

### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

#### 3.1 การสร้างและการคัดเลือกคอมบินันท์พลาสมิด pSV1

##### 3.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับ cloning จากโครโมโซม

##### จาก *Bacillus A<sub>11</sub>*

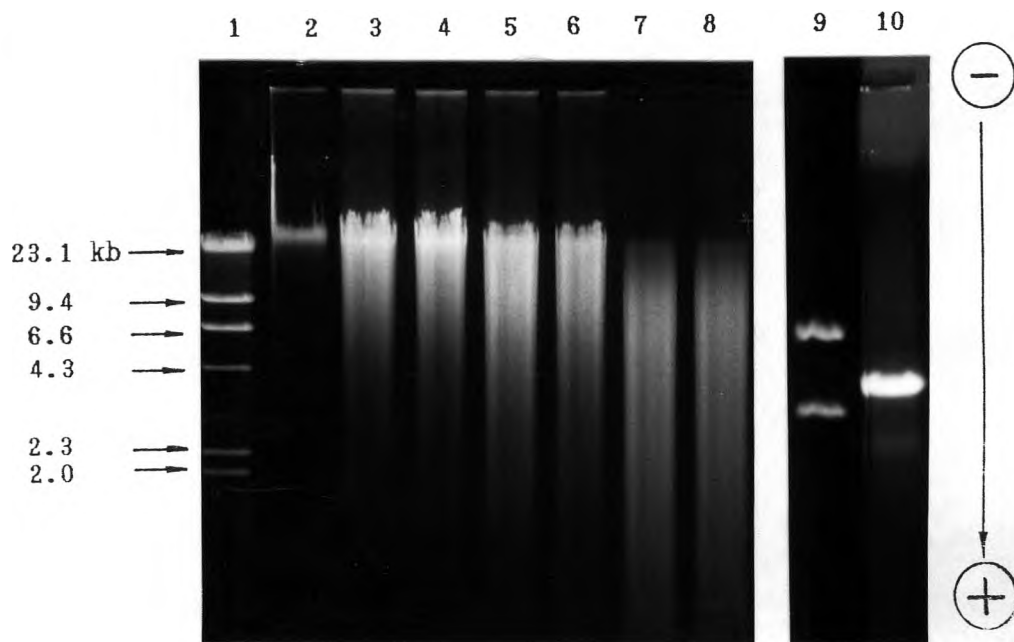
ก่อนการสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Bacillus A<sub>11</sub>* เพื่อนำไปโคลน CGTase gene ได้ทำการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตจาก *Bacillus A<sub>11</sub>* โดยวิธี CD-TCE assay (ข้อ 2.10.5.4) โดยนำ *Bacillus A<sub>11</sub>* มาเจริญใน Horikoshi's medium II, pH10 จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ปั่นที่ 4,000Xg เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสมาเติมแคลเซียมคลอไรด์ให้เป็น 10 มิลลิโมลาร์ เพื่อเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ (วิลฮา, 2534) ก่อนนำไปวัดแอกติวิตี พบว่าที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ให้ตะกอน CD-TCE complex ที่ dilution limit เท่ากับ 2<sup>2</sup>, 2<sup>4</sup> และ 2<sup>4</sup> ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่า *Bacillus A<sub>11</sub>* มี CGTase gene อยู่ และดีเอ็นเอของโครโมโซมเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการ cloning

Takano และคณะ (1986), Kato และ Horikoshi (1986), Kimura และคณะ (1987) และ Kaneko และคณะ (1988) ได้รายงานการโคลน CGTase gene จาก *B. macerans*, *B. subtilis* No.311, *Bacillus* sp.#1011 และ *Bacillus* sp. strain No.38-2 ตามลำดับเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ โดยพบว่าความสำเร็จนี้เกิดจากการใช้ เรสติกชันเอนไซม์ Sau3AI ย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมของจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งของ CGTase gene ดังกล่าวข้างต้นแบบ partial digestion แล้วนำเข้าไปเชื่อมกับตำแหน่ง BamHI บนดีเอ็นเอพาหะ ดังนั้นการวิจัยจึงได้เลือกใช้ เรสติกชันเอนไซม์ Sau3AI มาย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *Bacillus* A<sub>11</sub> แบบ partial digestion จากการนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าดีเอ็นเอของโครโมโซมถูกย่อยเป็นชิ้นขนาดต่างๆกันเห็นเป็นแถบยาวๆลงมา (รูปที่ 12) จะเห็นว่าเมื่อย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมเป็นเวลา 60 นาที จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีการกระจายของขนาดต่างๆดีที่สุด จึงเลือกตัดอะกาโรสเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดตั้งแต่ 2 kb ขึ้นไป (รูปที่ 12, ช่องที่ 7 และ 8) นำมาแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี electroelution (ข้อ 2.10.1) เพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปทำ ligation ต่อไป

### 3.1.2 การโคลน CGTase gene

นำดีเอ็นเอพาหะ pBR322 มาย่อยด้วยเรสติกชันเอนไซม์ BamHI นำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วตัดอะกาโรสเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.4 kb (รูปที่ 12, ช่องที่ 10) นำมาแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี electroelution จากนั้นนำมาทำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ด้วย calf intestine phosphatase (CIP) (ข้อ 2.10.2)

หลังจากเชื่อมชิ้นพลาสมิด pBR322 ที่มีปลาย BamHI กับชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *Bacillus* A<sub>11</sub> ที่มีปลาย Sau3AI (ข้อ 2.10.3) แล้วทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* strain HB101 กระจายเชื้อบนอาหารแข็ง LB-agar ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน บ่มที่



รูปที่ 12 ผลของการย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Bacillus A<sub>11</sub>* แบบ partial digestion และ การย่อยพลาสมิด pBR322 ด้วย BamHI แบบสมบูรณ์ บนอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซ็นต์

ช่องที่ 1 คือ standard  $\lambda$ -DNA ย่อยด้วย HindIII

ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *Bacillus A<sub>11</sub>*

ช่องที่ 3 และ 4 คือ ดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *Bacillus A<sub>11</sub>* ย่อยด้วย Sau3AI เป็นเวลา 15 นาที

ช่องที่ 5 และ 6 คือ ดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *Bacillus A<sub>11</sub>* ย่อยด้วย Sau3AI เป็นเวลา 30 นาที

ช่องที่ 7 และ 8 คือ ดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *Bacillus A<sub>11</sub>* ย่อยด้วย Sau3AI เป็นเวลา 60 นาที แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด >2kb นำไปทำ ligation ต่อไป

ช่องที่ 9 คือ ดีเอ็นเอพลาสมิด pBR322

ช่องที่ 10 คือ ดีเอ็นเอพลาสมิด pBR322 ย่อยด้วย BamHI แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.4 kb นำไปทำ ligation ต่อไป

อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์เจ้าเรือนที่ได้รับพลาสมิดเท่านั้นจึงสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจานนี้ ในขณะที่ยีสกับพลาสมิดที่ทรานสฟอร์มเข้าในเซลล์เจ้าเรือนก็มีทั้งรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และ พลาสมิด pBR322 ที่เกิดจากการ self ligation ดังนั้นจากการนำทรานสฟอร์มแมนท์ที่เจริญได้บน LB-agar ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินทั้งหมด 12,450 โคโลนี มาทำ replica plating (ข้อ 2.15.5.1) พบว่ามีทรานสฟอร์มแมนท์จำนวน 3,127 โคโลนี ที่มีคุณสมบัติต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินแต่ไม่ต้านยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (Ap<sup>r</sup>Tet<sup>r</sup>) อีก 9,323 โคโลนี มีคุณสมบัติต้านยาทั้งปฏิชีวนะแอมพิซิลินและเตตราไซคลิน (Ap<sup>r</sup>Tet<sup>r</sup>) แสดงว่าทรานสฟอร์มแมนท์ 3,127 โคโลนี ที่มีคุณสมบัติ Ap<sup>r</sup>Tet<sup>r</sup> เกิดจากเซลล์เจ้าเรือนได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ในขณะที่ทรานสฟอร์มแมนท์จำนวน 9,323 โคโลนีที่มีคุณสมบัติ Ap<sup>r</sup>Tet<sup>r</sup> เกิดจากเซลล์เจ้าเรือนได้รับพลาสมิด pBR322 ดังนั้นจึงสามารถคำนวณการเกิดรีคอมบิเนชันระหว่างพลาสมิด pBR322 กับชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *Bacillus A<sub>11</sub>* ได้จากจำนวนทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีคุณสมบัติ Ap<sup>r</sup>Tet<sup>r</sup> เทียบกับจำนวนทรานสฟอร์มแมนท์ทั้งหมดที่ต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่ามี การเกิดรีคอมบิเนชันประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์

### 3.1.3 การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับ CGTase gene

#### 3.1.3.1 ผลการวัด Amylolytic Activity

จากการที่เอนไซม์ CGTase มี amyolytic activity ด้วยจึงสามารถย่อยแป้งให้เป็นโมเลกุลเล็กลงได้ ทำให้มีปฏิกิริยาค่อสารละลายไอโอดีนเปลี่ยนไป ดังนั้นวิธีนี้จึงใช้เป็นขั้นตอนแรกในการตรวจสอบหา CGTase gene

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เซลล์เจ้าเรือน 3 สายพันธุ์คือ *E. coli* สายพันธุ์ HB101, JM101 และ DH5 $\alpha$  ตามลำดับ โดยนำเซลล์เจ้าเรือนทั้ง 3 สายพันธุ์มาทำการทดสอบ amyolytic activity ก่อน โดยเชื้อเชื้อลงบนจานเลี้ยงเชื้อ LB-starch agar ,



pH 7.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายไอโอดีน (ข้อ 2.10.5.2) พบว่าเซลล์เจ้าเรือนทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่ให่วงใสรอบๆโคโลนี ซึ่งแสดงถึงว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มี amyolytic activity (รูปที่ 13A)

เมื่อนำทรานสเฟอร์แมนท์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้ง 3,127 โคโลนี ในข้อ 3.1.2 มาเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-starch agar, pH7.4 ที่เสริมฮาปติชีวันอะแอมพิซิลิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบกับสารละลายไอโอดีน พบว่า มีทรานสเฟอร์แมนท์จำนวน 20 โคโลนี ที่แสดง amyolytic activity รูปที่ 13B แสดงตัวอย่างหนึ่งตัวอย่างของทรานสเฟอร์แมนท์นี้ จากรูปจะเห็นว่าทรานสเฟอร์แมนท์ที่สร้าง ขึ้นใหม่จะให่วงใสขนาดเล็กรอบๆโคโลนี วงใสที่เกิดขึ้นนั้นอยู่ใกล้โคโลนีมาก ในขณะที่ ทรานสเฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pBR322 ไม่ให่วงใสรอบโคโลนีเลย นั้นแสดงว่าวงใสที่เกิดขึ้นของทรานสเฟอร์แมนท์ทั้ง 20 โคโลนี เกิดจาก inserted DNA fragment ที่ถอดรหัส ให้เอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้

### 3.1.3.2 ผลการทำ Phenol red inclusion complex test (PICT)

นำทรานสเฟอร์แมนท์ทั้ง 20 โคโลนีที่แสดง amyolytic activity จากข้อ 3.1.3.1 มาตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase ต่อ ด้วยการทำ PICT ซึ่งเป็นการ วัดปริมาณสาร CDs ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ CGTase โดยตรง และมีความจำเพาะ (specificity) ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase สูงกว่าการวัด amyolytic activity

นำทรานสเฟอร์แมนท์มาเพาะเลี้ยงใน PM medium, pH7.4 ที่เสริมฮาปติชีวันอะแอมพิซิลิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข้อ 2.10.5.3) พบว่ามีเพียงทรานสเฟอร์แมนท์หนึ่งทรานสเฟอร์แมนท์ที่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ PM medium จากสีแดงเป็นสีส้มหลังจากบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ 14) ให้ชื่อทรานสเฟอร์แมนท์นี้ว่า SV1 และให้ชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้จาก SV1 ว่า pSV1

จากรูปที่ 14 จะเห็นว่าทรานสเฟอร์แมนที่ได้รับดีเอ็นเอพาหะ pBR322 ไม่สามารถเปลี่ยนสีแดงเข้มของ PM medium ในขณะที่ทรานสเฟอร์แมน SV1 และ *Bacillus A<sub>1,1</sub>* มีความสามารถในการเปลี่ยนสีของ PM medium จากสีแดงเป็นสีส้มแดง และสีส้มแกมเหลืองตามลำดับ แสดงว่าความสามารถในการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ PM medium ของทรานสเฟอร์แมน SV1 จึงไม่ได้เกิดจากยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอพาหะหรือเซลล์เจ้าเรือน แต่เกิดจากยีนดีเอ็นเอของ *Bacillus A<sub>1,1</sub>* ซึ่งนั่นหมายความว่าในส่วนของยีนดีเอ็นเอที่โคลนได้จะต้องมีบางส่วนที่เป็น CGTase gene นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติบอดีของแอนไซม์ CGTase จากทรานสเฟอร์แมน SV1 จะมีแอนติบอดีค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับแอนไซม์จาก *Bacillus A<sub>1,1</sub>* (รูปที่ 14 , หลอดทดลอง ก. และ ข.) ซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกับผลการวัด amyolytic activity ของทรานสเฟอร์แมน SV1 ที่ให้วงใสขนาดเล็กรอบๆ โคลนีเช่นกัน (รูปที่ 13B)

### 3.1.3.3 ผลของ Cyclodextrin-trichloroethylene assay

(CD-TCE assay)

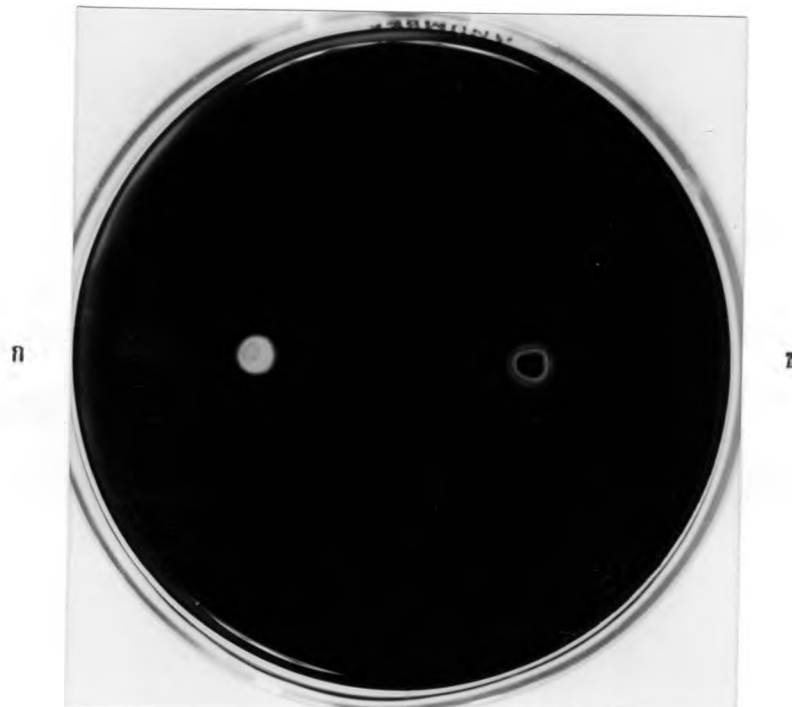
นำทรานสเฟอร์แมน SV1 ที่ให้ผลบวก (positive test) ต่อการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน และ PICT มาทดสอบการสร้างแอนไซม์ CGTase ต่อ โดยการวัดแอนติบอดีของแอนไซม์ CGTase ด้วยวิธี CD-TCE assay ซึ่งเป็นการวัดปริมาณสาร CDs ที่เกิดจากการทำงานของแอนไซม์ CGTase จึงเป็นการวัดแอนติบอดีของแอนไซม์ CGTase โดยตรงและยังได้ใช้เป็นวิธีหนึ่งในการเตรียมสาร CDs เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ต่อไป

เมื่อนำสารละลายแอนไซม์จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (S1), ส่วนของ supernate (S2) และทั้งเซลล์ (PC) (รูปที่ 11) ของทรานสเฟอร์แมน SV1 ที่เจริญใน LB-starch agar , pH 7.4 ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน จำนวน 100 มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาวัดการออกฤทธิ์ของแอนไซม์ CGTase ด้วย CD-TCE assay (ข้อ 2.10.5.4)



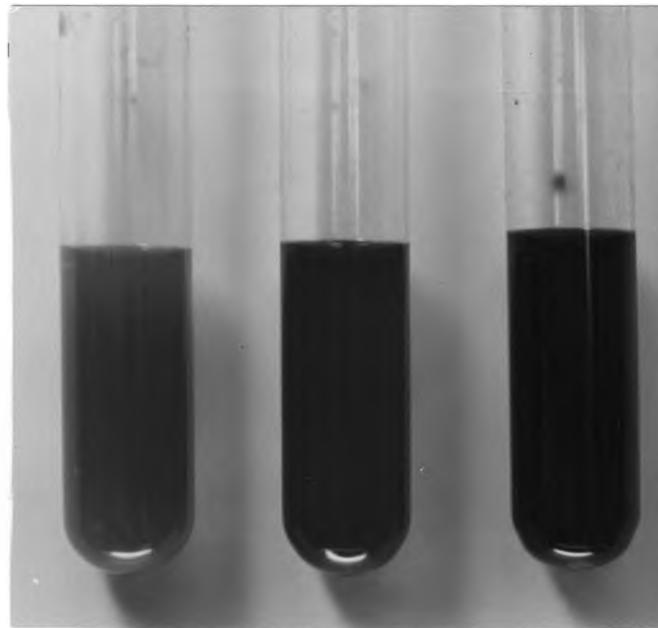
ก                      ข                      ค

รูปที่ 13A ผลการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-starch agar หลังจากบ่มเลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิ 37 ° ซ เป็นเวลา 60 ชั่วโมง  
โคโลนี ก. คือ *E. coli* strain HB101  
โคโลนี ข. คือ *E. coli* strain JM101  
โคโลนี ค. คือ *E. coli* strain DH5 $\alpha$



รูปที่ 13B ผลการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-starch agar ที่เสริมธาตุซีลีเนียมและแอมโมเนียม ในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร  
โคโลนี ก. คือ *E. coli* strain HB101 ที่ได้รับ pBR322  
โคโลนี ข. คือ *E. coli* strain HB101 ที่ได้รับ inserted DNA  
fragment จาก *Bacillus A<sub>11</sub>* ใน pBR322





ก

ข

ค

รูปที่ 14 ผลการทดสอบ Phenol red inclusion complex test หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร PM หรือ PM medium ที่เสริมธาตุชีวอะแอมไพซิลินในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

หลอดทดลอง ก. คือ *Bacillus A<sub>11</sub>*

หลอดทดลอง ข. คือ *E. coli* strain SV1 (pSV1)

หลอดทดลอง ค. คือ *E. coli* strain HB101 containing pBR322

พบว่าสารละลายเอนไซม์จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (S1) และส่วนของ supernate (S2) เท่านั้น  
 ที่ให้ตะกอน CD-TCE complex มี dilution limit เท่ากับ  $2^{-7}$  ทั้งคู่ ในขณะที่ส่วน  
 ทั้งเซลล์ (PC) ไม่พบตะกอน CD-TCE complex

### 3.1.4 การวิเคราะห์ CDs ที่เกิดจากทรานส์ฟอร์มแมนท์ SV1 โดยวิธี HPLC

เมื่อนำตะกอนขาวที่ได้จากการทำ CD-TCE assay มาวิเคราะห์ด้วย HPLC  
 (ข้อ 2.14) พบว่าตะกอนขาวที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (S1) และ  
 supernate (S2) ตามลำดับ ของทรานส์ฟอร์มแมนท์ SV1 (ข้อ 3.1.3.3) ให้ลักษณะของ  
 โครมาโตแกรมเป็น พีค (peak) เดียว และมี retention time เท่ากับ 7.84 และ 7.75  
 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 15 ฉ. และ 15 ช.) ซึ่งมีเวลาใกล้เคียงมากกับ retention time  
 ของ peak ของ standard  $\beta$ -CD ที่มีค่าเท่ากับ 7.66 (รูปที่ 15 ง.) ดังนั้นเพื่อเป็นการ  
 พิสูจน์ว่าตะกอน CD-TCE complex ที่นำมาวิเคราะห์นั้นเป็น  $\beta$ -CD จริงหรือไม่ จึงนำเอา  
 สารละลายตัวอย่างในแต่ละตัวอย่างผสมกับสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -CD ในอัตราส่วน 1:1  
 (โดยปริมาตร) เป็น internal standard ซึ่งควรจะทำให้มีพื้นที่ใต้ peak เพิ่มขึ้นเป็น  
 2 เท่า แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC พบว่าได้ peak เดียวเหมือนเดิมทั้งคู่ โดยมีพื้นที่ใต้ peak  
 เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าจาก peak เดิมโดยประมาณตามที่คาดไว้ และมี retention time  
 เท่ากับ 7.89 และ 7.71 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 15 ซ. และ 15 ฉ.) แสดงว่าตะกอนขาว  
 ที่นำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC คือ  $\beta$ -CD

รูปที่ 15 ลักษณะของโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ CDs จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (ข้อ 2.14) โดยใช้คอลัมน์ Supelco-NH<sub>2</sub> ตัวชะคือ ตัวทำละลายผสม Acetonitrile:water เท่ากับ 75:25 (v/v) อัตราเร็ว 2 มิลลิลิตร ต่อนาที, retentime time มีหน่วยเป็นนาที

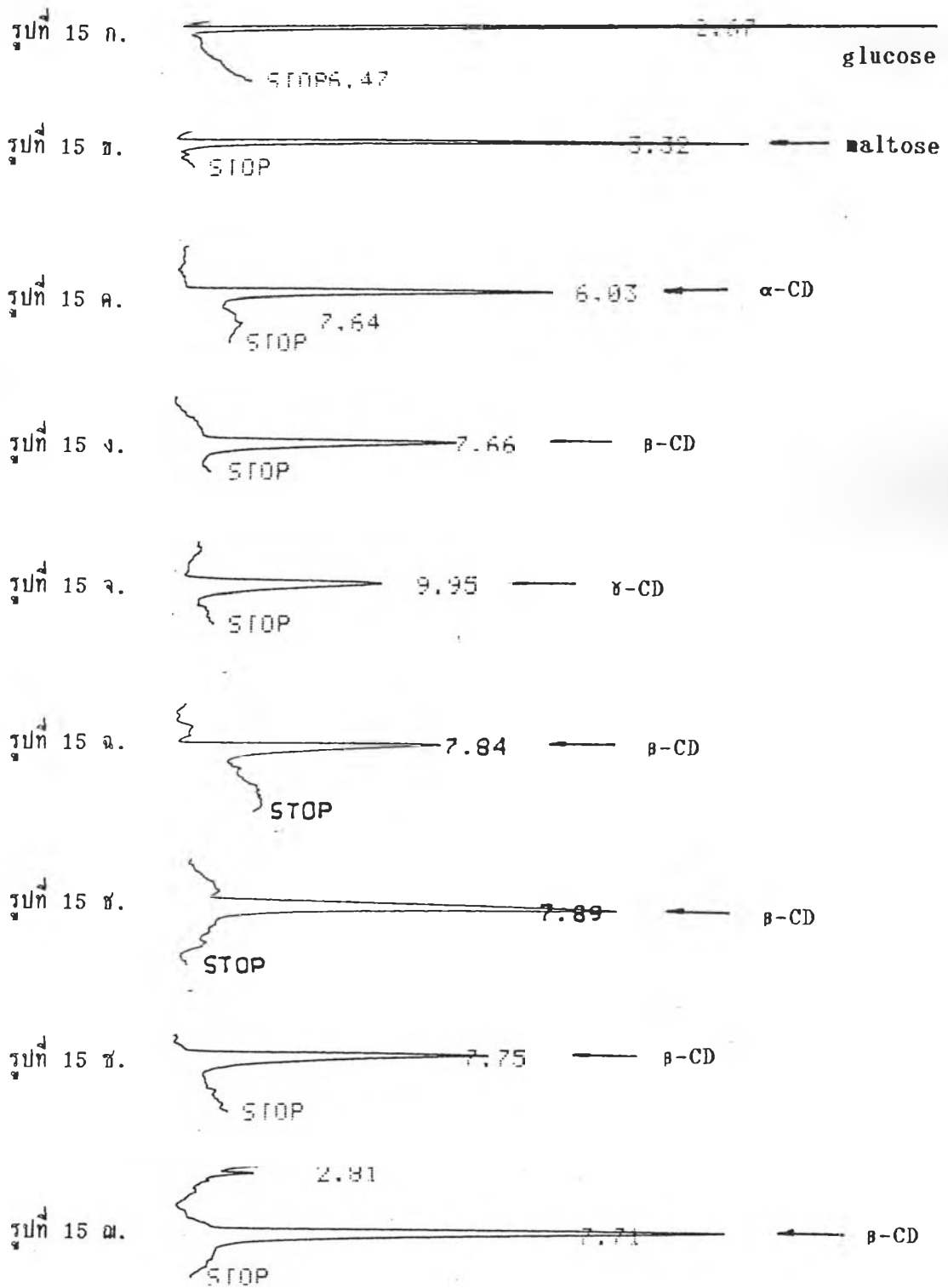
ก.-จ. คือ สารละลายมาตรฐาน glucose, maltose,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, และ  $\gamma$ -CD ตามลำดับ (ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ฉีก 20 ไมโครลิตร)

ฉ. คือ สารละลายของตะกอนชั้นขาวที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในส่วน S1 จากทรานส์ฟอร์มเม้นท์ SV1 (pSV1, ฉีก 20 ไมโครลิตร)

ช. คือ สารละลายของตะกอนชั้นขาวที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในส่วน S1 จากทรานส์ฟอร์มเม้นท์ SV1 (pSV1) ผสมกับสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -CD ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร (ฉีก 40 ไมโครลิตร)

ซ. คือ สารละลายของตะกอนชั้นขาวที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในส่วน S2 จากทรานส์ฟอร์มเม้นท์ SV1 (pSV1, ฉีก 20 ไมโครลิตร)

ด. คือ สารละลายของตะกอนชั้นขาวที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในส่วน S2 จากทรานส์ฟอร์มเม้นท์ SV1 (pSV1) ผสมกับสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -CD ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร (ฉีก 40 ไมโครลิตร)



### 3.2 การสร้างและการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV2, pSV3 และ pSV4

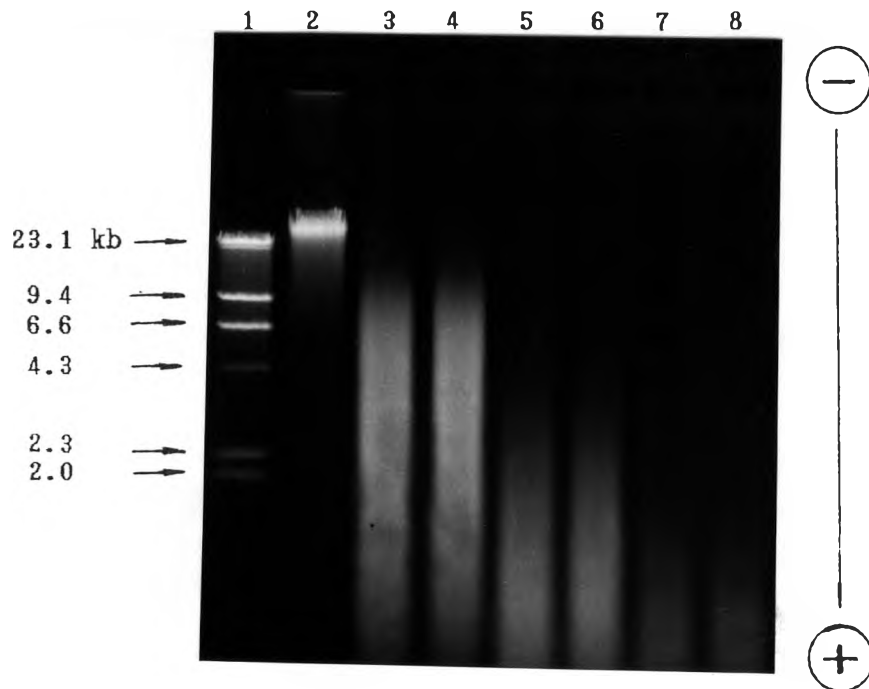
#### 3.2.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1

เมื่อได้ทรานส์ฟอร์มแมนท์ SV1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้แล้ว ก็นำทรานส์ฟอร์มแมนท์ SV1 ที่ได้รับ CGTase gene จาก *Bacillus A<sub>11</sub>* มาสกัดพลาสมิด เพื่อศึกษาถึงขนาด และ restriction site ของ inserted DNA fragment ต่อไป

เมื่อตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่สกัดได้จากทรานส์ฟอร์มแมนท์ SV1 (รูปที่ 16 ช่องที่ 2) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (รูปที่ 16, ช่องที่ 2) เทียบกับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอขนาดมาตรฐานของ  $\lambda$ -DNA ซึ่งถูกย่อยด้วย HindIII พบว่า pSV1 มีขนาดใหญ่กว่า 23 kb

เนื่องจากว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 ที่มีชิ้น CGTase gene อยู่ด้วย มีขนาดของ inserted DNA fragment ใหญ่เกินไป (ประมาณ 20-23 kb) จึงยากแก่การศึกษาถึง restriction map, ขนาด และ ตำแหน่งของ CGTase gene อีกทั้งยังไม่เสถียร โดยพบว่าเมื่อ subculture ของทรานส์ฟอร์มแมนท์ SV1 ไปเรื่อยๆ แอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่มีเลย

ดังนั้นจึงได้ทำการโคลนชิ้นต่อเนื่อง (subcloning) โดยย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 ด้วยเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอชนิด Sau3AI แบบ partial digestion แล้วนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า pSV1 ถูกย่อยเป็นชิ้นขนาดต่างๆกันเห็นเป็นแถบยาวๆลงมา (รูปที่ 16) จะเห็นว่าเมื่อย่อยดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 เป็นเวลา 15 นาที จะได้การกระจายดีเอ็นเอขนาดต่างๆที่ดีที่สุด จึงเลือกตัดอะกาโรสเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2-6 kb (รูปที่ 16, ช่องที่ 3 และ 4) ทั้งนี้เพราะจากรายงานการโคลน CGTase gene จากบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ พบว่า CGTase gene มีขนาดประมาณ 2-3 kb ดังแสดงในตารางที่ 9 และ รูปที่ 3-10 จึงคาดว่า CGTase gene จาก *Bacillus A<sub>11</sub>* เองก็น่าจะมีขนาดใกล้เคียงกัน น่าจะกาโรสเจลที่เลือกตัดมานั้น



รูปที่ 16 ผลของการศึกษาขนาด และการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 แบบ partial digestion บนอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซ็นต์

ช่องที่ 1 คือ standard  $\lambda$ -DNA ย่อยด้วย HindIII

ช่องที่ 2 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1

ช่องที่ 3 และ 4 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 ย่อยด้วย Sau3AI เป็นเวลา 15 นาที

ช่องที่ 5 และ 6 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 ย่อยด้วย Sau3AI เป็นเวลา 30 นาที

ช่องที่ 7 และ 8 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 ย่อยด้วย Sau3AI เป็นเวลา 60 นาที

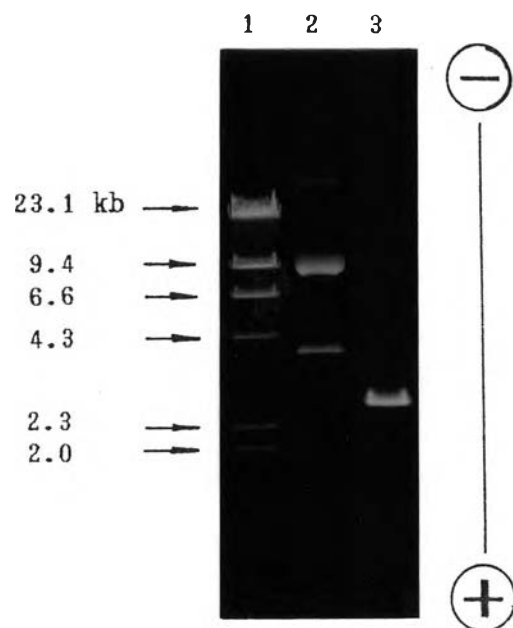
ดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลโดยวิธี electroelution (ข้อ 2.10.1) เพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปทำ ligation ต่อไป

### 3.2.2 การโคลนยีนต่อเนื่อง (subcloning) ของ CGTase gene

ในการโคลนยีนต่อเนื่องครั้งนี้ได้เปลี่ยนดีเอ็นเอพาหะจากพลาสมิด pBR322 เป็น pUC18 ทั้งนี้เพราะว่าพลาสมิด pUC18 เป็น high copy number plasmid และสามารถคัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดได้ง่าย โดยอาศัยหลัก insertion inactivation ของ  $\beta$ -galactosidase ซึ่งไม่ต้องทำ replica plating เช่นในกรณีของพลาสมิด pBR322

นำพลาสมิด pUC18 มาย่อยด้วยเอนไซม์ BamHI แล้วนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นตัดอะกาโรสเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.7 kb (รูปที่ 17, ช่องที่ 3) นำมาแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี electroelution จากนั้นนำมาทำจุ่มฟอสเฟตที่ปลาย 5' ด้วย CIP (ข้อ 2.11)

หลังจากเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC18 ที่มีปลาย BamHI กับชิ้นดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 ขนาด 2-6 kb ที่มีปลาย Sau3AI (ข้อ 2.11) แล้วทรานส์ฟอร์มเข้า *E. coli* strain JM101 กระจายเชื้อบน LB-agar ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน, IPTG และ X-gal บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์เจ้าเรือนที่ได้รับพลาสมิดเท่านั้นจึงจะสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจานนี้ และสามารถคัดเลือกทรานส์ฟอร์มเม้นท์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ออกจากทรานส์ฟอร์มเม้นท์ที่ได้รับพลาสมิด pUC18 ที่เกิดจากการ self ligation ได้โดยอาศัยการคูล์ของโคลนนี้ ซึ่งทรานส์ฟอร์มเม้นท์ที่มีโคลนสีขาว คือทรานส์ฟอร์มเม้นท์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เพราะไม่สามารถสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ที่จะย่อย X-gal ได้ ในขณะที่ทรานส์ฟอร์มเม้นท์ที่มีโคลนสีฟ้า คือทรานส์ฟอร์มเม้นท์ที่ได้รับพลาสมิด pUC18 เพราะมีการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase และสามารถย่อย X-gal ได้ ซึ่งเมื่อ X-gal ถูกย่อยแล้วจะให้สีน้ำเงินออกมา (ข้อ 2.11)



รูปที่ 17 ผลการย่อยพลาสมิด pUC18 ด้วย BamHI บนอะกาโรสเจล 8 เปอร์เซ็นต์  
 ช่องที่ 1 คือ standard  $\lambda$ -DNA ย่อยด้วย HindIII  
 ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอพาหะ pUC18  
 ช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ย่อยด้วย BamHI แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด  
 2.7 kb นำไป ligation ต่อไป



พบว่าทรานสเฟอร์แมนที่เจริญได้มีทั้งหมด 1,311 โคลนี เป็นทรานสเฟอร์แมนที่มี โคลนีสีขาวและสีฟ้าจำนวน 739 และ 572 โคลนี ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถคำนวณ การเกิดรีคอมบิเนชันระหว่างพลาสมิด pUC18 กับชิ้นดีเอ็นเอจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 ได้มีค่าประมาณ 56 เปอร์เซ็นต์

### 3.2.3 การคัดเลือกทรานสเฟอร์แมนที่ได้รับ CGTase gene

#### 3.2.3.1 ผลการวัด Amylolytic Activity

เมื่อนำทรานสเฟอร์แมนที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้ง 739 โคลนี จากข้อ 3.2.2 มาเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-starch agar, pH 7.4 ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และ IPTG เพื่อกระตุ้นให้ *lac* promoter ทำงาน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบกับสารละลายไอโอดีน (ข้อ 2.10.5.2) พบว่ามีทรานสเฟอร์แมนที่ จำนวน 3 โคลนี ที่ให้วงใสรอบโคลนี ซึ่งแสดงถึงการมี amylolytic activity ของ ทรานสเฟอร์แมนทั้งสาม ให้ชื่อทรานสเฟอร์แมนที่สร้างขึ้นใหม่ว่า SV2, SV3 และ SV4 และ ให้ชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้จากทรานสเฟอร์แมนเหล่านี้ว่า pSV2, pSV3 และ pSV4 ตามลำดับ

รูปที่ 18 แสดง amylolytic activity ของทรานสเฟอร์แมนทั้งสาม ซึ่งจากรูป จะเห็นว่าทรานสเฟอร์แมนทั้งสามจะให้วงใสที่มีขนาดใหญ่มาก เมื่อเปรียบเทียบกับวงใสที่เกิด จากทรานสเฟอร์แมน SV1 (รูปที่ 13B) โดยที่เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร ในขณะที่ทรานสเฟอร์แมนที่ได้รับพลาสมิด pUC18 ไม่ให้ วงใส รอบโคลนี

#### 3.2.3.2 ผลการทำ Phenol red inclusion complex test (PITC)

เมื่อนำทรานสเฟอร์แมน SV2, SV3 และ SV4 ที่แสดง amylolytic activity จากข้อ 3.2.3.1 มาตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase ต่อ ด้วยการทำ PITC โดย



รูปที่ 18 ผลการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-starch agar ที่เสริมฮาปทิวินอะแอมพิซิลิน และ IPTG ในปริมาณ 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากบ่มเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

โคโลนี ก. คือ *E. coli* strain JM101 containing pUC18

โคโลนี ข. คือ *E. coli* strain JM101 containing pSV2(SV2)

โคโลนี ค. คือ *E. coli* strain JM101 containing pSV3(SV3)

โคโลนี ง. คือ *E. coli* strain JM101 containing pSV4(SV4)

นำทรานสเฟอร์แมนท์ทั้งสามมาเพาะเลี้ยงใน PM medium ที่เสริมฮาปิชีวาระแนมพิซิลิน และ IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข้อ 2.10.5.3) พบว่าทรานสเฟอร์แมนท์ SV2 และ SV3 สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ PM medium จากสีแดงเป็นสีเหลือง เมื่อบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ 19) ในขณะที่ทรานสเฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pUC18 และ SV4 ไม่สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แม้ว่าจะบ่มเลี้ยงเป็นเวลานานถึง 96 ชั่วโมง (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง)

จากรูปที่ 19 ที่แสดงผลการทดสอบ PICT จะเห็นว่าทรานสเฟอร์แมนท์ SV2 และ SV3 สามารถเปลี่ยนสีของ PM medium เป็นสีเหลืองได้ดีกว่าทรานสเฟอร์แมนท์ SV1 มาก ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับผลการวัด amyolytic activity ของทรานสเฟอร์แมนท์ SV1, SV2 และ SV3 (รูปที่ 13B และ 18 ตามลำดับ) และยังคงเหมือนว่าทรานสเฟอร์แมนท์ SV2 และ SV3 น่าจะแสดงแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase ได้สูงกว่า *Bacillus A<sub>11</sub>* จากการพิจารณาการเปลี่ยนสีของ PM medium

### 3.2.3.3 ผลการศึกษาถึงอิทธิพลของ IPTG ที่มีต่อ CGTase activity ของทรานสเฟอร์แมนท์ SV2 และ SV3 โดยการทำให้ PICT

จากการที่ทรานสเฟอร์แมนท์ SV2 และ SV3 มี amyolytic activity สูง และแสดงแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase ได้สูงและคาดที่น่าจะสูงกว่า *Bacillus A<sub>11</sub>* จากการทำให้ PICT ในข้อ 3.2.3.2 นั้น ในการทดลองครั้งนั้นได้เสริม IPTG ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ซึ่ง IPTG เป็นตัวกระตุ้น (inducer) ต่อ *lac* promoter ที่อยู่บนพลาสมิด pUC18 ดังนั้นจึงคาดว่าทิศทางในการถอดรหัสของ CGTase gene น่าจะอยู่ภายใต้การควบคุมของ *lac* promoter จึงได้ทำการทดลองโดยนำทรานสเฟอร์แมนท์ SV2 และ SV3 มาเจริญใน PM medium ที่ไม่เสริมและเสริม IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าทรานสเฟอร์แมนท์ทั้งสองที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริม IPTG สามารถเปลี่ยนสีของ PM medium ให้เป็นสีเหลือง ในขณะที่เมื่อเจริญในอาหาร



เลี้ยงเชื้อที่ไม่เสริม IPTG ไม่สามารถเปลี่ยนสีของ PM medium ได้ (รูปที่ 20) นั้นแสดงว่า CGTase gene ที่โคลนได้อาศัยใต้การควบคุมของ *lac* promoter บนพลาสมิด pUC18

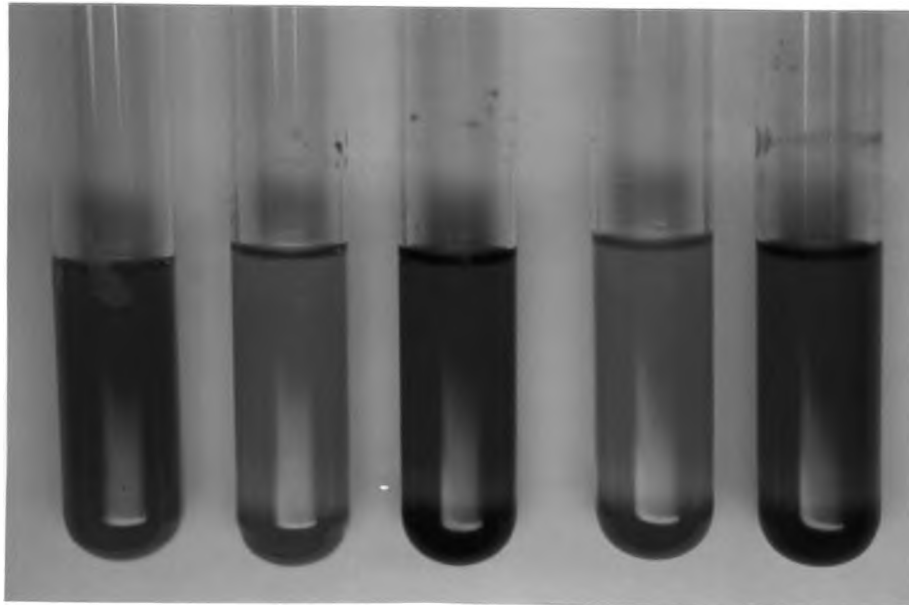
### 3.2.3.4 ผลของ Cyclodextrin-trichloroethylene assay

(CD-TCE assay)

นำทรานสฟอร์มแมนท์ SV2 และ SV3 ที่ให้ผลบวก (positive test) ต่อการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน และ PICT มาทำ CD-TCE assay ต่อ (ข้อ 2.10.5.4) โดยนำทรานสฟอร์มแมนท์ทั้งสองมาเจริญใน LB-starch broth จำนวน 100 มิลลิลิตร ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และขณะเดียวกันจะเสริมและไม่เสริม IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายเอนไซม์จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (S1), ส่วนของ supernate (S2) และทั้งเซลล์ (PC) (รูปที่ 11) ของทรานสฟอร์มแมนท์ทั้งสอง มาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase พบว่าสารละลายเอนไซม์จากส่วน S1 และ S2 ของทรานสฟอร์มแมนท์ SV2 และ SV3 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริม IPTG จะให้ตะกอน CD-TCE complex มี dilution limit เท่ากับ  $2^1$  เท่ากัน ในขณะที่ส่วนของทั้งเซลล์ (PC) ไม่พบตะกอน ในกรณีของทรานสฟอร์มแมนท์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เสริม IPTG จะไม่พบตะกอน CD-TCE complex เช่นกัน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองถึงอิทธิพลของ IPTG ต่อการแสดง CGTase activity ข้างต้น

### 3.2.4 ผลการศึกษาขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV2 และ pSV3

เมื่อได้ทรานสฟอร์มแมนท์ SV2 และ SV3 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้แล้วก็นำทรานสฟอร์มแมนท์ทั้งสองมาสกัดพลาสมิด และให้ชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้จากทรานสฟอร์มแมนท์ SV2 และ SV3 ว่า pSV2 และ pSV3 ตามลำดับ



ก                      ข                      ค                      ง                      จ

รูปที่ 20 ผลของอิทธิพลของ IPTG ต่อการแสดงแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร PM หรือ PM medium ที่เสริมแอมพิซิลิน และ IPTG ในปริมาณ 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับหลอดทดลอง ข. และ ง. แต่เสริมเฉพาะแอมพิซิลินในหลอดทดลอง ค. และ จ. ตามลำดับ หลอดทดลอง ก. คือ *Bacillus A<sub>1</sub>*,

หลอดทดลอง ข. คือ *E. coli* strain SV2

+ IPTG 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลอดทดลอง ค. คือ *E. coli* strain SV2 - IPTG

หลอดทดลอง ง. คือ *E. coli* strain SV3

+ IPTG 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

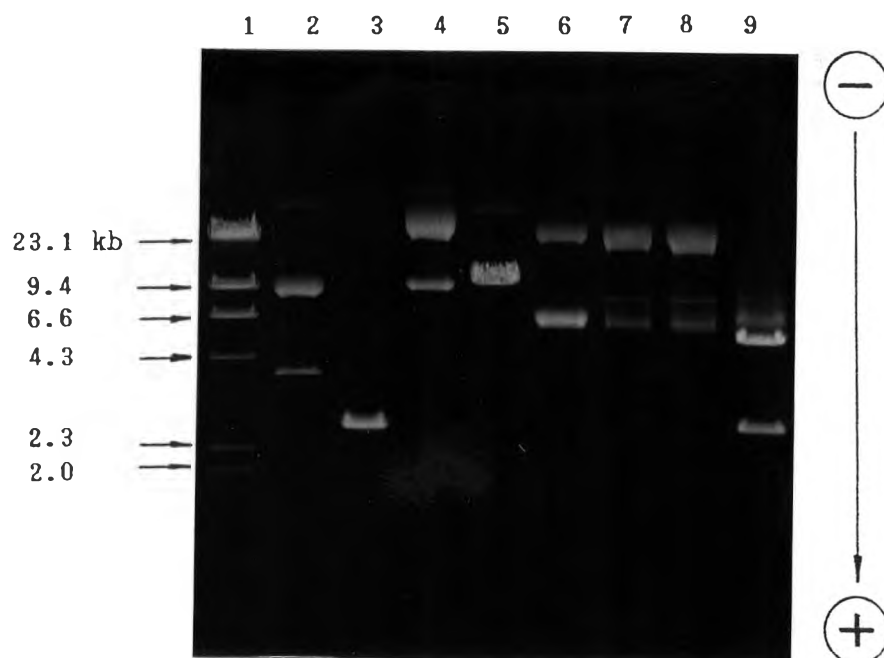
หลอดทดลอง จ. คือ *E. coli* strain SV3 - IPTG

ภายหลังการตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV2 และ pSV3 ในลักษณะที่ไม่ถูกย่อย และ ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ PstI และ/หรือ KpnI ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอกับขนาดมาตรฐานของ  $\lambda$ -DNA ซึ่งย่อยด้วย HindIII พบว่า pSV2 และ pSV3 มีขนาดประมาณ 9.5 และ 7.9 kb ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV2 และ pSV3 มี inserted DNA fragment ขนาดประมาณ 6.8 และ 5.2 kb ตามลำดับ (รูปที่ 21)

### 3.2.5 ผลการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ด้วยเอนไซม์ Restriction endonuclease

จากการศึกษาขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV2 และ pSV3 จากข้อ 3.2.4 พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 มีขนาดเล็กกว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV2 (รูปที่ 21) จึงเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 มาศึกษา restriction map คือ เพราะการศึกษา restriction site ของ inserted DNA fragment ที่มีขนาดเล็กกว่าสามารถทำได้ง่ายกว่า และใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาหาตำแหน่งของ CGTase gene บน inserted DNA fragment ได้อีกด้วย

หลังจากทำการศึกษากการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ด้วยเรสติกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น EcoRI, BamHI, HindIII, PvuII, PstI, KpnI, Sali และ NdeI ตามลำดับ ซึ่งพลาสมิด pUC18 จะมี restriction site ของเอนไซม์เหล่านี้อยู่ เมื่อนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (แสดงผลการทดลองบางส่วนในรูปที่ 21) พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ไม่ถูกย่อยด้วยเรสติกชันเอนไซม์เหล่านี้ แม้ว่าจะได้ลดปริมาณของดีเอ็นเอที่นำมาย่อยเป็น 100 นาโนกรัม และเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 20 หน่วย คือ reaction mixture และเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 โดยการเปลี่ยนเซลล์เจ้าเรือนจาก *E. coli* สายพันธุ์ JM101 มาเป็นสายพันธุ์ HB101 และ DH5 $\alpha$  แล้วก็ตามยังคงให้ผลการทดลองเหมือนเดิม ยกเว้นการย่อยด้วยเรสติกชัน



รูปที่ 21 ผลของการศึกษาขนาด และ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

pSV2 และ pSV3 บนอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์

ช่องที่ 1 คือ standard  $\lambda$ -DNA ย่อยด้วย HindIII

ช่องที่ 2 คือ พลาสมิด pUC18

ช่องที่ 3 คือ พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 4 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV2

ช่องที่ 5 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV2 ย่อยด้วย PstI

ช่องที่ 6 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3

ช่องที่ 7 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ย่อยด้วย PstI

ช่องที่ 8 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ย่อยด้วย KpnI

ช่องที่ 9 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ย่อยด้วย PstI และ KpnI แยกกัน

ดีเอ็นเอขนาด 5.2 kb นำไปทำ ligation ต่อไป



เอนไซม์ PvuII, PstI และ KpnI ตามลำดับ ที่ให้ลักษณะของดีเอ็นเอที่ถูกย่อยได้บ้าง

### 3.3 การสร้างและการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5

#### 3.3.1 การโคลนยีนต่อเนืองของ CGTase gene จาก รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3

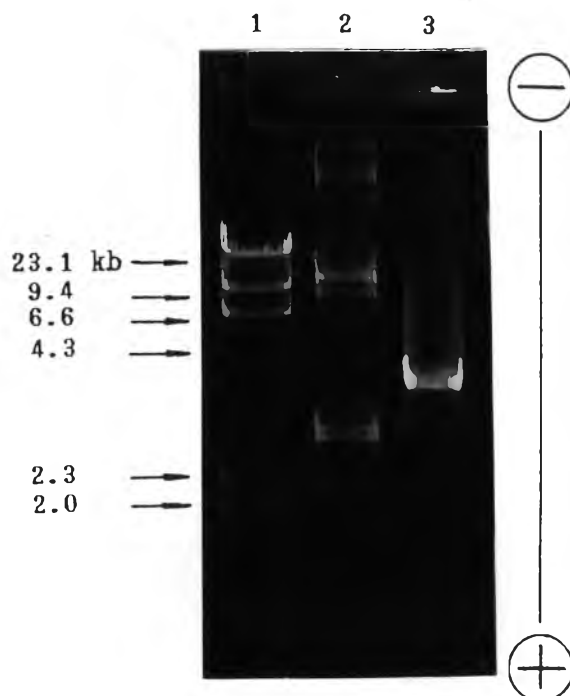
จากปัญหาที่เกิดขึ้นในการทำ restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 (ข้อ 3.2.5) จึงตัดสินใจโคลนยีนต่อเนืองอีกครั้ง โดยเปลี่ยนดีเอ็นเอพาหะจากพลาสมิด pUC18 เป็นพลาสมิด pSE411 ซึ่งเป็น expression vector ที่มี strong promoter คือ *tac* promoter และมีทิศทางในการถอดรหัสไปในทิศทางเดียวกันกับ *lac* promoter ของพลาสมิด pUC18 จากผลการศึกษาในข้อ 3.2.3.3 และ 3.2.3.4 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า CGTase gene อยู่ภายใต้การควบคุมของ *lac* promoter จึงเป็นการดีที่จะย้าย CGTase gene เข้าไปในพลาสมิด pSE411 เพราะนอกจากคาดว่าจะสามารถแก้ปัญหาการศึกษา restriction map แล้วยังสามารถทำให้ CGTase gene ที่โคลนได้อยู่ภายใต้การควบคุมของ *tac* promoter ด้วย

สำหรับการโคลนยีนดีเอ็นเอที่ต้องการกำหนดทิศทางของการเข้าเชื่อมกัน ระหว่างดีเอ็นเอพาหะและยีนดีเอ็นเอ สามารถทำได้โดยการตัดต่อด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด ที่ให้ปลายเหนียวของยีนดีเอ็นเอทั้งสองข้าง ไม่สามารถเชื่อมต่อกันตามกฎเบสคู่สมได้เพื่อป้องกันการเกิด self ligation ดังนั้นจึงเลือกใช้เอนไซม์ PstI และ KpnI ในการโคลนยีนครั้งนี้ เพราะทั้งรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 และพลาสมิด pSE411 มี restriction site PstI และ KpnI บน multiple cloning site และมีทิศทางในการถอดรหัสไปในทิศทางเดียวกันอีกด้วย และที่สำคัญคือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 มีแนวโน้มที่จะถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ PstI และ KpnI เพียง 2 ชนิดนี้เท่านั้น

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 มาย่อยด้วยเอนไซม์ PstI และ KpnI (ข้อ 2.12) แล้วนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าเอนไซม์ทั้งสองไม่สามารถย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ได้อย่างสมบูรณ์ แต่ก็ได้แสดงแถบของชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC18 และ inserted DNA fragment ออกมาแสดงว่าดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 โดยส่วนใหญ่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสอง ตัดอะกาโรสเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.2 kb (รูปที่ 21, ช่องที่ 9) ซึ่งคาดว่าเป็น inserted DNA fragment ที่มี CGTase gene อยู่ แล้วนำอะกาโรสเจลที่เลือกตัด มาแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลโดยวิธี electroelution (ข้อ 2.10.1) เพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอไปทำ ligation ต่อไป

นำดีเอ็นเอพาหะ pSE411 มาย่อยด้วยเอนไซม์ PstI และ KpnI นำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วตัดอะกาโรสเจลที่มีแถบของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4 kb (รูปที่ 22) นำมาแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี electroelution

หลังจากเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอพาหะที่มีปลาย PstI และ KpnI ทั้งแบบไม่ผสมและผสม กับชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.2 kb ที่มีปลาย PstI และ KpnI ซึ่งแยกได้จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 แล้วทรานส์ฟอร์มเข้า *E. coli* strain HB101 หลังจากนั้นกระจายเชื้อบน LB-gar ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์เจ้าเรือนที่ได้รับพลาสมิดเท่านั้นจึงจะสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้องานนี้ได้ พบว่า ligation mixture ที่มีเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิด pSE411 ให้ทรานส์ฟอร์มเม้นท์จำนวน 7 โคโลนี ซึ่งน่าจะเกิดจากพลาสมิด pSE411 บางส่วนถูกย่อยด้วยเอนไซม์เพียงชนิดเดียวซึ่งปนเปื้อนมากับพลาสมิดที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด ทำให้ชิ้นดีเอ็นเอพาหะที่ถูกย่อยตำแหน่งเดียวเกิดการ self ligation ได้ ในขณะที่ ligation mixture ที่มีชิ้นดีเอ็นเอพาหะผสมรวมกับชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.2 kb ที่แยกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ให้ทรานส์ฟอร์มเม้นท์ทั้งหมด 359 โคโลนี แสดงว่าทรานส์ฟอร์มเม้นท์



รูปที่ 22 ผลของการย่อยพลาสมิด pSE411 ด้วย PstI และ KpnI บนอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์

ช่องที่ 1 คือ standard  $\lambda$ -DNA ย่อยด้วย HindIII

ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอพาหะ pSE411

ช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอพาหะ pSE411 ย่อยด้วย PstI และ KpnI

แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4 kb นำไปทำ ligation ต่อไป

ส่วนใหญ่เกิดจากการที่เซลล์เจ้าเรือนได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างขึ้นใหม่ ดังนั้นจึงเลือก  
ทรานสเฟอร์แมนท์มา 1 โคโลนี แบบสุ่มจากทรานสเฟอร์แมนท์ทั้งหมด เพื่อนำไปทดสอบแอกติวิตี  
ของเอนไซม์ CGTase ต่อไป

### 3.3.2 ผลการวัด Amylolytic Activity

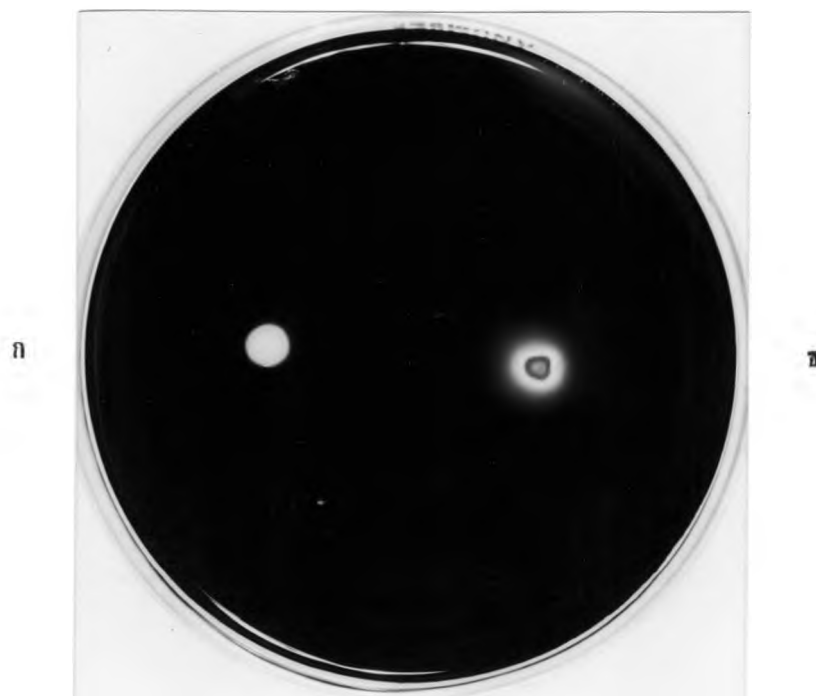
เมื่อนำทรานสเฟอร์แมนท์ที่สุ่มเลือกจากข้อ 3.3.1 มาเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ  
LB-starch agar, pH 7.4 ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา  
60 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบกับสารละลายไอโอดีน (ข้อ 2.10.5.2) พบว่าทรานสเฟอร์แมนท์  
ที่สร้างขึ้นใหม่ให้วงใสรอบโคโลนี โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.2 เซนติเมตร ในขณะที่  
ทรานสเฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pSE411 ไม่ให้วงใสรอบโคโลนี ให้ชื่อทรานสเฟอร์แมนและ  
รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างขึ้นใหม่ว่า SV5 และ pSV5 (รูปที่ 23)

### 3.3.3 ผลการทำ Phenol red inclusion complex test (PICT)

เมื่อนำทรานสเฟอร์แมนท์ SV5 มาตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ CGTase ต่อ ด้วย  
การทำ PICT โดยนำทรานสเฟอร์แมนท์ SV5 มาเพาะเลี้ยงใน PM medium ที่เสริมยา  
ปฏิชีวนะแอมพิซิลิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C พบว่าทรานสเฟอร์แมนท์ SV5 สามารถเปลี่ยนสีของ  
อาหารเลี้ยงเชื้อ PM medium จากสีแดงเป็นสีเหลือง เมื่อบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง  
ในขณะที่ทรานสเฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pSE411 ไม่สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อได้  
(รูปที่ 24)

### 3.3.4 ผลของ Cyclodextrin-trichloroethylene assay (CD-TCE assay)

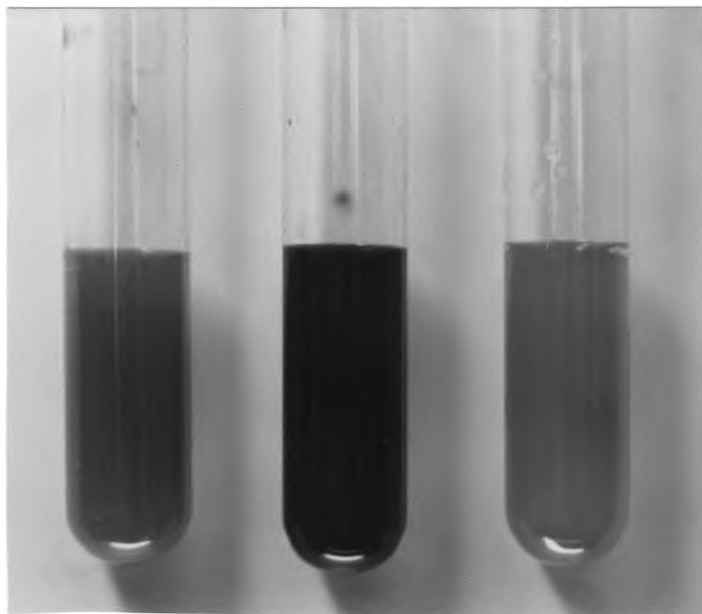
นำทรานสเฟอร์แมนท์ SV5 มาเจริญใน LB-starch broth, pH 7.4 ที่เสริมยา  
ปฏิชีวนะแอมพิซิลิน จำนวน 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำ  
สารละลายเอนไซม์จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (S1), ส่วนของ supernate (S2) และทั้งเซลล์



รูปที่ 23 ผลของการทดสอบด้วยสารไอโอดีนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-starch agar ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากบ่มเลี้ยงเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

โคโลนี ก. คือ *E. coli* strain HB101 containing pSE411

โคโลนี ข. คือ *E. coli* strain HB101 containing pSV5 (SV5)



ก

ข

ค

รูปที่ 24 ผลการทดสอบ Phenol red inclusion complex test หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหาร PM หรือ PM medium ที่เสริมธาตุชีวอะนอมฟอสฟอรัสในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

หลอดทดลอง ก. คือ *Bacillus A<sub>11</sub>*

หลอดทดลอง ข. คือ *E. coli* strain HB101 containing pSE411

หลอดทดลอง ค. คือ *E. coli* strain SV5 (pSV5)

(PC) (รูปที่ 11) มาทดสอบแอสติวิตีของเอนไซม์ CGTase โดยการทำให้ CD-TCE assay (ข้อ 2.10.5.4) พบว่าสารละลายเอนไซม์จากส่วน S1 และ S2 ให้ตะกอน CD-TCE complex มี dilution limite เท่ากับ  $2^1$  ทั้งคู่ ในขณะที่ส่วน PC ไม่พบตะกอน CD-TCE complex เลย

### 3.3.5 การวิเคราะห์ CDs ที่เกิดจากทรานส์ฟอร์มเม้นท์ SV5 โดยวิธี HPLC

เมื่อนำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมจากตะกอน CD-TCE complex และเตรียมจาก reaction mixture โดยตรง ซึ่งไม่ต้องตกตะกอน CDs ด้วย TCE มาวิเคราะห์ CDs ด้วย HPLC (ข้อ 2.14) พบว่าสารละลายตัวอย่างที่เตรียมจากตะกอน CD-TCE complex ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (S1) และส่วนของ supernate (S2) ตามลำดับ (รูปที่ 11) ของทรานส์ฟอร์มเม้นท์ SV5 ให้ลักษณะของโครมาโตแกรมเป็น peak เดี่ยว และมี retention time เท่ากับ 7.19 นาที ทั้งคู่ (รูปที่ 25 ก. และ 25 ข.) ซึ่งมีเวลาใกล้เคียงกับ retention time ของ peak ของ standard  $\beta$ -CD ที่มีค่าเท่ากับ 7.24 นาที มาก (รูปที่ 25 ค.) ดังนั้นจึงนำเอาสารละลายตัวอย่างในแต่ละตัวอย่างผสมกับสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -CD ในอัตราส่วน 1:1 (โดยปริมาตร) ใช้เป็น internal standard แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC พบว่าได้ peak เดี่ยวเหมือนเดิมทั้งคู่โดยมีพื้นที่ใต้ peak เพิ่มขึ้นจาก peak เดิมประมาณ 2 เท่า และมี retention time เท่ากับ 7.24 และ 7.25 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 25 ง. และ 25 จ.) นั้นแสดงว่าตะกอนขาวที่นำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC คือ  $\beta$ -CD

สำหรับสารละลายตัวอย่างที่เตรียมจาก reaction mixture ก็พบว่าสารละลายเอนไซม์จากส่วน S1 และ S2 ของทรานส์ฟอร์มเม้นท์ SV5 สามารถเปลี่ยนแป้งไปเป็น CDs ได้ทั้ง 3 ชนิดคือ  $\alpha$ -,  $\beta$ -, และ  $\gamma$ -CD ในอัตราส่วนเท่ากับ 1:1.9:6 และ 1:1.4:3.1 ตามลำดับโดยพิจารณาจากพื้นที่ใต้ peak นั้นแสดงว่า TCE สามารถตกตะกอน CDs ได้เฉพาะ  $\beta$ -CD เท่านั้น (รูปที่ 25)

รูปที่ 25 ลักษณะของโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ CDs จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (ข้อ 2.14) โดยใช้คอลัมน์ Supelco-NH<sub>2</sub> ตัวชะคือ ตัวทำละลายผสม Acetonitrile:water เท่ากับ 75:25 (V/V) อัตราเร็ว 2 มิลลิลิตร ต่อนาที, retention time มีหน่วยเป็นนาที

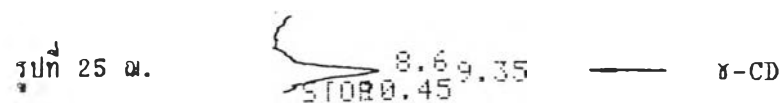
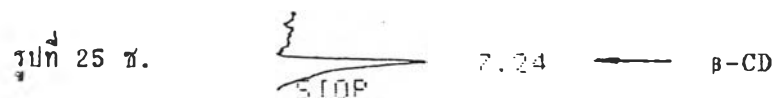
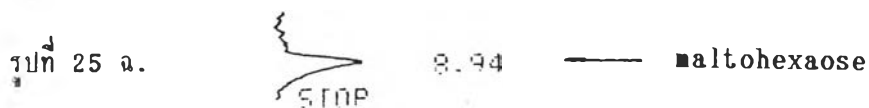
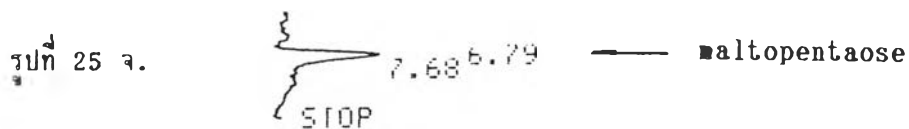
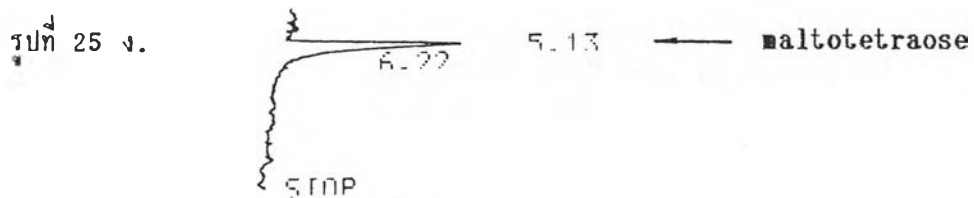
ก.-ง. คือ สารละลายมาตรฐาน glucose , maltotriose, maltotetraose, maltopentaose , maltohexaose ,  $\alpha$ - ,  $\beta$ - และ  $\gamma$ -CD ตามลำดับ (ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร , ฉีด 20 ไมโครลิตร)

ญ.-ฉ. คือ สารละลายของตะกอนชั้นขาวที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ ในส่วน S1 และ S2 ตามลำดับ จากทรานส์ฟอร์มเมนต์ SV5 (pSV5, ฉีดอย่างละ 20 ไมโครลิตร)

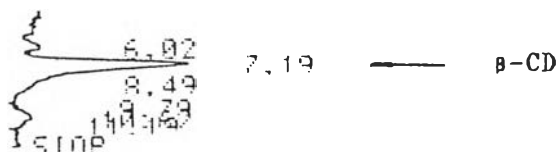
ค.-ช. คือ สารละลายของตะกอนชั้นขาวที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ ในส่วน S1 และ S2 ตามลำดับ จากทรานส์ฟอร์มเมนต์ SV5 (pSV5) ผสมกับสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -CD ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร (ฉีดอย่างละ 40 ไมโครลิตร)

ท.-ฑ. คือ สารละลายตัวอย่างที่เตรียมจาก reaction mixture ของสารละลาย เอนไซม์ S1 และ S2 ตามลำดับ จากการทรานส์ฟอร์มเมนต์ SV5 (pSV5, ฉีดอย่างละ 20 ไมโครลิตร)

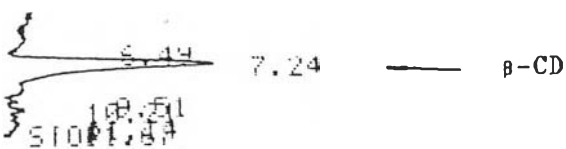




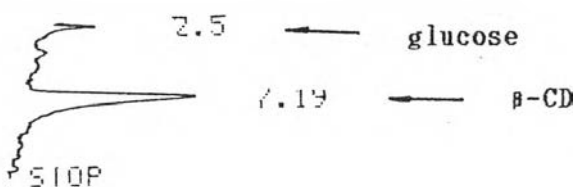
รูปที่ 25 จ.



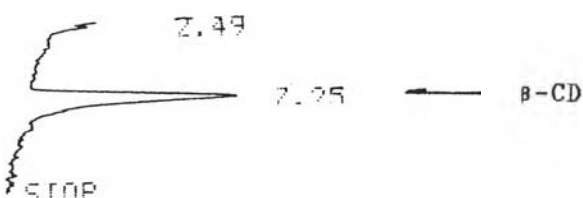
รูปที่ 25 ฉ.



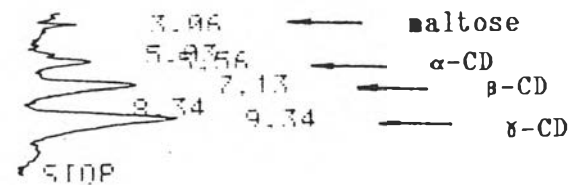
รูปที่ 25 ฉ.



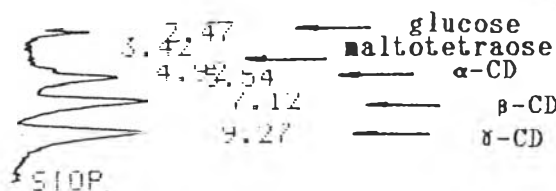
รูปที่ 25 ช.



รูปที่ 25 ซ.



รูปที่ 25 ฑ.



3.3.6 ผลของการศึกษาถึงความแตกต่างในการสร้างโปรตีนจากเซลล์เจ้าเรือน (*E. coli* strain HB 101), ทรานสเฟอร์แมนที่ที่ได้รับพลาสมิด pSE411 และ pSV5 ด้วย เอสดีเอส-โพลีอะโครลาไมด์เจลชนิดแผ่น

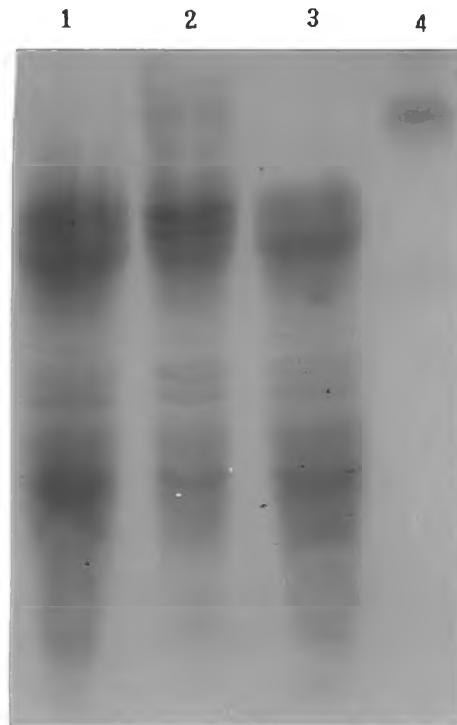
นำ *E. coli* strain HB101 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB-broth ส่วน ทรานสเฟอร์แมนที่ที่ได้รับพลาสมิด pSE411 และ pSV5 เพาะเลี้ยงใน LB-broth ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิซิลิน จำนวน 1 มิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ แล้วเติม sample buffer เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเอสดีเอส-โพลีอะโครลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยมีเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus A<sub>11</sub>* ที่แยกได้ก่อนข้างบริษัท เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบวิเคราะห์ผล (ข้อ 2.15)

จากรูปที่ 26 ที่แสดงแถบของโปรตีนจากการทำเอสดีเอส-โพลีอะโครลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าทรานสเฟอร์แมน SV5 จะสร้างโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus A<sub>11</sub>* ในขณะที่เซลล์เจ้าเรือนและทรานสเฟอร์แมนที่ที่ได้รับพลาสมิด pSE411 จะไม่ปรากฏแถบโปรตีนดังกล่าว จึงคาดว่าโปรตีนนี้สร้างขึ้นโดยการถอดรหัสของ CGTase gene ที่โคลนได้ในทรานสเฟอร์แมน SV5

3.3.7 ศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV 5

จากผลการทดสอบ amyolytic activity, PICT, CD-TCE assay และการวิเคราะห์ CDs ด้วย HPLC รวมทั้งการที่ทรานสเฟอร์แมน SV5 ได้ให้แถบโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับเอนไซม์ CGTase นั้นแสดงว่า inserted DNA fragment ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ดังกล่าวมี CGTase gene อยู่ด้วย

ภายหลังการตรวจสอบจนเป็นที่แน่ใจได้ว่าสามารถโคลน CGTase gene จาก *Bacillus A<sub>11</sub>* เข้าไปในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 จึงทำการศึกษา restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ค่อยๆ โดยเจริญทรานสเฟอร์แมน SV5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-broth ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิซิลิน จำนวน 100 มิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C



รูปที่ 26 รูปแบบโปรตีนของเอนไซม์ CGTase ที่แยกผ่านคอลัมน์ คีอีเออี-เซลลูโลส, โปรตีนที่สร้างจากเซลล์เจ้าเรือน และ ทรานส์ฟอร์แมนท์ แยกโดยเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 10 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 30 mA ต่อแผ่นเจล ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง (ข้อ 2.15)

ช่องที่ 1 คือ แถบโปรตีนที่สร้างจาก *E. coli* (เซลล์เจ้าเรือน)

ช่องที่ 2 คือ แถบโปรตีนที่สร้างจาก ทรานส์ฟอร์แมนท์ SV5 (pSV5)

ช่องที่ 3 คือ แถบโปรตีนที่สร้างจาก *E. coli* containing pSE411

ช่องที่ 4 คือ CGTase (12 ไมโครกรัมโปรตีน)

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline extraction (ข้อ 2.7.2) จากนั้นก็นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 มาศึกษาขนาดและ restriction site โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ แล้วนำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับขนาดมาตรฐานของ  $\lambda$ -DNA ซึ่งย่อยด้วย HindIII พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 มีขนาดประมาณ 9.2 kb และเมื่อย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ด้วย PstI และ KpnI แล้วนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบของชิ้นดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดเท่ากับ 4 และ 5.2 kb ซึ่งก็คือชิ้นดีเอ็นเอจากพลาสมิด pSE411 และ inserted DNA fragment ที่โคลนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ตามลำดับ (รูปที่ 27, ช่องที่ 6)

จากการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 27-32 พบว่า restriction site ที่ไม่มีอยู่บน inserted DNA fragment คือ BamHI, BglII, ClaI, EcoRI, PstI, ScaI, XbaI และ XhoI เป็นที่น่าสังเกตว่าเอนไซม์ BamHI ไม่สามารถย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ได้ แสดงว่า restriction site BamHI ได้สูญเสียไปแล้ว ภายหลังจากการโคลนในขั้นตอนการเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3

รูปที่ 28 ช่องที่ 6 และ 8 แสดงให้เห็นว่ามีตำแหน่งของ HpaI และ PvuII อย่างละ 1 ตำแหน่งบน inserted DNA fragment และรูปที่ 29 ช่องที่ 3, 4 และ 6 พบว่าตำแหน่ง HpaI อยู่ห่างจากตำแหน่ง KpnI บนดีเอ็นเอพาหะประมาณ 2.2 kb โดยตำแหน่ง PvuII น่าจะอยู่ downstream จากตำแหน่ง HpaI ประมาณ 0.1 kb นอกจากนี้จากรูปที่ 32 ช่องที่ 2 และ 3 ยังพบว่าตำแหน่ง HpaI อยู่ห่างจากตำแหน่ง PstI บนดีเอ็นเอพาหะมากกว่าตำแหน่ง PvuII ประมาณ 0.1 kb จริง และมีขนาดประมาณ 3 kb ซึ่งสอดคล้องกันกับเมื่อ PstI อยู่ห่างจากตำแหน่ง KpnI บนดีเอ็นเอพาหะประมาณ 5.2 kb

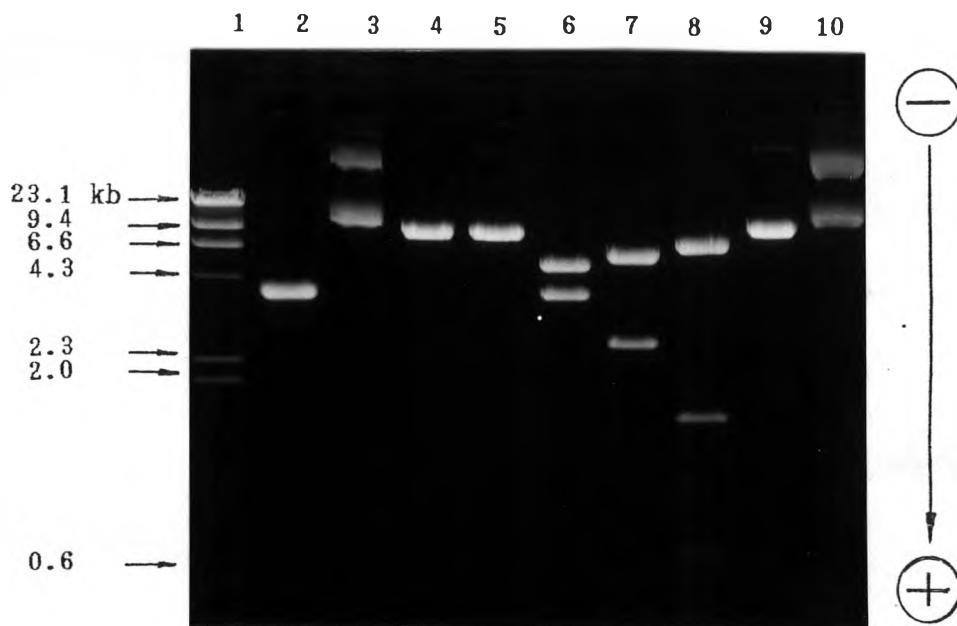
จากรูปที่ 27 ช่องที่ 7 แสดงให้เห็นว่ามีตำแหน่ง NdeI 1 ตำแหน่งบน inserted DNA fragment และจากรูปที่ 29 ช่องที่ 2 พบว่าตำแหน่ง NdeI อยู่ห่างจากตำแหน่ง PstI บนดีเอ็นเอพาหะประมาณ 1.7 kb

จากการโคลน KpnI-PstI fragment จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 มาไว้ในพลาสมิด pSE411 ได้สันนิษฐานว่าบริเวณของ multiple cloning site XbaI ถึง PstI (จากพลาสมิด pUC18) ยังคงมีอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 แต่จากการย่อยด้วยเรสติกชันเอนไซม์พบว่า XbaI ไม่สามารถย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ได้ แม้ว่าจะพบตำแหน่ง Sali บนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 1 ตำแหน่ง นอกจากนี้จากข้อมูลในรูปที่ 29 ช่องที่ 3, รูปที่ 30 ช่องที่ 4 และรูปที่ 32 ช่องที่ 5 ที่ย่อยด้วยเรสติกชันเอนไซม์ NdeI และ AccI, AccI และ HpaI และ AccI และ PvuII ตามลำดับ ยืนยันว่าตำแหน่ง AccI บน inserted DNA fragment มีทั้งหมด 3 ตำแหน่ง โดยที่ไม่มีตำแหน่ง AccI บนดีเอ็นเอพาหะซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับ Sali ข้อมูลทั้งหมดสรุปว่าตำแหน่ง AccI อยู่ห่างจากตำแหน่ง KpnI บนดีเอ็นเอพาหะประมาณ 0.5, 1.3 และ 3.1 kb ตามลำดับ คาดว่าตำแหน่ง Sali 1 ตำแหน่งที่พบบนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 จะตรงกับตำแหน่ง AccI ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบน inserted DNA fragment และส่วนของ XbaI-PstI ใน multiple cloning site ได้สูญเสียบไปในขั้นตอนการเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5

จากรูปที่ 31 และ 32 (ช่องที่ 7-9) แสดงให้เห็นว่ามีตำแหน่ง MluI 3 ตำแหน่งบน inserted DNA fragment และอยู่ห่างจากตำแหน่ง KpnI บนดีเอ็นเอพาหะประมาณ 0.5, 0.95 และ 3.5 kb ตามลำดับ

จากการศึกษา restriction map ของรีคอมบิแนนท์ pSV5 ไม่สามารถบอกตำแหน่งที่แน่ชัดของ AccI และ MluI ได้ เพราะจากข้อมูลต่างๆที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง AccI อยู่ห่างจากตำแหน่ง KpnI บนดีเอ็นเอพาหะพอกับตำแหน่ง MluI จึงคาดว่าตำแหน่ง AccI และ MluI มีตำแหน่งที่ใกล้เคียงกันมาก อีก 2 ตำแหน่งที่มีลักษณะเดียวกันคือตำแหน่ง MluI และ NdeI ซึ่งอยู่ห่างจากตำแหน่ง KpnI บนดีเอ็นเอพลาสมิดประมาณ 3.5 kb

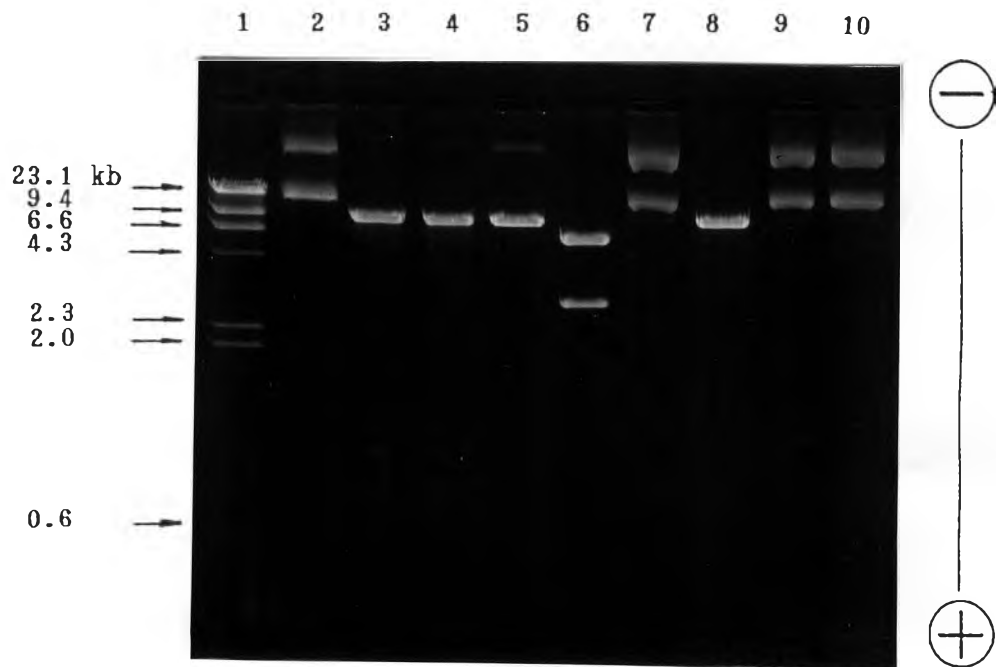
restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ได้รวบรวมแสดงในรูปที่ 33



รูปที่ 27 ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์

- ช่องที่ 1 คือ standard  $\lambda$ -DNA สอดด้วย HindIII
- ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอพาหะ pSE411 สอดด้วย PstI และ KpnI
- ช่องที่ 3 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5
- ช่องที่ 4 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 สอดด้วย PstI
- ช่องที่ 5 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 สอดด้วย KpnI
- ช่องที่ 6 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 สอดด้วย PstI และ KpnI
- ช่องที่ 7 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 สอดด้วย NdeI
- ช่องที่ 8 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 สอดด้วย AccI
- ช่องที่ 9 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 สอดด้วย Sali
- ช่องที่ 10 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 สอดด้วย BamHI

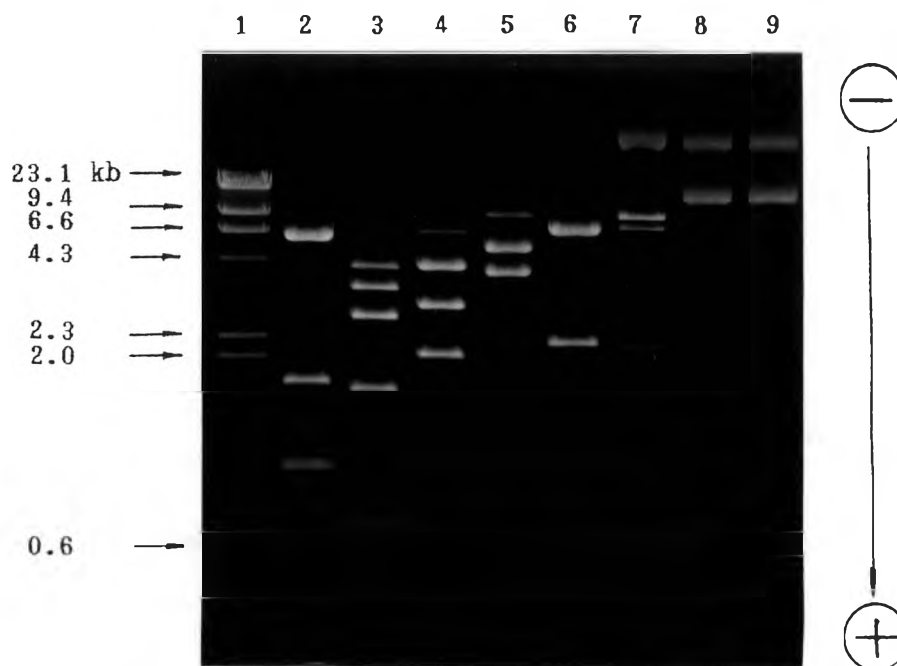




รูปที่ 28 ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV 5 บนอะกาโรสเจล 1.0 เปอร์เซ็นต์

- ช่องที่ 1 คือ standard  $\lambda$ -DNA ย่อยด้วย HindIII
- ช่องที่ 2 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5
- ช่องที่ 3 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย HindIII
- ช่องที่ 4 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย ClaI
- ช่องที่ 5 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย ScaI
- ช่องที่ 6 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย PvuII
- ช่องที่ 7 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย EcoRI
- ช่องที่ 8 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย HpaI
- ช่องที่ 9 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย XbaI
- ช่องที่ 10 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย BglII





รูปที่ 29 ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

pSV 5 บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์

ช่องที่ 1 คือ standard  $\lambda$ -DNA ย่อยด้วย HindIII

ช่องที่ 2 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย NdeI และ PstI

ช่องที่ 3 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย NdeI และ AccI

ช่องที่ 4 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย PvuII และ ScaI

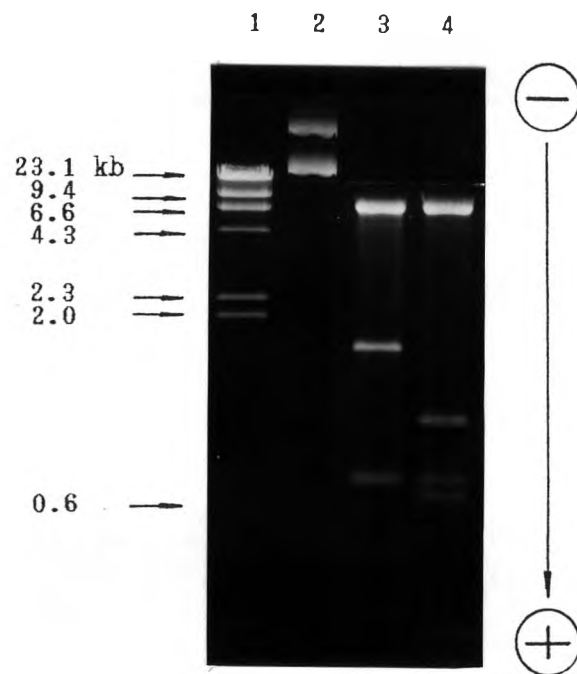
ช่องที่ 5 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย HpaI และ ScaI

ช่องที่ 6 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย HpaI และ KpnI

ช่องที่ 7 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย PvuI

ช่องที่ 8 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย XhoI

ช่องที่ 9 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5



รูปที่ 30 ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

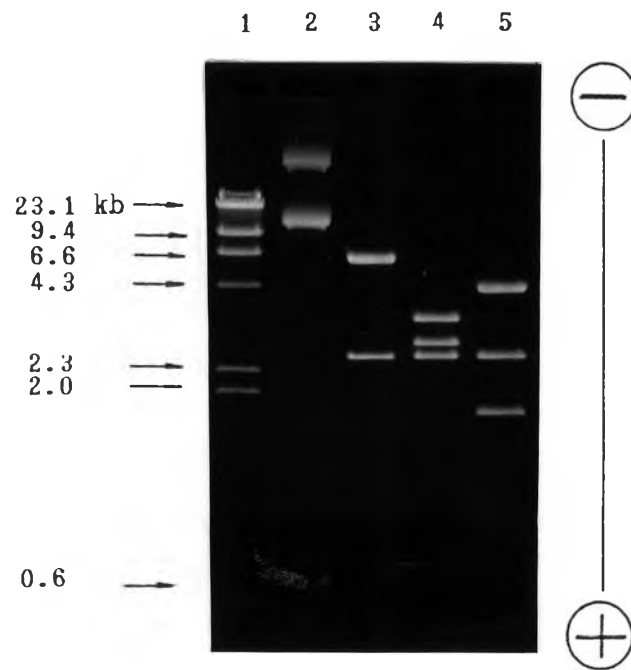
pSV 5 บนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์

ช่องที่ 1 คือ standard  $\lambda$ -DNA ย่อยด้วย HindIII

ช่องที่ 2 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5

ช่องที่ 3 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย AccI

ช่องที่ 4 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย AccI และ HpaI



รูปที่ 31 ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV 5 บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์

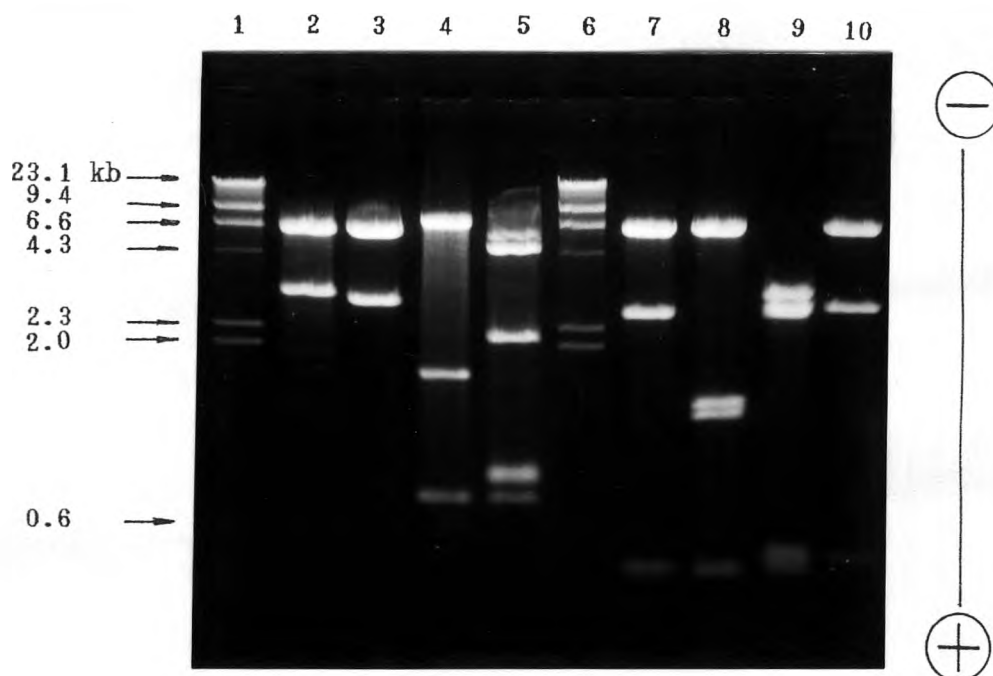
ช่องที่ 1 คือ standard  $\lambda$ -DNA ย่อยด้วย HindIII

ช่องที่ 2 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5

ช่องที่ 3 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย MluI

ช่องที่ 4 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย MluI และ ClaI

ช่องที่ 5 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย MluI และ PstI



รูปที่ 32 ผลของการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

pSV5 บนอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์

ช่องที่ 1 คือ standard  $\lambda$ -DNA ย่อยด้วย HindIII

ช่องที่ 2 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย PstI และ HpaI

ช่องที่ 3 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย PstI, HpaI และ PvuII

ช่องที่ 4 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย AccI

ช่องที่ 5 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย AccI และ PvuII

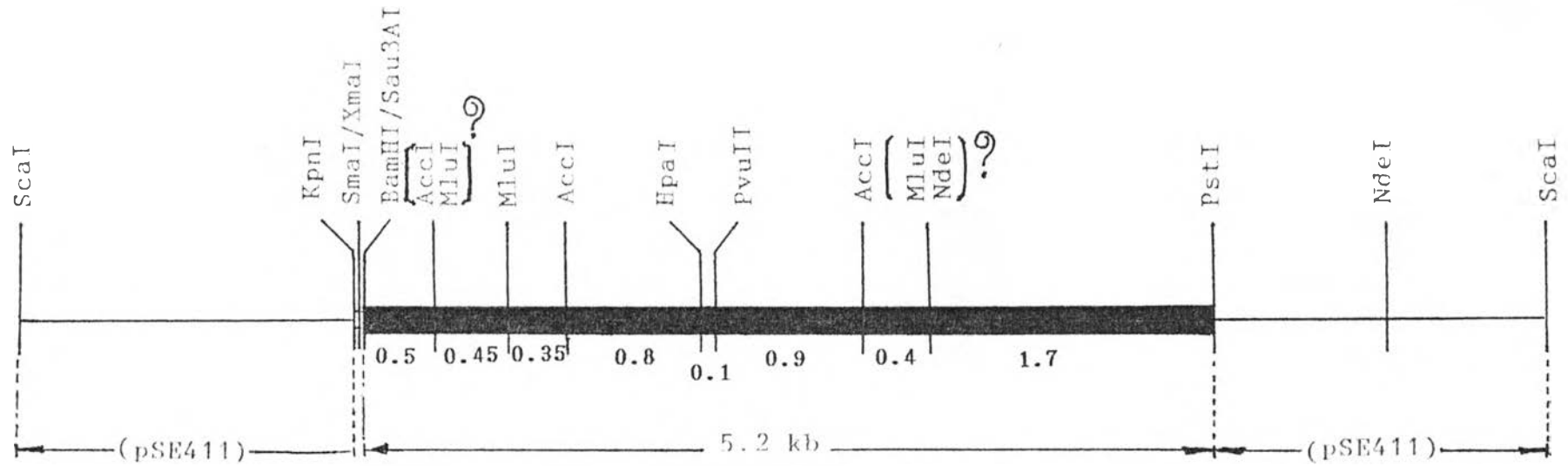
ช่องที่ 6 คือ standard  $\lambda$ -DNA ย่อยด้วย HindIII

ช่องที่ 7 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย MluI

ช่องที่ 8 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย MluI และ HpaI

ช่องที่ 9 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย MluI และ NdeI

ช่องที่ 10 คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ย่อยด้วย NdeI



รูปที่ 33 Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV 5

- : แสดงถึงที่ตัดเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Bacillus A<sub>11</sub>*  
ที่มีชั้น CGTase gene
- : แสดงถึงบริเวณ multiple cloning sites บางส่วน  
จากพลาสมิด pUC 18
- : แสดงถึงพลาสมิด pSE411