การตัดต่อและการแสดงออกของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสจาก

เอสเคอริเคีย โคไล

นางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2528

ISBN 974-564-939-2

013228

CLONING AND EXPRESSION OF THE PENICILLIN ACYLASE GENE FROM *Escherichia coli*

Miss Jarunya Ngernprasirtsiri

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Biotechnology programme

Graduate School

Chulalongkorn University

1985

ISBN 974-564-939-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตัดต่อและการแสดงออกของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสจากเอสเคอริเชีย โคไล

โดย นางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ

หลักสูตร เทคโนโลยีทางชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ลัณห์ พณิชยกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตัดต่อและการแสดงออกของยีนเพนนิซิลิน เอซีเลสจากเอสเคอริเคีย โคไล
ชื่อนิสิต	นางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์
หลักสูตร	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
ปีการศึกษา	2528

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้อาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ในการเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส (PA) โดยเริ่มจาก เอสเคอริเคีย โคไล เอทีซีซี 11105 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิต PA ได้ ในขั้นต้นของการทำ molecular cloning ได้ตัดยีน PA จากโครโมโซมของ อี.โคไล เอทีซีซี 11105 และตัดพลาสมิดดีเอนเอพาหะที่มีคุณสมบัติ runaway-replication ซึ่งมีชื่อว่า pSY 343 โดยใช้เอนไซม์เรสตริกชัน Hind III และ EcoR I หลังจากเชื่อมชิ้นดีเอนเอด้วยเอนไซม์ T_4-DNA ligase แล้ว จึงเคลื่อนย้ายพลาสมิดที่สร้างขึ้นใหม่เข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน อี.โคไล HB 101 แล้วคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ที่สามารถผลิต PA ได้ โดยอาศัยวิธีการลังเกตบริเวณใสของเซอราเทีย มาเซสเซน เอทีซีซี 27117 รอบ ๆ โคโลนีของทรานสฟอร์แมนต์ที่สามารถผลิต PA ได้

รีคอมบิแนนท์พลาสมิดดีเอนเอใหม่ที่มียีน PA ให้ชื่อว่า pJR 69 และทรานสฟอร์แมนท์ที่สามารถผลิต PA ได้ให้ชื่อว่า Q_{69} pJR 69 มีขนาดประมาณ 11 กิโลเบส การถอดรหัสของยีน PA ในสภาวะที่เหมาะสม ทำให้ Q_{69} สามารถต้านยาเพนนิซิลินได้ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถผลิต PA ที่มีแอคติวิตีสูงสุด 355.0 นาโนโมลของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิคต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ถ้านำค่าสูงสุดที่ได้เทียบกับค่าสูงสุดของ PA เดิมที่พบใน อี.โคไล เอทีซีซี 11105 แล้วจะพบว่าแอคติวิตีสูงขึ้น 9.3 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่า การถอดรหัสของเอนไซม์ PA ยังเปลี่ยนจากโอเปอรอนที่ต้องการตัวยักนำมาเป็นโอเปอรอนที่ถอดรหัสได้ตลอดเวลา

เนื่องจากการสร้าง PA ของ Q_{69} ยังคงถูกกดดันด้วยกลูโคสในอาหาร ดังนั้นจึงได้ยักนำการกลายพันธุ์เพื่อแยกสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถใช้กลูโคสเป็นสารตั้นตอคาร์บอน พร้อมทั้งถอด

รหัส PA ได้อีกด้วย การวิจัยนี้ได้เลือกใช้รังสีอุลตราไวโอเลต และ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) สำหรับการกลายพันธุ์ ในการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลตนั้นสามารถแยกได้มิวแตนท์ซึ่งมีคุณสมบัติ catabolite derepressed หลายตัว หลังจากทดสอบแล้วพบว่าสายพันธุ์ R_9 สามารถผลิต PA ได้สูงสุดในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ R_9 สามารถผลิต PA ได้มีแอคติวิตีสูงสุด 661.8 นาโนโมล ของกรดพาราอะมิโนเบนโซอิค ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งถ้านำค่าสูงสุดที่ได้นี้เทียบกับค่าสูงสุดของ PA จาก Q_{69} พบว่า แอคติวิตีสูงขึ้น 1.9 เท่า

ส่วนการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG นั้น สามารถแยกได้มิวแตนท์ซึ่งมีคุณสมบัติ catabolite derepressed หลายตัว หลังจากทดสอบแล้วพบว่าสายพันธุ์ S_5 สามารถผลิต PA ได้สูงสุด ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ S_5 สามารถผลิต PA ได้มีแอคติวิตีสูงสุดใกล้เคียงกับ R_9 ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ทั้งสองนี้อยู่ที่ S_5 มีความเสถียรกว่า ซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิต PA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Cloning and Expression of the Penicillin Acylase Gene from Escherichia coli
Name	Miss Jarunya Ngernprasirtsiri
Programme	Biotechnology
Thesis Advisor	Associate Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.
Academic Year	1985

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

This work reported the attempt to improve the production of penicillin acylase (PA) by an application of genetic engineering techniques. The PA gene was cloned from the chromosomal DNA of E. coli ATCC 11105. This gene was to be inserted into a runaway replication plasmid named pSY 343. Plasmid pSY 343 was double digested with restriction enzymes Hind III and EcoR I and then joined by the action of T_4-DNA ligase to the E. coli chromosomal DNA fragments containing PA gene which previously treated with the similar restriction enzymes as did pSY 343. The new constructed plasmid DNA were transformed into recipient cells named E. coli HB 101 and PA producing transformant was screened and isolated by an observation of the inhibitory clear zone of Serratia marcescens ATCC 27117 around the colonies of transformants. The transformant containing expression plasmid pJR 69 was named E. coli Q_{69}. The size of pJR 69 was determined to be approximately 11 kilobase. The optimal conditions for the expression of PA gene caused Q_{69} to tolerate penicillin upto 200 microgram per milliliter and the maximum PA activity was 355.0 nmole of p-aminobenzoic acid per minute per milligram protein. This value was 9.3 fold higher than that obtained from E. coli ATCC 11105. Furthermore, an expression of PA gene in Q_{69}

was changed from formerly inducible to constitutive type of operon.

The next objective of this work was to produce strains being devoid of glucose effect by the technique of mutation. Ultraviolet radiation (UV) and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) were used for mutagenesis. By UV mutagenesis, many strains having derepressed catabolite effect were isolated. After characterization, a strain named R_9 was found to be the best strain in the aspect of PA production. Under the optimal growth condition for R_9, 661.8 nmole PABA per min. per mg. protein were obtained and furthermore at this conditions, the maximal specific activity of PA from R_9 was 1.9 folds higher than that from Q_{69}.

Finally, with an application of NTG mutagenesis, many strains which were devoid of glucose effect could be isolated. S_5 was the strain with the highest level of PA activity under an optimal growth condition. The specitic activity of PA including the maximal growth yield of S_5 were very similar to those of R_9. However, the difference between these two strains was due to the mutation resided in S_5 causing this mutant more stable than R_9. Therefore, this mutant may be suitable for PA production.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ กิจพิทักษ์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ และความเข้าใจ อันมีค่ายิ่งต่อผู้เขียนตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่ในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่สำคัญและเป็นประโยชน์อย่างมากในการวิจัยนี้ รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ลิทธิประณีต ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและความเข้าใจด้านเทคนิคที่สำคัญในการทำ Molecular cloning รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และรองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ หน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม และภาควิชาชีวเคมี ที่ได้ให้ความกรุณา และคำชี้แนะต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอบคุณหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม และภาควิชาชีวเคมี ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องใช้ และสารเคมี ตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอบคุณ คุณจันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ เป็นอย่างยิ่งที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจและกำลังใจต่อผู้เขียน ขอบคุณ คุณนิวัฒน์ คุปปัวิวัฒน์ สำหรับความช่วยเหลือด้านการถ่ายภาพตลอดจนขอขอบคุณสมาชิกทุกคนในกลุ่มวิจัยเพนนิซิลิน เอซิเลส สมาชิกในหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม นิสิตปริญญาโทเทคโนโลยีชีวภาพ และชีวเคมี สำหรับความช่วยเหลือต่าง ๆ และกำลังใจต่อผู้เขียน

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกคน ในความช่วยเหลือเรื่องทั่วไป ระหว่างการทำวิจัย

ท้ายสุดนี้ ผู้เขียนขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูป ..... ฑ

คำย่อ ..... ต

บทที่

1. บทนำ 1

2. วิธีการทดลอง

2.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง 15

2.2 พลาสมิดดีเอนเอและดีเอนเอมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง 16

2.3 การเก็บรักษาดีเอนเอที่ใช้ในการทดลอง 16

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 17

2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ 17

2.6 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 20

2.7 การเตรียมสารละลาย 20

2.8 การศึกษาการเจริญของเชื้อ 23

2.9 การตรวจสอบแอคติวิตีเบื้องต้นของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของโคโลนีในจานเพาะเชื้อโดยวิธี Microbiological test 24

2.10 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส 24

2.11 การตรวจสอบแอคติวิตีเบื้องต้นของเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส ของโคโลนีในจานเพาะเชื้อโดยวิธี Microiodometric test ... 26

2.12 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส 26

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	2.13 การล้างพลาสมิดดีเอนเอ	27
	2.14 การล้างโครโมโซมของแบคทีเรีย	30
	2.15 การวัดปริมาณดีเอนเอ	31
	2.16 เทคนิคทาง Molecular cloning	31
	2.17 การแยก Catabolite derepressed mutant	33
	2.18 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry	34
3.	ผลการทดลอง	
	3.1 สมบัติของ E. coli ATCC 11105	36
	3.2 สภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนต่าง ๆ ในเทคนิค Molecular cloning	44
	3.3 สมบัติของ transformant Q_{69} (E. coli HB 101 ที่มีพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69)	56
	3.4 การแยก Catabolite derepressed mutant จาก Q_{69} ..	69
	3.5 สมบัติของ Catabolite derepressed mutant R_9 (E. coli C 600 ที่มี pJR 69)	73
	3.6 สมบัติของ Catabolite derepressed mutant S_5 (E. coli HB 101 ที่มี pJR 69)	84
	3.7 เปรียบเทียบค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส เมื่อวัดโดยวิธี PAAB และวิธี PDAB ใน E. coli ATCC 11105, Q_{69}, R_9 และ S_5	91
4.	วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	94
เอกสารอ้างอิง		108
ภาคผนวก		
1.	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี	116

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	2. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ p-aminobenzoic acid โดยวิธีของ Szewezuk	117
	3. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ 6-aminopenicillanic acid โดยวิธีของ Balasingham	118
	4. แอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-แลคตาเมสของ E. coli ATCC 11105 เมื่อเจริญในอาหารอุดม LB เสริม PAA 0.1 % ที่ 30°ซ.	119
ประวัติผู้เขียน	.....	120

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 18

2. การเจริญและแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ E. coli ATCC 11105 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่ 30°ซ. และ 37°ซ. 37

3. การเจริญและแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ E. coli ATCC 11105 ในอาหารเลี้ยงเชื้ออุดม LB ที่เสริม Phenylacetic acid ปริมาณต่าง ๆ กันที่ 30°ซ. 38

4. แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ E. coli ATCC 11105 เมื่อเติม Mitomycin C เปรียบเทียบกับไม่เติม 43

5. ผลของการแยกสาย DNA ด้วยความร้อนก่อน ligation 48

6. ผลของปริมาณ T_4-DNA ligase 49

7. ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ T_4-DNA ligase 50

8. ผลของเวลาที่ใช้ในการ ligation 51

9. ผลการทดสอบความสามารถในการต้านเพนนิซิลินจีของแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย 55

10. ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลสของ Q_{69} 59

11. ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ ต่อปริมาณพลาสมิดดีเอนเอของ Q_{69} เปรียบเทียบกับ E. coli HB 101 ที่มี pSY 343 60

12. ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลสของ Q_{69} 61

13. ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ R_9 75

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14.	ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ ต่อปริมาณพลาสมิดดีเอนเอของ R_9 เปรียบเทียบกับ Q_{69}	76
15.	ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลสของ R_9	77
16.	ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลสของ S_5	85
17.	ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อปริมาณพลาสมิดดีเอนเอของ S_5 เปรียบเทียบกับ Q_{69}	86
18.	ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลสของ S_5	87
19.	แอคติวิตีสูงสุดของ PA ของ E. coli ATCC 11105, Q_{69}, R_9 และ S_5 เมื่อวัดโดยใช้สับสเตรทเป็น PAAB เปรียบเทียบกับ Penicillin G	93
20.	เปรียบเทียบการเจริญสูงสุดและแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลส ระหว่าง E. coli ATCC 11105 กับ Q_{69}, R_9 และ S_5	105

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของเพนนิซิลิน และตัวอย่าง side chain ต่าง ๆ	2
2	ขั้นตอนการผลิต 6-Aminopenicillanic acid ด้วยวิธีทางเคมี	4
3	ปฏิกิริยาของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส	5
4	Restriction mapping ของพลาสมิดดีเอนเอ pHM 6 ซึ่งสร้างโดย Mayer และคณะ (1980)	10
5	Restriction mapping ของพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343	12
6	ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E. coli ATCC 11105 เมื่อเจริญในอาหารอุดม LB เสริม PAA 0.1 % ที่ 30°ซ. .	39
7	ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E. coli ATCC 11105 เมื่อเจริญในอาหารอุดม LB เสริม PAA 0.1 % และกลูโคส 0.2 % ที่ 30°ซ.	41
8	การตรวจสอบพลาสมิดของ E. coli ATCC 11105 บน 0.7 % agarose gel electrophoresis	42
9	ผลของการย่อยโครโมโซมของ E. coli ATCC 11105 ด้วยเอนไซม์ Hind III และ EcoR I บน 0.7 % agarose gel electrophoresis	45
10	ผลการย่อยพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ด้วยเอนไซม์ Hind III และ EcoR I	46
11	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ที่ใช้กับจำนวน transformant ทั้งหมด ที่ได้จากการ transformation เมื่อเตรียม competent cell โดยวิธี $CaCl_2$ treated-method	52
12	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ที่ใช้กับจำนวน transformant ทั้งหมด ที่ได้จากการ transformation เมื่อเตรียม competent cell โดยวิธี DMSO-treated-method	54

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
13	ผลของการ ligation ชิ้น DNA จาก E. coli ATCC 11105 กับ ชิ้นพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 บน 0.7 % agarose gel electrophoresis	57
14	ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ Q_{69} และ E. coli ATCC 11105 ในอาหารอุดม	63
15	ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ Q_{69} และ E. coli ATCC 11105 ในอาหารอุดม LB เสริม PAA 0.1 % ..	64
16	ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ Q_{69} และ E. coli ATCC 11105 ในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส 0.2 % ..	65
17	ก) ลักษณะของการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสที่สัมพันธ์กับเวลา, ความขุ่น และปริมาณพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ของ Q_{69} เมื่อเติม Mitomycin C เปรียบเทียบกับไม่เติม	
	ข) ลักษณะของปริมาณพลาสมิดดีเอนเอที่สัมพันธ์กับเวลาและความขุ่นของ Q_{69} เมื่อเจริญในสภาวะเช่นเดียวกับ ก เติมและไม่เติม Mitomycin C เปรียบเทียบกับ E. coli HB 101 ที่มี pSY 343	67
18	ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ของ Q_{69} บน 0.7 % agarose gel electrophoresis ..	68
19	Survival curve ของ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 เมื่อถูกกลายพันธุ์ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลตบนอาหารเลี้ยงเชื้ออุดม LB เสริม Penicillin G 200 μg/ml	71
20	การทดสอบการผลิต PA ของ Q_{69}, E. coli C 600 ที่มี pJR 69 และมิวแตนท์ 9 ตัวที่แยกได้จากการกลายพันธุ์ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต	72

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
21	การทดสอบการผลิต PA ของ Q_{69}, E. coli ATCC 11105 และมิวแตนท์ 5 ตัวที่แยกได้จากการกลายพันธุ์ Q_{69} ด้วย NTG	74
22	เปรียบเทียบการเจริญและแอคติวิตีของ PA ของ R_9 ในอาหารอุดม LB และ LB เสริมกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กัน	78
23	ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ R_9 และ Q_{69} ในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส 0.2 %	80
24	การทดสอบการผลิต PA ของ R_9 และ E. coli C 600 ที่ได้รับพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก R_9 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ โดย Microbiological test	82
25	ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ของ R_9 บน 0.7 % agarose gel electrophoresis	83
26	ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ และ Q_{69} ในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส 1 %	89
27	การทดสอบการผลิต PA ของ S_5 และ E. coli HB 101 ที่ได้รับพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก S_5 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ โดยวิธี Microbiological test	90
28	ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ของ S_5 บน 0.7 % agarose gel electrophoresis	92
29	Restriction mapping คร่าว ๆ ของ pJR 69	98

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
^oC	=	degree celcius
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
K.U.	=	klett unit
M	=	molar
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)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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
PA	=	Penicillin acylase
PAA	=	Phenylacetic acid
PAAB	=	Phenyl acetyl-4-aminobenzoic acid
PABA	=	p-Aminobenzoic acid
PDAB	=	p-Dimethyl amino benzaldehyde
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