ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อกรดของ *Bradyrhizobium japonicum* USDA110

ผู้เขียน นางสาวรุจิรา สุริยา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หทัยชนก เนียมทรัพย์

บทคัดย่อ

ดินเป็นกรดส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของแบคทีเรียในดินและการเกิดปมราก อย่างไรก็ตามมีแบคทีเรียที่ปมรากหลายชนิดสามารถเจริญในดินที่เป็นกรดรวมถึง *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 ซึ่งแบคทีเรียนี้สามารถอยู่รอดในอาหาร YM ที่พีเอชต่ำประมาณ 4.5 ได้ ยีน *lpiA* ใน *Sinorhizobium meliloti* WSM419 ถูกควบคุมให้มีการแสดงออกโดยพีเอชต่ำเท่านั้น ดังนั้นในการทดลองนี้ได้นำยีน *lpiA* มาเป็นแนวทางในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อกรดของ *B. japonicum* USDA110 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน lpiA ถูกนำไป blast กับฐานข้อมูลทั้งจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 มีโปรตีนหลายชนิดที่มีความคล้ายกับ lpiA โดยเลือกโปรตีน 7 ชนิดและนำมาเทียบเรียงกลุ่ม คู่ไพร์เมอร์ของ lpiA ถูกออกแบบจากส่วนลำดับเบสอนุรักษ์ที่ได้จากการเทียบเรียงคู่ระหว่าง blr1089 และ blr5867 ซึ่งเป็นลำดับเบสที่มีความเหมือนกันมากที่สุด

จีโนมิกดีเอ็นเอของ *B. japonicum* USDA110 ถูกนำมาเป็นแม่แบบสำหรับการทำพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ lpiA ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 500 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่คาดไว้ถูกทำให้บริสุทธิ์จาก agarose gel แล้วเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pTz57R/T ที่มีปลาย 3´ เป็นนิวคลีโอไทด์ไทมิดีนยื่น แล้วทำทรานสฟอร์เมชันเข้าสู่ *Escherichia coli* DH5α ดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดขึ้นสามารถตรวจสอบโดยใช้ blue-white selection และขนาดดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ตรวจสอบได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด แล้วนำไปหาลำดับเบส ดีเอ็นเอที่แทรกอยู่มีขนาดประมาณ 508 คู่เบส และมีความเหมือนกับ blr5867 ของ *B. japonicum* USDA110 อยู่ 99%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการสังเคราะห์ cDNA สายแรกโดยใช้อาร์เอ็นเอแม่แบบที่ไม่ได้กำจัดจีโนมิกดีเอ็นเอออกที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *B. japonicum* USDA110 ที่เลี้ยงในพีเอช 4.5 และ 6.8 โดยใช้ไพร์เมอร์ 16S rRNAF สำหรับยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (*16S rRNA*) และไพร์เมอร์ lpiAF สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อกรด (blr5867) หลังจากขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA ปฏิกิริยาที่ได้จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ DNase I เพื่อกำจัดจีโนมิกดีเอ็นเอ แล้วนำไปทำพีซีอาร์ด้วยคู่ไพร์เมอร์ 16S rRNA และ lpiA

ในกรณีของยีน *16S rRNA* ขนาดที่คาดไว้ คือ 1,480 คู่เบส ไม่เกิดขึ้นทั้งในพีเอช 4.5 และ 6.8 แต่ตรวจพบขนาดที่ไม่ได้คาดไว้ที่ 300 คู่เบส ที่ทั้งสองพีเอช ซึ่งอาจเกิดจากการที่ไม่มีอาร์เอ็นเอที่สมบูรณ์สำหรับการสังเคราะห์ cDNA ที่ต้องการ หรืออาจจะเป็นไปได้ว่าดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส เป็นส่วนหนึ่งในยีน *16S rRNA*

ในกรณีของ blr5867 ขนาดที่คาดไว้ประมาณ 500 คู่เบส ไม่สามารถตรวจพบได้หรือไม่มีการแสดงออกที่ทั้งสองพีเอช 4.5 และ 6.8 ทั้งนี้เนื่องจากความยาวของอาร์เอ็นเอของ blr5867 ที่สมบูรณ์ไม่เสถียรหรือมีปริมาณไม่เพียงพอ หรือ blr5867 เป็นดีเอ็นเอขยะที่เป็นเพียงส่วนหนึ่งของจีโนมที่ไม่สามารถแสดงออกไปเป็นยีนหรือโปรตีนได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Expression of a Gene Involving in Acid Tolerance of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110
Author	Miss Rujira Suriya
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Hataichanoke Niamsup

Abstract

Soil acidity affects the growth and survival of soil bacteria and the nodulation of legumes. However, various kinds of root nodule bacteria are able to grow in acidic soil including *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, which can survive in YM media at a pH as low as 4.5. The *lpiA* gene in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 is regulated specifically by pH, and is thus used a model to study the expression of a gene involving in acid tolerance of *B. japonicum* USDA110. The lpiA amino acid sequence was blasted with database of the whole genome of *B. japonicum* USDA110. More than one proteins were similar to lpiA, 7 proteins were selected and multiply aligned. The lpiA primer pair was designed from the conserved region of nucleotide pairwise alignment between the most similar sequence blr1089 and blr5867.

The genomic DNA of *B. japonicum* USDA110 was used as the template for PCR with lpiA primer pair. The PCR product of the expected size (500 bp) was purified from agarose gel and ligated to pTz57R/T vector having 3′ dT overhang at both ends and, subsequently transformed into *Escherichia. coli* DH5α. The recombinant clones were identified by blue-white selection and their insert sizes were confirmed by double restriction endonuclease digestion and were, subsequently, sequenced. The 508 bp nucleotide sequence of the insert showed 99% identity to blr5867 nucleotide sequence of *B. japonicum* USDA110.

RNA was isolated from *B. japonicum* USDA110 culture growing at pH 4.5 and 6.8. The first cDNA strands were synthesized using RNA template, in which genomic DNA had not been eliminated. The 16S rRNAF primer and lpiAF primer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

were used for cDNA synthesis of housekeeping gene (*16S rRNA*) and acid tolerance involving gene (blr5867), respectively. After the first strand synthesis, the cDNA preparation was digested with DNase I to eliminate contaminating genomic DNA, prior to PCR synthesis using primer pairs.

In the case of *16S rRNA* gene at both pH 4.5 and 6.8, the expected size of 1,480 bp was not observed, but unexpected product of 300 bp was detected. This result may be due to absence of intact RNA for synthesis of cDNA targets and alternatively this smaller product is a part of intergenic region of *16S rRNA* gene.

In the case of blr5867, the expected size of 500 bp was not detectable, presumably not expressed at both pH 4.5 and 6.8. It may possibly be explained that the full-length of blr5867 RNA was unstable or low abundant. It was suggested that the blr5867 may be a junk DNA, a portion of the genome which does not code genes or proteins.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved