การโคลนและการแสดงออกของยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส II จาก *Zymomonas mobilis* ใน *Rhodococcus opacus* *

Cloning and expression of alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis* in *Rhodococcus opacus*

ณภัค ชินชิราศัย **
กนกทิพย์ ภักดีบำรุง***

บทคัดย่อ

ยีนที่เข้ารหัสแอลกฮอล์ดีไฮโดรจิเนส II (*adhB*) จาก *Zymomonas mobilis* ได้ถูกโคลนเข้าสู่แบคทีเรีย *Rhodococcus opacus* ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่เป็นแหล่งของน้ำมัน การเตรียมเวคเตอร์สำหรับการแสดงออกของยีนทำโดยการแทรกโปรโมเตอร์ *tac* เข้าสู่ pNV18 ซึ่งเป็น shuttle plasmid ของ *Nocardia-Escherichia coli* จากการตรวจวัดแอกติวิตีของแอลกอฮฮล์ดีไฮโดรจีเนสในสารละลายเอนไซม์หยาบของรีคอมบิแนนต์ *R. opacus* โดยวิธีทางสเปกโทรโฟโทรเมทรีพบว่ามีค่าแอกติวิตีจำเพาะสูงกว่าที่มีรายงานใน *Z. mobilis* ประมาณ 7 เท่า การย้อมสีแอกติวิตีช่วยยืนยันว่ามีแอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนสจาก *Z. mobilis* ในรีคอมบิแนนต์โคลน

คำสำคัญ : ยีน *adhB*, แอลกอฮฮล์ดีไฮโดรจีเนส II, pNV18, *Rhodococcus opacus*

Abstract

Zymomonas mobilis alcohol dehydrogenase II gene (*adhB*) was cloned into*Rhodococcus opacus* PD630, a source of single cell oil. Expression vector was prepared by insertion of *tac* promoter into *Nocardia-Escherichia coli* shuttle plasmid pNV18. By spectrophotometric assay, crude extract of recombinant *R. opacus* possessed alcohol dehydrogenase specific activity about 7 fold of that reported in *Z. mobilis.* Activity staining also supported an existence of alcohol dehydrogenase from *Z. mobilis* in the recombinant clone.

Keywords: *adhB* gene, alcohol dehydrogenase II, pNV18, *Rhodococcus opacus*

---

* บทความนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิตของนางสาว ณภัค ชินชิราศัย

** นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย e-mail: fern_cu@hotmail.com

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย e-mail: kanoktip.p@chula.ac.th

บทนำ

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงดีเซลที่ได้จากน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ซึ่งจัดเป็นพลังงานทางเลือกที่สำคัญ เนื่องจากดีเซลที่ผลิตจากปิโตรเลียมมีปริมาณน้อยลงทุกวันทำให้ราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยทั่วไปการผลิตไบโอดีเซลทำได้โดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์กับแอลกอฮอล์สายสั้น ทำให้ได้มอนออัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน เช่น fatty acid methyl ester (FAME) และ fatty acid ethyl ester (FAEE) ดังนั้นการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรมจึงขึ้นกับสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพืชน้ำมัน

ในปีค.ศ. 2006 Kalscheuer และคณะ ได้ใช้เทคนิควิศวกรรมเมแทบอลิซึม (metabolic engineering) ปรับปรุงสายพันธุ์ *Escherichia coli* ให้สามารถผลิตไบโอดีเซลเพื่อที่จะพัฒนาเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกโดยการโคลนยีนไพรูเวทดีคาร์บอกซีเลส (pyruvate decarboxylase) และแอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) จาก *Zymomonas mobilis* และเอซิลทรานเฟอเรสที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรตต่ำ (unspecific acyltransferase) จาก *Acinetobacter baylyi* สายพันธุ์ ADP1 เข้าสู่ *E. coli* รีคอมบิแนนต์โคลนที่ได้สามารถผลิต FAEE ได้ถึง 1.28 กรัม/ ลิตร หรือ คิดเป็น 26% ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อทำการเลี้ยงแบบกะ (fed-batch fermentation) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดโอลีอิก(oleic acid) เป็นแหล่งของกรดไขมันภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition)

Rhodococcus opacus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสะสมน้ำมันในรูปของเอซิล กลีเซอรอล (acylglycerol) สูงถึง 76 % ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงภายใต้ภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด (Waltermann และคณะ, 2000) ดังนั้นเราจึงสนใจที่จะทำการสร้างวิถีการสังเคราะห์ไบโอดีเซลใน *Rhodococcus* โดยเทคนิควิศวกรรมเมแทบอลิซึม ทั้งนี้แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์หนึ่งในวิถีการสังเคราะห์แอลกอฮอล์ซึ่งเป็นสับสเตรตที่สำคัญสำหรับการสังเคราะห์ไบโอดีเซล ในงานวิจัยนี้เราได้ทำการโคลนและแสดงออกยีนที่เข้ารหัสแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส II (*adhB*) จาก *Z. mobilis* ใน *R. opacus*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทำการโคลนและการแสดงออกยีนที่เข้ารหัสแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส II จาก *Z. mobilis* ใน *R. opacus* โดยใช้ pNV18 ที่ถูกปรับปรุงให้มีโปรโมเตอร์ *tac* เป็นเวคเตอร์

วิธีการวิจัย

1. สายพันธุ์แบคทีเรีย พลาสมิด และการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่

- *E. coli* TOP10 เป็นเซลล์เจ้าเรือน (host) สำหรับการโคลนยีน *adhB* เมื่อใช้เวคเตอร์ **pGEM®-T Easy** (Promega) pMal-c2X (New England Biolabs) และ pNV18 ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก Jun Ishikawa (Chiba และคณะ, 2007)

- *Z. mobilis* เป็นแหล่งของยีน *adhB*

- *R. opacus* PD630 เป็นเซลล์เจ้าเรือนสำหรับการแสดงออกของยีน *adhB*

ทำการเลี้ยงเชื้อใน LB broth ที่ 37 องศาเซลเซียสสำหรับ *E. coli* หรือ 30 องศาเซลเซียสสำหรับ *R. opacus* และ *Z. mobilis* สำหรับการเลี้ยง *Z. mobilis* ต้องเสริมกลูโคส 2% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิด pGEM®-T Easy และ pMAL-c2X ทำในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับ pNV18 ใช้นีโอมัยซิน (neomycin) 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. เทคนิคทางดีเอ็นเอ (DNA manipulation)

เทคนิคทางดีเอ็นเอที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้แก่

2.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอใช้วิธีของ Frederick และคณะ (2002)

2.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอใช้ HiYield ™ Gel/PCR Fragments Extraction Kit (Real Biotech Corporation)

2.3 การย่อยดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ทำตามข้อแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

2.4 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase (Thermo Scientific)

2.5 การเติม 3’ A overhang ของยีน *adhB* ใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จากนั้นทำการเชื่อมยีน *adhB* กับ pGEM®-T Easy ด้วยเอนไซม์ไลเกส สำหรับไพรเมอร์และยีนที่ต้องการเพิ่มจำนวนแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ยีนที่ต้องการเพิ่มจำนวน
adhb forward	ATGGCTTCTTCATTTTATATTCC	ยีน *adhB* จากโครโมโซมัลดีเอ็นเอของ *Z. mobilis*
adhb reverse	TTAGAAAGCGCTCAGGAAGAGTTC	
NdeI_adhb_EcoRIF	GGAATTCCATATGGCTTCTTCAACTTTTTATATTCC	ยีน *adhB* จาก pGEM®-T Easy ที่มียีน *adhB* (pGem-*adhB*)
NdeI_adhb_EcoRIR	CGGAATTCTTAGAAAGCGCTCAGGAAG	
adhbEcoRI_ptacF	CGGAATTCCGCCGACATCATAACGG	โปรโมเตอร์ *tac* และยีน *adhB* จาก pMAL-c2X (pMAl-*adhB*)
adhb_KpnIR	GGGGTACCTTAGAAAGCGCTCAGGAAG	

*เส้นใต้แสดงตำแหน่งจดจำของเรสทริกชันเอนไซม์

2.6 การทำอิเลคโทรพอเรชัน (electroporation) ใช้เครื่อง Micropulser (Biorad) โดยทำในelectrocuvette ที่มีช่องว่างถึง (gap) 2 มิลลิเมตร กำหนดค่าความต่างศักย์ 1.8 กิโลโวลต์/เซนติเมตรสำหรับ *E. coli* และ 10 กิโลโวลต์/ เซนติเมตร สำหรับ *R. opacus* เวลาคงที่ 4-5 X 10^{-3} วินาที

3. การแสดงออกของยีน *adhB* ใน *R. opacus*

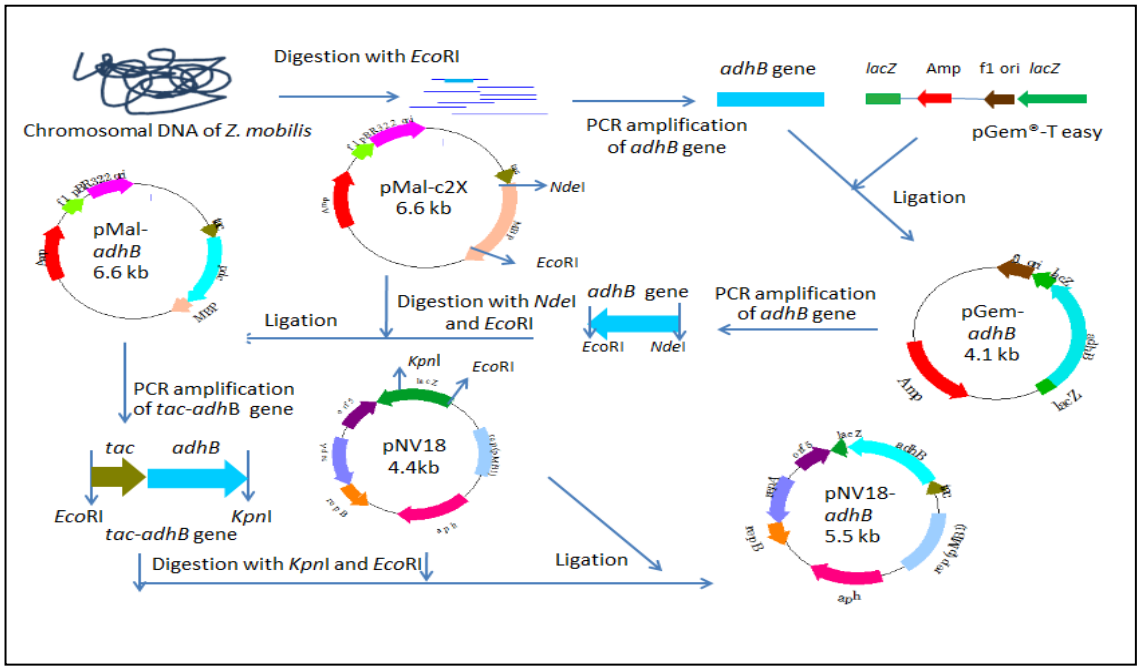
ทำการเลี้ยง *R . opacus* ที่ได้รับยีน *adhB* ในภาวะต่างๆ จากนั้นทำการเซนตริฟิวจ์เพื่อเก็บเซลล์ ล้างเซลล์ และกระจายเซลล์ในสารละลาย potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4 ที่มี phenyl methyl sulfonyl fluoride ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ French press ที่ความดัน 12,000 ปอนด์/ลูกบาศก์เมตร 7 รอบ ทำการเซนตริฟิวจ์เพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่ถูกทำลายและเศษเซลล์ เก็บสารละลายเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ที่ 4 องศาเซลเซียส

4. การวัดแอกติวิตีของแอลกอฮอลล์ดีไฮโดรจีเนส ทำการวัดแอกติวิตีในการออกซิไดซ์เอทานอลด้วยเทคนิคทางสเปกโตรโฟโทเมทรี โดยในสารละลายปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตรประกอบด้วย Glycine-KCl-KOH, pH 10.5 200 ไมโครโมล NAD^+ 1 ไมโครโมล absolute ethanol 200 ไมโครลิตรกับสารละลายเอนไซม์หยาบ ทำการบ่มปฏิกิริยาใน cuvette ที่มีช่องแสง 1 เซนติเมตรที่ 30 องศาเซลเซียส วัดการเปลี่ยนแปลงเริ่มต้นของการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที กำหนดให้เอนไซม์ 1 ยูนิต คือปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถผลิต NADH 1 ไมโครโมลใน 1 นาที ทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

5. การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ (non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis)

นำสารละลายเอนไซม์ไปทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ ตามวิธีของ Laemmli (1970) จากนั้นนำเจลที่ได้มาย้อมสีแอกติวิตีในสารละลายปฏิกิริยา 10 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย absolute ethanol 1 มิลลิลิตร nitroblue tetrazolium 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร phenazine methylsulfate 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร potassium phosphate buffer, pH 7.0 0.5 โมลาร์ และ NAD^+ 50 มิลลิโมลาร์ จนปรากฏสีม่วง หยุดปฏิกิริยาโดยนำเจลไปล้างในน้ำกลั่น

ทำการย้อมสีโปรตีนในสารละลายที่ประกอบด้วย Coomasie blue R-250 1% เมทานอล 45% และ glacial acetic acid 10% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเมทานอล 10% และ glacial acetic acid 10%



รูปที่ 1 แผนผังขั้นตอนการโคลนยีน *adhB*

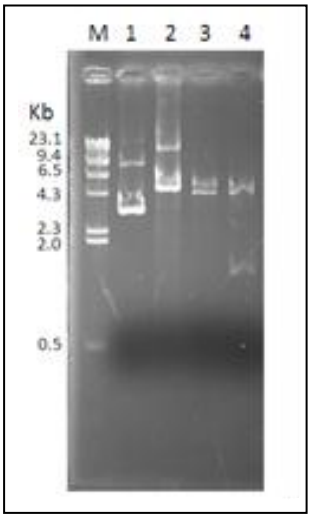
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การโคลนยีน *adhB*

การโคลนและแสดงออกของยีน *adhB* จาก *Z. mobilis* ใน *R. opacus* PD 630 เริ่มโดยการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน *adhB* จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Z. mobilis* จากนั้นโคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEM®-T Easy ดังแสดงในรูปที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนที่ได้มีความเหมือน (similarity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *adhB* จาก *Z. mobilis* ในฐานข้อมูล GenBank (AB359062.1) 99% โดยมีความแตกต่างของกรดอะมิโน 1 ตำแหน่งคือ Leu18 ของ M15394 ถูกแทนที่ด้วย Pro โดยทั่วไปในขั้นตอนต่อไปควรเป็นการ subclone ยีน *adhB* จาก pGEM®-T Easy เข้าสู่ expression vector สำหรับ *R. opacus* แต่เนื่องจากมีรายงานเกี่ยวกับเวคเตอร์สำหรับ *Rhodococcus* น้อยมาก ในจำนวนนี้ได้กล่าวถึง pNV18 ซึ่งเป็น shuttle vector ของ *Nocardia-E. coli* ประกอบด้วย multiple cloning site ยีน *lac Z* สำหรับการคัดเลือกโคลน *E. coli* ที่ได้รับยีนที่แทรก ยีน *aph* ซึ่งต้านยาปฏิชีวนะคานามัยซินและนีโอมัยซิน (Chiba และคณะ, 2007) นอกจากแบคทีเรียในจีนัส *Nocardia* แล้วยังสามารถใช้ pNV 18 กับจีนัส *Rhodococcus* และ *Dietria* ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม pNV18 เป็นเพียงเวคเตอร์ที่ใช้ในการโคลน (cloning vector) และไม่มีส่วนของโปรโมเตอร์ ในปี 2012 Xiang และคณะ ได้ทำการพัฒนา expression vector สำหรับ *R. opacus* โดยการแทรกโปรโมเตอร์ *tac* เข้าไปใน pNV18

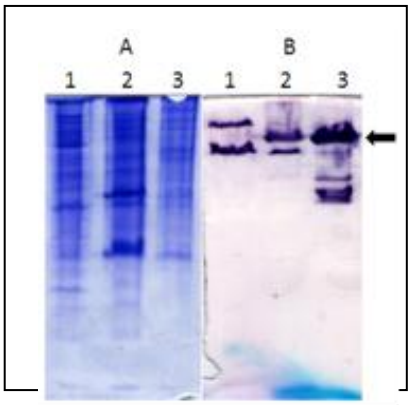
งานวิจัยนี้ได้ทำการ subclone ยีน *adhB* เข้าสู่ pMAL-c2X ภายใต้โปรโมเตอร์ *tac* แล้วทำการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน *tac-adhB* แล้ว subclone เข้าสู่ pNV 18 (รูปที่1) ทำการยืนยันว่ามียีน *adhB* แทรกอยู่ใน pNV18 โดยทำการย่อยพลาสมิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (รูปที่ 2) ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดก่อนหน้านี้ทำในเซลล์ของ *E. coli* จากนั้นทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสม pNV18 ซึ่งมียีน *adhB* เข้าสู่ *R. opacus* PD630

การแสดงออกของยีน *adhB* ใน *R. opacus* PD630 ทำการเลี้ยงรีคอมบิแนนต์โคลนของ *R. opacus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีนีโอมัยซิน 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จนได้ค่า OD 600 ประมาณ 0.6 จึงทำการเติม IPTG เพื่อเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าสามารถตรวจพบแอกติวิตีของแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในสารละลายเอนไซม์หยาบด้วยวิธีทางสเปคโทรโฟโทเมทรีเฉพาะภาวะที่เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG 0.8 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 12 ชั่วโมงเท่านั้น โดยมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 7.2 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าแอกติวิตีจำเพาะของ *Z. mobilis* ประมาณ 7 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ (Kinoshita และคณะ, 1995) ในปี 1994 Barbosa และ Ingram ได้ทำการโคลนยีน *adhB* จาก *Z. mobilis* เข้าสู่ *E. coli* DH5α และ *Bacillus subtilis* YB886 และพบว่าระดับการแสดงออกของยีนในแบคทีเรียทั้งสองต่ำมาก โดยให้แอกติวิตีจำเพาะของแอลกอฮอลล์ดีไฮโดรจีเนส ต่ำกว่า 0.01 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน



รูปที่ 2 รูปแบบของ pNV18-*adhB* เมื่อย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์: ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*dIII ช่อง 1 pNV18, ช่อง 2 pNV18-*adhB*, ช่อง 3 pNV18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI/*Kpn*I และช่อง 4 pNV18-*adhB* ที่ย่อยด้วย *Eco*RI และ *Kp*nI

เมื่อทำการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนในสารละลายเอนไซม์หยาบโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพแล้วทำการย้อมสีแอกติวิตี สามารถตรวจพบแถบแอกติวิตีของแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส จาก *Z. mobilis* ในสารละลายเอนไซม์หยาบจากรีคอมบิแนนต์ *R. opacus* (รูปที่ 3B) อย่างไรก็ตามไม่พบแถบของโปรตีนที่แตกต่างจากของ *R .opacus* ในบริเวณที่พบแถบแอกติวิตี (รูปที่ 3A) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลของ Barbosa และ Ingram (1994) ที่ไม่สามารถตรวจพบแถบของแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเมื่อย้อมเจลด้วย Coomasie blue เช่นกัน



รูปที่ 3 พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ A : การย้อมสี Coomassie blue B: การย้อมสีแอกติวิตีของแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ช่อง 1 สารละลายเอนไซม์หยาบของ *R. opacus* PD 630 ช่อง 2 สารละลายเอนไซม์หยาบของรีคอมบิแนนต์ *R. opacus* ที่มียีน *adhB* จาก *Z. mobilis* ช่อง 3 สารละลายเอนไซม์หยาบของ *Z. mobilis*

สรุปผลการทดลอง

ยีน *adhB* ซึ่งเข้ารหัสให้แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส II จาก *Z. mobilis* ได้ถูกโคลนและแสดงออกใน *R. opacus* PD 630 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณน้ำมันภายในเซลล์สูงมาก ผลการทดลองนี้นับเป็นก้าวแรกสำหรับการทำวิศวกรรมเมแทบอลิซึมเพื่อให้เกิดวิถีการสังเคราะห์ไบโอดีเซลใน ***Rhodococcus***

เอกสารอ้างอิง

Barbosa, Maria, and Ingram, Lonnie. "Expression of the *Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase II (*adhB*) and pyruvate decarboxylase (*pdc*) genes in *Bacillus*." Current Microbiology, no. 28 (1994): 279-282.

Chiba, Kazuhiro et al."Construction of a pair of practical *Nocardia-Escherichia coli* shuttle vectors."Japanese Journal of Infectious Diseases, no. 60 (2007): 45-47.

Frederick, Ausubel et al. Short protocols in molecular biology. 5th ed. United states: John Wiley & Sons, 2002

Kalscheuer, Rainer, Torsten Stolting, and Alexader Steinbuchel. "Microdiesel: *Escherichia coli* for fuel production." Microbiology, no. 152 (2006): 2529–2536.

Kinoshita, Shinich et al. "Purification of two alcohol dehydrogenases from *Zymomonas mobilis* their properties." Applied Microbiology and Biotechnology, no 22 (1985): 249-254.

Laemmli, Ulrich "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature, no. 227 (1970): 680–685.

Lowry, Oliver et al. "Protein measurement with the folin phenol reagent." The Journal of Biological Chemistry, no. 193 (1951): 265-275.

McLeod, Michael et al. "The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse." Proceeding of the National Academy of Sciences, no 103 (2006): 15582–15587.

Waltermann, Marc et al."*Rhodococcus opacus* strain PD630 as a new source of high-value single-cell oil? Isolation and characterization of triacylglycerols and other storage lipids." Microbiology, no 146 (2000): 1143–1149.

Xiong, Xiaochao, Wang Xi, and Chen Shulin. "Engineering xylose metabolic pathway in *Rhodococcus* strains." Applied and Environmental Microbiology, no. 78 (2012): 5483-5491.