บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบปริมาณเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและเอนไซม์ไซแลเนส

Pinphanichakarn (1990) และวรางคณา อินทรเสน (2534) ได้สร้างลูกผสมระหว่าง *Streptomyces sp.*190-1 ซึ่งมีคุณสมบัติต้านยาปฏิชีวนะเททราซัยคลินและสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้สูง และ *Streptomyces sp.*42-9 ซึ่งต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และสร้างเอนไซม์ไซแลเนสได้สูง โดยวิธีการหลอมโปรโตพลาสท์หรือคอนจูเกชัน พบว่าได้ลูกผสมที่มีความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 1 การทดลองนี้จึงได้นำลูกผสมทั้งหมดมาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสอง ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าลูกผสมที่นำมาทดสอบสามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสองได้ในปริมาณแตกต่างกันไปโดยลูกผสมส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสในปริมาณที่สูงกว่า *Streptomyces sp.*42-9 และผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้สูงกว่า *Streptomyces sp.*190-1 ด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะ D_3 จะมีปริมาณเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสสูงกว่า *Streptomyces sp.*42-9 มากจนเกือบจะเท่า *Streptomyces sp.*190-1 จากนั้นในขั้นตอนต่อไปจะนำลูกผสมเหล่านี้ไปศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อและแม่

ตารางที่ 2 แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและเอนไซม์ไซแลเนสใน *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆ

สายพันธุ์,รหัสของลูกผสม	เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (หน่วยต่อน้ำหนักเซลแห้ง)	เอนไซม์ไซแลเนส (หน่วยต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ)
*Streptomyces sp.*190-1	1100	0.49
*Streptomyces sp.*42-9	300	2.97
D_3	760	1.03
21.2 Aa	421	1.63
19.1 a	414	0.88
19.1 b	536	0.94
19.2 c	403	0.69
19.3 c	557	1.55
A	290	0.75
C	475	0.64
B	405	0.91
24-13	351	1.30
24-38	335	0.98
24-39	296	1.18
24-43	375	1.35
24-45	268	1.01
24-48	447	1.09
3	290	1.37
4	484	1.19

ตารางที่ 2 (ต่อ) แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและเอนไซม์ไซแลเนสใน *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆ

สายพันธุ์,รหัสของลูกผสม	เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (หน่วยต่อน้ำหนักเซลแห้ง)	เอนไซม์ไซแลเนส (หน่วยต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ)
5	106	1.27
6	205	1.16
8	300	1.20
9	567	1.25
10	432	1.26
11	195	1.65
17	587	1.22
18	228	1.10
19	313	1.03
22	554	1.19
23	298	1.19
24	316	1.13
26	589	1.22
27	526	1.13
35	559	1.45
37	450	1.41
38	473	1.49
40	450	1.35

ในการศึกษาด้านการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอนั้นสามารถทำได้ โดยอาศัยคุณสมบัติของ เรสตริกชันเอนไซม์ที่ตัดสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่างๆกัน ซึ่งแยกออกจากกันโดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสและจะได้รูปแบบจำเพาะที่แตกต่างกันไป โดยที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่างๆ จะแยกออกจากกันได้ชัดเจนต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ คือ โครโมโซมอลดีเอ็นเอต้องมีความบริสุทธิ์ และมีความสมบูรณ์มากพอด้วย จึงจะทำให้การตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์มีประสิทธิภาพสูง เช่น ในรายงานของ Klupt และ Komor (1989) ได้รายงานว่าถึงเรสตริกชันเอนไซม์ที่ใช้มีแอคติวิตีสูง และใช้ในบริมาณที่พอเหมาะแต่การย่อยดีเอ็นเอก็ยังเป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์ นั่นแสดงถึงว่ามีการปนเปื้อนเกิดขึ้นในระหว่างการเตรียมดีเอ็นเอ ซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของเรสตริกชันเอนไซม์ เช่น การมีโปรตีนตัวอื่นๆ ฟีนอล หรือเกลือ เป็นต้น นอกจากนี้ยังรวมถึงความพอเหมาะของเรสตริกชันเอนไซม์กับโครโมโซมอลดีเอ็นเอ และสภาวะที่เหมาะสมในการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสด้วย ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงต้องนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ ความสมบูรณ์ และความเข้มข้น

2. <u>การตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ</u>

เมื่อทำการสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1, 42-9 และลูกผสมต่างๆ แล้วนำไปตรวจสอบถึงความบริสุทธ์โดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร และคำนวณจากอัตราส่วน OD_{260}/OD_{280} ดังแสดงผลในตารางที่ 3 พบว่าค่าอัตราส่วนที่ได้มีค่าใกล้เคียง 1.8 นั่นแสดงว่าโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธ์เพียงพอไม่มีโปรตีนอื่นๆ ปนเปื้อนอยู่

ส่วนความเข้มข้นนั้นคำนวณได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 3 ผลที่ได้พบว่าโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธ์และความเข้มข้นที่มากพอสำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ ความต่างศักย์คงที่ที่ 7 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 3 ชม. ตัวอย่างการวิเคราะห์

ดังแสดงในรูปที่ 1ก และ 1ข

เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 1ก และ 1ข แสดงว่าแถบดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์และสมบูรณ์มากเพราะแถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็นแถบเดียวที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลสูง และไม่ปรากฏแถบขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งอาจเกิดจากการขาดของดีเอ็นเอไปในระหว่างขั้นตอนการสกัดแยกดีเอ็นเอ ดังนั้นโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้นี้จะนำไปทำการศึกษารูปแบบเฉพาะของการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ภายหลังการทำอะการ์โรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

สายพันธุ์,รหัสของลูกผสม	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}
*Streptomyces sp.*190-1	0.399	0.225	1.77
*Streptomyces sp.*42-9	0.299	0.164	1.82
D_3	0.570	0.305	1.87
21.2Aa	0.340	0.190	1.79
19.1a	0.349	0.190	1.83
19.1b	0.188	0.100	1.88
19.2c	0.485	0.263	1.84
19.3c	0.377	0.205	1.83
A	0.114	0.060	1.90
C	0.360	0.190	1.89
B	0.306	0.165	1.85

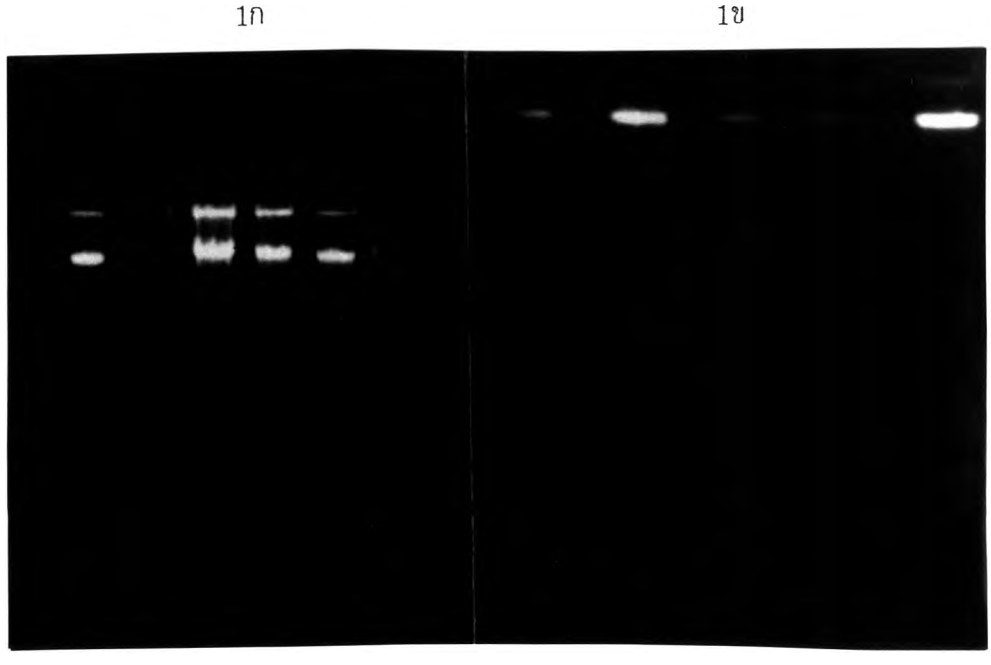
ตารางที่ 3 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

สายพันธุ์, รหัสของลูกผสม	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}
24-13	0.522	0.277	1.88
24-38	0.216	0.114	1.89
24-39	0.256	0.141	1.82
24-43	0.341	0.198	1.72
24-45	0.473	0.258	1.83
24-48	0.249	0.134	1.86
3	0.700	0.385	1.82
4	0.284	0.154	1.84
5	0.390	0.222	1.76
6	0.293	0.165	1.78
8	0.400	0.220	1.82
9	0.399	0.218	1.83
10	0.347	0.194	1.79
11	0.686	0.364	1.88
17	0.145	0.085	1.71
18	0.414	0.234	1.77
19	0.492	0.285	1.73
22	0.482	0.263	1.83
23	0.378	0.210	1.80

ตารางที่ 3 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

สายพันธุ์, รหัสของลูกผสม	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}
24	0.377	0.213	1.77
26	0.643	0.365	1.76
27	0.387	0.226	1.71
35	0.600	0.322	1.86
37	0.538	0.297	1.81
38	0.632	0.340	1.86
40	0.322	0.184	1.75

รูปที่ 1ก และ 1ข แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1, 42-9 และลูกผสมต่างๆภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ ความต่างศักย์คงที่ 7 โวลต์ ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตรเป็นเวลานาน 3 ชม.



รูปที่ 1ก ช่องที่ 1 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 21.2Aa
2 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 19-1b
3 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม D_3
4 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1
5 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

รูปที่ 1ข ช่องที่ 1 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม B
2 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม C
3 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-38
4 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม A
5 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-13

3. การหาสภาวะเหมาะสมในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตร-โฟรีซิส

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ได้ไปตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ชนิด 2 อย่างสมบูรณ์จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดที่แตกต่างกันไป และภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตร-โฟรีซิสจะได้รูปแบบเฉพาะตัวที่แตกต่างกัน โดยที่การแยกชิ้นส่วนออกจากกันได้อย่างชัดเจนต้องขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ความเข้มข้นของเรสตริกชันเอนไซม์ ความต่างศักย์และเวลาในการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ดังนั้นการทดลองต่อไปนี้จึงหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะให้ได้การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอดีที่สุด

3.1 การแปรปริมาณของเรสตริกชันเอนไซม์ที่ใช้ย่อยดีเอ็นเอ

ปริมาณของเรสตริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมกับปริมาณดีเอ็นเอก็เป็นปัจจัยที่จะทำให้การตัดของเรสตริกชันเอนไซม์สมบูรณ์ ซึ่งจะทำให้การแยกชิ้นส่วนต่างๆได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ดังนั้นจึงทดลองเพิ่มปริมาณของเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI จาก 3 เป็น 5 , 6 และ 8 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ดังรูปที่ 2 โดยทำอิเลคโตรโฟรีซิสตามสภาวะที่ดัดแปลงจากของ Hintermann และคณะ (1981)ที่ใช้กับ *Streptomyces glaucescens* คือ ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ ความต่างศักย์คงที่ 3 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 12-16 ชม. พบว่าเมื่อใช้ปริมาณเรสตริกชันเอนไซม์ 3 และ 5 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ดังรูปที่ 2 (ช่องที่ 7-10) การตัดดีเอ็นเอยังไม่สมบูรณ์มีโครโมโซมอลดีเอ็นเอเหลืออยู่สังเกตได้จาก ความสว่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเรืองแสงของเอธิเดียมโบรไมด์จะมีลักษณะเป็นแถบกว้าง การแยกออกจากกันไม่ชัดเจนแสดงว่าปริมาณเรสตริกชันเอนไซม์ที่ใช้น้อยไป แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของเรสตริกชันเอนไซม์เป็น 6 และ 8 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม พบว่าการตัดดีเอ็นเอสมบูรณ์มากขึ้นจะไม่มีชิ้นส่วนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอเหลืออยู่ ทำให้เห็นเป็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนและการแยกออกจากกันดีขึ้น ดังนั้นการเลือกปริมาณเรสตริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเอที่สุดคือ 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ช่องที่ 1 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วย เรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 8 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วย เรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 8 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วย เรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วย เรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม

6 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วย เรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 5 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม

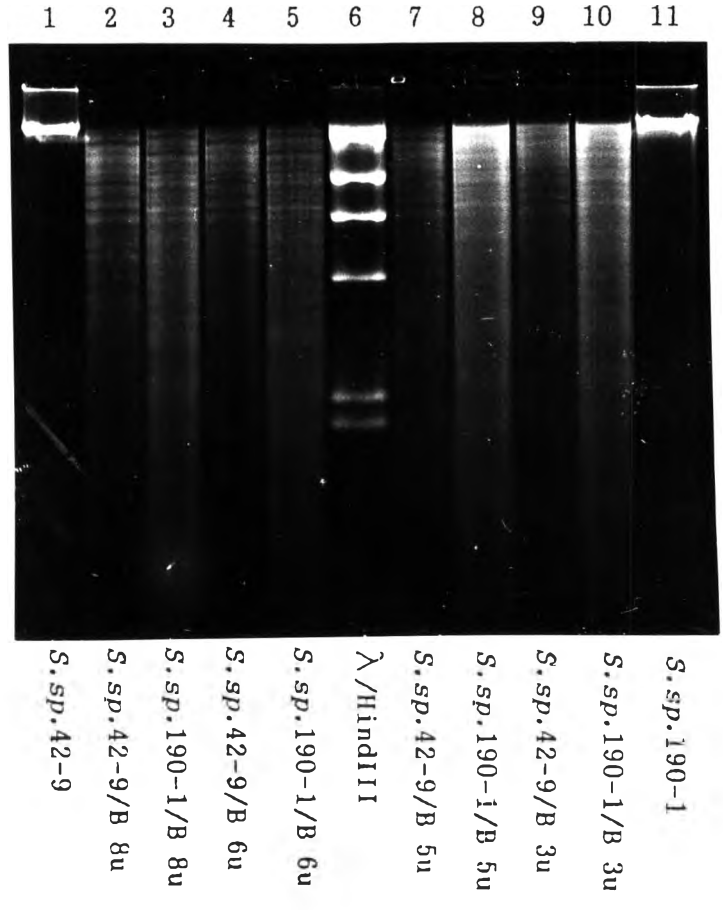
8 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วย เรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 5 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม

9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วย เรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 3 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วย เรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 3 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม

11 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 2 รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 3,5,6 และ 8 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสที่ ความต่างศักย์คงที่ 3 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 12-16 ชม. บนแผ่นอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์โดยแต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



3.2 การแปรความต่างศักย์ในการทำอิเลคโตรโฟรีซิส

เนื่องจากความต่างศักย์คงที่ที่ให้สำหรับการทำอิเลคโตรโฟรีซิสนั้น เป็นปัจจัยสำคัญต่อการแยกชิ้นส่วนขนาดต่างๆของดีเอ็นเอออกจากกัน Fangman (1978) ได้กล่าวไว้ว่า เมื่อความต่างศักย์ลดลงค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ จะลดลงด้วย และการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์จะมีผลกระทบอย่างมากในกรณีที่ดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองแปรความต่างศักย์ต่างๆ กัน คือ 5, 8, 10, 12 และ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร ที่ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ ใช้ปริมาณเรสตริกชันเอนไซม์ (BamHI) 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม และเวลาในการทำอิเลคโตรโฟรีซิสนาน 3 ชม.(ในกรณีที่มีความต่างศักย์เป็น 5,8 และ 10 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร) หรือจนกระทั่งสีติดตามเกือบตกจากแผ่นเจล (ในกรณีที่มีความต่างศักย์เป็น 12 และ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร) ดังแสดงในรูปที่ 3ก-3จ ตามลำดับ พบว่าเมื่อค่อยๆ เพิ่มความต่างศักย์ให้สูงขึ้นจาก 3 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร (รูปที่ 2) เป็น 5 หรือ 8 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตรการแยกของชิ้นส่วนยังไม่ดีมีบางชิ้นส่วนที่ยังทับกันอยู่ และเมื่อเพิ่มเป็น 10, 12 และ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร การแยกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะชัดเจนยิ่งขึ้น และค่อนข้างจะชัดเจนที่สุดสามารถบอกความแตกต่างได้ที่ความต่างศักย์ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร

ช่องที่ 1 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

3-5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

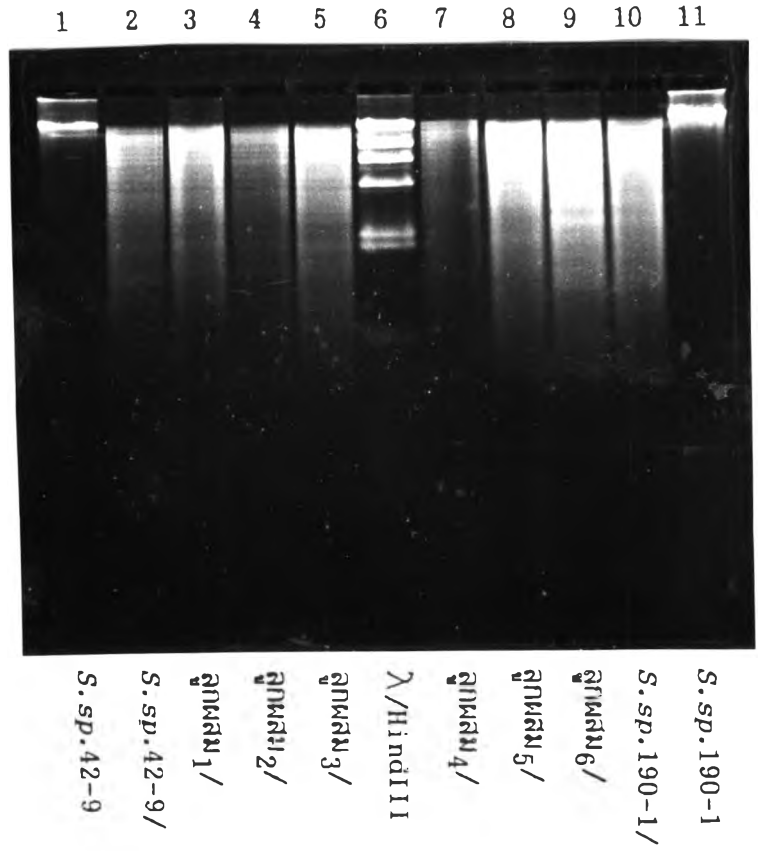
6 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

7-9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

11 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 3ก รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 5 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 3 ชม. บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



ช่องที่ 1 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

3-5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

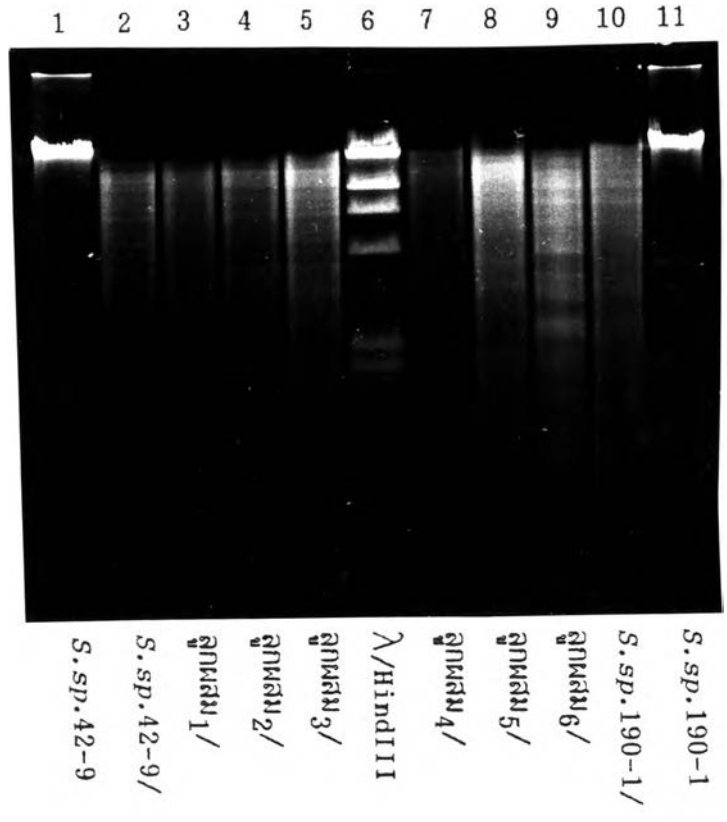
6 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

7-9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

11 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 3ข รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัมภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 3 ชม. บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



ช่องที่ 1 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

3-5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

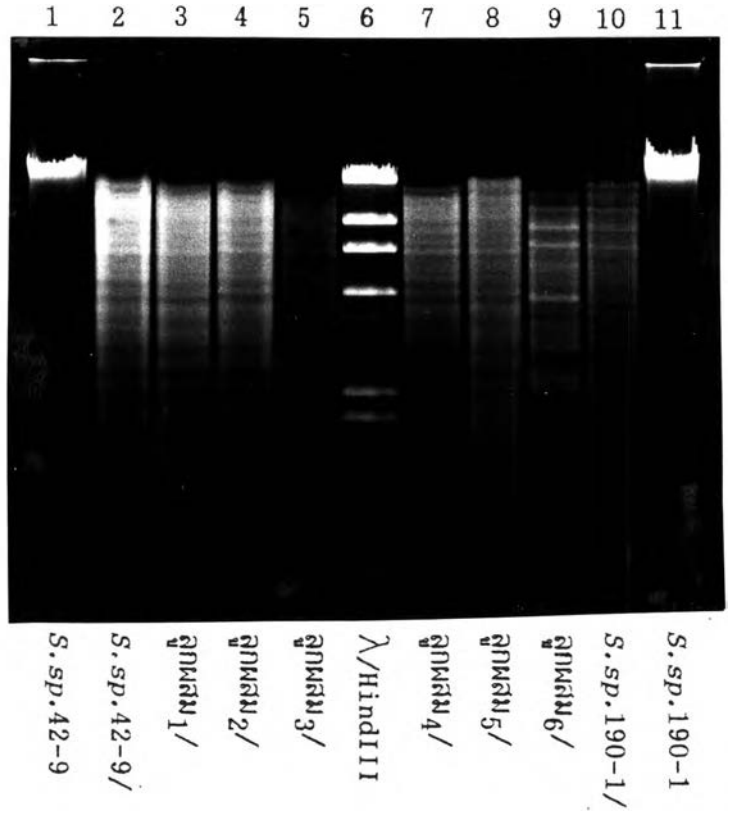
6 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

7-9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

11 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 3ค รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 10 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 3 ชม.บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



ช่องที่ 1 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

3-5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

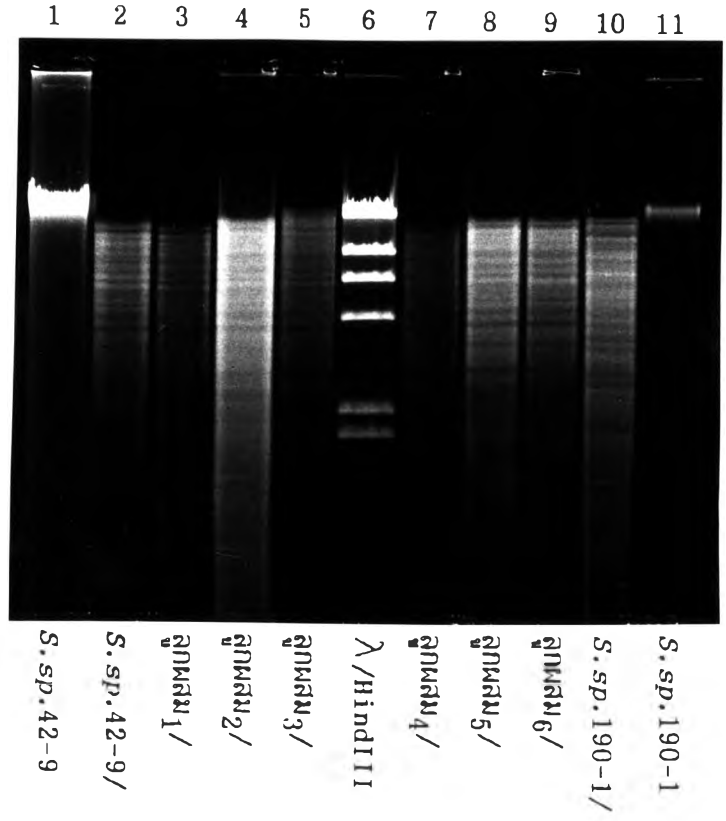
6 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

7-9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

11 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 3ง รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 12 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตรเป็นเวลานาน 1ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



ช่องที่ 1 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

3-5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

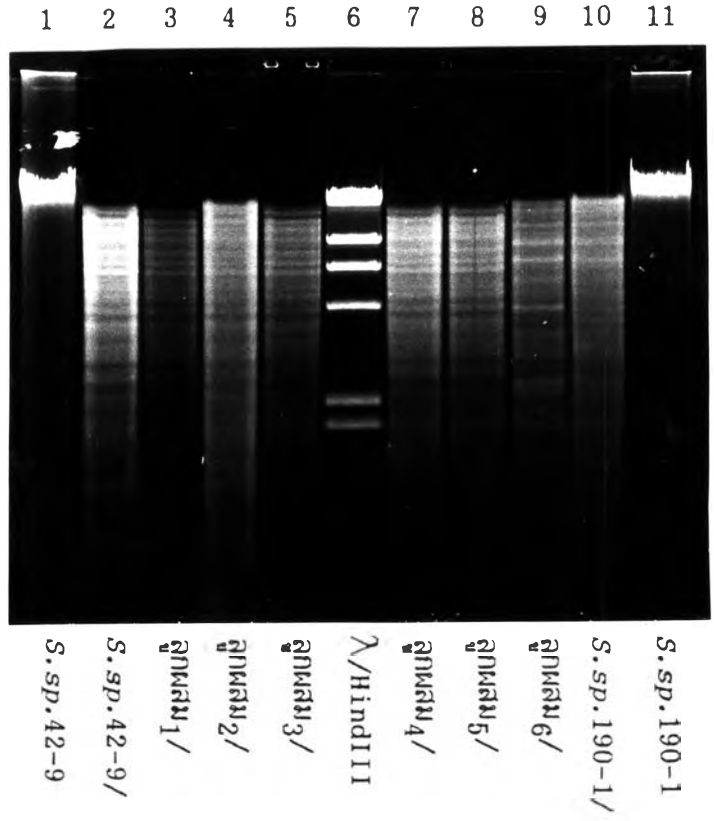
6 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

7-9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

11 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 3จ รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



จากรายงานของ McDonell, Simon และ Studier (1977) กล่าวไว้ว่า การที่จะแยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่ มักใช้ความต่างศักย์และความเข้มข้นเจลต่ำๆ ซึ่งจากการทดลองที่ผ่านมาข้างต้นใช้ความเข้มข้นเจล 0.7 เปอร์เซนต์ และแปรความต่างศักย์ตั้งแต่ 5-14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร ดังนั้นจึงได้ทดลองลดความเข้มข้นเจลเหลือ 0.4 เปอร์เซนต์และลดความต่างศักย์เหลือ 2 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร แต่เนื่องจากต้องใช้เวลาในการทดลองนานมาก Fangman (1978) ได้รายงานไว้ว่า การเปลี่ยนระดับความต่างศักย์จะทำให้การแยกออกจากกันของชิ้นส่วนดีเอ็นเอชัดเจน และใช้เวลาในการทำอิเลคโตรโฟรีซิสสั้นลงด้วย ในการทดลองนี้จึงทดลองใช้การเปลี่ยนระดับความต่างศักย์ คือ เริ่มทำอิเลคโตรโฟรีซิสที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 1 ชม.แล้วปรับความต่างศักย์ลงเหลือ 2 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 11 ชม. ดังแสดงในรูปที่ 3ฉ พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นเจลและความต่างศักย์ต่ำแต่เวลาในการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสนาน จะทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กเคลื่อนหลุดออกไปจากแผ่นเจลแต่ทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่แยกออกจากกันได้มากขึ้น แต่จะเห็นได้ว่าความคมชัดของแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเท่าเมื่อใช้ความต่างศักย์สูง (14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร ดังรูปที่ 3จ) แต่อย่างไรก็ตามจากการสังเกตด้วยตาการทดลองนี้ยังไม่ได้ทำให้เห็นความแตกต่างที่เด่นชัดของรูปแบบเฉพาะตัวของลูกผสม โดยยังคงมีลักษณะคล้ายคลึงกับรูปแบบเฉพาะตัวของ *Streptomyces sp.*42-9 ดังนั้นในการทดลองต่อๆ ไปจึงจะเลือกใช้ความเข้มข้นเจล 0.7 เปอร์เซนต์ ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชม.45 นาที เพราะใช้เวลาสั้นและให้แถบของดีเอ็นเอชัดกว่าด้วย

เมื่อเขียนกราฟระหว่างค่าลอการิทึมของขนาดดีเอ็นเอ (กิโลเบส) กับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของชิ้นส่วน λ ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย HindIII ตั้งแต่ขนาด 4.4-23.1 กิโลเบส ที่สภาวะต่างๆ กัน ดังนี้ ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ และความต่างศักย์ 5, 8, 10, 12, และ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร จากรูปที่ 3ก-3จ ตามลำดับ และความเข้มข้นอะกาโรสเจล 0.4 เปอร์เซนต์ ความต่างศักย์ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 1 ชม. และต่อด้วย 2 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 11 ชม. จากรูปที่ 3ฉ ดังแสดงในรูปกราฟที่ 3ช เมื่อพิจารณาจาก

กราฟของสภาวะความเข้มข้นเจล 0.7 เปอร์เซนต์ ความต่างศักย์ 5-8 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร พบว่าค่าลอการิทึมของขนาดดีเอ็นเอกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ไม่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงแต่ที่ความต่างศักย์ 10-14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตรนั้นจะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ในช่วงขนาดดีเอ็นเอ 4.4-9.4 กิโลเบส ส่วนในช่วงขนาดดีเอ็นเอ 9.4-23.1 กิโลเบส รูปกราฟที่ได้จะโค้งขึ้นในทุกสภาวะ แต่จะโค้งขึ้นน้อยที่สุดที่สภาวะความต่างศักย์ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร และเมื่อพิจารณาจากสภาวะความเข้มข้นเจล 0.4 เปอร์เซนต์ ความต่างศักย์ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 1 ชม. และต่อด้วย 2 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 11 ชม. กราฟจะเป็นเส้นตรงในช่วง 6.6-23.1 กิโลเบส แสดงว่าสามารถจะแยกขนาดดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนดีที่สุดในช่วงดังกล่าว แต่จากการทดลองนี้ต้องการแยกขนาดดีเอ็นเอ ในช่วง 4.4-23.1 กิโลเบส และภาพที่ได้มีความคมชัดมากที่สุด ใช้เวลาสั้นที่สุด จึงเลือกใช้สภาวะที่ความเข้มข้นเจล 0.7 เปอร์เซนต์ ความต่างศักย์ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เพราะเมื่อเปรียบเทียบจากรูปที่ 3จ กับ 3ฉ แล้วพบว่ารูปที่ 3จ จะให้ภาพที่มีความคมชัดมากกว่ารูปที่ 3ฉ และใช้เวลาเพียง 1ชม.45 นาที เท่านั้น ถึงแม้ว่าเส้นกราฟในรูปที่ 3ช ที่ช่วงขนาดดีเอ็นเอ 9.4-23.1 กิโลเบส จะโค้งขึ้นเล็กน้อย แต่ยังสามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากกันได้อย่างชัดเจน

3.3 การแปรเวลาที่ใช้ในการทำอิเลคโตรโฟรีซิส

การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เวลาในการทำอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร ให้นานขึ้นอาจจะทำให้การแยกดีเอ็นเอดียิ่งขึ้นโดยที่ชิ้นส่วนขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ห่างออกจากกันมากขึ้น ดังนั้นจึงได้ทดลองแปรเวลาที่ใช้ในการทำอิเลคโตรโฟรีซิส คือ จาก 1 ชม.45 นาที (รูป 3จ) เพิ่มเป็น 2 ชม.45 นาที ดังรูปที่ 4 จะสังเกตเห็นว่าถึงแม้จะเพิ่มเวลานานขึ้นจนชิ้นส่วนขนาดเล็กหลุดออกไปนอกแผ่นเจลแล้วแต่ชิ้นส่วนขนาดใหญ่ยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจนเมื่อเทียบกับการใช้ระยะเวลาสั้น ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำอิเลคโตรโฟรีซิส คือ 1 ชม.45 นาที

ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

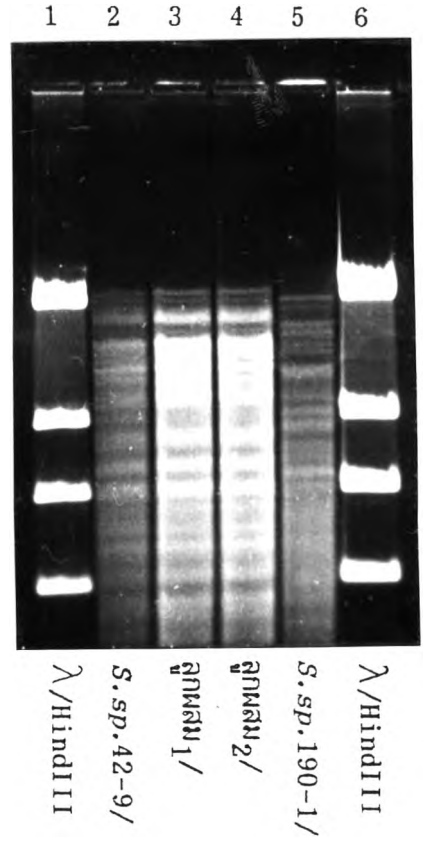
3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

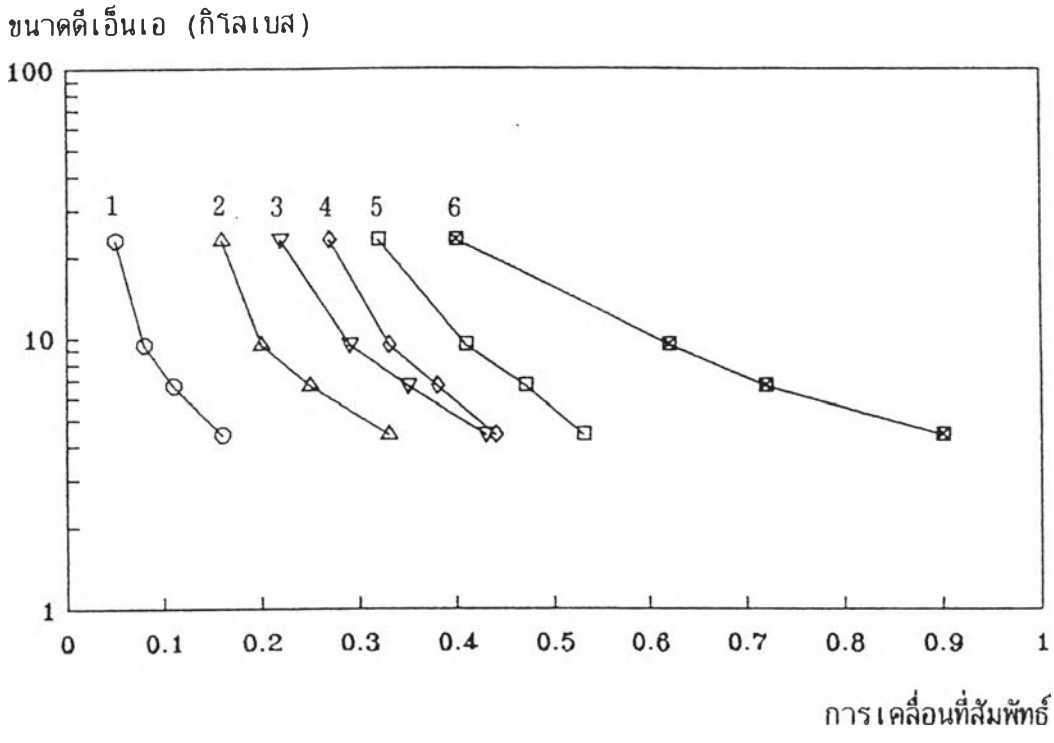
4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

6 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

รูปที่ 3ฉ รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 ชม.และต่อด้วย 2 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 11 ชม. บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย





5 โวลต์/ซม.เจล	12 โวลต์/ซม.เจล
8 โวลต์/ซม.เจล	14 โวลต์/ซม.เจล
10 โวลต์/ซม.เจล	2 โวลต์/ซม.เจล

รูป 3ช ผลของความต่างศักย์ที่มีการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วน λ ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย HindIII อิเลคโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ (จากรูป 3ก - 3จ, กราฟเส้นที่ 1-5) และ 0.4 เปอร์เซนต์ (จากรูป 3ฉ ,กราฟเส้นที่ 6)

ช่องที่ 1 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

3-5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

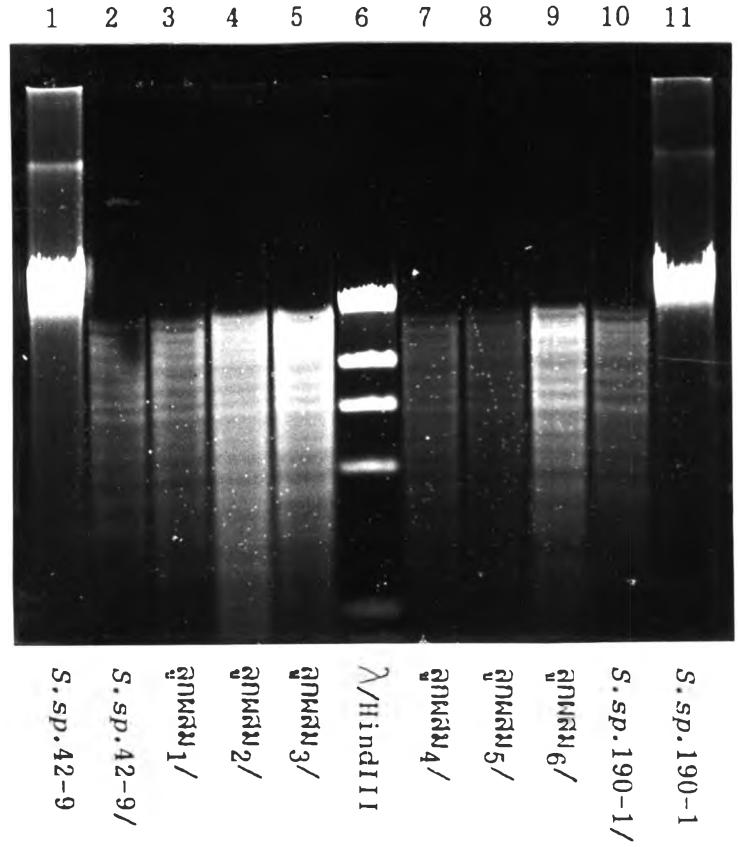
6 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

7-9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสมที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

11 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 4 รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 2 ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



3.4 การแบ่งชนิดของเรสตริกชันเอนไซม์

จากการทดลองของสมพร ต้นสกุล (2534) พบว่าเรสตริกชันเอนไซม์ 4 ชนิด ที่เหมาะสมในการตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ของ *Streptomyces spp.* ส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบเรียงตามลำดับ คือ PstI,BamHI,BglII และ EcoRI ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้เรสตริกชันเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดนี้ในการตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1, 42-9 และดีเอ็นเอของลูกผสมต่างๆ โดยใช้สภาวะการทำอิเลคโตรโฟรีซิสที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 1 ชม.45 นาที และปริมาณเรสตริกชันเอนไซม์ที่ใช้คือ 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ดังรูปที่ 5ก-5ง ตามลำดับ พบว่าการใช้ BamHI ในการตัดดีเอ็นเอจะให้รูปแบบเฉพาะตัวที่แยกออกจากกันได้ชัดเจน และสามารถตัดดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์ที่สุด ส่วนเมื่อใช้ PstI พบว่าจะมี *Streptomyces sp.*190-1 และ D_3 ที่ไม่สามารถถูกตัดได้อย่างสมบูรณ์โดยยังมีบางส่วนที่ไม่ถูกตัดเหลืออยู่ เมื่อทำอิเลคโตรโฟรีซิสจะเคลื่อนที่มาทับกันอยู่ที่ตำแหน่ง 23.1 กิโลเบส และเมื่อใช้ BglII และ EcoRI พบว่าไม่สามารถตัดสายดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์มีส่วนที่ไม่ถูกตัดเหลืออยู่เช่นเดียวกัน ดังนั้นในการตรวจสอบดีเอ็นเอของลูกผสมระหว่าง *Streptomyces sp.*190-1 และ 42-9 จะเลือกใช้เฉพาะ BamHI ในการตัดสายโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

2 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-13 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-38 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

6 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-39 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-43 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

8 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-45 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

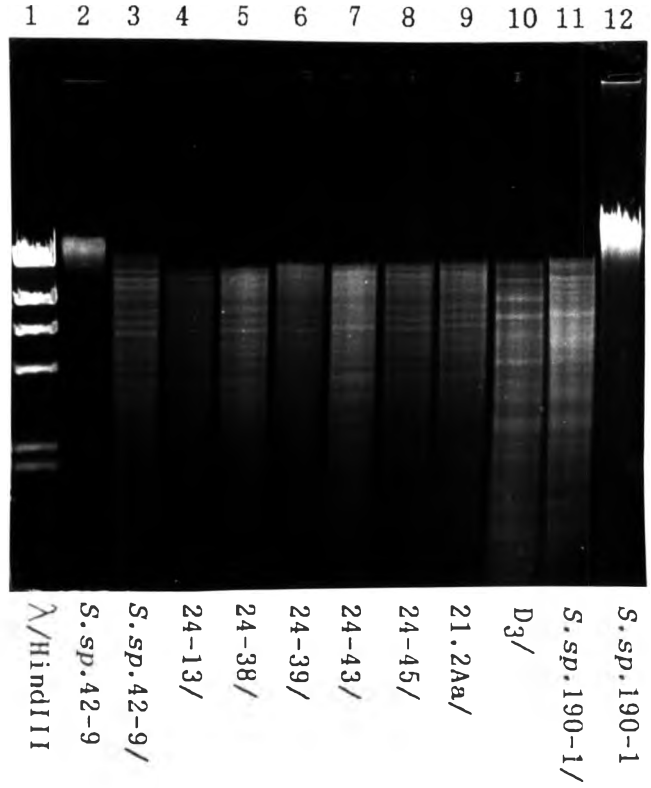
9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 21.2Aa ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม D_3 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

11 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

12 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 5ก รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

2 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-13 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-38 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI

6 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-39 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI

7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-43 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI

8 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-45 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI

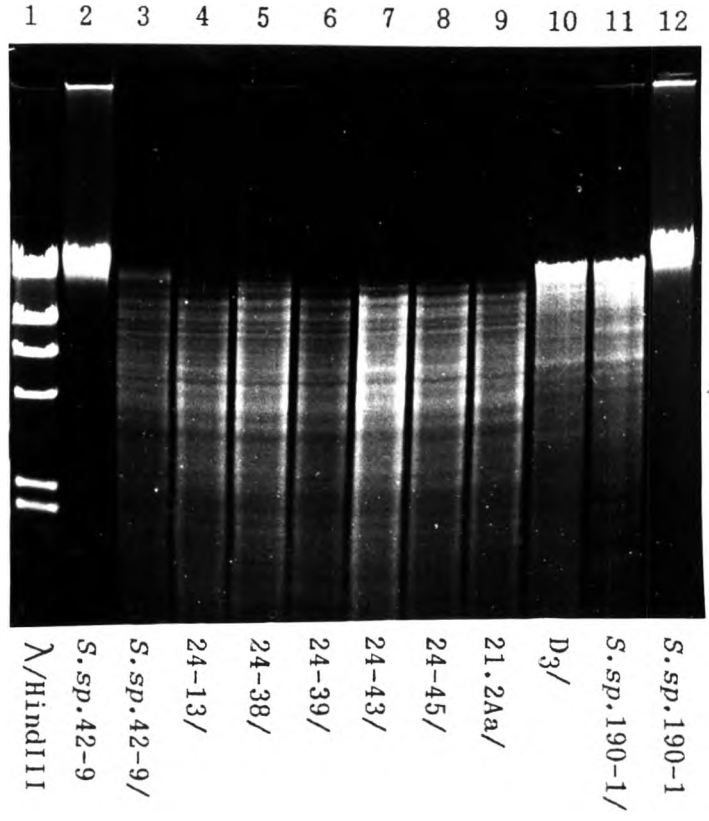
9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 21.2Aa ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม D_3 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI

11 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI

12 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 5ข รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

2 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-13 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-38 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI

6 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-39 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI

7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-43 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI

8 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-45 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI

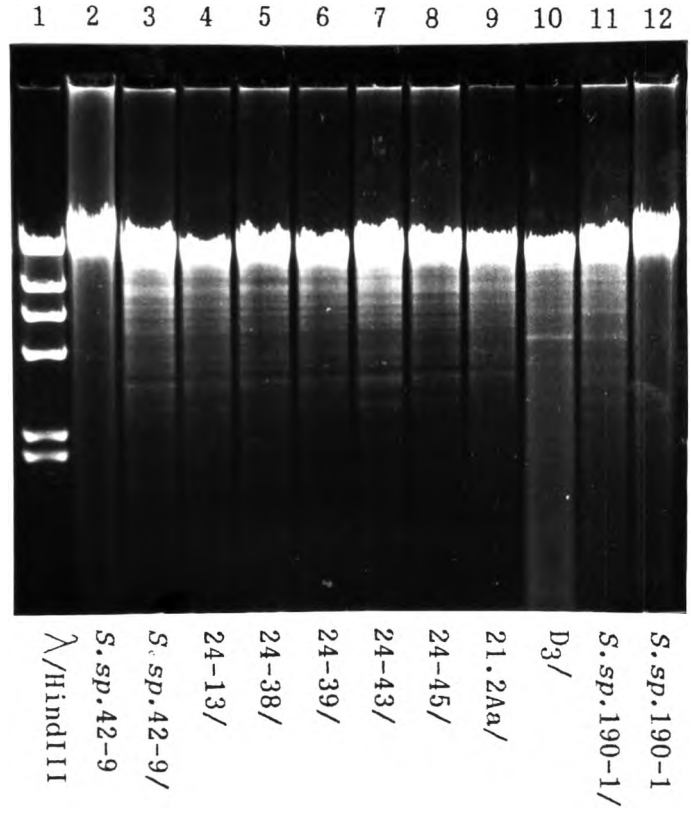
9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 21.2Aa ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม D_3 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI

11 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI

12 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 5ค รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

2 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BglII

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-13 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BglII

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-38 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BglII

6 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-39 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BglII

7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-43 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BglII

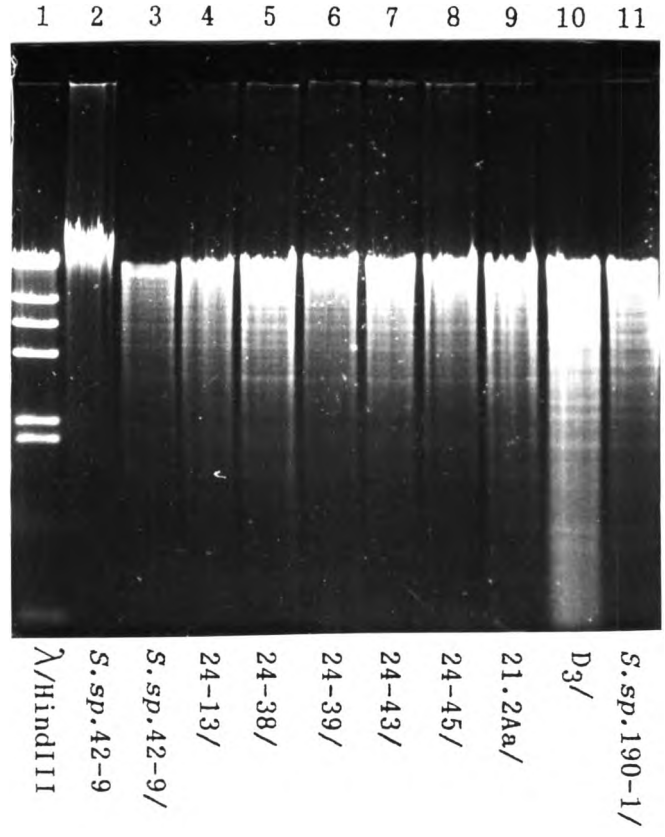
8 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-45 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BglII

9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 21.2Aa ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BglII

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม D_3 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BglII

11 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BglII

รูปที่ 5ง รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BglII 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



4. การวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากลูกผสมโดยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

จากผลการทดลองที่ได้จากหัวข้อที่ 3 จะได้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีการทำอะกาโรสอิเลคโตรโฟรีซิส คือ ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร นาน 1 ชม.45 นาที เรสตริกชันเอนไซม์ที่ใช้คือ BamHI ในปริมาณ 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม การทดลองนี้จึงนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาใช้วิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมต่างๆ (ตารางที่ 1) ดังรูป 6ก-6จ ตามลำดับ พบว่ารูปแบบเฉพาะของลูกผสมต่างๆค่อนข้างจะเหมือนกับรูปแบบเฉพาะตัวของ *Streptomyces sp.*42-9 แต่จะมีรูปแบบเฉพาะของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสม D_3 (ดังรูป 6ค ช่องที่ 9)ที่แสดงรูปแบบการเรียงตัวของดีเอ็นเอที่แตกต่างออกไปอย่างชัดเจนจาก *Streptomyces sp.*190-1 และ 42-9

ดังนั้นจึงแยกเฉพาะลูกผสม D_3 มาทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส โดยเปรียบเทียบกับรูปแแบบการเรียงตัวของดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 และ 42-9 เพื่อการยืนยันให้แน่ชัดว่ามีรูปแบบที่แตกต่างออกไป (ดังรูปที่ 6ฉ) ซึ่งจะมีแถบที่เด่นชัดขึ้นมาอยู่ที่ขนาดประมาณ 12.5, 9.4, 7.4, 5.6, 4.4, 2.3, 2.0 กิโลเบส

ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

2 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 3 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 4 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

6 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 5 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 6 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

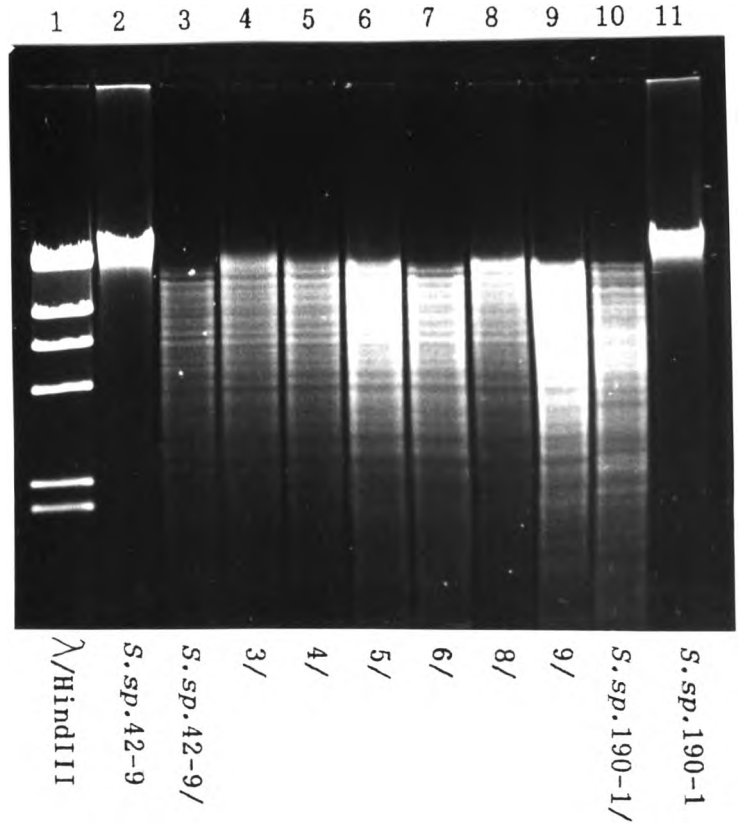
8 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 8 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

11 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 6ก รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

2 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 11 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 17 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

6 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 18 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 19 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

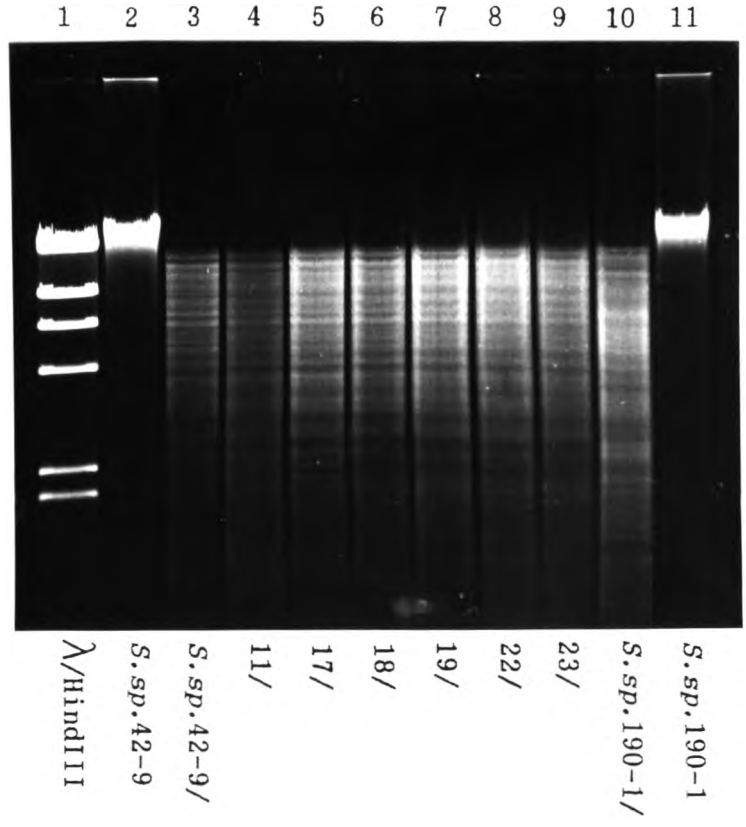
8 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 22 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 23 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

11 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 6ข รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



ช่องที่ 1 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 10 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 27 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

6 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 35 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

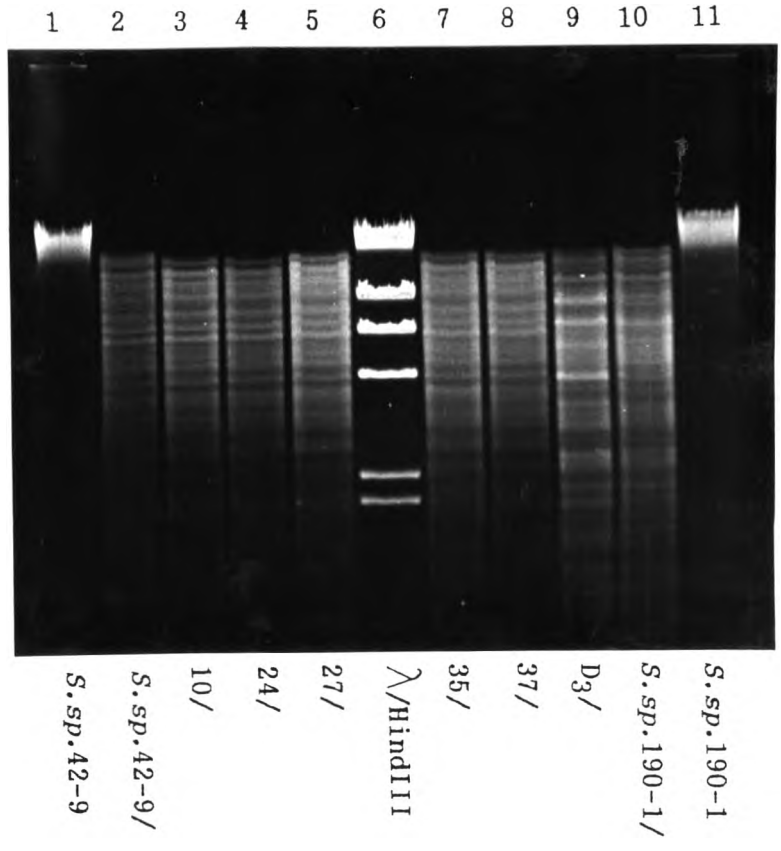
8 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 37 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม D_3 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

11 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 6ค รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



ช่องที่ 1 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 19.1a ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 19.1b ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 19.2c ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

6 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 19.3c ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

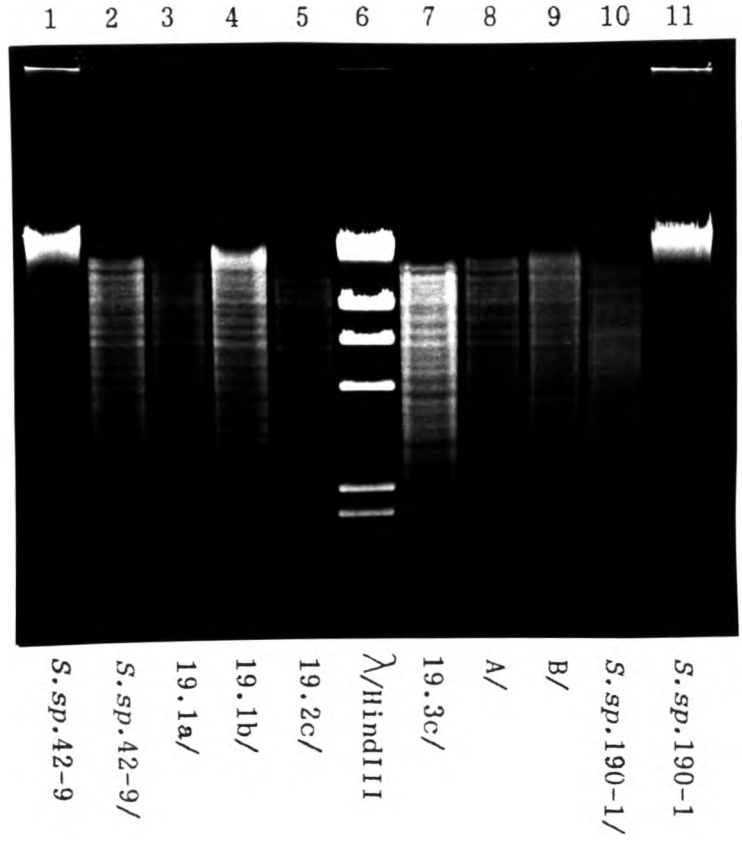
8 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม A ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม B ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

10 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

11 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1

รูปที่ 6ง รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



ช่องที่ 1 แถบโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 24-48 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 26 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 40 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

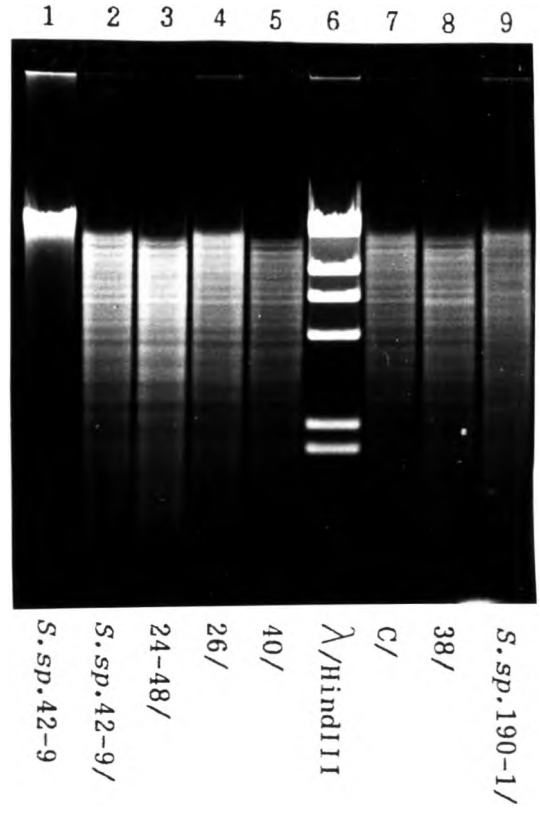
6 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม C ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

8 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม 38 ที่ตัดด้วยเรสตริกชัน

9 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

รูปที่ 6จ รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม D_3 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม D_3 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

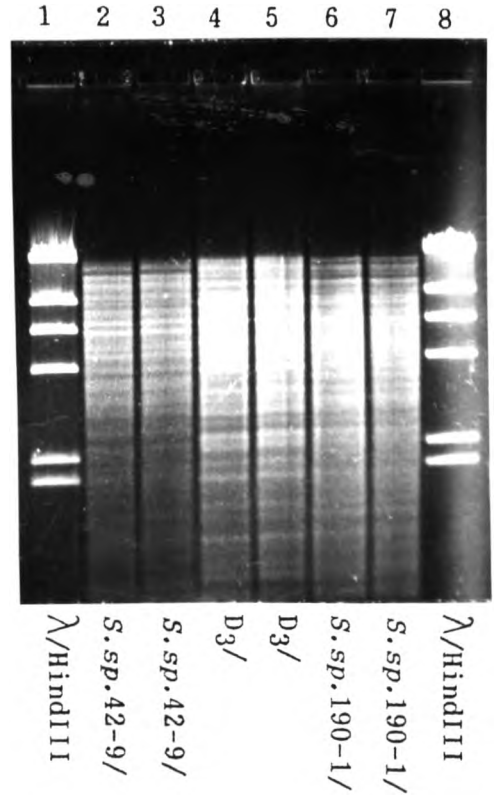
6 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI

8 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

วพ
เลขหมู่ ๒๓๕
เลขทะเบียน 1213
วันเดือนปี 3 ก.ค. 2535

รูปที่ 6ฉ รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสม D_3 ที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ BamHI 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



5. การย่อยโครโมโซมอลดีเอ็นเอด้วยเรสตริกชันเอนไซม์พร้อมกัน 2 ชนิด

การย่อยดีเอ็นเอด้วยเรสตริกชันเอนไซม์พร้อมกัน 2 ชนิด จะทำให้ได้ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแตกต่างจากการย่อยด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ชนิดเดียว ดังนั้นเพื่อการยืนยันว่าลูกผสม D_3 มีรูปแบบการเรียงตัวดีเอ็นเอที่แตกต่างกันชัดเจนออกไปจาก *Streptomyces sp.*190-1 และ 42-9 จึงนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ D_3 มาตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกัน คือ PstI ร่วมกับ BamHI และ EcoRI ร่วมกับ BamHI ดังแสดงในรูป 7ก และ 7ข ตามลำดับ ซึ่งก็พบว่ารูปแบบของ D_3 จะแตกต่างจาก *Streptomyces sp.*190-1 และ 42-9 อย่างชัดเจนทั้งการตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกัน 2 ชนิด จากรูปแบบเฉพาะของลูกผสมตัวอื่นๆ พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกันมากไม่มีแถบใดๆ ที่เด่นชัด

ดังนั้นในการแปลผลจึงต้องอาศัยการอ่านความเข้มของแถบดีเอ็นเอ ดังการทดลองต่อไป

ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI และ BamHI

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI และ BamHI

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม D_3 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI และ BamHI

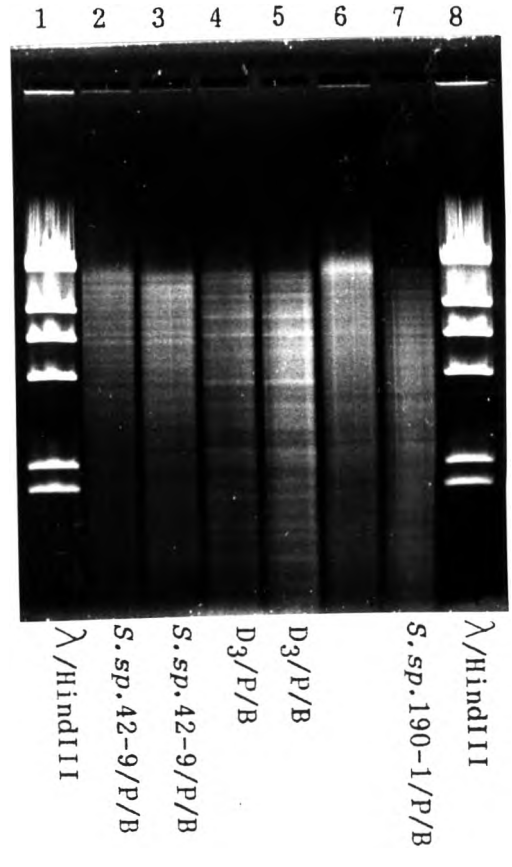
5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม D_3 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI และ BamHI

6 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดไม่สมบูรณ์

7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI และ BamHI

8 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

รูปที่ 7ก รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสม D_3 ที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ PstI ร่วมกับ BamHI โดยที่แต่ละชนิดมีปริมาณ 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 ชม.45 นาทีบนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม
รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI และ BamHI

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI และ BamHI

4 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม D_3 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI และ BamHI

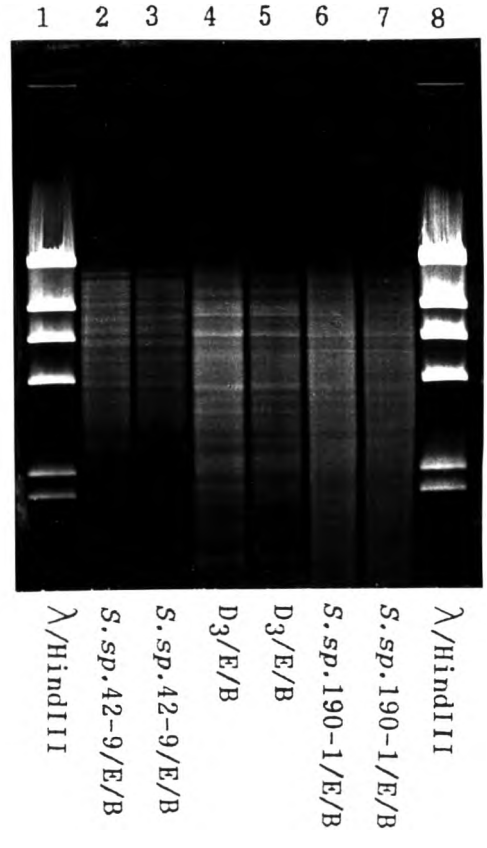
5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของลูกผสม D_3 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI และ BamHI

6 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI และ BamHI

7 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1 ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI และ BamHI

8 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ HindIII

รูปที่ 7ข รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสม D_3 ที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI ร่วมกับ BamHI โดยที่แต่ละชนิดมีปริมาณ 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอหนึ่งไมโครกรัม ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์คงที่ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 1 ชม.45 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้ด้านซ้าย



6. การวิเคราะห์ผลของรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

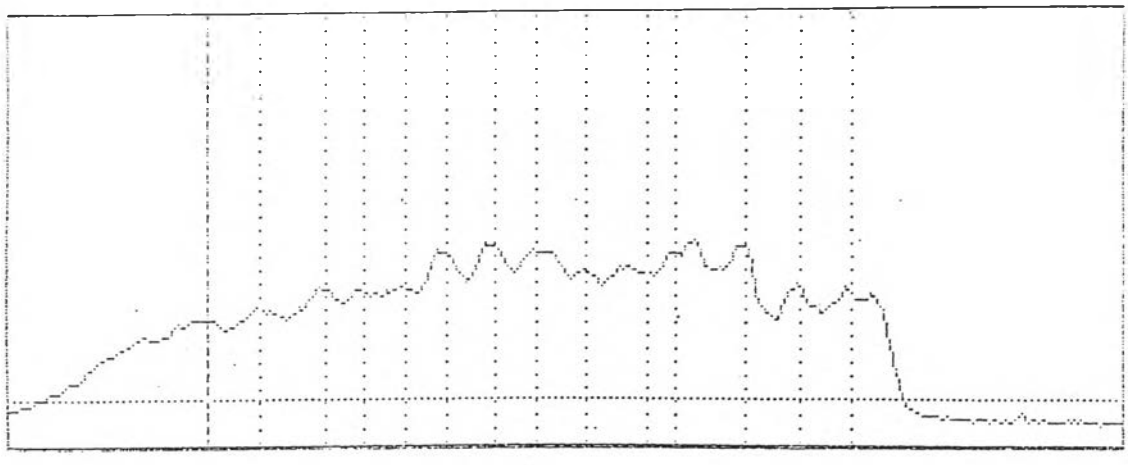
การวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอเมื่อดูจากรูปถ่ายโดยตรงด้วยตาอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อน ไม่แม่นยำ หรือไม่สามารถบอกความแตกต่างได้ Innocenti และคณะ (1990) รายงานการวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบของดีเอ็นเอของสายพันธุ์ต่างๆ ของ *Zymomonas* โดยใช้การนำแผ่นฟิล์มที่ได้จากการถ่ายรูปไปอ่านค่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอจากเครื่องอ่านความเข้มซึ่งเป็นวิธีง่ายและจำแนกสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันได้ และเนื่องจากการแปลผลรูปแบบการเรียงตัวของดีเอ็นเอของลูกผสมทั้งหมดที่นำมาศึกษา จากตารางที่ 1 โดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอจากรูปถ่ายที่ได้โดยตรงนั้นไม่สามารถบอกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน เพราะไม่มีแถบที่แตกต่างอย่างเด่นชัดเช่นของ D_3 ดังนั้นการวิเคราะห์ผลที่ได้จากลูกผสมเหล่านั้นต้องอาศัยการอ่านความเข้มของแถบดีเอ็นเอจากเครื่องอ่านความเข้ม จึงจะทำให้ได้ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่แน่นอนขึ้น ดังแสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ในรูปที่ 8 และเมื่อนำมาคำนวณโดยอาศัยตำแหน่งแถบที่ได้ในแต่ละรูปแบบของดีเอ็นเอโดยเทียบกับตำแหน่งแถบของ *Streptomyces sp.*190-1 และ 42-9 เป็นค่าสัมประสิทธิ์ของความเหมือน S_D (Disc similarity coefficient)

ดังสูตร S_D = สองเท่าของจำนวนแถบที่เหมือน/จำนวนแถบทั้งหมด

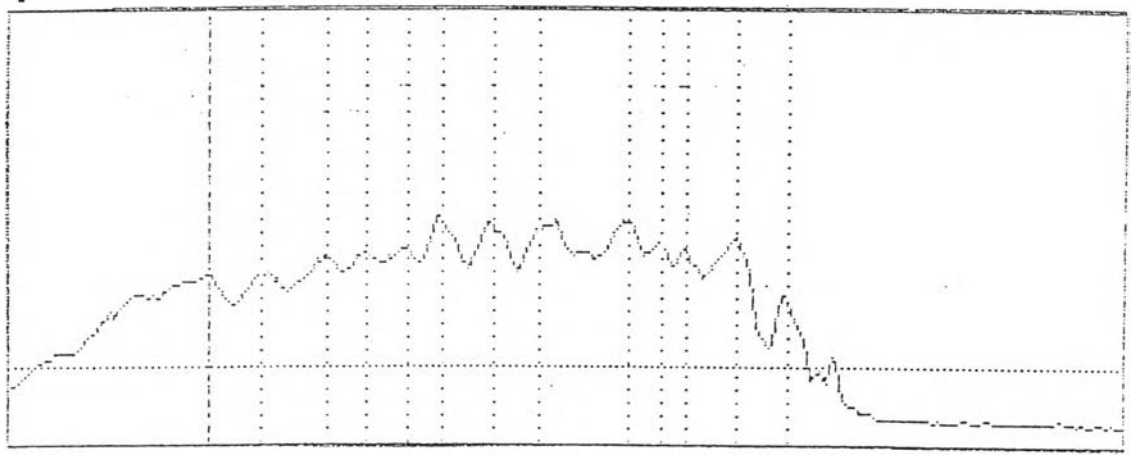
ดังตารางที่ 4 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่า S_D กับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองจะแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์กัน คือ ถ้าค่า S_D สัมพัทธ์กับ *Streptomyces sp.*42-9 สูงก็จะมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนสสูงด้วย และค่า S_D สัมพัทธ์กับ *Streptomyces sp.* 190-1 สูงก็จะมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสสูงด้วย

รูป 8 ตัวอย่างการวิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัวของดีเอ็นเอลูกผสมโดยเปรียบเทียบกับ *Streptomyces sp.*42-9 และ *Streptomyces sp.*190-1 จากเครื่องวัดความเข้ม

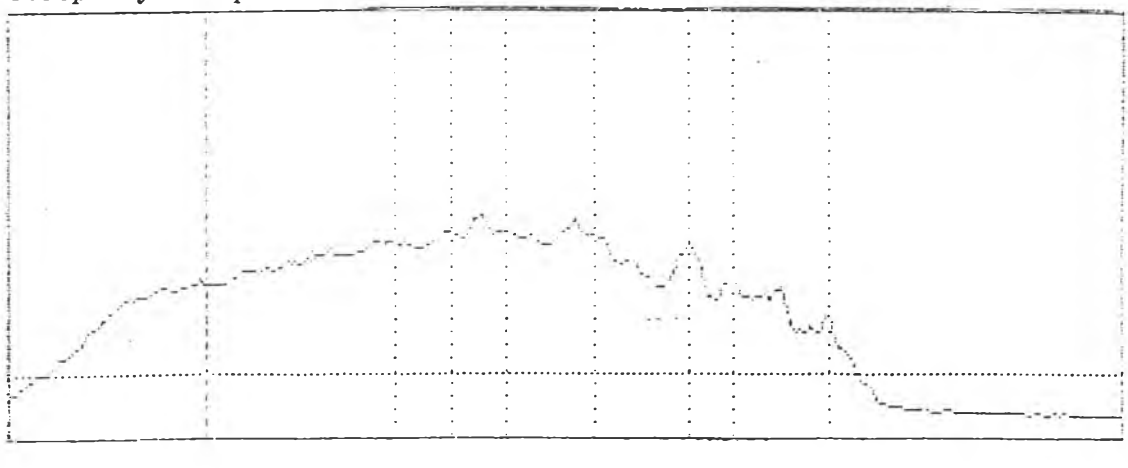
*Streptomyces sp.*42-9



ลูกผสม



*Streptomyces sp.*190-1



ตารางที่ 4 ค่า S_D ของลูกผสมสัมพัทธ์กับ *Streptomyces sp.*190-1 และ 42-9 และปริมาณเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและเอนไซม์ไซแลเนสเป็นเปอร์เซนต์

รหัสของลูกผสม	ค่า S_D สัมพัทธ์กับ		ปริมาณเอนไซม์ไซแลเนส (เปอร์เซนต์)	ปริมาณเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (เปอร์เซนต์)
	*Streptomyces sp.*42-9	*Streptomyces sp.*190-1		
D_3	0.13	0.34	34.68	69.04
21.2Aa	0.55	0.13	54.88	38.23
19.1a	0.14	0.13	29.63	37.63
19.1b	0.15	0.26	31.65	48.67
19.2c	0.10	0.12	23.23	36.58
19.3c	0.52	0.29	52.19	50.57
A	0.13	0.00	25.25	26.40
C	0.10	0.25	21.55	43.21
B	0.14	0.12	30.64	36.83
24-13	0.37	0.10	43.77	31.90
24-38	0.15	0.09	33.00	30.42
24-39	0.21	0.00	39.73	26.91
24-43	0.40	0.11	45.45	34.12
24-45	0.15	0.00	34.01	24.36
24-48	0.16	0.16	36.70	40.67
3	0.43	0.00	46.13	26.40
4	0.21	0.25	40.07	43.99
5	0.36	0.00	42.76	9.67

ตารางที่ 4(ต่อ) ค่า S_D ของลูกผสมสัมพัทธ์กับ *Streptomyces sp.*190-1 และ 42-9 และปริมาณเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและเอนไซม์ไซแลเนสเป็นเปอร์เซนต์

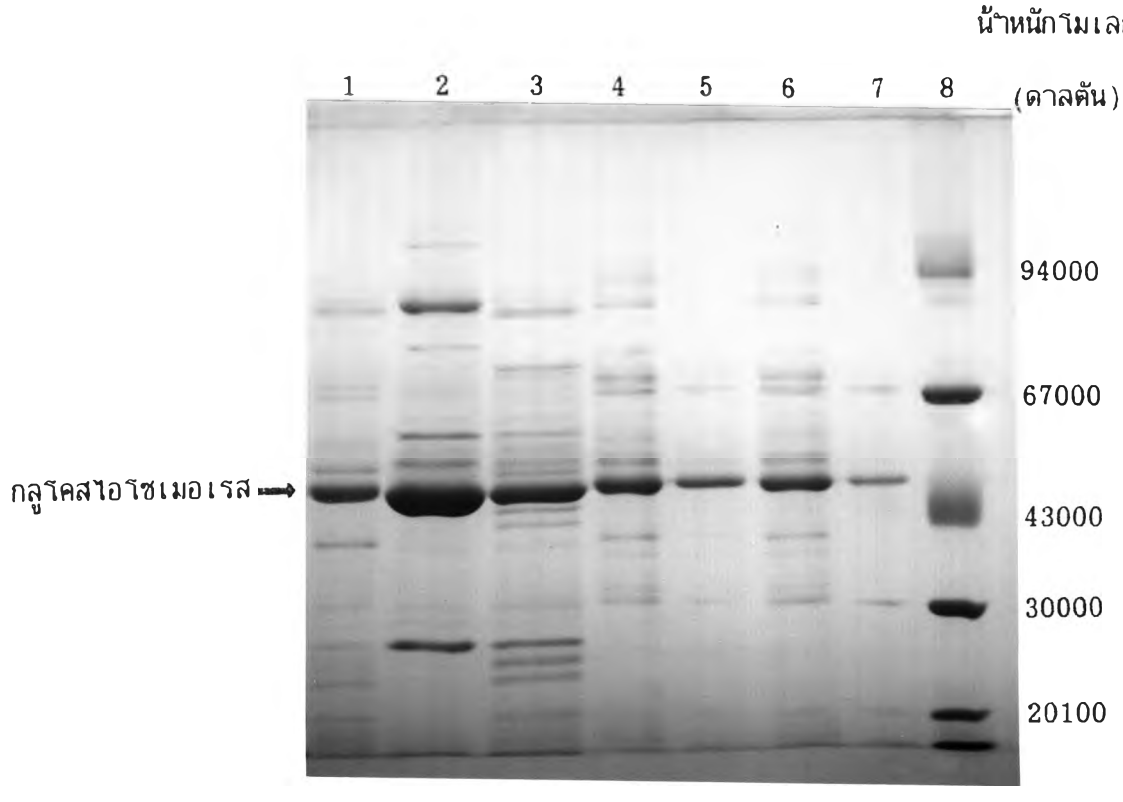
รหัสของลูกผสม	ค่า S_D สัมพัทธ์กับ		ปริมาณเอนไซม์ไซแลเนส (เปอร์เซนต์)	ปริมาณเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (เปอร์เซนต์)
	*Streptomyces sp.*42-9	*Streptomyces sp.*190-1		
6	0.21	0.00	39.06	18.62
8	0.22	0.00	40.40	27.28
9	0.33	0.31	42.09	51.51
10	0.34	0.13	42.42	39.25
11	0.58	0.00	55.56	17.69
17	0.30	0.32	41.08	53.36
18	0.16	0.00	37.04	20.69
19	0.16	0.00	34.68	28.48
22	0.20	0.26	40.07	50.36
23	0.20	0.00	40.07	27.11
24	0.20	0.00	38.05	28.69
26	0.33	0.32	41.08	53.55
27	0.20	0.26	38.05	47.81
35	0.44	0.30	48.82	50.83
37	0.44	0.16	47.47	40.91
38	0.49	0.24	50.17	42.96
40	0.40	0.17	45.45	40.91

7. การวิเคราะห์กลูโคสไอโซเมอเรสและไซแลเนสจากลูกผสมโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส

ในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและเอนไซม์ไซแลเนสที่ผลิตโดยลูกผสมต่าง ๆ พบว่าลูกผสมมีแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ร่วมกัน (ดังตารางที่ 2) ดังนั้นเพื่อการยืนยันว่ามีเอนไซม์ทั้ง 2 นี้จริงจึงนำลูกผสมมาสกัดแยกเอนไซม์ทั้ง 2 ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 14 และวิเคราะห์ลักษณะของโปรตีนโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่นเปรียบเทียบกับกลูโคสไอโซเมอเรสที่สกัดได้จาก *Streptomyces sp.*190-1 และไซแลเนสที่สกัดได้จาก *Streptomyces sp.*42-9 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 9ก และ 9ค พบว่าลูกผสมจะแสดงแถบโปรตีนตรงกับตำแหน่งของทั้งเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส และเอนไซม์ไซแลเนสที่สกัดได้จากสายพันธุ์ดั้งเดิม นอกจากนั้นเมื่อใช้ปริมาณโปรตีนที่เท่ากันแล้วความเข้มของแถบโปรตีนจะแปรผันตามปริมาณของเอนไซม์ทั้ง 2 เช่น D_3 ซึ่งมีแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสสูง แต่ไซแลเนสต่ำ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากรูปที่ 9ก ในแถวที่ 3 พบว่าให้ข้อมูลสอดคล้องกันโดยปรากฏเห็นแถบหนาของโปรตีนตำแหน่งกลูโคสไอโซเมอเรส ขณะที่แถบโปรตีนที่เป็นตำแหน่งของไซแลเนสค่อนข้างจางเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ รูปที่ 9ค แถวที่ 6 และเมื่อนำมาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเทียบกับ กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ ดังแสดงผลในรูปที่ 9ข และ 9ง พบว่ากลูโคสไอโซเมอเรสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 46,000 ดาลตัน ส่วนไซแลเนสจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 48,000 ดาลตัน

จากการพิจารณาควบคู่กันทั้งกลูโคสไอโซเมอเรสและไซแลเนส พบว่าลูกผสมที่ได้ปรากฏแถบโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ ค่อนข้างเด่นชัดกว่าสายพันธุ์เดิมซึ่งจะปรากฏแถบโปรตีนเด่นชัด เฉพาะเอนไซม์ชนิดเดียวที่สายพันธุ์เดิมมีประสิทธิภาพสูงในการสังเคราะห์เอนไซม์นั้น

รูป 9ก การวิเคราะห์กลูโคสไอโซเมอเรสที่สกัดจาก *Streptomyces sp.*190-1 , *Streptomyces sp.* 42-9 และลูกผสมต่างๆ โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม



ช่องที่ 1 เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากลูกผสมหมายเลข 17

2 เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces sp.*190-1

3 เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากลูกผสมหมายเลข D_3

4 เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากลูกผสมหมายเลข 22

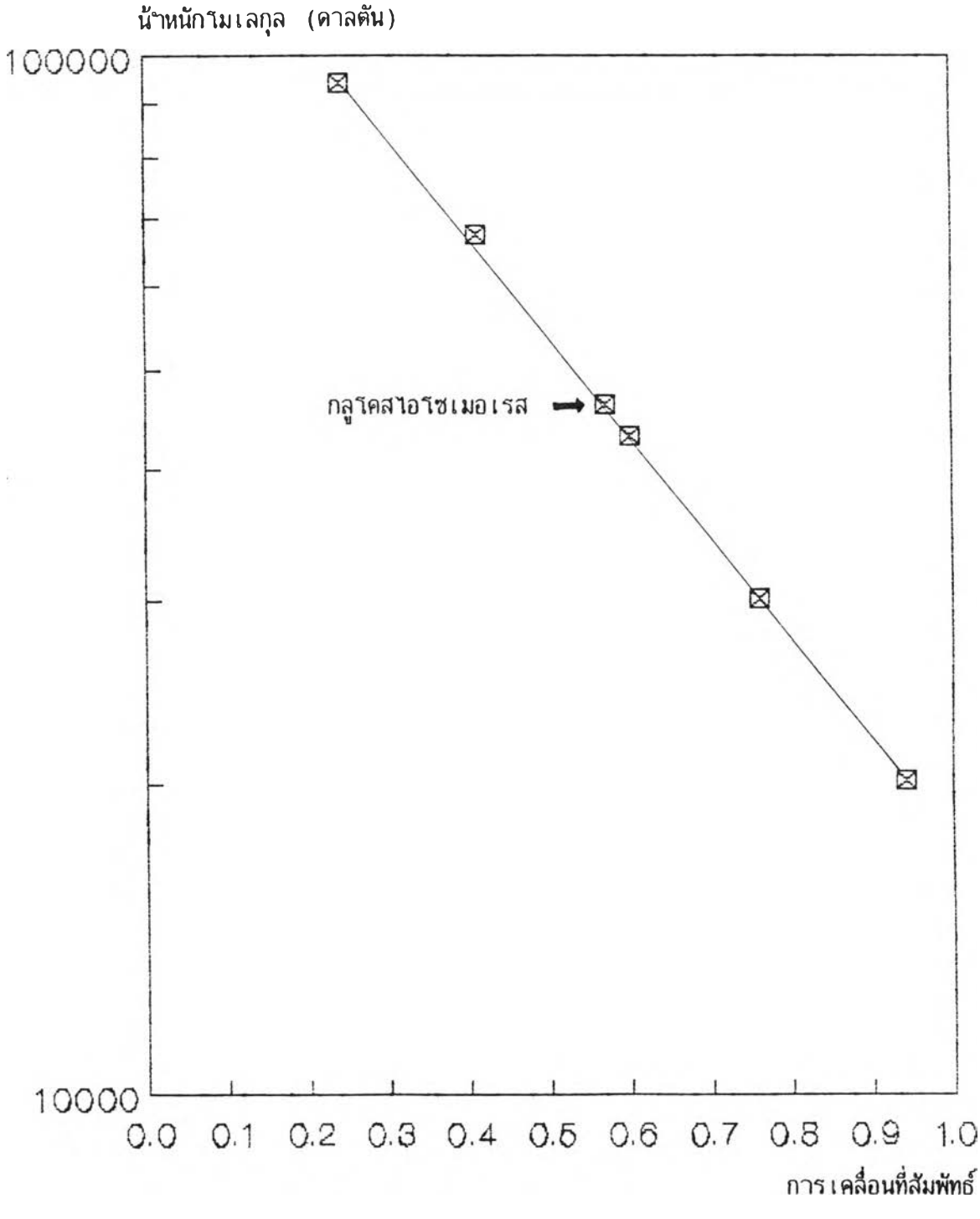
5 เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากลูกผสมหมายเลข 40

6 เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากลูกผสมหมายเลข 9

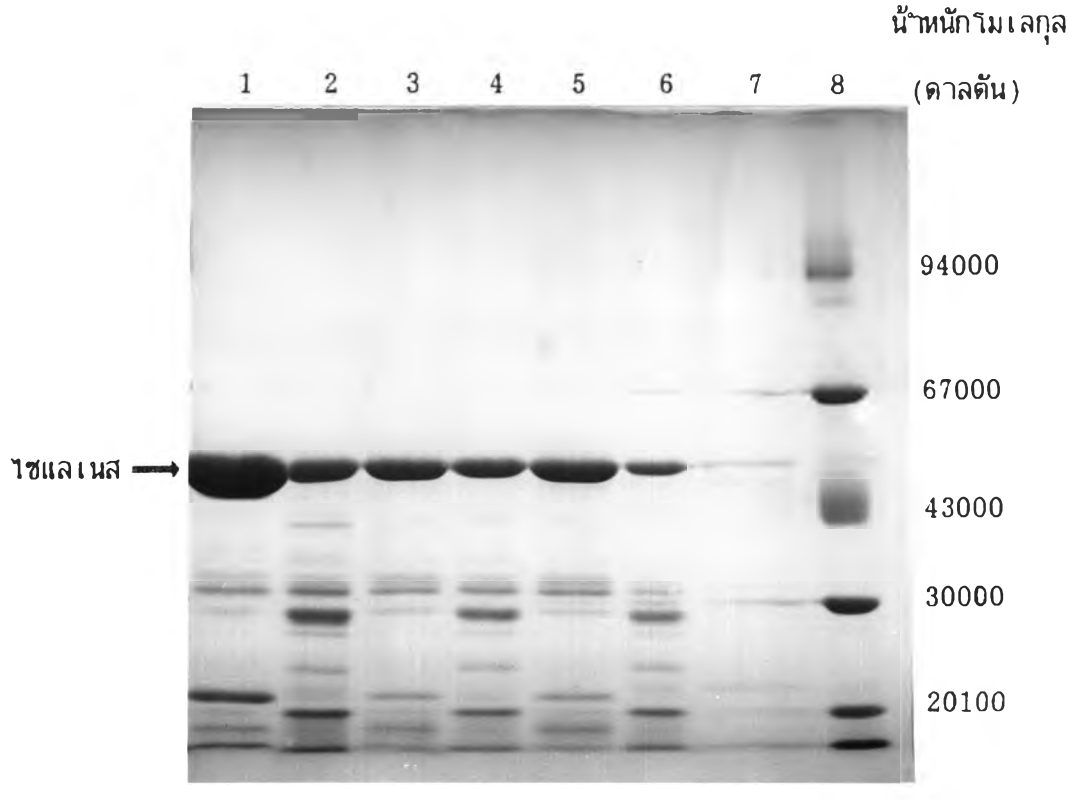
7 เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces sp.*42-9

8 โปรตีนมาตรฐาน

รูป 9ข กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน และค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์โดยการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส



รูป 9ค การวิเคราะห์เอนไซม์ไซแลเนสที่สกัดจาก *Streptomyces sp.*190-1 *Streptomyces sp.* 42-9 และลูกผสมต่างๆ โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส โดยที่แต่ละชนิดมีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม



ช่องที่ 1 เอนไซม์ไซแลเนสจาก *Streptomyces sp.*42-9

2 เอนไซม์ไซแลเนสจากลูกผสมหมายเลข 9

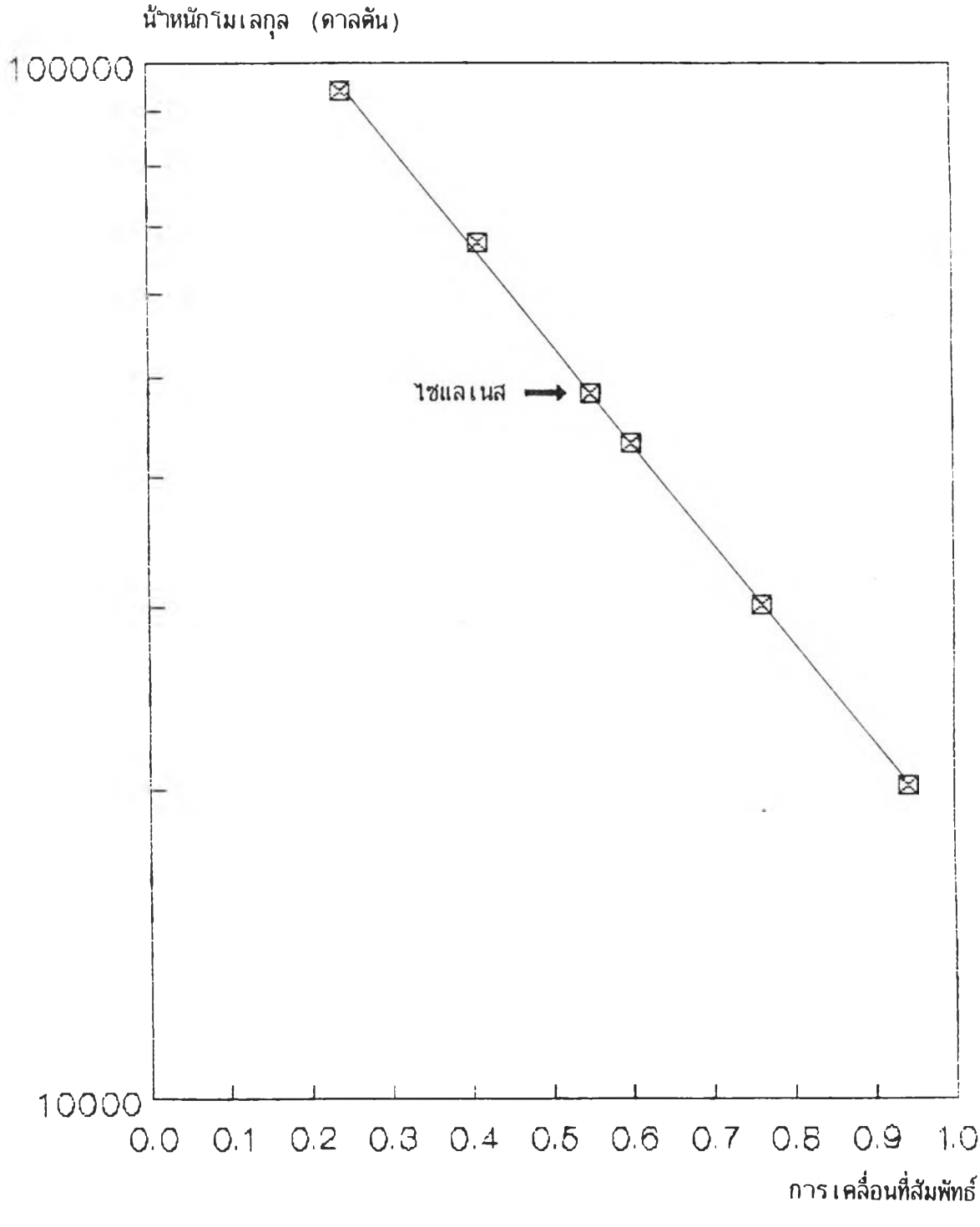
3 เอนไซม์ไซแลเนสจากลูกผสมหมายเลข 17

4 เอนไซม์ไซแลเนสจากลูกผสมหมายเลข 22

5 เอนไซม์ไซแลเนสจากลูกผสมหมายเลข 40

6 เอนไซม์ไซแลเนสจากลูกผสมหมายเลข D_3

7 เอนไซม์ไซแลเนสจาก *Streptomyces sp.*190-1

8 โปรตีนมาตรฐาน

รูป 9ง กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน และค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์โดยการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส