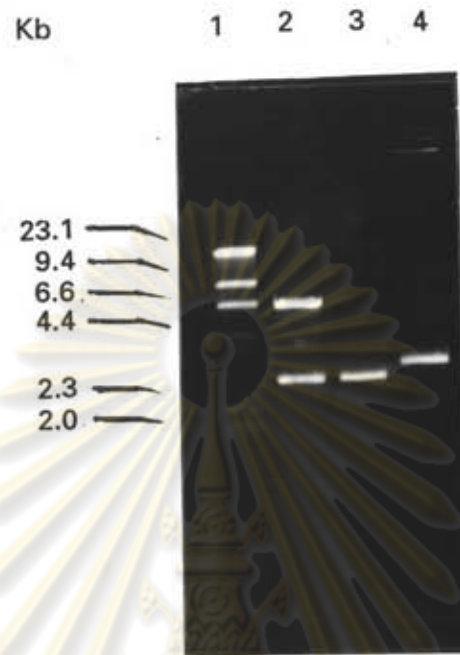


ผลการทดลอง

4.1 การหาลำดับเบส (nucleotide sequence) ของยีน CGTase

4.1.1 การโคลนยีนต่อเนื่องจากพลาสมิด pCSBC8 ลงในพลาสมิด pUC118

สุพิศรา (2538) ได้พบว่า ทรานสฟอร์แมนท์ CSBC8 ซึ่งแต่เดิมสามารถผลิต CDs ได้ (สุศักดิ์ ,2536) กลับไม่มีแอคติวิตีของ CGTase เลย อย่างไรก็ตาม ยังสามารถตรวจพบ dextrinizing activity ใน CSBC5 และสุพิศรายังได้พิสูจน์ว่า ซีนตีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 และ pCSBC8 เป็นซีนตีเอ็นเอเดียวกันจริง โดยการทำให้ Southern-blot hybridization นอกจากนี้ยังได้หาตำแหน่งของดีเอ็นเอ insert ที่มี dextrinizing activity อันเป็นแอคติวิตีส่วนหนึ่งของยีน CGTase ในพลาสมิด pCSBC5 พบว่า บริเวณที่ถอดรหัสให้ dextrinizing activity อยู่ระหว่างตำแหน่ง *Pst*I ถึง *Nde*I (pCSBC12) ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.7 กิโลเบส ดังรูปที่ 3 จึงคาดว่า ยีน CGTase น่าจะอยู่ในบริเวณดังกล่าว อย่างไรก็ตามจากรายงานเกี่ยวกับยีน CGTase ในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ พบว่ายีน CGTase นั้นจะมีขนาดประมาณ 2.0 ถึง 3.0 กิโลเบส ดังแสดงในตารางที่ 7 จึงคาดว่ายีน CGTase น่าจะอยู่ในท่อน DNA ที่ยาวกว่า 1.7 กิโลเบส ในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการโคลนยีนต่อเนื่องจากพลาสมิด pCSBC8 โดยตัดย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I และ *Pvu*II (double digestion) แล้วนำมาแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าได้ซีนตีเอ็นเอ 2 แถบ (รูปที่ 4 ช่องที่ 2) ที่มีขนาดประมาณ 6.2 และ 3.0 กิโลเบส แยกซีนตีเอ็นเอขนาด 3.0 กิโลเบสออกจากอะกาโรสเจล ด้วยวิธี electroelution (ข้อที่ 3.4.1) (รูปที่ 4 ช่องที่ 3) นำซีนตีเอ็นเอที่ได้ไปทำการโคลนโดยเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ที่ถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I และ *Sma*I ซึ่งจะมีความยาว 3.2 กิโลเบส (รูปที่ 4 ช่องที่ 4) ด้วยเอนไซม์ T_4 DNA Ligase (ข้อ 3.4.3) นำ ligation mixture ที่มีดีเอ็นเอลูกผสม มาทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM101 ที่เตรียมเป็นเซลล์คอมพีเทนต์โดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ (ข้อ 3.4.4) จากนั้นทำการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์บนจานอาหารอุดม LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน X-gal IPTG บ่มที่ 37 °C 16-18 ชั่วโมง พบโคโลนีทั้งสีฟ้าและสีขาว ขึ้นบนจานอาหารอุดม LB และได้คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาว ซึ่งเป็นโคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์ลูกผสม ตามหลักการเชื่อมต่อที่เป็นแบบ insertion inactivation ส่วนโคโลนีสีฟ้า



รูปที่ 4 ผลการย่อยพลาสมิด pCSBC8 และ pUC118 และผลการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC8 เพื่อใช้ในการโคลนยีนต่อเนื่อง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ / HindIII)

ช่องที่ 2 พลาสมิด pCSBC8 ย่อยด้วย PstI และ FvuII

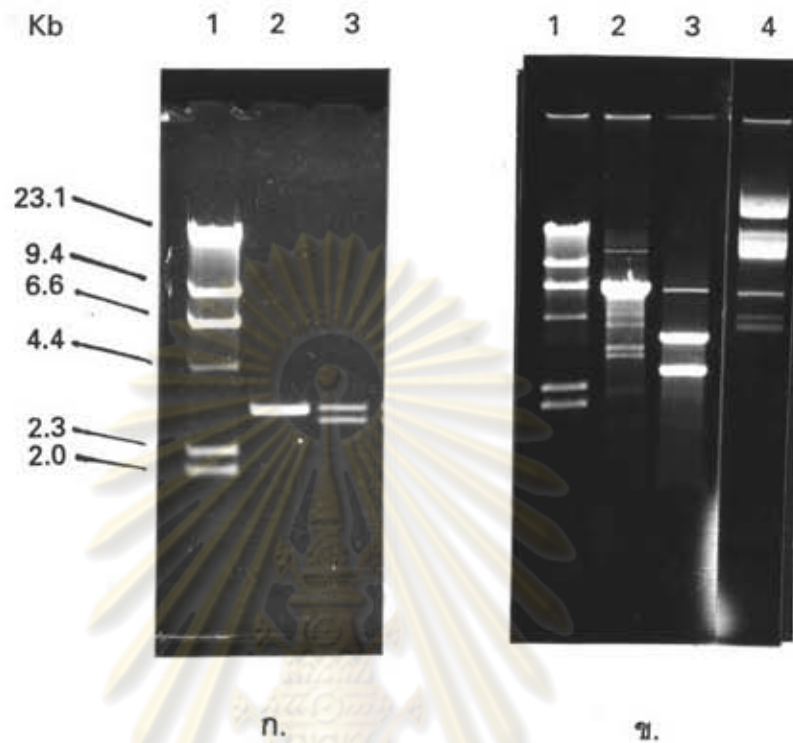
ช่องที่ 3 ชิ้นดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC8 หลังจากผ่านการทำ electroelution

ช่องที่ 4 พลาสมิด pUC118 ย่อยด้วย PstI และ SmaI

นั้น จะเป็นทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีแต่ดีเอ็นเอพาหะ นำทรานสฟอร์มแมนท์ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารอุดม LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 °C 16-18 ชั่วโมง ทำการสกัดพลาสมิดปริมาณน้อยโดยวิธีอัลคาไลน์ (ข้อ 3.1.2) เพื่อเตรียมการทดสอบขนาดและตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ต่อไป และตั้งชื่อดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการโคลนยีนต่อเนื่องลงในพลาสมิด pUC118 นี้ว่า pCSBC15 เรียกทรานสฟอร์มแมนท์ว่า CSBC15

4.1.2 การทดสอบขนาดและตำแหน่งของชิ้นดีเอ็นเอใน pCSBC15

นำดีเอ็นเอลูกผสม pCSBC15 ที่สกัดได้มาย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ วิเคราะห์ผลโดยนำมาแยกแถบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ -DNA / HindIII) และกับดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoRI พบว่า pCSBC15 เมื่อย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ EcoRI / PstI จะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาด 3.2 และ 3.0 กิโลเบส (รูปที่ 5 ช่องที่ 3) ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 3.0 กิโลเบสนั้นคาดว่าจะเป็ ชิ้นดีเอ็นเอจาก pCSBC8 ส่วนแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 3.2 กิโลเบส นั้นมีขนาดเท่ากับดีเอ็นเอพาหะ pUC118 พอดี จึงน่าจะเป็นแถบดีเอ็นเอของ pUC118 ที่ถูกตัดแยกออกมา ทำการพิสูจน์ว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ได้เชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะอย่างถูกต้อง ด้วยการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ NdeI / Scal และ Accl / Scal นำมาแยกแถบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ส่องดูแถบดีเอ็นเอใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ -DNA / HindIII) พบว่า หลังจากทำการย่อย pCSBC15 ด้วยเอนไซม์ NdeI / Scal จะแยกชิ้นดีเอ็นเอได้เป็น 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 3.0 และ 3.1 กิโลเบส (รูปที่ 5 ช่องที่ 5) ส่วนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏนอกเหนือจากดีเอ็นเอทั้งสองแถบนี้อาจเป็นแถบดีเอ็นเอที่ถูกย่อยไม่สมบูรณ์ จะทราบได้เมื่อทำการเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของ pCSBC15 ที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ใดๆ (รูปที่ 5 ช่องที่ 7) และเมื่อย่อย pCSBC15 ด้วยเอนไซม์ Accl / Scal จะแยกแถบดีเอ็นเอได้เป็น 2 แถบเช่นกัน แต่มีขนาดประมาณ 3.5 และ 2.6 กิโลเบส (รูปที่ 5 ช่องที่ 6) เมื่อนำขนาดของแถบดีเอ็นเอที่แยกได้เหล่านี้มาเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอที่คำนวณได้จากแผนผังเรสทริกชันที่ควรจะเป็นของ pCSBC15 ปรากฏว่าให้ผลที่ตรงกันเป็นไปตามที่คำนวณไว้ แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ขนาด 3.0 กิโลเบส จาก pCSBC8 ได้เชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC118 อย่างถูกต้องตามที่ต้องการ จากนั้นจึงได้นำดีเอ็นเอลูกผสม pCSBC15 ไปทำการเตรียมให้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยว เพื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสต่อไป



รูปที่ 5 ผลการทดสอบขนาดและตำแหน่งของชิ้นดีเอ็นเอ insert ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC15

- ก. ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ / HindIII)
 ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC118 ที่ย่อยด้วย EcoRI
 ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC15 ย่อยด้วย EcoRI และ PstI
- ข. ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ / HindIII)
 ช่องที่ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC15 ย่อยด้วย NdeI และ Scal
 ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC15 ย่อยด้วย Accl และ Scal
 ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC15 ที่ไม่ถูกย่อย

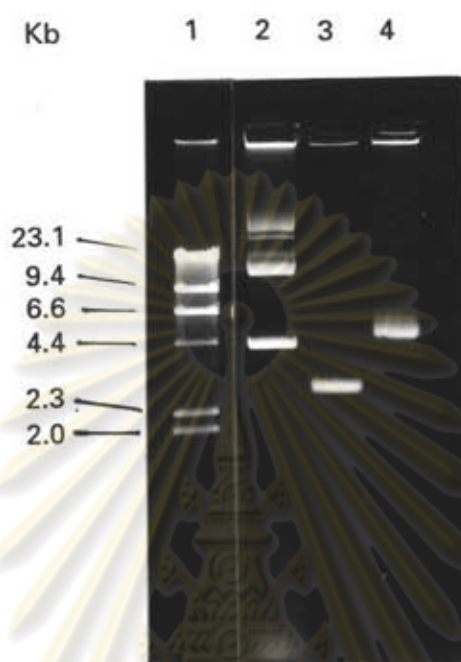
4.1.3 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวจาก pCSBC15

ในการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยว เนื่องจากพลาสมิดที่ใช้ในการโคลนยีนต่อ เนื่องครั้งนี้ คือพลาสมิด pUC118 หรือเรียกว่า phagemid ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มี origin of replication (Ori) อยู่ 2 จุด จุดหนึ่งจะเป็น Ori จากพลาสมิด pBR322 ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายแบบเพิ่มจำนวนชุดของพลาสมิดเหมือนกับพลาสมิดทั่วไป ส่วนอีกจุดหนึ่งจะเป็น origin of replication จาก M13 bacteriophage ซึ่งจะช่วยในการถ่ายแบบให้ pUC118 เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ เมื่อแบคทีเรียเจ้าเรือน *E. coli* JM101 ที่มีฟาจมิดเหล่านี้่อยู่ภายในเซลล์ถูกบุกรุกด้วย M13KO7 หรือ helper phage ซึ่งมียีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายแบบให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวและการสร้าง coat protein M13KO7 จะทำให้มีการสร้างดีเอ็นเอสายเดี่ยวของตัวเองและฟาจมิด แล้วเก็บไว้ใน coat protein เป็น phage particle ที่สมบูรณ์ ถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์ของ *E. coli* JM101 การสกัดดีเอ็นเอจาก phage particle นี้จะทำให้ได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวของฟาจมิดที่ต้องการ นำทรานสฟอร์มแมนท์ CSBC15 มาทำการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตามวิธีในข้อ 3.5.1 จากนั้นแบ่งสารละลายดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวของ pCSBC15 ที่สกัดได้ไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อดูผลที่ได้เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ -DNA / HindIII) พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 6.2 กิโลเบส ซึ่งคาดว่า เป็นแถบของดีเอ็นเอสายเดี่ยว (รูปที่ 6 ช่องที่ 4) เมื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวของ pCSBC15 ได้แล้ว ก็นำไปทำการหาลำดับเบสต่อไป

4.1.4 การหาลำดับเบสของพลาสมิด pCSBC15

ขั้นตอนของการทำปฏิกิริยา sequencing นั้น จะแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ การทำ annealing ให้ดีเอ็นเอไพรเมอร์เข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ จากนั้นเป็นการทำ elongation โดยเอนไซม์ T_7 DNA polymerase จะนำสับสเตรท คือ α -[35 S]-dATP dGTP dTTP และ dCTP มาสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอไพรเมอร์ให้ได้เป็นสายยาว และขั้นตอนสุดท้ายคือ termination จะเป็นช่วงที่ทำให้การสร้างสายดีเอ็นเอหยุดชะงักด้วยการใส่สารละลายที่มีไดออกซีนิวคลีโอไทด์ (ddNTP) ผสมอยู่ลงไป เมื่อ T_7 DNA polymerase นำ ddNTP ไปเชื่อมต่อกับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอสายต่างๆแล้ว จะทำให้นิวคลีโอไทด์ตัวอื่นๆไม่สามารถมาเชื่อมต่อได้อีก ปฏิกิริยาการสร้างสายดีเอ็นเอจึงหยุดลง

นำดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวที่เตรียมได้ไปทำปฏิกิริยา sequencing ตามวิธี chain termination sequencing โดยใช้ชุด Sequenase™ Version 2.0 DNA sequencing kit ตามวิธีในข้อ



รูปที่ 6 ผลการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC15

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ / HindIII)

ช่องที่ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC15 ที่ไม่ถูกย่อย

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ pUC118

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ pCSBC15

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.2 จากนั้น ทำการเตรียม 5% และ 8% polyacrylamide gel ที่มียูเรียเป็นองค์ประกอบ ตามวิธีในข้อ 3.5.3 โดยที่ 8% polyacrylamide gel จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสที่อยู่ใกล้ไพรมอร์ ส่วน 5% polyacrylamide gel ใช้สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสที่อยู่ห่างจากไพรมอร์ ประมาณ 150-200 เบส เมื่อ polyacrylamide gel เกิด polymerization โดยสมบูรณ์ นำสารละลายตัวอย่างของ pCSBC5 ที่ผ่านการทำปฏิกิริยา sequencing เรียบร้อยแล้ว มาอุ่นที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน นำไปหยอดลงใน well ของเจล โดยเรียงลำดับ sequencing reaction ของแต่ละสารละลายตัวอย่างเป็น G , A , T , C ตามลำดับ เปิดเครื่องให้พลังไฟฟ้า เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกออกจากกันเรียงเป็นลำดับตามขนาดของดีเอ็นเอแต่ละสาย นำเจลไปอบให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้ง นำไปทำ autoradiography โดยประกบกับฟิล์ม x-ray ประมาณ 24-48 ชั่วโมง ล้างฟิล์มแล้วนำผลที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มมาแปลให้เป็นลำดับเบส ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 7 สามารถอ่านลำดับเบสได้ทั้งหมด 192 เบส และพบลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งของ *Pst*I ซึ่งใช้ในการโคลนยีนต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองยังไม่พบลำดับเบสที่เป็นส่วนสำคัญต่างๆ เช่น promoter , start codon , ribosome-binding site และ open reading frame ที่บ่งบอกว่าเป็นยีน CGTase ทั้งนี้เนื่องจากลำดับเบสที่อ่านได้มีจำนวนน้อยและไม่สามารถทำการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไปได้อีก เพราะจากการทำแผนผังเรสทริกชันจากลำดับเบสที่อ่านได้ ไม่พบเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการโคลนยีนต่อเนื่อง จึงได้ส่ง pCSBC15 ไปให้ทางโครงการศูนย์ปฏิบัติการเครื่องมือรวม สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสเพิ่มขึ้น โดยใช้ดีเอ็นเอไพรมอร์ที่เป็น forward sequencing primer และ reverse sequencing primer เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสของปลายขึ้นดีเอ็นเอ insert ได้ทั้งสองด้าน จากการใช้ forward sequencing primer วิเคราะห์ลำดับเบส ได้ให้ชื่อว่า pCSBC15F สามารถอ่านลำดับเบสได้เพิ่มขึ้นเป็น 607 เบส มีลำดับเบสดังแสดงในรูปที่ 8 ได้นำไปทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNA Strider 1.0 หาแผนผังเรสทริกชัน (รูปที่ 9) พบว่า ที่ปลาย 5' มี restriction site ของ *Pst*I ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการโคลนยีนต่อเนื่อง ส่วนบริเวณปลาย 3' ไม่พบว่ามีเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการโคลนยีนต่อเนื่องต่อไปได้อีก การทำ 6-phase Translation (รูปที่ 10) เพื่อวิเคราะห์ว่าลำดับกรดอะมิโนเฟสใดน่าจะเป็นลำดับของกรดอะมิโนที่ถูกต้องของยีน CGTase และทำ 6-phase ORF map (รูปที่ 11) เพื่อวิเคราะห์ว่าเฟสใดน่าจะเป็น open reading frame ของยีน CGTase โดยใช้ข้อมูลจากการทำ 6-phase Translation จากผลการวิเคราะห์ พบว่า เฟสที่ -1 (รูปที่ 11) ของการทำ 6-phase ORF map มีลำดับกรดอะมิโนที่เรียงต่อกันไปได้ตลอดโดยไม่พบ start codon หรือ stop codon ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นช่วงหนึ่งของ open reading frame ของยีน CGTase เมื่อใช้

pCSBC15 -> List

DNA sequence	192 b.p.	CTGCAGGCTGAT	...	GACCTCCTGACC	linear		
	10	20	30	40	50	60	
1	CTGCAGGCTG	ATATCGCCAC	TGGCGACCAG	TTCGACCCCG	GCACGGTTCA	GGCGCGAGAT	60
61	AACAACGTCA	TAGCGTCTTT	TAAAGTGCAG	GTCGCGAATA	CGTTTTCCGA	GCACGTTTTTC	120
121	ATTGGTGACC	ACCACACGCT	CGACGCGCAA	ATCAGTGCCT	TTCGTGGACA	GCGAAGTATC	180
181	GACCTCCTGA	CC					192
	10	20	30	40	50	60	

รูปที่ 7 ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ pCSBC15 ด้วยวิธี chain termination sequencing

โดยใช้ชุด Sequenase™ Version 2.0 DNA sequencing kit

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DNA sequence 607 b.p. TGCCTGCAGGCT ... CTGCCCTGCCCA linear

	10	20	30	40	50	60	
1	TGCCTGCAGG	CTGATATCGC	CACTGGCGAC	CAGTTCGACC	CCGGCACGGT	TCAGGCGCGA	60
61	GATAACAACG	TCATAGCGTT	CTTTAAAGTG	CAGGTCGCGA	ATACGTTTTC	CGAGCACGTT	120
121	TTCATTGGTG	ACCACCACAC	GCTCGACGCG	CAAATCAGTG	CCTTTCGTGG	ACAGCGAAGT	180
181	ATCGACCTCC	TGACCAATCA	CCAGTTGCGC	ATTATGTAAA	TCCGCTGGCT	GACCCACCAG	240
241	ATGCAGCAAA	TCGCCCAGTT	GGATAATGGT	ATCTGGCGAA	GGAACTTTTA	GGGTTTCTTC	300
301	GCGTTTCAGA	CGCGAGCAGA	TAATTTGTTC	GCCGTTGAGA	ATCGGTACAT	CTTTAATGGC	360
361	TAAATCATGC	AGGTAGGGT	TCTCAACGCG	AATATTGATA	GTCTTGATCA	GCGGCGCGCC	420
421	ATTGGTGCGT	GAAGACTCGT	GCTGCGAGCT	TCTGTCTCGA	CATTGACGCG	GAATAAACC	480
481	CGCAACATCC	ACATGGTGAA	CAAAATCCCG	CAAATGCCGA	ATGGATACGC	CATCGCGTAA	540
541	CTCATCCCCA	TCTGATCGAC	CATTTCCATT	GGTGTACCAG	GTCGCGCAAA	ATCTGCTGCC	600
601	CTGCCCA						607
	10	20	30	40	50	60	

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
รูปที่ 8 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ pCSBC15F ด้วยวิธี chain termination
sequencing โดยใช้ forward sequencing primer
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 แผนผังเรสทริกชันของ pCSBC15F ที่วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNA Strider 1.0

1 / 1 31 / 11
 pro ala gly OPA tyr arg his trp arg pro val arg pro arg his gly ser gly ala arg
 ala cys arg leu ile ser pro leu ala thr ser ser thr pro ala arg phe arg arg glu
 cys leu gln ala asp ile ala thr gly asp gln phe asp pro gly thr val gln ala arg
 TGC CTG CAG GCT GAT ATC GCC ACT GGC GAC CAG TTC GAC CCC GGC ACG GTT CAG GCG CGA
 ACG GAC GTC CGA CTA TAG CGG TGA CCG CTG GTC AAG CTG GGG CCG TGC CAA GTC CGC GCT
 ala gln leu ser ile asp gly ser ala val leu glu val gly ala arg asn leu arg ser
 gly ala pro gln tyr arg trp gln arg gly thr arg gly arg cys pro glu pro ala leu
 arg cys ala ser ile ala val pro ser trp asn ser gly pro val thr OPA ala arg ser
 61 / 21 91 / 31
 OCH gln arg his ser val leu OCH ser ala gly arg glu tyr val phe arg ala arg phe
 ile thr thr ser AMB arg ser leu lys cys arg ser arg ile arg phe pro ser thr phe
 asp asn asn val ile ala phe phe lys val gln val ala asn thr phe ser glu his val
 GAT AAC AAC GTC ATA GCG TTC TTT AAA GTG CAG GTC GCG AAT ACG TTT TCC GAG CAC GTT
 CTA TTG TTG CAG TAT CGC AAG AAA TTT CAC GTC CAG CGC TTA TGC AAA AGG CTC GTG CAA
 ile val val asp tyr arg glu lys phe his leu asp arg ile arg lys gly leu val asn
 tyr cys arg OPA leu thr arg OCH leu ala pro arg ser tyr thr lys arg ala arg lys
 leu leu thr met ala asn lys leu thr cys thr ala phe val asn glu ser cys thr lys
 121 / 41 151 / 51
 his trp OPA pro pro his ala arg arg ala asn gln cys leu ser trp thr ala lys tyr
 ser leu val thr thr thr arg ser thr arg lys ser val pro phe val asp ser glu val
 phe ile gly asp his his thr leu asp ala gln ile ser ala phe arg gly gln arg ser
 TTC ATT GGT GAC CAC CAC ACG CTC GAC GCG CAA ATC AGT GCC TTT CGT GGA CAG CGA AGT
 AAG TAA CCA CTG GTG GTG TGC GAG CTG CGC GTT TAG TCA CGG AAA GCA CCT GTC GCT TCA
 glu asn thr val val val arg glu val arg leu asp thr gly lys thr ser leu ser thr
 OPA gln his gly gly cys ala arg arg ala phe OPA his arg glu his val ala phe tyr
 met pro ser trp trp val ser ser ala cys ile leu ala lys arg pro cys arg leu ile
 181 / 61 211 / 71
 arg pro pro asp gln ser pro val ala his tyr val asn pro leu ala asp pro pro asp
 ser thr ser OPA pro ile thr ser cys ala leu cys lys ser ala gly OPA pro thr arg
 ile asp leu leu thr asn his gln leu arg ile met OCH ile arg trp leu thr his gln
 ATC GAC CTC CTG ACC AAT CAC CAG TTG CGC ATT ATG TAA ATC CGC TGG CTG ACC CAC CAG
 TAG CTG GAG GAC TGG TTA GTG GTC AAC GCG TAA TAC ATT TAG GCG ACC GAC TGG GTG GTC
 asp val glu gln gly ile val leu gln ala asn his leu asp ala pro gln gly val leu
 arg gly gly ser trp asp gly thr ala cys OCH thr phe gly ser ala ser gly gly ser
 ser arg arg val leu OPA trp asn arg met ile tyr ile arg gln ser val trp trp ile
 241 / 81 271 / 91
 ala ala asn arg pro val gly OCH trp tyr leu ala lys glu leu leu gly phe leu arg
 cys ser lys ser pro ser trp ile met val ser gly glu gly thr phe arg val ser ser
 met gln gln ile ala gln leu asp asn gly ile trp arg arg asn phe AMB gly phe phe
 ATG CAG CAA ATC GCC CAG TTG GAT AAT GGT ATC TGG CGA AGG AAC TTT TAG GGT TTC TTC
 TAC GTC GTT TAG CGG GTC AAC CTA TTA CCA TAG ACC GGT TCC TTG AAA ATC CCA AAG AAG
 his leu leu asp gly leu gln ile ile thr asp pro ser pro val lys leu thr glu glu
 ala ala phe arg gly thr pro tyr his tyr arg ala phe ser ser lys pro asn arg arg
 cys cys ile ala trp asn ser leu pro ile gln arg leu phe lys OCH pro lys lys ala

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 ผลการวิเคราะห์ 6-phase Translation ของ pCSBC15F ด้วยโปรแกรม DNA Strider

1.0

1/1 หมายถึง เบสดั้งที่ 1 / กรดอะมิโนตัวที่ 1

OPA หมายถึง stop codon

OCH หมายถึง stop codon

AMB หมายถึง stop codon

301 / 101

val ser asp ala ser arg OCH phe cys arg arg OPA glu ser val his leu OCH trp leu
 arg phe arg arg glu gln ile ile leu ser pro leu arg ile gly thr ser leu met ala
 ala phe gln thr arg ala asp asn phe val ala val glu asn arg tyr ile phe asn gly
 GCG TTT CAG ACG CGA GCA GAT AAT TTT GTC GCC GTT GAG AAT CGG TAC ATC TTT AAT GGC
 CGC AAA GTC TGC GCT CGT CTA TTA AAA CAG CGG CAA CTC TTA GCC ATG TAG AAA TTA CCG
 arg lys leu arg ser cys ile ile lys asp gly asn leu ile pro val asp lys ile ala
 thr glu ser ala leu leu tyr asn gln arg arg gln ser asp thr cys arg OCH his ser
 asn OPA val arg ala ser leu lys thr ala thr ser phe arg tyr met lys leu pro AMB
 361 / 121

391 / 131

asn his ala gly AMB gly ser gln arg glu tyr OPA AMB ser OPA ser ala arg arg his
 lys ser cys arg leu gly phe ser thr arg ile leu ile val leu ile ser ala pro pro
 OCH ile met gln val arg val leu asn ala asn ile asp ser leu asp gln arg ala ala
 TAA ATC ATG CAG GTT AGG GTT CTC AAC GCG AAT ATT GAT AGT CTT GAT CAG CGC GCC GCC
 ATT TAG TAC GTC CAA TCC CAA GAG TTG CGC TTA TAA CTA TCA GAA CTA GTC GCG CGG CGG
 leu asp his leu asn pro asn glu val arg ile asn ile thr lys ile leu ala gly gly
 phe OPA ala pro OCH pro glu OPA arg ser tyr gln tyr asp gln asp ala arg arg trp
 ile met cys thr leu thr arg leu ala phe ile ser leu arg ser OPA arg ala ala met
 421 / 141

451 / 151

trp cys val lys thr arg ala ala ser phe cys leu asp ile asp ala glu asn asn pro
 leu val arg glu asp ser cys cys glu leu leu ser arg his OPA arg gly lys OCH pro
 ile gly ala OPA arg leu val leu arg ala ser val ser thr leu thr arg lys ile thr
 ATT GGT GCG TGA AGA CTC GTG CTG CGA GCT TCT GTC TCG ACA TTG ACG CGG AAA ATA ACC
 TAA CCA CGC ACT TCT GAG CAC GAC GCT CGA AGA CAG AGC TGT AAC TGC GCC TTT TAT TGG
 asn thr arg ser ser glu his gln ser ser arg asp arg cys gln arg pro phe tyr gly
 gln his thr phe val arg ala ala leu lys gln arg ser met ser ala ser phe leu gly
 pro ala his leu ser thr ser arg ala glu thr glu val asn val arg phe ile val arg
 481 / 161

511 / 171

gln his pro his gly glu gln asn pro ala asn ala glu trp ile arg his arg val thr
 ala thr ser thr trp OPA thr lys ser arg lys cys arg met asp thr pro ser arg asn
 arg asn ile his met val asn lys ile pro gln met pro asn gly tyr ala ile ala OCH
 CGC AAC ATC CAC ATG GTG AAC AAA ATC CCG CAA ATG CCG AAT GGA TAC GCC ATC GCG TAA
 GCG TTG TAG GTG TAC CAC TTG TTT TAG GGC GTT TAC GGC TTA CCT ATG CGG TAG CGC ATT
 ala val asp val his his val phe asp arg leu his arg ile ser val gly asp arg leu
 cys cys gly cys pro ser cys phe gly ala phe ala ser his ile arg trp arg thr val
 leu met trp met thr phe leu ile gly cys ile gly phe pro tyr ala met ala tyr ser
 541 / 181

571 / 191

his pro his leu ile asp his phe his trp cys thr arg ser arg lys ile cys cys pro
 ser ser pro ser asp arg pro phe pro leu val tyr gln val ala gln asn leu leu pro
 leu ile pro ile OPA ser thr ile ser ile gly val pro gly arg ala lys ser ala ala
 CTC ATC CCC ATC TGA TCG ACC ATT TCC ATT GGT GTA CCA GGT CGC GCA AAA TCT GCT GCC
 GAG TAG GGG TAG ACT AGC TGG TAA AGG TAA CCA CAT GGT CCA GCG CGT TTT AGA CGA CGG
 glu asp gly asp ser arg gly asn gly thr tyr trp thr ala cys phe arg ser gly
 OPA gly trp arg ile ser trp lys trp gln his val leu asp arg leu ile gln gln gly
 met gly met gln asp val met glu met pro thr gly pro arg ala phe asp ala ala arg
 601 / 201

ala
 cys
 leu pro
 CTG CCC
 GAC GGG
 gln gly
 ala
 gly

รูปที่ 10(ต่อ) ผลการวิเคราะห์ 6-phase Translation ของ pCSBC15F ด้วยโปรแกรม DNA

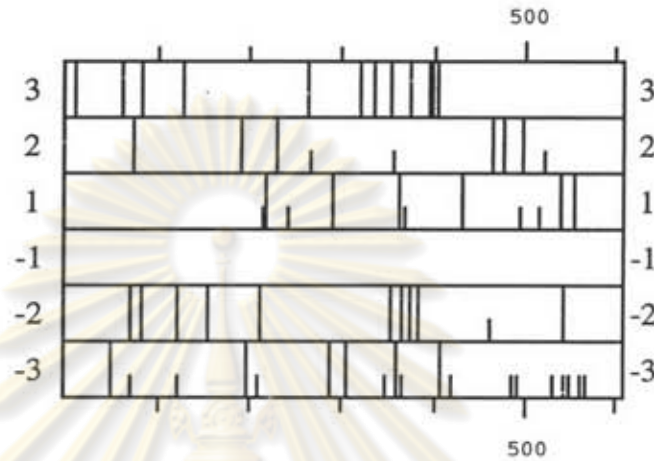
Strider 1.0

1/1 หมายถึง เบสตัวที่ 1 / กรดอะมิโนตัวที่ 1

OPA หมายถึง stop codon

OCH หมายถึง stop codon

AMB หมายถึง stop codon



รูปที่ 11 ผลการวิเคราะห์ 6-phase ORF map ของ pCSBC15F ด้วยโปรแกรม DNA Strider

1.0

หมายเลข 1-3 แสดง เฟสลำดับที่ 1-3 ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับเบสของ pCSBC15F

หมายเลข(-1)-(-3) แสดง เฟสลำดับที่ (-1)-(-3) ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับเบสของ pCSBC15F ที่เป็นสายคู่สม

ขีดสั้นที่อยู่ในช่องของแต่ละเฟส หมายถึง start codon

ขีดยาวที่อยู่ในช่องของแต่ละเฟส หมายถึง stop codon

reverse sequencing primer วิเคราะห์หาลำดับเบสจากปลายทางด้าน *PvuII* ของชิ้นดีเอ็นเอ insert ซึ่งได้ให้ชื่อว่า pCSBC15R พบว่า สามารถอ่านลำดับเบสได้ประมาณ 213 เบส (รูปที่ 12) และได้นำไปทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNA Strider 1.0 หาแผนผังเรสทริกชัน (รูปที่ 13) พบตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ที่สามารถใช้ในการโคลนยีนต่อเนื่องต่อไปได้ คือ *Sau3AI* ลำดับเบสที่ 75 และ *XbaI* ลำดับเบสที่ 141 ส่วนเรสทริกชันเอนไซม์อื่นๆนั้น เป็นเอนไซม์ที่ไม่รู้จักกันแพร่หลายนัก และไม่มีตำแหน่งตัดบนดีเอ็นเอพาหะ pUC118 จากการทำ 6-phase Translation (รูปที่ 14) และทำ 6-phase ORF map (รูปที่ 15) จากผลการวิเคราะห์ ไม่สามารถบอกได้ว่าเฟสใดเป็นลำดับกรดอะมิโนและ open reading frame ที่ถูกต้องของยีน CGTase

4.2 การทดสอบ pCSBC5 และ pCSBC8 และการติดตามยีน CGTase ใน chromosomal DNA ที่แยกได้จาก *Bacillus* sp. A11 โดยใช้เทคนิคทาง nucleic acid hybridization

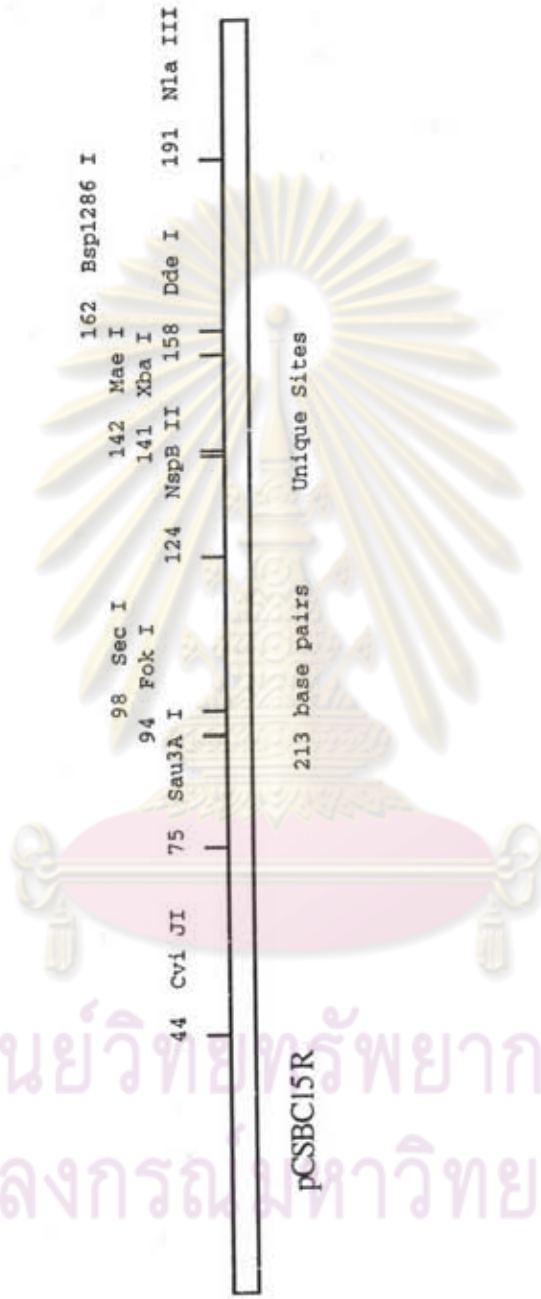
จากการศึกษาถึงความคล้ายคลึง (homology) ของเอนไซม์ CGTase ซึ่งพบว่า β -CGTase นั้นมีความคล้ายคลึงกับ α -CGTase ที่ระดับ nucleotide sequence เท่ากับ 64% และที่ระดับ amino acid sequence เท่ากับ 63 % นั้น (Horokoshi,1988) ดังนั้นยีนของ α -CGTase ที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการอื่น น่าจะสามารถใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามยีนของ β -CGTase ใน chromosomal DNA จาก *Bacillus* sp. A11 ได้ ในการนี้ได้รับการอนุเคราะห์พลาสติก pDS10 จาก Dr. Toshiya Takano แห่ง National Institute of Agrobiological Resources ,Japan มาใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม

พลาสติก pDS10 มีขนาดประมาณ 6.4 กิโลเบส มียีนที่สร้างเอนไซม์ α -CGTase จาก *Bacillus macerans* IAM1243 มีขนาดประมาณ 2.3 กิโลเบส ถูกโคลนลงในพลาสติก pUB110 (4.1 กิโลเบส) ที่มียีนต้านยาทานามัยซิน ดังแสดงในภาคผนวกที่ 2 ในการนำ ยีน α -CGTase จาก pDS10 มาใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามนั้น ได้ทำการย่อย pDS10 อย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *BamHI* / *PvuII* (double digestion) นำมาแยกและทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 2.5 กิโลเบส บริสุทธิ์ ด้วยวิธี electroelution (ข้อ 3.4.1) นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตาม ด้วยการติดฉลากโดยใช้สารปลดตรงสี (ข้อ 3.7.1) จากนั้นนำไปทำการทดสอบ homology กับ pCSBC5 และ pCSBC8 และติดตามยีน CGTase ใน chromosomal DNA ที่แยกได้จาก *Bacillus* sp. A11 โดยวิธีทาง nucleic acid hybridization ต่อไป

	10	20	30	40	50	60	
1	GGATTCTGGG	CGGTGGAATA	ACCGCATGG	TGGGTTGCGC	GTTGGCTTCG	CTTTTTTCAA	60
61	CGCGCGAGCG	CACCGATCTG	TCTTTGCGGA	ACACATCCCA	CGGCAGTAAA	AGCGTGTCCA	120
121	TCACAGCGGT	AAACGGCATA	TCTAGAATCG	CCAGCGACTT	AGTGCCCCAG	TGGTTTCAT	180
181	CGTCGCCAAT	CATGGTTGCG	CTGGCGCGGG	TGC			213
	10	20	30	40	50	60	

รูปที่ 12 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ pCSBC15R ด้วยวิธี chain termination sequencing โดยใช้ reverse sequencing primer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยพัชการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 แผนผังเรสตริกชันของ pCSBC15R ที่วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNA Strider 1.0

1 / 1 31 / 11
 ile leu gly gly gly ile thr ala leu val gly cys ala leu ala ser leu phe ser thr
 asp ser gly arg trp asn asn arg ile gly gly leu arg val gly phe ala phe phe asn
 gly phe trp ala val glu OCH pro his trp trp val ala arg trp leu arg phe phe gln
 GGA TTC TGG GCG GTG GAA TAA CCG CAT TGG TGG GTT GCG CGT TGG CTT CGC TTT TTT CAA
 CCT AAG ACC CGC CAC CTT ATT GGC GTA ACC ACC CAA CGC GCA ACC GAA GCG AAA AAA GTT
 ser glu pro arg his phe leu arg met pro pro asn arg thr pro lys ala lys lys leu
 ile arg pro pro pro ile val ala asn thr pro gln ala asn ala glu ser lys glu val
 asn gln ala thr ser tyr gly cys gln his thr ala arg gln ser arg lys lys OPA arg
 61 / 21 91 / 31
 arg glu arg thr asp leu ser leu arg asn thr ser his gly ser lys ser val ser ile
 ala arg ala his arg ser val phe ala glu his ile pro arg gln OCH lys arg val his
 arg ala ser ala pro ile cys leu cys gly thr his pro thr ala val lys ala cys pro
 CGC GCG AGC GCA CCG ATC TGT CTT TGC GGA ACA CAT CCC ACG GCA GTA AAA GCG TGT CCA
 GCG CGC TCG CGT GGC TAG ACA GAA ACG CCT TGT GTA GGG TGC CGT CAT TTT CGC ACA GGT
 ala arg ala cys arg asp thr lys ala ser cys met gly arg cys tyr phe arg thr trp
 arg ser arg val ser arg asp lys arg phe val asp trp pro leu leu leu thr asp met
 ala leu ala gly ile gln arg gln pro val cys gly val ala thr phe ala his gly asp
 121 / 41 151 / 51
 thr ala val asn gly ile ser arg ile ala ser asp leu val pro gln leu val ser ser
 his ser gly lys arg his ile AMB asn arg gln arg leu ser ala pro val gly phe ile
 ser gln arg OCH thr ala tyr leu glu ser pro ala thr AMB cys pro ser trp phe his
 TCA CAG CGG TAA ACG GCA TAT CTA GAA TCG CCA GCG ACT TAG TGC CCC AGT TGG TTT CAT
 AGT GTC GCC ATT TGC CGT ATA GAT CTT AGC GGT CGC TGA ATC ACG GGG TCA ACC AAA GTA
 OPA leu pro leu arg cys ile AMB phe arg trp arg ser leu ala gly thr pro lys met
 val ala thr phe pro met asp leu ile ala leu ser lys thr gly trp asn thr glu asp
 cys arg tyr val ala tyr arg ser asp gly ala val OCH his gly leu gln asn OPA arg
 181 / 61 211 / 71
 ser pro ile met val ala leu ala arg val
 val ala asn his gly cys ala gly ala gly
 arg arg gln ser trp leu arg trp arg gly cys
 CGT CGC CAA TCA TGG TTG CGC TGG CGC GGG TGC
 GCA GCG GTT AGT ACC AAC GCG ACC GCG CCC ACG
 thr ala leu OPA pro gln ala pro ala pro ala
 asp gly ile met thr ala ser ala arg thr
 arg trp asp his asn arg gln arg pro his

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 ผลการวิเคราะห์ 6-phase Translation ของ pCSBC15R ด้วยโปรแกรม DNA

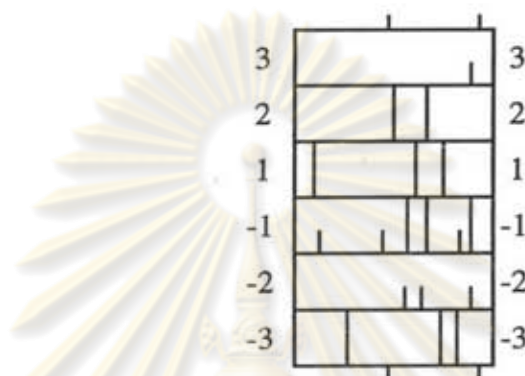
Strider 1.0

1/1 หมายถึง เบสตัวที่ 1 / กรดอะมิโนตัวที่ 1

OPA หมายถึง stop codon

OCH หมายถึง stop codon

AMB หมายถึง stop codon



รูปที่15 ผลการวิเคราะห์ 6-phase ORF map ของ pCSBC15R ด้วยโปรแกรม DNA Strider 1.0

หมายเลข 1-3 แสดง เฟสลำดับที่ 1-3 ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับเบสของ pCSBC15R

หมายเลข(-1)-(-3) แสดง เฟสลำดับที่ (-1)-(-3) ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับเบสของ pCSBC15R ที่เป็นสายคู่สม

ขีดสั้นที่อยู่ในช่องของแต่ละเฟส หมายถึง start codon

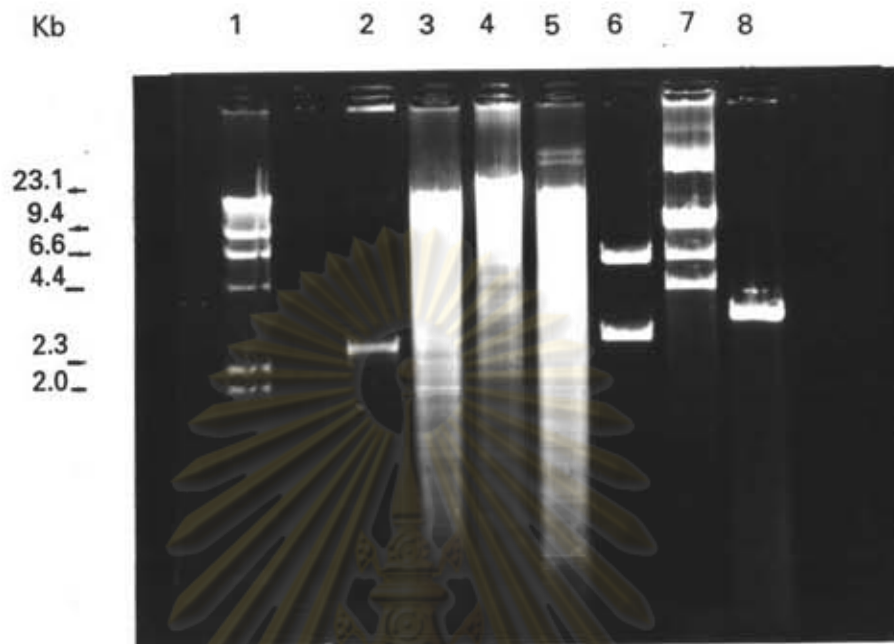
ขีดยาวที่อยู่ในช่องของแต่ละเฟส หมายถึง stop codon

4.2.1 การตรวจสอบหายีน CGTase ใน pCSBC5 pCSBC8 และ chromosomal DNA

การตรวจสอบหายีน CGTase นี้ได้นำเทคนิคทาง hybridization มาใช้ โดยใช้ชิ้นส่วนของ α -CGTase ใน pDS10 มาทำเป็นดีเอ็นเอติดตาม นอกจากนี้ยังใช้ชิ้นดีเอ็นเอ insert จากพลาสมิด pCSBC5 มาใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามด้วย เพื่อเป็นการเปรียบเทียบว่าจะสามารถไฮบริดได้เหมือนกับของ pDS10 หรือไม่

จากข้อมูล restriction pattern ของชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 และ pCSBC8 พบว่าไม่มี restriction site สำหรับ *EcoRI* *BamHI* และ *PstI* และคาดว่าอาจจะพบชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าที่สุรศักดิ์ (สุรศักดิ์, 1994) แยกได้ จึงได้นำดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 ที่สกัดได้ตามวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากโครโมโซม (ข้อ 3.1.1) มาย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ทีละตัว ได้แก่ *EcoRI* *BamHI* และ *PstI* ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอต่างๆ คือ ชิ้นยีน α -CGTase ขนาด 2.5 กิโลเบส ที่ผ่านการทำ electroelution จาก pDS10 ที่ถูกตัดแยกดีเอ็นเอพาหะด้วย *BamHI* / *PvuII* pCSBC5 ที่ย่อยด้วย *PstI* และ pCSBC8 ที่ถูกย่อยด้วย *KpnI* / *PstI* ซึ่งจะแยกดีเอ็นเอ insert ขนาดประมาณ 5.2 กิโลเบส ออกจากดีเอ็นเอพาหะ และ pUC118 ที่ย่อยด้วย *EcoRI* (รูปที่ 16) จากนั้นนำไปทำ Southern-blot hybridization ตามวิธีในข้อ 3.7.3 กับดีเอ็นเอติดตามทั้งสองชนิดดังกล่าวข้างต้น รูปที่ 17 เป็นการให้ชิ้นยีน α -CGTase จาก pDS10 เป็นดีเอ็นเอติดตามในการไฮบริดครั้งนี้ได้ทดลองใช้อุณหภูมิของการไฮบริดที่ 60 °C เนื่องจาก homology ระหว่างดีเอ็นเอติดตามกับดีเอ็นเอเป้าหมายมีประมาณ 60% ผลปรากฏว่า พบสัญญาณไฮบริดที่เข้มมากในช่องที่ 2 ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอของยีน α -CGTase ตัวเดียวกับที่ใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม ในช่องที่ 3 เป็นดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย *EcoRI* พบสัญญาณไฮบริดจางๆ ที่ตำแหน่งของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส ในช่องที่ 4 และ 5 เป็นดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ถูกย่อยด้วย *BamHI* และ *PstI* ตามลำดับ พบสัญญาณไฮบริดที่เข้มชัดเจนที่ตำแหน่งของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.5 และ 5.8 กิโลเบส ตามลำดับ ในช่องที่ 6 และ 7 คือ pCSBC5 และ pCSBC8 ที่ถูกตัดแยกดีเอ็นเอ insert ขนาดประมาณ 5.2 กิโลเบส ออกจากดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งก็พบสัญญาณไฮบริดเข้มที่ดีเอ็นเอ insert ของทั้งสอง ส่วนแถบของดีเอ็นเอพาหะจะเห็นสัญญาณจาง นอกจากนี้ในช่องที่ 7 จะเห็นสัญญาณไฮบริดเข้มที่แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 9.2 กิโลเบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดที่ถูกย่อยไม่สมบูรณ์ และช่องที่ 8 คือ pUC118 ย่อยด้วย *EcoRI* ก็พบสัญญาณไฮบริดจางเช่นเดียวกับแถบของดีเอ็นเอพาหะ ในช่องที่ 6 และ 7

เนื่องจากในการเตรียมดีเอ็นเอติดตามที่เป็นยีน α -CGTase จาก pDS10 นี้ มีชิ้นดีเอ็นเอของดีเอ็นเอพาหะบางส่วนขนาดประมาณ 200 เบส ติดมากับชิ้นยีนด้วย จากการตัด pDS10



รูปที่ 16 ผลการย่อยดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 พลาสมิด pDS10 pCSBC5 pCSBC8 และ pUC118 ที่ใช้ในการทำ Southern-blot hybridization

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ / HindIII)

ช่องที่ 2 ชิ้นยีน α -CGTase จากพลาสมิด pDS10

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย EcoRI

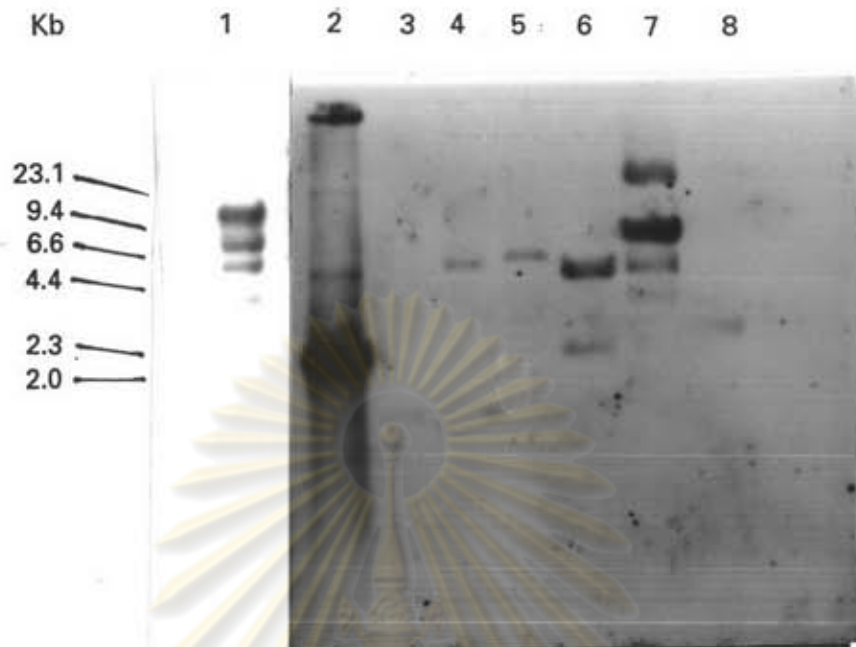
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย PstI

ช่องที่ 6 พลาสมิด pCSBC5 ที่ย่อยด้วย PstI

ช่องที่ 7 พลาสมิด pCSBC8 ที่ย่อยด้วย PstI และ KpnI

ช่องที่ 8 พลาสมิด pUC118 ที่ย่อยด้วย EcoRI



รูปที่ 17 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอตัดตามที่เป็นยีน α -CGTase และ ดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 พลาสมิด pCSBC5 pCSBC8 และ pUC118 ที่ย่อย ด้วยเอนไซม์ต่างๆ

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ / HindIII)

ช่องที่ 2 ยีน α -CGTase จากพลาสมิด pDS10

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย EcoRI

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย PstI

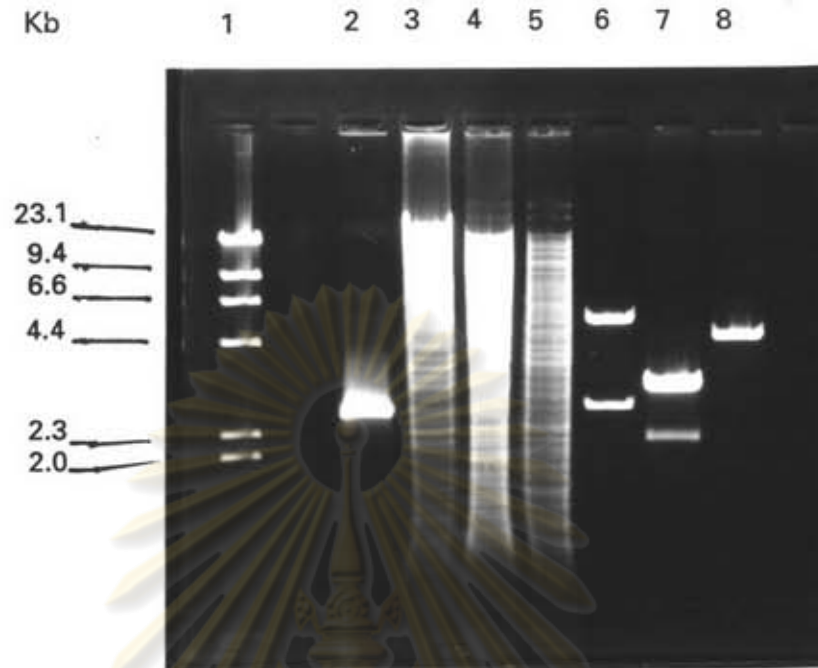
ช่องที่ 6 พลาสมิด pCSBC5 ที่ย่อยด้วย PstI

ช่องที่ 7 พลาสมิด pCSBC8 ที่ย่อยด้วย PstI และ KpnI

ช่องที่ 8 พลาสมิด pUC118 ที่ย่อยด้วย EcoRI

ด้วย *Bam*HI / *Pvu*II (ภาคผนวกที่ 2) จึงทำให้สงสัยว่าการที่มีสัญญาณไฮบริดของดีเอ็นเอติดตามกับดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 นี้ อาจเนื่องมาจากส่วนของดีเอ็นเอพาหะ pUB110 ที่ติดตาม จึงได้ทำการย่อยดีเอ็นเอชนิดต่างๆ ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ แล้วนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งได้แก่ ซีนัยน α -CGTase ขนาด 2.5 กิโลเบส จาก pDS10 ที่ถูกตัดด้วย *Bam*HI / *Pvu*II ดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI *Bam*HI และ *Pst*I pCSBC5 ที่ย่อยด้วย *Pst*I pUC118 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI และ pUB110 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI (ดังรูปที่ 18) จากนั้นนำไปทำ Southern-blot hybridization กับดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจากพลาสมิด pUB110 พบว่ามีสัญญาณไฮบริดเกิดขึ้นในช่องที่ 2 อันเป็นซีนัยน α -CGTase ที่มีบางส่วนของพลาสมิด pUB110 ติดตามด้วยในช่องที่ 6 คือ pCSBC5 ย่อยด้วย *Pst*I ให้แยกซีนัยนดีเอ็นเอ insert ออกจากพลาสมิด pUC18 จะพบสัญญาณไฮบริดจางๆ ขึ้นที่แถบดีเอ็นเอในตำแหน่งของพลาสมิด pUC18 ช่องที่ 7 และ 8 คือพลาสมิด pUC118 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI และพลาสมิด pUB110 ที่ย่อยด้วย *Bam*HI ตามลำดับ จะพบว่าในช่องที่ 8 ซึ่งเป็นพลาสมิดชนิดเดียวกับดีเอ็นเอติดตาม มีสัญญาณไฮบริดที่เข้มกว่าในช่องที่ 7 ส่วนช่องที่ 3 4 และ 5 ที่เป็นดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละตัว ได้แก่ *Eco*RI *Bam*HI และ *Pst*I ไม่พบสัญญาณไฮบริดเกิดขึ้นเลย (รูปที่ 19) แสดงว่า pUB110 ไม่ไฮบริดกับดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 และส่วนของดีเอ็นเอติดตามที่ไฮบริดกับดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ก็คือ ส่วนของซีนัยน α -CGTase จริงๆ

หลังจากที่ทำการไฮบริดกับซีนัยน α -CGTase แล้ว ก็นำแผ่นในลอนเมมเบรนที่ผ่านการไฮบริดนี้มาทำการ reprobe โดยล้างเอาดีเอ็นเอติดตามที่ไฮบริดอยู่กับดีเอ็นเอบนแผ่นในลอนเมมเบรนออก ทำการไฮบริดกับดีเอ็นเอติดตามตัวใหม่ที่เป็นซีนัยนดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC5 ที่อุณหภูมิ 65 °C ได้ผลดังรูปที่ 20 พบว่าไม่มีสัญญาณไฮบริดเกิดขึ้นในช่องที่ 2 , 3 , 4 และ 5 แสดงว่า ดีเอ็นเอติดตามจากพลาสมิด pCSBC5 นั้น ไม่ไฮบริดกับซีนัยน α -CGTase จาก pDS10 ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI *Bam*HI และ *Pst*I แต่จะไฮบริดกับ pCSBC5 pCSBC8 และพลาสมิด pUC118 ดังจะเห็นได้จากสัญญาณไฮบริดที่เกิดขึ้นในช่องที่ 6 7 และ 8 จากการที่ใช้อุณหภูมิ 65 °C ซึ่งมี stringency ที่เพิ่มขึ้น อาจจะสามารถอธิบายได้ว่า เหตุใดดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจาก pCSBC5 จึงไม่ไฮบริดกับซีนัยน α -CGTase แต่ก็ไม่สามารถอธิบายได้ว่า ทำไมมันจึงไม่ไฮบริดกับดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 อย่างไรก็ตาม เนื่องจากซีนัยน α -CGTase จาก pDS10 สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามซีนัยน CGTase ใน *Bacillus* sp. A11 ได้ จึงได้ทำการทดลองโคลนซีนัยนดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ในช่วงที่สามารถไฮบริดกับซีนัยน α -CGTase ได้



รูปที่ 18 ผลการย่อยดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 พลาสมิด pDS10 pCSBC5 pUC118 และ pUB110 ที่ใช้ในการทำ Southern-blot hybridization

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ / HindIII)

ช่องที่ 2 ซีนยีน α -CGTase จากพลาสมิด pDS10

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย EcoRI

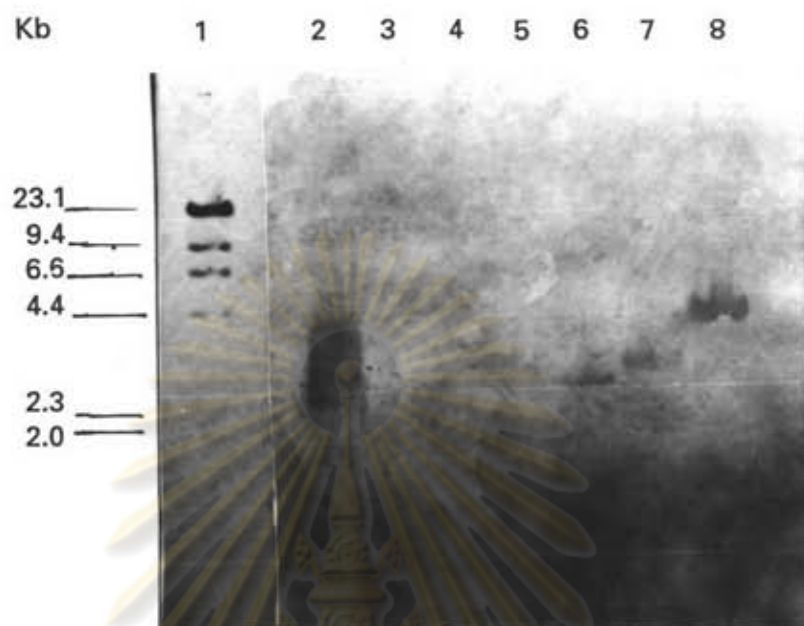
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย PstI

ช่องที่ 6 พลาสมิด pCSBC5 ที่ย่อยด้วย PstI

ช่องที่ 7 พลาสมิด pUC118 ที่ย่อยด้วย EcoRI

ช่องที่ 8 พลาสมิด pUB110 ที่ย่อยด้วย EcoRI



รูปที่ 19 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอตัดตามที่เป็นพลาสมิด pUB110 และ ดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 พลาสมิด pCSBC5 pDS10 pUC118 และ pUB110 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ / HindIII)

ช่องที่ 2 ชิ้นยีน α -CGTase จากพลาสมิด pDS10

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย EcoRI

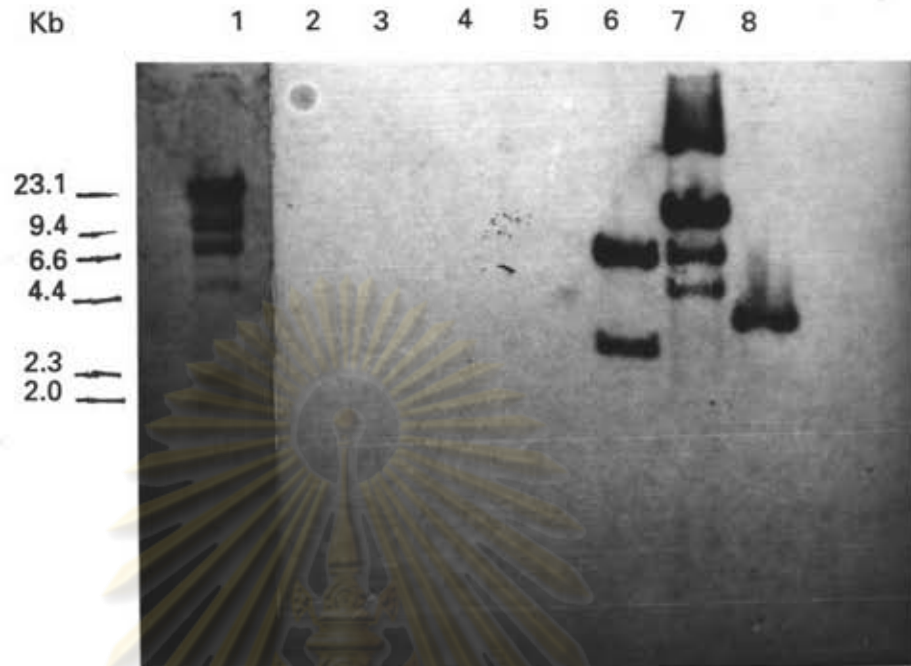
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ที่ย่อยด้วย PstI

ช่องที่ 6 พลาสมิด pCSBC5 ที่ย่อยด้วย PstI

ช่องที่ 7 พลาสมิด pUC118 ที่ย่อยด้วย EcoRI

ช่องที่ 8 พลาสมิด pUB110 ที่ย่อยด้วย EcoRI



รูปที่ 20 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอติดตามที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอ insert จากพลาสมิด pCSBC5 และดีเอ็นเอจาก *Bacillus sp. A11* pDS10 pCBSC5 pCSBC8 และ pUC118 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ / *HindIII*)

ช่องที่ 2 ชิ้นยีน α -CGTase จากพลาสมิด pDS10

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอของ *Bacillus sp. A11* ที่ย่อยด้วย *EcoRI*

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอของ *Bacillus sp. A11* ที่ย่อยด้วย *BamHI*

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอของ *Bacillus sp. A11* ที่ย่อยด้วย *PstI*

ช่องที่ 6 พลาสมิด pCSBC5 ที่ย่อยด้วย *PstI*

ช่องที่ 7 พลาสมิด pCSBC8 ที่ย่อยด้วย *PstI* และ *KpnI*

ช่องที่ 8 พลาสมิด pUC118 ที่ย่อยด้วย *EcoRI*

4.2.2 การโคลนยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ลงในพลาสมิด pUC18

หลังจากใช้ ยีน α -CGTase จาก pDS10 เป็นดีเอ็นเอติดตาม ทำไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 และทราบตำแหน่งที่คาดว่าจะมียีน CGTase บนดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 แล้ว จึงได้ทำการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 เพื่อนำไปใช้ในการโคลน โดยเลือกที่จะย่อยชิ้นดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 ด้วย BamHI ซึ่งจะมีขนาดประมาณ 5.5 กิโลเบส นำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เลือกตัดอะกาโรสเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอในช่วงขนาดตั้งแต่ 4.4 - 6.6 กิโลเบส แยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี electroelution (ข้อ 3.4.1) ดีเอ็นเอที่ได้ก็นำไปใช้ในการโคลนโดยเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่ถูกย่อยด้วย BamHI ด้วยเอนไซม์ T₄ DNA Ligase ตามวิธีในข้อ 3.4.3 จากนั้นทำการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสมใน ligation mixture เข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน คือ *E. coli* JM101 ที่เตรียมเป็นเซลล์คอมพีเทนต์โดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ (ข้อ 3.4.4) ทำการคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์บนจานอาหารอุดม LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน X-gal และ IPTG ผลการทดลองพบว่า ทรานสฟอร์มที่เจริญได้มีทั้งหมด 1,261 โคโลนี เป็นทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีโคโลนีสีขาวและสีฟ้าจำนวน 398 และ 863 โคโลนี ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถคำนวณการเกิดรีคอมบิเนชันระหว่างพลาสมิด pUC18 กับชิ้นดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 ได้ค่าประมาณ 31.56 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมไปทำการคัดเลือกหารีคอมบิเนนต์พลาสมิดที่คาดว่าจะมียีน CGTase ต่อไป

4.2.3 การคัดเลือกหาทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีน CGTase

4.2.3.1 การทดสอบแอกติวิตีด้วยวิธี starch hydrolytic activity

จากการที่เอนไซม์ CGTase มี amylolytic activity อยู่ด้วย จึงสามารถย่อยแบ่งให้เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลงได้ และทำให้เกิดปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนเปลี่ยนไป คือ เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเข้มเป็นไม่มีสี ทำให้มองเห็นเป็นวงใสรอบโคโลนี จึงสามารถใช้วิธีนี้ในการตรวจหายีน CGTase ได้โดยง่ายและรวดเร็ว

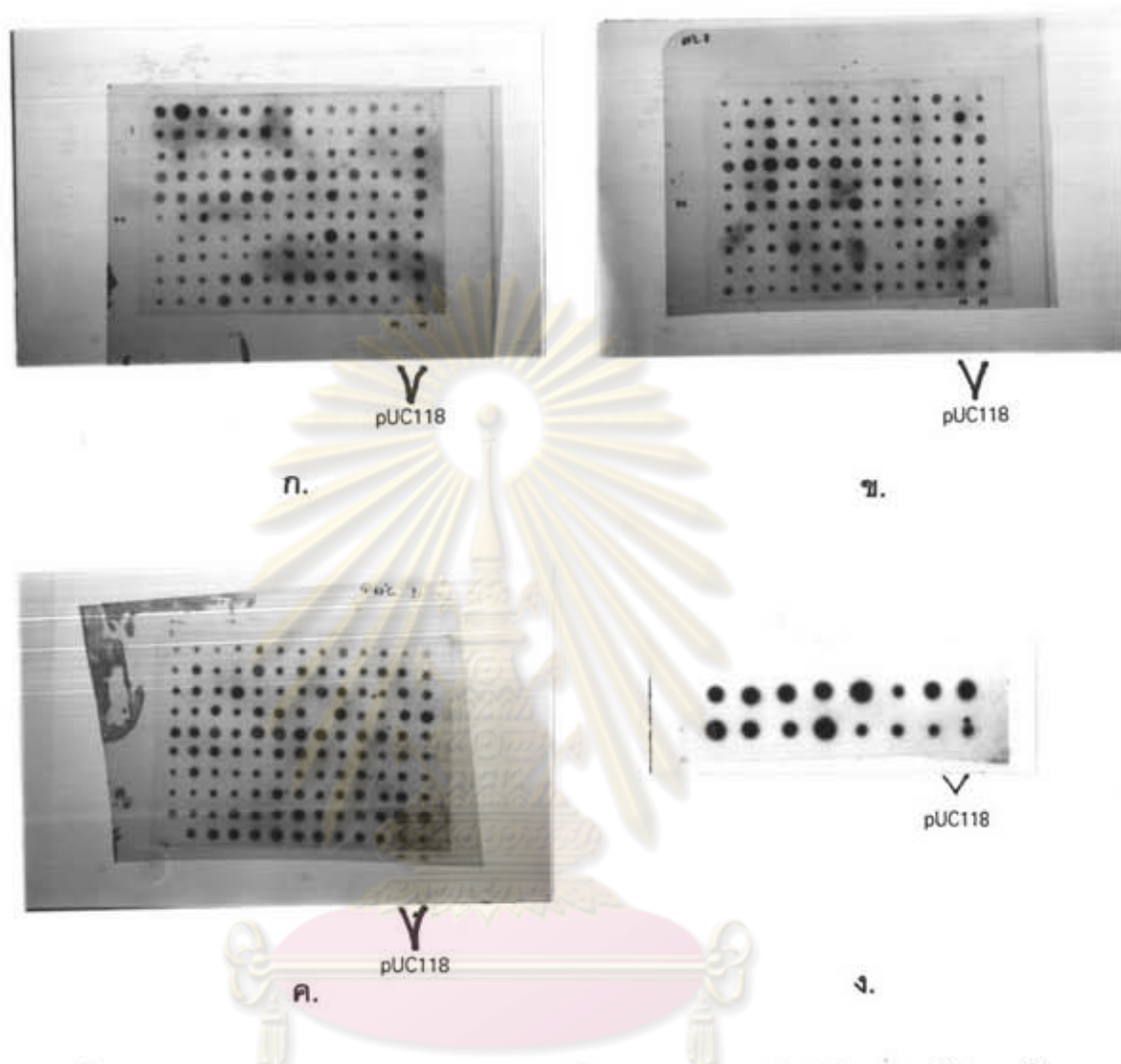
นำทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้ทั้งหมดมาทำ replica plating ลงบนจานอาหารอุดม LB ที่เสริมแป้ง (soluble starch) 1 เปอร์เซ็นต์ IPTG และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 ชั่วโมง แล้วหยดสารละลายไอโอดีน ทำการคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ใสรอบๆ โคโลนี ผลการทดลองพบว่า ในจำนวนทั้งหมด 398 โคโลนี ไม่มีทรานสฟอร์มแมนท์ใดให้

วงใสรอบๆ โคลนีเลย แสดงว่า ทรานสเฟอร์แมนท์ทั้งหมด ไม่มี amyolytic activity เลย จึงได้นำ ทรานสเฟอร์แมนท์ทั้งหมดไปทำการคัดเลือกโดยวิธี dot-blot hybridization ต่อไป

4.2.3.2 การคัดเลือกทรานสเฟอร์แมนท์โดยวิธี dot-blot hybridization

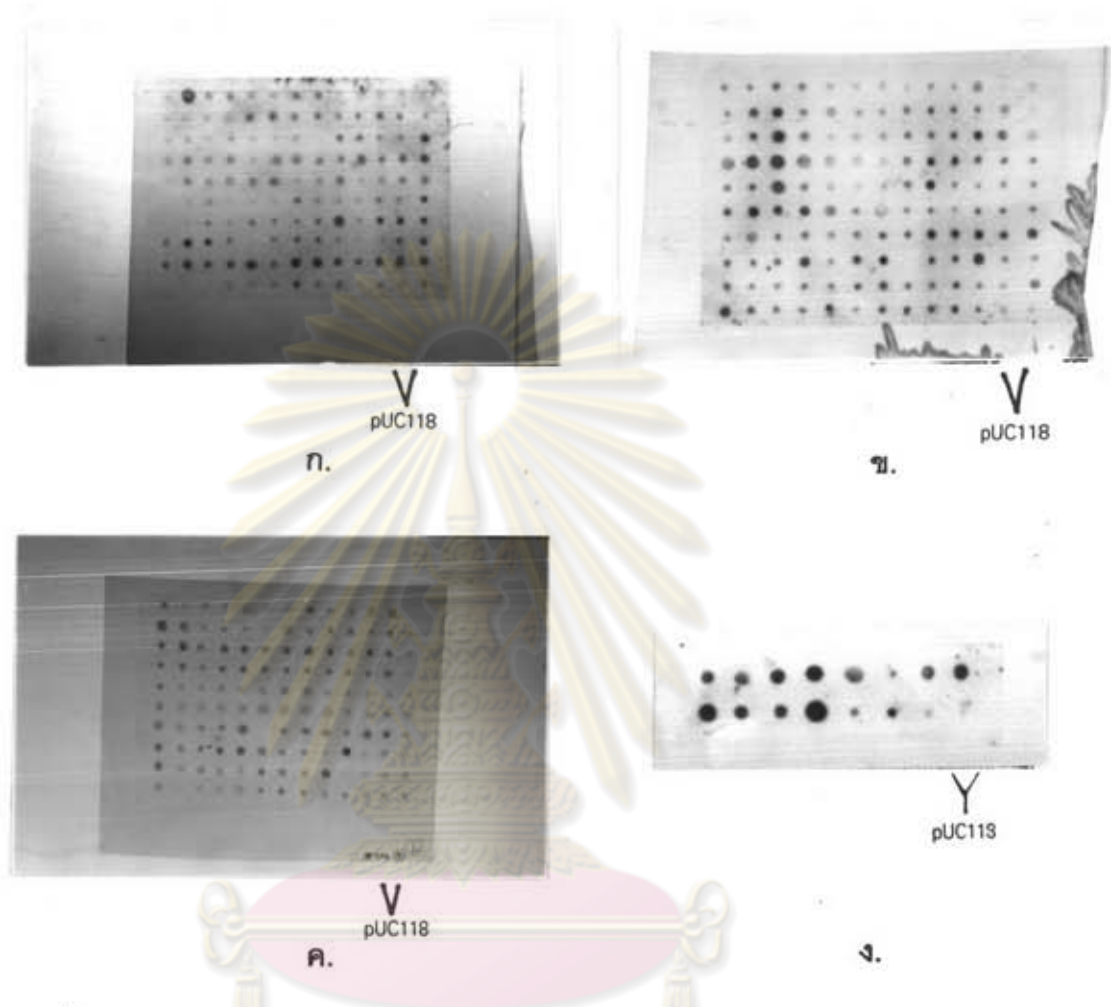
นำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการโคลนทั้งหมด 398 โคลน มาทำ dot-blot hybridization ตามวิธีในข้อ 3.7.2 ดีเอ็นเอติดตามที่ใช้เป็นยีน α -CGTase จากพลาสมิด pDS10 มีพลาสมิด pUC118 เป็นดีเอ็นเอควบคุม ผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการไฮบริดที่อุณหภูมิ 65 °C ดีเอ็นเอลูกผสมทั้ง 398 โคลน รวมทั้ง pUC118 ต่างก็ให้สัญญาณไฮบริดที่เข้มข้นไม่สามารถทำการคัดเลือกได้ (รูป 21) ดังนั้นจึงทำการทดลองเพิ่ม stringency ขึ้น เพื่อที่จะกำจัดดีเอ็นเอติดตามที่จับกับดีเอ็นเอลูกผสมบนเมมเบรนอย่างไม่จำเพาะออกไป การเพิ่ม stringency นี้ทำได้ 2 วิธี คือ การลดความเข้มข้นของเกลือในสารละลาย SSC และการเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนการวิเคราะห์สัญญาณไฮบริด (ข้อ 3.7.6) ซึ่งการทดลองนี้ได้เลือกใช้การเพิ่มอุณหภูมิ โดยในขั้นตอนของการล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออก ด้วย 0.5 X SSC ที่มี 0.1 % SDS จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 65 °C นั้น ได้ทำการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นครั้งละ 5 °C จากนั้นก็ทำไปตามขั้นตอนการวิเคราะห์สัญญาณไฮบริดตามเดิม จากผลการทดลองในรูปที่ 22 พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 65 °C ขึ้นเป็น 70 °C มีจำนวนดีเอ็นเอลูกผสมที่มีสัญญาณไฮบริดเข้มมากเหลือประมาณ 108 โคลน จากจำนวนดีเอ็นเอลูกผสมทั้งหมด แต่ก็ยังมีจำนวนมากจนยากที่จะทำการคัดเลือกอยู่ จึงได้เพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเป็น 75 °C พบว่า สัญญาณไฮบริดของดีเอ็นเอลูกผสมที่มีสัญญาณสีเข้มได้จางลง จนเหลือดีเอ็นเอลูกผสมที่มีสัญญาณไฮบริดเข้มอยู่ 7 โคลน ได้แก่ โคลน #226 #387 #388 #392 #393 #396 และ #398 (รูปที่ 23) และเมื่อลองเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเป็น 80 °C พบว่า มีดีเอ็นเอลูกผสมที่มีสัญญาณไฮบริดเข้มเหลืออยู่เพียง 1 โคลน คือ #226 ส่วนอีก 6 โคลนที่เหลือ จะให้สัญญาณที่ค่อนข้างอ่อน (รูปที่ 24) ผลการไฮบริดกับดีเอ็นเอควบคุม คือ pUC118 พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 65 °C ขึ้นเป็น 70 °C pUC118 ยังให้สัญญาณไฮบริดอ่อนๆ แต่จะไม่พบสัญญาณไฮบริดเหลืออยู่เลยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 75 °C และ 80 °C

จากผลการทดลองนี้จึงได้คัดเลือกโคลนที่ให้สัญญาณไฮบริดเข้มที่อุณหภูมิ 80 °C คือ #226 และสุ่มเลือกดีเอ็นเอลูกผสมมาอีก 3 โคลน จากโคลนที่ให้สัญญาณไฮบริดเข้มที่อุณหภูมิ 75 °C คือ #388 #392 และ #393 ดังแสดงในแผนผังรูปที่ 25 จากนั้นได้นำโคลนที่คัดเลือกนี้ไปทดสอบ amyolytic activity อีกครั้งหนึ่ง โดยการทำ replica plating ของทรานสเฟอร์แมนท์ทั้ง 4 ลงบนจานอาหารอุดมที่เสริม IPTG และแป้ง (soluble starch) 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ *E. coli* JM101 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าเรือน pDS10 ใน *Bacillus subtilis* BRB152 (Amy^-) และ *Bacillus subtilis*



รูปที่ 22 ผลการทำ Dot-blot hybridization ของดีเอ็นเอลูกผสม โดยใช้อุณหภูมิในการล้าง ดีเอ็นเอติดตาม (α -CGTase gene) ที่ 65°C .

- จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ก. clone ที่ 1 - 128
 ข. clone ที่ 129 - 256
 ค. clone ที่ 257 - 384
 ง. clone ที่ 385 - 398



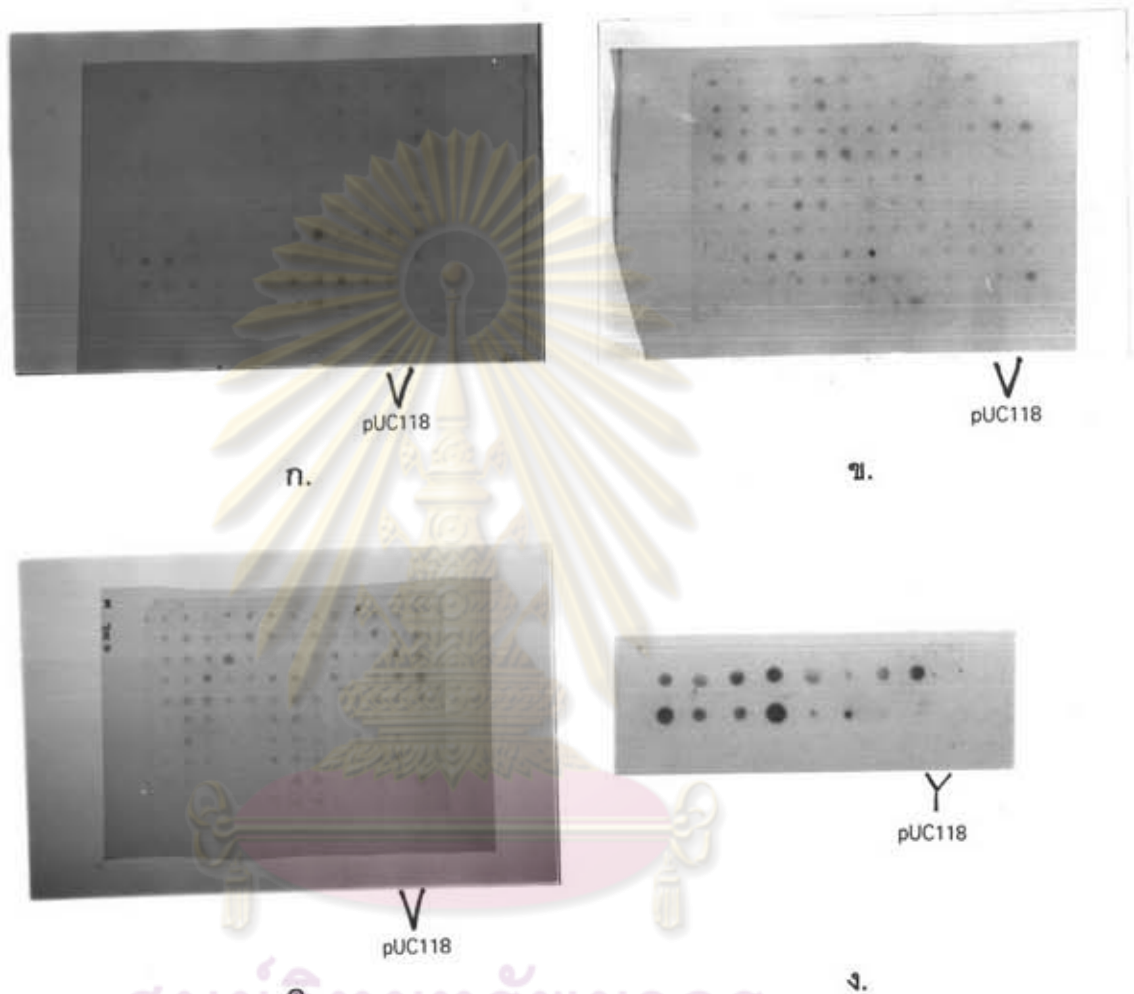
รูปที่ 23 ผลการทำ Dot-blot hybridization ของดีเอ็นเอลูกผสม โดยใช้ชุดหมุมในการล้าง ดีเอ็นเอติดตาม (α -CGTase gene) ที่ 70°C

ก. clone ที่ 1 - 128

ข. clone ที่ 129 - 256

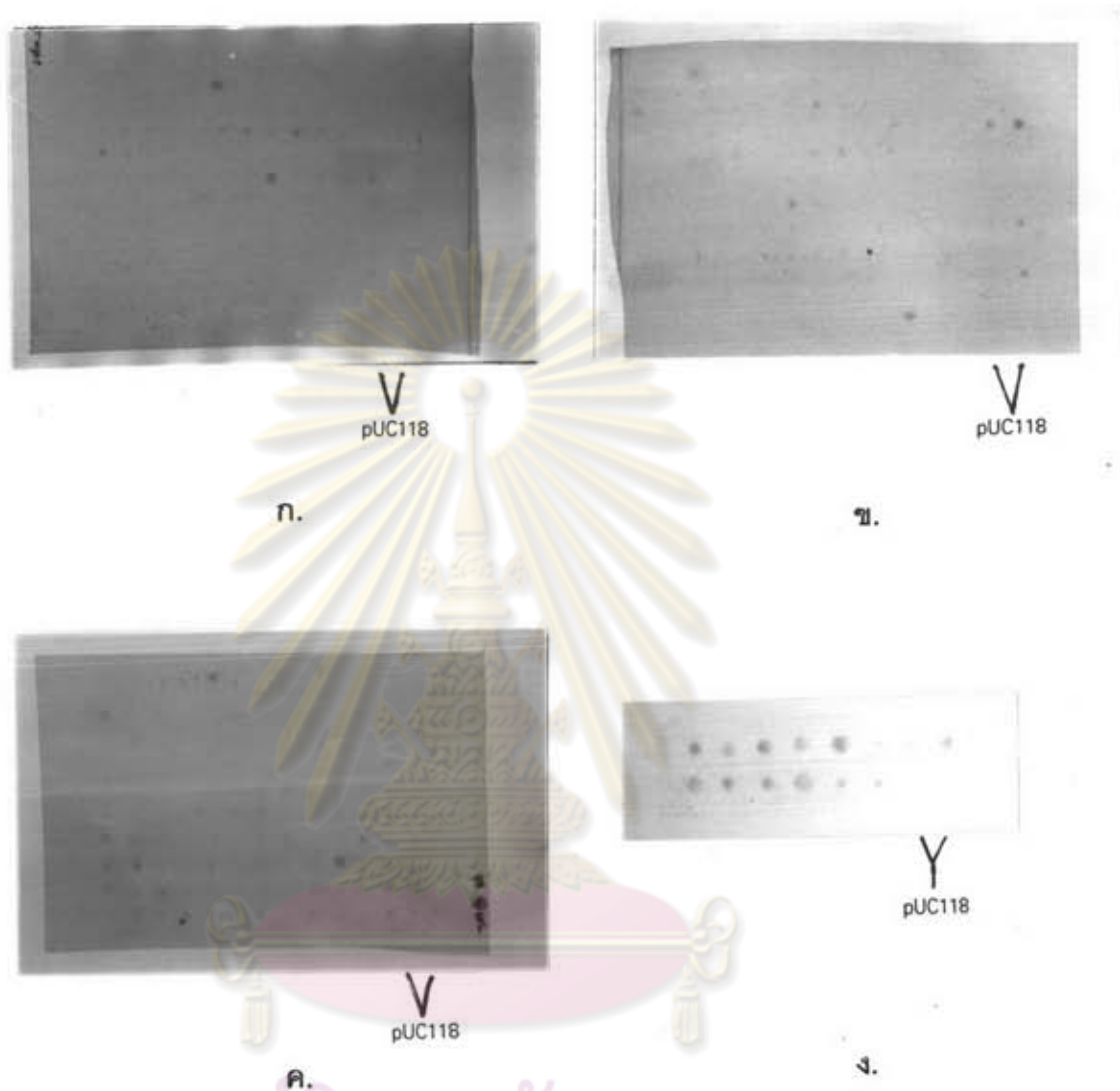
ค. clone ที่ 257 - 384

ง. clone ที่ 385 - 398



รูปที่ 24 ผลการทำ Dot-blot hybridization ของดีเอ็นเอลูกผสม โดยใช้อนุกรมในการล้าง ดีเอ็นเอติดตาม (α -CGTase gene) ที่ 75°C

- ก. clone ที่ 1 - 128
- ข. clone ที่ 129 - 256
- ค. clone ที่ 257 - 384
- ง. clone ที่ 385 - 398



รูปที่ 25 ผลการทำ Dot-blot hybridization ของดีเอ็นเอลูกผสม โดยใช้อุณหภูมิในการล้าง ดีเอ็นเอติดตาม (α -CGTase gene) ที่ 80°C

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

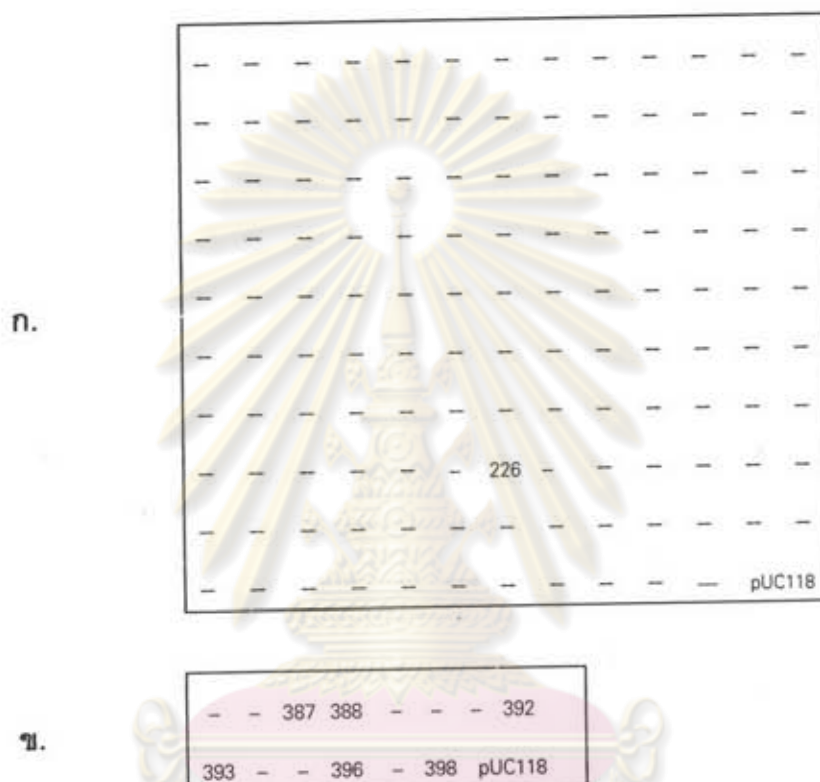
- ก. clone ที่ 1 - 128
- ข. clone ที่ 129 - 256
- ค. clone ที่ 257 - 384
- ง. clone ที่ 385 - 398

BRB152 (Amy⁻) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 60 ชั่วโมง แล้วหยดสารละลายไอโอดีน ดังแสดงในรูปที่ 26 ไม่พบวงใสรอบๆ โคโลนีของทรานสฟอร์มเม้นท์ทั้ง 4 *E. coli* JM101 และ *Bacillus subtilis* BRB152 (Amy⁻) แต่พบวงใสรอบโคโลนีของ pDS10 ใน *Bacillus subtilis* BRB152 (Amy⁻) เนื่องจากมีเอนไซม์ α -CGTase อยู่ใน pDS10 ดังนั้น ทรานสฟอร์มเม้นท์ทั้ง 4 ที่คัดเลือกได้นี้ไม่แสดง amylolytic activity เลย จึงสนใจว่า ถ้าตัดชิ้นดีเอ็นเอ insert ออกมาแล้ว มันจะสามารถไฮบริดกับ ดีเอ็นเอติดตามได้หรือไม่ จึงได้นำไปทำ Southern-blot hybridization เพื่อตรวจสอบการไฮบริดกับดีเอ็นเอติดตามต่อไป

4.2.4 การตรวจสอบ recombinant plasmids โดยวิธี Southern-blot hybridization

จากการคัดเลือกทรานสฟอร์มเม้นท์ ด้วยวิธี dot-blot hybridization ทำให้ได้ดีเอ็นเอลูกผสมที่มีสัญญาณไฮบริดเข้ามาทั้งหมด 4 โคลน ได้แก่ คือ #226 #388 #392 และ #393 นำดีเอ็นเอลูกผสมทั้ง 4 มาย่อยด้วยเอนไซม์รีstriction BamHI เพื่อตัดแยกเอาดีเอ็นเอ insert ออกจากดีเอ็นเอพาหะ ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ร่วมกับชุดดีเอ็นเอที่เป็นตัวควบคุม ได้แก่ pDS10 ย่อยด้วย BamHI / PvuII pCSBC5 ย่อยด้วย PstI และ pUC118 ย่อยด้วย EcoRI ได้เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ / HindIII พบว่า ชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ #226 มีขนาดประมาณ 5.3 กิโลเบส #388 ย่อยได้แถบดีเอ็นเอ insert 2 แถบ มีขนาดประมาณ 0.6 และ 5.0 กิโลเบส #392 ย่อยได้แถบดีเอ็นเอ insert มีขนาดประมาณ 5.0 กิโลเบส และ #393 ได้แถบดีเอ็นเอ insert ขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส (รูปที่ 27)

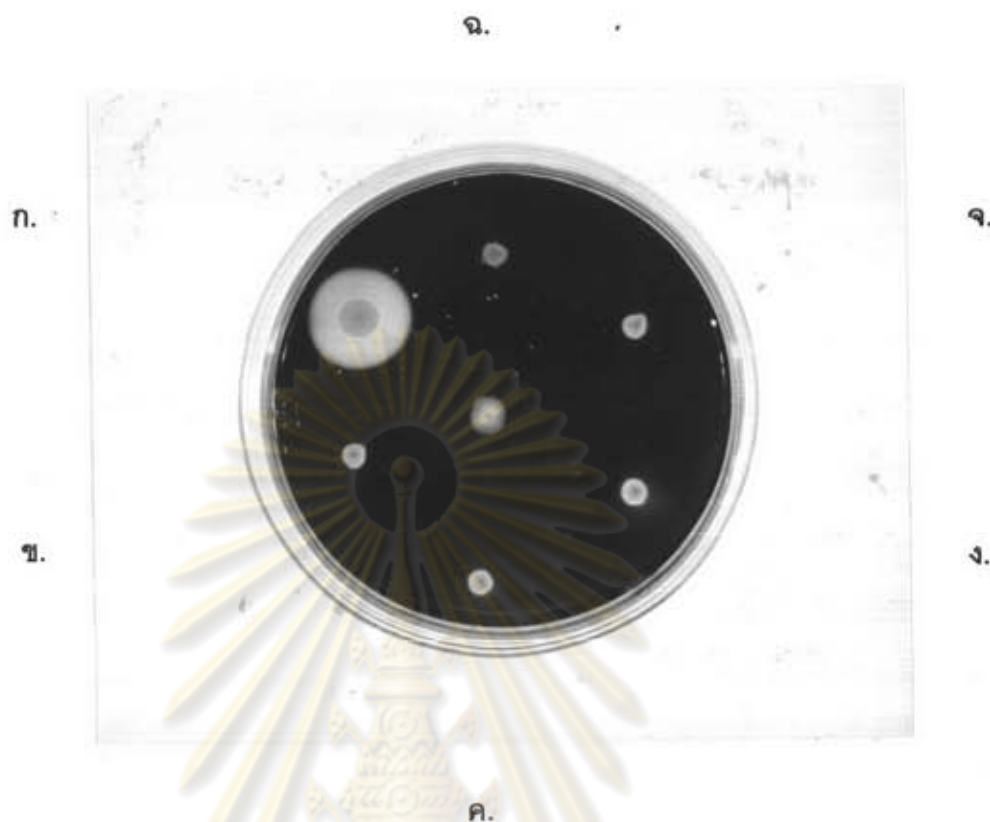
จากนั้นนำอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอทั้งหมดมาทำ Southern-blot hybridization ตามวิธีในข้อ 3.7.3 โดยไฮบริดกับดีเอ็นเอติดตามที่มีเอนไซม์ α -CGTase จากพลาสมิด pDS10 ทำการวิเคราะห์สัญญาณไฮบริด โดยในขั้นตอนการล้างดีเอ็นเอติดตามด้วย 0.5 X SSC ที่มี 0.1% SDS จะใช้อุณหภูมิ 75 °ซ ได้ผลดังรูปที่ 28 พบสัญญาณไฮบริดที่เข้มในช่องที่ 2 ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ โคลน #226 และในช่องที่ 6 ซึ่งเป็นพลาสมิด pDS10 ตัวเดียวกับดีเอ็นเอติดตาม ส่วนในช่องที่ 3 4 5 7 และ 8 นั้นไม่มีสัญญาณไฮบริดเกิดขึ้น แสดงว่า ดีเอ็นเอติดตามไม่ไฮบริดกับโคลน #388 #392 #393 พลาสมิด pCSBC5 และ pUC118 จากนั้นได้เปลี่ยนดีเอ็นเอติดตามเป็น ชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 แทน เมื่อไฮบริด พบสัญญาณเข้มในช่องที่ 7 ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 ตัวเดียวกับดีเอ็นเอติดตาม ส่วนในช่องอื่นๆไม่พบสัญญาณไฮบริดเกิดขึ้น แสดงว่า ดีเอ็นเอติดตามจาก pCSBC5 จะไม่เกิดไฮบริดกับทราน



รูปที่ 25 แผนผังแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอลูกผสมที่มีสัญญาณไฮบริด หลังจากทำ dot-blot hybridization โดยใช้อนุหภูมิในการล้างดีเอ็นเอติดตาม (α -CGTase) ที่ 75°C

ก. เป็นแมมเบรน ข. ในรูปที่ 23

ข. เป็นแมมเบรน ง. ในรูปที่ 23



รูปที่ 26 ผลของการทดสอบ amyolytic activity ด้วยสารละลายไอโอดีนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-starch agar หลังจากบ่มเลี้ยงเชื้อที่ 37 °ซ เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

โคโลนี ก. คือ *Bacillus subtilis* BRB 152 (Amy⁻) ที่ได้รับพลาสมิด pDS10

โคโลนี ข. คือ *E. coli* JM101 ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสม #226

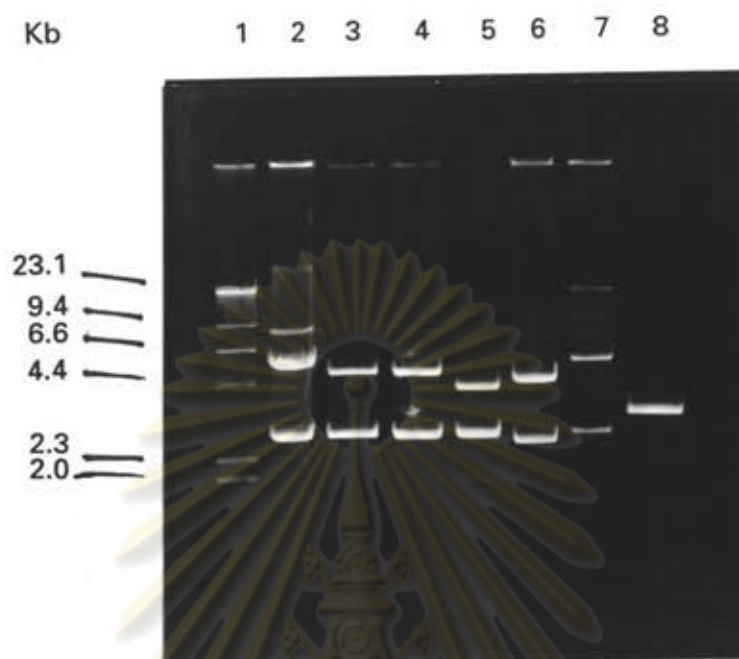
โคโลนี ค. คือ *E. coli* JM101 ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสม #388

โคโลนี ง. คือ *E. coli* JM101 ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสม #392

โคโลนี จ. คือ *E. coli* JM101 ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสม #393

โคโลนี ฉ. คือ *E. coli* JM101

โคโลนี ตรงกลาง คือ *Bacillus subtilis* BRB 152 (Amy⁻)



รูปที่ 27 ผลการย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด #226 #388 #392 #393 พลาสมิด pDS10 pCSBC5 และ pUC118 ที่จะนำไปใช้ในการทำ Southern-blot hybridization

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ / HindIII)

ช่องที่ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #226 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #388 ที่ย่อยด้วย BamHI

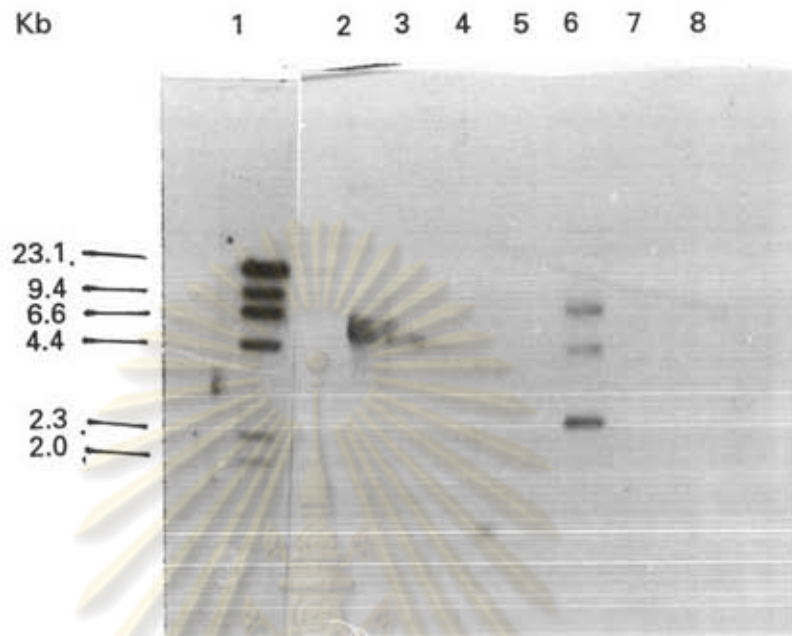
ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #392 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #393 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 6 พลาสมิด pDS10 ที่ย่อยด้วย BamHI และ PvuII

ช่องที่ 7 พลาสมิด pCSBC5 ที่ย่อยด้วย PstI

ช่องที่ 8 พลาสมิด pUC118 ที่ย่อยด้วย EcoRI



รูปที่ 28 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอติดตามที่เป็นยีน α -CGTase และ
รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #226 #388 #392 #393

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ / HindIII)

ช่องที่ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #226 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #388 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #392 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #393 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 6 พลาสมิด pDS10 ที่ย่อยด้วย BamHI และ PvuII

ช่องที่ 7 พลาสมิด pCSBC5 ที่ย่อยด้วย PstI

ช่องที่ 8 พลาสมิด pUC118 ที่ย่อยด้วย EcoRI

สฟอร์แมนท์ที่ได้ ดังรูปที่ 29 จากผลการทดลองนี้จึงเลือกได้โคลน #226 และตั้งชื่อดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #226 นี้ว่า pCSBC16 เพื่อนำไปทำการศึกษาแผนที่เรสทริกชัน ต่อไป

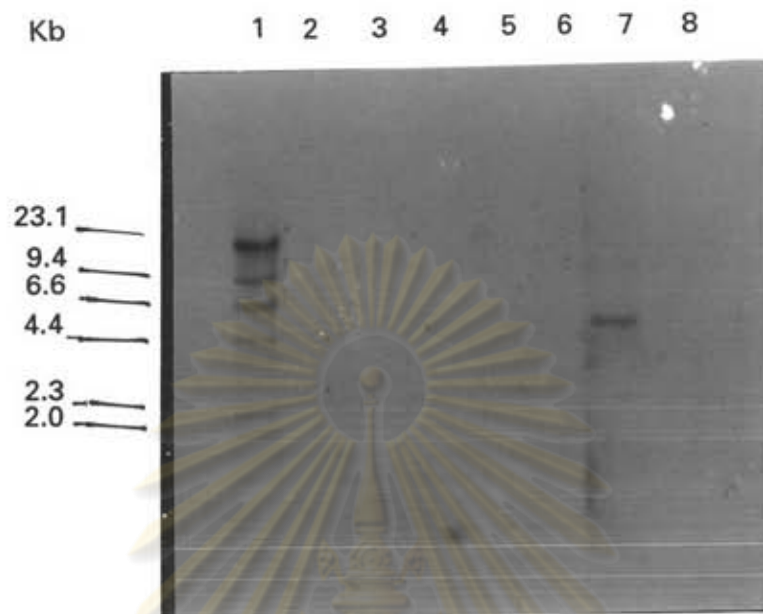
4.2.5 การศึกษาแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC16

นำพลาสมิด pCSBC16 ที่สกัดได้โดยวิธีอัลคาไลน์ ข้อ 3.1.2 ย่อยด้วยเรสทริกชัน เอนไซม์ชนิดต่างๆ แล้วนำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดของ ชิ้นดีเอ็นเอกับขนาดมาตรฐานของ λ / HindIII พบว่า พลาสมิด pCSBC16 มีขนาดประมาณ 8 กิโลเบส และเมื่อตัดด้วย BamHI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลน จะสามารถแยกแถบดีเอ็นเอออกเป็น 2 แถบ มีขนาดประมาณ 5.3 และ 2.7 กิโลเบส ซึ่งก็คือ ชิ้นดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 และ พลาสมิด pUC18 (รูปที่ 30 ช่องที่ 4)

จากการย่อย pCSBC16 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 30-33 พบว่า เอนไซม์ที่ไม่มี restriction site อยู่บนชิ้นดีเอ็นเอ insert คือ ClaI Scal EcoRI BamHI HindIII PstI KpnI SmaI และ XbaI ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ ยกเว้น ClaI เป็นเอนไซม์ที่มี restriction site อยู่ใน polylinker ของดีเอ็นเอพาหะ pUC18 จึงสามารถย่อย pCSBC16 ได้เป็น 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 8.0 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 30 ช่องที่ 8 10 และ 11 และ รูปที่ 31 ช่องที่ 4 5 7 10 และ 11

สำหรับเอนไซม์ที่มี restriction site อยู่บนชิ้นดีเอ็นเอ insert ได้แก่ NdeI ซึ่งจะมีอยู่ 1 ตำแหน่งบนชิ้นดีเอ็นเอ insert (รูปที่ 30 ช่องที่ 5) แต่ในรูปนั้นจะเห็นแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 4 แถบ มีขนาดประมาณ 23.0 8.0 4.1 และ 3.9 กิโลเบส ซึ่งแถบที่มีขนาดประมาณ 23.0 และ 8.0 กิโลเบส นั้น เป็นแถบดีเอ็นเอที่ถูกย่อยไม่สมบูรณ์ ดูเทียบได้กับแถบดีเอ็นเอของ pCSBC16 ที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ใดๆ ส่วนแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 4.1 และ 3.9 กิโลเบส นั้น คือแถบดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วย NdeI โดยสมบูรณ์ แต่ที่ถูกย่อยออกเป็น 2 แถบ ก็เพราะว่า บนพลาสมิด pUC18 ก็มี ตำแหน่งของ NdeI อยู่ 1 ตำแหน่งเช่นกัน ในรูปที่ 32 ช่องที่ 4 เมื่อย่อย pCSBC16 ด้วยเอนไซม์ EcoRI / NdeI จะได้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาดประมาณ 3.9 2.4 และ 1.7 กิโลเบส แสดงว่า EcoRI ย่อยชิ้น 4.1 กิโลเบส ออกเป็นสองส่วน เมื่อเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอพาหะแล้ว ตำแหน่งของ NdeI บนชิ้นดีเอ็นเอ insert นั้น จะอยู่ห่างจาก EcoRI ไปประมาณ 1.7 กิโลเบส

ในรูปที่ 33 ช่องที่ 6 แสดงให้เห็นว่าบนชิ้นดีเอ็นเอ insert มีตำแหน่งของ PvuII อยู่ 1 ตำแหน่ง ที่เห็นแถบดีเอ็นเอ 3 แถบมีขนาดประมาณ 3.1 2.6 และ 2.3 กิโลเบส เนื่องจากบน พลาสมิด pUC18 มีตำแหน่งของ PvuII อยู่แล้ว 2 ตำแหน่ง และในรูปที่ 33 ช่องที่ 2 เป็นการย่อย ด้วยเอนไซม์ NdeI / PvuII ช่วยบอกให้ทราบว่า แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 3.1 กิโลเบส นั้น มีตำแหน่ง



รูปที่ 29 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอติดตามที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอ insert จาก
พลาสมิด pCSBC5 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด #226 #388 #392 #393

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ / HindIII)

ช่องที่ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #226 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #388 ที่ย่อยด้วย BamHI

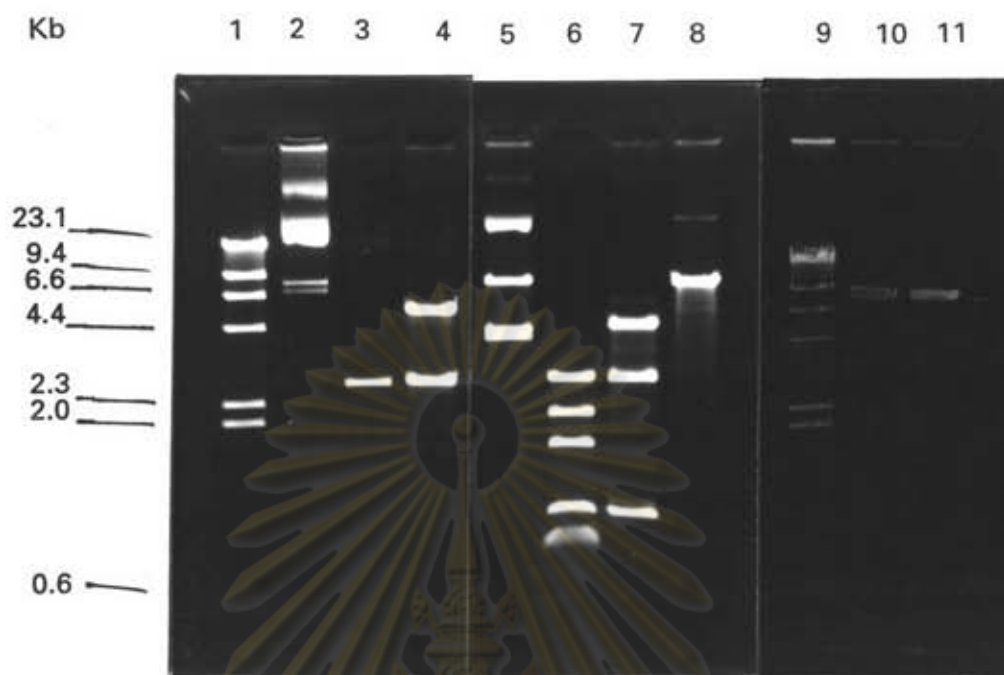
ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #392 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด #393 ที่ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 6 พลาสมิด pDS10 ที่ย่อยด้วย BamHI และ PvuII

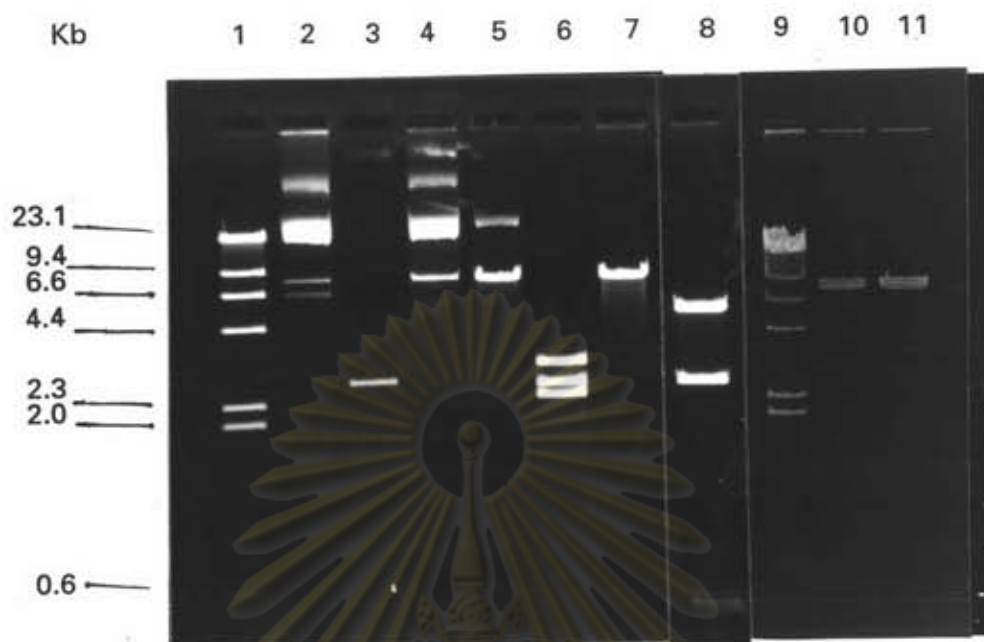
ช่องที่ 7 พลาสมิด pCSBC5 ที่ย่อยด้วย PstI

ช่องที่ 8 พลาสมิด pUC118 ที่ย่อยด้วย EcoRI



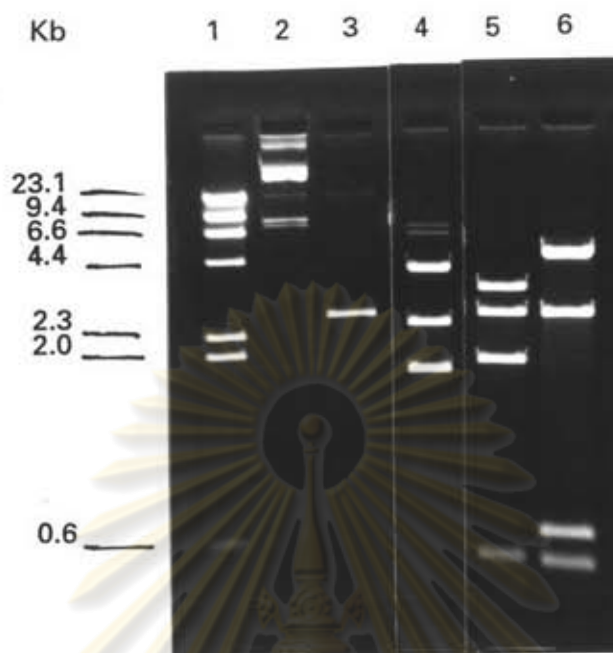
รูปที่ 30 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16

- ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ / *HindIII*
 ช่องที่ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ที่ไม่ถูกย่อย
 ช่องที่ 3 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *EcoRI*
 ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย *BamHI*
 ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย *NdeI*
 ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย *AccI*
 ช่องที่ 7 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย *SalI*
 ช่องที่ 8 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย *HindIII*
 ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ / *HindIII*
 ช่องที่ 10 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย *PstI*
 ช่องที่ 11 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย *KpnI*



รูปที่ 31 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16

- ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ / HindIII
 ช่องที่ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ที่ไม่ถูกย่อย
 ช่องที่ 3 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย EcoRI
 ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย ClaI
 ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย ScaI
 ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย PvuII
 ช่องที่ 7 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย EcoRI
 ช่องที่ 8 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย MluI
 ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ / HindIII
 ช่องที่ 10 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย XbaI
 ช่องที่ 11 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย SmaI



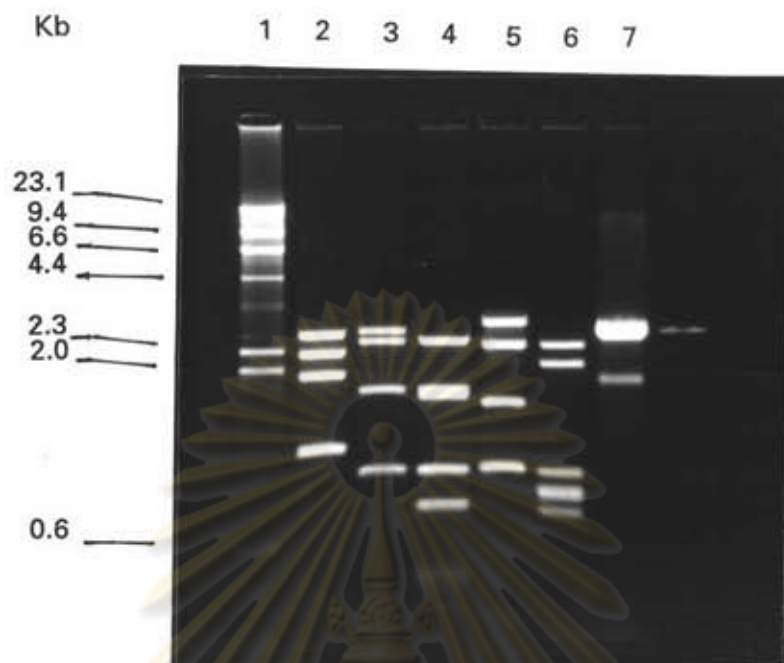
รูปที่ 32 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16

- ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ / *Hind*III
 ช่องที่ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ที่ไม่ถูกย่อย
 ช่องที่ 3 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Eco*RI
 ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย *Eco*RI และ *Nde*I
 ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย *Eco*RI และ *Mlu*I
 ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย *Hind*III และ *Mlu*I

ของ *NdeI* อยู่ด้วย จึงทำให้ถูกย่อยเป็น 2 ชิ้นที่มีขนาดประมาณ 1.2 และ 1.9 กิโลเบส แสดงว่าตำแหน่งของ *PvuII* ที่อยู่บนชิ้นดีเอ็นเอ insert นั้นมีระยะห่างจากตำแหน่งของ *PvuII* บนดีเอ็นเอพาหะ ทางด้าน *EcoRI* ไปประมาณ 3.1 กิโลเบส

เอนไซม์ *MluI* สามารถย่อย pCSBC16 ได้เป็นแถบดีเอ็นเอ 3 แถบด้วยกัน มีขนาดประมาณ 0.4 2.5 และ 5.0 กิโลเบส (รูปที่ 31 ช่องที่ 8) เมื่อย่อย pCSBC16 ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* / *MluI* จะได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 4 แถบ มีขนาดประมาณ 0.4 1.8 2.5 และ 3.2 กิโลเบส (รูปที่ 32 ช่องที่ 5) ซึ่งจะเห็นว่า *EcoRI* สามารถย่อยชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.0 กิโลเบส ออกได้เป็น 2 ชิ้น มีขนาดประมาณ 1.0 และ 3.2 กิโลเบส แสดงว่าแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.0 กิโลเบสนั้น มีส่วนของดีเอ็นเอพาหะติดอยู่ด้วย จึงมีตำแหน่งของเอนไซม์ *EcoRI* และชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส นั้น น่าจะเป็นชิ้นดีเอ็นเอ insert ส่วนปลายทางด้าน *EcoRI* แสดงว่า *MluI* จะต้องมีความห่างจากปลายทางด้าน *EcoRI* ไปประมาณ 1.8 กิโลเบสเช่นกัน เพื่อเป็นการยืนยันตำแหน่งของ *MluI* จึงย่อย pCSBC16 ด้วย *HindIII* / *MluI* ซึ่งจะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 0.4 0.6 2.5 และ 4.4 กิโลเบส (รูปที่ 32 ช่องที่ 6) แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 5.0 กิโลเบสนั้นมีตำแหน่งของ *HindIII* อยู่ด้วย และถูกย่อยออกเป็น 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 0.6 และ 4.4 กิโลเบส จึงแน่ใจได้ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 5.0 กิโลเบสนั้นมีส่วนของดีเอ็นเอพาหะอยู่จริง และชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 0.6 กิโลเบสนั้นน่าจะเป็นชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่อยู่ส่วนปลายทางด้าน *HindIII* ส่วน *MluI* อีกตำแหน่งหนึ่งนั้น ไม่สามารถจะตรวจสอบได้ว่า มีตำแหน่งที่แน่นอนอยู่ใกล้กับตำแหน่งของ *MluI* ทางด้านใด เนื่องจากไม่สามารถหาเอนไซม์ที่มีตำแหน่งใกล้เคียงเปรียบเทียบได้

เอนไซม์ *SalI* สามารถย่อย pCSBC16 ได้เป็นแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 3 แถบ มีขนาดประมาณ 1.0 2.7 และ 4.3 กิโลเบส (รูปที่ 30 ช่องที่ 7) แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบสนั้น น่าจะเป็นแถบของดีเอ็นเอพาหะ เนื่องจากมีขนาดที่สอดคล้องกับขนาดของดีเอ็นเอพาหะ (31 ช่องที่ 3) แสดงว่าต้องมีตำแหน่งของ *SalI* อยู่ที่ปลายทางด้านหนึ่งของชิ้นดีเอ็นเอ insert ใกล้กับ *EcoRI* เนื่องจากปลายทางด้าน *HindIII* บนดีเอ็นเอพาหะนั้น มี *SalI* อยู่ 1 ตำแหน่ง จึงสามารถย่อยให้ชิ้นดีเอ็นเอ insert แยกออกจากดีเอ็นเอพาหะได้ ส่วน *SalI* อีกตำแหน่งหนึ่งนั้น ย่อยชิ้นดีเอ็นเอ insert ออกเป็น 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 1.0 และ 4.3 กิโลเบส และเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ *SalI* / *NdeI* (รูปที่ 33 ช่องที่ 3) พบว่าแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 4.3 กิโลเบส ถูกย่อยออกเป็น 2 แถบมีขนาดประมาณ 1.7 และ 2.4 กิโลเบส แสดงว่าแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4.3 กิโลเบสนั้น น่าจะอยู่ทางด้านปลายที่มีตำแหน่งของ *NdeI* อยู่ด้วย จึงสรุปได้ว่า *SalI* ตำแหน่งที่ 3 นี้ อยู่ห่างจากปลายทางด้านที่มีตำแหน่งของ *HindIII* เข้ามาใน insert ประมาณ 1.0 กิโลเบส



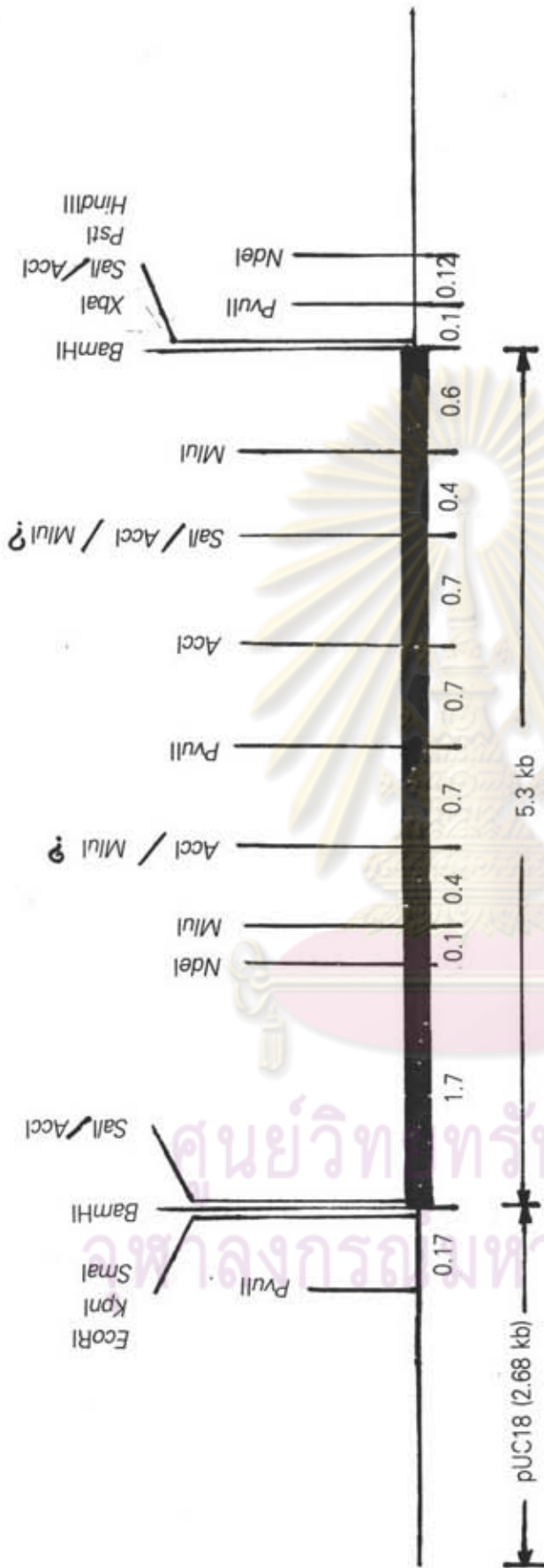
รูปที่ 33 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16

- ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ / HindIII
 ช่องที่ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย PvuII และ NdeI
 ช่องที่ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย SalI และ NdeI
 ช่องที่ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย AclI และ NdeI
 ช่องที่ 5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย SalI และ PvuII
 ช่องที่ 6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย AclI และ PvuII
 ช่องที่ 7 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย EcoRI

และเพื่อเป็นการยืนยันตำแหน่งของ *Sall* นี้ จึงได้ย่อย pCSBC16 ด้วยเอนไซม์ *Sall* / *PvuII* (รูปที่ 33 ช่องที่ 5) ได้แถบดีเอ็นเอ 4 แถบ มีขนาดประมาณ 2.9 2.5 1.4 และ 1.0 กิโลเบส ซึ่งเป็นไปตามที่คำนวณไว้ทุกประการ โดยแถบดีเอ็นเอขนาด 2.9 และ 1.4 กิโลเบส นั้นเป็นแถบของดีเอ็นเอ insert ที่ถูกเอนไซม์ *PvuII* ซึ่งมีอยู่ 1 ตำแหน่งบนชิ้น insert ตัดแยกออก ส่วนแถบดีเอ็นเอขนาด 1.0 กิโลเบสนั้น เป็นแถบดีเอ็นเอ insert ที่ถูกเอนไซม์ *Sall* ตัดออก ตรงกับผลของการย่อยด้วยเอนไซม์ *Sall* และ *Sall* / *NdeI* และแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 2.5 กิโลเบส นั้นเป็นแถบของดีเอ็นเอพาหะ ที่ถูกเอนไซม์ *PvuII* ซึ่งมีอยู่ 2 ตำแหน่งบนดีเอ็นเอพาหะตัดออกไปประมาณ 200 เบส ดังแสดงในแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC16 (รูปที่ 34)

เอนไซม์ *AccI* มีตำแหน่งบนชิ้นดีเอ็นเอ insert ทั้งหมด 5 ตำแหน่ง เนื่องจากสามารถย่อย pCSBC16 ออกได้เป็น 5 แถบ มีขนาดประมาณ 0.7 1.0 1.6 2.0 และ 2.7 กิโลเบส (รูปที่ 30 ช่องที่ 6) และเช่นเดียวกับเอนไซม์ *Sall* แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบสนั้นมีขนาดเท่ากับแถบของดีเอ็นเอพาหะ แสดงว่าที่ปลายด้าน *EcoRI* ของชิ้นดีเอ็นเอ insert จะต้องมีความยาวของ *AccI* และเป็นตำแหน่งเดียวกับจุดตัดของ *Sall* อีกด้วย ทั้งนี้เพราะ recognition site ของ *Sall* เป็น subset ของ recognition site ของ *AccI* แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบสนั้น มีขนาดตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Sall* (รูปที่ 30 ช่องที่ 7) แสดงว่าทั้งสองชิ้นนั้นเป็นดีเอ็นเอชิ้นเดียวกัน และมีตำแหน่งที่ห่างจากปลายด้าน *HindIII* ไปประมาณ 1.0 กิโลเบสเช่นเดียวกัน เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ *AccI* / *NdeI* (รูปที่ 33 ช่องที่ 4) พบว่าแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 2.0 กิโลเบส ถูกเอนไซม์ *NdeI* ย่อยให้มีขนาดเล็กลง แยกออกได้เป็น 2 แถบ มีขนาดประมาณ 0.3 และ 1.7 กิโลเบส แสดงว่า แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2.0 กิโลเบสนี้ เป็นส่วนปลายทางด้านที่มีตำแหน่งตัดของ *EcoRI* และ *NdeI* หมายความว่า มีตำแหน่งของ *AccI* อยู่หนึ่งตำแหน่งที่อยู่ห่างจาก *EcoRI* ไปประมาณ 2.0 กิโลเบส และห่างจาก *NdeI* ประมาณ 0.4 กิโลเบส เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ *AccI* / *PvuII* (รูปที่ 33 ช่องที่ 6) พบว่า แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1.6 กิโลเบสนั้น ถูกเอนไซม์ *PvuII* ตัดแยกออกเป็น 2 แถบ มีขนาดเท่าๆ กัน ประมาณ 0.8 กิโลเบส ซึ่งจากรูปจะสังเกตเห็นได้ว่า แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 0.8 กิโลเบสนั้น มีความเข้มเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าจากปกติ และมีแถบกว้างกว่าปกติ แสดงว่า ตำแหน่งของ *AccI* นี้ อยู่ห่างจากปลาย *EcoRI* มาประมาณ 3.6 กิโลเบส โดยมีตำแหน่งของเอนไซม์ *PvuII* อยู่ประมาณกึ่งกลางระหว่างตำแหน่งของ *AccI* ทั้งสอง และห่างจากตำแหน่งของ *Sall* มาประมาณ 0.7 กิโลเบส ซึ่งก็คือแถบดีเอ็นเอที่เล็กที่สุดนั่นเอง ดังนั้นจึงสามารถสรุปเป็นแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC16 ได้ดังแสดงในรูปที่ 34

จากแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC16 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC5 พบว่า มีความคล้ายคลึงกันมาก จึงเกิดความสงสัยว่า อาจจะมีคามผิดพลาดเกิดขึ้นใน



รูปที่ 34 แผนที่เรสทริคชันของรีพดอมบีแชนท์พลาสมิด pCSBC16

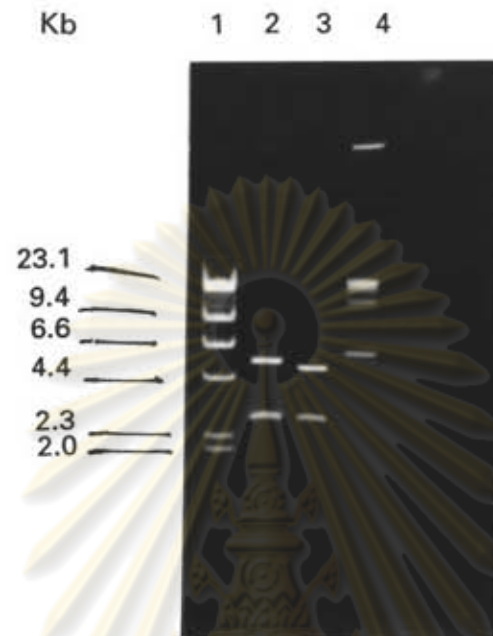
█ : แสดงถึงถิ่นดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11

— : แสดงถึงพลาสมิด pUC18

ขั้นตอนของการโคลนยีน CGTase จึงได้ทำการย่อยพลาสมิดทั้งสองให้แยกชิ้นดีเอ็นเอ insert ออกมา ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert จากพลาสมิดทั้งสองได้ผลดังแสดงในรูปที่ 35 พบว่า ชิ้นดีเอ็นเอ insert จากพลาสมิด pCSBC16 มีขนาดใหญ่กว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ของพลาสมิด pCSBC5 ประมาณ 100-200 เบส แสดงว่า pCSBC16 เป็นพลาสมิดที่ได้มาจากการโคลนยีน CGTase ในการทดลองครั้งนี้จริง และเพื่อยืนยันให้หนักแน่นขึ้นจึงได้ทำการย่อยพลาสมิด pCSBC5 ด้วย *Bam*HI ซึ่งพบว่า *Bam*HI ไม่สามารถย่อย pCSBC5 ได้ (รูปที่ 35 ช่องที่ 4) แสดงว่า restriction site ของ *Bam*HI ได้เสียไปจากการโคลนยีน CGTase ต่อเนื่องของสุรศักดิ์แล้ว (สุรศักดิ์, 2536)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 35 ผลการเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ระหว่างพลาสมิด pCSBC5 และ pCSBC16

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ / HindIII

ช่องที่ 2 พลาสมิด pCSBC16 ย่อยด้วย BamHI

ช่องที่ 3 พลาสมิด pCSBC5 ย่อยด้วย PstI

ช่องที่ 4 พลาสมิด pCSBC5 ย่อยด้วย BamHI

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย