การหาลำดับเบสของ pCSBC15 ที่มียีน CGTase และการตรวจหายีนนี้ใน *Bacillus* sp. A11 โดยใช้
ดีเอ็นเอติดตาม

นายจรัล บุญชัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-055-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17002400

SEQUENCING OF pCSBC15 HARBORING CGTase GENE AND DETECTION OF THE GENE IN *Bacillus* sp. A11 BY DNA PROBE

Mr. Jarun Boonchai

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Program of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
1996

ISBN 974-634-055-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาลำดับเบสของ pCSBC15 ที่มียีน CGTase และการตรวจหายีนนี้ใน *Bacillus* sp. A11 โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม
โดย	นายจรัล บุญชัย
สาขาวิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ

บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จรัล บุญยัง : การหาลำดับเบสของ pCSBC15 ที่มียีน CGTase และการตรวจหายีนนี้ใน *Bacillus* sp. A11 โดยใช้ดีเอ็นเอตาม (SEQUENCING OF pCSBC15 HARBORING CGTase GENE AND DETECTION OF THE GENE IN *Bacillus* sp. A11 BY DNA PROBE) อ.ที่ปรึกษา : ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ, 110 หน้า. ISBN 974-634-055-7

เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ insert ขนาด 3.0 กิโลเบส ใน pCSBC8 ที่คาดว่ามี CGTase gene จาก *Bacillus* sp. A11 จึง subclone ชิ้นดีเอ็นเอนี้โดยตัด pCSBC8 ด้วย *PstI/PvuII* แล้วใส่ลงที่ *PstI/smaI* ของ *pUC118* ได้พลาสมิดลูกผสมให้ชื่อว่า *pCSBC15* การวิเคราะห์ลำดับเบสของพลาสมิดลูกผสมนี้ด้วย chain termination sequencing โดยใช้ forward primer ได้ลำดับเบสที่อ่านได้ประมาณ 607 เบส และเมื่อใช้ reverse primer ได้ลำดับเบสที่อ่านได้ประมาณ 213 เบส ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งสองด้วยโปรแกรม DNA Strider 1.0 เพื่อศึกษา restriction map, 6-phase Translation, 6-phase ORF และทดสอบความคล้ายคลึงเทียบกับยีน CGTase อื่น ๆ ผลการวิเคราะห์พบว่า ไม่สามารถบอกได้ว่าเฟสใดเป็นลำดับกรดอะมิโนและ open reading frame ที่ถูกต้องและลำดับเบสช่วงที่วิเคราะห์นี้ไม่มีความคล้ายคลึงกับยีน CGTase อื่น ๆ การใช้ southern blot hybridization ตรวจสอบหายีน CGTase ใน *Bacillus* sp. A11, pCSBC5 และ pCSBC8 โดยใช้ยีน α-CGTase จาก *B. macerans* และดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC5 เป็นดีเอ็นเอติดตาม พบว่าเมื่อใช้ดีเอ็นเอติดตามเป็นยีน α-CGTase ให้สัญญาณไฮบริดขนาด 5.5 กิโลเบสกับดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 หลังตัดด้วย *Bam*HI, pCSBC5 และ pCSBC8 แต่เมื่อใช้ดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC5 จะให้สัญญาณไฮบริดกับ pCSBC5 และ pCSBC8 เท่านั้น จึงนำชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.4 - 6.6 กิโลเบส มาโคลนลงที่จุด *Bam*HI ของ pUC18 แล้วคัดเลือกทรานส์ฟอร์แมนท์ด้วย dot blot hybridization โดยใช้ยีน α-CGTase เป็นดีเอ็นเอติดตาม พลาสมิดลูกผสม pCSBC18 มีขนาดของดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 ประมาณ 5.3 กิโลเบส ซึ่งไม่พบว่ามี dextrinizing activity เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี starch hydrolysis activity หลังจากนั้นได้ศึกษาแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC16 เทียบกับแผนที่เรสทริกชันของยีน CGTase อื่น ๆ พบว่าคล้ายกับแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC5 แต่มีขนาดใหญ่กว่าประมาณ 200 เบส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา .... ลายมือชื่อนิสิต ....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ....

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

##C426357 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE / CGTase / Bacillus sp. All
JARUN BOONCHAI : SEQUENCING OF pCSBC15 HARBORING CGTase GENE AND DETECTION OF THE GENE IN Bacillus sp. All BY DNA PROBE. THESIS ADVISOR : VICHIEN RIMPHANITCHAYAKIT, Ph.D. 110 pp.
ISBN 974-634-055-7

Determination of DNA sequence of a 3.0 kb DNA insert in pCSBC8 was performed. *Pst1/Pvu11*-digested 3.0 kb DNA insert from pCSBC8 was ligated to *Pst1/Sma1*-digested pUC118 and transformed into *E. coli* JM101. The recombinant plasmid pCSBC15 was isolated. The nucleotide sequences of both 5 and 3 side of 3.0 kb DNA insert were determined. 607 and 213 base pairs of nucleotide sequence were obtained by using forward primer and reverse primer designated as pCSBC15F and pCSBC15R, respectively. Both sequences were analyzed by using DNA strider 1.0 for restriction map, 6-phase translation, 6-phase ORF as well as sequence comparison with other CGTase genes. The correct amino acid sequence and ORF for CGTase could not be determined. It was also found that the DNA sequences had no homology with other CGTase genes. By using α-CGTase gene from *B.* macerans and DNA insert from pCSBC5 as probes to trace CGTase gene in *Bacillus* sp. All and to detect the gene in pCSBC5 and pCSBC8, α-CGTase gene probe could hybridize with *Bam*H1-digested DNA of *Bacillus* sp. All, pCSBC5 and pCSBC8. DNA probe from pCSBC5 was shown to hybridize with pSCBC5 and pCSBC8 but not restriction enzyme-digested DNA from *Bacillus* sp. All, 4.4 - 6.6 kb *Bam*H1-digested DNA from *Bacillus* sp. All were cloned into *E. coli* JM101 by using plasmid vecter pUC18. Transformants were screened and selected by dot-blot hybridization. Recombinant plasmid pCSBC16 was selected. It contains an approximate 5.3 kb DNA insert and its transformant has no dextrinizing activity as determined by starch hydrolysis method on agar plate. Restriction mapping of pCSBC16 was performed and shown to be very similar to pCSBC5 though it was about 200 base pairs longer than pCSBC5.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา............ ลายมือชื่อนิสิต............
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา............
ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม............

[library stamp]

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษาให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ และความเข้าใจอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้เขียน ตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่ในภาควิชาชีวเคมี

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์ รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรดา มงคลกุล รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบและให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกๆท่านในภาควิชาชีวเคมีและหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอบพระคุณ Dr. Tashiya Takano จาก National Institute of Agrobiological Resources , Japan ที่ให้ความไว้วางใจมอบพลาสมิด pDS10 (ยีน α-CGTase) มาใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณสมาชิกในหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม ทุกคน รวมทั้งนิสิตปริญญาโทในภาควิชาชีวเคมีและเทคโนโลยีทางชีวภาพ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ และความร่วมมือในด้านต่างๆ

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ ความร่วมมือ และอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆในระหว่างการทำวิจัย

ขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

ท้ายสุดนี้ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ขอขอบคุณญาติพี่น้อง ตลอดจนคุณนุจรี บุญชัยและ ดญ. ณรจญา บุญชัย ที่ได้ให้ความรัก ความเข้าใจ ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดจนกำลังใจอันมีค่ายิ่งต่อผู้เขียนตลอดมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ญ

สารบัญรูป.....ฎ

คำย่อ.....ฑ

บทที่

1.บทนำ.....1

2. เครื่องมือ วัสดุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์

2.1 เครื่องมือ.....18

2.2 วัสดุภัณฑ์.....19

2.3 เคมีภัณฑ์.....19

2.4 พลาสมิด.....21

2.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน.....21

2.6 แบคเทอริโอฟาจ.....21

2.7 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง.....22

2.8 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์.....22

2.9 เครื่องแก้วและสารละลาย.....22

3. วิธีการทดลอง

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ.....23

3.1.1 การสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Bacillus* sp. A11.....23

3.1.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวิธีอัลคาไลน์.....24

3.2 การย่อยดีเอ็นเอด้วย restriction endonuclease.....25

3.3 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส.....25

3.4 การโคลนยีนต่อเนื่อง ของ CGTase gene จากพลาสมิด pCSBC8 ลงใน pUC118.....26

3.4.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCSBC8 สำหรับการโคลน.....26

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

3.4.2 การเตรียมดีเอ็นเอพาหะ....26
3.4.3 การสร้างดีเอ็นเอลูกผสม....27
3.4.4 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน....27
3.4.4.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์....27
3.4.4.2 การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน....28
3.4.5 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์....28
3.5 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ....29
3.5.1 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยว....29
3.5.2 การทำปฏิกิริยา sequencing....30
3.5.3 การเตรียม sequencing Gel....30
3.6 การติดตามยีน CGTase ใน *Bacillus* sp. A11 โดยใช้ nucleic acid hybridization....32
3.7 nucleic acid hybridization....33
3.7.1 การติดฉลากดีเอ็นเอ....33
3.7.2 Dot-blot hybridization....33
3.7.3 Southern-blot hybridization....33
3.7.4 การตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นไนลอนเมมเบรน....34
3.7.5 Prehybridization และ hybridization....34
3.7.6 การวิเคราะห์สัญญาณการเกิดไฮบริด....35
3.8 การโคลนยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ลงในพลาสมิด pUC18....36
3.9 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ โดยการทดสอบแอคติวิตีของการย่อยแป้ง....36
3.10 การคัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมโดยใช้เทคนิคทาง nucleic acid hybridization....36
3.11 การศึกษาแผนที่เรสทริกชันของดีเอ็นเอลูกผสมที่ถูกคัดเลือก....37
4. ผลการทดลอง
4.1 การหาลำดับเบสของยีน CGTase....38
4.1.1 การโคลนยีนต่อเนื่องจากพลาสมิด pCSBC8 ลงในพลาสมิด pUC118....38
4.1.2 การทดสอบขนาดและตำแหน่งของชิ้นดีเอ็นเอใน pCSBC15....40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

4.1.3 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวจาก pCSBC15

4.1.4 การหาลำดับเบสของพลาสมิด pCSBC15....42

4.2 การทดสอบ pCSBC5 และ pCSBC8 และการติดตามยีน CGTase ใน chromosomal DNA ที่แยกได้จาก *Bacillus* sp. A11 โดยใช้ nucleic acid hybridization....50

4.2.1 การตรวจสอบหายีน CGTase ใน pCSBC5 pCSBC8 และ chromosomal DNA....55

4.2.2 การโคลนยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ลงในพลาสมิด pUC18....62

4.2.3 การคัดเลือกหาทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีน CGTase....62

4.2.3.1 การทดสอบแอคติวิตีด้วยวิธี starch hydrolytic activity....62

4.2.3.2 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์โดยวิธี dot-blot hybridization....63

4.2.4 การตรวจสอบ recombinant plasmids โดยวิธี Southern-blot hybridization....68

4.2.5 การศึกษาแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC16....72

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง....84

รายการอ้างอิง....98

ภาคผนวก....103

ประวัติผู้เขียน....110

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. การนำผลิตภัณฑ์ของไซโคลเดกซ์ทรินไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ในประเทศญี่ปุ่น ในช่วงปี ค.ศ. 1984-1987..........3
2. แสดงปริมาณการใช้ไซโคลเดกซ์ทรินในตลาดโลก..........4
3. สรุปความสัมพันธ์ระหว่างความยาวลูกโซ่ของสับสเตรตกับการเร่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของเอนไซม์ CGTase..........7
4. การแบ่งกลุ่มแบคทีเรียตามชนิดของ CGTase..........10
5. แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ CGTase ที่สร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ..........11
6. Molecular cloning ของยีน CGTase..........12
7. เปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จาก wild-type คือ *Klebsiella oxytoca* (α-CGTase) และ alkalophilic *Bacillus* 1-1 (β-CGTase) กับรีคอมบิแนนท์โคลนที่ใช้ *E. coli* และ *B. subtilis* เป็นเซลล์เจ้าเรือน..........14
8. การเตรียม acrylamide gel ที่เปอร์เซนต์ความเข้มข้นต่างๆ..........31

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. โครงสร้างไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α- β- และ γ- ตามลำดับ....................2
2. แบบจำลองกลไกการทำงานของเอนไซม์ α-CGTase จาก *Bacillus oxytoca* M5a1....................8
3. ชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 ที่นำมา subclone ชิ้นที่ 1 ถึงชิ้นที่ 5....................17
4. ผลการย่อยพลาสมิด pCSBC8 และ pUC118 และผลการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC8 เพื่อใช้ในการโคลนยีนต่อเนื่อง....................39
5. ผลการทดสอบขนาดและตำแหน่งของชิ้นดีเอ็นเอ insert ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดpCSBC15..41
6. ผลการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC15....................43
7. ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ pCSBC15 ด้วยวิธี chain termination sequencing โดยใช้ชุด Sequenase ™ Version 2.0 DNA sequencing kit....................45
8. ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ pCSBC15F ด้วยวิธี chain termination sequencing โดยใช้ forward sequencing primer....................46
9. แผนผังเรสทริกชันของ pCSBC15F ที่วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNA Strider 1.0....................47
10. ผลการวิเคราะห์ 6-phase Translation ของ pCSBC15F ด้วยโปรแกรม DNA Strider 1.0....................48
11. ผลการวิเคราะห์ 6-phase ORF map ของ pCSBC15F ด้วยโปรแกรม DNA Strider 1.0....................49
12. ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ pCSBC15R ด้วยวิธี chain termination sequencing โดยใช้ forward sequencing primer....................51
13. แผนผังเรสทริกชันของ pCSBC15R ที่วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNA Strider 1.0....................52
14. ผลการวิเคราะห์ 6-phase Translation ของ pCSBC15R ด้วยโปรแกรม DNA Strider 1.0....................53
15. ผลการวิเคราะห์ 6-phase ORF map ของ pCSBC15R ด้วยโปรแกรม DNA Strider 1.0....................54
16. ผลการย่อยดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 พลาสมิด pDS10 pCSBC5 pCSBC8 และ pUC118 ที่ใช้ในการทำ Southern-blot hybridization....................56
17. Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอติดตามที่เป็นยีน α-CGTase และดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 พลาสมิด pCSBC5 pCSBC8 และ pUC118 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ....................57
18. ผลการย่อยดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 พลาสมิด pDS10 pCSBC5 pUC118 และ pUB110 ที่ใช้ในการทำ Southern-blot hybridization....................59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

19. Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอติดตามที่เป็นพลาสมิด pUB110 และดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 พลาสมิด pCSBC5 pDS10 pUC118 และ pUB110 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ....60
20. Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอติดตามที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอ insert จากพลาสมิด pCSBC5 และดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 pDS10 pCBSC5 pCSBC8 และpUC118 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ....61
21. ผลการทำ Dot-blot hybridization ของดีเอ็นเอลูกผสม โดยใช้อุณหภูมิในการล้างดีเอ็นเอติดตาม (α-CGTase gene) ที่ 65 °ซ....64
22. ผลการทำ Dot-blot hybridization ของดีเอ็นเอลูกผสม โดยใช้อุณหภูมิในการล้างดีเอ็นเอติดตาม (α-CGTase gene) ที่ 70 °ซ....65
23. ผลการทำ Dot-blot hybridization ของดีเอ็นเอลูกผสม โดยใช้อุณหภูมิในการล้างดีเอ็นเอติดตาม (α-CGTase gene) ที่ 75 °ซ....66
24. ผลการทำ Dot-blot hybridization ของดีเอ็นเอลูกผสม โดยใช้อุณหภูมิในการล้างดีเอ็นเอติดตาม (α-CGTase gene) ที่ 80 °ซ....67
25. แผนผังแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอลูกผสมที่มีสัญญาณไฮบริดหลังจากทำ dot-blot hybridization โดยใช้อุณหภูมิในการล้างดีเอ็นเอติดตาม (α-CGTase) ที่ 75 °ซ....69
26. ผลของการทดสอบ amylolytic activity ด้วยสารละลายไอโอดีนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-starch agar หลังจากบ่มเลี้ยงเชื้อที่ 37 °ซ เป็นเวลา 60 ชั่วโมง....70
27. ผลการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด #226 #388 #392 #393 พลาสมิด pDS10 pCSBC5 และ pUC118 ที่จะนำไปใช้ในการทำ Southern-blot hybridization....71
28. Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอติดตามที่เป็นยีน α-CGTase และ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #226 #388 #392 #393....72
29. Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอติดตามที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอ insert จากพลาสมิด pCSBC5 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด #226 #388 #392 #393....74
30. ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 (1)....75
31. ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 (2)....76

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

32. ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 (3)....................77
33. ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 (4)....................79
34. แผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16..81
35. ผลการเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ระหว่างพลาสมิด pCSBC5 และ pCSBC16....83

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

$CaCl_2$	=	Calcium chloride
EDTA	=	Ethylene diamine tetraacetic acid
I_2	=	Iodine
IPTG	=	Isopropylthio-β-D-galactoside
kb	=	kilobase pair (10^3 base pair)
KI	=	Potassium iodide
LB	=	Luria-Bertani medium
NaCl	=	Sodium chloride
NaoAc	=	Sodium acetate
NaOH	=	Sodium hydroxide
RNase	=	Ribonuclease
SDS	=	Sodium dodesyl sulfate
Tris	=	Tris (hydroxy mythyl) aminomethane
X-gal	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactoside

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย