LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL
28 JAN 1991

GENE TRANSFER SYSTEM IN *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *ISRAELENSIS* BY CONJUGATION-LIKE PROCESS

UNCHALEE CHAWALA

อภินันทนาการ
จาก

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

IN
FALCULTY OF GRADUATE STUDIES
OF MAHIDOL UNIVERSITY
1990

Copyright by Mahidol University

16423

ชื่อวิทยานิพนธ์ การส่งถ่ายยีนใน *Bacillus thuringinsis*
ผู้วิจัย อัญชลี ชวาลา
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์
อมเรศ ภูมิรัตน Ph.D.
สมศักดิ์ พันธุวัฒนา Ph.D.
วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด Dr.Eng.
สกล พันธุ์ยิ้ม Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา 3 มกราคม พ.ศ. 2533

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการถ่ายทอดยีนเข้าสู่ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (B.t.i.) พบว่าจำเป็นต้องถ่ายทอดไปสู่ *Bacillus sp.* strain O 016 ก่อน โดยเริ่มจากการนำพลาสมิดพาหะ คือ pTF6 และ pHV33 ถ่ายทอดไปสู่ *Bacillus sp.* strain O 016 โดยวิธี PROTOPLAST TRANSFORMATION แล้วจึงถ่ายทอดเข้าสู่ B.t.i. ต่อไป โดยวิธี CONJUGATION-LIKE อัตราการถ่ายทอดพลาสมิด pTF6 และ pHV33 ใน *Bacillus sp.* strain O 016 เท่ากับ 3.2×10^{3} และ 2.0×10^{3} transformants/μg DNA ตามลำดับ อัตราการถ่ายทอดพลาสมิด pTF6 และ pHV33 ใน B.t.i.A084 เท่ากับ 3.5×10^{-7} และ 2.5×10^{-7} (number of transcipients per number recipients) ตามลำดับ พลาสมิด pTF6 นี้สามารถคงอยู่ได้ทั้งใน *Bacillus sp.* strain O 016 และ B.t.i.A084.

พลาสมิดลูกผสม pTF6-Xd และ pHV33-Xd ซึ่งเกิดจากการตัดต่อระหว่างพลาสมิด pTF6 หรือ pHV33 กับยีนซัยโลซัยเดสได้ถูกถ่ายทอดไปสู่ *Bacillus sp.* strain O 016 และพบว่า พลาสมิดลูกผสม pTF6-Xd และ pHV33-Xd ไม่สามารถคงอยู่ได้ใน *Bacillus sp.* strain O 016 ในขณะที่สามารถถ่ายทอดพลาสมิดลูกผสม pBA401 ซึ่งเกิด

Copyright by Mahidol University

จากการตัดต่อระหว่างพลาสมิด pTF6 และยีนเพนนิซิลินอะซัยเลสเข้าสู่ *Bacillus sp.* strain O 016 ด้วยอัตราการถ่ายทอดเท่ากับ 9.9×10^{2} transformants/μg DNA ซึ่งพลาสมิด pBA401 นี้สามารถที่จะถ่ายทอดต่อไปเข้าสู่ B.t.i.A084 ได้ด้วยอัตรา 6.7×10^{-7} (number of transcipients per number of recipients) พลาสมิด pBA 401 นี้สามารถคงอยู่ได้ทั้งใน *Bacillus sp.* strain O 016 และ B.t.i.A084 จากการศึกษาด้วยวิธี Hybridization และ Microbiological plate assayพบว่าพลาสมิดลูกผสม pBA401 ได้ถ่ายทอดเข้าสู่ *Bacillus sp.* strain O 016 และ B.t.i.A084 ทำให้ได้เชื้อ *Bacillus sp.* strain O 016 และ B.t.i.A084 ที่สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลินอะซัยเลสได้ด้วย

Copyright by Mahidol University

Thesis Title : GENE TRANSFER SYSTEM IN *BACILLUS THURINGIENSIS SUBSP. ISRAELENSIS* BY CONJUGATION-LIKE PROCESS

Name : Unchalee Chawala

Degree : Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee :

Amaret Bhumiratana Ph.D.

Somsak Pantuwatana Ph.D.

Watanalai Panbangred Dr.Eng.

Sakol Panyim Ph.D.

Date of Graduation : 3 January B.E. 2533 (1990)

ABSTRACT

Protoplast of a lysozyme sensitive strain of *Bacillus sp.* strain O 016 was transformed by plasmid pTF6 and pHV33 with the frequencies of 3.2×10^3 and 2.0×10^3 transformants/µg DNA respectively. The plasmids pTF6 and pHV33 in *Bacillus sp.* strain O 016 was subsequently transferred to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strain A084 (*B.t.i.*A084) by conjugation-like process with the frequencies of 3.5×10^{-7} and 2.5×10^{-7} (number of transcipients per number of recipients), respectively. Plasmid pTF6 was found to be stably maintained in *Bacillus sp.* strain O 016 and *B.t.i.*A084 but the plasmid pHV33 was found to be unstable in *Bacillus sp.* strain O 016 and B.t.i.A084.

Recombinant plasmids, pTF6-Xd and pHV33-Xd which were constructed by ligation between plasmid pTF6

Copyright by Mahidol University

or pHV33 and the xylosidase gene were transferred into *Bacillus sp.* strain O 016. It was found that plasmids pTF6-Xd and pHV33-Xd were not stable in either hosts.

Another recombinant plasmids, pBA401 which composed of plasmid pTF6 and the pencillin acylase gene was transferred into *Bacillus sp.* strain O 016 and subsequently into *B.t.i.*A084 with the frequencies of 9.9×10^{2} transformants/μg DNA and 6.7×10^{-7} (number of transcipients per number of recipients),respectively. Plasmid pBA401 was found to be stable in both *Bacillus sp.* strain O 016 and *B.t.i.*A084. Studies by using hybridization technique indicated the presence of plasmid pBA401 in *Bacillus sp.* strain O 016. The gene for penicillin G acylase was also found to express in both *Bacillus sp.* strain O 016 and *B.t.i.*A084 hosts.

Copyright by Mahidol University