บทคัดย่อ

T 152261

ในไซยาโนแบคทีเรีย เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 ชนิด รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสซึ่งถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hox* เร่งปฏิกิริยาการสร้างและสลายโมเลกุลของไฮโดรเจน อัพเทกไฮโดรจีเนสซึ่งถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hup* เร่งปฏิกิริยาการสลายโมเลกุลของไฮโดรเจนที่เป็นผลิตผลพลอยได้จากการตรึงไนโตรเจน โดยทั่วไป ยีน *hup* สามารถพบได้เฉพาะในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนเท่านั้น ดังนั้นเมื่อทำให้ยีน *hup* หมดหน้าที่ จึงคาดหวังว่าประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนจะสูงขึ้น ในโครงการวิจัยนี้ ได้ทำการสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ใส่ชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินเข้าไปในบริเวณยีน *hupL* (ยีน *hup* หน่วยย่อยใหญ่) โดยเริ่มจากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA ที่มีชิ้นส่วนของยีน *hupL* และพลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 ที่มีชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินโดยการใช้ด่าง นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ตัดได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จ (QIAquick gel extraction kit) และนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Spe*I จะได้ชิ้นส่วนยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินขนาด 1,352 คู่เบส จากนั้นแยกชิ้นส่วนที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ T4 DNA polymerase เพื่อสร้างปลายทู่ หลังจากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ก่อนทำการทรานสฟอร์มไปยังเซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5α เมื่อนำมาทดสอบบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินพบทรานสฟอร์มแมนท์ 4 โคโลนี นำโคโลนีทั้งสี่มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการใช้ด่าง พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะไม่แตกต่างกัน จึงเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Pst*I จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I พบว่า พลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 5,500 คู่เบสซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวังไว้คือ 5,710 คู่เบส นอกจากนี้ เมื่อตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบแถบที่มีขนาดประมาณ 300, 2,300 และ 3,000 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวังไว้ คือ 308, 2,387 และ 3,015 คู่เบส จากผลที่กล่าวมาข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า พลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.1 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยาต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินอยู่ภายในบริเวณยีน *hupL* และสามารถนำเข้าสู่เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนต่อไป

ABSTRACT

TE 152261

In cyanobacteria, hydrogenase enzyme can be classified into 2 classes. Reversible hydrogenase encoded by *hox* gene catalyzes the production and degradation of molecular hydrogen. Uptake hydrogenase encoded by *hup* gene catalyzes the degradation of molecular hydrogen which is a by-product of nitrogen fixation. In general, *hup* gene can be found in only nitrogen-fixing cyanobacteria. When function of *hup* gene is deleted, the nitrogen fixation efficiency is increased. In this project, the recombinant plasmid DNA in which *hupL* region (*hup* gene large subunit) was inserted with the kanamycin-resistance cassette was constructed. Plasmid DNAs pUTA and pMV261 were isolated by alkaline lysis method. Plasmid pUTA containing *hupL* gene fragment was cut by restriction endonuclease *Bsa*BI and subsequently purified by using QIAquick gel extraction. Plasmid pMV261 containing the kanamycin-resistance cassette was cut by restriction endonucleases *Hin*dIII and *Spe*I. A 1,352 bp of the kanamycin-resistance cassette was isolated, purified and finally reacted with T4 DNA polymerase to create blunt ends. This cassette was ligated by T4 DNA ligase to plasmid pUTA cut by *Bsa*BI before transformation to competent cell *E. coli* DH5α. Four transformants were obtained on kanamycin containing LB agar. Their plasmid DNAs were isolated. No differences of 4 plasmid DNAs were found. Plasmid pSP4.1 was selected and cut by either restriction endonucleases *Eco*RI or *Pst*I. It was found that the size of plasmid pSP4.1 cut by *Pst*I was approximately 5,500 bp which was similar to expected size 5,691 bp. In addition, plasmid pSP4.1 cut by *Eco*RI showed 3 bands of about 300, 2,300 and 3,000 bp that were equivalent to the expected sizes 308, 2,387 and 3,015 bp. It can be summarized that plasmid pSP4.1 is the new recombinant plasmid in which the *hup* region was inserted to the kanamycin-resistance cassette and able to introduce to nitrogen fixing cyanobacterial cell *Anabaena siamensis* for increasing the nitrogen fixation.