

**CONSTRUCTION OF A GENE KNOCKOUT
CASSETTE FOR *Leucosporidium antarcticum***

JOSEPH KOH SOON PENG

**DISSERTATION SUBMITTED IN PARTIAL
FULFMENT FOR THE DEGREE OF MASTER OF
MOLECULAR BIOLOGY**

PENPUSATANGAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE
UNIVERISITI MALAYSIA SABAH**

2011

ABSTRACT

CONSTRUCTION OF A GENE KNOCKOUT CASSETTE FOR *Leucosporidium antarcticum*

Leucosporidium antarcticum, a psychrophilic yeast was isolated from Antarctica. It grew optimally at 12°C, and adapted well to the cold temperature in Antarctic. The whole genome of the *L. antarcticum* has been sequenced using the 454 system. It is ideal to conduct systematic knockout of genes to determine its gene function especially genes that are responsible for the adaptation to the cold. Hence, there is a need to construct a knock-out system for *L. antarcticum*. The gene knockout constructs were built by fusing an antibiotic (*Geneticin-G418*) resistance gene, *KanMX* used for gene knock out in *Saccharomyces cerevisiae* to a series of *L. antarcticum* gene's promoters. The gene promoters used belonged to the *ACT*, *SNF* and *Cyclophilic* genes of *L. antarcticum*. Gene fusion was conducted using the polymerase chain reaction (PCR). One set of primer was designed to amplify the genes' promoter region with an overhang that was homologous to the second set of primer used to amplify the *KanMX* gene. The promoter that was fused to the *KanMX* gene was cloned onto a CloneJet Vector (Fermentas) and subsequently used as the template to prepare the gene knock-out DNA fragment for *L. antarcticum*. The significances of the study involved the verification of the putative promoters obtained from *L. antarcticum* in the expression of the *kanMX* gene, secondly, the constructed gene knockout cassette can be used to knockout the targeted gene in order to reveal the function of the gene, and lastly, to demonstrate that gene fusion can be established seamlessly using PCR. Preliminary transformation of *L. antarcticum* using knockout cassette constructed was tested by using electroporation and heat-shock transformation systems applied in *S. cerevisiae*. The transformation of *L. antarcticum* was not successful. *L. antarcticum*'s colonies were found after electroporation transformation but did not grow onto the medium containing geneticin (G418). No colony was found after heat-shock transformation.

ABSTRAK

Leucosporidium antarcticum merupakan sejenis ragi psikrofilik terpendek dari Antartika. *L. antarcticum* bertumbuh dengan optimum pada suhu 12°C, dan juga menyesuaikan dengan baik pada suhu rendah di Antartika. Genom *L. antarcticum* telah diimpikan dengan sistem jujukan DNA 454. KO (Knock-out) gen-gen *L. antarcticum* dengan sistematik boleh menentukan fungsi gen terutamanya gen yang terlibat dalam adaptasi terhadap suhu yang rendah. Oleh demikian, pembinaan sistem KO adalah amat penting. Pembinaan kaset KO terlibat gabungan gen kanMX (ringtangan genetikin G418) dan gen promoter yang dipilih daripada gen ACT, SNF dan CYCLOPHILIN, gen kanMX adalah gen yang digunakan sebagai gen KO pada *S. cerevisiae*. Penggabungan gen-gen yang tersebut berlangsung dengan cara PCR. Satu set primer direka untuk bahagian promoter gen dengan pengubahsuaian pada hujung 5' secara penambahan homologi gen kanMX. Penggabungan gen akan diklon ke dalam CloneJet (Fermentas) dan digunakan sebagai templat untuk menyiapkan gen KO serpihan DNA untuk *L. antarcticum*. Kepentingan kajian ini termasuk percubaan gen promoter yang terpilih ke atas ungkapan gen kanMX. Kepentingan kedua ialah pembinaan kaset KO boleh digunakan untuk menyelidik ungkapan fungsi-fungsi gen yang terpilih. Kepentingan terakhir ialah untuk menunjukkan gabungan gen-gen boleh dilakukan dengan menggunakan PCR. Transformasi percubaan telah dilakukan dengan menggunakan cara elektroporasi and cara kimia, kedua-dua cara tersebut telah dilaksanakan dalam *S. cerevisiae*. Transformasi percubaan tersebut tidak berjaya dicapai. Koloni-koloni *L. antarcticum* telah dijumpai selepas transformasi dengan cara elektroporasi tetapi koloni-koloni tersebut tidak dapat menumbuh ke atas media yang mengandungi antibiotik genetikin (G418). Tiada koloni dijumpai selepas transformasi dengan cara kimia.