หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp.190-1

ดังที่กล่าวมาแล้วในบทนำว่าการนำ DNA เข้าสู่ *Streptomyces* จะต้องอยู่ในรูปของโปรโตพลาสต์ ดังนั้นขั้นตอนแรกที่จะต้องศึกษาคือการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดและการรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสต์

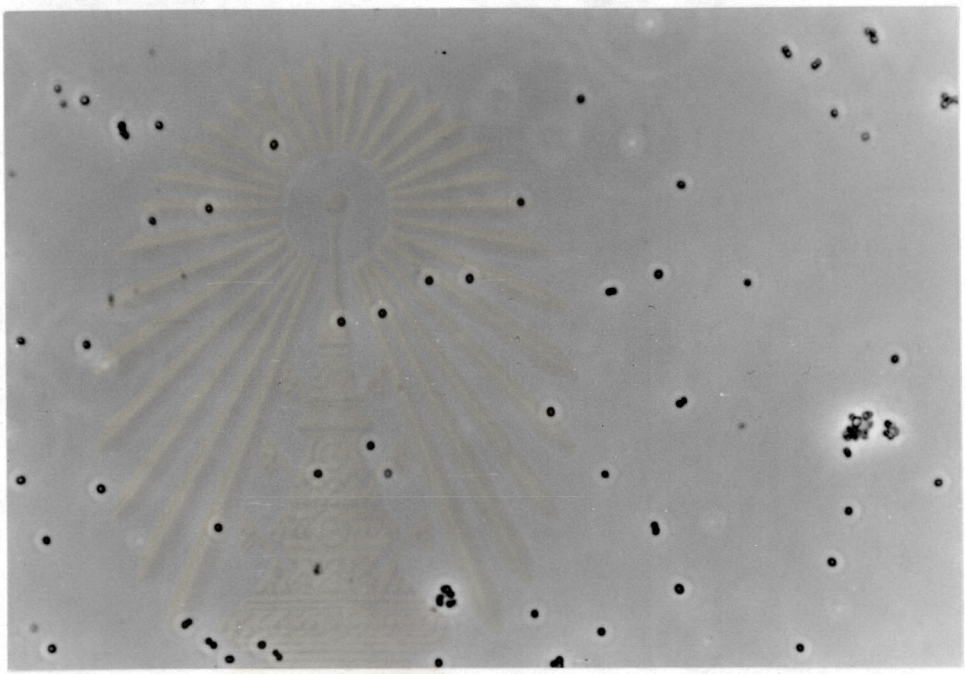
Streptomyces sp.190-1 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย (48) และยังไม่มีผู้ใดศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์ของเชื้อนี้มาก่อน ดังนั้นการทดลองนี้จึงมุ่งหาสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว

1.1 ผลของอายุเชื้อ

ผลการเตรียมโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp.190-1 ตามบทที่ 2 ข้อ 5.1 พบว่ามีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 3 และเมื่อนำมาทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีการที่ได้นี้ ยืนยันว่ามีชิ้นส่วนของไมซีเลียมปนมาเพียงเล็กน้อย โดยการเจือจางโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้ด้วยบัฟเฟอร์ P และสารละลาย 0.01% SDS และให้เจริญบนอาหารแข็ง R2YE ดังแสดงในรูปที่ 4

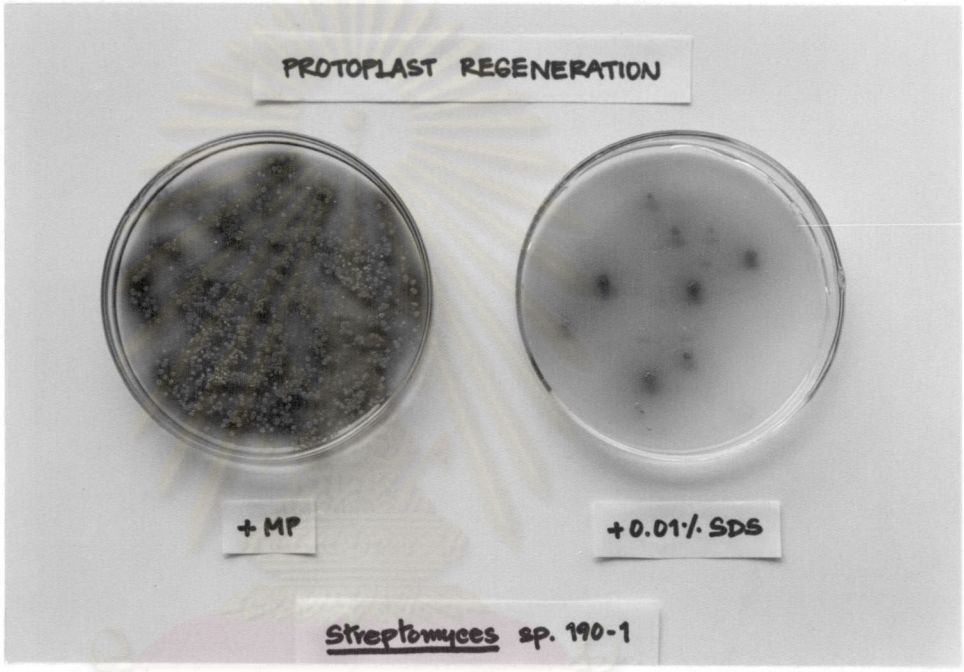
จากที่กล่าวมาในบทนำข้างต้นว่าการสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์ของ streptomycetes แปรผันตามอายุและสภาวะทางสรีรวิทยา (physiological state) ของเชื้อ ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง อายุของเชื้อกับการสร้างและการรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp.190-1 ผลการทดลองในตารางที่ 1 และรูปที่ 5 พบว่าโปรโตพลาสต์จะเกิดได้ดีในช่วงอายุของเชื้อระหว่าง 30-40 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะ middle ถึง late-log phase โดยในระยะนี้จะได้โปรโตพลาสต์ที่ความเข้มข้น 1.2 - 4.8×10^{8} โปรโตพลาสต์/มล. หรือประมาณ 0.4 - 1.3×10^{11} โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง สำหรับ

รูปที่ 3 ลักษณะโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp.190-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 ผลของการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ R2YE โดยแขวนลอยในบัฟเฟอร์ P (MP) เปรียบเทียบกับแขวนลอยใน 0.01% SDS โดยเจือจาง 10^4 เท่า



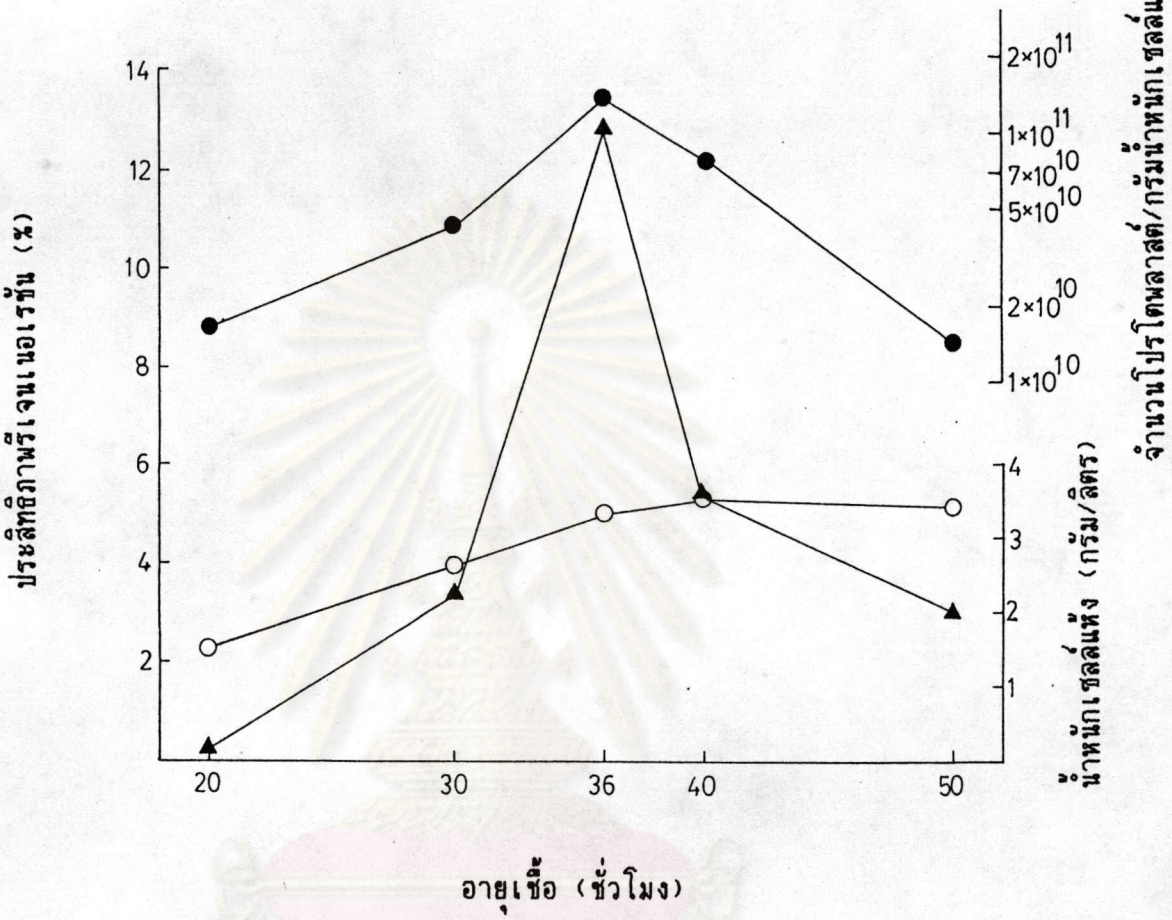
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ผลของอายุเชื้อต่อการสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp.190-1

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	โปรโตพลาสต์/มล.	รีเจนเนอเรชันของโปรโตพลาสต์/มล.
20	2.80×10^{7}	6.10×10^{5}
30	1.20×10^{8}	3.95×10^{6}
36	4.80×10^{8}	6.13×10^{7}
40	2.80×10^{8}	1.47×10^{7}
50	5.00×10^{7}	1.48×10^{7}

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 ผลของอายุเชื้อต่อการสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces sp. 190-1*



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์พบว่า โปรโตพลาสต์สามารถรีเจนเนอเรทได้ดีตั้งแต่การเจริญของเชื้ออยู่ในระยะ middle-log phase ไปจนถึง stationary phase ซึ่งจำนวนโปรโตพลาสต์ที่รีเจนเนอเรทได้อยู่ในช่วง $1.47-6.13 \times 10^{7}$ โดยให้การรีเจนเนอเรทสูงสุด 12.77 % ในช่วง late - log phase

1.2 ผลของไกลซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ได้มีผู้รายงานถึงการเติมไกลซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ streptomycetes ว่ามีผลทำให้การเกิดโปรโตพลาสต์ง่ายขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากไกลซีนทำให้เกิดความผิดปกติในการสร้างผนังเซลล์ดังได้กล่าวมาแล้วในบทนำ จึงทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายโดยไลโซไซม์ได้ง่ายขึ้น (33)

การทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของไกลซีน ต่อการเกิดโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp.190-1 โดยแปรผันความเข้มข้นของไกลซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 0 - 0.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 6 พบว่าการเติมหรือไม่เติมไกลซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลเด่นชัดต่อการเกิดโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces*' sp.190-1 โดยโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้จากไมซีเลียมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีหรือไม่มีไกลซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ จะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^{8} โปรโตพลาสต์/มล. หรือ 10^{11} โปรโตพลาสต์/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนั้นยังพบว่าการเติมไกลซีนจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของไมซีเลียม

ดังนั้นในการสร้างโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp.190-1 เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไปจะใช้เชื้อที่อายุ 36 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมไกลซีน

2. ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม *Streptomyces* sp.190-1 ด้วยพลาสมิดพาหะ

2.1 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม *Streptomyces* sp.190-1 และ *S. lividans* TK64 ด้วยพลาสมิด pIJ702 และ pIJ699

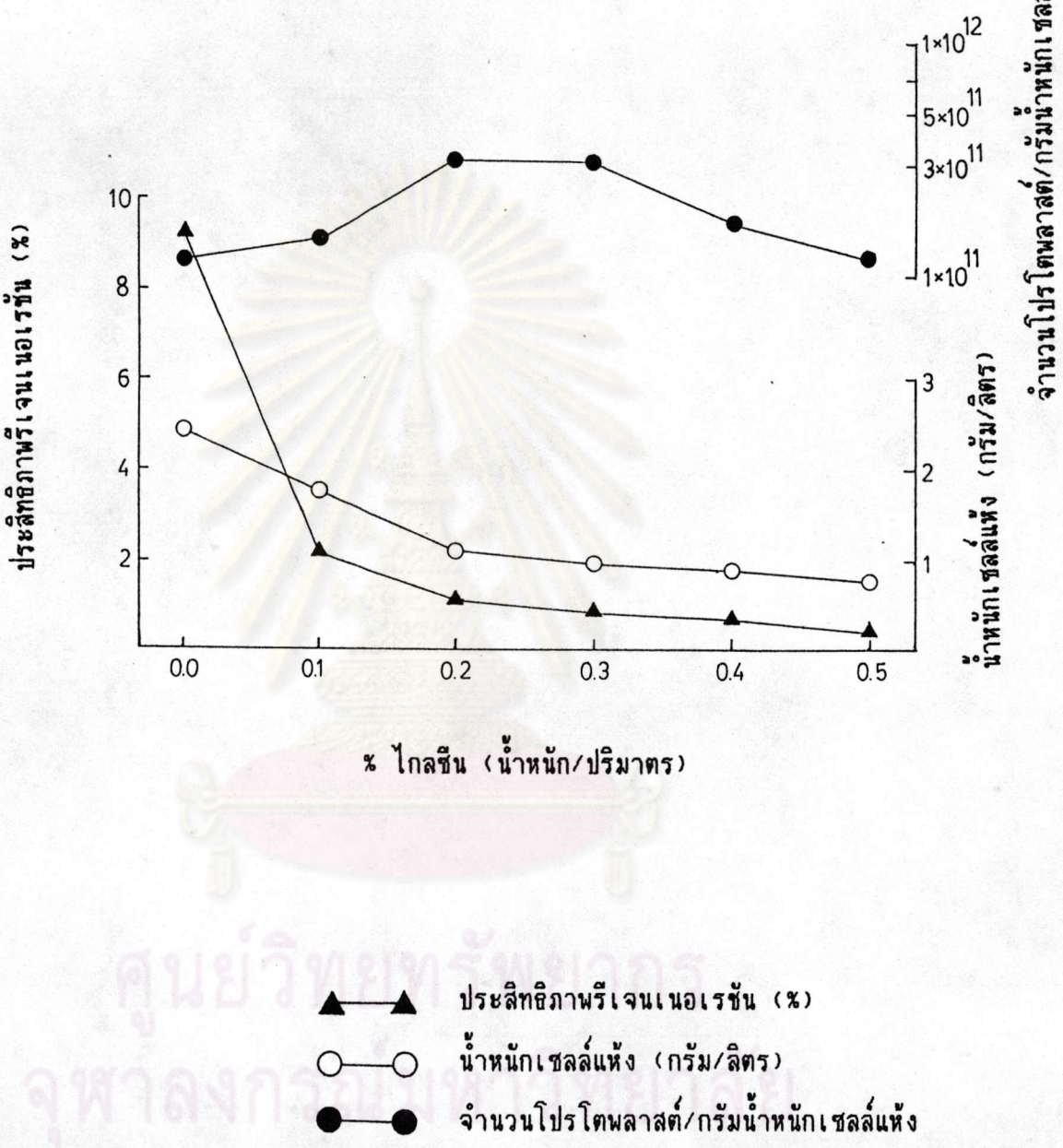
ได้ตรวจสอบประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ702 และ pIJ699 เข้าสู่ *Streptomyces* sp.190-1 และ *S. lividans* TK64 ภายใต้สภาวะที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 7.4 คือ ใช้ PEG 25% ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ผลการทดลอง

ตารางที่ 2 ผลของการเติมไกลซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp. 190-1

%ไกลซีน (น้ำหนัก/ปริมาตร)	โปรโตพลาสต์/มล.	รีเจนเนอเรชันของโปรโตพลาสต์/มล.
0.0	2.80×10^{8}	7.24×10^{7}
0.1	2.56×10^{8}	5.50×10^{6}
0.2	3.31×10^{8}	3.65×10^{6}
0.3	2.83×10^{8}	2.32×10^{6}
0.4	1.55×10^{8}	1.07×10^{6}
0.5	9.19×10^{7}	3.40×10^{5}

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 ผลของการเติมไกลซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างและการรีเจนเนอเรท โปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp. 190-1



ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 พบว่าสายพันธุ์มาตรฐาน S. *lividans* TK64 ให้ประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดทั้งสองชนิดสูงกว่า Streptomyces sp.190-1 คือให้ 9.52×10^5 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมของพลาสมิด pIJ702 และ 5.84×10^5 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมของพลาสมิด pIJ699 ขณะที่ Streptomyces sp.190-1 ให้ 4.19×10^2 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมของพลาสมิด pIJ702 และ 1.29×10^2 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมของพลาสมิด pIJ699

ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไป จึงจะหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ ของ Streptomyces sp.190-1

2.2 ผลของโพลีเอธิลีนไกลคอล (PEG) ต่อทรานสฟอร์เมชัน

PEG เป็นสารที่ใช้ทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของ streptomycetes (39) จากรายงานบางฉบับพบว่า ความเข้มข้นของ PEG ที่ใช้ในการทรานสฟอร์ม จะแตกต่างกันไปบ้างขึ้นกับแต่ละสายพันธุ์ (40) การทดลองนี้จึงศึกษาผลของ PEG ต่อการทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ702 เข้าสู่ Streptomyces sp.190-1 ผลการทดลองในตารางที่ 4 พบว่าการทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิด pIJ702 จะเกิดได้ดีเมื่อความเข้มข้นของ PEG อยู่ในระหว่าง 20-40% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่ก็ไม่แตกต่างจากผลการทดลองที่ได้ในตารางที่ 3 อย่างเด่นชัด โดยให้ประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มอยู่ในช่วง $1.09\text{-}6.39 \times 10^2$ ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมของดีเอนเอ อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้น 25% ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใช้ในผลการทดลองตามตารางที่ 3 ก็ยังคงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการทรานสฟอร์เมชัน ของ Streptomyces sp.190-1

2.3 ผลของอุณหภูมิในการบ่มโปรโตพลาสต์ก่อนนำไปทำทรานสฟอร์เมชัน

Bailey และ Winstanley (43) รายงานว่า Streptomyces *clavuligerus* มีประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ702 ต่ำ ซึ่งคาดว่าอาจเนื่องมาจาก restriction system ใน Streptomyces นี้ เขาได้ทดลองบ่มโปรโตพลาสต์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ก่อนทำการทรานสฟอร์เมชัน พบว่าการบ่มโปรโตพลาสต์ที่

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ702 และ pIJ699 เข้าสู่ *Streptomyces* sp.190-1 และ S. *lividans* TK64

สายพันธุ์	จำนวนทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมของพลาสมิด pIJ702	จำนวนทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมของพลาสมิด pIJ699
S. *lividans* TK64	9.52×10^5	5.84×10^5
Streptomyces sp.190-1	4.19×10^2	1.29×10^2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ผลของความเข้มข้นของ PEG ต่อประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม พลาสมิด pIJ702 เข้าสู่โปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp.190-1

%PEG (น้ำหนัก/ปริมาตร)	จำนวนทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอนเอ
20	2.72×10^2
25	6.39×10^2
30	1.53×10^2
40	1.09×10^2
50	0.75×10^2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

45°ซ เป็นเวลา 10 นาที สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มได้ 100 เท่า

ดังนั้น การทดลองนี้จึงศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทรานสฟอร์เมชัน โดยการบ่มโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp.190-1 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ก่อนนำไปทำทรานสฟอร์เมชัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 พบว่าที่ 40°ซ จะเพิ่มประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มจากสภาวะปกติประมาณ 5 เท่า

แม้ว่าจะได้ทำการศึกษาโดยแปรปัจจัยและสภาวะที่เกี่ยวข้อง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ *Streptomyces* sp.190-1 ด้วยพลาสมิดพาหะ ก็ยังพบว่า *Streptomyces* sp.190-1 ให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะต่ำกว่า *S. lividans* TK64 ประมาณ 100 เท่าซึ่งไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเซลเจ้าบ้านในการโคลนยีนที่ต้องการตามที่กล่าวมาแล้วในบทนำ ดังนั้น ในการโคลนยีนที่เหมาะสมเข้าสู่ *Streptomyces* sp.190-1 จะใช้ *S. lividans* TK64 เป็นเซลเจ้าบ้าน ในการโคลนยีนที่ต้องการก่อน และเมื่อได้ยีนที่ต้องการบนพลาสมิดพาหะแล้ว จึงจะทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนั้นเข้าสู่ *Streptomyces* sp.190-1

3. <u>การโคลนไซแลเนสยีนจาก *Streptomyces* sp.42-9 เข้าสู่ *S. lividans* TK64</u>

3.1 <u>การเตรียมชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอ ขนาด 3-8 กิโลเบส ของ *Streptomyces* sp.42-9</u>

จากรายงานการโคลนไซแลเนสยีนใน *Streptomyces* Mondou และคณะ (6) ได้โคลนไซแลเนสยีนจาก *S. lividans* 1326 เข้าสู่ *S. lividans* 10-164 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ผ่าเหล่าของ *S. lividans* 1326 ที่ขาดความสามารถในการสร้างไซแลเนส เมื่อศึกษาโคลนต่างๆที่ได้โดยทำ Southern blotting พบว่าบนชิ้นส่วนของดีเอนเอที่มี coding sequence ของไซแลเนสยีนมีขนาดประมาณ 2 กิโลเบส Iwasaki และคณะ (7) โคลนไซแลเนสยีนจาก *Streptomyces* sp.No.36a เข้าสู่ *S. kasugaensis* G3 และ *S. lividans* TK21 เมื่อทำการ Sub-cloning ของโคลนต่าง ๆ ที่ได้แล้ว พบว่าชิ้นส่วนดีเอนเอขนาดเล็กที่สุดที่ยังคงถอดรหัสให้เอนไซม์ไซแลเนส มีความยาว 1.04 กิโลเบส

ตารางที่ 5 ผลของอุณหภูมิในการบ่มโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp.190-1 ก่อนนำไปทำทรานสฟอร์เมชัน

อุณหภูมิ (°ซ)	จำนวนทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอนเอ
อุณหภูมิห้อง	6.15×10^{2}
40	2.94×10^{3}
45	8.62×10^{2}
50	< 50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงจะเลือกชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอของ *Streptomyces* sp.42-9 หลังจากตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ Sau3A1 ขนาด 3-8 กิโลเบส ซึ่งคาดว่าจะครอบคลุมไซแลเนสยีนทั้งหมด และนำมาเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้พลาสมิดพาหะสองชนิด คือ pIJ702 ขนาด 5.8 กิโลเบส และชิ้นส่วนขนาด 5.0 กิโลเบส ของพลาสมิดพาหะ pIJ699

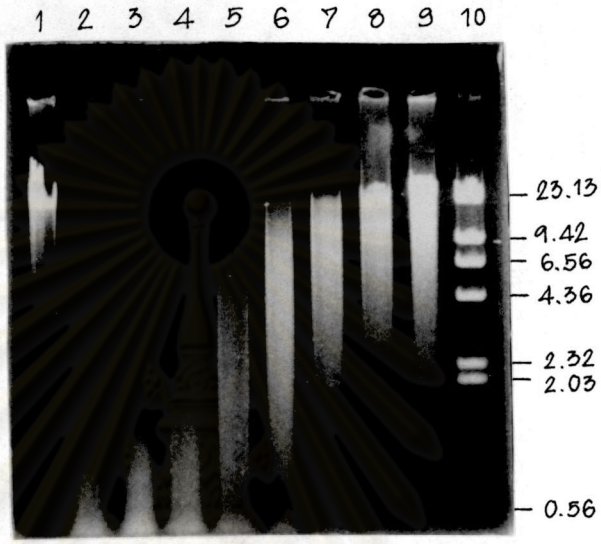
ผลการย่อยโครโมโซมอลดีเอนเอของ *Streptomyces* sp.42-9 แบบกึ่งสมบูรณ์ด้วย Sau3A1 ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 7.1 ดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่าในช่องที่ 6 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม ระหว่างความเข้มข้นของดีเอนเอและเอนไซม์ คือที่ความเข้นข้นของดีเอนเอ 0.972 ไมโครกรัม (คำนวณจากดีเอนเอเริ่มต้นเข้มข้น 1.62 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งวัดด้วยวิธีอัลตราไวโอเลตแอบซอร์บชันสเปกโตรสโคปี ตามที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 6.3) ต่อเอนไซม์ 0.125 หน่วย โดยให้การย่อยที่ให้ชิ้นส่วนขนาด 3-8 กิโลเบส ได้สูงสุด

จากผลการทดลองดังกล่าวนี้ จะนำอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และดีเอนเอที่เหมาะสมนี้ไปขยายส่วนเพื่อเตรียมชิ้นส่วนขนาด 3-8 กิโลเบสปริมาณมากต่อไป

3.2 <u>การตัดพลาสมิดพาหะ pIJ702 และ pIJ699</u>

นำพลาสมิดพาหะ pIJ702 มาตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BglII ตามรูปที่ 8 และตัดพลาสมิดพาหะ pIJ699 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BglII และ BamHI ตามรูปที่ 9 สำหรับ pIJ699 จะนำชิ้นส่วนขนาด 5 กิโลเบส มาใช้เป็นพาหะซึ่งแยกด้วยวิธีจับดีเอนเอด้วยแผ่น DEAE-cellulose ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 7.1.2 หลังจากตัดด้วยเอนไซม์แล้ว จึงกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายด้วย Bacterial Alkaline Phosphatase (BAP) พบว่าพลาสมิดพาหะทั้งสองไม่สามารถเชื่อมตัวเองได้ (self ligation) เมื่อเชื่อมด้วยเอนไซม์ T_4 DNA ligase ตามรูปที่ 10 ช่องที่ 3 และรูปที่ 11 ช่องที่ 3 โดยพลาสมิดยังคงอยู่ในรูปเส้น (linear form)

รูปที่ 7 ผลของการย่อยโครโมโซมอลดีเอนเอของ *Streptomyces* sp. 42-9 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sau3A1 แบบกึ่งสมบูรณ์ (partial digestion)



ช่องที่ 1 โครโมโซมอลดีเอนเอของ *Streptomyces* sp.42-9

2 โครโมโซมอลดีเอนเอเข้มข้น 0.972 ไมโครกรัมต่อ Sau3A1 2 หน่วย

3 โครโมโซมอลดีเอนเอเข้มข้น 0.972 ไมโครกรัมต่อ Sau3A1 1 หน่วย

4 โครโมโซมอลดีเอนเอเข้มข้น 0.972 ไมโครกรัมต่อ Sau3A1 0.5 หน่วย

5 โครโมโซมอลดีเอนเอเข้มข้น 0.972 ไมโครกรัมต่อ Sau3A1 0.25 หน่วย

6 โครโมโซมอลดีเอนเอเข้มข้น 0.972 ไมโครกรัมต่อ Sau3A1 0.125 หน่วย

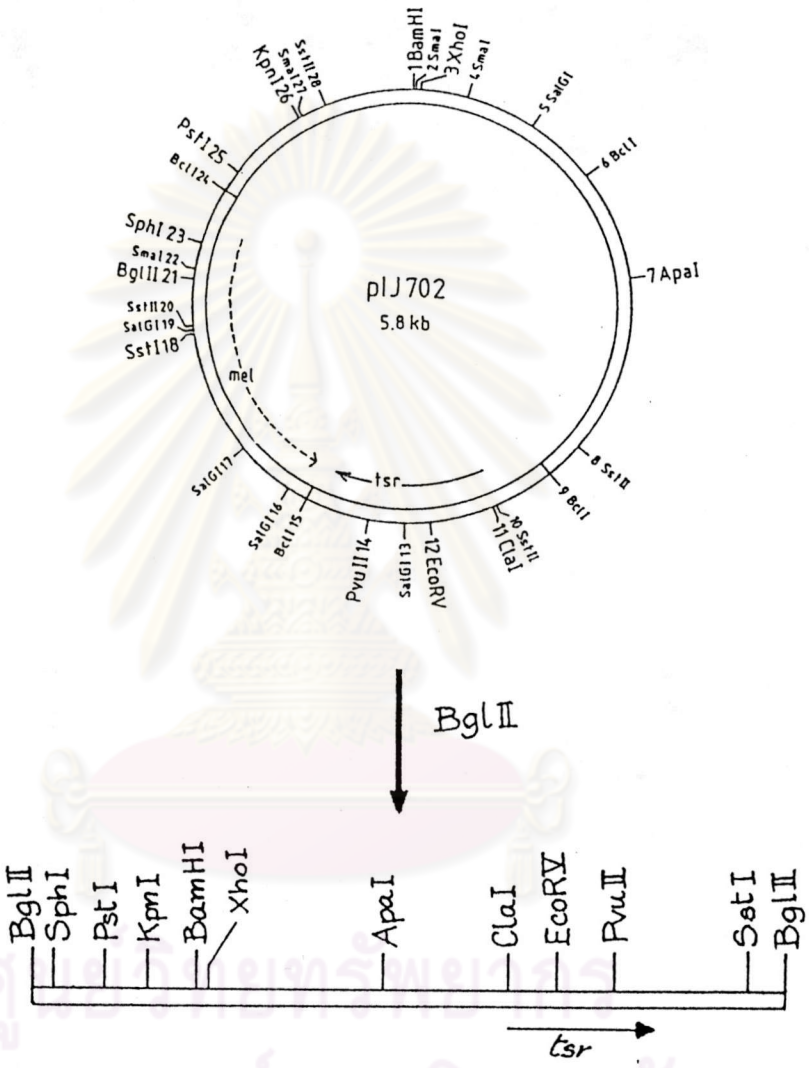
7 โครโมโซมอลดีเอนเอเข้มข้น 0.972 ไมโครกรัมต่อ Sau3A1 0.0625 หน่วย

8 โครโมโซมอลดีเอนเอเข้มข้น 0.972 ไมโครกรัมต่อ Sau3A1 0.03125 หน่วย

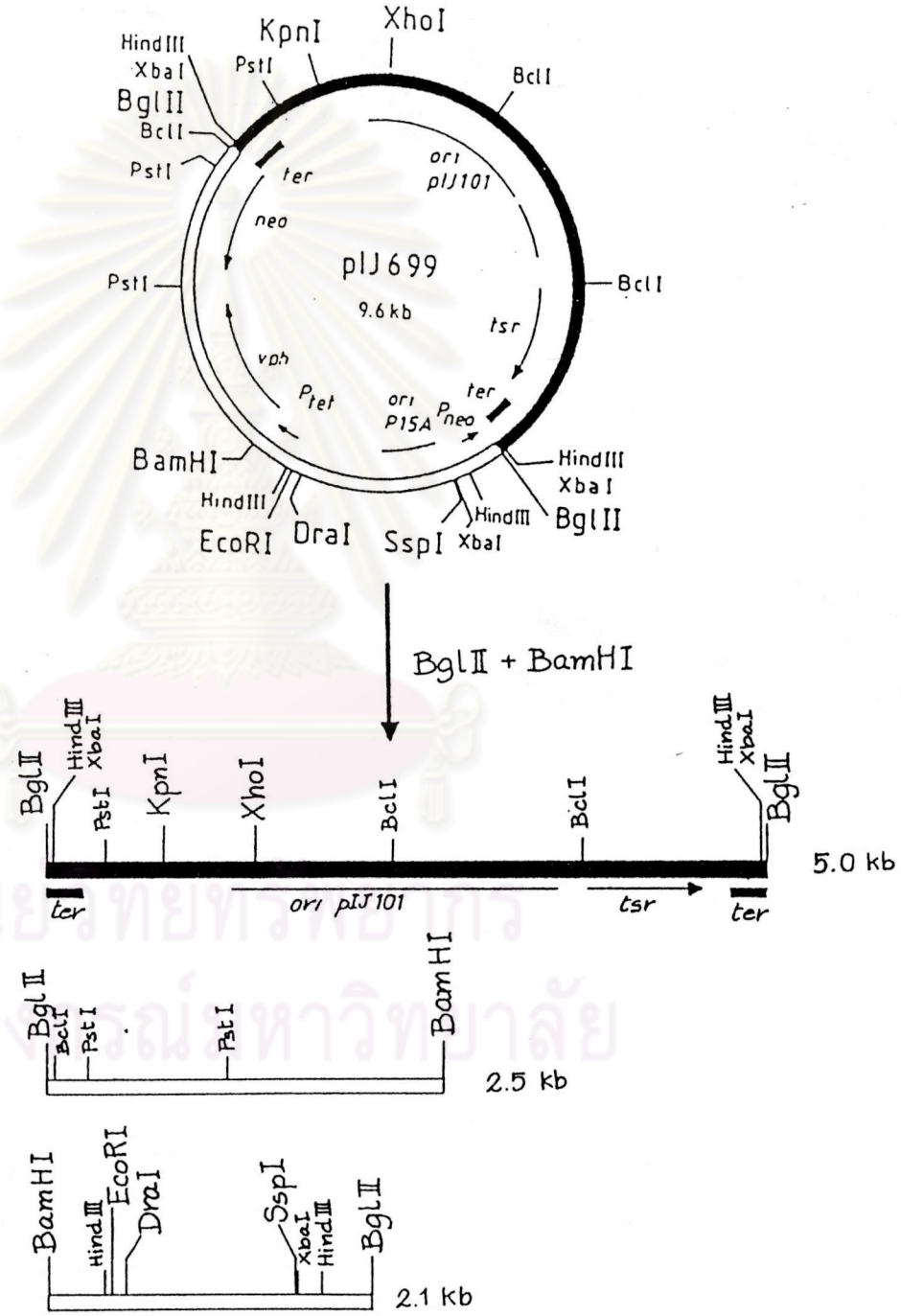
9 โครโมโซมอลดีเอนเอเข้มข้น 0.972 ไมโครกรัมต่อ Sau3A1 0.015625 หน่วย

10 λ HindIII (กิโลเบส)

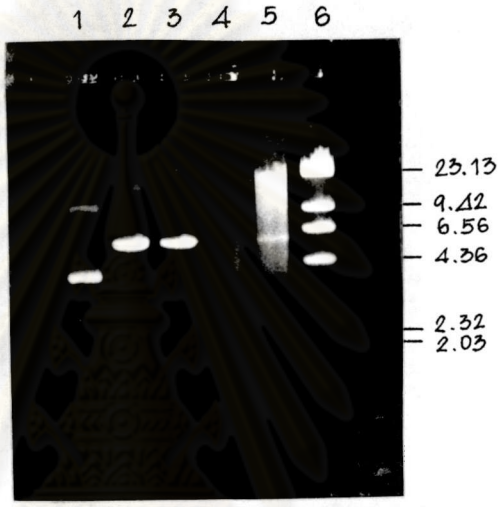
รูปที่ 8 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pIJ702 เมื่อถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BglII



รูปที่ 9 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pIJ699 เมื่อถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BglII และ BamHI



รูปที่ 10 ภาพแสดงการตัดพลาสมิด pIJ702 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BglII แล้วทดสอบการเชื่อมกันด้วยตัวเอง (self ligation) หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว และแสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ผ่านการเชื่อม ด้วย T_4 DNA ligase บนอะกาโรสเจล



ช่องที่ 1 พลาสมิด pIJ702

2 พลาสมิด pIJ702 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BglII และ BAP

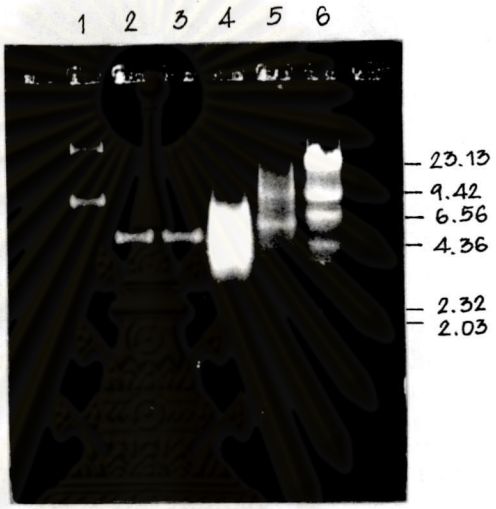
3 พลาสมิด pIJ702 จากช่องที่ 2 เชื่อมด้วยเอนไซม์ T_4 DNA ligase

4 ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอของ *Streptomyces* sp.42-9 ขนาด 3-8 กิโลเบส

5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด

6 λ HindIII (กิโลเบส)

รูปที่ 11 ภาพแสดงการตัดพลาสมิด pIJ699 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BglII แล้วทดสอบการเชื่อมกันด้วยตัวเอง (self ligation) หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว และแสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ที่ผ่านการเชื่อมด้วย T_4 DNA ligase บนอะกาโรสเจล



ช่องที่ 1 พลาสมิด pIJ699

2 พลาสมิด pIJ699 ขนาด 5 กิโลเบสที่ผ่านการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BglII และ BamHI และ BAP

3 พลาสมิด pIJ699 จากช่องที่ 2 เชื่อมด้วยเอนไซม์ T_4 DNA ligase

4 ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอของ *Streptomyces* sp.42-9 ขนาด 3-8 กิโลเบส

5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด

6 λ HindIII (กิโลเบส)

3.3 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

เมื่อเชื่อมชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอขนาด 3-8 กิโลเบส เข้ากับพลาสมิดพาหะที่เตรียมได้ในข้อ 3.2 ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 7.3 พบว่าเมื่อใช้ pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ จะได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดอยู่ในช่วงขนาดประมาณ 6-23 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 10 ช่องที่ 5 และยังคงเหลือส่วนของพลาสมิดพาหะอิสระซึ่งเห็นเป็นแถบที่ 5.8 กิโลเบส และชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเออิสระขนาดเล็กกว่า 5.8 กิโลเบส

สำหรับรีคอมบีแนนท์ที่ได้จากการเชื่อมชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอกับพลาสมิดพาหะ pIJ699 ขนาด 5 กิโลเบสนั้น มีขนาดอยู่ในช่วงประมาณ 5.5-20 กิโลเบส ตามรูปที่ 11 ช่องที่ 5

4. การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *S. lividans* TK64

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิด 2 ชนิด คือ pIJ699 และ pIJ702 ที่ยังไม่ได้ผ่านขั้นตอนโคลนยีนเข้าสู่ *S. lividans* TK64 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่า ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม pIJ699 และ pIJ702 มีค่าเท่ากับ 5.84×10^5 และ 9.52×10^5 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอนเอตามลำดับ แต่เมื่อทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนท์พลาสมิดจากข้อ 3.3 ปรากฏว่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มลดลง คือเมื่อทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ pIJ699 เป็นพลาสมิดพาหะได้จำนวนทรานสฟอร์แมนท์ 3.02×10^3 ต่อไมโครกรัมดีเอนเอ และเมื่อทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ ได้จำนวนทรานสฟอร์แมนท์ 5.40×10^3 ต่อไมโครกรัมดีเอนเอ โดยลดลง 193 และ 110 เท่า ตามลำดับ

5. การแสดงออกของไซแลเนสยีนในโคลนของ *S. lividans* TK64

5.1 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของพลาสมิด pIJ699 และแสดงแอคติวิตีของไซแลเนส

จากการคัดเลือกโคลนที่ให้วงใสรอบโคโลนี บนอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ พบว่าได้โคลน 3 โคลน คือ *S. lividans* TK64 ที่มีพลาสมิด pPT6C ,

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ702 และ pIJ699 ที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ เทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของพลาสมิดพาหะทั้งสองเข้าสู่โปรโตพลาสต์ ของ S. *lividans* TK64

ชนิดของพลาสมิด	จำนวนทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอนเอ
pIJ702	9.52×10^{5}
pIJ699	5.84×10^{5}
รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ	5.40×10^{3}
รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ชิ้นส่วนของ pIJ699 เป็นพลาสมิดพาหะ	3.02×10^{3}

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

pPT6E และ pPT6G ดังแสดงในรูปที่ 12

นำโคลน S. *lividans* TK64/pPT6C , S. *lividans* TK64/pPT6E และ S. *lividans* TK64/pPT6G มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ผลการทดลองในรูปที่ 13 และตารางที่ 7 พบว่าได้แอคติวิตีของไซแลเนสสูงสุดในโคลนที่มีพลาสมิด pPT6C , pPT6E และ pPT6G วัดแอคติวิตีได้ 5.19 , 4.85 และ 4.28 หน่วย/มล.ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับแอคติวิตีสูงสุดของ *Streptomyces* sp.42-9 คือ 4.50 หน่วย/มล.

เมื่อเปรียบเทียบกับ S. *lividans* TK64 พบว่า pPT6C , pPT6E และ pPT6G มีแอคติวิตีของไซแลเนสเพิ่มขึ้นจากเดิม 74 , 69 และ 61 เท่าตามลำดับ

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีกากรำข้าว ผลการทดลองในรูปที่ 14 และตารางที่ 7 โดยใช้สูตรอาหารที่ปรับปรุงแล้วสำหรับ *Streptomyces* sp.42-9 พบว่า S. *lividans* TK64/pPT6C ให้แอคติวิตีของไซแลเนสใกล้เคียงกับ *Streptomyces* sp.42-9 ขณะที่ S. *lividans* TK64/pPT6E และ S. *lividans* TK64/pPT6G ให้แอคติวิตีต่ำกว่าเล็กน้อย

5.2 <u>รีคอมบิแนนท์ที่มีพลาสมิด pIJ702 และแสดงแอคติวิตีของไซแลเนส</u>

จากการคัดเลือกโคลนที่ให้วงใสรอบโคโลนี บนอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ พบว่าได้โคลน 5 โคลน คือ S. *lividans* TK64 ที่มีพลาสมิด pPT7-1, pPT7-2 , pPT7-3 , pPT7-4 และ pPT7-5 ดังแสดงในรูปที่ 15

นำโคลนทั้ง 5 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ผลการทดลองในตารางที่ 8 พบว่าให้แอคติวิตีของไซแลเนสสูงสุดอยู่ในช่วง 0.3-0.8 หน่วย/มล.เท่านั้น ซึ่งให้ผลต่ำกว่า *Streptomyces* sp.42-9 มาก เมื่อเปรียบเทียบกับ S.*lividans* TK64 พบว่าแอคติวิตีของไซแลเนสเพิ่มขึ้นกว่าเดิมประมาณ 5-11 เท่า

เมื่อนำโคลนทั้ง 5 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ ปรากฏว่าไม่พบแอคติวิตีของไซแลเนส

รูปที่ 12 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของ S. *lividans* TK64/pPT6C, S. *lividans* TK64/pPT6E และ S. *lividans* TK64/pPT6G เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp.42-9 และ S. *lividans* TK64 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ

1 *Streptomyces* sp.42-9

2 S. *lividans* TK64

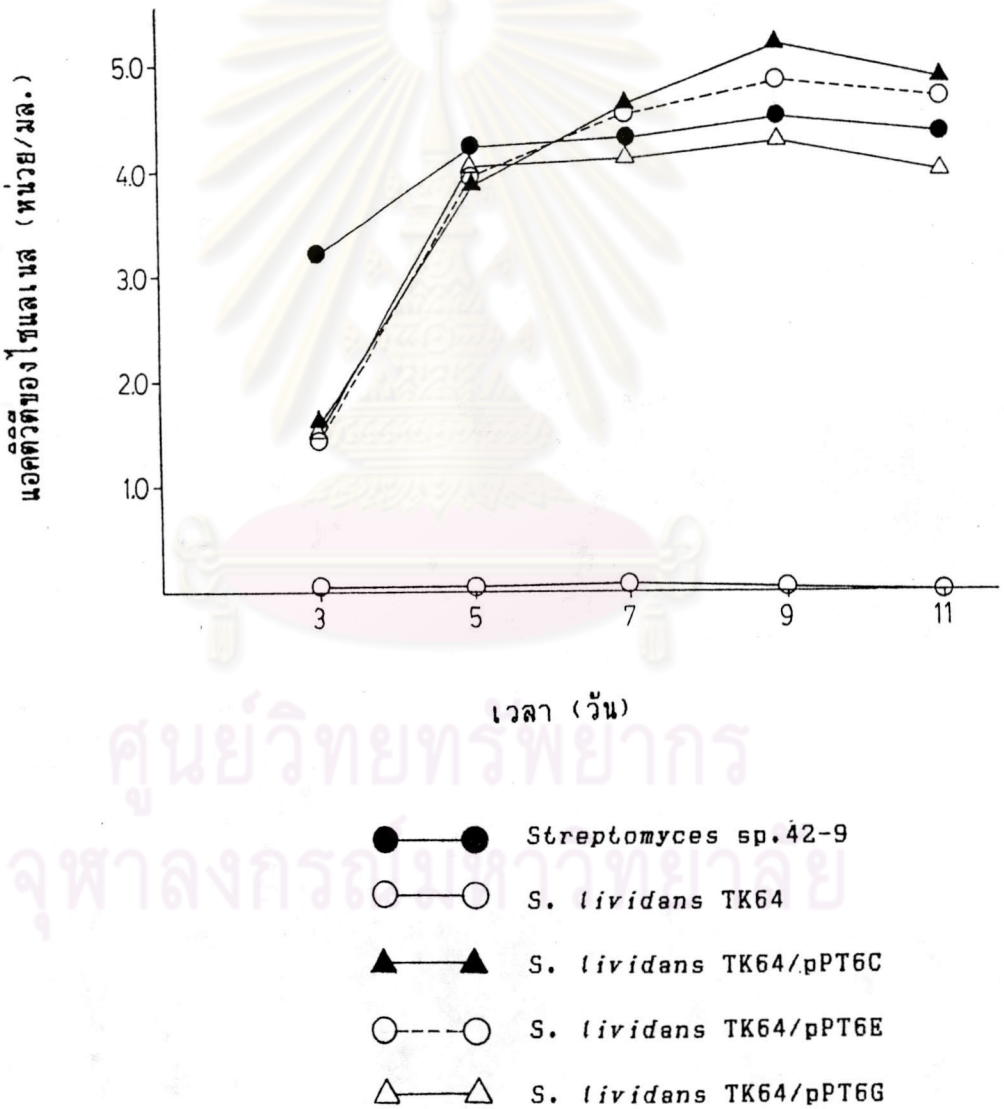
3 S. *lividans* TK64/pPT6C

4 S. *lividans* TK64/pPT6E

5 S. *lividans* TK64/pPT6G

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 แอคติวิตีของไซแลเนสที่เวลาต่าง ๆ ของโคลนที่คัดเลือกได้จากรูปที่ 12 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp.42-9 และ S. *lividans* TK64 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก.4) โดยเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3-11 วัน



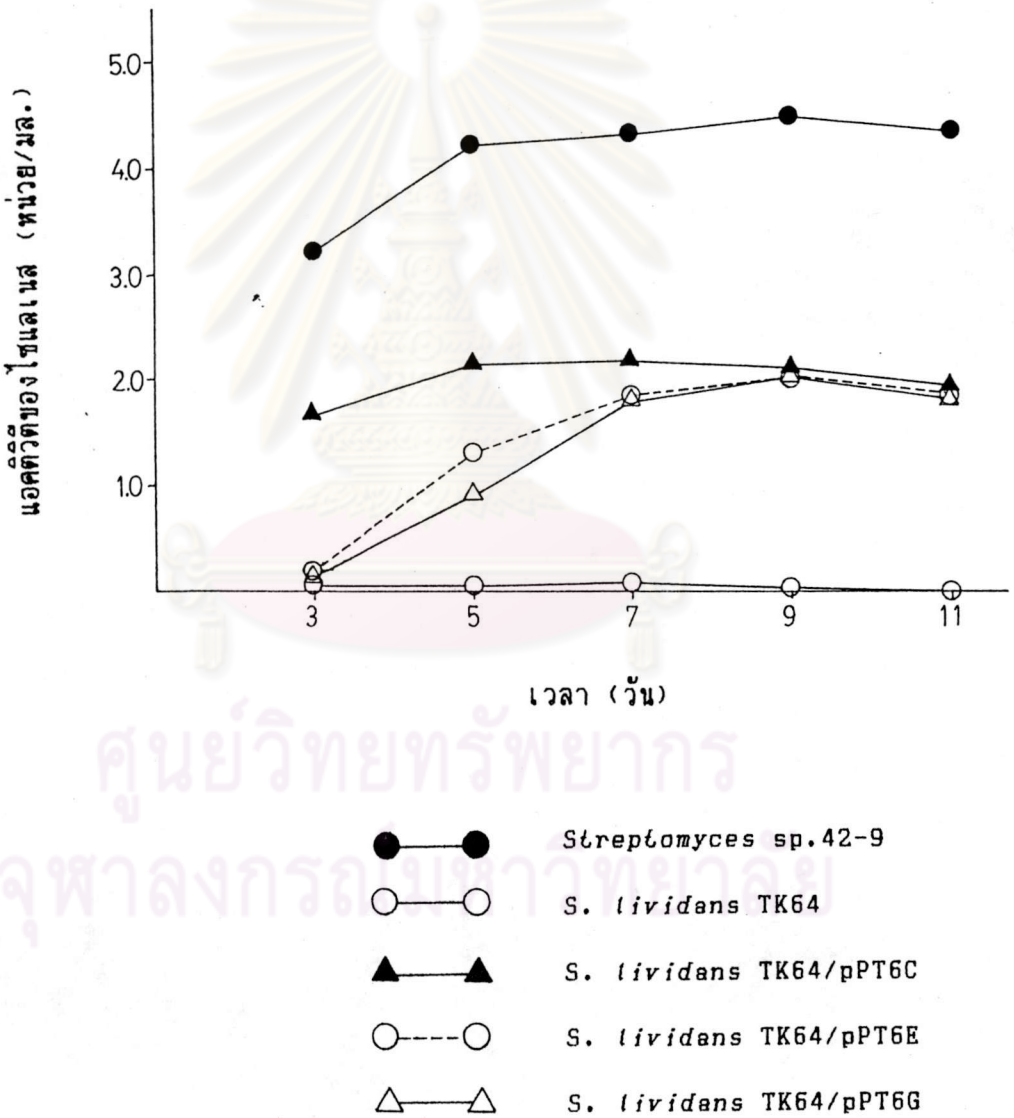
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบแอคติวิตีสูงสุดของไซแลเนสจากโคลนที่คัดเลือกได้จากรุ่นที่ 12 ซึ่งแสดงออกใน *S. lividans* TK64 กับ *Streptomyces* sp.42-9 และ *S. lividans* TK64 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนและกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก.4 และ ก.5) โดยเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ

สายพันธุ์	แอคติวิตีของไซแลเนส (หน่วย/มล.)	
	ไซแลน	กากรำข้าว
Streptomyces sp.42-9	4.50	2.10
S. lividans TK64	0.07	0.00
S. lividans TK64/pIJ6-C	5.19	2.17
S. lividans TK64/pIJ6-E	4.85	2.04
S. lividans TK64/pIJ6-G	4.28	2.02

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 แอคติวิตีของไซแลเนสที่เวลาต่าง ๆ ของโคลนที่คัดเลือกได้จากรูปที่ 12 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp.42-9 และ S. *lividans* TK64 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก.5) โดยเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3-11 วัน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของ S. *lividans* TK64/pPT7-1,S. *lividans* TK64/pPT7-2, S. *lividans* TK64/pPT7-3 , S. *lividans* TK64/pPT7-4 และ S. *lividans* TK64/pPT7-5 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp.42-9 และ S. *lividans* TK64 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ

1 *Streptomyces* sp.42-9

2 S. *lividans* TK64

3 S. *lividans* TK64/pPT7-1

4 S. *lividans* TK64/pPT7-2

5 S. *lividans* TK64/pPT7-3

6 S. *lividans* TK64/pPT7-4

7 S. *lividans* TK64/pPT7-5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบแอคติวิตีสูงสุดของไซแลเนสจากโคลนที่คัดเลือกได้จากรุ่นที่ 15 ซึ่งแสดงออกใน S. *lividans* TK64 กับ Streptomyces sp.42-9 และ S. *lividens* TK64 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก.4) โดยเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ

สายพันธุ์	แอคติวิตีของไซแลเนส (หน่วย/มล.)
Streptomyces sp.42-9	4.50
S. *lividans* TK64	0.07
S. *lividans* TK64/pPT7-1	0.79
S. *lividans* TK64/pPT7-2	0.73
S. *lividans* TK64/pPT7-3	0.35
S. *lividans* TK64/pPT7-4	0.32
S. *lividans* TK64/pPT7-5	0.32

6. การทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะที่มีไซแลเนสยีนที่โคลนได้ เข้าสู่ *Streptomyces* sp.190-1

สกัดแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีไซแลเนสยีน คือ pPT6C , pPT6E , pPT6G , pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-3 , pPT7-4 และ pPT7-5 จาก *S. lividans* TK64 แล้วนำมาทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Streptomyces* sp.190-1 นำทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้มาตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส บนอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ แต่เนื่องจาก *Streptomyces* sp.190-1 สร้างรงควัตถุสีดำ (melanin) ในปริมาณสูงทำให้ไม่เห็นวงใสรอบโคโลนีอย่างชัดเจน (ไม่ได้แสดงในผลการทดลอง) จึงนำทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้มาตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส

7. การแสดงออกของไซแลเนสยีนในโคลนต่าง ๆ ของ *Streptomyces* sp.190-1

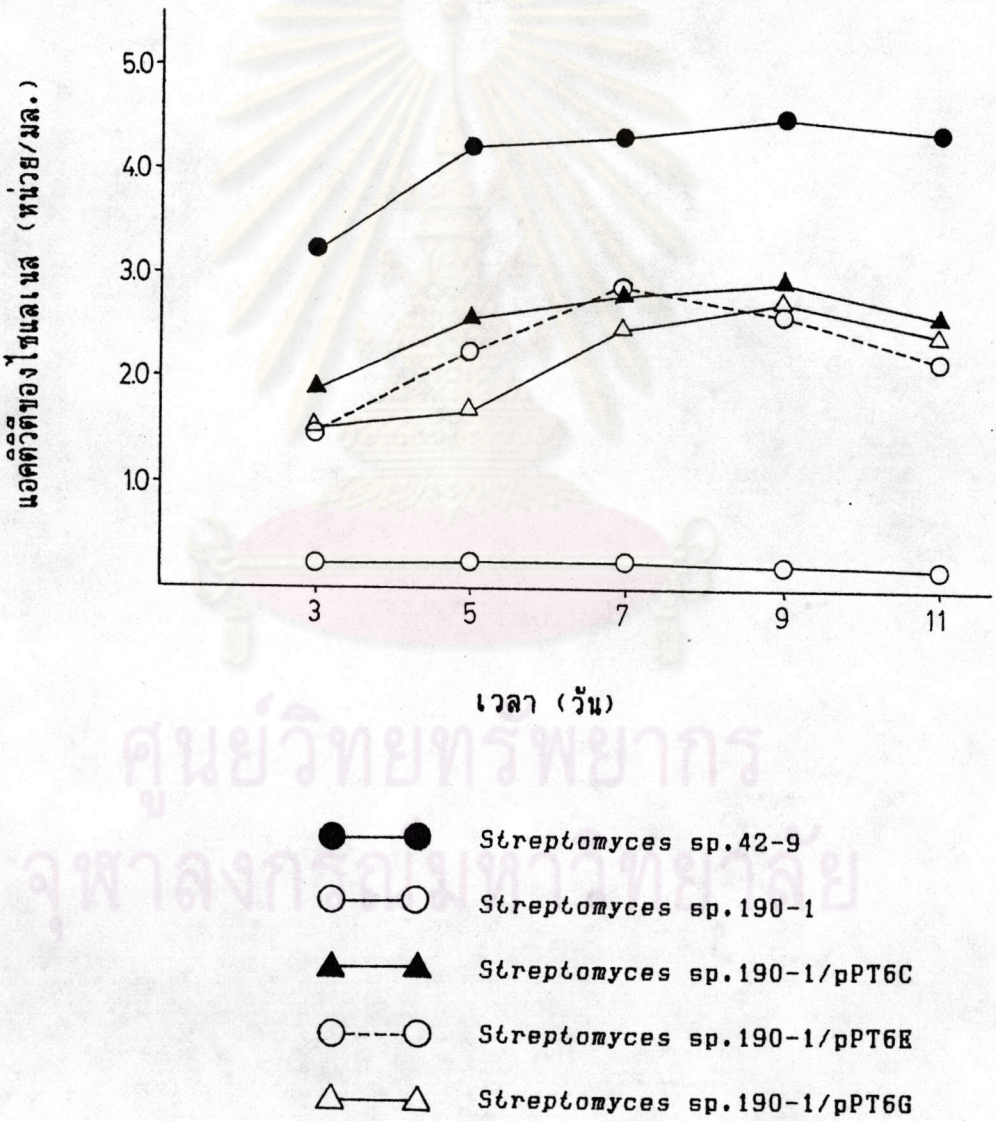
7.1 การแสดงออกของไซแลเนสแอคติวิตีของพลาสมิด pPT6C , pPT6E และ pPT6G ใน *Streptomyces* sp.190-1

เลี้ยงโคลน *Streptomyces* sp.190-1/pPT6C , *Streptomyces* sp.190-1/pPT6E และ *Streptomyces* sp.190-1/pPT6G ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ผลการทดลองในรูปที่ 16 และตารางที่ 9 พบว่าแอคติวิตีของไซแลเนสที่ได้สูงสุด คือ 2.93 , 2.82 และ 2.73 หน่วย/มล. ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่า *Streptomyces* sp.42-9 ประมาณ 1.5 เท่า

เมื่อเปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp.190-1 พบว่า โคลนทั้งสามให้แอคติวิตีของไซแลเนสเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 10 เท่า

นำโคลนทั้ง 3 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ ผลการทดลองในรูปที่ 17 ตารางที่ 9 พบว่า *Streptomyces* sp.190-1/pPT6C ให้แอคติวิตีของไซแลเนสสูงกว่า *Streptomyces* sp.42-9 เล็กน้อย *Streptomyces* sp.190-1/pPT6E ให้แอคติวิตีใกล้เคียงกันกับของ *Streptomyces* sp.42-9 ขณะที่ *Streptomyces* sp.190-1/pPT6G ให้แอคติวิตีต่ำกว่าเล็กน้อย แต่เมื่อเทียบกับ *Streptomyces* sp.190-1 พบว่า แอคติวิตีของไซแลเนสเพิ่มขึ้นมากกว่าเดิม 6-8 เท่า

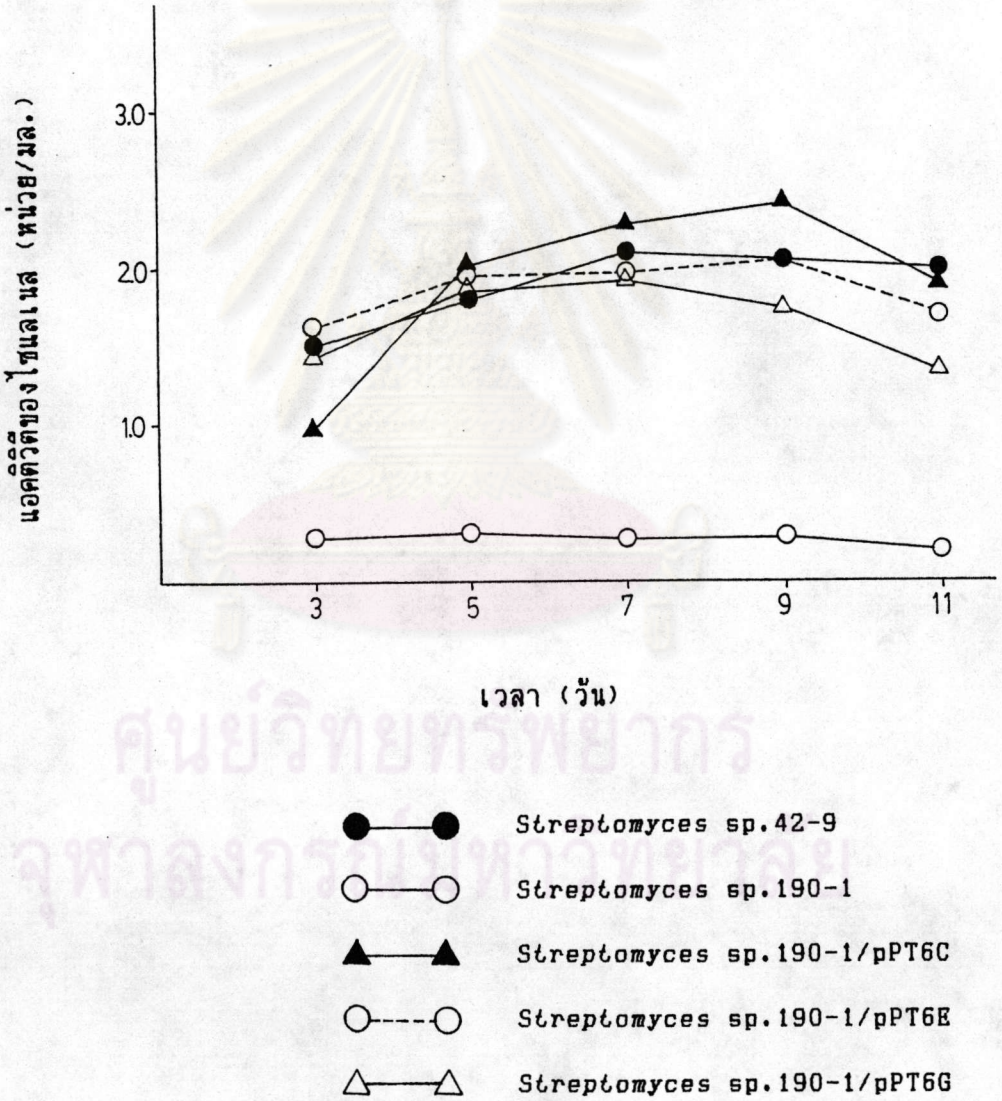
รูปที่ 16 แอคติวิตีของไซแลเนสที่เวลาต่าง ๆ ของ *Streptomyces* sp.190-1 /pPT6C , *Streptomyces* sp.190-1/pPT6E และ *Streptomyces* sp.190-1/pPT6G เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp.42-9 และ *Streptomyces* sp.190-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก.4) โดยเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3-11 วัน



ตารางที่ 9 เปรียบเทียบแอคติวิตีสูงสุดของไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp.190-1 ที่รับพลาสมิด pPT6C , pPT6E และ pPT6G กับ *Streptomyces* sp.42-9 และ *Streptomyces* sp.190-1 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลน และกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก.4 และ ก.5) โดยเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ

สายพันธุ์	แอคติวิตีของไซแลเนส (หน่วย/มล.)	
	ไซแลน	กากรำข้าว
Streptomyces sp.42-9	4.50	2.10
Streptomyces sp.190-1	0.26	0.31
Streptomyces sp.190-1/pPT6C	2.93	2.42
Streptomyces sp.190-1/pPT6E	2.82	2.06
Streptomyces sp.190-1/pPT6G	2.73	1.95

รูปที่ 17 แอคติวิตีของไซแลเนสที่เวลาต่าง ๆ ของ *Streptomyces* sp.190-1 /pPT6C , *Streptomyces* sp.190-1/pPT6E และ *Streptomyces* sp.190-1/pPT6G เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp.42-9 และ *Streptomyces* sp.190-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก.5) โดยเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3-11 วัน



7.2 การแสดงออกของไซแลเนสแอคติวิตีของพลาสมิด pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-3 , pPT7-4 และ pPT7-5 ใน *Streptomyces* sp.190-1

ผลการทดลองเลี้ยง *Streptomyces* sp. 190-1 ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-3 , pPT7-4 และ pPT7-5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบในรูปที่ 18 และตารางที่ 10 พบว่า *Streptomyces* sp.190-1/pPT7-1 ให้แอคติวิตีของไซแลเนสสูงสุดในกลุ่มเดียวกัน คือ 3.22 หน่วย/มล. แต่ทุก ๆ โคลนให้แอคติวิตีต่ำกว่า *Streptomyces* sp.42-9

เมื่อเทียบกับ *Streptomyces* sp.190-1 พบว่าให้แอคติวิตีของไซแลเนสสูงกว่าเดิม 9-12 เท่า

นำโคลนต่าง ๆ มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ ผลการทดลองในรูปที่ 19 และตารางที่ 10 พบว่า pPT7-1 และ pPT7-3 ให้แอคติวิตีของไซแลเนสสูงกว่า *Streptomyces* sp.42-9 1.44 และ 1.11 เท่า ตามลำดับ นอกนั้นให้แอคติวิตีต่ำ โดยเฉพาะ pPT7-5 ให้แอคติวิตีต่ำที่สุด คือ 0.85 หน่วย/มล.

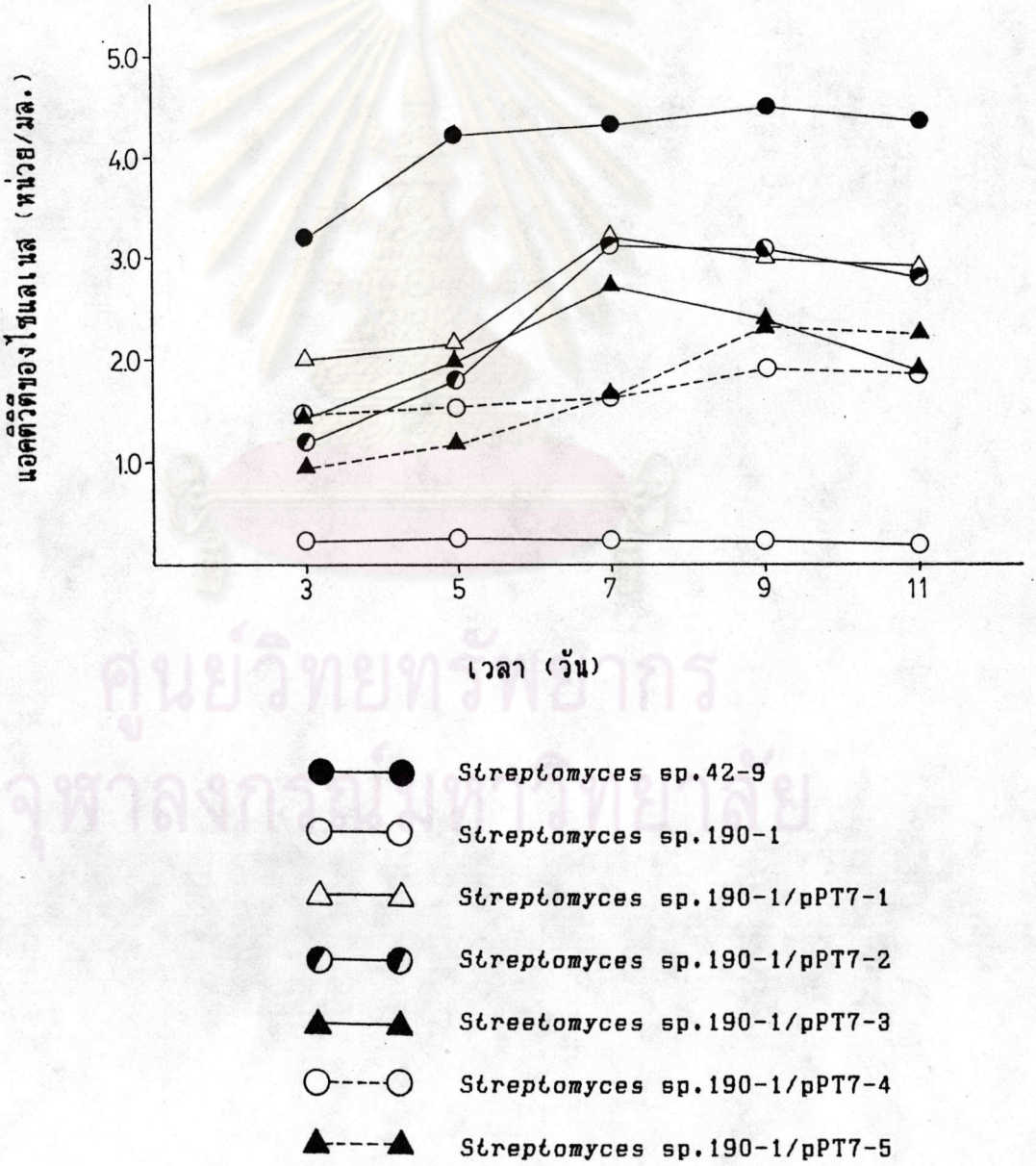
เมื่อเปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp.190-1 พบว่าโคลนต่าง ๆ ให้แอคติวิตีของไซแลเนสเพิ่มขึ้นมากกว่าเดิม โดย *Streptomyces* sp.190-1/pPT7-1 ให้แอคติวิตีสูงสุดคือ 3.02 หน่วย/มล. ซึ่งสูงกว่าเดิม 9.7 เท่า

8. ผลของกลูโคสต่อการผลิตไซแลเนสในโคลนต่าง ๆ ของ *Streptomyces* sp.190-1

กาญจนา (49) ทดลองเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces* sp.42-9 พบว่ากลูโคส 1% จะกดดัน (repress) การผลิตไซแลเนสโดยสิ้นเชิง แสดงว่าไซแลเนสที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp.42-9 เป็นลักษณะชักนำ (inducible enzyme) โดยมีไซโลสเป็นสารชักนำและกลูโคสเป็นสารกดดันการสร้างเอนไซม์

Ghangas และคณะ (47) โคลนไซแลเนสยีนจาก *Thermomonospora fusca* เข้าสู่ *S. lividans* พบว่าโคลนที่ได้ใหม่สามารถผลิตไซแลเนสในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ทั้ง ๆ ที่การสร้างไซแลเนสใน *T. fusca* จะถูกกดดันการผลิตไซแลเนสเมื่อมีกลูโคส

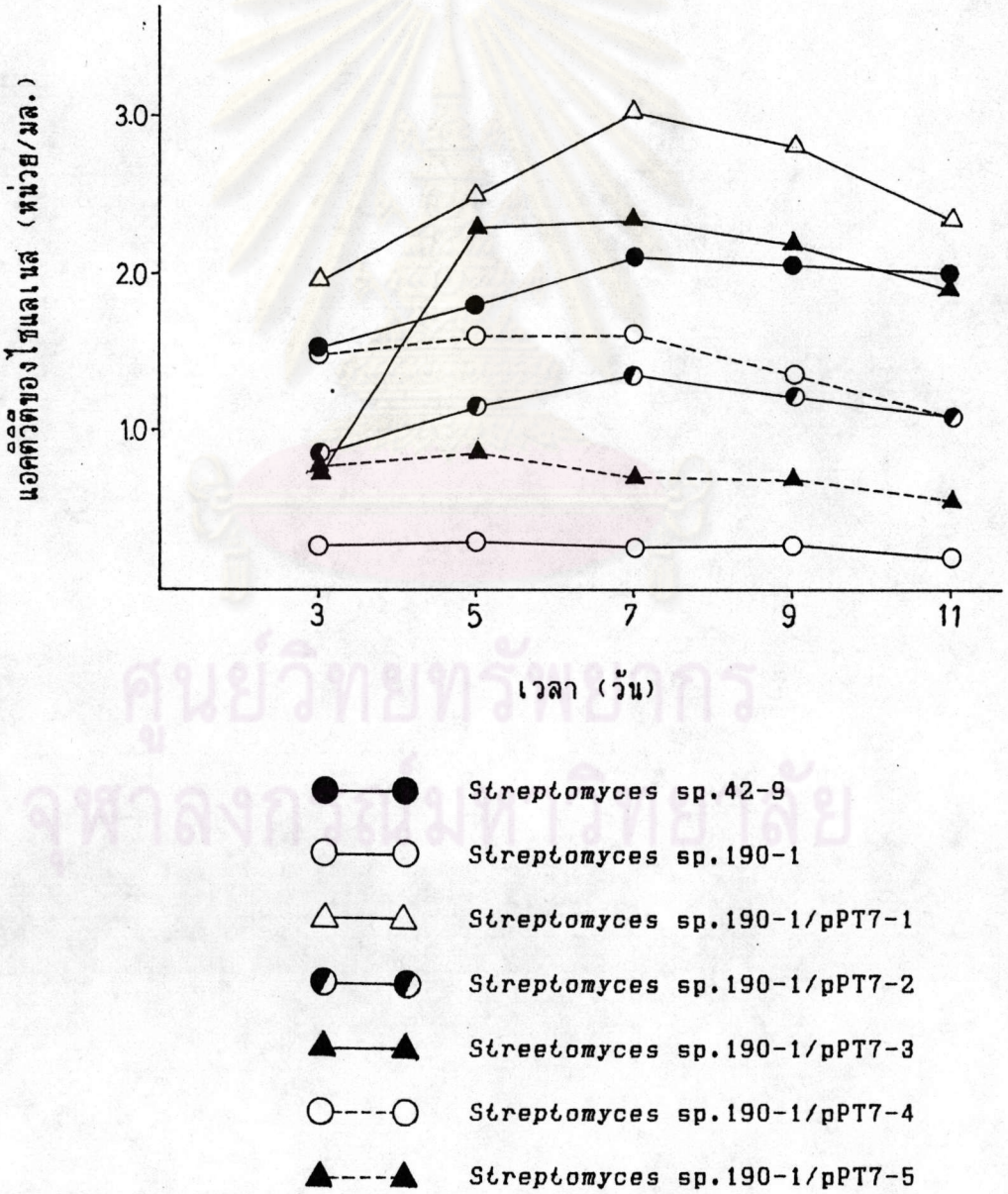
รูปที่ 18 แอคติวิตีของไซแลเนสที่เวลาต่าง ๆ ของ *Streptomyces* sp.190-1/pPT7-1 , *Streptomyces* sp.190-1/pPT7-2 , *Streptomyces* sp.190-1/pPT7-3 , *Streptomyces* sp.190-1/pPT7-4 และ *Streptomyces* sp.190-1/pPT7-5 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp.42-9 และ *Streptomyces* sp.190-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก.4) โดยเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3-11 วัน



ตารางที่ 10 เปรียบเทียบแอคติวิตีสูงสุดของไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp.190-1 ที่รับพลาสมิด pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-3 , pPT7-4 และ pPT7-5 กับ *Streptomyces* sp.42-9 และ *Streptomyces* sp.190-1 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลน และกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก.4 และ ก.5) โดยเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ

สายพันธุ์	แอคติวิตีของไซแลเนส (หน่วย/มล.)	
	ไซแลน	กากรำข้าว
Streptomyces sp.42-9	4.50	2.10
Streptomyces sp.190-1	0.26	0.31
Streptomyces sp.190-1/pPT7-1	3.22	3.02
Streptomyces sp.190-1/pPT7-2	3.13	1.34
Streptomyces sp.190-1/pPT7-3	2.73	2.34
Streptomyces sp.190-1/pPT7-4	1.92	1.61
Streptomyces sp.190-1/pPT7-5	2.32	0.85

รูปที่ 19 แอคติวิตีของไซนลเนสที่เวลาต่าง ๆ ของ *Streptomyces* sp.190-1/pPT7-1 , *Streptomyces* sp.190-1/pPT7-2 , *Streptomyces* sp.190-1/pPT7-3 , *Streptomyces* sp.190-1/pPT7-4 และ *Streptomyces* sp.190-1/pPT7-5 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp.42-9 และ *Streptomyces* sp.190-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก.5)โดยเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3-11 วัน



การทดลองนี้ จึงจะตรวจสอบผลของกลูโคสต่อการสร้างไซแลเนส โดยยีนที่โคลนได้โดยนำ *Streptomyces* sp.190-1 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C , pPT6E , pPT6G , pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-3 , pPT7-4 และ pPT7-5 มาเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 1% เป็นแหล่งคาร์บอนแทนไซแลน (องค์ประกอบอื่น ๆ เหมือนเดิมตามภาคผนวก ก.4) โดยเปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp.42-9 พบว่ากลูโคสยังมีผลกดดันการสร้างไซแลเนสในยีนที่โคลนได้ทุกโคลน โดยวัดแอคติวิตีของไซแลเนสได้อยู่ในช่วง 0.00-0.03 หน่วย/มล. (ไม่ได้แสดงผลในการทดลอง)

9. <u>ขนาดชิ้นส่วนของดีเอนเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่แสดงแอคติวิตีของไซแลเนส</u>

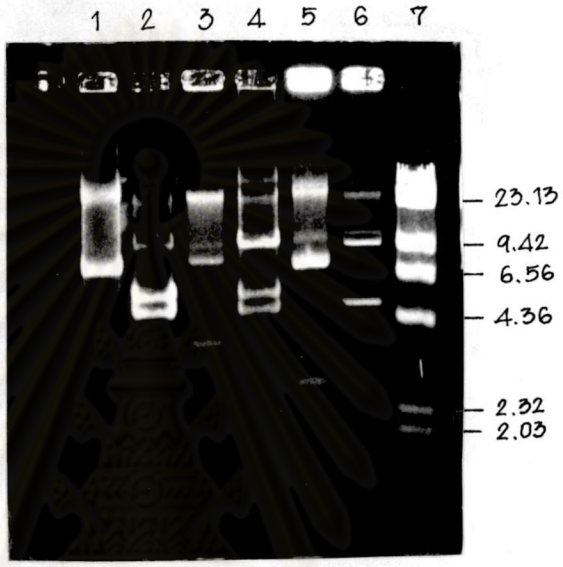
9.1 <u>ขนาดชิ้นส่วนดีเอนเอจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ที่สร้างขึ้นโดยใช้ชิ้นส่วนของ pIJ699 เป็นพลาสมิดพาหะ</u>

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C , pPT6E และ pPT6G มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ HindIII เพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอนเอที่ใส่เข้าไป (inserted DNA) ออกจากชิ้นส่วนพาหะ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 20 และตารางที่ 11 พบว่าขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอ ที่ใส่เข้าไปและมีไซแลเนสยีน เท่ากับ 4.8 , 14.2 และ 9.4 กิโลเบสตามลำดับ

9.2 <u>ขนาดชิ้นส่วนดีเอนเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างขึ้นโดยใช้ pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ</u>

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-3 , pPT7-4 และ pPT7-5 มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamHI ผลการทดลองตามรูปที่ 21 ก. และตารางที่ 12 พบว่าพลาสมิดทั้ง 5 มีขนาด 6.3 , 10.2 , 6.3 , 12.2 , 10.2 กิโลเบส ตามลำดับ และเมื่อหักลบขนาดของพลาสมิดพาหะ pIJ702 ซึ่งมีขนาด 5.8 กิโลเบสออก พบว่าขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอที่มีไซแลเนสยีนในพลาสมิด pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-3 , pPT7-4 และ pPT7-5 มีขนาดเท่ากับ 0.5 , 4.4 , 0.5 , 6.4 , 4.4 กิโลเบสตามลำดับ เมื่อตัด pPT7-3 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ PstI พบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอนเอ 2 ชิ้น มีขนาด 6.3 และ 5.75 กิโลเบส ตามรูปที่ 21 ข.

รูปที่ 20 ภาพแสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอที่มีไซแลเนสยีน (inserted DNA) ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C , pPT6E และ pPT6G เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ HindIII บนอะกาโรสเจล



ช่องที่ 1 พลาสมิด pPT6C

2 พลาสมิด pPT6C ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ HindIII

3 พลาสมิด pPT6E

4 พลาสมิด pPT6E ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ HindIII

5 พลาสมิด pPT6G

6 พลาสมิด pPT6G ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ HindIII

7 λ HindIII (กิโลเบส)

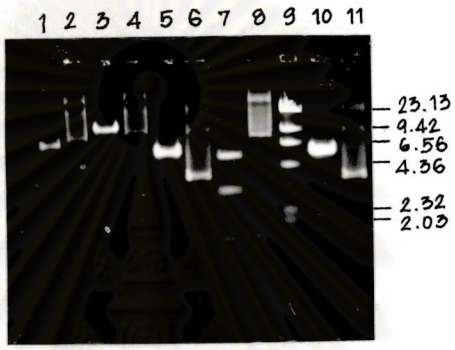
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอที่มีไซแลเนสยีน (inserted DNA) ที่ได้จากการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C , pPT6E และ pPT6G ด้วย HindIII

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด	ขนาดชิ้นส่วนดีเอนเอที่มีไซแลเนสยีน (กิโลเบส)
pPT6C	4.8
pPT6E	14.2
pPT6G	9.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 ก. ภาพแสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอที่มีไซแลเนสยีน (inserted DNA) ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-3 , pPT7-4 และ pPT7-5 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamHI บนอะกาโรสเจล



ช่องที่ 1 พลาสมิด pPT7-5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamHI

2 พลาสมิด pPT7-5

3 พลาสมิด pPT7-4 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamHI

4 พลาสมิด pPT7-4

5 พลาสมิด pPT7-3 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamHI

6 พลาสมิด pPT7-3

7 พลาสมิด pPT7-2 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamHI

8 พลาสมิด pPT7-2

9 λ HindIII (กิโลเบส)

10 พลาสมิด pPT7-1 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamHI

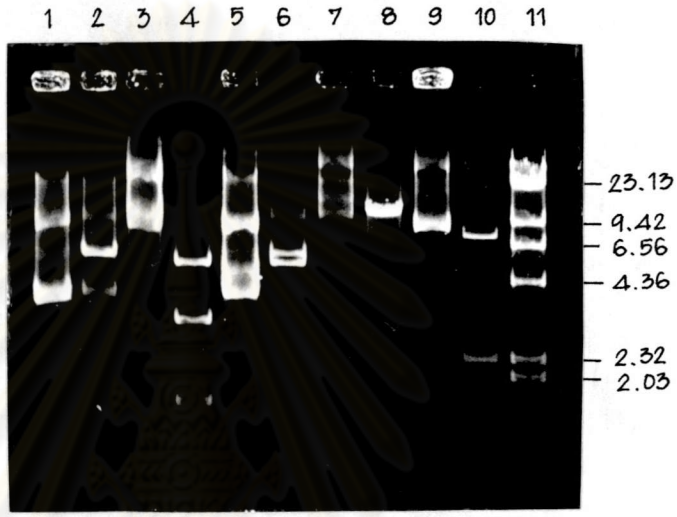
11 พลาสมิด pPT7-1

ตารางที่ 12 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอที่มีไซแลเนสยีน (inserted DNA) ที่ได้จากการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-4 และ pPT7-5 ด้วย BamHI ยกเว้น pPT7-3 ตัดด้วย PstI

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด	ขนาดดีเอนเอ (กิโลเบส)	ขนาดชิ้นส่วนดีเอนเอที่มีไซแลเนสยีน (กิโลเบส)
pPT7-1	6.3	0.5
pPT7-2	10.2	4.4
pPT7-3	6.3	0.5
pPT7-4	12.2	6.4
pPT7-5	10.2	4.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 ข. ภาพแสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอที่มีไซแลเนสยีน (inserted DNA) ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-4 , pPT7-5 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamHI ยกเว้น pPT7-5 ตัดด้วย PstI



ช่องที่ 1 พลาสมิด pPT7-1

2 พลาสมิด pPT7-1 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamHI

3 พลาสมิด pPT7-2

4 พลาสมิด pPT7-2 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamHI

5 พลาสมิด pPT7-3

6 พลาสมิด pPT7-3 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ PstI

7 พลาสมิด pPT7-4

8 พลาสมิด pPT7-4 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamHI

9 พลาสมิด pPT7-5

10 พลาสมิด pPT7-5 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BamHI

11 λ HindIII (กิโลเบส)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซึ่งอาจเนื่องมาจากยีนที่โคลนได้มีบริเวณจำเพาะของ PstI อยู่ด้วย โดยอยู่ในตำแหน่งที่ค่อนข้างใกล้กับบริเวณจำเพาะของ PstI บนพลาสมิดพาหะ จึงอาจปรากฏชิ้นส่วนที่ตัดไม่สมบูรณ์ (6.3 กิโลเบส) ปนอยู่ด้วย ขณะที่ชิ้นส่วนขนาด 5.75 กิโลเบส เป็นชิ้นส่วนที่ตัดอย่างสมบูรณ์ และอาจมีชิ้นส่วนขนาดเล็ก ซึ่งหลุดออกไปจากแผ่นอะกาโรสเจล ในระหว่างการทำอิเลคโตรโฟรีซีส

10. การแสดงออกของกลูโคสไอโซเมอเรสในโคลนต่าง ๆ

ภายหลังจากการทรานสฟอร์ม รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีไซแลเนสยีนเข้าไปใน *Streptomyces* sp.190-1 แล้ว ได้นำสายพันธุ์เหล่านี้มาตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส ผลการทดลองตามตารางที่ 13 พบว่าโคลนต่าง ๆ ยังคงมีแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส แต่เมื่อเทียบกับ *Streptomyces* sp.190-1 พบว่าแอคติวิตีจะลดลงจากเดิม 20-30% คืออยู่ในช่วง 800-1000 หน่วย/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่ *Streptomyces* sp.190-1 มีแอคติวิตี 1256 หน่วย/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และ *Streptomyces* sp.42-9 มีแอคติวิตีเพียง 174 หน่วย/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp.190-1 ที่รับพลาสมิดซึ่งมีไซแลเนสยีน กับ *Streptomyces* sp.42-9 และ *Streptomyces* sp.190-1 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3 วัน

สายพันธุ์	กลูโคสไอโซเมอเรส (หน่วย/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
Streptomyces sp.190-1	1256
Streptomyces sp.42-9	174
Streptomyces sp.190-1/pPT6C	968
Streptomyces sp.190-1/pPT6E	980
Streptomyces sp.190-1/pPT6G	936
Streptomyces sp.190-1/pPT7-1	1078
Streptomyces sp.190-1/pPT7-2	983
Streptomyces sp.190-1/pPT7-3	867
Streptomyces sp.190-1/pPT7-4	821
Streptomyces sp.190-1/pPT7-5	833