215501

รัชนีวรรณ แจ่มแสง 2551: การโคลนและศึกษาหน้าที่ของยีน *aroE* ในวิถี shikimate ของ *Streptomyces venezuelae* ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D. 91 หน้า

Streptomyces venezuelae ผลิตสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ซึ่งสังเคราะห์มาจากวิถี shikimate โดยเอนไซม์ shikimate dehydrogenase ที่สังเคราะห์จากยีน *aroE* เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่สำคัญในวิถี shiimate เมื่อเพิ่มปริมาณยีน *aroE* ใน *S. venezuelae* ด้วยวิธีพีซีอาร์ แล้วใช้เป็นโพรบติดตามยีน *aroE* จากโครโมโซมของ *S. venezuelae* ซึ่งสามารถโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบส ซึ่งเมื่อหาลำดับเบสแล้วพบว่าได้ส่วน C-terminal ของยีน *aroE* ของ *S. venezuelae* ที่ประกอบด้วย 525 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 175 กรดอะมิโน และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ AroE ของ *S. pristinaespiralis* ATCC 25486 เพื่อตรวจสอบหน้าที่ของยีนจึงทำคอนจูเกชันต่างสกุล โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำคอนจูเกชันระหว่าง *S. venezuelae* และ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSET152) เพื่อนำไปใช้ในการทำยีนดิสรับชัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือกระตุ้นการงอกของสปอร์ *S. venezuelae* ที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรือ ใช้ไมซีเลียมที่เลี้ยงอายุ 12-24 ชั่วโมงเป็นผู้รับ ก่อนนำไปคอนจูเกชันกับ *E. coli* บนอาหารแข็ง TSA (Oxoid) ที่มี $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีความถี่สูงสุดที่ 10^{-4} เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ โดยเอกซ์คอนจูแกนต์มีรูปแบบการแทรกของพลาสมิด pSET152 บนโครโมโซมที่ตำแหน่งเดียวกัน และมีสมบัติทางสัณฐานวิทยาและสังเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอลได้เช่นเดียวกับไวด์ไทป์ เมื่อทำการศึกษาหน้าที่ของยีน *aroE* ใน *S. venezuelae* ด้วยวิธียีนดิสรับชันโดยส่งถ่ายพลาสมิด pATT803 (pSET151 ที่มีชิ้นพีซีอาร์ของ *aroE*) เข้าสู่โครโมโซมของ *S. venezuelae* ด้วยการทำคอนจูเกชัน พบว่าสายพันธุ์กลายที่ได้ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่เติมกรดอะมิโน ทริปโตเฟน ไทโรซีน ฟีนิลอะลานีน และไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* JM109 ซึ่งไวต่อคลอแรมฟินิคอลได้ และเมื่อสกัดสารคลอแรมฟินิคอลจากสายพันธุ์กลายแล้วตรวจโดย HPLC พบสายพันธุ์กลายสร้างคลอแรมฟินิคอลในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับไวด์ไทป์ การเกิดยีนดิสรับชันในสายพันธุ์กลายพิสูจน์ด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยการกลายที่ยีน *aroE* นี้มีผลกระทบต่อวิถี shikimate และการผลิตคลอแรมฟินิคอลของ *S.venezuelae*

Ratchaniwan Jeamseang 2008: Cloning and Studying Function of *aroE* Gene in Shikimate Pathway of *Streptomyces venezuelae*. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Arinthip Thamchaipenet, Ph.D. 91 pages.

Streptomyces venezuelae produces chloramphenicol which is synthesized via shikimate pathway. Shikimate dehydrogenase (encoded by *aroE* gene) is one of the seven important enzymes in shikimate pathway. The *aroE* gene of *S. venezuelae* was amplified by PCR and used as a probe to hybridize the genomic fragments. Positive fragment of 1.5 kb was subsequently cloned and sequenced. The C-termimal *aroE* gene of *S. venezuelae* consists of 525 basepairs encoded 175 amino acids and its protein was closely similar to that of *S. pristinaespiralis* ATCC 25486. Intergeneric conjugation between *S. venezuelae* and *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSET 152) was conducted in order to develop a plasmid transfer system for gene disruption. The optimum condition for conjugation to occur was when either pre-germinated spores at 40 °C for 10 minutes or 12-24 hours old mycelium of *S. venezuelae* was used as recipient to mate with *E. coli* on TSA (Oxoid) containing 10 mM $MgCl_2$. Maximum frequency of conjugation was observed at 10^{-4} exconjugants per recipients. The exconjugants showed identical integration pattern of pSET152 into their chromosome and maintained stable morphology and antibacterial activity as the wild type. The attempt to verify the *aroE* gene function was achieved by gene disruption using the optimal conjugal condition to transfer pATT803 (pSET151 harbouring *aroE* PCR fragment) into *S. venezuelae* chromosome. The mutants could not grow on minimum medium lacking of tryptophan, tyrosine and phenylalanine. Furthermore, the mutants could not inhibit *E. coli* JM109 which is sensitive to chloramphenicol. The cultures of mutants were then characterised by HPLC and revealed that choloramphenicol was drastically reduced comparing to that of wild type. The *aroE* gene disruption was essentially verified by Southern blot hybridization. The results of this study indicated that *aroE* gene is involved in shikimate pathway that leads to the production of chloramphenicol in *S. venezuelae*.