บทที่ 1

คำนำ

ลักษณะทั่วไปของ *Streptomyces*

Streptomyces เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบในดิน จัดอยู่ในพวกแอคติโนมัยซิส (Actinomyces) ที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต มีลักษณะเป็นสายใยที่ผิวอาหาร (substrate mycelium) หลังจากนั้นเมื่อความสมบูรณ์ของอาหารลดลง จึงเกิดสายใยอากาศ (aerial mycelium) และเกิดการงอกของสปอร์ขึ้นสายใยอากาศเป็นสายของสปอร์ ถ้า *Streptomyces* เจริญในสภาวะมีคาร์บอนมอนอกไซด์ และไม่มีอากาศ (anaerobic condition) จะไม่มีสายใยอากาศเกิดขึ้น สายใยประกอบไปด้วย L-diaminopimelic acid(L-DAP)และไกลซีน (Ensign, 1978; William et al., 1983) องค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเออยู่ในช่วง 69-73 mol% ของ G+C โดยมีขนาดของจีโนมประมาณ 10^4 กิโลเบส (Hunter, 1985)

ในปัจจุบันนี้ *Streptomyces* ได้เข้ามามีบทบาทและมีประโยชน์ทั้งในทางการแพทย์ และทางด้านอุตสาหกรรม ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ทางการแพทย์ พบว่า *Streptomyces* สามารถผลิตยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด (มากกว่า 2 ใน 3 ของยาปฏิชีวนะทั้งหมด) ดังตัวอย่างเช่น (Kirby, 1980)

Streptomyces griseus	สามารถผลิตสเทรปโทมัยซิน (streptomycin)
Streptomyces fradiae	สามารถผลิตนีโอมัยซิน (neomycin)
Streptomyces kanamyceticus	สามารถผลิตคานามัยซิน (kanamycin)
Streptomyces vinaceus	สามารถผลิตวิโอมัยซิน (viomycin)
Streptomyces lividus	สามารถผลิตลิวิโดมัยซิน (lividomycin)
Streptomyces alboniger	สามารถผลิตพูโรมัยซิน (puromycin)

นอกจากนี้ *Streptomyces* บางชนิดยังสามารถผลิตยาปฏิชีวนะได้มากกว่า 1 ชนิด เช่น *Streptomyces coelicolor* A3(2) สามารถผลิตยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกันได้ 4 ชนิด คือ แอคติโนโรดิน (actinorhodin),อันเดซิลโพรดิจิโอซิน (undecylprodigiocin) เมทธิลลีโนมัยซิน (methylenomycin) และ แคลเซียม-ดีเพนเดนท์ แอนติไบโอติค (CDA(calcium-dependent antibiotic)) (Hopwood and Wright, 1983) *Streptomyces glaucescens* สามารถผลิตยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกันได้ 3 ชนิด คือ ไฮดรอกซีสเทรปโทมัยซิน (hydroxystreptomycin) , เททราซีโนมัยซิน ซี (tetracenomycin C)และ สารประกอบที่คล้ายแบคเทอริโอซิน (bacteriocin-like substance (Schurter, Kissling-Abderhalden, and Leisinger, 1979) จากความสามารถในการผลิตยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดนี้มีผลทำให้ การรักษาโรคในปัจจุบันเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว และสะดวกขึ้น ทางด้านอุตสาหกรรม *Streptomyces* ก็เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมได้หลายชนิด เช่น โปรเนส โดย *Streptomyces griseus* (William et al.,1983) ไทโรสิเนส โดย *Streptomyces antibioticus* (William et al.) ไซแลเนส โดย *Streptomyces xylophagus* (Kawaminami and Iizuka, 1969) และ กลูโคส ไอโซเมอเรส โดย *Streptomyces flavogriseus*(Chen, Anderson, and Han, 1979) และ *Streptomyces sp.*190-1 (นฤมล ศุภจรรยา, 2526) จากการที่จุลินทรีย์มีความสำคัญเป็นอย่างมากในหลายด้าน จึงมีผู้สนใจที่จะคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้คุณสมบัติที่ดีของจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ต่อไป

<u>การปรับปรุงสายพันธุ์</u>

ในกระบวนการทางธรรมชาติปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซลมีชีวิตจะถูกควบคุมอย่างมีประสิทธิภาพที่สุดและสังเคราะห์แต่สารจำเป็นในปริมาณที่น้อย ซึ่งเพียงพอต่อความต้องการของเซลในการคงอยู่และเจริญเติบโตต่อไปเท่านั้น จึงมีปริมาณไม่พอเพียงกับความต้องการของมนุษย์ที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่ต้องพัฒนาให้จุลินทรีย์ต่างๆ ผลิตสารตามที่เราต้องการและในปริมาณที่มากกว่าระดับปกติได้ การปรับปรุงที่จะทำให้เกิด

การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์มี 2 ลักษณะ ได้แก่ (Schwab, 1988)

1. การปรับปรุงทางสรีรวิทยาเพื่อให้ได้ผลผลิตตามต้องการ แต่การปรับปรุงด้านนี้ ยังมีข้อจำกัดทางพันธุกรรม

2. การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม

การพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์โดย การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้เริ่มทำกันมานานโดยวิธีการที่ใช้กันมี 3 วิธี คือ วิธีแรก เป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutagenesis) ซึ่งอาจทำโดยใช้สารเคมีหรือทางฟิสิกส์ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้เป็นกระบวนการแบบสุ่ม เพราะไม่สามารถไปกำหนดตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงนั้นๆได้ แต่การทำการกลายพันธุ์แบบนี้ก็สามารถประสบความสำเร็จได้สำหรับใช้กับจุลินทรีย์ โดยอาจใช้สำหรับกลายพันธุ์ให้หยุดการทำงานของเอนไซม์ที่ไม่ต้องการ และกำจัดการควบคุมที่ให้ผลลบแก่ผลผลิตที่ต้องการทิ้งไป เช่น ในการผลิตเพนนิซิลิน (Tien, 1981) แต่อย่างไรก็ตาม ข้อเสียของการกลายพันธุ์คือ เสียเวลา และเปลืองพลังงาน วิธีที่สอง คือการรวมกันของสารพันธุกรรม (genetic recombination) ซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมระหว่าง 2 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ การหลอมโปรโตพลาสท์โดยใช้สารเคมีชักนำ และการคอนจูเกชัน โดยที่การเหนี่ยวนำให้เซลมารวมกันมีผลทำให้เกิดลูกผสมที่มีลักษณะที่ดีของทั้งสองเซล และการนำสองเซลมารวมกันนั้นอาจมาจากต่างสปีชีส์กันก็ได้ ซึ่งการนำเซลทั้งสองมารวมกันโดยการหลอมโปรโตพลาสท์จะมีความถี่ของการรวมกันสูงกว่าการทำคอนจูเกชันถึง 10^2-10^4 เท่า (Godfrey, Ford, and Huber, 1978) ดังนั้น ในระดับอุตสาหกรรมจึงได้มีการพัฒนานำเอาการหลอมโปรโตพลาสท์มาใช้คือ นำสายพันธุ์กลายพันธุ์สองลักษณะของจุลินทรีย์หนึ่งที่เป็นลักษณะที่ดีมารวมกัน ซึ่งจะได้ลูกผสมที่มีลักษณะที่ดีสองลักษณะรวมกัน เพื่อนำไปใช้ต่อไป เช่น การหลอม *Cephalosporium acremonium* 2 สายพันธุ์ โดยที่สายพันธุ์หนึ่งเจริญเร็ว สร้างสปอร์ได้ และต้องการเมทไธโอนีนในการเจริญ ส่วนอีกสายพันธุ์ เจริญช้า ไม่สร้างสปอร์ และ สามารถใช้สารอินทรีย์พวกซัลเฟตได้ เมื่อหลอม 2 สายพันธุ์ เข้าด้วยกันแล้วจะได้ลูกผสมที่มีคุณสมบัติดังนี้ เจริญเร็ว สร้างสปอร์ได้ สามารถใช้สารอินทรีย์พวกซัลเฟตได้ และผลิตเซฟาโลสปอริน ซี(cephalosporin C)ได้มากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่(Hamlyn and Ball, 1979) วิธีสุดท้ายที่นิยมใช้กันในการปรับปรุงสายพันธุ์คือ วิธีการทางพันธุวิศวกรรม วิธีนี้เป็นวิธีที่

พัฒนาใหม่ที่สามารถกำหนดเจาะจงยีนที่ต้องการ แล้วนำยีนที่ต้องการจากเซลหนึ่งถ่ายทอดสู่อีกเซลหนึ่งเพื่อให้เกิดผลผลิตตามที่ต้องการได้ ดังนั้น วิธีการนี้จึงเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายเพราะวิธีการนี้ไม่ได้เป็นวิธีสุ่มแต่สามารถกำหนดสิ่งที่ต้องการได้

การหลอมโปรโตพลาสท์ เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันมากในการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Streptomyces* เพราะให้ความถี่ของการรวมกันทางพันธุกรรมสูงและการรวมกันระหว่างสปีชีส์ใน *Streptomyces* ยังทำให้เกิดเมตาโบไลท์ (metabolite)ใหม่ๆ ที่มีประโยชน์ เช่นในการผลิตยาปฏิชีวนะได้มีการหลอมโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces galilaeus* ทำให้ได้ลูกผสมที่สามารถสร้าง 2-ไฮดรอกซีอะคลาลิโนมัยซิน (2-hydroxyaclacinomycin) (Akihiro et al., 1991) เป็นต้น รายงานต่อไปนี้จะบ่งบอกถึงความเป็นไปได้ของการหลอมโปรโตพลาสท์ใน *Streptomyces* สายพันธุ์ต่างๆ

Hopwood และคณะ (1977) ได้รายงานถึงการรวมกันของสารพันธุกรรมโดยการหลอมโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces* ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการหลอมโปรโตพลาสท์สามารถนำไปดัดแปลงใช้กับสายพันธุ์อื่นๆ ของแอคติโนมัยซิสได้

Baltz (1978)ศึกษาถึงสภาวะของการหลอมโปรโตพลาสท์ใน *Streptomyces* ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยใช้โปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces fradiae* และ *Streptomyces griseus* พบว่าการหลอมของโปรโตพลาสท์โดยใช้สารเคมีโพลีเอธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ชักนำ จะได้ความถี่ของการรวมกันสูง

Godfrey และคณะ (1978)ได้ทำการทดลองโดยการหลอมโปรโตพลาสท์ และคอนจูเกชันระหว่าง *Streptomyces fradiae* และ *Streptomyces bikiniensis* พบว่าการหลอมโปรโตพลาสท์จะให้ความถี่ของการรวมกันสูงกว่าการทำคอนจูเกชัน ถึง 200-10,000 เท่า ซึ่งจะต้องอาศัยการชักนำด้วย PEG ในความเข้มข้นที่เหมาะสม

Baltz และ Matsushima (1981) ศึกษาสภาวะของการเกิดโปรโตพลาสท์ใน *Streptomyces* และการหลอมโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces fradiae* พบว่าอุณหภูมิของการเจริญของเซล และการงอกใหม่ของโปรโตพลาสท์ เป็นปัจจัยหนึ่งต่อประสิทธิภาพของการหลอมโปรโตพลาสท์ โดยพบว่าความถี่การรวมกันจะสูงภายใต้สภาวะที่การงอกใหม่ของโปรโตพลาสท์มีประสิทธิภาพดีที่สุด

Ogata และคณะ (1985) ศึกษาถึงการหลอมโปรโตพลาสท์และคอนจูเกชันของ

Streptomyces azureus พบว่าความถี่ของการรวมกันโดยการหลอมโปรโตพลาสท์จะสูงกว่าการทำคอนจูเกชันถึง 10^4 เท่าและเมื่อนำสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างไทโอสเทรปทรอนมารวมกับที่ไม่สร้างไทโอสเทรปทรอน พบว่าลูกผสมสามารถผลิตยาไทโอสเทรปทรอนได้สูงในหลายๆ เจเนอเรชั่น

สำหรับรายงานในประเทศไทยได้มีผู้ศึกษาการผลิตเอนไซม์โดย *Streptomyces* รวมทั้งการปรับปรุงสายพันธุ์ดังนี้ นฤมล ศุภจรรยา (2526) ได้แยก *Streptomyces* จากแหล่งดินต่างๆในประเทศไทยที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ และพบว่า *Streptomyces sp.*190-1 สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ในปริมาณสูงสุดภายใต้สภาวะที่ใช้ และขจีนาฏ จรรยาอุดม (2528)ได้นำเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces sp.*190-1 มาทำการสกัดแยก และทำให้บริสุทธิ์รวมทั้งได้ศึกษาลักษณะบางประการของเอนไซม์นี้ด้วย พบว่าการที่ *Streptomyces sp.*190-1 จะผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซ-เมอเรสได้นั้นต้องมีตัวชักนำ คือน้ำตาลไซโลส(D-xylose) ต่อมากาญจนา วรวิทย์วัฒนะ (2530)ได้แยก *Streptomyces sp.*42-9 จากดินในประเทศไทยที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้สูง และ กมลวรรณ มั่นภักดี (2534)ได้ทำการสกัดแยก ทำให้บริสุทธิ์ รวมทั้งได้ศึกษาลักษณะบางประการของเอนไซม์นี้ ดังนั้น เนื่องจากข้อจำกัดของเอนไซม์กลูโคส-ไอโซเมอเรสที่ต้องการตัวชักนำที่มีราคาแพง คือ น้ำตาลไซโลส จึงได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Streptomyces sp.*190-1 โดย อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต (2532) ได้โคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces sp.*42-9 เข้าสู่ *Streptomyces sp.*190-1 มีผลทำให้ *Streptomyces sp.*190-1 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ไซแลเนสขึ้นจากเดิม 7-12 เท่า และยังคงผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้เหมือนเดิม นอกจากการโคลนยีนแล้วยังมีการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการหลอมโปรโตพลาสท์ และการคอนจูเกชัน โดย Pinphanichakarn (1990) และวรางคณา อินทรเสน (2534) ได้ทำคอนจูเกชัน และหลอมโปรโตพลาสท์ระหว่าง *Streptomyces sp.*190-1 และ *Streptomyces sp.*42-9 ทำให้ได้ลูกผสมเกิดขึ้นมากมายซึ่งลูกผสมเหล่านี้สามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส และเอนไซม์ไซแลเนสในปริมาณที่แตกต่างกัน

การปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Streptomyces* ดังกล่าวข้างต้นทำให้ได้ลูกผสมที่สามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส และเอนไซม์ไซแลเนสซึ่งจะเป็นประโยชน์

ในการนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสในระดับอุตสาหกรรม ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ไซแลเนสที่สร้างขึ้นโดยลูกผสม จะเปลี่ยนวัสดุราคาถูกที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น กากรำข้าว ฟางข้าว เป็นต้น ให้เป็นน้ำตาลไซโลสซึ่งใช้เป็นตัวชักนำการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสต่อไป จึงทำให้ต้นทุนการผลิตเอนไซม์นี้ลดต่ำลง

การวิเคราะห์ลูกผสมที่ได้จากการหลอมโปรโตพลาสท์ และการทำคอนจูเกชันสามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของลูกผสมเปรียบเทียบกับของสายพันธุ์พ่อแม่ รายละเอียดการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ มีดังต่อไปนี้

<u>การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้วิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส</u>

การทำอิเลคโตรโฟรีซิสของโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule) โดยผ่านรูพรุนของเจลถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของทั้ง โพลีเปปไตด์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และไรโบโซม โดยอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อทำให้โมเลกุลมีประจุเหมือนกัน อัตราการเคลื่อนที่ขึ้นกับมวลโมเลกุลเพียงอย่างเดียว สำหรับโมเลกุลดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนผ่านเจล โดยโมเลกุลเล็กจะผ่านรูพรุนของเจลได้ง่ายกว่าโมเลกุลใหญ่ (Freifelder, 1987)

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงในสายดีเอ็นเอที่ให้ผลแม่นยำจะอาศัย การตัดอย่างจำเพาะด้วยเรสตริกชันเอนไซม์แล้วนำมาผ่านการทำ อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ซึ่งการที่เอนไซม์ตัดสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะจะทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวแตกต่างกัน จำนวนและตำแหน่งที่เรสตริกชันเอนไซม์ตัดนี้มีความจำเพาะในแต่ละจีโนม ซึ่งชิ้นส่วนที่ถูกตัดแล้วเมื่อนำมาแยกโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส จะได้รูปแบบที่จำเพาะเกิดขึ้นเรียกว่า ฟิงเกอร์พริ้นท์ (fingerprint) สำหรับเรสตริกชันเอนไซม์ที่นิยมใช้ในการตัดสายดีเอ็นเอ คือ เรสตริกชันเอนไซม์ชนิดที่ 2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยโปรตีนสายเดี่ยว ต้องการเพียง Mg^{2+} เป็นโคแฟคเตอร์ในการทำงานและจะตัดโมเลกุลดีเอ็นเอตรงจุดที่อยู่บริเวณจดจำส่วนการที่จะเลือกใช้เรสตริกชันเอนไซม์ชนิดใดขึ้นกับจีโนมของจุลินทรีย์นั้นๆ ว่ามีลำดับเบสที่จำเพาะกับเรสตริกชันเอนไซม์ใด (Nathans and Smith, 1975)

ในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่จะทำให้การแยกชิ้นส่วนเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ให้แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอแยกออกจากกันเด่นชัดนั้น มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการดังต่อไปนี้

1. ชนิดและความเข้มข้นของเจล

รูพรุนของเจลชนิดต่างๆ มีขนาดแตกต่างกันโดยที่รูพรุนของโพลีอะคริลาไมด์เจลจะมีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของอะกาโรสเจล ดังนั้นการแยกช่วงโมเลกุลขนาดใหญ่ควรเลือกใช้อะกาโรสเจลและช่วงโมเลกุลเล็กควรเลือกใช้โพลีอะคริลาไมด์เจล แต่ขนาดของรูพรุนของเจลจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของเจลที่ใช้ คือ ขนาดของรูพรุนจะเพิ่มเมื่อความเข้มข้นของเจลลดลงซึ่งโมเลกุลดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ดังในรายงานของ Aaij และ Borst (1972)ได้เปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดผ่านเจลที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 0.6 และ 2.5 เปอร์เซนต์ พบว่าเมื่อดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านอะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซนต์ ดีเอ็นเอปลายเปิดจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าที่ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้การแยกชิ้นส่วนที่เล็กกว่า 10^6 ดาลตัน มักนิยมใช้ 4-5 เปอร์เซนต์ของโพลีอะคริลาไมด์เจล ส่วนช่วง $2-3x10^6$ ดาลตัน มักนิยมใช้ 1-2 เปอร์เซนต์ ของอะกาโรสเจล หรือใช้โพลีอะคริลาไมด์ 1-2 เปอร์เซนต์รวมกับอะกาโรส 0.7 เปอร์เซนต์ แต่ถ้าเป็นโมเลกุลดีเอ็นเอระหว่าง 3 และ $25x10^6$ ดาลตันมักนิยมใช้ 0.3-0.7 เปอร์เซนต์ของอะกาโรส

2. ขนาดและรูปร่างของดีเอ็นเอ

การที่ดีเอ็นเอต้องเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจล ทำให้อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขึ้นกับขนาดและรูปร่างของดีเอ็นเอ เพราะประจุลบต่อมวลของดีเอ็นเอทั้งโมเลกุลใหญ่หรือเล็กจะเท่ากัน ทำให้โมเลกุลดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าขนาดโมเลกุลเล็กในกรณีที่โมเลกุลดีเอ็นเอมีรูปร่างเหมือนกันแต่ถ้ารูปร่างต่างกันการเคลื่อนที่จะขึ้นกับรูปร่างของดีเอ็นเอด้วย ดังในรายงานของ Aaij และ Borst (1972) ได้เปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอเกลียวคู่ปลายปิดและดีเอ็นเอเกลียวคู่ปลายเปิด พบว่าการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอเกลียวคู่ปลายปิดจะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลได้เร็วกว่า และอัตราการเคลื่อนที่จะเป็นสัดส่วนผกผันกับค่าลอการิทึมของมวลโมเลกุลด้วย

3. ความต่างศักย์ไฟฟ้า

ในการทำอิเลคโตรโฟรีซิสนั้นความต่างศักย์ที่ใช้จะขึ้นกับ ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ มีผู้รายงานไว้ว่าการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอขนาดใหญ่ต้องเลือกใช้ความเข้มข้นเจลและความต่างศักย์ต่ำแต่ใช้เวลานาน ดังในรายงานของ Fangman (1978) ได้ศึกษาและแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ T4(T4 DNA) แลมบ์ดา (λ DNA) และ แบคเทอริโอฟาจ จี ซึ่งดีเอ็นเอที่กล่าวมาข้างต้นเป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ และจากการทดลองต้องใช้สภาวะการทำอิเลคโตรโฟรีซิสที่เหมาะสมดังนี้คือ ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 0.1เปอร์เซนต์ และความต่างศักย์ 2.5 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 10 ชม. พบว่าสามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอเหล่านี้ออกจากกันได้ดี ดังนั้นจะเห็นว่าการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอขนาดใหญ่ออกจากกันได้ดีต้องใช้ความเข้นข้นเจลต่ำ แต่ในกรณีที่ดีเอ็นเอที่จะวิเคราะห์มีทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็กซึ่งแตกต่างกันมาก การทำอิเลคโตรโฟรีซิสต้องเลือกใช้ความเข้มข้นของเจลที่ครอบคลุมขนาดเหล่านั้น เช่น Signer และคณะ (1988) ได้ดัดแปลงการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอของเลือดหนูที่ตัดด้วย HaeIII โดยใช้ความเข้นข้นเจลที่แตกต่างกัน 2 ระดับคือ 0.8 เปอร์เซนต์ และ 1.5 เปอร์เซนต์ ในแผ่นเจลเดียวกัน ใช้ความต่างศักย์ในอัตรา 1 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร พบว่าสามารถแยกชิ้นส่วนได้ทั้งสองกลุ่ม คือ ดีเอ็นเอกลุ่มขนาดเล็กจะสามารถแยกออกจากกันได้ที่ความเข้นข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ ส่วนดีเอ็นเอกลุ่มขนาดใหญ่จะแยกออกจากกันได้ดีที่ความเข้นข้นเจล 0.8 เปอร์เซนต์

Helling, Goodman และ Boyer (1974) ทำการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคเทอริโอฟาจและไวรัสอื่นๆที่ถูกตัดด้วย EcoRI จากการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ซึ่งในกรณีนี้จะใช้ความต่างศักย์ต่ำในการทดลอง เพื่อแยกโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่โดยใช้ 100 โวลต์ นาน 5 นาที จากนั้นใช้ 1.5 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร และความเข้มข้นเจล คือ อะกาโรส 0.7 เปอร์เซนต์ จากวิธีการนี้สามารถใช้บ่งบอกมวลโมเลกุลและแผนที่ของดีเอ็นเอจากไวรัสอื่นที่ถูกตัดด้วย EcoRI

Harris-Warrick และคณะ (1975) ทำการแยกยีนของเชื้อ *Bacillus subtillis* ที่ตัดด้วย EcoRI ได้โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสที่สภาวะที่เหมาะสมคือ 150 โวลต์นาน 3 นาทีแล้วต่อด้วย 2 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร

นาน 24 ชม. เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุศาสตร์ต่อไป

นอกจากปัจจัยดังกล่าวข้างต้นแล้ว การที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจนยังต้องขึ้นกับการตัดโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยเรสตริกชันเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ และการที่จะตัดดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์นั้นหมายถึง ทุกๆตำแหน่งจดจำต้องถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ อย่างไรก็ตามต้องใช้ปริมาณที่พอเหมาะของดีเอ็นเอกับเรสตริกชันเอนไซม์และระยะเวลาที่ใช้ในการตัดด้วย นอกจากนี้ยังรวมถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยที่ดีเอ็นเอต้องมีความบริสุทธิ์สูงไม่มีการขาดของสายดีเอ็นเอในระหว่างการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ (Ley, 1989)

Hintermann และคณะ (1981) ได้วิเคราะห์จีโนมของ *Streptomyces glaucescens* โดยใช้เรสตริกชันเอนไซม์ต่างๆกันแล้วผ่านการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส พบว่าภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของการทำอิเลคโตรโฟรีซิสคือ ความเข้มข้นของอะกาโรส 0.85 เปอร์เซนต์ และความต่างศักย์ 2.7 โวลต์ต่อความยาวเจล รวมทั้งชนิดของเรสตริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ BamHI จะสามารถใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของ *Streptomyces glaucescens* ได้ซึ่งขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขึ้นกับชนิดของเรสตริกชันเอนไซม์ที่ใช้และรูปแบบของแถบดีเอ็นเอจะเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์ไป นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์บางสายพันธุ์ออกจากสายพันธุ์ดั้งเดิมได้อีกด้วย

Peterson และ Dela Maza (1983) ศึกษาลักษณะดีเอ็นเอของ *Chlamydia sp.* โดยใช้การตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมหลายชนิดมาเปรียบเทียบกัน พบว่าเมื่อใช้ชนิดของเรสตริกชันเอนไซม์ต่างกันจะให้รูปแบบที่แตกต่างกันไป สามารถนำเทคนิคนี้มาแยก *C.trachomatis* ออกจาก *C.psittci* ได้โดยอาศัยจากรูปแบบของดีเอ็นเอที่ต่างกัน และในปีต่อมา MacClenaghan, Herring และ Aitken (1984) ได้อาศัยเทคนิคนี้มาเปรียบเทียบ *Chlamydia psittaci* ที่แยกมาได้ 12 สายพันธุ์ โดยใช้เจลชนิดโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส เนื่องจากว่าชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสมจะเป็นชนิดที่ให้ความถี่ในการตัดสูงทำให้ได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดเล็ก และจากการนำเทคนิคนี้มาใช้สามารถแยกความแตกต่างของ *C.psittaci* ได้โดยอาศัยรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ Peterson และ Dela Maza (1988) ได้ใช้เทคนิคเดียวกันนี้มาศึกษา

วิเคราะห์ดีเอ็นเอของ *Chlamydia trachomatis* Biovars จาก 60 ตัวอย่าง และเมื่ออาศัยรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วย EcoRI สามารถจัดแบ่งได้จุลินทรีย์นี้ออกเป็น 3 กลุ่ม ตามรูปแบบที่มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม

Chandler และ คณะ (1982) ได้ทำการวิเคราะห์จีโนมและฟีโนไทป์ของ *Mycoplasma pneumoniae* สายพันธุ์ต่างๆ โดยอาศัยรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์เป็นส่วนหนึ่งที่ช่วยในการศึกษาวิเคราะห์จีโนมได้ ซึ่งเมื่อใช้ XbaI และ EcoRI พบว่ารูปแบบของสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาคล้ายคลึงกันมีเพียง 1-2 แถบเท่านั้นที่แตกต่างกันเล็กน้อยซึ่งก็สอดคล้องกับการทดลองด้านอื่นๆ

Kakoyiannis, Winter และ Marshall (1984)ได้ใช้วิธีการศึกษารูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย HindIII บนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสมาจำแนก *Campylobacter coli* 99 สายพันธุ์ ที่แยกจากสัตว์และคน พบว่าแตกต่างกันออกไปตามแหล่งที่มาของเชื้อนี้ ดังนั้นจึงใช้วิธีนี้มาเป็นวิธีจำแนกเชื้อเมื่อมีการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อนี้

Klich และ Mullaney (1987) ได้ใช้วิธีการนี้มาแยกความแตกต่างของ *Aspergillus flavus* ออกจาก *Aspergillus oryzae* ได้อย่างรวดเร็วเพราะการแยก *A.flavus* และ *A.oryzae* ทำได้ยากถ้าใช้ลักษณะทางกายภาพ และเสียเวลามาก

ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้นได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้กันอย่างกว้างขวาง ในการจำแนกการวิเคราะห์ การจัดหมวดหมู่จุลินทรีย์ รวมทั้งการจำแนกสายพันธุ์ที่ถูกกลายพันธุ์ (mutant) นอกจากนั้นในงานด้านการวินิจฉัยโรคต่างๆ ก็ได้นำเทคนิคนี้มาใช้ทั้งนี้เพราะเป็นวิธีการที่มีความไวสูงกว่าวิธีการทางชีววิทยาและภูมิวิทยา ดังในรายงานของ Hilliard และคณะ (1986) ซึ่งได้ใช้เทคนิคนี้จำแนกการติดเชื้อจาก Herpesvirus simian (B virus) โดยใช้เทคนิคนี้จะช่วยให้การวินิจฉัยสาเหตุของโรคว่าเกิดจากเชื้อชนิดใดได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำขึ้น และ Skare และ Summers (1975) ยังได้ใช้ศึกษาถึงโครงสร้างและหน้าที่ของจีโนมของ Herpesvirus อีกด้วย โดยใช้การตัดด้วย EcoRI และเปรียบเทียบ HSV สายพันธุ์ต่างๆ

นอกเหนือจากการศึกษาโดยใช้ดีเอ็นเอทั้งหมด (total DNA) แล้วยังมีผู้รายงานการวิเคราะห์ไมโตรคอนเดรียล ดีเอ็นเอ (mitrochondrial DNA) หรือ

ไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) เช่นกันดังในรายงานของ Vincent และคณะ (1986) ได้ทำการแบ่งกลุ่มของรา *Histoplasma capsulatum* โดยอาศัยรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนของไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ และไรโบโซมอล ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ต่างๆกัน คือ KpnI ,BglII ,HhaI ,XbaIและ EcoRI แล้วนำไปทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสด้วยสภาวะในการทำดังนี้คือ ความเข้มข้นเจล 0.7-2 เปอร์เซนต์ ความต่างศักย์ 1-2 โวลต์ต่อความยาวเจล ซึ่งทำให้สามารถแบ่งแยกรานี้ออกเป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะรูปแบบการเรียงตัวของดีเอ็นเอที่เฉพาะตัว

Magee, D'Souza และ Magee (1987) ก็ได้จำแนกสายพันธุ์และสปีชีส์ของ *Candida* โดยอาศัยไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ต่างๆกันและพบว่าเมื่อใช้ EcoRI จะสามารถจำแนก *Candida spp.* ได้

สำหรับการนำประโยชน์ของเทคนิคนี้มาใช้กับ *Streptomyces* สมพร ต้นสกุล (2534)ได้นำมาใช้ในการจำแนกและแบ่งกลุ่มของ *Streptomyces sp.* ที่แตกต่างกัน 5 สปีชีส์ คือ *Streptomyces sp.*42-9, *Streptomyces sp.*190-1, *Streptomyces glaucescens*, *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Streptomyces lividans* 1326 โดยใช้เรสตริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมเรียงตามลำดับคือ PstI,BamHI,BglII, และ EcoRI และความเข้มข้นเจล คือ 0.7เปอร์เซนต์ ความต่างศักย์ 14 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร

อนึ่ง นอกจากการเปรียบเทียบรูปแบบเฉพาะตัวของดีเอ็นเอในแต่ละสายพันธุ์แล้วยังสามารถวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการแปลรหัสของดีเอ็นเออีกด้วย ซึ่งจะทำให้สามารถยืนยันถึงการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอในสายพันธุ์ที่ต้องการศึกษาได้ โดยใช้การเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตโปรตีนนั้นๆกับของสายพันธุ์ที่ได้ศึกษามาแล้ว จากวิธีการทำอิเลคโตรโฟรีซิสชนิดโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (Laemmli, 1970)

สำหรับงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะวิเคราะห์ลูกผสมระหว่าง *Streptomyces sp.*190-1 ที่ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส และ *Streptomyces sp.*42-9 ที่ผลิตเอนไซม์ไซแลเนส โดยเปรียบเทียบรูปแบบการเรียงตัวบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ ควบคู่กับการวิเคราะห์เอนไซม์ทั้งสองโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและเอนไซม์ไซแลเนส

2. สกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *Streptomyces sp.* 190-1, *Streptomyces sp.* และลูกผสมต่างๆ

3. เลือกสภาวะที่เหมาะสมในการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

4. วิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสของลูกผสมต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อและแม่

5. สกัดแยกเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและเอนไซม์ไซแลเนสจาก *Streptomyces sp.*190-1, *Streptomyces sp.* 42-9 และลูกผสม

6. วิเคราะห์เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและเอนไซม์ไซแลเนสจากข้อ 5 โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส