ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246164

MRG4780019 ผศ.ดร. นงพงา คุณจักร

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดขนาดเล็กจาก *Lactobacillus* sp. ที่มีบทบาทในอาหารหมักของไทยและการศึกษายีนที่ต้านทานโลหะหนัก

Sequence Analysis of a Small Plasmid from *Lactobacillus* sp., a Starter Culture Used in Thai Fermented Food and Isolation of Metal Resistance Gene

โดยนางสาวนงพงา คุณจักร

และ

นายวิเชียร ลีลาวัชรมาศ

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ : 3 พฤศจิกายน 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดขนาดเล็กจาก *Lactobacillus* sp. ที่มีบทบาทในอาหารหมักของไทยและการศึกษายีนที่ต้านทานโลหะหนัก

Sequence Analysis of a Small Plasmid from *Lactobacillus* sp., a Starter Culture Used in Thai Fermented Food and Isolation of Metal Resistance Gene

โดยนางสาวนงพงา คุณจักร

และ

นายวิเชียร ลีลาวัชรมาศ

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ : 3 พฤศจิกายน 2553

b0025168A

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246164

สัญญาเลขที่ MRG4780019

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดขนาดเล็กจาก *Lactobacillus* sp. ที่มีบทบาทในอาหารหมักของไทยและการศึกษายีนที่ต้านทานโลหะหนัก

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. นางสาวนงพงา คุณจักร	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
2. นายวิเชียร ลีลาวัชรมาศ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และสกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทางผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย ที่ได้ให้โอกาสและสนับสนุนเงินทุนวิจัยเป็นระยะเวลา 2 ปี ขอขอบคุณ รศ.ดร. วิเชียร ลีลาวัชรมาศ อาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นักวิจัยที่ปรึกษาโครงการ Prof. Noel Dunn และ Dr. Liu C.-Q. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยนิวเซาท์เวลส์ ประเทศออสเตรเลีย ที่ได้ให้ความรู้และให้แนวทางในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆ

รหัสโครงการ : MRG4780019

ชื่อโครงการ : การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดขนาดเล็กจาก *Lactobacillus* sp. ที่มีบทบทบาทในอาหารหมักของไทยและการศึกษายีนที่ต้านทานโลหะหนัก

ชื่อนักวิจัย : นางสาวนงพงา คุณจักร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

E-mail Address : naongpanga.khu@kmutt.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

Abstract

246164

The aim of this work was to isolate a small cryptic plasmid from Lactobacillus isolated from food samples to be used as a food grade cloning vector for Lactobacilli and related strains. Metal resistance determinants, such as nickel, copper and cadmium from lactic acid bacteria were also studied in order to use those resistance genes as food grade selection markers to replace antibiotic resistance markers. A total of 174 *Lactobacillus* strains were isolated from food samples. One isolate from Nham identified as *Lactobacillus plantarum* (designated *L. plantarum* KM1) was chosen as it contains small plasmid. A small 3-กิโลเบส plasmid namely pKM1 was isolated from *L. platarum* KM 1 for sequencing. Sequence analysis revealed two open reading frames (ORFs). The deduced amino acid sequence encoded by ORF1 and ORF2 showed high degrees of sequence homology to the Mob and Rep proteins, respectively, of a numbers of rolling circle plasmids from lactic acid bacteria such as pLC88, pRS4, pF8801, pWCFS101 and pRS4. Two conserved sequences of *dso* (double strand origin) and *sso* (single strand origin) characteristic of rolling circle plasmid were also identified upstream of ORF2. Therefore, pKM1 from *L. plantarun* KM1 could be classified as rolling circle type plasmid that can be used to construct a cloning vector for Lactobacilli. Screening of metal ion resistance lactic acid bacteria was carried out and the results showed that 61, 45 and 12 isolates could resistance to copper sulfate, nickel sulfate and cadmium chloride to up to 20, 200 and 1 mM, respectively. Plasmid curing using novobiocin and high temperature was failed to identify plasmid harboring metal resistance determinants. The genes responsible for cadmium resistance therefore were identified by PCR using primers specific to *cadA* gene. About 600 bp PCR products were obtained and subjected to direct sequencing analysis. A homology search reveàled sequence similarity to *cadA* gene on plasmids pGdh 442, pNP40, pAH82, pAG6, pND302 and pLI100 from a number of lactic acid bacteria. Southern hybridization *cadA* specific probe was carried out to localize cadmium resistance determinants plasmids. Positive signals were detected from 3 isolates C53, V13 and NU1.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, cadmium resistance, rolling circle plasmid, Mob and RepA proteins, plasmid curing

บทคัดย่อ

246164

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแยกพลาสมิดขนาดเล็กจากเชื้อ Lactobacillus ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารเพื่อนำมาพัฒนาใช้เป็นเวคเตอร์ชนิดที่เป็น food grade ที่ใช้ในการโคลนยีนสำหรับเชื้อ Lactobacillus และเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียง นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษายีนที่ควบคุมการต้านทานโลหะหนักจากแบคทีเรียแลคติก เพื่อนำมาใช้เป็นยีน selection markers ทดแทนยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ ได้ทำการแยกเชื้อ Lactobacillus จากตัวอย่างอาหารได้ 174 ไอโซเลต จากการศึกษารูปแบบของพลาสมิด (plasmid profile) ได้เลือกเชื้อที่มีพลาสมิดขนาดเล็กซึ่งแยกได้จากแหนม และจัดจำแนกเชื้อได้เป็น *Lactobacillus plantarum* โดยให้ชื่อว่า *L. plantarum* KM1 ทำการแยกพลาสมิดขนาดประมาณ 3.0 กิโลเบส และให้ชื่อพลาสมิดว่า pKM1 จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบ open reading frame 2 ชนิด ซึ่งเมื่อศึกษาลำดับกรดอะมิโนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ORF1 และ ORF2 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายโปรตีน mobilization (Mob) และ replication (RepA) ตามลำดับ โดยมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีนที่พบบนพลาสมิดที่มีการจำลองตัวแบบ rolling circle จากแบคทีเรียแลคติกหลายชนิดเช่น พลาสมิด pLC88, pRS4, pF8801, pWCFS101 และ pRS4 นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งที่เรียกว่า double strand origin (*dso*) และ single stand origin (*sso*) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของพลาสมิดที่มีการจำลองตัวเองแบบ rolling circle ดังนั้นพลาสมิด pKM1 จึงจัดเป็นพลาสมิดชนิด rolling circle และจากการที่พลาสมิด pKM1 มีตำแหน่งที่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถใช้ในการตัดต่อยีนได้จึงสามารถนำมาพัฒนาสร้างเป็นเวคเตอร์สำหรับการโคลนยีนสำหรับ Lactobacillus ได้

จากการคัดเลือกเชื้อที่ต้านทานโลหะหนักพบเชื้อสามารถต้านทานนิกเกิล 20 mM คอปเปอร์ 200 mM และแคดเมียม 1 mM จำนวน 61, 45 และ12 ไอโซเลต ตามลำดับ การทำ plasmid curing โดยใช้สาร novobiocin ร่วมกับการใช้อุณหภูมิสูงไม่สามารถแยกชิ้นพลาสมิดที่มียีนควบคุมการต้านทานโลหะหนักได้ การศึกษายีนต้านทานแคดเมียมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *cadA* ซึ่งควบคุมการต้านทานแคดเมียมพบว่าสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 600 คู่เบส จากการใช้พลาสมิดและโครโมโซมเป็นแม่แบบ และจากการศึกษาลำดับเบสบนผลลผลิต PCR พบว่าคล้ายกับยีน *cadA* บนพลาสมิดหลายชนิดจากแบคทีเรียแลคติก ได้แก่พลาสมิด pGdh 442, pNP40, pAH82, pAG6, pND302 และ pLI100 การหาชิ้นของพลาสมิดที่มียีนควบคุมการต้านทานแคดเมียมโดยวิธี Southern hybridization โดยใช้โพรบที่จำเพาะกับยีน *cadA* และ *cadC* พบพลาสมิดจากเชื้อ V13, C53 และ NU1 ที่มียีนต้านทานแคดเมียมคล้ายกับยีน *cadA*

คำสำคัญ: *Lactobacillus plantarum*, การต้านทานแคดเมียม, พลาสมิด rolling circle, โปรตีน Mob และ RepA, plasmid curing

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ....4
บทคัดย่อภาษาไทย....5
กิตติกรรมประกาศ....3
สารบัญ....6
สารบัญตาราง....7
สารบัญภาพ....8
บทที่ 1 บทนำ....9
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย....11
บทที่ 2 การทบทวนเอกสาร....12
บทที่ 3 วิธีการทดลอง....14
3.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. จากตัวอย่างอาหาร....14
3.2 การศึกษา plasmid profile ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้....14
3.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกโดยใช้ API 50CHL kit และ16S rDNA sequencing....14
3.4 ทดสอบความเสถียร (stability) ของพลาสมิดโดยการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เหมาะสม....15
3.5 การแยกพลาสมิดขนาดที่ต้องการออกจากพลาสมิดอื่นๆ....15
3.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่แยกได้....15
3.7 การทดสอบการต้านทานโลหะหนัก....15
3.8 การแยกยีนต้านทานแคดเมียมบางส่วนจากพลาสมิดโดยวิธี Polymerase Chain Reaction....16
3.9 Southern Hybridization....16
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์....17
4.1 การแยกแบคทีเรียแลคติกและการศึกษารูปแบบของพลาสมิดของเชื้อ....17
4.2 การจัดจำแนกเชื้อรหัส KM1 และ SV12....18
4.3 การศึกษาความคงตัวของพลาสมิดของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KM1....19
4.4 ลักษณะยีนที่อยู่บนพลาสมิด pKM1....20
4.5 การทดสอบการต้านทานคอปเปอร์ นิกเกิลและแคดเมียมของแบคทีเรียแลคติก....25
4.6 การตรวจสอบพลาสมิดของแบคทีเรียแลคติกที่ต้านทานโลหะหนัก....28
4.7 การศึกษาตำแหน่งของยีนที่ต้านทานนิกเกิลโดยวิธี plasmid curing....30
4.8 การศึกษาตำแหน่งของยีนต้านทานแคดเมียมโดยเทคนิค PCR....32
4.9 การทำ hybridization ของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถต้านทานแคดเมียมได้....36
สรุปผลการทดลอง....38
เอกสารอ้างอิง....39

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แสดงรหัสเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากนมแพะและตัวอย่างอาหารที่ให้ผลผลิต PCR ของยีนที่ควบคุมการต้านทานแคดเมียม.....33

2 แสดงสายพันธุ์แบคทีเรียที่มียีน *cadA* คล้ายกับยีนในแบคทีเรียแลคติก รหัส C53 และ NU1 34

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	Plasmid profiles ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่แยกจากผลิภัณฑ์เนื้อหมัก (A) และผักดอง (B)	17
2	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์1,476 คู่เบสของยีน 16S rRNA จากเชื้อรหัส KM1 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ *Lactobacillus plantarum*	19
3	Plasmid profile ของ *Lactobacillus plantarum* KM1	20
4	แผนที่พลาสมิด pKM 1 ขนาดประมาณ 3300 คู่เบสจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KM1	20
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 3,311 คู่เบส ของพลาสมิด pKM 1	21
6	แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน RepA ของพลาสมิด pKM1 กับโปรตีน RepA ของพลาสมิดชนิดอื่นๆ 5 ชนิด ที่พบในของแบคทีเรียแลคติก	24
7	แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Mop ของพลาสมิด pKM1 กับโปรตีน Mob ของพลาสมิดชนิดอื่นๆ ที่พบในแบคทีเรียแลคติก	25
8	Plasmid profile ของแบคทีเรียแลคติกที่ต้านทานคอปเปอร์ (A) แคดเมียม (B) และนิกเกิล (C)	28
9	ผลการสกัดพลาสมิดหลังจากการทำ plasmid curing ของเชื้อรหัส A55 และ G35 ที่ต้านทานนิกเกิลได้ P = parent strain	31
10	ผลการสกัดพลาสมิดหลังจากการทำ plasmid curing ของเชื้อรหัส X32 ที่ต้านทานคอปเปอร์และเกิดการสูญหายของพลาสมิดขนาด 2.5 และ 5.5 กิโลเบส	32
11	แสดงตัวอย่างผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ที่ได้จากแบคทีเรียแลคติก	33
12	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ของยีน *cadA* ขนาดประมาณ 600 คู่เบส จากแบคทีเรียแลคติกรหัส C53 และ NU1	34
13	แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *cadA* จากแบคทีเรียแลคติก รหัส C53 และ NU1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่มีพลาสมิดชนิดที่ต้านทานแคดเมียมในฐานข้อมูล GenBank	35
14	(A) Plasmid profile ของแบคทีเรียแลคติกที่ต้านทานแคดเมียม (B) แสดงผลการทำ southern hybridization ของแบคทีเรียแลคติกที่ต้านทานแคดเมียมได้	37