

บทที่ 3

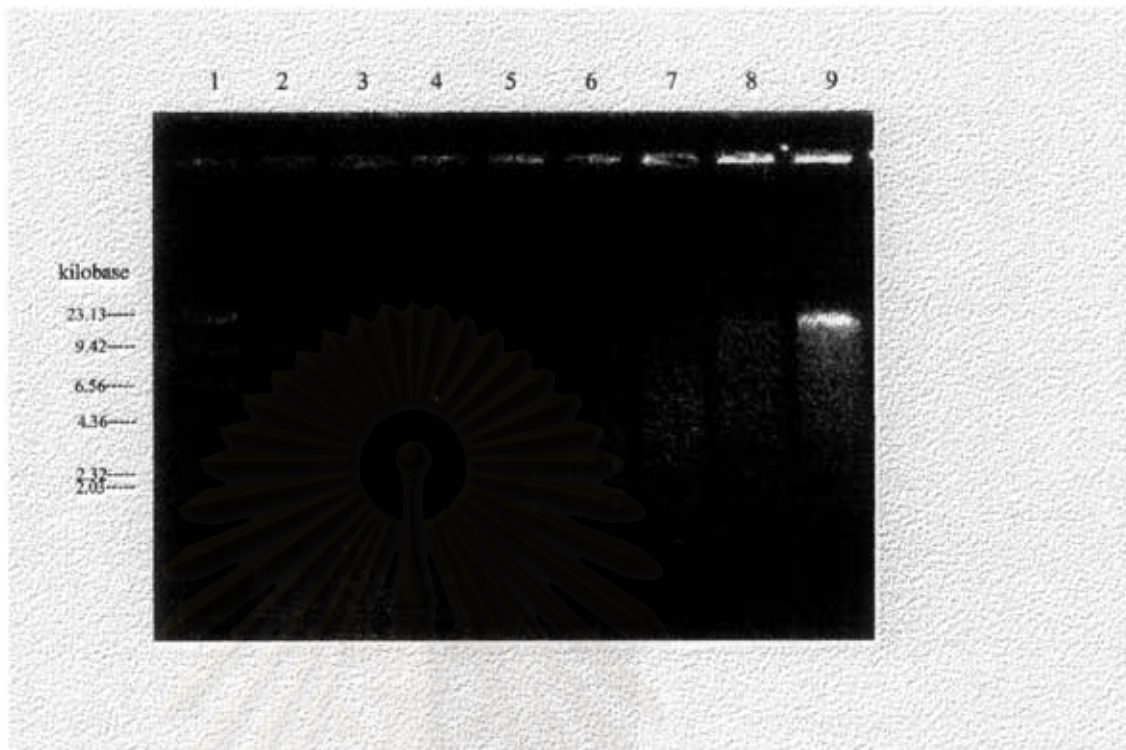
ผลการวิจัย

3.1 การโคลนยีนบีตา-ไซโตลิตเอสจาก *Streptomyces* sp. CH7 โดยใช้ *E. coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

3.1.1 การเตรียมชิ้นส่วนโครโมโซมอดีเอ็นเอ โดยการย่อยแบบกึ่งสมบูรณ์จากรายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับการโคลนยีนบีตา-ไซโตลิตเอสจากจุลินทรีย์ต่างๆ พบว่าจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมียีนบีตา-ไซโตลิตเอสขนาดแตกต่างกันดังกล่าวในบทนำ ซึ่งโดยส่วนมากจะมีขนาดอยู่ระหว่าง 1-4 กิโลเบส (Lee and Zeikus, 1993; Baba et al., 1994; Suh et al., 1996; Lorenz and Wiegel, 1997) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้โครโมโซมอดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1-5 กิโลเบส ซึ่งคาดว่าจะครอบคลุมยีนบีตา-ไซโตลิตเอสทั้งหมด โดยการย่อยโครโมโซมอดีเอ็นเอแบบกึ่งสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 2.9.1 จากการทดลองหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณเอนไซม์และดีเอ็นเอ พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อโครโมโซมอดีเอ็นเอ คือ 0.5 หน่วยของเอนไซม์ต่อ 0.9 ไมโครกรัมของดีเอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ช่องที่ 5 ดังนั้นจึงนำอัตราส่วนนี้มาใช้เตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1 ถึง 5 กิโลเบส ปริมาณมากต่อไป

3.1.2 การเตรียมรีคอมมิแนนท์พลาสมิด

ได้ตัดพลาสมิดพาหะ pUC18 ด้วยเอนไซม์รีstriction *Bam*HI ซึ่งให้พลาสมิดพาหะในรูปเส้น (linear form) ที่มีขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบส แล้วนำพลาสมิดพาหะในรูปเส้นที่ได้มาผ่านการกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายทั้ง 2 ข้างของดีเอ็นเอตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 2.9.2 จากนั้นนำมาเชื่อมกับชิ้นส่วนโครโมโซมอดีเอ็นเอขนาด 1 ถึง 5 กิโลเบส ที่เตรียมได้ในข้อ 3.1.1 พบว่าได้รีคอมมิแนนท์พลาสมิดที่ส่วนใหญ่มีขนาดประมาณ 4-6 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 3.2 ช่องที่ 3 ซึ่งแสดงว่าปฏิกิริยาการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิดพาหะมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 3.1 ผลการย่อยโครโมโซมอดิเอ็นเอจาก *Streptomyces* sp. CH7 ด้วย
เรสทริกชันเอนไซม์ *Sau3AI* แบบกึ่งสมบูรณ์ (partial digestion)
บนอะกาโรสเจล

ช่องที่ 1 λ DNA/*HindIII* (กิโลเบต)

- | | | |
|---|--|-------|
| 2 | โครโมโซมอดิเอ็นเอเข้มข้น 0.9 ไมโครกรัม ต่อ <i>Sau3AI</i> 4 | หน่วย |
| 3 | โครโมโซมอดิเอ็นเอเข้มข้น 0.9 ไมโครกรัม ต่อ <i>Sau3AI</i> 2 | หน่วย |
| 4 | โครโมโซมอดิเอ็นเอเข้มข้น 0.9 ไมโครกรัม ต่อ <i>Sau3AI</i> 1 | หน่วย |
| 5 | โครโมโซมอดิเอ็นเอเข้มข้น 0.9 ไมโครกรัม ต่อ <i>Sau3AI</i> 0.5 | หน่วย |
| 6 | โครโมโซมอดิเอ็นเอเข้มข้น 0.9 ไมโครกรัม ต่อ <i>Sau3AI</i> 0.25 | หน่วย |
| 7 | โครโมโซมอดิเอ็นเอเข้มข้น 0.9 ไมโครกรัม ต่อ <i>Sau3AI</i> 0.125 | หน่วย |
| 8 | โครโมโซมอดิเอ็นเอเข้มข้น 0.9 ไมโครกรัม ต่อ <i>Sau3AI</i> 0.0625 | หน่วย |
| 9 | โครโมโซมอดิเอ็นเอเข้มข้น 0.9 ไมโครกรัม ต่อ <i>Sau3AI</i> 0.03125 | หน่วย |

1 2 3

kilobase

23.13

9.42

6.56

4.36

2.32

2.03



รูปที่ 3.2 ภาพแสดงการเชื่อมพลาสมิด pUC18 กับชิ้นส่วนโครโมโซมอดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. CH7 ขนาด 1-5 กิโลเบส ด้วย T_4 DNA ligase บนอะกาโรสเจล

ช่องที่ 1 λ DNA/*Hind*III

2 ชิ้นส่วนโครโมโซมอดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. CH7 ขนาด 1-5 กิโลเบส

3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.1.3 การทรานสฟอร์มรีคอมมิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันและการคัดเลือกโคลนที่ได้รับยีนบีตา-ไซโลติคัส

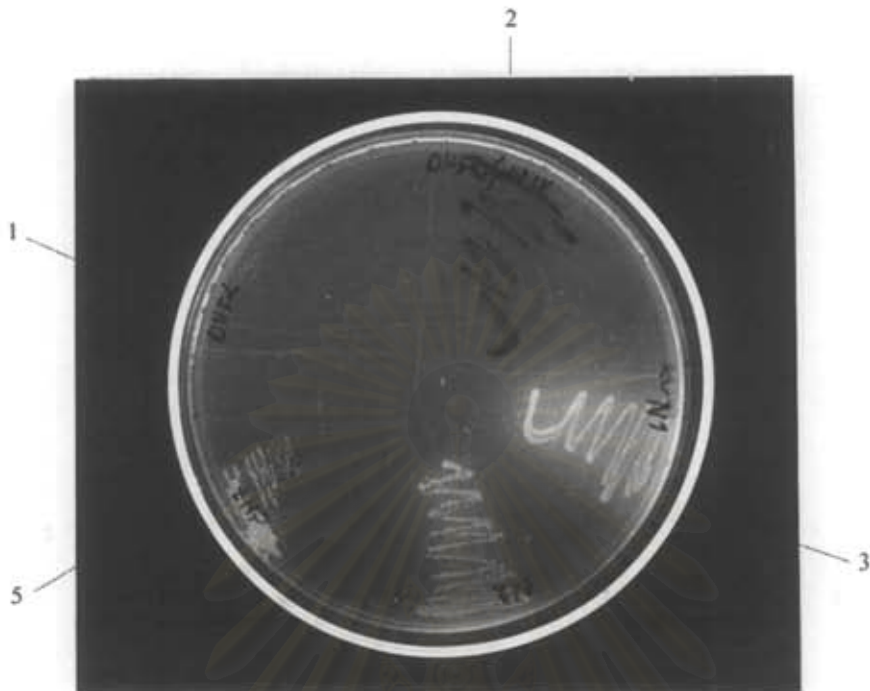
จากการทรานสฟอร์มรีคอมมิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้เข้า *E. coli* DH5 α โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน และตรวจนับโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิซิลิน IPTG, X-gal และ MUX (ภาคผนวก ข.) พบว่าได้โคโลนีสีขาวประมาณมากกว่า 70 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ของทรานสฟอร์มแมนท์ทั้งหมด ซึ่งคำนวณประสิทธิภาพของทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับรีคอมมิแนนท์พลาสมิดได้ประมาณ 10^3 ทรานสฟอร์มแมนท์ต่อเซลล์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม และจากทรานสฟอร์มแมนท์ที่ให้โคโลนีสีขาวรวมทั้งหมดประมาณ 11,000 ทรานสฟอร์มแมนท์ ตรวจพบโคลนที่มียีนบีตา-ไซโลติคัส 2 โคลน ซึ่งคัดเลือกได้จากการเรืองแสงสีฟ้าทั้งภายในและรอบโคโลนี ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร จึงตั้งชื่อโคลนที่พบว่า N1 และ N2 ดังแสดงในรูป 3.3a และ 3.3b ตามลำดับ

3.1.4 การตรวจสอบรีคอมมิแนนท์พลาสมิดจากโคลน N1 และ N2

สกัดพลาสมิดจากโคลน N1 และ N2 แล้วนำมาวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เปรียบเทียบกับพลาสมิดพาหะ pUC18 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.4 พบว่าพลาสมิดจากโคลน N1 และ N2 มีขนาดใกล้เคียงกันและใหญ่กว่า pUC18 แสดงว่าพลาสมิดทั้ง 2 เป็นรีคอมมิแนนท์พลาสมิดจริง จึงให้ชื่อพลาสมิดจากโคลน N1 และ N2 ว่า pCH7-1 และ pCH7-2 ตามลำดับ

จากนั้นได้นำ pCH7-1 และ pCH7-2 มาทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 α อีกครั้ง (re-transform) ผลการทดลองพบว่าทุกโคโลนีที่เจริญบนอาหารทดสอบสูตรเดิมสามารถเรืองแสงสีฟ้าได้ ดังรูปที่ 3.5a และ 3.5b จึงเป็นการยืนยันว่าทั้ง pCH7-1 และ pCH7-2 มียีนบีตา-ไซโลติคัส

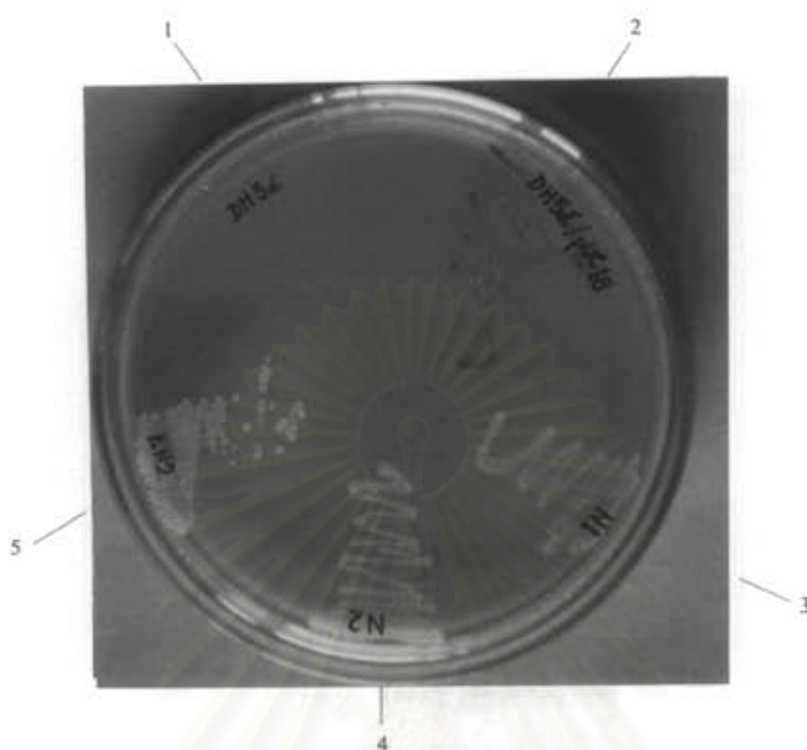
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.3a ลักษณะการเรียงแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตของโคดอน N1 และ N2 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. CH7 และ *E. coli* DH5 α /pUC18 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มี IPTG, X-gal, MUX และแอมพิซิลิน

- 1 *E. coli* DH5 α
- 2 *E. coli* DH5 α /pUC18
- 3 N1
- 4 N2
- 5 *Streptomyces* sp. CH7

หมายเหตุ *E. coli* DH5 α ไม่เจริญบนอาหารที่มีแอมพิซิลิน



รูปที่ 3.3b ลักษณะโคโคไนท์จากตัวอย่างในรูปที่ 3.3a เมื่ออยู่ภายใต้แสงสีขาว

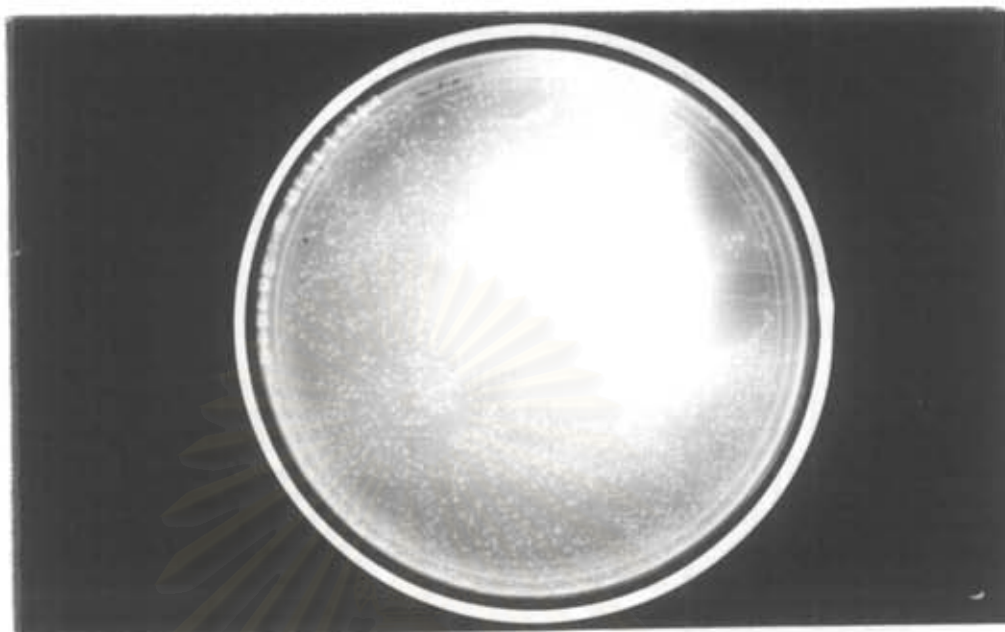
- 1 *E. coli* DH5 α
- 2 *E. coli* DH5 α /pUC18
- 3 N1
- 4 N2
- 5 *Streptomyces* sp. CH7

หมายเหตุ *E. coli* DH5 α ไม่เจริญบนอาหารที่มีแอมพิซิลิน



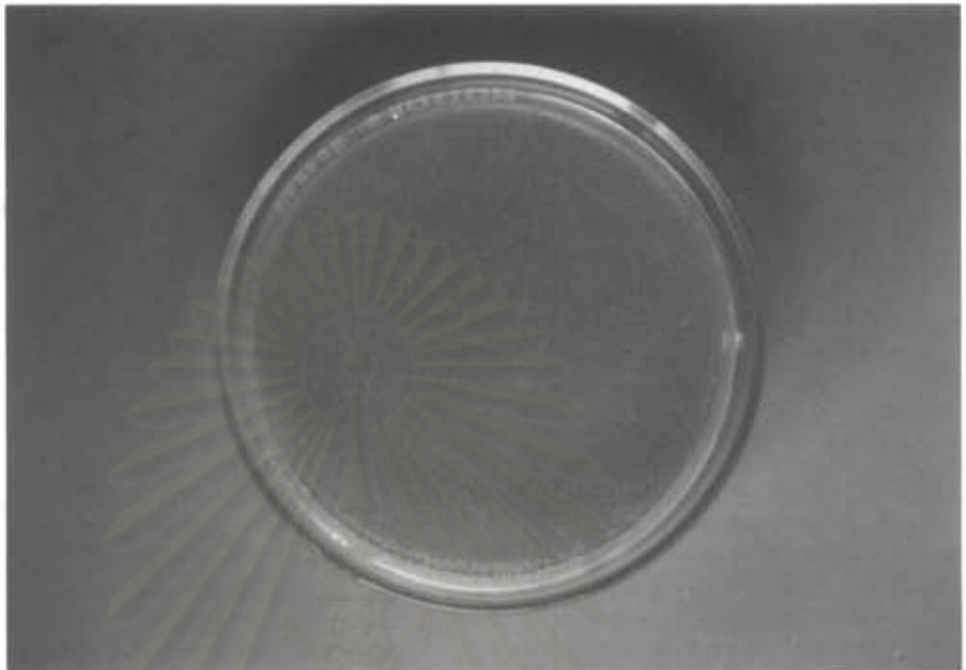
รูปที่ 3.4 ภาพแสดงขนาดพลาสมิด pCH7-1 และ pCH7-2 เปรียบเทียบกับ pUC18 บนอะกาโรสเจล

- ช่องที่ 1 λ DNA/*Hind*III
 2 พลาสมิด pUC18
 3 พลาสมิด pCH7-1
 4 พลาสมิด pCH7-2



รูปที่ 3.5a ภาพแสดงการเรืองแสงของ *E. coli* DH5 α ที่ได้รับพลาสมิด pCH7-1
ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.5b ภาพแสดงโคโคไนซ์จากตัวอย่างในรูปที่ 3.5a เมื่ออยู่ภายใต้แสงสีขาว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การตรวจสอบแอกติวิตีของปีคา-ไซโลติคสจากโคลน N1 และ N2

เมื่อนำโคลน N1 และ N2 มาตรวจสอบแอกติวิตีของปีคา-ไซโลติคส เปรียบเทียบกับ *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิด pUC18 และ *Streptomyces* sp. CH7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เป็นแหล่งของยีนปีคา-ไซโลติคส ผลการทดลองแสดงดังในตารางที่ 3.1 พบว่าทั้งโคลน N1 และ N2 มีแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงกว่า *E. coli* DH5 α ที่มี pUC18 ประมาณ 30 เท่า ซึ่งเป็นการยืนยันว่าทั้ง 2 โคลนได้รับยีนปีคา-ไซโลติคส แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. CH7 พบว่าทั้ง N1 และ N2 มีแอกติวิตีจำเพาะของปีคา-ไซโลติคส ต่ำกว่าประมาณ 10 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยีนซึ่งได้มาจาก *Streptomyces* มีประสิทธิภาพการแสดงออกใน *E. coli* ได้ค่อนข้างต่ำ

3.3 การศึกษาขนาดและแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pCH7-1 และ pCH7-2

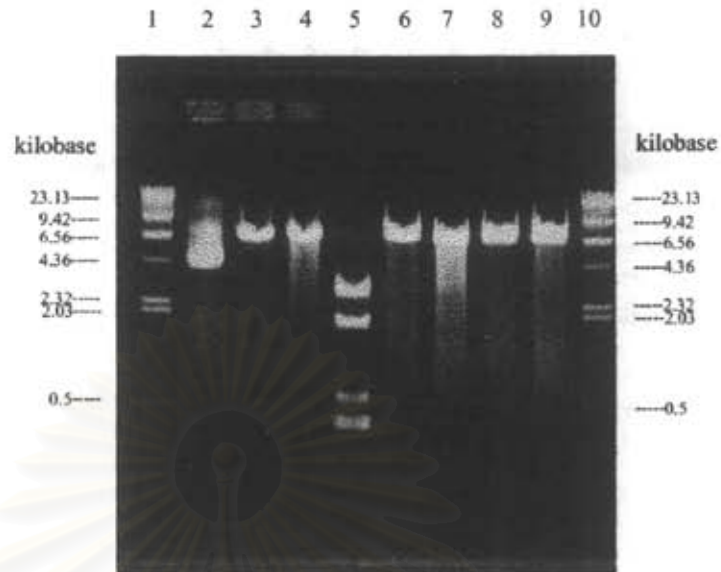
3.3.1 การศึกษาขนาดของพลาสมิด pCH7-1 และ pCH7-2 และรูปแบบการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ

จากการตัดพลาสมิด pCH7-1 และ pCH7-2 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 7 ชนิด คือ *EcoRI*, *KpnI*, *SmaI*, *XbaI*, *BamHI*, *SphI*, และ *HindIII* ซึ่งมีตำแหน่งการตัดบนตำแหน่งสำหรับการโคลนของพลาสมิดพาหะ pUC18 แสดงผลการทดลองในรูปที่ 3.6 และ 3.7 พบว่าทั้ง 2 พลาสมิดให้รูปแบบการถูกตัดด้วยเอนไซม์เหล่านี้คล้ายกัน ซึ่งทุกเอนไซม์ยกเว้น *SmaI* สามารถตัดพลาสมิดได้ 1 ตำแหน่งโดยให้แอมป์ลิคอน 1 แอมป์ แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (DNA insert) ในพลาสมิดทั้ง 2 ไม่มีตำแหน่งสำหรับการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI*, *KpnI*, *XbaI*, *SphI*, และ *HindIII* ยกเว้น *BamHI* ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอนการโคลนยีนตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อที่ 2.10 ได้ใช้ตำแหน่งที่ตัดด้วย *BamHI* บนพลาสมิดพาหะ pUC18 เป็นตำแหน่งในการเชื่อมพลาสมิดพาหะกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากโครโมโซมของ *Streptomyces* sp. CH7 ที่ถูกตัดแบบกึ่งสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sau3AI* ซึ่งการเชื่อมกันของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย 2 เอนไซม์นี้จะทำให้สูญเสียตำแหน่งที่เอนไซม์ *BamHI* สามารถจดจำได้ ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นที่พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดสามารถถูกตัดได้ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI* จึงสรุปเบื้องต้นว่าชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกนั้นมีตำแหน่งที่เรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI* สามารถจดจำและตัดได้

ตารางที่ 3.1 แอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-ไฮโดลิตเอสจากโคลน N1 และ N2 เทียบกับ *E. coli* DH5 α /pUC18 และ *Streptomyces* sp. CH7

จุลินทรีย์	โปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอคติวิตีของบีตา-ไฮโดลิตเอส	
		หน่วยต่อมิลลิลิตร	หน่วยต่อ มิลลิกรัมโปรตีน
<i>E. coli</i> DH5 α /pUC18	14.90	0.19	0.01
N1	12.73	4.30	0.34
N2	14.18	4.10	0.29
<i>Streptomyces</i> sp. CH7	8.18	31.72	3.88

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.6 ภาพแสดงรูปแบบการตัดพลาสมิด pCH7-1 ด้วยเอนไซม์restriction *EcoRI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SphI* และ *HindIII* บนอะกาโรสเจล

ช่องที่ 1 λ DNA/*HindIII*

2 พลาสมิด pCH7-1

3 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์ restriction *EcoRI*

4 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์ restriction *KpnI*

5 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์ restriction *SmaI*

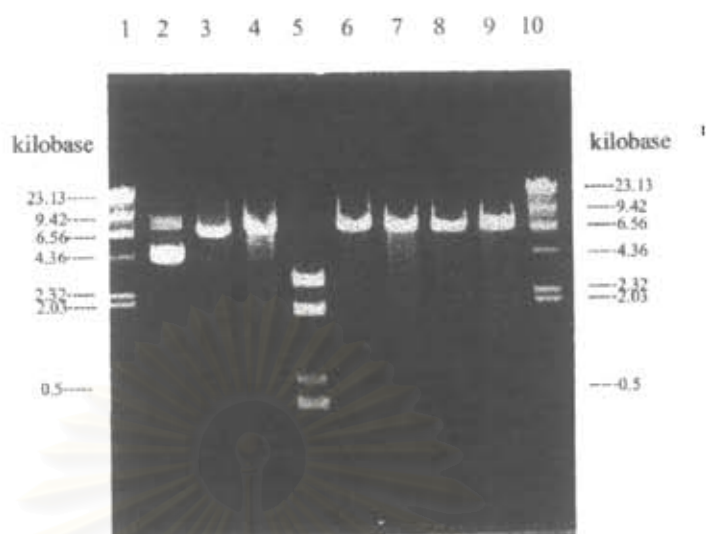
6 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์ restriction *BamHI*

7 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์ restriction *XbaI*

8 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์ restriction *SphI*

9 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์ restriction *HindIII*

10 λ DNA/*HindIII*



รูปที่ 3.7 ภาพแสดงรูปแบบการตัดพลาสมิด pCH7-2 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SphI* และ *HindIII* บนอะกาโรสเจล

ช่องที่ 1 λ DNA/*HindIII*

2 พลาสมิด pCH7-2

3 พลาสมิด pCH7-2 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI*

4 พลาสมิด pCH7-2 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *KpnI*

5 พลาสมิด pCH7-2 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *SmaI*

6 พลาสมิด pCH7-2 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI*

7 พลาสมิด pCH7-2 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *XbaI*

8 พลาสมิด pCH7-2 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *SphI*

9 พลาสมิด pCH7-2 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *HindIII*

10 λ DNA/*HindIII*

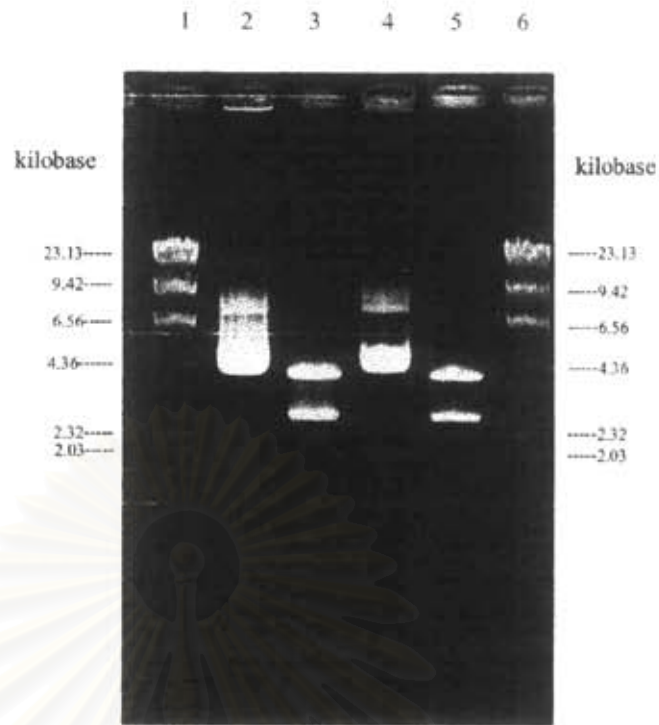
นอกจากนี้จากผลการทดลองในรูปที่ 3.6 และ 3.7 ยังพบว่า pCH7-1 และ pCH7-2 ถูกตัดได้ด้วย *SmaI* และให้แถบดีเอ็นเอ 4 แถบ แสดงว่านอกจากตำแหน่งที่ *SmaI* สามารถตัดได้บนพลาสมิดพาหะแล้ว ชิ้นดีเอ็นเอสอคแทรกยังมีตำแหน่งที่ถูกตัดได้ด้วย เรสทริกชันเอนไซม์ *SmaI* มากกว่า 1 แห่ง

เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอสอคแทรกนั้นไม่มีตำแหน่งที่เรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ตัดได้ ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไปจึงวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสอคแทรก โดยการใช้เรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ร่วมกันในการตัดเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ ดังกล่าวออกมาจาก pCH7-1 และ pCH7-2 ผลการวิเคราะห์ขนาดโดยการทำอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในรูปที่ 3.8 พบว่าชิ้นดีเอ็นเอสอคแทรกจากพลาสมิดทั้ง 2 มีขนาดเท่ากันคือประมาณ 3.6 กิโลเบส แสดงว่า pCH7-1 และ pCH7-2 คือพลาสมิดชนิด เดียวกันที่มีขนาดประมาณ 6.3 กิโลเบส (ชิ้นพลาสมิดพาหะขนาด 2.7 กิโลเบส รวมกับชิ้น ดีเอ็นเอสอคแทรกขนาด 3.6 กิโลเบส) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกเพียง pCH7-1 มาเป็นตัวแทนในการศึกษา

3.3.2 การศึกษาค่าแห่งจำเพาะสำหรับเรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI* และ *SmaI* บน ชิ้นดีเอ็นเอสอคแทรก

นำชิ้นดีเอ็นเอสอคแทรกจาก pCH7-1 มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI* ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.9 พบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอทั้งที่ถูกตัดและไม่ถูกตัด ด้วย *BamHI* ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงอาจบอกได้ว่าค่าแห่งจำเพาะสำหรับ *BamHI* อาจอยู่ใกล้ปลายโคปลายหนึ่งของชิ้นดีเอ็นเอสอคแทรก จึงทำให้ขนาดของดีเอ็นเอภายหลัง การตัดไม่เปลี่ยนแปลง หรืออีกกรณีหนึ่งคือตำแหน่งที่ *BamHI* สามารถจดจำและตัดได้นั้น อาจอยู่ที่ตำแหน่งเดิมบนพลาสมิดพาหะ โดยที่เบสตัวสุดท้ายของชิ้นดีเอ็นเอสอคแทรกนั้นมี ปลายด้านหนึ่งเป็น G:C จึงทำให้ได้ลำดับเบสสมบูรณ์ที่ *BamHI* สามารถจดจำได้กลับคืนมา ภายหลังปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 3.10

การทดลองต่อไปได้ตัดพลาสมิด pCH7-1 และชิ้นดีเอ็นเอสอคแทรกจาก pCH7-1 ด้วย เรสทริกชันเอนไซม์ *SmaI* ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.11 เมื่อวิเคราะห์ ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่าในพลาสมิด pCH7-1 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 3.1, 1.8, 0.6 และ 0.4 กิโลเบส และในชิ้นดีเอ็นเอสอคแทรกมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.8, 0.6 และ 0.4 กิโลเบส



รูปที่ 3.8 ภาพแสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (DNA insert) ที่มีขึ้นที่เป็นรหัสสำหรับบีตา-ไฮโดรลีสในพลาสมิด pCH7-1 และ pCH7-2 บนอะกาโรสเจล

ช่องที่ 1 λ DNA/*Hind*III

2 พลาสมิด pCH7-1

3 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์รีstriction *Eco*RI ร่วมกับ *Hind*III

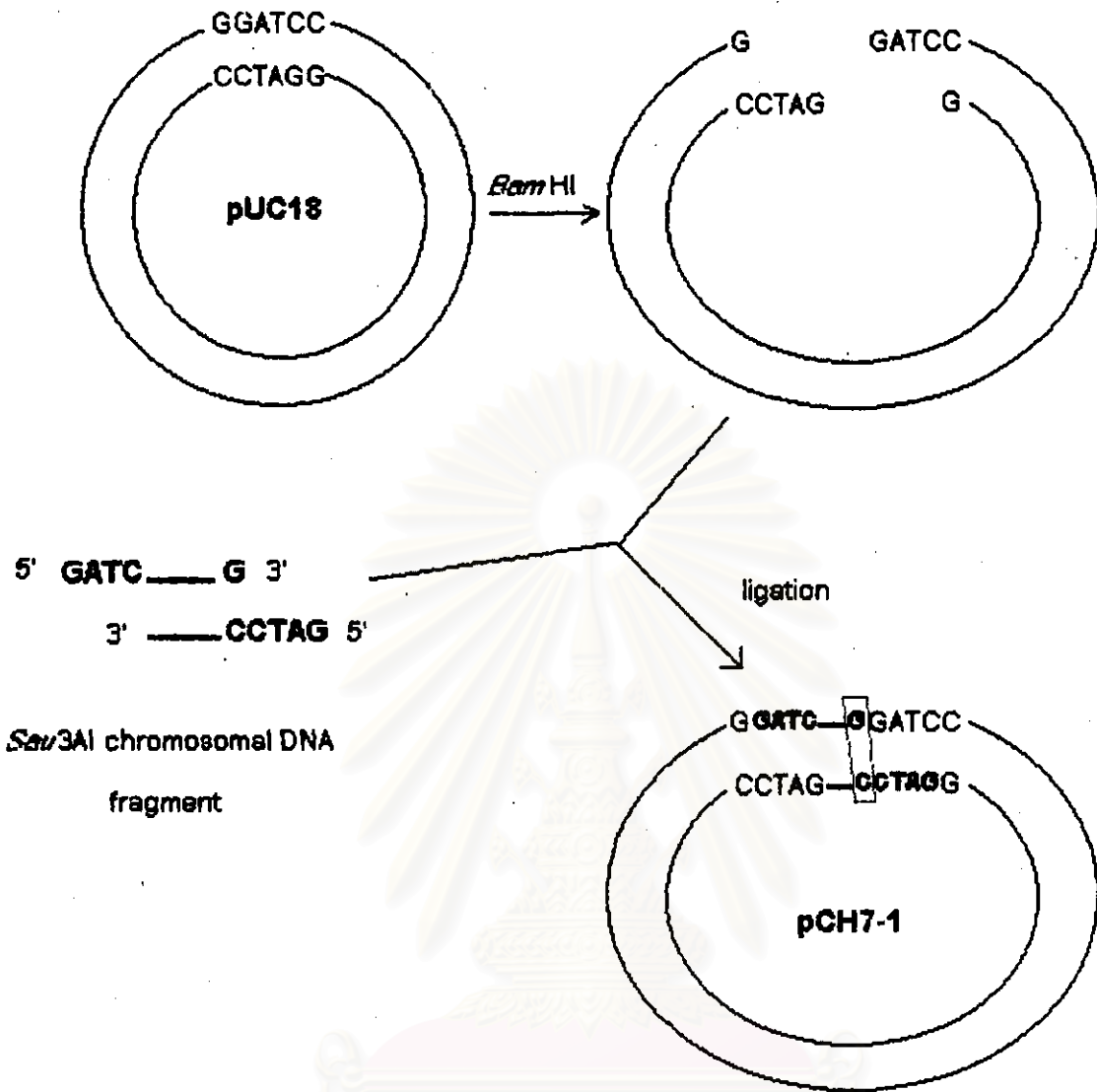
4 พลาสมิด pCH7-2

5 พลาสมิด pCH7-2 ตัดด้วยเอนไซม์รีstriction *Eco*RI ร่วมกับ *Hind*III

6 λ DNA/*Hind*III



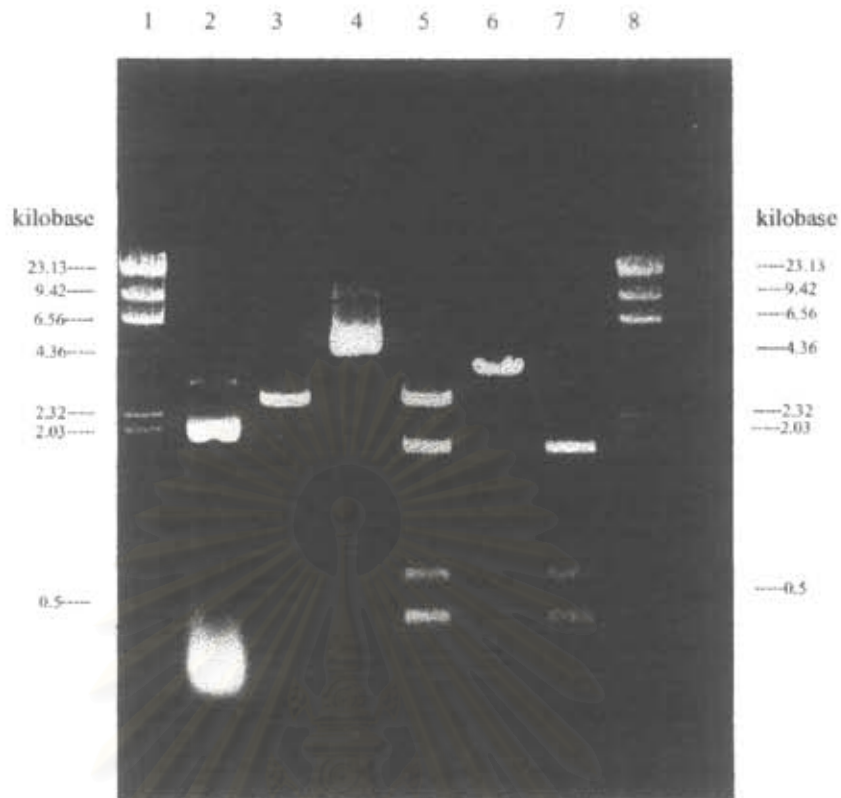
- รูปที่ 3.9 ภาพแสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ได้จากพลาสมิด pCH7-1 ก่อนตัดและหลังตัดด้วยเอนไซม์ BamHI บนอะกาโรสเจล
- ช่องที่ 1 λ DNA/*Hind*III
- 2 ชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ได้จากพลาสมิด pCH7-1 ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI
- 3 ชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ได้จากพลาสมิด pCH7-1 หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI



รูปที่ 3.10 ภาพแสดงตำแหน่งจดจำของ *Bam*HI ที่ก่อดับคีนมา

ตำแหน่งจดจำของ *Bam*HI คือ 5'...G ▼ GATCC...3'

ตำแหน่งจดจำของ *Sau*3AI คือ 5'... ▼ GATC...3'



รูปที่ 3.11 ภาพแสดงรูปแบบการตัดพลาสมิด pUC18 , pCH7-1 และชิ้นดีเอ็นเอ
สอดแทรกที่ได้จากพลาสมิด pCH7-1 ด้วยเอนไซม์ SmaI
บนอะกาโรสเจล

- ช่องที่ 1 λ DNA/HindIII
- 2 พลาสมิด pUC18
- 3 พลาสมิด pUC18 ตัดด้วยเอนไซม์ SmaI
- 4 พลาสมิด pCH7-1
- 5 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์ SmaI
- 6 ชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ได้จากพลาสมิด pCH7-1
- 7 ชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ได้จากพลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วย
เอนไซม์ SmaI
- 8 λ DNA/HindIII

นำข้อมูลนี้มาประเมินร่วมกับขนาดของ pCH7-1 (6.3 กิโลเบส) และขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (3.6 กิโลเบส) รวมทั้งพิจารณาจากความเข้มของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 0.4 กิโลเบสที่มากกว่าชิ้นส่วนขนาด 0.6 กิโลเบส สามารถระบุได้ว่า pCH7-1 ที่ตัดด้วย *Sma*I มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 0.4 กิโลเบส 2 ชิ้น สำหรับชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ตัดด้วย *Sma*I มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 0.4 กิโลเบส 3 ชิ้น

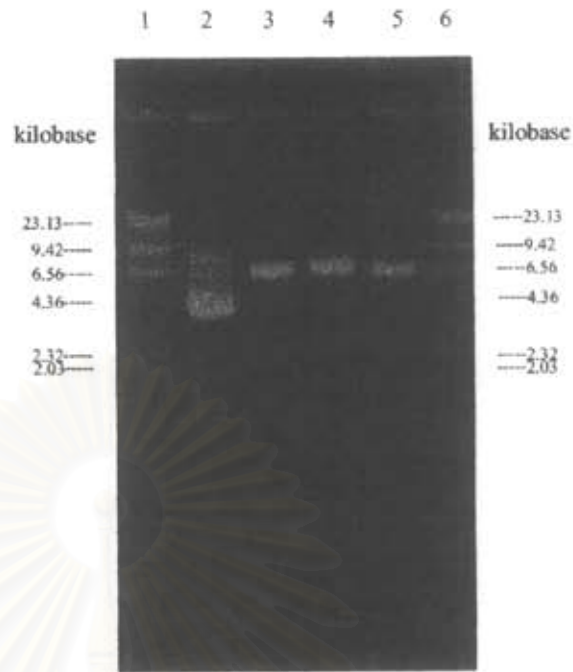
นอกจากนี้ยังได้นำ pCH7-1 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Sma*I เปรียบเทียบกับการตัดด้วยเอนไซม์ *Sma*I ร่วมกับ *Bam*HI ดังแสดงในรูปที่ 3.12 พบว่าให้แถบดีเอ็นเอ 4 แถบ คล้ายคลึงกันที่มีขนาด 3.1, 1.8, 0.6 และ 0.4 กิโลเบส และยืนยันผลการทดลองด้วยการตัด pCH7-1 ด้วยเอนไซม์ *Hind*III ร่วมกับ *Bam*HI ดังแสดงในรูปที่ 3.13 และ *Eco*RI ร่วมกับ *Bam*HI ดังแสดงในรูปที่ 3.14 พบว่า เมื่อตัด pCH7-1 ด้วย *Hind*III ร่วมกับ *Bam*HI จะได้แถบของพลาสมิด pCH7-1 ในรูปเส้นตรง 1 แถบ และเมื่อตัด pCH7-1 ด้วย *Eco*RI ร่วมกับ *Bam*HI จะได้แถบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบส ซึ่งเป็นชิ้นพลาสมิด และ 3.6 กิโลเบส ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก จากข้อมูลที่ได้นี้แสดงว่าบน pCH7-1 มีตำแหน่งจดจำของ *Bam*HI อยู่ทางด้านเดียวกับตำแหน่งจดจำของ *Hind*III

จากข้อมูลทั้งหมดในการทดลองข้างต้นสามารถสร้างแผนที่เรสทริกชันสำหรับเอนไซม์บนพลาสมิด pCH7-1 ได้ดังรูปที่ 3.15 โดยชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกมีตำแหน่งจำเพาะสำหรับเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI อยู่ด้านเดียวกับตำแหน่งจำเพาะสำหรับเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III บนพลาสมิดพาหะ และตำแหน่งจำเพาะสำหรับ *Sma*I I ตำแหน่งที่ทราบแน่นอนบนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ให้ชิ้นส่วนขนาด 0.4 กิโลเบส อยู่ใกล้กับตำแหน่งจำเพาะสำหรับ *Bam*HI ซึ่งก็คือด้านเดียวกับตำแหน่งจำเพาะของ *Hind*III บนพลาสมิดพาหะ (ข้อมูลในรูปที่ 3.15) ส่วนตำแหน่งอื่นๆที่จำเพาะสำหรับ *Sma*I บนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกนั้นยังระบุไม่ได้ ทั้งนี้เนื่องจากความจำกัดของชนิดเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีอยู่ ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการตัดร่วมกับ *Sma*I



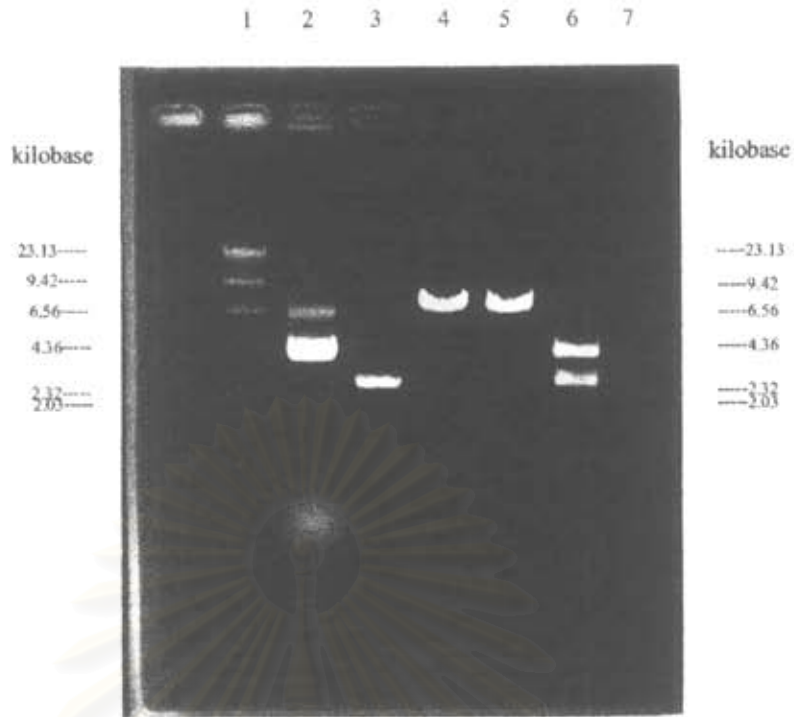
รูปที่ 3.12 ภาพแสดงรูปแบบการตัดพลาสมิด pCH7-1 ด้วยเอนไซม์restriction *SmaI* และ *SmaI* ร่วมกับ *BamHI* บนอะกาโรสเจล

- ช่องที่ 1 λ DNA/*HindIII*
- 2 พลาสมิด pCH7-1
- 3 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์restriction *SmaI*
- 4 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์restriction *SmaI* ร่วมกับ *BamHI*



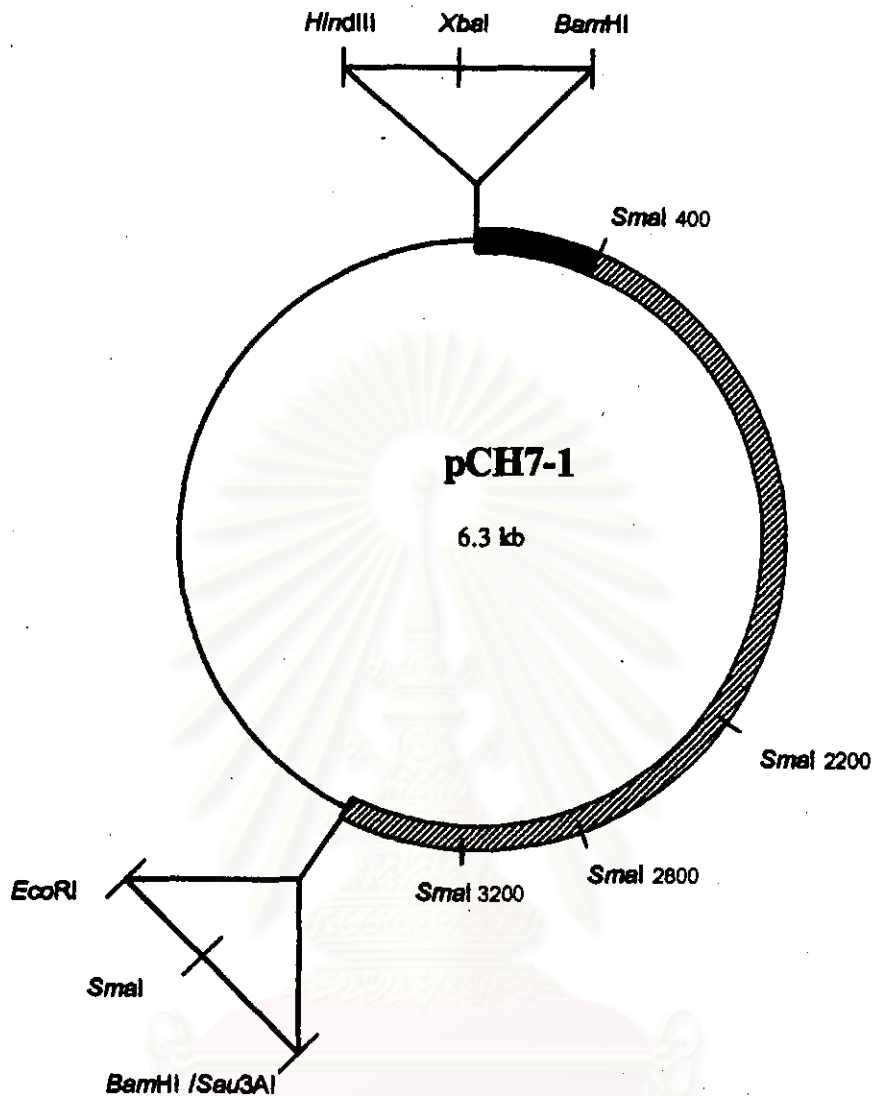
รูปที่ 3.13 ภาพแสดงรูปแบบการตัดพลาสมิด pCH7-1 ด้วยเอนไซม์ *Hind*III, *Bam*HI และ *Hind*III ร่วมกับ *Bam*HI บนอะกาโรสเจล

- ช่องที่ 1 λ DNA/*Hind*III
- 2 พลาสมิด pCH7-1
- 3 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III
- 4 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI
- 5 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III ร่วมกับ *Bam*HI
- 6 λ DNA/*Hind*III






รูปที่ 3.14 ภาพแสดงรูปแบบการตัดพลาสมิด pCH7-1 ด้วยเอนไซม์restriction EcoRI, BamHI และ EcoRI ร่วมกับ BamHI บนอะกาโรสเจล

- ช่องที่ 1 λ DNA/HindIII
- 2 พลาสมิด pCH7-1
- 3 พลาสมิด pUC18 ตัดด้วยเอนไซม์restriction BamHI
- 4 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์restriction EcoRI
- 5 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์restriction BamHI
- 6 พลาสมิด pCH7-1 ตัดด้วยเอนไซม์restriction EcoRI ร่วมกับ BamHI
- 7 λ DNA/HindIII



รูปที่ 3.15 ภาพแสดงแผนที่เรสทริกชันของ pCH7-1

-  แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรกที่เรสทริกชันเอนไซม์ *SmaI* ตัดได้ แต่ยังไม่ทราบตำแหน่งที่แน่นอน
-  แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรกที่เรสทริกชันเอนไซม์ *SmaI* ตัดได้ และทราบตำแหน่งที่แน่นอน
-  แสดงชิ้นส่วนพลาสมิดขนาด 2.7 กิโลเบส

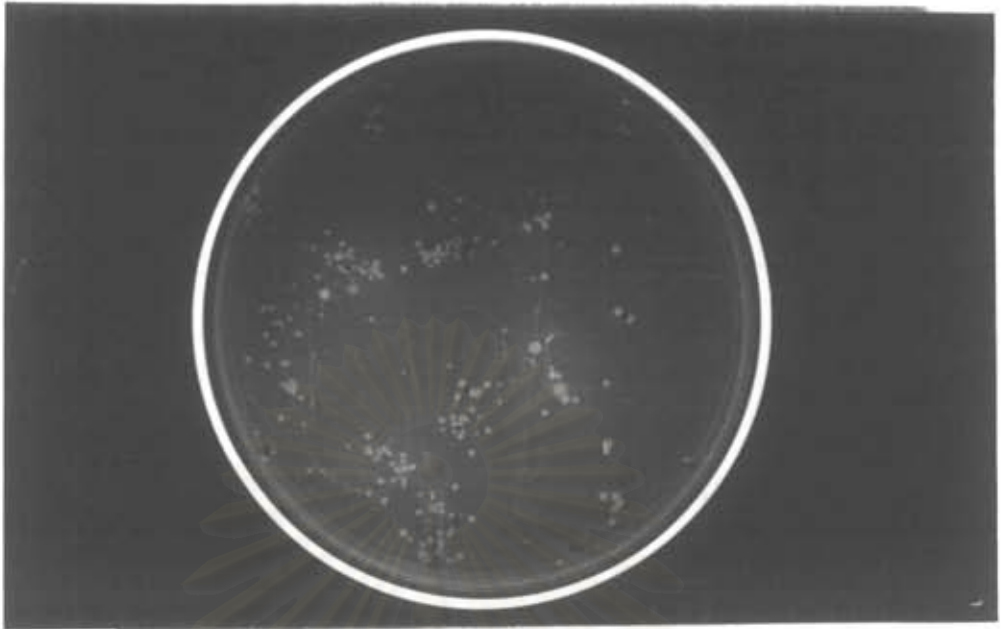
3.4 การโคลนยีนฮินบิตา-ไซโลติเคสเข้าพลาสมิดพาหะ pUC19

เพื่อศึกษาว่าฮินบิตา-ไซโลติเคสซึ่งอยู่ใน pCH7-1 แสดงออกภายใต้การชักนำของโพรโมเตอร์ของพลาสมิด pUC18 (P_{uc}) หรือโพรโมเตอร์ของตัวเอง จึงทำการโคลนยีนฮินบิตา-ไซโลติเคสแทรกจาก pCH7-1 เข้าพลาสมิดพาหะ pUC19 ซึ่งมีลำดับตำแหน่งที่จำเพาะสำหรับเรสทริกชันเอนไซม์บนตำแหน่งสำหรับการโคลนสลับกับ pUC18 ดังแสดงในรูปที่ 1 ในภาคผนวก ง. โดยตัด pCH7-1 ด้วย *EcoRI* และ *HindIII* ร่วมกัน แล้วนำเอาฮินบิตา-ไซโลติเคสแทรกมาเชื่อมกับฮินพลาสมิดพาหะ pUC19 ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกัน เมื่อทรานสฟอร์มรีคอมมิแนนท์พลาสมิดนี้เข้า *E. coli* DH5 α สังเกตพบโคโลนีเรืองแสงสีฟ้าบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิซิลินและ MUX ดังแสดงในรูปที่ 3.16 ซึ่งแสดงว่าฮินบิตา-ไซโลติเคสที่โคลนได้นั้นสามารถแสดงออกได้ด้วยโพรโมเตอร์ของตัวเอง ตั้งชื่อโคลนที่ได้ว่า N1(19)

จากนั้นได้สกัดแยกพลาสมิดจากโคลน N1(19) และวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับ pCH7-1 พบว่ามีขนาดเท่ากัน ดังแสดงในรูปที่ 3.17 และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pCH7-1(19) นำ pCH7-1(19) มาทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* DH5 α อีกครั้ง พบว่าทุกโคโลนีเรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิซิลินและ MUX ดังแสดงในรูปที่ 3.18a และ 3.18b จึงเป็นการยืนยันว่าฮินบิตา-ไซโลติเคสที่โคลนได้มีความเสถียร และมีโพรโมเตอร์ของตัวเอง โดยสามารถแสดงออกได้แม้จะสร้างให้กลับทิศทางกับโพรโมเตอร์ของพลาสมิดพาหะ

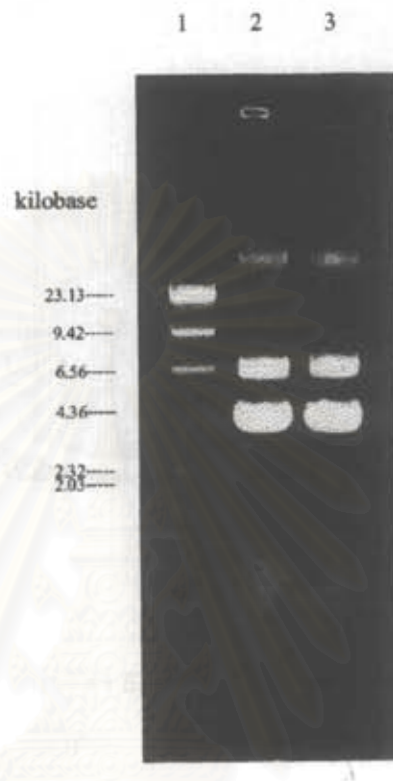
3.5 การทดสอบแอกติวิตีของฮินบิตา-ไซโลติเคสในโคลน N1 เทียบกับ N1(19)

เมื่อทดสอบแอกติวิตีของฮินบิตา-ไซโลติเคสในโคลน N1 เทียบกับ N1(19) และ *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิดพาหะ pUC19 ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.2 ซึ่งพบว่า N1(19) มีแอกติวิตีสูงกว่า *E. coli* DH5 α /pUC19 ประมาณ 10 เท่า แต่ต่ำกว่า N1 ประมาณ 3 เท่า ทั้งนี้ อาจเนื่องจากการแสดงออกของฮินบิตา-ไซโลติเคสใน pCH7-1 อยู่ภายใต้การชักนำของ P_{uc} ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในเซลล์เจ้าบ้านเอง ขณะที่ฮินบิตา-ไซโลติเคสใน pCH7-1(19) แสดงออกภายใต้การชักนำโดยโพรโมเตอร์ของตัวเอง ซึ่งมาจาก *Streptomyces* ดังนั้นจึงมีประสิทธิผลต่ำใน *E. coli*



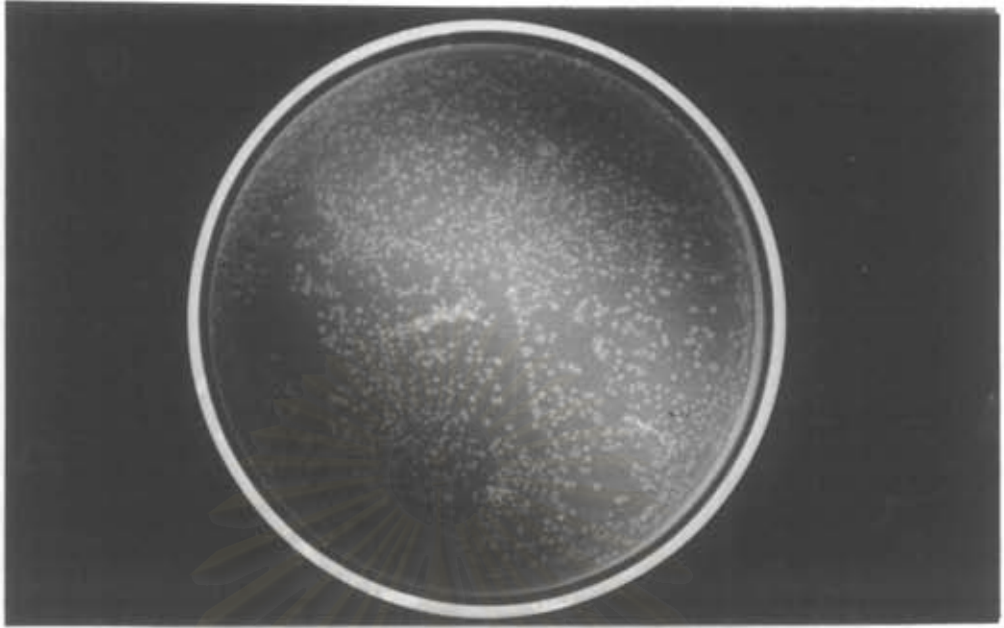
รูปที่ 3.16 ภาพแสดงการเรืองแสงของโคโลนีภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตหลังจาก
โคลนย่อย (subclone) โดยใช้พลาสมิด pUC19

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



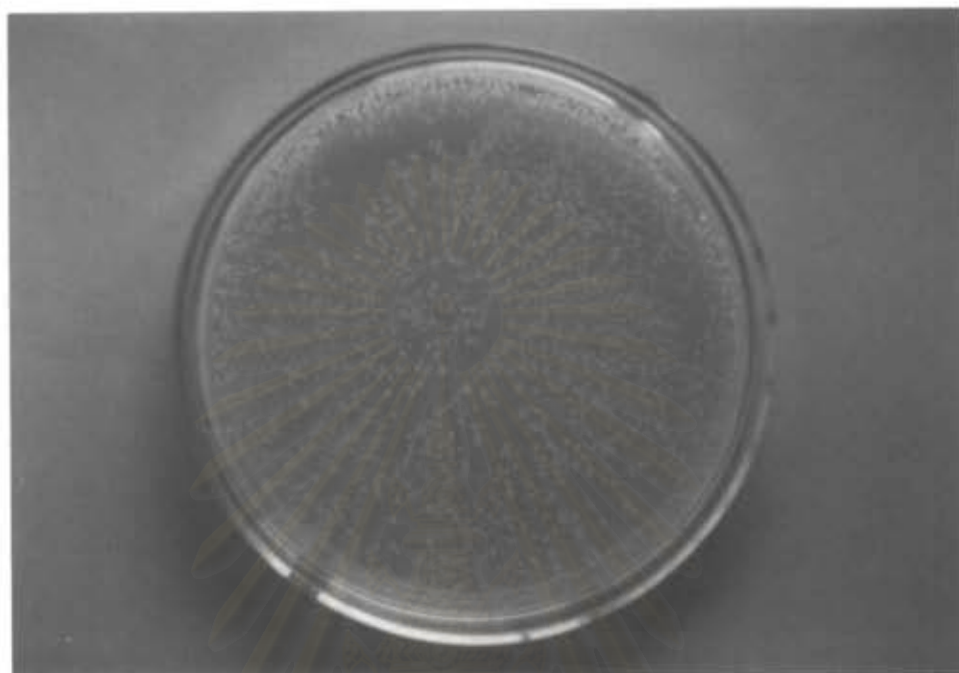
รูปที่ 3.17 ภาพแสดงขนาดรีคอมมิแนนท์พลาสมิด pCH7-1 และ pCH7-1(19) บน
อะกาโรสเจล

- ช่องที่ 1 λ DNA/*Hind*III
 2 พลาสมิด pCH7-1
 3 พลาสมิด pCH7-1(19)



รูปที่ 3.18a ภาพแสดงการเรืองแสงของ *E. coli* DH5α ที่ได้รับพลาสมิด pCH7-1(19) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.18b ภาพแสดงโคโตนีจากตัวอย่างในรูป 3.18a เมื่ออยู่ภายใต้แสงสีขาว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.2 แอคติวิตีของบีตา-ไซโลลิเนสจากโคลน N1 เทียบกับ N1(19) และ *E. coli* DH5 α /pUC19

จุลินทรีย์	โปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอคติวิตีของบีตา-ไซโลลิเนส	
		หน่วยต่อมิลลิลิตร	หน่วยต่อ มิลลิกรัมโปรตีน
<i>E. coli</i> DH5 α /pUC19	14.18	0.094	0.01
N1	15.64	4.720	0.30
N1(19)	11.64	1.133	0.10

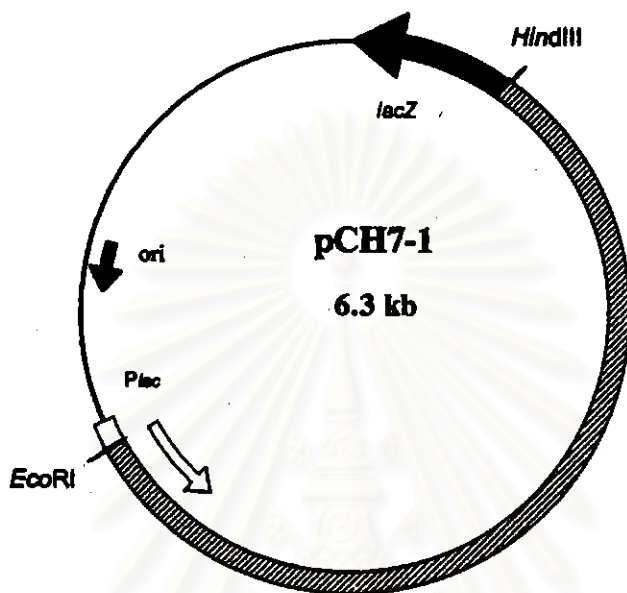
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองข้างต้น จึงภาคีศทางการแสดงออกของยีนบีตา-ไซโตไลเอสเมื่ออยู่ในพลาสมิดพาหะ pUC18 และ pUC19 ได้ดังแสดงในรูปที่ 3.19a และ 3.19b




งานวิจัยนี้จึงสรุปว่าสามารถโคลนยีนบีตา-ไซโตไลเอสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ได้โดยใช้ *E. coli* DH5 α เป็นเชสต์เจ้าบ้านและ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะ และจีนคิเอ็นเอสอดแทรกที่มียีนบีตา-ไซโตไลเอสที่โคลนได้มีขนาดประมาณ 3.6 กิโลเบส ยีนบีตา-ไซโตไลเอสที่ได้นี้สามารถแสดงออกใน *E. coli* ทั้งภายใต้โพรโมเตอร์ p_{lac} และโพรโมเตอร์ของตัวเอง



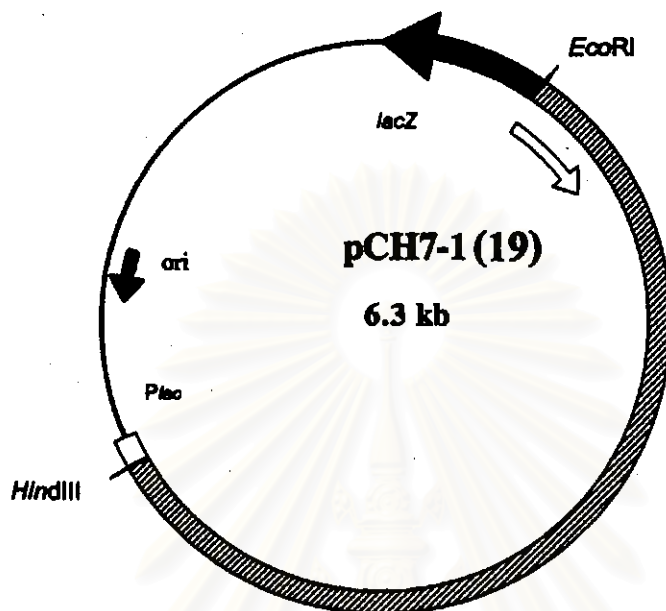
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.19a ภาพแสดงทิศทางการแสดงออกของยีนที่เป็นรหัสสำหรับบีตา-
 ไซโคลิเดสเมื่ออยู่ในพลาสมิด pUC18

-  แสดงทิศทางการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีนบนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก
 แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรกขนาด 3.6 กิโลเบส
 แสดงชิ้นส่วนพลาสมิดขนาด 2.7 กิโลเบส

สถาบันวิจัยและบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.19b ภาพแสดงทิศทางการแสดงออกของยีนที่เป็นรหัสสำหรับบีตา-ไฮโดรไลเตสเมื่ออยู่ในพลาสมิด pUC19

- ➡ แสดงทิศทางการทำงานของโพรโมเตอร์ของยีนบนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก
- ▨ แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรกขนาด 3.8 กิโลเบส
- แสดงชิ้นส่วนพลาสมิดขนาด 2.7 กิโลเบส

สถาบันวิจัยและบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย