สารบาญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบาญตาราง	ฑ
สารบาญภาพ	ณ
รายการอักษรย่อ	ธ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 เอนไซม์	1
1.2 เอนไซม์โปรติเอส	2
1.3 ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส	3
1.4 เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม	5
1.4.1. การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการโคลน	6
1.4.1.1 สารพันธุกรรม	6
1.4.1.2 การแยกดีเอ็นเอออกจากเซลล์แบคทีเรีย	12
1.4.2 การเตรียมดีเอ็นเอพาหะ	14
1.4.2.1 ชนิดของดีเอ็นเอพาหะ	14
1.4.2.2 การเตรียมดีเอ็นเอพาหะจากแบคทีเรีย	16
1.4.3 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการกับดีเอ็นเอพาหะ	17
1.4.3.1 เอนไซม์ที่ใช้ในงานทางด้านพันธุวิศวกรรม	18
1.4.3.2 การตัดดีเอ็นเอเป้าหมายและดีเอ็นเอพาหะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	20
1.4.3.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ต้องการกับดีเอ็นเอพาหะด้วยเอนไซม์เชื่อมต่อ	21
1.4.4 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	22
1.4.5 การคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม	24
1.4.5.1 การคัดเลือกโดยอาศัยลักษณะทาง Phenotype	25
1.4.5.2 การทำ Colony hybridization	25

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

หน้า

1.4.5.3 วิธีทางอิมมิวโนเคมี (Immunochemical method) 26
1.5. การทำ Subcloning 26
1.6 เทคนิคที่เกี่ยวข้องในการศึกษาการโคลนยีนเอนไซม์โปรติเอส 27
1.6.1 การหาแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอส 27
1.6.2 การหาปริมาณโปรตีน 27
1.6.2.1. วิธี Ultraviolet spectrophotometry 27
1.6.2.2 วิธี Protein-Dye Binding 28
1.6.3 อัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) 28
1.6.4 อิเล็คโตรโฟริซิส (Electrophoresis) 29
1.6.4.1 Polyacrylamide gel electrophoresis 29
1.6.4.2 Agarose gel electrophoresis 32
1.6.5 การแยกดีเอ็นเอออกจากเจล 33
1.6.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) 34
1.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการโคลนยีนของเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อน 36
1.8 วัตถุประสงค์ของการศึกษา 38
บทที่ 2 การทดลอง 39
2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี 39
2.1.1 สารเคมี 39
2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ 41
2.1.3 จุลินทรีย์ 42
2.2 วิธีการทดลอง 42
2.2.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย 42
2.2.1.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* TLS33 42
2.2.1.2 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5α 42
2.2.1.3 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5α with pUC19 43

หน้า

2.2.1.4 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียที่ได้รับการโคลนยีนโปรติเอส 43
2.2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 43
2.2.2.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* TLS33 43
2.2.2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5α with pUC19 44
2.2.3 การโคลนยีนโปรติเอส 44
2.2.3.1 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* TLS33 44
2.2.3.2 การสกัดดีเอ็นเอพาหะ pUC19 จากแบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5α 46
2.2.3.3 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 48
2.2.3.4 การทำ Agarose gel electrophoresis 50
2.2.3.5 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ 51
2.2.3.6 การเตรียม Competent cell ด้วยวิธี Calcium chloride method 51
2.2.3.7 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยวิธี Transformation 52
2.2.3.8 การหาแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสโดย วิธี Azocasein hydrolysis 52
2.2.3.9 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน 54
2.2.3.10 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน 56
2.2.3.11 การศึกษาขนาดยีนโปรติเอสที่โคลนได้ 64
2.2.3.12 การเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จากการโคลนยีนโดยใช้โปรแกรม BLAST 65
2.2.4 การทำ Subcloning 65
2.2.4.1 การสกัดยีนโปรติเอสจากดีเอ็นเอสายผสม 65
2.2.4.2 การตัดยีนโปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีนด้วยวิธี Partial digestion 67
2.2.4.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอจาก Cloned TLS33 ที่ทำการตัดด้วยวิธี Partial digestion กับดีเอ็นเอพาหะ pUC19 67

หน้า

2.2.4.4 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน 68
2.2.4.5 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning 68
2.2.4.6 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการ Subcloning 69
2.2.4.7 การศึกษาขนาดยีนโปรติเอสที่ได้จาก Subclone I 70
2.2.4.8 การเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จาก Subcloning โดยใช้โปรแกรม BLAST 70
บทที่ 3 ผลการทดลอง 71
3.1 การโคลนยีนโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 71
3.1.1 การศึกษาการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย 71
3.1.1.1 ผลการศึกษาการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 71
3.1.1.2 ผลการศึกษาการสกัดดีเอ็นเอพาหะ pUC19 72
3.1.2 การศึกษาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 72
3.1.2.1 ผลการศึกษาการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยวิธี Partial digestion 72
3.1.2.2 ผลการศึกษาการตัดดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ด้วยวิธี Complete digestion 74
3.1.3 การศึกษาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอพาหะ และการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน 75
3.1.4 ผลการตรวจสอบโคโลนีที่มียีนโปรติเอส 76
3.1.5 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน 77
3.1.5.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก Cloned TLS33 77
3.1.5.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส 80
3.1.5.3 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส 81
3.1.5.4 ผลการศึกษาความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์โปรติเอส 83

หน้า

3.1.5.5 ผลการศึกษาแอคทิวิตีของโปรติเอสภายในและภายนอกเซลล์ 84
3.1.6 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน 85
3.1.6.1 ผลการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี SDS- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 85
3.1.6.2 ผลการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Zymography 87
3.1.7 การศึกษาขนาดของยีนโปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน 89
3.1.8 ผลการหาลำดับเบสของยีนโปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 92
3.2 การทำ Subcloning ยีนโปรติเอส 100
3.2.1 การศึกษาการสกัดยีนโปรติเอสจากดีเอ็นเอสายผสม 100
3.2.1.1 การศึกษาการตัดยีนโปรติเอสจากดีเอ็นเอสายผสม 100
3.2.1.2 การศึกษาการสกัดยีนโปรติเอสจาก Agarose gel 101
3.2.2 การตัดยีนโปรติเอสด้วยวิธี Partial digestion 102
3.2.3 การตรวจสอบโคโลนีที่มียีนโปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning 103
3.2.4 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning 103
3.2.4.1 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเซลล์เจ้าบ้านที่ได้จากการทำ Subcloning 103
3.2.4.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning 105
3.2.4.3 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning 106
3.2.4.4 ผลการศึกษาความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning 108
3.2.4.5 ผลการศึกษาแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสภายในและภายนอกเซลล์ของ Subclone I และ Subclone II 109
3.2.5 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning 110
3.2.5.1 ผลการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของโปรติเอสที่ได้จากการทำ 110

หน้า

Subcloning โดยวิธี SDS- polyacrylamide gel electrophoresis
3.2.5.2 ผลการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของโปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning โดยวิธี Zymography 111
3.2.6 การศึกษาขนาดของยีนโปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning 113
3.2.7 ผลการหาลำดับเบสของยีนโปรติเอสที่ได้จาก Subclone I 114
บทที่ 4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 117
4.1 การโคลนยีนโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 117
4.1.1 การศึกษาการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย 117
4.1.2 การศึกษาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 117
4.1.3 การศึกษาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอพาหะ และการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน 118
4.1.4 ผลการตรวจสอบโคโลนีที่มียีนโปรติเอส 119
4.1.5 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน 120
4.1.6 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน 122
4.1.7 การศึกษาขนาดและลำดับเบสของยีนโปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน 123
4.2 การทำ Subcloning ยีนโปรติเอส 124
4.2.1 การทำ Subcloning ยีนโปรติเอสจาก Cloned TLS33 124
4.2.2 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning 126
4.2.3 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning 128
4.2.4 การศึกษาขนาดของยีนโปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning 129
4.2.5 สรุปผลการทดลอง 130
บรรณานุกรม 133
ประวัติผู้เขียน 139

สารบาญตาราง

	หน้า
1.1 การแบ่งชนิดของเอนไซม์ตามชนิดการเร่งปฏิกิริยา	2
1.2 โครงสร้างดีเอ็นเอแบบต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตหลายแบบ	12
1.3 ข้อดีและข้อเสียของ *E.coli* ในฐานะเซลล์เจ้าบ้าน	22
1.4 ช่วงที่เหมาะสมในการแยกดีเอ็นเอโดย agarose gel	32
2.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.02 M ที่มี 5 mM $CaCl_2$ ที่พีเอชต่าง ๆ ปริมาตร 1 ลิตร	55
2.2 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding assay	58
3.1 แอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ของแต่ละโคโลนีที่ได้จากการโคลนยีน	76
3.2 ค่า OD_{620} ของการเจริญเติบโตของ Cloned TLS33 ในอาหารเหลวนมพร่องไขมันที่ผสมแอมพิซิลิน โดยติดตามผลทุก ๆ 4 ชม.	77
3.3 แอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Cloned TLS33 โดยติดตามผลทุก ๆ 4 ชม.	78
3.4 แอคทิวิตีของโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	80
3.5 แอคทิวิตีของโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 ที่พีเอชต่าง ๆ	82
3.6 แอคทิวิตีที่เหลืออยู่ของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 เมื่อแช่เอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชม.	83
3.7 แอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสภายในและภายนอกเซลล์ของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33	85
3.8 ค่า Rm และระยะทางที่โปรตีนแต่ละตัวเคลื่อนที่ จากการทำ SDS – polyacrylamide gel electrophoresis	86
3.9 ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ และค่า Log of fragment size จากการทำ Agarose gel electrophoresis	91

หน้า

3.10 แอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Subclone I และ Subclone II โดยติดตามผลทุก ๆ 4 ชม. 104

3.11 แอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 , Cloned TLS33, Subclone I และ Subclone II ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 105

3.12 แอคทิวิตีของโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33, Cloned TLS33, Subclone I และ Subclone II ที่พีเอชต่าง ๆ 107

3.13 แอคทิวิตีที่เหลืออยู่ของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33, Cloned TLS33, Subclone I และ Subclone II เมื่อแช่เอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชม. 108

3.14 แอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสภายในและภายนอกเซลล์ของ Subclone I และ Subclone II 110

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

สารบาญภาพ

		หน้า
1.1	องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ แสดงความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ และความแตกต่างระหว่างนิวคลีโอไซด์และนิวคลีโอไทด์	7
1.2	เบสที่พบในกรดนิวคลีอิค อะดีนีนและกัวนีนเป็นอนุพันธ์ของเพียวรีน ไซโตซีน ไทมีน และ ยูเรซิลเป็นอนุพันธ์ของไพริมิดีน	8
1.3	สูตรโครงสร้างของ polydeoxyribonucleotide	9
1.4	โครงสร้างของดีเอ็นเอ	10
1.5	สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของ ดีเอ็นเอ	13
1.6	พลาสมิด pUC19	17
1.7	การตัดดีเอ็นเอที่เป็น palindrom โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI	18
1.8	กลไกการเกิด transformation ของเซลล์เจ้าบ้าน	24
1.9	ลักษณะการเกิดวงใสรอบโคโลนี (Clear zone)	25
1.10	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่โปรตีนมาตรฐานเคลื่อนที่กับค่า log มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (กราฟมาตรฐานโปรตีน)	30
1.11	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่ DNA marker เคลื่อนที่กับขนาด ของ DNA marker	33
1.12	การหาลำดับเบสด้วยวิธี Dideoxy chain termination	35
2.1	ชุดอุปกรณ์ Vivaspin	56
2.2	ชุดอุปกรณ์ Concert rapid gel extraction	66
3.1	แถบจีโนมิคดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 บน Agarose gel ภายหลังจากการทำ Agarose gel electrophoresis	71
3.2	แถบของดีเอ็นเอพาหะ pUC19 บน Agarose gel ภายหลังจากการทำ Agarose gel electrophoresis	72

หน้า

3.3 การตัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยวิธี Partial digestion โดยใช้เอนไซม์ *Sau* 3A ปริมาณต่าง ๆ กัน ใช้เวลาในการตัด 1 ชม. ช่องที่ 1 คือ λDNA marker ช่องที่ 2-9 คือจีโนมิคดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *Sau* 3AI ปริมาณต่าง ๆ กัน ตามลำดับดังนี้ 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.007 และ 0.003 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ช่องที่ 10 คือ จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 73

3.4 การตัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI ความเข้มข้น 0.025 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ที่เวลาต่าง ๆ กัน ช่องที่ 1 คือ λDNA marker ช่องที่ 2 คือ จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ช่องที่ 3-7 คือ จีโนมิคดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *Sau* 3AI ที่เวลาต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้ 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที 74

3.5 การตัดดีเอ็นเอพาหะ pUC19 อย่างสมบูรณ์ ด้วยเอนไซม์ *Bam* HI ปริมาณต่าง ๆ กัน ช่องที่ 1 คือ λDNA marker ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ช่องที่ 3-6 คือ ดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI ปริมาณต่างๆ กัน ตามลำดับดังนี้ 1, 2 ,3 และ 4 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ 75

3.6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{620} ของ Cloned TLS33 กับเวลา และความสัมพันธ์ระหว่างแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Cloned TLS33 กับเวลา โดยติดตามผลทุกๆ 4 ชม. 79

3.7 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิตีของโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 81

3.8 ผลของพีเอชต่อแอคทิวิตีของโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 82

3.9 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคทิวิตีที่เหลืออยู่กับอุณหภูมิที่ใช้แช่เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 เป็นเวลา 1 ชม. 84

3.10 การตรวจสอบขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี SDS-PAGE ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Cloned TLS33 86

หน้า

3.11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Rm และ Log MW ของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ SDS – polyacrylamide gel electrophoresis 87

3.12 การตรวจสอบขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Zymography ชนิด SDS-PAGE ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Cloned TLS33 88

3.13 การตรวจสอบขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Zymography ชนิด Native PAGE ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Cloned TLS33 89

3.14 การหาขนาดดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Cloned TLS33 โดยการทำ Agarose gel electrophoresis 90

3.15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ และ Log of fragment size จากการทำ Agarose gel electrophoresis 91

3.16 ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอจาก Cloned TLS33 ที่ได้จากการโคลนยีน 93

3.17 Restriction map ของชิ้นดีเอ็นเอจาก Cloned TLS33 ที่ได้จากการโคลนยีน 94

3.18 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอจาก Cloned TLS33 กับ ข้อมูลลำดับเบสของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST 95

3.19 ผล Translation ของชิ้นดีเอ็นเอจาก Cloned TLS33 แบบที่ 1 96

3.20 ผล Translation ของชิ้นดีเอ็นเอจาก Cloned TLS33 แบบที่ 2 97

3.21 ผล Translation ของชิ้นดีเอ็นเอจาก Cloned TLS33 แบบที่ 3 98

3.22 Open Reading Frame (ORF) ของยีนต่าง ๆ บน สายดีเอ็นเอที่ได้จาก Cloned TLS33 99

3.23 การตัดยีนโปรติเอสจากดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Cloned TLS33 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Eco*RI 100

3.24 ผลการสกัดยีนโปรติเอสจาก Agarose gel ภายหลังจากตัดดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Cloned TLS33 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Eco*RI แล้วนำมาทำอิเล็คโตรโฟรีซิส 101

หน้า

3.25 แสดงการตัดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI ความเข้มข้น 0.025 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ที่เวลาต่าง ๆ กัน ช่องที่ 1 คือ λDNA marker ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจล ช่องที่ 3-6 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI ที่เวลาต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้ 15,30, 45 และ 60 นาที 102

3.26 ความสัมพันธ์ระหว่าง แอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Subclone I และ Subclone II กับเวลา โดยติดตามผลทุก ๆ 4 ชม. 104

3.27 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิตีของโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33, Cloned TLS33, Subclone I และ Subclone II 106

3.28 ผลของพีเอชต่อแอคทิวิตีของโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33, Cloned TLS33, Subclone I และ Subclone II 107

3.29 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคทิวิตีที่เหลืออยู่กับอุณหภูมิที่ใช้แช่เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33, Cloned TLS33, Subclone I และ Subclone II เป็นเวลา 1 ชม. 109

3.30 การตรวจสอบขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning โดยวิธี SDS-PAGE ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone I และ ช่องที่ 3 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone II 111

3.31 การตรวจสอบขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Zymography ชนิด SDS-PAGE ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone I และ ช่องที่ 3 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone II 112

3.32 การตรวจสอบขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Zymography ชนิด Native PAGE ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone I และ ช่องที่ 3 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone II 113

3.33 การหาขนาดดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Subclone I โดยการทำ Agarose gel electrophoresis 114

หน้า

3.34 ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นจาก Subclone I ที่ได้จากการโคลนยีน โดยที่ตัวอักษรหนาคือชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีน 115

3.35 Restriction map ของชิ้นดีเอ็นจาก Subclone I ที่ได้จากการโคลนยีน 116

3.36 แสดง Open Reading Frame (ORF) ของยีนที่อยู่บนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก Subclone I 116

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

รายการอักษรย่อ

ชม.	=	ชั่วโมง
ซม.	=	เซนติเมตร
^{0}ซ	=	องศาเซลเซียส
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
A_{260}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
A_{280}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
bp	=	base pair
µg	=	microgram
h	=	hour
kb	=	kilobase
µl	=	microlitre
M	=	molar
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
MW	=	molecular weight
nm	=	nanometre
OD	=	optical density
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
Rm	=	relative mobility
rpm	=	round per minute
U	=	Unit
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University