การกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่โอเปอรอนของเอนไซม์ไนโตรจีเนสโดยวิธีการเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส

นางสาวรัตนา เจนเจริญธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

พ.ศ.2522

002576 i 17108822

Construction of *nif* Mutants of *K.pneumoniae* by Localized Mutagenesis

Miss Ratana Jenjareontham

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1979

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่โอเปอรอนของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยวิธีการเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส
โดย	นางสาวรัตนา เจนเจริญธรรม
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ไขศรี อาภรณ์รัตน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร)

.....กรรมการ

(ดร.พรชัย มาดังคสมบัติ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่โอเปอรอน ของ เอนไซม์ไนโตรจีเนส
โดยวิธีการ เหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส

ชื่อนิสิต นางสาววัตนา เจนเจริญธรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์

ภาควิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2522

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ ได้ดัดแปลงวิธีการแยกมิวแตนท์ โดยการ เหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส ของ Hong,J.,and Ames,B.N. Proc.Natl.Acad.Sci.US.68 (1971), 3158 - 3162. เพื่อนำมาสร้างมิวแตนท์ของการตรึงไนโตรเจน หลักการ คือ กลายพันธุ์โครโมโซมของแบคทีเรียที่บรรจุอยู่ใน generalized transducing phage P1 แล้ว เหนี่ยวนำเข้า Klebsiella pneumoniae M5a1 ผลการทดลองพบว่า ประมาณหนึ่ง เปอร์เซนต์ของทรานสดัคแตนท์ที่ปรากฏ เป็นมิวแตนท์ที่มีความผิดปรกติที่โอเปอรอนไนโตรจีเนส และจากมิวแตนท์ 90 ตัวที่แยกได้ พบว่า มีอยู่ 64 ตัวที่มีฟีโนไทป์เป็น nif และที่เหลือ คือ partial nif

จากคุณสมบัติของ nif มิวแตนท์ที่ศึกษาได้ พบว่า มิวแตนท์กลุ่มนี้ ไม่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน มีเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นเทียบกับ his D แปรปรวนอยู่ระหว่าง 45 ถึง 85 ให้สีต่างกันเป็นสามแบบบน 6-Cyanopurine เพลท คือ สีขาว สีม่วงอ่อน และ สีม่วงเข้ม สามารถคอนจูเกทกับ Escherichia coli JC5466 (RP41) ซึ่งมีพลาสมิดต้านยารวมกับยีนการตรึงไนโตรเจน ด้วยความถี่ 1 - 5 X 10^{-4} คุณสมบัติสำคัญของรีคอมบิแนนท์ที่ได้ นอกจากจะทวลคืนสมบัติการตรึงไนโตรเจนแล้ว ยังพบว่าค่าเฉลี่ยสูงสุดของการรีดิวส์อะเซทีลีนของรีคอมบิแนนท์ที่สร้างจาก nif มิวแตนท์ ที่มีความผิดปรกติที่ยีนควบคุม จะสูงกว่าค่าที่ได้จากรีคอมบิแนนท์ที่สร้างมาจาก nif มิวแตนท์ที่มีความผิดปรกติที่ยีนโครงสร้าง ถึง 46 เปอร์เซนต์ จากคุณสมบัติเบื้องต้นของ partial nif

มิวแตนท์ที่ศึกษาได้ พบว่า มิวแตนท์กลุ่มนี้ตรึงไนโตรเจนได้ แต่รูปแบบของการตรึงไนโตรเจนกับปริมาณของเซลสูงสุดที่ได้ จะแตกต่างกัน กล่าวคือ มิวแตนท์บางตัว จะให้แอคติวิตี้ของการรีดิวส์อะเซทีลีน ประมาณเท่ากับของ wild type ในขณะที่จำนวนเซลสูงสุดกลับน้อยกว่าถึง 50 เปอร์เซนต์ มิวแตนท์บางตัว จะให้ค่าสูงสุดของการรีดิวส์อะเซทีลีนต่ำกว่าค่าของ wild type ในขณะที่จำนวนเซลที่ได้ใกล้เคียงกัน

Thesis Title Construction of nif Mutants of K.pneumoniae by Localized Mutagenesis

Name Miss Ratana Jenjareontham

Thesis Advisor Assistant Professor Dr.Pairor Thipayathasana

Department Biochemistry

Academic Year 1979

Abstract

By the application of the Localized Mutagenesis procedure of Hong,J.,and Ames,B.N. Proc.Natl.Acad.Sci.US.68 (1971), 3158 - 3162, a large number of nif mutants were isolated. Its principle is to mutagenize the transducing phage P1 with hydroxylamine and then transduce it into Klebsiella pneumoniae M5a1 his D. It was found that approximately one percent of the obtained transductants expressed abnormality at the nif operon. About ninety strains of isolated mutants were examined. Out of this amount, sixty-four strains were characterized as nif and the rest as partial nif mutants.

The physiological properties of nif mutants were also studied. It was found that all of them have no capability of fixing nitrogen. The cotransduction frequency with respect to the his D recipient ranged between 45 - 85. Colonies grown on 6-Cyanopurine indicator plates can be divided into three groups based on color : white , purple and dark purple. Conjugation between these nif mutants and Escherichia coli K12 JC5466 (RP41) , conferring

drug resistant plasmid adjoined with nif genes, can occur at a frequency of $1 - 5 \times 10^{-4}$ per donor. It was found that all of the recombinants regain the ability of nitrogen fixation. The interesting thing is that the recombinants derived from the regulatory nif mutants provide higher average values of the maximal activity of acetylene reduction than those derived from nif structural mutants. Some of the partial nif mutants were studied to a certain extent. It was found that this group of mutants can fix nitrogen, but of an altering fixation pattern. For instance, the value of the maximal activity of acetylene reduction detected in some partial nif mutants is comparable to that of the wild type whereas its maximal cell density is 50 percent lower. The opposite a lower acetylene reduction activity renders an equal cell density when compared to those of the wild type.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และ ให้แนวความคิดอย่างดียิ่ง ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ สาขาปักเตรีวิทยาและจุลินทรีย์ดิน กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ได้อนุญาตให้ใช้สถานที่ และ เครื่องมือสำหรับการทำวิทยานิพนธ์นี้บางส่วน

ขอขอบพระคุณ และ ขอบคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ สภาวิจัยแห่งชาติ บัณฑิตวิทยาลัย อาจารย์เย็นใจ วสุวัต คุณวรวิชญ์ รุ่งรัตนกสิน และ ทุกท่านซึ่งมิได้เอ่ยนามในที่นี้ สำหรับกำลังใจ ความช่วยเหลือ ตลอดจนการสนับสนุนด้านทุนการวิจัย จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

รายการตารางประกอบ ..... ช

รายการรูปประกอบ ..... ญ

คำย่อ ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ 1

2. วิธีการทดลอง

1. วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง 12
2. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 13
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ 13
4. การเตรียมสารละลาย 16
5. การหาปริมาณโปรตีนของเชื้อโดยวิธีลอรี่ 16
6. การหาปริมาณ Reducing Sugar โดยวิธีของ Somogyi และ Nelson 17
7. การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 17
8. การเจริญเติบโตของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน 18
9. การให้สีของแบคทีเรียบน 6-Cyanopurine เพลท 18
10. การวัดการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีอะเซทีลีนรีดัคชั่น 18

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

11. การเตรียม his D ออกโซโทรพ จาก Klebsiella pneumoniae M5a1 19
12. การหาปริมาณ Phage P1 20
13. การเพิ่มปริมาณ Phage P1 โดย Agar layer method 21
14. การตกตะกอน Phage P1 โดยใช้ Polyethylene Glycol 21
15. การกลายพันธุ์ Phage P1 โดยใช้ Hydroxylamine 22
16. การเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส 22
17. การผสมพันธุ์แบคทีเรียโดยวิธีคอนจูเกชั่น 23
18. การสร้างและคัดเลือก nif มิวแตนท์ 23

3. ผลการวิจัย

1. การรอดชีวิตของ Phage P1 ในบัฟเฟอร์ที่ 4°ซ 26
2. ประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำยีนของ Phage P1 26
3. การเหนี่ยวนำยีนโดย Phage P1 ที่กลายพันธุ์ 28
4. ลักษณะทั่ว ๆ ไป ของมิวแตนท์ที่แยกได้ 31
5. คุณสมบัติของ nif มิวแตนท์ 31
6. การทดสอบคุณสมบัติของ partial nif มิวแตนท์ 45

4. วิจารณ์ผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย 57

เอกสารอ้างอิง 70

ภาคผนวก 79

ประวัติผู้เขียน 86

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	การรอดชีวิตของ Phage P1 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ	27
ตารางที่ 2	ประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำยีนของ Phage P1	29
ตารางที่ 3	การเปลี่ยนแปลงจำนวน Phage P1 ในขบวนการกลายพันธุ์	30
ตารางที่ 4	คุณสมบัติเบื้องต้นของ nif มิวแตนท์ที่แยกได้	33
ตารางที่ 5	การเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนของ nif มิวแตนท์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	35
ตารางที่ 6	เปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นของ nif มิวแตนท์กับ his D	37
ตารางที่ 7	คุณสมบัติโดยทั่วไปของรีคอมบิแนนท์ที่ได้จากการคอนจูเกท Escherichia coli K12 JC5466 (RP41) กับ nif มิวแตนท์	39
ตารางที่ 8	การเจริญเติบโตและความสามารถสูงสุดในการรีดิวส์อะเซทีลีนของรีคอมบิแนนท์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีปริมาณกลูตามีนต่าง ๆ กัน ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน	44
ตารางที่ 9	เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการให้สีบน 6-Cyanopurine เพลท และเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นของ nif มิวแตนท์เดิม กับแอกติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนสูงสุดของรีคอมบิแนนท์และ wild type	46
ตารางที่ 10	คุณสมบัติเบื้องต้นของ partial nif มิวแตนท์	47
ตารางที่ 11	การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของการใช้กลูโคสต่อความขุ่นของเชื้อ ระหว่าง partial nif มิวแตนท์ (P2,P4,P7) และ Klebsiella pneumoniae M5a1 โดยวิธีการวิเคราะห์วาเรียนซ์แบบแจงหลายทาง	54

หน้า

ตารางที่ 12	เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของการใช้กลูโคสต่อความขุ่นของเชื้อระหว่าง partial nif มิวแตนท์ และ Klebsiella pneumoniae M5a1 โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test	56
ตารางที่ 13	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสที่ใช้กับความขุ่นของเซลของ partial nif มิวแตนท์ กับ Klebsiella pneumoniae M5a1	78
ตารางที่ 14	ปริมาณกลูโคสที่ใช้ต่อหน่วย $O.D._{420}$ ของ partial nif มิวแตนท์ และ Klebsiella pneumoniae M5a1	79
ตารางที่ 15	การวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณกลูโคสที่ใช้ต่อหน่วย $O.D._{420}$ โดยวิธีวาเรียนซ์แบบแจงหลายทาง	80
ตารางที่ 16	ผลรวมและค่าเฉลี่ยปริมาณกลูโคสที่ใช้ต่อหน่วย $O.D._{420}$ ของ partial nif มิวแตนท์ และKlebsiella pneumoniae M5a1	82

รายการรูปประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	ขบวนการเปลี่ยนอนุมูลแอมโมเนียมเป็นกรดอะมิโนใน Klebsiella aerogenes	7
รูปที่ 2	ลักษณะจานเพาะเชื้อที่แบ่งพื้นที่เป็น 50 ส่วน	19
รูปที่ 3	แสดงสีซึ่งแตกต่างกันบน 6-Cyanopurine เพลท ของ nif มิวแตนท์	34
รูปที่ 4	ลักษณะการเจริญเติบโต และแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของ Klebsiella pneumoniae M5a1 และ nif มิวแตนท์	40
รูปที่ 5	ลักษณะการเจริญเติบโต และแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของรีคอมบิแนนท์	41
รูปที่ 6	ลักษณะการเจริญเติบโตของรีคอมบิแนนท์ เทียบกับ Klebsiella pneumoniae M5a1	43
รูปที่ 7	ลักษณะการเจริญเติบโต และแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของ Klebsiella pneumoniae M5a1 และ P2	49
รูปที่ 8	ลักษณะการเจริญเติบโต และแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของ P4 และ P7	50
รูปที่ 9	ลักษณะการเจริญเติบโต แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีน และ การใช้กลูโคสของ Klebsiella pneumoniae M5a1 , P2 , P4 , P7	52

คำย่อ

A^r	=	Ampicillin resistant
ADP	=	Adenosine-5'-diphosphate
ATP	=	Adenosine-5'-triphosphate
6-CP	=	6-Cyanopurine
EDTA	=	Ethylene-diamine-tetraacetec acid
his	=	histidine
his D	=	histidinol
K^r	=	Kanamycin resistant
m.o.i.	=	multiplicity of infection
NADPH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form
nif	=	nitrogen fixation
NTG	=	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
PEG	=	Polyethylene Glycol
Pi	=	Inorganic phosphate
T^r	=	Tetracycline resistant
WT	=	Wild type