

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



203320



การผลิตรายของยีนที่เกี่ยวเนื่องในวิถีชีวสังเคราะห์

ของยีนราณิธยราณิธใน *Escherichia coli*

COEXPRESSION OF GENES INVOLVED IN GERANYLGERANIOL

BIOSYNTHETIC PATHWAY IN *ESCHERICHIA COLI*

นายอนุวิษณิธ กล้ารักษั

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

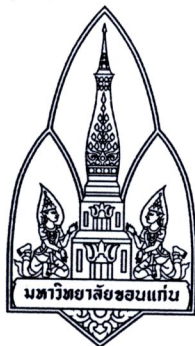
พ.ศ. 2553

๖๐๐๖๕๖๐๑๔

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



203320



การแสดงออกร่วมของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์

ของเจอร์านิลเจอร์านิลแอลใน *Escherichia coli*

COEXPRESSION OF GENES INVOLVED IN GERANYLGERANIOL

BIOSYNTHETIC PATHWAY IN *ESCHERICHIA COLI*



นายอนุวัชกิจ กล้ารักษ์

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2553

การแสดงออกร่วมของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์
ของเจอร์านิลเจอร์านีอลใน *Escherichia coli*

นายอนุวัชกิจ กล่ำรักษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

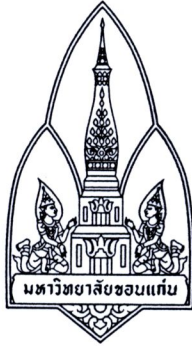
พ.ศ. 2553

**COEXPRESSION OF GENES INVOLVED IN GERANYLGERANIOL
BIOSYNTHETIC PATHWAY IN *ESCHERICHIA COLI***

MR. ANUWATCHAKIJ KLAMRAK

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF THE REQUIRMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2010



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
หลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ชื่อวิทยานิพนธ์: การแสดงออกร่วมของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ
เจอรานิลเจอรานีโอลใน *Escherichia coli*

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์: นายอนุวัชกิจ กล้ารักษ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์: รศ. ดร. วราภรณ์ ภูตะสุน

ประธานกรรมการ

รศ. ดร. วันชัย ดีเอกนามกุล

กรรมการ

ผศ. ดร. วรพรรณ สัทธิดาวร

กรรมการ

ดร. นาฏศจี นวลแก้ว

กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์:

..... นาคโค อาจารย์ที่ปรึกษา

(ดร. นาฏศจี นวลแก้ว)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย ดีเอกนามกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร. สุทิพา ธนพงศ์พัฒน์)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ลำปาง แม่นม้าย)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. บังอร ศรีพานิชกุลชัย)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น

อนุวัชกิจ กล้ารักษ์. 2553. การแสดงออกร่วมของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของเจอร์รานิล
เจอร์รานีโออลใน *Escherichia coli*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ดร.นาฏศิจี นวลแก้ว, ดร.สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์,
รศ. ดร.วันชัย ดีเอกนามกุล

บทคัดย่อ

203320

เจอร์รานิลเจอร์รานีโออล (GGOH) เป็นสารในกลุ่มพรีนิลแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด และเป็นสารตัวกลางสำคัญวิถีชีวสังเคราะห์ของเปลาโนทอล ซึ่งเป็นยาพิษฆ่าแมลงในกระเพาะอาหารที่ได้จากเปล่าน้อย (*Croton stellatopilosus* Ohba) ปัจจุบันการสังเคราะห์ GGOH ด้วยกระบวนการทางเคมีมักพบปัญหาสำคัญคือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นของผสม racemic mixture และการแสดงออกของยีน prenyl diphosphate phosphatase (PDPase) ใน *E. coli* BL21(DE3)RIL ไม่สามารถเพิ่มระดับการสร้าง GGOH ได้ จึงได้นำแนวทางการทำวิศวกรรมเมทาบอลิซึมเพิ่มระดับการสร้าง GGOH ใน *E. coli* BL21(DE3)RIPL โดยที่วิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH เกี่ยวข้องกับเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิดคือ geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน FPP เป็น GGPP จากนั้นเอนไซม์ prenyl diphosphate phosphatase (PDPase) เข้ามาตัดฟอสเฟตออกจาก GGPP ได้เป็น GGOH ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้เป็นการสร้างพลาสมิด pETDuet-1 ที่การแทรกสอดของยีน GGPPS และ PDPase และตรวจสอบการผลิต GGOH จากริคอมบิแนนท์ *E. coli* ด้วยเทคนิค HPLC โดยเปรียบเทียบกับโคลนที่มีการแสดงออกร่วมกับโคลนที่มีการแสดงออกของยีนเดียว จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/GGPPS/PDPase และพลาสมิด pETDuet/GGPPS มีการผลิตโปรตีนของยีน GGPPS ที่ขนาด 33 kDa แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน PDPase จากการศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์โดยดูความสามารถในการผลิต GGOH พบมีการสะสม GGOH ในริคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/GGPPS/PDPase และ pETDuet/GGPPS แต่กลับไม่พบการสะสม GGOH ในโคลนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน GGPPS เพียงอย่างเดียว ในขณะที่การเติมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 2% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สามารถเพิ่มระดับการสร้าง GGOH ได้ ส่งผลให้ริคอมบิแนนท์ *E. coli* มีค่าชีวมวลสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/GGPPS/PDPase มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับโคลนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน GGPPS หรือ PDPase เพียงอย่างเดียว

Anuwachakij Klamrak. 2010. **Coexpression of Genes Involved in Geranylgeraniol Biosynthetic Pathway in *Escherichia coli***. Master of Science Thesis in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Dr. Natsajee Nualkaew,

Dr. Sutipa Tanapongpipat,

Assoc. Prof. Dr. Wanchai De-Eknamkul

ABSTRACT

203320

Geranylgeraniol (GGOH) is a potent apoptotic inducer in various cancer cells line. It is the only intermediate of biosynthetic pathway of plaunotol, an anti ulcer drug from *Croton stellatopilosus*. Previous work on the cloning of prenyl diphosphate phosphatase (PDPase) showed low yield of terpenoid mixture produced by the host cells. To overcome this problem, the pathway engineering was used to reconstruct the biosynthetic pathway in *E. coli* BL21(DE3)RIPL, in order to increase GGOH accumulation. In doing this, recombinant plasmid pETDuet-1 harboring two genes encoding two enzymes involved in GGOH biosynthetic pathway was constructed. The first enzyme is geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) which catalyses formation of GGPP and the second one is prenyl diphosphate phosphatase (PDPase) which catalyses dephosphorylation of GGPP to form GGOH. Here we describe construction of the vector for coexpression of the 2 genes (*GGPPS* and *PDPase*), follow by detection of GGOH as its phenotype of the coexpression in comparison with single gene expression in *E. coli*. SDS-PAGE analysis revealed that *E. coli* cells harboring the plasmid pETDuet/*GGPPS/PDPase* and pETDuet/*GGPPS* could express *GGPPS* as a protein product with of about 33 kDa, whereas the expression of *PDPase* gene was not detected. HPLC analysis revealed that GGOH was accumulated in *E. coli* cells harboring coexpression vector and single gene *GGPPS*, but not *PDPase* alone. Feeding medium with 2% glycerol does not enhance GGOH production. On the other hand, biomass of recombinant *E. coli* was significantly increased. In addition, the growth rate of *E. coli* cells bearing the plasmid pETDuet/*GGPPS/PDPase* was significantly decreased as compared to that parental strain.

งานวิทยานิพนธ์นี้ขอมอบให้แด่บิดามารดาและคณาจารย์ทุกท่าน

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. นาฏจรี นวลแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และปลูกฝังแนวคิดที่ดีในการทำวิจัย และช่วยอบรมให้ข้าพเจ้ามีความรับผิดชอบ ตลอดจนให้กำลังใจมาโดยตลอดจนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้โอกาสข้าพเจ้าได้ทำวิจัยส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเอนไซม์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ตลอดจนปลูกฝังความรู้ และคอยให้กำลังใจจนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. วันชัย คีเอนนามกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมสำหรับคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยและการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สมศักดิ์ นวลแก้ว คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่กรุณาเอื้อเฟื้อคอดัมน์ของเครื่อง HPLC เพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเครื่องผลิตคลื่นความถี่สูง (Sonicator) เพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพีระดา พรหมคอนกอย และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเอนไซม์ที่เสียสละเวลาอันมีค่าและให้ความรู้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคทางด้านอนุชีววิทยา ตลอดจนให้กำลังใจจนกระทั่งการทำวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์บริการทางวิชาการและวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ

ขอกราบขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ทุนวิจัยมหบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สัญญาเลขที่ MRG-WII505S037) และทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสมบุญ และคุณแม่บุญปลูก กล้ารักษ์ รวมทั้งสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนค่าเล่าเรียน ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณทุกท่าน ทั้งที่ได้กล่าวนามและไม่ได้กล่าวนามอีกครั้งหนึ่งไว้ ณ ที่นี้ด้วย

อนุวัชกิจ กล้ารักษ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
คำอุทิศ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1. วิถีชีวิตสังเคราะห์ของสารประกอบเทอร์ปีน	4
2. วิถีชีวิตสังเคราะห์ของสารประกอบเทอร์ปีนใน <i>Escherichia coli</i>	5
3. แนวทางการทำวิศวกรรมเมตาบอลิกเพื่อเพิ่มระดับการสร้างสารเทอร์ปีนอยด์	6
4. ปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนในระบบ <i>E. coli</i>	21
5. การเพิ่มระดับการสร้างสารทุติยภูมิโดยการใช้กลีเซอรอล (glycerol) เป็นแหล่งของคาร์บอน	25
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	26
1. สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการวิจัย	26
2. สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์	26
3. โปรแกรมชีวสารสนเทศส์ (Bioinformatics)	29
4. ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	29
บทที่ 4 ผลการทดลอง	41
1. การสกัด Total RNA จากใบเปปเปอร์มินต์	41
2. การสร้างพลาสมิด pETDuet-1 vector ที่มีการแทรกสอดของยีน <i>GGPPS</i>	42
3. การสร้างพลาสมิด pETDuet-1 vector ที่มีการแทรกสอดของยีน <i>PDPase</i>	47
4. การสร้างพลาสมิด pETDuet-1 vector ที่มีการแทรกสอดของยีน <i>GGPPS</i> และ <i>PDPase</i>	51

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5. การแสดงออกของยีนใน <i>E. coli</i> BL21(DE3)RIPL	52
6. การวิเคราะห์ปริมาณ GGOH จากरिकอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH	54
7. ผลของการเติมกลีเซอรอลลงในเซลล์เพาะเลี้ยงของरिकอมบิแนนท์ <i>E. coli</i>	56
8. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของरिकอมบิแนนท์ <i>E. coli</i>	57
9. การเจริญเติบโตของरिकอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ในอาหารเหลวที่มีการเติมกลีเซอรอล	58
10. ผลการเปลี่ยนแปลงค่าชีวมวลของरिकอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ในอาหารที่มีกลีเซอรอล	59
บทที่ 5 วิจัยผลการศึกษาทดลอง	60
1. การสร้างพลาสมิด pETDuet-1 ที่มีการแทรกสอดของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH	60
2. การแสดงออกของยีน GGPPS และ PDPase ใน <i>E. coli</i> BL21(DE3)RIPL	61
3. การเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของยีน PDPase	63
4. การผลิต GGOH ในरिकอมบิแนนท์ <i>E. coli</i>	66
5. ผลของกลีเซอรอลต่อการสร้าง GGOH ในरिकอมบิแนนท์ <i>E. coli</i>	67
6. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของरिकอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH	68
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาทดลอง	69
เอกสารอ้างอิง	71
ภาคผนวก	79
ภาคผนวก ก รายละเอียดเพิ่มเติมของการศึกษา	80
ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงานวิทยานิพนธ์	85

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของแคโรทีนอยด์ใน <i>E. coli</i> ผ่านการเพิ่มการสร้าง GGPP	15
ตารางที่ 2.2 การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของแคโรทีนอยด์ในยีสต์ ผ่านการเพิ่มการสร้าง GGPP	16
ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย	26
ตารางที่ 5.1 ผลการวิเคราะห์การใช้โคดอนของยีน <i>PDPase</i> ด้วยโปรแกรม ACUA	62
ตารางที่ 5.2 ผลการวิเคราะห์การใช้โคดอนของยีน <i>GGPPS</i> ด้วยโปรแกรม ACUA	63

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 วิธีชีวสังเคราะห์ของ GGOH ใน <i>C. stellatopilosus</i> Ohba	2
รูปที่ 2.1 แสดงวิธีชีวสังเคราะห์สารในกลุ่มเทอร์ปีนแบบ MVA และ DXP	5
รูปที่ 2.2 แสดงปริมาณ GGPP ที่ตรวจวัดได้จากกริคอมบีแนนท์ <i>E. coli</i> ที่ผ่าน การทำวิศวกรรมเมตาบอลิกโดยเพิ่มการแสดงออกของยีน <i>GGPPS</i>	6
รูปที่ 2.3 การทำวิศวกรรมเมตาบอลิกเพื่อเพิ่มระดับการสร้าง GGPP ใน <i>E. coli</i>	7
รูปที่ 2.4 การทำโคทรานส์ฟอร์มชันของยีน 4 ชนิดใน <i>E. coli</i>	8
รูปที่ 2.5 การแสดงออกร่วมของยีนแบบ Single vector, single RNA transcript ใน <i>E. coli</i>	9
รูปที่ 2.6 การแสดงออกร่วมของยีนแบบ Single vector, multi RNA transcript ใน <i>E. coli</i>	10
รูปที่ 2.7 การทำวิศวกรรมเมตาบอลิกของฟีนิลแอลกอฮอล์ใน <i>S. cerevisiae</i>	11
รูปที่ 2.8 แสดงแนวทางการทำวิศวกรรมเมตาบอลิกของ GGOH ใน <i>S. cerevisiae</i>	11
รูปที่ 2.9 การผลิต GGOH ใน <i>E. coli</i> โดยใช้การแสดงออกร่วมของยีน <i>idi</i> และ <i>GGPPS</i> (<i>IspAm*</i>) และเอนไซม์ Alkaline phosphatase	12
รูปที่ 2.10 แนวทางการผลิตฟีนิลแอลกอฮอล์โดยใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์ ent-kaurene synthase, phytoene synthase และ squalene synthase	13
รูปที่ 2.11 แสดงแนวทางการทำวิศวกรรมเมตาบอลิกของแคโรทีนอยด์ในจุลินทรีย์	14
รูปที่ 2.12 แสดงการทำวิศวกรรมเมตาบอลิกของ taxadiene ใน <i>E. coli</i> โดยใช้ การแสดงออกร่วมของยีน <i>dxs</i> (1), <i>idi</i> (2), <i>GGPPS</i> (3) และ <i>TDS</i> (4)	17
รูปที่ 2.13 แสดงการทำวิศวกรรมเมตาบอลิกของ taxadiene ใน <i>S. cerevisiae</i> โดยอาศัยการแสดงออกร่วมของยีน <i>HMG1</i> (HMG-CoA reductase), <i>GGPPS</i> และ <i>TDS</i>	17
รูปที่ 2.14 แสดงการทำวิศวกรรมเมตาบอลิกของ artemisinic acid ใน <i>S. cerevisiae</i>	19
รูปที่ 2.15 แสดงการทำวิศวกรรมเมตาบอลิกของ amorphadiene ใน <i>E. coli</i>	20

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 2.16 แสดงการทำวิสกรรมเมทาบอลิกของ tocotrienol ในรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> โดยใช้การแสดงออกร่วมของยีน <i>GGPPS</i> และยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ Tocotrienol	21
รูปที่ 2.17 แสดงแผนที่ของพลาสมิด pRARE ที่มีการแสดงออกของ rare codon	22
รูปที่ 2.18 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของยีน monoterpene และ diterpene synthase	24
รูปที่ 2.19 แสดงวิธีการสลายกลีเซอรอลใน <i>E. coli</i>	25
รูปที่ 4.1 แสดงการตรวจสอบคุณภาพของ Total RNA ที่ได้จากปลั้นน้อยด้วยเทคนิคฟอร์มอลดีไฮด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	41
รูปที่ 4.2 แสดงการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของยีน <i>GGPPS</i> ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	42
รูปที่ 4.3 แสดงแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i>	43
รูปที่ 4.4 แสดงแผนที่ของพลาสมิด pTZ57R/T/ <i>GGPPS</i>	44
รูปที่ 4.5 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ truncate ของยีน <i>GGPPS</i> ,	45
รูปที่ 4.6 แสดงแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ <i>BamHI</i> และ <i>SalI</i>	46
รูปที่ 4.7 แสดงแผนที่ของพลาสมิด pETDuet/ <i>GGPPS</i>	46
รูปที่ 4.8 แสดงแถบ DNA ของยีน truncate <i>PDPase</i> ที่ได้จากการทำ PCR	47
รูปที่ 4.9 แสดงแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ <i>NdeI</i> และ <i>EcoRV</i>	48
รูปที่ 4.10 แสดงแผนที่ของพลาสมิด pTZ57R/T/ <i>PDPase</i>	49
รูปที่ 4.11 แสดงแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ <i>NdeI</i> และ <i>EcoRV</i>	50
รูปที่ 4.12 แสดงแผนที่ของพลาสมิด pETDuet/ <i>PDPase</i>	50
รูปที่ 4.13 แสดงแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamHI</i> และ <i>EcoRV</i>	51
รูปที่ 4.14 แสดงแผนที่พลาสมิด pETDuet/ <i>GGPPS/PDPase</i>	52
รูปที่ 4.15 แสดงผลการทำ SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>GGPPS</i>	53

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4.16 แสดงผลการทำ SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>GGPPS</i> และ <i>PDPase</i>	54
รูปที่ 4.17 แสดง HPLC chromatogram ของริคอมบิแนนท์ ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนใน วิธีชีวสังเคราะห์ของ GGOH	55
รูปที่ 4.18 กราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบปริมาณ GGOH จาก <i>E. coli</i> BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิธีชีวสังเคราะห์ของ GGOH	56
รูปที่ 4.19 กราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบปริมาณ GGOH จาก <i>E. coli</i> BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิธีชีวสังเคราะห์ของ GGOH ที่ผ่านการทำ feeding ของกลีเซอรอล	56
รูปที่ 4.20 อัตราการเจริญเติบโตของริคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิธีชีวสังเคราะห์ของ GGOH	57
รูปที่ 4.21 อัตราการเจริญเติบโตของริคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ในอาหารเหลว LB ที่มีกลีเซอรอล	58
รูปที่ 4.22 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าชีวมวลของริคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ในอาหารเหลวสูตรต่างๆ	59
รูปที่ 5.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ทำนายการเกิด โครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA	64
รูปที่ 5.2 แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของยีน <i>PDPase</i> ที่เกิดจากการจับของ ribosome binding site กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>PDPase</i> ในตำแหน่ง 49 ถึง 53	64
รูปที่ 5.3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ใช้ทำนายการเกิด โครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA ที่ผ่านการทำ mutation	65
รูปที่ 5.4 แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของยีน <i>PDPase</i> ที่ผ่านการทำ site directed mutagenesis	68
รูปที่ 5.5 แผนภูมิแสดงสมมติฐานของวิธีการสลายกลีเซอรอลในริคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิธีชีวสังเคราะห์ของ GGOH	68

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

%	ร้อยละ
% v/v	ร้อยละปริมาตรต่อปริมาตร
% w/v	ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร
$^{\circ}\text{C}$	องศาเซลเซียส
ADS	Amorphadiene synthase
bp	คู่เบส
<i>CrtB</i>	Phytoene synthase
<i>CrtE</i>	Geranylgeranyl diphosphate synthase
<i>CrtI</i>	Phytoene desaturase
<i>CrtW</i>	β -Carotene ketolases
<i>CrtZ</i>	Carotene hydroxylase
DMAPP	Dimethylallyl pyrophosphate
DNA	ดีเอ็นเอ
DPP1	Diacylglycerol pyrophosphate phosphatase
DXP	Deoxyxylulose-5-phosphate pathway
DXS	Deoxyxylulose-5-phosphate synthase
FOH	Farnesol
FPP	Farnesyl diphosphate
G3-P	Glyceraldehyde 3-phosphate
GGOH	Geranylgeraniol
GPP	Geranyl diphosphate
GGPP	Geranylgeranyl diphosphate
GPSS	Geranyl diphosphate synthase
g	กรัม
g/L	กรัมต่อลิตร
GGPPS	Geranylgeranyl diphosphate synthase

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

HMGR	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase
IDI	Isopentenyl diphosphate isomerase
IPP	Isopentenyl diphosphate
<i>IspA</i>	Farnesyl diphosphate synthase
<i>IspB</i>	Octaprenyl diphosphate synthase
<i>IspC</i>	Deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase
<i>IspD</i>	4-diphosphocytidyl 2C-methyl-D-erythritol synthase
<i>IspE</i>	4-diphosphocytidyl 2C-methyl-derythritol kinase
<i>IspF</i>	2C-methyl-D-erythritol 2, 4-cyclodiphosphate synthase
<i>IspG</i>	4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate synthase
<i>IspH</i>	4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate synthase reductase
kDa	กิโลดาลตัน
Kkal/mol	กิโลแคลอรีต่อ โมล
MCS	Multiple cloning site
L	ลิตร
mg	มิลลิกรัม
mL	มิลลิลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
mg/mL	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ml/min	มิลลิลิตรต่อนาที
mRNA	เอ็มอาร์เอ็นเอ
tRNA	Transfer RNA
MVA	Mevalonate pathway
nm	นาโนเมตร
OD	Optical density
PCR	Polymerase chain reaction
PDPase	Prenyl diphosphate phosphatase

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

RNA	อาร์เอ็นเอ
rpm	รอบต่อนาที
rRNA	ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SQS	Squalene synthase
TDS	Taxadiene synthase
TIR	Transcription initiation region
Tm	Melting temperature
U/ μ l	ยูนิตต่อไมโครลิตร
μ g/L	ไมโครกรัมต่อลิตร
μ g/mL	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
μ l	ไมโครลิตร
μ M	ไมโครโมลาร์