175041

Streptomyces rimosus R7 ผลิตสารต้านเชื้อรา rimocidin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม polyene สังเคราะห์จากเอนไซม์ Type I Polyketide Synthase (Type I PKS) ศึกษากลุ่มยีน Type I PKS นี้โดยการโคลนยีน Type I PKS จากพลาสมิด pATT404 โดยใช้โดเมน ketoacyl synthase (KS) เป็นโพรบ สามารถโคลนยีนขนาด 8 กิโลเบสได้ เมื่อ subclone ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส ให้ชื่อว่า pATT702 เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่าเป็นส่วนของยีน Type I PKS จึงนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย โคลนเข้าพลาสมิด pSET151 ให้ชื่อว่า pATT709 แล้วทำยีนดิสรัปชันโดยนำเข้าสู่ *S. rimosus* R7 ด้วยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุลกับ *Escherichia coli* ET12567 (pUZ8002) พบว่าได้สายพันธุ์กลาย *S. rimosus* ATT709 ซึ่งสร้างสารต้านเชื้อราต่อ *Aspergillus niger* ได้น้อยลงมาก เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR ยีน *tsr* และชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายยืนยันว่าพลาสมิด pATT709 แทรกเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของ *S. rimosus* R7 นำสายพันธุ์กลายและ wild type ที่เลี้ยงในอาหาร SPG มาสกัดสารและตรวจสอบโดยวิธี Thin-Layer-Chromatography (TLC) โดยใช้ตัวพาคือ n-butanol: acetic acid: H_2O (4:5:1) แล้วทำ Bioautography เททับด้วยสปอร์ของ *A. niger* พบว่าเกิดวงใสบริเวณที่เป็นสารสกัดจากเส้นใยของ wild type แต่ไม่พบวงใสจากสายพันธุ์กลาย เมื่อนำสารสกัดจากเส้นใยของสายพันธุ์กลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่าให้ค่า λmax ที่ 255, 260 และ 266 นาโนเมตร ซึ่งแตกต่างจาก rimocidin เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Southern blot hybridization พบว่ามีการแทรกของพลาสมิด pATT709 เข้าไปในโครโมโซม ทำให้โคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.7 กิโลเบส ซึ่งครอบคลุมบริเวณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายและบริเวณถัดไป พบว่าประกอบด้วยโดเมนเรียงตามลำดับคือ ketoreductase (KR), acyl transferse (AT), KS, acyl carrier protein (ACP) และ KR โดยโดเมน AT มีความจำเพาะต่อ malonyl-CoA โดเมนทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่ม polyene เมื่อวิเคราะห์ด้วย Phylogenetic tree และน่าจะอยู่ในช่วงโมดูลที่ 8 และ 9 ของ rimocidin synthase (RMS) ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ rimocidin

Streptomyces rimosus R7 produces an anti-fungal antibiotic, rimocidin. This polyene antibiotic is synthesized by Type I polyketide synthase (Type I PKS). This gene cluster was studied by cloning part of Type I PKS gene from pATT404 using ketoacyl synthase (KS) domain as a probe. An 8 kb DNA fragment was cloned and subsequently a 3.3 kb fragment was subcloned and analyzed. DNA sequence revealed that fragment composed of Type I PKS gene. Therefore, the 3.3 kb fragment was used as a DNA target and cloned into a mobilizable plasmid, pSET151, designated as pATT709. pATT709 was transformed into *Escherichia coli* ET12567 (pUZ8002) and used as a donor for performing intergeneric conjugation with *S. rimosus* R7 as a recipient. A disruptant, *S. rimosus* ATT709, was obtained and showed less anti-fungal activity against *Aspergillus niger*. The integration of pATT709 was confirmed by PCR of the DNA target and *tsr* gene. Mutant and wild type were grown in SPG medium and were extracted and determined by Thin-Layer-Chromatography (TLC) using n-butanol: acetic acid: H_2O (4:5:1) as a mobile phase. Bioautography showed clear zone against *A. niger* only in the extract from wild type. Spectrophotometry of the extract from the mutant indicated λmax at 255, 260 and 318 nm which are different from rimocidin. A 5.7 kb fragment was cloned from the result of Southern hybridization which contains the 3.3 kb DNA target and the adjacent DNA which orderly consists of ketoreductase (KR), acyl transferse (AT), KS, acyl carrier protein (ACP) and KR domains. Analysis of AT domain revealed specificity to malonyl-CoA. Phylogenetic analysis suggested that the 5.7 kb fragment corresponds to module 8 and 9 of rimocidin synthase (RMS) and is responsible for rimocidin production in *S. rimosus* R7.