

รหัสโครงการ : MRG4780019

ชื่อโครงการ : การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดขนาดเล็กจาก *Lactobacillus* sp. ที่มีบทบาทในอาหารหมักของไทยและการศึกษายีนที่ต้านทานโลหะหนัก

ชื่อนักวิจัย : นางสาวนงพงา คุณจักร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

E-mail Address : naongpanga.khu@kmutt.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

Abstract

The aim of this work was to isolate a small cryptic plasmid from *Lactobacillus* isolated from food samples to be used as a food grade cloning vector for *Lactobacilli* and related strains. Metal resistance determinants, such as nickel, copper and cadmium from lactic acid bacteria were also studied in order to use those resistance genes as food grade selection markers to replace antibiotic resistance markers. A total of 174 *Lactobacillus* strains were isolated from food samples. One isolate from Nham identified as *Lactobacillus plantarum* (designated *L. plantarum* KM1) was chosen as it contains small plasmid. A small 3-kilobase plasmid namely pKM1 was isolated from *L. plantarum* KM 1 for sequencing. Sequence analysis revealed two open reading frames (ORFs). The deduced amino acid sequence encoded by ORF1 and ORF2 showed high degrees of sequence homology to the Mob and Rep proteins, respectively, of a numbers of rolling circle plasmids from lactic acid bacteria such as pLC88, pRS4, pF8801, pWCFS101 and pRS4. Two conserved sequences of *dso* (double strand origin) and *sso* (single strand origin) characteristic of rolling circle plasmid were also identified upstream of ORF2. Therefore, pKM1 from *L. plantarum* KM1 could be classified as rolling circle type plasmid that can be used to construct a cloning vector for *Lactobacilli*. Screening of metal ion resistance lactic acid bacteria was carried out and the results showed that 61, 45 and 12 isolates could resistance to copper sulfate, nickel sulfate and cadmium chloride to up to 20, 200 and 1 mM, respectively. Plasmid curing using novobiocin and high temperature was failed to identify plasmid harboring metal resistance determinants. The genes responsible for cadmium resistance therefore were identified by PCR using primers specific to *cadA* gene. About 600 bp PCR products were obtained and subjected to direct sequencing analysis. A homology search revealed sequence similarity to *cadA* gene on plasmids pGdh 442, pNP40, pAH82, pAG6, pND302 and pLI100 from a number of lactic acid bacteria. Southern hybridization *cadA* specific probe was carried out to localize cadmium resistance determinants plasmids. Positive signals were detected from 3 isolates C53, V13 and NU1.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, cadmium resistance, rolling circle plasmid, Mob and RepA proteins, plasmid curing

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแยกพลาสมิดขนาดเล็กจากเชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารเพื่อนำมาพัฒนาใช้เป็นเวกเตอร์ชนิดที่เป็น food grade ที่ใช้ในการโคลนยีนสำหรับเชื้อ *Lactobacillus* และเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียง นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาในที่ควบคุมการต้านทานโลหะหนักจากแบคทีเรียแลคติก เพื่อนำมาใช้เป็นยีน selection markers ทดแทนยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ ได้ทำการแยกเชื้อ *Lactobacillus* จากตัวอย่างอาหารได้ 174 ไอโซเลต จากการศึกษาารูปแบบของพลาสมิด (plasmid profile) ได้เลือกเชื้อที่มีพลาสมิดขนาดเล็กซึ่งแยกได้จากนม และจัดจำแนกเชื้อได้เป็น *Lactobacillus plantarum* โดยให้ชื่อว่า *L. plantarum* KM1 ทำการแยกพลาสมิดขนาดประมาณ 3.0 กิโลเบส และให้ชื่อพลาสมิดว่า pKM1 จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบ open reading frame 2 ชนิด ซึ่งเมื่อศึกษาลำดับกรดอะมิโนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ORF1 และ ORF2 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายโปรตีน mobilization (Mob) และ replication (RepA) ตามลำดับ โดยมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีนที่พบบนพลาสมิดที่มีการจำลองตัวเองแบบ rolling circle จากแบคทีเรียแลคติกหลายชนิดเช่น พลาสมิด pLC88, pRS4, pF8801, pWCFS101 และ pRS4 นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งที่เรียกว่า double strand origin (dso) และ single strand origin (sso) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของพลาสมิดที่มีการจำลองตัวเองแบบ rolling circle ดังนั้นพลาสมิด pKM1 จึงจัดเป็นพลาสมิดชนิด rolling circle และจากการที่พลาสมิด pKM1 มีตำแหน่งที่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถใช้ในการตัดต่อยีนได้จึงสามารถนำมาพัฒนาสร้างเป็นเวกเตอร์สำหรับการโคลนยีนสำหรับ *Lactobacillus* ได้

จากการคัดเลือกเชื้อที่ต้านทานโลหะหนักพบเชื้อสามารถต้านทานนิกเกิล 20 mM คอปเปอร์ 200 mM และแคดเมียม 1 mM จำนวน 61, 45 และ 12 ไอโซเลต ตามลำดับ การทำ plasmid curing โดยใช้สาร novobiocin ร่วมกับการใช้อุณหภูมิสูงไม่สามารถแยกชั้นพลาสมิดที่มียีนควบคุมการต้านทานโลหะหนักได้ การศึกษายีนต้านทานแคดเมียมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *cadA* ซึ่งควบคุมการต้านทานแคดเมียมพบว่าสามารถแยกชั้นดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 600 คู่เบสจากการใช้พลาสมิดและโครโมโซมเป็นแม่แบบ และจากการศึกษาลำดับเบสบนผลผลิต PCR พบว่าคล้ายกับยีน *cadA* บนพลาสมิดหลายชนิดจากแบคทีเรียแลคติก ได้แก่พลาสมิด pGdh 442, pNP40, pAH82, pAG6, pND302 และ pLI100 การหาชั้นของพลาสมิดที่มียีนควบคุมการต้านทานแคดเมียมโดยวิธี Southern hybridization โดยใช้โพรบที่จำเพาะกับยีน *cadA* และ *cadC* พบพลาสมิดจากเชื้อ V13, C53 และ NU1 ที่มียีนต้านทานแคดเมียมคล้ายกับยีน *cadA*

คำสำคัญ: *Lactobacillus plantarum*, การต้านทานแคดเมียม, พลาสมิด rolling circle, โปรตีน Mob และ RepA, plasmid curing