บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการเพิ่มยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสโดยกระบวนการ Polymerase chain reaction (PCR)

4.1.1 ผลการค้นหายีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (APS reductase) ของพืช *Arabidopsis thaliana* จากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI)

ผลการค้นหายีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสของ *A. thaliana* สายพันธุ์ Columbia จากฐานข้อมูลของ NCBI เลือกศึกษายีน *APR1* และยีน *prh19* ซึ่งรายงานโดย Setya และคณะ (1996) และ Gutierrez-Marcos และคณะ (1996) ตามลำดับ ยีน *APR1* หรือ *Arabidopsis thaliana* 5'adenylylsulphate reductase มีหมายเลขใน Genbank (accession number) คือAF016282 ประกอบด้วย 1,945 เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 465 ตัว และ ยีน *prh19* หรือยีน PAPS reductase homolog หมายเลขใน GenBank คือ U53864 ประกอบด้วย 1,748 เบส มีความเหมือน (homology) กับดีเอ็นเอส่วนเอกซอน (exon) ในยีน *APR1* 99% สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 465 ตัวและมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีน *APR1* 99% ดังนั้น การออกแบบดีเอ็นเอไพร์เมอร์เพื่อใช้ในกระบวนการ PCR จึงเลือกใช้ลำดับเบสบางบริเวณของยีน *prh19* เนื่องจากเป็นลำดับเบสที่สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ตลอดสาย

4.1.2 ผลการออกแบบและสังเคราะห์ดีเอ็นเอไพร์เมอร์

ตารางที่ 4.1 ผลการออกแบบและสังเคราะห์ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จำนวน 5 สาย

ดีเอ็นเอไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (เบส)	Tm (^{0}C)
Prh1	5′-GGAGGTTGAATCCTGAGACG-3′	20	60
Prh2	5′-TGAAGTCCACATTCCTTGGC-3′	20	61
Prh3	5′-TCTAGACTGTGAAGATGGCAATGTCTGTAAATG-3′	33	65
Prh4	5′-CTCGAGCAGAGCTTATCTCTGACTTTGTGATCC-3′	33	66
Prh5	5′-CATATGGCTCCTGTGTCTCTGAATCTATC-3′	29	73

จากตารางที่ 4.1 ดีเอ็นเอไพเมอร์ที่ออกแบบและสังเคราะห์เพื่อเพิ่มจำนวนยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสของ *A. thaliana* สายพันธุ์ Columbia คือดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4 โดยได้ทำการเพิ่มตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I ที่ปลายด้าน 5′ ของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4 ตามลำดับ เพื่อใช้ในการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้ของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และดีเอ็นเอไพเมอร์ Prh4 แสดงตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และของเอนไซม์ เรสทริกชัน *Xho*I ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR (PCR product) เมื่อใช้ คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ *A. thaliana* สายพันธุ์ Columbia เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4 นี้ควรจะได้ดีเอ็นเอขนาด 1,558 เบส เรียกว่า SNN1

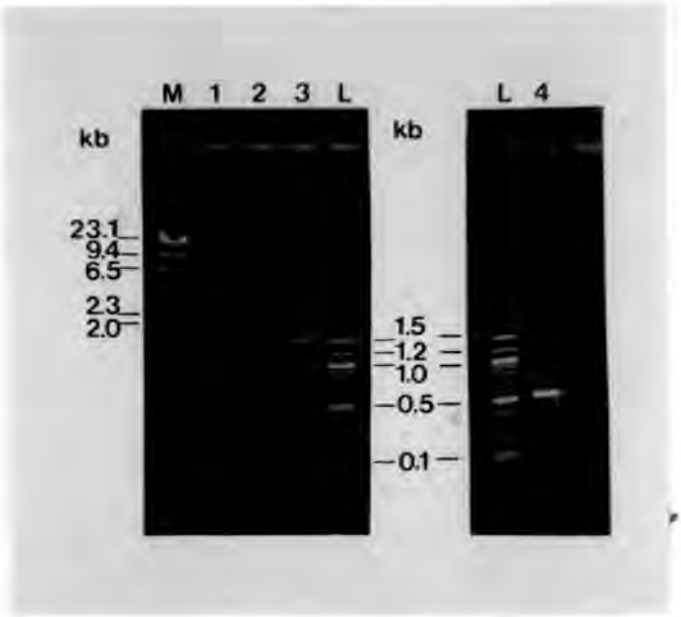
ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR หรือดีเอ็นเอขนาด 1,558 เบส หรือ SNN1 คือ Prh1 และ Prh2 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR เมื่อใช้ SNN 1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 และ Prh2 ควรจะได้ดีเอ็นเอขนาด 523 เบส หรือ SNN1-1

ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ซึ่งใช้ขจัดยีนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่งของยีน *prh19* คือ

Prh5 และ Prh2 โดยได้ทำการเพิ่มตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I ที่ปลายด้าน 5′ ของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh5 เพื่อใช้เชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ และตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I นี้มีตำแหน่งจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสด้วย จากตารางที่ 4.1 ลำดับเบสที่จีดเส้นใต้ของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh5 แสดงตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR เมื่อใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของ *A. thaliana* สายพันธุ์ Columbia เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh5 และ Prh2 นี้ควรจะได้ดีเอ็นเอขนาด 1,423 เบส เรียกว่า SNN2

4.1.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ SNN1 โดยกระบวนการ PCR

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอสายเดี่ยว ของ *A. thaliana* สายพันธุ์ Columbia เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4 โดยกระบวนการ PCR ตามวิธีข้อ 3.1 เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่าเมื่อกำหนดให้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบเป็นเวลา 20 วินาที (annealling) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการคือดีเอ็นเอ 1 แถบขนาดประมาณ 1,500 เบส ซึ่งเป็นขนาดความยาวของชิ้นดีเอ็นเอที่มีความเป็นไปได้ว่าจะเป็นดีเอ็นเอที่ต้องการคือดีเอ็นเอขนาด 1,558 เบส หรือ SNN1 (ดังแสดงในภาพที่ 4.1 ก) แยกเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ออกจากเจลอะกาโรสโดยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ซ้ำโดยการใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 และ Prh2 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีความเป็นไปได้ว่าจะเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการคือดีเอ็นเอขนาด 523 เบส หรือ SNN1-1 (ดังแสดงในภาพที่ 4.1 ข)



ก. ข.

ภาพที่ 4.1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR

ก. ใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ *A. thaliana* เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4 กำหนดอุณหภูมิในขั้นตอนที่ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นแม่แบบต่างกัน

ข. ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR (ข้อ ก ช่องที่ 3) หรือ SNN1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 และ Prh2 อุณหภูมิในขั้นตอนที่ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบเท่ากับ 58 องศาเซลเซียส

M หมายถึง ดีเอ็นเอของฟาจแลมป์ดาตัดด้วยเอนไซม์ เรสทริกชัน *Hin*dIII

L หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดเพิ่มขึ้นทีละ 100 เบส ช่วง 100 เบส ถึง 1 กิโลเบส

1 หมายถึง ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR เมื่อให้ดีเอ็นไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

2 หมายถึง ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR เมื่อให้ดีเอ็นไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส

3 หมายถึง ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ขนาดประมาณ 1,500 เบสเมื่อให้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส คาดว่าคือ SNN1

4 หมายถึง ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ขนาดประมาณ 500 เบส คาดว่าคือ SNN1-1

4.2 ผลการโคลนดีเอ็นเอ SNN1 (ผลจากข้อ 4.1.3)

4.2.1 ผลการทำทรานสฟอร์เมชันและการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ขั้นต้น

เนื่องจากดีเอ็นเอ SNN 1 (ผลจากข้อ 4.1.3) มีลักษณะเป็นดีเอ็นเอปลายทู่เพราะใช้เอนไซม์ไพโรเบสดีเอ็นเอโพลีเมอเรสในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงตัดพลาสมิดพาหะ pUC18 ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I นำมาเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอ SNN 1 และทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ได้เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 ได้โคโลนีทรานสฟอร์แมนต์หรือโคโลนีสีขาวประมาณ 300 โคโลนี อัตราส่วนระหว่างโคโลนีสีขาวต่อโคโลนีสีฟ้าเท่ากับ 1:3 คัดเลือกโคโลนีสีขาว 48 โคโลนี มาตรวจสอบว่าเป็นทรานสฟอร์แมนต์คือมีพลาสมิด pUC18 ที่มียีนสอดแทรกหรือมีรีคอมบิแนนต์พลาสมิดด้วยวิธีโคโลนีแครกกิง ตามวิธีข้อ 3.7 พบว่าเป็นทรานสฟอร์แมนต์ คือมีพลาสมิดขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 ซึ่งแสดงว่าเป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิด จำนวน 16 โคโลนี ผลการตรวจสอบโคโลนีสีขาวโดยวิธีโคโลนีแครกกิงว่าเป็นทรานสฟอร์แมนต์ดังแสดงในภาพที่ 4.2

4.2.2 ผลการตรวจสอบพลาสมิดขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 (ผลจากข้อ 4.2.1) ว่าเป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสอดแทรกคือ SNN1 ผลจากข้อ 4.1.3 ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน

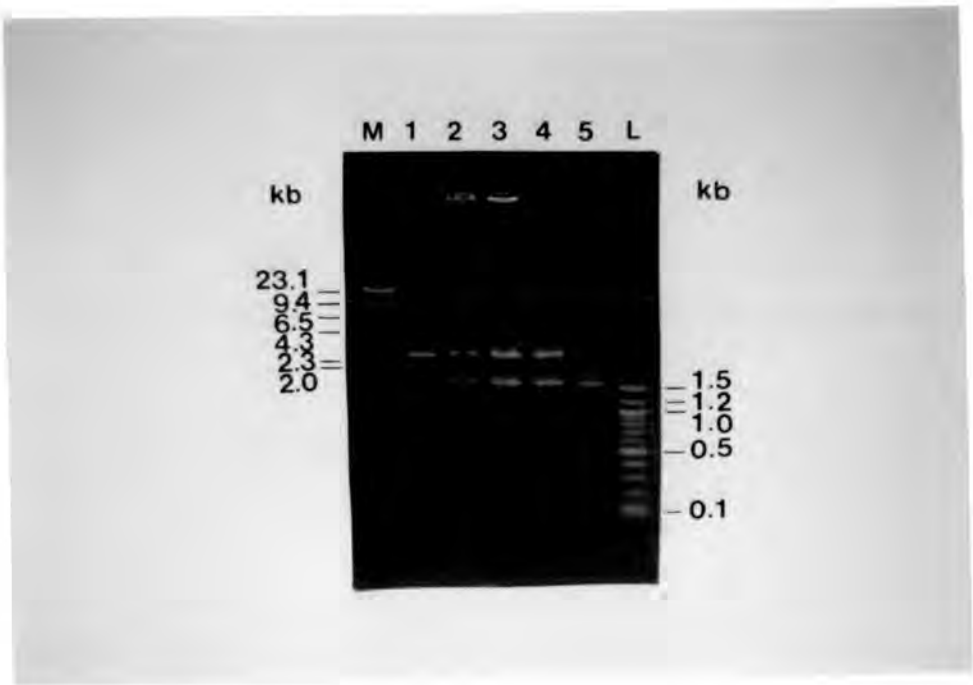
สกัดพลาสมิดที่พบว่ามีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 ซึ่งอาจเป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิดผลจากข้อ 4.2.1 จากทรานสฟอร์แมนต์ จำนวน 3 โคโลนี นำมาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน 2 ชนิด คือ *Xba*I และ *Xho*I ตามลำดับ แล้วนำมาวิเคราะห์ผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสได้ดีเอ็นเอ 2 แถบ แถบแรกขนาด 2.6 กิโลเบส ซึ่งเท่ากับขนาดของพลาสมิดพาหะ pUC18 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I และแถบที่สองขนาด 1,558 เบส ซึ่งเท่ากับขนาดของดีเอ็นเอ SNN1 หรือพลาสมิดที่สกัดได้เป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ SNN1 สอดแทรก ดังแสดงในภาพที่ 4.3

ภาพที่ 4.2 ผลการตรวจหารีคอมบิแนนต์พลาสมิดโดยการเปรียบเทียบกับขนาดของพลาสมิดพาหะ pUC18 ซึ่งไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน จากโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์ 6 โคโลนี โดยวิธีโคโลนีแครกกิง (colony cracking)

M หมายถึง ดีเอ็นเอของฟาจแลมป์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Hin*dIII

1 หมายถึง พลาสมิดพาหะ pUC18 ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏชัดคือพลาสมิดพาหะ pUC18 รูปพลาสมิดปลายปิด

2-7 หมายถึง พลาสมิดจากโคโลนีของทรานสฟอร์แมนต์ จำนวน 6 โคโลนีได้จากวิธีโคโลนีแครกกิง แถบบนสุดแสดงแถบของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ แถบใต้ลงมาเป็นแถบของรีคอมบิแนนต์พลาสมิดรูปพลาสมิดปลายปิด และแถบล่างสุดคือแถบของอาร์เอ็นเอ



ภาพที่ 4.3 ผลการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดของทรานสฟอร์แมนต์ (ผลจากข้อ 4.2.1) ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I เปรียบเทียบกับขนาดของพลาสมิดพาหะ pUC 18 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I

M หมายถึง ดีเอ็นเอของฟาจแลมป์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Hin*dIII

L หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดเพิ่มขึ้นทีละ 100 เบส ช่วง 100 เบส ถึง 1 กิโลเบส

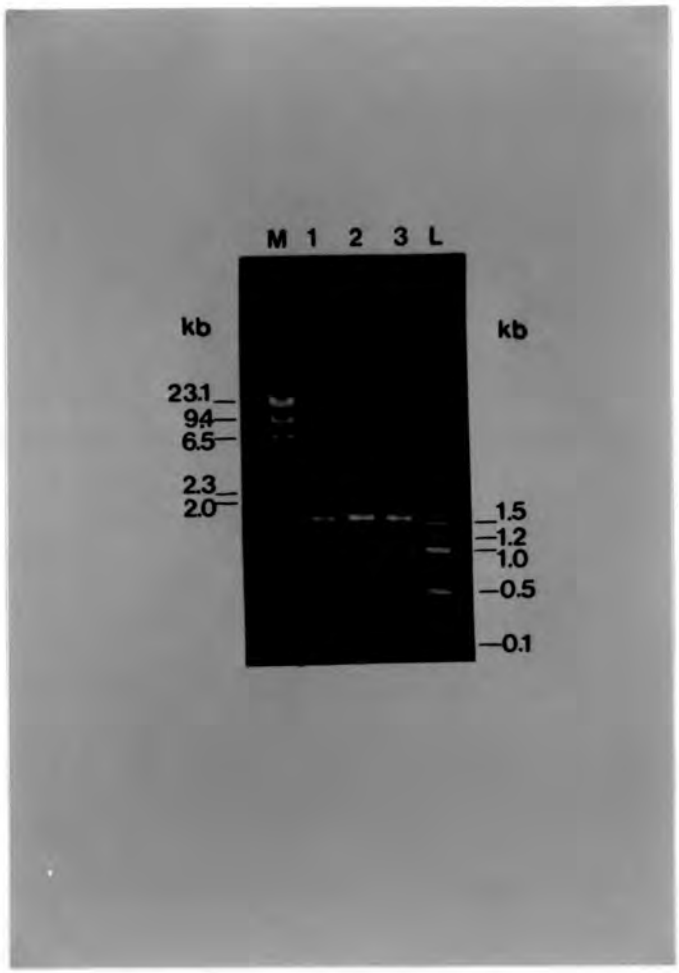
1 หมายถึง พลาสมิดพาหะ pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I

2-4 หมายถึง ผลการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดของทรานสฟอร์แมนต์ (ผลจากข้อ 4.2.1) ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ แถบบนขนาด 2.6 กิโลเบส ซึ่งเท่ากับขนาดของพลาสมิดพาหะ pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I แถบล่างขนาด 1,558 เบส เท่ากับขนาดของ SNN1 (ผลจากข้อ 4.1.3)

5 หมายถึง ดีเอ็นเอ SNN1 ขนาด 1,558 เบส เมื่อใช้ cDNA ของ *A. thaliana* เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ในกระบวนการ PCR และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4

4.2.3 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนต์พลาสมิดผลจากข้อ 4.2.2 ว่าดีเอ็นเอสอดแทรกคือ SNN1

ผลการนำรีคอมบิแนนต์พลาสมิดซึ่งตรวจสอบแล้วว่ามีดีเอ็นเอสอดแทรก ผลจากข้อ 4.2.2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ตามวิธีข้อ 3.1 ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4 นำดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอของฟาจแลมบ์ดาที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Hin*dIII ดีเอ็นเอแลดเดอร์ และดีเอ็นเอขนาดยาว 1,558 เบส ผลจากข้อ 4.1.3 ดังแสดงในภาพที่ 4.4 พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ PCR ข้างต้นมีขนาดเท่ากับ 1,558 เบส เรียกรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ตรวจสอบแล้วว่ามีดีเอ็นเอ SNN1 สอดแทรกนี้ว่า pUC/SNN1



ภาพที่ 4.4 ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR โดยใช้รีคอมบิแนนต์พลาสมิด ผลจากข้อ 4.2.2 จำนวน 2 พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4

M หมายถึง ดีเอ็นเอของฟาจแลมป์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Hin*dIII

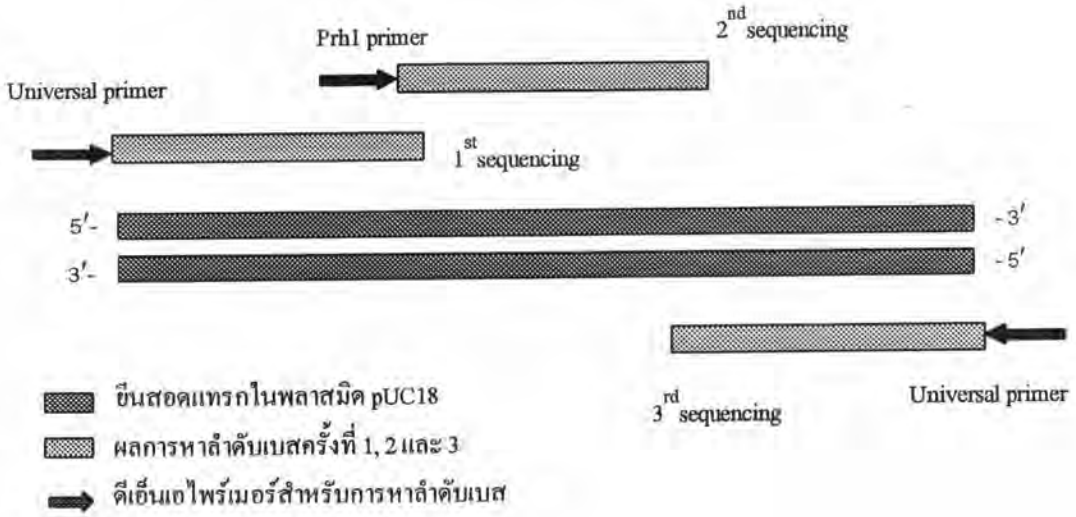
L หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดเพิ่มขึ้นทีละ 100 เบส ช่วง 100 เบส ถึง 1 กิโลเบส

1-2 หมายถึง ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCRขนาด 1,558 เบส

3 หมายถึง ดีเอ็นเอ SNN1 ขนาด 1,558 เบส

4.3 ผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ SNN1 (ผลจากข้อ 4.2.3)

นำโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์ (ผลจากข้อ 4.2.3) จำนวน 1 โคโลนีมาสกัดเอารีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN1 เพื่อนำไปทำการหาลำดับเบสโดยวิธี Thermal Cycle DNA Sequencing การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอสอดแทรก หรือ SNN1 นี้ทำโดยแบ่งเป็น 3 ช่วง ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ 3 สาย คือ universal primers ซึ่งเป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward primer) และทิศทางกลับ (reverse primer) ซึ่งอยู่ด้านปลาย 5′ และ 3′ ของตำแหน่งสอดแทรกของยีน (multiple cloning site) ของพลาสมิดพาหะ pUC18 ตามลำดับ และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 (ผลจากข้อ 4.1.2) ดังแสดงในภาพ 4.5

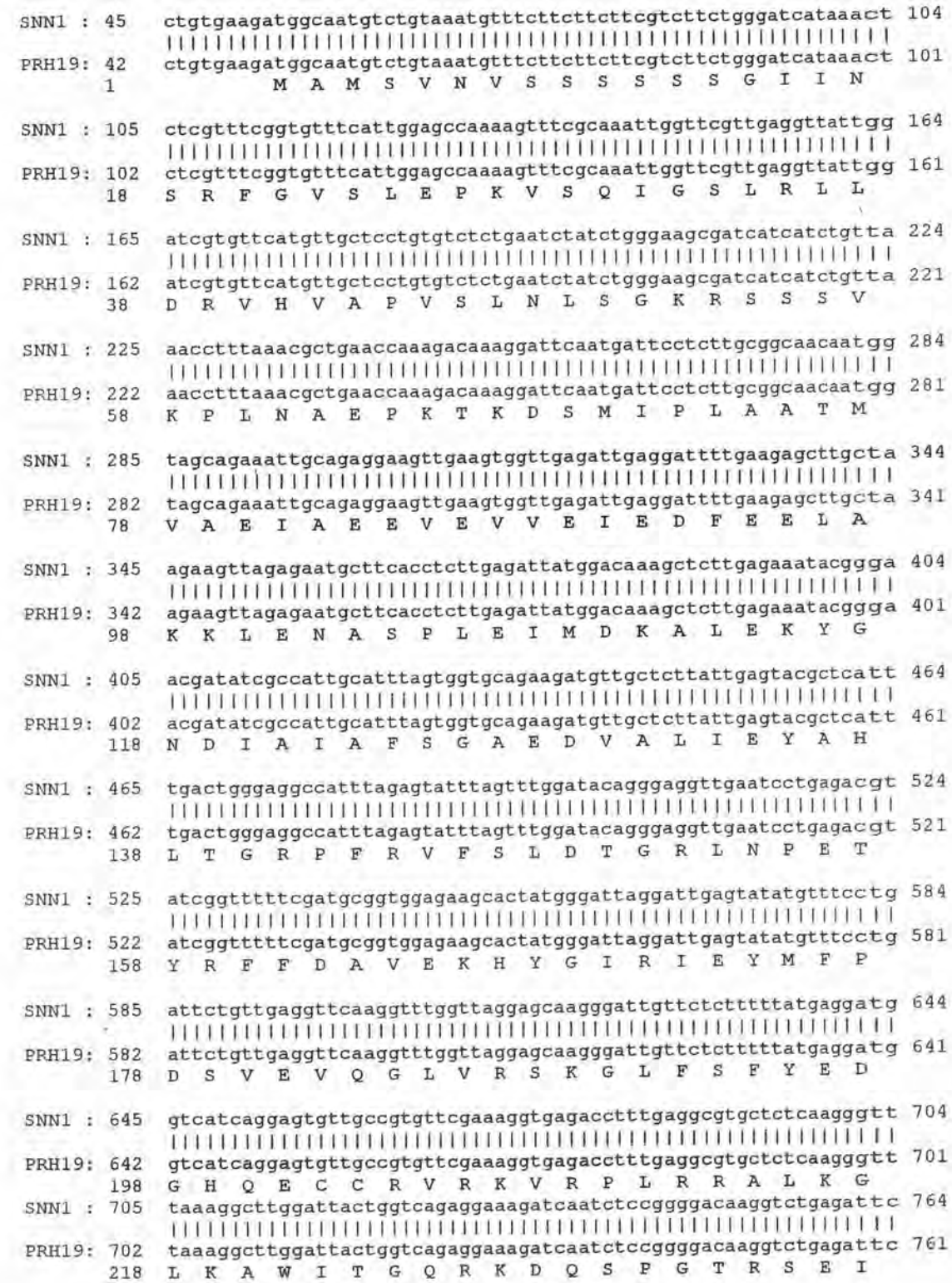


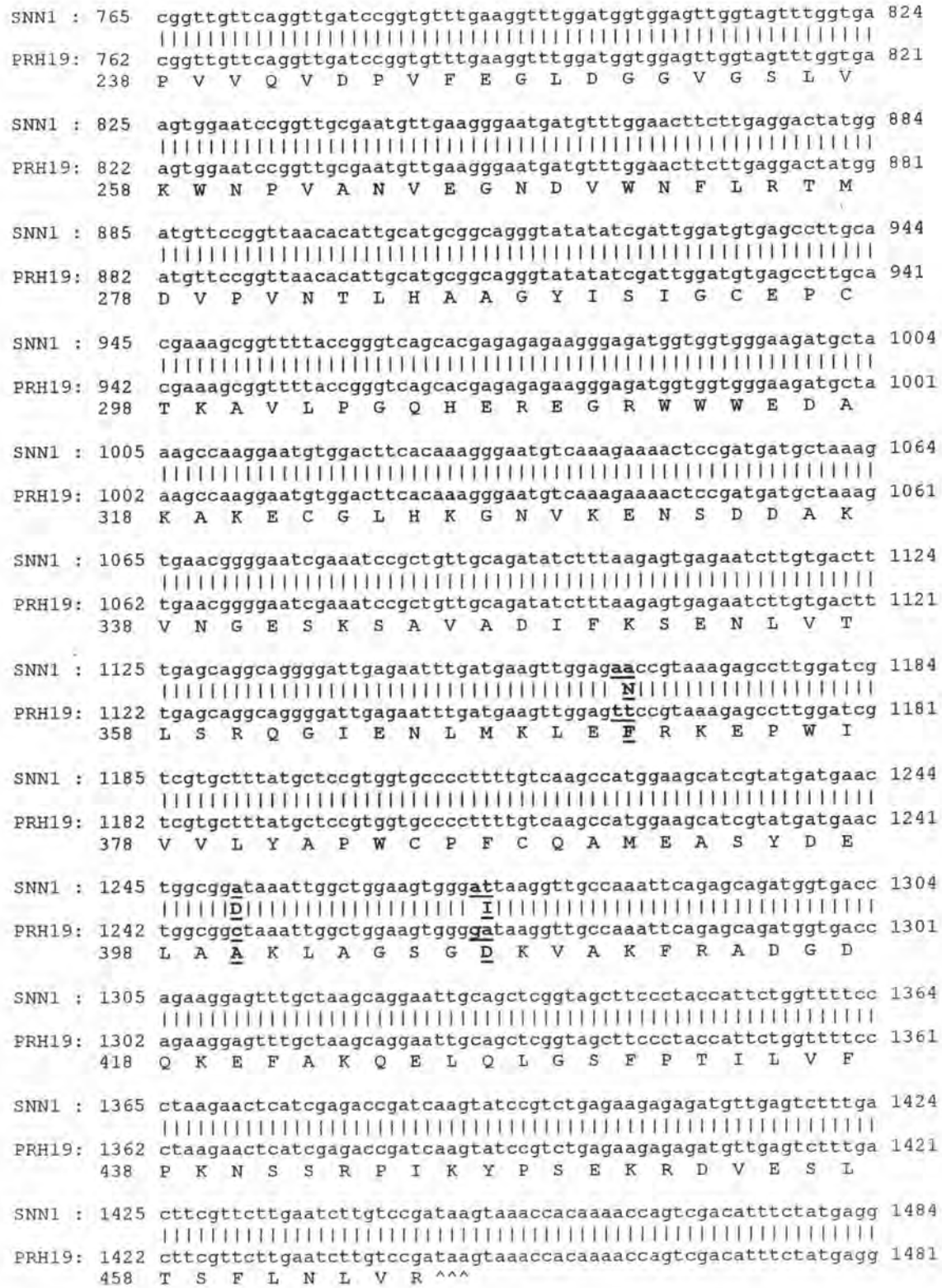
ภาพที่ 4.5 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอสอดแทรก (SNN1) ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN1 และตำแหน่งของดีเอ็นเอไพร์เมอร์

ผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอสอดแทรก SNN1 พบว่าดีเอ็นเอ SNN1 ประกอบด้วย 1,558 เบส ปลายด้าน 5′ และ 3′ มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I ตามลำดับ SNN1 แทรกอยู่บริเวณสอดแทรกตรงตำแหน่งของเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I ปลายด้าน 5′ ติดกับบริเวณสอดแทรกของพลาสมิดพาหะ pUC18 หลังตำแหน่งของ universal primer ในทิศทางไป (Forward universal primer) ปลายด้าน 3′ ติดกับบริเวณสอดแทรกของพลาสมิดพาหะ pUC18 หลังตำแหน่งของ universal primer ในทิศทางกลับ (Reverse universal primer) ดังแสดงในภาพที่ 4.6

```
     10         20         30         40         50         60
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
gnngnttgct gcctgcaggt cgactctaga ggatccccTC TAGActgtga agATGGcaat   60
                                    * -XbaI-          start codon
gtctgtaaat gtttcttctt cttcgtcttc tgggatcata aactctcgtt tcggtgtttc  120
attggagcca aaagtttcgc aaattggttc gttgaggtta ttggatcgtg ttcatgttgc  180
tcctgtgtct ctgaatctat ctgggaagcg atcatcatct gttaaacctt taaacgctga  240
accaaagaca aaggattcaa tgattcctct tgcggcaaca atggtagcag aaattgcaga  300
ggaagttgaa gtggttgaga ttgaggattt tgaagagctt gctaagaagt tagagaatgc  360
ttcacctctt gagattatgg acaaagctct tgagaaatac gggaacgata tcgccattgc  420
atttagtggt gcagaagatg ttgctcttat tgagtacgct catttgactg ggaggccatt  480
tagagtattt agtttggata cagggaggtt gaatcctgag acgtatcggt ttttcgatgc  540
ggtggagaag cactatggga ttaggattga gtatatgttt cctgattctg ttgaggttca  600
aggtttggtt aggagcaagg gattgttctc tttttatgag gatggtcatc aggagtgttg  660
ccgtgttcga aaggtgagac ctttgaggcg tgctctcaag ggtttaaagg cttggattac  720
tggtcagagg aaagatcaat ctccggggac aaggtctgag attccggttg ttcaggttga  780
tccggtgttt gaaggtttgg atggtggagt tggtagtttg gtgaagtgga atccggttgc  840
gaatgttgaa gggaatgatg tttggaactt cttgaggact atggatgttc cggttaacac  900
attgcatgcg gcagggtata tatcgattgg atgtgagcct tgcacgaaag cggttttacc  960
gggtcagcac gagagagaag ggagatggtg gtgggaagat gctaaagcca aggaatgtgg 1020
acttcacaaa gggaatgtca aagaaaactc cgatgatgct aaagtgaacg gggaatcgaa 1080
atccgctgtt gcagatatct ttaagagtga gaatcttgtg actttgagca ggcaggggat 1140
tgagaatttg atgaagttgg agaaccgtaa agagccttgg atcgtcgtgc tttatgctcc 1200
gtggtgcccc ttttgtcaag ccatggaagc atcgtatgat gaactggcgg ataaattggc 1260
tggaagtggg attaaggttg ccaaattcag agcagatggt gaccagaagg agtttgctaa 1320
gcaggaattg cagctcggta gcttccctac cattctggtt ttccctaaga actcatcgag 1380
accgatcaag tatccgtctg agaagagaga tgttgagtct ttgacttcgt tcttgaatct 1440
tgtccgaTAA gtaaaccaca aaaccagtcg acatttctat gaggaataag aattatatct 1500
      stop codon
tcgtctcgtt ccagattgct agaacagatg aagttggtgt ttggagaatc aattcaaagc 1560
tttggatcac aaagtcagag ataagctctg CTCGAGgggt accgagctcg aattcgtaat 1620
catgtcaatc ttttcctgtg          -XhoI-*                            1648
```

ภาพที่ 4.6 ผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอสอดแทรก SNN1 ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN1 โดยแสดงถึงบริเวณของเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I และบริเวณที่ขีดเส้นใต้จะเป็นลำดับเบสในบริเวณสอดแทรก บนพลาสมิดพาหะ pUC18 หลังตำแหน่งของ universal primer ทั้ง 2 ทิศทาง


SNN1 : 45 ctgtgaagatggcaatgtctgtaaatgtttcttcttcttcgtcttctgggatcataaact 104
PRH19: 42 ctgtgaagatggcaatgtctgtaaatgtttcttcttcttcgtcttctgggatcataaact 101
1 M A M S V N V S S S S S S S G I I N
SNN1 : 105 ctcgtttcggtgtttcattggagccaaaagtttcgcaaattggttcgttgaggttattgg 164
PRH19: 102 ctcgtttcggtgtttcattggagccaaaagtttcgcaaattggttcgttgaggttattgg 161
18 S R F G V S L E P K V S Q I G S L R L L
SNN1 : 165 atcgtgttcatgttgctcctgtgtctctgaatctatctgggaagcgatcatcatctgtta 224
PRH19: 162 atcgtgttcatgttgctcctgtgtctctgaatctatctgggaagcgatcatcatctgtta 221
38 D R V H V A P V S L N L S G K R S S S V
SNN1 : 225 aacctttaaacgctgaaccaaagacaaaggattcaatgattcctcttgcggcaacaatgg 284
PRH19: 222 aacctttaaacgctgaaccaaagacaaaggattcaatgattcctcttgcggcaacaatgg 281
58 K P L N A E P K T K D S M I P L A A T M
SNN1 : 285 tagcagaaattgcagaggaagttgaagtggttgagattgaggattttgaagagcttgcta 344
PRH19: 282 tagcagaaattgcagaggaagttgaagtggttgagattgaggattttgaagagcttgcta 341
78 V A E I A E E V E V V E I E D F E E L A
SNN1 : 345 agaagttagagaatgcttcacctcttgagattatggacaaagctcttgagaaatacggga 404
PRH19: 342 agaagttagagaatgcttcacctcttgagattatggacaaagctcttgagaaatacggga 401
98 K K L E N A S P L E I M D K A L E K Y G
SNN1 : 405 acgatatcgccattgcatttagtggtgcagaagatgttgctcttattgagtacgctcatt 464
PRH19: 402 acgatatcgccattgcatttagtggtgcagaagatgttgctcttattgagtacgctcatt 461
118 N D I A I A F S G A E D V A L I E Y A H
SNN1 : 465 tgactgggaggccatttagagtatttagtttggatacagggaggttgaatcctgagacgt 524
PRH19: 462 tgactgggaggccatttagagtatttagtttggatacagggaggttgaatcctgagacgt 521
138 L T G R P F R V F S L D T G R L N P E T
SNN1 : 525 atcggttttcgatgcggtggagaagcactatgggattaggattgagtatatgtttcctg 584
PRH19: 522 atcggttttcgatgcggtggagaagcactatgggattaggattgagtatatgtttcctg 581
158 Y R F F D A V E K H Y G I R I E Y M F P
SNN1 : 585 attctgttgaggttcaaggtttggttaggagcaagggattgttctcttttatgaggatg 644
PRH19: 582 attctgttgaggttcaaggtttggttaggagcaagggattgttctcttttatgaggatg 641
178 D S V E V Q G L V R S K G L F S F Y E D
SNN1 : 645 gtcatcaggagtgttgccgtgttcgaaaggtgagacctttgaggcgtgctctcaagggtt 704
PRH19: 642 gtcatcaggagtgttgccgtgttcgaaaggtgagacctttgaggcgtgctctcaagggtt 701
198 G H Q E C C R V R K V R P L R R A L K G
SNN1 : 705 taaaggcttggattactggtcagaggaaagatcaatctccggggacaaggtctgagattc 764
PRH19: 702 taaaggcttggattactggtcagaggaaagatcaatctccggggacaaggtctgagattc 761
218 L K A W I T G Q R K D Q S P G T R S E I


SNN1 : 765 cggttgttcaggttgatccggtgtttgaaggtttggatggtggagttggtagtttggtga 824
PRH19: 762 cggttgttcaggttgatccggtgtttgaaggtttggatggtggagttggtagtttggtga 821
238 P V V Q V D P V F E G L D G G V G S L V
SNN1 : 825 agtggaatccggttgcgaatgttgaagggaatgatgtttggaacttcttgaggactatgg 884
PRH19: 822 agtggaatccggttgcgaatgttgaagggaatgatgtttggaacttcttgaggactatgg 881
258 K W N P V A N V E G N D V W N F L R T M
SNN1 : 885 atgttccggttaacacattgcatgcggcagggtatatatcgattggatgtgagccttgca 944
PRH19: 882 atgttccggttaacacattgcatgcggcagggtatatatcgattggatgtgagccttgca 941
278 D V P V N T L H A A G Y I S I G C E P C
SNN1 : 945 cgaaagcggttttaccgggtcagcacgagagagaagggagatggtggtgggaagatgcta 1004
PRH19: 942 cgaaagcggttttaccgggtcagcacgagagagaagggagatggtggtgggaagatgcta 1001
298 T K A V L P G Q H E R E G R W W W E D A
SNN1 : 1005 aagccaaggaatgtggacttcacaaagggaatgtcaaagaaaactccgatgatgctaaag 1064
PRH19: 1002 aagccaaggaatgtggacttcacaaagggaatgtcaaagaaaactccgatgatgctaaag 1061
318 K A K E C G L H K G N V K E N S D D A K
SNN1 : 1065 tgaacggggaatcgaaatccgctgttgcagatatctttaagagtgagaatcttgtgactt 1124
PRH19: 1062 tgaacggggaatcgaaatccgctgttgcagatatctttaagagtgagaatcttgtgactt 1121
338 V N G E S K S A V A D I F K S E N L V T
SNN1 : 1125 tgagcaggcaggggattgagaatttgatgaagttggagaaccgtaaagagccttggatcg 1184
PRH19: 1122 tgagcaggcaggggattgagaatttgatgaagttggagttccgtaaagagccttggatcg 1181
358 L S R Q G I E N L M K L E F R K E P W I
SNN1 : 1185 tcgtgctttatgctccgtggtgccccttttgtcaagccatggaagcatcgtatgatgaac 1244
PRH19: 1182 tcgtgctttatgctccgtggtgccccttttgtcaagccatggaagcatcgtatgatgaac 1241
378 V V L Y A P W C P F C Q A M E A S Y D E
SNN1 : 1245 tggcggataaattggctggaagtgggattaaggttgccaaattcagagcagatggtgacc 1304
PRH19: 1242 tggcggctaaattggctggaagtgggataaggttgccaaattcagagcagatggtgacc 1301
398 L A A K L A G S G D K V A K F R A D G D
SNN1 : 1305 agaaggagtttgctaagcaggaattgcagctcggtagcttccctaccattctggttttcc 1364
PRH19: 1302 agaaggagtttgctaagcaggaattgcagctcggtagcttccctaccattctggttttcc 1361
418 Q K E F A K Q E L Q L G S F P T I L V F
SNN1 : 1365 ctaagaactcatcgagaccgatcaagtatccgtctgagaagagagatgttgagtctttga 1424
PRH19: 1362 ctaagaactcatcgagaccgatcaagtatccgtctgagaagagagatgttgagtctttga 1421
438 P K N S S R P I K Y P S E K R D V E S L
SNN1 : 1425 cttcgttcttgaatcttgtccgataagtaaaccacaaaaccagtcgacatttctatgagg 1484
PRH19: 1422 cttcgttcttgaatcttgtccgataagtaaaccacaaaaccagtcgacatttctatgagg 1481
458 T S F L N L V R ^^^

```
SNN1 : 1485 aataagaattatatcttcgtctcgttccagattgctagaacagatgaagttggtgtttgg 1544
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PRH19: 1482 aataagaattatatcttcgtctcgttccagattgctagaacagatgaagttggtgtttgg 1541

SNN1 : 1545 agaatcaattcaaagctttggatcacaaagtcagaga 1581
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||
PRH19: 1542 agaatcaattcaaagctttggatcacaaagtcagaga 1578
```

ภาพที่ 4.7 ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากดีเอ็นเอสอดแทรก SNN1 ใน รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN1 เปรียบเทียบกับลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *prh19*)

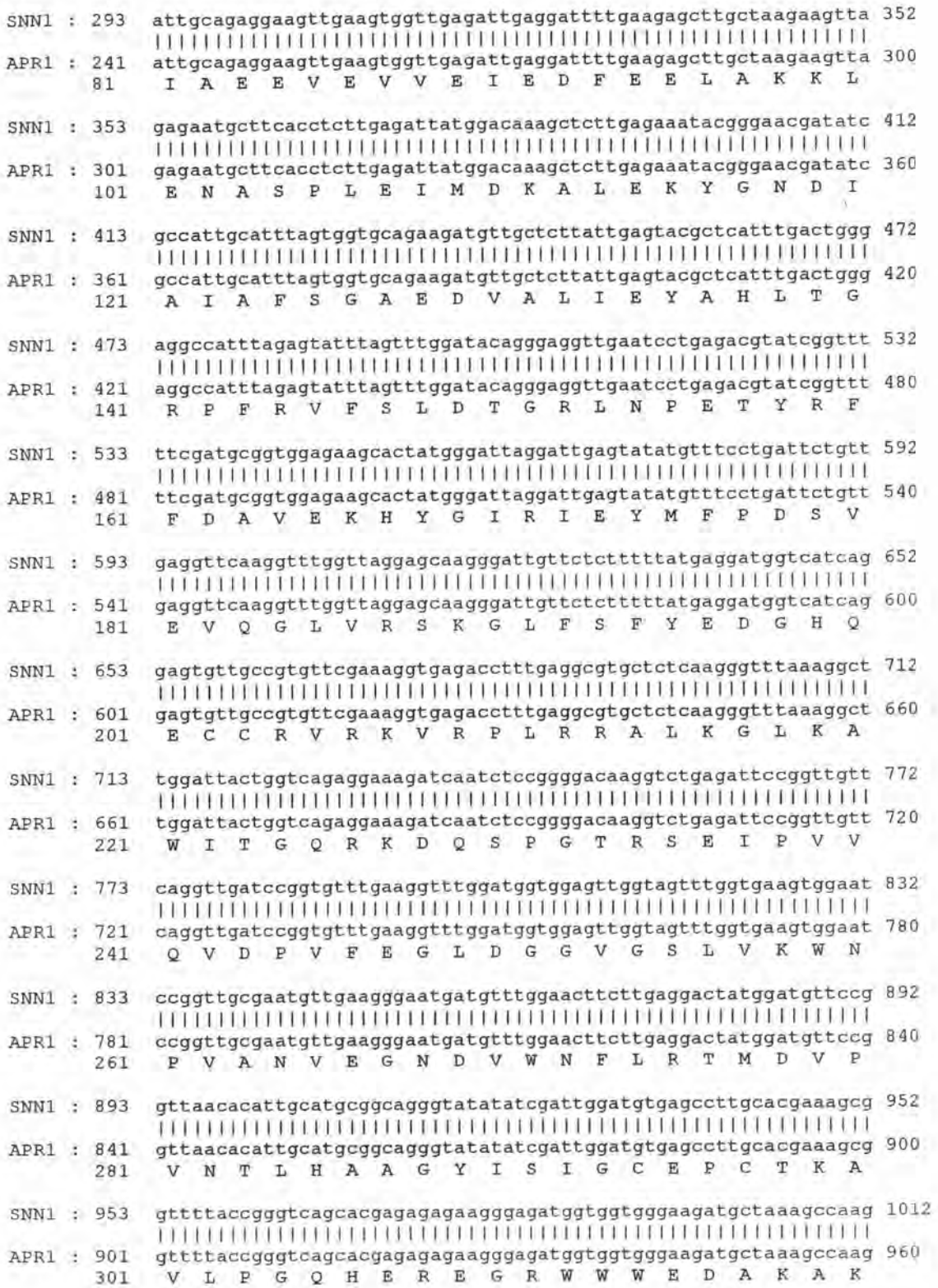
ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโน ที่แปลรหัสจากดีเอ็นเอ SNN1 กับลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีน *prh19* โดยใช้โปรแกรม Blast ของ NCBI ดังแสดงในภาพที่ 4.7 พบว่าลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้ไม่เหมือนกัน ได้แก่ลำดับกรดอะมิโนที่ 371, 400 และ 407 ของยีน *prh19* คือ ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine; F) อะลานีน (alanine; A) และ แอสปาร์เทต (aspartate; D) ตามลำดับ แต่ลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ตรงกันของดีเอ็นเอ SNN1 เป็น แอสปาราจีน (asparagine; N) แอสปาร์เทต (aspartate; D) และ ไอโซลิวซีน (Isoleucine; I) ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากดีเอ็นเอ SNN1 กับลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีน *APR1* พบว่าเหมือนกันทุกประการ ดังแสดงในภาพที่ 4.8

```
SNN1 : 53   atggcaatgtctgtaaatgtttcttcttcttcgtcttctgggatcataaactctcgtttc 112
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
APR1 : 1    atggcaatgtctgtaaatgtttcttcttcttcgtcttctgggatcataaactctcgtttc 60
       1     M  A  M  S  V  N  V  S  S  S  S  S  S  G  I  I  N  S  R  F

SNN1 : 113  ggtgtttcattggagccaaaagtttcgcaaattggttcgttgaggttattggatcgtgtt 172
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
APR1 : 61   ggtgtttcattggagccaaaagtttcgcaaattggttcgttgaggttattggatcgtgtt 120
       21    G  V  S  L  E  P  K  V  S  Q  I  G  S  L  R  L  L  D  R  V

SNN1 : 173  catgttgctcctgtgtctctgaatctatctgggaagcgatcatcatctgttaaaccttta 232
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
APR1 : 121  catgttgctcctgtgtctctgaatctatctgggaagcgatcatcatctgttaaaccttta 180
       41    H  V  A  P  V  S  L  N  L  S  G  K  R  S  S  S  V  K  P  L

SNN1 : 233  aacgctgaaccaaagacaaaggattcaatgattcctcttgcggcaacaatggtagcagaa 292
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
APR1 : 181  aacgctgaaccaaagacaaaggattcaatgattcctcttgcggcaacaatggtagcagaa 240
       61    N  A  E  P  K  T  K  D  S  M  I  P  L  A  A  T  M  V  A  E
```


SNN1 : 293 attgcagaggaagttgaagtggttgagattgaggattttgaagagcttgctaagaagtta 352
APR1 : 241 attgcagaggaagttgaagtggttgagattgaggattttgaagagcttgctaagaagtta 300
81 I A E E V E V V E I E D F E E L A K K L
SNN1 : 353 gagaatgcttcacctcttgagattatggacaaagctcttgagaaatacgggaacgatatc 412
APR1 : 301 gagaatgcttcacctcttgagattatggacaaagctcttgagaaatacgggaacgatatc 360
101 E N A S P L E I M D K A L E K Y G N D I
SNN1 : 413 gccattgcatttagtggtgcagaagatgttgctcttattgagtacgctcatttgactggg 472
APR1 : 361 gccattgcatttagtggtgcagaagatgttgctcttattgagtacgctcatttgactggg 420
121 A I A F S G A E D V A L I E Y A H L T G
SNN1 : 473 aggccatttagagtatttagtttggatacagggaggttgaatcctgagacgtatcggttt 532
APR1 : 421 aggccatttagagtatttagtttggatacagggaggttgaatcctgagacgtatcggttt 480
141 R P F R V F S L D T G R L N P E T Y R F
SNN1 : 533 ttcgatgcggtggagaagcactatgggattaggattgagtatatgtttcctgattctgtt 592
APR1 : 481 ttcgatgcggtggagaagcactatgggattaggattgagtatatgtttcctgattctgtt 540
161 F D A V E K H Y G I R I E Y M F P D S V
SNN1 : 593 gaggttcaaggtttggttaggagcaagggattgttctctttttatgaggatggtcatcag 652
APR1 : 541 gaggttcaaggtttggttaggagcaagggattgttctctttttatgaggatggtcatcag 600
181 E V Q G L V R S K G L F S F Y E D G H Q
SNN1 : 653 gagtgttgccgtgttcgaaaggtgagacctttgaggcgtgctctcaagggtttaaaggct 712
APR1 : 601 gagtgttgccgtgttcgaaaggtgagacctttgaggcgtgctctcaagggtttaaaggct 660
201 E C C R V R K V R P L R R A L K G L K A
SNN1 : 713 tggattactggtcagaggaaagatcaatctccggggacaaggtctgagattccggttgtt 772
APR1 : 661 tggattactggtcagaggaaagatcaatctccggggacaaggtctgagattccggttgtt 720
221 W I T G Q R K D Q S P G T R S E I P V V
SNN1 : 773 caggttgatccggtgtttgaaggtttggatggtggagttggtagtttggtgaagtggaat 832
APR1 : 721 caggttgatccggtgtttgaaggtttggatggtggagttggtagtttggtgaagtggaat 780
241 Q V D P V F E G L D G G V G S L V K W N
SNN1 : 833 ccggttgcgaatgttgaagggaatgatgtttggaacttcttgaggactatggatgttccg 892
APR1 : 781 ccggttgcgaatgttgaagggaatgatgtttggaacttcttgaggactatggatgttccg 840
261 P V A N V E G N D V W N F L R T M D V P
SNN1 : 893 gttaacacattgcatgcggcagggtatatatcgattggatgtgagccttgcacgaaagcg 952
APR1 : 841 gttaacacattgcatgcggcagggtatatatcgattggatgtgagccttgcacgaaagcg 900
281 V N T L H A A G Y I S I G C E P C T K A
SNN1 : 953 gttttaccgggtcagcacgagagagaagggagatggtggtgggaagatgctaaagccaag 1012
APR1 : 901 gttttaccgggtcagcacgagagagaagggagatggtggtgggaagatgctaaagccaag 960
301 V L P G Q H E R E G R W W W E D A K A K

```
SNN1 : 1013 gaatgtggacttcacaaagggaatgtcaaagaaaactccgatgatgctaaagtgaacggg 1072
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
APR1 : 961  gaatgtggacttcacaaagggaatgtcaaagaaaactccgatgatgctaaagtgaacggg 1020
       321   E  C  G  L  H  K  G  N  V  K  E  N  S  D  D  A  K  V  N  G

SNN1 : 1073 gaatcgaaatccgctgttgcagatatctttaagagtgagaatcttgtgactttgagcagg 1132
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
APR1 : 1021 gaatcgaaatccgctgttgcagatatctttaagagtgagaatcttgtgactttgagcagg 1080
       341   E  S  K  S  A  V  A  D  I  F  K  S  E  N  L  V  T  L  S  R

SNN1 : 1133 caggggattgagaatttgatgaagttggagaaccgtaaagagccttggatcgtcgtgctt 1192
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
APR1 : 1081 caggggattgagaatttgatgaagttggagaaccgtaaagagccttggatcgtcgtgctt 1140
       361   Q  G  I  E  N  L  M  K  L  E  N  R  K  E  P  W  I  V  V  L

SNN1 : 1193 tatgctccgtggtgccccttttgtcaagccatggaagcatcgtatgatgaactggcggat 1252
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
APR1 : 1141 tatgctccgtggtgccccttttgtcaagccatggaagcatcgtatgatgaactggcggat 1200
       381   Y  A  P  W  C  P  F  C  Q  A  M  E  A  S  Y  D  E  L  A  D

SNN1 : 1253 aaattggctggaagtgggattaaggttgccaaattcagagcagatggtgaccagaaggag 1312
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
APR1 : 1201 aaattggctggaagtgggattaaggttgccaaattcagagcagatggtgaccagaaggag 1260
       401   K  L  A  G  S  G  I  K  V  A  K  F  R  A  D  G  D  Q  K  E

SNN1 : 1313 tttgctaagcaggaattgcagctcggtagcttccctaccattctggttttccctaagaac 1372
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
APR1 : 1261 tttgctaagcaggaattgcagctcggtagcttccctaccattctggttttccctaagaac 1320
       421   F  A  K  Q  E  L  Q  L  G  S  F  P  T  I  L  V  F  P  K  N

SNN1 : 1373 tcatcgagaccgatcaagtatccgtctgagaagagagatgttgagtctttgacttcgttc 1432
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
APR1 : 1321 tcatcgagaccgatcaagtatccgtctgagaagagagatgttgagtctttgacttcgttc 1380
       441   S  S  R  P  I  K  Y  P  S  E  K  R  D  V  E  S  L  T  S  F

SNN1 : 1433 ttgaatcttgtccgataa 1450
       ||||||||||||||||||
APR1 : 1381 ttgaatcttgtccgataa 1398
       461   L  N  L  V  R ^^^
```

ภาพที่ 4.8 ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากดีเอ็นเอสอดแทรก SNN1 ใน รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN1 เปรียบเทียบกับลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *APR1*)

4.4 ผลการทดสอบการแสดงออกของดีเอ็นเอ SNN1 (ผลจากข้อ 4.3)

4.4.1 ผลการตัดยีนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่งออกจากดีเอ็นเอ SNN1

ผลการนำรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN1 ซึ่งตรวจสอบแล้วว่ามีลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสจากดีเอ็นเอ SNN1 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *APR1*) (ผลจากข้อ 4.3) มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้สายดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh 5 และ Prh4 การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสพบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 เบส (ดังแสดงในภาพที่ 4.9 ก) ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอที่ควรจะได้คือ 1,423 เบส เพราะดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh 5 และ Prh4 ตามที่ออกแบบไว้จะสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขนาด 1,423 เบส (ผลจากข้อ 4.1.2) เรียกดีเอ็นเอที่ได้นี้ว่า SNN2 แยกเอาดีเอ็นเอ SNN2 ที่ได้ ออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ นำมาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh 1 และ Prh2 ผลการวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอ SNN1-1 คือขนาด 523 เบส ตามที่คาด (ดังแสดงในภาพที่ 4.9 ข)

4.4.2 ผลการโคลนดีเอ็นเอ SNN2 (ผลจากข้อ 4.4.1)

4.4.2.1 ผลการทำทรานสฟอร์เมชันและการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์

เนื่องจากดีเอ็นเอ SNN2 เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยใช้เอนไซม์ไพโรเบสดีเอ็นเอโพลิเมอเรส ดังนั้นจึงเป็นดีเอ็นเอปลายทู่ นำดีเอ็นเอ SNN2 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pUC18 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ได้เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 ได้โคโลนีสีขาวหรือทรานสฟอร์แมนต์ทั้งหมด 300 โคโลนี อัตราส่วนระหว่างจำนวนโคโลนีสีขาว : โคโลนีสีฟ้า เท่ากับ 1 : 3 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์จำนวน 48 โคโลนีมาตรวจหาว่ามีพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะโดยวิธีโคโลนีแครกกิง พบว่ามีเพียง 12 โคโลนีเท่านั้นที่มีพลาสมิดขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18

ก. ข.

ภาพที่ 4.9 ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR

ก. เมื่อใช้รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN1 (ผลจากข้อ 4.2.3) เป็นดีเอ็นแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh5 และ Prh4

ข. เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR (ข้อ ก.) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 และ Prh2

M หมายถึง ดีเอ็นเอของฟาจแลมบ์ดาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Hin*dIII

L หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดเพิ่มขึ้นทีละ 100 เบส ช่วง 100 เบส ถึง 1 กิโลเบส

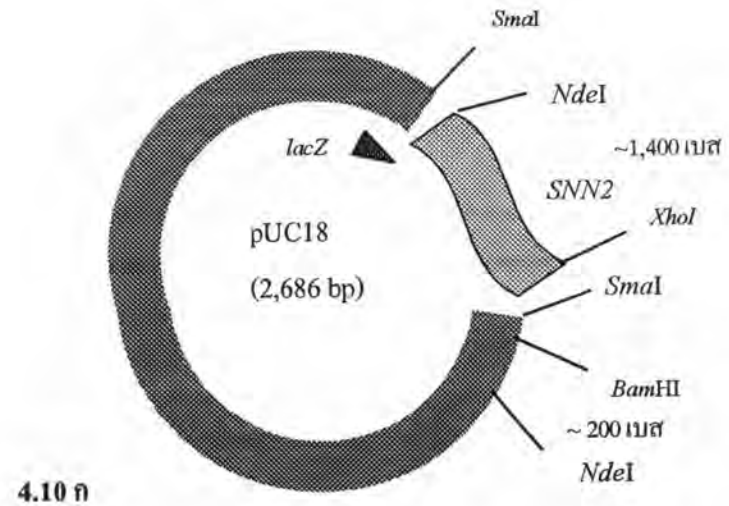
1-2 หมายถึง ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ขนาดประมาณ 1,400 เบส เรียกดีเอ็นเอ SNN2 (คือดีเอ็นเอ SNN1 ซึ่งปราศจากยีนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่ง)

3 หมายถึง ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ขนาดประมาณ 500 เบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอ SNN1-1 คือ 523 เบสตามที่ควรจะได้เมื่อดีเอ็นเอแม่แบบคือดีเอ็นเอ SNN2

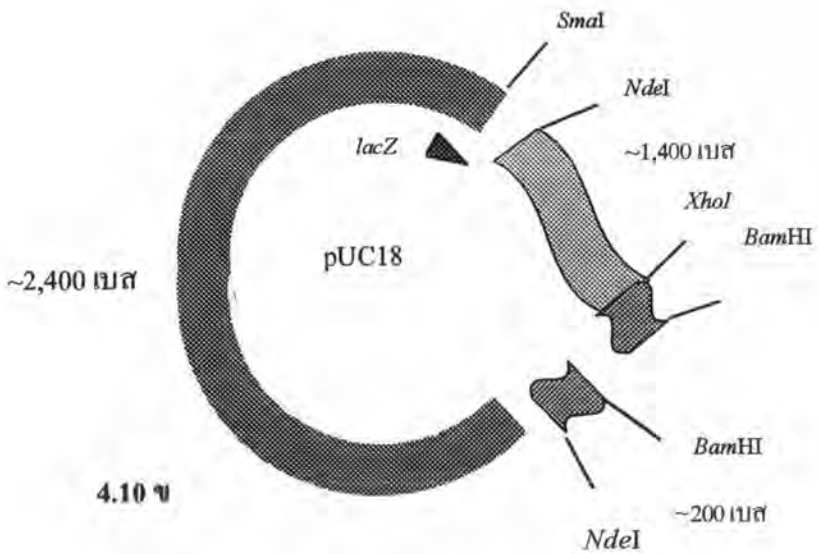
4.4.2.2 ผลการตรวจสอบทิศทางการสอดแทรกของดีเอ็นเอ SNN2 ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด(ผลจากข้อ 4.4.2.1)

ดีเอ็นเอ SNN2 ที่สอดแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด (ผลจากข้อ 4.4.2.1) จะสามารถแสดงออกได้ หาก SNN2 เชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I โดยหันปลายด้าน 5′ เข้าหายีนส่วนโปรโมเตอร์ *lac* (*lac* promoter) ของพลาสมิดพาหะ pUC18 SNN2 มีขนาด 1,423 เบส ปลายด้าน 5′ และปลายด้าน 3′ มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Xho*I ตามลำดับ สอดแทรกในพลาสมิดพาหะ pUC18 ซึ่งมีขนาด 2,686 เบส ที่ตำแหน่งสอดแทรก *Sma*I หลังตำแหน่ง *Sma*I บนพลาสมิดพาหะ pUC18 เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Bam*HI และถัดจากตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Bam*HI นี้บนพลาสมิดพาหะ pUC18 ออกไปประมาณ 200 เบส เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I ดังแสดงในภาพที่ 4.10 ก. ภาพที่ 4.10 ข. แสดงชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 เบส ที่ควรจะได้เมื่อตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดซึ่งมีดีเอ็นเอ SNN2 สอดแทรกอยู่ในทิศทางที่ดีเอ็นเอ SNN2 จะสามารถแสดงออกได้ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI

ผลการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดของทรานสฟอร์แมนต์ 12 โคโลนีผลจากข้อ 4.4.2.1 ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI วิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่ามีเพียง 5 ทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 เบส ซึ่งเป็นขนาดดีเอ็นเอสอดแทรก SNN2 และได้ดีเอ็นเอขนาด 200 เบส ซึ่งเป็นขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการที่พลาสมิดพาหะ pUC18 ถูกตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI (ดังแสดงในภาพที่ 4.11) แสดงว่าดีเอ็นเอ SNN2 สอดแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิดทั้ง 5 โดยหันปลายด้าน 5′ เข้าหายีนส่วนโปรโมเตอร์ *lac* ของพลาสมิดพาหะ pUC18 เรียกรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ SNN2 สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดพาหะ pUC18 โดยหันปลายด้าน 5′ เข้าหายีนส่วนโปรโมเตอร์ของพลาสมิดพาหะ pUC18 นี้ว่า pUC/SNN2



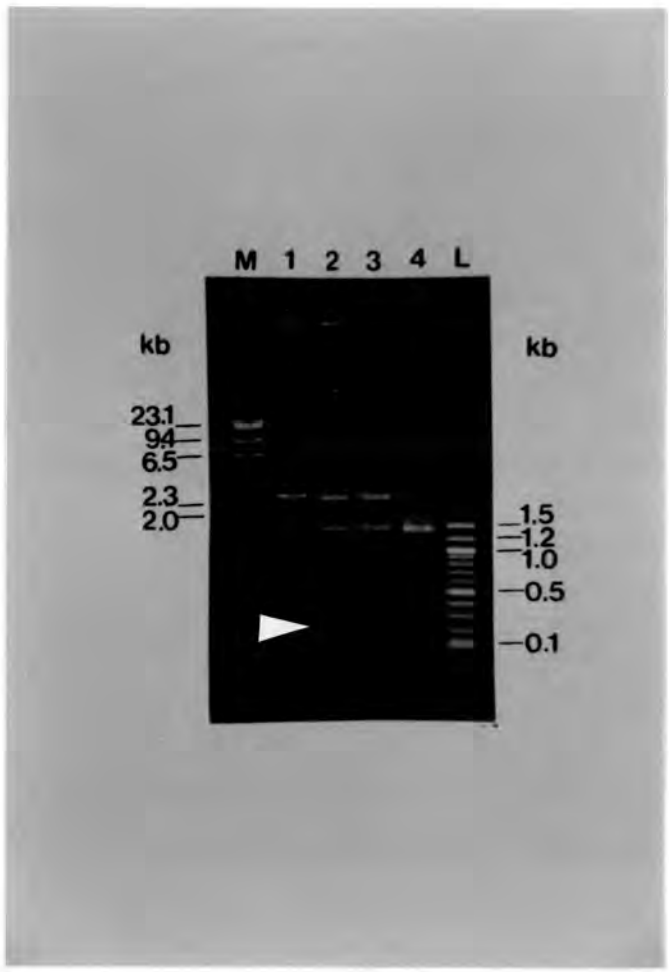
4.10 ก



4.10 ข

ภาพที่ 4.10 - 4.10ก ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชันบนดีเอ็นเอ SNN2 และบนพลาสมิดพาหะ pUC18

- 4.10ข ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 เบส ที่ควรจะได้จากการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอSNN2 สอดแทรกอยู่ในทิศทางที่สามารถแสดงออกได้



ภาพที่ 4.11 ผลการตรวจสอบว่าดีเอ็นเอ SNN2 สอดแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิดในทิศทางที่ดีเอ็นเอ SNN2 สามารถแสดงออกได้

M หมายถึง ดีเอ็นเอของฟาจแลมป์ดาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Hin*dIII

L หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดเพิ่มขึ้นทีละ100 เบส ช่วง 100 เบส ถึง 1 กิโลเบส

1 หมายถึง พลาสมิดพาหะ pUC18 ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I ขนาด 2,600 เบส

2-3 หมายถึง ผลการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,400, 1,400 และ 200 เบส ตามลำดับ (ถูกศรแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 เบส)

4 หมายถึง ดีเอ็นเอ SNN2 ขนาด 1,423 เบส

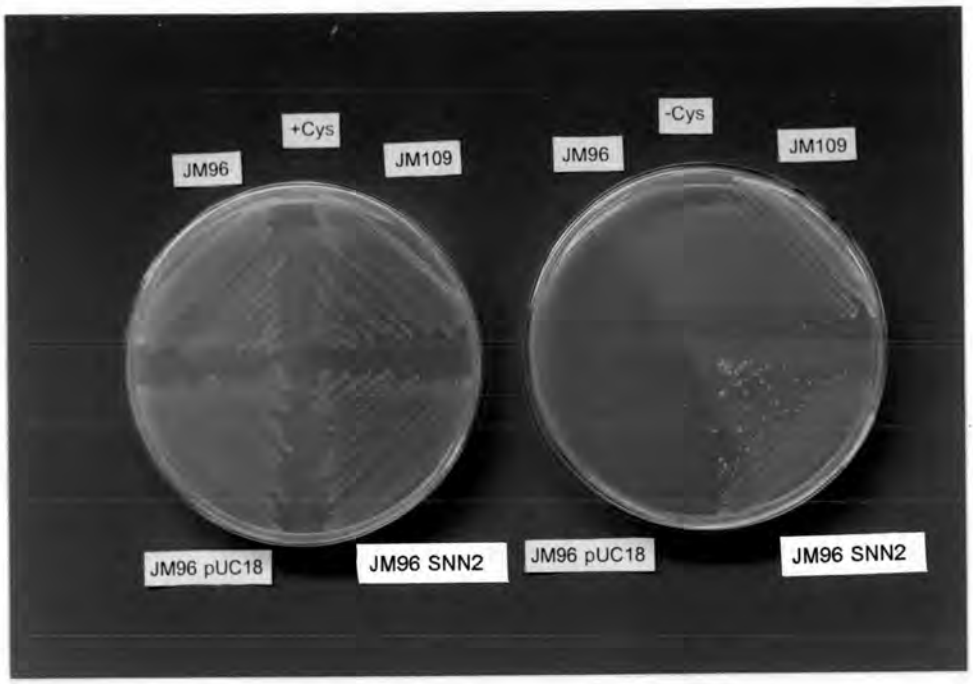
4.4.3 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของดีเอ็นเอ SNN2 โดยวิธีคอมพลีเมนเตชัน (complementation test)

ทำการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN2 (ผลจากข้อ 4.4.2) และพลาสมิดพาหะ pUC18 เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM96 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนซิสเตอีนได้ เพราะยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตสผ่าเหล่า (mutation) การทดลองเปรียบเทียบใช้ *E. coli* JM96 และ *E. coli* JM109 เพาะเลี้ยง *E. coli* ทั้ง 4 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร M9 2 ชนิดคือชนิดที่เติมกรดอะมิโนครบทั้ง 20 ชนิด ความเข้มข้นชนิดละ 25 ไมโครกรัม/มล. และชนิดที่เติมกรดอะมิโนเพียง 18 ชนิดที่ความเข้มข้นชนิดละ 25 ไมโครกรัม/มล. แต่ไม่เติมกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดสอบดังแสดงในภาพที่ 4.12 *E. coli* ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร M9 ชนิดที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิด ภายในเวลา 2 วัน เฉพาะ *E. coli* JM96 ซึ่งมีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN2 และ *E. coli* JM109 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีนได้เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร M9 ที่เติมกรดอะมิโน 18 ชนิด ไม่เติมกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีน ภายในเวลา 3 วัน เนื่องจาก *E. coli* JM96 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีนเพราะยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตสผ่าเหล่า แสดงว่าดีเอ็นเอ SNN2 ที่สอดแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN2 สามารถแสดงออกได้ คือสามารถทำหน้าที่ประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสได้จึงสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนเพื่อการเจริญได้

4.5 ผลการทดสอบว่าเอพีเอสรีดักเตสสามารถทำให้ *E. coli* นำกำมะถันซัลเฟตมาสร้างเป็นกรดอะมิโนซิสเตอีนและเมไธโอนีนได้เพิ่มมากขึ้น

4.5.1 ผลการสร้างรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pET/SNN2

ผลการตัดพลาสมิดพาหะ pET5b ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI แล้วนำมาวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 4,130 เบส แยกเอาชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4,130 เบส ที่ได้ออกจากเจลอะกาโรสนำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอ SNN2 ซึ่งมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI อยู่ด้านปลาย 5′ และ 3′ ตามลำดับ ซึ่งเตรียมโดยการตัด



ภาพที่ 4.12 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของดีเอ็นเอ SNN2 โดยวิธีคอมพลีเมนเตชัน โดยการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN2 เข้าสู่ *E. coli* JM96 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีนได้ เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเซลล์ทรานสฟอร์แมนต์กับ *E. coli* JM96, *E. coli* JM96 ที่มีพลาสมิดพาหะ pUC18 และ *E. coli* JM109 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีนได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมและไม่เติมกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีน

+cys หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร M9 ที่เติมกรดอะมิโนครบ 20 ชนิด

-cys หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร M9 ที่เติมกรดอะมิโน 18 ชนิด ไม่เติมกรดอะมิโนซิสเตอีน และกรดอะมิโนเมไธโอนีน

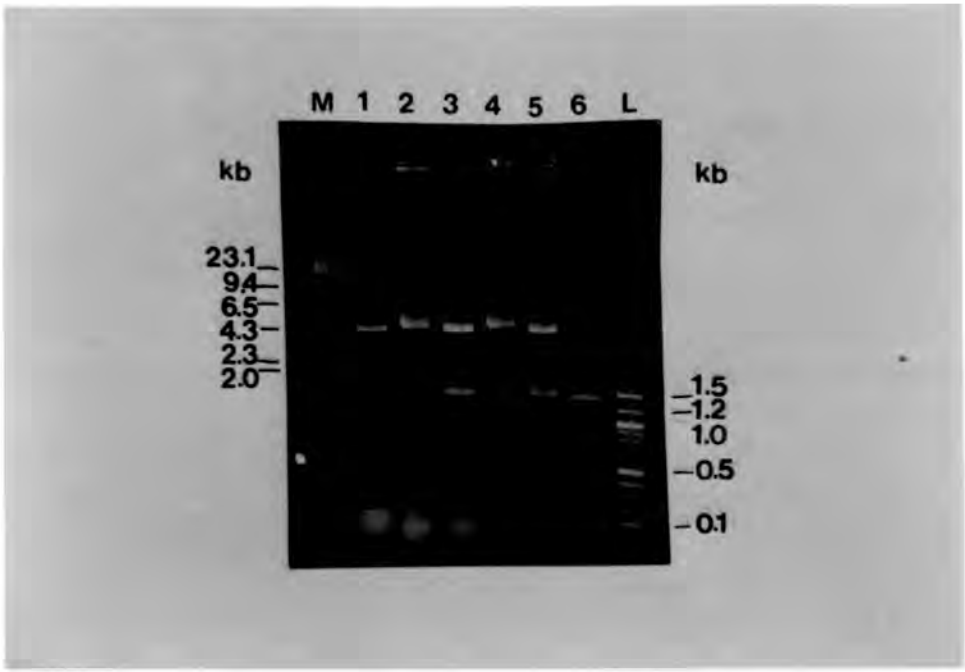
รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN2 ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI จากนั้นนำมาทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 ผลการทำทรานสฟอร์เมชันได้โคโลนีทรานสฟอร์แมนต์เป็นสีขาวทั้งหมดประมาณ 300 โคโลนี คัดเลือกมา 8 โคโลนี นำมาตรวจหารีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pET5b โดยวิธีโคโลนีแครกกิง พบว่าทั้ง 8 โคโลนีมีพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pET5b เลือกมาศึกษาต่อ 2 โคโลนี

4.5.2 ผลการตรวจสอบพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดpET5b (ผลจากข้อ 4.5.1) ว่ามีดีเอ็นเอ SNN2 สอดแทรกอยู่โดยการตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน

ผลการตัดพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pETsb (ผลจากข้อ 4.5.1) ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 4,130 เบส และขนาด 1,400 เบส ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิดพาหะ pET5b และดีเอ็นเอ SNN2 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.13 แสดงว่าเป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิดของพลาสมิด pET5b ที่มีดีเอ็นเอ SNN2 สอดแทรกอยู่ เรียกรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ได้นี้ว่า pET/SNN2

4.5.3 ผลการทดสอบกระบวนการนำซัลเฟตมาสร้างเป็นกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีน ใน *E. coli* JM109DE3

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pET/SNN2 เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109DE3 ตามวิธีข้อ 3.5.2.2 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์จากความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน นำทรานสฟอร์แมนต์มาทดสอบความสามารถในการนำกำมะถันซัลเฟตไปสร้างเป็นกรดอะมิโนซิสเตอีน และกรดอะมิโนเมไธโอนีน การทดลองเปรียบเทียบใช้ *E. coli* JM109DE3 ซึ่งมีพลาสมิดพาหะ pET5b และ *E. coli* JM109DE3 โดยเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ปริมาตร 50 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล.บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเป็นหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อ 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร M9 ซึ่งเติมกรดอะมิโน 18 ชนิด ความเข้มข้นชนิดละ 25 ไมโครกรัม/มล.ไม่เติมกรดอะมิโนซิสเตอีน และกรดอะมิโนเมไธโอนีน



ภาพที่ 4.13 ผลการตรวจสอบว่ารีคอมบิแนนต์พลาสมิด pET/SNN2 มีดีเอ็นเอ SNN2 สอดแทรกอยู่ โดยการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI

M หมายถึง ดีเอ็นเอของฟาจแลมป์ดาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Hin*dIII

L หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดเพิ่มขึ้นทีละ 100 เบส ช่วง 100 เบส ถึง 1 กิโลเบส

1 หมายถึง พลาสมิดพาหะ pET5b ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI

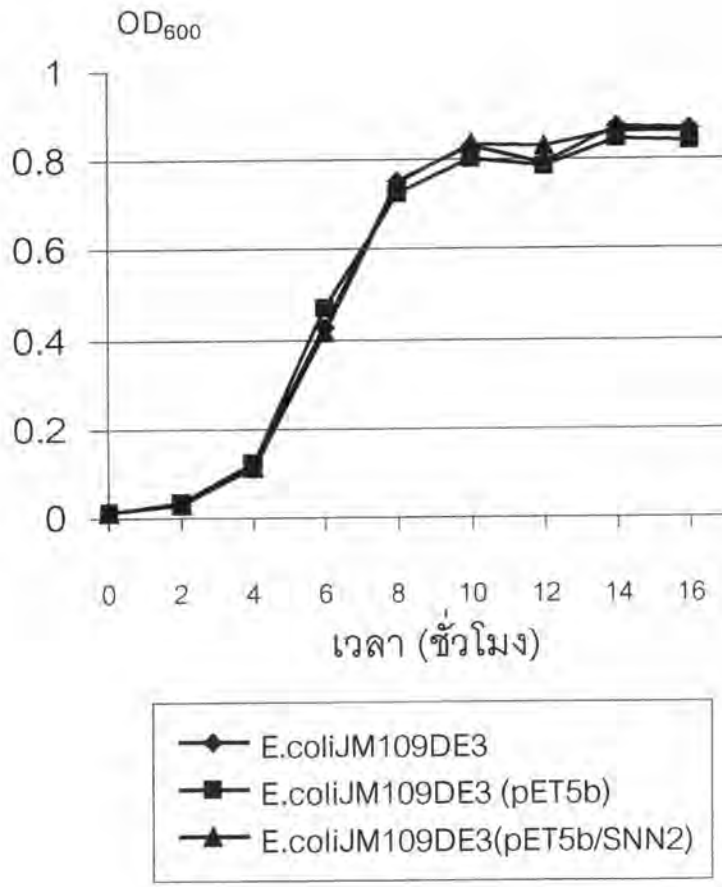
ขนาดความยาว 4,130 เบส

2,4 หมายถึง รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pET/SNN2 ในรูปพลาสมิดปลายปิด

3,5 หมายถึง รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pET/SNN2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI ได้ดีเอ็นเอ 2 แถบขนาด 4,130 เบส และขนาด 1,423 เบส

6 หมายถึง ดีเอ็นเอ SNN2 ขนาด 1,423 เบส

ปริมาตร 50 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. (กำหนดให้ความเข้มข้นสุดท้ายของกำมะถันซัลเฟต ในรูปแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้เท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์) เติม IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัม/มล. เพื่อเป็นตัวชักนำให้โปรโมเตอร์ *lacUV5* (*lacUV5* promoter) ทำงาน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.14 การเจริญของ *E. coli* JM109DE3 สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pET/SNN2, pET5b และไม่มีพลาสมิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร M9 ซึ่งเติมกรดอะมิโน 18 ชนิด ความเข้มข้นชนิดละ 25 ไมโครกรัม/มล. ไม่เติมกรดอะมิโนซิสเตอีน และกรดอะมิโนเมไธโอนีน

บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง การทดลองชุดควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ติดตามการเจริญโดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ดังแสดงผลในภาพที่ 4.14 หลังจาก 16 ชั่วโมง แยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 2,000xg เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ (cell dry weight) และนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาปริมาณกำมะถันซัลเฟต ผลการหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ และผลการวิเคราะห์ปริมาณกำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* JM109DE3 ทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ปลูกเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณกำมะถันซัลเฟตที่ถูกใช้ไป และน้ำหนักแห้งของเซลล์ *E. coli* JM109DE3 ทั้ง 3 ชนิด

ชนิดของเซลล์	ปริมาณซัลเฟต (มก./ลิตร)			น้ำหนักแห้ง (มก./ลิตร)	ปริมาณซัลเฟตที่ใช้ไป/น้ำหนักแห้ง
	ก่อนปลูกเชื้อ	หลังปลูกเชื้อ	ถูกใช้ไป		
E. coli JM109DE3	115.96	102.83	8.21	706	0.012
E. coli JM109DE3 (pET5b)	104.00	95.79	13.10	708	0.018
E. coli JM109DE3 (pET5b/*SNN2*)	118..57	100.15	18.42	750	0.025
Control	114.82	113.81	1.01	-	-

E. coli JM109DE3 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pET/SNN2 สามารถดูดซับ (absorp) กำมะถันซัลเฟตเข้าสู่เซลล์ได้สูงกว่า *E. coli* JM109DE3 และ *E. coli* JM109DE3 ที่มีพลาสมิดพาหะ pET5b แสดงว่าดีเอ็นเอ SNN2 ที่สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดพาหะ pET5b สามารถแสดงออกได้ และทำหน้าที่

ประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส เอพีเอสรีดักเตสเป็นเอนไซม์ในขั้นตอนของกระบวนการนำกำมะถันซัลเฟตมาสร้างเป็นกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีนของ *E.coli*

4.6 ผลการสร้างรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1/SNN1 สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งใน *E. coli* และ *A. tumefaciens* EHA101

4.6.1 ผลการสร้างรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1/SNN1

ตัดพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I วิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสพบว่าได้ดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 15 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I และดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของยีน *Gus* ซึ่งเป็นยีนเครื่องหมายเพื่อใช้ตรวจหาความสามารถของยีนส่วนโปรโมเตอร์ของพลาสมิดพาหะ ในการทำให้ยีนแสดงออก (ดังแสดงในภาพที่ 4.15) พืชที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ซึ่งมียีน *Gus* สอดแทรกอยู่เมื่อนำเนื้อเยื่อมาย้อมด้วยสี X-Gluc ซึ่งเป็นสับสเตรตของโปรตีน Gus หรือเบตากลูโคโรนิเดส (β-glucoronidase) เนื้อเยื่อของพืชจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า (แผนที่ของพลาสมิด pBIH1-IG ดังแสดงในภาคผนวก ค) แยกเอาแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 15 กิโลเบสที่ได้ ซึ่งเป็นแถบของพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I ออกจากเจลอะกาโรสโดยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ นำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอ SNN1 (ผลจากข้อ 4.3) ซึ่งมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I อยู่ที่ปลาย 5′ และ 3′ ตามลำดับ แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 เพื่อเพิ่มจำนวนรีคอมบิแนนต์พลาสมิด คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์จากความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. ได้ทรานสฟอร์แมนต์จำนวน 12 โคโลนี เลือกทรานสฟอร์แมนต์จำนวน 9 โคโลนี นำมาสกัดเอาพลาสมิดและตัดพลาสมิดที่ได้ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I วิเคราะห์ผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสพบว่า มีพลาสมิด 2 โคโลนีที่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชันแล้ว ได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 15 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของ

พลาสมิด pBIH1-IG(SX) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *XbaI* และ *XhoI* และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอ SNN1 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.16 เรียกรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ได้นี้ว่า pBIH1/SNN1

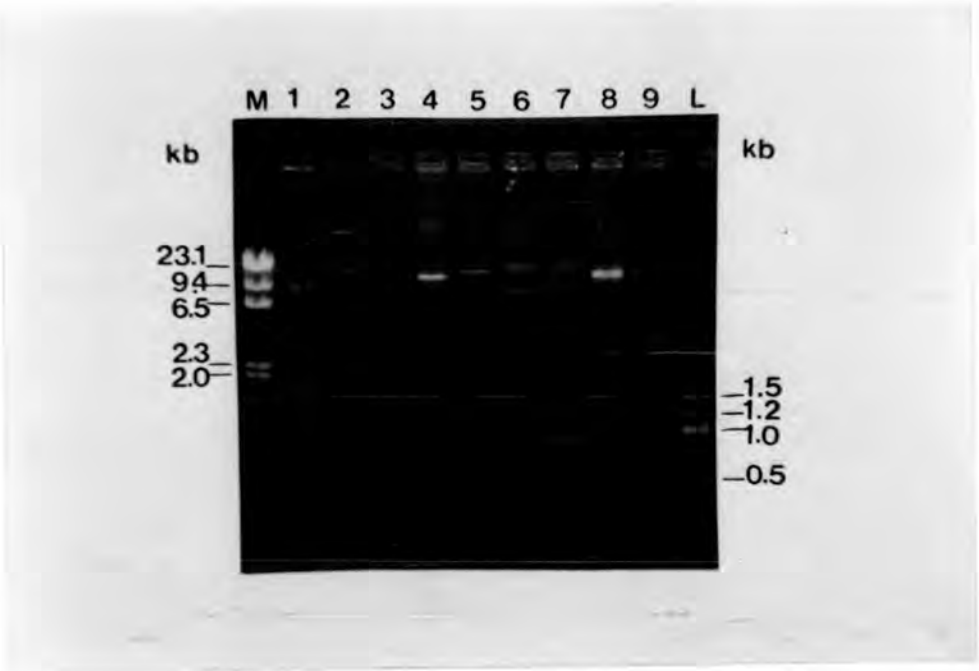
4.6.2 ผลการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1/SNN1 เข้าสู่ *A. tumefaciens* EHA101 โดยวิธีอิเลคโตรพอเรชัน

ผลการทำอิเลคโตรพอเรชันโดยใช้รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1/SNN1 ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *A. tumefaciens* EHA101 ตามวิธีข้อ 3.8 ได้ทรานสฟอร์แมนต์ประมาณ 200 โคโลนี คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์จำนวน 7 โคโลนี มาทำโคโลนี PCR ตามวิธีข้อ 3.9.4.3 โดยแขวนลอยเซลล์ทรานสฟอร์แมนต์ในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh 1 และ Prh2 วิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส (ดังแสดงในภาพที่ 4.17) ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอ SNN1-1 ที่ได้จากกระบวนการ PCR เมื่อใช้ดีเอ็นเอ SNN1 เป็นแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 และ Prh2 จาก 2 โคโลนี แสดงว่าทรานสฟอร์แมนต์ 2 โคโลนีมีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1/SNN1

ภาพที่ 4.15 ผลการตัดพลาสมิดพาหะ pBIHI-IG(SX) ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I

M หมายถึง ดีเอ็นเอของฟาจแลมป์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Hin*dIII

3 หมายถึง ดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่ได้ แถบบนขนาด 15 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิดพาหะ pBIHI-IG(SX) แถบล่างขนาด 2.0 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของยีน *Gus*

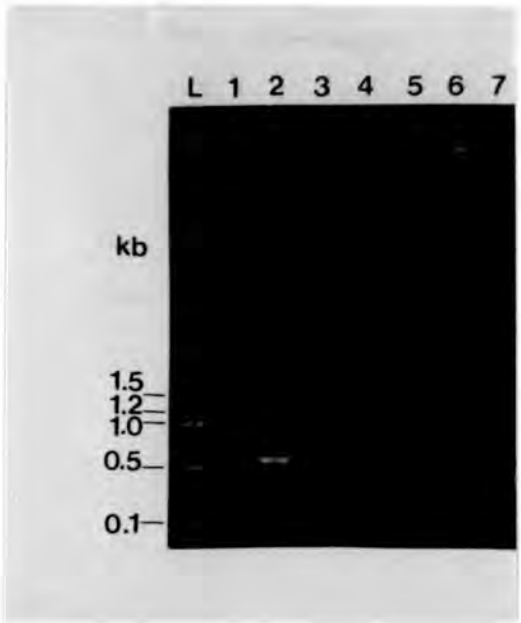


ภาพที่ 4.16 ผลการนำพลาสมิดที่สกัดได้จากทรานสฟอร์แมนต์ 9 โคโลนี (จากข้อ 4.6.1) มาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I (1-9)

M หมายถึง ดีเอ็นเอของฟาจแลมป์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Hin*dIII

L หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดเพิ่มขึ้นทีละ100 เบส ช่วง100เบส ถึง1กิโลเบส

4,8 หมายถึง ดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่ได้ แถบบนขนาดประมาณ 15 กิโลเบสซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) ที่ปราศจากยีน *Gus* และแถบล่างขนาด 1.5 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอ SNN1



ภาพที่ 4.17 ผลการทำ โคโลนี PCR ของโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์ ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 และ Prh2 (1-7)

L หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดเพิ่มขึ้นทีละ 100 เบส ช่วง 100 เบส ถึง 1 กิโลเบส

1,2 หมายถึง แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 523 เบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอ SNN1-1