สำนักหอสมุด
21 DEC 1992

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION IN *E. COLI* OF THE DNA POLYMERASE GENE FROM THERMOSTABLE *THERMUS AQUATICUS*

PLEARNPIS LUXANANIL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILIMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

อภินันทนาการ
จาก

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1992

Copyright by Mahidol University

20968

ชื่อวิทยานิพนธ์	การตัดต่อและขยายยีน ดีเอนเอโพลีเมอเรส ซึ่งทนต่ออุณหภูมิสูงจากเชื้อ *Thermus aquaticus* เข้าสู่เชื้อ *E. coli* และควบคุมการแสดงออกของยีน
ผู้วิจัย	เพลินพิศ ลักษณะนิล
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

วิภา จึงจตุพรชัย, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 22 ตุลาคม พ.ศ. 2535

บทคัดย่อ

เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสซึ่งสกัดจากเชื้อ *Thermus aquaticus* สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง มีบทบาทอย่างสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์อย่างสูงทั้งทางด้านการศึกษาวิจัยและทางการแพทย์ในปัจจุบัน แต่เนื่องจากวิธีการนี้ต้องเสียค่าใช้จ่ายอย่างมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งต้องสูญเสียไปกับเอ็นไซม์ที่ยังคงมีราคาแพงในปัจจุบัน ดังนั้นเพื่อสามารถลดค่าใช้จ่ายในส่วนนี้จึงจำเป็นต้องหาวิธีการที่จะสามารถผลิตเอ็นไซม์ได้อย่างสะดวกรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงต่อการผลิตในปริมาณมากเพียงพอแก่การใช้ประจำในงานวิจัยของห้องปฏิบัติการ โดยในการศึกษานี้ได้เลือกวิธีการตัดต่อและขยายยีนดีเอ็นเอโพลีเมอเรส จากเชื้อ *Thermus aquaticus* เข้าสู่เชื้อ *E. coli* และควบคุมการแสดงออกของยีน รวมทั้งการแยกเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์พร้อมทั้งศึกษาคุณสมบัติในส่วนที่เกี่ยวข้องต่อการใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

งานวิจัยนี้เริ่มจากการสกัดแยกดีเอ็นเอทั้งหมดของเชื้อ *Thermus aquaticus* ATCC 25104 และนำมาทำการขยายยีนดีเอ็นเอโพลีเมอเรสซึ่งมีขนาด 2.5 กิโลเบส โดยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองจากการเข้าจับของเบสคู่สมในส่วนหัวและท้ายของยีนดีเอ็นเอโพลีเมอเรสของสายดีเอ็นเอเส้นสั้นซึ่งสร้างขึ้น ยีนดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นนี้ถูกนำเชื่อมต่อกับดีเอนเอพาหะ Bluescribe plus และนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21(DE3) พบ 6 โคโลนีของดีเอ็นเอลูกผสม (BS-Taq 3, 5, 8, 13, 20 และ 57) จากโคโลนีที่ถูกคัดเลือก 60 โคโลนี โดยโคโลนีลูกผสม BS-Taq 57 ให้เอ็นไซม์แอคติวิตี้

Copyright by Mahidol University

เพียง 1980 ยูนิตต่อปริมาณเซลล์ 1 ลิตร ดังนั้นจึงต้องปรับปรุงคุณภาพในการแสดงออกของยีนโดยการเชื่อมต่อยีนดีเอ็นเอโพลีเมอเรสเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pMEX8 และนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* JM 107 พบ 5 โคโลนีของดีเอนเอลูกผสม (MEX-Taq 3, 18, 25, 30 และ 48) จาก 63 โคโลนีที่ถูกคัดเลือก โคโลนีลูกผสม MEX-Taq 30 สามารถให้ปริมาณของเอ็นไซม์ได้สูงถึง 16960 ยูนิตต่อปริมาณเซลล์ 1 ลิตร และสามารถสังเกตเห็นโปรตีนของดีเอ็นเอโพลีเมอเรสซึ่งมีขนาด 94 กิโลดาลตันจากแผ่นเจลโปรตีน และจากการหาสัดส่วนของปริมาณเอ็นไซม์ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ พบว่าเป็นสัดส่วน 3.4%

การแยกเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์สามารถทำได้อย่างรวดเร็วภายใน 1วัน ด้วยวิธีการ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรก เป็นการแยกเอ็นไซม์ออกจากโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านโดยใช้ความร้อน (75°C, 20นาที) และปั่นแยก โดยวิธีนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์อื่นในเซลล์เจ้าบ้านด้วย ขั้นที่สอง เป็นการแยกเอ็นไซม์ออกจากดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านโดยใช้วิธีโครโมโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-sephacel ซึ่งเอ็นไซม์จะถูกแยกออกจากคอลัมน์โดยการใช้สารละลาย TMK ที่มีความเข้มข้นของเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ 450 มิลลิโมลาร์เป็นตัวพาเอ็นไซม์ หลังจากผ่านขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์แล้วได้รับเอ็นไซม์ในปริมาณ 16700 ยูนิตต่อเซลล์ 1 ลิตร

จากการศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองพบว่าสภาพที่เหมาะต่อการทำงานของเอ็นไซม์คือช่วงอุณหภูมิ 70-75°C สภาพความเป็นกรดด่าง 8.5-9 ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมหรือโปแตสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ แต่การทำงานของเอ็นไซม์จะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของเกลือเป็น 160 มิลลิโมลาร์ การทำงานของเอ็นไซม์ต้องการแมกนีเซียมอิออนช่วยในการทำงานโดยมีความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 2 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่แมงกานีสอิออนจะยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์หรือสามารถกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ได้น้อยมากที่ปริมาณอิออนเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่าเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสนี้ปราศจากคุณสมบัติของเอ็นไซม์ Exonuclease และ Endonuclease ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลมากกว่า 10% การทำงานของเอ็นไซม์จะมีประสิทธิภาพน้อยลง เอ็นไซม์ที่ผลิตขึ้นนี้สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้ 1 สัปดาห์ จึงจะสูญเสียประสิทธิภาพการทำงานลงครึ่งหนึ่ง

Copyright by Mahidol University

Thesis title	Molecular Cloning and Expression in *E. coli* of the DNA Polymerase Gene from Thermostable *Thermus aquaticus*
Name	Plearnpis Luxananil
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisory Committee	Sakol Panyim, Ph.D. Wipa Chungjatupornchai, Ph.D.
Date of Graduation	22 October B.E. 2535 (1992)

ABSTRACT

The thermostable DNA polymerase of *Thermus aquaticus* (Taq Pol I) greatly simplifies the PCR procedure by enabling the amplification reaction to be performed at higher temperatures. This thesis aims to clone *Taq Pol I* gene in *E. coli* and to partially purified the enzyme product suitable for the PCR reaction.

The total DNA of *Thermus aquaticus* ATCC 25104 was isolated. The *Taq Pol I* gene were amplified from the total DNA using the primer pairs. The 2.5 kb *Taq Pol I* gene was cloned into *E. coli* BL21 (DE3) with bluescribe plus (BS+) plasmid. 6 out of 60 transformants were characterized as the recombinant clones harbouring the *Taq Pol I* gene and designated as BS-Taq 3, 5, 8, 13, 20 and 57. The Taq Pol I product of BS-Taq 57 had the enzyme activity of 1980 U/L of cell cultures. In order to improve the gene expression, the *Taq Pol I* gene was subcloned into pMEX8 plasmid and transformed into *E. coli* JM

Copyright by Mahidol University

107. 5 out of 63 transformants were characterized as recombinant clones which were designated as MEX-Taq 3, 18, 25, 30 and 48. The Taq Pol I product of clone MEX-Taq 30 provided the highest enzyme activity which was 16960 U/L of cell cultures. Analysis of the total intracellular proteins of *E. coli* (MEX-Taq 30) in SDS-PAGE showed an intense protein band of 94 kDa. This 94 kDa Taq Pol I protein represents about 3.4% of the total solubilized protein content in the *E. coli* cells.

Taq Pol I was purified from *E. coli* using a simple purification scheme in two steps. First, since Taq Pol I protein was thermostable, any other *E. coli* proteins was inactivated and denatured by heating at 75°C for 20 min and then was removed by centrifugation. Second, the *E. coli* nucleic acids were removed using ion-exchange chromatography, DEAE-sephacel. The Taq Pol I protein was eluted from DEAE-sephacel with 450 mM KCl TMK buffer. This partial purified Taq Pol I had polymerase activity of 16700 U/L of cell cultures.

From the characterization of Taq Pol I, the enzyme exhibited the optimum activity at the temperature in the range of 70-75°C, pH in the range of 8.5-9, concentration of monovalent cations either KCl or NaCl at 50 mM while at 160 mM showed the inhibitory effects. The absolute requirement for Mg++ as the divalent cation cofactor at the optimum concentration was 2 mM whereas Mn++ displayed the inhibitory effect or to a lesser extent at 1 mM. The Taq Pol I enzyme lacks of exonuclease or endonuclease activity. More than 10% glycerol in the

Copyright by Mahidol University

total PCR reaction decreased the activity of Taq Pol I. Without adding any stabilizers, Taq Pol I could be stored at room temperature (25-30^{o}C) for a week with the loss of approximately a half of activity.

Copyright by Mahidol University