การติดตามยีน *betB* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica*

นางสาว ณัฐธนัญ ภูศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-523-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19433691

PROBING OF THE *betB* GENE FROM THE CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*

Miss Nadthanan Phusi

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-332-523-9

Thesis title	Probing of the *betB* gene from the cyanobacterium *Aphanothece halophytica*
By	Miss Nadthanan Phusi
Program	Biotechnology
Thesis Advisor	Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.

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

.....Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis committee

.....Chairman

(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

.....Member

(Rath Pichyangkura, Ph.D.)

ณัฐธนัญ ภูศรี : การติดตามยีน *betB* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* (PROBING OF THE *betB* GENE FROM THE CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ , 75 หน้า. ISBN 974-332-523-9.

Aphanothece halophytica เป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มและมีการสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนเพื่อตอบสนองต่อความเครียดออสโมซิส การสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนเริ่มจากการทำงานของเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนสซึ่งเปลี่ยนโคลีนเป็นบีเทนอัลดีไฮด์จากนั้นเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสเปลี่ยนบีเทนอัลดีไฮด์ให้เป็นไกลซีนบีเทน ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองนี้สร้างมาจากยีนเบทเอและเบทบี โดยยีนเบทเอถอดรหัสสำหรับเอนไซม์โคลีนดีไฮโดรจีเนส และยีนเบทบีถอดรหัสสำหรับเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส การแยกยีนเบทบีออกมาจากโครโมโซมัลดีเอ็นเอของ *A. halophytica* ได้ทดลอง 3 วิธีคือ การคัดเลือกจากการแสดงออกของยีนเบทบี โคโลนีไฮบริไดเซชัน และเซาเทิร์นบลอทไฮบริไดเซชัน วิธีแรกเริ่มจากการสร้างไลบรารีของโครโมโซมัลดีเอ็นเอของ *A. halophytica* โดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอมาเชื่อมเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และใช้เซลล์เจ้าเรือนคือ *Escherichia coli* จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนเบทบี หรือได้รับยีนเบทเอและเบทบีซึ่งจะสามารถเจริญบนอาหารสูตร M63 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์ และใส่ซับสเตรตสำหรับไกลซีนบีเทนคือโคลีนหรือบีเทนอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และวิธีที่สองที่ใช้ในการคัดเลือกคือ โคโลนีไฮบริไดเซชัน โดยใช้ตัวติดตามหมายเลข 4402 และ 4403 ซึ่งออกแบบมาจากบริเวณที่มีความเหมือนของที่ถอดรหัสสำหรับเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสจากพืชและแบคทีเรียชนิดอื่น โดยตัวตรวจตามนี้มีลำดับเบสคือ 5′ TGGAACTTGGCGGTAAAA 3′ และ 5′ GCCCCTGCGCTGGCCGCTGG 3′ ตามลำดับ แต่เนื่องจากทั้งสองวิธีที่กล่าวมานั้นไม่สามารถแยกยีนเบทบีออกมาได้ ดังนั้นจึงเปลี่ยนมาใช้ตัวติดตามที่เตรียมมาจากยีนจีบีเอสเอของ *Bacillus subtilis* ซึ่งยีนนี้ถอดรหัสสำหรับบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสเช่นเดียวกับยีนเบทบีของ *A. halophytica* โดยตัวติดตามนี้มีความยาว 0.92 กิโลเบส จากการศึกษาพบว่าตัวติดตามนี้สามารถจับกับโครโมโซมัลดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ต่างๆ ของ *A. halophytica* ได้ โดยชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณนั้นมีขนาด 9.4 และมากกว่า 23.1 กิโลเบส

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

#C827112 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD:
Aphanothece halophytica / *betB* GENE / PROBING

NADTHANAN PHUSI : PROBING OF THE *betB* GENE FROM THE CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ARAN INCHAROENSAKDI, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. VICHIEN RIMPHANITCHAYAKIT, Ph.D.
75 pp. ISBN 974-332-523-9.

The halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* synthesizes the osmoprotectant glycine betaine in response to osmotic stress when the cells were grown in high salt medium. Choline is converted to betaine aldehyde, which in turn is converted further to glycine betaine. The enzymes involved are the products of *betAB* genes. Three methods of selection were used to isolate *betB* gene from *A. halophytica* chromosomal DNA, namely bet phenotypic selection, colony hybridization and Southern blot hybridization. For the first two methods, the *A. halophytica* choromsomal DNA library was constructed by ligating the *Sau*3AI digested DNA into the *Bam*HI site of pUC18 and transforming into *Escherichia coli*. The bet phenotype was selected on M63 agar containing 0.7 M NaCl and 1 mM choline or betaine aldehyde. The transformant containing the *betB* or *betAB* genes should be able to grow on such medium. In the colony hybridization, probe no. 4402 and 4403 were designed from the homologous sequences at the N-terminal and the C-terminal coding sequences, respectively, of the related *betB* of other bacteria and plants and were used as hybridization probes. The sequences of these probes were 5′ TGGAACTTGGCGGTAAAA 3′ and 5′ GCCCCT GCGCTGGCCGCTGG 3′, respectively. None of the *bet* genes were selected by using the above two techniques. The 0.92 kb of *gbsA* gene, a *betB* related gene, of *Bacillus subtilis* was finally used as a probe for Southern blot hybridization of the chromosomal DNA digested with various restriction enzymes. The hybridization bands of about 9.4-23.1 kb were observed. This suggested the extence of *betB* in *A. halophytica* chromosomal DNA.

ภาควิชา –	ลายมือชื่อนิสิต Nadtha Phusi
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Aran Incharoensakdi
ปีการศึกษา 2541	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Vichien Rimphanitchayakit

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Aran Incharoensakdi and my co-advisor, Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, for their excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis. Without their kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Assistant Professor Tipaporn Limpaseni and Dr. Rath Pichyangkura for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

Sincere thanks are also expressed to all staff members and friends of Biotechnology and Biochemistry Department for their help in laboratory and friendship.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my parents and members in family for their unlimited love, support, understanding and encouragement.

CONTENT

PAGE

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT v

ACKNOWLEDGEMENT vi

CONTENT vii

LIST OF TABLE xi

LIST OF FIGURES xii

LIST OF ABBREVIATIONS xiii

CHAPTER I INTRODUCTION 1

1.1 Compatible solutes 3

1.2 Glycine betaine 6

1.3 The role of glycine betaine 7

1.4 The synthesis of glycine betaine 8

1.5 Glycine betaine synthesis of *E. coli* 9

1.6 Glycine betaine biosynthesis in plants 10

1.7 Expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene in different hosts 11

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS 13

2.1 Instruments 13

2.2 Supplies 14

2.3 Chemicals 14

2.4 Kit 15

2.5 Enzymes and restriction enzymes 15

2.6 Bacterial strains and plasmids 15

2.7 Extraction and purification of chromosomal DNA from *A. halophytica* 16

2.8 Agarose gel electrophoresis 17

2.9 Preparation of *Sau*3AI partial digested chromosomal DNA 18

2.9.1 Trial digestion 18

2.9.2 Scale-up digestion 18

2.10 Ligation 19

2.11 Transformation of *E. coli* by electroporation 19

2.11.1 Preparation of competent cells 19

2.11.2 Electroporation 20

2.12 Screening of transformed cells containing *bet* genes

by phenotypic test 20

2.12.1 Effect of NaCl concentration on growth of *E. coli* 20

2.12.2 Effect of exogenous choline and glycine betaine

on growth of *E. coli* 21

2.12.3 BET phenotypic test 21

2.13 Preparation of synthetic oligonucleotide probe 21

2.13.1 Oligonucleotide design and synthesis 21

2.13.2 5′ end-labeling with [γ-^{32}P]ATP using

T_4 polynucleotide kinase 22

2.14 Screening of transformed cells containing *betB* gene by colony hybridization 22

2.14.1 Colony blotting 22

2.14.2 Colony hybridization 23

2.14.3 Screening of positive colony 23

2.15 Alkaline extraction of plasmid DNA 24

2.16 Restriction endonuclease analysis of the recombinant plasmid 24

2.17 Nucleic acid transfer by Southern blotting 25

2.17.1 Restriction digestion of chromosomal DNA 25

2.17.2 Southern blotting 26

2.17.3 Vacuum blotting 26

2.18 Preparation of *gbsA* probe 27

2.18.1 Digestion of pJB007 with *Nde*I and *Pst*I 27

2.18.2 DNA fragment elution 28

2.18.3 Probe labeling by nick translation 29

2.18.4 Purification of labeled probe 29

2.19 Screening of *betB* gene by Southern blot hybridization 30

CHAPTER III RESULTS 31

3.1 Isolation of *A. halophytica* chromosomal DNA 31

3.2 Construction of the *A. halophytica* chromosomal DNA library 31

3.3 Effect of NaCl concentrations on the growth of *E. coli* JM109 34

3.4 Effect of exogenous choline, betaine aldehyde and glycine betaine on the growth of *E. coli* JM109 34

3.5 BET phenotypic selection 38

3.6 Colony hybridization 38

3.6.1 The design of oligonucleotide probes 38

3.6.2 Screening of *betB* gene by colony hybridization 39

3.7 Southern blot hybridization using *gbsA* probe 43

3.7.1 Preparation of *gbsA* probe 43

3.7.2 Southern blot hybridization analysis 43

CHAPTER IV DISCUSION 48

CHAPTER V CONCLUSION 52

REFERENCES 53

APPENDIX 65

BIOGRAPHY 75

LIST OF TABLE

PAGE

Table 1.1 Major organic osmoregulatory solutes of cyanobacteria. 5

LIST OF FIGURES

PAGE

Figure 1.1 Structure of glycine and glycine betaine.....6

Figure 1.2 Choline-glycine betaine pathway.....9

Figure 2.1 *gbsAB* containing insert in pJB007.....28

Figure 3.1 Chromosomal DNA preparation of *A. halophytica*.....32

Figure 3.2 Analysis of partially digested of *A. halophytica* chromosomal DNA with *Sau*3AI on 0.7% agarose gel electrophoresis.....33

Figure 3.3 Effect of various NaCl concentration on the growth of *E. coli* JM109.....36

Figure 3.4 Effect of exogenous choline, betaine aldehyde and glycine betaine on the growth of *E. coli* JM109.....37

Figure 3.5 Sequence comparison of the genes coded for betaine aldehyde dehydrogenase from bacteria and plants.....41

Figure 3.6 Examples of colony hybridization screening with the $[\gamma\text{-}^{32}P]$ATP labeled probe no. 4402.....42

Figure 3. 7 Preparation of 0.92 kb of *gbsA* gene from the digestion of pJB007 with *Nde*I and *Pst*I.....45

Figure 3.8 Digestion of *A. halophytica* chromosomal DNA with 5 restriction endonucleases.....46

Figure 3.9 Southern-blot hybridization analysis of digested *A. halophytica* chromosomal DNA with *gbsA* probe. 47

LIST OF ABBREVIATIONS

A	Absorbance
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
^{o}C	Degree celsius
Ci	Curie
cm	Centimetre
dATP	2′-deoxyadenosine 5′-triphosphate
dCTP	2′-deoxycytidine 5′-triphosphate
dGTP	2′-deoxyguanosine 5′-triphosphate
dTTP	2′-deoxythymidine 5′-triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
kb	Kilobase
l	Litre
Lac	Lactose
LB	Luria-Bertani
µg	Microgram
µl	Microlitre
ml	Millilitre
mM	Millimolar
ng	Nanogram
rpm	Revolution per minute
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TBE	Tris/borate electrophoresis (buffer)
TE	Tris/EDTA (buffer)

Tris-HCl	Tris hydrochloride
UV	Ultraviolet
v	Volume