การสร้างมิวแทนท์ของ Azotobacter spp. ที่ไนโตรจิเนสไม่ถูกกดตัน

นางสาวเสาวคนธ์ ภคอัครเลิศกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974-568-100-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

013009

i10299865

CONSTRUCTION OF NITROGENASE DEREPRESSED MUTANTS OF *AZOTOBACTER* SPP.

Miss Saowakon Paca-uccaralertkun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-568-100-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสร้างมิวแทนท์ของ Azotobacter spp. ที่ไนโตรจิเนส ไม่ถูกกดดัน

โดย นางสาวเสาวคนธ์ ภคอัครเลิศกุล

ภาควิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพย์ทัศน์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.จริยา บุญญวัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพย์ทัศน์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ลิทธิประณีต)

..... กรรมการ

(ดร.นันทกร บุญเกิด)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสร้างมิวแทนท์ของ Azotobacter spp. ที่ไนโตรจิเนส ไม่ถูกกดดัน
ชื่อนิสิต	นางสาวเสาวคนธ์ ภคอัครเลิศกุล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2529

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้เคลื่อนพลาสมิดดีเอนเอ pCK3 ซึ่งมียีน nif A จาก Klebsiella pneumoniae M5al มีคุณสมบัติถอดรหัสได้ตลอดเวลาเข้าไปใน Azotobacter โดยใช้วิธีทรานสฟอร์เมชั่น พบว่าสามารถแยกทรานสฟอร์แมนท์ของ A. vinelandii และ A. chroococcum ที่ถอดรหัสไนโตรจิเนสภายใต้ภาวะที่มีอนุมูลอัมโมเนียมปริมาณสูงได้ด้วยความถี่ 1.2×10^{9} และ 2×10^{7} เซลล์ต่อกรัมของพลาสมิดดีเอนเอ ตามลำดับ ซึ่งทรานสฟอร์แมนท์เหล่านี้มีสมบัติการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกันมาก มีความสามารถต้านยาเตรทตราซัยคลิน 5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ และคานามัยซิน 50 $ng \cdot ml^{-1}$ ได้ดี และถอดรหัสให้เอนไซม์ไนโตรจิเนสภายใต้ภาวะที่มีอนุมูลอัมโมเนียมได้ค่า ARA ใกล้เคียงกันแม้ว่าจะค่อนข้างต่ำคือมีค่าเพียง 30 - 60 นาโนโมลของเอทีลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง จึงได้กลายพันธุ์ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pCK3 ด้วย NTG และได้พลาสมิดตัวใหม่ให้ชื่อว่า pCK3* นำไปทรานสฟอร์มเข้า Azotobacter spp. สายพันธุ์ WT อีกครั้งหนึ่ง ในครั้งนี้สามารถแยกได้ทรานสฟอร์แมนท์ที่ต้านคานามัยซินได้ถึง 1 $\mu g. ml^{-1}$ หรือเพิ่มเป็น 20 เท่าจากเดิม นอกจากนี้ยังพบว่าทรานสฟอร์แมนท์ชุดใหม่มีค่า ARA เพิ่มจากทรานสฟอร์แมนท์เดิม 13 เท่า ในภาวะที่มี Ammonium acetate 15 mM เป็นสารตั้นต่อไนโตรเจน

ได้สุ่มเลือกสายพันธุ์ของทรานสฟอร์แมนท์จากการทรานสฟอร์เมชั่นทั้งสองครั้งนำไปศึกษาผลกระทบต่ออ้อย พบว่าน้ำหนักแห้งของต้นและใบอ้อยจากอ้อยที่ปลูกร่วมกับ

Azotobacter WT และทรานส์ฟอร์แมนท์มีค่าสูงกว่า control ที่ไม่มี Azotobacter เมื่อปลูกอ้อยในสารอาหารที่มี Ammonium sulfate 1.2 mM สายพันธุ์ที่มี pCK3 จะช่วยเพิ่มน้ำหนักแห้งของต้นและใบอ้อยเป็น 153% และเพิ่มค่า ARA จากรากอ้อยเป็น 233% เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ WT ยิ่งไปกว่านั้นสายพันธุ์ที่มี pCK3* จะช่วยเพิ่มน้ำหนักแห้งของลำต้นและใบอ้อยเป็น 157% และเพิ่มค่า ARA จากรากอ้อยเป็น 472% เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่มี pCK3 ผลของการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดตัวใหม่ pCK3* มีประสิทธิภาพในการถอดรหัสของยีน nif A สูงกว่าเดิม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Construction of Nitrogenase Derepressed Mutants of *Azotobacter* spp.
Name	Miss Saowakon Paca-uccaralertkun
Thesis Advisor	Associate Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.
Department	Biochemistry
Academic Year	1986

พระจุลจอมเกล้า สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABSTRACT

We had transformed the pCK3 plasmid DNA with harbored the constitutive *nif* A gene tailored from *Klebsiella pneumoniae* M5al into strains of *Azotobacter* spp. in order to construct strains of derepressed *nif* mutants. The frequencies of transformation were found equal to 1.2×10^9 and 2×10^7 cells per g of plasmid DNA in *A. vinelandii* and *A. chroococcum* respectively. Growth properties, detected in all transformants, are found very similar. All strains could form colonies equally well in Burk's medium supplemented with the combination of tetracycline and kanamycin at a concentration of 5 µg per ml and 50 ng per ml respectively. Also, all cultures, cultivated under the medium having 15 mM ammonium acetate as the nitrogen source rendered an equal derepressed activity of acetylene reduction, eventhough with a rather low value, in the range of 30 - 60 nmole of ethylene per mg protein per hour.

We had developed, by means of NTG mutagenesis, a method

of the new plasmid DNA isolation, and named it as pCK3*. This new plasmid pCK3* was retransformed into both species of Azotobacter rendering strains of kanamycin resistance of 1 µg per ml, a 20 fold increase in antibiotic concentration with respected to the initial transformants. In addition, the culture of new transformants, rendered a 13 fold increase in the activity of acetylene reduction, when compared to that of the original transformants, all of which being cultivated under the medium having 15 mM ammonium acetate as the nitrogen source.

Strains from the transformation were randomly selected as representative to investigate an inoculum effect to the sugarcane growth. It was found that all sugarcane plants, being previously inoculated with Azotobacter spp., irrespective of the nature of transforming plasmid, rendered a higher value in the acetylene reduction activity and the total dry weight of the whole plant, when compared to those of the control, the uninoculated ones. In the media with 1.2 mM ammonium sulfate, plants, inoculated with strain, harboring pCK3 rendered a 153% increase in the total dry weight of the whole plant and a 233% increase in the acetylene reduction activity when compared to those inoculated with the WT. Furthermore, plants, inoculated with strain, harboring pCK3* rendered a 157% increase in the total dry weight of the whole plant and a 472% increase in the acetylene reduction activity when compared to those inoculated with the strain, harboring pCK3. Our result illustrated that the pCK3* new plasmid DNA should consist of an efficient regulatory gene, which was more suitable for the nif A gene expression than that of the original.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ และกำลังใจ อันล้ำค่าต่อผู้เขียนตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่ในภาควิชาชีวเคมี

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่สำคัญและเป็นประโยชน์อย่างมากในการวิจัยนี้ รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ ดร.นันทกร บุญเกิด ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลืออย่างมากในการวิจัยนี้ รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จริยา บุญญวัฒน์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ชนาญวัฒน์ เทวกุล, รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทรรศนีย์ ศรีไชโย ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่สำคัญและเป็นประโยชน์อย่างมากในการวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมี ที่ได้ให้ความกรุณาและคำชี้แนะต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่ในภาควิชาชีวเคมี

ขอบคุณหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม และภาควิชาชีวเคมีที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องใช้ และสารเคมี ตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอบคุณ คุณเศรษฐา ศิริพินทุ์ เป็นอย่างยิ่งที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและความเข้าใจ รวมทั้งสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่นำมาทำวิจัย ขอบคุณ คุณวีระวัฒน์ อังควณิช ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและความเข้าใจแก่ผู้เขียน ขอบคุณสมาชิกทุกคนในหน่วยปฏิบัติพันธุวิศวกรรม เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ในภาควิชาชีวเคมีทุกคน สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจ

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกคน ในความช่วยเหลือเรื่องทั่วไประหว่างการทำวิจัย ขอบคุณสมาคมนิสิตเก่าจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนด้านทุนการศึกษา ขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

สารบัญ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ 1

2 วิธีการทดลอง 14

3 ผลการทดลอง 29

4 วิจารณ์ผลการทดลอง 76

5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 86

เอกสารอ้างอิง 88

ภาคผนวก 99

ประวัติผู้เขียน 130

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สมบัติของ Mo Fe proteins จากแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้สกุลต่าง ๆ	5
2	สมบัติของ Fe proteins จากแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้สกุลต่าง ๆ	6
3	โปรตีนต่าง ๆ จากยีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนสพร้อมทั้งหน้าที่ได้จากการถอดรหัสของยีนไนโตรจิเนสของ Klebsiella pneumoniae	9
4	ความสามารถในการใช้สารตันตอคาร์บอนของ Azotobacter vinelandii และ Azotobacter chroococcum เพื่อการเจริญเติบโต	34
5	ความไวของ A. vinelandii และ A. chroococcum ต่อยาปฏิชีวนะ	35
6	ลักษณะการเจริญของ A. vinelandii และ A. chroococcum	41
7	ความไวของ Azotobacter spp. WT และทรานสฟอร์แมนท์ต่อยาปฏิชีวนะ	47
8	เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีนรีดักชั่น (ARA) ของ Azotobacter spp. WT และทรานสฟอร์แมนท์	51
9	เปรียบเทียบการเจริญของ A. vinelandii WT และทรานสฟอร์แมนท์ TF23(pCK3)	55

ตารางที่ หน้า

10 เปรียบเทียบการเจริญของ A. vinelandii WT และทรานส์ฟอร์แมนท์ TF 23 (pCK3) และมิวแทนท์สายพันธุ์ TF 239 (pCK3*) 57

11 เปรียบเทียบการเจริญของ Azotobacter spp. ระหว่าง WT และทรานส์ฟอร์แมนท์ที่มี pCK3* 62

12 เปรียบเทียบการเจริญของ Azotobacter spp. ระหว่าง WT, TF 23 (pCK3) และ TF 2 (pCK3*) 68

13 เปรียบเทียบการเจริญของ Azotobacter spp. ระหว่าง WT และ TF C2 (pCK3*) 69

14 ผลกระทบของ Azotobacter ที่มีต่อน้ำหนักแห้ง ความสูงและแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีนรีดักชั่นของอ้อยในการทดลองครั้งที่ 1 73

15 ผลกระทบของ Azotobacter ที่มีต่อน้ำหนักแห้ง ความสูงและแอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีนรีดักชั่นของอ้อยในการทดลองครั้งที่ 2 75

16 สมบัติต่าง ๆ ของ Azotobacter spp. 77

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ยีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนสใน Klebsiella pneumoniae	8
2	การควบคุมการถอดรหัสยีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนส	11
3	ลักษณะโคโลนีของ A. vinelandii และ A. chroococcum	30
4	คัลเจอร์ของ A. vinelandii และ A. chroococcum ที่เจริญโดยใช้ Rhamnose และ Mannitol เป็นสารต้นตอคาร์บอน	31
5	ความสามารถในการใช้แป้งเป็นสารต้นตอคาร์บอนของ A. vinelandii และ A. chroococcum	33
6	รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดัคชั่นของ A. vinelandii ในอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน	36
7	รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดัคชั่นของ A. chroococcum ในอาหารที่มีปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน	37
8	รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดัคชั่นของ A. vinelandii ในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 mM เป็นสารต้นตอไนโตรเจน ..	38
9	รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดัคชั่นของ A. chroococcum ในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 mM เป็นสารต้นตอไนโตรเจน ..	39

รูปที่		หน้า
10	แผนผังเรสติคชั่นของ พลาสมิด pCK3	43
11	ผลการย่อยพลาสมิดดีเอนเอ pCK3 ด้วยเอนไซม์ EcoRI และ SalI บน 0.6% Agarose gel electrophoresis	44
12	รูปแบบของการเจริญของ A. vinelandii ใน TF medium และ TF medium ที่เสริมด้วย Ferrous sulfate 18 mM	45
13	เปรียบเทียบการทนทานต่อยาปฏิชีวนะของ A. vinelandii WT และทรานสฟอร์แมนท์	48
14	เปรียบเทียบการทนทานต่อยาปฏิชีวนะของ A. chroococcum WT และทรานสฟอร์แมนท์	49
15	การตรวจสอบพลาสมิดดีเอนเอของทรานสฟอร์แมนท์ของ Azotobacter	50
16	รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดัคชั่นของ TF 23 (pCK3) ในอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน	53
17	รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดัคชั่นของ TF 23 (pCK3) ในอาหารที่มี Ammonium acete 15 mM เป็นสารต้นตอไนโตรเจน	54
18	ผลของการย่อยพลาสมิดดีเอนเอ pCK3 และ pCK3* ด้วยเอนไซม์ EcoRI และ Sal I บน 0.6% Agarose gel electrophoresis	58
19	รูปแบบของการเจริญของ A. vinelandii WT และ TF 2 (pCK3*) ในอาหารสูตรปรับต่ำ และอาหารอุดม	60
20	รูปแบบของการเจริญของ A. chroococcum WT และ TF C2 (pCK3*) ในอาหารสูตรปรับต่ำ และอาหารอุดม	61

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่		หน้า
21	รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชั่นของ TF2(pCK3*) ในอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน	63
22	รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชั่นของ TFC2(pCK3*) ในอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน	64
23	รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชั่นของ TF2(pCK3*) ในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 mM เป็นสารต้นตอไนโตรเจน	66
24	รูปแบบของความขุ่น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชั่นของ TFC2(pCK3*) ในอาหารที่มี Ammonium acetate 15 mM เป็นสารต้นตอไนโตรเจน ..	67
25	Dixon plot ของ A. vinelandii WT ที่เจริญในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนมี Ammonium chloride เป็นตัวยับยั้ง	70
26	Dixon plot ของ TF2(pCK3*) ที่เจริญในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน มี Ammonium chloride เป็นตัวยับยั้ง	72

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย