บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การแยกชิ้นส่วนที่มีไซแลเนสยีน

จากงานวิจัยของอรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต (13) ซึ่งได้สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีความสามารถถอดรหัสให้ไซแลเนส โดยการตัดพลาสมิดพาหะ pIJ699 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bgl*II และ *Bam*HI จากนั้นแยกเฉพาะชิ้นส่วนขนาด 5 กิโลเบส มาเชื่อมกับโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp.42-9 ที่ผ่านการตัดกึ่งสมบูรณ์ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI พบว่าได้ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด ได้แก่ pPT6C pPT6E และ pPT6G ซึ่งเมื่อทรานสฟอร์มเข้า *S. lividans* TK64 ทำให้มีความสามารถในการผลิตไซแลเนสได้สูงขึ้นกว่าเดิม 74 69 และ 61 เท่า ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่า *S. lividans* TK64 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C ให้แอคติวิตีของไซแลเนสสูงสุดเมื่อเทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งหมดที่ได้ งานวิจัยนี้จึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้มาโคลนซ้ำ (subclone) โดยใช้พลาสมิดใหม่ที่มีโปรโมเตอร์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงและคาดว่าจะทำให้การถอดรหัสของยีนมีประสิทธิภาพสูงด้วย ซึ่งจะเป็นผลทำให้แอคติวิตีของไซแลเนสเพิ่มขึ้น

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C มาตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII เพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไป (inserted DNA) ออกจากชิ้นส่วนพลาสมิดพาหะ pIJ699 ได้ดีเอ็นเอในรูปเส้น (linear form) 2 ชิ้นส่วนคือ ชิ้นส่วนของพลาสมิดพาหะ pIJ699 ขนาด 5 กิโลเบส และ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน ขนาดประมาณ 5.4 กิโลเบส ดังรูปที่ 7 ซึ่งเมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอ pPT6C ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII ไปทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับพลาสมิดพาหะ pIJ699 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bgl*II และ *Bam*HI พบว่าชิ้นส่วนล่างมีขนาดเท่ากับชิ้นส่วนของพลาสมิดพาหะ (ขนาด 5 กิโลเบส) ดังนั้นชิ้นส่วนบนจึงเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มี

ไซแลเนสยีนซึ่งใส่เข้าไป ดังแสดงในรูปที่ 8 ช่องที่ 1 และ 3 จึงทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนออกจากเจล โดยใช้ GENECLEAN II kit ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 12 พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง ดังรูปที่ 8 ช่องที่ 4

เพื่อยืนยันว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้ เป็นชิ้นส่วนที่ใส่เข้าไปในพลาสมิดจริง ไม่ใช่ชิ้นส่วนของพลาสมิดพาหะ pIJ699 ดังนั้นจึงได้ทดลองตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bcl*I ซึ่งจากรูปที่ 7 จะเห็นว่าชิ้นส่วนของพลาสมิด pIJ699 นั้นมีตำแหน่งที่สามารถตัดได้ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bcl*I ถึงสองตำแหน่ง หากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้เป็นชิ้นส่วนของพลาสมิด pIJ699 ก็จะต้องถูกตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน แต่จากผลการทดลองในรูปที่ 9 จะเห็นว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้ไม่สามารถถูกตัดได้ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bcl*I แสดงว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้เป็นชิ้นส่วนที่มีไซแลเนสจริง ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้นี้จะนำไปใช้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยเชื่อมกับพลาสมิดพาหะชนิดต่างๆ ต่อไป

2. **<u>การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด</u>**

2.1 เมื่อใช้ pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะ

pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะที่มี *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พลาสมิดนี้สร้างขึ้นให้มียีน *lacZ* พร้อมโปรโมเตอร์ และ มีตำแหน่งตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์หลายตำแหน่งบนยีน *lacZ* โดยมีตำแหน่งของ *Hind*III อยู่ใกล้กับตำแหน่งโปรโมเตอร์มากที่สุด (26) การนำยีนอื่นเข้ามาสอดใส่หลังตำแหน่งโปรโมเตอร์ คาดว่าจะเพิ่มประสิทธิภาพการถอดรหัสของยีนนั้นๆ ได้ การทดลองนี้จึงนำพลาสมิด pUC19 มาตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III ซึ่งได้พลาสมิดดีเอ็นเอในรูปเส้น โดยมีโปรโมเตอร์ของยีน *lacZ* อยู่ก่อนตำแหน่งที่ตัดด้วย *Hind*III ดังแสดงในรูปที่ 10 เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 5.4 กิโลเบส จาก pPT6C ที่ตัดด้วย *Hind*III มาเชื่อมกับ pUC19 คาดว่าจะทำให้การแสดงออกของยีนโครงสร้างที่นำมาต่อนั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน *lacZ* โดยตรง หลังจากตัดพลาสมิด pUC19 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III ก่อนนำไปเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้ ต้องนำไปกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกด้วย BAP และทดสอบการเชื่อมตัวเอง ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 13 ผลการตัด pUC19 การกำจัดหมู่ฟอสเฟต และการเชื่อมตัวเอง แสดงดังรูปที่ 11 ในช่องที่ 2 3 และ 4

ตามลำดับ จะเห็นว่าหลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้วพลาสมิดพาหะ pUC19 ไม่สามารถเชื่อมตัวเองได้ กล่าวคือยังคงอยู่ในรูปเส้น จากนั้นจึงนำไปเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนส จากข้อ 1 (รูปที่ 11 ช่องที่ 5) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 14 แล้วตรวจสอบผลการเชื่อมกันของพลาสมิดพาหะ กับ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับ λDNA/*Hind*III ผลการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มีขนาดใหญ่กว่า pUC19 และ ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำมาสอดใส่ ดังรูปที่ 11 ช่องที่ 6

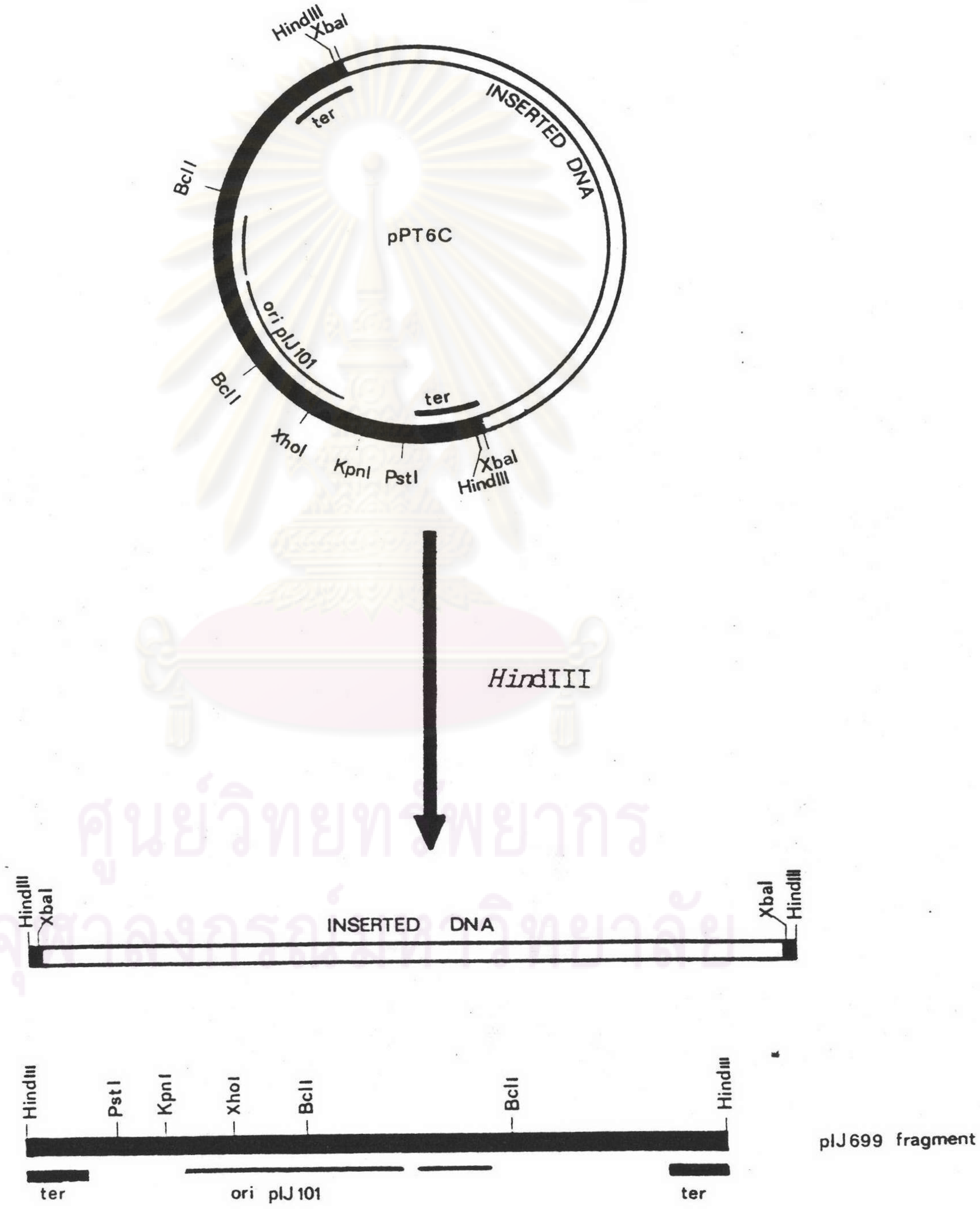
2.2 เมื่อใช้ pT7-7 เป็นพลาสมิดพาหะ

พลาสมิดพาหะ pT7-7 เป็นพลาสมิดที่มี *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน โดยมีโปรโมเตอร์ ϕ10 ซึ่งมีรายงานว่าสามารถอ่านและถอดรหัสของ *Streptomyces* ใน *E. coli* ได้ (30) เมื่อตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III จะได้พลาสมิดในรูปเส้น ดังแสดงในรูปที่ 12 จากนั้นกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกจากปลายทั้งสองด้านด้วย BAP และทดสอบการเชื่อมตัวเอง ก่อนนำไปเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน ซึ่งเมื่อตรวจสอบผล โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับ λDNA/*Hind*III ได้ผลดังรูปที่ 13 จะเห็นว่า pT7-7 เมื่อตัดด้วย เรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III (ช่องที่ 2) แล้วนำไปกำจัดหมู่ฟอสเฟตออก(ช่องที่ 3) พบว่าไม่สามารถเชื่อมตัวเองได้ (ช่องที่ 4) และเมื่อนำไปเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไซแลเนสยีน จะเห็นว่าขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น (ช่องที่ 6)

2.3 เมื่อใช้ pIJ4083/3 เป็นพลาสมิดพาหะ

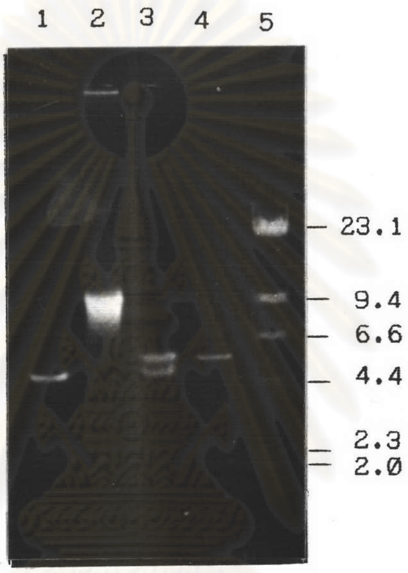
จากการตรวจสอบประสิทธิภาพ ของโปรโมเตอร์ในพลาสมิดพาหะ pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 และ pIJ4083/4 โดยการฉีดพ่นโคโลนีของ *S. lividans* TK64 ที่มีพลาสมิดเหล่านี้ด้วย สารละลาย 0.5 โมลาร์แคทีคอล ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9 พบว่าโคโลนีของ *S. lividans* TK64 ที่มีพลาสมิด pIJ4083/3 ให้โคโลนีที่มีสีเหลืองเข้มที่สุด ดังรูปที่ 14 ซึ่งแสดงว่าพลาสมิด pIJ4083/3 มีโปรโมเตอร์ที่ประสิทธิภาพสูงกว่าตัวอื่นๆ ดังนั้นจึงใช้พลาสมิด pIJ4083/3 เป็นพลาสมิดพาหะในระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces*

รูปที่ 7 แผนที่เรสตริกชันบางส่วนของ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C เมื่อถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสเพื่อเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C เมื่อตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III กับพลาสมิดพาหะ pIJ699 เมื่อตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bgl*II และ *Bam*HI รวมทั้งผลการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนออกจากเจล โดยใช้ GENECLEAN II kit



ช่องที่ 1 พลาสมิดพาหะ pIJ699 ที่ตัดด้วย *Bgl*II และ *Bam*HI

2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C

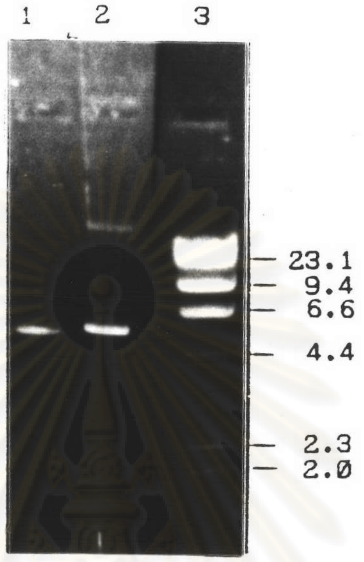
3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C ที่ตัดด้วย *Hind*III

4 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน ภายหลังการแยกออกจากเจลโดยใช้ GENECLEAN II kit

5 λDNA/*Hind*III (กิโลเบส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้ เมื่อตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *BclI* เปรียบเทียบกับ λDNA/*Hind*III



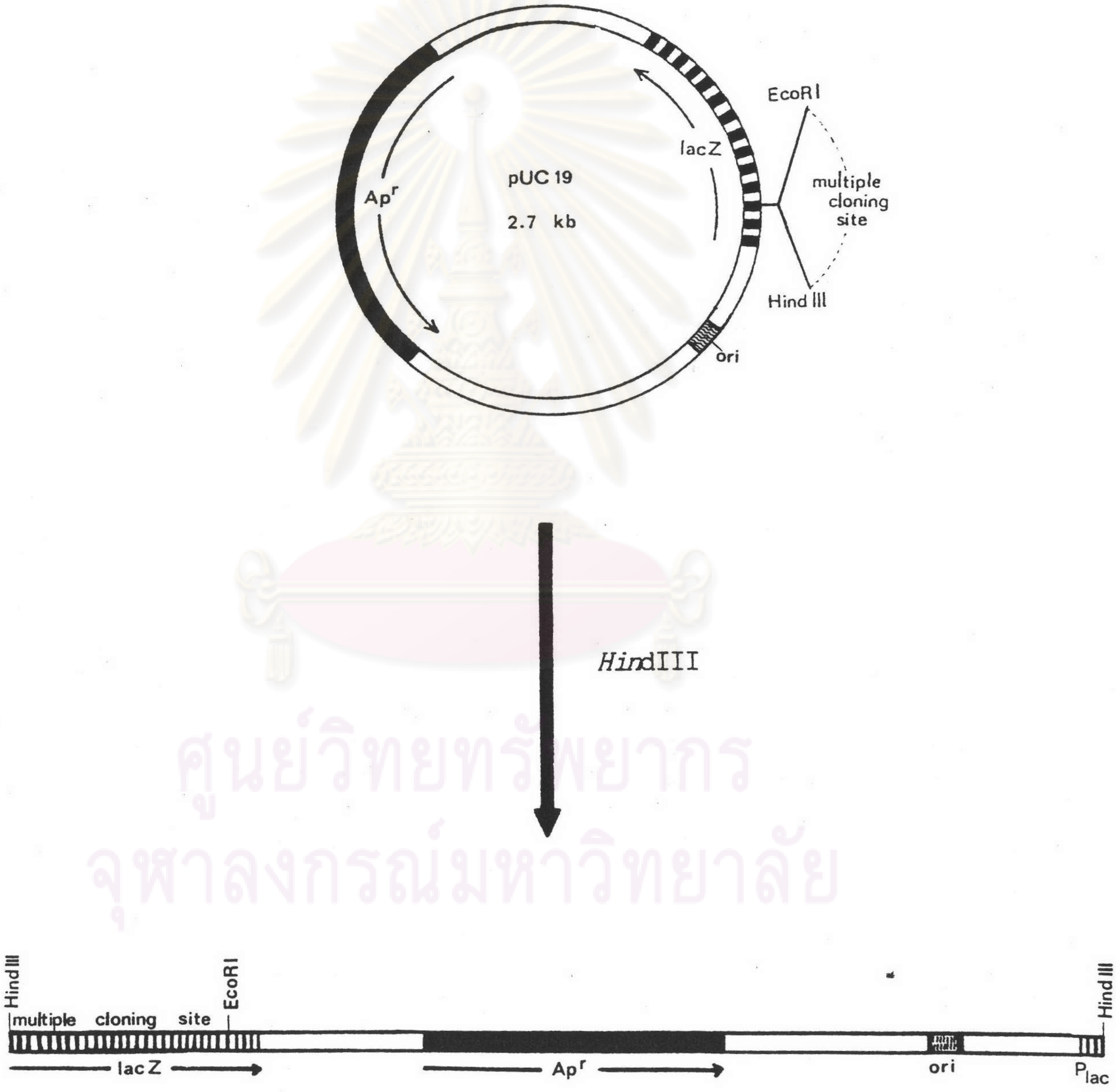
ช่องที่ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสที่เตรียมได้

2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้ จากช่องที่ 1 ตัดด้วย *BclI*

3 λDNA/*Hind*III

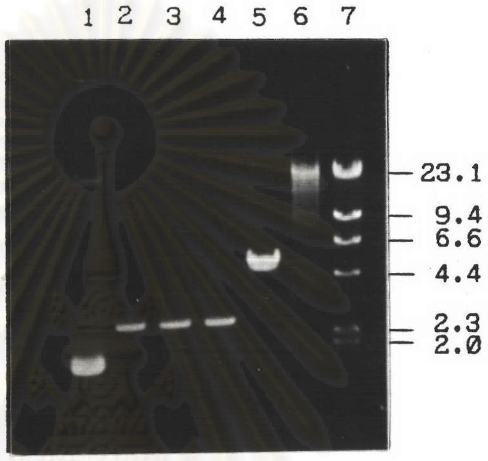
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 แผนที่เรสตริกชันบางส่วนของพลาสมิด pUC19 เมื่อถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดพาหะ pUC19 ที่ถูกตัด ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเอง หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้ว และผลการเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน เปรียบเทียบกับ λDNA/*Hin*dIII



ช่องที่ 1 พลาสมิดพาหะ pUC19

2 พลาสมิดพาหะ pUC19 ที่ถูกตัดด้วย *Hin*dIII

3 พลาสมิดพาหะ pUC19 จากช่องที่ 2 ที่ถูกกำจัดหมู่ฟอสเฟตด้วย BAP

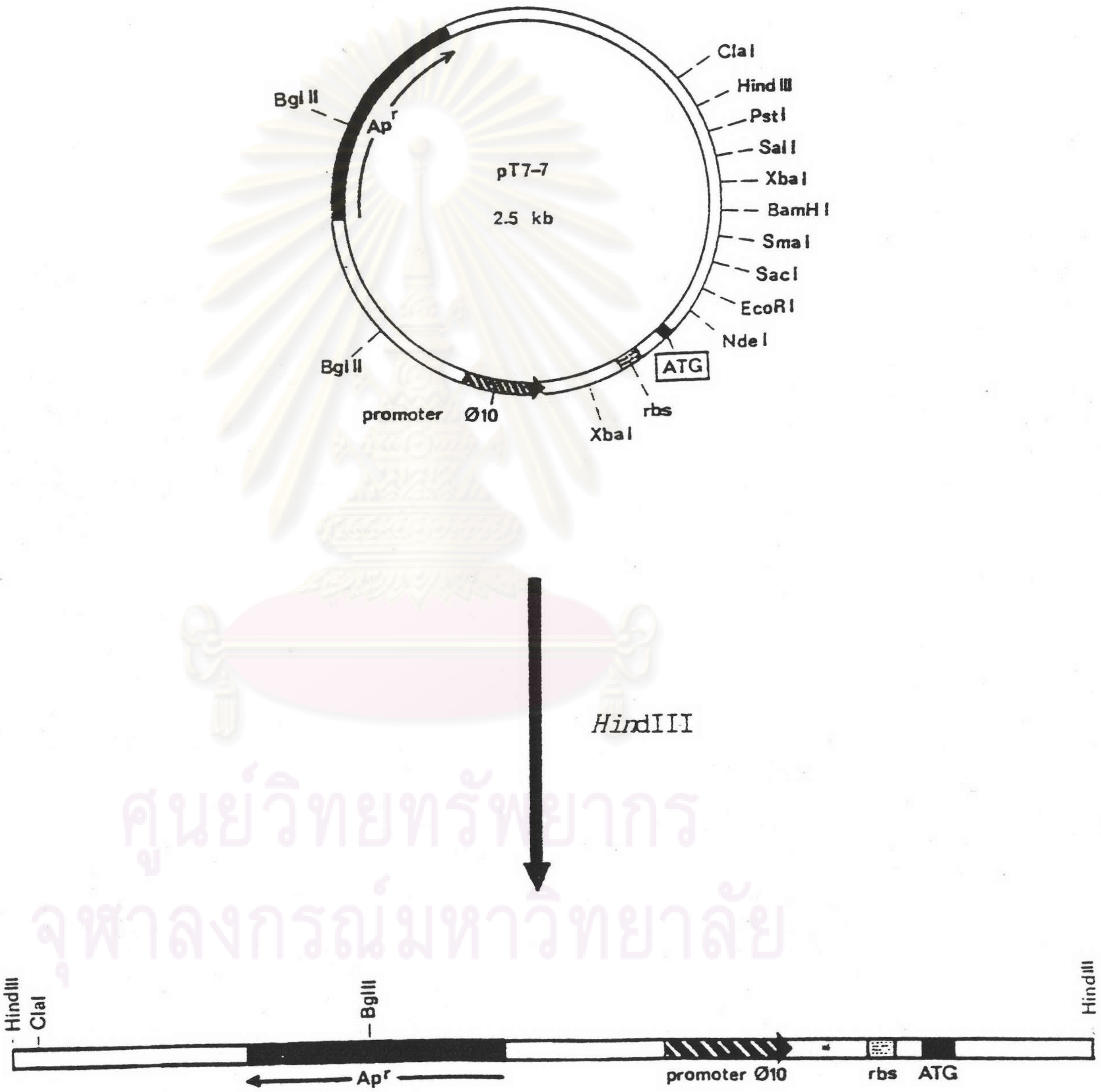
4 ทดสอบการเชื่อมตัวเอง (self ligation) ของพลาสมิดพาหะ pUC19 จากช่องที่ 3 ด้วยเอนไซม์ T_4 DNA ligase

5 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน

6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด

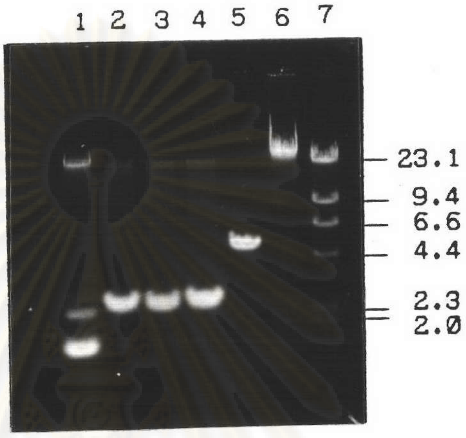
7 λDNA/*Hin*dIII (กิโลเบส)

รูปที่ 12 แผนที่เรสตริกชันบางส่วนของพลาสมิด pT7-7 เมื่อถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดพาหะ pT7-7 ที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเอง ภายหลังกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้ว และผลการเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน เปรียบเทียบกับ λDNA/*Hind*III



ช่องที่ 1 พลาสมิดพาหะ pT7-7

2 พลาสมิดพาหะ pT7-7 ที่ถูกตัดด้วย *Hind*III

3 พลาสมิดพาหะ pT7-7 จากช่องที่ 2 ที่ถูกกำจัดหมู่ฟอสเฟตด้วย BAP

4 ทดสอบการเชื่อมตัวเองของพลาสมิดพาหะ pT7-7 จากช่องที่ 3

5 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน

6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด

7 λDNA/*Hind*III (กิโลเบส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของโปรโมเตอร์ โดยการฉีดพ่นโคโลนีของ *S. lividans* TK64 ที่มีพลาสมิด pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 และ pIJ4083/4 ด้วยสารละลาย 0.5 โมลาร์ แคทีคอล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

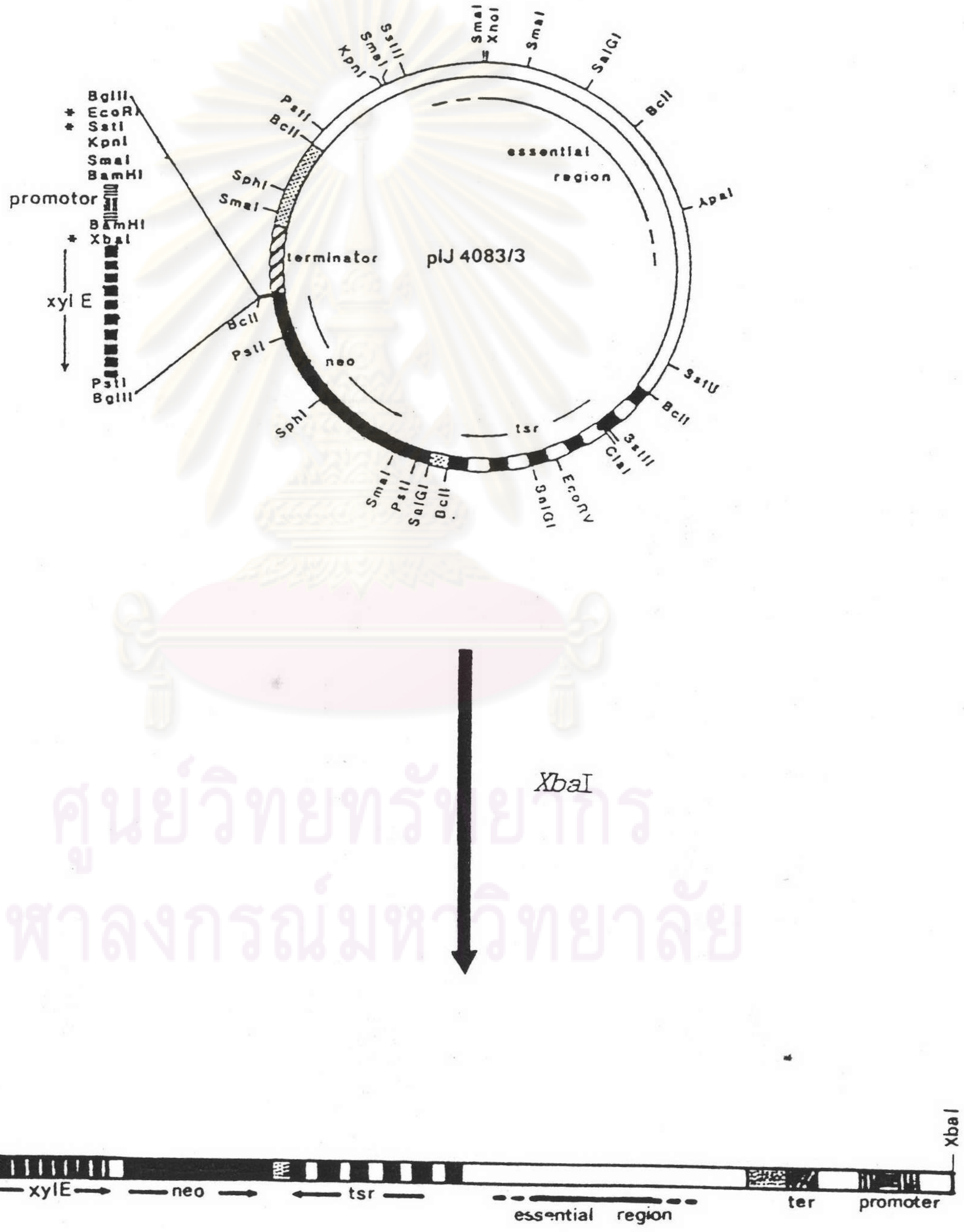
และเนื่องจาก Pinphanichkarn (29) ได้โคลนโปรโมเตอร์ยีนของ *S. gaucescens* เข้าที่ตำแหน่ง *Bam*HI ของ pIJ4083 ดังกล่าวไว้ในบทที่ 1 ตามรูปที่ 4 และ 5 ดังนั้นจึงมีตำแหน่งที่จะเชื่อมชิ้นส่วนเอ็นเอเข้ากับ pIJ4083/3 ได้เพียงตำแหน่งเดียวคือ ตำแหน่งที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I ซึ่งเมื่อตัด pIJ4083/3 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I จะได้พลาสมิดในรูปเส้นดังแสดงในรูปที่ 15 เมื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้วนำไปเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน ซึ่งผ่านการตัดซ้ำด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I เพื่อให้ปลายดีเอ็นเอทั้งสองส่วนมีลักษณะเป็นเบสคู่สมกัน ทั้งนี้จากรูปที่ 7 จะเห็นว่าเมื่อตัด pPT6C ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III แล้ว ปลายทั้งสองด้านถัดจาก *Hind*III เข้ามาจะเป็นตำแหน่งที่ตัดได้ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I

ผลการตรวจสอบการเชื่อมกันของดีเอ็นเอทั้งสองส่วนแสดงดังรูปที่ 16 ซึ่งจะเห็นว่า pIJ4083/3 เมื่อตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I (ช่องที่ 2) แล้วผ่านการกำจัดหมู่ฟอสเฟตออก (ช่องที่ 3) ไม่สามารถเชื่อมตัวเองได้ (ช่องที่ 4) และเมื่อนำไปเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดมีขนาดใหญ่ขึ้น และเนื่องจากการคำนวณอัตราส่วนระหว่างพลาสมิดพาหะต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอในขั้นตอนการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดคลาดเคลื่อน ดังนั้นจากรูปที่ 16 ช่องที่ 6 จะเห็นว่ามีชิ้นส่วนของพลาสมิดพาหะเหลืออยู่มากพอสมควร แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีการกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกจากปลายทั้งสองด้านของพลาสมิดพาหะแล้ว ดังนั้นจึงไม่มีผลต่อการคัดเลือกโคลนในภายหลัง

2.4 เมื่อใช้ pIJ4090 เป็นพลาสมิดพาหะ

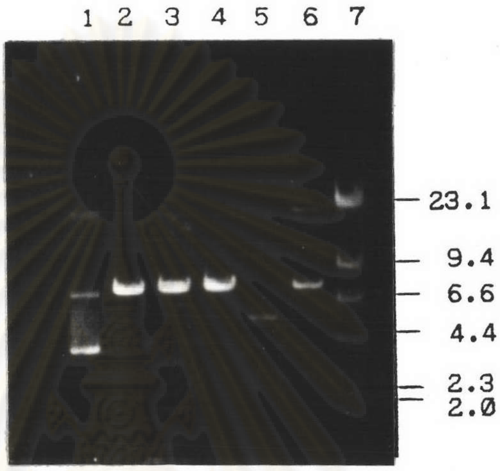
pIJ4090 เป็นพลาสมิดพาหะที่มี *Streptomyces* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และถูกสร้างให้มีโปรโมเตอร์ของยีนอีริธโทรมัยซิน (*ermE*) จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการโคลนยีนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการถอดรหัสยีนของ *Streptomyces* ภายใต้โปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพของ *ermE* ดังกล่าว ซึ่งเมื่อตัด pIJ4090 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III จะได้ลักษณะของดีเอ็นเอดังรูปที่ 17 และเมื่อนำไปกำจัดหมู่ฟอสเฟตออก แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเอง จากนั้นนำไปเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน ตรวจสอบผลการเชื่อมกันของดีเอ็นเอทั้งสองส่วน โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 18 ซึ่งจะเห็นว่า พลาสมิดพาหะที่ผ่านการกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้วไม่สามารถเชื่อมตัวเองได้ และ เมื่อเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน ก็มีขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดใหญ่ขึ้นโดยยังมีส่วนของพลาสมิดพาหะเหลืออยู่บ้างเล็กน้อย

<u>รูปที่ 15</u> แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิด pIJ4083/3 เมื่อถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 16 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดพาหะ pIJ4083/3 ที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเอง หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้ว และผลการเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน เปรียบเทียบกับ λDNA/*Hin*dIII



ช่องที่ 1 พลาสมิดพาหะ pIJ4083/3

2 พลาสมิดพาหะ pIJ4083/3 ที่ถูกตัดด้วย *Xba*I

3 พลาสมิดพาหะ pIJ4083/3 จากช่องที่ 2 ที่ถูกกำจัดหมู่ฟอสเฟตด้วย BAP

4 ทดสอบการเชื่อมตัวเองของพลาสมิดพาหะpIJ4083/3 จากช่องที่ 3

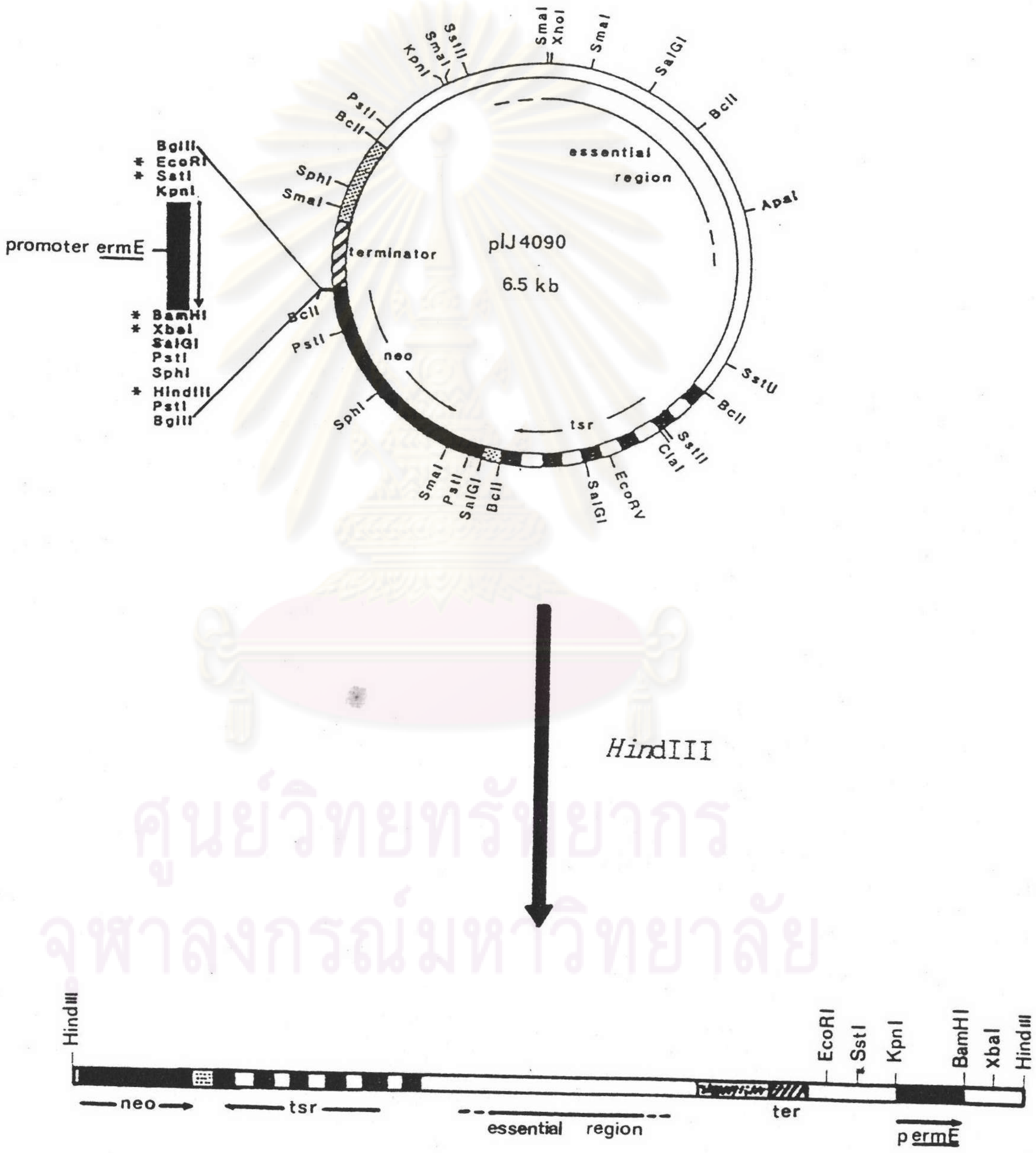
5 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนจากการตัดซ้ำด้วย *Xba*I

6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด

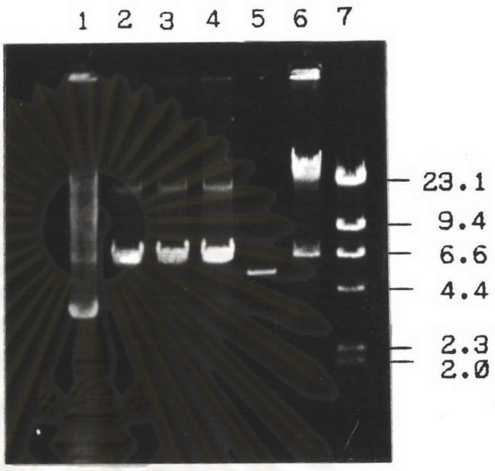
7 λDNA/*Hin*dIII (กิโลเบส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 17 แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิด pIJ4090 เมื่อถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII



รูปที่ 18 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสของพลาสมิดพาหะ pIJ4090 ที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเอง หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้ว และผลการเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน เปรียบเทียบกับ λDNA/*Hind*III



ช่องที่ 1 พลาสมิดพาหะ pIJ4090

2 พลาสมิดพาหะ pIJ4090 ที่ถูกตัดด้วย *Hind*III

3 พลาสมิดพาหะ pIJ4090 จากช่องที่ 2 ที่ถูกกำจัดหมู่ฟอสเฟตด้วย BAP

4 ทดสอบการเชื่อมตัวเองของพลาสมิดพาหะ pIJ4090 จากช่องที่ 3

5 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน

6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด

7 λDNA/*Hind*III (กิโลเบส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. <u>การทรานสฟอร์เมชัน</u>

จากการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะต่างๆ ซึ่งได้แก่ pUC19 หรือ (pT7-7 ร่วมกับ pGP1-2) เข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* และการทรานสฟอร์ม pIJ4083/3 และ pIJ4090 เข้าสู่โปรโตพลาสท์ของ *S. lividans* TK64 พบว่า มีประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 2 ทั้งนี้สำหรับ *S. lividans* TK64 จะมีเปอร์เซนต์การรีเจนเนอเรท ของโปรโตพลาสท์ในแต่ละครั้ง ไม่คงที่ โดยจะแปรผันอยู่ในช่วง 7-13% หลังจากเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน เข้ากับพลาสมิดพาหะชนิดต่างๆ แล้ว นำไปทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน พบว่ามี ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มที่แสดงได้ดังตารางที่ 3

4. <u>การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์</u>

จากการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ของ *E. coli* DS941 ที่ถูกทรานสฟอร์มด้วย รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LA ที่มี ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน x-gal และ IPTG พบว่าทุกโคโลนีที่มีสีขาวเมื่อนำไปตรวจสอบ หาแอคติวิตีของไซแลเนสตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 17 แล้ว ไม่พบว่ามีโคลนใดให้ แอคติวิตีของไซแลเนส แม้ว่าจะทำการตรวจสอบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดแยกจาก เซลล์แล้วก็ตาม

นอกจากนี้ยังได้ทดลองเปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้านโดยทำการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดที่มี pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะเข้าสู่ *E. coli* JM109 แต่ก็พบว่าไม่มีโคลนใดให้ แอคติวิตีของไซแลเนสเช่นกัน ผลการทดลองที่ได้นี้อาจเนื่องมาจาก ยีนของ *Streptomyces* อาจไม่สามารถถอดรหัสได้ในระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *E. coli*

อย่างไรก็ตามได้ทดลองใช้พลาสมิดพาหะ pT7-7 ซึ่งมีรายงานถึงการนำมาใช้ ถอดรหัสยีนของ *Streptomyces* ใน *E. coli* (30) ผลการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ ที่มีพลาสมิด pT7-7 เป็นพลาสมิดพาหะเมื่อทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ โดยมี พลาสมิด pGP1-2 ร่วมด้วย พบว่า ได้ทรานสฟอร์แมนท์ของ *E. coli* DS941 เพียง 4 โคลนเท่านั้น แต่เมื่อนำไปตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วมีเพียง 1 โคลน เท่านั้นที่มีขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ใหญ่ขึ้น และยังคงตรวจไม่พบแอคติวิตีของ ไซแลเนสเช่นกัน สำหรับผลการตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนั้นได้แสดงไว้ใน ขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันของพลาสมิดพาหะเข้าสู่ *E. coli* และ *S. lividans* TK64

เชื้อจุลินทรีย์/พลาสมิด	ขนาดของพลาสมิดพาหะ (กิโลเบส)	ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม จำนวนทรานสฟอร์แมนท์ / ไมโครกรัมดีเอ็นเอ
E. coli DS941		
pUC19	2.7	$1.32x10^{5}$
E. coli DS941		
(pT7-7+pGP1-2)	2.5,7.2	$5.33x10^{3}$
S. lividans TK64		
pIJ4083/3	~7.6	$1.27x10^{3}$
S. lividans TK64		
pIJ4090	6.5	$9.44x10^{4}$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ผลการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างได้ เข้าสู่เซลล์ให้อาศัยที่เป็น *E. coli* และ *S. lividans* TK64

เชื้อจุลินทรีย์/พลาสมิด	ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม (จำนวนทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ)
E. coli DS941	
pUC19/inserted DNA	1.36×10^3
E. coli DS941	
pT7-7/inserted DNA+pGP1-2	80
S. lividans TK64	
pIJ4083/3/ inserted DNA	33
S. lividans TK64	
pIJ4090/inserted DNA	1.98×10^3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนทรานสฟอร์แมนท์ของ *S. lividans* TK64 ที่ทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี pIJ4083/3 และ pIJ4090 เป็นพลาสมิดพาหะนั้น เมื่อนำไปทำ replica plating ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบซึ่งผสมยาปฏิชีวนะไธโอสเตรพตอน พบว่า โคลนทั้งหมดที่ได้ไม่มีโคลนใดให้วงใสรอบโคโลนีมากกว่าหรือเท่ากับ *S. lividans* TK64 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C จึงได้สุ่มตัวอย่างทรานสฟอร์แมนท์ออกมาทดสอบแอคติวิตีของไซแลเนส แต่ก็ไม่พบว่ามีโคลนใดให้แอคติวิตีดีพอ ซึ่งผลการตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนสแสดงดังตารางที่ 4 เมื่อสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส พบว่ารีคอมบิแนนท์ที่ได้มีขนาดเท่ากับพลาสมิดพาหะเดิม ไม่มีโคลนใดให้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ขึ้น

ดังนั้นในการศึกษาขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด จึงศึกษาจากทรานสฟอร์แมนท์จาก *E. coli* เท่านั้น

5. <u>การตรวจสอบหาขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในทรานสฟอร์แมนท์</u>

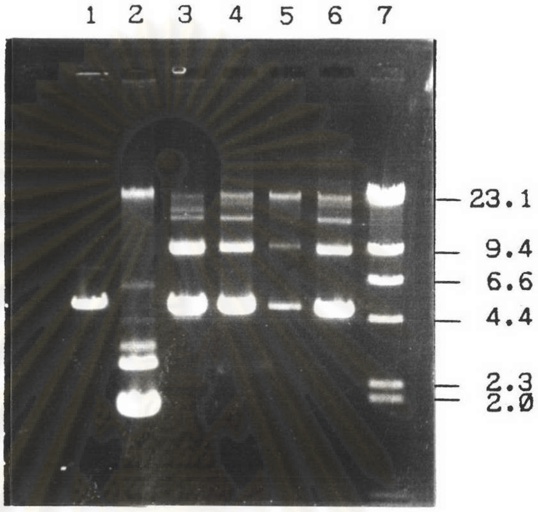
เนื่องจากทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จากการทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะนั้นมีจำนวนมาก และตามทฤษฎีแล้วชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิดพาหะมีเพียงชิ้นเดียวคือขนาดประมาณ 5.4 กิโลเบส ดังนั้นทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จึงควรมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีขนาดเดียวกันคือประมาณ 8.1 กิโลเบส ด้วยเหตุผลนี้จึงสุ่มตัวอย่างออกมาจากทรานสฟอร์แมนท์ทั้งหมดเพียง 3 โคลนเท่านั้น เพื่อเป็นตัวแทนของทรานสฟอร์แมนท์ตัวอื่นๆ โดยได้นำมาทดสอบหาว่าขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ใหญ่ขึ้นหรือไม่เพียงใด ทั้งนี้ได้ให้ชื่อกำกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแต่ละตัวเป็น p19C-1 p19C-2 และ p19C-3 ตามลำดับ เมื่อเลี้ยง *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเหล่านี้แล้วสกัดพลาสมิดออกมาทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสเทียบกับ λDNA/*Hin*dIII พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สุ่มตัวอย่างมาทั้ง 3 มีขนาดเท่ากัน และ มีขนาดใหญ่กว่า pUC19 ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะเดิม ดังแสดงในรูปที่ 19 ช่องที่ 3 4 และ 5 ตามลำดับ และโดยวิธีเดียวกัน ได้สุ่มตัวอย่างจากทรานสฟอร์แมน์ของ *E. coli* JM109 ที่ทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะออกมา 1 โคลน และให้หมายเลขกำกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในโคลนนี้เป็น p19C-4 จากนั้นสกัดพลาสมิดแล้วทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสเทียบกับ λDNA/*Hin*dIII ดังรูปที่ 19 ช่องที่ 6 ซึ่งจะเห็นว่าขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้นเช่นกัน และมีขนาดเท่ากับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1 p19C-2 และ p19C-3 ด้วย

<u>**ตารางที่ 4**</u> เปรียบเทียบแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ไซแลเนสจากโคลนต่างๆ กับ *Streptomyces* sp. 42-9 *Streptomyces lividans* TK64 *S. lividans* TK64/pPT6C *S. lividans* TK64/pIJ4083/3 และ *S. lividans* TK64/pIJ4090 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ

สายพันธุ์	แอคติวิตีของไซแลเนส (หน่วย/มล.)
Streptomyces sp.42-9	4.44
S. lividans TK64	0.02
S. lividans TK64/pPT6C	4.85
S. lividans TK64/pIJ4083/3	0.07
No.4/3-1	0.44
No.4/3-2	0.20
No.4/3-3	0.12
No.4/3-4	0.30
No.4/3-6	0.36
S. lividans TK64/pIJ4090	0.18
No.4090-2	0.42
No.4090-4	0.00
No.4090-5	0.05
No.4090-11	0.00
No.4090-16	0.00

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 19 ตำแหน่งของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1 p19C-2 p19C-3 และ p19C-4 ก่อนตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน และพลาสมิดพาหะ pUC19



ช่องที่ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน

2 พลาสมิดพาหะ pUC19

3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1

4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2

5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-3

6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4

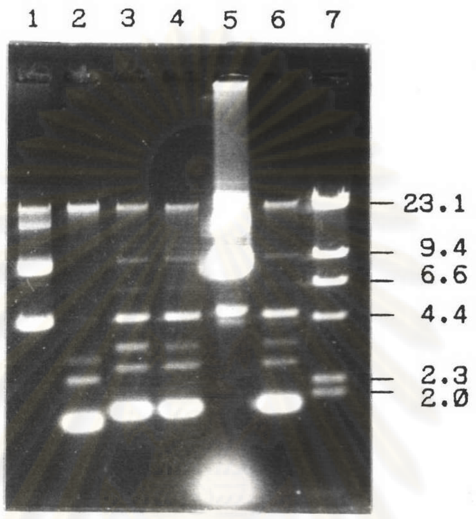
7 λDNA/*Hind*III (กิโลเบส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากที่กล่าวไว้ในข้อ 4 ว่า ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จาก การทรานสฟอร์ม *E. coli* DS941 ด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี pT7-7 เป็นพลาสมิดพาหะนั้น มีเพียง 4 โคลนเท่านั้น เมื่อทำการเลี้ยงทรานสฟอร์แมนท์เหล่านี้แล้วสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมา และให้ชื่อกำกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเหล่านี้เป็น p7C-1 p7C-2 p7C-3 และ p7C-4 ตามลำดับ จากนั้นทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสเทียบกับ λDNA/*Hind*III ดังรูปที่ 20 พบว่ามีเพียงรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3 เท่านั้นที่มีขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดใหญ่ขึ้น ส่วนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวอื่นๆ มีขนาดเท่ากับพลาสมิดพาหะเดิม คือ pT7-7 นอกจากนั้นยังพบว่าทุกโคลนที่นำมาตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ยังตรวจพบพลาสมิด pGP1-2 ซึ่งใช้ในการทรานสฟอร์เมชันร่วมกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วย แสดงว่าทรานสฟอร์เมชันเกิดได้สมบูรณ์ตามที่ต้องการ และยืนยันได้โดยทรานสฟอร์แมนท์เหล่านี้สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LA ที่มีทั้งยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินซึ่งเป็น marker ของ pT7-7 และกานามัยซิน ซึ่งเป็น marker ของ pGP1-2

เพื่อยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1 p19C-2 p19C-3 p19C-4 และ p7C-3 ได้รับเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนเข้าไป จึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเหล่านี้มาตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*II ซึ่งได้ผลดังแสดงรูปที่ 21 22 และ 23 ในรูปที่ 21 จะเห็นว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1 p19C-2 และ p19C-3 หลังจากตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III แล้ว ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ส่วนคือ ส่วนล่างมีขนาด 2.7 กิโลเบส ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของพลาสมิดพาหะ pUC19 และชิ้นส่วนบนเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไป (inserted DNA) ขนาดประมาณ 5.4 กิโลเบส ส่วนในรูปที่ 22 นั้น หลังจากตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III พบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ส่วนคือชิ้นส่วนของ pUC19 ขนาด 2.7 กิโลเบสและชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 5.2 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไป ส่วนในรูปที่ 23 เมื่อตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III (ช่องที่ 7) จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ชิ้นส่วน คือ ชิ้นส่วนของพลาสมิดพาหะ pT7-7 ขนาด 2.5 กิโลเบส ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนที่ใส่เข้าไปขนาดประมาณ 5.4 กิโลเบส และชิ้นส่วนของพลาสมิด pGP1-2 ขนาด 7.2 กิโลเบส ทั้งนี้เนื่องจากบนพลาสมิด pGP1-2 มีตำแหน่งที่สามารถตัดได้ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III เช่นกัน ดังนั้นจึงทำให้พลาสมิดนี้เปลี่ยนโครงรูปจากการขดเป็นวง(supercoil form)เป็นอยู่ในรูปเส้น(linear form) ซึ่งมีขนาด 7.2 กิโลเบสดังกล่าว ทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ในเจลเปลี่ยนไป

รูปที่ 20 ตำแหน่งของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-1 p7C-2 p7C-3 และ p7C-4 ก่อนตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับพลาสมิด pGP1-2 และพลาสมิดพาหะ pT7-7



ช่องที่ 1 พลาสมิด pGP1-2

2 พลาสมิดพาหะ pT7-7

3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-1

4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-2

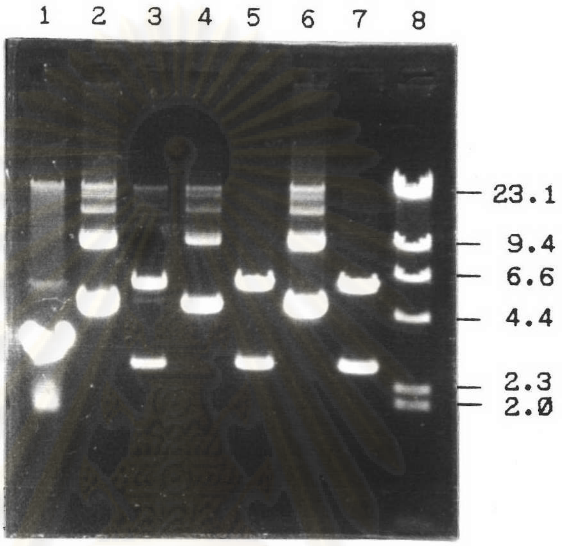
5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3

6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-4

7 λDNA/*Hind*III (กิโลเบส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>รูปที่ 21</u> ผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1 p19C-2 และ p19C-3 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน และ พลาสมิดพาหะ pUC19 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III



ช่องที่ 1 พลาสมิดพาหะ pUC19 ตัดด้วย *Hind*III

2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1

3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1 ตัดด้วย *Hind*III

4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2

5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2 ตัดด้วย *Hind*III

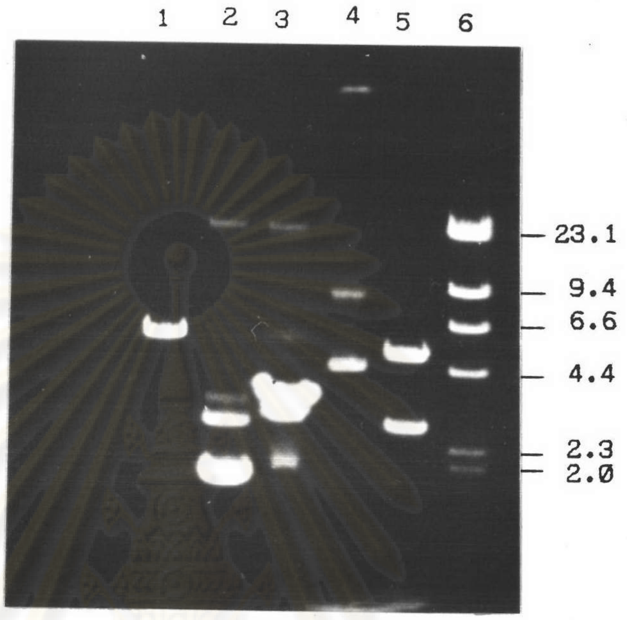
6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-3

7 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-3 ตัดด้วย *Hind*III

8 λDNA/*Hind*III (กิโลเบส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22 ผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับ ชิ้นส่วนที่มีไซแลเนสยีน และ พลาสมิดพาหะ pUC19 ที่ตัดด้วย *Hind*III



ช่องที่ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน

2 พลาสมิดพาหะ pUC19

3 พลาสมิดพาหะ pUC19 ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III

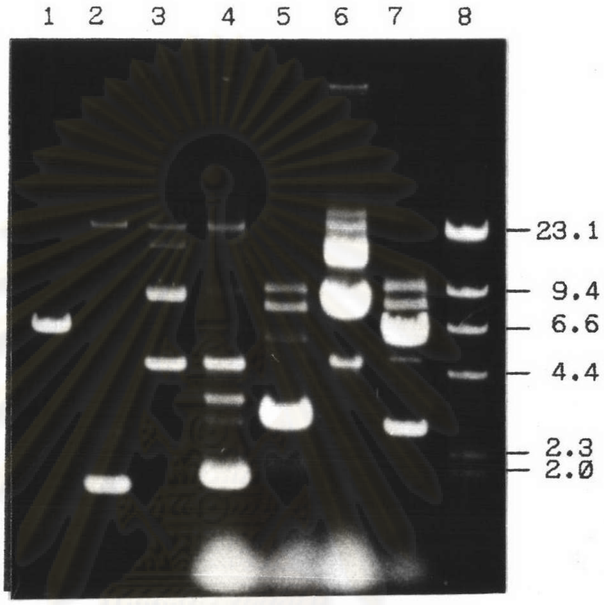
4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4

5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4 ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์*Hind*III

6 λDNA/*Hind*III (กิโลเบส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23 ผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3 **ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์** *Hind*III โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส **เปรียบเทียบกับ ชิ้นส่วนที่มี** ไซแลเนลยีน พลาสมิดพาหะ pT7-7 และ **พลาสมิด** pGP1-2



ช่องที่ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนลยีน

2 พลาสมิดพาหะ pT7-7

3 พลาสมิด pGP1-2

4 พลาสมิด (pT7-7+pGP1-2)

5 พลาสมิด (pT7-7+pGP1-2) **ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์** *Hind*III

6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3

7 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3 **ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์** *Hind*III

8 λDNA/*Hind*III (กิโลเบส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้นจะเห็นว่าตำแหน่งของพลาสมิด pGP1-2 ในรูปที่ 23 ช่องที่ 5 และ 7 เปลี่ยนไปจากโครงรูปเดิมที่อยู่ในช่องที่ 4 และ 6 ตามลำดับ

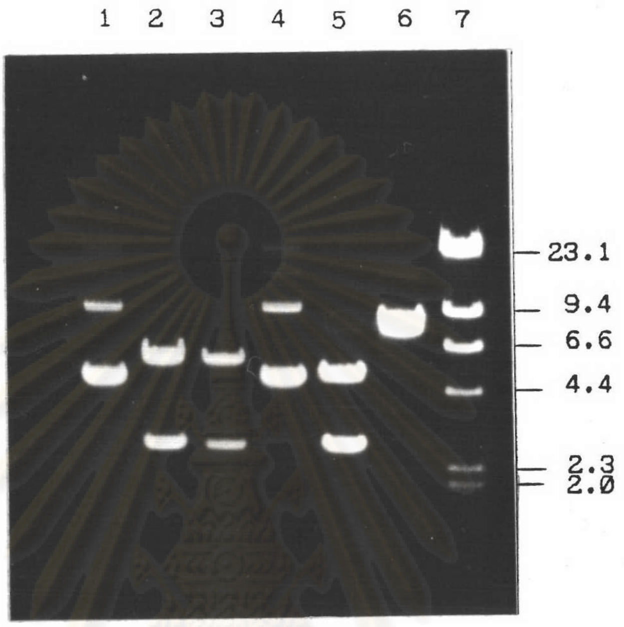
จากรูปที่ 21 และ 23 จึงยืนยันได้ว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปนั้นเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนที่ได้จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C ยกเว้นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4 โดยจะเห็นว่าภายหลังตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1 p19C-2 p19C-3 และ p7C-3 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III แล้ว ตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปมีตำแหน่งตรงกันกับ ตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้ ก่อนการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวใหม่ ดังรูปที่ 21 ช่องที่ 3 5 และ 7 และ รูปที่ 22 ช่องที่ 5 เปรียบเทียบกับช่องที่ 1 ตามลำดับ

จากรูปที่ 7 จะเห็นว่าที่ปลายทั้งสองด้านของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสนั้นมีตำแหน่งที่สามารถตัดได้ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I ดังนั้นเมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่รับเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้เข้าไปมาตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I ควรจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ส่วน คือส่วนของพลาสมิดพาหะและส่วนของดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไป จึงได้นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2 และ p19C-4 ซึ่งเป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จาก *E. coli* DS941 และ *E. coli* JM109 ตามลำดับ มาทดสอบโดยตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I ผลที่ได้พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2 ถูกตัดออกเป็น 2 ส่วน ดังรูปที่ 24 ช่องที่ 3 ขณะที่รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4 เมื่อตัดด้วย *Xba*I แล้ว ได้ชิ้นส่วนขนาดใหญ่เพียงชิ้นเดียวโดยมีขนาดประมาณ 8 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 24 ช่องที่ 6

6. <u>การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนจากการทำ SDS-PAGE</u>

แม้ว่าไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตีของไซแลเนสในโคลนต่างๆ ที่รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 5.4 กิโลเบสก็ตาม งานวิจัยในขั้นตอนต่อไปจะตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนจากเซลล์เจ้าบ้านที่ไม่ได้รับ กับที่ได้รับพลาสมิดพาหะ หรือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด ทั้งนี้เพราะจากรายงานการวิจัยของ กมลวรรณ มั่นภักดี (46) ซึ่งศึกษาสมบัติของไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. 42-9 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าเอนไซม์นี้มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28000 ดาลตัน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE ดังนั้นจึงคาดว่าถ้าเซลล์เจ้าบ้านรับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีไซแลเนสยีนเข้าไปและสามารถถอดรหัสให้ไซแลเนสได้ ก็ควรจะมีความเข้ม

รูปที่ 24 ผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2 และ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III และ *Xba*I โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับ λDNA/*Hind*III



ช่องที่ 1 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2

2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2 ตัดด้วย *Hind*III

3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2 ตัดด้วย *Xba*I

4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4

5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4 ตัดด้วย *Hind*III

6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4 ตัดด้วย *Xba*I

7 λDNA/*Hind*III (กิโลเบส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ของโปรตีนที่ประมาณ 28000 ดาลตัน แตกต่างจากเซลล์เจ้าบ้านที่ไม่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยการนำน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดแยกจากเซลล์ที่เตรียมได้จากบทที่ 2 ข้อ 17 ไปทำ SDS-PAGE ตามวิธีจากบทที่ 2 ข้อ 18

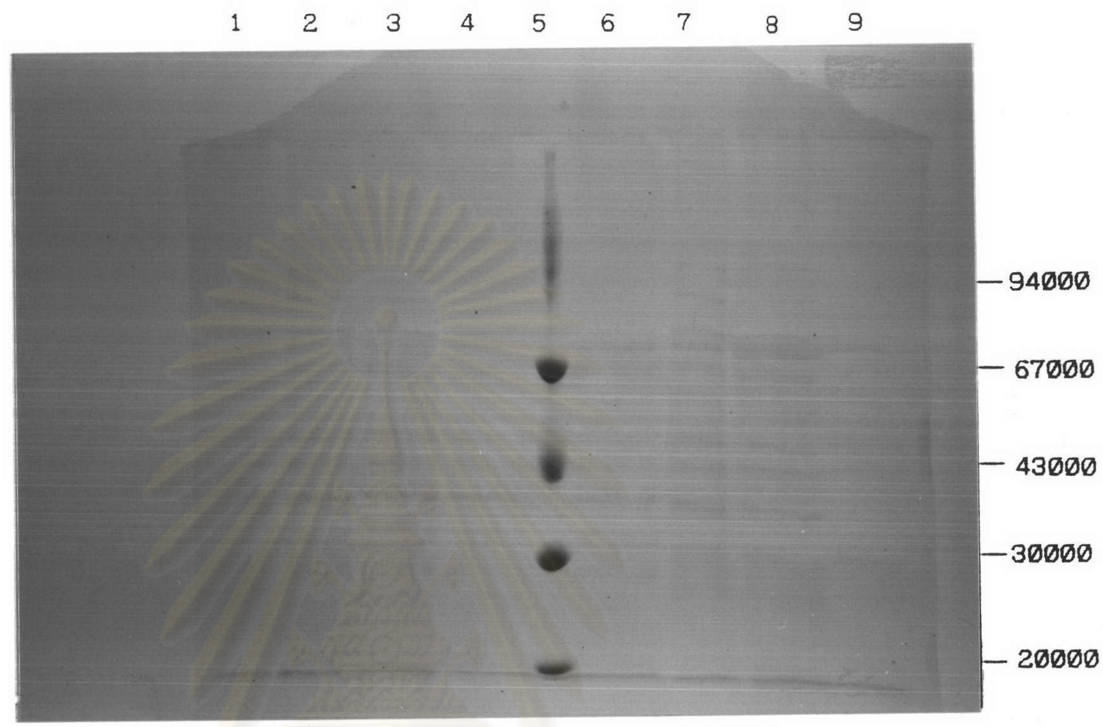
เมื่อนำสารละลายโปรตีนมาตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE พบว่าโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากภายในเซลล์ ดังรูปที่ 25 และ 26 ตามลำดับ

จากรูปที่ 26 ซึ่งเป็นผลแสดงรูปแบบของโปรตีนจากสารสกัดจากเซลล์ เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะปกติ ที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่ารูปแบบของโปรตีนจาก *E. coli* ทั้งที่มีและไม่มีพลาสมิดมีรูปแบบไม่แตกต่างกัน และ เนื่องจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากการใช้พลาสมิด pUC19 เป็นพาหะ ซึ่งได้แก่ p19C-1 p19C-2 และ p19C-3 นั้น ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน *lacZ* ดังกล่าวในบทที่ 1 ซึ่งสามารถถูกเหนี่ยวนำได้ด้วย IPTG ดังนั้นจึงได้ทดลองเติม IPTG ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะนำมาตรวจสอบรูปแบบของโปรตีน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดแยกจากเซลล์ของ *E. coli* DS941 และ *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเหล่านี้มาวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 27 ซึ่งไม่พบว่ามีแถบของโปรตีนใดที่มีความเด่นชัดขึ้น

และเนื่องจากที่พลาสมิด pGP1-2 ซึ่งใช้ในการทรานสฟอร์ม *E. coli* DS941 ร่วมกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี pT7-7 เป็นพลาสมิดพาหะนั้น มียีนที่สร้างเอนไซม์ RNA polymerase (ซึ่งจะไปจับกับโปรโมเตอร์ ϕ10 บน T7-7)ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของยีน cI857 และสามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์นี้ได้เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 42 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงได้ทดลองเพิ่มอุณหภูมิเป็น 42 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำสารละลายภายนอกและภายในเซลล์ของ *E. coli* DS941 และ *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-1 และ p7C-3 มาทำ SDS-PAGE ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 28

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีน ที่ได้จากเซลล์ซึ่งเลี้ยงในสภาพต่างๆ กันในรูปที่ 26 27 และ 28 พบว่ามีรูปแบบของโปรตีนไม่แตกต่างกัน ซึ่งช่วยยืนยันได้ว่าทรานสฟอร์แมนท์เหล่านี้ไม่มีการแสดงออกของไซแลเนส

<u>รูปที่ 25</u> รูปแบบโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DS941 และทรานสฟอร์แมนท์เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน



ช่องที่ 1 โปรตีนจาก *E. coli* DS941

2 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีพลาสมิด pUC19

3 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1

4 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2

5 โปรตีนมาตรฐาน (ดาลตัน)

6 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-3

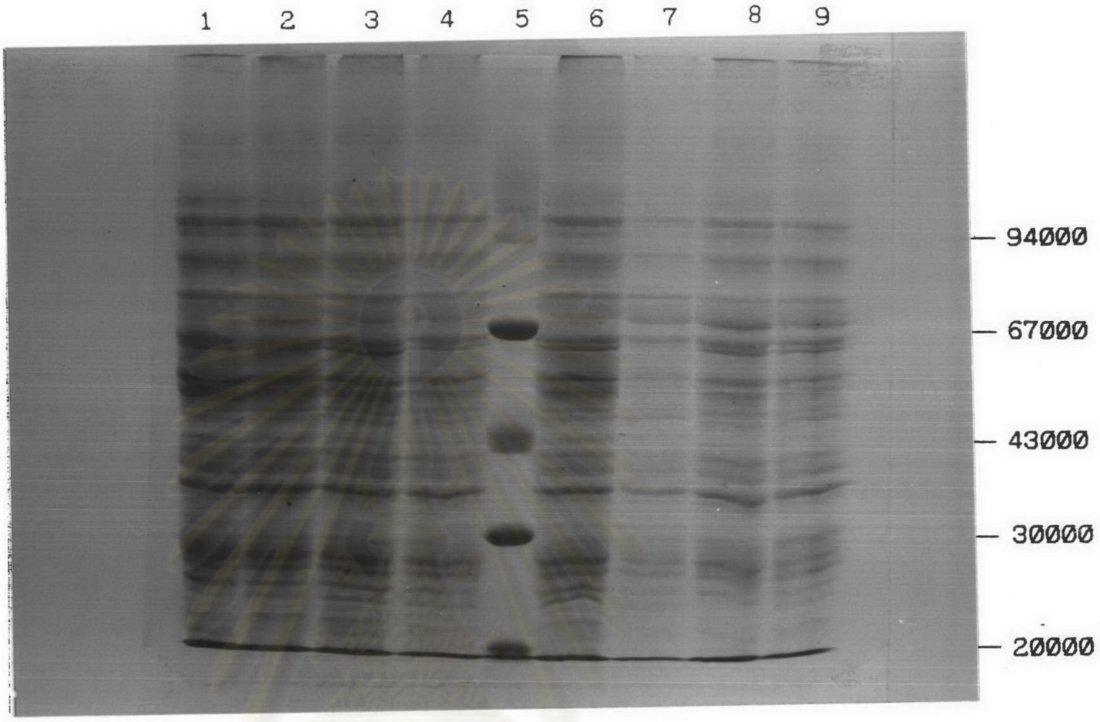
7 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีพลาสมิด pT7-7+pGP1-2

8 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลวสมิด p7C-3

9 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-1

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 26 รูปแบบโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากสารสกัดแยกจากเซลล์ของ *E. coli* DS941 และทรานสฟอร์แมนท์เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน



ช่องที่ 1 โปรตีนจาก *E. coli* DS941

2 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีพลาสมิด pUC19

3 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1

4 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2

5 โปรตีนมาตรฐาน (ดาลตัน)

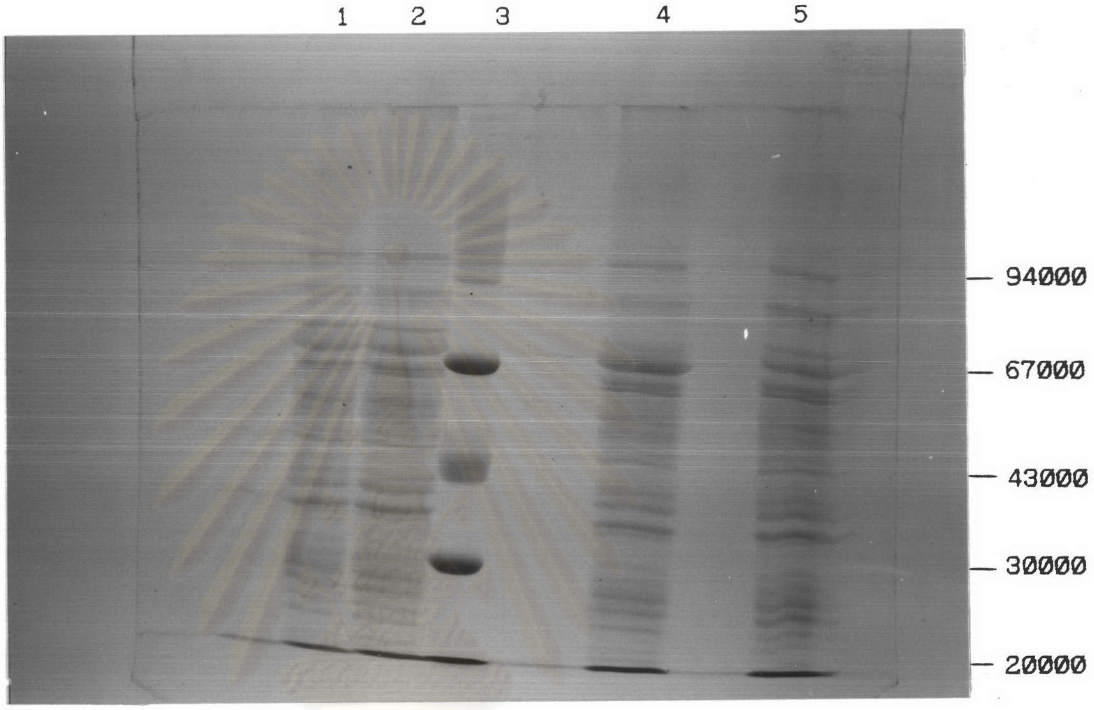
6 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-3

7 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีพลาสมิด pT7-7+pGP1-2

8 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3

9 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-1

<u>รูปที่ 27</u> รูปแบบโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากสารสกัดจากเซลล์ของ *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1 p19C-2 หรือ p19C-3 เมื่อเติม IPTG ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน



ช่องที่ 1 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีพลาสมิด pUC19

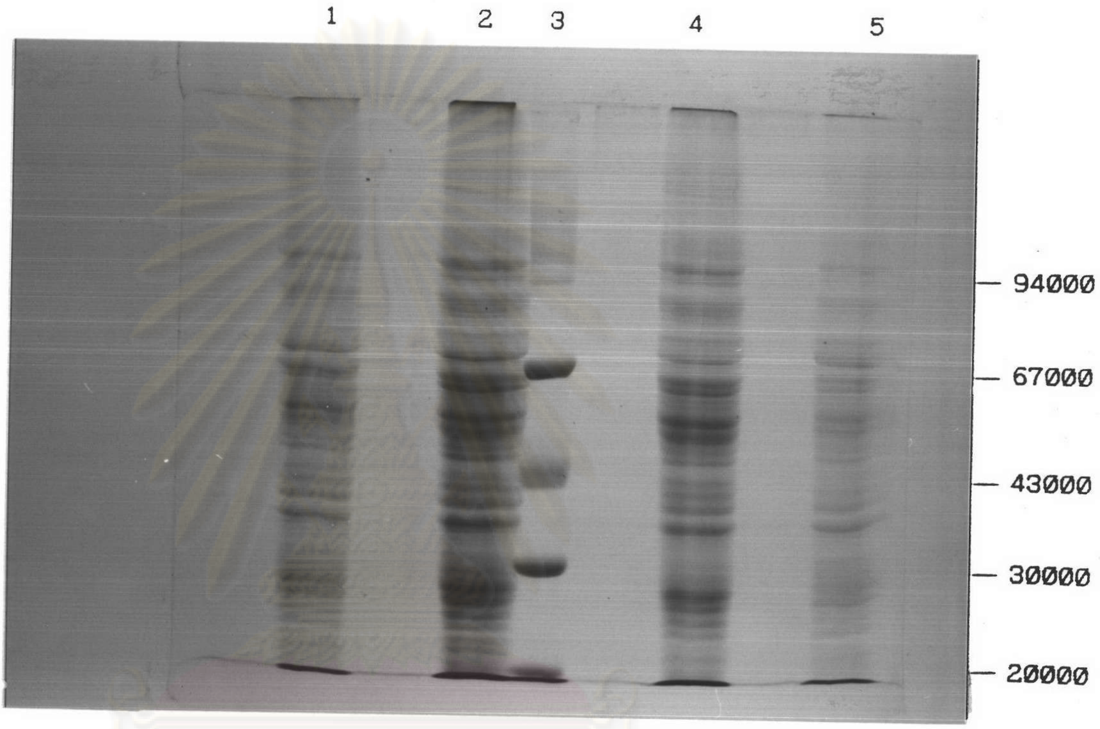
2 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1

3 โปรตีนมาตรฐาน (ดาลตัน)

4 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2

5 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-3

<u>รูปที่</u> <u>28</u> รูปแบบโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากสารสกัดจากเซลล์ของ *E. coli* DS941 ที่มีพลาสมิด pT7-7+pGP1-2 และ *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-1 หรือ p7C-3 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเป็น 42 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน



ช่องที่ 1 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีพลาสมิด pT7-7 + pGP1-2 (37 องศาเซลเซียส)

2 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีพลาสมิด pT7-7 + pGP1-2 (42 องศาเซลเซียส)

3 โปรตีนมาตรฐาน (ดาลตัน)

4 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3 (42 องศาเซลเซียส)

5 โปรตีนจาก *E. coli* DS941 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-1 (42 องศาเซลเซียส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย