บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เลือกศึกษายีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสของ *Arabidopsis thaliana* 2 ยีน คือยีน *APR1* และยีน *prh19* ผลการเปรียบเทียบยีนทั้ง 2 ชนิดนี้ พบว่าลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 99 % จำนวนกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีนทั้ง 2 เท่ากันคือ 465 กรดอะมิโน เลือกยีน *prh19* เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบสายดีเอ็นเอไพร์เมอร์ 5 สาย เพื่อใช้เพิ่มยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส จากคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ *A. thaliana* โดยกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Polymerase Chain Reaction หรือกระบวนการ PCR ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4 เพื่อใช้เพิ่มจำนวนยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *prh19*) โดยครอบคลุมยีนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่งไปคลอโรพลาสต์ด้วย ดีเอ็นเอที่ได้ขนาด 1,558 เบส ปลายด้าน 5′ และปลายด้าน 3′ ของดีเอ็นเอที่ได้มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I ตามลำดับ เรียกดีเอ็นเอที่ได้ว่า SNN1 ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 และ Prh2 ใช้เพื่อยืนยันว่าดีเอ็นเอแม่แบบขนาดประมาณ 1,500 เบส เป็นดีเอ็นเอ SNN1 จริง เรียกดีเอ็นเอที่ได้ขนาด 523 เบส ว่าดีเอ็นเอ SNN1-1 ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh5 และ Prh4 เพื่อใช้ขจัดยีนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่งออกจากยีน *prh19* หรือดีเอ็นเอ SNN1 ปลายด้าน 5′ และปลายด้าน 3′ ของดีเอ็นเอที่ได้มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Xho*I ตามลำดับ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ เรสทริกชัน *Nde*I ที่ปลายด้าน 5′ ก่อให้เกิดจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส เรียกดีเอ็นเอที่ได้ขนาด 1,423 เบส ว่าดีเอ็นเอ SNN2

กระบวนการ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ SNN1 ได้ทำการแปรผันอุณหภูมิขั้นตอนที่ดีเอ็นเอไพร์เมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่จะได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวของ SNN1 คือ 58 องศาเซลเซียส ดังนั้นกระบวนการ PCR ในการทดลองต่อไปจึงกำหนดให้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ไพโรเบสดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Pyrobest DNA polymerase) ที่ใช้มีกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องของนิวคลีโอไทด์ที่นำมาต่อสาย (prove reading) ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทั้ง 5 สาย สังเคราะห์ขึ้นโดยไม่ได้เติมหมู่ฟอสเฟตที่ปลายด้าน 5′ และทิศทางการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (DNA replication) โดยกระบวนการ PCR เป็นชนิด 5′ ไป 3′ ดีเอ็นเอ SNN1 และ SNN2 ที่ได้จึงเป็นดีเอ็นเอปลายทู่ที่มีลำดับเบสถูกต้อง และไม่มีหมู่ฟอสเฟตที่

ปลายด้าน 5′ ดังนั้นพลาสมิดพาหะที่จะนำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอ SNN1 และ SNN2 หลังจากตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชันแล้วจึงไม่สามารถทำการป้องกันการเชื่อมต่อกันเอง (self ligation) ของพลาสมิดพาหะโดยการกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายด้าน 5′ ด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) ได้

ผลการโคลนดีเอ็นเอ SNN1 โดยการเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I ด้วยเอนไซม์ T4 ligase ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 ได้โคโลนีสีฟ้าเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากการเกิด self ligation ของพลาสมิดพาหะ pUC18 ได้โคโลนีสีขาว (ทรานสฟอร์แมนต์) คิดเป็นอัตราส่วน 1 : 3 ของโคโลนีสีฟ้า คัดเลือกโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์สีขาวจำนวน 48 โคโลนี มาตรวจหาพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 โดยวิธีโคโลนีแครกกิง (colony cracking) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว พบว่ามีเพียง 6 โคโลนีเท่านั้นที่มีพลาสมิดขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 ตรวจสอบขั้นที่ 2 ว่าในพลาสมิดขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 ที่ได้มีดีเอ็นเอ SNN1 สอดแทรกอยู่โดยเลือกพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 ที่สกัดได้จากทรานสฟอร์แมนต์จำนวน 3 โคโลนี มาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I วิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบขนาดประมาณ 2.6 กิโลเบส และ 1.5 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิดพาหะ pUC18 และดีเอ็นเอ SNN1 ตามลำดับ ตรวจสอบขั้นที่ 3 โดยการนำพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบสสอดแทรกอยู่จากผลการตรวจสอบขั้นที่ 2 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4 ผลการวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสได้แถบดีเอ็นเอเพียงชิ้นเดียวขนาดประมาณ 1,500 เบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอ SNN1 จากผลการทดสอบทั้งสามขั้นตอนนี้สรุปได้ว่าทรานสฟอร์แมนต์ทั้ง 3 โคโลนีที่นำมาตรวจสอบนี้มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ SNN1 สอดแทรกอยู่ เรียกรีคอมบิแนนต์พลาสมิดนี้ว่า pUC/SNN1

นำรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN1 มาหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ SNN1 โดยวิธี Thermal Cycle DNA Sequencing และเนื่องจากดีเอ็นเอ SNN1 มีขนาดประมาณ 1,500 เบส การหาลำดับเบสจึงต้องใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ 3 สาย เพื่อให้ได้ลำดับเบสครบตลอดทั้งสายดีเอ็นเอ ได้แก่ ดีเอ็นไพร์เมอร์ทิศทางไปและทิศทางกลับซึ่งอยู่ที่ปลายด้าน 5′ และ 3′ ของตำแหน่งสอดแทรกของยีน (multiple cloning site) บนพลาสมิดพาหะ pUC18 (universal primers) เพื่อหาลำดับเบสด้านปลาย 5′ และ 3′ ของดีเอ็นเอ SNN1 และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 เพื่อหาลำดับเบสช่วงกลางของดีเอ็นเอ SNN1 ผลการหาลำดับเบสพบว่าลำดับเบสของดีเอ็นเอ SNN1 เหมือนกับลำดับเบสของยีน *prh19* และยีน *APR1*

เท่ากับ 99 และ 100 เปอร์เซนต์ตามลำดับ โดยตำแหน่งของเบสที่แตกต่างกันระหว่างยีน *prh19* และดีเอ็นเอ SNN1 คือลำดับที่ 1,160; 1,161; 1,248; 1,268 และ 1,269 ของยีน *prh19* จากข้อมูลลำดับเบสที่ได้นำมาวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนซึ่งสามารถแปลรหัสจากดีเอ็นเอ SNN1 พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสจากยีน *prh19* และยีน *APR1* เท่ากับ 99 และ 100 เปอร์เซนต์ตามลำดับ โดยกรดอะมิโนที่แตกต่างกันระหว่างยีน *prh19* และดีเอ็นเอ SNN1 คือตำแหน่งที่ 371, 400 และ 407 ของยีน *prh19*

Bick,J.A. (1998) ได้รายงานว่ายีน *APR1* และยีน *prh19* นี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนประมวลรหัสของเอพีเอสรีดักเตส และส่วนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่ง (Transit peptide) ทำหน้าที่นำโปรตีนที่ถอดรหัสจากยีน *APR1* และยีน *prh19* จากนิวเคลียสออกไปยังคลอโรพลาสต์ สายเปปไทด์ขนส่งจะถูกตัดออกที่คลอโรพลาสต์เหลือไว้เฉพาะส่วนที่แปลรหัสเป็นเอพีเอสรีดักเตสต่อไป เนื่องจาก *E. coli* เป็นโปรคาริโอท (prokaryotic cell) ไม่ต้องมีการนำโปรตีนจากนิวเคลียสไปยังออกาแนลเฉพาะ และไม่มีกระบวนการตัดโปรตีนบางส่วนเหมือนยูคาริโอต (eukaryotic cell) ดังนั้นเพื่อให้ดีเอ็นเอ SNN1 ซึ่งเป็นยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสของพืช *A. thaliana* ที่เพิ่มจำนวนได้แสดงออกใน *E. coli* จึงทำการขจัดยีนส่วนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่งออกและเติมจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสของยีนในตำแหน่งที่ 175 ซึ่งเป็นตำแหน่งหลังจากจุดตัดของสายเปปไทด์ขนส่ง (transit peptide cleavage site) (Gutierrez-Marcos และคณะ 1996) การทดลองนี้ทำโดยใช้ดีเอ็นเอ SNN1 เป็นแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh5 และ Prh4 ซึ่งออกแบบให้ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้เป็นยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสที่ปราศจากยีนส่วนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่ง (ดีเอ็นเอ SNN2) และที่ปลายด้าน 5′ มีจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส ทั้งนี้เพราะดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh5 ออกแบบให้ปลาย 5′ มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I มีผลทำให้เกิดโคดอน (codon) ซึ่งเป็นรหัสเริ่มต้นของการแปลรหัสในดีเอ็นเอ SNN2 ดีเอ็นเอ SNN2 มีขนาด 1,423 เบส เชื่อมต่อดีเอ็นเอ SNN2 ปลายทู่ซึ่งมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Xho*I ที่ปลายด้าน 5′ และ 3′ ตามลำดับ เข้ากับพลาสมิดพาหะ pUC18 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I ด้วยเอนไซม์ T4 ligase ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 พบว่าทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นสีฟ้า โดยมีอัตราส่วนระหว่างโคโลนีสีขาว ต่อโคโลนีสีฟ้าเท่ากับ 1: 3 คัดเลือกโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์สีขาวจำนวน 48 โคโลนี มาตรวจหาพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 โดยวิธีโคโลนีแครกกิง พบว่ามี 12 โคโลนีที่มีพลาสมิดขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18

นำทรานสฟอร์แมนต์ที่มีพลาสมิดขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 ที่ได้มาสกัดเอาพลาสมิด เพื่อตรวจสอบทิศทางการสอดแทรกของดีเอ็นเอ SNN2 ในพลาสมิดพาหะ pUC18 ว่าดีเอ็นเอ SNN2 หันปลายด้าน 5′ เข้าหายีนส่วนโปรโมเตอร์ *lac* (*lac* promotor) ของพลาสมิดพาหะ pUC18 ซึ่งเป็นทิศทางซึ่งดีเอ็นเอ SNN2 จะสามารถแสดงออกได้ โดยการตัดพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI ผลการวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,423 เบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอ SNN2 แสดงว่าดีเอ็นเอ SNN2 สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดพาหะ pUC18 ในทิศทางที่สามารถแสดงออกได้ภายใต้ยีนส่วนโปรโมเตอร์ *lac* ของพลาสมิดพาหะ pUC18 เรียก รีคอมบิแนนต์พลาสมิดนี้ว่า pUC/SNN2

ผลการทดสอบว่าดีเอ็นเอ SNN2 สามารถประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสได้โดยการทดสอบด้วยวิธีคอมพลีเมนเทชัน (complementation test) ตามวิธีของ Setya และคณะ 1996 และ Gutierrez-Marcos และคณะ 1996 โดยการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN2 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM96 ซึ่งเป็น *E. coli* สายพันธุ์ที่ยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตสเกิดการกลายพันธุ์ จึงไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนซิสเตอีนจากกำมะถันซัลเฟตได้ การทดลองชุดควบคุมใช้ *E. coli* JM96 ที่มีพลาสมิดพาหะ pUC18, *E. coli* JM96 และ *E. coli* JM109 เพาะเลี้ยง *E. coli* ทั้ง 4 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร M9 2 ชนิด ชนิดแรกเติมกรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิด ความเข้มข้นชนิดละ 25 ไมโครกรัม/มล. ชนิดที่ 2 เติมกรดอะมิโนเพียง 18 ชนิดที่ความเข้มข้นชนิดละ 25 ไมโครกรัม/มล. เช่นเดียวกันแต่ไม่เติมกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่า *E. coli* ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร M9 ชนิดที่ 1 ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 2 วัน เฉพาะ *E. coli* JM96 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN2 และ *E. coli* JM109 สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร M9 ชนิดที่ 2 ภายหลังการบ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน แสดงว่าดีเอ็นเอ SNN2 สามารถแสดงออกและเป็นรหัส (code) เอพีเอสรีดักเตสได้ *E. coli* JM96 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN2 จึงสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีน และกรดอะมิโนเมไธโอนีนเพื่อการเจริญได้

ผลการทดสอบว่าการเพิ่มจำนวนชุดของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส สามารถทำให้ *E. coli* นำกำมะถันซัลเฟตมาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซิสเตอีนหรือกรดอะมิโนเมไธโอนีนได้เพิ่มมากขึ้น โดยการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN2 ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI นำมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pET5b (Promega, USA.) ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน

*Nde*I และ *Bam*HI ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์จากความสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เลือกทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้มา 8 โคโลนีนำมาตรวจหาพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pET5b โดยวิธีโคโลนีแตรกกิง พบว่าทั้ง 8 โคโลนีมีพลาสมิดขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pET5b ตรวจสอบว่าเป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ SNN2 สอดแทรกอยู่ โดยการตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI วิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ผลการวิเคราะห์พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 4.3 กิโลเบส และ 1.4 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิดพาหะ pET5b และดีเอ็นเอ SNN2 เรียกรีคอมบิแนนต์พลาสมิดนี้ว่า pET/SNN2

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pET/SNN2 เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 DE3 ซึ่งมียีนประมวลรหัส T7 RNA polymerase ซึ่งทำงานภายใต้การควบคุมของยีนส่วนโปรโมเตอร์ *lacUV5* (*lacUV5* promoter) บนพลาสมิดพาหะ pET5b ใช้ IPTG เป็นตัวชักนำให้สังเคราะห์เอนไซม์ T7 RNA polymerase คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์จากความสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เพาะเลี้ยงทรานสฟอร์แมนต์ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pET/SNN2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร M9 ที่เติมกรดอะมิโน 18 ชนิดความเข้มข้นชนิดละ 25 ไมโครกรัมต่อมล. ไม่เติมกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีน และกำหนดให้ความเข้มข้นสุดท้ายของกำมะถันซัลเฟต ในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้เท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ การทดลองชุดควบคุมใช้ *E. coli* JM109 DE3 ที่มีพลาสมิดพาหะ pET5b และ *E. coli* JM109 DE3 และอาหารเลี้ยงเชื้อข้างต้นที่ไม่ปลูกเชื้อ ติดตามการเจริญโดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) หลังจากนั้นแยกเซลล์ออก นำเซลล์มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ นำส่วนน้ำใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณของกำมะถันซัลเฟตโดยวิธีตกตะกอนกำมะถันซัลเฟตด้วยแบเรียมคลอไรด์ เปรียบเทียบกับปริมาณกำมะถันซัลเฟตในการทดลองชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งไม่ได้ปลูกเชื้อ

ผลการวัดการเจริญพบว่า *E. coli* JM109DE3 ทุกชนิดที่ทดสอบเจริญได้เท่าๆ กัน ผลการวิเคราะห์ปริมาณกำมะถันซัลเฟตก่อนและหลังการบ่มเชื้อเปรียบเทียบกับปริมาณกำมะถันซัลเฟตในการทดลองชุมควบคุมซึ่งไม่ปลูกเชื้อ พบว่าปริมาณกำมะถันซัลเฟตที่ *E. coli* JM109 DE3, *E. coli* JM109 DE3 ที่มีพลาสมิดพาหะ pET5b และ *E. coli* JM109 DE3 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pET/SNN2 ใช้ไปเท่ากับ 8.2, 13.1 และ 18.4 มก./ล. ตามลำดับ เนื่องด้วยพลาสมิดพาหะ pET5b มียีนประมวลโปรตีนฟิวชัน (fusion protein) ซึ่งโปรตีนฟิวชันมีกรดอะมิโนเมไธโอนีนเป็นองค์ประกอบ

3 ตัว จึงทำให้ *E. coli* JM109DE3 ที่มีพลาสมิดพาหะ pET5b นำเอากำมะถันซัลเฟตไปใช้มากกว่า *E.coli* JM109DE3 เพราะนำไปสังเคราะห์เป็นโปรตีนฟิวชัน ปริมาณกำมะถันซัลเฟตซึ่ง *E. coli* JM109DE3 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pET/SNN2 นำไปใช้มากกว่า *E. coli* JM109DE3 ที่มีพลาสมิดพาหะ pET5b เท่ากับ 5.3 มก./ลิตร ซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มจำนวนชุดของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส แสดงว่าเอพีเอสรีดักเตสสามารถทำให้ *E. coli* JM109DE3 นำกำมะถันซัลเฟตมาสร้างเป็นกรดอะมิโนซิสเตอีน กรดอะมิโนเมไธโอนีน และสารเมทาโบไลต์ปฐมภูมิ และทุติยภูมิที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบได้เพิ่มมากขึ้น การทดสอบมิได้ทำการหากิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสของน้ำสกัดจากเซลล์ *E. coli* JM109DE3 ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ทดสอบเปรียบเทียบกันเพราะข้อจำกัดของการใช้สารกัมมันตรังสี (radioisotope)

เพื่อตรวจสอบว่าการเพิ่มกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในพืช จะมีผลทำให้พืชสามารถนำกำมะถันซัลเฟตมาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซิสเตได้มากขึ้นหรือไม่ จึงเชื่อมต่อดีเอ็นเอ SNN1 เข้ากับ พลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I ด้วยเอนไซม์ T4 ligase พลาสมิด pBIH1-IG(SX) นี้ดัดแปลงมาจากพลาสมิด pBIH1-IG (Kimura และคณะ 1993) คือทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ เรสทริกชัน *Sac*I ซึ่งอยู่ด้านปลาย 3′ ของยีน *Gus* เปลี่ยนเป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Xho*I พลาสมิด pBIH1-IG(SX) เป็นพลาสมิดที่ต้องอยู่ร่วมกับพลาสมิด pEHA101 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีน *vir* ใน *A. tumefaciens* EHA101 (Hood และคณะ 1986) จึงจะสามารถถ่ายทอดยีนส่วน T-DNA ให้แก่โครโมโซมของพืชได้ พลาสมิด pBIH1-IG(SX) สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งใน *E. coli* และ *A. tumefaciens* EHA101 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX) ที่มีดีเอ็นเอ SNN1 สอดแทรกอยู่เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 เพื่อเพิ่มจำนวนรีคอมบิแนนต์พลาสมิด คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์จากความสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. นำทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้จำนวน 9 โคโลนี มาสกัดเอาพลาสมิด ตรวจวิเคราะห์ว่าเป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ SNN1 สอดแทรกโดยการนำพลาสมิดมาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้โดยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่าพลาสมิดที่สกัดจากเพียง 2 โคโลนีที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 15 กิโลเบส และ 1.5 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) ที่ปราศจากยีน *Gus* และขนาดของดีเอ็นเอ SNN1 เรียกรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ได้ว่า pBIH1/SNN1

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1/SNN1 เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *A. tumefaciens* EHA101 โดยวิธีอิเลคโตรพอเรชัน คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์จากความสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ได้ทรานสฟอร์-แมนต์จำนวน 200 โคโลนี ตรวจสอบว่าทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1/SNN1 ด้วยวิธีโคโลนี PCR โดยนำทรานสฟอร์แมนต์จำนวน 8 โคโลนี มาทำให้เซลล์แตกแล้วใช้ดีเอ็นเอที่ได้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 และ Prh2 วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ผลการทำโคโลนี PCR พบว่าเพียง 2 โคโลนี ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบสซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอ SNN1-1 ตามที่ควรจะได้ แสดงว่าเป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1/SNN1

เพื่อที่จะหาความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส และประสิทธิภาพการดูดซับกำมะถันซัลเฟตเข้าสู่เซลล์พืช งานวิจัยที่จะต้องทำต่อไปคือทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1/SNN1 เข้าสู่เซลล์พืช วิเคราะห์กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส และวิเคราะห์ปริมาณกำมะถันซัลเฟตที่พืชดูดซับเข้าสู่เซลล์