การโคลนย่อยยีนไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคลซิลทรานสเฟอร์เรส จาก *Bacillus* sp. A11 เข้าสู่พาหะของ *Bacillus*

นางสาว วิภาวรรณ วิทยกฤตศิริกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.๒๕๓๘

ISBN 974-632-396-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16665147X

SUBCLONING OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE GENE FROM *Bacillus* sp. A11 INTO *Bacillus* VECTORS

MISS VIPAWAN VITAYAKRITSIRIKUL

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Education

Graduated Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-632-396-2

Thesis Title	Subcloning of Cyclodextrin Glycosyl Transferase Gene from *Bacillus* sp. A11 into *Bacillus* Ve
BY	Miss Vipawan Vitavakritsirikul
Graduated School	Biotechnology
Thesis Advisor	Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Lecturer Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Santi Thoongsuwan

..... Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

Tipaporn Limpaseni

..... Chairman

(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

Siriporn Sittipraneed

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Lecturer Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

A. Tassanakajon

..... Member

(Assistant Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

P. Pongsawasdi

..... Member

(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

วิภาวรรณ วิทยกฤตศิริกุล : การโคลนย่อยยีนไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอรเรสจาก *Bacillus* sp. A11 เข้าสู่พาหะของ *Bacillus* (CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE GENE FROM *Bracillus* sp. A11 INTO *Bacillus* VECTORS) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ศิริพร สิทธิประณีต. อ. ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ, 99 หน้า. ISBN 974-632-396-2

จุดมุ่งหมายของการศึกษานี้คือ ต้องการโคลนย่อยยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC5 หรือ pCSBC8 เพื่อให้มีการแสดงออกของยีนใน *Bacillus subtilis* โดยใช้ pUB110 เป็นพาหะของ *Bacillus* sp. และ pHV33 เป็นดีเอนเอพาหะ ผลการทดลองที่ได้ปรากฏว่า การโคลนย่อยยีน CGTase ลงใน pHV33 ที่ตำแหน่ง *Hind*III,*Sal*I และ *Eco*RI ไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากไม่สามารถเตรียมชิ้นพาหะ pHV33 ได้โดยการตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ที่ตำแหน่งดังกล่าว นอกจากนั้น ยังมีการโคลนย่อยยีน CGTase ลงใน pUB110 ที่ตำแหน่ง *Eco*RI และ *Pvu*II ไม่ประสบผลสำเร็จเช่นเดียวกัน เพราะไม่สามารถเตรียมชิ้นยีน CGTase ได้ และเมื่อโคลนย่อยยีน CGTase จาก pCSBC5 หรือ pCSBC8 ลงในพาหะ pHV33 ปรากฏว่าไม่มีทราสฟอร์แมนท์เกิดขึ้น ดังนั้น จึงได้มีการรีโคลนยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ลงในพาหะ pUC18 เพื่อสร้างโคลนใหม่ ยีน CGTase ถูกแยกออกด้วยการตัดโครโมโซมของ *Bacillus* sp. A11 ด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind*III โดยวิธีการทำดีเอ็นเอไฮบริไดซ์เซชั่นซึ่งมี pCSBC5 เป็น probe นำมาเชื่อมต่อกับพาหะ pUC18 ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind*III แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM101 การทดสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้มากกว่า 1,000 โคโลนี เพื่อหาแอคติวิตีในการย่อยแป้งของเอนไซม์ CGTase โดยการทดสอบกับไอโอดีน พบว่ามีเพียงทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 17 เท่านั้น ที่มีแอคติวิตี รีคอมบิแนนท์พลาสมิดหมายเลข 17 ถูกนำมาทดสอบหายีน CGTase โดยใช้ส่วนของยีน CGTase 2 ส่วนที่เตรียมจากยีน CGTase ใน pCSBC5 เป็น probes พบว่า ส่วนของดีเอ็นเอขนาด 3.54 kb ที่ได้จากการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหมายเลข 17 ด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind*III สามารถไฮบริไดซ์กับ probes ส่วนของยีน CGTase ขนาด 1.7 และ 3 kb ที่เตรียมจาก pCSBC5 อย่างไรก็ตาม ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 17 ได้สูญเสียแอคติวิตีของการย่อยแป้ง หลังจากการ subculture ซึ่งแสดงว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้นี้ไม่เสถียร

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต Vipawan Vitayakornkirikul

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C326525 MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE / SUBCLONING

VIPAWAN VITAYAKRITSIRIKUL : SUBCLONING OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE GENE FROM *Bacillus* sp. A11 INTO *Bacillus* VECTORS THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: LECTURER VICHIEN RIMPHANITCHAYAKIT, Ph.D. 99 pp. ISBN 974-632-396-2

The aim of this study was to subclone CGTase gene from *Bacillus* sp. A11 in *E. coli* recombinant plasmids pCSBC5 or pCSBC8, into an expression system of *Bacillus subtilis* host using pUB110, *Bacillus* sp. DNA vector and pHV33, as the DNA vector. However, subcloning of CGTase gene into pHV33 at *Hind*III, *Sal*I , *Eco*RI sites and subcloning of CGTase gene into pUB110 at *Eco*RI ,*Pvu*II sites were unsuccessful. Since, the vector pHV33 and CGTase gene containing fragment from pCSBC5 could not be prepared for ligation by cleaving at the designing of restriction sites, and when CGTase gene from pCSBC5 or pCSBC8 was subcloned into pHV33, it appeared that there were no transformant at all. It was later found out that the CGTase activity in pCSBC5 and pCSBC8 could not be detected. Therefore,recloning of the CGTase gene from *Bacillus* sp. A11 into the plasmid vector pUC18 was performed. The CGTase gene fragments were isolated from *Hind*III-digested chromosomal DNA of *Bacillus* sp. A11 via DNA-DNA hybridization using pCSBC5 as a DNA probe, then ligated with *Hind*III-digested pUC18, and transformed into *E. coli* JM101. More than 1,000 transformants containing recombinant plasmids were screened for dextrinizing activity by iodine test. It appeared that only one transformant, namely no.17, showed dextrinizing activity by hydrolyzing starch resulting in clear zone formation. To ascertain if the plasmid isolated from transformant no.17 contained the CGTase gene, it was hybridized with 2 CGTase gene probes (1.7 and 3kb) prepared from the CGTase gene in pCSBC5. The DNA fragment 3.54 kb from the *Hind*III-digested recombinant plasmid no.17 could hybridize with both the labeled 1.7 and 3 kb CGTase probes from pCSBC5. Upon subculture, however, the transformant no.17 lost its dextrinizing activity.

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต Vipawan Vitayakritsirikul

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ACKNOWLEDGEMENTS

I am greatly indebted to my advisors, Assoc.Prof.Dr.Siriporn Sittipraneed and Dr.Vichien Rimphanitchayakit, who never let me down in any situations with their excellent guidance, understanding and constant encouragement throughout my study.

I would like to express my gratefulness to Asst. Prof. Dr. Tipaporn Limpaseni, Asst. Prof. Dr. Anchalee Tassanakajon and Assoc. Prof. Dr. Piamsook Pongsawasdi for serving as thesis committee, for their valuable comments and useful suggestions

The greatest appreciation would be expressed to all the staffs and members in the Department of Biochemistry for their assistance and friendship.

Finally, I wish to express my deepest gratitute to my parents, sister, and brothers for their unlimited love and understanding.

ABBREVIATIONS

α	Alpha
Am	Ampicillin
β	Beta
bp	Base pair
CD	Cyclodextrin
cfu	Colony forming units
Cm	Chloramphenicol
cm	Centrimeter
cm^2	Square centrimeter
°C	Degree Celcius
ddH_2O	Double distilled water
DNA	Deoxyribonucleic acid
dUTP	Deoxyuridine 5' Triphasphate
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	Ethyleneglycol-bis-(β-aminoethylether)-N, N'-tetraacetic acid
g	Gram
γ	Gamma
h	Hour
kb	Kilobases
kg	Kilogram
Km	Kanamycin
l	Liter

M	Molar
µg	Microgram
µl	Microliter
mg	Milligram
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm^3	Cubric millimeter
min	Minute
ng	Nanogram
nm	Nanometer
ORI	Origin of Replication
PEG	Polyethylene glycol
pg	Picogram
RNase A	Ribonuclease A
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tc	Tetracycline
TCE	Trichloroethylene
V	Volume
W	Weight

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... IV

ENGLISH ABSTRACT..... V

ACKNOWLEDGEMENTS..... VI

CONTENTS..... VII

LIST OF TABLES..... IX

LIST OF FIGURES..... X

ABBREVIATIONS.....XIII

CHAPTER

I INTRODUCTION..... 1

II MATERIALS AND METHODS..... 10

Bacterial Strains and Plasmids..... 10

Procedure for Extraction of Plasmid DNA..... 10

Procedure for Extraction of Chromosomal DNA..... 14

Agarose Gel Electrophoresis..... 15

Restriction Enzymes Digestion..... 16

DNA Recovery after Agarose Gel Electrophoresis..... 16

Ligation..... 19

Transformation..... 20

Selection of CGTase Producing Transformant..... 22

DNA-DNA Hybridization..... 24

III RESULTS..... 31

Preparation and Characterization of Plasmid DNAs..... 31

Page

Subcloning of CGTase Gene from pCSBC8 to Shuttle Vector pHV33 at *Hin*dIII and *Sal*I sites..... 34

Subcloning of pC194 Segment from pHV33 into *Hin*dIII Site of pCSBC8 and pCSBC5..... 43

Subcloning of CGTase Gene from pCSBC5 to Modified Shuttle Vector pHV33 at *Eco*RI and *Hin*dIII Sites..... 47

Subcloning of CGTase Gene Containing Fragment from pCSBC5 to pUB110 at *Eco*RI and *Pvu*II Sites..... 53

Detection and Isolation of CGTase Gene by DNA-DNA Hybridization to Chromosomal DNA of *Bacillus* sp. A11 Using pCSBC5 as a Probe..... 57

Cloning of CGTase Gene from *Bacillus* sp. A11..... 62

Detection of Recombinant Plasmids that Carried CGTase Gene..... 65

IV DISCUSSION AND CONCLUSION..... 71

REFERENCES..... 80

APPENDIX..... 87

BIOGRAPHY..... 99

LIST OF TABLES

Table		Page
1.1	Present and anticipated world market for cyclodextrin.....	6
1.2	Bacteria which produce CGTases.....	7
2.1	Bacterial strains and plasmids.....	11
2.2	List of restriction endonucleases used.....	17
3.1	Number of *E. coli* transformants obtained after ligation and transformation of restriction enzymes-digested plasmid DNAs.....	48
3.2	Number of *E. coli* transformants obtained after ligation and transformantion of plasmid DNAs.....	54
3.3	Number of transformants from the cloning of chromosomal DNA of *Bacillus* sp. A11 digested with *Hin*dIII, into plasmid vector pUC18 at *Hin*dIII site.....	64

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.1	Structure of α-, β-and γ-cyclodextrins.....	4
1.2	Illustration of inclusion of cyclodextrin.....	5
1.3	Illustration of the recombinant plasmids construction pSV1, pSV2, pSV3, pSV4 and pSV5.....	9
2.1	Preparation of Southern transfer of DNA fragment.....	27
3.1	Electrophoretic analysis of plasmids pCSBC8 and pHV33.....	32
3.2	Electrophoretic analysis of plasmid pCSBC8.....	33
3.3	Electrophoretic analysis of plasmid vector pHV33.....	35
3.4	Experimental design of the subcloning of CGTase gene to shuttle vector pHV33 at *Hin*dIII and *Sal*I sites.....	36
3.5	Electrophoretic analysis of pCSBC8 to demonstrate excision CGTase gene with restriction endonucleases *Hin*dIII and *Sal*I.....	37
3.6	Electrophoretic analysis of pCSBC8 to demonstrate the separation of CGTase gene with restriction endonucleases, *Cla*I, *Hin*dIII and *Sal*I.....	38
3.7	Electrophoretic analysis of vector pHV33, completely digested with restriction endonucleases *Sal*I and then partially digested with *Hin*dIII.....	40
3.8	Electrophoretic analysis of vector pHV33, partially digested with restriction endonucleases *Hin*dIII and then completely digested with *Sal*I.....	42

Page

3.9 Subcloning of pC194 segment from pHV33 into *Hin*dIII site of pCSBC8 and pCSBC5..... 44

3.10 Electrophoretic analysis of *Hin*dIII-digested pCSBC8 and pCSBC5..... 45

3.11 Electrophoretic analysis of *Hin*dIII-cleaved pHV33..... 46

3.12 Subcloning of CGTase gene containing fragment from pCSBC5 to modified shuttle vector pHV33 at *Eco*RI and *Hin*dIII sites..... 49

3.13 Electrophoretic analysis of pCSBC5 digested with restriction endonucleases *Hin*dIII and *Eco*RI order to demonstrste the separation of CGTase gene containing fragment..... 50

3.14 Electrophoretic analysis of *Pvu*II-cleaved pHV33..... 52

3.15 Subcloning of CGTase gene containing fragment from pCSBC5 to pUB110 at *Eco*RI and *Pvu*II sites..... 55

3.16 Electrophoretic analysis of vector pUB110 digested with restriction endonucleases *Eco*RI and *Pvu*II..... 56

3.17 Electrophoretic analysis of pCSBC5 digested with restriction endonucleases *Eco*RI and *Hin*cII..... 58

3.18 Estimation of DNA concentration of nonradioactive DIG-labeled probes by chemiluminescent detection..... 60

Page

3.19 Chemiluminescent dot blot hybridization of chromosomal DNA of *Bacillus* sp.A11 with DIG-labeled probes..... 61

3.20 Electrophoretic analysis (A) and Southern blot hybridization of (A) with nonradioactive labeled pCSBC5 probe (B)..... 63

3.21 Electrophoretic analysis (A) and Southern blot hybridization of (A) with nonradioactive labeled 1.7 kb CGTase gene fragment probe (B)..... 68

3.22 Electrophoretic analysis (A) and Southern blot hybridization of (A) with nonradioactive labeled 3 kb CGTase gene fragment probe (B)..... 70