249953

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249953

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การวิเคราะห์หน้าที่ของยีน polyketide synthase ที่คาดว่าจะสามารถผลิตสารลดระดับคอเลสเตอรอลโดยการแสดงออกใน Heterologous host

(Functional analysis of a polyketide synthase gene encoding putative Cholesterol lowering agent by expression in heterologous host)

คณะผู้วิจัย

นายอนุวัฒน์ เตชะฤทธิ์
ดร.จันทิรา ปัญญา
ดร.สุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์

รายงานนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน
สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 – 2553

b00855186
249953
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249953

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การวิเคราะห์หน้าที่ของยีน polyketide synthase ที่คาดว่าจะสามารถผลิตสารลดระดับคอเลสเตอรอลโดยการแสดงออกใน Heterologous host

(Functional analysis of a polyketide synthase gene encoding putative Cholesterol lowering agent by expression in heterologous host)

คณะผู้วิจัย

นายอนุวัฒน์ เตชะฤทธิ์
ดร.จันทิรา ปัญญา
ดร.สุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รายงานนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน
สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 – 2553

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ประจำปีงบประมาณ 2552 – 2553 (งานวิจัยต่อเนื่อง 2 ปี)

ชื่อโครงการวิจัย (Research Project)

ภาษาไทย การวิเคราะห์หน้าที่ของยีน polyketide synthase ที่คาดว่าจะสามารถผลิตสารลดระดับคอเลส เตอรอลโดยการแสดงออกใน Heterologous host

ภาษาอังกฤษ Functional analysis of a polyketide synthase gene encoding putative Cholesterol lowering agent by expression in heterologous host

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานวิจัย สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ (สรบ.)
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มจธ.)
83 หมู่ 8 อาคาร สรบ. แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน
กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์ 02-4707503 โทรสาร 02-4523455

คณะผู้วิจัย

1) หัวหน้าโครงการวิจัย นายอนุวัฒน์ เตชะฤทธิ์
ตำแหน่ง นักวิจัย สังกัด สรบ.
E-mail anuwat@pdti.kmutt.ac.th
ประสบการณ์การวิจัย - Molecular biology and gene manipulation of filamentous fungi
- Heterologous gene expression
สัดส่วนความรับผิดชอบในงานวิจัย คิดเป็น 80% ของงานทั้งหมด

2) ผู้ร่วมโครงการวิจัย น.ส.จันทิรา ปัญญา
ตำแหน่ง นักวิจัย สังกัด ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
E-mail pee_punya@hotmail.com
ประสบการณ์การวิจัย - Fermentation and Secondary metabolite screening
- Molecular genetic
สัดส่วนความรับผิดชอบในงานวิจัย คิดเป็น 15% ของงานทั้งหมด

3) ที่ปรึกษาโครงการวิจัย นางสุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์
ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์ ระดับ 8 สังกัด มจธ.
E-mail supapon.che@pdti.kmutt.ac.th
ประสบการณ์การวิจัย - Gene manipulation
- Bioinformatics and Systems biology
สัดส่วนความรับผิดชอบในงานวิจัย คิดเป็น 5% ของงานทั้งหมด

บทคัดย่อ

249953

ในงานวิจัยนี้ซึ่งได้ทำการสร้าง expression vector ชนิด pPNGB โดยเวคเตอร์นี้มีองค์ประกอบของยีนต้านยา phleomycin (*Tn5 ble* gene) และมี cloning site ที่สามารถนำยีนใด ๆ มาเชื่อมต่อเข้าไปในเวคเตอร์ดังกล่าวได้โดยที่ยีนที่นำมาเชื่อมต่อจะถูกควบคุมภายใต้การทำงานของ *gpdA* promoter และ *trypC* terminator นอกจากนั้นยังมีการเติมยีนเรืองแสงสีเขียว (*gfp* gene) เข้าไปบริเวณปลาย 3'-end ของยีนเพื่อใช้เป็น reporter gene จากนั้นได้นำยีน *pksmt* ที่แยกได้จากรา *Xylaria* sp.BCC1067 มาเชื่อมต่อเข้าไปในบริเวณ cloning site สำหรับใช้เป็นยีนทดสอบระบบการ แสดงออกของยีน จากนั้นได้ส่งถ่ายยีน *pksmt* เข้าไปในเซลล์ของรา *Aspergillus oryzae* U1638 ที่มีความบกพร่องต่อการสร้างเอ็นไซม์โปรติเอส พบว่าสามารถสร้างราสายพันธุ์ใหม่ คือ *A. oryzae* MTG4 เมื่อแยกวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์สกัดหยาบด้วยเทคนิค HPLC พบว่ารา *A. oryzae* MTG4 มีรูปแบบการสังเคราะห์สารที่แตกต่างไปจากราสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยมีการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์เพิ่มขึ้นถึง 3 ชนิด และเมื่อนำสารเมตาบอไลต์สกัดหยาบที่ได้ไปวิเคราะห์ผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากรา *A. oryzae* MTG4 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากและมะเร็งเต้านม แต่อย่างไรก็ตาม สารเมตาบอไลต์ทั้งสามชนิดที่สังเคราะห์ขึ้นได้ในรา *A. oryzae* MTG4 ยังอยู่ระหว่างการแยกบริสุทธิ์และวิเคราะห์อัตลักษณ์ทางเคมีของสาร ด้วยกระบวนการทาง Chemical purification and Structural Elucidation เทคนิคการศึกษาหน้าที่ของยีนต่าง ๆ ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มอื่น ๆ เช่น ยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สาร polyketide, nonribosomal peptide, fatty acid หรือยีนที่ผลิตเอ็นไซม์และโปรตีนมูลค่าสูงชนิดต่าง ๆ

Abstract

249953

During the couse of genome sequencing project, analysis of over 40 fungal genomes showed polyketide synthase (PKS) gene are abundant. However, the polyketide products synthesized by identificated PKS remain largely unexplored. Heterologous expression system for bioactive molecule biosynthesis gene in well characterized host not only allows easy identification of its product structure but also facilitates large scale compound production. Here we developed expression system employing low protease producer host strain, *Aspergilus oryzae* U1638 and plasmid vector pPNGB. This vector contained a phleomysin selectable marker, an expression cassette containing glucose phosphate dehydrogenase (GPD) promoter, *trypC* terminator and a green fluorescent reporter protein located upstream of terminator to facilitate C-terminal fusion. We also demonstrated functional expression of *Xylaria* sp. BCC1067 polyketide synthase (PKS), PKSMT gene. Comparing to wild type strain, culture broth extract of transformant expressing PKSMT gene showed 3 extra peaks from HPLC analysis. Crude extract of transformant also exhibited anti-cancer activity against oral cavity cancer (KB) and breast cancer (MCF7) cell. Purification and identification of these two peaks are under investigation. Expression of other metabolite biosynthetic genes such as nonribosomal pepetide synthetase (NRPS) and hybrid PKS-NRPS will also be subjected for further study.

สารบัญ

ลำดับ	หัวข้อ	หน้าที่
	บทคัดย่อ	ii
	บทนำ	1
1	ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
2	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
3	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
4	หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	4
5	ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย	5
6	ผลการทดลอง คำวิจารณ์และข้อเสนอแนะ	6
	6.1 การทดสอบคุณสมบัติในการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ของรา *A. oryzae* MTG transformant เปรียบเทียบกับรา *A. oryzae* U1638	8
	6.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารเมตาบอไลต์จากรา *A. oryzae* MTG4	11
	6.3 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารเมตาบอไลต์หยาบจากรา *A. oryzae* MTG4	12
	6.4 ศึกษาลักษณะทางสัญฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปของราลูกผสม เมื่อเปรียบเทียบกับราสายพันธุ์ดั้งเดิม	13
	6.5 ศึกษาอัตราการเจริญของราลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวต่อการผลิตสารเมตาบอไลต์	15
7	สรุปและวิจารณ์ผล	18
8	เอกสารอ้างอิง	20

สารบัญภาพและตาราง

รูปที่		หน้าที่
1	แสดงแผนภูมิรูปภาพของ expression vector ชนิด pPNGB และ pPNGB-MT	7
2	แสดงผลการทดสอบการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้อง Fluorescent microscope	7
3	แสดงผล Western hybridization	8
4	แสดงผลการวิเคราะห์สารสกัดหยาบ (Crude) ที่ผลิตขึ้นในรา *A. oryzae*	10
5	แสดงผลการวิเคราะห์สารสกัดหยาบที่แยกได้จากน้ำหมักเลี้ยงเชื้อของรา *A. oryzae* MTG4	11
6	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญของราบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ	14
7	แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการเจริญของราลูกผสมและราสายพันธุ์ดั้งเดิม	15
8	ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ	16
9	แสดงผลการวิเคราะห์รูปแบบการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ที่ผสมอยู่ในสารสกัดหยาบ	17

ตารางที่		
1	แสดงคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ	12