LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

23 MAR 1990

INCREASED EXPRESSION OF A CLONED PENICILLIN ACYLASE GENE IN ESCHERICHIA COLI BY USING A STRONG PROMOTER

METINEE UDOMBUNDITKUL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1989

Copyright by Mahidol University

13904

วิทยานิพนธ์: การใช้ strong promoter เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมการ แสดงออกของ cloned penicillin acylase gene ใน *Escherichia coli*

ผู้วิจัย: เมทินี อุดมบัณฑิตกุล

ปริญญา: วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์:

วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D.

ช่อฟ้า ทองไทย, Ph.D.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, Dr. Eng.

ประมาณ เทพชัยศรี, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา: 8 พฤษภาคม พ.ศ. 2532

บทคัดย่อ

โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมการแสดงออกของยีนเพนนิซิลลินเอซิเลส จากเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*)ได้ ในการเพิ่มประสิทธิภาพนี้กระทำได้โดยใช้ pTTQ18 เป็นดีเอ็นเอพาหะ พาหะนี้มีองค์ประกอบสำคัญคือมี strong promoter ได้แก่ ptac ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ $lacI^q$ regulatory gene และสามารถถูกกระตุ้นเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนโดยใช้สารชักนำ เช่น สาร isopropyl β-D thiogalactoside (IPTG) ในการทดลองได้ตัดต่อยีนเพนนิซิลลินเอซิเลสให้อยู่ภายใต้การควบคุมของ ptac และ $lacI^q$ ซึ่งในขั้นต้นได้ตัดแปลงดีเอ็นเอพาหะ pTTQ18 โดยนำยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยา คลอแรมเพนิคอลใส่เข้าไปแทนที่ยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยาแอมพิซิลลิน ได้เป็นดีเอ็นเอพาหะใหม่ชื่อ pQCAT1 ซึ่งจะมียีนดื้อยาคลอแรมเฟนิคอล มี ptac และ $lacI^q$ ทำการตัดดีเอ็นเอพาหะ pQCAT1 และตัดเอาเฉพาะชิ้นของยีนเพนนิซิลลินเอซิเลส ซึ่งอยู่บนพลาสมิด pMLV7 ด้วยเอ็นไซม์ HindIII แล้วนำมาเชื่อมต่อกันโดยให้ยีนของเอ็นไซม์เพนนิซิลลินเอซิเลสอยู่ถัดต่อจาก ptac promoter นำพลาสมิดที่สร้างขึ้นใหม่เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเอสเชอริเชีย โคไล สายพันธุ์ DH5-α

Copyright by Mahidol University

ได้ transformant ที่สามารถผลิตเอ็นไซม์เพนนิซิลลินเอซิเลสได้สูงขึ้น ให้ชื่อดีเอ็นเอสายผสมที่สร้างขึ้นใหม่นี้ว่า pQEA11 pQEA11 มีขนาดประมาณ 8.56 กิโลเบส และมีคุณสมบัติตามที่ต้องการคือมียีนเพนนิซิลลินเอซิเลสอยู่ภายใต้การควบคุมของ ptac promoter และ $lacI^q$ นอกจากนี้ยังพบว่ามีส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนเพนนิซิลลินเอซิเลสอยู่ด้วย

จากการศึกษาการผลิตเอ็นไซม์ใน shaking flask cultures ปรากฏว่าช่วงการเจริญของเชื้อที่เหมาะสมในการเติมสารชักนำ IPTG คือช่วง early exponential phase และเซลล์จะสร้างเอ็นไซม์สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 1-2 ชั่วโมง ที่ 28-30 องศาเซลเซียส หลังจากเติมสารชักนำ เอ็นไซม์ที่เซลล์ผลิตมีปริมาณมากกว่าเอ็นไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ สายพันธุ์ 194-3 20 เท่า และมากกว่าสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pMLV7 4 เท่า นอกจากนี้ ยังพบว่าการสร้างเอ็นไซม์เพนนิซิลลินเอซิเลสของสายพันธุ์ใหม่นี้ ยังถูกกดดันด้วยกลูโคส (2%) ในอาหาร แต่การกดดันด้วยกลูโคสนี้จะไม่สมบูรณ์เมื่อเติมสารชักนำ IPTG ลงไป

จากการหาความคงตัวและจำนวนชุดของพลาสมิด pQEA11 พบว่าพลาสมิด pQEA11 ซึ่งมีขนาดใหญ่ประมาณ 8.56 กิโลเบส มีจำนวนชุดของพลาสมิดประมาณ 42 ชุดต่อหนึ่งเซลล์ จากการที่มีขนาดใหญ่และจำนวนชุดมากอาจทำให้มีผลไปลดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ตลอดจนทำให้พลาสมิดสูญเสียความคงตัวได้เร็ว คือในเวลาเพียง 3 วัน เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ใส่ยาคลอแรมเฟนิคอล

Copyright by Mahidol University

Thesis Title : INCREASED EXPRESSION OF A CLONED PENICILLIN ACYLASE GENE IN ESCHERICHIA COLI BY USING A STRONG PROMOTER

Name : Metinee Udombunditkul

Degree : Master Degree of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee :

Vithaya Meevootisom Ph.D.

Chaufah Thongthai Ph.D.

Watanalai Panbangred Dr.Eng.

Pramuan Tapchaisri Ph.D.

Date of Graduation : 8 May B.E. 2532 (1989)

ABSTRACT

Efficiency of gene expression of the cloned penicillin acylase (PA) gene in Escherichia coli was increased by using an expression vector, pTTQ18 (ampicillin resistance). The vector comprises of a strong promoter, ptac, which is regulated by $lacI^q$ regulatory gene product and induced by an inducer, isopropyl β-D thiogalactoside (IPTG). To construct the plasmid in which expression of the PA gene was controlled by ptac and $lacI^q$, the vector pTTQ18 was first modified by inactivating the ampicillin resistance gene using the insertion inactivation method. The resulting vector, pQCAT1 was composed of a chloramphenicol resistance gene marker, ptac strong promoter and $lacI^q$ regulatory gene. The DNA fragment encoding PA gene from the plasmid pMLV7 and the vector pQCAT1 were digested with restriction enzyme HindIII and ligated in such a way that the PA gene was placed downstream from

Copyright by Mahidol University

the ptac promoter. The ligated mixture was transformed to host cell E. coli strain DH5-α and a transformant which produced high enzyme activity was selected. The new recombinant plasmid was about 8.56 Kb in size and was designated as pQEA11. It had the PA gene under the control of ptac promoter and $lacI^q$ regulatory gene. In addition, it also contained the self promoter of the PA gene.

Study on PA production in shaking flask cultures showed that suitable time for addition of the inducer IPTG was during early exponential phase. The maximum enzyme activity was obtained when the culture was incubated at 28°C-30°C for around 1-2 hours after addition of 1mM IPTG. The enzyme produced from E. coli harboring pQEA11 was about 20 times higher than that of the parent strain, E. coli 194-3, and 4 times higher than that of the originally cloned E. coli strain harboring pMLV7. The enzyme was produced in small amount in the absence of inducer. The production of enzyme was partially repressed (50%) when 2% glucose was present in the medium under the induction condition.

Study on plasmid copy number and stability of plasmid pQEA11 in E. coli DH5-α indicated that it was present in high copy number (42 copies per cell) and because of its large size (8.56 Kb), this might cause reduction in growth rate and instability of the plasmid. The instability of the plasmid was shown by the lost of pQEA11 within 3 days when cells were grown in medium without chloramphenicol.

Copyright by Mahidol University