บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีนของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ตรวจสอบชนิดของยีนโปรตีเอสที่โคลนได้ และนำพลาสมิดลูกผสมในทรานสฟอร์แมนท์ที่ผลิตโปรตีเอสมาศึกษาแผนที่เรสทริกชันเพื่อเป็นพื้นฐานนำไปสู่การศึกษาตำแหน่งของยีนโปรตีเอสต่อไป การเตรียมดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR 25 เพื่อใช้ในการโคลน ทำโดยสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมโดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย Rodriguez (ข้อ 3.7.1) ดีเอ็นเอของโครโมโซมที่สกัดได้จะอยู่ในรูปของโมเลกุลขนาดใหญ่ (high molecular weight DNA) มีขนาดของโมเลกุลเฉลี่ยมากกว่า 23.1 กิโลเบส (รูปที่ 1) จากการศึกษารายงานการโคลนยีน alkaline protease จาก *B. alcalophilus* PB92 โดย Van der Laan และคณะ เมื่อปี คศ. 1991 พบว่าประสบผลสำเร็จด้วยการใช้เรสทริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI มาย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมแบบ partial digestion และโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ที่ตำแหน่ง *Bam*HI ของดีเอ็นเอพาหะ pUB110 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้เรสทริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI มาย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR 25 แบบ partial digestion ซึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียวเป็นเบสคู่สมซึ่งกันและกัน (compatible cohesive end) กับชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ด้วย *Bam*HI ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อถูกย่อยด้วย *Sau*3AI จะมีการกระจายของขนาดต่างๆกันตั้งแต่ 23 กิโลเบสลงมา (รูปที่ 2) ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2-7 กิโลเบส สำหรับการโคลน เนื่องจากรายงานการโคลนยีนโปรตีเอสจาก *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าชิ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีเอสมีขนาดประมาณ 1-2 กิโลเบส (Kubo, 1988 และ Van der Laan, 1991)

ดีเอ็นเอพาหะที่เลือกใช้ในการวิจัยครั้งนี้คือ พลาสมิด pUC18 ทั้งนี้เพราะมีชุดการจำลองตัวสูงถึง 500-700 ชุดต่อเซลล์ มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และยีน lacZ' ที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอนไซม์ β-galactosidase มีส่วนของ multicloning site อยู่บนยีน lacZ' การคัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมสามารถทำได้ในขั้นตอนเดียว โดยกระจายเซลล์ที่ผ่านการทำการเชื่อมต่อบนอาหารที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน X-gal และ IPTG โคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอพาหะเดิมซึ่งสร้างผลิตภัณฑ์ทางด้าน N-terminal ของ β-galactosidase ที่สามารถเกิด α-complementary กับผลิตภัณฑ์ด้าน C-terminal ของ β-galactosidase ที่ได้จากเซลล์เจ้าเรือน (*Escherichia coli* JM109) ทำให้ได้เอนไซม์ β-galactosidase

ที่สมบูรณ์ สามารถเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้น X-gal โดยมี IPTG เป็นตัวชักนำ (inducer) ได้สารประกอบสีน้ำเงิน จึงทำให้โคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอพาหะดั้งเดิมเป็นสีน้ำเงิน ส่วนโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมจะไม่เป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากการเชื่อมต่อที่บริเวณ multicloning site จะเป็นการ inactivate ยีน lacZ' ให้ไม่สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ด้าน N-terminal ของ β-galactosidase ได้ตามปกติ จึงไม่เกิด α-complementary กับผลิตภัณฑ์จากด้าน C-terminal ของ β-galactosidase ที่ได้จากเซลล์เจ้าเรือน เป็นผลทำให้เอนไซม์ β-galactosidase ไม่ถูกสังเคราะห์อย่างสมบูรณ์ จึงไม่สามารถย่อยสารตั้งต้น X-gal ให้ได้สารประกอบสีน้ำเงินได้ ทำให้เหลือคุณสมบัติการต้านยาแอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียว โคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมจึงไม่เป็นสีน้ำเงิน (Maniatis และคณะ, 1982)

หลังจากทำการย่อยพลาสมิด pUC18 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI แล้วจึงทำการเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมขนาด 2-7 กิโลเบสที่เตรียมได้ ด้วยเอนไซม์ T4-DNA ligase ที่อุณหภูมิ 12-16°ซ นาน 15-20 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ทำการเชื่อมต่อไปทำการทรานสฟอร์มเข้าเซลล์เจ้าเรือน *E. coli* JM109 ที่เตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (Cohan และคณะ,1972) ผลการทรานสฟอร์ม ได้โคโลนีสีขาวที่มีดีเอ็นเอลูกผสม 325 โคโลนี และได้โคโลนีสีน้ำเงินซึ่งมี pUC18 2,280 โคโลนี คำนวณเป็นค่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเท่ากับ 2.6×10^4 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอที่ใช้ทรานสฟอร์ม และได้ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมเพียง 12.47 เปอร์เซนต์ เหตุที่ได้ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมต่ำนั้นเป็นผลเนื่องมาจากในการโคลนที่นำมารายงานผลครั้งนี้ไม่ได้กำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายด้าน 5' ของชิ้นดีเอ็นเอพาหะ (dephosphorylation) ด้วยเอนไซม์ calf intestine phosphatase ก่อนที่จะนำไปใช้ในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ จึงทำให้ดีเอ็นเอพาหะส่วนใหญ่เกิดการเชื่อมต่อกันเองได้ (self ligation) มีผลให้มีการเกิดรีคอมบิเนชันได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดจำนวนน้อย ในการโคลนครั้งอื่นๆนั้นได้ทำการกำจัดหมู่ 5'-ฟอสเฟตของชิ้นดีเอ็นเอพาหะก่อน พบว่ามีการเกิดการเชื่อมกันเองของปลายทั้งสองของดีเอ็นเอพาหะ (self ligation) น้อยมาก แต่ที่ไม่ได้นำมารายงานผลเพราะไม่พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนโปรตีเอส อย่างไรก็ตามในการโคลนที่นำมารายงานผลครั้งนี้นั้นพบว่าได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนโปรตีเอสจำนวน 18 โคลน จากการตรวจสอบได้โดยการทำ replica plating บน skim milk plate แล้วคัดเลือกโคโลนีที่มี clear zone ทั้งนี้เพราะโคลนที่สามารถสร้างโปรตีเอสจะสามารถย่อยเคซีนซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำนมทำให้เกิดวงใสรอบๆโคโลนีได้ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าได้โคโลนีที่มี clear zone 18 โคโลนี และมีขนาดที่ใกล้เคียงกันทั้งหมด

การศึกษาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ทำโดยนำโคลนที่ได้คัดเลือกทั้ง 18 โคลนนี้มาสกัดพลาสมิด แล้วย่อยด้วย *Sca*I ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บน pUC18 เพียงตำแหน่งเดียว หลังวิเคราะห์ขนาดโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (รูปที่ 7) พบว่ามี 16 โคลน ที่มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert เล็กกว่า 1

กิโลเบส มี 1 โคลน ที่มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ประมาณ 1 กิโลเบส และมีอีก 1 โคลน ที่มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ประมาณ 4 กิโลเบส จะเห็นได้ว่า 16 โคลนแรกนั้นมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่เล็กเกินไปไม่เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาต่อ ส่วนโคลนที่มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ประมาณ 1 กิโลเบสนั้นอาจได้ชิ้นส่วนของยีนโปรตีเอสมาเพียงบางส่วน ดังนั้นจึงเลือกโคลนที่มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ประมาณ 4 กิโลเบสมาทำการศึกษาต่อ โดยให้ชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนนี้ว่า pCSBC14 ส่วนโคลนอื่นๆนั้นได้ทำการเก็บไว้ในรูปของพลาสมิด

จากผลการศึกษาขนาดและแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 โดยย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ คือ *Acc*I, *Bam*HI, *Bgl*I, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sca*I, *Sma*I และ *Xba*I แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในรูปที่ 17-25 พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 มีขนาดประมาณ 6.6 กิโลเบส มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ประมาณ 4 กิโลเบส และตำแหน่งเรสทริกชันที่มีอยู่บนชิ้นดีเอ็นเอ insert คือ *Acc*I, *Bam*HI, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III และ *Sca*I ดังแสดงไว้ในแผนที่เรสทริกชัน (รูปที่ 26)

การศึกษาชนิดและปริมาณของเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตจากทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ทำโดยการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 เปรียบเทียบกับเซลล์เจ้าเรือน *E. coli* JM109 และ เซลล์ดั้งเดิม *B. subtilis* TISTR 25 หลักการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ทำโดยวัดปริมาณไทโรซีนอิสระที่เกิดขึ้นจากการย่อยเคซีนด้วยโปรตีเอสที่ pH ต่างๆ ซึ่งการวัดปริมาณไทโรซีนทำโดยวัดการดูดกลืนแสงของไทโรซีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สำหรับอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อนั้นใช้อาหารสูตรพื้นฐาน (basal medium) สูตรที่ 1 ในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ส่วนเซลล์เจ้าเรือนและทรานสฟอร์แมนท์จะเลี้ยงในอาหาร minimum medium (M9 medium + succinate) เนื่องจาก M9 medium + succinate เป็นสูตรอาหารที่มีโปรตีนต่ำจะไม่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างโปรตีเอส จากผลการทดลอง รูปที่ 9 จะเห็นว่าเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนกระทั่งลดลงในที่สุดภายหลังการเลี้ยงเชื้อ 1 วัน ในช่วงที่มีการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างสูงหรือที่เรียกว่า Logarithmic phase นั้น การสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ที่ตรวจพบจะมีแอคติวิตีต่ำ แสดงว่าเชื้อเพิ่งเริ่มสร้างเอนไซม์เท่านั้น จนกระทั่งการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะที่เรียกว่า Stationary phase คือมีอัตราการเจริญค่อนข้างคงที่ จึงมีการสร้างเอนไซม์สูงขึ้น ดังนั้นการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 จะเกิดในช่วงปลายของการเจริญระยะ Logarithmic phase ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ร.อ. ปกรณ์ (2532) และสนธยา (2533) และเหมือนกับเชื้อ *Bacillus* ในสายพันธุ์อื่นดังรายงานของ Millet และคณะ (1969) อีกด้วย ดังแสดงผลในรูปที่ 10 และเมื่อทำการเปรียบเทียบแอคติวิตีของ alkaline protease และ

neutral protease ที่ได้จาก *B. subtilis* TISTR 25 โดยวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ค่า pH 7.5 และ pH 10.5 ดังรูปที่ 10 จะเห็นว่าแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ pH 7.5 กับที่ pH 10.5 มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าแอคติวิตีของ neutral protease มีค่าใกล้เคียงกับ alkaline protease ในการเปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์และจากเซลล์เจ้าเรือน พบว่าการเจริญของเชื้อทั้งสองมีลักษณะที่คล้ายกันคือ เชื้อจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจะเริ่มคงที่และลดลงในที่สุด (รูปที่ 12, 14) ซึ่งสอดคล้องกับแอคติวิตีของโปรตีเอสจะมีค่าสูงสุดในวันที่ 1 และลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 เหมือนกันทั้งในทรานสฟอร์แมนท์และเซลล์เจ้าเรือน (รูปที่ 13, 15) ทำการเปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์และเซลล์เจ้าเรือน พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 นี้สามารถผลิตโปรตีเอสได้มากกว่าและพบว่าวัดแอคติวิตีของ protease ได้ในช่วง pH 7.5 ถึง 11.0 แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่มีอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 นี้อาจมีทั้งส่วนของยีน neutral protease และ alkaline protease อยู่ในชิ้นเดียวกัน ทั้งนี้สอดคล้องกับผลที่มีผู้รายงานว่ายีนของโปรตีเอสทั้งสองชนิดนี้ใน *B. subtilis* 168 อยู่ใกล้กัน ดังแสดงในภาคผนวกที่ 6 (Zeigler, 1992) นอกจากนี้การเกิดแอคติวิตีของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 มีช่วง pH ที่เหมาะสมเป็น 9.5 ซึ่งเปลี่ยนไปจาก pH ที่เหมาะสมในเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 คือ 7.5 และ 10.5 แสดงว่า fusion enzyme ที่ผลิตจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 มีช่วงการทำงานของเอนไซม์ที่เปลี่ยนไป ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจสอบชนิดของยีนโปรตีเอสที่ได้นี้ต่อไป

การตรวจสอบว่ายีนโปรตีเอสที่มีอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 นี้เป็นยีน neutral protease หรือ alkaline protease นอกจากทำโดยการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสแล้วได้เลือกใช้เทคนิค nucleic acid hybridization ซึ่งหลักการของ nucleic acid hybridization คือการวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการว่าเป็นสายคู่สมกับดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) หรือไม่โดยการตรวจการเกิดไฮบริดระหว่างดีเอ็นเอทั้งสอง การตรวจการเกิดไฮบริดมักทำโดยติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วยสารรังสีหรือสารปลอดรังสีก็ได้ เนื่องจากสารรังสีที่นิยมใช้คือ ^{32}P-dNTP มีข้อจำกัดต่างๆเช่น มีค่าครึ่งชีวิต (half life) สั้น ประมาณ 14 วัน และเปล่งอนุภาคที่มีพลังงานสูง จึงต้องใช้ความระมัดระวังในการปฏิบัติ ทั้งยังต้องแยกใช้เครื่องมือและอุปกรณ์เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารรังสี นอกจากนี้ของเสียหรือขยะที่เกิดขึ้นจากการทดลองยังต้องมีการกำจัดด้วยวิธีเฉพาะ (ทรงศักดิ์, 2530) อีกประการหนึ่งการสั่งซื้อสารประกอบ ^{32}P-dNTP หากใช้ในปริมาณน้อยก็จะต้องมีการสูญเสียสารที่เหลือใช้ ทำให้สิ้นเปลืองค่าสารเคมีสูงมากไม่เหมาะกับงานทดลองในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้สารปลอดรังสีในการติดฉลากดีเอ็นเอติดตาม เนื่องจากสะดวก ปลอดภัย ง่ายต่อการปฏิบัติและสามารถเก็บไว้ใช้ได้เป็นเวลานาน ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ digoxigenin ซึ่งเป็นสาร steroid hapten ในรูป DIG-11-dUTP (Boehringer, 1993) เป็นสารติดฉลาก

และใช้วิธีติดฉลากแบบ random primed labelling มีหลักการดังนี้คือ hexanucleotide primer ที่มีการเรียงตัวแบบสุ่มจะเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกัน เมื่อเติมเอนไซม์ Klenow fragment ของ DNA polymerase I จะเกิดการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่โดยใช้ dNTP และ DIG-11-dUTP โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดิมเป็นแม่พิมพ์ (Kirby, 1992) ในการวิเคราะห์สัญญาณการไฮบริไดซ์ ทำโดยใช้หลักการทางอิมมูโนวิทยาด้วยการใช้ Anti-DIG-alkaline phosphatase ซึ่งเป็นแอนติบอดีของ digoxigenin ที่คอนจูเกตอยู่กับเอนไซม์ alkaline phosphatase เมื่อเติมสารตั้งต้นที่เป็นสารเรืองแสง (Chemiluminescent Detection) คือ Lumigen PPD สำหรับเอนไซม์เข้าไป ก็จะเกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารเรืองแสงขึ้น ทำให้สามารถติดตามสัญญาณการไฮบริไดซ์ได้

ในการทำ Sounthern-blot hybridization ได้นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 มาย่อยด้วย *Kpn*I และ *Pst*I เพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอ insert ออกจากดีเอ็นเอพาหะ pUC18 หลังจากแยกชิ้นดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้ว จึงถ่ายโอนและตรึงบนแผ่นเมมเบรน จากนั้นจึงนำมาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่มียีน neutral protease คือ พลาสมิด pNC3 และดีเอ็นเอติดตามที่มียีน alkaline protease คือ พลาสมิด pKWZ จากผลของสัญญาณการไฮบริไดซ์ที่ได้พบว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 สามารถไฮบริไดซ์ได้กับดีเอ็นเอติดตาม pNC3 และดีเอ็นเอติดตาม pKWZ ซึ่งสัญญาณการไฮบริไดซ์นั้นไม่ได้มาจากส่วน pUC18 เพราะ pUC18 ที่ตัดด้วย *Pvu*II และ *Nde*I ไม่เกิดไฮบริด (รูปที่ 28 และ 29, ช่องที่ 3) และไม่มี cross hybridize ระหว่างดีเอ็นเอติดตามทั้งสองด้วย (รูปที่ 29, ช่องที่ 2) จากผลการไฮบริไดซ์แสดงว่ายีนโปรตีเอสที่มีอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 น่าจะมีทั้งยีน neutral protease และยีน alkaline protease อยู่ในชิ้นเดียวกันที่มีขนาด 4 กิโลเบส ซึ่งจากที่มีผู้ได้รายงานไว้ว่ายีน neutral protease และยีน alkaline protease จาก *B. subtilis* TISTR 25 นั้นมีขนาดเพียง 1.4 และ 1 กิโลเบส (อุดมลักษณ์, 2533 และ ร.อ. ปกรณ์, 2532) จึงเป็นไปได้ที่จะมีทั้งยีน neutral protease และยีน alkaline protease อยู่ในชิ้น insert ขนาด 4 กิโลเบสดังกล่าว

เนื่องด้วยจุดที่ใช้ในการโคลนยีนโปรตีเอสมาไว้ในพลาสมิด pUC18 ที่ multicloning site นั้นจะอยู่ downstream จาก *lac* promoter จึงน่าสนใจว่ายีนโปรตีเอสที่โคลนได้จะอยู่ภายใต้การควบคุมของ *lac* promotor หรือไม่จึงได้ศึกษาถึงอิทธิพลของ IPTG ต่อการแสดงออกของยีนโปรตีเอสในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 ซึ่งทำโดยการทำ replica plating ลงบน skim milk plate ที่มี IPTG วัดขนาดของ clear zone ที่ได้เปรียบเทียบกับ skim milk plate ที่ไม่ได้เติม IPTG ผลการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของขนาด clear zone และจากการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอส โดยเติม IPTG ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่ได้เติม IPTG พบว่าไม่มีความแตกต่างของแอคติวิตีเช่นกัน (ไม่ได้แสดงผล) ดังนั้นแสดงว่า IPTG ซึ่งเป็นตัวกระตุ้น (inducer) ต่อ *lac* promoter บนพลาสมิด

pUC18 ไม่ได้มีผลช่วยทำให้การแสดงออกของยีนโปรตีเอสเพิ่มมากขึ้น แสดงว่ายีนโปรตีเอสไม่ได้อยู่ภายใต้การควบคุมของ *lac* promoter แต่น่าจะมี promotor ของยีนโปรตีเอสอยู่ในชิ้น insert นี้ด้วย

จากผลการทดลองแสดงว่าชิ้น insert ขนาด 4 กิโลเบสที่อยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 นั้นมียีนโปรตีเอสที่มีความคล้ายคลึงกับยีน neutral protease และยีน alkaline protease ดังนั้นงานวิจัยต่อจากนี้จึงควรมีการศึกษาต่อไป ไม่ว่าจะเป็นการทำ deletion analysis รวมทั้งศึกษาถึงตำแหน่งของยีนและลำดับการเรียงตัวของเบส อย่างไรก็ตามยีนโปรตีเอสที่ได้อีกทั้งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นพื้นฐานนำไปสู่การศึกษาเกี่ยวกับยีนโปรตีเอส และอาจนำไปเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงและพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตโปรตีเอสในอุตสาหกรรมต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถโคลนยีนโปรตีเอส ที่อยู่บนชิ้นโครโมโซมของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดชนิดใหม่ให้ชื่อว่า pCSBC14 มีขนาดประมาณ 6.6 กิโลเบส โดยมีขนาดของดีเอ็นเอ insert ประมาณ 4 กิโลเบส

2. ยีนโปรตีเอสที่อยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 มีความคล้ายคลึงกับยีน neutral protease และยีน alkaline protease

3. แผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCSBC14 มีตำแหน่งเรสทริกชัน คือ *Acc*I, *Bam*HI, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III และ *Sca*I อยู่ในดีเอ็นเอ insert 4 กิโลเบส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย