บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการโคลนยีนไซแลเนส จาก *Streptomyces* sp. สาพันธุ์ PC22 ซึ่งแยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทยในจังหวัด ประจวบคีรีขันธ์ โดย สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) และได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างไซแลเนส พบว่าภายใต้ภาวะที่เหมาะสม *Streptomyces* สายพันธุ์ PC22 สามารถสร้างไซแลเนสได้สูงถึง 14.68 หน่วย/มล. และมีสมบัติอยู่ในเกณฑ์ดี โดยมีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 4.0 ถึง 9.0 และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 65 องศาเซลเซียส สำหรับวิธีการโคลนยีนในงานวิจัยนี้ใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้าน 2 ระบบ คือ *Streptomyces lividans* TK21 โดยใช้พลาสมิดพาหะ pIJ699 และ pIJ702 และ *E.coli* DH5α โดยใช้พลาสมิดพาหะ pUC18 ทั้งนี้เพราะระบบ *E.coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านเป็นระบบที่รวดเร็วใช้ระยะเวลาสั้น เพราะไม่ต้องผ่านขั้นตอนของโปรโตพลาสท์ในขั้นการทรานสฟอร์มเช่นของ *Streptomyces* และยังมีรายงานการแสดงออกได้ของยีนจากจุลินทรีย์ต่างๆใน *E.coli* เช่น Ghangas และคณะ (1989) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Thermomonospora fusca* เข้าสู่ *E. coli* โดยใช้ lambda gtWES เป็นพลาสมิดพาหะ ได้ดีเอ็นเอขนาด 2.1 กิโลเบส ที่มีการแสดงออกของไซแลเนส Srivastava (1991) โคลนไซแลเนสยีนจาก *Streptomyces flavogriscus* เข้าสู่ *E. coli* ซึ่งเป็น lysogen ของ lambda cI857 เมื่อชักนำ lambda ให้ย่อยสลายเซลล์เจ้าบ้านด้วยการบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส สามารถคัดเลือกโคลนที่มียีนขนาด 0.8 กิโลเบส ที่ผลิตไซแลเนสน้ำหนักโมเลกุล 18 กิโลดาลตัน ดังนั้นจึงคาดว่า *E. coli* น่าจะเป็นระบบที่นำมาใช้ได้กับการโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 แต่เนื่องจากไซแลเนสเป็นเอนไซม์ที่ส่งออกนอกเซลล์ ประสิทธิภาพการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากโคลนที่ได้รับยีนนี้อาจต่ำ เพราะ *E.coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองที่ใช้ระบบของ *Streptomyces* เป็นเซลล์เจ้าบ้านควบคู่ไปด้วย ส่วนการตรวจหาโคลนที่ต้องการโดยวิธี Southern hybridization กับดีเอ็นเอติดตามเป็นวิธีที่ใช้งบประมาณสูง งานวิจัยนี้จึงไม่ได้ใช้วิธีดังกล่าว

การโคลนยีนไซแลเนสโดยระบบเซลล์เจ้าบ้านเป็น *Streptomyces*

เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมไม่ควรมียีนที่ต้องการโคลน เพราะอาจทำให้เกิดการสูญเสียยีนที่ต้องการได้จากกระบวนการ homologous recombination and deletion ดังนั้นจึงมีผู้รายงานการโคลนยีนไซแลเนสโดยใช้เซลล์เจ้าบ้านที่มียีนนี้บกพร่อง ดังเช่น Mondou และคณะ (1986) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces lividans* 1326 โดยใช้ *Streptomyces* สายพันธุ์เดิมเป็นเซลล์เจ้าบ้าน แต่ได้ผ่านการกลายพันธุ์ให้สูญเสียความสามารถในการสร้างเอนไซม์นี้ และ Vats-Mehta และคณะ (1990) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces lividans* 66 เข้าสายพันธุ์เดิมที่เกิดการกลายพันธุ์ให้ไม่สามารถผลิตไซแลเนสได้ แต่ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถหา *Streptomyces* ที่เหมาะสมที่ไม่สร้างไซแลเนสได้ จึงใช้ *Streptomyces lividans* TK21 ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานที่นิยมใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการโคลนยีนจากสายพันธุ์อื่น เช่น เอนไซม์, สมบัติการต้านยาปฏิชีวนะ (Hopwood, 1981) พบว่า *Streptomyces lividans* TK21 มีแอคติวิตีไซแลเนสในระดับหนึ่งดังแสดงในตารางที่ 3.1 แต่ยังต่ำกว่า *Streptomyces* สายพันธุ์ PC22 ประมาณ 20 เท่า จึงคาดว่าสามารถนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านได้

จากนั้นนำ *Streptomyces lividans* TK21 มาตรวจสอบประสิทธิภาพในการทำให้เกิดโปรโตพลาสท์ และการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะเข้าสู่โปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้ ผลการสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 พบว่า *Streptomyces lividans* TK21 สามารถรีเจนเนอเรทได้ 1.12% Hopwood และคณะ (1977) ได้รายงานว่า *Streptomyces coelicotor* A3(2) สามารถรีเจนเนอเรทได้เพียง 1-10% ซึ่งจากผลของงานวิจัยนี้พบว่ามีประสิทธิภาพในการรีเจนเนอเรทเมื่อเทียบกับ *Streptomyces coelicotor* A3(2) ไม่ต่ำมากนัก จึงสามารถนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการโคลนยีนไซแลเนสได้

การตรวจสอบประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ699 และ pIJ702 เข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21 แสดงดังตารางที่ 3.3 พบว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเท่ากับ 2.6×10^4 และ 1.2×10^4 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ตามลำดับ

Hopwood และคณะ (1977) รายงานว่า *Streptomyces lividans* และ *Streptomyces ccelicotor* A3(2) เมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิด SCP2 ขนาด 31 กิโลเบส ที่อยู่ในรูปวงแหวนปิด (ccc DNA) จะได้ ทรานสฟอร์แมนท์ 10^5-10^7 ต่อไมโครกรัมของพลาสมิด จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าต่ำกว่ารายงานของ Hopwood และคณะ (1977) 10-100 เท่า

Bibb และคณะ (1980) รายงานว่าถ้าทรานสฟอร์มพลาสมิดที่อยู่ในรูปวงแหวนเปิด (open circular) หรือในรูปเส้น (linearised plasmid) ที่มีปลายดีเอ็นเอเป็นปลายเหนียว (sticky ends) พบว่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มใน *Streptomyces lividans* และ *Streptomyces coelicotor* A3(2) จะลดลงประมาณ 10-100 เท่าจากเมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดในรูปวงแหวนปิด จึงเป็นไปได้ว่าในงานวิจัยนี้การทรานสฟอร์ม pIJ699 และ pIJ702 เข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21 นั้นมีประสิทธิภาพลดลง เพราะมีพลาสมิดในรูปวงแหวนเปิดปนอยู่ โดยจากผลการสกัดพลาสมิด pIJ699 (ไม่ได้แสดงรูป) และ pIJ702 รูปที่ 3.7 ช่องที่ 6 พบว่าพลาสมิด pIJ699 และ pIJ702 ที่สกัดได้ไม่ได้อยู่ในรูปวงแหวนปิดทั้งหมด โดยยังมีส่วนของพลาสมิดในรูปวงแหวนเปิดปนมาด้วย

จากผลการทดลองทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในตารางที่ 3.4 เมื่อทรานสฟอร์มด้วย recombinant ที่มีส่วนของพลาสมิดพาหะ pIJ699 พบว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มมีค่าเท่ากับ 1.7×10^2 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ และเมื่อทรานสฟอร์มด้วย recombinant ที่มีพลาสมิดพาหะเป็น pIJ702 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มมีค่าเท่ากับ 1.3×10^2 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดพาหะ pIJ699 และ pIJ702 พบว่าการทรานสฟอร์มลดลง 150 และ 92 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พลาสมิดพาหะที่ใช้จะต้องผ่านการกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายทั้งสอง เมื่อนำมาเชื่อมกับชิ้นดีเอ็นเอจึงมีจุดนิค (nick) 2 จุด เกิดขึ้นบนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเสมอ เพราะไม่สามารถเกิดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างปลาย 5′-hydroxy พลาสมิดพาหะ และปลาย 3′-hydroxy ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำมาเชื่อมได้ ทำให้โครงรูปของพลาสมิดในรูปวงแหวนเปิด ซึ่งตรงกับข้อสนับสนุนเบื้องต้นของ Bibb และคณะ (1980) ที่ว่าเมื่อทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะอยู่ในรูปวงแหวนเปิด ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มจะลดลง

นอกจากนี้เมื่อทำการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วทำให้พลาสมิดที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้นด้วย ซึ่งตรงกับหลักทฤษฎีที่ว่า เมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดขนาดใหญ่จะทำให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มต่ำกว่าเมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดขนาดเล็ก (Maniatis *et al.*, 1982)

การแสดงออกของไซแลเนสยีนเมื่อเข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21

จากผลการทดลองโคลนยีนไซแลเนส จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. PC22 เข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21 โดยใช้ pIJ699 เป็นพลาสมิดพาหะ พบว่าได้โคลนที่ให้วงใสรอบโคโลนี 5 โคลน เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบตามรูปที่ 3.8 ชื่อว่า S-1, S-2, S-3, S-6 และ S-21 แต่เมื่อทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไม่สามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และพบว่าเมื่อเลี้ยงโคลนต่อไป S-1, S-2, S-3, และ S-6 มีการสูญเสียแอคติวิตีของไซแลเนส ส่วน S-21 สามารถนำไปตรวจสอบแอคติวิตีได้ โดยพบว่ามีแอคติวิตีเท่ากับ 1.21 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับ *Streptomyces lividans* TK21 มีปริมาณเพิ่มขึ้น 2.42 เท่า

สำหรับโคลน S-1, S-2, S-3, และ S-6 ไม่พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 3.6 ช่องที่ 4 จะเห็นว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้มีขนาดใหญ่มาก ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเกิด muliple insert คือรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหนึ่งๆ จะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกันมากกว่า 1 ชิ้นขึ้นไป Kieser และ Melton (1988) กล่าวว่าการเกิด muliple insert จะทำให้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดไม่เสถียร และมีโอกาสเกิดการกำจัดชิ้นส่วนที่มีการซ้ำกันออกไปสูง (internal recombination and deletion of palindrome) นอกจากนั้นชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 5 กิโลเบสของพลาสมิดพาหะ pIJ699 ก็เป็นชิ้นส่วนที่สร้างขึ้นมาให้ปลายทั้งสองข้างมี inverted terminator sequence (รูปที่ 3.4) ซึ่งจะเสถียรอยู่ได้ถ้ามีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ระหว่างปลายทั้งสอง แต่ถ้าชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่หลุดไปชิ้นพลาสมิดก็จะถูกทำลายด้วย ดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจพบชิ้นพลาสมิดพาหะ เมื่อโคลนสูญเสียแอคติวิตีของไซแลเนส

สำหรับ S-21 ไม่พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด แต่สามารถแสดงแอคติวิตีของไซแลเนสได้ จึงอาจเป็นผลมาจากยีนไซแลเนสได้มีการ integrate เข้าสู่โครโมโซม

จากรายงานของ Lin และ Thomson (1991) ศึกษาการโคลนยีนไซแลเนสจาก *Butyrivibrio fibrisolvens* สายพันธุ์ H170 พบไซแลเนสมีกรดอะมิโน 635 ตัว เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนกับ cellobiohydrolase/endogluconase ของ *Caldocellum saccharolyticum* และจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ เช่น *Bacillus* sp. C-125 และ *B.fibrisolvens* สายพันธุ์ 49 มีความเหมือนเท่ากับ 40%, 38% และ 32% ตามลำดับ

Baba และคณะ (1994) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Bacillus stearothermophilus* สายพันธุ์ 21 พบยีนที่มีส่วนเหมือนกับ cellulase-xylanase ตระกูล F ถึง 6 ส่วน

Jeong และคณะ (1998) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Bacillus* sp. พบไซแลเนสยีนถอดรหัสได้กรดอะมิโน 213 ตัว และมีความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของไซแลเนสอื่นอีก 96%

จากรายงานต่างๆ ถึงความเหมือนของไซแลเนสยีนและลำดับกรดอะมิโนของไซแลเนสจากจุลินทรีย์หลายๆ สายพันธุ์ ดังนั้นไซแลเนสยีนจาก *Streptomyces* สายพันธุ์ PC22 และเซลล์เจ้าบ้าน *Streptomyces lividans* TK21 อาจมีความคล้ายกันมากทำให้เกิดการ crossing over ของขึ้นยีนไซแลเนสใน S-21 เข้าไปรวมกับโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้ไม่พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และแอคติวิตีของไซแลเนสที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับของเซลล์เจ้าบ้าน พบว่าสูงกว่า 2 เท่า ซึ่งไม่มากนัก อาจเป็นผลจากการนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเข้ารวมกับโครโมโซมนำเข้าได้เพียงบางส่วน ทำให้การแสดงออกของยีนไม่สมบูรณ์ การ integrate นี้ยังได้นำชิ้นส่วน 5 กิโลเบสของพลาสมิดพาหะ pIJ699 เข้าไปด้วย ทำให้โคลน S-21 มีความสามารถทนต่อไธโอสเตรพทอนได้

ในขณะเดียวกันเมื่อใช้พลาสมิดพาหะเป็น pIJ702 ได้โคลนที่ให้วงใสรอบโคโลนี 1 โคลน เรียกว่า S-22 ดังรูปที่ 3.11 แต่เมื่อวิเคราะห์พลาสมิดจากโคลนนี้ กลับได้พลาสมิดที่มีขนาดเท่ากับพลาสมิดพาหะ pIJ702 และยังพบว่า S-22 ได้สูญเสียแอคติวิตีของไซแลเนส แสดงว่ายีนที่โคลนได้ไม่มีความเสถียร เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 3.7 ช่องที่ 5 จะเห็นว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้มีขนาดใหญ่มาก อาจทำให้เกิด mulitiple insert รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จึงไม่เสถียรและมีโอกาสเกิดการกำจัดชิ้นส่วนที่ซ้ำกันออกไป ดังกล่าวในตอนต้น และนอกจากนั้นยังอาจเนื่องมาจากความคล้ายคลึงของยีนไซแลเนสของ *Streptomyces* สายพันธุ์ PC22 และเซลล์เจ้าบ้าน จึงทำให้เกิด recombination และ deletion ได้ เมื่อดีเอ็นเอลอดแทรกหลุดไปก็ยังคงพบ pIJ702 ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ได้

นอกจากนั้นยังได้ทำการสุ่มตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ที่สร้างจากพลาสมิดพาหะ pIJ702 หลังจากการทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21 พบว่าพลาสมิดที่สกัดได้จากทุกทรานสฟอร์แมนท์ที่สุ่มมาทดสอบขนาดเล็กกว่าพลาสมิดพาหะ pIJ702 เดิม ดังรูปที่ 3.13 แสดงว่าน่าจะเกิด recombination และ deletion ระหว่างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดกับโครโมโซมอลดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งเป็นผลมาจากความคล้ายคลึงกันมากของไซแลเนสยีน หรือยีนอื่นๆจาก *Streptomyces* sp. PC22 กับเซลล์เจ้าบ้าน ดังรายงานต่างๆ ที่กล่าวไว้ตอนต้น

การโคลนยีนไซแลเนส โดยระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *E.coli*

เช่นเดียวกับการคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces* เซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *E.coli* ก็ไม่ควรมีแอคติวิตีของไซแลเนส จากผลการทดลองพบว่า *E.coli* DH5α ให้แอคติวิตีจำเพาะของไซแลเนส 0.08 หน่วย/มก.โปรตีน ซึ่งจัดว่าต่ำมาก จึงสามารถนำ *E.coli* DH5α มาเป็นเซลล์เจ้าบ้านได้

การตรวจสอบการทรานสฟอร์มของพลาสมิดพาหะ pUC18 เข้าสู่ *E.coli* DH5α โดยวิธี electroporation พบว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเท่ากับ $1.5x10^7$ ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ในขณะที่ Dower และคณะ (1988) ได้รายงานว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์ม *E.coli* DH5α ด้วย pUC18 เท่ากับ 10^9-10^{10} ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ทั้งนี้เนื่องจากพลาสมิดที่สกัดได้ ไม่ได้อยู่ในรูปของวงแหวนปิดทั้งหมด

เมื่อทรานสฟอร์ม *E.coli* DH5α ด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างจากพลาสมิดพาหะ pUC18 พบว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเท่ากับ $4x10^5$ ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ซึ่งลดลงจากการทรานสฟอร์มโดยพลาสมิดพาหะ pUC18 37 เท่า

เมื่อพิจารณาจากรายงานของ Bibb และคณะ (1980) และจากทฤษฎีข้างต้น สนับสนุนว่าเมื่อทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจะมีประสิทธิภาพต่ำลง อันเนื่องจากการที่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดอยู่ในรูปวงแหวนเปิด และการสร้างรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดมีขนาดใหญ่ขึ้น การทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์จึงยากกว่า

การแสดงออกของยีนไซแลเนสใน *E.coli* DH5α

จากผลการทดลองโคลนยีนไซแลเนสจากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. PC22 เข้าสู่ *E.coli* DH5α โดยใช้ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะ พบว่าได้โคลนที่ให้วงใสรอบโคโลนี 1 โคลน เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และคัดเลือกตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 2.13.1.2 เรียกชื่อว่า E-8 ดังรูปที่ 3.17 ซึ่งสกัดได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPC1 มีขนาดเท่ากับ 4.6 กิโลเบส โดยมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส และมีแอคติวิตีจำเพาะของไซแลเนสเท่ากับ 0.25 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าของ *E.coli* DH5α/pUC18 ประมาณ 3 เท่า ซึ่งใกล้เคียงกับ Baba และคณะ (1994) ที่รายงานการโคลนยีนไซแลเนสจาก *Bacillus stearothermophilus* 21 โดยใช้ pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะ และ *E.coli* JM109 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งวิเคราะห์แอคติวิตีจำเพาะของไซแลเนสจาก *E.coli* JM109 ได้ 0.081 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และแอคติวิตีจำเพาะของโคลนที่ได้ ชื่อ 13E เท่ากับ 0.206 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยโคลน 13E มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส และเมื่อทำการ

โคลนย่อยโดยตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ออกไป 712 คู่เบส ได้โคลน 13E-1 มีแอคติวิตีจำเพาะของไซแลเนสสูงขึ้นเป็น 0.268 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่เมื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ออกไป 1110 คู่เบส ได้โคลน 13E-2 มีแอคติวิตีจำเพาะของไซแลเนสลดลงเป็น 0.158 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

สำหรับโคลน E-8 ที่ได้จากงานวิจัยนี้ มีขีนดีเอ็นเอสอดแทรกขนาดเล็ก จึงยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าครอบคลุมส่วนจำเป็นทั้งหมดของยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ได้สมบูรณ์หรือไม่ ส่วนการเปรียบเทียบแอคติวิตีของไซแลเนสกับ *Streptomyces* sp. PC22 ยังไม่สามารถหาวิธีที่แม่นยำได้ เพราะ *Streptomyces* sp. PC22 สร้างและปล่อยเอนไซม์นี้ออกนอกเซลล์ ดังนั้นการวิเคราะห์ แอคติวิตีจำเพาะก็ยังไม่ใช่ค่าที่ถูกต้อง เพราะโปรตีนที่นำมาวิเคราะห์นั้นส่วนหนึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ การวิเคราะห์ที่ถูกต้องจะทำได้ถ้ามีการนำยีนนี้ไปแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces* ที่เหมาะสมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย