บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาการโคลนยีนบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ซึ่งคัดเลือกได้จากแหล่งดินในประเทศไทยและเป็นสายพันธุ์ที่สร้างบีตา-ไซโลสิเดสที่มีสมบัติดีโดยมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดค่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 4.0-9.5 (สุมาลี อึ้งใจธรรม, 2539)

จากรายงานต่างๆ ที่กล่าวในบทที่ 1 พบว่า บีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันโดยอยู่ในช่วงประมาณ 60-360 กิโลดาลตัน เช่น บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Bacillus stearothermophilus* มีน้ำหนักโมเลกุล 150 กิโลดาลตัน (Nanmori et al., 1990) บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Thermomonospora fusca* 15 มีน้ำหนักโมเลกุล 168 กิโลดาลตัน (Bachmann and McCarthy, 1989) และจาก *Aspergillus fumigatus* มีน้ำหนักโมเลกุล 360 กิโลดาลตัน (Kitpreechavanich et al., 1986) และยังพบว่า บีตา-ไซโลสิเดสส่วนใหญ่ประกอบด้วยหน่วยย่อยมากกว่า 1 หน่วยย่อย ดังแสดงในตารางที่ 1.2 กอบเดช วาณิชวโรฒม์ (2540) รายงานการศึกษาเบื้องต้นถึงการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 โดยนำเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยการทำโครมาโตกราฟีบนคอลัมน์ของ Sephadex G-200 พบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 170 กิโลดาลตัน ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์อื่นๆ ดังกล่าวมาข้างต้น และจากรายงานการโคลนยีนบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ พบว่ายีนที่เป็นรหัสของบีตา-ไซโลสิเดสมีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลและจำนวนหน่วยย่อยของเอนไซม์ เช่น ยีน *xynB* จาก *Bacillus pumilus* IPO มีขนาดประมาณ 1.6 กิโลเบส และเป็นรหัสสำหรับบีตา-ไซโลสิเดสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 56 กิโลดาลตัน (Xu et al., 1991) ยีน *xylB* ของ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ JW/SL VS485 มีขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส เป็นรหัสสำหรับบีตา-ไซโลสิเดสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 58.5 กิโลดาลตัน (Lorenz and Wiegel, 1997) เป็นต้น

จากการพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 เปรียบเทียบกับของจุลินทรีย์ต่างๆ และขนาดของยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์นี้ที่มีผู้รายงานไว้ งานวิจัยนี้จึงสร้างธนาคารยีน (genomic library) จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1-5 กิโลเบส

ซึ่งได้จากการย่อยโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. CH7 แบบกึ่งสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI โดยคาดว่าขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นนี้ครอบคลุมยีนทั้งหมดของบีตา-ไซโลสิเดส

มีรายงานถึงความสำเร็จในการโคลนยีนจากจุลินทรีย์ต่างๆ โดยสามารถแสดงออกได้เมื่อใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เช่น การโคลนยีนที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ไซแลเนสจาก *Cellulomonas* sp. NCIM2353 เข้าพลาสมิดพาหะ pUC18 และศึกษาการแสดงออกใน *E. coli* JM107 พบว่าโคลนที่ได้มีแอคติวิตีของไซแลเนสแต่น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งต้นที่เป็นแหล่งของยีน 17 เท่า (Bhalerao et al., 1990) การโคลนย่อยยีน *xynB* ที่เป็นรหัสสำหรับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* สายพันธุ์ B6A-RI เข้า *E. coli* DH5α โดยใช้พลาสมิดพาหะ pUC18 พบว่าโคลนที่ได้มีแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสแต่น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งต้นที่เป็นแหล่งของยีน 10 เท่า (Lee and Zeikus, 1993) เนื่องจากการโคลนยีนโดยใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านและพาหะ (host-vector) ที่มีเซลล์เจ้าบ้านเป็น *E. coli* เป็นวิธีการที่สะดวกและรวดเร็ว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการโคลนยีนบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 โดยใช้ *E. coli* DH5α ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มียีนบีตา-ไซโลสิเดส (Vroemen et al., 1995) เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และใช้ pUC18 ซึ่งมียีนเครื่องหมาย *lacZ* สำหรับคัดเลือกโคลนที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (DNA insert) เป็นพลาสมิดพาหะ แล้วคัดเลือกโคลนที่ได้รับยีนบีตา-ไซโลสิเดสจากการแสดงออกของยีนที่สามารถย่อยสลายสับสเตรทสังเคราะห์ 4-methylumbelliferyl-β-D-xyloside (MUX) ให้ผลิตภัณฑ์เป็น 4-methylumbelliferone ซึ่งเรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

งานวิจัยนี้พบว่าจากทรานสฟอร์เมนท์ที่ให้โคโลนีสีขาวบนอาหารคัดเลือกที่มี X-gal, IPTG และ MUX จำนวนทั้งหมดประมาณ 11,000 โคโลนี มี 2 โคลนที่ย่อยสลาย MUX ให้โคโลนีเรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งให้ชื่อโคลนนี้ว่า N1 และ N2 จากการสกัดแยกพลาสมิดจากโคลนทั้ง 2 ได้พลาสมิดที่ให้ชื่อว่า pCH7-1 และ pCH7-2 ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ขนาดเปรียบเทียบกับ pUC18 พบว่าพลาสมิดทั้ง 2 ใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะแต่ทั้งคู่มีขนาดเท่ากัน นอกจากนั้นพลาสมิดทั้ง 2 ยังให้รูปแบบการถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 3.6 และ 3.7) จึงสรุปว่าทั้ง pCH7-1 และ pCH7-2 มีดีเอ็นเอสอดแทรกเป็นชิ้นเดียวกัน และเมื่อทำการวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิดทั้ง 2 พบว่ามีขนาดเท่ากันคือ ประมาณ 3.6 กิโลเบส (รูปที่ 3.8) และเมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสจากโคลน N1 และ N2 เปรียบเทียบกับ *E. coli* DH5α/pUC18 พบว่า

ทั้ง 2 โคลน ให้แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสสูงกว่าเซลล์เจ้าบ้านประมาณ 30 เท่า ดังนั้นจากขนาดของดีเอ็นเอสอดแทรกซึ่งมีความยาวอยู่ในช่วงของขนาดดีเอ็นเอที่ครอบคลุมยีนบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ ดังมีผู้รายงานไว้ เช่น Xu และคณะ (1991) รายงานว่า ยีนที่เป็นรหัสสำหรับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *B. pumilus* IPO มีขนาดประมาณ 1.6 กิโลเบส Baba และคณะ (1994) รายงานว่ายีนที่เป็นรหัสสำหรับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Bacillus stearothermophilus* 21 มีขนาดประมาณ 2.1 กิโลเบส ประกอบกับการที่สามารถตรวจพบแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสจากโคลนทั้ง 2 จึงเชื่อว่าชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้นี้มีรหัสของยีนบีตา-ไซโลสิเดสที่สมบูรณ์ แม้ว่าจะมีบางรายงานที่กล่าวว่าสามารถพบบีตา-ไซโลสิเดสได้หลายชนิดในจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน เช่น รายงานของ Tuohy และคณะ (1993) ที่พบบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ JW/SL YS485 3 ชนิด ได้แก่ บีตา-ไซโลสิเดส 1, 2 และ 3 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 86, 78 และ 57 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และรายงานของ Lorenz และ Wiegel (1997) ที่พบบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Talaromyces emersonii* 3 ชนิด ได้แก่ บีตา-ไซโลสิเดส I (Xy1I) บีตา-ไซโลสิเดส II (Xy1II) และบีตา-ไซโลสิเดส III (Xy1III) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 181, 131 และ 54.2 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โดย Xy1I และ Xy1III มี 2 หน่วยย่อย ส่วน Xy1II มี 1 หน่วยย่อย แต่จากการศึกษาเบื้องต้นของ กอบเดช วาณิชวโรฒม์ (2540) ตรวจพบว่าแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสเพียงพีค (peak) เดียวจากการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีบน Sephadex G-200 จึงคาดว่าเชื้อนี้สร้างบีตา-ไซโลสิเดสเพียงชนิดเดียว อย่างไรก็ตามการพิสูจน์ว่ายีนที่โคลนได้นี้เป็นยีนที่สมบูรณ์จะสามารถทำได้ถ้ามีการศึกษาต่อไปโดยทำการโคลนย่อย (subcloning) ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นี้เพื่อหาส่วนที่จำเป็นบนชิ้นดีเอ็นเอที่ยังคงแสดงออกให้บีตา-ไซโลสิเดสที่สมบูรณ์ พร้อมทั้งวิเคราะห์ลักษณะเอนไซม์ที่ได้เปรียบเทียบกับที่ได้จาก *Streptomyces* sp. CH7 รวมทั้งการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นกรอบการอ่านรหัส (open reading frame) ของยีน แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้มีเวลาจำกัดจึงไม่สามารถดำเนินการขั้นตอนเหล่านี้ได้

ผลการวิเคราะห์แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของดีเอ็นเอที่โคลนได้พบว่ามีตำแหน่งจดจำของ *Sma*I ถึง 4 แห่ง นอกจากนั้นชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้นี้ยังสามารถให้ตำแหน่งจดจำ *Bam*HI บนพลาสมิดพาหะกลับคืนมา ซึ่งโดยทั่วไปตำแหน่งนี้จะสูญเสียไปเนื่องจากการเชื่อมระหว่างปลายพลาสมิดที่ถูกตัดด้วย *Bam*HI กับปลายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย *Sau*3AI การมีตำแหน่งจดจำของ *Sma*I หลายแห่งบนดีเอ็นเอสอดแทรก ซึ่งลำดับเบสจำเพาะของตำแหน่งจดจำของ *Sma*I คือ CCC▼GGG และการกลับคืนมาของตำแหน่งจดจำ *Bam*HI บนพลาสมิด

พาหะที่ได้รับดีเอ็นเอสอดแทรกนี้อาจเนื่องมาจากการมีเบส C หรือ G ที่ปลายดีเอ็นเอสอดแทรก จึงแสดงให้เห็นว่าชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้นี้น่าจะมาจาก *Streptomyces* จริง ทั้งนี้เพราะดีเอ็นเอของ *Streptomyces* ชนิดต่างๆ มีองค์ประกอบ GC สูง คือประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ (Hopwood et al., 1985; Vincent et al., 1997) การยืนยันความเป็นไปได้ดังกล่าวจะสามารถทำได้ถ้ามีการนำดีเอ็นเอสอดแทรกที่ได้มาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) แล้ววิเคราะห์ความสามารถในการไฮบริไดส์ได้กับโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. CH7 โดยวิธี Southern hybridization แต่เนื่องจากความจำกัดของงบประมาณ งานวิจัยนี้จึงไม่ได้ศึกษาขั้นตอนนี้

เมื่อเปรียบเทียบแผนที่เรสทริกชันของดีเอ็นเอที่มียีนบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ที่โคลนได้จากงานวิจัยนี้ กับแผนที่เรสทริกชันของยีนบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์อื่นๆ พบว่าไม่มีความคล้ายคลึงกัน ดังเช่น ยีน *xynB* ที่เป็นรหัสสำหรับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *B. pumilus* IPO ถูกตัดได้ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Ban*I 2 ตำแหน่ง *Eco*RI 1 ตำแหน่ง *Hind*III 4 ตำแหน่ง *Hgi*AI 1 ตำแหน่ง *Pst*I 1 ตำแหน่ง *Sma*I 1 ตำแหน่ง และ *Xba*I 1 ตำแหน่ง (Xu et al., 1991) ยีน *xylB* ที่เป็นรหัสสำหรับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ JW/SL YS485 ถูกตัดได้ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI 1 ตำแหน่ง และ *Kpn*I 1 ตำแหน่ง เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ยีนที่เป็นรหัสสำหรับบีตา-ไซโลสิเดสที่นำมาเปรียบเทียบนี้ไม่ได้มาจาก *Streptomyces* จึงอาจมี codon usage ต่างจากของ *Streptomyces* จึงทำให้ได้แผนที่เรสทริกชันที่แตกต่างกัน

จากความสามารถในการแสดงออกได้ของยีนที่เป็นรหัสสำหรับบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ใน *E. coli* งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาต่อไปว่ายีนที่ได้นี้แสดงออกภายใต้โพรโมเตอร์ของยีน *lac* (P_{lac}) หรือมีโพรโมเตอร์ของตัวเองด้วย จึงนำดีเอ็นเอสอดแทรกที่ได้มาโคลนย่อยเข้า pUC19 ซึ่งมีลำดับตำแหน่งที่จำเพาะสำหรับเรสทริกชันเอนไซม์บนตำแหน่งสำหรับการโคลนสลับกับ pUC18 ซึ่งจะทำให้การแสดงออกของยีนไม่อยู่ภายใต้ P_{lac} ผลการทดลองพบว่ายังสามารถตรวจพบแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสได้ แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้นี้มีทั้งยีนโครงสร้างของบีตา-ไซโลสิเดสและโพรโมเตอร์จาก *Streptomyces* ติดมาด้วย การพบว่าโพรโมเตอร์ของ *Streptomyces* sp. CH7 สามารถทำงานได้ใน *E. coli* นี้สอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงความคล้ายคลึงกันของโพรโมเตอร์ของ *Streptomyces* กับโพรโมเตอร์ของ *E. coli* เช่น รายงานของ Deng และคณะ (1986) ที่พบว่า โพรโมเตอร์จาก *S. lividans* คล้ายกันมากกับโพรโมเตอร์ของ *E. coli* รายงานของ Forsman และ Jaurin (1987) ที่กล่าวว่าโพรโมเตอร์ P1(SEP8) ของ *S. lividans* คล้ายกันมากกับโพรโมเตอร์

ของ *E. coli* รายงานของ Buttner (1989) ที่กล่าวว่า *S. coelicolor* มียีน 4 ยีน ที่เป็นรหัสสำหรับ sigma factor ซึ่งเหมือนกันมากกับ sigma 70 polypeptide ใน *E. coli* แสดงว่า RNA polymerase ของ *Streptomyces* และ *E. coli* ซึ่งมีองค์ประกอบส่วนหนึ่งเป็น sigma factor ที่เหมือนกันมากสามารถจับกับโพรโมเตอร์ที่มีส่วนคล้ายกันได้ และรายงานของ Hindle และคณะ (1994) ที่พบว่าโพรโมเตอร์ของยีน *argCJB* จาก *S. coelicolor* A3(2) สามารถทำงานได้ใน *E. coli* อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้พบว่าแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสจากดีเอ็นเอสอดแทรกที่อยู่ใน pUC19 ค่อนข้างต่ำกว่าเมื่ออยู่ใน pUC18 มาก แสดงว่าการทำงานของโพรโมเตอร์จาก *Streptomyces* sp. CH7 มีประสิทธิภาพต่ำใน *E. coli*

งานวิจัยนี้สรุปได้ว่าประสบความสำเร็จในการโคลนยีนบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 โดยใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านและพาหะ (host-vector) ที่มีเซลล์เจ้าบ้านเป็น *E. coli* และยีนที่ได้สามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* โดยอาศัยโพรโมเตอร์ของตัวเองหรือโพรโมเตอร์ของ *E. coli* ถ้ามีการนำยีนนี้กลับเข้าไปแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces* โดยใช้พลาสมิดที่แบ่งตัวเพิ่มปริมาณได้สูง (multicopy plasmid) หรือใช้โพรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น พลาสมิด pCAN46 ซึ่งสร้างมาจากพลาสมิด pIJ680 และเป็นพลาสมิดที่สามารถนำเข้าและทำงานได้ทั้งใน *Streptomyces* และ *E. coli* สามารถแบ่งตัวเพิ่มปริมาณได้สูง มี strong constitutive promoter ที่ได้มาจากยีน *aph* ของ *S. fradiae* และยังมีลำดับเบสที่เป็นรหัสสำหรับ signal peptide ที่ได้มาจากยีนที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ protease B ของ *S. griseus* ซึ่งจะช่วยในการปล่อยผลิตภัณฑ์ออกมานอกเซลล์อีกด้วย (Binnie et al., 1997) คาดว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์นี้ให้สูงกว่า *Streptomyces* sp. CH7 หลายเท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย