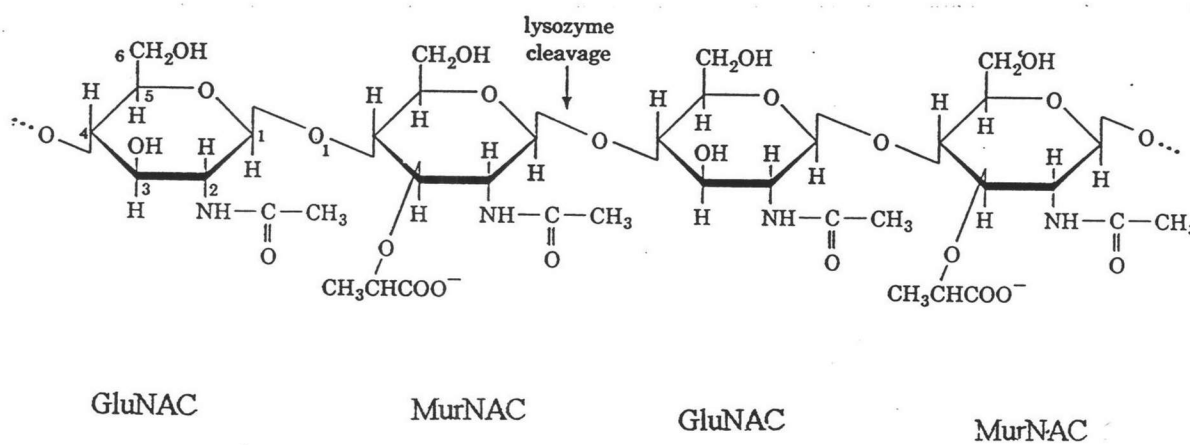
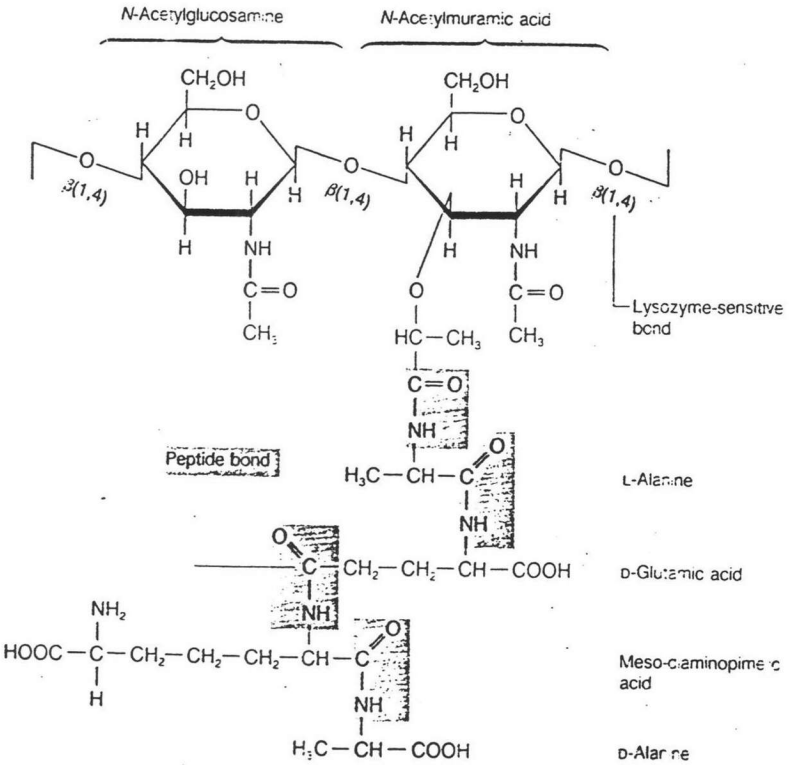
บทที่ 1

บทนำ

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป็นส่วนประกอบของเซลล์ที่อยู่นอกสุด ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงและป้องกันเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งชนิดกรัมบวกและกรัมลบมีเปปติโดไกลแคน(peptidoglycan) เป็นองค์ประกอบ เปปติโดไกลแคนประกอบด้วยสายไกลแคน (glycan) และสายเปปไทด์ (peptide) โดยสายไกลแคนเกิดจาก N-acetylglucosamine (GluNAC) และ N- acetylmuramic acid (MurNAC) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β 1 , 4 ไกลโคซิดิก เรียงสลับกันตลอดสาย (แสดงในรูปที่ 1) ที่หมู่คาร์บอกซิล(carboxyl group) ของ MurNAC บางโมเลกุลบนสายไกลแคนมีสายเปปไทด์เชื่อมต่อ (แสดงในรูปที่ 2) กรดอะมิโนบนสายเปปไทด์ของไกลแคนต่างสายกัน อาจเชื่อมต่อกันโดยตรง หรือ เชื่อมต่อกันด้วยสายพอลิเมอร์ของน้ำตาลหรือสายเปปไทด์อื่น จากลักษณะดังกล่าวนี้ ทำให้เปปติโดไกลแคนมีลักษณะเป็นร่างแหครอบคลุมพื้นที่ผิวทั้งหมดของเซลล์แบคทีเรียต่างชนิดกัน ลักษณะของสายเปปไทด์ที่เชื่อมต่อกับสายไกลแคน ตลอดจนการต่อเชื่อมกันระหว่างสายเปปไทด์ของไกลแคนต่างสายกันจะต่างกัน

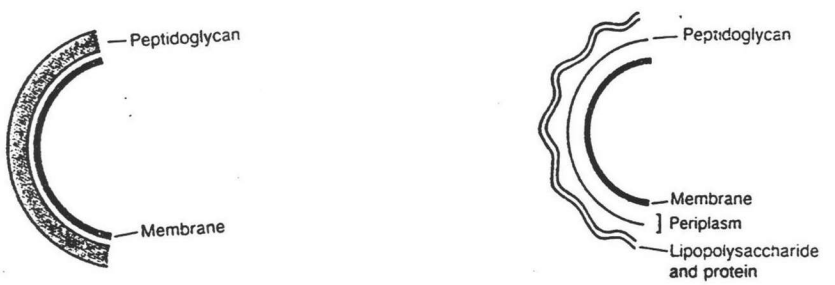


รูปที่ 1 แสดงลักษณะของสายไกลแคน



รูปที่ 2 แสดงการเชื่อมต่อของสายเปปไทด์ที่หมู่คาร์บอกซิลของ MurNAC

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรัมบวกส่วนที่เป็นเปปติโดไกลแคนจะหนาทั้งนี้เพราะประกอบด้วยส่วนร่างแหของเปปติโดไกลแคนหลายชั้นวางซ้อนๆ กัน โดยมีกรดไตรโคอิก (teichoic acid) เป็นตัวยึด (Knox , 1973) ส่วนผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรัมลบนั้นมีเปปติโดไกลแคนเพียงชั้นเดียว แต่ปกคลุมด้วยชั้นของสารประกอบลิโปโพลีแซกคาไลน์และสารประกอบลิโปโปรตีน เรียกชั้นของสารเหล่านี้ว่าเยื่อหุ้มชั้นนอก(outer membrane) เยื่อหุ้มชั้นนอกเหล่านี้มีไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่สูงถึง 20 % จึงป้องกันมิให้ชั้นเปปติโดไกลแคน ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ออโตไลซิน (autolysin) ได้โดยง่าย (Moat , 1979) ไดอะแกรมแสดงความแตกต่างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรัมบวกและของแบคทีเรียกรัมลบดังแสดงในรูปที่ 3(ก) และ 3(ข)



รูปที่ 3 (ก) ผนังเซลล์แบคทีเรียกรัมบวก (ข) ผนังเซลล์แบคทีเรียกรัมลบ

Schleifer และ Kandle (1972) ได้เสนอหลักการในการแบ่งกลุ่มเปปติโดไกลแคนของแบคทีเรีย โดยอาศัยลักษณะดังต่อไปนี้

1. การเชื่อมต่อระหว่างสายเปปไทด์ต่างสายกัน เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3 ของสายเปปไทด์สายหนึ่งกับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 4 ของสายเปปไทด์อีกสายหนึ่ง(กลุ่ม A) หรือเกิดระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 2 ของสายเปปไทด์สายหนึ่งกับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 4 ของสายเปปไทด์อีกสายหนึ่ง(กลุ่ม B)

2. ลักษณะการเชื่อมต่อกันระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3 และตำแหน่งที่ 4 ในกลุ่ม A กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 2 และตำแหน่งที่ 4 ในกลุ่ม B

3. ชนิดของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3

ไดอะแกรมการแบ่งกลุ่มเปปติโดไกลแคนของแบคทีเรียแสดงดังรูปที่ 4

ตำแหน่งที่เกิดการเชื่อมต่อ (Anchorage point of the cross-linkage)	A) การเชื่อมต่อของสายเปปไทด์เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3 ของสายเปปไทด์สายที่ 1 และกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 4 ของสายเปปไทด์สายที่ 2				B.) การเชื่อมต่อของสายเปปไทด์เกิดขึ้นระหว่าง กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 2 ของสายเปปไทด์สายที่ 1 และ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 4 ของสายเปปไทด์สายที่ 2	
ชนิดของโพลิเมอร์ที่เชื่อมต่อระหว่างสายเปปไทด์ (Type of intervening bridge)	1. ไม่มี bridge	2. สายเปปไทด์	3. ไกลซีนหรือสายโพลิเมอร์ของไกลซีน	4. กรดอะมิโนชนิดที่มีหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ เช่น กรดแอสพาติก	1. กรดอะมิโนชนิดแอล (L-amino acid)	2. กรดดี-ไดอะมิโน (D-diamino acid)
ชนิดของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3 (Amino acid at position 3)	α L-Lysine β L-ornithine γ meso-diaminopimilic acid	α L-lysine	α L-lysine β L-ornithine γ L , L-diaminopimilic acid	α L-lysine β L-ornithine γ meso-diaminopimilic acid δ L-diaminobutyric acid	α L-lysine β L-homoserine γ L-glutamic acid δ L-alanine	α L-lysine β L-homoserine γ L-diaminobutyric acid
ตัวอย่างของแบคทีเรีย	*Gaffkya homari* *Spirochaeta stemostrepta* *Escherichia coli ,* *Bacillus megaterium ,* *Bacillus subtilis*	*Micrococcus luteus* *Sarcina flava*	*S. aureus* *Leuconostoc mesenteroid* *Micrococcus radiodurans* *Propionibacterium petersoni* *Streptomyces albus*	*Streptococcus faecium* *Sporosarcina ureae* *Lactobacillus cellobiosus* *Arthrobacter duodecadis* *Arthrobacter sp. Ar22*	*Microbacterium lacticum* *Brevibacterium imperiale* *Arthrobacter J39* *Erysipelothrix rhusiopathiae*	*Butyribacterium rettgeri* *Corynebacterium poinsettiae* *Corynebacterium insidiosum*

<u>รูปที่ 4</u> ไดอะแกรมการแบ่งกลุ่มเปปติโดไกลแคน

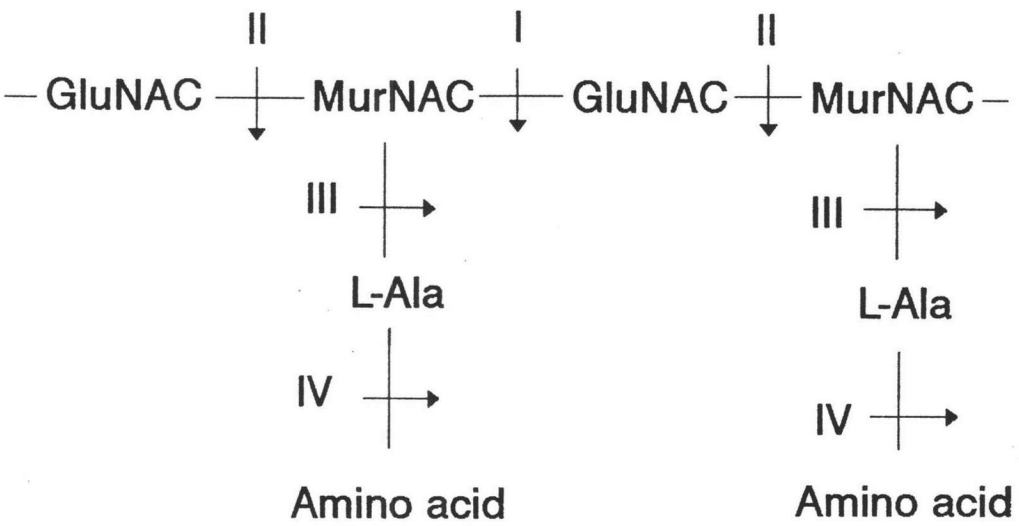
การสลายตัวของผนังเซลล์แบคทีเรีย เป็นปรากฏการณ์ที่บ่งชี้ถึงการแตกของเซลล์หรือการเกิดกระบวนการ cellular lysis ซึ่งตรวจวัดได้จากค่าความขุ่นของเซลล์ที่ลดลงอันเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มออโตไลซิน ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ดังต่อไปนี้

1. Peptidoglycan N-acetylmuramoyl-hydrolase (EC 3 .2. 1. 7) หรือ Lysozyme ย่อยสลายไกลแคนที่ตำแหน่งหลัง MurNAC ก่อให้เกิดหมู่น้ำตาลรีดิวซ์อิสระ

2. Endo-β-N-acetylglucosaminidase (EC 3. 2 .1. 30)ย่อยสลายสายไกลแคนที่ตำแหน่งหลัง GluNAC ก่อให้เกิดหมู่น้ำตาลรีดิวซ์อิสระ

3. N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase(EC 3. 5. 1. 28 , ซึ่งต่อไปนี้จะขอเรียกว่า NA-L-alanine amidase) ย่อยสลายพันธะระหว่างสายไกลแคนและแอล-อะลานีน (L-alanine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนตัวแรกของสายเปปไทด์ที่ต่อเชื่อมอยู่

4. Peptidase ย่อยสลายสายเปปไทด์



<u>รูปที่ 5</u> แสดงตำแหน่งการย่อยสลายสายเปปติโดไกลแคนโดยเอนไซม์ในกลุ่มออโตไลซิน

I Peptidoglycan N-acetylmuramoyl-hydrolase

II Endo-β-N-acetylglucosaminidase

III N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase

IV Peptidase

เอนไซม์ออโตไลซินนอกจากจะทำให้เซลล์แบคทีเรียในช่วงระยะการเจริญระยะสุดท้าย(death phase) แตกแล้ว สมบัติการย่อยสลายผนังเซลล์ซึ่งเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงมากของเซลล์ได้ทำให้คิดว่าเอนไซม์ออโตไลซินน่าจะเกี่ยวข้องในกระบวนการหลายกระบวนการที่สำคัญของแบคทีเรีย เช่น

1. กระบวนการเจริญเติบโต

โดยเอนไซม์ออโตไลซินย่อยสลายสายเปปติโดไกลแคนบางช่วงทำให้เซลล์สามารถนำเอาองค์ประกอบของเปปติโดไกลแคนมาแทรกเพิ่มลงไป ทำให้พื้นที่ผิวของผนังเซลล์ขยายใหญ่ขึ้นตามการเจริญของเซลล์ (Fein and Roger , 1976)

2. กระบวนการแยกเซลล์ออกจากกันหลังกระบวนการแบ่งเซลล์

Bacillus subtilis สายพันธุ์กลายพันธุ์ คือมีปริมาณเอนไซม์ออโตไลซินน้อยกว่าเซลล์ปกติเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการแบ่งเซลล์ไม่สามารถแยกเซลล์ออกจากกันได้ จึงปรากฏให้เห็นเป็นลักษณะโซ่ของเซลล์หรือกลุ่มของเซลล์ขนาดใหญ่ (Tilby, 1978)

3. การเคลื่อนที่ของเซลล์

Bacillus subtilis และ *Bacilus licheniformis* (Fein , 1979 ; Fein และ Roger , 1976) สายพันธุ์กลายพันธุ์คือมีปริมาณเอนไซม์ออโตไลซินลดน้อยกว่าเซลล์ปกติจะเคลื่อนที่ไม่ได้เพราะไม่สามารถสร้างแฟลกเจลล่า (flagella) การทำให้แบคทีเรียกลายพันธุ์เหล่านี้กลับมามีปริมาณเอนไซม์ในระดับปกติ (reverse mutant) พบว่าจะสามารถสร้างแฟลกเจลล่าและเคลื่อนที่ได้ตามปกติเช่นเดิม (Forsberg et al. , 1973)

4. สมดุลระหว่างการสังเคราะห์และการย่อยสายเปปติโดไกลแคน (cell wall turnover)

ผลการตรวจสอบสายเปปติโดไกลแคนที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีพบว่ามีกระบวนการย่อยสลายและสังเคราะห์เปปติโดไกลแคนขึ้นพร้อมๆ กันตลอดเวลา โดยเซลล์จะทำหน้าที่หมุนเวียน นำเอาองค์ประกอบของเปปติโดไกลแคนที่ถูกย่อยสลายออกไปกลับมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์อีก (Pooley , 1976) *Staphylococcus aureus* (Chatterjee et al., 1976) และ *Bacillus subtilis* (Pooley , 1976) สายพันธุ์กลายพันธุ์คือมีปริมาณเอนไซม์ออโตไลซินลดน้อยลงกว่าสายพันธุ์ปกติพบว่าอัตราการเกิดกระบวนการย่อยสลายแล้วสังเคราะห์เปปติโดไกลแคนขึ้นใหม่แทนที่จะเกิดขึ้นช้ามาก

5. กระบวนการทรานฟอร์เมชั่น (transformation)

ในบางช่วงของการเจริญเซลล์สามารถนำเอาดีเอ็นเออิสระ จากภายนอกเข้าสู่เซลล์ได้ เรียกเซลล์ที่มีสมบัติเช่นนี้ว่าเซลล์คอมพลีแทนซ์ (competent cell) (Young and Spizizen , 1963) Akigg และ Ayad (1970) รายงานว่าสิ่งสกัดจากเซลล์คอมพลีแทนซ์ของ *Bacillus subtilis* ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ออโตไลซินเพิ่มสูงขึ้น และไม่พบกระบวนการทรานฟอร์เมชั่นในแบคทีเรียที่ปราศจากผนังเซลล์

6. กระบวนการแยกตัวของสปอร์ออกจากเซลล์แม่ (sporulation) และกระบวนการงอกของสปอร์ (spore germination)

Waeth (1972) ได้รายงานว่าพบเอนไซม์ β-N-Acetylglucosaminidase และเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ในสปอร์ของ *Bacillus subtilis* ในกระบวนการงอกของสปอร์

ไลโซไซม์ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออโตไลซิน ที่พบได้ทั่ว ๆ ไปในของเหลวในร่างกายมนุษย์ เช่น น้ำตา น้ำลาย น้ำนม ของเหลวในสายรก (Mosky , 1982 ; Muzaki *et al.*, 1983;) และพบปริมาณมากในไข่ขาวของไก่ (Jolles and Jolles, 1984) พบในเชื้อราคือ *Chalaropsis* sp.(Fouche and Hash, 1978) แบคทีเรียคือ *Streptomyces erythraeus* (Morita, Hara and Matsuchima, 1978) และจากการที่ไลโซไซม์ย่อยสลายสายไกลแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบ ที่พบในเปปทิโดไกลแคนของแบคทีเรียทุกชนิด ในปี ค.ศ.1965 Nakazawa และคณะได้ทดลองนำไลโซไซม์ซึ่งสกัดจากไข่ขาวของไก่ มาทดสอบศักยภาพในการนำมาใช้เป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด(Minimum inhibitory concentration) ของไลโซไซม์ที่เชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบไม่สามารถเจริญได้ ผลการศึกษาพบว่าไลโซไซม์สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียกรัมบวกได้ดีกว่ากรัมลบ

ค.ศ.1970 Wagabayashi และคณะ รายงานว่าการใช้ไลโซไซม์ ร่วมกับการรักษาหลังการผ่าตัดทำให้อัตราการติดเชื้อของผู้ป่วยลดลง ในปีเดียวกัน Miyao และ Ozaki รายงานว่าทารกที่ดื่มน้ำนมที่ผสมไลโซไซม์มีอัตราการติดเชื้อลดลง

เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยทั่วไปกรดอะมิโนตัวแรกของสายเปปไทด์ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับหมู่คาร์บอกซิลของ MurNAC บนสายไกลแคนคือแอล-อะลานีน ดังนั้น NA-L-alanine amidase ซึ่งตัดพันธะระหว่างแอล-อะลานีนและสายไกลแคนในร่างแหเปปติโดไกลแคน จึงน่าจะมีศักยภาพในการนำมาใช้ฆ่าหรือทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกได้

เช่นเดียวกับไลโซไซม์

ในปี คศ. 1966 Young และคณะพบว่าผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ จะเกิดกระบวนการ autolysis คือค่าความขุ่นของสารละลายที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรจะลดลง พร้อมกับมีการปลดปล่อยกรดอะมิโนชนิดแอล-อะลานีน แต่ไม่พบว่ามีน้ำตาลรีดิวซ์อิสระถูกปลดปล่อยออกมาด้วย จากปรากฏการณ์อันนี้ทำให้สรุปได้ว่าเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ของ *Bacillus subtilis* 168 นี้เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์และเมื่อเปรียบเทียบอัตราเร็วของการเกิดการแตก (lysis) ของผนังเซลล์ที่เตรียมจากเซลล์ระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้า (log phase) และระยะการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) พบว่ากระบวนการแตกของผนังเซลล์ระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าเร็วกว่าการแตกของผนังเซลล์ระยะการเจริญแบบคงที่ สมมุติฐานสองประการคือกิจกรรมของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ที่เตรียมจากเซลล์ระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้านั้นสูงกว่า หรือโครงสร้างของผนังเซลล์ของเซลล์ระยะการเจริญแบบคงที่มีความทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase มากกว่าซึ่งเตรียมจากเซลล์ที่ระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้ามากกว่า แต่จากผลการทดลองเอาผนังเซลล์ของเซลล์ที่ระยะการเจริญต่างๆ กันมาต้มเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อทำลายเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์มาใช้เป็นสารตั้งต้นในปฏิกริยาแล้วเติมเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ลงไป พบว่าอัตราเร็วของการย่อยสลายผนังเซลล์ของเซลล์ที่ระยะการเจริญแตกต่างกันนี้มีค่าเท่ากันหมด สรุปได้ว่าความแตกต่างของอัตราเร็วของกระบวนการแตกของผนังเซลล์ของเซลล์ที่ระยะการเจริญต่างกันนี้ เป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ หรือกิจกรรมของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ที่เตรียมจากเซลล์ที่ระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าสูงกว่าของเอนไซม์ที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ที่เตรียมจากเซลล์ที่ระยะการเจริญแบบคงที่

เมื่อทราบว่าเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ของ *Bacillus subtilis* 168 เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ วิธีการเตรียมเอนไซม์นี้จึงเริ่มจากการนำผนังเซลล์มาแขวนลอยในสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมคาร์บอเนตเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.6 ในปริมาณ 5 มก./มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกเอาผนังเซลล์ออกมาใช้เป็นเอนไซม์ (Young et al., 1969) ต่อมา Fan (1970) รายงานว่าสามารถสกัดแยกเอนไซม์ที่ออกมาจากผนังเซลล์ได้ ด้วยสารละลายลิเทียมคลอไรด์ความ

เข้มข้น 3 โมลาร์ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 0 °ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแต่เนื่องจากวิธีการดังกล่าวนี้มีข้อเสียกล่าวคือวิธีการแรกในปฏิกิริยามีการจับกันของเอนไซม์และผนังเซลล์ เอนไซม์ที่ได้จึงยากต่อการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป ทั้งนี้เพราะจะมีสารประกอบพอลิเมอร์ซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์ปนเปื้อนมาด้วย ส่วนวิธีการที่สองนั้นการเตรียมผนังเซลล์ยุ่งยากใช้เวลานาน ปริมาณผนังเซลล์ที่เตรียมแต่ละครั้งน้อยเพราะว่าผนังเซลล์คิดเป็นองค์ประกอบเพียง 2-5 % ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ จึงต้องใช้ผนังเซลล์เริ่มต้นในปริมาณมาก และนอกจากนี้ยังสูญเสียเอนไซม์ระหว่างขั้นตอนการดำเนินการในปริมาณมากอีกด้วย Brown (1973) จึงปรับปรุงวิธีการโดยการสกัดเอนไซม์จากเซลล์ในระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าโดยตรง โดยการใช้สารละลายลิเทียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 0 °ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และโดยการใช้สารซักฟอกไร้ประจุ (nonionic detergent) คือทริทรอน เอกซ์-100 (triton x-100) ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 0 °ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าทั้งสองวิธีสามารถสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์ได้โดยตรง โดยประสิทธิภาพในการสกัดขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายลิเทียมคลอไรด์และสารละลายทริทรอน เอ็กซ์-100 ที่ใช้ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลิเทียมคลอไรด์และสารละลายทริทรอน เอ็กซ์-100 คือ 5 โมลาร์และ 2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนั้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์สามารถนำมาใช้แทนสารละลายลิเทียมคลอไรด์ เมื่อเปรียบเทียบวิธีการต่างๆ ใน การสกัดเอนไซม์ การสกัดเอนไซม์จากเซลล์โดยตรงด้วยสารละลายลิเทียมคลอไรด์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยปริมาณเอนไซม์ที่ได้จะมากกว่าปริมาณเอนไซม์ที่ได้หลังกระบวนการสลายตัวของผนังเซลล์ 6 เท่า และมากกว่าปริมาณเอนไซม์ที่ได้จากการนำผนังเซลล์มาสกัด 14 เท่า ส่วนวิธีที่มีประสิทธิภาพต่ำสุดคือการสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์ด้วยสารละลายทริทรอน เอ็กซ์-100 แต่จากรายงานของ Brown และคณะ (1969) รายงานว่าการทำให้เอนไซม์ NA-L-alanine amidase บริสุทธิ์นั้นมีปัญหาหลายประการอาทิเช่น ไม่สามารถทำให้เอนไซม์นี้บริสุทธิ์แบบบางส่วนได้โดยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ไม่สามารถทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นโดยวิธีระเหยแห้ง และไม่สามารถแยกออกจากโปรตีนชนิดอื่นๆได้โดยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchanger) และวิธีโครมาโตรกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล (Gel filtration) ที่มีตัวค้ำจุนเป็น Sephadex G 100 และ G 200 โดยไม่สามารถตรวจสอบพบกิจกรรมของเอนไซม์นี้ได้ หลังจากทำให้

บริสุทธิ์ด้วยวิธีข้างต้น แต่จะพบกิจกรรมของเอนไซม์ในส่วนวอยด์โวลุ่ม(void volumn) หรือ ส่วนที่ไหลผ่านออกจากคอลัมม์ทันที

Harbold และ Glaser (1975) ประสบความสำเร็จในการทำให้เอนไซม์ NA-L-alanine amidase ชนิดหลักคือชนิดที่มีปริมาณสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ ออโตไลซิน ทั้งหมดของ *Bacillus subtilis* 168 บริสุทธิ์โดยการสกัดเอนไซม์ออกมาจากเซลล์ที่ ระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้า โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องแรงอัดกำลังสูง (French press) ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส พีเอช 8.0 เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ในภาวะที่มี แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ อีดีทีเอเข้มข้น 0.001 โมลาร์ (สารละลายบัพเฟอร์ A) และ PMSF (Phenylmetylsulfonyl fluoride)เข้มข้น 0.02 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสแล้วนำสารสกัดที่ได้จากเซลล์มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตรกราฟีโดยมีตัวค้ำจุนเป็น ไฮดรอกซีอะพาไทด์ ชะด้วยสารละลายบัพเฟอร์ฟอสเฟตเข้มข้น 0.1-0.5 โมลาร์ ที่มีโปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ รวบรวมส่วน(Fraction) ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นนำไปผ่านโครมาโตรกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล โดยมีตัวค้ำจุนเป็นไบโอเจล A ชะด้วยสารละลายบัพเฟอร์ A นำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มาศึกษาลักษณะและสมบัติข้างต้นด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟริซิส รา ยงานว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน

Kuroda และ Sekiguchi (1990) ได้ทำการโคลนยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ของ *Bacillus subtilis* 168 ให้แสดงออกใน *Escherichia coli* โดยทำการตัดดีเอ็นเอของโครโมโซม (Chromosomal DNA) ของ *Bacillus subtilis* 168 เพียงบางส่วน (Partial digestion) ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Sau* 3AI เลือกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2-10 กิโลเบส มาทำให้บริสุทธิ์เชื่อมเข้ากับพลาสมิดพาหะ pUC 19 ที่ตำแหน่งเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Bam* HI แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Escherichia coli* JM 109 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (Transformant) ที่ต้องการจากลักษณะโคโลนีที่แสดงบริเวณใสโดยรอบ เมื่อเพาะเลี้ยงไว้บนอาหารแข็งซึ่งมีผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 ที่ผ่านการทำลายโปรตีนที่เกาะอยู่ออกด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต(Sodium Dodecyl Sulphate) เรียกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่คัดเลือกได้ว่า pBA 47 และเรียกยีนที่โคลนได้ว่า *cwl* A ซึ่งผลการหาลำดับเบสของยีนที่โคลนได้นี้พบ Open reading frame ซึ่งเป็นกรอบรหัส

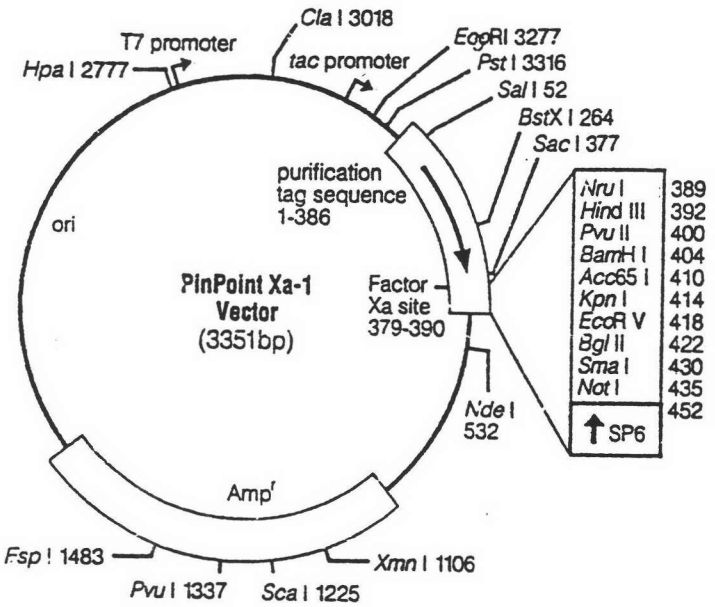
สำหรับกรดอะมิโนจำนวน 272 โมเลกุล หรือโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุล 29.9 กิโลดาลตัน ต่อมาในปี คศ. 1991 Kuroda และคณะได้ทำการวิเคราะห์ ลักษณะและสมบัติของเอนไซม์ที่ถอดรหัสจากยีน *cwl* A ที่โคลนได้ โดยนำสารสกัดจากการทำให้เซลล์แตก (Crude enzyme) มาวิเคราะห์โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟริซิส (Native polyacylramide gel eletrophoresis) ที่มีผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 ในอัตราส่วน 2 % เป็นองค์ประกอบตรวจพบโปรตีนขนาด 32 กิโลดาลตันแสดงบริเวณใสบนแผ่นเจลซึ่งเกิดจากการย่อยสลายผนังเซลล์

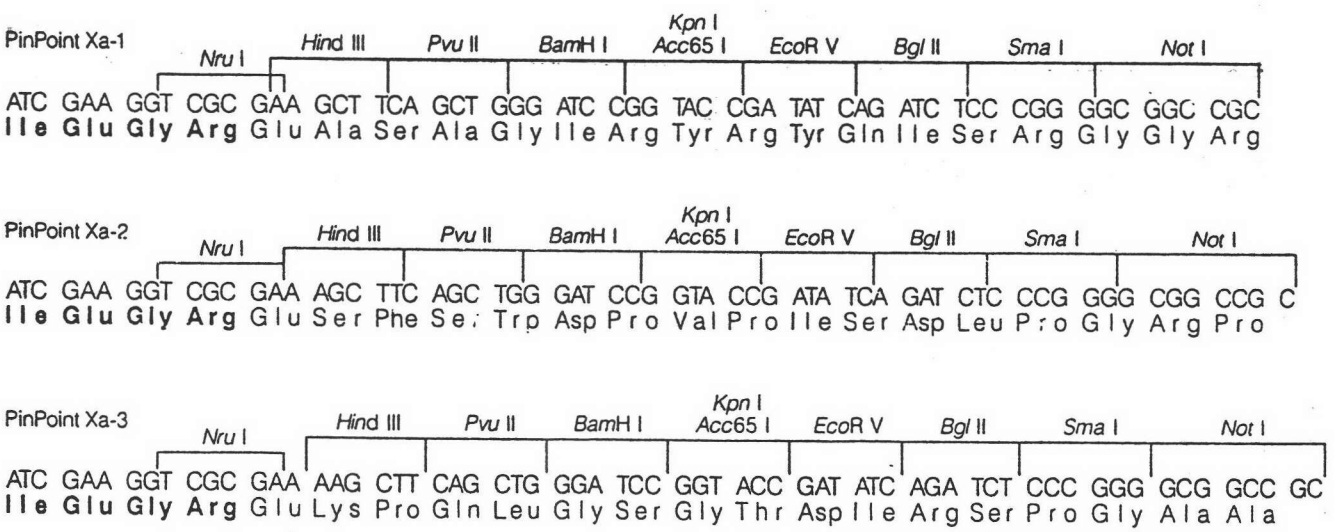
Foster (1991) ได้ทำการโคลนยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase จาก *Bacillus subtilis* 168 เช่นเดียวกับ Kuroda และคณะ (1990) โดยการตัดดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *Bacillus subtilis* 168 ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Eco*RI เลือกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3 กิโลเบสเชื่อมเข้ากับพลาสมิดพาหะ pUBS I (อนุพันธ์ของพลาสมิด pUC 19) แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Escherichia coli* DH5$_{\alpha}$ คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ต้องการจากลักษณะโคโลนีที่แสดงบริเวณใสโดยรอบ เมื่อเพาะเลี้ยงไว้บนอาหารแข็งที่มีผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 ซึ่งผ่านการทำลายโปรตีนที่เกาะติดอยู่ออกด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต นำยีนที่โคลนได้มาหาลำดับเบสพบ Open reading frame 5 ส่วน โดยในจำนวนนี้ Open reading frame ที่ 3 ตรวจพบว่าเป็นกรอบรหัสของกรดอะมิโนจำนวน 272 โมเลกุล หรือโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุล 29.9 กิโลดาลตัน ข้อมูลที่ได้เกี่ยวกับลำดับของเบส และลำดับของกรดอะมิโนที่คาดว่าจะเป็นของยีนที่โคลนได้ พบว่ายีนที่ Foster(1991) โคลนได้นี้เป็นยีนชนิดเดียวกันกับที่ Kuroda และ Sekiguchi (1990) ได้รายงานไว้

ผลการวิจัยของ Kuroda และ Sekiguchi (1990) และ Foster(1991) พบว่าเมื่อนำโปรตีนที่ถอดรหัสจากยีนที่โคลนได้ย่อยสลายผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 แล้ววิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ พบการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอิสระชนิด แอล-อะลานีน ไม่พบการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์อิสระ แสดงว่ายีนที่โคลนได้เป็นยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase จริง แต่เป็นเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอย่างอื่นของเซลล์ มิใช่เอนไซม์ NA-L-alanine amidase ชนิดที่ทำให้เซลล์ในระยะการเจริญช่วงสุดท้ายแตก ทั้งนี้เพราะ Harbold และ Gloser (1975) ได้รายงานไว้ว่าเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ชนิดที่ทำให้เซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญช่วงสุดท้ายแตก นั้นมีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน มิใช่ 30 กิโลดาลตัน

ผลของการโคลนยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ได้นี้จะทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ได้ในปริมาณมากและการที่จะนำเอนไซม์นี้ไปศึกษาวิจัยหรือนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไปนั้น จำเป็นต้องผ่านกระบวนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์แต่จากรายงานเกี่ยวกับอุปสรรคและความยุ่งยากในการทำให้เอนไซม์ NA- L-alanine amidase บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโตรกราฟี่แบบปกติและในขณะเดียวกันบริษัท Promega (1994) ได้รายงานเกี่ยวกับ พลาสมิด PinPoint Xa (Promega , 1994) ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะที่มีสมบัติในการทำให้เอนไซม์ที่ถอดรหัสจากยีนบนพลาสมิดพาหะชนิดนี้บริสุทธิ์ในขั้นตอนเดียวได้ โดยวิธีโครมาโตรกราฟีชนิดแอฟฟินิตี้ (Affinity chromatography) ทั้งนี้เพราะยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ได้ถูกเชื่อมเข้ากับยีนที่เป็นรหัสของโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกส ดังแสดงในรูปที่ 6 เอนไซม์ไบโอตินไลเกสจะทำหน้าที่นำไบโอตินมาเกาะที่บริเวณจดจำ ทำให้เอนไซม์ซึ่งถอดรหัสจากยีนที่ได้โคลนไว้มีไบโอตินเกาะติดอยู่ จึงสามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยโครมาโตรกราฟีชนิดแอฟฟินิตี้ โดยใช้ อะวิดิน เรซิน (Avidin resin) เป็นตัวค้ำจุน ไบโอตินจะเกาะอย่างจำเพาะกับอะวิดิน ทำให้สามารถแยกโปรตีนที่มีไบโอตินเกาะอยู่ออกจากโปรตีนชนิดอื่นได้ พลาสมิด PinPoint Xa แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ Pinpoint Xa-1 PinPoint Xa-2 และ PinPoint Xa-3 ตามกรอบรหัสของการแปลรหัสจากยีนเป็นโปรตีน โดยPinPoint Xa-2 และ PinPoint Xa-3 เป็น อนุพันธ์ที่เพิ่มอะดีโนซีน 1 และ 2 ตัว ตามลำดับ ที่ลำดับที่ 394 จึงทำให้บริเวณเอนไซม์เรสตริกชั่นเพื่อการสอดแทรกยีนนั้น แหน่งเบสที่เ อนไซม์เรสตริกชั่นตัดจะแตกต่างกันทีละ 1 เบส ดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งการที่ตำแหน่งเบสที่เอนไซม์เรสตริกชั่นตัดแตกต่างกันทีละ 1 เบสนี้ก่อให้เกิดประโยชน์ เพราะสามารถคัดเลือกชนิดของพลาสมิดพาหะให้เหมาะสมกับยีนที่จะนำมาสอดแทรก กล่าวคือสามารถกำหนดให้กระบวนการแปลรหัสเป็นโปรตีนของยีนที่สอดแทรกเข้าไปเกิดจากจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส(start codon) เดิมได้

ผู้วิจัยจึงประสงค์จะโคลนยีน *cwl* A เข้าสู่พลาสมิด Pinpoint Xa-1 เพื่อที่จะสามารถทำให้เอนไซม์ NA- L-alanine amidase บริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนเดียวแล้วนำเอนไซม์ NA- L-alanine amidase บริสุทธิ์ที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการทำให้เซลล์แบคทีเรียทดสอบชนิดต่างๆซึ่งมีลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์แตกต่างกันแตกเพื่อประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป





รูปที่6 แสดงลำดับเบสที่จะได้หลังการตัดบริเวณเอนไซม์เรสตริกชั่นของพลาสมิด PinPoint Xa ชนิดต่างๆ ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ที่กำหนด