ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การสร้างแหล่งยีนของเห็ดฟาง

ชื่อผู้เขียน นางสาว อรศรี ตันตยาภินันท์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล ประธานกรรมการ

ผศ.ดร.สิทธิโชค แสงโสดา กรรมการ

ผศ.ดร.เกรียงศักดิ์ ไชยโรจน์ กรรมการ

บทคัดย่อ

การสร้างแหล่งยีนของเห็ดฟาง (Volvariella volvacea) ได้อาศัยเทคนิคการสร้างดีเอ็นเอลูกผสมทางวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ยีนที่ต้องการคือยีนรหัสเอนไซม์เซลลูเลส การศึกษาเริ่มโดยศึกษาวิธีสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอด้วยวิธีต่างกัน พบว่าการทำเซลล์ให้แตกโดยวิธี freeze and thaw จะได้โครโมโซมดีเอ็นเอจากเห็ดครบสมบูรณ์ กว่าการทำเซลล์ให้แตกด้วยวิธี sonication จึงเลือกใช้วิธีแรกในการสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นแหล่งยีนรหัสเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นได้นำมาทดลองตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดคือ Sau 3AI และ Bam HI พบว่า Sau 3AI จะตัดโครโมโซมดีเอ็นเอได้ขนาดเล็กและพอเหมาะที่จะสอดใส่เข้าไปในพลาสมิดพาหะได้ดีกว่าพลาสมิดพาหะที่ใช้คือ พลาสมิด pFL1 (YEp24;URA3) ซึ่งเป็นพลาสมิดลูกผสมที่มียีนต้านต่อ ampicillin และ tetracyclin พลาสมิดดังกล่าวถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bam HI ตรงจุดที่อยู่บนท่อนยีนที่ต้าน tetracyclin เพียงตำแหน่งเดียว แล้วได้ทำการสอดใส่ชิ้นส่วนของโครโมโซมดีเอ็นเอจากเห็ดได้จากการตัดด้วย Sau 3AI ดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ถูกทรานส์ฟอร์มเข้าไปในเซลล์ E. coli C-600 ผลการทดลองนี้พบว่าถ้าใช้เซลล์ E.coli C-600 ในปริมาณมากการทรานส์ฟอร์มจะได้ผลดี จากนั้นนำเซลล์ที่ถูกทรานส์ฟอร์มแล้วมาเลี้ยงบนอาหารแข็งเพื่อทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดลูกผสมบรรจุอยู่โดยอาศัยสมบัติการต้านต่อ ampicillin และไม่ต้านต่อ tetracyclin อีกต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยใช้ replica-plating technique แล้วรวบรวมเซลล์ที่มีพลาสมิดลูกผสมดังกล่าวให้ได้มาก ๆ ตั้งแต่ 5,000 โคโลนีขึ้นไป เพื่อที่จะให้ได้ท่อนยีนในดีเอ็นเอลูกผสมที่มีความยาวเท่ากับจีโนมของเห็ดฟาง เพื่อใช้ในการโคลนยีนเซลลูเลสต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Construction of Straw Mushroom (Volvariella volvacea) Gene Library

Author Miss Orasri Tanthayaphinant

M.Sc. Chemistry

Examining Committee :

Assoc.Prof.Dr.Suree Phutrakul Chairman

Assist.Prof.Dr.Siddhichoke Sangsoda Member

Assist.Prof.Dr.Griangsak Chairote Member

Abstract

The gene library of straw mushroom (Volvariella volvacea) was constructed by the recombinant DNA technique on the proposal of the cellulase gene study. The chromosomal DNA extracted from straw mushroom cells by freezing and thawing contained more high molecular weight DNA than those of the sonicated cells as analyzed by agarose gel electrophoresis. The chromosomal DNA obtained from the former extraction was subjected to restriction endonuclease Sau 3AI and Bam HI. The results of the restriction cut by these two enzymes indicated that the Sau 3AI could provide shorter DNA fragments than those by Bam HI. These fragments had suitable sizes to recombine in plasmid vector. The yeast-bacterial hybrid plasmid as pFL1 (YEp24; URA3) was used as the vector containing both ampicillin and tetracyclin resistant genes. The plasmids were cut by Bam HI at only one site in the tetracyclin resistant gene and the Sau 3AI chromosomal DNA fragments were inserted.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

The recombinant plasmids were transformed into the E. coli C-600 and the E. coli C-600 containing the recombinant plasmids were cellected based on ampicillin resistant and tetracyclin sensitive by replica-plating technique. At least 5,000 colonies of the transformant cells were collected to construct the gene library for the further study of cellulase gene cloning.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved