บทคัดย่อ

T 163927

งานวิจัยเรื่องนี้มีจุดประสงค์เพื่อแยกโปรโมเตอร์ของ *groESL* operon ซึ่งเป็นยีน heat shock จากเชื้อ *Lactobacillus* sp. ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) แล้วศึกษาการทำงานของโปรโมเตอร์โดยอาศัย promoter probe vector pMU1327*gfp* ที่มียีน *gfp* เป็นยีนแสดงผล pMU1327*gfp* สร้างขึ้นจากการนำยีน *gfp* จากพลาสมิด pBC*gfp* นำไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pMU1327 ซึ่งเป็น shuttle vector ของ *E.coli* และแบคทีเรียแลคติก อย่างไรก็ตามในการแยกโปรโมเตอร์ของ *groESL* operon ด้วยวิธี PCR มีข้อจำกัดของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานใน GenBank ซึ่งจะไม่ครอบคลุมเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ด้านหน้าของโปรโมเตอร์ ทำให้ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมส่วนของโปรโมเตอร์ได้ ดังนั้นการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์โปรโมเตอร์ของ *groESL* operon จึงใช้วิธี Southern hybridization ซึ่งใช้ดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน *groEL* ขนาดประมาณ 967 bp ที่เตรียมด้วยวิธี PCR ผลปรากฏว่าโครโมโซมดีเอ็นเอของเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII จะให้ผลบวกต่อดีเอ็นเอติดตาม 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 5.7 และ 3.8 กิโลเบส เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I จะให้ผลบวกต่อแถบดีเอ็นเอติดตามขนาดประมาณ 2.9 กิโลเบส จากนั้นทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกต่อดีเอ็นเอติดตามเข้าพลาสมิด pUC18 แล้วคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี dot blot และ colony hybridization แต่ไม่พบพลาสมิดลูกผสมที่มี *groESL* operon จากนั้นทำการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี PCR พบพลาสมิดลูกผสมหลายโคลนที่ให้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 967 bp แต่เมื่อนำเชื้อที่มีพลาสมิดลูกผสมที่บรรจุ *groESL* operon มาเลี้ยงบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้ จึงทำให้ไม่สามารถแยกชิ้นโครโมโซมดีเอ็นเอที่มี *groESL* operon ได้ นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ด้านหน้าและด้านหลังของผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 967 bp ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามด้วยวิธี Inverse PCR แต่ไม่พบผลผลิต PCR ที่มีขนาดตามที่คาดไว้

TE 163927

Abstract

A major purpose of this study is to isolate a heat shock promoter of *groESL* operon from *Lactobacillus* sp. by using polymerase chain reaction (PCR) and characterize its activity using a promoter probe vector pMU1327*gfp*. pMU1327*gfp*, with Green Fluorescent Protein (GFP) as the reporter system, was constructed by insertion of a promoter-less *gfp* gene from plasmid pBC*gfp* into pMU1327, a shuttle vector for *E.coli* and Lactic Acid Bacteria. However, isolation of the *groESL* promoter using PCR is limited since there is no sequence upstream of the *groESL* promoter available in the GenBank for primer design. Therefore, the promoter sequence of the *groESL* operon needs to be characterized. Chromosomal DNA fragments containing the *groESL* operon then was identified by Southern Hybridization using a 967 bp homologous *groEL* probe generated by PCR. Southern blot analysis of *Lactobacillus bulgaricus* chromosomal DNA cleaved with *Hin*dIII produced 2 hybridizing bands of about 5.7 kb and 3.8 kb and a single band of about 2.9 kb when cleaved with *Kpn*I. Several attempts were made to clone the fragments into pUC18 and the transformants were screened by either dot blot and colony hybridization analysis. No positive clone was detected in all experiments. However positive clones were further detected by PCR analysis. Unfortunately, all positive cloned could not survive in selective media. As a consequence, the fragment containing *groESL* operon could not be isolated. Inverse PCR then was utilized to characterize the sequences upstream and downstream of a 967 bp PCR product. No PCR product of expected size was obtained.