

### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

##### 3.1 การศึกษาเบื้องต้นของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 และ pUC – TP811

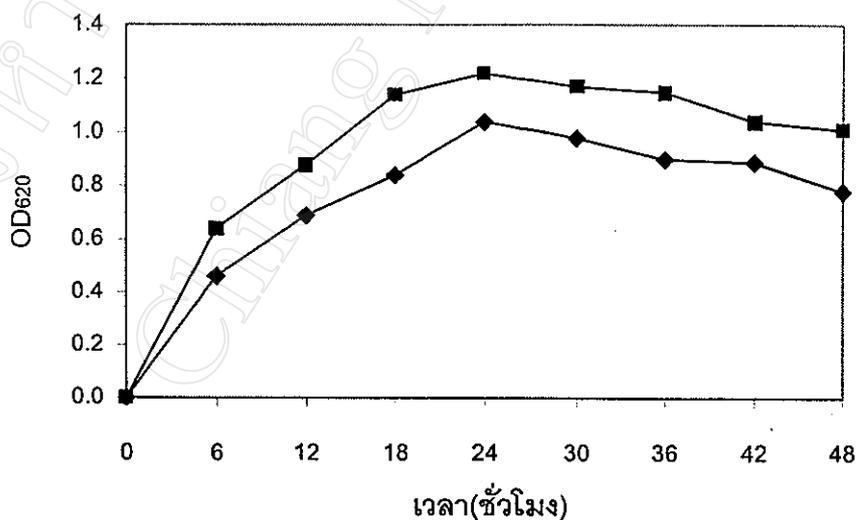
แบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TP811 เป็นแบคทีเรียที่แยกมาจากน้ำและดินบริเวณบ่อน้ำร้อนเทพพนม จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งสามารถผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ และได้มีการนำความรู้ด้านพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณไลเปสให้สูงขึ้น โดยโคลนยีนไลเปสจากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TP811 เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pUC 19 ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* DH 5 $\alpha$  เรียกโคลนนี้ว่า pUC – TP811 ในงานวิจัยนี้เริ่มจากการศึกษาแบคทีเรียทนความร้อน TP811 เบื้องต้น ได้แก่ การเจริญเติบโตและการผลิตไลเปสออกเซลล์ โดยเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียทนความร้อน TP811 ในอาหารเหลว ที่ประกอบด้วย น้ำกลั่น 80% (v/v) Base mixture 10% (v/v) 0.2 M Phosphate buffer pH 7.2 10% (v/v) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บน้ำเลี้ยงทุก 6 ชั่วโมง ได้ตรวจสอบการเจริญเติบโตและนำสารละลายใสส่วนบนที่เซนติฟิวจ์แยกตะกอนเซลล์ออกแล้วไปตรวจสอบแอกติวิตีของไลเปส เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและผลผลิตของไลเปสจากแบคทีเรีย pUC – TP811 ซึ่งเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว LB ที่ประกอบด้วย Tryptone 1% (w/v) Yeast extract 0.5% (w/v) NaCl 0.5% (w/v) ที่อุณหภูมิ 37 °C และเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมของแบคทีเรีย pUC – TP811 เพื่อใช้เตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

##### 3.1.1 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 และ แบคทีเรีย pUC – TP811

จากการตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียทนความร้อน TP811 และแบคทีเรีย pUC – TP811 โดยวัดความขุ่นของเซลล์ในน้ำเลี้ยงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ( $OD_{620}$ ) ผลการทดลองแสดงในตาราง 3.1 และเมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและระยะเวลาในการเลี้ยงแสดงดังรูป 3.1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียทนความร้อน TP811 มีการเจริญเติบโตได้ช้ากว่าแบคทีเรีย pUC – TP811 และแบคทีเรียทนความร้อน TP811 มีการเจริญเติบโตได้มากที่สุดในช่วงเวลา 24 – 36 ชั่วโมงซึ่งช้ากว่า pUC – TP811 ซึ่งมีการเจริญเติบโตได้มากที่สุดในช่วงเวลา 18 – 30 ชั่วโมง

ตาราง 3.1 การเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียทนความร้อน TP811 ในอาหารเหลวที่มีสารสกัดยีสต์ ทรีปโตน และน้ำมันมะกอก ในสารละลายเบสผสม และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 M , pH 7.2 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 65 °C และแบคทีเรีย pUC – TP811 ในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 100 µg/ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ณ เวลาต่างๆ ของการเลี้ยง

เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>620</sub>	
	TP811	pUC – TP811
6	0.46	0.64
12	0.69	0.88
18	0.84	1.14
24	1.04	1.22
30	0.98	1.17
36	0.90	1.15
42	0.89	1.04
48	0.78	1.01



รูป 3.1 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 (◆) ในอาหารเหลวที่มีสารสกัดยีสต์ ทรีปโตน และน้ำมันมะกอกในสารละลายเบสผสม และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 M , pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 65 °C ในขวดเขย่า และแบคทีเรีย pUC – TP811 (■) ที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 100 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37 °C ในขวดเขย่า

### 3.1.2 การผลิตไลเปสของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 และแบคทีเรีย pUC-TP811

แบคทีเรียทนความร้อน TP811 และ แบคทีเรีย pUC – TP811 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสแล้วส่งออกนอกเซลล์ เมื่อเซนติพิวจ์แยกเซลล์ออกแล้วจะพบไลเปสอยู่ในน้ำเลี้ยง ในการตรวจสอบแอกติวิตีของไลเปส ทำได้โดยการตรวจหาปริมาณของ p-nitrophenol ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของไลเปสในการสลายสับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyllaurate ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 2 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตไลเปส คือปริมาณ p-nitrophenol ที่เกิดขึ้น 1 นาโนโมล จากการเร่งปฏิกิริยาของไลเปสในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง

#### 3.1.2.1 การตรวจสอบแอกติวิตีของไลเปสโดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์ p – nitrophenyllaurate

การติดตามหาปริมาณ p – nitrophenol ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสสับสเตรทสังเคราะห์ p – nitrophenyllaurate จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาแอกติวิตีของไลเปส ดังนี้

กำหนดให้	A	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร
	E	คือ	Extinction coefficient ของ p – nitrophenol เท่ากับ $1.85 \text{ l. mmol}^{-1} . \text{ mm}^{-1}$
	b	คือ	ความกว้างของ cuvette เท่ากับ 1 ซม.
	c	คือ	แอกติวิตีของเอนไซม์ หน่วย nmol / ml.min หรือ U/ml

การคำนวณหาแอกติวิตีของไลเปส ดังสมการ 3.1

$$E = \frac{A}{bc} \quad \text{สมการ 3.1}$$

เมื่อแทนค่าคงที่ในสมการที่ 3.1

$$c = \frac{A}{10 \times 1.85} \quad \text{m mol / l}$$

$$c = \frac{A \times 10^6}{10 \times 1.85 \times 1000} \quad \text{n mol / ml}$$

เมื่อใช้สารละลายไลเปส d ไมโครลิตร แรงปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสับสเตรทสังเคราะห์ เป็นเวลา 2 นาที

$$\therefore \text{แอกติวิตีของไลเปส} = \frac{A \times 10^6}{10 \times 1.85 \times 2 \times d} \text{ n mol / ml. min}$$

#### ตัวอย่างการคำนวณ

จากการนำสารละลายไลเปสที่เซนติฟิวจ์แยกเซลล์แบคทีเรียทนความร้อน TP811 ออกแล้ว ซึ่งเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 20  $\mu$ l ไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyllaurate ในสารละลาย Tris-HCl buffer ที่ผสม gum arabic และ Deoxycholic acid ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 2 นาที ดังการทดลองในข้อ 2.2.3.2 หลังหยุดปฏิกิริยาแล้วนำสารละลายปฏิกิริยาไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ( $A_{405}$ ) โดยเทียบกับ blank พบว่า  $A_{405}$  เท่ากับ 0.12 ดังนั้น

$$\begin{aligned} \text{แอกติวิตีของไลเปส} &= \frac{0.12 \times 10^6}{10 \times 1.85 \times 2 \times 20} \\ &= 162.16 \text{ U/ml} \end{aligned}$$

ดังนั้นแอกติวิตีของไลเปสจึงมีค่า 162.16 หน่วยต่อปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร

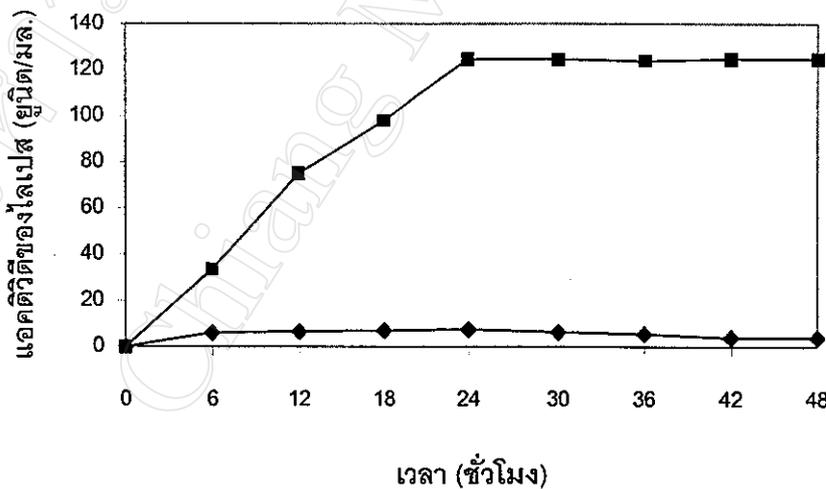
#### 3.1.2.2 การผลิตแอกติวิตีของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 และแบคทีเรีย pUC-TP811

ไลเปสซึ่งอยู่ในน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ TP811 และ แบคทีเรีย pUC-TP811 ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 65°C และ 37°C ตามลำดับ หลังจากเซนติฟิวจ์แยกเอาตะกอนเซลล์ออกแล้ว นำน้ำเลี้ยงปริมาตร 20 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบแอกติวิตีของไลเปสโดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyllaurate เข้มข้น 8 mM ใน 2-propanol นอกจากนี้ นำตะกอนเซลล์ที่แยกได้มาทำให้แตกด้วยคลื่นความถี่สูง เพื่อหาแอกติวิตีของไลเปสภายในเซลล์ ได้ผลการทดลองดังตาราง 3.2 เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของไลเปสภายนอกและภายในเซลล์ของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 และ pUC-TP811 กับระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ ได้ผลดังรูป 3.2 ซึ่งพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ได้ในอาหารเหลวที่เลี้ยง หลังจากเลี้ยงเซลล์ 6 ชั่วโมง แบคทีเรียทนความร้อน TP811 และ pUC-TP811 เริ่มผลิตไลเปสในอัตราที่สูงขึ้น และสามารถผลิตไลเปสภายนอกเซลล์ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตรวจสอบแอกติวิตีของไลเปสภายนอกเซลล์เท่ากับ 7.57 และ 126.76 U/ml ตามลำดับ และพบว่ายังคงมีไลเปสค้างอยู่ในเซลล์ของแบคทีเรีย pUC-

TP811 ประมาณ 2.5 เท่า ของไลเปสภายนอกเซลล์แต่ไม่พบแอกติวิตีของไลเปสภายในเซลล์ของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 เลย

ตาราง 3.2 แอกติวิตีของไลเปสภายนอกและภายในเซลล์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียทนความร้อน TP811 และแบคทีเรีย pUC – TP811 โดยใช้สับสเตรทหลังเคราะห์ p – nitrophenyllaurate

เวลา (ชั่วโมง)	แอกติวิตีของไลเปส (U/ml)			
	TP811		pUC – TP811	
	นอกเซลล์	ในเซลล์	นอกเซลล์	ในเซลล์
6	5.95	0	33.51	259.46
12	6.49	0	75.14	342.23
18	7.03	0	77.87	335.81
24	7.57	0	126.76	334.46
30	6.22	0	124.46	323.04
36	5.41	0	123.78	326.01
42	4.05	0	124.86	313.18
48	4.05	0	124.86	317.56



รูป 3.2 การผลิตไลเปสภายนอกเซลล์จากการเลี้ยงแบคทีเรียทนความร้อน TP811 (◆) ในอาหารเหลวที่มีสารสกัดจากยีสต์ ทรีปโตน และน้ำมันมะกอกในสารละลายเบสผสม และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 M pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 65°C และแบคทีเรีย pUC – TP811 (■) ในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C โดยมีการเขย่า ณ เวลาต่างๆ ของการเลี้ยง

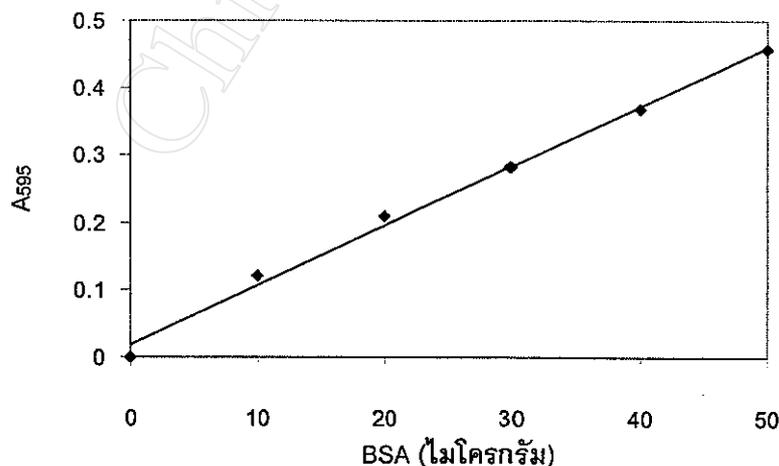
### 3.1.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

การหาปริมาณโปรตีนที่ผลิตส่งออกภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford โดยใช้สารละลาย bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐานในความเข้มข้น 1 มก. / มล. แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ดังการทดลองในข้อ 2.2.4.2 ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.3

ตาราง 3.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่มีปริมาณต่างๆ กัน หาโดยวิธี Bradford

ปริมาณโปรตีนในสารละลาย โปรตีนมาตรฐาน BSA ( $\mu\text{g}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 nm.
0.0	0.000
10.0	0.120
20.0	0.209
30.0	0.284
40.0	0.368
50.0	0.458

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.3 นำมาเขียนกราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรกับปริมาณโปรตีนเป็นไมโครกรัมได้ดังรูปที่ 3.3 จากกราฟสามารถนำมาใช้เทียบหาปริมาณโปรตีนที่ผลิตส่งออกภายนอกและภายในเซลล์ของแบคทีเรียได้



รูป 3.3 กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณโปรตีนในสารละลายมาตรฐาน BSA ด้วยวิธี Bradford

### การคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสารละลายตัวอย่าง

กำหนดให้ จากการทดลองใช้สารละลายตัวอย่าง	= 0.5 มล.
วัดค่า $A_{595}$ ของโปรตีนในสารละลายตัวอย่างที่จับกับสีย้อม	= 0.20
เมื่อเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐานจะมีปริมาณโปรตีน	= 20 ไมโครกรัม
ดังนั้นสารละลายโปรตีนตัวอย่างมีความเข้มข้น	= 40 ไมโครกรัม/มล.

เมื่อนำน้ำเลี้ยงที่ได้จากการติดตามการเจริญเติบโตใน 48 ชั่วโมงของเซลล์แบคทีเรียที่เรียก ความร้อน TP811 และแบคทีเรีย pUC – TP811 ที่แยกเอาเซลล์ออกแล้ว ปริมาตรตัวอย่างละ 0.5 มล. และนำสารละลายที่ได้จากการทำเซลล์แบคทีเรียให้แตกด้วยคลื่นความถี่สูง ไปหา ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford แล้วเทียบค่า  $A_{595}$  กับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน BSA ได้ผลดังตารางที่ 3.4 และคำนวณค่าแอกติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของไลเปสโดย ใช้แอกติวิตีจากตาราง 3.2 ได้ผลดังตารางที่ 3.4 เช่นกัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่เรียก ความร้อน TP811 และแบคทีเรีย pUC – TP811 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะผลิตไลเปสส่งออกภายนอกเซลล์ที่มีค่าแอกติวิตีจำเพาะสูงสุดที่ 0.46 และ  $15.99 \times 10^3$  ยูนิต / มิลลิกรัม ตามลำดับ และพบว่าแบคทีเรีย pUC – TP811 จะผลิตไลเปสแล้วค้างอยู่ในเซลล์ที่มีค่าแอกติวิตี จำเพาะสูงสุดเท่ากับ  $3.91 \times 10^3$  ยูนิต/มิลลิกรัม เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และในเวลา 24 ชั่วโมงจะมีแอกติวิตีจำเพาะ  $3.12 \times 10^3$  ยูนิต/มิลลิกรัม

ตาราง 3.4 ปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีจำเพาะของไลเปสภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ของ แบคทีเรียที่เรียก ความร้อน TP811 และแบคทีเรีย pUC – TP811 ณ เวลาต่างๆ ของ การเลี้ยง

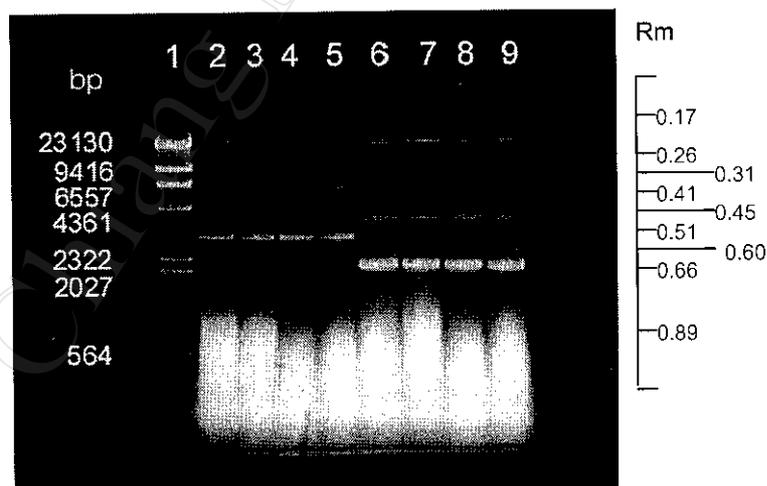
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม / มล.)				แอกติวิตีจำเพาะ ( $\times 10^3$ ยูนิต / มิลลิกรัม)			
	TP811		pUC – TP811		TP811		pUC – TP811	
	นอกเซลล์	ในเซลล์	นอกเซลล์	ในเซลล์	นอกเซลล์	ในเซลล์	นอกเซลล์	ในเซลล์
6	6.59	35.31	5.36	76.38	0.90	0	6.25	3.40
12	20.63	40.10	6.69	87.42	0.31	0	11.23	3.91
18	16.54	43.99	6.17	91.88	0.42	0	12.62	3.65
24	16.73	54.69	7.30	107.14	0.46	0	15.99	3.12
30	16.97	57.23	7.86	117.65	0.37	0	15.83	2.74
36	16.59	54.88	8.14	126.15	0.33	0	15.21	2.54
42	17.34	59.24	9.22	127.56	0.23	0	13.54	2.46
48	18.56	54.89	10.11	136.56	0.22	0	12.35	2.32

### 3.2 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย pUC – TP811 และ pQE – 60

จากผลการศึกษาการผลิตไลเปสภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 มีแอกติวิตีของไลเปสเท่ากับ 7.57 ยูนิต/มล. และไม่พบแอกติวิตีของไลเปสภายในเซลล์เลย สำหรับแบคทีเรีย pUC-TP811 พบแอกติวิตีภายนอกเซลล์เท่ากับ 126.76 ยูนิต/มล. และพบว่ายังมีไลเปสค้างอยู่ภายในเซลล์เท่ากับ 335.81 ยูนิต/มล. แต่อย่างไรก็ตามแอกติวิตีของไลเปสที่สูงออกนอกเซลล์จากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ยังคงมีค่าค่อนข้างต่ำ ในการวิจัยนี้จึงใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาพัฒนาการผลิตไลเปสจาก pUC – TP811 โดยเปลี่ยนดีเอ็นเอพาหะเป็น pQE 60 ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15 [pREP4]

#### 3.2.1 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย pUC – TP811 และ pQE – 60

จากการเลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรีย pUC-TP811 และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 เพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอใช้ในการโคลนยีน ในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซนต์ปีทิวจ์แยกตะกอนเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง แล้วจึงสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ดังการทดลองในข้อ 2.2.5.2 นำพลาสมิดดีเอ็นเอของ pUC-TP811 และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ที่เตรียมได้มาวิเคราะห์หาขนาดของดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดดีเอ็นเอ ได้ผลการทดลองดังรูป 3.4



รูป 3.4 0.8% agarose gel electrophoresis ของดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ DNA / *Hind* III (1) พลาสมิดดีเอ็นเอ pUC – TP811 (2-5) และพลาสมิดดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 (6-9)

การหาขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย pUC – TP811 และ pQE 60 ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้สารละลาย  $\lambda$ DNA / Hind III เป็นสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน แถบของดีเอ็นเอจะปรากฏบนแผ่นเจลหลังจากย้อมด้วย Ethidium bromide แสดงดังรูป 3.4 จากระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาดต่างๆ กันบนแผ่นเจล และระยะการเคลื่อนที่ของ bromophenol blue สามารถคำนวณหาค่า Relative mobility ของดีเอ็นเอมาตรฐานโดยมีความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{Relative mobility } (R_m) = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอ}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของ bromophenol blue}} \quad (\text{ชม.})$$

ตัวอย่างของการคำนวณหาค่า  $R_m$

สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน $\lambda$ DNA / Hind III ที่มีจำนวน 23,130 คู่เบสเคลื่อนที่บนแผ่นเจลได้	=	0.60	ชม.
ระยะการเคลื่อนที่ของ bromophenol blue บนแผ่นเจล	=	3.5	ชม.
$\therefore R_m$ ของ $\lambda$ DNA / Hind III ที่มีขนาด 23130 คู่เบส			
		$= \frac{0.60}{3.5}$	
		= 0.17	

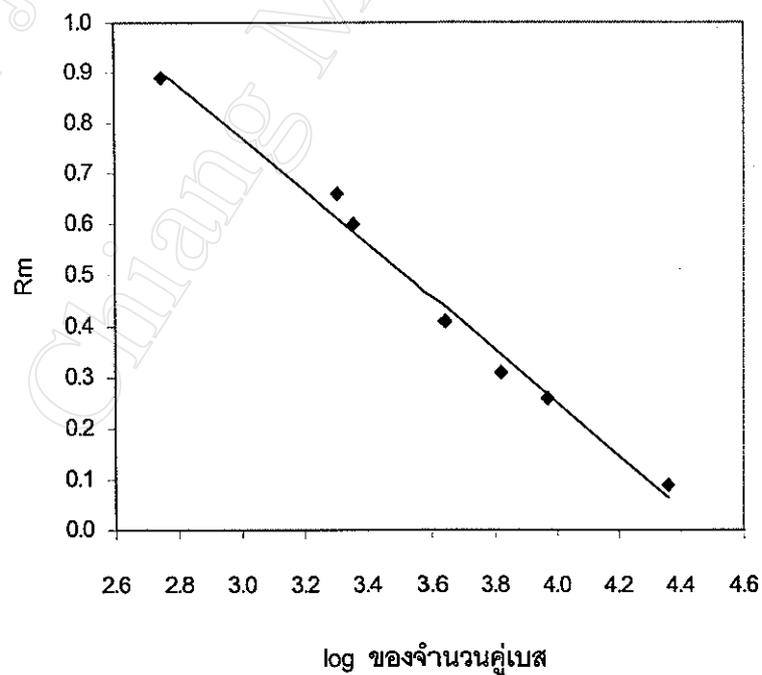
ในทำนองเดียวกันจึงสามารถคำนวณค่า  $R_m$  ของดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ DNA / Hind III ที่มีคู่เบสต่างๆ กัน ได้ผลดังตารางที่ 3.5 และเขียนกราฟมาตรฐานดีเอ็นเอระหว่าง  $\log_{10}$  ของจำนวนคู่เบสกับค่า  $R_m$  ได้ผลดังรูป 3.5

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก pUC-TP811 และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 มาหาขนาดของดีเอ็นเอด้วยการทำ agarose gel electrophoresis แล้ววัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจล เพื่อคำนวณค่า  $R_m$  แล้วเทียบค่า  $R_m$  ที่ได้กับกราฟมาตรฐาน  $\lambda$ DNA / Hind III เพื่อหาขนาดของดีเอ็นเอ ได้ผลดังตารางที่ 3.6 จากรูปที่ 3.4 และตารางที่ 3.6 พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย pUC-TP811 (ช่องที่ 2-5) พบด้วยแถบของดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ ซึ่งมีขนาดของตรงกับ 23130, 6557 และ 3235 คู่เบส สำหรับดีเอ็นเอพาหะของ pQE 60 (ช่องที่ 6-9) พบแถบของดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบเช่นกัน ซึ่งมีขนาดดีเอ็นเอตรงกับ 23130, 4168 และ 2187 คู่เบส และยังพบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิดมีอาร์เอ็นเอปะปนอยู่ ซึ่งแสดงเป็นแถบ

เข้มนยาวที่มีขนาดดีเอ็นเอน้อยกว่า 2027 คู่เบส จึงต้องกำจัดอาร์เอ็นเอออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอ และทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอบริสุทธิ์เสียก่อน

ตาราง 3.5 ค่า  $R_m$  และ  $\log_{10}$  ของจำนวนคู่เบสของสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ DNA / *Hind* III บน 0.8% agarose gel electrophoresis

จำนวนคู่เบสของ $\lambda$ DNA / <i>Hind</i> III (base pair)	$\log_{10}$ ของจำนวนคู่เบส	ระยะการเคลื่อนที่ (ซม.)	$R_m$
23130	4.36	0.90	0.17
9416	3.97	1.35	0.26
6557	3.82	1.65	0.31
4361	3.64	2.20	0.41
2322	3.36	3.20	0.60
2027	3.31	3.50	0.66
564	2.75	4.70	0.89



รูป 3.5 กราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ DNA / *Hind* III 0.8% agarose gel electrophoresis

ตาราง 3.6 ระยะการเคลื่อนที่และขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย pUC-TP811 และ ดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 บน 0.8% agarose gel electrophoresis

สารละลายดีเอ็นเอ ตัวอย่าง	ระยะการเคลื่อนที่ (ซม.)	$R_m$	$\log_{10}$ ของจำนวนคู่เบส	ขนาดของดีเอ็นเอ (base pair)
pUC-TP811				
แถบที่ 1	0.90	0.17	4.36	23130
2	1.65	0.31	3.82	6557
3	2.70	0.51	3.51	3235
pQE 60				
แถบที่ 1	0.90	0.17	4.36	23130
2	2.40	0.45	3.62	4168
3	3.30	0.63	3.34	2187

### 3.2.2 การกำจัดอาร์เอ็นเอออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย pUC-TP811 และ pQE 60

จากการกำจัดอาร์เอ็นเอออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811 และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ด้วยเอนไซม์ RNase A ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสองชนิดบริสุทธิ์ โดยการสกัดด้วย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ดังการทดลองในข้อ 2.2.6.2 เมื่อได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้ว นำไปวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเออีกครั้งด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis ได้ผลดังรูป 3.6 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแถบของอาร์เอ็นเอที่มีขนาดน้อยกว่า 2027 คู่เบส ที่ปะปนอยู่กับพลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811 และ pQE 60 หายไป พบเพียงแถบดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC-TP811 และ pQE 60 ที่ตรงกับ 23130, 6557 และ 3235 คู่เบส และ 23130, 4168 และ 2187 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งเหมือนกับพลาสมิดดีเอ็นเอก่อนทำการกำจัดอาร์เอ็นเอออก

### 3.3 การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เมื่อเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811 และ pQE 60 ที่บริสุทธิ์และปราศจากอาร์เอ็นเอ แล้วทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เมื่อเจือจางสารละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer pH 7.6 คำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอดังการทดลองในข้อ 2.2.7.2 ได้ผลดังตารางที่ 3.7 และนำพลาสมิดดีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิดมาตรวจคุณภาพ

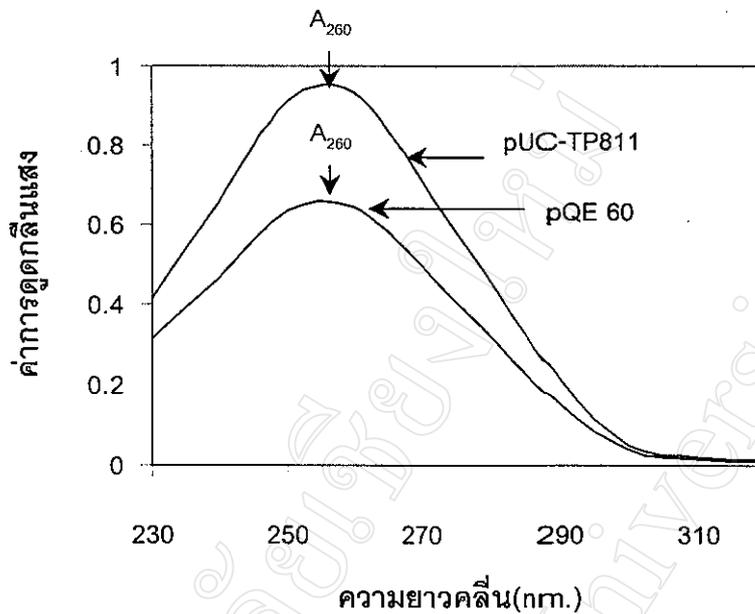
โดยการ scan ค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ความยาวคลื่น 230 - 320 นาโนเมตร ได้ผลดังรูป 3.7 จากตาราง 3.7 พบว่าการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811 และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ได้ดีเอ็นเอสายบริสุทธิ์ โดยมีอัตราส่วนระหว่าง  $A_{260}$  และ  $A_{280}$  เท่ากับ 1.840 และ 1.706 ตามลำดับ และมีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 3175 และ 765  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ จากรูป 3.7 การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการ scan ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 - 320 นาโนเมตร พบว่า พลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811 และ pQE 60 ได้เพียงพีคเดียวที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ดังนั้นจึงได้ พลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811 และ pQE 60 ที่บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการโคลนยีนต่อไป



รูป 3.6 0.8% agarose gel electrophoresis ของดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$  DNA / *Hind* III (1) พลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811(2-3) และ pQE 60 (4-5) ที่กำจัดอาร์เอ็นเอออกและทำให้บริสุทธิ์แล้ว

ตาราง 3.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และปริมาณดีเอ็นเอจากพลาสมิด pUC-TP811 และ pQE 60 เมื่อเจือจางสารละลายดีเอ็นเอ 10 เท่าด้วย TE buffer pH 7.6

สารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{280}$	ปริมาณของดีเอ็นเอ( $\mu\text{g/ml}$ )
pUC-TP811	0.635	0.345	1.840	3175
pQE 60	0.157	0.092	1.706	785



รูป 3.7 การ scan ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230-320 นาโนเมตรของพลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811 และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60

#### 3.4 การหาลำดับเบสของยีนไลเปสของ *Bacillus stearothermophilus* TP811

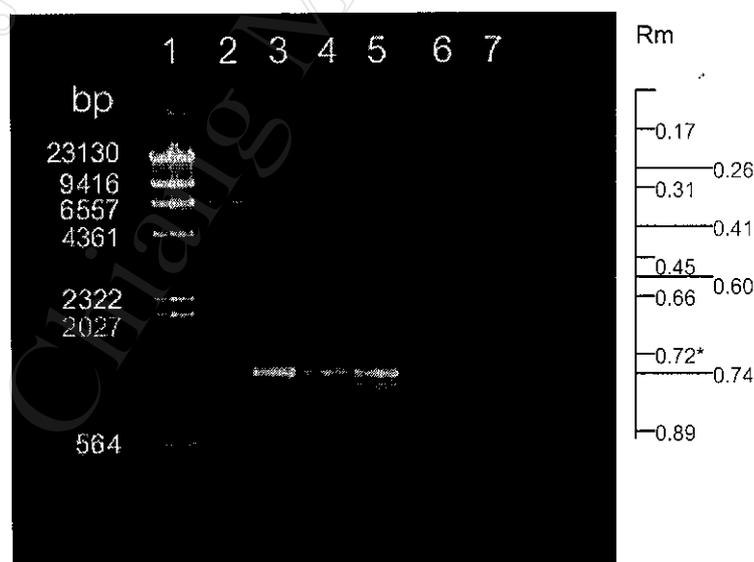
จากการศึกษาหาลำดับเบสของยีนไลเปสของ *Bacillus stearothermophilus* TP811 โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอของ pUC-TP811 และโคลนตัวอย่างของ pQE-TP811 (ที่ส่งไปภายหลังเมื่อทำการตรวจสอบทรานสฟอร์มเม้นท์ด้วย PCR แล้ว) ไปหาลำดับเบส ณ Institute of Biological Chemistry, Academic Sinica เมืองไทเป ประเทศไต้หวัน พบว่ามี open reading frame จำนวน 1254 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสดีเอ็นเอเป็นโพลีเพปไทด์ได้กรดอะมิโนจำนวน 417 ตัว ประกอบด้วยกรดอะมิโนของ signal peptide 29 ตัว และ mature lipase 388 ตัว แสดงดังรูป 3.8 เมื่อนำลำดับเบสของยีนไลเปสดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับยีนไลเปสจากฐานข้อมูลของ GeneBank พบว่าลำดับเบสมีความคล้ายกับยีนไลเปสทนความร้อนจาก *B. stearothermophilus* P1 จากน้ำพุร้อนเทพพนม จ. เชียงใหม่ และ *B. stearothermophilus* L1 จากน้ำพุร้อนในประเทศเกาหลี<sup>(16)</sup> ถึงมากกว่า 93 % ซึ่งมีเพียงกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน 6 จาก 388 ตัว นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับเบสยังมีความคล้ายกับ *B. thermocatenulatus*<sup>(16)</sup> ซึ่งมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน 23 จาก 388 ตัว เมื่อทราบลำดับเบสของ *Bacillus stearothermophilus* TP811 แล้วจึงสร้างไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนไลเปสจากพลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811 ด้วยวิธี PCR ต่อไป

110 TTT CTC TCA CAG AAA AAC CCG ACA ATT GCG CGG ATT GAA TCA GTT GGT TGA TAT ATA TAG AAT ATT CAG GTA ATT ATG AAC AAA AAG ATT CCG TTT ATG TGA GGG GAG CAG AAG GAT AGG  
 120 ATG ATG AAA CGC TGC CGG GTG ATG GTT GTG TGG CAC GGA TTA TGC TTT GTG TTC GGC CTA TGG GTC CCG GGA GGG CCG ACG GAA GCG GCA TCC CTA GCG GGC AAT GAT GAT CCG ATT GTG  
 M M K C C K V M V V L L G L C F V F G L S V F G C K T E A A S L K A N D A P I V  
 130 CTT CTC CAT CGG TTT ACC GGA TGG GGA CCA GAG GAA ATG TTT GGA TTC AAG TAT TGG GCG GCG TGC CCG GCG GAT ATC GAA CAA TGG CTA ANE GAC ANE GGT TAT GEA ACG TAT ACG CTA  
 L L H C G F T G W G R E N F G F G Y W G D I E Q W L N D N G Y K T Y T L  
 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240  
 250 GCG CTC GCA CCG CTC TCG AAC TCG CAC CCG GCG TGT GAA CCG TAT GCT CAG CTT GTC GCG CCG ACG GTC GAT TAT GGG GCA AAC CAC GCG CAT GCG CCG TTT GCG  
 A V G P L S S N W D R A C E A Y A Q L V G C T V D Y C A A H A A A K H G H A R F C  
 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360  
 370 GGC ACT TAT GCG CCG CTC TGC GAA TGC AAA AAG GGT GGC CCA ATCCAT ATC ATC GGC AAC CAA GGG GGG GAG ACG GCG CCG ATG CTT GTC TCG CTC CTA GAG AAC GGA AAG CAA  
 K T Y F G L L P E L K R G G R I H I I A H S Q T A R M L V S L L E N C S Q  
 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480  
 490 GAA GAG CCG CAG TAC CCG AAG CCG CAC AAC GTG TGG TTT GAA GGT GGA CAT CAT TTT GTG TGG AGT GTG ACG ACC ATC GCG ACT CTT CAT CAC GCG ACG ACG CTT GTC  
 E R E Y A K A H N V S L S P L F L F G G H H F V L S Y T T I A T F H D C T T L Y  
 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600  
 610 AAC ATG GTT GAT TTC ACC GAT CCG TTT TTT GAC TTG CAA AAA GCG GTG TTC GAA GCG CCG GCT GTC GGC ACC AAC CTS CCG TAC ACG AGT CAA GTA TAC GAT TTT AAG CTC CAC CAA TCG  
 N M V D F T D R F F D L Q K A V L E A A A V A S N V P Y T S Q V Y D F K L D Q W  
 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720  
 730 GGA CCG CCG CAG CCG GCG GAA TCG TTC GAC CAT TAT TTT GAA CCG CTC AAG CCG TCC CCG CTC TGG ACA TCG ACC GAT ACC CCG CCG TAC GAT TTA TCG GTT TCG GGA GCT GAG AAG  
 G L R R Q F C E S F D H Y F E K L K K S F V W T S T D T A K Y D L S V S G A E K  
 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840  
 850 TTT AAT CAA TGG GTG CAA CCA ACG CCG AAT ACG TAT TAT TGG AGT TTC TCT ACA GAA CCG ACG TAT CCG CCA GCG CTC ACA GCG AAC CAT TAT CCG GAA CTC GCA ATG AAC GCA TTC AGC  
 L N Q W V Y Q A S F N T Y Y L S F S T E R T Y K D A L T D N H Y F E L C M N A T S  
 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960  
 970 GCG CTC GTA TGC CCG CCG TTT CTC GGT TCG TAC CCG AAT CCG ACG CTT GCG ATT GAC AGT CAT TGG CTT CAG AAC GAC GCG ATT GTC AAT ACC A TT TCG ATG AAC GGT CCG AAG CCG TCG A  
 A V Y C A F F L G S Y R N F T L G I D S H W L E N D G I V N T I S M N G F K R C  
 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080  
 1090 TCA AAC GAT CAG ATC CCG CCG TAT GAC GCG ACG TTC AAA AAA CCG GTT TCG AAT GAT A TG GGA ACG TAC AAT GTC GAC CAT TGG GAA ATC ATC GCG GTT CCG CCG AAT CCG TCA TTT GAT  
 S N D R I V F Y D G T L K K G Y W N D M G T Y N V D H L E I I G Y D F N F S F D  
 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
 1210 ATT CCG CCG TTT TAT TCG GGT ACC TTG CCG CAG TTG CCG ACC TTG CAG CCG TAA AAC GAG TAT TTT GCA AAA AAG CCA TCT CGA TCC TCT AGA CTC GAC CTC CAG GCA TCC  
 I K A F Y L R L A E Q L A S L Q F N E Y F A K K F S K S S K V D L L Q A C

รูป 3.8 ลำดับเบสของยีนไลโปเอสของ *Bacillus stearothermophilus* TP811

### 3.5 ผลการเพิ่มปริมาณยีนไลเปสด้วยวิธี PCR

การเพิ่มปริมาณยีนไลเปสจากพลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811 ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ Lipase F และ Lipase R primer และใช้พลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus stearothermophilus* P1 (pUC-P1) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำ positive control สำหรับ negative control ใช้พลาสมิดดีเอ็นเอพาหะ pUC 19 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ดังการทดลองในข้อ 2.2.10 นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR มาวิเคราะห์หาขนาดของดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ได้ผลดังรูป 3.9 เมื่อวัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR เมื่อใช้ pUC-P1 และ pUC-TP811 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ คำนวณหาค่า  $R_m$  และเทียบหาขนาดดีเอ็นเอกับกราฟมาตรฐาน ได้ผลดังตาราง 3.8 ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR เมื่อใช้ pUC-P1 และ pUC-TP811 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบนั้น มีแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบที่เหมือนกัน มีค่า  $R_m$  เท่ากับ 0.72 และ 0.74 และมีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 1285 และ 1122 คู่เบส ตามลำดับ แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1285 คู่เบส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอหลักมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาด 1122 คู่เบส ดังนั้นจึงทำการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาด 1285 คู่เบส ซึ่งเป็นยีนไลเปสที่ต้องการออกจากเจล เพื่อให้ได้ยีนไลเปสเพียงอย่างเดียวเพื่อใช้ในการโคลนยีนต่อไป



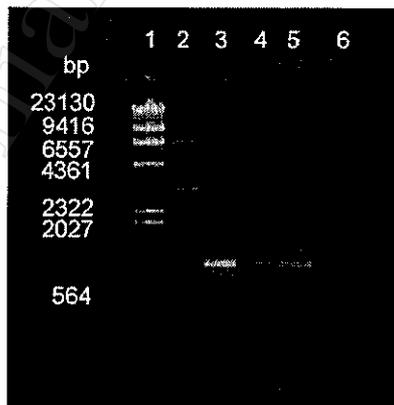
รูป 3.9 0.8% agarose gel electrophoresis ของสารละลายดีเอ็นเอ  $\lambda$  DNA / *Hind* III มาตรฐาน (1) พลาสมิดดีเอ็นเอจาก pUC-TP811 (2) ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR เมื่อใช้พลาสมิดดีเอ็นเอจาก pUC-P1 (3) pUC-TP811 (4-5) และ pUC 19 (6) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และไม่เติมดีเอ็นเอแม่แบบ (7) โดยใช้ไพรเมอร์ Lipase F และ Lipase R เมื่อระยะการเคลื่อนที่ของ bromophenol blue เท่ากับ 5.3 ซม.

ตาราง 3.8 ค่า  $R_m$  และขนาดของดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR เมื่อใช้ pUC-P1 และ pUC-TP811 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

ชนิดของดีเอ็นเอแม่แบบ	ระยะการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ (ซม.)	$R_m$	ขนาดดีเอ็นเอ (คู่เบส)
pUC-P1 แถบที่ 1	3.80	0.72	1285
	3.90	0.74	1122
pUC-TP811 แถบที่ 1	3.80	0.72	1285
	3.90	0.74	1122

### 3.6 ผลการทำไลเปสที่ได้จากวิธี PCR ให้บริสุทธิ์ด้วย Rapid gel extraction

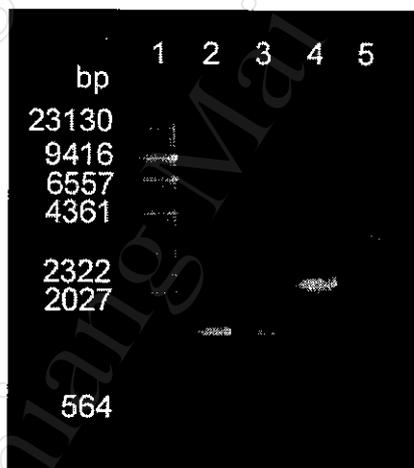
การเพิ่มปริมาณยีนไลเปสด้วยวิธี PCR โดยใช้ pUC-TP811 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ พบว่าดีเอ็นเอขนาด 1122 คู่เบสปะปนอยู่ จึงทำการกำจัดออกโดยการสกัดยีนไลเปสที่ต้องการออกจากแผ่น agarose gel ด้วยการใช้นิวคลีโอไทด์ตัดลงบนเนื้อเจลที่มียีนไลเปสอยู่ แล้วใช้ Rapid gel extraction kit สกัดยีนไลเปสที่ต้องการออกจากเจล ดังการทดลองในข้อ 2.2.11 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis ได้ผลดังรูป 3.10 ซึ่งพบว่าเมื่อสกัดดีเอ็นเอของยีนไลเปสออกจากเจลแล้ว ได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์เพียง 1 แถบ ที่มีขนาด 1285 คู่เบส เพื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป



รูป 3.10 0.8 % agarose gel electrophoresis ของ  $\lambda$  DNA / *Hind* III มาตรฐาน (1) พลาสมิดดีเอ็นเอจาก pUC-TP811(2) ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR โดยใช้ pUC-TP811 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (3) และดีเอ็นเอของยีนไลเปสบริสุทธิ์สกัดจากเจลด้วยวิธี Rapid-gel extraction (4-5) และไม่เติมดีเอ็นเอแม่แบบ (6)

### 3.7 ผลการตัดยีนไลเปสและดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Nco* I

เมื่อเตรียมยีนไลเปสจากพลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811 และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ให้บริสุทธิ์แล้วจึงตัดดีเอ็นเอทั้งสองด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hind* III และ *Nco* I ดังการทดลองในข้อ 2.2.12 แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาวิเคราะห์ดูจำนวนชิ้นและขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis ได้ผลดังรูป 3.11 เมื่อวัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอ คำนวณค่า  $R_m$  และเทียบขนาดดีเอ็นเอกับกราฟมาตรฐานพบว่าดีเอ็นเอของยีนไลเปสจาก pUC-TP811 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ มีค่า  $R_m$  ประมาณ 0.72 และมีขนาด 1.2 กิโลเบส สำหรับดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ มีค่า  $R_m$  เท่ากับ 0.49 และมีขนาด 3.4 กิโลเบส เมื่อได้ดีเอ็นเอของยีนไลเปสและดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ซึ่งพร้อมจะนำไปเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์  $T_4$  DNA Ligase ให้ได้ดีเอ็นเอสายผสมต่อไป



รูป 3.11 0.8% agarose gel electrophoresis ของ  $\lambda$  DNA / *Hind* III มาตรฐาน (1) ยีนไลเปสจาก pUC-TP811 (2) ยีนไลเปสจาก pUC-TP811 จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Nco* I (3) ดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 (4) และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Nco* I (5)

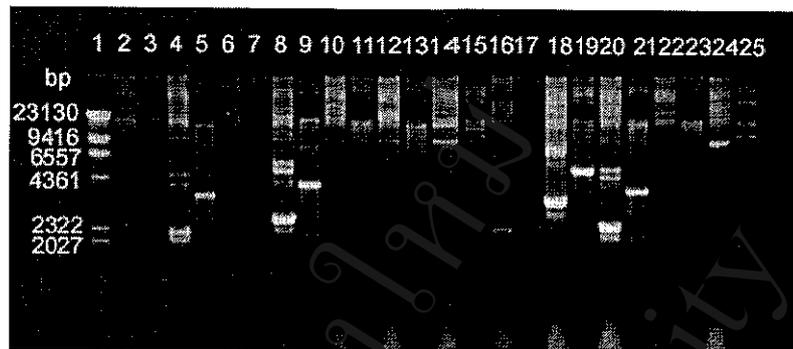
### 3.8 ผลการคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้องด้วยวิธี Restriction enzyme analysis

เมื่อทำการเชื่อมยีนไลเปสจาก pUC-TP811 และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ด้วยเอนไซม์  $T_4$  DNA Ligase แล้ว นำดีเอ็นเอสายผสมทรานสฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15 [pREP4]

ซึ่งเตรียมให้อยู่ในรูป competent cell แล้ว ดังการทดลองในข้อ 2.2.14 ในการวิจัยนี้ใช้คุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะของดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 และแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15 [pREP4] คือ มียีนที่ต่อต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและกานามัยซิน ตามลำดับ เพื่อใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียในการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านดังกล่าว แบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารร่วน LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด แสดงดังรูป 3.12 เมื่อได้โคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารร่วน LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและกานามัยซิน ดังกล่าวแล้ว จึงทำการสุ่มเลือกโคโลนีบนอาหารร่วนมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เหย้าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที แล้วแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ ดังการทดลองในข้อ 2.2.5 แล้วตัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียตัวอย่างด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ของดีเอ็นเอสายผสมที่ถูกต้อง นำดีเอ็นเอที่ถูกตัดแล้วมาวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสและขนาดดีเอ็นเอ ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis ดังรูปที่ 3.13 จากรูป 3.13 คำนวณค่า  $R_m$  และเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับกราฟมาตรฐาน จากการทดลองพบว่าโคโลนีหมายเลข 7 เมื่อทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอแล้วตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR* I แล้วผลิตพันธะดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 4.6 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของยีนไลเปส (1.2 กิโลเบส) รวมกับดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 (3.4 กิโลเบส) ดังนั้นโคโลนีหมายเลข 7 จึงเป็นโคโลนีที่คาดว่าจะป็นทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้อง แล้วจึงนำโคโลนีหมายเลข 7 ไปตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้องด้วยวิธี PCR อีกครั้ง



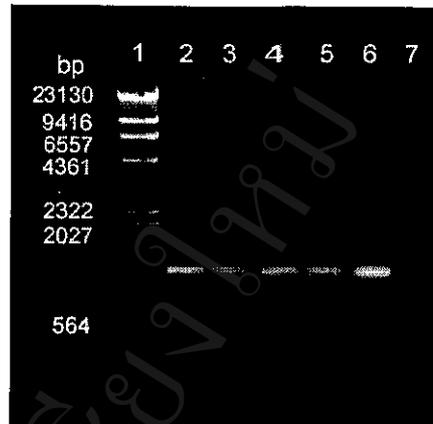
รูป 3.12 โคโลนีของแบคทีเรียหลังจากทรานสฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15 [pREP4] บนอาหารร่วน LB ที่มีแอมพิซิลิน 100  $\mu\text{g/ml}$  และ กานามัยซิน 25  $\mu\text{g/ml}$  เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูป 3.13 0.8 % agarose gel electrophoresis ของ  $\lambda$  DNA / *Hind* III มาตรฐาน (1) พลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15[pREP4] (2) พลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15[pREP4] ตัดด้วย *Eco*R I (3) ดีเอ็นเอพาหะของ pQE 60 ที่ถูกทรานสฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15[pREP4] (4) ดีเอ็นเอพาหะของ pQE 60 ที่ถูกทรานสฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15[pREP4] ตัดด้วย *Eco*R I (5) พลาสมิดดีเอ็นเอพาหะจากโคลนหมายเลข 1-10 (6,8,10,12,14,16,18,20,22,24) พลาสมิดดีเอ็นเอพาหะจากโคลนหมายเลข 1-10 ตัดด้วย *Eco*R I (7,9,11,13,15,17,19, 21,23,25)

### 3.9 การตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้องด้วยวิธี PCR

นำดีเอ็นเอจากโคลนีตัวอย่างหมายเลข 7 ที่ได้จากการคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้องด้วยวิธี Restriction enzyme analysis มาตรวจสอบหาชิ้นยีนไลเปสด้วยวิธี PCR อีกครั้งโดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด ได้แก่ Lipase F , Lipase R, Lipase pQE F และ Lipase pQE R primer นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR มาวิเคราะห์ดูจำนวนชิ้นและขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ได้ผลการทดลองดังรูป 3.14 เมื่อคำนวณค่า  $R_m$  และหาขนาดของดีเอ็นเอจากกราฟมาตรฐาน พบว่าดีเอ็นเอจากโคลนีตัวอย่างหมายเลข 7 ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบที่เหมือนกันเมื่อใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิดและมีค่า  $R_m$  เท่ากับ 0.72 มีขนาดดีเอ็นเอ 1.2 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับยีนไลเปสที่ใช้ในการโคลนยีน ดังนั้นโคลนีตัวอย่างหมายเลข 7 ซึ่งมียีนไลเปสของ *Bacillus stearothermophilus* TP811 อยู่จึงเรียกโคลนีดังกล่าวเป็น pQE-TP811 แล้วนำแบคทีเรีย pQE-TP811 ไปตรวจสอบหาแอกติวิตีของไลเปสต่อไป



รูป 3.14 0.8% agarose gel electrophoresis ของ  $\lambda$  DNA / *Hind* III มาตรฐาน (1) ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากวิธี PCR ของโคลนหมายเลข 7 เมื่อใช้ไพรเมอร์ Lipase F กับ Lipase R (2) เมื่อใช้ไพรเมอร์ Lipase F กับ Lipase pQE-R (3) เมื่อใช้ไพรเมอร์ Lipase pQE-F กับ Lipase pQE-R (4) เมื่อใช้ไพรเมอร์ Lipase pQE-F กับ Lipase R (5) ยีนไลเปสก่อนการโคลน (6) และเมื่อไม่ได้เติมดีเอ็นเอแม่แบบ(7)

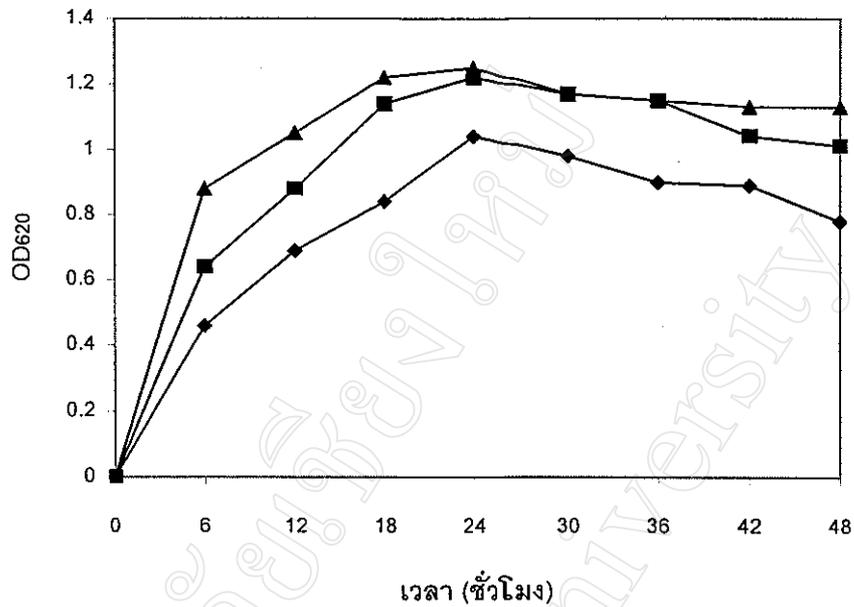
### 3.10 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไลเปสส่งออกและในเซลล์ของ pQE-TP811

เมื่อได้แบคทีเรีย pQE -TP811 จากการโคลนยีนไลเปสของ *Bacillus stearothermophilus* TP811 ลงในดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลิน 100  $\mu\text{g/ml}$  และกานามัยซิน 25  $\mu\text{g/ml}$  ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยทำการวัดความขุ่นของเซลล์ในน้ำเลี้ยงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ( $\text{OD}_{620}$ ) ได้ผลการทดลองในตาราง 3.9 เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและระยะเวลาในการเลี้ยงเปรียบเทียบกับ pUC-TP811 และ TP811 (จากตาราง 3.1) แสดงดังรูป 3.15 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแบคทีเรีย pQE-TP811 มีการเจริญเติบโตได้เร็วกว่าแบคทีเรีย pUC-TP811 และ TP811 และสามารถเจริญเติบโตได้มากที่สุดในช่วงเวลา 18-30 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับช่วงเวลาที่มี pUC-TP811 เจริญเติบโตสูงสุด และเมื่อศึกษาการผลิตไลเปสและปริมาณโปรตีนที่แบคทีเรียผลิตทั้งที่ส่งออกนอกเซลล์และในเซลล์ ดังการทดลองในข้อ 2.2.3.2 และ 2.2.4.2 ผลการทดลองแสดงในตาราง 3.9 เช่นกัน และเมื่อเขียนกราฟระหว่างแอกติวิตีของไลเปสออกและในเซลล์ของแบคทีเรีย pQE-TP811(จากตาราง 3.6) pUC-TP811 และ TP811 (จากตาราง 3.2) กับระยะเวลาของการเลี้ยง แสดงดังรูป 3.16 จากตาราง 3.9 และรูปที่ 3.16 จะเห็นได้ว่า

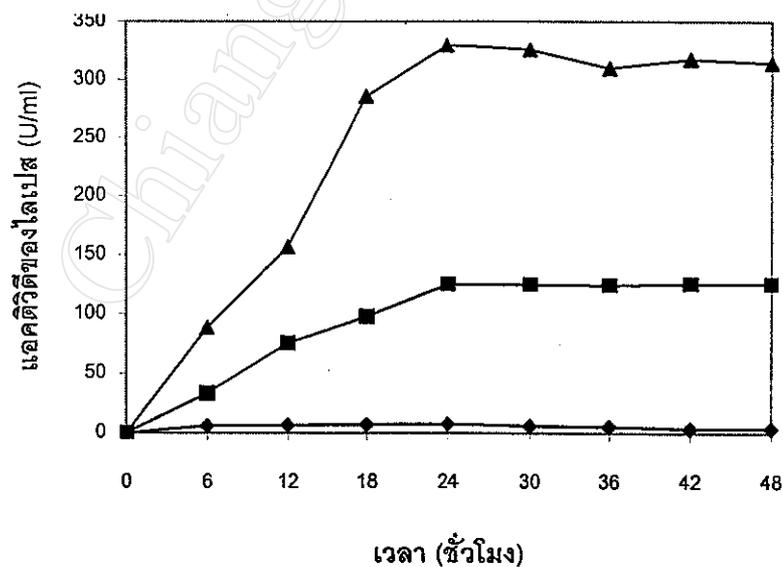
แบคทีเรีย pQE-TP811 สามารถผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ได้หลังการเลี้ยงเซลล์ได้ 6 ชั่วโมง และได้แอกติวิตีไลเปสสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง มีแอกติวิตีของไลเปสเท่ากับ 329.63 U/ml ซึ่งมีแอกติวิตีของไลเปสออกเซลล์มากกว่า pUC-TP811(126.76 U/ml) และ TP811(7.57U/ml) นอกจากนี้ pQE-TP811 เมื่อผลิตไลเปสแล้วยังคงค้างอยู่ในเซลล์จำนวนหนึ่ง แอกติวิตีภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 380.43 U/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับแอกติวิตีภายนอกเซลล์

ตาราง 3.9 การเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 $\mu$ g/ml และกานามัยซิน 25  $\mu$ g/ml ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที

เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>620</sub>	ปริมาณโปรตีน ( $\mu$ g/ml)		แอกติวิตีของไลเปส (U/ml)		แอกติวิตีจำเพาะ ( $\times 10^3$ U/mg)	
		นอกเซลล์	ในเซลล์	นอกเซลล์	ในเซลล์	นอกเซลล์	ในเซลล์
6	0.88	4.63	38.76	88.15	295.04	19.04	7.01
12	1.05	5.24	40.38	156.51	368.80	29.87	9.13
18	1.22	6.37	42.70	285.93	377.25	44.80	7.89
24	1.25	7.07	52.03	329.63	380.43	46.62	7.31
30	1.17	7.51	58.70	325.84	377.63	43.48	6.43
36	1.15	8.38	60.97	310.16	374.04	37.01	6.13
42	1.13	9.69	62.15	317.87	371.65	32.80	5.97
48	1.13	13.13	69.41	314.16	370.14	23.13	5.33



รูป 3.15 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลิน 100  $\mu\text{g/ml}$  และกานามัยซิน 25  $\mu\text{g/ml}$  (▲) แบคทีเรีย pUC-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลิน 100  $\mu\text{g/ml}$  เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C (■) และ TP811 ในอาหารเหลว ที่มีสารสกัดยีสต์ ทริปโตน และน้ำมันมะกอก ในสารละลายเบสผสม และ 0.2 M phosphate buffer pH 7.4 เลี้ยงที่ 65°C ณ เวลาต่างๆ ของการเลี้ยง (◆)



รูป 3.16 การผลิตไลเปสภายนอกเซลล์จากการเลี้ยงแบคทีเรียทนความร้อน TP811 (◆) แบคทีเรีย pUC-TP811 (■) และ แบคทีเรีย pQE-TP811 (▲) ณ เวลาต่างๆของการเลี้ยง

### 3.11 การศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสส่งออกนอกเซลล์จากแบคทีเรีย pQE-TP811

นำสารละลาย crude lipase ที่ได้จากการเลี้ยง pQE-TP811 ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเซนติฟิวจ์แยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเพื่อนำมาศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสที่ส่งออกนอกเซลล์ ได้แก่ อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการทำงานของไลเปส และความเสถียรของไลเปสที่อุณหภูมิต่างๆเมื่อแช่เย็น 1 ชั่วโมง

#### 3.11.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส

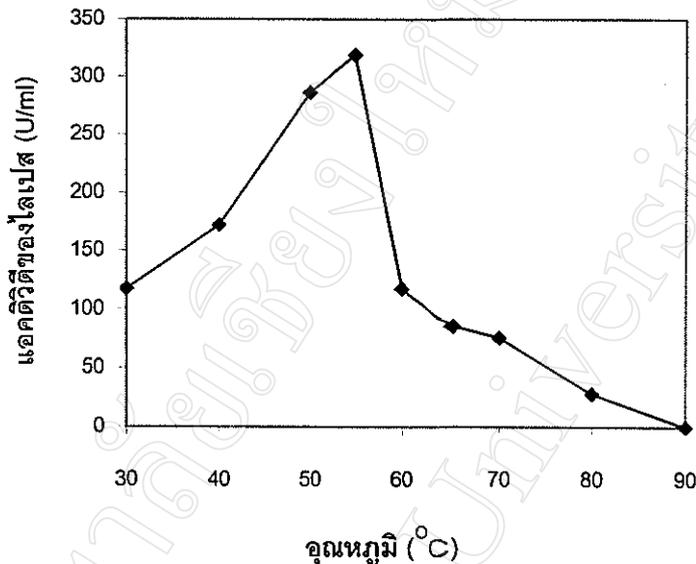
จากการหาแอกติวิตีของไลเปสที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 30,40,50,55,60,65,70,80 และ 90°C โดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyllaurate บ่มที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 2 นาที พบว่าไลเปสสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 50-55°C โดยมีแอกติวิตีของไลเปสสูงสุดที่ 55°C (319.10 U/ml) (ดังตารางที่ 3.10) และไลเปสสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงสุดที่ 80°C โดยมีแอกติวิตีคงเหลือประมาณ 27.84 U/ml

ตาราง 3.10 การทำงานของไลเปสจากแบคทีเรีย pQE-TP811 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	แอกติวิตีของไลเปส (U/ml)
30	117.70
40	172.25
50	285.93
55	319.10
60	118.02
65	85.59
70	75.67
80	27.84
90	0.00

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.10 สามารถเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับแอกติวิตีของไลเปส ได้ดังรูป 3.17 โดยไลเปสทำงานได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 55°C โดยมี

แอกติวิตีของไลเปส 319.10 U/ml ของ crude lipase ดังนั้นจึงใช้อุณหภูมิ 55°C ในการหาแอกติวิตีของไลเปสเพื่อศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสในขั้นตอนต่อไป



รูป 3.17 การทำงานของไลเปสจากแบคทีเรีย pQE-TP811 ที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อใช้สับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyllaurate

### 3.11.2 pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส

จากการหาแอกติวิตีของไลเปสที่ pH ต่างๆ ได้แก่ 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 9, 10 และ 11 ที่เตรียมได้ดังข้อ 2.2.20.2 โดยนำไปหาแอกติวิตีของไลเปส ที่ pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 55°C ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.11 เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของไลเปสและ pH ของสารละลายปฏิกิริยา ทำให้ได้ผลดังรูป 3.18 ซึ่งจะเห็นได้ว่าในปฏิกิริยาที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.5 และ 8.0 พบแอกติวิตีของไลเปส เท่ากับ 306.40 และ 317.85 U/ml ตามลำดับ นั่นคือไลเปสส่งออกนอกเซลล์จากแบคทีเรีย pQE-TP811 สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีที่สุดที่ pH 8.0

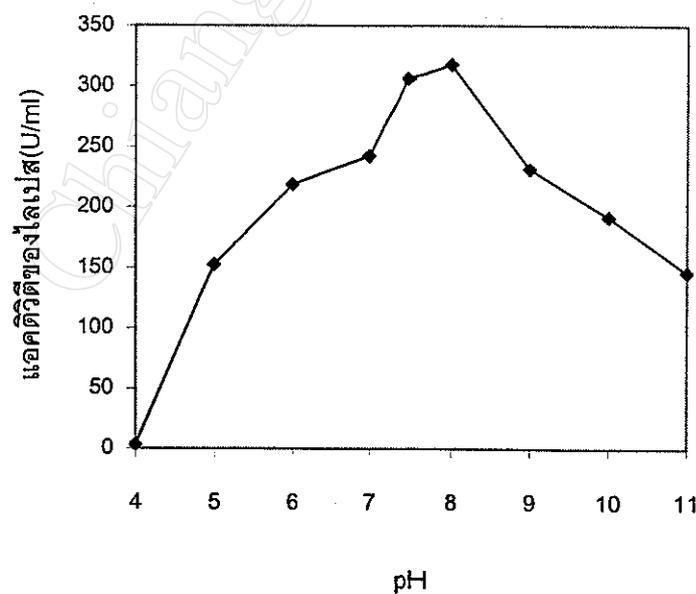
### 3.11.3 ความเสถียรของไลเปสที่อุณหภูมิต่างๆ

จากการแช่ crude lipase ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่อุณหภูมิ 30,40,50,55,60,65, 70, 80 และ 90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหาแอกติวิตีของไลเปสที่อุณหภูมิ 55°C pH 8.0 คำนวณหา %แอกติวิตีที่เหลืออยู่ เนื่องจากการที่อุณหภูมิมีผลต่อความเสถียรของไลเปส ผลการทดลองดังตาราง 3.12 และเมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง%แอกติวิตีที่เหลือกับอุณหภูมิที่ใช้แช่ไลเปสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้กราฟดังรูปที่ 3.19 ซึ่งพบว่าไลเปสจากแบคทีเรีย pQE-

TP811 ทนต่อความร้อนจากการแช่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้ 50% ที่อุณหภูมิ 60°C และสามารถทนต่อความร้อนได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 70°C โดยมีแอกติวิตีเหลือ เท่ากับ 6 % ของแอกติวิตีเริ่มต้น

ตาราง 3.11 การทำงานของไลเปสจากแบคทีเรีย pQE-TP811 ที่ pH ต่างๆ เมื่อใช้สับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyllaurate

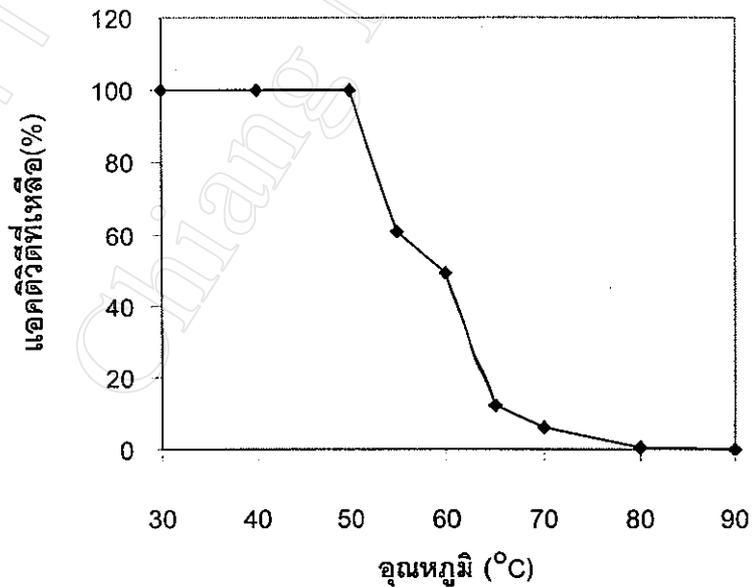
pH	แอกติวิตีของไลเปส (U/ml)
4	3.60
5	152.80
6	219.10
7	242.64
7.5	306.40
8	317.85
9	231.47
10	192.04
11	146.18



รูป 3.18 การทำงานของไลเปสจาก pQE-TP811 ที่ pH ต่างๆ

ตาราง 3.12 การทำงานของไลเปสจากแบคทีเรีย pQE-TP811 หลังจากแช่ไลเปส 320.80  
 ยูนิต/มล. ที่อุณหภูมิต่าง ๆ นาน 1 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (°C)	แอกติวิตีของไลเปส (U/ml)	แอกติวิตีที่เหลือ (%)
30	324.10	100
40	322.36	100
50	323.06	100
55	196.13	61
60	160.09	49
65	38.74	12
70	18.94	6
80	1.80	0.5
90	0.00	0.0



รูป 3.19 ความเสถียรต่อความร้อนของไลเปสจาก pQE-TP811 ที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อแช่ไลเปส  
 นาน 1 ชั่วโมง

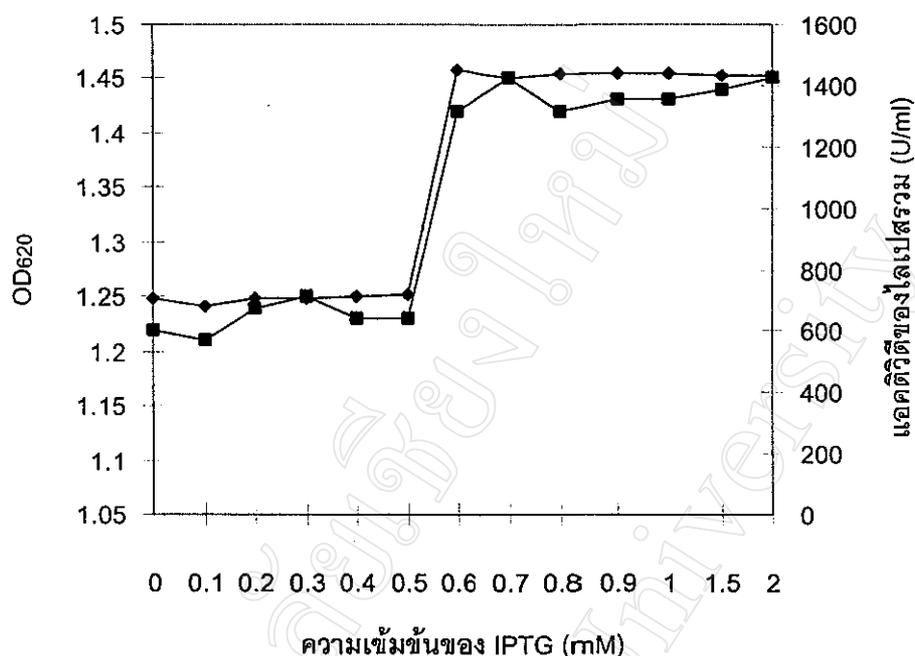
### 3.12 ผลความเข้มข้นของ IPTG ต่อการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปสจาก pQE-TP811

จากการเติม IPTG ลงในอาหารเหลว LB หลังเลี้ยงเซลล์ pQE-TP811 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5 และ 2.0 mM แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตโดยวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของไลเปสส่งออกนอกเซลล์และในเซลล์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.13 เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและความเข้มข้นของ IPTG ที่เติมลงในอาหารเหลว LB แสดงได้ดังรูป 3.20 ซึ่งพบว่าการเจริญเติบโตของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ผสม IPTG เข้มข้น 0.1-0.5 mM ไม่แตกต่างจากการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ธรรมดา แต่เมื่อมีความเข้มข้นของ IPTG เพิ่มขึ้นเป็น 0.6-2.0 mM ทำให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นจากเดิมและมีค่าค่อนข้างคงที่ จากการวัดแอกติวิตีของไลเปสส่งออกนอกเซลล์และภายในเซลล์พบว่า pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB ผสม IPTG เข้มข้น 0.1-0.5 mM จะผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์และภายในเซลล์ใกล้เคียงกับการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ธรรมดา ซึ่งมีค่าประมาณ 330 และ 370 U/ml ตามลำดับ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB ผสม IPTG เข้มข้น 0.6-2.0 mM จะผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์และในเซลล์เพิ่มขึ้นและมีค่าคงที่ประมาณ 990 และ 445 U/ml ตามลำดับ

จากการเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของไลเปสรวมกับความเข้มข้นของ IPTG ต่างๆกันที่เติมลงในอาหารเหลว LB ได้ดังรูป 3.20 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของ IPTG เท่ากับ 0.6 – 2.0 mM สามารถเหนี่ยวนำการผลิตไลเปสของ pQE-TP811 ได้เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกันมีค่าประมาณ 1420 U/ml จากการหาปริมาณโปรตีนที่ส่งออกนอกเซลล์และภายในเซลล์ที่แสดงดังตาราง 3.13 นำมาคำนวณหาแอกติวิตีจำเพาะได้ผลดังตารางเดียวกัน พบว่า pQE-TP811 มีแอกติวิตีจำเพาะภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อมี IPTG เข้มข้น 0.6 – 2.0 mM ในอาหารเหลว LB ซึ่งมีค่าประมาณ  $110 \times 10^3$  U/mg แต่ แอกติวิตีจำเพาะภายในเซลล์จะลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของ IPTG เพิ่มขึ้น

ตาราง 3.13 การเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่ผสม IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

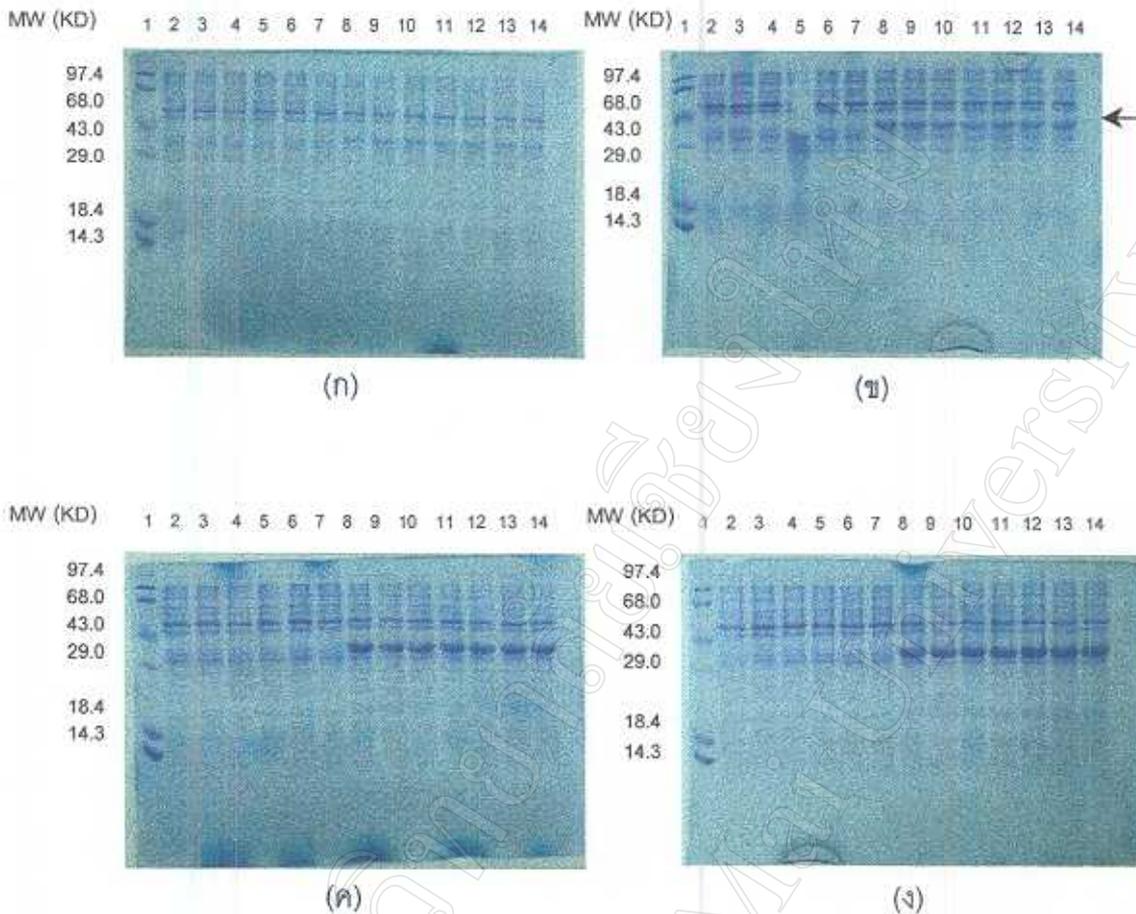
ความเข้มข้นของ IPTG (mM)	OD <sub>620</sub>	ปริมาณโปรตีน (µg/ml)			แอกติวิตีของไลเปส (U/ml)			แอกติวิตีจำเพาะ (x10 <sup>3</sup> U/mg)		
		นอกเซลล์	ในเซลล์	รวม	นอกเซลล์	ในเซลล์	รวม	นอกเซลล์	ในเซลล์	รวม
0.0	1.22	6.95	55.23	62.18	329.63	375.50	705.13	47.42	6.80	54.22
0.1	1.21	7.07	57.50	64.57	315.10	368.15	683.25	44.57	6.40	50.97
0.2	1.24	7.15	54.92	62.07	335.50	372.40	707.90	46.92	6.78	53.70
0.3	1.25	7.02	58.45	65.47	326.25	377.25	703.50	46.47	6.45	52.92
0.4	1.23	7.21	60.05	67.26	340.95	369.32	710.27	47.28	6.15	53.43
0.5	1.23	7.36	73.45	75.81	355.14	362.45	717.59	48.25	5.30	53.55
0.6	1.42	8.98	88.50	97.48	995.85	456.05	1451.90	110.89	5.15	113.04
0.7	1.45	8.74	85.21	93.95	980.12	445.90	1426.02	112.14	5.22	117.36
0.8	1.42	8.90	89.50	98.40	990.45	450.75	1441.20	111.29	5.03	116.32
0.9	1.43	8.81	87.40	96.21	987.55	449.32	1436.87	112.10	5.14	117.24
1.0	1.43	8.95	90.25	99.20	994.85	442.56	1437.41	111.15	4.90	116.05
1.5	1.44	8.80	85.40	94.20	988.45	440.70	1429.15	112.32	5.16	117.48
2.0	1.44	8.76	87.75	96.51	990.45	442.32	1432.77	113.05	5.04	118.09



รูป 3.20 การเจริญ (■) และการผลิตไลเปสรวม(นอกเซลล์และในเซลล์) (◆) ของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม IPTG ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการเลี้ยงเซลล์ pQE-TP811 เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้วเติม IPTG ความเข้มข้นต่างๆลงในอาหารเหลว LB นำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเซนติฟิวจ์แยกตะกอนเซลล์ออกมาวิเคราะห์แถบของโปรตีนภายในเซลล์ของ pQE-TP811 ด้วยวิธี SDS - PAGE ได้ใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน Phosphorelase B (97,400) Bovine serum albumin (68,000) Ovalbumin (43,000) Carbonic anhydrase (29,600)  $\beta$ -Lactoglobulin (18,400) Lysozyme (14,300) ดังการทดลองข้อ 2.2.19.2 แถบสีของโปรตีนที่มีสีน้ำเงินซึ่งปรากฏบนแผ่นเจลจากการย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 แสดงได้ดังรูป 3.21 จากระยะทางที่โปรตีนมาตรฐานซึ่งทราบมวลโมเลกุลได้เคลื่อนที่บนแผ่นเจลและระยะทางการเคลื่อนที่ของ bromophenol blue เคลื่อนที่เท่ากับความยาวของ separating gel สามารถนำมาคำนวณค่า Relative mobility ( $R_m$ ) ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดได้โดยความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{Relative mobility } (R_m) = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน (ซม.)}}{\text{ความยาวของเจล (ซม.)}}$$



รูป 3.21 12% SDS-PAGE ของโปรตีนมาตรฐาน(1) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนมาตรฐานผสม Phosphorylase B (97,400) Bovine serum albumin (68,000) Ovalbumin (43,000) Carbonic anhydrase (29,000)  $\beta$ -Lactoglobulin (18,400) Lysozyme (14,300) โปรตีนภายในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อไม่เติม IPTG (2) และโปรตีนในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5 และ 2.0 mM (3 - 14) เมื่ออายุได้ 1 ชั่วโมง (ก) 2 ชั่วโมง (ข) 3 ชั่วโมง (ค) และ 6 ชั่วโมง (ง) หลังเติมเลี้ยงเซลล์ได้ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที

ตัวอย่างเช่น

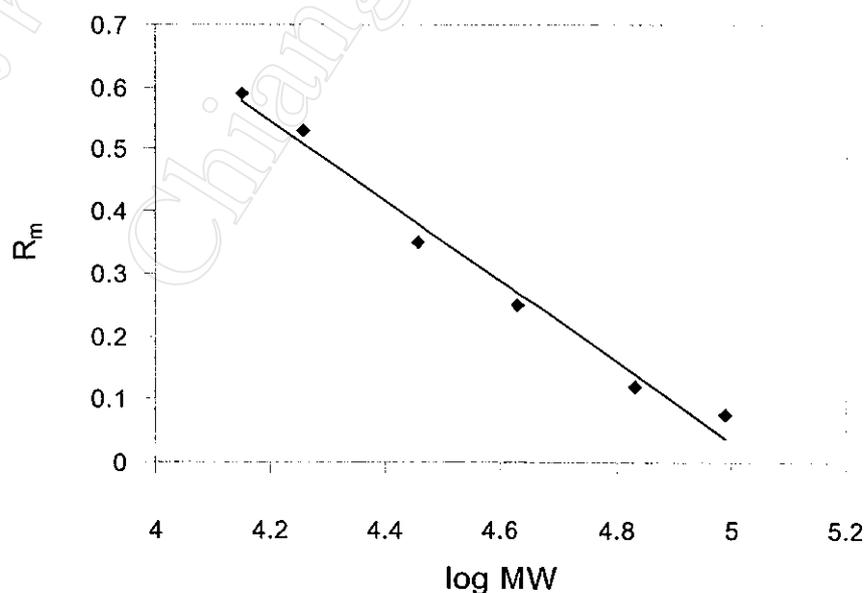
โปรตีนมาตรฐาน Phosphorylase B เคลื่อนที่บนแผ่นเจลได้	=	0.6 ซม.
ระยะทางที่ bromophenol blue เคลื่อนที่บนแผ่นเจล	=	7.8 ซม.

$$\begin{aligned} \therefore R_m \text{ ของ Phosphorelase B} &= \frac{0.60}{7.80} \\ &= 0.077 \end{aligned}$$

ในทำนองเดียวกันสามารถคำนวณค่า  $R_m$  ของโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin Ovalbumin Carbonic anhydrase  $\beta$ -Lactoglobulin และ Lysozyme ซึ่งได้ผลสรุปดังตาราง 3.14 เมื่อเขียนกราฟมาตรฐานมวลโมเลกุลโปรตีนชนิดต่างๆ ได้ดังรูป 3.22

ตาราง 3.14 ค่า  $R_m$  และ log ของมวลโมเลกุลของสารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิดต่างๆบน 12% SDS-PAGE

โปรตีนมาตรฐาน	มวลโมเลกุล (ดาลตัน)	log ของมวลโมเลกุล	ระยะทางที่เคลื่อนที่ (ซม.)	$R_m$
Phosphorelase B	97,400	4.99	0.60	0.08
BSA	68,000	4.83	0.90	0.12
Ovalbumin	43,000	4.63	1.80	0.23
Carbonic anhydrase	29,000	4.46	2.60	0.33
$\beta$ -Lactoglobulin	18,400	4.26	4.20	0.54
Lysozyme	14,300	4.15	4.60	0.59



รูป 3.22 กราฟมาตรฐานมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานจาก 12 % SDS - PAGE

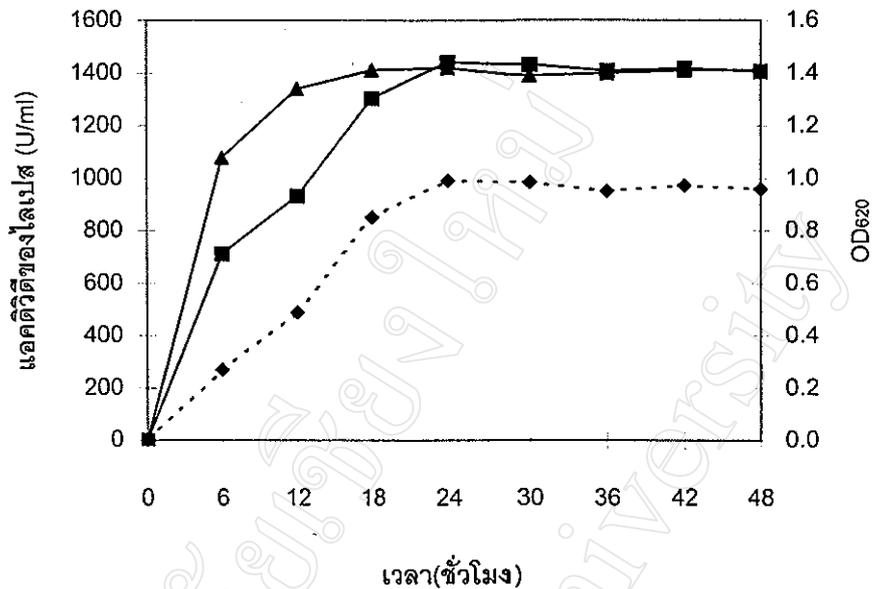
จากรูป 3.21 ซึ่งพบว่าเมื่อเติม IPTG เข้มข้น 0.1 – 0.5 mM ลงไปในอาหารเหลว LB นั้น จำนวนและความเข้มของแถบโปรตีนไม่แตกต่างจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร LB ธรรมดา แต่เมื่อมีความเข้มข้นของ IPTG มาขึ้นเป็น 0.6 – 2.0 mM จะพบแถบของโปรตีนเข้มข้น มีค่า  $R_m$  เท่ากับ 0.29 เมื่อเทียบกราฟมาตรฐานมวลโมเลกุล พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 39,000 ดาลตัน ซึ่งเข้มกว่าจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว LB ธรรมดา ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นของ IPTG เท่ากับ 0.6 mM ในศึกษาการเหนี่ยวนำการเพิ่มผลผลิตไลเปสจาก pQE-TP811 ต่อไป

จากการติดตามการเจริญเติบโตโดยวัดจากความขุ่นของเซลล์และวัดแอกติวิตีของไลเปสเมื่อเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM ลงในอาหารเหลว LB ที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังตาราง 3.15 เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและแอกติวิตีของไลเปสนอกเซลล์กับระยะเวลาในการเลี้ยงแสดงดังรูป 3.23 ซึ่งพบว่า pQE-TP811 สามารถเจริญเติบโตเร็วได้ดีที่สุดเมื่อเวลา 24 ชั่วโมง จากการหาแอกติวิตีของไลเปสทั้งภายนอกและภายในเซลล์พบว่า pQE-TP811 เริ่มผลิตไลเปสส่งออกภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และผลิตไลเปสสูงขึ้นเรื่อยๆและพบแอกติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีแอกติวิตีเท่ากับ 990.95 U/ml แต่ยังคงมีไลเปสค้างอยู่ภายในเซลล์ของ pQE-TP811 อยู่ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 450 U/ml ตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์

จากการหาปริมาณโปรตีนภายนอกและภายในเซลล์ของ pQE-TP811 ได้ผลการทดลองดังตาราง 3.15 นำมาคำนวณหาแอกติวิตีจำเพาะซึ่งแสดงดังตารางเดียวกัน จะเห็นได้ว่าแอกติวิตีจำเพาะนอกเซลล์มีค่าสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ( $112.61 \times 10^3$  U/mg) และมีแนวโน้มลดลงเมื่อเลี้ยงเซลล์ในระยะเวลาที่นานขึ้น แต่แอกติวิตีจำเพาะภายในเซลล์นั้นจะมีค่าลดลงเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานานขึ้น และพบว่าแอกติวิตีจำเพาะรวมจะเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและจะลดลงเมื่อเลี้ยงเซลล์ระยะเวลามากขึ้น จากผลการทดลองในตาราง 3.15 pQE-TP811 พบว่าสามารถผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์เพิ่มมากขึ้นแต่ยังมีบางส่วนที่ค้างอยู่ภายในเซลล์ดังนั้นจึงทำการศึกษาการเพิ่มการส่งไลเปสออกนอกเซลล์ให้มากขึ้นโดยการเติมสารเคมีบางชนิดที่สามารถทำให้เยื่อเซลล์ของแบคทีเรียเปลี่ยนไปในทิศทางที่หลังไลเปสออกนอกเซลล์มากขึ้น เช่น Tween 80 และ Triton X-100 เป็นต้น

ตาราง 3.15 การเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม IPTG เพิ่มขึ้น 0.6 mM ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ณ เวลาต่างๆ ของการเลี้ยง

เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>620</sub>	ปริมาณโปรตีน (µg/ml)		แอกติวิตีของไลเปส (U/ml)		แอกติวิตีจำเพาะ (×10 <sup>3</sup> U/mg)		
		นอกเซลล์	ในเซลล์	นอกเซลล์	ในเซลล์	นอกเซลล์	ในเซลล์	รวม
6	1.08	5.93	48.67	268.92	442.56	45.35	9.09	54.44
12	1.34	6.69	60.38	490.54	442.56	73.32	7.33	80.65
18	1.41	8.09	74.60	851.35	452.70	105.23	6.67	111.90
24	1.42	8.80	88.03	990.95	449.32	112.61	5.10	117.71
30	1.39	10.54	107.70	985.14	445.95	93.46	4.14	97.60
36	1.40	11.94	112.95	951.35	456.05	79.68	4.04	83.72
42	1.41	13.35	116.77	971.62	445.95	72.78	3.82	76.60
48	1.41	14.15	119.25	959.45	445.95	67.80	3.73	71.53



รูป 3.23 การเจริญ (▲) การผลิตไลเปสรวม (■) และแอกติวิตีไลเปสนอกเซลล์ (---◆---) ของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม IPTG ความเข้มข้น 0.6 mM ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.13 การศึกษาการเพิ่มการส่งไลเปสออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811

#### 3.13.1 ผลของ Tween 80 ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811

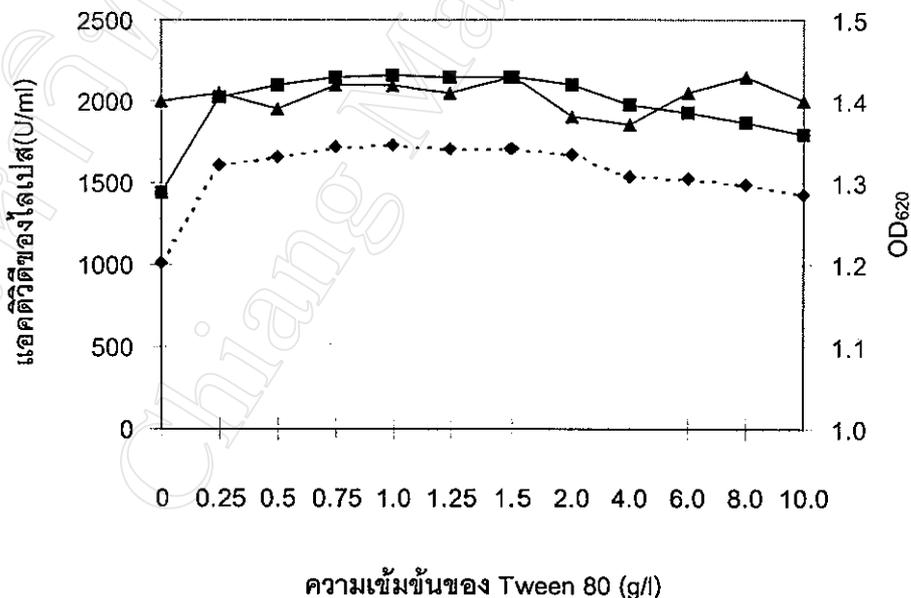
จากการเติม Tween 80 ลงในอาหารเหลว LB ให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน ได้แก่ 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัม/ลิตร และเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.6 mM และผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและกานามัยซินเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงวัดการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ได้ผลดังตาราง 3.16 เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์และระยะเวลาในการเลี้ยง แสดงดังรูป 3.24 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเจริญของ pQE-TP811 ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีความเข้มข้นของ Tween 80 เพิ่มขึ้น จากการหาแอกติวิตีของไลเปสส่งออกนอกเซลล์และภายในเซลล์แสดงดังตาราง 3.16 พบว่ามีแอกติวิตีของไลเปสนอกเซลล์เริ่มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของ Tween 80 เท่ากับ 0.25 กรัม/ลิตร และมีแอกติวิตีของไลเปสนอกเซลล์สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของ Tween 80 เท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร (1727.56 U/ml) และมีแอกติวิตีของไลเปสนอกเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Tween 80 มากกว่า 1.0 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ยังคงมีไลเปสค้างอยู่ภายในเซลล์ประมาณ

ตาราง 3.16 การเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม Tween 80 ความเข้มข้นต่างๆ และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 µg/ml และ กานามัยซิน 25 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ Tween 80 (g/l)	OD <sub>620</sub>	ปริมาณโปรตีน (µg/ml)			แอกติวิตีของเอนไซม์ (U/ml)			แอกติวิตีจำเพาะ (x10 <sup>3</sup> U/mg)		
		นอกเซลล์	ในเซลล์	รวม	นอกเซลล์	ในเซลล์	รวม	นอกเซลล์	ในเซลล์	รวม
0.0	1.40	10.94	87.57	98.51	1015.48	424.58	1440.06	92.82	4.84	97.66
0.25	1.41	18.54	85.16	103.70	1606.75	413.85	2020.60	86.66	4.85	91.51
0.50	1.39	29.98	83.86	113.84	1660.22	436.15	2102.37	55.57	5.20	60.77
0.75	1.42	39.58	81.57	121.15	1717.56	432.77	2150.33	43.39	5.30	48.69
1.00	1.42	44.56	80.24	124.80	1727.56	435.14	2162.70	38.77	5.42	44.19
1.25	1.41	52.76	81.91	134.67	1710.03	440.54	2150.54	32.41	5.37	37.78
1.50	1.43	56.40	76.00	132.40	1704.05	436.49	2140.54	30.21	5.74	35.95
2.00	1.38	60.04	65.43	125.47	1667.56	433.78	2101.34	27.77	6.62	34.39
4.00	1.37	81.91	63.11	145.02	1541.89	429.78	1971.67	18.82	6.81	25.63
6.00	1.41	102.87	60.56	163.43	1529.73	402.02	1931.75	14.87	6.64	21.51
8.00	1.43	140.68	57.03	197.71	1486.49	383.02	1869.94	10.56	6.72	17.28
10.00	1.40	171.21	52.31	223.52	1421.49	375.00	1796.49	8.36	7.17	15.53

430 U/ml และที่ความเข้มข้นของ Tween 80 เป็น 6.0-10.0 กรัม/ลิตรแอกติวิตีของไลเปสในเซลล์จะลดลง และพบว่าแอกติวิตีของไลเปสรวมเริ่มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของ Tween 80 เท่ากับ 0.25 กรัม/ลิตร มีแอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 2162.70 U/ml เมื่อมีความเข้มข้นของ Tween 80 เป็น 1.0 กรัม/ลิตร และแอกติวิตีรวมมีค่าลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของ Tween 80 มากกว่า 1.0 กรัม/ลิตร

จากการหาปริมาณโปรตีนที่ส่งออกภายนอกเซลล์และในเซลล์ของ pQE-TP811 ได้ผลการทดลองดังตาราง 3.16 เช่นกัน พบว่าเมื่อมีความเข้มข้นของ Tween 80 เพิ่มมากขึ้นโปรตีนภายนอกเซลล์จะเริ่มเพิ่มสูงขึ้นแต่ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์กลับเริ่มลดลง เมื่อนำปริมาณโปรตีนมาหาแอกติวิตีจำเพาะแสดงในตารางเดียวกันจะพบว่า pQE-TP811 มีแอกติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์ลดลงเมื่อเติม Tween 80 เพิ่มสูงขึ้น แต่แอกติวิตีจำเพาะภายในเซลล์จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ Tween 80 มากขึ้น การเติม Tween 80 เป็นผลให้แอกติวิตีรวมของไลเปสทั้งนอกเซลล์และในเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น



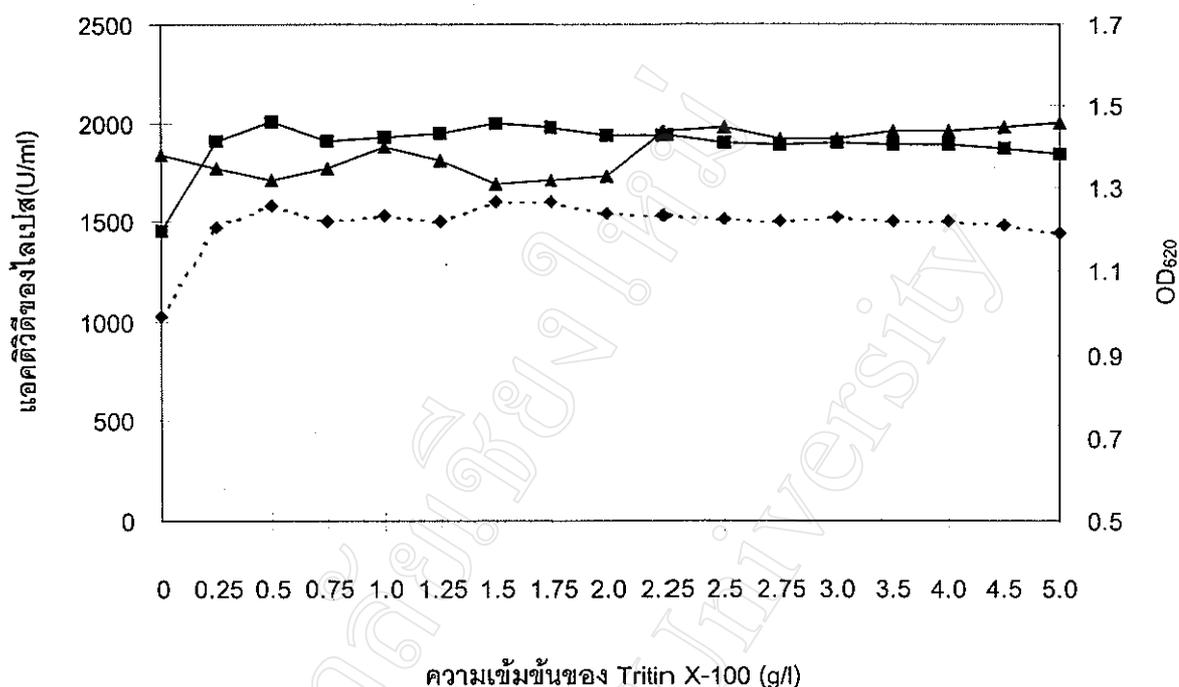
รูป 3.24 การเจริญ (▲) และการผลิตไลเปสรวม (■) และแอกติวิตีของไลเปสนอกเซลล์(◆) ของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม Tween 80 ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.13.2 ผลของ Triton X-100 ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการผลิตไลเปสออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811

จากการเติม Triton X-100 ลงในอาหารเหลว LB ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.25, 2.5, 2.75, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 กรัม/ลิตร และเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.6 mM และผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและกานามัยซิน เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดการเจริญเติบโตโดยการวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ได้ผลการทดลองดังตาราง 3.17 เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ ดังแสดงในรูป 3.25 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ผสม Triton X-100 ไม่แตกต่างจากการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ธรรมดา จากการหาแอกติวิตีของไลเปสส่งออกภายนอกเซลล์และในเซลล์แสดงดังตาราง 3.17 เช่นกันซึ่งพบว่าแอกติวิตีของไลเปสออกเซลล์เริ่มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ Triton X-100 เท่ากับ 0.25 กรัม/ลิตร และมีแอกติวิตีของไลเปสออกเซลล์สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของ Triton X-100 เท่ากับ 1.75 กรัม/ลิตร (1600 U/ml) และมีแอกติวิตีของไลเปสออกเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Triton X-100 มากกว่า 2.0 กรัม/ลิตร แต่ยังคงมีไลเปสค้างอยู่ภายในเซลล์และแอกติวิตีภายในเซลล์จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Triton X-100 สูงขึ้น แอกติวิตีของไลเปสรวมเริ่มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของ Triton X-100 เท่ากับ 0.25 กรัม/ลิตร และมีแอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 1991.89 U/ml เมื่อมีความเข้มข้นของ Tween 80 เป็น 1.75 กรัม/ลิตร และแอกติวิตีรวมจะลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของ Triton X-100 เพิ่มสูงขึ้น

จากการหาปริมาณโปรตีนที่ส่งออกนอกเซลล์และภายในเซลล์ของ pQE-TP811 ได้ผลดังตาราง 3.17 ซึ่งพบว่าปริมาณโปรตีนภายนอกเซลล์จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของ Triton X-100 มากขึ้นแต่ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์กลับลดลง เมื่อนำปริมาณโปรตีนมาคำนวณหาแอกติวิตีจำเพาะภายนอกและภายในเซลล์ของ pQE-TP811 ซึ่งแสดงในตารางเดียวกัน พบว่าแอกติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์และแอกติวิตีจำเพาะรวมจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Triton X-100 เพิ่มสูงขึ้น โดยมีแอกติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์สูงสุดเมื่อมี Triton X-100 เข้มข้น 0.25 กรัม/ลิตร ( $73.83 \times 10^3$  U/mg) แต่แอกติวิตีจำเพาะภายในเซลล์จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ Triton X-100 มากขึ้น





รูป 3.25 การเจริญ (▲) การผลิตไลเปสรวม (■) และแอกติวิตีของไลเปสนอกเซลล์(--◆--) ของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม Triton X-100 ความเข้มข้นต่างๆเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.13.3 ผลการเติม glutamic acid เพื่อเพิ่มแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว LB

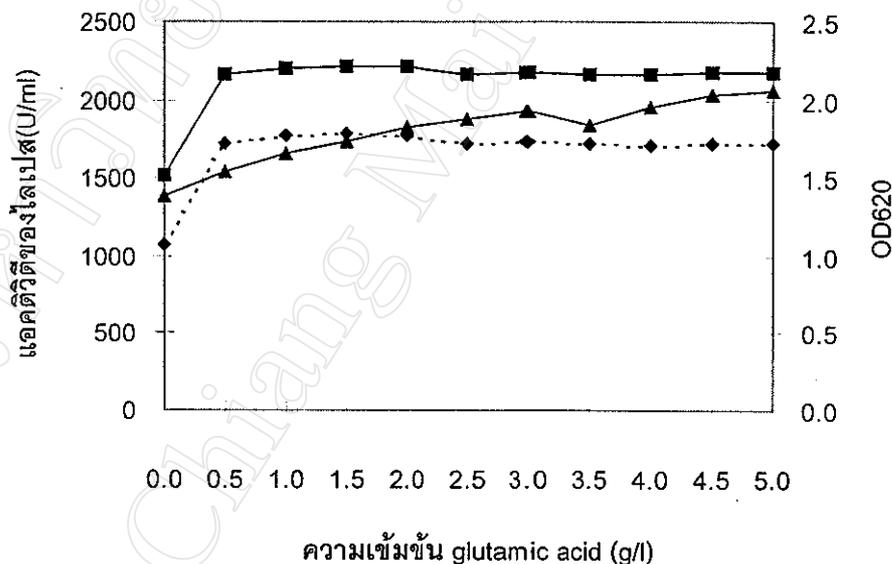
จากการเติม glutamic acid ลงในอาหารเหลว LB ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 กรัม/ลิตร แล้วนำไปเลี้ยงเซลล์ pQE-TP811 ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตโดยวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ได้ผลการทดลองดังตาราง 3.18 เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและความเข้มข้นของ glutamic acid ที่เติมลงในอาหารเหลว LB แสดงดังรูป 3.26 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของ pQE-TP811 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ glutamic acid ที่สูงขึ้นและเจริญได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ธรรมดา โดยเจริญเติบโตได้มากที่สุดเมื่อมีความเข้มข้นของ glutamic acid เท่ากับ 5.0 กรัม/ลิตร จากการหาแอกติวิตีของไลเปสนอกและในเซลล์แสดงดังตารางที่ 3.18 เช่นกัน ซึ่งพบว่าแอกติวิตีของไลเปสนอกเซลล์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของ glutamic acid เพียง 0.5 กรัม/ลิตรและมีแอกติวิตีของไลเปสนอกเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1790.54 U/ml เมื่อมีความเข้มข้นของ glutamic acid เท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตร เมื่อความเข้มข้นของ glutamic acid เพิ่มขึ้นแอกติวิตีของไลเปสนอกเซลล์จะ

ตาราง 3.18 การเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม glutamic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 µg/ml และกานามัยซิน 25 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ glutamic acid (g/l)	OD <sub>620</sub>	ปริมาณโปรตีน (µg/ml)			แอกติวิตีของไลเปส (U/ml)			แอกติวิตีจำเพาะ (x10 <sup>3</sup> U/mg)		
		นอกเซลล์	ในเซลล์	รวม	นอกเซลล์	ในเซลล์	รวม	นอกเซลล์	ในเซลล์	รวม
0.0	1.39	10.72	82.61	93.33	1081.08	431.76	1512.84	100.84	5.22	106.06
0.5	1.54	14.92	89.35	104.27	1727.03	433.10	2160.13	115.92	4.85	120.77
1.0	1.66	18.87	103.10	121.97	1778.38	419.59	2197.97	94.24	4.07	98.31
1.5	1.73	21.02	112.60	133.62	1790.54	424.32	2214.86	85.18	3.77	88.95
2.0	1.83	24.37	124.60	148.97	1768.91	439.86	2208.77	72.59	3.53	76.12
2.5	1.88	24.52	133.85	158.37	1717.57	448.65	2166.22	70.05	3.35	73.40
3.0	1.93	24.47	130.85	155.32	1737.84	441.22	2179.06	71.02	3.37	74.39
3.5	1.84	24.57	128.35	152.92	1720.27	442.57	2162.84	70.01	3.45	73.46
4.0	1.96	24.37	130.10	154.47	1710.81	455.41	2166.22	70.20	3.50	73.70
4.5	2.04	22.62	136.35	158.97	1725.68	451.69	2177.37	76.29	3.31	79.60
5.0	2.06	22.37	133.60	155.97	1722.97	453.04	2170.01	77.02	3.39	80.41

ค่อนข้างคงที่ แต่ยังคงมีไลเปสค้างอยู่ในเซลล์ประมาณ 430 U/ml เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของไลเปสรวมกับความเข้มข้นของ glutamic acid แสดงดังรูป 3.26 ซึ่งพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ glutamic acid เพิ่มขึ้น แอกติวิตีของไลเปสรวมจะค่อนข้างคงที่

จากการหาปริมาณโปรตีนภายนอกและภายในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ผสม glutamic acid แสดงดังตาราง 3.18 พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งภายนอกและภายในเซลล์เริ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของ glutamic acid และจะค่อนข้างคงที่เมื่อมีความเข้มข้นของ glutamic acid เท่ากับ 2.5 กรัม/ลิตร นำปริมาณโปรตีนมาคำนวณ แอกติวิตีจำเพาะภายนอกและภายในเซลล์ของ pQE-TP811 แสดงดังตาราง 3.18 เช่นกัน ซึ่งพบว่าแอกติวิตีจำเพาะทั้งนอกเซลล์และในเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของ glutamic acid สูงขึ้น โดยมีแอกติวิตีจำเพาะนอกและในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 115.92 และ  $4.85 \times 10^3$  U/ml ตามลำดับ เมื่อมีความเข้มข้นของ glutamic acid เท่ากับ 0.5 กรัม/ลิตร



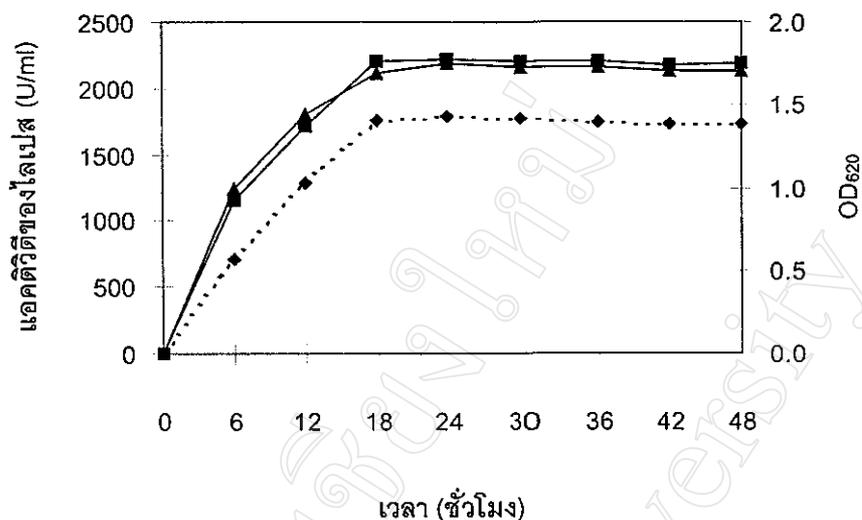
รูป 3.26 การเจริญ (▲) การผลิตไลเปสรวม (■) และแอกติวิตีของไลเปสนอกเซลล์ (---◆---) ของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม glutamic acid ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.13.4 ผลการเติม Tween 80 และ glutamic acid ลงในอาหารเหลว LB

จากการเลี้ยงเซลล์ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่ผสม Tween 80 ความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร พบว่าให้แอกติวิตีของไลเปสส่งออกนอกเซลล์ได้สูงสุดเท่ากับ 1727.56 U/ml และจากการเลี้ยงเซลล์ pQE-TP811 ในอาหารเหลวที่ผสม glutamic acid ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร พบว่าให้แอกติวิตีของไลเปสส่งออกนอกเซลล์ สูงสุดเท่ากับ 1790.54 U/ml ดังนั้นการวิจัยนี้จึงได้ทดลองเติมทั้ง Tween 80 ความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร และ glutamic acid ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร ลงในอาหารเหลว LB เพื่อใช้เลี้ยง pQE-TP811 จากกรติดตามการเจริญเติบโตโดยวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลดังตาราง 3.19 เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและระยะเวลาในการเลี้ยง แสดงดังรูป 3.27 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ pQE-TP811 เริ่มเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการหาแอกติวิตีของไลเปสภายนอกและภายในเซลล์ แสดงดังตาราง 3.19 เช่นกัน พบว่า pQE-TP811 สามารถผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ได้เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แอกติวิตีของไลเปสนอกเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1791.32 U/ml เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ยังมีไลเปสค้างอยู่ในเซลล์ตั้งแต่เลี้ยงเซลล์ได้ 6 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าประมาณ 435 U/ml จากการหาปริมาณโปรตีนภายนอกและภายในเซลล์ของ pQE-TP811 ได้ผลดังตาราง 3.19 พบว่าปริมาณโปรตีนภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานาน แต่ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์จะลดลงเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลานาน นำปริมาณโปรตีนมาคำนวณแอกติวิตีจำเพาะภายนอกและภายในเซลล์ แสดงดังตารางเดียวกัน ซึ่งเห็นได้ว่า pQE-TP811 มีแอกติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์เริ่มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และมีแอกติวิตีจำเพาะนอกเซลล์สูงสุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ( $84.85 \times 10^3$  U/mg) และจะมีแอกติวิตีจำเพาะนอกเซลล์ลดลงเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 18 – 48 ชั่วโมง สำหรับแอกติวิตีจำเพาะภายในเซลล์เริ่มสูงและสูงสุดเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ( $9.66 \times 10^3$  U/mg) แล้วจะลดลงเรื่อยๆเมื่อเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น

ตาราง 3.19 การเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม Tween 80 เข้มข้น 1.0 g/l และ glutamic acid เข้มข้น 1.5 g/l ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 µg/ml และกานามัยซิน 25 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

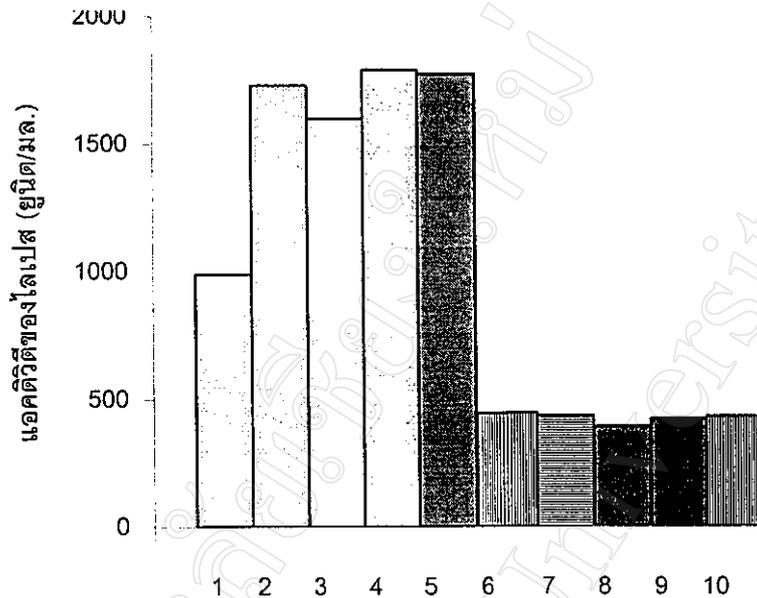
เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>620</sub>	ปริมาณโปรตีน (µg/ml)		แอสดีวิตีของไลเปส (U/ml)		แอสดีวิตีจำเพาะ (x10 <sup>3</sup> U/mg)		
		นอกเซลล์	ในเซลล์	นอกเซลล์	ในเซลล์	นอกเซลล์	ในเซลล์	รวม
6	1.00	14.08	44.69	714.86	432.09	50.77	9.66	60.43
12	1.44	15.13	97.03	1283.78	436.82	84.85	4.50	89.35
18	1.69	23.04	115.00	1754.05	450.67	76.13	3.92	80.05
24	1.75	27.83	99.11	1791.32	434.46	64.33	4.38	68.71
30	1.73	33.88	94.43	1774.89	435.81	52.39	4.62	57.01
36	1.73	36.58	74.64	1743.25	453.72	47.65	6.08	53.73
42	1.71	40.96	65.26	1725.67	442.23	42.13	6.78	48.91
48	1.71	42.00	67.86	1733.78	462.16	41.28	6.81	48.09



รูป 3.27 การเจริญ (▲) การผลิตไลเปสรวม (■) และแอกติวิตีของไลเปสนอกเซลล์(--◆--)ของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่เติม Tween 80 ความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร และ glutamic acid ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ณ เวลาต่างๆของการเลี้ยง

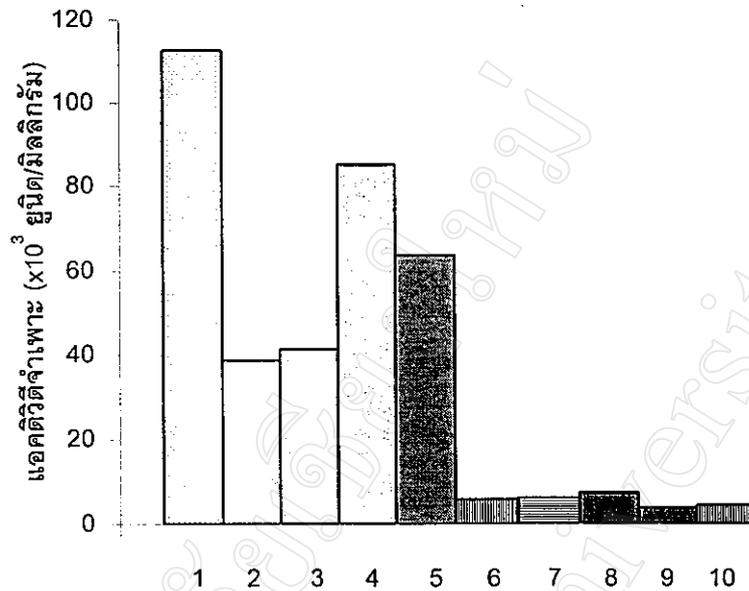
จากผลการศึกษาการเติม Tween 80 ,Triton X – 100 และ glutamic acid ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในอาหารเหลว LB ให้แอกติวิตีของไลเปสนอกและในเซลล์สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเปรียบเทียบกัน แสดงรูป 3.28 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อเติม glutamic acid เข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตรลงในอาหารเหลว LB นั้นให้แอกติวิตีของไลเปสนอกเซลล์สูงที่สุดและมากกว่าการเติมทั้ง Tween 80 เข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร และ glutamic acid เข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตรเล็กน้อย ซึ่งคิดเป็นประมาณ 1.7 เท่าของแอกติวิตีไลเปสนอกเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB ธรรมดา แต่สำหรับแอกติวิตีของไลเปสภายในเซลล์พบว่าไม่แตกต่างกันไม่ว่าจะเติม Tween 80, Triton X – 100 หรือ glutamic acid หรือไม่เติมก็ตาม

นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบแอกติวิตีจำเพาะนอกเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ผสม Tween 80 ,Triton X – 100 และ glutamic acid แสดงดังรูป 3.29 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแอกติวิตีจำเพาะของไลเปสนอกเซลล์เมื่อเลี้ยง pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ธรรมดามีแอกติวิตีจำเพาะนอกเซลล์สูงที่สุด รองลงมาคือเลี้ยงในอาหารเหลว LB ผสม glutamic acid 1.5 กรัม/ลิตร และแอกติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์ต่ำที่สุดคือ อาหารเหลว LB ผสม Tween 80 เข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร สำหรับแอกติวิตีจำเพาะภายในเซลล์มีค่าใกล้เคียงกันไม่ว่าจะเติม Tween 80,Triton X – 100 หรือ glutamic acid หรือไม่เติมก็ตาม



- 1 คือ แอคติวิตีของไลเปสภายนอกเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB
- 2 คือ แอคติวิตีของไลเปสภายนอกเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม Tween 80 1.0 กรัม/ลิตร
- 3 คือ แอคติวิตีของไลเปสภายนอกเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม Triton X-100 1.75 กรัม/ลิตร
- 4 คือ แอคติวิตีของไลเปสภายนอกเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม glutamic acid 1.5 กรัม/ลิตร
- 5 คือ แอคติวิตีของไลเปสภายนอกเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม glutamic acid 1.5 กรัม/ลิตร และ Tween 80 1.0 กรัม/ลิตร
- 6 คือ แอคติวิตีของไลเปสในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB
- 7 คือ แอคติวิตีของไลเปสในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม Tween 80 1.0 กรัม/ลิตร
- 8 คือ แอคติวิตีของไลเปสในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม Triton X-100 1.75 กรัม/ลิตร
- 9 คือ แอคติวิตีของไลเปสในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม glutamic acid 1.5 กรัม/ลิตร
- 10 คือ แอคติวิตีของไลเปสในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม glutamic acid 1.5 กรัม/ลิตร และ Tween 80 1.0 กรัม/ลิตร

รูป 3.28 การเปรียบเทียบแอคติวิตีของไลเปสทั้งภายนอก(1 - 5) และภายในเซลล์ (6-10) ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม Tween 80 , Triton X-100 และ glutamic acid ความเข้มข้นที่ให้แอคติวิตีของไลเปสสูงที่สุด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



- 1 คือ แอคติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB
- 2 คือ แอคติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม Tween 80 1.0 กรัม/ลิตร
- 3 คือ แอคติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม Triton X-100 1.75 กรัม/ลิตร
- 4 คือ แอคติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม glutamic acid 1.5 กรัม/ลิตร
- 5 คือ แอคติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม glutamic acid 1.5 กรัม/ลิตร และ Tween 80 1.0 กรัม/ลิตร
- 6 คือ แอคติวิตีจำเพาะในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB
- 7 คือ แอคติวิตีจำเพาะในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม Tween 80 1.0 กรัม/ลิตร
- 8 คือ แอคติวิตีจำเพาะในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม Triton X-100 1.75 กรัม/ลิตร
- 9 คือ แอคติวิตีจำเพาะในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม glutamic acid 1.5 กรัม/ลิตร
- 10 คือ แอคติวิตีจำเพาะในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม glutamic acid 1.5 กรัม/ลิตร และ Tween 80 1.0 กรัม/ลิตร

รูป 3.29 การเปรียบเทียบแอกติวิตีจำเพาะของไลเปสทั้งภายนอก(1 - 5) และภายในเซลล์ (6-10) ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เมื่อเติม Tween 80 , Triton X-100 และ glutamic acid ความเข้มข้นที่ให้แอกติวิตีของไลเปสสูงที่สุด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง