รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

Metagenomic Library ของจุลินทรีย์ในดิน

Metagenomic Library of Soil Microbial DNA

โดย

ดร. กาญจนา ศรีนิติวรวงศ์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เนับสนุนโดยทุนเงินกองทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ปี 2549

บทคัดย่อ

Metagenomic library เป็นหนทางหนึ่งที่สามารถใช้ในการศึกษา genome ของจุลินทรีย์ที่อยู่ในธรรมชาติ การทดลองนี้นำตัวอย่างดินจากบริเวณริมอ่างน้ำศรีตรัง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งเป็นดินร่วนสีน้ำตาลเข้ม pH 5.0 มาสกัด chromosomal DNA โดยใช้เทคนิค SDS-based DNA extraction method จากนั้นทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยนำไปสกัดด้วย CTAB และ Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit หลังการทำให้บริสุทธิ์ พบว่า DNA มีสัดส่วน A_{260}/A_{280}= 2.0 จึงนำ DNA ดังกล่าวมาสร้าง metagenomic library โดยการนำชิ้น DNA ขนาด 1-10 kb ที่ย่อยแบบบางส่วน (partial digestion) ด้วย *Sau*3AI มาเชื่อมกับ pZErO-2 ที่ย่อยด้วย *Bam*HI แล้วถ่ายโอนเข้าไปใน *E. coli*TOP10 โดยเทคนิค electroporation จากนั้น transformant ประมาณ 30,000 โคลน ที่เจริญบน LB agar ที่มี kānamycin 50 μg/ml ถูกเก็บที่ -70 °C เพื่อใช้เป็น metagenomic library ต่อไป

Abstract

Metagenomic libraries provide accesses to gene pool of microorganisms present in environmental samples avoiding the cultivation-dependent bias. In this study, soil near Sritrang reservoir in Prince of Songkla University was collected. It was dark-brown in colour and had pH of 5.0. The chromosomal DNA was extracted by SDS-based DNA extraction method and further purified using CTAB and Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit. The purified chromosomal DNA with A_{260}/A_{280} ratio of 2 was used for the construction of metagenomic library. The 1-10 kb of DNA partially digested with *Sau*3AI were ligated with the zero-background cloning vector, pZErO-2 that was digested with *Bam*HI. The ligated plasmids were transformed into *E. coli*TOP10 by electroporation. About 30,000 transformants were selected on the LB agar supplemented with kanamycin 50 μg/ml and subsequently stored in -70 °C for metagenomic library.