บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการโคลนยีนของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 เข้าสู่ *E. coli* HB101 โดยอาศัยระบบการหลอมยีนกับจีเอสที ทดสอบหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) เมื่อทำงานในภาวะต่าง ๆ กัน แล้วทำการตรวจสอบชนิดของโปรตีเอสที่ผลิตได้ว่าเกิดจากยีนโปรตีเอสชนิดหรือนิวทรัลโปรตีเอสด้วยวิธีการไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม ซึ่งจะทำให้สามารถปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีการผลิตโปรตีเอสได้มากขึ้นกว่าเซลล์ดั้งเดิม และเพื่อเป็นแนวทางในการผลิตโปรตีเอสโดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมให้ได้สายพันธุ์ใหม่เพื่อใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมต่อไป เริ่มโดยการสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซม จาก *B. subtilis* TISTR25 ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย ศิริพร สิทธิประณีต, 2532 และวิธีที่เสนอโดย Rodrigues และคณะ, 1983 แล้วนำมาทำการย่อยแบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI โดยวิธีการของ ดลนภา ตนุนาถ, 2538 ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนี้สามารถย่อยลำดับเบส ↓GATC ทุกตำแหน่งที่อยู่บนสายดีเอ็นเอจึงทำให้ได้ดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกันมากมาย เพื่อใช้ในการโคลนยีนให้มีโอกาสตรวจพบยีนที่ต้องการ ดังนั้นจึงเลือกเวลาที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเอเพื่อให้ได้เป็นแถบสม่ำเสมอครอบคลุมขนาด 1-7 กิโลเบส เมื่อใช้เอนไซม์ดังกล่าว 1 ยูนิตต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ คือ 3 นาที การทำการย่อยแบบไม่สมบูรณ์นี้จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีส่วนซ้ำซ้อนกัน (overlap) แบบสุ่มและจะทำให้สามารถได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนของโปรตีเอสที่อยู่บนโครโมโซมของ *B. subtilis* TISTR25 ครบถ้วน เนื่องจากมีการรายงานว่ายีนโปรตีเอสจากเชื้อบาซิลลัสสายพันธุ์ต่าง ๆ มีขนาดประมาณ 1-2 กิโลเบส (Kubo,1988 และ Van der Laan, 1991) การจะเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจำเป็นต้องอาศัยพาหะดีเอ็นเอที่มีความเหมาะสมในการนำพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและต้องมีคุณสมบัติช่วยให้การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์เป็นไปได้โดยสะดวก และรวดเร็วพลาสมิด pGEX-2T ที่ใช้เป็นพาหะดีเอ็นเอในการทดลองนี้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ1 ตำแหน่ง ทำให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบปลายเปิด (linear form) มีขนาดประมาณ 4.948 กิโลเบส และเมื่อมีการตัดแบบคู่กันที่ตำแหน่ง 2 ตำแหน่งบนดีเอ็นเอคือ *Eco*RI และ *Pst*I จะทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 3.994 กิโลเบส และ 950 เบส

ซึ่งขนาดที่ได้ตรงกับที่ระบุไว้ในแผนที่ของพลาสมิด pGEX-2T ในการโคลนอาศัยพลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกตัดให้เป็นสายยาวด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ซึ่งจดจำลำดับเบสดีเอ็นเอ G↓GATCC ทำให้สามารถเชื่อมกันได้ดีกับดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* TISTR25 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AIเนื่องจากดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสอง จะได้เป็นปลายเหนียวที่มีลำดับเบสที่ปลายเหมือนกันโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA ligase มี ATP เป็นโคแฟกเตอร์ที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งเอนไซม์ ligase จะทำหน้าที่สร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์เพื่อเชื่อมต่อปลาย 5' ที่มีหมู่ฟอสเฟตและปลาย 3' ที่มีหมู่ไฮดรอกซี จากการศึกษาพบว่าในการเชื่อมหากสายดีเอ็นเอมีปลายเป็นปลายเหนียวจะสามารถเชื่อมได้ดีในที่ที่มี T4 DNA ligase ปริมาณน้อย แต่ถ้าเป็นปลายทู่หรือมีเบสเพียงตัวเดียวยื่นออกมา (single-base pair overhang) จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากกว่าถึง 50 เท่า (New England Biolabs) รีคอมบิแนนท์พลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสม์ที่ได้มีขนาดประมาณตั้งแต่ 5-12 กิโลเบส เนื่องจาก *Sau*3AI มีบริเวณจดจำเพียง 4 คู่เบส ส่วน *Bam*HIมีบริเวณจดจำเพียง 6 คู่เบส และลำดับเบส 4 คู่ที่อยู่ตรงกลางเมื่อตัดด้วย *Bam*HI คือ ↓GATC เหมือนกับบริเวณจดจำของ *Sau*3AI ดังนั้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดนี้จึงสามารถเชื่อมต่อกันได้ และเมื่อเชื่อมต่อกันแล้ว ดีเอ็นเอนั้นจะตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI แต่อาจจะตัดด้วย *Bam*HI ได้หรือไม่ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของเบสที่อยู่ข้างเคียงบริเวณจดจำ ปัญหาที่มักเกิดขึ้นคือพลาสมิดอาจเชื่อมตัวเอง (self ligation) ทำให้ลดประสิทธิภาพในการเคลื่อนย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ จึงนิยมที่จะทำ dephosphorylation โดยการดึงหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ของพลาสมิดออกด้วยการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase เพื่อป้องกันไม่ให้ปลายของพลาสมิดกลับมาเชื่อมกันเอง เนื่องจากเอนไซม์ ligase จะสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ได้เมื่อปลาย 5' มีหมู่ฟอสเฟตและปลาย 3' เป็นหมู่ไฮดรอกซีที่อยู่ใกล้กันเท่านั้น จากนั้นนำไปทำการเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 ด้วยวิธี electroporation (Dower et al., 1988) อาศัยกระแสไฟฟ้าในการส่งรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่อยู่ในสภาพมีรูพรุน (competent cell) ซึ่งพร้อมสำหรับการรับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เนื่องจากการใช้กระแสไฟฟ้าสูง หรือเวลานานเกินไปทำให้เซลล์ตายได้ จึงต้องใช้กระแสไฟฟ้าและเวลาที่เหมาะสม รีคอมบิแนนท์พลาสมิดจึงจะมีโอกาสเข้าสู่เซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและ IPTG แล้วทำการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่เจริญได้บนอาหารดังกล่าว เนื่องจากพลาสมิด pGEX-2T เป็นพาหะดีเอ็นเอที่เอื้อต่อการแสดงออกของยีนที่มียีนด้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ซึ่งสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ β-lactamase ที่ย่อย แอมพิซิลลินได้ และ *tac* promoter เป็น

โปรโมเตอร์ลูกผสมที่จำเป็นต้องอาศัยการเหนี่ยวนำโดย IPTG พบว่าเป็นโคโลนีสีขาวทั้งสิ้น 3,640 โคโลนี ไม่มีโคโลนีสีน้ำเงินเลย เนื่องจากในพลาสมิด pGEX-2T ไม่มียีน *lac Z* จึงทำให้ได้เฉพาะโคโลนีสีขาวเท่านั้น และนำทุกโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารดังกล่าวมาทำการคัดเลือกในขั้นตอนต่อไป เพื่อทดสอบว่าทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ทั้งหมดจะมีความสามารถในการผลิตโปรตีเอสได้ โดยต้องทำการย้ายทรานสฟอร์แมนท์ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ IPTG มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีนมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ IPTG โดยไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อ ทั้งสิ้น 28 จาน ๆ ละ 130 โคโลนี พบว่ามีทรานสฟอร์แมนท์ที่สามารถเจริญและย่อยโปรตีนในน้ำนมได้ ปรากฏเป็นวงใส ๆ (clear zone) ขนาดเล็กใหญ่แตกต่างกันรอบ ๆ โคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์ จำนวนทั้งสิ้น 509 โคโลนี และทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากทั้งหมดเพื่อใช้ในการศึกษาในระดับยีนต่อไป แล้วจึงทำการย้ายทรานสฟอร์แมนท์อีกครั้งเฉพาะ 509 โคโลนีที่ให้วงใสรอบ ๆ โคโลนีไปยังอาหารแข็งที่มีนมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ IPTG จานละ 50 โคโลนี โดยไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อเช่นกัน สังเกตได้ว่ามีโคโลนีที่ให้วงใส ๆ ดังกล่าวขนาดใกล้เคียงกันแต่จำนวนลดลง ได้แก่ #1, #6, #11, #20, #36, #42, #45, #48, #51, #93, #94, #96, #97 เป็นต้น ซึ่งการลดจำนวนลงอาจเกิดจากการสูญเสียยีนโปรตีเอสไป มีทรานสฟอร์แมนท์บางตัวเท่านั้นที่ยังมีความคงตัวอยู่ พบว่าโคโลนีที่ให้วงใส ๆ ดังกล่าวขนาดใหญ่ที่สุดคือ #97 ดังปรากฏ ในรูปที่ 12 จึงนำโคโลนีเหล่านี้ไปทำการศึกษาต่อไป เริ่มด้วยการสุ่ม รีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาตรวจสอบขนาด ดังแสดงในรูปที่ 13 พบว่าเมื่อทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซิสโดยเปรียบเทียบขนาดกับพลาสมิด pGEX-2T ปรากฏว่ามีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหลายขนาดทั้งที่มีขนาดเล็กกว่าและใหญ่กว่าพลาสมิด pGEX-2T จึงได้ทำการสุ่มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งสันนิษฐานว่าที่ขนาดใหญ่ขึ้นนั้นเกิดจากได้รับชิ้นดีเอ็นเอจาก *B. subtilis* TISTR25 นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 1 ตำแหน่งบนพลาสมิด pGEX-2T คือ *Eco*RI และ *Bst*EII ดังแสดงในรูปที่ 14 เพื่อทำให้ทราบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอ insert อยู่ในรีคอมบิแนนท์หรือไม่ ซึ่งควรจะมีขนาดสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI ซึ่งมีขนาด 4.948 กิโลเบส พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ #36, #94 และ #97 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI คู่กับ *Bst*EII ตามแผนที่เรสทริกชันเมื่อตัดพลาสมิด pGEX-2T ด้วย *Eco*RI คู่กับ *Bst*EII จะทำให้ได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 2.881 และ 2.027 กิโลเบส ตามลำดับ แต่ปรากฏว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดของทรานสฟอร์แมนท์ #36, #94 และ #97 มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ 3 แถบ ขนาดประมาณ 3.7, 2.8 และ 2.0 กิโลเบส ซึ่ง 2 ขนาดหลังเป็นขนาดเดียวกับ pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI คู่กับ *Bst*EII จึง

สันนิษฐานว่าขนาดจริงของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดคือประมาณ 8.4 กิโลเบส ชิ้น insert มีขนาดประมาณ 3.7 กิโลเบส ทั้งนี้สันนิษฐานว่าบนชิ้นดีเอ็นเอ insert มีตำแหน่งที่สามารถถูกตัดด้วย *Bst*EII หรือ *Eco*RI ที่บริเวณใกล้ ๆ กับตำแหน่ง *Bam* HI ที่ใช้ในการโคลนยีน จึงทำให้ชิ้น insert ขนาดประมาณ 3.7 กิโลเบส แยกออกมาจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าว ระหว่างที่ศึกษาระดับยีนพร้อมกันนั้นได้ทำการวิเคราะห์ความสามารถในการทำงานของโปรตีเอส ที่ได้จากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 จากการโคลนโดยอาศัยระบบการหลอมกับยีนจีเอสทีทำให้มีการผลิตโปรตีเอสที่อยู่ในรูป fusion protein โดยเชื่อมอยู่กับเอนไซม์ glutathione S-transferaseจึงต้องมีการศึกษาความสามารถในการทำงานของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์ทั้งที่อยู่ในรูปของ fusion protein และ โปรตีเอสอิสระ ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 ศึกษาการเจริญในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีซักซิเนตเป็นสารต้นตอคาร์บอนและปรับ pH เป็น 7.4 ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการวิเคราะห์หาแอคติวิตีน้อยที่สุด ในการศึกษาการเจริญเป็นเวลา 72 ชั่วโมงพบว่าทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 มีอัตราการเจริญต่ำกว่าจีโนไทป์ดั้งเดิมคือ *E. coli* HB101 และสายพันธุ์ที่มียีนโปรตีเอสคือ *B. subtilis* TISTR25 โดยมีการเจริญแบบลอกกาลิทีม (log phase) ในช่วงเวลาตั้งแต่ 4 ถึง 18 ชั่วโมงและเริ่มเข้าสู่การเจริญแบบคงที่ (stationary phase) ในชั่วโมงที่ 24 Dancer และ Mandelstam (1975) พบว่า โปรตีเอสจาก *B. subtilis* จะถูกปล่อยออกจากเซลล์สู่น้ำเลี้ยงในช่วง sporulation เป็นต้นไป และเมื่อทำการศึกษาหาแอคติวิตีของโปรตีเอสที่เซลล์สังเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ กัน ซึ่งอยู่ในรูปของ fusion protein พบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 สามารถผลิต โปรตีเอสซึ่งอยู่ในรูปของ fusion protein พบว่าให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด ที่ pH 8.5 จึงเลือกที่จะทำการวิเคราะห์ในเวลาดังกล่าว การหาค่าแอคติวิตีในการไฮโดรไลส์เคซีนได้เป็นไทโรซีน อิสระที่มีความสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนไทโรซีน โดยทำ Blank และ Control เพื่อใช้หักลบหาค่าแอคติวิตีที่แท้จริง โดยเป็นปริมาณของโปรตีนอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นโดยเซลล์หรือมีอยู่ในอาหาร และที่สำคัญคือ ดีเอ็นเอที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับความยาวคลื่นที่ใช้ในการหาแอคติวิตีของโปรตีเอสมาก พบว่า fusion protein มีแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) สูงที่สุด เท่ากับ 305.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ที่ภาวะ pH 8.5 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 17 ซึ่งมีแอคติวิตีจำเพาะต่ำกว่า *B. subtilis* TISTR25 คิดเป็น 98.68 หน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีน นอกจากนี้ fusion protein มี แอคติวิตีจำเพาะสูงกว่า *E. coli* HB101 และ *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pGEX-2T อย่างเห็นได้ชัด และเมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ของ

แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี ซึ่งมีส่วนโครงสร้างของ glutathione ที่ติดอยู่กับ Sepharose 4B ภายในคอลัมน์ทำให้สามารถจับกับ fusion protein ที่มีเอนไซม์ glutathione S-transferase เท่านั้น แล้วจึงตัดแยก fusion protein เพื่อให้เป็นโปรตีเอสอิสระด้วย thrombin จะทำให้ได้เฉพาะโปรตีเอสอิสระเพื่อหาความสามารถในการทำงานต่อไป พบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสอิสระทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ 1,289.18 หน่วยหน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ที่ภาวะ pH 8.5 ดังแสดงในรูปที่ 22 เมื่อพิจารณาถึงสมบัติของโปรตีเอสที่สัมพันธ์กับค่า pH จากกราฟทำให้เชื่อว่าทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 น่าจะมียีนนิวทรัลโปรตีเอสอยู่ จากนั้นได้ทำการศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของ โปรตีเอสโดยสารยับยั้ง 2 ชนิด คือ PMSF และ EDTA เนื่องจากเคยมีการศึกษาและพบว่าสารทั้งสองชนิดนี้มีผลต่อความสามารถในการทำงานของโปรตีเอส พบว่าการศึกษากับ PMSF เมื่อนำ crude lysate มาใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ โดยให้ทำงานในภาวะที่มีสารละลาย PMSF เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปรากฏว่าโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 มีแอคติวิตีต่ำลงทุกค่าของ pH โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในภาวะ pH ตั้งแต่ 9.5-11.0 แสดงผลโดยกราฟรูปที่ 18 ส่วนการทำงานในภาวะที่มีสารละลาย EDTA เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปรากฏว่าโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 ไม่มีแอคติวิตีเลยเมื่ออยู่ในภาวะ pH ตั้งแต่ 7.0-8.5 แสดงผลโดยกราฟรูปที่ 19 Uehara และคณะ (1979) เสนอว่า นิวทรัลโปรตีเอสจะถูกยับยั้งในสภาวะที่มี 1 mM PMSF และ 10 mM EDTA Goldberg (1971) มีการศึกษาพบว่า PMSF เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นสารยับยั้งที่จำเพาะกับการเกิด protein breakdown มีผลต่อการสร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *E. coli* ที่เลี้ยงอาหาร minimum media แต่แอลคาไลน์โปรตีเอสจะไม่ถูกยับยั้งการทำงานโดย EDTA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (Priest, 1977) ฉะนั้นจากผลของการยับยั้งดังกล่าว สรุปว่าทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 สร้างโปรตีเอสชนิดนิวทรัลโปรตีเอสและสามารถยับยั้งด้วย PMSF เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ คิดเป็น 61.83 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งด้วย EDTA ที่เข้มข้นเพียง 5 มิลลิโมลาร์ คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และการตรวจสอบชนิดของยีนโปรตีเอสที่มีอยู่ในทรานสฟอร์แมนท์ว่ามียีนที่สามารถผลิตโปรตีเอสนั้นจะเป็นยีนชนิดนิวทรัลโปรตีเอสโดยใช้วิธีโคโลนีไฮบริไดเซชัน Grunstein และ Hogness (1980) เป็นผู้คิดค้นวิธีคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการโดยนำมาทำการไฮบริไดซ์กับอาร์เอ็นเอติดตาม (RNA probe) ซึ่งจะตรวจสอบจากโคโลนีหรือ plaque ก็ได้ และต่อมาได้มีการดัดแปลงวิธีเพิ่มขึ้นโดย Hanahan และ Meselson (1980) ทำให้ตรวจสอบได้ครั้งละมาก ๆ โดยการไฮบริไดซ์กับส่วนของดีเอ็นเอของพลาสมิด pNC3 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI และ *Bgl*I ขนาด 500 เบสที่ใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามของยีนนิวทรัลโปรตีเอสที่ติดฉลากกับสารกัมมันตภาพรังสี [α ^{32}P] dATP ด้วยวิธี Nick

translation เสนอโดย Rigby และคณะ (1977) อาศัยเอนไซม์ 2 ประเภท คือ DNase I และ DNA polymerase I โดยที่ DNase I จะย่อยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ทำให้ดีเอ็นเอติดตามเกิดรอยขาด (Nick) จากนั้น DNA polymerase I จะทำหน้าที่ดึงนิวคลีโอไทด์ออกแล้วเติม dATP ที่มีสารกัมมันตภาพรังสี [α ^{32}P] ลงไปแทนที่ ทำให้สายดีเอ็นเอติดตามนี้มีสารกัมมันตภาพรังสีติดอยู่ด้วย หลังการทำออโตเรดิโอกราฟ พบว่ามีทรานสฟอร์แมนท์จำนวนมากให้จุดสีดำซึ่งเป็นสัญญาณการไฮบริไดเซชันบนฟิล์มเอ็กซเรย์ที่ได้จากการทำโคโลนีไฮบริไดเซชันเมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งกับจานเลี้ยงเชื้อเดิม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปที่ 20 แสดงความสัมพันธ์กันระหว่างโคโลนีต่าง ๆ ที่ให้วงใสรอบ ๆ ซึ่งเป็นโคโลนีจากการเลี้ยงในอาหารที่มีนมพร่องมันเนยมาแล้วถึง 3 ครั้ง พบว่ายังมีความสามารถในการทำงานของโปรตีเอสปรากฏอยู่ ส่วนการวิเคราะห์โปรตีเอสด้วยวิธี SDS-PAGE เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของ fusion protein และ โปรตีเอสอิสระที่ได้จากการผ่านลงในคอลัมน์ของกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานต่าง ๆ ได้แก่ β-galactosidase (น้ำหนักโมเลกุล 116,400), glutamate dehydrogenase (น้ำหนักโมเลกุล 55,600), chymotrypsinogen (น้ำหนักโมเลกุล 27,000) และ trypsin inhibitor (น้ำหนักโมเลกุล 20,100) พบว่าโปรตีเอสที่อยู่ในรูป fusion protein จะมี 1 แถบที่เข้มตรงน้ำหนักประมาณ 70,000 ดาลตัน เมื่อผ่านการแยกด้วยทรอมบินสามารถมองเห็นแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักต่ำลงมา รวมถึงแถบของ GST อิสระที่มีน้ำหนักประมาณ 26,000 ดาลตันด้วย แถบโปรตีนดังกล่าวคือโปรตีเอสอิสระดังแสดงในรูป 24 ซึ่งมีหลายขนาด จึงสันนิษฐานว่าโปรตีนบางตัวที่เซลล์สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาอาจมีความสามารถย่อยทรอมบินซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 37,000 ดาลตันให้มีขนาดเล็กลงได้ เนื่องจากในการทำ แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี ใช้ทรอมบินจำนวนถึง 50 cleavage unit (50 ไมโครลิตร) ซึ่งมากเกินพอที่จะตัด fusion protein ทั้งสิ้น 2.5 มิลลิกรัมที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ 1,000 มิลลิลิตร (ควรใช้ทรอมบินไม่ต่ำกว่า 10 cleavage units ต่อ fusion protein 1 มิลลิกรัม) ดังนั้นอาจมีทรอมบินเหลืออยู่และอาจถูกย่อยด้วยโปรตีเอสอิสระที่เซลล์สังเคราะห์ขึ้นมา จึงปรากฏเป็นแถบโปรตีนขนาดเล็ก ๆ จำนวนมากในช่องของโปรตีเอสที่ผ่านคอลัมน์มาแล้ว โดยปกติน้ำหนักของโปรตีเอสที่ได้มีการศึกษามาก่อนนี้ใน *B. subtilis* TISTR25 คือแอลคาไลน์โปรตีเอสมีน้ำหนักโมเลกุล 27,000 ดาลตัน (ปกรณ์ วิโรจน์กุลกิจ, 2532) และนิวทรัลโปรตีเอสมีน้ำหนักโมเลกุล 37,000 ดาลตัน (อุดมลักษณ์ ธิติรักษ์พาณิชย์, 2534) สรุปว่าโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 ที่อยู่ในรูป fusion protein มีน้ำหนักประมาณ 70,000 ดาลตัน เมื่อใช้ทรอมบินตัดแยกจะได้โปรตีเอสอิสระที่มีน้ำหนักประมาณ 44,000 ดาลตัน ซึ่งเป็นน้ำหนักที่ใกล้เคียงกับนิวทรัลโปรตีเอสมากที่สุด

จากแอคติวิตีที่ลดลงเมื่อมีการยับยั้งด้วยผลการทดลอง และขนาดโมเลกุล แสดงว่าเป็นเอนไซม์ชนิดนิวทรัลโปรตีเอส ยืนยันได้จากผลของโคโลนีไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามของยีนนิวทรัลโปรตีเอสในรูปที่ 20 ทำให้ค่อนข้างเชื่อมั่นว่าทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 มียีนนิวทรัลโปรตีเอส จึงพยายามหาหลักฐานเพื่อสนับสนุนและยืนยันผลดังกล่าว แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นคือหลังจากได้ตรวจสอบด้วยโคโลนีไฮบริไดเซชันแล้วจึงนำรีคอมบิแนนท์จากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 มาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อแยกเฉพาะชิ้น insert มาตรวจสอบด้วยการทำ Southern blot hybridization โดยการเตรียมดีเอ็นเอบนแผ่นเมมเบรนที่ได้จากการย้ายมาจากเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ซึ่งประกอบด้วยช่องของดีเอ็นเอมาตรฐานของฟาจแลมบ์ดา (λ-DNA) ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III ดีเอ็นเอมาตรฐานของฟาจแลมบ์ดา (λ-DNA) ที่ถูกย่อยด้วย *Bst*EII เพื่อเป็นการเทียบหาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ พลาสมิด pGEX-2T ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI (เป็น negative control ของการไฮบริไดซ์กับทั้งดีเอ็นเอติดตามของยีนนิวทรัลโปรตีเอส) รีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคโลนีที่ 97 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI และ *Bst*EII ควรจะได้ 3 แถบ คือ 3.7, 2.8 และ 2.0 กิโลเบส และ พลาสมิด pNC3 ที่ถูกย่อยด้วย *Bgl*I (เป็น positive control ในการไฮบริไดกับดีเอ็นเอติดตามของยีนนิวทรัลโปรตีเอส) พบว่าชิ้น insert จากทรานสฟอร์แมนท์ #97 ขนาด 3.7 กิโลเบสได้หายไปและไม่มีสัญญาณการไฮบริไดซ์เกิดขึ้นบนพลาสมิดจากทรานสฟอร์แมนท์ #97 เมื่อใช้ดีเอ็นเอติดตามของยีนนิวทรัลโปรตีเอสเลยในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากทรานสฟอร์แมนท์ #97 ทั้งที่ทรานสฟอร์แมนท์นี้ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าในเซลล์เจ้าบ้าน ได้นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากทรานสฟอร์แมนท์ #97 ไปทำการหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) โดยอาศัยไพรเมอร์ของพลาสมิด pGEX-2T เอง แต่ก็พบว่าไม่มีลำดับเบสของยีนโปรตีเอสอยู่เลย พบแต่ลำดับเบสของพลาสมิด pGEX-2T อยู่เท่านั้น ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากการสูญเสียชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนโปรตีเอสไปแล้วในระหว่างที่ทำการต่อเชื้อทุก ๆ เดือน แสดงว่าการโคลนนี้ไม่มีความคงตัว จึงยังไม่สามารถพิสูจน์ชิ้น insert ว่ามียีนของนิวทรัลโปรตีเอสจริง ซึ่งจะเป็นการยืนยันผลของโคโลนีไฮบริไดเซชันที่ได้มาก่อนหน้านี้ อีกสาเหตุที่อาจเป็นไปได้คือการที่ยีนโปรตีเอสนั้นได้รวมตัวเข้าไปกับโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้านแล้ว แต่พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมจึงยังคงอยู่ ดังนั้นจึงไม่ให้สัญญาณการไฮบริไดเซชันเมื่อใช้เมมเบรนแผ่นดังกล่าว ซึ่งวิธีแก้ปัญหาอาจทำได้โดยนำทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 ที่ได้เคยนำไปทำการเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธี lyophilization ตั้งแต่ครั้งที่ได้โคลนนี้ในระยะแรก ๆ กลับมาตรวจสอบด้วยการไฮบริไดเซชัน ทั้งนี้ต้องทำเปรียบเทียบกับโครโมโซมของเซลล์ดั้งเดิมด้วย เนื่องจากการทำไฮบริไดเซชันนั้นมีปัจจัยที่ต้องให้ความสำคัญมาก คือเรื่องอุณหภูมิในการทำงานของดีเอ็นเอติดตาม (Tm) ทั้งอุณหภูมิใน

การไฮบริไดซ์ และอุณหภูมิในการล้าง แม้มีความคลาดเคลื่อนของอุณหภูมิเพียง 1 องศาก็อาจทำให้ไม่เกิดสัญญาณไฮบริไดซ์ที่ถูกต้องได้ จึงต้องอาศัยความพยายามในการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการไฮบริไดเซชัน จึงจะทำให้การไฮบริไดเซชันเกิดประสิทธิภาพสูงสุด

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้นำเสนอมานั้น สรุปได้ว่าการการโคลนยีนของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *B. subtilis* TISTR25 เข้าสู่ *E. coli* HB101 โดยอาศัยระบบการหลอมยีนกับจีเอสที่นี้ไม่ใช่วิธีที่เหมาะสม ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำกว่าเชื้อดั้งเดิม การทำให้บริสุทธิ์สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ได้เพียง 4.23 เท่า ซึ่งค่อนข้างต่ำ ต้องเสียเวลาทำให้เซลล์แตกก่อนด้วย และที่สำคัญคือเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีความคงตัว จึงไม่คุ้มค่าในเชิงพาณิชย์ในการจะนำไปผลิตในระดับสเกลใหญ่ ๆ ต่อไป การทดลองที่ผ่านมาจึงเป็นเพียงการ trial เพื่อพิสูจน์สมมติฐานเท่านั้น ในที่สุดก็สรุปได้ว่าไม่สามารถทำให้ประสบความสำเร็จได้ด้วยระบบดังกล่าว จึงขอเสนอแนวทางที่เป็นไปได้ในการศึกษาโปรตีเอสต่อไปในอนาคต จากการที่ *B. subtilis* TISTR25 สามารถผลิตโปรตีเอสที่มีแอคติวิตีสูงและยังขับออกมานอกเซลล์ไม่จำเป็นต้องทำให้เซลล์แตกก่อน จึงสมควรที่จะใช้สายพันธุ์เดิมนั้นในการผลิตโปรตีเอส โดยควรศึกษาหาสภาวะที่จะเหมาะสมที่สุดในการผลิตด้วยกระบวนการหมัก ให้มีการใช้สับสเตรตอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย