LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

22 JUL 1992

EFFECT OF TOXIN GENE PROMOTER ON EXPRESSION OF CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE GENE (*cat*) IN *BACILLUS THURINGIENSIS*

SUPAT CHAREONPORNWATTANA

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1992

Copyright by Mahidol University

19164

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของ Promoter จาก Toxin Gene ต่อการแสดงออกของยีน Chloramphenicol Acetyltransferase (*cat*) ใน *Bacillus thuringiensis*

ผู้วิจัย สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

อมเรศ ภูมิรัตน, Ph.D.

สมศักดิ์ พันธุวัฒนา, Ph.D.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, Dr.Eng.

วันสำเร็จการศึกษา 27 มีนาคม พ.ศ. 2535

บทคัดย่อ

เมื่อนำ *BamH* I-*Pst* I fragmentจากพลาสมิด pBTC1 ซึ่งมีส่วนของ Promoter จาก *cry IV* gene ที่สร้างสารพิษฆ่าลูกน้ำยุง และ มีน้ำหนักโมเลกุล 130 kDa ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* มาต่อกับพลาสมิดพาหะ pPL703 ซึ่งใช้สำหรับตรวจสอบส่วนที่เป็น promoter ของชิ้น DNA ทำให้ได้พลาสมิดสายผสม pPLC1 จากนั้นนำเข้า *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ O-016 โดยวิธี protoplast transformation จากนั้นถ่ายทอดเข้าสู่ *B.thuringiensis* subsp. *israelensis* สายพันธุ์ c4Q2-72 และ 4Q2-72 โดยวิธี conjugation-like processโดยอัตราการถ่ายทอดพลาสมิดเท่ากับ 2.1×10^{-7} และ 1.7×10^{-7} ตามลำดับ (อัตราการถ่ายทอดเท่ากับจำนวน transconjugant ต่อจำนวน recipient ก่อน conjugate)เมื่อวิเคราะห์พลาสมิดจาก transconjugant ที่ได้โดยใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ และ southern blot hybridization พบว่า พลาสมิด pPLC1 ที่อยู่ใน *B.thuringiensis* นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงและมีชิ้นส่วน *BamH* I-*Pst* I ที่มี promoter ของ *cry IV* gene ร่วมอยู่ด้วย DNA fragment ที่ต้องการอยู่ในพลาสมิด ระดับการแสดงออกของยีน chloramphenical

Copyright by Mahidol University

acetyltransferase (CAT) ใน crude extract จาก transformant และ transconjugant ที่เลี้ยงใน NBS medium (nutrient broth supplemented mineral) จนถึงระยะ mid exponential , T_0 , T_2 และ T_8 พบว่า ชิ้นส่วนของ promoter ซึ่งนำมาจาก *cry IV* gene นั้นแสดงคุณสมบัติเป็น post exponential promoter เมื่อเปรียบเทียบกับ transformant และ transconjugant ที่มี plasmid อนุพันธ์ เช่น pPL603 และ pPL703 และ จากการตรวจสอบจำนวน plasmid ต่อเซล (copy number) ของพลาสมิด pPLC1 และ อนุพันธ์ใน *B.thuringiensis* มีจำนวนใกล้เคียงกัน เมื่อศึกษาการคงอยู่ของ พลาสมิดสายผสม pPLC1 ใน transformant และ transconjugant โดย การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติม kanamycin และมีการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่ไม่ใส่ยาทุกวัน แสดงให้เห็นว่า ไม่มีผลต่อการคงอยู่ของพลาสมิดในเซล tranconjugant แต่มีผลต่อการคงอยู่ของพลาสมิดใน transformant เมื่อเลี้ยงเชื้อใน สภาพดังกล่าว เป็นเวลาอย่างน้อย 4 สัปดาห์

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Effect of Toxin Gene Promoter on Expression of Chloramphenicol Acetyltransferase Gene (*cat*) in *Bacillus thuringiensis*

Name Supat Chareonpornwattana

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Amaret Bhumiratana, Ph.D.

Somsak Pantuwatana, Ph.D.

Watanalai Panbangred, Dr.Eng.

Date of Graduation 27 March B.E. 2535 (1992)

ABSTRACT

A *Bam*H I-*Pst*I fragment harbouring the promoter region of *cry IV* gene encoding 130 kDa *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* mosquitocidal toxin protein from pBTC1 was cloned into the promoter probe plasmid vector, pPL703. The recombinant plasmid pPLC1 was transformed into *Bacillus megaterium* strain O-016 by protoplast transformation and subsequently was transferred from the transformant to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strain c4Q2-72 and 4Q2-72 by conjugation-like process with the frequency of 2.1×10^{-7} and 1.7×10^{-7} respectively (number of transconjugant per number of recipient before mating). The presence of cloned promoter region in the constructed plasmid was confirmed by restriction pattern and Southern blot hybridization. The expression level of chloramphenicol acetyltransferase gene (*cat*) was determined

Copyright by Mahidol University

by measuring the specific activity of the enzyme chloramphenicol acetyltransferase (CAT). The *cat* gene product was assayed in crude extracts obtained from lysozyme treated *B.megaterium* strain O-016 transformants and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* transconjugants. Both transformant and transconjugants were grown in NBS medium (nutrient broth supplemented with minerals) and harvested at the various growth phases, namely, mid exponential, T_0, T_2 and T_8. It was shown that the inserted promoter region from *cry IV* gene conferred the post exponential promoter activity according to the growth pattern when compared to those harbouring the relevant plasmid, pPL603, pPL703 and pTF6. There was no significant difference in term of plasmid copy number in all these plasmids in *Bacillus thuringiensis* host. Finally, the recombinant plasmid was stably maintained in *Bacillus megaterium* strain O-016 transformant, but highly stable in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* c4Q2-72 and 4Q2-72 transconjugant upon daily subculture for at least 4 weeks in LB broth medium without any selective pressure.

Copyright by Mahidol University