การแสดงออกของยีนกลูโคซีรีโบรซิเดสของคนในสาหร่ายสีเขียว *Dunaliella salina* Teod. ที่ได้รับการถ่ายยีน

นายปรเมษฐ์ กลั่นฤทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXPRESSION OF HUMAN GLUCOCEREBROSIDASE GENE IN TRANSGENIC GREEN ALGAE *Dunaliella salina* Teod.

Mr.Poramate Klanrit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492204

Thesis Title	EXPRESSION OF HUMAN GLUCOCEREBROSIDASE GENE IN TRANSGENIC GREEN ALGAE *Dunaliella salina* Teod.
By	Mr.Poramate Klanrit
Field of Study	Genetics
Thesis Advisor	Assistant Professor Piyasak Chaumpluk, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Preeda Boon-Long, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Piyasak Chaumpluk, Ph.D.)

..... Member

(Professor Vorasuk Shotelersuk)

..... Member

(Assistant Professor Teunchai Kosakul)

ปรเมษฐ์ กลั่นฤทธิ์ : (การแสดงออกของยีนกลูโคซีรีโบรซิเดสของคนในสาหร่ายสีเขียว *Dunaliella salina* Teod. ที่ได้รับการถ่ายยีน. EXPRESSION OF HUMAN GLUCOCEREBROSIDASE GENE IN TRANSGENIC GREEN ALGAE *Dunaliella salina* Teod.) อ. ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 47 หน้า.

Dunaliella salina เป็นสาหร่ายสีเขียวที่เป็นแหล่งผลิตเบตาแคโรทีน สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือสูงและมีศักยภาพในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม การทดลองหาสภาวะเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยสูตรอาหาร JR ที่ดัดแปลง พบว่า ความเข้มข้นของอาหารที่ 0.25 เท่า และ pH 8.5 ทำให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเดียวกันกับสูตร J/1 ซึ่งเป็นสูตรแนะนำ พบว่ามีการเจริญที่สูงกว่าจึงสามารถใช้สูตรอาหารนี้เป็นระบบเลี้ยงทดแทนได้

การถ่ายยีนโดยใช้ยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส (*bar*) เป็นมาร์คเกอร์ สาหร่ายดังกล่าวเมื่อนำมาถ่ายยีนร่วมกับ PEG ความเข้มข้นต่างๆ 6 ระดับคือ 0% 0.02% 0.04% 0.06% 0.08% และ 0.1% โดยมวลต่อปริมาตร พบว่าการใช้ PEG ความเข้มข้น 0.08% ช่วยให้สาหร่ายต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสมากที่สุด การทดสอบทางชีววิทยาโมเลกุลในระดับดีเอ็นเอโดยวิธี PCR และการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอโดยวิธี RT-PCR พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายตรงกับการทดลองชุดควบคุม เมื่อนำยีนกลูโคซีรีโบรซิเดสซึ่งเป็นยีนสร้างโปรตีนทางการแพทย์จากมนุษย์มาทดลองถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายโดยเชื่อมต่อยีนเข้ากับพลาสมิด pBicBar และถ่ายยีนตามสภาวะดังกล่าว พบการต้านทานยาปราบวัชพืชของสาหร่ายภายหลังการเพาะเลี้ยง 1 เดือน โดยสาหร่ายมีการเจริญในอัตรา 5 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และตรวจวัดทางชีววิทยาโมเลกุลด้วยวิธี PCR และ RT-PCR กับยีนกลูโคซีรีโบรซิเดส พบว่าให้ผลบวกทั้ง 2 วิธี เป็นการยืนยันว่าได้ถ่ายยีนกลูโคซีรีโบรซิเดสของคนสำเร็จและมีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอ ผลการทดลองยืนยันความเป็นไปได้ในการใช้ความสามารถในการถ่ายยีนและแสดงออกของยีนสาหร่ายและเป็นรากฐานในการประยุกต์ในอนาคต

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....ปรเมษฐ์ กลั่นฤทธิ์.....

สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2549.....

467 23226 23 : MAJOR GENETICS

KEY WORD: PEG-MEDIATED TRANSFORMATION / BIALAPHOS / GLUCOCEREBROSIDASE/ *Dunaliella salina*

PORAMATE KLANRIT: (EXPRESSION OF HUMAN GLUCOCEREBROSIDASE GENE IN TRANSGENIC GREEN ALGAE *Dunaliella salina* Teod.) THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PIYASAK CHAUMPLUK, Ph.D., 47 pp.

Dunaliella salina Teod., a green microalgae and a source of β-carotene production, is a salt tolerant algae able to grow at high salt concentration and having potential for industrial production. The optimization of conditions for culturing of this algae using modified JR medium was investigated. Results revealed 0.25X JR at pH 8.5 was the most effective condition providing maximum growth. When this JR was compared with the original recommended J/1, results showed that cell proliferation in JR was found higher than those in J/1, supporting JR medium as a substitution. Genetic transformation in *D. salina* using bialaphos-resistant gene (*bar*) as a marker gene was carried out based on PEG-mediated transformation. Among 6 levels of concentrations investigated, 0%, 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% to 0.1% w/v. A 0.08% PEG revealed most effective in providing the highest number of cells resistant to bialaphos herbicide. Molecular analyses of DNA via PCR and RNA via RT-PCR were also revealed the integration of target DNA and expression of mRNA, respectively, as evidence by DNA bands similarly found in those of positive control. When Glucocerebrosidase gene (GBA) was employed to investigate the possibility of using *D. salina* as a model system to produce human recombinant protein using GBA gene connected with pBicBar with the condition previously obtained in bar gene transfer. The transformants presented with $5x10^4$ cells/ml after 1 month in selective condition. Molecular analyses via PCR and RT-PCR revealed a positive results both GBA DNA insertion and mRNA expression, the transformation was successful and the expression of GBA in *D. salina* was occurred at RNA level. These results showed the possibility in using this expression system as a basis for future applications.

Department of.....Botany..... Student's signature.....Poramate Klanrit.....

Field of study.....Genetics..... Advisor's signature.....

Academic year.....2006.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest sense of gratitude to my advisor, Assistant Professor Dr.Piyasak Chaumpluk for his guidances, encouragement, valuable suggestions and supports throughout my study

My appreciation is also expressed to Professor Vorasuk Shotelersuk for his valuable recommendations and suggestions.

Many thanks are also expressed to everybody at Botany Department, Faculty of science Chulalongkorn University, for their kindness.

I would also like to thank all of my friends at Transgenic Plant and Biosensor Laboratory and Food Reseach Testing Laboratory for their suggestions and encouragement throughout my study.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my grandparents, my parents and my sisters for their love, care, understanding and encouragement extended throughout my study.

CONTENTS

page

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....viii

LIST OF FIGURES.....ix

CHAPTER I INTRODUCTION..... 1

CHAPTER II LITERATURE REVIEWS..... 5

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....13

3.1 Equipments and reagents..... 13

3.2 Methods..... 14

3.2.1 Production of *D. salina* using simple media for the substitution of original J/1 medium..... 14

3.2.2 Selection condition for herbicide resistance..... 15

3.2.3 Method for gene transformation in *D. salina*..... 15

3.2.4 Construction of transformation vector, containing GBA gene.....16

3.2.5 Transformation of GBA gene in *D. salina*.....18

CHAPTER IV RESULTS.....19

4.1 Production of *D. salina* using simple media for the substitution of original J/1 medium 19

4.2 Selection condition for herbicide resistance..... 23

4.3 Method for gene transformation in *D. salina*..... 25

4.4 Construction of transformation vector, containing GBA gene.....28

4.5 Transformation of GBA gene in *D. salina*.....30

CHAPTER V CONCLUTIONS AND DISCUSSIONS.....33

REFERENCES.....36

APPENDICES 40

BIOGRAPHY.....47

LIST OF TABLES

page

Table 1.1 Recombinant glucocerebrosidase details.....1

Table 1.2 Microalgae – based products and their related businesses.....2

Table 3.1 2 pairs of primers for amplifying 2 overlapping fragments of *GBA*.....16

Table 4.1 Comparison of chemicals between J/1 and JR media.....21

Table 4.2 Comparison on costs between J/1 and JR media calculated based on standard prices.....22

LIST OF FIGURES

page

Figure 2.1 Glucocerebrosidase enzyme (Dvir *et al.*, 2003).....7

Figure 2.3 *D. salina* cells in 40X objective lens.....11

Figure 4.1 Growth rate of *D. salina* in various concentrations of JR media.....20

Figure 4.2 Growth rate of *D. salina* in various pH.....20

Figure 4.3 Growth rate of *D. salina* in 1X JR and 1X J/1 media.....22

Figure 4.4 bialaphos screening of *D. salina* ranging from 5 – 12 ppm.....23

Figure 4.5 Effect of the treatment of *D. salina* with bialaphos 24

Figure 4.6 LD 50 of *D.salina* a day after treating with bialaphos.....24

Figure 4.7 Efficiency of pBic Bar transformation in various PEG concentration.....26

Figure 4.8 PCR analysis of *bar* gene using genomic DNA obtaining from transformant using different concentration of PEG.....27

Figure 4.9 Amplification of GBA gene 28

Figure 4.10 Approximately 800 nt of 35S-GBA5' fusion obtaining after ligation-PCR amplification.....29

Figure 4.11 Full-length GBA connected with 35S promoter connection.....29

Figure 4.12 Selection of pBicBarGBA.....30

Figure 4.13 PCR analysis of GBA5' portion in transformed *D. salina*.....31

Figure 4.14 RT-PCR analysis of GBA5' portion in transformed *D. salina*.....31