LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

CLONING OF AN *ESTERASE* GENE FROM *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *GLYCINES*

URAIWAN INTAMASO

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

With compliments
of
Faculty of Graduate Studies, Mahidol University

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1995

Copyright by Mahidol University

TH
U7860
1995

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษายีน *esterase* ของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*.

ผู้วิจัย อุไรวรรณ อินทมาโส

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ศกรณ์ มงคลสุข,Ph D

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด,D Eng

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ,Ph D

วันที่สำเร็จการศึกษา 26 กันยายน พ ศ 2538

บทคัดย่อ

เอนไซม์ *esterase* เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะ ester ในสารประกอบ ester ที่มีส่วนประกอบเป็นกรดไขมันชนิดสั้น จากการศึกษาเอนไซม์ *esterase* ที่อยู่ภายในเซลล์ของ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้เป็นชนิด monomeric protein มีขนาด 59 kDa และการผลิตเอนไซม์ขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ จากการศึกษาต่อไปถึง ปัจจัยที่มีผลต่อการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ พบว่าทั้ง divalent cation และ oxidative agent ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ยีน *esterase* จากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* ได้ถูกแยกจาก genomic DNA library ใน λZipLox ที่ถูก circularized เป็นรูปพลาสมิด pZLI ใน *E. coli* สายพันธุ์ DH10B (ZIP) ที่ถูกใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน การคัดเลือกโคโลนีที่มียีน *esterase* อยู่นั้นได้จากการอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสาร tributyrin ในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดเป็นวงใสๆ ล้อมรอบโคโลนี ซึ่งทำให้แยกความแตกต่างได้ชัดเจนจากโคโลนีอื่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะทึบแสง โคโลนีที่คัดเลือกได้จำนวน 7 โคลนเป็นยีน *esterase* จริงเนื่องจากไม่สามารถสร้างสารเรืองแสงได้บน rhodamine medium เมื่อส่องดูด้วยแสง UV ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นคุณสมบัติของเอนไซม์ lipase หลังจากนำมาศึกษาโดย restriction mapping และ Southern blot analysis พบว่า ทั้ง 7 โคลนมีชิ้นส่วนขนาด 0 9 kb ที่ homologous กัน ดังนั้นจึงเลือกโคลนที่มีขนาดเล็กที่สุด คือ 1 6 kb ตั้งชื่อว่า pEST5 เพื่อนำมาใช้ศึกษาต่อไป ข้อมูลจาก Southern blot โดยใช้ 0 9 kb เป็นตัวตรวจสอบกับโครโมโซมของ *Xanthomonas* ชนิดต่าง ๆ และพวก

แบคทีเรียชนิดแท่งแกรมลบชนิดอื่น ๆ พิสูจน์ได้ว่า โคลนที่ได้นี้มาจาก *Xanthomonas campestris* pv *glycines* แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ยีน *esterase* มี homology ในอัตราที่สูงกับกับยีน *esterase* จาก *Xanthomonas* บางชนิด

หลังจากนั้นนำโคลนที่ได้มาศึกษาหาตำแหน่งของ coding region พบว่าอยู่บน Fragment 1.3 kb และการแสดงออกอยู่ภายใต้การควบคุมของ *lacZ* promoter นอกจากนั้นข้อมูลเพิ่มเติมที่ได้จากการตรวจสอบ esterase activity ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว สามารถสรุปได้ว่า ยีน *esterase* ที่ถูกคัดเลือกได้นี้สร้างเอนไซม์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ โดยเป็นคนละชนิดกับเอนไซม์ esterase ที่อยู่ภายในเซลล์ที่ศึกษามาก่อนแล้ว ในการศึกษาบทบาทของยีน *esterase* ที่มีต่อเซลล์จาก overexpressionของยีน *esterase* ใน *Xanthomonas* พบว่า ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตและไม่มีผลต่อการต่อต้านการเกิด oxidative stress แต่อย่างไรก็ตามหน้าที่ของ *esterase* ใน *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Cloning of an *esterase* gene from *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*

Name Uraiwan Intamaso

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Supervisory Commitee

Skorn Mongkolsuk, Ph.D.

Watanalai Panbangred, D. Eng

Saovanee Dharmsthiti, Ph.D.

Date of Graduation 26 September B.E. 2538 (1995)

ABSTRACT

Esterase are a group of enzymes that hydrolyze the ester bond in ester compounds, especially those with short chain fatty acid. Studied from cell lysates of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* showed that the intracellular esterase was a monomeric protein with MW of 59 kDa and expressed under control of growth-phase-dependent process. The study on factors affecting the production of the enzyme found that neither divalent cations nor oxidants agents have any influence on the enzyme activity.

Esterase gene was screened from *X. campestris* pv. *glycines* DNA library in a ZipLox vector circularized into plasmids in a DH10BZIP. Seven colonies out of 10,000 colonies forming clear halo around the colonies were selected on TBA plates and further checked on rhodamine B plates. Due to inability to produce a fluorescent agent on Rhodamine B agar medium under UV light, all of 7 clones were proved to be true esterases. By restriction enzyme and Southern blot analysis, they shared a homologous band with MW of 0.9 kb, thus the smallest cloned with insert DNA MW of 1.6 kb was chosen for further study.

Copyright © by Chulalongkorn University

Results from Southern blot confirmed that the insert portion of this clone derived from *X. campestris* pv. *glycines* and showed high homology to a genomic DNA fragment from each of other *Xanthomonas* species. The entire coding region was found to be 1.3 kb and the expression was under the *lacZ* vector promoter. Adddition evidence from esterase assay in cell-free supernatant suggested that the cloned *esterase* gene produced a secreted enzyme. The overexpression study of the enzyme in *Xanthomonas* showed that the esterase levels had no effect on oxidative stress response. Currently, the biological role of esterase in *X. campestris* pv. *glycines* is not understood.

Copyright by Mahidol University