249755

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

249755

รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การโคลนจีนที่สร้างโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHA) ของ *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ NCIB8288 เข้าไปยัง *Escherichia coli*

(Cloning of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase gene(s) from *Rhodopseudomonas palustris* strain NCIB8288 gene(s) in *Escherichia coli*)

รหัสวิจัย SCI52119900168

ปีงบประมาณแผ่นดิน 2551 และ 2553

โดย

ผศ. ดร. สมพร ตั้นสกุล

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

หาดใหญ่ สงขลา

b00254699

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249755

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
Abstract	1
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	5
ขอบเขตของโครงการวิจัย	5
ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	6
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ(information) ที่เกี่ยวข้อง	7
วิธีการทดลอง	8
การเลี้ยง *Rhodopseudomonas palustris* strain CH72 เพื่อผลิต PHA	9
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ PHA synthase จากเซลล์	9
การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PHA synthase	9
การเพิ่มจำนวน PHA synthase gene โดยวิธี polymerase chain Reaction (PCR)	10
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน	11
การเชื่อมชิ้นส่วน PHA synthase gene(s) เข้าสู่ดีเอนเอพาหะ pGEM T-easy vector (ligation)	11
การนำ recombinant pGEM T-easy containing PHA synthase gene เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* JM109 competent cell (transformation)	11
การสกัด recombinant pGEM T-easy vector จาก *E. coli* JM109	11
ผลการทดลอง	12
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ PHA synthase จากเซลล์	12
การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PHA synthase	12
การออกแบบไพรเมอร์	13
ผลการทำ alignment ด้วยโปรแกรม Clustal X	16

การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ
phaC gene จาก *Rhodopseudomonas palustris* CH72 19
การวิเคราะห์ phaC gene ที่เพิ่มจำนวน (PCR product) ด้วย
lectrophoresis เทียบกับ marker (1 kb ladder) 20
การทำบริสุทธิ์ PCR product 21
การสกัด recombinant pGEM T-easy vector จาก *E. coli* JM109
ภายหลังการทำ ligation และ transformation 21
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 22
เอกสารอ้างอิง 23
กิตติกรรมประกาศ 29

รายงานฉบับสมบูรณ์

การโคลนจีนที่สร้างโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHA) ของ *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ NCIB8288 เข้าไปยัง *Escherichia coli*

(Cloning of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase gene(s) from *Rhodopseudomonas palustris* strain NCIB8288 gene(s) in *Escherichia coli*)

Abstract

249755

The optimum conditions for extracting PHA synthase from the cell using a sonicator was in the range of 5 min with a 5 second pause every 15 seconds. The PHA synthase activity in this crude extract of *Rhodopseudomonas palustris* NCIB8288 or CH 72 was 24.57 units/mL. The PHA synthase gene was amplified by PCR with primers design according to the conserved region of the PHA synthase gene (class I) of related strains of *R. palustris* CH 72. The primers were complementary to the template chromosomal DNA of *R. palustris* CH 72 and produced a PCR product of 538 bp. At present we are analyzing its nucleotide sequence, and continuing our attempts to ligate and transform this PHA synthase gene.

บทคัดย่อ

249755

จากการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด PHA synthase ออกจากเซลล์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ PHA synthase จากเซลล์ คือการทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator โดยใช้ช่วงเวลา 5 นาที โดยให้หยุดทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 5 วินาที ค่ากิจกรรมของ PHA synthase ในสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จาก *Rhodopseudomonas palustris* NCIB8288 หรือ CH72 มีค่าเท่ากับ 24.57 units/ml การเพิ่มจำนวน PHA synthase gene ด้วยวิธี PCR โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ PHA synthase gene โดยทำการเลือกบริเวณที่ conserve จาก PHA synthase gene (class I) ในแบคทีเรียกลุ่ม *Rhodopseudomonas palustris* ที่สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถจับกับ chromosomal DNA ของ *Rhodopseudomonas palustris* CH72 เป็น template ได้โดยมีขนาดประมาณ 538 bp ซึ่งมีขนาดตรงกับ PCR product ของไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ แต่อย่างไรก็ตาม การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ตลอดจนการทำ ligation และ transformation ยังไม่สามารถได้ *E. coli* JM109 ที่มี PHA synthase gene ดังกล่าว