บทที่ 3

ผลการทดลอง

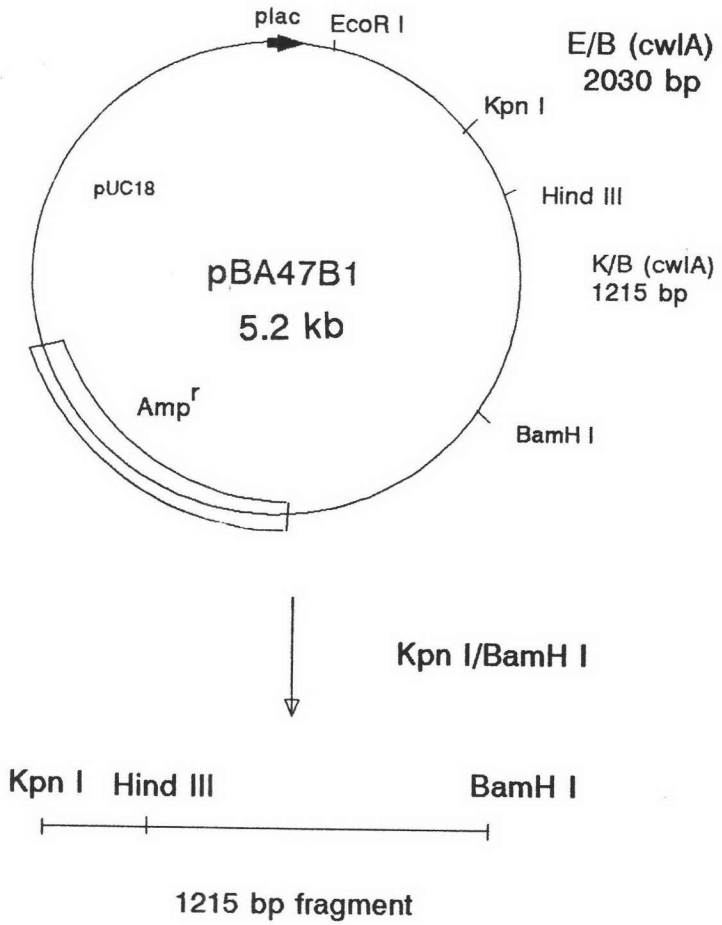
3. 1 ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSO 2

3. 1. 1 ผลการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่มียีน *cwl* A

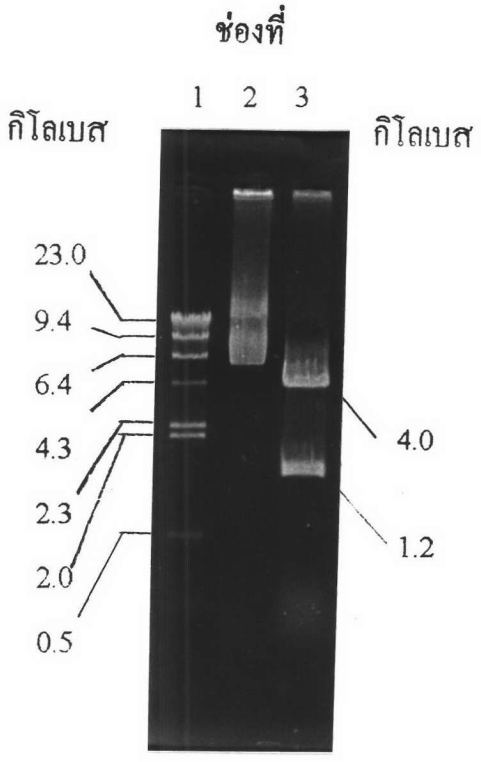
Kuroda และ Sekiguchi (1990) ได้สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *cwl* A ที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase โดยการเชื่อมพลาสมิดพาหะ pUC 19 ที่ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Bam* HI เข้ากับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2-10 กิโลเบสของโครโมโซมของ *Bacillus subtilis* 168 ที่ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Sau* 3AI แบบบางส่วนได้รีคอมบิแนนท์ พลาสมิดที่มียีน *cwl* A 2 ชนิดคือ pBA 6 และ pBA 47 ขนาด 6.0 และ 9.1 กิโลเบส ตามลำดับ งานวิจัยนี้ได้นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBA 47 BI ขนาด 5.2 กิโลเบส ซึ่งเป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดลูกพันธ์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBA 47 มาทำการโคลนซ้ำ(subclone) เพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กที่สุดที่สามารถถอดรหัสเป็นเอนไซม์ NA-L-alanine amidase จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBA 47 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะชนิดใหม่ที่มีโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงและเป็นโปรโมเตอร์ที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน *cwl* A ได้ โดยสามารถถอดรหัสเป็นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ภายใต้สภาวะที่กำหนด ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่ย่อยสลายผนังเซลล์จึงเป็นอันตรายต่อเซลล์

นำพลาสมิด pBA 47 BI ซึ่งเป็นลูกพันธ์ของพลาสมิด pBA 47 มียีน *cwl* A ขนาด 2.0 กิโลเบส ที่ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase เชื่อมต่ออยู่ภายในมาตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bam* HI เพื่อแยกเอายีน *cwl* A ออกจากพลาสมิดดังกล่าว โดยชิ้นดีเอ็นเอลักษณะเส้นยาว (linear form) 2 เส้นที่ควรได้คือชิ้นดีเอ็นเอที่มียีน *cwl* A ซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส และชิ้นพลาสมิดพาหะขนาดประมาณ 4.0 กิโลเบส ดังรูป 7 ผลการตรวจพิสูจน์โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้นไปทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนของแลมด้าดีเอ็นเอ(λ DNA) ที่ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ 2 ชิ้นมีขนาดประมาณ 1.2 และ

4.0 กิโลเบส ซึ่งเป็นไปตามขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่คาดหมายว่าควรจะเป็นดังรูปที่ 8 จากนั้นแยกเอาเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.2 กิโลเบส ที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase โดยทำการ Prep-A-Gene ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 9 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะมีความบริสุทธิ์และพร้อมที่จะนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะที่มีลักษณะตามที่ต้องการต่อไป



<u>รูปที่ 7</u> แสดงแผนภาพการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBA 47 BI ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอ(*Eco*RI/*Bam* HI) ขนาด 2.0 กิโลเบส ครอบคลุมยีน *cwl* A ที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bam* HI



<u>รูปที่ 8</u> แสดงภาพของผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBA 47 BI ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bam* HI บนอะกาโรสเจล

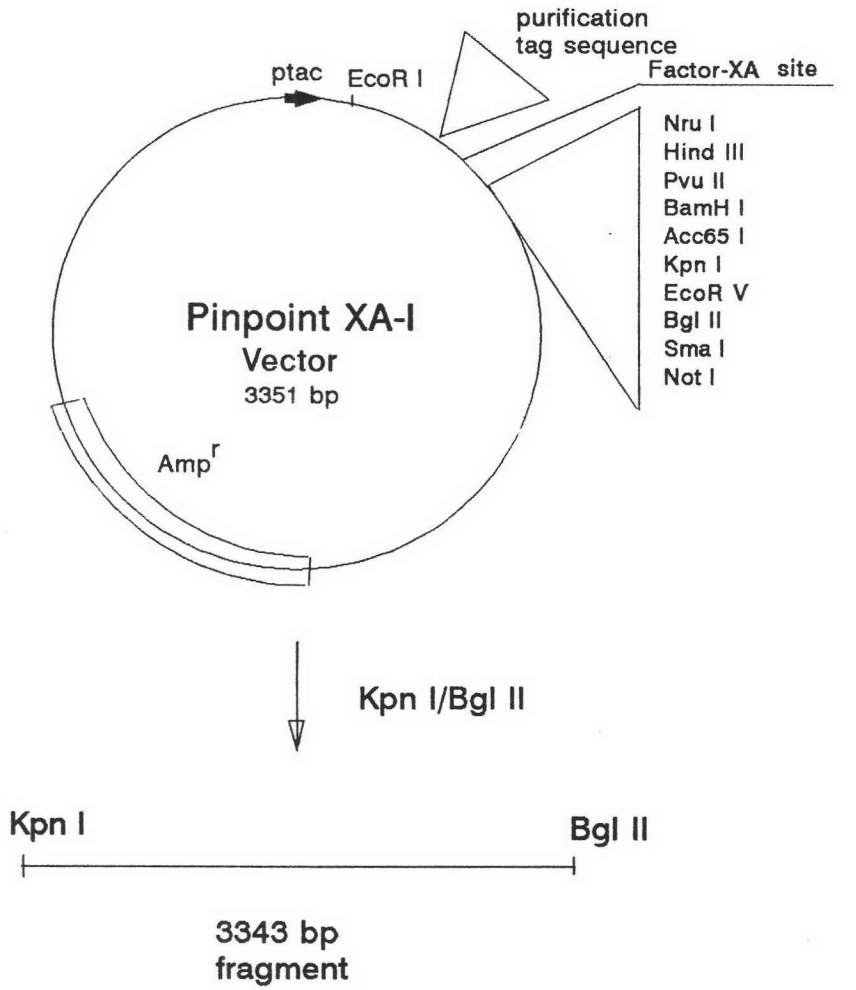
ช่องที่ 1 แลมด้าดีเอ็นเอ (λ DNA) ที่ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III

2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBA 47 BI ไม่ตัดเรสตริกชั่นเอนไซม์

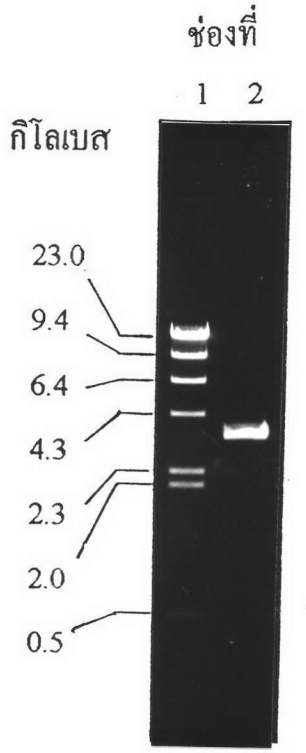
3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBA 47 BI ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bam* HI แสดงชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.0 และ 1.2 กิโลเบส

3. 1. 2 ผลการเตรียมพลาสมิดพาหะ PinPoint Xa-1

PinPoint Xa-1 เป็นพลาสมิดพาหะชนิดที่มี *Escherichia coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พลาสมิดชนิดนี้มียีนที่เป็นรหัสของโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกส เชื่อมต่อระหว่างโปรโมเตอร์และบริเวณเรสตริกชั่นสำหรับสอดแทรกยีนที่ต้องการ ในที่นี้คือยีน *cwl* A ที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ซึ่งเตรียมได้จากข้อที่ 3. 1. 1 โปรโมเตอร์เป็นชนิด *tac* มีประสิทธิภาพสูงในการถอดรหัสยีนซึ่งอยู่ถัดไปให้เป็นโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 9 ดังนั้นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ซึ่งได้จากการถอดรหัสของยีน *cwl* A ภายใต้โปรโมเตอร์ *tac* ของพลาสมิด PinPoint Xa-1 จึงมีโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสเชื่อมต่ออยู่ที่ปลายด้านเอ็น (N-terminal) การเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิด PinPoint Xa-1 ซึ่งมียีน *cwl* A มาเชื่อมต่ออยู่นี้ในภาวะที่มีไบโอตินและสารชักนำให้โปรโมเตอร์ทำงานได้คือ IPTG เอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่ได้จะมีไบโอตินเกาะอยู่ที่โปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกส การทำให้เอนไซม์ NA- L-alanine amidase นี้บริสุทธิ์จึงทำได้สะดวกโดยการใช้คอลัมน์โครมาโตรกราฟีชนิดแอฟฟินิตี้ใช้ อะวิดิน เรซิน เป็นตัวค้ำจุน จะจับกับไบโอตินอย่างเฉพาะ การทดลองนี้ได้นำพลาสมิด PinPoint Xa-1 มาตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bgl* II ซึ่งสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นยีน *cwl* A ที่ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bam* HI ที่เตรียมได้ โดยลำดับเบสในกระบวนการถอดรหัสเป็นโปรตีนของชิ้นยีน *cwl* A นี้ถูกต้อง หลังจากนำชิ้นพลาสมิดพาหะ PinPoint Xa-1 ไปตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bgl* II และกำจัดหมู่ฟอตเฟตออกด้วย CIAP ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 8 แล้วนำมาทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส เมื่อเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากแลมด้าดีเอ็นเอถูกย่อยสลายด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตามที่คาดหมายไว้คือ 3.3 กิโลเบสดังรูปที่ 10 ทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวนี้บริสุทธิ์ด้วยชุด Prep-A-Gene ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 9 หลังจากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับยีน *cwl* A ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1



<u>รูปที่ 9</u> แสดงแผนภาพการตัดพลาสมิดพาหะ PinPoint Xa-1 ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bgl* II



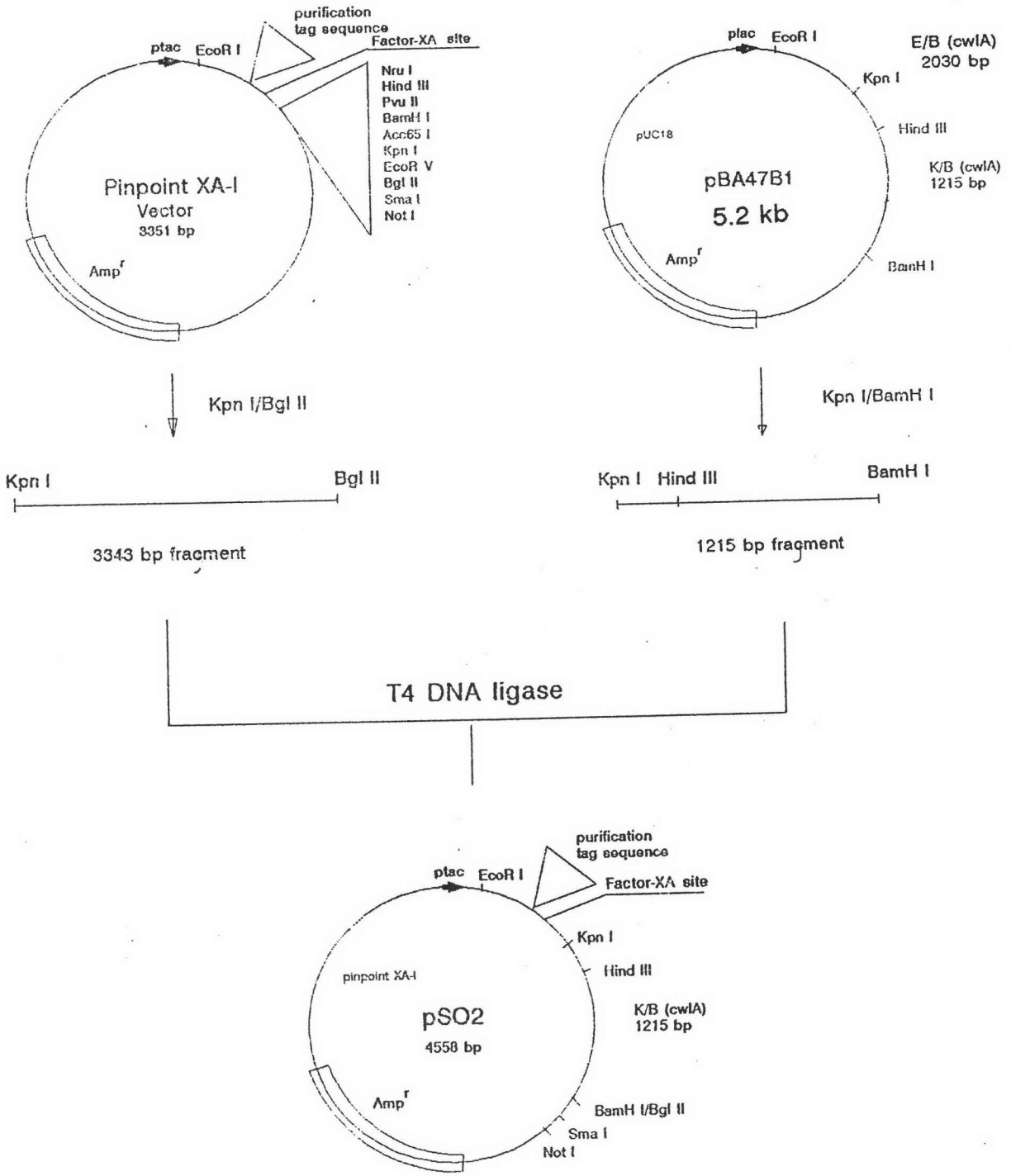
รูปที่ 10 รูปชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดพาหะ PinPoint Xa-1 ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bgl* II บนอะกาโรสเจล

ช่องที่ 1 แลมด้าดีเอ็นเอ (λ DNA) ที่ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III

2 พลาสมิดพาหะ PinPoint Xa-1 ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bgl* II แสดงชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส

3.1.3 ผลการเชื่อมยีน *cwl* A เข้ากับพลาสมิดพาหะ PinPoint Xa-1 และผลการทำทรานสฟอร์เมชั่น

เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 มาเชื่อมต่อกันในอัตราส่วนปริมาณยีน *cwl* A ต่อพลาสมิดพาหะ Pinpoint Xa-1 เท่ากับ 3 : 1 ด้วยเอนไซม์ทีโฟร์ไลเกส หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 8-12 ° ซ. เป็นเวลาประมาณ 16 ชม. นำมาทำการทรานสฟอร์มตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 11 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* JM109 หลังการบ่มที่ 37 ° ซ. ประมาณ 16-24 ชม. ได้โคโลนีจำนวนทั้งสิ้น 7 โคโลนี นำโคโลนีที่ได้ไปคัดเลือกหาทรานสฟอร์แมนท์ที่ต้องการต่อไป แผนผังแสดงการเชื่อมต่อของดีเอ็นเอข้างต้นแสดงดังรูป 11



<u>รูปที่ 11</u> แสดงแผนภาพการเชื่อมต่อยีน *cwl* A และพลาสมิดพาหะ PinPoint Xa-1 ด้วยเอนไซม์ทีโฟร์ไลเกส

3. 2 ผลการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์

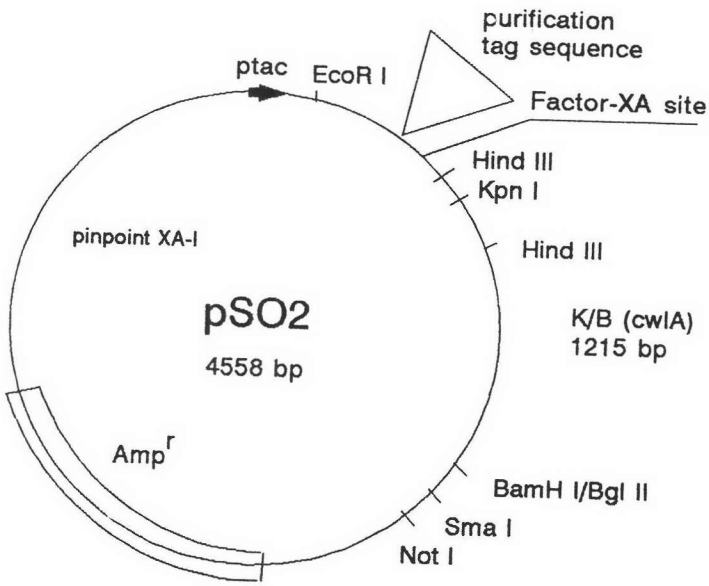
3. 2. 1 การสร้างบริเวณใสรอบโคโลนีเมื่อทรานสฟอร์แมนท์เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่เติมผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168

นำแต่ละโคโลนีที่ได้จากข้อ 3. 1. 3 มาคัดเลือกหาทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีน *cwl* A ที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมแอมพิซิลินและผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 ที่ต้มกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเพื่อทำลายเอนไซม์ที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ออก ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มล. และ 0.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับบ่มที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 48 ชม. ได้โคโลนีที่มีบริเวณใสโดยรอบจำนวน 4 โคโลนี (รูปที่ 12) นำโคโลนีทั้ง 4 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่เติมแอมพิซิลินเพื่อสกัดเอาพลาสมิดมาวัดขนาดต่อไป

รูปที่ 12 แสดงบริเวณใสรอบโคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์ บนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168

3. 2. 2 ผลการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีน *cwl* A โดยการสกัดเอาพลาสมิดของเซลล์แต่ละชนิดมาตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์แล้ววัดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ (restriction enzyme analysis)

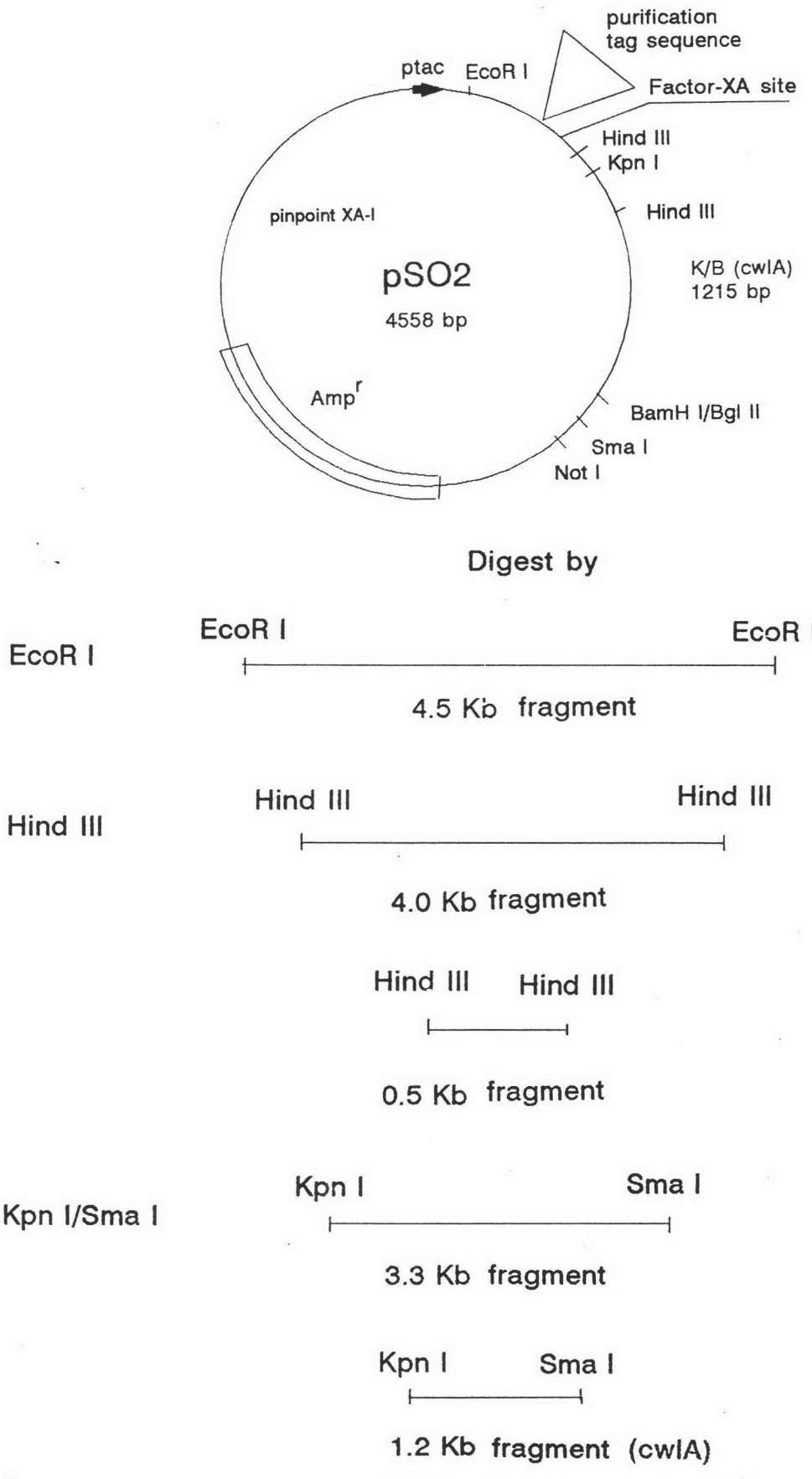
ผลการนำพลาสมิดที่สกัดได้จากโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่แสดงบริเวณใสโดยรอบ (ข้อ 3.2.1) มาตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ชนิดต่างๆ และวัดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ ดังแสดงในรูปที่ 14 และตารางที่ 1



รูปที่ 13 แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของทรานสฟอร์แมนท์ที่คาดว่าจะได้

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอรูปเส้นที่ได้จากการนำพลาสมิดที่สกัดได้จากโคโลนีที่แสดงบริเวณใสโดยรอบมาตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ชนิดต่างๆ

เรสตริกชั่นเอนไซม์	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอรูปเส้นที่ได้
*Eco*RI	4.5 กิโลเบส
Hind III	4.0 กิโลเบสและ 0.5 กิโลเบส
Kpn I และ *Sma* I	3.3 กิโลเบสและ 1.2 กิโลเบส

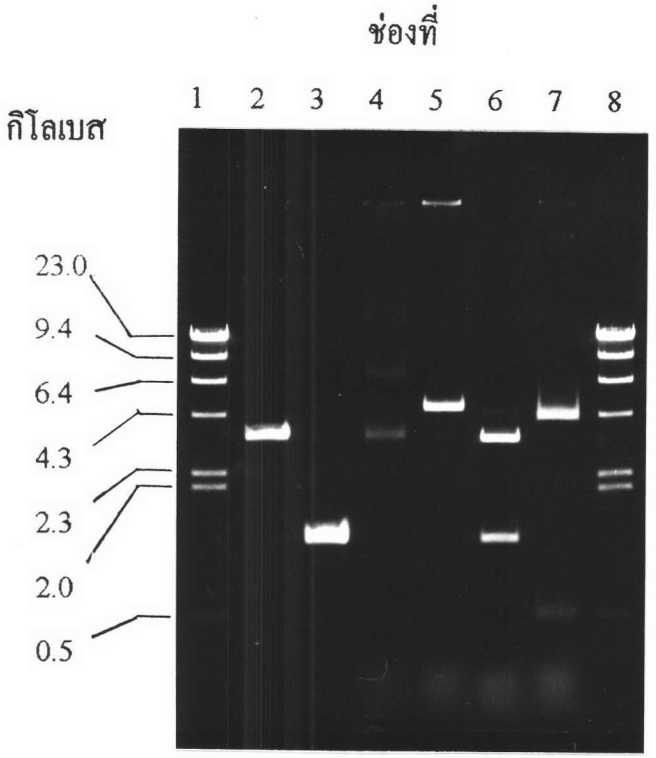


รูปที่ 14 แสดงแผนภาพการตัดพลาสมิดที่ได้จากโคโลนีทรานฟอร์แมนท์ซึ่งแสดงบริเวณใสโดยรอบ (ข้อ 3. 2. 1) ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ชนิดต่างๆ

ผลการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ ดังแสดงในรูปที่ 15 พบว่าขนาดชิ้นดีเอ็นเอสายยาวที่ได้เป็นไปตามที่คาด จึงน่าจะเป็นพลาสมิดชนิดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *cwl* A สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดพาหะ PinPoint Xa-1 ดังนั้นโคโลนีที่แสดงบริเวณใสโดยรอบทั้ง 4 โคโลนี เมื่อเจริญบนอาหารแข็งที่มีผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 เป็นองค์ประกอบ จึงเป็นทรานสฟอร์แมนท์ที่ต้องการ เรียกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้นี้ว่า pSO 2 และเรียกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ว่า *Escherichia coli* ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D

3. 2. 3 ผลการหากิจกรรมของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ของทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D

ผลการหากิจกรรมของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 12.5.3.2 ของทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ในปริมาณ 64.2 หน่วยเอนไซม์/มล. ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSO 2 นี้มียีน *cwl* A ซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase จริง พลาสมิด pSO 2 เป็นพลาสมิดที่เกิดจากการโคลนซ้ำของยีน *cwl* A ซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase เชื่อมเข้ากับพลาสมิดพาหะ PinPoint Xa-1 เก็บทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป



<u>รูปที่ 15</u> แสดงผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pSO 2) ซึ่งสกัดได้จาก *Escherichia coli* ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ชนิดต่างๆ

ช่องที่ 1 และ 8 แลมด้าดีเอ็นเอ (λ DNA) ที่ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III

2 พลาสมิด PinPoint Xa-1 ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bgl* II

3 ยีน *cwl* A ได้จากการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBA 47 BI ด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Bam*HI แสดงชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.2 กิโลเบส

4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSO 2 ไม่ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ใดๆขนาด 4.5 กิโลเบส

5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSO 2 ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Eco*RI แสดงชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.5 กิโลเบส

6 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSO 2 ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Sma* I แสดงชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบสและ 1.2 กิโลเบส

7 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSO 2 ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III แสดงชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.0 กิโลเบสและ 0.5 กิโลเบส

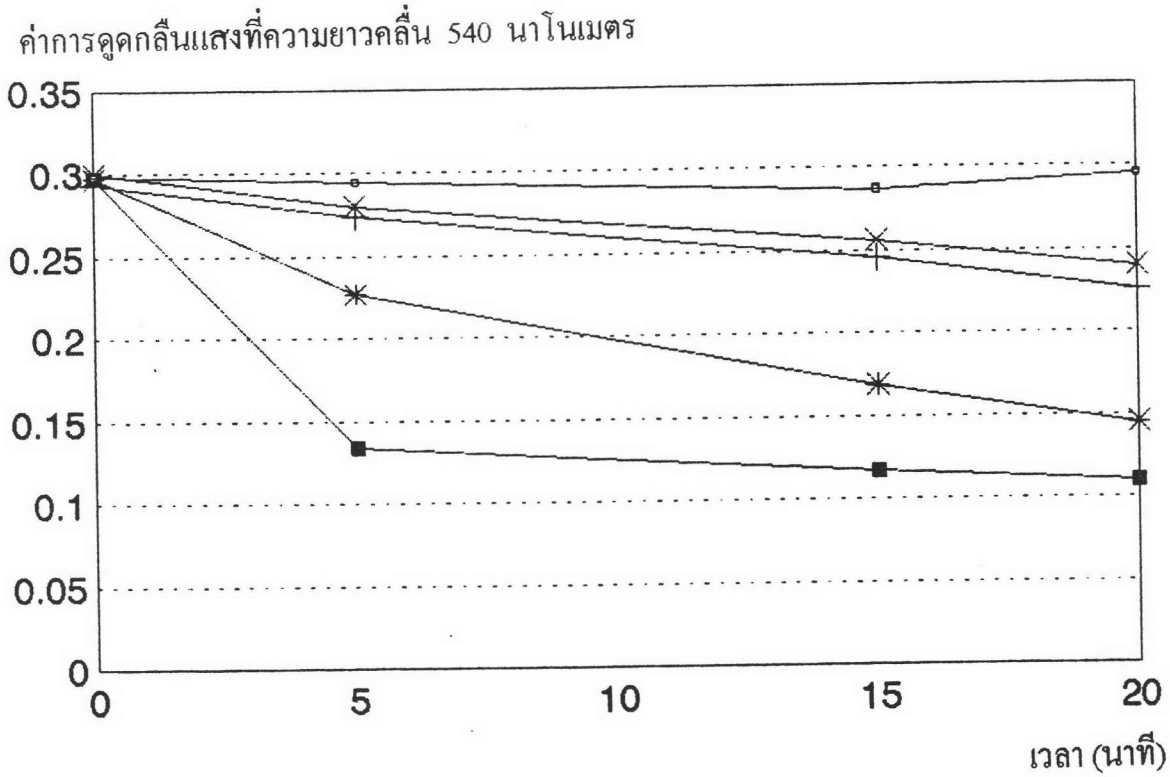
3. 3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่ได้จากทรานสฟอร์แมนท์ซึ่งมีพลาสมิด pSO 2 และพลาสมิด pBA 47 BI

ผลการนำเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่สกัดได้จากทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 12.3 ซึ่งมีพลาสมิด pSO 2 และที่สกัดได้จาก *Escherichia coli* JM109 พลาสมิด pBA 47 BI ที่ต่างก็มียีน *cwl* A มาหากิจกรรมของเอนไซม์ ดังแสดงผลในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ซึ่งเตรียมได้จากทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pSO 2 และทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBA 47 BI โดยมีสภาวะการเลี้ยงในอาหารสูตร LB ที่เติม IPTG ในระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงต้น และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เซลล์ที่ได้เตรียมเป็นเอนไซม์ในปริมาตร 1 มล

เชื้อจุลินทรีย์	พลาสมิด	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)
Escherichia coli JM109	-	8.0
Escherichia coli JM109	PinPoint Xa-1	7.6
Escherichia coli JM109	pBA 47 BI	28.0
Escherichia coli JM109	pSO 2	64.2

พลาสมิด pBA 47 BI เป็นพลาสมิดอนุพันธ์ของพลาสมิด pBA 47 ซึ่งมียีน *cwl* A ขนาด 2.0 กิโลเบส ส่วนพลาสมิด pSO 2 เป็นพลาสมิดอนุพันธ์ของพลาสมิด PinPoint Xa-1 ที่มียีน *cwl* A ขนาด 1.2 กิโลเบสจากพลาสมิด pBA 47 BI เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่สั้นที่สุดที่สามารถถอดรหัสเป็นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase มีโปรโมเตอร์เป็นชนิด *tac* จึงมีประสิทธิภาพสูงในการถอดรหัสเป็นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 16 เอนไซม์ที่เตรียมได้จากทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBA 47 BI มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 28.0 หน่วยเอนไซม์/มล. ในขณะที่ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pSO2 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 64.2 หน่วยเอนไซม์/มล. เพิ่มขึ้นประมาณ 2. 4 เท่า



<u>รูปที่ 16</u> กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เนื่องจากผนังเซลล์ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่สกัดจาก *Escherichia coli* JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดชนิดต่างๆ สัญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้คือ

□ (ชุดควบคุมที่ไม่มีเอนไซม์)

× *Escherichia coli* JM109 ซึ่งไม่มีพลาสมิด

* มีพลาสมิด pBA 47 BI

\+ มีพลาสมิด PinPoint Xa-1

■ มีพลาสมิด pSO 2

3. 4 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D สร้างเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ในปริมาณมาก

3. 4. 1 ผลการศึกษาระยะการเจริญของเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ที่เหมาะสมในการเติม IPTG เพื่อชักนำให้ยีน *cwl* A ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *tac* ถอดรหัสเป็นเอนไซม์

ผลการเติม IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ ให้กับเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ที่ระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงต้น (OD_{650} = 0.05) ที่ระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงกลาง (OD_{650} = 0.2) และที่ระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงปลาย (OD_{650} = 0.6) แล้วบ่มเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิและสภาวะเดิมที่ทำการเลี้ยงเชื้อต่ออีกเป็นเวลา 6 ชม. จึงนำมาสกัดเอาเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ผลการหากิจกรรมของเอนไซม์ ดังแสดงในตารางที่ 3 จะเห็นว่าเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่สกัดได้จากเซลล์ที่ระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงปลายให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 334 หน่วยเอนไซม์/มล. การทดลองต่อไปจึงทำการเติม IPTG เพื่อชักนำให้ยีน *cwl* A ถอดรหัส เมื่อเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D อยู่ในระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงปลาย

ตารางที่ 3 แสดงผลของการเติม IPTG ให้เซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ที่ระยะการเจริญแตกต่างกัน ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่สกัดได้

ระยะของการเจริญ	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยเอนไซม์/มล.)
แบบอัตราก้าวหน้าช่วงต้น	67.2
แบบอัตราก้าวหน้าช่วงกลาง	180.0
แบบอัตราก้าวหน้าช่วงปลาย	334.0

3. 4. 2 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D หลังการเติม IPTG เพื่อชักนำให้ยีน *cwl* A ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase

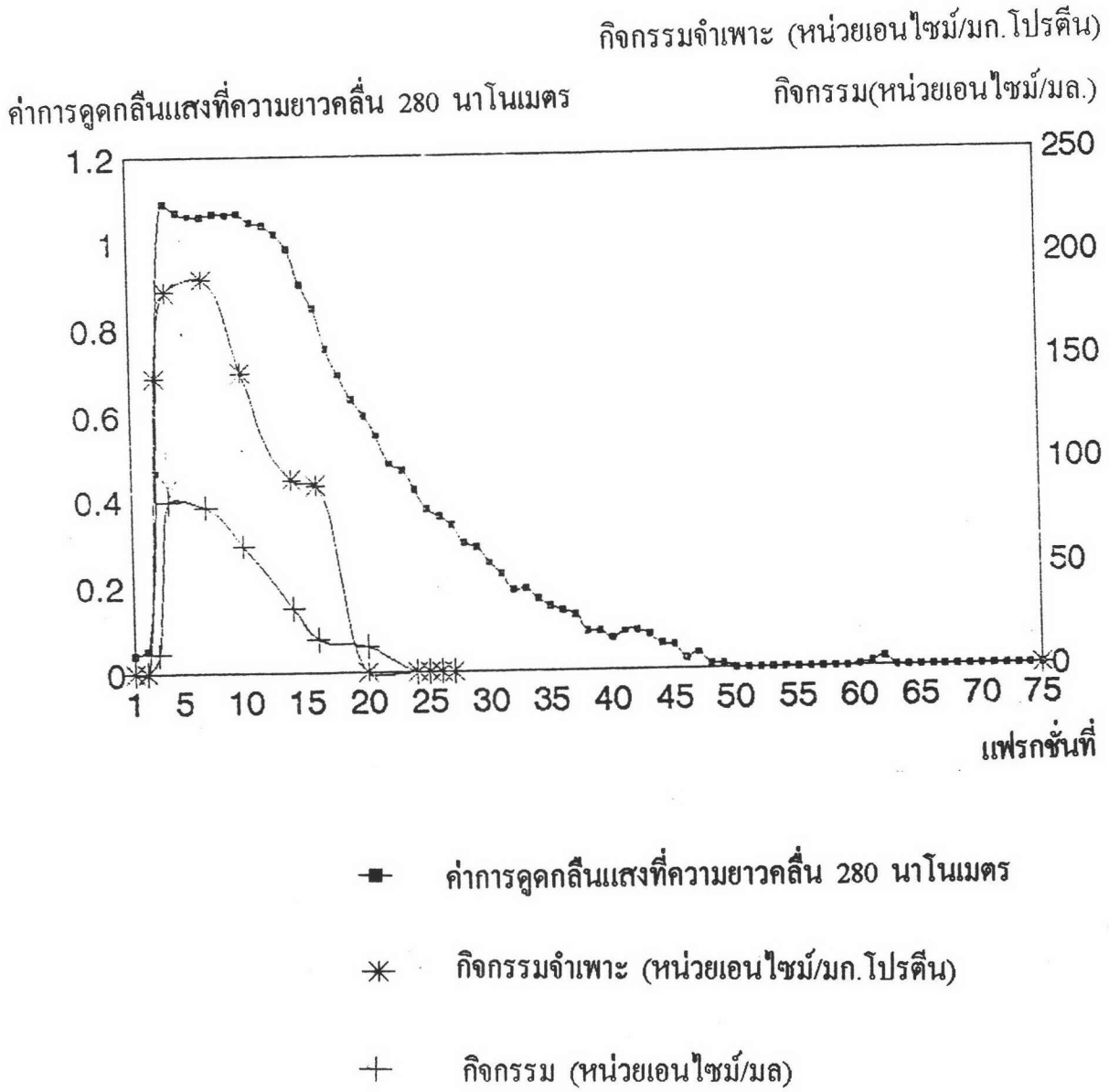
ผลการศึกษาในข้อ 3. 4. 1 พบว่าระยะการเจริญของเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์ที่เหมาะสมในการเติม IPTG เพื่อชักนำให้ยีน *cwl* A ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase คือระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงปลาย การทดลองนี้จึงได้ทำการเติม IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ให้กับเซลล์ที่เจริญอยู่ในระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงปลาย แล้วแปรผันระยะเวลาในการบ่มเซลล์หลังจากเติม IPTG จากระยะเวลา 3 ถึง 12 ชม. นำเซลล์ที่ได้มาสกัดเอนไซม์ NA- L-alanine amidase แล้วหากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้ ดังแสดงผลในตารางที่ 4. การบ่มเซลล์ไว้หลังการเติม IPTG ต่ออีกเป็นระยะเวลา 3 ชม. ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 370 หน่วยเอนไซม์/มล.

ตารางที่ 4 แสดงผลของระยะเวลาในการบ่มเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D หลังการเติม IPTG ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เตรียมได้

ระยะเวลาการบ่มเชื้อหลังการเติม IPTG (ชม.)	กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยเอนไซม์/มล.)
3	370.0
6	334.0
9	282.0
12	260.0

3. 5 ผลการทำให้เอนไซม์ NA- L-alanine amidase บริสุทธิ์โดยชุด PinPoint ™ Xa protein purification system

เนื่องจากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D มีพลาสมิด pSO 2 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของพลาสมิด PinPoint Xa-1 ที่มียีนที่เป็นรหัสของโปรตีนซึ่งเอนไซม์ไบโอตินไลเกสจะนำไบโอตินมาเชื่อมเกาะอยู่ระหว่างโปรโมเตอร์ *tac* และยีน *cwl* A ซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ดังนั้นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่สกัดได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไบโอตินตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 4.2.2 จึงมีไบโอตินเกาะติดอยู่ การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาวิธีการทำให้เอนไซม์ NA-L-alanine amidase ซึ่งมีไบโอตินเกาะอยู่นี้บริสุทธิ์โดยชุด PinPoint ™ Xa protein purification system หลักการของวิธีการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยวิธีการนี้คือ การผ่านเอนไซม์ที่มีไบโอตินเกาะอยู่ลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วย อะวิดินเรซิน ซึ่ง อะวิดินเรซิน นี้จะจับกับไบโอตินของเอนไซม์ ทำให้สามารถแยกออกจากเอนไซม์อื่นซึ่งไม่มีไบโอตินได้แล้วจึงทำการชะเอนไซม์ซึ่งมีไบโอตินและไบโอตินเกาะอยู่ที่อะวิดินเรซิน ออกจากคอลัมน์โดยใช้สารละลายไบโอติน ผลการสกัดเอนไซม์ NA- L-alanine amidase จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ปริมาตร 2 ลิตร ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 12.3 ได้เอนไซม์จำนวน 15 มล. (17,175 หน่วยเอนไซม์)นำมาผ่าน อะวิดิน เรซิน ปริมาตร 0.5 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. ชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TDE เก็บตัวอย่างที่ไหลออกจากคอลัมน์ใส่หลอดไมโครฟิวจ์ปริมาณหลอดละ 0.5 มล. นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และเมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรนี้มีค่าคงที่ ชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TDE ที่มีไบโอตินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ เก็บตัวอย่างที่ไหลออกจากคอลัมน์ใส่หลอดไมโครฟิวจ์ปริมาตรหลอดละ 0.5 มล. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำตัวอย่างที่เก็บได้มาหากิจกรรมของเอนไซม์ จากรูปที่ 17 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างหมายเลข 4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 83 หน่วยเอนไซม์/มล. และตัวอย่างหมายเลข 7 มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุดคือ 190.47 หน่ายเอนไซม์/มก.โปรตีน เก็บตัวอย่างที่ 7 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดไว้ทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป และจากตัวอย่างที่ 7 จะเห็นได้ว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่สกัดได้จากเซลล์มีค่าเท่ากับ 32 หน่วยเอนไซม์/มก.เพิ่มขึ้น เป็น 190.47 หน่วยเอนไซม์/มก. ในตัวอย่างที่ 7 หรือเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 6 เท่า

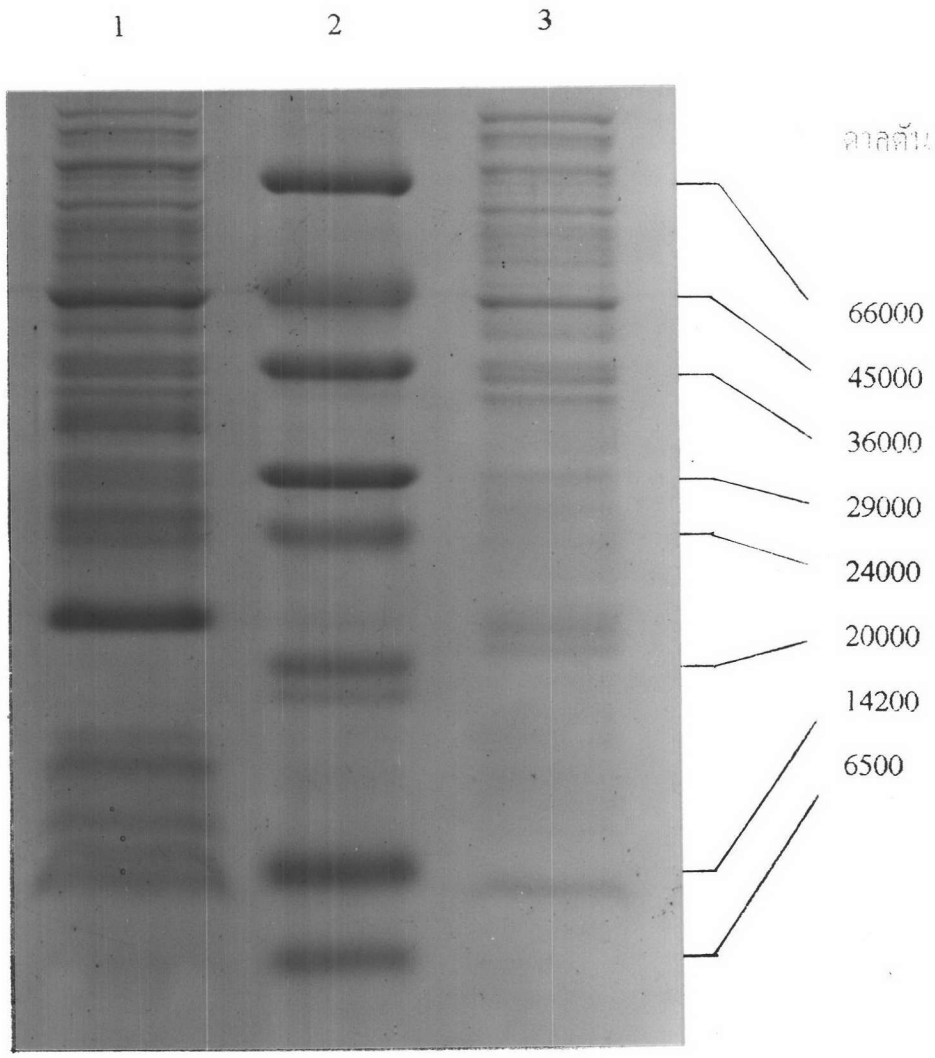


<u>รูปที่ 17</u> แสดงโครมาโตรแกรมของการทำให้เอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่สกัดได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D บริสุทธิ์โดยชุด PinPoint ™ Xa protein purification system

3. 6 ผลการศึกษาลักษณะและสมบัติของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่ได้จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PinPoint ™ Xa protein purification system

3. 6. 1 ผลการศึกษาโดยการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตโฟริซิส (SDS-PAGE)

นำเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่สกัดได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D และเอนไซม์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PinPoint ™ Xa protein purification system (ตัวอย่างที่ 7 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 80.0 หน่วยเอนไซม์/มล. ค่ากิจกรรมจำเพาะ 190.47 หน่วยเอนไซม์/มก.) มาทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตโฟริซิส ใช้ความเข้มข้นของเจล 20 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 12.5.3.3 หาค่าน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของสารละลายผสมของโปรตีนมาตรฐาน และระยะทางที่โปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดเคลื่อนที่ได้ ดังแสดงผลในรูปที่ 18 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ประกอบด้วยแถบโปรตีนหลัก 2 ชนิดคือโปรตีนขนาด 43 และ 22 5 กิโลดาลตัน โปรตีนขนาด 43 กิโลดาลตัน เอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่ถอดรหัสจากยีน *cwl* A ขนาด 29.9กิโลดาลตัน (Kuroda and Sekeguchi , 1990) เชื่อมต่อกับบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสขนาด 13 กิโลดาลตัน ส่วนโปรตีนขนาด 22.5กิโลดาลตันซึ่งพบเป็นโปรตีนหลักอีกชนิดหนึ่งนั้นคือ โปรตีนของ *Escherichia coli* JM109 ซึ่งใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ส่วนเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และมีความบริสุทธิ์สูงกว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จากเซลล์โดยตรง 6 เท่า(ผลการศึกษาข้อ 3. 5) ผลการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตโฟริซิส พบแถบโปรตีนอื่นๆปะปนอยู่มากแต่แถบโปรตีนหลักที่พบคือ แถบโปรตีนขนาด 43 กิโลดาลตัน



<u>รูปที่ 18</u> แสดงขนาดของโปรตีนที่พบเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส

ช่องที่ 1 เอนไซม์ที่สกัดได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PinPoint ™ XA protein purification system

2 สารละลายผสมของโปรตีนมาตรฐาน(ภาคผนวก ข)

3 เอนไซม์หลังการผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PinPoint ™ Xa protein purification system

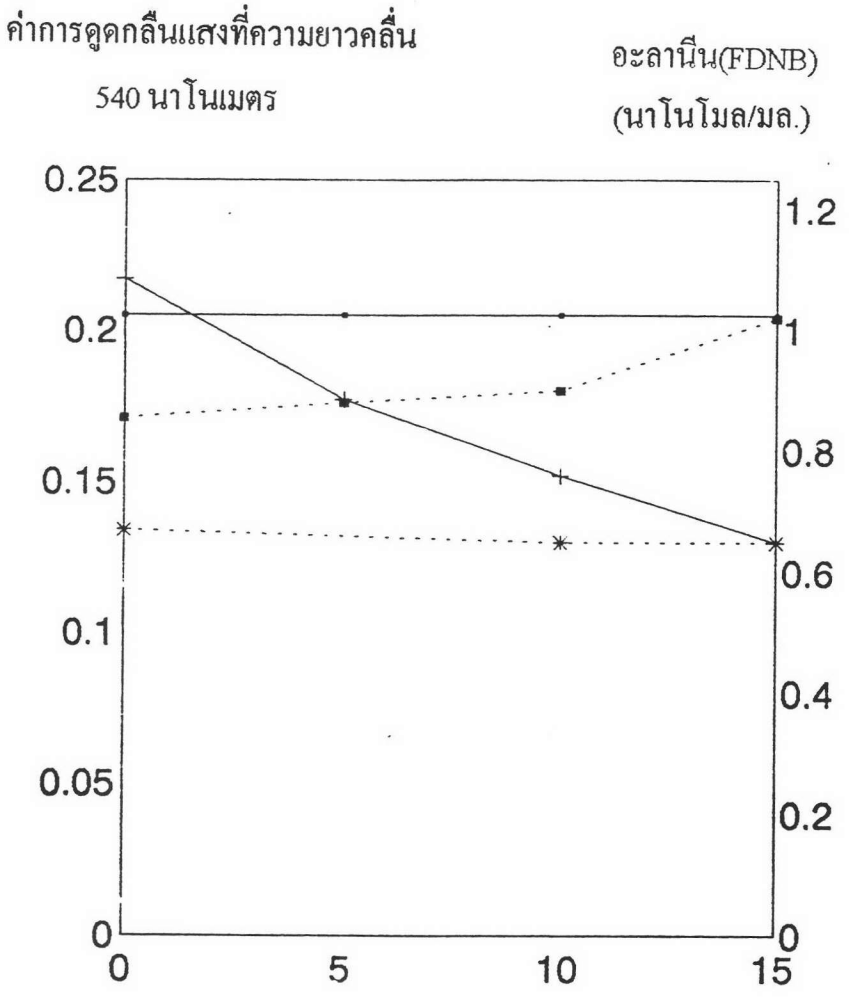
3. 6. 2 ผลการตรวจพิสูจน์เอนไซม์ที่สกัดได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ว่าเป็นเอนไซม์ NA- L-alanine amidase

นำเอนไซม์ที่สกัดได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PinPoint ™ Xa protein purification system แล้วมาหากิจกรรมของเอนไซม์ในสภาวะที่เติม PMSF ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ความเข้มข้นสุดท้าย 0.02 มิลลิโมลาร์ แล้วนำผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นมาวิเคราะห์หากรดอะมิโนอิสระและน้ำตาลรีดิวซ์ จากรูปที่ 19 พบการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอิสระแต่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์อิสระ กรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสทั้งนี้เพราะเป็นสภาวะที่มีPMSF อยู่ฉะนั้นจึงน่าจะเกิดจากการตัดพันธะระหว่าง กรดอะมิโนแอล-อะลานีนบนสายเปปไทด์ L-alanine และหมู่คาร์บอกซิลของ MurNAC บนสายไกลแคน โดยเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ส่วนการที่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์อิสระนั้นแสดงว่าปฏิกริยาการย่อยสลายผนังเซลล์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรลดลงนั้นมิได้เกิดจากการย่อยสลายสายไกลแคน

3. 7 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ในการทำให้เซลล์แบคทีเรียทั้งกรัมบวกและกรัมลบซึ่งมีโครงสร้างของผนังเซลล์แตกต่างกันแตก

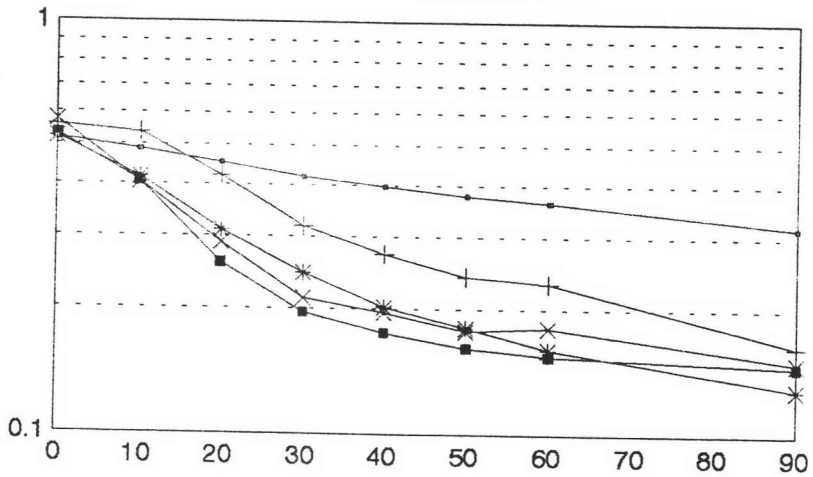
เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียชนิดต่างๆ ซึ่งมีโครงสร้างของเปปติโดไกลแคนแตกต่างกันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที จนกระทั่งค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 0.25 ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงกลาง ปริมาตร 10 มล. มากรองผ่านแผ่นกรองรูพรุน 0.45 ไมครอน ล้างด้วยน้ำกลั่นอุณหภูมิ 37 ° ซ. ปริมาตร 10 มล. 2 ครั้ง แขวนลอยเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่ปรับอุณหภูมิ 37 ° ซ. ปริมาตร 5 มล. เติมเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ในปริมาณความเข้มข้นสุดท้าย 1 หน่วย 5 หน่วย 10 หน่วย 20 หน่วยเอนไซม์/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ติดตามการเปลี่ยนแปลงของ ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรดังแสดงในรูปที่ 20 แล้วคำนวณหาอัตราเร็วของการแตกของเซลล์ ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ

12.6 และคำนวณหาอัตราเร็วของการแตกสัมพัทธ์ของเซลล์ เมื่อกำหนดให้อัตราเร็วของการแตกของเซลล์ในสารละลาย TK มีค่าเท่ากับ 1.0 ดังแสดงผลในตารางที่ 5



รูปที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และระยะเวลา สัญญลักษณ์ที่ใช้แสดง.กรดอะมิโนอิสระในปฏิกริยาที่เติมเอนไซม์ -▪- ไม่เติมเอนไซม์ -*- แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เตรียมได้ในปฏิกริยาที่เติมเอนไซม์ —+— ไม่เติมเอนไซม์ —•—

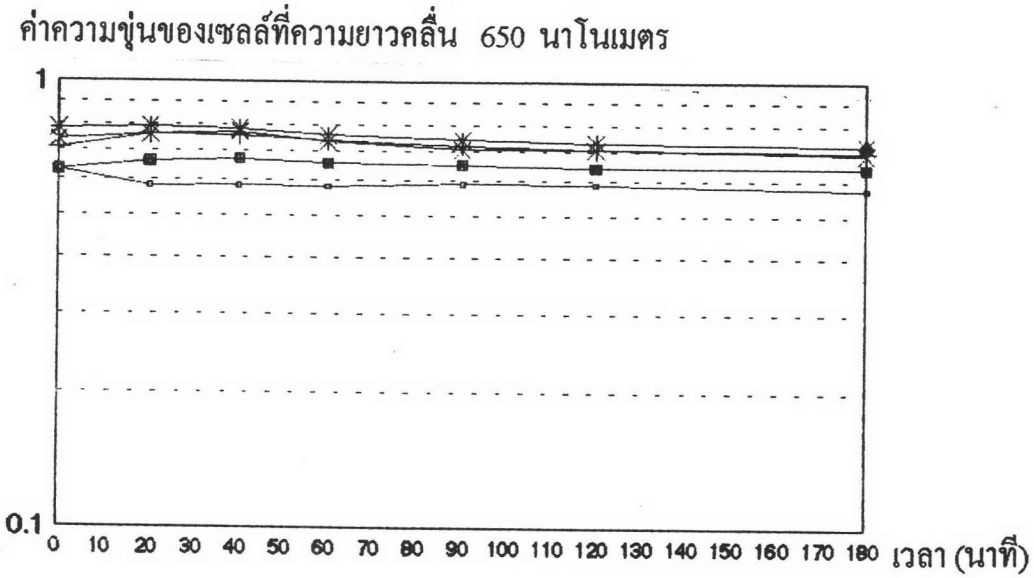
ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร



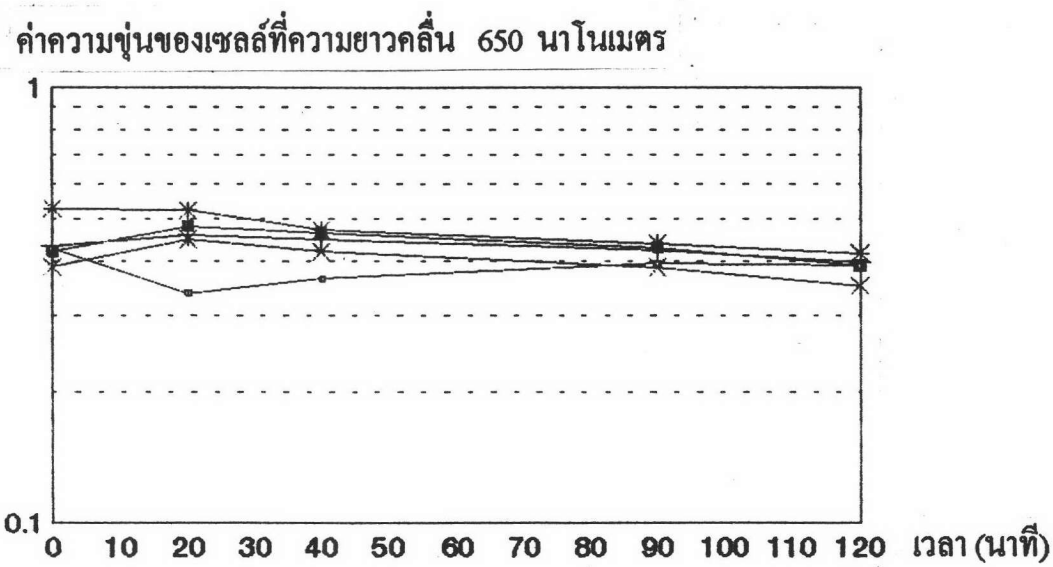
รูปที่ 20 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ สัญญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ TK —•— สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA-L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ 1 —+— 5 —✳— 10 —■— และ 20 (—✳—) หน่วยเอนไซม์/มล. ตามลำดับ

ตารางที่ 5 แสดงอัตราเร็วของการแตกของเซลล์และอัตราเร็วของการแตกสัมพัทธ์ของเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 ในสารละลายทดสอบชนิดต่างๆ

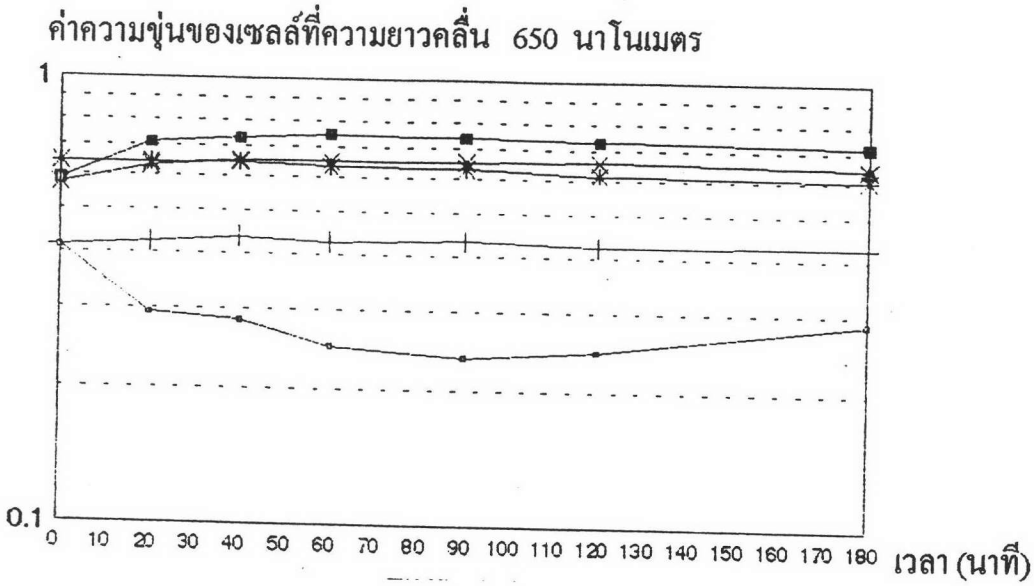
สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA- L-alanine amidase	อัตราเร็วการแตกของเซลล์(x 10^{-2} /นาที)	อัตราเร็วการแตกสัมพัทธ์
สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่ไม่มีเอนไซม์	0.68	1.0
1 หน่วยเอนไซม์/มล.	13.05	19.19
5 หน่วยเอนไซม์/มล.	12.95	19.04
10 หน่วยเอนไซม์/มล.	18.05	26.54
20 หน่วยเอนไซม์/มล.	17.2	25.29



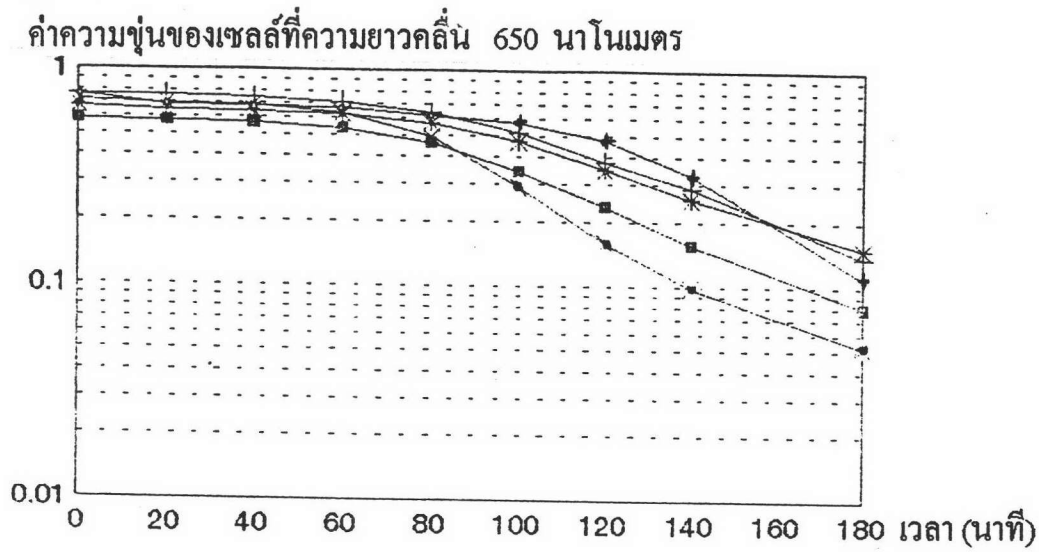
รูปที่ 21 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Micrococcus luteus* TISTR 745 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ สัญญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ TK —•— สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ 1 —+— 5 —✳— 10 —■— และ 20 —✳— หน่วยเอนไซม์/มล. ตามลำดับ



รูปที่ 22 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Streptococcus faeciumm* IFO 3128 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ สัญญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ TK —•— สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ 1 —+— 5 —✳— 10 —■— และ 20 —✳— หน่วยเอนไซม์/มล. ตามลำดับ

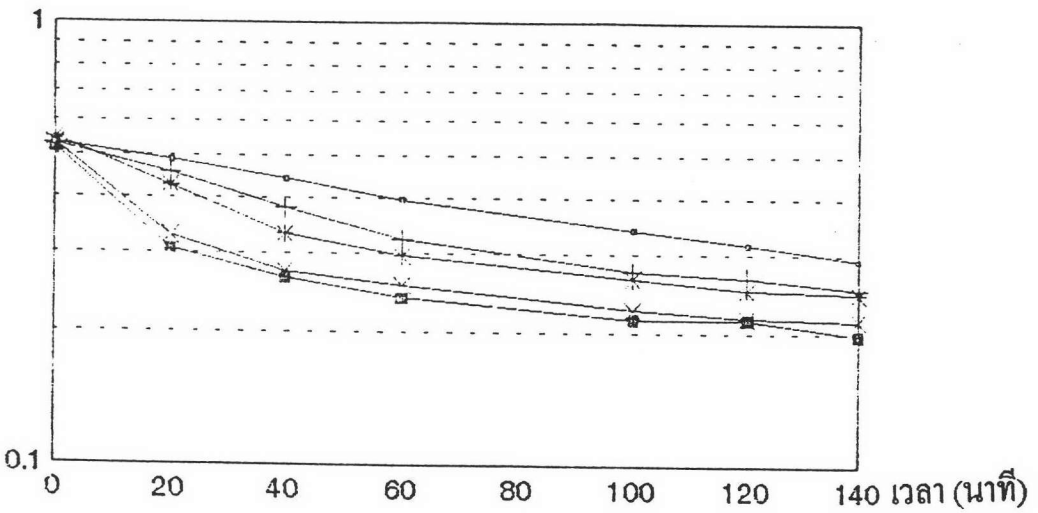


<u>รูปที่ 23</u> แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ สัญญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ TK (-●-) สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ 1 (-+-) 5 (-✱-) 10 (-■-) และ 20 (-✱-) หน่วยเอนไซม์/มล. ตามลำดับ



<u>รูปที่ 24</u> แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Escherichia coli* TISTR 780 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ สัญญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ TK (-●-) สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ 1 (-+-) 5 (-✱-) 10 (-■-) และ 20 (-✱-) หน่วยเอนไซม์/มล. ตามลำดับ

ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร



รูปที่ 25 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ สัญญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ TK (-▪-) สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ 1 (-+-) 5 (-✳-) 10 (-■-) และ 20 (-✕-) หน่วยเอนไซม์/มล. ตามลำดับ

ตารางที่ 6 แสดงอัตราเร็วของการแตกของเซลล์และอัตราเร็วของการแตกสัมพัทธ์ของเซลล์ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 ในสารละลายทดสอบชนิดต่างๆ

สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA- L-alanine amidase	อัตราเร็วการแตกของเซลล์(x 10^{-2} /นาที)	อัตราเร็วการแตกสัมพัทธ์
สารละลายบัฟเฟอร์ TK	0.42	1.00
1 หน่วยเอนไซม์/มล.	3.55	8.45
5 หน่วยเอนไซม์/มล.	4.4	10.47
10 หน่วยเอนไซม์/มล.	13.2	31.42
20 หน่วยเอนไซม์/มล.	11.95	28.45

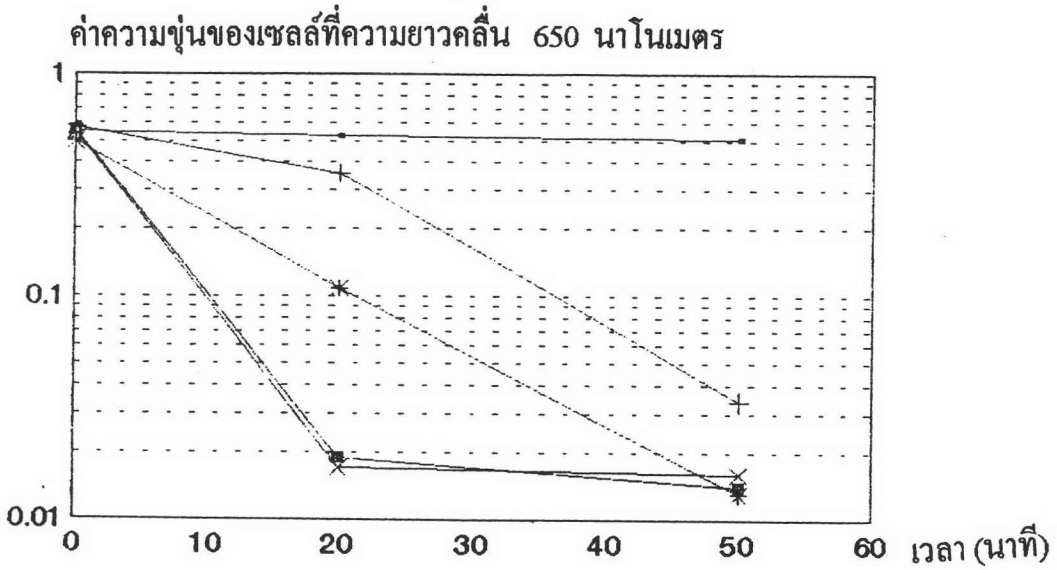
จากรูปที่ 20 ถึงรูปที่ 25 และตารางที่ 5 ถึงตารางที่ 6 พบว่าแบคทีเรียกรัมบวกที่นำมาทดสอบคือ *Bacillus subtilis* 168 *Micrococcus luteus* TISTR 745 *Streptococcus faecium* IFO 3128 *Staphylococcus aureus* TISTR 118 เอนไซม์ NA-L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D สามารถทำให้เฉพาะเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 แตกโดยเมื่อใช้เอนไซม์เข้มข้น 10 หน่วยเอนไซม์/มล. อัตราเร็วของการแตกของเซลล์มีค่าเท่ากับ 18.05×10^{-2} /นาที และอัตราเร็วของการแตกสัมพัทธ์ของเซลล์มีค่าเท่ากับ 26.54 สำหรับแบคทีเรียกรัมลบที่นำมาทดสอบคือ *Escherichia coli* TISTR 780 และ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 เอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้สามารถชักนำให้เซลล์ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 แตกได้ โดยเมื่อใช้เอนไซม์เข้มข้น 10 หน่วยเอนไซม์/มล. อัตราเร็วของการแตกของเซลล์มีค่าเท่ากับ 13.2×10^{-2} /นาที และอัตราเร็วของการแตกสัมพัทธ์ของเซลล์มีค่าเท่ากับ 31.42 จะได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบ *Bacillus subtilis* 168 และ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 แล้วที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 10 หน่วยเอนไซม์/มล. *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 ไวต่อการชักนำทำให้เซลล์แตกได้มากกว่า *Bacillus subtilis* 168 และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการชักนำให้เซลล์ทั้งสองชนิดแตกคือ 10 หน่วยเอนไซม์/มล. สำหรับ *Escherichia coli* TISTR 780 พบว่าเซลล์สามารถแตกได้ดีในสารละลายบัฟเฟอร์ TK มากกว่าในสารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่เติมเอนไซม์

3. 8 ผลการศึกษาผลของโปรตีนซึ่งเชื่อมอยู่กับเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ซึ่งสกัดได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ต่อกิจกรรมของเอนไซม์

นำเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D ซึ่งมีโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสเชื่อมอยู่มากำจัดโปรตีนนี้ออกด้วยเอนไซม์แฟกเตอร์เอ็กซ์เอโปรติเอส (Factor-Xa protease) เข้มข้น 2% ซึ่งตัดสายเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนดังต่อไปนี้ Ile-Glu-Gly-Arg ที่ตำแหน่งหลังกรดอะมิโนอาร์จินิน (จากภาคผนวก ค ข้อ 4 แสดงตำแหน่งที่แฟกเตอร์เอ็กซ์เอโปรติเอสจดจำ) การย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างจำเพาะที่บริเวณนี้ จะมีผลทำให้เอนไซม์ NA- L-alanine amidase แยกออกจากโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสได้ แล้วเมื่อนำเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่ได้มาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่ลดลง เนื่องมาจากมีตำแหน่งจำเพาะของการตัดด้วย เอนไซม์แฟกเตอร์เอ็กซ์เอโปรติเอส (Factor-Xa site) ที่ได้ถูกกำหนดไว้แล้วอยู่ระหว่าง โปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกส กับ เอนไซม์ NA- L-alanine amidase และ จากลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ผลิตเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ไม่พบตำแหน่งจดจำของการตัดของเอนไซม์แฟกเตอร์เอ็กซ์เอโปรติเอส

3. 9 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่กำจัดเอาโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสที่เกาะอยู่ออกในการทำให้เซลล์แบคทีเรียทั้งกรัมบวกและกรัมลบซึ่งมีโครงสร้างของผนังเซลล์แตกต่างกันแตก

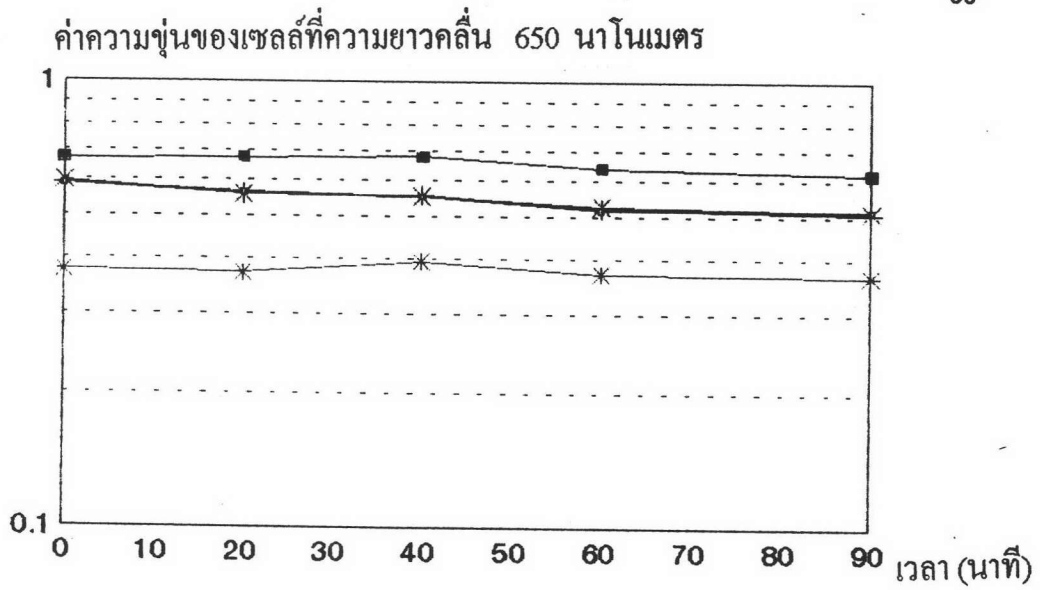
เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่มีโครงสร้างของเปปติโดไกลแคนแตกต่างกัน ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที จนกระทั่งค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรมีค่าเท่ากับ 0.25 ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงกลาง จำนวน 10 มล. มากรองผ่านแผ่นกรองรูพรุน 0.45 ไมครอน ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 มล. 2 ครั้ง แขวนลอยเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่ปรับอุณหภูมิ 37° ซ. จำนวน 5 มล. เติมเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D และได้กำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออกแล้ว ในปริมาณความเข้มข้นสุดท้าย 1 หน่วย 5 หน่วย 10 หน่วย 20 หน่วยเอนไซม์/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ติดตามการเปลี่ยนแปลงของ ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรดังแสดงในรูปที่ 27 คำนวณหาอัตราเร็วของการแตกของเซลล์ และคำนวณหาอัตราเร็วสัมพัทธ์ของการแตกของเซลล์เมื่อกำหนดให้อัตราเร็วของการแตกของเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ TK มีค่าสัมพัทธ์เท่ากับ 1.0



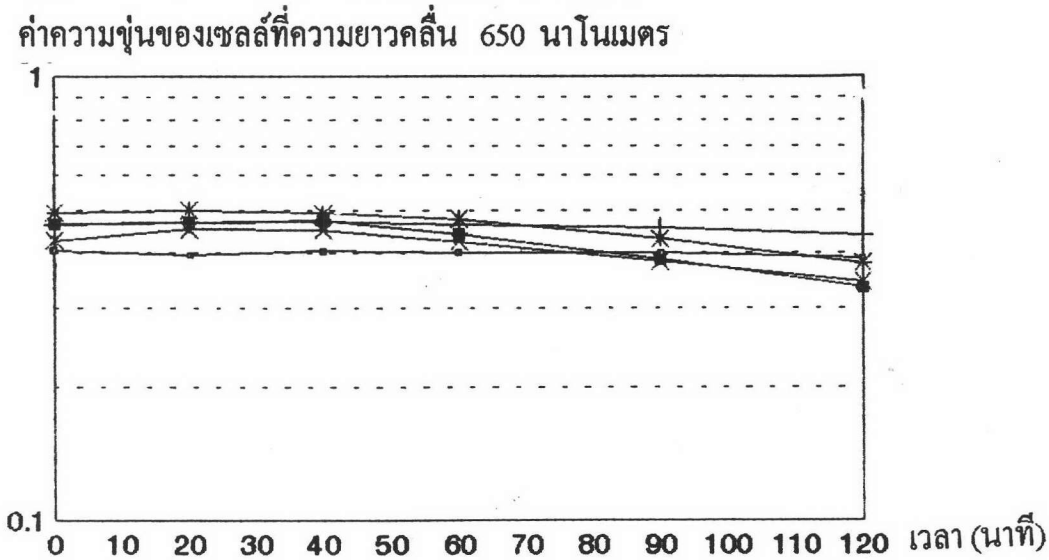
รูปที่ 27 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ สัญญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ TK (+) สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA-L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้และกำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออก 1 (+) 5 (*) 10 (●) และ 20 (×) หน่วยเอนไซม์/มล. ตามลำดับ

ตารางที่ 8 แสดงอัตราเร็วของการแตกของเซลล์และอัตราเร็วของการแตกสัมพัทธ์ของเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 ในสารละลายทดสอบชนิดต่างๆ

สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่กำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกส	อัตราเร็วการแตกของเซลล์ ($\times 10^{-2}$ /นาที)	อัตราเร็วการแตกสัมพัทธ์
สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่ไม่มีเอนไซม์	0.25	1.0
1 หน่วยเอนไซม์/มล.	11.95	47.8
5 หน่วยเอนไซม์/มล.	38.1	152.4
10 หน่วยเอนไซม์/มล.	84.5	338.0
20 หน่วยเอนไซม์/มล.	86.8	347.2

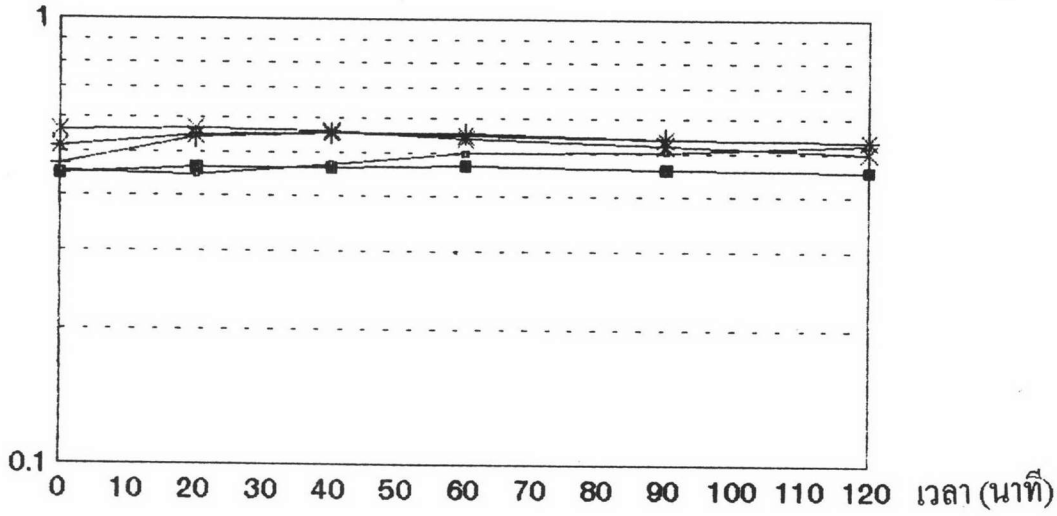


รูปที่ 28 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Micrococcus luteus* TISTR 745 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ สัญญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ TK (-▫-) สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้และกำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออก 1 (-+-) 5 (-✳-) 10 (-■-) และ 20 (-✕-) หน่วยเอนไซม์/มล. ตามลำดับ



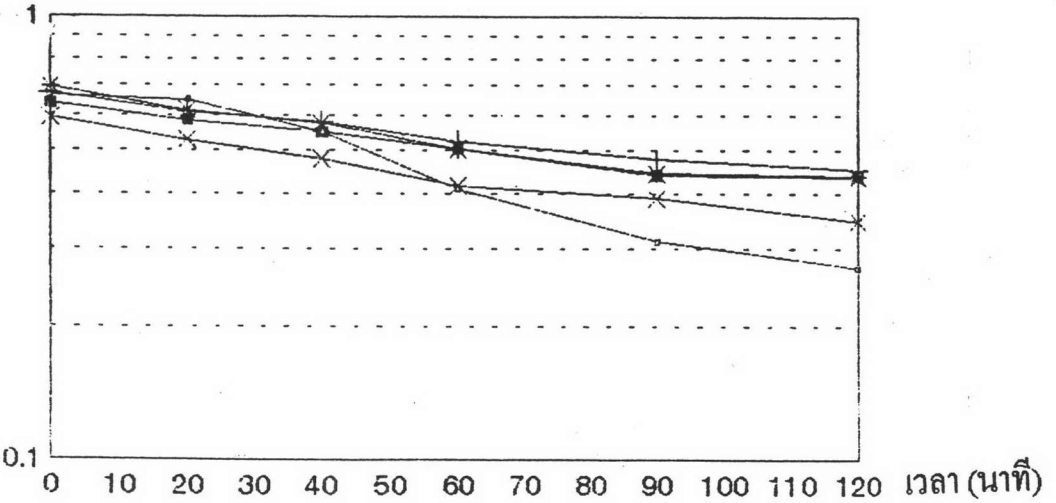
รูปที่ 29 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ ***Streptococcus faecium*** IFO 3128 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ สัญญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ TK (-▫-) สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้และกำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออก 1 (-+-) 5 (-✳-) 10 (-■-) และ 20 (-✕-) หน่วยเอนไซม์/มล. ตามลำดับ

ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

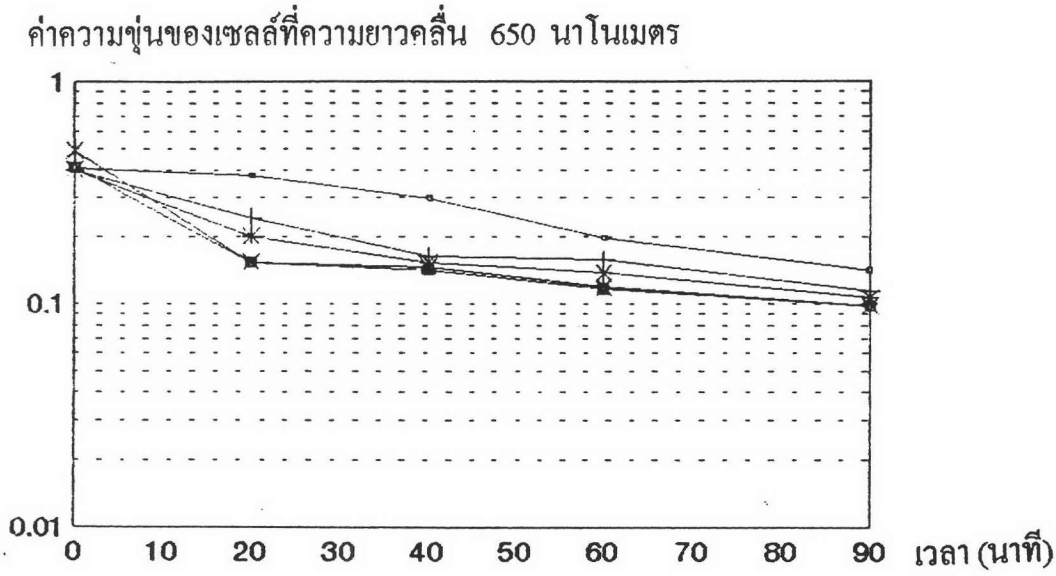


<u>รูปที่ 30</u> แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ สัญญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ TK (-•-) สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้และกำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออก 1 (-+-) 5 (-✳-) 10 (-■-) และ 20 (-✕-) หน่วยเอนไซม์/มล. ตามลำดับ

ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร



<u>รูปที่ 31</u> แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Escherichia coli* TISTR 780 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ สัญญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ TK (-•-) สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA-L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้และกำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออก 1 (-+-) 5 (-✳-) 10 (-■-) และ 20 (-✕-) หน่วยเอนไซม์/มล. ตามลำดับ



รูปที่ 32 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่นของเซลล์ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ในสารละลายทดสอบที่ระยะเวลาต่างๆ สัญญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้คือ สารละลายบัฟเฟอร์ TK (-•-) สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้และกำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออก 1 (-+-) 5 (-✳-) 10 (-●-) และ 20 (-✳-) หน่วยเอนไซม์/มล. ตามลำดับ

ตารางที่ 9 แสดงอัตราเร็วของการแตกของเซลล์และอัตราเร็วของการแตกสัมพัทธ์ของเซลล์ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 ในสารละลายทดสอบชนิดต่างๆ

สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่มีเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่กำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกส	อัตราเร็วการแตกของเซลล์ ($x 10^{-2}$ /นาที)	อัตราเร็วการแตกสัมพัทธ์
สารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่ไม่มีเอนไซม์	0.42	1.0
1 หน่วยเอนไซม์/มล.	12.5	29.76
5 หน่วยเอนไซม์/มล.	17.2	40.95
10 หน่วยเอนไซม์/มล.	24.45	58.21
20 หน่วยเอนไซม์/มล.	25.6	60.95

จากรูปที่ 27 ถึงรูปที่ 32 และตารางที่ 8 ถึงตารางที่ 9 พบว่าแบคทีเรียกรัมบวกที่นำมาทดสอบคือ *Bacillus subtilis* 168 *Micrococcus luteus* TISTR 745 *Streptococcus faecium* IFO 3128 *Staphylococcus aureus* TISTR 118 เอนไซม์ NA-L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2D และกำจัดเอาโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสออกด้วย เอนไซม์แฟกเตอร์เอกซ์เอโปรติเอส สามารถทำให้เฉพาะเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 แตกโดยเมื่อใช้เอนไซม์เข้มข้น 10 หน่วยเอนไซม์/มล. อัตราเร็วของการแตกของเซลล์มีค่าเท่ากับ 84.5×10^{-2} /นาที และอัตราเร็วของการแตกสัมพัทธ์ของเซลล์มีค่าเท่ากับ 338.0 สำหรับแบคทีเรียกรัมลบที่นำมาทดสอบคือ *Escherichia coli* TISTR 780 และ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 เอนไซม์ NA- L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่ตัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกส ออก สามารถชักนำให้เซลล์ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 แตกได้ โดยเมื่อใช้เอนไซม์เข้มข้น 10 หน่วยเอนไซม์/มล. อัตราเร็วของการแตกของเซลล์มีค่าเท่ากับ 24.45×10^{-2} /นาที และอัตราเร็วของการแตกสัมพัทธ์ของเซลล์มีค่าเท่ากับ 58.21 เมื่อเปรียบเทียบ *Bacillus subtilis* 168 และ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 แล้วที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 10 หน่วยเอนไซม์/มล. *Bacillus subtilis* 168 ไวต่อการชักนำทำให้เซลล์แตกได้มากกว่า *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการชักนำให้เซลล์ทั้งสองชนิดแตกคือ 10 หน่วยเอนไซม์/มล. สำหรับ *Escherichia coli* TISTR 780 พบว่าเซลล์สามารถแตกได้ดีในสารละลายบัฟเฟอร์ TK มากกว่าในสารละลายบัฟเฟอร์ TK ที่เติมเอนไซม์

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ที่มีและไม่มีโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกสต่อการชักนำให้เซลล์ *Bacillus subtilis* 168 และ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 แตก พบว่าเอนไซม์ซึ่งกำจัดโปรตีนบริเวณจดจำของเอนไซม์ไบโอตินไลเกส มีประสิทธิภาพในการทำให้เซลล์แตกสูงกว่า