บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Bacillus subtilis* TISTR25

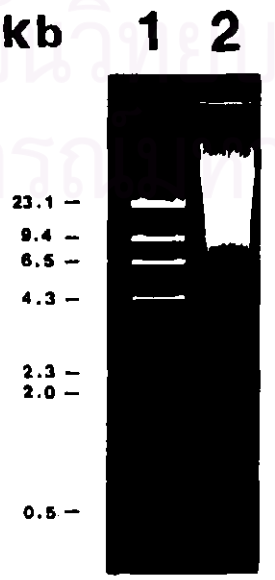
ตรวจปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ที่เลี้ยงในอาหาร LB 100 มล. pH 7.4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในวิธีการทดลองที่ 3.1 ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานของฟาจแลมบ์ดา (λ-DNA) ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Hind*III ผลการทดลองพบว่าได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 23.1 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 5 และมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมดประมาณ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อละลายในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

รูปที่ 5 แสดงผลการสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR25

สกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR25 ที่ทำการเลี้ยงในอาหาร LB 100 มล. หลังสกัดละลายในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ผ่านกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปรากฏแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตเมื่อย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ-DNA ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III

ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR25



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การย่อยดีเอ็นเอแบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเตรียมซิ้นดีเอ็นเอเพื่อให้มีขนาดเหมาะสมสำหรับการโคลนยีนโดยย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI จำนวน 1 ยูนิตต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ แบบไม่สมบูรณ์ด้วยระยะเวลานานต่างกัน ได้แก่ 1, 3, 5 และ 10 นาที ตรวจสอบการย่อยโดยการนำดีเอ็นเอที่ถูกย่อยตามเวลาดังกล่าวมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าดีเอ็นเอถูกย่อยปรากฏเป็นแถบยาวลงมาด้านล่าง ซึ่งเมื่อเพิ่มเวลาในการย่อยมากขึ้น ดีเอ็นเอขนาดใหญ่ ๆ ที่อยู่ด้านบนจะถูกย่อยจนหมดไป และจะปรากฏเป็นดีเอ็นเอขนาดเล็กลงมากขึ้น จากที่แสดงในรูปที่ 6 สามารถเลือกเวลาที่เหมาะสมที่ย่อยดีเอ็นเอเป็นแถบสม่ำเสมอครอบคลุมขนาด 1-7 กิโลเบส คือ 3 นาที

รูปที่ 6 แสดงผลการย่อยดีเอ็นเอแบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI

ย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR25 ด้วย *Sau*3AI จำนวน 1 ยูนิตต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 10 นาที ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

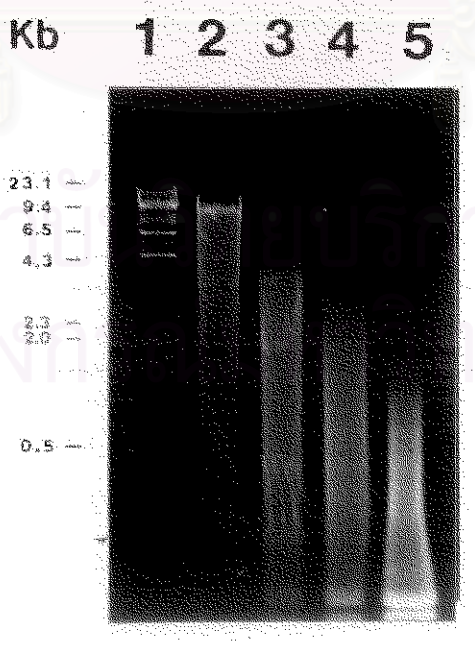
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ-DNA ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III

ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR25 ย่อยด้วย *Sau*3AI เป็นเวลา 1 นาที

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR25 ย่อยด้วย *Sau*3AI เป็นเวลา 3 นาที

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR25 ย่อยด้วย *Sau*3AI เป็นเวลา 5 นาที

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* TISTR25 ย่อยด้วย *Sau*3AI เป็นเวลา 10 นาที



4.3 การแยกดีเอ็นเอจากเจล

เมื่อทราบระยะเวลาที่ดีที่สุดในการย่อยดีเอ็นเอ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและทำการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวตามเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอในขนาดที่ต้องการมากขึ้น และสามารถแยกดีเอ็นเอในขนาดที่ต้องการออกมาได้โดยวิธีในข้อ 3.3 เมื่อตรวจสอบผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังรูปที่ 7 ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอเฉพาะในขนาดที่ต้องการ คือ 1-7 กิโลเบส เนื่องจากมีการรายงานว่ายีนโปรตีเอสจากเชื้อบาซิลลัสสายพันธุ์ต่าง ๆ มีขนาดประมาณ 1-2 กิโลเบส (Kubo,1988 และ Van der Laan, 1991) จึงต้องเลือกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนให้คลอบคลุมขนาดของยีนโปรตีเอส

รูปที่ 7 แสดงแถบดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR25 ขนาด 1-7 กิโลเบส ซึ่งแยกจากเจล
หลังแยกดีเอ็นเอออกจากเจลแล้วนำมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ-DNA ที่ถูกย่อยด้วย *HindIII*
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR25 ที่มีขนาด 1-7 กิโลเบส

4.4 การสกัดพลาสมิด pGEX-2T โดยวิธี minipreparation

จากการทรานสฟอร์มพลาสมิด pGEX-2T เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 ในข้อ 3.4 สามารถตรวจสอบได้ว่ามีพลาสมิดหรือไม่โดยการสกัดพลาสมิด pGEX-2T ด้วยวิธีแอลคาไลน์แบบ minipreparation แล้วนำพลาสมิด pGEX-2T มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่าง ๆ ที่มี

ตำแหน่งการตัดบนพลาสมิด pGEX-2T แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบ ดังรูปที่ 8 พลาสมิด pGEX-2T ที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใด ๆ (ในช่องที่ 2) จะอยู่ในรูปแบบวงแหวน (relaxed form) และ ซุปเปอร์คอยล์ (supercoiled form) ตามลำดับ เมื่อตัดด้วย *Eco*RI (ช่องที่ 3) จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.948 กิโลเบส เมื่อตัดด้วย *Eco*RI และ *Pst* I (ช่องที่ 4 และ 5) จะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 3.998 กิโลเบส และ 950 เบส ซึ่งขนาดที่ได้ตรงกับที่ระบุไว้ในแผนที่ของพลาสมิด pGEX-2T

รูปที่ 8 พลาสมิด pGEX-2T ที่ใช้เป็นพาหะดีเอ็นเอในการโคลน

สกัดพลาสมิด pGEX-2T จาก *E. coli* HB101 ที่ได้ทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าไปในเซลล์ ทำการเลี้ยงในอาหาร LB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 37^{0}ซ นำพลาสมิดที่ได้มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เจลเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปรากฏแถบของดีเอ็นเอเมื่อย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ-DNA ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III

ช่องที่ 2 พลาสมิด pGEX-2T

ช่องที่ 3 พลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 4 พลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI + *Pst*I

ช่องที่ 5 พลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI + *Pst*I (ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 2 เท่าของช่องที่4)

4.5 การย่อยพลาสมิด pGEX-2T อย่างสมบูรณ์ (complete digestion)

หลังย่อยพลาสมิด pGEX-2T อย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จึงได้ดีเอ็นเอปลายเปิดสายยาว 4.948 กิโลเบส เมื่อทำการสกัดด้วยฟีนอลเพื่อแยกเฉพาะพลาสมิดออกจากส่วนผสมของปฏิกิริยาแล้ว จะปรากฏดังรูปที่ 9 ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นี้จะใช้ในการโคลนต่อไป

รูปที่ 9 แสดงการย่อยพลาสมิด pGEX-2T อย่างสมบูรณ์ (complete digestion) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

นำพลาสมิด pGEX-2T ที่ย่อยด้วย *Bam*HI มาตรวจสอบการย่อยด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ผ่านกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปรากฏแถบของดีเอ็นเอดีเอ็นเอเมื่อย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ-DNA ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III

ช่องที่ 2 พลาสมิด pGEX-2T

ช่องที่ 3 พลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI

4.6 การเชื่อมดีเอ็นเอ (Ligation)

นำชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1-7 กิโลเบสของโครโมโซมของ *Bacillus subtilis* TISTR25 ปริมาณ 0.3 ไมโครกรัม (300 นาโนกรัม) มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI อย่างสมบูรณ์ขนาด 4.948 กิโลเบส ปริมาณ 0.1 ไมโครกรัม (100 นาโนกรัม) โดยอาศัยเอนไซม์ T4 DNA ligase (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ดังแสดงในรูปที่ 10 ได้แถบรีคอมบิแนนท์

พลาสมิดมีขนาดใหญ่กว่าเป็นจำนวนมากอยู่เหนือขึ้นไปด้านบนในช่องที่ 6 จึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101

รูปที่ 10 แสดงการเชื่อมกันระหว่าง ดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR25 ขนาด 1-7 กิโลเบส กับพลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI

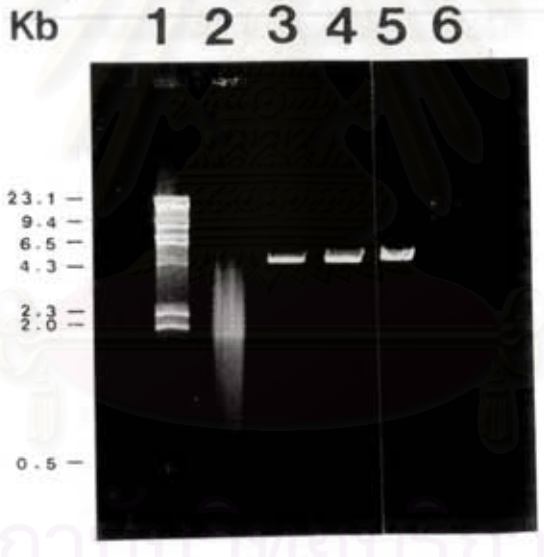
นำดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR25 ขนาด 1-7 กิโลเบสจากการย่อยแบบไม่สมบูรณ์ และพลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI มาเชื่อมกันโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA ligase

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ-DNA ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III

ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR25 ขนาด 1-7 กิโลเบส

ช่องที่ 3-5 พลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI

ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากการเชื่อมกัน

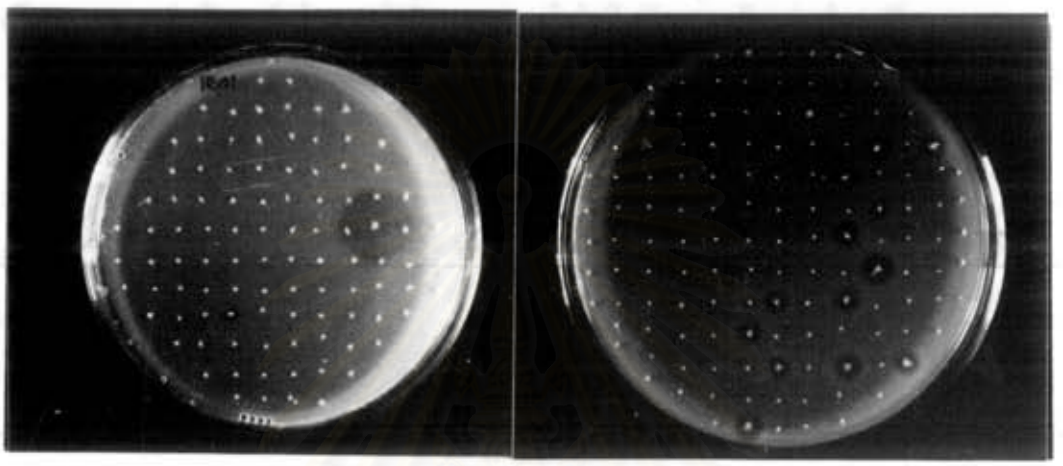


4.7 การเคลื่อนย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 ด้วยวิธี electroporation (Dower et al., 1988)

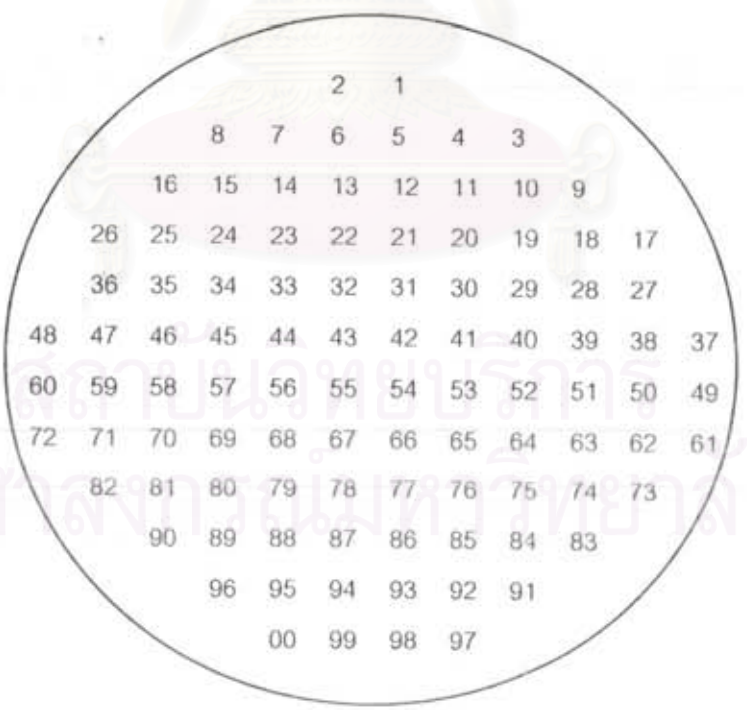
หลังเคลื่อนย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 ด้วยวิธีให้กระแสไฟฟ้า (electroporation) 2.5 กิโลโวลท์ นาน 4-5 msec ตามวิธีในข้อ 3.10 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ IPTG พบว่า เป็นโคโลนีสีขาวทั้งหมดจำนวน 3,640 โคโลนี

รูปที่ 11 แสดงการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ด้วยการเลี้ยงบนอาหารที่มีนมพร่องมันเนย

คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์บนอาหารแข็งที่มีนมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ IPTG พบว่ามีทรานสฟอร์แมนท์ที่สามารถเจริญได้ และ ย่อยโปรตีนในน้ำนมได้ปรากฏเป็นวงใส ๆ ขนาดเล็กใหญ่แตกต่างกันรอบ ๆ โคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์



ก. ตัวอย่างการเลี้ยงบนอาหารที่มีนมผงพร่องมันเนยจานละ 100 โคโลนี



ข. แผนภาพแสดงตำแหน่งของโคโลนีบนจานเลี้ยงเชื้อ

4.8 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนโปรตีเอส

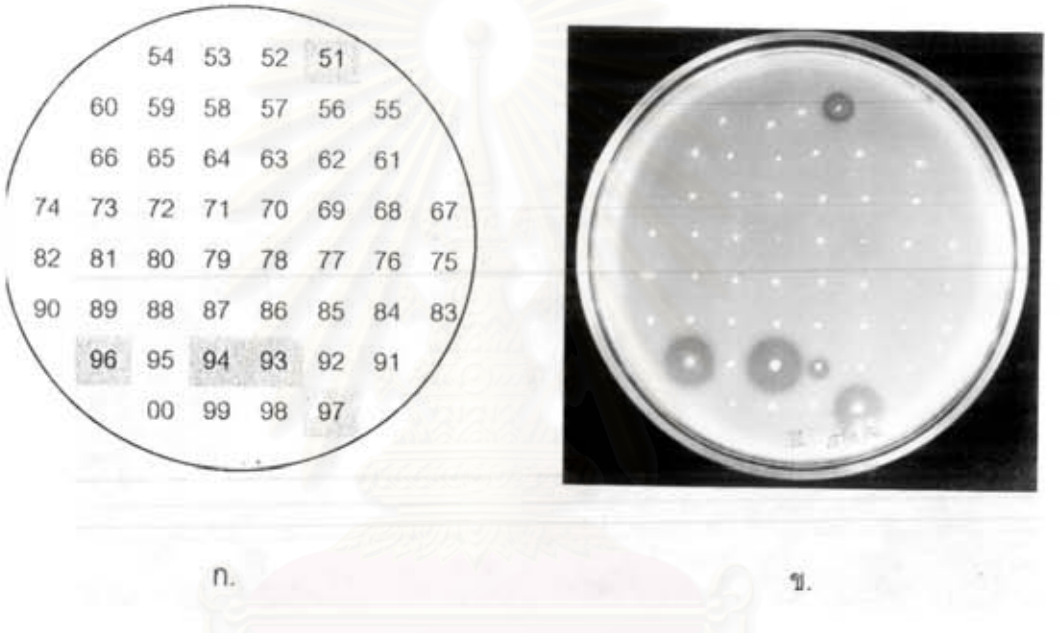
ทำการย้ายทรานสฟอร์แมนท์ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ IPTG มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีนมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ IPTG โดยไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อ ทั้งสิ้น 28 จาน ๆ ละ 130 โคโลนี พบว่ามีทรานสฟอร์แมนท์ที่สามารถเจริญได้ และ ย่อยโปรตีนในน้ำนมได้ปรากฏเป็นวงใส ๆ ขนาดเล็กใหญ่แตกต่างกันรอบ ๆ โคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์ จำนวนทั้งสิ้น 509 โคโลนี ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 11 แสดงว่าทรานสฟอร์แมนท์นั้นมีควรจะยีนของโปรตีเอส จึงทำการย้ายทรานสฟอร์แมนท์อีกครั้งเฉพาะที่ให้วงใสรอบ ๆ โคโลนีไปยังอาหารแข็งที่มีนมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ IPTG จานละ 50 โคโลนี โดยไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อ ได้สังเกตว่ามีโคโลนีที่ให้วงใส ๆ อยู่แต่จำนวนลดลงจากเดิม ได้แก่ #1, #6, #11, #20, #36, #42, #45, #48, #51, #93, #94, #96, #97 เป็นต้น พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ #51, #93, #94, #96 และ #97 ยังสามารถให้วงใสรอบ ๆ โคโลนี เมื่อผ่านการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ด้วยการเลี้ยงบนอาหารที่มีนมพร่องมันเนย 3 ครั้ง และโคโลนีที่ให้วงใส ๆ ดังกล่าวขนาดใหญ่ที่สุดคือ #97 ดังปรากฏในรูปที่ 12 จึงนำโคโลนีเหล่านี้ไปทำการศึกษาต่อไปเพื่อตรวจสอบชนิดของยีนโปรตีเอส โดยทำการสกัดแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากทั้ง 509 ทรานสฟอร์แมนท์ แล้วสุ่มนำมาตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในรูปที่ 13 พบว่าเมื่อทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยเปรียบเทียบขนาดกับพลาสมิด pGEX-2T ปรากฏว่ามีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลายขนาดทั้งที่มีขนาดเล็กกว่าและใหญ่กว่าพลาสมิด pGEX-2T จึงได้ทำการสุ่มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่ามาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 1 ตำแหน่งบนพลาสมิด pGEX-2T ได้แก่ *Eco*RI และ *Bst*EII เพื่อตรวจสอบว่ามียีนดีเอ็นเอ insert อยู่จริงหรือไม่ ดังแสดงในรูปที่ 14 ช่องที่ 2 เป็นพลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI ช่องที่ 3 เป็นพลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI คู่กับ *Bst*EII จะได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 2.881 และ 2.027 กิโลเบส และช่องที่ 4, 5 และ 6 เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ #36, #94 และ #97 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI คู่กับ *Bst*EII ปรากฏว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ #36, #94 และ #97 มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ 3 แถบ ขนาดประมาณ 3.7, 2.8 และ 2.0 กิโลเบส ทั้งนี้สันนิษฐานว่าบนชิ้นดีเอ็นเอ insert มีตำแหน่งที่สามารถถูกตัดด้วย *Bst*EII หรือ *Eco*RI 1 ตำแหน่ง ซึ่งอยู่ใกล้ตำแหน่ง *Bam*HI ใน multiple cloning site ของพลาสมิด pGEX-2T จึงทำให้ชิ้น insert ขนาดประมาณ 3.7 กิโลเบสแยกออกมาจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าว

รูปที่ 12 แสดงวงใสรอบ ๆ โคโลนี ของทรานสฟอร์แมนท์ #51, #93, #94, #96 และ #97 บนอาหารที่มีนมพร่องมันเนย

ทรานสฟอร์แมนท์ #51, #93, #94, #96 และ #97 ยังสามารถให้วงใสรอบ ๆ โคโลนีเมื่อผ่านการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ด้วยการเลี้ยงบนอาหารที่มีนมพร่องมันเนย 3 ครั้ง

ก. แผนภาพแสดงตำแหน่งของโคโลนีบนจานเลี้ยงเชื้อ

ข. ตัวอย่างการเลี้ยงบนอาหารที่มีนมผงพร่องมันเนยจานละ 50 โคโลนี



ก. ข.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 แสดงการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้จากทรานสฟอร์แมนท์ที่โคลนได้

สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทรานสฟอร์แมนท์ที่โคลนได้ทั้งสิ้น 509 โคโลนี แล้วสุ่มนำมาตรวจสอบขนาดด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับพลาสมิด pGEX-2T

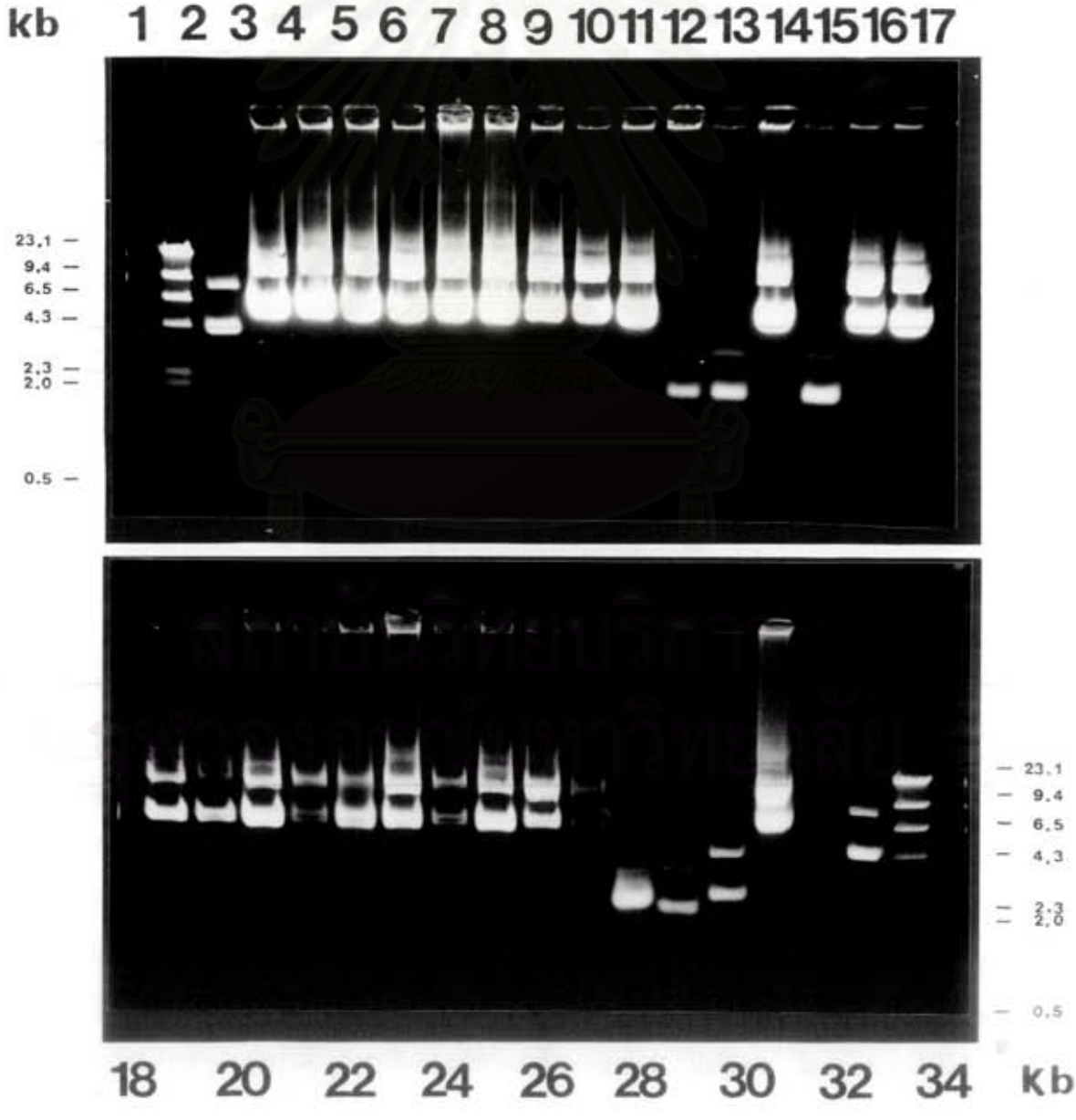
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ-DNA ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III

ช่องที่ 2 พลาสมิด pGEX-2T

ช่องที่ 3-32 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ช่องที่ 33 พลาสมิด pGEX-2T

ช่องที่ 34 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ-DNA ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III



รูปที่ 14 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 1 ตำแหน่งบนพลาสมิด pGEX-2T

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากทรานสฟอร์แมนท์ #36 และ #97 ที่สกัดได้ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 1 ตำแหน่งบนพลาสมิด pGEX-2T แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ-DNA ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III

ช่องที่ 2 พลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI

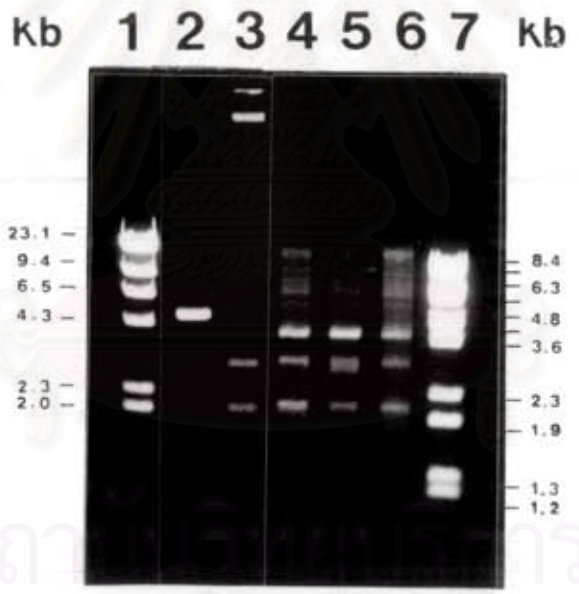
ช่องที่ 3 พลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI + *Bst*EII

ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ #36 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI + *Bst*EII

ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ #94 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI + *Bst*EII

ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ #97 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI + *Bst*EII

ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ-DNA ที่ถูกย่อยด้วย *Bst*EII

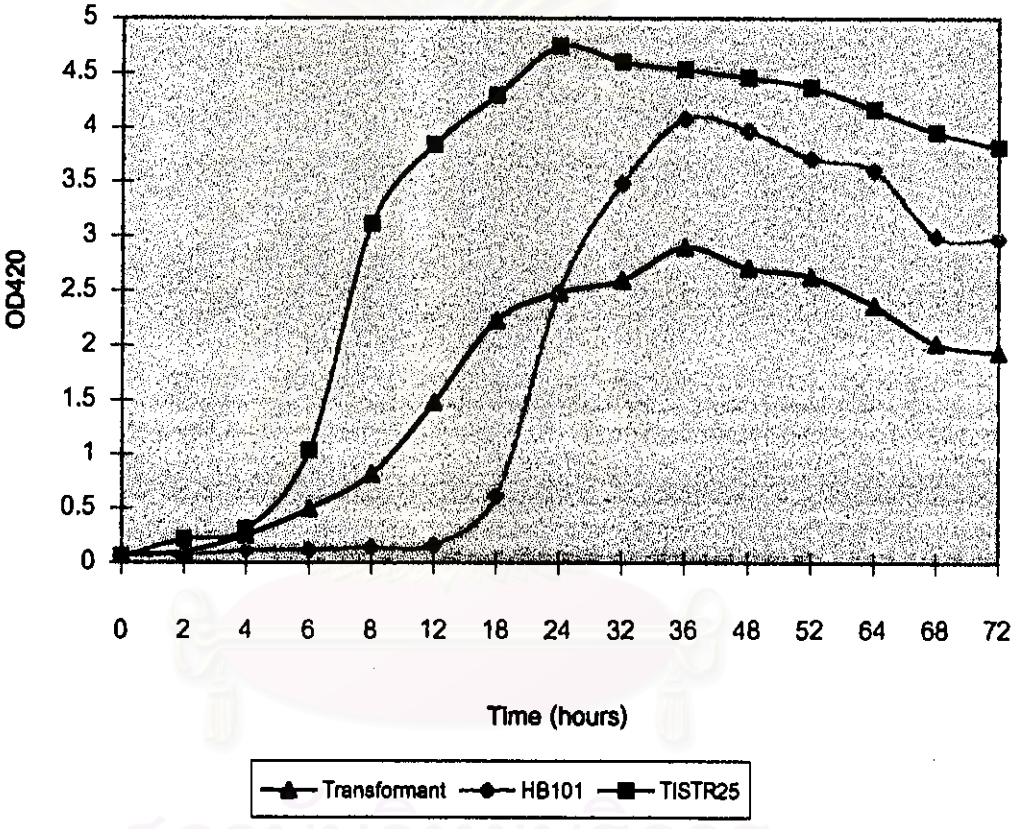


4.9 การตรวจวัดแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 ซึ่งอยู่ในรูป fusion protein

เพาะเลี้ยงทรานสฟอร์แมนท์ #97 ในอาหารสูตร Basal medium ที่มีซักซิเนต (succinate) เป็นสารต้นตอคาร์บอนจำนวน 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 16 ชั่วโมง (OD_{420} ประมาณ 0.3-0.5) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น แล้วถ่ายลงในอาหารขวดใหม่ที่มีอาหารสูตร Basal medium ที่มีซักซิเนต (succinate) เป็นสารต้นตอคาร์บอนจำนวน 100 มิลลิลิตร โดยคำนวณให้ได้ค่า

OD_{420} สุดท้าย 0.07-0.08 เลี้ยงเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดค่า OD_{420} และค่าแอคติวิตีทุก 2 ชั่วโมงและ 12 ชั่วโมงตามลำดับ เป็นเวลาทั้งสิ้น 72 ชั่วโมง แสดงกราฟการเจริญของเชื้อในรูปที่ 15

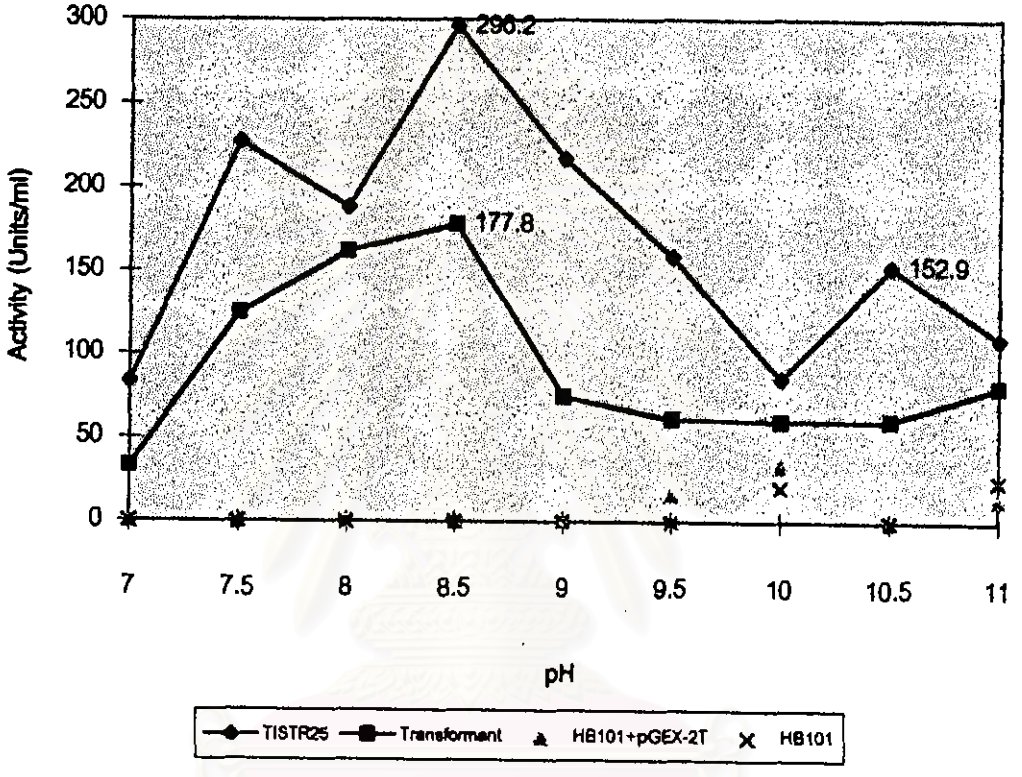
รูปที่ 15 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* TISTR25 ทรานสฟอร์แมนท์ และ เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีซักซิเนตเป็นสารต้นตอคาร์บอน pH 7.4 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



4.9.1 การวัดแอคติวิตีในการไฮโดรไลส์เคซีนได้ไทโรซีนอิสระที่มีความสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) (เกษม พงษ์มณี, 2536)

เพาะเลี้ยงทรานสฟอร์แมนท์ #97 จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 16 ชั่วโมง แล้วถ่ายลงในอาหารขวดใหม่ที่มีอาหารสูตร Basal medium ที่มีซักซิเนต (succinate) เป็นสารต้นตอคาร์บอนจำนวน 100 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) เลี้ยงเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อจำนวน 1 มิลลิลิตรมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แล้วนำของเหลวที่แตกออกมาจากเซลล์ (crude lysate) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนต่าง ๆ ที่เซลล์สังเคราะห์ขึ้น และ

รูปที่ 16 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของโปรตีเอส ที่ pH ต่าง ๆ กัน จาก *B. subtilis* TISTR25 ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 (fusion protein) เซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิด pGEX-2T และ เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



(บัฟเฟอร์ที่ใช้ : บัฟเฟอร์ฟอสเฟต, pH 7.5 และ 8.0, บัฟเฟอร์คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต, pH 9.5, 10.0 และ 10.5 , บัฟเฟอร์ Tris-HCl, pH 7.0 และ 9.0 และบัฟเฟอร์คาร์บอเนต, pH 11.0 (เกษม พงษ์มณี, 2536)

4.9.2 การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ของเบรดฟอร์ด (Bradford Assay) (Harris and Angal, 1989)

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรที่วัดได้ เท่ากับ 0.2040 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA ที่เข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด เท่ากับ 58.28 มิลลิกรัมต่อเซลล์ culture 100 มิลลิลิตร

4.9.3 การคำนวณหาค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97

นำค่าแอคติวิตีในการไฮโดรไลส์เคซีนได้ไทโรซีนอิสระที่มีความสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) และปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ของเบรดฟอร์ด มาคำนวณหาค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์ #97

สูตรการคำนวณ

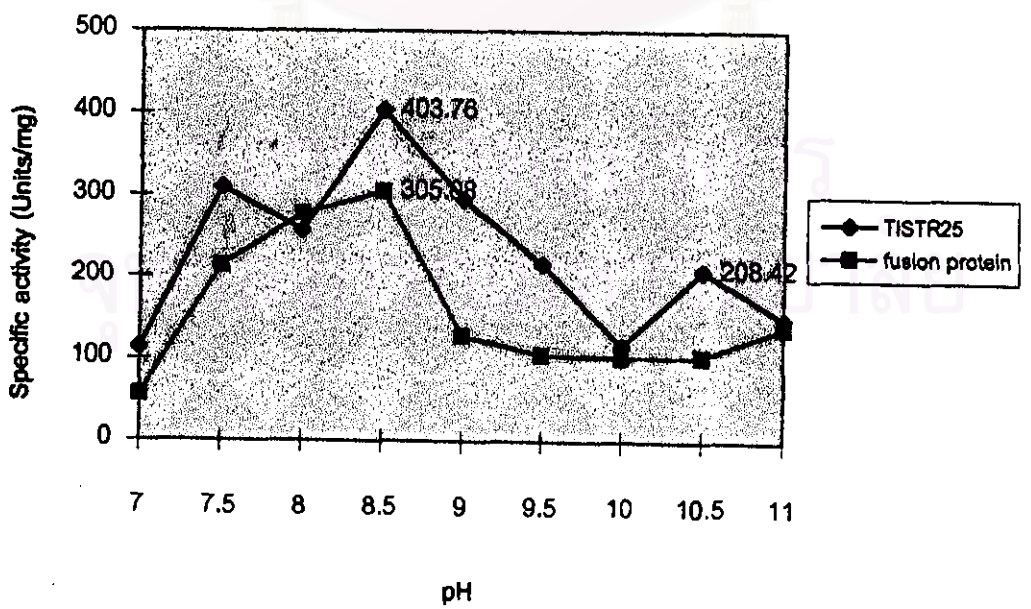
$$\text{specific activity (units/mg protein)} = \frac{\text{total activity (units)}}{\text{total protein (mg)}}$$

$$= \frac{17{,}780}{58.28}$$

$$= 305.08 \text{ units/mg protein}$$

ดังนั้นค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสในรูป fusion protein เท่ากับ 305.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และได้คำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีเอสจาก *B. subtilis* TISTR25 เท่ากับ 403.74 หน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ด้วยวิธีเดียวกัน (เนื่องจากมีค่าแอคติวิตีทั้งหมด 29,620 หน่วยและมีโปรตีนทั้งหมด 73.36 มิลลิกรัมต่อเซลล์ culture 100 มิลลิลิตร) ดังแสดงในรูปที่ 17 ซึ่งกราฟแสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะเปรียบเทียบกัน

รูปที่ 17 กราฟแสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 ในรูป fusion protein และ *B. subtilis* TISTR25 ที่ pH ต่าง ๆ กัน



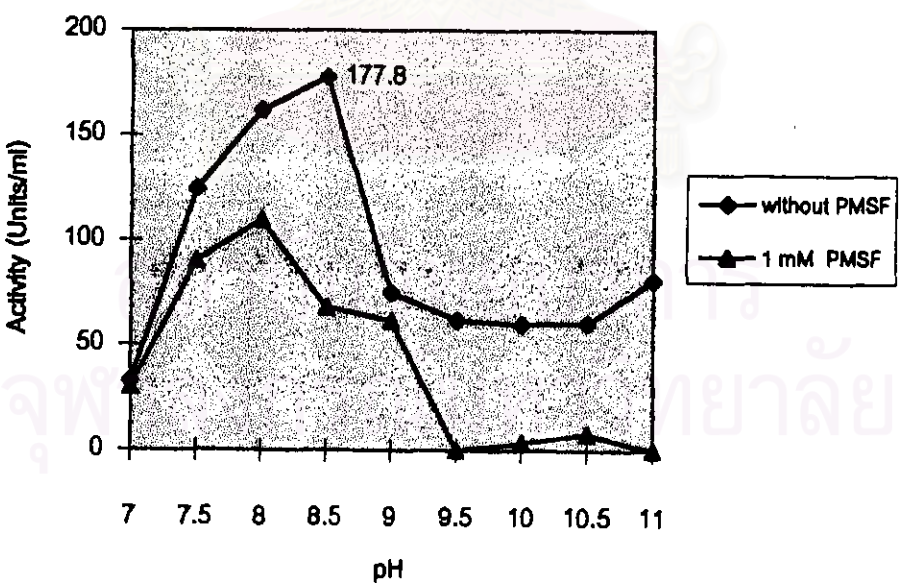
4.10 การศึกษาการยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสโดย PMSF (phenyl methanesulphonyl fluoride) และ EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)

ศึกษาการยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสโดยสารเคมี 2 ชนิด คือ PMSF และ EDTA เนื่องจากเคยมีการศึกษาและพบว่าสารทั้งสองชนิดนี้มีผลต่อความสามารถในการทำงานของโปรตีเอสจาก *B. subtilis* TISTR25

4.10.1 การยับยั้งการทำงานโดย PMSF (phenyl methanesulphonyl fluoride)

พบว่าเมื่อนำของเหลวที่แตกออกมาจากเซลล์ (crude lysate) ที่ใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ให้ทำงานในภาวะที่มีสารละลาย PMSF เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วทำการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ค่า pH ต่าง ๆ แสดงผลโดยกราฟรูปที่ 18 ปรากฏว่าโปรตีเอสจากทรานฟอร์แมนท์ #97 มีแอคติวิตีต่ำลงทุกค่าของ pH แต่จะยับยั้งเกือบสมบูรณ์เมื่ออยู่ในภาวะ pH ตั้งแต่ 9.5-11.0 เมื่อคำนวณเป็นค่า relative activity (%) ดังแสดงในตารางที่ 3 ปรากฏว่าที่ pH 8.5 แอคติวิตีของโปรตีเอสลดลง 61.83 เปอร์เซ็นต์ โดย PMSF 1 มิลลิโมลาร์

รูปที่ 18 กราฟแสดงการเปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 ซึ่งอยู่ในรูป fusion protein เมื่อถูกยับยั้งโดย 1 mM PMSF



ตารางที่ 3 แสดงผลของการยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์ #97 ในรูป fusion protein โดยใช้ 1mM PMSF

	ไม่เติม PMSF		เติม PMSF	
pH	Activity (units)	Relative activity (%)	Activity (units)	Relative activity (%)
7.0	32.80	18.45	30.10	16.93
7.5	124.70	70.13	90.30	50.78
8.0	161.95	91.08	109.80	61.75
8.5	177.80	100.00	67.87	38.17
9.0	74.90	42.12	61.57	34.63
9.5	61.74	34.72	0.00	0.00
10.0	59.97	33.73	3.51	1.97
10.5	60.50	34.02	7.88	4.43
11.0	81.08	45.60	0.00	0.00

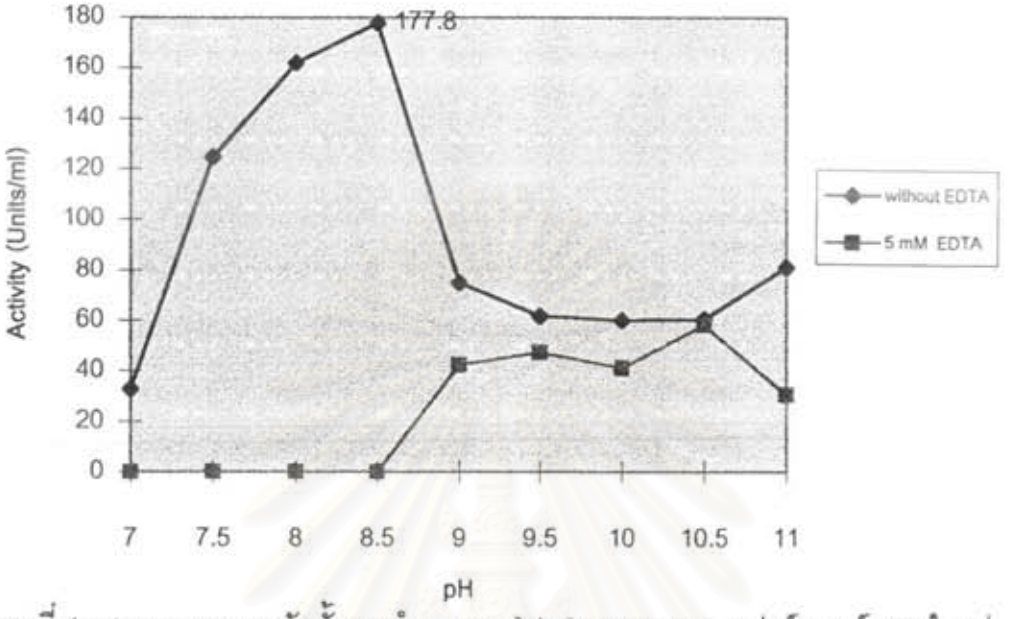
** Activity of Protease in fusion protein 177.8 Units = 100%

จากผลจากการศึกษาการยับยั้งข้างต้น โปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 ควรเป็นชนิดนิวทรัลโปรตีเอส

4.10.2 การยับยั้งการทำงานโดย EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)

ส่วนการศึกษากับ EDTA พบว่าเมื่อนำ crude lysate มาใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ โดยให้ทำงานในภาวะที่มีสารละลาย EDTA เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ แล้วทำการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ค่า pH ต่าง ๆ ปรากฏว่าโปรตีเอสจากทรานฟอร์แมนท์ #97 ไม่มีแอคติวิตีเลยเมื่ออยู่ในภาวะ pH ตั้งแต่ 7.0-8.5 แต่แอคติวิตีลดลงเล็กน้อยที่ภาวะ pH ตั้งแต่ 9.0-11.0 แสดงผลโดยกราฟรูปที่ 19 เมื่อคำนวณเป็นค่า relative activity (%) ดังแสดงในตารางที่ 3 ปรากฏว่าที่ pH 8.5 แอคติวิตีของโปรตีเอสลดลง 100 เปอร์เซ็นต์ โดย EDTA 5 มิลลิโมลาร์

รูปที่ 19 กราฟแสดงการเปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 ซึ่งอยู่ในรูป fusion protein เมื่อถูกยับยั้งโดย 5 mM EDTA



ตารางที่ 4 แสดงผลของการยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์ #97 ในรูป fusion protein โดยใช้ 5mM EDTA

	ไม่เติม EDTA		เติม EDTA	
pH	Activity (units)	Relative activity (%)	Activity (units)	Relative activity (%)
7.0	32.80	18.45	0.00	0.00
7.5	124.70	70.13	0.00	0.00
8.0	161.95	91.08	0.00	0.00
8.5	177.80	100.00	0.00	0.00
9.0	74.90	42.12	42.42	23.85
9.5	61.74	34.72	47.25	26.57
10.0	59.97	33.73	41.23	23.19
10.5	60.50	34.02	58.14	32.70
11.0	81.08	45.60	30.47	17.10

** Activity of Protease in fusion protein 177.8 Units = 100%

4.11 การตรวจสอบชนิดของยีนโปรตีเอสที่ได้ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

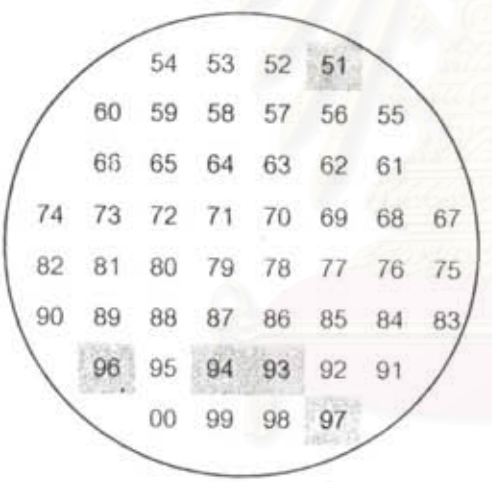
เพื่อตรวจสอบว่ายีนโปรตีเอสที่มีอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากทรานสฟอร์แมนท์ โดยใช้ยีนนิวทรัลโปรตีเอสเป็นดีเอ็นเอติดตาม การเตรียมเมมเบรนสำหรับโคโลนีไฮบริไดเซชันสามารถเตรียมได้ทั้งสิ้น 10 แผ่น ๆ ละ 50 โคโลนี (แผ่นกลม)การทำโคโลนีไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอของพลาสมิด pNC3 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI และ *Bgl*I ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามของยีนนิวทรัลโปรตีเอสที่อุณหภูมิ 52°ซ เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของทรานสฟอร์แมนท์ #51, #93, #94, #96 และ #97 ที่ให้วงใสรอบ ๆ โคโลนีจากรูปที่ 12 กับผลการทำโคโลนีไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามของยีนนิวทรัลโปรตีเอส พบว่าโคโลนีที่ให้วงใสเหล่านั้นให้จุดดำบนฟิล์มเอ็กซเรย์ด้วยเช่นกัน ดังรูปที่ 20

รูปที่ 20 แสดงการเปรียบเทียบตำแหน่งของทรานสฟอร์แมนท์ที่ให้วงใสรอบ ๆ โคโลนีกับผลการทำโคโลนีไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามของยีนนิวทรัลโปรตีเอส

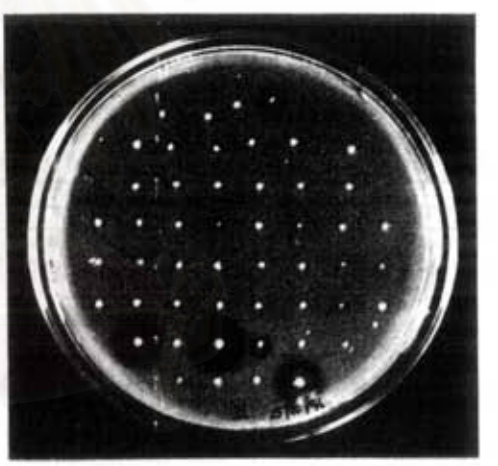
ก. แผนภาพแสดงตำแหน่งของโคโลนีบนจานเลี้ยงเชื้อ

ข. ทรานสฟอร์แมนท์ที่เจริญบนอาหารที่มีนมพร่องมันเนยและให้วงใสรอบ ๆ โคโลนี

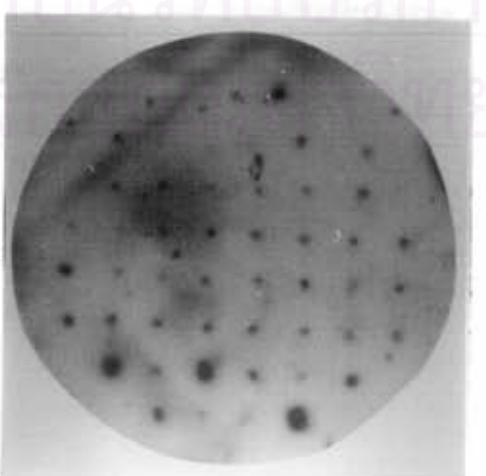
ค. ผลโคโลนีไฮบริไดเซชัน กับดีเอ็นเอติดตามของยีนนิวทรัลโปรตีเอส



ก.



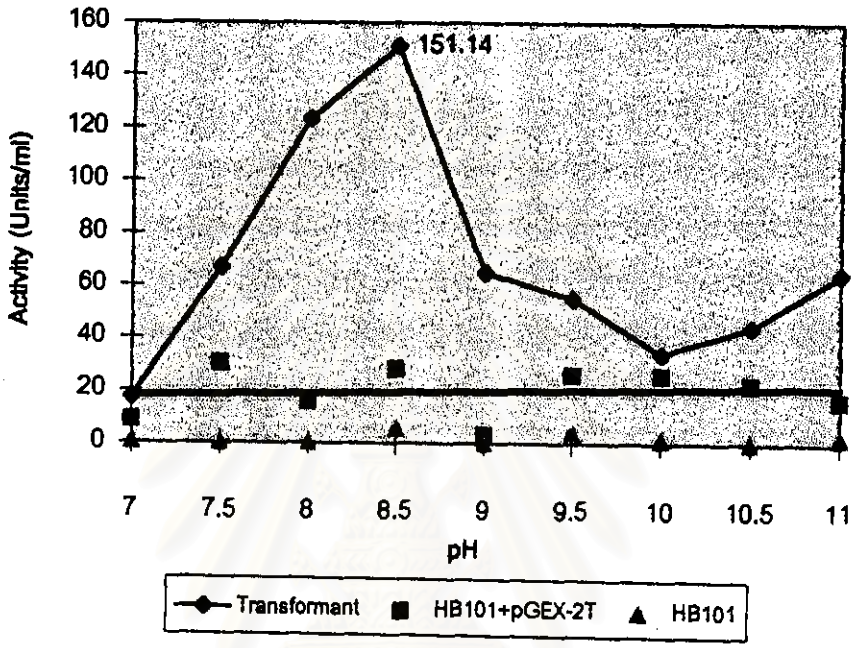
ข.



ค.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของโปรตีเอส ที่ pH ต่าง ๆ กัน จากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 ซึ่งอยู่ในรูปโปรตีเอสอิสระ กับเซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิด pGEX-2T และ เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 ที่ pH ต่าง ๆ กัน เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



4.13.2 การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดของโปรตีเอสอิสระที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการวิเคราะห์ของเบรดฟอร์ด

มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด เท่ากับ 11.725 มิลลิกรัมต่อเซลล์ culture 100 มิลลิลิตร

4.13.3 การคำนวณหาค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีเอสอิสระที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

นำค่าแอคติวิตีในการไฮโดรไลส์เคซีนได้ไทโรซีนอิสระที่มีความสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) และปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ของเบรดฟอร์ด มาคำนวณหาค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีเอสอิสระที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

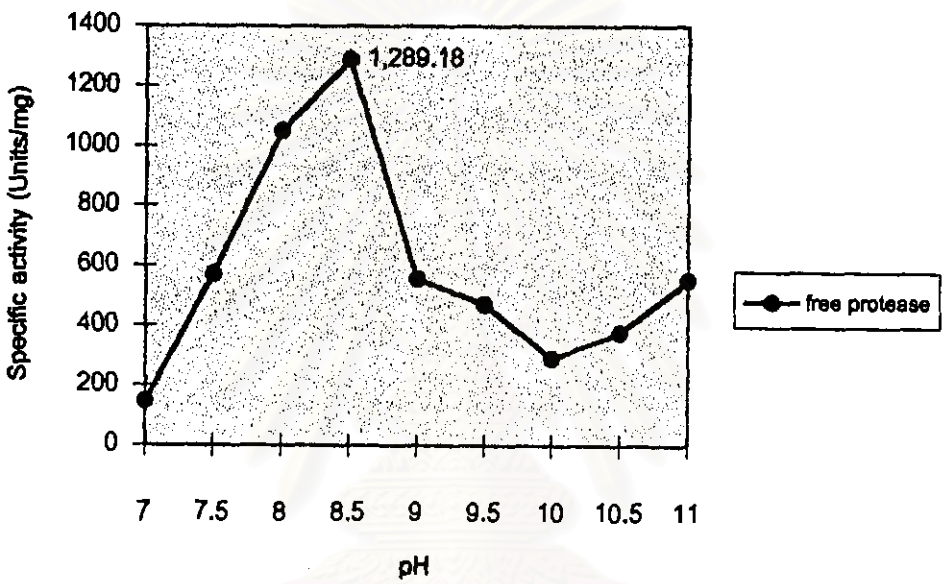
$$\text{specific activity (units/mg protein)} = \frac{\text{total activity (units)}}{\text{total protein (mg)-amount of thrombin (mg)}}$$

$$= \frac{15,114}{11.725-0.0013}$$

= 1,289.18 units/mg protein

ดังนั้นค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสในรูปเอนไซม์อิสระ เท่ากับ 1,289.18 หน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 22

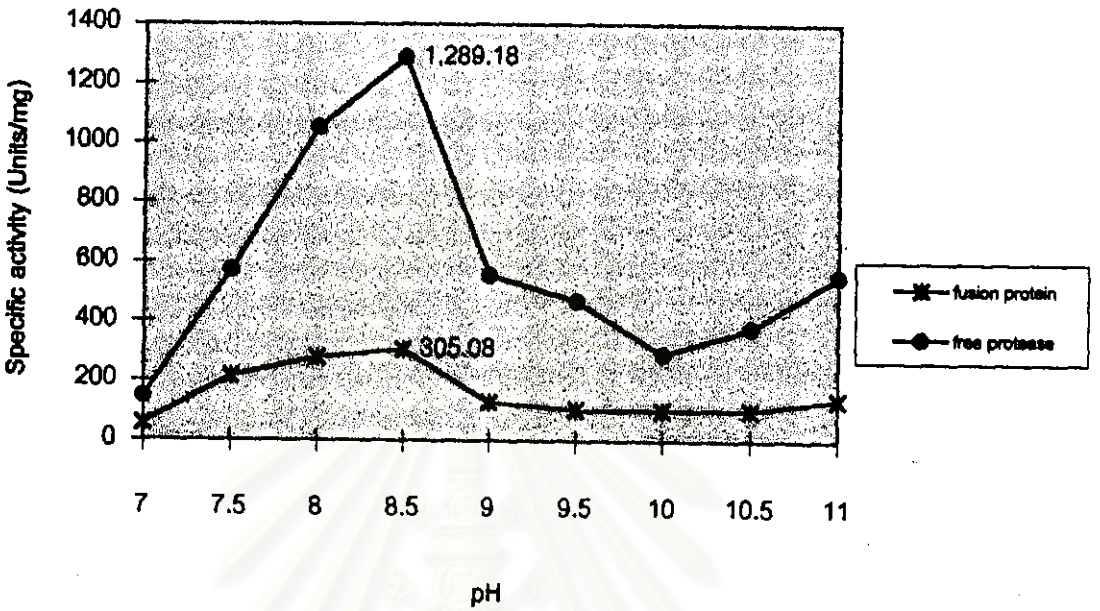
รูปที่ 22 กราฟแสดงค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสอิสระจากทรานสฟอร์แมนท์ หมายเลข 97 ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ที่ pH ต่าง ๆ กัน



4.13.4 การเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีจำเพาะกับโปรตีเอสที่อยู่ในรูป fusion protein แล้วหาค่าจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ (purification fold)

นำค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสที่อยู่ในรูป fusion protein มาเปรียบเทียบกับค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสอิสระที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่ามี purification fold เป็น 4.23 เท่า ดังแสดงผลในรูปกราฟในรูปที่ 23 และตารางที่ 5

รูปที่ 23 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์



ตารางที่ 5 ตารางแสดงค่าจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์ #97 ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์

Enzyme	Total activity (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity (Unit/mg)	Purification fold
Fusion protein	17,780	58.28	305.08	1
Free protease	15,114	11.72	1,289.18	4.23

4.14 ผลการวิเคราะห์โปรตีเอสด้วยวิธี SDS-PAGE

ทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของ fusion protein และโปรตีเอสอิสระของทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 ที่ได้จากการผ่านลงในคอลัมน์ในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ย้อมด้วยสี coomassie blue เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานต่าง ๆ ได้แก่ β-galactosidase (น้ำหนักโมเลกุล 116,400), glutamate dehydrogenase (น้ำหนักโมเลกุล 55,600), chymotrypsinogen (น้ำหนักโมเลกุล 27,000) และ trypsin inhibitor (น้ำหนักโมเลกุล 20,100) พบว่าในช่องที่ 3 มีแถบโปรตีนที่เข้มซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นโปรตีเอสที่อยู่ในรูป fusion protein 1 แถบมีน้ำหนักประมาณ 70,000 ดาลตัน ในช่องที่ 5 มีแถบโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าในช่องที่ 3 และมีแถบขนาดประมาณ 44,000 ดาลตัน ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นโปรตีเอสในรูปอิสระ และเป็นซนิดนิวทรัลโปรตีเอส ส่วนในช่องที่ 6 เป็นแถบของ GST ที่มีน้ำหนักประมาณ 26,000 ดาลตัน และในช่องที่ 7 เป็นแถบของทรอมบินที่มีน้ำหนัก 37,000 ดาลตัน ดังแสดงผลในรูปที่ 24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 24 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีเอสด้วยวิธี SDS-PAGE

ทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของ fusion protein และ โปรตีเอสอิสระที่ได้จากการผ่านลงในคอลัมน์โนกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ย้อมด้วยสี coomassie blue เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานต่าง ๆ ได้แก่ β-galactosidase (น้ำหนักโมเลกุล 116,400), glutamate dehydrogenase (น้ำหนักโมเลกุล 55,600), chymotrypsinogen (น้ำหนักโมเลกุล 27,000) และ trypsin inhibitor (น้ำหนักโมเลกุล 20,100)

พบว่าโปรตีเอสจากทรานฟอร์แมนท์หมายเลข 97 ที่อยู่ในรูป fusion protein มีน้ำหนักประมาณ 70,000 ดาลตัน เมื่อใช้ทรอมบินตัดแยกจะได้โปรตีเอสอิสระที่มีขนาดประมาณ 44,000 ดาลตัน

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน 4 ชนิด

ช่องที่ 2 อาหาร LB

ช่องที่ 3 crude fusion protein ที่ได้จาก cell lysate

ช่องที่ 4 โปรตีนอื่น ๆ ที่เซลล์ปลดปล่อยออกมาและไม่ถูกจับโดยคอลัมน์ (สร้าง)

ช่องที่ 5 free protease ที่แยกโดยทรอมบิน

ช่องที่ 6 GST ที่ชะออกมาจากคอลัมน์

ช่องที่ 7 ทรอมบินที่ใช้เป็น proteolytic cleavage enzyme