หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

4.1 การจำแนกสปีชีส์ของ *Azospirillum sp.* A_{12}

ในการคัดเลือกทำสายพันธุ์ของ *Azospirillum* ซึ่งได้รับมาจากกรมวิชาการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อที่จะนำไปปรับปรุงพันธุ์ให้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในขณะที่เจริญในสารอาหารที่มีอนุมูลแอมโมเนียมสูงนั้น เมื่อทำการศึกษาการเจริญในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนในสภาพกึ่งแข็งและวัดแอคติวิตีของอะเซทิลีนริดัคชันของ *Azospirillum* 4 สายพันธุ์ คือ *A. brasilense* Sp_7, *A. brasilense* A_2, *A. lipoferum* $SpMRa_1$ และ *Azospirillum sp.* A_{12} ซึ่งให้รูปแบบการเจริญและแอคติวิตีของอะเซทิลีนริดัคชันของคล้ายคลึงกัน คือ พบว่ามีการแกว่ง (oscillation) ของไนโตรจิเนสแอคติวิตีของ *Azospirillum* ซึ่งปรากฏการณ์นี้ได้เคยมีผู้ศึกษารวบรวมไว้เช่นกัน Papen, H. และ Werner, D. (1980) พบว่าการแกว่งนี้เกิดเฉพาะเมื่อเจริญ *Azospirillum* ในสภาวะที่เป็น microaerobic เท่านั้น และตรงกับระดับการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ (form) ระหว่าง vegetative form กับ cyst form โดยขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสเริ่มลดลงในช่วงแรก เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงจาก vegetative form ไปเป็น cyst form ในช่วงเวลาที่เป็น cyst form นี้ แอคติวิตีของเอนไซม์จะต่ำมาก แต่การเปลี่ยนไปเป็น cyst form เกิดขึ้นประมาณ 80 เปอร์เซนต์ของเซลล์ทั้งหมดเท่านั้น จึงเห็นว่าเซลล์บางส่วนสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ หลังจากนั้นเมื่อเซลล์เปลี่ยนรูปจาก cyst form กลับไปเป็น vegetative form แอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงขึ้นอีกครั้งหนึ่งแล้วจะลดต่ำลงอีกเมื่ออายุของเซลล์มากขึ้น การที่ *Azospirillum* มีการเปลี่ยนรูปร่างเป็น cyst form อาจเกิดขึ้นเนื่องจาก 1) ไม่สามารถควบคุมปริมาณออกซิเจนให้เหมาะสมกับการเจริญและการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจิเนสเนื่องจากการทำงานของไนโตรจิเนสถูกยับยั้งได้โดยออกซิเจน 2) เกิดจากการขาดแหล่งต้นตอไนโตรเจน 3) การที่สภาวะแวดล้อมภายนอกไม่เหมาะสม เช่น ความแรงอิออน pH และอุณหภูมิ

จากการที่ *Azospirillum sp.* A_{12} มีค่าแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดัคชันสูงที่สุด และมีการเจริญในอาหารอุดมได้ดี อีกทั้งยังเป็นสายพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งแยกออกมาได้จากรากข้าวโพดในประเทศไทย จึงควรที่จะเจริญและเข้ากับพืชในประเทศไทยได้ดี ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้เลือกที่จะนำ *Azospirillum sp.* A_{12} มาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ เมื่อทำการตรวจสอบจีนัสและจำแนกสปีชีส์ของ *Azospirillum sp.* A_{12} พบว่าเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Azospirillum* จริง เนื่องจากมีลักษณะเหมือนกับแบคทีเรียในจีนัส *Azospirillum*ที่ Terrand, J.J. และคณะ (1978) ได้บรรยายไว้ คือเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้นๆตรงจนถึงโค้งเล็กน้อย สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ single polar flagellum พลังงานที่ใช้ในการเจริญเติบโตส่วนใหญ่มาจาก respiratory metabolism ซึ่งใช้ออกซิเจนและไนเตรตเป็นตัวรับอิเลคตรอน และอาจได้พลังงานบางส่วนจากการหมัก (fermentation) สามารถตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (microaerobic) ภายใต้สภาวะบรรยากาศจะเจริญได้ดีเมื่อใช้อาหารที่มีแหล่งต้นตอไนโตรเจนเป็น fixed nitrogen เช่น เกลือแอมโมเนียม ในสภาวะที่มีออกซิเจนไนเตรตจะถูก dissimilate ไปเป็นไนไตรต์หรือไนตรัสออกไซด์และไนโตรเจนก๊าซ เมื่อเจริญใน nutrient agar หรือสารอาหารที่มีต้นตอไนโตรเจนแบบผสม (combine nitrogen) โคโลนีมีลักษณะ ทึบแสง นูน และขอบเป็นลอน เมื่อเจริญในจานเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนโคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวแห้ง ทึบแสง กลม ขอบเรียบ โคโลนีมีอายุมากๆ จะมีสีชมพูในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด มีแอคติวิตีของเอนไซม์ออกซิเดสและยูริเอสเจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือของกรดอินทรีย์เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน เช่น มาเลท ซัคซิเนท แลคเตท หรือ ไพรูเวท ส่วนการจำแนกสปีชีส์นั้นพบว่า *Azospirillum sp.* A_{12} มีลักษณะเหมือนแบคทีเรียในสปีชีส์ *A. lipoferum* เนื่องจากพบว่า 1) สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนได้ 2) สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดเมื่อเจริญใน peptone-base glucose medium 3) มีความต้องการไบโอตินในการเจริญ 4) เมื่อเจริญใน complex media จะมีลักษณะเป็นท่อนตรงหรือค่อนข้างโค้ง แต่เมื่อเจริญในอาหารที่ไม่มีแหล่งต้นตอไนโตรเจน ซึ่งมีมาเลทเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน ในสภาวะกึ่งแข็ง เซลล์จะมีรูปร่างหลายอย่าง ขนาดของเซลล์จะใหญ่ขึ้น รูปร่างเป็น s shape หรือ helical shape ซึ่งไม่เคลื่อนที่

นอกจากนี้ *Azospirillum sp.* A_{12} เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากรากข้าวโพดซึ่ง Baldane, V.L. และ Doberiener, J. (1980) พบว่า *Azospirillum* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากรากพืช C_3 เช่น ข้าวสาลี เป็น *A. brasilense* และทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากพืช C_4 เช่น ข้าวโพด เป็น *A. lipoferum* ซึ่งเป็นความจำเพาะระหว่างทั้งสองสปีชีส์ต่อพืช C_3 และ พืช C_4 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า *Azospirillum sp.* A_{12} เป็นแบคทีเรียในสปีชีส์ *A. lipoferum*

4.2 การทรานส์ฟอร์มพลาสมิดเข้า *Azospirillum lipoferum* A_{12}

ในการทรานส์ฟอร์มพลาสมิด pCK_3 เข้าสู่ *A. lipoferum* A_{12} โดยวิธีต่างๆกัน พบว่าไม่ประสบความสำเร็จโดยไม่ได้ทรานส์ฟอร์แมนท์เลยโดยที่ positive control สามารถทำให้เกิดทรานส์ฟอร์แมนท์อยู่ในระดับที่น่าพอใจ คือ อยู่ในระดับ 10^3 เซลล์ต่อไมโครกรัมพลาสมิด การทรานส์ฟอร์มไม่สำเร็จมีโอกาสเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น พลาสมิดที่ใช้ในการทรานส์ฟอร์มใหญ่มากเกินไป การเข้ากันไม่ได้ของพลาสมิด (incompatibility) ของพลาสมิดที่นำเข้ากับพลาสมิดที่มีอยู่เดิม การที่เซลล์เจ้าเรือนมีระบบป้องกันดีเอ็นเอแปลกปลอมโดยสร้างเรสทริกชันเอนไซม์

สำหรับเหตุผลแรกของการทรานส์ฟอร์มพลาสมิดซึ่งคาดว่าเกิดจากขนาดของพลาสมิดนั้นไม่น่าจะเป็นสาเหตุสำคัญในกรณีของการทรานส์ฟอร์มพลาสมิด pCK3 เข้าสู่ *A. lipoferum* A_{12} เนื่องจากเมื่อทดลองเปลี่ยนพลาสมิดให้มีขนาดเล็กลงคือ pBR322 และ pSA30 ซึ่งมีขนาด 4.4 และ 10.9 กิโลเบสตามลำดับ ก็ยังไม่สามารถสร้างทรานส์ฟอร์แมนท์ได้

เนื่องจากตรวจพบพลาสมิดดั้งเดิมใน *A. lipoferum* A_{12} ถึง 4 ขนาด ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเกิดการเข้ากันไม่ได้ของพลาสมิดที่มีอยู่ดั้งเดิมกับพลาสมิดที่ต้องการทรานส์ฟอร์มเข้าไป คือ พลาสมิดที่อยู่ในเซลล์เดียวกันได้จะต้องมี origin of replication (ORI) ต่างกัน โดยมีผู้ตั้งสมมติฐานว่า อาจเกิดจาก 1) ในระหว่างที่มีการจำลองพลาสมิด จะต้องมีการจับของพลาสมิดกับผนังเซลล์ พลาสมิดที่มี ORI เหมือนกันต้องการจับที่ผนังเซลล์บริเวณเดียวกัน จึงเกิดการแข่งขันกันขึ้น (complete) ทำให้จำลองตัวได้เฉพาะที่มี ORI ต่างกันเท่านั้น 2) ORI สามารถสร้างโปรตีนบางชนิดออกมาได้ เมื่อ ORI เหมือนกันสร้างโปรตีนออกมาได้มาก จะมีผลยับยั้งการจำลองตัวของพลาสมิดที่มี ORI แบบเดียวกัน

แต่อย่างไรก็ตามโอกาสที่จะเกิดความเข้ากันไม่ได้ของพลาสมิดดั้งเดิมกับพลาสมิดที่ต้องการทรานส์ฟอร์มเข้าไปของการทดลองครั้งนี้มีน้อย เนื่องจากโอกาสที่ ORI ทั้ง 3 ชนิดของพลาสมิด pBR322, pSA30 และ pCK3 ซึ่งทราบกันดีว่าแตกต่างกัน จะซ้ำกับ ORI ของพลาสมิดที่มีอยู่เดิม 4 ชนิดในเซลล์ของ *A. lipoferum* A_{12} นั้นเป็นไปได้น้อยมาก สำหรับการทดสอบว่าการทรานส์ฟอร์มไม่ได้เป็นเหตุมาจาก ORI ของพลาสมิดนั้นยังไม่สามารถทำได้ เนื่องจากยังไม่สามารถแยกพลาสมิดดั้งเดิมของ *A. lipoferum* A_{12} ออกมาเพื่อใช้ในการทดสอบได้

เมื่อตรวจสอบเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ของ *A. lipoferum* A_{12} พบว่าสามารถตัดพลาสมิดที่ต้องการนำเข้าได้ แสดงว่าเรสทริกชันเอนไซม์เป็นสาเหตุหนึ่งของการทรานส์ฟอร์มไม่สำเร็จในครั้งนี้

4.3 <u>การตรวจหาเรสทริกชันเอนไซม์และการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น</u>

เมื่อวิเคราะห์หาเรสทริกชันเอนไซม์ใน cell free extract ของ *Azospirillum lipoferum* A_{12} (ใช้โปรตีน 15-250 ไมโครกรัม) โดยใช้พลาสมิด pBR322, pSA30, pCK3 และ λ ดีเอ็นเอเป็นสับสเตรท พบว่า พลาสมิด pBR322, pSA30 และ pCK3 ถูกตัดได้ 1 ตำแหน่ง แต่ λ ดีเอ็นเอไม่ถูกตัด ผลการตัดนี้น่าจะเกิดจากการทำงานของเรสทริกชันเอนไซม์มากกว่าที่จะเป็น nonspecific endonuclease อื่นๆ ทั้งนี้เพราะ 1) λ ดีเอ็นเอไม่ถูกตัดถึงแม้ว่าจะบ่มสารละลายปฏิกิริยาไว้นานถึง 4 ชั่วโมงซึ่งถ้าเป็นการทำงานของ nonspecific endonuclease แล้วน่าจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกย่อยอย่างไม่จำเพาะ คือ ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆซึ่งเห็นลักษณะเป็นปื้น (smear) บนอะกาโรสเจล 2) ขนาดและความเข้มของแถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ใน cell free extract หลังจากบ่มนานตั้งแต่ 1 ชั่วโมงขึ้นไปจนถึง 4 ชั่วโมงค่อนข้างคงที่ ซึ่งเป็นลักษณะการทำงานของเรสทริกชันเอนไซม์เนื่องจากเรสทริกชันเอนไซม์มีความเสถียรต่ำเมื่อเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้นผลิตภัณฑ์ก็ยังค่อนข้างคงที่ แต่ถ้าเป็น nonspecific endonuclease ซึ่งมีความเสถียรสูงเมื่อเพิ่มเวลาจะได้ผลิตภัณฑ์เพิ่มมากตามไปด้วย

เนื่องจาก nonspesific endonuclease สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นสับเสตรทได้โดยตัดดีเอ็นเอที่จุดไม่จำเพาะ ซึ่งจะทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กลงดังรูปที่ 14 และถ้า

การทำงานของ nonspecific endonuclease เกิดได้สมบูรณ์ จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กมากจนไม่สามารถตรวจสอบในการทำอิเลคโทรโฟริซิสในสภาวะปกติได้ดังรูปที่ 16 ซึ่งจะทำให้ผลการตรวจวัดแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ผิดพลาดไปทั้งนี้เพราะ 1) ถ้าเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดหนึ่งๆสามารถตัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่จุดจำเพาะได้ 1 ตำแหน่ง หลังตัดจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นพลาสมิดในโครงรูปปลายเปิด (linear form) ถ้า nonspecific endonuclease ใดๆ ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่จุดหนึ่งจุดใด 1 ครั้ง ก็จะให้พลาสมิดในรูปปลายเปิดเช่นกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์ไม่สามารถแยกได้จากพลาสมิดโครงรูปปลายเปิดที่ได้จากการตัดที่จุดจำเพาะ ทำให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ตรวจสอบได้สูงกว่าความเป็นจริง 2) ในกรณีที่ nonspecific endonuclease ย่อยดีเอ็นเอในโครงรูปใดๆที่จุดไม่จำเพาะมากกว่า 1 ตำแหน่ง จะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆกัน เมื่อทำอิเลคโทรโฟริซิสจะเห็นเป็นปื้น(smear)ของดีเอ็นเอ ในกรณีนี้จะให้ผลการตรวจสอบปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์จริงๆต่ำลง ดังนั้นในการนำเรสทริกชันเอนไซม์มาศึกษาควรทำให้ปราศจากหรือมี nonspecific endonuclease ในปริมาณที่ต่ำมากๆ จนไม่สามารถมีผลกระทบต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ต้องการตรวจในช่วงเวลาที่ใช้บ่มเรสทริกชันเอนไซม์กับสับสเตรทดีเอ็นเอเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา (Greene, P.J.และคณะ,1978)

สำหรับระยะของเซลล์ *A. lipoferum* $A_{,2}$ ที่เหมาะสมในการนำมาศึกษาเรสทริกชันเอนไซม์คือ เซลล์ในระยะสเตชันเนอรีเฟสอายุประมาณ 24 ชั่วโมงเนื่องจากเป็นระยะที่พบแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์สูงแต่พบแอคติวิตีของ nonspecific endonuclease ต่ำ ซึ่งคาดว่า nonspecific endonuclease ที่ต่ำลงในระยะสเตชันเนอรีเฟสนี้เป็นเพราะเซลล์มีความต้องการที่จะใช้ nonspecific endonuclease ในการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) และการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) ต่ำกว่าในระยะล็อกเฟสผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการใช้เซลล์ในระยะนี้ในการศึกษาเรสทริกชันเอนไซม์ในเชื้อชนิดอื่นๆ (Pirrotta,V. และBikle, T.A., 1983)

เมื่อทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลสแยกได้เรสทริกชันเอนไซม์ 2ชนิดซึ่งมีประจุแตกต่างกัน พบว่าแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ลดลงรวดเร็วมากและจะไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์หลังจากเก็บไว้นานกว่า 4 วัน ปรากฏการณ์นี้เกิดในเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น Eco RI, Bam HI ด้วยเช่นกัน (การติดต่อเป็นส่วนตัว

กับผู้ทำวิจัย) การที่แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างมากนี้อาจเป็นไปได้ว่าหลังจากที่เอนไซม์ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลสแล้วโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณเร่ง (active site) ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีก

เมื่อทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส แยกได้เรสทริกชันเอนไซม์ 2 ชนิด คือ Ali I และ Ali II เมื่อทำ Ali I ให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ และทำให้ Ali II บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100 และไฮดรอกซิลอะพาไทต์ แล้วนำไปตรวจดูผลกระทบของ nonspecific endonuclease ต่อการวัดแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ (รูปที่ 27 และ 28) ไม่มีการรบกวนของ nonspecific endonuclease ในช่วงเวลาที่ทำการตรวจแอคติวิตีซึ่งปกติใช้เวลาในการบ่ม 1 ชั่วโมงเรสทริกชันเอนไซม์ที่ซื้อขายทั่วไปถึงแม้ว่าจะทำให้บริสุทธิ์แล้วก็ยังมี nonspecific endonuclease ปนอยู่ในปริมาณต่ำ ซึ่งจะไม่มีผลกระทบต่อการตรวจแอคติวิตีของเอนไซม์ในช่วง 5 ชั่วโมง ซึ่งการทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์จนถึงระดับใดนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำเรสทริกชันเอนไซม์ไปใช้ (Pirrotta, V. และ Bickile, T.A., 1983)

4.4 สมบัติของเรสทริกชันเอนไซม์ที่บริสุทธิ์

เรสทริกเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดควรเป็นเรสทริกชันเอนไซม์ประเภทที่ 2 เพราะสามารถติดตามแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยไม่ต้องเติม ATP และ SAM และจากการที่เรสทริกชันเอนไซม์ Ali I และ Ali II สามารถตัดพลาสมิด pBR322, pSA30, pCK3ได้เป็นการพิสูจน์ว่า การทรานส์ฟอร์มพลาสมิดเหล่านี้เข้าสู่เซลล์ของ *Azospirillum lipoferum* A_{12} ไม่ได้ เนื่องจากมีเรสทริกชันเอนไซม์อยู่ภายในเซลล์นั่นเองและการที่ *A. lipoferum* A_{12} มีเรสทริกชันเอนไซม์ทำให้ไม่สามารถปรับปรุงสายพันธุ์โดยการรับจีนจากภายนอกได้

แบคทีเรียหลายชนิดมีเรสทริกชันเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิดในเซลล์ เช่น *Haemophilus aegyptius* มีเรสทริกชันเอนไซม์ถึง 3 ชนิด คือ Hae I, Hae II และ Hae III การที่มีเรสทริกชันเอนไซม์มากกว่า 2 ชนิดในเซลล์หนึ่งๆเป็นการเพิ่มโอกาสในการทำลาย

ดีเอ็นเอแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้นเนื่องจากแต่ละเอนไซม์มีความสามารถในการตัดที่บริเวณจำเพาะต่างกันและทำงานได้ในสภาวะ (ความแรงอิออน, อุณหภูมิ, pH) ที่ต่างกัน จากการที่คุณสมบัติของเรสทริกชันเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดใน *A. lipoferum* A_{12} ค่อนข้างแตกต่างกันอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ทำงานไม่พร้อมกันขึ้นอยู่กับสภาวะของเซลล์ในขณะนั้นเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ชนิดใด

เมื่อทำการเปรียบเทียบสมบัติของ Ali I และ Ali II กับเรสทริกชันเอนไซม์อื่นๆ ที่มีผู้ค้นพบแล้วทุกชนิดโดยเน้นเรื่องความสามารถในการย่อย λ ดีเอ็นเอ, ϕX174 ดีเอ็นเอ และพลาสมิด pBR322 ปรากฏว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสามารถในการตัดดีเอ็นเอมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดต่างจากเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดอื่นๆที่มีผู้ค้นพบแล้ว ซึ่งคาดว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้อาจเป็นเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดใหม่ที่น่าจะทำการศึกษาต่อไป

สรุปผลการวิจัย

1. จากการตรวจสอบสปีชีส์ของ *Azospirillum* sp. A_{12} โดยใช้การทดสอบทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และ ชีวเคมี พบว่าเป็น *Azospirillum lipoferum*

2. จากการที่ไม่สามารถทรานส์ฟอร์มพลาสมิดที่มีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 4.4-27 กิโลเบส ในรูปของ pBR322, pSA30 และ pCK3 เข้าใน *A. lipoferum* A_{12} นี้ ทำให้นำมาซึ่งสมมติฐานว่า น่าจะมีเรสทริกชันเอนไซม์อยู่ภายในเซลล์มากกว่าจะเป็นเหตุผลอื่น

3. การทดสอบสมมติฐานในขั้นต้น ได้พัฒนาวิธีการตรวจแยกแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์จาก nonspesific endonuclease โดยการสังเกตแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล เรสทริกชันเอนไซม์อย่างน้อยที่สุด 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ทำให้เรสทริกชันเอนไซม์

4. การทำเรสทริกชันเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จะมีผลทำให้ nonspecific endonuclease ปะปนมา

5. เรสทริกชันเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านออกจากคอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลสจะมีความเสถียรต่ำ

6. การที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส พบเรสทริกชันเอนไซม์ 2 ชนิด เอนไซม์ชนิดที่ 1 ให้ชื่อ Ali I ไม่เกาะกับคอลัมน์สามารถตัดพลาสมิด pBR322 ได้ 1 ตำแหน่ง และตัด λ ดีเอ็นเอได้ชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 10 กิโลเบส เอนไซม์ชนิดที่ 2 ให้ชื่อว่า Ali II ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์ ซึ่งเอนไซม์นี้ตัดพลาสมิด pBR322 ได้ 1 ตำแหน่งแต่ไม่ตัด λ ดีเอ็นเอ

7. เมื่อนำ Ali I ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ และ Ali II ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี -100 และคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ แล้วไดอะไลซ์เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นแล้วนี้ในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาตรวจสอบผลกระทบของ nonspecific endonuclease ต่อการวัดแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ พบว่าไม่มีการรบกวนของ nonspecific endonuclease ในช่วงเวลาที่ใช้ในการตรวจวัดแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์

8. สภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของ Ali I คือ ขนาดความแรงออออนต่ำ

ค่า pH ที่ให้การเร่งปฏิกิริยาสูงสุด คือ pH 7.5 และเอนไซม์มีความเสถียรต่อ pH ที่ pH เท่ากับ 7.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา คือ 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วงเวลา 1 ชั่วโมงตั้งแต่ อุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส

9. สภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของ Ali II คือ ขนาดความแรงอิออนปานกลาง ค่า pH ที่ให้การเร่งปฏิกิริยาสูงสุดอยู่ในช่วง 8.0 ถึง 8.5 ความเสถียรต่อ pH เท่ากันตลอดตั้งแต่ pH 7.0 ถึง 9.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา คือ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วงเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งแต่อุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส

10. เรสทริกชันเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด จัดอยู่ในเรสทริกชันเอนไซม์ประเภทที่ 2 ซึ่งไม่ต้องการ ATP และ SAM ในการเร่งปฏิกิริยา

11. Ali I ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นแล้ว สามารถตัดพลาสมิด pBR 322, pSA 30 และ pCK 3 ได้ 1 ตำแหน่ง ตัด ϕx174 ได้มากกว่า 6 ตำแหน่ง ตัด λ ดีเอ็นเอได้ 2 ตำแหน่ง ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 10, 19, และ 20 กิโลเบส

12. Ali II ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นแล้ว สามารถตัดพลาสมิด pBR 322, pSA 30, pCK3 และ ϕx174 ได้ 1 ตำแหน่ง และไม่ตัด λ ดีเอ็นเอ

ประโยชน์

1. ได้ค้นพบเรสทริกชันเอนไซม์ประเภทที่ 2 จำนวน 2 ชนิดซึ่งเป็นเรสทริกชันเอนไซม์ที่ยังไม่เคยมีผู้ใดรายงานมาก่อน

2. ได้ค้นพบสาเหตุของการไม่สามารถที่จะทรานสฟอร์มพลาสมิด pCK3 เข้า *Azospirillum lipoferum* A_{12} เพราะเหตุจากการมีเรสทริกชันเอนไซม์อยู่ภายในการค้นพบครั้งนี้ ยังไม่เคยมีผู้ใดรายงานมาก่อน

3. ได้พัฒนาวิธีการทำเรสทริกชันเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในระดับที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์กับ nonspecific endonuclease ได้ชัดเจนอย่างต่ำที่สุดภายในช่วงเวลาการติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ถึง 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ทำให้เรสทริกชันเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วนั้น สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในเทคนิคพันธุวิศวกรรมได้

4. ได้จำแนกสมบัติของ *Azospirillum* sp. A_{12} ที่แยกจากดินเมืองไทยและพบว่า คือ *A. lipoferum* ซึ่งพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าตัวอื่นๆ