หน้า 40, 42 รูปภาพหรือว่าจะต่อไป

การเพิ่มผลผลิตของ

เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยการปรับปรุงพลาสมิดดีเอนเอ (pJR_{69})

นางสาว พัชราภร ทิพรังกร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2530

ISBN 974-568-146-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014290

I 10299191

ENHANCEMENT OF THE PENNICILLIN ACYLASE PRODUCTION VIA RECONSTRUCTION OF PLASMID DNA (pJR_{69})

Miss Pachrakorn Tiprungkorn

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of The Requirements

for The Degree of Master of Science

Biotechnology Programe

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-568-146-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยการปรับปรุงพลาสมิด ดีเอนเอ (pJR_{69})

โดย นางสาวพัชราภร ทิพรังกร

หลักสูตร เทคโนโลยีทางชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ วินิจ ทำวิวรรธน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ลิทธิประณีต)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยการปรับปรุงพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69}
ชื่อนิสิต	นางสาวพัชราภร ทิพรังกร
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพย์ทัศน์
หลักสูตร	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
ปีการศึกษา	2529

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยคือ การหาวิธีเพิ่มความสามารถของการสังเคราะห์เพนนิซิลิน เอซิเลส จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} พลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} นี้มียีนเพนนิซิลิน เอซิเลสที่ตัดจาก Escherichia coli สายพันธุ์ ATCC 11105 ซึ่งสร้างขึ้นโดย นางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ ในปีพ.ศ. 2528 ปัญหาที่เผชิญก็คือ การลดลงของแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ตามจำนวนครั้งของการถ่ายเชื้อที่เพิ่มขึ้น ปรากฏการณ์นี้พบในเซลล์เจ้าเรือนทุกสายพันธุ์ไม่ว่าจะใช้สายพันธุ์ที่มีจีโนไทพ์อย่างไร แต่ความเสถียรของแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ได้พบ ในสายพันธุ์ที่เลือกจากทรานสฟอรแมนท์ที่มี พลาสมิดดีเอนเอ ที่สร้างขึ้นใหม่ และให้ชื่อว่า pCR_{28} ซึ่งมีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 5.5 กิโลเบส แต่อย่างไรก็ตาม แอคติวิตีสูงสุดของเพนนิซิลิน เอซิเลสที่พบในสายพันธุ์ดังกล่าวก็ยังมีค่าต่ำ ซึ่งเนื่องมาจากได้สูญเสียสมบัติการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอไป

ได้แก้ไขให้ความสามารถในการเพิ่มจำนวนยีนของพลาสมิดดีเอนเอกลับคืน โดยการตัดยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสจาก pCR_{28} มาต่อเข้ากับพลาสมิดดีเอนเอของ pSY343 ซึ่งตัด เอายีนต้านยาคานามัยซินออกแล้ว ผลที่ได้คือพลาสมิดดีเอนเอใหม่ที่ให้ชื่อว่า pCR_{29} ซึ่งมีขนาด 11.5 กิโลเบส

หลังจากทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอนเอ pCR_{29} เข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน E.coli BD817 แยกได้ทรานสฟอร์แมนท์ยีตหนึ่ง ซึ่งคัดเลือกตัวที่น่าสนใจตัวหนึ่งให้ชื่อว่า W21 เป็นตัวแทนการศึกษา จากการทดลองพบว่า แอคติวิตีสูงสุดของเพนนิซิลิน เอซิเลส จากสายพันธุ์ W21 มี ค่าเท่ากับ 500 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่า E.coli ATCC 11105 อยู่ 21 เท่าเมื่อเจริญในสภาวะเดียวกัน

เนื่องจาก pCR_{29} ยังคงสมบัติของการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอโดยการเพิ่มอุณหภูมิ จึงทำให้เป็นข้อได้เปรียบในการหาวิธีคัดสายพันธุ์ ซึ่งมีจำนวนพลาสมิดดีเอนเอสูงกว่า โดยหลักการ sibling จากการทดลองได้นำ W21 ผ่านกระบวนการ sibling 2 ครั้ง จึงแยกได้สายพันธุ์ที่ใช้ชื่อว่า X25 และ Y324 และทั้งสองสายพันธุ์นี้มีพลาสมิดดีเอนเอชนิดเดียวกัน แต่ทว่ามีความสามารถต้านยาเพนนิซิลินระดับต่างกัน ค่าแอคติวิตีสูงสุดที่พบในเซลล์ X25 และ Y324 มีค่าเท่ากับ 810 และ 1111 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ น่าสังเกตว่าค่าแอคติวิตีสูงสุดที่พบใน Y324 มีค่าสูงถึง 48 เท่า เมื่อเทียบกับค่าที่วัดได้จากสายพันธุ์ E.coli ATCC 11105 ในสภาวะเดียวกัน

พบว่าการเติม ฟีนิลอะซิติก เอซิด(PAA) 0.02% และ $MgCl_2$ 1 mM ลงในอาหารอุดม นั้นก็เป็นเหตุหนึ่ง ที่ทำให้เกิดการชักนำทางพันธุกรรม และทำให้แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เพิ่มขึ้น 2 เท่า ในขณะที่การเจริญสูงสุดยังมีค่าไม่ต่างจากก่อนเติมสารดังกล่าว นอกจากนั้นเซลล์ที่ผ่านการ starve ในสภาวะที่เหมาะสมอย่างน้อย 4 ชั่วโมง จะพบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส เพิ่มขึ้นอีก 2 เท่า เช่นกัน

ประการสุดท้าย ในการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด สามารถทำได้โดย การปรับความขุ่นของคัลเจอร์ หลังเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30°ซ. เป็น 37°ซ. ให้ได้ประมาณ 400 KU ก่อนที่จะเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญกลับมาที่ 30°ซ. จะสามารถทำให้ความขุ่นสูงสุด เพิ่มขึ้นจาก 425 KU เป็น 600 KU ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามความขุ่นที่เพิ่มขึ้นนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Enhancement of The Penicillin Acylase Production via Reconstruction of Plasmid DNA (pJR_{69})
Name	Miss Pachrakorn Tiprungkorn
Programe	Biotechnology
Thesis Advisor	Associated Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.
Academic Year	1986

Abstract

The aim of this research was to establish the enhancement of penicillin acylase biosynthesis from the strain of Escherichia coli K12 harboring the plasmid DNA called pJR_{69}. This pJR_{69} possessed penicillin acylase gene which was tailored from Escherichia coli ATCC 11105 by Miss Jaranya Ngernprasirtsiri in 1985. The first confronted problem was the declination in the activity of penicillin acylase in accordance with the increment of the sub-culturing number. This event was found in any strain of E.coli which harbored pJR_{69}, regardless of the original genotype, Reconciliation of the enzymic activity was found in a strain screened from transformants harboring the new constructed plasmid DNA, called pCR_{28}. The average molecular size of pCR_{28} was 5.5 Kb. However, it gave low maximal activity of penicillin acylase which may be due to the loss of the amplification property. Recurrent of the amplification property was succeeded by joining penicillin acylase gene fragment tailored from pCR_{28} with the large fragment of DNA prepared from pSY343 in which, the Kanamycin resistance gene was previously cut. This new constructed plasmid was named pCR_{29} which later was identified as a 11.5 Kb plasmid DNA. Transformation of pCR_{29} into E.coli BD817 rendered a group of new transformants, from which one strain so-called W21 was selected to study the role of pCR_{29} plasmid DNA towards the production of the penicillin acylase. The W21 strain gave a maximal activity of

penicillin acylase of 500 nmolePABA per min. per mg. protein. This value was 21 folds higher than that obtained from the original strain ATCC 11105 when compared under an identical condition.

Due to the presence of the run away replication resided in pCR_{29} plasmid DNA, it, therefore, offered an advantage to a screening method designed based on the principle of a sibling selection for a strain of higher copy plasmid number. After two successive sibling selections, strains so called X25 and Y324 were isolated and identified as strains having the same type of plasmid but of different levels of penicillin G resistance. The maximal activities of penicillin acylase detected from strains X25 and Y324 were 810 and 1111 nmole PABA per min. per mg. protein, respectively. The highest activity found in Y324 was 48 folds higher than that from the ATCC 11105 when compared under an identical condition.

In addition, a supplementation of 0.02% Phenyl acetic acid (PAA) plus 1 mM $MgCl_2$ into the LB medium resulted in an induction and the two-fold increase in the activity of penicillin acylase. Furthermore, when the cells were starved under an appropiate condition for a duration of 4 hours, the enzyme production was found increase to 2 folds.

Finally, means to enhance the total activity of pennicilin acylase was established that concentrating cell turbidity after amplification to a total of 400 KU prior to shifting temperature from $37^{o}C.$ to $30^{o}C.$ provided a maximal turbidity of 600 KU whereas the maximal activity of the enzyme was detected in cells grown under that heavy turbidity was still maintained at a high value.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์ ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ แนวความคิด ความเข้าใจ และคำสั่งสอนอันมีค่ายิ่งต่อข้าพเจ้าตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ที่กรุณาให้คำแนะนำ แนวความคิดและความเข้าใจต่อข้าพเจ้ามาโดยตลอด รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์วินิจ ชำวิวรรธน์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์ และคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ ตลอดจนคำแนะนำ ต่อข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอขอบคุณนางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริที่ได้กรุณาให้สายพันธ์ Q69 และ S5 มาเพื่องานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้เงินทุนวิจัย

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยพันธุวิศวกรรม ที่ได้ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยมาโดยตลอด ทั้งยังให้เงินทุนในการปฏิบัติงานวิจัย แก่ข้าพเจ้าอีกด้วย

ขอขอบคุณ คุณ อรพินท์ บุณยพรรค ที่ได้ช่วยพิมพ์วิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนพี่ เพื่อน น้อง ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

และขอขอบคุณอย่างที่สุดต่อครอบครัวอันเป็นสุดที่รักของข้าพเจ้า ที่ได้ให้ทุก ๆ สิ่งอันประมาณค่ามิได้ ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็น "พลัง" ให้ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ช

สารบัญ..... ฌ

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญรูป..... ฐ

คำย่อ..... ฒ

บทที่.....

1. บทนำ..... 1

2. วิธีการทดลอง..... 17

2.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์..... 18

2.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง..... 19

2.3 การเก็บรักษาแบคทีเรีย..... 20

2.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย..... 20

2.5 การเลี้ยงและการติดตามการเจริญ..... 22

2.6 เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง..... 23

2.7 ดีเอนเอที่ใช้ในการทดลอง..... 25

2.8 การเก็บรักษาดีเอนเอ..... 26

2.9 การเตรียมสารละลาย..... 27

2.10 การสกัดและทำดีเอนเอจาก Bacteriophage λ CI857S7 ให้บริสุทธิ์..... 29

2.11 การสกัดพลาสมิดดีเอนเอ..... 30

2.12 การวัดปริมาณดีเอนเอ..... 30

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.13 การทำดีเอนเอให้บริสุทธิ์โดยใช้กระดาษ DEAE-cellulose บนแผ่นอะกาโรส์เจล อิเลกโตรโฟรีซิส..... 31

2.14 การตรวจขนาดของพลาส์มิดดีเอนเอโดยการทำให้แบคทีเรียแตกขณะอิเลกโตรโฟรีซิส..... 32

2.15 การหาแผนผังเรส์ตริกชั่นของพลาส์มิดดีเอนเอ..... 33

2.16 การส์ร้าง Deletion mutant..... 34

2.17 การเลือกส์ายพันธุ์ที่ขยายจำนวนของพลาส์มิดดีเอนเอโดยวิธี Sibling..... 35

2.18 การตรวจส์อบแอคติวิตีเบื้องต้นของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส์ ของโคโลนีในจานเพาะเชื้อโดยวิธี Microbiological test..... 35

2.19 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส์..... 36

2.20 การตรวจส์อบแอคติวิตีเบื้องต้นของเอนไซม์ บีตา-แลคตาเมส์ ของโคโลนีในจานเพาะเชื้อ โดยวิธี Microiodometric test..... 36

2.21 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry..... 37

2.22 การ Starvation 37

3. ผลการทดลอง.....

3.1 ปัญหาเกี่ยวกับความเส์ถียรและแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส์ จากแบคทีเรียส์ายพันธุ์ Q69 และ S5..... 38

3.2 ปัญหาเกี่ยวกับการส์ร้าง deletion mutant..... 43

3.3 การเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส์ โดยการปรับปรุงพลาส์มิดดีเอนเอ pCR_{28}..... 48

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4 สมบัติของ W21..... 57

3.5 การเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอ เพิ่มขึ้นโดยวิธี Sibling selection..... 72

3.6 เปรียบเทียบสมบัติของ VU 1/9, W21, X25 และ Y324..... 75

4. วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย..... 86

เอกสารอ้างอิง..... 94

ภาคผนวก.....

1. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ PABA ซึ่งได้จากการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลสโดยวิธีของ Szewezuk..... 100

2. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี่..... 101

3. กราฟมาตราฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี่ เทียบกับความขุ่นของศัลเจอร์..... 102

4. กราฟมาตราฐานความสัมพันธ์ของความขุ่น (KU) กับการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm..... 103

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1. แบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง..... 19
2. เอนไซม์เรสตริกชั่น..... 23
3. บัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ เรสตริกชั่น..... 24
4. จำนวนทรานสฟอรแมนท์ที่ได้จากการทรานสฟอร์พลาสมิดดีเอนเอที่ผ่านการย่อยด้วย S1 nuclease ในปริมาณต่าง ๆ..... 48
5. ปัจจัยที่เสริมในอาหารซึ่งมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส จาก W21..... 60
6. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ระหว่างคัลเจอร์ที่มิได้ starve และที่ starve 4 ชม. ของ W21..... 63
7. ผลการแปรอัตราส่วนระหว่าง PAA/Pen G ในการทำ starvation ของ W21..... 64
8. การปรับสภาวะการเจริญของ W21 เพื่อการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส..... 71
9. แสดง Doubling time และแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส เมื่อเจริญ W21, X25 และ Y324 ในอาหารที่เสริมเพนนิซิลิน จี ปริมาณต่าง ๆ..... 81
10. สภาวะการเจริญของ W21, X25 และ Y324 เมื่อเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ของ เพนนิซิลิน เอซิเลส..... 82
11. เปรียบเทียบจำนวนเท่า (fold) ของแอคติวิตี ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จากแหล่งต่าง ๆ..... 83

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

1. ปฏิกิริยาของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสและเอนไซม์บีต้า-แลคตาเมส..... 2

2. แสดงโครงสร้างของเพนนิซิลิน..... 3

3. แสดงแผนผังเรสตริกชั่น และการถอดรหัสของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสจาก pHM 12 ซึ่งสร้างขึ้นโดย Bruns และคณะ..... 7

4. สมมุติฐานของการนำส่าย Proprotein ผ่านผนังเซลล์ชั้นในเข้าสู่ส่วน periplasm ของผนังเซลล์โดยการนำของ leader peptide..... 9

5. สมมุติฐานของการตัดเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสจาก E.coli ATCC 11105 อย่างเป็นขั้นตอนโดย Proteolytic enzyme..... 10

6. แผนผังเรสตริกชั่นคร่าว ๆ ของ pJR_{69} สร้างขึ้นโดยนางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ..... 12

7. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Q69, Q69/1, Q69/2..... 39

8. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส แบคทีเรียสายพันธุ์ S5/1, S5/2 และ S5/3..... 41

9. ชิ้นส่วนของพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ เรสตริกชั่น ชนิดต่าง ๆ..... 45

10. แผนผังเรสตริกชั่นของพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} 46

11. ชิ้นส่วนของพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ที่ถูกย่อยด้วย EcoRI และติดตามด้วย S1 nuclease ปริมาณต่าง ๆ..... 47

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

12.1 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของทรานสฟอร์แมนท์ที่แยกได้ ทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 2.18 ยกเว้นแต่ว่าอาหารที่ใช้เจริญทรานสฟอร์แมนท์ คือ LB และปริมาณของเพนนิซิลินจีที่ใช้ราดทับคือ 10 มก.ต่อมล..... 50

12.2 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสของทรานสฟอร์แมนท์ที่แยกได้ ทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 2.18 ยกเว้นแต่ว่าปริมาณของเพนนิซิลินจีที่ใช้เทราดทับคือ 1 มก.ต่อมล..... 51

12.3 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของทรานสฟอร์แมนท์ ที่แยกได้โดยทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 1.18 ยกเว้นแต่ว่าปริมาณของเพนนิซิลินจีที่ใช้เทราดทับคือ 10 มก.ต่อมล..... 52

13. ขนาดพลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} สกัดจาก VU 1/9 และ pCR29 สกัดจาก V 1/7..... 53

14. แผนผังเรสตริกชั่นของ pCR_{28} เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์เรสตริกชั่นต่าง ๆ..... 55

15. แผนผังเรสตริกชั่นของพลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} ที่สกัดจาก pCR_{29}..... 56

16. ชิ้นส่วน Hind III, Bgl II จาก pCR_{28} Hind III, Bam HI จาก pSY343 และพลาสมิดดีเอนเอ pCR_{29} 58

17. ผลของเวลาที่ใช้ Starve เซลล์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ W21..... 61

18. ปริมาณพลาสมิดดีเอนเอ pCR_{29} สกัดจาก W21 ภายหลังจากการเจริญที่ 37 °ซ ในเวลาต่างกัน..... 65

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

19. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ขยายจำนวนยุคของพลาสมิดดีเอนเอ กับแอคติวิตีของ เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ W21..... 66

20. รูปแบบความสัมพันธ์ของความขุ่นของเซลล์ และแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ W21..... 69

21. รูปแบบความสัมพันธ์ของความขุ่นของเซลล์ และแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลสของ X25..... 73

22. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ของสายพันธุ์ ต่าง ๆ โดยทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.18 ยกเว้นแต่ว่าเพิ่ม ... ปริมาณ เพนนิซิลินจีในอาหารที่ใช้เจริญเซลล์เป็น 300 ไมโครกรัม/มล. และปริมาณของเพนนิซิลินจีที่ใช้เทราดทับคือ 10 มก.ต่อมล..... 76

23. รูปแบบความสัมพันธ์ของความขุ่นของเซลล์เมื่อเจริญในอาหารที่เสริม เพนนิซิลินจี ปริมาณต่าง ๆ ของ W21 77

24. รูปแบบความสัมพันธ์ของความขุ่นของเซลล์เมื่อเจริญในอาหารที่เสริม เพนนิซิลินจี ปริมาณต่าง ๆ ของ X25..... 78

25. รูปแบบความสัมพันธ์ของความขุ่นของเซลล์ เมื่อเจริญในอาหารที่เสริม เพนนิซิลินจี ปริมาณต่าง ๆ ของ Y324..... 79

26. แสดงการสร้างพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} , pCR_{28} และ pCR_{29}..... 88

คำย่อ

6-APA	=	6-Aminopenicillanic acid
ATCC	=	American Type Culture Collection
ATP	=	Adenosine - 5' - triphosphate
bp	=	base pair
BSA	=	Bovine serum albumin
c-AMP	=	Cyclic adenosine monophosphate
$CHCl_3$	=	Chloroform
CsCl	=	Cesium chloride
$^oซ$	=	องศา เซลเซียส
d	=	dalton
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
DNase	=	Deoxyribonuclease
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
EDTA	=	Ethylene diamine tetraacetic acid
g	=	gram
HCl	=	Hydrochloric acid
hr	=	hour
kb	=	kilobase pair (10^3 base pair)
Km^r	=	Kanamycin resistance
KU	=	klett unit
M	=	molar
min.	=	minute
Md	=	megadalton (10^6 dalton)
µg	=	microgram (10^{-6} gram)
µl	=	microlitre (10^{-6} litre)
ml	=	millilitre (10^{-3} litre)
mM	=	millimolar (10^{-3} molar)

คำย่อ (ต่อ)

μmole	=	micromole (10^{-6} mole)
ng	=	nanogram (10^{-9} gram)
nm	=	nanometer (10^{-9} meter)
nmole	=	nanomole (10^{-9} mole)
NTG	=	N-methyl-N´-nitro-N-nigrosoguanidine
O.D.	=	optical density
PAase	=	Penicillin acylase
PAA	=	Phenylacetic acid
PAAB	=	Phenyl acetyl-4-aminobenzoic acid
PABA	=	p-Aminobenzoic acid
Pen G	=	Penicillin G
Pen G^r	=	Penicillin G resistance
rec A	=	Recombination
RNA	=	Ribonucleic acid
RNase	=	Ribonuclease
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
sec	=	second
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
UV	=	Ultraviolet

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย