

การโคลนและการแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp.  
สายพันธุ์ 190-1 ใน *Streptomyces* spp.



นางสาว ยวดี ตาลาวนิช

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

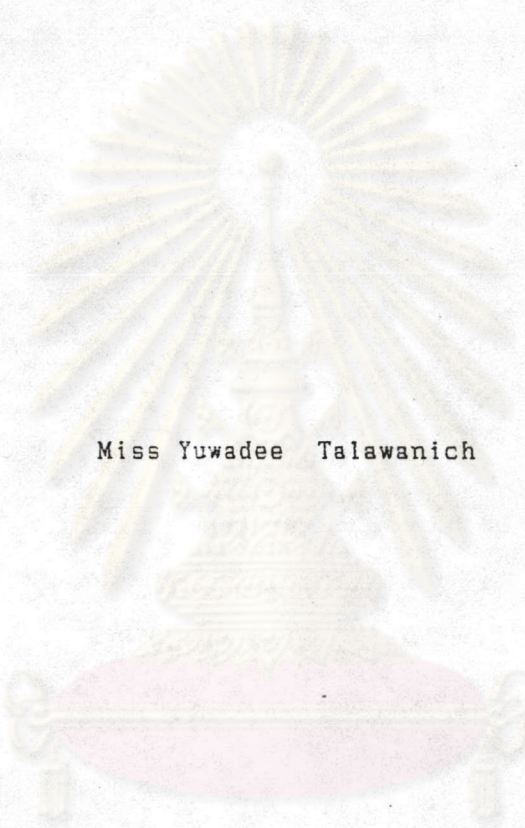
พ.ศ. 2537

ISBN 974-584-694-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17139910

Cloning and Expression of Glucose Isomerase gene from  
*Streptomyces* sp. strain 190-1 in *Streptomyces* spp.



Miss Yuwadee Talawanich

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-584-694-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนและการแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรส จาก  
Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ใน Streptomyces spp.

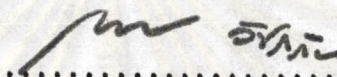
โดย นางสาว ยุวดี ตาลาวนิช

ภาควิชา จุลชีววิทยา

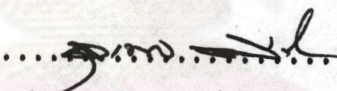
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

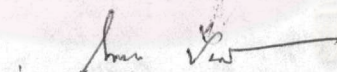



บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

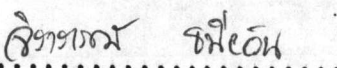
  
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วิชราชัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ อนิยวัน)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ อนิยวัน)

## C326195 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: Streptomyces / GLUCOSE ISOMERASE / GENE CLONING

YUWADEE TALAWANICH : CLONING AND EXPRESSION OF GLUCOSE ISOMERASE  
GENE FROM Streptomyces sp. STRAIN 190-1 IN Streptomyces spp.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 85 pp.

ISBN 974-584-694-5

Glucose isomerase gene from Streptomyces sp. 190-1 was cloned in Streptomyces lividans TK21 using pIJ4090 as a cloning vector. Transformants were selected by thiostrepton resistibility. Clones having glucose isomerase gene were detected by colony hybridization with DNA probe. The DNA probe was prepared by Polymerase Chain Reaction (PCR) using chromosomal DNA of Streptomyces sp. 190-1 as template. The 24-mer oligonucleotide deduced from amino acid sequence of the glucose isomerase from Streptomyces sp. 190-1 and 23-mer oligonucleotide synthesized from conserved sequence of glucose isomerase gene found in various microorganisms were used as primers. However, the DNA probe showed non-specific binding, hence, positive clones with glucose isomerase gene could not be detected by this technique.

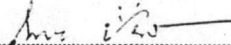
Plasmid pUR289, a recombinant plasmid containing glucose isomerase gene from Streptomyces sp. 190-1 cloned via E. coli system, was then used for subcloning. The 1.8 kb of DNA insert was ligated to pIJ4090 and transformed into Streptomyces sp. 190-1. The transformants were randomly checked for glucose isomerase activity. One clone, namely clone 19SL1, showed 2.15 units of glucose isomerase per mg of protein which was approximately 25% higher than that of Streptomyces sp. 190-1. Extraction of clone 19SL1 revealed the composition of 2 plasmids.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....

ลายมือชื่อนิสิต.....ยุวดี ภาคทวาร.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..........

ปีการศึกษา.....2536.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



พิมพ์ต้นฉบับบทความวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

ยวดี ตาลาวนิษฐ์ : การโคลนและการแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ใน Streptomyces spp. (CLONING AND EXPRESSION OF GLUCOSE ISOMERASE GENE FROM Streptomyces sp. STRAIN 190-1 IN Streptomyces spp.) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ไพเราะ ปันพานิชการ, 85 หน้า. ISBN 974-584-694-5

ได้ทำการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก Streptomyces sp. 190-1 เข้าสู่ Streptomyces lividans TK21 โดยใช้พลาสมิดพาหะ pIJ4090 คัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์โดยอาศัย การต้านยาปฏิชีวนะเทโอสเตรพตอน และโคลนดีไอบริโตเชียนกับดีเอ็นเอติดตามซึ่งเตรียมโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์โมลดีเอ็นเอของ Streptomyces sp. 190-1 เป็นแม่แบบ ที่มี 24-mer นิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยยึดตามลำดับกรดอะมิโนด้าน N-terminal ของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของ Streptomyces sp. 190-1 และ 23-mer นิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก conserved sequence ของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิดเป็น โพรเมอร์ จากการคัดเลือกพบว่าดีเอ็นเอติดตามไม่มีความจำเพาะ จึงไม่สามารถนำวิธีนี้มาคัดเลือก ทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่มียีนกลูโคสไอโซเมอเรสได้

จึงได้นำยีนกลูโคสไอโซเมอเรสที่อยู่บนพลาสมิด pUR289 ที่ประสบความสำเร็จจากการโคลน ในระบบ E. coli มาโคลนย่อยโดยเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pIJ4090 แล้วทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ Streptomyces sp. 190-1 นำทรานส์ฟอร์มแมนท์มาลุ่มตรวจแอกติวิตีจำเพาะของกลูโคสไอโซเมอเรส พบ 1 โคลนที่ให้แอกติวิตีสูงกว่า Streptomyces sp. 190-1 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านประมาณ 25% โดยมีแอกติวิตีเท่ากับ 2.15 หน่วย/มก. โปรตีน ให้ชื่อว่าโคลน 19SL1 และเมื่อสกัดพลาสมิดจากโคลน 19SL1 พบว่ามี 2 พลาสมิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา  
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม  
ปีการศึกษา.....2536

ลายมือชื่อนิสิต.....ยวดี ตาลาวนิษฐ์  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



### กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ บินพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณา ให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบ ให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Prof. D.A. Hopwood แห่ง John Innes Institute, Norwich, U.K. ที่กรุณาเอื้อเฟื้อจุลินทรีย์ *Streptomyces lividans* TK21 และ *S. lividans* TK24 ที่มีพลาสมิด pIJ4090 ขอขอบพระคุณ Dr. Iain S. Hunter แห่ง University of Glasgow, U.K. ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเรสเทรคชันเอนไซม์บางส่วน

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อให้ใช้เครื่องมือ PCR ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอติดตาม และคุณอรินทิพย์ ธรรมชัยนิเขต ที่ช่วยกรุณา สังเคราะห์ดีเอ็นเอติดตามที่ใช้ในการทดลองนี้

ขอขอบคุณ คุณรัชนี ไสยประจง ที่ให้เชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* HB101 ที่มี พลาสมิด pUR289 คุณป้าหนั้น เริงสำราญ ที่ช่วยฝึกสอน ให้ข้อมูลและคำปรึกษาใน การทำวิจัย

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ ทุกท่าน รวมทั้งพี่ เพื่อน และน้องทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และมูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์ โทเร ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัยบางส่วน โดยผ่าน รศ.ดร. ไพเราะ บินพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษา

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ และญาติๆ ทุกคนที่ได้ช่วยเหลือ สนับสนุนและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จอย่างสมบูรณ์

สารบัญ



	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญตาราง .....	ช
สารบัญรูป .....	ฅ
สัญลักษณ์และคำย่อ .....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ .....	1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย .....	11
3. ผลการวิจัย .....	28
4. วิเคราะห์และสรุปผลการวิจัย .....	57
เอกสารอ้างอิง .....	65
ภาคผนวก .....	73
ประวัติผู้เขียน .....	85

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	เปรียบเทียบระดับของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของเซลล์เจ้าบ้าน โดย เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวัดแอกติวิตี..... 29
2	ผลการสร้างและรีเจนเนอเรตโปรโตพลาสต์ของ <i>Streptomyces lividans</i> TK21 <i>Streptomyces</i> sp.Y1 และ <i>Streptomyces</i> sp.190-1..... 30
3	ประสิทธิภาพในการทรานส์ฟอร์มพลาสมิดาหะ pIJ4090 ที่ยังไม่ผ่านการตัด ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ของ <i>Streptomyces lividans</i> TK21 และ <i>Streptomyces</i> sp.Y1..... 32
4	ประสิทธิภาพการทรานส์ฟอร์มพลาสมิดาหะ pIJ4090 ที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วย เรสทริกชันเอนไซม์ เทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของ <i>Streptomyces lividans</i> TK21 และ <i>Streptomyces</i> sp. Y1... 38
5	ประสิทธิภาพการทรานส์ฟอร์มพลาสมิดาหะ pIJ4090 ที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วย เรสทริกชันเอนไซม์ เทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เชื่อมแบบปลายทู่หรือปลาย เหนียวเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของ <i>Streptomyces lividans</i> TK21 และ <i>Streptomyces</i> sp.190-1..... 50
6	เปรียบเทียบแอกติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส ที่จากโคลนที่สุ่มได้ โดยเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวัดแอกติวิตี ..... 51



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรัคโตส โดยเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส และการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส.....	2
2 ภาพแสดงการจัดเรียงยีนของ <i>xyI</i> operon ในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	8
3 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pIJ4090.....	9
4 ผลการย่อยโครโมโซมอลติเอ็นเอของ <i>Streptomyces</i> sp. 190-1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ หรือ <i>MboI</i> แบบกึ่งสมบูรณ์ (Partial Digestion)..	34
5 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pIJ4090 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>BamHI</i> .....	35
6 ภาพแสดงการตัดพลาสมิด pIJ4090 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>BamHI</i> แล้วทดสอบการเชื่อมกันด้วยตัวเอง (self ligation) หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟต และแสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมด้วย $T_4$ DNA ligase บนอะกาโรสเจล.....	36
7 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอติดตามโดยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	40
8 การทำโคโลนีไฮบริดเซชันของ <i>Streptomyces</i> sp.190-1 เซลล์เจ้าบ้านชนิดต่างๆ และทรานสเฟอร์แมนท์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างได้.....	41
9 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUR289.....	43
10 แผนภาพแสดงการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการเชื่อมแบบปลายทู่.....	45
11 ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้มีชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส โดยการเชื่อมแบบปลายทู่.....	46
12 แผนภาพแสดงการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการเชื่อมแบบปลายเหนียว..	47

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
13	ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้มีชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส โดยการ เชื่อมแบบปลายเหนียว.....	48
14	แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้จากทรานสฟอร์มแมนต์ต่างๆ.....	53
15	แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้จากโคลน 19SL1.....	54
16	ผลการตัดแถบดีเอ็นเอจากโคลน 19SL1 ด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> ...	55

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สัญลักษณ์และคำย่อ

มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ซม.	=	เซนติเมตร
%	=	เปอร์เซ็นต์
ตร.ซม.	=	ตารางเซนติเมตร
$\lambda_{DNA/HindIII}$	=	ดีเอ็นเอของแบคทีริโอเฟจ แลมด้า ( $\lambda$ ) ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ <i>HindIII</i>

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย