บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสของ *Streptomyces* sp. 190-1 โดยใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านและพลาสมิดพาหะเป็นระบบของ *Streptomyces* ดังนั้นจึงต้องคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม ซึ่งเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมไม่ควรมีแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส หรือมีอยู่ในระดับที่ต่ำมาก เพื่อง่ายต่อการคัดเลือกโคลนที่รับยีนเข้าไป ฉะนั้นในขั้นแรก จึงนำ *Streptomyces* ที่มีในห้องปฏิบัติการมาตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส คือ *Streptomyces lividans* TK21 ที่ได้รับอนุเคราะห์จาก Prof. D.A. Hopwood แห่ง John Innes Institute, UK. ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานที่นิยมใช้ศึกษาพลาสมิด และเป็นเซลล์เจ้าบ้านในการโคลนยีนจากสายพันธุ์อื่น เช่น เอนไซม์ สมบัติการต้านยาปฏิชีวนะ (Hopwood และคณะ, 1985) และ *Streptomyces* sp. Y1 เป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากงานวิจัยในห้องปฏิบัติการ พบว่า *Streptomyces* ทั้งสองชนิดที่กล่าวแล้วมีแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสในระดับหนึ่ง ดังแสดงในตารางที่ 1 แต่ยังคงต่ำกว่า *Streptomyces* sp.190-1 ประมาณ 50% จึงคาดว่าสามารถนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านได้

ในขั้นตอนการตรวจสอบประสิทธิภาพในการนำ *Streptomyces* ทั้งสองชนิดนี้มาทำให้เกิดโปรโตพลาสท์ และการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะเข้าสู่โปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้ ผลการสร้างและรีเจนเนอเรตโปรโตพลาสท์ ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า *Streptomyces lividans* TK21 สามารถรีเจนเนอเรตได้ 0.53% *Streptomyces* sp.Y1 สามารถรีเจนเนอเรตได้ 0.20% นอกจากนี้ยังได้ทดลองเตรียมโปรโตพลาสท์จาก *Streptomyces* sp. 190-1 และตรวจสอบประสิทธิภาพในการรีเจนเนอเรตโปรโตพลาสท์ พบว่าสามารถรีเจนเนอเรตได้ต่ำ คือ 0.08% Ochi และคณะ (1979) รายงานว่าสามารถรีเจนเนอเรตโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces parvulus* ได้มากกว่า 50% แต่ Hopwood และคณะ (1977) ได้รายงานว่า *Streptomyces*

coelicolor สามารถรีเจนเนอเรตได้เพียง 1-10% ซึ่งผลการวิจัยนี้หากจะนำมาเปรียบเทียบกับ *Streptomyces coelicolor* ก็พบว่าประสิทธิภาพในการรีเจนเนอเรตโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp.Y1 ไม่ต่ำมากนัก จึงคาดว่าจะนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสได้ ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการรีเจนเนอเรต ได้แก่ อายุของเชื้อที่นำมาเตรียมโปรโตพลาสท์ องค์ประกอบของอาหาร อุณหภูมิที่เลี้ยงเชื้อก่อนนำมาเตรียมโปรโตพลาสท์ และค่าออสโมติกของอาหารสำหรับรีเจนเนอเรต เป็นต้น (Hopwood, 1981) ซึ่งถ้ามีการปรับปรุงสภาวะต่างๆเหล่านี้ให้เหมาะสมก็อาจเพิ่มประสิทธิภาพการรีเจนเนอเรตโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces* ทั้งสองชนิดได้

ในการทดสอบประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ4090 เข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp.Y1 แสดงดังตารางที่ 3 พบว่า ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเท่ากับ 1.30×10^5 และ 1.20×10^5 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ตามลำดับ

Hopwood และคณะ (1985) รายงานว่า เมื่อทรานสฟอร์มพลาสมิดที่อยู่ในรูปวงแหวนปิด เข้าสู่ *Streptomyces lividans* และ *Streptomyces coelicolor* A3(2) จะได้ทรานสฟอร์แมนท์ 10^6-10^7 ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ ซึ่งผลจากการทดลองนี้มีประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มต่ำกว่ารายงานของ Hopwood ข้างต้น 10-100 เท่า Bibb และคณะ (1980) ได้รายงานว่าการทรานสฟอร์มพลาสมิดในรูปวงแหวนเปิด (open circular) หรือ รูปเส้น (linearised plasmid) ที่มีปลายดีเอ็นเอเป็นปลายเหนียว (sticky ends) เข้าสู่ *S. lividans* และ *S. coelicolor* A3(2) จะมีประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มต่ำกว่าการทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดรูปวงแหวนปิดประมาณ 10-100 เท่า

จากผลการสกัดพลาสมิดในรูปที่ 6 พบว่าพลาสมิด pIJ4090 ที่สกัดได้นั้นไม่ได้อยู่ในรูปวงแหวนปิดทั้งหมด แต่มีส่วนของพลาสมิดในรูปวงแหวนเปิดปนมาด้วย จึงเป็นไปได้ว่าการทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ4090 เข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp.Y1 มีประสิทธิภาพลดลงเพราะมีพลาสมิดรูปวงแหวนเปิดปนอยู่ด้วย จากผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังแสดงในรูปที่ 6 ช่องที่ 6 พบว่าบริเวณด้านล่างมีแถบสว่างเกิดขึ้น คาดว่าเป็นแถบของ tRNA ที่เติมลงไปชักนำให้ดีเอ็นเอตกตะกอน

จากผลการทดลองทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในตารางที่ 4 พบว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มมีค่าเท่ากับ 5.86×10^2 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ซึ่งต่ำกว่าการทรานสฟอร์ม pIJ4090 ประมาณ 220 เท่า Streptomyces sp.Y1 มีประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเท่ากับ 6.04×10^2 ต่ำกว่าการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ4090 ถึง 198 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chater และคณะ (1982) ที่พบว่าการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจะให้ประสิทธิภาพต่ำกว่าการทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดพาหะที่ไม่ผ่านการตัดประมาณ 100-1000 เท่า ทั้งนี้เพราะในการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พลาสมิดพาหะที่ใช้จะต้องผ่านการกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายด้าน 5′ ก่อน เมื่อนำมาเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอจึงมีจุดนิค (nick) 2 จุดเกิดขึ้นบนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเสมอ เพราะไม่สามารถเกิดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างปลาย 5′-hydroxy ของพลาสมิดพาหะ และปลาย 3′-hydroxy ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำมาเชื่อมต่อกันได้ (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531) ทำให้โครงรูปของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดอยู่ในรูปวงแหวนเปิด หรือพลาสมิดพาหะและชิ้นส่วนดีเอ็นเอเกิดการเชื่อมไม่สมบูรณ์ ทำให้ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลายรูปร่างที่ไม่สามารถทรานสฟอร์มได้ และเมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาทรานสฟอร์มจะไม่สามารถทรานสฟอร์มได้ทั้งหมด ทำให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มลดลง เมื่อเทียบกับการทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดในรูปวงแหวนปิด

หลังจากได้ทรานสฟอร์แมนท์แล้ว ขั้นตอนต่อมาคือการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับยีนกลูโคสไอโซเมอเรสเข้าไป โดยทั่วไปแล้วการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์อาจทำได้โดยดูจากแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับซับสเทรตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ซึ่งโดยวิธีนี้เอนไซม์ที่สร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) จะแสดงผลที่ค่อนข้างชัดเจน แต่กลูโคสไอโซเมอเรสเป็นเอนไซม์ที่มีการสร้างและเก็บอยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) ซึ่งจากผลการทดลองที่ผ่านมาก็พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสที่สร้างโดย Streptomyces sp.190-1 Streptomyces *lividans* TK21 และ Streptomyces sp. Y1 ก็เป็น intracellular enzyme ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบโดยวิธีนี้ได้ ดังนั้นการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์จึงต้องอาศัยการตรวจหายีนที่สนใจด้วยดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะ

การทำโคโลนีไฮบริไดเซชัน เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ตรวจหารีคอมบิแนนท์โคลนที่ต้องการ เพราะสามารถคัดเลือกโคลนที่สนใจ ออกจากรีคอมบิแนนท์โคลนจำนวนมากๆได้ โดยการนำดีเอ็นเอติดตามที่เหมาะสมและมีความจำเพาะสูงต่อยีนที่สนใจมาติดฉลาก และไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบ

สำหรับผลการวิจัยนี้จากการทดลองตรวจหาโคลนที่รับยีนกลูโคสไอโซเมอเรสในเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp.Y1 โดยวิธีโคโลนีไฮบริไดเซชันดังแสดงในรูปที่ 8 พบว่า *Streptomyces lividans* TK21 ที่มีและไม่มีพลาสมิดพาหะ *Streptomyces* sp. 190-1 *Streptomyces* sp.Y1 และทรานสฟอร์แมนท์ทุกโคลน สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามโดยไม่สามารถแยกความแตกต่างของสัญญาณได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *Streptomyces lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp.Y1 เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ในระดับหนึ่ง ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งมีแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.65 และ 0.78 หน่วย/มก.โปรตีน ตามลำดับ ถึงแม้ว่าจะเป็นระดับที่ต่ำกว่าระดับเอนไซม์ที่พบใน *Streptomyces* sp. 190-1 แต่ก็ยังมียีนกลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ และจากรายงานของ Tiraby และคณะ (1989) พบว่า เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่สร้างโดย *Streptomyces* หลายชนิด มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันมาก จึงอาจจะมีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันด้วย ทำให้ดีเอ็นเอติดตามสามารถเข้าจับได้

จากรายงานความสำเร็จในการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผ่านมา โดย Marcel และคณะ (1987) และ Wong และคณะ (1991) พบว่าผู้วิจัยทั้งสองกลุ่มนี้ใช้เซลล์เจ้าบ้านที่มีลักษณะเป็น xyl^- ในการโคลนยีน การตรวจหารีคอมบิแนนท์ที่ได้รับยีนจะทำโดยการตรวจหาผลิตภัณฑ์ของยีน ซึ่งเซลล์เจ้าบ้านที่ดีไม่ควรมียีนที่สนใจอยู่ด้วย ในงานวิจัยนี้ก็ควรใช้เซลล์เจ้าบ้านที่มีลักษณะเป็น xyl^- เพราะเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวจะไม่สามารถเจริญได้ แต่ถ้าได้รับยีนกลูโคสไอโซเมอเรสเข้าไปแล้วจะสามารถเจริญได้ แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ไม่สามารถหา *Streptomyces* ที่มีลักษณะเป็น xyl^- จึงไม่มีเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมสำหรับการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส

จากเหตุผลดังกล่าวมาแล้วข้างต้น การทำโคโลนีไฮบริไดเซชันเพื่อคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ในงานวิจัยนี้ จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสม จึงได้เปลี่ยนแนวทางการวิจัยเพื่อให้ได้ *Streptomyces* ที่สามารถผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสเพิ่มมากขึ้น โดยทำการโคลนย่อยของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUR289 ที่ประสบความสำเร็จจากการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp.190-1 ใน *E. coli* โดยรัชนี ไสยประจง (2537)

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUR289 ได้จากการเชื่อมพลาสมิดพาหะ pUC18 ขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบส และชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.8 กิโลเบสจาก *Streptomyces* sp. 190-1 ที่มีแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส งานวิจัยนี้จึงได้ทำการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.8 กิโลเบสจาก pUR289 มาเชื่อมกับ pIJ4090 แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces* โดยคาดว่าจะมีการแสดงออกได้ เพราะ *Streptomyces* เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งของยีนนี้ แต่เนื่องจากยังไม่ทราบบริเวณที่เป็นโปรโมเตอร์ หรือทิศทางการอ่านรหัสของยีนกลูโคสไอโซเมอเรส การนำชิ้นยีนมาเชื่อมกับพลาสมิดจึงทำการเชื่อมโดยไม่กำหนดทิศทางโดยนำมาเชื่อมแบบปลายทู่ ในการทำให้ปลายของดีเอ็นเอเปลี่ยนจากปลายเหนียวไปเป็นปลายทู่ ต้องอาศัยเอนไซม์ Large fragment DNA polymerase ซึ่งมีปฏิกิริยา 5'-->3' polymerase และ 3'-->5' exonuclease ดังนั้นพลาสมิดพาหะหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอก่อนที่จะนำมาดัดแปลงปลายดีเอ็นเอให้เป็นปลายทู่ จะต้องผ่านการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ให้ปลายดีเอ็นเอเป็นปลายเหนียวมีส่วนยื่นที่ปลาย 5' จึงจะใช้ปฏิกิริยาจากเอนไซม์นี้ได้

การตัดพลาสมิด pIJ4090 ด้วย *Bam*HI ซึ่งมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ดังนี้ 5'-G↓GATCC-3' จะทำให้ได้ปลาย 5' ที่ยื่นออกมา สำหรับรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ซึ่งตัดด้วย *Xba*I และ *Sma*I ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส โดยมีปลายบริเวณด้านที่ตัดด้วย *Sma*I ที่มีบริเวณจดจำเป็น 5'-CCC↓GGG-3' เป็นปลายทู่ ส่วนด้านที่ถูกตัดด้วย *Xba*I ซึ่งมีบริเวณจดจำเป็น 5'-T↓CTAGA-3' ได้ปลายยื่นทางด้าน 5' จึงสามารถดัดแปลงปลายของดีเอ็นเอทั้งในพลาสมิดพาหะ pIJ4090 และชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ทำให้สามารถเชื่อมกันด้วยปลายทู่ได้

นอกจากนั้น งานวิจัยนี้ยังได้ทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิดพาหะในรูปปลายเหนียวด้วย สำหรับการเชื่อมแบบปลายเหนียวนั้นทำโดยการตัดพลาสมิดพาหะ pIJ4090 ที่ตำแหน่ง *Bam*HI และ *Xba*I ซึ่งเป็นบริเวณที่ถัดจากโปรโมเตอร์ ermE แล้วนำมาเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. 190-1 ที่ตัดออกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUR289 ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xba*I เช่นกัน ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส การเชื่อมลักษณะนี้เป็นการบังคับทิศทางของชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสให้ถูกอ่านต่อจากโปรโมเตอร์ ermE มีทิศทางจาก *Bam*HI--->*Pst*I---> *Hin*dIII

ในการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้จากการเชื่อมปลายทู่ และปลายเหนียวเข้าสู่โปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21 พบว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มใกล้เคียงกันคือประมาณ 4.21×10^2 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ และเมื่อทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Streptomyces* sp.190-1 ได้ประสิทธิภาพประมาณ 20 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ซึ่งนับว่ามีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำอาจมีสาเหตุจาก *Streptomyces* sp.190-1 มีประสิทธิภาพการรีเจนเนอเรตที่ต่ำอยู่แล้ว(ตารางที่ 2) หรืออาจเกิดจาก restriction activity ภายในเซลล์

เมื่อนำทรานสฟอร์แมนท์มาสุ่มตรวจแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส ได้ผลดังตารางที่ 6 ซึ่งพบโคลน 19SL1 เพียงโคลนเดียวที่มีแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสเพิ่มขึ้นจาก *Streptomyces* sp.190-1 ประมาณ 25% ส่วนทรานสฟอร์แมนท์อื่นๆมีระดับกลูโคสไอโซเมอเรสไม่ต่างจากเซลล์เจ้าบ้านมากนัก จึงได้นำทรานสฟอร์แมนท์ที่มีระดับกลูโคสไอโซเมอเรสใกล้เคียงกับเซลล์เจ้าบ้านมาสกัดพลาสมิด ดังแสดงในรูปที่ 14 พบว่าทรานสฟอร์แมนท์หลายโคลนมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งแสดงว่าได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสเข้าไป แต่ยังคงมีระดับของกลูโคสไอโซเมอเรสไม่ต่างไปจากเซลล์เจ้าบ้าน อาจเกิดจากทิศทางการอ่านรหัสของโปรโมเตอร์ ermE กับทิศทางของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสไม่อยู่ในทิศทางเดียวกัน ทำให้การแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสไม่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ ermE หรือเกิดจากเมื่อเชื่อมชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสเข้ากับพลาสมิดพาหะแล้ว ทำให้ชุดการเรียงตัวของเบสเคลื่อนไป และมีผลต่อเนื่องไปถึงการแปลรหัสเพื่อให้ได้กรดอะมิโน ทำให้เกิดโปรตีนอื่นแทน เป็นทำนองเดียวกับการเกิด frame shift mutation

นอกจากนี้ทรานสฟอร์แมนท์บางโคลนไม่สามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งนี้อาจเกิดจากการรวมพลาสมิดเข้ากับโครโมโซมอลดีเอ็นเอ (integraion) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานบางฉบับที่พบว่า พลาสมิดบางชนิดสามารถอยู่ในรูปอิสระ หรือในรูปที่สอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมอลดีเอ็นเอได้ เช่น Bibb และคณะ (1981) ได้รายงานว่า พลาสมิด SLP1 เป็นพลาสมิดที่รวมอยู่กับโครโมโซมอลดีเอ็นเอเมื่ออยู่ใน *Streptomyces coelicolor* A3(2) แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าทรานสฟอร์มพลาสมิดนี้เข้าไปอยู่ในเซลล์ของ *Streptomyces lividans* พบว่า จะสามารถแยกออกเป็นดีเอ็นเออิสระและเพิ่มจำนวนได้ด้วยตัวเอง Schrempf (1982) พบว่า สายพันธุ์ wild type ของ *Streptomyces reticuli* มีพลาสมิดขนาด 48-49 เมกะดาลตัน แต่เมื่อทรานสฟอร์มพลาสมิดนี้เข้าสู่สายพันธุ์ที่ไม่มีพลาสมิด ยังคงได้ทรานสฟอร์แมนท์ที่ไม่มีพลาสมิด แต่จากการตรวจสอบโดยวิธีโคโลนีไฮบริไดเซชันระหว่างทรานสฟอร์แมนท์กับพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลาก ปรากฏว่าพลาสมิดถูกทรานสฟอร์มเข้าเซลล์ได้ แต่สูญหายไปเมื่อเจริญถึงระยะสร้างเส้นใย

ในทรานสฟอร์แมนท์ที่มีเซลล์เจ้าบ้านเป็น *Streptomyces* sp. 190-1 จะสามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากทุกโคลนที่สุ่มมา แสดงว่า *Streptomyces* sp. 190-1 เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่สามารถรักษาพลาสมิดไว้ได้ดีกว่าเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces lividans* TK21

สำหรับงานวิจัยนี้เมื่อนำโคลน 19SL1 มาสกัดแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พบว่ามีแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ คือ แถบ A B C และ D (ดังแสดงในรูปที่ 15) และจากผลการทดลองในรูปที่ 16 คาดว่า แถบ A และ B เป็นพลาสมิดชุดเดียวกัน เพราะเมื่อตัดด้วย *Eco*RI ได้พลาสมิดรูปเส้นขนาด 8.5 กิโลเบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดรวมของพลาสมิดพาหะกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.8 กิโลเบส และจากการทดลองในรูปที่ 16 ก็คาดว่าแถบ C และ D เป็นพลาสมิดชุดเดียวกันอีกชุดหนึ่ง ในการตรวจสอบเพื่อยืนยันว่าแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลน 19SL1 แถบ A และ B เป็นพลาสมิดชุดเดียวกัน แถบ C และ D เป็นพลาสมิดชุดเดียวกัน อาจทำได้โดยทรานสฟอร์มดีเอ็นเอจากแต่ละแถบเข้าสู่โปรโตพลาสท์ของเซลล์เจ้าบ้าน แล้วสกัดพลาสมิดออกมาทำเจลอิเล็กโทรโฟริซีสเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดที่ได้ ถ้าเป็นพลาสมิดชุดเดียวกันตามที่คาดไว้ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้

รับดีเอ็นเอแถบ A และ B จะให้พลาสมิดรูปแบบที่เหมือนกัน ขณะที่ทรานสฟอร์แมนท์ที่รับดีเอ็นเอแถบ C และ D ก็จะให้พลาสมิดรูปแบบที่เหมือนกันอีกชุดหนึ่ง

งานวิจัยนี้จึงคาดว่าโคลน 19SL1 มีพลาสมิด 2 ชนิด คือมีพลาสมิดซึ่งคาดว่าอยู่ในรูปวงแหวนปิดที่ตำแหน่ง 4.7 และ 2.2 กิโลเบส เมื่อเทียบกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของฟาจแลมดาที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII Kieser และคณะ (1982) รายงานว่า S. *lividans* ISP 5434 มีพลาสมิดอยู่ถึง 4 ชนิด คือ pIJ101-pIJ104 โดยที่ pIJ102-pIJ104 เป็นอนุพันธ์ของพลาสมิด pIJ101 ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ สำหรับงานวิจัยนี้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดจากโคลน 19SL1 ซึ่งแสดงพลาสมิดที่ตำแหน่ง 2.2 กิโลเบสนั้น คาดว่าอาจเป็นอนุพันธ์ที่เกิดจากการรีคอมบิเนชันของพลาสมิดที่ตำแหน่ง 4.7 กิโลเบสกับโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chen และคณะ (1987) ที่พบว่าการทรานสฟอร์มพลาสมิด pIF132 ซึ่งมียีน *mel* ซ้ำกัน 2 ชุด และมียีน *tsr* เข้าสู่ S. *lividans* TK64 และเมื่อสกัดพลาสมิดออกจาก S. *lividans* TK64 พบว่านอกจากพลาสมิด pIF132 แล้ว ยังพบพลาสมิดขนาดเล็กกว่า pIF132 ซึ่งให้ชื่อว่า pIF138 จากการตรวจสอบพบว่าพลาสมิด pIF138 เกิดจากการรีคอมบิเนชันภายในเซลล์เจ้าบ้านและมีการตัดชิ้นยีน *tsr* และ *mel* ที่ซ้ำกันออกไปทำให้ได้พลาสมิด pIF138 ที่มีขนาดเล็กลง การเกิดรีคอมบิเนชันหรือความไม่เสถียรของยีน (genetic instability) เป็นเหตุการณ์ที่พบได้บ่อยครั้งใน *Streptomyces* หลายชนิด (Nakano และคณะ (1984), Cullum และคณะ (1989), Crameri และคณะ (1983), Dyson และ Schrempf (1987))

อย่างไรก็ตามผลการวิจัยนี้ สามารถเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสใน *Streptomyces* sp. 190-1 ได้ โดยได้ *Streptomyces* สายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น 25% และมีพลาสมิด 2 ชนิดอยู่ภายในเซลล์