บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สุรศักดิ์ (2536) ได้ทำการโคลนยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ใส่ในดีเอ็นเอพาหะ pUC18 และ pSE411 และตั้งชื่อดีเอ็นเอลูกผสมที่โคลนได้ว่า pCSBC5 และ pCSBC8 ตามลำดับ ได้ศึกษาแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC8 พบว่ามีขนาดประมาณ 9.2 กิโลเบส และมีชิ้นดีเอ็นเอ insert ขนาดประมาณ 5.2 กิโลเบส ต่อมา สุพิศรา (2538) ได้ทำการศึกษาหาตำแหน่งของยีน CGTase ว่าอยู่บริเวณใดของดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC8 โดยการตัดชิ้นดีเอ็นเอ insert บางส่วนออกมาในช่วงต่างๆ เพื่อนำมาโคลนใส่ในดีเอ็นเอพาหะ pUC18 แล้วทดสอบแอคติวิตีของ CGTase จากทรานสฟอร์แมนท์เหล่านั้น แต่เนื่องจากว่า สุพิศราได้พบว่า ทรานสฟอร์แมนท์ CSBC8 ได้สูญเสียแอคติวิตีของ CGTase ไปก่อนแล้ว แต่ยังสามารถตรวจพบ dextrinizing activity ในทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 ที่มีพลาสมิด pCSBC5 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการโคลนยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 เช่นกัน ซึ่งได้ทำการพิสูจน์ว่า ชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 และใน pCSBC8 เป็นชิ้นเดียวกันจริง ด้วยการทำ Southern-blot hybridization จึงได้ศึกษาหาตำแหน่งของชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่มี dextrinizing activity ใน pCSBC5 อันเป็นแอคติวิตีส่วนหนึ่งของยีน CGTase และพบว่า บริเวณที่ถอดรหัสให้ dextrinizing activity อยู่ระหว่างตำแหน่งของ *Pst*I กับ *Nde*I ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.7 กิโลเบส (รูปที่3) เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในพลาสมิด pCSBC12 ที่สุพิศราทำการโคลนยีนต่อเนื่องได้จาก pCSBC5 งานวิจัยนี้จึงต้องการจะศึกษาหาลำดับเบส (nucleotide sequence) ของยีน CGTase ที่อยู่บนพลาสมิด pCSBC8 และศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำยีน CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งมาใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 เพื่อยืนยันว่าพลาสมิด pCSBC5 และ pCSBC8 เป็น CGTase clone หรือไม่ และยังใช้ในการโคลนยีน CGTase ที่สมบูรณ์อีกด้วย

การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน CGTase ในครั้งนี้ ไม่สามารถจะทำการหาลำดับเบสจากพลาสมิด pCSBC12 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ insert ขนาดประมาณ 1.7 กิโลเบส ที่สุพิศราทำการโคลนยีนต่อเนื่องจาก pCSBC5 ได้ เนื่องจาก pCSBC12 เป็นพลาสมิดที่ได้จากการย่อยพลาสมิด pCSBC5 ด้วยเอนไซม์ *Nde*I แล้วทำให้เกิด religation ของสายดีเอ็นเอชิ้นใหญ่ จึงทำให้บริเวณ

ที่จะจับกับ reverse primer หายไป ไม่สามารถจะหาลำดับเบสจากทางด้านปลายของ *NdeI* ได้ ดีเอ็นเอพาหะใน pCSBC12 ก็เป็น pUC18 ซึ่งไม่สามารถใช้เตรียมให้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยว สำหรับการหาลำดับเบสได้ และไม่สามารถจะทำการโคลนยีนต่อเนื่องย้ายดีเอ็นเอ insert ขนาด 1.7 กิโลเบส จาก pCSBC12 ไปเข้าพลาสมิด pUC118 ที่สามารถเตรียมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ เนื่องจาก restriction site ของเอนไซม์ *NdeI* บน pUC118 สูญเสียไปจากการนำ origin of replication จาก M13 phage มาเชื่อมเข้ากับ pUC18 แล้ว อีกทั้งเมื่อพิจารณาจากรายงานการวิจัย ของ วัลยา (2534) และ จิราพร (2537) ถึงการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 โดยการทำเอสดีเอสโพลีอะคริลลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซีส พบว่า มีน้ำหนัก โมเลกุลประมาณ 72,000 ดาลตัน เมื่อคำนวนกลับมาเป็นลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ค่าน้ำหนัก โมเลกุลโดยเฉลี่ยของกรดอะมิโน 1 ตัว เท่ากับ 110 ดาลตัน จะได้ว่ายีน CGTase จะมีขนาด ประมาณ 2.0 กิโลเบสจึงคาดว่ายีน CGTase ที่อยู่บนพลาสมิด pCSBC5 และ pCSBC8 น่าจะอยู่ บนชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 1.7 กิโลเบส เมื่อพิจารณาจากแผนผังเรสทริกชันของ pCSBC8 แล้ว (เหมือนกับแผนผังของ pCSBC5 ในรูปที่ 3 แต่ชิ้นดีเอ็นเอ insert สลับด้านกัน) พบว่า ชิ้นดีเอ็น เอครอบคลุมยีนที่เล็กที่สุดที่สามารถทำการโคลนยีนต่อเนื่องได้ มีขนาดประมาณ 3.0 กิโลเบส อยู่ ระหว่างตำแหน่ง *PstI* ถึง *PvuII* จึงได้ทำการโคลนยีนต่อเนื่องชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.0 กิโลเบสนี้ จาก พลาสมิด pCSBC8 เข้าสู่พลาสมิด pUC118 ที่ตำแหน่ง *PstI/SmaI* เคลื่อนย้ายเข้าเซลล์เจ้าเรือน *E. coli* JM101 แล้วคัดเลือกเฉพาะทรานสฟอร์แมนท์ที่มีโคโลนีสีขาว ทั้งนี้เพราะ pUC118 และ *E. coli* JM101 มี *lacZ'* และ *lacZ*ΔM15 ที่ถอดรหัสให้ส่วนปลายอะมิโนและส่วนปลายคาร์บอกซิลของ เอนไซม์ β-galactosidase ตามลำดับ แล้วสายเปปไทด์จากทั้งสองส่วนจะมารวมกันเป็นเอนไซม์ β-galactosidase ที่สมบูรณ์ภายในเซลล์เจ้าเรือน และทรานสฟอร์แมนท์จะสามารถย่อย X-gal ได้ และให้โคโลนีเป็นสีฟ้า ส่วน pUC118 ที่ได้รับดีเอ็นเอ insert เข้าไปในตำแหน่ง polylinker จะทำให้ ถอดรหัสส่วนปลายอะมิโนของ β-galactosidase มาได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้ไม่เกิดเป็นเอนไซม์ β-galactosidase ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จึงมีโคโลนีสีขาว ซึ่งได้ตั้งชื่อดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการ โคลนยีนต่อเนื่องนี้ว่า pCSBC15 และเรียกทรานสฟอร์แมนท์ว่า CSBC15 นำดีเอ็นเอลูกผสม pCSBC15 มาทดสอบขนาดและตำแหน่งของชิ้นดีเอ็นเอ insert ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส พบว่า ผลที่ได้เป็นไปตามที่ต้องการคือ ได้ดีเอ็นเอลูกผสมที่ มีชิ้นดีเอ็นเอ insert ขนาดประมาณ 3.0 กิโลเบส (รูปที่ 6 ช่องที่ 3) และมี restriction site ของ *NdeI* และ *AccI* อยู่บนชิ้นดีเอ็นเอ insert ซึ่งเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ *NdeI/ScaI* แล้วจะได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 3.1 และ 3.0 กิโลเบส (รูปที่ 6 ช่องที่ 5) และย่อยด้วยเอนไซม์ *AccI/ScaI* จะได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 3.5 และ 2.6 กิโลเบส (รูปที่ 7 ช่องที่ 6) จากนั้นนำ

ทรานสฟอร์แมนท์ CSBC15 ไปเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยว โดยอาศัยความช่วยเหลือในการถ่ายแบบดีเอ็นเอลูกผสมให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวจาก M13KO7 หรือที่เรียกว่า helper phage ได้ เนื่องจากบนพลาสมิด pUC118 จะมี origin of replication ของ M13 phage อยู่ด้วย (ภาคผนวกที่ 1) ซึ่งเมื่อ M13KO7 บุกรุกเซลล์ของทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมอยู่ มันจะทำการถ่ายแบบดีเอ็นเอของตัวเองได้เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ ที่เรียกว่า replicative form (RF) ไปพร้อมๆ กับการถ่ายแบบของดีเอ็นเอลูกผสม ขณะที่มีการถ่ายแบบก็จะมีการสังเคราะห์โปรตีนจากยีนของ M13KO7 ซึ่งจะไปจับกับดีเอ็นเอสาย (-) ที่เป็นสายคู่สม (complementary strand) กับดีเอ็นเอสาย (+) ของ M13KO7 ที่อยู่ในรูปเรฟลิเคทีฟและสาย (-) ของดีเอ็นเอลูกผสม มีผลให้เกิดการยับยั้งการถ่ายแบบของดีเอ็นเอสาย (-) ขณะนั้นก็จะมีการถ่ายแบบดีเอ็นเอสาย (+) ของ M13KO7 และดีเอ็นเอลูกผสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ coat protein จะถูกสร้างขึ้นมากมายโดยใช้ดีเอ็นเอสาย (-) เป็นแม่พิมพ์ จากนั้นจึงเกิดการประกอบตัวเป็นอนุภาคของ M13KO7 ที่สมบูรณ์ ซึ่งดีเอ็นเอลูกผสมสายเดี่ยวก็จะถูกหุ้มด้วย coat protein ด้วยเช่นกัน และหลุดออกจากเซลล์เจ้าเรือนเป็น phage particle เมื่อนำ phage particle มาสกัดเอาโปรตีนที่หุ้มออก ก็จะได้ดีเอ็นเอลูกผสมสายเดี่ยวที่นำไปใช้ในการวิเคราะห์หาลำดับเบสได้

เมื่อเตรียม pCSBC15 ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้แล้วจึงนำไปทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยวิธี chain termination sequencing หรือ dideoxy nucleotide method (Sanger, 1977) โดยใช้เอนไซม์ T_7 DNA polymerase (Amersham, 1994) ช่วยในการสร้างสายดีเอ็นเอ มีหลักการคือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเริ่มโดยใช้แม่พิมพ์ที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เตรียมจากดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่ต้องการศึกษาหาลำดับเบส ส่วนสับสเตรทจะใช้ dNTP และ (α-S^{35}) dATP เมื่อใส่ไพรเมอร์ สับสเตรท และ T_7 DNA polymerase แล้วทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จะเริ่มขึ้น ใน 4 หลอดทดลองที่แบ่งเป็น G , A , T และ C T_7 DNA polymerase จะนำเอานิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวมาต่อเข้ากับดีเอ็นเอไพรเมอร์ไปเรื่อยๆ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในแต่ละหลอดทดลองจะหยุดลงเมื่อใส่ตัวยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ คือ ไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (ddNTP) แต่ละชนิดลงไปในแต่ละหลอดตามที่เขียนแบ่งเอาไว้ ซึ่งเมื่อ ddNTP ถูกดึงไปใช้ในปฏิกิริยาจะทำให้ dNTP หรือ ddNTP ตัวถัดไปไม่สามารถเกิดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์กับ ddNTP ได้ จึงเป็นผลให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่ติดฉลากกัมมันตรังสีขนาดต่างๆ กัน ซึ่งสามารถแยกออกจากกันตามขนาดโดยการทำอิเล็ดโตรโฟรีซิสและติดตามแถบดีเอ็นเอเหล่านั้นโดยการทำ autoradiography จากนั้นจึงอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่เป็นสายคู่สมกับสายแม่พิมพ์ได้ โดยอาศัยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอและชนิดของ ddNTP ที่ใช้ในปฏิกิริยา

การวิเคราะห์หาลำดับเบสของ pCSBC15 สามารถอ่านลำดับเบสได้เพียง 192 เบส (รูปที่ 7) และจากการทำแผนที่เรสทริกชันด้วยโปรแกรม DNA Strider 1.0 พบ restriction site ของ *Pst*I ที่ใช้ในการโคลนยีนต่อเนื่อง แต่ไม่พบ restriction site ของเอนไซม์ที่เหมาะสมที่จะทำการโคลนยีนต่อไปได้อีก อีกทั้งไม่สามารถจะชี้บ่งได้ว่า ลำดับเบสที่อ่านได้เป็นส่วนหนึ่งของยีน CGTase เนื่องจากลำดับเบสที่อ่านได้ยังเป็นข้อมูลที่น้อยเกินไป จึงได้ส่ง pCSBC15 ไปให้โครงการศูนย์ปฏิบัติการเครื่องมือรวม สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จ.นครปฐม ทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสบริเวณปลายทั้งสองด้านของชิ้นดีเอ็นเอ insert โดยใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ forward sequencing primer และ reverse sequencing primer จากผลของการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ pCSBC15 โดยใช้ forward sequencing primer ได้ให้ชื่อว่า pCSBC15F (รูปที่ 8) พบว่า สามารถอ่านลำดับเบสได้ทั้งหมด 607 เบส เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่อ่านได้ในครั้งแรก 192 เบส พบว่า มีลำดับที่เหมือนกันทุกเบส ช่วยให้มั่นใจได้ว่า วิธีการทดลองที่ใช้ มีความเที่ยงตรงและอ่านลำดับเบสได้อย่างถูกต้อง สำหรับผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ pCSBC15 โดยใช้ reverse sequencing primer ให้ชื่อว่า pCSBC15R (รูปที่ 12) สามารถอ่านลำดับเบสได้ 213 เบส จากลำดับเบสที่ได้มาทั้งสองชุด เมื่อนำไปวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม DNA strider 1.0 พบว่า จากการทำแผนผังเรสทริกชันของ pCSBC15F ดังแสดงในรูปที่ 9 ไม่พบ restriction site ของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการโคลนยีนต่อเนื่อง เพื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสต่อไปได้อีก เนื่องจากว่า restriction site ของเอนไซม์ที่พบส่วนใหญ่ ไม่เป็นที่รู้จักและนิยมใช้กันและเอนไซม์เหล่านั้นไม่มีบน polylinker site ของพลาสมิด pUC118 ทำให้ยากต่อการโคลนยีนต่อเนื่อง ส่วนแผนผังเรสทริกชันของ pCSBC15R ดังแสดงในรูปที่ 13 พบ restriction site ของเอนไซม์ *Xba*I ที่สามารถจะนำไปใช้ในการโคลนยีนต่อเนื่อง เพื่อการวิเคราะห์หาลำดับเบสต่อไปได้อีก ทั้งนี้เพราะบน polylinker site ของ pUC118 ก็มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Xba*I เช่นกัน

การทำ 6-phase translation เป็นการแปลลำดับเบสให้เป็นลำดับของกรดอะมิโน โดยการแปลลำดับเบสนี้จะเลื่อนไปทีละเฟสบนดีเอ็นเอทั้งสองสาย (strand (+) และ (-)) ที่ complementary กัน และการทำ 6-phase ORF map เป็นการนำลำดับของกรดอะมิโนที่ได้จากการทำ 6-phase translation มาตรวจสอบว่าเฟสใดมีความเป็นไปได้ที่จะเป็น open reading frame มากที่สุด โดยสังเกตจาก start codon และ stop codon ของแต่ละเฟสเป็นหลัก การวิเคราะห์ 6-phase translation และ 6-phase ORF map ของ pCSBC15F ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11 ตามลำดับ พบว่าเฟสที่ -1 ของการทำ 6-phase ORF map หรือการแปลลำดับเบสให้เป็นลำดับกรดอะมิโนของดีเอ็นเอสาย (-) ในการทำ 6-phase translation ลำดับกรดอะมิโนสามารถจะเรียงลำดับไปได้โดยไม่พบ

start codon หรือ stop codon ส่วนเฟสอื่น ๆ นั้น จะพบทั้ง start codon และ stop codon อยู่ตลอดทั้งสาย แต่ก็ยังไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่า เฟสที่ -1 นี้ เป็น open reading frame ของยีน CGTase ทั้งนี้เนื่องจาก ลำดับเบสที่อ่านได้เพียง 607 เบส ยังมีจำนวนน้อยเกินกว่าจะเป็นลำดับเบสของยีน CGTase ได้ อีกทั้งบริเวณปลายทั้งสองด้านของเฟสที่ -1 ก็ไม่พบทั้ง start codon และ stop codon ที่เป็นเครื่องหมายบอกขอบเขตของยีน แต่ก็พอจะตั้งเป็นข้อสังเกตในอีกแง่หนึ่งได้ว่า เฟสที่ -1 นี้ อาจจะเป็นลำดับกรดอะมิโนของยีน CGTase ที่ไม่ครบสมบูรณ์ อาจจะมีลำดับเบสช่วงใดช่วงหนึ่งขาดหายไปจากการโคลนยีนหรือการกลายพันธุ์ ซึ่งส่วนที่ขาดหายไปอาจจะเป็นบริเวณของ promoter หรือ start codon ก็เป็นได้ ทั้งนี้เนื่องจาก เมื่อพิจารณาจากงานวิจัยของสุพิศรา (2538) ที่พบว่า บริเวณตำแหน่งระหว่าง *Pst*I ถึง *Nde*I ของชิ้นดีเอ็นเอ insert จากพลาสมิด pCSBC5 มี dextrinizing activity ที่มีรายงานว่า บริเวณที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการย่อยแป้งจะเป็นทางด้านปลายอะมิโน (N-terminal) ของเอนไซม์ CGTase (Kimura,1987 และ Svenson,1989) ซึ่งก็คือ บริเวณปลาย 5 ของดีเอ็นเอที่เป็นส่วนของ promoter และ start codon ของยีน CGTase และบริเวณที่ขาดหายไปนี้ อาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ ในทรานสฟอร์แมนท์ CSBC8

จากการวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโน โดยการทำ 6-phase translation และ 6-phase ORF map ของ pCSBC15R ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 14 และ 15 ตามลำดับ ก็ยังไม่สามารถจะบอกได้ว่าเฟสใดน่าจะเป็นลำดับกรดอะมิโนของยีน CGTase หากจะพิจารณาจากข้อมูลของสุพิศรา ดังที่กล่าวไปข้างต้น บริเวณปลายทางด้านนี้ของ pCSBC15R ควรจะเป็นบริเวณปลายทางด้าน 3 ของยีน CGTase และเป็นบริเวณที่มี stop codon ซึ่งหากเป็นปลายทางด้าน 3 ของยีนจริง จะต้องพิจารณาเฟสลำดับที่ (-1) - (-3) ในรูปที่ 15 ซึ่งจะเป็นการอ่านลำดับกรดอะมิโนของ pCSBC15R ที่สอดคล้องเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับลำดับกรดอะมิโนของ pCSBC15F เมื่อพิจารณาแล้วพบว่าเฟสที่ -3 น่าจะมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นส่วนหนึ่งของ open reading frame ของยีน CGTase เนื่องจากพบ stop codon อยู่ในลักษณะที่ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากกว่าเฟสอื่นๆ

ในการเปรียบเทียบความคล้ายคลึง (homology) ในระดับ nucleic acid sequence กับยีน CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ได้ทดลองนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้มาทำการเปรียบเทียบ ก็ไม่พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน CGTase ของแบคทีเรียสายพันธุ์ใดๆ แม้ว่าจะนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน β-CGTase ด้วยกันเอง ซึ่งมีรายงานว่า มีความคล้ายคลึงกันของ β-CGTase ที่ระดับ nucleic acid sequence เท่ากับ 77% (Kaneko และคณะ , 1989) แต่เมื่อนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนต่างๆ ได้แก่ *Escherichia coli ibpA ibpB* , Maize alcohol dehydrogenase gene , Maize Mu5 transposable element , *Haemophilus influenzae mdl* ,

mreB-B , *Haemophilus influenzae* Rd hypothetica และ *Cerebratulus lacteus* 18S rRNA พบว่า ลำดับเบสของ *Escherichia coli ibpA ibpB* มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ pCSBC15F และ pCSBC15R มากที่สุด จากผลการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันนี้ ทำให้ทราบว่าลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้ไม่ใช่บริเวณที่มียีน CGTase แน่นอน ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่า บริเวณที่มียีน CGTase นั้นจะอยู่ในช่วงที่ยังทำการหาลำดับเบสเข้าไปไม่ถึงในดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC15 ที่เหลืออยู่ประมาณ 2.2 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดใหญ่พอสำหรับยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11

ในการตรวจสอบพลาสมิด pCSBC5 pCSBC8 และติดตามยีน CGTase ใน chromosomal DNA ที่แยกได้จาก *Bacillus* sp. A11 นี้ ได้เลือกใช้เทคนิค nucleic acid hybridization ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบว่าเป็นสายคู่สมกับดีเอ็นเอติดตามหรือไม่ โดยตรวจการเกิดสัญญาณไฮบริดระหว่างดีเอ็นเอทั้งสอง ซึ่งมักจะทำโดยติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วยสารรังสีหรือสารปลอดรังสีก็ได้ ในการทดลองนี้เลือกใช้สารปลอดรังสีในการติดฉลากดีเอ็นเอติดตาม คือ digoxigenin ซึ่งเป็นสาร steriod hapten ในรูป DIG-11-dUTP (Boehringer,1993) เป็นสารติดฉลาก และใช้วิธีติดฉลากแบบ random primed labelling (Kirby,1992) การวิเคราะห์สัญญาณการไฮบริดทำโดยการใช้ Anti-DIG-alkaline phosphatase ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ digoxigenin ที่คอนจูเกตอยู่กับเอนไซม์ alkaline phosphatase เมื่อเติมสารตั้งต้นที่เป็นสารเรืองแสง(Chemiluminescent Detection) คือ lumigen PPD สำหรับเอนไซม์เข้าไป ก็จะเกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารเรืองแสงขึ้น ทำให้สามารถติดตามสัญญาณการไฮบริดได้

จากที่วัลยา (2534) ได้รายงานไว้ว่า เอนไซม์ CGTase ที่ *Bacillus* sp. A11 ผลิตขึ้นมานั้นเป็นชนิด β-CGTase และจากการศึกษาความคล้ายคลึง (homology) ของเอนไซม์ CGTase พบว่าความคล้ายคลึงในระหว่างเอนไซม์ β-CGTase ด้วยกันเอง มีประมาณ 70-75 % ที่ระดับ amino acid sequence (Nitschke และคณะ, 1990) และความคล้ายคลึงระหว่างเอนไซม์ β-CGTase กับ α-CGTase ที่ระดับ amino acid sequence เท่ากับ 63% ที่ระดับ nucleotide sequence เท่ากับ 64% นั้น (Horokoshi, 1988) จึงคิดว่า ยีน CGTase ที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการอื่น คงจะสามารถนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ได้ จึงได้ทำการขอยีน CGTase จากห้องปฏิบัติการอื่นๆ และ Dr. Toshiya Takano แห่ง National Food Research Institute,Yataba , Japan ได้ให้ความกรุณามอบพลาสมิด pDS10 ซึ่งมียีน α-CGTase มาให้ใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม ดังนั้นในการติดตามยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ในครั้งนี้จึงได้ใช้ดีเอ็นเอติดตาม 2 ชนิดคือ ยีน α-CGTase จากพลาสมิด pDS10 และชิ้นดีเอ็นเอ insert ขนาดประมาณ 5.2 กิโลเบส จากพลาสมิด pCSBC5

ในการทำ Southern-blot hybridization ได้นำ chromosomal DNA จาก *Bacillus* sp. A11 มาย่อยให้มีขนาดเล็กลงด้วยเอนไซม์ *Eco*RI *Pst*I และ *Bam*HI ไปแยกชิ้นดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส ร่วมกับชิ้นยีน α-CGTase จาก pDS10 ที่ย่อยด้วย *Bam*HI/ *Pvu*II pCSBC5 ที่ย่อยด้วย *Pst*I pCSBC8 ย่อยด้วย *Pst*I/*Kpn*I ที่จะแยกเอาชิ้นดีเอ็นเอ insert ของแต่ละพลาสมิดออกจากดีเอ็นเอพาหะ และ pUC118 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI เป็นตัวควบคุม นำไปถ่ายโอนและตรึงบนแผ่นเมมเบรน จากนั้นนำมาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม ซึ่งในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ ชิ้นยีน α-CGTase จาก pDS10 และชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่คาดว่าเป็นยีน CGTase จาก pCSBC5 มาใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามเปรียบเทียบกัน จากผลของการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่เป็นยีน α-CGTase (รูปที่17) พบว่า ยีน α-CGTase สามารถไฮบริไดซ์ได้กับ chromosomal DNA ของ *Bacillus* sp. A11 ให้สัญญาณไฮบริดจางๆที่แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส ของการย่อยด้วย *Eco*RI ให้สัญญาณไฮ-บริดเห็นได้ชัดเจนที่แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.5 และ 5.8 กิโลเบส ของการย่อยด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Pst*I ตามลำดับ ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏสัญญาณไฮบริไดซ์เหล่านี้อาจจะมียีน CGTase อยู่ก็เป็นได้ ส่วนพลาสมิด pCSBC5 และ pCSBC8 ที่ถูกตัดแยกชิ้นดีเอ็นเอ insert นั้น (รูปที่ 17 ช่องที่ 6 และ 7) พบว่า ยีน α-CGTase สามารถไฮบริไดซ์และให้สัญญาณไฮบริดกับชิ้นดีเอ็นเอ insert จากพลาสมิดทั้งสองได้ แต่สัญญาณไม่เข้มเท่ากับตัวควบคุม (positive control) ซึ่งเป็นชิ้นยีน α-CGTase และยังพบว่าดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ก็ให้สัญญาณไฮบริดได้จางๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีบางช่วงของสายดีเอ็นเอทั้งสองมีเบสคู่สมกันจึงสามารถจับกันและในขั้นตอนการวิเคราะห์สัญญาณไฮบริดจึงปรากฏสัญญาณได้จางๆ

เนื่องจากดีเอ็นเอติดตามที่เป็นยีน α-CGTase นั้นมีบางส่วนของดีเอ็นเอพาหะ pUB110 ติดมาด้วยในขั้นตอนของการเตรียมดีเอ็นเอติดตาม ทำให้ผลของการไฮบริดไดซ์ที่ได้ในรูปที่ 17 อาจเนื่องจากเกิดการไฮบริไดซ์กันระหว่างส่วนของดีเอ็นเอพาหะที่ติดมากับยีน α-CGTase กับดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 จึงได้ทำ Southern-blot hybridization โดยใช้ pUB110 เป็นดีเอ็นเอติดตาม พบว่า pUB110 สามารถไฮบริไดซ์ได้กับยีน α-CGTase จากพลาสมิด pDS10 และ pUB110 ซึ่งเป็นตัวควบคุม (positive control) แต่ไม่สามารถไฮบริไดซ์ได้กับ chromosomal DNA ของ *Bacillus* sp. A11 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ต่างๆ และชิ้นดีเอ็นเอ insert จากพลาสมิด pCSBC5 (รูปที่ 19) ดังนั้นแสดงว่า สัญญาณไฮบริดที่เกิดขึ้นกับ chromosomal DNA ของ *Bacillus* sp. A11 และชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 และ pCSBC8 นั้น เกิดจากการไฮบริไดซ์ของยีน α-CGTase จริง ส่วนแถบดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC118 ที่เป็นตัวควบคุม (negative control) ให้สัญญาณไฮบริดจางๆ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะการล้างดีเอ็นเอติดตามไม่ดีพอ หรือเป็นเพราะว่า ดีเอ็นเอติดตาม pUB110 อาจจะมีลำดับเบสบางช่วงที่คล้ายคลึงกับ pUC118 จึงสามารถไฮบริไดซ์ได้กับ

pUC118 และให้สัญญาณไฮบริดเกิดขึ้น จากผลการทดลองนี้ เมื่อย้อนกลับไปในรูปที่ 17 การที่แถบดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ให้สัญญาณไฮบริดขึ้นมา ในการใช้ยีน α-CGTase ที่มีบางส่วนของดีเอ็นเอพาหะ pUB110 ติดมาด้วยเป็นดีเอ็นเอติดตาม สัญญาณไฮบริดที่เกิดขึ้นนั้นอาจจะเป็นผลมาจากส่วนของดีเอ็นเอพาหะ pUB110 ไฮบริไดซ์กับพลาสมิด pUC118 ก็เป็นได้

เมื่อเปลี่ยนมาใช้ดีเอ็นเอติดตามเป็นชิ้นดีเอ็นเอ insert ขนาดประมาณ 5.2 กิโลเบส จาก pCSBC5 แทนยีน α-CGTase (รูปที่ 20) พบว่า มีสัญญาณไฮบริดเกิดขึ้นที่แถบดีเอ็นเอของ pCSBC5 pCSBC8 และพลาสมิด pUC118 แต่ไม่เกิดสัญญาณไฮบริดกับยีน α-CGTase และดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI *Pst*I และ *Bam*HI เลย ซึ่งการที่ไม่มีสัญญาณไฮบริดเกิดขึ้นกับแถบดีเอ็นเอของยีน α-CGTase อาจเนื่องมาจาก เปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงกัน (homology) ของเบสคู่สมระหว่างยีน α-CGTase กับดีเอ็นเอติดตามไม่สูงมากนักในขณะที่อุณหภูมิของการไฮบริไดซ์ค่อนข้างสูงถึง 65 °ซ ทั้งนี้เพราะจุดประสงค์ของการไฮบริไดซ์ในครั้งนี้ มุ่งจุดประสงค์ไปที่ผลการไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอติดตามที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC5 กับ chromosomal DNA ของ *Bacillus* sp. A11 มากกว่า และวิภาวรรณ (2538) ได้รายงานไว้ว่า ดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC5 สามารถไฮบริไดซ์ได้กับ chromosomal DNA ของ *Bacillus* sp. A11 ได้ เมื่อใช้อุณหภูมิในการไฮบริไดซ์เท่ากับ 65 °ซ แต่จากผลการทดลองพบว่า ชิ้นดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC5 ไม่สามารถไฮบริไดซ์กับ chromosomal DNA ของ *Bacillus* sp. A11 ได้ แม้ว่าจะได้ทำการทดลองซ้ำหลายครั้งแล้วก็ตาม ซึ่งเมื่อนำผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสก่อนที่จะนำไปทำ Southern-blot hybridization ของวิภาวรรณมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้ พบว่า มีสิ่งหนึ่งที่แตกต่างกัน นั่นคือ chromosomal DNA ของ *Bacillus* sp. A11 ที่วิภาวรรณใช้จะมีปริมาณมากกว่ามาก ซึ่งอาจจะมีผลทำให้ได้ผลการทดลองที่ต่างกัน

อย่างไรก็ตาม เมื่อยีน α-CGTase จาก pDS10 สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามยีน CGTase ใน *Bacillus* sp. A11 ได้ จึงทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ในช่วงที่สามารถไฮบริไดซ์กับยีน α-CGTase โดยในการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอนั้น เลือกที่จะใช้เอนไซม์ *Bam*HI ย่อยดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 และทำ electroelution แยกเอาชิ้นดีเอ็นเอในช่วงขนาดตั้งแต่ 4.4-6.6 กิโลเบส ออกมาใช้โคลน ทั้งนี้เพราะจากผลการไฮบริไดซ์กับยีน α-CGTase เมื่อย่อยดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ด้วย *Bam*HI พบสัญญาณไฮบริดปรากฏขึ้นที่แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.5 กิโลเบส

ดีเอ็นเอพาหะที่เลือกใช้ คือ พลาสมิด pUC18 หลังจากย่อยพลาสมิด pUC18 ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI แล้ว จึงทำการเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่มีขนาด 4.4-6.6 กิโลเบส ที่เตรียมได้ ด้วยเอนไซม์ T_4 DNA ligase ที่อุณหภูมิ 12-16 °ซ นาน 15-20 ชั่วโมง จากนั้นนำ

ดีเอ็นเอที่ทำการเชื่อมต่อนี้ไปทำการทรานสฟอร์มเข้าเซลล์เจ้าเรือน *E. coli* JM101 ที่เตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (cohan และคณะ,1972) ผลการทรานสฟอร์มได้โคโลนีสีขาวที่มีดีเอ็นเอลูกผสม 398 โคโลนี และได้โคโลนีสีน้ำเงินซึ่งมีแต่ pUC18 863 โคโลนี คำนวนการเกิดรีคอมบิเนชันระหว่างพลาสมิด pUC18 กับชิ้นดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 ได้ค่าเพียง 36.56 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้คงเนื่องมาจาก ไม่ได้ทำการกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายด้าน 5' ของดีเอ็นเอพาหะ (dephosphorylation) ด้วยเอนไซม์ calf intestine phosphatase ก่อนที่จะนำไปใช้ในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ จึงทำให้ดีเอ็นเอพาหะส่วนใหญ่ เกิดการเชื่อมต่อกันเองได้ (self ligation) มีผลให้ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวนน้อย

จากนั้นได้นำทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมทั้งหมด มาทำการคัดเลือกหาทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีน CGTase โดยการทดสอบ starch hydrolytic activity ซึ่ง Kimura และคณะ (1989) พบว่า ส่วนปลาย N-terminal ของเอนไซม์ CGTase จะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้งคล้ายกับเอนไซม์ α-amylase จึงสามารถใช้การทดสอบนี้ ตรวจหายีน CGTase ได้โดยง่ายและรวดเร็ว โดยการทำ replica plating บนจานอาหารอุดม LB ที่เสริมด้วยแอมพิซิลลิน IPTG และแป้ง (soluble strach) 1 เปอร์เซนต์ พบว่า ไม่มีทรานสฟอร์แมนท์ใด สามารถย่อยแป้ง ให้วงใสรอบโคโลนีเลย ซึ่งการไม่พบ amylolytic activity อาจเนื่องมาจาก ทรานสฟอร์แมนท์ไม่มียีน CGTase อยู่ในดีเอ็นเอลูกผสม หรืออาจมียีน CGTase แต่ไม่แสดงแอคติวิตี ดังเช่นที่พบในรายงานของสุพิศรา (2538) ว่าแอคติวิตีของยีน CGTase ในทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 และ CSBC8 ได้สูญเสียไปเฉยๆ โดยไม่รู้สาเหตุ

เมื่อการทดสอบแอคติวิตีของการย่อยแป้ง ไม่ประสบผลสำเร็จในการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีน CGTase ทำให้ต้องหาวิธีอื่นในการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์เหล่านี้ จากการที่ยีน α-CGTase สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 จึงได้นำเทคนิค dot-blot hybridization มาช่วยในการคัดเลือก เนื่องจากวิธีนี้มีความสะดวก รวดเร็ว เหมาะสำหรับจะใช้ในการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์จำนวนมากได้ดี โดยใช้ยีน α-CGTase เป็นดีเอ็นเอติดตาม เช่นเดิม จากผลของสัญญาณไฮบริดที่ได้ เมื่อใช้อุณหภูมิของการไฮบริไดซ์ที่ 65°ซ (รูปที่ 21) พบว่า ดีเอ็นเอลูกผสมทั้ง 398 โคลน รวมทั้ง pUC118 ที่เป็นตัวควบคุม ต่างก็ให้สัญญาณไฮบริดที่เข้มจนไม่สามารถทำการคัดเลือกได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากดีเอ็นเอลูกผสมทั้งหมดนี้ยังมีดีเอ็นเอพาหะ คือ pUC18 ติดอยู่ด้วย ไม่ได้ทำการตัดแยกชิ้น insert ก่อนการไฮบริไดซ์ ซึ่งดีเอ็นเอติดตามนี้สามารถจะไฮบริไดซ์กับพลาสมิด pUC18 และ pUC118 ได้ (ไม่ได้แสดงผล) และการย้ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเหล่านี้ลงบนเมมเบรนโดยวิธีหยอดสารละลายดีเอ็นเอลงบนแผ่นเมมเบรนทีละจุด จากลักษณะของพื้นที่ผิวดังกล่าว ทำให้ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอในจุดนั้นๆมี

ความเข้มข้นสูง ดีเอ็นเอติดตามจะไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ดี ซึ่งหากสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้มีความบริสุทธิ์ไม่มากพอ เพราะผ่านการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอแบบสกัดปริมาณน้อย ก็จะทำให้เกิดสัญญาณการไฮบริดของแบ็คกราวน์สูง และยังยากต่อการล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินอีกด้วย จึงได้ทำการทดลองเพิ่ม stringency ของระบบขึ้น เป็นการกำจัดดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินที่ไม่จำเพาะออกไป ลดสัญญาณไฮบริดที่เป็นแบ็คกราวน์ลง โดยเลือกใช้การเพิ่มอุณหภูมิขึ้นทีละ 5 °ซ ในขั้นตอนของการล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกิน แทนการลดความเข้มข้นของเกลือในสารละลาย SSC เพราะการเพิ่มอุณหภูมิ จะทำได้สะดวกและสามารถปรับเปลี่ยนเพิ่ม stringency ได้ในช่วงที่กว้างกว่า

หลังจากที่ทดลองเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 80 °ซ มีโคลน #226 ให้สัญญาณไฮบริดที่เข้มเหลือเพียงโคลนเดียว จึงได้เลือกโคลนนี้ไปทำการศึกษาต่อ (รูปที่ 24) การคัดเลือกโคลนเพียงโคลนเดียวไปศึกษาต่อ อาจทำให้โอกาสจะพบยีนที่ต้องการน้อยลง จึงได้พิจารณาที่ผลของการใช้อุณหภูมิ 75 °ซ ในการล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกิน (รูปที่ 23) พบว่า pUC118 ซึ่งเป็นตัวควบคุม (negative control) ไม่มีสัญญาณไฮบริดเหลืออยู่ และมีบางโคลนที่ยังให้สัญญาณไฮบริด ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอติดตามกับชิ้น insert ของดีเอ็นเอลูกผสม จึงได้ทำการเลือกโคลนที่ให้สัญญาณไฮบริดเข้มมาอีก 3 โคลน ได้แก่ #388 #392 และ #393 จากนั้นนำโคลนทั้ง 4 ไปทำการทดสอบ amylolytic activity อีกครั้งหนึ่ง บนจานอาหารอุดม LB ที่เสริมด้วยแป้ง 1 เปอร์เซนต์ และ IPTG ร่วมกับตัวควบคุม คือ *E. coli* JM101 *Bacillus subtilis* BRB152 (Amy $^-$) ที่เป็นเซลล์เจ้าเรือนของพลาสมิด pDS10 และ pDS10 ใน *Bacillus subtilis* BRB152 (Amy $^-$) จากผลปรากฏว่า ไม่พบ amylolytic activity จากโคลนที่คัดเลือกทั้ง 4 พบแต่ amylolytic activity จากทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pDS10 ซึ่งมียีน α-CGTase อยู่ (รูปที่ 26) จึงได้นำไปทำการตรวจสอบด้วย Southern-blot hybridization อีกครั้งหนึ่ง ใช้ดีเอ็นเอติดตามเป็นยีน α-CGTase และชิ้นดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC5 เพื่อให้แน่ใจว่าสัญญาณไฮบริดที่พบใน dot-blot hybridization เกิดจากการไฮบริดกันระหว่างดีเอ็นเอติดตามกับดีเอ็นเอ insert ที่ได้จากการโคลนยีน CGTase ใน *Bacillus* sp. A11 จริง

จากผลของ Southern-blot hybridization เมื่อใช้ยีน α-CGTase เป็นดีเอ็นเอติดตาม ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 28 จากสัญญาณไฮบริดที่ปรากฏ พบว่า ชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่มีขนาดประมาณ 5.3 กิโลเบส จากโคลน #226 สามารถไฮบริไดซ์ได้กับยีน α-CGTase ส่วนโคลนอื่นๆ นั้นไม่สามารถไฮบริไดซ์ได้กับยีน α-CGTase จึงมีความเป็นไปได้ที่ชิ้นดีเอ็นเอ insert จาก #226 นี้อาจมียีน CGTase อยู่ และน่าจะมีความคล้ายคลึง (homology) กันที่สูงพอสมควร แต่สัญญาณไฮบริดที่ได้ (รูปที่ 28 ช่องที่ 2) จะสังเกตุเห็นว่า แถบดีเอ็นเอมีความเข้มพอประมาณและเข้มไม่

สม่ำเสมอเท่ากันเมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอของพลาสมิด pDS10 ที่เป็นตัวควบคุม (รูปที่ 28 ช่องที่6) ทั้งนี้เนื่องจากใช้อุณหภูมิในขั้นตอนการล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินที่ 75 °ซ เพื่อกำจัดการไฮบริไดซ์ที่ไม่จำเพาะออกไป

เมื่อเปลี่ยนมาใช้ดีเอ็นเอติดตามเป็นชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่คาดว่าเป็นยีน CGTase จากพลาสมิด pCSBC5 พบสัญญาณไฮบริดเกิดขึ้นที่แถบดีเอ็นเอ ที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 ซึ่งเป็นตัวควบคุมเท่านั้น (รูปที่ 29 ช่องที่ 7) แสดงว่า ชิ้นดีเอ็นเอ insert จากดีเอ็นเอลูกผสมที่โคลนได้ไม่สามารถไฮบริไดซ์กับชิ้นดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC5 ได้ อีกทั้งพลาสมิด pDS10 ที่มียีน α-CGTase ก็ไม่สามารถไฮบริไดซ์ได้กับ pCSBC5 ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากใช้อุณหภูมิในการล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินที่ค่อนข้างสูงและเป็น condition สำหรับดีเอ็นเอติดตามที่เป็นยีน α-CGTase ที่ได้มาจากการทดลองของ dot-blot hybridization อาจจะไม่เหมาะสมกับดีเอ็นเอติดตามที่เป็นยีน CGTase จากพลาสมิด pCSBC5 อีกทั้งแผ่นไนลอนเมมเบรนที่ใช้ในครั้งนี้ก็ผ่านการทำไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่เป็นยีน α-CGTase และผ่านการ reprobe มาแล้ว ซึ่งอาจจะมีผลให้ดีเอ็นเอที่ตรึงอยู่กับแผ่นไนลอนเมมเบรนหลุดออกไปบ้างบางส่วน มีผลให้ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC5 ได้น้อยลง

อย่างไรก็ตาม จากผลการคัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมด้วยดีเอ็นเอติดตามที่เป็นยีน α-CGTase ทำให้สามารถคัดเลือกได้โคลน #226 ซึ่งคาดว่าจะมียีน CGTase อยู่ในดีเอ็นเอ insert จึงได้นำมาทำการศึกษาแผนที่เรสทริกชันและเปรียบเทียบกับแผนที่เรสทริกชันของเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธ์สายพันธุ์อื่นๆ โดยให้ชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนนี้ว่า pCSBC16 จากผลการศึกษาขนาดและแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 โดยย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ *Acc*I *Bam*HI *Cla*I *Eco*RI *Hin*dIII *Kpn*I *Pst*I *Sma*I *Xba*I *Nde*I *Pvu*II *Mlu*I *Sca*I และ *Sal*I แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโตรโฟรีซิส ดังแสดงในรูปที่ 30-33 พบว่า pCSBC16 มีขนาดประมาณ 8.0 กิโลเบส มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ประมาณ 5.3 กิโลเบส และตำแหน่งเรสทริกชันที่มีอยู่บนชิ้นดีเอ็นเอ insert คือ *Acc*I *Nde*I *Pvu*II *Mlu*I และ *Sal*I ดังแสดงไว้ในแผนที่เรสทริกชัน (รูปที่ 34)

เมื่อนำแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC16 มาเปรียบเทียบกับแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pCSBC5 พบว่า มีความคล้ายคลึงกันมากไม่ว่าจะเป็นชนิดของเอนไซม์และตำแหน่งของ restriction site จะมีความแตกต่างกันก็ตรงที่ restriction site ของเอนไซม์ *Kpn*I *Pst*I และ *Sma*I ใน pCSBC16 นั้นมีเพียงตำแหน่งเดียวอยู่บนดีเอ็นเอพาหะ ในขณะที่ pCSBC5 จะมี restriction site ของเอนไซม์เหล่านี้ 2 ตำแหน่งที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอ insert แต่ละด้าน (สุพิศรา,2538) ตำแหน่ง restriction site ของเอนไซม์ *Acc*I และ *Sal*I ใน pCSBC16 ที่มีเพิ่มขึ้นมาอีกหนึ่งตำแหน่งนั้น น่าจะ

มีตำแหน่งอยู่บนชิ้นดีเอ็นเอ insert มากกว่าจะอยู่บนดีเอ็นเอพาหะเหมือนกับ pCSBC5 ทั้งนี้เพราะตำแหน่งของ restriction site ของเอนไซม์ต่างๆ บน polylinker ใน pUC18 ที่เป็นดีเอ็นเอพาหะนี้ ยังคงเดิมตรงกับในแผนที่เรสทริกชันของ pUC18 ที่แสดงในภาคผนวกที่ 2 ทุกประการ ตำแหน่ง restriction site ของเอนไซม์ *Bam*HI ก็เป็นอีกจุดหนึ่งที่ต่างกันระหว่าง pCSBC5 และ pCSBC16 เนื่องจาก restriction site ของ *Bam*HI ใน pCSBC5 ได้สูญเสียไปในระหว่างการโคลนยีนต่อเนื่องแล้ว (สุรศักดิ์,2536) แต่ใน pCSBC16 จะพบว่ามี restriction site ของ *Bam*HI อยู่ 2 ตำแหน่ง บริเวณปลายทั้งสองของชิ้นดีเอ็นเอ insert เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการโคลนยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ได้มีการตรวจสอบเพื่อยืนยันว่า pCSBC16 ได้มาจากการติดตามยีนครั้งนี้จริง โดยการเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ระหว่าง pCSBC5 กับ pCSBC16 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 35 ช่องที่ 2 และ 3 พบว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC16 มีขนาดใหญ่กว่า pCSBC5 ประมาณ 100-200 เบส และ restriction site ของ *Bam*HI ใน pCSBC5 ได้เสียไปจริง ดังแสดงในรูปที่ 35 ช่องที่ 4 จะเห็นว่าเอนไซม์ *Bam*HI ไม่สามารถย่อย pCSBC5 ได้

เมื่อเปรียบเทียบแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC16 กับยีน CGTase ในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ พบว่า ไม่มีความคล้ายคลึงกันเลยใน restriction site ทุกตำแหน่งที่มีบนชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC16 ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบแผนที่เรสทริกชันของยีน CGTase ในระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆแล้ว พบว่า แผนที่เรสทริกชันของยีน CGTase ในแบคทีเรียแต่ละชนิด แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง แม้จะมีรายงานว่า มีความคล้ายคลึง (homology) กันของยีน CGTase ในระดับ nucleotide sequence และ amino acid sequence เท่ากับ 60 เปอร์เซนต์โดยประมาณ (Horokoshi,1988)

จากการหาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอ insert ขนาด 3.0 กิโลเบส จาก pCSBC15 ไปบางส่วน เมื่อนำมาเปรียบเทียบความคล้ายคลึง (homology) กับยีนต่างๆ แล้ว พบว่า ไม่มีความคล้ายคลึงกับยีน CGTase ของแบคทีเรียสายพันธุ์ใดๆ แต่มีความคล้ายคลึงกับยีน *ibpA* และ *ibpB* ของ *E. coli* มาก และจากการติดตามยีน CGTase โดยใช้ยีน α-CGTase เป็นดีเอ็นเอติดตาม ที่พบว่าสามารถติดตามยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ได้ชิ้นดีเอ็นเอ insert ขนาดประมาณ 5.3 กิโลเบส ที่มีแผนที่เรสทริกชันคล้ายกับดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 และ pCSBC8 จึงเป็นไปได้ว่าบริเวณที่มี homology กับดีเอ็นเอติดตามยีน α-CGTase และเป็นบริเวณที่มียีน CGTase อาจจะอยู่ในช่วงที่ยังหาลำดับเบสเข้าไปไม่ถึงของดีเอ็นเอ insert ขนาด 3.0 กิโลเบส หรืออาจจะเป็นบริเวณทางด้าน *Pvu*II ถึง *Hin*dIII บน pCSBC5 และ pCSBC16 และ *Pvu*II ถึง *Kpn*I บน pCSBC8 ที่มีขนาดประมาณ 2.2 กิโลเบส ดังนั้นแนวทางในการที่จะศึกษาต่อไปคือ การวิเคราะห์หาลำดับ

เบสในช่วงที่เหลือของดีเอ็นเอ insert ขนาด 3.0 กิโลเบส รวมไปถึงหาลำดับเบสอีกทางด้านหนึ่งของชิ้นดีเอ็นเอ insert ขนาด 5.2 กิโลเบส จาก pCSBC8 การเปลี่ยนดีเอ็นเอพาหะให้เหมาะสมกับเซลล์เจ้าเรือนที่เป็น *Bacillus subtilis* BRB152 (Amy $^-$) การใช้ดีเอ็นเอติดตามที่สังเคราะห์ขึ้นจากการแปลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 มาตรวจสอบและติดตามยีน CGTase ซึ่งแนวทางเหล่านี้เป็นวิธีการที่จะช่วยตรวจสอบและทำให้ได้แอคติวิตีคืนมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถหาลำดับเบสได้ 607 เบส จากการใช้ forward primer และ 213 เบส จากการใช้ reverse primer กับชิ้นดีเอ็นเอ insert ขนาดประมาณ 3.0 กิโลเบส ใน pCSBC15 ซึ่งไม่มีความคล้ายคลึง(homology) กับลำดับเบสของยีน CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ

2. สามารถใช้ดีเอ็นเอติดตามที่เป็นยีน α-CGTase ติดตามยีน CGTase จาก *Bacillus* sp.A11 ได้ และโคลนยีนจาก *Bacillus* sp. A11 เข้าในพลาสมิด pUC18 ได้ดีเอ็นเอลูกผสม pCSBC16 ที่มีดีเอ็นเอ insert ขนาดประมาณ 5.3 กิโลเบส ซึ่งไฮบริไดซ์ได้กับ ยีน α-CGTase มีแผนที่เรสทริกชันคล้ายกับ pCSBC5 แต่ไม่พบแอคติวิตีของ CGTase ในทรานสฟอร์แมนท์ CSBC16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย