

การกลายพันธุ์ของแบคทีเรียทีโอ เพอรอนของ เอนไซม์ไนโตรจีเนสโดยวิธีการเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส



นางสาวรัตนา เจริญธรรม

วิทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

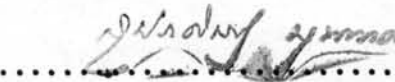
Graduate School

Chulalongkorn University


1979

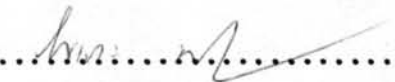
หัวข้อวิทยานิพนธ์	การกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่โอเปอรอนของ เอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยวิธีการเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส
โดย	นางสาวรัตนา เจนเจริญธรรม
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพย์ทัศน์

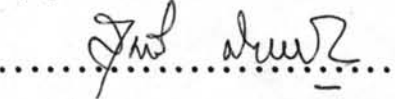
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทมหาบัณฑิต

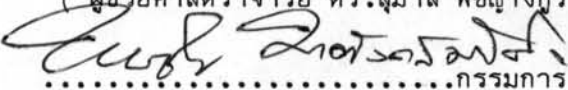

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ พูนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ไชศรี อภรณ์รัตน์)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพย์ทัศน์)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมาลี พิชญางกูร)


.....กรรมการ
(ดร.พรชัย มาตังคสมบัติ)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่โอเปอรอน ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส
 โดยวิธีการเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส
 ชื่อนิสิต นางสาวรัตนา เจนเจริญธรรม
 อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์
 ภาควิชา ชีวเคมี
 ปีการศึกษา 2522



บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ ได้ดัดแปลงวิธีการแยกมิวแตนท์ โดยการเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส ของ Hong, J., and Ames, B.N. Proc. Natl. Acad. Sci. US. 68 (1971), 3158 - 3162. เพื่อนำมาสร้างมิวแตนท์ของการตรึงไนโตรเจน หลักการ คือ กลายพันธุ์โครโมโซมของแบคทีเรียที่บรรจุอยู่ใน generalized transducing phage P1 แล้วเหนี่ยวนำเข้า Klebsiella pneumoniae M5a1 ผลการทดลองพบว่า ประมาณหนึ่งเปอร์เซ็นต์ของทรานสดักแตนท์ที่ปรากฏ เป็นมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่โอเปอรอนไนโตรจีเนส และจากมิวแตนท์ 90 ตัวที่แยกได้ พบว่า มีอยู่ 64 ตัวที่มีฟิโนไทป์เป็น nif และที่เหลือ คือ partial nif

จากคุณสมบัติของ nif มิวแตนท์ที่ศึกษาได้ พบว่า มิวแตนท์กลุ่มนี้ ไม่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน มีเปอร์เซ็นต์โคทรานสดักชันเทียบกับ his D แปรปรวนอยู่ระหว่าง 45 ถึง 85 ให้สีต่างกันเป็นสามแบบบน 6-Cyanopurine เพลท คือ สีขาว สีม่วงอ่อน และ สีม่วงเข้ม สามารถคอนจูเกทกับ Escherichia coli JC5466 (RP41) ซึ่งมีพลาสมิดต้านยาารวมกับยีนการตรึงไนโตรเจน ด้วยความถี่ $1 - 5 \times 10^{-4}$ คุณสมบัติสำคัญของรีคอมบิแนนท์ที่ได้ นอกจากจะหาลดคืนสมบัติการตรึงไนโตรเจนแล้ว ยังพบว่าค่าเฉลี่ยสูงสุดของการรีดิวส์อะเซทิลีนของรีคอมบิแนนท์ที่สร้างจาก nif มิวแตนท์ ที่มีความผิดปกติที่ยีนควบคุม จะสูงกว่าค่าที่ได้จากรีคอมบิแนนท์ที่สร้างมาจาก nif มิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่ยีนโครงสร้าง ถึง 46 เปอร์เซ็นต์ จากคุณสมบัติเบื้องต้นของ partial nif

มิวแทนท์ที่ศึกษาได้ พบว่า มิวแทนท์กลุ่มนี้ตรึงในโครโมโซมได้ แต่รูปแบบของการตรึงในโครโมโซม
กับปริมาณของเซลล์สูงสุดที่ได้ จะแตกต่างกัน กล่าวคือ มิวแทนท์บางตัว จะให้แอกติวิตีของการ
รีดิวส์อะเซทิลีน ประมาณเท่ากับของ wild type ในขณะที่จำนวนเซลล์สูงสุดกลับน้อยกว่าถึง
50 เปอร์เซ็นต์ มิวแทนท์บางตัว จะให้ค่าสูงสุดของการรีดิวส์อะเซทิลีนต่ำกว่าค่าของ
wild type ในขณะที่จำนวนเซลล์ที่ได้ใกล้เคียงกัน

A

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-Cyano-purine 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 ทิพย์ทัศน์
ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และ ให้แนวความคิดอย่างดียิ่ง ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ
สาขาบักเตรีวิทยาและจุลินทรีย์ดิน กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวง
เกษตรและสหกรณ์ ที่ได้อนุญาตให้ใช้สถานที่ และ เครื่องมือสำหรับการทำวิทยานิพนธ์นี้
บางส่วน

ขอขอบพระคุณ และ ขอบคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ สภาวิจัยแห่งชาติ
บัณฑิตวิทยาลัย อาจารย์เย็นใจ วสุวัต คุณวารวิชญ์ รุ่งรัตนกลิน และทุกท่านซึ่งมิได้เอ่ยนาม
ในที่นี้ สำหรับกำลังใจ ความช่วยเหลือ ตลอดจนการสนับสนุนด้านทุนการวิจัย จน
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
รายการตารางประกอบ	ช
รายการรูปประกอบ	ญ
คำย่อ	ฉ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วิธีการทดลอง	
1. วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	12
2. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	13
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ	13
4. การเตรียมสารละลาย	16
5. การหาปริมาณโปรตีนของเชื้อโดยวิธีลอร์รี่	16
6. การหาปริมาณ Reducing Sugar โดยวิธีของ Somogyi และ Nelson	17
7. การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	17
8. การเจริญเติบโตของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซ ออกซิเจน	18
9. การให้สีของแบคทีเรียบน 6-Cyanopurine เพลท	18
10. การวัดการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีอะเซทีลีนรีดักชัน	18



บทที่

หน้า

11. การเตรียม <u>his D</u> ออกโซโทรฟ จาก <u>Klebsiella pneumoniae M5a1</u>	19
12. การหาปริมาณ Phage P1	20
13. การเพิ่มปริมาณ Phage P1 โดย Agar layer method	21
14. การตกตะกอน Phage P1 โดยใช้ Polyethylene Glycol	21
15. การละลายพันธุ์ Phage P1 โดยใช้ Hydroxylamine	22
16. การเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส	22
17. การผสมพันธุ์แบคทีเรียโดยวิธีคอนจูเกชัน	23
18. การสร้างและคัดเลือก <u>nif</u> มีวแทนท์	23
3. ผลการวิจัย	
1. การรอดชีวิตของ Phage P1 ในบัฟเฟอร์ที่ 4 ^o ซ	26
2. ประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำยีนของ Phage P1	26
3. การเหนี่ยวนำยีนโดย Phage P1 ที่ละลายพันธุ์	28
4. ลักษณะทั่ว ๆ ไป ของมีวแทนท์ที่แยกได้	31
5. คุณสมบัติของ <u>nif</u> มีวแทนท์	31
6. การทดสอบคุณสมบัติของ <u>partial nif</u> มีวแทนท์	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 <u>nif</u> มิวแทนท์ที่แยกได้	33
ตารางที่ 5	การเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนของ <u>nif</u> มิวแทนท์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	35
ตารางที่ 6	เปอร์เซ็นต์โคทรานสดักชันของ <u>nif</u> มิวแทนท์กับ <u>his D</u>	37
ตารางที่ 7	คุณสมบัติโดยทั่วไปของรีคอมบิแนนท์ที่ได้จากการคอนจูเกท <u>Escherichia coli</u> K12 JC5466 (RP41) กับ <u>nif</u> มิวแทนท์	39
ตารางที่ 8	การเจริญเติบโตและความสามารถสูงสุดในการรีดิวส์อะเซทิลีนของ รีคอมบิแนนท์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีปริมาณกลูตามีนต่าง ๆ กัน ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน	44
ตารางที่ 9	เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการให้สับน 6-Cyanopurine เพลท และเปอร์เซ็นต์โคทรานสดักชันของ <u>nif</u> มิวแทนท์เดิม กับแอกทิวิตีการรีดิวส์อะเซทิลีนสูงสุดของรีคอมบิแนนท์และ wild type	46
ตารางที่ 10	คุณสมบัติเบื้องต้นของ <u>partial nif</u> มิวแทนท์	47
ตารางที่ 11	การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของการใช้กลูโคสต่อความขุ่นของ เชื้อ ระหว่าง <u>partial nif</u> มิวแทนท์ (P2, P4, P7) และ <u>Klebsiella pneumoniae</u> M5a1 โดยวิธีการวิเคราะห์ วาเรียนซ์แบบแจกหลายทาง	54

ตารางที่ 12	เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของการใช้กลูโคส ต่อความขุ่นของเชื้อระหว่าง <u>partial nif</u> มีวแตนท์ และ <u>Klebsiella pneumoniae M5a1</u> โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test	56
ตารางที่ 13	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสที่ใช้กับความขุ่นของ เซลของ <u>partial nif</u> มีวแตนท์ กับ <u>Klebsiella pneumoniae M5a1</u>	78
ตารางที่ 14	ปริมาณกลูโคสที่ใช้ต่อหน่วย O.D. 420 ของ <u>partial nif</u> มีวแตนท์ และ <u>Klebsiella pneumoniae M5a1</u>	79
ตารางที่ 15	การวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณกลูโคสที่ใช้ต่อหน่วย O.D. 420 โดย วิธีวาเรียนซ์แบบแจกหลายทาง	80
ตารางที่ 16	ผลรวมและค่าเฉลี่ยปริมาณกลูโคสที่ใช้ต่อหน่วย O.D. 420 ของ <u>partial nif</u> มีวแตนท์ และ <u>Klebsiella pneumoniae</u> <u>M5a1</u>	82

รายการรูปประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	ขบวนการเปลี่ยนอนุพลแอมโมเนียมเป็นกรดอะมิโนใน <u>Klebsiella aerogenes</u>	7
รูปที่ 2	ลักษณะจานเพาะเชื้อที่แบ่งพื้นที่เป็น 50 ส่วน	19
รูปที่ 3	แสดงสีซึ่งแตกต่างกันบน 6-Cyanopurine เพลท ของ <u>nif</u> มีวแทนท์	34
รูปที่ 4	ลักษณะการเจริญเติบโต และแอกติวิตีการรีดิวส์อะเซทิลีนของ <u>Klebsiella pneumoniae M5a1</u> และ <u>nif</u> มีวแทนท์	40
รูปที่ 5	ลักษณะการเจริญเติบโต และแอกติวิตีการรีดิวส์อะเซทิลีนของรีคอมบิแนนท์	41
รูปที่ 6	ลักษณะการเจริญเติบโตของรีคอมบิแนนท์ เทียบกับ <u>Klebsiella pneumoniae M5a1</u>	43
รูปที่ 7	ลักษณะการเจริญเติบโต และแอกติวิตีการรีดิวส์อะเซทิลีนของ <u>Klebsiella pneumoniae M5a1</u> และ P2	49
รูปที่ 8	ลักษณะการเจริญเติบโต และแอกติวิตีการรีดิวส์อะเซทิลีนของ P4 และ P7	50
รูปที่ 9	ลักษณะการเจริญเติบโต แอกติวิตีการรีดิวส์อะเซทิลีน และ การใช้ กลูโคสของ <u>Klebsiella pneumoniae M5a1</u> , 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
<u>his</u>	=	histidine
<u>his D</u>	=	histidinol
K ^r	=	Kanamycin resistant
m.o.i.	=	multiplicity of infection
NADPH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form
<u>nif</u>	=	nitrogen fixation
NTG	=	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
PEG	=	Polyethylene Glycol
Pi	=	Inorganic phosphate
T ^r	=	Tetracycline resistant
WT	=	Wild type