MOLECULAR CLONING OF GLUCOAMYLASE GENE FROM *CEPHALOSPORIUM EICHHORNIAE*

MANEE LEARTVIBHAS

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1995

Copyright by Mahidol University

32248

ชื่อวิทยานิพนธ์ การโคลนยีนกลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Cephalosporium eichhorniae*

ผู้วิจัย มาณี เลิศวิภาส

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ชวนพิศ ดีเอกนามกูล Ph.D.

ชื่นจิตต์ บุญเฉิด Ph.D.

ทิมมอที วิลเลี่ยม เฟลเกล Ph D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 5 เมษายน พ ศ 2538

บทคัดย่อ

ยีนกลูโคอะไมเลสขนาด 3.1 kb ที่มีปลาย*Eco*RI ถูกคัดแยกออกมาจากlibrary ของเชื้อ *Cephalosporium eichhorniae* ที่สร้างขึ้นโดยใช้ λgt10 เป็นดีเอ็นเอพาหะและใช้ดีเอ็นเอติดตาม (oliBT2) ที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี (ECL-enhance chemilumines-cence) ลำดับเบสของoliBT2 ถูกดัดแปลงมาจาก ลำดับเบสของยีนกลูโคอะไมเลสของเชื้อ *Aspergillus niger* ประสิทธิภาพของการ *in vitro* packaging คือ 10^6 pfu/μg จากจำนวน $2x10^5$ λ plaques ที่ทำการตรวจ พบว่ามี 8 plaques ที่มียีนกลูโคอะไมเลสอยู่ ซึ่งมีขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 3-5 kb หนึ่งในจำนวนทั้งหมด 8 โคลน (3-1) มียีนกลูโคอะไมเลสครบทั้งยีน โดยการติดตามด้วยตัวติดตามอีก 2 ตัวคือ oli117 และ oli118 จากนั้นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาด 3 1 kb จากโคลน 3-1 ซึ่งให้signal ที่เข้มจาก Southern blot analysis ถูก subclone ในพลาสมิดpBluescript II KS+ จากการตัดย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่า มี 1 ตำแหน่งที่ตัดด้วย *Bgl*II, *Hind*III, *Kpn*I, *Nde*I, *Pst*I, 2 ตำแหน่งที่ตัดด้วย *Eco*RV และ 6 ตำแหน่งที่ตัดด้วย *Sau*3AI

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Molecular Cloning of Glucoamylase Gene from *Cephalosporium eichhorniae*
Name	Manee Leartvibhas
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Supervisory Committee	Chuanpit De-Eknamkul, Ph.D. Chuenchit Boonchird, Ph.D. Timothy W. Flegel, Ph.D.
Date of Graduation	5 April B.E. 2538 (1995)

ABSTRACT

The *Cephalosporium eichhorniae* glucoamylase-encoding gene (3.1 kb *Eco*RI fragment) was isolated from λgt10 genomic library using non-radioisotope labelled (enhanced chemiluminescence; ECL) synthetic oligonucleotide oliBT2 as a probe. The sequence of the probe was derived from *Aspergillus niger* glucoamylase gene. The efficiency of *in vitro* packaging was 10^6 pfu/μg. From $2x10^5$ λ plaques being screened, 8 positive plaques were obtained. The length of these inserts was in the range of 3-5 kb. The positive clones were further probed with oli117 and oli118 whose sequences were taken from 5′ upstream and 3′ downstream regions of the *A. niger* glucoamylase gene. The insert of 3.1 kb which gave strong signal from Southern blot analysis was further subcloned into pBluescript II KS^+. The restricion map revealed that this 3.1 kb *Eco*RI fragment contained several unique restriction enzyme sites including *Bgl*II, *Hind*III, *Kpn*I, *Nde*I, *Pst*I, two *Eco*RV, and six *Sau*3AI sites.

Copyright by Mahidol University