บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สุรศักดิ์ (2536) ได้ทำการโคลนยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ใส่ในดีเอ็นเอพาหะ pUC18 และ pSE411 และตั้งชื่อดีเอ็นเอลูกผสมที่โคลนได้ว่า pCSBC5 และ pCSBC8 ตามลำดับ นำทรานสฟอร์แมนท์ของดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้มาทดสอบแอคติวิตีของ CGTase ด้วยวิธี dextrinizing activity PICT CD-TCE assay และการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ CDs โดย HPLC พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ทั้ง 2 แสดงแอคติวิตีของ CGTase สุรศักดิ์จึงได้ศึกษาแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC8 พบว่ามีขนาด 9.2 kb และมีชิ้นดีเอ็นเอ insert ขนาด 5.2 kb และสุรศักดิ์ได้สรุปว่าสามารถโคลนยีน CGTase ที่อยู่บนโครโมโซมอลดีเอ็นเอ (chromosomal DNA) จาก *Bacillus* sp. A11 ได้ จากรายงานเกี่ยวกับยีน CGTase ในแบคทีเรียหลายๆสายพันธุ์ พบว่ายีน CGTase นั้นจะมีขนาดประมาณ 2.0 ถึง 3.0 kb (ตารางที่ 7) แต่ชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้มีขนาด 5.2 kb ซึ่งใหญ่กว่ายีนถึงเกือบเท่าตัว งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาหาตำแหน่งของยีน GCTase ว่าอยู่บริเวณใดของดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC8 ซึ่งจะสามารถทำได้โดยตัดดีเอ็นเอ insert บางส่วนออกมาในช่วงต่างๆ เพื่อนำมาโคลนใส่ในดีเอ็นเอพาหะ แล้วทดสอบแอคติวิตีของ CGTase จากทรานสฟอร์แมนท์เหล่านั้น ในการศึกษาเบื้องต้นของวิทยานิพนธ์นี้ได้นำพลาสมิด pCSBC8 และทรานสฟอร์แมนท์ CSBC8 มาทดสอบแอคติวิตีของ CGTase ปรากฏว่าทรานสฟอร์แมนท์ CSBC8 ได้สูญเสียแอคติวิตีของ CGTase ไป แม้ว่าจะทำวิธีการทดลองตามวิธีของสุรศักดิ์หรือปรับปรุงวิธีการทดลองบางจุดแล้วก็ตาม จึงได้นำพลาสมิด pCSBC5 และทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 มาศึกษา ซึ่งเป็นดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการโคลนยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 เช่นกัน โดยปกติแล้วการทำงานของ CGTase จะแบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ

คือ ส่วนที่ทำหน้าที่ในการย่อยแป้ง (Amylolytic activity หรือ Dextrinizing activity) และส่วนที่ทำหน้าที่ในการทำให้เกิดเป็นวงแหวน CDs (Cyclization activity) ในการทดสอบขั้นแรกตรวจพบว่าทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 นั้นมี dextrinizing activity ซึ่งเป็นแอคติวิตีส่วนหนึ่งของ CGTase จึงได้ใช้ pCSBC5 และทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 ในการศึกษาตำแหน่งของยีน CGTase ต่อไป โดยตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ว่าเป็นชิ้นเดียวกับใน pCSBC8 โดยการทำ Southern blot hybridization (รูปที่ 2) โดยการทำไฮบริดไดเซชันระหว่างระหว่างดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 กับดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) คือดีเอ็นเอ insertใน pCSBC8 โดยจะมีชุดควบคุมคือชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC8 เอง ผลการทดลองปรากฏว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 และ pCSBC8 นั้นให้สัญญาณการไฮบริดได้เข้มพอๆกัน แสดงถึงว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ทั้ง 2 นี้มีความคล้ายคลึงกันมาก (มี homology สูง) และพลาสมิด pCSBC8 ก็เกิดมาจากการ subclone ของ pCSBC5 (ภาคผนวกที่ 5) การทดลองนี้จึงเป็นการยืนยันว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 กับใน pCSBC8 น่าจะเป็นเป็นชิ้นเดียวกัน จากผลที่แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 อาจจะเป็นชิ้นเดียวกับใน pCSBC8 จึงทำการศึกษาแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC5 เปรียบเทียบกับของ pCSBC8 เพื่อยืนยันให้ชัดเจนขึ้น การศึกษาแผนที่เรสทริกชันของ ดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ได้ยึดแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC8 เป็นหลัก จากการศึกษาขนาดและตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ โดยการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ แล้วนำไปวิเคราะห์โดยอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซีส เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งในที่นี้ใช้ λ / Hind III ดังแสดงในรูปที่ 3 และ 4 พบว่าพลาสมิด pCSBC5 นั้นมีขนาด 7.8 kb และมีดีเอ็นเอ insert ขนาด 5.2 kb ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC8 แต่ขนาดโดยรวมของ pCSBC8 จะใหญ่กว่าเนื่องจากดีเอ็นเอพาหะของ pCSBC8 คือ pSE411 ซึ่งมีขนาด 3.9 kb ส่วนใน pCSBC5 คือ pUC18 ซึ่งมีขนาด 2.6 kb เมื่อพิจารณาขนาดและตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆใน insert ของ pCSBC5 พบว่าตรงกับที่สุรศักดิ์เคยศึกษาไว้ใน pCSBC8 แต่มีข้อแตกต่างคือทางด้านปลาย 3′ และ 5′ ของ

ดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 จะมีตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์เพิ่มมาหลายตัวคือ Kpn I Pst I Sma I Sal I และ Acc I ซึ่งทำให้มีนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นมาอีกเล็กน้อย และทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอ insert ก็มีทิศทางตรงกันข้ามกับใน pCSBC8 ด้วย (รูปที่ 5) ซึ่งผลที่ได้ยืนยันว่ามียีน CGTase ใน pCSBC5 เมื่อเปรียบเทียบแผนที่เรสทริกชันของดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 กับยีน CGTase ในแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น พบว่า pCSBC5 มีตำแหน่งของ Nde I 1 ตำแหน่งบนดีเอ็นเอ insert คล้ายกับใน Alkalophilic *Bacillus* sp. strain no. 38-2 และ Alkalophilic *Bacillus* sp. strain no. 17-1 ที่มีระยะห่างจาก EcoR I 1.25 kb (Kaneko, 1989) และมีตำแหน่ง Acc I 3 ตำแหน่งในยีนซึ่งมี 2 ตำแหน่งห่างกัน 1.8 kb คล้ายกับใน *Bacillus circulans* ที่จะมีตำแหน่ง Acc I อยู่ 2 ตำแหน่งในยีนและห่างกัน 1.5 kb (Nitschke, 1990) เป็นที่น่าสังเกตว่าแผนที่เรสทริกชันของยีน CGTase ในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆมีความแตกต่างกัน (ภาคผนวกที่ 6)

การศึกษาในลำดับต่อไปคือการหาตำแหน่งของยีน CGTase ในดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 ดังนั้นก่อนจะมีการ subclone ต้องมีการตรวจสอบแอคติวิตีของ CGTase ของทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 ซึ่งในขั้นแรกใช้วิธี CD-TCE assay ปรากฏว่าไม่พบตะกอน CD-TCE จึงได้ใช้วิธีการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ CDs ด้วยเครื่อง HPLC เนื่องจากเป็นวิธีที่วัดผลิตภัณฑ์ CDs โดยตรง จากการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าไม่สามารถตรวจพบ CDs ได้ (รูปที่ 6) ถึงแม้ว่าจะมีการดัดแปลงวิธีการทดลองออกไปบ้างคือ บ่มแป้งด้วย α amylase ก่อนที่จะนำไปบ่มกับสารละลายเอนไซม์ หรือบ่ม reaction mixture ด้วย β amylase แล้วก็ตาม แม้จะดูเหมือนมีบาง peak ที่มี retention time ใกล้เคียงกับ CDs แต่เมื่อเติม internal standard ลงไปพร้อมกับ reaction mixture ผลปรากฏว่า peak เหล่านั้นไม่ใช่ peak ของ CDs

หลังจากที่ไม่สามารถตรวจพบ CDs ได้ด้วยวิธี HPLC จึงทำการทดลองตรวจหาเอนไซม์ CGTase โดย Immunodiffusion ซึ่งจะเป็นวิธีที่ตรวจสอบเอนไซม์โดยใช้แอนติบอดีที่สามารถจับกับ CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ได้ จากผลการทดลอง (รูปที่ 7) พบ

ว่าจะเกิดตะกอน Ag-Ab complex ใน dish ที่เป็นของชุดควบคุมคือสารละลายเอนไซม์ของ *Bacillus* sp. A11 เท่านั้น การที่ไม่สามารถตรวจหาเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีนี้ได้ถึงแม้ว่าจะทำให้สารละลายเอนไซม์เข้มข้นขึ้น 5 เท่าแล้วก็ตาม อาจเป็นเพราะสารละลายเอนไซม์จากทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 นั้นไม่มีเอนไซม์ CGTase หรือมีน้อยมากจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบได้ ดังจะเห็นได้จากค่า dextrinizing activity ที่พบในสารละลายเอนไซม์ของทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 ที่มีค่าต่ำกว่าใน *Bacillus* sp. A11 ถึง 100 เท่า (data not shown) และต้องใช้ระยะเวลาในการบ่มนานกว่า *Bacillus* sp. A11 มาก (วรรณรัตน์, 2537) การที่พบค่า dextrinizing activity ต่ำมาก อาจเป็นเพราะความไม่เสถียรของดีเอ็นเอลูกผสม หรือเกิดจากการที่ยีนใน *Bacillus* ต้องมาทำงานในเซลล์ของ *E. coli* ซึ่งจะทำงานได้ไม่ดีเท่าที่ควร

จากการที่ทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 แสดงแต่ dextrinizing activity แต่ไม่แสดง cyclization activity จึงทำให้เกิดข้อสงสัยว่าการย่อยแป้งที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากแอคติวิตีของ α amylase เพราะการทำงานของ α amylase กับ CGTase ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้งมีความคล้ายคลึงกันมาก (MacGregor, 1993; Svensson, 1994) แต่จากรายงานของ Pongsawasdi (1987) ไม่พบแอคติวิตีของ α amylase ใน *Bacillus* sp. A11 และจากผลของ dextrinizing activity ที่พบว่ามีค่าต่ำมากจนกระทั่งไม่น่าจะเป็นแอคติวิตีที่เกิดจาก α amylase

เมื่อไม่สามารถตรวจหาแอคติวิตีของ CGTase ในส่วนของ cyclization activity ได้ จึงไม่สามารถหาตำแหน่งของยีน CGTase ได้ แต่เนื่องจากสามารถตรวจพบ dextrinizing activity ซึ่งเป็นแอคติวิตีอย่างหนึ่งของ CGTase ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองหาช่วงของดีเอ็นเอ insert ที่ทำให้เกิด dextrinizing activity ใน pCSBC5 แทน เมื่อทราบตำแหน่งที่เกิด dextrinizing activity ก็อาจจะทำให้ทราบตำแหน่งของที่เป็นปลาย 5′ ของยีน CGTase หรือปลายอะมิโน (N - terminal) ของเอนไซม์ CGTase ได้ เนื่องจากมีข้อมูลว่าปลายด้านอะมิโนของเอนไซม์ เป็นส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการย่อยแป้งและปลายด้าน

คาร์บอกซิล (C-terminal) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการ cyclizationเพราะจากรายงานต่างๆพบว่าเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนทางปลายด้านอะมิโน จะพบว่ามีความคล้ายคลึง (homology) กับ α amylase มาก (Kimura, 1987; Svensson, 1989) นอกจากนี้ผลการศึกษาโครงสร้างตติยภูมิ (3^{o} structure) ของเอนไซม์ CGTase โดยการทำ X-ray crystallography ก็พบว่าทางด้านปลายอะมิโนของเอนไซม์ CGTase มี active site ที่คล้ายกับของ α amylase มาก (Hofmah, 1989; Jespersen, 1991; Klein, 1991, 1992) และถ้าสร้าง mutant ที่ตัดกรดอะมิโนทางปลายด้านคาร์บอกซิลออก พบว่าเอนไซม์ CGTase สามารถที่จะย่อยแป้งได้ แต่การสร้างให้เกิดเป็น CDs นั้นเกิดได้น้อยลงมาก (Kimura, 1989) นอกจากนี้หากทราบว่าบริเวณใดเป็นปลายอะมิโนของยีน CGTase ที่อยู่ใน pCSBC5 ก็สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นของการศึกษาต่างๆในภายหลังได้ เช่นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ยืนยันตำแหน่งยีน CGTase เทียบกับสายพันธุ์อื่น การศึกษาความผิดปรกติของยีนCGTase ที่อยู่ในพลาสมิด pCSBC5 และ pCSBC8 หรือการตัดต่อเปลี่ยน promoter เข้าทางด้านปลาย 5′ ของยีน เพื่อปรับปรุงให้ยีน CGTase ทำงานได้ดีขึ้น เป็นต้น

การหาตำแหน่งที่ทำให้เกิด dextrinizing activity ทำได้โดยการตัดชิ้นดีเอ็นเอ insert บางส่วนใน pCSBC5 ออกมาแล้วทำการโคลนใส่ในดีเอ็นเอพาหะ pUC118 และทรานสฟอร์มเข้าในเซลล์เจ้าเรือน *E. coli* JM 101 ชิ้นดีเอ็นเอที่นำมาโคลนมีอยู่ 5 ช่วงด้วยกัน การที่เลือกพลาสมิด pUC118 เป็นดีเอ็นเอพาหะในการโคลนครั้งนี้ เพราะเป็นดีเอ็นเอพาหะที่มีจำนวนชุดต่อเซลล์สูง และสามารถคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมได้โดยง่าย คือคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวทั้งนี้เพราะพลาสมิด pUC118 และ *E. coli* JM101 มี *lac Z′* และ Δ *(lac Z)* ที่ถอดรหัสให้ส่วนทางปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซิลของเอนไซม์ β-galactosidase ตามลำดับ แล้วสายเปปไทด์จากทั้ง 2 ส่วนจะมารวมกันเป็นเอนไซม์ β-galactosidase ที่สมบูรณ์ภายในเซลล์เจ้าเรือน และทรานสฟอร์แมนท์จะสามารถย่อย X-gal ได้และให้เป็นโคโลนีสีฟ้า ส่วนพลาสมิด pUC118 ที่ได้รับดีเอ็นเอ insert เข้าไปในตำแหน่ง polylinker จะทำให้ถอดรหัสส่วนปลายอะมิโนของ

β-galactosidase มาได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้ไม่เกิดเป็นเอนไซม์ β-galactosidase ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จึงมีโคโลนีเป็นสีขาว ดีเอ็นเอลูกผสมที่สร้างได้จากการโคลนของชิ้นที่ 1 ถึงชิ้นที่ 5 นั้นถูกนำมาตรวจสอบขนาดและตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ (รูปที่ 10) เมื่อพบว่าตรงตามที่ต้องการจึงได้ตั้งชื่อดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการโคลนชิ้นที่ 1 ถึง 5 นี้ว่า pCSBC9 10 11 12 และ 13 และทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ว่า CSBC9 10 11 12 และ 13 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ทั้งหมดมาทดสอบ dextrinizing activity โดยมีทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 เป็น positive control และทรานสฟอร์แมนท์ UC118 เป็น negative control ผลการทดสอบ dextrinizing activity เมื่อเวลา 1 ถึง 5 ชั่วโมง แสดงดังกราฟรูปที่ 11 จากกราฟจะพบว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะและระยะเวลาเดียวกัน ทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 มี dextrinizing activity มากที่สุด รองลงมาคือทรานสฟอร์แมนท์ CSBC12 และ CSBC13 ส่วนทรานสฟอร์แมนท์ CSBC9 10 และ 11 นั้นไม่ถือว่ามี dextrinizing activity เนื่องจากมีระดับการย่อยแป้งที่ใกล้เคียงกับในทรานสฟอร์แมนท์ UC118 ดังนั้นช่วงดีเอ็นเอที่เล็กที่สุดที่ยังแสดง dextrinizing activity ได้คือชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ใน pCSBC12 ซึ่งเป็นช่วง EcoR I ถึง Nde I ในพลาสมิด pCSBC5 ภายหลังจากที่ทราบว่า pCSBC12 นั้นมี dextrinizing activity จึงได้ทำการทดลองว่า transcription ของชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC12 นั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของ IPTG เช่นเดียวกับใน pCSBC8 (สุรศักดิ์, 2536) หรือไม่ โดยดูผลของ IPTG ต่อ dextrinizing activity โดยทำการเลี้ยงทรานสฟอร์แมนท์ CSBC12 ในสภาวะที่เสริม IPTG และไม่เสริม IPTG แล้วจึงนำไปวัด dextrinizing activity พบว่าค่า dextrinizing activity ของทั้ง 2 สภาวะนั้นใกล้เคียงกัน (รูปที่ 12) นั่นคือ IPTG ไม่มีผลต่อ dextrinizing activity ของทรานสฟอร์แมนท์ CSBC12 ซึ่งแสดงว่าการทำงานของยีนนั้นไม่อยู่ภายใต้การควบคุมของ *lac* promoter ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยีนมี promoter ของตัวเองและสามารถทำงานได้อิสระจาก *lac* promoter แต่ dextrinizing activity ที่วัดได้ในการทดลองครั้งนี้ พบว่ามีค่าต่ำกว่าการทดลองที่ผ่านมา (การทดสอบ dextrinizing activity ของทรานสฟอร์แมนท์ต่างๆ) เกิดจากการความไม่

เสถียรของดีเอ็นเอลูกผสม (unstable) ซึ่งเคยเกิดขึ้นมาแล้วในกรณีของ pCSBC5 และ pCSBC8 ที่แต่เดิมมีแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase แต่มาภายหลังพบว่าได้สูญเสีย cyclization activity (ในกรณีของ pCSBC5) หรือไม่พบแอคติวิตีใดๆเลย (ในกรณีของ pCSBC8)

จากการศึกษาผลของแผนที่เรสทริกชันใน pCSBC5 และ pCSBC8 พบว่าแผนที่เรสทริกชันของทั้ง 2 พลาสมิดนั้นสลับปลายกันอยู่ และจากการที่ไม่สามารถตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ได้ สาเหตุอาจเป็นเพราะการที่อยู่ในทิศทางที่ไม่ถูกต้อง จึงได้ทำการทดลองสลับปลายของชิ้นดีเอ็นเอ insert ในพลาสมิดทั้ง 2 ให้อยู่ในทิศทางที่ตรงกันข้าม ทำได้โดยการตัดชิ้นดีเอ็นเอ insert ออกมาแล้วโคลนใส่ในดีเอ็นเอพาหะที่เหมาะสม สำหรับการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC8 นั้นได้ใช้ดีเอ็นเอพาหะ pUC19 เนื่องจากมีตำแหน่ง polylinker สลับข้างกับ pSE411 จะทำให้ตำแหน่งที่อยู่ติดกับ promoter เปลี่ยนไปเป็นตำแหน่ง Pst I ซึ่งจะไปเหมือนใน pCSBC5 และการสลับปลายของชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 จะโคลนเข้าในดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ด้วยเหตุผลเดียวกัน เพราะตำแหน่งที่ติดกับ promoter จะเป็นตำแหน่ง Hind III (Kpn I) ซึ่งจะไปเหมือนกับใน pCSBC8 เมื่อตรวจหาแอคติวิตีของ CGTase ในทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จากการสลับปลายของชิ้นดีเอ็นเอ insert ทั้ง 2 ปรากฏว่าไม่สามารถตรวจพบได้ เพราะฉะนั้นการที่ไม่สามารถพบแอคติวิตีของ CGTase ใน pCSBC5 และ pCSBC8 ไม่ได้เกิดจากการที่อยู่ในทิศทางที่ไม่ถูกต้อง การที่พลาสมิดทั้ง 2 ได้สูญเสียแอคติวิตีของ CGTase ไปอาจเกิดจากความไม่เสถียรของดีเอ็นเอลูกผสมดังที่กล่าวมาแล้ว อาจเกิดการกลายพันธุ์อย่างสมบูรณ์ หรืออาจเกิดจากความผิดปรกติบางอย่างของยีนในขณะที่ทำการ sub-culture มาเรื่อยๆ เนื่องจากยีนนี้เป็นยีนที่อยู่ใน *Bacillus* เมื่อมาอยู่ในเซลล์ของ *E. coli* อาจถูกดัดแปร (modified) ไป ซึ่งการดัดแปรนั้นได้เกิดในส่วนที่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์แต่มีผลต่อแอคติวิตีของการ cyclization หรืออาจเกิดจากการที่ promoter ของ *Bacillus* ต้องมาทำงาน (express) ในเซลล์ของ *E. coli* เพราะจะทำให้

ทำงานไม่ได้หรือทำได้ไม่ดี ในกรณีที่มีสาเหตุเนื่องจาก promoter ไม่เหมาะสมต่อการแสดงออกใน *E. coli* แนวทางหนึ่งในการที่จะศึกษาต่อไปคือการเปลี่ยนชนิดของ promoter การใช้ shuttle vector หรือการเปลี่ยนเซลล์เจ้าเรือนให้เป็นพวก *Bacillus* ซึ่งอาจทำให้ได้แอคติวิตีของ CGTase กลับมาได้ แต่ถ้าเกิดจากความผิดปรกติที่ยีน CGTase ซึ่งจะทราบได้เมื่อศึกษาถึงระดับลำดับนิวคลีโอไทด์ ก็จะมีแนวทางแก้ไขในระดับที่เหมาะสมต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. ชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 เป็นชิ้นดีเอ็นเอเดียวกันกับใน pCSBC8 ทั้งในแง่ DNA homology และ แผนที่เรสทริกชัน แต่ชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 มีทิศทางตรงกันข้ามกับดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC8 และทางปลายด้าน 5′ และ 3′ ของดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 จะมีตำแหน่งของเรสทริกชันเพิ่มขึ้นหลายตัวคือ Kpn I Pst I Sma I Sal I และ Acc I เหมือนกันทั้ง 2 ข้าง เมื่อเปรียบเทียบกับยีน CGTase ในแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น พบว่ามีบางตำแหน่งคล้ายคลึงกับยีน CGTase ใน Alkalophilic *Bacillus* sp. strain no. 38-2 Alkalophilic *Bacillus* sp. strain no. 17-1 และ *Bacillus circulans* strain no. 8

2. ไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตีของ CGTase ในทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 แต่สามารถตรวจพบ dextrinizing activity ซึ่งเป็นแอคติวิตีส่วนหนึ่งของ CGTase เมื่อทำการศึกษาช่วงของดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ที่ทำให้เกิด dextrinizing activity พบว่าคือช่วง EcoR I ถึง Nde I ซึ่งมีขนาด 1.7 kb และอยู่ในดีเอ็นเอลูกผสม pCSBC12 และการแสดงออกของยีนไม่อยู่ภายใต้การควบคุมของ *lac* promoter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย