

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 และเมื่อสกัดสารคลอแรมฟิโนคอลจากสายพันธุ์กลายแล้วตรวจด้วย HPLC พบสายพันธุ์กลายสร้างคลอแรมฟิโนคอลในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับไวต์ไทป์ การเกิดยีนดิสรับชันในสายพันธุ์กลายพิสูจน์ด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยการกลายที่ยีน *aroE* นี้มีผลกระทบต่อวิถี shikimate และการผลิตคลอแรมฟิโนคอลของ *S. venezuelae*