LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

9 AUG 1996

COMPLEMENTARY DNA CLONING OF *ASPERGILLUS NIGER* GLUCOAMYLASE GENE

PREECHA LEANGARAMGUL

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

With compliments
of

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

Copyright by Mahidol University

TH
P933c
1996

25885

ชื่อวิทยานิพนธ์	การโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของยีนกลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger*
ผู้วิจัย	ปรีชา เหลืองอร่ามกุล
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	
	ชื่นจิตต์ บุญเฉิด Ph.D.
	ทิมมอที วิลเลี่ยม เฟลเกล Ph D
วันที่สำเร็จการศึกษา	17 พฤษภาคม พ ศ 2539

บทคัดย่อ

ได้ทำการสกัด total RNA ด้วยวิธี TRIzol™ จากเชื้อรา *Aspergillus niger* GA36 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูง จากนั้นทำการแยก Poly(A)$^+$ RNA ออกจาก total RNA ด้วยวิธี Oligo (dT) Cellulose Column Poly(A)$^+$ RNA ที่ได้ถูกนำไปใช้เป็นแม่แบบสำหรับสังเคราะห์ cDNA เส้นที่หนึ่ง โดยการใช้เอนไซม์ SuperScript RNase H$^-$ Reverse Transcriptase ตามวิธีของ 3′ RACE System (Rapid Amplification of cDNA Ends) cDNA เส้นที่สองได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธี PCR โดยใช้ oli 20 ที่ปลาย 5′ และ oli 118 ที่ปลาย 3′ เป็น primer และได้ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการเพิ่มจำนวน double-stranded cDNA ยีนกลูโคอะไมเลส cDNA ของเชื้อ *A niger* GA36 ที่ได้มีความยาวประมาณ 2 1 กิโลเบส หลังจากโคลน cDNA เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pCR™ II (ความยาว 3 9 กิโลเบส) แล้ว ได้นำดีเอ็นเอสายผสมดังกล่าว ไปทรานสฟอร์มเข้า *E coli* INVαF′ จากนั้นทำการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นส่วนของยีนขนาด 2 1 กิโลเบส ด้วยการตัดย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และทำการตรวจยีนยันพลาสมิดที่ตัดด้วย *Eco*RI ว่ามียีนกลูโคอะไมเลสด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามขนาด 700 คู่เบส ซึ่งได้มาจากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR จากยีน

Copyright by Mahidol University

กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา *A niger* 3124 การทดลองนี้ได้ใช้การติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี (Digoxigenin random prime labeling and detection system) จากจำนวนโคโลนีสีขาว 35 โคโลนีบนอาหารที่มี X-Gal พบว่ามี 2 โคโลนี ที่มียีนกลูโคอะไมเลส cDNA ความยาว 2.1 กิโลเบส เมื่อตัดย่อยยีนกลูโคอะไมเลส cDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่ามี 1 ตำแหน่งที่ตัดด้วย *Bam*HI, *Bst*XI, *Pst*I, *Pvu*II, *Sal*I และ 2 ตำแหน่งที่ตัดด้วย *Kpn*I โดยมีหลายตำแหน่งที่เหมือนกับยีนกลูโคอะไมเลสที่เคยมีผู้รายงานไว้ จากหลักฐานที่ได้กล่าวมานี้ สามารถระบุได้ว่ายีน cDNA โคลนจากการศึกษานี้เป็น ยีนกลูโคอะไมเลส

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Complementary DNA Cloning of *Aspergillus niger* Glucoamylase Gene
Name	Preecha Leangaramgul
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Thesis Supervisory Committee	Chuenchit Boonchird, Ph.D
	Timothy W Flegel, Ph D
Date of Graduation	17 May B.E 2539 (1996)

ABSTRACT

Total RNA was isolated from *Aspergillus niger* GA36, a high glucoamylase activity strain, by using the TRIzol™ extraction method. Poly $(A)^+$ RNA was purified from total RNA on an Oligo (dT) Cellulose Column and used as a template for the synthesis of first strand cDNA by using SuperScript RNase H^- RT (Reverse Transcriptase) in the 3′ RACE System (Rapid Amplification of cDNA Ends) Second strand cDNA was then synthesized by the PCR technique with two primers [oli 20 (5′-end) and oli 118 (3′-end)] and double-stranded cDNA was amplified by the same technique. The full-length double-stranded cDNA of the *A niger* GA36 glucoamylase gene (about 2 1 kb) was cloned into the 3.9 kb pCR™I I vector and the recombinant plasmid was introduced into *E coli* INVαF′ *E. coli* transformants containing the 2 1 kb insert were screened by restriction endonuclease analysis with *Eco*RI to confirm the presence of the glucoamylase gene by Southern blot hybridization of *Eco*RI-digested

Copyright by Mahidol University

plasmids with a 700 bp probe This probe was derived from a PCR amplified product of the *A. niger* 3124 genomic glucoamylase gene using the non-radioisotopic digoxigenin random prime labeling and detection system. Two positive clones containing 2.1 kb fragments of the glucoamylase gene were obtained from thirty-five white colonies on the X-Gal plate The restriction map revealed that this 2 1 kb *Eco*RI fragment contained several unique restriction sites including *Bam*HI, *Bst*XI, *Pst*I, *Pvu*II, *Sal*I and two *Kpn*I Several sites were similar to that of reported glucoamylase gene This provided strong evidence that the clone cDNA gene from this study was the glucoamylase gene

Copyright by Mahidol University