

บทที่ 3

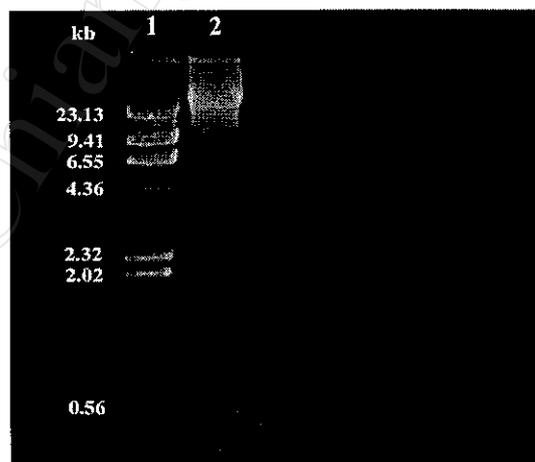
ผลการทดลอง

3.1 การโคลนยีนโปรตีนจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33

3.1.1 การศึกษาการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

3.1.1.1 ผลการศึกษาการสกัดจีโนมดีเอ็นเอจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33

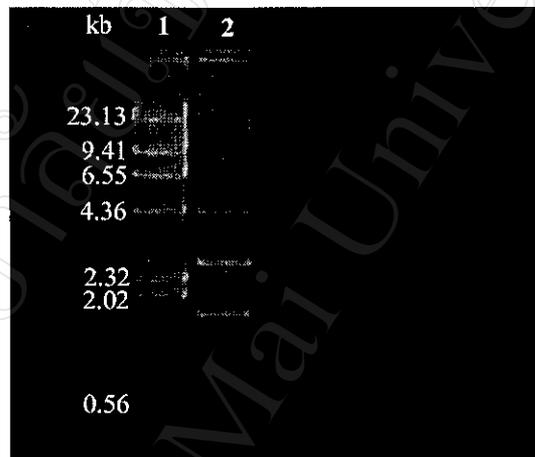
จากการศึกษาการสกัดจีโนมดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ดังหัวข้อที่ 2.2.5.1.ก เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปหาความบริสุทธิ์ โดยการนำไปวัดค่า A_{260}/A_{280} พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ซึ่งถือว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์พอที่จะนำไปใช้งานได้⁽²²⁾ และเมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำ Agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่ทราบขนาด(DNA marker) ของ λ DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III จะได้ผลดังรูปที่ 3.1 โดยในช่องที่ 1 แสดงแถบ λ DNA marker ที่มีขนาดใหญ่ไปหาขนาดเล็กดังนี้ 23,130 ; 9,416 ; 6,557 ; 4,361 ; 2,322 ; 2,027 และ 564 bp ในช่องที่ 2 แสดงแถบจีโนมดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ที่สกัดได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับ λ DNA marker แล้วพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วงที่มีขนาดใหญ่กว่า 23,130 bp ซึ่งแสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่เกิดการขาดของสายดีเอ็นเอเป็นชิ้นเล็กๆ ในขั้นตอนการสกัดจึงเหมาะที่จะนำไปใช้ทำ Genomic DNA library ในลำดับต่อไป



รูปที่ 3.1 แถบจีโนมดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 บน Agarose gel ภายหลังจากการทำ Agarose gel electrophoresis

3.1.1.2 ผลการศึกษาการสกัดดีเอ็นเอพลาสมิด pUC19

ผลการศึกษาการสกัดดีเอ็นเอพลาสมิด pUC19 โดยวิธี Alkaline lysis method พบว่า ดีเอ็นเอพลาสมิดที่สกัดได้เมื่อนำไปทำ Agarose gel electrophoresis แล้วพบว่า มีแถบของดีเอ็นเอ อยู่ 4 แถบ คือ มีขนาดประมาณ 4.3 , 2.8 , 2.5 และ 1.6 kb แสดงว่า ดีเอ็นเอพลาสมิดที่สกัดได้มี รูปร่างหลายแบบซึ่งรูปร่างแต่ละแบบจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกัน ทำให้เมื่อนำมาทำ อิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วจึงเห็นดีเอ็นเอมี 4 แถบ ดังรูปที่ 3.2 โดยในช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่อง ที่ 2 คือ ดีเอ็นเอพลาสมิด pUC19



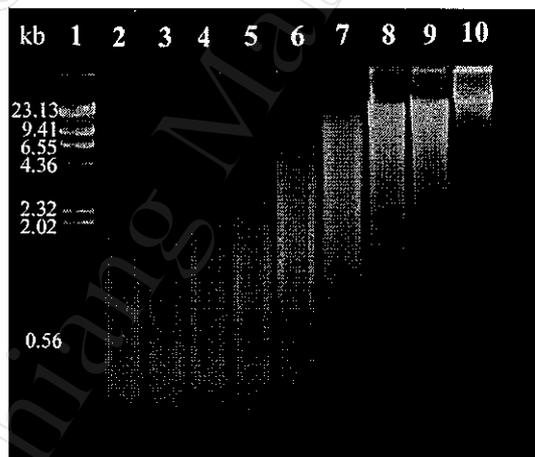
รูปที่ 3.2 แถบของดีเอ็นเอพลาสมิด pUC19 บน Agarose gel ภายหลังจากการทำ Agarose gel electrophoresis

3.1.2 การศึกษาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

3.1.2.1 ผลการศึกษาการตัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Partial digestion

ในการตัดดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ให้ได้เป็นดีเอ็นเอ สายสั้น ๆ ได้ทำการตัดดีเอ็นเอแบบจำกัดเวลาแต่ไม่จำกัดปริมาณเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเอนไซม์ ที่ใช้คือ *Sau* 3AI ซึ่งความสามารถในการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ตัดจำเพาะจะอยู่ในรูปของยูนิต (Unit) โดยที่เอนไซม์ 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ตัด λ DNA ปริมาณ 1 μ g ได้อย่าง สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 37°C ที่เวลา 1 ชม. ในการศึกษาที่ใช้เวลาในการตัดดีเอ็นเอ 1 ชม. ที่ อุณหภูมิ 37°C โดยใช้เอนไซม์ปริมาณแตกต่างกันคือ 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.007

และ 0.003 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ได้ผลดังรูปที่ 3.3 ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2-9 คือจีโนมดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *Sau* 3AI ปริมาณต่าง ๆ กัน ตามลำดับดังนี้ 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.007 และ 0.003 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ช่องที่ 10 คือ จีโนมดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 พบว่า ปริมาณเอนไซม์ 0.03 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ และ 0.015 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ จะให้แถบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 2 – 10 kb ซึ่งเหมาะแก่การนำไปทำ Genomic DNA library⁽¹⁷⁾ จึงได้เลือกใช้เอนไซม์ปริมาณ 0.025 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 0.015 - 0.03 ยูนิท ในการตัดจีโนมดีเอ็นเอเพื่อจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 2 – 10 kb โดยใช้ระยะเวลาในการตัดจีโนมดีเอ็นเอดังนี้คือ 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที พบว่า ที่เวลา 75 นาทีจะให้แถบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 2 – 10 kb ดังรูปที่ 3.4 จากผลการศึกษาที่ได้จึงได้เลือกใช้ เอนไซม์ *Sau* 3AI ปริมาณ 0.025 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ และใช้เวลาในการตัดดีเอ็นเอ 75 นาที เป็นภาวะที่ใช้ในการตัดจีโนมดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ให้มีขนาดเล็กลงเพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะในขั้นต่อไป



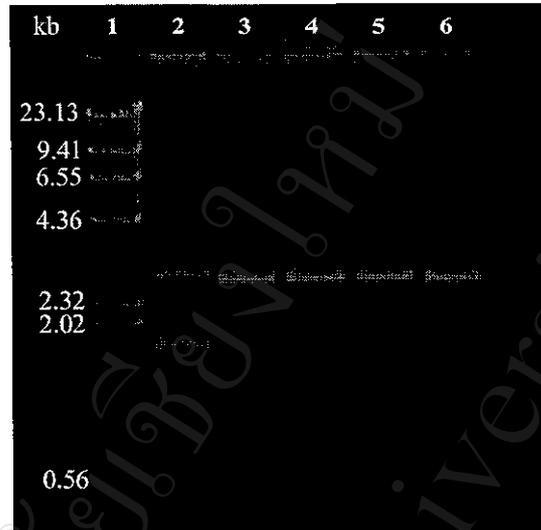
รูปที่ 3.3 การตัดจีโนมดีเอ็นเอด้วยวิธี Partial digestion โดยใช้เอนไซม์ *Sau* 3AI ปริมาณต่าง ๆ กัน ใช้เวลาในการตัด 1 ชม. ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2-9 คือจีโนมดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *Sau* 3AI ปริมาณต่าง ๆ กัน ตามลำดับดังนี้ 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.007 และ 0.003 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ช่องที่ 10 คือ จีโนมดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33



รูปที่ 3.4 การตัดจีโนมคิตีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI ความเข้มข้น 0.025 ยูนิท/ไมโครกรัมคิตีเอ็นเอ ที่เวลาต่าง ๆ กัน ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2 คือ จีโนมคิตีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ช่องที่ 3-7 คือ จีโนมคิตีเอ็นเอที่ตัดด้วย *Sau* 3AI ที่เวลาต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้ 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที

3.1.2.2 ผลการศึกษาการตัดดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ด้วยวิธี Complete digestion

ดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ที่สกัดได้ถูกนำมาตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Bam* HI ปริมาณต่าง ๆ กันดังนี้ 1, 2, 3, และ 4 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ได้ผลดังรูปที่ 3.5 ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ช่องที่ 3-6 คือ ดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI ปริมาณต่าง ๆ กัน ตามลำดับดังนี้ 1, 2, 3 และ 4 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ พบว่าดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ถูกตัดได้อย่างสมบูรณ์ด้วยปริมาณเอนไซม์ 1, 2, 3 และ 4 ยูนิท ต่อปริมาณดีเอ็นเอพาหะ 1 ไมโครกรัม โดยดูจากแถบของดีเอ็นเอพาหะในช่องที่ 2 ก่อนที่จะทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI จะมีอยู่ 4 แถบ ภายหลังจากทำการตัดด้วยเอนไซม์ปริมาณ 1, 2, 3 และ 4 ยูนิท (ช่องที่ 3-6) แล้วจะเหลือเพียงแถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 2.7 kb เมื่อเทียบกับ λ DNA marker ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้เอนไซม์ *Bam* HI ปริมาณ 2 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ในการตัดดีเอ็นเอพาหะเพื่อนำดีเอ็นเอพาหะที่ได้ไปเชื่อมต่อกับชิ้นจีโนมคิตีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI



รูปที่ 3.5 การตัดดีเอ็นเอพลาสมิด pUC19 อย่างสมบูรณ์ ด้วยเอนไซม์ *Bam* HI ปริมาณต่าง ๆ กัน ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอพลาสมิด pUC19 ช่องที่ 3-6 คือ ดีเอ็นเอพลาสมิด pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI ปริมาณต่าง ๆ กัน ตามลำดับดังนี้ 1, 2, 3 และ 4 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ

3.1.3 การศึกษาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอพลาสมิด และการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ภายหลังจากการตัดจีโนมดีเอ็นเอและดีเอ็นเอพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ได้ทำความสะอาดดีเอ็นเอที่ได้โดยการนำไปสกัดด้วยสารละลายฟีนอลอิมิตัวเพื่อกำจัดโปรตีนและเอนไซม์ที่ปนมาในขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอ จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการเชื่อมต่อกันด้วยวิธีตามหัวข้อที่ 2.2.5.3 แล้วจึงทำการ transform เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH5 α โดยหลังจากที่ทำการ transform แล้วเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้านที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C บนอาหารวุ้นที่มีนมพร่องไขมัน (Skim milk agar plate) ที่เติมยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน ลงไป โดยมีความเข้มข้นของแอมพิซิลินในอาหารเลี้ยงเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มล.

3.1.4 ผลการตรวจสอบโคโลนีที่มีฮีนโปรติเอส

ในการคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม ตรวจสอบได้จากลักษณะทางฟีโนไทป์ของดีเอ็นเอพาหะและฮีนที่ต้องการโคลน โดยในการศึกษานี้ทำการตรวจสอบได้จากการเจริญได้ของเซลล์เจ้าบ้านบนอาหารวุ้นนมพร่องไขมันที่มีแอมพิซิลินผสมอยู่และดูการเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีซึ่งเกิดจากการย่อยซบัสเตรทที่เป็นนมพร่องไขมันของเอนไซม์โปรติเอสที่โคลนได้ พบว่า ภายหลังจากทำการ spread เซลล์เจ้าบ้านที่ผ่านการ transform ดีเอ็นเอสายผสมเรียบร้อยแล้วบน skim milk agar plate จำนวน 8 แผ่น แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37^oซ เป็นเวลา 24 ชม. พบว่า มี skim milk agar plate 1 แผ่นเกิด clear zone ขึ้นกระจายเต็มแผ่นอาหารเลี้ยง ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตออกมาเป็นของโคโลนีใด จึงได้ทำการนำเอาโคโลนีที่อยู่ในบริเวณ clear zone จำนวน 11 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เป็นนมพร่องไขมันแล้วทำการตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Azocasein hydrolysis ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ของแต่ละโคโลนีที่ได้จากการโคลนฮีน

| โคโลนี | แอกทิวิตี (Unit/ml) |
|--------|---------------------|
| 1 | 0.770 |
| 2 | 0.860 |
| 3 | 0.632 |
| 4 | 0.768 |
| 5 | 0.816 |
| 6 | 0.990 |
| 7 | 0.862 |
| 8 | 0.744 |
| 9 | 1.090 |
| 10 | 0.886 |
| 11 | 0.894 |

จากการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Azocasein hydrolysis ที่อุณหภูมิ 65^oซ พบว่าทั้ง 11 โคโลนี ผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมา โดยโคโลนีที่ 9 มีแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอส สูงที่สุดคือ 1.09 Unit/ml ดังนั้นจึงได้เลือกโคโลนีที่ 9 มาทำการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน

3.1.5 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน

3.1.5.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก Cloned TLS33

การศึกษากการเจริญเติบโตของ Cloned TLS33 (เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* DH5 α ที่มียีนโปรติเอสของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33) ในอาหารเหลวนมพร่องไขมันที่ผสมแอมพิซิลิน ซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37^oซ เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 52 ชม. ทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชม. เพื่อติดตามผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยนำมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 3.2 หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกตะกอนเซลล์ออกเพื่อนำ Crude enzyme ที่ได้มาหาแอกทิวิตีโดยวิธี Azocasein hydrolysis ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 3.3 และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD₆₂₀ กับเวลา และ แอกทิวิตีกับเวลา แสดงในรูป 3.6

ตารางที่ 3.2 ค่า OD₆₂₀ ของการเจริญเติบโตของ Cloned TLS33 ในอาหารเหลวนมพร่องไขมันที่ผสมแอมพิซิลิน โดยทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37^oซ 200 rpm ติดตามผลการเจริญเติบโตทุก ๆ 4 ชม.

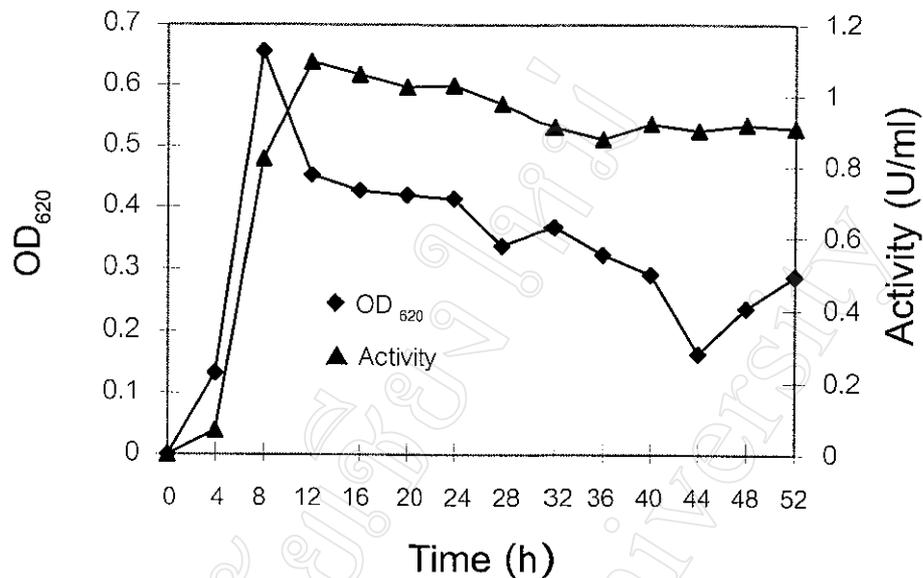
| เวลา (ชั่วโมง) | OD ₆₂₀ |
|------------------|-------------------|
| 0 | 0.000 |
| 4 | 0.133 |
| 8 | 0.657 |
| 12 | 0.453 |
| 16 | 0.427 |
| 20 | 0.420 |
| 24 | 0.414 |
| 28 | 0.337 |

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

| | |
|----|-------|
| 32 | 0.367 |
| 36 | 0.323 |
| 40 | 0.291 |
| 44 | 0.164 |
| 48 | 0.237 |
| 52 | 0.288 |

ตารางที่ 3.3 แอคทิวิตีของเอนไซม์โปรตีนเอสที่ผลิตได้จาก Cloned TLS33 โดยติดตามผลทุก ๆ 4 ชม.

| เวลา (ชั่วโมง) | แอกทิวิตี (U/ml) |
|------------------|------------------|
| 0 | 0.000 |
| 4 | 0.068 |
| 8 | 0.822 |
| 12 | 1.096 |
| 16 | 1.060 |
| 20 | 1.024 |
| 24 | 1.030 |
| 28 | 0.978 |
| 32 | 0.912 |
| 36 | 0.878 |
| 40 | 0.920 |
| 44 | 0.902 |
| 48 | 0.918 |
| 52 | 0.908 |



รูปที่ 3.6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD₆₂₀ ของ Cloned TLS33 กับเวลา และ ความสัมพันธ์ระหว่างแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Cloned TLS33 กับเวลา โดยติดตามผลทุกๆ 4 ชม.

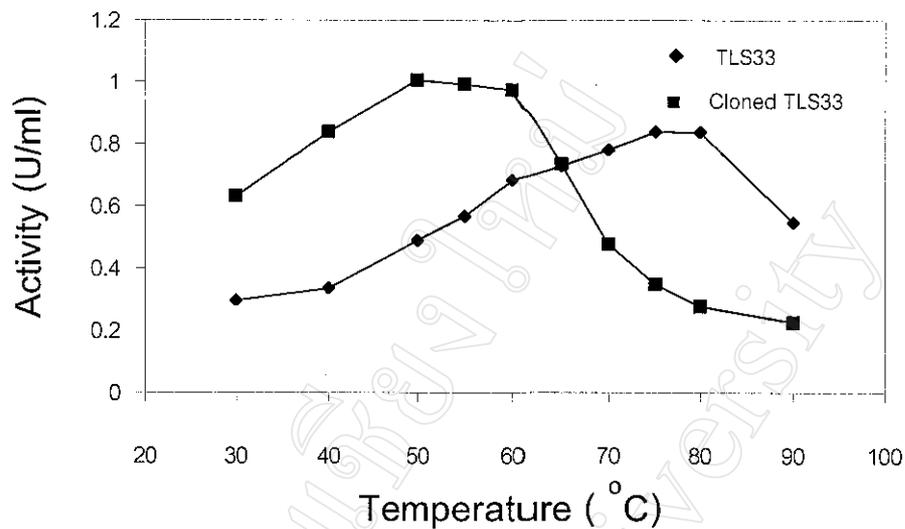
การหาแอกทิวิตีโดยวิธี Azocasein hydrolysis คำนวณโดยกำหนดให้ หนึ่งหน่วยโปรติเอส หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ตกตะกอนที่ให้ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 ต่อหนึ่งชั่วโมง⁽¹⁴⁾ ถ้าในการหาแอกทิวิตีใช้เอนไซม์ 0.5 มล. และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 1 ชม. แอกทิวิตีของเอนไซม์จะมีค่าเท่ากับ Ax(1/0.5) โดยที่ A คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ Cloned TLS33 พบว่า Cloned TLS33 เจริญเติบโตได้ดีที่เวลา 8 ชม.ภายหลังจากการนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว หลังจากนั้นการเจริญเติบโตจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ส่วนแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจะมีค่าสูงสุดที่เวลา 12 ชม. แล้วแอกทิวิตีจะค่อยๆ ลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจนถึง 28 ชม. จากนั้นแอกทิวิตีจะค่อนข้างคงที่ จากการเปรียบเทียบระหว่างค่า OD₆₂₀ กับแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสพบว่า เอนไซม์โปรติเอสจะมีแอกทิวิตีตามการเจริญเติบโตของ Cloned TLS33 โดยจะมีแอกทิวิตีสูงสุดภายหลังจากที่ Cloned TLS33 มีการเจริญเติบโตสูงสุด และจะมีแอกทิวิตีลดลงตามการเจริญเติบโตที่ลดลงของ Cloned TLS33

3.1.5.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส จากผลการศึกษาแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Cloned TLS33 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 30–90 °ซ โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 พบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Cloned TLS33 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 50 – 60 °ซ โดยแอกทิวิตีจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจนถึง 60 °ซ จากนั้นแอกทิวิตีจะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งต่างจากโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 70-80 °ซ โดยแอกทิวิตีจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่สูงขึ้นจนถึง 80 °ซ แอกทิวิตีจึงลดลง ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.7 นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากแอกทิวิตีที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของโปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 และ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 พบว่า แอกทิวิตีของโปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 จะมีค่ามากกว่าโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33

ตารางที่ 3.4 แอกทิวิตีของโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

| อุณหภูมิ (°ซ) | แอกทิวิตี (U/ml) | |
|---------------|------------------|--------------|
| | TLS33 | Cloned TLS33 |
| 30 | 0.294 | 0.634 |
| 40 | 0.336 | 0.840 |
| 50 | 0.490 | 1.004 |
| 55 | 0.570 | 0.996 |
| 60 | 0.686 | 0.972 |
| 65 | 0.730 | 0.734 |
| 70 | 0.780 | 0.476 |
| 75 | 0.840 | 0.348 |
| 80 | 0.836 | 0.276 |
| 90 | 0.550 | 0.226 |



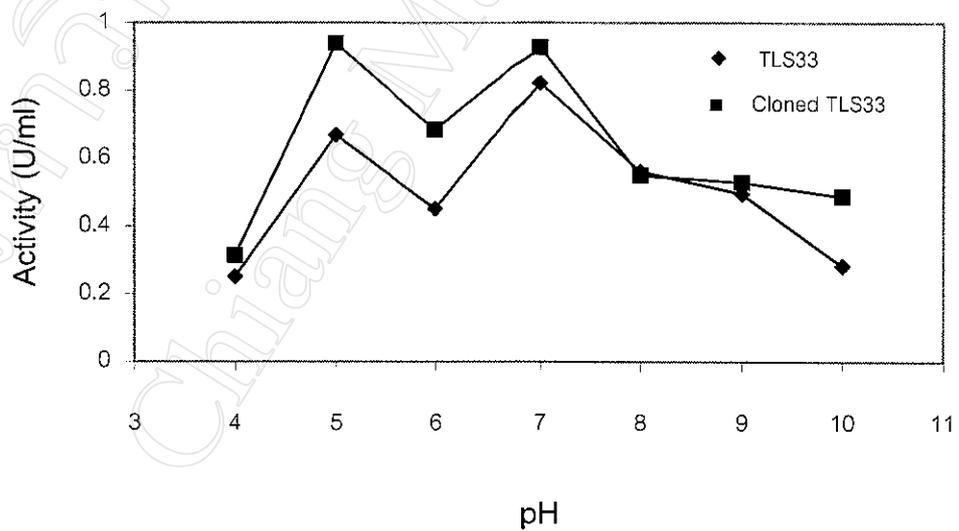
รูปที่ 3.7 ผลของอุณหภูมิต่อแอกทิวิตีของโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33

3.1.5.3 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส

จากผลการศึกษาแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Cloned TLS33 ที่พีเอช (pH) ต่าง ๆ กันตั้งแต่ 4 – 10 พบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 มี พีเอช ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 5 -10 โดยมีแอกทิวิตีที่สูงสุดที่พีเอช 5 และ 7 ส่วนโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 มีพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 5 – 9 โดยมีแอกทิวิตีที่สูงสุดที่พีเอช 7 ดังแสดงในตารางที่ 3.5 และรูปที่ 3.8 เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างแอกทิวิตีกับพีเอชของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Cloned TLS33 กับ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 พบว่า โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 และ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 มีพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาช่วงกว้างคล้ายกัน และมีแอกทิวิตีสูงที่พีเอช 5 และ 7 เหมือนกัน แต่โปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 มีแอกทิวิตีที่สูงสุดที่พีเอช 7 โดยที่โปรติเอสจาก Cloned TLS33 มีแอกทิวิตีที่สูงสุดทั้งที่พีเอช 5 และ 7

ตารางที่ 3.5 แอคติวิตีของโปรตีนจาก *Bacillus stearotherophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 ที่พีเอชต่าง ๆ

| พีเอช (pH) | แอคติวิตี (U/ml) | |
|------------|------------------|--------------|
| | TLS33 | Cloned TLS33 |
| 4 | 0.252 | 0.314 |
| 5 | 0.670 | 0.940 |
| 6 | 0.452 | 0.684 |
| 7 | 0.822 | 0.928 |
| 8 | 0.562 | 0.550 |
| 9 | 0.496 | 0.530 |
| 10 | 0.284 | 0.488 |



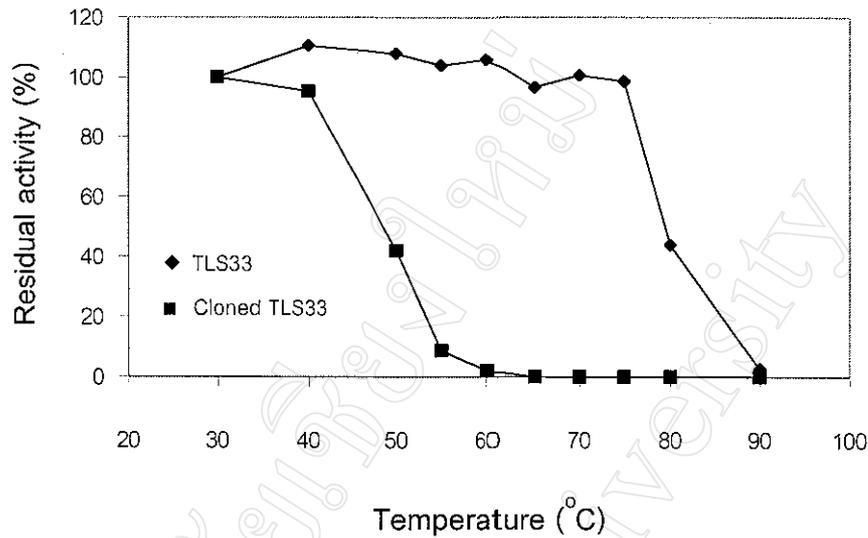
รูปที่ 3.8 ผลของพีเอชต่อแอคติวิตีของโปรตีนจาก *Bacillus stearotherophilus* TLS33 และ Cloned TLS33

3.1.5.4 ผลการศึกษาความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์โปรติเอส

ผลการศึกษาความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์โปรติเอสจาก Cloned TLS33 เทียบกับ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30 – 90 °ซ พบว่า โปรติเอสจาก Cloned TLS33 ทนต่อความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. โดยที่แอกทิวิตียังคงเหลือมากกว่า 50 % และที่อุณหภูมิ 60°ซ โปรติเอสจะสูญเสียแอกทิวิตีไปเกือบหมด ส่วนโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ทนต่อความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 75 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. โดยที่แอกทิวิตียังคงเหลือมากกว่า 50% และจะสูญเสียแอกทิวิตีไปเกือบหมดที่อุณหภูมิ 90 °ซ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.6 และรูปที่ 3.9

ตารางที่ 3.6 แอกทิวิตีที่เหลืออยู่ของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 เมื่อแช่เอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชม.

| อุณหภูมิ (°ซ) | TLS33 | | Cloned TLS33 | |
|---------------|------------------|---------------------------|------------------|---------------------------|
| | แอกทิวิตี (U/ml) | แอกทิวิตีที่เหลืออยู่ (%) | แอกทิวิตี (U/ml) | แอกทิวิตีที่เหลืออยู่ (%) |
| 30 | 0.488 | 100.0 | 0.600 | 100.0 |
| 40 | 0.540 | 110.7 | 0.572 | 95.3 |
| 50 | 0.528 | 108.2 | 0.250 | 41.7 |
| 55 | 0.508 | 104.1 | 0.052 | 8.7 |
| 60 | 0.516 | 105.7 | 0.010 | 1.7 |
| 65 | 0.472 | 96.7 | 0.000 | 0.0 |
| 70 | 0.490 | 100.4 | 0.000 | 0.0 |
| 75 | 0.482 | 98.8 | 0.000 | 0.0 |
| 80 | 0.216 | 44.3 | 0.000 | 0.0 |
| 90 | 0.012 | 2.5 | 0.000 | 0.0 |



รูปที่ 3.9 ความสัมพันธ์ระหว่างแอกทิวิตีที่เหลืออยู่กับอุณหภูมิที่ใช้แช่เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 เป็นเวลา 1 ชม.

3.1.5.5 ผลการศึกษาแอกทิวิตีของโปรติเอสภายในและภายนอกเซลล์

ผลการศึกษาแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 พบว่า แอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ส่งออกนอกเซลล์ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 เท่ากับ 0.924 U/ml คิดเป็น 81.91 % ของแอกทิวิตีทั้งหมด ในขณะที่แอกทิวิตีภายในเซลล์เท่ากับ 0.204 U/ml คิดเป็น 18.09 % โดยที่แอกทิวิตีของโปรติเอสที่ส่งออกนอกเซลล์ Cloned TLS33 เท่ากับ 0.946 U/ml คิดเป็น 83.07 % ของแอกทิวิตีทั้งหมด ในขณะที่แอกทิวิตีภายในเซลล์เท่ากับ 0.193 U/ml คิดเป็น 16.93 % ดังตารางที่ 3.7 ซึ่งแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีนที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ของ Cloned TLS33 มีค่าใกล้เคียงกันกับแอกทิวิตีของโปรติเอสที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33

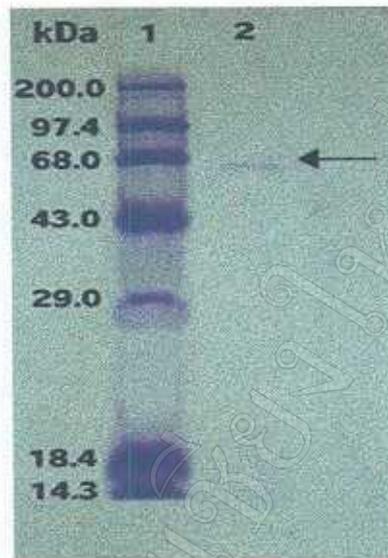
ตารางที่ 3.7 แอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสภายในและภายนอกเซลล์ของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ซึ่งหาแอคทิวิตีที่อุณหภูมิ 65^oซ และ Cloned TLS33 หาแอคทิวิตีที่อุณหภูมิ 50^oซ

| อุณหภูมิ (^o ซ) | TLS33 | | Cloned TLS33 | |
|-------------------------------|--|--|--|--|
| | Extracellular protease activity (U/ml) | Intracellular protease activity (U/ml) | Extracellular protease activity (U/ml) | Intracellular protease activity (U/ml) |
| 50 | - | - | 0.946 | 0.193 |
| 65 | 0.924 | 0.204 | - | - |

3.1.6 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน

3.1.6.1 ผลการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

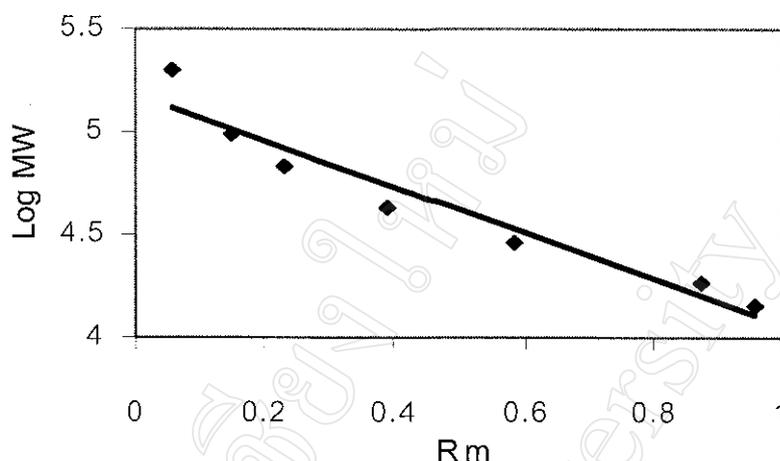
จากการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสจาก Cloned TLS33 โดยวิธี SDS polyacrylamide gel electrophoresis เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ได้ผลดังรูปที่ 3.10 ในช่องที่ 1 เป็นโปรตีนมาตรฐานผสมที่ทราบมวลโมเลกุล คือ Myosin (MW.200,000), Phosphorylase B (MW.97,400), Bovine serum albumin (MW.68,000), Ovalbumin (MW.43,000), Carbonic anhydrase (MW.29,000), β -Lactoglobulin (MW.18,400) และ Lysozyme (MW.14,300) ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 10 μ l ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 ความเข้มข้น 160 μ g/ml ปริมาตร 10 μ l เมื่อนำระยะทางที่โปรตีนแต่ละตัวเคลื่อนที่ไปคำนวณหา Relative mobility (Rm) จะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.8 และเมื่อนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า Rm กับ Log molecular weight (Log MW) ของโปรตีนมาตรฐาน จะได้ผลดังรูปที่ 3.11 ซึ่งนำมาใช้หาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสได้ พบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 เมื่อนำมาทำ SDS-PAGE แล้วได้แถบของโปรตีน 1 แถบ ที่มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 65 kDa



รูปที่ 3.10 การตรวจสอบขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรตีนจาก Cloned TLS33

ตารางที่ 3.8 ค่า Rm และระยะทางที่โปรตีนแต่ละตัวเคลื่อนที่ จากการทำให้ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

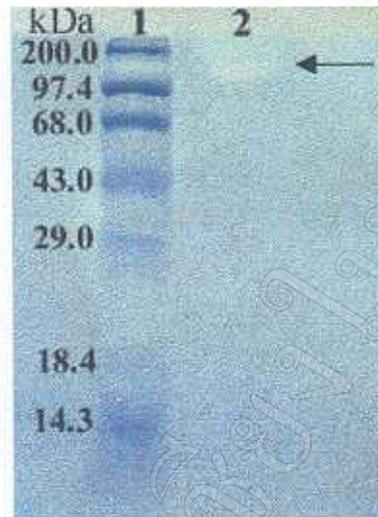
| ความยาวของ เจล (ซม.) | สารตัวอย่าง | ระยะที่เคลื่อนที่ (ซม.) | Relative mobility (Rm) |
|-------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 6.0 | Myosin | 0.35 | 0.059 |
| | Phosphorylase B | 0.90 | 0.151 |
| | Bovine serum albumin | 1.35 | 0.227 |
| | Ovalbumin | 2.20 | 0.370 |
| | Carbonic anhydrase | 3.20 | 0.538 |
| | β -Lactoglobulin | 5.25 | 0.882 |
| | Lysozyme | 5.75 | 0.966 |
| | Protease from Cloned TLS33 | 1.45 | 0.244 |



รูปที่ 3.11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Rm และ Log MW ของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำ SDS – polyacrylamide gel electrophoresis

3.1.6.2 ผลการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Zymography ก. Zymography ชนิด SDS – polyacrylamide gel electrophoresis

จากการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 โดยวิธี Zymography ชนิด SDS – polyacrylamide gel electrophoresis เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล คือ Myosin (MW.200,000), Phosphorylase B (MW.97,400), Bovine serum albumin (MW.68,000), Ovalbumin (MW.43,000), Carbonic anhydrase (MW.29,000), β -Lactoglobulin (MW.18,400) และ Lysozyme (MW.14,300) ในช่องที่ 1 จะเป็นโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ช่องที่ 2 เป็นเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 ซึ่งมีแอกทิวิตี เท่ากับ 9.02 U/ml ปริมาตร 10 μ l พบว่า ในช่องที่ 2 เกิดแถบใสบนแผ่นเจล 1 แถบตรงตำแหน่งระหว่างแถบของ Myosin กับ Phosphorylase B ดังรูปที่ 3.12 ซึ่งเกิดจากการย่อยซบสเตรทที่เป็นนมพร่องไขมันโดยเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ตรงตำแหน่งนั้น และเมื่อนำตำแหน่งที่เกิดแถบใสมาเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Rm กับ Log MW ของโปรตีนมาตรฐาน ทำให้ทราบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 มีมวลโมเลกุลประมาณ 118 kDa



รูปที่ 3.12 การตรวจสอบขนาดโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนโดยวิธี Zymography ชนิด SDS-PAGE ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบโมเลกุล ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรตีนจาก Cloned TLS33

ข. Zymography ชนิด Native polyacrylamide gel electrophoresis

ผลการศึกษากการทำ Zymography ชนิด Native polyacrylamide gel electrophoresis ของเอนไซม์โปรตีนจาก Cloned TLS33 เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน Myosin, Phosphorylase B, Bovine serum albumin, Ovalbumin, Carbonic anhydrase, β -Lactoglobulin และ Lysozyme ในช่องที่ 1 เป็นโปรตีนมาตรฐาน ช่องที่ 2 เป็นเอนไซม์โปรตีนที่ได้จาก Cloned TLS33 ซึ่งมีแอกทิวิตี เท่ากับ 1.10 U/ml ปริมาตร 10 μ l พบว่า ในช่องที่ 2 เกิดแถบใสบนแผ่นเจล 1 แถบตรงตำแหน่งระหว่างแถบของ Phosphorylase B กับ Bovine serum albumin ดังรูปที่ 3.13 เมื่อนำตำแหน่งที่เกิดแถบใสมาเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ทำให้ทราบว่าเอนไซม์โปรตีนที่ได้จาก Cloned TLS33 มีขนาดโมเลกุลประมาณ 93 kDa

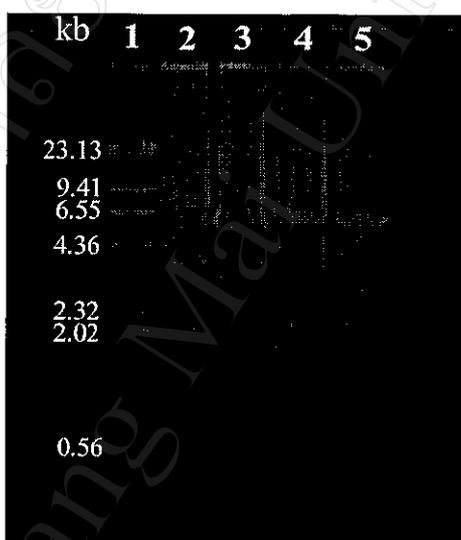


รูปที่ 3.13 การตรวจสอบขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Zymography ชนิด Native PAGE ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Cloned TLS33

3.1.7 การศึกษาขนาดของยีนโปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน

ผลการศึกษาขนาดของยีนโปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน โดยทำการตัดดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Cloned TLS33 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI, *Hind* III และ *Eco*R I ได้ผลดังรูปที่ 3.14 ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Clone TLS33 ช่องที่ 3-5 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI, *Hind* III และ *Eco*R I ตามลำดับ พบว่า ดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Cloned TLS33 เมื่อนำมาทำ Agarose gel electrophoresis จะให้แถบของดีเอ็นเอ 3 แถบ บน agarose gel มีขนาดประมาณ 3.6, 6 และ 7 kb เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI จะได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบขนาดประมาณ 5 kb และ 550 bp แสดงว่า บนโมเลกุลของดีเอ็นเอสายผสมซึ่งมีรูปร่างเป็นวงกลมมีจุดตัดของเอนไซม์ *Bam* HI 2 ที่ห่างกันประมาณ 550 bp จึงให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบดังกล่าว และจากการตัดดีเอ็นเอสายผสมด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco*R I พบว่าได้แถบดีเอ็นเอแถบเดียวที่มีขนาดเท่ากัน แสดงว่าบนโมเลกุลของดีเอ็นเอสายผสมมีจุดตัดของเอนไซม์ 2 ชนิดนี้อย่างละหนึ่งที่ทำให้เมื่อตัดด้วย

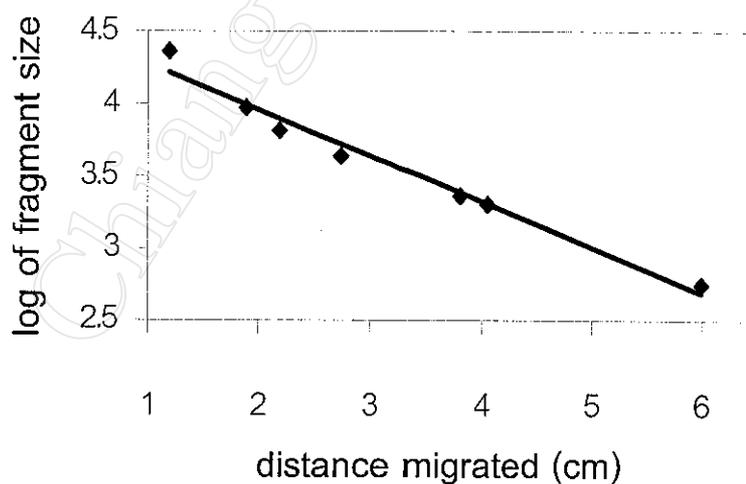
เอนไซม์ 2 ชนิดนี้จึงได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน เมื่อนำระยะทางที่ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *EcoR* I มาเทียบกับค่า Log ขนาดชิ้นดีเอ็นเอของ λ DNA marker (ตารางที่ 3.9) และนำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่กับค่า Log ขนาดชิ้นดีเอ็นเอของ λ DNA marker (รูปที่ 3.15) พบว่า ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *EcoR* I มีขนาดประมาณ 5,813 bp ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอพาหะรวมกับโปรติเอสยีนจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ที่ได้จากการโคลนยีน และเมื่อทำการหักลบเอาขนาดของดีเอ็นเอพาหะที่มีขนาด 2,690 bp ออก ทำให้ทราบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนของเอนไซม์โปรติเอสซึ่งได้จากการโคลนยีนมีขนาดประมาณ 3,123 bp



รูปที่ 3.14 การหาขนาดดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Cloned TLS33 โดยการทำให้ Agarose gel electrophoresis ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Clone TLS33 ช่องที่ 3-5 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI, *Hind* III และ *EcoR* I ตามลำดับ

ตารางที่ 3.9 ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ และค่า Log of fragment size จากการทำ Agarose gel electrophoresis

| DNA marker fragment size (bp) | ระยะที่ DNA เคลื่อนที่ (ซม.) | Log of fragment size |
|-------------------------------|------------------------------|----------------------|
| 23,130 | 1.35 | 4.364 |
| 9,416 | 1.90 | 3.974 |
| 6,557 | 2.20 | 3.817 |
| 4,361 | 2.75 | 3.640 |
| 2,322 | 3.80 | 3.366 |
| 2,027 | 4.05 | 3.307 |
| 564 | 6.00 | 2.751 |
| Protease gene | 2.45 | - |



รูปที่ 3.15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ และ Log of fragment size จากการทำ Agarose gel electrophoresis

3.1.8 ผลการหาลำดับเบสของยีนโปรตีนที่ได้จาก Cloned TLS33

Cloned TLS33 ได้ถูกส่งไปหาลำดับเบสของโปรตีนยีนที่ " Institute of Biological Chemistry Academia Sinica, Taipei, TAIWAN " ได้ผลดังนี้คือ ขึ้นดีเอ็นเอจาก Cloned TLS33 ที่โคลนได้มีขนาด 3,157 bp มีลำดับเบสและ restriction map ดังรูปที่ 3.16 และ 3.17 ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลลำดับเบสจาก GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST^(31,50) พบว่า ลำดับเบสของ Cloned TLS33 ช่วงตำแหน่งที่ 742 – 944 เหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus subtilis* 82% ดังรูปที่ 3.18 เมื่อทำการแปลลำดับเบสที่ได้ให้กลายเป็นลำดับกรดอะมิโน (translation) สามารถแปลลำดับเบสให้เป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 3 แบบ ดังรูปที่ 3.19, 3.20 และ 3.21 ซึ่งพบว่า มีความเป็นไปได้ที่ขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีนประกอบไปด้วยยีนที่จะแปรไปเป็นลำดับกรดอะมิโนต่าง ๆ จำนวน 26 ยีนบนสายดีเอ็นเอที่โคลนได้ดังรูปที่ 3.22 โดยที่ยีนต่างๆ เหล่านี้แสดงในรูปของ Open Reading Frame (ORF) จากผลที่ได้ทำให้ทราบว่าขึ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้มียีนอื่นที่ไม่ใช่ยีนของเอนไซม์โปรตีนที่ต้องการปะปนมาด้วย ดังนั้นจึงได้ทำการ Subcloning ขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก Cloned TLS33 ให้มีขนาดเล็กลง เพื่อที่จะกำจัดยีนอื่นที่ไม่ใช่ยีนของเอนไซม์โปรตีนออกไปและจะได้ทราบถึงยีนของเอนไซม์โปรตีนที่แท้จริง

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 18 | 28 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| 198 | 199 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 |
| 360 | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 |
| 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 | 670 | 680 | 690 | 700 | 710 |
| 720 | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 | 790 | 800 | 810 | 820 | 830 | 840 | 850 | 860 | 870 | 880 | 890 |
| 900 | 910 | 920 | 930 | 940 | 950 | 960 | 970 | 980 | 990 | 1000 | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 | 1060 | 1070 |
| 1080 | 1090 | 1100 | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 | 1210 | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 |
| 1260 | 1270 | 1280 | 1290 | 1300 | 1310 | 1320 | 1330 | 1340 | 1350 | 1360 | 1370 | 1380 | 1390 | 1400 | 1410 | 1420 | 1430 |
| 1440 | 1450 | 1460 | 1470 | 1480 | 1490 | 1500 | 1510 | 1520 | 1530 | 1540 | 1550 | 1560 | 1570 | 1580 | 1590 | 1600 | 1610 |
| 1620 | 1630 | 1640 | 1650 | 1660 | 1670 | 1680 | 1690 | 1700 | 1710 | 1720 | 1730 | 1740 | 1750 | 1760 | 1770 | 1780 | 1790 |
| 1800 | 1810 | 1820 | 1830 | 1840 | 1850 | 1860 | 1870 | 1880 | 1890 | 1900 | 1910 | 1920 | 1930 | 1940 | 1950 | 1960 | 1970 |
| 1980 | 1990 | 2000 | 2010 | 2020 | 2030 | 2040 | 2050 | 2060 | 2070 | 2080 | 2090 | 2100 | 2110 | 2120 | 2130 | 2140 | 2150 |
| 2160 | 2170 | 2180 | 2190 | 2200 | 2210 | 2220 | 2230 | 2240 | 2250 | 2260 | 2270 | 2280 | 2290 | 2300 | 2310 | 2320 | 2330 |
| 2340 | 2350 | 2360 | 2370 | 2380 | 2390 | 2400 | 2410 | 2420 | 2430 | 2440 | 2450 | 2460 | 2470 | 2480 | 2490 | 2500 | 2510 |
| 2520 | 2530 | 2540 | 2550 | 2560 | 2570 | 2580 | 2590 | 2600 | 2610 | 2620 | 2630 | 2640 | 2650 | 2660 | 2670 | 2680 | 2690 |
| 2700 | 2710 | 2720 | 2730 | 2740 | 2750 | 2760 | 2770 | 2780 | 2790 | 2800 | 2810 | 2820 | 2830 | 2840 | 2850 | 2860 | 2870 |
| 2880 | 2890 | 2900 | 2910 | 2920 | 2930 | 2940 | 2950 | 2960 | 2970 | 2980 | 2990 | 3000 | 3010 | 3020 | 3030 | 3040 | 3050 |
| 3060 | 3070 | 3080 | 3090 | 3100 | 3110 | 3120 | 3130 | 3140 | 3150 | 3160 | 3170 | 3180 | 3190 | 3200 | 3210 | 3220 | 3230 |
| 3240 | 3250 | 3260 | 3270 | 3280 | 3290 | 3300 | 3310 | 3320 | 3330 | 3340 | 3350 | 3360 | 3370 | 3380 | 3390 | 3400 | 3410 |
| 3420 | 3430 | 3440 | 3450 | 3460 | 3470 | 3480 | 3490 | 3500 | 3510 | 3520 | 3530 | 3540 | 3550 | 3560 | 3570 | 3580 | 3590 |
| 3600 | 3610 | 3620 | 3630 | 3640 | 3650 | 3660 | 3670 | 3680 | 3690 | 3700 | 3710 | 3720 | 3730 | 3740 | 3750 | 3760 | 3770 |
| 3780 | 3790 | 3800 | 3810 | 3820 | 3830 | 3840 | 3850 | 3860 | 3870 | 3880 | 3890 | 3900 | 3910 | 3920 | 3930 | 3940 | 3950 |
| 3960 | 3970 | 3980 | 3990 | 4000 | 4010 | 4020 | 4030 | 4040 | 4050 | 4060 | 4070 | 4080 | 4090 | 4100 | 4110 | 4120 | 4130 |
| 4140 | 4150 | 4160 | 4170 | 4180 | 4190 | 4200 | 4210 | 4220 | 4230 | 4240 | 4250 | 4260 | 4270 | 4280 | 4290 | 4300 | 4310 |
| 4320 | 4330 | 4340 | 4350 | 4360 | 4370 | 4380 | 4390 | 4400 | 4410 | 4420 | 4430 | 4440 | 4450 | 4460 | 4470 | 4480 | 4490 |
| 4500 | 4510 | 4520 | 4530 | 4540 | 4550 | 4560 | 4570 | 4580 | 4590 | 4600 | 4610 | 4620 | 4630 | 4640 | 4650 | 4660 | 4670 |
| 4680 | 4690 | 4700 | 4710 | 4720 | 4730 | 4740 | 4750 | 4760 | 4770 | 4780 | 4790 | 4800 | 4810 | 4820 | 4830 | 4840 | 4850 |
| 4860 | 4870 | 4880 | 4890 | 4900 | 4910 | 4920 | 4930 | 4940 | 4950 | 4960 | 4970 | 4980 | 4990 | 5000 | 5010 | 5020 | 5030 |
| 5040 | 5050 | 5060 | 5070 | 5080 | 5090 | 5100 | 5110 | 5120 | 5130 | 5140 | 5150 | 5160 | 5170 | 5180 | 5190 | 5200 | 5210 |
| 5220 | 5230 | 5240 | 5250 | 5260 | 5270 | 5280 | 5290 | 5300 | 5310 | 5320 | 5330 | 5340 | 5350 | 5360 | 5370 | 5380 | 5390 |
| 5400 | 5410 | 5420 | 5430 | 5440 | 5450 | 5460 | 5470 | 5480 | 5490 | 5500 | 5510 | 5520 | 5530 | 5540 | 5550 | 5560 | 5570 |
| 5580 | 5590 | 5600 | 5610 | 5620 | 5630 | 5640 | 5650 | 5660 | 5670 | 5680 | 5690 | 5700 | 5710 | 5720 | 5730 | 5740 | 5750 |
| 5760 | 5770 | 5780 | 5790 | 5800 | 5810 | 5820 | 5830 | 5840 | 5850 | 5860 | 5870 | 5880 | 5890 | 5900 | 5910 | 5920 | 5930 |
| 5940 | 5950 | 5960 | 5970 | 5980 | 5990 | 6000 | 6010 | 6020 | 6030 | 6040 | 6050 | 6060 | 6070 | 6080 | 6090 | 6100 | 6110 |
| 6120 | 6130 | 6140 | 6150 | 6160 | 6170 | 6180 | 6190 | 6200 | 6210 | 6220 | 6230 | 6240 | 6250 | 6260 | 6270 | 6280 | 6290 |
| 6300 | 6310 | 6320 | 6330 | 6340 | 6350 | 6360 | 6370 | 6380 | 6390 | 6400 | 6410 | 6420 | 6430 | 6440 | 6450 | 6460 | 6470 |
| 6480 | 6490 | 6500 | 6510 | 6520 | 6530 | 6540 | 6550 | 6560 | 6570 | 6580 | 6590 | 6600 | 6610 | 6620 | 6630 | 6640 | 6650 |
| 6660 | 6670 | 6680 | 6690 | 6700 | 6710 | 6720 | 6730 | 6740 | 6750 | 6760 | 6770 | 6780 | 6790 | 6800 | 6810 | 6820 | 6830 |
| 6840 | 6850 | 6860 | 6870 | 6880 | 6890 | 6900 | 6910 | 6920 | 6930 | 6940 | 6950 | 6960 | 6970 | 6980 | 6990 | 7000 | 7010 |
| 7020 | 7030 | 7040 | 7050 | 7060 | 7070 | 7080 | 7090 | 7100 | 7110 | 7120 | 7130 | 7140 | 7150 | 7160 | 7170 | 7180 | 7190 |
| 7200 | 7210 | 7220 | 7230 | 7240 | 7250 | 7260 | 7270 | 7280 | 7290 | 7300 | 7310 | 7320 | 7330 | 7340 | 7350 | 7360 | 7370 |
| 7380 | 7390 | 7400 | 7410 | 7420 | 7430 | 7440 | 7450 | 7460 | 7470 | 7480 | 7490 | 7500 | 7510 | 7520 | 7530 | 7540 | 7550 |
| 7560 | 7570 | 7580 | 7590 | 7600 | 7610 | 7620 | 7630 | 7640 | 7650 | 7660 | 7670 | 7680 | 7690 | 7700 | 7710 | 7720 | 7730 |
| 7740 | 7750 | 7760 | 7770 | 7780 | 7790 | 7800 | 7810 | 7820 | 7830 | 7840 | 7850 | 7860 | 7870 | 7880 | 7890 | 7900 | 7910 |
| 7920 | 7930 | 7940 | 7950 | 7960 | 7970 | 7980 | 7990 | 8000 | 8010 | 8020 | 8030 | 8040 | 8050 | 8060 | 8070 | 8080 | 8090 |
| 8100 | 8110 | 8120 | 8130 | 8140 | 8150 | 8160 | 8170 | 8180 | 8190 | 8200 | 8210 | 8220 | 8230 | 8240 | 8250 | 8260 | 8270 |
| 8280 | 8290 | 8300 | 8310 | 8320 | 8330 | 8340 | 8350 | 8360 | 8370 | 8380 | 8390 | 8400 | 8410 | 8420 | 8430 | 8440 | 8450 |
| 8460 | 8470 | 8480 | 8490 | 8500 | 8510 | 8520 | 8530 | 8540 | 8550 | 8560 | 8570 | 8580 | 8590 | 8600 | 8610 | 8620 | 8630 |
| 8640 | 8650 | 8660 | 8670 | 8680 | 8690 | 8700 | 8710 | 8720 | 8730 | 8740 | 8750 | 8760 | 8770 | 8780 | 8790 | 8800 | 8810 |
| 8820 | 8830 | 8840 | 8850 | 8860 | 8870 | 8880 | 8890 | 8900 | 8910 | 8920 | 8930 | 8940 | 8950 | 8960 | 8970 | 8980 | 8990 |
| 9000 | 9010 | 9020 | 9030 | 9040 | 9050 | 9060 | 9070 | 9080 | 9090 | 9100 | 9110 | 9120 | 9130 | 9140 | 9150 | 9160 | 9170 |
| 9180 | 9190 | 9200 | 9210 | 9220 | 9230 | 9240 | 9250 | 9260 | 9270 | 9280 | 9290 | 9300 | 9310 | 9320 | 9330 | 9340 | 9350 |
| 9360 | 9370 | 9380 | 9390 | 9400 | 9410 | 9420 | 9430 | 9440 | 9450 | 9460 | 9470 | 9480 | 9490 | 9500 | 9510 | 9520 | 9530 |
| 9540 | 9550 | 9560 | 9570 | 9580 | 9590 | 9600 | 9610 | 9620 | 9630 | 9640 | 9650 | 9660 | 9670 | 9680 | 9690 | 9700 | 9710 |
| 9720 | 9730 | 9740 | 9750 | 9760 | 9770 | 9780 | 9790 | 9800 | 9810 | 9820 | 9830 | 9840 | 9850 | 9860 | 9870 | 9880 | 9890 |
| 9900 | 9910 | 9920 | 9930 | 9940 | 9950 | 9960 | 9970 | 9980 | 9990 | 10000 | 10010 | 10020 | 10030 | 10040 | 10050 | 10060 | 10070 |
| 10080 | 10090 | 10100 | 10110 | 10120 | 10130 | 10140 | 10150 | 10160 | 10170 | 10180 | 10190 | 10200 | 10210 | 10220 | 10230 | 10240 | 10250 |
| 10260 | 10270 | 10280 | 10290 | 10300 | 10310 | 10320 | 10330 | 10340 | 10350 | 10360 | 10370 | 10380 | 10390 | 10400 | 10410 | 10420 | 10430 |
| 10440 | 10450 | 10460 | 10470 | 10480 | 10490 | 10500 | 10510 | 10520 | 10530 | 10540 | 10550 | 10560 | 10570 | 10580 | 10590 | 10600 | 10610 |
| 10620 | 10630 | 10640 | 10650 | 10660 | 10670 | 10680 | 10690 | 10700 | 10710 | 10720 | 10730 | 10740 | 10750 | 10760 | 10770 | 10780 | 10790 |
| 10800 | 10810 | 10820 | 10830 | 10840 | 10850 | 10860 | 10870 | 10880 | 10890 | 10900 | 10910 | 10920 | 10930 | 10940 | 10950 | 10960 | 10970 |
| 10980 | 10990 | 11000 | 11010 | 11020 | 11030 | 11040 | 11050 | 11060 | 11070 | 11080 | 11090 | 11100 | 11110 | 11120 | 11130 | 11140 | 11150 |
| 11160 | 11170 | 11180 | 11190 | 11200 | 11210 | 11220 | 11230 | 11240 | 11250 | 11260 | 11270 | 11280 | 11290 | 11300 | 11310 | 11320 | 11330 |
| 11340 | 11350 | 11360 | 11370 | 11380 | 11390 | 11400 | 11410 | 11420 | 11430 | 11440 | 11450 | 11460 | 11470 | 11480 | 11490 | 11500 | 11510 |
| 11520 | 11530 | 11540 | 11550 | 11560 | 11570 | 11580 | 11590 | 11600 | 11610 | 11620 | 11630 | 11640 | 11650 | 11660 | 11670 | 11680 | 11690 |
| 11700 | 11710 | 11720 | 11730 | 11740 | 11750 | 11760 | 11770 | 11780 | 11790 | 11800 | 11810 | 11820 | 11830 | 11840 | 11850 | 11860 | 11870 |
| 11880 | 11890 | 11900 | 11910 | 11920 | 11930 | 11940 | 11950 | 11960 | 11970 | 11980 | 11990 | 12000 | 12010 | 12020 | 12030 | 12040 | 12050 |
| 12060 | 12070 | 12080 | 12090 | 12100 | 12110 | 12120 | 12130 | 12140 | 12150 | 12160 | 12170 | 12180 | 12190 | 12200 | 12210 | 12220 | 12230 |
| 12240 | 12250 | 12260 | 12270 | 12280 | 12290 | 12300 | 12310 | 12320 | 12330 | 12340 | 12350 | 12360 | 12370 | 12380 | 12390 | 12400 | 12410 |
| 12420 | 12430 | 12440 | 12450 | 12460 | 12470 | 12480 | 12490 | 12500 | 12510 | 12520 | 12530 | 12540 | 12550 | 12560 | 12570 | 12580 | 12590 |
| 12600 | 12610 | 12620 | 12630 | 12640 | 12650 | 12660 | 12670 | 12680 | 12690 | 12700 | 12710 | 12720 | 12730 | 12740 | 12750 | 12760 | 12770 |
| 12780 | 12790 | 12800 | 12810 | 12820 | 12830 | 12840 | 12850 | 12860 | 12870 | 12880 | 12890 | 12900 | 12910 | 12920 | 12930 | 12940 | 12950 |
| 12960 | 12970 | 12980 | 12990 | 13000 | 13010 | 13020 | 13030 | 13040 | 13050 | 13060 | 13070 | 13080 | 13 | | | | |

>gb : RSUB0018 | Z99121 | Bacillus subtilis complete genome

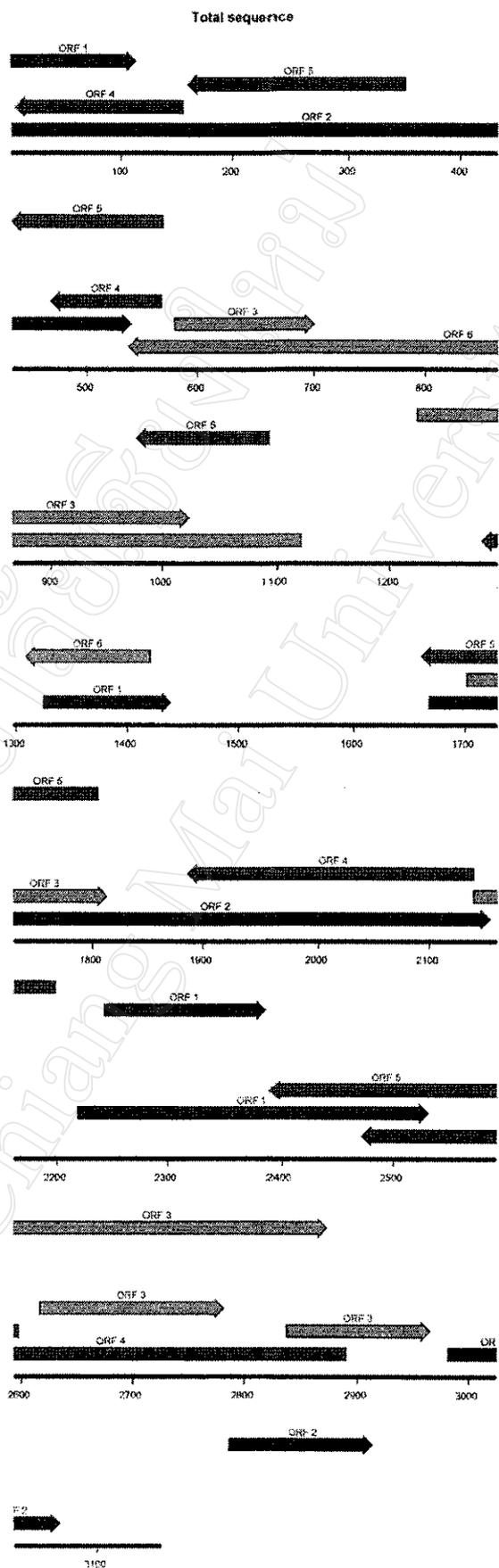
Score = 117 bits (59) , Expect = 3e-23

Identities = 167/203 (82%)

Strand = Plus / Plus

| | | | |
|-------------------|-------|---|-------|
| Cloned TLS | 742 | acgttggcaatacactaagtfttgggttggcggcaaccgggaaategcegggtatggactttg | 801 |
| <i>B.subtilis</i> | 30618 | acgttegenatenthaagtttgatggctgctegcegggaact cactgtatgaaacttg | 30677 |
| Cloned TLS | 802 | ggatttcegecagggccggtcateagcttgtaa tctctgtaglettgacgeggcegct | 861 |
| <i>B.subtilis</i> | 30678 | ggatttcegecaggecagtcateagcttaaatcctegtaa tccgtatatacggcegct | 30737 |
| Cloned TLS | 862 | tegacaanagagcgggaaatgccacgtccattgacgeettegacceagcggtaggggtg | 921 |
| <i>B.subtilis</i> | 30738 | tegacaanacagcgggaaatgccattt atcctegat gecttcccccagccataggggtg | 30797 |
| Cloned TLS | 922 | ccgetatgctegaaatggtacgg | 944 |
| <i>B.subtilis</i> | 30798 | ccgtatgategaaatgatacgg | 30820 |

รูปที่ 3.18 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอจาก Cloned TLS33 กับ ข้อมูลลำดับเบสของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST



รูปที่ 3.22 Open Reading Frame (ORF) ของยีนต่าง ๆ บน สายดีเอ็นเอที่ได้จาก Cloned TLS33

3.2 การทำ Subcloning ยีนโปรตีน

3.2.1 การศึกษาการสกัดยีนโปรตีนจากดีเอ็นเอสายผสม

3.2.1.1 การศึกษาการตัดยีนโปรตีนจากดีเอ็นเอสายผสม

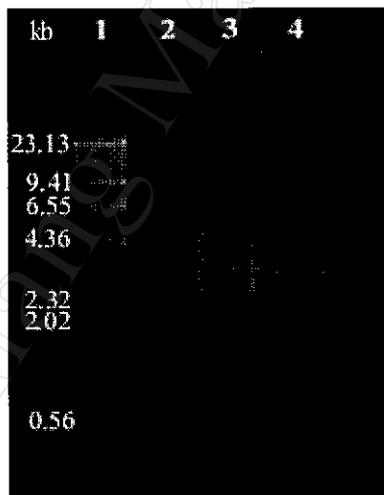
ผลการศึกษาการตัดยีนโปรตีนจากดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Cloned TLS33 โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Eco*R I ในการตัด เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะตัดดีเอ็นเอสายผสมบริเวณด้านหน้าและด้านหลังส่วนที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนที่มาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ ได้ผลดังรูปที่ 3.23 ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Clone TLS33 และช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco*R I พบว่า ดีเอ็นเอสายผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด จะให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบบน agarose gel เมื่อนำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ดีเอ็นเอทั้งสองชิ้นมีขนาดประมาณ 2.7 kb และ 3.1 kb โดยที่ชิ้นขนาด 2.7 kb จะเป็นดีเอ็นเอของส่วนที่เป็นดีเอ็นเอพาหะ และชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.1 kb จะเป็นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนที่ได้จากการโคลนยีน



รูปที่ 3.23 การตัดยีนโปรตีนจากดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Cloned TLS33 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Eco*R I ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Clone TLS33 และช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco*R I

3.2.1.2 การศึกษาการสกัดยีนโปรตีนจาก Agarose gel

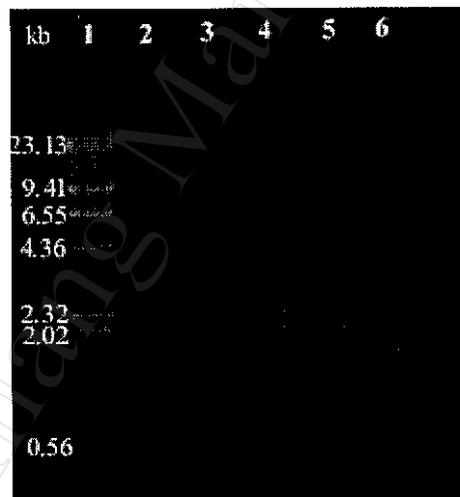
ภายหลังจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของยีนโปรตีนที่ถูกตัดออกมาจากดีเอ็นเอสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Eco*R I agarose gel ตรงตำแหน่งของยีนโปรตีนจะถูกตัดออกมาแล้วนำไปทำการสกัดยีนโปรตีนจากเจลโดยใช้ชุด Concert rapid gel extraction system แล้วนำเอาชิ้นโปรตีนที่ยีนที่สกัดได้มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 3.24 ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Clone TLS33 ช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco*R I และช่องที่ 4 คือ ยีนโปรตีนที่สกัดออกมาจากเจล จากการศึกษาการสกัดยีนโปรตีนออกมาจากเจล โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอสายผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco*R I พบว่า ยีนโปรตีนที่สกัดได้จากเจลให้แถบของดีเอ็นเอแถบเดียวบน agarose gel ขนาดประมาณ 3.1 kb เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอสายผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco*R I ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่เป็นแถบของ ดีเอ็นเอพาหะ และ แถบของยีนโปรตีน โดยมีขนาดประมาณ 2.7 kb และ 3.1 kb ตามลำดับ แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลเป็นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนที่ต้องการและไม่มีดีเอ็นเอพาหะปะปนมาด้วยจึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการทำ Subcloning ในลำดับต่อไป



รูปที่ 3.24 ผลการสกัดยีนโปรตีนจาก Agarose gel ภายหลังจากตัดดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Cloned TLS33 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Eco*R I แล้วนำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Clone TLS33 ช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco*R I และช่องที่ 4 คือ ยีนโปรตีนที่สกัดออกมาจากเจล

3.2.2 การตัดยีนโปรตีนด้วยวิธี Partial digestion

เนื่องจากดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีนมีขนาดใหญ่และมียีนอื่นที่ไม่ใช่ยีนโปรตีนปนมาด้วย จึงได้ทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กลงเพื่อที่จะให้ได้ยีนโปรตีนที่แท้จริงในการทำ Subcloning โดยยีนโปรตีนที่สกัดได้จาก agarose gel จะถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบจำกัดปริมาณเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ไม่จำกัดเวลา ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เอนไซม์ *Sau* 3AI 0.025 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ในการตัดชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจล ใช้ระยะเวลาในการตัดชิ้นดีเอ็นเอ ดังนี้คือ 15, 30, 45 และ 60 นาที พบว่า ที่เวลา 60 นาทีจะให้แถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดต่างๆ กันตั้งแต่ 0.5 - 3.1 kb ดังรูปที่ 3.25 ซึ่งเหมาะแก่การทำ Genomic library เพราะดีเอ็นเอที่ได้มีหลายขนาด จึงมีโอกาสที่จะได้ยีนโปรตีนที่ไม่มียีนอื่นปนมาด้วย จากผลการศึกษาที่ได้จึงได้เลือกใช้เอนไซม์ *Sau* 3AI ปริมาณ 0.025 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ และใช้เวลาในการตัดดีเอ็นเอ 60 นาที เป็นภาวะที่ใช้ในการตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีน เพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการโคลนลงในเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH5 α ในลำดับต่อไป



รูปที่ 3.25 การตัดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI ความเข้มข้น 0.025 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ที่เวลาต่างๆ กัน ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจล ช่องที่ 3-6 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI ที่เวลาต่างๆ ตามลำดับดังนี้ 15, 30, 45 และ 60 นาที

3.2.3 การตรวจสอบโคโลนีที่มีเอนไซม์โปรตีนเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

หลังจากทำการตัดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลแล้ว ดีเอ็นเอที่จะถูกนำมาเชื่อมต่อกับ ดีเอ็นเอพาหะ pUC19 แล้ว transform เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* DH5 α จากนั้นเซลล์เจ้าบ้าน จะถูกนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่เป็นนมพร่องไขมัน (Skim milk agar plate) ที่เติม แอมพิซิซิลิน ลงไป โดยมีความเข้มข้นของแอมพิซิซิลินในอาหารเลี้ยงเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มล. เพื่อตรวจสอบการ เจริญได้ของเซลล์เจ้าบ้านบนอาหารวุ้นนมพร่องไขมันที่มีแอมพิซิซิลินผสมอยู่และดูการเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนี ซึ่งพบว่า ภายหลังจากทำการ spread เซลล์เจ้าบ้านที่ผ่านการ transform ดีเอ็นเอสายผสมเรียบร้อยแล้วบน skim milk agar plate จำนวน 8 แผ่น แล้วนำไป เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 24 ชม. พบว่า มี skim milk agar plate 2 แผ่น มีโคโลนีที่เกิด clear zone ขึ้นจำนวน 2 โคโลนี โดยให้ชื่อเป็น Subclone I และ Subclone II และได้นำเอา โคโลนีทั้งสองมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เป็นนมพร่องไขมัน แล้วทำการตรวจสอบแอกทิวิตีของ เอนไซม์โปรตีนเอสโดยวิธี Azocasein hydrolysis โดยใช้เอนไซม์ปริมาตร 0.1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ ซ 30 นาที พบว่า Subclone I และ Subclone II มีแอกทิวิตีเท่ากับ 8.32 และ 8.06 U/ml ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์โปรตีนเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II จะถูกนำมาศึกษา คุณสมบัติต่างๆ ในลำดับต่อไป

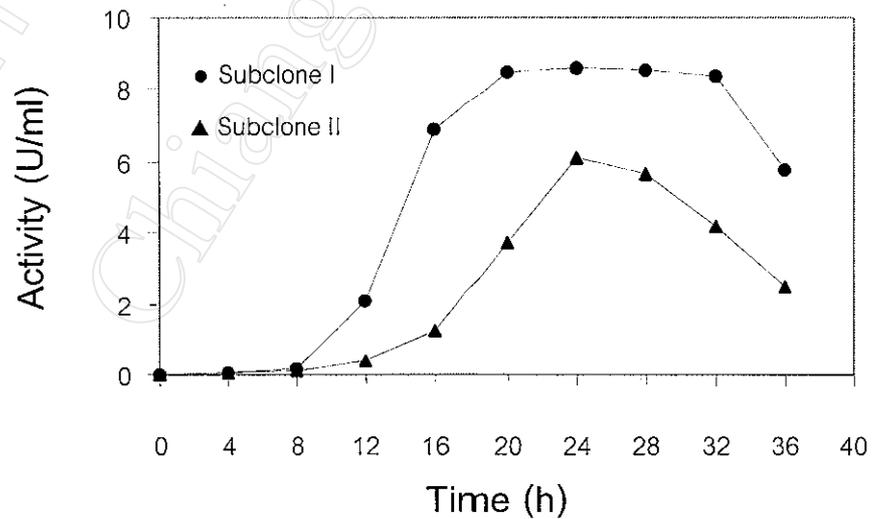
3.2.4 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรตีนเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

3.2.4.1 การผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจากเซลล์เจ้าบ้านที่ได้จากการทำ Subcloning

ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของ Subclone I และ Subclone II ในอาหารเหลว นมพร่องไขมันที่ผสมแอมพิซิซิลิน ซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ ซ เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 36 ชม. ทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชม. แล้วนำ Crude enzyme ที่ได้มาหาแอกทิวิตีโดยวิธี Azocasein hydrolysis พบว่า เอนไซม์โปรตีนเอสที่ผลิตได้จาก Subclone I และ Subclone II มี แอกทิวิตีสูงสุดที่เวลา 24 ชม. ดังตารางที่ 3.10 และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอกทิวิตีกับเวลา แสดงในรูป 3.26

ตารางที่ 3.10 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Subclone I และ Subclone II โดยติดตามผลทุก ๆ 4 ชม.

| เวลา (ชม.) | แอกติวิตี (U/ml) | |
|------------|------------------|-------------|
| | Subclone I | Subclone II |
| 4 | 0.04 | 0.04 |
| 8 | 0.16 | 0.12 |
| 12 | 2.08 | 0.40 |
| 16 | 6.88 | 1.26 |
| 20 | 8.46 | 3.74 |
| 24 | 8.56 | 6.08 |
| 28 | 8.52 | 5.66 |
| 32 | 8.34 | 4.16 |
| 36 | 5.76 | 2.50 |



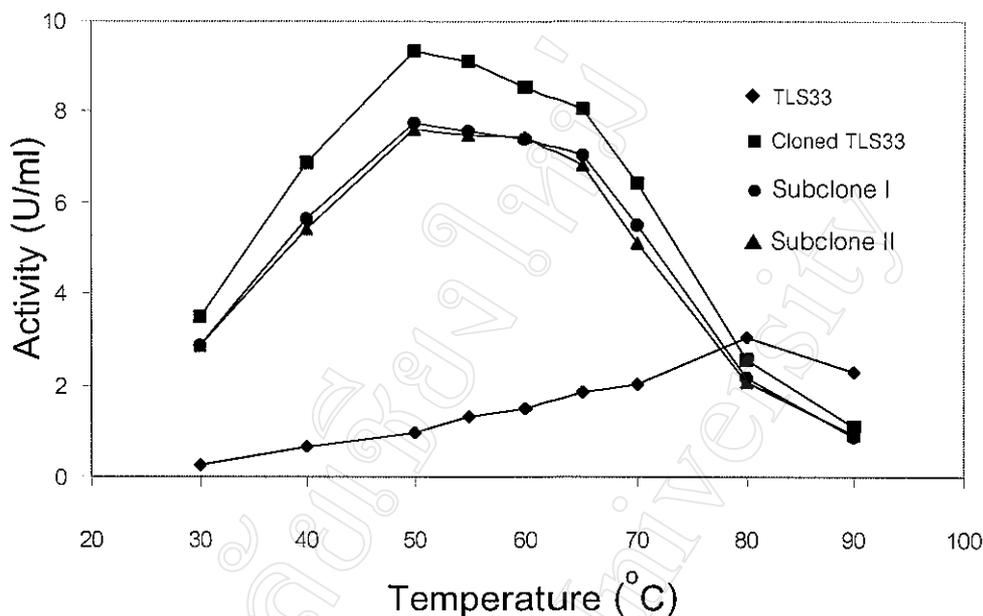
รูปที่ 3.26 ความสัมพันธ์ระหว่าง แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Subclone I และ Subclone II กับเวลา โดยติดตามผลทุก ๆ 4 ชม.

3.2.4.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

จากการศึกษาแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Subclone I และ Subclone II ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 30–90 °ซ โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 ดังตารางที่ 3.11 พบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Subclone I และ Subclone II มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเหมือนกับ Cloned TLS33 คือที่ 50 – 65 °ซ โดยมีแอกทิวิตีสูงสุด 50°ซ ซึ่งต่างจากโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 80 °ซ เมื่อพิจารณาแอกทิวิตีที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของโปรติเอสแต่ละชนิดจะพบว่า โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 , Subclone I และ Subclone II มีค่าสูงกว่าโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ประมาณ 3 , 2.5 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ โดยที่ Subclone I และ Subclone II มีแอกทิวิตีใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณากาฟความสัมพันธ์ระหว่างแอกทิวิตีกับอุณหภูมิจะเห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II มีค่าใกล้เคียงกันและมีลักษณะคล้ายกันกับกาฟที่ได้จาก Cloned TLS33 ดังรูปที่ 3.27

ตารางที่ 3.11 แอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 , Cloned TLS33, Subclone I และ Subclone II ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

| อุณหภูมิ (°ซ) | แอกทิวิตี (U/ml) | | | |
|---------------|--------------------|-------------|------------|-------------|
| | TLS33 | Clone TLS33 | Subclone I | Subclone II |
| 30 | 0.28 | 3.48 | 2.86 | 2.86 |
| 40 | 0.66 | 6.88 | 5.64 | 5.44 |
| 50 | 0.98 | 9.36 | 7.74 | 7.64 |
| 55 | 1.32 | 9.12 | 7.58 | 7.48 |
| 60 | 1.48 | 8.56 | 7.40 | 7.44 |
| 65 | 1.84 | 8.04 | 7.04 | 6.82 |
| 70 | 2.02 | 6.42 | 5.50 | 5.12 |
| 80 | 3.02 | 2.54 | 2.14 | 2.08 |
| 90 | 2.28 | 1.10 | 0.88 | 0.94 |



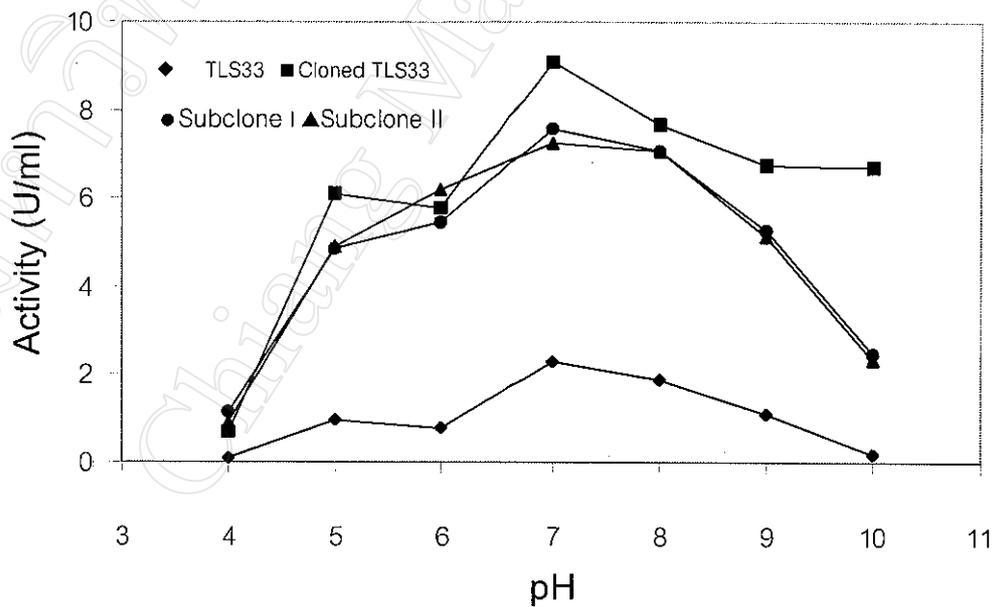
รูปที่ 3.27 ผลของอุณหภูมิต่อแอกทิวิตีของโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33, Cloned TLS33, Subclone I และ Subclone II

3.2.4.3 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

จากการศึกษาแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II ที่พีเอช (pH) ต่าง ๆ กันตั้งแต่ 4 – 10 โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 พบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Subclone I และ Subclone II มีแอกทิวิตีที่พีเอชต่างๆ ใกล้เคียงกัน มีพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 5-9 ซึ่งเหมือนกับโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ส่วน Cloned TLS33 มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมกว้างกว่าคือ 5-10 โดยที่โปรติเอสทั้ง 4 ชนิดมีแอกทิวิตีที่ดีที่สุดที่พีเอช 7 เหมือนกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.12 และรูปที่ 3.28 เมื่อพิจารณารูปความสัมพันธ์ระหว่างแอกทิวิตีของโปรติเอสกับพีเอช พบว่า Subclone I และ Subclone II มีแอกทิวิตีที่พีเอชต่าง ๆ ใกล้เคียงกันและที่พีเอช 6 จะมีค่าสูงกว่าพีเอช 5 ซึ่งต่างจากโปรติเอสของ Cloned TLS33 และ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 โปรติเอสจาก Subclone I และ Subclone II มีแอกทิวิตีสูงกว่า *Bacillus stearothermophilus* TLS33 แต่น้อยกว่า Cloned TLS33

ตารางที่ 3.12 แอคติวิตีของโปรตีนจาก *Bacillus stearotherophilus* TLS33, Cloned TLS33, Subclone I และ Subclone II ที่พีเอชต่าง ๆ

| พีเอช (pH) | แอกติวิตี (U/ml) | | | |
|------------|------------------|-------------|------------|-------------|
| | TLS33 | Clone TLS33 | Subclone I | Subclone II |
| 4 | 0.08 | 0.70 | 1.16 | 0.92 |
| 5 | 0.96 | 6.12 | 4.86 | 4.92 |
| 6 | 0.80 | 5.76 | 5.44 | 6.18 |
| 7 | 2.28 | 9.06 | 7.56 | 7.26 |
| 8 | 1.88 | 7.68 | 7.08 | 7.08 |
| 9 | 1.08 | 6.76 | 5.26 | 5.14 |
| 10 | 0.18 | 6.70 | 2.50 | 2.36 |



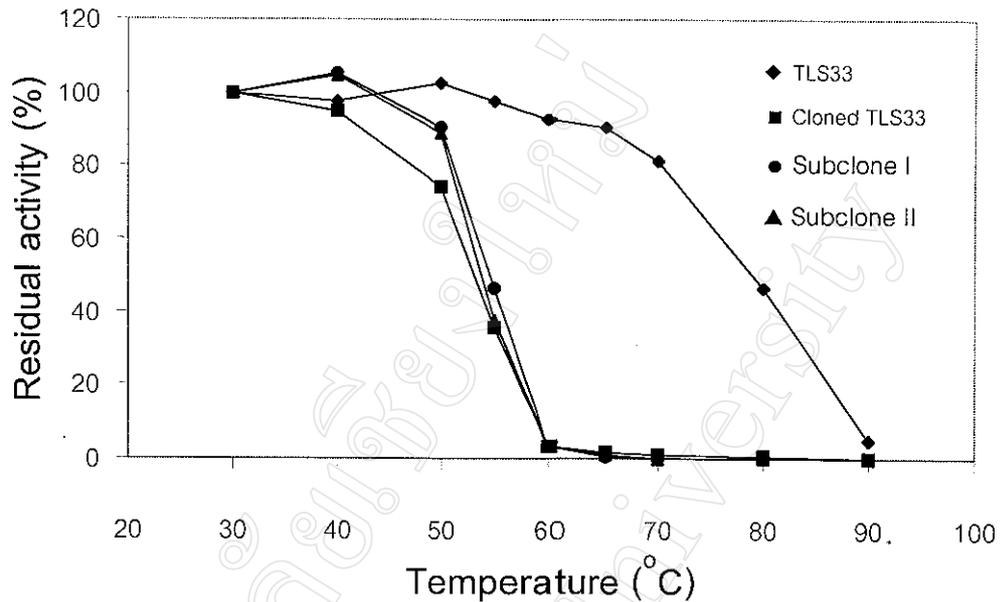
รูปที่ 3.28 ผลของพีเอชต่อแอกติวิตีของโปรตีนจาก *Bacillus stearotherophilus* TLS33, Cloned TLS33, Subclone I และ Subclone II

3.2.4.4 ผลการศึกษาความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

ผลการศึกษาความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone I และ Subclone II เทียบกับ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30 – 90 °ซ พบว่า โปรติเอสจาก Subclone I และ Subclone II ทนต่อความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. โดยที่แอกทิวิตียังคงเหลือมากกว่า 50 % และที่อุณหภูมิ 60 °ซ โปรติเอสจะสูญเสียแอกทิวิตีไปเกือบหมด ซึ่งจะเหมือนกับโปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 ส่วนโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ทนต่อความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. โดยที่แอกทิวิตียังคงเหลือมากกว่า 50% และจะสูญเสียแอกทิวิตีไปเกือบหมดที่อุณหภูมิ 90 °ซ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.13 และรูปที่ 3.29

ตารางที่ 3.13 แอกทิวิตีที่เหลืออยู่ของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33, Cloned TLS33, Subclone I และ Subclone II เมื่อแช่เอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชม.

| อุณหภูมิ (°ซ) | TLS33 | | Cloned TLS33 | | Subclone I | | Subclone II | |
|------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| | แอกทิวิตี (U/ml) | แอกทิวิตี ที่เหลืออยู่ (%) | แอกทิวิตี (U/ml) | แอกทิวิตี ที่เหลืออยู่ (%) | แอกทิวิตี (U/ml) | แอกทิวิตี ที่เหลืออยู่ (%) | แอกทิวิตี (U/ml) | แอกทิวิตี ที่เหลืออยู่ (%) |
| 30 | 1.72 | 100.0 | 6.56 | 100.0 | 6.50 | 100.0 | 6.52 | 100.0 |
| 40 | 1.68 | 97.7 | 6.24 | 95.1 | 6.86 | 105.5 | 6.84 | 104.9 |
| 50 | 1.76 | 102.3 | 4.86 | 74.1 | 5.88 | 90.5 | 5.78 | 88.7 |
| 55 | 1.68 | 97.7 | 2.32 | 35.4 | 3.00 | 46.0 | 2.44 | 37.4 |
| 60 | 1.60 | 93.0 | 0.20 | 3.1 | 0.22 | 3.4 | 0.20 | 3.1 |
| 65 | 1.56 | 90.7 | 0.12 | 1.8 | 0.02 | 0.3 | 0.06 | 0.9 |
| 70 | 1.40 | 81.4 | 0.08 | 1.2 | 0.00 | 0.0 | 0.00 | 0.0 |
| 80 | 0.80 | 46.5 | 0.04 | 0.6 | 0.00 | 0.0 | 0.00 | 0.0 |
| 90 | 0.08 | 4.65 | 0.00 | 0.0 | 0.00 | 0.0 | 0.00 | 0.0 |



รูปที่ 3.29 ความสัมพันธ์ระหว่างแอกทิวิตีที่เหลืออยู่กับอุณหภูมิที่ใช้แช่เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33, Cloned TLS33, Subclone I และ Subclone II เป็นเวลา 1 ชม.

3.2.4.5 ผลการศึกษาแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสภายในและภายนอกเซลล์ของ Subclone I และ Subclone II

ผลการศึกษาแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ของ Subclone I และ Subclone II พบว่า แอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ส่งออกนอกเซลล์ ของ Subclone I เท่ากับ 7.98 U/ml คิดเป็น 93.44 % ของแอกทิวิตีทั้งหมด ในขณะที่แอกทิวิตีภายในเซลล์เท่ากับ 0.56 U/ml คิดเป็น 6.56 % แอกทิวิตีของโปรติเอสที่ส่งออกนอกเซลล์ของ Subclone II เท่ากับ 7.26 U/ml คิดเป็น 87.22 % ของแอกทิวิตีทั้งหมด ในขณะที่แอกทิวิตีภายในเซลล์เท่ากับ 1.06 U/ml คิดเป็น 12.78 % ดังตารางที่ 3.14 โดยแอกทิวิตีของโปรติเอสที่ส่งออกนอกเซลล์ของ Subclone I จะมีค่ามากกว่าของ Subclone II จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II เป็นเอนไซม์โปรติเอสนอกเซลล์ซึ่งเหมือนกันกับโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33

ตารางที่ 3.14 แอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสภายในและภายนอกเซลล์ของ Subclone I และ Subclone II หาแอคทิวิตีที่อุณหภูมิ 50^oซ

| อุณหภูมิ (^o ซ) | Subclone I | | Subclone II | |
|-------------------------------|--|--|--|--|
| | Extracellular protease activity (U/ml) | Intracellular protease activity (U/ml) | Extracellular protease activity (U/ml) | Intracellular protease activity (U/ml) |
| 50 | 7.98 | 0.56 | 7.26 | 1.06 |

3.2.5 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

3.2.5.1 ผลการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของโปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

โดยวิธี SDS- polyacrylamide gel electrophoresis

จากการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone I และ Subclone II โดยวิธี SDS polyacrylamide gel electrophoresis เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ได้ผลดังรูปที่ 3.30 ในช่องที่ 1 เป็นโปรตีนมาตรฐานผสมที่ทราบมวลโมเลกุล คือ Myosin (MW.200,000), Phosphorylase B (MW.97,400), Bovine serum albumin (MW.68,000), Ovalbumin (MW.43,000), Carbonic anhydrase (MW.29,000), β -Lactoglobulin (MW.18,400) และ Lysozyme (MW.14,300) ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 10 μ l ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I ความเข้มข้น 159.28 μ g/ml ปริมาตร 15 μ l ช่องที่ 3 คือ เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Subclone II ความเข้มข้น 141.04 μ g/ml ปริมาตร 15 μ l พบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II เมื่อนำมาทำ SDS-PAGE แล้วได้แถบของโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับแถบโปรตีนของ Lysozyme ซึ่งมีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 14 kDa



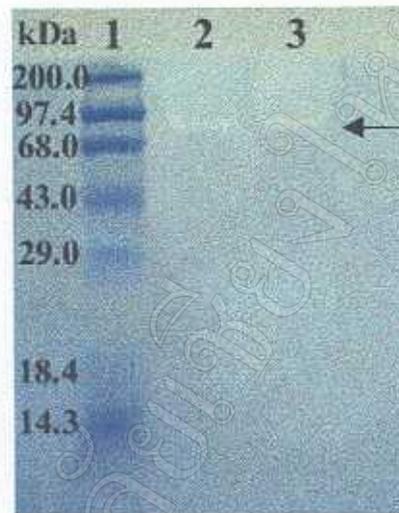
รูปที่ 3.30 การตรวจสอบขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนที่ได้จากการทำ Subcloning โดยวิธี SDS-PAGE ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรตีนจาก Subclone I และ ช่องที่ 3 คือ เอนไซม์โปรตีนจาก Subclone II

3.2.5.2 ผลการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของโปรตีนที่ได้จากการทำ Subcloning โดยวิธี Zymography

ก. Zymography ชนิด SDS – polyacrylamide gel electrophoresis

จากการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II โดยวิธี Zymography ชนิด SDS – polyacrylamide gel electrophoresis เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล คือ Myosin, Phosphorylase B, Bovine serum albumin, Ovalbumin, Carbonic anhydrase, β -Lactoglobulin และ Lysozyme ได้ผลดังรูปที่ 3.31 ในช่องที่ 1 คือโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ช่องที่ 2 คือเอนไซม์โปรตีนที่ได้จาก Subclone I ซึ่งมีแอกทิวิตีเท่ากับ 7.68 U/ml ปริมาตร 10 μ l และช่องที่ 3 คือเอนไซม์โปรตีนจาก Subclone II มีแอกทิวิตีเท่ากับ 7.34 U/ml ปริมาตร 10 μ l พบว่า ในช่องที่ 2 และ 3 เกิดแถบใสบนแผ่นเจล 1 แถบที่มีขนาดเท่ากันตรงตำแหน่งระหว่างแถบของ Phosphorylase B กับ Bovine serum albumin และเมื่อนำตำแหน่งที่เกิดแถบใสมาเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง

ค่า Rm กับ Log MW ของโปรตีนมาตรฐาน ทำให้ทราบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II มีมวลโมเลกุลประมาณ 93 kDa



รูปที่ 3.31 การตรวจสอบขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Zymography ชนิด SDS-PAGE ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone I และ ช่องที่ 3 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone II

ข. Zymography ชนิด Native polyacrylamide gel electrophoresis

ผลการศึกษการทำ Zymography ชนิด Native polyacrylamide gel electrophoresis ของเอนไซม์โปรติเอสจาก Cloned TLS33 เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน Myosin, Phosphorylase B, Bovine serum albumin, Ovalbumin, Carbonic anhydrase, β -Lactoglobulin และ Lysozyme ได้ผลดังรูปที่ 3.32 ช่องที่ 1 คือโปรตีนมาตรฐาน ช่องที่ 2 คือเอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone I ซึ่งมีแอกทิวิตีเท่ากับ 7.53 U/ml ปริมาตร 10 μ l และช่องที่ 3 คือเอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone II มีแอกทิวิตีเท่ากับ 7.45 U/ml ปริมาตร 10 μ l พบว่า ในช่องที่ 2 และ 3 เกิดแถบใสบนแผ่นเจล 1 แถบที่มีขนาดเท่ากับตรงกัตำแหน่งแถบของ Bovine serum albumin ซึ่งมีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 68 kDa

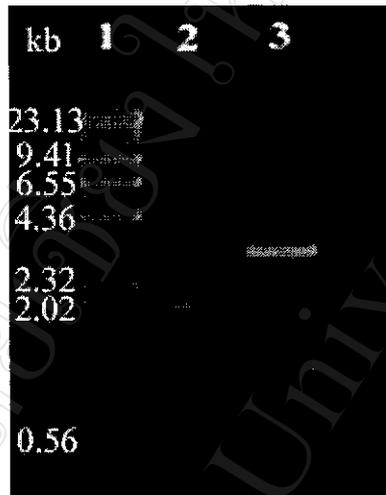


รูปที่ 3.32 การตรวจสอบขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Zymography ชนิด Native PAGE ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ช่องที่ 2 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone I และ ช่องที่ 3 คือ เอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone II

3.2.6 การศึกษาขนาดของยีนโปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

ผลการศึกษาขนาดของยีนโปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning โดยทำการตัดดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Subclone I ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ได้ผลดังรูปที่ 3.33 ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Subclone I และช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III พบว่า ดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Subclone I เมื่อนำมาทำ Agarose gel electrophoresis จะให้แถบของดีเอ็นเอ 2 แถบ บน agarose gel มีขนาดประมาณ 3.38 kb และ 1.99 kb ส่วนดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III พบว่าได้แถบดีเอ็นเอแถบเดียวที่มีขนาดเท่ากับ 3,262 bp ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอพาหะรวมกับยีนโปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning และเมื่อทำการหักลบเอาขนาดของดีเอ็นเอพาหะที่มีขนาด 2,690 bp ออก ทำให้ทราบว่าโปรติเอสยีนที่ได้จากการทำ Subcloning มีขนาดประมาณ 572 bp

หมายเหตุ เนื่องจาก Subclone II ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอสายผสมออกมาได้จึงไม่สามารถทำการหาขนาดยีนโปรตีนของ Subclone II ได้



รูปที่ 3.33 การหาขนาดดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Subclone I โดยการทำให้ Agarose gel electrophoresis ช่องที่ 1 คือ λ DNA marker ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Subclone I และช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอสายผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III

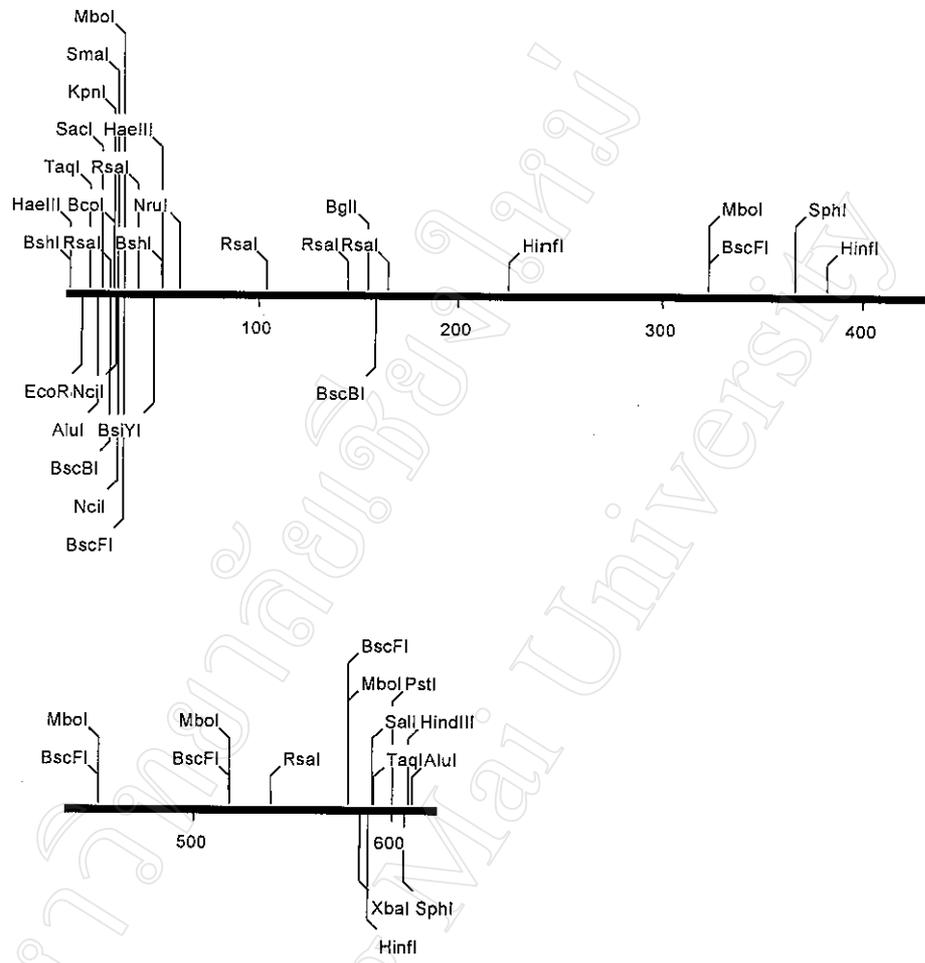
3.2.7 ผลการหาลำดับเบสของยีนโปรตีนที่ได้จาก Subclone I

จากการหาลำดับเบสของ Subclone I พบว่า ยีนดีเอ็นเอจาก Subclone I ที่โคลนได้มีขนาด 542 bp มีลำดับเบสและ restriction map ดังรูปที่ 3.34 และ 3.35 ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลลำดับเบสของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าลำดับเบสของ Subclone I ไม่เหมือนกับลำดับเบสที่มีข้อมูลอยู่ใน GenBank และจากการแปลลำดับเบสที่ได้ให้กลายเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่า มีความเป็นไปได้ที่ยีนดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีนประกอบไปด้วยยีนที่จะแปรไปเป็นลำดับกรดอะมิโนต่าง ๆ จำนวน 4 ยีนบนสายดีเอ็นเอที่โคลนได้ดังรูปที่ 3.36 โดยที่ยีนต่างๆ เหล่านั้นแสดงในรูปของ Open Reading Frame (ORF)

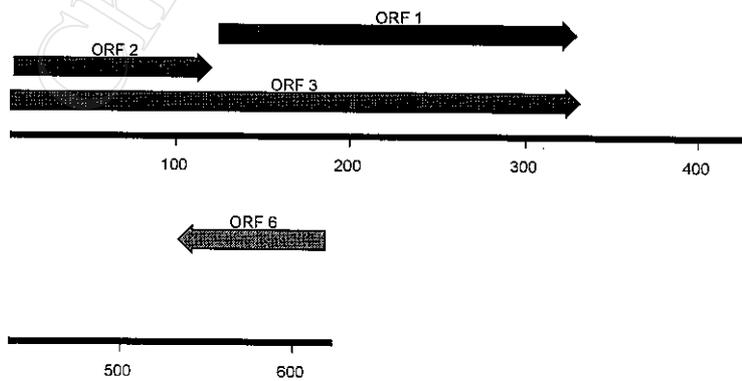
Eco RI →

GACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCTGTACCGTTTGCTGGCCAGC
 CTCGCGATTGCCTTCATACAGGCGAAGAGTTGCCTCGGTGCTATCGTACTCTCCA
 CATCAACGCTGATGCCGTATTCCTCTCCCGCGTACAGCCTTTGCGGCACCTGTACA
 GATGTAAGAACGACCTCATCCCCTTTGGCTGCTGCAAGGAAACAGCCTCTACAGC
 GATTCCTCGCTCCCTCGCCAGTCTCGTCTGCCGTGCTGCATCTCCGTTTGTTTCCAG
 ACCATCTGTCAACAAGACGACTTTTCTCTGGCATTGTAGGGATCTCGTTATTCACA
 GCGCCACCAAATTTTAAGCGGGCATGCGGACGCATTGGGCGGAGTCGTTTTCGGT
 TCTCAGCAGTTGATGGAAAAAGTGTATCACTACAGAGAAATAAATGGAGCAACGATG
 GATCACTTGGACATGGGCTTTTGCATACAAATATGAAGGACAGTGTGTGAAGGGGA
 GGTTGTATATGATCGCGGTTACATAACATGTAAGGACAGTGTGTGAAGGGGA
 TATCAATCACGCGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCA
 T ← *Hind* III

รูปที่ 3.34 ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอจาก Subclone I ที่ได้จากการโคลนนิ่ง โดยที่ตัวอักษรหนาคือ
 ชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนนิ่ง



รูปที่ 3.35 Restriction map ของชิ้นดีเอ็นเอจาก Subclone I ที่ได้จากการโคลนยีน



รูปที่ 3.36 Open Reading Frame (ORF) ของยีนที่อยู่บนสายดีเอ็นเอที่ได้จาก Subclone I