บทที่ 1

บทนำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (molecular genetic) ได้รับการพัฒนาให้ก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว มีการศึกษาและวิจัยกันอย่างแพร่หลายและต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอมาใช้ เพื่อให้สิ่งมีชีวิตสร้างสาร หรือ โปรตีนที่มีคุณสมบัติตามต้องการ ซึ่งรู้จักกันในชื่อของ พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) หรือ รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเทคโนโลยี (recombinant DNA technology) กระบวนการนี้จะเป็นประโยชน์ได้อย่างสมบูรณ์ก็ต่อเมื่อ ลักษณะทางพันธุกรรมที่สร้างขึ้นใหม่นั้น สามารถถูกถ่ายทอดโดยการแสดงออกของยีน (gene expression) เป็นโปรตีนอันเป็นส่วนประกอบสำคัญต่อการดำรงชีวิตได้ ทั้งนี้เพราะเป็นที่ทราบกันดีว่า สิ่งมีชีวิตทุกชนิดประกอบด้วยเซลล์ และภายในเซลล์ทุกเซลล์มีปฏิกิริยาทางชีวเคมีเกิดขึ้นเพื่อให้ได้สารอาหารและพลังงานที่จะนำไปใช้ในการดำรงชีวิต ปฏิกิริยาทางชีวเคมีนี้จะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมี เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนมาเกี่ยวข้อง และโดยที่โปรตีนทุกชนิดที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ มีลำดับการเรียงตัวของเบสบนดีเอ็นเอหรือยีนเป็นตัวกำหนด ดังนั้นงานวิจัยส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นนำเทคนิคการทำรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอมาเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอ เพื่อผลิตโปรตีนที่สิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ ผลิตได้น้อยให้สามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการนั้นได้ในปริมาณที่มากขึ้น มีคุณภาพดีขึ้น หรือ อาจนำมาใช้เพื่อผลิตโปรตีนชนิดใหม่ๆ

ไซแลเนส

ไซแลเนส(xylanase)เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อทั้งสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรม เอนไซม์นี้จะย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลไซโลส หรือ ไซโลโอลิโก-แซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ไซแลนเป็นส่วนประกอบหลักที่พบอยู่มากในโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสในพืชทั่วไป มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-xylosidic เมื่อพืชถูกนำไปใช้ในการเกษตรและอุตสาหกรรม

จะมีส่วนที่เหลือทิ้งเช่น ฟางข้าว กากรำข้าว เปลือกเมล็ดฝ้ายและเปลือกข้าวโพด เป็นต้น ดังนั้นเอนไซม์ไซแลเนสจึงเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญ ในการย่อยวัตถุดิบที่เหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมได้ (1-3) ซึ่งนอกจากจะช่วยลดการเกิดมลภาวะทางน้ำและทางอากาศ จากการทิ้งหรือเผาวัตถุดิบเหล่านี้แล้ว น้ำตาลไซโลสที่ได้จากการย่อยไซแลนยังสามารถนำไปใช้ ผลิตสารหรือผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูงขึ้นได้อีก เช่น เอธานอล (ethanol) โปรตีนเซลเดี่ยว (single cell protein) ไซลูโลส (xylulose) และ ไซลิทอล (xylitol) เป็นต้น (1,4,5) นอกจากนี้น้ำตาลไซโลสยังเป็นสารเหนี่ยวนำ (inducer) ในการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสโดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโตส (high fructose syrup) ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมที่มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีแนวโน้มว่าจะเป็นที่ต้องการของตลาดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อีกด้วย (6,7)

จากรายงานต่างๆ พบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้ เช่น *Bacillus circulans* (1) *B. polymyxa* (5) *B. subtilis* (8) *Aeromonas* sp.(9) *Clostridium acetobutylicum* (10) *Cellulomonas* sp. (11) และ *Streptomyces* sp. 42-9 (12) เป็นต้น

สำหรับ *Streptomyces* sp. 42-9 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย ซึ่งกาญจนา วรวิทย์วัฒนะ (12) ได้ทำการแยกเชื้อและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ จากนั้น อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต (13) ได้ทำการโคลนไซแลเนสยีนขนาด 3-8 กิโลเบส จาก *Streptomyces* sp. 42-9 เข้าสู่ *Streptomyces* sp. 190-1 ซึ่งผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้ในปริมาณต่ำ โดยใช้พลาสมิด pIJ699 และ pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ พบว่าสามารถปรับปรุงสายพันธุ์ ของ *Streptomyces* sp. 190-1 ให้สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้เพิ่มขึ้น 7-12 เท่า แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตของเอนไซม์ก็ยังคงต่ำกว่า *Streptomyces* sp. 42-9 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การแสดงออกของยีนที่ทำการโคลนเข้าไปนั้น ยังอยู่ภายใต้การควบคุมของยีนควบคุม (regulatory gene) และประสิทธิภาพของโปรโมเตอร์ (promoter) ยังไม่ดีพอ

อนึ่ง จากรายงานการวิจัยของ นฤมล ศุภจรรยา (14) ซึ่งทำการศึกษาจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptomycetes* ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย และ พบว่า *Streptomyces* sp. 190-1 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ โดยมีน้ำตาล

ไซโลสเป็นสารชักนำการผลิต เมื่ออรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต (13) ทำการเคลื่อนย้ายยีนจาก *Streptomyces* sp. 42-9 เข้าไปใน *Streptomyces* sp. 190-1 และสามารถทำให้ *Streptomyces* sp. 190-1 มีประสิทธิภาพในการผลิตไซแลเนสได้สูงขึ้น ยังพบว่า *Streptomyces* sp. 190-1 ก็ยังคงผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ แม้ว่าความสามารถในการผลิตจะลดลงเล็กน้อย

Changas และ คณะ (15) รายงานการโคลนไซแลเนสยีนจาก *Thermomonospora fusca* รวมทั้งการโคลนชิ้นส่วนย่อย (subcloning) ของยีน โดยใช้ pBR322 เป็นพลาสมิดพาหะ พบว่าขนาดของดีเอ็นเอที่ถอดรหัสให้เอนไซม์ไซแลเนสได้ มีความยาว 2.1 กิโลเบส ซึ่งได้รวมโปรโมเตอร์และยีนควบคุมไว้ด้วย

Mondou และ คณะ (16) ได้ทำการโคลนไซแลเนสยีนของ *Streptomyces lividans* 1326 เข้าสายพันธุ์เดิมซึ่งทำให้เกิดกลายพันธุ์แล้วไม่สามารถผลิตไซแลเนสได้ โดยใช้พลาสมิดพาหะ pIJ702 พบว่าขนาดของไซแลเนสยีนที่รวมเอายีนควบคุมไว้ด้วย มีความยาวประมาณ 2 กิโลเบส และให้ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น 60 เท่า ของสายพันธุ์ที่ทำให้กลายพันธุ์แล้ว เมื่อมีไซแลนเป็นตัวเหนี่ยวนำ

Bhalerao และคณะ(11)ใช้ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะเพื่อโคลนไซแลเนสยีนของ *Cellomonas* sp.(NCIM2353) แล้วให้แสดงออกใน *E. coli* พบว่าขนาดของไซแลเนสยีนที่รวมทั้งโปรโมเตอร์และยีนควบคุมไว้มีขนาดเพียง 1.42 กิโลเบสเท่านั้น

Yang และคณะ (17) โคลนไซแลเนสยีนใน *Bacillus circulans* และพบว่าขนาดของไซแลเนสยีนมีขนาด 1.3 กิโลเบสและการผลิตเอนไซม์สูงกว่าสายพันธุ์เดิม 23 เท่า ผู้วิจัยเสนอว่าการที่ผลผลิตของเอนไซม์สูงขึ้นนั้น อาจเกิดจากการเพิ่มจำนวนของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดขนาดเล็กมีอัตราเร็วกว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดขนาดใหญ่ จึงทำให้มีจำนวนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดขนาดเล็กมากขึ้น นอกจากนี้ การอ่านและถอดรหัสของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดขนาดเล็กให้เป็นโปรตีนเกิดได้เร็วขึ้นเป็นผลทำให้ผลผลิตของเอนไซม์มีปริมาณสูงขึ้นด้วย

Iwasaki และคณะ(18) ทำการโคลนไซแลเนสยีนจาก *Streptomyces* sp. No.36a เข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK 64 โดยใช้พลาสมิดพาหะ pIJ702 จากนั้นทำการโคลนชิ้นส่วนย่อยของยีน และพบว่าขนาดของดีเอ็นเอที่เป็นรหัสในการผลิตไซแลเนสมีความยาวประมาณ 1.04 กิโลเบส ภายหลังจากการโคลนชิ้นส่วนย่อยของยีน พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ได้ถึง 73 เท่า

การแสดงออกของยีนเพื่อให้ได้เอนไซม์หรือโปรตีนต่างๆ ต้องผ่านกระบวนการ 2 ขั้นตอน (19) คือ การอ่านรหัส (transcription) ให้เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA)และการแปลรหัส (translation) ให้โปรตีน ในส่วนของการอ่านรหัส ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของการแสดงออกของยีนนั้น มีความคล้ายคลึงกับกระบวนการถ่ายแบบดีเอ็นเอ (DNA replication) แต่การถ่ายแบบดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นพร้อมกันทั้งสองสายและเกิดต่อเนื่องกันจนครบทั้งโมเลกุลของดีเอ็นเอ ส่วนการอ่านรหัสจะเกิดขึ้นเฉพาะบางส่วนของดีเอ็นเอที่เรียกว่า ยีนหรือกลุ่มยีน (gene หรือ gene cluster) เท่านั้น อีกทั้งใช้ดีเอ็นเอเป็นแม่แบบเพียงสายเดียว (sense strand) ขั้นตอนการอ่านรหัสเริ่มต้นด้วยเอนไซม์ DNA dependent RNA polymerase หรือ เอนไซม์ RNA polymerase ไปจับกับดีเอ็นเอบริเวณก่อนถึงจุดเริ่มต้นของยีนที่เรียกว่าโปรโมเตอร์ (promoter) ซึ่งมีลักษณะเฉพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จากนั้นดีเอ็นเอจะคลายเกลียวออกและเอนไซม์จะเคลื่อนที่ไปบนสายดีเอ็นเอแม่แบบ พร้อมทั้งเร่งปฏิกิริยาการเกิดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ของสายอาร์เอ็นเอในทิศทาง 5'---> 3' โดยใช้ไรโบนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (ATP UTP CTP และ GTP) ที่มีอยู่ภายในเซลล์ เมื่อเอนไซม์ RNA polymerase เคลื่อนที่ถึงจุด termination ของยีน สาย mRNA จะแยกออกจากดีเอ็นเอแม่แบบและจะถูกนำไปเป็นแบบในการสร้างโปรตีน ในบางกรณี mRNA ที่สร้างขึ้นอาจถูกตัดบางส่วนออกไปหรือเพิ่มบางส่วนเข้ามาก่อนที่จะถูกส่งต่อไปเพื่อแปลรหัสเป็นโปรตีน ซึ่งกรณีนี้มักพบว่าเกิดในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง

ในขั้นที่สอง คือการแปลรหัส (translation) ซึ่งเป็นการแปลรหัสของนิวคลีโอไทด์บนสาย mRNA ให้เป็นลำดับของกรดอะมิโนบนสายโปรตีน โดยมีรหัสเบสทุกๆ 3 ตัวบน mRNA เรียกว่า codon เป็นตัวกำหนดว่าโปรตีนชนิดนั้นๆ จะมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนอย่างไร จากการศึกษาพบว่า codon แรกบน mRNA ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดจะเหมือนกันคือ AUG (แต่บางครั้งอาจพบว่าเป็น GUG) การแปลรหัสเป็นโปรตีนจะหยุดเมื่อพบรหัสหยุดบน mRNA ซึ่งได้แก่ UAA UAG และ UGA

ในการแสดงออกของยีนนั้นมีปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้องหลายประการ แต่พบว่าทั้งในโปรคาริโอต และ ยูคาริโอต ปฏิกิริยาในขั้นการถอดรหัสเป็นขั้นตอนสำคัญที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน และปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนมากที่สุด คือ โปรโมเตอร์ (20,21)

โปรโมเตอร์

โปรโมเตอร์ เป็นส่วนของยีนบนดีเอ็นเอที่มีสัญญานที่จะให้เอนไซม์ RNA polymerase ที่มีความจำเพาะต่อกันมาจับและเริ่มสังเคราะห์ mRNA ในบางกรณีบริเวณโปรโมเตอร์อาจเป็นตำแหน่งที่ให้ repressor หรือ activator มาจับ ซึ่งก็จะมีผลต่อการทำงานของโปรโมเตอร์ (20) ในโปรคาริโอต พบว่า โปรโมเตอร์จะอยู่บริเวณตำแหน่ง -10 และ -35 เรียกว่า Pribnow box และ -35 region ตามลำดับ ส่วนในยูคาริโอตโปรโมเตอร์จะอยู่ที่ตำแหน่ง -25 เรียกว่า TATA box และ บางครั้งพบว่าอยู่ที่ตำแหน่ง -70 ด้วย เรียกว่า Hogness box หรือ CAAT box (19) การเรียงตัวของเบสบริเวณโปรโมเตอร์ จะมีความคล้ายคลึงกันในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน หรือ ในยีนชนิดเดียวกัน เรียกลักษณะของเบสที่มีความคล้ายคลึงกันนี้ว่า consensus sequences จากความรู้ที่ได้จากการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของ *E. coli* พบว่า consensus sequences มีการเรียงตัวของเบสเป็น TATAAT (ที่บริเวณ Pribnow box) และ TTGACA (ที่บริเวณ -35 region) ซึ่งโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูง (strong promoter) จะมีการเรียงตัวของเบสคล้ายคลึงกับการเรียงตัวของเบสใน consensus sequences (ตารางที่ 1) หากมีการกลายพันธุ์ (mutation) ของเบสในบริเวณนี้ไปเพียง 1 หรือ 2 ตัว ก็จะมีผลทำให้มีการเพิ่ม หรือ ลดประสิทธิภาพของโปรโมเตอร์ได้ (20-22) การใช้โปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูง จะทำให้เอนไซม์ RNA polymerase จับกับโปรโมเตอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ป้องกันการทำลายจากเอนไซม์ดีเอ็นเอส (DNase) และยังทำให้ยีนถูกอ่านรหัสได้ในอัตราเร็วที่สูงขึ้น ผลก็คือทำให้ได้ผลผลิตโปรตีนในปริมาณที่สูงขึ้นด้วย (19,22)

แม้ว่าโปรโมเตอร์จะมีลักษณะเฉพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด แต่พัฒนาการทางด้านรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเทคโนโลยี ก็สามารถนำโปรโมเตอร์และยีนโครงสร้างจากต่างแหล่งมาใช้ร่วมกันและทำงานได้ ด้วยการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการต่อยีนโครงสร้างที่ต้องการเข้ากับพลาสมิดพาหะที่มีโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งพลาสมิดพาหะแต่ละชนิดก็จะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไป ดังนั้นจึงต้องเลือกพลาสมิดพาหะให้เหมาะสมกับงานที่ต้องการ ตัวอย่างพลาสมิดที่น่าสนใจ ได้แก่ pUC19 pT7-7 pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 pIJ4083/4 และ pIJ4090

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 การเรียงตัวของลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ (23-25)

ยีนต่างๆ	-35 region	Pribnow box
consensus sequences	TTGACA	TATAAT
E. coli		
lac UV5	TTTACA	TATAAT
trp	TTGACA	TTAACT
tac	TTGACA	TATAAT
tc	TTGACA	TTTAAT
P_L	TTGACA	GACACT
B. subtilis		
PenP	TTGCAT	AATACT
α-Amylase	TTGTTA	TATAAT
ϕ29 A1	TTGACA	TATAAT
Yeast		
2μCi protein	TTGACA	TATAAT
Streptomyces sp.		
erm E1	TGGACA	TAGGAT
erm E2	TTGACG	GAGGAT

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. pUC19

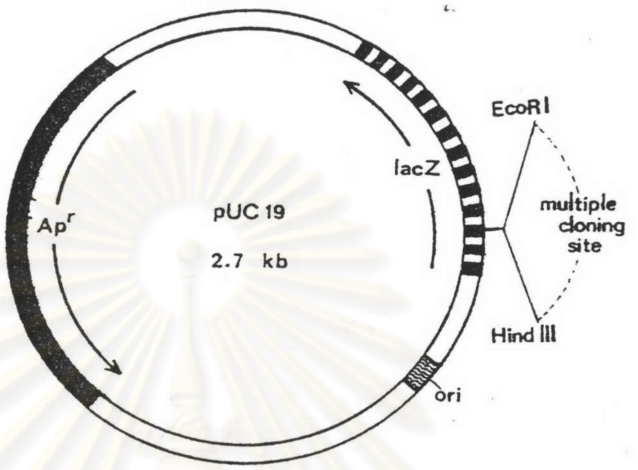
pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะที่ใช้กับระบบเซลล์เจ้าบ้าน (host system) ที่เป็น *E. coli* มีขนาด 2.7 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 1 ประกอบด้วย 2 ส่วน จากพลาสมิด pBR322 คือจุดเริ่มต้นของการถ่ายแบบ (origin of replication)และยีน β-lactamase ซึ่งแสดงคุณสมบัติต้านยาแอมพิซิลลิน (ampicillin resistance, Ap^r) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยยีน *lacZ* ซึ่งเมื่อเลี้ยงเชื้อที่มีพลาสมิดนี้ในอาหารที่มีน้ำตาลแลคโตสและมี IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) เป็นตัวเหนี่ยวนำ *lacZ* จะแสดงออกและผลิตเอนไซม์ β-galactosidase ออกมาย่อยน้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลกลูโคสกับกาแลคโตส(26-28) ถ้าหากน้ำตาลแลคโตสอยู่ในรูปของสารประกอบ x-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) เอนไซม์ β-galactosidase ที่ถูกสร้างขึ้นจะตัดพันธะระหว่างสาร x (5-bromo-4-chloro-3-indolyl) กับ gal (galactoside) เมื่อสาร x เป็นอิสระ จะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีน้ำเงิน ทำให้โคโลนีของเชื้อที่มีพลาสมิดนี้มีสีน้ำเงินด้วย บริเวณยีน *lacZ* ของ pUC19 จะมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายตำแหน่ง (polycloning site) หากมีการใส่ยีนใดๆ เข้าในบริเวณนี้จะทำให้ *lacZ* แสดงออกไม่ได้ สาร x และ gal ยังคงอยู่รวมกัน โคโลนีที่รับเอารีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้เข้าไปจะมีสีขาวตามปกติ ทำให้สะดวกต่อการคัดเลือกโคโลนีที่รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดออกจากโคลนทั้งหมด

ตัวอย่างงานวิจัย ที่ใช้โปรโมเตอร์ของยีน *lacZ* เพื่อเพิ่มผลผลิต เช่น เมื่อ Vigal และคณะ(29)ได้ทดลองเปลี่ยนโปรโมเตอร์ของ *Streptomyces griseus* ซึ่งควบคุมยีนที่ผลิตอะไมเลสด้วยโปรโมเตอร์ของยีน *lacZ* พบว่าแอคติวิตีของอะไมเลสสูงขึ้น 2.5 เท่า

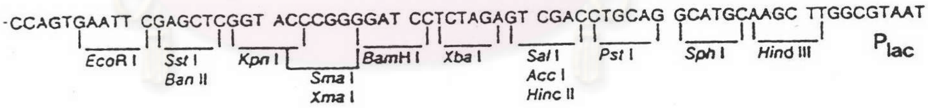
ส่วน Goeddel และคณะ (30) รายงานว่าเมื่อต่อยีนที่ผลิตฮอร์โมนควบคุมการเจริญเข้ากับโปรโมเตอร์ของ *lacZ* พบว่าผลผลิตของฮอร์โมนเพิ่มขึ้น 1-20 เท่า

นอกจากนั้นงานวิจัยของ Oka และคณะ (31) ยังพบว่าผลผลิตของเอนไซม์ leucine dehydrogenase เพิ่มสูงขึ้นเมื่อโคลนยีนของเอนไซม์นี้จาก *Bacillus stearothermophilus* เข้ากับโปรโมเตอร์ของ *lacZ* เป็นต้น

รูปที่ 1 แผนที่เรสตริกชันบางส่วนของพลาสมิด pUC19 (26)



pUC19 multiple cloning site



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ขนาด 2.7 กิโลเบส
- เป็น relaxed plasmid
- มีโปรโมเตอร์ของยีน *lacZ* (P_{lac})
- มียีน *lacZ* ซึ่งผลิตเอนไซม์ β-galactosidase
- มี polycloning site บนยีน *lacZ*
- มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ap^r)

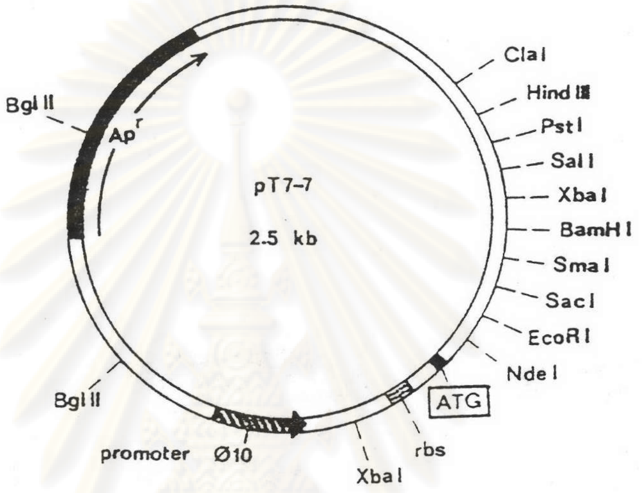
2. pT7-7

pT7-7 เป็นพลาสมิดพาหะที่ใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *E. coli* เช่นกัน มีขนาด 2.5 กิโลเบส ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ของยีน T7 RNA polymerase (ϕ10) ของแบคเทอริโอฝาจ T7 มีจุดเริ่มต้นของการถ่ายแบบและยีนต้านยาแอมพิซิลลินที่ได้จาก pBR322 ถัดจากโปรโมเตอร์ ϕ10 มีตำแหน่งตัดจำเพาะหลายตำแหน่งที่ได้จากพลาสมิด pUC12 ดังรูปที่ 2 (32) การใช้ pT7-7 จะต้องใช้ร่วมกับพลาสมิด pGP1-2 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ pACYC177 มียีนที่ผลิตเอนไซม์ T7 RNA polymerase ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ p_L ของแบคเทอริโอฝาจแลมด้า (λ) และมียีน cI857 ซึ่งสร้าง repressor-โปรตีน ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ T7 RNA polymerase repressor โปรตีนนี้ ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง และยังมียีนต้านต่อยากานามัยซิน (Kan^r)ด้วย ดังรูปที่ 3 เมื่อเลี้ยงเซลล์ที่มีพลาสมิดทั้งสองที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส โปรโมเตอร์ p_L บน pGP1-2 จะถูกยับยั้งโดย repressor ที่ผลิตจากยีน cI857 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 42 องศาเซลเซียส โปรโมเตอร์ p_L จะถูกกระตุ้น ขณะเดียวกัน repressor ก็จะสูญเสียความสามารถ เมื่อโปรโมเตอร์ p_L สามารถทำงานได้ จะผลิตเอนไซม์ T7 RNA polymerase ออกมาในปริมาณมาก เอนไซม์นี้มีความจำเพาะสูงต่อโปรโมเตอร์ ϕ10 ที่อยู่บน pT7-7 ดังนั้นหากใส่ยีนที่ต้องการเข้าไปบริเวณตำแหน่งตัดจำเพาะ ที่อยู่ถัดจากโปรโมเตอร์ ϕ10 จะทำให้เกิดการอ่านรหัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากรายงานการวิจัยของ Tabor และคณะ (32) ซึ่งใช้พลาสมิด pT7-7 ร่วมกับพลาสมิด pGP1-2 โดยใส่ยีน 5 ของแบคเทอริโอฝาจ T7 เข้าที่พลาสมิด pT7-7 พบว่ามีการผลิตโปรตีนจากยีน 5 เพิ่มขึ้นถึง 200 เท่า

การใช้พลาสมิด pT7-7 ร่วมกับพลาสมิด pGP1-2 นอกจากจะให้ทรานสฟอร์แมนท์ที่ให้ผลผลิตที่ต้องการในปริมาณสูงแล้ว เนื่องจากพลาสมิด pT7-7 มียีนที่ต้านยาแอมพิซิลลิน และพลาสมิด pGP1-2 มียีนที่ต้านยากานามัยซินจึงทำให้ง่ายต่อการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ต้องการออกจากโคลนทั้งหมดอีกด้วย

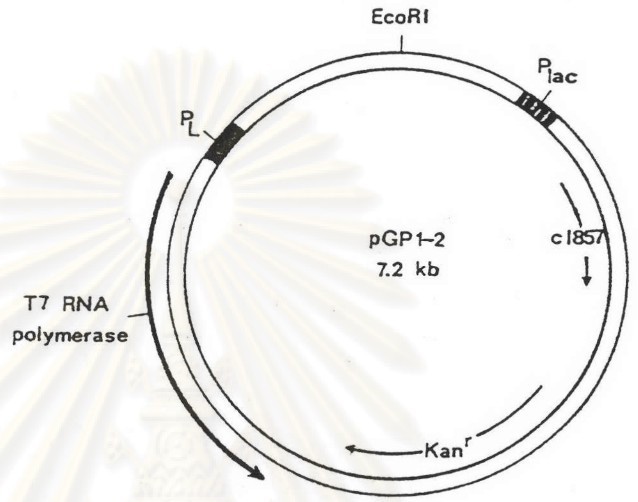
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แผนที่เรสตริกชันบางส่วนของพลาสมิด pT7-7 (32)



- ขนาด 2.5 กิโลเบส
- เป็น relaxed plasmid
- มีโปรโมเตอร์ของ ϕ10 ซึ่งมีความจำเพาะสูงต่อ T7 RNA polymerase
- มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ap^r)

รูปที่ 3 แผนที่เรสตริกชันบางส่วนของพลาสมิด pGP1-2 (32)



- ขนาด 7.2 กิโลเบส
- เป็น stringent plasmid
- มียีนที่ผลิตเอนไซม์ T7 RNA polymerase ที่อยู่ภายใต้การทำงานของโปรโมเตอร์ P_L
- มียีน cI857 ซึ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะสร้าง repressor protein ไปยับยั้งการทำงานของโปรโมเตอร์ P_L
- มียีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (Kan^r)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

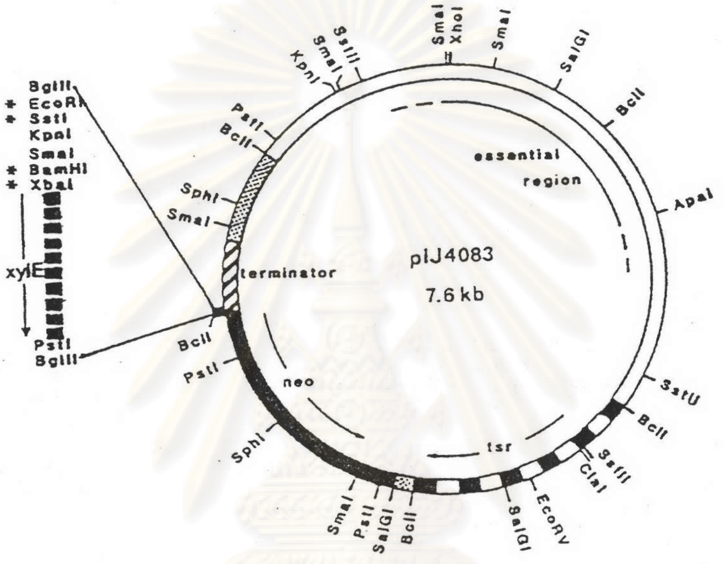
3. pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 และ pIJ4083/4

พลาสมิดเหล่านี้เป็นพลาสมิดที่ Pinphanichakarn (33)สร้างขึ้นโดยการโคลนโปรโมเตอร์ยีนจากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ S. *glaucescens* เข้าที่ตำแหน่ง *Bam*HI ของ pIJ4083

pIJ4083(34)เป็นพลาสมิดที่สามารถเพิ่มจำนวนได้หลายชุด (multicopy plasmid) ใช้กับระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces* sp. มีขนาด 7.6 กิโลเบส เป็นอนุพันธ์ของพลาสมิด pIJ487 มียีนที่ต้านต่อยาปฏิชีวนะไธโอสเตรพตอนและนีโอมัยซิน พลาสมิดนี้สร้างขึ้นมา เพื่อนำมาใช้ติดตาม และ ทดสอบประสิทธิภาพของโปรโมเตอร์ที่ต้องการศึกษา (promoter-probe plasmid) ทั้งนี้เนื่องจากบนพลาสมิด pIJ4083 มียีน *xylE* ที่ไม่มีโปรโมเตอร์อยู่ ดังรูปที่ 4 ดังนั้นในสภาพปกติยีน *xylE* จึงไม่สามารถแสดงออกได้ แต่จะแสดงออกได้ก็ต่อเมื่อเชื่อมโปรโมเตอร์เข้าหน้ายีน *xylE* ตัวอย่างเช่น พลาสมิด pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 และ pIJ4083/4 ซึ่ง Pinphanichakarn(33)ได้สร้างขึ้นโดยการต่อโปรโมเตอร์ยีนจากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ S. *glaucescens* เข้าข้างหน้ายีน *xylE* ที่ตำแหน่ง *Bam*HI ของ pIJ4083 ดังกล่าวข้างต้น โปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีน*xylE* คือเอนไซม์แคทิคอล-2,3-ไดออกซีจีเนส (catechol-2,3-dioxygenase) ซึ่งจะเปลี่ยนสารแคทิคอล (catechol) ที่ไม่มีสีให้เป็น 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิก เซมิอัลดีไฮด์ (2-hydroxymuconic semialdehyde) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีสีเหลือง ทั้งนี้ถ้าโปรโมเตอร์ที่โคลนเข้าไปมีประสิทธิภาพสูง โคโลนีที่รับเอารีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้เข้าไปก็จะมีสีเหลืองเข้ม ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์คือยีนที่ต้านต่อยาปฏิชีวนะไธโอสเตรพตอน (thiostrepton) และ นีโอมัยซิน (neomycin) แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิด pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/4 และ pIJ4083/4 แสดงดังรูปที่ 5

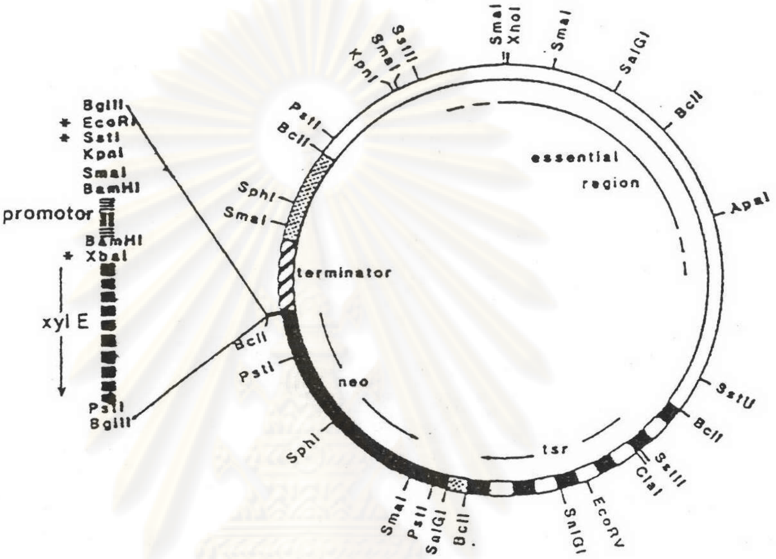
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิด pIJ4083 (34)



- ขนาด 7.6 กิโลเบส
- เป็น multicopy plasmid
- จัดเป็น promoter probe plasmid โดยมียีน *xylE* ที่ไม่มีโปรโมเตอร์
- มียีนต้านยาปฏิชีวนะ นีโอมัยซิน (neo) และ ไธโอสเตรพตอน (tsr)

รูปที่ 5 แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิด pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 และ pIJ4083/4 (33)



- ขนาด ~7.6 กิโลเบส
- เป็น multicopy plasmid
- สร้างจาก การโคลนโปรโมเตอร์ยีน จาก โครโมโซมอลดีเอ็นเอ ของ *S. glaucescens* เข้าที่ตำแหน่ง *BamHI* ของพลาสมิด pIJ4083
- มียีนต้านยาปฏิชีวนะ นีโอมัยซิน (neo) และ ไธโอสเตรพตอน (tsr)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. pIJ4090

pIJ4090 เป็นพลาสมิดที่ใช้กับระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces* เป็นอนุพันธ์ของพลาสมิด pIJ487 ที่ Dr.M.J.Bibb แห่ง John Innes Institute, U.K. (personal communication,February,1992) สร้างจากการนำโปรโมเตอร์ของยีน *ermE* (erythromycin resistance gene) ที่จัดว่าเป็นโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูง ขนาดประมาณ 0.3 กิโลเบส จาก *S. erythraeus* ต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pIJ487 ซึ่งมีคุณสมบัติต้านต่อยาปฏิชีวนะไธโอสเตรพตอน และ นีโอมัยซิน pIJ4090 เป็นพลาสมิด ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้หลายชุด (multicopy plasmid) มีขนาด 6.5 กิโลเบส แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิด pIJ4090 แสดงดังรูปที่ 6

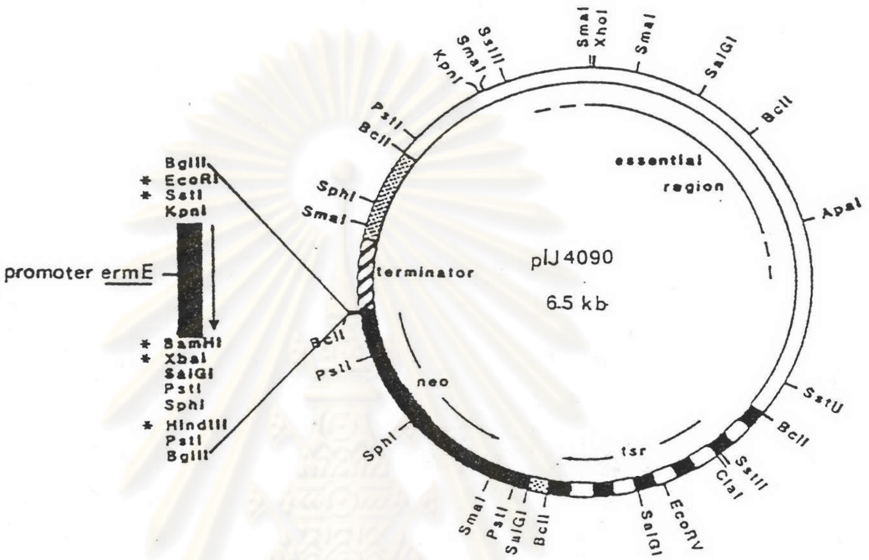
ทิศทางการอ่านรหัสของโปรโมเตอร์ของยีน *ermE* จะอ่านจากเบสด้าน *Kpn*I ไปยังด้าน *Bam*HI ดังนั้นหากมีการใส่ยีนโครงสร้างจากแหล่งอื่น เข้าที่ตำแหน่งถัดจากโปรโมเตอร์ยีนออกมา ซึ่งได้แก่ *Bam*HI *Xba*I และ *Hind*III ก็จะทำให้ยีนโครงสร้างนั้นๆ ถูกอ่านโดยอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *ermE* ที่มีประสิทธิภาพสูง

เนื่องจาก pIJ4090 เป็นพลาสมิดพาหะที่ถูกสร้างขึ้น เมื่อไม่นานมานี้ ดังนั้นจึงยังไม่มีรายงานการนำพลาสมิดนี้ไปใช้ในงานวิจัย แต่จากคุณสมบัติดังกล่าวคาดว่าสามารถนำมาเพิ่มประสิทธิภาพการถอดรหัสของยีนที่ต้องการศึกษาได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018207

<u>รูปที่ 6</u> แผนที่เรสตริกชันของพลาสมิด pIJ4090



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ขนาด 6.5 กิโลเบส
- เป็น multicopy plasmid
- มีโปรโมเตอร์ของยีน *ermE*
- มียีนต้านยาปฏิชีวนะ นีโอมัยซิน (neo) และ ไธโอสเตรพตอน (tsr)

จากรายงานการวิจัยของอรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต (13) ถึงการโคลนยีนไซแลเนส โดยการตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. 42-9 แบบกึ่งสมบูรณ์ (partial digestion) ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI แล้วต่อเข้ากับชิ้นส่วนของพลาสมิด pIJ699 ขนาด 5 กิโลเบส ที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Bgl*II แล้วทรานสฟอร์มเข้า *S. lividans* TK64 พบว่าได้ 3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด ที่มีการแสดงออกของไซแลเนส คือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C pPT6E และ pPT6G โดยมีความสามารถในการผลิตไซแลเนสเป็น 5.19 4.85 และ 4.24 หน่วย/มล. ตามลำดับ ขณะที่ *Streptomyces* sp.42-9 มีความสามารถผลิตได้ 4.5 หน่วย/มล. เมื่อตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเหล่านี้ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III เพื่อแยกออกจากชิ้นส่วนของพลาสมิดพาหะ พบว่า ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 4.8 14.2 และ 9.4 กิโลเบส ตามลำดับ ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอเหล่านี้ได้รวมโปรโมเตอร์ยีนและยีนควบคุมไว้ด้วย ซึ่งจะเห็นว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C นั้น นอกจากจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนที่เล็กที่สุดแล้ว ยังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้สูงกว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดอื่นด้วย และเพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตไซแลเนสให้สูงขึ้น งานวิจัยนี้จึงได้นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C มาปรับปรุงโดย นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน มาอยู่ภายใต้การทำงานของโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งได้แก่โปรโมเตอร์ของยีนต่างๆ ที่อยู่บนพลาสมิดพาหะ pUC19 pT7-7 pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 pIJ4083/4 หรือ pIJ4090 ดังกล่าวมาแล้ว โดยคาดว่าจะได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวใหม่ ที่มีประสิทธิภาพในการถูกอ่านและแปลรหัสให้ไซแลเนสที่สูงขึ้น เมื่อทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย