# บทที่ 3

## ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces* sp. 190-1 โดยมีเซลล์เจ้าบ้านเป็น *Streptomyces* เช่นกัน และมีพลาสมิด pIJ4090 ซึ่งเป็นพลาสมิดในระบบ *Streptomyces* เป็นพลาสมิดพาหะ

### 1. การหาแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสในเซลล์เจ้าบ้าน

ในการที่จะโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสนั้น เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมไม่ควรมีเอนไซม์นี้ หรือมีในปริมาณที่ต่ำมาก ดังนั้น จึงได้นำ *Streptomyces* ที่จะใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการทดลองนี้ มาตรวจสอบระดับแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. 190-1 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9.2 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า *Streptomyces* sp. 190-1 มีระดับกลูโคสไอโซเมอเรสเท่ากับ 1.62 หน่วย/มก.โปรตีน *Streptomyces* sp. Y1 มีระดับของเอนไซม์เท่ากับ 0.78 หน่วย/มก.โปรตีน ส่วน *Streptomyces lividans* TK21 มีระดับของเอนไซม์เท่ากับ 0.65 หน่วย/มก.โปรตีน ดังนั้นจึงเลือก *Streptomyces lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp.Y1 เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส จาก *Streptomyces* sp.190-1

### 2. การสร้างและรีเจนเนอเรตโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21 *Streptomyces* sp.Y1 และ *Streptomyces* sp.190-1

ผลการสร้างและรีเจนเนอเรตโปรโตพลาสท์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 5.1 และ 5.2 ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21 สามารถรีเจนเนอเรตได้ $1.15 \times 10^7$ โปรโตพลาสท์/มล. คิดเป็น 0.53% เมื่อเทียบกับโปรโตพลาสท์ที่นับได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ *Streptomyces* sp.Y1 สามารถรีเจนเนอเรตได้ $3.90 \times 10^6$ โปรโตพลาสท์/มล. คิดเป็น 0.20% เมื่อเทียบกับ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบระดับของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของเซลล์เจ้าบ้าน โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวัดแอคติวิตี (ภาคผนวก ก.3) เขย่าแบบ reciprocal อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที

| สายพันธุ์ | แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (หน่วย/มก.โปรตีน) |
|---|---|
| *Streptomyces* sp.190-1 | 1.62 |
| *Streptomyces* sp.Y1 | 0.78 |
| S. *lividans* TK21 | 0.65 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ผลการสร้างและรีเจนเนอเรตโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21 *Streptomyces* sp.Y1 และ *Streptomyces* sp. 190-1

| สายพันธุ์ | โปรโตพลาสท์/มล. | รีเจนเนอเรชันของโปรโตพลาสท์/มล. | %รีเจนเนอเรชัน |
|---|---|---|---|
| S. *lividans* TK21 | $2.18 \times 10^{9}$ | $1.15 \times 10^{7}$ | 0.53 |
| *Streptomyces* sp.Y1 | $1.92 \times 10^{9}$ | $3.90 \times 10^{6}$ | 0.20 |
| *Streptomyces* sp. 190-1 | $5.24 \times 10^{8}$ | $3.92 \times 10^{5}$ | 0.08 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โปรโตพลาสท์ที่นับได้จากกล้องจุลทรรศน์ และโปรโตพลาสท์ของ Streptomyces sp. 190-1 รีเจนเนอเรตได้ $3.92 \times 10^5$ โปรโตพลาสท์/มล. เทียบเท่ากับ 0.08% ของโปรโตพลาสท์ที่นับได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งประสิทธิภาพด้อยกว่า S. *lividans* TK21 ประมาณ 7 เท่า และด้อยกว่า Streptomyces sp.Y1 ประมาณ 2.5 เท่า

3. **ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม Streptomyces *lividans* TK21 และ Streptomyces sp.Y1 ด้วยพลาสมิดพาหะ pIJ4090**

ได้ตรวจสอบประสิทธิภานในการทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ4090 เข้าสู่ Streptomyces *lividans* TK21 และ Streptomyces sp.Y1 ภายใต้สภาวะที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.4 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 พบว่า S. *lividans* TK21 และ Streptomyces sp.Y1 ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเท่ากับ $1.30 \times 10^5$ และ $1.20 \times 10^5$ ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมของพลาสมิด pIJ4090 ตามลำดับ ซึ่งจัดว่ามีประสิทธิภาพสูงเพียงพอที่จะใช้เป็นระบบสำหรับการโคลนยีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ4090 ที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ของ *Streptomyces lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp. Y1

| สายพันธุ์ | จำนวนทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ |
|---|---|
| S. *lividans* TK21 | $1.30 \times 10^5$ |
| *Streptomyces* sp. Y1 | $1.20 \times 10^5$ |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp.190-1 เข้าสู่ *S. lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp. Y1

4.1 การเตรียมชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอขนาด 2-8 กิโลเบส ของ *Streptomyces* sp.190-1

จากรายงานการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสใน *Streptomyces violaceoniger* โดย Marcel และคณะ (1987) พบว่ายีนกลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ในชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2.1 กิโลเบส และเมื่อ Tiraby และคณะ (1988) นำไปหาลำดับเบส ปรากฏว่ามีขนาด 1167 นิวคลีโอไทด์ Wong และคณะ (1991) ทดลองโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces rubiginosus* และหาลำดับเบสของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสพบว่ามีขนาด 1167 นิวคลีโอไทด์ เช่นกัน

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงจะเลือกช่วงขนาดของชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp.190-1 หลังจากตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Mbo*I ขนาด 2-8 กิโลเบสซึ่งคาดว่าจะครอบคลุมยีนกลูโคสไอโซเมอเรสทั้งหมด นำมาเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pIJ4090

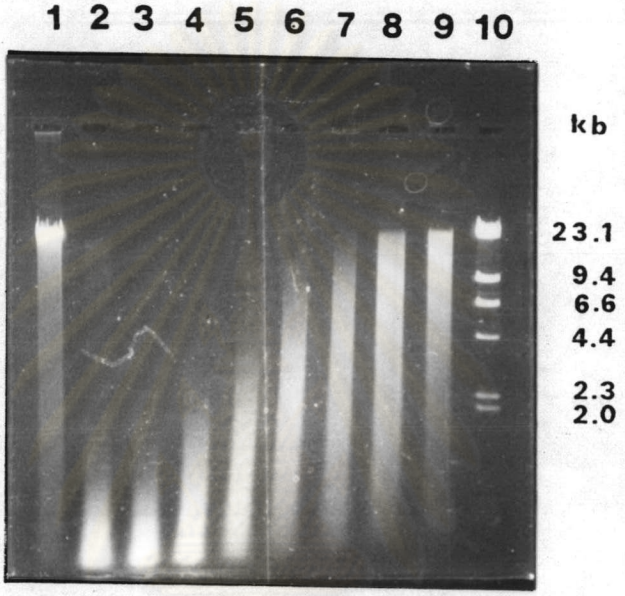
ผลการย่อยโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. 190-1 แบบกึ่งสมบูรณ์ด้วย *Mbo*I ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 8.1แสดงในรูปที่ 4 พบว่าช่องที่ 8 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างความเข้มข้นของดีเอนเอและเอนไซม์ คือ ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.046875 หน่วย เป็นการย่อยที่ให้ชิ้นส่วนขนาด 2-8 กิโลเบสได้สูงสุด

จากผลการทดลองดังกล่าวนี้จะนำอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และดีเอ็นเอที่เหมาะสมนี้ไปขยายส่วนเพื่อเตรียมชิ้นส่วนขนาด 2-8 กิโลเบสปริมาณมากต่อไป

4.2 การตัดพลาสมิดพาหะ pIJ4090

นำพลาสมิด pIJ4090 มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI ดังรูปที่ 5 ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 8.2 หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายด้วย Calf Intestine Alkaline phosphatase(CIAP) มาทดสอบการเชื่อมตัวเองด้วยเอนไซม์ $T_4$ DNA ligase พบว่าไม่สามารถเชื่อมตัวเองได้ ตามรูปที่ 6 ช่องที่ 5 โดยพลาสมิดยังคงอยู่ในรูปเส้น (linear form)

รูปที่ 4 ผลการย่อยโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp.190-1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Mbo*I แบบกึ่งสมบูรณ์ (Partial Digestion)




ช่องที่ 1 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp.190-1

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 3 หน่วย

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 1.5 หน่วย

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.75 หน่วย

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.375 หน่วย

6 โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.1875 หน่วย

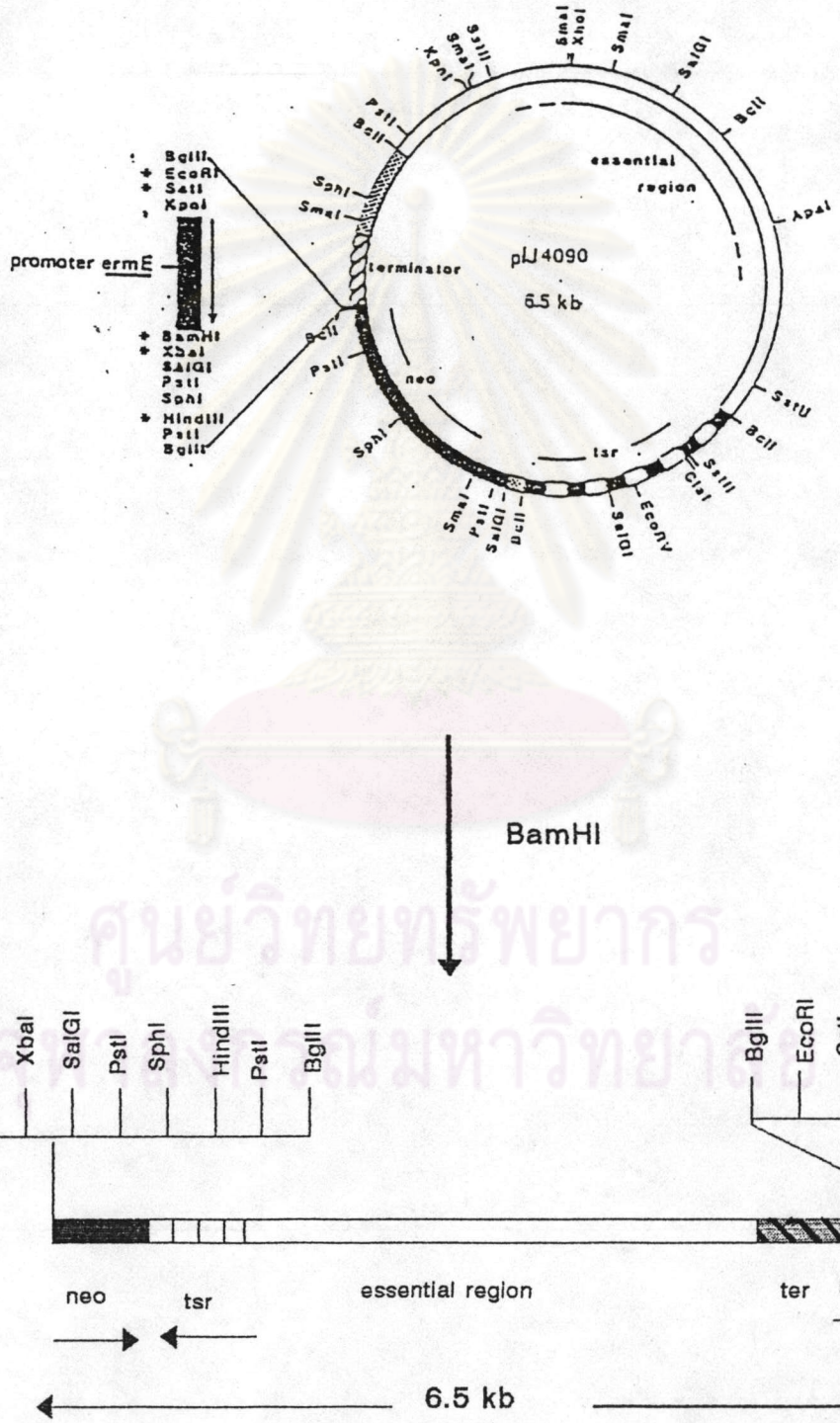
7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.09375 หน่วย

8 โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.046875 หน่วย

9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.0234375 หน่วย

10 λDNA/*Hin*dIII

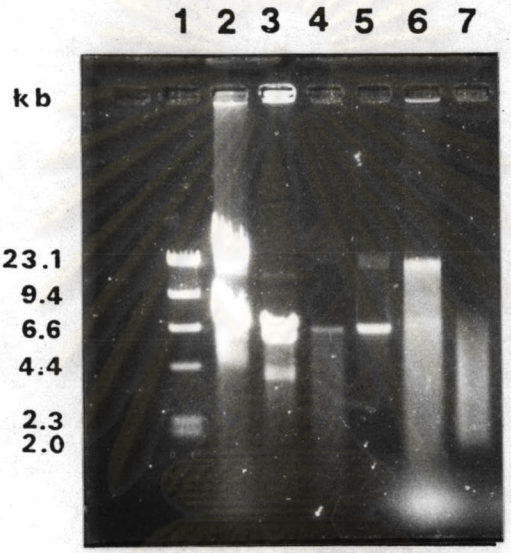
รูปที่ 5 แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิด pIJ4090 เมื่อตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI




ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I13139910

รูปที่ 6 ภาพแสดงการตัดพลาสมิด pIJ4090 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI แล้วทดสอบการเชื่อมกันด้วยตัวเอง (self ligation) หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตและแสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมด้วย $T_4$ DNA ligase บนอะกาโรสเจล




ช่องที่ 1. λDNA/*Hin*dIII

2. การเชื่อมตัวเองของพลาสมิด pIJ4090 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI แต่ไม่ได้กำจัดหมู่ฟอสเฟต
3. พลาสมิด pIJ4090
4. พลาสมิด pIJ4090 ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และถูกกำจัดหมู่ฟอสเฟตด้วย CIAP
5. พลาสมิด pIJ4090 จากช่องที่ 4 เชื่อมตัวเองด้วยเอนไซม์ $T_4$ DNA ligase
6. รีคอมบิแนนท์พลาสมิด
7. ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp.190-1 ขนาด 2-8 กิโลเบส

4.3 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

เมื่อเชื่อมชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอขนาด 2-8 กิโลเบส เข้ากับพลาสมิดพาหะ pIJ4090 ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 8.3 พบว่าได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดอยู่ในช่วงขนาดประมาณ 4-20 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 6 ช่องที่ 6 และยังคงเหลือชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเออิสระที่เล็กกว่า 6.5 กิโลเบส

5. การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ S. *lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp.Y1

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ4090 เข้าสู่ S. *lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp.Y1 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4 พบว่า S. *lividans* TK21 มีประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเท่ากับ $1.30 \times 10^5$ ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ แต่เมื่อทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 4.3 ปรากฏว่า ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มลดลงเหลือ $5.86 \times 10^2$ ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ หรือ ลดลง 220 เท่า ส่วน *Streptomyces* sp.Y1 มีประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะเท่ากับ $1.20 \times 10^5$ และมีประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเท่ากับ $6.04 \times 10^2$ ลดลงประมาณ 198 เท่า

6. การทำโคโลนีไฮบริไดเซชัน

ในการตรวจหาทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนกลูโคสไอโซเมอเรส จะใช้วิธีโคโลนีไฮบริไดเซชัน โดยการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่เหมาะสม

6.1 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอติดตามด้วยวิธี PCR

ดีเอ็นเอติดตามสร้างขึ้นจากการนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. 190-1 มาเป็นแม่แบบ โดยมีไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่สร้างขึ้นโดยความเอื้อเฟื้อของ Dr. Iain S. Hunter จาก University of Glasgow, Scotland คือ 24-mer ที่สร้างจากลำดับกรดอะมิโนด้าน N-terminal ของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส จาก *Streptomyces* sp. 190-1 ซึ่งประกอบด้วย Thr Pro Glu Asp Arg Phe Thr Phe หรือ TPEDRFTF (Pinphanichkarn,

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ4090 ที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ เทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่โปรโตพลาสท์ของ S. *lividans* TK21 และ Streptomyces sp.Y1

| เซลล์เจ้าบ้าน | ชนิดของพลาสมิด | จำนวนทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ |
|---|---|---|
| S. *lividans* TK21 | pIJ4090 | $1.30 \times 10^5$ |
| | รีคอมบิแนนท์พลาสมิด | $5.86 \times 10^2$ |
| Streptomyces sp.Y1 | pIJ4090 | $1.20 \times 10^5$ |
| | รีคอมบิแนนท์พลาสมิด | $6.04 \times 10^2$ |

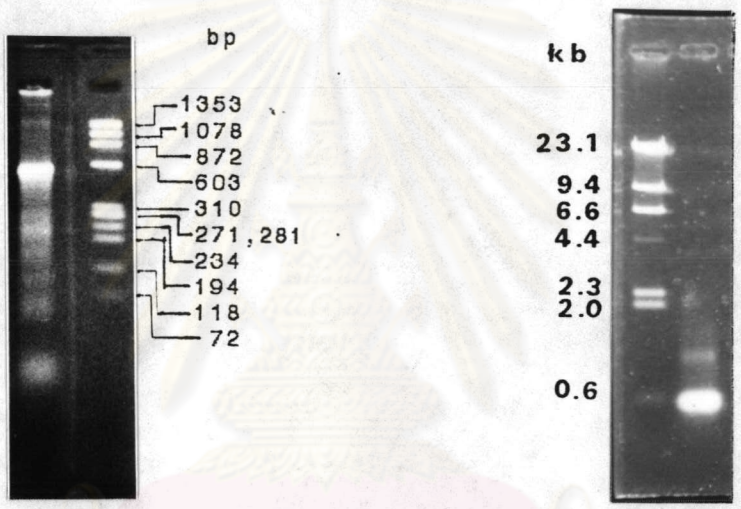
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1991) และ 23-mer ที่ได้จากกรดอะมิโนตำแหน่ง 181-187 ซึ่งเป็น conserved sequence ของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์หลายชนิด โดย Wong และคณะ (1991) ได้นำลำดับกรดอะมิโนของกลูโคสไอโซเมอเรสมาเปรียบเทียบกัน สำหรับ *Streptomyces* spp. พบว่า conserved sequence ประกอบด้วย Glu Pro Lys Pro Asn Glu Pro Arg หรือ EPKPNEPR การสังเคราะห์ดีเอ็นเอติดตามกระทำดังวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 9.1.2 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการสังเคราะห์ได้นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบขนาด โดยการทำนูซีฟอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสเทียบกับ ϕx174/*Hae*III ดังรูปที่ 7a พบว่า ดีเอ็นเอติดตามที่สังเคราะห์ได้มีชิ้นส่วนหลักขนาดประมาณ 550 นิวคลีโอไทด์ และมีชิ้นส่วนย่อยๆ ขนาดต่างๆ อีกมาก จึงนำชิ้นส่วนขนาดประมาณ 550 นิวคลีโอไทด์ มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ชุด GENECLEAN และผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในรูปที่ 7b พบว่า ดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

6.2 <u>การทำไฮบริไดเซชัน</u>

เมื่อนำแผ่นเมมเบรนที่ได้รับการตรึงดีเอ็นเอตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 9.1.1 มาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 9.1.4 ผลปรากฏดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งพบว่า *Streptomyces* sp. 190-1 *Streptomyces* เจ้าบ้านชนิดต่างๆที่นำมาทดสอบ และทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามโดยไม่สามารถแยกความแตกต่างของสัญญาณได้ แสดงว่าดีเอ็นเอติดตามนี้ไม่เหมาะที่จะใช้คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีเซลล์เจ้าบ้านเป็น *Streptomyces lividans* TK21 หรือ *Streptomyces* sp.Y1 ดังนั้น การคัดเลือกโคลนที่ได้รับยีนกลูโคสไอโซเมอเรสโดยวิธีโคโลนีไฮบริไดเซชัน ไม่สามารถกระทำได้ในงานวิจัยนี้ เนื่องจากไม่มีเซลล์เจ้าบ้าน *Streptomyces* ที่เหมาะสม

รูปที่ 7 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอติดตามโดยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

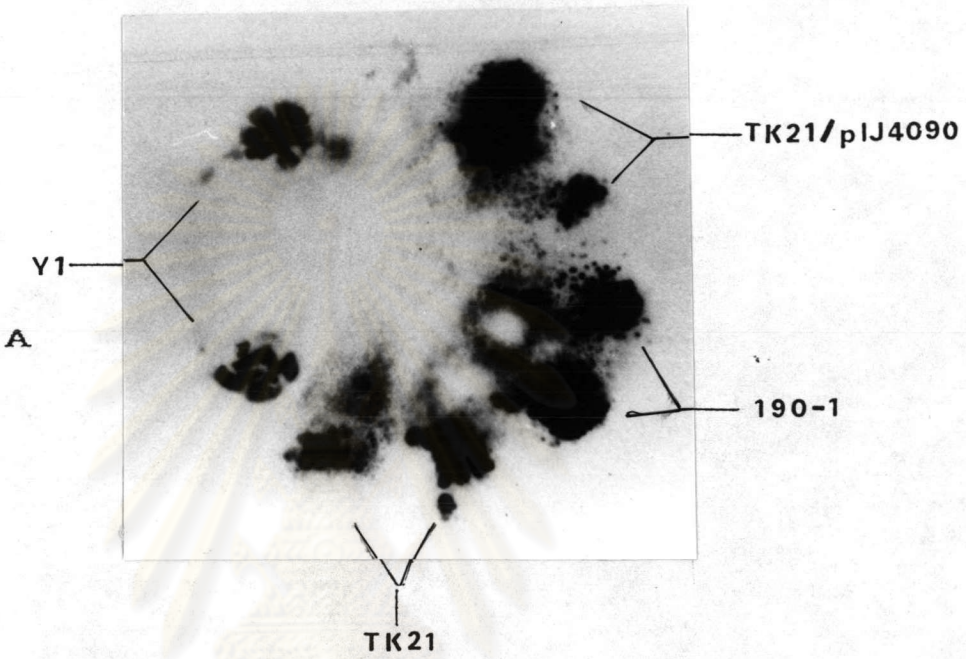



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A: ดีเอ็นเอติดตามที่ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นเทียบกับ ϕx174/*Hae*III บน 4% นูซีฟอะกาโรส

B: ดีเอ็นเอติดตามที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยชุด GENECLEAN เทียบกับ λ/*Hin*dIII บน 0.7% อะกาโรส

รูปที่ 8 การทำโคโลนีไฮบริไดเซชันของ *Streptomyces* sp.190-1 เซลล์เจ้าบ้านชนิดต่างๆ และทรานสฟอร์แมนท์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างได้



A: ไฮบริไดซ์กับ *Streptomyces* sp.190-1 และเซลล์เจ้าบ้านชนิดต่าง ๆ

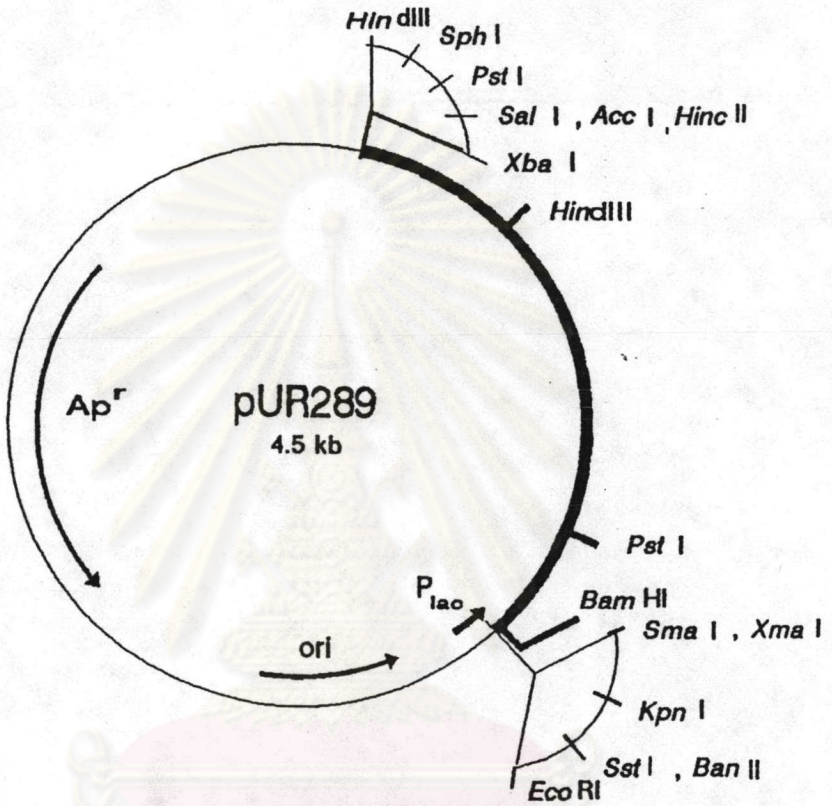
B: ไฮบริไดซ์กับทรานสฟอร์แมนท์

7. <u>การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้มีชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส</u>

จากผลงานวิจัยข้างต้นในการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp.190-1 โดยใช้เซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces* และพลาสมิดพาหะสำหรับ *Streptomyces* นั้น พบว่าไม่สามารถหาวิธีที่เหมาะสมในการคัดเลือกโคลนที่รับยีนกลูโคสไอโซเมอเรสเข้าไปได้ ทั้งนี้เพราะดีเอ็นเอติดตามที่ใช้ในการทำโคโลนีไฮบริไดเซชันไม่แสดงความจำเพาะ และเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสเป็นเอนไซม์ที่สร้างและเก็บอยู่ภายในเซลล์ การตรวจหาโคลนที่ได้รับยีนกลูโคสไอโซเมอเรสโดยดูความแตกต่างของทรานสฟอร์แมนท์บนอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่สามารถกระทำได้ ดังนั้นจึงได้นำยีนกลูโคสไอโซเมอเรสซึ่งอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUR289 (รูปที่ 9) ที่ประสบความสำเร็จจากการโคลนโดยมี *Escherichia coli* HB101 เป็นเซลล์เจ้าบ้านและ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะ (รัชนี ไลยประจง, 2537) มาโคลนย่อยเข้าสู่ *Streptomyces* โดยใช้พลาสมิดที่เหมาะสม สำหรับเซลล์เจ้าบ้านนั้นจะใช้ทั้ง *Streptomyces* sp. 190-1 และ *Streptomyces lividans* TK21 ส่วน *Streptomyces* sp.Y1 นั้นจะไม่นำมาใช้ เนื่องจากในการทดลองที่ผ่านมาไม่ประสบความสำเร็จในการสกัดพลาสมิดที่เซลล์เจ้าบ้านชนิดนี้รับเข้าไป ซึ่งจะเป็นปัญหาในการศึกษาขั้นต่อไป

พลาสมิด pUR289 มีขนาดประมาณ 4.5 กิโลเบส ประกอบด้วยชิ้นส่วนพลาสมิดพาหะ pUC18 ขนาด 2.7 กิโลเบส และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่รับเข้าไป (DNA insert) ขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส *Escherichia coli* HB101 เป็นมิวแทนของ *E. coli* K12 มีลักษณะเป็น $xyl^-$ คือ ขาดเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรสหรือที่เรียกว่ากลูโคสไอโซเมอเรส ทำให้ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ เมื่อเลี้ยงในอาหาร MacConkey ที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว จะได้โคโลนีสีขาว แต่เมื่อทรานสฟอร์ม pUR289 เข้าสู่ *E. coli* HB101 นำไปเลี้ยงในอาหาร MacConkey ที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว พบว่า ได้โคโลนีสีชมพู แสดงลักษณะเป็น $xyl^+$ แสดงว่าบน pUR289 มียีนกลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ งานวิจัยนี้ จึงได้นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก pUR289 มาเชื่อมกับพลาสมิด pIJ4090 แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces* โดยทำการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำมาจาก pUR289 เข้ากับพลาสมิด pIJ4090 ซึ่งทำได้ 2 วิธี คือ

รูปที่ 9 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUR289




ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

—— แทนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC18

▬▬ แทนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. 190-1

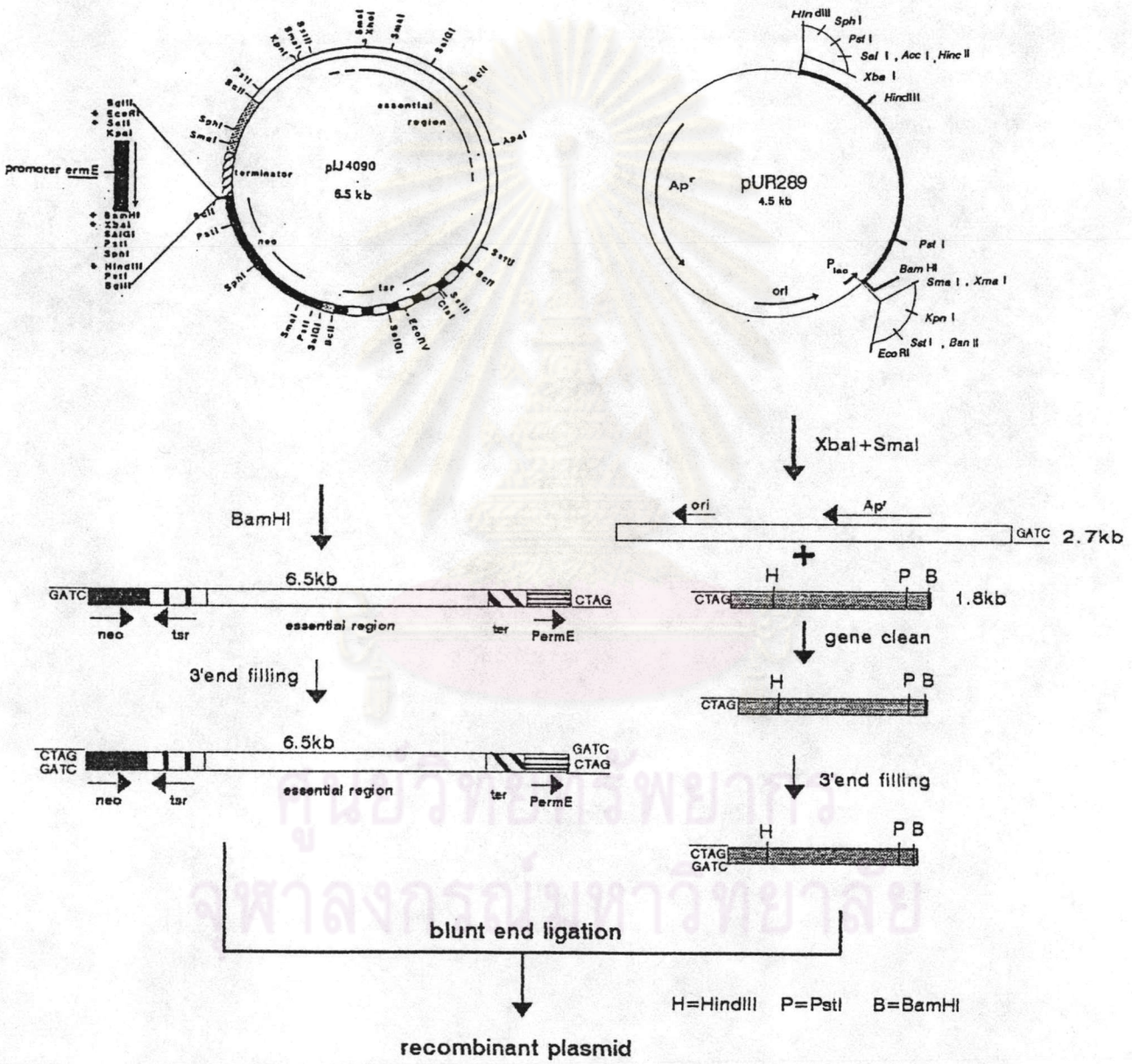
7.1 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการเชื่อมแบบปลายทู่ (blunt end)

การเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแบบปลายทู่ ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 10.1 ผลจากการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sma*I กับ *Xba*I ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส ปลายที่ตัดด้วย *Sma*I เป็นปลายทู่ ส่วนอีกข้างหนึ่งซึ่งตัดด้วย *Xba*I เป็นปลายเหนียว ผลการตัดพลาสมิด pIJ4090 ด้วย *Bam*HI ได้พลาสมิดรูปเส้นที่มีปลายเหนียวทั้งสองข้าง และเนื่องจากเป็นการตัดด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกัน ทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิดพาหะไม่สามารถเชื่อมกันโดยตรง จึงต้องทำให้ปลายทั้งสองเป็นปลายทู่เพื่อให้สามารถเชื่อมกันได้ (แผนภาพการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการเชื่อมแบบปลายทู่แสดงในรูปที่ 10) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 11 พบว่าช่องที่ 4 เป็นพลาสมิด pIJ4090 ที่ทดสอบการเชื่อมตัวเองภายหลังจากการทำปลายทู่และกำจัดหมู่ฟอสเฟต ปรากฏว่าไม่สามารถเชื่อมได้ ช่องที่ 5 เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ พบว่ามีหลายชิ้นที่มีขนาดใหญ่กว่า 6.5 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิดพาหะรูปเส้น ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจาก multiple insert แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีพลาสมิดพาหะเหลืออยู่บางส่วน

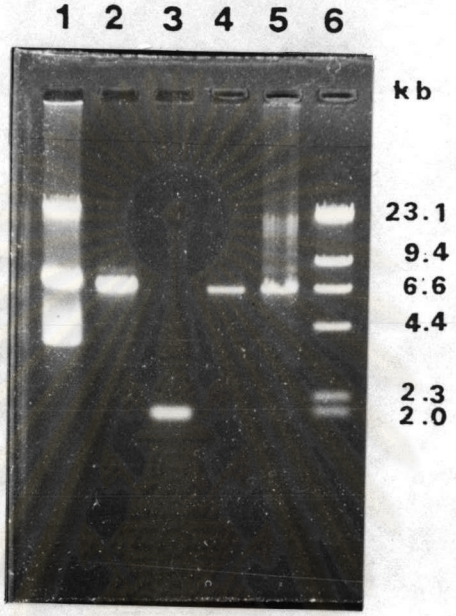
7.2 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการเชื่อมแบบปลายเหนียว (cohesive end)

การเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแบบปลายเหนียวตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 10.2 นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUR289 มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI กับ *Xba*I ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส และตัดพลาสมิดพาหะ pIJ4090 ด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน จึงสามารถเชื่อมกันได้โดยไม่ต้องดัดแปลงปลายทั้งสองของดีเอ็นเอ (แผนภาพการสร้างรีคอมบิแนนท์โดยการเชื่อมแบบปลายเหนียว แสดงในรูปที่ 12) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 13 ช่องที่ 5 เป็นพลาสมิด pIJ4090 ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ทดสอบการเชื่อมตัวเองหลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟต พบว่าไม่สามารถเชื่อมตัวเองได้ ช่องที่ 6 เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ ซึ่งทำนองเดียวกับผลการทดลองในข้อ 7.1 คือ พบว่ามีหลายชิ้นที่มีมีขนาดใหญ่กว่า 6.5 กิโลเบส อย่างไรก็ตามพบว่ายังคงมีพลาสมิดพาหะเหลืออยู่

รูปที่ 10 แผนภาพแสดงการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการเชื่อมแบบปลายทู่



รูปที่ 11 ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้มีชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส
โดยการเชื่อมแบบปลายทู่




ช่องที่ 1 พลาสมิด pIJ4090

2 พลาสมิด pIJ4090 ตัดด้วย *Bam*HI ผ่านการทำให้เป็นปลายทู่
และกำจัดหมู่ฟอสเฟต

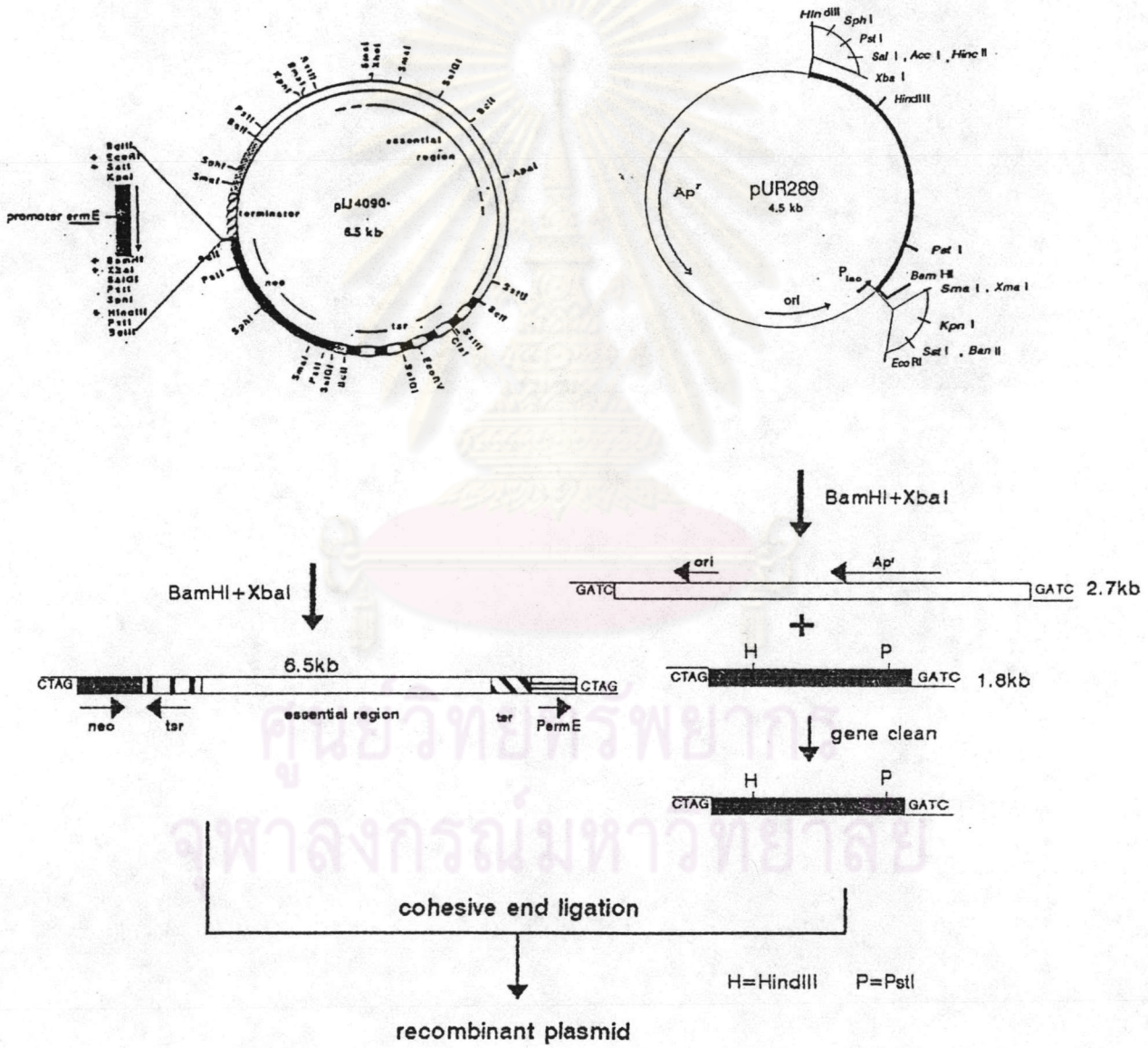
3 ชิ้นส่วน 1.8 กิโลเบส จากการตัด pUR289 ด้วย *Xba*I กับ *Sma*I
ผ่านการทำให้ปลายทู่

4 พลาสมิด pIJ4090 จากช่องที่ 2 เชื่อมตัวเองด้วยเอนไซม์ $T_4$ DNA ligase

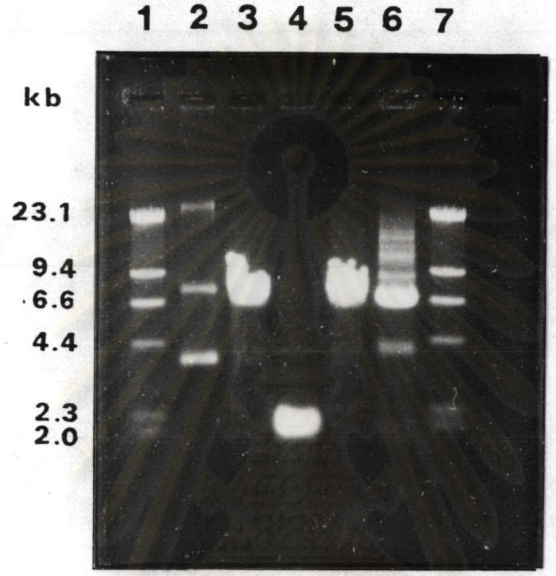
5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากเชื่อมดีเอ็นเอช่องที่ 2 และ 3

6 λDNA/*Hin*dIII

รูปที่ 12 แผนภาพแสดงการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการเชื่อมแบบปลายเหนียว



รูปที่ 13 ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้มีชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส
โดยการเชื่อมแบบปลายเหนียว




ช่องที่ 1 λDNA/*Hin*dIII

2 พลาสมิด pIJ4090

3 พลาสมิด pIJ4090 ตัดด้วย *Bam*HI และกำจัดหมู่ฟอสเฟต

4 ชิ้นส่วน 1.8 กิโลเบส จากการตัด pUR289 ด้วย *Xba*I กับ *Bam*HI

5 พลาสมิด pIJ4090 จากช่องที่ 3 เชื่อมตัวเองด้วยเอนไซม์ $T_4$ DNA ligase

6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากการเชื่อมดีเอ็นเอจากช่องที่ 3 และ 4

7 λDNA/*Hin*dIII

8. <u>การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสเข้าสู่ S. *lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp. 190-1</u>

เมื่อทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส จากการเชื่อมแบบปลายทู่ (7.1) และปลายเหนียว (7.2) เข้าสู่ S. *lividans* TK21 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 พบว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม pIJ4090 เข้าสู่ S. *lividans* TK21 ที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์มีค่าเท่ากับ $1.30 \times 10^{5}$ ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ แต่เมื่อทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมโดยวิธีเชื่อมปลายทู่หรือปลายเหนียว ปรากฏว่ามีประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มใกล้เคียงกันคือเพียงประมาณ $4.21 \times 10^{2}$ ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ซึ่งลดลงประมาณ 310 เท่า และเมื่อทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้ทั้ง 2 วิธี เข้าสู่ *Streptomyces* sp.190-1 ก็ได้ประสิทธิภาพใกล้เคียงกันคือประมาณ 20 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามเนื่องจากขั้นตอนนี้เป็นการโคลนย่อย แม้ประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มจะค่อนข้างต่ำ แต่ก็จะไม่เป็นปัญหาใหญ่ต่อผลการทดลอง

9. <u>ผลการหาแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสในทรานสฟอร์แมนท์โดยเลือกแบบสุ่ม</u>

จากการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ S. *lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp.190-1 ได้ทรานสฟอร์แมนท์หลายโคลน จึงสุ่มมาตรวจหาแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส ได้ผลดังตารางที่ 6 พบว่า *Streptomyces* sp.190-1 มีแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1.62 หน่วย/มก.โปรตีน และมีทรานสฟอร์แมนท์เพียง 1 โคลน คือ โคลน 19SL1 ได้จากการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมแบบปลายเหนียวเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces* sp.190-1 มีแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 2.15 หน่วย/มก.โปรตีน ซึ่งเพิ่มขึ้นจาก *Streptomyces* sp. 190-1 ประมาณ 25% ส่วนทรานสฟอร์แมนท์อื่นๆมีค่าแอคติวิตีจำเพาะไม่ต่างจากเซลล์เจ้าบ้านเดิมมากนัก

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ4090 ที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ เทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เชื่อมแบบปลายทู่หรือปลายเหนียวเข้าสู่โปรโตพลาสท์ของ Streptomyces *lividans* TK21 และ Streptomyces sp.190-1

| เซลล์เจ้าบ้าน | ชนิดของพลาสมิด | จำนวน ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัม ดีเอ็นเอ |
|---|---|---|
| S. *lividans* TK21 | pIJ4090 | $1.30 \times 10^{5}$ |
| | รีคอมบิแนนท์พลาสมิด | $4.21 \times 10^{2}$ |
| Streptomyces sp. 190-1 | รีคอมบิแนนท์พลาสมิด | 20 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสจากโคลนที่สุ่มได้ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวัดแอคติวิตี (ภาคผนวก ก.3) โดยเขย่าแบบ reciprocal อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที

| สายพันธุ์ | แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (หน่วย/มก.โปรตีน) |
|---|---|
| *Streptomyces* sp.190-1 | 1.62 |
| 19SL1 | 2.15 |
| 19SL2 | 1.11 |
| 19SL3 | 0.82 |
| 19SL4 | 1.49 |
| 19SL5 | 1.45 |
| 19SL6 | 1.38 |
| *S. lividans* TK21 | 0.65 |
| TK21/pIJ4090 | 0.76 |
| 13-6 | 0.73 |
| 27-2 | 0.77 |
| 27-3 | 0.66 |
| 27-4 | 0.70 |
| 27-6 | 0.54 |
| 27-8 | 0.56 |
| 27-14 | 0.68 |
| 27-15 | 0.75 |
| 27-19 | 0.51 |
| 27-24 | 0.78 |

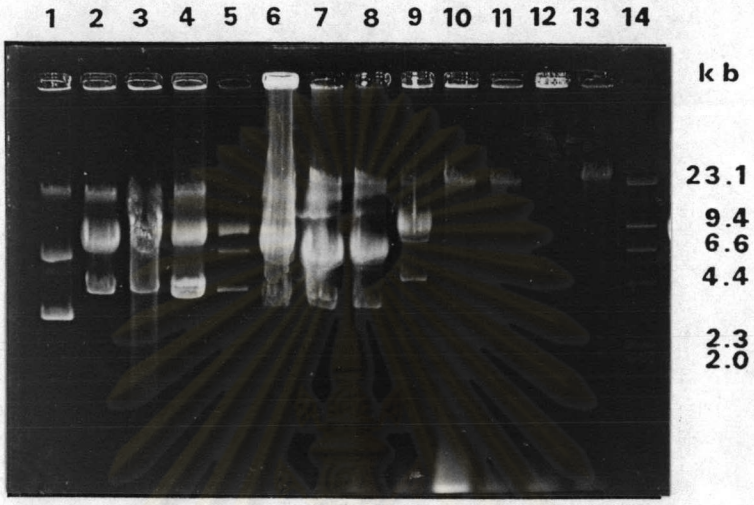
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. ผลการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากทรานสฟอร์แมนท์

ผลการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากทรานสฟอร์แมนท์บางตัวที่สุ่มมา แสดงดังรูปที่ 14 พบว่า มีหลายโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะเดิม และบางโคลนก็พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดขนาดไม่ต่างจากพลาสมิดเดิมถึง 1.8 กิโลเบส

สำหรับโคลน 19SL1 เมื่อนำมาสกัดพลาสมิดเพื่อดูขนาดของพลาสมิด ดังผลการทดลองแสดงในรูปที่ 15 ปรากฏว่า โคลน 19SL1 มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดต่างไปจากพลาสมิดพาหะเดิม คือ ให้แถบดีเอ็นเอถึง 4 แถบ โดยกำหนดให้เป็นแถบ A B C และ D ในการทดลองต่อไปจึงได้แยกแถบดีเอ็นเอออกจากกันด้วยชุด GENECLEAN แล้วนำไปตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI ผลการทดลองดังรูปที่ 16 พบว่า แถบ A (รูปที่ 16 ช่องที่ 3) เมื่อผ่านการแยกด้วยชุด GENECLEAN ปรากฏ 2 แถบ โดยแถบล่างขนาดประมาณ 8.5 กิโลเบส มีปริมาณต่ำกว่า แต่เมื่อตัดด้วย *Eco*RI (รูปที่ 16 ช่องที่ 4) พบว่า แถบล่างมีปริมาณเพิ่มขึ้น จึงคาดว่าเป็นรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับพลาสมิดพาหะเชื่อมกับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.8 กิโลเบส โดยคาดว่าแถบบนซึ่งตรงกับตำแหน่ง 9.4 กิโลเบส คือ พลาสมิดรูปวงแหวนเปิด (open circular) และแถบล่าง (ตรง 8.5 กิโลเบส) คือพลาสมิดรูปเส้น (linear form) สำหรับแถบ B เมื่อผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย GENECLEAN ปรากฏเป็น 3 แถบ (รูปที่ 16 ช่องที่ 5) และเมื่อนำมาตัดด้วย *Eco*RI (รูปที่ 16 ช่องที่ 6) พบว่า แถบล่างสุดซึ่งตรงกับตำแหน่ง 4.7 กิโลเบส มีปริมาณลดลงโดยปรากฏสองแถบบนเพิ่มขึ้น คือขนาด 8.5 และ 9.4 กิโลเบส จึงคาดว่าแถบล่างสุด คือ พลาสมิดรูปวงแหวนปิด (ccc form) และแถบกลางคือพลาสมิดรูปเส้น ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นส่วนของพลาสมิดพาหะเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.8 กิโลเบส ดังนั้นจึงคาดว่าแถบ A และ B คือพลาสมิดชุดเดียวกัน สำหรับแถบ C ที่ตำแหน่ง 3.7 กิโลเบส พบว่าไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อตัดด้วย *Eco*RI (รูปที่ 16 ช่องที่ 7 และ 8) ส่วนแถบ D ปรากฏ 2 แถบหลังจากการผ่าน GENECLEAN (รูปที่ 16 ช่องที่ 9 และ 10) คือ ที่ตำแหน่ง 3.7 และ 2.2 กิโลเบส และเมื่อตัดด้วย *Eco*RI พบว่า แถบทั้งสองไม่เปลี่ยนแปลง จึงคาดว่า C และ D คือพลาสมิดชุดเดียวกัน โดย C คือพลาสมิดรูปวงแหวนเปิด และแถบ D คือพลาสมิดรูปวงแหวนปิด

รูปที่ 14 แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้จากทรานสฟอร์แมนท์ต่างๆ




ช่องที่ 1 พลาสมิด pIJ4090

2 พลาสมิดจากโคลน 19SL2 ที่มีเซลล์เจ้าบ้านคือ Streptomyces sp.190-1

3 พลาสมิดจากโคลน 19SL4 ที่มีเซลล์เจ้าบ้านคือ Streptomyces sp.190-1

4 พลาสมิดจากโคลน 19SL5 ที่มีเซลล์เจ้าบ้านคือ Streptomyces sp.190-1

5 พลาสมิดจากโคลน 19SL6 ที่มีเซลล์เจ้าบ้านคือ Streptomyces sp.190-1

6 พลาสมิดจากโคลน 13-2 ที่มีเซลล์เจ้าบ้านคือ S. *lividans* TK21

7 พลาสมิดจากโคลน 13-3 ที่มีเซลล์เจ้าบ้านคือ S. *lividans* TK21

8 พลาสมิดจากโคลน 13-4 ที่มีเซลล์เจ้าบ้านคือ S. *lividans* TK21

9 พลาสมิดจากโคลน 13-6 ที่มีเซลล์เจ้าบ้านคือ S. *lividans* TK21

10 พลาสมิดจากโคลน 27-10 ที่มีเซลล์เจ้าบ้านคือ S. *lividans* TK21

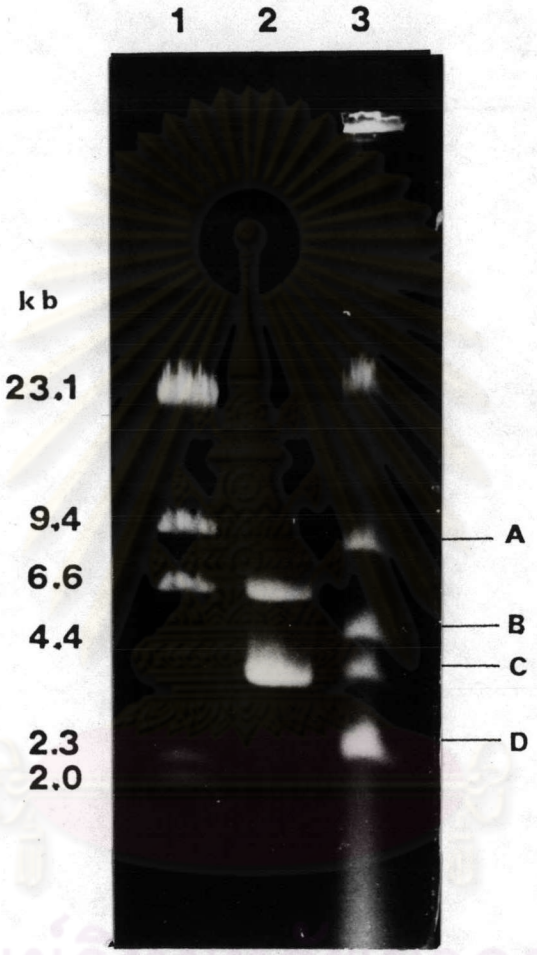
11 พลาสมิดจากโคลน 27-12 ที่มีเซลล์เจ้าบ้านคือ S. *lividans* TK21

12 พลาสมิดจากโคลน 27-21 ที่มีเซลล์เจ้าบ้านคือ S. *lividans* TK21

13 พลาสมิดจากโคลน 27-24 ที่มีเซลล์เจ้าบ้านคือ S. *lividans* TK21

14 λ DNA/*Hin*dIII

รูปที่ 15 แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้จากโคลน 19SL1



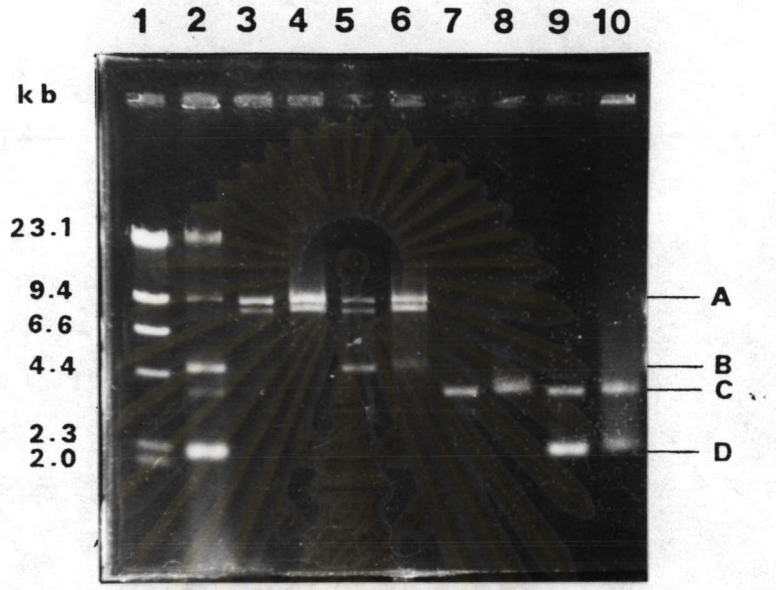

ช่องที่ 1 λDNA/*Hin*dIII

2 พลาสมิด pIJ4090

3 พลาสมิดจากโคลน 19SL1 ที่มีเซลล์เจ้าบ้านคือ *Streptomyces* sp.190-1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 16 ผลการตัดแถบดีเอ็นเอจากโคลน 19SL1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI




ช่องที่ 1 λDNA/*Hin*dIII

2 พลาสมิดจากโคลน 19SL1

3 แถบ A ที่ผ่านการทำ gene clean

4 พลาสมิดจากช่องที่ 3 ตัดด้วย *Eco*RI

5 แถบ B ที่ผ่านการทำ gene clean

6 พลาสมิดจากช่องที่ 5 ตัดด้วย *Eco*RI

7 แถบ C ที่ผ่านการทำ gene clean

8 พลาสมิดจากช่องที่ 7 ตัดด้วย *Eco*RI

9 แถบ D ที่ผ่านการทำ gene clean

10 พลาสมิดจากช่องที่ 9 ตัดด้วย *Eco*RI

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองนี้คาดว่าอย่างน้อยมีพลาสมิด 2 ชนิด ในโคลน 19SL1 โดยมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดขนาดประมาณ 8.5 กิโลเบส ที่เกิดจากการเชื่อมพลาสมิดพาหะ pIJ4090 กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.8 กิโลเบส นอกจากนั้นยังปรากฏพลาสมิดที่ตำแหน่งประมาณ 3.7 กิโลเบส ซึ่งอาจเกิดจากการสูญเสียดีเอ็นเอบางส่วนออกไป เนื่องจากเกิดรีคอมบิเนชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดขนาด 8.5 กิโลเบสบางซ้ำ กับ homologous gene บนโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp.190-1

จากผลงานวิจัยข้างต้น สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส โดย *Streptomyces* sp.190-1 ได้ประมาณ 25% โดยวิธีการโคลนยีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย