

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การแยกและศึกษาคุณลักษณะของโปรโมเตอร์ของไซยาโนแบคทีเรีย
Synechococcus PCC7942

**Isolation and Characterization of Promoters of
Cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942**

หัวหน้าโครงการวิจัย: ผศ. ดร. วิภา จิงจตุพรชัย
สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

สนับสนุนโดย
สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การแยกและศึกษาคูณลักษณะของโปรโมเตอร์ของไซยาโนแบคทีเรีย
Synechococcus PCC7942

**Isolation and Characterization of Promoters of
Cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942**

หัวหน้าโครงการวิจัย: ผศ. ดร. วิภา จีงจตุพรชัย
สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

สนับสนุนโดย
สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุนพัฒนานักวิจัย สำนักงานสนับสนุนการวิจัย (สกว) ในระหว่าง กันยายน 2538- สิงหาคม 2541 ขอขอบคุณ ศ.ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยอย่างดียิ่งตลอดมา ขอขอบคุณ คุณเพ็ชรินทร์ แพ้เรือง และ คุณชนิกานต์ บุญช่วย สำหรับ Technical assistance

อนึ่งทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ มีส่วนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยดังกล่าวของนักศึกษาปริญญาโท สาขาอนุพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์ จำนวน 3 คน ได้แก่ นายธนเศรษฐ์ เสนาวงศ์ น.ส. มัจฉรี จุโลทก และ น.ส. ศิริรัตน์ ฟ้ารุ่งอรุณ นับว่าได้มีส่วนช่วยเสริมสร้างความเข้มแข็งให้แก่การวิจัยอย่างยิ่ง ผู้วิจัยขอขอบคุณ สกว มา ณ โอกาสนี้ด้วย

บทคัดย่อ

เมื่อเรารู้ว่าการใช้ไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเป็นเจ้าบ้านในการสร้างโปรตีนต่างๆเช่นโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงของ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* และ *Bacillus sphaericus* เพื่อใช้ควบคุมประชากรลูกน้ำยุง สร้างฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของปลาแซลมอน (salmon growth hormone) เป็นต้น อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในไซยาโนแบคทีเรียยังอยู่ระดับต่ำกว่าใน *E. coli* วิธีหนึ่งที่จะเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนก็โดยการใช้ endogenous strong promoter อย่างไรก็ตามความรู้เกี่ยวกับลักษณะของโปรโมเตอร์ของไซยาโนแบคทีเรียมีย่น้อยมาก

ในโครงการวิจัยนี้จึงใช้ *Synechococcus* PCC7942 เป็น model system เพื่อที่จะศึกษาคุณลักษณะโปรโมเตอร์ของไซยาโนแบคทีเรีย ได้สร้าง promoter-probe shuttle vector ชื่อ pKG ซึ่งมียีน promoterless β -glucuronidase (GUS) จาก *E. coli* เพื่อใช้เป็นยีนรายงาน (reporter gene) ในการแยกชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์โดย transcriptional gene fusion กับยีน GUS จาก transformant จำนวน 640 clones มี 2.3% และ 3.9% ที่มีระดับ GUS activity สูงและต่ำตามลำดับ มี clone เพียง 10% ที่มี GUS activity ใน *E. coli* ด้วย

ชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ E3, E4, D13 และ D21 สามารถทำงานได้ทั้งใน *E. coli* และ *Synechococcus* ส่วน E8, E10 และ E14 สามารถทำงานใน *Synechococcus* แต่ไม่ทำงานใน *E. coli* E3 ทำงานในเซลล์ *Synechococcus* ได้ดีกว่าโปรโมเตอร์ λP_R ในขณะที่ E10 และ E14 ทำงานได้ในระดับที่ใกล้เคียงกับโปรโมเตอร์ λP_R ความเข้มของแสงมีผลกระทบต่อแสดงออกของ E10

ได้วิเคราะห์หาจุดตั้งต้นของ transcript ของ D13, D21, E14 และ E3 พบว่าจุดตั้งต้นของ major transcript ของ D13 ใน *Synechococcus* อยู่ในบริเวณเดียวกันกับใน *E. coli* และพบ inferred -10 (TAAACT) และ -35 (TTGTAG) regions ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ *E. coli* σ^{70} promoter จุดตั้งต้นของ major transcript ของ D21 ใน *E. coli* จะแตกต่างจากใน *Synechococcus* และพบ inferred -10 (TAAGCT) และ -35 (TTAATG) region ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ *E. coli* σ^{70} promoter ส่วนใน *Synechococcus* พบ inferred -10 (TACCAA) แต่ไม่พบ -35 region กรณีของ E3 ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ที่ทำงานได้ดีที่สุดพบว่าจุดตั้งต้นของ major transcript ใน *Synechococcus* อยู่ในบริเวณเดียวกันกับใน *E. coli* บริเวณ upstream เป็นยีน tRNA^{pro} (GGG) ซึ่งมีสองบริเวณที่ strong homology กับ major promoter elements ในยีน eukaryotic tRNA แต่ไม่พบลักษณะโปรโมเตอร์ที่คล้ายกับของ *E. coli* ดังนั้นยีน tRNA^{pro} สามารถทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์

งานวิจัยนี้ได้ค้นคว้าเอ็นเอโปรโมเตอร์ที่แข็งแกร่ง (strong) หลายอันซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการสร้างโปรตีนต่างๆ โดยใช้ *Synechococcus* เป็นเจ้าบ้าน การวิจัยวิเคราะห์ต่อไปจะนำไปสู่ความเข้าใจในลักษณะของ strong promoter ของ *Synechococcus* เนื่องจากโปรโมเตอร์ส่วนใหญ่ที่แยกได้ไม่สามารถ recognized โดย sigma factors ใน σ^{70} class หากใช้โปรโมเตอร์เหล่านี้เป็น DNA templates ก็จะสามารถตรวจหา sigma factors ต่างๆที่ยังไม่มีการศึกษามาก่อน

Abstract

Recently, cyanobacteria or 'blue green algae' have been used as hosts to express several heterologous genes. For example, attempts have been made to express the mosquitocidal protein genes of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in order to provide an alternative biological insecticide for control of mosquito populations. They have also been used in the expression of salmon growth hormone gene in order to produce a feed additive for fish. However, the level of heterologous gene expression in cyanobacteria is very low when compared with that in *E. coli*. A possibility to improve the gene expression is to use an endogenous strong promoter. However, little is known about what is the promoter sequence in cyanobacteria.

In order to find out what is the promoter sequence of cyanobacteria, *Synechococcus* PCC7942 was used as a model system in this study. A promoter probe shuttle vector, pKG containing the promoterless β -glucuronidase (GUS) gene from *E. coli* which was used as a reporter gene, was constructed. Promoter-active fragments of *Synechococcus* PCC7942 were isolated by transcriptional gene fusion to the promoterless GUS gene. 2.3% and 3.9% of the 640 *Synechococcus* transformants expressed high and low GUS activity respectively. Only 10% of these clones could also express GUS in *E. coli*. Several of isolated promoters expressed GUS activity comparable with that of the λP_R strong promoter.

Promoter-active fragments E3, E4, D13 and D21 were active in both *Synechococcus* and *E. coli*. E8, E10 and E14 were active only in *Synechococcus* but not active in *E. coli*. In *Synechococcus*, E3 was stronger than the λP_R promoter, whereas E10 and E14 were of similar strength. We also observed that light intensity affected expression of E10.

The transcription initiation sites of D13, D21, E14 and E3, were identified. The major transcription initiation site of D13 in *Synechococcus* were located within a few nucleotides identical to those *E. coli*. The inferred -10 and -35 regions of D13 were TAAACT and TTGTAG respectively which conformed to the *E. coli* σ^{70} promoter. The major transcription initiation site of D21 in *E. coli* was different from that in *Synechococcus*. In *E. coli*, The inferred -10 and -35 regions of D21 were TAAGCT and TTAATG respectively which conformed to the *E. coli* σ^{70} promoter. Whereas, in *Synechococcus*, The inferred -10 region, TACCAA, were found but not the -35 region. Similar results were observed that upstream of transcription initiation site of the E14, the inferred -10 region TAGCAT was found, but not the -35 region. In case of the strongest promoter-active fragment E3, the major transcription initiation site in *Synechococcus* were located within a few nucleotides identical to those *E. coli*. Immediately upstream of the E3-GUS transcription initiation sites was tRNA^{pro} (GGG) gene, which contained two regions exhibiting strong homology to the major promoter elements in eukaryotic tRNA genes but did not contain *E. coli* promoter element. Thus the tRNA^{pro} gene can act as a promoter.

Several isolated strong promoters from this study could be useful for high expression of heterologous genes in *Synechococcus*. Further analysis of these promoters could elucidate the characteristics of strong promoter in *Synechococcus*. The majority of the isolated promoters did not function in *E. coli*, which indicated that the promoters were not recognized by sigma factors of σ^{70} class. These promoters could be used as DNA templates to probe for other uncharacterized sigma factors in *Synechococcus*.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	7
วิธีการทดลอง	9
ผลการทดลอง	12
บทวิจารณ์	16
หนังสืออ้างอิง	18
ตารางที่ 1-2	21-22
รูปที่ 1-17	23-37
Out put ที่ได้	38
ภาคผนวก	39-68
รายงานการเงิน	69-74

บทนำ

ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (blue green alga) เป็นจุลินทรีย์ prokaryote ที่สามารถสังเคราะห์แสงโดยมี thylakoid apparatus คล้ายกับ Chloroplast ของพืช จึงนิยมใช้ไซยาโนแบคทีเรียเป็น model system เพื่อการศึกษากลไกในการสังเคราะห์แสง ในระดับอนุซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจในกลไกดังกล่าวของพืช มีการแยก (isolate) ยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของไซยาโนแบคทีเรีย เพื่อศึกษาการแสดงออก (express) ของยีนดังกล่าวโดยใช้ *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นเจ้าบ้าน (host) แต่ในทางกลับกันการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยใช้ไซยาโนแบคทีเรียเป็นเจ้าบ้านยังอยู่ในระยะเริ่มต้น จึงมีความรู้ความเข้าใจในกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆในไซยาโนแบคทีเรียน้อยมาก

ปัจจุบันมีความสนใจเป็นอันมากที่จะใช้ไซยาโนแบคทีเรียเป็นเจ้าบ้าน เพื่อผลิตโปรตีนต่างๆที่มีประโยชน์ทางเศรษฐกิจ เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์แสง จึงเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะอากาศร้อนชื้น (เช่นประเทศไทย) และอาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาถูกเมื่อเทียบกับที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ตัวอย่างเช่น มีการใช้ไซยาโนแบคทีเรียเป็นเจ้าบ้านในการสร้างโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงจาก *Bacillus sphaericus* และ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* เพื่อใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุง (de Marsac et al., 1987; Angsuthanasombat and Panyim, 1989; Cahungjatupornchai, 1990) ใช้เป็นเจ้าบ้านสร้างฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต (growth hormone) จากปลาซลมอนเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมในการเร่งการเจริญเติบโตของปลา (Kawata et al., 1991) หรือใช้เป็นเจ้าบ้านในการสร้าง ethylene-forming enzyme เพื่อใช้ CO_2 ในอากาศเป็น substrate (Fukuda et al., 1994) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม heterologous gene สามารถแสดงออกในไซยาโนแบคทีเรียในระดับที่ต่ำมาก เมื่อเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของยีนเดียวกันใน *E. coli* (Chungjatupornchai et al., 1988; Chungjatupornchai, 1990) การที่จะปรับปรุงให้ heterologous gene ให้สามารถแสดงออกได้ดีในเจ้าบ้านไซยาโนแบคทีเรียนั้น หนึ่งในหลายปัจจัยที่สำคัญคือการใช้โปรโมเตอร์ที่แข็งแรงของไซยาโนแบคทีเรีย (endogenous strong promoter) แต่ในปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับโครงสร้าง (structure) และหน้าที่ของโปรโมเตอร์ในไซยาโนแบคทีเรียยังจำกัด แม้ว่าไซยาโนแบคทีเรียจะถูกจำแนกอยู่ในกลุ่ม eubacteria (Giovannoni et al., 1988) แต่ก็มี RNA polymerase holoenzyme ที่มีลักษณะพิเศษกล่าวคือ นอกจากจะมี $\alpha 2 \beta \beta' \sigma$ ซึ่งพบใน eubacteria อื่นๆแล้วยังมี γ subunit ด้วย (Schneider and Haselkorn, 1988)

ผลการวิจัย (Chungjatupornchai and Panyim, 1994) พบว่าโปรโมเตอร์บางตัวที่แข็งแรง (strong) ใน *E. coli* อาจเป็นโปรโมเตอร์ที่อ่อนแอ (weak) ในไซยาโนแบคทีเรีย จึงเป็นการบ่งชี้ว่าโปรโมเตอร์ของไซยาโนแบคทีเรียน่าจะมีลักษณะแตกต่างจากที่พบใน *E. coli* นอกจากนี้ยังได้พบ

ว่าโปรโมเตอร์ *psbA* จาก chloroplast genome ของพืชสาหร่าย (Sugita & Sugiura, 1984) ซึ่งสามารถควบคุมการแสดงออกของยีน *cry IVB* ของ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* ได้ค่อนข้างดีในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* PCC6803 แต่เป็นโปรโมเตอร์ที่อ่อนแอใน *Synechococcus* PCC7942 (Chungjatupornchai and Panyim, 1994) ซึ่งเป็นการบ่งชี้โปรโมเตอร์ของไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิดต่างกัน การที่ไม่พบลักษณะร่วมของลำดับเบส (consensus sequences) ในโปรโมเตอร์ของยีนต่างๆ ที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรียหลาย strains ดังที่ได้พบใน eubacteria อื่นๆ นั้น อาจเกิดจากความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจาก taxonomy ของไซยาโนแบคทีเรียยังอยู่ในลักษณะที่สับสน เพราะจำแนกตามลักษณะ morphology และการแบ่งตัว เมื่อดู GC content ของจีโนมจะพบช่วงตั้งแต่ 35% ถึง 71% (Rippka, 1988) ซึ่งเป็นช่วงที่กว้างมากอาจเทียบเท่ากับทั้ง kingdom ของแบคทีเรีย

โครงการวิจัยนี้ได้เลือกไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว (unicellular) *Synechococcus* PCC7942 (เดิมชื่อ *Anacystis nidulans* R2, Pasteur Culture collection no. 7942) เพื่อแยกและศึกษาคุณลักษณะของโปรโมเตอร์ เนื่องจากเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่ได้มีการศึกษาทางพันธุกรรมและสรีรวิทยาค่อนข้างมากทั้งยังสามารถ transform ได้

ยีนรายงาน (reporter gene) หลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในไซยาโนแบคทีเรีย ยกตัวอย่างเช่นยีนรายงาน *cat* (Friedberg and Seijffer, 1986) *lacZ* (Scanian et al., 1990) และ *galK* (Milkowski and Quinones, 1991) ได้นำมาใช้แยกโปรโมเตอร์ *luxAB* (Elhai, 1993) ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน นอกจากนี้ได้มีการนำ β -glucuronidase (GUS) จาก *E.coli* นำมาใช้เป็นยีนรายงานในพืช สัตว์ และนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนในไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจาก GUS เป็นโปรตีนที่เสถียร (stable) สามารถทำงานในช่วง pH ที่กว้าง (pH 5.0-7.5) ทนต่อความร้อนที่ 50°C

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาข้อมูลพื้นฐานในระดับอนุของโปรโมเตอร์ต่างๆของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC7942 เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจในกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในไซยาโนแบคทีเรีย ดังนี้

1. แยกจีโนมของไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์ โดยใช้ยีน β -glucuronidase (GUS) เป็นยีนรายงาน
2. ศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลักษณะลำดับเบสในโปรโมเตอร์กับระดับการควบคุมการแสดงออกของยีน GUS
3. วิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลลักษณะ โปรโมเตอร์ที่ได้กับฐานข้อมูล

วิธีการทดลอง

จุลชีพและสภาวะที่ใช้เลี้ยง

เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC7942 strain R2-SPc ซึ่งปราศจากพลาสมิดขนาดเล็ก pUH24 (Kuhlemeier et al., 1983) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11 ชนิดเหลว หรือแข็ง (เติม 1% Difco Bacto agar) ตามที่มีผู้อธิบายไว้แล้ว (William, 1988) ส่วน *E. coli* strain MC1061 (Casadaban and cohen, 1980) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลวหรือแข็งดังในรายงาน (Sambrook et al., 1989)

การสร้างพลาสมิด

พลาสมิด pUC303 ซึ่งเป็น shuttle vector สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน *Synechococcus* PCC7942 และ *E. coli* ได้สร้างไว้ก่อนแล้ว (Kuhlemeier et al., 1983) (รูปที่ 1A) เพื่อสร้าง promoter-probe vector ในงานวิจัยนี้จึงได้ปรับปรุงพลาสมิด pUC303 โดยแทนที่ชิ้นดีเอ็นเอ SacI-XhoI ซึ่งมียีนคือต่อ streptomycin ด้วยชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.2 kb ซึ่งมียีนคือต่อ kanamycin จาก Tn903 (Vieira and Messing, 1982) แทนที่ชิ้นดีเอ็นเอ SalI-EcoRI ซึ่งมียีนคือต่อ chloramphenical ด้วยชิ้นดีเอ็นเอ 2.2 kb ซึ่งมียีน GUS ที่ปราศจากโปรโมเตอร์ และมี nopaline synthase terminator (Nos-ter) (Jefferson et al., 1987) ผลที่ได้ก็คือ promoter-probe shuttle vector pKG (รูปที่ 1B) ซึ่งมีขนาด 9.6 kb และมี BamHI หนึ่งแห่งอยู่ด้านหน้าของยีน GUS ใช้เป็นที่โคลนชิ้นโปรโมเตอร์ได้เมื่อใส่ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.8 kb ซึ่งมีโปรโมเตอร์ CaMV35S จาก cauliflower mosaic virus (Odell et al., 1985) ลงไปยัง BamHI site ที่อยู่ด้านหน้าของยีน GUS ในพลาสมิด pKG ก็จะได้พลาสมิด pKG-35S เมื่อใส่ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.9 kb ที่มียีน cI857 (สร้าง thermosensitive repressor) และโปรโมเตอร์ P_R จาก phage λ (Tsurimoto et al., 1982) ลงไปยัง BamHI site ที่อยู่ด้านหน้าของยีน GUS ในพลาสมิด pKG ก็จะได้พลาสมิด pKG- P_R ซึ่งมี 42 nucleotide ทางด้าน 5' end ของ structural gene เกิดการ fused in-frame กับยีน GUS

การโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์จาก *Synechococcus* PCC7942 (รูปที่ 2)

นำดีเอ็นเอโครโมโซมจาก *Synechococcus* PCC7942 ซึ่งแยกโดยวิธีที่ได้อธิบายไว้แล้ว (Draper and Scott, 1988) มา partial cut ด้วย Sau3A1 แล้วแยกเฉพาะชิ้นขนาด 1-2 kb มา ligate กับพลาสมิด pKG ซึ่งถูกตัดด้วย BamHI และถูก dephosphorylate ก่อนแล้ว เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนพลาสมิด จึงนำ ligation mixture ที่ได้มา transform เข้าสู่ *E. coli* โดยวิธีที่มีผู้รายงานไว้ (Sambrook et al., 1989) เลือก transformants บน LB agar ที่มี kanamycin 25 μ g/ml นำ transformants ที่ได้มารวมสกัดพลาสมิดแล้วจึงนำไป transform เข้า *Synechococcus* PCC7942

strain R2-SPc โดยวิธีที่ได้มีผู้อธิบายไว้แล้ว (Kuhlemeier et al., 1983) แล้วคัดเลือก transformants บน BG-11 agar ที่มี kanamycin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ นำ transformants ที่ได้มาตรวจสอบ GUS activity เฉพาะโคลนที่มี GUS activity จะถูกนำมาสกัด total chromosomal DNA แล้ว transform เข้าสู่ *E. coli* เพื่อได้ recombinant plasmid ไว้ศึกษาด้านอนุชีววิทยาต่อไป

β -glucuronidase และ protein assay

สำหรับการทดสอบ GUS activity แบบ quick quantitative screening ทำได้โดยขูดเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจาก BG-11 agar แล้ว resuspend และ lyse เซลล์ใน 10% SDS นำมาเจือจาง 100 เท่าใน extraction buffer (50mM NaPO_4 pH7.0, 10mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% Sarkosyl, 10mM β -mercaptoethanol) แล้วนำมาตรวจสอบ GUS activity ดังได้อธิบายต่อไป

ส่วนการทดสอบ GUS activity แบบ quantitative ทำได้โดยนำเซลล์ *Synechococcus* และ *E. coli* มา suspend ใน extraction buffer แล้ว lyse เซลล์โดยใส่ silica ละเอียดใช้ hand-held mortar homogenizer บดแล้วแยกเศษเซลล์และ silica ละเอียดออกโดยวิธี centrifugation

cell lysate ที่ได้จากสองวิธีดังกล่าวข้างต้นสามารถนำมาวัด GUS activity (รูปที่ 3) โดยใช้ 4-methylumbelliferone- β -D-glucuronide เป็น substrate ดังที่ได้มีผู้อธิบายไว้แล้ว (Scott et al., 1988) จะได้ product เป็น 4-methylumbelliferone fluorescence ซึ่งวัดได้ด้วยเครื่อง TKO 100 Mini-Fluorometer (Hoefer Scientific Instruments, USA.) แล้วเปรียบเทียบกับ calibration curve ซึ่งทราบจำนวนของ 4-methylumbelliferone ความเข้มข้นของโปรตีนใน cell lysate ตรวจสอบโดยใช้ Bio-Rad Detergent Compatible Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, USA)

การวิเคราะห์ nucleotide sequence

ใช้ automated sequence analyzer (Perkin Elmer, ABI, Model 377) ในการหาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ และของโคลนจาก 5'RACE-PCR การวิเคราะห์ลำดับเบสและแปลโปรตีนนั้นใช้คอมพิวเตอร์ที่มี software package จาก Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group (GCG, Madison, WI, USA) และใช้ BLAST program (Altschul et al., 1990) เพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank database และ genome database สำหรับ *Synechocystis* PCC6803 (Nakamura et al., 1998)

Primer extension (รูปที่ 8)

สกัด total RNA จาก *E. coli* โดยใช้ RNeasy Kit (Qiagen Germany) การวิเคราะห์หาจุดเริ่มต้นของ transcripts ใช้วิธี Primer extension โดยใช้ Superscript II reverse transcriptase ในการ

สร้าง cDNA ตามที่มีผู้อธิบายไว้ (Garcia-Sanz and Mullner, 1997) Primer-GUS1 (รูปที่ 4) ซึ่งติดฉลากด้วย $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{dATP}$ ใช้ในวิธี Primer extension ส่วนที่ติดฉลากด้วย $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ สำหรับใช้ใน manual DNA sequencing ซึ่งใช้ T7 Sequencing Kit (Pharmacia Biotech)

5'Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) –PCR (รูปที่ 9)

สกัด total RNA จากเซลล์ *E. coli* หรือ cyanobacteria โดยใช้ Trizol Reagent (GIBCO, BRL) แล้วตรวจสอบการปราศจากการปนเปื้อนของ DNA ในตัวอย่าง RNA โดยใช้วิธี PCR การวิเคราะห์หาจุดตั้งต้นของ transcripts โดยใช้วิธีการตามที่มีผู้ผลิตได้อธิบายไว้ (5'/3' RACE kit, Boehringer Mannheim) มีวิธีการโดยย่อดังนี้ (รูปที่ 9) ใช้ total RNA จำนวน 2 μg มา anneal กับ Primer-GUS2 (รูปที่ 4) แล้วสร้าง cDNA โดยใช้ AMV reverse transcriptase และต่อหาง (tailing) ด้วย d(A) โดยใช้เอนไซม์ terminal transferase สำหรับ first PCR ใช้ Primer-GUS1 (รูปที่ 4) และ oligo d(T) anchor primer (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTV-3', V คือ A, C หรือ G) ที่ 94°C 1 นาที, 60°C 30 วินาที, และ 72°C 2 นาที จำนวน 35 cycles นำ first PCR product มาเจือจาง 20 เท่าแล้วใช้ 1 μl สำหรับ nested PCR ซึ่งทำในสภาวะเหมือน first PCR ยกเว้นใช้ Primer-Link (รูปที่ 4) และ anchor-primer (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3') แทนที่ Primer-GUS1 และ oligo d(T) anchor primer ตามลำดับ เพื่อยืนยันว่าความถูกต้องของชิ้นดีเอ็นเอ จึงนำ nested PCR product ที่ได้มาตรวจสอบโดยตัดด้วยเอนไซม์ SmaI เนื่องจากมี SmaI site หนึ่งตำแหน่งที่ downstream ของ Primer-Link (รูปที่ 4) แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ SalI นำ DNA ที่ตัดแล้วมาแยกโดย electrophoresis ใน 4.5 % NuSieve GTG agarose (FMC BioProducts) ย้อมด้วย ethidium bromide ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตามต้องการออกจาก agarose gel แล้วนำมา ligate โดยตรงเข้ากับพลาสมิด, pUC18 ที่ตัดด้วย SmaI และ SalI ก่อนแล้ว ตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิต agarose (FMC BioProducts) recombinant plasmids ที่ได้นำมาวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ automated sequence analyzer

ผลการทดลอง

การแสดงออกของยีน GUS ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ λP_R และ CaMV35S ใน *Synechococcus* PCC7942 และ *E. coli*

เพื่อแยกโปรโมเตอร์ของ *Synechococcus* PCC794 strain R2-SPc จึงได้สร้างพลาสมิด pKG (ดูรูปที่ 1B) ซึ่งเมื่อ transform เข้าสู่ *Synechococcus* พบว่าสามารถคงสภาพเป็นพลาสมิด และสามารถ rescue ได้ใน *E. coli* (ดูรูปที่ 1C)

เพื่อประเมิน การแสดงออกของยีน GUS ใน *Synechococcus* จึงได้สร้างพลาสมิด pKG- P_R ซึ่งมีโปรโมเตอร์ λP_R และสร้างพลาสมิด pKG-35S ที่มีโปรโมเตอร์ CaMV35S แล้ว transform เข้าสู่ *E. coli* และ *Synechococcus* ผลการทดลอง (ดูตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าหลัง heat induction สามารถตรวจสอบ GUS activity ได้ทั้งใน *E. coli* และ *Synechococcus* ที่มีพลาสมิด pKG- P_R ดังนั้นยีน cl857 สร้าง thermosensitive λ repressor ที่สามารถทำงานได้ใน *Synechococcus* ซึ่งสอดคล้องกับที่ได้รายงานไว้ (Chungjatupornchai and Panyim, 1990; Mermet-Bouvier and Chauvat 1994) โปรโมเตอร์ CaMV35S ซึ่งแสดงออกได้ดีในพืช (Jefferson et al., 1986) แต่ยีน GUS ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ CaMV35S แสดงออกได้น้อยมากใน *Synechococcus* และไม่แสดงออกเลยใน *E. coli*

การแยกชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์จาก *Synechococcus* PCC7942

การแยกชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์โดยใช้ transcriptional gene fusion กับยีน GUS ในพลาสมิด pKG แล้วตรวจสอบ GUS activity ผลการทดลองพบว่าจาก transformant ทั้งหมด 640 clones พบว่ามี 15 clones (2.3%) และ 25 clones (3.9%) ที่มี GUS activity ในระดับสูงและต่ำตามลำดับ จากจำนวน 40 clones นี้มีเพียง 4 clones (10%) ที่มี GUS activity ทั้งใน *Synechococcus* และ *E. coli* ดังนั้นชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ส่วนใหญ่ที่ได้ไม่สามารถทำงานได้ใน *E. coli*

ระดับการทำงานของชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ใน *Synechococcus* PCC7942 และ *E. coli*

ตรวจสอบระดับการทำงานของชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ได้โดยวัด GUS activity เปรียบเทียบกับโปรโมเตอร์ λP_R ดังได้แสดงในตารางที่ 1 ชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ E3, E4, D13 และ D21 ทำงานได้ทั้งใน *Synechococcus* และ *E. coli* ส่วน E8, E10 และ E14 ทำงานได้เฉพาะใน *Synechococcus* แต่ไม่ทำงานใน *E. coli* เมื่อเปรียบเทียบใน *Synechococcus* พบว่า E3 ทำงานได้ดีกว่าโปรโมเตอร์ λP_R แต่ E10 และ E14 ทำงานได้ในระดับเดียวกับโปรโมเตอร์ P_R ทั้ง 7 ชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์นี้ไม่สามารถถูก induced ที่ 39°C ได้สังเกตพบว่าการเข้มข้นของแสงมีผลต่อการ

ทำงานของ E10 กล่าวคือหากเลี้ยง *Synechococcus* ที่มี E10 ที่ความเข้มของแสง 1,500 Lux จะมี GUS activity $65 (\pm 7)$ nmole/ min/ mg protein ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่เลี้ยงที่ความเข้มของแสง 5,000 Lux ประมาณ 4 เท่า (ดูตารางที่ 1) ส่วนค่า GUS activity ของอีก 6 ชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มของแสงในสองสภาวะดังกล่าว ใน *E. coli* ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ใดที่แยกได้ (ดูตารางที่ 1) จะทำงานได้ดีกว่าโปรโมเตอร์ λP_R

ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ E8

ได้แสดงลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ E8 ในรูปที่ 5 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแล้ว ไม่พบว่ามี homology อย่างมีนัยสำคัญกับยีนใด จะได้วิเคราะห์หาลำดับเบสของโปรโมเตอร์ต่อไป

ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ E10

รูปที่ 6 ได้แสดงลำดับเบสบางส่วนของชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ E10 จะพบว่าด้าน 5' end มี deduced amino acids ที่มี homology กับ htpG heat shock protein ของ *Synechocystis* PCC7942 ดังได้แสดงในรูปที่ 7 คาดว่าโปรโมเตอร์น่าจะอยู่บริเวณ downstream ของยีน htpG เนื่องจากได้กล่าวในข้างต้นแล้วว่าความเข้มของแสงมีผลต่อการทำงานของ E10 จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งและทำการศึกษาคือไปว่าโปรโมเตอร์จะมีลักษณะร่วมใดกับโปรโมเตอร์ที่มีผู้รายงานว่าสามารถถูก induced ได้ด้วยความเข้มของแสงหรือไม่อย่างไร

การวิเคราะห์หาตำแหน่งจุดตั้งต้น transcript ของ D13-GUS และตำแหน่งโปรโมเตอร์

เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ D13 ทำงานได้ดีใน *E. coli* (ดูตารางที่ 1) จึงได้เลือกมาวิเคราะห์หา transcription initiation site โดยวิธี Primer extension ผลการทดลองพบว่า transcription initiation site ใน *E. coli* อยู่ที่เบส T (ดูรูปที่ 10) อย่างไรก็ดีพบว่ามี ชิ้นดีเอ็นเอชิ้นขนาดเล็กกว่าที่เบส T downstream อีก 8 เบส คาดว่าน่าจะเป็น incomplete primer extension product ตำแหน่งของเบสที่เป็น major transcription initiation site ในชิ้นดีเอ็นเอได้ระบุเป็น (a) ในรูปที่ 12 อย่างไรก็ดีตามเมื่อใช้วิธี Primer extension มาวิเคราะห์หา transcription initiation site ใน *Synechococcus* อยู่หลายครั้ง กลับไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นจึงได้ใช้วิธี 5'RACE-PCR เพื่อวิเคราะห์หา transcription initiation site ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 5'RACE-PCR (ดูรูปที่ 11) จำนวน 18 clones พบว่า transcription initiation sites อยู่ที่ตำแหน่งเบส TTTG (8 clones), TG (8 clones) และ C (2 clones) ดังได้ระบุเป็น (b), (c) และ (d) ตามลำดับในรูปที่ 12 เนื่องจากตำแหน่ง ของ major transcription initiation site ของ D13 ใน *E. coli* อยู่ในบริเวณเดียวกันกับใน *Synechococcus* ทำให้คาดว่า functional promoter sequence ของ D13 น่าจะเหมือนกันในเซลล์จุลินทรีย์ทั้งสองชนิด บริเวณ upstream ของ transcription initiation sites พบลำดับเบส

TAAACT และ TTGTAG ซึ่งมีลักษณะคล้าย -10 และ -35 ของ *E. coli* σ^{70} promoter ทางด้าน 5' end ของ D13-GUS transcript พบว่ามี 12 bp inverted repeat ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ (รูปที่ 12) ยังไม่ทราบว่า ซีนติเอ็นเอ D13 เป็นโปรโมเตอร์ของยีนใด

การวิเคราะห์หาตำแหน่งจุดตั้งต้น transcript ของ D21-GUS และตำแหน่งโปรโมเตอร์

ได้วิเคราะห์หา transcription initiation site ของ D21-GUS โดยวิธี Primer extension ผลการทดลองพบว่า transcription initiation sites ใน *E. coli* อยู่ที่เบส G และ T (รูปที่ 13, ตำแหน่ง a) บริเวณ upstream ของ transcription initiation sites พบลำดับเบส TAAGCT และ TTAATG ซึ่งมีลักษณะคล้าย -10 และ -35 ของ *E. coli* σ^{70} promoter (รูปที่ 14) สำหรับใน *Synechococcus* ได้ใช้วิธี 5'RACE มาวิเคราะห์หา transcription initiation site ผลจากการวิเคราะห์ ลำดับเบสของ 5'RACE-PCR (รูปที่ 11) จำนวน 7 clones พบว่า transcription initiation sites อยู่ที่ตำแหน่งเบส G (6 clones) และ A (1 clone) ดังได้ระบุเป็น (b) และ (c) ตามลำดับในรูปที่ 14 จะเห็นได้ว่าตำแหน่งของ transcription initiation site ของ D21 ใน *E. coli* อยู่มีได้อยู่ในบริเวณเดียวกันกับใน *Synechococcus* บริเวณ upstream ของ transcription initiation sites ใน *Synechococcus* พบลำดับเบส TACCAA ซึ่งมีลักษณะคล้าย -10 element ของ *E. coli* σ^{70} promoter อย่างไรก็ตาม ไม่พบลำดับเบสที่มีลักษณะคล้าย -35 element ของ *E. coli* σ^{70} (รูปที่ 14) ยังไม่ทราบว่า ซีนติเอ็นเอ D21 เป็นโปรโมเตอร์ของยีนใด

การวิเคราะห์หาตำแหน่งจุดตั้งต้น transcript ของ E14-GUS และตำแหน่งโปรโมเตอร์

ซีนติเอ็นเอโปรโมเตอร์ E14 ทำงานได้ใน *Synechococcus* แต่ไม่ทำงานใน *E. coli* (ดูตารางที่ 1) ได้วิเคราะห์หา transcription initiation site ของ E14 โดยวิธี 5'RACE ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 5'RACE-PCR (รูปที่ 11) จำนวน 9 clones พบว่า transcription initiation sites อยู่ที่ตำแหน่งเบส TTG (5 clones), C (2 clones) และ TG (2 clones) ดังแสดงในรูปที่ 15 บริเวณ upstream ของ major transcription initiation site พบลำดับเบส TAGCAT ซึ่งมีลักษณะคล้าย -10 element ของ *E. coli* σ^{70} promoter (รูปที่ 15) อย่างไรก็ตาม ไม่พบลำดับเบสที่มีลักษณะคล้าย -35 element ของ *E. coli* σ^{70}

การวิเคราะห์ลำดับเบสในซีนติเอ็นเอ E3

เนื่องจากซีนติเอ็นเอโปรโมเตอร์ E3 ทำงานได้ดีที่สุดใน *Synechococcus* จึงได้นำมาวิเคราะห์ลำดับเบส (รูปที่ 16) พบว่ามี ORF สำหรับ 107 amino acids ซึ่ง highly homologous กับ hypothetical protein slr1846 จาก *Synechocystis* PCC6803 และ ORF107 จาก *Porphyra purpurea* โดยมี amino acids identity 76.6% และ 53.3% ตามลำดับ ส่วน downstream ของ

ORF107 มี 74 nucleotides ที่ 100% เหมือน กับยีน tRNA^{pro} (anticodon GGG) จาก *Synechocystis* PCC6803 (accession no. D90900) ไม่พบลักษณะลำดับเบสที่คล้ายกับ *E. coli* promoter element ด้าน upstream ของ 5' end tRNA^{pro} gene ส่วนด้าน 3' end ของยีนพบ 15 bp inverted repeat (ดูรูปที่ 16)

ยีน tRNA^{pro} สามารถทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์

ได้วิเคราะห์หา transcription initiation sites ของ E3-GUS โดยวิธี 5'RACE ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 5'RACE-PCR (ดูรูปที่ 11) จำนวน 10 clones พบว่า transcription initiation sites ใน *E. coli* อยู่ที่ตำแหน่งเบส TTG (6 clones) และ G (4 clones) ซึ่งระบุเป็น (a) และ (b) ตามลำดับในรูปที่ 16 ส่วน transcription initiation sites ใน *Synechococcus* อยู่ที่ตำแหน่งเบส TTG (11 จาก 13 clones) และ A (2 clones) ซึ่งระบุเป็น (c) และ (d) ตามลำดับในรูปที่ 16 ดังนั้นมี major และ minor transcription initiation sites อย่างละ 1 ตำแหน่ง โดยมี major transcription initiation site ใน *E. coli* อยู่ในตำแหน่งบริเวณเดียวกันใน *Synechococcus* ทำให้คาดว่า functional promoter sequence น่าจะเหมือนกันในเซลล์จุลชีพทั้งสองชนิด ซึ่ง immediately upstream ของ transcription initiation site เป็นยีน tRNA^{pro} ดังนั้นเป็นการบ่งชี้ว่ายีน tRNA^{pro} สามารถทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์ได้ อย่างไรก็ตามยีน tRNA^{pro} มิได้มีลำดับเบสที่มีลักษณะ -10 และ -35 regions ที่คล้ายกับของ *E. coli* แต่มี 2 regions คือ block A และ B (ดูรูปที่ 16) ซึ่ง strongly homologous กับ block A (TGGCNNAGTGG) และ B (GGTTCGANNCC) ของ eukaryotic tRNA gene (Galli et al., 1981)

บทวิจารณ์

แม้ว่าจำนวน *Synechococcus* transformants ที่จากการโคลนชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์จะไม่มากพอที่จะเป็นตัวแทนของ complete *Synechococcus* genome และ 4 clones ที่ได้สามารถทำงานใน *E. coli* ก็ได้เป็นตัวแทนของ *Synechococcus* sequence ทั้งหมดที่สามารถทำงานได้ใน *E. coli* แต่ชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ส่วนใหญ่ที่แยกได้ไม่สามารถทำงานได้ใน *E. coli* จึงเป็นการบ่งชี้ว่า functional sequence ของโปรโมเตอร์ส่วนใหญ่ใน *Synechococcus* แตกต่างกับของ *E. coli* เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์แยกโดยใช้สภาวะปกติของการเลี้ยงเชื้อ หากปรับเปลี่ยนสภาวะการเลี้ยงแตกต่างกันออกไป มีความเป็นไปได้ที่จะมีผลต่อระดับการทำงานของโปรโมเตอร์

ชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ E3, E4, D13 และ D21 ทำงานใน *Synechococcus* ได้ดีกว่าใน *E. coli* ทั้งนี้ นอกจากปัจจัยสำคัญคือลักษณะของ functional promoter แล้ว ยังมีอีกปัจจัยหนึ่งที่อาจมีผลกระทบคือ ช่วง upstream ของยีน GUS (รูปที่ 4) ไม่พบ canonical Shine-Dalgarno sequence (GGAGG) ดังที่พบใน *E. coli* ได้มีผู้รายงานว่า การมี canonical Shine-Dalgarno sequence สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนรายงานใน *E. coli* อย่างไรก็ดี ก็ยังมี SD-independent translation initiation system (Fargo et al., 1998)

การที่ไม่ประสบความสำเร็จในการวิเคราะห์หา transcription initiation sites ใน *Synechococcus* โดยวิธี Primer extension ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการมีระดับ steady-state mRNA ต่ำใน *Synechococcus* จึงได้ใช้วิธี 5'RACE-PCR แทน อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่เบส T ในตำแหน่งที่ถัดจาก transcription initiation site จะทำให้ไม่สามารถระบุตำแหน่งเบสอย่างเจาะจงได้ เนื่องจากใช้ d(A) สำหรับ tailing ใน cDNA ปัญหานี้แก้ไขได้โดยใช้ d(C) หรือ d(G) แทน

เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของโปรโมเตอร์ในชิ้นดีเอ็นเอ D13, D21 และ E14 (ดูตารางที่ 2) จะเห็นได้ว่า D13 มีลำดับเบสที่คล้ายกับ *E. coli* σ^{70} promoter ได้มีผู้รายงานแล้วว่าใน *Synechococcus* มี multiple sigma factor genes ซึ่งมีลักษณะ conserved domains ของ σ^{70} อย่างไรก็ตาม ลำดับเบสของโปรโมเตอร์ใน D21 และ E14 มี -10 region แต่ไม่พบ -35 region ที่คล้ายกับของ *E. coli* นอกจากนี้การไม่พบลักษณะ *E. coli*-like promoter ในยีน tRNA ของ E3 และชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ส่วนใหญ่ไม่สามารถทำงานได้ใน *E. coli* จึงเป็นข้อบ่งชี้ว่าโปรโมเตอร์เหล่านี้ไม่สามารถ recognized ได้ด้วย sigma factor σ^{70} คาดว่าหากใช้ชิ้นดีเอ็นเอโปรโมเตอร์เหล่านี้เป็น DNA template ก็อาจตรวจพบ sigma factor ที่ยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อนได้

ยีน tRNA^{Pro} ใน E3 เป็นโปรโมเตอร์ที่ทำงานใน *Synechococcus* ได้ดีกว่าโปรโมเตอร์ P_R (ดูตารางที่ 1) ได้มีรายงานว่า λP_R เป็น strong promoter ใน *Synechococcus* PCC7942 โดยที่สามารถสร้างยีนรายงาน lacZ สูงถึง 10% ของ total soluble proteins (Mermet-Bouvier and

chauvat, 1994) ดังนั้น ยีน tRNA^{pro} จึงเป็น strong promoter มีรายงานว่า block A และ B เป็น split promoter sequence ของ tRNA^{Lue} ใน *Xenopus laevis* ซึ่งสามารถ recognized ได้ด้วย RNA polymerase III (Galli et al., 1981) tRNA ของ yeast ที่มี conserved block A และ B สามารถทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์ได้ ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า conserved block A และ B ในยีน tRNA^{pro} มีบทบาทเป็นโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน GUS ใน *Synechococcus* และ *E. coli* หรือไม่อย่างไร

โครงการวิจัยนี้ได้ขึ้น DNA strong promoters หลายชิ้นซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการนำไปควบคุมการแสดงออกของ heterologous gene ใน *Synechococcus* การวิเคราะห์ขั้นต้นคือเอ็นเอโปรโมเตอร์โดยใช้ deletion analysis และ site directed mutagenesis ในส่วน potential region จะนำไปสู่ความเข้าใจในลักษณะของ strong promoter ใน *Synechococcus*

หนังสืออ้างอิง

1. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
2. Angsuthanasombat C, Panyim S (1989) Biosynthesis of 130-kilodalton mosquito larvicide in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Appl Environ Microbiol* 55:2428-2430
3. Bracey LT, Paigen K (1987) Changes in translational yield regulate tissue-specific expression of β -glucuronidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9020-9024
4. Casadaban MJ, Cohen SN (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 138:179-207
5. Chungjatupornchai W (1990) Expression of the mosquitocidal-protein genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and the herbicide-resistance gene *bar* in *Synechocystis* PCC6803. *Curr Microbiol* 21:283-288
6. Chungjatupornchai W, Panyim S (1994) Advances in heterologous gene expression in cyanobacteria. In: Phang SM, Lee YK, Borowitzka MA, Whitton BA (eds) *Algal biotechnology in the Asia-Pacific region*. Malaysia: University of Malaya, pp186-189
7. Draper J, Scott R (1988) The isolation of plants nucleic acids. In: Draper J, Scott R, Armitage P, Walden R (eds) *Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual*. London: Blackwell Scientific Publications, pp 199-236
8. Elhai J (1993) Strong and regulated promoters in the cyanobacterium *Anabaena* PCC7120. *FEMS Microbiol Lett* 114:179-184
9. Fargo DC, Zhang M, Gillham NW (1998) Shine-Dalgarno-like sequences are not required for translation of chloroplast mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts or in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 257:271-282
10. Friedberg D, Seijffer J (1986) Controlled gene expression utilising Lambda phage regulatory signals in a cyanobacterium host. *Mol Gen Genet* 203:505-510
11. Fukuda H, Sakai M, Nagahama K, Fujii K, Matsuoka M, Inoue Y, Ogawa T (1994) Heterologous expression of the gene for the ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae* in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Biotech Lett* 16:1-6
12. Galli G, Hofstetter H, Birnstiel ML (1981) Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. *Nature* 294:626-631
13. Garcia-Sanz JA, Mullner EW (1997) RNase protection and primer extension. In: Lefkovits I (ed) *Immunology methods manual*. NY: Academic Press, pp 425-438
14. Geerts D, Bovy A, de Vrieze G, Borrias M, Weisbeek P (1995) Inducible expression of heterologous genes targeted to a chromosome platform in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Microbiology* 141:831-841
15. Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, Pace NR (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J Bacteriol* 170:720-726
16. Gray MW (1989) The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet* 5:294-299

17. Harley CB, Reynolds R (1987) Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 15:2343-2361
18. Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986) β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8447-8451
19. Jefferson RA, Kavanagh TA and Bevan MW (1987) GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker. *EMBO J* 6:3901-3908
20. Kawata Y, Yamano N, Kojima H, Itoh S (1991) Expression of salmon growth hormone in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *Biotech Lett* 13:851-856
21. Kuhlemeier CJ, Thomas AAM, van der Ende A, van Leen RW, Borrias WE, van den Hondel CAMJJ, Arkel GA (1983) A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Plasmid* 10:156-163
22. Mermet-Bouvier P, Chauvat F (1994) A condition expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. *Curr Microbiol* 28:145-148
23. Milkowski C, Quinones A (1991) Cloning of promoter-active DNA sequences from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 in an *Escherichia coli* host. *Curr Microbiol* 23:333-336
24. Nakamura Y, Kaneko T, Hirose M, Miyajima N, Tabata S (1998). CyanoBase, a www database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Nucl Acids Res* 26:63-67
25. Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812
26. Otter CA, Straby KB (1991) Transcription of eukaryotic genes with impaired internal promoters: the use of a yeast tRNA gene as promoter. *J Biotech* 21:289-294
27. Porter RD (1986) Transformation in cyanobacteria. *Crit Rev Microbiol* 13:111-132
28. Rippka R (1988) Recognition and identification of cyanobacteria. *Methods Enzymol* 167:28-67
29. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
30. Scanlan DJ, Bloye SA, Mann NH, Hodgson DA, Carr NG (1990) Construction of lacZ promoter probe vectors for use in *Synechococcus*: application to the identification of CO₂-regulated promoters. *Gene* 90: 43-49
31. Schneider GJ, Haselkorn R (1988) RNA polymerase subunit homology among cyanobacteria, other eubacteria, and archaeobacteria. *J Bacteriol* 170: 4136-4140
32. Scott R, Draper J, Jefferson R, Dury G, Jacob L (1988) Analysis of gene organization and expression in plants. In: Draper J, Scott R, Armitage P, Walden R (eds) Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual. London: Blackwell Scientific Publications, pp 265-337
33. Sugimoto Y, Tanaka K, Masuda S, Takahashi H (1997) The *rpoD1* gene of *Synechococcus* sp. strain PCC7942 encodes the principle sigma factor of RNA polymerase. *J Gen Appl Microbiol* 43:17-21
34. Tanaka K, Masuda S, Takahashi H (1992) Multiple rpoD-related genes of cyanobacteria. *Biosci Biotech Biochem* 56:1113-1117

35. Tandeau de Marsac N, de la Torre F, Szulmijster J (1987) Expression of the larvicidal gene of *Bacillus sphaericus* 1593M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Mol Gen Genet* 209:396-398
36. Tsurimoto T, Hase T, Matsubara H, Matsubara K (1982) Bacteriophage lambda initiation preparation from a strain that overproduces the O and P protein. *Mol Gen Genet* 187:79-86
37. Vieira J, Messing J (1982) The pUC plasmid, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis with synthetic universal primers. *Gene* 19:259-268
38. William JGK (1988) Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol* 167:766-778

Table 1. GUS activity of promoter-GUS fusion in *Synechococcus* PCC7942 and *E. coli* MC1061.

Plasmid	GUS activity (nmole/ min/ mg protein) ^a	
	<i>Synechococcus</i> ^b	<i>E. coli</i> ^c
Host (without pKG)	0.11 ($\pm$ 0.01)	13 ($\pm$ 2)
PKG (control)	0.13 ($\pm$ 0.01)	13 ($\pm$ 2)
PKG-35S	6 ($\pm$ 1.7)	N
PKG-P _R (non induction) ^d	27 ($\pm$ 10)	N
PKG-P _R (heat induction) ^d	276 ($\pm$ 30)	505 ($\pm$ 8)
PKG-E3	325 ($\pm$ 20)	57 ($\pm$ 8)
PKG-E4	36 ($\pm$ 5)	21 ($\pm$ 3)
PKG-E8	22 ($\pm$ 9)	N
PKG-E10	298 ($\pm$ 30)	N
PKG-E14	245 ($\pm$ 22)	N
PKG-D13	145 ($\pm$ 20)	70 ($\pm$ 3)
PKG-D21	79 ($\pm$ 15)	31 ($\pm$ 8)

^a: The specific activities are the means of three independent experiments (each in duplicate), with standard deviations indicated in parantheses. N: no expression (the GUS activity is not higher than the control).

^b: *Synechococcus* was grown on BG-11 agar at 28°C with a light intensity of approximately 5,000 Lux, for 6 days.

^c: *E. coli* was grown in LB broth at 37°C for 14 hr.

^d: For non induction conditions, cells were grown at 28°C. For heat induction, a 5-day culture of *Synechococcus* and a log-phase culture of *E. coli* were further grown at 39°C, 24 hr and at 42°C, 18 hr respectively.

Table 2. Comparison of promoter sequences tested in *E. coli* and *Synechococcus* PCC79422

Promoter	-35	spacing	-10
<i>E. coli</i> σ_{70}	T ₇₈ T ₈₂ G ₆₈ A ₅₈ C ₅₂ A ₅₄	16-18	T ₈₂ A ₈₉ T ₅₂ A ₅₉ A ₄₉ T ₈₉
λ P_R	TTGACT	17	GATAAT
<i>CaMV</i> 35S	ACAATC	27	TATATAA
D13 (E/S)	TTGTAG	17	TAAACT
D21 (E)	TTAATG	21	TAAGCT
(S)	-	-	TACCAA
E14 (S)	-	-	TAGCAT

(E): in *E. coli* MC1061
(S): in *Synechococcus* PCC7942

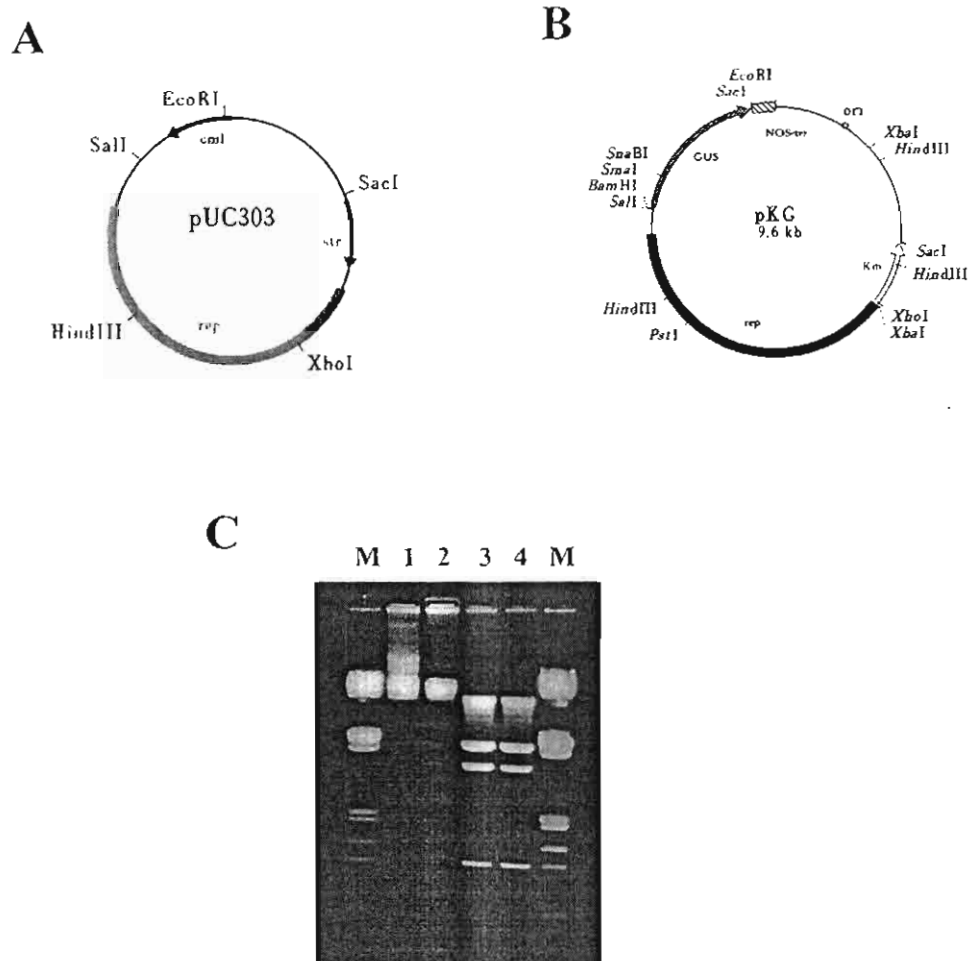
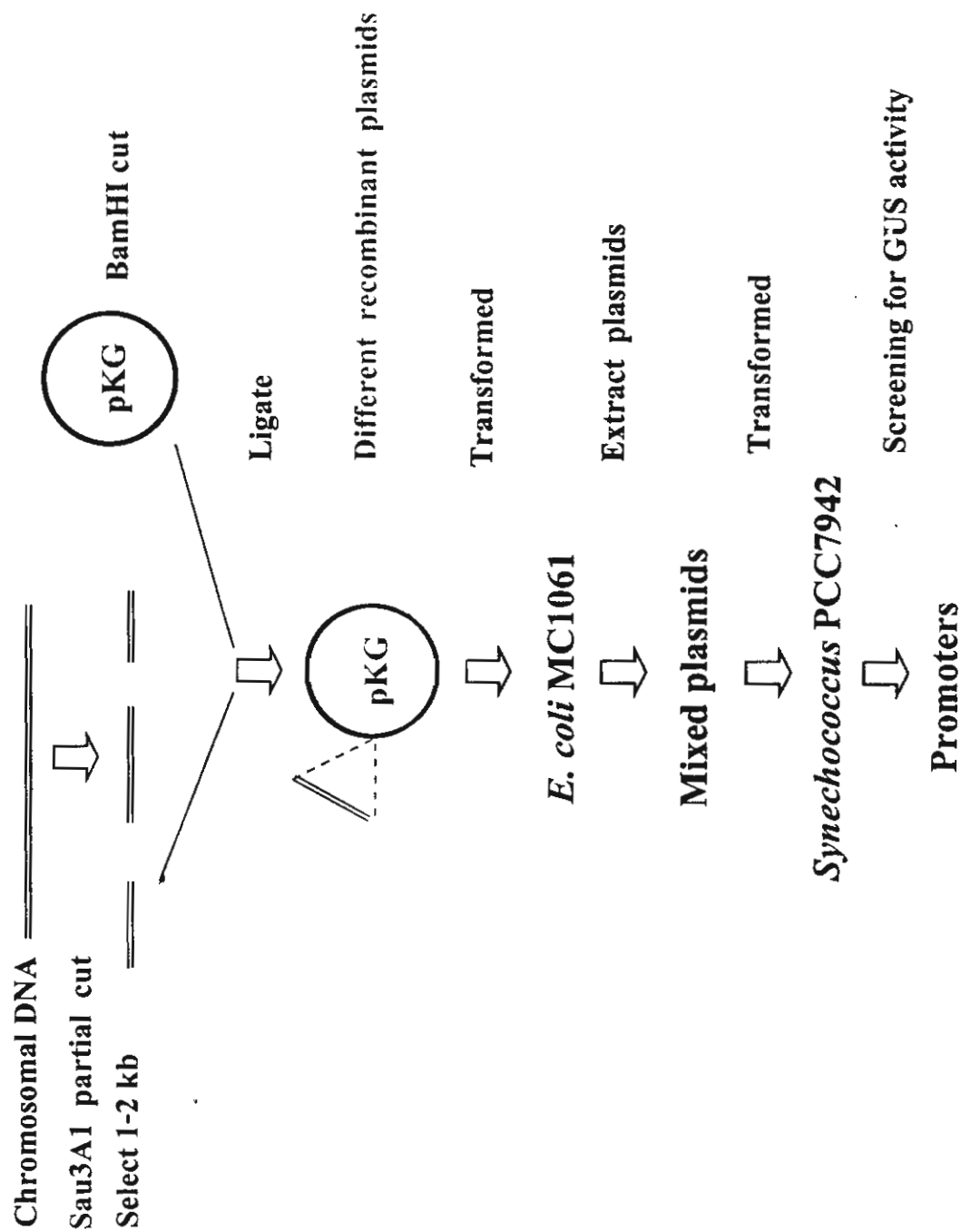


Fig. 1. A). Plasmid pUC303 constructed previously (Kuhlemeier et al, 1983).
 B). Promoter-probe vector pKG (this study).
 C). 1% Agarose gel stained with ethidium bromide of rescued pKG.
 Lanes 1, pKG; 2, total DNA of *Synechococcus* PCC7942; 3, pKG cut with *HindIII*; 4, pKG after rescued from PCC7942 and cut with *HindIII* and M, λ DNA cut with *HindIII*/*EcoRI*.

Fig. 2. Isolation of *Synechococcus* PCC7942 promoters



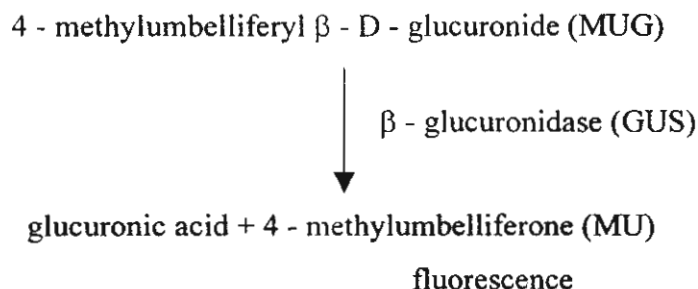


Fig. 3. β - Glucuronidase (GUS) activity assay.

MUG was used as substrate for GUS enzyme. The MU fluorescence product was measured with a TKO100 minifluorometer (Hoefer Scientific Instruments, USA).

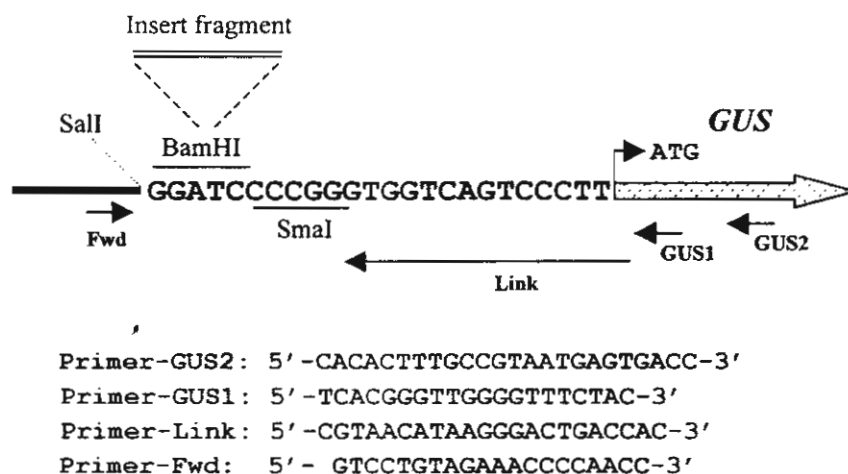


Fig. 4. The primers used in DNA sequencing, primer extension and 5'RACE-PCR.

Primer-GUS2 and primer-GUS1 are complementary to the nucleotides 269 to 283, and 13 to 32 of the GUS gene respectively. Primer-Link is complementary to the nucleotides 15 upstream and 8 downstream of the GUS start codon. Primer-Fwd is located in the pKG vector. The positions of the primers are marked. The figure is not drawn to scale. Sequences of the primers are shown.

E8

```

1  GATCGCTAAA CTTGTCATGC AAGTCATGTG ACAATTCTGA AATTGTCTTC
   Sau3A1
51 CTGTTTGAGT GATTTGGAAC CCATGCAGAG CTTCTACGTC AAGATGAGGG
101 TCTGTTGAGT TCATATCAAC CTCAATGCAT TTCTCTTCTC TATTCAAAGG
151 AGCTCTTGTC TCTACGCTCG TCCTGAGCCC AATGCTGGGT TTAATGCCTG
201 CACAGGCAGA AATGAATAAG CCCAACAAAT CATCTACTGA AACCACAAAA
251 ATCAAAACCT CTCAGCAAGC TCAGACCTCA ATTCTGGATA TTGCGAAGAG
301 CAACGAAAAT TTCAGCACTT TGGTAGCTGC GATCTCAGAA TAGCCAGGAA
   Sau3A1
351 TGGCCGCCAG CAAAGCCGTT ACAGCGGTAC TTTGACCGGC CATGTGTTTCG
401 CAGAGCCACA GACCGAGCGA TC
   Sau3A1

```

Fig. 5. Nucleotide sequence of the E8 promoter-active fragment.

E10 //

```

1   CCCAGTCAGT AGTCAGAGAG CAATACCGTT AAACCCTGCC CACGCGGGGT
51  TTTTTTATGG GCGATCGCAG ACGCGTCCGT AAGATGAAGG GGTGATGTTG
      Sau3A1
101 GCCATCGCCT CAATGCTGAT CCGGCTAATA TACCCGATGA CCATGTCCTG
      Sau3A1
151 CTCGTGAATA CCGCGCATCC TCTTGTCCAG AACATCCTTA GTCTGCAGCA
201 GGGGGCTATC CTCAGCAGTG ATGGACACTC TCCAAGCCAG GTCCTGGCAG
251 AGCAGCTCTG TCGACACATC TATGACTTGG CCTTGATGAC CAAAAAGGG
301 TTTGATGCTG AGGGAATGAA AGCCTTCATT GAGCGTTCTA ATGCGGTCTT
351 GACGGCGTTG ACGACTCGCC AGTGAAGGGT TTAGGGGAAC TCTAACTTC
401 ACAGAACGTC ATCCTAGCTA TCTCGCCCTC AGACGTGAGC CTCGCTAAGC
451 TGAGGGCGAC GATCGCAGCG GAAAAATGTG ACCGGGGCGG CGCAGATC
      Sau3A1

```

Fig. 6. Nucleotide sequence of the E10 promoter-active fragment.

The nucleotide sequence shown is the 3' end of the 1.75 kb E10 fragment immediately upstream of the promoter-less GUS gene. The 233 nucleotides of *htpG* heat shock protein gene are in bold. The stop codons of *htpG* are marked by double lines.

E10	PDDHVLXVNT AHXLVQNILS LQQGXILSSD GHSPSQVLAE
	'P+ HVL NT H L++NILS L QG I++ G SPSLA+
PCC6803	580 PEQHVLAIN NT NHPLIKNILS LSQGGIVTGS GESPSAELAK
E10	QLCRHIYDLA LMTQKGFDAE GMKAFIERSN AVLTAALT
	LC+ H+YDLA LM QKGFDAE GMK FIER SN AVL T LT
PCC6803	SLCQHVDYDLA LMAQKGFDAE GMKGFIERSN AVLTRLT 657

Fig. 7. Amino acid alignment of E10 and *htpG* protein of *Synechocystis* PCC6803.

Deduced amino acids of nt. 131-363 of E10 promoter-active fragment was highly homologous to the C-terminal of *htpG* heat shock protein of PCC6803. There are 68% (53/77) identities and 80% (62/77) positives.

Fig. 8. Overview primer extension

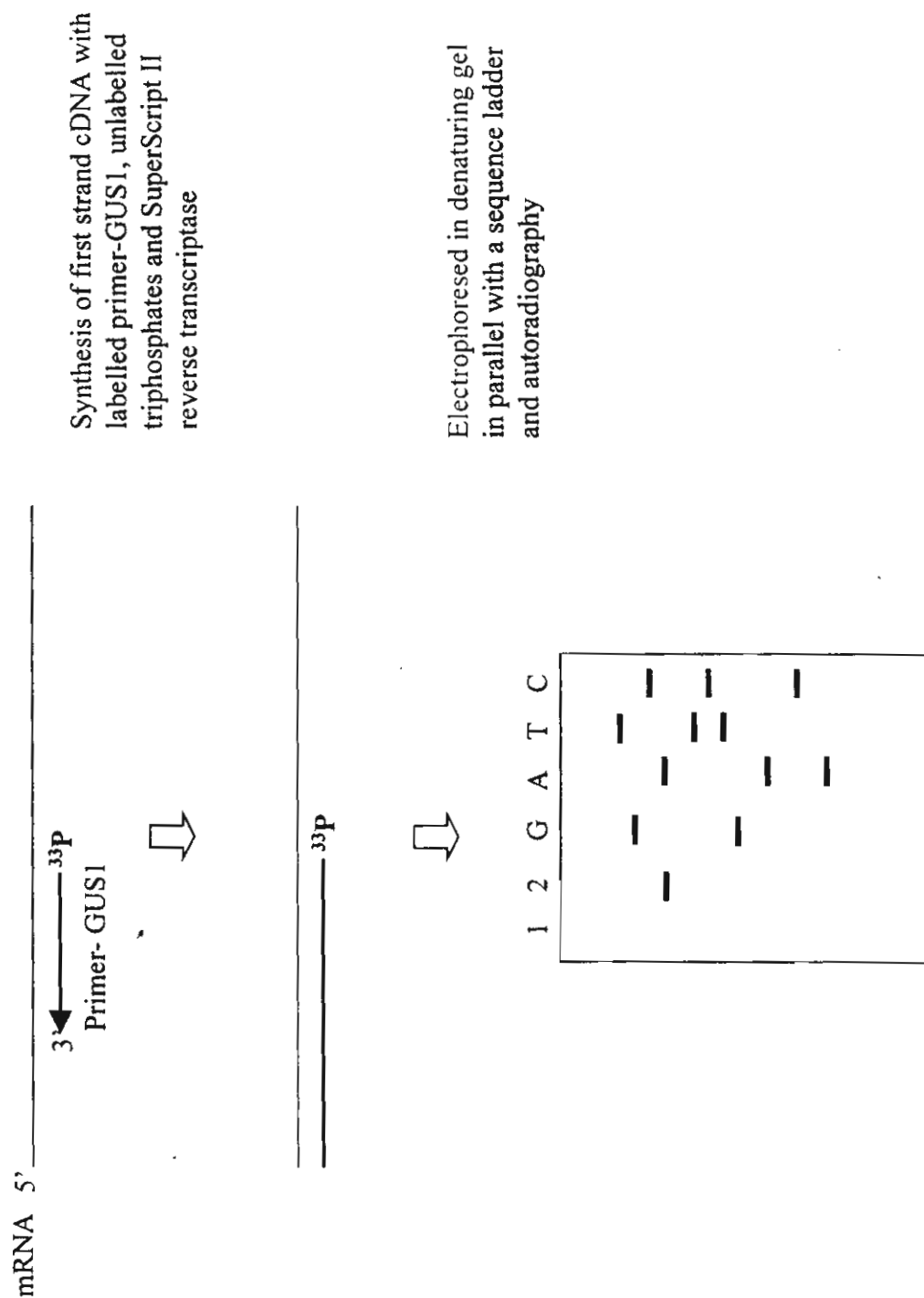
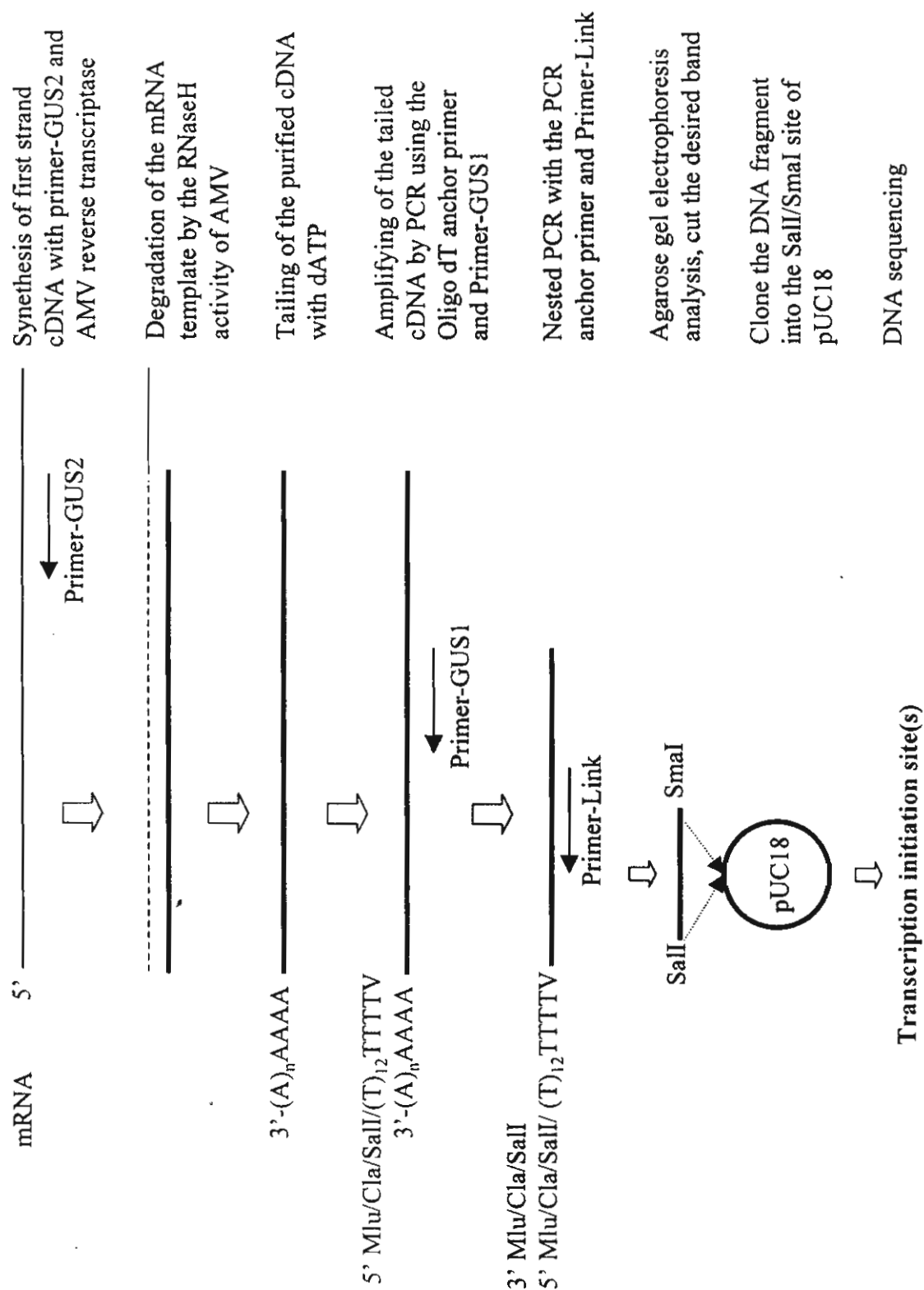


Fig. 9. Overview 5'RACE-PCR



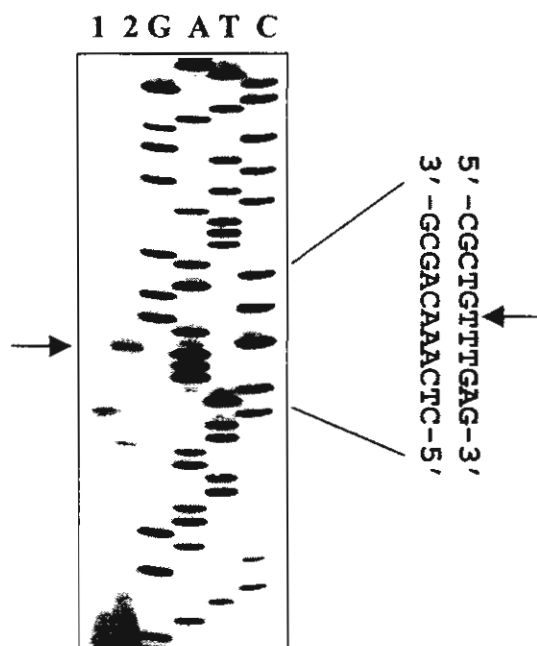


Fig. 10. Primer extension mapping of the initiation site of the D13-GUS transcript in *E. coli*.

The primer-GUS1 was used in primer extension assays with total RNA isolated from *E. coli* cells (as control, lane 1) and from those harbouring plasmid pKG-D13 (lane 2). The primer-extended products were electrophoresed in parallel with a sequence ladder (lane G, A, T, C) generated by using the same primer. The arrow indicates the longest products of the extension assay.

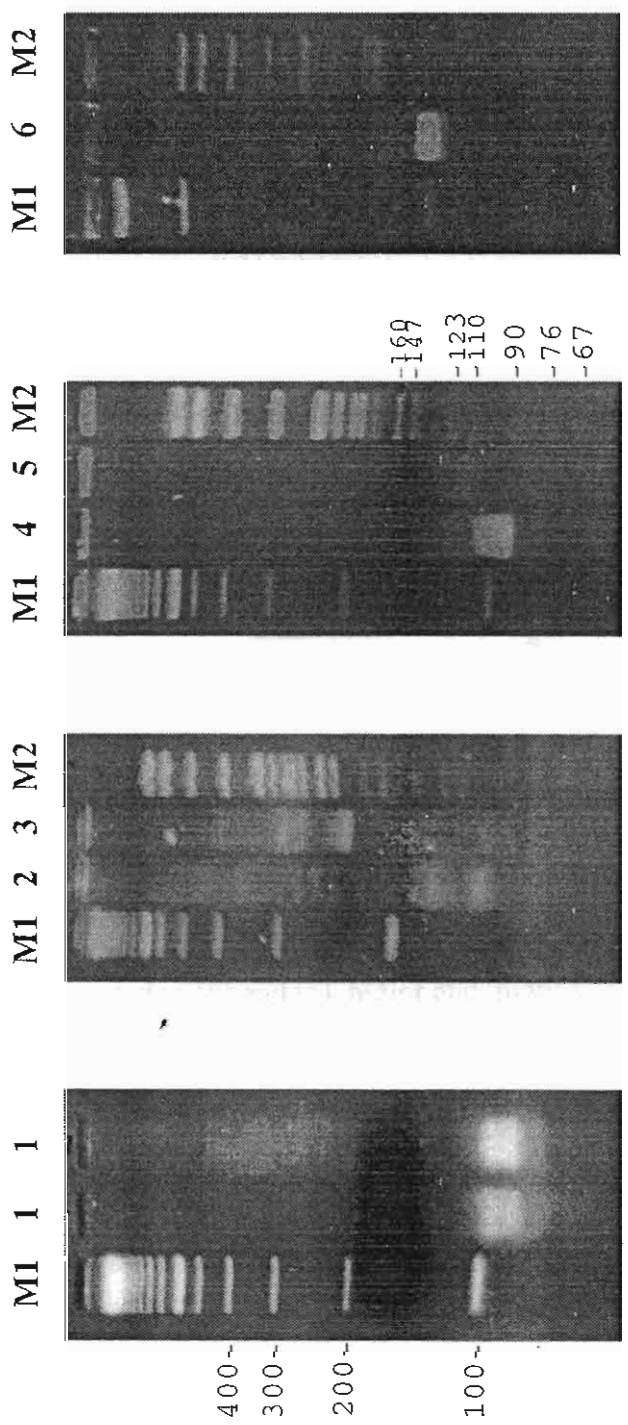


Fig. 11. Nested PCR products of 5' RACE.

4% agarose gel stained with ethidium bromide. Lanes M1, 100 bp ladder marker; M2, pBR322 cut with MspI. Nested PCR products of 5' RACE from *Synechococcus* harboring pKG containing promoter-active fragments, lanes 1, D13; 2, D21; 3, E14Δ2; 4, E3 and 5, E14. Lane 6, from *E. coli* harboring pKG containing promoter-active fragment E3.

D13

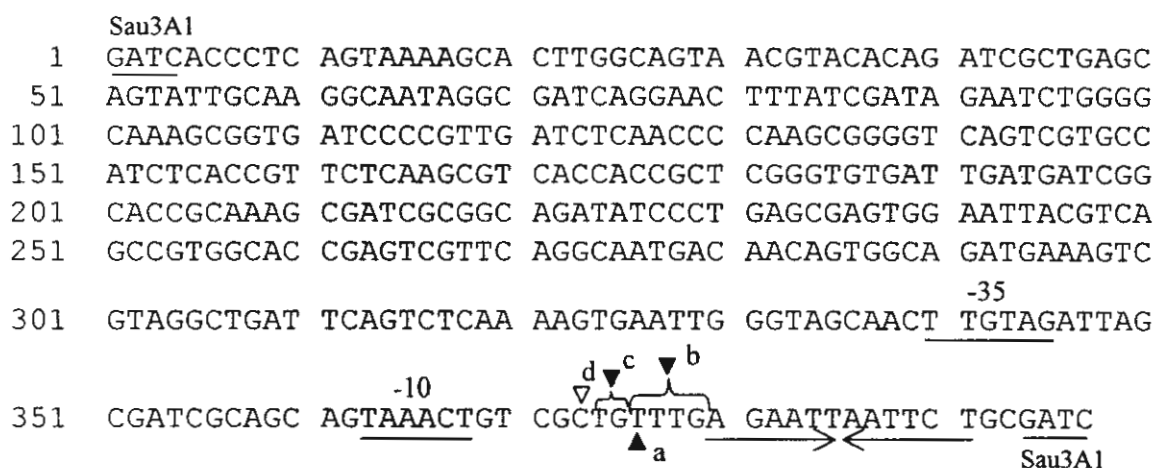


Fig. 12. Nucleotide sequence of the D13 promoter-active fragment.

The 397 bp Sau3A1 fragment of D13 (GenBank Database accession no. AF062517) was inserted in the BamHI site of pKG vector. In *E. coli*, the transcription initiation site determined by primer extension is indicated as (a). In *Synechococcus*, the transcription initiation sites determined by 5'RACE-PCR are indicated as (b) and (c). Major and minor transcription initiation sites are marked by black and white triangles respectively. The -10 and -35 regions are underlined. The inverted repeat sequence at the 5' end of the transcript is marked by arrows.

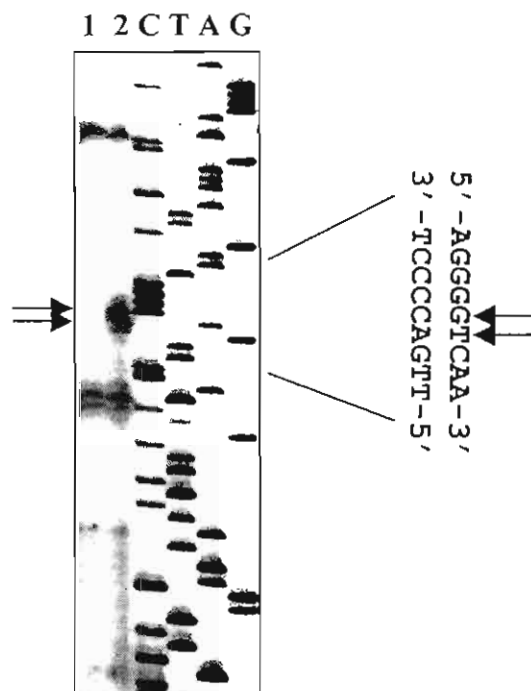


Fig. 13. Primer extension mapping of the initiation site of the D21-GUS transcript in *E. coli*.

The primer-GUS1 was used in primer extension assays with total RNA isolated from *E. coli* cells (as control, lane 1) and from those harbouring plasmid pKG-D21 (lane 2). The primer-extended products were electrophoresed in parallel with a sequence ladder (lane C, T, A, G) generated by using the same primer. The arrows indicate the longest products of the extension assay.

D21

Sau3A1 -35 (a)

1 GATCAAGACG TTACCAAGTT CATCCGAAAT ATTAATGGTC

41 ATCCGCCCTA TGGCTTTGTA AGCTTAGGGG TCAAGGTAGA

81 CGAAGAGATA TTGCCAGAGT GGCATCAGCG AATCATAGAC

121 TCTTTACCAA TCAATTTAGT AGTTAGAAGATC

Sau3A1

Fig. 14. Nucleotide sequence of the D21 promoter-active fragment.

The 152 bp Sau3A1 fragment of D21 was inserted in the BamHI site of pKG vector. In *E. coli*, the two major transcription initiation sites determined by primer extension is indicated as (a). The -10 and -35 regions are underlined. In *Synechococcus*, the major and minor transcription initiation sites determined by 5'RACE-PCR are indicated as (b) and (c) respectively. The -10 region is underlined. However, there is no *E. coli* -35 consensus.

E14 

```

1  AGCCTGAAAA TAGCTTTGCT CAGCTAGCGG CGGTTGTGGT TCGCAACCTC
51  AAGCAGGCCA GCGATCAATG GCAATTGGGC CGAGCTGATC AAGTTGCCGT
101 CACTCCTGCT CTGGCTCGGT TAGCCGGTGG GGCAATCGAT CCCTACACCG
151  CCACGGTGGT -10TAGCATTCCG  ATTGAACCTC  AAGAAGCCGC TCGGGCCTTG
201  GCCGCCAGTT TTGAGCGATC
      Sau3A1

```

Fig. 15. Nucleotide sequence of the E14 promoter-active fragment.

The nucleotide sequence shown is the 3' end of the E14 fragment immediately upstream of the promoterless-GUS gene. The transcription initiation sites of GUS transcripts in *Synechococcus* were determined by 5' RACE-PCR. Major and minor transcription initiation sites are marked by black and white triangles respectively.

E3 //

```

1  ATGACTCCTG AACTCCAAGA ACGCCTGACT AGCATCATTA ATGGCGACAA
51  GATTGTTGTC TTTATGAAAG GCAATAAGCT GATGCCCCAG TCGGGCTTTT
101 CCAACAACGT TGTTCAAATC TTGAATATCC TGGGCGTGCC CTTACCACC
151 GTTGATGTCT TGGCAGACTA CGACATTCGC CAAGGGATTA AAGAGTTTTC
201 GAATTGGCCG ACCATTCCCC AGGTTTACGT CAACGGGGAA TTTATCGGCG
251 GCTCTGATAT TTTGATTGAG CTCTATCAGA ATGGTGAAGT GCAGCAGATG
301 CTAGAGGTTG CCCTCGCCTC CTAGTCCTGC ACCTGAGTAG GATACGCCTC

351 TTGGCAGTGA CCGGCATCAG TGCTACATTG GTAACCTGTC ACGGGGCGTA
      A                                ▽b                                B
401 GCGCAGCTTG GTAGCGCACC ACTTTGGGGT AGTGGGGGTC GTGGGTTCAA
      ▽d ▽a,c
451 ATCCGCGCGC TCCGATTGAA TCGGAATCAC TCCAACATCA CGATC
                                     ←
                                     Sau3A1

```

Fig. 16. Nucleotide sequence of the E3 promoter-active fragment.

The nucleotide sequence shown is the 3' end of the 1.5 kb E3 fragment immediately upstream of the promoterless-GUS gene (GenBank Database accession no. AF083392). The start and stop codons of an open reading frame of 107 amino acids (shown in Fig. 17) are marked by double lines. The 74 nucleotides (nt. 392-465) of tRNA^{Pro} gene is in bold. The two boxed regions A and B conform to the two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes. The transcription initiation sites of GUS transcripts were determined by 5' RACE-PCR. In *E. coli*, the transcription initiation sites are indicated as (a) and (b). In *Synechococcus*, the transcription initiation sites are indicated as (c) and (d). Major and minor transcription initiation sites are marked by black and white triangles respectively. The inverted repeat sequence at the 5' end of the transcript is marked by arrows.

PCC7942	M	I	P	E	L	Q	E	R	L	T	S	I	I	N	G	D	K	I	V	V	F	M	K	G	N	K	L	M	P	Q	C	G	F	S	N	N	V	V	Q	I	L	N	I	L	G	V	P	F
PCC6803	M	N	P	E	T	K	A	R	I	D	Q	L	V	T	A	N	K	V	M	V	F	M	K	G	T	K	L	M	P	Q	C	G	F	S	N	N	V	V	Q	I	L	N	M	L	G	I	P	F
<i>P. purpurea</i>	M	D	I	E	T	K	K	V	I	E	Q	I	L	D	N	N	K	I	V	L	F	M	K	G	S	K	L	M	P	M	C	G	F	S	N	T	A	I	Q	I	L	N	T	L	N	T	D	Y
PCC7942	T	T	V	D	V	L	A	D	Y	D	I	R	Q	G	I	K	E	F	S	N	W	P	T	I	P	Q	V	Y	V	N	G	E	F	I	G	G	S	D	I	L	I	E	L	Y	Q	N	G	E
PCC6803	E	T	L	D	V	L	A	D	A	E	I	R	Q	G	I	K	E	Y	S	N	W	P	T	I	P	Q	V	Y	V	N	G	E	F	V	G	G	S	D	I	M	I	E	L	Y	Q	N	G	E
<i>P. purpurea</i>	F	T	Y	D	I	L	E	N	E	N	I	R	Q	A	I	K	E	H	S	S	W	P	T	I	P	Q	L	Y	I	N	R	E	F	V	G	G	A	D	I	M	L	E	L	F	E	Q	G	E
PCC7942	L	Q	M	L	E	V	A	L	A	S																																						
PCC6803	L	Q	E	M	L	E	V	A	L	A	S																																					
<i>P. purpurea</i>	L	Q	A	Q	V	E	T	L	L	A	A																																					

Fig. 17. Comparison of the ORF107 of E3 promoter-active fragment.

The ORF from *Synechococcus* PCC7942 (this study, accession no. AF083392), slr1846 from *Synechocystis* PCC6803 (accession no. P73056) and ORF107 from *Porphyra purpurea* (accession no. U38804). Boxed residues represent identical amino acids.

Out put ที่ได้

1. Output Publication

Wipa Chungjatupornchai, Thanaset Senawong and Sakol Panyim (1998) Isolation and Characterization of *Synechococcus* PCC7942 Promoters: tRNA^{pro} gene functions as a promoter. (Submitted to Current Microbiology) **คุณฉันทน์ฉบับในภาคผนวก**

2. Output Proceeding

Wipa Chungjatupornchai and Sakol Panyim (1997) The use of β -glucuronidase gene as a reporter gene for isolation of cyanobacterial promoters. The Second Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference and Third Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology May 7-10, 1997. Phuket, Thailand **(บทคัดย่อคุณฉันทน์ฉบับในภาคผนวก)**

3. Output **อื่นๆ**ที่ผู้วิจัยได้ร่วมวิจัยขณะที่ได้รับทุนวิจัยสกว และได้กล่าวถึง สกว ในกิตติกรรมประกาศ

Pawjai Khamphang, **Wipa Chungjatupornchai**, Plearnpis Luxananil and Sakol Panyim (1998) Efficient expression of mosquito-larvicidal proteins in the gram-negative bacterium capable of recolonization in the guts of *Anopheles dirus* larva. (submitted to Appl. Microbiol. Biotech.)

ภาคผนวก

The Use of β -Glucuronidase Gene as a Reporter Gene for Isolation of Cyanobacterial Promoters

Wipa Chungjatupornchai and Sakol Panyim
Center for Molecular Genetics-Genetic Engineering,
Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University,
Salaya Campus, Nakornpathom 73170, Thailand.

Recently, cyanobacteria or 'blue green algae' have been used as hosts to express several heterologous genes (i.e. mosquitocidal protein genes of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, salmon growth hormone gene). However, the level of heterologous gene expression in cyanobacteria is very low when compared with that in *E. coli*. A possibility to improve the gene expression is to use an endogenous strong promoter. However, little is known about what is the promoter sequence in cyanobacteria. Comparison of the putative promoter sequences of several cyanobacterial genes reveals that some of them are *E. coli*-like promoters whereas most of them have no consensus sequence. This might be due to the genetic heterogeneity of the compared cyanobacteria, since the GC content of cyanobacterial DNA ranges from 35-71% which is as much as the whole kingdom of bacteria.

In order to find out what is the promoter sequence of cyanobacteria, *Synechococcus* PCC7942 was used as a model system in this study. The *E. coli* β -glucuronidase (*GUS*) gene was used as a reporter gene for isolation of the PCC7942 promoters. A promoter probe shuttle vector, pKG containing the promoterless *GUS* gene, was constructed. The λP_R promoter of lambda bacteriophage or the *CaMV35S* promoter of cauliflower mosaic virus was cloned upstream of the *GUS* gene in pKG and transformed into both *E. coli* and PCC7942. Comparison of the *GUS* gene expression revealed that the gene under the control of λP_R promoter was expressed in both hosts, whereas the gene under the control of *CaMV35S* promoter was expressed in PCC7942 but not in *E. coli*. This result indicated that the functional promoter in PCC7942 was not identical to that in *E. coli*. In order to isolate promoters, a library of chromosomal DNA fragments of PCC7942 inserted upstream of *GUS* gene in pKG was constructed and transformed into PCC7942. Transformants were screened for *GUS* enzyme activity and classified according to the level of the enzyme activity from low to high as group A, B, C, D and E respectively. They are A, 15.5%; B, 15.4%; C, 12.4% D, 5.9%; and E, 2.6%. The enzyme activity of the remaining 48.2% is either lower than group A or not detectable. Thus *GUS* gene is a highly sensitive reporter gene for PCC7942. Comparison of the activity of the isolated promoters in PCC7942 and *E. coli* will be discussed.

Published in proceeding of the Second Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference and Third Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology May 7-10, 1997. Phuket, Thailand

(Submitted to Current Microbiology)

**Isolation and Characterization of *Synechococcus* PCC7942 Promoters:
tRNA^{Pro} Gene Functions as a Promoter**

Wipa Chungjatupornchai*, Thanaset Senawong and Sakol Panyim

Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Thailand.

* Corresponding author: Dr. Wipa Chungjatupornchai

Institute of Molecular Biology and Genetics,

2nd floor, Institute of Science & Technology Building,

Mahidol University, Salaya Campus,

Nakornpathom 73170, Thailand

E-mail: stwcj@mucc.mahidol.ac.th

Fax: 662/ 441-9906

Telephone: 662/ 441 9003-7 ext.1240, 1235

Abstract

Promoter-active fragments of *Synechococcus* PCC7942 were isolated by transcriptional gene fusion to the promoterless β -glucuronidase (GUS) gene of *E. coli*, which was used as a reporter gene. Several of the isolated promoter-active fragments expressed GUS activity in *Synechococcus* comparable with that of the λP_R promoter. Only 10% of the isolated promoter-active fragments also functioned in *E. coli*. The transcription initiation sites of the two promoter-active fragments, D13 and E3, were identified. The major transcription initiation sites of D13 and E3 in *Synechococcus* were located within the nucleotides TTTG and TTG respectively which were identical to those corresponding in *E. coli*. The inferred -10 and -35 regions of D13 were TAAACT and TTGTAG respectively which conformed to the *E. coli* σ^{70} promoter. Immediately upstream of the E3 transcription initiation sites was tRNA^{pro} (GGG) gene, which contained two regions exhibiting strong homology to the major promoter elements in eukaryotic tRNA genes but did not contain the *E. coli* promoter element. Thus, the tRNA^{pro} gene can act as a promoter.

Key words: Cyanobacteria, *Synechococcus* PCC7942, β -glucuronidase, Transcription initiation site, Promoters, tRNA.

Introduction

Cyanobacteria are the simplest organisms capable of performing oxygenic photosynthesis, with a thylakoid apparatus remarkably similar to that of higher plant chloroplasts [16]. They are model organisms for the cloning of genes involved in photosynthesis. Cyanobacteria have been used as hosts to express several heterologous genes. For example, attempts have been made to express the mosquitocidal protein genes of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in order to provide an alternative biological insecticide for control of mosquito populations [2, 5, 35]. They have also been used in the expression of salmon growth hormone gene in order to produce a feed additive for fish [20], or the expression of ethylene-forming enzyme in order to exploit atmospheric CO₂ as a substrate [11]. However, the level of heterologous gene expression in cyanobacteria is very low when compared with that in *E. coli*. A possible way to improve the gene expression is to use an endogenous strong promoter. However, current knowledge of the structure and function of promoters recognized within cyanobacteria is still limited. Although cyanobacteria are classified as eubacteria [15], their RNA polymerase holoenzyme is unique in that it contains a subunit γ , in addition to the $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ structure common to the RNA polymerase of other eubacteria [31]. The genetics of cyanobacteria is highly heterogeneous, the GC content of their DNA ranges from 35% to 71% which is as varied as the whole kingdom of bacteria [28]. In order to isolate cyanobacterial promoters for structure and functional studies, the unicellular *Synechococcus* PCC7942 (previously referred to as *Anacystis nidulans* R2, Pasteur Culture Collection no. 7942) was used, because it is both physiologically and genetically well characterized and highly transformable [27].

Various reporter genes, e.g., *cat* [10], *lacZ* [30] and *galK* [23] have been used to isolate cyanobacterial promoters. *luxAB* [8] has been used to examine the expression of promoters in cyanobacteria. *E. coli* β -glucuronidase (GUS) is a very stable enzyme, with a

broad pH optimum (pH 5.0-7.5) and is resistant to thermal inactivation at 50°C [18]. It has been used as a reporter gene in plants [19] and animal cells [3]. GUS has also been used to monitor gene expression in cyanobacteria [14].

In this study, GUS was used as a reporter gene to isolate *Synechococcus* PCC7942 promoters, which are active in the cyanobacterium. The isolated promoters were characterized by measuring their relative promoter strength. The transcription initiation sites of two isolated promoters active both in *Synechococcus* and *E. coli* were identified. One of these promoters was tRNA^{Pro} gene.

Materials and Methods

Organisms and culture conditions

Synechococcus PCC7942 strain R2-SPc, cured of the small plasmid pUH24 [21], was grown in liquid or on solid (1% Difco Bacto Agar) BG-11 medium as described previously [38]. *E. coli* strain MC1061 [4] was grown in LB broth or agar as previously described [29].

Construction of plasmids

Plasmid pUC303, a shuttle vector capable of replication in *Synechococcus* PCC7942 and in *E. coli*, was generated previously [21]. In order to construct a promoter-probe vector, the DNA of pUC303 was replaced as follows: the SacI-XhoI fragment containing streptomycin-resistance gene was replaced by the 1.2 kb kanamycin-resistance gene from Tn903 [37], and the SalI-EcoRI fragment containing chloramphenicol-resistance gene was replaced by the 2.2 kb *E. coli* promoterless-GUS gene and the nopaline synthase terminator (Nos-ter) [19]. The resulting 9.6 kb promoter-probe shuttle vector was designated pKG (Fig. 1A). Plasmid pKG-35S and pKG-P_R were modified from pKG to carry the 0.8 kb *CaMV35S* promoter of the cauliflower mosaic virus [25] and the 0.9 kb of the *cI857* gene (which encodes a thermosensitive λ repressor) and the P_R promoter of phage λ [36] at the BamHI site upstream of the GUS gene respectively. In the resulting pKG-P_R, the 5' end 37 nucleotides of λ P_R structural gene were fused in-frame with the GUS gene.

Cloning of promoter-active DNA fragments from *Synechococcus* PCC7942

Chromosomal DNA of *Synechococcus* PCC7942 strain R2-SPc, isolated as previously described [7], was partially cut with Sau3A1 restriction enzyme. The purified 1-2 kb Sau3A1 DNA fragments were ligated at the dephosphorylated BamHI site which was located upstream of the promoterless-GUS gene in pKG. In order to amplify the plasmids, the ligation mixture

was transformed into *E. coli* MC1061 [29]. The transformants were selected on LB agar containing 25 µg/ ml of kanamycin. The plasmid mixture isolated from total *E. coli* transformants were transformed into *Synechococcus* PCC7942 strain R2-SPc as described previously [21]. The transformants were selected on BG-11 agar containing 10 µg/ ml of kanamycin and screened for GUS activity. Total DNA extracted from *Synechococcus* clones expressing GUS activity was transformed into *E. coli* to recover the recombinant plasmids for further molecular analysis.

β-glucuronidase and protein assay

For the GUS assay of *Synechococcus* and *E. coli*, the harvested cells cultures were suspended in buffer (50 mM NaPO₄ pH7.0, 10mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% Sarkosyl, 10 mM β-mercaptoethanol). Cells were lysed using a hand-held motor homogenizer in the presence of fine silica. The cell debris and fine silica were removed by centrifugation. GUS activity in the cell lysates was assayed using 4-methylumbelliferone-β-D-glucuronide as a substrate following the method of Scott *et al.* [32]. 4-methylumbelliferone fluorescence was measured with a TKO 100 Mini-Fluorometer (Hoefer Scientific Instruments, USA.). The values obtained were converted into specific activity using a calibration curve with known amounts of 4-methylumbelliferone product. Protein concentration of the cell lysates were determined using the Bio-Rad Detergent Compatible Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, USA).

Nucleotide sequence analysis

DNA sequences of the promoter-active fragments and recombinant plasmids from 5'RACE-PCR were determined by an automated sequence analyzer (Perkin Elmer, ABI,

Model 377). Sequence comparisons and analysis were carried out using the Wisconsin Package Version 9.1 software, Genetics Computer Group (GCG, Madison, WI, USA) and the BLAST program [1] with the GenBank database and the genome database for *Synechocystis* PCC6803 [24].

Primer extension

Total RNA from *E. coli* was isolated using RNeasy Kit (Qiagen, Germany). Primer extension method used to determine the transcription initiation site was as described previously [13]. Primer-GUS1 (Fig. 1B) labelled with [γ - ^{33}P]dATP was used in both the primer extension assay and the manual DNA sequencing that employed [α - ^{35}S]dATP and the T7 Sequencing Kit (Pharmacia Biotech, USA).

5'Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) -PCR

Total RNA was extracted from *E. coli* or cyanobacterial cells using Trizol Reagent (GIBCO BRL, USA). The absence of DNA contamination in the total RNA sample was verified using PCR detection. 5'RACE-PCR method, used to identify the transcription initiation sites, were carried out following the manufacturer's manual (5'/3' RACE kit, Boehringer Mannheim, Germany). In brief, 2 μg of total RNA was annealed with primer-GUS2 (see Fig. 1B). The cDNA were synthesized using AMV reverse transcriptase and tailed with d(A) using terminal transferase. The first PCR was carried out with primer-GUS1 (Fig. 1B) and the oligo d(T) anchor primer (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTT-3', V was either A, C or G) at 94 °C for 1 min, 60 °C for 30 sec, and 72 °C for 2 min for 35 cycles. One μl of twenty-fold dilution of the first PCR product was then subjected to the nested PCR. The condition of the

nested PCR was identical to the first PCR except that the primer-Link (Fig.1B) and PCR anchor-primer (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3') were used in place of primer-GUS1 and oligo d(T) anchor primer, respectively. To confirm that the desired region was amplified, the nested PCR products were digested with SmaI, since there is one SmaI site located downstream of the primer-Link (Fig. 1B). The products were further digested with SalI restriction endonuclease. The digested products were electrophoresed in 4.5 % NuSieve GTG agarose (FMC BioProducts, USA) and stained with ethidium bromide. The PCR products of the expected size were excised from the gel, directly cloned in pUC18 vector following the manufacturer's manual (FMC BioProducts, USA). The nucleotide sequences of inserts in the resulting recombinant plasmids were determined by an automated sequence analyzer.

Results and Discussion

GUS expression in *Synechococcus* PCC7942 and *E. coli* under the control of λP_R and *CaMV35S* promoter

In order to confirm that the GUS gene could be expressed in *Synechococcus*, plasmid pKG- P_R and pKG-35S, carrying promoter λP_R which has been shown to be a strong promoter in the cyanobacteria [6, 22] and *CaMV35S* which is active in plants [19] respectively, were transformed into *E. coli* and *Synechococcus*. Results in Table 1 indicate that, after heat induction, GUS activity was detected in both *E. coli* and *Synechococcus* harboring pKG- P_R . Thus, *cI857* gene encoding a thermosensitive λ repressor was functioning in *Synechococcus*, in agreement with the previous data [6, 22]. The GUS gene under the control of *CaMV35S* promoter was expressed with low activity in *Synechococcus* but not expressed in *E. coli*. The promoter sequence of *CaMV35S* did not conform to the *E. coli* promoter [17]. No published data on the activity of the *CaMV35S* promoter in cyanobacteria are available.

Isolation of promoter-active DNA fragments from *Synechococcus* PCC7942

Promoter-active fragments of *Synechococcus* were isolated by transcriptional gene fusion to the promoterless-GUS gene in pKG and detection of GUS activity. From a total of 640 transformants screened, 15 clones (2.3%) and 25 clones (3.9%) of the transformants expressed high and low GUS activity respectively. Out of these 40 clones, only 4 clones (10%) could express in both *Synechococcus* and *E. coli*. Since the number of *Synechococcus* transformants obtained in our experiments was not representative of the complete *Synechococcus* genome, the 4 clones that expressed GUS in *E. coli* did not represent the totality of *Synechococcus* sequences that were able to interact with the *E. coli* RNA polymerase. However, the majority of the isolated promoters could not function in *E. coli*, thus it indicated that their functional sequences were different from those of *E. coli*. Since the

promoters were isolated under normal cyanobacterial growth condition as previously described [38], it remains to be investigated whether their activities would be different under other environmental growth conditions. Electrophoresis analysis of the recombinant plasmids revealed that the size of the isolated promoter-active fragments varied from a few hundred base pairs to 2.7 kilobases (data not shown).

Promoter strength of the isolated DNA fragments in *Synechococcus* PCC7942 and *E.coli*

The promoter strength of the isolated DNA fragments was determined by measuring GUS activity. In comparison with the *CaMV35S* and λP_R promoters, the GUS activity of the 7 isolated promoter-active fragments is shown in Table 1. Promoter-active fragments E3, E4, D13 and D21 were active in both *Synechococcus* and *E. coli*. E8, E10 and E14 were active only in *Synechococcus* but not active in *E. coli*. In *Synechococcus*, E3 was stronger than the λP_R promoter, whereas E10 and E14 were of similar strength. These 7 isolated promoters were not inducible by heat at 39°C. We also observed that light intensity affected expression of E10. GUS activity of E10 in *Synechococcus* grown at 1,500 Lux was 65 (± 7) nmole/ min/ mg protein. This activity was approximately 4 times lower than that detected when the *Synechococcus* were grown at 5,000 Lux, (see Table 1). GUS activity of the remaining 6 promoters was not significantly different when they were grown at 1,500 or 5,000 Lux. GUS activity of E3, E4, D13 and D21 in *Synechococcus* was higher than the corresponding activity in *E. coli*. The region immediately upstream of the initiation codon of the GUS gene did not contain a canonical Shine-Dalgarno sequence (GGAGG) similar to that found in *E. coli* (Fig. 1). This may be one of the factors that caused lower levels of GUS activity in *E. coli* than in *Synechococcus* (Table 1). Although it has been shown that in *E. coli*, the presence of canonical SD sequence increases expression of the reporter gene, SD-independent translation

initiation system also exists [9]. No consensus sequence of a cyanobacterial counterpart to the SD sequence in *E. coli* has been previously reported.

None of the 7 isolated promoters were as strong as the λP_R promoter in *E. coli*. Several promoters from this study were stronger or as strong as the λP_R promoter which has been previously shown to be a strong promoter in *Synechococcus* [6, 22] and thus they are useful for high expression of heterologous genes in *Synechococcus*. Further characterization of the isolated promoters will reveal more detail of cyanobacterial promoter structures.

D13-GUS transcript mapping and promoter analysis.

Since D13 was the strongest of the four isolated promoter-active fragments in *E. coli* (Table 1), it was chosen for study of the transcription initiation site. The transcription initiation site of D13-GUS in *E. coli* was determined by the primer extension method. The major primer extension product of RNA transcripts from *E. coli* harbouring pKG-D13 was clearly shown (Fig. 2). This result placed the transcription initiation site at the nucleotide T. However, a minor primer extension product of a smaller fragment was also detected at another nucleotide T located 8 bases downstream of the major product. This smaller minor fragment might be an incomplete primer extension product. The position of the major transcription initiation site is indicated as (a) in Fig 3.

We were unsuccessful in several attempts to determine the initiation site of the D13-GUS transcript from *Synechococcus* using the primer extension method. This may have been due to the relatively low abundance of steady-state transcripts of D13-GUS in *Synechococcus*. Thus 5'RACE-PCR was used to determine the transcription initiation site of D13-GUS in *Synechococcus*. Sequencing analysis of eighteen 5'RACE-PCR independent clones revealed that transcription initiation sites were located at TTTG (8 clones), TG (8 clones) and C (2 clones) indicated as (b), (c), and (d) respectively in Fig. 3. Since the cDNA were tailed with

d(A), we could not identify the exact transcription initiation nucleotide if its immediately upstream sequence was a nucleotide T. This can be solved by tailing the cDNA with d(C) or d(G). The results indicate that there are two major and one minor transcription initiation sites of D13-GUS in *Synechococcus*. The major transcription initiation sites of D13-GUS in *Synechococcus* were located within a few nucleotides identical to those in *E. coli*. Therefore, both organisms probably used the same functional promoter sequence of D13. The inferred -10 and -35 regions upstream of the D13-GUS transcription initiation sites were TAAACT and TTGTAG (Fig. 3) which conformed to that of the *E. coli* σ^{70} promoter (TATAAT) and (TTGACA) respectively [17]. It has been shown previously that *tac* promoter recognized by *E. coli* σ^{70} can function in *Synechococcus* [6, 14]. An 12 bp inverted repeat with unknown function was detected at 5' end of the D13-GUS transcript (Fig. 3). No significant similarity to nucleotide sequence of D13 was detected in the database and thus the D13 promoter probably belongs to an unknown gene.

Nucleotide sequence analysis of promoter-active fragment E3

The insert fragment E3 exhibited the strongest promoter activity in *Synechococcus* (Table 1), and therefore further characterized. The nucleotide sequence at the 3' end of the 1.5 kb of E3 fragment, immediately upstream of the promoterless-GUS gene, was determined. Nucleotide sequence analysis revealed an ORF of 107 amino acids (Fig. 4) which was highly homologous to the hypothetical proteins slr1846 from *Synechocystis* PCC6803 and ORF107 from *Porphyra purpurea* with 76.6% and 53.3% amino acids identity respectively (Fig. 5). The 74 nucleotides following the ORF107 (Fig. 4) were 100% identical to the tRNA^{pro} (anticodon GGG) gene of *Synechocystis* PCC6803 (accession no. D90900). Upstream of the 5' end tRNA^{pro} gene, no conformed *E. coli* promoter element was detected (Fig. 4). At the 3' end of this gene there was an 15 bp inverted repeat (Fig. 4). Immediately downstream at the

end of the tRNA^{pro} gene of *Synechocystis* PCC6803, an 10 bp inverted repeat (TTCAGCTGAA) is observed (accession no. D90900). There is no Sau3A1 site within ORF107 and tRNA^{pro} gene, thus the organizations of the gene could not be artifacts from cloning.

The tRNA^{pro} gene can act as promoter

Transcription initiation sites of E3-GUS were determined using 5'RACE-PCR. Sequencing analysis of 5'RACE-PCR independent clones revealed that transcription initiation sites in *E. coli* were located at TTG (6 out of 10 clones) and at G (4 clones) indicated as (a) and (b) respectively. Those in *Synechococcus* were located at TTG (11 out of 13 clones) and at A (2 clones) indicated as (c) and (d) respectively (Fig. 4). Thus, there are one major and one minor transcription initiation sites of E3-GUS. The major transcription initiation site in *E. coli* was located within nucleotides TTG identical to that in *Synechococcus*. Thus in both organisms, the GUS transcripts were probably controlled by the same functional promoter sequence. Immediately upstream of the transcription initiation sites was the tRNA^{pro} gene, and therefore the tRNA^{pro} gene can act as a strong promoter. However, it did not contain any -10 and -35 regions which conformed to those of *E. coli* σ^{70} promoter and may be one of the factors that caused low promoter activity in *E. coli* (Table 1). The tRNA^{pro} gene contained two regions, block A and B (Fig. 4), exhibiting strong homology respectively to block A (TGGC^NNAGTGG) and B (GGTTCGANNCC) of the eukaryotic tRNA gene [12]. In the tRNA^{pro} gene, two additional nucleotides at nt.16 and 17 interrupt the block A (Fig. 4). It has been shown that blocks A and B are split promoter sequences of the tRNA^{Leu} gene of *Xenopus laevis* and recognized by RNA polymerase III [12]. Yeast tRNA gene containing the two conserved blocks can act as promoter in yeast [26]. Whether these two conserved blocks are the promoter elements that control the GUS transcripts in *E. coli* and in *Synechococcus*

remain to be investigated. Further deletion analysis and site directed mutagenesis of the potential region in the tRNA^{pro} gene could elucidate the characteristics of a strong promoter in *Synechococcus*.

Multiple sigma factor genes have been identified in *Synechococcus* PCC7942. Their encoded products have conserved domains characteristic of principal sigma factors of the σ^{70} class [33, 34]. However, our results show that the majority of isolated *Synechococcus* promoters did not function in *E. coli*. The tRNA^{pro} gene, which functions as a promoter and lacks the *E. coli* promoter element, was not recognized by sigma factors of the σ^{70} class. The use of these isolated promoters as DNA templates to probe for new RNA polymerase activity *in vitro* will clarify whether other uncharacterized sigma factors exist in *Synechococcus* PCC7942.

Acknowledgements

We thank Ms. Petcharin Pareong, Chanikarn Boonchouy for technical assistance and Dr. Kanyawim Kirtikarn for critical reading of the manuscript. This work was supported in part by the Thailand Research Fund (TRF). W. Ch. is a recipient of TRF. T. S. was supported by a Graduate Student Fellowship from National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand. S. P. is a TRF Senior Research Scholar.

Literature Cited

1. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
2. Angsuthanasombat C, Panyim S (1989) Biosynthesis of 130-kilodalton mosquito larvicide in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Appl Environ Microbiol* 55:2428-2430
3. Bracey LT, Paigen K (1987) Changes in translational yield regulate tissue-specific expression of β -glucuronidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9020-9024
4. Casadaban MJ, Cohen SN (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 138:179-207
5. Chungjatupornchai W (1990) Expression of the mosquitocidal-protein genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and the herbicide-resistance gene *bar* in *Synechocystis* PCC6803. *Curr Microbiol* 21:283-288
6. Chungjatupornchai W, Panyim S (1994) Advances in heterologous gene expression in cyanobacteria. In: Phang SM, Lee YK, Borowitzka MA, Whitton BA (eds) *Algal biotechnology in the Asia-Pacific region*. Malaysia: University of Malaya, pp186-189
7. Draper J, Scott R (1988) The isolation of plants nucleic acids. In: Draper J, Scott R, Armitage P, Walden R (eds) *Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual*. London: Blackwell Scientific Publications, pp 199-236
8. Elhai J (1993) Strong and regulated promoters in the cyanobacterium *Anabaena* PCC7120. *FEMS Microbiol Lett* 114:179-184
9. Fargo DC, Zhang M, Gillham NW (1998) Shine-Dalgarno-like sequences are not required for translation of chloroplast mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts or in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 257:271-282

10. Friedberg D, Seijffer J (1986) Controlled gene expression utilising Lambda phage regulatory signals in a cyanobacterium host. *Mol Gen Genet* 203:505-510
11. Fukuda H, Sakai M, Nagahama K, Fujii K, Matsuoka M, Inoue Y, Ogawa T (1994) Heterologous expression of the gene for the ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae* in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Biotech Lett* 16:1-6
12. Galli G, Hofstetter H, Birnstiel ML (1981) Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. *Nature* 294:626-631
13. Garcia-Sanz JA, Mullner EW (1997) RNase protection and primer extension. In: Lefkovits I (ed) *Immunology methods manual*. NY: Academic Press, pp 425-438
14. Geerts D, Bovy A, de Vrieze G, Borrias M, Weisbeek P (1995) Inducible expression of heterologous genes targeted to a chromosome platform in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Microbiology* 141:831-841
15. Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, Pace NR (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J Bacteriol* 170:720-726
16. Gray MW (1989) The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet* 5:294-299
17. Harley CB, Reynolds R (1987) Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 15:2343-2361
18. Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986) β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8447-8451
19. Jefferson RA, Kavanagh TA and Bevan MW (1987) GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker. *EMBO J* 6:3901-3908
20. Kawata Y, Yamano N, Kojima H, Itoh S (1991) Expression of salmon growth hormone in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *Biotech Lett* 13:851-856

21. Kuhlemeier CJ, Thomas AAM, van der Ende A, van Leen RW, Borrias WE, van den Hondel CAMJJ, Arkel GA (1983) A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Plasmid* 10:156-163
22. Mermet-Bouvier P, Chauvat F (1994) A condition expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. *Curr Microbiol* 28:145-148
23. Milkowski C, Quinones A (1991) Cloning of promoter-active DNA sequences from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 in an *Escherichia coli* host. *Curr Microbiol* 23:333-336
24. Nakamura Y, Kaneko T, Hirose M, Miyajima N, Tabata S (1998). CyanoBase, a www database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Nucl Acids Res* 26:63-67
25. Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812
26. Otter CA, Straby KB (1991) Transcription of eukaryotic genes with impaired internal promoters: the use of a yeast tRNA gene as promoter. *J Biotech* 21:289-294
27. Porter RD (1986) Transformation in cyanobacteria. *Crit Rev Microbiol* 13:111-132
28. Rippka R (1988) Recognition and identification of cyanobacteria. *Methods Enzymol* 167:28-67
29. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
30. Scanlan DJ, Bloye SA, Mann NH, Hodgson DA, Carr NG (1990) Construction of lacZ promoter probe vectors for use in *Synechococcus*: application to the identification of CO₂-regulated promoters. *Gene* 90: 43-49

31. Schneider GJ, Haselkorn R (1988) RNA polymerase subunit homology among cyanobacteria, other eubacteria, and archaebacteria. *J Bacteriol* 170: 4136-4140
32. Scott R, Draper J, Jefferson R, Dury G, Jacob L (1988) Analysis of gene organization and expression in plants. In: Draper J, Scott R, Armitage P, Walden R (eds) *Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual*. London: Blackwell Scientific Publications, pp 265-337
33. Sugimoto Y, Tanaka K, Masuda S, Takahashi H (1997) The *rpoLD1* gene of *Synechococcus* sp. strain PCC7942 encodes the principle sigma factor of RNA polymerase. *J Gen Appl Microbiol* 43:17-21
34. Tanaka K, Masuda S, Takahashi H (1992) Multiple rpoD-related genes of cyanobacteria. *Biosci Biotech Biochem* 56:1113-1117
35. Tandeau de Marsac N, de la Torre F, Szulmijster J (1987) Expression of the larvicidal gene of *Bacillus sphaericus* 1593M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Mol Gen Genet* 209:396-398
36. Tsurimoto T, Hase T, Matsubara H, Matsubara K (1982) Bacteriophage lambda initiation preparation from a strain that overproduces the O and P protein. *Mol Gen Genet* 187:79-86
37. Vieira J, Messing J (1982) The pUC plasmid, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis with synthetic universal primers. *Gene* 19:259-268
38. William JGK (1988) Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol* 167:766-778

Legends to Figure

Fig. 1. Promoter-probe plasmid pKG and positions of Primers.

A). The plasmid pKG, modified from pUC303 (see materials and methods), is able to replicate in *E. coli* and *Synechococcus* PCC7942. The cyanobacterial replicon is drawn in bold. The plasmid carries the kanamycin resistance gene (Km), the promoterless β -glucuronidase gene (GUS) and nopaline synthase terminator (Nos-ter). Promoter-active fragments were inserted at the BamHI site upstream of the GUS gene.

B). The primers used in primer extension and 5'RACE-PCR.

Primer-GUS2 and primer-GUS1 are complementary to the nucleotides 269 to 283, and 13 to 32 of the GUS gene respectively. Primer-Link is complementary to the nucleotides 15 upstream and 8 downstream of the GUS start codon. The positions of the primers are marked. The figure is not drawn to scale. Sequences of the primers are shown.

Fig. 2. Primer extension mapping of the initiation site of the D13-GUS transcript in *E. coli*.

The primer-GUS1 was used in primer extension assays with total RNA isolated from *E. coli* cells (as control, lane 1) and from those harbouring plasmid pKG-D13 (lane 2). The primer-extended products were electrophoresed in paraell with a sequence ladder (lane G, A, T, C) generated by using the same primer. The arrow indicates the longest products of the extension assay.

Fig. 3. Nucleotide sequence of the D13 promoter-active fragment.

The 397 bp Sau3A1 fragment of D13 (GenBank Database accession no. AF062517) was inserted in the BamHI site of pKG vector. In *E. coli*, the transcription initiation site determined by primer extension is indicated as (a). In *Synechococcus*, the transcription initiation sites determined by 5'RACE-PCR are indicated as (b) and (c). Major and minor

transcription initiation sites are marked by black and white triangles respectively. The -10 and -35 regions are underlined. The inverted repeat sequence at the 5' end of the transcript is marked by arrows.

Fig. 4. Nucleotide sequence of the E3 promoter-active fragment.

The nucleotide sequence shown is the 3' end of the 1.5 kb E3 fragment immediately upstream of the promoterless-GUS gene (GenBank Database accession no. AF083392). The start and stop codons of an open reading frame of 107 amino acids (shown in Fig. 5) are marked by double lines. The 74 nucleotides (nt. 392-465) of tRNA^{pro} gene is in bold. The two boxed regions A and B conform to the two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes. The transcription initiation sites of GUS transcripts were determined by 5' RACE-PCR. In *E. coli*, the transcription initiation sites are indicated as (a) and (b). In *Synechococcus*, the transcription initiation sites are indicated as (c) and (d). Major and minor transcription initiation sites are marked by black and white triangles respectively. The inverted repeat sequence at the 5' end of the transcript is marked by arrows.

Fig. 5. Comparison of the ORF107 from *Synechococcus* PCC7942 (this study, accession no. AF083392), slr1846 from *Synechocystis* PCC6803 (accession no. P73056) and ORF107 from *Porphyra purpurea* (accession no. U38804). Boxed residues represent identical amino acids.

Table 1. GUS activity of promoter-GUS fusion in *Synechococcus* PCC7942 and *E. coli* MC1061.

Plasmid	GUS activity (nmole/ min/ mg protein) ^a	
	<i>Synechococcus</i> ^b	<i>E. coli</i> ^c
Host (without pKG)	0.11 ($\pm$ 0.01)	13 ($\pm$ 2)
PKG (control)	0.13 ($\pm$ 0.01)	13 ($\pm$ 2)
PKG-35S	6 ($\pm$ 1.7)	N
PKG-P _R (non induction) ^d	27 ($\pm$ 10)	N
PKG-P _R (heat induction) ^d	276 ($\pm$ 30)	505 ($\pm$ 8)
PKG-E3	325 ($\pm$ 20)	57 ($\pm$ 8)
PKG-E4	36 ($\pm$ 5)	21 ($\pm$ 3)
PKG-E8	22 ($\pm$ 9)	N
PKG-E10	298 ($\pm$ 30)	N
PKG-E14	245 ($\pm$ 22)	N
PKG-D13	145 ($\pm$ 20)	70 ($\pm$ 3)
PKG-D21	79 ($\pm$ 15)	31 ($\pm$ 8)

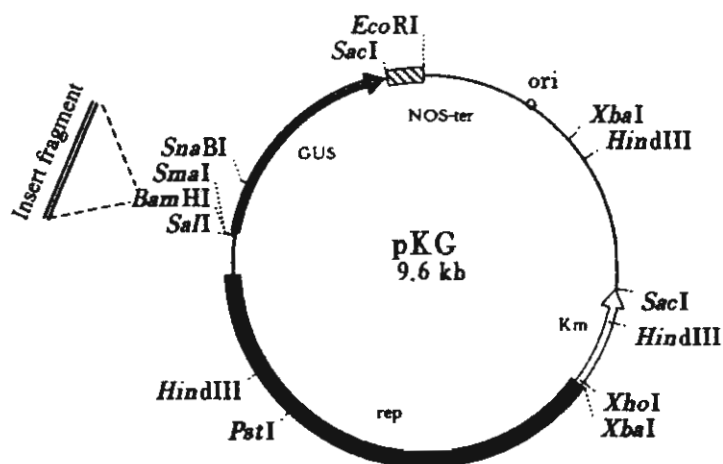
^a: The specific activities are the means of three independent experiments (each in duplicate), with standard deviations indicated in parantheses. N: no expression (the GUS activity is not higher than the control).

^b: *Synechococcus* was grown on BG-11 agar at 28°C with a light intensity of approximately 5,000 Lux, for 6 days.

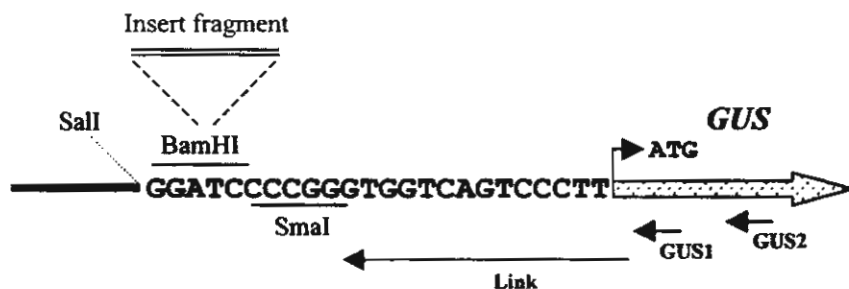
^c: *E.coli* was grown in LB broth at 37°C for 14 hr.

^d: For non induction conditions, cells were grown at 28°C. For heat induction, a 5-day culture of *Synechococcus* and a log-phase culture of *E. coli* were further grown at 39°C, 24 hr and at 42°C, 18 hr respectively.

A



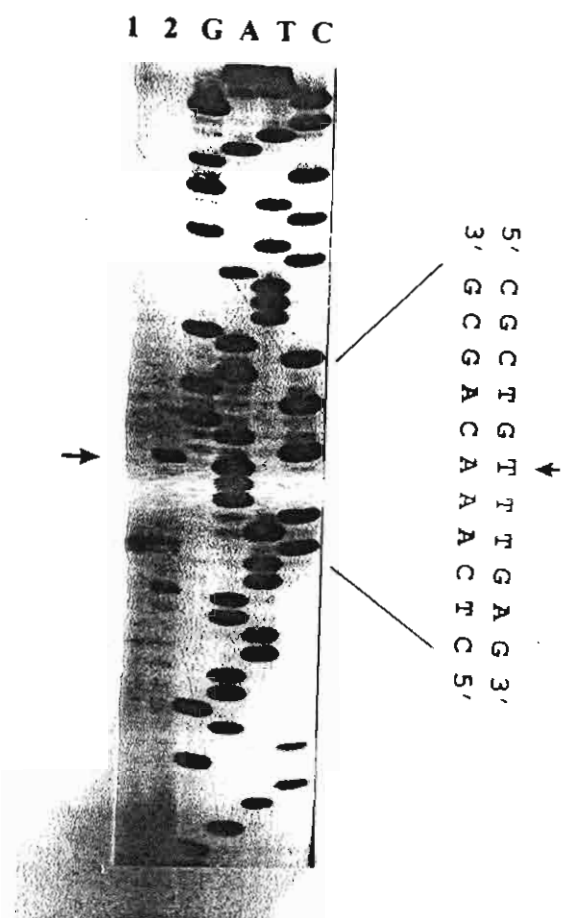
B



Primer-GUS2: 5' -CACACTTTGCCGTAATGAGTGACC-3'

Primer-GUS1: 5' -TCACGGGTTGGGGTTTCTAC-3'

Primer-Link: 5' -CGTAACATAAGGGACTGACCAC-3'



D13

Sau3A1

```

1  GATCACCCTC AGTAAAAGCA CTTGGCAGTA ACGTACACAG ATCGCTGAGC
51 AGTATTGCAA GGCAATAGGC GATCAGGAAC TTTATCGATA GAATCTGGGG
101 CAAAGCGGTG ATCCCCGTTG ATCTCAACCC CAAGCGGGGT CAGTCGTGCC
151 ATCTCACCGT TCTCAAGCGT CACCACCGCT CGGGTGTGAT TGATGATCGG
201 CACCGCAAAG CGATCGCGGC AGATATCCCT GAGCGAGTGG AATTACGTCA
251 GCCGTGGCAC CGAGTCGTTC AGGCAATGAC AACAGTGGCA GATGAAAGTC

301 GTAGGCTGAT TCAGTCTCAA AAGTGAATTG GGTAGCAACT TGTAGATTAG
                                     -35
351 CGATCGCAGC AGTAAACTGT CGCTGTTTGA GAATTAATTC TCGGATC
      -10      ▲ a      ▼ d ▼ c ▼ b      ←
                                     Sau3A1

```

E3

[illegible]

Chungjatapornchai et al. Fig. 4

PCC7942	M	T	P	E	L	Q	E	R	L	T	S	I	I	N	G	D	K	I	V	V	F	M	K	G	N	K	L	M	P	Q	C	G	F	S	N	N	V	Q	I	L	N	I	L	G	V	P	F	
PCC6803	M	N	P	E	T	K	A	R	I	D	L	V	T	A	N	K	V	M	V	F	M	K	G	T	K	L	M	P	Q	C	G	F	S	N	N	V	Q	I	L	N	M	L	G	I	P	F		
<i>P. purpurea</i>	M	D	I	E	T	K	K	V	I	E	Q	I	L	D	N	N	K	I	V	L	F	M	K	G	S	K	L	M	P	M	C	G	F	S	N	T	A	I	Q	I	L	N	T	L	N	T	D	Y
PCC7942	T	T	V	D	V	L	A	D	Y	D	I	R	Q	G	I	K	E	F	S	N	W	P	T	I	P	Q	V	Y	V	N	G	E	F	I	G	G	S	D	I	L	I	E	L	Y	Q	N	G	E
PCC6803	E	T	L	D	V	L	A	D	A	E	I	R	Q	G	I	K	E	Y	S	N	W	P	T	I	P	Q	V	Y	V	N	G	E	F	V	G	G	S	D	I	M	I	E	L	Y	Q	N	G	E
<i>P. purpurea</i>	F	T	Y	D	I	L	E	N	E	N	I	R	Q	A	I	K	E	H	S	S	W	P	T	I	P	Q	I	Y	I	N	R	E	F	V	G	G	A	D	I	M	L	E	L	F	E	O	G	E
PCC7942	L	Q	M	L	E	V	A	L	A	S																																						
PCC6803	L	Q	E	M	L	E	V	A	L	A	S																																					
<i>P. purpurea</i>	L	Q	A	Q	V	E	T	L	L	A	A																																					

รายงานการเงิน

รายงานการเงินในรอบ 3 ปี

ปีที่	จำนวนเงินรับ (บาท)	รวมยอดเงินรับ (บาท)	รายจ่ายหมวด (บาท)	รวมจ่าย (บาท)	คงเหลือ (บาท)
1	รับจากสกว. 360,000.00 ดอกเบี้ย 10,698.08	370,698.08	ค่าตอบแทนเมธีวิจัย 180,000.00 ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย 32,800.00 ค่าสารเคมีและวัสดุ 71,083.93 ค่าใช้สอย 9,354.20	293,238.13	77,459.95
2	ขกยลดจากปี 1 77,459.95 รับจากสกว. 360,000.00 ดอกเบี้ย 10,258.27	447,718.22	ค่าตอบแทนเมธีวิจัย 180,000.00 ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย 83,200.00 ค่าสารเคมีและวัสดุ 39,231.00 ค่าใช้สอย 20,765.75	323,196.75	124,521.47
3	ขกยลดจากปี 2 124,521.47 รับจากสกว. 270,000.00 ดอกเบี้ย 9,228.75	403,750.22	ค่าตอบแทนเมธีวิจัย 90,000.00 ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย 80,000.00 ค่าสารเคมีและวัสดุ 224,820.65 ค่าใช้สอย 8,821.00	403,641.65	108.57

ชื่อบัญชี
NAME

6094-4 เมธีวิชัย สก. - วิภา จิงจุฑาทรัพย์

ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน)
THE SIAM COMMERCIAL BANK PUBLIC COMPANY LIMITED

สาขาออม บณาวัดวิทยาลัยสตรี

บัญชีเงินฝากออมทรัพย์
SAVINGS ACCOUNT

เลขที่บัญชี
ACCOUNT NO.

333-2

06094-4



ผู้มีอำนาจลงนาม
Authorized Signature

ไม่ได้นำไปใช้เพื่อการค้าหรือการบริการ On-Line

ฝาก - ถอน

DATE	TIME	DEBIT	CREDIT	BALANCE	REMARKS
23/08/95	CDF		*****100.00	*****100.00	0156A
2/10/95	QDN		****360,000.00	****360,100.00	0535
31/10/95	CWD	/ *****15,000.00		****345,100.00	0156A
30/11/95	CWD	/ *****15,000.00		****330,100.00	0153B
28/12/95	CWD	/ *****15,000.00		****315,100.00	0156A
23/12/95	CWD	/ *****1,000.00		****314,100.00	0156A
31/12/95	T/I	*****0.00	*****4,287.50	****318,387.50	0000A
30/01/96	CWD	/ *****15,000.00		****303,387.50	0156A
30/01/96	CWD	/ *****1,000.00		****302,387.50	0156A
27/02/96	CWD	/ *****1,500.00		****300,887.50	0153A
27/02/96	CWD	/ *****15,000.00		****285,887.50	0153A
22/03/96	XWD	5,963.20		****279,924.30	0153A
22/03/96	KWD	/ *****1,839.97		****278,084.33	0153A
26/03/96	CWD	/ *****30,000.00		****248,084.33	0153A
26/03/96	CWD	/ *****1,500.00		****246,584.33	0153A
30/04/96	CWD	/ *****9,000.00		****237,584.33	0156A
30/04/96	CWD	/ *****15,000.00		****222,584.33	0156A
15/05/96	CWD	/ *****9,383.00		****213,201.33	0153B
21/05/96	CWD	/ *****3,346.96		****209,854.37	0156A
30/05/96	KWD	/ *****15,000.00		****194,854.37	0153B
30/05/96	CWD	/ *****1,371.00		****193,483.37	0153B
30/05/96	CWD	/ *****4,000.00		****189,483.37	0153B

รหัสรายการ

COP, CON ฝากเงินสด

ODP, ODN ฝากด้วยเช็ค

XOP, XON ฝากเป็นเงินโอน

ODP, ODN ฝากด้วยเช็คธนาคาร

CWD, CWN ถอนเงินสด

XWD, XWN ถอนเป็นเงินโอน

COR รายการแก้ไข

ATC เช็คคืน

INT ดอกเบี้ย

TAXภาษี

การฝากเงินโดยอัตโนมัติผ่าน 12 รายการรับเงินจากธนาคารต่างประเทศ

เงินฝากออมทรัพย์ และเงินฝากประจำ

1

000000							
วันที่ DATE	ประเภท TRANS CODE	ถอน WITHDRAWAL	ฝาก DEPOSIT	คงเหลือ BALANCE	หมายเลข บัญชี	ชื่อผู้รับเงิน	ลายเซ็น SIGNATURE
25/08/97	CWD	*****37,704.00	****141,903.47 0153A				1
3/09/97	CWD	*****17,382.00	****124,521.47 0153A				2
24/09/97	CWD	*****9,999.00	****114,522.47 0153B				3
30/09/97	QDN	*****270,000.00	****384,522.47 0156B				4
30/09/97	CWD	*****22,383.00	****362,139.47 0153B				5
3/11/97	CWD	*****41,500.00	****320,639.47 0153A				6
02/12/97	CWD	*****21,500.00	****299,139.47 0156A				7
30/12/97	CWD	*****21,780.00	****277,359.47 0156A				8
	INT	*****6,310.98					9
31/12/97	TAX	*****2,050.41	****281,620.04 0000A				10
16/01/98	CWD	*****11,342.00	****270,278.04 0153A				11
							12
27/01/98	CWD	*****42,733.25	****227,544.79 0156A				13
12/02/98	CWD	*****4,587.00	****222,957.79 0153A				14
26/02/98	CWD	*****24,680.00	****198,277.79 0156A				15
03/04/98	CWD	*****9,450.00	****188,827.79 0156A				16
09/04/98	CWD	*****10,883.40	****177,944.39 0153A				17
04/05/98	CWD	*****6,500.00	****171,444.39 0156A				18
01/06/98	CWD	*****7,554.00	****163,890.39 0156A				19
23/06/98	CWD	*****16,005.00	****147,885.39 0153A				20
	INT	*****4,968.18					21
30/06/98	TAX	*****0.00	****152,853.57 0000A				22
02/07/98	CWD	*****6,500.00	****146,353.57 0153A				

บริการฝาก-ถอนด้วยสำเนาบัตร และบริการอิเล็กทรอนิกส์

ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) เป็นผู้ให้บริการอิเล็กทรอนิกส์ ช่วยให้บริการฝากถอน โอนเงิน สอบถามยอดคงเหลือในบัญชี
ข้อมูลธุรกิจธนาคาร และธุรกิจทั่วไป ได้ทั้งจากสาขา ON-LINE และด้วยตนเอง จากบริการอิเล็กทรอนิกส์ในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ บริการเงินด่วน

ATM บริการธนาคารทางโทรศัพท์ (TELE-BANKING) บริการโทรรับเงิน
(TELECASH)

000000

3