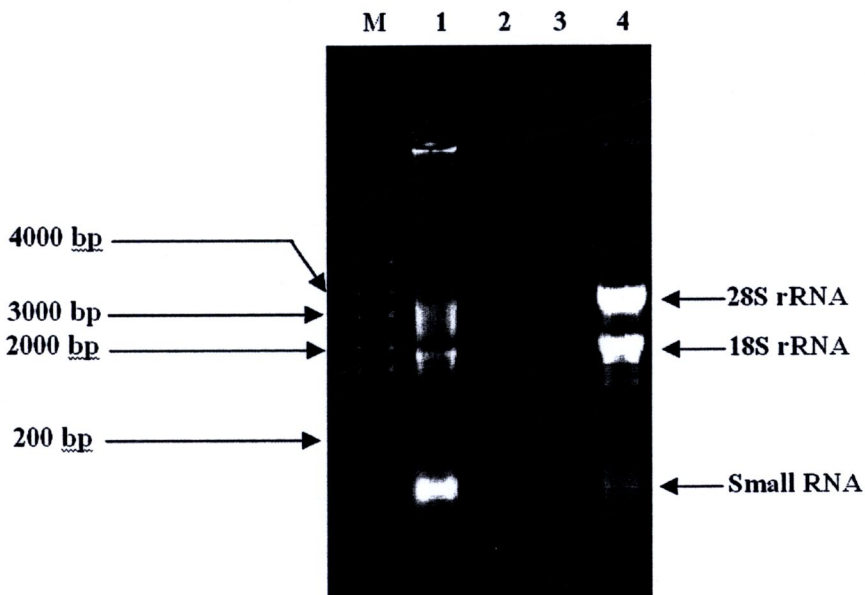


บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การสกัด Total RNA จากใบเปล้าน้อย

Total RNA ที่สกัดได้จากใบอ่อนของเปล้าน้อยจำนวน 1 กรัมมีความเข้มข้น $1.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญคือ 28S rRNA, 18S rRNA และ small RNA) (รูปที่ 4.1) มีค่า A260/A280 เท่ากับ 2 และมีค่า A260/A230 เท่ากับ 1.94 แสดงว่า total RNA ที่ได้มีความบริสุทธิ์ไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีนและพอลิแซคคาไรด์ตามลำดับ สามารถใช้เป็นต้นแบบในการทำ RT-PCR เพื่อสังเคราะห์ cDNA ของยีน *GGPPS* ในขั้นตอนต่อไป

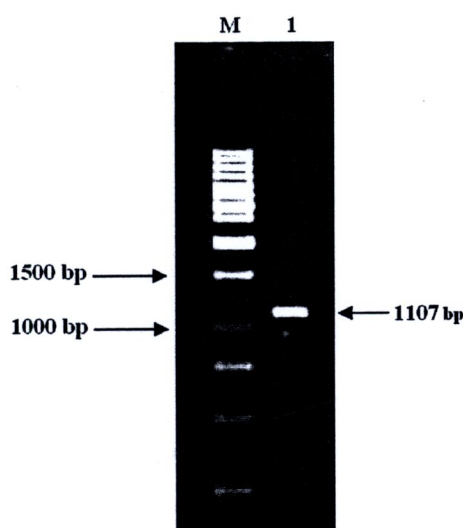


รูปที่ 4.1 แสดงการตรวจสอบคุณภาพของ Total RNA ที่ได้จากเปล้าน้อยด้วยเทคนิคฟอรั่มอลดีไฮด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1% ในสารละลาย 1X MOPS buffer ที่ความต่างศักย์ 100 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยที่ Lane M คือ RNA มาตรฐาน (High range RNA ladder) และ Lane 1, 2, 3 และ 4 คือ total RNA ที่ได้จากใบเปล้าน้อยทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ซึ่งแถบ RNA หมายเลข 4 ปรากฏ 28S rRNA, 18S rRNA และ small RNA อย่างชัดเจน

2. การสร้างพลาสมิด pETDuet-1 vector ที่มีการแทรกสอดของยีน *GGPPS*

2.1 การโคลนยีน *geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS)*

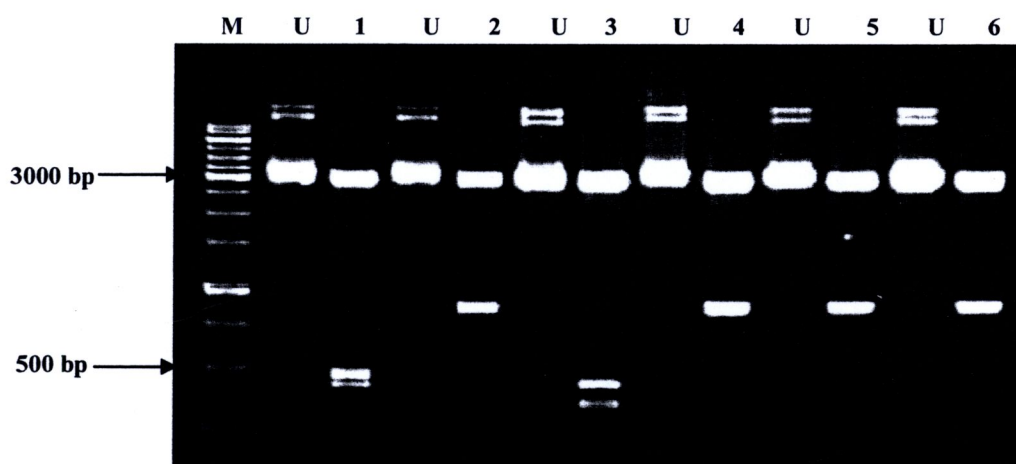
เมื่อนำ cDNA ที่ได้จากการทำ RT-PCR มาเพิ่มปริมาณยีน *GGPPS* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GGPPSFW และ GGPPSRV พบว่าได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดตามต้องการคือ 1107 bp (รูปที่ 4.2)



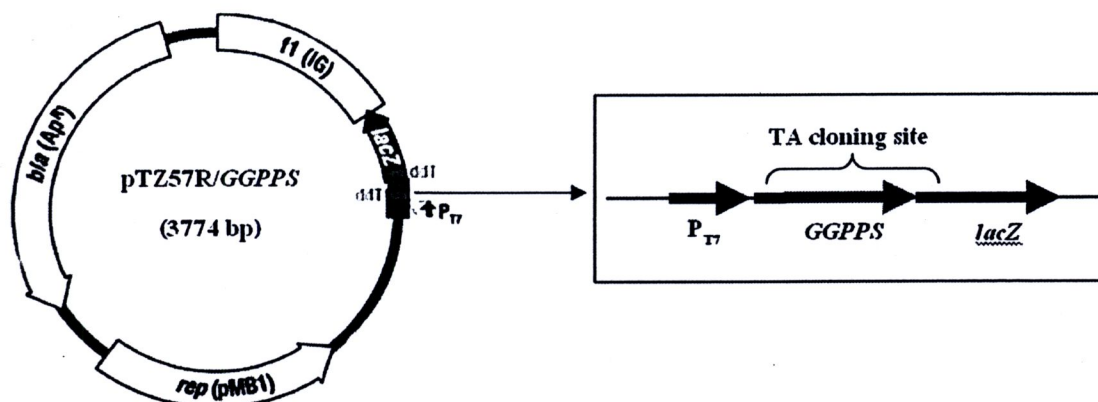
รูปที่ 4.2 แสดงการตรวจสอบแถบ DNA ของยีน *GGPPS* ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1% ในสารละลายตัวกลาง 1X TBE buffer ความต่างศักย์ 100 V เป็นเวลา 40 นาที โดยที่ Lane M คือ แถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder และ Lane 1 คือ แถบ DNA ของยีน *GGPPS* ซึ่งมีขนาด 1107 bp

จากนั้นนำแถบ DNA ของยีน *GGPPS* มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R/T vector และถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5 α และตรวจสอบการแทรกสอดของยีน *GGPPS* พลาสมิด pTZ57R/T โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าพลาสมิดคือเอ็นเอหมายเลข 1 ให้แถบเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III ตามขนาดที่คาดไว้คือ 3118, 464 และ 411 bp ตามลำดับ (รูปที่ 4.3) และผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยคู่ไพรเมอร์ M13 forward และ M13 reverse พบว่ามีการแทรกสอดของยีน *GGPPS* เข้าไปในตำแหน่ง cloning site ของพลาสมิด pTZ57R/T (รูปที่ 4.4) และพบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีนในรูปแบบ silent mutation ทั้งหมด 7 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโนของ

ยีน *GGPPS* จึงนำพลาสมิด pTZ57R/T/*GGPPS* ใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ truncate ของยีน *GGPPS*



รูปที่ 4.3 แสดงแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* แล้วนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1 % โดยที่ Lane M คือแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder, Lane U คือ uncut plasmid DNA และ Lane 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 คือแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* ซึ่ง DNA หมายเลข 1 คือพลาสมิด pTZ57R/T ที่มีการแทรกสอดของยีน *GGPPS*

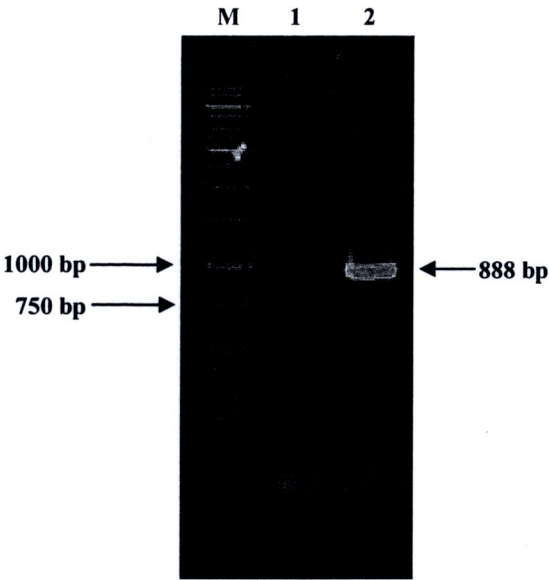


รูปที่ 4.4 แสดงแผนที่ของพลาสมิด pTZ57R/T/GGPPS และบริเวณที่มีการแทรกสอดของ ยีน *GGPPS* เข้าไปในตำแหน่ง “TA cloning site” ของพลาสมิด pTZ57R/T โดยที่ พลาสมิด pTZ57R/GGPPS จะถูกนำไปใช้เป็นตัวเอ็นคั้นแบบในการทำ PCR เพื่อสร้าง truncate ของยีน *GGPPS*

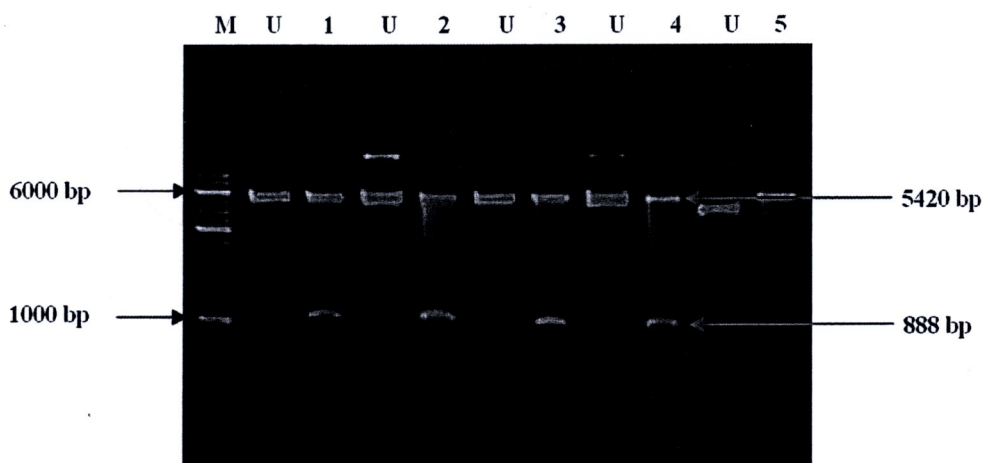
2.2 การโคลน *GGPPS* เข้าสู่ pETDuet-1 vector

เมื่อใช้พลาสมิด pTZ57R/GGPPS เป็น DNA ต้นแบบในการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ tGGPPS FW และ tGGPPS RV ที่ถูกออกแบบขึ้นมาเพื่อตัดส่วนของเปปไทด์สัญญาณ (signal peptide) พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดที่ต้องการคือ 888 bp (รูปที่ 4.5) และเมื่อนำชิ้น DNA ของยีน truncated *GGPPS* มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sal*I และเชื่อมต่อกับพลาสมิด pETDuet-1 vector ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน แล้วถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5 α แล้วตรวจสอบการแทรกสอดของยีน *GGPPS* ใน pETDuet-1 vector โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sal*I ให้ผลดังรูปที่ 4.6 พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอหมายเลข 1, 2, 3 และ 4 ให้แถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sal*I ตามขนาดที่ต้องการคือ 5420 และ 888 bp ตามลำดับ ในขณะที่พลาสมิดดีเอ็นเอหมายเลข 5 ซึ่งเป็น pETDuet-1, empty vector ไม่พบการแทรกสอดของ ยีนเป้าหมาย

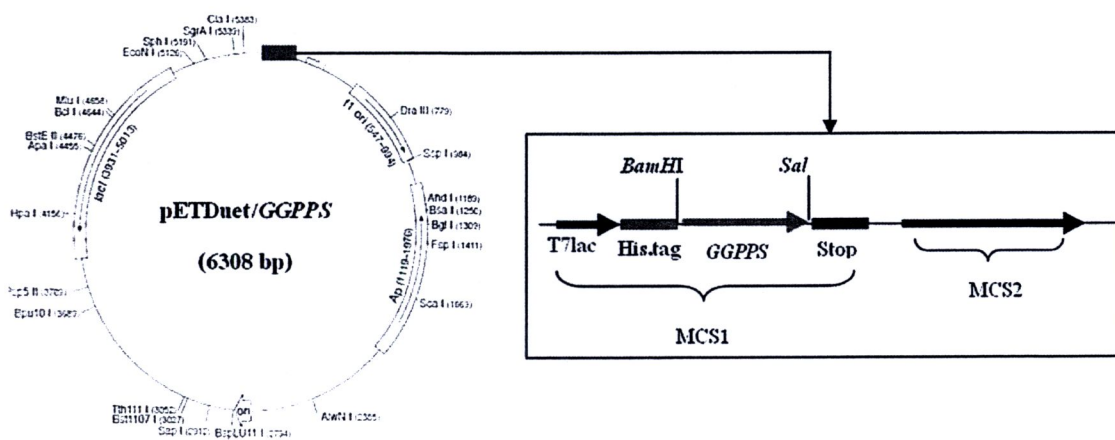
การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *GGPPS* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ pETUpstream primer และ DuetDOWN 1 primer พบการแทรกสอดของยีนเป้าหมายเข้าไปในตำแหน่ง *Bam*HI และ *Sal*I บริเวณ MCS1 ของ pETDuet-1 vector และถูกขนาบด้วย T7lac promoter และ self terminator ในทิศทางและมีเฟรมการแปลรหัสเป็นพอลิเปปไทด์ที่ถูกต้อง (in-frame) (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.5 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ truncate ของยีน *GGPPS* แล้วนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1 % โดยที่ Lane M คือแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder; Lane 1 คือ Negative control ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทน DNA ต้นแบบ; Lane 2 คือแถบ DNA ของ truncate *GGPPS*



รูปที่ 4.6 แสดงแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sal*I และทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1% โดยที่ Lane M คือแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder, Lane U คือ uncut plasmid; Lane 1, 2, 3, 4, และ 5 คือแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sal*I

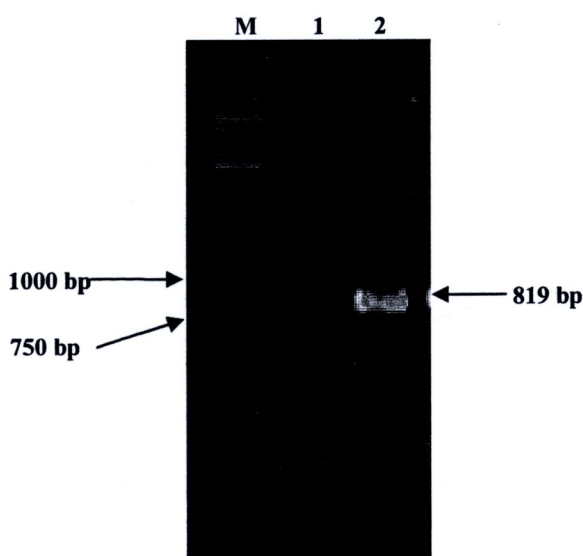


รูปที่ 4.7 แสดงแผนที่ของพลาสมิด pETDuet/GGPPS โดยที่ยีน *GGPPS* ถูกตัดต่อเข้าไปในตำแหน่ง *Bam*HI และ *Sal*I ของ MCS1 และถูกขนานข้างด้วย T7lac promoter และ self terminator sequence โดยที่การแสดงออกของยีน *GGPPS* สามารถเหนี่ยวนำโดยการเติม IPTG ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง

3. การสร้างพลาสมิด pETDuet-1 vector ที่มีการแทรกสอดของยีน *PDPase*

3.1 การโคลน truncate ของยีน *PDPase*

เมื่อใช้พลาสมิด pET101/TOPO/*PDPase* เป็น DNA ต้นแบบในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ truncate ของยีน *PDPase* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ tPDPase FW และ tPDPase RV ที่ออกแบบขึ้นมาเพื่อตัดส่วนของเปปไทด์สัญญาณตามรายงานของ Nualkaew และคณะ (Nualkaew et al., 2004) พบแถบ DNA ในขนาดที่ต้องการคือ 819 bp (รูปที่ 4.8)

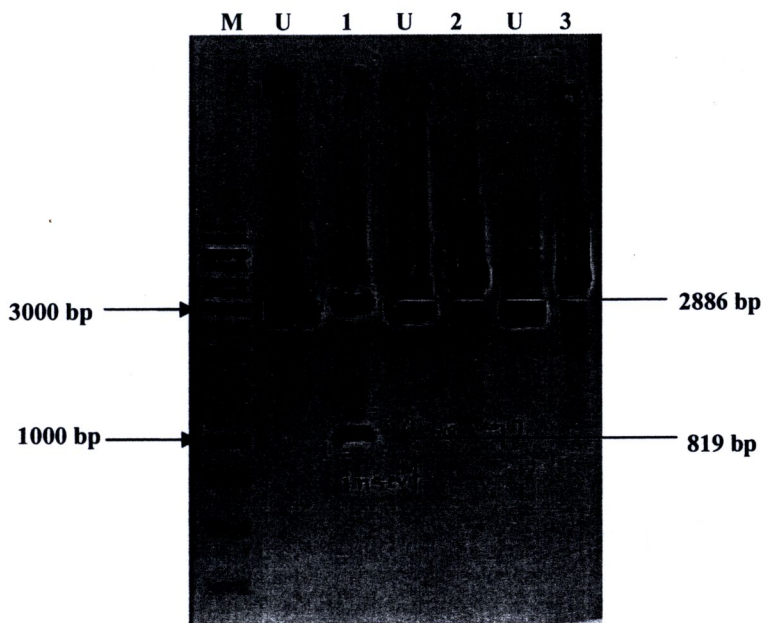


รูปที่ 4.8 แสดงแถบ DNA ของยีน truncate *PDPase* ที่ได้จากการทำ PCR แล้วนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1 % โดยที่ Lane M คือแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder; Lane 1 คือ Negative control ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทน DNA ต้นแบบ และ Lane 2 คือแถบ DNA ของ truncate *PDPase*

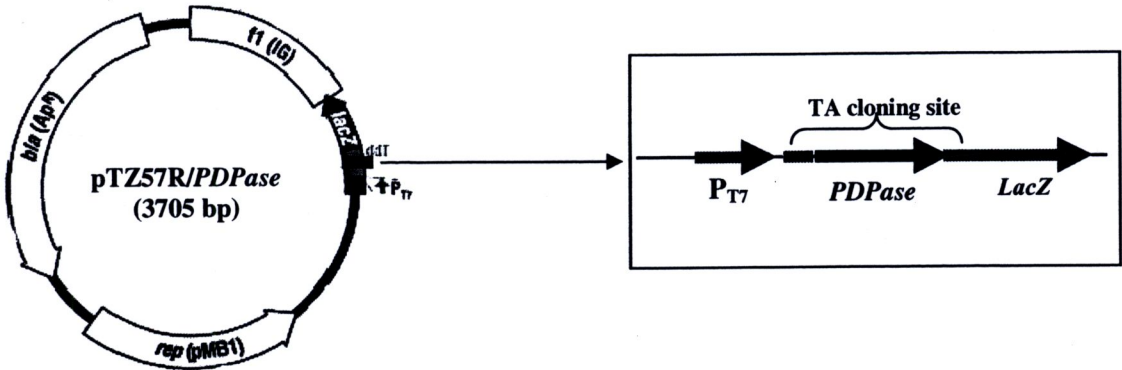
เมื่อนำ DNA ของ truncate *PDPase* มาทำปฏิกิริยาการเติมเบส Adenine (A) ที่ปลายด้าน 3' ของ DNA ทั้งสองด้าน และนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R/T vector แล้วถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5 α จากนั้นจึงตรวจสอบการแทรกสอดของยีนเป้าหมายใน pTZ57R/T vector โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Eco*RV พบว่าตัวอย่าง DNA หมายเลข 1 ให้แถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I และ *Eco*RV ตามขนาดที่ต้องการคือ 2886 และ 819 bp ตามลำดับ (รูปที่ 4.9)



จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PDPase* โดยใช้คู่มือ M13 FW และ M13 RV พบว่ามีการแทรกสอดของยีนเป้าหมายในตำแหน่ง cloning site ของ pTZ57R/T vector และไม่พบการ mutation ของยีนเป้าหมาย (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.9 แสดงแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *EcoRV* และทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1% โดยที่ Lane M คือแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder; Lane U คือ uncut plasmid; Lane 1, 2 และ 3 คือแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *EcoRV*

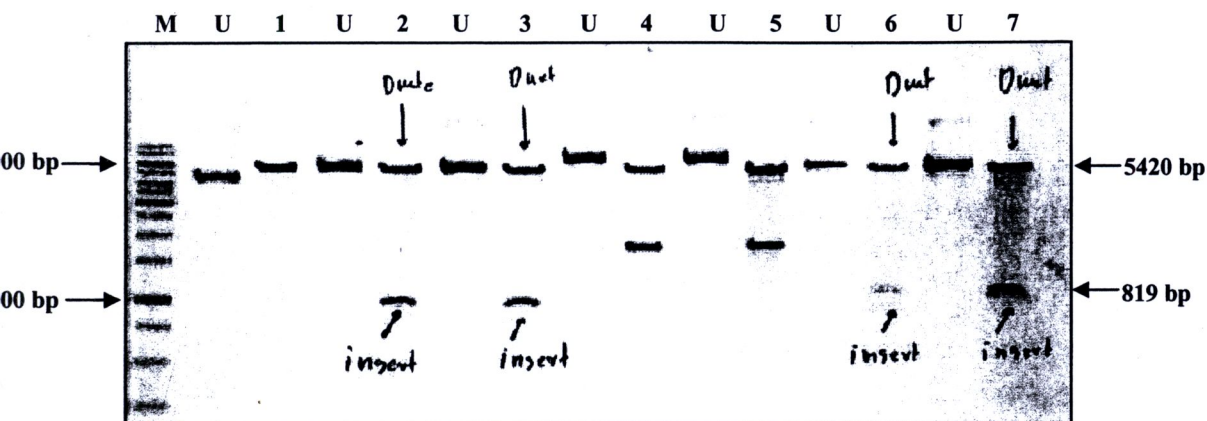


รูปที่ 4.10 แสดงแผนที่ของพลาสมิด pTZ57R/T/*PDPase* และบริเวณที่มีการแทรกสอดของยีน *PDPase* เข้าไปในตำแหน่ง “TA cloning site”

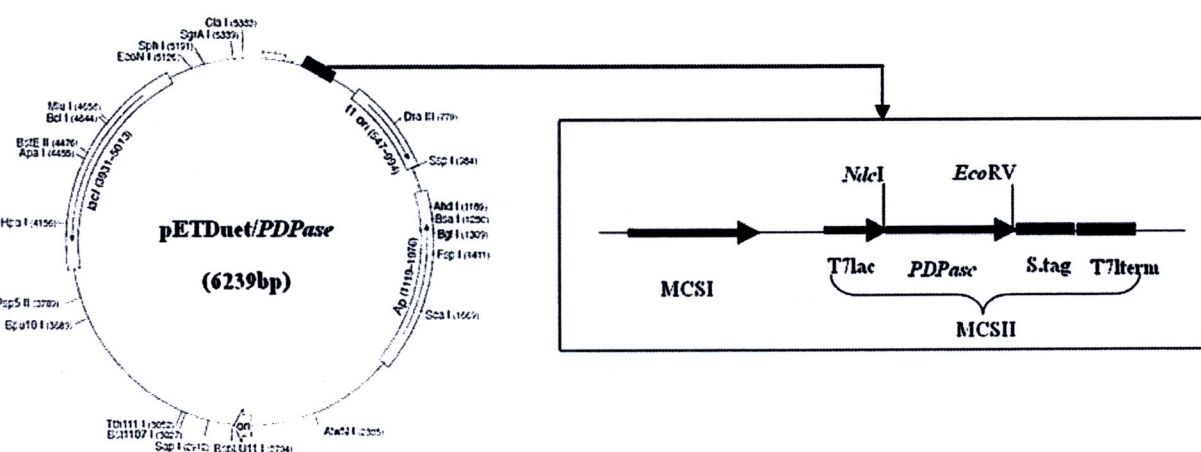
3.2 การโคลน truncate ของยีน *PDPase* เข้าสู่พลาสมิด pETDuet-1 vector

เมื่อนำพลาสมิด pTZ57R/T/*PDPase* มาตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *EcoRV* แล้วเชื่อมต่อกับพลาสมิด pETDuet-1 vector ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน และทำการตรวจสอบการแทรกสอดของยีนเป้าหมายโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่า DNA หมายเลข 2, 3, 6 และ 7 ปรากฏแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *EcoRV* ตามขนาดที่ต้องการคือ 5420 และ 819 bp ตามลำดับ (รูปที่ 4.11)

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PDPase* โดยใช้ไพรเมอร์ DuetUP2 primer และ T7 terminator พบว่ามีการเชื่อมต่อของยีนเป้าหมายเข้าไปในตำแหน่ง *NdeI* และ *EcoRV* บริเวณ MCSII ของ pETDuet-1 vector และถูกขนาบด้วย T7lac promoter และ T7 terminator ในทิศทางและมีเฟรมการแปลรหัสเป็นพอลิเปปไทด์ที่ถูกต้อง (in frame) (รูปที่ 4.12)



รูปที่ 4.11 แสดงแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *EcoRV* และทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยที่ Lane M คือ แถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder; Lane U คือ uncut plasmid; Lane 1, 2, 3, 4, และ 5 คือ แถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *EcoRV*

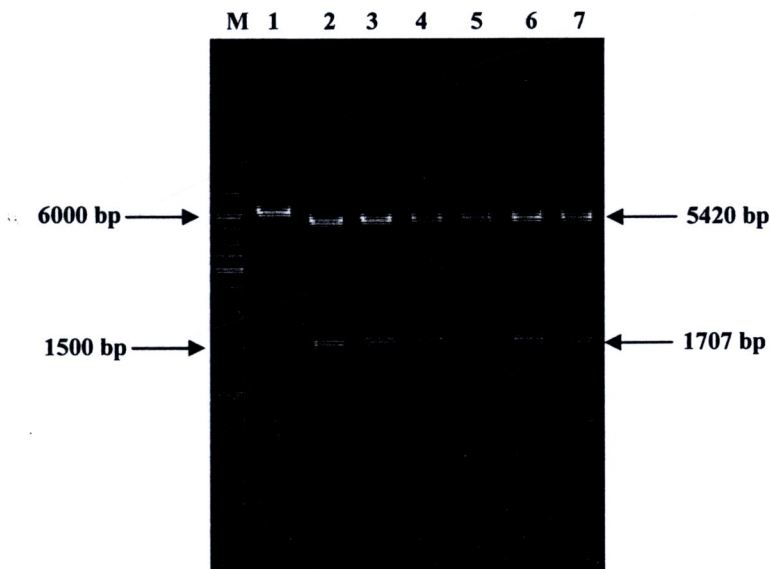


รูปที่ 4.12 แสดงแผนที่ของพลาสมิด pETDuet/PDPase โดยที่ยีนเป้าหมายถูกตัดต่อเข้าไปในบริเวณ *NdeI* และ *EcoRV* ของ MCS2 เชื่อมต่อกับ S-tag ที่ปลาย 5' เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PDPase* โดยใช้ S.tag monoclonal antibody

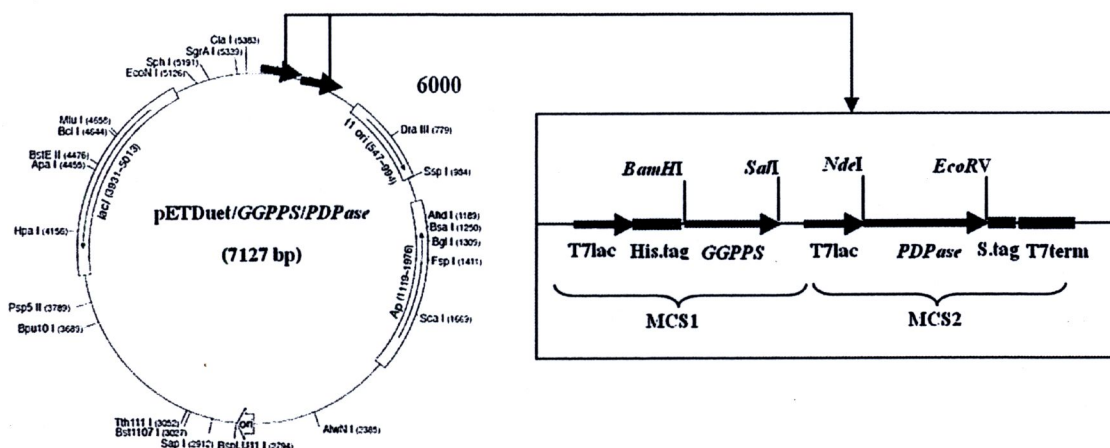
4. การสร้างพลาสมิด pETDuet-1 vector ที่มีการแทรกสอดของยีน *GGPPS* และ *PDPase*

เมื่อทำการเชื่อมต่อ pETDuet/*PDPase* และ truncated *GGPPS* ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RV จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* DH5 α และทำการตรวจสอบการแทรกสอดของยีนเป้าหมายโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่า DNA หมายเลข 2, 3, 6 และ 7 ปรากฏแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RV ตามขนาดที่ต้องการคือ 5420 และ 1707 bp ตามลำดับ (รูปที่ 4.13)

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *GGPPS* และ *PDPase* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ pETUpstream primer และ DuetDOWN 1 primer และ (DuetUP2 primer และ T7 terminator) พบว่ามีการเชื่อมต่อของยีนเป้าหมายเข้าไปในตำแหน่ง MCSI และ MCSII ของ pETDuet-1 vector ในทิศทางและมีเฟรมการแปลรหัสเป็นพอลิเปปไทด์ที่ถูกต้อง (in frame) (รูปที่ 4.14)



รูปที่ 4.13 แสดงแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RV แล้วนำมาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1 % โดยที่ Lane M คือ แถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder, Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 คือแถบ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RV

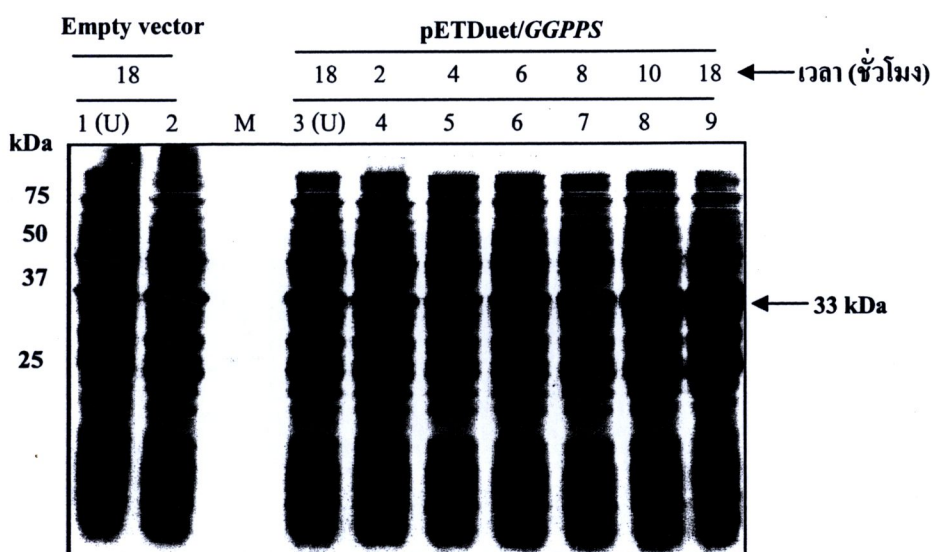


รูปที่ 4.14 แสดงแผนที่พลาสมิด pETDuet/GGPPS/PDPase โดยที่ยีน GGPPS และ PDPase ถูกแทรกสอดเข้าไปตำแหน่ง MCS1 และ MCS2 ของพลาสมิด pETDuet-1 vector ตามลำดับ

5. การแสดงออกของยีนใน *E. coli* BL21(DE3)RIPL

5.1 การแสดงออกของยีน GGPPS ในพลาสมิด pETDuet/GGPPS

จากการนำ *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pETDuet/GGPPS มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน GGPPS พบว่ามีการสร้างโปรตีน GGPPS ที่มีขนาด 33 kDa ตามที่คาดการณ์ไว้ในขณะที่ *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอน pETDuet-1 empty vector ไม่พบแถบโปรตีน (รูปที่ 4.15)



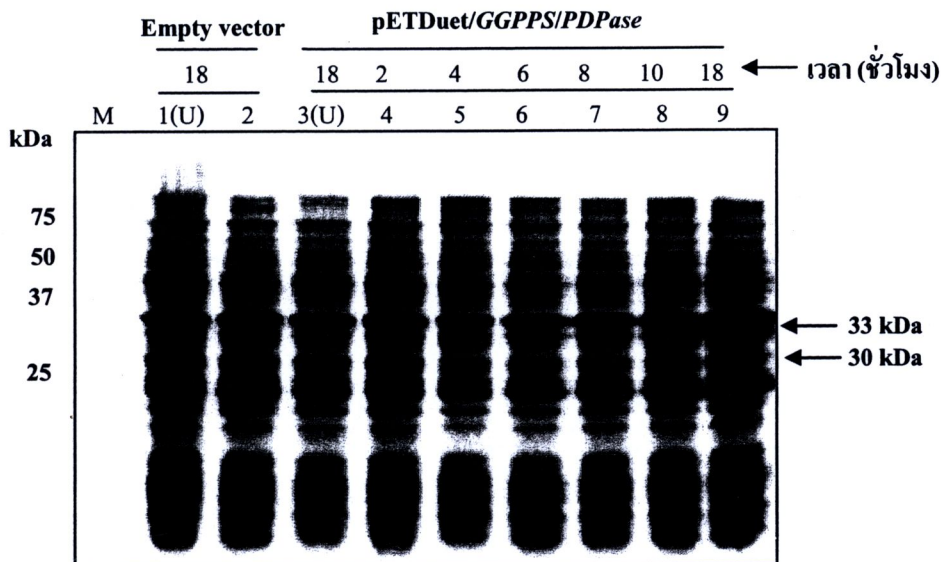
รูปที่ 4.15 แสดงผลการทำ SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GGPPS* ที่เวลาต่างๆ โดย Lane M คือ แถบโปรตีนมาตรฐาน; Lane 1 และ 2 แถบโปรตีนของโคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet-1 empty vector; Lane 3-9 คือแถบโปรตีนของโคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/*GGPPS* โดยที่ U คือ แถบโปรตีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG

5.2 การแสดงออกของยีน *PDPase* จากพลาสมิด pETDuet/*PDPase*

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PDPase* จาก *E.coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/*PDPase* ไม่พบการแสดงออกสร้างโปรตีนเป้าหมายที่มีขนาด 30 kDa และจากการตรวจยืนยันอีกครั้งโดยการทำ western blot พบว่าไม่สามารถตรวจสอบแถบโปรตีนเป้าหมายของ *PDPase* ได้

5.3 การแสดงออกของยีน *GGPPS* และ *PDPase* ในพลาสมิด pETDuet/*GGPPS/PDPase*

เมื่อนำ *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pETDuet *GGPPS/PDPase* มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยการทำ SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีน *GGPPS* ในขนาดประมาณ 33 kDa ตามต้องการ ในขณะที่ไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PDPase* ได้ ควรมีขนาด 30 kDa (รูปที่ 4.16) จากการทำ western blot โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ S-agarose protein ก็ยังไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวได้เช่นเดียวกัน

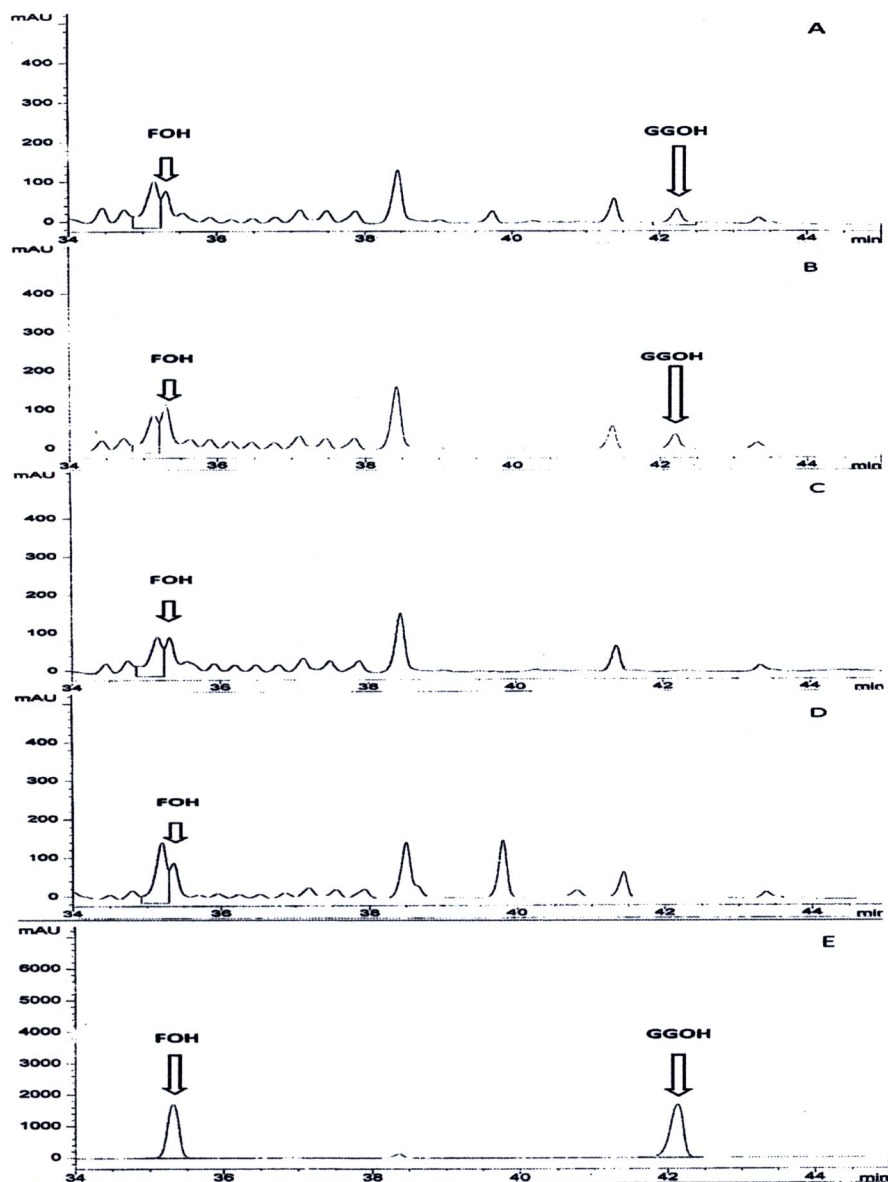


รูปที่ 4.16 แสดงผลการทำ SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GGPPS* และ *PDPase* ที่เวลาต่างๆ โดย Lane M คือ แถบโปรมาตรฐาน; Lane 1 และ 2 แถบโปรตีนของโคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet-1 empty vector; Lane 3-9 คือแถบโปรตีนของโคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/*GGPPS* /*PDPase* โดยที่ U คือแถบโปรตีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วย 1mM IPTG

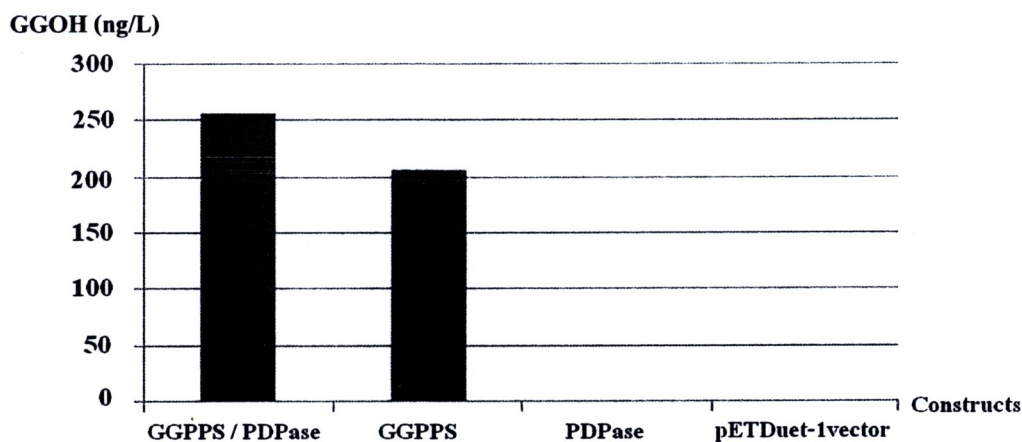
6. การวิเคราะห์ปริมาณ GGOH จากरिकอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีสังเคราะห์ของ GGOH

จากการศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์โดยดูความสามารถในการผลิต GGOH พบว่าโดยใช้เทคนิค HPLC พบว่าโคลนที่ได้รับการพลาสมิด pETDuet/*GGPPS*/*PDPase* สามารถผลิต GGOH ได้ที่ระดับความเข้มข้น 252 ng/L และโคลนที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pETDuet/*GGPPS* สามารถผลิต GGOH ได้ที่ระดับความเข้มข้น 205 ng/L ในขณะที่โคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/*PDPase* และ pETDuet-1 empty vector ไม่พบการผลิต GGOH นอกจากนี้ยังพบว่ามีการผลิต FOH จาก *E. coli* ทุกสายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด (pETDuet/*GGPPS*, pETDuet/*PDPase* และ pETDuet/*GGPPS*/*PDPase*) รวมทั้ง pETDuet-1 empty vector โดยที่รูป

4.17 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ GGOH ที่ตรวจวัดได้จากरिकอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 4 construct



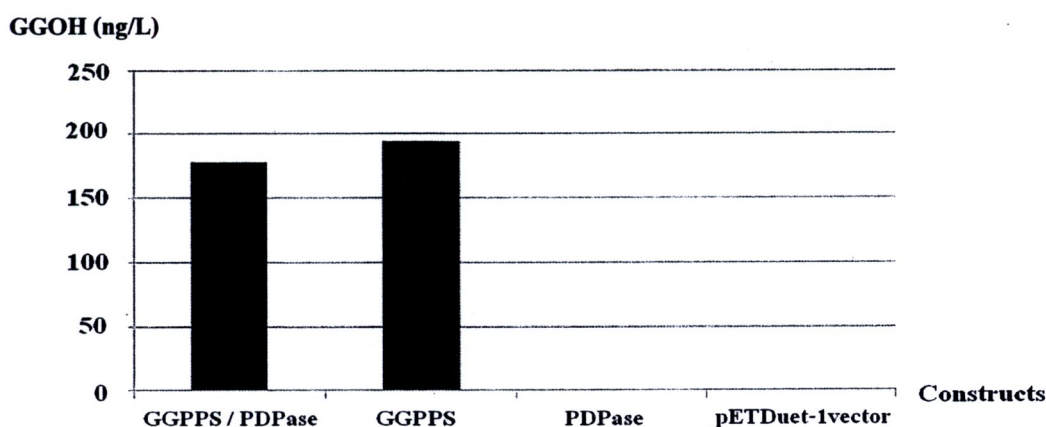
รูปที่ 4.17 แสดง HPLC chromatogram ของรีคอมบิแนนท์ ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในวิธีชีวสังเคราะห์ของ GGOH โดยที่ A คือโคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/GGPPS/PDPase; B คือโคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/GGPPS; C คือโคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/PDPase; D คือ control ที่ได้รับ empty vector และ E คือ chromatogram ของสารมาตรฐาน FOH และ GGOH



รูปที่ 4.18 กราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบปริมาณ GGOH จาก *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH

7. ผลของการเติมกลีเซอรอลลงในเซลล์เพาะเลี้ยงของริคอมบิแนนท์ *E. coli*

จากการเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและตรวจวัดปริมาณ GGOH ที่ผลิตได้ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pETDuet/GGPPS และ pETDuet/GGPPS/PDPase มีการผลิต GGOH ลดลงอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 194.6 และ 178 นาโนกรัมต่อลิตรตามลำดับ ในขณะที่ *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอน pETDuet/PDPase และ pETDuet-1 empty vector ไม่พบการผลิต GGOH (รูปที่ 4.19)

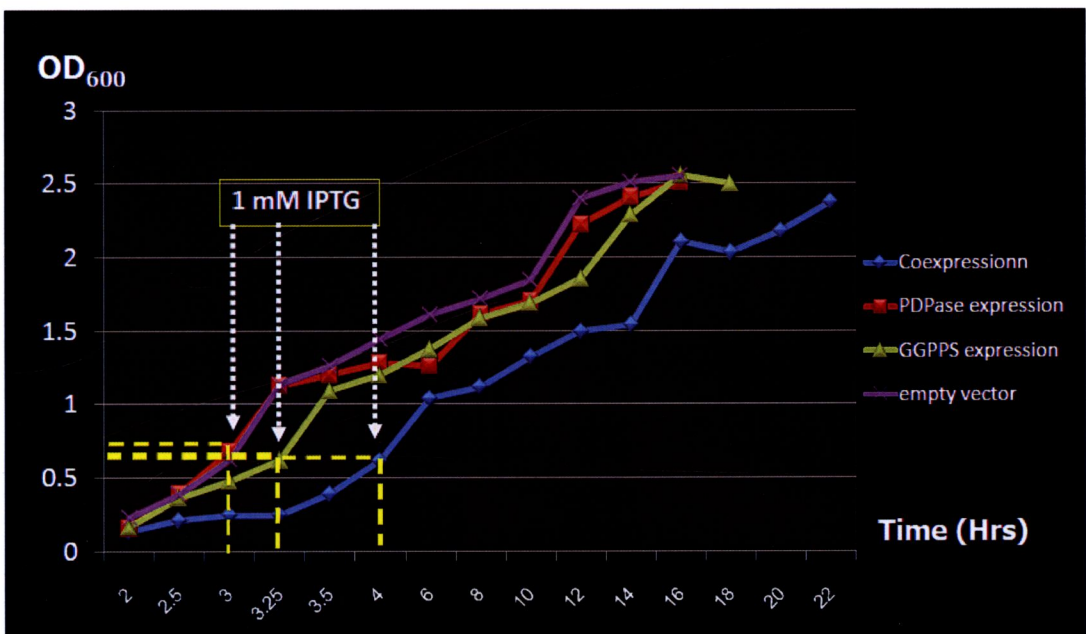


รูปที่ 4.19 กราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบปริมาณ GGOH จาก *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอน ยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH ที่ผ่านการทำ feeding ของ กลีเซอรอล

8. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของริคอมบิแนนท์ *E. coli*

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของริคอมบิแนนท์ *E. coli* พบว่าขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอ (size) มีผลต่อการเจริญเติบโตของริคอมบิแนนท์ *E. coli* ในช่วงก่อน log phase โดยโคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/GGPPS/PDPase ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง ในขณะที่โคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/GGPPS ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง 15 นาที ส่วนโคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/PDPase และ pETDuet-1 empty vector ใช้เวลาเพียง 3 ชั่วโมง

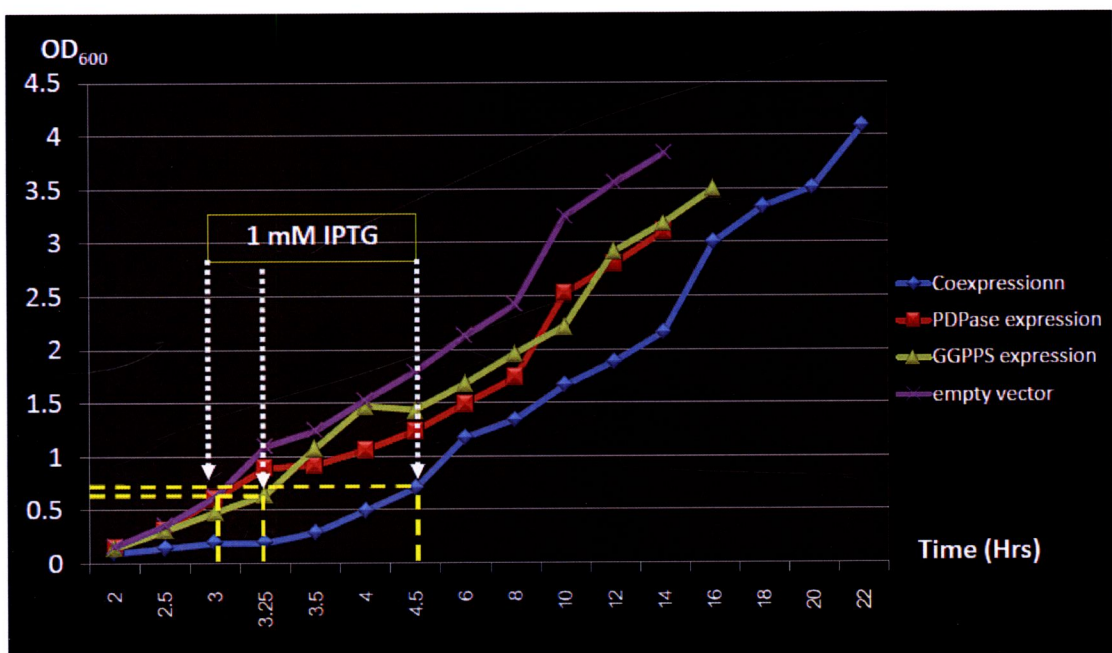
อัตราการเจริญเติบโตหลังจากที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายด้วย 1 mM IPTG (ที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.6-0.8) พบว่า *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอน พลาสมิด pETDuet/GGPPS, pETDuet/PDPase และ pETDuet-1 empty vector มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยโคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/GGPPS/PDPase มีอัตราการเจริญเติบโตช้าที่สุด (growth inhibition) (รูปที่ 4.22)



รูปที่ 4.20 อัตราการเจริญเติบโตของริคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH โดยที่ถูกรบกวนแสดงเวลาที่เติม IPTG เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย

9. อัตราการเจริญเติบโตของริคอมบิแนนท์ *E. coli* ในอาหารเหลวที่มีกลีเซอรอล

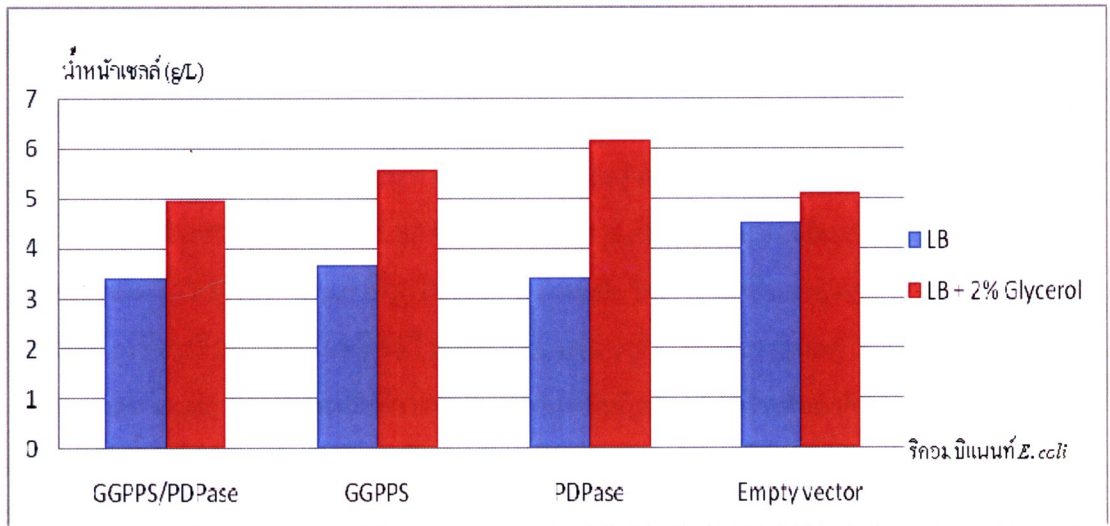
เมื่อเติมกลีเซอรอลลงไปในการเลี้ยง *E. coli* และทำการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของริคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH พบว่าขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตก่อนถึงช่วง log phase พบว่า *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pETDuet/*PDPase* และ pETDuet-1 empty vector ใช้เวลาเพียง 3 ชั่วโมง ในขณะที่โคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/*GGPPS* ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง 15 นาที และ *E. coli* BL21 (DE3) RIPL ที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/*GGPPS/PDPase* ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง 30 นาที ก่อนถึงช่วง log phase โดยที่อัตราการเจริญเติบโตหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย 1 mM IPTG พบว่า *E. coli* ทุกสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ยกเว้นโคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/*GGPPS/PDPase* เกิดขบวนการ cell growth inhibition (รูปที่ 4.21)



รูปที่ 4.21 อัตราการเจริญเติบโตของริคอมบิแนนท์ *E. coli* ในอาหารเหลว LB ที่มีกลีเซอรอล โดยถูกสรแสดงระยะเวลาที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วย 1 mM IPTG

10. การเปลี่ยนแปลงค่าชีวมวลของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในอาหารที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอล

จากการเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเหลว LB พบว่ารีคอมบิแนนท์ *E. coli* ทุกสายพันธุ์มีการเพิ่มขึ้นของค่าชีวมวล เมื่อเทียบกับค่าชีวมวลของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในอาหารเหลว LB ที่ไม่มีส่วนผสมของกลีเซอรอล (รูปที่ 4.22)



รูปที่ 4.22 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าชีวมวลของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ใน อาหารเหลวสูตรต่างๆ