สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

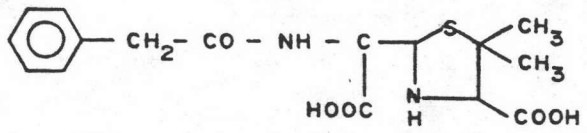
1.1 ความสำคัญของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส

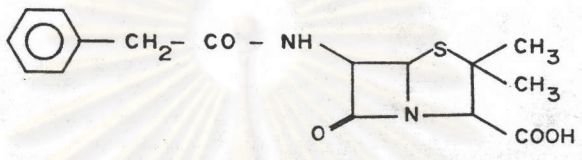
เอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส เป็นเอนไซม์ในการย่อยสลายยาในกลุ่มเพนนิซิลิน ซึ่งได้แก่ เพนนิซิลิน วี, เพนนิซิลิน จี และแอมพิซิลิน ผลผลิตสำคัญที่ได้คือ 6-Aminopenicillanic acid (6-APA) (รูปที่ 1) สารประกอบนี้นำไปใช้เป็นสารตั้งต้อ ในการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะที่เป็นอนุพันธ์ของเพนนิซิลินอีกมากมาย (รูปที่ 2) (Vandamme และ Voets, 1974; Daumy และคณะ, 1985) ดังนั้น 6-APA จึงเป็นสารมัธยันตรของอุตสาหกรรม การผลิตยาอนุพันธ์เพนนิซิลินโดยปริยาย (Vandamme และ voets, 1974)

ในระยะเริ่มแรก การสังเคราะห์ 6-APA อาศัยกระบวนการเคมี ซึ่งได้เผชิญข้ออุปสรรคในการผลิต (Rolinson และคณะ, 1960) ทำให้ราคาของ 6-APA ค่อนข้างสูง จึงได้มีความพยายามที่จะผลิต 6-APA ที่มีราคาถูกขึ้น กระบวนการผลิต 6-APA ทางชีวภาพ จึงเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง นำมาซึ่งการค้นพบว่า เอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญของการผลิต 6-APA จากเพนนิซิลิน จี เอนไซม์ตัวนี้ผลิตได้จากแบคทีเรีย เช่น*E. coli* ATCC 11105, *E.coli* ATCC 9637, *Bacillus megaterium* และ *Proteus rettgeri* เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อราบางชนิดก็สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้เช่นกัน (Vandamme, 1980)

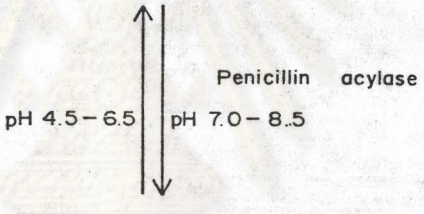
เพื่อให้กระบวนการผลิตทางชีวภาพ มีความเป็นไปได้ทางเศรษฐกิจ เช่นเดียวกับกระบวนทางเคมี การผลิต เพนนิซิลิน เอซิเลสให้ได้ในราคาถูกจึงเป็นตัวแปรสำคัญของกระบวนการผลิตทางชีวภาพ หลักการสำคัญของกระบวนการที่ต้องคำนึงถึงก็คือ

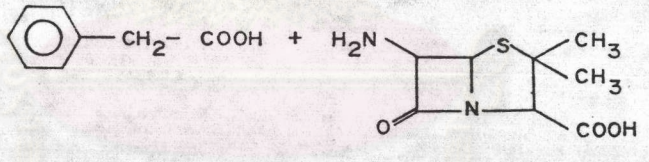
ก. สายพันธุ์นั้นไม่ควรผลิตเอนไซม์ปิตาแลคตาเมส เพราะว่าจะใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรทเช่นเดียวกันกับเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ดังนั้นจึงเป็นการแย่งจับสับสเตรทกับเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสโดยตรง





Penicillin G



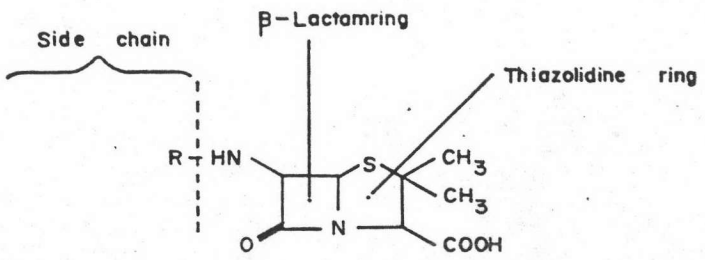


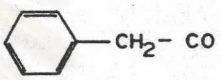
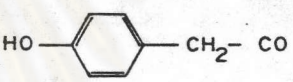
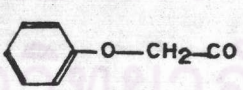
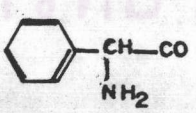
Phenylacetic acid (PAA) 6 – Aminopenicillanic acid (6 – PAA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 ปฏิกิริยาของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสและเอนไซม์บีตา – แลคตาเมส

(Vandamme และ Voets , 1980)



Penicillin	R
Benzyl (G)	
p – Hydroxybenzyl (X)	
2 – Pentenyl (F)	$CH_3CH_2CH=CHCH_2CO$
n – Amyl (dihydro – F)	$CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2CO$
n – Heptyl (K)	$CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CO$
L – δ – Aminoadipyl (iso – N)	$\delta - HOOCCH(NH_2)(CH_2)_3CO$
Phenoxymethypenicillin (V)	
D α aminobenzylpenicillin (ampicillin)	
6 – Aminopenicillanic acid	H

รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของเพนนิซิลิน (Vandamme และ Voets, 1974)

ข. ตัวแปรของการ Optimization ที่ให้เอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลสสูง จะต้องให้ราคาต้นทุนต่ำ เช่น จุลชีพที่ใช้ต้องเจริญได้รวดเร็ว สารอาหารที่ใช้ราคาถูก อุณหภูมิเหมาะสม เช่นนี้เป็นต้น

ค. เพิ่มศักยภาพในการสังเคราะห์ของเซลล์ให้สูงขึ้น โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วย ในปัจจุบันการตัดยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสต่อเข้ากับพลาสมิดดีเอนเอพาหะที่เหมาะสม จะช่วยลดราคาผลิตของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสให้ราคาถูกลง

ได้มีการศึกษาวิจัยหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมทั้งในแบคทีเรียแกรมบวก เช่น Bacillus megatarium, Proteus rettgeri และในแกรมลบ เช่น E.coli ATCC 11105 เป็นต้น (McCullough , 1985 ; Vandamme และ Voets, 1974)

จากการศึกษาพบว่า E.coli ATCC 11105 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับงานวิจัยเกี่ยวกับการตัดต่อยีน เพราะเทคนิคต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับ E.coli เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ทั้งทางด้านพลาสมิดดีเอนเอพาหะ, แผนผังเรสตริกชั่น หรือ ความรู้ทั่วไปอื่น ๆ รวมทั้งการเลือกตัดต่อยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสที่อาจทำได้ง่าย เนื่องจากมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสเบื้องต้นได้สะดวก และง่ายดายโดยการทำ Microbiogical test (Mayer และคณะ, 1979; Bruns และคณะ 1985; Meevootisom และคณะ, 1983) รวมทั้งวิธีการวัดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสก็ยังสามารถวัดได้สะดวก โดยให้สับสเตรททำปฏิกิริยากับเซลล์โดยตรง (Szewezuk และคณะ, 1980; Balasingham และคณะ, 1982)

ในปี 1979 Mayer และคณะได้สร้างสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลสโดยอาศัยวิธีทางพันธุวิศวกรรมได้สำเร็จ แม้ว่าครั้งแรกจะได้สายพันธุ์ที่ต้องการตัวชักนำ (inducer) ในการสร้างเอนไซม์ และพบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสต่ำกว่าในสายพันธุ์ E.coli ATCC 11105 ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์แม่ แต่หลังจาก subclone แล้วก็ประสบความสำเร็จในการพบสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสสูงขึ้น และไม่ต้องการตัวชักนำ และหลังจากทำ UV mutagenesis สายพันธุ์ดังกล่าวแล้วทำให้ได้คุณสมบัติเป็น Catabolic derepress อีกลักษณะหนึ่งด้วย สายพันธุ์นี้ชื่อว่า E.coli 5K/pHM12 (Mayer และคณะ, 1979; Mayer และคณะ, 1980)

ต่อมาได้นำสายพันธุ์ดังกล่าวไปจดลิขสิทธิ์ (Bruening และคณะ, 1983) และได้นำไปเลี้ยงในระดับเฟอร์เมนเตอร์ (Schomer และคณะ, 1984)

ในขณะเดียวกันนั้นที่เกาหลีก็ได้ตีพิมพ์ผลการทดลองโดยการสร้าง Recombinant DNA ของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสจาก E.coli ATCC 11105 เช่นกัน และพบสายพันธุ์ใหม่ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงกว่า E.coli ATCC 11105 ถึง 20 เท่า (Chang และคณะ, 1983)

และในปีค.ศ. 1985 ที่หน่วยวิจัยพันธุวิศวกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ ก็ได้สร้าง Recombinant DNA โดยนำยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสจาก E.coli ATCC 11105 แต่ใช้พลาสมิดตีเอนเอพาหะต่างจากการทดลองของ Mayer และ Chang จากการวิจัยสามารถพบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ชื่อ Q69 และ S5 ซึ่งมีแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสสูงกว่า E.coli ATCC 11105 ประมาณ 9 และ 17 เท่าตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมจะเข้ามามีบทบาทสำคัญในการสร้างสายพันธุ์ใหม่ ให้มีศักยภาพทางอุตสาหกรรมสูง แต่ก็มีปัญหาที่สำคัญติดตามมานั่นคือ ความเสถียรในการสร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และความเสถียรของพลาสมิดตีเอนเอ ดังเช่น Schomer และคณะได้ประสบปัญหาดังกล่าวอยู่กับ E.coli 5K/pHM 12 พบว่าเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ดังกล่าวใน batch fermenter 3-6 วัน แอคติวิตีเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิลสลดลงจนเหลือ 14% จากแอคติวิตีเริ่มต้น และพบเซลล์เพียง 7% ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์นี้อยู่ (Schomer และคณะ, 1984) เหตุการณ์ที่คล้ายคลึงกันนี้ก็เกิดขึ้นกับสายพันธุ์ Q69 และ S5 ที่นางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริสร้างขึ้นเช่นกัน

1.2 ชีวเคมีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสลายเพนนิซิลิน จี ให้ได้ 6-APA และ PAA แล้วยังสามารถเร่งปฏิกิริยาผกผันกลับในสภาวะที่เป็นกรด pH 4.5-6.5 (รูปที่ 1) (Vandamme และ Voets, 1974)

พบว่าน้ำหนักโมเลกุลจากเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสที่แยกจากจุลชีพต่างชนิดกันจะต่างกัน รวมทั้งจลศาสน์ของปฏิกิริยาที่ให้ค่า Km ต่างกันด้วย เช่น เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสจาก Bacillus megaterium ATCC 14945 จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 120,000

ค่า Km เท่ากับ 4.5 ในขณะที่จาก E.coli ATCC 11105 มีน้ำหนักโมเลกุล 70,000 ประกอบด้วย 2 subunit คือ 65,000 และ 25,000 และมีค่า Km เท่ากับ 0.02 เป็นต้น (Vandamme, 1980) ในกรณีของ E.coli ATCC 11105 นี้ยังพบอีกว่า PAA เป็นตัวชักนำ (inducer) พร้อมกันนั้นยังเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition) มี 6-APA เป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive inhibition) และ เพนนิซิลิน จี ก็เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาด้วยเช่นกัน (Schomer และคณะ, 1984)

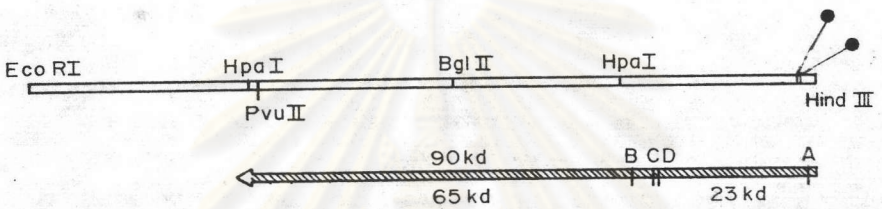
1.3 ยีน การถอดรหัส และการแปลรหัสของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

1.3.1 ยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส

ในปีค.ศ. 1925 Bruns และคณะได้ศึกษาโครงสร้างของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส บนพลาสมิดดีเอนเอ pHM 12 อย่างละเอียด โดยที่ยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส ดังกล่าวนั้นได้ตัดมาจาก E.coli ATCC 11105 หลังจากทรานสฟอร์ม พลาสมิดดีเอนเอ pHM 12 เข้า E.coli 5Kแล้ว พบทรานสฟอรแมนท์ที่ไม่ต้องการ PAA ในการชักนำ คณะดังกล่าวจึงตั้งสมมติฐานว่าregulatory gene ของโอเปอรอน เพนนิซิลิน เอซิเลสนั้นถูกตัดออกไปแล้ว (Bruns และคณะ, 1985; Mayer และคณะ, 1980)

และเนื่องจากยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส ที่อยู่บนพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ที่นางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริได้สร้างขึ้นนี้ ได้ใช้ตำแหน่งตัดคล้ายคลึงกับในการทดลองของ Bruns และคณะ และพบทรานสฟอรแมนท์ที่มีสมบัติคล้ายคลึงกับ E.coli 5K/pHM 12 ดังนั้นสมมติฐานดังกล่าวของ Bruns และคณะจึงน่าจะใช้อธิบายกับปรากฏการณ์ของ pJR_{69} ได้เช่นกัน

โครงสร้างของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส (รูปที่ 3)ที่ได้จากการรายงานของ Bruns และคณะ พบว่าตำแหน่งของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสส่วนที่ถอดรหัสให้เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส นั้นจะมีขนาด 2.575 กิโลเบสจากปลาย Hind III มีตำแหน่งของ ribosom binding site 2 ตำแหน่งอยู่ติดปลาย Hind III ตำแหน่งของ promotor gene จะอยู่ถัดมา ribosome binding site เข้ามาอีก 40 bp ส่วนที่เหลือจะเป็นยีนโครงสร้างของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส (Bruns และคณะ, 1985)



● Ribosome binding site

รูปที่ 3 แสดงแผนผังเรสตริกชั่นและการถอดรหัสของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสจาก pHM12ซึ่งสร้างขึ้นโดย Bruns และคณะ (1985)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.2 การควบคุมการถอดรหัส และการแปลรหัสของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส

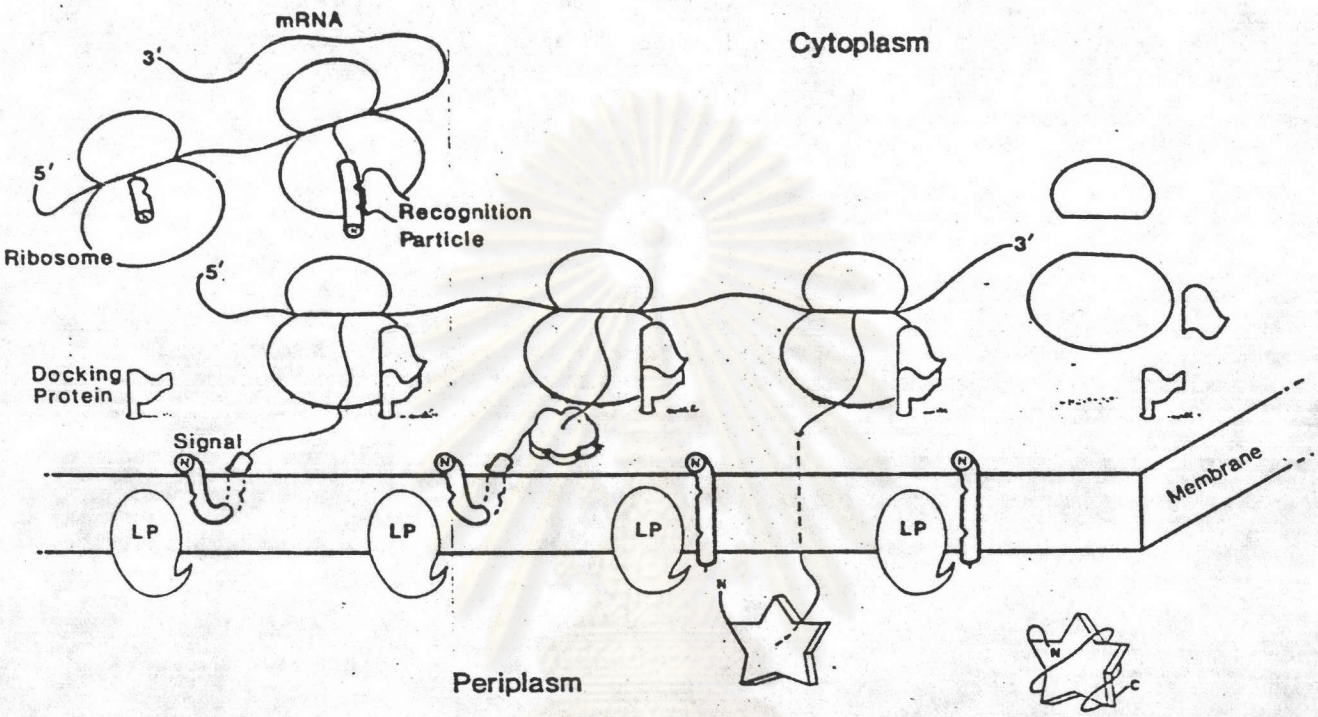
การถอดรหัสของเพนนิซิลิน เอซิเลสใน E.coli ATCC 11105 ต้องการ PAA เป็นตัวชักนำ (inducer) และจะถูกกดดันด้วย glucose ในลักษณะของ catabolic repression (Vandamme และ Voet, 1974)

สำหรับการแปลรหัส ของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส นี้ จะมีลักษณะค่อนข้างจะพิเศษ เพราะเหตุว่า เอนไซม์นี้อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ที่ต้องการ การmaturation ในผนังเซลล์ชั้น periplasm (Bruns และคณะ, 1985) ดังนั้นการแปลรหัสของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสนี้จะเป็นแบบ ribosome associated membrane การแปลรหัสในลักษณะนี้ mRNA ที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกนำไปแปลรหัสที่บริเวณผนังเซลล์ชั้นใน หลังจากแปลรหัสเรียบร้อยแล้วสาย poly peptide จะเคลื่อนเข้าสู่ชั้น periplasm ด้วยการนำของ leader peptide (รูปที่ 4) (Randall และ Hardy, 1977)

1.3.3 การ maturation ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

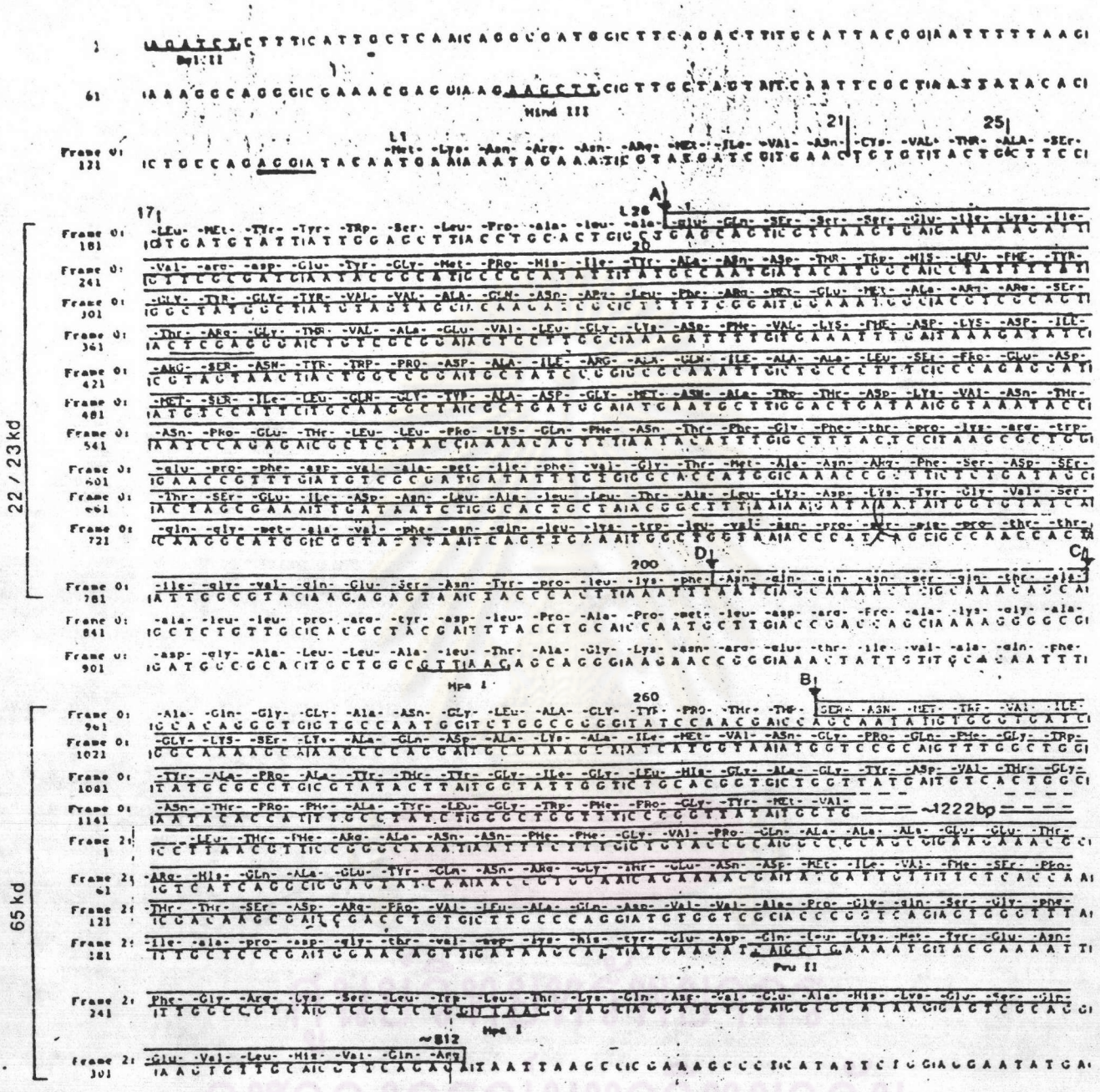
การ maturation โดยทั่วไปจะมีขั้นตอนที่สำคัญ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการนำสาย polypeptide ที่เป็น proenzyme ผ่านผนังเซลล์ชั้นในเข้าสู่ชั้น periplasm ของผนังเซลล์โดยการนำของ leader peptide ในขั้นตอนนี้ต้องการพลังงานจาก proton motive force (Enequist และคณะ, 1981) หลังจากสาย proenzyme เคลื่อนเข้าสู่ชั้น periplasm leader peptide จะถูกตัดทิ้งด้วย leader peptidase ทันที ขั้นตอนที่สองเป็นการตัดสาย proenzyme ให้กลายเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้โดยอาศัย proteolytic enzyme ที่อยู่ใน periplasm นั้นเอง (Enequist และคณะ, 1981, Randall และ Handy, 1977)

ในกรณีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส มี proenzyme ขนาด 90 Kd. โดยมี leader peptide เป็น hydrophobic ขนาดประมาณ 26 amino acid อยู่ติดกับ N-terminal (รูปที่ 5) (Bruns และคณะ, 1985) เมื่อ leader peptide นำสาย proenzyme ของเพนนิซิลิน เอซิเลส ส่งเข้า periplasm แล้ว ตัวมันจะถูกตัดออกที่ตำแหน่ง A (รูปที่ 5) จากนั้นสาย proenzyme นี้จะถูกตัดที่ตำแหน่ง B, C และ D (รูปที่ 5) เป็นขั้นตอนหลังจากนั้นจะได้เอนไซม์ที่ทำงานได้ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ขนาด 65 kd และ 23 kd



รูปที่ 4 สมมุติฐานของการนำสาย Proprotein ผ่านinnermembrane เข้าสู่ส่วน periplasm ของผนังเซลล์โดยการนำของ leader peptide

(Randall และ Hardy , 1985)



รูปที่ 5 สมมุติฐานของการตัดเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสจาก E. coli ATCC11105 อย่างเป็นขั้นตอนโดย Proteolytic enzyme (Bruns และคณะ, 1985)

↓ คือตำแหน่งการตัดของ Proteolytic enzyme

นอกจากเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส แล้วยังมีเอนไซม์อื่น ๆ เช่น ปิตา-แลคตาเมส และอัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส เป็นต้น ที่ต้องการขั้นตอนที่คล้ายคลึงกับ เพนนิซิลิน เอซิเลส (Josefsson และ Randall, 1981; Randall และคณะ, 1977)

1.4 ปัญหาเกี่ยวกับการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของสายพันธุ์ Q69 และ S5

1.4.1 การสร้าง pJR_{69}

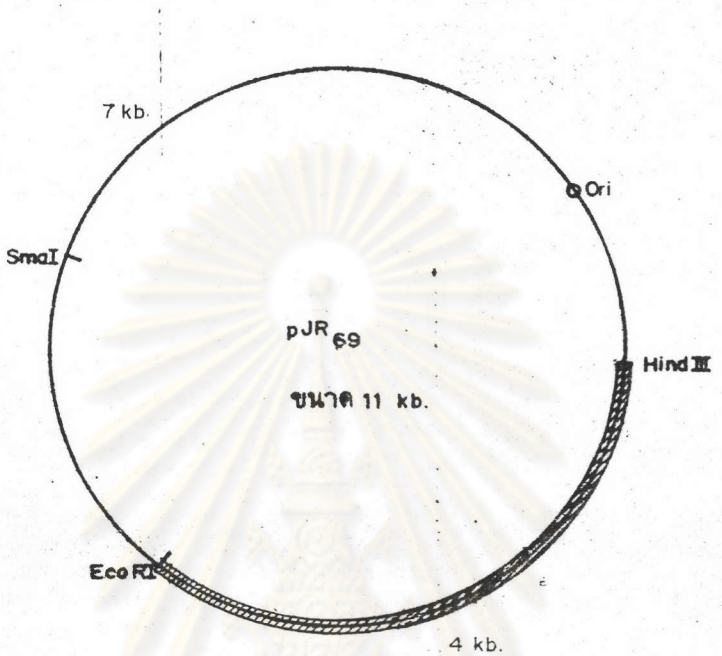
นางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริได้สร้าง pJR_{69} รูปที่ 6 โดยการตัดยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสจาก E.coli ATCC 11105 มาเชื่อมกับชิ้นส่วนของพลาสมิดตีเอนเอ pSY343 ได้ pJR_{69} ขนาด 11 กิโลเบส สายพันธุ์ที่มี pJR_{69} อยู่ชื่อว่า Q69 หลังจากนำ Q69 ไปทำ NTG mutagenesis พบสายพันธุ์ใหม่คือ S5 ซึ่งมี pJR_{69} นี้สามารถเพิ่มจำนวนพลาสมิดตีเอนเอได้โดยใช้คุณสมบัติเช่นเดียวกับ pSY343 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการเลี้ยงเป็น 37° ซ นอกจากนั้นยังคาดว่า pJR_{69} สามารถถอดรหัสของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส ได้เช่นเดียวกับ E.coli ATCC 11105

1.4.2 สมบัติเดิมของ pJR_{69}

จากงานวิจัยของนางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ พบว่าสายพันธุ์ S5 ซึ่งมี pJR_{69} อยู่นั้นสามารถเจริญได้ดีบนอาหารสูตร LB เสริม เพนนิซิลินจี 200 µg/ml นอกจากนั้นยังเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์โดยไม่ต้องการ PAA เป็นตัวชักนำ และปลอดจากการกดดันของ glucose เมื่อเจริญ S5 ในอาหารสูตร LB เสริม glucose 0.2% พบการเจริญสูงสุดมีความขุ่น 420 KU และให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่า E.coli ATCC 11105 ถึง 17 เท่า (รูปที่ 8)

1.4.3 ปัญหาที่ตามมาภายหลังจากได้ดำเนินการวิจัยไปแล้ว

ได้นำสายพันธุ์ Q69 และ S5 มาทดสอบการเจริญ และแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยเลียนแบบการทดลองของนางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ ปรากฏว่ารูปแบบของการเจริญ และแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ต่างไปจากรูปแบบของ Q69 และ S5 ที่เคยรายงานไว้อย่างมาก (รูปที่ 7 และ 8) โดยเฉพาะแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสจะลดลงเหลือประมาณ 1 ใน 3 ในกรณีของ Q69 (รูปที่ 7) และ 1 ใน 5 ในกรณีของ S5 เมื่อเทียบกับค่าที่เคยรายงานไว้ (รูปที่ 8) เมื่อ subculture ต่อไป พบว่า



ส่วนที่ตัดมาจาก E.coli ATCC 11105

ส่วนที่ตัดมาจาก pSY 343

รูปที่ 6 แผนผังเรสตริกชั่นคร่าว ๆ ของ pJR_{69} (จากวิทยานิพนธ์ของ นส. จรัญญา เงินประเสริฐศิริ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทั้งQ69 และ S5 ได้สูญเสียทั้งแอคติวิตีของเอ็นไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส และพลาสมิดดีเอนเอโดยสิ้นเชิง

1.5 แนวทางที่ทำให้เกิดความไม่เสถียรของพลาสมิดดีเอนเอ

ด้วยเหตุว่าปัจจัยที่ทำให้เกิดความไม่เสถียรของพลาสมิดดีเอนเอมีหลายปัจจัย เช่น ลักษณะ genotype ของเซลล์เจ้าเรือน, โครงสร้างของยีนและพลาสมิดดีเอนเอ และสภาวะการเจริญของเซลล์ (Noack และคณะ, 1981) เป็นต้น ในกรณีที่ใช้เซลล์เจ้าเรือนเป็น recA$^-$ จะป้องกันการเข้ารวม (recombine) ของพลาสมิดดีเอนเอเข้าโครโมโซมดีเอนเอของเจ้าเรือนได้ และเมื่อเป็น rel A ก็จะทำให้พลาสมิดดีเอนเอ แบ่งตัวได้อย่างอิสระ (Noack และคณะ, 1981) นอกจากนั้น อาหารที่ใช้เลี้ยงจะต้องไม่มีผลต่อการจำกัดการ replication ของดีเอนเออีกด้วย (Noack และคณะ, 1981; Caucott และคณะ, 1985)

ปัจจัยที่ควบคุมได้มากที่สุดคือ โครงสร้างของยีน และโครงสร้างของพลาสมิดดีเอนเอ มักจะพบกับเหตุการณ์ที่ไม่คาดคิดอยู่เสมอ เช่นในปี 1985 Caulcott และคณะได้รายงานว่าพลาสมิดดีเอนเอจะเสถียรขึ้น ถ้ารักษาให้มีจำนวน copy ต่ำ ๆ ในเซลล์ และถ้ามีการแปลรหัสของ recombinant gene ในปริมาณมากแล้วนั้น ก็จะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พลาสมิดดีเอนเอไม่เสถียรยิ่งขึ้น นอกจากนั้น การเปลี่ยนลำดับของเบสบนพลาสมิดดีเอนเอ จะด้วยวิธีการ spontaneus mutation หรือ การตัดต่อยีนก็ตาม สิ่งเหล่านี้ก็เป็นเหตุแห่งการไม่เสถียรของพลาสมิดดีเอนเอทั้งสิ้น (Caulcott และคณะ, 1985) นอกจากปรากฏการณ์ต่าง ๆ เหล่านี้จะพบใน E.coliแล้ว ก็ยังพบในแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ และ Yeast อีกด้วย สำหรับใน Yeast นั้นพบว่า ความไม่เสถียรของพลาสมิดดีเอเอ จะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการเจริญเริ่มต่ำลงหลังระยะ log phase (Kleinman และคณะ, 1987)

1.6 แนวความคิดในการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส จาก pJR_{69}

1.6.1 การตัดดีเอนเอส่วนที่ไม่จำเป็นในการสร้างเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ออกจากยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส

จากการทดลองของ Yasuda และ Takagi ได้ทดลองเชื่อมยีน dna Z เข้ากับพลาสมิดดีเอนเอ pSY343 โดยตัดยีนส่วนของ dna Z ที่ไม่จำเป็นออกบางส่วน แล้วนำยีนส่วนของ dna Z ที่เหลือนั้นมาต่อ linker เชื่อมกับพลาสมิดดีเอนเอ pSY343 พบว่าได้

ได้แอคติวิตีของ dna Z เพิ่มขึ้นถึง 100 เท่าเมื่อเทียบกับแอคติวิตีของ dna Z ที่ได้จาก dna Zที่ต่อเข้ากับพลาสมิดดีเอนเอตัวเดียวกัน แต่ไม่ตัดยีนส่วนใด ๆ ของ dna Zออก (Yasuda และ Takagi, 1983) นอกจากนี้ยังมีการทดลองของ Matsuda และ Komatsu ในปีค.ศ. 1985 โดยทำการตัดยีนสำหรับ 7β-(40Carboxybutanamido) Cephalosporanic acid acylase จาก Pseudomona spp มาเชื่อมกับพลาสมิดดีเอนเอ pBR325 แล้วทรานสฟอรมเข้า E.coli ได้ทรานสฟอรแมนท์ที่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวในระดับต่ำ แต่เมื่อตัดดีเอนเอที่ไม่จำเป็นบนยีนดังกล่าวออกบางส่วน ก็พบว่าเอนไซม์แอคติวิตีสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Matsuda และ Komatsu, 1985)

ด้วยเหตุนี้จึงได้ตั้งสมมติฐานว่า ถ้าตัด ดีเอนเอที่ไม่จำเป็นจาก pJR_{69} ซึ่งมีอยู่ถึง 1 กิโลเบส ออกบ้าง อาจจะได้พลาสมิดดีเอนเอตัวใหม่ที่มีลักษณะเหมาะสม และเอื้ออำนวยให้สร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้มากขึ้น

1.6.2 การต่อยีนที่จำเป็นต่อการแปลรหัสของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส

จาก Patent ของ Bruening และคณะในปี 1984 ได้กล่าวถึงการต่อ Strong promotor ให้กับยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส เป็นผลให้ได้ทรานสฟอรแมนท์ที่เพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้มากถึง 0.1 กรัมต่อลิตรฟอร์เมนเตอร์ ดังนั้นถ้างานวิจัยนี้ต้องการใช้หลักการเชื่อม strong promotor ให้กับยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส ดังเช่น Bruening และคณะ ก็จะต้องหาแผนผังเรสตริกชั่นของ pJR_{69} อย่างละเอียด เพื่อจะหาตำแหน่งเหมาะสมที่จะสามารถนำ strong promotor ที่มีขายอยู่เช่น lac promotor หรือ tac promotor มาเชื่อมให้กับโอเปอรอนของเพนนิซิลิน เอซิเลสบน pJR_{69}

1.6.3 วิธีการ Site directed mutagenesis

Site directed mutagenesis คือการกลายพันธุ์ชิ้นส่วนเล็ก ๆ ของดีเอนเอในหลอดทดลอง โดยใช้วิธีการกลายพันธุ์ด้วยวิธีที่เหมาะสม

จากแนวคิดที่ว่าอาจจะสร้าง strong promotor ให้กับโอเปอรอนของเพนนิซิลิน เอซิเลสบน pJR_{69} ได้โดยการ ทำให้ promotor ของโอเปอรอนเพนนิซิลิน เอซิเลสที่มีอยู่แล้วนั้นมีเบส adenin และ thyamine มากขึ้น (A=T rich) ซึ่งลักษณะจาก

A=T rich นี้เป็นลักษณะที่พบมากใน strong promotor โดยทั่วไป (Stryer, 1981)

การกลายพันธุ์ที่น่าสนใจ และอาจจะเลือกมาทำการกลายพันธุ์ เช่น sodium bisulfite สารเคมีตัวนี้จะไปมีผลเร่งการ deamination ของ cytosin ไปเป็น uracil (Hayatsu และ Miuva, 1970; Kai และ Hayatsu, 1974) ต่อมาในปีค.ศ. 1978 Shortte และคณะทำการทดลอง local mutagensis โดยใช้ sodium bisulfite กับ SV40 formI DNA ปรากฏว่าเกิด deamination ของ cytosin ไปเป็น uracil ได้มากกว่า 50% บนบริเวณดีเอนเอสายเดี่ยวที่สร้างขึ้น (Shortte และ Nathans, 1978) ดีเอนเอสายเดี่ยวอาจทำได้โดยใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมตัดเพื่อสร้าง gapped DNA ขึ้น แล้วจึงให้ Sodium bisulfite เข้าไปทำปฏิกิริยากับสายดีเอนเอสายเดี่ยวที่ gapped DNA นั้น (Ciampi และคณะ, 1982) หรืออีกวิธีหนึ่ง โดยอาศัย single strain phage rector เช่น fd phage rector เป็นตัวนำดีเอนเอสายเดี่ยว (Weiher และคณะ, 1982)

นอกจากนี้ Mukai และคณะ ยังรายงานเสริมอีกว่า Sodium bisulfite ยังสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์กับดีเอนเอได้ โดยให้ sodium bisulfite เข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงต่อเซลล์ โดยไม่ต้องสกัดดีเอนเอออกจากเซลล์ (Mukai และคณะ, 1970)

ดังนั้น หากนำสารกลายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้กับ pJR_{69} หรือแม้แต่เซลล์ของ S5 โดยตรง ก็อาจจะทำให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่สร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงขึ้นก็ได้

จากแนวคิดทั้ง 3 ทางนั้นเป็นแนวคิดที่ให้ความเป็นไปได้ในการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงทั้งสิ้น แต่ความเหมาะสมและความยากง่ายอาจจะต่างกัน ดังนั้นในการทำวิจัย จึงเลือกแนวคิดที่เหมาะสมกับเหตุการณ์ และสถานะภาพ มาเป็นอันดับแรก จึงได้เลือก แนวคิดที่ 1 คือการตัดดีเอนเอส่วนไม่จำเป็นต่อการสร้างเอนไซม์ มาเป็นแนวคิดในการทำวิจัย

1.7 <u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

1. หาแผนผังเรสตริกชั่นของพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69}

2. สร้าง deletion-mutant ที่ดีเอนเอส่วนเกินของการสร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสจาก pJR_{69} ถูกตัดทอนลงไป

014290

3. สร้างสายพันธุ์ที่ให้ แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสสูงโดยเพิ่มจำนวนชุดของพลาสมิดดีเอนเอ

4. หาวิธีเพิ่มเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยการศึกษาตัวแปรต่าง ๆ จนพบค่าเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เพื่อให้เหมาะกับการทำอุตสาหกรรมการผลิต 6-APA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย