

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญตาราง	ฒ
สารบัญภาพ	ด
อักษรย่อ	ป
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ไลเปส	3
1.3.1 ความจำเพาะของไลเปส	3
1.3.2 แหล่งไลเปส	4
1.3.2.1 ไลเปสจากสัตว์	4
1.3.2.2 ไลเปสจากพืช	4
1.3.2.3 ไลเปสจากจุลินทรีย์	5
1.3.3 ชนิดของปฏิกิริยาที่เร่งโดยไลเปส	5
1.3.3.1 ปฏิกิริยาในสารละลายน้ำ	5
1.3.3.2 ปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์	6
1.3.3.3 ปฏิกิริยาอื่นๆ	7
1.3.4 การหาแอคติวิตีของไลเปส	7
1.3.5 การหาปริมาณโปรตีน	9
1.3.6 การประยุกต์ใช้ไลเปส	9
1.4 การศึกษาการเพิ่มจำนวนยีนและการแสดงออกของยีนไลเปส จากจุลินทรีย์ (งานที่มีผู้ศึกษามาแล้ว)	12
1.5 เวกเตอร์ชนิดต่างๆสำหรับการโคลนยีน	14
1.5.1 พลาสมิด	14

	หน้า
1.5.2 ฝาจ	21
1.5.3 คอสมิด	26
1.6 การเตรียมพลาสติกดีเอ็นเอ	27
1.6.1 การเตรียมพลาสติกปริมาณน้อยๆจากแบคทีเรีย	27
1.6.2 การตกตะกอนดีเอ็นเอ	28
1.6.3 การทำกรดนิวคลีอิกให้บริสุทธิ์	29
1.7 การวัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิก	30
1.7.1 การวัดปริมาณกรดนิวคลีอิกจากค่าการดูดกลืนแสง	30
1.7.2 การวัดปริมาณกรดนิวคลีอิกจากปฏิกิริยาการเกิดสี	31
1.8 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	32
1.9 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ	34
1.9.1 ไลเกส	36
1.9.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอโดยไม่มี การตัดแปลงโมเลกุล	36
1.10 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	37
1.10.1 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์โดยตรง	37
1.10.2 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์โดยวิธีกระแสไฟฟ้า	38
1.11 การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์	38
1.11.1 การนำดีเอ็นเอจากพีในไทป์	39
1.11.2 การคัดเลือกโดยใช้วิธีอิมมูโนเคมี	39
1.11.3 การคัดเลือกโดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม	39
1.12 เทคนิคอื่นๆทางพันธุวิศวกรรม	40
1.12.1 การทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	40
1.12.2 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ	41
1.12.3 เทคนิคการทำ PCR	44
บทที่ 2 การทดลอง	46
2.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์	46
2.1.1 สารเคมี	46
2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	49

	หน้า
2.1.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	50
2.2 วิธีการทดลอง	50
2.2.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์	50
2.2.1.1 อาหารเหลว	50
2.2.1.2 อาหารวุ้น	52
2.2.2 วิธีศึกษาการเจริญและการผลิตไลเปสจากแบคทีเรีย เทอร์โมไฟล์ TP 811 และ pUC-TP811	53
2.2.3 การหาแอกติวิตีของไลเปส	53
2.2.3.1 วิธีเตรียมสาร	53
2.2.3.2 วิธีหาแอกติวิตีของไลเปสโดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์	54
2.2.4 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford	54
2.2.4.1 วิธีเตรียมสาร	54
2.2.4.2 วิธีหาปริมาณโปรตีน	55
2.2.5 การเตรียมพลาสมิดปริมาณน้อยๆจากแบคทีเรียโดยวิธี Alkaline lysis	55
2.2.5.1 วิธีเตรียมสาร	55
2.2.5.2 วิธีเตรียมพลาสมิดปริมาณน้อยๆจากแบคทีเรียโดย วิธี Alkaline lysis	57
2.2.6 การกำจัดอาร์เอ็นเอออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอ	58
2.2.6.1 วิธีเตรียมสาร	58
2.2.6.2 วิธีกำจัดอาร์เอ็นเอออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอ	59
2.2.7 การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอจากการดูดกลืนแสง	59
2.2.7.1 วิธีเตรียมสาร	59
2.2.7.2 วิธีวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ	60
2.2.8 การทำ agarose gel electrophoresis ของดีเอ็นเอ	60
2.2.8.1 วิธีเตรียมสาร	60
2.2.8.2 วิธีทำ agarose gel electrophoresis ของดีเอ็นเอ	61
2.2.9 การหาลำดับของยีนไลเปสจาก <i>B. stearothermophilus</i> TP811	62

	หน้า
2.2.10 การเพิ่มปริมาณยีนไลเปสด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)	62
2.2.11 การทำยีนไลเปสจากวิธี PCR ให้บริสุทธิ์ด้วย วิธี Rapid gel extraction kit	66
2.2.12 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Nco</i> I	68
2.2.13 การเชื่อมต่อยีนไลเปสกับดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ด้วย T_4 DNA Ligase	68
2.2.14 การเตรียม competent cell ของแบคทีเรีย <i>E.coli</i> M15 [pREP4]	69
2.2.14.1 วิธีเตรียมสาร	69
2.2.14.2 วิธีเตรียม competent cell ของแบคทีเรีย <i>E.coli</i> M15 [pREP4]	70
2.2.15 การทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน <i>E.coli</i> M15 [pREP4]	70
2.2.15.1 วิธีเตรียมสาร	70
2.2.15.2 วิธีการทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน <i>E.coli</i> M15 [pREP4]	71
2.2.16 การคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ด้วยวิธี Restriction Enzyme Analysis	71
2.2.17 การทำ PCR เพื่อตรวจทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้อง	72
2.2.18 การศึกษาความเข้มข้นของ IPTG ต่อการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปสใน pQE-TP811	72
2.2.18.1 วิธีเตรียมสาร	73
2.2.18.2 วิธีศึกษาผลความเข้มข้น IPTG ต่อการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปส	73
2.2.19 การวิเคราะห์โปรตีนในเซลล์ด้วยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis	73
2.2.19.1 วิธีเตรียมสาร	73

	หน้า
2.2.19.2 วิธีวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE	75
2.2.20 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของไลเปสออกเซลล์จาก pQE-TP811	76
2.2.20.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส	77
2.2.20.2 pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส	77
2.2.20.3 ความเสถียรของไลเปสที่อุณหภูมิต่างๆ	78
2.2.21 การศึกษาการเพิ่มการส่งไลเปสออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811	79
2.2.21.1 การศึกษาผลของ Tween 80 ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตและส่งไลเปสออกนอกเซลล์	79
2.2.21.2 การศึกษาผลของ Triton X-100 ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตและส่งไลเปสออกนอกเซลล์	80
2.2.21.3 การศึกษาการเติม glutamic acid เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงโคลน pQE-TP811	80
บทที่ 3 ผลการทดลอง	
3.1 การศึกษาเบื้องต้นของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 และ pUC-TP811	81
3.1.1 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 และ pUC-TP811	81
3.1.2 การผลิตไลเปสของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 และ pUC-TP811	83
3.1.2.1 การตรวจสอบแอกติวิตีของไลเปสโดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyllaurate	83
3.1.2.2 การผลิตไลเปสของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 และ pUC-TP811	84
3.1.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford	86
3.2 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย pUC-TP811 และ pQE 60	88
3.2.1 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย pUC-TP811 และ pQE 60	88
3.2.2 การกำจัดอาร์เอ็นเอออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย pUC-TP811 และ pQE 60	91

	หน้า
3.3 การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ	91
3.4 การหาลำดับเบสของยีนไลเปสของ <i>B. stearothermophilus</i> TP811	93
3.5 ผลการเพิ่มปริมาณยีนไลเปสด้วยวิธี PCR	95
3.6 ผลการทำไลเปสที่ได้จากวิธี PCR ให้บริสุทธิ์ด้วย Rapid gel extraction	96
3.7 ผลการตัดยีนไลเปสและดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ด้วยเอนไซม์จำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Nco</i> I	97
3.8 ผลการคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้องด้วยวิธี Restriction enzyme analysis	97
3.9 การตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้องด้วยวิธี PCR	99
3.10 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811	100
3.11 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของไลเปสส่งออกนอกเซลล์จาก แบคทีเรีย pQE-TP811	103
3.11.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส	103
3.11.2 pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส	104
3.11.3 ความเสถียรของไลเปสที่อุณหภูมิต่างๆ	104
3.12 ผลความเข้มข้นของ IPTG ต่อการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปส จาก pQE-TP811	107
3.13 การศึกษาการเพิ่มการส่งออกไลเปสออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811	114
3.13.1 ผลของ Tween 80 ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการผลิตไลเปส ส่งออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811	114
3.13.2 ผลของ Triton X-100 ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการผลิตไลเปส ส่งออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811	117
3.13.3 ผลการเติม glutamic acid เพื่อเพิ่มแหล่งคาร์บอนในอาหาร เหลว LB	119
3.13.4 ผลการเติม Tween 80 และ glutamic acid ลงในอาหารเหลว LB	122
บทที่ 4 วิจัยและสรุปผลการทดลอง	
4.1 การศึกษาเบื้องต้นของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 และ pUC-TP811	127

	หน้า
4.2 การโคลนยีนไลเปสของ <i>Bacillus stearothermophilus</i> TP811	128
4.2.1 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย pUC-TP811 และ pQE60	128
4.2.2 การเพิ่มปริมาณยีนไลเปสด้วยวิธี PCR	129
4.2.3 การทำยีนไลเปสจากวิธี PCR ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Rapid gel extraction kit	129
4.2.4 การตัดยีนไลเปสและดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Nco</i> I	130
4.2.5 การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้องด้วยวิธี Restriction enzyme analysis	130
4.2.6 การตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้องด้วยวิธี PCR	131
4.3 การเจริญเติบโตและการผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์และในเซลล์ของ pQE-TP811	131
4.4 การศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสส่งออกนอกเซลล์จากแบคทีเรีย pQE-TP811	132
4.5 การศึกษาผลความเข้มข้นของ IPTG ต่อการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปสจาก pQE-TP811	133
4.6 การศึกษาการเพิ่มการส่งออกไลเปสออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811	134
4.6.1 การศึกษาผลของ Tween 80 ที่ความเข้มข้นต่างๆ การผลิตไลเปสออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811	134
4.6.2 การศึกษาผลของ Triton X-100 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิตไลเปสออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811	135
4.6.3 การศึกษาผลการเติม glutamic acid เพื่อเพิ่มแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว LB	136
4.6.4 การศึกษาการเติม Tween 80 และ glutamic acid ลงในอาหารเหลว LB	137
เอกสารอ้างอิง	139
ประวัติผู้เขียน	143

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1.1	11
1.2	11
1.3	17
1.4	24
1.5	34
1.6	41
1.7	42
3.1	82
3.2	85
3.3	86
3.4	87
3.5	90

ตาราง	หน้า
3.6 ระยะการเคลื่อนที่และขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย pUC-TP811 และ ดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 บน 0.8% agarose gel electrophoresis	91
3.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และปริมาณ ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pUC-TP811 และ pQE 60 เมื่อเจือจางสารละลาย ดีเอ็นเอ 10 เท่าด้วย TE buffer pH 7.6	92
3.8 ค่า R _m และขนาดของดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR เมื่อใช้ pUC-P1 และ pUC-TP811 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ	96
3.9 การเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 µg/ml และกานามัยซิน 25 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที	101
3.10 การทำงานของไลเปสจากแบคทีเรีย pQE-TP811 ที่อุณหภูมิต่างๆ	103
3.11 การทำงานของไลเปสจากแบคทีเรีย pQE-TP811 ที่ pH ต่างๆ เมื่อใช้ สับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyllaurate	105
3.12 การทำงานของไลเปสจากแบคทีเรีย pQE-TP811 หลังจากแช่ไลเปสที่ อุณหภูมิต่างๆ นาน 1 ชั่วโมง	106
3.13 การเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่ผสม IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	108
3.14 ค่า R _m และ log ของมวลโมเลกุลของสารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด ต่างๆบน 12% SDS-PAGE	111
3.15 การเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ณ เวลาต่างๆ ของการเลี้ยง	113
3.16 การเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม Tween 80 ความเข้มข้นต่างๆและยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 µg/ml และ กานามัยซิน 25 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	115

ตาราง	หน้า
3.17 การเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม Triton X-100 ความเข้มข้นต่างๆและยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 $\mu\text{g/ml}$ และกานามัยซิน 25 $\mu\text{g/ml}$ ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	118
3.18 การเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม glutamic acid ความเข้มข้นต่างๆและยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 $\mu\text{g/ml}$ และกานามัยซิน 25 $\mu\text{g/ml}$ ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	120
3.19 การเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม Tween 80 เข้มข้น 1.0 g/l และ glutamic acid เข้มข้น 1.5 g/l ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 $\mu\text{g/ml}$ และกานามัยซิน 25 $\mu\text{g/ml}$ ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	123

สารบัญญภาพ

รูป	หน้า
1.1 ปฏิกริยาที่ถูกเร่งด้วยไลเปส (ก) เอสเทอร์ฟิเคชัน และ (ข) อัลกอฮอล์ไลซิส	6
1.2 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดคาร์บอกซิลิกกับ Racemic alcohol ซึ่งเร่งด้วยไลเปส	7
1.3 ปฏิกริยาการสลาย p – nitrophenyl palmitate (p – NPP) โดยไลเปส	9
1.4 พลาสมิด pBR 322	17
1.5 ดีเอ็นเอพาหะ pUC 18 และ pUC 19 แสดงลำดับเบสบริเวณ multiple cloning site ซึ่งมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ	18
1.6 พลาสมิด pQE – 60	19
1.7 การจับระหว่างโปรตีน 6xHis tag กับ Ni – NTA matrix	20
1.8 พลาสมิด p[REP4] ใน <i>E. coli</i> M15 [pREP4] และ SG 13009 [pREP4]	20
1.9 การดำรงชีวิตของฝาจแลมบ์ดา	22
1.10 แผนภาพของ λgt 11	23
1.11 จีโนมของฝาจ	25
1.12 เวกเตอร์ M13 mp RF	26
1.13 คอสมิด pJB 8	27
1.14 ปฏิกริยาการเกิดสีของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Deoxyribose กับ Diphenylamine	31
1.15 ปฏิกริยาการเกิดสีของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Ribose กับ Orcinol	32
1.16 ไดดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต ddATP	43
1.17 PCR Amplification ในแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ Denaturation, Annealing และ Primer extension	45
2.1 การติดตั้งเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเข้าสู่แผ่น agarose gel โดยกระแสไฟฟ้า มีทิศทางจากขั้วลบ(สายสีดำ) ไปยังขั้วบวก(สายสีแดง)	62
2.2 โดอะแกรมการทำยีนไลเปสจากวิธี PCR ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Rapid gel extraction	67

รูป	หน้า
2.3 การผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่แผ่นเจลในการทำ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis โดยมีทิศทางการไหลของกระแสจากขั้วลบ (สายสีดำ) ไปยังขั้วบวก (สายสีแดง)	76
3.1 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 (◆) ในอาหารเหลว ที่มีสารสกัดยีสต์ ทริปโตน และน้ำมันมะกอกในสารละลายเบสผสม และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.2 M ,pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 65 °C ในขวดเขย่า และแบคทีเรีย pUC – TP811 (■) ที่มีแอมพิซิลิน เข้มข้น 100µg/ml ที่อุณหภูมิ 37 °C ในขวดเขย่า	82
3.2 การผลิตไลเปสภายนอกเซลล์จากการเลี้ยงแบคทีเรียทนความร้อน TP811 (◆) ในอาหารเหลวที่มีสารสกัดจากยีสต์ ทริปโตน และน้ำมันมะกอกในสารละลายเบสผสมและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 M pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 65 °C และแบคทีเรีย pUC – TP811 (■) ในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C โดยมีการเขย่า ณ เวลาต่างๆ ของการเลี้ยง	85
3.3 กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณโปรตีนในสารละลายมาตรฐาน BSA ด้วยวิธี Bradford	86
3.4 0.8% agarose gel electrophoresis ของดีเอ็นเอมาตรฐาน λDNA/ Hind III (1) พลาสมิดดีเอ็นเอ pUC – TP811 (2-5) และพลาสมิดดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 (6-9)	88
3.5 กราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอมาตรฐาน λDNA / Hind III 0.8% agarose gel electrophoresis	90

รูป	หน้า
3.6 0.8% agarose gel electrophoresis ของดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA / <i>Hind</i> III (1) พลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811(2) และ pQE 60 (3) ที่กำจัดอาร์เอ็นเอออกและทำให้บริสุทธิ์แล้ว	92
3.7 การ scan ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230-320 นาโนเมตรของ พลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811 และ ดีเอ็นเอพาหะ pQE 60	93
3.8 ลำดับเบสของยีนไลเปสของ <i>B. stearothermophilus</i> TP811	94
3.9 0.8% agarose gel electrophoresis ของสารละลายดีเอ็นเอ λ DNA / <i>Hind</i> III มาตรฐาน (1) พลาสมิดดีเอ็นเอจาก pUC-TP811 (2) ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR เมื่อใช้พลาสมิดดีเอ็นเอจาก pUC-P1 (3) pUC-TP811 (4-5) และ pUC 19 (6) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และไม่เติม ดีเอ็นเอแม่แบบ (7) โดยใช้ไพโรเมอร์ Lipase F และ Lipase R เมื่อระยะเวลา การเคลื่อนที่ของ bromophenol blue เท่ากับ 5.3 ชม.	95
3.10 0.8 % agarose gel electrophoresis ของ λ DNA / <i>Hind</i> III มาตรฐาน (1) พลาสมิดดีเอ็นเอจาก pUC-TP811(2) ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR โดยใช้ pUC-TP811 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (3) และดีเอ็นเอของยีน ไลเปสบริสุทธิ์สกัดจากเจลด้วยวิธี Rapid - gel extraction (4-5) และไม่เติมดีเอ็นเอแม่แบบ (6)	96
3.11 0.8% agarose gel electrophoresis ของ λ DNA / <i>Hind</i> III มาตรฐาน (1) ยีนไลเปสจาก pUC-TP811 (2) ยีนไลเปสจาก pUC-TP811 จากการตัดเอนไซม์ <i>Hind</i> III และ <i>Nco</i> I (3) ดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 (4) และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hind</i> III และ <i>Nco</i> I (5)	97
3.12 โคโลนีของแบคทีเรียหลังจากทรานสฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย เจ้าบ้าน <i>E.coli</i> M15 [pREP4] บนอาหารร่วน LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 $\mu\text{g/ml}$ และ กานามัยซิน 25 $\mu\text{g/ml}$ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	98

รูป	หน้า
<p>3.13 0.8 % agarose gel electrophoresis ของ λ DNA / Hind III มาตรฐาน (1) พลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียเจ้าบ้าน <i>E.coli</i> M15[pREP4] (2) พลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียเจ้าบ้าน <i>E.coli</i> M15[pREP4] ตัดด้วย <i>EcoRI</i> (3) ดีเอ็นเอพาหะของ pQE 60 ที่ถูกทรานสฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน <i>E.coli</i> M15[pREP4] (4) ดีเอ็นเอพาหะของ pQE 60 ที่ถูกทรานสฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน <i>E.coli</i> M15[pREP4] ตัดด้วย <i>EcoRI</i> (5) พลาสมิดดีเอ็นเอพาหะจาก โคลนหมายเลข 1-10(6,8,10,12,14,16,18,20,22,24) พลาสมิดดีเอ็นเอพาหะ จากโคลนหมายเลข 1-10ตัดด้วย <i>EcoRI</i> (7,9,11,13,15,17,19,21,23,25)</p>	99
<p>3.14 0.8% agarose gel electrophoresis ของ λ DNA / Hind III มาตรฐาน (1) ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากวิธี PCR ของโคลนหมายเลข 7 เมื่อใช้ไพรเมอร์ Lipase F กับ Lipase R (2) เมื่อใช้ไพรเมอร์ Lipase F กับ Lipase pQE-R (3) เมื่อใช้ไพรเมอร์ Lipase pQE-F กับ Lipase pQE-R (4) เมื่อใช้ไพรเมอร์ Lipase pQE-F กับ Lipase R (5) ยีนไลเปสก่อนการโคลน (6) และเมื่อไม่ได้เติมดีเอ็นเอแม่แบบ(7)</p>	100
<p>3.15 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 μg/ml และกานามัยซิน 25 μg/ml(▲) แบคทีเรีย pUC-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 μg/ml เลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37°C (■) และ TP811 ในอาหารเหลวที่มีสารสกัดยีสต์ ทริปโตน และน้ำมันมะกอก ในสารละลายเบสผสม และ 0.2 M phosphate buffer pH 7.4 เลี้ยงที่ 65°C ณ เวลาต่างๆ ของการเลี้ยง(◆)</p>	102
<p>3.16 การผลิตไลเปสภายนอกเซลล์จากการเลี้ยงแบคทีเรียทนความร้อน TP811 (◆) แบคทีเรีย pUC-TP811(■) และ แบคทีเรีย pQE-TP811(▲) ณ เวลาต่างๆของการเลี้ยง</p>	102
<p>3.17 การทำงานของไลเปสจากแบคทีเรีย pQE-TP811 ที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อใช้สับสเตรตสังเคราะห์ p-nitrophenyllaurate</p>	104

รูป	หน้า
3.18 การทำงานของไลเปสจาก pQE-TP811 ที่ pH ต่างๆ	105
3.19 ความเสถียรต่อความร้อนของไลเปสจาก pQE-TP811 ที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อแช่ไลเปสนาน 1 ชั่วโมง	106
3.20 การเจริญ (■) และการผลิตไลเปสรวม (◆) (นอกเซลล์และในเซลล์) ในอาหารเหลว LB ที่เติม IPTG ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	109
3.21 12% SDS-PAGE ของโปรตีนมาตรฐาน(1) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนมาตรฐานผสม Phosphorylase B (97,400) Bovine serum albumin (68,000) Ovalbumin (43,000) Carbonic anhydrase (29,000) β-Lactoglobulin (18,400) Lysozyme (14,300) โปรตีนภายในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อไม่เติม IPTG (2) และโปรตีนในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9,1.0,1.5 และ 2.0 (3 - 14) เมื่ออายุได้ 1 ชั่วโมง (ก) 2 ชั่วโมง (ข) 3 ชั่วโมง (ค) และ 6 ชั่วโมง (ง) หลังเติมเลี้ยงเซลล์ได้ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที	110
3.22 กราฟมาตรฐานมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานจาก 12 % SDS-PAGE	111
3.23 การเจริญ (■) และการผลิตไลเปสรวม (◆) ของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม IPTG ความเข้มข้น 0.6 mM ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	114
3.24 การเจริญ (■) และการผลิตไลเปสรวม (◆) ของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม Tween 80 ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	116
3.25 การเจริญ (■) และการผลิตไลเปสรวม (◆) ของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม Triton X-100 ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	119

รูป	หน้า
3.26 การเจริญ (■) และการผลิตไลเปสรวม (◆) ของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม glutamic acid ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	121
3.27 การเจริญ (■) และการผลิตไลเปสรวม (◆) ของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม Tween 80 ความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร และ glutamic acid ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ณ เวลาต่างๆของการเลี้ยง	124
3.28 การเปรียบเทียบแอคติวิตีของไลเปสทั้งภายนอก(1 - 5) และภายในเซลล์ (6-10) ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม Tween 80 , Triton X-100 และ glutamic acid ความเข้มข้นที่ให้แอคติวิตีของไลเปสสูงที่สุด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	125
3.29 การเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสทั้งภายนอก(1 - 5) และภายในเซลล์ (6-10) ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม Tween 80 , Triton X-100 และ glutamic acid ความเข้มข้นที่ให้แอคติวิตีของไลเปสสูงที่สุด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	126

อักษรย่อ

ชม	ชั่วโมง
ซม	เซนติเมตร
%	เปอร์เซ็นต์
มก	มิลลิกรัม
มล	มิลลิลิตร
A	absorbance
BSA	Bovine serum albumin
Bis	N,N'-methylene bis acrylamide
cm	centimetre
dm	decimetre
g	gram
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactoside
kg	kilogram
l	litre
M	molar
μ g	microgram
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
MW	molecular weight
nm	nanometre
nmol	nanomole
OD	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
R_m	relative mobility
SDS	sodium dodecyl sulfate

Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	unit
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University