

ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้จะโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp.190-1 โดยใช้ *E. coli* HB101 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ทั้งนี้เพราะเป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ขาดยีนกลูโคสไอโซเมอเรส หรือ ไซโลสไอโซเมอเรส คือ *xy15* จึงทำให้ไม่สามารถใช้ไซโลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ทำให้เหมาะสมที่จะใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อทำการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp.190-1 เข้าสู่ระบบเซลล์เจ้าบ้านของ *E. coli* HB101 (*E. coli*-host system) ทั้งนี้จะสามารถตรวจสอบการรับยีนที่ต้องการเข้าไปได้ง่าย โดยนำทรานสฟอร์มแมนท์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกแบคทีเรียแกรมลบ (Miller 1972) โดยเติม 1% ไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว จุลินทรีย์แกรมลบที่ใช้ไซโลสได้จะให้โคโลนีสีแดง ส่วนโคโลนีที่ไม่สามารถใช้ไซโลสได้จะให้สีขาว ผลการทดลองในรูปที่ 4 โดยนำ *E. coli* SH50 ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานที่สามารถใช้ไซโลสได้มาเพาะเลี้ยงบน MacConkey agar base ที่มี 1% ไซโลสเปรียบเทียบกับ *E. coli* HB101 และ *E. coli* HB101 ที่รับพลาสมิด pUC18 และ pUC19 ซึ่งพบว่า *E. coli* SH50 ให้โคโลนีสีแดง ในขณะที่ *E. coli* HB101 และ *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิดพาหะ pUC18 และ pUC19 ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ให้โคโลนีสีขาว ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าการใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านของ *E. coli* HB101 และพลาสมิดพาหะ pUC18 และ pUC19 เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสต่อไป

การโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp.190-1

เข้าสู่ *E. coli* HB101

1.1 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนกลูโคสไอโซเมอเรส

จากรายงานการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าขนาดของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสมีขนาดประมาณ 1.6 กิโลเบส (Briggs และคณะ 1984) หรือ 1.16 กิโลเบส (Wong และคณะ 1991)



รูปที่ 4 เทคนิคคัดเลือกโคลนที่มียีนกลูโคสไอโซเมอเรส (positive clone) เมื่อใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านของ *E. coli* HB101 โดยเปรียบเทียบ *E. coli* SH50 (xyI^+) กับ *E. coli* HB101 (xyI^-), *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิดพาหะ pUC18 และ pUC19 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มี 1% ไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอน

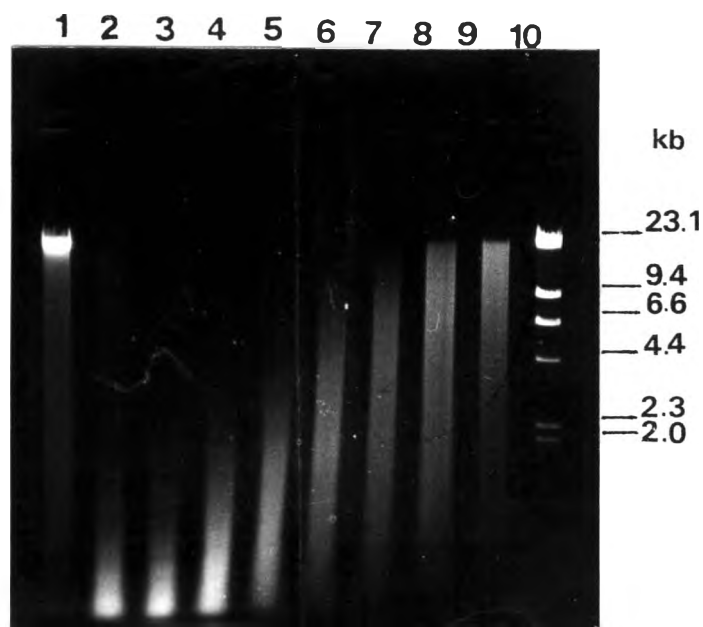
ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้เลือกใช้นาฬิกาชิ้นส่วนของโครโมโซมอดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. 190-1 ให้อยู่ในช่วง 2-8 กิโลเบส ซึ่งคาดว่าครอบคลุมยีน กลูโคสไอโซเมอเรสทั้งหมด จากการย่อยโครโมโซมอดีเอ็นเอแบบกึ่งสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* หรือ *MboI* ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 10 ดังแสดงในรูปที่ 5 พบว่าช่องที่ 8 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ และโครโมโซมอดีเอ็นเอ คือที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.046875 หน่วย จากผลการทดลองนี้จะนำอัตราส่วนที่ได้ไปขยายส่วนเพื่อเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปริมาณมากต่อไป

1.2 การเตรียมพลาสมิดนาหะ pUC18 และ pUC19

เมื่อนำพลาสมิดนาหะ pUC18 และ pUC19 มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI* จะได้พลาสมิดนาหะในรูปเส้น (linear form) ดังแสดงในรูปที่ 6 และรูปที่ 7 โดยมีโปรโมเตอร์ของยีน *LacZ* อยู่ก่อนตำแหน่งที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI* นำพลาสมิดนาหะที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แล้วมาแยก และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดแยก GENE CLEAN Kit ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 12 แล้วกำจัดหมุ่นอลเนตที่ปลายทั้งสองข้างด้วย Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) พบว่าพลาสมิดนาหะ pUC18 และ pUC19 ไม่สามารถเชื่อมตัวเองได้ (Self ligation) เมื่อเชื่อมด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ดังแสดงในรูปที่ 8 ช่องที่ 3 และรูปที่ 9 ช่องที่ 4 และ 8 ตามลำดับ โดยพลาสมิดนาหะทั้งสองยังคงอยู่ในรูปเส้นในตำแหน่งที่ 2.7 กิโลเบส

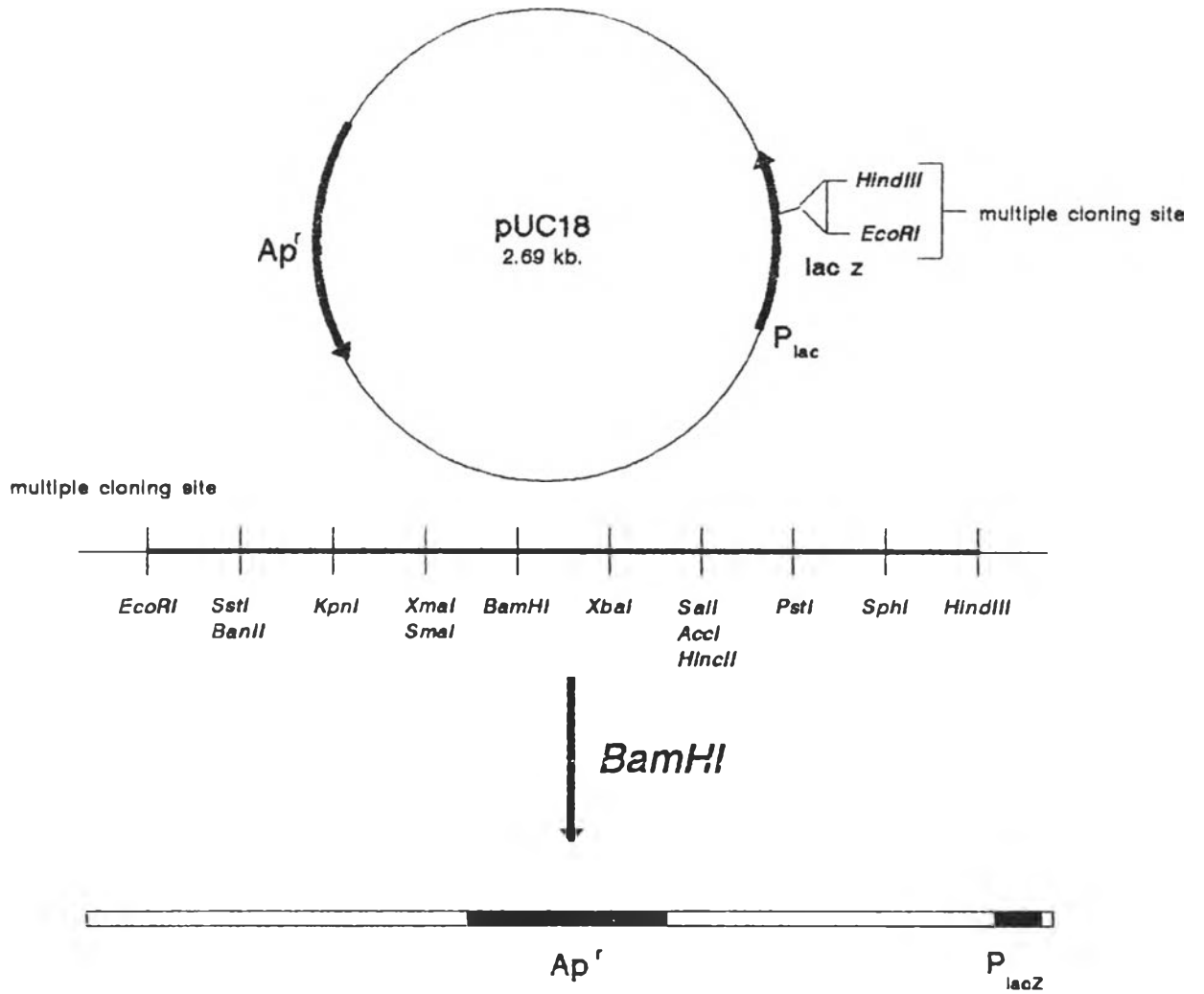
1.3 การสร้างรีคอมบิแนนต์พลาสมิด

เมื่อเชื่อมชิ้นส่วนโครโมโซมอดีเอ็นเอจาก *Streptomyces* sp. 190-1 ขนาด 2-8 กิโลเบส เข้ากับพลาสมิดนาหะ pUC18 และ pUC19 ที่เตรียมได้จาก ข้อ 1.2 ตามวิธีการที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 14 พบว่าเมื่อใช้พลาสมิดนาหะ pUC18 จะได้รีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่สูงขึ้นจากเดิมอยู่ในช่วง 6-23 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 8 ช่องที่ 4 และยังคงมีส่วนของพลาสมิดนาหะเหลืออยู่ ซึ่งจะเห็นเป็นแถบที่ตำแหน่ง 2.7 กิโลเบส ซึ่งเป็นตำแหน่งในรูปเส้นของพลาสมิดนาหะ และชิ้นส่วนโครโมโซมอดีเอ็นเอขนาดเล็ก เมื่อใช้พลาสมิดนาหะ pUC19 รีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ได้อยู่ในช่วง 6-20 กิโลเบสดังแสดงในรูปที่ 9 ช่องที่ 5 และ 7 และมีส่วนพลาสมิดนาหะและโครโมโซมอดีเอ็นเอเหลืออยู่เช่นเดียวกับเมื่อใช้พลาสมิดนาหะ pUC18

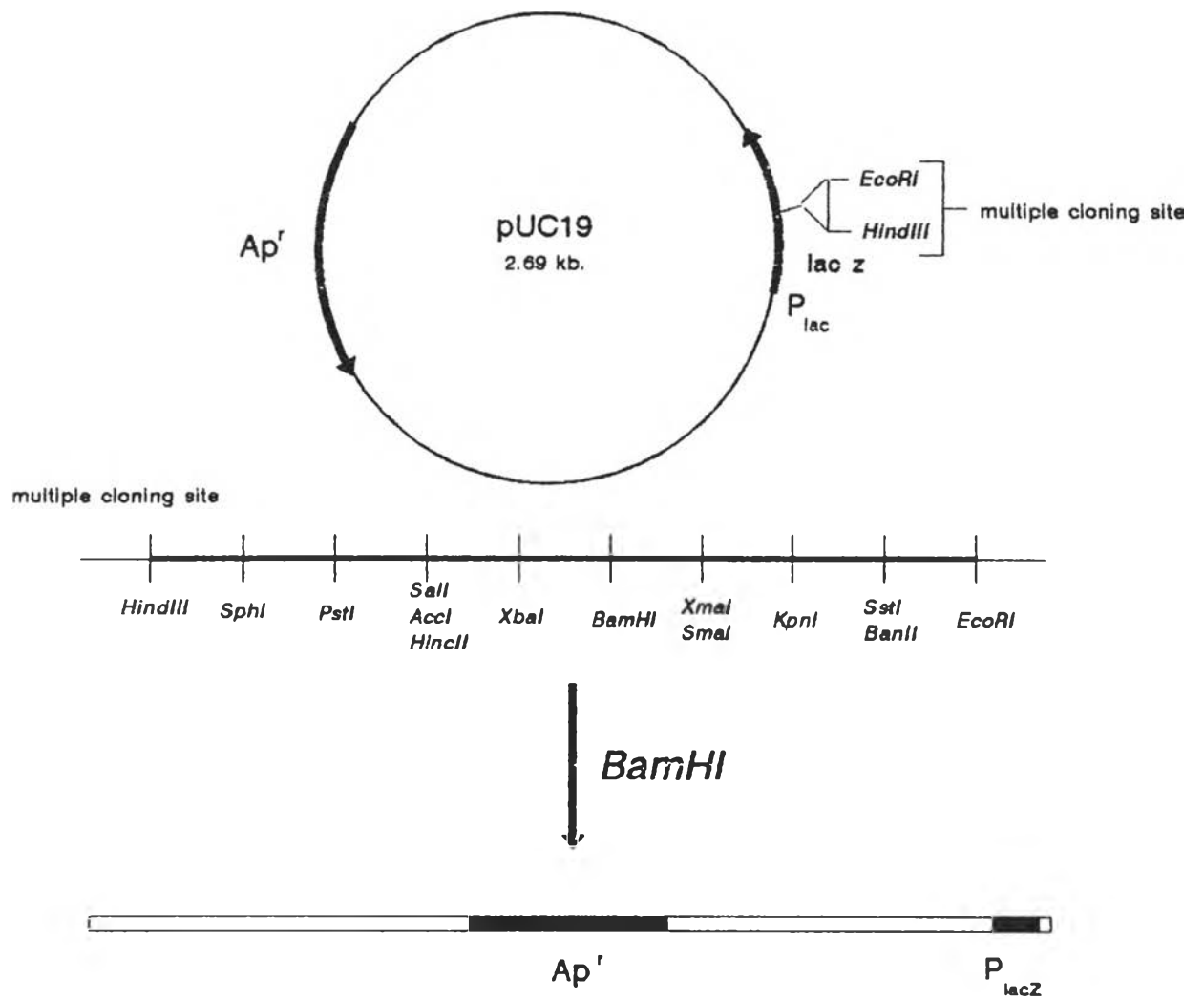


รูปที่ 5 ผลการย่อยโครโมโซมอลติเอ็นเอของ *Streptomyces* sp.190-1 ด้วย
เรสทริกชันเอนไซม์ *Sau3AI* หรือ *MboI* แบบกึ่งสมบูรณ์ (Partial
Digestion)

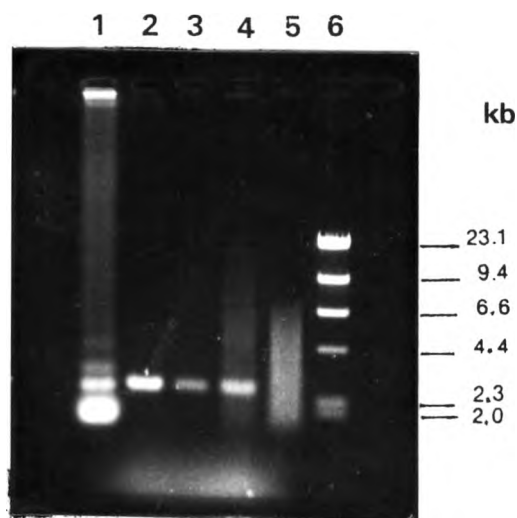
ช่องที่ 1	โครโมโซมอลติเอ็นเอของ <i>Streptomyces</i> sp.190-1		
ช่องที่ 2	โครโมโซมอลติเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์	3	หน่วย
ช่องที่ 3	โครโมโซมอลติเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์	1.5	หน่วย
ช่องที่ 4	โครโมโซมอลติเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์	0.75	หน่วย
ช่องที่ 5	โครโมโซมอลติเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์	0.375	หน่วย
ช่องที่ 6	โครโมโซมอลติเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์	0.1875	หน่วย
ช่องที่ 7	โครโมโซมอลติเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์	0.09375	หน่วย
ช่องที่ 8	โครโมโซมอลติเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์	0.046875	หน่วย
ช่องที่ 9	โครโมโซมอลติเอ็นเอ 1.2 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์	0.0234375	หน่วย
ช่องที่ 10	λ DNA/ <i>HindIII</i>		



รูปที่ 6 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดนากะ pUC18 เมื่อถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI*



รูปที่ 7 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pUC19 เมื่อถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamHI



รูปที่ 8 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของพลาสมิดนาหะ pUC18 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเองหลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว และแสดงรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมด้วย T4 DNA ligase แล้วเทียบกับ λ DNA/*Hind*III

ช่องที่ 1 พลาสมิดนาหะ pUC18

ช่องที่ 2 พลาสมิดนาหะ pUC18 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI และ CIAP

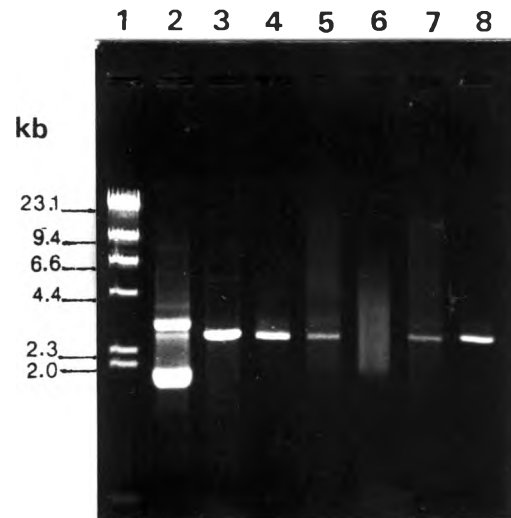
ช่องที่ 3 พลาสมิดนาหะ pUC18 จากช่องที่ 2 ที่ผ่านการทดสอบการเชื่อมตัวเอง

ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนต์พลาสมิด ระหว่างชิ้นส่วนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

กับพลาสมิดนาหะ pUC18

ช่องที่ 5 ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp.190-1

ช่องที่ 6 λ DNA/*Hind* III



รูปที่ 9 ผลการทำออยก้าโรสเจลอี้เล็กโทรไฟริชีสของพลาสมีดพหะ pUC19 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเอง หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว และแสดงรีคอมบิแนนต์พลาสมีดที่ผ่านการเชื่อมด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase แล้วเทียบกับ λ DNA/*Hind*III

ช่องที่ 1 λ DNA/*Hind*III

ช่องที่ 2 พลาสมีดพหะ pUC19

ช่องที่ 3 พลาสมีดพหะ pUC19 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI. และ CIAP

ช่องที่ 4,8 พลาสมีดพหะ pUC19 จากช่องที่ 3 ที่ผ่านการทดสอบการเชื่อมตัวเอง (Self ligation)

ช่องที่ 5,7 รีคอมบิแนนต์พลาสมีดระหว่างชิ้นส่วนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอกับพลาสมีดพหะ pUC19

ช่องที่ 6 ชิ้นส่วนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp.190-1

2. ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดนำหะเข้าสู่ *E. coli* HB101

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดนำหะ pUC18 และ pUC19 ที่ยังไม่ได้ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* HB101 ที่เตรียมด้วยแคลเซียมคลอไรด์ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 8.1 ดังแสดงในตารางที่ 1 และ ที่เตรียมด้วยรูบิเดียมคลอไรด์ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 8.2 ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม pUC18 และ pUC19 มีค่าอยู่ในเกณฑ์สูงเพียงพอที่จะใช้สำหรับตีเอ็นเอโคลนนิ่งได้ เนื่องจากเมื่อทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบีแนนต์พลาสมิดจากข้อ 1.3 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มจะลดลง จากการทดลองพบว่าการใช้รูบิเดียม-คลอไรด์ หรือ แคลเซียมคลอไรด์ในการเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มไม่แตกต่างกันมากนัก แต่เนื่องจากรูบิเดียมคลอไรด์ มีราคาสูงกว่า แคลเซียมคลอไรด์ ดังนั้นในการเตรียมคอมพีเทนต์ในการศึกษานี้จึงเลือกใช้ แคลเซียมคลอไรด์

3. การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนต์

จากการคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนต์ของ *E. coli* HB101 ที่ถูกทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบีแนนต์พลาสมิดที่มี pUC18 และ pUC19 เป็นพลาสมิดนำหะ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยที่โคลนที่รับยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจะให้โคโลนีสีแดง (Positive clone) ในขณะที่โคลนที่ไม่ได้รับยีนกลูโคสไอโซเมอเรสเข้าไปจะให้โคโลนีสีขาว (Negative clone) ดังแสดงในรูปที่ 10 ทรานสฟอร์มแมนต์ที่คัดเลือกได้ทำให้โคโลนีสีแดงนำมาสกัดพลาสมิดตามวิธีการที่กล่าวมาในบทที่ 2 ข้อ 17 เพื่อเปรียบเทียบขนาดของรีคอมบีแนนต์พลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้กับพลาสมิดนำหะเดิม พบว่ารีคอมบีแนนต์พลาสมิดที่ได้มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดนำหะเดิมทุกตัว ดังแสดงในรูปที่ 11 ช่องที่ 2-8

นำรีคอมบีแนนต์พลาสมิดที่ให้แอกติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส มาทดสอบซ้ำโดยทรานสฟอร์มกลับเข้าสู่ *E. coli* HB101 อีกครั้ง (Re-transformation) พบว่ารีคอมบีแนนต์พลาสมิดที่สกัดได้จากโคลน 289 ซึ่งให้ชื่อว่า pUR289 เท่านั้นที่ให้ทรานสฟอร์มแมนต์ทุกโคโลนีเป็นสีแดง ดังแสดงในรูปที่ 12 ในขณะที่ทรานสฟอร์มแมนต์ที่รับพลาสมิดซึ่งสกัดจากโคลนอื่นๆให้โคโลนีสีขาว และเมื่อนำโคลน 289 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มี 1% ไซโลส และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเพื่อยืนยัน

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดนำหะ pUC18 และ pUC19 เข้าสู่
 คอมพิวเตอร์เซลล์ของ *E. coli* HB101 ที่เตรียมด้วยแคลเซียมคลอไรด์

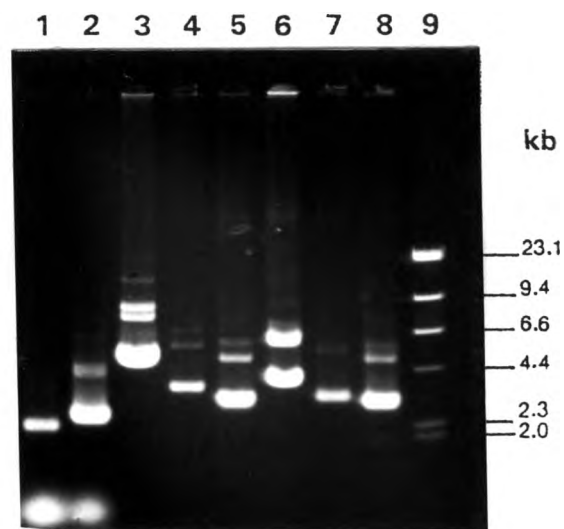
เชื้อจุลินทรีย์/พลาสมิด	ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม (จำนวนทรานสฟอร์มแมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ)
<i>E. coli</i> HB101 /pUC18	2.08×10^6
<i>E. coli</i> HB101 /pUC19	2.5×10^6

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพหุ pUC18 และ pUC19 เข้าสู่
 คอมพิวเตอร์เซลล์ของ *E. coli* HB101 ที่เตรียมด้วยวิธีเดิมคลอไรด์

เชื้อจุลินทรีย์/พลาสมิด	ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม (จำนวนทรานสฟอร์มแมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ)
<i>E. coli</i> HB101 /pUC18	$4.5 \times 10^5 - 10^6$
<i>E. coli</i> HB101 /pUC19	3.35×10^5



รูปที่ 10 การคัดเลือกโคลนที่รับยีนกลูโคสไอโซเมอเรสเข้าไปจะให้โคโลนีสีแดง ในขณะที่โคลนที่ไม่ได้รับยีนกลูโคสไอโซเมอเรส จะให้โคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มี 1% ไซโลส และ 50 ไมโครกรัม/มล. ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน



รูปที่ 11 อีทาร์โรสเจลอีเล็กโทรโฟรีซิสของพลาสมิดพาหะ กับ รีคอมบิแนนต์พลาสมิด จากโคลนที่คัดเลือกได้ เมื่อใช้ *E. coli* HB101 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และ pUC18, pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะ

ช่องที่ 1 พลาสมิดพาหะ pUC18

ช่องที่ 2-8 รีคอมบิแนนต์พลาสมิด

ช่องที่ 9 λ DNA/*Hind*III



รูปที่ 12 รีทรานส์ฟอร์มเมชัน (Re-transformation) ของ *E. coli* HB101 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ให้ 100% ของโคโลนีสีแดง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มี 1% ไชโลส และ 50 ไมโครกรัม/มล. ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน

ย่นว่ายีนกลูโคสไอโซเมอเรสมีความเสถียรในโคลน 289 ผลการทดลองพบว่า โคลน 289 ยังคงให้สีแดงดังแสดงในรูปที่ 13 จึงเป็นการยืนยันว่าโคลน 289 รัยีนกลูโคสไอโซเมอเรสเข้าไปจริง ดังนั้นจึงเลือกโคลน 289 ซึ่งเป็นโคลนที่ได้จากรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่มี pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะ มาศึกษาต่อไป

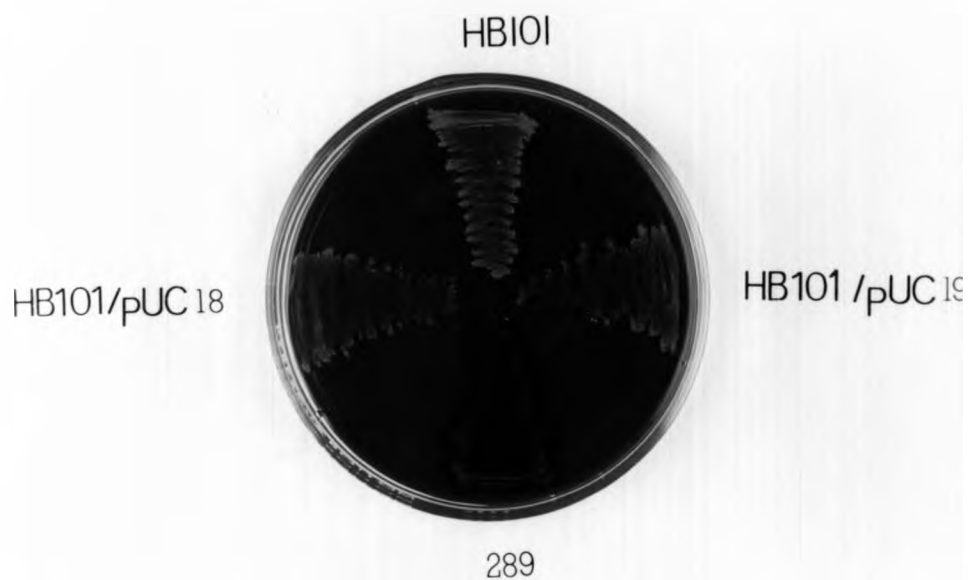
4. การศึกษาขนาดของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ที่ได้จากโคลน 289

เมื่อนำโคลน 289 มาสกัดพลาสมิดและเปรียบเทียบกับพลาสมิดพาหะ pUC18 วิเคราะห์ผลบนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่ารีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 เป็นการยืนยันว่ารีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 รัยีนส่วนดีเอ็นเอเข้าไปจริง ดังแสดงในรูปที่ 14 ช่องที่ 3 และเมื่อนำมาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* และ *XbaI* แบบสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 15 ช่องที่ 4 และ 5 ตามลำดับพบว่า จะได้ดีเอ็นเอรูปเส้นที่ตำแหน่ง 4.5 กิโลเบส เมื่อเทียบกับ λ DNA/*HindIII* ตำแหน่งเดียวกันและไม่ได้ขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งอื่น จึงคำนวณขนาดของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ได้ประมาณ 4.5 กิโลเบส และในรูปที่ 15 ช่องที่ 6 แสดงรีคอมบิแนนต์พลาสมิดของ pUR289 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 2 ชนิด (double digestion) คือ *EcoRI* และ *XbaI* ร่วมกัน พบว่าจะให้ขึ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ส่วน คือ แถบขมมีขนาด 2.7 กิโลเบส ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของพลาสมิดพาหะ pUC18 และ แถบล่างเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไป (inserted DNA) มีขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบสเมื่อคำนวณเทียบกับชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก λ DNA/*HindIII*

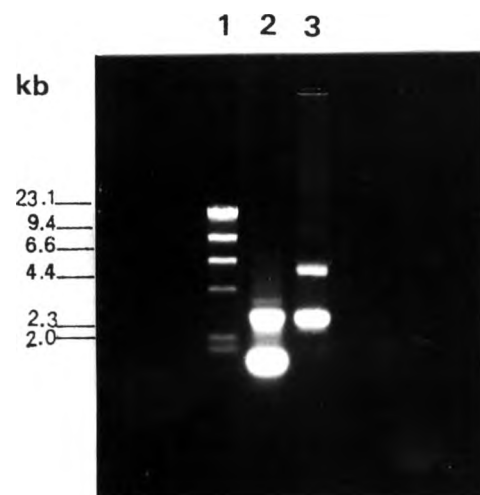
5. การวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของ pUR289

จากการวิเคราะห์แอกติวิตีเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของ pUC18 และ pUR289 ใน *E. coli* HB101 ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 18 ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าแอกติวิตีของ *E. coli* HB101 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีไซโลสมิค่าเท่ากับ 24.9 และ 7.8 นาโนโมล/นาท/มก. ของโปรตีนตามลำดับ ซึ่งสูงกว่า *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิดพาหะ pUC18 ซึ่งมีแอกติวิตีเท่ากับ 11.5 และ 6.05 นาโนโมล/นาท/มก. ของโปรตีน ตามลำดับ

เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแหล่งของคาร์บอนต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี 0.2% น้ำตาล



รูปที่ 13 แสดงโคโลนีสีแดงของโคลน 289 ที่คัดเลือกได้เทียบกับ *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิดพาหะ pUC18 pUC19 และที่ไม่มีพลาสมิดพาหะ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มี 1% ไซโลส

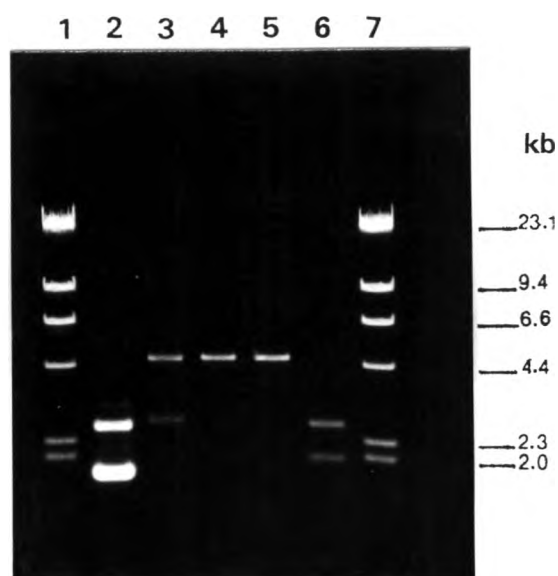


รูปที่ 14 อยะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289
เปรียบเทียบกับพลาสมิดพาหะ pUC18

ช่องที่ 1 λ DNA/*Hind*III

ช่องที่ 2 พลาสมิดพาหะ pUC18

ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289



รูปที่ 15 การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอที่รับเข้าไป (inserted DNA) ของริคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ วิเคราะห์ผลบนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เทียบกับ λ DNA/*Hind*III

ช่องที่ 1 λ DNA/*Hind*III

ช่องที่ 2 พลาสมิดพาหะ pUC18

ช่องที่ 3 ริคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289

ช่องที่ 4 ริคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI

ช่องที่ 5 ริคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I

ช่องที่ 6 ริคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI และ *Xba*I'

ช่องที่ 7 λ DNA/*Hind*III

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบระดับเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pUR289 หรือ pUC18 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี และไม่มี 0.2% ไชโลส เป็นองค์ประกอบ

พลาสมิด	แหล่งคาร์บอน 0.2%	แอกติวิตีจำเพาะของกลูโคสไอโซเมอเรส (นาโนโมล/นาที/มก. ของโปรตีน)
pUC18	-	6.05
pUC18	ไชโลส	11.5
pUR289	-	7.8
pUR289	ไชโลส	24.9

กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิดพาหะ pUC18 จะให้แอกติวิตีใกล้เคียงกับที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี 0.2% น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 11.0 และ 10.0 นาโนโมล/นาท./มก. ของโปรตีน ตามลำดับ ในขณะที่ *E. coli* HB101 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 27.9 และ 8.3 นาโนโมล/นาท./มก. ของโปรตีน ตามลำดับซึ่งสูงกว่าประมาณ 3 เท่า ซึ่งแสดงว่ากลูโคสมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์ ในขณะที่ไซโลสสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ได้

เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ พบว่า ปริมาณแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จาก *E. coli* HB101 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 มีค่าเท่ากับ 33.3 นาโนโมล/นาท./มก. ของโปรตีน เทียบกับที่ไม่ได้ใช้ IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ ปริมาณเอนไซม์ที่ได้มีค่าเท่ากับ 12.2 นาโนโมล/นาท./มก. ของโปรตีน ตารางที่ 5 ซึ่งพบว่าปริมาณเอนไซม์ที่ได้สูงขึ้นจากเดิม แต่เมื่อเทียบกับ *Streptomyces* sp.190-1 จะพบว่าปริมาณเอนไซม์ที่ได้จาก *E. coli* HB101 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 จะต่ำกว่าปริมาณที่ได้จาก *Streptomyces* sp.190-1 อาจจะเป็นเนื่องมาจากการแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสใน *E. coli* ได้ไม่ดีเท่าที่ควร

6. ผลการหาแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 (Restriction map)

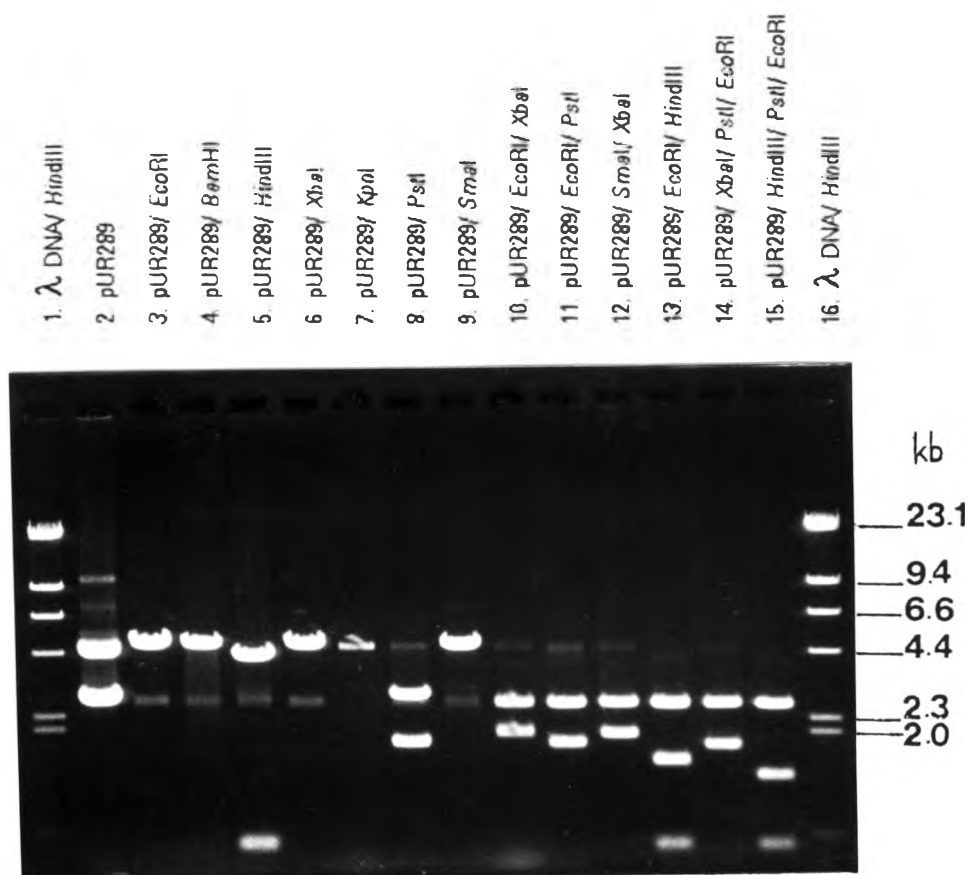
เมื่อนำรีคอมบิแนนต์พลาสมิดจาก pUR289 มาตัดจำเพาะด้วยเรสทริกชันเอนไซม์หลาย ๆ ชนิด ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 20 ดังแสดงในรูปที่ 16 ตารางที่ 6 และรูปที่ 17 ตารางที่ 7 เมื่อตัดจำเพาะด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียว พบว่าดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไป (inserted DNA) มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI *Hind*III และ *Pst*I ดังแสดงในรูปที่ 16 ช่องที่ 4, 5 และ 8 ตามลำดับ และเมื่อนำมาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 2 ชนิด และ 3 ชนิด ร่วมกัน จากการวิเคราะห์ผลที่ได้คำนวณเทียบกับซันดิเอ็นเอที่ได้จาก λ DNA/*Hind*III ทำให้สามารถระบุตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์บนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปได้ดังแสดงในรูปที่ 18

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบระดับเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pUR289 หรือ pUC18 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีน้ำตาลไซโลส หรือ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน

พลาสมิด	แหล่งคาร์บอน 0.2%	แอกติวิตีจำเพาะของกลูโคสไอโซเมอเรส (นาโนโมล/นาที/มก. ของโปรตีน)
pUC18	กลูโคส	11.0
pUC18	ไซโลส	10.0
pUR289	กลูโคส	8.3
pUR289	ไซโลส	27.9

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบระดับของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย *E. coli* HB101 ที่มี
พลาสมิด pUR289 และ pUC18 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี IPTG
เป็นตัวเหนี่ยวนำ

พลาสมิด	IPTG (มิลลิโมลาร์)	แอกติวิตีจำเพาะของกลูโคสไอโซเมอเรส (นาโนโมล/นาที/มก. ของโปรตีน)
pUC18	-	6.05
pUC18	+	0.0
pUR289	-	12.2
pUR289	+	33.3



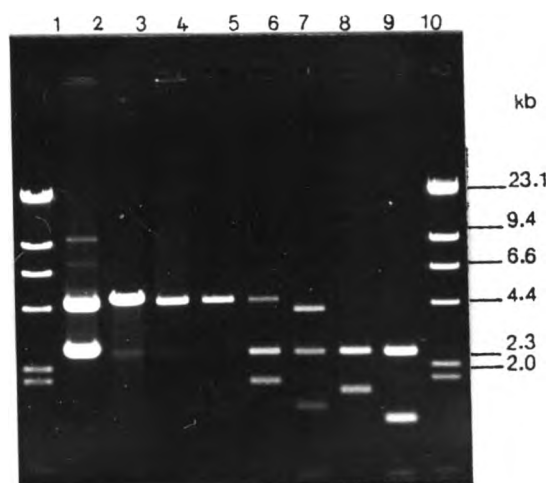
รูปที่ 16 อีทาร์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

ตารางที่ 6 ผลการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ
จากรูปที่ 16 วิเคราะห์หาแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289

ช่องที่	ดีเอ็นเอ/ เรสทริกชันเอนไซม์	จำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (กิโลเบส)
1	λ DNA/ <i>Hind</i> III	-	-
2	pUR289	-	-
3	pUR289/E	1	4.5
4	pUR289/B	1	4.5
5	pUR289/H	2	4.0, 0.5
6	pUR289/X	1	4.5
7	pUR289/K	1	4.5
8	pUR289/P	2	2.7, 1.4
9	pUR289/S	1	4.5
10	pUR289/E/X	2	2.7, 1.8
11	pUR289/E/P	2	2.7, 1.4
12	pUR289/S/X	2	2.7, 1.8
13	pUR289/E/H	3	2.7, 1.3, 0.5
14	pUR289/X/P/E	2	2.7, 1.4
15	pUR289/H/P/E	3	2.7, 0.9, 0.5
16	λ DNA/ <i>Hind</i> III	-	-

หมายเหตุ

- ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 4.5 กิโลเบส เป็นตำแหน่งดีเอ็นเอรูปเส้นของ pUR289
- ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2.7 กิโลเบส เป็นตำแหน่งดีเอ็นเอรูปเส้นของ pUC18
- ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.8, 1.4, 1.3, 0.9, 0.5 กิโลเบส เป็นตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ
- E=*Eco*RI, B=*Bam*HI, H=*Hind*III, X=*Xba*I, K=*Kpn*I, P=*Pst*I และ S=*Sma*I



รูปที่ 17 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ตัดด้วยเรสทริคชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

ช่องที่ 1 λ DNA/*Hind*III

ช่องที่ 2 รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289

ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ตัดด้วย *Bam*HI

ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ตัดด้วย *Bam*HI และ *Eco*RI

ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ตัดด้วย *Kpn*I

ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ตัดด้วย *Xba*I และ *Bam*HI

ช่องที่ 7 รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ตัดด้วย *Hind*III และ *Bam*HI

ช่องที่ 8 รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ตัดด้วย *Pst*I และ *Bam*HI

ช่องที่ 9 รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ตัดด้วย *Hind*III, *Pst*I และ *Eco*RI

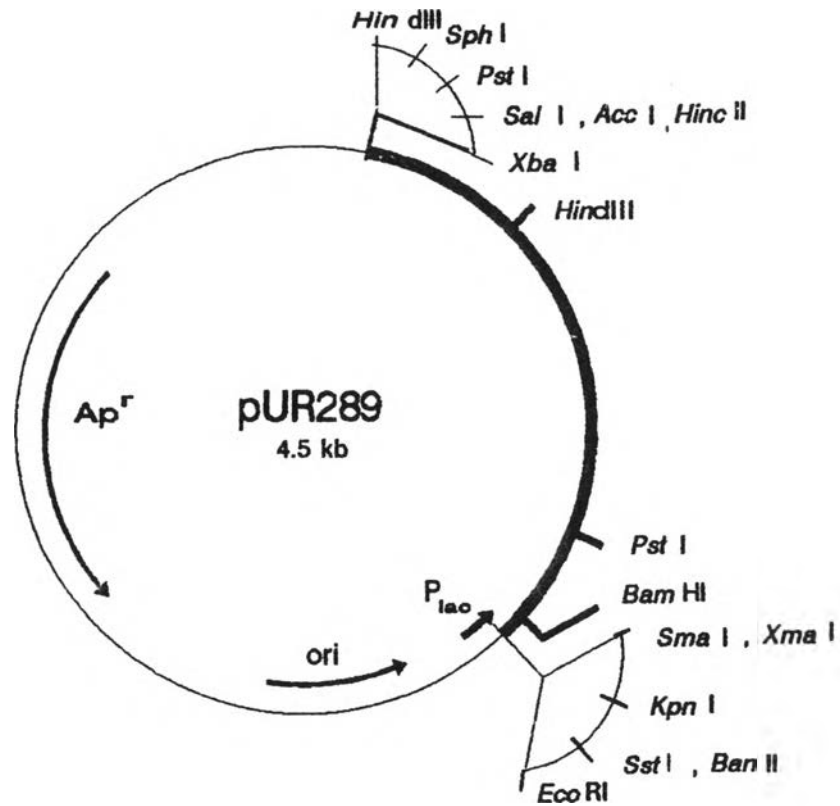
ช่องที่ 10 λ DNA/*Hind*III

ตารางที่ 7 ผลการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ จากรูปที่ 17 วิเคราะห์หาแผนที่เอนไซม์ของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289

ช่องที่	ดีเอ็นเอ/ เอนไซม์	จำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (กิโลเบส)
1	λ DNA/ <i>Hind</i> III	-	-
2	pUR289	-	-
3	pUR289/B	1	4.5
4	pUR289/B/E	1	4.5
5	pUR289/K	1	4.5
6	pUR289/X/B	3	4.5, 2.7, 1.8
7	pUR289/H/B	4	4.0, 2.7, 1.3, 0.5
8	pUR289/P/B	2	2.7, 1.4
9	pUR289/H/P/E	3	2.7, 0.9, 0.5
10	λ DNA/ <i>Hind</i> III	-	-

หมายเหตุ

- ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 4.5 กิโลเบส เป็นตำแหน่งดีเอ็นเอรูปเส้น ของ pUR289
- ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2.7 กิโลเบส เป็นตำแหน่งดีเอ็นเอรูปเส้น ของ pUC19
- ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.8, 1.4, 1.3, 0.9, 0.5 กิโลเบส เป็นตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ
- ในช่องที่ 6 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 4.5 กิโลเบส คือ pUR289 ที่ตัดไม่สมบูรณ์
- B=*Bam*HI, E=*Eco*RI, K=*Kpn*I, H=*Hind*III, P=*Pst*I และ X=*Xba*I



รูปที่ 18 แผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289

————— : พลาสมิดพาหะ pUC18

————— : ดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไป (DNA insert)

7. ผลการโคลนย้อยของยีนที่ได้จาก pUR289

การโคลนย้อยเป็นวิธีการหนึ่งที่จะหาขนาดเล็กสุดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปที่ยังคงความสามารถในการแสดงออกของยีน การทดลองนี้จึงนำรีคอมบิแนนต์พลาสมิดจาก pUR289 มาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชันเอนไซม์ ตามวิธีการที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 21 และนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการมาเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pUC18 หรือ pUC19 แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* HB101 ผลที่ได้ตั้งแสดงในรูปที่ 19 พบว่า pUR290 ซึ่งเป็นโคลนย้อยที่ได้จากการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *XbaI* กับพลาสมิดพาหะ pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน โคลนย้อยที่ได้จะมีทิศทางของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปตรงข้ามกับใน pUR289 เมื่อจะตรวจสอบว่าทิศทางการแสดงออกของชิ้นดีเอ็นเอ (orientation) ไปในทิศทางใด ผลที่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มี 1% ไซโลส และ 50 ไมโครกรัม/มล. ของยาปฏิชีวนะพบว่าให้โคโลนีสีแดง แสดงว่าการแสดงออกของยีน (Gene expression) หรือดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปไม่ได้ขึ้นอยู่กับ *Lac* โปรโมเตอร์ของพลาสมิดพาหะ แต่อยู่ภายใต้การทำงานของโปรโมเตอร์ของยีนเอง (own promoter)

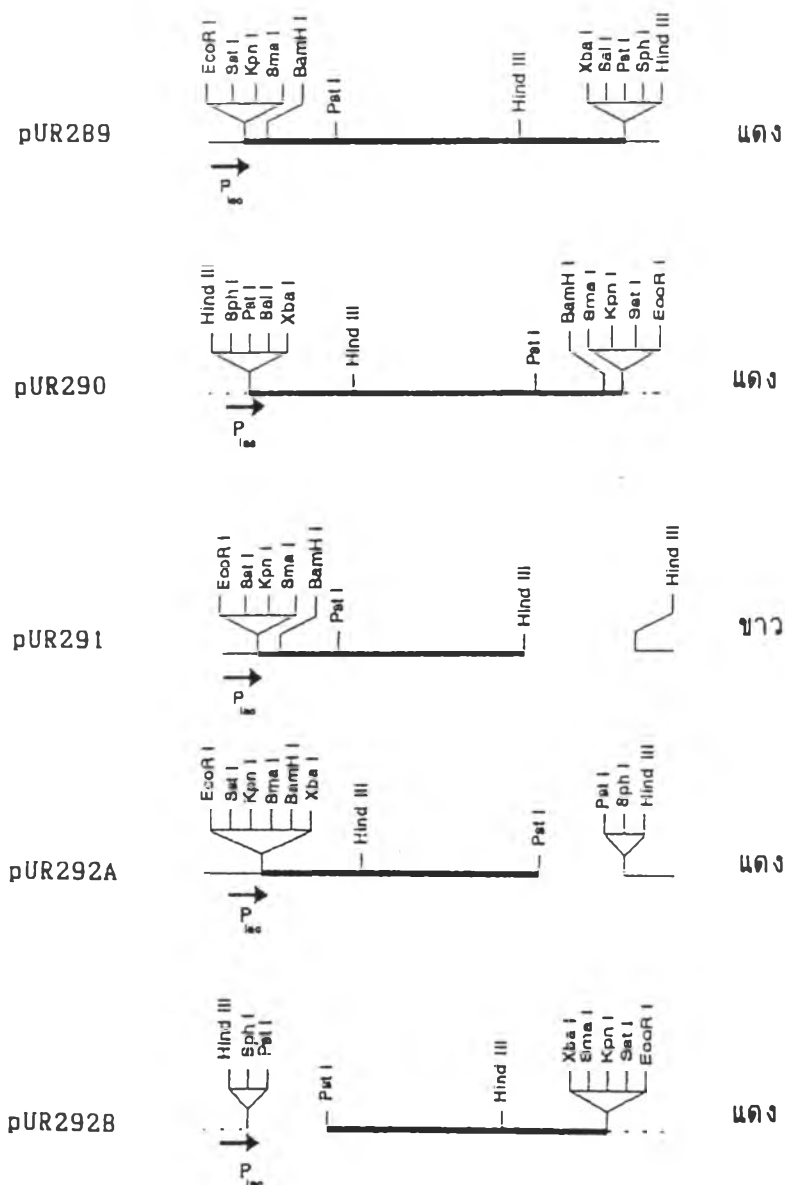
เมื่อนำ *E. coli* HB101 ที่มี pUR290 มาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสเทียบกับพลาสมิดพาหะเดิม ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าแอกติวิตีของ pUR290 ที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงกว่า pUR290 ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 37.0 และ 6.7 นาโนโมล/นาท/มก. ของโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าประมาณ 5-6 เท่า ในขณะที่แอกติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จาก pUC19 ที่มีกลูโคสหรือไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 7.0 และ 6.0 นาโนโมล/นาท/มก. ของโปรตีน ตามลำดับ และเมื่อใช้ IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำในการสร้างเอนไซม์ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ได้มีค่าเท่ากับ 32.0 นาโนโมล/นาท/มก. ของโปรตีน เมื่อเทียบกับไม่ได้ใช้ IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำจะให้ค่าเท่ากับ 5.0 นาโนโมล/นาท/มก. ของโปรตีน ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่ใช้ IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำประมาณ 6 เท่า และเมื่อนำแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จากตารางที่ 5 และ 9 มาเปรียบเทียบกัน พบว่าแอกติวิตีที่ได้จาก pUR289 และ pUR290 ที่ใช้ IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำให้ค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งแสดงว่าการทำงานของยีนอาจจะไม่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน *LacZ* แต่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีนเอง

สำหรับ pUR291 เป็นโคลนย้อยที่ได้จากการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* โดยนำชิ้นส่วนที่มีขนาดประมาณ 1.3 กิโลเบส

รูปที่ 19 โคลนย่อยของ pUR289 นำเข้าสู่ *E. coli* HB101 โดยมีลาสมิติเอ็นเอพาหะ pUC18 หรือ pUC19 เป็นพาหะในการนำเข้า

โคลนย่อย

การแสดงออกบน McC+1% Xylose



pUR290: เป็นโคลนย่อยที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก pUR289 ด้วย *EcoRI* และ *XbaI* เชื่อมกับพลาสมิคพาหะ pUC19

pUR291: เป็นโคลนย่อยที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก pUR289 ด้วย *EcoRI* และ *HindIII* เชื่อมกับพลาสมิคพาหะ pUC18

pUR292A: เป็นโคลนย่อยที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก pUR289 ด้วย *EcoRI* *PstI* และ *XbaI* เชื่อมกับพลาสมิคพาหะ pUC18

pUR292B: เป็นโคลนย่อยที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก pUR289 ด้วย *EcoRI* *PstI* และ *XbaI* เชื่อมกับพลาสมิคพาหะ pUC19

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบระดับของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย *E. coli* HB101 ที่มี
 พลาสมิด pUR290 หรือ pUC19 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีน้ำตาล
 ซาโลส หรือ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

พลาสมิด	แหล่งคาร์บอน 0.2%	แอกติวิตีจำเพาะของกลูโคสไอโซเมอเรส (นาโนโมล/นาที/มก. ของโปรตีน)
pUC19	กลูโคส	7.0
pUC19	ซาโลส	6.0
pUR290	กลูโคส	6.7
pUR290	ซาโลส	37.0

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบระดับของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย *E. coli* HB101 ที่มี
พลาสมิด pUR290 หรือ pUC19 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี IPTG
เป็นตัวเหนี่ยวนำ

พลาสมิด	IPTG (1 มิลลิโมลาร์)	แอกติวิตีจำเพาะของกลูโคสไอโซเมอเรส (นาโนโมล/นาท./มก. ของโปรตีน)
pUC19	-	10.0
pUC19	+	17.0
pUR290	-	5.0
pUR290	+	32.0

มาเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน พบว่าโคลนย่อยที่ได้ให้โคโลนีสีขาว แสดงว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ *HindIII-HindIII* ที่มีขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส ที่หายไปมีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน ส่วน pUR292A และ B เป็นโคลนย่อยที่ได้จากการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *PstI* *EcoRI* และ *XbaI* ร่วมกัน โดยแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส มาเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pUC18 และ pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน ตามลำดับ พบว่าทั้ง pUR292A และ pUR292B ให้โคโลนีสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ *PstI* และ *BamHI* ที่หายไปไม่มีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน และจากการกลับทิศทางของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *PstI-XbaI* ทั้งใน pUC18 และ pUC19 ก็ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน เป็นการยืนยันว่าการแสดงออกของยีนอยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ของยีนเอง

8. ผลการวิเคราะห์ pUR289 ด้วยวิธี Southern blot hybridization

เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากริคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ที่ได้จากการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *PstI*, *EcoRI* และ *XbaI* ร่วมกัน แยกชิ้นส่วน *PstI-XbaI* ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส มาเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตาม (DNA Probe) ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 22 และนำมาไฮบริไดซ์ (hybridized) กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากโครโมโซมอลติเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. 190-1 ที่ตัดแบบสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI* ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 23 เพื่อเป็นการยืนยันว่าริคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 มีส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากโครโมโซมอลติเอ็นเอของ *Streptomyces* sp.190-1 จริง

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 20 พบว่าหลังจากขบวนการไฮบริไดซ์เช็ชชั่นและออโตเรดิโอกราฟ (autoradiograph) พบ 1 แถบดีเอ็นเอของโครโมโซมอลติเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม แสดงให้เห็นว่า pUR289 มีส่วนของโครโมโซมอลติเอ็นเอจาก *Streptomyces* sp.190-1 อยู่จริง

จากผลการทดลองที่ได้งานวิจัยนี้ สามารถยืนยันได้ว่าการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp.190-1 ประสบความสำเร็จใน *E. coli* HB101 โดยใช้พลาสมิดพาหะ pUC18 และ pUC19 จากการทำโคลนย่อย พบว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กที่สุดที่สามารถแสดงออกได้มีขนาด 1.4 กิโลเบส การแสดงออกของยีนอยู่ภายใต้การควบคุมของยีนเอง นอกจากนี้ยังต้องการไซโลสเป็นตัวแทนยิวนาในการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส และถูกยับยั้งการทำงานด้วยกลูโคส



รูปที่ 20 ผลการทำ Southern blot hybridization ระหว่างโครโมโซมอลติเอ็นเอของ *Streptomyces* sp.190-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI กับดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจากรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 โดยใช้ชุดติดฉลาก และตรวจสอบ enhanced chemiluminescence (ECL) ของ Amersham, U.K.

ช่องที่ 1 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของโครโมโซมอลติเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI

ช่องที่ 2 ผลการทำ autoradiograph บนฟิล์มเอกซเรย์ (X-ray film)