ประสิทธิภาพของเอนไซม์ *N*- ACETYLMURAMOYL-L-ALANINE AMIDASE จาก *Bacillus subtilis* ที่ได้จากการโคลนยีนต่อการชักนำให้เซลล์แบคทีเรียแตก

นายโสภณ สิริศรัทธา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-395-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFICIENCY OF *Bacillus subtilis N*- ACETYLMURAMOYL-L-ALANINE AMIDASE FROM THE CLONED GENE ON BACTERIAL LYTIC INDUCTION

Mister Sophon Sirisattha

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of The Requirements

for The Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduated School

Chulalongkorn University

1996

ISBN 974-634-395-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ประสิทธิภาพของเอนไซม์ *N*- ACETYLMURAMOYL-L-ALANINE AMIDASE จาก *Bacillus subtilis* ที่ได้จากการโคลนยีนต่อการชักนำให้เซลล์แบคทีเรียแตก

โดย นายโสภณ สิริศรัทธา

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

โสภณ สิริศรัทธา : ประสิทธิภาพของเอนไซม์ N-ACETYLMURAMOYL-L-ALANINE AMIDASE จาก Bacillus subtilis ที่ได้จากการโคลนยีนต่อการชักนำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (EFFICIENCY OF Bacillus subtilis N-ACETYLMURAMOYL-L-ALANINE AMIDASE FROM THE CLONED GENE ON BACTERIAL LYTIC INDUCTION) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. อัญชริดา สวารชร. 90 หน้า. ISBN 974-634-395-5

N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase ขนาด 30 กิโลดาลตันของ Bacillus subtilis 168 ซึ่งถอดรหัสมาจากยีน cwl A ในพลาสมิด Pinpoint Xa-1 มีบริเวณให้ไบโอตินมาเกาะ จึงสามารถทำให้บริสุทธิ์ขึ้นได้โดย affinity chromatography ชนิด avidin resin การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ในการทำให้แบคทีเรีย 6 สายพันธุ์คือ Bacillus subtilis 168 Micrococcus luteus TISTR 745 Streptococcus faecium IFO 3128 Staphylococcus aureus TISTR 118 Escherichia coli TISTR 780 Klebsiella pneumoniae IFO 3317 ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์แตกต่างกันแตก พบว่าเอนไซม์สามารถชักนำให้เฉพาะ Bacillus subtilis 168 และ Klebsiella pneumoniae IFO 3317 แตก การกำจัดบริเวณเกาะของไบโอตินและไบโอตินออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการทำให้แบคทีเรียทั้งสองชนิดข้างต้นแตกสูงขึ้น

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต โสภณ สิริศรัทธา

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลติกที่ได้จากยีนโคลนของ Bacillus subtilis

C526172 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD: Bacillus subtilis 168 / AMIDASE / CLONING

SOPHON SIRISATTHA : EFFICIENCY OF Bacillus subtilis N-ACETYL-MURAMOYL-L-ALANINE AMIDASE FROM THE CLONED GENE ON BACTERIAL LYTIC INDUCTION. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. ANCHARIDA SVARACHORN, Ph.D. 90 pp. ISBN 974-634-395-5

N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase , the 30 kilodaltons protein of Bacillus subtilis 168 encoded from cwl A gene in Pinpoint Xa-1 plasmid could be purified by affinity chromatography using specific binding between avidin resin and biotin at biotin binding site on the enzyme. Efficiency of the partial purified enzyme on cellular lysis of 6 bacterial strains : Bacillus subtilis 168 Micrococcus luteus TISTR 745 Streptococcus faecium IFO 3128 Staphylococcus aureus TISTR 118 Escherichia coli TISTR 780 and Klebsiella pneumoniae IFO 3317 having different cell wall structure was tested . The lysis occurred in Bacillus subtilis 168 and Klebsiella pneumoniae IFO 3317. Removal of biotin and biotin binding site from the enzyme molecule resulted in higher efficiency on cellular lysis induction of both sensitive strains.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร ที่ได้กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และได้ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ คำแนะนำ ตลอดมาจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพาณิชการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา เจ้าหน้าที่ทุก ๆท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่คอยเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์อย่างเสมอมา

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ พี่ และน้อง ที่คอยเป็นกำลังใจให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือทุกๆ สิ่ง อย่างหาที่สุดไม่ได้

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		จ
กิตติกรรมประกาศ		ฉ
สารบัญ		ช
สารบัญตาราง		ซ
สารบัญรูป		ฎ
คำย่อ		ณ
บทที่		
1	บทนำ	1
2	อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	14
3	ผลการทดลอง	30
4	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	65
รายการอ้างอิง		70
ภาคผนวก		75
ประวัติผู้เขียน		89

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอรูปเส้นที่ได้จากการนำพลาสมิดที่สกัดได้จากโคโลนีที่แสดงบริเวณใสโดยรอบมาตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ชนิดต่างๆ	38
2	แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ซึ่งเตรียมได้จากทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pSO 2 และทรานฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBA47 BI	42
3	แสดงผลของการเติม IPTG ให้เซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ที่ระยะการเจริญแตกต่างกัน ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่สกัดได้	44
4	แสดงผลของระยะเวลาในการบ่มเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D หลังการเติม IPTG ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เตรียมได้	45
5	แสดงอัตราเร็วของการแตกของเซลล์ และอัตราเร็วของการแตกสัมพัทธ์ของเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 ในสารละลายทดสอบชนิดต่างๆ	52
6	แสดงอัตราเร็วของการแตกของเซลล์ และอัตราเร็วของการแตกสัมพัทธ์ของเซลล์ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 ในสารละลายทดสอบชนิดต่างๆ	55
7	แสดงผลของการกำจัดโปรตีน บริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออกจากเอนไซม์NA- L-alanine amidase ด้วยเอนไซม์แฟกเตอร์เอ็กซ์เอโปรติเอสต่อกิจกรรมของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase	57
8	แสดงอัตราเร็วของการแตกของเซลล์และอัตราเร็วของการแตกสัมพัทธ์ของเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 ในสารละลายเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ที่กำจัดโปรตีน บริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกส	

ตารางที่ หน้า

ออกเมื่อทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ..... 60

9 แสดงอัตราเร็วของการแตกของเซลล์และอัตราเร็วของการแตกสัมพัทธ์ของเซลล์ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 ในสารละลายเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ที่กำจัดโปรตีน บริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออกเมื่อทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ..... 63

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 แสดงลักษณะของสายไกลแคน..... 1

2 แสดงการเชื่อมต่อของสายเปปไทด์ที่หมู่คาร์บอกซิลของ MurNAC..... 2

3 แสดงความแตกต่างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรัมบวกและของแบคทีเรียกรัมลบ..... 2

4 ไดอะแกรมการแบ่งกลุ่มเปปติโดไกลแคน..... 4

5 แสดงตำแหน่งการย่อยสลายสายเปปติโดไกลแคนโดยเอนไซม์ในกลุ่มออโตไลซิน..... 5

6 แสดงลำดับเบสที่ได้หลังการตัดบริเวณเอนไซม์เรสตริกชั่นของพลาสมิด PinPoint Xa ชนิดต่างๆ ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ที่กำหนด..... 13

7 แสดงแผนภาพการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBA 47 BI ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอ(*Eco*RI/*Bam* HI) ขนาด 2.3 กิโลดาลตัน ครอบคลุมยีน *cwl* A ที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bam* HI..... 31

8 แสดงภาพของผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBA 47 BI ด้วยเรสตริกชั่น เอนไซม์ *Kpn* I และ *Bam* HI บนอะกาโรสเจล..... 32

9 แสดงแผนภาพการตัดพลาสมิดพาหะ PinPoint Xa-1 ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bgl* II..... 34

10 รูปชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดพาหะ PinPoint Xa-1 ด้วยเรสตริกชั่น เอนไซม์ *Kpn* I และ *Bgl* II บนอะกาโรสเจล..... 35

11 แสดงแผนภาพการเชื่อมต่อยีน *cwl* A และพลาสมิดพาหะ PinPoint Xa-1 ด้วยเอนไซม์ทีโฟร์ไลเกส..... 36

12 แสดงบริเวณใสของทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D บนอาหารแข็งสูตร LB ที่มีการเติมผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168..... 37

13 แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของทรานสฟอร์แมนท์ที่คาดว่าจะได้..... 38

14 แสดงแผนภาพการตัดพลาสมิดที่ได้จากโคโลนีซึ่งแสดงบริเวณใสโดย

รูปที่		หน้า
	รอบด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ชนิดต่างๆ	39
15	แสดงผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pSO 2) ซึ่งสกัดได้จาก *Escherichia coli* ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ชนิดต่างๆ	41
16	กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เนื่องจากผนังเซลล์ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่สกัดจาก *Escherichia coli* JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดชนิดต่างๆ	43
17	แสดงโครมาโตรแกรมของการทำให้เอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่สกัดได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D บริสุทธิ์โดยชุด PinPoint ™ Xa-1 protein purification system	47
18	แสดงขนาดของโปรตีนที่พบเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส	49
19	แสดงการเพิ่มของกรดอะมิโนอิสระและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	51
20	แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ	52
21	แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Micrococcus luteus* TISTR 745 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ	53
22	แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Streptococcus faecium* IFO 3128 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ	53
23	แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ	54

รูปที่ หน้า

24 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Escherichia coli* TISTR 780 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ..... 54

25 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ..... 55

26 แสดงขนาดของโปรตีนที่พบเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ NA - L-alanine amidase ด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส..... 58

27 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ที่กำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออกเมื่อทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ..... 60

28 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Micrococcus luteus* TISTR 745 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ ที่กำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออกเมื่อทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ..... 61

29 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Streptococcus faecium* IFO 3128 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ที่กำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออกเมื่อทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ..... 61

30 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ที่กำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออกเมื่อทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ..... 62

31 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Escherichia coli* TISTR 780 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายเอน

รูปที่ หน้า

ไซม์กึ่งบริสุทธิ์ที่กำจัดโปรตีน บริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไล.
เกสออกเมื่อทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ..... 62

32 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ที่กำจัดโปรตีน บริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออก. เมื่อทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ..... 63

33 กราฟมาตรฐานโปรตีนบีเอสเอ..... 79

34 กราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนอิสระ..... 80

35 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์..... 81

คำย่อ

° ซ. = องศาเซลเซียส

ชม. = ชั่วโมง

มก. = มิลลิกรัม

มม. = มิลลิเมตร

มล. = มิลลิลิตร

% = เปอร์เซ็นต์

A_{280} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

A_{260} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร