บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ เป็นการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไซแลเนส โดยการนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C ที่อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต (13) ได้สร้างไว้ มาตัดแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนออกจากพลาสมิดพาหะ pIJ699 ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 5.4 กิโลเบส ไปเชื่อมเข้ากับพลาสมิดพาหะชนิดต่างๆ ซึ่งมีรายงานว่ามีโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูง (strong promoter) ซึ่งคาดว่าเมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนมาอยู่ภายใต้การทำงานของโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพเหล่านี้ จะทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน มีประสิทธิภาพในการถูกอ่านรหัส และ แปลรหัสให้เป็นไซแลเนสได้ในปริมาณที่สูงขึ้น ซึ่งจากผลการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอในรูปที่ 8 จะเห็นว่าเมื่อทำอะกาโรส-เจลอิเลคโตรโฟรีซิสแล้ว ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้มีตำแหน่งตรงกันกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C

ก่อนที่จะนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้ ไปสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยเชื่อมกับพลาสมิดพาหะที่มีโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพ ได้ทดสอบยืนยันอีกครั้งว่าชิ้นส่วนดังกล่าวไม่ใช่ส่วนของพลาสมิดพาหะ pIJ699 (ขนาด 5 กิโลเบส) โดยการตัดชิ้นส่วนที่เตรียมได้ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bcl*I ซึ่งจากรูปที่ 7 จะเห็นว่าชิ้นส่วนของพลาสมิดพาหะ pIJ699 นั้น มีตำแหน่งที่สามารถตัดได้ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bcl*I อยู่ 2 ตำแหน่ง แต่จากผลการทดลองในรูปที่ 9 ซึ่งพบว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้ไม่สามารถถูกตัดได้ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bcl*I จึงสรุปได้ว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะนำไปใช้ในการสร้าง รีคอมบิแนนท์พลาสมิดต่อไปนั้น เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนของ *Streptomyces* sp. 42-9 ซึ่งใส่เข้าไปในพลาสมิดพาหะ pIJ699 (13)

จากการนำพลาสมิดพาหะ ที่จะใช้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด มาทดสอบประสิทธิภาพ ในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli*

พบว่า เมื่อทรานสฟอร์ม *E. coli* DS941 ด้วยพลาสมิดพาหะ pUC19 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มมีค่าเท่ากับ 1.32×10^5 ทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ แต่เมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดพาหะ pT7-7 ร่วมกับ พลาสมิด pGP1-2 พบว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มลดลงเหลือเพียง 5.33×10^3 ทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอเท่านั้น ซึ่งต่ำกว่าเมื่อทรานสฟอร์มด้วย pUC19 (ที่มีขนาด 2.7 กิโลเบส ซึ่งใกล้เคียงกับ pT7-7 ที่มีขนาด 2.5 กิโลเบส) ถึง 25 เท่า

จากงานวิจัยของ Hanahan (47) ซึ่งได้ทรานสฟอร์ม competent cell ของ *E. coli* ด้วยพลาสมิด pBR322 ขนาด 4.3 กิโลเบส พบว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มมีค่าอยู่ในช่วง 10^5-10^6 ทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ แต่เมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิด pBR322 ร่วมกับ พลาสมิด pAC184 ขนาด 4.0 กิโลเบส พบว่า competent cell หนึ่งๆ สามารถรับพลาสมิดเข้าไปได้มากกว่า 1 โมเลกุล ทั้งนี้ประสิทธิภาพที่เซลล์หนึ่งๆ จะรับพลาสมิดเข้าไปพร้อมๆ กัน 2 ชนิด จะต่ำกว่าเมื่อรับเพียงพลาสมิดเดียว โดยภายหลังที่ทรานสฟอร์มพลาสมิด 2 ชนิดพร้อมๆ กัน พบว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มจะต่ำกว่าเมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดชนิดเดียว 10-15 เท่า แต่ในการทดลองนี้จะเห็นว่า ค่าที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 2 นั้น เมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิด 2 ชนิด (pT7-7+pGP1-2) จะให้ประสิทธิภาพต่ำกว่าการทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิด pUC19 ถึง 25 เท่า ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากงานของ Hanahan ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าพลาสมิด 2 ชนิด ที่ Hanahan ใช้นั้น มีขนาดใกล้เคียงกัน (4.3 และ 4.0 กิโลเบส) และเล็กกว่าพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ pT7-7 ขนาด 2.5 กิโลเบส และ pGP1-2 ขนาด 7.2 กิโลเบส จึงทำให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มที่ได้จากงานวิจัยนี้ต่ำกว่าเมื่อใช้พลาสมิดขนาดใกล้เคียงกัน

การทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ4083/3 และ pIJ4090 เข้าสู่โปรโตพลาสท์ของเซลล์เจ้าบ้าน ที่เป็น *Streptomyces* นั้น พบว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มมีค่าเท่ากับ 1.27×10^3 และ 9.44×10^4 ทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ ซึ่งจากรายงานของ Matsushima และ Baltz (48)พบว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ702 ขนาด 5.7 กิโลเบส เข้าสู่ *S. fradiae* มีค่าเป็น 2×10^6 ทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ และ มีค่าเป็น 5×10^6 ทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ เมื่อทรานสฟอร์มเข้าสู่ *S. ambofaciens* นอกจากนี้ Hopwood และคณะ (49) ได้รายงานว่า เมื่อทรานสฟอร์มพลาสมิด SCP2* ขนาด 31 กิโลเบส

เข้าสู่ S. *lividans*66 และ S. *coelicolor*A3(2) ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มจะอยู่ในช่วง 10^6-10^7 ทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ ซึ่งจะเห็นว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะที่ได้จากงานวิจัยนั้นมีค่าต่ำกว่ามาก ซึ่ง Richardson และคณะ (50) พบว่า เมื่อนำพลาสมิดพาหะจาก *Streptomyces* สายพันธุ์หนึ่งมาทรานสฟอร์มเข้า *Streptomyces* อีกสายพันธุ์หนึ่ง จะทำให้ ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มมีค่าต่ำมากโดยได้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเพียง 10^4 ทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอเท่านั้น ซึ่งเหตุผลนี้สามารถนำมาสนับสนุนผลการทดลองได้ ทั้งนี้เพราะ พลาสมิดพาหะ pIJ4083/3 ที่นำมาใช้ทรานสฟอร์มเข้า S. *lividans* TK64 นั้น สกัดมาจาก S. *lividans* 1326 ส่วนพลาสมิด pIJ4090 นั้น สกัดมาจาก S. *lividans*TK24 จึงเป็นไปได้ว่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มในการทดลองนี้มีค่าต่ำ

นอกจากนี้จะเห็นว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ4090 ซึ่งมีขนาด 6.5 กิโลเบสมีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อทรานสฟอร์มด้วย pIJ4083/3 ถึง 74 เท่า ซึ่งตรงกับหลักทฤษฎีที่ว่า เมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดขนาดเล็กจะให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มสูงกว่าเมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดขนาดใหญ่

นอกจากขนาดของพลาสมิดแล้ว ยังมีรายงานถึงโครงรูปของพลาสมิดซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเช่นกัน Hopwood และ คณะ (51) รายงานว่า S. *lividans* และ S. *coelicolor* A3(2) เมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดที่อยู่ในรูปวงแหวนปิด (covalently closed circular (ccc)DNA) จะได้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม 10^6-10^7 ทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ แต่เมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดในรูปรีแลกซ์ (relaxed DNA) ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มจะลดลงประมาณ 10-100 เท่า (49) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Bibb และคณะ (51)

จากผลการทดลอง ในตารางที่ 3 ซึ่งแสดงผลของ ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างได้ โดยที่เมื่อทรานสฟอร์มด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี pUC19 pT7-7 pIJ4083/3 และ pIJ4090 เป็นพลาสมิดพาหะ พบว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเท่ากับ 1.36×10^3 80 33 และ 1.98×10^3 ทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าเมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดพาหะในรูปวงแหวนปิด (จากตารางที่ 2) ประมาณ 97 67 39 และ 48 เท่า

ตามลำดับ ทั้งนี้เพราะ ในการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการเชื่อมดีเอ็นเอที่ต้องการเข้ากับพลาสมิดพาหะที่ผ่านการกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกจากปลาย 5'-phosphate แล้วนั้น ภายหลังการเชื่อมกันของ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิดพาหะจะมีจุดนิค (nick) เกิดขึ้นบนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 2 จุดเสมอ เพราะไม่สามารถเกิดพันธะ ฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างปลาย 5'-hydroxyl ของพลาสมิดพาหะ และ ปลาย 3'-hydroxyl ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำมาเชื่อมต่อได้ ทำให้โครงรูปของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดอยู่ในรูปรีแลกซ์เสมอ (53) เมื่อนำมาใช้ในการทรานสฟอร์ม จึงทำให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับการทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดในรูปวงแหวนปิด ในตารางที่ 2

จากการที่ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์เมชันใน *Streptomyces* มีค่าต่ำมาก ทำให้การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เพื่อเพิ่มการผลิตไซแลเนสโดยใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces* ไม่ได้ผล และ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 16 และ 18 ช่องที่ 6 จะเห็นว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มีขนาดใหญ่มาก ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเกิด multiple insert กล่าวคือ ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหนึ่งๆ จะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกันมากกว่า 2 ชิ้นขึ้นไป ซึ่ง Kieser และ Melton (54) กล่าวว่า การเกิด multiple insert จะทำให้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดไม่เสถียรและมีโอกาสเกิดการกำจัดชิ้นส่วนที่มีการซ้ำกันออกไปสูง (internal recombination and deletion of palindrome) และเมื่อสุ่มตัวอย่างทรานสฟอร์แมนท์ เพื่อสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาตรวจสอบขนาด พบว่า โคลนที่ได้มีขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เท่ากับพลาสมิดพาหะเดิม จากรายงานของ Hunter (55) กล่าวว่าปลายเหนียว (sticky end) ของพลาสมิดพาหะที่กำจัดหมู่ฟอสเฟตออกแล้ว เมื่อทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน บางครั้งสามารถเกิดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ขึ้นได้ใหม่ ซึ่งเรียกปฏิกิริยาการเกิดลักษณะเช่นนี้ว่า "chewed back" ด้วยเหตุผลนี้และการเกิดการกำจัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกไปของ multiple insert ทำให้เมื่อสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้ว พบว่าให้ขนาดเท่ากับพลาสมิดพาหะเดิม

สำหรับการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เพื่อเพิ่มการผลิตไซแลเนสในระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *E. coli* นั้น มีงานวิจัยไม่มากนักที่จะประสบผลสำเร็จในการนำยีนโครงสร้างจาก *Streptomyces* ให้แสดงออกในระบบเซลล์ของ *E. coli*

แต่อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยของ Robbins และคณะ (56) ที่สามารถนำยีนที่ผลิตเอนไซม์ endoglycosidase H จาก S. *plicatus* มาแสดงออกใน *E. coli* ได้ แม้ว่าประสิทธิภาพจะไม่ดีนัก

สำหรับในงานวิจัยนี้ ได้นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนจาก Streptomyces sp.42-9 มาสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและตรวจสอบการแสดงออกใน *E. coli* DS941 ซึ่ง Prof. D. Sherratt แห่ง Institute of Genetic, University of Glasgow, U.K. ได้ใช้ในงานโคลนยีนของ Streptomyces (personal communication, 1992) โดยให้ไซแลเนสยีนอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน *lacZ* บนพลาสมิดพาหะ pUC19 แล้วแสดงออกใน *E. coli* DS941 แต่ในงานวิจัยนี้พบว่า เมื่อนำทั้งน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดแยกจากเซลล์ไปตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส ไม่พบว่ามีโคลนใดให้แอคติวิตีของไซแลเนส แต่โคลนเหล่านี้สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LA ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ ให้โคโลนีสีขาว เมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสารประกอบ x-gal และ IPTG แสดงว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกเข้าไประหว่างยีน *lacZ* ของพลาสมิดพาหะ pUC19 ทำให้ *lacZ* ไม่สามารถแสดงออกได้ จึงไม่มีเอนไซม์ β-galactosidase ไปตัดพันธะระหว่างสาร x และ gal ออกจากกัน โคโลนีของเชื้อที่รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าไป จึงมีสีขาวและสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LA ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน สาร x-gal และ IPTG นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ก็พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะเดิม ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 19 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเหล่านี้ คือ p19C-1 p19C-2 และ p19C-3

เนื่องจากไม่พบการแสดงออกของไซแลเนสยีนเมื่อใช้ *E. coli* DS941 เป็นเซลล์เจ้าบ้านจึงได้ทดลองเปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้านเป็น *E. coli* JM109 ซึ่ง Miyashita และคณะ (57) ได้โคลนยีนจาก S. *lividans* 66 ที่ผลิต chitinase เข้ากับพลาสมิดพาหะ pUC18 แล้วพบว่าสามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* JM109

แต่จากการทดลอง ก็ยังคงไม่พบว่ามีโคลนใดให้แอคติวิตีของไซแลเนสเช่นกัน เมื่อสุ่มตัวอย่างมาทดสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ก็พบว่าได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4 ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าพลาสมิดพาหะเดิม (ดังรูปที่ 19)

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากการใช้ *E. coli* DS941 คือ p19C-1 p19C-2 และ p19C-3 มาตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII พบว่าได้ชิ้นส่วน 2 ส่วน

คือ ส่วนของพลาสมิดพาหะ pUC19 ขนาด 2.7 กิโลเบส และชิ้นส่วนที่มีไซแลเนสยีนขนาดประมาณ 5.4 กิโลเบส ดังรูปที่ 21 ขณะที่เมื่อตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากการใช้ *E. coli* JM109 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน คือ p19C-4 พบว่าขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปมีขนาดเล็กลงเล็กน้อย โดยมีขนาด 5.2 กิโลเบส ดังรูปที่ 22 นอกจากนี้เมื่อนำมาตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2 ที่ได้จาก *E. coli* DS941 พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-2 สามารถถูกตัดแล้วแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปออกจากพลาสมิดพาหะได้ ทั้งนี้เนื่องจากที่ปลายทั้งสองด้านของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปสามารถตัดได้ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I ดังกล่าวแล้ว แต่รีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-4 ไม่สามารถตัดแยกชิ้นส่วนดังกล่าวออกมาได้ แต่ถูกตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Xba*I ได้เพียงตำแหน่งเดียว ทำให้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเปลี่ยนโครงรูปจากวงแหวนปิด เป็นอยู่ในรูปเส้นขนาดประมาณ 8 กิโลเบส ดังรูปที่ 24 ซึ่งก็อาจเป็นไปได้ว่า มีการกำจัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนออกไป (DNA deletion) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอ (DNA modification) โดยเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งชิ้นส่วนที่ถูกกำจัดออกไปอาจมีผลทำให้ยีนไม่สามารถแสดงแอคติวิตีของไซแลเนสได้

จะเห็นว่า ทรานสฟอร์แมนท์เหล่านี้ ไม่สามารถแสดงแอคติวิตีของไซแลเนสได้ แม้ว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดได้รับเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสเข้าไปแล้วก็ตาม ทั้งนี้ได้มีรายงานที่กล่าวถึงความแตกต่างของ อัตราส่วนระหว่างเบสชนิดต่างๆ บนดีเอ็นเอของ *Streptomyces* และ *E. coli* ซึ่งกล่าวว่า ดีเอ็นเอของ *E. coli* นั้นมีปริมาณเบสของ A+T (อะดีนีนและไทมีน) สูงกว่า G+C (กวานีนและไซโตซีน) ขณะที่ดีเอ็นเอของ *Streptomyces* นั้น มีปริมาณของ G+C อยู่ถึง 73% ของเบสทั้งหมดบนดีเอ็นเอ ซึ่งสูงกว่า A+T (51,58) ทั้งนี้เนื่องจากพัฒนาการในด้านพันธุกรรมของ *Streptomyces* มีความซับซ้อนมากกว่าใน *E. coli* ดังนั้นรหัสที่ใช้ในการอ่านให้เป็น mRNA (codon-usage) ใน *Streptomyces* จึงไม่สามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* ขณะที่ codon-usage ของ *E. coli* ซึ่งมีพัฒนาการน้อยกว่าสามารถแสดงออกได้ใน *Streptomyces* (58) สาเหตุนี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ทรานสฟอร์แมนท์ที่มี *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านไม่สามารถแสดงแอคติวิตีของไซแลเนสของ *Streptomyces* ได้

นอกจากนี้ การที่ทรานสฟอร์แมนท์ไม่แสดงแอคติวิตีของไซแลเนสอาจเกิดจากทิศทางการอ่านรหัส (orientation) ของโปรโมเตอร์ยีน *lacZ* กับทิศทางของไซแลเนสยีนไม่อยู่ในทิศทางเดียวกัน ทำให้การแสดงออกของไซแลเนสยีนไม่อยู่ภายใต้

การควบคุมของโปรโมเตอร์ยีน lacZ ซึ่งหากเกิดจากสาเหตุนี้ก็สามารถแก้ไขได้โดยเปลี่ยนพลาสมิดพาหะเป็น pUC18 ซึ่งมีทิศทางการอ่านของโปรโมเตอร์ยีน lacZ สวนทางกับพลาสมิด pUC19 (26-28) ดังที่กล่าวมาแล้วในบทนำว่า การอ่านรหัสของยีนจะเกิดขึ้นโดยใช้ดีเอ็นเอเป็นแม่แบบเพียงสายเดียวคือ สายที่เรียกว่า sense strand หากทิศทางการอ่านรหัสที่ถูกต้องของไซแลเนสยีนเชื่อมเข้ากับพลาสมิดที่สาย non-sense ก็จะทำให้ไซแลเนสยีนไม่สามารถถูกอ่านและแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนได้ (19)

หรือสาเหตุที่ทำให้ทรานสฟอร์แมนท์ ไม่แสดงแอคติวิตีของไซแลเนส อีกกรณีหนึ่งอาจเกิดจากสาเหตุในทำนองเดียวกันกับการเกิด frame-shift mutation ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนเข้ากับพลาสมิดพาหะแล้ว ทำให้ชุดการเรียงตัวของเบส(frame) ที่จะเป็นตัวกำหนดการเรียงตัวของกรดอะมิโนเคลื่อนไปเป็นผลให้การเรียงตัวของกรดอะมิโนผิด โดยเกิดเป็นโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่มีแอคติวิตีของไซแลเนสแทน (59,60)

เมื่อไม่สามารถใช้โปรโมเตอร์ของยีน lacZ มาควบคุมการผลิตไซแลเนสได้ ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนมาใช้พลาสมิดพาหะ pT7-7 ซึ่งมีรายงานว่าสามารถถอดรหัสยีนของ Streptomyces ได้ (32) โดยการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างได้เข้า *E. coli* พร้อมๆ กับพลาสมิด pGP1-2 ซึ่งสร้างเอนไซม์ RNA polymerase ที่มีความจำเพาะต่อโปรโมเตอร์ของ ϕ10 บนพลาสมิดพาหะ pT7-7 โดยคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LA ที่มีทั้งยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินซึ่งเป็น marker ของ pT7-7 และกานามัยซินซึ่งเป็น marker ของ pGP1-2 จากผลการทดลองพบว่ามี 4 โคลนเท่านั้น ที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ เมื่อสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนเหล่านี้พบว่ามีเพียงรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3 เท่านั้นที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-1 p7C-2 และp7C-4 นั้นมีขนาดเท่ากับพลาสมิดพาหะเดิมคือ pT7-7

จากรูปที่ 20 จะเห็นว่าทุกโคลนมีพลาสมิด pGP1-2 ซึ่งใช้ในการทรานสฟอร์มร่วมกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างได้ แสดงว่าการทรานสฟอร์เมชันเกิดได้สมบูรณ์ จึงทำให้ทรานสฟอร์แมนท์เหล่านี้ สามารถเจริญได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด แต่จะเห็นว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอของ pGP1-2 นั้น น้อยกว่าแถบของพลาสมิดพาหะ pT7-7 หรือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด ทั้งนี้เนื่องจาก พลาสมิด pGP1-2 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ pACYC184 ดังนั้นจึงมีจุดเริ่มต้นของการถ่ายแบบเป็น p15A (32)

ทำให้การเพิ่มจำนวนของพลาสมิดเป็นแบบสตริงเจนท์ (stringent control) (27) ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอได้อย่างอิสระ ขณะที่ pT7-7 นั้นเป็นอนุพันธ์ของพลาสมิด pBR322 ซึ่งมีจุดเริ่มต้นของการถ่ายแบบเป็น colE1 ดังนั้นการเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอจึงเป็นแบบรีแลกซ์ (relaxed control) สามารถเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอได้โดยไม่ขึ้นกับเซลล์เจ้าบ้าน จึงทำให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอสูงกว่าพลาสมิด pGP1-2 ดังรูปที่ 20

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3 มาตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII พบว่าสามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปขนาด 5.4 กิโลเบส ออกจากพลาสมิดพาหะ pT7-7 ได้ และเนื่องจากบนพลาสมิด pGP1-2 มีตำแหน่งที่สามารถตัดได้ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์นี้เช่นกัน จึงทำให้ pGP1-2 ที่ตำแหน่งโครงรูปวงแหวนปิด (รูปที่ 23 ช่องที่ 3 4 และ 6) เปลี่ยนตำแหน่งไปอยู่ที่ตำแหน่งโครงรูปแบบเส้น ซึ่งบอกขนาด 7.2 กิโลเบส (รูปที่ 23 ช่องที่ 5 และ 7)

ในระบบการทำงานของพลาสมิด pT7-7 และ pGP1-2 นั้น ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โปรโมเตอร์ P_L บนพลาสมิด pGp1-2 สามารถทำงานได้โดยสร้างเอนไซม์ RNA polymerase ซึ่งมีความจำเพาะสูงต่อโปรโมเตอร์ ϕ10 ที่อยู่บนพลาสมิด pT7-7 (หรือรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี pT7-7 เป็นพลาสมิดพาหะ) ซึ่งเมื่อเอนไซม์ RNA polymerase จับกับโปรโมเตอร์ จะสามารถอ่านและแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ในปริมาณสูง เนื่องจาก RNA polymerase และ โปรโมเตอร์มีความจำเพาะต่อกันสูง (21) แต่จากการทดลอง ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3 ก็ไม่สามารถแสดงแอคติวิตีของไซแลเนส ทั้งนี้อาจเกิดจากเอนไซม์ RNA polymerase จาก pGP1-2 ทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ เพราะขณะที่เลี้ยง *E. coli* ที่มีพลาสมิดเหล่านี้นั้น เซลล์ของ *E. coli* เอง ก็สามารถผลิตเอนไซม์ RNA polymerase ที่สามารถจับกับที่โปรโมเตอร์ϕ10 ได้เช่นกัน มีรายงานการเติมยาปฏิชีวนะไรแฟมปิซิน (rifampicin) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปกระตุ้นด้วยอุณหภูมิสูง เพื่อยับยั้งการสร้างเอนไซม์ RNA polymerase ของ *E. coli* และ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการอ่านและแปลรหัส พบว่าผลผลิตของโปรตีนที่ต้องการมีปริมาณสูงขึ้น (32)

นอกจากนี้ การที่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างได้ ไม่สามารถแสดงแอคติวิตีของไซแลเนสได้ อาจเกิดจากการที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดได้รวมโปรโมเตอร์ยีนและยีนควบคุมเดิมจาก *Streptomyces* sp.42-9 ไว้ด้วย ดังนั้น

จึงทำให้การแสดงออกของไซแลเนสยีน ไม่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ยีนต่างๆ ของพลาสมิดพาหะโดยตรง อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถระบุได้ว่า รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C ที่นำมาศึกษาไซแลเนสยีนนี้ มียีนโครงสร้างของไซแลเนสอยู่สมบูรณ์หรือไม่ วิธีที่ดี ในการตรวจสอบว่ามียีนโครงสร้างสมบูรณ์อยู่หรือไม่ ในปัจจุบันคือการใช้ DNA probe technique ซึ่งการติดตามยีนโดยวิธีนี้มีความจำเพาะสูง (specificity) และมีความไวในการตรวจสอบสูง (sensitivity) สามารถบอกความแตกต่างได้ใน DNA ปริมาณน้อยมากๆ และมีความง่ายในการใช้(simplicity) (61) หากนำเทคนิคนี้มาใช้ในการติดตามไซแลเนสยีนก็จะมีความแม่นยำ และ ใช้เวลาสั้นกว่าการติดตามยีนโดยวิธีอื่น แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ ยังไม่สามารถสร้าง DNA probe ที่เหมาะสม ในการติดตามไซแลเนสยีนได้ จึงยังไม่พร้อมที่จะนำเทคนิคนี้มาใช้

แม้ว่าจะไม่สามารถตรวจสอบ แอคติวิตีของไซแลเนสในโคลนต่างๆ ที่รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนขนาด 5.4 กิโลเบสเข้าไป การทดลองขั้นต่อมาได้ตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับเซลล์เจ้าบ้าน

ซึ่งก่อนที่จะนำสารละลายโปรตีนมาทำ SDS-PAGE ได้นำไปทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (45) ก่อน แล้วคำนวณปริมาณโปรตีน เพื่อนำมาทำ SDS-PAGE ตัวอย่างละ 400 ไมโครกรัมเท่ากัน แต่จากรูปจะเห็นว่า ปริมาณโปรตีนในแต่ละช่องมีความเข้มของแถบโปรตีนแตกต่างกัน โดยเฉพาะสารละลายโปรตีนที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อในรูปที่ 25

Bradford (62) รายงานว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสีในปฏิกิริยาการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry ได้แก่ โปตัสเซียมไอออน แมกนีเซียมไอออน EDTA Tris ไธออล (thiol) และคาร์โบไฮเดรต ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าปริมาณโปรตีนที่ตรวจสอบได้นั้นเป็นค่าที่เกิดจากการรบกวน (interfere) ของปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในบัฟเฟอร์ น้ำ และสารสกัดจากเซลล์

จากรายงานวิทยานิพนธ์ของ กมลวรรณ มั่นภักดี (46) ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. 42-9 ในด้านการทำให้บริสุทธิ์ และ ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ พบว่าไซแลเนสของ *Streptomyces* sp. 42-9 เมื่อทำ SDS-PAGE เอนไซม์ไซแลเนสที่ได้เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ที่ไม่มีหน่วยย่อย โดยมีขนาดของน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28000 ดาลตัน

และเนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำมาสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในงานวิจัยนี้เป็นไซแลเนสยีนที่ได้จาก Streptomyces sp. 42-9 ดังนั้นจึงคาดว่า ขนาดของน้ำหนักโมเลกุล ของไซแลเนสจากเซลล์เจ้าบ้าน ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดก็ควรจะมีขนาดเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน และ จากผลการทดลองนี้ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ ไม่แสดงแอคติวิตีของไซแลเนส และผลการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนจากเซลล์เจ้าบ้าน และเซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิดพาหะ หรือ เซลล์เจ้าบ้านที่รับเอารีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าไป โดยวิธี SDS-PAGE ต่างก็มีรูปแบบของโปรตีนที่คล้ายกัน จึงเป็นการยืนยันได้ว่าทรานสฟอร์แมนท์เหล่านี้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้ และเมื่อได้ทดลองใส่ IPTG ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19C-1 p19C-2 p19C-3 และ p19C-4 จากนั้นนำโปรตีนมาตรวจสอบรูปแบบ ก็ยังคงให้รูปแบบของโปรตีนเหมือนเดิม ไม่มีแถบของโปรตีนใดเด่นชัดขึ้นมา ในกรณีของ *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p7C-3ก็เช่นเดียวกันคือเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเป็น 42 องศาเซลเซียส รูปแบบโปรตีนที่ได้ก็ยังคงเป็นเช่นเดิม

แม้ว่างานวิจัยนี้ จะไม่ประสบผลสำเร็จในด้านการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส แต่จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างได้ คือ p19C-1 p19C-2 p19C-3 และ p7C-3 ก็มีประโยชน์ในแง่ที่หากจะนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสไปใช้และศึกษาในด้านต่างๆ เช่น ติดตามด้วย DNA probe หรือ ตรวจสอบแผนที่เรสตริกชันของไซแลเนสยีน ก็สามารถทำได้สะดวกกว่า เมื่อชิ้นส่วนนี้อยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C ทั้งนี้เนื่องจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างได้เหล่านี้ใช้กับ ระบบเซลล์เจ้าบ้านของ *E. coli* ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณมากได้ในเวลาสั้น ดังนั้นปริมาณพลาสมิดที่สกัดได้ในแต่ละครั้งจึงสูงกว่าการสกัดจาก Streptomyces ทั้งนี้เพราะระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* เพื่อสกัดพลาสมิด ใช้เวลาเพียง 16 ชั่วโมง ซึ่งเร็วกว่า Streptomyces ที่ใช้เวลาเลี้ยงเซลล์นานถึง 5 วัน

ตารางที่ 5 สรุปผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

เชื้อจุลินทรีย์	พลาสมิดพาหะ	รีคอมบิแนนท์พลาสมิด	ขนาดของชิ้นส่วน DNA เมื่อตัดด้วย *Hind*III (กิโลเบส)
E. coli DS941	pUC19	p19C-1	5.4
	pUC19	p19C-2	5.4
	pUC19	p19C-3	5.4
E. coli JM109	pUC19	p19C-4	5.2
E. coli DS941	pT7-7	p7C-3	5.4
S. *lividans* TK64	pIJ4083/3	-	-
S. *lividans* TK64	pIJ4090	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย