บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์และผลการทดลอง

Kuroda และ Sekiguchi (1990) ได้ทำการโคลนยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ของ *Bacillus subtilis* 168 โดยการตัดดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *Bacillus subtilis* 168 แบบบางส่วน (partial digestion) ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Sau* 3A1 คัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 9.1 กิโลเบสเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pUC 19 ที่ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Bam* HI ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Escherichia coli* JM109 ตรวจหาทรานฟอร์แมนซ์ที่มียีนซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase โดยการคัดเลือกหาโคโลนีที่แสดงบริเวณใสโดยรอบเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 เป็นองค์ประกอบ ได้ทรานสฟอร์แมนซ์ที่มีพลาสมิด pBA 47 ซึ่งมีดีเอ็นเอของโครโมโซมขนาด 9.1 กิโลเบส ของ *Bacillus subtilis* 168 สอดแทรกอยู่

Kuroda และ Sekiguchi (1991) ได้สกัดเอนไซม์ NA- L-alanine amidase จากทรานสฟอร์แมนซ์ที่มีพลาสมิด pBA 47 แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตรกราฟีที่มีตัวค้ำจุนเป็นไฮดรอกซี่อะพาไทต์และใช้สารละลายบัฟเฟอร์โปแตสเซียมฟอสเฟตเป็นตัวชะทำให้เข้มข้น และผ่านคอลัมน์ HPLC ที่มีตัวค้ำจุนเป็น TSK-gel G3000 SW_{XL} พบว่ายีนที่โคลนได้สามารถถอดรหัสเป็นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ขนาด 30 กิโลดาลตัน จึงสรุปได้ว่าไม่ใช่เอนไซม์ NA- L-alanine amidase ชนิดหลัก ซึ่งใช้ย่อยสลายเซลล์ในระยะการเจริญช่วงสุดท้ายของวงชีวิต (death phase) ทั้งนี้เพราะว่า Herbold และ Glaser (1975) ได้รายงานว่าเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ชนิดหลักของ *Bacillus subtilis* 168 มีขนาด 50 กิโลดาลตัน เรียกยีนที่โคลนได้นี้ว่า *cwl* A พลาสมิดที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้คือ pBA 47 BI ซึ่งเป็นพลาสมิดอนุพันธ์ของพลาสมิด pBA 47 เกิดจากการตัดดีเอ็นเอบางส่วนทิ้ง มีดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *Bacillus subtilis* 168 ขนาด 2.0 กิโลเบส จากการทดลองตัดชิ้นยีน *cwl* A ของพลาสมิด pBA 47 ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ชนิดต่างๆ (deletion method) พบว่าชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กที่สุดที่สามารถถอดรหัสเป็นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ยาวเพียง 1.35 กิโลเบสอยู่ระหว่างตำแหน่งเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Sau* 3AI และ *Eco*RI (Kuroda and Sekiguchi , 1990) และจากลำดับเบสของยีน *cwl* A ขนาด

9.1 กิโลเบสในพลาสมิด pBA 47 ซึ่ง Kuroda และ Sekiguchi ได้รายงานไว้ ผู้วิจัยตรวจพบลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งเริ่มต้นและตำแหน่งสุดท้าย ตลอดจนตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (ribosomal binding site) ของการถอดรหัสเป็นโปรตีนของลำดับเบสที่อยู่ระหว่างตำแหน่งเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bam* HI จึงได้ทำการตัดเอาเฉพาะลำดับเบสที่เป็นรหัสของยีน *cwl* A ขนาด 1.2 กิโลเบสจากพลาสมิด pBA 47 BI ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bam* HI เพื่อนำมาเชื่อมกับพลาสมิด PinPoint Xa-1 พลาสมิด PinPoint Xa-1 มีสมบัติพิเศษคือมียีนที่เป็นรหัสของโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จะนำไบโอตินมาเกาะบริเวณโปรตีนนี้ ยีนที่เป็นรหัสของโปรตีนดังกล่าวนี้จะเกาะอยู่ระหว่างบริเวณเรสตริกชั่นเอนไซม์เพื่อการสอดแทรกยีนที่ต้องการศึกษาและโปรโมเตอร์ชนิด *tac* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการถอดรหัสเป็นโปรตีน และสามารถควบคุมให้ถอดรหัสได้เฉพาะเวลาที่ต้องการ โดยการใช้สาร IPTG ชักนำให้เกิดการถอดรหัส เอนไซม์ NA- L-alanine amidase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ที่มีผลทำให้เซลล์แตก จึงจำเป็นที่จะต้องควบคุมให้เกิดการผลิตเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ขึ้นเฉพาะในเวลาที่เหมาะสม ยีน *cwl* A หรือชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bam* HI ขนาด 1.2 กิโลเบส เชื่อมต่อกับพลาสมิด PinPoint Xa-1 ที่ตำแหน่ง *Kpn* I และ *Bgl* II เรียกพลาสมิดที่ได้นี้ว่าพลาสมิด pSO 2 และเรียกเซลล์ทรานสฟอร์แมนซ์ที่มีพลาสมิด pSO 2 ว่าเซลล์ทรานสฟอร์แมนซ์หมายเลข 2D การถอดรหัสของยีน *cwl* A เป็นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase จึงมีโปรตีนขนาด 13 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสเชื่อมต่ออยู่ การสกัดเอนไซม์ NA- L-alanine amidase จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนซ์หมายเลข 2D ในสภาวะที่มีไบโอตินจะได้เอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่มีไบโอตินเกาะอยู่ที่โปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกส จึงสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยวิธีโครมาโตกราฟีโดยใช้อะวิดินเรซินเป็นตัวค้ำจุน อะวิดินเรซินนี้สามารถจับอย่างจำเพาะกับไบโอตินทำให้สามารถแยกเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่มีไบโอตินเชื่อมต่ออยู่ออกจากเอนไซม์อื่นได้

การวิจัยนี้ได้สร้างพลาสมิด pSO 2 แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Escherichia coli* JM109 ได้เซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ซึ่งมียีน *cwl* A ขนาด 1.2 กิโลเบส ตรวจพิสูจน์ว่าเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ผลิตเอนไซม์ NA- L-alanine amidase จากการมีบริเวณใสรอบโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่เจริญบนผิวอาหารแข็งที่มีผนังเซลล์ของ

Bacillus subtilis 168 เป็นองค์ประกอบ และตรวจพิสูจน์ว่าเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D มีพลาสมิดรีคอมบิแนนท์หมายเลข pSO 2 โดยทำการตัดพลาสมิดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์หลายๆ ชนิด แล้ววัดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ พบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เป็นไปตามที่คาดหมายไว้จากแผนที่เรสตริกชั่น

ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ผลิตเอนไซม์ NA- L-alanine amidase โดยการชักนำด้วย IPTG เมื่อเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์เจริญที่ระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงต่างๆ คือช่วงต้น (early log phase) ช่วงกลาง (mid log phase) และช่วงปลาย(late log phase) สามารถสกัดเอนไซม์จากเซลล์ที่ระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงปลายได้มากที่สุด แต่ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองนี้ใช้ค่าความขุ่นของเซลล์เป็นดัชนีบอกระยะเวลาการเจริญของเซลล์ในช่วงเวลาต่างๆ ดังนั้นการที่สกัดเอนไซม์ได้ในปริมาณมากกว่าในระยะการเจริญที่มีค่าความขุ่นของเซลล์มากกว่า อาจเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนเซลล์ที่นำมาสกัดเอนไซม์มีจำนวนมากกว่าด้วย สำหรับระยะเวลาในการบ่มเชื้อหลังการเติม IPTG นั้นพบว่าที่เวลา 3 ชม. จะได้ปริมาณเอนไซม์มากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากการสกัดเอนไซม์ทำการสกัดจากเซลล์โดยตรง และที่ระยะเวลา 3 ชม. เป็นระยะเวลาที่ระดับปริมาณเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์มากที่สุด และเมื่อระยะเวลานานกว่านี้เซลล์เริ่มแตกทำให้ที่เวลาหลังจากเวลา 3 ชม. เอนไซม์ถูกปล่อยจากเซลล์สู่ภายนอก

ผลการสกัดเอนไซม์ NA- L-alanine amidase จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเหลวสูตร LB ที่มีไบโอตินความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ จำนวน 2 ลิตรได้เอนไซม์จำนวน 17,175 หน่วยเอนไซม์ หลังการนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยชุด PinPoint ™ Xa protein purification system โดยใช้อะวิดินเรซินเป็นตัวค้ำจุนจะได้เอนไซม์ NA- L-alanine amidase จำนวน 0.5 มล. ค่ากิจกรรมจำเพาะ 190.47 หน่วยเอนไซม์/มก. มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากสารสกัดจากเซลล์เพียง 6 เท่า ซึ่งไม่เป็นไปตามที่คาดหมายทั้งนี้พบว่าเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่เตรียมได้ไม่เกาะกับอะวิดินเรซิน ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ที่บรรจุด้วยอะวิดินเรซินได้โดยสารละลายบัฟเฟอร์ TDE ที่ปราศจากไบโอติน Brown และคณะ (1969) รายงานถึงปัญหาการทำให้เอนไซม์ชนิดนี้บริสุทธิ์โดยพบว่าการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพียงบางส่วนนั้น ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในตะกอนโปรตีนที่ได้ ไม่สามารถแยกเอนไซม์

NA -L - alanine amidase ออกจากโปรตีนอื่นได้โดยโครมาโตรกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของโมเลกุล ซึ่ง Brown และคณะ (1969) ได้สันนิษฐานสาเหตุของปรากฏการณ์นี้ว่าเนื่องมาจาก teichoic acid ซึ่งมักจะพบเกาะอยู่กับเอนไซม์ NA- L-alanine amidase มีผลทำให้สมบัติทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ผิดไปจากเดิม ผลการศึกษาลักษณะและสมบัติของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PinPoint ™ Xa protein purification system หรือโครมาโตรกราฟีชนิดที่ใช้อะวิดินเรซินเป็นตัวค้ำจุนได้ว่าเอนไซม์ NA- L-alanine amidase มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นกว่าก่อนการทำให้บริสุทธิ์ 6 เท่า โดยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส พบแถบโปรตีนหลัก 1 ชนิดขนาด 43 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นแถบของโปรตีนที่คาดว่าจะพบ ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่ถอดรหัสจากยีน *cwl* A มีขนาด 30 กิโลดาลตัน (Kuroda and Sekiguchi , 1990) ส่วนโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินที่เชื่อมต่ออยู่ขนาด 13 กิโลดาลตัน ฉะนั้นขนาดของโปรตีนหลักที่คาดว่าจะพบจึงมีขนาดเท่ากับ 30+13 หรือ 43 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ ผลการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส พบแถบโปรตีนหลัก 2 ชนิดขนาด 43 และ 22.5 กิโลดาลตัน โปรตีนขนาด 22.5 กิโลดาลตันนี้เข้าใจว่าเป็นโปรตีนของ *Escherichia coli* JM109 (Promega , 1994) ซึ่งพบว่าสามารถแยกออกจากเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ได้โดยชุด PinPoint ™ Xa protein purification system

ผลการตรวจพิสูจน์ชนิดของเอนไซม์ว่าเป็นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase โดยทำการย่อยสลายผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 ที่ต้มกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเพื่อทำลายโปรตีนทุกชนิดที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ในสภาวะที่มี PMSF เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส แล้วทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นตรวจพบการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอิสระแต่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงว่าเป็นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase เพราะมีการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนที่ไม่ได้เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสและกรดอมิโนที่เพิ่มขึ้น น่าจะเป็นกรดอะมิโนชนิด แอล-อะลานีน ซึ่งเป็นผลมาจากการตัดพันธะระหว่างกรดอะมิโนแอล-อะลานีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนตัวแรกของสายเปปไทด์ออกจากโมเลกุล MurNAC บนสายไกลแคน

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่ถอดรหัสจากยีน *cwl* A บนพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ pSO 2 ซึ่งมีโปรตีนบริเวณ จดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสติดอยู่ในการทำให้เซลล์แบคทีเรียทั้งกรัมบวกและกรัมลบที่มีโครงสร้างของผนังเซลล์แตกต่างกันแตก แบคทีเรียกรัมบวกที่นำมาทดสอบคือ *Bacillus subtilis* 168 *Micrococcus luteus* TISTR 745 *Streptococcus faecium* IFO 3128 *Staphylococcus aureus* TISTR 118 พบว่าเฉพาะ *Bacillus subtilis* 168 ที่แตก ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกคือ 10 หน่วยเอนไซม์/มล. จะได้อัตราเร็วของการแตกของเซลล์เท่ากับ 18.05x 10^{-2}/นาที แบคทีเรียกรัมลบที่นำมาทดสอบคือ *Escherichia coli* TISTR 780 และ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 พบว่าสามารถทำให้ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 แตกได้ ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกคือ 10 หน่วยเอนไซม์/มล. จะได้อัตราเร็วของการแตกของเซลล์เท่ากับ 13.2 x 10^{-2} /นาที

การศึกษาผลของโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกส ที่ต่อเชื่อมอยู่กับเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่ถอดรหัสจากยีน *cwl* A บนพลาสมิรีคอมบิแนนท์ pSO 2 และตัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออกด้วยเอนไซม์แฟกเตอร์เอกซ์เอโปรติเอส ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์และไม่พบความแตกต่างของกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกริยาการย่อยสลายผนังเซลล์ โดยเอนไซม์ NA- L-alanine amidase แสดงว่าเอนไซม์แฟกเตอร์เอกซ์เอโปรติเอสไม่สามารถย่อยสลายเปปไทด์ในสายเปปติโดไกลแคนได้

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่กำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออก ในการทำให้เซลล์แบคทีเรียทั้งกรัมบวกและกรัมลบที่มีโครงสร้างของผนังเซลล์แตกต่างกันแตก ชนิดของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น แบคทีเรียกรัมบวกที่ทดสอบพบว่าเฉพาะเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 ที่แตก ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกคือ 10 หน่วยเอนไซม์/มล. จะได้อัตราเร็วของการแตกของเซลล์เท่ากับ 84.5 x 10^{-2} /นาที แบคทีเรียกรัม.ลบพบว่าเฉพาะ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 แตก ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกคือ 10 หน่วยเอนไซม์/มล.

จะได้อัตราเร็วของการแตกของเซลล์เท่ากับ 24.45×10^{-2} /นาที จะเห็นได้ว่าการกำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออก มีผลทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ใน การทำให้เซลล์ *Bacillus subtilis* 168 และ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 แตกสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากขนาดของเอนไซม์โมเลกุลเล็กลง จึงเข้าทำปฏิกริยาที่บริเวณตัด.จำเพาะของเอนไซม์ภายในร่างแหเปปติโดไกลแคนได้ดีขึ้น