



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุ์วิศวกรรม

สาขา

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลนและศึกษาหน้าที่ของยีน *aroE* ในวิถี shikimate ของ *Streptomyces venezuelae*

Cloning and Studying Function of *aroE* Gene in Shikimate Pathway of *Streptomyces*

venezuelae

นามผู้วิจัย นางสาวรัชนีวรรณ แจ่มแสง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์อรุณทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมชัย พรบันลือลาภ, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนและศึกษาหน้าที่ของยีน *aroE* ในวิถี shikimate ของ *Streptomyces venezuelae*

Cloning and Studying Function of *aroE* Gene in Shikimate Pathway of *Streptomyces venezuelae*

โดย

นางสาวรัชนีวรรณ แจ่มแสง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

พ.ศ. 2551

รัชนีวรรณ แจ่มแสง 2551: การโคลนและศึกษาหน้าที่ของยีน *aroE* ในวิถี shikimate ของ *Streptomyces venezuelae* ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขา พันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: รองศาสตราจารย์อรุณทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D. 91 หน้า

Streptomyces venezuelae ผลิตภัณฑ์ชีวสังเคราะห์คลอแรมฟิโนคอล ซึ่งสังเคราะห์มาจากวิถี shikimate โดยเอนไซม์ shikimate dehydrogenase ที่สังเคราะห์จากยีน *aroE* เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่สำคัญในวิถี shikimate เมื่อเพิ่มปริมาณยีน *aroE* ใน *S. venezuelae* ด้วยวิธีพีซีอาร์ แล้วใช้เป็นโพรบติดตามยีน *aroE* จากโครโมโซมของ *S. venezuelae* ซึ่งสามารถโคลนขึ้นต้นได้ขนาด 1.5 กิโลเบส ซึ่งเมื่อหาลำดับเบสแล้วพบว่าได้ส่วน C-terminal ของยีน *aroE* ของ *S. venezuelae* ที่ประกอบด้วย 525 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 175 กรดอะมิโน และมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ AroE ของ *S. pristinaespiralis* ATCC 25486 เพื่อตรวจสอบหน้าที่ของยีนจึงทำคอนจูเกชันต่างสกุล โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำคอนจูเกชันระหว่าง *S. venezuelae* และ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSET152) เพื่อนำไปใช้ในการทำยีนดิสรับชัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ กระตุ้นการออกของสปอร์ *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} เอกซ์คอนจูเกนต์ต่อผู้รับ โดยเอกซ์คอนจูเกนต์มีรูปแบบการแทรกของพลาสมิด pSET152 บนโครโมโซมที่ตำแหน่งเดียวกัน และมีสมบัติทางสัณฐานวิทยาและสังเคราะห์สารคลอแรมฟิโนคอลได้เช่นเดียวกับไวต์ไทป์ เมื่อทำการศึกษาหน้าที่ของยีน *aroE* ใน *S. venezuelae* ด้วยวิธียีนดิสรับชันโดยส่งถ่ายพลาสมิด pATT803 (pSET151 ที่มีชิ้นพีซีอาร์ของ *aroE*) เข้าสู่โครโมโซมของ *S. venezuelae* ด้วยการทำคอนจูเกชัน พบว่าสายพันธุ์กลายที่ได้ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่เติมกรดอะมิโน ทริปโตเฟน ไทโรซีน ฟีนิลอะลานีน และไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* JM109 ซึ่งไวต่อคลอแรมฟิโนคอลได้ และเมื่อสกัดสารคลอแรมฟิโนคอลจากสายพันธุ์กลายแล้วตรวจโดย HPLC พบสายพันธุ์กลายสร้างคลอแรมฟิโนคอลในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับไวต์ไทป์ การเกิดยีนดิสรับชันในสายพันธุ์กลายพิสูจน์ด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยการกลายที่ยีน *aroE* นี้มีผลกระทบต่อวิถี shikimate และการผลิตคลอแรมฟิโนคอลของ *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-terminal *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 MgCl₂. 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 chloramphenicol 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*.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ ศศ.ดร. สมชัย พรบันลือลาภ กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชาร่วม ที่ให้คำปรึกษาในการ
เรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และกราบ
ขอบพระคุณ รศ. ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล ประธานการสอบ และ ดร.ณัฐกานา แสงกฤษ
ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ดร. พัทธกษ ธีรวงศ์ ภาควิชาเคมี ที่ได้เสียสละเวลาให้คำปรึกษาในการสกัดสาร
ขอกราบขอพระคุณอาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและ
มอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ และให้ความช่วยเหลือและให้
คำแนะนำต่างๆ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนระดับบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ สาขา
เทคโนโลยีชีวภาพ จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติสำนักงานพัฒนา
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้
อบรมและให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

รัชนิวรรณ แจ่มแสง

กันยายน 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	40
สรุป	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	71
ภาคผนวก	83

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	21
2	พลาสติกที่ใช้ในงานวิจัย	21
3	ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยง <i>Streptomyces</i> และ <i>E. coli</i>	23
4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย	28
5	แสดงประสิทธิภาพของการคอนจูเกชัน โดยการกระตุ้นการงอกของสปอร์ <i>S. venezuelae</i> ผู้รับ ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	43
6	แสดงประสิทธิภาพของการคอนจูเกชัน โดยใช้ไมซีเลียมที่เลี้ยงในเวลาที่แตกต่างกัน	44

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การสังเคราะห์สารจากวิถี shikimate	5
2 วิถี shikimate ใน <i>E. coli</i>	7
3 ปฏิริยาการทำงานของเอนไซม์ shikimate dehydrogenase	9
4 ปฏิริยาการทำงานของเอนไซม์ NAD-quinat/shikimate dehydrogenase	12
5 วิถี quinate	13
6 วงจรชีวิตของ <i>Streptomyces</i>	14
7 วิธีการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล	16
8 พลาสมิดสำหรับทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง <i>E. coli</i> กับ <i>Streptomyces</i>	19
9 พลาสมิด pSET152 ที่ใช้สำหรับทำคอนจูเกชันระหว่าง <i>S. venezuelae</i> และ <i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002)	31
10 พลาสมิด pJET 1.2 blunt	35
11 พลาสมิด pSET151 ที่ใช้สำหรับทำอินดิสรับชั้นใน <i>S. venezuelae</i>	36
12 กราฟแสดงการอยู่รอดของสปอร์และประสิทธิภาพในการคอนจูเกชันเมื่อกระตุ้นการออกของสปอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ	41
13 การตรวจสอบเอกซ์คอนจูเกนต์ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยการเพิ่มปริมาณยีนที่ต้านยาปฏิชีวนะอะพราไมซิน ด้วยไพรเมอร์ Apr C-1 และ AprC-2	45
14 การตรวจสอบเอกซ์คอนจูเกนต์ของ <i>S. venezuelae</i> ที่ได้รับพลาสมิด pSET152 ด้วย Southern blot hybridization โดยใช้ attP ที่ตัดด้วย SacI และ HindIII เป็นโพรบ	46
15 การแทรกตัวของพลาสมิด pSET152 เข้าในโครโมโซมของ <i>S. venezuelae</i>	47
16 การตรวจสอบการสร้างคลอแรมฟินิคอลต่อ <i>E. coli</i> JM109 ด้วยวิธี agar plug assay	48
17 บริเวณอนุรักษ์บนยีน <i>aroE</i> ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	49
18 ผลการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ATT061F และ ATT061R จากโครโมโซมของ <i>S. venezuelae</i>	50
19 ผลการทดสอบโคลน pATT802 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	ลำดับเบสและลำดับกรดของยีน <i>aroE</i> จาก <i>S. venezuelae</i> ในพลาสมิด pATT802	51
21	การตรวจตรวจหายีน <i>aroE</i> ของ <i>S. venezuelae</i> ด้วยวิธี Southern blot hybridiza โดย ใช้ pATT802 ที่ตัดด้วย <i>HindIII</i> เป็นโพรบ	52
22	การสกัดแถบดีเอ็นเอที่มียีน <i>aroE</i> และตรวจสอบโดยวิธีพีซีอาร์	53
23	ตรวจสอบ DNA library ที่มียีน <i>aroE</i> โดยวิธีการสกัดพลาสมิดแบบ pool ด้วยวิธีพีซีอาร์	54
24	ตรวจสอบโคลนจากพลาสมิด pool ที่ 7 โดย PCR ไพร์เมอร์ ATT061F และ ATT061R โคลนที่มียีน <i>aroE</i> ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ขนาด 500 คู่เบส	54
25	ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>aroE</i> จาก <i>S. venezuelae</i> ในพลาสมิด pATT804	55
26	การทำ multiple alignment ลำดับกรดอะมิโน AroE จาก <i>S. venezuelae</i> และ <i>Actinomyces</i>	57
27	ผลการทดสอบโคลน pATT803 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	58
28	ตรวจสอบสายพันธุ์กลายโดยการเพิ่มปริมาณยีนด้านยาไรโอสเตรปทอนด้วยวิธีพีซีอาร์	59
29	แสดงการแทรกตัวของพลาสมิด pATT803 ในโครโมโซมสายพันธุ์กลาย	60
30	ตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนส์โดย PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ M13 forward และ M13 reverse	60
31	การตรวจสอบสายพันธุ์กลายของ <i>S. venezuelae</i> ที่ได้รับพลาสมิด pATT803 ด้วย Southern blot hybridization โดยใช้ <i>tsr</i> ที่ตัดด้วย <i>NdeI</i> เป็นโพรบ	61
32	การตรวจสอบสายพันธุ์กลายในอาหาร MM ที่เติมและไม่เติมกรดอะมิโนทริปโทเฟน ฟีนีลอะลานีน และไทโรซีน	62
33	การตรวจสอบการสร้างคลอแรมฟินิคอลโดยการเกิดวงใสของสายพันธุ์กลายต่อ <i>E. coli</i> JM109 ด้วยวิธี agar plug assay	63
34	ผลการวิเคราะห์สารสกัดด้วยวิธี HPLC	65

การโคลนและศึกษาหน้าที่ของยีน *aroE* ในวิถี shikimate ของ

Streptomyces venezuelae

Cloning and Studying Function of *aroE* Gene in Shikimate Pathway of

Streptomyces venezuelae

คำนำ

วิถี shikimate (shikimate pathway) เป็นวิถีที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย รา และ พืช เนื่องจากเป็นวิถีที่สังเคราะห์สารที่สำคัญต่างๆ เช่น โคเอนไซม์คิว (coenzyme Q) โฟเลต และ กรดอะมิโนในกลุ่ม aromatic ที่สำคัญ 3 ชนิด คือ ทริปโตเฟน (tryptophan) ไทโรซีน (tyrosin) และฟีนิลอะลานีน (phenylalanine)

สาร intermediate ที่สำคัญในวิถีนี้คือ shikimate หรือ shikimic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น ทามิฟลู (Tamiflu) คลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol) โนวาไบโอซิน (novobiocin) และลินโคมัยซิน (lincomycin) เป็นต้น ปัจจุบัน shikimic acid ถูกสกัดมาจากพืชชนิดหนึ่งในประเทศจีนชื่อว่า ไป๋ยักก (star anis) แต่เนื่องจากวิถี shikimate นั้นพบทั้งในแบคทีเรีย รา และ พืช จึงมีการวิจัยหาวิธีสกัด หรือ เพิ่มปริมาณ shikimate จากแบคทีเรีย โดยเริ่มศึกษาจากกลุ่มยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ในวิถี shikimate ในแบคทีเรีย ซึ่งมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว ทำให้เกิดการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยง

ในการทดลองครั้งนี้จึงสนใจศึกษาและโคลนยีน *aroE* ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ shikimate dehydrogenase และทำให้เกิดการกลายของยีนใน *Streptomyces venezuelae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล โดยการทำยีนดิสรัปชัน (gene disruption) โดยใช้เทคนิคคอนจูเกชันต่างสกุล (intergeneric conjugation) เพื่อดูผลกระทบของการกลายต่อวิถี shikimate และการผลิตคลอแรมฟินิคอล เพื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาเอนไซม์อื่นในวิถี shikimate รวมทั้งพัฒนาการผลิตสารต่างๆ ที่ได้จากวิถีนี้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. หาสภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายพลาสมิดจาก *Escherichia coli* เข้าสู่ *S. venezuelae* โดยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุล (intergeneric conjugation)
2. โคลนยีน shikimate dehydrogenase (*aroE*) จาก *S. venezuelae*
3. ศึกษาหน้าที่ของยีน *aroE* โดยทำให้เกิดการกลายเพื่อดูผลกระทบต่อวิถี shikimate และการสร้างคลอแรมฟินิคอลใน *S. venezuelae*

การตรวจเอกสาร

วิถี shikimate

วิถี shikimate พบในแบคทีเรีย ยีสต์ รา และพืช แต่ไม่พบวิถีนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Bentley, 1990) โดย shikimate เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่สำคัญ 3 ชนิด คือ ทรีปโตเฟน ไทโรซีน และฟีนิลอะลานีน เป็นวิถีที่สังเคราะห์สารที่สำคัญต่างๆ เช่น โคเอนไซม์คิวโฟเลท

สาร intermediate ที่สำคัญในวิถีนี้คือ shikimate หรือ shikimic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น ทามิฟลู การศึกษา shikimate นั้นนำไปสู่การพัฒนาการผลิตยาปฏิชีวนะ และยาปราบวัชพืช

Shikimic acid

Shikimate หรือ shikimic acid เป็นกรดอินทรีย์ โดยชื่อของ shikimate ได้มาจากชื่อของพืชในกลุ่ม *Illicium* ในภาษาญี่ปุ่นคือ シキミ (shikimi-no-ki) สามารถสกัด shikimate ได้ครั้งแรกในปี 1885 โดย Eykmann สกัดสารจากเมล็ดของต้นโป๊ยกั๊ก (star anis) *Illicium religiosum* และ *Illicium anisatum* (Euverink, 1995) shikimate ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมยาใช้ shikimate เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยา oseltamivir หรือที่รู้จักกันดีในชื่อของ Tamiflu โดยสกัด shikimate จากผลของ sweetgum ซึ่ง oseltamivir ทำหน้าที่เป็น neuraminidase inhibitor ที่ใช้ในการยับยั้งไวรัส influenza A และ influenza B ที่เกิดจาก ไวรัสไข้หวัดนก H5N1 (Bradley, 2005) เนื่องจาก shikimate มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรม จึงมีการพัฒนาการผลิตและศึกษาวิธีการผลิต shikimate อย่างต่อเนื่อง

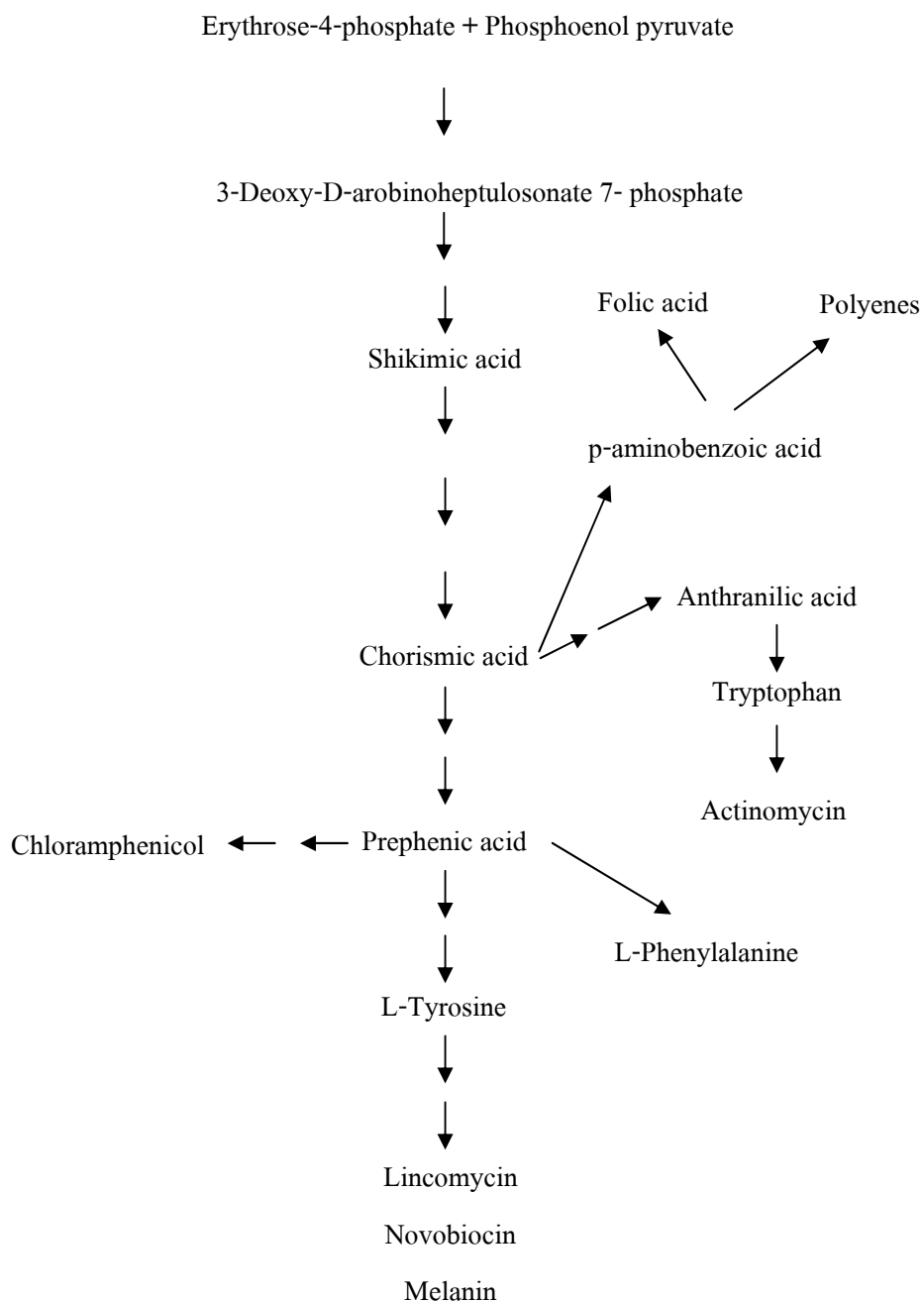
ปฏิกิริยาในวิถี shikimate

วิถี shikimate สังเคราะห์ให้สารสุดท้ายคือ chorismate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่สำคัญ 3 ชนิด คือ ทริปโตเฟน ไทโรซีน ฟีนอลอะลานีน (Nelson and Cox, 2005) และสารประกอบที่มีกรดอะมิโนเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ folic acid, polyene และ melanin (ภาพที่ 1) โดยวิถีนี้มีสารตั้งต้นคือ phosphoenol pyruvate (PEP) และ erythrose-4-phosphate (E-4-P) ซึ่งได้จากวิถีไกลโคไลซิส และ วิถีเพนโทส ตามลำดับซึ่งในวิถี shikimate มีปฏิกิริยาทั้งหมด 7 ขั้นตอน (ภาพที่ 2) โดยในขั้นแรกเกิดการรวมตัวกันของ PEP และ E-4-P ได้เป็น 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) โดยหมู่ฟอสเฟตของ PEP จะถูกปล่อยออกมาในรูปของ inorganic phosphate (Pi) หลังจากตัดพันธะระหว่างคาร์บอนและออกซิเจนออกและกระตุ้นหมู่ pyruvyl ได้เป็น DAHP หลังจากนั้น DAHP จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะคาร์บอนระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 7 เป็นวงแหวน 5-dehydroquinolate และปล่อย inorganic phosphate ออกมา ปฏิกิริยาต่อมาเกิดการสร้างพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนที่ 1 และ 2 ได้เป็น 5-dehydroshikimate หลังจากนั้นเกิดการสังเคราะห์ shikimate โดยการรีดิวซ์หมู่คีโตตำแหน่งที่ 3 ของ dehydroshikimate ปฏิกิริยาต่อมา ATP จะให้หมู่ฟอสเฟตกับ shikimate ที่หมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ได้เป็น shikimate-3-phosphate ถัดจากนั้น โมเลกุลของ PEP จะเข้ามาที่บริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของ shikimate-3-phosphate ได้เป็น 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate (EPSP) ขั้นตอนสุดท้ายเกิดการกำจัดหมู่ฟอสเฟตจากบริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ทำให้เกิดการสร้าง พันธะคู่และเกิดการปล่อย inorganic phosphate ได้เป็น chorismate ซึ่งเป็นสารสุดท้ายในวิถีนี้

ยีนและเอนไซม์ในวิถี shikimate

วิถี shikimate เป็นวิถีที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย ยีสต์ รา และพืชดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น โดยทั่วไปประกอบด้วยปฏิกิริยาทั้งหมด 7 ขั้นตอน โดยใน *E. coli* ทั้ง 7 ปฏิกิริยา (ภาพที่ 2) ทำงานด้วยเอนไซม์ที่แตกต่างกันทั้งหมด (Giles *et al.*, 1967, Berluy and Giles, 1969) และเอนไซม์ทั้งหมดถูกสังเคราะห์มาจากยีนที่แตกต่างกัน (Pittard and Wallace, 1966) ซึ่งต่างจากวิถี shikimate ของ *Saccharomyces cerevisiae* (Larimer *et al.*, 1983; Duncan *et al.*, 1987) ที่พบว่ามี 5 ปฏิกิริยา (ภาพที่ 2, ปฏิกิริยาที่ 2-6) เกิดขึ้นจากเอนไซม์แบบ multifunctional (pentafunctional) หรือที่เรียกว่า arom protein ซึ่งทั้ง 5 เอนไซม์นี้ถูกสังเคราะห์มาจากยีนเพียงยีนเดียว (Lumsden and

Coggines, 1977; 1978) ซึ่งเหมือนกับใน *Neurospora crassa* (Coggines., 1987) และ *Aspergillus nidulans* (Charles *et al.*, 1986)



ภาพที่ 1 การสังเคราะห์สารจากวิถี shikimate

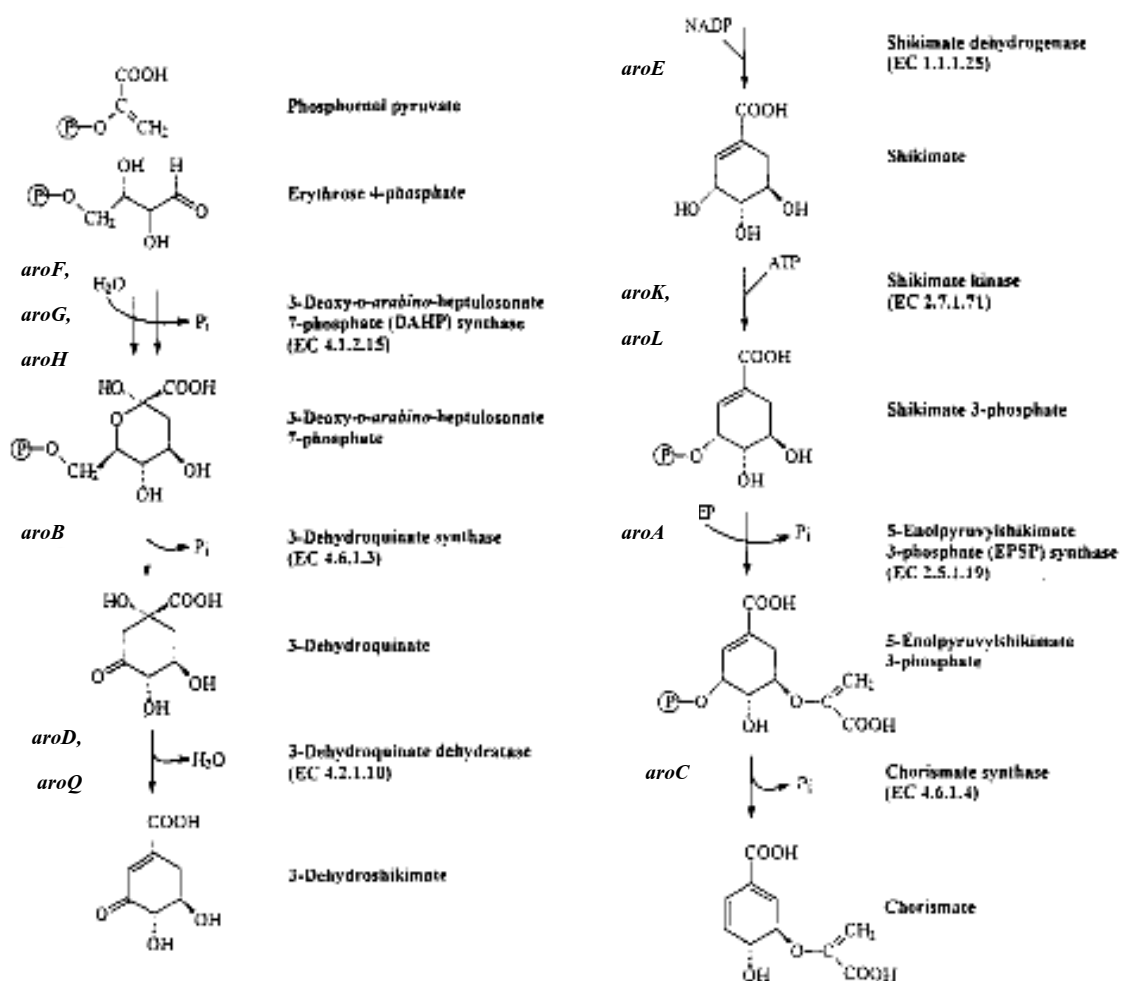
เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถี shikimate มีดังต่อไปนี้

3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (EC 2.5.1.54)

3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (DS) เป็นเอนไซม์แรกของวิถีนี้ โดยเอนไซม์นี้ทำให้เกิดการรวมตัวของ PEP และ E-4-P ได้เป็น DAHP เอนไซม์ DS ต้องการไอออนของโลหะ ได้แก่ Fe^{2+} , Co^{2+} และ Mn^{2+} ในการทำงาน โดย DS เป็น isoenzyme ที่สังเคราะห์มาจากยีน *aroF* (DS-phe), *aroG* (DS-tyr) และ *aroH* (DS-trp) ซึ่งถูกควบคุมแบบ feedback inhibition โดยอัตราส่วนของกรดอะมิโน ฟีนิลอะลานีน: ไทโรซีน: ทริปโตเฟน เป็น 75: 25: <1 ตามลำดับ (Ahmad *et al.*, 1986) โดยการควบคุมนี้เป็นการควบคุมหลักของการส่งผ่านคาร์บอนของวิถีใน *E. coli* (Ogino *et al.*, 1982) แต่ใน *Bacillus licheniformis* และ *B. subtilis* เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งโดย chorismate และ prephenate (Jensen, 1966; Nasser *et al.*, 1969)

Dehydroquinate synthase (EC 4.2.3.4)

dehydroquinate synthase (DHQS) เป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน DAHP ไปเป็น 3-dehydroquinate อาศัยปฏิกิริยาเคมีหลายกระบวนการ คือ ออกซิเดชัน (oxidation) เบต้า-อีลิมีเนชัน รีดักชัน (β -elimination) และการรวมตัวกันแบบ aldol ภายในโมเลกุล (intramolecular aldol condensation) (Bender *et al.*, 1989) ซึ่งเอนไซม์นี้สังเคราะห์มาจากยีน *aroB* จากการศึกษายีน *aroB* ใน *E. coli*, *A. nidulans*, *Mycobacterium tuberculosis*, และ *S. cerevisiae* พบว่ามีความเหมือนกันมาก (Garbe *et al.*, 1991) โดยใน *B. subtilis* เอนไซม์ DHQS จะทำงานร่วมกันกับ chorismate synthase และ NADPH-dependent flavin reductase (Hasan and Nester, 1978a) โดยพบว่า บริเวณ upstream ของยีน *aroB* คือยีน *aroF* โดยทั้งสองยีนนี้เป็นส่วนหนึ่งของ supra operon ที่ประกอบด้วย *aroFBH-trpEDCFBA-hisH-tyrA-aroE* (Babitzke *et al.*, 1992)



ภาพที่ 2 วิถี shikimate ใน *E. coli*

- (1) 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (*aroF*, *aroG* และ *aroH*)
- (2) dehydroquinate synthase (*aroB*) (3) dehydroquinate dehydratase (*aroD* และ *aroQ*)
- (4) shikimate dehydrogenase (*aroE*) (5) shikimate kinase (*aroK* และ *aroL*)
- (6) 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (*aroA*) (7) chorismate synthase(*aroC*)

ที่มา: คัดแปลงจาก Herrmann (1995)

Dehydroquinase dehydratase (EC 4.2.1.10)

dehydroquinase dehydratase (DHQD) จะกระตุ้นการเปลี่ยนโครงสร้างของ 5-dehydroquinate ได้เป็น 5-dehydroshikimate โดยเอนไซม์ DHQD แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ type I และ type II โดย type I DHQD มีคุณสมบัติไม่ทนต่อความร้อน สัมเคราะห์จากยีน *aroD* พบได้ในแบคทีเรียทั่วไป เช่น *E. coli* และ type II DHQD มีคุณสมบัติทนต่อความร้อน สัมเคราะห์จากยีน *aroQ* มักพบในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ quinate เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ (Galina *et al.*, 1998,) ซึ่ง subunit ของ type II DHQD มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16,000 ดาลตัน ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า subunit ของ type I DHQD โดยจากการศึกษาพบว่าในอาหารที่มีสาร quinate นั้น *Acetobacter calcoaceticus* (Ingledew *et al.*, 1971) และ *Pseudomonas aeruginosa* (Ingledew and Tai, 1972) มีการสังเคราะห์ DHQD ทั้ง 2 ชนิดขึ้นพร้อมกัน แต่ใน *M. tuberculosis* (Grabe *et al.*, 1991) และ *Streptomyces coelicolor* (White *et al.*, 1990) พบเพียงเอนไซม์ type II DHQD เท่านั้น

Shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.25)

shikimate dehydrogenase (SKDH) ซึ่งสังเคราะห์มาจากยีน *aroE* ทำให้เกิดการรีดิวซ์ของ 5-dehydroshikimate ได้เป็น shikimate โดยเอนไซม์นี้ทำงานร่วมกับ NADPH ที่เป็นโคแฟกเตอร์และเอนไซม์นี้ยังมีการทำงานแบบย้อนกลับโดยสามารถใช้ shikimate เป็นสารตั้งต้นได้ด้วย โดยพบว่า SKDH เป็นโปรตีนแบบโมโนเมอร์ (monomer) ใน *Rhodococcus rhodochrous* (Bruce and Cain, 1990), *N. crassa* (Barea and Giles, 1978) และ *A. nidulans* (Hawkins *et al.*, 1988)

Shikimate kinase (EC 2.7.1.71)

shikimate kinase (SK) เป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นการเปลี่ยนโครงสร้างของ shikimate ให้อยู่ในรูปของ shikimate-3-phosphate โดยรับฟอสเฟตมาจาก ATP ใน *E. coli* แบ่ง shikimate kinase ออกเป็น 2 ชนิด คือ shikimate kinase I (*aroK*) และ shikimate kinase II (*aroL*) โดยเอนไซม์ทั้งสองจะไม่ถูกควบคุมโดย feedback inhibition (DeFeyter and Pittard, 1986) แต่พบว่าเอนไซม์นี้ใน *B. subtilis* ถูกยับยั้ง โดย chorismate และ prephenate (Nakatsukasa and Nester, 1972; Nasser *et al.*, 1969)

ยีน *aroE* เริ่มมีการศึกษาครบทั้งระบบใน *E. coli* พบว่านารหัสสำหรับ AroE (shikimate dehydrogenase) เป็นโพลีเปปไทด์ยาว 272 กรดอะมิโน มีโครงสร้างเป็น monomer มีน้ำหนักโมเลกุล 29,380 ดาลตัน (Ian and Coggins, 1988) เช่นเดียวกับ *H. influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995) แต่ใน *N. crassa* เอนไซม์ shikimate dehydrogenase จะทำงานร่วมกับเอนไซม์ dehydroquinase dehydratase (Smith and Coggins, 1983)

นอกจากใน *E. coli* แล้วยังมีการศึกษาใน *M. tuberculosis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ทำให้เกิดโรควัณโรค โดยเพิ่มจำนวนขึ้นขนาด 810 คู่เบส ด้วยวิธี PCR แล้วเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pET23a ซึ่งเป็น expression vector ก่อนถ่ายเข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) พบว่าสามารถเพิ่มการแสดงออกและสกัดเอนไซม์ได้น้ำหนักโมเลกุลขนาด 27,200 ดาลตัน โดยมีลำดับกรดอะมิโน 11 ลำดับแรกที่ปลาย N-terminal เป็น SEGPKKAGVLG (Fonseca *et al.*, 2006) และเมื่อทดสอบการทำงานของเอนไซม์โดยวัดปริมาณของ NADP ที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา พบว่าเอนไซม์ทำงานได้มากขึ้น 5 เท่า เมื่อเทียบกับการทำงานจากสายพันธุ์วัณโรคไทป์ (Magalhaes *et al.*, 2002) โดยเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ที่ pH 9-12 ที่อุณหภูมิ 63 °C โดยอาศัย NADP⁺ (Zhang *et al.*, 2005)

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่นารหัสโดยยีน *aroE* ใน *M. tuberculosis* โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv เทียบกับ *E. coli*, *M. tuberculosis* CDC1511, *M. bovis* AF2122197 และ *M. leprae* TN พบว่ามีความเหมือนกัน 24, 86, 85 และ 70% ตามลำดับ (Zhang *et al.*, 2005) โดยพบบริเวณอนุรักษ์ที่ Gly61-Lys69 ซึ่งมีรูปแบบเป็น G-X-(N/S)-V-(T/S)-X-P-X-K และยังพบลำดับอนุรักษ์ที่ Asn90, Asp105 และ Glu259 โดยการม้วนตัวของเอนไซม์ประกอบด้วย -helix, -sheet, -turn และ random coil 29.2, 9.3, 3.2 และ 28.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Zhang *et al.*, 2005) โดย AroE ของ *M. tuberculosis* H37Rv มีโครงสร้างเป็น dimer น้ำหนักโมเลกุล 58,367 ดาลตัน หรือ 27,076 ดาลตันต่อแต่ละ subunit ซึ่งต่างจาก *E. coli* (Chaudhuri and Coggins, 1985) และ *H. influenzae* (Ye *et al.*, 2003) ที่โปรตีนเป็นแบบ monomer ดังได้กล่าวไว้ข้างต้น

ต่อมาได้มีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์โดยการทำให้เกิดการกลายของยีน *aroE* ในแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคขอบใบแห้งในข้าว คือ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ทำให้การผลิตที่เกิดมาจากสาร xanthomonadin ลดลง การที่มีสีลดลงเนื่องจากโครงสร้างของวงแหวนอโรมาติกใน xanthomonadin ที่ได้รับมาจากวิถี shikimate เกิดการเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้การกลายของ *aroE*

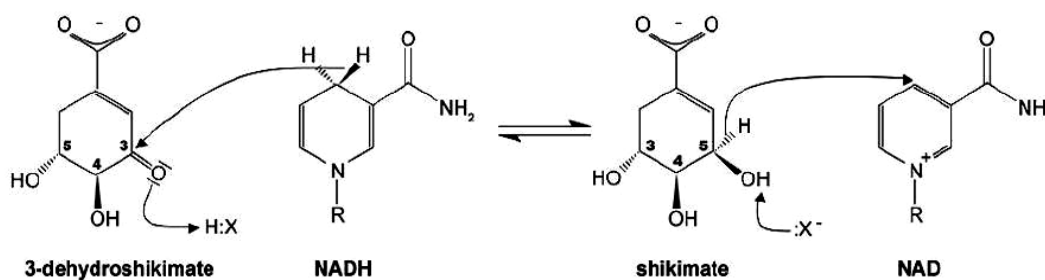
ยังทำให้ความรุนแรงในการก่อโรคขอบใบแห้งในข้าวลดลงด้วย ซึ่งจากการศึกษานี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการผลิตยาปราบศัตรูพืช (Goel *et al.*, 2001)

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาใน *aroE* ใน *Helicobacter pylori* (Han *et al.*, 2006) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ทำให้เกิดโรคในกระเพาะอาหารของมนุษย์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *H. pylori* สายพันธุ์ SS1 กับ *E. coli*, *H. influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *M. jannaschii*, *Archaeoglobus fulgidus* และ *M. tuberculosis* พบว่าเหมือนกัน (identity) 31, 31, 33, 30, 30 และ 26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้ dehydroshikimate analogue หลายๆ ชนิด พบว่า กลุ่มของ polyphenol และ สารอนุพันธ์ของ chromene สามารถยับยั้งการทำงานของ shikimate dehydrogenase ได้ เนื่องจากวิธีนี้ไม่พบในมนุษย์ เมื่อทำการยับยั้งเอนไซม์ในวิธีนี้จึงไม่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์ ซึ่งจากการศึกษานี้นำไปสู่ประโยชน์ในการพัฒนาการผลิตยาปฏิชีวนะต่อไป

นอกจาก AroE แล้วยังมีโปรตีนอื่นในวิถี quinate ที่ทำหน้าที่คล้ายกัน คือ NAD-quinatase/shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.282) ที่สังเคราะห์จากยีน *ydiB* เนื่องจาก shikimate และ quinate นั้นมีโครงสร้างที่คล้ายกันมาก ต่างกันเพียงมีหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของ quinate (Michel *et al.*, 2003) ซึ่งวิถีหลักในแบคทีเรีย ยีสต์ รา และพืชนั้น จะใช้เอนไซม์ shikimate dehydrogenase เป็นเอนไซม์หลัก และมีการใช้ quinate/shikimate dehydrogenase เป็นเอนไซม์รองในแบคทีเรียบางชนิด จากการศึกษาของ Giles และคณะ (1985) พบว่าในราและแบคทีเรียบางชนิดสามารถใช้ทั้ง quinate และ shikimate เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยจะเปลี่ยน quinate ให้เป็น protocatechuate, succinate และ acetyl CoA โดยพบวิถี quinate นี้ใน *N. crassa*, *A. nidulans* (Grant *et al.*, 1988) และยังพบว่ามีการใช้ quinate ในพืชหลายชนิด ได้แก่ แครอท (Refeno *et al.*, 1982) ถั่วเขียว (Kang *et al.*, 1994) เป็นต้น

NADPH-shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.25) และ NAD-quinatase/shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.282) ทำปฏิกิริยาในการเปลี่ยน dehydroshikimate เป็น shikimate ได้เหมือนกัน แต่ต่างกันที่สารตั้งต้นของ NADPH-shikimate dehydrogenase นั้นจำเพาะต่อ 5-dehydroshikimate (ภาพที่ 3) แต่เอนไซม์ NAD-quinatase/shikimate dehydrogenase จะใช้ 3-dehydroshikimate เป็นสารตั้งต้น (ภาพที่ 4) โดยเอนไซม์ shikimate dehydrogenase นั้นทำงานร่วมกับเอนไซม์ NADP-dependent glucose dehydrogenase โดยจากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มกลูโคส

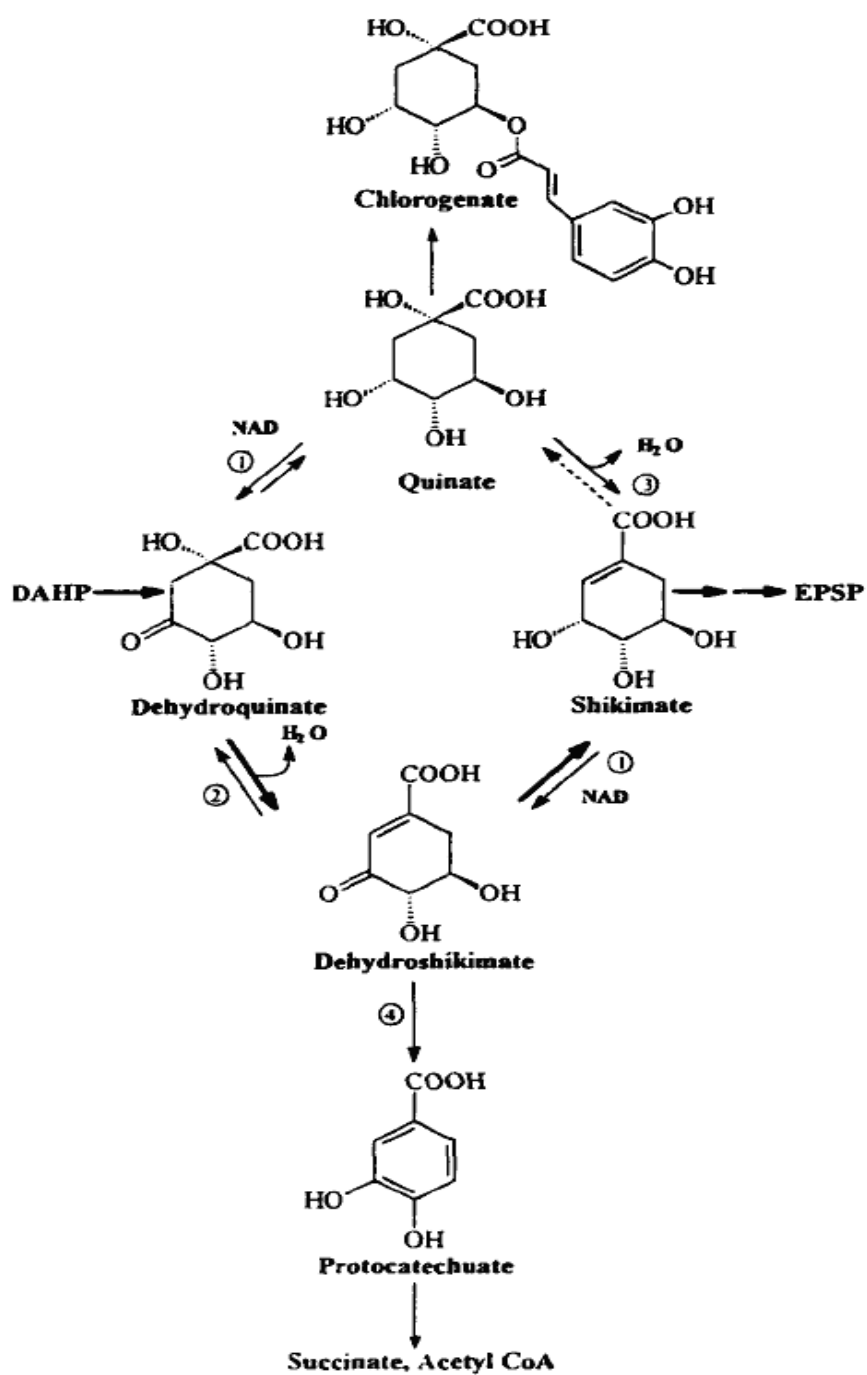
ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ NADP-dependent glucose dehydrogenase ควบคู่กับ shikimate dehydrogenase พบว่าสามารถเปลี่ยน dehydroshikimate เป็น shikimate ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก NADP-dependent glucose dehydrogenase สามารถทำให้เกิดการ regenerate ของ NADP เป็น NADPH จากการเปลี่ยนกลูโคส เป็นกลูโคโนแลกโตน (Adachi *et al.*, 2003b)



ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ NAD-quinat/shikimate dehydrogenase

ที่มา: Lindner (2005)

ในวิถี quinate จะออกซิไดซ์ quinate เป็น 3-dehydroquinate, 3-dehydroshikimate และ shikimate ตามลำดับ (ภาพที่ 5) ซึ่งเป็น intermediate เดียวกับในวิถี shikimate โดย quinate สามารถสังเคราะห์ได้โดยการเปลี่ยน shikimate เป็น quinate โดยเอนไซม์ quinate hydrolase หรือเปลี่ยน dehydroquinate ให้เป็น quinate โดยเอนไซม์ quinate dehydrogenase โดยเอนไซม์นี้สามารถเปลี่ยน quinate กลับมาเป็น 3-dehydroquinate ได้เช่นกัน ซึ่งเอนไซม์นี้แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ NAD(P)-dependent quinate dehydrogenase ได้แก่ NADP-quinate dehydrogenase (EC 1.1.1.24) ที่จำเพาะต่อ quinate เท่านั้น (Mitsuhashi and Davis 1954) และ NAD-quinate/shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.282) ที่สามารถใช้ทั้ง quinate และ shikimate เป็นสารตั้งต้น (Michel *et al.*, 2003) กลุ่มที่สองคือ NAD(P)-independent quinate dehydrogenase โดยใช้ pyrroloquinoline quinone (PQQ) เป็นโคแฟกเตอร์แทน NAD(P) โดยพบเอนไซม์ PQQ-quinate dehydrogenase (EC 1.1.99.25) ที่เป็น membrane-associate dehydrogenase นี้ใน *Acetobacter calcoaceticus* (van Kleef and Duine, 1988) หลังจากนั้นทำการเปลี่ยน 3-dehydroquinate เป็น 3-dehydroshikimate โดยเอนไซม์ dehydroquinate dehydratase เช่นเดียวกับวิถี shikimate แล้วจึงจะเปลี่ยน 3-dehydroshikimate เป็น shikimate โดยเอนไซม์ NAD-quinate/shikimate dehydrogenase (Adachi *et al.*, 2003a)



ภาพที่ 5 วิถี quinate

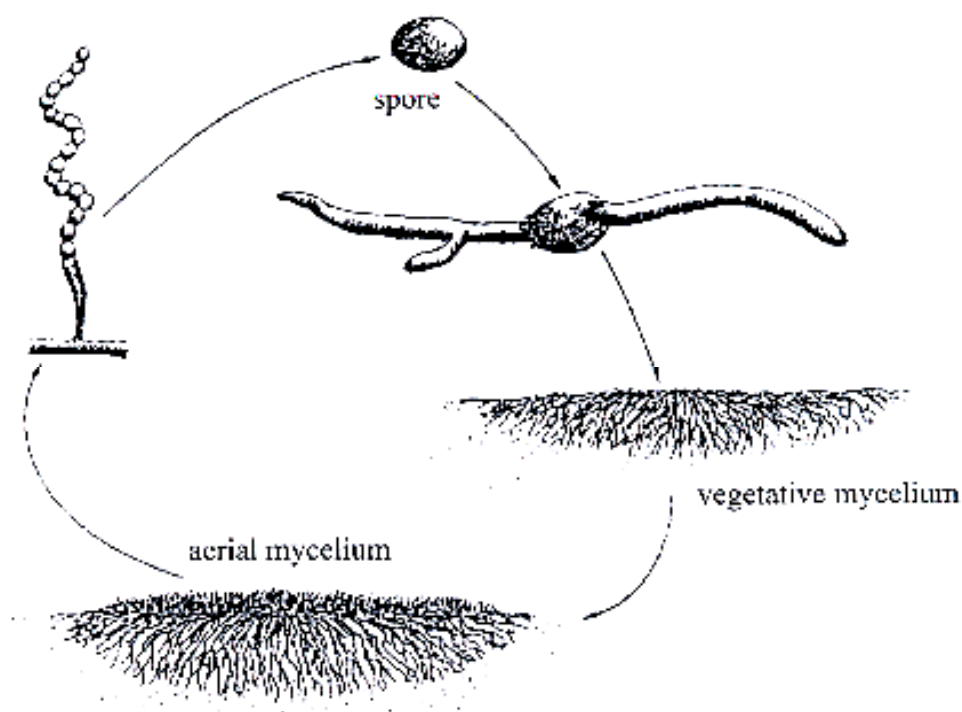
(1) quinate/shikimate dehydrogenase (2) 3-dehydroquininate dehydratase (3) quinate hydrolyase (4). 3-dehydroshikimate dehydratase

ที่มา: Herrmann (1995)

Streptomyces venezuelae

ลักษณะทั่วไป

Streptomyces venezuelae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก อยู่ในอันดับ (Order) Actinomycetales วงศ์ (Family) Actinomycetaceae เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobe) ใช้สารประกอบอินทรีย์หลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างพลังงานและการเจริญ *Streptomyces* มีการเจริญเป็นเส้นใยคล้ายเชื้อรา เรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) โดยมีวงจรชีวิตดังภาพที่ 6 เมื่อสปอร์งอกบนอาหารแข็งจะมีเส้นใยสำหรับยึดติดกับผิวอาหารเรียกว่า เส้นใยอาหารที่มีการแตกกิ่ง (branched substrate mycelium) และเมื่อเจริญเต็มที่จะมีการสร้างเส้นใยชูขึ้นเรียกว่าเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งจะมีการสร้างสปอร์อยู่ที่ปลายของเส้นใยอากาศ (Williams *et al.*, 1989) จากการศึกษาพบว่า *Streptomyces* ส่วนใหญ่มีโครโมโซมเป็นเส้นตรง (linear) (Birch *et al.*, 1990) มีขนาดจีโนมประมาณ 8 เมกะเบส (Huang *et al.*, 1998) มีปริมาณ G+C ประมาณ 72 เปอร์เซ็นต์ (Williams *et al.*, 1989)



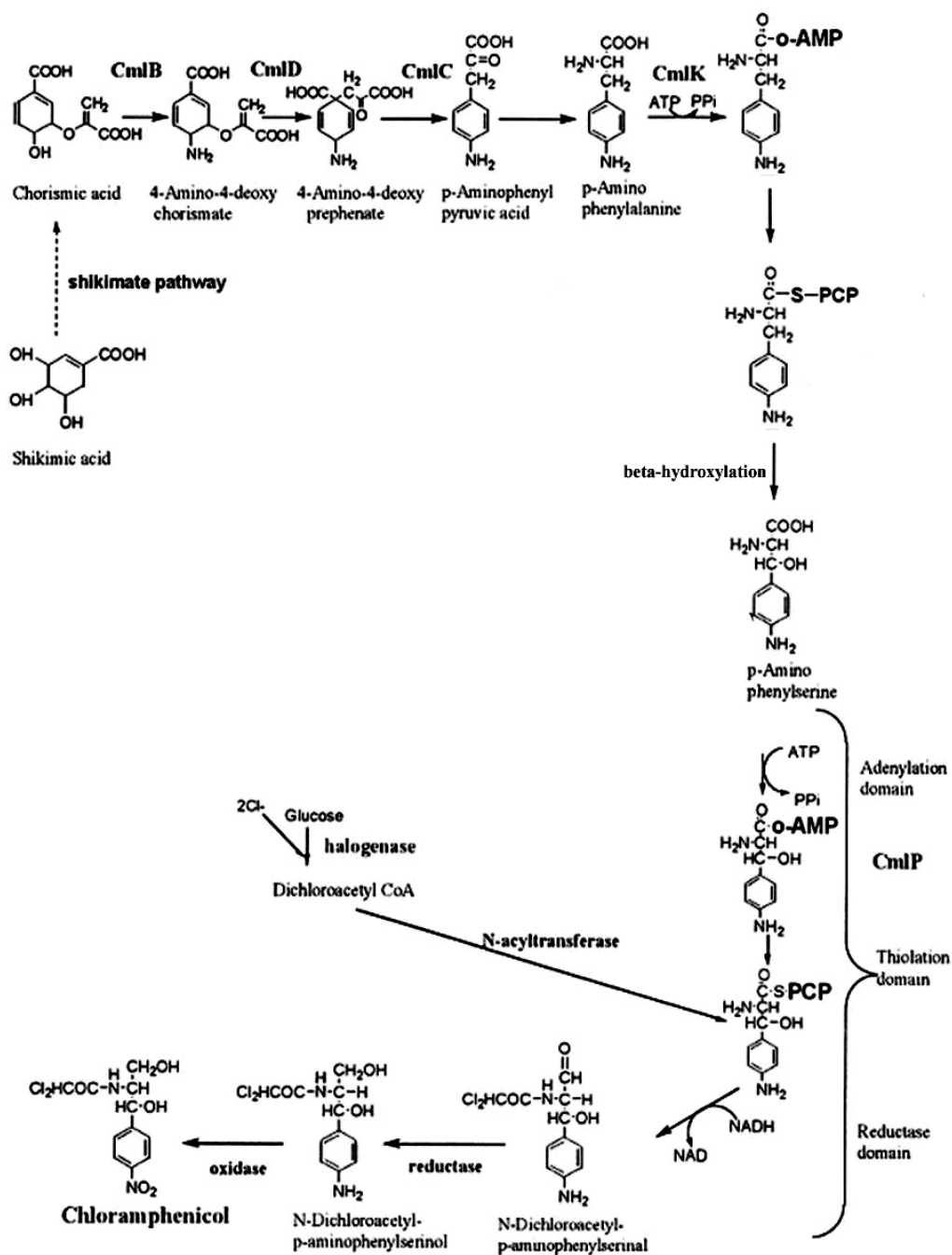
ภาพที่ 6 วงจรชีวิตของ *Streptomyces*

ที่มา: Kieser *et al.* (2000)

ความสำคัญ

Streptomyces venezuelae มีความสำคัญอย่างมากในการผลิตสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ซึ่งมีสมบัติในการต้านแบคทีเรียแกรมลบโดยเฉพาะใน *Shigella sonnei* และ *Rickettsia prowasekii* (Ehrlich *et al.*, 1947) นอกจากนี้ยังใช้ในการรักษาโรคไทฟอยด์อีกด้วย (Woodward *et al.*, 1948) ซึ่งคลอแรมฟินิคอล เป็นสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างเป็น aromatic ring ซึ่งได้รับจาก chorismate ที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ วิถี shikimate (ภาพที่ 7)

จากการศึกษาคลอแรมฟินิคอลใน *S. venezuelae* พบว่าการที่คลอแรมฟินิคอล สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ เนื่องจากคลอแรมฟินิคอลนั้นไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ribosomal peptidyl transferase ซึ่งมีความสำคัญในการดำรงชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย การที่คลอแรมฟินิคอลสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้แต่ไม่มีผลต่อ *S. venezuelae* เองนั้น เนื่องมาจากการเติมหมู่ฟอสเฟตที่โมเลกุลของคลอแรมฟินิคอล ซึ่งเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ chloramphenicol phosphotransferase (CPT) ทำให้ *S. venezuelae* ทนต่อคลอแรมฟินิคอลที่สร้างขึ้นเอง (Izard, 2001)



ภาพที่ 7 วิธีการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล

ที่มา: He *et al.* (2001)

การศึกษาหน้าที่ของยีนโดยวิธียีนดิสรัปชันใน *S. venezuelae*

ยีนดิสรัปชัน (gene disruption) เป็นการทำให้เกิดการกลายที่ตำแหน่งยีนจำเพาะบนโครโมโซมวิธีหนึ่ง นิยมใช้ศึกษาหน้าที่ของยีน วิธีการนี้ทำโดยการแทรกชิ้นดีเอ็นเอเพื่อยับยั้งการทำงานของยีน (insertional inactivation) โดยการนำชิ้นของยีน เชื่อมเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งมีสมบัติเป็น non-replicative เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เจ้าบ้าน (host) จะเพิ่มจำนวนไม่ได้ แต่จะแทรกเข้าไปในโครโมโซม ณ ตำแหน่งของยีนนั้น โดยเกิดโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน ทำให้ดีเอ็นเอพาหะแทรกอยู่บนโครโมโซม ณ ตำแหน่งของยีนนั้น ซึ่งสามารถทำลายการแสดงออกของยีนนั้นได้ หรืออาจทำให้เกิดการกลายของยีนที่ต้องการศึกษานั้น โดยทั่วไปการเกิดครอสซิงโอเวอร์ตำแหน่งเดียว (single crossing over) จะเกิดขึ้นได้ง่ายกว่า นิยมใช้ในการศึกษายีนที่ทำงานร่วมกันเป็นกลุ่ม (cluster) เนื่องจากเมื่อเกิด single crossing over ที่ยีนใดยีนหนึ่งบนกลุ่มยีน จะทำให้ยีนที่อยู่ถัดไป (down stream gene) ไม่สามารถทำงานได้ แต่ในกรณีที่ต้องการศึกษายีนเดี่ยว (single gene) โดยวิธีดิสรัปชันจะต้องสร้างยีนกลายด้วยการแทรกยีนเครื่องหมาย (marker gene) บนยีนที่ต้องการศึกษาเพื่อให้เกิดการกลายบนยีนนั้นก่อนที่จะเชื่อมเข้ากับพาหะ เมื่อพลาสมิดสายผสมถูกนำเข้าสู่เซลล์ จะเกิดครอสซิงโอเวอร์สองตำแหน่ง (double crossing over) ทำให้เกิดการแทนที่ระหว่างยีนกลายกับยีนปกติบนโครโมโซมแล้วจึงศึกษาสายพันธุ์กลายที่ได้ การทำยีนดิสรัปชันนิยมใช้กันมากในการศึกษายีนใน *S. venezuelae* ดังเช่นการศึกษาต่อไปนี้

การตรวจสอบหน้าที่ของยีน *pabAB* ที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ 4-amino-4-deoxychorismate (ADC) synthase ว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คลอแรมฟินิคอล โดยเมื่อทำยีนดิสรัปชันแล้วทำให้ *S. venezuelae* ไม่สามารถผลิตคลอแรมฟินิคอลได้แสดงว่า *pabAB* เกี่ยวข้องกับการผลิตสารปฏิชีวนะดังกล่าว (He *et al.*, 2001)

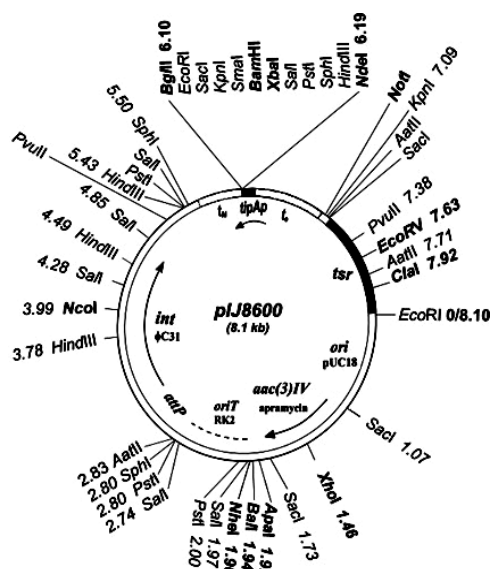
การศึกษาหน้าที่ของยีนที่สังเคราะห์ dichloroacetyl ที่เป็นองค์ประกอบประเภท halogen ในโครงสร้างของคลอแรมฟินิคอล ที่ผลิตจาก *S. venezuelae* สายพันธุ์ ISP5230 พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องนั้นมีตำแหน่งอยู่บน ORF11 (*cmlK*) และ ORF12 (*cmlS*) (ภาพที่ 7) ดังนั้นจึงศึกษาหน้าที่ของยีน โดยทำให้เกิดยีนดิสรัปชันบริเวณดังกล่าว ทำให้ได้สายพันธุ์กลายสองสายพันธุ์ คือ *S. venezuelae* สายพันธุ์ VS1111 และ VS1112 ที่ทำการกลายที่ยีน *cmlK* และ *cmlS* ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสายพันธุ์กลายทั้งสองสายพันธุ์นั้น ผลิตสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับคลอแรมฟินิคอล (analog) โดยมีหมู่ acetyl ที่ไม่ใช่สารประกอบประเภท halogen แทนที่หมู่ dichloroacetyl ที่มีอยู่ใน

คลอแรมฟินิคอล แสดงให้เห็นว่ายีนทั้งสอง นั้นมีความสำคัญในการควบคุมการสังเคราะห์หมู่ dichloroacetyl ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการสร้างสารปฏิชีวนะนี้ (Piraece *et al.*, 2004)

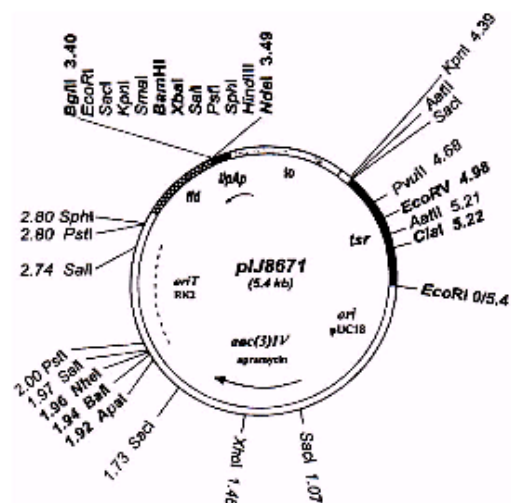
คอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces*

การเกิดคอนจูเกชันสามารถเกิดได้โดยทั่วไปในแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก ซึ่งจะเกิดการส่งถ่ายพลาสมิดจากเซลล์ของผู้ให้ (donor) ไปยังเซลล์ผู้รับ (recipient) โดยการเกิดคอนจูเกชันอาศัยการทำงานของยีนที่สำคัญในพลาสมิด 2 ส่วน คือ กลุ่มยีน *tra* ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการส่งถ่ายพลาสมิด และ *oriT* (origin of transfer) ซึ่งมีหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นและเป็นปลายที่จะกลับมาเชื่อมกันของพลาสมิดในการส่งถ่าย เรียกพลาสมิดที่มีสมบัติเช่นนี้ว่า self-transmissible plasmid การเกิดคอนจูเกชันใน *E. coli* จะมีการสร้างเซ็กซ์พิลัส (sex pilus) เพื่อใช้ในการส่งถ่าย ซึ่งไม่มีรายงานในแบคทีเรียแกรมบวก (Snyder and Champness, 1997)

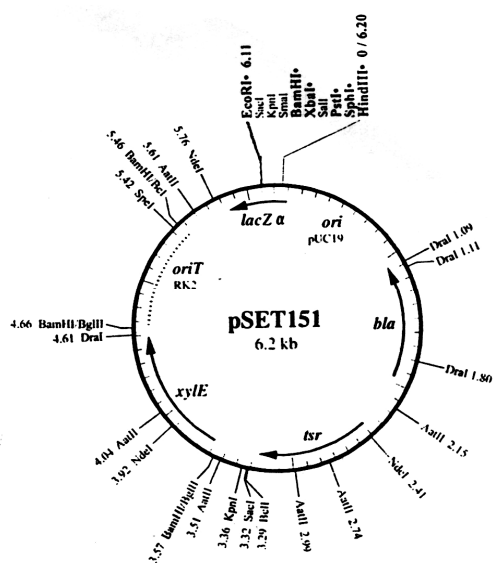
E. coli ที่ใช้ในการทำคอนจูเกชันต่างสกุล ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ S17-1 ที่มียีน *tra* จากพลาสมิด RP4 อยู่บนโครโมโซม (Mazodier *et al.*, 1989) และสายพันธุ์ ET12567 ที่มียีน *tra* อยู่บนพลาสมิด pUZ8002 ซึ่งเป็นพลาสมิดแบบ non-transmissible plasmid (Sia *et al.*, 1996) โดย *Streptomyces* นั้นมีระบบป้องกัน โดยทำลายดีเอ็นเอที่แปลกปลอม (restriction modification system) (Macneil *et al.*, 1988) ดังนั้นจึงนิยมส่งถ่ายดีเอ็นเอผ่านเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ที่ขาดการเติมหมู่เมทิลเสียก่อน แล้วจึงนำมาถ่ายเข้าสู่ *Streptomyces* เพื่อให้ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายพลาสมิดสูงขึ้น โดยสายพันธุ์ S17-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีการเติมหมู่เมทิลในดีเอ็นเอตามปกติ ส่วนสายพันธุ์ ET12567 จะขาดการเติมหมู่เมทิลเนื่องจากมีจีโนไทป์เป็น *dam*⁻ และ *dcm*⁻ ซึ่งทำให้ ET12567 มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Streptomyces* ที่มีระบบการป้องกัน โดยการทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอมที่มีการเติมหมู่เมทิลได้ดีกว่า (Flett *et al.*, 1997) พลาสมิดที่ใช้สำหรับการทำคอนจูเกชันในปัจจุบันล้วนเป็นพลาสมิดที่ไม่สามารถจำลองตัวเองได้ใน *Streptomyces* (non-replicative plasmid) ได้แก่ pIJ8600 (ภาพที่ 8 ก; Sun *et al.*, 1999), pIJ8671 (ภาพที่ 8 ข; Sun *et al.*, 1999), pSET151 (ภาพที่ 8 ค; Bierman *et al.*, 1992), pSET152 (ภาพที่ 8 ง; Bierman *et al.*, 1992) ซึ่งจะสามารถเข้าไปแทรกตัวกับโครโมโซมได้ก็ต่อเมื่อเกิด site-specific recombination ของตำแหน่ง attachment site (*attP*) ของพลาสมิด ϕ C31 ที่อยู่บนพลาสมิดนั้นกับตำแหน่ง *attB* บนโครโมโซม (Bierman *et al.*, 1992; Thorepe *et al.*, 2000) หรือโดยการเกิดโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันของชิ้นดีเอ็นเอจาก *Streptomyces* ที่โคลนเข้าไปในพลาสมิด (Bierman *et al.*, 1992)



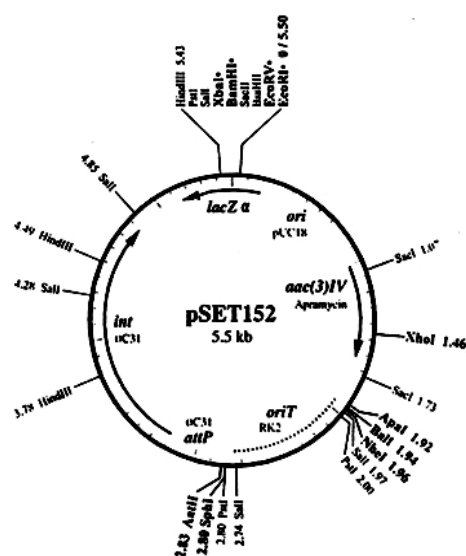
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 8 พลาสมิดสำหรับทำคอนจูชันต่างสปีชีส์ระหว่าง *E. coli* กับ *Streptomyces*

(ก) pIJ8600 (ข) pIJ8671 (ค) pSET151 (ง) pSET152

ที่มา: Kieser *et al.* (2000)

วิธีการทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces* ทำได้โดยการเตรียมเซลล์ *E. coli* ผู้ให้และการเตรียมสปอร์ของ *Streptomyces* ผู้รับ แล้วนำมาผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นนำไปเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และคัดเลือกผู้รับที่มีพลาสมิดหรือเอกซ์คอนจูแกนต์ (exconjugant) โดยใช้ยาปฏิชีวนะ (Kieser *et al.* 2000) ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดมีสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่างกัน ทำให้ต้องศึกษาวิธีการให้เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด (Kitani *et al.*, 2000)

อัตราส่วนของสปอร์ *Streptomyces* ผู้รับต่อเซลล์ *E. coli* ผู้ให้ เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการคอนจูเกชัน ตัวอย่างเช่น การทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *S. lavendulae* FRI-5 และ *E. coli* ET2567 (pUZ8002) ที่มีพลาสมิด pSET152 สำหรับส่งถ่ายบนอาหารแข็ง ISP2 ที่มี 10 mM MgCl₂ ประสิทธิภาพที่ได้จะสูงขึ้น เมื่อค่าอัตราส่วนของผู้รับต่อผู้ให้มีค่าต่ำลง (ประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 1.6×10^{-5} - 3.9×10^{-8} exconjugation/recipient) (Kitani *et al.*, 2000)

ชนิดของอาหารแข็งก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันต่างสกุล ตัวอย่างเช่น การทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *S. lavendulae* FRI-5 และ *E. coli* ET2567 (pUZ8002) บนอาหารแข็ง R5 ที่มี 10 mM MgCl₂ พบว่าไม่มีการส่งถ่ายพลาสมิดแต่สามารถส่งถ่ายได้ดีเมื่อใช้อาหารแข็ง ISP2 และ MS ที่มี 10 mM MgCl₂ (Kitani *et al.*, 2000)

อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ ก็ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันใน *S. lividans* พบว่าการกระตุ้นสปอร์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันสูงขึ้น 5-10 เท่า (Mazodier *et al.*, 1989) อย่างไรก็ตามใน *S. lavendulae* FRI-5 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แต่ไม่ได้ช่วยให้ประสิทธิภาพสูงขึ้น (Kitani *et al.*, 2000)

นอกจากการคอนจูเกชันโดยอาศัยสปอร์แล้ว ยังสามารถใช้เส้นใยแทนได้ด้วย เช่น การคอนจูเกชันระหว่าง *S. fradiae* และ *E. coli* S17-1 เมื่อใช้เส้นใยที่ทำให้แตกหักพบว่ามีประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันไม่ต่างจากการใช้สปอร์ (Bierman *et al.*, 1992)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

สายพันธุ์	สมบัติ	แหล่งที่มา/เอกสารอ้างอิง
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 relA1 thiΔ (lac-proAB) F'(traD36 proAB+ lacI^q lacZΔM15)</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>Sup E44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA thi relA1 lac-F' [proAB⁺ lacI^f lacZ Δ M15 Tn10 (tet^r)]</i>	Bullock <i>et al.</i> (1987)
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdS Km^r</i>	MacNeil <i>et al.</i> (1992);
<i>S. venezuelae</i>	Chloramphenicol production	John Innes Institute, UK

หมายเหตุ Km = กานามัยซิน (kanamycin) และ Cm = คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol)

ตารางที่ 2 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

พลาสมิด	สมบัติ	แหล่งที่มา/เอกสารอ้างอิง
pJET1.2/blunt	Amp ^r	Fermentus
pSET152	ColE1 replicon <i>oriT attP int Apr^r lacZα</i>	Bierman <i>et al.</i> (1992)
pSET151	ColE1 replicon <i>oriT Amp^r Thio^r lacZα</i>	Bierman <i>et al.</i> (1992)
pUC18	Amp ^r <i>lacZα</i>	Norrande <i>et al.</i> (1983)

หมายเหตุ Apr = อะพราไมซิน (apramycin), Amp = แอมพิซิลิน (ampicillin) และ

Thio = ไธโอสเตรปทอน (thiostrepton)

2. สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัยนี้ซื้อจากบริษัท Amresco (USA), APS Finechem (Australia), Becton Dickinson (USA), Fluka (Switzerland), Himedia (India), Hispanlab (Spain), Macherey-Nagel (Germany), Merck (Germany), Scharlau (Spain), Sigma (Germany)

เอนไซม์ตัดจำเพาะจากบริษัท Fermentas (USA) เอนไซม์ไลโซไซม์จากบริษัท Amresco (USA) และ Fluka (Switzerland) เอนไซม์ RNaseA จากบริษัท Amresco (USA) เอนไซม์ T4 DNA ligase จากบริษัท Fermentas (USA) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จากบริษัท Invitrogen (USA) และ Fermentas (USA) ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb DNA ladder) จากบริษัท Fermentas (USA)

3. วิธีพื้นฐานที่ใช้สำหรับ *Streptomyces*

วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับ *Streptomyces* ใช้ตามวิธีการของ Kieser *et al.* (2000)

3.1 การเลี้ยงและ การเก็บรักษา *Streptomyces*

การเลี้ยง *Streptomyces* บนอาหารแข็ง ทำโดยใช้ก้านไม้พันสำลีปลอดเชื้อจิ้มสปอร์จาก stock culture มาเกลี่ยให้ทั่วบนจานอาหารแข็ง Mannitol soya flour (MS 1 L; 20 g mannitol, 20 g soya flour, 20 g agar ; Hobbs *et al.*, 1989) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3-5 วัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวจะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีขวดสปริงม้วนเป็นวงอยู่ที่ก้นขวด เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยใส่สารละลายสปอร์ลงในอาหารเหลว Tryptone soya broth (TSB สำเร็จรูป) ในอัตราส่วน 1:100

การเก็บสปอร์ของ *Streptomyces* จะเก็บจากเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS เป็นเวลาประมาณ 3-5 วัน โดยเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารแข็ง แล้วใช้ก้านไม้พันสำลีจิ้มสปอร์บนผิวอาหารให้หลุดออกเบาๆ จากนั้นนำก้อนสำลีวางลงให้ซับน้ำและสปอร์ไว้ แล้วใช้หลอดฉีดยาคูดสารละลายสปอร์ผ่านก้อนสำลี เพื่กรองเส้นใยออก นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1-2 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วแขวนลอยสปอร์ในกลีเซอรอลเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การเลี้ยง *Streptomyces* ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะทำได้โดยเติมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมลงในอาหาร ให้มีความเข้มข้นดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยง *Streptomyces* และ *E. coli*

Antibiotics stock solution (mg/ml)	Final concentration in media (µg/ml)				
	<i>Streptomyces</i>			<i>E. coli</i>	
	Agar	Broth	Overlay (µg/plate)	Agar	Broth
Ampicilin (100)	-	-	-	100	50
Apramycin (50)	100	50	100(2000)	100	50
Chloramphenicol (200)	-	-	-	50	25
Kanamycin (50)	-	-	-	50	25
Nalidixic acid (25)	25	-	25(500)	-	-
Thiostrepton (50 in DMSO)	50	5	50(1000)	-	-

การสกัดดีเอ็นเอจาก *Streptomyces*

นำเชื้อ *S. venezuelae* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1-2 นาที เทสารละลายทิ้ง นำเส้นใยที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ (Hopwood *et al.*, 1985) โดยเติม lysis solution [0.3 M sucrose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA (pH 8.0)] ที่มีไลโซไซม์ 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และ RNase A 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงให้เส้นใยกระจาย นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที โดยจะใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงระหว่างบ่ม 2-3 ครั้ง จากนั้นเติม sodium dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้ของเหลวผสมกันดี เติมสารละลาย phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนบนถ่ายลงสู่หลอดใหม่ (อาจทำซ้ำ 2-3 ครั้ง ถ้ามีปริมาณตะกอนโปรตีนมาก) เติม 3M sodium acetate ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูดได้ เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ผสมโดยพลิกหลอดไปมา ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลาย

ออก แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดูดสารละลาย ออกให้หมด ทิ้งให้ตะกอนแห้ง แล้วละลายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส ในระยะยาว

4. วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับ *E. coli*

วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับ *E. coli* ใช้ตามวิธีการของ Sambrook *et.al.* (2001)

4.1 การเลี้ยงและการเก็บรักษา *E. coli*

เชื้อเชื้อ *E. coli* ลงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB 1 L; 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl และ 15 g agar; pH 7.2) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

การเลี้ยงในอาหารเหลว จะเติมเชื้อลงขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร Luria-Bertani (LB; สูตรเหมือนเดิม แต่ไม่เติม agar) ในอัตราส่วน 1:100 นำไปเขย่า 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

การเลี้ยง *E. coli* ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะทำได้โดยเติมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมลงในอาหาร ให้มีความเข้มข้นตามตารางที่ 3

4.2 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli*

การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* ใช้วิธี alkaline lysis ของ Sambrook *et.al.* (2001) โดยนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร LB เป็นเวลาข้ามคืน ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อเก็บเซลล์ เติมน้ำจากนั้นละลายตะกอนด้วย Solution I [50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)] ที่เย็นจัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แช่ไว้ในน้ำแข็ง 10-15 นาที เติม Solution II (0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) ที่เตรียมสำหรับใช้ทันที 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาทันทีจนเข้ากันดี แล้วแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที เติม Solution III (5 M potassium acetate 60 ml, glacial acetic 17.5 ml ในน้ำกลั่น 28.5 ml) ที่เย็นจัด

ปริมาตร 150 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้ของเหลวผสมกันดี แล้วแช่ในน้ำแข็ง นาน 3-5 นาที เติมน RNase A 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายถ่ายใส่หลอดใหม่ เติมน

phenol:chloroform:isoamyl alcohol ปริมาตร 1 เท่า ของสารละลายที่ดูดได้ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมเอธานอลสัมบูรณ์ ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ดูดได้ พลิกหลอดไปมาเบาๆ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 1 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมด ตั้งไว้ให้ตะกอนแห้ง จึงละลายดีเอ็นเอใน TE ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.3 การเตรียมเซลล์คอมพิเทนต์ (competent cell)

การเตรียมเซลล์คอมพิเทนต์ของ *E. coli* ทำตามวิธีของ Chung *et al.* (1989) โดยนำเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนในอาหาร LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เช้า 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส จนมีค่าดูดแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เป็น 0.3-0.4 (ประมาณ 2-3 ชั่วโมง) ถ่ายใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วแช่น้ำแข็งนาน 15-20 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ ที่ 3,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เทอาหารทิ้ง แล้วเติม Transformation and storage solution [TSS; 10 % (w/v) polyethylene glycol (PEG) MW=8000, 10 % dimethylsulphoxide (DMSO), 100 mM $MgCl_2$, pH 6.5] ที่เย็นจัด ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตต์ขนาด 1000 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงเบาๆ ให้เซลล์แขวนลอยดีในสารละลาย โดยแบ่งเก็บในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร ที่ -80 องศาเซลเซียส ถ้ายังไม่นำมาใช้ในทันที

4.4 การทรานสฟอร์มเมชัน (transformation) ใน *E. coli*

การทรานสฟอร์มเมชัน ใช้วิธี heat-shock (Sambrook *et al.*, 2001) โดยใช้เซลล์คอมพิเทนต์ 100 ไมโครลิตร แล้วเติมพลาสมิด 2-10 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตต์ผสมเบาๆ ตั้งไว้ในน้ำแข็ง 20 นาที จึงบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที แล้วนำกลับไปแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที เติมหาอาหาร LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เช้า 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จึงแบ่งเซลล์ 100 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB (มียาปฏิชีวนะตามความ

เหมาะสม) ในกรณีคัดเลือกลายผสมเกลี่ยกับอาหารแข็ง LB ด้วย X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน dimethylformamide ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 7 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน โดยโคโลนีที่มีพลาสมิดสายผสมจะปรากฏเป็นสีขาว ขณะที่โคโลนีที่ไม่มีจะเป็นสีฟ้า

5. เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

5.1 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (agarose gel electrophoresis)

ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6x loading beffer (0.25% (w/v) bromophenol blue, 0.25% (w/v) xylene cyanol, 30% glycerol) ในอัตราส่วน 5:1 แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder; Fermentus, USA) ใช้อะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 1x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยการย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบภายใต้แสง UV และถ่ายภาพ

5.2 การสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล

ใช้ชุดอุปกรณ์ Gel/PCR Fragments Extraction Kit (Geneaid, Korea) และทำตามขั้นตอนในคู่มือ โดยตัดเจลในตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร หลอดละประมาณ 300 มิลลิกรัม เติม DF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที จนกว่าเจลละลายหมด กลับหลอดไปมาระหว่างที่ทำการบ่ม 2-3 ครั้ง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง คูณสารละลายปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ลงใน DF column ที่วางอยู่ใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อวินาที 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ถ้ายังมีสารละลายเหลือให้ดูดมาใส่ใน DF column แล้วทำตามขั้นตอนข้างต้น หลังจากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิตร หลอดใหม่ เติม elution buffer ปริมาตร 15-50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเก็บสารละลายดีเอ็นเอ นาน 2 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การทำสารละลายดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดอุปกรณ์

ใช้ชุดอุปกรณ์ Gel/PCR Fragments Extraction Kit (Geneaid, Korea) และทำตามขั้นตอนในคู่มือ โดยเติมสารละลายดีเอ็นเอในหลอด 1.5 ไมโครลิตร หลอดละประมาณ 50 ไมโครลิตร เติม DF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร คูดสารละลายใส่ลงใน DF column ที่วางอยู่ใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทของเหลวทิ้ง หลังจากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เทของเหลวทิ้งปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม elution buffer ปริมาตร 15-50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเก็บสารละลายดีเอ็นเอ นาน 2 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR; polymerase chain reaction)

การทำพีซีอาร์ใช้ ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม และไพรเมอร์อย่างละ 0.05 พิโคโมล (ตารางที่ 4) สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1x PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 10 % DMSO, 0.5 unit *Taq* DNA polymerase ในปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะดังนี้

รอบที่ 1	94	องศาเซลเซียส	4	นาที
รอบที่ 2-29	94	องศาเซลเซียส	30	วินาที
อุณหภูมิ annealing ตามชนิดของไพรเมอร์		1	นาที	
	72	องศาเซลเซียส	1	นาที
รอบที่ 30	94	องศาเซลเซียส	30	วินาที
อุณหภูมิ annealing ตามชนิดของไพรเมอร์		1	นาที	
	72	องศาเซลเซียส	4	นาที

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ไพรเมอร์	Ta (°C)	เอกสารอ้างอิง
Apr C-1 5'GACGTCGCGGTGAGTTCAGGC3'	65	Choi <i>et al.</i> (2004)
Apr N-2 5'CCCCGGCGGTGTGCT G3'		
ATT012 5'TGACTGAGTTGGACACCATCGC 3'	58	นิรินทรียา (2548)
ATT013 5'CCTGTCGATCCTCTCGTGAC 3'		
ATT061F 5'TTTAAGCTTGACAACACCGACATCCCSGG 3'	60	งานวิจัยนี้
ATT061R 5'TTTGAATTCCCGGTCATCTGCTGSACCTGG 3'		
M13 Forward 5'CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC3'	58	Messing(1983)
M13 Reverse 5'GTCATAGCTGTTTCCTGTGTGA3'		

หมายเหตุ W=A/T; S=G/C; Y=C/T; GAATTC, CTGCAG = ตำแหน่งตัดของ *EcoRI* และ *PstI*
ตามลำดับ

5.5 การหาลำดับเบส

สกัดพลาสมิดและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดอุปกรณ์ Gel/PCR Fragments Extraction Kit (Geneaid, Korea) ตามวิธีในข้อ 5.3 และส่งไปหาลำดับเบสที่ 1st BASE ประเทศมาเลเซีย

5.6 การตัดและเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

ตัดพลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกับที่ใช้ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่จะนำมาเชื่อม ในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเพื่อสร้างพลาสมิดสายผสมใช้อัตราส่วนพลาสมิดต่อดีเอ็นเอเท่ากับ 1 ต่อ 3 ผสมในปฏิกิริยาที่มี 10x ligation buffer 2 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase (1 U/μl) 1 ไมโครลิตรในปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียสข้ามคืน

Southern blot hybridisation

Southern blot hybridisation (Southern, 1975) ทำโดยนำเจลที่ทำอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแล้ว แช่ใน 0.25 M HCl นาน 15 นาที (depurination) แล้วแช่ใน Denaturing solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) นาน 15 นาที 2 ครั้ง จากนั้นจะทำ Southern blot โดยใช้ Alkaline transfer buffer (0.25 M NaOH, 1.5 M NaCl) ย้ายดีเอ็นเอไปสู่เมมเบรน (Hybond N⁺; Amersham Pharmacia Biotech, UK) แบบ capillary transfer เป็นเวลาข้ามคืน

Dot blot hybridisation ทำโดยนำสารละลายดีเอ็นเอไป denature ในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 10 นาที จากนั้นจึงหยดสารละลายดีเอ็นเอลงบนเมมเบรน ที่ละ 2-3 ไมโครลิตร รอให้เมมเบรนแห้งดีแล้วจึงจะนำไปใช้ต่อไป

การติดฉลากดีเอ็นเอที่ใช้เป็นโพรบ ใช้ชุดอุปกรณ์ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roach) โดยใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม มาละลายน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 16 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม DIG High prime 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ป่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา หนึ่งคืน หยดปฏิกิริยาคด้วยความร้อน 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทำ hybridisation และการตรวจสอบผล ใช้ชุดอุปกรณ์ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roach) ทำ pre-hybridisation โดยป่ม hybridization buffer ที่ 37 องศาเซลเซียส เติมในถุงที่มีเมมเบรนปริมาตร 3.5 มิลลิตร ต่อเมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร นำไปป่มที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นเท pre-hybridisation buffer ออก เติมดีเอ็นเอโพรบที่ denature ในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที โดยเติมโพรบปริมาตร 1-2 ไมโครลิตร ต่อ hybridization buffer 1 มิลลิตร แล้วเติมลงในถุงเมมเบรนปริมาตร 3.5 มิลลิตร ต่อเมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร ป่มไว้ที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำเมมเบรนมาล้างด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 2x SSC และ 0.1 % (w/v) SDS ที่อุณหภูมิห้อง เข้า 50 รอบต่อนาที นาน 20 นาที 2 ครั้ง และล้างด้วย สารละลาย 0.1x SSC และ 0.1 % (w/v) SDS ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 15 นาที 2 ครั้ง โดยเข้าบ้างเป็นครั้งคราว จากนั้นนำไปล้างใน washing buffer [0.3% tween 20 ใน maleic acid buffer (0.1 M maleic acid, 0.15M NaCl,

pH 9.5)] นาน 1-5 นาที จึงนำไปป้อนใน blocking solution ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 50 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แล้วนำไปป้อนใน antibody solution (alkaline phosphatase 1: 10,000 ใน maleic acid buffer) เขย่า 50 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แล้วนำเมมเบรนไปล้างใน washing buffer โดยเขย่า 50 รอบต่อนาที นาน 15 นาที 2 ครั้ง เติม detection buffer (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 9.5) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ป้อนที่อุณหภูมิห้อง 2-5 นาที จากนั้นนำเมมเบรน วางบนแผ่นพลาสติก หยด CSPD ready to use จนทั่วแผ่นเมมเบรน นำพลาสติกอีกแผ่นปิดทับโดยไม่ให้มีฟองอากาศ ริดของเหลวส่วนเกินออก บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำไปทาบกับฟิล์มนาน 30 นาที แล้วล้างฟิล์มด้วย Developer และ Fixer (Kodak) ตามลำดับ

5.8 การวิเคราะห์ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโน

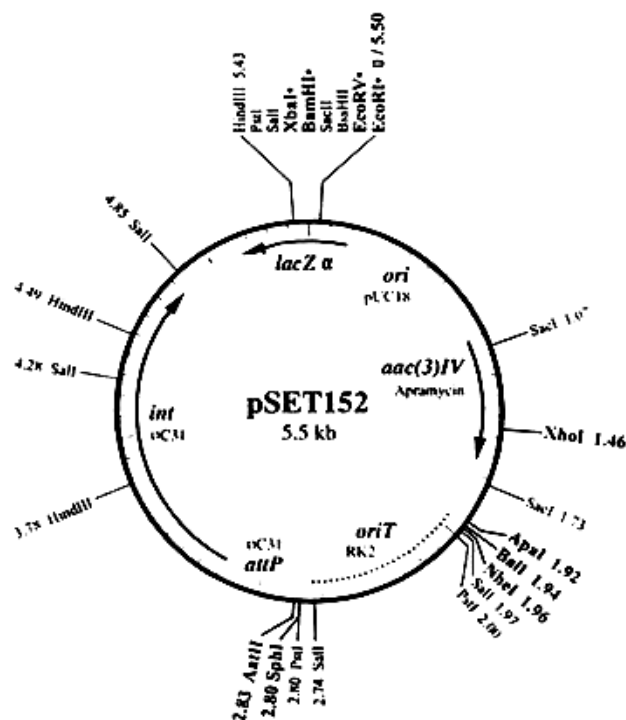
การแปลรหัสลำดับเบสเป็นลำดับกรดอะมิโนใช้โปรแกรม Six-Frame Translation (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/sixframe.html>) การค้นหาลำดับที่มีความคล้ายกันในฐานะข้อมูลใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul *et al.*, 1990) เปรียบเทียบลำดับเบสหรือลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี multiple alignment, clustering และใช้โปรแกรม ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1994) การหาคำแหน่งจุดจำของเอนไซม์ ตัดจำเพาะบนลำดับเบสอาศัยโปรแกรม NEBcutter 2.0 (<http://tool.neb.com/NEBcutter2/index.php>)

6. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *S. venezuelae* และ *E. coli* ET12567 (pUZ8002)

ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องับประสิทธิภาพของการส่งถ่ายพลาสมิด ในการเกิดคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *S. venezuelae* และ *E. coli* ET12567 (pUZ8002) ซึ่งดัดแปลงมาจาก Mazodier *et al.* (1989) โดยใช้พลาสมิด pSET152 ซึ่งเป็น mobilisable plasmid (ภาพที่ 9) โดยทำการศึกษาดังต่อไปนี้

6.1 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการกระตุ้นการงอกของสปอร์

ในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ใช้ขั้นตอนตาม (Kieser *et al.*, 2000) โดยเก็บสปอร์ของ *S. venezuelae* ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน (ตามข้อ 3.1) ปรับให้สปอร์มีความเข้มข้น 10^5 - 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรในอาหาร 2x YT (1 L: 16 g tryptone, 10 g yeast extract, 5 g NaCl) แล้วนำสปอร์ไปกระตุ้นการงอกที่อุณหภูมิห้อง 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทิ้งให้สปอร์เย็นลง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แวนลอยตะกอนใน 2x YT ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง TSA ที่มี 10 mM $MgCl_2$ บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส 3 วัน บันทึกจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร



ภาพที่ 9 พลาสมิด pSET152 ที่ใช้สำหรับทำคอนจูเกชันระหว่าง *S. venezuelae* และ *E. coli*

ET12567 (pUZ8002)

ที่มา: Kieser *et al.* (2000)

6.2 คอนจูเกชันต่างสกุล

6.2.1 การเตรียม *E. coli* ผู้ให้

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSET152) ข้ามคืนในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะอะพราไมซิน, กานามัยซิน และคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้นดังตารางที่ 3 เจือจางเซลล์ 1:100 ด้วยอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ แล้วเลี้ยงต่อที่สภาวะเดิม จนมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 (OD₆₀₀) อยู่ระหว่าง 0.4-0.6 จึงนำเชื้อที่ได้ 500 ไมโครลิตรลิตร ไปล้าง 2 ครั้งด้วยอาหาร LB ตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงแล้วละลายในอาหาร LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

6.2.2 การเตรียม *S. venezuelae* ผู้รับ

6.2.2.1 การเตรียมสปอร์ของ *S. venezuelae*

เลี้ยงเชื้อ *S. venezuelae* บนอาหาร MS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน เก็บสปอร์ตามข้อ 3.1 โดยให้สปอร์มีความเข้มข้น 10^8 - 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร 2x YT ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปกระตุ้นการงอกของสปอร์โดยการบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเย็นลงก่อนนำไปใช้

6.2.2.2 การเตรียมไมซีเลียมของ *S. venezuelae*

เลี้ยง *S. venezuelae* ในอาหารเหลวจะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีขวดดสปริงม้วนเป็นวงอยู่ที่ก้นขวด โดยใส่สารละลายสปอร์ลงในอาหารเหลว Tryptone soya broth (TSB สำเร็จรูป) ในอัตราส่วน 1:100 เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่เหมาะสม

6.2.3 การทำคอนจูเกชันต่างสกุล

ผสมผู้ให้และผู้รับเข้าด้วยกัน นำไปปั่นเหวี่ยง และละลายตะกอนด้วยอาหาร 2x YT ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมด้วยอาหาร 2x YT แล้วเกลี่ย

ส่วนผสมดังกล่าวปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อจานอาหาร บนอาหาร TSA (Oxoid) ที่มี 10 mM $MgCl_2$ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ก่อนเททับด้วยสารละลาย 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยยาปฏิชีวนะอะพราไมซิน และกรดนาลิซิก ความเข้มข้นตามตารางที่ 3 เพื่อคัดเลือก *Streptomyces* ที่ได้รับพลาสมิดหรือเอกซ์คอนจูแกนท์ (ex-conjugant) และกำจัด *E. coli* ตามลำดับ

6.3 การศึกษาประสิทธิภาพของการคอนจูกันต์ต่างสกุลระหว่าง *S. venezuelae* และ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSET152)

การทดลองนี้จะทำคอนจูกันต์ต่างสกุลโดยใช้ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSET152) เป็นผู้ให้ ตามวิธีในข้อ 6.2 โดยทำการศึกษาในสองสถานะคือ การใช้สปอร์ของ *S. venezuelae* เป็นผู้รับ และใช้ไมซีเลียมของ *S. venezuelae* เป็นผู้รับ คำนวณหาประสิทธิภาพของการคอนจูกันต์โดยคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างจำนวนเอกซ์คอนจูแกนต์กับจำนวนสปอร์หรือไมซีเลียมของผู้ให้ที่ใช้ทั้งหมด

6.4 การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนต์

นำโคโลนีเอกซ์คอนจูแกนต์ไปเขียนลงบนอาหาร TSA ที่มียาปฏิชีวนะดังกล่าว อีก 10 รอบ เพื่อยืนยันผลการต้านทานยาปฏิชีวนะจากพลาสมิดรวมทั้งกำจัด *E. coli* ที่อาจหลงเหลืออยู่ นำโคโลนีเอกซ์คอนจูแกนต์ที่เจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะไปสกัดดีเอ็นเอตามข้อ 3.2 และตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณยีนต้านยาอะพราไมซิน โดยใช้ไพรเมอร์ Apr C-1 และ AprC-2 (ตารางที่ 4) ตามวิธีข้อ 5.4

นำเอกซ์คอนจูแกนต์ไปตรวจสอบตำแหน่งการแทรกตัวของพลาสมิด pSET152 ในโครโมโซม โดยสกัดโครโมโซมตามวิธีข้อ 3.2 และทำ Southern blot hybridisation ตามวิธีข้อ 5.7 โดยใช้โพรบบริเวณ *attP* ของ pSET152 โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *HindIII* ได้โพรบขนาด 2.05 กิโลเบส

ตรวจสอบการสังเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอล ของ *S. venezuelae* โดยการตรวจสอบการเกิดวงใส (clear zone) ต่อเชื้อ *E. coli* JM109 ที่ไวต่อคลอแรมฟินิคอล

7. การโคลนและวิเคราะห์ยีน *aroE* ใน *S. venezuelae*

7.1 การออกแบบไพรเมอร์และการเพิ่มปริมาณยีน *aroE*

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *aroE* โดยการรวบรวมลำดับกรดอะมิโนของยีน *aroE* ในแอคติโนมัยซีทที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank และนำลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวมาทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW 1.82 แล้วหาบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ โดยการเพิ่มปริมาณยีน *aroE* จากโครโมโซมของ *S. venezuelae* โดยการทำให้ฟิชอาร์ตามวิธีการในข้อ 5.4 ในสภาวะที่เหมาะสม แล้วนำผลที่ได้ไปตรวจสอบด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีในข้อ 5.1 จากนั้นโคลนยีนที่ได้จากการทำให้ฟิชอาร์เข้าสู่พลาสมิด pUC18 และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* XL-1 Blue ตามวิธีในข้อ 4.5

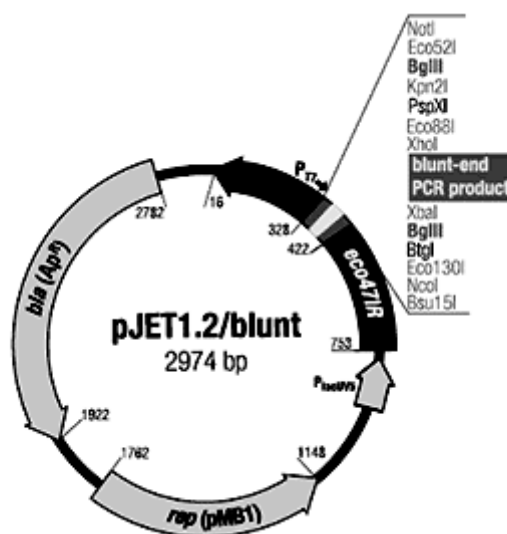
ตรวจสอบโคลนที่ได้โดยการสกัดพลาสมิดตามวิธีในข้อ 4.2 และพิสูจน์โคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม จากนั้นแยกขนาดด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เมื่อได้โคลนที่ต้องการ นำโคลนนั้นไปหาลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบสกับยีน *aroE* ที่มีในฐานข้อมูล

7.2 การตรวจหายีน *aroE* ด้วย Southern blot hybridisation

นำโครโมโซมของ *S. venezuelae* ไปตัดให้สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม และแยกขนาดโดยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำไปทำ Southern blot hybridisation ตามวิธีการข้อ 5.7 โดยใช้โพรบที่เตรียมได้จากข้อ 7.1

7.3 การโคลนยีน

เลือกโคลนชั้นดีเอ็นเอจากผลการทำ Southern blot hybridisation ในข้อ 7.2 โดยตัดชั้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากอะกาโรส เจลและสกัดดีเอ็นเอตามข้อ 5.2 นำไปตรวจสอบซ้ำเพื่อยืนยันว่ามีชั้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยการทำให้ฟิชอาร์ จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ โคลนเข้าไปใน pJET 1.2/blunt cloning vector (ภาพที่ 10) โดยใช้ชุดอุปกรณ์ CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentus, USA) ตรวจสอบโคลนโดยการทำ PCR จากนั้นเลือกโคลนที่เหมาะสมไปหาลำดับเบส



ภาพที่ 10 พลาสมิด pJET 1.2 blunt

ที่มา: Fermentus (USA)

8. การศึกษาหน้าที่ของยีน *aroE* ของ *S. venezuelae* ด้วยวิธีคอนจูกันข้ามสกุล

8.1 การสร้างพลาสมิดสายผสมเพื่อทำยีนดิสรัปชัน

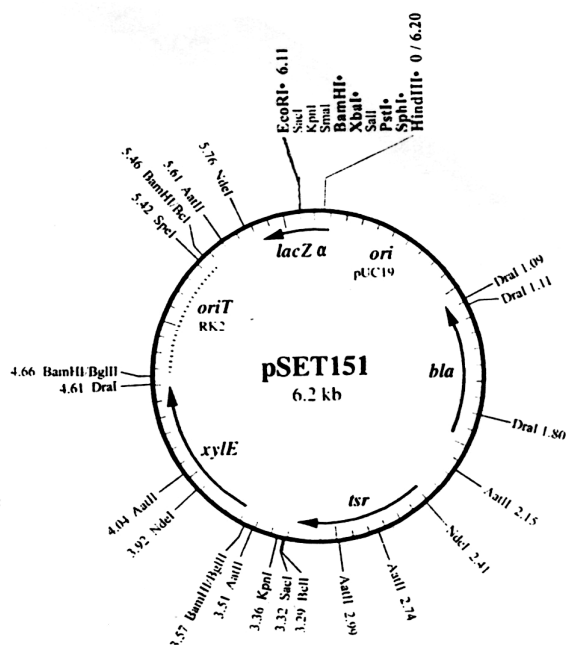
หลังจากโคลนยีน *aroE* เข้าพลาสมิด pUC18 ตามต้องการแล้ว จะย้ายชิ้นดีเอ็นเอ ดังกล่าวเข้าสู่พลาสมิด pSET151 (Bierman *et al.*, 1992) (ภาพที่ 11) ซึ่งเป็นพลาสมิดแบบ mobilisable แล้วทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* ET12567 (pUZ8002) สำหรับทำคอนจูกันข้ามสกุลต่อไป

8.2 การคอนจูกันข้ามสกุล

8.2.1 การเตรียม *E. coli* ผู้ให้

นำเชื้อ *E. coli* ET12567 (pUZ8002) ที่มีพลาสมิดในข้อ 8.1 มาเลี้ยงข้ามคืนในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะอะพราไมซิน กานามัยซิน และ คลอแรมฟินิคอล ตามความเข้มข้นในตารางที่ 3 เจือจางเซลล์ 1:100 ด้วยอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ แล้วเลี้ยงต่อที่สภาวะเดิม จนมีค่า

ดูความขุ่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 (OD_{600}) อยู่ระหว่าง 0.4-0.6 จึงนำเชื้อที่ได้ 500 ไมโครลิตร ติ่ง 2 ครั้งด้วยอาหาร LB ตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงแล้วละลายในอาหาร LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร



ภาพที่ 11 พลาสมิด pSET151 ที่ใช้สำหรับทำยีนดิสรับชันใน *S. venezuelae*
ที่มา: Bierman *et al.* (1992)

8.2.2 การเตรียม *S. venezuelae* ผู้รับ

เลี้ยง *S. venezuelae* ในอาหารเหลวจะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีขวดดัดสปริงม้วน เป็นวงอยู่ที่ก้นขวด โดยใส่สารละลายสปอร์ลงในอาหารเหลว Tryptone soya broth (TSB สำเร็จรูป) ในอัตราส่วน 1:100 เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.2.3 การทำคอนจูกันต่างสกุล

ทำตามวิธีในข้อ 6.2.3 บนอาหาร MS ที่มี 10 mM $MgCl_2$ และกรดอะมิโนทริปโตเฟน ฟีนอลอะลานีน ไทโรซีน อย่างละ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ก่อนเททับด้วยสารละลาย 1 มิลลิกรัม ซึ่งประกอบด้วยยาปฏิชีวนะ ไธโอเตรปทอน และกรดนาดีดิก ตามความเข้มข้นในตารางที่ 3 เพื่อคัดเลือก *S. venezuelae* ที่

ได้รับพลาสมิด และกำจัด *E. coli* ตามลำดับ จากนั้นจะนำโคโลนีของเชื้อที่ขึ้น ไปเจียลงบนอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะและกรดอะมิโนดังกล่าว อีก 10 รอบ เพื่อยืนยันผลการต้านทานยาปฏิชีวนะ จากพลาสมิดรวมทั้งกำจัด *E. coli* ที่หลงเหลืออยู่

9. การวิเคราะห์สายพันธุ์กลายของ *S. venezuelae*

9.1 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วยการทำพีซีอาร์

นำโคโลนีสายพันธุ์กลายที่เจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะไปสกัดดีเอ็นเอตามข้อ 3.2 และตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณยีนต้านยาปฏิชีวนะไรโอสเตรปทอน (*tsr*) โดยใช้ไพรเมอร์ ATT012 และ ATT013 (ตารางที่ 4) เพื่อยืนยันการส่งถ่ายพลาสมิด หรือตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ M13 Forward และ M13 Reverse (ตารางที่ 4) เพื่อตรวจสอบการแทรกตัวของพลาสมิด โดยหากเกิดการแทรกตัวจะไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนโดยไพรเมอร์คู่นี้ได้ จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

9.2 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายโดย Southern blot hybridisation

9.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอโพรบ

การเตรียมโพรบจากบริเวณยีน *tsr* โดยนำพลาสมิด pSET151 มาตัดด้วย เอนไซม์ *NdeI* นำไปแยกขนาดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีการในข้อ 5.1 แล้วสกัด ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบส ซึ่งเป็นส่วนของยีน *tsr* ออกจากเจลตามวิธีในข้อ 5.2 จากนั้นนำไปติด ฉลากโพรบตามวิธีในข้อ 5.7

9.2.2 การทำ Southern blot hybridisation

นำโครโมโซมของสายพันธุ์กลายไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม แยกขนาดโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสตามวิธีในข้อ 5.1 แล้วจึงนำไปทำ Southern blot hybridisation ตามวิธีในข้อ 5.7 ตรวจสอบขึ้นดีเอ็นเอที่มียีนเป้าหมาย ด้วยโพรบที่เตรียมไว้ในข้อ 9.2.1 โดยเลือกใช้โพรบที่เหมาะสม

9.3 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วยการเลี้ยงบนอาหาร minimal medium (MM)

นำโคโลนีสายพันธุ์กลายที่เจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะไปเลี้ยงในอาหารเหลวตามข้อ 3.1 แบ่งเชื้อใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นเชื้อบ่นอาหาร minimal medium (MM, 1L: 0.5g L-asparagine, 0.5g K₂HPO₄, 0.2g MgSO₄·7H₂O, 0.01g FeSO₄·7H₂O, 10g glucose, 10g agar; Kieser *et al.*, 2000) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-5 วัน

9.4 การตรวจสอบการสังเคราะห์สารคลอแรมฟินิคอลในสายพันธุ์กลาย

9.4.1 การตรวจสอบการเกิดวงใส (clear zone) ด้วยวิธี agar plug assay

นำสายพันธุ์กลายที่ต้องการตรวจสอบเกลี่ยลงบนอาหาร TSA ซึ่งมียาปฏิชีวนะไซโอสเตรปตอน โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันเจาะอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่ด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร (agar plug) มาวางลงบนอาหารแข็ง LB ที่เททับด้วย *E.coli* JM109 ความเข้มข้น 10³-10⁴ เซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจสอบการเกิดวงใสเทียบกับ *S. venezuelae* สายพันธุ์ไวค์ไทป์

9.4.2 การตรวจสอบสารสกัดคลอแรมฟินิคอลด้วยวิธี HPLC

9.4.2.1 การสกัดสารจาก *S. venezuelae* และสายพันธุ์กลาย

เลี้ยง *S. venezuelae* และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลว GNY medium (1L: 20 ml glycerol, 8 g Nutrient broth, 3 g yeast extract, 5 g K₂HPO₄; Malik and Vining, 1970) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คูดเชื้อที่มีปริมาตร 2% v/v ลงในอาหาร GI medium (GNY medium, 3% glucose, 0.75% L-isoleusine; Chatterjee and Vining, 1982) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เก็บน้ำเลี้ยงที่ 7 วัน โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,500 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

สกัดสารจากน้ำเลี้ยงปริมาตร 5 มิลลิลิตรโดยเติมเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วทิ้งให้แยกชั้น เก็บสารละลายส่วนบนมาทำเจนน้ำออกโดยการเติม Sodium sulfate anhydrous จนอิ่มตัว (ตกตะกอนดี) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน กรอง sodium sulfate anhydrous ออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำไประเหยเอทิลอะซิเตทออกโดยการทำให้ evaporation จนแห้ง ละลายตะกอนในเมทานอลต่อน้ำ 3:1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส

9.4.2.2 การตรวจสอบสารสกัดโดยวิธี High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) Photodiode Array Detector

วิเคราะห์สารสกัดด้วย HPLC Photodiode Array Detector ที่ 273 nm โดยใช้ ChromSep 5 C18 250x4.6 mm reverse-phase silica-gel column โดยใช้สภาวะ linear gradients ของเมทานอลที่ 0-25 (v/v)% 1 นาที, 25-50 (v/v)% 3 นาที, 50-100 (v/v)% 1 นาที, เมทานอล 100% 10 นาที และปรับสภาวะให้กลับเป็นน้ำ 100% นาน 5 นาที โดยฉีดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการเปรียบเทียบเอกซ์คอนจูเกนต์กับสายพันธุ์ไวส์ไค์ โดยเทียบความเข้มข้นของสารสกัดกับคลอแรมฟินิโคลมาตราฐาน

10. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตบางเขน ในระหว่างเดือนตุลาคม 2549 - สิงหาคม 2551

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดคอนจูกันต่างสกุลระหว่าง *S. venezuelae* และ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSET152)

ในการศึกษาการแสดงออกของยีนใน *S. venezuelae* โดยวิธียีนดิสรับชันจะเลือกใช้วิธีส่งผ่านรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *S. venezuelae* ด้วยวิธีการคอนจูกันต่างสกุล จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับทำคอนจูกันระหว่าง *E. coli* ET12567 (pUZ8002) และ *S. venezuelae* ซึ่ง *E. coli* สายพันธุ์นี้ ขาดสมบัติในการเติมหมู่เมธิลที่เบสอะดีนีน และ เบสไซโตซีน (*dam*⁻, *dcm*⁻) (MacNeil *et al.*, 1992) เพื่อเป็นการลดการทำลายพลาสมิดที่ถูกนำเข้าสู่เซลล์ของ *Streptomyces* เนื่องจาก *Streptomyces* มีระบบ restriction และ modification ที่ใช้ในการทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอม นอกจากนี้ *E. coli* ET12567 ยังมีพลาสมิด pUZ8002 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มีส่วนของกลุ่มยีน *tra* ทำหน้าที่ส่งถ่ายพลาสมิดอื่นที่มี *oriT* ไปยังเซลล์ผู้รับเมื่อเกิดการคอนจูกัน (Sia *et al.*, 1996) โดยการศึกษาครั้งนี้จะใช้พลาสมิด pSET152 เป็นพลาสมิดทดสอบในการส่งถ่ายจาก *E. coli* ET12567 ไปยัง *S. venezuelae*

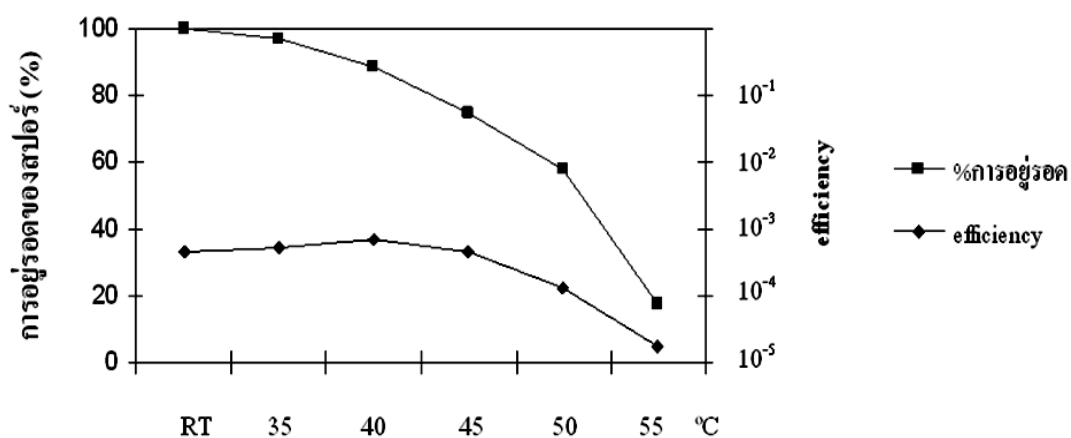
1.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการงอกของสปอร์ของ *S. venezuelae*

ในการทำคอนจูกันนั้นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งก่อนที่จะนำสปอร์ของ *S. venezuelae* ผสมเข้ากับเซลล์ของ *E. coli* คือการกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ (pre-germination) โดยวิธีการให้ความร้อน (Flett *et al.*, 1997) ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม กล่าวคือ อุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นที่เหมาะสมนั้นต้องทำให้สปอร์ยังมีชีวิตอยู่ การทดลองนี้จึงต้องการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการงอกของสปอร์ *S. venezuelae*

ศึกษาอุณหภูมิในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ *S. venezuelae* ตามวิธีการในข้อ 6.1 โดยเมื่อใช้เวลาในการบ่มสปอร์เป็นเวลา 10 นาที แปรอุณหภูมิที่ 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง (RT) เมื่อทำการทดลอง 2 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ยพบว่า การอยู่รอดของสปอร์เริ่มลดลงอย่างชัดเจนในระหว่างช่วงอุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 12) โดยลดลงจากการอยู่รอดที่ 88.7 เปอร์เซ็นต์ เป็น 74.6 เปอร์เซ็นต์ คาดว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการกระตุ้นการงอกของสปอร์จะอยู่ในช่วงนี้ โดยจากรายงานอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการงอกของ

สปอร์ของ *Streptomyces* โดยทั่วไปจะอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส เช่น *S. lividans* (Mazodier *et al.*, 1989) และ *S. coelicolor* (Kieser *et al.*, 2000) แต่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส การอยู่รอดของสปอร์ *S. venezuelae* มีค่าเป็น 57.7 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และอาจแสดงว่าสปอร์ของ *S. venezuelae* ทนต่อความร้อนได้ไม่ดี

เนื่องจากการบ่มทำให้การอยู่รอดของสปอร์ลดลง มีผลต่อจำนวนสปอร์มีชีวิตที่จะนำไปใช้ในการทำคอนจูเกชัน อุณหภูมิที่เหมาะสมจึงควรเป็นอุณหภูมิที่ต่ำที่สุดที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Kitani *et al.* (2000) พบว่าอุณหภูมิที่เริ่มทำให้การอยู่รอดของสปอร์ลดลงสามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ได้ ดังนั้นสำหรับ *S. venezuelae* อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งเป็นสถานะเดียวกับ *S. lavendulae* FRI-5 (Kitani *et al.*, 2000) แต่แตกต่างจาก *S. lividans* (Mazodier *et al.*, 1989) และ *S. coelicolor* (Kieser *et al.*, 2000) ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งการกระตุ้นการงอกของสปอร์นี้จะทำให้ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันต่างสกุลสูงขึ้น (Mazodier *et al.*, 1989)



ภาพที่ 12 กราฟแสดงการอยู่รอดของสปอร์และประสิทธิภาพในการคอนจูเกชันเมื่อกระตุ้นการงอกของสปอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *S. venezuelae* และ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSET152)

การทดลองนี้จะทำการคอนจูเกชันต่างสกุลโดยใช้ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSET152) เป็นผู้ให้ ตามวิธีในข้อ 6.2 โดยศึกษาในสองสภาวะคือ การใช้สปอร์ของ *S. venezuelae* เป็นผู้รับ และใช้ไมซีเลียมของ *S. venezuelae* เป็นผู้รับ

ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันโดยใช้สปอร์ของ *S. venezuelae* เป็นผู้รับ

การใช้สปอร์ของ *S. venezuelae* เป็นผู้รับ โดยมีความเข้มข้นสปอร์อยู่ในช่วง 10^9 - 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^5 - 10^6 สปอร์ นำไปกระตุ้นการงอกของสปอร์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากทำการคอนจูเกชัน เมื่อคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิด pSET152 โดยการเทปัดด้วยยาปฏิชีวนะอะพราไมซิน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้บนอาหาร และคำนวณประสิทธิภาพการคอนจูเกชันต่างสกุล พบว่าการทำการคอนจูเกชันบนอาหาร TSA (Oxoid) ที่มี $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ ให้ประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อกระตุ้นการงอกของสปอร์ที่ 40 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพอยู่ในช่วง 10^{-5} - 10^{-4} เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ (ภาพที่ 12, ตารางที่ 5) ซึ่งมีค่าสูงกว่าคอนจูเกชันต่างสกุลของ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSET152) และ *S. lavendulae* FRI-5 โดยประสิทธิภาพบนอาหาร MS อยู่ในช่วง 10^{-6} เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ (Kitani *et al.*, 2000) โดยประสิทธิภาพจะลดลงเมื่ออัตราส่วนของผู้ให้ต่อผู้รับเพิ่มขึ้น ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นการงอกของสปอร์นั้นมีผลต่อการคอนจูเกชัน เช่นใน *S. lividans* พบว่าการกระตุ้นสปอร์โดยบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ประสิทธิภาพการคอนจูเกชันสูงขึ้น 5-10 เท่า (Mozodier *et al.*, 1989) แต่ใน *S. virginiae* ซึ่งไม่ทนต่อความร้อน จะให้ประสิทธิภาพที่ดีเมื่อไม่มีการกระตุ้นการงอกของสปอร์ด้วยความร้อน (Voeykova *et al.*, 1998) โดยประสิทธิภาพการส่งถ่าย พลาสมิด pSET152 เข้าสู่ *S. venezuelae* นั้นมีค่าใกล้เคียงกับการเกิดคอนจูเกชันของ pTO1 โดยใช้ *E. coli* S17-1 เข้าสู่ *Streptomyces* จำนวน 16 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพอยู่ในช่วง 10^{-5} - 10^{-3} เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ (Voeykova *et al.*, 1998)

ตารางที่ 5 แสดงประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันโดยกระตุ้นการงอกของสปอร์ *S. venezuelae* ผู้รับ ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	จำนวนสปอร์เริ่มต้น	ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชัน (เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ)
RT	3.55×10^5	4.5×10^{-4}
35	3.45×10^5	5.2×10^{-4}
40	3.15×10^5	6.9×10^{-4}
45	2.65×10^5	4.5×10^{-4}
50	2.05×10^5	1.27×10^{-4}
55	6.25×10^6	1.7×10^{-5}

ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันโดยใช้ไมซีเลียมของ *S. venezuelae* เป็นผู้รับ

เลี้ยง *S. venezuelae* โดยใส่สารละลายสปอร์ลงในอาหารเหลว Tryptone soya broth (TSB สำเร็จรูป) ในอัตราส่วน 1:100 เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นของไมซีเลียมที่นำมาใช้ในช่วง 10^{10} - 10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^5 - 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากทำคอนจูเกชันโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับการคอนจูเกชันโดยใช้สปอร์ และคำนวณประสิทธิภาพการคอนจูเกชันต่างสกุล พบว่าการทำคอนจูเกชันบนอาหาร TSA (Oxoid) ที่มี $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ มีประสิทธิภาพอยู่ในช่วง 10^{-5} - 10^{-4} เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ (ตารางที่ 6) ซึ่งเหมือนกับการคอนจูเกชันโดยใช้ไมซีเลียมของ *S. peucetius* ซึ่งสร้างสปอร์ได้ไม่ดี พบว่ามีประสิทธิภาพที่ 1.5×10^{-4} เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ (Paranthaman and Dharmalingam, 2003) โดยการคอนจูเกชันระหว่าง *E. coli* และ *S. venezuelae* ให้ประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้ไมซีเลียมที่อายุ 12-24 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 แสดงประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันโดยใช้ไมซีเลียมของ *S. venezuelae* ที่อายุต่างกัน

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์เริ่มต้น	ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชัน (เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ)
12	1.37×10^5	6.07×10^{-4}
24	3.55×10^5	6.20×10^{-4}
36	1.00×10^6	5.80×10^{-5}
48	1.45×10^6	5.60×10^{-5}

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการคอนจูเกชันต่างสกุลโดยใช้สปอร์ของ *S. venezuelae* เป็นผู้รับ และไมซีเลียมของ *S. venezuelae* เป็นผู้รับ พบว่าประสิทธิภาพที่ได้ไม่ต่างกัน (10^{-4}) เช่นเดียวกับการคอนจูเกชันระหว่าง *S. fradiae* และ *E. coli* S17-1 (Bierman *et al.*, 1992) แต่การคอนจูเกชันระหว่าง *S. toyocaensis* และ *E. coli* S17-1 พบว่าเมื่อใช้ไมซีเลียมในการคอนจูเกชันจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้สปอร์ (Matsushima and Baltz, 1996) และพบว่าการคอนจูเกชันโดยใช้ไมซีเลียมไม่ประสบความสำเร็จใน *S. natalensis* (Enriquez *et al.*, 2006)

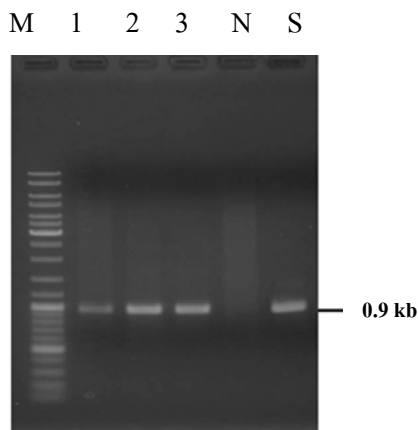
จากการทดลองนี้สามารถเลือกทำคอนจูเกชันได้โดยใช้ทั้งสปอร์โดยกระตุ้นการออกของสปอร์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และไมซีเลียมของ *S. venezuelae* เป็นผู้รับ โดยเลี้ยงไมซีเลียมอายุ 12-24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การเตรียมสปอร์นั้นค่อนข้างยุ่งยากมากกว่า ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงเลือกไมซีเลียมเป็นผู้รับ

การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนต์

การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนต์โดยวิธีพีซีอาร์

การตรวจสอบนี้จะตรวจสอบว่าพลาสมิด pSET152 ได้เข้าไปอยู่ในเอกซ์คอนจูแกนต์จริง โดยใช้วิธีพีซีอาร์ตรวจหาชิ้นด้านยาอะพรามัยซินที่อยู่บนพลาสมิด นำโคโลนีเอกซ์คอนจูแกนต์ที่เจริญได้บนอาหาร TSA ที่มียาปฏิชีวนะไปเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ที่มียาปฏิชีวนะอะพรามัยซิน เพื่อสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบโดยการทำพีซีอาร์ เพิ่มปริมาณยีนที่ด้านยาปฏิชีวนะอะพรามัยซิน โดยใช้ไพรเมอร์ Apr C-1 และ AprC-2 (ตารางที่ 4) พบว่าได้ชิ้นดีเอ็น

ขนาด 900 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดตามต้องการ เมื่อเปรียบเทียบกับการทำฟิซัวร์ของ pSET152 ซึ่งใช้เป็น positive control และไม่พบผลิตภัณฑ์ฟิซัวร์ดังกล่าวใน *S. venezuelae* (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนส์ด้วยวิธีฟิซัวร์โดยการเพิ่มปริมาณยีนที่ด้านยาปฏิชีวนะอะพรามายซิน ด้วยไพรเมอร์ Apr C-1 และ AprC-2

M = 1 kb DNA ladder, แถวที่ 1-3 = เอกซ์คอนจูแกนส์ *S. venezuelae*,

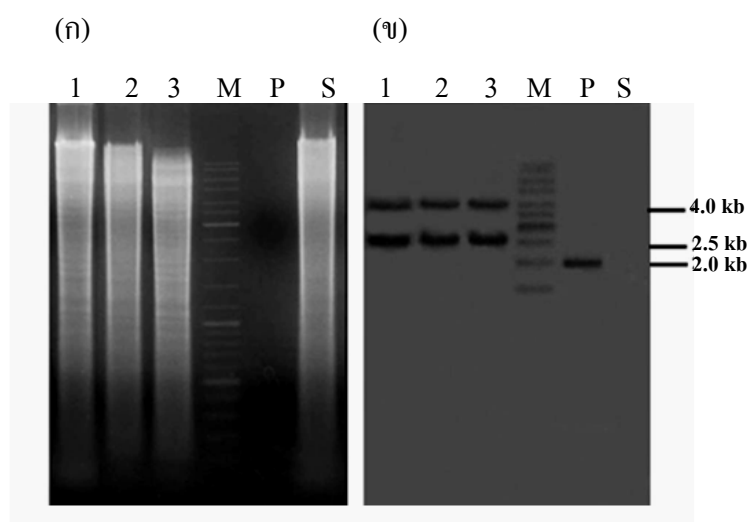
N = *S. venezuelae*, S = pSET152

การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนส์โดยวิธี Southern blot hybridization

เพื่อยืนยันการส่งถ่ายพลาสมิด pSET152 เข้าไปใน *S. venezuelae* โดยการแทรกตัวเข้าไปในโครโมโซม การทดสอบนี้จะนำเอกซ์คอนจูแกนส์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธี Southern blot hybridisation ตามวิธีข้อ 5.7 โดยใช้ไพรเมอร์บริเวณ *attP* ของพลาสมิด pSET152 โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *SacI* และ *HindIII* ได้ไพรบขนาด 2.05 กิโลเบส

ผลของ Southern blot hybridisation (ภาพที่ 14) แสดงว่าเอกซ์คอนจูแกนส์ได้รับพลาสมิด pSET152 ซึ่งแทรกตัวเข้าไปในโครโมโซมจริง โดยเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบคือ ขนาด 4.0 และ 2.5 กิโลเบส (ภาพที่ 14 แถวที่ 1-3) ขณะที่ *attP* ของ pSET152 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* และ *HindIII* ให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบขนาด 2.05 กิโลเบส แสดงว่ามีตำแหน่งตัดของ *SacI* ห่างออกไปทางซ้ายและด้านขวาของ pSET152 ที่แทรกตัวอยู่ (ภาพที่ 15) โดยจากการตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนส์พบว่า รูปแบบของ Southern blot hybridization มีเพียงรูปเดียวแสดงว่าตำแหน่งการแทรกตัวของพลาสมิดที่เข้าไปในตำแหน่ง *attB* บนโครโมโซมเป็น

ตำแหน่งเดียวกัน เช่นเดียวกับที่มีรายงานใน *S. lavendulae* (Kitani *et al.*, 2000) *S. toyocaensis* (Matsushima and Baltz, 1996) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Combes *et al.* (2002) แสดงว่าโครโมโซมของ *Streptomyces* มีตำแหน่ง *attB* ของ ϕ C31 อยู่หลายตำแหน่ง แต่การที่ตรวจสอบพบการแทรกตัวที่ตำแหน่งเดียวกันเสมอนั้น เนื่องจากความถี่ในการแทรกตัวในแต่ละตำแหน่งมีความแตกต่างกัน โดยพบการแทรกที่ตำแหน่งแรกมากกว่าตำแหน่งที่ 2 ถึง 300 เท่า



ภาพที่ 14 การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนส์ของ *S.venezuelae* ที่ได้รับพลาสมิด pSET152 ด้วย

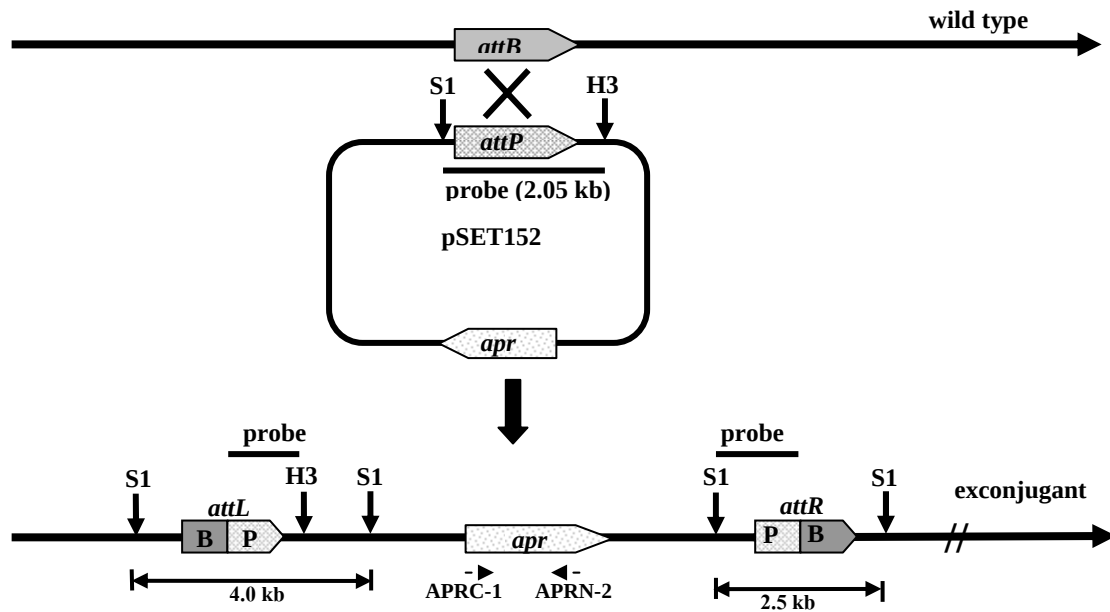
Southern blot hybridization โดยใช้ *attP* ที่ตัดด้วย *SacI* และ *HindIII* เป็นโพรบ

(ก) อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของโครโมโซมที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI*

(ข) Southern hybridisation

M = 1 kb DNA ladder, แถวที่ 1-3 = เอกซ์คอนจูแกนส์ที่ 1-3/*SacI*,

P = pSET152/*SacI/HindIII*, S = *S. venezuelae/SacI*



ภาพที่ 15 การแทรกตัวของพลาสมิด pSET152 เข้าไปในโครโมโซมของ *S. venezuelae*

S1 = *SacI* H3 = *HindIII*, *apr* = ยีนต้านยาอะพราไมซิน

การตรวจสอบพื้นฐานวิทยาและการสร้างโคลนแฟนิคอลของเอกซ์คอนจูแกนส์

จากการศึกษาพื้นฐานวิทยาของเอกซ์คอนจูแกนส์ ได้แก่ ลักษณะโคโลนี สีของสปอร์บนอาหารแข็ง พบว่ามีลักษณะเหมือน *S. venezuelae* สายพันธุ์ไวต์ไทป์ทุกประการ เช่นเดียวกับการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *S. lavendulae* FRI-5 (Kitani *et al.*, 2002) และเมื่อนำเอกซ์คอนจูแกนส์ไปทดสอบการสร้างโคลนแฟนิคอล โดยวิธี agar plug assay ตรวจสอบการเกิดวงใสต่อเชื้อ *E. coli* JM109 ที่ไวต่อโคลนแฟนิคอล เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ไวต์ไทป์ พบว่าเอกซ์คอนจูแกนส์ยังคงสามารถสร้างโคลนแฟนิคอลได้เหมือนสายพันธุ์ไวต์ไทป์ (ภาพที่ 16) แสดงว่าการแทรกตัวของพลาสมิดเข้าไปในโครโมโซมในตำแหน่ง *attB* ที่เกิดขึ้นนั้น ไม่มีผลต่อลักษณะทางฟีโนไทป์ของ *S. venezuelae* และไม่มีผลต่อการสังเคราะห์โคลนแฟนิคอล ซึ่งต่างจากการแทรกตัวของพลาสมิด pTO1 เข้าสู่ *Streptomyces* ที่มีผลต่อการสร้างยาปฏิชีวนะและการเจริญ (Voeykova *et al.*, 1998)



ภาพที่ 16 การตรวจสอบการสร้างคลอแรมฟินิโคลต่อ *E. coli* JM109 ด้วยวิธี agar plug assay
 1 = *S. venezuelae*, 2-4 = เอกซ์คอนจูแกนส์ที่ 1-3, 5 = paper disc ที่มีคลอแรมฟินิโคล
 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การโคลนและวิเคราะห์ยีน *aroE* ใน *S. venezuelae*

2.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *aroE* โดยการรวบรวมลำดับกรดอะมิโนของยีน *aroE* ในแอคติโนมัยสิทที่มีอยู่ในฐานข้อมูล และนำลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวมาทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW 1.82 แล้วหาบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ พบว่ามีบริเวณอนุรักษ์ ที่สามารถออกแบบไพรเมอร์เป็น forward และ reverse ได้ดังภาพที่ 18 โดยใช้บริเวณอนุรักษ์ คือ DNTDIPG และ QVEQMTG ที่บริเวณ N-terminal และ C-terminal ตามลำดับ แล้วเปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเลือกใช้ codon usage ของ *Streptomyces* พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์แบบ forward คือ ATT061F และไพรเมอร์แบบ reverse คือ ATT061R โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

ATT061F 5' TTTAAGCTTGACAACACCGACATCCC(G/C)GG 3'
 ATT061R 5' TTTGAATTCCTCCGGTCATCTGCTG(G/C)ACCTGG 3'

จากไพรเมอร์ ATT061F และ ATT061R ดังกล่าวได้เพิ่มตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Eco*RI เข้าไปที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ด้วยตามลำดับ

(ก)

<i>Mycobacterium_tuberculosis</i>	WRA-DNTDIDG VAGALG---AAAGHALVLGSGGTAPAAVVGLAELGVTD 143
<i>Mycobacterium_bovis</i>	WRA-DNTDIDG VAGALG---AAAGHALVLGSGGTAPAAVVGLAELGVTD 134
<i>Streptomyces_coelicolor</i>	RRTGDNTDIPGIAAALREHGIEKVESAAILGAGATASSALAALARICTGE 127
<i>Streptomyces_avermitilis</i>	RRVGDNTDIPG MVAALRERGIEQVDSAAILGAGATASSALAALARICTGE 150

Consensus DNTDIPG

Nucleotide 5' GACAACACCGACATCCC(G/C)GG 3'

(ข)

<i>Mycobacterium_tuberculosis</i>	QAFAQVEQFTG—LPAPREAMTCA-LAALD—269
<i>Mycobacterium_bovis</i>	QAFAQVEQFTG—LPAPREAMTCA-LAALD—260
<i>Streptomyces_coelicolor</i>	QAVLQVEQMTGRAPAPLAAMRKAGEHALADR 255
<i>Streptomyces_avermitilis</i>	QAVLQVEQMTGRSPAPLDAMRRAGEHALAA- 277

Consensus QVEQMTG

Nucleotide 5' CAGGT(G/C)GAGCAGATGACCGG 3'

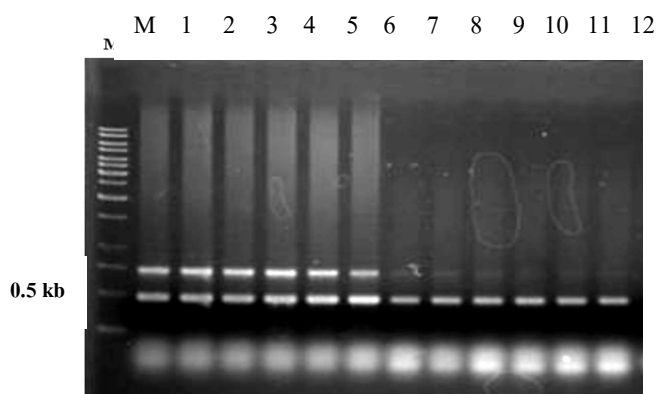
Reverse complement 5' CCGGTCATCTGCTG(G/C)ACCTGG 3'

ภาพที่ 18 บริเวณอนุรักษ์ของ *AroE* ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

(ก)บริเวณอนุรักษ์ N-terminal (ข) บริเวณอนุรักษ์ C-terminal

2.2 การเพิ่มปริมาณยีน *aroE*

เพิ่มปริมาณยีน *aroE* จากโครโมโซมของ *S. venezuelae* โดยการทำพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ ATT061F และ ATT061R ที่ออกแบบไว้ในข้อ 2.1 โดยใช้สภาวะตามวิธีข้อ 5.4 โดยทำ gradient PCR เพื่อหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม โดยแปรอุณหภูมิ annealing ระหว่าง 55-65 องศาเซลเซียส พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการขนาดประมาณ 500 คู่เบส พร้อมกับพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (non-specific) ที่มีขนาดใหญ่กว่า แถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะนี้จะลดลงเมื่ออุณหภูมิ annealing เท่ากับ 61 องศาเซลเซียส ขึ้นไป แต่ขณะเดียวกันแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบสที่ต้องการนั้นมีความเข้มข้นลดลงด้วย (ภาพที่ 18) ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส มาใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *aroE* จากโครโมโซมของ *S. venezuelae*

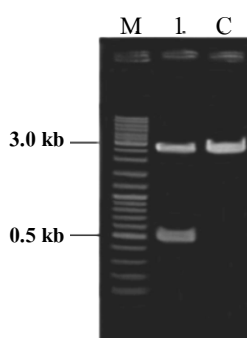


ภาพที่ 18 ผลการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ATT061F และ ATT061R จากโครโมโซมของ

S. venezuelae

M = 1 kb DNA ladder, แถวที่ 1-12 = อุณหภูมิ annealing ที่ 55, 55.3, 55.9, 56.7, 57.8, 59.3, 61.0, 62.7, 63.5, 64.3, 64.8 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

จากนั้นสกัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 500 เบสจากเจลตามวิธีข้อ 5.2 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Eco*RI ซึ่งจะตัดบริเวณปลายของชิ้นดีเอ็นเอตามที่ได้ออกแบบไว้ที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิด pUC18 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันนำไปทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* XL1-Blue ตรวจสอบโคลนที่ได้ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและแยกขนาดโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 19) ให้ชื่อพลาสมิดว่า pATT802 แล้วนำโคลนที่เลือกได้ ไปหาลำดับเบสและเปรียบเทียบกับยีน *aroE* ที่มีในฐานข้อมูล



ภาพที่ 19 ผลการทดสอบโคลน pATT802 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

M = 1 kb ladder, 1 = pATT802/*Eco*RI/*Hind*III, C = pUC18/*Eco*RI/*Hind*III

2.3 การวิเคราะห์ชั้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์

นำพลาสมิด pATT802 ไปหาลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ M13 forward ได้ลำดับเบสจำนวน 1,027 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์แล้วพบว่าประกอบด้วยส่วนของพลาสมิด pUC18 และส่วนของยีน *aroE* เมื่อตัดส่วนของพลาสมิด pUC18 ออกพบว่าได้ยีน *aroE* ที่มีลำดับเบสขนาด 454 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนขนาด 151 กรดอะมิโน (ภาพที่ 20, ภาคผนวก) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BlastP พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน *aroE* ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เอนไซม์ shikimate dehydrogenase โดย 2 ลำดับแรกมีความเหมือน (identity) สูงที่สุดที่ 76-77 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้แก่ยีน *aroE* ของ *S. avermitilis* MA-4680 (NP_828029) และ *S. coelicolor* A3(2) (NP_625778) จากความเหมือนนี้แสดงให้เห็นว่าชั้นยีนที่น่าจะเป็นบริเวณหนึ่งซึ่งอยู่ในยีน *aroE* ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เอนไซม์ shikimate dehydrogenase ของวิถี shikimate ใน *S. venezuelae*

```

1: CACACCGACATCCCCGGCATGCTCGCCGTCCTGCGGGAGCGCGGCGTCGAG
1: H T D I P G M L A V L R E R G V E

52: AAGGTGGAGTCGGCGGCATCCTCGGCGCCGGCGCCACCGCCTCCTCCGCC
18: K V E S A A I L G A G A T A S S A

103: GTGGCCGCCCTCGCCCGGATCTGCGGCGGCCCCGTCACCGCGTACGTCCGC
35: V A A L A R I C G G P V T A Y V R

154: AGCGAGGCGCGGGCCGAGGAGATGCGCGGCTGGGGCGAGCGGCTCGGCGTG
52: S E A R A E E M R G W G E R L G V

205: GACGTCCGCACCGCCCCCTGGGACGACGCGGCCGAGGCCCTTCGCGTCCCCG
69: D V R T A P W D D A A E A F A S P

256: CTGGTCGTCGCGACCACCCCGCCGGCACCACGAACGCCCTGGCCACCGCC
86: L V V A T T P A G T T N A L A T A

307: GTCCCGGACGCCGTCGGCACCCCTCTTCGACGTCCTGTACGACCCCTGGCCG
103: V P D A V G T L F D V L Y D P W P

358: ACGGCACTGGCCGCGGCCTGGTCCGAACGCGGCGGCAAGGTGGTCGGCGGC
120: T A L A A A W S E R G G K V V G G

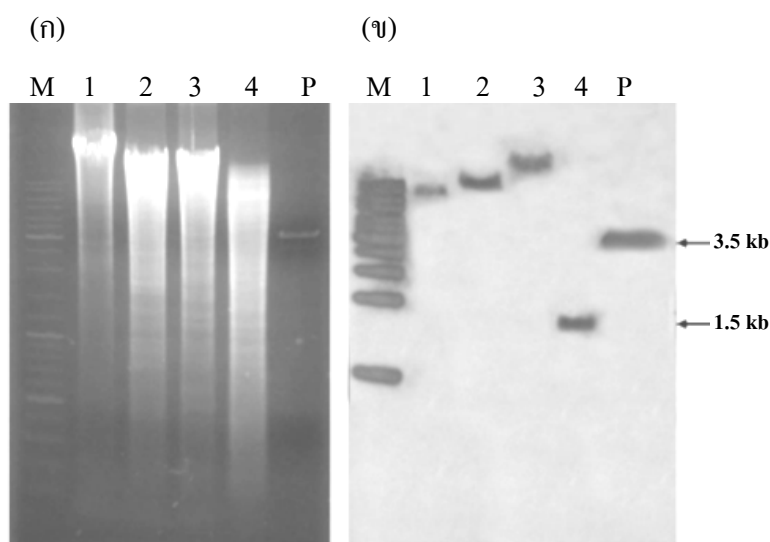
409: CTCGACCTCCTGGTCCACCAGGCGGTCCTCCAGGTCGAGCAGATGA
137: L D L L V H Q A V L Q V E Q M

```

ภาพที่ 20 ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน *aroE* จาก *S. venezuelae* ในพลาสมิด pATT802

2.4 การตรวจหา ยีน *aroE* ด้วย Southern blot hybridization

ตัดจีโนมของ *S. venezuelae* ด้วยเอนไซม์ *SacI*, *PstI*, *BamHI* และ *KpnI* แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพที่ 21 ก) นำพลาสมิด pATT802 ที่มีส่วนของยีน *aroE* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และติดฉลากตามวิธีข้อ 5.7 เพื่อเตรียมโพรบในการติดตามยีน *aroE* เมื่อทำ Southern blot hybridisation แล้วพบว่าได้สัญญาณจากแถบจีโนมของ *S. venezuelae* ที่ตัดด้วย *SacI*, *PstI* และ *BamHI* ขนาด ประมาณ 1.5 กิโลเบส, 6 กิโลเบส และขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส ตามลำดับ (ภาพที่ 21) ขณะที่จีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ *KpnI* ให้แถบจีโนมที่มากกว่า 10 กิโลเบส



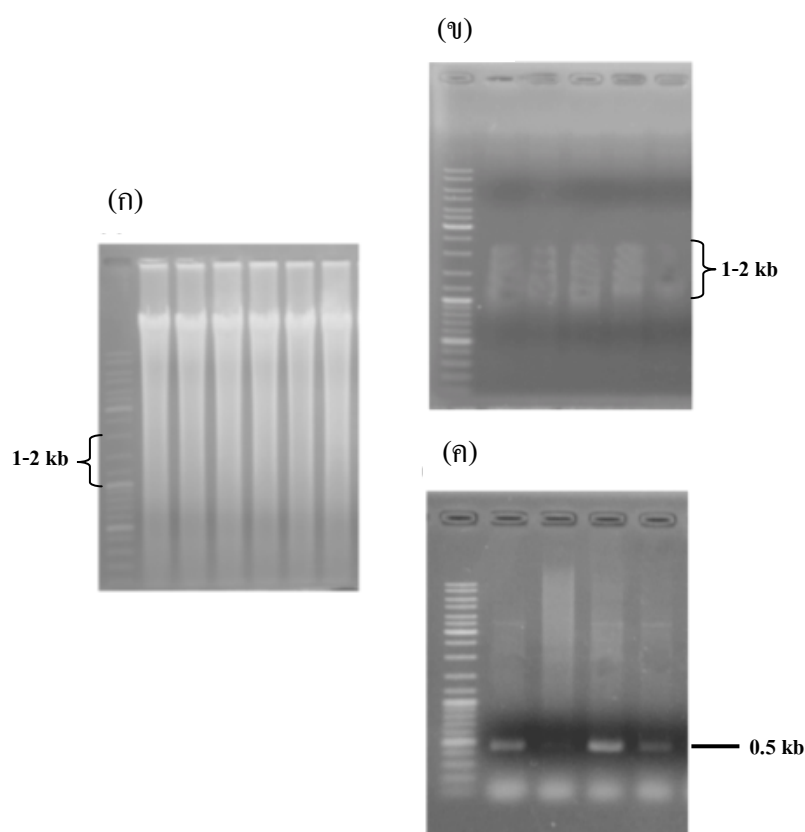
ภาพที่ 21 การตรวจหา ยีน *aroE* ของ *S. venezuelae* ด้วยวิธี Southern blot hybridisation โดยใช้ pATT802 ที่ตัดด้วย *HindIII* เป็นโพรบ

(ก) อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ของโครโมโซมของ *S. venezuelae* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ข) Southern hybridization

M = 1 kb DNA ladder, 1 = *S. venezuelae*/*PstI*, 2 = *S. venezuelae*/*BamHI*,
3 = *S. venezuelae*/*KpnI*, 4 = *S. venezuelae*/*SacI*, P = pATT802/*HindIII*

2.5 การโคลนยีน *aroE*

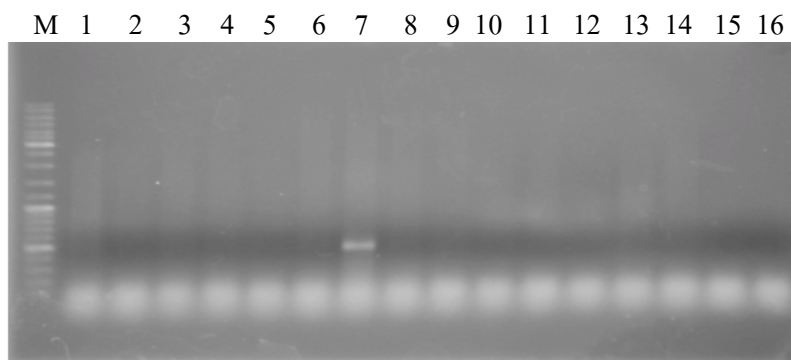
เลือกโคลนจีนดิเอ็นเอของ *S. venezuelae* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* ขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส จากผลสัญญาณ Southern blot hybridisation โดยตัดโครโมโซมของ *S. venezuelae* ใหม่ด้วยเอนไซม์ดังกล่าว (ภาพที่ 22 ก) และสกัดแถบดิเอ็นเอดังกล่าวออกจากเจล (ภาพที่ 22 ข) และตรวจสอบดิเอ็นเอที่สกัดได้โดยการทำฟิซอร์ด้วยไพรเมอร์ ATT061F และ ATT061R ซึ่งพบว่าดิเอ็นเอที่สกัดได้มีส่วนของยีน *aroE* อยู่ (ภาพที่ 22 ค) จึงได้นำดิเอ็นเอที่สกัดได้นั้นไปสร้าง library โดยการโคลนเข้าพลาสมิด pJET1.2 blunt ตรวจสอบ library ทั้งหมด 1,023 โคลนโดยการเลี้ยงโคลนแบบ pool ที่ละ 10 โคลน แล้วสกัดพลาสมิดทั้ง pool พร้อมกัน แล้วจึงตรวจสอบแต่ละ pool โดยการทำฟิซอร์ด้วยไพรเมอร์ ATT061F และ ATT061R (ภาพที่ 23) ที่จำเพาะต่อยีน *aroE* พบว่า pool ที่ 7 ได้ผลิตภัณฑ์ฟิซอร์ขนาด 500 คู่เบส แสดงว่าน่าจะมีโคลนที่มียีน *aroE* อยู่



ภาพที่ 22 การสกัดแถบดิเอ็นเอที่มียีน *aroE* และตรวจสอบโดยวิธีฟิซอร์

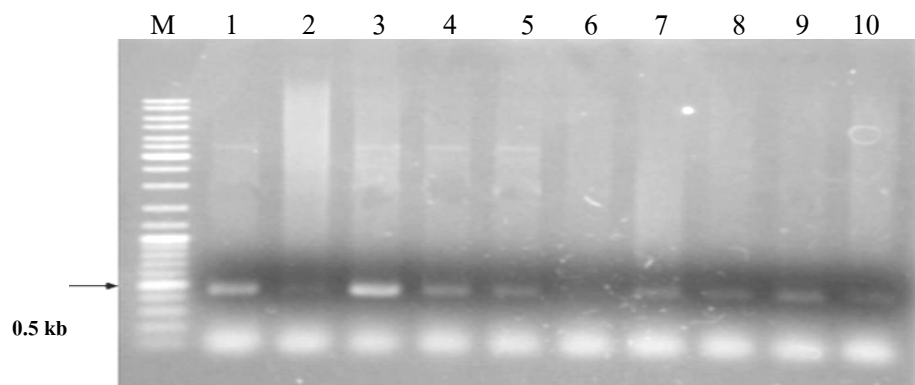
(ก) ดิเอ็นเอของ *S. venezuelae* ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* (ข) แถบดิเอ็นเอที่สกัดออกจากเจล ขนาด 1-2 กิโลเบส (ค) ผลิตภัณฑ์ฟิซอร์ด้วยไพรเมอร์ ATT061F และ ATT061R

นำ library pool ที่ 7 ทั้ง 10 โคลนมาแยกเลี้ยง และสกัดพลาสมิดใหม่เพื่อทำพีซีอาร์ตรวจสอบยีน *aroE* อีกครั้งว่าอยู่ในโคลนใด ซึ่งพบว่าได้โคลนที่มียีน *aroE* อยู่เกือบทุกโคลน โดยเลือกโคลนที่ให้ผลของพีซีอาร์ชัดเจนที่สุด (ภาพที่ 24 ช่องที่3) ไปหาลำดับเบส โดยตั้งชื่อโคลนว่า pATT804



ภาพที่ 23 ตรวจสอบ DNA library ที่มียีน *aroE* โดยวิธีสกัดพลาสมิดแบบ pool ด้วยการทำพีซีอาร์

M = 1 kb DNA ladder, 1 = clone 161-170, 2 = clone 171-180, 3 = clone 181-190, 4 = clone 191-200, 5 = clone 201-210, 6 = clone 211-220, 7 = clone 221-230, 8 = clone 231-240, 9 = clone 241-250, 10 = clone 251-260, 11 = clone 261-270, 12 = clone 271-280, 13 = clone 281-290, 14 = clone 291-300, 15 = clone 301-310, 16 = clone 311-320



ภาพที่ 24 ตรวจสอบโคลนจากพลาสมิด pool ที่ 7 โดยวิธีพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ATT061F และ ATT061R โคลนที่มียีน *aroE* ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ขนาด 500 คู่เบส

2.6 การหาลำดับเบสและวิเคราะห์ยีน *aroE* จาก *S. venezuelae*

หาลำดับเบสของโคลน pATT804 โดยใช้ไพรเมอร์ ATT061F ได้ลำดับเบสขนาด 836 มีลำดับเบสส่วนของยีน *aroE* ขนาด 525 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนขนาด 175 กรดอะมิโน โดยได้ในส่วนของ stop codon ของยีน แสดงว่าได้ยีนครบทาง C-terminal นอกจากนั้นยังพบส่วนของยีน *aroC* ที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ chorismate synthase ในวิถี shikimate ถัดออกไปจาก stop codon ของยีน *aroE* 143 คู่เบส (ภาพที่ 25, ภาคผนวก) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BlastP พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน *aroE* ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เอนไซม์ shikimate dehydrogenase ซึ่งมีค่าความเหมือน (identity) กับ AroE ในฐานข้อมูล ซึ่งได้แก่ *S. pristinaespiralis* ATCC 25486 (YP_002197227), *S. clavuligerus* ATCC 27064 (ZP_03183927), *S. griseus* subsp *griseus* NBRC 13350 (YP_001827549), *S. coelicolor* A3(2) (NP_625778), *S. avermitilis* MA-4680 (NP_828029), *S. svuceus* ATCC 29083 (YP_002204773), *Salinispora tropica* CNB-440 (YP_001158671) และ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NP_217068) โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 83, 81, 79, 78, 77, 77, 47 และ 39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

aroE →

```

1: CACACCGACATCCCCGGCATGCTCGCCGTCCTGCGGGAGCGCGGCGTCGAG
1: H T D I P G M L A V L R E R G V E

52: AAGGTGGAGTCGGCGGCGATCCTCGGCGCCGGCGCCACCGCCTCCTCCGCC
18: K V E S A A I L G A G A T A S S A

103: GTGGCCGCCCTCGCCCGGATCTGCGGCGGCCCCGTCACCGCGTACGTCCGC
35: V A A L A R I C G G P V T A Y V R

154: AGCGAGGCGCGGGCCGAGGAGATGCGCGGCTGGGGCGAGCGGCTCGGCGTG
52: S E A R A E E M R G W G E R L G V

205: GACGTCCGCACCGCCCCCTGGGACGACGCGGCCGAGGCCTTCGCGTCCCCG
69: D V R T A P W D D A A E A F A S P

256: CTGGTCGTCGCGACCACCCCCGCCGGCACCACGAACGCCCTGGCCACCGCC
86: L V V A T T P A G T T N A L A T A

307: GTCCCGGACGCCGTCGGCACCCCTCTTCGACGTCCTGTACGACCCCTGGCCG
103: V P D A V G T L F D V L Y D P W P
  
```

ภาพที่ 25 ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน *aroE* จาก *S. venezuelae* ในพลาสมิด pATT804

```

358: ACGGCACTGGCCGCGGCCTGGTCCGAACGCGGCGGCAAGGTGGTCGGCGGC
120: T A L A A A W S E R G G K V V G G

409: CTCGACCTCCTGGTCCACCAGGCGGTCCCTCCAGGTCGAGCAGATGACGGGC
137: L D L L V H Q A V L Q V E Q M T G

460: GTCCCCAAGGCGCCGCTCGCCGCCATGCGCGCCGCGGGGGAGCGGGGCGC
154: V P K A P L A A M R A A G G A G R

511: TCGCCGCCCCGCTAGGCGCCCGAAGACCCCGCAGAAGGCGACCGGACGTC
171: S P P R *

562: CGACAGCTGGACCGGGGGCCGAGGTAGCCGCCCGGACGTGGGAGGATCGGG

613: GATGGCGGGCCAGGGCCGCGCACCCGGTCGCGCCGTCGCAGTACCCAGGCG
664: CGAGCATGAGGAGCATCGTTGAGCAGTTGCGTTGGCTGACCGCTGGGGAAT
    aroC
    →
1: M R S I V E Q L R W L T A G E S

715: CCCACGACCCGCGCTGGGTGCGGACCCTGGAGGGTCTTCCGGCCGACGTCC
17: H D P R W V A T L E G L P A D V P

766: CGGTCCACCACAGAGCTGGTGGCGGACTACCTTCGCGCTGCGACGCTTCGC
34: V H H R A G G G L P S R C D A S L

817: TATGGGCCCCGGCGCCCCGAA
51: W A R R P E

```

ภาพที่ 25 (ต่อ)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน AroE ของ *S. venezuelae* กับ AroE จากฐานข้อมูล พบว่ามีบริเวณอนุรักษ์ที่บริเวณ Gln26-Ala 31 (Gln 124-Ala129 ของ *M. tuberculosis*) โดยมีลำดับ เป็น G/A-XGGTA (ภาพที่ 26) โดย Ala125 และ Ala128 ของ *M. tuberculosis* จะจับกับ adenine ribose และ diphosphate ของ NADP (Padyana and Burley, 2003) โดยมีรายงานว่าที่บริเวณอนุรักษ์ ที่บริเวณ Gln61-Lys69 ของ *M. tuberculosis* มีลำดับเป็น GXSTMPXK เป็นบริเวณ active site (Padyana and Burley, 2003) และพบบริเวณ Ser18, Ser20, Lys69, Asn90, Thr104, Asp105 และ Gln243 (ของ *M. tuberculosis*) ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ โดยบริเวณนี้จะไปจับกับ nicotinamide ring ของ NADP (Fonseca *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณอนุรักษ์ที่เป็น catalytic site ที่ทำการ เปลี่ยน dehydroshikimate เป็น shikimate ที่บริเวณ Lys69, Asn90, Asp105 และ Glu259 ของ *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 2005)

S_pristinaespiralis	-----MAPRR-AAVLGSPIAHSLSPVLHRAAYAEGLTDSYDRFEVDEAALPGFVA	52
S_griseus	-----MAEIRRRAAVLGSPIAHSLS PVLHRAAYAEGLDDWSYDRFEVDEAALPGFVA	53
S_clavuligerus	MTAAQSGPAGPVRAAVALGSPIEHSLSPVLHRAAYAAALGLDAWSYGRHEVTETPLPGFLD	60
S_venezuelae		
S_sviveus	----MQARAADARRAAVLGKPIAHSLSPVLHVAAAYEELGLTGWSYDRFELDEAALPAFVE	56
S_avermitilis	----MTG-TDSKRRAAVLGSPIAHSLS PVLHRAAYAEGLRLSDWSYDRFDVDEEALPAFFG	55
S_coelicolor	-----MLHRAAYAEGLADWTYDHFVDVDEAALPGFLE	32
Salinispora tropica	-----MSSERVRAAVVGDPPIAHSLSPVINNAGYAAYGLHDWSYTRIECAQAQLPALVA	53
M_tuberculosis	-----MSEGPKKAGVLGSPIAHSRSPQLHLAAAYRALGLHDWTYERIECGAAELPVVVG	53
GXSTMPXK		
S_pristinaespiralis	ELDASWAGLSLTmplkRAIIPLLDGISDTAASVEAVNTVVFTEDGRRVGDNDTPGMVAA	112
S_griseus	GLDASWAGLSLTmplkRAIIPLLDEISAASAVEAVNTVVFTEDGRRVGDNDTPGMIAA	113
S_clavuligerus	GLDPSWAGLSLTmplkRAVIPLLDGVSPTAAAVAANTVVLTDPGRRLDGNDTPGMVAA	120
S_venezuelae	-----HTDIPGMLAV	10
S_sviveus	QLGPEWAGLSLTmplkRAVIPLLDGISDTAASVEAVNTVVFTEDGRRLDGNDTPGMVAA	116
S_avermitilis	KLGPEWAGLSLTmplkRAVIPLLDEITETAASVEAVNTVVCTRDGRRVGDNDTPGMVAA	115
S_coelicolor	GLGPEWAGLSLTmplkRAVIPLLDSVETAASVDANTVVLTEDGRRVGDNDTPGIAA	92
Salinispora tropica	GLGPEWAGLSVTMPKEAALAATTASPVAVAVGAANTLVRRPNGSWHADNTDVAGMVEV	113
M_tuberculosis	GFGPEWGVSVTMPGKFALRFADERTARADVGSANTLVRTPHG-WRADNTIDIGVAGA	112
G/XGGTA		
S_pristinaespiralis	LRERGVEQVDSAAILGAGATASSAVAALSRCVTPGTAYVRSEARAAMRWGERLGVDF	172
S_griseus	LRERGVDKVESA AVL GAGATASSAVAALA VCTGPVTAYVRGERAAEMRAWGDRLGVDV	173
S_clavuligerus	LAERGVDKVESA AVL GAGATASSALAALRICAGPVTAYVRGEARAAMRWGERLGVDF	180
S_venezuelae	LRERGVEKVESAAILGAGATASSAVAALARICGPGVTAYVRSEARAEMRWGERLGVDF	70
S_sviveus	LRERGIEQVDSAAILGAGATASSALAALARICTGAVVAYVRSEARAEMRWGERLDVEI	176
S_avermitilis	LRERGIEQVDSAAILGAGATASSALAALARICTGEVVAYVRSEARAEMRWGERLDVEV	175
S_coelicolor	LRHGIEKVESAAILGAGATASSALAALARICTGEVTVHVRSAARAEMRWGERLGVDF	152
Salinispora tropica	LTAAGVRPGSTLTVLGAGGTARAAAALARTVTTVARRKAAIADLRPVLETGVGSL	173
M_tuberculosis	LGAA--AGHAL-VLGS GGTTAPAAVVG LAELGVTDITVARNSDKAA RLVDLTRGVGAT	168
* : . : ***.* * : . : : . . *		
S_pristinaespiralis	RTADWAD---AAHALRSPLVIATTAGTTDALAAEVPAAPG-TLFDVLYDPWPPTALAAAW	228
S_griseus	VTADWAD---AAAAATAPLVVATTAGATDALAGAVPTAPG-ILFDVLYDPWPPTALAAAW	229
S_clavuligerus	HTADWSD---AARALEAPLVVATTAGAADALAAAVPDPRG-TLFDVLYDPWPPTPLAAAW	236
S_venezuelae	RTAPWD---AAEFASFPLVATTAGTTNALATAVPDAPG-TLFDVLYDPWPPTALAAAW	236
S_sviveus	RTADWAD---AAEALRAPLVIATTAGATDALAHAVPERPA-ALFDVLYDPWPPTALAAAR	232
S_avermitilis	RTEDWAQ---AAEALRAPLVVATTAGATDALAAAVPERPA-TLFDVLYDPWPPTDLAAR	231
S_coelicolor	RLADWAD---AAEALRAPLVVATTAGATDALAAAVPEMPT-TLFDVLYDPWPPTALAAAR	208
Salinispora tropica	TGVPWD---AAAACSDVVISTVPAGAADPLATAVWRPPTVLFDALYDPWPPTS LASAA	230
M_tuberculosis	RFCAFDSGGLADA VAAAEVLVSTIPA EVAAGYAGTLA AIP--VLLDAIYDPWPPTPLAAAV	226
: . * . : : : ** * : : * : : *:*** ** :		
S_pristinaespiralis	SGNGGGVVGGLDLLVHQAVFQVEQMTGRSPAFLRAMRTAGEHALRAR-----	275
S_griseus	SARGGAVVGGLDLLVHQALLQVEQMTGRAPPLAAMRQAGEAALAAAR-----	276
S_clavuligerus	SARGGAVVGGLDLLVHQAVLQVEQMTGRAPPLAAMRAAGEAAIVQRSALS IWP	291
S_venezuelae	SERGKVVVGGLDLLVHQAVLQVEQMTGVKPAFLAAMRAAGGAGRSFPF-----	174
S_sviveus	SMIGGAVVVGGLDLLVHQAVLQVEQMTGRVPAPVDAMRKAGEHALAAR-----	279
S_avermitilis	SAGGAVVVGGLDLLVHQAVLQVEQMTGRSPAFLDMRRAGEHALAAR-----	278
S_coelicolor	SAHGAVVVGGLDLLHQAVLQVEQMTGRAPPLAAMRKAGEHALADR-----	255
Salinispora tropica	RTAGRCVCSGLDLLLAQAVGQFEQFTG-VPAAPRAAMDALTAARAG-----	275
M_tuberculosis	GSAGGRVISGLQMILLHQAVFAQEFTG-LPAPREAMTCALAAALD-----	269
* * *.*. * * * * * * * *		

ภาพที่ 26 การทำ multiple alignment ลำดับกรดอะมิโน AroE จาก *S.venezuelae* และ *Actinomyces*

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าชิ้นโคลน pATT804 ที่นำมาวิเคราะห์เป็นยีน *aroE* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ shikimate dehydrogenase ที่อยู่ในวิถี shikimate

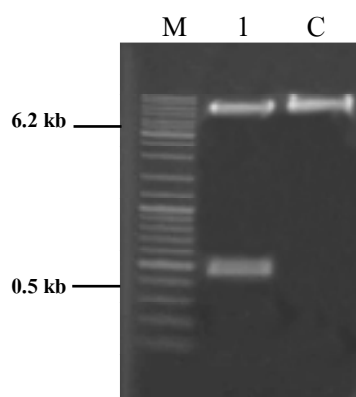
แผนการทดลองต่อไปจะศึกษาว่าชั้นยีน *aroE* ที่โคลนได้เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ เอนไซม์ shikimate dehydrogenase โดยทำให้เกิดการกลายของยีนด้วยการทำยีนดิสรับชั้นของยีน

aroE ใน *S. venezuelae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล เพื่อดูผลกระทบของการกลายต่อวิถี shikimate และการผลิตคลอแรมฟินิคอล

3 การศึกษาหน้าที่ของยีน *aroE* ของ *S. venezuelae* ด้วยวิธียีนดิสรับชัน

3.1 การสร้างพลาสมิดสายผสมเพื่อทำยีนดิสรับชัน

พลาสมิดสายผสมสำหรับทำยีนดิสรับชัน สร้างโดยการเชื่อมชิ้น *aroE* ขนาด 500 คู่เบส ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* จากพลาสมิด pATT802 กับพลาสมิด pSET151 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันได้เป็นพลาสมิด pATT803 ตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* (ภาพที่ 27) จากนั้นจึงทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* ET12567(pUZ8002) ซึ่งเป็นผู้ให้สำหรับทำคอนจูเกชัน



ภาพที่ 27 ผลการทดสอบโคลน pATT803 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

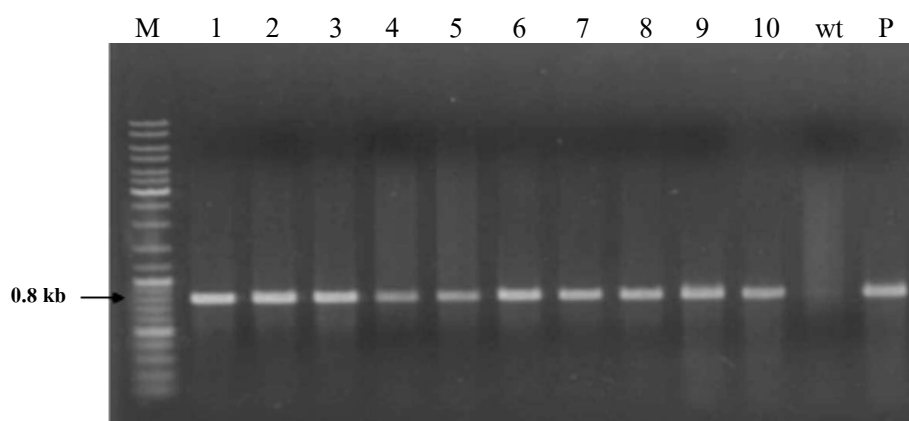
M = 1 kb DNA ladder, 1 = pATT803/*EcoRI*/*HindIII*, C = pSET151/*EcoRI*/*HindIII*

3.2 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วยวิธีพีซีอาร์

3.2.1 การตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์โดยไพรเมอร์สำหรับยีนต้านยาไรโอสเตรปทอน

กลุ่มเลือกสายพันธุ์กลายมาทั้งหมด 10 โคลน แล้วนำมาจัดบนอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะไรโอสเตรปทอน และกรดนาติซิก เพื่อคัดเลือก แล้วนำสายพันธุ์กลายมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำมาทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ATT012 และ ATT013 (ตารางที่ 4) ซึ่งจำเพาะต่อยีนต้านยา

ไซโอสเตรปทอน ซึ่งอยู่บนพลาสมิด pATT803 พบว่าสายพันธุ์กลายทั้ง 10 โคลน มียีน *tsr* แทรกอยู่ โดยให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 28) แสดงว่าพลาสมิด pATT803 อยู่ในเอกซ์คอนจูแกนส์ทั้งหมด



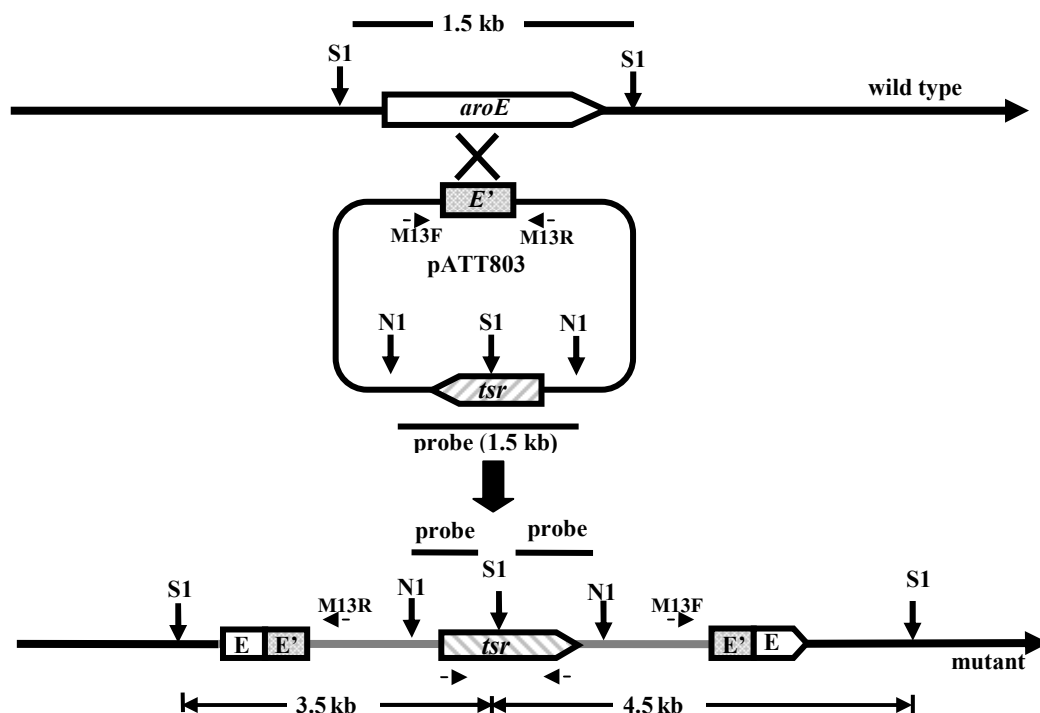
ภาพที่ 28 ตรวจสอบสายพันธุ์กลายโดยการเพิ่มปริมาณยีนต้านยาไซโอสเตรปทอนด้วยวิธีพีซีอาร์

M = 1 kb DNA ladder, 1-10 = สายพันธุ์กลายที่ 1-10, wt = *S. venezuelae*

P = pATT803

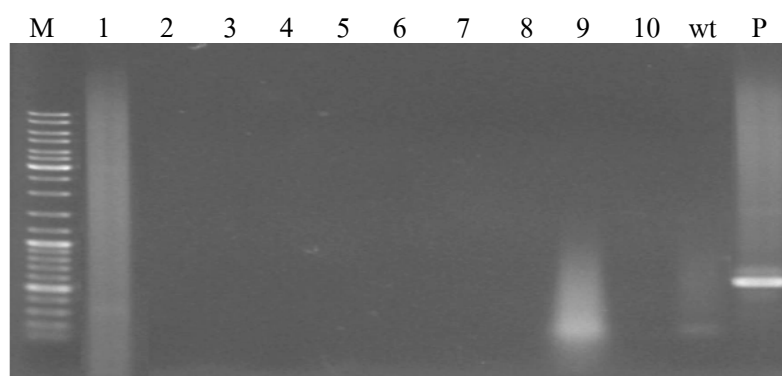
3.2.2 ตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ ของ M13 forward และ M13 reverse

เพื่อยืนยันว่าการแทรกตัวของพลาสมิดในโครโมโซมของสายพันธุ์กลายจริง เลือกใช้ไพรเมอร์ M13 forward และ M13 reverse ในการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์คู่นี้จะไม่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ในกรณีที่พลาสมิด pATT803 แทรกเข้าไปอยู่ในโครโมโซมที่ตำแหน่ง *aroE* โดยการเกิด homologous recombination กับ *aroE* บนโครโมโซม (ภาพที่ 29) ผลการทำพีซีอาร์ไม่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในสายพันธุ์กลายที่สุ่มตรวจทุกตัว แต่พบในพลาสมิด pATT803 (ภาพที่ 30) ซึ่งเป็นการยืนยันเบื้องต้นว่าการแทรกตัวของพลาสมิด pATT803 ในโครโมโซมของ *S. venezuelae* จริง



ภาพที่ 29 แผนภาพแสดงการแทรกตัวของพลาสมิด pATT803 ในโครโมโซมของสายพันธุ์กลายที่ตำแหน่งยีน *aroE*

S1 = *SacI*, N1 = *NdeI*, M13F = ไพรเมอร์ M13 forward, M13R = ไพรเมอร์ M13 reverse, *tsr* = ยีนต้านยาไซโอสเตรปทอน, *E'* = *aroE* 500 คู่เบส

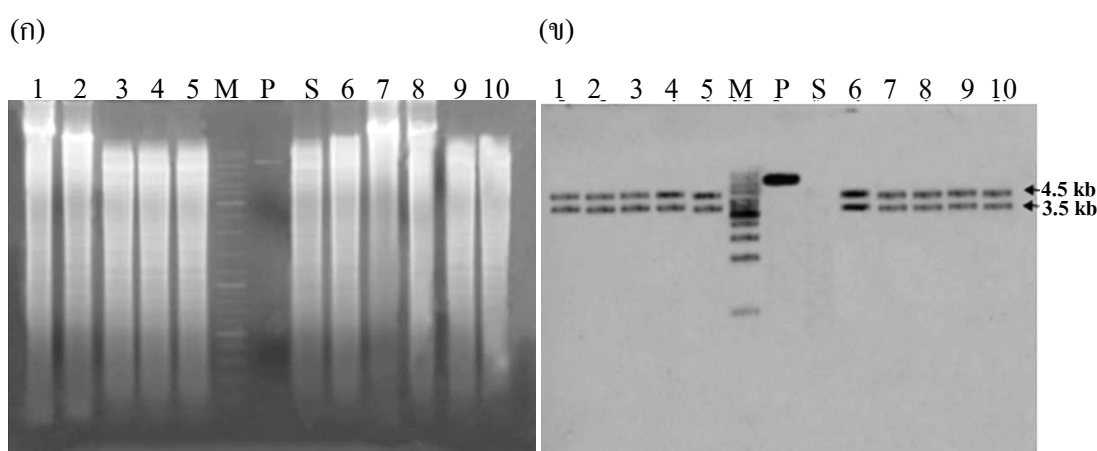


ภาพที่ 30 ตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนส์โดยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ M13 forward และ M13 reverse

M = 1 kb DNA ladder, 1-10 = เอกซ์คอนจูแกนส์ 1-10, wt = *S. venezuelae*, P = pATT803

3.3 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายโดย Southern blot hybridisation

ตรวจสอบสายพันธุ์กลายว่ามีการแทรกตัวของพลาสมิด pATT803 เข้าไปที่ตำแหน่งยีน *aroE* ในโครโมโซมของ *S. venezuelae* อยู่จริง โดยนำพลาสมิด pSET151 มาตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* โดยเลือกแถบที่มีขนาด 1.5 กิโลเบส ที่เป็นส่วนของยีน *tsr* มาใช้เป็นโพรบ และตัดโครโมโซมของสายพันธุ์กลายด้วยเอนไซม์ *SacI* (ภาพที่ 31) เนื่องจากมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์นี้อยู่ในยีน *tsr* (ภาพที่ 29) แล้วทำ Southern blot hybridisation ด้วยโพรบดังกล่าว พบว่าให้สัญญาณแถบดีเอ็นเอ 2 แถบคือ ขนาด 3.5 และ 4.5 กิโลเบส (ภาพที่ 31 ข แถวที่ 1-10) ขณะที่ *tsr* ของพลาสมิด pATT803 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* ให้สัญญาณแถบดีเอ็นเอ 1 แถบขนาด 6.7 กิโลเบส แสดงว่าสายพันธุ์กลายได้รับพลาสมิด pATT803 โดยแทรกตัวเข้าไปที่ตำแหน่งยีน *aroE* บนโครโมโซม โดยมีตำแหน่งตัดของ *SacI* ห่างออกไปทางด้านซ้ายและด้านขวาของพลาสมิด (ภาพที่ 29) โดยจากการตรวจสอบสายพันธุ์กลาย พบว่ารูปแบบของการแทรกตัวของพลาสมิดมีเพียงรูปแบบเดียว แสดงว่าพลาสมิด pATT803 เกิด homologous recombination ที่ตำแหน่งยีน *aroE* เท่านั้น



ภาพที่ 31 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายของ *S. venezuelae* ที่ได้รับพลาสมิด pATT803 ด้วย

Southern blot hybridisation โดยใช้ยีน *tsr* เป็นโพรบ

(ก) อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของโครโมโซมที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI*

(ข) Southern blot hybridisation

M = 1 kb DNA ladder, 1-10 = สายพันธุ์กลายที่ 1-10/*SacI*, P = pATT803/*SacI*,

S = *S. venezuelae*/*SacI*

3.4 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายบนอาหาร minimal medium

นำสายพันธุ์กลายทั้ง 10 โคลน มาเลี้ยงบนอาหาร minimal medium (MM) ที่มีและไม่มี กรดอะมิโนทริปโทเฟน ฟีนิลอะลานีน และไทโรซีน พบว่าสายพันธุ์กลายไม่สามารถเจริญได้ในอาหาร MM ที่ไม่มีกรดอะมิโน (ภาพที่ 32) แสดงว่าการแทรกตัวของพลาสมิด pATT803 เข้าไปในโครโมโซม มีผลต่อการเจริญของ *S. venezuelae* โดยที่ไปขัดขวางการแสดงออกของยีน *aroE* (ยีนดิสรับชัน) ไม่สร้างเอนไซม์ shikimate dehydrogenase เกิดการหยุดชะงักของวิถี shikimate ไม่มีการสร้างกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิด ทำให้สายพันธุ์กลายของ *S. venezuelae* ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่ไม่มีกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิดได้

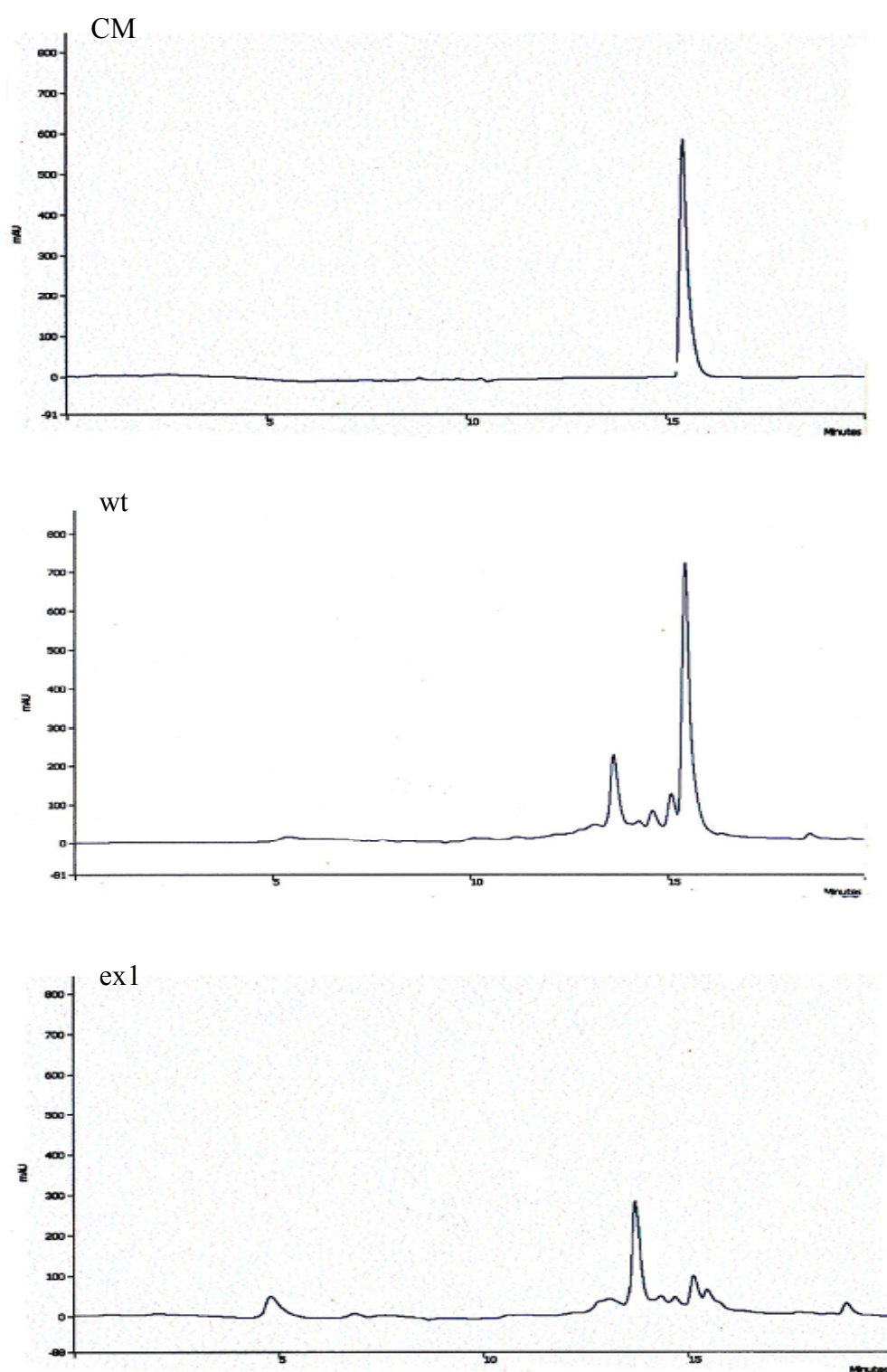


ภาพที่ 32 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายในอาหาร MM ที่เติมกรดอะมิโน ทริปโทเฟน ฟีนิลอะลานีน และไทโรซีน (ขวา) และไม่เติมกรดอะมิโน (ซ้าย)

wt = *S. venezuelae*, 1-10 = สายพันธุ์กลายที่ 1-10

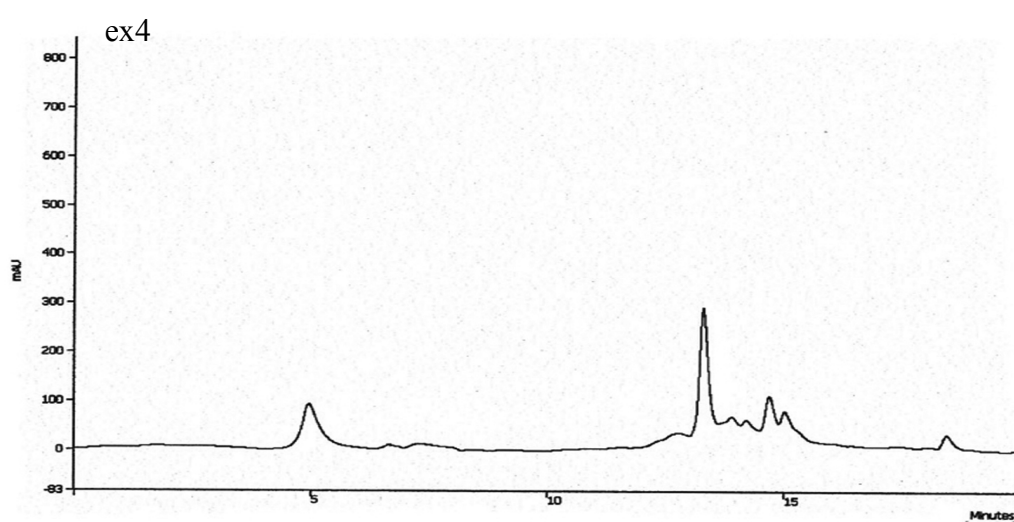
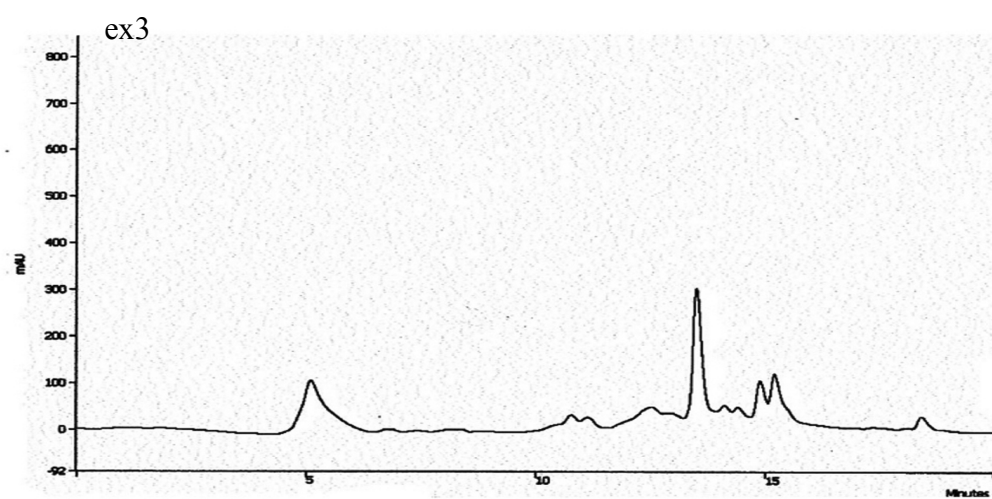
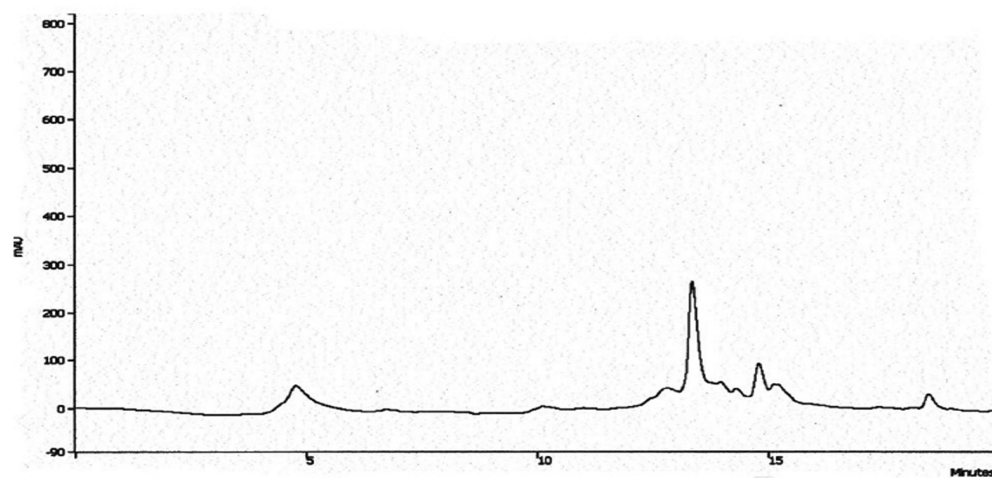
พบว่าเมื่อฉีดคลอแรมฟินิคอล (4 ไมโครกรัม) ให้ peak ในนาที่ที่ 15.4 (ภาพที่ 34) โดยที่ *S. venezuelae* สายพันธุ์ไวต์ไทป์ ให้ peak ที่ตำแหน่งเดียวกับคลอแรมฟินิคอลมาตรฐาน โดยคำนวณค่าการผลิตคลอแรมฟินิคอลได้ 22.741 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่สายพันธุ์กลายนั้นพบ peak ที่นาที่ดังกล่าวเพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจจะเป็นสารอื่นที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงที่นาที่เดียวกัน หรืออาจเป็นสารคลอแรมฟินิคอลที่สร้างได้ลดลงอย่างมาก ถ้ายังมีการสร้างสารคลอแรมฟินิคอลอยู่อาจเนื่องมาจาก การทำงานของเอนไซม์ quinate/shikimate dehydrogenase ในวิถี quinate ที่สามารถสร้าง shikimate ได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ shikimate dehydrogenase ที่สังเคราะห์จากยีน *aroE* (Giles *et al.*, 1985) เช่นใน *Gluconobacter oxydans* IFO3244 (Adachi *et al.*, 2003a), *A. nidulans* (Grant *et al.*, 1988) และ *Rhodococcus rhodochrous* (Bruce and Cain, 1990) ที่สามารถใช้ quinate เป็นสารตั้งต้นแทน อย่างไรก็ตามยังพบ peak ในนาที่ที่ 13.2 ของสายพันธุ์กลายมีการสะสมมากกว่าไวต์ไทป์ อาจเป็นไปได้ว่า peak ดังกล่าวอาจเป็นสาร intermediate ที่สะสมขึ้นเมื่อยีน *aroE* ถูกยับยั้งการแสดงออก

จากผลการศึกษาโดยการทำยีนดิสรับชันของยีน *aroE* พบว่าสายพันธุ์กลายที่ได้ทั้งหมดไม่สามารถเจริญบนอาหารที่ไม่มีการเติมกรดอะมิโน ทรีปโทเฟน ฟีนอลอะลานีน ไทโรซีน และสายพันธุ์กลายที่ได้ไม่สามารถสร้างสารคลอแรมฟินิคอลหรือสร้างได้น้อยมากเมื่อเทียบกับ *S. venezuelae* สายพันธุ์ไวต์ไทป์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียในข้อ 3.5.1 แสดงให้เห็นว่ายีน *aroE* ที่โคลนได้นี้มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ในวิถี shikimate ซึ่งมีผลต่อการสร้างคลอแรมฟินิคอลใน *S. venezuelae* ด้วย

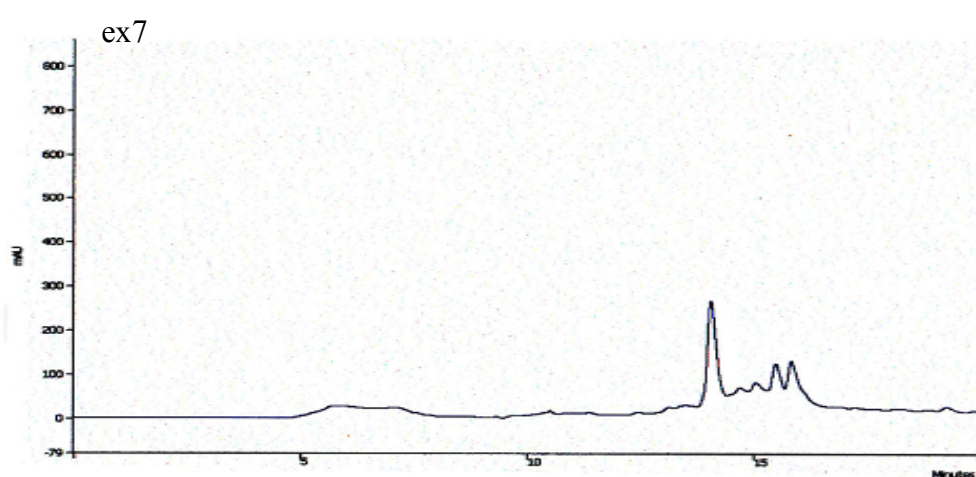
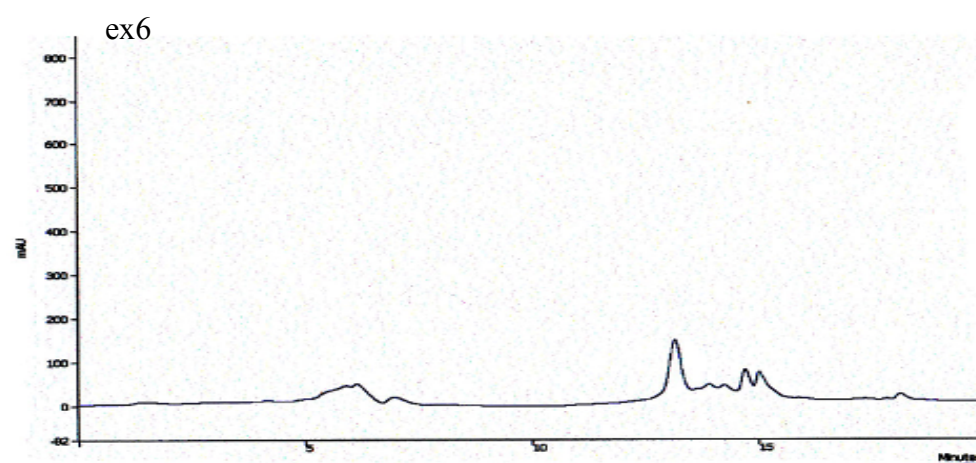
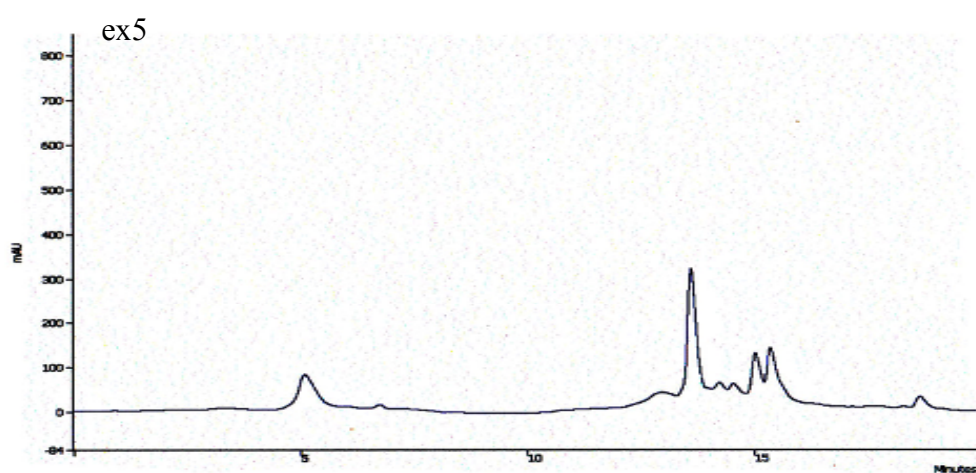


ภาพที่ 34 ผลการวิเคราะห์สารสกัดด้วยวิธี HPLC

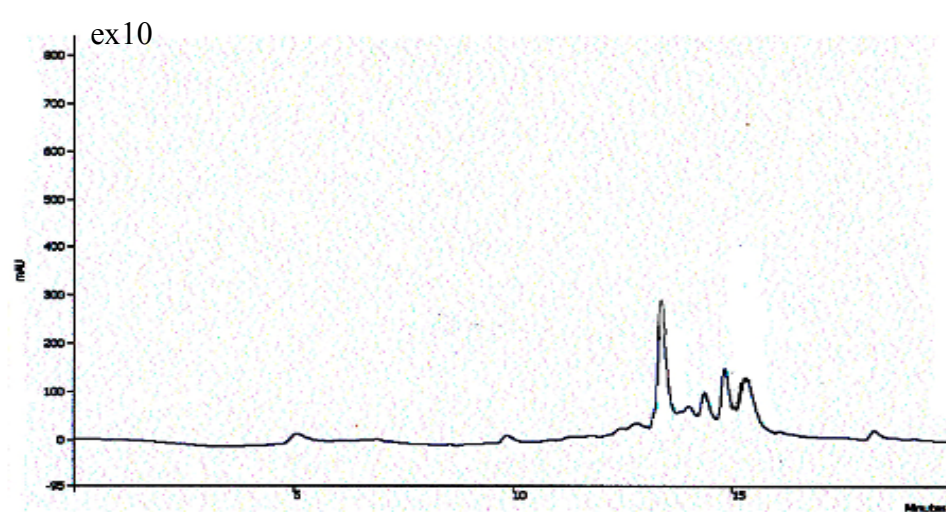
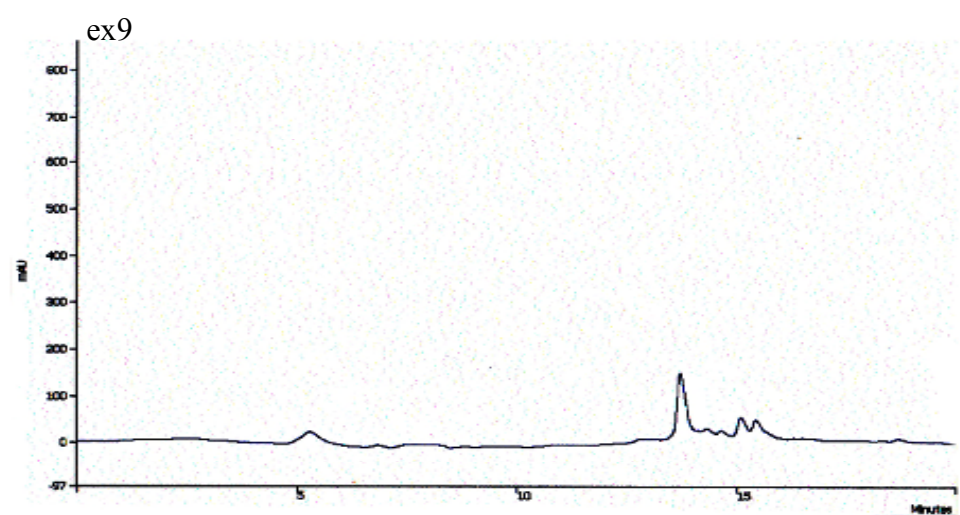
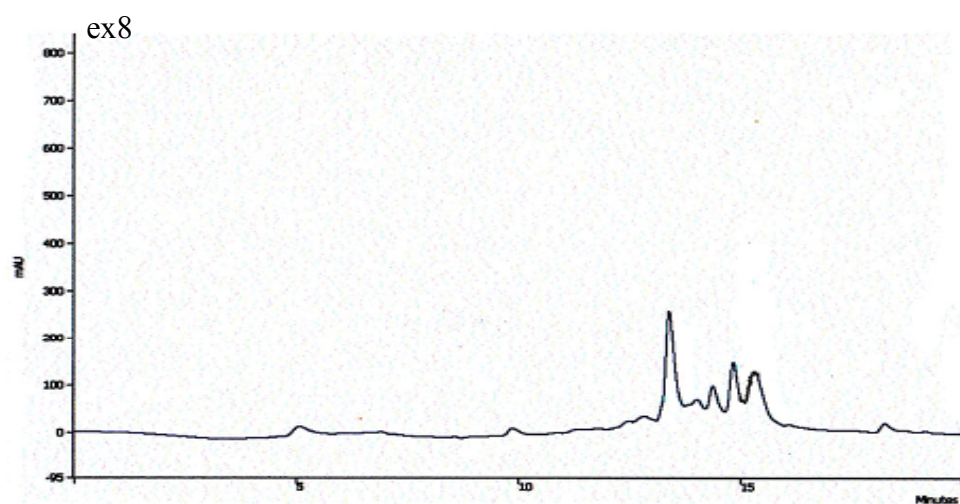
Cm = คลอแรมฟินิคอล เข้มข้น 4 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$, wt = *S. venezuelae*, ex1-10 = *S. venezuelae*
สายพันธุ์กลายที่ 1-10



ภาพที่ 34 (ต่อ)



ภาพที่ 34 (ต่อ)



สรุป

การศึกษาการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *S. venezuelae* โดยอาศัยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุลกับ *E. coli* ET12567 เพื่อใช้ในการสร้างสายพันธุ์กลายและศึกษาหน้าที่ของยีนใน *S. venezuelae* พบว่าสถานะที่เหมาะสมเมื่อใช้สปอร์ *S. venezuelae* เป็นผู้รับ คือกระตุ้นการงอกของสปอร์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนผสมกับ *E. coli* โดยสามารถส่งถ่ายพลาสมิด pSET152 ได้ที่ความถี่ในช่วง 10^{-5} - 10^{-4} เอกซ์คอนจูแกนส์ต่อผู้รับ โดยให้ความถี่สูงสุดที่ 6.9×10^{-4} เอกซ์คอนจูแกนส์ต่อผู้รับ และเมื่อทำคอนจูเกชันโดยใช้ไมซีเลียมของ *S. venezuelae* เป็นผู้รับ พบว่ามีประสิทธิภาพอยู่ในช่วง 10^{-5} - 10^{-4} เอกซ์คอนจูแกนส์ต่อผู้รับ โดยให้ประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้ไมซีเลียมที่อายุ 12-24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำคอนจูเกชันต่างสกุล ระหว่างการใช้สปอร์หรือไมซีเลียมเป็นผู้รับ พบว่าประสิทธิภาพที่ได้ไม่ต่างกัน โดยเอกซ์คอนจูแกนส์มีพื้นฐานวิทยาและความสามารถในการสร้างคลอแรมฟินิโคลได้เท่ากับไวต์ไทป์ทุกประการ โดยที่การแทรกตัวของพลาสมิด pSET152 เข้าไปในโครโมโซมของ *S. venezuelae* นั้นเกิดที่ตำแหน่ง attachment site (*attB*) บนโครโมโซมเพียงตำแหน่งเดียว

การโคลนยีน *aroE* จากเชื้อ *S. venezuelae* ซึ่งเป็นยีนสำคัญในวิถี shikimate โดยการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ แล้วนำไปใช้เป็นโพรบทำ Southern blot hybridization กับดีเอ็นเอของ *S. venezuelae* ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด พบว่าได้สัญญาณแถบดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบส กับดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *SacI* เมื่อสกัดดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวออกจากเจลไปทำ DNA library แล้วค้นหาโคลนด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่าจาก DNA library ทั้งหมด 1,023 โคลน ได้โคลน pATT804 ซึ่งมียีน *aroE* เมื่อนำโคลนดังกล่าวมาหาลำดับเบสพบว่ามีส่วน C-terminal ของยีน *aroE* มีขนาด 525 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 175 กรดอะมิโน และมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ AroE จาก *S. pristinaespiralis* ATCC 25486 มากที่สุด (83%)

เมื่อศึกษาหน้าที่ของยีน *aroE* โดยการทำยีนดิสรับชัน โดยสร้างรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pATT803 ที่มีส่วนของยีน *aroE* ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ในพลาสมิด pSET151 แล้วส่งผ่านจาก *E. coli* ET12567 เข้าสู่ *S. venezuelae* ด้วยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุล พบว่าสายพันธุ์กลายที่ได้ไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร minimal medium ที่ไม่เติมกรดอะมิโนทรีปโทเฟน ไทโรซีน และฟีนิลอะลานีน และยังไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* JM109 ซึ่งไวต่อคลอแรมฟินิโคลได้ เมื่อนำอาหารเหลวของสายพันธุ์กลายมาสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทแล้วตรวจสอบด้วย HPLC พบว่าสายพันธุ์กลายทั้งหมดสร้าง

คลอแรมฟินิคอลในปริมาณที่ต่ำมาก หรือเกือบไม่สร้างเลย เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ไวด์ไทป์ และเมื่อนำดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายทั้งหมดนี้ไปทำ Southern blot hybridisation เพื่อพิสูจน์การเกิดยีนดิสรีบชัน พบว่าเกิด homologous recombination ระหว่างบางส่วนของยีน *aroE* บนพลาสมิด pATT803 กับตำแหน่งของยีน *aroE* บนโครโมโซมของ *S. venezuelae* เป็นผลให้พลาสมิดดังกล่าวแทรกเข้าไปในยีน *aroE* ทำให้ยีน *aroE* ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้สายพันธุ์กลายที่ได้ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนทริปโทเฟน ไทโรซีน และฟีนอลอะลานีน รวมทั้งยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอลได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- นิรินทรียา สุกดาชาติ. 2548. การวิเคราะห์กลุ่มยีนโพลีคีไทด์จีนเซสชนิดที่1 จาก *Streptomyces rimosus* R7 ด้วยวิธียีนดิสรับชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- Adachi, O., S. Tanasupawat, N. Yoshihara, H. Toyama and K. Matsushita. 2003a. 3-dehydroquinate production by oxidative fermentation and future conversion of 3-dehydroquinate to the intermediates in the shikimate pathway. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 67: 2144-2131.
- _____, D. Moonmangmee, H. toyoma, M. Yamada, E. Shinagawa and K. Matsushita. 2003b. New developments in oxidative fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 60: 643-653.
- Ahmad, S., E. Rightmire and R.A. Jensen, 1986. Evolution of the regulatory isozymes of 2-deoxy-o-arabino-heptulosonate phosphatesynthase present in the *Escherichia coli* genealogy. **J. Bacteriol.** 165: 146-154.
- Amrhein, N., D. Johaenning, J. Schab, and A. Schulz. 1983. Biochemical basis for glyphosate tolerance in a bacterium and a plant tissue culture. **FEBS Lett.** 157: 191-196.
- Babitzke, P., P. Gollnick, and C. Yanofsky. 1992. The *mtrAB* operon of *Bacillus subtilis* encodes GTPcyclohydrolase-I (MtrA), an enzyme involved in folic acid biosynthesis, and MtrB, a regulator of tryptophan biosynthesis. **J. Bacteriol.** 174: 2059-2064.
- Barea, J.L. and N. H. Giles. 1978. Purification and characterization of quinate (shikimate) dehydrogenase, an enzyme in the inducible quinic acid catabolic pathway of *Neurospora crassa*. **Biochim. Biophys. Acta.** 524: 1-14.

- Bender, S.L., S. Mehdi and J.R. Knowles. 1989. Dehydroquinase synthase: the role of divalent metal cations and of nicotinamide adenine dinucleotide in catalysis. **Biochemistry** 28: 7555–7560.
- Bentley, R. 1990. The shikimate pathway. a metabolic tree with many branches. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** 25: 307-384.
- Berlyn, M.B. and N.H. Giles. 1969. Organisations of enzymes in the polyaromatic synthetic pathway: separability in bacteria. **J. Bacteriol.** 99: 222-230.
- Bierman, M., R. Logan, K. O'Brien, E.T. Seno, R.N. Rao and B.E. Schoner. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. **Gene** 166: 43-39.
- Birch, A., A. Hausler and R. Hutter. 1990. Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. **Bacteriology.** 172: 4138-4142
- Bradley, D. 2005. Star role for bacteria in controlling flu pandemic. **Nat. Rev. Drug Discov.** 4: 945-946.
- Bruce, N.C. and R.B. Cain. 1990. Hydroaromatic metabolism in *Rhodococcus rhodochrous*: purification and characterisation of its NAD-dependent quinate dehydrogenase. **Arch. Microbiol.** 154: 179-186.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez and J. M. Short. 1987. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. **Biotechniques** 5: 367-379

- Charles, I.G., J.W. Keyte, W.J. Brammar, M. Smith and A.R. Hawkins. 1986. The isolation and nucleotide sequence of the complex *AROM* locus of *Aspergillus nidulans*. **Nucl Acids Res.** 14: 2201-2213.
- Chatterjee, S., and L. C. Vining. 1983. Nutrition requirements for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. **Can. J. Microbiol.** 29: 247-253.
- Chaudhuri, S. and J. R. Coggins. 1985. The purification of shikimate dehydrogenase from *Escherichia coli*. **Biochem. J.** 226: 217-223.
- Choi, S. U., C.K. Lee, Y. I. Hwang, H. Kinoshita and T. Nihira, 2004. Cloning and functional analysis by gene disruption of a gene encoding a γ -butyrolactone autoregulator receptor from *Kitasatospora setae*. **J. Bacteriol.** 186: 3423-3430.
- Chung, C.T., S.L. Niemela and R.H. Miller. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86: 2172-2175.
- Coggins, J.R., M.R. Boocock, S. Chaudhuri, J. M. Lambert, J. Lumsden, G.A. Nimmo, and D.S. Smith. 1987. The *arom* multifunctional enzyme from *Neurospora crassa*. **Meth. Enzymol.** 142: 325-341.
- Combes, P., R. Till, S. Bee and M.C.M. Smith. 2002. The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-*attB* sites for the ϕ C31-encoded site specific recombination system. **J. Bacteriol.** 184: 5746-5752.
- De Feyter, R. C. and J. Pittard. 1986. Genetic and molecular analysis of *aroL*, the gene for shikimate kinase II in *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** 165: 262-232.

- Duanan, K., R.M. Edwards and J.R. Coggins. 1987. The pentafunctional arom enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* a mosaic of monofunctional domains. **Biochem J.** 246: 375-386.
- Ehrlich, J., Q.R. Bartz, R.M. Smith, D.A. Joslyn and P.R. Burkholder. 1947. Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. **Science** 106: 417.
- _____, D. Gottlieb, P.R. Burkholder, L.E. Anderson and T.G. Pridham. 1948. *Streptomyces venezuelae* n. sp. the source of chloromycetin. **J. Bacteriol.** 56: 467-477.
- Enriquez, L.L., M.V. Mendes, N. Anton, S. Tunca, S.M. Guerra and J.F Martín. 2006. An efficient gene transfer system for the pimaricin producer *Streptomyces natalensis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 257: 312-318.
- Euverink, G.J. W. 1995. Biosynthesis of phenylalanine and tyrosine in the methylotrophic actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. **J. Bacteriol.** 176: 6827-6835.
- Fleischmann R. D., M. D. Adams, O. White, R.A. Clayton, E.R. Kirkness, A.R. Kerlavage, C.J. Bult and J.M. Merrick. 1995. Whole genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* RD. **Science** 269: 496-512.
- Flett, F., V. Mersinias and C.P. Smith. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. **FEMS Microbiol. Lett.** 155: 223-229.
- Fonseca, I.O., M.L.B. Magalhaes, J.S. Oliveira, R.G. Silva, M.A. Mendes, M.S. Palma, D.S. Santos and L.A. Basso, 2006. Functional shikimate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: purification and characterization. **Protein Expr. Purif.** 46: 429–437.

- Galina, F., D. Claudio, R.M. Margaret, D.S. Deborah and A.R. Kevin. 1998. Cloning, expression and charecterization of type II 3-dehydroquinate dehydratase gene from *Streptomyces hygroscopicus*. **Arch. Biochem. Biophys.** 350: 298-306.
- Garbe, T., S. Servos, A. Hawkins, G. Dimitriadis, D. Young, G. Dougan, and I. G. Charles. 1991. The *Mycobacterium tuberculosis* shikimate pathway genes: evolutionary relationship between biosynthetic and catabolic 3-dehydroquinases. **Mol. Gen. Genet.** 228: 385-392.
- Giles, N.H., C.W. H. Partridge, S.I. Ahmed, and M.E. Case. 1967. The occurrence of two dehydroquinases in *Neurospora crassa*, one constitutive and one inducible. **Gene** 58: 1930-1937.
- _____, M.E., Case, J., Baum, R., Geever, L., Hulet, V., Patel and B. Tyler. 1985. Gene organization and regulation in the qa (Quinic acid) gene cluster of *Neurospora crassa*. **Microbiol. Rev.** 49:338-358.
- Goel A.K, Rajagopal L. and R.V. Sonti., 2001. Pigment and virulence deficiencies associated with mutations in the *aroE* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 245-250.
- Grant, S., C.F. Roberts, H. Lamb, M. Stoutand and A.R. Hawkins. 1988. Genetic regulation of the quinic acid utilization (*qut*) gene cluster in *Aspergillus nidulans*. **J. Gen. Microbiol.** 134:347-358.
- Han, C., L. Wang, K. Yu, L. Chen, L. HuK. Chen, H. Jiang and X. Shen. 2006. Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from *Helicobacter pylor*. **FEBS J.** 273:4683-4692
- Hasan, N. and E.W. Nester. 1978a. Dehydroquinate synthase in *Bacillus subtilis*. **J. Biol. Chem.** 253: 4999-5004.

- Hasan, N. and E.W. Nester. 1978b. Purification and properties of chorismate synthase from *Bacillus subtilis*. **J. Biol. Chem.** 253: 4993-4998.
- Haslam, E. 1993. **Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites**. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Hawkins, A.R., H.K. Lamb, M. Smith, J.W. Keyte, and C.F. Roberts. 1988. Molecular organization of the quinic acid utilization (QUT) gene cluster in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Gen. Genet.** 214: 224-231.
- He, J., N. Magarvey, M. Pirae and L.C. Vining. 2001. The gene cluster for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 includes novel shikimate pathway homologues and a monomodular nonribosomal peptide synthetase gene. **Microbiology** 147: 2817-2829.
- Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. **Plant Cell** 7:907-919
- Hobbs, G., C.M. Frazer, D.C.J. Gardner, J.A. Cullum and S.G. Oliver. 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 31: 272-277.
- Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chapter, T. Kieser, C.T. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward and H. Schrempf. 1985. **Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual**. The John Innes Foundation, Norwich.
- Huang, C.H., Y. S. Lin, Y.L. Yang, S. Huang and C. W. Chen. 1998. The telomerase of *Streptomyces* chromosome contain conserved palindromic sequence with potential to form complex secondary structures. **Mol. Microbiol.** 28:905-916.

- Ian, A.A. and J.R. Coggins. 1988. Sequencing and overexpression of the *Escherichia coli aroE* gene encoding shikimate dehydrogenase. **Biochem. J.** 249: 319-326.
- Ingledeu, W.M., M.E.F. Tresguerres, and J.L. Cánovas. 1971. Regulation of the enzymes of the hydroaromatic pathway in *Acinetobacter calcoaceticus*. **J. Gen. Microbiol.** 68: 273-282.
- _____ and C.C. Tai. 1972. Quinate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. **Can. J. Microbiol.** 18: 1817-1824.
- Izard, T. 2001. Structural basis for chloramphenicol tolerance in *Streptomyces venezuelae* by chloramphenicol phosphotransferase activity. **Protein Sci.** 10: 1508-1513.
- Izumi, Y., T. Yoshida, S.S. Miyazaki, T. Mitsunaga, T. Ohshiro, M. Shimao, A. Miyata, and T. Tanabe. 1993. L-serine production by a methylotroph and its related enzymes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 39: 427-432.
- Jensen, R.A. and E.W. Nester. 1966. Regulatory enzymes of aromatic amino acid biosynthesis in *Bacillus subtilis*. purification and properties of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase. **J. Biol. Chem.** 241: 3365-3372.
- Kang, X., H.E. Neuhaus, and R. Schelbe. 1994. Subcellular localization of quinate:oxidoreductase from *Phaseolus mungo* L. sprouts. **Z. Naturforsch.** 49: 415-420.
- Kieser, T., M.J. Bibb, M.J. Buttner, K.F. Chater and D.A. Hopwood. 2000. **Practical Streptomyces Genetics**. The John Innes Foundation, Norwich. 613 p.
- Kitani, S., M.J. Bibb, T. Nihira and Y. Yamada. 2000. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces lavendulae* FRI-5. **J. Microbiol. Biotechnol.** 10: 535-538.

- Larimer, F.W., C.C. Morse, A.K. Beck, K.W. Cole and F.H. Gaerther. 1983. Isolation of the Aro1 cluster gene of *Saccharomyces cerevesiae*. **Mol. Cell Biol.** 3: 1609-1614.
- Lindner, H.A., G. Nadeau, A. Matte, G. Michel, R. Ménard and M. Cygle. 2005. Site-directed mutagenesis of the active site region in the quinate/shikimate 5-dehydrogenase YdiB of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 280: 7162-7169.
- Lumsden, J. and J.R. Coggins. 1977. The subunit structure of the arom multienzyme complex of *Neurospora crassa*. a possible pentafunctional polypeptide chains. **Biochem J.** 161: 599-607.
- _____. and _____. 1978. The subunit structure of the arom multienzyme complex of *Neurospora crassa*. Evidence from peptide maps for the identity of the subunits. **Biochem J.** 169: 441-444.
- MacNeil, D.J. 1988. Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. **J. Bacteriol.** 170: 5607-5612.
- _____, K.M. Gewain, C.L. Ruby, G. Dezeny, P.H. Gibbons and T. MacNeil. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel intergreion vector. **Gene** 111: 61-68
- Magalhes, M.L.B., C.P. Pereira, L.A. Basso, and D.S. Santos. 2002. Cloning and expression of functional shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.25) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Protein Expr. Purif.** 26: 2659-2664.
- Malik ,V. S. 1983. Biochemistry and genetics of chloramphenicol production. **Enz. Microbiol. Technol.** 5:332-336.

- Malik ,V. S. and L.C. Vining. 1970. Metabolism of chloramphenicol by the producing organism.
Can. J. Microbiol. 16: 173-179.
- Matsushima, P.and R.H. Baltz. 1996. A gene cloning system for *Streptomyces toyocaensis*.
Microbiology. 142: 261-267.
- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. **Meth. Enzymol.** 101: 20-78.
- Michel, G., A.W. Roszak, V. Sauve, J. Maclean, A. Matte, J.R.Coggins, M. Cygler, A.J.
Lapthorn. 2003., Structures of shikimate dehydrogenase AroE and its paralog YdiB, **J. Biol. Chem.** 278 : 19463–19472.
- Mitsuhashi, S. and B.D. Davis. 1954. Aromatic biosynthesisXIII. Conversion of quinic acid to 5-dehydroquinic acid by quinic dehydrogenase. **Biochem Biophys. Acta.** 15: 268-280
- Mozodier, P., R. Petter and C. Thompson.1989. Intergeneric conjugation between
Escherichia coli and *Streptomyces* species. **J. Bacteriol.** 171: 3583-3585.
- Nakatsukasa, W.M. and E.W. Nester. 1972. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in
Bacillus subtilis 168. I. Evidence for and characterization of a trifunctional enzyme
complex. **J. Biol. Chem.** 247: 5972-5979.
- Nasser, D., G. Henderson, and E.W. Nester. 1969. Regulated enzymes of aromatic amino acid
synthesis: control, isoenzymic nature, and aggregation in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. **J. Bacteriol.** 98: 44-50.
- Nelson, D.L. and M.M. Cox. 2005. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 4 th edition. Worth
Publishers.

- Norrande, J., T. Kempe and J. Messing. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. **Gene** 26: 101-106.
- Ogino, T., C. Garner, J.L. Markley and K.M. Herrmann. 1982. Biosynthesis of aromatic compounds: ¹³CNMR spectroscopy of whole *Escherichia coli* cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79: 5828-5832.
- Padyana, A.K. and S. K. Burley. 2003. Crystal structure of shikimate 5-dehydrogenase (SDH) bound to NADP: insights into function and evolution. **Structure** 11: 1005–1013.
- Paranthaman, S. and Dharmalingam, K. 2003. Intergeneric conjugation in *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces* sp. strain C5: chromosomal integration and expression of recombinant plasmids carrying the *chiC* gene. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 84-91
- Pirae, M., L.R. White and L.C. Vining. 2004. Biosynthesis of dichloroacetyl component of chloramphenicol in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: genes required for halogenation. **Microbiology** 150: 85-94.
- Pittard, J. and B.J. Wallace. 1966. Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 91:1494-1508.
- Refeno, G., R. Ranjeva and A.M. Boudet. 1982. Modulation of quinate:NAD⁺ oxidoreductase activity through reversible phosphorylation in carrot cell suspensions. **Planta** 154:193-198.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 2001. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York.

- Schulz, A., A. Krueper, and A. Amrhein. 1985. Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. **FEMS Microbiol. Lett.** 28: 297-301.
- Sia, L.A., D.M. Kuehner and D.H. Figurski. 1996. Mechanism of retransfer in conjugation: prior transfer of the conjugative plasmid is required. **J. Bacteriol.** 178: 1457-1464.
- Smith D.D. and J.R. Coggins. 1983. Isolation of a bifunctional domain from the pentafunctional arom enzyme complex of *Neurospora crassa*. **Biochem J.** 213: 405–415.
- Snyder, L. and W. Champness. 1997. **Molecular Genetics of Bacteria**. American Society for Microbiology Press, Washington. 504 p.
- Sun, J., G.H. Kelemen, J.M. Fernandez-Abalos and M.J. Bibb. 1999. Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Microbiology** 145: 2221-2227.
- Southern, T.G. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. **J. Mol. Biol.** 98: 503-507.
- Thorpe, H.M., S.E. Wilson, and M.C.M. Smith. 2000. Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage ØC31. **Mol. Microbiol.** 38: 232-241.
- Van Kleef, M.A.G. and J.A. Duine. 1988. Bacterial NAD(P)-independent quinate dehydrogenase is a quinoprotein. **Arch. Microbiol.** 150: 32-36.
- Voeykova, T., L. Emelyanova, V. Tabakov and N. Mkrtumyan. 1998. Transfer of plasmid pT01 from *Escherichia coli* to various representatives of the order Actinomycetales by intergeneric conjugation. **FEMS Microbiol. Lett.** 162: 47-52.

Williams, S.T., M. Goodfellow and G. Alderson. 1989. Genus *Streptomyces*. pp. 2452-2492.

In S.T. Williams, ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** Vol.4. Williams and Wikins, Baltimore. 349 p.

White, P.J., J. Young, I.S. Hunter, H.G. Nimmo, and J.R. Coggins. 1990. The purification and characterization of 3-dehydroquinase from *Streptomyces coelicolor*. **Biochem. J.** 265: 735-738.

Woodward, T.E., J.E. Smadel, H.E. Ley, R. Green and D.S. Mankikar. 1948. Preliminary report on the beneficial effect of chloromycetin in the treatment of typhoid fever. **Ann. Int. Med.** 29: 131.

Yanisch perron, C., J. Vieira and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strain: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectrors. **Gene** 33: 103-119.

Ye, S., F. Delft, A. Brooun, M.W. Knuth, R.V. Swanson and D.E. McRee. 2003. The crystal structure of shikimate dehydrogenase (AroE) reveals a unique NADPH binding mode. **J. Bacteriol.** 185, 4144-4151.

Zhang, X., Z. Shunbao, H. Fang, L. Xuhui, Y. Haidong, H. Yishu and W. Honghai. 2005. Expression, purification and properties of shikimate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Biochem. Mol. Biol.** 38: 624-631.

ภาคผนวก

ตาราง แสดงจำนวนสปอร์และจำนวนเอกซ์คอนจูแกนส์ของการคอนจูเกชัน โดยกระตุ้นการงอกของสปอร์ *S. venezuelae* ผู้รับ ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	จำนวนสปอร์เริ่มต้น	จำนวนสปอร์ที่ใช้ในการ คอนจูเกชัน	จำนวนเอกซ์ คอนจูแกนส์
RT	7.10×10^{10}	3.55×10^5	160
35	6.90×10^{10}	3.45×10^5	182
40	6.30×10^{10}	3.15×10^5	219.5
45	5.30×10^{10}	2.65×10^5	119.5
50	4.10×10^{10}	2.05×10^5	260.5
55	1.25×10^{10}	6.25×10^6	107.5

ตาราง แสดงจำนวนเซลล์และจำนวนเอกซ์คอนจูแกนส์ของการคอนจูเกชัน โดยใช้ไมซีเลียมของ *S. venezuelae* ที่อายุต่างกัน

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์เริ่มต้น	จำนวนเซลล์ที่ใช้ในการ คอนจูเกชัน	จำนวนเอกซ์ คอนจูแกนส์
12	2.75×10^{10}	1.37×10^5	83.2
24	7.10×10^{10}	3.55×10^5	220.1
36	2.10×10^{10}	1.00×10^6	58
48	2.90×10^{10}	1.45×10^6	81.2

ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน *aroE* จาก *S. venezuelae* ในพลาสมิด pATT802

(ก) ลำดับเบสขนาด 454 คู่เบส (ข) ลำดับกรดอะมิโนขนาด 151 กรดอะมิโน

(ก)

```
CACACCGACATCCCCGGCATGCTCGCCGTCCTGCGGGAGCGGGCGTCGAGAAGGTGGAGTCGGCGGCGATCCTCGGCGCCGGCGCCACCG
CCTCCTCCGCCGTGGCCGCCCTCGCCGGATCTGCGGGCGGCCCGTCACCGCGTACGTCCGCAGCGAGGCGGGCCGAGGAGATGCGCGG
CTGGGGCGAGCGGCTCGGCGTGGACGTCCGCACCGCCCCCTGGGACGACGCGGCCGAGGCCTTCGCGTCCCCGCTGGTCGTCGCGACCACT
CCCGCCGGCACCACGAACGCCCTGGCCACCGCCGTCCCGGACGCCGTGGGACCCCTTTCGACGTCCTGTACGACCCCTGGCCGACGGCACT
GGCCGCGGCCTGGTCCGAACGCGGCGGCAAGGTGGTCGGCGGCCTCGACCTCCTGGTCCACCAGGCGGTCTCCAGGTCGAGCAGATGA
```

(ข)

```
HTDIPGMLAVLRERGVEKVESAAILGAGATASSAVAALARICGGPVTAYVRSEARAEEMRGWGERLGVDRTPAPWDDAAEFASPLVVATTPA
GTTNALATAVPDAVGTLFDVLYDPWPTALAAWSEGGKVVGGDLVHQAQLQVEQM
```

ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน *aroE* จาก *S. venezuelae* ในพลาสมิด pATT804

(ก) ลำดับเบสขนาด 525 คู่เบส (ข) ลำดับกรดอะมิโนขนาด 174 กรดอะมิโน

(ก)

```
CACACCGACATCCCCGGCATGCTCGCCGTCCTGCGGGAGCGGGCGTCGAGAAGGTGGAGTCGGCGGCGATCCTCGGCGCCGGCGCCACCG
CCTCCTCCGCCGTGGCCGCCCTCGCCGGATCTGCGGGCGGCCCGTCACCGCGTACGTCCGCAGCGAGGCGGGCCGAGGAGATGCGCGG
CTGGGGCGAGCGGCTCGGCGTGGACGTCCGCACCGCCCCCTGGGACGACGCGGCCGAGGCCTTCGCGTCCCCGCTGGTCGTCGCGACCACT
CCCGCCGGCACCACGAACGCCCTGGCCACCGCCGTCCCGGACGCCGTGGGACCCCTTTCGACGTCCTGTACGACCCCTGGCCGACGGCACT
GGCCGCGGCCTGGTCCGAACGCGGCGGCAAGGTGGTCGGCGGCCTCGACCTCCTGGTCCACCAGGCGGTCTCCAGGTCGAGCAGATGACG
GGCGTCCCAAGGCGCCGCTCGCCGCCATGCGCGCCCGGGGGAGCGGGGCGCTCGCCGCCCGCTAGGCGCCCGAAGACCCCGCAGA
AGGCGACCGGACGTCCGACAGCTGGACCGGGGGCCGAGGTAGCCGCCCGGACGTGGGAGGATCGGGGATGGCGGGCCAGGGCCGCGCAC
CGGTGCGCGCCGTGCGAGTACCCAGGCGCGAGCATGAGGAGCATCGTTGAGCAGTTGCGTTGGCTGACCGCTGGGGAATCCACGACCCGCG
CTGGGTGCGACCCCTGGAGGGTCTTCGGGCCGACGTCCCGGTCCACCACAGAGCTGGTGGCGGACTACCTTCGCGCTGCGACGCTTCGCTAT
GGGCCCGGCGCCCCGAA
```

(ข)

```
HTDIPGMLAVLRERGVEKVESAAILGAGATASSAVAALARICGGPVTAYVRSEARAEEMRGWGERLGVDRTPAPWDDAAEFASPLVVATTPA
GTTNALATAVPDAVGTLFDVLYDPWPTALAAWSEGGKVVGGDLVHQAQLQVEQMTGVPKAPLAAMRAAGGAGRSPPR*
```

Intergeneric Conjugative Transfer of pSET152 from *Escherichia coli* to *Streptomyces venezuelae*

Ratchaniwan JeamSeang^{1,2}, Nandin-Erdene Namjilsuren¹, and Arinthip Thamchaipenet^{1*}

¹Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University,

²Department of Genetic Engineering, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Abstract

Streptomyces venezuelae produces the important antibiotic, chloramphenicol, derived from shikimate pathway. We have developed a system for introducing plasmid DNA into *S. venezuelae* via intergeneric conjugal transfer from *E. coli*. Conjugative plasmid pSET152 containing *oriT* and *attP* of ϕ C31 in *E. coli* ET12567 (pUZ8002) was used to establish conjugation condition. Heat treatment of spores of *S. venezuelae* from room temperature up to 45°C for 10 min resulted in high conjugation efficiency. In addition, young mycelium of *S. venezuelae* was efficiently used as an alternative recipient. Integration of pSET152 into *S. venezuelae* chromosome was confirmed by PCR amplification of apramycin resistance gene (*apr*). Southern hybridization showed similar hybridization patterns from exconjugants when 2.05 kb *Hind*III-*Sac*I fragment of pSET152 containing *attP* region was used as a probe indicating that all integrations occurred at a single site on *S. venezuelae* chromosome. All exconjugants showed no phenotypic changes in morphology and chloramphenicol activity. This method will be used to manipulate genes in *S. venezuelae*.

Keywords: Intergeneric conjugation; *Streptomyces venezuelae*; pSET152

1. Introduction

Streptomycetes are filamentous Gram-positive bacteria [1], which are the largest producers of bacterial secondary metabolites including over two-thirds of all antibiotics in the market [2]. Secondary metabolites are synthesized from intermediates or end products of primary metabolism via unique biosynthesis pathway. *Streptomyces venezuelae* produces chloramphenicol that is active against several Gram-negative bacteria, in particularly *Shigella sonnei* and *Rickettsia prowazekii* [3]. The phenyl-propanoid moiety of chloramphenicol has its origin in chorismate, the end product of shikimate pathway [4].

Although applications of recombinant DNA techniques in *Streptomyces* have rapidly increased in the past several years, genetic manipulation in *Streptomyces* has more limits as the bacteria grow slowly and recombinant plasmids are sometimes unstable. Techniques such as transposon mutagenesis are poorly

developed. Recently, conjugal transfer of plasmid from *E. coli* to *Streptomyces* has been increasingly developed for gene disruption/replacement, gene expression and genetic complementation, because the recombinant constructs can be easily made in *E. coli* [5]. Plasmid transfer from *E. coli* to *Streptomyces* depends on several factors including the origin of transfer (*oriT*) of IncP plasmid RK2, the *tra* genes function of RP4 [6] and ϕ C31 integrase derived from actinophage for integration at attachment (*att*) site to enable recombination [7].

We report here the optimal conditions for intergeneric conjugation in transferring plasmid pSET152 from *E. coli* into both spores and mycelium of *S. venezuelae*. This system provides a simple and reliable procedure for transferring plasmid DNA from *E. coli* to *S. venezuelae*.

2. Materials and Methods

The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology
 “TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness”

2.1 Bacterial strains, plasmids and growth conditions

S. venezuelae (kindly provided by M.J. Buttner, John Innes Institute, UK) was used as recipient and manipulated by standard procedures [8]. A methylation-deficient *E. coli* strain ET12567 (*dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdS* Cm^r) containing pUZ8002 was used as a donor for intergeneric conjugations [9]. pUZ8002 (*tra* Cm^r) is a RK2 derivative with a defective *oriT* and a non-self-transmissible plasmid that drives the mobilisation function for *oriT*-containing plasmids [10]. Plasmid pSET152 carrying *oriT*, ϕ C31 *int*, *attP* and apramycin resistance gene (*apr*) [11] was used as conjugative plasmid.

E. coli ET12567 (pUZ8002/pSET152) was grown in LB broth supplemented with apramycin (50 μ g/ml), chloramphenicol (25 μ g/ml) and kanamycin (25 μ g/ml). Mannitol soya agar (MS) [12] was used for preparing spores of *S. venezuelae*, tryptic soya broth (TSB) for growing *S. venezuelae* mycelia, Oxoid tryptic soya agar (TSA) containing 10mM MgCl₂ as conjugative media, and TSA supplemented with apramycin for growing and maintaining exconjugants.

2.2 DNA manipulation

Standard procedures for DNA manipulation were followed [13] for *E. coli* and [8] for *Streptomyces*.

2.3 Intergeneric conjugation

S. venezuelae spores (10^3 - 10^4) were suspended in 500 μ l of 2 $\times$ yeast extract tryptone (YT) medium and treated from room temperature to 55°C for 10 min. Donor *E. coli* strain ET12567 (pUZ8002/pSET152), was grown in LB until OD₆₀₀ reached 0.4-0.6 in the presence of antibiotics as described above. *E. coli* cells were sedimented and washed twice with LB to remove the remaining antibiotics, then resuspended in a final volume of 500 μ l of LB (10^8 cells). *E. coli* cells and *S. venezuelae* spore suspension were mixed and spread on Oxoid TSA media containing 10 mM MgCl₂ and incubated at 30°C for 12-14 h. The plates were flooded with 1 ml of water containing nalidixic acid (500 μ g/ml) and apramycin (50 μ g/ml) and incubated for further 5-7 days. Exconjugants were counted and calculated for efficiency from the number of exconjugants/recipients. For conjugation with mycelium, *S. venezuelae* spores were inoculated in TSB at 250 rpm at 30°C for

24 h. An equal volume of *S. venezuelae* mycelium (10^4 cfu) was mixed with *E. coli* donor cells and conjugation was performed in the same way as described above.

2.4 Analysis of exconjugants

Total chromosomal DNA of exconjugants was subjected to PCR using specific primers within *acc(3)IV* (*apr*) gene: AprC-1 (5'- GAC GTC GCG GTG AGT TCA GGC-3') and AprN-2 (5'-CCC CGG CGG TGT GCT G-3') under conditions previously described [14]. Exconjugants were further analysed by Southern hybridisation. Exconjugant chromosomal DNA was digested with *SacI* and transferred to HybondN+ membrane (Amersham, UK) using standard protocol [13]. Membrane was hybridised at 68°C with labelled 2.05 kb *attP* region of pSET152 as a probe using Gene Images Random Prime Labeling Module and detection kits as described by the manufacturer (Amersham, UK). Exconjugants were also analysed for chloramphenicol production by using agar plug assay [15].

3. Results and Discussion

3.1 Effect of heat treatment of *S. venezuelae* spores on intergeneric conjugation

Spore pre-germination by heat treatment before being mixed with *E. coli* donor cells is necessary for efficient conjugation [8]. For *S. coelicolor* A3(2), heat treatment of spores at 50°C for 10 min is recommended [8]. After 10 min incubation time, heat-treated spores of *S. venezuelae* gave the same conjugation efficiency (10^{-4}) from room temperature up to 45°C (Table 1). However, treated spore of *S. venezuelae* at 40°C was selected as the best condition to achieve highest conjugation efficiency. Higher temperature may reduce viability of spore and, thus, lower the yield of exconjugants. It has been reported that treating *S. lavendulae* FRI-5 spores at 50°C resulted in loss of spore viability as well as conjugation efficiency of [16].

The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology
 “TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness”

Table 1 Effect of temperature on *S. venezuelae* spores as recipients for conjugal transfer of pSET152 from *E. coli* ET12567 (pUZ8002)

Temperature (°C)	Exconjugants per recipient ¹
RT	2.7×10^{-4}
35	4.1×10^{-4}
40	4.4×10^{-4}
45	1.1×10^{-4}
50	4.1×10^{-5}
55	2.7×10^{-5}

¹The value represents average efficiency from three independent experiments. RT = room temperature.

3.2 Efficiency of *S. venezuelae* mycelium as recipient in intergeneric conjugation

Young mycelium of *S. venezuelae* was used as an alternative recipient for intergeneric conjugation. Young 24-h *S. venezuelae* mycelium was mated with log-phase *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSET152). *S. venezuelae* spore suspension was heat-treated at 40°C for 10 min before mating with *E. coli* donor. Both mycelium and spore of *S. venezuelae* gave equivalent conjugation efficiency (10^{-4} ; Table 2). However, it may be argued that a fragmented mycelium may contain more than a single cell and thus is not comparable to a single spore. Nevertheless from these result indicated that either spores or mycelium of *S. venezuelae* can be employed as recipient to generate relatively high frequency of intergeneric conjugation.

Table 2 Effect of recipient types of *S. venezuelae* on conjugal transfer of pSET152 from *E. coli* ET12567 (pUZ8002)

Recipient type	Number of recipients	Exconjugants per recipient
Mycelium	10^4	1.0×10^{-4}
Spore ¹	10^4	1.1×10^{-4}

¹Recipient spores were heat-treated at 40°C for 10 min before mating step.

3.3 Effect of plasmid integration on phenotype

The presence of plasmid integrating into streptomycete chromosome can result in reduction of antibiotic productivity and/or reduction of growth [17]. However, randomly selected *S. venezuelae* exconjugants showed similar growth rates to the wild-type strain (data not shown). Furthermore, no morphological changes were observed and exconjugants were able to produce equivalent levels of chloramphenicol as the wild-type (data not shown).

3.4 Analysis of exconjugants by PCR and Southern hybridisation

Total chromosomal DNA of three independent *S. venezuelae* exconjugants were analysed by amplification of *apr* gene using the specific primers APRC-1 and APRN-2 [14]. The expected 0.9-kb PCR product was obtained from all 3 exconjugants (Figure 1).

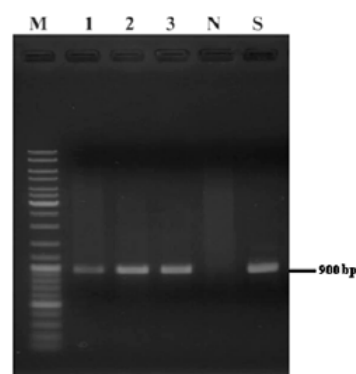


Figure 1 PCR detection of apramycin resistance gene (*apr*). Lane M, 1 kb DNA ladder; lanes 1-3, *S. venezuelae* exconjugants; lane N, *S. venezuelae*, lane S, pSET152.

Chromosomal DNA of the exconjugants was digested with *SacI* and subjected to Southern blotting analysis using 2.05 kb containing *attP* region of pSET152 as a probe at 68°C (Figure 2). Similar hybridisation patterns of 2.5 kb and 4.0 kb fragments were obtained from all 3 exconjugants (Figure 2c) indicating that pSET152 was integrated into *S. venezuelae* chromosome by a site specific recombination between *attP* site of plasmid and *attB* site of chromosome (see Figure 2a). Furthermore, this integration occurred at a single attachment site of the chromosome of *S. venezuelae*.

The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology
 “TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness”

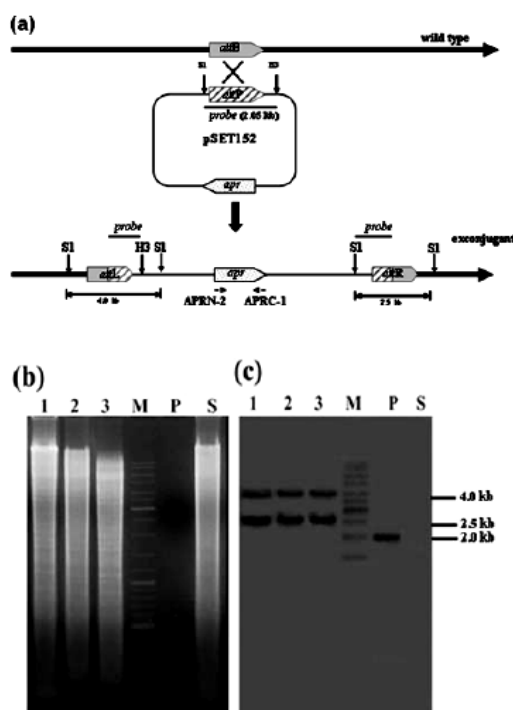


Figure 2 Integration of pSET152 into chromosome of *S. venezuelae*. (a) Schematic representation of pSET152 integration by site specific recombination into the *attB* of *S. venezuelae* (H3, *Hind*III; S1, *Sac*I). (b) DNA digested with *Sac*I separated on 0.8% agarose gel. (c) Southern hybridisation of *Sac*I-digested DNA using 2.05 kb *attP* region of pSET 152 as a probe. Lane M, 1 kb DNA ladder; lanes 1-3, exconjugants/*Sac*I; lane P, pSET152/*Sac*I; lane S, *S. venezuelae*/*Sac*I.

In summary, we have established an optimal condition for intergeneric conjugation of plasmid DNA between *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSET152) and *S. venezuelae* and confirmed that the integration of pSET152 has no effect on phenotype. This method will be used to manipulate genes in *S. venezuelae*.

4. Acknowledgements

We thank Mark Buttner, John Innes Institute, UK for providing plasmids and bacterial strains. R.J. and N.E.M. received scholarship from BIOTEC, NSTDA and UNESCO, respectively. This work was supported by a research grant from BIOTEC, NSTDA.

References

- [1] Williams, S.T., Goodfellow M. and Alderson G. 1989. Genus *Streptomyces*, pp. 2452-2492. In S.T. Williams, ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore.
- [2] Sanglier, J.J., Haag, H., Huck, T.A., and Fehr, T. 1993. Novel bioactive compounds from actinomycetes. A short review. Res. Microbiol. 144: 633-642.
- [3] Ehrlich, J., Bartz Q.R., Smith R.M., Joslyn D.A. and Burkholder P.R. 1947. Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. Science. 106: 417.
- [4] He, J., Magarvey N., Pirae M. and Vining L.C. 2001. The gene cluster for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 includes novel shikimate pathway homologues and a monomolecular nonribosomal peptide synthetase gene. Microbiology. 147: 2817-2829.
- [5] Mazodier, P., Petter, R. and Thompson, C. 1989. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. J. Bacteriol. 171: 3583-3585.
- [6] Donald, G. and Emanuel, Y. 1983. Location and nucleotide sequence of the transfer origin of the broad host range plasmid RK2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 3595-3598.
- [7] Calos, M.P. 2006. The ϕ C31 integrase system for gene therapy. Curr. Gene Ther. 6: 633-645.
- [8] Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. and Hopwood, D.A. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich, UK: The John Innes Foundation.
- [9] McNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H. and MacNeil, T. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. Gene 111: 61-68.
- [10] Paget, M.S.B., Chanberlin, L., Atrih, A., Foster, S.J. and Buttner, M.J. 1999. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor σ^E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Bacteriol. 181, 204-211.

The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology
 “TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness”

- [11] Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Rao, R.N. and Schonert, B.E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116: 43-49.
- [12] Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, D.C.J., Cullum, J.A. and Oliver, S.G. 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 272-277
- [13] Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- [14] Choi, S.-U., Lee, C.-K., Hwang, Y.-I., Kinoshita, H. and Nihira, T. 2004. Cloning and functional analysis by gene disruption of a gene encoding a γ -butyrolactone autoregulator receptor from *Kitasatospora setae*. *J. Bacteriol.* 186: 3423-3430.
- [15] Jeffry, J.F. 1994. Isolation of Microorganisms Producing Antibiotic, pp. 379-405. In R.W. Weaver, J.S. Angel and T.S. Botlomley, eds. *Methods of Soil Analysis, Part2. Microbiological and Biochemical Property*. ASM Press, Washington D.C.
- [16] Kitani, S.K., Bibb, M.J., Nihira, T. and Yamada, Y. 2000. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 535-538.
- [17] Voeykova, T., Emelyanova L., Tabakov V., and Mkrtumyan N. 1998. Transfer of plasmid pT01 from *Escherichia coli* to various representatives of the order Actinomycetales by intergeneric conjugation. *FEMS Microbiol. Lett.* 162: 47-52.

ประวัติการศึกษา

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวรัชนิวรรณ แจ่มแสง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	6 ธันวาคม 2526
สถานที่เกิด	นนทบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ.ชีววิทยาประยุกต์ (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยราชภัฏ สวนสุนันทา
ผลงานทางวิชาการ	JeamSeang R., N-E Namjilsuren and A.Thamchaipenet. 2007. Intergeneric Conjugative Transfer of pSET152 from <i>Escherichia coli</i> to <i>Streptomyces venezuelae</i> . In Proceedings of the 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology.
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (พ.ศ. 2550-2551)