MANIPULATION OF *ESCHERICHIA COLI* GENOME TO GENERATE A MULTI-FUNCTIONAL STRAIN FOR DNA CLONING AND PROTEIN EXPRESSION

MANADSAREE KLOMTUN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2018

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

MANIPULATION OF ESCHERICHIA COLI GENOME TO GENERATE A MULTI-FUNCTIONAL STRAIN FOR DNA CLONING AND PROTEIN EXPRESSION

MANADSAREE KLOMTUN 5636191 SCBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: JAMORM SOMANA, M.D., Ph.D.,
KITTISAK YOKTHONGWATTANA, Ph.D., VARODOM CHAROENSAWAN, Ph.D.

ABSTRACT

Genome modifications of several *E. coli* strains have been done for many specific purposes, such as for DNA cloning and gene expression. Recently, multifunctional strains were constructed in which blue/white screening to select cloned gene, simultaneously with tight regulation for protein expression can be performed. Unfortunately, the $lacI^q$ promoter carried by those strains is not sufficient to minimize leaky transcription when using pUC-based plasmids. To overcome this problem, we constructed a new multifunctional *E. coli* strain which contains all of the essential properties for DNA cloning and protein expression, but in which the leaky transcription is completely controlled. The ability to perform *in vivo* homologous cloning was conserved from the parental strain, the $lacI^{q1}\Delta ZM15$ genotype was modified and a T7 RNA polymerase was added. In this study, the genome of the K-12 strain DH10B was modified using the λ red recombination system in which the selectable and counter-selectable markers were incorporated. After successful modification, the new strain DH10B3054 exhibited tight control of gene transcription under a *lac* promoter in pUC-based plasmids as demonstrated by its superior resistance to a lethal gene, *ndd*. The α-complementation could be achieved by deletion of the residue 2-42 in the *lacZ* gene. However, the new strain showed lower complementation of β-galactosidase. Unfortunately, the T7-based system was unable to control gene expression, leading to severe leaky expression of the *egfp* gene, although such expression could still be controlled by glucose. Furthermore, in contrast to the parental DH10B strain the new strain was unable to perform *in vivo* cloning, in spite of no significant changes being detected in other parts of its genome. These unexpected results might be considered in the future for reconstruction of the gene cassettes to further improve bacterial cell properties for specific purposes.

KEY WORDS: GENOME EDITING / λ RED RECOMBINATION/ $LACI^{Q1}$/
PROTEIN EXPRESSION / *ESCHERICHIA COLI*

Copyright by Mahidol University

114 pages

การดัดแปลงจีโนมของอีโคไลเพื่อสร้างพันธุ์เอนกประสงค์สำหรับการโคลนดีเอ็นเอและการผลิตโปรตีน
MANIPULATION OF ESCHERICHIA COLI GENOME TO GENERATE A MULTI-FUNCTIONAL STRAIN FOR DNA CLONING AND PROTEIN EXPRESSION

มนัสรี กล่อมตุ้น 5636191 SCBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: จามร สมณะ, MD., Ph.D., กิตติศักดิ์ หยกทองวัฒนา, Ph.D., วโรดม เจริญสวรรค์, Ph.D.

บทคัดย่อ

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย *E. coli* โดยส่วนใหญ่ในปัจจุบันเกิดจากการดัดแปลงจีโนมเพื่อประโยชน์ในการโคลนดีเอ็นเอและผลิตโปรตีน ซึ่ง *E. coli* เหล่านี้มีคุณสมบัติในการคัดเลือกโคลนดีเอ็นเอโดยวิธีคัดเลือกโคโลนีน้ำเงินหรือขาว (blue/white screening) และป้องกันการแสดงออกของยีนก่อนเวลาที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ของ *E. coli* ที่มีในปัจจุบันยังมีคุณสมบัติไม่เพียงพอต่อการควบคุมแสดงออกยีนจากพลาสมิดที่มีหลายโมเลกุลต่อเซลล์ (pUC-based plasmid) เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติดังกล่าว ผู้วิจัยจึงคิดสร้าง *E. coli* สายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติเป็นพันธุ์อเนกประสงค์เพิ่มเติมจากที่กล่าวมาข้างต้น กล่าวคือสามารถผลิตโปรตีนโดยใช้ T7 RNA polymerase รวมถึงควบคุมการแสดงออกของยีนจาก pUC-based plasmid และเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเข้ากับดีเอ็นเอพาหะได้ในเซลล์ (*in vivo* cloning) หลังจากทำการดัดแปลงโครโมโซมเสร็จสิ้นโดยใช้ระบบของไวรัส λ ทำให้ *E. coli* สายพันธุ์ใหม่ (DH10B3054) ที่ได้สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนได้เป็นอย่างดีใน pUC-based plasmid แต่ยีนนั้นต้องแสดงออกผ่าน *lac* promoter ไม่ใช่ T7 promoter แบคทีเรียยังคงความสามารถในการคัดเลือกโคลนดีเอ็นเอโดย blue/white screening ได้ แต่การแสดงออกของยีนที่ให้เอนไซม์ β-galactosidase ต่ำลง นอกจากนี้ความต่างทางด้านส่วนประกอบของจีโนมทำให้ปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้ในสายพันธุ์ใหม่โดยใช้ T7 RNA polymerase น้อยกว่าใน BL21(DE3) อย่างไรก็ตาม DH10B3054 สูญเสียความสามารถในการทำ *in vivo* cloning โดยที่ไม่พบความเปลี่ยนแปลงที่สำคัญในส่วนอื่นของจีโนม จึงยังไม่มีเหตุผลอธิบายแน่ชัดว่าเป็นเพราะสาเหตุใดและจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคตหรือปรับปรุงชุดยีนใหม่เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้ดียิ่งขึ้น

Copyright by Mahidol University

114 หน้า