บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมดีเอ็นเอจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25

ในการวิจัยนี้ทำการสกัดดีเอ็นเอของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซม (ข้อ 3.7.1) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ*Hind*III) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในรูป high molecular weight DNA มีขนาดมากกว่า 23.1 กิโลเบส (รูปที่ 1) จากนั้นทำการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้ในการโคลนโดยการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI แบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) ด้วยเวลาต่างๆกันโดยทดลองย่อยดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI 1 หน่วย บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1, 3, 5, 7 และ 10 นาทีตามลำดับ จากการนำ digestion mixture มาตรวจสอบผลการตัดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าดีเอ็นเอของโครโมโซมถูกย่อยเป็นชิ้นขนาดต่างๆกันเห็นเป็นแถบยาวๆลงมา (รูปที่ 2) จะเห็นว่าเมื่อย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมเป็นเวลา 1 นาที จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีการกระจายของขนาดต่างๆดีที่สุด จึงเลือกตัดอะกาโรสเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดตั้งแต่ 2-7 กิโลเบส นำมาแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี electroelution (ข้อ 3.10.1) (รูปที่ 5,ช่องที่ 3) ดีเอ็นเอที่ได้นี้จะนำไปใช้ในการโคลนโดยเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI ซึ่งจะให้ปลายของชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเชื่อมต่อกันได้ต่อไป

4.2 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอพาหะ

ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการวิจัยนี้คือพลาสมิด pUC18 ซึ่งสกัดโดยวิธีอัลคาไลน์ (ข้อ 3.7.2) และวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าได้ดีเอ็นเอ 2 แถบ ซึ่งเป็นรูปแบบต่างๆของพลาสมิด (รูปที่ 4, ช่องที่ 2) ทำการตรวจสอบว่าพลาสมิดที่ได้นั้นเป็น pUC18 จริง โดยการนำมาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆคือ *Eco*RI, *Nde*I และ *Sca*I ซึ่งผลการย่อยพบว่าได้ชิ้นของดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงกับที่แสดงไว้ในแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC18 (ภาคผนวกที่ 1) คือเมื่อย่อยด้วย *Eco*RI จะได้แถบดีเอ็นเอ 1 ชิ้น

มีขนาด 2.7 กิโลเบส เมื่อย่อยด้วย *Eco*RI และ *Sca*I ได้แถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาด 1 และ 1.7 กิโลเบส และเมื่อย่อยด้วย *Sca*I และ *Nde*I จะได้แถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้นมีขนาด 0.7 และ 2 กิโลเบส (รูปที่ 3) จากนั้นทำการศึกษาหาปริมาณของเอนไซม์ *Bam*HI ที่เหมาะสมในการย่อยพลาสมิด pUC18 1 ไมโครกรัมอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์ *Bam*HI จำนวน 5, 10 และ 15 หน่วย (รูปที่ 4) ผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอให้ผลการย่อยเหมือนกันหมด คือได้แถบดีเอ็นเอเพียงขนาดเดียวที่ 2.7 กิโลเบส ซึ่งแสดงว่าพลาสมิดดีเอ็นเอถูกย่อยอย่างสมบูรณ์แล้วตั้งแต่ปริมาณของ *Bam*HI ที่ 5 หน่วย ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์ *Bam*HI 5 หน่วยย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ตรวจสอบ digestion mixture ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตัดเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC18 แยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี electroelution จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มากำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ด้วยเอนไซม์ calf intestine phosphatase (CIP) (ข้อ 3.10.2) ดีเอ็นเอของ pUC18 ที่ได้จะนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการโคลนต่อไป

4.3 <u>ผลการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ</u>

นำดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC18 ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Bam*HI มาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอของโครโมโซมที่เตรียมได้ (รูปที่ 5) ด้วยเอนไซม์ T-4 DNA ligase แล้วนำ ligation mixture 10 ไมโครลิตรมาตรวจสอบด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อวิเคราะห์ดูว่าดีเอ็นเอมีการเชื่อมต่อกันหรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC18 ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI และดีเอ็นเอของโครโมโซมที่เตรียมได้ ผลการทดลอง (รูปที่ 5) พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 2.7 กิโลเบสขึ้นไป แสดงว่ามีการเชื่อมต่อกันระหว่างดีเอ็นเอพาหะและดีเอ็นเอของโครโมโซม จากนั้นนำส่วนของ ligation mixture ที่เหลือไปทำการทรานสฟอร์มต่อไป

4.4 <u>ผลการทำทรานสฟอร์เมชัน</u>

ทำการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมได้เข้าสู่เซลล์เจ้าเรือนคือ *E. coli* JM109 ที่เตรียมเป็นเซลล์คอมพีเทนต์โดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ (ข้อ 3.10.4.1) จากนั้นทำการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์บนจานอาหารอุดม LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน, X-gal และ IPTG ผลการทดลองพบว่าได้โคโลนีสีขาวจำนวน 325 โคโลนี และได้โคโลนีสีฟ้าจำนวน 2,280 โคโลนี ได้ค่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเท่ากับ 2.6×10^4 โคโลนีต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอที่ใช้ทรานสฟอร์ม และประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูก

ผสมเท่ากับ 12.47 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับจำนวนของทรานสฟอร์แมนท์ทั้งหมด หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ไปทำการคัดเลือกหารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนโปรตีเอสต่อไป

4.5 การคัดเลือกหารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนโปรตีเอส

นำทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้มาทำ replica plating ลงบนจานอาหารที่มีนมพร่องไขมันและเสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ข้อ 3.10.5) เนื่องจากเอนไซม์โปรตีเอสสามารถย่อยเคซีนซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำนมทำให้เกิดวงใสรอบๆโคโลนี (clear zone) ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนโปรตีเอส โดยเลือกเซลล์ที่ต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและให้วงใสรอบๆโคโลนี ผลการทดลองพบว่าได้โคโลนีที่มี clear zone ในขนาดที่ใกล้เคียงกันทั้งหมด 18 โคโลนี คือโคลน #8, #22, #23, #43, #45, #56, #58, #72, #74, #78, #94, #96, #105, #111, #116, #120, #123 และ #124 ตามลำดับ (รูปที่ 6) นำโคลนที่คัดเลือกได้นี้ไปศึกษาขนาดของชิ้นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดต่อไป

4.6 การหาขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

นำโคลนที่คัดเลือกได้ทั้งหมดมาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sca*I จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานของ λDNA ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III และเทียบกับขนาดของพลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Sca*I ผลการทดลองพบว่าโคลน #8, #22, #23, #56, #58, #72, #74, #78, #94, #96, #105, #111, #116, #120, #123 และ #124 ตามลำดับ มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิด pUC18 ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะไม่ถึง 1 กิโลเบส ส่วนโคลน #45 มีขนาด 3.6 กิโลเบส และโคลน #43 มีขนาด 6.6 กิโลเบส (รูปที่ 7) จากขนาดของโคลนที่ได้จะเห็นว่าโคลน #8, #22, #23, #56, #58, #72, #74, #78, #94, #96, #105, #111, #116, #120, #123 และ #124 มีขนาดเล็กเกินไปไม่เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาต่อ ส่วนโคลน #45 ซึ่งมีขนาดของชิ้น insert 1 กิโลเบสนั้นอาจได้ชิ้นส่วนของยีนโปรตีเอสมาเพียงบางส่วน ดังนั้นจึงเลือกเอาโคลน #43 ซึ่งมีขนาดของชิ้น insert 4 กิโลเบสมาทำการศึกษาหาแผนที่เรสทริกชันและแอคติวิตีของเอนไซม์ต่อไป โดยให้ชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลน #43 นี้ว่า pCSBC14 (รูปที่ 8)

4.7 ผลการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14

ทำการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสจากเซลล์ดั้งเดิมคือ *B. subtilis* TISTR 25 ซึ่งมีทั้ง alkaline protease และ neutral protease เพื่อจะดูลักษณะของโปรตีเอสจากเซลล์เดิมเปรียบเทียบกับทรานสฟอร์-แมนท์และเซลล์เจ้าเรือนโดยทำการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ในอาหารสูตรพื้นฐาน(basal medium) สูตรที่ 1 (ข้อ 3.6.5) ส่วนเซลล์เจ้าเรือนคือ *E. coli* JM109 และ ทรานสฟอร์แมนท์จะเลี้ยงในอาหารสูตร M9 + succinate เนื่องจาก M9 medium เป็นสูตรอาหารที่มีโปรตีนต่ำจะไม่มีผลต่อการยับยั้งการหลั่งโปรตีเอส ทำการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสในการไฮโดรไลส์เคซีนได้ไทโรซีนอิสระที่มีความสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งการทดลองได้ดัดแปลงมาจากวิธีที่เสนอโดย เกษม (2536) (ข้อ 3.10.6) ทำการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ค่า pH ต่างๆกัน โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ บัฟเฟอร์ฟอสเฟต 0.1 โมลาร์ pH 7.5 และ 8.0 บัฟเฟอร์คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ pH 9.5, 10.0 และ 10.5 บัฟเฟอร์คาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ pH 11.0 หรือบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 โมลาร์ pH 7.0-9.0 จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 พบว่ามีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนกระทั่งลดลงในที่สุดภายหลังการเลี้ยงเชื้อ 1 วัน ดังรูปที่ 9 ในช่วงที่มีการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างมาก (logarithmic phase) ภายใน 24 ชั่วโมงแรกนั้น การสร้างโปรตีเอสของ *B. subtilis* TISTR 25 ที่ตรวจพบจะมีแอคติวิตีต่ำ จนกระทั่งการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase จึงมีการสร้างโปรตีเอสสูงขึ้นดังรูปที่ 10 จากการที่เชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 มีการสร้างโปรตีเอสสูงสุดในวันที่ 2 จึงได้ทำการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสหลังการเลี้ยงเชื้อ 2 วันที่ค่า pH ต่างๆกันคือ pH 7.5-11.0 ซึ่งจะพบทั้งแอคติวิตีของ neutral protease และ alkaline protease (รูปที่ 11) และทำการเปรียบเทียบแอคติวิตีของ alkaline protease และ neutral protease โดยวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ค่า pH 7.5 และ 10.5 ได้ผลดังรูปที่ 10 ในการเปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสจากเซลล์เจ้าเรือนและจากทรานสฟอร์แมนท์นั้น ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองพบว่ามีลักษณะที่คล้ายกันคือเชื้อจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจะเริ่มคงที่และลดลงในที่สุด (รูปที่ 12, 14) ซึ่งสอดคล้องกับแอคติวิตีของโปรตีเอสที่จะมีค่าสูงสุดในวันที่ 1 และลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 เหมือนกันทั้งในทรานสฟอร์แมนท์และเซลล์เจ้าเรือน (รูปที่ 13, 15) เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสภายในวันที่ 1 จากเชื้อทั้งสองพบว่าทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 สามารถผลิตโปรตีเอสได้มากกว่าเซลล์เจ้าเรือนและพบว่ามีทั้งแอคติวิตีของ alkaline protease และ neutral protease ดังรูปที่ 16

4.8 <u>ผลการทำแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14</u>

จากการศึกษาขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 (รูปที่ 17) พบว่าชิ้น insert ที่ได้มีขนาดประมาณ 4 กิโลเบสซึ่งมีขนาดเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาต่อ ในการศึกษาแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pCSBC14 ทำโดยย่อยพลาสมิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ คือ *Acc*I, *Bam*HI, *Bgl*I, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sca*I, *Sma*I และ *Xba*I นำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 18-25 พบว่าตำแหน่งเรสทริกชันที่มีอยู่บนชิ้น insert คือ *Acc*I, *Bam*HI, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III และ *Sca*I ดังแสดงไว้ในแผนที่เรสทริกชัน (รูปที่ 26)

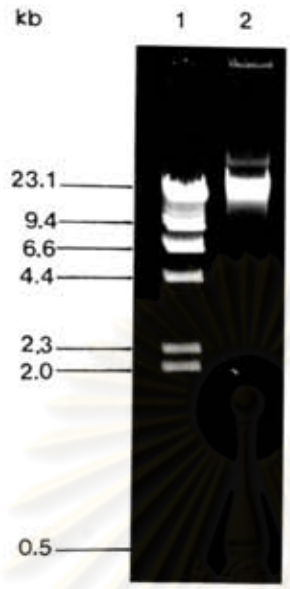
4.9 การตรวจสอบยีนโปรตีเอสในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

การตรวจสอบว่ายีนโปรตีเอสที่มีอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 นั้นเป็นยีน neutral protease หรือ alkaline protease นอกจากทำโดยทดสอบการทำงานของเอนไซม์ดังข้อ 4.7 แล้ว อีกวิธีคือใช้เทคนิค Hybridization โดยนำดีเอ็นเอลูกผสมที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 มาทำ Southern-blot Hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่มียีน neutral protease คือพลาสมิด pNC3 และดีเอ็นเอติดตามที่มียีน alkaline protease คือ พลาสมิด pKWZ

ทำ Southern-blot Hybridization โดยนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 มาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Kpn*I และ*Pst*I เพื่อแยกชิ้น insert ออกจากดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอต่างๆคือ pNC3 ย่อยด้วย *Eco*RI ดีเอ็นเอพาหะอื่นๆคือพลาสมิด pUB110 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI และดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการทดลองนี้คือ pUC18 ย่อยด้วย *Nde*I และ *Pvu*II ซึ่งตัดส่วนของ lacZ ออกไป (รูปที่ 27) นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ทั้งหมดมาทำ Southern-blot transfer (ข้อ 3.11.3) ทำการตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นไนลอนเมมเบรน (ข้อ 3.11.4) จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอดังกล่าวติดอยู่มาทำการไฮบริไดซ์ (ข้อ 3.11.5) กับดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมไว้ โดยทำการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่มียีน neutral protease จากนั้นทำการวิเคราะห์สัญญาณการไฮบริด (ข้อ 3.11.6) ได้ผลดังรูปที่ 28 พบสัญญาณไฮบริไดซ์ที่เข้มมากในช่องที่ 2 ซึ่งเป็นพลาสมิด pNC3 ตัวเดียวกับดีเอ็นเอติดตาม ส่วนในช่องที่ 3 และ 4 นั้นไม่มีสัญญาณการไฮบริดเกิดขึ้น แสดงว่าดีเอ็นเอติดตาม pNC3 ไม่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 และพลาสมิด pUB110 แต่จะไฮบริไดซ์กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 และชิ้น insert ใน pCSBC14 ดังจะเห็นจากสัญญาณการไฮบริดที่เกิดขึ้นในช่องที่ 5 และ 6 จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาทำการ reprobe เพื่อล้างเอาดีเอ็นเอติดตามที่ไฮบริไดซ์อยู่กับดีเอ็นเอบนแผ่นไนลอนเมมเบรนออก ทำการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่มียีน alkaline protease ได้ผลดังรูป 29 พบว่าไม่มีสัญญาณไฮบริไดซ์เกิดขึ้นในช่องที่ 2, 3 และ 4 แสดงว่าดีเอ็นเอติดตาม pKWZ นั้นไม่ไฮบริไดซ์กับพลาสมิด pNC3, ดีเอ็นเอพาหะ

pUC18 และพลาสมิด pUB110 แต่จะไฮบริไดซ์กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 และชิ้น insert ใน pCSBC14 ดังจะเห็นจากสัญญาณการไฮบริดที่เกิดขึ้นในช่องที่ 5 และ 6 ผลการทดลองแสดงว่ายีนโปรตีเอสที่มีอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ประกอบด้วยยีน neutral protease และ alkaline protease อยู่ในชิ้นเดียวกันที่มีขนาด 4.0 กิโลเบส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

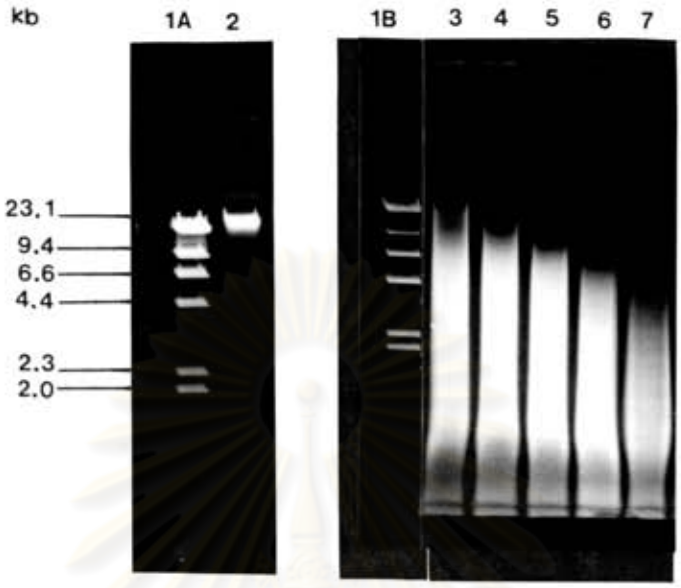


รูปที่ 1 ผลการสกัดดีเอ็นเอของ *Bacillus subtilis* TISTR 25

สกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่เลี้ยงในอาหารอุดม LB เป็นเวลา 1 วัน นำดีเอ็นเอของโครโมโซมมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 0.7 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ตรวจแถบดีเอ็นเอของโครโมโซม โดยการย้อมด้วยเอธิเดียม-โบรไมด์

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR 25

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

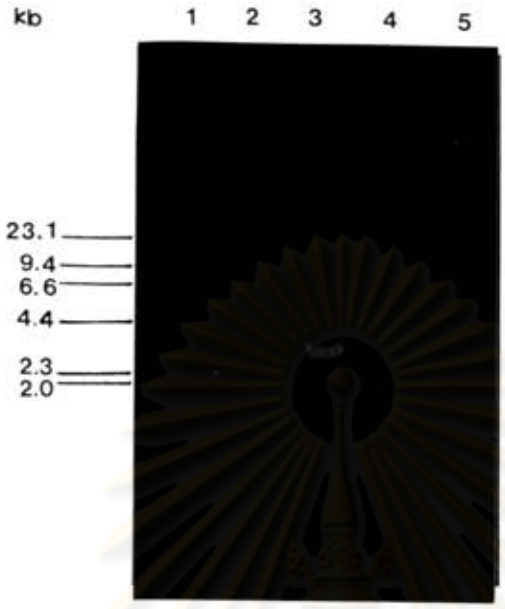


หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 ผลการย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR 25 แบบ partial digestion

ย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR 25 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI แบบ partial digestion ที่เวลาต่างๆ นำดีเอ็นเอของโครโมโซมที่ย่อยแล้วมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 0.7 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ตรวจแถบดีเอ็นเอของโครโมโซมโดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

ช่องที่ 1A, B ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR 25
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR 25 ย่อยด้วย *Sau*3AI เป็นเวลา 1 นาที
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR 25 ย่อยด้วย *Sau*3AI เป็นเวลา 3 นาที
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR 25 ย่อยด้วย *Sau*3AI เป็นเวลา 5 นาที
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR 25 ย่อยด้วย *Sau*3AI เป็นเวลา 7 นาที
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR 25 ย่อยด้วย *Sau*3AI เป็นเวลา 10 นาที

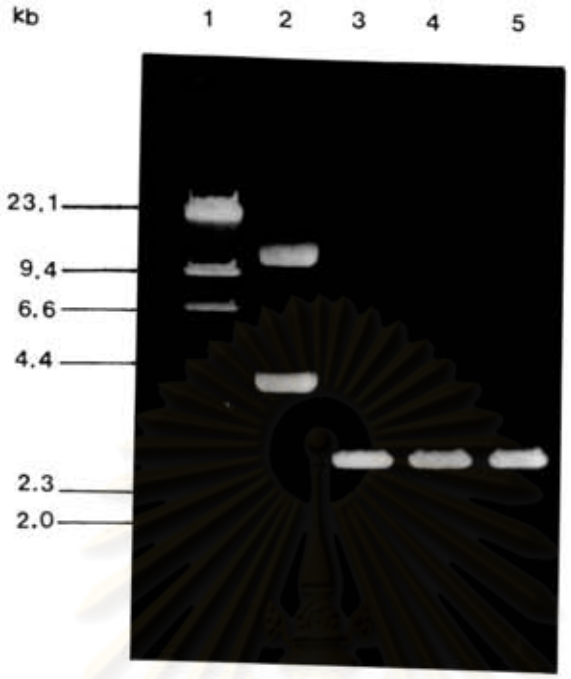


รูปที่ 3 ผลการตรวจสอบพลาสมิด pUC18

ย่อยพลาสมิด pUC18 ด้วย *Eco*RI, *Nde*I และ *Sca*I บ่มที่ 37°ซ นาน 2 ชั่วโมง นำพลาสมิดที่ย่อยมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 1.0 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ตรวจแถบดีเอ็นเอของพลาสมิด โดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC18 ที่ไม่ถูกย่อย
ช่องที่ 3 พลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 4 พลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI และ *Sca*I
ช่องที่ 5 พลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Nde*I และ *Sca*I

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 ผลการหาปริมาณ *Bam*HI ที่เหมาะสมในการย่อยพลาสมิด pUC18

ย่อยพลาสมิด pUC18 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI 5, 10 และ 15 หน่วย บ่มที่ 37°ซ นาน 2 ชั่วโมง นำพลาสมิดที่ย่อยแล้วมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 0.7 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ตรวจแถบดีเอ็นเอของพลาสมิด โดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

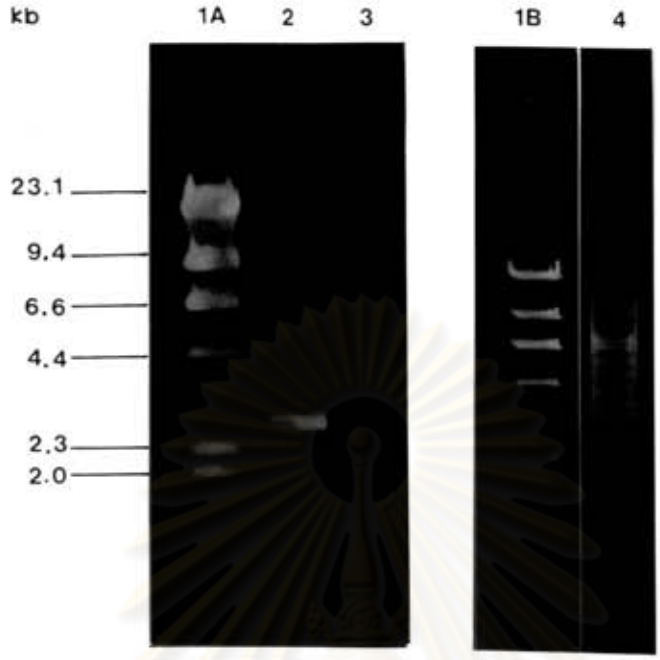
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC18 ที่ไม่ถูกย่อย

ช่องที่ 3 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Bam*HI 5 หน่วย

ช่องที่ 4 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Bam*HI 10 หน่วย

ช่องที่ 5 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Bam*HI 15 หน่วย



รูปที่ 5 ผลการเชื่อมต่อดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR 25 และพลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Bam*HI

ทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR 25 ที่ย่อยด้วย *Sau*3AI และพลาสมิด pUC18 ที่ย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Bam*HI ด้วยเอนไซม์เชื่อมต่อ T_4-DNA ligase บ่มที่ 15°ซ เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง นำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อแล้วมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 1.0 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นานประมาณ 4 ชั่วโมง ตรวจแถบดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อโดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

ช่องที่ 1A, B ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Bam*HI

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR 25 ที่ย่อยด้วย *Sau*3AI ขนาด 2-7 กิโลเบส

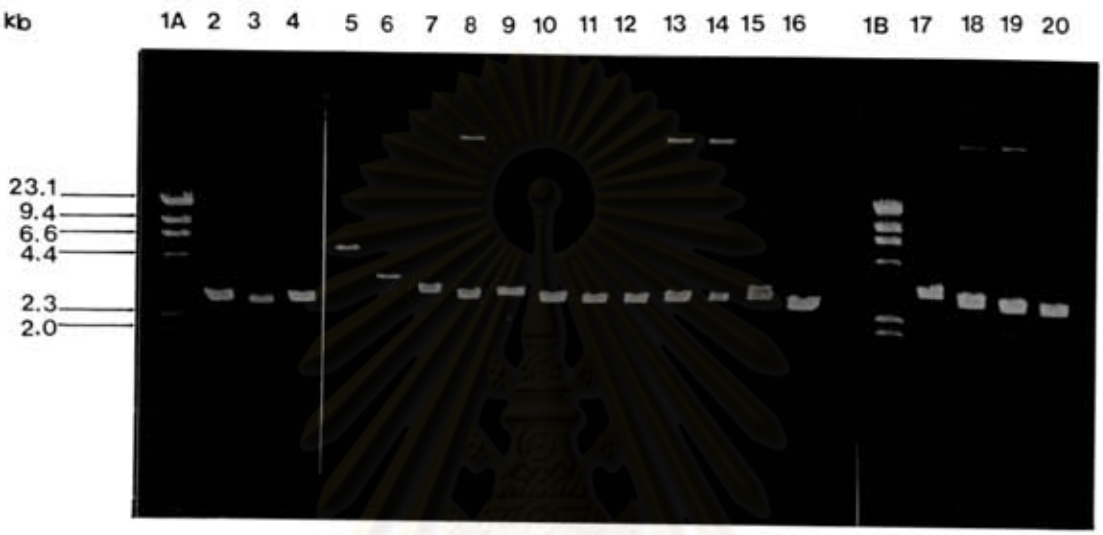
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR 25 และพลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Bam*HI

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 clear zone บนจานอาหารที่มีนมพร่องไขมันที่ได้จากดีเอ็นเอลูกผสมที่มียีนโปรตีเอส

ทำการคัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมที่มียีนโปรตีเอสโดยการทำ replica plating ลงบนจานอาหารที่มีนมพร่องไขมัน บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 1-2 วัน ดีเอ็นเอลูกผสมที่มียีนโปรตีเอสจะสามารถย่อยเคซีนในนม ทำให้เกิดลักษณะวงใสรอบๆโคโลนี (clear zone)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7

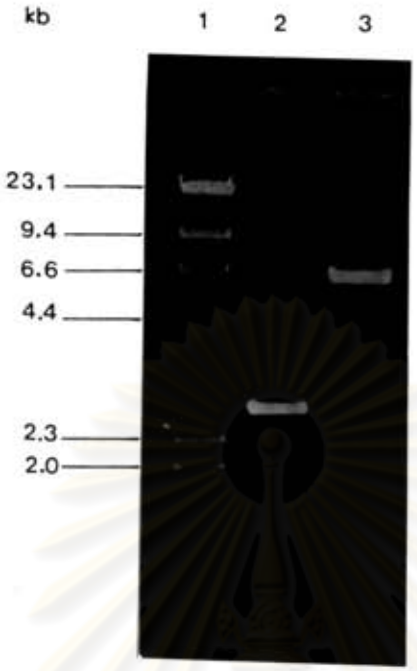
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 ผลการศึกษาขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวน 18 โคลน

ทำการย่อยพลาสมิดที่สกัดจากดีเอ็นเอลูกผสมที่ห้วงใสรอบๆโคโลนีจำนวน 18 โคลนด้วย *Sca*I ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III) และพลาสมิด pUC18 ที่ถูกย่อยด้วย *Sca*I บนอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ตรวจแถบดีเอ็นเอของพลาสมิด โดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

ช่องที่ 1A, B ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 พลาสมิดจากโคลน #8 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 3 พลาสมิดจากโคลน #22 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 4 พลาสมิดจากโคลน #23 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 5 พลาสมิดจากโคลน #43 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 6 พลาสมิดจากโคลน #45 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 7 พลาสมิดจากโคลน #56 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 8 พลาสมิดจากโคลน #58 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 9 พลาสมิดจากโคลน #72 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 10 พลาสมิดจากโคลน #74 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 11 พลาสมิดจากโคลน #78 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 12 พลาสมิดจากโคลน #94 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 13 พลาสมิดจากโคลน #96 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 14 พลาสมิดจากโคลน #105 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 15 พลาสมิดจากโคลน #111 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 16 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 17 พลาสมิดจากโคลน #116 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 18 พลาสมิดจากโคลน #120 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 19 พลาสมิดจากโคลน #123 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 20 พลาสมิดจากโคลน #124 ย่อยด้วย *Sca*I

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

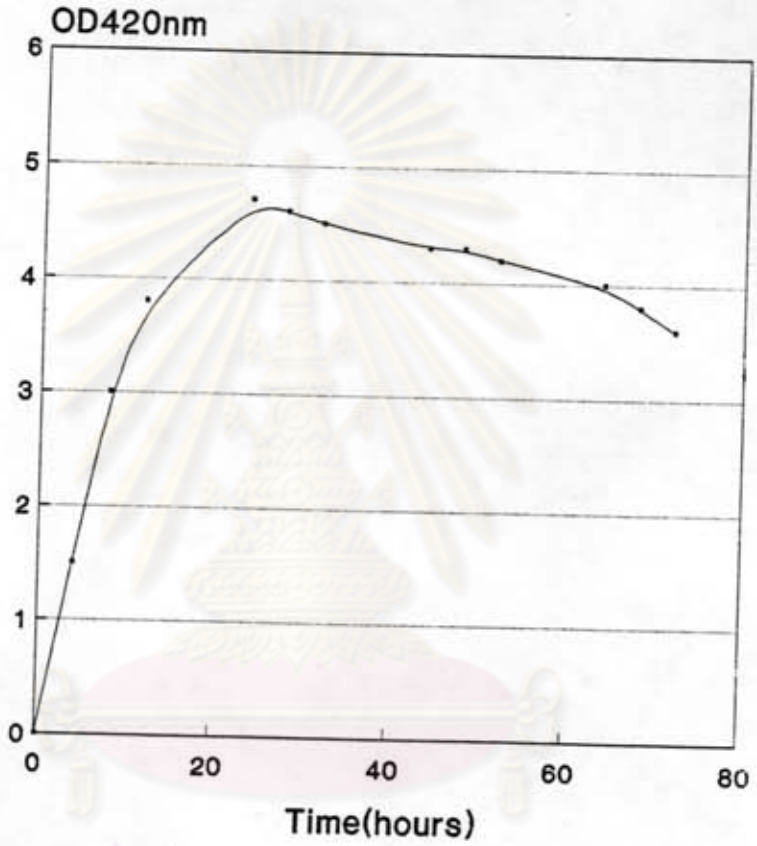


รูปที่ 8 ผลการศึกษาขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14

ทำการย่อยพลาสมิด pCSBC14 ด้วย *Pst*I เพื่อหาขนาดของพลาสมิดนี้ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI นำพลาสมิดที่ย่อยแล้วมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 0.7 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ตรวจแถบดีเอ็นเอของพลาสมิด โดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

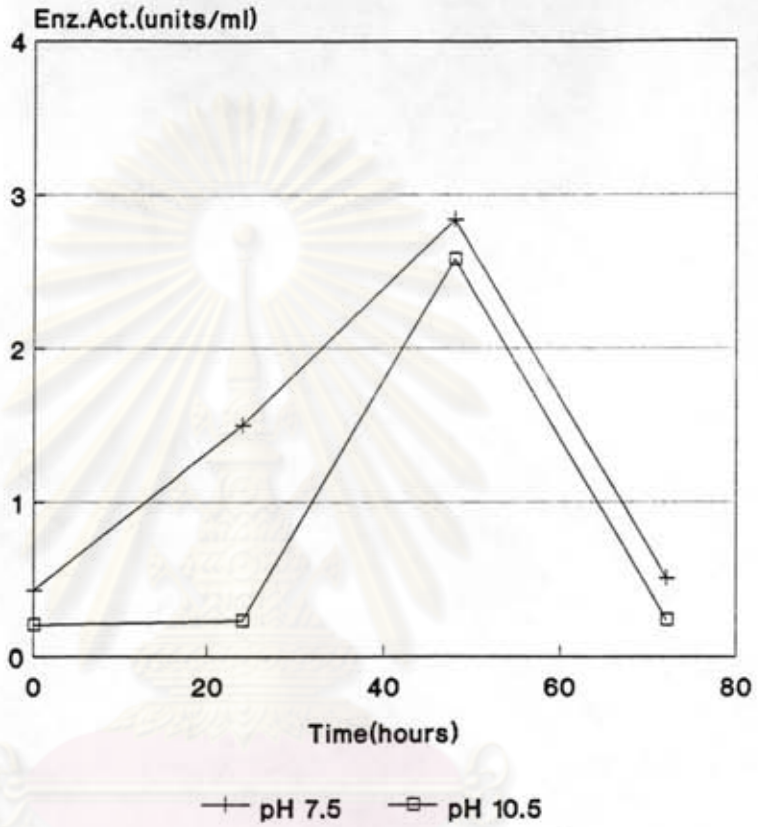
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ที่ย่อยด้วย *Pst*I

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



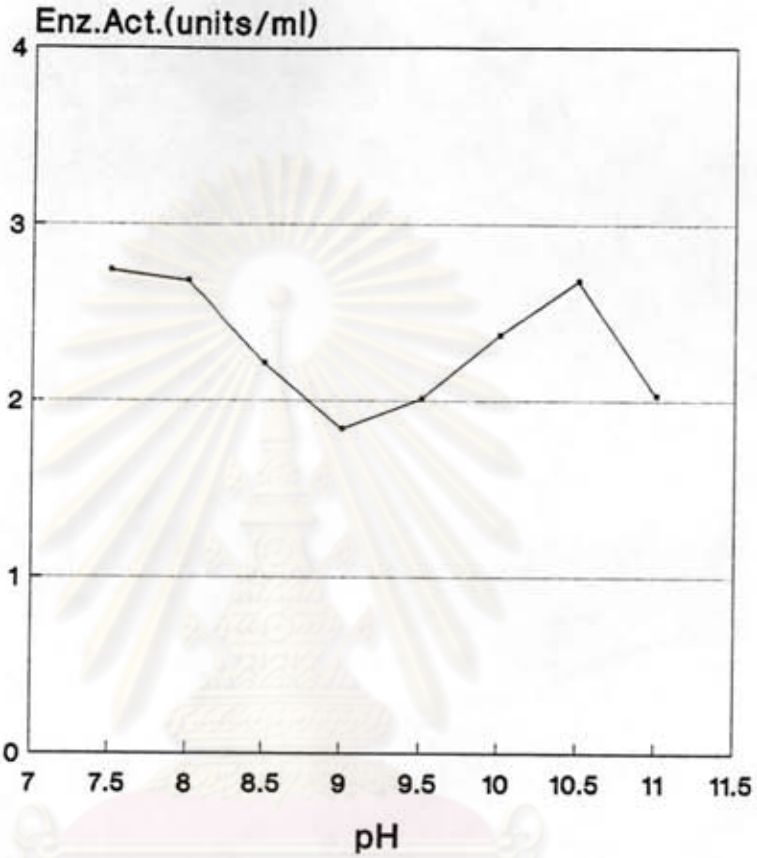
รูปที่ 9 การเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium) สูตรที่ 1 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

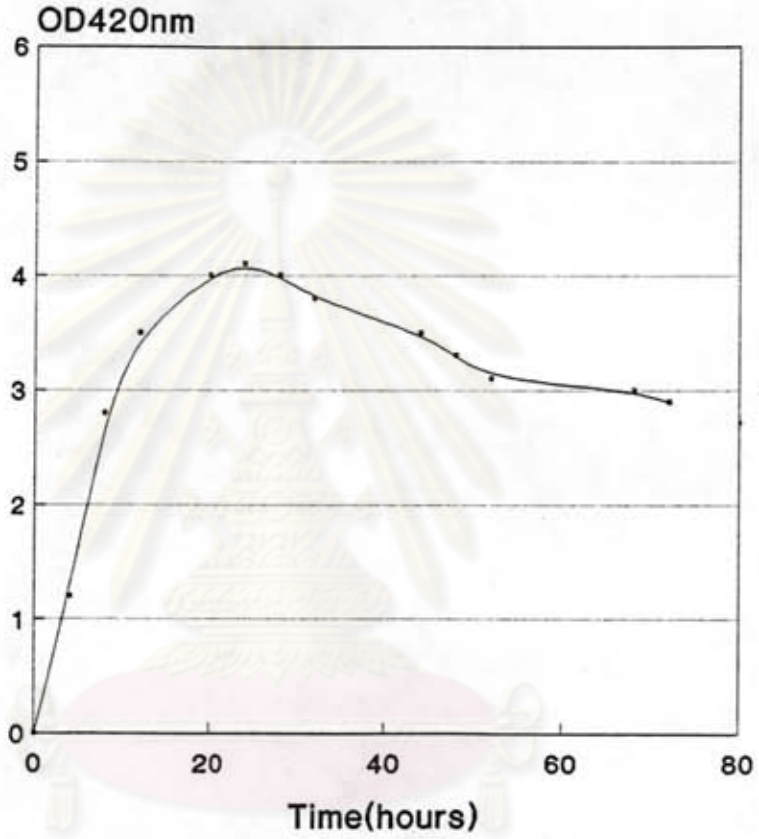


รูปที่ 10 เปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ pH 7.5 และ 10.5 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium) สูตรที่ 1 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

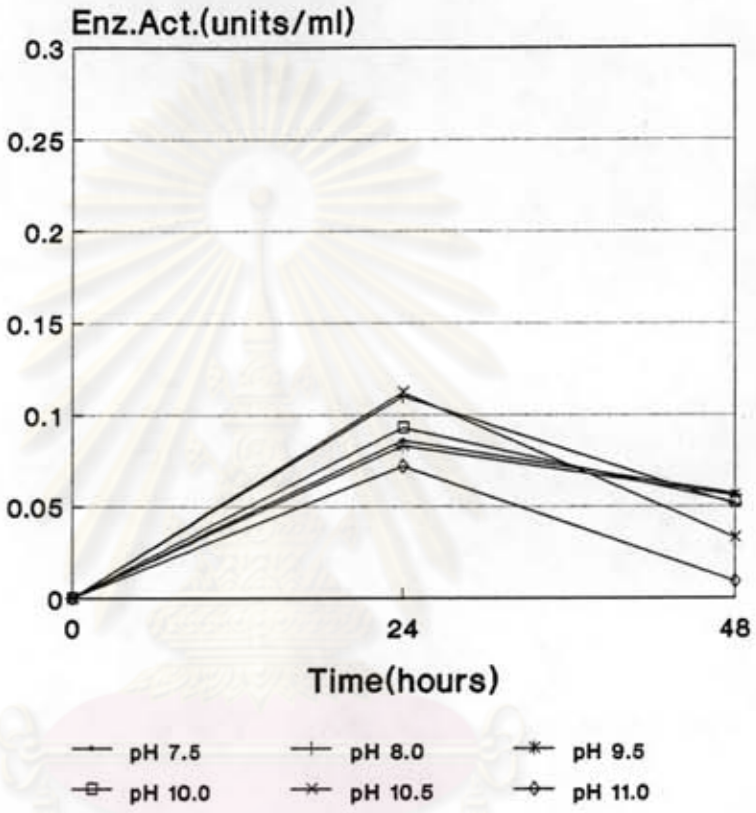


รูปที่ 11 เปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ pH ต่างๆ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium) สูตรที่ 1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



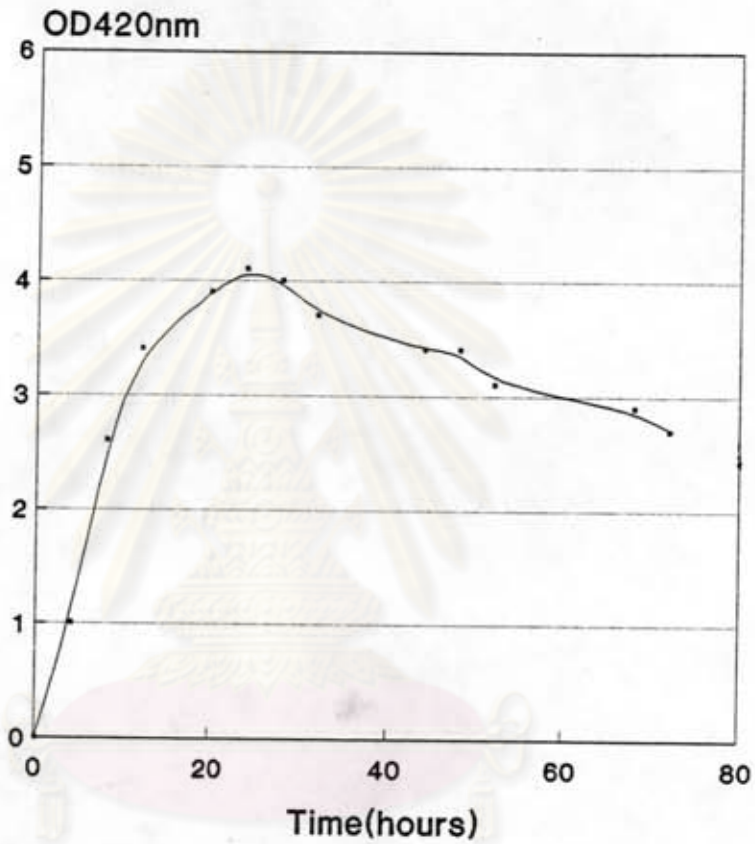
รูปที่ 12 การเจริญของเซลล์เจ้าเรือน *Escherichia coli* JM109 เมื่อเลี้ยงในอาหาร (M9-medium + succinate) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



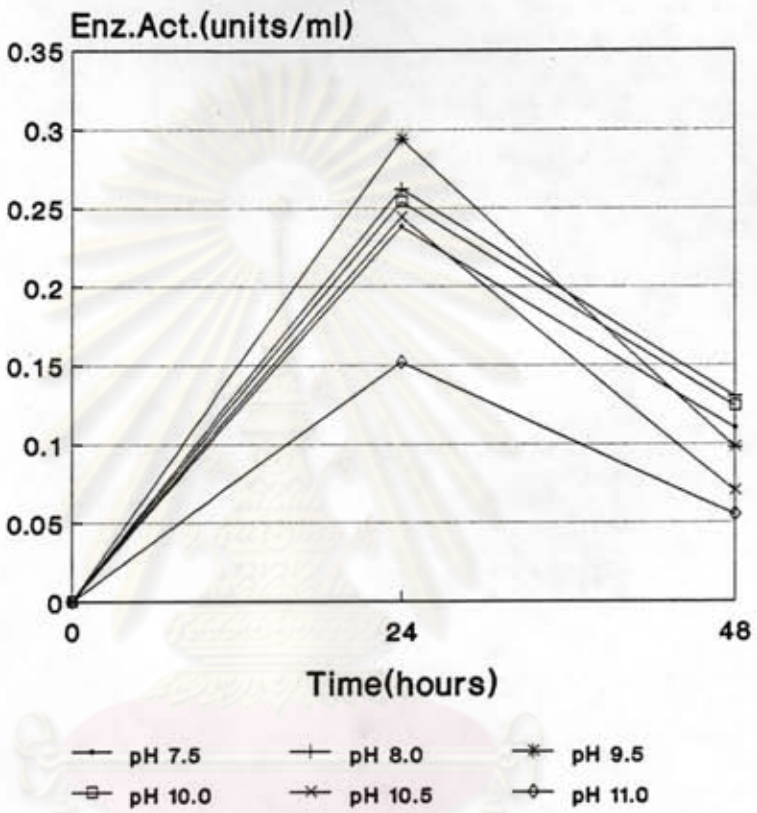
รูปที่ 13 เปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ได้จาก *Escherichia coli* JM109 ที่ pH ต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหาร (M9 medium + succinate) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

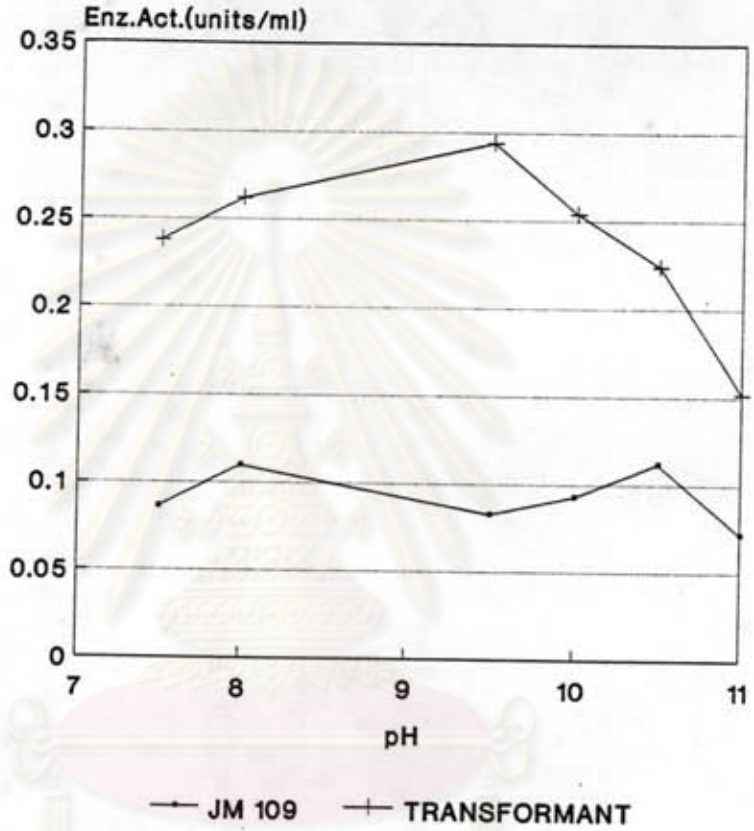


รูปที่ 14 การเจริญของทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 เมื่อเลี้ยงในอาหาร (M9 medium + succinate) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

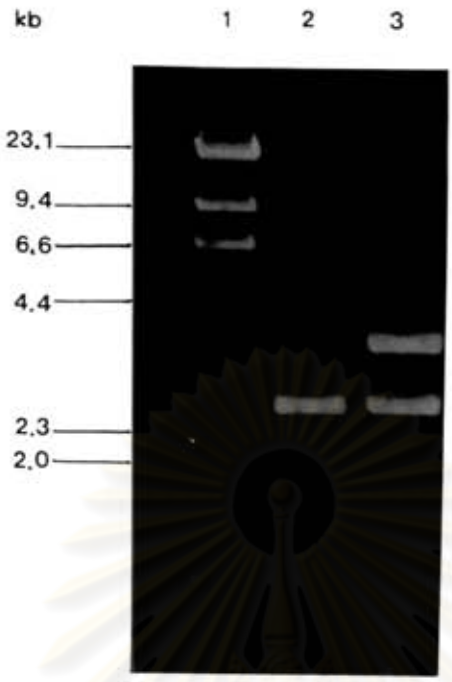
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ที่ pH ต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหาร (M9 medium + succinate) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 16 เปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ได้จากทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 และ เซลล์เจ้าเรือน *E.coli* JM109 ที่ pH ต่างๆ โดยเลี้ยงในอาหาร (M9-medium + succinate) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 17 ผลการศึกษาขนาดของชิ้น insert ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14

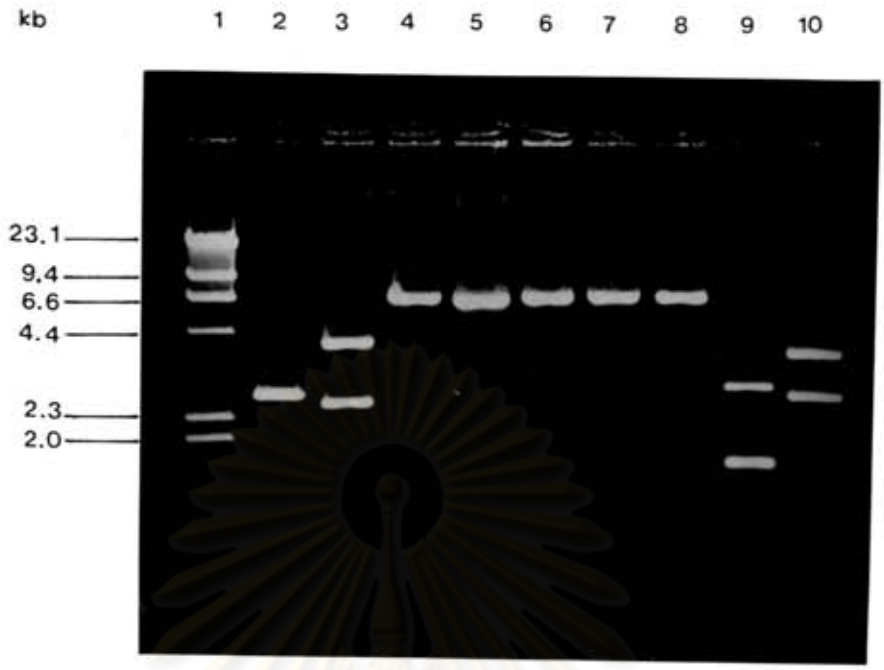
ทำการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ด้วย *KpnI* และ *PstI* เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่ย่อยด้วย *BamHI* เพื่อหาขนาดของชิ้น insert ที่มีอยู่ในพลาสมิด pCSBC14 ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 0.7 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*HindIII*)

ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *BamHI*

ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *KpnI* และ *PstI*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

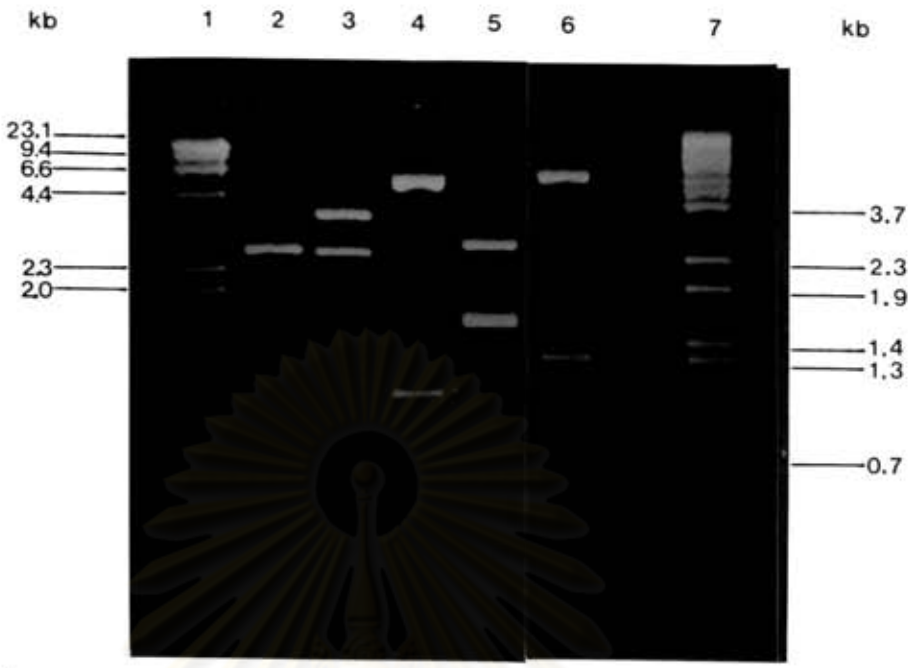


หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 18 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14

ทำการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆคือ *Acc*I, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I, *Sma*I และ *Xba*I เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI ตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 1.0 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ*Hind*III)
ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Acc*I
ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Kpn*I
ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Pst*I
ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Sal*I
ช่องที่ 7 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Sma*I
ช่องที่ 8 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Xba*I
ช่องที่ 9 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Hind*III
ช่องที่ 10 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Kpn*I และ *Pst*I



รูปที่ 19 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14

ทำการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆคือ *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I และ *Sca*I เปรียบเทียบกับพลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI ตรวจสอบด้วยอะกาโรส-เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Eco*RI

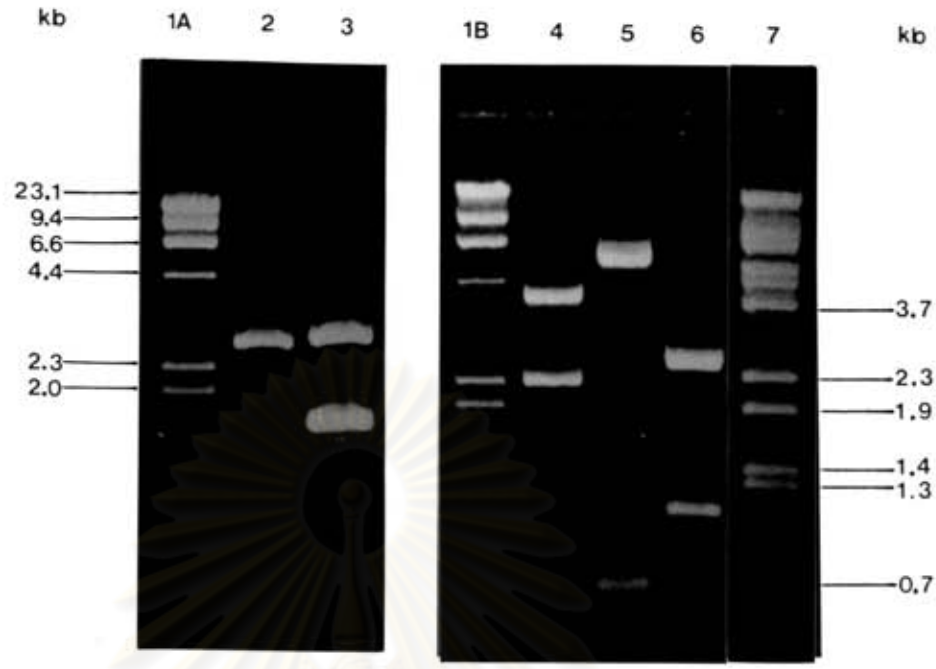
ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Kpn*I และ *Pst*I

ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Hind*III

ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Sca*I

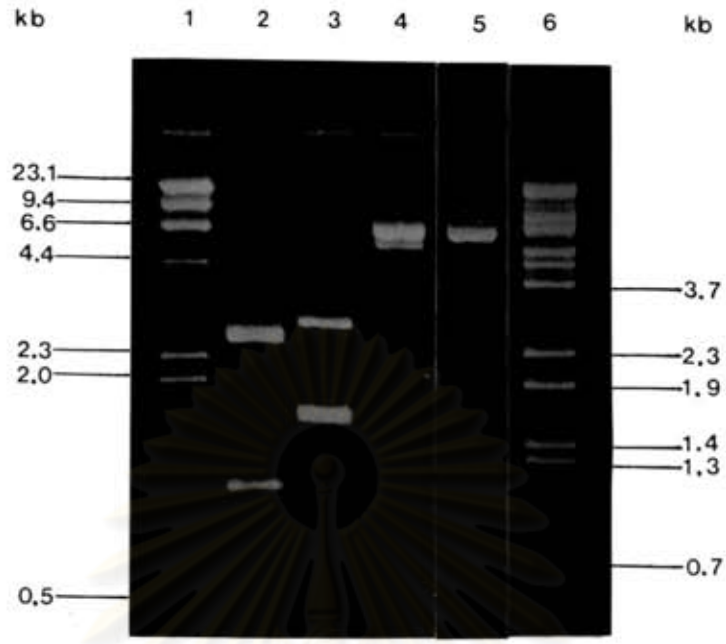
ช่องที่ 7 λ ดีเอ็นเอ ย่อยด้วย *Bst*EII



รูปที่ 20 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14

ทำการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆคือ *Bam*HI, *Cla*I, *Acc*I, *Eco*RI และ *Pst*I เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1A, B ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Bam*HI
ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Acc*I และ *Pst*I
ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Cla*I และ *Pst*I
ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Eco*RI และ *Pst*I
ช่องที่ 7 λ ดีเอ็นเอ ย่อยด้วย *Bst*EII



รูปที่ 21 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14

ทำการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ดังนี้ *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I และ *Sca*I ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.0 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

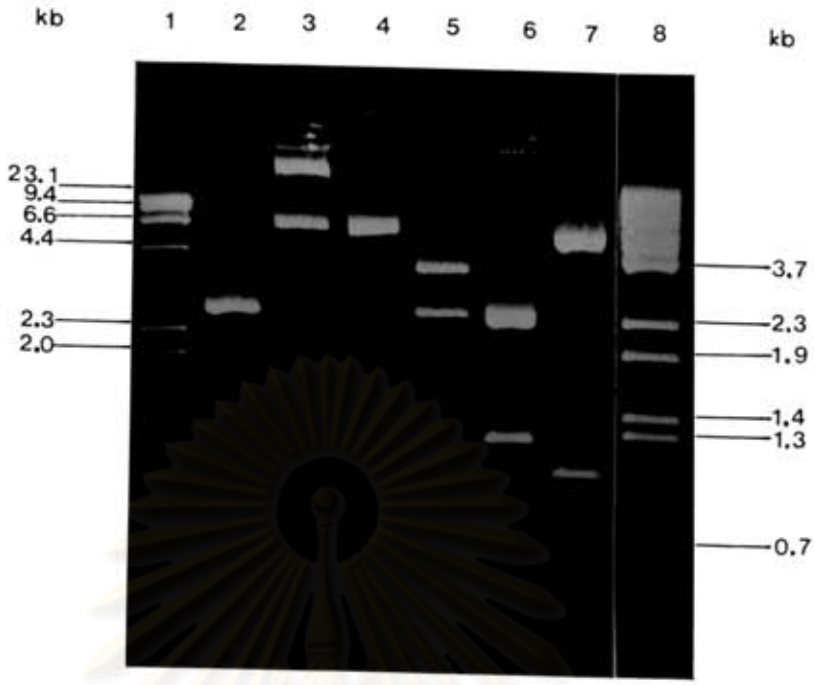
ช่องที่ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Pst*I และ *Eco*RI

ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Pst*I และ *Hind*III

ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Pst*I และ *Sca*I

ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Pst*I

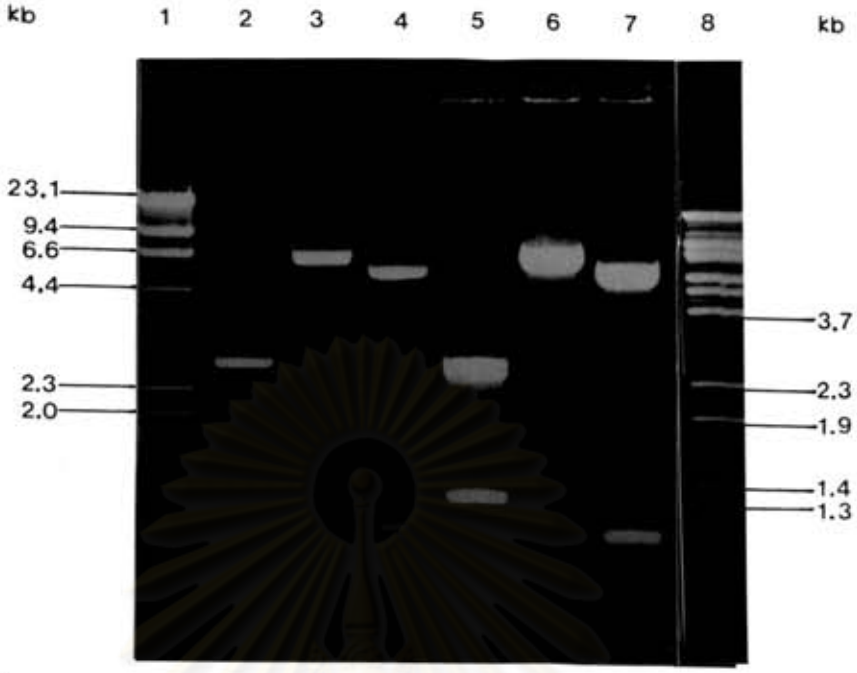
ช่องที่ 6 λ ดีเอ็นเอ ย่อยด้วย *Bst*EII



รูปที่ 22 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14

ทำการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆดังนี้ *Sma*I, *Xba*I, *Acc*I และ *Eco*RI เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ที่ไม่ถูกย่อย
ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Sma*I
ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Sma*I และ *Xba*I
ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Sma*I และ *Acc*I
ช่องที่ 7 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Sma*I และ *Eco*RI
ช่องที่ 8 λ ดีเอ็นเอ ย่อยด้วย *Bst*EII



รูปที่ 23 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14

ทำการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆดังนี้ *Kpn*I, *Acc*I, *Cla*I และ *Eco*RI เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 1.0 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Kpn*I

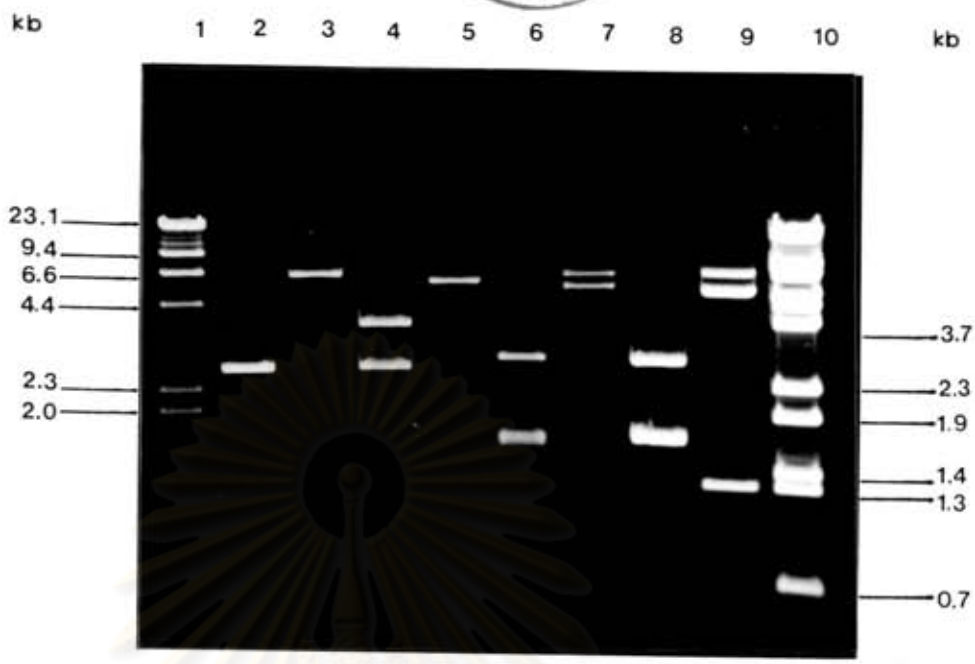
ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Bgl*I

ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Kpn*I และ *Acc*I

ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Kpn*I และ *Sma*I

ช่องที่ 7 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Kpn*I และ *Eco*RI

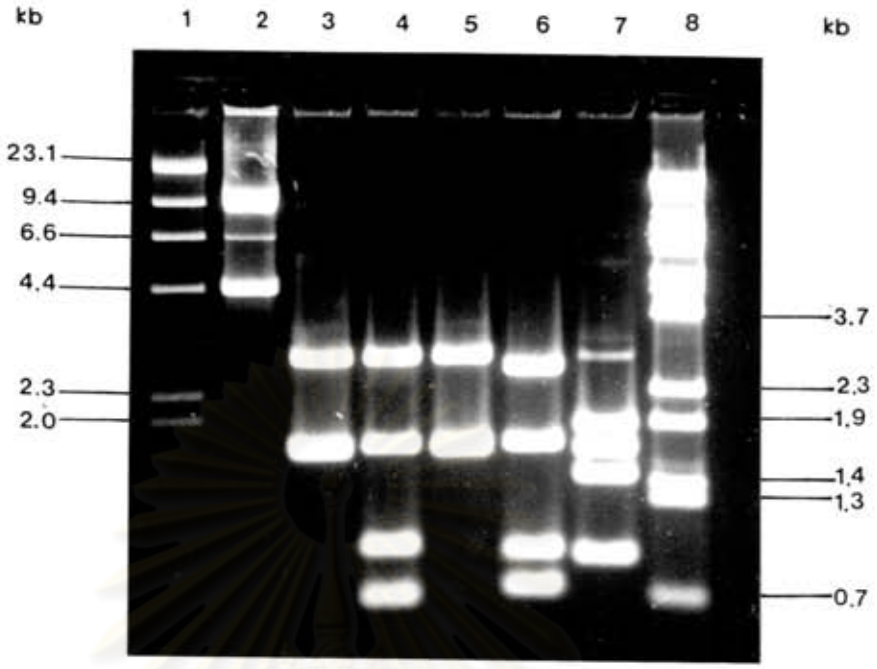
ช่องที่ 8 λ ดีเอ็นเอ ย่อยด้วย *Bst*EII



รูปที่ 24 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14

ทำการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆดังนี้ *Cla*I, *Hind*III *Kpn*I, *Pst*I และ *Sca*I เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI ตรวจสอบด้วยอะกาโรส-เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 1.0 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

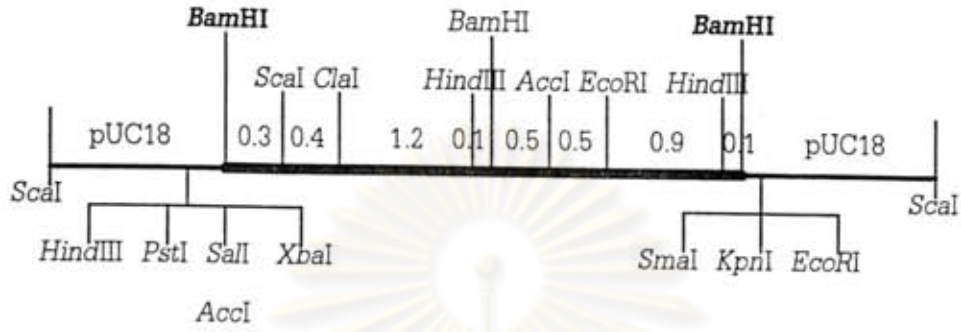
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Pst*I
ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Pst*I และ *Kpn*I
ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Pst*I และ *Cla*I
ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Pst*I และ *Hind*III
ช่องที่ 7 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Pst*I และ *Sca*I
ช่องที่ 8 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Hind*III
ช่องที่ 9 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 10 λ ดีเอ็นเอ ย่อยด้วย *Bst*EII



รูปที่ 25 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14

ทำการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆดังนี้ *Acc*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III และ *Sca*I ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 1.0 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ที่ไม่ถูกย่อย
ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Hind*III
ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Hind*III และ *Acc*I
ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Bam*HI
ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Hind*III และ *Eco*RI
ช่องที่ 7 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ย่อยด้วย *Hind*III และ *Sca*I
ช่องที่ 8 λ ดีเอ็นเอ ย่อยด้วย *Bst*EII

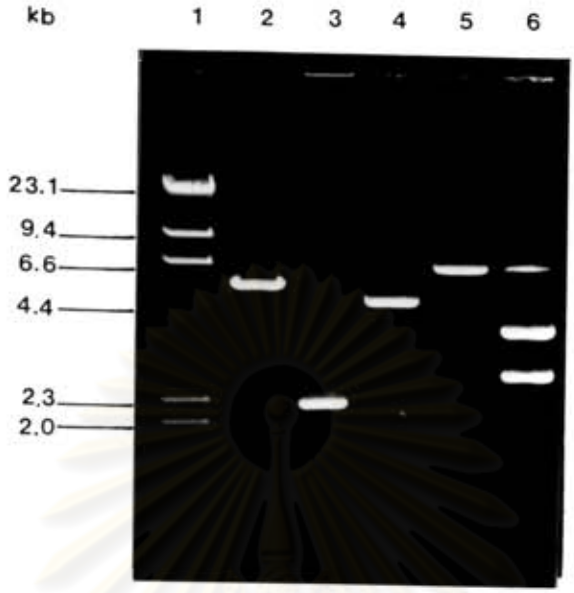


รูปที่ 26 แผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14

: แสดงถึงชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25

: แสดงถึงพลาสมิด pUC18

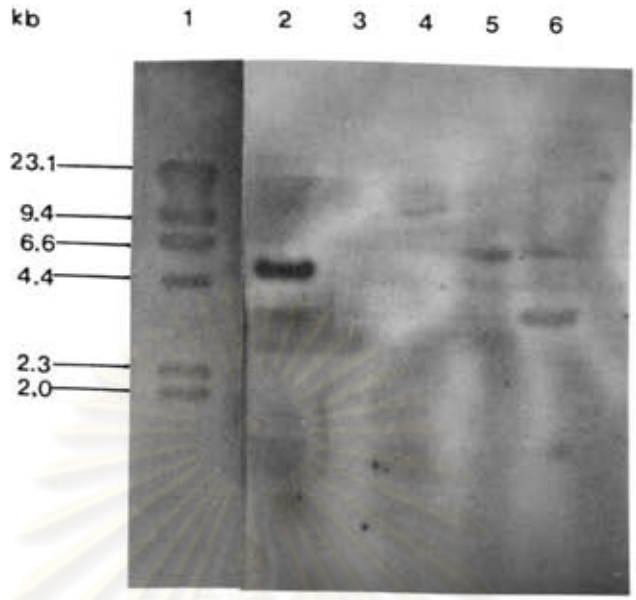
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 ผลการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 และพลาสมิด pNC3, pUC18 และ pUB110 ที่ใช้ในการทำ Southern-blot Hybridization

ทำการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Kpn*I และ *Pst*I และทำการย่อยดีเอ็นเอพาหะต่างๆคือ พลาสมิด pNC3 ย่อยด้วย *Eco*RI, pUC18 ย่อยด้วย *Pvu*II และ *Nde*I และย่อย pUB110 ด้วย *Eco*RI ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 0.7 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นานประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลที่ได้ไปทำ Southern transfer ต่อไป

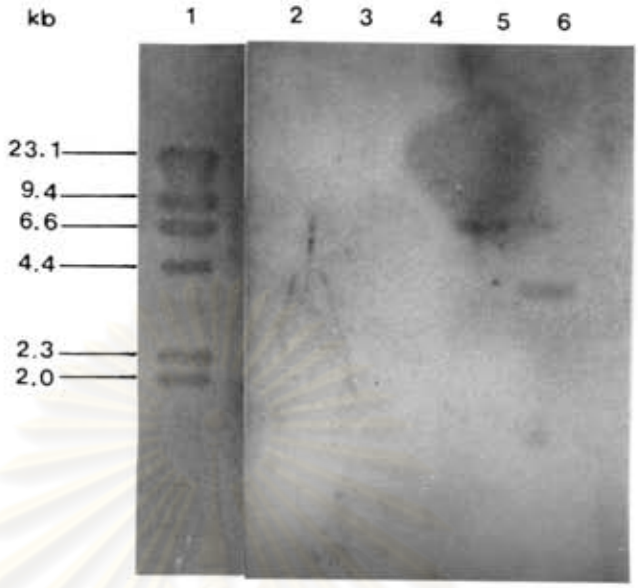
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 พลาสมิด pNC3 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 3 พลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Pvu*II และ *Nde*I
ช่องที่ 4 พลาสมิด pUB110 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ที่ย่อยด้วย *Pst*I
ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ที่ย่อยด้วย *Pst*I และ *Kpn*I



รูปที่ 28 Southern-blot Hybridization ระหว่างดีเอ็นเอติดตาม pNC3 และดีเอ็นเอลูกผสม pCSBC14

หลังจากการตรึงดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ Southern-blot ของดีเอ็นเอลูกผสม pCSBC14 และพลาสมิด pUB110 และดีเอ็นเอพาหะ pUC18 บนแผ่นไนลอนเมมเบรนแล้ว นำมาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่มียีนนิวทรัลโปรตีเอส pNC3 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI และ *Bgl*II จากนั้นจึงวิเคราะห์สัญญาณการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 พลาสมิด pNC3 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 3 พลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Pvu*II และ *Nde*I
ช่องที่ 4 พลาสมิด pUB110 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ที่ย่อยด้วย *Pst*I
ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ที่ย่อยด้วย *Pst*I และ *Kpn*I



รูปที่ 29 Southern-blot Hybridization ระหว่างดีเอ็นเอติดตาม pKWZ และดีเอ็นเอลูกผสม pCSBC14

หลังจากทำการวิเคราะห์สัญญาณการไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอติดตาม pNC3 และดีเอ็นเอลูกผสม pCSBC14 แล้วนำแผ่นไนลอนเมมเบรนดังกล่าวมา reprobe จากนั้นทำการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่มียีนแอลคาไลน์โปรตีเอสคือ pKWZ วิเคราะห์สัญญาณการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 พลาสมิด pNC3 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 3 พลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Nde*I และ *Pvu*II
ช่องที่ 4 พลาสมิด pUB110 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ที่ย่อยด้วย *Pst*I
ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ที่ย่อยด้วย *Pst*I และ *Kpn*I