บทที่ 3

ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการโคลนยีนไซแลเนสของ *Streptomyces* sp. PC22 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งสุมาลี ลิ้งใจธรรม (2539) ได้ทำการแยกเชื้อและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบและภายใต้สภาวะที่เหมาะสมคือ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถสร้างไซแลเนสได้ 14.68 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่สูงเมื่อเทียบกับรายงานอื่น ดังแสดงในตาราง 1.1 รวมทั้งมีสมบัติอยู่ในเกณฑ์ดี โดยมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงกว้าง คือ ตั้งแต่ 4.0 ถึง 9.0 และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 65 องศาเซลเซียส สำหรับวิธีการโคลนยีนในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์เจ้าบ้าน 2 ระบบควบคู่กันไปคือ *Streptomyces lividans* TK21 กับพลาสมิด pIJ699 และพลาสมิด pIJ702 และ *E. coli* DH5α กับพลาสมิด pUC18

3.1 การโคลนยีนไซแลเนส โดยใช้เซลล์เจ้าบ้านเป็น *Streptomyces*

3.1.1 การหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนสในเซลล์เจ้าบ้าน

ในการโคลนยีนไซแลเนส เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมไม่ควรมีเอนไซม์นี้หรือมีในปริมาณที่ต่ำ ดังนั้นการใช้ *Streptomyces lividans* TK21 เป็นเซลล์เจ้าบ้านจึงต้องตรวจสอบระดับแอคติวิตีของเอนไซม์นี้เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. PC22 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.13.2 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.1 โดยเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ *Streptomyces lividans* TK21 พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 มีระดับไซแลเนสเท่ากับ 5.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วน *Streptomyces lividans* TK21 มีระดับของเอนไซม์เท่ากับ 0.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าสายพันธุ์ PC22 มาก ดังนั้นจึงใช้ *Streptomyces lividans* TK21 เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับใช้ในการโคลนไซแลเนสยีนจาก *Streptomyces* sp. PC22 ได้

3.1.2 การสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21

ในการโคลนยีนโดยใช้ระบบเ
ซลล์เจ้าบ้านเป็น *Streptomyces* นั้น เซลล์เจ้าบ้านต้องอยู่ในรูปโปรโตพลาสท์ในขั้นตอนทรานสฟอร์เมชัน ดังนั้นในขั้นต้นจึงต้องศึกษาประสิทธิภาพการสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21

ผลการสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.5.2 ดังแสดงในตารางที่ 3.2 พบว่า โปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้จาก *Streptomyces lividans* TK21 ที่อยู่ในช่วง mid log phase มีความเข้มข้น 1.58×10^9 โปรโตพลาสท์ต่อมิลลิลิตร มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 3.1 และสามารถรีเจนเนอเรทได้ ดังแสดงในรูปที่ 3.2 โดยความสามารถในการรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสท์ที่ได้คิดเป็นเปอร์เซนต์รีเจนเนอเรชันเท่ากับ 1.12

Hopwood และคณะ (1977) รายงานว่า โปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces coelicotor* A3(2) สามารถรีเจนเนอเรทได้ 1-10% ซึ่งเมื่อเทียบกับโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21 จากงานวิจัยนี้ จึงจัดว่าไม่ต่ำมากนัก จึงสามารถนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการโคลนยีนไซแลเนสได้

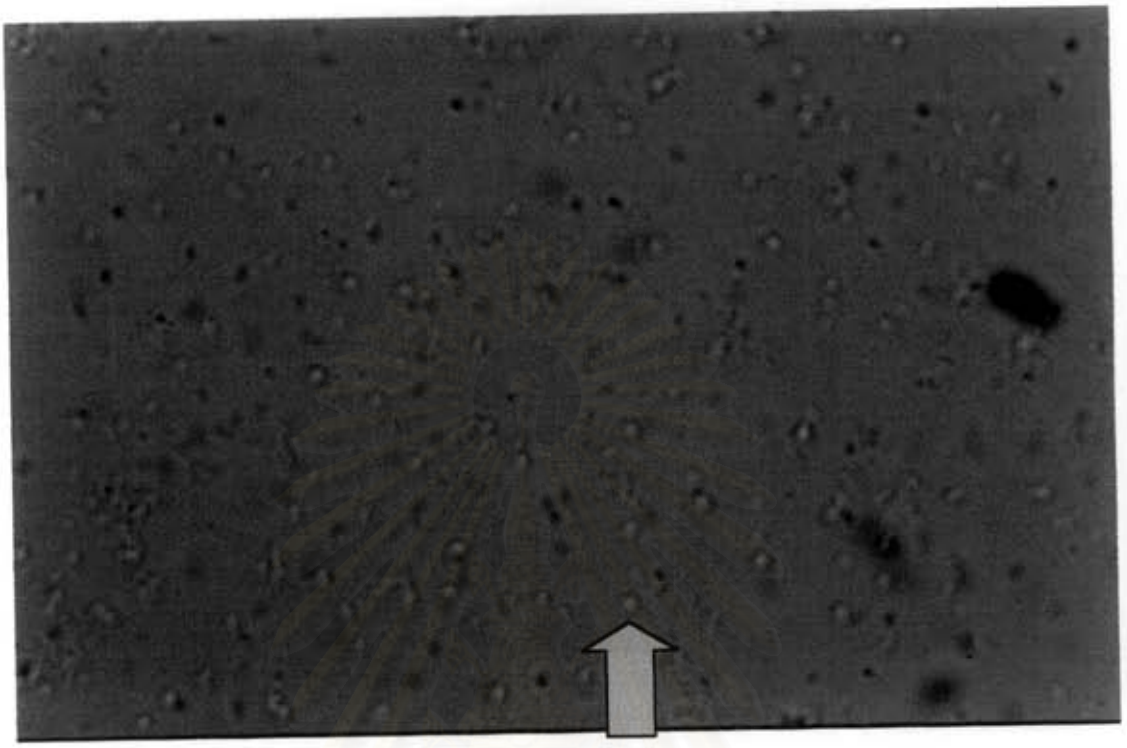
ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบแอคติวิตีของไซแลเนสระหว่าง *Streptomyces* sp. PC22 กับ *Streptomyces lividans* TK21

สายพันธุ์	แอคติวิตีของไซแลเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
Streptomyces sp. PC22	5.9
Streptomyces lividans TK21	0.3

หมายเหตุ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจสอบแอคติวิตีของ สุมาลี อึ้งไจธรรม (2539) (ภาคผนวก ก4) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน

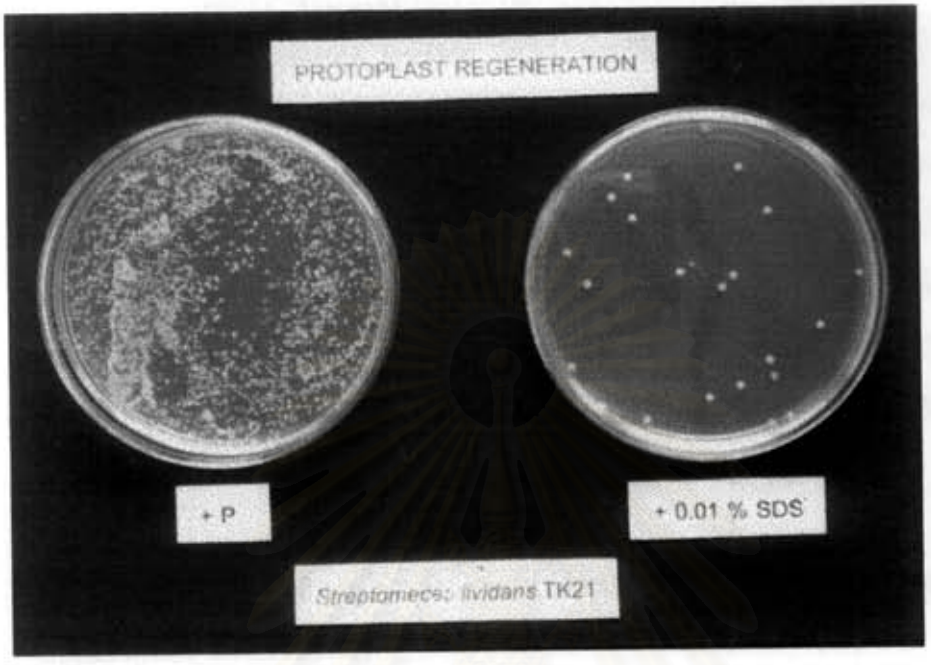
ตารางที่ 3.2 ผลการสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21

โปรโตพลาสท์/มล.	รีเจนเนอเรชันของโปรโตพลาสท์/มล.	% รีเจนเนอเรชัน
1.58×10^9	1.76×10^7	1.12



รูปที่ 3.1 ลักษณะโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.2 ผลการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ R2YE โดยแขวนลอยใน บัฟเฟอร์ P (P) เปรียบเทียบกับการแขวนลอยใน 0.01% SDS โดยเจือจาง 10^{-4} เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19303433

3.1.3 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม *Streptomyces lividans* TK21 ด้วยพลาสมิดพาหะ pIJ699 และ pIJ702

ได้ตรวจสอบประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ699 และ pIJ702 เข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21 ตามวิธีที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.12.1 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.3 พบว่าพลาสมิดพาหะ pIJ699 ให้ประสิทธิภาพการ ทรานสฟอร์มเท่ากับ 2.6×10^4 ทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมของพลาสมิด และพลาสมิดพาหะ pIJ702 ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเท่ากับ 1.2×10^4 ทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมของพลาสมิด ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดพาหะทั้ง 2 มีความใกล้เคียงกัน และมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้เป็นพลาสมิดพาหะสำหรับการโคลนยีนได้ แต่ในการทรานสฟอร์มแต่ละครั้งจะต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่เข้มข้นสูง เพื่อให้ได้จำนวนทรานสฟอร์แมนท์เพียงพอสำหรับการคัดเลือกโคลน

ตารางที่ 3.3 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ699 และ pIJ702 เข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21

ชนิดของพลาสมิดพาหะ	จำนวนทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ
pIJ699	2.6×10^4
pIJ702	1.2×10^4

3.1.4 การโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 เข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21 โดยใช้ pIJ699 และ pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ

3.1.4.1 การเตรียมชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอขนาด 2-6 กิโลเบส ของ *Streptomyces* sp. PC22

จากรายงานการโคลนยีนไซแลเนสใน *Streptomyces* sp. No. 36a เข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21 โดย Iwasaki และคณะ (1986) เมื่อทำการโคลนชิ้นส่วนย่อยของยีน พบว่าขนาดของดีเอ็นเอที่เป็นรหัสของไซแลเนสมีความยาวประมาณ 1.04 กิโลเบส Mondou และคณะ (1986) ทำการโคลนยีนไซแลเนสของ *Streptomyces lividans* 1326 เข้าสู่สายพันธุ์เดิมที่ผ่านการกลายพันธุ์ให้ไม่สามารถผลิตไซแลเนสได้ พบว่าขนาดของยีนไซแลเนสที่รวมเอายีนควบคุมไว้ด้วยมีความยาวประมาณ 2 กิโลเบส

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. PC22 หลังจากการตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI ขนาด 2-6 กิโลเบส ซึ่งคาดว่าจะครอบคลุมยีนไซแลเนสทั้งหมด และนำมาเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ชิ้นส่วนขนาด 5 กิโลเบส ของพลาสมิด pIJ699 ซึ่งมีขนาด 9.6 กิโลเบส และพลาสมิด pIJ702 ขนาด 5.8 กิโลเบส ตามลำดับ

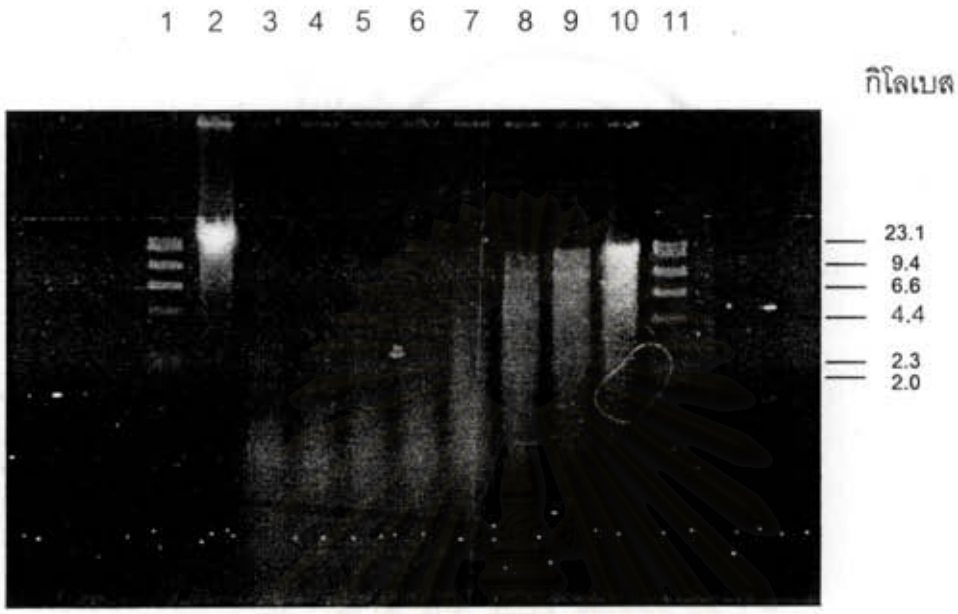
ผลการย่อยโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. PC22 แบบกึ่งสมบูรณ์ด้วย *Sau*3AI ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.11.1 แสดงในรูปที่ 3.3 พบว่าช่องที่ 8 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอและเอนไซม์คือ ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 1.8795 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเอนไซม์ 0.15625 หน่วย เป็นการย่อยที่ให้ชิ้นส่วนขนาด 2-6 กิโลเบส ได้สูงสุด

จากผลการทดลองดังกล่าวนี้ให้อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ และดีเอ็นเอที่เหมาะสมซึ่งนำไปใช้เตรียมชิ้นส่วนขนาด 2-6 กิโลเบส ปริมาณมาก

3.1.4.2 การตัดพลาสมิดพาหะ pIJ699 และ pIJ702 และการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

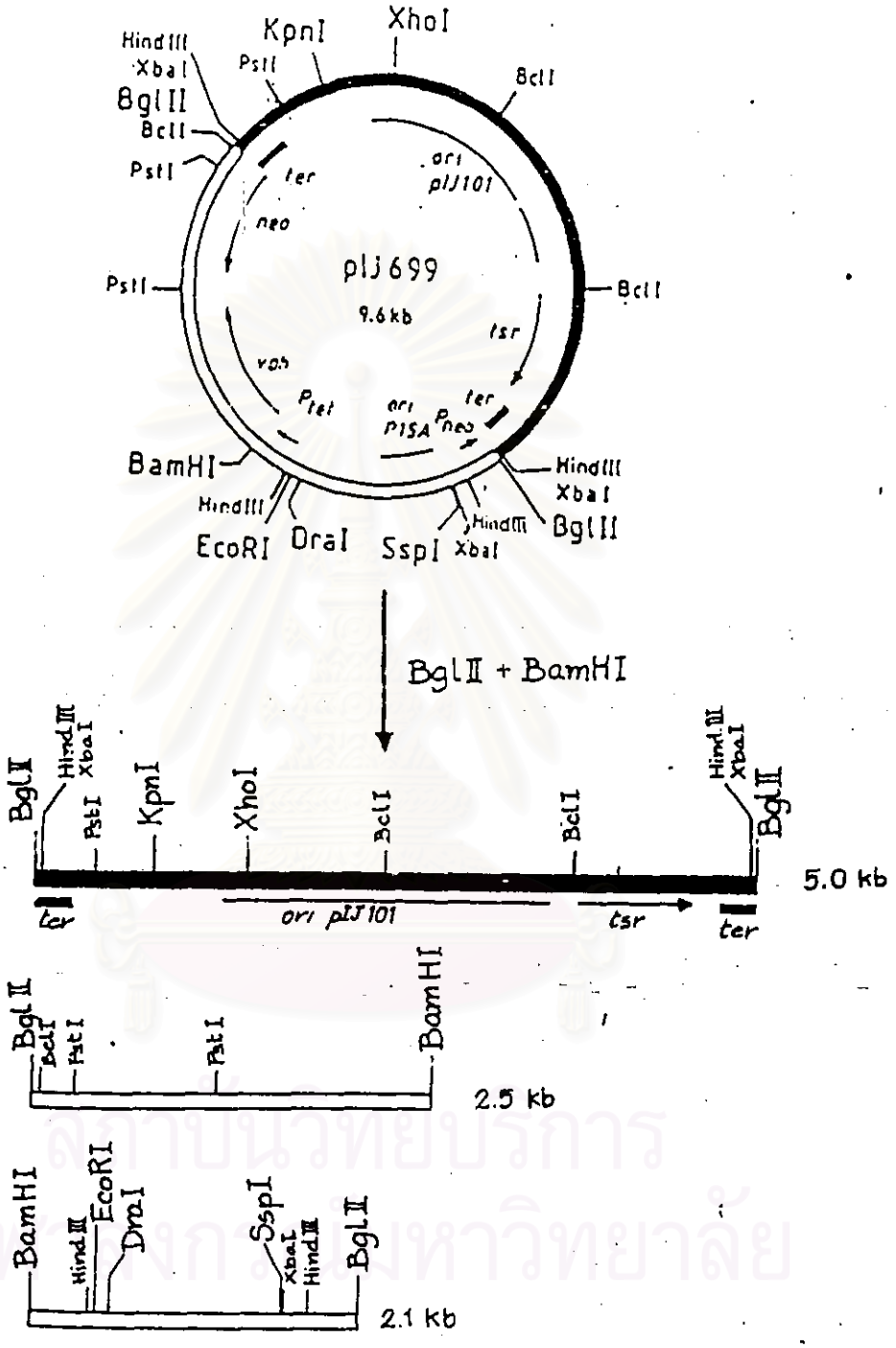
นำพลาสมิด pIJ699 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่สร้างขึ้นให้เพิ่มจำนวนได้ ทั้งใน *E. coli* และ *Streptomyces* (Kieser and Melton, 1988) มาตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bgl*II และ *Bam*HI ดังรูปที่ 3.4 และตัดพลาสมิดพาหะ pIJ702 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bgl*II ดังรูปที่ 3.5 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.11.2 สำหรับ pIJ699 นำชิ้นส่วนขนาด 5 กิโลเบส ซึ่งเป็นส่วนที่มีจุดเริ่มต้น (origin) ของ pIJ101 ซึ่งเป็นพลาสมิดของ *Streptomyces* มาใช้เป็นพาหะ นำพลาสมิดทั้งสองมาทำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายทั้งสองด้วย Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเองด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase พบว่าไม่สามารถเชื่อมตัวเองได้ ตามรูปที่ 3.6 ช่องที่ 3 และรูปที่ 3.7 ช่องที่ 3 โดยพลาสมิดทั้งคู่ยังคงอยู่ในรูปเส้น (linear form)

ส่วนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างจากชิ้นส่วน 5 กิโลเบสของ pIJ699 มีขนาดประมาณมากกว่า 5-20 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 3.6 ช่องที่ 4 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างจาก pIJ702 มีขนาดอยู่ในช่วงประมาณ 6-20 กิโลเบส ดังรูปที่ 3.7B ช่องที่ 3

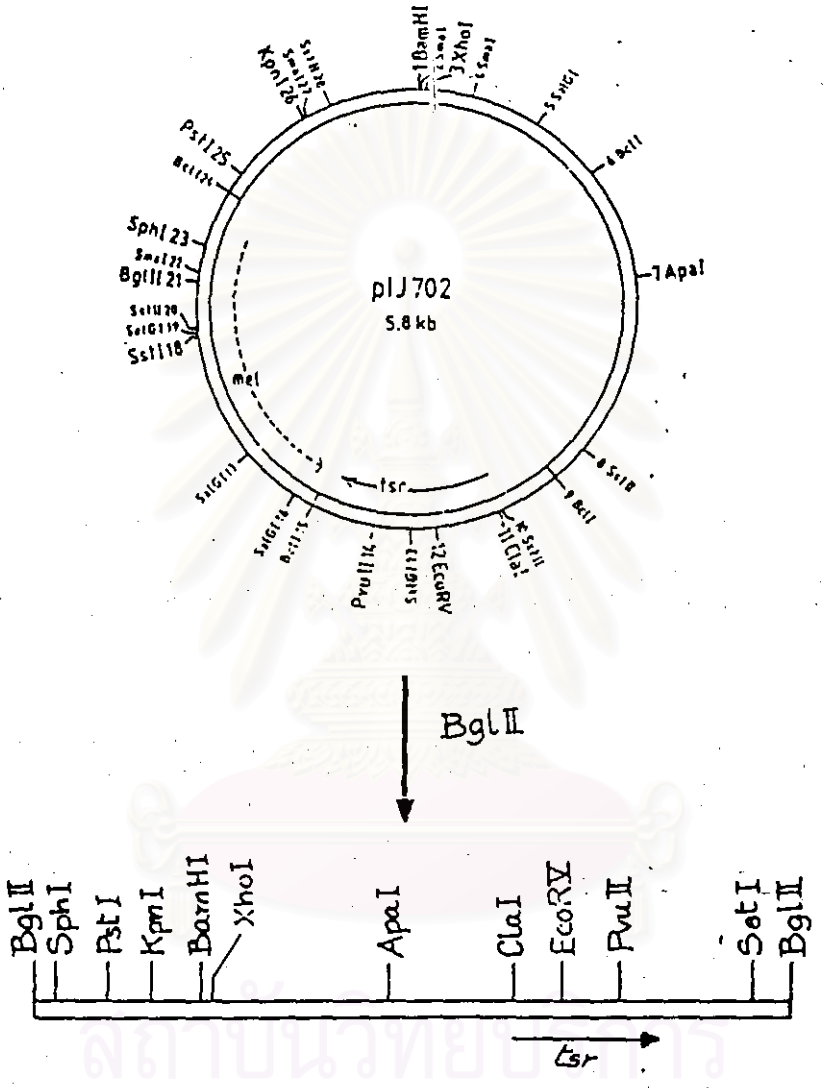


รูปที่ 3.3 ผลการย่อยโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. PC22 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI แบบกึ่งสมบูรณ์ (partial digestion)

ช่องที่	1	λDNA/*Hin*dIII
	2	โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. PC22
	3	โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.8795 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 5 หน่วย
	4	โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.8795 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 2.5 หน่วย
	5	โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.8795 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 1.25 หน่วย
	6	โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.8795 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.625 หน่วย
	7	โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.8795 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.3125 หน่วย
	8	โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.8795 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.15625 หน่วย
	9	โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.8795 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.078125 หน่วย
	10	โครโมโซมอลดีเอ็นเอ 1.8795 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.0390625 หน่วย
	11	λDNA/*Hin*dIII

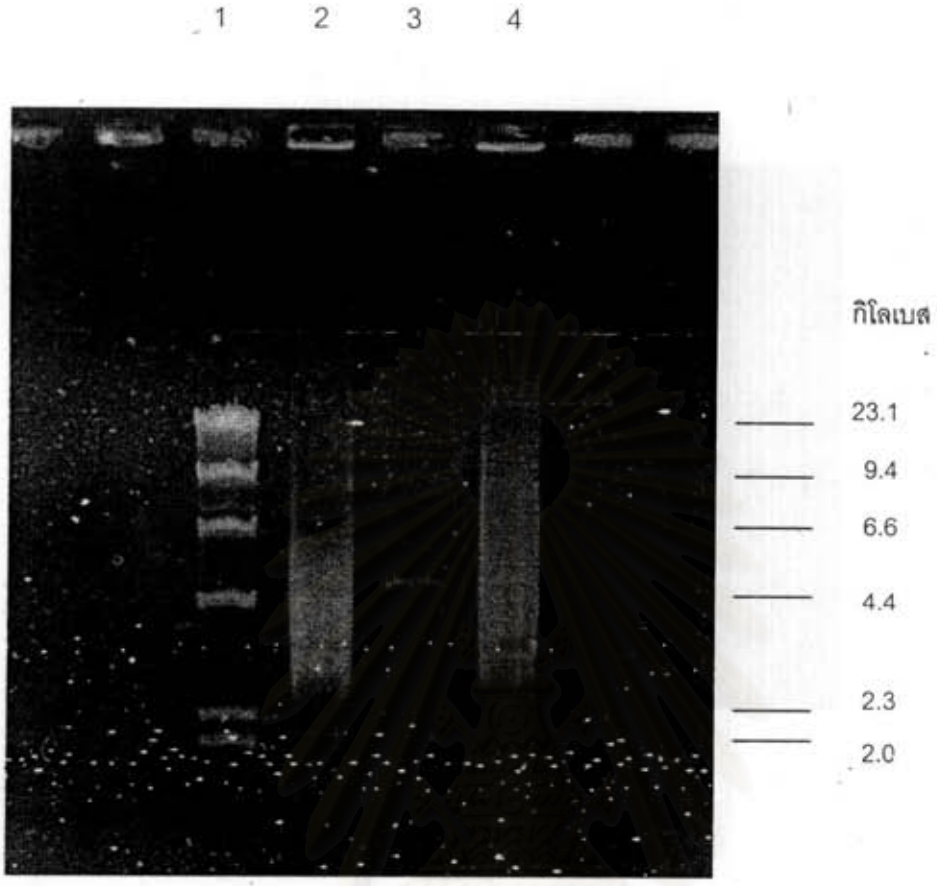


รูปที่ 3.4 แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิดพาหะ pIJ699 เมื่อถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bgl*II และ *Bam*HI (Kieser and Melton, 1988)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>รูปที่ 3.5</u> แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิดพาหะ pIJ702 เมื่อถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bgl*II (Hopwood *et al.*, 1985)



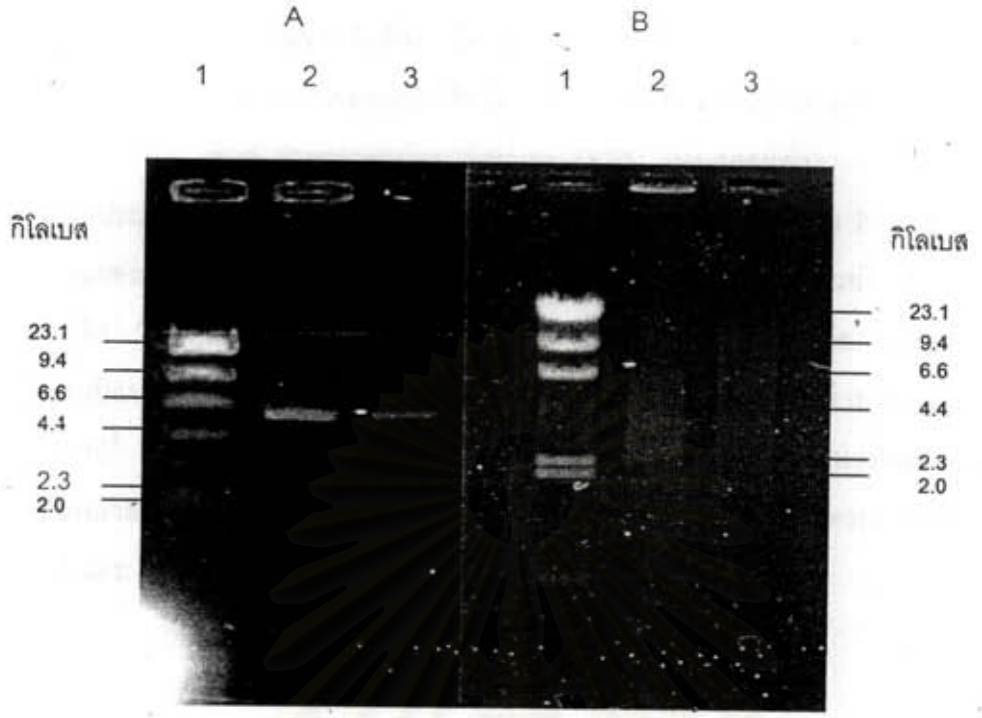
<u>รูปที่ 3.6</u> ภาพแสดงการเชื่อมตัวเองของชิ้นส่วนขนาด 5 กิโลเบสของ pIJ699 ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะ หลังการกำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดระหว่างชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอกับพลาสมิดพาหะที่ผ่านการเชื่อมด้วย T4 DNA ligase บนอะกาโรสเจล

ช่องที่ 1 λDNA/*Hin*dIII

2 ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. PC22 ขนาด 2-6 กิโลเบส

3 ชิ้นส่วน 5 กิโลเบสของ *pIJ699* ที่ทดสอบความสามารถในการเชื่อมด้วย T4 DNA ligase หลังกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกจากชิ้นส่วน 5 กิโลเบส ด้วย CIAP

4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด



<u>รูปที่ 3.7</u> ภาพแสดงการเชื่อมตัวเองของพลาสมิดพาหะ pIJ702 ภายหลังการตัดด้วย *Bgl*II และกำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว (A) และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดระหว่างชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอกับ pIJ702 (B) ที่ผ่านการเชื่อมด้วย T4 DNA ligase บนอะกาโรสเจล

A ช่องที่ 1 λDNA/*Hind*III

2 พลาสมิด pIJ702 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bgl*II ที่กำจัดหมู่ฟอสเฟตด้วย CIAP

3 พลาสมิด pIJ702 จากช่องที่ 2 เชื่อมด้วย T4 DNA ligase

B ช่องที่ 1 λDNA/*Hind*III

2 ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. PC22 ขนาด 2-6 กิโลเบส

3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.5 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิด 2 ชนิดคือ pIJ699 และ pIJ702 เข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21 ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 3.4 พบว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์ม pIJ699 และ pIJ702 มีค่าเท่ากับ $2.6x10^4$ และ $1.2x10^4$ ทรานสฟอร์มแมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ตามลำดับ เมื่อทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.1.4.2 ปรากฏว่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มลดลงคือ เมื่อทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ pIJ699 เป็น พลาสมิดพาหะได้จำนวนทรานสฟอร์มแมนท์ $1.7x10^2$ ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ และเมื่อทรานสฟอร์มด้วยด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ ได้จำนวนทรานสฟอร์มแมนท์ $1.3x10^2$ ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ โดยลดลง 152 และ 92 เท่าตามลำดับ

ตารางที่ 3.4 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ699 และ pIJ702 เทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างจากพลาสมิดพาหะทั้งสอง เข้าสู่โปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces lividans* TK21

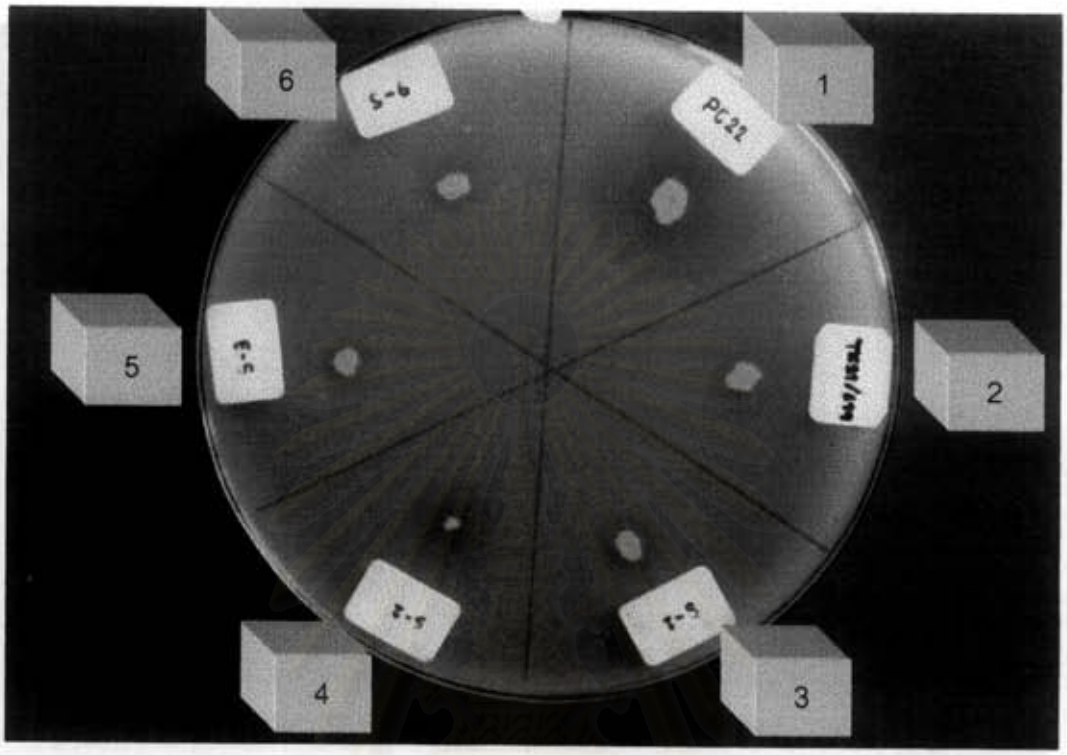
ชนิดของพลาสมิด	จำนวนทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ
pIJ699	$2.6x10^4$
pIJ702	$1.2x10^4$
รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ชิ้นส่วน 5 กิโลเบส ของ pIJ699 เป็นพลาสมิดพาหะ	$1.7x10^2$
รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ	$1.3x10^2$

3.1.6 การแสดงออกของไซแลเนสยีนในโคลนของ *Streptomyces lividans* TK21

3.1.6.1 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างจากชิ้นส่วน 5 กิโลเบสของพลาสมิด pIJ699 และแสดงแอคติวิตีของไซแลเนส

นำทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จากการทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างจากชิ้นส่วน 5 กิโลเบสของ pIJ699 มาคัดเลือกโคลนที่ให้วงใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ พบว่าได้ 5 โคลน ตั้งชื่อโคลนว่า S-1, S-2, S-3, S-6 และ S-21 ดังแสดงในรูปที่ 3.8 และรูปที่ 3.9 เมื่อทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของแต่ละโคลนออกมา พบว่าทุกโคลนไม่สามารถตรวจพบพลาสมิด และเมื่อนำมาเลี้ยงซ้ำบนอาหารแข็งที่มีไซแลน พบว่าโคลน S-1, S-2, S-3 และ S-6 สูญเสียแอคติวิตีของไซแลเนสไป ส่วน S-21 ยังคงแสดงแอคติวิตีของไซแลเนส จึงนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ผลการทดลองในรูปที่ 3.10 และตารางที่ 3.4 พบว่าโคลน S-21 วัดแอคติวิตีของไซแลเนสได้ 1.21 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าแอคติวิตีของ *Streptomyces* sp. PC22 คือ 5.75 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ *Streptomyces lividans* TK21 ที่มีพลาสมิดพาหะ pIJ699 พบว่าโคลน S-21 มีแอคติวิตีของไซแลเนสสูงกว่า 2.42 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 3.5 จึงคาดว่า S-21 น่าจะได้รับชิ้นยีนไซแลเนสเข้าไป แต่การตรวจไม่พบพลาสมิดจึงอาจเป็นไปได้ว่าเกิดการสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าไปในโครโมโซม ทั้งนี้เพราะโคลนที่ได้สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะไธโอสเตรพทอน ซึ่งเป็นสมบัติจากยีนเครื่องหมายบนพลาสมิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.8 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของโคลน S-1, S-2, S-3 และ S-6 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. PC22 และ *Streptomyces lividans* TK21/ pIJ699 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ

1 *Streptomyces* sp. PC22

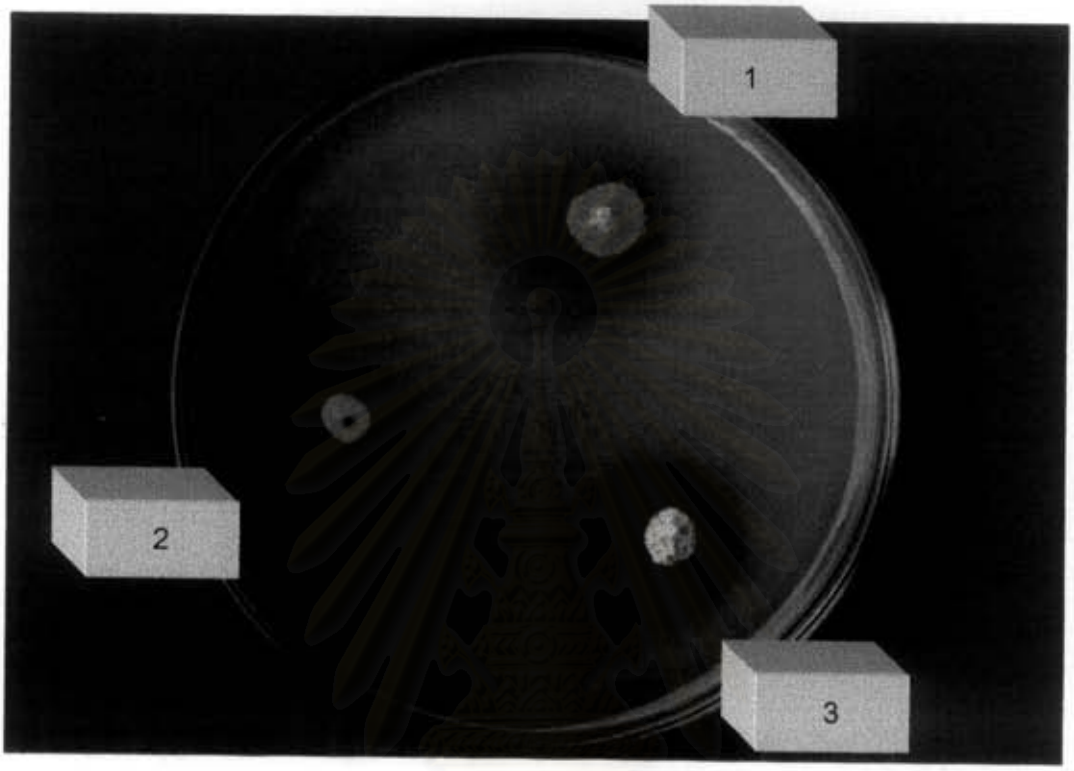
2 *Streptomyces lividans* TK21/ pIJ699

3 โคลน S-1

4 โคลน S-2

5 โคลน S-3

6 โคลน S-6

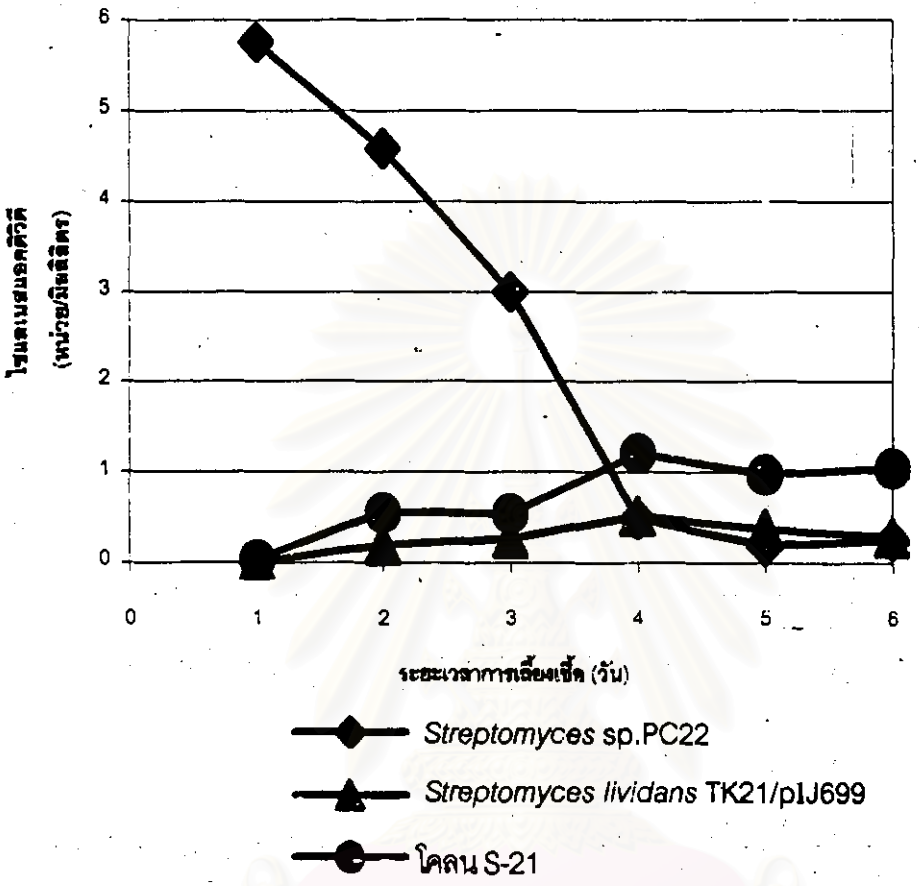


รูปที่ 3.9 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของโคลน S-21 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. PC22 และ *Streptomyces lividans* TK21/pIJ699 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไขแลนเป็นองค์ประกอบ

1 *Streptomyces* sp. PC22

2 *Streptomyces lividans* TK21/pIJ699

3 โคลน S-21



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.10 เปรียบเทียบรูปแบบการสร้างไซแลเนส โดยโคลน S-21 กับ *Streptomyces* sp. PC22 และ *Streptomyces lividans* TK21/pIJ699 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก4) เลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าแบบ rotary ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-6 วัน

ตารางที่ 3.5 เปรียบเทียบแอคติวิตีสูงสุดของไซแลเนสจากโคลน S-21 กับ *Streptomyces* sp. PC22 และ *Streptomyces lividans* TK21/pIJ699

สายพันธุ์	แอคติวิตีของไซแลเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
Streptomyces sp. PC22	5.75
Streptomyces lividans TK21/ pIJ699	0.50
S-21	1.21

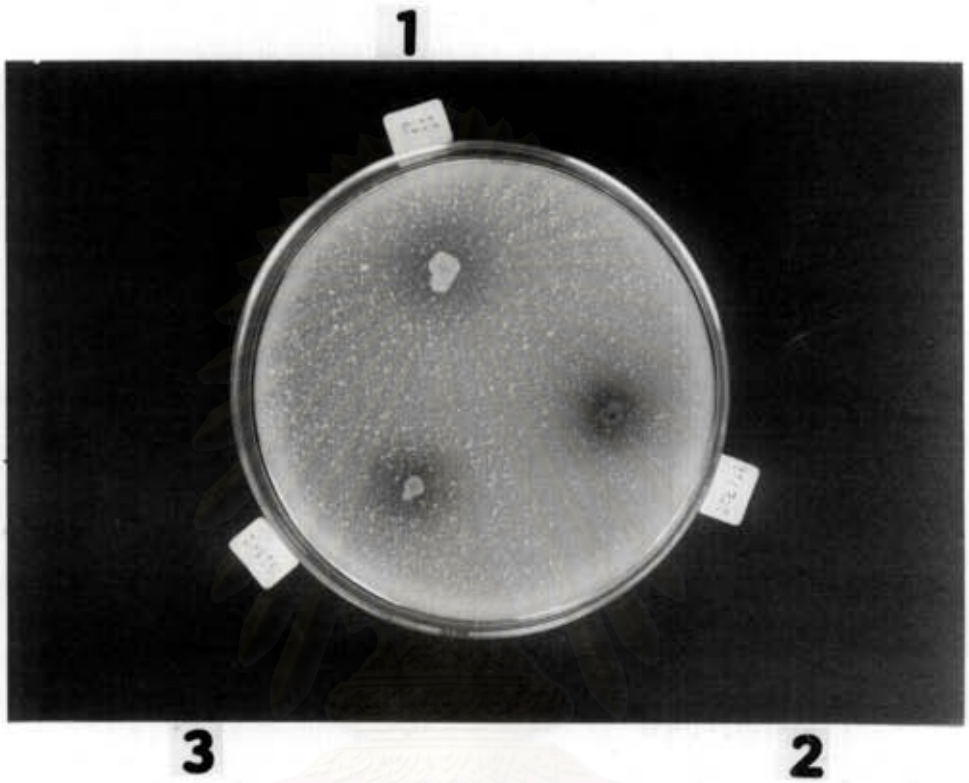
3.1.6.2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างจากพลาสมิด pIJ702 และแสดงแอคติวิตีของไซแลเนส

จากการคัดเลือกโคลนที่ให้วงใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ พบว่าได้ 1 โคลนให้ชื่อ S-22 ดังแสดงในรูปที่ 3.11 แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปพบว่า เชื้อเกิดสูญเสียแอคติวิตีของไซแลเนส และเมื่อนำมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดได้พลาสมิดซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับพลาสมิด pIJ702 ดังแสดงในรูป 3.12 ช่องที่ 2 จึงคาดว่าอาจสูญเสียดีเอ็นเอสอดแทรก (DNA insert) ที่มียีนไซแลนเนส เนื่องจากเกิด รีคอมบิเนชันกับชิ้นยีนไซแลนเนสบนโครโมโซมของ *Streptomyces lividans* TK21

3.1.6.3 การตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างจากชิ้นส่วนของพลาสมิด pIJ699 และพลาสมิด pIJ702 เมื่อ ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21

เนื่องจากผลของโคลนที่ได้ไม่สามารถสกัดแยกพลาสมิดได้ ดังการทดลองที่ 3.1.6.1 หรือรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้มีขนาดเท่ากับพลาสมิดที่ใช้เป็นพาหะ ดังการทดลองที่ 3.1.6.2 จึงได้ทำการตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากการสุ่มตัวอย่างทรานสฟอร์แมนท์ของ *Streptomyces lividans* TK21 ที่ได้จากการทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่สร้างจาก pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ มาสกัดแยกและตรวจวิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดเทียบกับพลาสมิดพาหะ พบว่าขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมีขนาด 4.3 กิโลเบส ซึ่งเล็กลงจากขนาดของ pIJ702 ซึ่งเดิมมีขนาด 5.8 กิโลเบส ดังแสดงในรูป 3.13

ผลการทดลองที่ได้จึงน่าจะยืนยันได้ว่าเกิด recombination และ deletion ระหว่างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดกับโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ดังนั้น *Streptomyces lividans* TK21 จึงเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22

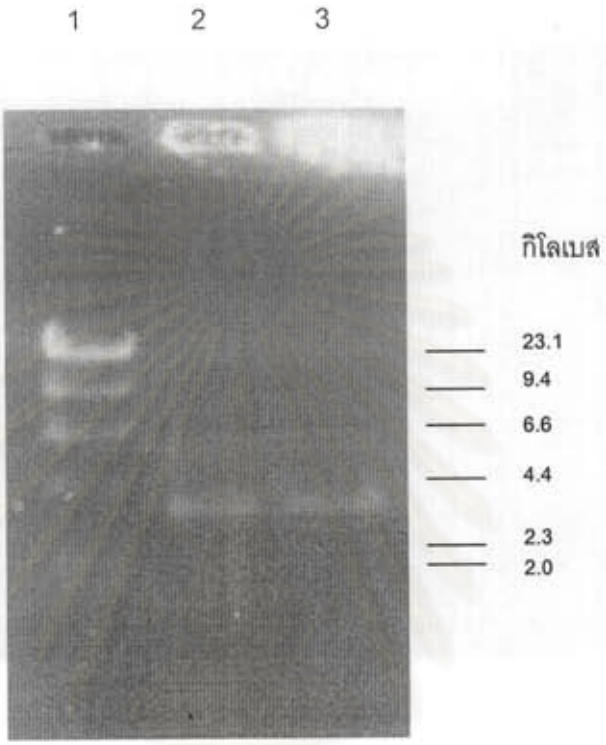


รูปที่ 3.11 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของโคลน S-22 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. PC22 และ *Streptomyces lividans* TK21/pIJ702 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ

1 *Streptomyces* sp. PC 22

2 *Streptomyces lividans* TK21/pIJ702

3 โคลน S-22



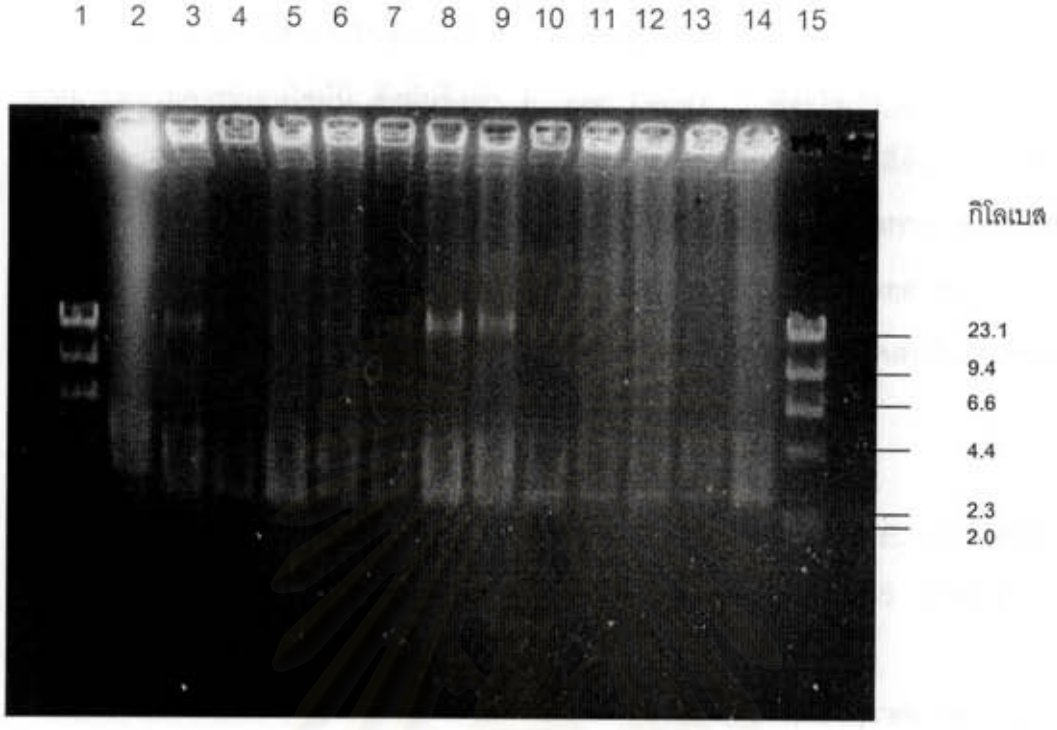
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.12 ภาพแสดงพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลน S-22

ช่องที่ 1 λDNA/*Hind*III

ช่องที่ 2 พลาสมิดที่สกัดได้จากโคลน S-22

ช่องที่ 3 pIJ702



รูปที่ 3.13 ภาพแสดงขนาดของพลาสมิดพาหะ pIJ702 และรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่สร้างจาก pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ หลังการทรานสฟอร์มเข้า *Streptomyces lividans* TK21

ช่องที่ 1 λDNA/*Hind*III

ช่องที่ 2 pIJ702

ช่องที่ 3-14 recombinant DNA ที่มีพลาสมิดพาหะ pIJ702

ช่องที่ 15 λDNA/*Hind*III

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การโคลนยีนไซแลเนสโดยใช้ *E. coli* DH5α เซลล์เจ้าบ้าน

3.2.1 การหาแอคติวิตีจำเพาะของไซแลเนสในเซลล์เจ้าบ้าน

เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าในการโคลนยีนไซแลเนสนั้น เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมไม่ควรมีเอนไซม์นี้ ดังนั้นจึงนำ *E. coli* DH5α ที่จะใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการทดลองนี้ มาตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส โดยวิเคราะห์ในรูปแอคติวิตีจำเพาะ เนื่องจาก *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบไม่ปลดปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ผลการวิเคราะห์ พบว่า *E. coli* DH5α มีแอคติวิตีจำเพาะของไซแลเนสเท่ากับ 0.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีระดับต่ำจึงสามารถใช้ *E. coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ได้

3.2.2 การโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 เข้าสู่ *E. coli* DH5α

3.2.2.1 การเตรียมชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอขนาด 1-5 กิโลเบส ของ *Streptomyces* sp. PC22

จากรายงานการโคลนยีนไซแลเนสใน *Streptomyces flavogrisceus* โดย Srivastava (1991) เข้าสู่ *E. coli* ซึ่งเป็น lysogen ของ lambda cI857 สามารถคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นยีนขนาด 0.8 กิโลเบส Bhalerao และคณะ (1990) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Cellulomonas* sp. สายพันธุ์ NCIM2353 พบไซแลเนสยีนขนาด 1.42 กิโลเบส Lin และคณะ (1991) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Butyrivibrio fibrisolvens* สายพันธุ์ H170 เข้าสู่ *E. coli* พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3 กิโลเบส ที่มี open-reading frame ขนาด 1905 เบส

ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงจะเลือกช่วงขนาดของชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. PC22 หลังจากการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI ขนาด 1-5 กิโลเบส ซึ่งคาดว่าจะครอบคลุมยีนไซแลเนสทั้งหมด และมีขนาดเล็กเหมาะสมที่จะนำมาเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pUC18 ที่มีขนาดเล็กเพียง 2.7 กิโลเบส

ผลการย่อยโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. PC22 แบบกึ่งสมบูรณ์ด้วย *Sau*3 AI ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 2.11.1 ดังแสดงในรูปที่ 3.3 พบว่าช่องที่ 7 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอและเอนไซม์คือ ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 1.8795 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 0.3125 หน่วย เป็นการย่อยที่ให้ชิ้นส่วนขนาด 1-5 กิโลเบสได้สูงสุด

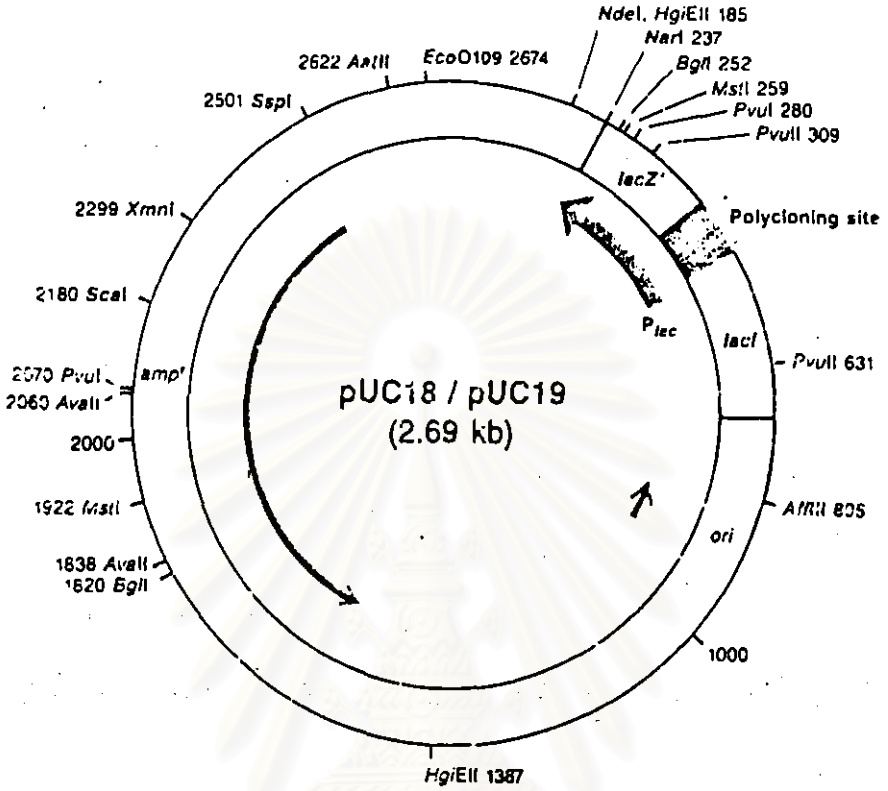
จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น จึงนำอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และดีเอ็นเอที่เหมาะสมนี้ไปเตรียมชิ้นส่วนขนาด 1-5 กิโลเบสปริมาณมาก

3.2.2.2 การตัดพลาสมิดพาหะ pUC18 และการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

นำพลาสมิด pUC18 ซึ่งแสดงแผนที่เรสทริกชันในรูปที่ 3.14 มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 2.11.2 หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายด้วย Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) แล้วนำมาทดสอบการเชื่อมตัวเองด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase พบว่าไม่สามารถเชื่อมตัวเองได้ ตามรูปที่ 3.15 ช่องที่ 3 โดยพลาสมิดยังคงอยู่ในรูปเส้น (linear form)

เมื่อเชื่อมชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอขนาด 1-5 กิโลเบสกับพลาสมิดพาหะ pUC18 ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีขนาดประมาณ 4-20 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 3.15 ช่องที่ 5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



Polycloning Sites

pUC18

	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	7	8
	Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Gly	Asp	Pro	Leu	Glu	Ser	Thr	Cys	Arg	His	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	AAT	TCG	AGC	TCG	GTA	CCC	GGG	GAT	CCT	CTA	GAG	TCG	ACC	TGC	AGG	CAT	GCA	AGC	TTG	GCA	CTG	GCC

EcoRI *SacI* *KpnI* *SmaI* *XmaI* *SamHI* *XbaI* *SalI* *AccI* *HincII* *PstI* *SphI* *HindIII*

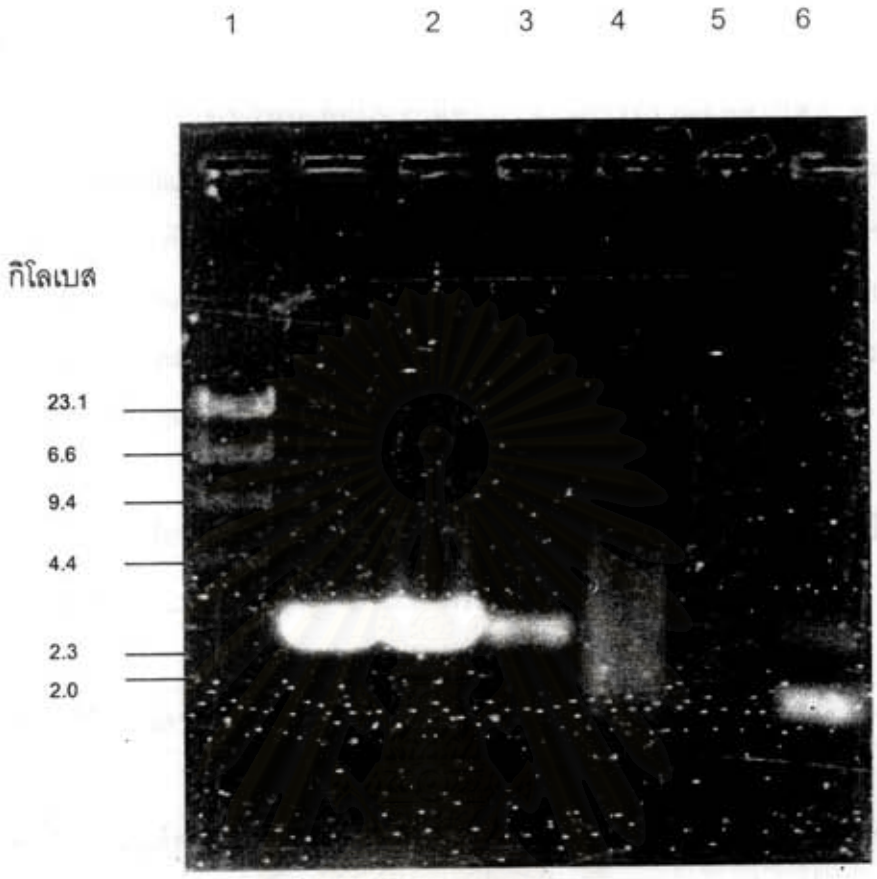
pUC19

	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	5	6	7	8
	Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Leu	His	Ala	Cys	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Asp	Pro	Arg	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Ser	Leu	Ala
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	CAT	GCC	TGC	AGG	TCG	ACT	CTA	GAG	GAT	CCC	CGG	GTA	CCG	AGC	TCG	AAT	TCA	CTG	GCC

HindIII *SphI* *PstI* *SalI* *AccI* *HincII* *XbaI* *BamHI* *SmaI* *XmaI* *KpnI* *SacI* *EcoRI*

In pUC18, the *EcoRI* site lies immediately downstream from P_{lac}.
In pUC19, the *HindIII* site lies immediately downstream from P_{lac}.

รูปที่ 3.14 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC18 (Maniatis, *et al.*, 1982)



รูปที่ 3.15 ภาพแสดงการตัดพลาสมิด pUC18 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI แล้วทดสอบการเชื่อมกันด้วยตัวเอง (self ligation) หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตและแสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมด้วย T4 DNA ligase บนอะกาโรสเจล

ช่องที่ 1 λDNA/*Hin*dIII

2 พลาสมิด pUC18 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI และ CIAP

3 พลาสมิด pUC18 เชื่อมตัวเองด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase

4 ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. PC22 ขนาด 1-5 กิโลเบส

5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดระหว่าง pUC18 จากช่องที่ 3 กับชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ช่องที่ 5

6 พลาสมิด pUC18

3.2.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มพลาสมิด pUC18 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α โดยวิธีอิเลคโทรพอเรชัน

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะคือ pUC18 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2.2 เข้าสู่ *E. coli* DH5α โดยวิธีอิเลคโทรพอเรชัน ดังผลการทดลองในตารางที่ 3.6 พบว่า ประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มด้วย รีคอมบิแนนท์พลาสมิดต่ำกว่าการทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดพาหะประมาณ 40 เท่า อย่างไรก็ตามจำนวนทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ ก็น่าจะสูงพอที่จะคัดเลือกโคลนที่ได้รับยีนที่ต้องการได้

ตารางที่ 3.6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มพลาสมิด pUC18 กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างจาก pUC18 เข้าสู่ *E. coli* DH5α โดยวิธีอิเลคโทรพอเรชัน

ชนิดของพลาสมิด	จำนวนทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ
pUC18	1.5×10^7
รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะ	4×10^5

3.2.4 การแสดงออกของไซแลเนสยีนในโคลนของ *E. coli* DH5α

จากการคัดเลือกโคลนที่ให้วงใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LA ที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ โดยวิธีราดด้วย Congo red ตามวิธีที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.13.1.2 ดังรูปที่ 3.16 ได้ 1 โคลน ให้ชื่อว่าโคลน E-8 ซึ่งนำมาทดสอบแอคติวิตีของไซแลเนสซ้ำบนอาหารแข็ง ดังแสดงในรูปที่ 3.17 จากนั้นนำโคลน E-8 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ แล้วตรวจวิเคราะห์แอคติวิตีจำเพาะของไซแลเนสเปรียบเทียบกับเซลล์เจ้าบ้าน ผลการทดลองในตารางที่ 3.7 พบว่าโคลน E-8 มีแอคติวิตีจำเพาะของไซแลเนสเท่ากับ 0.25 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ขณะที่ *E. coli* DH5α/ pUC18 มีแอคติวิตีจำเพาะของไซแลเนส 0.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้พบว่าโคลน E-8 มีแอคติวิตีจำเพาะของไซแลเนสสูงกว่าเซลล์เจ้าบ้านประมาณ 3 เท่า

3.2.5 การตรวจวิเคราะห์รีคอมบิแนนทพลาสมิดจากโคลน E-8

ได้ทำการสกัดแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลน E-8 และให้ชื่อว่า pPC1 พบว่ามีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 ดังแสดงในรูปที่ 3.18

3.2.6 การวิเคราะห์ขนาดของพลาสมิด pPC1 และขนาดของดีเอ็นเอสอดแทรก

ผลการทดลองในรูปที่ 3.19 แสดงการนำพลาสมิด pPC1 มาตัด *Hind*III หรือ *Eco*RI พบว่าได้ดีเอ็นเอรูปเส้นมีขนาดเท่ากันคือ 4.6 กิโลเบส แสดงว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรก (DNA insert) ไม่มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ทั้งสองนี้ และเมื่อตัด pPC1 ด้วย *Hind*III ร่วมกับ *Eco*RI สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกออกมาได้ โดยมีขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส

ดังนั้นจากการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่า สามารถโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ได้ โดยใช้ *E.coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะ ยีนที่โคลนได้อยู่ในชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส และสามารถแสดงออกได้ใน *E.coli*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>รูปที่ 3.16</u> แสดงการคัดเลือกโคลน *E.coli* DH5α ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอพลาสมิดที่มียีนไซแลเนส เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งแล้วผ่านการอบด้วยไอคลอโรฟอร์ม แล้วราดทับด้วยไซแลน และย้อมด้วยสี Congo red

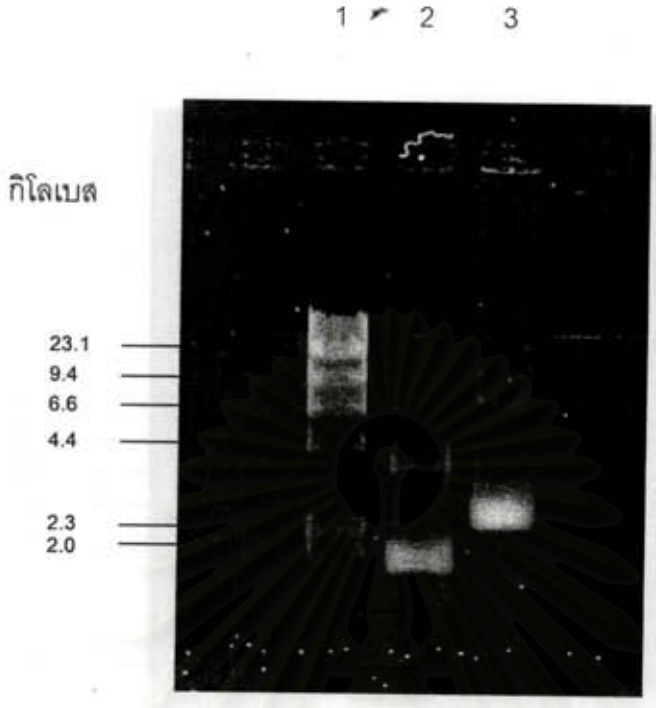
รูปที่ 3.17 แสดงไซแลเนสแอคติวิตีของโคลน E-8 ที่ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.7 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไขแลเนสจากโคลน E-8 กับ *E. coli* DH5α/pUC18 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไขแลนเป็นองค์ประกอบ โดยเขย่าแบบ rotary ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สายพันธุ์	แอคติวิตีของไขแลเนส (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
E. coli DH5α/pUC18	0.08
E-8	0.25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



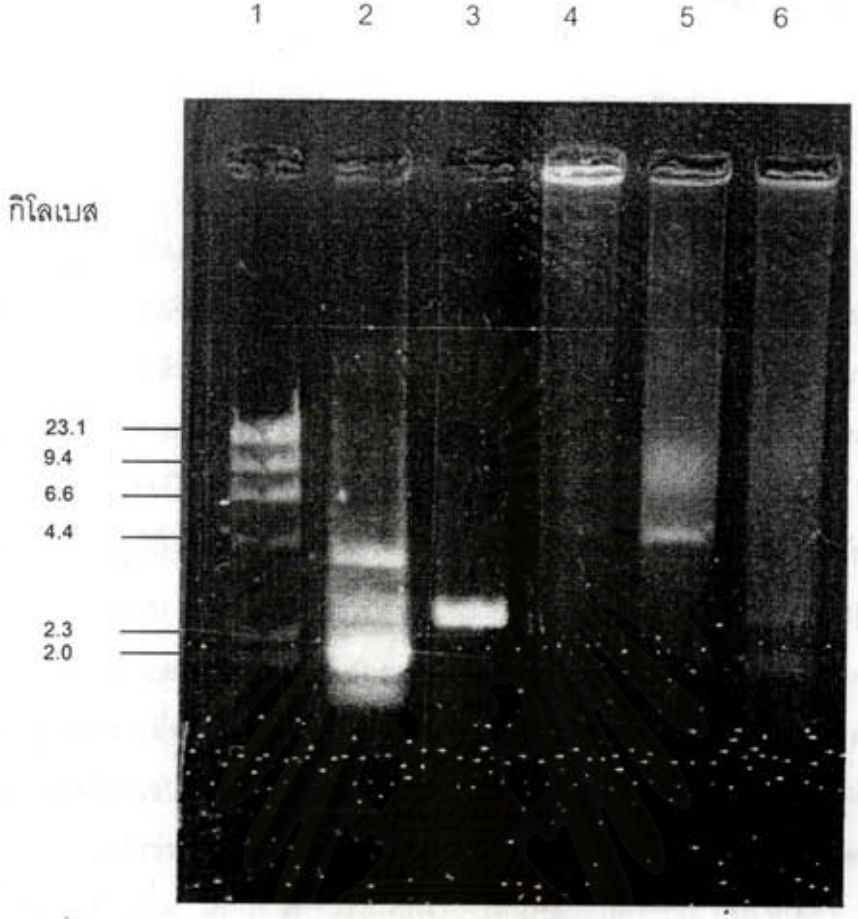
รูปที่ 3.18 ภาพแสดงขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลน E-8 เปรียบเทียบกับพลาสมิด pUC18 บนอะกาโรสเจล

ช่องที่ 1 λDNA/*Hind*III

2 พลาสมิดพาหะ pUC18

3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPC1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



<u>รูปที่ 3.19</u> ภาพแสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน (DNA insert) ในรีคอม บิแนนท์พลาสมิด pPC1 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI และ *Hind*III บนอะกาโรสเจล

ช่องที่ 1 λDNA/*Hind*III

2 พลาสมิดพาหะ pUC18

3 พลาสมิดพาหะ pUC18/BamHI

4 รีคอม บิแนนท์พลาสมิด pPC1/ *Hind*III

5 รีคอม บิแนนท์พลาสมิด pPC1/ *Eco*RI

6 รีคอม บิแนนท์พลาสมิด pPC1/ *Eco*RI และ *Hind*III