การโคลนยีนบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7

นางสาว จิราวรรณ ธนะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-347-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19186078

CLONING OF β-XYLOSIDASE GENE FROM *Streptomyces* sp. CH7

Miss Chirawan Thana

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-332-347-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนยีนบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7

โดย นางสาวจิราวรรณ ชนะ

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จิราวรรณ ธนะ : การโคลนยีนบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 (CLONING OF β-XYLOSIDASE GENE FROM *Streptomyces* sp. CH7) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 93 หน้า. ISBN 974-332-347-3.

ได้ทำการโคลนยีนบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 โดยมี *Escherichia coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะ พบสองโคลน คือ N1 และ N2 ที่แสดงออกได้ใน *E. coli* โดยทั้งคู่ให้แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสสูงกว่า *E. coli* DH5α/pUC18 ประมาณ 30 เท่า และยังพบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากทั้งสองโคลน ซึ่งให้ชื่อว่า pCH7-1 และ pCH7-2 มีขนาดเท่ากันคือ 6.3 กิโลเบส จากรูปแบบการตัดด้วย *Sma*I พบว่าทั้งสองพลาสมิดมีดีเอ็นเอสอดแทรกชนิดเดียวกันที่มีขนาด 3.6 กิโลเบส จากการวิเคราะห์แผนที่เรสทริกชันของดีเอ็นเอสอดแทรกพบว่ามีบริเวณจดจำของ *Sma*I สี่ตำแหน่ง โดยเมื่อตัดด้วย *Sma*I จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.8 กิโลเบส หนึ่งชิ้น 0.6 กิโลเบส หนึ่งชิ้น และ 0.4 กิโลเบส สามชิ้น เมื่อนำดีเอ็นเอสอดแทรกมาโคลนเข้า pUC19 พบว่า *E. coli* DH5α ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ซึ่งเรียกว่า pCH7-1(19) ยังสามารถแสดงแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสได้แต่สูงกว่า *E. coli* DH5α/pUC19 ประมาณ 10 เท่า แสดงว่ายีนที่โคลนได้นี้มีโพรโมเตอร์ของตัวเอง แต่ประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนภายใต้โพรโมเตอร์ของตัวเองใน *E. coli* ต่ำกว่าเมื่ออยู่ภายใต้ P_{lac} บนพลาสมิดพาหะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต จิราวรรณ ธนะ

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C826486 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD *Streptomyces* sp. CH7 / β-XYLOSIDASE / CLONING

CHIRAWAN THANA : CLONING OF β-XYLOSIDASE GENE FROM *Streptomyces* sp. CH7. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 93 pp. ISBN 974-332-347-3.

β-xylosidase gene from ***Streptomyces*** sp. CH7 was cloned by using ***Escherichia coli*** DH5α as a host and pUC18 as a cloning vector. Two clones, namely, N1 and N2 capable of expressing β-xylosidase gene showing β-xylosidase activity of about 30 folds higher than that of *E. coli* DH5α/pUC18 were obtained. The recombinant plasmids from both clones namely pCH7-1 and pCH7-2 had similar size of 6.3 kb. Both plasmids showed similar restriction patterns by *Sma*I indicating they had the same DNA insert of 3.6 kb in size. The restriction analysis of the DNA insert showed that it contained four *Sma*I sites and after restriction cut with this enzyme giving one fragment each of 1.8 and 0.6 kb and three fragments of 0.4 kb. When the DNA insert was subcloned in pUC19 calling pCH7-1(19), *E. coli* DH5α receiving this recombinant plasmid was still able to show β-xylosidase activity although only about 10 folds higher than that of *E. coli* DH5α/pUC19. The result indicated that the cloned gene also carried its own promoter and was able to be expressed under it in *E. coli* although with lower efficiency than that under P_{lac} on the cloning vector.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆของการวิจัย รวมทั้งการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ. ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ที่กรุณาเป็นกรรมการ ให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการพิมพ์วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ คุณ ศิรพรรณ สุคนธสิงห์ และคุณ อรอนงค์ พริ้งศุลกะ ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการพิมพ์วิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน รวมทั้ง เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ได้ให้ทุนอุดหนุนในงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมาจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ซ
สารบัญรูป..... ฌ
บทที่
1. บทนำ..... 1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย..... 22
3. ผลการวิจัย..... 36
4. วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย..... 68
รายการอ้างอิง..... 73
ภาคผนวก..... 83
ประวัติผู้เขียน..... 93

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ต่างๆ ที่สามารถย่อยสลายไซแลนได้..... 8

1.2 น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ..... 13

1.3 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ..... 15

3.1 แอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-ไซโลสิเดสจากโคลน N1 และ N2 เทียบกับ *E. coli* DH5α/Puc18 และ *Streptomyces* sp. CH7..... 46

3.2 แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสจากโคลน N1 เทียบกับ N1(19) และ *E. coli* DH5α/pUC19..... 64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1.1 โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง..... 3
1.2 โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน..... 4
1.3 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน..... 9
3.1 ผลการย่อยโครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *Streptomyces* sp. CH7 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI แบบกึ่งสมบูรณ์ (partial digestion) บนอะกาโรสเจล..... 37
3.2 ภาพแสดงการเชื่อมพลาสมิด pUC18 กับชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. CH7 ขนาด 1-5 กิโลเบส ด้วย T_4 DNA ligase บนอะกาโรสเจล..... 38
3.3a ลักษณะการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตของโคลน N1 และ N2 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. CH7 และ *E. coli* DH5α/pUC18 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มี IPTG, X-gal, MUX และแอมพิซิลิน..... 40
3.3b ลักษณะโคโลนีจากตัวอย่างในรูปที่ 3.3a เมื่ออยู่ภายใต้แสงสีขาว..... 41
3.4 ภาพแสดงขนาดพลาสมิด pCH7-1 และ pCH7-2 เปรียบเทียบกับ pUC18 บนอะกาโรสเจล..... 42
3.5a ภาพแสดงการเรืองแสงของ *E. coli* DH5α ที่ได้รับพลาสมิด pCH7-1 ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต..... 43
3.5b ภาพแสดงโคโลนีจากตัวอย่างในรูปที่ 3.5a เมื่ออยู่ภายใต้แสงสีขาว..... 44
3.6 ภาพแสดงรูปแบบการตัดพลาสมิด pCH7-1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI, *Kpn*I, *Sma*I, *Bam*HI, *Xba*I, *Sph*I และ *Hin*dIII บนอะกาโรสเจล..... 47
3.7 ภาพแสดงรูปแบบการตัดพลาสมิด pCH7-2 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI, *Kpn*I, *Sma*I, *Bam*HI, *Xba*I, *Sph*I และ *Hin*dIII บนอะกาโรสเจล..... 48

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.8 ภาพแสดงขนาดชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (DNA insert) ที่มียีนที่เป็นรหัสสำหรับบีตา-ไซโลสิเดสในพลาสมิด pCH7-1 และ pCH7-2 บนอะกาโรสเจล..... 50

3.9 ภาพแสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ได้จากพลาสมิด pCH7-1 ก่อนตัดและหลังตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI บนอะกาโรสเจล..... 51

3.10 ภาพแสดงตำแหน่งจดจำของ *Bam*HI ที่กลับคืนมา..... 52

3.11 ภาพแสดงรูปแบบการตัดพลาสมิด pUC18, pCH7-1 และชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ได้จากพลาสมิด pCH7-1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sma*I บนอะกาโรสเจล..... 53

3.12 ภาพแสดงรูปแบบการตัดพลาสมิด pCH7-1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sma*I และ *Sma*I ร่วมกับ *Bam*HI บนอะกาโรสเจล..... 55

3.13 ภาพแสดงรูปแบบการตัดพลาสมิด pCH7-1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III, *Bam*HI และ *Hind*III ร่วมกับ *Bam*HI บนอะกาโรสเจล..... 56

3.14 ภาพแสดงรูปแบบการตัดพลาสมิด pCH7-1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI, *Bam*HI และ *Eco*RI ร่วมกับ *Bam*HI บนอะกาโรสเจล..... 57

3.15 ภาพแสดงแผนที่เรสทริกชันของ pCH7-1..... 58

3.16 ภาพแสดงการเรืองแสงของโคโลนีภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตหลังจากโคลนย่อย (subclone) โดยใช้พลาสมิด pUC19..... 60

3.17 ภาพแสดงขนาดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1 และ pCH7-1(19) บนอะกาโรสเจล..... 61

3.18a ภาพแสดงการเรืองแสงของ *E. coli* DH5α ที่ได้รับพลาสมิด pCH7-1(19) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต..... 62

3.18b ภาพแสดงโคโลนีจากตัวอย่างในรูป 3.18a เมื่ออยู่ภายใต้แสงสีขาว..... 63

3.19a ภาพแสดงทิศทางการแสดงออกของยีนที่เป็นรหัสสำหรับบีตา-ไซโลสิเดส เมื่ออยู่ในพลาสมิด pUC18..... 66

3.19b ภาพแสดงทิศทางการแสดงออกของยีนที่เป็นรหัสสำหรับบีตา- ไซโลสิเดส เมื่ออยู่ในพลาสมิด pUC19..... 67