

**ANALYSIS OF THE ESSENCE OF *ORF76* GENE IN  
*SYNECHOCOCCUS PCC7942***

**SIAM POPLUECHAI**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2004**

**ISBN 974-04-4478-4  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การวิเคราะห์ความสำคัญของยีน *ORF76* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC7942  
(ANALYSIS OF THE ESSENCE OF *ORF76* GENE IN *SYNECHOCOCCUS* PCC7942)

สยาม ภพลือชัย 4436429 MBMG/M

วท.ม. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิชา จีงจตุพรชัย, Ph.D., อภินันท์ อุดมกิจ, Ph.D., กุศล ภูธนกิจ, Ph.D.,

บทคัดย่อ

ยีน *ORF76* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC7942 สามารถแปรรหัสเป็นกรดอะมิโน 76 ตัว ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ ยีน *ORF76* ตั้งอยู่ downstream ของ heat shock protein gene (*htpG*) และอยู่ในทิศทางเดียวกัน โปรโมเตอร์ของยีน *ORF76* (ซึ่งตั้งชื่อว่า E10) ตอบสนองต่อความเข้มแสง

ในการศึกษานี้ เพื่อตรวจสอบหน้าที่ของยีน *ORF76* จึงได้สร้าง *Synechococcus* สายพันธุ์ที่มียีน inactivated *ORF76* ด้วยการสอดแทรก spectinomycin-resistant gene cassette โดยวิธี homologous recombination ผลการทดลองโดยวิธี PCR และ Southern blot พบว่าสายพันธุ์ที่ได้ มียีน inactivated *ORF76* อยู่ในทุกชุดของโครโมโซม ซึ่งบ่งชี้ว่ายีน *ORF76* ไม่มีความจำเป็นต่อการอยู่รอดของเซลล์ในสภาวะปกติ เนื่องจากยีน *ORF76* ตั้งอยู่ downstream ของยีน *htpG* จึงได้ตรวจสอบว่าอุณหภูมิสูงมีผลต่อการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ inactivated *ORF76* อย่างไรหรือไม่ ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 42°C การเจริญเติบโตและลักษณะของเซลล์ของสายพันธุ์ wild type และ inactivated *ORF76* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นยีน *ORF76* จึงไม่มีความจำเป็นต่อการอยู่รอดของเซลล์ในสภาวะอุณหภูมิสูง

เพื่อเตรียม recombinant *ORF76* protein สำหรับผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจสอบโปรตีน *ORF76* ใน *Synechococcus* จึงได้โคลนยีน *ORF76* เข้าพลาสมิด pTYB2 และ pTYB12 ผลที่ได้คือ pB2C76 และ pB12N76 ซึ่งมียีน *intein* ที่ fused in frame กับปลายด้าน 3' และ 5' ของยีน *ORF76* ตามลำดับ *E. coli* ที่มี pB2C76 ไม่สร้าง *ORF76* fusion protein ส่วน *E. coli* ที่มี pB12N76 สร้าง CBD (Chitin Binding Domain)-*Intein-ORF76* fusion protein ที่เป็น inclusion เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นจึงนำ soluble protein ส่วนที่เหลือไปแยกโปรตีน *ORF76* บริสุทธิ์โดยใช้ CBD และ *Intein* โดยวิธีดังกล่าวได้โปรตีน *ORF76* บริสุทธิ์ประมาณ 180 µg/l ซึ่งไม่เพียงพอที่จะนำไปใช้ผลิตแอนติบอดีในหนู

ANALYSIS OF THE ESSENCE OF *ORF76* GENE IN *SYNECHOCOCCUS*  
PCC7942

SIAM POPLUECHAI 4436429 MBMG/M

M.Sc.(MOLECULAR GENETICS AND GENETICS ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: WIPA CHUNGJATUPORNCHAI, Ph.D., APINUNT  
UDOMKIT, Ph.D., KUSOL POOTANAKIT, Ph.D.

ABSTRACT

A *Synechococcus* PCC7942 gene, encoding 76 amino acids of an unknown protein (designated ORF76) is located at the same orientation and downstream from the heat shock protein gene (*htpG*). The ORF76 promoter (previously isolated and designated E10) responds to light intensity.

In this study, in order to investigate the function of the *ORF76* gene, the *ORF76*-inactivated strains were constructed and segregated. The *ORF76* gene was inactivated by insertion of spectinomycin-resistant gene cassette via homologous recombination. PCR and Southern blotting analysis revealed that all copies of *ORF76* gene on *Synechococcus* chromosomes were inactivated. The results indicate that *ORF76* gene is not essential for cell viability in optimal growth condition. Since the *ORF76* gene is located downstream of the *htpG* gene, the *ORF76*-inactivated strains grown under high temperature were investigated. Results revealed that cell growth and morphology of *ORF76*-inactivated strains grown under 42°C were not significantly different from those of wild type strain. Thus, *ORF76* gene is not essential for cell viability under high temperature.

In order to obtain recombinant ORF76 protein to raise antibody for detection of ORF76 protein in *Synechococcus*, the *ORF76* gene was cloned into the *E. coli* expression vectors pTYB2 and pTYB12. The resulting plasmids pB2C76 and pB12N76 harbor the *intein* gene fused in frame with 3' end and 5' end of *ORF76* gene, respectively. No ORF76 fusion protein was detected in *E. coli* harboring pB2C76. However, *E. coli* harboring pB12N76 produced a high amount of CBD (Chitin Binding Domain)-Intein-ORF76 fusion protein inclusions. Thus, the remaining small amount of soluble CBD-Intein-ORF76 fusion protein was used for CBD and Intein-mediated protein purification system. The yield of purified ORF76 protein is about 180 µg/l, which is not enough to raise antibody in mice.

KEY WORDS: CYANOBACTERIA/ *SYNECHOCOCCUS* PCC7942/ *ORF76* GENE/  
GENE INACTIVATION/ *htpG* GENE

82 pp. ISBN 974-04-4478-4