บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส หรือ ไซโลสไอโซเมอเรส จาก *Streptomyces* sp.190-1 เข้าสู่ *E. coli* HB101 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ขาดยีนไซโลสไอโซเมอเรส โดยใช้พลาสมิด pUC18 และ pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะ ในขั้นต้นของงานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบความเหมาะสมในการที่จะนำ *E. coli* HB101 มาเป็นเซลล์เจ้าบ้าน และพลาสมิด pUC18 และ pUC19 เป็นดีเอ็นเอพาหะในการโคลนยีน ซึ่งทำโดยเลี้ยง *E. coli* HB101 และ *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pUC18 หรือ pUC19 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะใช้คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ โดยเปรียบเทียบกับ *E. coli* SH50 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มียีนไซโลสไอโซเมอเรสผลการทดลองพบว่า *E. coli* HB101 และ *E. coli* HB101 ที่รับพลาสมิด pUC18 หรือ pUC19 ให้โคโลนีสีขาว ซึ่งแสดงว่าไม่สามารถใช้ไซโลสได้ ในขณะที่ *E. coli* SH50 ที่ใช้ไซโลสได้จะให้โคโลนีสีแดง (รูปที่ 4) ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ไซโลสจะทำให้เกิดกรดอินทรีย์ซึ่งเป็นผลให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเป็นกรด สารบ่งชี้ (indicator) ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ neutral red จะเปลี่ยนสีทำให้ได้โคโลนีสีแดงเกิดขึ้น ดังนั้นจากการทดสอบดังกล่าวจึงพบว่าระบบเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 และพลาสมิดพาหะ pUC18 หรือ pUC19 มีความเหมาะสมในการที่จะนำมาใช้ในการโคลนยีนเช่นเดียวกับในรายงานของ Feldmann (1992) ที่ใช้ *E. coli* HB101 เป็นเซลล์เจ้าบ้านและ pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะในการโคลนย่อยยีนไซโลสไอโซเมอเรส

ในขั้นต่อมาได้ทดสอบประสิทธิภาพของคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* HB101 ที่เตรียมด้วยรูบิเดียมคลอไรด์ (Hanahan, 1985) หรือแคลเซียมคลอไรด์ (Maniatis, 1982) โดยการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pUC18 หรือ pUC19 พบว่า เมื่อทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pUC18 และ pUC19 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* HB101

ที่เตรียมด้วยแคลเซียมคลอไรด์ (ตารางที่ 1) พบว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มของ pUC18 มีค่าเท่ากับ $2.08x10^5$ ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ และ pUC19 มีค่าเท่ากับ $2.5x10^5$ ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ในขณะที่เมื่อใช้คอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียมด้วยรูบิเดียมคลอไรด์ (ตารางที่ 2) ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มมีค่าเท่ากับ $4.5x10^5$-10^6 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ และ $3.35x10^5$ ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ตามลำดับจะเห็นว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มคอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียมโดยทั้งสองวิธีนี้มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้แคลเซียมคลอไรด์ในการเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ เนื่องจากมีราคาต่ำกว่ารูบิเดียมคลอไรด์และขั้นตอนในการเตรียมไม่ยุ่งยากทำให้สะดวกและรวดเร็วในการเตรียม

Hanahan (1983) ได้กล่าวถึงปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิด เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ ปัจจัยแรกได้แก่ขนาดของพลาสมิด พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะมีประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มสูงกว่าพลาสมิดขนาดใหญ่ เมื่อเพิ่มขนาดของพลาสมิดขึ้นเรื่อยๆ ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มก็จะยิ่งลดต่ำลงเช่นกัน ปัจจัยที่สองนอกจากขนาดของพลาสมิดแล้ว โครงรูปของพลาสมิดยังมีผลต่อประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม พลาสมิดที่อยู่ในรูปขดเป็นวงและเป็นเกลียวซ้อน (super coiled form) จะให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มสูงกว่าพลาสมิดที่อยู่ในรูปร่างคลายเป็นวง (relaxed form) และดีเอ็นเอรูปเส้น (linear form) และนอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่มากเกินพอไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม เช่นที่ปริมาณดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม จะให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเท่ากับที่ใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 10 นาโนกรัม ดังนั้นในการทำทรานสฟอร์เมชันไม่จำเป็นที่จะใช้ปริมาณดีเอ็นเอในปริมาณสูง เพราะจะเป็นการสิ้นเปลืองดีเอ็นเอ อีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญคือระยะการเจริญเติบโตของเซลล์เจ้าบ้านที่นำมาเตรียมเป็นคอมพีเทนต์เซลล์ ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์เจ้าบ้านที่ระยะ mid log phase จะให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มสูงสุด เนื่องจากเป็นระยะที่แบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ได้มากและดีที่สุด เมื่อรีคอมบิแนนต์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ก็สามารถซ่อมแซมผนังเซลล์ และเพิ่มจำนวนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในระยะ lag phase เซลล์ยังอ่อนแอมีการสร้างเอนไซม์น้อย เมื่อถูกสารเคมีทำให้ตายได้ง่าย ส่วนระยะ stationary phase เซลล์แก่เกินไป เมื่อถูกสารเคมีทำให้ตายได้ง่ายทำให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มต่ำ

Lederberg, 1974 ได้รายงานประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* HB101 ที่เตรียมด้วยแคลเซียมคลอไรด์ มีค่าเท่ากับ $1.52\pm 0.11\times10^{6}$ ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่เตรียมได้ในงานวิจัยนี้ ถึงแม้ว่าจะมีรายงานถึงประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* ในปริมาณสูง เช่น Nishimura (1990) ได้รายงานวิธีการเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มสูงถึง 10^{9} ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ แต่ผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่าค่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มของพลาสมิดพาหะที่ได้นี้ อยู่ในเกณฑ์ที่จะใช้ในการโคลนยีนได้

ได้มีรายงานถึงความสำเร็จในการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* สายพันธุ์ต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสใน *E. coli* หรือใน *Streptomyces* สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ให้ขาดเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (Marcel และคณะ 1987, Wong และคณะ 1991) รวมทั้งยังมีรายงานถึงการโคลนยีนของเอนไซม์อื่นๆ จาก *Streptomyces* ที่สามารถแสดงออกใน *E. coli* ได้ (Vara และคณะ 1985, Miyasita และคณะ 1991, Robbins และคณะ 1986) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้โคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.190-1* เข้าสู่ *E. coli* HB101 โดยใช้ pUC18 และ pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะ ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะที่ใช้ในการแสดงออกของยีนนั้นๆได้ (expression vector) โดยคาดว่าจะให้ยีนกลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน *LacZ* บนพลาสมิดพาหะซึ่งโปรโมเตอร์ของยีน *LacZ* จะมีประสิทธิภาพในการชักนำให้สร้างเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง

Dekker และคณะ (1991) ได้โคลนย่อยยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Clostridium thermohydrosulfuricum* เข้า *E. coli* โดยใช้ pUC118 เป็นพลาสมิดพาหะโดยให้ยีนอยู่ภายใต้การทำงานของยีน *LacZ* พบว่าปริมาณเอะไซม์ที่สร้างโดย *E. coli* สูงขึ้นจากเดิม 4 เท่า เมื่อเทียบกับ *C. thermohydrosulfuricum*

จากงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ให้โคโลนีสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มี 1% ไซโลส (รูปที่ 10) และนำมาตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด พบว่ารีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ได้มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะเดิมทุก

ตัว(รูปที่ 11) เมื่อนำรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ได้จากโคลนเหล่านี้ มาทรานสฟอร์มกลับเข้าสู่ *E. coli* HB101 อีกครั้ง เพื่อเป็นการยืนยันว่ารีคอมบิแนนต์พลาสมิดเหล่านี้มีส่วนของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ซึ่งจะให้โคโลนีสีแดงทุกโคโลนี แต่ถ้าไม่มีส่วนของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจะให้โคโลนีสีขาว พบว่ารีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ได้จากโคลน 289 ซึ่งให้ชื่อว่า pUR289 เท่านั้นที่ให้โคโลนีสีแดงทุกโคโลนี (รูปที่ 12) ในขณะที่โคลนอื่น ๆให้โคโลนีสีขาว และเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนโคลน 289 ก็ยังคงให้โคโลนีสีแดง (รูปที่ 13) ซึ่งแสดงว่ายีนกลูโคสไอโซเมอเรสเสถียรในโคลน 289 เท่านั้นส่วนในโคลนอื่น ๆ ไม่เสถียรอาจจะเนื่องมาจากรีคอมบิแนนต์พลาสมิดหนึ่งๆ จะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกันมากกว่า 2 ชิ้นขึ้นไปในระหว่างขั้นตอนการเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ หรือเรียกว่าเกิด multiple inserts ซึ่ง Kiesser และ Melton (1988) ได้รายงานว่าการเกิด multiple insert จะทำให้รีคอมบิแนนต์พลาสมิดไม่เสถียร และมีโอกาสเกิดการกำจัดชิ้นส่วนที่มีการซ้ำกันออกไปสูง จากเหตุผลข้างต้นจึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้โคลนที่คัดเลือกได้ไม่เสถียร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เลือกโคลน 289 เท่านั้นมาศึกษาต่อไป

การแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจากรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289

เมื่อนำ *E.coli*HB101 ที่รับรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 และพลาสมิดพาหะ pUC18 มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ที่มีและไม่มีไซโลส พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่สร้างโดย *E.coli* HB101 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าที่สร้างโดย *E. coli* HB101 ที่รับพลาสมิดพาหะ pUC18 (ตารางที่ 3) และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ที่มีกลูโคส หรือไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส ซึ่งพบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้จะต่ำกว่า เมื่อใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4) แสดงว่า *E. coli* HB101 ที่รับรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ยังคงต้องการไซโลสเป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ และกลูโคสอาจจะมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Schellenberg (1983) ซึ่งพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แอคติวิตี

ของเอนไซม์จะต่ำกว่าที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 5 เท่า และนอกจากนี้ Briggs (1984) ได้รายงานว่า การสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสต้องการไซโลสเป็นตัวหนี่ยวนำ (inducer)

เมื่อใช้ IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำโปรโมเตอร์ของยีน *LacZ* พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จาก *E. coli* HB101 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 จะเพิ่มสูงจากที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG (ตารางที่ 5) จากรายงานของ Vara และคณะ (1985) พบว่าเมื่อให้ยีนแสดงออกภายใต้การควบคุมของ *LacZ* แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้เพิ่มสูงขึ้นจากเดิม 7.8 เท่า แต่แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ เมื่อใช้ IPTG เหนี่ยวนำไม่เพิ่มสูงมากนัก อาจจะเนื่องมาจากการแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces* sp. 190-1 ไม่สามารถแสดงออกได้ดีเท่าที่ควร ใน *E. coli* HB101 และการแสดงออกของยีนอาจจะยังอยู่ภายใต้การควบคุมของยีน และโปรโมเตอร์บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไป โดยไม่ได้รับอิทธิพลจากโปรโมเตอร์ของยีน *LacZ* บนพลาสมิดพาหะ นอกจากนี้อาจเกิดจากทิศทางการอ่านรหัส (orientation) ของโปรโมเตอร์ของยีน *LacZ* สวนทางกับทิศทางการทำงานของยีนกลูโคสไอโซเมอเรส จึงทำให้การแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสไม่ดีเท่าที่ควร

เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จากการใช้ IPTG (ตารางที่ 5) และไซโลสเป็นตัวเหนี่ยวนำ (ตารางที่ 4) พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งแสดงว่าการทำงานของยีนอาจจะอยู่ภายใต้การทำงานของโปรโมเตอร์ของยีนเองไม่ได้อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน *LacZ* แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จึงไม่แตกต่างกันมากนัก

การวิเคราะห์ขนาด และแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289

ได้นำรีคอมบิแนนต์พลาสมิดจาก pUR289 มาหาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปพบว่า มีขนาดปริมาณ 1.8 กิโลเบส (รูปที่ 15) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ รวมทั้ง *Streptomyces* ดังมีรายงานหลายฉบับอาทิเช่น Briggs (1984) รายงานว่ายีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *E. coli* มีขนาด 1.6 กิโลเบส, ยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Thermus thermophilus* มีขนาด

1.2 กิโลเบส (Dekker, 1991), จาก *C. thermohydrosulfuricum* มีขนาดประมาณ 2.2 กิโลเบส (Lee, 1991), ยีนจาก *B. subtilis* มีขนาด 1.3 กิโลเบส (Willlhelm และ Hollengerg, 1988), จาก *Streptomyces violaceoniger* มีขนาด 2.1 กิโลเบส (Marcel, 1987) และยีนจาก *Streptomyces rubiginosus* มีขนาด 1.16 กิโลเบส (Wong, 1990)

เมื่อนำรีคอมบิแนนต์พลาสมิดจาก pUR289 มาวิเคราะห์แผนที่เรสทริกชัน โดยนำมาตัดจำเพาะด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม ทำให้ทราบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI, *Pst*I และ *Hin*dIII อย่างละ 1 ตำแหน่ง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อตัดจำเพาะด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I หรือ *Hin*dIII จะได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้นส่วน โดยการวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (รูปที่ 16) แสดงว่านอกจากตำแหน่งตัดจำเพาะบนพลาสมิดพาหะ แล้วยังมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์บนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปด้วยจึงทำให้ตัดได้ 2 ชิ้นส่วน ส่วนตำแหน่งตัดจำเพาะของ *Bam*HI จะเห็นว่าในการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสนี้ ได้นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดจำเพาะด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI หรือ *Mbo*I มาโคลนเข้าที่ตำแหน่ง *Bam*HI ของพลาสมิดพาหะ ดังนั้นตำแหน่งตัดจำเพาะของ *Bam*HI บนพลาสมิดพาหะจะสูญเสียไปแต่จากผลการทดลองตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ด้วย *Bam*HI พบว่า เอนไซม์นี้ยังตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดได้ แสดงว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่รับเข้าไปมีตำแหน่งตัดจำเพาะของ *Bam*HI ดังนั้นจึงได้ทำการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดจาก pUR289 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 2 และ 3 ชนิด (รูปที่ 16 และ รูปที่ 17) เพื่อที่จะวิเคราะห์ว่าตำแหน่งตัดจำเพาะของเรสทริกเอนไซม์ *Bam*HI, *Pst*I และ *Hin*dIII อยู่ในตำแหน่งใดบนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จากผลการทดลองพบว่าชิ้นส่วน *Hin*dIII-*Hin*dIII มีขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Pst*I-*Pst*I มีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Hin*dIII-*Pst*I มีขนาดประมาณ 0.9 กิโลเบส และจากการคำนวณเทียบกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA ที่ตัดด้วย *Hin*dIII พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Bam*HI-*Pst*I มีขนาดประมาณ 0.3 กิโลเบส และ *Bam*HI-*Eco*RI มีขนาดประมาณ 0.1 กิโลเบส ซึ่งจากผลการทดลองนี้ทำให้สามารถระบุตำแหน่งตัดจำเพาะของเรสทริกชันเอนไซม์ บนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ได้ (รูปที่ 18)

การโคลนย่อยของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289

ได้ทำการโคลนย่อยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่รับเข้าไปในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* HB101 อีกครั้งโดยใช้พลาสมิดพาหะ pUC18 หรือ pUC19 (รูปที่ 19) เพื่อศึกษาทิศทางการแสดงออกของยีนที่โคลนได้ และเพื่อศึกษาถึงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่รับเข้าไปที่เล็กที่สุดของยีนที่ยังคงสามารถแสดงออกได้ พลาสมิด pUR290 เป็นโคลนย่อยที่มีทิศทางการแสดงออกของยีนสวนทาง กับรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 เนื่องจากดังได้กล่าวมาแล้วว่าประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของ *E. coli* HB101 ที่รับรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ไม่เพิ่มสูงมากนัก ดังนั้นจึงได้หาเหตุผลที่จะมาอธิบายเหตุการณ์ดังกล่าว เหตุผลหนึ่งก็คือทิศทางการแสดงออกของยีนถ้าจุดเริ่มต้นของการแสดงออกของยีน (initiation codon) อยู่กลับทิศกับทิศทางการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *LacZ* บนพลาสมิดพาหะก็จะทำให้ไม่มีการสร้างเอนไซม์ งานวิจัยนี้จึงได้นำชิ้นส่วนยีนจากรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 มาโคลนย่อย และนำกลับเข้า *E. coli* HB101 โดยใช้พลาสมิดพาหะ pUC19 ซึ่งมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเรสทริกชันเอนไซม์บริเวณ polycloning site ตรงข้ามกันกับพลาสมิดพาหะ pUC18 พบว่าพลาสมิด pUR290 ให้โคโลนีสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว และเมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 8) เปรียบเทียบกับแอคติวิตีที่ได้จากรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 (ตารางที่ 4) พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก

นอกจากนั้นเมื่อใช้ IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำในการสร้างเอนไซม์ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จาก *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pUR290 เพิ่มสูงขึ้นจากที่ไม่ใช้ IPTG เหนี่ยวนำ (ตารางที่ 9) และเมื่อเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ที่ใช้ IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำในการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (ตารางที่ 5) พบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งแสดงว่าการแสดงออกของยีนไม่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน *LacZ* แต่อาจจะอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีนเอง

พลาสมิด pUR291 เป็นพลาสมิดที่ได้จากโคลนย่อยรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 โดยการเชื่อมชิ้นส่วน *EcoRI-HindIII* ขนาดประมาณ 1.3 กิโลเบส ที่ได้จากการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* เข้ากับ

พลาสมิดพาหะ pUC18 พบว่าเมื่อทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* HB101 โคลนย่อยที่ได้ไม่สามารถให้โคโลนีสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มีไซโลสได้ แสดงว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *Hin*dIII-*Hin*dIII ขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส ที่หายไปมีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน ส่วนพลาสมิด pUR292A และ B เป็นพลาสมิดที่ได้จากการโคลนย่อยของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 โดยการเชื่อมชิ้นส่วน *Pst*I-*Xba*I ขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส ที่ได้จากการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I, *Xba*I และ *Eco*RI เข้ากับพลาสมิดพาหะ pUC18 และ pUC19 ตามลำดับ เมื่อทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* HB101 พบว่าโคลนย่อยทั้งสองสามารถใช้ไซโลสได้ให้โคโลนีสีแดงบน MacConkey agar base ได้ แสดงว่าชิ้นส่วน *Eco*RI-*Pst*I ขนาดประมาณ 0.4 กิโลเบส ที่หายไปไม่มีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน และจากผลที่ได้สามารถยืนยันได้ว่า การแสดงออกของยีนอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน *Streptomyces* เอง ถึงแม้ว่าจะมีรายงานว่ามีโปรโมเตอร์ของยีน *Streptomyces* น้อยมากที่จะทำงานได้ใน *E. coli* (Bibb และ Cohen, 1982 และ Jaurin และ Cohen, 1985) อย่างไรก็ตามก็มีรายงานอีกหลายฉบับที่รายงานว่าโปรโมเตอร์ของ *Streptomyces* สามารถทำงานได้ใน *E. coli* ดังจะกล่าวต่อไปนี้

Buttner และ Brown (1987) ได้รายงานว่าโปรโมเตอร์ของพลาสมิด pIJ101A และ B ซึ่งเป็นพลาสมิดจำเพาะสำหรับ *Streptomyces* สามารถถอดรหัส (transcription) ยีนของ *Streptomyces* ใน *E. coli* ได้ และได้เสนอเหตุผลว่าโปรโมเตอร์ของยีนใน *E. coli* และ *Streptomyces* มีความคล้ายคลึงกันจึงทำให้ RNA polymerase ของเชื้อทั้งสองสามารถจดจำได้ Hopwood และคณะ (1986) และ Deng และคณะ (1986) ได้รายงานว่าโปรโมเตอร์ของ *Streptomyces* อย่างน้อย 11 ชนิด ที่มีความคล้ายคลึงกับโปรโมเตอร์ของ *E. coli* จึงทำให้ยีนของ *Streptomyces* สามารถแสดงออกใน *E. coli* ได้ จากรายงานการวิจัยข้างต้นมีความสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ นั่นคือ ยีนจาก *Streptomyces* sp.190-1 สามารถแสดงออกใน *E. coli* โดยอาศัยโปรโมเตอร์ของยีนเอง

จากผลการศึกษาโคลนย่อยทำให้ทราบว่า ชิ้นส่วนของยีนขนาดเล็กสุดที่สามารถแสดงออกได้ คือประมาณ 1.4 กิโลเบส ซึ่งใกล้เคียงกับยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

การวิเคราะห์รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

เทคนิคไอบริไดเซชันของกรดนิวคลีอิค (nucleic acid hybridization) เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง ในการตรวจดูความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนที่ต้องการศึกษา โดยใช้ดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอจำเพาะซึ่งอาจจะเป็นยีน หรือ อาร์เอ็นเอนำรหัส (mRNA) ที่ติดฉลากกัมตรังสี ^{32}P หรือเอนไซม์ เป็นตัวติดตาม (probe)

Maleszka (1982) ได้ใช้เทคนิคไอบริไดเซชันของกรดนิวคลีอิคเพื่อทำการยืนยันว่ารีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ได้คือ pRM10 มีส่วนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *E. coli* โดยใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pRM10 เป็นดีเอ็นเอติดตาม พบว่าสามารถไอบริไดซ์กับโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *E. coli* ได้

ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่ายีนที่โคลนได้ใน pUR289 มาจากโครโมโซมอลดีเอ็น Streptomyces sp. 190-1 จริง จึงได้นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 โดยการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I, *Eco*RI และ *Xba*I ร่วมกัน แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส มาเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตาม โดยใช้ชุดติดฉลากและตรวจสอบ ECL kit ของ Amersham, U.K. เพื่อทำการไอบริไดซ์กับโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ Streptomyces sp.190-1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI แบบสมบูรณ์และผ่านขั้นตอนการทำ southern blot แล้ว จากผลการทดลอง พบว่าดีเอ็นเอติดตามสามารถไอบริไดซ์กับโครโมโซมอลดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะโดยให้ 1 แถบดีเอ็นเอ (รูปที่ 20) ซึ่งยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 มีส่วนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ Streptomyces sp.190-1 จริง

จากผลการวิจัยในครั้งนี้ สามารถโคลน และแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก Streptomyces sp.190-1 เข้า *E. coli* HB101 ได้สำเร็จ โดยใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม การแสดงออกของยีนใน *E. coli* HB101 อาศัยโปรโมเตอร์ของยีน Streptomyces sp.190-1 เอง และชิ้นส่วนยีนขนาดเล็กที่สุดที่สามารถแสดงออกได้มีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส ยีนที่โคลนได้นี้จะมีประโยชน์ต่อไปในการหาลำดับเบส และการดัดแปลงลำดับเบสควบคุมการแสดงออก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแสดงออกของยีนใน *E.coli*