การศึกษาลักษณะของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14

นางสาว จารุณี วานิชธนันกูล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-639-694-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19040644

CHARACTERIZATION OF THE DNA INSERT IN RECOMBINANT PLASMID pCSBC14

Miss Jarunee Vanichtanankul

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998

ISBN 974-639-694-3

Thesis Title	Characterization of the DNA Insert in Recombinant Plasmid pCSBC14
By	Miss Jarunee Vanichtanankul
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Assistant Professor Napa Siwarungson, M.Sc.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement 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
(Assistant Professor Napa Siwarungson, M.Sc.)

..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จารุณี วานิชชนันกุล : การศึกษาลักษณะของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 (CHARACTERIZATION OF THE DNA INSERT IN RECOMBINANT PLASMID pCSBC14) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. นภา ศิวรังสรรค์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ, 95 หน้า. ISBN 974-639-694-3

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ซึ่งเป็น pUC18 ที่มีโครโมโซมัลดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR25 ขนาด 4.0 กิโลเบส และเชื่อว่าเป็นโคลนของยีนโปรตีเอส มาย่อยด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Eco*RI ได้ชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของ pCSBC14 ขนาด 0.7, 0.9 และ 1.6 กิโลเบส นำแต่ละชิ้นมาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ M13mp18 และเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือนคือ *E. coli* JM109 ได้รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ 3 โคลนให้ชื่อว่า mCSBC141, mCSBC142 และ mCSBC143 มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกเท่ากับ 0.7, 0.9 และ 1.6 กิโลเบส ตามลำดับ จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14, mCSBC141, mCSBC142 และ mCSBC143 มาทำการหาลำดับเบสโดยวิธี dideoxynucleotide chain-termination ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาด 2,308 เบสจากปลาย 3′ ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของ pCSBC14 ซึ่งแสดง open reading frame 1,803 เบสแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 600 ตัว เมื่อนำลำดับเบสของยีนนี้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของดีเอ็นเอใน GenBank โดยใช้ BLAST พบว่ามีความเหมือนกัน 86% กับยีน L-glutamine D-fructose-6-phosphate amidotransferase (*gcaA*) จากเชื้อ *B. subtilis* 168 เมื่อทำการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ *gcaA* ใน *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pCSBC14 พบว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์นี้อยู่ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 นี้เป็นโคลนของยีน L-glutamine D-fructose-6-phosphate amidotransferase (*gcaA*) จากเชื้อ *B. subtilis* TISTR25 สำหรับการทำ Southern blot hybridization เพื่อติดตามยีน โปรตีเอสในจีโนมของ *B. subtilis* TISTR25 ยืนยันว่ายีนของทั้งนิวทรัล และแอลคาไลน์โปรตีเอสยังคงอยู่ในจีโนมของ *B. subtilis* TISTR25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

บทคัดย่อและบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เป็นของนิสิต

C826150 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: SEQUENCING/ L-glutamine D-fructose-6-phosphate amidotransferase (*gcaA*) gene/ *Bacillus subtilis* TISTR25

JARUNEE VANICHTANANKUL : CHARACTERIZATION OF THE DNA INSERT IN RECOMBINANT PLASMID pCSBC14. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. NAPA SIWARUNGSON, THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. VICHIEN RIMPHANITCHAYAKIT, Ph.D., 95 pp. ISBN 974-639-694-3

The recombinant plasmid pCSBC14, originally beleived to be a clone of protease gene, contains a 4.0 kb chromosomal DNA fragment of *B. subtilis* TISTR25 in pUC18. The pCSBC14 was digested with *Hin*dIII and *Eco*RI. Each of the 0.7, 0.9 and 1.6 kb fragment of pCSBC14 DNA insert was ligated to M13mp18 DNA vector and transformed into *E. coli* JM109. The 3 recombinant clones, comprising of 0.7, 0.9 and 1.6 kb insert fragments were named as mCSBC141, mCSBC142 and mCSBC143, respectively. The pCSBC14, mCSBC141, mCSBC142 and mCSBC143 were sequenced by dideoxynucleotide chain-termination method. The sequence of 2,308 bp in the 3′ side of the insert in pCSBC14 was determined. The sequence revealed an open reading frame of 1,803 bp, capable of encoding a protein of 600 amino acids. This gene was compared with the GenBank deposited DNA sequences using BLAST. It showed 86% identity to L-glutamine D-fructose-6-phosphate amidotransferase (*gcaA*) gene of *B. subtilis* 168. The activity of *gcaA* protein in *E. coli* DH5α harboring pCSBC14 was assayed and confirmed. Therefore, the pCSBC14 was a clone of *B. subtilis* TISTR25 L-glutamine D-fructose-6-phosphate amidotransferase (*gcaA*) gene. By using Southern blot hybridization assay; it was confirmed that the protease genes for both neutral and alkaline protease exist in the genome of *B. subtilis* TISTR25.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พระนครกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep gratitude and appreciation to Assist. Prof. Napa Siwarungson, my advisor and Assist. Prof. Dr. Vichien Rimphanitchayakit, my co-advisor for encouragement, suggestions, discussion, and helpful guidance throughout this research.

My appreciation is also expressed to Assist. Prof. Dr. Tipaporn Limpaseni and Assoc. Prof. Dr. Siriporn Sittipraneed for serving as thesis committee.

I would like to thanks Dr. Sirawut Klinbunga for helping discussion about phylogenetic tree.

I would like to thanks research assistant scholarship, Chulalongkorn university for supporting in my study.

I wish to extend my deepest gratitude to my whole family and Miss Onuma Songram who always give me warm love and understanding.

Finally, I wish to express my sincere thanks to all teachers and friends in the Department of Biochemistry and Biotechnology for their helps and friendship.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv
ENGLISH ABSTRACT v
ACKNOWLEDGMENT vi
CONTENTS vii
LIST OF TABLES ix
LIST OF FIGURES x
ABBREVIATIONS xii
CHAPTER 1 INTRODUCTION 1
CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS 5
2.1 Instruments 5
2.2 Supplies 6
2.3 Chemicals 6
2.4 Enzymes 7
2.5 Bacterial strains and plasmids 7
2.6 Alkaline extraction of plasmid DNA 8
2.7 Measurement of DNA concentration 8
2.8 Subcloning of DNA fragments from pCSBC14 into M13mp18 9
2.9 DNA sequencing 13
2.10 DNA sequence analysis 17
2.11 Assay of L-glutamine D-fructose-6-phosphate amidotransferase 18
2.12 Protein determination 19
2.13 Southern-blot hybridization analysis of *B. subtilis* TISTR25 chromosomal DNA with neutral and alkaline protease probes 20
CHAPTER 3 RESULT 26
3.1 Subcloning of DNA fragment from pCSBC14 26
3.2 DNA sequencing 30

Page

3.3 DNA sequence analysis..... 37
3.4 Assay of L-glutamine D-fructose-6-phosphate amidotransferase activity..... 53
3.5 Southern-blot hybridization analysis of *B. subtilis* TISTR25 chromosomal DNA with neutral and alkaline protease probes..... 55
CHAPTER 4 DISCUSSION..... 62
CHAPTER 5 CONCLUSION..... 66
REFERENCES..... 67
APPENDICES..... 70
BIOGRAPHY... 95

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

3.1 Amino acid composition of *B. subtilis* TISTR25 *gcaA* protein in comparison with *B. subtilis* 168 *gcaA* protein 46

3.2 Estimated genetic distances among nucleotide sequences of the *gcaA* gene from 8 organisms 49

3.3 Estimated genetic distances among amino acid sequences of the *gcaA* protein from 8 organisms 49

3.4 L-glutamine D-fructose-6-phosphate amidotransferase activity in cell extracts 54

3.5 An approximately size of digested *B. subtilis* TISTR25 fragment from the hybridization with neutral protease probe 60

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure Page

1.1 Restriction map of pCSBC14 3
1.2 Hexosamine biosynthetic pathway 4
2.1 Restriction map modification of pCSBC14 10
2.2 Manual use of NENSORB™ 20 Nucleic Acid Purification Cartridge 24
3.1 Ligation products of 3 DNA fragments, 0.7, 0.9 and 1.6 kb, from *Hin*dIII and *Eco*RI digestion of pCSBC14 into M13mp18 27
3.2 Determination of the insert fragments of 3 transformants 29
3.3 Automated DNA sequencing of pCSBC14 with forward primer 31
3.4 Automated DNA sequencing of pCSBC14 with reverse primer 31
3.5 Sequencing of mCSBC141 with forward primer 32
3.6 Sequencing of mCSBC141 with reverse primer 33
3.7 Sequencing of mCSBC142 with forward primer 34
3.8 Sequencing of mCSBC142 with reverse primer 35
3.9 Sequencing of mCSBC143 with forward primer 36
3.10 Sequencing orientation of individual clones 40
3.11 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *B. subtilis* TISTR25 *gcaA* gene 41
3.12 Percent identity of *B. subtilis* TISTR25 and *B. subtilis* 168 *gcaA* gene by BLAST comparison 42
3.13 Sequence alignment of *B. subtilis* TISTR25 and *B. subtilis* 168 *gcaA* gene by using ClastalX (1.64b) 43
3.14 Alignment of the predicted amino acid sequence of *B. subtilis* TISTR25 *gcaA* open reading frame with those of 7 organisms 47
3.15 A phylogenetic tree of the *gcaA* gene from *B. subtilis* TISTR25 and 7 organisms based on nucleotide sequence divergences 50
3.16 A phylogenetic tree of the *gcaA* protein from *B. subtilis* TISTR25 and 7 organisms based on amino acid sequence divergences 51

Figure Page

3.17 The predicted three-dimensional structure of the *gcaA* protein..... 52
3.18 Chromosomal DNA of *B. subtilis* TISTR25 56
3.19 Digestion of *B. subtilis* TISTR25 chromosomal DNA with 8 restriction endonuclease 57
3.20 Southern-blot hybridization analysis of digested *B. subtilis* TISTR25 chromosomal DNA with neutral protease probe 59
3.21 Southern-blot hybridization analysis of digested *B. subtilis* TISTR25 chromosomal DNA with alkaline protease probe..... 61

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

A	2′-deoxyadenosine (in a DNA sequence)
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
C	2′-deoxycytidine (in a DNA sequence)
°C	Degree celsius
Ci	Curie
cm	Centrimetre
dATP	2′-deoxyadenosine 5′-triphosphate
dCTP	2′-deoxycytidine 5′-triphosphate
ddATP	2′, 3′-dideoxyadenosine 5′-triphosphate
ddCTP	2′, 3′-dideoxycytidine 5′-triphosphate
ddGTP	2′, 3′-dideoxyguanosine 5′-triphosphate
ddNTP	2′, 3′-dideoxynucleoside 5′-triphosphate
ddTTP	2′, 3′-dideoxythymidine 5′-triphosphate
dGTP	2′-deoxyguanosine 5′-triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	2′-deoxynucleoside 5′-triphosphate
dTTP	2′-deoxythymidine 5′-triphosphate
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
G	2′-deoxyguanosine (in a DNA sequence)
IPTG	Isopropyl-thiogalactoside
kb	Kilobase
Lac	Lactose
LB	Luria-Bertani
µg	Microgram
µl	Microlitre
ml	Millilitre

mM	Millimolar
ng	Nanogram
OD	Optical density
PEG	Polyethylene glycol
RF	Replicative form
rpm	Revolution per minute
SDS	Sodium dodecyl sulphate
T	2′-deoxythymidine (in a DNA sequence)
TBE	Tris/borate electrophoresis (buffer)
TE	Tris/EDTA (buffer)
TEMED	*N, N, N′, N′*-tetramethylethylenediamine
Tris-HCl	Tris hydrochloride buffer
uv	Ultraviolet
v	Volume
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย