การโคลนยีนไซโคลเดกซ์ทริน กลูคาโนทรานสเฟอเรส จาก *Bacillus* A_{11} ใน *Escherichia coli*

นายสุรศักดิ์ ศิรินรอดุลศิลป์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2536

ISBN 974-583-034-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018822
i17191492

MOLECULAR CLONING OF CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE GENE FROM *Bacillus* A_{11} IN *Escherichia coli*

Mr. Surasak Siripornadulsil

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-034-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนยีนไซโคลเดกซ์ทริน กลูคาโนทรานสเฟอเรสจาก *Bacillus* A_{11} ใน *Escherichia coli*
โดย	นายสุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา มงคลกุล

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา มงคลกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สุรศักดิ์ คิริพรอดุลคิลป์ : การโคลนยีนไซโคลเดกซ์ทริน กลูคาโนทรานส์เฟอเรส์ จาก Bacillus A_{11} ใน Escherichia coli (MOLECULAR CLONING OF CYCODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE GENE FROM Bacillus A_{11} IN Escherichia Coli) อ.ที่ปรึกษา: อ.ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร.พีรดา มงคลกุล, 143 หน้า. ISBN 974-583-034-8

ได้ทำการโคลนยีนไซโคลเดกซ์ทริน กลูคาโนทรานส์เฟอเรส์ (CGTase gene) จาก Bacillus A_{11} เข้าไปใน Escherichia coli โดยใช้พลาส์มิด pBR322, pUC18 และ pSE411 เป็นดีเอ็นเอพาหะตามลำดับ นำดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก Bacillus A_{11} ที่ย่อยด้วยเรส์ติกชั่น-เอนไซม์ Sau3AI แบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) มาเชื่อมเข้ากับตำแหน่ง BamHI บนพลาส์มิด pBR322 แล้วเคลื่อนย้ายรีคอมบิแนนท์พลาส์มิดที่สร้างขึ้นใหม่เข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน E. coli strain HB101 ทำการคัดเลือกทรานส์ฟอร์แมนท์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase โดยการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วยการทำ iodine-test, phenol red inclusion complex test (PICT), cyclodextrin trichloroethylene assay (CD-TCE assay) และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ CDs ด้วย HPLC รีคอมบิแนนท์พลาส์มิดที่มี CGTase gene ให้ชื่อว่า pSV1 มีขนาดของยีนดีเอ็นเอจาก Bacillus A_{11} ประมาณ 20 - 22 kb เนื่องจาก pSV1 มีขนาดใหญ่และไม่เสถียร จึงทำการโคลนยีนต่อ โดยย่อยรีคอมบิแนนท์พลาส์มิด pSV1 ด้วยเรส์ติกชั่นเอนไซม์ Sau3AI แบบไม่สมบูรณ์ แล้วเลือกยีนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 2 - 6 kb และเชื่อมยีนดีเอ็นเอนี้เข้าไปในตำแหน่ง BamHI ของพลาส์มิด pUC18 เคลื่อนย้ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน E. coli strain JM101 พบทรานส์ฟอร์แมนท์แสดง amylolytic activity 3 ทรานส์ฟอร์แมนท์ แต่แสดง CGTase activity เพียง 2 ทรานส์ฟอร์แมนท์ และสามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ CGTase ได้ด้วย IPTG ให้ชื่อรีคอมบิแนนท์พลาส์มิดใหม่นี้ว่า pSV2 และ pSV3 ซึ่งมีขนาดของยีนดีเอ็นเอจาก Bacillus A_{11} ประมาณ 6.8 และ 5.2 kb ตามลำดับ เนื่องจากการนำรีคอมบิแนนท์พลาส์มิด pSV3 มาศึกษา restriction map ทำได้ยาก จึงได้โคลนยีนต่ออีกครั้งโดยย้าย inserted DNA fragment จากรีคอมบิแนนท์พลาส์มิด pSV3 ไปตัดต่อเข้ากับพลาส์มิด pSE411 โดยใช้เรส์ติกชั่นเอนไซม์ PstI และ KpnI แล้วทรานส์ฟอร์มเข้า E. coli strain HB101 ให้ชื่อทรานส์ฟอร์มแนท์และรีคอมบิแนนท์พลาส์มิดที่สร้างขึ้นใหม่ว่า SV5 และ pSV5 ตามลำดับ เมื่อศึกษา restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาส์มิด pSV5 พบว่า CGTase gene Bacillus A_{11} แตกต่างจาก CGTase gene จากสายพันธุ์อื่น ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ CDs ด้วย PHLC พบว่าทรานส์ฟอร์แมนท์ SV5 ให้ผลิตภัณฑ์ γ-CD ในสัดส่วนที่มากที่สุดตามด้วย β- และ α-CD สามารถตรวจพบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงและเท่ากับเอนไซม์ CGTase จากทรานส์ฟอร์แมนท์ SV5 ด้วยเอส์ดีเอส์-โพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C325934 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: MOLECULAR CLONING OF GENE / CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE
SURASAK SIRIPORNADULSIL: MOLECULAR CLONING OF CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE GENE FROM Bacillus A_{11} IN Escherichia coli. THESIS ADVISOR: VICHIEN RIMPHANITCHAYAKIT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSIST. PROF. PEERADA MONGKOLKUL, Ph.D., 143 pp. ISBN 974-583-034-8

The cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) gene from Bacillus A_{11} has been cloned into Escherichia coli using plasmid vector pBR322, pUC18 and pSE411 respectively. Partially Sau3AI-digested chromosomal DNA from Bacillus A_{11} was ligated to BamHI-cleaved pBR322 and transformed into E. coli strain HB101. CGTase producing transformats were screened and isolated by iodine test, phenol red inclusion complex test, trichloroethylene precipitation and HPLC analysis. The constructed plasmid, pSV1, was isolated and analysed. The cloned CGTase gene was found to be within an approximately 20 - 22 kb insert. Due to its large size and instability, pSV1 was used for subcloning. It was partially digested with Sau3AI and DNA fragments of 2 to 6 kb were isolated and ligated to BamHI-cleaved pUC18. The ligation mixture was then transformed into E. coli strain JM101. Three halo-positive transformants were obtained but only 2 transformants showed CGTase activity which was inducible by IPTG. The plasmids obtained were designated as pSV2 and pSV3, and found to contain an approximately 6.8 and 5.2 kb DNA insert, respectively. For unknown reason, these plasmids were only partially digested with restriction endonuclease used, making it difficult to do restriction mapping. Therefore, the inserted DNA fragment from pSV3 was further subcloned as PstI-KpnI fragment into PstI-KpnI cleaved pSE411. The resulting plasmid and transformant were designated as pSV5 and SV5, respectively. Restriction mapping was performed on pSV5 and it was found that its pattern was different from those of other known CGTase gene. HPLC analysis of SV5-generated products indicated that the cloned CGTase produced γ-CD > β-CD > α-CD. By using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, a protein band with MW equal to CGTase from Bacillus A_{11} was detected as well as other presumably modified forms of the cloned CGTase.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ เป็นอย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษาให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ และความเข้าใจอันมีค่ายิ่งต่อผู้เขียนตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่ในภาควิชาชีวเคมี

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา มงคลกุล ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพาพร ลิมปเสนีย์ และรองศาสตราจารย์ ดร.วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมีและหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม ที่ได้ให้ความกรุณาให้คำปรึกษา และชี้แนะต่างๆตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย

ขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม และภาควิชาชีวเคมี ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี ตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย

ขอบคุณสมาชิกในหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมทุกคน รวมทั้งนิสิตปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี เทคโนโลยีชีวภาพ และชีววิทยา สำหรับความช่วยเหลือต่างๆ และให้กำลังใจต่อผู้เขียน

ขอบคุณ คุณ จิราพร โรจน์ทินกร นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ช่วยอนุเคราะห์เอนไซม์ CGTase เพื่อใช้ในการทดลอง

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกคน ในความช่วยเหลือเรื่องทั่วไประหว่างการทำงานวิจัย

ท้ายสุดนี้ ผู้เขียนขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญรูป..... ฐ

คำย่อ..... ฒ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. เครื่องมือวัสดุ-เคมีภัณฑ์และวิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือ..... 37

2.2 วัสดุภัณฑ์..... 38

2.3 เคมีภัณฑ์..... 39

2.4 พลาสมิดดีเอ็นเอและดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง..... 39

2.5 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง..... 40

2.6 เครื่องแก้วและสารละลาย..... 42

2.7 การสกัดดีเอ็นเอ

2.7.1 การสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Bacillus* A_{11}..... 42

2.7.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวิธีอัลคาไลน์ (Alkaline Extraction)..... 43

2.8 การย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ Restriction endonuclease..... 45

2.9 อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส..... 46

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

2.10 การทำ molecular cloning ของ CGTase gene ในพลาสมิด pBR322

2.10.1 การเตรียมดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับ cloning จากโครโมโซม จาก *Bacillus* A_{11}..... 47

2.10.2 วิธีเตรียม alkaline phosphatase-treated plasmid pBR322..... 48

2.10.3 วิธีเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ (ligation)..... 48

2.10.4 วิธีการทำทรานสฟอร์เมชั่น (transformation)..... 49

2.10.5 การจำแนกและคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับ CGTase gene

2.10.5.1 Replica plating..... 50

2.10.5.2 Starch Hydrolytic Activity (Amylolytic Activity)..... 51

2.10.5.3 Phenol red inclusion complex test(PICT) 51

2.10.5.4 Cyclodextrin-trichloroethylene assay (CD-TCE assay)..... 52

2.11 การโคลนยีนต่อเนื่อง (subcloning) ของ CGTase gene ในพลาสมิด pUC18..... 53

2.12 การโคลนยีนต่อเนื่อง (subcloning) ของ CGTase gene ในพลาสมิด pSE411..... 55

2.13 ศึกษาบริเวณต่างๆ ที่เอนไซม์ CGTase กระจายอยู่ในเซลล์ของ *E. coli*. 55

2.14 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)..... 56

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

2.14.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน..... 56

2.14.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.14.2.1 เตรียมจากตะกอนที่ได้จาก CD-TCE assay..... 58

2.14.2.2 เตรียมจาก reaction mixture..... 58

2.14.3 สภาวะในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC..... 58

2.15 การศึกษาถึงความแตกต่างในการสร้างโปรตีนจากเซลล์เจ้าเรือน (*E.coli* strain HB101), ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pSE411 และ pSV5 ด้วยเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแผ่น

2.15.1 การเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจล 10 เปอร์เซนต์.... 59

2.15.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างและเอนไซม์ CGTase ที่ต้องการวิเคราะห์..... 60

2.15.3 การทำอิเลคโตรโฟรีซีส..... 60

3. ผลการทดลอง

3.1 การสร้างและการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1

3.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับ cloning จากโครโมโซมจาก *Bacillus* A_{11}..... 62

3.1.2 การโคลน CGTase gene..... 63

3.1.3 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับ CGTase gene

3.1.3.1 ผลการวัด Amylolytic Activity..... 65

3.1.3.2 ผลการทำ Phenol red inclusion complex test (PICT)..... 66

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.1.3.3 ผลของ Cyclodextrin-trichloroethylene assay (CD-TCE assay).....	67
	3.1.4 การวิเคราะห์ CDs ที่เกิดจากทรานสฟอร์แมนท์ SV1 โดยวิธี HPLC.....	71
3.2	การสร้างและการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV2, pSV3 และ pSV4	
	3.2.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1..	74
	3.2.2 การโคลนยีนต่อเนื่อง (subcloning) ของ CGTase gene.....	76
	3.2.3 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับ CGTase gene	
	3.2.3.1 ผลการวัด Amylolytic Activity.....	78
	3.2.3.2 ผลการทำ Phenol red inclusion complex test (PICT).....	78
	3.2.3.3 ผลการศึกษาถึงอิทธิพลของ IPTG ที่มีต่อการแสดง CGTase activity ของทรานสฟอร์แมนท์ SV2 และ SV3 โดยการทำ PICT.....	80
	3.2.3.4 ผลของ Cyclodextrin-trichloroethylene assay (CD-TCE assay).....	82
	3.2.4 ผลการศึกษาขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV2 และ pSV3....	82
	3.2.5 ผลการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ด้วยเอนไซม์ Restriction endonuclease.....	84
3.3	การสร้างและการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5	
	3.3.1 การโคลนยีนต่อเนื่องของ CGTase gene จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3.....	86

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.3.2 ผลการวัด Amylolytic Activity.....	89
	3.3.3 ผลการทำ Phenol red inclusion complex test (PICT).	89
	3.3.4 ผลของ Cyclodextrin-trichloroethylene assay (CD-TCE assay).....	89
	3.3.5 การวิเคราะห์ CDs ที่เกิดจากทรานสฟอร์แมนท์ SV5 โดยวิธี HPLC.....	92
	3.3.6 ผลของการศึกษาถึงความแตกต่างในการสร้างโปรตีนจากเซลล์เจ้าเรือน (*E.coli* strain HB101), ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pSE411 และ pSV5 ด้วยเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแผ่น.....	96
	3.3.7 ศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5.....	96
4.	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	108
เอกสารอ้างอิง.....		121
ภาคผนวก.....		131
งานเพิ่มเติมหลังวิทยานิพนธ์.....		141
ประวัติผู้เขียน.....		143

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. สมบัติของไซโคลเดกซ์ทริน..... 4
2. การนำผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ในประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1984-1987..... 7
3. Method and patent for cyclodextrin production..... 8
4. แสดงปริมาณการใช้ CDs ในตลาดโลก..... 14
5. สรุปกลไกการทำงานของเอนไซม์ CGTase..... 16
6. สรุปความสัมพันธ์ระหว่างความยาวลูกโซ่ของสับสเตรตกับการเร่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของเอนไซม์ CGTase..... 18
7. แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ CGTase ที่สร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ..... 22
8. Molecular cloning of CGTase gene..... 24
9. เปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จาก wild-type คือ *Klebsiella oxytoca* M5a1 (α-CGTase) และ Alkalophilic *Bacillus* 1-1(β-CGTase) ตามลำดับ กับรีคอมบิแนนท์โคลนที่ใช้ *E. coli* และ *B. subtilis* เป็นเซลล์เจ้าเรือน..... 33
10. แสดงปริมาณของเอนไซม์ β-CGTase ของ β-CGTase จาก Alkalophilic *Bacillus* No. 38-2 ในบริเวณต่างๆ ของเซลล์เจ้าเรือน (host cell) ชนิดต่างๆ..... 35
11. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง..... 41

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. โครงสร้างไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α-, β- และ ɣ- ตามลำดับ..... 2
2. กลไกการเกิดปฏิกิริยา cyclization ของเอนไซม์ α-CGTase จาก *Klebsiella oxytoca* M5a1..... 20
3. Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCM100..... 25
4. Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pDS10..... 26
5. Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCM1110..... 27
6. Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCS8..... 28
7. Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTUE202, pTUE217, pTUB703 และ pTUB766 ตามลำดับ..... 29
8. Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUCP1..... 30
9. Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBC22..... 31
10. Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pMT2..... 32
11. แผนภูมิแสดงการเตรียมสารละลายเอนไซม์จากส่วนต่างๆ ของเซลล์..... 57
12. ผลของการย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Bacillus* A_{11} แบบ partial digestion ด้วย Sau3AI และการย่อยพลาสมิด pBR322 ด้วย BamHI..... 64

13A. ผลการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-starch agar ของเซลล์เจ้าเรือน..... 68

13B. ผลการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-starch agar ของทรานสฟอร์แมนท์ของเซลล์เจ้าเรือนที่ได้รับ inserted DNA fragment จาก *Bacillus* A_{11} ใน pBR322..... 69

14. ผลการทดสอบ Phenol red inclusion complex test ของทรานสฟอร์แมนท์ SV1..... 70

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

15. ลักษณะของโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ CDs ที่เกิดจากทรานสฟอร์แมนท์ SV1 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC..... 72
16. ผลการศึกษาขนาดและการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 แบบ partial digestion ด้วย Sau3AI..... 75
17. ผลการย่อยพลาสมิด pUC18 ด้วย BamHI..... 77
18. ผลการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-starch agar ของทรานสฟอร์แมนท์ SV2, SV3 และ SV4..... 79
19. ผลการทดสอบ Phenol red inclusion complex test ของทรานสฟอร์แมนท์ SV1, SV2 และ SV3..... 81
20. ผลของอิทธิพลของ IPTG ต่อการแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ของทรานสฟอร์แมนท์ SV2 และ SV3..... 83
21. ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV2 และ pSV3 85
22. ผลการย่อยพลาสมิด pSE411 ด้วย PstI และ KpnI..... 88
23. ผลการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-starch agar ของทรานสฟอร์แมนท์ SV5..... 90
24. ผลการทดสอบ Phenol red inclusion complex test ของทรานสฟอร์แมนท์ SV5..... 91
25. ลักษณะของโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ CDs ที่เกิดจากทรานสฟอร์แมนท์ SV5 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC..... 93

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

26. รูปแบบของโปรตีนของเอนไซม์ CGTase ที่แยกผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส, โปรตีนที่สร้างจากเซลล์เจ้าเรือน และ ทรานสฟอร์แมนท์ แยกโดย เอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส..... 97

27. ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซนต์ 101

28. ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 บนอะกาโรสเจล 1.0 เปอร์เซนต์ 102

29. ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซนต์ 103

30. ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 บนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซนต์ 104

31. ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซนต์ 105

32. ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซนต์ 106

33. Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5..... 107

34. ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 บนอะกาโรสเจล 1.0 เปอร์เซนต์ 142

คำย่อ

Ap^r	=	Apicillin resistance
BSA	=	Bovine serum albumin
$CaCl_2$	=	Calcium chloride
CD	=	Cyclodextrin
CD-TCE assey	=	Cyclodextrin-trichloroethylene assey
CGTase gene	=	Cyclodextrin Glucanotransferase gene
$CHCl_3$	=	Chloroform
CIP	=	Calf intestine phosphatase
EDTA	=	Ethylene diamine tetraacetic acid
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	=	Isopropylthio-β-galactoside
kb	=	kilobase pair (10^3 base pair)
LB	=	Luria-Bertani medium
ml	=	millilitre (10^{-3} litre)
NaCl	=	Sodium chloride
PICT	=	Phenol red inclusion complex test
RNase	=	Ribonuclease
SDS	=	Sodium dodesil sulfate
Tet^r	=	Tetracyclin resistance
Tet^s	=	Tetracyclin sensitive
Tris	=	Tris (hydroxy methyl) aminomethane
X-gal	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactoside