จุฬาภรณ์ จุฬาฯ กาญ
หอสมุดมหาวิทยาลัยมหิดล
LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

2 JUL 1992

CLONING AND EXPRESSION OF P. GONIONOTUS GROWTH HORMONE CDNA IN ESCHERICHIA COLI BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) METHOD

SARADEE WARIT

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย ม.มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

(BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1992

Copyright by Mahidol University

19102

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายตัดต่อยีนและการสร้างโปรตีนจากยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของปลาตะเพียนขาว (*P. gonionotus*) ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ผู้วิจัย สารดี วาฤทธิ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 10 มกราคม พ.ศ. 2535

บทคัดย่อ

ประเทศไทยนั้นจัดได้ว่า เป็นประเทศหนึ่งที่รายได้ส่วนใหญ่ยังขึ้นอยู่กับรายได้ทางการเกษตรและการประมง ในด้านการประมงนั้น ปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus* or Thai silver carp) สามารถจัดได้ว่ามีความสำคัญอยู่ไม่น้อยทีเดียว ฉะนั้นหากสามารถเพิ่มปริมาณและคุณภาพของปลาได้จักเป็นประโยชน์อย่างมาก

ฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโต (Growth Hormone, GH) เป็นโปรตีนฮอร์โมนชนิดหนึ่ง มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22 กิโลดาลตัน ฮอร์โมนชนิดนี้ถูกผลิตขึ้นด้วยเซลพิ-เศษของต่อมใต้สมอง (pituitary gland) หน้าที่โดยทั่วไปของฮอร์โมนนี้ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงคือ ช่วยในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลภายในร่างกาย จากความสำคัญของฮอร์โมนนี้เองจึงได้มีการทำการศึกษาและค้นคว้าวิจัยกันอย่างมาก โดยเฉพาะในกลุ่มปลา

เดิมตามปกติวิธีการศึกษายีนด้วยวิธีการขยายตัดต่อยีนที่น่าสนใจนั้น จะใช้วิธีการสร้างห้องสมุดของยีนดังกล่าวนั้นขึ้น ด้วยวิธีดังกล่าวนี้จำเป็นต้องใช้ผลิตภัณฑ์เริ่มต้นในการสกัดยีนเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังใช้เวลานานในการคัดเลือกยีนที่

Copyright by Mahidol University

ต้องการจากห้องสมุดยีน แต่ในปัจจุบันนี้มีวิธีการใหม่ที่สามารถใช้แทนวิธีการเดิมได้ วิธีการดังกล่าวนี้คือ วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR).

วิธี PCR เป็นวิธีการขยายและเพิ่มปริมาณยีนที่น่าสนใจโดยอาศัยชิ้นส่วนของยีนที่ออกแบบ และสังเคราะห์ให้จำเพาะเจาะจงกับยีนที่ต้องการ เป็นตัวช่วยคัดเลือกและเพิ่มปริมาณของยีนดังกล่าว

จากความรู้ที่ว่าปลาตะเพียนขาว ได้ถูกจัดไว้ในกลุ่ม family Cyprinidae เช่นเดียวกับปลาไน (<u>Cyprinus carpio</u>) ซึ่งฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโตของปลาไน ได้ถูกทำการศึกษาค้นคว้าไว้เป็นที่เรียบร้อยร่วมกับความรู้ที่ว่า GH ยีนมีโครงสร้างอนุรักษ์ (conserved structure) ทำให้สามารถนำข้อมูลดังกล่าว มาทำการออกแบบลำดับของเบสในชิ้นส่วนของยีน ที่จะนำมาใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการเพิ่มและขยายยีน GH ของปลาตะเพียนขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในการศึกษาและค้นคว้ายีน GH ของปลาตะเพียนขาวนั้น เริ่มต้นด้วยการนำเอาต่อมใต้สมองของปลามาทำการสกัด RNA ที่จะถูกนำมาใช้เป็นแบบในการสร้างสาย cDNA ของ GH ต่อไปและถูกนำไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR หลังจากนั้น cDNA ของ GH จะถูกนำมาทำการตัดต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะที่มีความสามารถในการนำยีน GH เข้าสู่เชื้อแบคทีเรียต่อไป เพื่อใช้ในการศึกษาหาลำดับเบสภายในยีน GH cDNA

จากลำดับเบสของ <u>GH</u> cDNA ที่ได้มาทำให้ทราบว่า <u>GH</u> cDNA ของปลาตะเพียนขาวประกอบขึ้นด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 567 นิวคลีโอไทด์ ที่มีความสามารถในการสร้างสายโปรตีนที่มีความยาว 188 กรดอะมิโน ทั้งนี้จะมีเบสที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปได้โดยไม่มีผลต่อการสร้างสายโปรตีนอยู่ 2 ตำแหน่งที่เรียกว่า polymorphism นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ <u>GH</u> cDNA ของปลาตะเพียนขาวกับของปลาไนพบว่า มีความคล้ายคลึงกันอยู่ประมาณ 97% ของลำดับเบสทั้งหมด และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับยีน GH ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆที่ได้มีผู้ทำการศึกษามาก่อนแล้วนั้น พบได้ว่า <u>GH</u> cDNA ของปลาตะเพียนขาวมีโครงสร้างของลำดับเบสที่สำคัญเช่นเดียวกับของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยมีจำนวนเบสที่คงเดิมอยู่ 37 เบสที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ด้วยกัน นอกจากนี้โปรตีนฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบ-

โตของปลาตะเพียนขาวยังได้ถูกทำให้ผลิตขึ้น ในเชื้อแบคทีเรีย E. coli โดยทำการตัดต่อ GH cDNA เข้ากับพลาสมิดพาหะ pUC19 ภายใต้การควบคุมการสร้างโปรตีนของ lacZ promotor ทั้งนี้โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นมานั้นจะใช้ SD-sequence และเบสเริ่มต้นการสร้างโปรตีนที่ถูกออกแบบ โดยพบว่าเชื้อ E. coli ที่มี GH cDNA ของปลาตะเพียนขาวอยู่ สามารถที่จะสร้างโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 กิโลดาลตัน เพิ่มขึ้นมาได้เป็นจำนวนประมาณ 8% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้น และจากการทำ Southern blot hybridization กับ DNA ของปลาตะเพียนขาว พบว่า ปลาตะเพียนขาวมียีนที่ควบคุมการสร้าง GH อยู่เพียงหนึ่งยีน.

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Cloning and Expression of P. gonionotus Growth Hormone cDNA in Escherichia coli by the Polymerase Chain Reaction (PCR) Method
Name	Saradee Warit
Degree	Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

	Sakol Panyim, Ph.D.
	Prapon Wilairat, Ph.D.
Date of Graduation	10 January B.E. 2535 (1992)

ABSTRACT

Puntius gonionotus or Thai silver carp is an economically important fish in our country, and there is a need to improve the quantity and quality of this fish. Growth Hormone (GH) is a 22 kDa polypeptide synthesized in the anterior part of the pituitary gland. This hormone is widely distributed in all vertebrates and regulates the essence function of growth. Because of its importance and its potential in agriculture, the GH gene has been extensively studied in many species. The general strategy used to clone this GH gene involves in the construction of genomic or cDNA library, however nowadays there is a more powerful technique to clone this gene namely the Polymerase Chain Reaction (PCR). This method can amplify DNA fragment of interest by using two specific primers located at the boundaries of the desired sequence. Since

Copyright by Mahidol University

P. gonionotus belongs to the same family of Cyprinidae and as the GH cDNA of Cyprinus carpio or common carp that had been cloned and sequenced, the nucleotide sequence of that carp was used to provide an information in the design of two specific oligonucleotide primers located at the 3'-end and 5'-end of the GH gene used to clone the PgGH cDNA by PCR method. PgGH cDNA reverse-transcribed from total RNA was amplified by PCR and cloned in E. coli using the BS- vector. The recombinant clones were selected and characterized using two restriction enzymes, EcoRI and RsaI, and their inserts were subsequently sequenced. The PgGH cDNA was found to encode a polypeptide of 188 amino acids with two points of polymorphism and had a 97% amino acid homology with carpGH cDNA. When compared with other GHs, the PgGH cDNA structural feature contained the 5 common conserved domains. In order to express the PgGH cDNA in E. coli, the PgGH cDNA was cloned into pUC19 vector under the control of the lac Z promoter of the vector and using the SD sequence and the starting codon (ATG) designed in primer sequence. The GH protein of P. gonionotus produced in E. coli comprised about 8% of the total cellular protein with a molecular weight of about 21 kDa. Moreover, the Southern blot hybridization of P. gonionotus genome with PgGH cDNA showed that the fish contained only one gene coding for GH.

Copyright by Mahidol University