หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการใช้เทคนิคการโคลน PCR product โดยตรงเพื่อการทำพันธุวิศวกรรมแบคคิวโลไวรัส
หน่วยกิจ	12
ผู้เขียน	นางสาวศิริยาภรณ์ นบนอบ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. กนกวรรณ พุ่มพุทรา ดร. สมเกียรติ เตชกาญจนารักษ์
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
สายวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
คณะ	ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
พ.ศ.	2547

บทคัดย่อ

T167935

การทำพันธุวิศวกรรมแบคคิวโลไวรัสในการศึกษานี้ใช้เทคนิคการโคลนยีนที่เตรียมได้จากเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เข้าสู่จีโนมของแบคคิวโลไวรัสโดยตรง โดยทำการแทรกยีนที่ต้องการศึกษาด้วยกระบวนการ homologous recombination เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการโคลนโดยการปรับเปลี่ยนความยาวของ homologous region จากการออกแบบ PCR primer ทำให้ยีนที่สนใจมีความยาวของ homologus region แตกต่างกัน ในการศึกษานี้ใช้โปรตีนที่เรืองแสงสีเขียว (Green Fluorescent Protein หรือ GFP) เป็นยีนทดสอบโดยทำการแทรกเข้าสู่จีโนมที่ตำแหน่งยีนไคติเนสของแบคคิวโลไวรัสสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย (Th-HaNPV, *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus) โดยมีส่วน chitinase locus sequence เป็น homologous region ซึ่งมีความยาวที่ทำการศึกษาต่างกัน ได้แก่ 50 75 และ 100 นิวคลีโอไทด์ ด้วยการใช้เทคนิค PCR และใช้พลาสมิด pNVBGFP เป็นต้นแบบ ได้ผลิตภัณฑ์ คือ chitinase-GFP PCR ที่มีความยาวของ Homologous region ต่างกัน จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา cotransfection เข้าสู่เซลล์แมลง (*Helicoverpa zea*) ร่วมกับดีเอ็นเอของแบคคิวโลไวรัสสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type Th-HaNPV genomic DNA) ผลการ cotransfection พบว่าความยาวของ homologous region ที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการส่งผ่านยีน GFP เข้าสู่จีโนมของแบคคิวโลไวรัส เนื่องจากพบ การแสดงออกของยีน GFP ในเปอร์เซ็นต์ใกล้เคียงกัน ส่วนผลการตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) ของการแทรกยีน GFP ที่ตำแหน่งยีนไคติเนสของแบคคิวโลไวรัส ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ยีน GFP ที่มีความยาวของ homologous region 75 และ 100 นิวคลีโอไทด์ มีความจำเพาะในการเกิด recombination เป็น 0.032

T167935

และ 0.049 % ตามลำดับ และจากการยืนยันผลด้วยการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของ recombinant baculovirus (ยีนไคติเนสถูกแทรกด้วยยีน GFP) ด้วยสับเตรท fluorescent chitin oligomer analogue พบว่า recombinant HaNPV-Th (chi-GFP) ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีความยาวของ homologous region 50 นิวคลีโอไทด์ ไม่พบการเกิด recombination ที่จำเพาะจึงไม่พบการแทรกของยีน GFP อย่างจำเพาะที่ยีนไคติเนสเลยทั้งนี้อาจเนื่องจากมี homologous region ที่สั้นเกินไป จากการทดลองนี้แสดงว่าการเพิ่มความยาวของ homologous region โดยวิธีการโคลนโดยตรงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการเกิด homologous recombination ที่จำเพาะได้

คำสำคัญ : การโคลน PCR product โดยตรง / แบคคิวโลไวรัสสายพันธุ์ดั้งเดิม (Th-HaNPV baculovirus) / กระบวนการ homologous recombination / ยีน GFP / ยีนไคติเนส

Thesis Title	Study of Direct PCR Cloning Technique for Genetic Engineering of Baculovirus
Thesis Credits	12
Candidate	Miss Siriyaporn Nobnorb
Thesis Advisors	Asst. Prof. Dr. Kanokwan Poomputsa
	Dr. Somkiet Techkarnjnaruk
Program	Master of Science
Fieid of Study	Biotechnology
Department	Biotechnology
Faculty	School of Biotechnology and Technology
B.E.	2547

Abstract

T167935

A rapid recombination technique for genetic engineering of baculovirus by PCR direct cloning method was performed in this study. Improvement of specific recombination for insertion of foreign gene into baculovirus genome via homologous recombination was proposed by varying the length of homologous region. Green Fluorescenct Protein (GFP) gene was used as a marker to recombine into a Thai isolated *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (Th-HaNPV) genome at chitinase locus. Homologous region which are homologous to the chitinase gene and also specific to GFP at the length of 50, 75 and 100 bp were designed. By using these primers, linear fragments contain complete GFP gene between the homologous region of chitinase genes were generated by PCR using pNVBGFP plasmid with GFP gene as the template. Suspension culture of the *Helicoverpa zea* cell (Hz cell) was then co-transfected with chitinase-GFP PCR product and Th-HaNPV genomic DNA. It was found that specific "recombinant arm" had no effect on homologous recombination since all three lengths gave rise to the same number of green fluorescent plaques. Recombination specificity where GFP was specifically inserted at chitinase gene was determind by PCR. It was demonstrated that 75 and 100 bp homologous region led to specificity of 0.032 and 0.049 %, repectively. In addition, chitinase activity of recombinant Th-HaNPV which had GFP inserted at

T167935

Chitinase locus via fluorescent chitinase oligomer analoque was examined. The result showed that chitinase activity was not found in all recombinants Th-HaNPV (chi-GFP) indicated the interuption of chitinase expression by GFP. HR of the PCR product with 50 bp Homologous region yileded no specific recombinaticn which poribility due to the too short length. Thus the length of specific recombinant arm affects specificity of directional cloning of PCR product into baculovirus genome.

Keywords : Direct PCR Cloning / PCR Product / Th-HaNPV / Homologous Recombination / GFP / Chitinase Gene