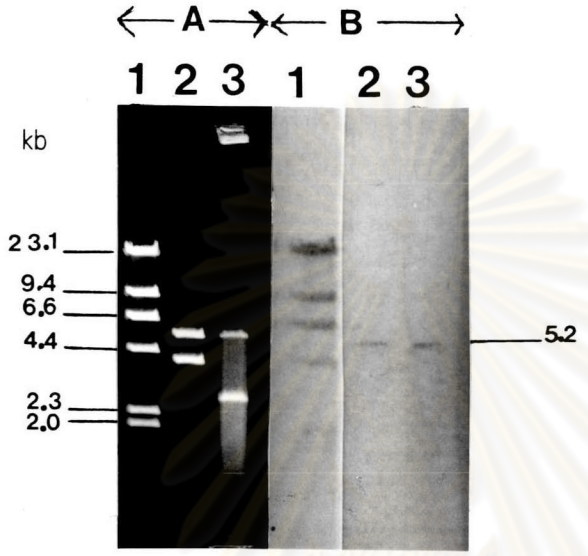
บทที่ 3

ผลการทดลอง

การทดสอบดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ด้วยวิธี Southern blot hybridization

หลังจากที่สุรศักดิ์ (2536) ได้ทำการโคลนยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ใส่ในดีเอ็นเอพาหะ pUC18 และ pSE411 ตั้งชื่อดีเอ็นเอลูกผสมว่า pCSBC5 และ pCSBC8 ซึ่งแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase นั้น ภายหลังเมื่อนำมาทำการทดลองปรากฏว่า pCSBC8 นั้นไม่แสดงแอคติวิตีใดๆของ CGTase ขณะที่ pCSBC5 ยังแสดง dextrinizing activity ซึ่งเป็นแอคติวิตีส่วนหนึ่งของ CGTase เป็นที่สงสัยว่า insert ใน pCSBC5 กับ pCSBC8 เป็นดีเอ็นเอชิ้นเดียวกันหรือไม่จึงต้องทดสอบดูโดยการทำ Southern blot hybridization

จากการทำ Southern blot hybridization ของ pCSBC5 (เดิมคือ pSV3) และ pCSBC8 (เดิมคือ pSV5) ตามวิธีการทดลองข้อการทดสอบดีเอ็นเอใน insert โดยวิธี Southern blot hybridization โดยที่ก่อน blot จะตัด pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pst I และ pCSBC8 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I และ Pst I เพื่อเป็นการแยกชิ้นดีเอ็นเอ insert (ขนาด 5.2 kb) ออกมา โดยใช้ดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC8 เป็นดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) ผลแสดงในรูปที่ 2 จากรูปจะเห็นว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 ให้สัญญาณการไฮบริดที่ใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC8 แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 นั้นมีความคล้ายคลึง (homology) กับดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC8 มาก และจริงๆแล้ว pCSBC8 เกิดจากการ subclone ชิ้น DNA insert จาก pCSBC5 (ภาคผนวกที่ 5) แสดงว่าดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 เป็นชิ้นเดียวกับที่เป็นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC8 แม้ว่าจะไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตีของ CGTase ใน pCSBC8 ก็ตาม



รูปที่ 2 ผลการทำ Southern blot hybridization ของ pCSBC5 และ pCSBC8 โดยใช้ดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC8 เป็นดีเอ็นเอติดตาม

A. อะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซีส และ

B. Southern blot hybridisation ของ

ช่องที่ 1 λ / Hind III

ช่องที่ 2 pCSBC8 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I และ Pst I

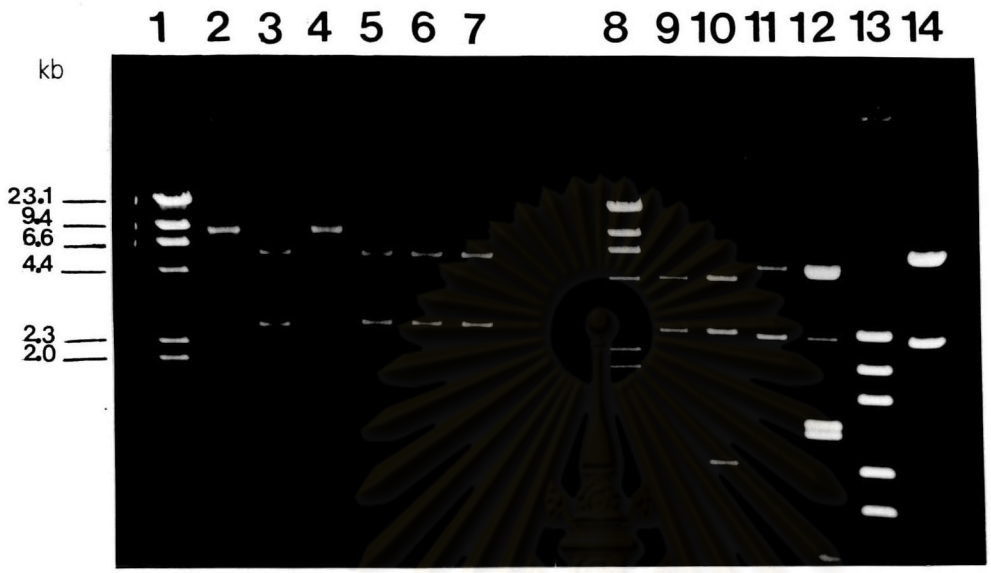
ช่องที่ 3 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pst I

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC5

จากผลการทดลอง ซึ่งสันนิษฐานว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 เป็นชิ้นเดียวกับ pCSBC8 การศึกษาแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC5 จึงได้ยึดแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC8 ที่สุรศักดิ์เคยศึกษาไว้เป็นหลัก หลังจากสกัดพลาสมิด pCSBC5 ด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอพาหะปริมาณมาก นำมาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ แล้วนำมาแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซีส เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I หรือ Hind III มีอยู่บน pCSBC5 ตัวละตำแหน่ง และตัดพลาสมิดได้ขนาดประมาณ 7.8 kb เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I และ Hind III เพื่อดูขนาดของดีเอ็นเอ insert พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบคือขนาดประมาณ 2.6 kb ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอพาหะ pUC18 และขนาดประมาณ 5.2 kb ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 (รูปที่ 3 ช่องที่ 3) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับของ pCSBC8 ซึ่งมีขนาดของดีเอ็นเอ insert 5.2 kb เช่นกัน แต่เมื่อตัด pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I หรือ Pst I หรือ Sma I จะพบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ซึ่งมีขนาด 2.6 และ 5.2 kb (ช่องที่ 5 6 และ 7) แสดงให้เห็นว่า pCSBC5 มีตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์พวกนี้ 2 ตำแหน่ง ในขณะที่ pCSBC8 มีตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์เหล่านี้เพียงชนิดละ 1 ตำแหน่งเท่านั้น (สุรศักดิ์, 2536)

เมื่อตัด pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sal I (ช่องที่ 9) พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ขนาดคือ 2.6 ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอพาหะ pUC18 0.8 และ 4.4 และเมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sal I และ Hind III (ช่องที่ 10) ก็จะพบขนาดเท่ากับที่ตัดด้วย Sal I แสดงว่าตำแหน่งของ Sal I ตำแหน่งหนึ่งจะต้องอยู่ใกล้กับ Hind III มากจนกระทั่งไม่สามารถบอกความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอได้ และดูเหมือนว่าจะมีตำแหน่ง Sal I อยู่ที่ปลายทั้ง 2 ข้างของดีเอ็นเอ insert นอกเหนือจากอีก 1ตำแหน่งที่อยู่ภายใน เมื่อพิจารณาช่องที่ 11 และ 14 ซึ่งเป็นการตัด pCSBC5 และ pCSBC8 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Mlu I พบว่าเรสทริกชันแพทเทิน (restriction pattern) ของ pCSBC5 สอดคล้องกับ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 ผลของการศึกษาขนาดและตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆของ pCSBC5 และ pCSBC8 บนอะกาโรสเจล 1.0%

ช่องที่ 1 และ 8 λ / Hind III

ช่องที่ 2 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I

ช่องที่ 3 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I และ Hind III

ช่องที่ 4 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III

ช่องที่ 5 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I

ช่องที่ 6 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pst I

ช่องที่ 7 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sma I

ช่องที่ 9 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sal I

ช่องที่ 10 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sal I และ Hind III

ช่องที่ 11 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Mlu I

ช่องที่ 12 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Mlu I และ Hpa I

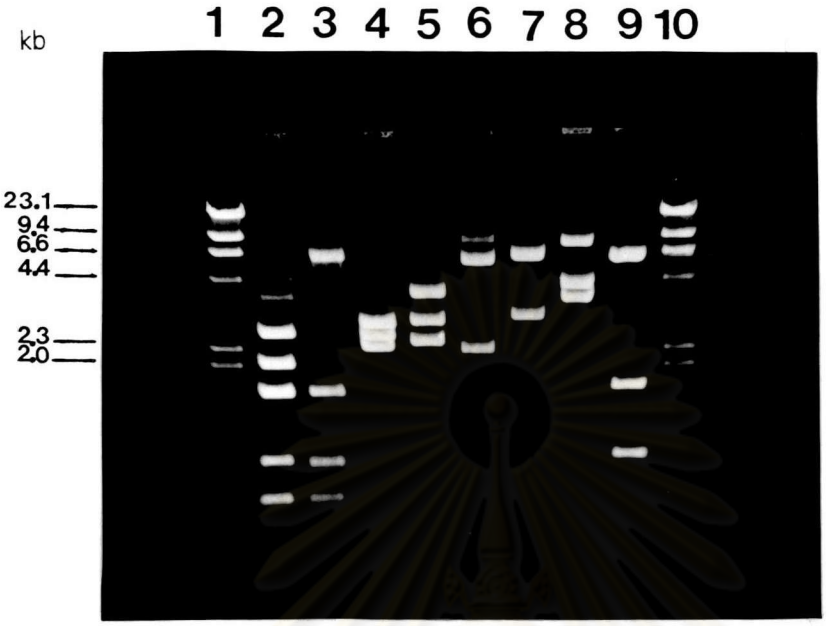
ช่องที่ 13 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Acc I

ช่องที่ 14 pCSBC8 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Mlu I

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ของ pCSBC8 คือได้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือขนาดประมาณ 0.45 และ 2.55 kb ซึ่งเป็นขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่มีตำแหน่งของ Mlu I อยู่ ส่วนอีกขนาดที่เหลือจะเป็นขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่เหลือรวมกับขนาดของดีเอ็นเอพาหะของแต่ละตัว ชิ้นดีเอ็นเอที่มาจาก pCSBC8 จะมีขนาดใหญ่กว่าเนื่องจากดีเอ็นเอพาหะของ pCSBC8 คือ pSE411 ซึ่งมีขนาด 3.9 kb (ภาคผนวกที่ 3) และในช่องที่ 12 ซึ่งเป็นการตัด pCSBC5 ด้วย Mlu I และ Hpa I ก็ได้ชิ้นดีเอ็นเอสอดคล้องกับที่สุรศักดิ์เคยศึกษาไว้ จึงถือได้ว่าตำแหน่งของ Mlu I และ Hpa I ใน pCSBC5 นั้นตรงกันกับใน pCSBC8 ในช่องที่ 13 เป็นการตัด pCSBC5 ด้วย Acc I ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 5 ขนาด ซึ่งถ้าเป็นใน pCSBC8 จะตัดได้เพียง 3 ขนาดเท่านั้น แสดงว่า pCSBC5 มีตำแหน่งของ Acc I เพิ่มมาอีก 2 ตำแหน่ง และน่าจะเป็นตำแหน่งของ Sal I ด้วย (ตามที่กล่าวถึงข้างต้น)

จากผลของเรสทริกชันแพทเทินของรูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่าแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC5 นั้นมีความคล้ายคลึงกับ pCSBC8 มาก แต่ยังมีหลายจุดที่ยังสับสน เช่น มี duplication ของบางตำแหน่งขึ้นและไม่สามารถบอกทิศทางได้อย่างแน่ชัด จึงได้ทำการทดลองตัด pCSBC5 และ pCSBC8 เปรียบเทียบกันด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ตัวอื่นๆดังแสดงในรูปที่ 4 ช่องที่ 2 และ 3 เป็นการศึกษาตำแหน่งของ Acc I ใน pCSBC5 และ pCSBC8 พบว่าเมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Acc I เพียงตัวเดียว จะให้ชิ้นดีเอ็นเอเหมือนกับเมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Acc I และ EcoR I แสดงว่ามีตำแหน่ง Acc I ตำแหน่งหนึ่งใกล้กับ EcoR I มาก ในขณะที่ผลของ pCSBC8 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I และ Acc I ยังคงสอดคล้องกับผลของสุรศักดิ์ ช่องที่ 4 และ 5 เป็นการศึกษาตำแหน่งของ Pvu II ใน pCSBC5 และ pCSBC8 พบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอไม่สอดคล้องกัน และเมื่อคำณวนดูตำแหน่งดูเหมือนว่าดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 และ pCSBC8 อาจจะมีทิศทางตรงกันข้ามกัน ช่องที่ 6 และ 7 เป็นการหาระยะห่างระหว่างตำแหน่งของ Hind III และ Hpa I บนพลาสมิดทั้ง 2 ผลจากการตัดพบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือขนาดของ Hind III ถึง Hpa I และขนาดของดีเอ็นเอ insert ที่เหลือรวมกับดีเอ็นเอพาหะ ชิ้น Hind III ถึง



รูปที่ 4 ผลของการศึกษาขนาดและตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆของ pCSBC5 และ pCSBC8 บนอะกาโรสเจล 1.0%

ช่องที่ 1 และ 10 λ / Hind III

ช่องที่ 2 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Acc I และ EcoR I

ช่องที่ 3 pCSBC8 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Acc I และ Kpn I

ช่องที่ 4 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pvu II และ EcoR I

ช่องที่ 5 pCSBC8 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pvu II และ Kpn I

ช่องที่ 6 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III และ Hpa I

ช่องที่ 7 pCSBC8 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III และ Hpa I

ช่องที่ 8 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III และ Nde I

ช่องที่ 9 pCSBC8 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III และ Nde I

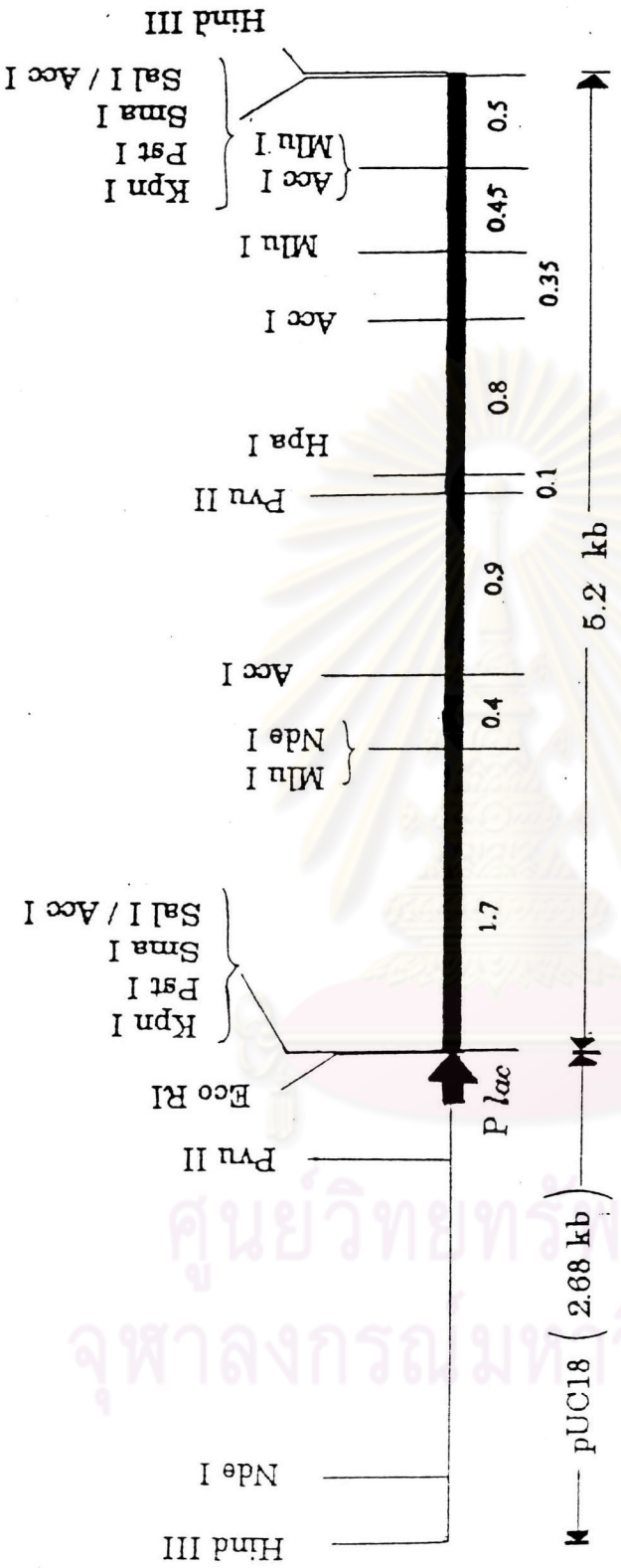
Hpa I ในดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC8 มีขนาด 3.1 kb แต่ใน pCSBC5 กลับมีขนาด 2.3 kb ซึ่งน่าจะเป็นขนาดของ Hpa I ถึง EcoR I มากกว่า ส่วนในช่องที่ 8 และ 9 นั้นเป็นการหาระยะห่างระหว่างตำแหน่งของ Hind III ถึง Nde I (ของ insert) บนพลาสมิดทั้ง 2 พบว่าใน pCSBC8 จะพบชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III และ Nde I (ของ insert) มีขนาด 1.7 kb แต่ใน pCSBC5 จะไม่พบชิ้นนี้ แต่จะพบชิ้นขนาด 3.5 kb แทน ซึ่งก็น่าจะเป็นชิ้นของ EcoR I ถึง Nde I (ของ insert) เช่นเดียวกัน ดังนั้นเมื่อพิจารณาผลของช่องที่ 6 ถึง 9 ก็จะพบว่าตำแหน่งของ Hpa I และ Nde I บนดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 ได้เปลี่ยนไปจากตำแหน่งเดิมที่อยู่ใน pCSBC8 โดยที่ตำแหน่ง Hpa I และ Nde I ของดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 จะสลับข้างกับที่พบใน pCSBC8 ดังนั้นจึงเป็นการสนับสนุนความคิดที่ว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 นั้นมีทิศทางตรงกันข้ามกับใน pCSBC8

จากผลของเรสทริกชันแพทเทินของ pCSBC5 ที่แสดงในรูปที่ 3 และ 4 แสดงว่าตำแหน่งและระยะห่างของเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆบนชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 นั้นตรงกับของ pCSBC8 แต่ทิศทางนั้นตรงกันข้ามกัน และทางด้านปลาย 5′ และ 3′ของดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ก็จะมีตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์เกิดขึ้นหลายตัวคือ Kpn I Pst I Sma I Sal I และ Acc I เหมือนกันทั้งด้านปลาย 5′และ 3′ บนดีเอ็นเอ insert ซึ่งแตกต่างจาก pCSBC8 แผนที่เรสทริกชันของ pCSBC5 ได้รวบรวมแสดงไว้ในรูปที่ 5

<u>การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ของทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5</u>

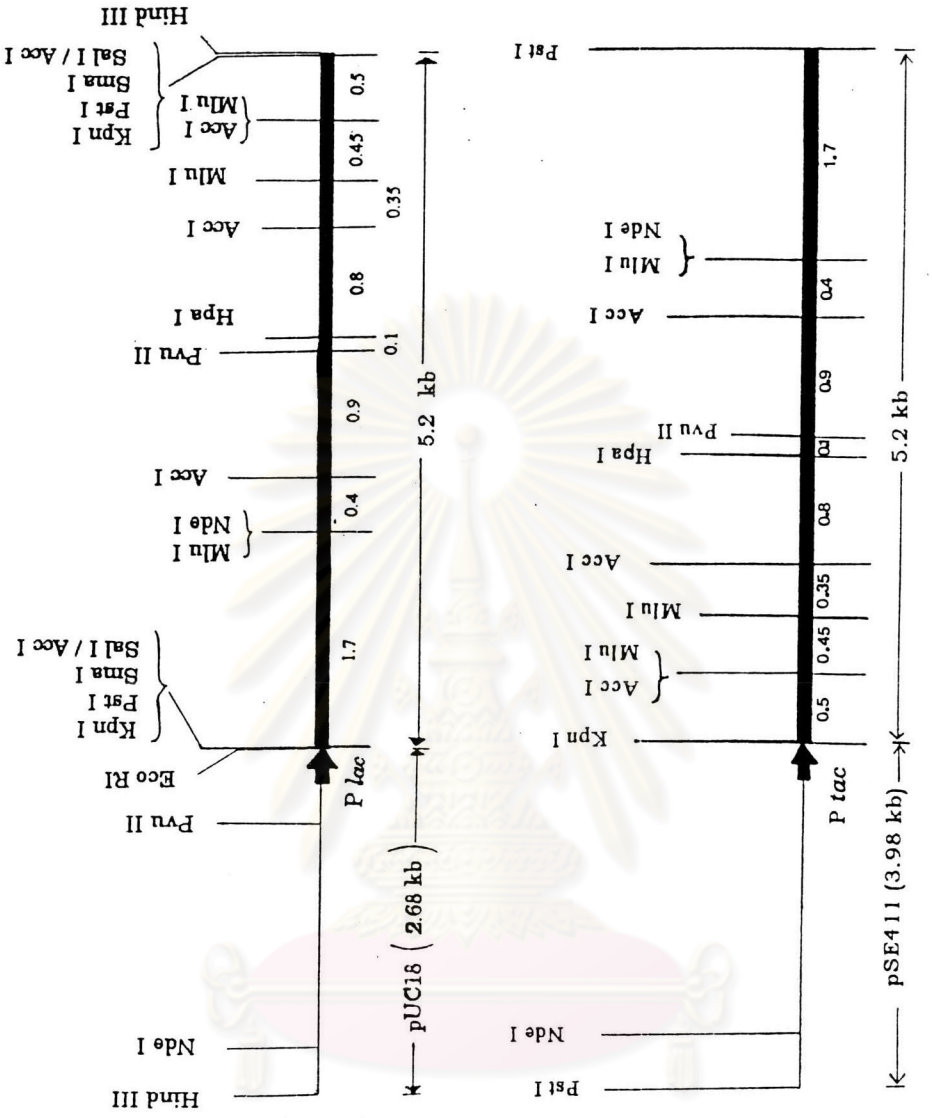
ทำการเลี้ยงทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 และ UC18 (เพื่อเป็นชุดควบคุม) ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB ที่เสริมแป้ง (Potato soluble starch) 1% และ IPTG 0.0025 % เขย่าที่ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน. ปั่นตกตะกอนเซลล์ แล้วนำส่วนน้ำใส (supernate) เตรียมเป็นสารละลายเอนไซม์ เพื่อมาทดสอบหาแอคติวิตีของ CGTase โดยวิธี CD -TCE assay พบว่าไม่สามารถตรวจพบตะกอนของ CD-TCE ได้ จึงมาทดสอบด้วย HPLC (ตามวิธีการ

I17885018X



รูปที่ 5.1 แผนที่เอสทริกชันของพลาสมิด pCSBC5 แถบสีดำแสดงชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน พลาสมิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



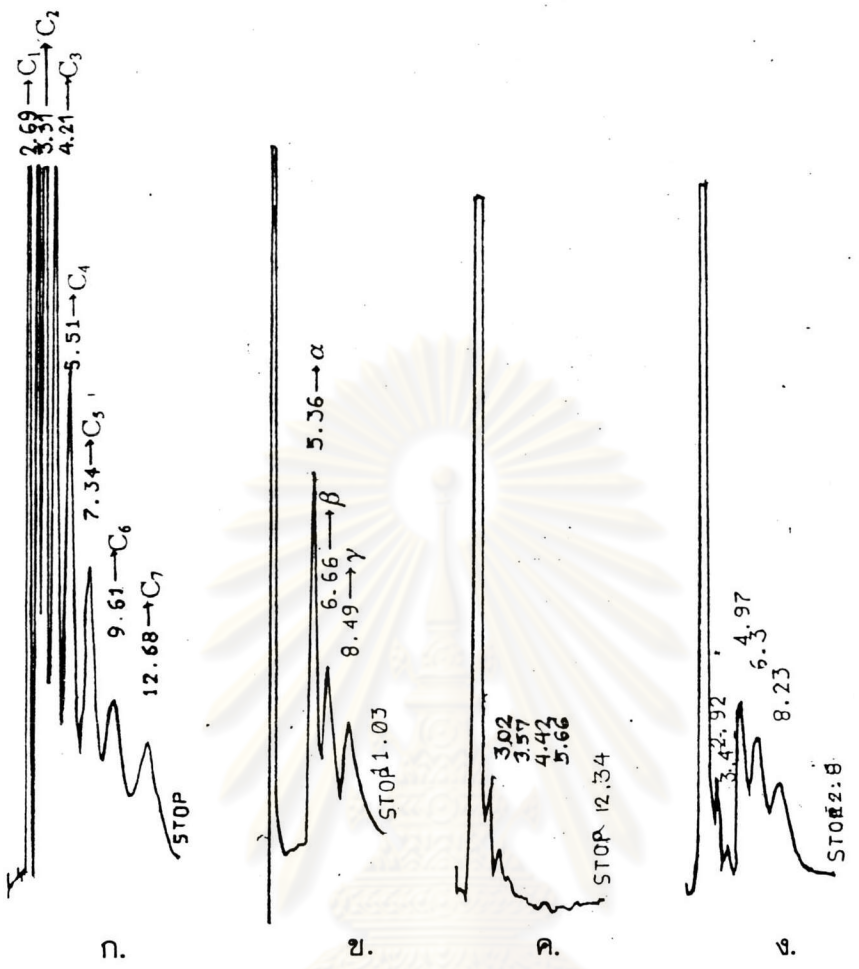
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5.2 เปรียบเทียบแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pCSBC5 (ก.) และ pCSBC8 (ข.) โดยแถบสีดำแสดงชิ้นดีเอ็นเอ insert ภายในพลาสมิดทั้ง 2

วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ CDs ด้วย HPLC) การเตรียมตัวอย่างสำหรับการฉีด HPLC จะทำการทดลองแบ่งเป็น 3 แบบคือ 1) นำสารละลายเอนไซม์มาบ่มกับน้ำแป้ง (Potato soluble starch) 2% ใน 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเพอร์ pH6.0 ที่ 40°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง milipore แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยจะแบ่งเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 จะนำไปวิเคราะห์เลยส่วนชุดที่ 2 จะเติม internal standard คือสารละลายผสมของ α-CD β-CD และ γ-CD เพื่อตรวจสอบ peak ที่เกิดขึ้นว่าเป็น CDs หรือไม่ 2) บ่มน้ำแป้ง 10% (ในบัฟเฟอร์เดียวกัน) กับ α amylase 1% เป็นเวลา 10 นาที ต้มในน้ำเดือด 10 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาของ α amylase แล้วจึงนำแป้งนั้นมาบ่มกับสารละลายเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 1 จุดประสงค์เพื่อให้โมเลกุลของแป้งมีขนาดเล็กลงจะทำให้สามารถสร้างเป็น CDs ได้ง่ายขึ้น และ 3) ทำการทดลองตามแบบที่ 1 ก่อนแล้วจึงนำ Reaction mixture นั้นมาบ่มกับ β amylase 20 unit ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC จุดประสงค์เพื่อกำจัดโมเลกุลของแป้งที่ไม่ใช่ CDs ให้มีขนาดเล็กลงด้วย β amylase จะทำให้เห็น peak ของ CDs ชัดขึ้น เมื่อนำ reaction mixture ทั้ง 3 ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลแสดงในรูปที่ 6 จะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ α-CD β-CD และ γ-CD มาตรฐานแล้วไม่พบว่ามี peak ใดมี retention time ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานและ peak ที่ได้ก็ไม่แตกต่างจากของชุดควบคุม แสดงว่าไม่สามารถตรวจพบ CDs จากวิธีนี้

<u>การทดสอบเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธี Immunodiffusion</u>

เป็นการทดสอบเอนไซม์ CGTase โดยอาศัยความจำเพาะของแอนติบอดี้ต่อแอนติเจน เตรียมสารละลายเอนไซม์ของทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 ด้วยวิธีเดียวกับที่เตรียมไว้สำหรับทดสอบแอคติวิตีของ CGTase และทำให้เข้มข้นขึ้น 5 เท่าด้วยการทำ ultrafiltration จากนั้นนำไปทดสอบตามวิธีการตรวจสอบเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธี immunodiffusion เปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์ของ *Bacillus* sp. A11 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 7



<u>รูปที่ 6.1</u> ผลการตรวจวัด CDs ด้วย HPLC

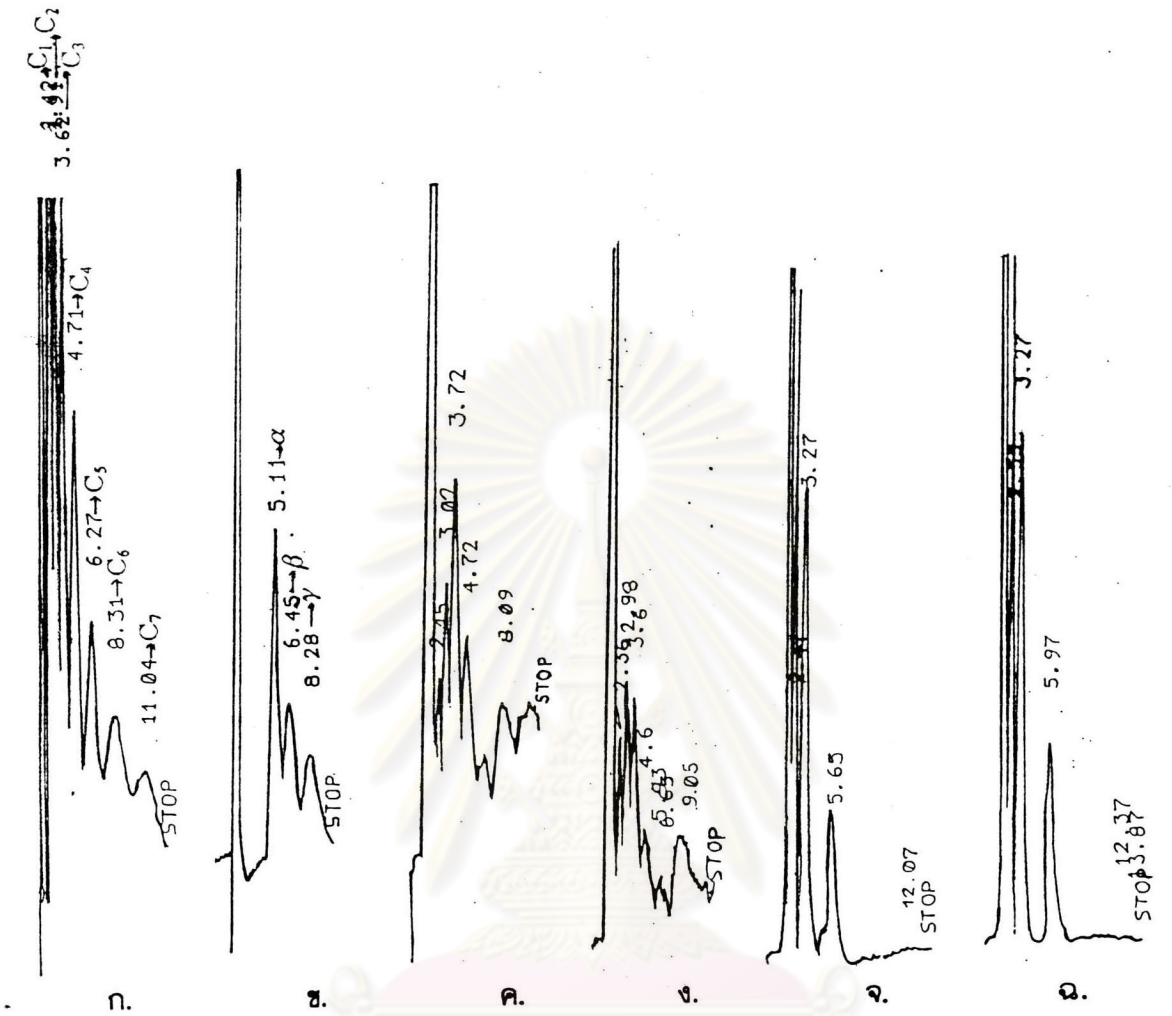
ก. สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน C_1-C_7

ข. สารละลาย CDs มาตรฐาน

ค. สารตัวอย่างที่เตรียมวิธีแบบที่ 1

ง. สารตัวอย่างที่เตรียมวิธีแบบที่ 1 ผสมกับ สารละลาย CDs มาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6.2 ผลการตรวจวัด CDs ด้วย HPLC

ก. สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน C_1-C_7

ข. สารละลาย CDs มาตรฐาน

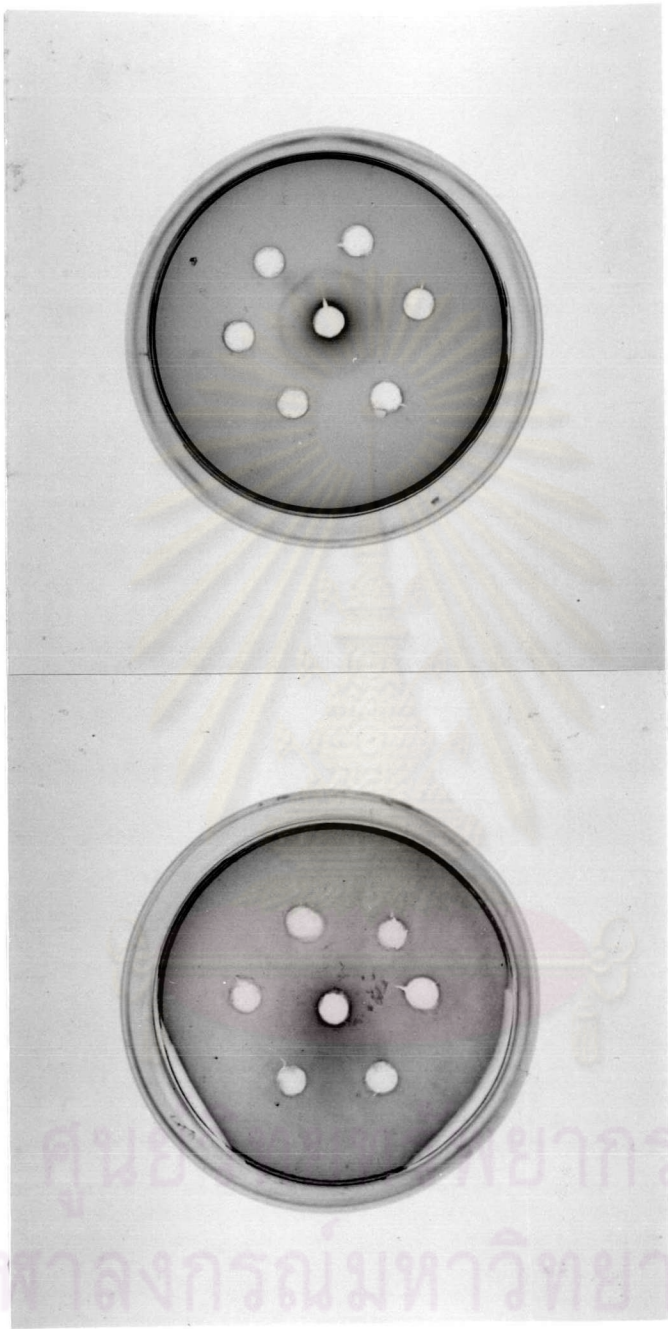
ค. สารตัวอย่างที่เตรียมวิธีแบบที่ 2 ของชุดควบคุม

ง. สารตัวอย่างที่เตรียมวิธีแบบที่ 2 ของทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5

จ. สารตัวอย่างที่เตรียมวิธีแบบที่ 3 ของชุดควบคุม

ฉ. สารตัวอย่างที่เตรียมวิธีแบบที่ 3 ของทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก.

ข.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>รูปที่ 7</u> ผลการทำ Immunodiffustion ระหว่างแอนติบอดีของเอนไซม์ CGTase (ในหลุมกลาง) กับ

ก. สารละลายเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. A11 (ในหลุมรอบๆหลุมกลาง)

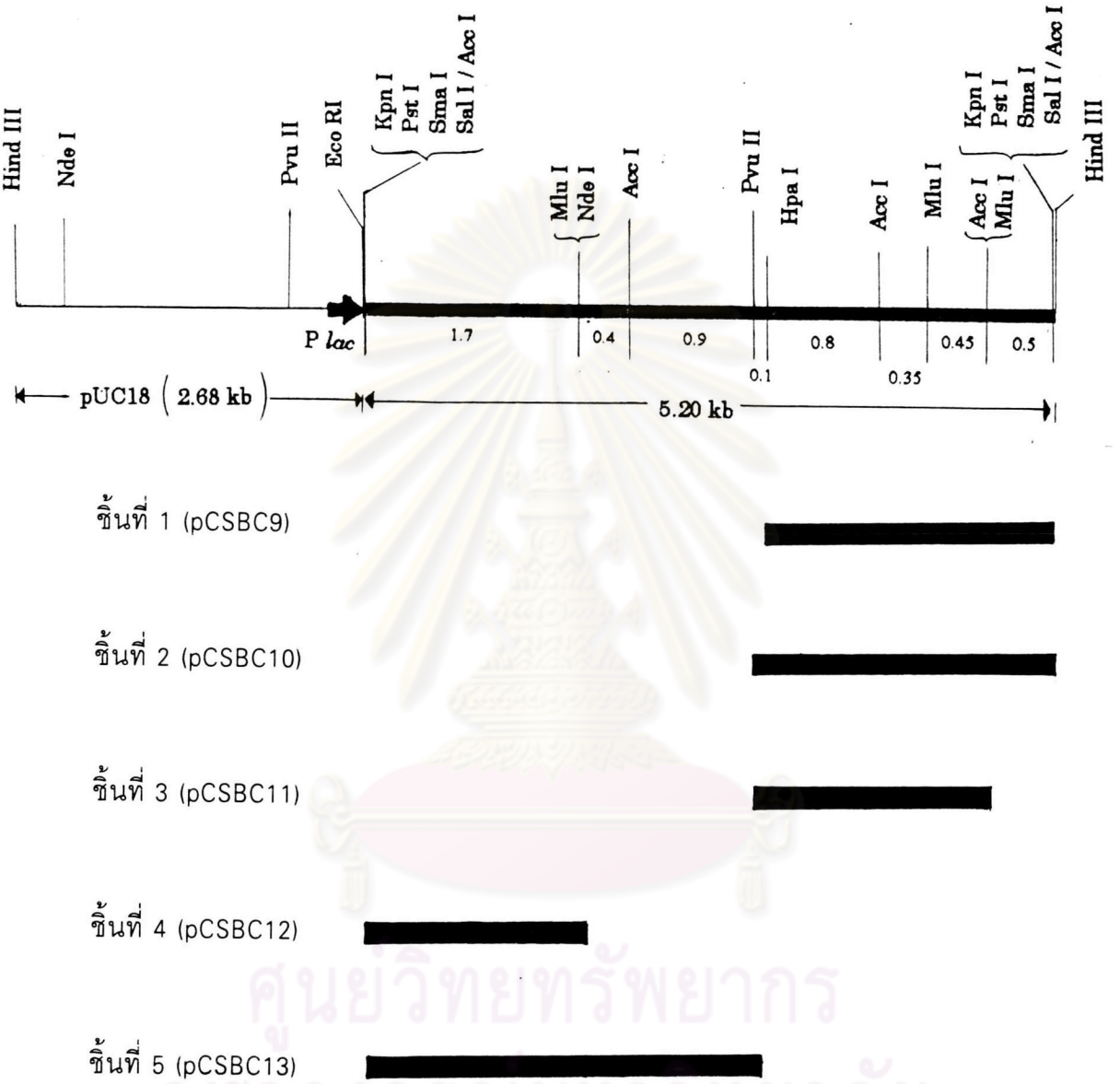
ข. สารละลายเอนไซม์จากทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 (ในหลุมรอบๆหลุมกลาง)

ซึ่งจะเห็นตะกอนแอนติเจน-แอนติบอดี้คอมเพล็กซ์ (Ag-Ab complex) ใน dish ที่เป็นสารละลายเอนไซม์ของ *Bacillus* sp. A11 เท่านั้น ส่วนใน dish ที่เป็นสารละลายเอนไซม์ของทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 นั้นไม่พบ แอนติเจน-แอนติบอดี้คอมเพล็กซ์ แสดงว่าในสารละลายเอนไซม์ของทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 นั้นไม่มีเอนไซม์ CGTase หรือมีน้อยมากจนกระทั่งไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธีนี้ได้

การหาตำแหน่งของดีเอ็นเอ insert ที่เกิด dextrinizing activity ในพลาสมิด pCSBC5

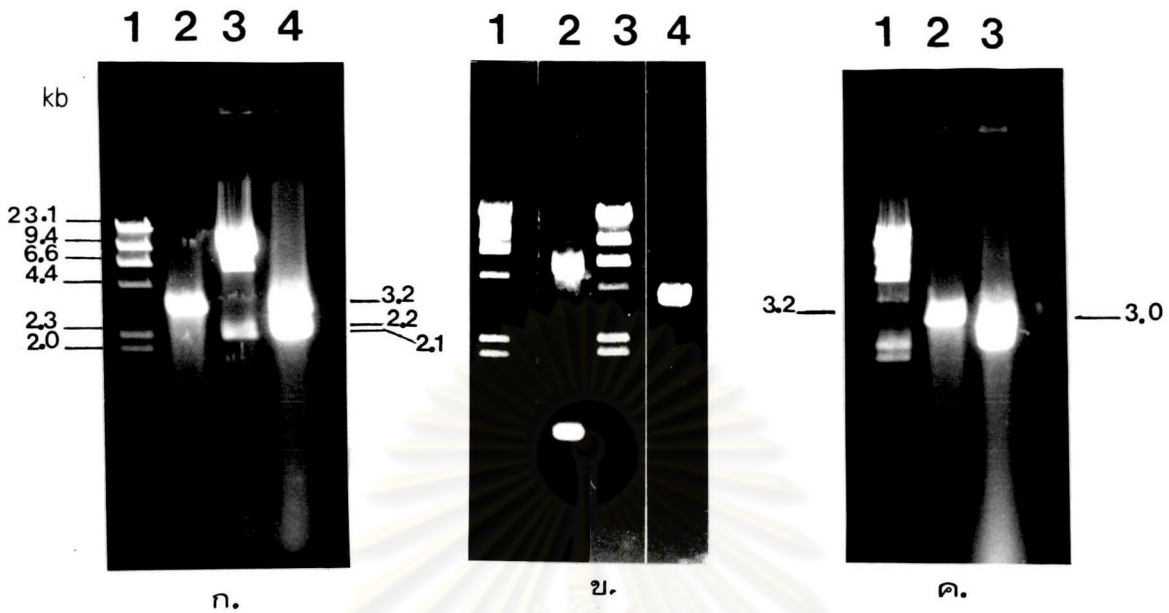
1. การ subclone ชิ้นดีเอ็นเอ insert ในพลาสมิด pCSBC5

เนื่องจาก CGTase มีแอคติวิตีส่วนหนึ่งคือ dextrinizing activity ซึ่งเป็นแอคติวิตีของการย่อยแป้ง และใน pCSBC5 ก็มีแอคติวิตีนี้ ดังนั้นจึงทำการทดลองหาช่วงของดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ที่ทำให้มี dextrinizing activity โดยการ subclone ชิ้นดีเอ็นเอ insert บางส่วน โดยทำการทดลอง subclone ดีเอ็นเอใน insert มา 5 บริเวณด้วยกันคือ 1) Hind III ถึง Hpa I 2) Hind III ถึง Pvu II 3) Acc I(Sal I) ถึง Pvu II 4) Nde I ถึง EcoR I และ 5)Pvu II ถึง EcoR I (รูปที่ 8) ชิ้นที่ 1 เตรียมได้โดยการตัด pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III และ Hpa I จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.1 kb (รูปที่ 9 ก.) ตามวิธีการใช้อะกาโรสที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ ชิ้นที่ 2 เตรียมได้จากการตัด pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III และ Pvu II แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.2 kb ออกมาด้วยวิธีเดียวกัน ชิ้นที่ 1 และ 2 นี้นำไปเชื่อมต่อ (ligate) กับดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ในตำแหน่งของ Hind III และ Sma I ด้วยเอนไซม์ T_4 DNA ligase (ตามวิธีการทดลองการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ) ชิ้นที่ 3 เตรียมได้จากการตัดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการ subclone ของชิ้นที่ 2 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sal I จากนั้นจึงทำให้เกิดการเชื่อมต่อเป็นวงของปลายดีเอ็นเอเส้นเดียวกัน (religate) ชิ้นที่ 4 เตรียมจากการตัด pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Nde I แล้วทำให้เกิดการ religate เช่นเดียวกัน (รูปที่ 9 ข.) และชิ้นที่ 5 เตรียมจากการตัด pCSBC5 ด้วย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 แสดงชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 ที่นำมา subclone ชิ้นที่ 1 ถึงชิ้นที่ 5



รูปที่ 9 ผลการตัด pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ เพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอ insert ออกมา subclone

ก. ช่องที่ 1 λ / Hind III

ช่องที่ 2 pUC118 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III และ Sma I

ช่องที่ 3 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III และ Hpa I

ช่องที่ 4 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III และ Pvu II

ข. ช่องที่ 1 และ 3 λ / Hind III

ช่องที่ 2 pCSBC10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sal I

ช่องที่ 4 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Nde I

ค. ช่องที่ 1 λ / Hind III

ช่องที่ 2 pUC118 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pvu II และ EcoR I

ช่องที่ 3 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pvu II และ EcoR I

เรสทริกชันเอนไซม์ Pvu II และ EcoR I แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3 kb มาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ในตำแหน่งของ Sma I และ EcoR I (รูปที่ 9 ค.)

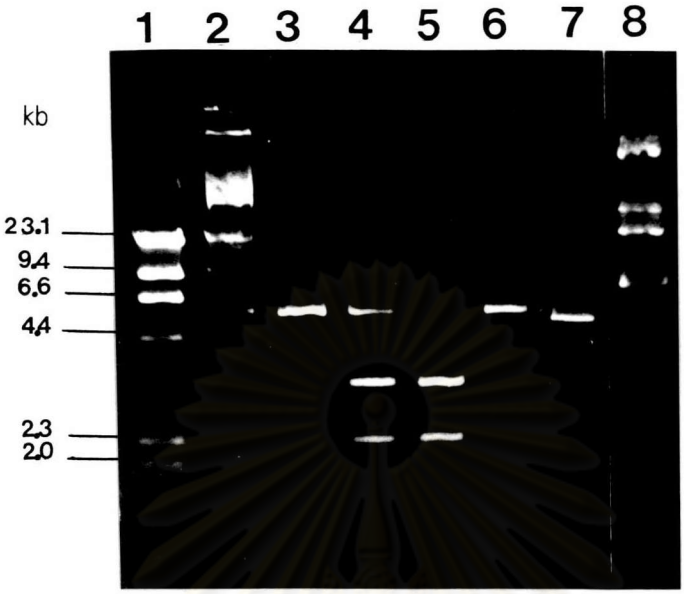
หลังจากเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอต่างๆตามที่กล่าวมา นำดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ ligation มาทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* JM 101 แล้วนำมากระจายบนอาหารแข็ง LB ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร X-gal 0.002% และ IPTG 0.0025% บ่มที่ 37 ^{o}ซ ข้ามคืน สำหรับการทรานสฟอร์มของชิ้นดีเอ็นเอ insert ชิ้นที่ 1 2 และ 5 โคโลนีที่ขึ้นจะมีทั้งสีฟ้าและสีขาว เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาว เนื่องจากเป็นโคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสม เพราะเมื่อมีชิ้นดีเอ็นเอ insert แทรกเข้าไปในตำแหน่ง polylinker ของพลาสมิด pUC118 จะทำให้ทรานสฟอร์แมนท์นั้นไม่สามารถย่อย X-gal ได้โคโลนีจึงเป็นสีขาว แต่ในพลาสมิด pUC118 ที่ไม่ถูก insert เข้าไปใน polylinker ก็จะสามารถย่อย X-gal ได้และมีโคโลนีเป็นสีฟ้า ส่วนการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอ insert ของชิ้นที่ 3 และ 4 จะให้แต่โคโลนีสีขาวเท่านั้น เพราะเป็นการ subclone จากดีเอ็นเอลูกผสมที่ไม่สามารถย่อย X-gal ได้อยู่แล้ว ดังนั้นจึงกระจายเชื้อที่ทรานสฟอร์มของชิ้นที่ 3 และ 4 ลงบนอาหารแข็ง LB ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเท่านั้น หลังจากที่โคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์ขึ้น นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วทำการสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย (เพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป) และตั้งชื่อดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการ subclone ชิ้นที่ 1 ถึง 5 ว่า pCSBC9 10 11 12 และ 13 และเรียกทรานสฟอร์แมนท์ว่า CSBC 9 10 11 12 และ 13 ตามลำดับ

2. <u>การทดสอบขนาดและตำแหน่งของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการ subclone ของชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5</u>

นำพลาสมิดที่สกัดได้จากการทดลองเรื่องการ subclone ชิ้นดีเอ็นเอ insert ในพลาสมิด pCSBC5 มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ เพื่อทดสอบขนาดและตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ว่าตรงตามที่ต้องการหรือไม่ พบว่าได้ตรงตามที่ต้องการคือ

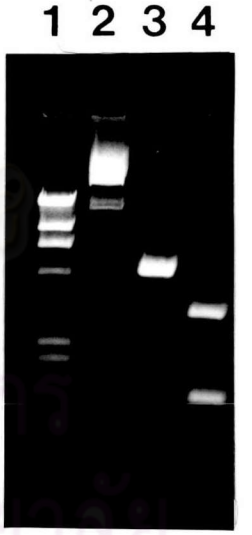
(1) pCSBC9 (รูปที่ 10 ก.) เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III (ช่องที่ 3) หรือ Pst I (ช่องที่ 6) จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.3 kb ซึ่งเป็นขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่มา subclone (2.1 kb) รวมกับชิ้นดีเอ็นเอพาหะ pUC118 (3.2 kb) เมื่อพิจารณาช่องที่ 4 และ 5 ซึ่งเป็นการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I หรือ Hind III และ Pst I จะเป็นการตัดแยกชิ้นดีเอ็นเอ insert ออกจากดีเอ็นเอพาหะ พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดเกือบจะ 2.3 และขนาด 3.2 kb ขนาด 3.2 kb นี้เป็นชิ้นของดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ส่วนขนาดเกือบจะ 2.3 kb นั้นเป็นขนาดของ insert ซึ่งพบว่ามีขนาดใหญ่กว่าที่ทำการ subclone เล็กน้อยเป็นเพราะว่าทางปลายของชิ้นดีเอ็นเอทางด้านที่ติดกับตำแหน่ง Hind III นั้นมีตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ขึ้นมาอีกหลายตัวทำให้มีนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นมาอีก แต่ไม่ทราบจำนวนที่แน่นอน ทำให้ขนาดของดีเอ็นเอ insert ใหญ่กว่าที่ควรจะเป็น ส่วนในช่องที่ 9 เป็นการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Mlu I เพราะในชิ้นที่นำมา subclone นั้นจะมีตำแหน่งของ Mlu I อยู่ 2 ตำแหน่ง และห่างกันประมาณ 0.45 kb จากรูปจะเห็นว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะมีขนาดเล็กกว่าที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III เล็กน้อย เนื่องจากถูกตัดออกไป 0.45 kb แต่จากเจลจะไม่สามารถเห็นชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.45 kb ได้ เพราะได้ตกจากเจลไปแล้ว ส่วนในช่องที่ 8 เป็นการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Nde I ปรากฏว่าไม่ตัดซึ่งก็เป็นไปตามคาดเพราะดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ไม่มีตำแหน่งของ Nde I และชิ้นดีเอ็นเอที่นำมา subclone ก็ไม่มีเช่นกัน

(2) pCSBC10 (รูปที่ 10 ข.) เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III (ช่องที่ 2) หรือ Pst I (ช่องที่ 4) จะพบชิ้นดีเอ็นเอขนาด ประมาณ 5.6 kb ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอ insert (2.4 kb) รวมกับ pUC118 (3.2 kb) ขนาดของดีเอ็นเอ insert จะใหญ่กว่าที่ควรจะเป็นเล็กน้อยเนื่องจากเหตุผลเดียวกับใน pCSBC 9 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I (ช่องที่ 3) หรือ EcoR I และ Hind III (ช่องที่ 7) จะได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 2.4 kb และ 3.2 kb เมื่อพิจารณาช่องที่ 5 เป็นการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Mlu I พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.0 kb และ 0.45 kb ซึ่งจะเป็นตำแหน่งของ Mlu I ในชิ้นที่นำมา subclone



ก.

ข.



ค.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 ผลการตัดดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการ subclone ของดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้

ก. ช่องที่ 1 λ / Hind III

ช่องที่ 2 pCSBC9

ช่องที่ 3 pCSBC9 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III

ช่องที่ 4 pCSBC9 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I

ช่องที่ 5 pCSBC9 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III และ Kpn I

ช่องที่ 6 pCSBC9 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pst I

ช่องที่ 7 pCSBC9 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Mlu I

ช่องที่ 8 pCSBC9 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Nde I

ข. ช่องที่ 1 pCSBC10

ช่องที่ 2 pCSBC10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III

ช่องที่ 3 pCSBC10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I

ช่องที่ 4 pCSBC10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pst I

ช่องที่ 5 pCSBC10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Mlu I

ช่องที่ 6 pCSBC10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Nde I

ช่องที่ 7 pCSBC10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sal I

ช่องที่ 8 pCSBC10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I และ Hind III

ช่องที่ 9 λ / Hind III

ค. ช่องที่ 1 λ / Hind III

ช่องที่ 2 pCSBC11

ช่องที่ 3 pCSBC11 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I

ช่องที่ 4 pCSBC11 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I และ Hind III

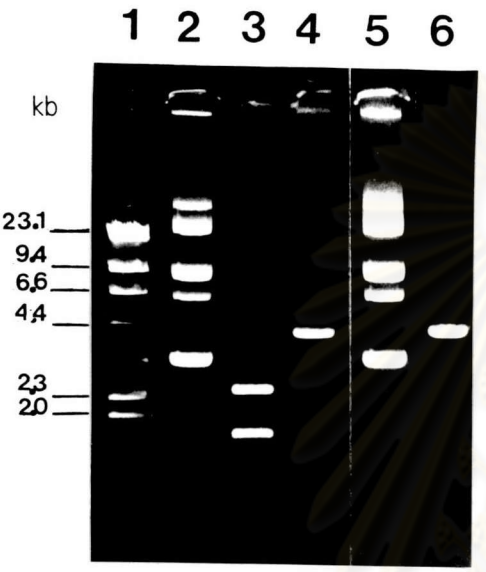
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และเมื่อพิจารณาในช่องที่ 6 ซึ่งเป็นการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Nde I ก็พบว่าไม่ตัด เนื่องจากเหตุผลเดียวกับใน pCSBC9

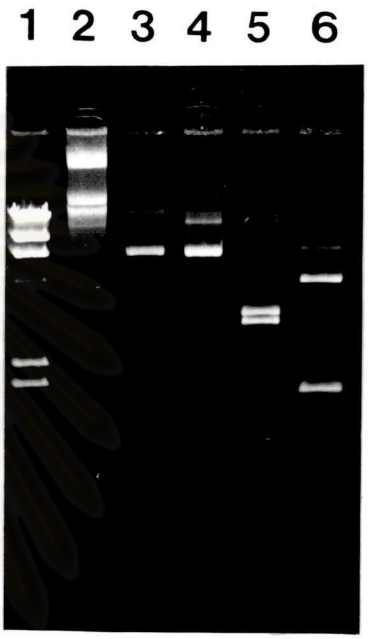
(3) pCSBC11 (รูปที่ 10 ค.) ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ได้จากการ subclone ของพลาสมิด pCSBC10 ได้สร้างขึ้นหลังจากที่ทดสอบว่าพลาสมิด pCSBC10 มีขนาดและตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ตรงตามต้องการ ดังนั้นการตรวจสอบจึงตรวจสอบแต่ขนาดของพลาสมิด (ช่องที่ 3) ซึ่งเป็นการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I พบว่ามีขนาดประมาณ 4.5 kb และขนาดของดีเอ็นเอ insert โดยการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I และ Hind III (ช่องที่ 4) ได้ดีเอ็นเอขนาด 3.2 และ 1.5 kb ซึ่งตรงตามต้องการ

(4) pCSBC12 (รูปที่ 10 ง.) สร้างจากการ subclone ของ pCSBC5 โดยการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Nde I แล้วทำให้เกิดการ religate ดังนั้นดีเอ็นเอพาหะยังคงเป็น pUC18 ซึ่งมีขนาด 2.6 kb ช่องที่ 4 เป็นการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I พบว่าได้ขนาดประมาณ 4.1 kb ซึ่งเป็นขนาดของ pUC18 ที่ถูกตัดส่วน Nde I ออกไป (จะทำให้เหลือประมาณ 2.2 kb) รวมกับชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ EcoR I ถึง Nde I (1.7 kb) และรวมกับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยทางด้านปลายที่ติดกับตำแหน่ง EcoRI ช่องที่ 3 เป็นการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I และ Nde I เพื่อดูขนาดของดีเอ็นเอ insert พบว่าได้ขนาด 1.9 และ 2.2 kb ช่องที่ 5 เป็นการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hpa I ซึ่งปรากฏว่าไม่เกิดการตัด เป็นการยืนยันว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่ได้ไม่มีตำแหน่งของ Hpa I และช่องที่ 6 เป็นการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pvu II พบว่ามีตำแหน่งเดียวซึ่งเป็นตำแหน่งที่อยู่บนพลาสมิด pUC18

(5) pCSBC13 (รูปที่ 10 จ.) เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III (ช่องที่ 3) จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 6.4 kb ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอ insert (3.0 kb) และขนาดของดีเอ็นเอพาหะ pUC118 (3.2 kb) รวมกับนิวคลีโอไทด์ที่เกินมาทางด้านที่ติดกับตำแหน่ง EcoR I อีกเล็กน้อย ในช่องที่ 5 เป็นการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I และ Hind III เพื่อศึกษาขนาดของดีเอ็นเอ insert พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.0 และ 3.2 kb ส่วนในการตัด



ง.



จ.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 (ต่อ) ผลการตัดดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการ subclone ของดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้

ง. ช่องที่ 1 λ / Hind III

ช่องที่ 2 pCSBC12

ช่องที่ 3 pCSBC12 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I และ Nde I

ช่องที่ 4 pCSBC12 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I และ Pvu II

ช่องที่ 5 pCSBC12 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hpa I

ช่องที่ 6 pCSBC12 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pvu II

จ. ช่องที่ 1 λ / Hind III

ช่องที่ 2 pCSBC13

ช่องที่ 3 pCSBC13 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III

ช่องที่ 4 pCSBC13 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Mlu I

ช่องที่ 5 pCSBC13 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoR I และ Hind III

ช่องที่ 6 pCSBC13 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Mlu I และ EcoR I

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Mlu I (ช่องที่ 4) เป็นการตรวจสอบตำแหน่งของ Mlu I ซึ่งจะมีได้เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น และการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Mlu I และ EcoR I (ช่องที่ 6) เป็นการตรวจสอบตำแหน่ง Mlu I ภายในชิ้น insert และพบว่าได้ตำแหน่งตรงตามต้องการคือได้ดีเอ็นเอขนาด 1.7 kb และอีกชิ้นคือขนาดของดีเอ็นเอ insert ที่เหลือรวมกับดีเอ็นเอพาหะ pUC118

การทดสอบ Dextrinizing activity

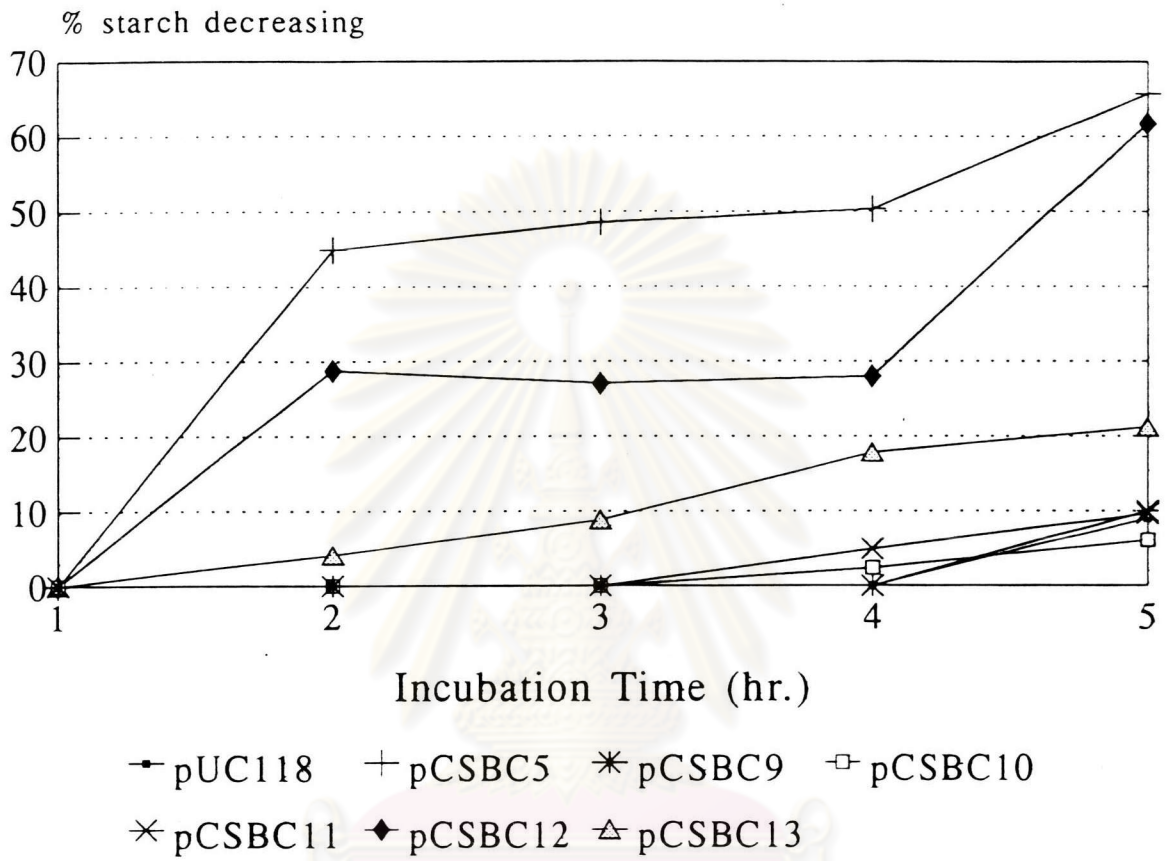
1. การทดสอบ Dextrinizing activity ของทรานสฟอร์แมนท์ต่างๆ

นำทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 9 10 11 12 13 และ UC118 (เพื่อเป็นชุดควบคุม) มาเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB ที่เสริมแป้ง (Potato soluble starch) 1 % และ IPTG 0.0025 % เขย่าที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ เป็นเวลา 3 วัน ปั่นตกตะกอนเซลล์แล้วเก็บส่วนน้ำใสเพื่อใช้เป็นสารละลายเอนไซม์สำหรับการทดสอบ dextrinizing activity ซึ่งทรานสฟอร์แมนท์ UC118 จะใช้เป็นชุดควบคุมของส่วนน้ำใสที่ไม่มี dextrinizing activity ผลของ dextrinizing actvity ของทรานสฟอร์แมนท์ต่างๆแสดงในกราฟรูปที่ 11 จากกราฟจะเห็นว่าทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 12 และ 13 นั้นพบ dextrinizing activity ส่วน CSBC9 10 และ 11 นั้นไม่ถือว่ามี dextrinizing activity เนื่องจากมีการย่อยแป้งในระดับที่ใกล้เคียงกับทรานสฟอร์แมนท์ UC118 ซึ่งเป็นชุดควบคุม เพราะฉะนั้นช่วงที่เล็กที่สุดของดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 ที่ยังพบ dextrinizing activity คือชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่อยู่ในพลาสมิด pCSBC12 ซึ่งเป็นชิ้นที่มาจาก EcoR I ถึง Nde I ใน pCSBC5

2. ผลการทดสอบอิทธิพลของ IPTG ต่อ dextrinizing activity ของทรานสฟอร์แมนท์ CSBC12

เมื่อทราบว่าทรานสฟอร์แมนท์ CSBC12 นั้นเป็นส่วนที่พบ dextrinizing activity

Dextrinizing activity



รูปที่ 11 Dextrinizing activity ของทรานสฟอร์แมนท์ต่างๆระหว่างเวลา 1-5 ชั่วโมง

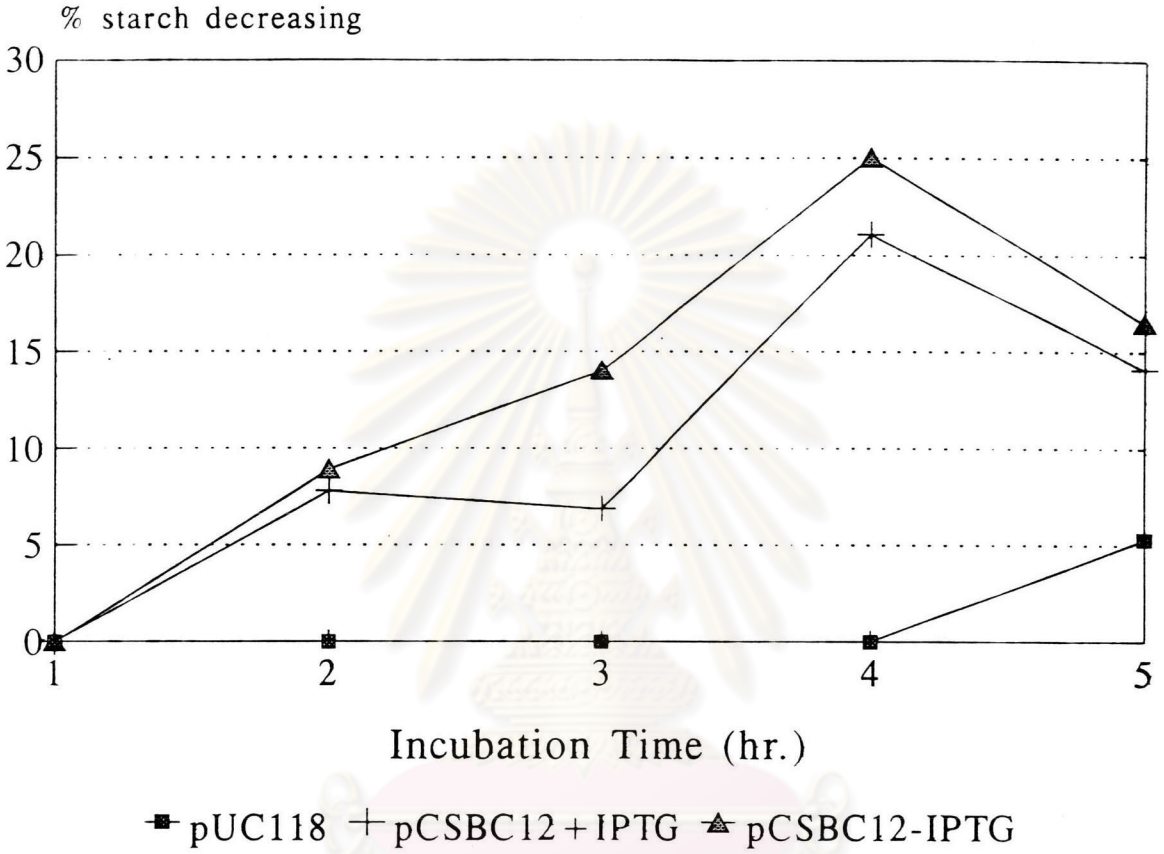
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จึงได้ทำการทดลองต่อโดยการศึกษาอิทธิพลของ IPTG ต่อ dextrinizing activity ทั้งนี้เนื่องจากชิ้น DNA insert ถูกโคลนไปที่ polylinker ซึ่งอยู่ downstreemของ *lac* promoter อาจเป็นไปได้ที่ *lac* promoter จะมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของ dextrinizing activity โดยเลี้ยงทรานสฟอร์แมนท์ CSBC12 เช่นเดียวกับการทดสอบ dextrinizing activity ในทรานสฟอร์แมนท์ต่างๆ แต่จะเลี้ยงใน 2 สภาวะคือ สภาวะที่เสริม IPTG 0.0025 % และที่ไม่เสริม IPTG และเลี้ยงทรานสฟอร์แมนท์ UC118 ในสภาวะที่เสริม IPTG เพื่อเป็นชุดควบคุม เขย่าที่ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน เก็บส่วนน้ำใสมาใช้ทดสอบ dextrinizing activity ผลแสดงในกราฟรูปที่ 12 จากกราฟจะพบว่าในสภาวะที่เสริมหรือไม่เสริม IPTG นั้นก็ให้ค่า dextrinizing activity ในระดับใกล้เคียงกัน แสดงถึงว่า IPTG ไม่มีผลต่อการเกิด dextrinizing activity ของทรานสฟอร์แมนท์ CSBC12

<u>การสลับปลายของชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 และ pCSBC8 เพื่อหาแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase</u>

จากผลการศึกษาแผนที่เรสทริกชัน จะพบว่าแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC5 และ pCSBC8 นั้นสลับปลายกับ promoter ซึ่งใน pCSBC8 ด้านปลายที่เป็นตำแหน่ง Kpn I จะเป็นด้านที่ติดกับ *tac* promoter (สุรศักดิ์, 2536) แต่เมื่อศึกษาใน pCSBC5 พบว่าด้านที่ติดกับ *lac* promoter กลับเป็นด้าน EcoR I (หรือด้าน Pst I ใน pCSBC8) ซึ่งจะตรงกันข้ามกับใน pCSBC8 และเนื่องจากไม่สามารถหาแอคติวิตีของ CGTase ได้ใน pCSBC5 และ pCSBC8 ซึ่งปัญหาอาจมาจากการที่ชิ้นดีเอ็นเอ insert นั้นยังอยู่ในทิศทางที่ถูกต้องตาม promoter จึงได้ทำการทดลองสลับปลายของชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 และ pCSBC8 จากทิศทางเดิมให้อยู่ในทิศตรงกันข้าม โดย pCSBC8 จะตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I และ Pst I แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.2 kb ออกมา แล้วโคลนใส่ดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ในตำแหน่ง Kpn I และ Pst I ส่วนใน pCSBC 5 จะตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pst I แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.2 kb โคลนใส่ดีเอ็นเอพาหะ pUC18

Dextrinizing activity

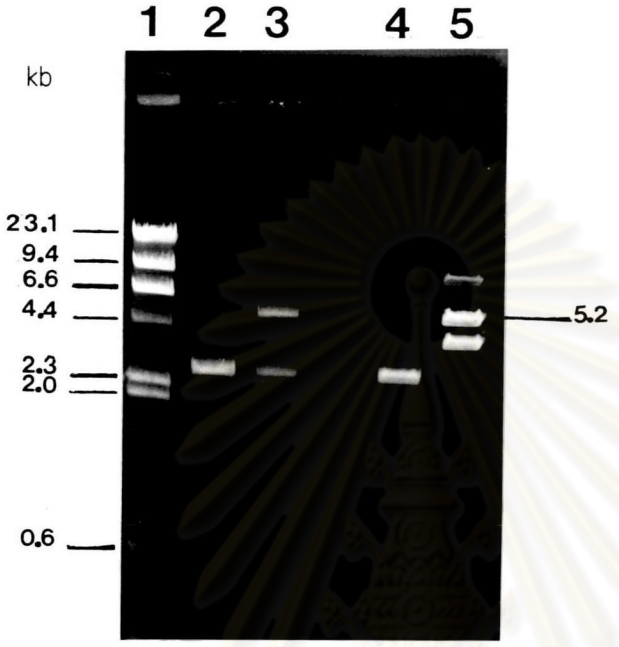


รูปที่ 12 การศึกษาอิทธิพลของ IPTG ต่อ dextrinizing activity ของ pCSBC12 ระหว่างเวลา 1-5 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในตำแหน่ง Pst I (รูปที่ 13) เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเอนไซม์ T_4 DNA ligase ทรานสฟอร์มดีเอ็นเอที่เชื่อมแล้วเข้า *E. coli* JM101 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิดที่ตรงตามต้องการ มาทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase โดยวิธี CD-TCE assay ผลการทดสอบไม่พบตะกอนของ CD-TCE complex จึงได้ทำการทดลองต่อโดยการตรวจสอบแอคติวิตีของ CGTase ด้วยวิธีการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ CDs ด้วยเครื่อง HPLC ผลปรากฏว่าไม่สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ CDs (data not shown) แสดงถึงว่าแม้ว่าจะสลับปลายของชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 และ pCSBC8 แล้วก็ยังไม่สามารถหาแอคติวิตีของ CGTase ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 ผลการตัด pCSBC5 และ pCSBC8 เพื่อทำการแยกออกมาทำ ligation

ช่องที่ 1 λ / Hind III

ช่องที่ 2 pUC18 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pst I

ช่องที่ 3 pCSBC5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pst I

ช่องที่ 4 pUC19 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I และ Pst I

ช่องที่ 5 pCSBC8 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I และ Pst I

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย