ali I..... 81
34. ผลของ pH ต่อความเสถียรของเรสทริกชันเอนไซม์ Ali II..... 82
35. ผลของอุณหภูมิ ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเรสทริกชันเอนไซม์ Ali I..... 83
36. ผลของอุณหภูมิ ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเรสทริกชันเอนไซม์ Ali II..... 84
37. ผลของอุณหภูมิ ต่อความเสถียรของเรสทริกชันเอนไซม์ Ali I..... 85
38. ผลของอุณหภูมิ ต่อความเสถียรของเรสทริกชันเอนไซม์ Ali II..... 86
39. ผลการย่อย ⋀ดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่แยกได้..... 87
40. ผลการย่อย ϕX174 ดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่แยกได้..... 88
41. ผลการย่อยพลาสมิด pBR322 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่แยกได้..... 89
42. ผลการย่อยพลาสมิด pSA30 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่แยกได้..... 90
43. ผลการย่อยพลาสมิด pCK3 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่แยกได้..... 91

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

ARA = Acetylene Reduction Activity

ATP = Adenosine triphosphate

DMSO = Dimethylsulfoxide

EDTA = Ethylenediaminetetraacetate

Kb = kilobase

μM = micromolar

mM = milimolar

SAM = S-adenosylmethionine