บทที่ 3

ผลการทดลอง

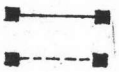
3.1 ปัญหาเกี่ยวกับความเสถียรและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จากแบคทีเรียสายพันธุ์ Q_{69} และ S_5

Q_{69} และ S_5 เป็น E.coli สายพันธุ์ที่นางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ สร้างขึ้น ณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยพันธุวิศวกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ความสามารถดังกล่าวเป็นผลสืบเนื่องมาจากพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ซึ่งเป็นพลาสมิดดีเอนเอที่ประกอบด้วยยีนส่วนของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส จาก E.coliATCC 11105 และยีนส่วนของพลาสมิดดีเอนเอ pSY343 โดยใช้ E.coli HB101 เป็นแบคทีเรียเจ้าเรือน จากวิทยานิพนธ์ของนางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ Q_{69} และ S_5 เจริญได้ดีบนอาหารแข็ง LB เสริมเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัม ต่อ มล. และเมื่อเจริญ Q69 ใน LB พบการเจริญสูงสุด 250 KU และแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส 355 nmole PABA/min/mg. protein (รูปที่ 7) และ S_5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ Q_{69} ด้วย NTG พบการเจริญสูงสุด 411KU และแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุด 651 nmolePABA/min/mg. protein เมื่อเจริญในอาหารอุดมเสริม glucose 0.2% (รูปที่ 8)

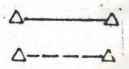
จากการนำ Q_{69} และ S_5 มาทำการทดลองซ้ำ พบว่าสมบัติของ Q_{69} และ S_5 แปรผันไป กล่าวคือ สูญเสียความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็ง LB เสริมเพนนิซิลินจี 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อ มล. และเมื่อติดตามการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในคัลเจอร์ที่ปลูกในอาหารเหลว LB และ LB เสริม glucose 0.2% ตามลำดับ พบว่ารูปแบบของความยุ่นของทั้งสองสายพันธุ์แตกต่างไปจากที่นางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ ได้รายงานไว้ (รูปที่ 7 และ 8) รวมทั้งแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ลดต่ำลงอย่างมาก ตามจำนวนครั้งของการถ่ายเชื้อ (subculture) จนในที่สุดได้สูญเสียไปจากคัลเจอร์อย่างสิ้นเชิง พร้อม ๆ กันนั้นได้นำเซลล์จากคัลเจอร์ดังกล่าวมาตรวจสอบพลาสมิดดีเอนเอ พบว่า

รูปที่ 7. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Q69, Q69/1 และ Q69/2

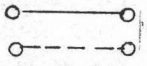
เมื่อเจริญ Q69 , Q69/1 และ Q69/2 ในอาหารอุดม LB ที่ 30°ซ 2 ชม. แล้วเปลี่ยนอุณหภูมิ การเจริญเป็น 37°ซ 1 ชม. จากนั้นนำกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ



เป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสคัดลอกจากวิทยานิพนธ์ของนางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ

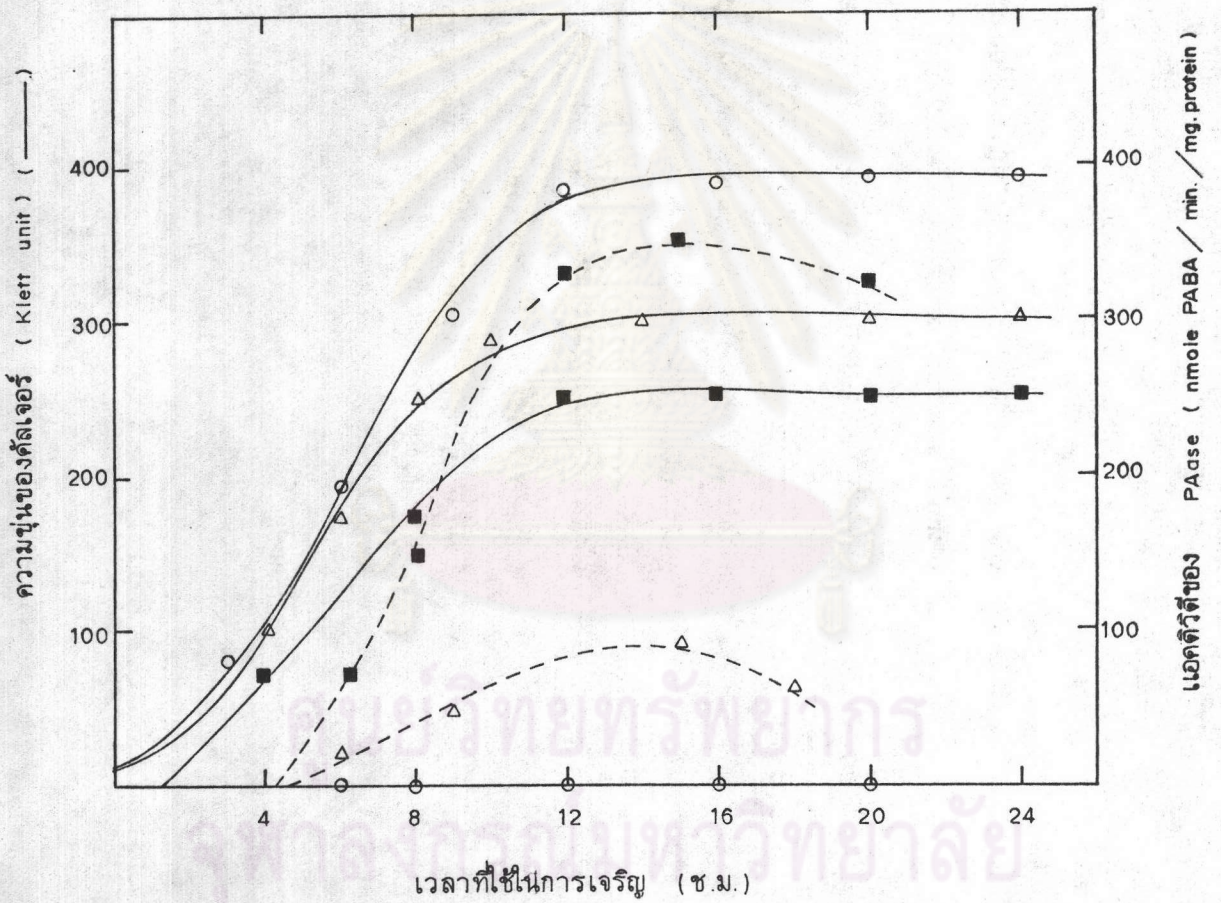


เป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยการนำสายพันธุ์ Q69 ของนางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริที่เก็บใน glycerol 50% อุณหภูมิ -20°ซ มาทำการทดลองให้ชื่อว่า Q69/1



เป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยนำสายพันธุ์ Q69/1 มาทำการ subculture 1 ครั้ง โคโลนีที่ได้เรียก Q69/2 นำมาทำการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ความขุ่นของคัลเจอร์ (Klett unit) (———)
400
300
200
100
4
8
12
16
20
24
เวลาที่ใช้ในการเจริญ (ช.ม.)
แอคติวิตีของ PAase (nmole PABA / min. / mg. protein)
(- - - - -)

รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของแบคทีเรียสายพันธุ์ S5. , S5/1 , และ S5/2

เมื่อเจริญ S5 , S5/1 และ S5/2 ในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส 1% ที่อุณหภูมิ 30°ซ 2 ชม. แล้วเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญเป็น 37°ซ 1 ชม. จากนั้นนำกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ

■——■ S5
■----■

เป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส คัดลอกจากวิทยานิพนธ์ของนางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ

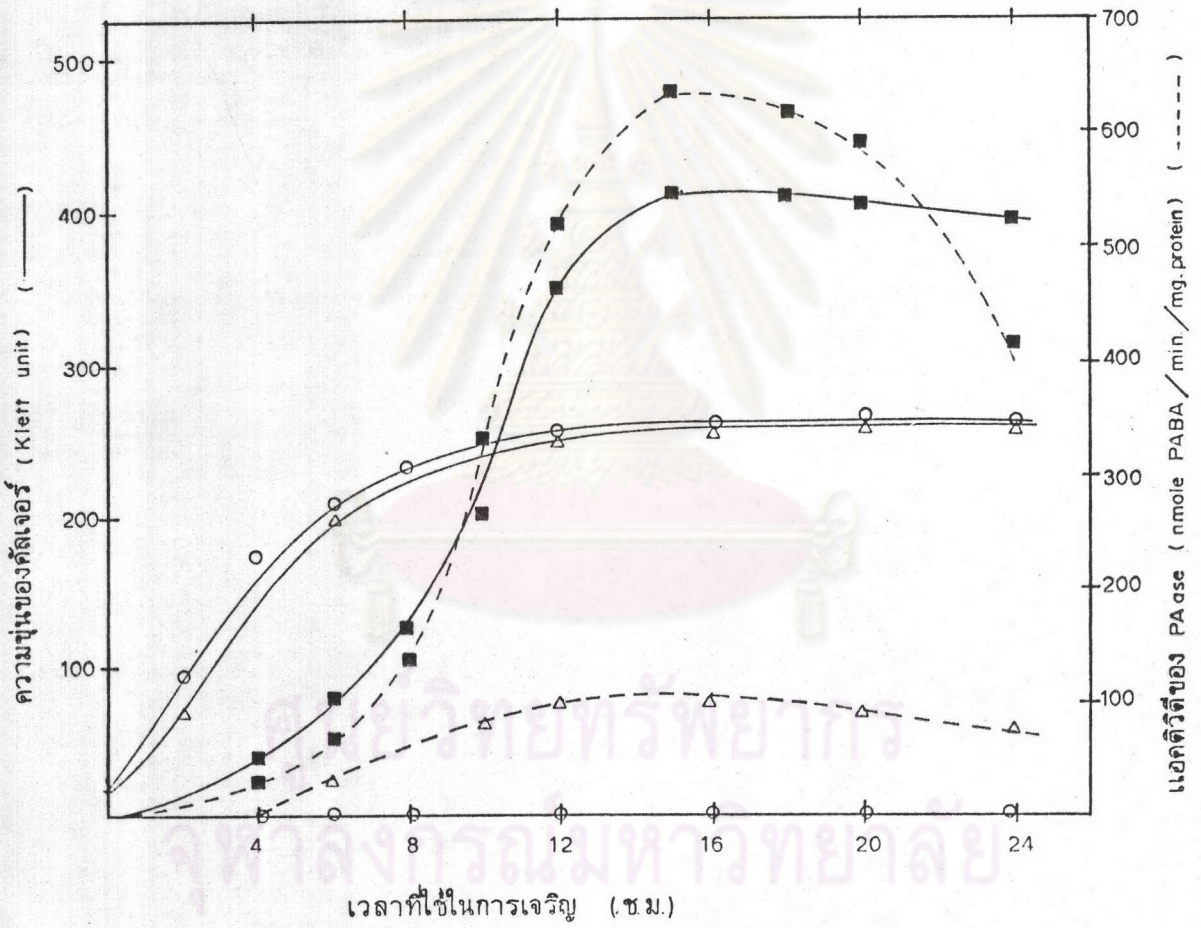
△——△ S5/1
△---△

เป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยการนำสายพันธุ์ S5 ของนางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ ที่เก็บใน glycerol 50% อุณหภูมิ -20°ซ มาทำการทดลอง ให้ชื่อว่า S5/1

○——○ S5/2
○----○

เป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยนำสายพันธุ์ S5/1 มาทำการ subculture 1 ครั้ง โคโลนีที่ได้เรียก S5/2 นำมาทำการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับคัลเจอร์ที่ยังคงให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เล็กน้อยนั้นยังคงตรวจพบพลาสมิดขนาดเดียวกันกับที่นางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริได้รายงานไว้ แต่ครั้นเมื่อนำคัลเจอร์ที่สูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส มาสกัดเมื่อตรวจสอบพลาสมิดดีเอนเอในครั้งแรก ๆ ก็ยังพบพลาสมิดดีเอนเออยู่ แต่หลังจากได้ถ่ายเชื้อโดยทำ Subculture ไปอีกหลาย ๆ ครั้ง ก็พบว่าพลาสมิดดีเอนเอดังกล่าวได้หายไป

3.2 ปัญหาเกี่ยวกับการสร้าง deletion mutant

3.2.1 สมมุติฐานการสร้าง

ในขณะที่สายพันธุ์ S5 ยังคงให้ แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส อยู่บ้างแม้จะต่ำลงก็ตาม จึงได้ตั้งสมมุติฐานว่า การลดลงของแอคติวิตีของ เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสนี้ เนื่องจากพลาสมิดดีเอนเอที่นางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ ได้สร้างไว้ มีชิ้นส่วนของดีเอนเอที่ไม่จำเป็นต่อการถอดรหัสเป็นเอนไซม์ที่ดื้อตัว ดังนั้นจึงได้พยายามหาวิธีลดชิ้นส่วนดีเอนเอที่คาดว่าไม่จำเป็นออกไป

สมมุติฐานในการลดทอนชิ้นส่วนดีเอนเอมี 2 วิธีคือ

ก. หาตำแหน่งตัดโดยเอนไซม์เรสตริกชั่น เพื่อใช้ในการพยากรณ์ว่าจะสามารถใช้ เอนไซม์ เรสตริกชั่นลดทอนชิ้นส่วนดีเอนเอได้หรือไม่ และอย่างไร

ข. ย่อยด้วย EcoRI เมื่อเปิดพลาสมิดดีเอนเอให้เป็นเส้นตรง แล้วจึงย่อยด้วย S_1 nuclease ในปริมาณต่าง ๆ กัน

ในการทำวิจัยนี้ได้ทำการทดลองโดยใช้สมมุติฐานข้อแรก ก่อนข้อหลัง สรุปผลการทดลองดังต่อไปนี้

ได้ทดลองใช้เอนไซม์ เรสตริกชั่น ทั้งหมด 8 ตัว เมื่อย่อย pJR_{69} โดยครั้งแรกใช้เอนไซม์เพียง 1 ตัว เพื่อตรวจสอบว่า มีตำแหน่งของเอนไซม์ชนิดนั้น ๆ บน pJR_{69} หรือไม่ จากการทดลองพบว่า Sal I, Kpn I และ Xhol I ไม่มีตำแหน่งตัดบน pJR_{69} ในขณะที่ Hind III, Bam HI, Eco RI และ Sma I จะตัด pJR_{69} ได้ 1 ตำแหน่ง และ Bgl II นั้น มีตำแหน่งตัด 2 ตำแหน่ง (ช่องที่ 5 รูปที่ 9) ได้ชิ้นดีเอนเอขนาด 4.1 และ 6.8 กิโลเบส

ต่อมาได้ตัด pJR_{69} โดยใช้เอนไซม์เป็นคู่ โดยย่อย pJR_{69} ด้วยเอนไซม์เรสตริกชั่นตัวที่หนึ่ง แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์ เรสตริกชั่นตัวที่สอง ภายหลังจากการย่อยอย่างสมบูรณ์แล้วจึงนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอ ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 9 พบว่าจากการใช้ Bam HI และ Hind III เข้าคู่กันย่อย pJR_{69} จะได้ชิ้นดีเอนเอขนาดประมาณ 1.5 และ 9.5 กิโลเบส (ช่องที่ 4 ของรูปที่ 9) และจากการใช้ Hind III เข้าคู่กับ EcoRI จะได้ชิ้นส่วนดีเอนเอขนาดประมาณ 3.5 และ 7.5 กิโลเบส และท้ายสุดได้ใช้เอนไซม์ย่อยติดต่อกัน 3 ตัว คือ Bgl II ตามด้วย Hind III และ Bam HI ตามลำดับ ผลการทดลองพบชิ้นดีเอนเอ 4 ชิ้นคือขนาดประมาณ 1.0, 3.7, 5.7 และ 6.8 กิโลเบส ซึ่งคาดว่าชิ้นดีเอนเอขนาด 6.8 กิโลเบสที่ได้จากการย่อยครั้งนี้เป็นดีเอนเอที่หลงเหลือจากการย่อยของ Hind III และ Bam HI (Incomplete digestion) (ช่องที่ 6 รูปที่ 9)

จากผลการทดลองดังกล่าวนี้ จึงสรุปได้ว่าแผนผังเอนไซม์เรสตริกชั่นของ pJR_{69} คือรูปที่ 10 จะเห็นว่าไม่มีตำแหน่งเอนไซม์เรสตริกชั่นในส่วนดีเอนเอที่ต้องการตัดเลย

ดังนั้น จะสรุปได้ว่าไม่มีเอนไซม์เรสตริกชั่นตัวใดเหมาะสมในการทำ deletion mutant จึงต้อง ทำการวิจัยใหม่โดยใช้สมมุติฐานข้อถัดมา

ในการวิจัยนี้ต้องการใช้ S_1 nuclease ที่มีปริมาณต่าง ๆ กันเร่งปฏิกิริยาการย่อยดีเอนเอทั้งสายเดี่ยวและสายคู่ จากรายงานของ Bruns ในปี 1985 ทำให้ทราบว่ายีนโครงสร้างของเพนนิซิลิน เอซิเลส ใน pJR_{69} อยู่ติดกับปลาย Hind III มีขนาด 2.57 กิโลเบส ดังนั้นจึงเลือกเปิดปลาย pJR_{69} ด้วย EcoRI แล้วแปรความเข้มข้นของ S_1 nuclease ต่าง ๆ กัน โดยหวังว่าจะย่อยดีเอนเอส่วนเกินขนาดประมาณ 1 กิโลเบสออกไป จากผลการทดลองพบว่า เมื่อย่อย pJR_{69} ด้วย EcoRI และติดตามด้วย S_1 nuclease ปริมาณต่าง ๆ กัน จากนั้นนำส่วนของดีเอนเอไปตรวจสอบ พบว่ามีชิ้นดีเอนเอขนาดแตกต่างกัน ขนาดประมาณ 1.0 ถึง 11 กิโลเบส (รูปที่ 11)

เมื่อนำไฮโดรไลเซททั้งหมดไปทรานส์ฟอร์มเข้า E.coli BD817 ด้วยวิธีการทำ competent cell โดยใช้ DMSO treated method ผลการทดลองพบว่าถ้าย่อยด้วย S_1 nuclease ปริมาณ 40-50 ยูนิต จะไม่พบทรานส์ฟอรแมนท์เลย (ตารางที่ 4) ในขณะที่ปริมาณของ S_1 nuclease ในช่วง 1-10 ยูนิต จะให้ทรานส์ฟอรแมนท์กระจาย จากไฮโดรไลเซททุกหลอด (ตารางที่ 4)

รูปที่ 9 ชิ้นส่วนของพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์เรสตริกชั่นชนิดต่าง ๆ

ช่องที่ 1 ดีเอนเอมาตรฐาน

"" 2 พลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69}

" 3 พลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ย่อยด้วย Bam HI

" 4 พลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ย่อยด้วย Bam HI และ Hind III

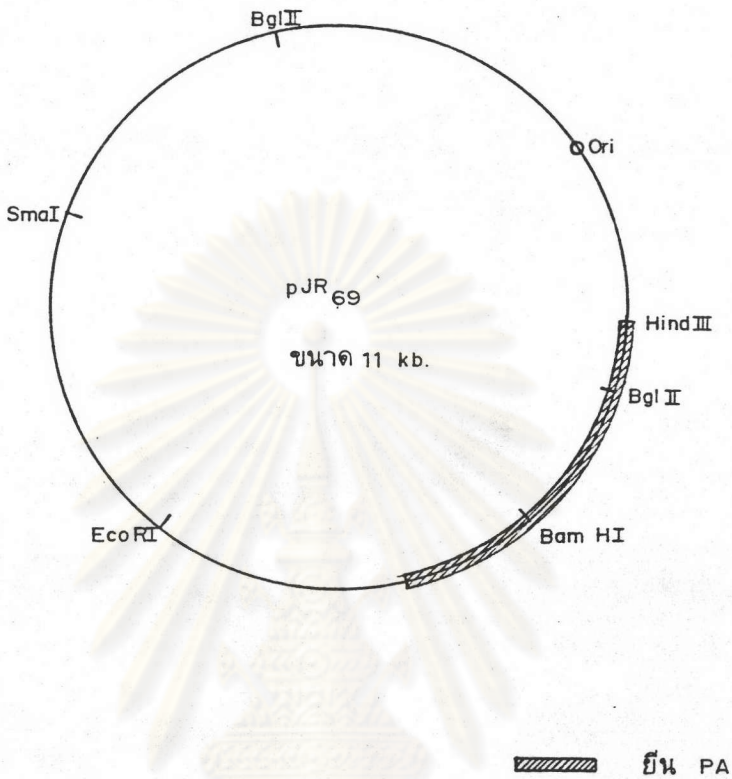
" 5 พลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ย่อยด้วย Bgl II

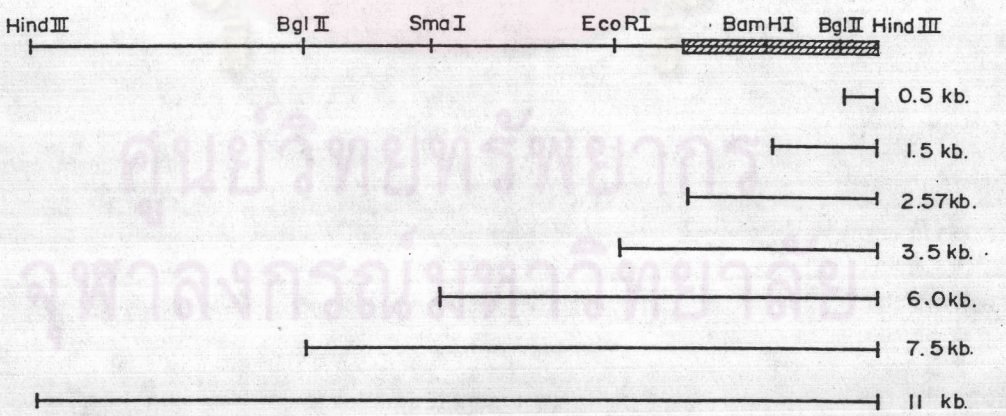
" 6 พลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ย่อยด้วย Hind III,Bam HIและ Bgl II

" 7 พลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ย่อยด้วย Hind III

" 8 พลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ย่อยด้วย Hind IIIและ EcoRI

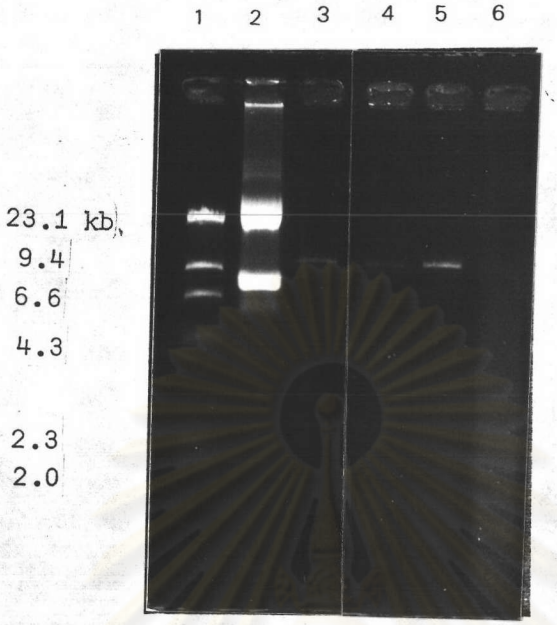
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 10 แผนผังเรสตริกชั่นของพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69}

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 ชิ้นส่วนของพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ที่ถูกย่อยด้วย EcoRI และติดตามด้วย S1 nuclease ปริมาณต่าง ๆ

ช่องที่ 1 ดีเอนเอมาตรฐาน

" 2 พลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ก่อนทำการย่อยด้วย EcoRI พบทั้ง Supercoil form และ relax form

" 3 พลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ที่ถูกย่อยด้วย EcoRI

" 4 พลาสมิดดีเอนเอจาก ช่องที่ 3 ย่อยต่อด้วย S1 nuclease 1 ยูนิต

" 5 พลาสมิดดีเอนเอจาก ช่องที่ 3 ย่อยต่อด้วย S1 nuclease 10 ยูนิต

" 6 พลาสมิดดีเอนเอจาก ช่องที่ 3 ย่อยต่อด้วย S1 nuclease 50 ยูนิต

ตารางที่ 4 จำนวนทรานส์ฟอรแมนท์ที่ได้จากการทรานส์ฟอร์มพลาส์มิดดีเอนเอ ที่ผ่านการย่อยด้วย S1 nuclease ในปริมาณต่าง ๆ

ปริมาณ S1 nuclease(unit)		จำนวนทรานส์ฟอรแมนท์ที่ได้(colony)
ครั้งที่ 1	1	5
	4	2
	10	3
	50	0
ครั้งที่ 2		
	1	7
	5	3
	10	1
	40	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภายหลังจากนำทรานส์ฟอร์แมนท์ทั้งหมดมาทำให้บริสุทธิ์แล้ว จึงนำไปตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยการใช้ Microbiological test ตามวิธีข้อ 2.18

ผลการทดลองพบทรานส์ฟอร์แมนท์ที่น่าสนใจ 2 สายพันธุ์ ให้ชื่อว่า VU1/9 และ V1/7 ตามลำดับ เป็นทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้จากการย่อยของ S_1 nuclease 1 ยูนิตทั้งคู่

สมบัติของ VU1/9 และ V1/7 มีดังต่อไปนี้

(i) เจริญได้ดีบนอาหารแข็ง LB โดย VU1/9 ให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสต่ำ แต่ V1/7 ไม่ให้แอคติวิตีเลย (รูปที่ 12.1)

(ii) เมื่อเสริม PAA ลงใน LB ทั้ง VU1/9 และ V1/7 จะให้แอคติวิตีสูงขึ้นจนสามารถเห็นวงใสได้ (รูปที่ 12.3)

(iii) สมบัติจากข้อ 1 และ 2 จะเป็นจริงก็ต่อเมื่อ ปริมาณของเพนนิซิลิน จี ที่ใช้เทราดทับ คือ 10 มก.ต่อมล. แต่จะไม่พบวงใสของแอคติวิตีของเอนไซม์เลยเมื่อใช้ปริมาณเพนนิซิลิน จี ที่ใช้เทราดทับเป็น 1 มก.ต่อมล. (รูปที่ 12.3 และ 12.2)

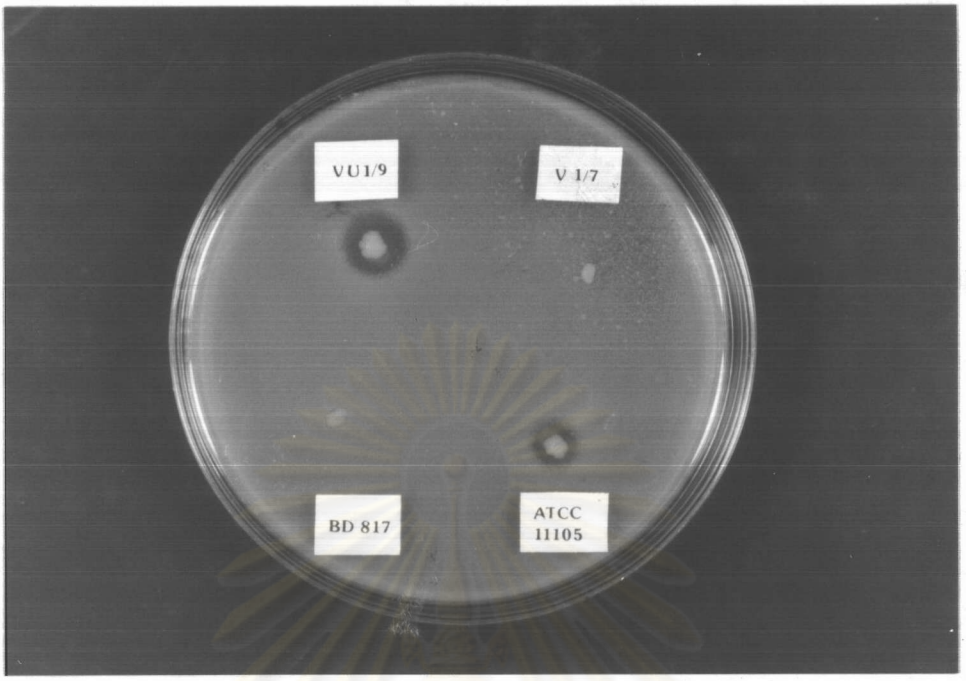
(iv) เมื่อเจริญในอาหารเหลว LB เสริม PAA 0.02% ในสภาวะเพิ่มปริมาณพลาสมิด 2 ชม. แล้วนำเซลล์มาหาแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ตามวิธีการทดลองข้อ 2.19 พบว่า VU1/9 มีแอคติวิตีสูงสุด 31 nmolePABA/min/mg protein และ V1/7 มีแอคติวิตีสูงสุด 19 nmolePABA/min/mg protein

เมื่อนำทรานส์ฟอร์แมนท์ทั้งสองมาตรวจสอบพลาสมิดดีเอนเอ พบว่าพลาสมิดดีเอนเอจากทั้งสองสายพันธุ์มีขนาดต่างกัน (รูปที่ 13) คือ ขนาดประมาณ 5.5 กิโลเบสจาก VU1/9 และขนาดประมาณ 5.0 กิโลเบสจาก V1/7 ให้ชื่อพลาสมิดดีเอนเอทั้งสองว่า pCR_{28} และ pCR_{27} ตามลำดับ

จากการทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอ 10 มล. ปรากฏว่าทั้ง pCR_{28} และ pCR_{27} สูญเสียสมบัติในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอไปอย่างสิ้นเชิง

3.3 <u>การเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยการปรับปรุงพลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28}</u>

สมมติฐานคือเมื่อทำการโคลนยีนส่วนดีเอนเอที่มียีนเพนนิซิลิน เอซิเลสจาก pCR_{28} ไปเชื่อมกับยีนดีเอนเอที่มี <u>ori</u> (origin of replication) ปกติจาก pSY343 ก็น่า



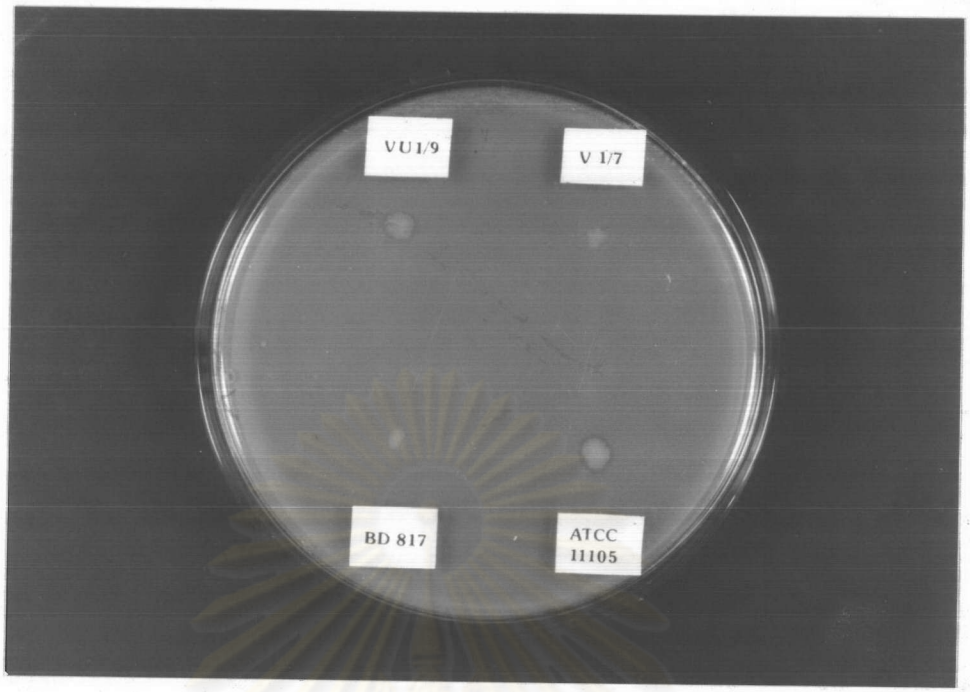
รูปที่ 12.1 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของทรานส์ฟอรแมนท์ที่แยกได้ ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.18 ยกเว้นแต่ว่า อาหารที่ใช้เจริญทรานส์-ฟอรแมนท์ คือ LB และ ปริมาณของเพนนิซิลินจีที่ใช้เทราดทับคือ 10 มก.ต่อมล.

BD 817 คือ เซลล์เจ้าเรือน

ATCC 11105 คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ต้นแบบที่สร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

VU 1/9 คือ ทรานส์ฟอรแมนท์ ที่ได้จากการทรานส์ฟอร์มพลาสมิด ดีเอนเอ ที่ถูกย่อยด้วย S1 nuclease 1 unit ครั้งที่ 1

V 1/7 คือ ทรานส์ฟอร์แมนท์ ที่ได้จากการทรานส์ฟอร์มพลาสมิด ดีเอนเอ ที่ถูกย่อยด้วย S1 nuclease 1 unit ครั้งที่ 2



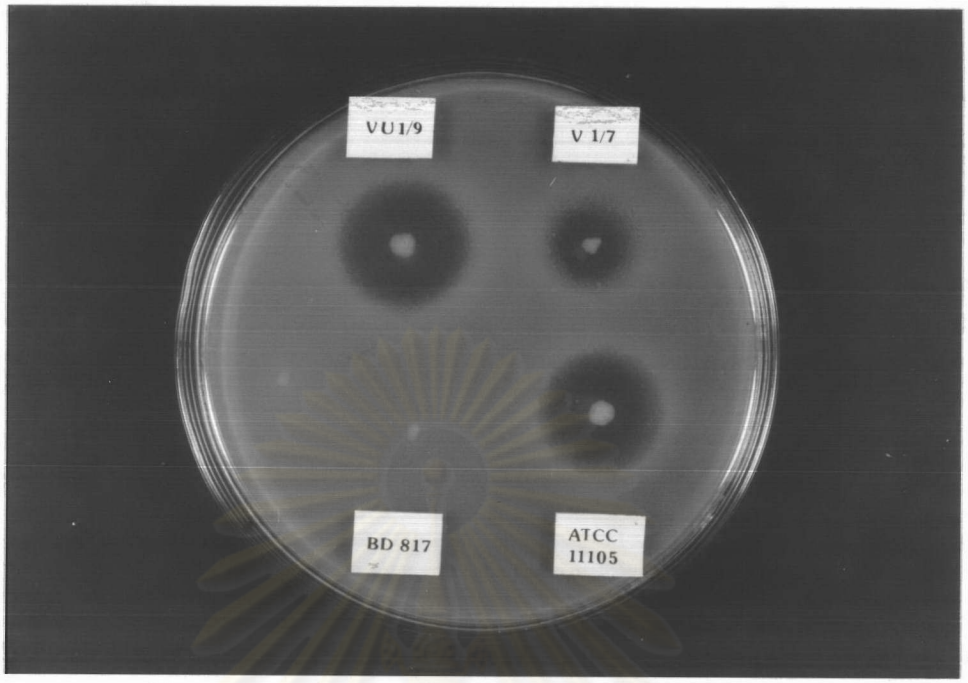
รูปที่12.2 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของทรานสฟอรแมนท์ ที่แยกได้ ทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 2.18 ยกเว้นแต่ว่า ปริมาณของเพนนิซิลินจี ที่ใช้เทราตทับคือ 1 มก.ต่อมล.

BD 817 คือ เซลล์เจ้าเรือน

ATCC 11105 คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ต้นแบบที่สร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

VU 1/9 คือ ทรานสฟอรแมนท์ ที่ได้จากการทรานสฟอร์มพลาสมิด ดีเอนเอ ที่ถูกย่อยด้วย S1 nuclease 1 unit ครั้งที่ 1

V 1/7 คือ ทรานสฟอร์แมนท์ ที่ได้จากการทรานสฟอร์มพลาสมิด ดีเอนเอ ที่ถูกย่อยด้วย S1 nuclease 1 unit ครั้งที่ 2



รูปที่12.3 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของทรานส์ฟอร์แมนท์ ที่แยกได้ โดยทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.18 ยกเว้นแต่ว่าเติม PAA 0.02% ในอาหาร LB และปริมาณของเพนนิซิลินจี ที่ใช้เทราดทับคือ 10 มก.ต่อมล.

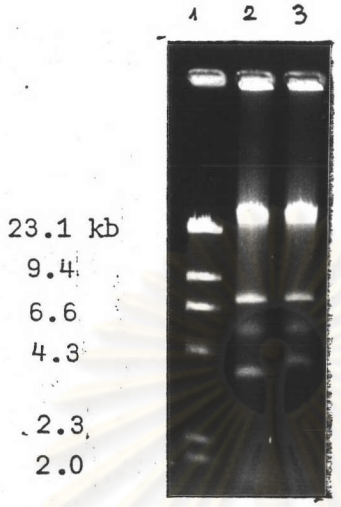
BD 817 คือ เซลล์เจ้าเรือน

ATCC 11105 คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ต้นแบบที่สร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

VU 1/9 คือ ทรานส์ฟอร์แมนท์ ที่ได้จากการทรานส์ฟอร์มพลาสมิด ดีเอนเอ ที่ถูกย่อยด้วย S1 nuclease 1 unit ครั้งที่ 1

V 1/7 คือ ทรานส์ฟอร์แมนท์ ที่ได้จากการทรานส์ฟอร์มพลาสมิด ดีเอนเอ ที่ถูกย่อยด้วย S1 nuclease 1 unit ครั้งที่ 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 ขนาดพลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} สกัดจาก VU 1/9 และ pCR_{29} สกัดจาก V 1/7

ช่องที่ 1 ดีเอนเอมาตรฐาน

" 2 พลาสมิดดีเอนเอ pCR_{27} สกัดจาก V 1/7

" 3 พลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} สกัดจาก VU 1/9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จะทำให้ได้พลาสมิดดีเอนเอลูกผสมตัวใหม่ที่ มีความสามารถถอดรหัสยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสได้เหมือน pCR_{28} และมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอได้เหมือน pSY343

ขั้นตอนการทดลองประกอบด้วย 2 ขั้นตอน

ก. การหาแผนผังของ pCR_{28} เพื่อค้นหาตำแหน่งของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส และตำแหน่งของ ori

ข. การสร้างพลาสมิดดีเอนเอลูกผสมของยีนดีเอนเอจาก pCR_{28} และยีนดีเอนเอจาก pSY343

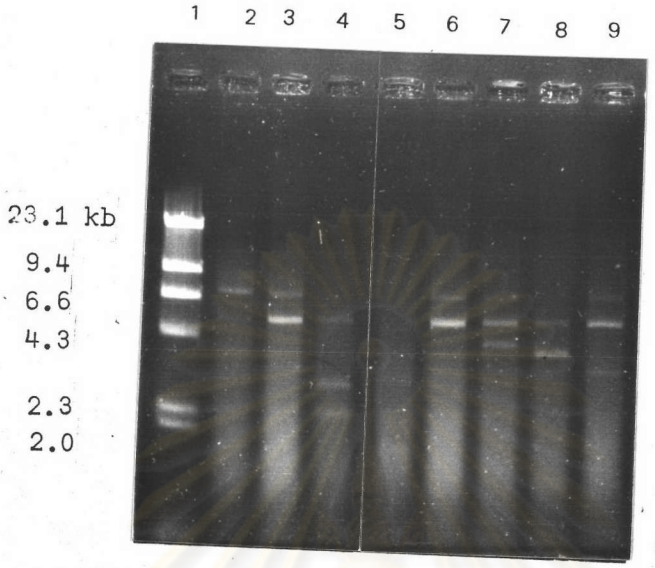
ก. การหาแผนผังของ pCR_{28}

ได้ทดลองใช้เอนไซม์เรสตริกชั่น 8 ตัว โดยครั้งแรกใช้เอนไซม์ 1 ตัวก่อน พบว่า Hind III, EcoRI, Bgl II, SmaI และ Kpn I ย่อย pCR_{28} ได้ชนิดละ 1 ตำแหน่ง

ต่อมาใช้เอนไซม์เป็นคู่โดยตัด pCR_{28} ด้วยเอนไซม์ 1 ชนิดก่อนแล้วจึงติดตามด้วยเอนไซม์ตัวที่สอง ผลปรากฏว่าเมื่อใช้ Kpn I ย่อยเข้าคู่กับ EcoRI จะได้ยีนดีเอนเอขนาด 3.7 และ 1.8 กิโลเบส เมื่อย่อย Hind III เข้าคู่กับ KpnI จะได้ยีนดีเอนเอขนาด 4.1 และ 1.4 กิโลเบส เมื่อใช้ Hind III เข้าคู่กับ Bgl II จะได้ยีนดีเอนเอขนาด 3.9 และ 1.6 กิโลเบส และย่อย Hind III เข้าคู่กัน และ Sma I จะได้ยีนดีเอนเอ 3.6 และ 1.9 กิโลเบส (รูปที่ 14) นอกจากนั้นยังทดลองย่อย pCR_{28} ด้วย Hind III เข้าคู่กับ EcoRI จะได้ยีนดีเอนเอขนาด 3.0 และ 2.5 กิโลเบส และสุดท้ายย่อยด้วย Kpm เข้าคู่กับ Sma I จะได้เอนเอขนาด 3.1 และ 2.9 กิโลเบส (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้)

ผลจากการทดลองดังกล่าวจึงสามารถสรุปแผนผัง pCR_{28} ได้ดังแสดงไว้ในรูปที่ 13 และเมื่อนำแผนผังของ pCR_{28} ไปเทียบกับ pJR_{69} คาดคะเนได้ว่ายีนเพนนิซิลิน เอซิเลส น่าจะอยู่ติดปลาย Hind III ทอดยาวไปจนเกือบจะถึงตำแหน่ง EcoRI และ ori. น่าจะอยู่ข่วงยีนดีเอนเอ Hind III, Bgl II ขนาด 1.6 กิโลเบส

ดังนั้นในการทดลองต่อไป จะนำยีนส่วน Hind III Bgl II ขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส ซึ่งคาดว่ามียีนเพนนิซิลิน เอซิเลส อยู่นั้นไปเชื่อมกับดีเอนเอยีน Hind III Bam HI ขนาดประมาณ 7.5 กิโลเบสจาก pSY343



รูปที่ 14 แผนผังเรสตริกชั่น ของ pCR_{28} เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์เรสตริกชั่นต่าง ๆ

ช่องที่ 1 ดีเอนเอมาตรฐาน

" 2 พลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28}

" 3 พลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} ที่ย่อยด้วย Kpn I

" 4 พลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} ที่ย่อยด้วย Kpn I และ Bgl II

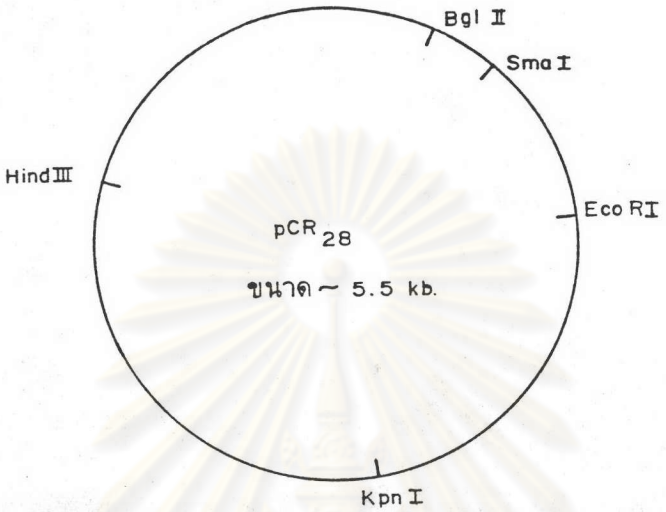
" 5 พลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} ที่ย่อยด้วย Kpn I และ Sma I

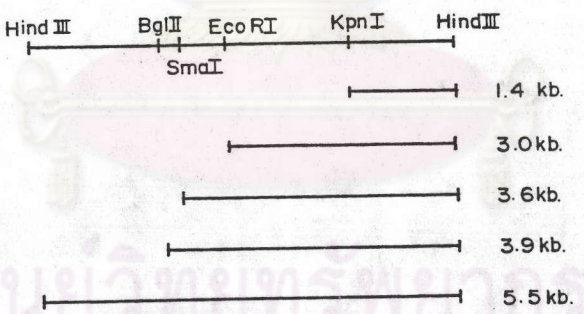
" 6 พลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} ที่ย่อยด้วย Hind III

" 7 พลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} ที่ย่อยด้วย Hind III และ Kpn I

" 8 พลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} ที่ย่อยด้วย Hind III และ Bgl II

" 9 พลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} ที่ย่อยด้วย Hind III และ Sma I





รูปที่ 15 แผนผังเรสตริกชั่น ของ พลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} ที่ลำดัดจาก งบ 1/9

ข. การสร้างพลาสมิดดีเอนเอลูกผสม จากยีนดีเอนเอที่ตัดจาก pCR_{28} และ pSY343 นำยีนดีเอนเอดังกล่าวทั้งสองยีนมาเชื่อมให้เป็นวงด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase (รูปที่ 16) จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซีส เมื่อพบว่าปฏิกิริยาการเชื่อมเกิดสมบูรณ์ แล้วจึงนำพลาสมิดดีเอนเอที่ผ่านการเชื่อมนั้นไปทำการทรานสฟอรมเข้า E.coli BD817 ด้วยวิธีการเตรียม competent cell ด้วย DMSO treated method

เลือกบนอาหารแข็ง LB เสริม PAA 0.02% และ เพนนิซิลินจี 100, 200 ไมโครกรัมต่อมล. ปรากฏว่าพบทรานสฟอรแมนท์ทั้งหมด 276 โคโลนี

จากนั้นเลือกลุ่มทรานสฟอรแมนท์ 30 โคโลนีมาทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนิ-นิซิลิน เอซิเลสโดยวิธี Microbiological test

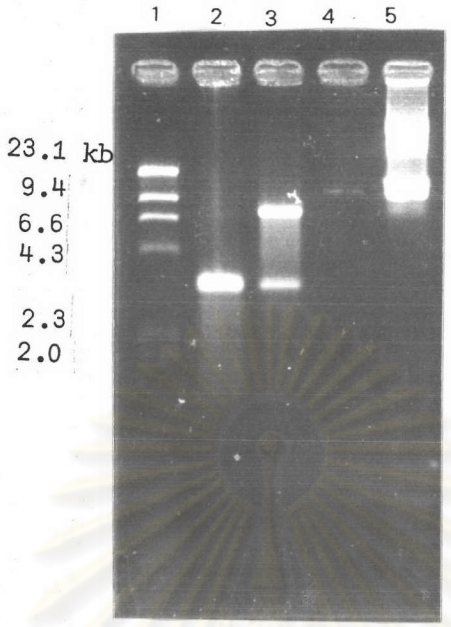
พบทรานฟอรแมนท์ที่น่าสนใจ 1 ตัวให้ชื่อว่า W21 ซึ่ง W21 นี้เป็นทรานสฟอรแมนท์เพียงตัวเดียวที่ได้จากการเลือกบน LB เสริม PAA0.02% และเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมล.

เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติของพลาสมิดดีเอนเอจาก W21 ก็พบว่าพลาสมิดดีเอนเอที่พบมีขนาดประมาณ 11.5 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับก่อนทรานสฟอรม (รูปที่ 16) นอกจากนั้นยังพบคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนพลาสมิด ดีเอนเออีกด้วย (รูปที่ 17) พลาสมิดดีเอน-เอลูกผสมนี้ให้ชื่อว่า pCR_{29} ซึ่งมีคุณสมบัติที่การทดลองนี้ต้องการทุกประการ ดังนั้นคาดได้ว่า W21 ซึ่งเป็นทรานสฟอรแมนท์ของ pCR_{29} นี้น่าจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในปริมาณสูง

3.4 สมบัติของ W21

3.4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และให้แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส W21 เจริญได้ดี

W21 เจริญได้ดีบนอาหารแข็ง LB และ LB เสริม PAA 0.02% แต่เจริญได้ช้าลงเล็กน้อยบน LB เสริม PAA 0.02% และเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมล.จากการทดลองพบว่า W21 ที่เจริญบนอาหารที่มี PAA อยู่เท่านั้น จึงจะพบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) และไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ บีตาแลกตาเมส เมื่อทดสอบตามวิธีทดลองข้อ 2.20



รูปที่ 16 ยีนส่วน Hind III Bgl II จาก pCR_{28}, Hind III . Bam H I จาก pSY 343 และ พลาสมิดดีเอนเอ pCR_{29}

ช่องที่ 1 ดีเอนเอมาตรฐาน

" 2 ยีนดีเอนเอ ตัดด้วย Hind III และ Bgl II จาก pCR_{28}

" 3 ยีนดีเอนเอ ตัดด้วย Hind III และ Bam H I จาก pSy 343 และ ยีนดีเอนเอจาก Hind III และ Bgl II จาก pCR_{28} ก่อนทำการเชื่อม

" 4 ดีเอนเอจาก ช่องที่ 3 หลังจากทำการเชื่อมด้วยเอนไซม์ T_4 DNA Ligase

" 5 พลาสมิดดีเอนเอสกัดจาก ทรานสฟอร์แมนท์ ที่ได้จากการทรานสฟอร์ม ดีเอนเอจาก ช่อง 4 คือ pCR_{29} จาก W2I

สำหรับการศึกษาสภาวะดังกล่าวในเชิงปริมาณ (Quantitative) นั้นจะต้องศึกษาผลกระทบจากปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ก. ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการปลูก W21 ในอาหาร LB, LB เสริม PAA 0.02% LB เสริม glucose 10 mM และ PAA 0.02% และสุดท้าย LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% (ตารางที่ 5) ในสภาวะเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอที่ 37°ซ 2 ชม. พบว่า W21 เจริญได้ดีในอาหารทั้ง 4 ชนิด พบความขุ่นสูงสุด 425 KU หลังจากเจริญไป 15 ชม. จะพบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสก็ต่อเมื่อเจริญ W21 ใน LB ที่มี PAA 0.02% เสริมอยู่ โดยจะพบแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดใน LB เสริม PAA 0.02% $MgCl_2$ 1 mM แต่จะลดลงใน LB เสริม PAA 0.02% และ LB เสริม PAA 0.02% glucose 2 mM ตามลำดับ สำหรับในอาหาร LB นั้นไม่พบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสเลย (ตารางที่ 5)

จากการทดลองอาจสรุปได้ว่า อาหารที่เหมาะสมในการเจริญ และให้แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสของ W21 คือ LB เสริม PAA 0.02% และ $MgCl_2$ 1 mM ดังนั้นจะใช้อาหารสูตรนี้ในการปลูก W21 ในการทดลองครั้งต่อ ๆ ไป

ข. ผลของการ Starvation

เซลล์ที่จะนำไปศึกษาผลของการ starvation นั้นจะปลูกในอาหาร LB เสริม PAA 0.02% และ $MgCl_2$ 1 mM จนได้ความขุ่น 45 KU แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอที่ 37°ซ 2 ชม. แล้วจึงนำกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ จนครบ 15 ชม. จากนั้นจึงนำเซลล์ที่ได้จากคัลเจอร์ที่ปลูกไปทดลองต่อตามปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

1. ผลของเวลาในการ starvation

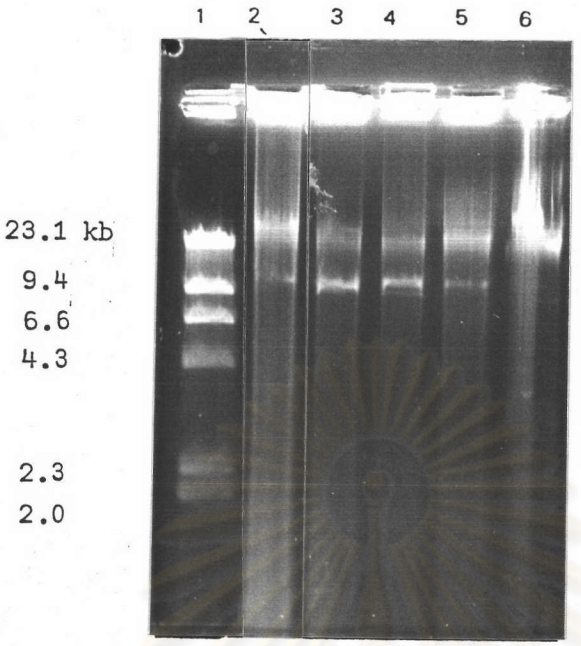
นำเซลล์ที่เตรียมไว้นั้นมากระจายใน starving buffer แล้ว starve ตามวิธีการทดลองข้อ 2.22 โดยแปรเวลาในการ starve จนถึง 24 ชม. (รูปที่ 18) หลังจากนั้นนำเซลล์มาหาแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส จากผลการทดลองพบว่า หลังจาก starve เซลล์แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยสังเกตจากความชันของเส้นกราฟจากเซลล์ที่ไม่ starve และเซลล์ที่ผ่านการ starve 3 ชม. จากนั้นแอคติวิตีจะสูงขึ้นอีกเล็กน้อยที่ 4 ชม. และจะคงที่ไปจนถึง 24 ชม. (รูปที่ 17)

ตารางที่ 5 ปัจจัยที่เสริมในอาหารซึ่งมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จาก W21

ชนิดของอาหาร	ความขุ่นสูงสุดของคัลเจอร์ (KU)	แอคติวิตีสูงสุดของ PAase (nmolePABA/min/mg protein)
LB	430	0
LB + PAA 0.02%	420	107
LB + PAA 0.02% + glucose 2 mM	425	83
LB + PAA 0.02% + $MgCl_2$ 1 mM	425	238

นำ W21 เจริญในอาหารดังตาราง ที่อุณหภูมิ 30°ซ 2 ชม. เปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญเป็น 37°ซ จากนั้นนำกลับมาเจริญที่ 30°ซ เมื่อถึงการเจริญสูงสุด จึงนำเซลล์มาหาแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ตามวิธีการทดลองข้อ 2.19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 ปริมาณพลาส์มิดดีเอนเอ pCR_{29} ส่กัดจาก W21 ภายหลังจากการเจริญที่ 37°ซ ในเวลาต่างกัน

ช่องที่ 1 ดีเอนเอมาตรฐาน

" 2 พลาส์มิดดีเอนเอ pCR_{29} เมื่อเจริญ W21 30°ซ ตลอด 10 ชม.

" 3 พลาส์มิดดีเอนเอ pCR_{29} เมื่อเจริญ W21 เพิ่มพลาส์มิดดีเอนเอ[1] 4 ชม.

" 4 พลาส์มิดดีเอนเอ pCR_{29} เมื่อเจริญ W21 เพิ่มพลาส์มิดดีเอนเอ 2 ชม.

" 5 พลาส์มิดดีเอนเอ pCR_{29} เมื่อเจริญ W21 เพิ่มพลาส์มิดดีเอนเอ 1 ชม.

" 6 เซลล์เจ้าเรือน E.coli BD817

(1) หลังจากเจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เส่ริม $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% ไปเจริญที่ 37° ซึ่งเป็นการเจริญเพื่อเพิ่มพลาส์มิดดีเอนเอโดยใช้เวลาต่าง ๆ กัน

2. ผลของระยะการเจริญของเซลล์ที่นำมา starve

ได้ทดลอง starve เซลล์ในระยะ midlog phase ความขุ่น 324 KU late log phase ความขุ่น 425 KU และ stationary phase ความขุ่น 425 KU (ตารางที่ 6) โดยใช้เวลาในการ starve 4 ชม. พบว่าแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส เพิ่มขึ้น 2 เท่าในเซลล์ทุกระยะ

3. ผลของอัตราส่วน PAA/Pen G ในการ starvation

กระจายเซลล์ใน starving buffer ซึ่งประกอบด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 80 mM pH 7.8, $MgCl_2$ 1 mM, PAA 0.02% แล้วแปรปริมาณเพนนิซิลินจี (Pen G) เป็น 100 ไมโครกรัมต่อมล., 5 มก.ต่อมล. และ 10 มก.ต่อมล. เมื่อคิดเป็นอัตราส่วน PAA/Pen G เท่ากับ 54/1, 1/1, 0.54/1 M/M ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

จากการทดลองพบว่า แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส จะเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่ออัตราส่วน ของ PAA/ Pen G ลดลง (ตารางที่ 7)

ในการทดลองครั้งต่อ ๆ ไปจะใช้อัตราส่วน PAA/Pen G เท่ากับ 54/1 ในการ starve เซลล์ เพื่อสะดวกในการกำจัดเพนนิซิลินจีออกขณะเตรียมเซลล์เพื่อไปทดสอบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส

ค. ผลของเวลาการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอ

ปลูก W21 ใน LB เสริม PAA 0.02% และ $MgCl_2$ 1 mM จนได้ความขุ่น 45 KU จากนั้นนำไปเจริญในสภาวะเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอที่ 37 °ซ เป็นเวลา 1, 2 และ 4 ชม. นำกลับมาเจริญที่ 30 °ซ ต่อจนถึง 10 ชม. นำเซลล์ทุกคัลเจอร์มา 1 มล. เจือจางให้ทุกตัวอย่างมีจำนวนเซลล์เท่ากันแล้วนำไปตรวจสอบปริมาณพลาสมิดดีเอนเอตามวิธี ทดลองข้อ 2.14 (รูปที่ 17) พร้อมกันนั้นก็ได้ติดตามการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์ไปด้วย (รูปที่ 19)

จากผลการทดลองพบว่าทั้งจำนวนพลาสมิดดีเอนเอและแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะไม่เพิ่มพลาสมิดดีเอนเอ (รูปที่ 17, 19) แต่แอคติวิตีของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอ

จากการประมวลผลของปัจจัยต่าง ๆ จากผลการทดลอง แล้วอาจสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการเจริญ และให้แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุด คือ

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ระหว่างศัลเจอร์ ที่มิได้ starve และที่ starve 4 ชม. ของ W21

ความขุ่นของศัลเจอร์ (KU)	แอคติวิตี PAase(nmolePABA/min/mg. protein)		จำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้น
	nonstarve	starve (3)	
305	49	97	1.98
425(1)	250	524	2.09
425(2)	261	524	2.00

(1) ค่าความขุ่นที่ศัลเจอร์ที่ late log phase

(2) ค่าความขุ่นที่ศัลเจอร์เมื่อเข้า stationary phase แล้วเป็นเวลา 3 ชม.

(3) เวลาที่ starve 4 ชม.

เจริญ W21 ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% เขย่าที่ 30°ซ จนได้ความขุ่น 45 KU เปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญเป็น 37°ซ 2 ชม. จากนั้น นำกลับมาเจริญที่ 30°ซ วัดความขุ่นของศัลเจอร์ พร้อมนำไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสโดยวิธีการทดลองข้อ 2.19 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ผ่านการ starve และไม่ผ่านการ starve ตามวิธีการทดลองข้อ 2.22

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ผลการแปรอัตราส่วนระหว่าง PAA / Pen G ในการทำ starvation ของ W21

ความขุ่นของเซลล์ (KU)	แอคติวิตี PAase(nmolePABA/min/mg protein)(1)		
	PenG 100µg/ml (3)	PenG 5mg/ml (4)	PenG 10mg/ml (5)
305	97(3)	108(4)	110(5)
425(2)	524	580	607

(1) เป็นแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยวิธีการทดลองในข้อ 2.19 หลังจากทำการ starve โดยวิธีการทดลองข้อ 2.22 โดยให้ starvation buffer มี PAA คงที่คือ 0.02% แต่แปรปริมาณ Pen G ใช้เวลา starve 4 ชม.

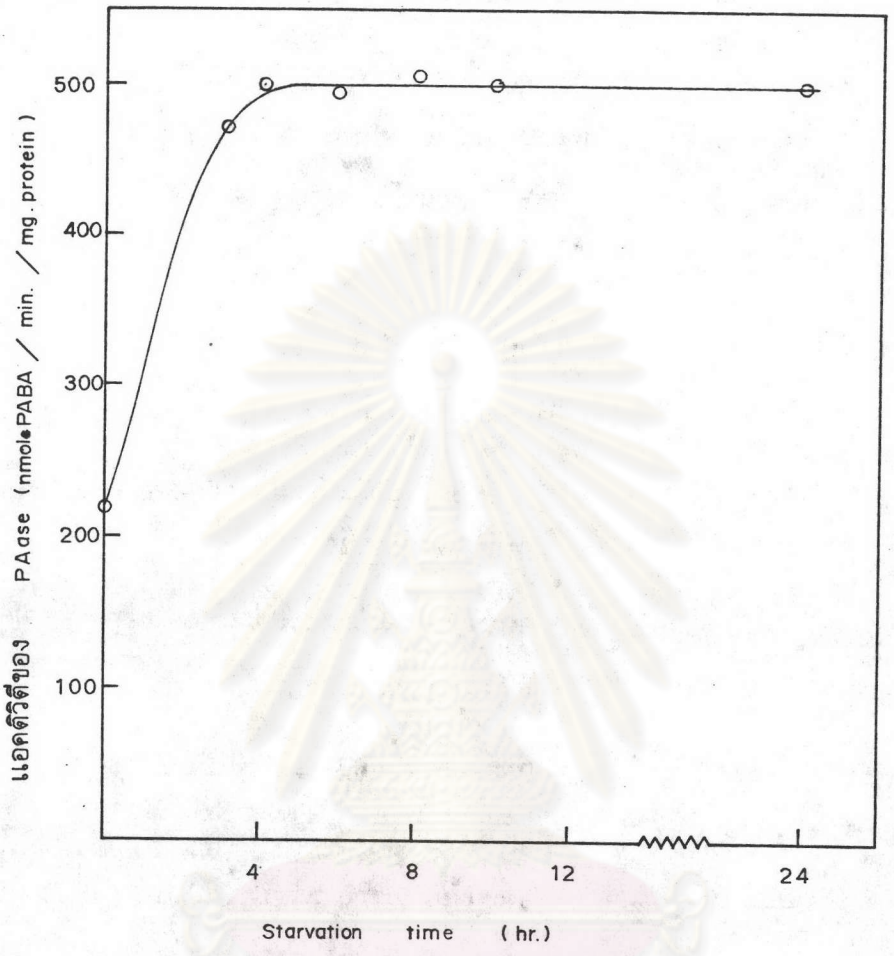
(2) ความขุ่นของเซลล์หลังจากเข้า stationary phase แล้ว 3 ชม.

(3) อัตราส่วน PAA/Pen G = 54/1

(4) อัตราส่วน PAA/Pen G = 1.08/1

(5) อัตราส่วน PAA/Pen G = 0.54/1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

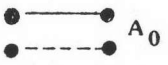


รูปที่ 18 ผลของเวลาที่ใช้ Starve เซลล์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ W21

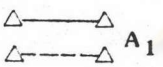
ภายหลังจากเจริญ W21 จนได้ความขุ่นขนาด 45 KU แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอที่ 37°ซ. 2 ชม. แล้วนำกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ. จนครบ 15 ชม. แล้วจึงนำมาเซนตริฟิวจ์ เพื่อกำจัดเอาอาหารออก กระจายเซลล์ใน starvation buffer ทำ starvation ตามวิธีการทดลองข้อ 2.22 ยกเว้นที่เวลาต่าง ๆ กัน ก่อนนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ตามวิธีการทดลองข้อ 2.19

รูปที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ขยายจำนวนชุดของพลาสมิดดีเอนเอ กับแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของ W21

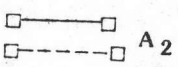
เจริญเซลล์ในอาหารอุตม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% เจริญเพื่อขยายจำนวนชุดพลาสมิดดีเอนเอ นำเซลล์ที่ได้ทำ starvation ตามวิธีการทดลองข้อ 2.22 แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลสตามวิธีการทดลองข้อ 2.19



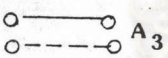
ความขุ่นของเซลล์และแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่ได้จากการเจริญ W21 ที่อุณหภูมิ 30°ซ ตลอด 14 ชม.



ความขุ่นของเซลล์และแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่ได้จากการเจริญ W21 ที่ อุณหภูมิ 30°ซ จนได้ค่าความขุ่น 45 KU แล้วเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 37°ซ 1 ชม. จากนั้นย้ายกลับมาเจริญที่ 30°ซ ต่อจนครบ 14 ชม.

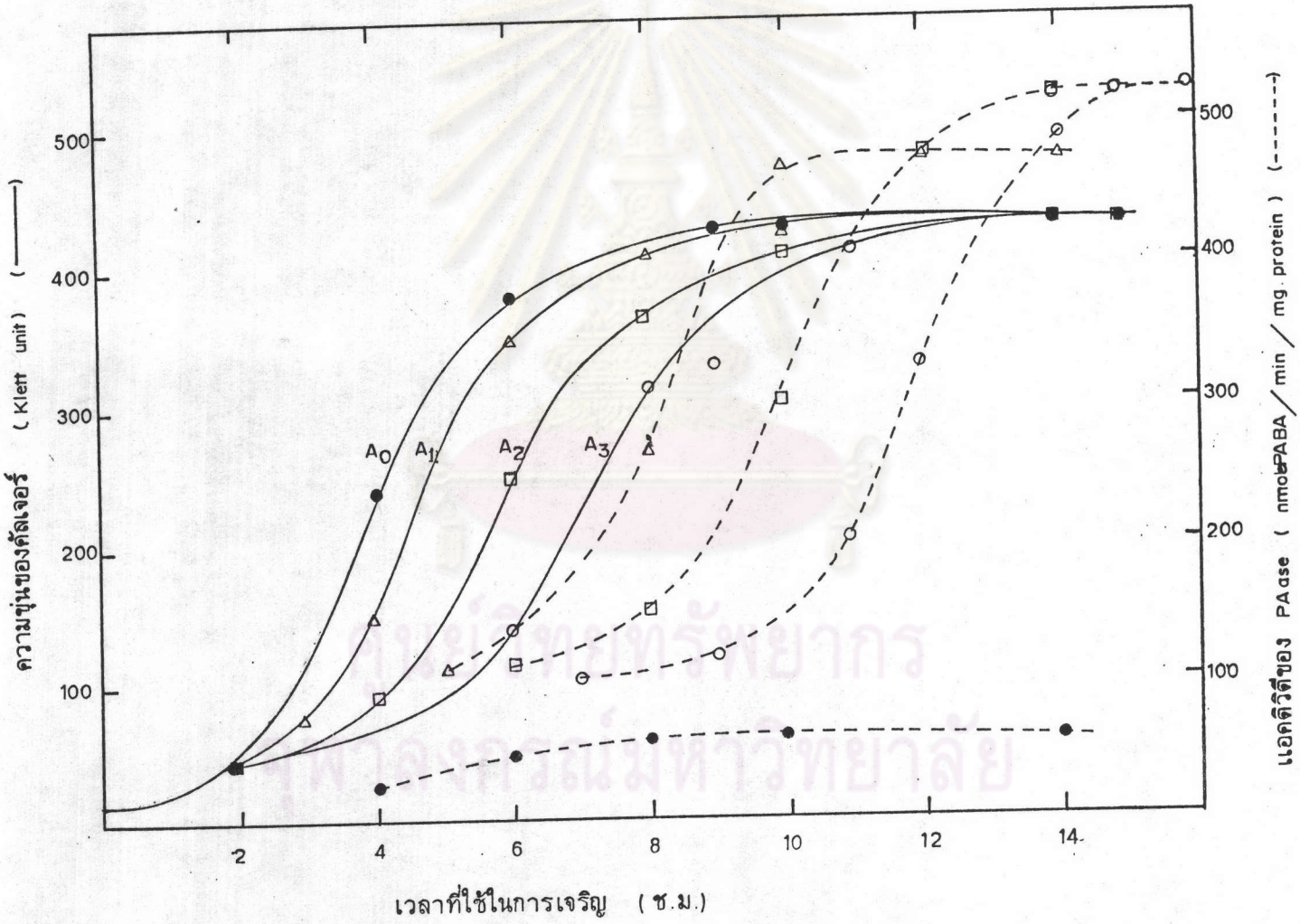


ความหมายเดียวกับ A1 ยกเว้นแต่ว่าเจริญที่ 37°ซ 2 ชม.



ความหมายเดียวกับ A1 ยกเว้นแต่ว่าเจริญที่ 37°ซ 4 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ความขุ่นของคัลเจอร์ (Klett unit) (——)
แอคติวิตีของ PAase (nmolPABA / min / mg. protein) (------)
เวลาที่ใช้ในการเจริญ (ช.ม.)
A0
A1
A2
A3
100
200
300
400
500
2
4
6
8
10
12
14

ปลูกเซลล์ในอาหาร LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% ที่ 30°ซ จนได้ความขุ่น 45 KU แล้ว จึงเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอโดยการเปลี่ยนการเจริญไปที่อุณหภูมิ 37°ซ 2 ชม. แล้วนำกลับมาเจริญที่ 30°ซ ต่อจนครบ 12 ถึง 15 ชม. จะได้ความขุ่นสูงสุดประมาณ 425 KU จากนั้นนำเซลล์ไป starve ใน starving buffer ซึ่งประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 80 mM pH 7.8 เสริมด้วย $MgCl_2$ 1 mM, PAA 0.02% และเพนนิซิลินจี 100 ไมโครกรัมต่อมล. ใช้เวลา starve 4 ชม.

ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อ ๆ ไป จะใช้สภาวะดังกล่าวเจริญเซลล์ เพื่อศึกษาคุณสมบัติอื่น ๆ ต่อไป

3.4.2 รูปแบบการเจริญ และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส

เจริญ W21 ในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวเทียบกับสภาวะไม่เพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอ พร้อมกันนั้น ได้ติดตามการเจริญ และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส (รูปที่ 20) ในทั้งสองสภาวะ พบว่ามีความขุ่นสูงสุดเท่ากันคือ 425 KU แต่ระยะเวลาในการเข้า stationary phase ของ W21 ในสภาวะไม่เพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอจะเร็วกว่า เมื่อเพิ่มพลาสมิดดีเอนเอประมาณ 3 ชม. (รูปที่ 20)

แต่สำหรับศัลเจอร์ที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอจะพบ แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุดประมาณ 75 nmole PABA/min/mg protein หลังจากเจริญจนถึง 8 ถึง 14 ชม. หลังจากนั้นแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสก็ลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นกัน

3.4.3 การปรับสภาวะการเจริญของ W21 เพื่อเพิ่มแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส

หลักการทดลองก็คือ แปรความขุ่นของเซลล์ ก่อนเพิ่มจำนวนพลาสมิดเป็น 45, 80 และ 120 KU และอีกประการหนึ่งคือการชักนำให้เกิด stationary phase ขึ้นในศัลเจอร์โดยการนำเซลล์ที่ได้หลังจากเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอมาทำให้เข้มข้นขึ้น จนมีความขุ่นประมาณ 350 ถึง 450 KU (ตารางที่ 8) โดยกำจัดอาหารเก่าออกให้หมด แล้วใส่อาหารใหม่สูตรเดิมลงไปให้ได้ความขุ่นที่ต้องการ นำไปเจริญต่อที่ 30°ซ

พบว่าความขุ่นสูงสุด ของทั้งสามตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกันคือประมาณ 600 KU และพบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุด เมื่อใช้ความขุ่นของศัลเจอร์ก่อนเพิ่มจำนวนพลาสมิด

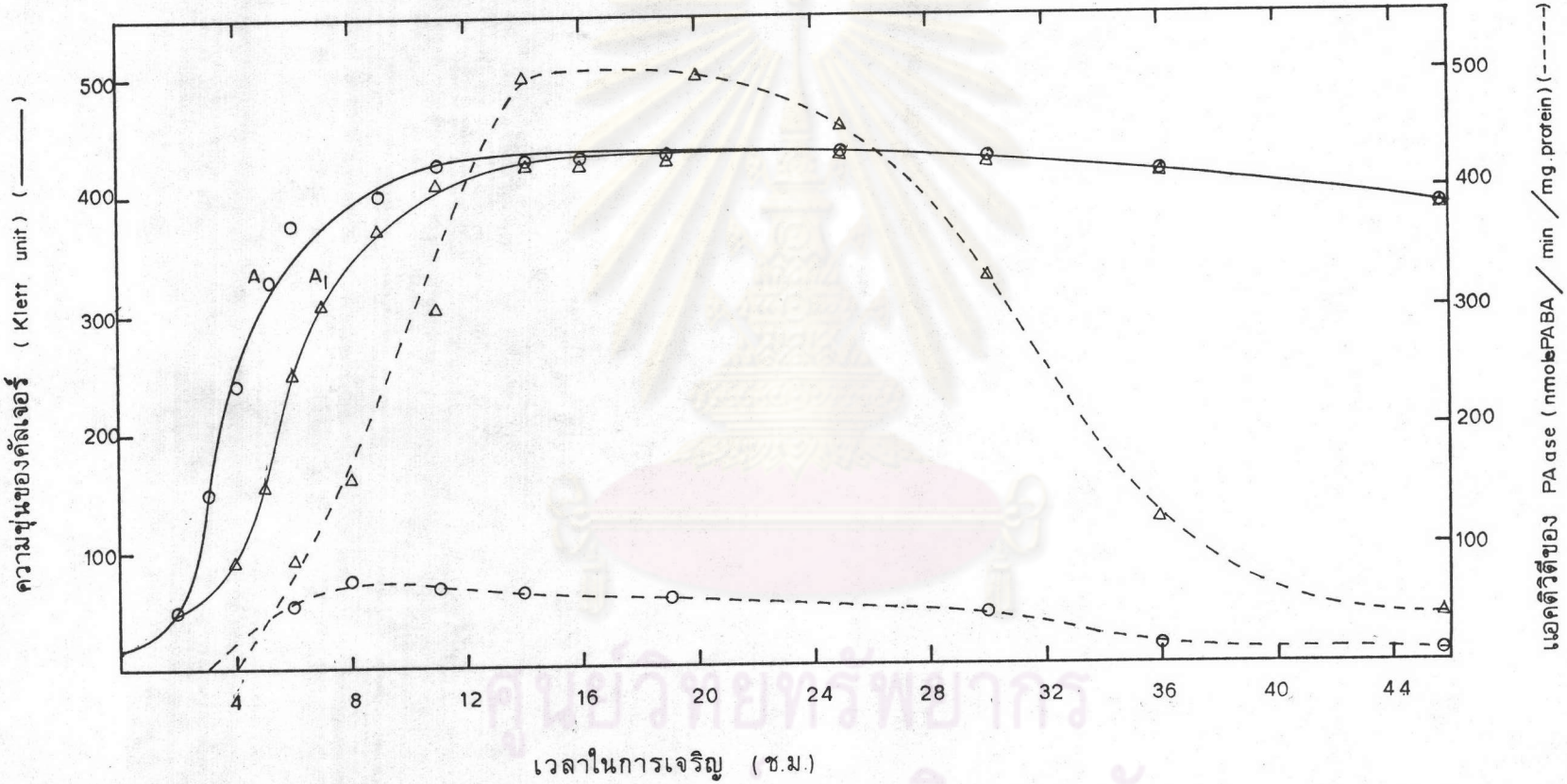
รูปที่ 20 รูปแบบความสัมพันธ์ของความขุ่นของเซลล์ และแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ W21

เจริญเซลล์ในอาหารฉุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% เขย่าในสภาวะที่ระบุไว้ และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยวิธีการทดลองข้อ 2.19 หลังจากทำ starvation ตามวิธีการทดลองข้อ 2.22 เป็นเวลา 4 ชม.

o———o A_o ความขุ่นของเซลล์และแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่ได้จาก
o------o A_o คัลเจอร์ที่เจริญ 30°ซ ตลอด

Δ———Δ A_1 เจริญเซลล์ที่ 30°ซ จนได้ความขุ่น 45 KU จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญ
Δ------Δ A_1 เป็น 37°ซ 2 ชม. ย้ายกลับมาเจริญที่ 30°ซ วัดความขุ่นพร้อมวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ควบคู่ไปด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 การปรับสภาวะการเจริญของ W21 เพื่อการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซีเลส

ความขุ่นของศัลเจอร์[1] ก่อนขยายจำนวนขุด (KU)	ความขุ่นของศัลเจอร์[2] หลังขยายจำนวนขุด (KU)	ความขุ่นสูงสุดของ[3] ศัลเจอร์ (KU)	แอคติวิตี PAase[4] ที่ความขุ่นสูงสุด
45	435	600	550
80	385	605	539
120	400	600	429

(1) เป็นความขุ่นของเซลล์ที่เจริญในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1mM และ PAA 0.02% จนได้ KU เท่าที่ระบุไว้

(2) นำความขุ่นหลังจากนำไปขยายจำนวนขุดพลาสมิดดีเอนเอที่ 37 °ซ แล้ว 2 ชม. มาปรับให้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่า ๆ กัน โดยนำเซลล์มากระจายในอาหารสูตรเดิม แล้วเขย่าที่ 30 °ซ

(3) หลังจากเจริญเซลล์จาก (2) ที่ 30 °ซ 7 ชม.

(4) เป็นแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่วัดได้จากความขุ่นของ (3) มีหน่วยเป็น (nmole PABA/min/mg.protein)

ดีเอนเอ 45 KU และจะลดลงเมื่อใช้ความขุ่นของศัลเจอร์ ก่อนเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 8)

3.5 การเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอ เพิ่มขึ้นโดยวิธี sibling selection

ได้นำ W21 มาทำ sibling selection ตามวิธีการทดลองข้อ 2.17 โดยใช้เพนนิซิลินจี 5 มก./มล. แล้วนำศัลเจอร์ที่ได้เลือกบนอาหารแข็ง LB เสริม PAA 0.02% $MgCl_2$ 1 mM และ เพนนิซิลินจี 200, 300 และ 500 ไมโครกรัมต่อมล. ปรากฏว่าพบมิวแตนท์บนอาหารที่เสริมเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมล. จำนวน 325 โคโลนี จากนั้นทำการสุ่ม 30 โคโลนี มาทดสอบ แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสโดยดูวงใสที่เกิดกับ S. marcescence ปรากฏว่าพบมิวแตนท์ที่ให้แอคติวิตีสูงสุด 1 โคโลนี ให้ชื่อว่าX25

เมื่อนำ X25 มาศึกษารูปแบบการเจริญ และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในสภาวะเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอ 2 ชม.เทียบกับ ไม่เพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอ (รูปที่ 21) พบว่าในทั้งสองสภาวะ X25 มีความขุ่นสูงสุดเท่ากันคือ 425 KU และได้พบแอคติวิตีของเพนนิซิลินเอซิเลส ประมาณ 800 nmolePABA/min./mg. protein และ 81 nmolePABA/min./mg. protein ตามลำดับ

ได้นำ X25 มาทำการทดลอง sibling selection ซ้ำอีกครั้งหนึ่งโดยใช้ เพนนิซิลิน จี 10 มก./มล. แล้วเลือกบน LB เสริม PAA 0.02%, $MgCl_2$ 1 mM และ เพนนิซิลิน จี 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมล. จากการทดลองพบมิวแตนท์บนอาหารที่เจริญเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมล. จำนวนมาก จนไม่สามารถนับได้ และพบมิวแตนท์ 35 โคโลนีบนอาหารที่เสริมเพนนิซิลินจี 300 ไมโครกรัมต่อมล. แต่ไม่พบมิวแตนท์เลยบนอาหารที่เสริมเพนนิซิลินจี 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมล.

ต่อมาได้นำมิวแตนท์ทั้ง 35 โคโลนีไปทดสอบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ก็ปรากฏว่าพบมิวแตนท์ที่น่าสนใจ 1 ตัวให้ชื่อว่า Y324 เมื่อนำ Y324 เจริญในอาหารและสภาวะที่เหมาะสม พบว่าได้ความขุ่นสูงสุด 425 KU และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุด 1111 nmolePABA/min/mg protein (ตารางที่ 9)

รูปที่ 21 รูปแบบความสัมพันธ์ของความขุ่นของเซลล์ และแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ X_{25}

เจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% เขย่าในสภาวะที่ระบุไว้ และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยวิธีการทดลองข้อ 2.19 หลังจากทำ starvation ตามวิธีการทดลองข้อ 2.22 เป็นเวลา 4 ชม.

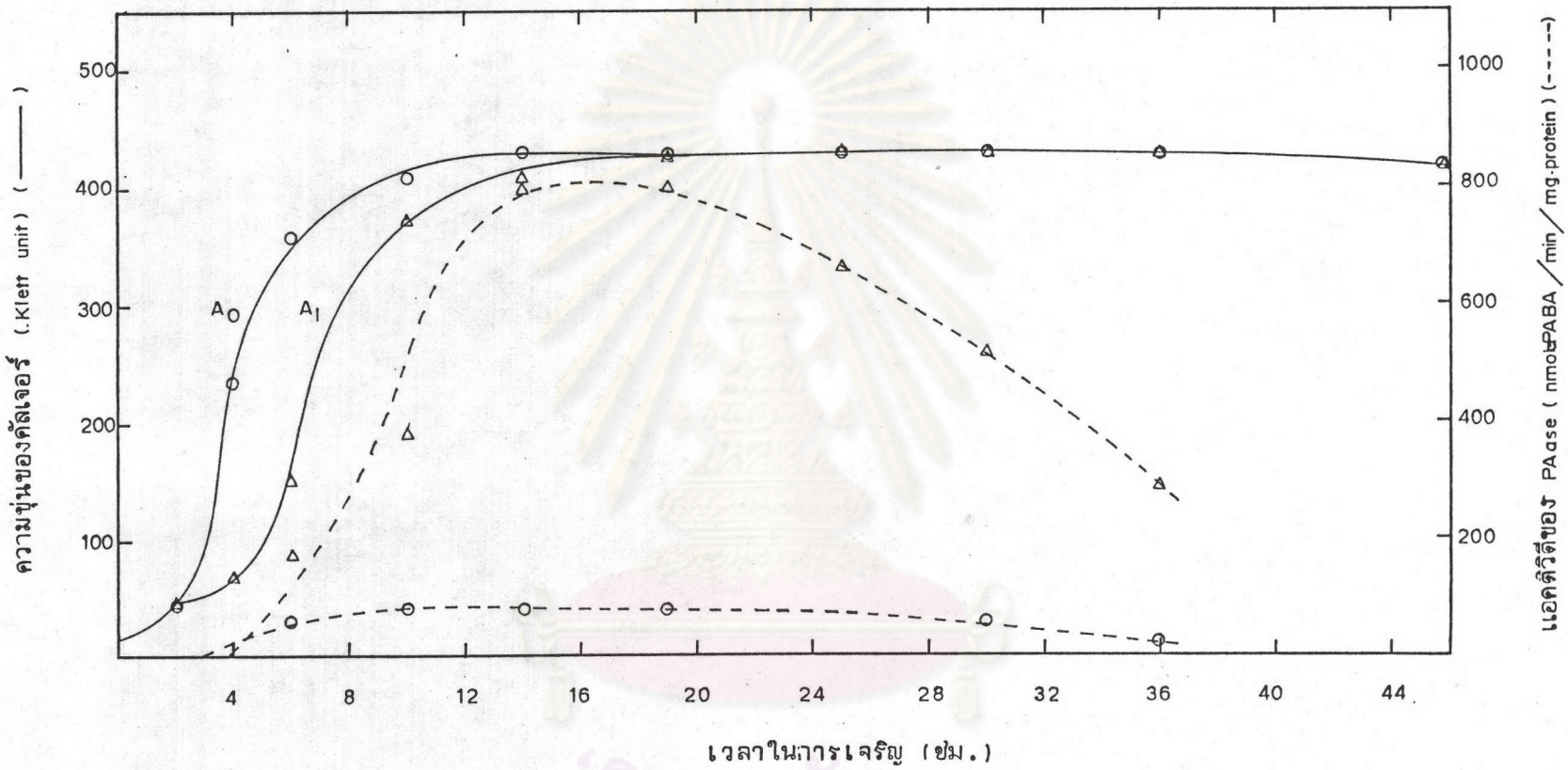
o——o A_o ความขุ่นของเซลล์ และแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

o- - - -o A_o ที่ได้จากศัลเจอร์ที่เจริญ 30°ซ ตลอด

Δ——Δ A_1 เจริญเซลล์ที่ 30°ซ จนได้ความขุ่น 45 KU จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิ

Δ- - - -Δ A_1 การเจริญเป็น 37°ซ 2 ชม. ย้ายกลับมาเจริญที่ 30°ซ วัดความขุ่นพร้อมวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ควบคู่ไปด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 เปรียบเทียบสมบัติของ VU1/9, W21, X25 และ Y325

ก. เปรียบเทียบการเจริญและวงใสจากการทดสอบแอคติวิตี เพนนิซิลิน เอซิเลส ด้วยวิธี Microbiological test

กรด แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์บนอาหารแข็ง LB เสริม PAA 0.02%, $MgCl_2$ 1 mM และเพนนิซิลินจี 300 ไมโครกรัมต่อมล. โดยมี E. coli ATCC 11105 และ E.coli BD817 เป็นตัวเปรียบเทียบ จากการทดลองพบว่า Y324 เจริญได้ดี ส่วน VU1/9, W21 และ X25 เจริญได้น้อยมาก แต่ E.coli BD817 และ E.coli ATCC 11105 ไม่พบการเจริญบนอาหารดังกล่าว (รูปที่ 22) และเมื่อราดทับด้วย s.marcessenc เสริมด้วยเพนนิซิลิน จี 10 มก.ต่อมล. พบว่า วงใสจาก Y324 มีขนาดใหญ่มากเมื่อเทียบกับวงใสที่ได้จากสายพันธุ์อื่น (รูปที่ 22) และไม่พบวงใสกับ E.coli BD817 และ ATCC 11105

ข. ความสามารถในการเจริญ และ doubling time ในอาหารที่เสริมเพนนิซิลิน จี ปริมาณต่าง ๆ

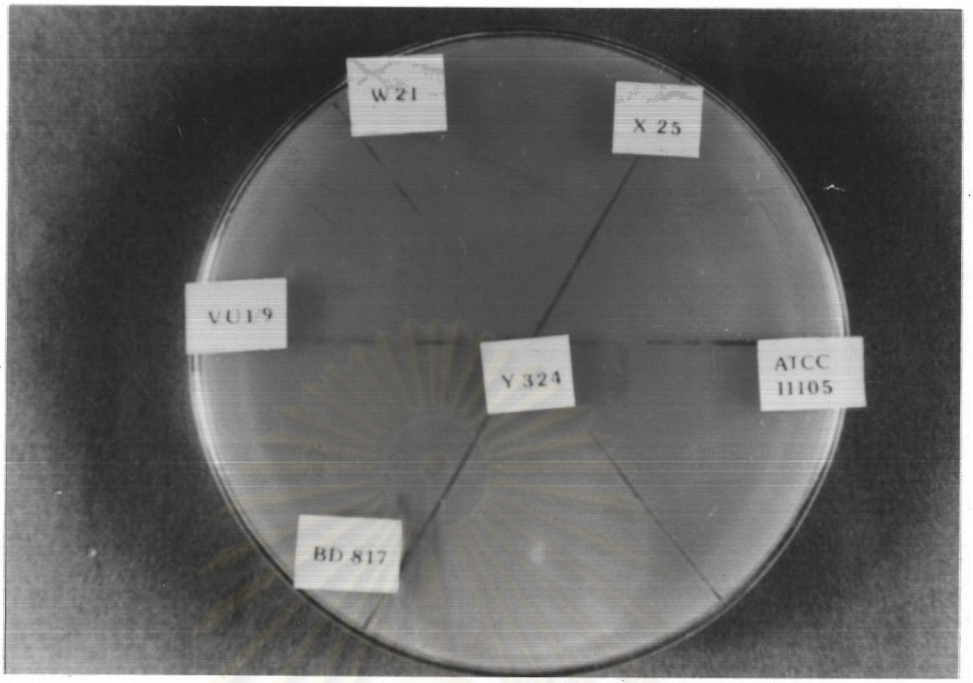
ได้ทดลองเจริญ W21 ในอาหารเสริมเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมล. (รูปที่ 23) X25 ใน อาหารเสริมเพนนิซิลินจี 200 และ 500 ไมโครกรัมต่อมล. (รูปที่ 24) และ Y324 ในอาหารเสริมเพนนิซิลินจี 200, 300 และ 500 ไมโครกรัมต่อมล. (รูปที่ 25) พบปรากฏการณ์ดังนี้

(i). doubling time ของ W21 และ X25 ในอาหารที่เสริมเพนนิซิลินจี ปริมาณดังกล่าวจะช้าลง เมื่อเทียบกับ doubling time ในอาหารที่ไม่เสริมเพนนิซิลินจี และจะพบปรากฏการณ์เช่นเดียวกันนี้กับ Y324 เมื่อเจริญในอาหารที่เสริม เพนนิซิลินจี 500 µg/ml (ตารางที่ 9)

(ii). ในคัลเจอร์ที่มีปริมาณเพนนิซิลินจี สูงขึ้น การเจริญและแอคติวิตีสูงสุดของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของแต่ละสายพันธุ์จะยิ่งลดต่ำลง ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ค. สภาวะการเจริญสูงสุดในการเพิ่ม แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส

ในการทดลองนี้จะใช้หลักการเดียวกับการทดลองในข้อ 3.4.3 แต่จะให้ความขุ่นคัลเจอร์เมื่อเริ่มต้นเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอเพียงค่าเดียวคือ 45KU



รูปที่ 22 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลสของสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.18 ยกเว้นแต่ว่าเพิ่มปริมาณ เพนนิซิลินจีในอาหารที่ใช้เจริญเซลล์เป็น 300 ไมโครกรัมต่อมล.และปริมาณของเพนนิซิลินจีที่ใช้เทราดทับคือ 10 มก.ต่อมล.

BD 817 คือ เซลล์เจ้าเรือน

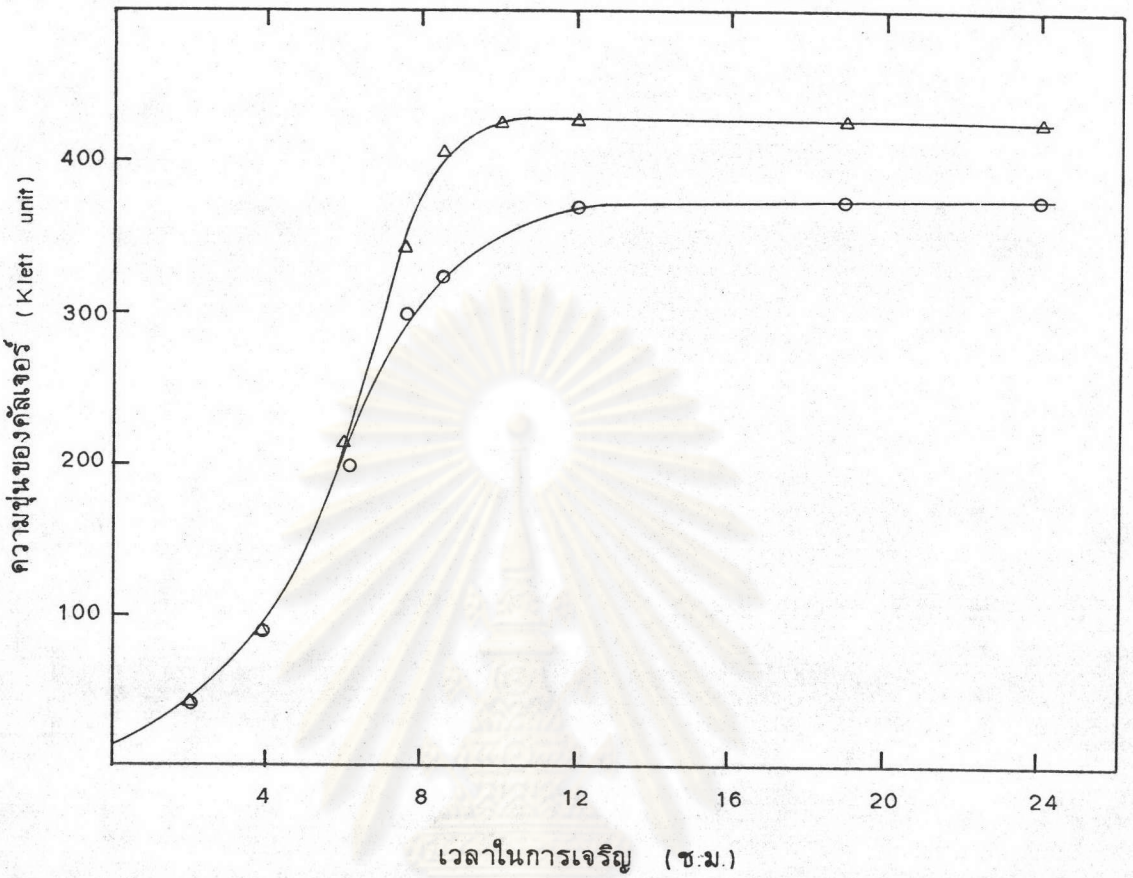
ATCC 11105 คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ต้นแบบที่สร้างเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส

VU 1/9 คือ ทรานสฟอรแมนท์ ที่ได้จากการทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอนเอที่ถูกย่อยด้วย S1 nuclease คือ pCR_{28}

W21 คือ ทรานสฟอรแมนท์ ที่ได้จากการทรานสฟอร์ม พลาสมิดดีเอนเอที่ปรับปรุงจาก pCR_{28}

X25 คือ มิวแตนท์ ที่ได้จากการทำ sibling selectionของ W21

Y324 คือ มิวแตนท์ ที่ได้จาก การทำ sibling selection ของ X25

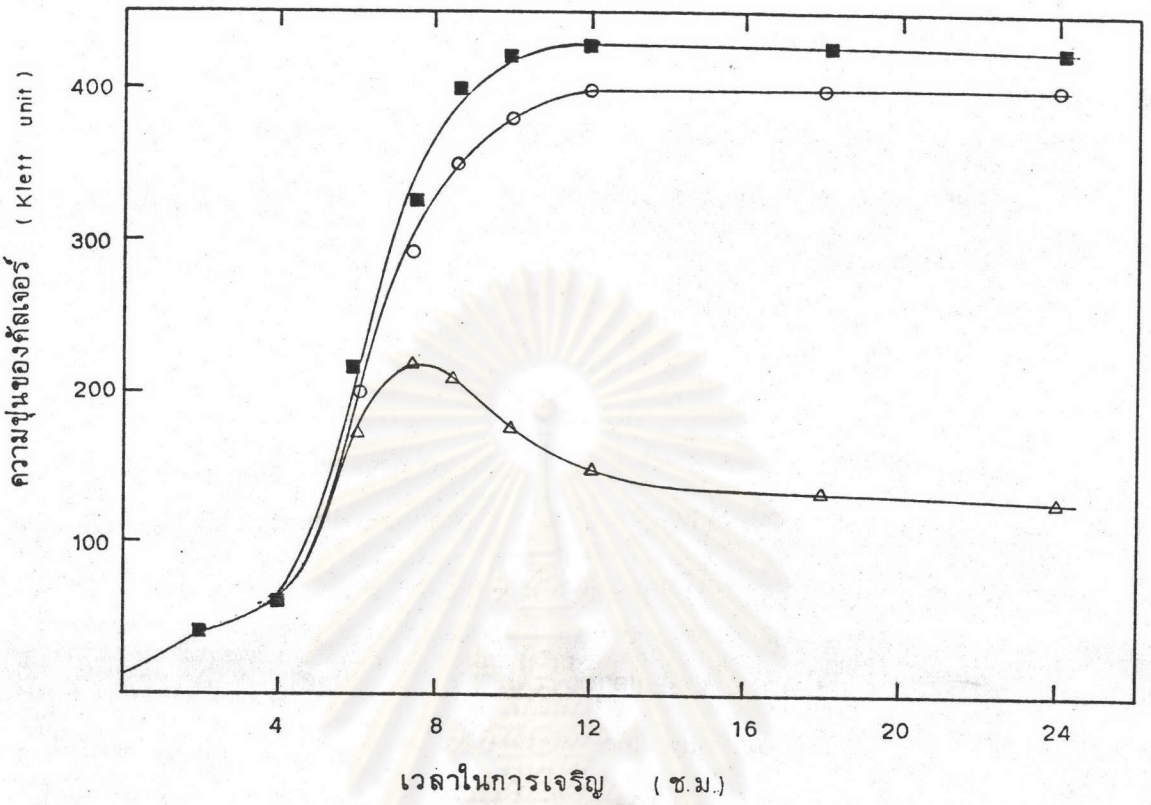


รูปที่ 23 รูปแบบความสัมพันธ์ของความขุ่นของเซลล์เมื่อเจริญในอาหารที่เสริมเพนนิซิลินจี ปริมาณต่าง ๆ ของ W21

เจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% เขย่า 125 รอบต่อนาทีที่ 30°ซ จนได้ความขุ่นเท่ากับ 45 KU จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญเป็น 37°ซ 2 ชม. แล้วนำกลับมาเจริญที่ 30° ซ

△——△ เจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM และPAA 0.02%

○——○ เจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM, PAA 0.02% และเสริมเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมล. หลังจากเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญจาก 37°ซ. เป็น 30°ซ. แล้ว 30 นาที



รูปที่ 24 รูปแบบความสัมพันธ์ของความขุ่นของเซลล์เมื่อเจริญในอาหารที่เสริมเพนนิซิลินจี ปริมาณต่าง ๆ ของ X25

เจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% เขย่า 125 รอบต่อนาทีที่ 30°ซ จนได้ความขุ่นเท่ากับ 45 KU เปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญเป็น 37°ซ 2 ชม. แล้วนำกลับมาเจริญที่ 30°ซ

■——■ เจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02%

○——○ เจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM, PAA 0.02% และเสริมเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมล. หลังจากเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญจาก 37°ซ.เป็น 30°ซ. แล้ว 30 นาที

△——△ เจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM, PAA 0.02% และเสริมเพนนิซิลินจี 500 ไมโครกรัมต่อมล. หลังจากเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญจาก 37°ซ.เป็น 30°ซ. แล้ว 30 นาที

รูปที่ 25 รูปแบบความสัมพันธ์ของความขุ่นของเซลล์ เมื่อเจริญในอาหารที่เสริมเพนนิซิลินจี ปริมาณต่าง ๆ ของ Y324

เจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% เขย่า 125 รอบต่อนาที ที่ 30°ซ จนได้ความขุ่นเท่ากับ 45 KU จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญเป็น 37°ซ 2 ชม. แล้วนำกลับมาเจริญที่ 30°ซ

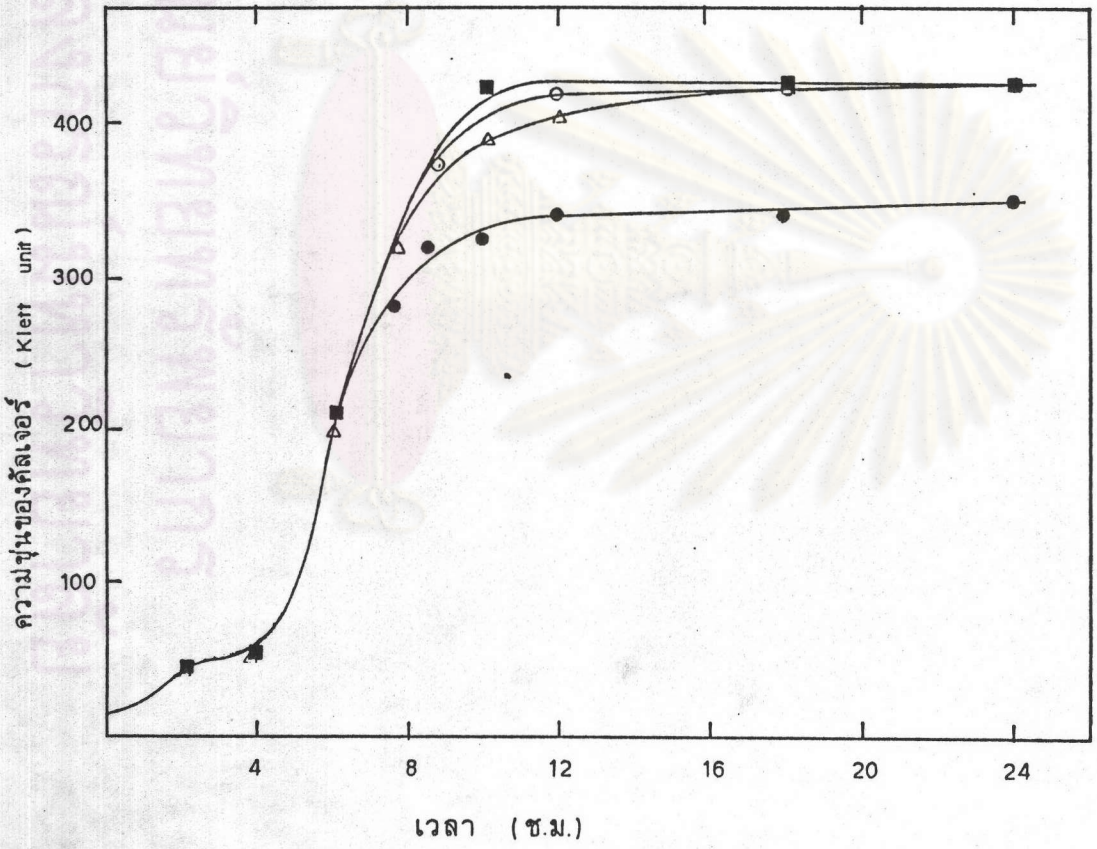
■——■ เจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM และPAA 0.02%

○——○ เจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM,PAA 0.02% เสริมเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมล. หลังจากเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญจาก 37°ซ เป็น 30°ซ แล้ว 30 นาที

△——△ เจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM, PAA 0.02% และเสริมเพนนิซิลินจี 300 ไมโครกรัมต่อมล. หลังจากเปลี่ยนอุณหภูมิ การเจริญจาก 37° เป็น 30°ซ แล้ว 30 นาที

●——● เจริญเซลล์ในอาหารอุดม LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM, PAA 0.02% และเสริมเพนนิซิลินจี 500 ไมโครกรัมต่อมล. หลังจากเปลี่ยนอุณหภูมิ การเจริญจาก 37°ซ. เป็น 30°ซ แล้ว 30 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


400
300
200
100
ความขุ่นของคัลเจอร์ (Klett unit)
4
8
12
16
20
24
เวลา (ช.ม.)

ตารางที่ 9 แสดง Doubling time และแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส เมื่อเจริญ W21, X25 และ Y324 ในอาหาร[1] ที่เสริมเพนนิซิลินจี ปริมาณต่าง ๆ

สายพันธุ์	ปริมาณ Pen G[2] (µg/ml)	Doubling time (min.)	แอคติวิตี PAase ที่ 15 ชม.[3] (nmol PABA/min/mg protein)
W21	0	105	476
	200	132	426
X25	0	105	800
	200	120	748
	500	(?)	121
Y324	0	105	1111
	200	105	1094
	300	105	924
	500	144	786

(1) อาหารที่ใช้เจริญคือ LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02%

(2) เติมเพนนิซิลินจีหลังจาก เจริญเซลล์ที่ 37°ซ แล้ว 2 ชม. แล้วเปลี่ยนมาเจริญที่ 30°ซ 30 นาที

(3) ทำ starvation ตามวิธีการทดลองข้อ 2.22 เป็นเวลา 4 ชม.

(?) ไม่สามารถหาค่าได้

ตารางที่ 10 สภาวะการเจริญของ W21, X25 และ Y324 เพื่อเพิ่มเอนไซม์แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส

สายพันธุ์	ความขุ่นของ[1] คัลเลอร์ (KU)	ความขุ่นหลังขยาย[2] จำนวนชุด (KU)	ความขุ่นที่ให้[3] PAase สูงสุด(KU)	แอคติวิตีสูงสุด[4] ของPAase (nmole PABA/min/ mg.Protein)
W21	45	435	600	550
X25	45	340	600	747
Y324	45	330	600	907

(1) เป็นความขุ่นของเซลล์ที่เจริญใน LB ที่เสริม $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% จนได้ KU เท่าที่ระบุไว้

(2) นำความขุ่นหลังจากนำไปขยายจำนวนชุดพลาสมิดดีเอนเอที่ 37°ซ แล้ว 2 ชม. มาปรับให้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่า ๆ กัน โดยนำเซลล์มากระจายในอาหารสูตรเดิม แล้วเขย่าที่ 30°ซ

(3) หลังจากเจริญเซลล์จาก(2) ที่ 30°ซ 7 ชม.

(4) เป็นแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่วัดได้จากความขุ่นของ(3)

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบจำนวนเท่า ของแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จากแหล่งต่าง ๆ

สายพันธุ์	ความขุ่นสูงสุดของคัลเจอร์ (KU)	แอคติวิตีสูงสุดของ PAase (nmole PABA/min/mg. protein)	จำนวนเท่าเทียบสัมพัทธ์กับ E.coli ATCC 11105
E.coli ATCC 11105 (1)	435	23	1
W21 (2)	425	500	21
X25 (2)	425	810	35
Y324 (2)	425	1111	48

เมื่อเจริญสายพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารอุดม LB เสริม PAA 0.02% และ $MgCl_2$ 1 mM

(1) เจริญที่ 30°ซ. ตลอด 11 ชม.

(2) เจริญที่ 30°ซ. จนได้ความขุ่น 45 KU แล้วเปลี่ยนอุณหภูมิการเลี้ยงเป็น 37°ซ. 2 ชม. แล้วกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ. จนครบ 15 ชม.

จากนั้นนำไปทำ starvation ตามวิธีการทดลองข้อ 2.22 เป็นเวลา 4 ชม. แล้วจึงนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสตามวิธีการทดลองข้อ 2.19

จากการทดลองพบว่าทั้งสามสายพันธุ์มีความยุ่นสูงสุดเท่ากันคือ 600 KU แต่ แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ เพนนิซิลินเอซิเลส ต่างกัน (ตารางที่ 10) กล่าวคือ Y324 ให้แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสสูงสุด 907 nmole PABA/min/mg protein รองลงมา คือ X25 747 nmol PABA/min/mg protein และสุดท้ายคือ W21 550 nmole PABA/min/mg protein (ตารางที่ 10)

ดังนั้นจากการประมวลความสามารถในการเจริญ และแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส จากสายพันธุ์ต่าง ๆ 6 สายพันธุ์ คือ E.coli ATCC 11105, W21, X25 และ Y324 (ตารางที่ 11) พบว่า Y324 เป็นสายพันธุ์ที่มีการเจริญ และให้แอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ดีที่สุด

เมื่อได้ทดสอบความเสถียรในการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และ ความเสถียรของพลาสมิดดีเอนเอ pCR_{29} จากสายพันธุ์ W21 พบว่า หลังจากถ่ายเชื้อ (subculture) W21 ไป 20 ครั้ง ยังคงพบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในปริมาณไม่เปลี่ยนแปลง และพลาสมิดดีเอนเอก็ยังคงมีขนาดเท่าเดิม สำหรับ X25 และ Y324 ได้ทำการถ่ายเชื้อไป 6 และ 4 ครั้งตามลำดับ ก็ยังไม่พบความเปลี่ยนแปลงทั้งแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และขนาดของพลาสมิดดีเอนเอ เช่นกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย