179880

วรรคพรรณ นาควัชระ : การสร้างชัตเทิลเวกเตอร์และการศึกษาเบื้องต้นของยีนเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่แสดงออกใน *Bacillus subtilis* (CONSTRUCTION OF SHUTTLE VECTOR AND PRELIMINARY STUDY OF DEXTRANASE GENE FROM *Arthrobacter* sp. STRAIN AG-2 EXPRESSED IN *Bacillus subtilis*) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน; 80 หน้า. ISBN 974-53-2742-5.

pGEMTF เป็นชัตเทิลเวกเตอร์ขนาด 8 กิโลเบสที่สร้างขึ้นโดยการเชื่อมกันระหว่าง pGEM-7Zf(+) และ pTF6 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ถ่ายแบบใน *Escherichia coli* และ *Bacillus* sp. ตามลำดับ เพื่อใช้ศึกษาการแสดงออกของเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ใน *Bacillus subtilis* โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสขยายส่วนที่ประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. โดยออกแบบให้ปลายของไพรเมอร์ทั้งสองฝั่งมีจุดตัดเอนไซม์ *Alw*21I แล้วโคลนเข้าใน pGEM-7Zf(+) ตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pGEMDEX จากนั้นตัด pGEMDEX ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Alw*21I ได้ชิ้นดีเอ็นเอซึ่งมีส่วนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสขนาดประมาณ 2 กิโลเบส นำมาโคลนลงใน pGEMTF ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เป็นคู่สมกับ *Alw*21I โดยใช้ *E.coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่าได้พลาสมิดขนาด 10 กิโลเบส ตั้งชื่อว่า pBUNDEX จากนั้นทรานสฟอร์ม pBUNDEX เข้าสู่ *Bacillus subtilis* 3 สายพันธุ์ คือ MI111, MI111 low protease และ MI113 ขนาดของพลาสมิดที่พบใน *Bacillus subtilis* ทั้งสามชนิดนั้นมีขนาดเล็กกว่า pBUNDEX และไม่สามารถตรวจพบส่วนประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการตัดออกของยีนเกิดขึ้น

179880

## 4572633723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

**KEY WORD:** DEXTRANASE/ *Arthrobacter* sp./ EXPRESSION VECTOR

VAKKAPUN NARKVAJARA : CONSTRUCTION OF SHUTTLE VECTOR AND PRELIMINARY STUDY OF DEXTRANASE GENE FROM *Arthrobacter* sp. STRAIN AG-2 EXPRESSED IN *Bacillus subtilis*. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. SUTHEP THANEEYAWAN, Ph.D., 80 pp. ISBN 974-53-2742-5.

pGEMTF (8 Kb), a shuttle vector that was constructed from pGEM+7Zf(+) and pTF6, capable of replicating in *E.coli* and *Bacillus* sp. was used as an expression vector for dextranase gene (*dex*) isolated from *Arthrobacter* sp. strain AG-2 in *Bacillus subtilis*. The *dex* amplified by BUN+F and BUN+R primers, with *Alw*21I restriction site at their 5'end, was cloned into pGEM-7Zf(+) and designated as pGEMDEX. The *Alw*21I fragment from pGEMDEX containing *dex* was cloned into *Pst*I cut pGEMTF by using *E. coli* DH5α as host. The 10 Kb product that contained *dex* was found and designated as pBUNDEX. Finally, pBUNDEX was transformed into 3 *Bacillus subtilis* strain;MI111, MI111 low protease and MI113 host. Plasmid size in these *Bacillus subtilis* strains was smaller than pBUNDEX in *E.coli* and *dex* could not be detected by PCR amplified. The result showed that constructed plasmid was deleted when transformed into *Bacillus subtilis* hosts.