หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1.1 ความสำคัญของ 6-Aminopenicillanic acid

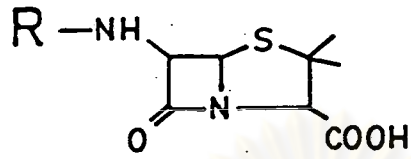
ปัญหาสำคัญของการใช้ยา เพนนิซิลินในปัจจุบันคือ จุลชีพส่วนใหญ่มีความสามารถทนทานต่อฤทธิ์ของยาได้ดี ทำให้ประสิทธิภาพในการเป็นยารักษาลดลง ดังนั้นจึงเกิดมีความต้องการยาปฏิชีวนะตัวใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ บริษัทต่าง ๆ ได้ทุ่มเงินเพื่องานวิจัยค้นคว้ายาปฏิชีวนะตัวใหม่ ๆ ที่ให้ผลในการรักษาสูงขึ้น ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการนำยาปฏิชีวนะเข้า ในมูลค่าสูงขึ้นทุกปี เช่น ในปี ค.ศ. 1981 มีการนำเข้ายาปฏิชีวนะมูลค่าสูงถึง 614 ล้านบาท ในจำนวนนี้เป็นยา เพนนิซิลินและอนุพันธ์ของมันอยู่มากกว่า 30 เปอร์เซนต์ (Annual Report on Foreign Trade Statistics of Thailand, 1981)

โครงสร้างที่สำคัญของเพนนิซิลินแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนนิวเคลียส ได้แก่ โครงสร้างของ 6-Aminopenicillanic acid (6-APA) กับส่วน side chain และส่วน side chain นี้เองที่แสดงฤทธิ์ต่อต้านจุลชีพ การมี side chain ต่างกันทำให้มีผลในการต่อต้านจุลชีพต่างกัน ดังนั้นหากต้องการสังเคราะห์อนุพันธ์ขึ้นมาใหม่เพื่อวัตถุประสงค์ในการเพิ่มประสิทธิภาพของยาแล้ว อาจทำได้จากการเปลี่ยนหมู่ทำปฏิกิริยาของโครงสร้างส่วน side chain ในหลักการนี้จำเป็นต้องใช้ 6-APA เป็นนิวเคลียสตั้งต้น ดังนั้นจึงนิยมเรียกยาที่สังเคราะห์ขึ้นในหลักการนี้ว่า อนุพันธ์ของ 6-APA ตัวอย่างเช่น Aminobenzylpenicillin (Ampicillin), $\alpha$ -phenoxyethyl penicillin (Phenethicillin), 5-methyl-3-phenyl-4-isoxazolyl penicillin (Oxacillin), dimethoxyphenyl penicillin (Methicillin) เป็นต้น (Vandamme, 1980; Vandamme และ Votes, 1974; Carrington, 1971) ตัวอย่างสูตรโครงสร้างแสดงไว้ในรูปที่ 1

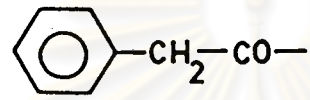
## 1.2 การผลิต 6-Aminopenicillanic acid

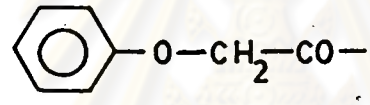
การผลิต 6-APA ทำได้ 2 วิธี (Vandamme, 1980; Carrington, 1971) ดังต่อไปนี้

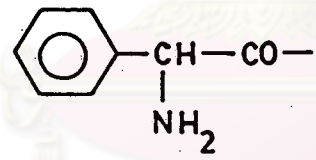
รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของเพนนิซิลินและตัวอย่าง side chain ต่าง ๆ (Vandamme, 1980)



Penicillin

R =  Benzylpenicillin (G)

R =  Phenoxymethyl penicillin (V)

R =  Ampicillin

R = H 6-Aminopenicillanic acid

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. วิธีทางเคมี (Chemical hydrolysis) โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของสาร ประกอบในสภาวะที่เหมาะสม ดังรูปที่ 2

2. วิธีทางเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis) โดยอาศัยความสามารถของ เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินไปเป็น 6-APA ดังรูปที่ 3

การผลิต 6-APA ในรูปอุตสาหกรรม เริ่มขึ้นด้วยการใช้วิธีทางเคมี สำหรับการผลิต โดยวิธีนี้ต้องใช้วิธีการควบคุมที่ยุ่งยาก เช่น ต้องใช้อุณหภูมิ -40°ซ. ในการทำปฏิกิริยา, ใช้ตัว ทำละลายอินทรีย์ และต้องปราศจากน้ำ ในขณะที่ถ้าใช้วิธีทางเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส กระบวนการผลิตจะลดลงเหลือเพียงขั้นตอนเดียว จึงทำให้การผลิตวิธีหลังง่ายและถูกกว่าวิธีแรก รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่าอีกด้วย (Aharonowitz, 1981) ดังนั้น แนวโน้ม ของอุตสาหกรรมการผลิต 6-APA ในปัจจุบันจึงหันความนิยมมาสู่การผลิตโดยวิธีทางเอนไซม์

วิธีการใช้เอนไซม์ในการผลิต 6-APA เริ่มขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1960 ครั้งแรกใช้จุลชีพ ทั้งเซลล์เพื่อผลิต 6-APA ต่อมาในปี 1963 จึงเริ่มใช้ crude extracts และ ปี ค.ศ. 1964 เริ่มใช้เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและพัฒนาให้บริสุทธิ์มากขึ้นเรื่อย ๆ (Vandamme, 1980)

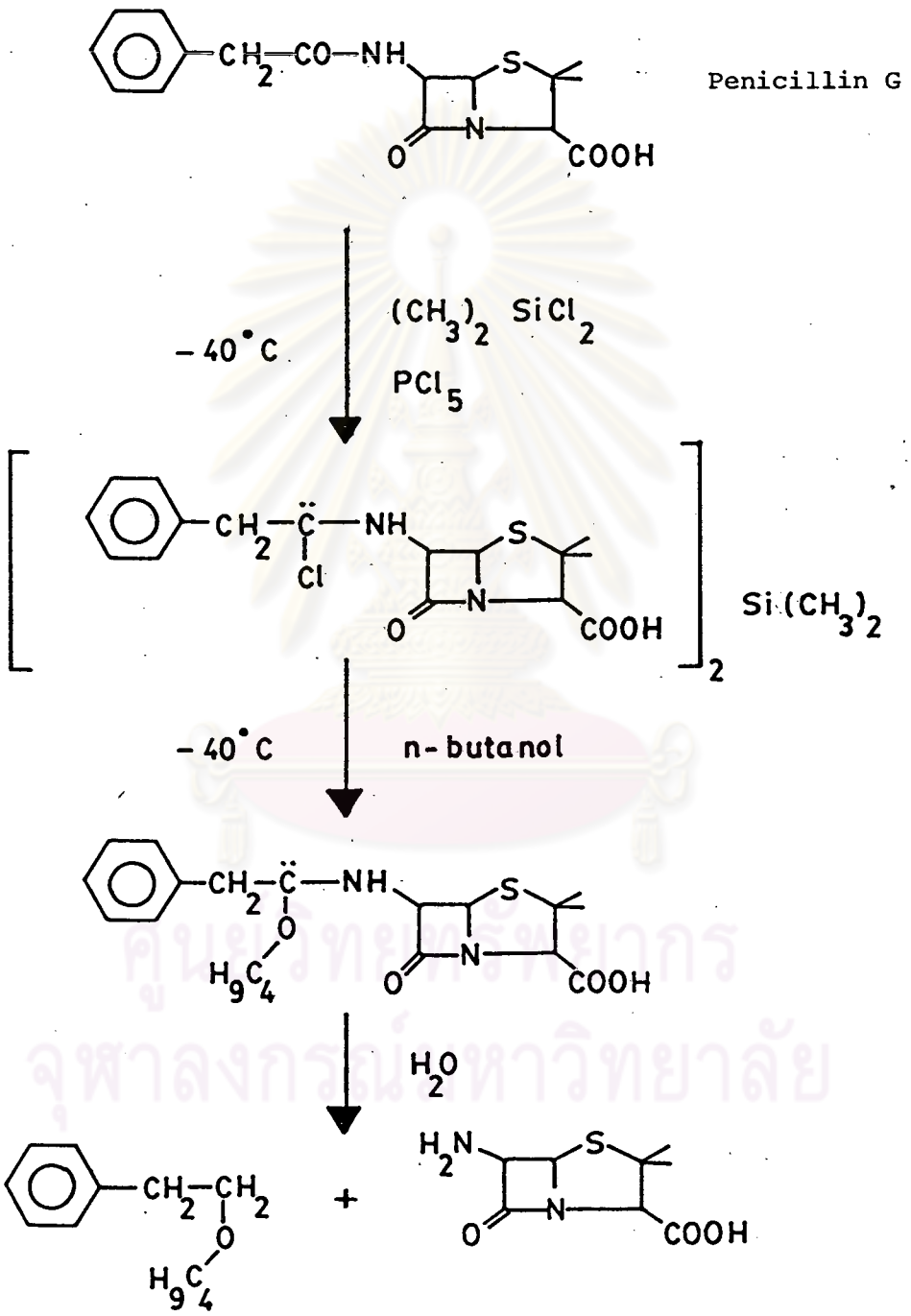
ในระยะแรกการใช้เอนไซม์นั้นไม่คุ้มทุน จึงได้มีผู้พัฒนาวิธีการขึ้น เช่น พยายามเพิ่ม เสถียรภาพของเอนไซม์หรือเซลล์ด้วยการตรึง (Immobilized) กับ Matrix บางชนิด ใน ปัจจุบันพบว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณการผลิต 6-APA ในโลกได้มาจากวิธีการตรึงเอนไซม์ และตรึงเซลล์ เช่น บริษัท Beechams, Bayer ซึ่งเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ (Vandamme, 1980)

## 1.3 เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

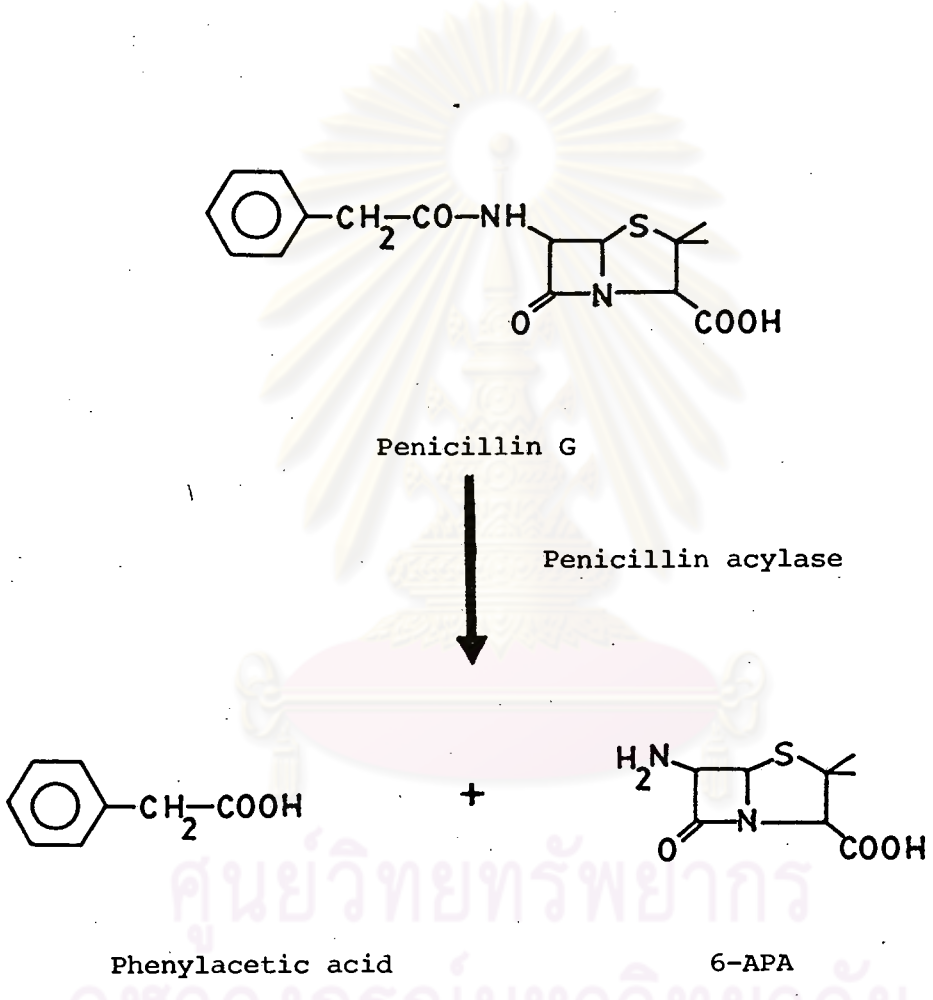
### 1.3.1 การค้นพบและการเรียกชื่อ (Discovery and Nomenclature)

ในปี ค.ศ. 1963 Sakaguchi และ Murao ค้นพบเอนไซม์เอซิเลสใน ไมซีเลียม (mycelium) ของ *Penicillium chrysogenum* $Q_{176}$ และ *Aspergillus oryzae* จากนั้นจึงได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเรื่อยมา ในปี ค.ศ. 1961 Batchelor และคณะ พบผลึกของ 6-APA จากกระบวนการหมัก และศึกษาโครงสร้างของสาร ประกอบนี้ (6-APA หรือ penicin) และได้พบต่อไปอีกว่า 6-APA สามารถทำปฏิกิริยากับ

รูปที่ 2 ขั้นตอนการผลิต 6-Aminopenicillanic acid ด้วยวิธีทางเคมี (Aharonowitz, 1981)



รูปที่ 3 ปฏิกิริยาของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (Vandamme, 1980)




ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

phenylacetylchloride ได้ผลผลิตเป็น เพนนิซิลิน ซ หรือทำปฏิกิริยากับสารรูปแบบอื่น ๆ เกิดเป็นอนุพันธ์ของเพนนิซิลินได้ เนื่องด้วยเหตุนี้จึงก่อให้เกิดการนำเอนไซม์ PA เข้าไปใช้สังเคราะห์ยาเพนนิซิลินชนิดต่าง ๆ ในระดับอุตสาหกรรม (Chain, 1971)

เอนไซม์ชนิดนี้มีชื่อเรียกแตกต่างกันหลายชื่อ เช่น penicillin amidase , penamidase, benzyl penicillin acylase, penicillin splitting and synthesizing enzyme, benzyl penicillin amidohydrolase ชื่อที่ได้รับความนิยมเรียกที่สุดคือ penicillin acylase (PA) (penicillin amidohydrolase E.C. 3.4.1.11) (Cole, 1964)

1.3.2 ประเภทของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

ในปี ค.ศ. 1974 Vandamme และ Votes ได้แบ่งประเภทของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ตามโครงสร้างของเพนนิซิลิน ซึ่งเอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์ได้เป็น 3 รูปแบบคือ

ก. Benzylpenicillin (Penicillin G) acylase

แยกได้จากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น Escherichia, Bacillus และ Proteus เป็นต้น

ข. Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V) acylase

พบใน รา ยีสต์ Actinomyces และแบคทีเรียบางชนิด

ค. D- $\alpha$ -aminobenzylpenicillin (Ampicillin) acylase

พบใน Pseudomonas melanogenum, P. ovalis

1.3.3 บทบาทและการทำงานของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

แม้มีการค้นพบจุลชีพมากมายหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ PA ได้ แต่รายละเอียดเกี่ยวกับบทบาทของเอนไซม์ตัวนี้ยังมีการค้นพบไม่มากนัก

เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะสามารถไฮโดรไลซ์ พันธะอะมิดที่เชื่อม

ระหว่าง side chain กับนิวเคลียส์ (6-APA) ของโมเลกุลเพนนิซิลิน ได้เป็น 6-APA กับ free side chain acid แต่กรณีที่มีเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส์อยู่ด้วย มีรายงานว่าเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส์จะแย่งไฮโดรไลซ์บริเวณวงแหวนบีตา-แลคแตมของโมเลกุลเพนนิซิลินด้วย เกิดเป็น penicilloic acid (Hamilton - miller, 1966; Vandamme, 1980)

ความสามารถของ PA ที่น่าสนใจอีกคือ การไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินเป็น 6-APA กับ free side chain acid สามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับเป็นการสังเคราะห์เพนนิซิลินได้ด้วย (Hamilton - Miller, 1966) โดย optimum pH ของปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ประมาณ 7-8.5 ในขณะที่ของการสังเคราะห์ประมาณ 4.5-6.5

แบคทีเรียกรัมลบที่นิยมใช้ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส์ ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะ E. coli ATCC 11105 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของ American Type Culture Collection และเป็นสายพันธุ์หนึ่งที่นิยมใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส์ (Vandamme, 1980; Wojskowiez, 1981; Levitor และคณะ, 1967; Vojtisek, 1975; Kutzbach และ Rauenbusch, 1974)

เอนไซม์ PA จาก E. coli ATCC 11105 เป็น Penicillin G acylase มีมวลโมเลกุลประมาณ 70,000 เป็น intracellular enzyme ต้องการ PAA เป็นสารชักนำ และกลูโคสอาจกดดันการสร้าง PA ได้ (Vandamme, 1980; Wojskowiez, 1981) สายพันธุ์นี้ให้แอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส์ในปริมาณน้อยมาก ซึ่งต่างจาก E. coli สายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีการสร้างเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส์แบบ constitutive ข้อเสียของสายพันธุ์ที่มีเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส์ก็คือ ใช้สับสเตรทตัวเดียวกับ PA และถ้าเป็น extracellular enzyme จะสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกว่า PA อีกด้วย

1.3.4 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส์

การวัดแอคติวิตีของ PA ทำได้หลายวิธีด้วยกัน ณ ที่นี้จะกล่าวเฉพาะวิธีที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ

ก. Microbiological test

Oostendrop (1972) รายงานว่าสามารถใช้ Serratia marcescens

ATCC 27117 สำหรับตรวจสอบแอคติวิตีของ PA ของโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ โดยอาศัยแนวคิดที่ว่า โคโลนีใดสามารถผลิต PA มาไฮโดรไลซ์ penicillin G ให้กลายเป็น 6-APA อยู่รอบ ๆ โคโลนี จะพบบริเวณใสรอบโคโลนีนั้น ทั้งนี้เพราะ S. marcescens สายพันธุ์ดังกล่าว sensitive ต่อ 6-APA มาก

ข. วิธีทางเคมี

Balasingham (1972) รายงานวิธีการวัดแอคติวิตีของ PA โดยอาศัยหลักการเช่นเดียวกับ Svatex (1965) ก็คือใช้ penicillin G เป็นสับสเตรท เมื่อถูก PA ไฮโดรไลซ์จะเกิดเป็น 6-APA ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ PDAB ก่อให้เกิด coloured schiff's base ซึ่งเป็นสารประกอบสีเขียวอ่อน สามารถดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

Szewezuk และคณะ (1980) รายงานวิธีการสังเคราะห์สาร PAAB เพื่อนำไปใช้เป็นสับสเตรทสำหรับวัดแอคติวิตีของ PA พบว่า PA สามารถไฮโดรไลซ์ PAAB ให้เป็น p-Aminobenzoic acid (PABA) ซึ่งอาจนำไปทำปฏิกิริยากับโซเดียมไนตรัส เรียกว่า diazotization เกิดเป็นสารประกอบที่จะทำปฏิกิริยา coupling กับ 1-amino-8-hydroxy-naphthalene-3,6-disulfonic acid เป็นสารประกอบสีแดง ดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร

## 1.4 ยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส

### 1.4.1 โอเปอรอนของยีน PA

Vandamme (1980) และ Wojskowiez (1981) ได้รายงานว่าเมื่อเสริม PAA ในอาหาร จึงสามารถวัดแอคติวิตีของ PA ได้ แสดงว่า PAAเป็นสารจำเป็นในการชักนำการสร้างเอนไซม์ PA รวมทั้งได้พบว่า กลูโคสสามารถกดดันการสร้าง PA ได้ แสดงว่าการถอดระหัสของยีน PA อยู่ภายใต้ catabolite repression ซึ่งพอจะอนุมานได้ว่า โอเปอรอนของ PA ควรมีลักษณะโดยนัยเดียวกับ lac operon

### 1.4.2 ยีน PA

ในปี ค.ศ. 1979 ถึง 1984 Mayer และคณะที่เยอรมันนี รายงานว่า ได้ใช้

Cosmid vector DNA ชื่อว่า pJC 720 เพื่อ clone ยีน DNA จากโครโมโซมของ E. coli ATCC 11105 โดยใช้ Hind III และ transform เข้า E. coli HB 101 สามารถเลือกได้ transformant ที่มีแอคติวิตีของ PA ใกล้เคียงกับ E. coli ATCC 11105 แต่ยังคงสภาพต้องการ PAA เป็นตัวชักนำการสร้างเอนไซม์ PA รีคอมบิแนนท์พลาสมิดตีเอนเอนี้ได้รับการตั้งชื่อว่า pHM 5 มีส่วนของ pJC 720 ประมาณ 25 kb และมีส่วน DNA จาก E. coli ATCC 11105 ประมาณ 16 kb

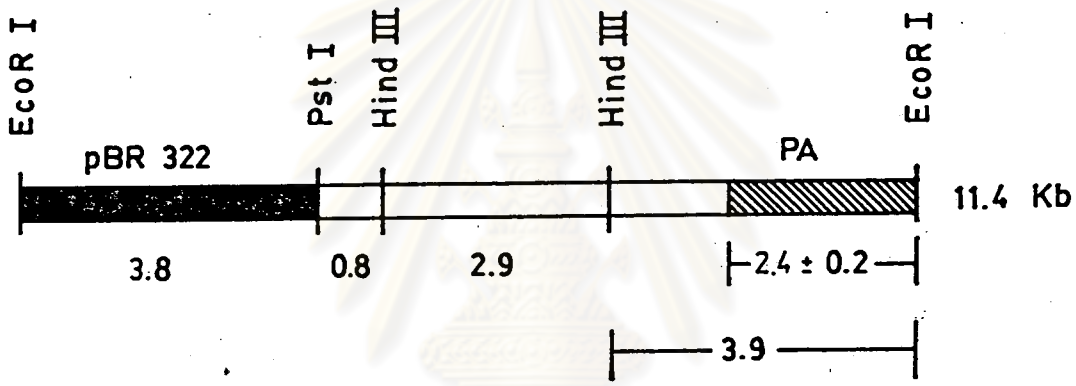
จากนั้นได้นำ pHM 5 มาทำการ subclone ยีน DNA ส่วนของ E. coli ATCC 11105 ที่มีปลายเป็น EcoR I และ Pst I ขนาดประมาณ 7.6 kb.จาก pHM 5 เข้าเชื่อมกับยีนส่วนของ pBR 322 ได้รีคอมบิแนนท์ตีเอนเอใหม่ชื่อ pHM 6 ภายหลังจาก transform เข้า E. coli 5 K แล้วได้ transformant ที่สามารถสร้าง PA ได้สูงกว่า E. coli ATCC 11105 ประมาณ 2.8 เท่า โดยไม่จำเป็นต้องใช้ PAA เป็นตัวชักนำ แต่ก็ยังถูกควบคุมการสร้าง PA ด้วยกลูโคส เมื่อนำไปทำการกลายพันธุ์ด้วย UV ได้พลาสมิดชื่อ pHM 12 สามารถสร้าง PA ได้สูงกว่า E. coli ATCC 11105 ประมาณ 7.5 เท่า โดยปลอดจาก catabolite repression โดยกลูโคส

จากการศึกษาตำแหน่งของยีน PA โดยการทำ transposon localization พบว่า structural gene ของ PA อยู่ห่างจาก EcoR I site ประมาณ 2.4 ± 0.2 kb (รูปที่ 4)

ในปี ค.ศ. 1984 ลิงได้ทำการ subclone ยีน PA จาก pHM 12 ไปสู่พลาสมิด pOP 203-3 ซึ่งมี strong promotor ของ lac operon และรายงานว่าได้สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิต PA ได้ในปริมาณสูงขึ้นมาก ทำการศึกษา DNA sequencing และจดลิขสิทธิ์ โดยไม่กล่าวรายละเอียดของการ subclone ในครั้งนี้แต่อย่างไร

ในปี ค.ศ. 1983 ที่เกาหลี Chang และคณะ รายงานว่า ใช้พลาสมิด pKM 300 ในการ clone ยีน DNA จากโครโมโซมของ E. coli ATCC 11105 ซึ่งมีปลายเป็น Pst I และ EcoR I ขนาดประมาณ 18.8 kb ได้เป็นพลาสมิด pPAK 1 จากนั้นตัดบางส่วนของยีน DNA ออก ได้เป็นพลาสมิด pPAKS 2 ทำ transformation เข้าสู่ E. coli HB 101 สามารถเลือกได้ transformant ที่มีแอคติวิตีของ PA สูงกว่า E. coli ATCC 11105 ประมาณ 20 เท่า(แบบ constitutive และปลอดจาก catabolite repression )

รูปที่ 4 Restriction mapping ของพลาสมิดดีเอนเอ pHM 6 ซึ่งสร้างโดย Mayer และคณะ (1980)




ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.5 แนวความคิดในการปรับปรุงสายพันธุ์ E. coli ATCC 11105

1. การทำ Molecular cloning มีปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือ

ก. การเลือกพลาสมิดดีเอนเอพาหะที่เหมาะสม

คุณสมบัติของพลาสมิดที่เหมาะสำหรับใช้เป็นพาหะควรต้องเป็น relaxed plasmid ที่มีขนาดเล็ก เพื่อให้มีประสิทธิภาพของ transformation สูงขึ้น, ควรมี stable marker เพื่อใช้จำแนกว่าเป็น transformant, ควรจะมี site ที่ตัดโดย restriction enzyme บางชนิดที่เดียว และต้องไม่อยู่ในส่วน replicon แต่ควรอยู่บน marker

สามารถแบ่งประเภทของพลาสมิดออกเป็น 2 พวกคือ

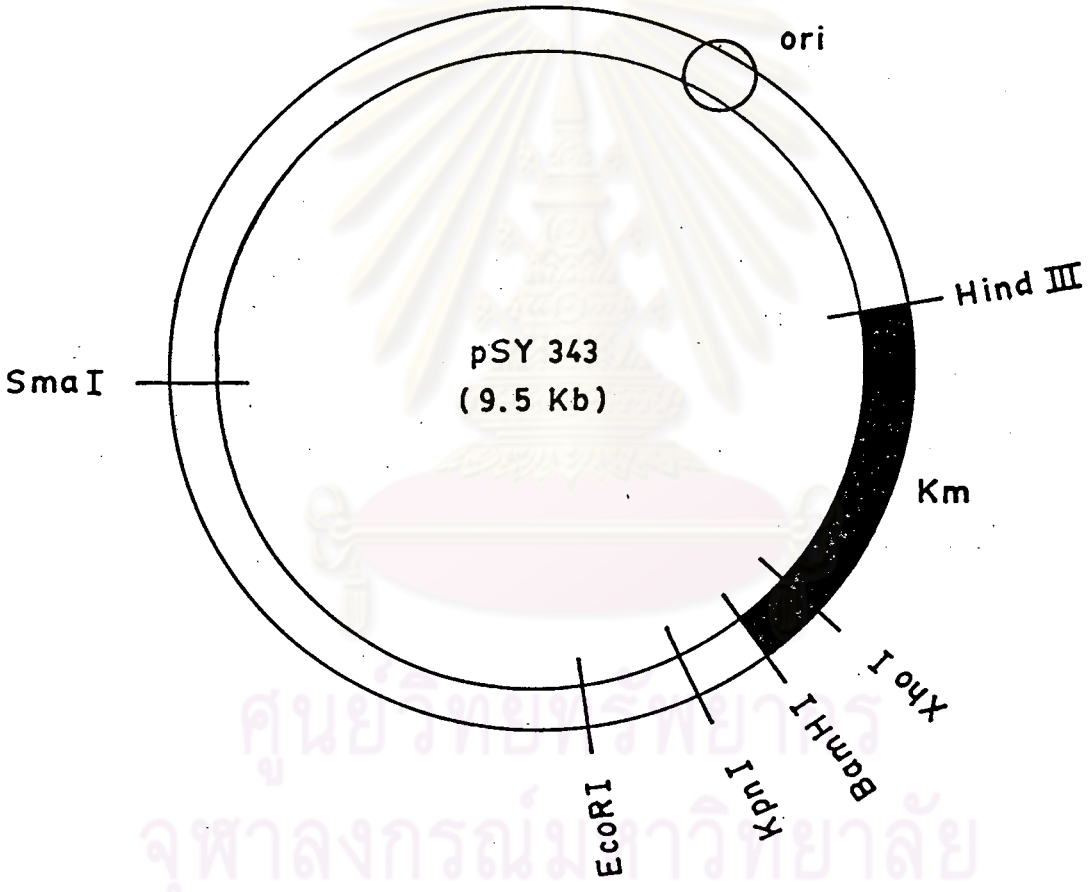
ก. Cloning vector ซึ่งมักใช้ในห้องทดลองโดยทั่วไปที่มีจุดประสงค์เพียง การ cloneยีนเพื่อเพิ่มจำนวนชุดของยีน เช่น pBR 322

ข. Expression vector ซึ่งส่วนใหญ่พลาสมิดพวกนี้จะมีพวก promotor และ operator ของ lac operon เหมาะสำหรับใช้ในกรณีที่ต้องการให้ได้ผลิตภัณฑ์ของยีนที่ใส่เข้าไปออกมาในรูปของโปรตีน เช่น pUC-8, pUC-9 และ pSY 343 (ใช้ในงานวิจัยนี้) เป็นต้น

ในการทำ Molecular cloning ในการวิจัยนี้ มีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ PA ดังนั้นจึงต้องเลือกพลาสมิดดีเอนเอพาหะที่เป็น Expression vector พลาสมิดดีเอนเอพาหะที่เลือกใช้ในการวิจัยนี้คือ pSY 343 ซึ่ง Yasuda และคณะ (1983) สร้างขึ้นจากการต่อยีนของยีนต้าน Kanamycin ของพลาสมิด DNA pKC 7 เข้ากับยีนของ pBEU 17 ที่ปลาย BamH I และ Hind III pBEU 17 นี้สร้างจาก pKN 402 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Runaway replication plasmid R 1 drd 19 (Uhlin และคณะ, 1979; Bittner และ Vapnek, 1981) pSY 343 มีขนาดประมาณ 9.5 kb. ประกอบด้วย 1 site ของ Sma I, EcoR I, Kpn I, BamH I, Xho I และ Hind III มี origin of replication ใกล้กับ Hind III site และมียีนต้าน Kanamycin อยู่ระหว่าง BamH I กับ Hind III site (รูปที่ 5) กลไกการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอแตกต่างจากพลาสมิด

รูปที่ 5 Restriction mapping ของพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343

(Yasuda และคณะ, 1983)




ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่มี origin of replication จาก Col E I ซึ่งจะมีการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอเมื่อหยุด protein synthesis โดยการ treat เซลล์ด้วย chloramphenicol (Clewell, 1972) แต่ pSY 343 ซึ่งเป็น runaway replication plasmid จะมีคุณสมบัติสูญเสียการควบคุมการ replication พลาสมิดดีเอนเอเมื่อเซลล์เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า $35^{\circ}$ซ. (ใน pSY 343 Yasuda และคณะ (1983) ใช้สภาวะการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอ โดยการให้เจริญที่ $30^{\circ}$ซ. จนกระทั่ง $O.D._{660}$ = 0.1 หน่วย จึงย้ายไปเจริญต่อที่ $37^{\circ}$ซ. สามารถเพิ่มจำนวนพลาสมิดได้ถึง 2,000 copy/เซลล์ )

ข. การเลือก Restriction enzyme

การเลือกใช้ restriction enzyme ใดในการทำ molecular cloning จะขึ้นอยู่กับ restriction site บนพลาสมิดดีเอนเอพาหะ โดยมีข้อจำกัดอยู่เพียงว่า restriction เอนไซม์ที่ใช้ต้องไม่ตัดบริเวณ origin of replication และบริเวณ promotor (ถ้ามี) และยีนส่วนของพลาสมิดดีเอนเอส่วนที่จะนำไปใช้จะต้องมี origin of replication และบริเวณ promotor (ถ้ามี) อยู่ ทั้งนี้ restriction enzyme ที่ใช้ตัดพลาสมิดดีเอนเอพาหะ ควรเป็นชนิดเดียวกับที่ใช้ตัดยีนดีเอนเอที่ต้องการจะ clone ด้วย

ในการวิจัยนี้ใช้พลาสมิดดีเอนเอพาหะ pSY 343 ดังนั้นเมื่อพิจารณาแผนผัง restriction ของ pSY 343 ประกอบกับแผนผัง restriction ของยีน PA จาก E. coli ATCC 11105 (Mayer และคณะ, 1980) จึงเลือกใช้ EcoR I และ Hind III ด้วยเหตุผลดังกล่าว ข้างต้นแล้ว

ค. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการ cloning

โดยทั่วไปยีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีนจะมีอยู่ชุดเดียว ซึ่งคาดว่าในกรณีของยีน PA ก็จะเป็นเช่นเดียวกัน ดังนั้นโอกาสที่จะประสบความสำเร็จในการ clone ยีน PA จะต่ำมาก จึงมีความจำเป็นต้องเพิ่มโอกาสเพื่อให้พบ transformant ที่มียีน PA โดยการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำ molecular cloning อันได้แก่ การเตรียมยีนดีเอนเอ, การเตรียมยีนพลาสมิดดีเอนเอพาหะ, การ ligation และการ transformation เพื่อจุดมุ่งหมายในการเพิ่มโอกาสการพบ transformant ที่มียีน PA นั่นเอง

2. การสร้าง Catabolite derepressed mutant

ในกรณีที่การแสดงออกของยีนที่ศึกษาอยู่ภายใต้การควบคุมของ catabolic effect ซึ่งใน E. coli พบว่าเป็นผลเนื่องมาจากเมตาบอไลล์ของกลูโคส มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน จึงนิยมเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า glucose effect เมื่อเป็นเช่นนี้ก็จะทำให้เกิดข้อเสียเปรียบบางประการคือ หนึ่ง ได้การเจริญสูงสุดต่ำลง เพราะการเสริมกลูโคส ถึงแม้จะช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของ E. coli แต่ก็กดดันการสร้างเอนไซม์ PA ไว้ สอง เสียโอกาสที่จะใช้สารเหลือใช้บางอย่างซึ่งอาจมาแปรเป็นกลูโคสได้ (Vogtisek และ Slezak, 1975)

การปรับสายพันธุ์ให้มีความสามารถในการหลีกหนีจากอิทธิพลของกลูโคส เรียกว่า catabolite derepressed mutant ซึ่งอาจทำให้เกิดขึ้นได้ โดยการใช้มิวตาเจนชนิดต่าง ๆ เช่น รังสีอุลตราไวโอเลต ซึ่งเป็น physical mutagen หรือ NTG ซึ่งเป็น chemical mutagen ตามความเหมาะสม

1.6 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ตัดยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสจาก Escherichia coli ATCC 11105 เพื่อต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะที่เหมาะสม

2. เลือกสายพันธุ์ E. coli ตัวรับที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ในปริมาณสูง

3. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสายพันธุ์ที่ clone ได้ และทำการปรับปรุงให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ในปริมาณสูงขึ้นกว่าเดิม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย