หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของ *Azospirillum*

แบคทีเรียในจีนัส *Azospirillum* เป็นแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (diazotroph) ซึ่งพบในบริเวณรากพืช ได้ถูกกล่าวถึงครั้งแรกในชื่อของ *Spirillum lipoferum* โดย Beijinck, M.W. ในปี ค.ศ. 1922 ซึ่งในช่วงเวลานั้นได้รับความสนใจน้อยมาก จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1976 Döbereiner, J. and Day, J.M. ได้แยกเชื้อนี้จากรากของหญ้าในประเทศบราซิลและพบว่าชิ้นส่วนของรากนี้มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนส (nitroginase activity) โดยการตรวจวัดอะเซทิลีนรีดัคชัน (acetylene reduction) และพบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของพืชโดยการทดลองนำเข้าของ $^{15}N_2$ เข้าสู่เนื้อเยื่อพืช (De-Polli, H. และคณะ, 1977) ต่อมาถูกจัดเป็นจีนัสใหม่คือ *Azospirillum* โดย Tarran, J.J. และคณะในปี ค.ศ. 1978

Azospirillum อยู่ร่วมกับพืชในบริเวณรากโดยไม่ทำให้โครงสร้างของรากเกิดการเปลี่ยนแปลง (Neyra, C.A. และ Dobereiner, J., 1977) นอกจากจะตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้แก่พืชแล้วยังผลิตฮอร์โมนที่มีผลต่อการเจริญของพืช เช่น ออกซิน, กรดจิบเบอริลิก และไซโตไคนิน ฮอร์โมนเหล่านี้มีผลต่อการเพิ่มพื้นที่ในการดูดซึมของรากพืช โดยมีการผลิตรากแขนง, รากขนอ่อน และ micilageneous sheath (mucigel) เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับพืชที่ไม่ได้ใส่ *Azospirillum* (Tien, T. M. และคณะ, 1979, Umali-Garcia, M. และคณะ, 1980) Okon, Y. (1985) ได้ทำการเพาะเชื้อ *Azospirillum brasilense* strain Cd หรือ Sp7 ร่วมกับข้าวโพด (*Zea mays*) พบว่าการนำ NO_3^-, K^+ และ $K_2HPO_4^-$ เข้าสู่รากในช่วงอายุ 2-4 สัปดาห์ สูงกว่าพืชควบคุมถึง 30 - 50 เปอร์เซนต์

1.2 การปรับปรุง *Azospirillum* ให้ตรึงไนโตรเจนสูงขึ้น

1.2.1 เอนไซม์ไนโตรจิเนส (nitrogenase)

ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนเกิดเนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้มีเอนไซม์ไนโตรจิเนส ซึ่งสามารถเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย ดังสมการ (Posgate, J.R., 1982)

$$N_2 + 6H^+ + 6e^- + X\ ATP \xrightarrow{\text{nitrogenase}} 2NH_3 + XADP + XP_i$$

การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจิเนสจะถูกยับยั้งได้ด้วยอนุมูลแอมโมเนียมที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อม มีรายงานว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสของ *Azotobacter* ถูกยับยั้งได้ด้วยอนุมูลแอมโมเนียมความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียมคลอไรด์ขึ้นไป (Klugkist, J. และ Haaker, H., 1984) และใน *Azospirillum* เอนไซม์นี้ถูกยับยั้งด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป (Hartmann, A. และคณะ, 1986)

1.2.2 การควบคุมการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจิเนส

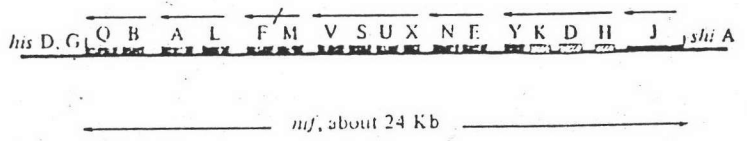
การสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจิเนสถูกควบคุมโดย *nif* gene ซึ่งการเรียงตัวของจีนนี้ได้มีการศึกษาอย่างลึกซึ้งใน *Klebsiella pneumoniae* พบว่าจีนนี้มีลักษณะเป็นโอเปอรอนประกอบด้วย 17 จีน 7 โอเปอรอน (Dixon, R. และคณะ, 1980) ดังรูปที่ 1 และมีหน้าที่ดังตารางที่ 1 จีนทั้งหมดแบ่งเป็น 3 พวกใหญ่ๆคือ

1. จีนโครงสร้าง (structural gene) ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจิเนสประกอบด้วยจีน 3 จีน คือ *nif* K, *nif* D, และ *nif* H ซึ่งมีหน้าที่สังเคราะห์ β subunit ของ K_p1, α subunit ของ K_p1 และ subunit ของ K_p2 ตามลำดับ

2. จีนควบคุม (regulatory gene) ทำหน้าที่สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่มีผลในการควบคุมการแสดงออกของจีนโครงสร้าง ได้แก่ *nif* A และ *nif* L

3. จีนที่สังเคราะห์โปรตีนอื่นๆซึ่งช่วยในการทำงานของไนโตรจิเนส

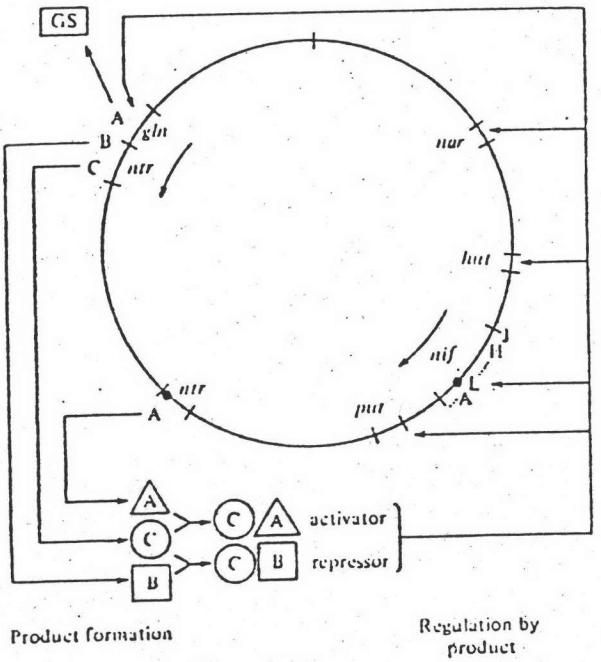
Postgate, J.R. (1982) ได้เสนอสมมติฐานเกี่ยวกับการควบคุมการถอดรหัสของ *nif* gene ดังในรูปที่ 2 คือ *ntr* gene (nitrogen assimilation regulator gene) ซึ่งประกอบด้วย *ntr* A, B และ C จะให้โปรตีนมาควบคุม



รูปที่ 1 จีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนสใน Klebsiella pneumoniae M5a1 แสดงการเรียงตัวของ 17 จีน ซึ่งมีขนาดประมาณ 24 กิโลเบส เครื่องหมายลูกศรแสดงทิศทางของ transcription ของโอเปอร์รอนทั้ง 7 (จาก Postgate, J.R., 1982)

Gene	Rel. mol. mass of product ('000)	Function of product
Q	unknown	unknown
B	unknown	involved in synthesis or insertion of FeMoco of Kp1
A	57–60	regulatory
L	45–50	regulatory
F	c. 17	codes for a flavodoxin
M	28	activates Kp2
V	42	modifies substrate specificity of Kp1
S	18–45	unknown
U	22–32	unknown
X	18	unknown
N	50	as B
E	40–46	as B
Y	19–24	unknown
K	60	codes for β sub-unit of Kp1
D	56–60	codes for α sub-unit of Kp1
H	31–39	codes for sub-unit of Kp2
J	120	electron input into nitrogenase

ตารางที่ 1 โปรตีนต่างๆจากจีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนส พร้อมทั้งหน้าที่ ได้จากการถอดรหัสของจีนไนโตรจิเนสของ Klebsiella pneumoniae M5a1 (จาก Kennedy, C. และคณะ, 1981)



รูปที่ 2 การควบคุมการถอดรหัสจีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนส โดยจีน ntr ซึ่งควบคุมเกี่ยวกับการนำเข้าของสารประกอบไนโตรเจน ซึ่งนอกจากจะควบคุมจีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนสแล้วยังควบคุมจีน put (proline oxidation) และจีน hut (histidine oxidation) และจีน gln A (glutamine synthase synthesis) อีกด้วย (จาก Postgate, J.R., 1982)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การถอดรหัสของ *nif* gene โดยโปรตีนจาก *ntr* C และ *ntr* A ประกอบกันเป็นตัวกระตุ้น (activator) ส่วนโปรตีนจาก *ntr* C และ *ntr* B จะประกอบกันเป็นตัวกดดัน (repressor) ซึ่งการที่เซลล์จะสร้างตัวกระตุ้นหรือตัวกดดันขึ้นอยู่กับสภาพของอาหารสำหรับเซลล์ในขณะนั้น ตัวกดดันหรือตัวกระตุ้นที่เกิดขึ้นจะไปจับที่โปรโมเตอร์ของ *nif* L ซึ่งโอเปอรอน *nif* LA นี้ ทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของ *nif* K, *nif* D และ *nif* H (Drummond, M. และคณะ, 1983) โดยที่ *nif* A (Ow, D.W. และ Ausubel, F.M., 1983, Buchanan, V. และคณะ, 1981) จะให้โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการถอดรหัสของ *nif* HDK ส่วน *nif* L (Merrick, M. และคณะ, 1982) จะให้โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวกดดันการถอดรหัสของ *nif* HDK

เมื่อใช้บางส่วนจาก *nif* ดีเอ็นเอของ *K. pneumoniae* เป็นโพรบ (probe) ในการศึกษาความคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอในโครโมโซมของ *Azospirillum* โดยการไฮบริไดซ์ของกรดนิวคลีอิค พบว่ามีความคล้ายคลึงกันอย่างสูงระหว่างดีเอ็นเอของ *Azospirillum* กับพลาสมิด pSA30 ซึ่งมี *nif* HDK เป็นจีนโครงสร้างของโปรตีนหน่วยที่ 1 และหน่วยที่ 2 (Elmerich, C.และ Franche, C.,1982, Quivigar, B. และคณะ, 1982) และมีความคล้ายคลึงกันบ้างกับพลาสมิด pPC 936 และพลาสมิด pMC 71A ซึ่งมีจีน *nif* A (Buchanan-Wollaston, V. และคณะ, 1981)

1.2.3 <u>การเพิ่มประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนโดยใช้พลาสมิด pCK3</u>

เนื่องจากการถอดรหัสของ *nif* HDK ถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนจาก *nif* A ดังนั้นการนำ *nif* A เข้าสู่เซลล์ในรูปของพลาสมิดซึ่งจะให้โปรตีนจาก *nif* A ตลอดเวลาน่าจะช่วยให้การถอดรหัสของ *nif* HDK เกิดขึ้นตลอดเวลาด้วย Buchanan, V. และคณะ (1981) ได้นำ *nif* A ของ *K. pneumoniae* M5a1 เข้าสู่เซลล์ของ *K. pneumoniae* เอง พบว่าสามารถกระตุ้นการถอดรหัสของ *nif* HDK ได้ ดังนั้นการเคลื่อน *nif* A ของ *K. pneumoniae* M5a1 เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนอื่นๆ ก็อาจได้ผลเช่นกันซึ่ง Sundaresan, V. และคณะ (1983) ได้นำ *nif* A จาก *Klebsiella pneumoniae* M5a1 เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนอื่นๆก็อาจได้ผลเช่นกันซึ่ง Sundaresan, V. และคณะ (1983)ได้นำ *nif* A จาก *K. pneumoniae* M5a1 เข้าสู่ *Rhizobium meliloti* พบว่าสามารถกระตุ้นการถอดรหัสของ *nif* HDK ได้เช่นกัน

Kennedy, C. และ Drummond, M. ได้โคลน (clone) *nif* A ของ *K. pneumoniae* ลงบนจุด Bgl II ของพลาสมิด pRK 290 ได้พลาสมิดที่เรียกว่า pCK3 ซึ่งมีขนาด 27 กิโลเบส ดังรูปที่ 3 เมื่อนำพลาสมิดนี้ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Azotobacter* หลายสายพันธุ์ พบว่า *Azotobacter* สามารถถอดรหัส *nif* HDK ในสภาวะที่มีอนุมูลแอมโมเนียมอยู่ด้วย (มากกว่า 10 มิลลิโมลาร์แอมโมเนียมอะซิเตท) (Kennedy, C. และ Robson, R.L., 1983, เสาวคนธ์, 2530)

1.3 เรสทริกชันเอนไซม์

เรสทริกชันเอนไซม์ (restriction enzyme) หรือเรสทริกชันเอนโดนิวคลิเอส (restriction endonuclease) เป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากพวกโพรคาลิโอทมีหน้าที่ทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอมโดยการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของดีเอ็นเอเกลียวคู่บริเวณที่มีการเรียงตัวของเบสจำเพาะ (specific sequence) หรือบริเวณใกล้เคียงซึ่งบริเวณดังกล่าวมักมีการเรียงตัวของเบสเป็นพาลินโดรม (palindrome sequence) (Maniatis, T. และคณะ, 1982) แต่เรสทริกชันเอนไซม์จะไม่ทำลายดีเอ็นเอของเซลล์ให้อาศัย (host) เพราะเบสบางตัวตรงบริเวณจำเพาะถูกเปลี่ยนแปลงไปโดยการเติมหมู่เมธิล (methylation) ด้วยเอนไซม์เมทิลเลส (methylase)

ตัวอย่างการเรียงตัวของเบสแบบพาลินโดรม เช่น

5'----------G-A-A-T-T-C---------3'

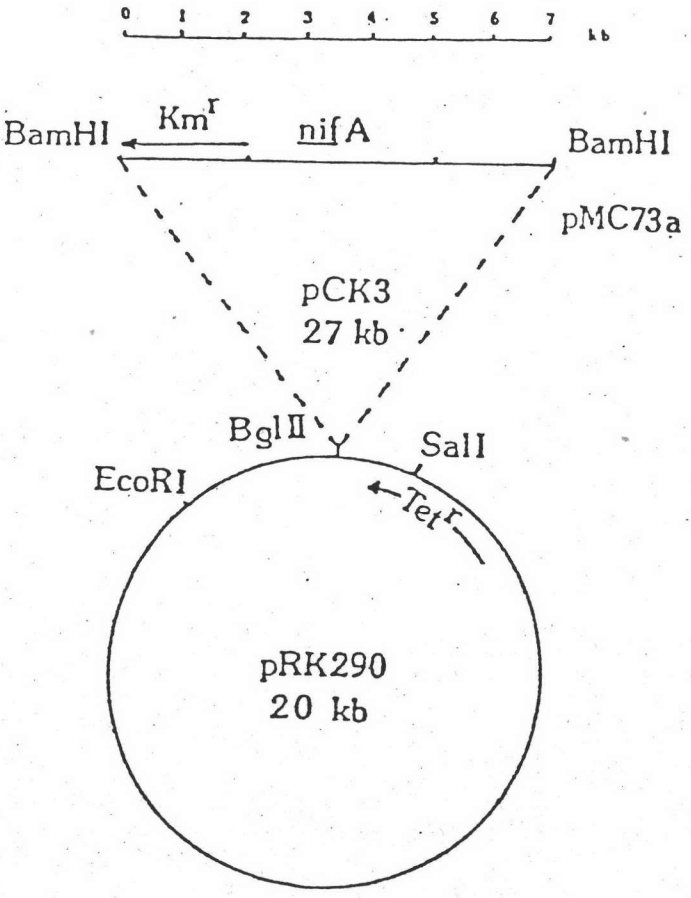
3'----------C-T-T-A-A-G---------5'

ซึ่งสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ Eco RI (Green, R. และคณะ, 1974)

5'----------G-A-A-T-T-C----------3'

3'----------C-T-T-A-A-G----------5'

Eco RI



รูปที่ 3 แผนผังเรสทริกชันของพลาสมิด pCK3 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของพลาสมิด pRK 290 Bam HI, Bgl II, Eco RI, Sal I เป็นเรสทริกชันเอนโดนิวคลิเอส

Km^r และ Tet^r = สมบัติการทนทานต่อคานาไมซินและเททระไซคลิน ตามลำดับ

nif A = จีน nif A

5'---------G 3' 5' A-A-T-T-C-----3'

3'---------C-T-T-A-A 5' 3' G----5'

1.3.1 ประเภทของเรสทริกชันเอนไซม์

สามารถแบ่งเรสทริกชันเอนไซม์เป็น 3 ประเภทตามลักษณะการตัด ชนิดของโคเอนไซม์ (coenzyme) และโคแฟคเตอร์ (cofactor) ที่เอนไซม์ต้องการ (Maniatis, T. และคณะ,1982) คือ

1. เรสทริกชันเอนไซม์ประเภทที่ 1 (Type I) นอกจากตัดดีเอ็นเอแล้ว ยังสามารถเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอ (modification) โดยการเติมหมู่เมธิล (methylation) การทำงานของเอนไซม์ต้องการ ATP, Mg^{2+} และ S-adenosylmethionine เรสทริกชันเอนไซม์ประเภทนี้ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์แบบสุ่ม (ramdom) ภายนอกบริเวณจดจำ (recognition site)

2. เรสทริกชันเอนไซม์ประเภทที่ 2 (Type II) เป็นเอนไซม์ที่ต้องการเพียง Mg^{2+} เป็นโคแฟคเตอร์ในการทำงาน ตัดโมเลกุลของดีเอ็นเอตรงจุดที่อยู่บริเวณจดจำ

3. เรสทริกชันเอนไซม์ประเภทที่ 3 (Type III) เอนไซม์ประเภทนี้ตัดโมเลกุลของดีเอ็นเอคล้ายกับ Type III คือ ตัดนอกบริเวณจดจำแต่เป็นจุดที่จำเพาะ เอนไซม์ประเภทนี้ต้องการ ATP และ Mg^{2+}

1.3.2 ความสำคัญของเรสทริกชันเอนไซม์ประเภทที่ 2

เนื่องจากเรสทริกชันเอนไซม์ประเภทที่ 2 สามารถตัดโมเลกุลของดีเอ็นเอตรงตำแหน่งบริเวณ จึงนำมาใช้ประโยชน์ในงานพันธุวิศวกรรม เช่น การโคลนจีน (molecular cloning) การหาลำดับเบส (sequencing) และการทำแผนที่ของดีเอ็นเอ (physical mapping) จึงได้รับการศึกษามากกว่าเอนไซม์ในประเภทอื่นๆ

ปัจจุบันมีผู้ค้นพบเรสทริกชันเอนไซม์ประเภทนี้ไม่ต่ำกว่า 350 ชนิดโดยมีบริเวณจดจำที่แตกต่างกันประมาณ 85 ตำแหน่ง (Blaskesly, R., 1981) ตำแหน่งจดจำจะประกอบด้วยการเรียงตัวของนิวคลิโอไทด์จำนวนระหว่าง 4-7 นิวคลิโอไทด์และที่พบมากที่สุด

ประกอบด้วย 6 นิวคลิโอไทด์

1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการทรานส์ฟอร์มพลาสมิด pCK3 เข้าสู่ *Azospirillum* sp. A_{12} ซึ่งเป็นสาเหตุของการค้นพบเรสทริกชันเอนไซม์

2. ทำให้เรสทริกชันเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้น

3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรและสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเรสทริกชันเอนไซม์