



ผลการทดลอง

3.1 การจำแนกสปีชีส์ของ *Azospirillum* sp. A_{1,2}

เนื่องจาก *Azospirillum* ที่ได้รับมาจากกรมวิชาการ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มีถึง 4 สายพันธุ์ คือ *Azospirillum brasilense* Sp₇, *Azospirillum brasilense* A₂, *Azospirillum lipoferum* SpMRa, และ *Azospirillum* sp. A_{1,2} ดังนั้นในขั้นแรกจำเป็นต้องศึกษาสมบัติบางประการของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ซึ่งสมบัติเหล่านี้จะใช้เป็นประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการเป็นเซลล์เจ้าเรือนของการทรานส์ฟอร์มพลาสมิด pCK3

3.1.1 ความไวต่อยาปฏิชีวนะ

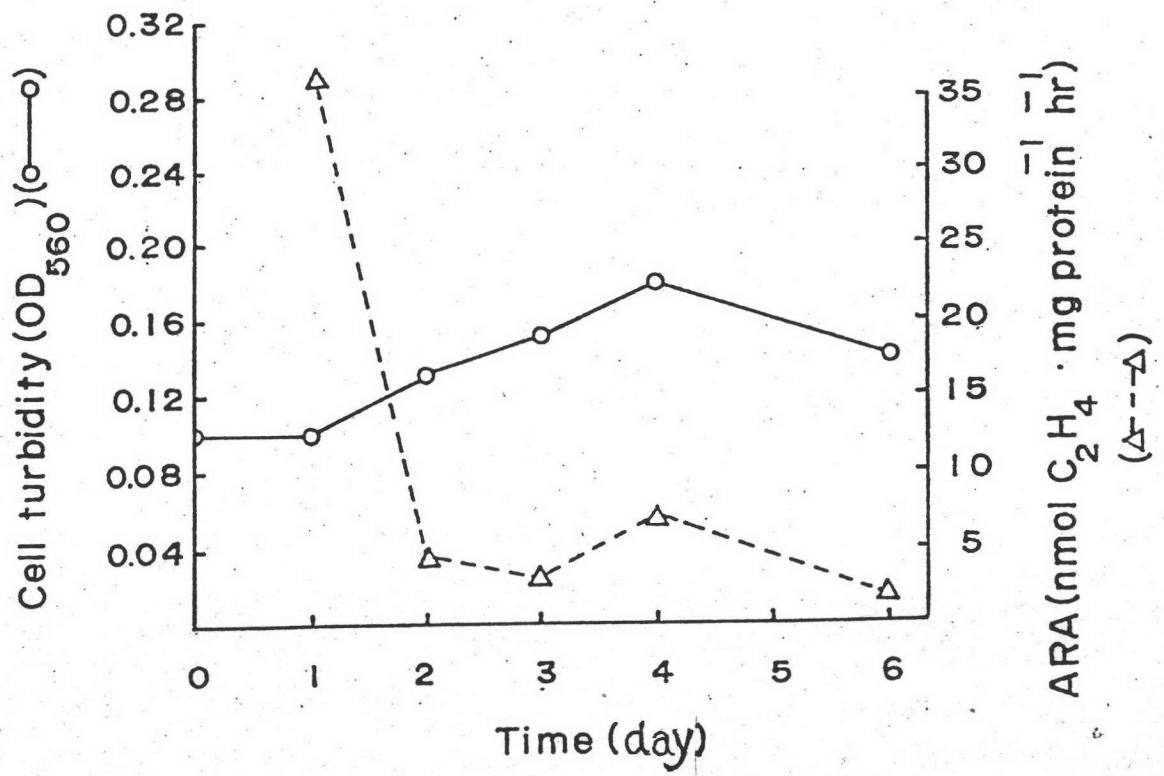
เนื่องจากพลาสมิด pCK3 เป็นพลาสมิดพาหะที่มีจีนเครื่องหมายคือ จีนต้านเทตระไซคลินและคานาไมซิน ดังนั้นในขั้นแรกจะต้องทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะทั้งสองที่สามารถระงับการเจริญเติบโตของ *Azospirillum* ทั้ง 4 สายพันธุ์อย่างสิ้นเชิง พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเทตระไซคลิน 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคานาไมซิน 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Azospirillum* ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ (ตารางที่ 2)

3.1.2 รูปแบบการตรึงไนโตรเจน

เพื่อที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตและแอกติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจึงได้ติดตามความชุ่มของคัลเจอร์และวัดแอกติวิตีของอะเซทิลรีดักชัน (ARA) ในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน โดยทำการทดลองในเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ซึ่งให้รูปแบบการเจริญและแอกติวิตีของอะเซทิลรีดักชันคล้ายคลึงกัน คือ ในช่วง 2 วันแรกแบคทีเรียจะมีการเจริญเข้าและเข้าสู่ล็อกเฟสในวันที่ 2 จากนั้นจึงเจริญเข้าสู่สแตชันเนอรีเฟส สำหรับสายพันธุ์ที่น่าสนใจ คือ *Azospirillum* sp. A_{1,2} ซึ่งมีค่าการเจริญสูงสุดและแอกติวิตีของอะเซทิลรีดักชันสูงกว่าอีก 3 สายพันธุ์มาก โดยให้ค่าการเจริญสูงสุด OD₅₆₀ เท่ากับ 0.17 และค่าแอกติวิตีของอะเซทิลรีดักชันสูงสุดเท่ากับ 35 นาโนโมล C₂H₄ / มิลลิกรัมโปรตีน /

ตารางที่ 2 ระดับความต้านยาปฏิชีวนะใน *Azospirillum*. spp

ชื่อสายพันธุ์	ระดับความต้านยาปฏิชีวนะ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	เททระไซคลิน	คานาไมซิน
<i>Azospirillum</i> sp. A ₁₂	4	2
<i>A. brasilense</i> Sp ₇	3	1
<i>A. lipoferum</i> SpMRa ₁	1	1
<i>A. brasilense</i> A ₂	6	1



รูปที่ 4 รูปแบบการเจริญและแอกติวิตีจำเพาะของอะเซทิลรีดักชันของ *Azospirillum* sp. A_{1,2} ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนที่ 30 องศาเซลเซียส

ข้าวโมง (รูปที่ 4)

3.1.3 การเจริญของ *Azospirillum spp.* ในอาหารอุดม NB

เมื่อเจริญ *Azospirillum* ทั้ง 4 ในอาหารอุดม NB แล้วติดตามการเจริญ ได้ผลดังรูปที่ 5 คือ สายพันธุ์ทั้ง 4 มีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดโดยดูจาก ค่าการเจริญสูงสุดและค่า doubling time โดย *A. brasilense Sp₇* มีค่าการเจริญ สูงสุดวัดที่ OD₅₆₀ เท่ากับ 1.20 ค่า doubling time เท่ากับ 1.3 หน่วย สำหรับ *A. brasilense A₂* มีค่าการเจริญสูงสุด OD₅₆₀ เท่ากับ 0.87 doubling time เท่ากับ 2.3 หน่วย ส่วน *Azospirillum sp. A_{1,2}* มีค่าความขุ่นสูงสุดใกล้เคียงกับ *A. brasilense Sp₇* คือ 1.18 แต่ค่า doubling time เท่ากับ 2.8 หน่วย สำหรับ *A. lipoferum SpMRa₁* มีค่าความขุ่นสูงสุดเท่ากับ 0.66 และค่า doubling time เท่ากับ 4.2

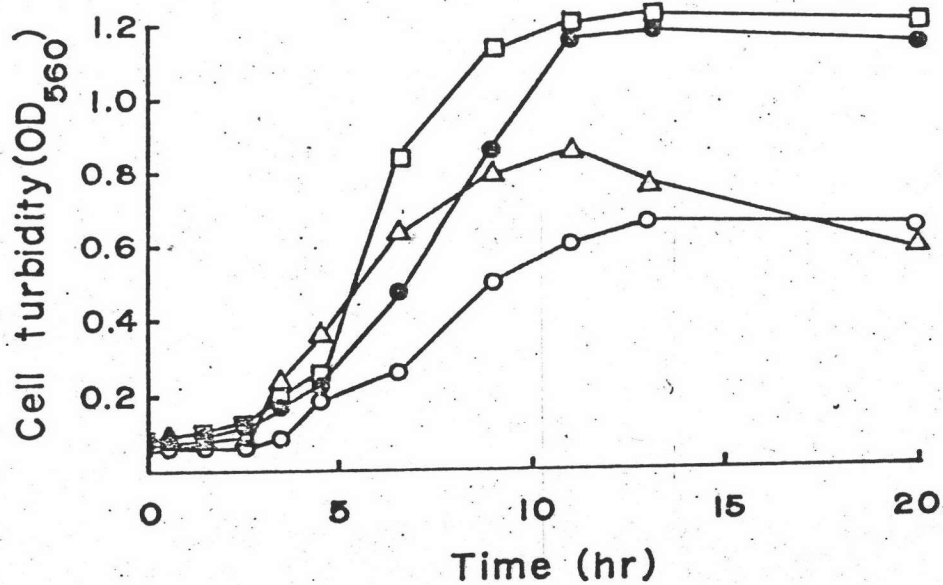
เนื่องจาก *Azospirillum sp. A_{1,2}* เป็นสายพันธุ์พื้นเมืองที่มีการเจริญ ในอาหารที่ปราศจากต้นตอไนโตรเจนและในอาหารอุดมได้ใกล้เคียงกับ *A. brasilense Sp₇* ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานจากต่างประเทศ และยังมีค่าแอกติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชันสูงกว่า ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการปรับปรุงพันธุ์ *Azospirillum sp. A_{1,2}* ต่อไป

3.1.4 การจำแนกสปีชีส์ของ *Azospirillum sp. A_{1,2}*

เนื่องจาก *Azospirillum sp. A_{1,2}* ยังไม่ได้รับการจำแนกสปีชีส์ จึงได้ ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีที่สำคัญในการจำแนกสปีชีส์ ผลการตรวจสอบแสดงดังตารางที่ 3

3.1.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Azospirillum sp. A_{1,2} เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อเจริญ ในอาหารอุดมมีรูปร่างเป็นท่อนสั้นๆตรงจนถึงโค้งเล็กน้อย (รูปที่ 6) เมื่อเจริญในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนที่มีมาเลทเป็นสารต้นตอคาร์บอนมีรูปร่างเป็นรูป S ซึ่งมีความกว้าง และความยาวมาก (รูปที่ 7) ลักษณะโคโลนีเมื่อเจริญในอาหารอุดมขณะที่อายุ 1 วัน มี รูปร่างกลม ผิวมัน นูน ขอบเรียบและไม่มีสี แต่เมื่ออายุประมาณ 3 วันโคโลนีเริ่มเปลี่ยน เป็นสีน้ำตาลแดงและจะสีเข้มขึ้นเมื่ออายุของเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อเจริญในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอ ไนโตรเจน จะเริ่มเห็นโคโลนีชัดเจนเมื่ออายุ 2 วัน โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวแห้ง ทึบแสง

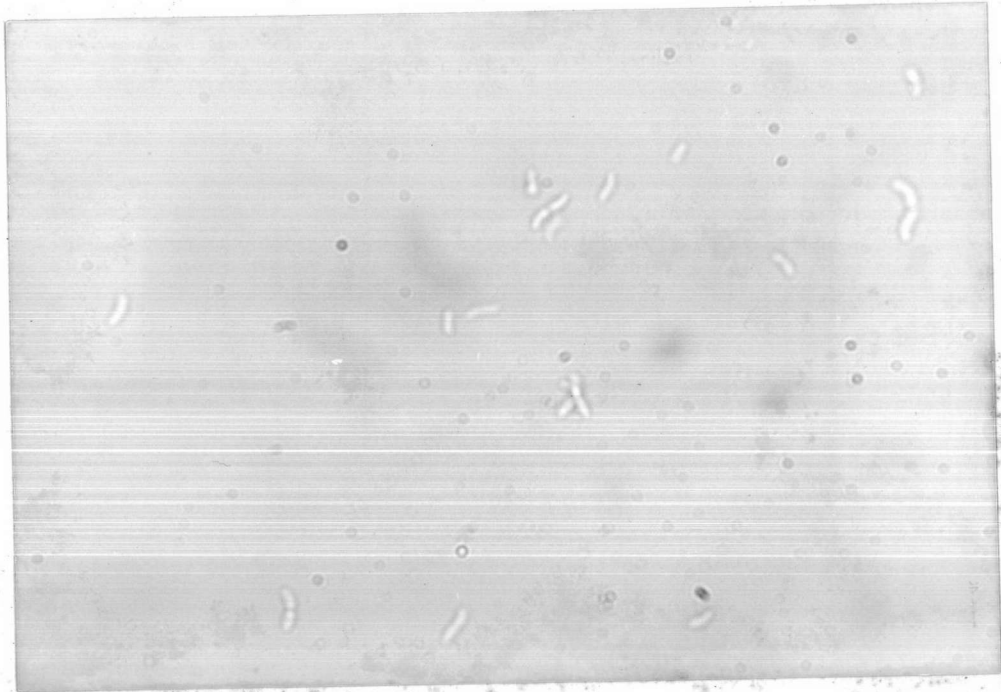


รูปที่ 5 รูปแบบการเจริญของ *Azospirillum* spp. ในอาหารอดัม NB ที่ 30 องศาเซลเซียส

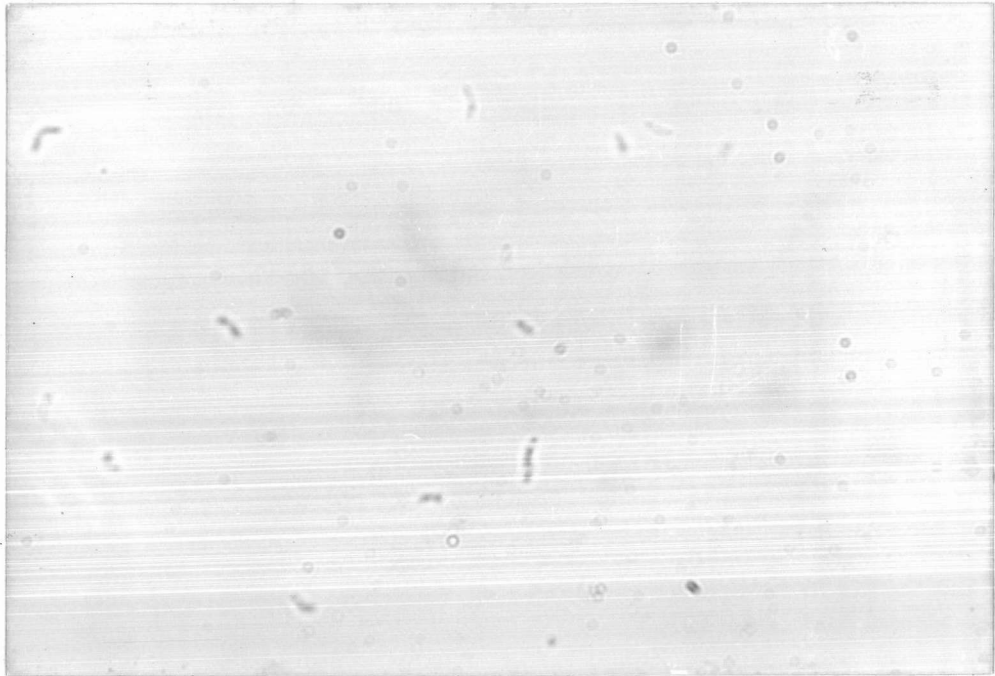
- ▲ *Azospirillum brasilense* A₂ ● *Azospirillum* sp. A₁₂
 □ *Azospirillum brasilense* Sp₇ ○ *Azospirillum lipoferum* SpMRa₁

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และ ชีวเคมีของ *Azospirillum* sp. A₁₂

การทดลอง	<i>A. brasilense</i>	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. sp. A₁₂</i>
การติดสีแกรม (gram stain)	ติดสีแดง	ติดสีแดง	ติดสีแดง
รูปร่างของเซลล์ใน peptone-succinate salt medium, NB	ท่อนสั้นๆตรงหรือโค้ง เล็กน้อย	ท่อนสั้นๆตรงหรือโค้ง เล็กน้อย	ท่อนสั้นๆค่อนข้าง โค้ง (vibroid cell)
รูปร่างของเซลล์ใน nitrogen free malate medium	ท่อนสั้นๆ, vibroid เคลื่อนที่ได้	รูป ๘ มีความกว้าง และยาวมาก ไม่ - เคลื่อนที่	รูป ๘ มีความกว้าง และยาวมาก ไม่ - เคลื่อนที่
ลักษณะและสีของโคโลนี บนอาหารอุดม	ผิวมัน, นูน, ขอบเรียบ ไม่มีสี เมื่อแกมสีชมพู	ผิวมัน, นูน, ขอบเรียบ ไม่มีสี เมื่อแกมสีชมพู	ผิวมัน, นูน, ขอบ- เรียบ, ไม่มีสี เมื่อ แกมสีน้ำตาลแดง
ลักษณะและสีของโคโลนี บนอาหารที่ไม่มีแหล่งต้น- ตอไนโตรเจน	ขนาดเล็ก, แห้ง, ทึบ ขอบเรียบ, สีชมพู	ขนาดเล็ก, แห้ง, ทึบ ขอบเรียบ, สีชมพู	ขนาดเล็ก, แห้ง, ทึบ ขอบเรียบ, สีชมพู
การเคลื่อนที่ของเซลล์ใน อาหารอุดม	+	+	+
ออกซิเดส	+	+	+
ยูรีเอส	+	+	+
คะตะเลส	+	+	+
nitrate reduction	+	+	+
การใช้น้ำตาลกลูโคส	—	+	+
การผลิตกรดเมื่อเลี้ยงใน peptone-based-	—	+	+
glucose			
ความต้องการไบโอติน	—	+	+



รูปที่ 6 รูปร่างของ *Azospirillum* sp. A₁₂ เมื่อเจริญใน MPSS medium



รูปที่ 7 รูปร่างของ *Azospirillum* sp. A₁₂ เมื่อเจริญในอาหารที่ไม่มีแหล่งต้นตอไนโตรเจน

กลม ขอบเรียบ และมีสีชมพูโดยที่สีชมพูจะเข้มมากขึ้นเมื่ออายุเพิ่มขึ้น เมื่อตรวจดูการเคลื่อนที่ด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นการเคลื่อนที่อย่างมีทิศทางซึ่งเป็นการเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลัม และจากการตรวจสอบด้วย semisolid method แบคทีเรียจะมีการเคลื่อนที่ออกจากรอยแทง (stab) ไปในอาหารรอบๆโดยที่บริเวณที่แบคทีเรียเคลื่อนที่ไปจะมีความขุ่นเพิ่มขึ้นหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง

3.1.4.2 ลักษณะทางสรีรวิทยา

Azospirillum sp. A_{1,2} สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนได้ และสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดเมื่อเจริญใน peptone-base glucose medium อีกทั้งมีความต้องการไบโอตินในการเจริญ

3.1.4.3 ลักษณะทางชีวเคมี

Azospirillum sp. A_{1,2} สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส ยูรีเอส และ คะตะเลส นอกจากนี้ยังสามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์และไนโตรเจนก๊าซ จากลักษณะพื้นฐานวิทยา สรีรวิทยา และ ชีวเคมี สามารถสรุปได้ว่า *Azospirillum* sp. A_{1,2} เป็นแบคทีเรียในสปีชีส์ *Azospirillum lipoferum*

3.2 การทำทรานส์ฟอร์มเมชันโดยใช้พลาสมิด pCK3

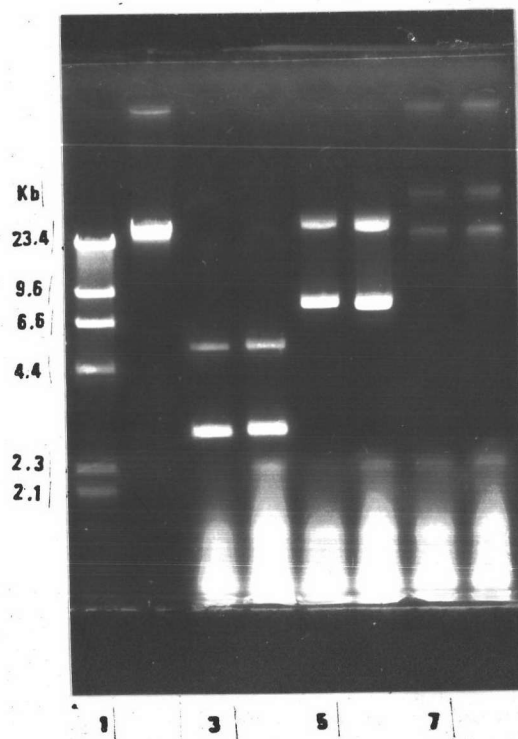
เพื่อที่จะสร้างสายพันธุ์ *Azospirillum lipoferum* A_{1,2} ให้มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีอนุพลแอมโมเนียสูง จึงทำการทรานส์ฟอร์มพลาสมิด pCK3 ซึ่งมี *nif A* จิน เข้าสู่ *A. lipoferum* A_{1,2}

3.2.1 การแยกพลาสมิด pCK3 โดยวิธี Rapid alkali extraction (Birnboim, H.C. และ Doly, J., 1979)

เมื่อสกัดพลาสมิด pCK30 จาก *E. coli* แล้วนำมาวิเคราะห์โดยการทำอิเล็กโทรโฟริซิส (รูปที่ 8) พบว่าพลาสมิดที่เตรียมได้อยู่ใน 2 โครงรูป คือ ซูเปอร์คอยล์ และ รีแลกซ์ ซึ่งโครงรูปที่เป็นซูเปอร์คอยล์จะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้เร็วกว่าโครงรูปรีแลกซ์

3.2.2 การทรานส์ฟอร์ม pCK3 เข้าสู่ *Azospirillum lipoferum* A_{1,2}

เนื่องจากพลาสมิด pCK3 มีถิ่นตํานยาเทระไซคลิน และคานาไมซินอยู่ด้วย



รูปที่ 8 การตรวจพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี rapid alkali extraction

ช่องที่ 1	standard λ DNA ซึ่งย่อยด้วย Hind III
ช่องที่ 2	โครโมโซมดีเอ็นเอของ <i>E. coli</i>
ช่องที่ 3 และ 4	พลาสมิดดีเอ็นเอ pBR322
ช่องที่ 5 และ 6	พลาสมิดดีเอ็นเอ pSA30
ช่องที่ 7 และ 8	พลาสมิดดีเอ็นเอ pCK3

การถอดรหัสของ *nif A* จะมีผลต่อการถอดรหัสของจินตาคานาไมซิน กล่าวคือ ถ้าไม่มีการถอดรหัสของจินตาคานาไมซิน ก็จะไม่มีการถอดรหัสของจินตาคานาไมซิน ดังนั้นจึงสามารถคัดทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่ได้รับ *nif A* โดยดูจากระดับการต้านทานคาไมซินที่เพิ่มขึ้นได้โดยใช้คาไมซินความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นระดับที่ *A. lipoferum A₁₂* wild type ไม่สามารถเจริญได้ แต่ทรานส์ฟอร์มแมนท์ควรจะต้านทานคาไมซินในระดับนี้ได้

3.2.2.1 ผลการทรานส์ฟอร์มพลาสมิด ด้วยวิธี Deoxyribonucleic

Acid-Mediated Transformation (Mishra, A.K., 1979)

เมื่อทำการทรานส์ฟอร์ม *pCK3* เข้าสู่ *A. lipoferum A₁₂* แล้วตรวจสอบทรานส์ฟอร์มแมนท์โดยใช้จานเลี้ยงเชื้อที่มีคาไมซิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปรากฏว่าไม่สามารถสร้างทรานส์ฟอร์มแมนท์โดยวิธีนี้ได้ (ตารางที่ 4) เมื่อทำการทรานส์ฟอร์มพลาสมิดที่มีขนาดเล็กกว่า *pCK3* (27 kb) โดยใช้ *pBR322* และ *pSA30* ซึ่งมีขนาด 4.4 และ 10.9 kb ตามลำดับ และใช้จานเลี้ยงเชื้อที่มีเทระไซคลิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับคัดทรานส์ฟอร์มแมนท์ก็ยังไม่สามารถสร้างทรานส์ฟอร์มแมนท์ของ *A. lipoferum A₁₂*

3.2.2.2 ผลการทรานส์ฟอร์มโดยใช้ $CaCl_2$

(Dagert, H. และ Elrich, S.D., 1979)

เมื่อทรานส์ฟอร์มพลาสมิด *pBR322*, *pSA30* และ *pCK3* เข้าสู่ *A. lipoferum A₁₂* ผลคือไม่สามารถสร้างทรานส์ฟอร์มแมนท์ได้ ในขณะที่ *E. coli* BD817 ซึ่งเป็น positive control สามารถรับพลาสมิด *pBR322*, *pSA30* และ *pCK3* ด้วยประสิทธิภาพการทรานส์ฟอร์มเท่ากับ 4.1×10^5 , 6.7×10^4 และ 7.7×10^3 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

3.2.2.3 ผลการทรานส์ฟอร์มโดยใช้ DMSO (Fani, R., 1986)

เมื่อทรานส์ฟอร์มพลาสมิด *pBR322*, *pSA30* และ *pCK3* เข้าสู่ *A. lipoferum A₁₂* โดยวิธีนี้ปรากฏว่า ไม่สามารถสร้างทรานส์ฟอร์มแมนท์ได้ ในขณะที่ *E. coli* BD817 สามารถรับพลาสมิด *pBR322*, *pSA30* และ *pCK3* ด้วยประสิทธิภาพการทรานส์ฟอร์มที่เท่ากับ 4.0×10^4 , 1.8×10^4 และ 1.2×10^3 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

3.3 การทดลองเพื่อหาสาเหตุความล้มเหลวในการแยกทรานส์ฟอร์มแมนท์

ตารางที่ 4 ผลการทรานสเฟอร์พลาสมิดเข้าสู่ *Azospirillum lipoferum* A₁₂

วิธี	ชื่อสายพันธุ์	พลาสมิด	จำนวนทรานสเฟอร์แมนท์/ ไมโครกรัมพลาสมิด
Mishra's	<i>A. lipoferum</i> A ₁₂	pBR322	0
		pSA30	0
		pCK3	0
Dagert, M. and Ehrich, S.D.'s (CaCl ₂)	<i>A. lipoferum</i> A ₁₂	pBR322	0
		pSA30	0
		pCK3	0
	<i>E. coli</i> BD817	pBR322(4.4Kb)	4.1×10^5
		pSA30(9.6Kb)	6.7×10^4
		pCK3 (27Kb)	7.7×10^3
Fani's (DMSO)	<i>A. lipoferum</i> A ₁₂	pBR322	0
		pSA30	0
		pCK3	0
	<i>E. coli</i> BD817	pBR322	4.0×10^4
		pSA30	1.8×10^4
		pCK3	1.2×10^3

3.3.1 การพบพลาสมิดใน *Azospirillum lipoferum* A_{1,2}

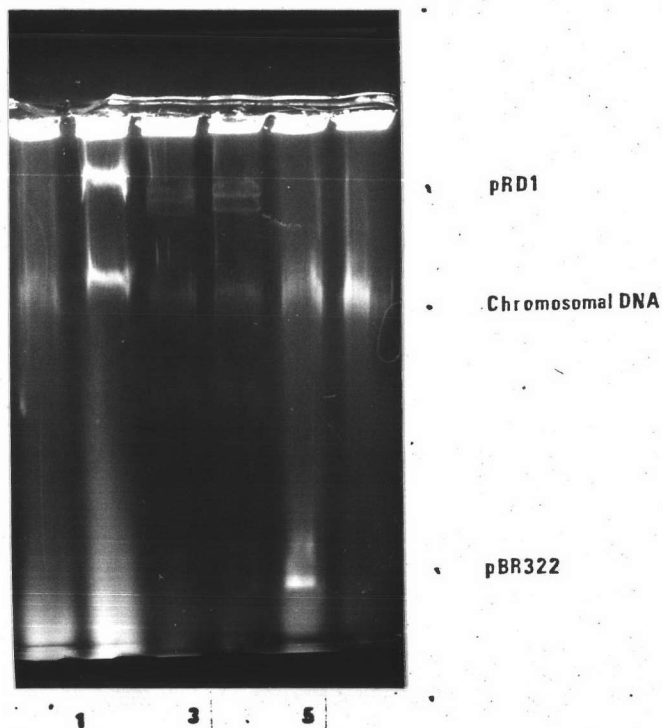
เมื่อทำการตรวจสอบพลาสมิดใน *A. lipoferum* A_{1,2} โดยการทำให้เซลล์แตกขณะอิเล็กโทรโฟริซิส หลังจากย้อมเจลใน ethidium bromide แล้วนำมาส่องดูดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต เห็นได้ว่า *A. lipoferum* A_{1,2} มีพลาสมิดภายในเซลล์ 4 ขนาด คือ มีขนาดประมาณ 11, 70, 80, และ 90 Kb (รูปที่ 9)

3.3.2 การค้นพบปรากฏการณ์ที่น่าจะมีเรสทริกชันเอนไซม์ใน *Azospirillum lipoferum* A_{1,2}

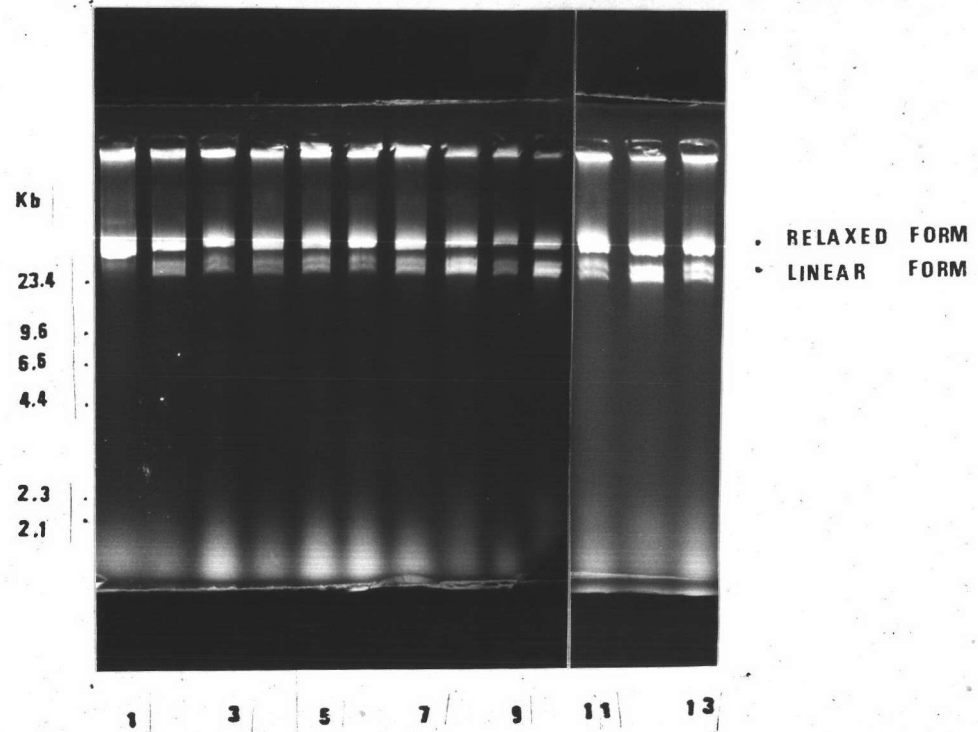
เมื่อนำ cell free extract ของ *A. lipoferum* A_{1,2} ไปตรวจหาแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ โดยใช้พลาสมิด pCK3 (ซึ่งได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็น relaxed form) เป็นลึบสเตรท จะให้แถบดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ 2 แถบ ซึ่งเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้เร็วกว่า pCK3 ลึบสเตรท ดังรูปที่ 10 เมื่อทำการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วย cell free extract กับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วย Eco RI ซึ่งมีจุดตัดบน pCK3 1 ตำแหน่ง (รูปที่ 11) เห็นได้ว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ใน cell free extract มีลักษณะเหมือนกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อย pCK3 ด้วย Eco RI อย่างไม่สมบูรณ์ ทำให้คาดว่าน่าจะมีเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract เมื่อศึกษาผลของ ATP และ S-adenosylmethionine (SAM) ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ปรากฏว่า ATP และ SAM ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (รูปที่ 10) และเมื่อศึกษาผลของความแรงไอออน (ionic strength) ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีความแรงไอออนต่ำ, กลาง และสูง คือมี NaCl ความเข้มข้น 0, 50 และ 10 มิลลิโมลาร์ ก็ยังให้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่ไม่ต่างกัน

3.4 การตรวจระยะของเซลล์ที่เหมาะสมในการศึกษาเรสทริกชันเอนไซม์

เนื่องจาก nonspecific endonuclease สามารถรบกวนเรสทริกชันเอนไซม์ เพราะสามารถตัดดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงทำการศึกษาปริมาณการผลิตเรสทริกชันเอนไซม์ และ nonspecific endonuclease ระหว่างระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโต เมื่อเจริญเซลล์ *A. lipoferum* A_{1,2} ในอาหารอุดม NB ในรูปแบบการเจริญดังรูปที่ 12 จากนั้นทำการวัดแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ที่ระยะต่างๆของการเจริญโดยใช้ pBR322



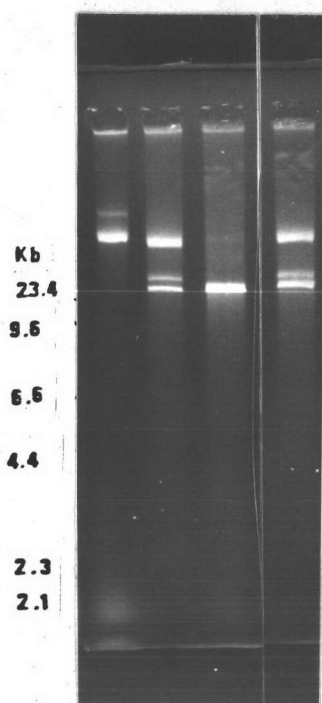
- รูปที่ 9 การตรวจสอบพลาสมิดดั้งเดิมใน *Azospirillum lipoferum* A_{1,2} โดยการทำให้เซลล์แตกขณะอิเล็กโตรโฟรีซิส (Eckhardt, T., 1978) วิธีข้อ 2.8
- ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอจากเชื้อ *E. coli* C600 ซึ่งไม่มีพลาสมิด
- ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอจากเชื้อ *E. coli* ซึ่งมีพลาสมิด pRD1 ขนาด 86 กิโลเบส
- ช่องที่ 3 และ 4 ดีเอ็นเอจากเชื้อ *Azospirillum lipoferum* A_{1,2} มีพลาสมิดขนาด 11, 70, 80 และ 90 กิโลเบส
- ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอจากเชื้อ *E. coli* ซึ่งมีพลาสมิด pBR322 ขนาด 4.4 กิโลเบส
- ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอจากเชื้อ *E. coli* C600 ซึ่งไม่มีพลาสมิด



รูปที่ 10 การตรวจแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ของ *A. lipoferum* A_{1,2} โดยใช้ pCK3 เป็นลัมบลีเตอร์ (วิธีข้อ 2.15)

- ช่องที่ 1 พลาสมิด pCK3 ลัมบลีเตอร์
- ช่องที่ 2 และ 3 ผลิตรหัสที่ได้หลังจากบ่ม pCK3 กับ cell free extract ในสารละลายปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง
- ช่องที่ 4 และ 5 ผลิตรหัสที่ได้หลังจากบ่ม pCK3 กับ cell free extract ในสารละลายปฏิกิริยาซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง
- ช่องที่ 6 และ 7 ผลิตรหัสที่ได้หลังจากบ่ม pCK3 กับ cell free extract ในสารละลายปฏิกิริยาซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง
- ช่องที่ 8 และ 9 ผลิตรหัสที่ได้หลังจากบ่ม pCK3 กับ cell free extract ในสารละลายปฏิกิริยาซึ่งมี ATP, SAM ที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

- ช่องที่ 10และ11 ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากบ่ม pCK3 กับ cell free extract ใน สารละลายปฏิกิริยาซึ่งมี ATP, SAM และโซเดียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง
- ช่องที่ 12และ13 ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากบ่ม pCK3 กับ cell free extract ใน สารละลายปฏิกิริยาซึ่งมี ATP, SAM และ โซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง



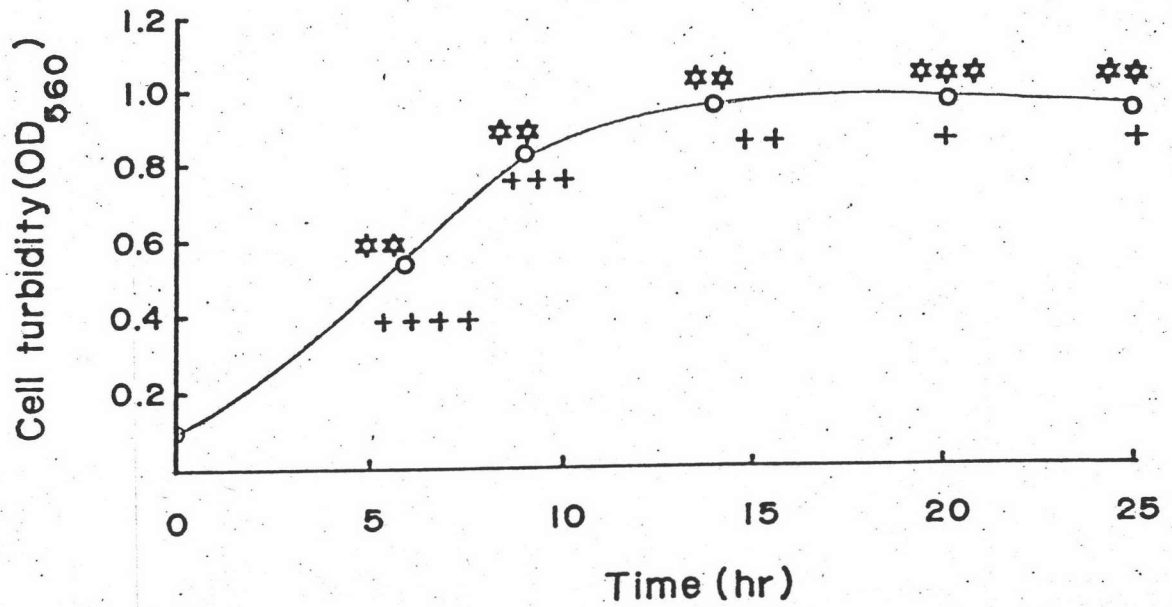
รูปที่ 11 การเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการย่อย pCK3 ด้วย Eco RI กับ เอนไซม์ใน cell free extract ของ *A. lipoferum* A_{1,2}

ช่องที่ 1 พลาสมิด pCK3 ลับสเตรท

ช่องที่ 2 พลาสมิด pCK3 ย่อยอย่างไม่สมบูรณ์ (partial digestion) ด้วย Eco RI

ช่องที่ 3 พลาสมิด pCK3 ย่อยอย่างสมบูรณ์ (complete digestion) ด้วย Eco RI

ช่องที่ 4 พลาสมิด pCK3 ย่อยด้วยเอนไซม์ใน cell free extract



รูปที่ 12 รูปแบบการเจริญ แอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์และแอคติวิตีของ nonspecific endonuclease ของ *A. lipoferum* A₁₂ ในอาหารอุดม NB ที่ 30 องศาเซลเซียส

- ☆ แอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์
- + แอคติวิตีของ nonspecific endonuclease

เป็นสับสเตรท ได้ผลดังรูป 13 คือ การผลิตเรสทริกชันเอนไซม์ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาของการเจริญ และเมื่อตรวจสอบแอกติวิตีของ nonspecific endonuclease โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *E. coli* เป็นสับสเตรทได้ผลการทดลองดังรูปที่ 14 คือ การผลิต nonspecific endonuclease จะลดลงเมื่ออายุของเซลล์มากขึ้น ดังนั้นจะเห็นว่าช่วงสเตชันเนอรีเฟสเป็นช่วงที่เหมาะสมในการที่จะนำเซลล์มาศึกษาเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งต่อไปจะใช้เซลล์ที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง เนื่องจากมีแอกติวิตีของ nonspecific endonuclease ต่ำ

3.5 การตรวจพบว่ามีเรสทริกชันเอนไซม์ 2 ชนิด

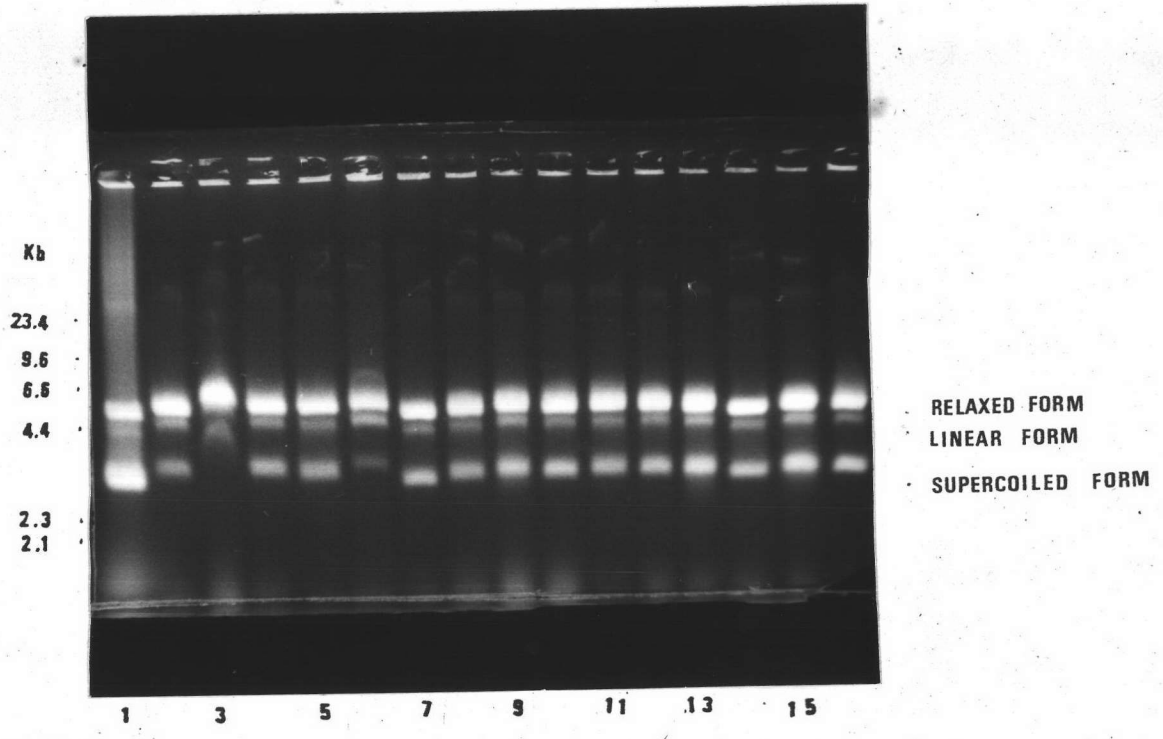
3.5.1 จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อนำ cell free extract ไปตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นตั้งแต่ 20 จนถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของความเข้มข้นอิ่มตัว โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำตะกอนแต่ละช่วงไปวัดแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ และ nonspecific endonuclease ผลการทดลองพบว่าเรสทริกชันเอนไซม์ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 40-70 เปอร์เซ็นต์ของความเข้มข้นอิ่มตัว (รูปที่ 15) และ nonspecific endonuclease ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 20-60 เปอร์เซ็นต์ของความเข้มข้นอิ่มตัว (รูปที่ 16)

เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด คือ เรสทริกชันเอนไซม์ และ nonspecific endonuclease ตกตะกอนได้ด้วยความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงเดียวกัน จึงไม่สามารถใช้วิธีนี้ในการทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นเพราะแยกออกจาก nonspecific endonuclease ไม่ได้ และจะเห็นได้ว่าเรสทริกชันเอนไซม์ตกตะกอนออกมาในช่วงเปอร์เซ็นต์ของแอมโมเนียมซัลเฟตที่กว้างมาก คือ ช่วง 40-70 เปอร์เซ็นต์ของความเข้มข้นอิ่มตัว อาจเป็นไปได้ว่ามีเรสทริกชันเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิด

3.5.2 จากคอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลส

เมื่อผ่าน cell free extract ลงในคอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลส แล้วชะด้วย linear gradient ของโซเดียมคลอไรด์ 0-2 โมลาร์ ได้ profile ของโปรตีน ดังรูป 17 เมื่อตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์โดยใช้พลาสมิด pBR322 เป็นสับสเตรท



รูปที่ 13 การเปรียบเทียบแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ของ *A. lipoferum* A₁₂ ในช่วงระยะเวลาเจริญต่างๆกัน

ช่องที่ 1 พลาสมิด pBR322 ลับสเตรท

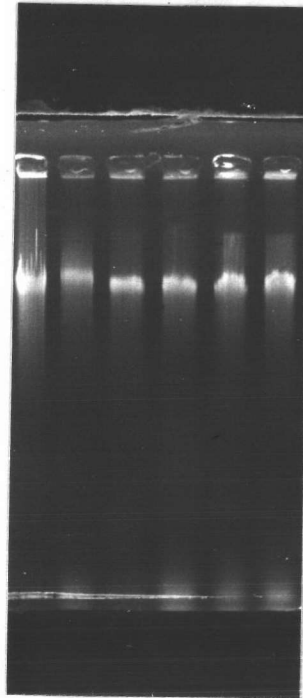
ช่องที่ 2-4 พลาสมิด pBR322 ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ที่ระยะเวลาเจริญ 6 ชั่วโมง

ช่องที่ 5-7 พลาสมิด pBR322 ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ที่ระยะเวลาเจริญ 9 ชั่วโมง

ช่องที่ 8-10 พลาสมิด pBR322 ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ที่ระยะเวลาเจริญ 15 ชั่วโมง

ช่องที่ 11-13 พลาสมิด pBR322 ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ที่ระยะเวลาเจริญ 20 ชั่วโมง

ช่องที่ 14-16 พลาสมิด pBR322 ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ที่ระยะเวลาเจริญ 25 ชั่วโมง



รูปที่ 14 การเปรียบเทียบแอกติวิตีของ nonspecific endonuclease ใน cell free extract ของ *A. lipoferum* A₁₂ ในช่วงระยะเวลาการเจริญต่างกันโดยใช้ โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *E. coli* เป็นสับสเตรท (วิธีทำข้อ 2.16)

ช่องที่ 1 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *E. coli* สับสเตรท

ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอย่อยด้วย nonspecific endonuclease ใน cell free extract ของ *A. lipoferum* ที่ระยะเวลาการเจริญ 6 ชั่วโมง

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอย่อยด้วย nonspecific endonuclease ใน cell free extract ของ *A. lipoferum* ที่ระยะเวลาการเจริญ 9 ชั่วโมง

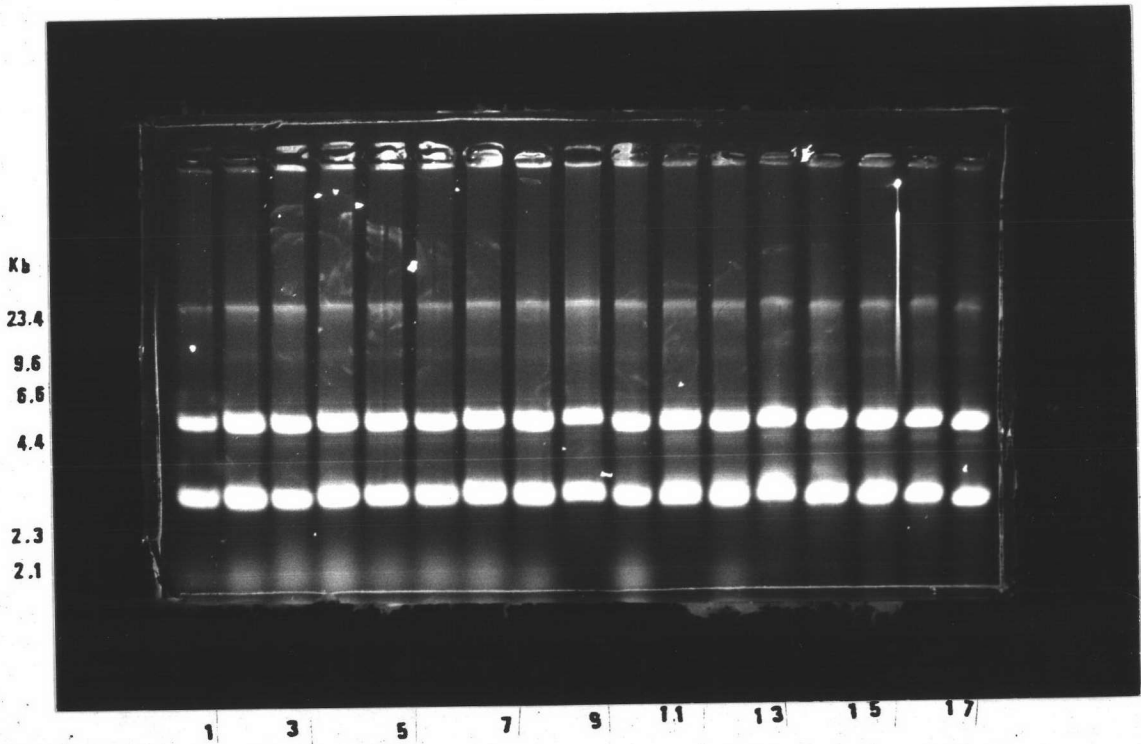
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอย่อยด้วย nonspecific endonuclease ใน cell free extract ของ *A. lipoferum* ที่ระยะเวลาการเจริญ 15 ชั่วโมง

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอย่อยด้วย nonspecific endonuclease ใน cell free extract ของ *A. lipoferum* ที่ระยะเวลาการเจริญ 20 ชั่วโมง

ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอย่อยด้วย nonspecific endonuclease ใน cell free extract ของ *A. lipoferum* ที่ระยะเวลาการเจริญ 25 ชั่วโมง



รูปที่ 15 และ 16 แสดงผลการทำเรสทริกชันเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตโดยวิธีข้อ 2.18.1

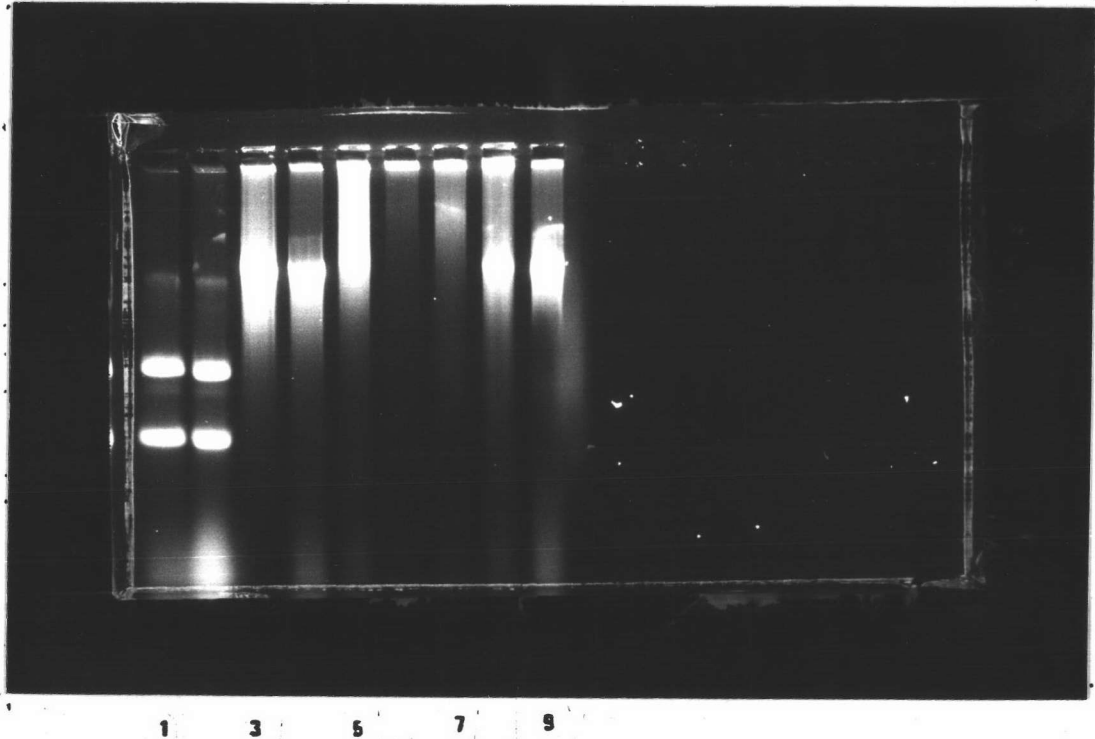


รูปที่ 15 ตรวจสอบแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์โดยวิธีข้อ 2.15

- ช่องที่ 1 pBR322 ลับสเตรท
- ช่องที่ 2-4 pBR322 ย่อยด้วยโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-20 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์เป็น 0, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ
- ช่องที่ 5-7 pBR322 ย่อยด้วยโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20-30 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์เป็น 0, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ
- ช่องที่ 8-10 pBR322 ย่อยด้วยโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-40 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์เป็น 0, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ
- ช่องที่ 11-13 pBR322 ย่อยด้วยโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว

- ช่องที่ 14-16 40-50 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของ
โซเดียมคลอไรด์เป็น 0, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ
pBR322 ย่อยด้วยโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว
- ช่องที่ 17 50-60 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของ
โซเดียมคลอไรด์เป็น 0, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ
pBR322 ย่อยด้วยโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว
- 60-70 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของ
โซเดียมคลอไรด์เป็น 0 มิลลิโมลาร์

Kb
23.4
9.6
6.6
4.4
2.3
2.1



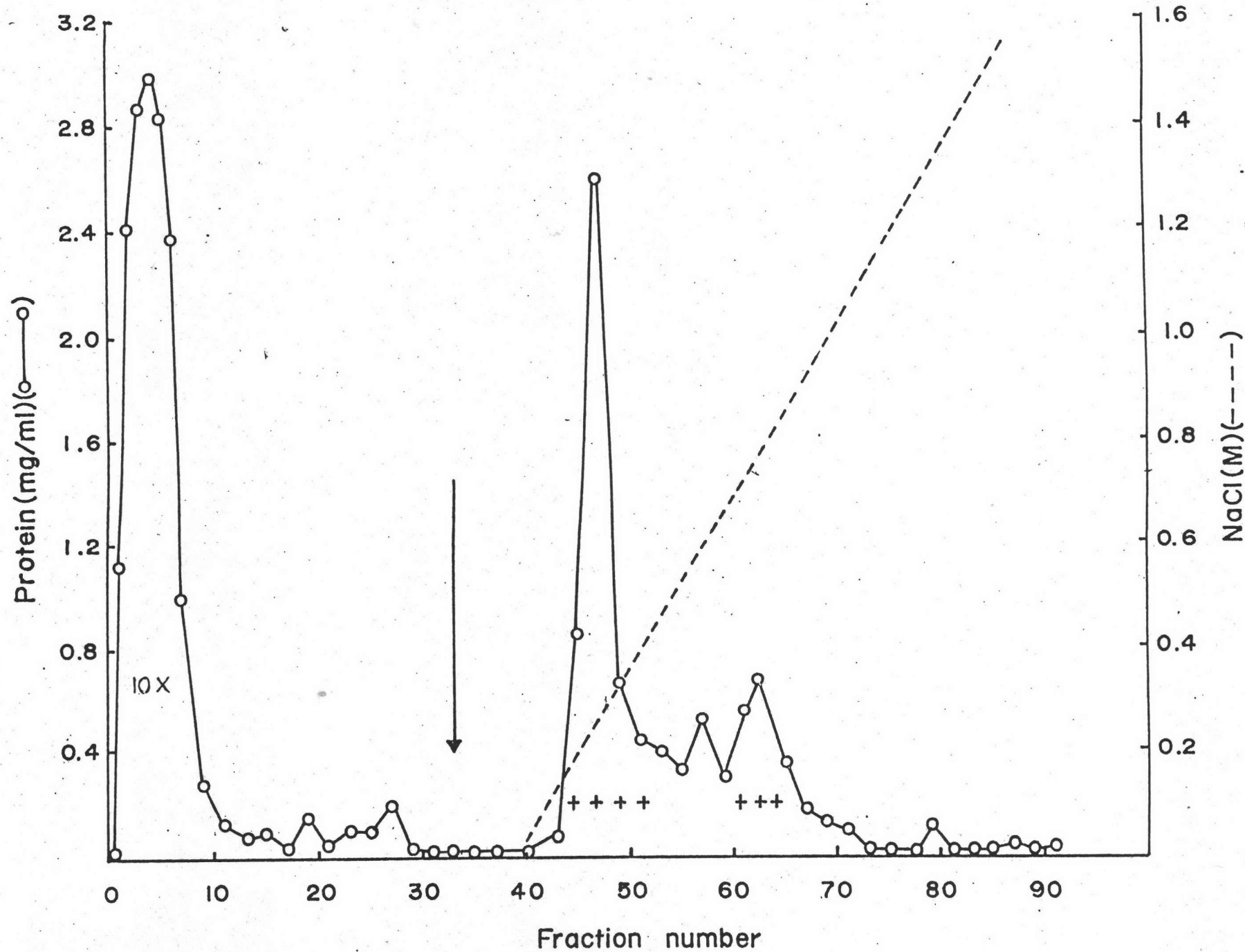
รูปที่ 16

- ช่องที่ 1-2 pBR322 ย่อยด้วยโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 60-70 เปอร์เซ็นต์โดยวิธีข้อ 2.15 ในสารละลายปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ
- ช่องที่ 3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *E. coli*
- ช่องที่ 4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *E. coli* ย่อยด้วยโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 0-20 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีข้อ 2.16
- ช่องที่ 5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *E. coli* ย่อยด้วยโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 20-30 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีข้อ 2.16
- ช่องที่ 6 โครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *E. coli* ย่อยด้วยโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 30-40 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีข้อ 2.16
- ช่องที่ 7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *E. coli* ย่อยด้วยโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 40-50 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีข้อ 2.16
- ช่องที่ 8 โครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *E. coli* ย่อยด้วยโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 50-60 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีข้อ 2.16
- ช่องที่ 9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *E. coli* ย่อยด้วยโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 60-70 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีข้อ 2.16

รูปที่ 17 คอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลส

ผลการแยกเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ให้บริสุทธิ์โดยผ่าน
คอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลส (ขนาด 2.5 x 21 เซนติเมตร) ชะด้วย linear gradient
ของ 350 มิลลิลิตร โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, 10 มิลลิโมลาร์,
2-เมอร์แคปโตเอทานอล 10 มิลลิโมลาร์ และ 350 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์
2.0 โมลาร์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 10 มิลลิโมลาร์,
2-เมอร์แคปโตเอทานอล 10 มิลลิโมลาร์ อัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง
แบ่งเก็บแยกส่วนหลอดละ 10 มิลลิลิตร (วิธีข้อ 2.18.2)

↓ เริ่มชะด้วย linear gradient
+ บริเวณที่พบเรสทริกชันเอนไซม์



พบแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์อยู่ 2 ช่วง คือ ช่วงที่โปรตีนถูกชะออกด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.30 และ 0.72 โมลาร์ โดยเอนไซม์จากทั้ง 2 ช่วงนี้ต่างตัด pBR322 ได้ 1 ตำแหน่ง แต่เนื่องจากความไม่เสถียรของเรสทริกชันเอนไซม์หลังจากผ่านคอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลส ซึ่งพบว่าแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ลดลงรวดเร็วมาก และไม่สามารถตรวจพบแอกติวิตีของเอนไซม์เมื่อเก็บเรสทริกชันเอนไซม์ที่ 4 องศาเซลเซียสเกิน 4 วัน ดังนั้นจะไม่ใช้คอลัมน์นี้ในการทำเอนไซม์บริสุทธิ์

3.5.3 จากคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส

เมื่อผ่าน cell free extract ลงในคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส แล้วชะด้วย linear gradient ของโซเดียมคลอไรด์ 0-0.5 โมลาร์ ได้ profile ของโปรตีนแสดงไว้ในรูปที่ 18 เมื่อตรวจหาแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์โดยใช้ λ ดีเอ็นเอ และพลาสมิด pBR322 เป็นลึบสเตรท (รูปที่ 19 และ 20) พบแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ 2 ชนิด คือ ชนิดแรกพบในส่วนของโปรตีนที่ไม่เกาะกับคอลัมน์ เอนไซม์ส่วนนี้สามารถตัดพลาสมิด pBR322 ได้ 1 ตำแหน่งและตัด λ ดีเอ็นเอ ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 10 kb เรสทริกชันเอนไซม์ชนิดที่ 2 ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์ ซึ่งเอนไซม์ส่วนนี้ตัดพลาสมิด pBR322 1 ตำแหน่ง และไม่ตัด λ ดีเอ็นเอ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทำเรสทริกชันเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยใช้คอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลส คือ *A. lipoferum* A₂ มีเรสทริกชันเอนไซม์ 2 ชนิด ให้ชื่อเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดที่ 1 ว่า Ali I และ Ali II

3.6 การทำเรสทริกชันเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดให้บริสุทธิ์

3.6.1 ผลการทำเอนไซม์ Ali I บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์

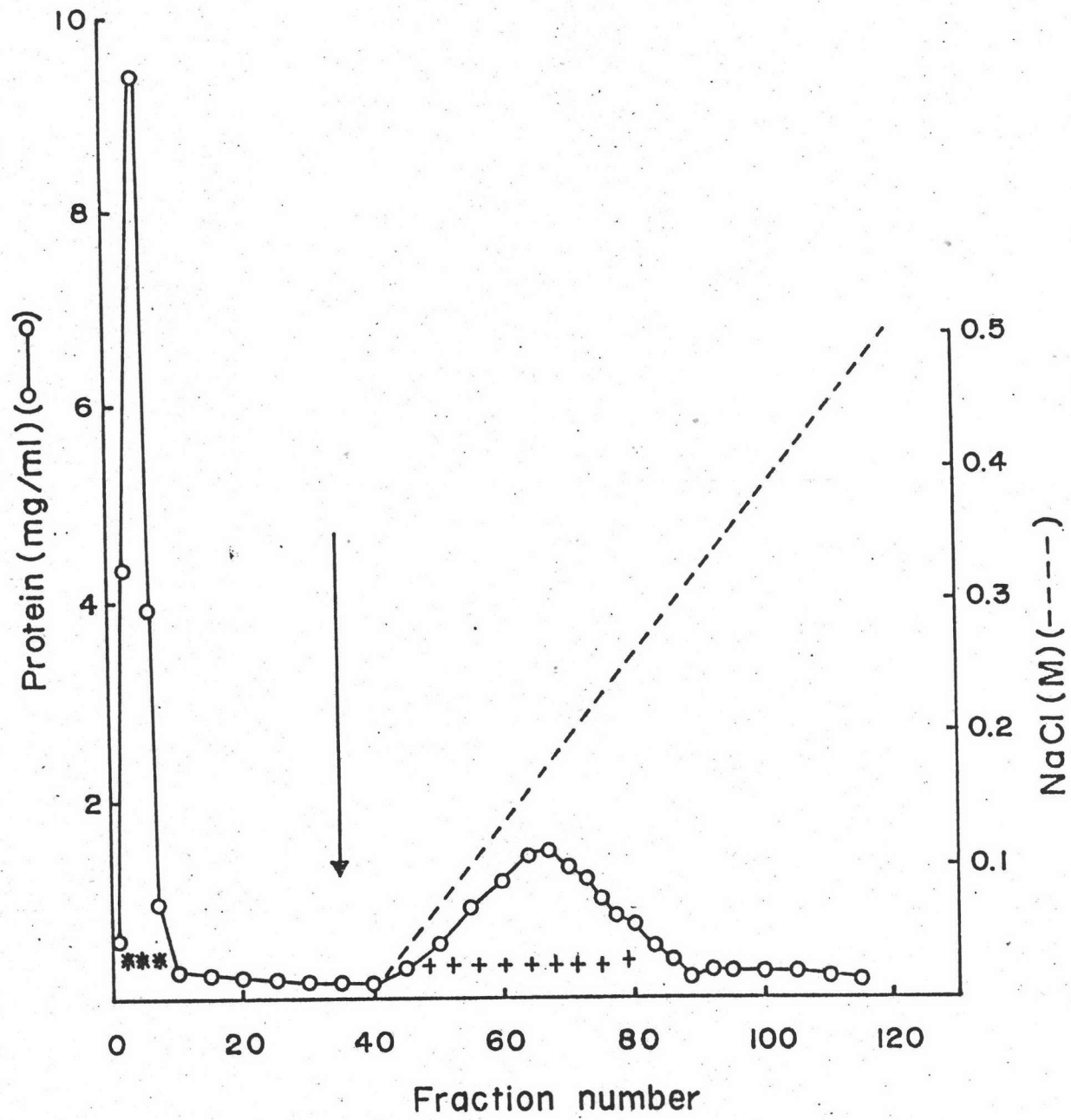
ผลจากรูปที่ 19 แสดงให้เห็นว่า Ali I มี nonspecific endonuclease ปะปนมาเป็นจำนวนมากเพราะเมื่อย่อยดีเอ็นเอแล้วได้ปิ่น (smear) ของดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นสูงมาก เพื่อทำให้ Ali I มีความบริสุทธิ์มากขึ้นจึงนำไปผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์แล้วชะด้วย linear gradient ของโปแตสเซียมฟอสเฟต pH7.5, 0-0.8 โมลาร์ โปรตีนที่ชะได้มี profile ดังแสดงในรูปที่ 21 เมื่อตรวจหาแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์

รูปที่ 18 คอลัมน์ดีไอเอไอเซลลูโลส

ผลการแยกเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ดีไอเอ
เซลลูโลส (ขนาด 1.7 x 30 เซนติเมตร) ๕ ด้วย linear gradient ของ 250
มิลลิลิตร Tris บัฟเฟอร์ pH 7.5 10 มิลลิโมลาร์, 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 10
มิลลิโมลาร์ และ 250 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ใน Tris บัฟเฟอร์ pH 7.5
10 มิลลิโมลาร์, 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 10 มิลลิโมลาร์ อัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อ
ชั่วโมง แบ่งเก็บแยกส่วนแฟรคชันที่ 1-40 หลอดละ 7.5 มิลลิลิตร และแฟรคชันที่ 41-118
หลอดละ 5 มิลลิลิตร (วิธีข้อ 2.19.1)

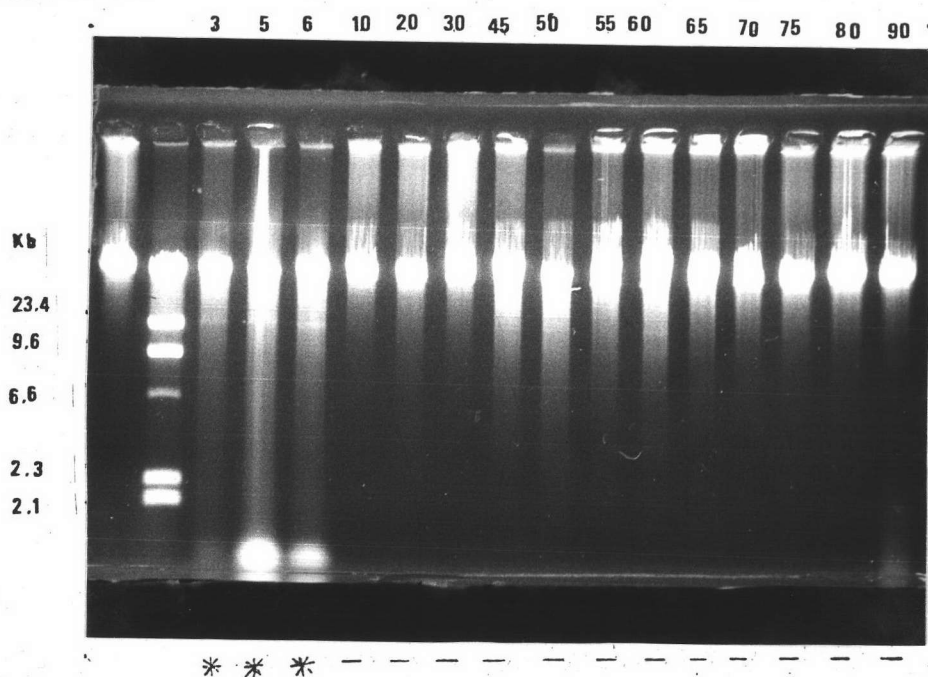
↓ เริ่ม๕ด้วย linear gradient

- * บริเวณที่พบเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดที่ 1
- + บริเวณที่พบเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดที่ 2





เลขที่แฟรคชัน



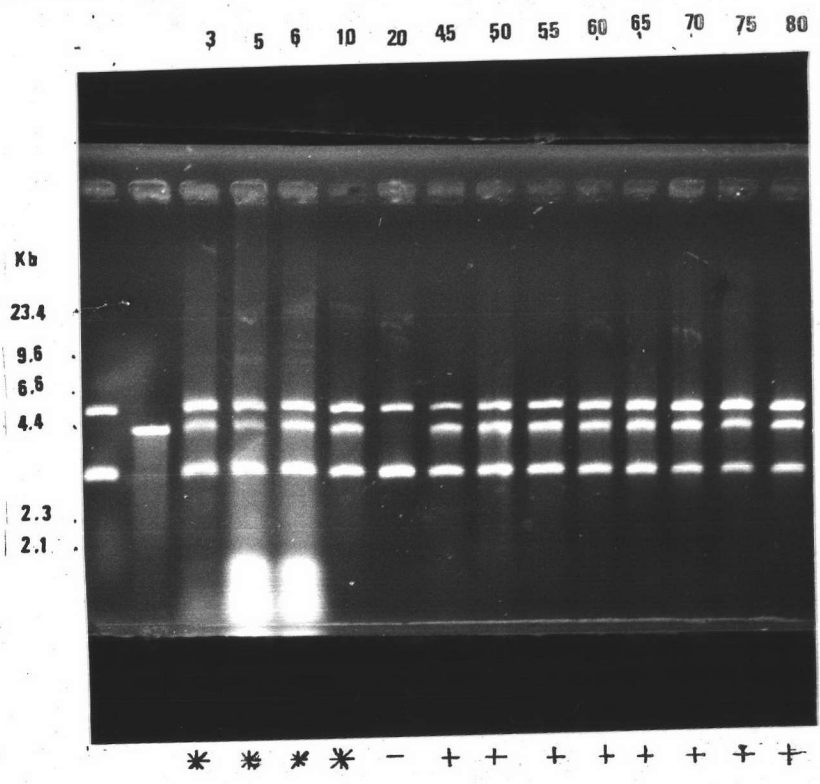
รูปที่ 19 ผลการแยกเรสทริกชันเอนไซม์โดยคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสแล้วนำมาตรวจสอบแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ดังวิธีข้อ 2.15 โดยใช้ λ ดีเอ็นเอเป็นสับสเตรท

- ช่องที่ 1 standard λ ดีเอ็นเอ
- ช่องที่ 2 standard λ ดีเอ็นเอย่อยด้วย Hind III
- ช่องที่ 3-17 standard λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยโปรตีนจากแฟรคชันต่างๆที่ได้
จากคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส

* แฟรคชันที่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ชนิดที่ 1

— แฟรคชันที่ไม่พบแอกติวิตีของเอนไซม์

เลขที่แฟรคชัน



รูปที่ 20 ผลการแยกเรสทริกชันเอนไซม์โดยคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสแล้วตรวจวัดแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ด้วยข้อ 12.5 โดยใช้ pBR322 เป็นสับสเตรท

- ช่องที่ 1 พลาสมิด pBR322 สับสเตรท
- ช่องที่ 2 พลาสมิด pBR322 ย่อยด้วย Eco RI
- ช่องที่ 3-15 พลาสมิด pBR322 ย่อยด้วยโปรตีนจากแฟรคชันต่างๆที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส

- * แฟรคชันที่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ชนิดที่ 1
- + แฟรคชันที่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ชนิดที่ 2
- แฟรคชันที่ไม่พบแอกติวิตีของเอนไซม์

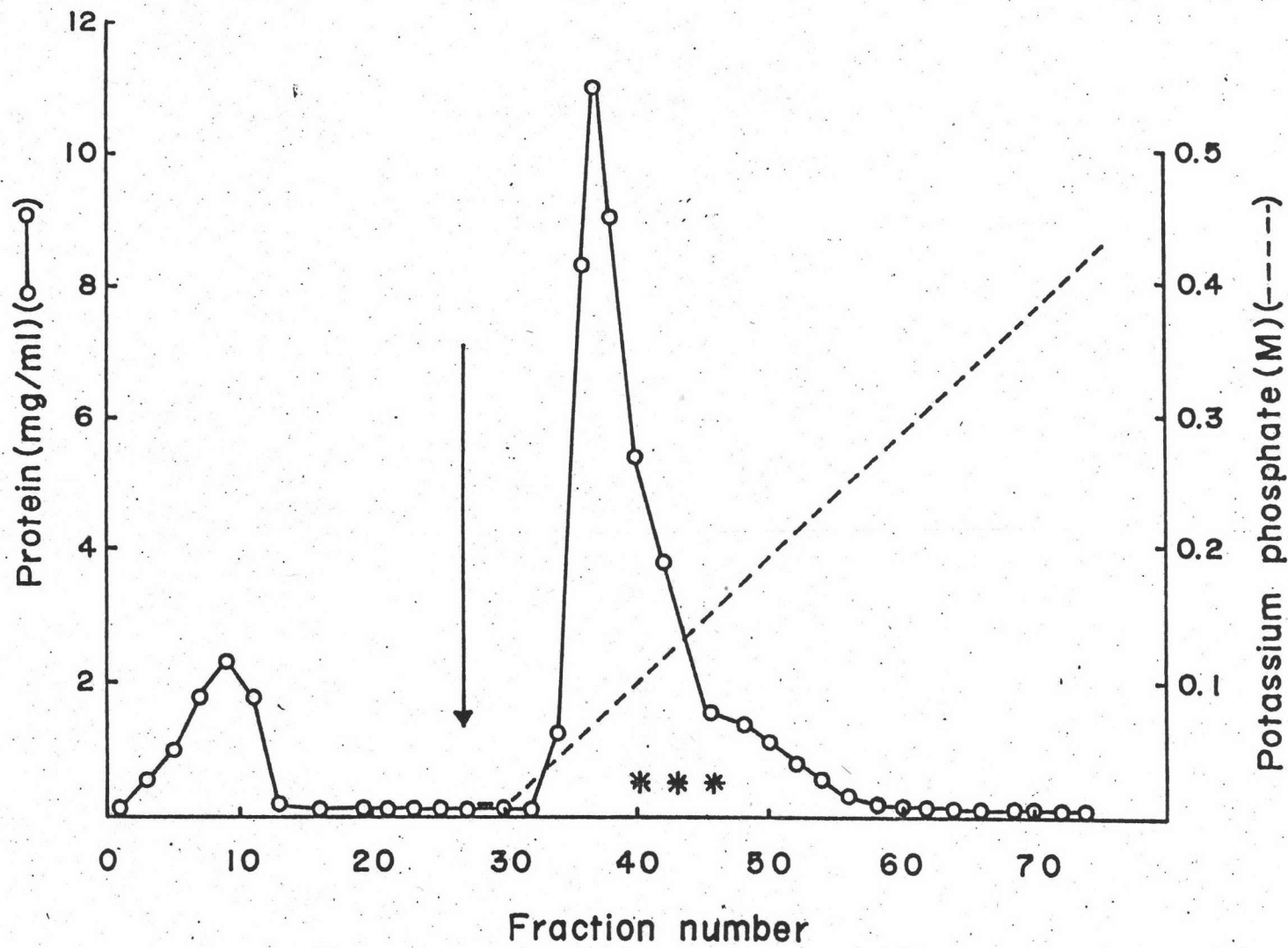
รูปที่ 21 คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ (1)

ผลการแยกเรสทริกชันเอนไซม์ Ali I ที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส โดยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ (ขนาด 1.3×10 เซนติเมตร) ชะด้วย linear gradient ของ 25 มิลลิลิตร โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 10 มิลลิโมลาร์, 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 10 มิลลิโมลาร์ และ 25 มิลลิลิตรของ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 0.5 โมลาร์, 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 10 มิลลิโมลาร์ อัตราไหล 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แบ่งเก็บแยกส่วนแฟรคชันที่ 1-26 หลอดละ 5 มิลลิลิตร และแฟรคชันที่ 25-62 หลอดละ 1 มิลลิลิตร (วิธีการทดลองข้อ 2.19.3)



เริ่มชะด้วย linear gradient

* บริเวณที่พบเรสทริกชันเอนไซม์ Ali I



โดยใช้ λ ดีเอ็นเอเป็นลึบสเตรท ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 22 จะเห็นว่ามีการตัดลึบสเตรทเมื่อใช้โปรตีนซึ่งเป็นส่วนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้นของโปแตสเซียมฟอสเฟต 0.12 โมลาร์ การผ่านคอลัมน์นี้สามารถกำจัดโปรตีนชนิดอื่นออกไปได้ ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามก็ยังพบ nonspecific endonuclease ในบริเวณที่พบแอกติวิตีของ A1i I บางส่วน ดังนั้นจึงเลือกเก็บเรสทริกชันเอนไซม์แฟรคชันที่มี nonspecific endonuclease ปะปนมาน้อยที่สุด (ในช่วงความเข้มข้นของโปแตสเซียมฟอสเฟต 0.13-0.15 โมลาร์) นำไปโดยไลซ์ในบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ในการศึกษาต่อไป

3.6.2 ผลการทำให้เรสทริกชันเอนไซม์ A1i II บริสุทธิ์ โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100 และ ไฮดรอกซิลอะพาไทต์

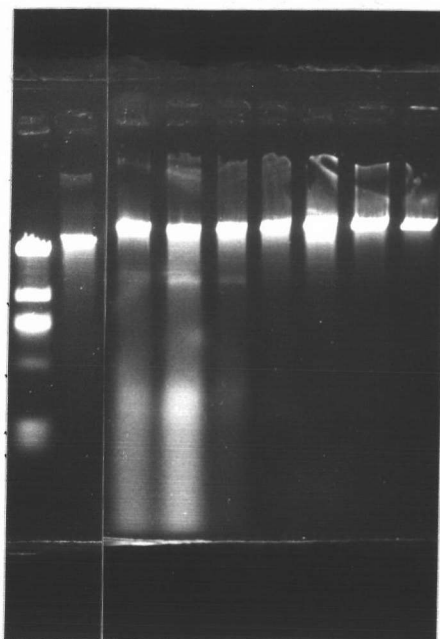
เมื่อนำ A1i II ที่ได้จากคอลัมน์ดีไอเออีเซลลูโลสไปทำให้ปริมาตรลดลงเหลือ 3 มิลลิลิตร โดย ultrafiltration จากนั้นผ่านสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 1.1 มิลลิลิตร ซึ่งมีโปรตีน 22.5 มิลลิกรัม ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100 ได้ profile ของโปรตีนดังรูปที่ 23 เมื่อตรวจหาแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์โดยใช้ pBR322 เป็นลึบสเตรท ผลการตรวจแสดงในรูปที่ 24 พบว่ามีการตัดลึบสเตรท pBR322 เมื่อใช้เอนไซม์ในแฟรคชันที่ 7-26 จากคอลัมน์นี้สามารถกำจัดโปรตีนชนิดอื่นออกไปได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อรวมแฟรคชันที่มีแอกติวิตีของ A1i II ไว้ แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ แล้วชะด้วย linear gradient ของโปแตสเซียมฟอสเฟต pH 7.5 0-0.8 โมลาร์ ได้ profile ของโปรตีนแสดงดังในรูปที่ 25 พบว่ามีการตัดลึบสเตรท pBR322 ได้ 1 ตำแหน่ง (รูปที่ 26) เมื่อใช้โปรตีนซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้นของโปแตสเซียมฟอสเฟต 0.7 โมลาร์ จากคอลัมน์นี้สามารถแยกโปรตีนอื่นออกได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และ A1i II ที่ได้มี nonspecific endonuclease ปะปนน้อยมาก จากนั้นนำเอนไซม์ไปโดยไลซ์ในบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเก็บไว้ศึกษาต่อไป

3.7 ความบริสุทธิ์ของเรสทริกชันเอนไซม์ที่เตรียมได้

เมื่อนำ A1i I ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์มาตรวจวัดแอกติวิตีของเรสทริกชัน

เลขที่แฟรคชัน

40 42 44 48 51 55 59

Kb
48.5
23.4
9.5
6.5
4.4
2.3
2.1

* * * - - - -

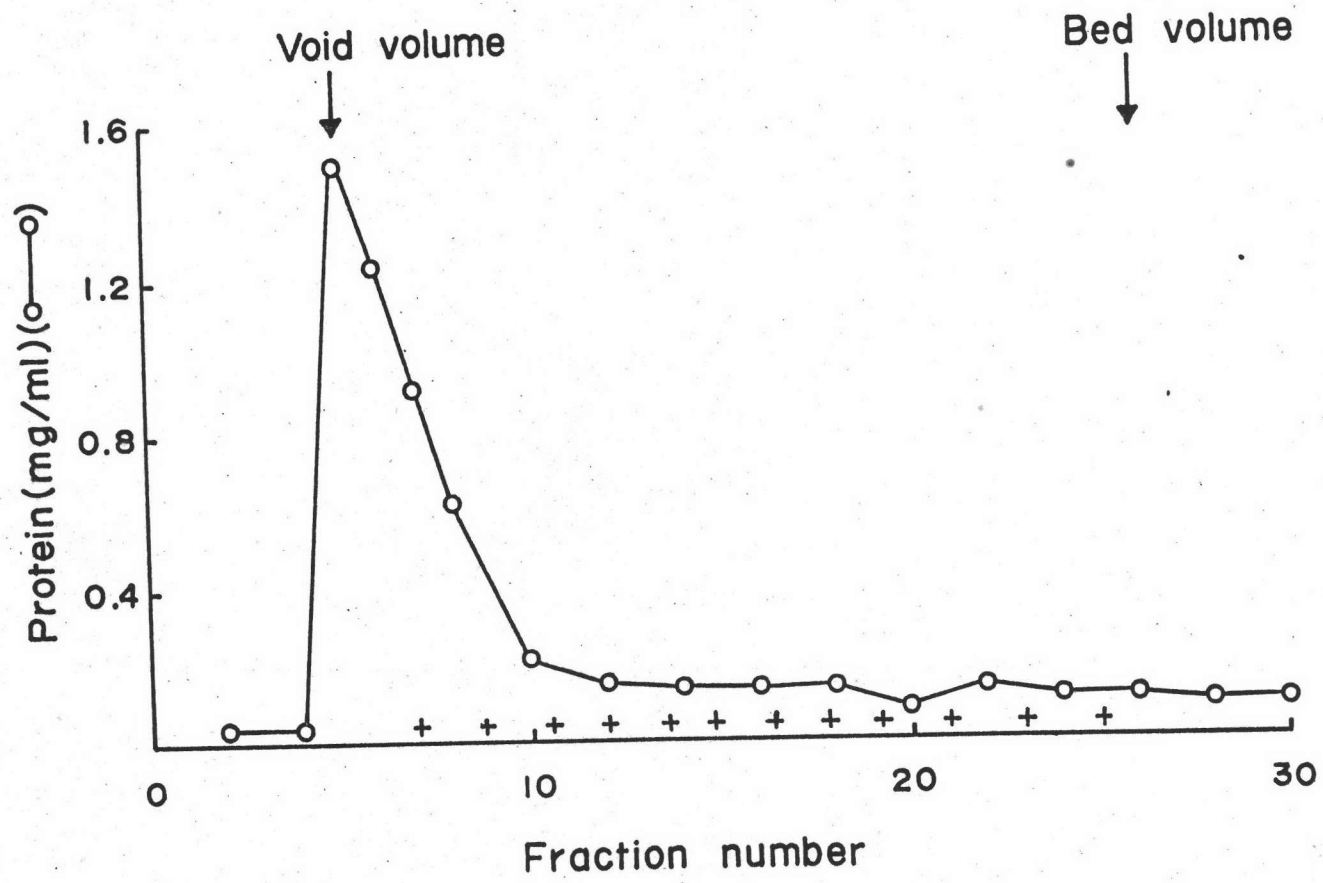
รูปที่ 22 ผลการทำเรสทริกชันเอนไซม์ *Alu I* ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทด์

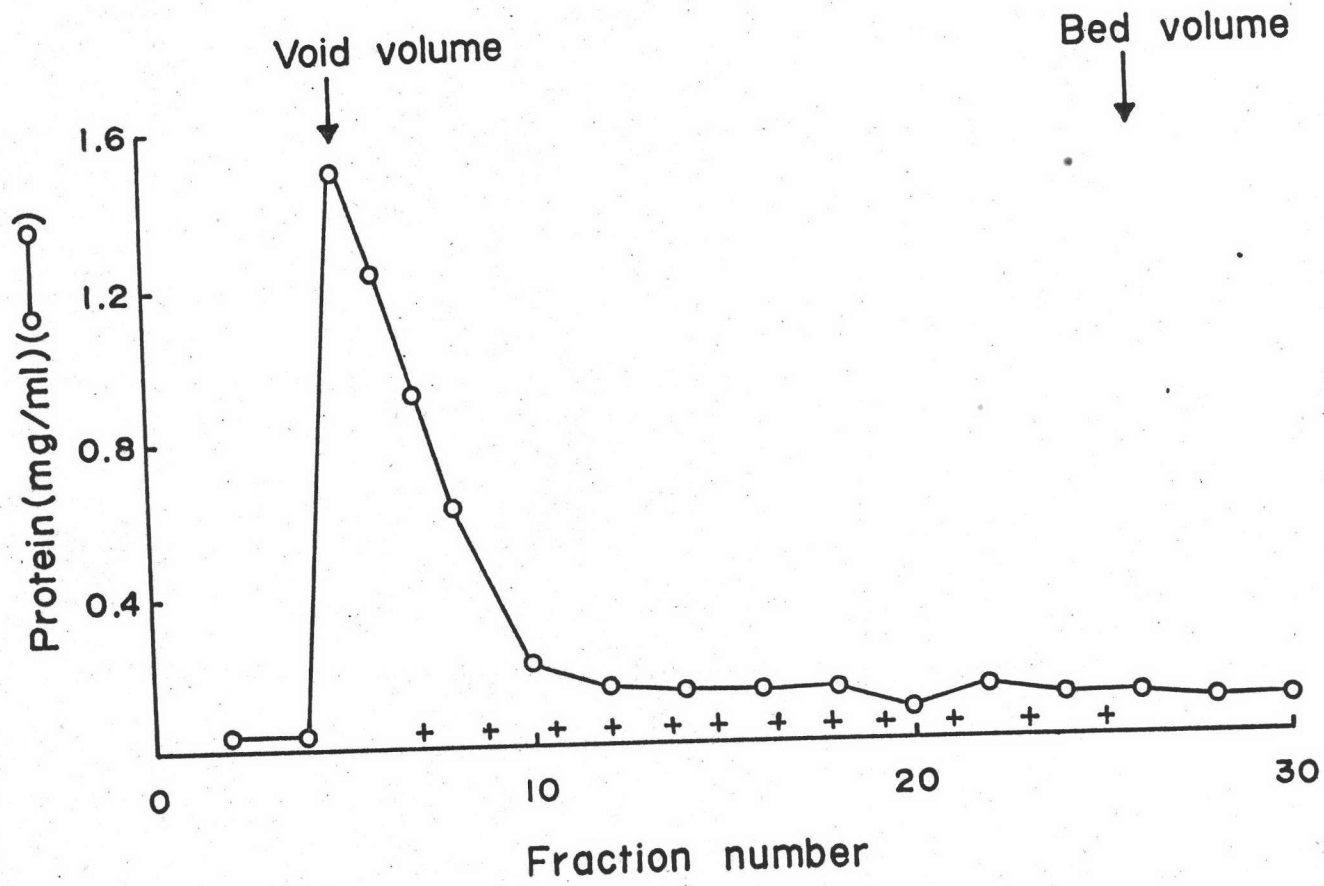
ช่องที่ 1 standard λ ดีเอ็นเอย่อยด้วย *Hind III*

ช่องที่ 2 standard λ ดีเอ็นเอ

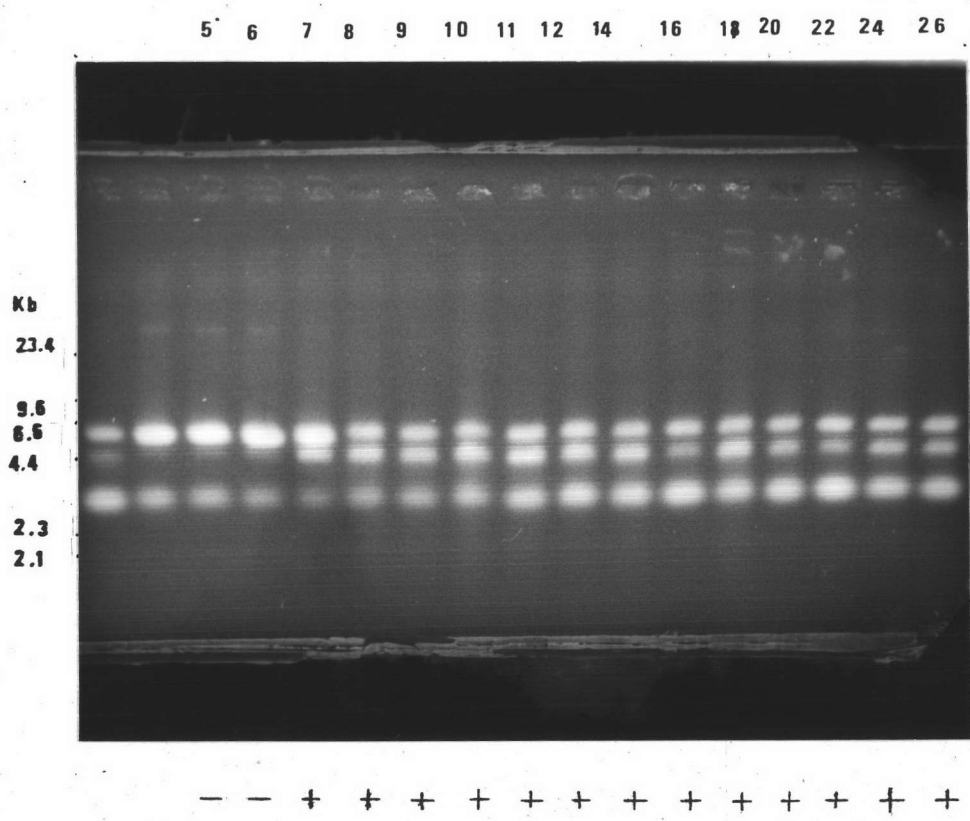
ช่องที่ 3-9 standard λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยโปรตีนจากแฟรคชันต่างๆที่ได้จากคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทด์

* แฟรคชันที่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ *Alu I*





เลขที่แฟรคชัน



รูปที่ 24 ผลการทำเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสให้
บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100

ช่องที่ 1 พลาสมิด pBR322 ย่อยด้วย Eco RI
ช่องที่ 2 พลาสมิด pBR322 ลับสเตรท
ช่องที่ 3-17 พลาสมิด pBR322 ย่อยด้วยโปรตีนจากแฟรคชันต่างๆที่ได้จาก
คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100

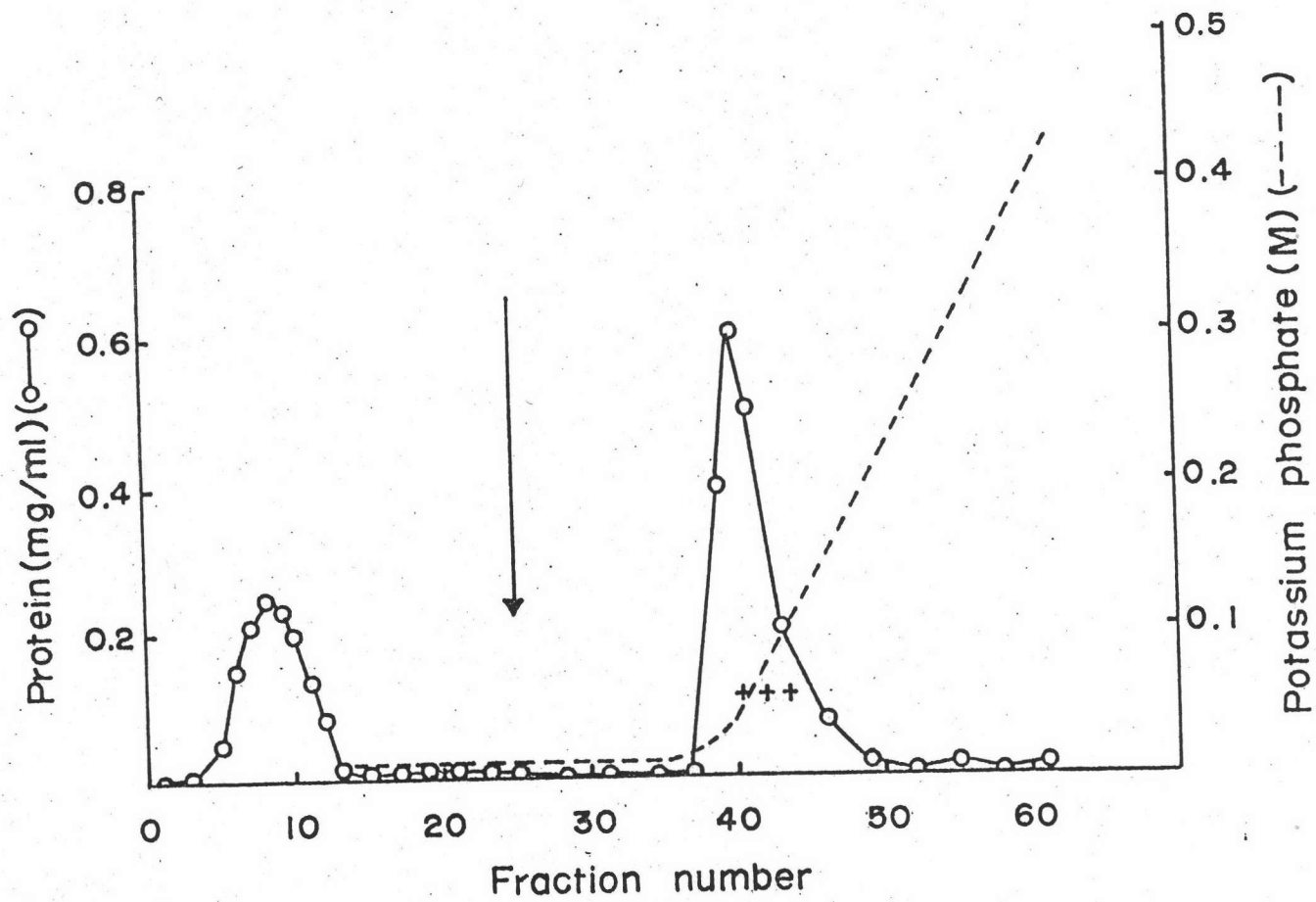
+ แฟรคชันที่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ A1i II

รูปที่ 25 คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ (II)

ผลการแยกเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ที่แยกได้จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100 โดยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ (ขนาด 1.3×10 เซนติเมตร) ชะด้วย linear gradient ของ 25 มิลลิลิตร โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 10 มิลลิโมลาร์, 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 10 มิลลิโมลาร์ และ 25 มิลลิลิตรของ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 0.5 โมลาร์, 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 10 มิลลิโมลาร์ อัตราไหล 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แบ่งเก็บแยกส่วนแฟรคชันที่ 1-24 หลอดละ 5 มิลลิลิตร และ แฟรคชันที่ 25-62 หลอดละ 1 มิลลิลิตร (วิธีการทดลองข้อ 2.19.3)

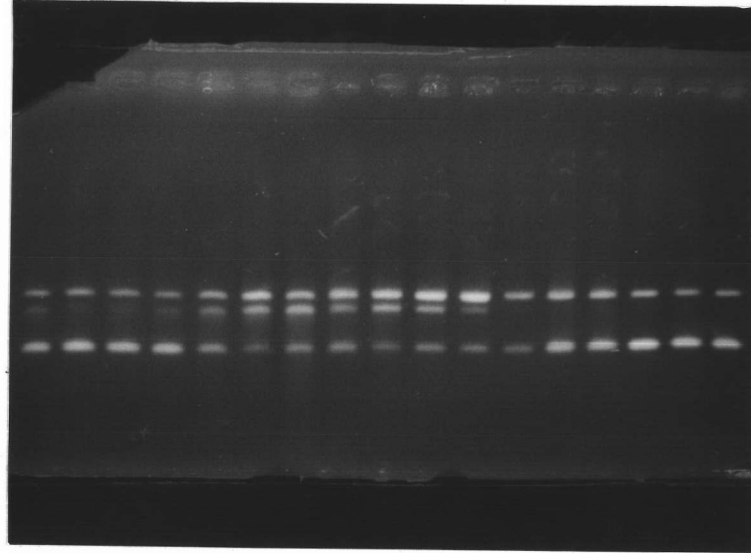
↓ เริ่มชะด้วย linear gradient

+ บริเวณที่พบเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II



เลขที่แฟรคชัน

10 38 40 41 42 43 44 45 46 48 50 52 54 56 58

Kb
23.4
9.6
6.6
4.4
2.3
2.1

- - + + + + + + - - - - -

รูปที่ 26 ผลการทำเรสทริกชันเอนไซม์ *Alu* II ที่ได้จากโคลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100 ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านโคลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์

ช่องที่ 1 พลาสมิด pBR322 ย่อยด้วย *Eco* RI

ช่องที่ 2 พลาสมิด pBR322 สับสเตรท

ช่องที่ 3-17 พลาสมิด pBR322 ย่อยด้วยโปรตีนจากแฟรคชันต่างๆที่ได้จากโคลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์

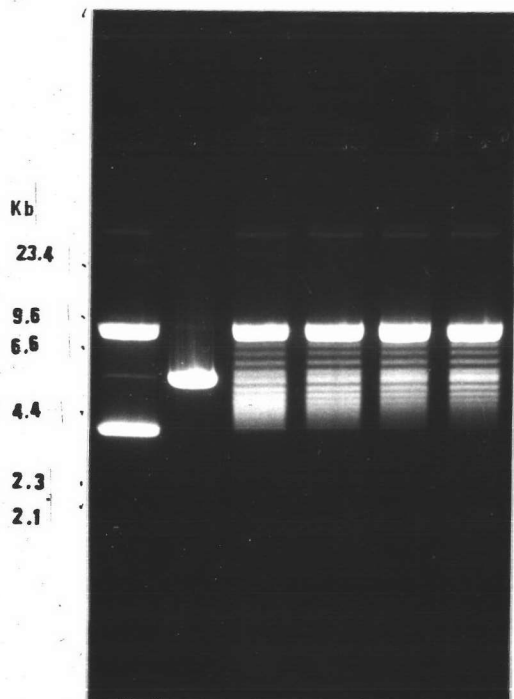
+ แฟรคชันที่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ *Alu* II

เอนไซม์โดยใช้ λ ดีเอ็นเอเป็นสับสเตรทเพื่อคำนวณผลผลิตที่ได้ ปรากฏว่าได้ A1i I ที่ได้ ทำให้บริสุทธิ์แล้ว 322 หน่วยต่อน้ำหนักเซลล์ที่ใช้ 50 กรัม โดย 1 หน่วยของเรสทริกชัน เอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ตัดสับสเตรทดีเอ็นเอจำนวน 1 ไมโครกรัมได้อย่าง สมบูรณ์ในเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบผลกระทบของ nonspecific endonuclease โดยวิธีดังข้อ 2.16 แต่ใช้เวลาในการบ่มเป็น 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง โดยใช้ ϕ X174 เป็นสับสเตรท (รูปที่ 27) เห็นได้ว่าเมื่อใช้เวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นแถบดีเอ็นเอก็จะจาง มากขึ้นตามลำดับแต่ไม่แตกต่างกันมากนักในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งปริมาณของ nonspecific endonuclease ในระดับนี้ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของเรสทริกชันเอนไซม์เมื่อใช้เวลา ในการบ่มอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

สำหรับ A1i II เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100 และ ไอศรอกซิลอะพาไทต์ ปรากฏว่าได้ A1i II ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นแล้ว 891 หน่วยต่อน้ำหนัก เซลล์เปียก 50 กรัม เมื่อตรวจสอบผลกระทบของ nonspecific endonuclease โดยใช้ ϕ X174 เป็นสับสเตรท ผลคือ เมื่อใช้เวลาในการบ่มนานขึ้นเอนไซม์สามารถย่อย ϕ X174 ได้มากขึ้น ดังรูปที่ 28 และแถบดีเอ็นเอขนาดเล็กๆที่เกิดจากการย่อยของ nonspecific endonuclease ต่ำมากแม้ว่าจะบ่มนานถึง 4 ชั่วโมง แสดงว่ามี nonspecific endonuclease ปะปนมาน้อยมาก ในปริมาณที่ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของ แอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์เมื่อใช้เวลาในการบ่มอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

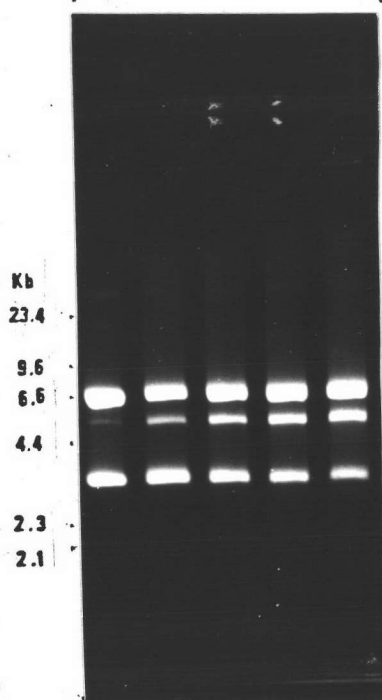
3.8 สมบัติของ A1i I และ A1i II

เมื่อศึกษาสมบัติของเรสทริกชันเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด โดยวิธีข้อ 2.21 ได้ผลดังรูปที่ 29-43 ซึ่งสรุปผลไว้ในตารางที่ 5 เห็นได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ทั้ง 2 ชนิดค่อนข้างแตกต่างกันคือ A1i I ต้องการความแรงไอออนต่ำ อุณหภูมิที่เหมาะสม ในการทำงานของเอนไซม์คือ 30-70 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมในการทำงาน เท่ากับ 7.5 ส่วน A1i II ต้องการความแรงไอออนปานกลาง เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ สูงกว่า A1i I คือ 37-50 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงกว้าง และสูงกว่า A1i I คือ ทำงานได้ดีที่ pH 8.0-8.5 และยังคงทำงานได้จนถึง pH 9.0

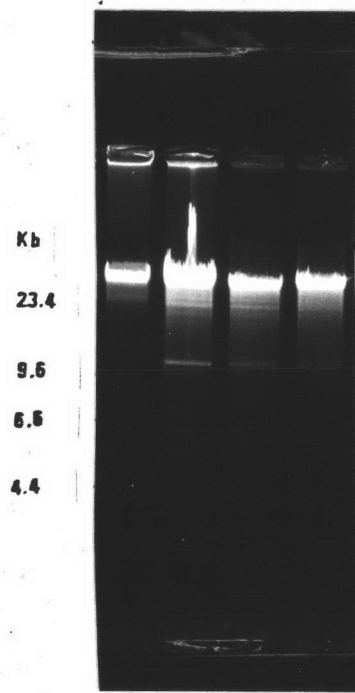


รูปที่ 27 ผลการตรวจสอบผลกระทบจาก nonspecific endonuclease ต่อการตรวจวัดแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ A1i I

- ช่องที่ 1 ϕ X174 ดีเอ็นเอ
- ช่องที่ 2 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วย Xho I
- ช่องที่ 3 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i I ใช้เวลาในการบ่ม 1 ชั่วโมง
- ช่องที่ 4 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i I ใช้เวลาในการบ่ม 2 ชั่วโมง
- ช่องที่ 5 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i I ใช้เวลาในการบ่ม 3 ชั่วโมง
- ช่องที่ 6 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i I ใช้เวลาในการบ่ม 4 ชั่วโมง

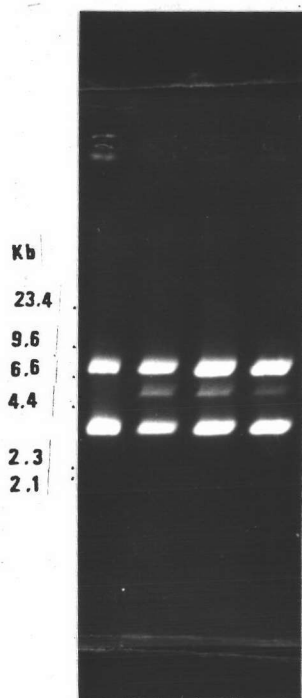


- รูปที่ 28 ผลการตรวจสอบผลกระทบจาก nonspecific endonuclease ต่อการตรวจวัดแอกติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II
- ช่องที่ 1 ϕ X174 ดีเอ็นเอ
- ช่องที่ 2 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ใช้เวลาในการบ่ม 1 ชั่วโมง
- ช่องที่ 3 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ใช้เวลาในการบ่ม 2 ชั่วโมง
- ช่องที่ 4 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ใช้เวลาในการบ่ม 3 ชั่วโมง
- ช่องที่ 5 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ใช้เวลาในการบ่ม 4 ชั่วโมง



รูปที่ 29 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเรสทริกชัน เอนไซม์ A1i I

- ช่องที่ 1 standard λ ดีเอ็นเอ
- ช่องที่ 2 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i I ในสารละลายปฏิกิริยา ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 มิลลิโมลาร์
- ช่องที่ 3 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i I ในสารละลายปฏิกิริยา ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์
- ช่องที่ 4 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i I ในสารละลายปฏิกิริยา ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 30 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเรสทริกชัน
เอนไซม์ A1i II

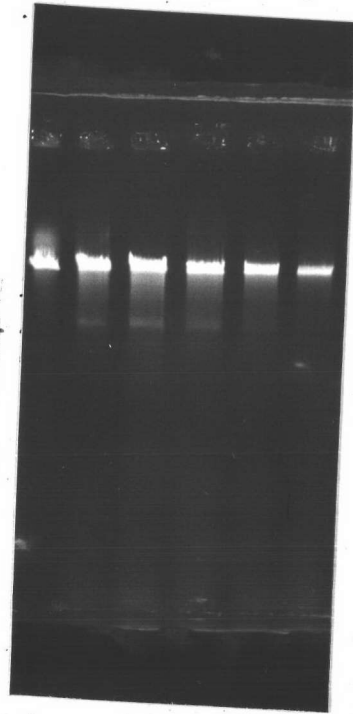
ช่องที่ 1 ϕ X174 ดีเอ็นเอส์บสเตรท

ช่องที่ 2 ϕ X174 ดีเอ็นเอ้อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ในสารละลาย
ปฏิกิริยาที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 3 ϕ X174 ดีเอ็นเอ้อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ในสารละลาย
ปฏิกิริยาที่มีโซเดียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์

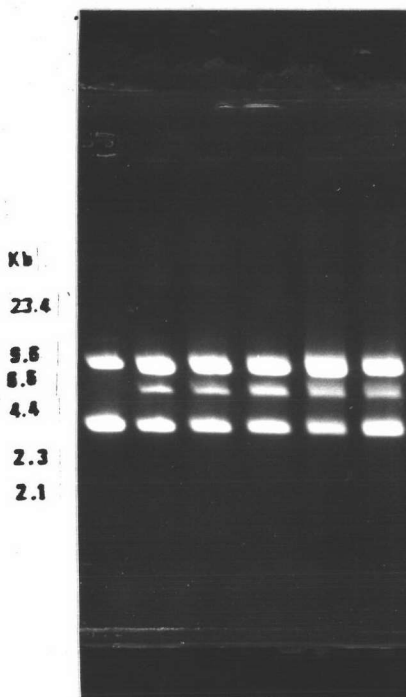
ช่องที่ 4 ϕ X174 ดีเอ็นเอ้อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ในสารละลาย
ปฏิกิริยาที่มีโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์

Kb
23.4
9.6
6.6
4.4
2.3
2.1



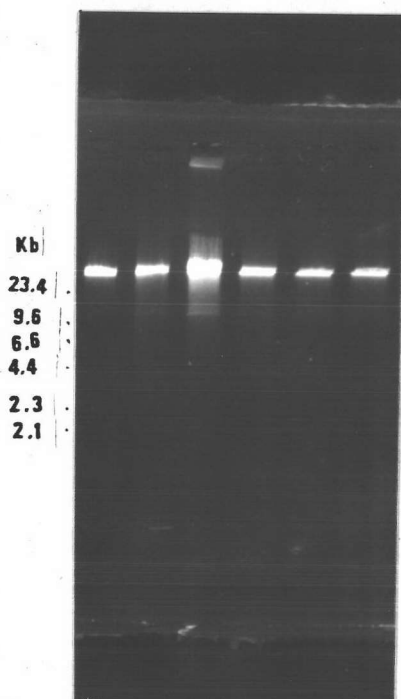
รูปที่ 31 ผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเรสทริกชันเอนไซม์ AlI I

- | | |
|-----------|--|
| ช่องที่ 1 | λ ดีเอ็นเอลadder |
| ช่องที่ 2 | λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ AlI I ที่ pH 7.0 |
| ช่องที่ 3 | λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ AlI I ที่ pH 7.5 |
| ช่องที่ 4 | λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ AlI I ที่ pH 8.0 |
| ช่องที่ 5 | λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ AlI I ที่ pH 8.5 |
| ช่องที่ 6 | λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ AlI I ที่ pH 9.0 |



รูปที่ 32 ผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II

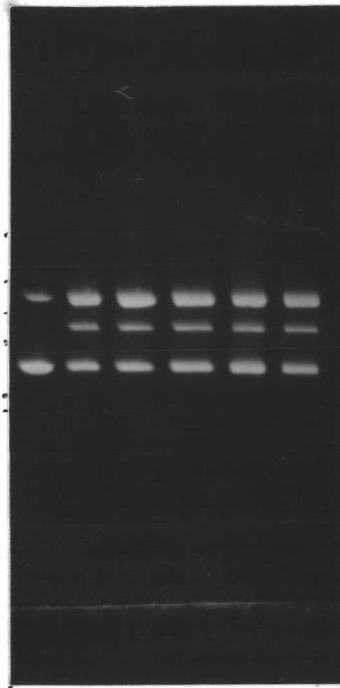
ช่องที่ 1	φX174	ดีเอ็นเอลัมบัสเตราท	
ช่องที่ 2	φX174	ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II	ที่ pH 7.0
ช่องที่ 3	φX174	ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II	ที่ pH 7.5
ช่องที่ 4	φX174	ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II	ที่ pH 8.0
ช่องที่ 5	φX174	ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II	ที่ pH 8.5
ช่องที่ 6	φX174	ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II	ที่ pH 9.0



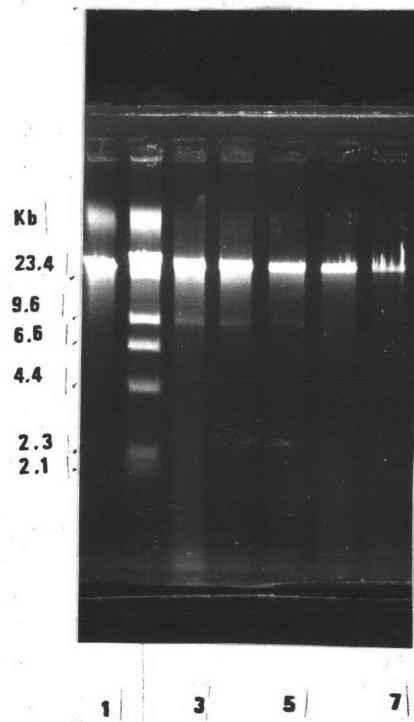
รูปที่ 33 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเรสทริกชันเอนไซม์ AlI I

- ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอลadder
- ช่องที่ 2 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ AlI I ซึ่งบ่มที่ pH 7.0
7 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- ช่องที่ 3 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ AlI I ซึ่งบ่มที่ pH 7.5
7 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- ช่องที่ 4 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ AlI I ซึ่งบ่มที่ pH 8.0
7 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- ช่องที่ 5 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ AlI I ซึ่งบ่มที่ pH 8.5
7 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- ช่องที่ 6 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ AlI I ซึ่งบ่มที่ pH 9.0
7 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

Kb
23.4
9.6
6.6
4.4
2.3
2.1



- รูปที่ 34 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II
- ช่องที่ 1 ϕ X174 ดีเอ็นเอลัมบัสเทรท
- ช่องที่ 2 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ซึ่งบ่มที่ pH 7.0, 7 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- ช่องที่ 3 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ซึ่งบ่มที่ pH 7.5, 7 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- ช่องที่ 4 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ซึ่งบ่มที่ pH 8.0, 7 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- ช่องที่ 5 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ซึ่งบ่มที่ pH 8.5, 7 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- ช่องที่ 6 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ซึ่งบ่มที่ pH 8.5, 7 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง



รูปที่ 35 ผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาของเรสทริกชันเอนไซม์ Alu I

ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอสับสเตรท

ช่องที่ 2 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วย Hind III

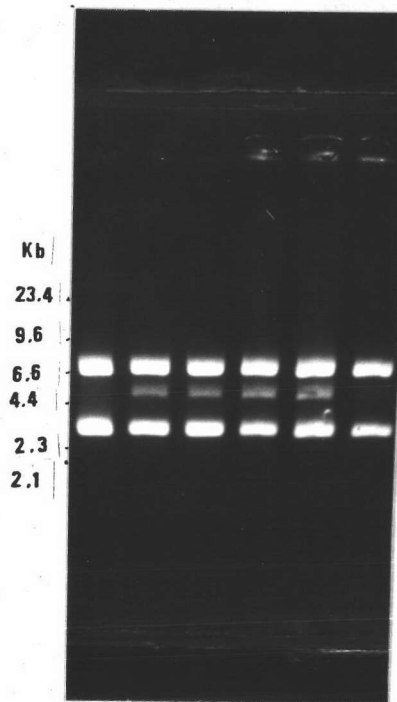
ช่องที่ 3 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Alu I ที่ 30 องศาเซลเซียส

ช่องที่ 4 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Alu I ที่ 37 องศาเซลเซียส

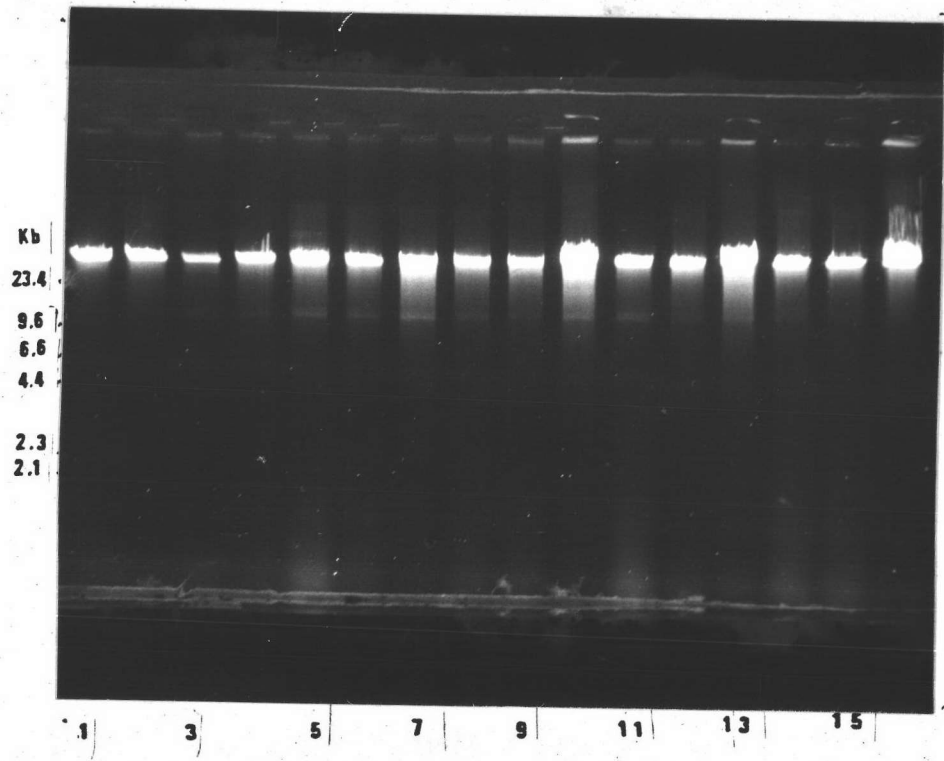
ช่องที่ 5 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Alu I ที่ 42 องศาเซลเซียส

ช่องที่ 6 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Alu I ที่ 50 องศาเซลเซียส

ช่องที่ 7 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Alu I ที่ 60 องศาเซลเซียส

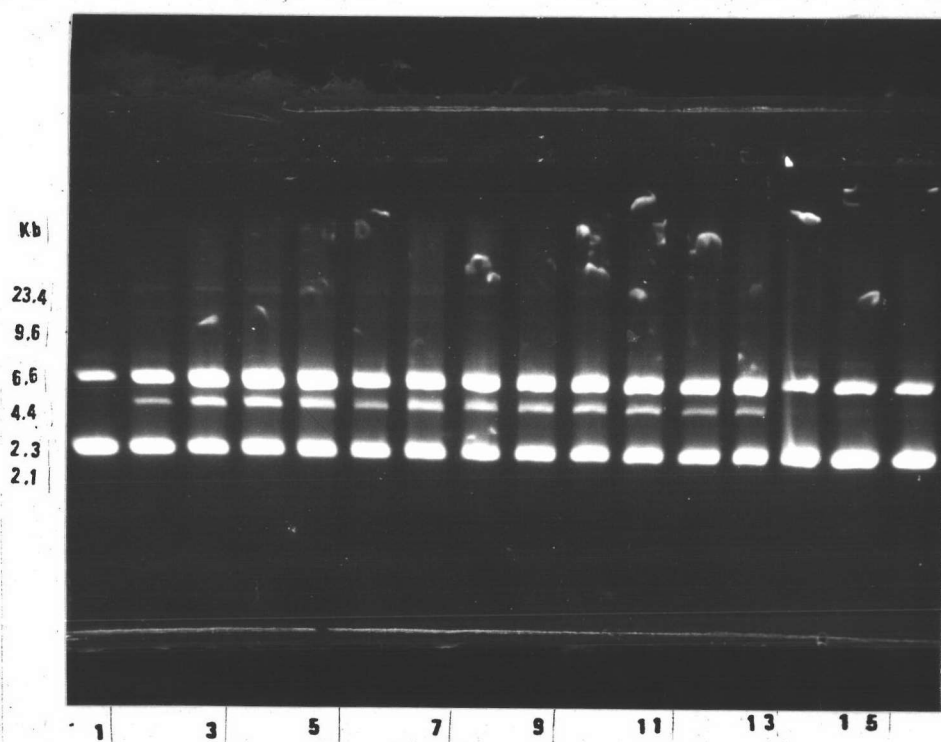


- รูปที่ 36 ผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาของเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II
- ช่องที่ 1 ϕ X174 ดีเอ็นเอลบสเตรท
- ช่องที่ 2 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ที่ 30 องศาเซลเซียส
- ช่องที่ 3 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ที่ 37 องศาเซลเซียส
- ช่องที่ 4 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ที่ 42 องศาเซลเซียส
- ช่องที่ 5 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ที่ 50 องศาเซลเซียส
- ช่องที่ 6 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II ที่ 60 องศาเซลเซียส



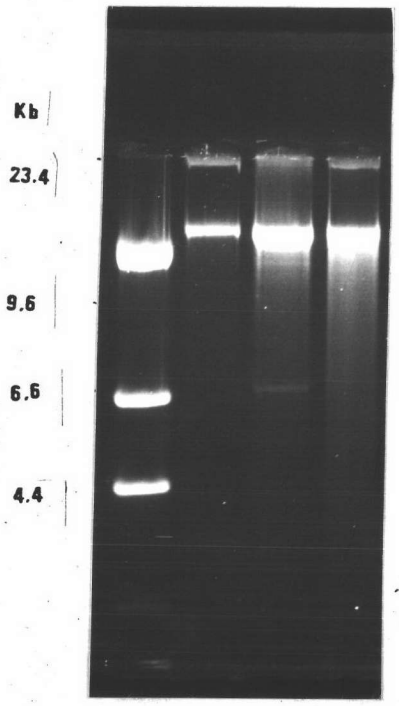
รูปที่ 37 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเรสทริกชันเอนไซม์ *Alu I*

ช่องที่ 1	λ ดีเอ็นเอลัมบัสเตราท
ช่องที่ 2-4	λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Alu I</i> บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ
ช่องที่ 5-7	λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Alu I</i> บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ
ช่องที่ 8-10	λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Alu I</i> บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ
ช่องที่ 11-13	λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Alu I</i> บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ
ช่องที่ 14-16	λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Alu I</i> บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ



รูปที่ 38 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II

- | | |
|---------------|--|
| ช่องที่ 1 | φX174 ดีเอ็นเออัลบัลเตรท |
| ช่องที่ 2-4 | φX174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ |
| ช่องที่ 5-7 | φX174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ |
| ช่องที่ 8-10 | φX174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ |
| ช่องที่ 11-13 | φX174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ |
| ช่องที่ 14-16 | φX174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ |



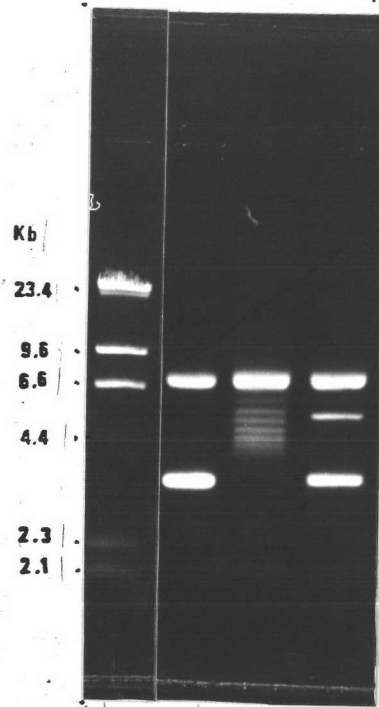
รูปที่ 39 ผลการย่อย λ ดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่แยกได้ (0.5% agarose run 15 V. 24 ชม.) โดยวิธีข้อ 12.5

ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วย Hind III

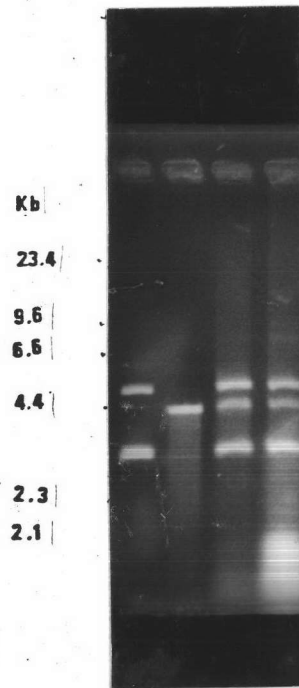
ช่องที่ 2 λ ดีเอ็นเออัลบัสเตรท

ช่องที่ 3 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i I ได้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 10, 19 และ 20 กิโลเบส

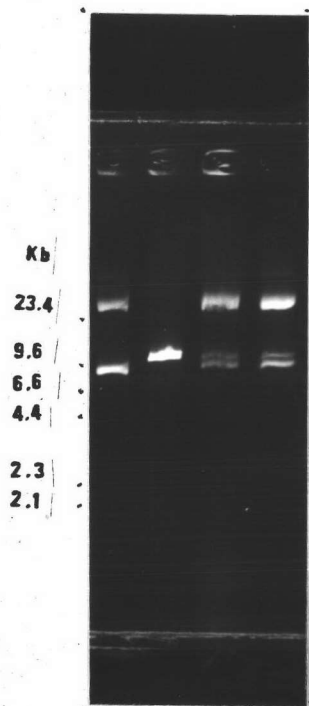
ช่องที่ 4 λ ดีเอ็นเอไม่ถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1i II



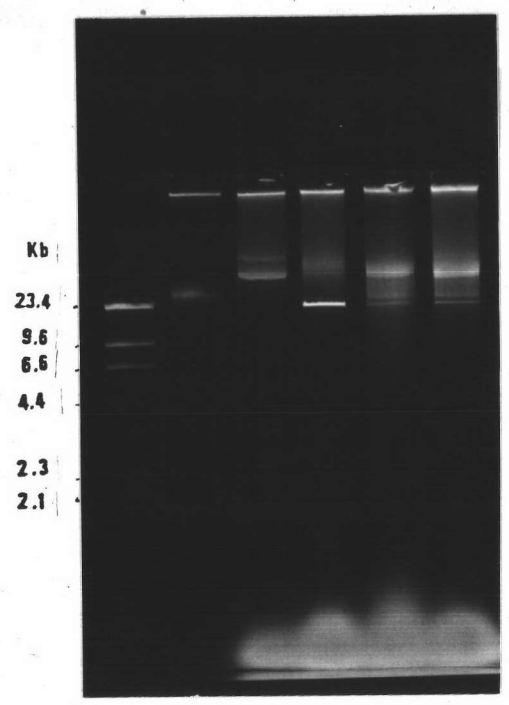
- รูปที่ 40 ผลการย่อย ϕ X174 ดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่แยกได้ โดยวิธีข้อ 12.5
- ช่องที่ 1 standard λ ดีเอ็นเอย่อยด้วย Hind III
- ช่องที่ 2 ϕ X174 ดีเอ็นเอลึบสเตรท
- ช่องที่ 3 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1 i I
- ช่องที่ 4 ϕ X174 ดีเอ็นเอย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ A1 i II



- รูปที่ 41 ผลการย่อยพลาสมิด pBR322 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่แยกได้ โดยวิธีข้อ 12.5
- | | | |
|-----------|----------------|----------------------------------|
| ช่องที่ 1 | พลาสมิด pBR322 | ลึบสเตรท |
| ช่องที่ 2 | พลาสมิด pBR322 | ย่อยด้วย Eco RI |
| ช่องที่ 3 | พลาสมิด pBR322 | ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Ali I |
| ช่องที่ 4 | พลาสมิด pBR322 | ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Ali II |



- รูปที่ 42 ผลการย่อยพลาสมิด pSA30 ด้วยเอนไซม์ที่แยกได้ โดยวิธีข้อ 12.5
- ช่องที่ 1 พลาสมิด pSA30 ลับสเตรท
- ช่องที่ 2 พลาสมิด pSA30 ย่อยด้วย Bgl II
- ช่องที่ 3 พลาสมิด pSA30 ย่อยด้วยเอนไซม์ Ali I
- ช่องที่ 4 พลาสมิด pSA30 ย่อยด้วยเอนไซม์ Ali II



รูปที่ 43 ผลการย่อยพลาสมิด pCK3 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่แยกได้ โดยวิธีข้อ 12.5

- ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอย่อยด้วย Hind III
- ช่องที่ 2 โครโมโซมอลติเอ็นเอของ *E. coli*
- ช่องที่ 3 พลาสมิด pCK3
- ช่องที่ 4 พลาสมิด pCK3 ย่อยด้วย Eco RI
- ช่องที่ 5 พลาสมิด pCK3 ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Ali I
- ช่องที่ 6 พลาสมิด pCK3 ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Ali II



ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบสมบัติของเรสทริกชันเอนไซม์ A1i I และ A1i II

สมบัติ	เรสทริกชันเอนไซม์ A1i I	เรสทริกชันเอนไซม์ A1i II
1. สภาพที่เหมาะสมใน การเร่งปฏิกิริยา ความแรงอ่อน pH อุณหภูมิ	ต่ำ 7.5 30-37°C	ปานกลาง 8.0-8.5 30-50°C
2. ความเสถียรของเอนไซม์ pH อุณหภูมิ	7.5 30-50°C	7.0-9.0 30-50°C
3. การตัดสับสเตรตดีเอ็นเอ λ ดีเอ็นเอ φx174 ดีเอ็นเอ pBR322 pSA30 pCK3	2 sites มากกว่า 6 site 1 site 1 site 1 site	ไม่ตัด 1 site 1 site 1 site 1 site

เมื่อตรวจสอบผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ทั้ง 2 เสถียรต่ออุณหภูมิในช่วงเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งแต่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส แต่ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์แตกต่างกันมากคือ A1i 1 เสถียรต่อ pH เฉพาะที่ pH 7.5 เท่านั้น ส่วน A1i 11 มีความเสถียรต่อ pH ในช่วงกว้างตั้งแต่ 7.0-9.0

รูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการบ่มกับเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นแล้วได้ผลว่า A1i 1 สามารถตัดพลาสมิด pBR322, pSA30 และ pCK3 ได้ 1 ตำแหน่ง ตัด ϕ X174 ดีเอ็นเอได้มากกว่า 6 ตำแหน่ง และตัด λ ดีเอ็นเอได้ 2 ตำแหน่งให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 10, 19 และ 20 กิโลเบส ส่วน A1i 11 ตัดพลาสมิด pBR322, pSA30, pCK3 และ ϕ X174 ดีเอ็นเอได้ 1 ตำแหน่ง และไม่ตัด λ ดีเอ็นเอ