บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 สมบัติของ E. coli ATCC 11105

3.1.1 ลักษณะการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ E. coli ATCC 11105

E. coli ATCC 11105 เป็นสายพันธุ์ที่สั่งซื้อจาก American Type Culture Collection และเป็นสายพันธุ์หนึ่งที่นิยมใช้ปรับปรุงการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (PA) ในระดับอุตสาหกรรม (Mayer และคณะ, 1980)

ได้นำแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มาทดลองหาความสามารถในการเจริญเติบโต พบว่าไม่สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ (MM) แม้จะเสริมด้วย phenylacetic acid (PAA) ซึ่งเป็นตัวชักนำของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ทั้งที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ 37°ซ. แต่สายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้ดีในอาหารอุดม เช่น LB หรือ BY ในสภาวะที่ไม่เสริมด้วย PAA พบว่า แอคติวิตีสูงสุดของ PA ที่ตรวจพบในเซลล์ต่ำมาก คือมีค่าประมาณ 3-5 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ครั้นเมื่อเสริม PAA 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรากฏว่า แอคติวิตีสูงสุดของ PA สูงขึ้น 7-8 เท่า พบอยู่ในคาบระหว่าง 30-38 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน น่าสังเกตว่า แอคติวิตีสูงสุดของ PA จากเซลล์ที่เจริญใน LB เสริม PAA จะสูงกว่าที่เจริญใน BY เสริม PAA เล็กน้อย (ตารางที่ 2)

นอกจากนี้ยังพบว่า การเสริม PAA 0.1 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหาร จะให้แอคติวิตีสูงสุดของ PA สูงกว่าเมื่อเสริม PAA ที่มีความเข้มข้นสูงหรือต่ำกว่านี้ (0.05 หรือ 0.2 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงในตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นของเชื้อในอาหารอุดม LB ที่เสริมด้วย PAA กับการผลิต PA แสดงในรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่า แอคติวิตีสูงสุดของ PA จะอยู่ในช่วงการเจริญที่ Mid log phase คือเมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 10 ชั่วโมง แอคติวิตีของ PA สูงสุดคือ 38.3 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ลักษณะการผลิต PA ของเชื้อในช่วงแรกมีความสัมพันธ์กับการเจริญที่เพิ่มขึ้น จนกระทั่งแอคติวิตีของ PA สูงสุด จากนั้นแอคติวิตี

ตารางที่ 2 การเจริญและแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ E. coli ATCC 11105 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่ 30°ซ. และ 37°ซ.

อุณหภูมิ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญสูงสุด (Klett unit)	แอคติวิตีสูงสุดของ PA* (units/mg protein)
30°ซ.	MM	(—)	(—)
	MM + PAA 0.1 %	(—)	(—)
	LB	383 ± 3	4.2 ± 0.2
	LB + PAA 0.1 %	405 ± 4	38.3 ± 0.5
	LB + PAA 0.1 % + Glucose 0.2 %	150 ± 3	3.5 ± 0.3
	BY	380 ± 2	3.9 ± 0.2
	BY + PAA 0.1 %	400 ± 4	29.9 ± 0.4
37°ซ.	MM	(—)	(—)
	MM + PAA 0.1 %	(—)	(—)
	LB	415 ± 3	4.1 ± 0.2
	LB + PAA 0.1 %	415 ± 4	5.2 ± 0.3
	LB + PAA 0.1 % + Glucose 0.2 %	160 ± 2	3.2 ± 0.1
	BY	410 ± 3	3.5 ± 0.2
	BY + PAA 0.1 %	415 ± 3	5.0 ± 0.2

* 1 unit คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 นาโนโมลของ PABA ต่อนาที เมื่อวัดโดยวิธีของ Szewezuk

ค่าแอคติวิตีสูงสุดพบในเซลล์ที่เจริญในระยะ mid log phase ภายหลังจากบ่มเชื้อ 10 ชั่วโมง

(—) คือไม่สามารถเจริญ

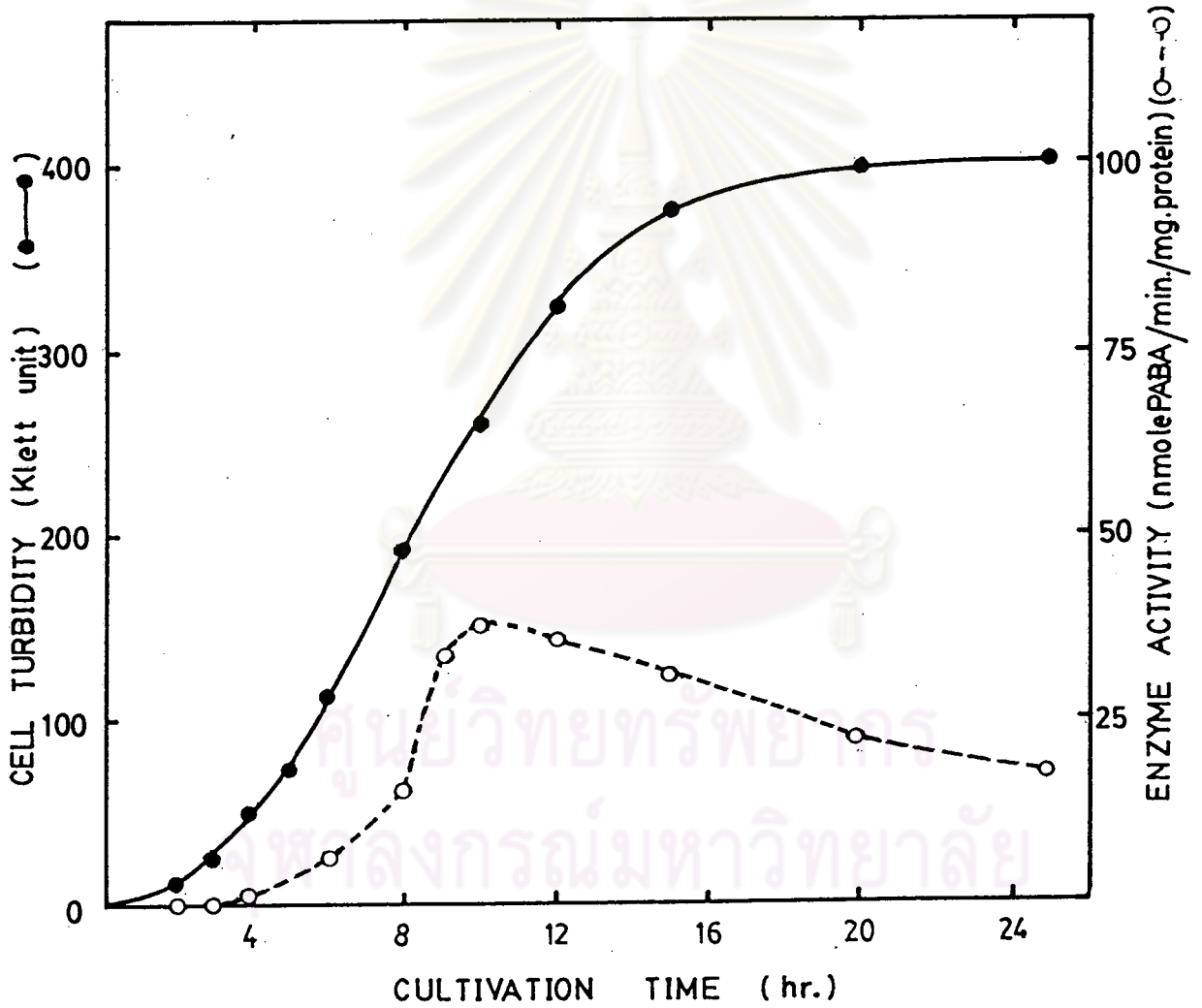
ตารางที่ 3 การเจริญและแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ E. coli ATCC 11105 ในอาหารเลี้ยงเชื้ออุดม LB ที่เสริม phenylacetic acid ปริมาณต่าง ๆ กัน ที่ 30°ซ.

อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญสูงสุด (Klett unit)	แอคติวิตีสูงสุดของ PA* (units/mg protein)
LB	383 ± 3	4.2 ± 0.2
LB + PAA 0.05 %	392 ± 2	25:0 ± 0.1
LB + PAA 0.1 %	405 ± 4	38.3 ± 0.5
LB + PAA 0.2 %	420 ± 2	30.2 ± 0.3

* 1 unit คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 นาโนโมลของ PABA ต่อนาที เมื่อวัดโดยวิธีของ Szewezuk
ค่าแอคติวิตีสูงสุดพบในเซลล์ที่เจริญในระยะ mid log phase ภายหลังจากบ่มเชื้อ 10 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลสของ E. coli ATCC 11105 เมื่อเจริญในอาหารอุดม LB เสริม PAA 0.1 % ที่ 30°ซ.



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ของ PA จะค่อย ๆ ลดต่ำลงในขณะที่การเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยแล้วคงที่

ปรากฏการณ์ที่น่าสนใจ 2 ปรากฏการณ์คือ หนึ่ง เมื่อเจริญ E. coli ATCC 11105 ที่อุณหภูมิ 30°ซ. การเจริญสูงสุดที่วัดได้เมื่อใช้อาหารอุดม LB เสริม PAA คือ 405 K.U. แต่ถ้าเปลี่ยนอุณหภูมิที่บ่มเชื้อมาเป็น 37°ซ. ในอาหารชนิดเดียวกัน การเจริญสูงสุดจะสูงขึ้นเล็กน้อย คือเท่ากับ 415 K.U. แต่แอคติวิตีสูงสุดของ PA กลับลดลงไปอย่างมาก คือเปลี่ยนจากเดิม 38.3 เป็น 5.2 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน สอง ในอาหารที่เสริมด้วยกลูโคส เช่น LB เสริม PAA เสริมกลูโคส แทนที่เชื้อจะเจริญได้ดีขึ้น กลับลดต่ำลงจากเดิม 405 K.U. มาเป็น 150 K.U. ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ผลของกลูโคสต่อการเจริญของสายพันธุ์นี้เป็นจริงเสมอแม้เปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญมาเป็น 37°ซ. ก็ตาม กล่าวคือค่าการเจริญสูงสุดจะลดลงจาก 415 K.U. มาเป็น 160 K.U. ตามลำดับ และในรูปที่ 7 ได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญในอาหารที่มีกลูโคสกับแอคติวิตีของ PA ซึ่งจะพบว่า นอกจากกลูโคสจะลดอัตราการเจริญลงแล้ว ยังก่อให้เกิด catabolic repression อีกด้วย เนื่องจากไม่พบแอคติวิตีของ PA แต่อย่างใด

3.1.2 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมสของ E. coli ATCC 11105

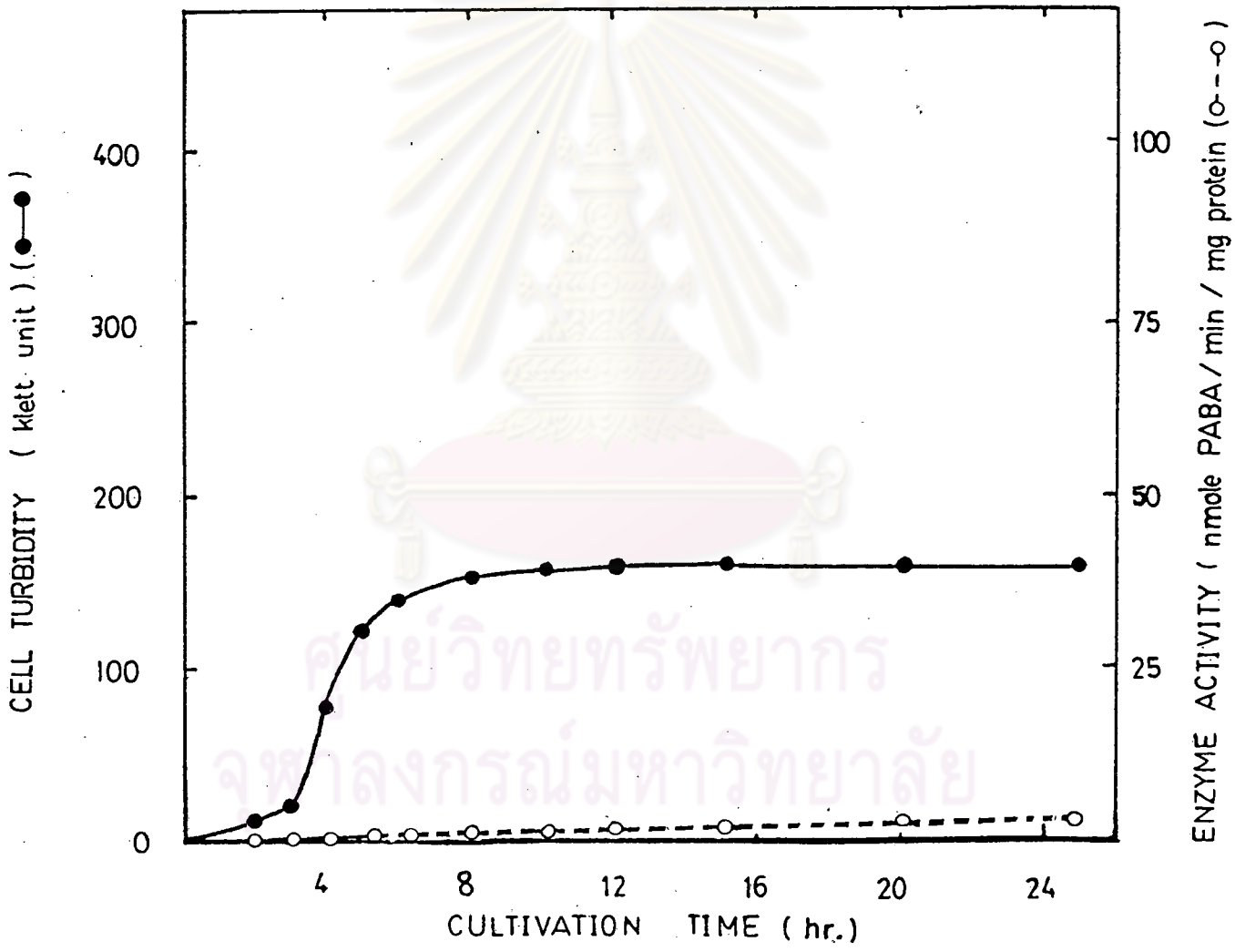
เพราะว่าปีตา-แลคตาเมสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยเพนนิซิลินจี ได้ penicilloic acid ซึ่งเท่ากับเป็นการแย่งสับสเตรทจาก PA ดังนั้นสายพันธุ์ที่ใช้ผลิต PA จึงควรเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตปีตา-แลคตาเมส ในการวิจัยนี้ได้ตรวจสอบแอคติวิตีของปีตา-แลคตาเมสในเซลล์ E. coli ATCC 11105 ที่เจริญในสภาวะเดียวกับที่ตรวจสอบ พบแอคติวิตีของ PA สูงสุด พบว่าไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมสแต่อย่างใด (ภาคผนวกที่ 4)

3.1.3 การตรวจสอบที่อยู่ของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสในเซลล์ E. coli ATCC 11105

โดยทั่วไปแบคทีเรียที่สามารถต้านยาปฏิชีวนะ มักจะมียีนต้านยาอยู่ในรูปของพลาสมิดดีเอนเอ ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจสอบว่ามีพลาสมิดดีเอนเออยู่ในเซลล์ E. coli ATCC 11105 หรือไม่ จากการใช้วิธี rapid Extraction สกัดพลาสมิดดีเอนเอจาก E. coli ATCC 11105 พบว่า ไม่พบพลาสมิดดีเอนเอในสายพันธุ์นี้ (รูปที่ 8)

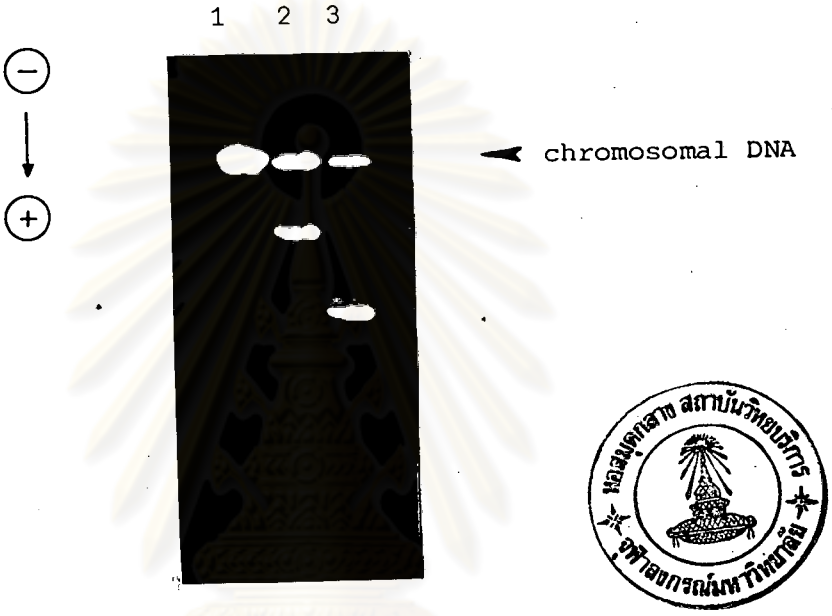
เพื่อยืนยันผลการทดลองนี้ ได้ทดลองวัดแอคติวิตีของ PA จากเซลล์ที่เจริญเมื่อเสริมด้วย mitomycin C 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองซึ่งแสดงในตารางที่ 4 พบว่า

รูปที่ 7 ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ E. coli ATCC 11105 เมื่อเจริญในอาหารอุตม LB เสริม PAA 0.1 % และกลูโคส 0.2 % ที่ 30°ซ.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอนเอของ E. coli ATCC 11105 บน 0.7 % agarose gel electrophoresis



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช่องที่ 1 คือ ผลจากการสกัดพลาสมิดดีเอนเอจาก E. coli ATCC 11105

" 2 คือ ผลจากการสกัดพลาสมิดดีเอนเอจาก E. coli C-600 ที่มี pSY 343 ขนาดประมาณ 9.5 kb.

" 3 คือ ผลจากการสกัดพลาสมิดดีเอนเอจาก E. coli C-600 ที่มี pBR 322 ขนาดประมาณ 4.3 kb.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แอคติวิตีของ PA ของ E. coli ATCC 11105 เมื่อเจริญในอาหารอุดม LB เสริม PAA 0.1 % ที่ 30°ซ. ได้ 8 ชั่วโมง แล้วเติม mitomycin C 2 µg/ml วัดแอคติวิตีของ PA หลังจากเติม mitomycin C เปรียบเทียบกับเมื่อไม่เติม mitomycin C

เวลาหลังจากชั่วโมงที่ 8 (ชั่วโมง)	* แอคติวิตีของ PA (units/mg protein)	
	ไม่เติม Mitomycin C	เติม Mitomycin C
1	34.2 ± 0.3	32.0 ± 0.2
2	38.3 ± 0.5	36.2 ± 0.3
4	35.1 ± 0.3	32.9 ± 0.3
7	32.7 ± 0.4	30.5 ± 0.2
12	22.4 ± 0.3	20.3 ± 0.4

หมายเหตุ * 1 unit คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 นาโนโมลของ PABA ต่อนาที เมื่อวัดโดยวิธีของ Szewezuk

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอคติวิตีของ PA ของ E. coli ATCC 11105 ที่เจริญเมื่อเสริมและไม่เสริมด้วย mitomycin C ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

3.2 สภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนต่าง ๆ ในเทคนิค Molecular cloning

3.2.1 การคัดเลือกชิ้น DNA ที่เหมาะสมจากโครโมโซม E. coli ATCC 11105

จากการรายงานของ Mayer และคณะ ในปี ค.ศ. 1980 ซึ่งสามารถ clone ยีน PA จาก E. coli ATCC 11105 เข้ากับพลาสมิดพาหะได้นั้น พบว่า ความสำเร็จนี้เกิดจากการใช้เอนไซม์ Hind III ย่อยโครโมโซมจาก E. coli ATCC 11105 แบบ partially digestion การวิจัยนี้จึงได้เลือก Hind III มาย่อยโครโมโซมเลือกเวลาการย่อยเท่ากับ 30 นาที แผนภาพของโครโมโซมที่พบในอะกาโรสเจลซึ่งปรากฏเป็นแถบยาว ๆ นั้น บ่งชี้ว่าโครโมโซมถูกย่อยเป็นชิ้นขนาดต่าง ๆ กัน ในที่นี้ได้ตัดสินใจแยกชิ้น DNA ที่มีขนาดประมาณ 9-16 kb จากอะกาโรสเจล โดยวิธี DEAE - cellulose paper

จากนั้นได้ใช้ EcoRI ย่อยทำให้ชิ้น DNA มีขนาดเล็กลงไปอีก ในครั้งนี้ได้ตัดสินใจเลือกใช้ DNA ที่มีขนาดประมาณ 3-4.3 kb ซึ่งแยกจากอะกาโรสเจลโดยวิธี DEAE - cellulose paper อีกเช่นเดิม ชิ้น DNA ที่ได้นี้จะนำไปทำ ligation ต่อไป (รูปที่ 9)

3.2.2 การเตรียมชิ้นพลาสมิดดีเอนเอที่เหมาะสม

ในทำนองเดียวกันได้นำเอนไซม์ Hind III และ EcoRI มาย่อยพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ซึ่งเป็นพลาสมิดดีเอนเอพาหะ และแยกส่วนของพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ที่มีขนาด 7 kb มาทำให้บริสุทธิ์ ตามรูปที่ 10 ชิ้น DNA ส่วนนี้จะนำไปทำ ligation ต่อไป

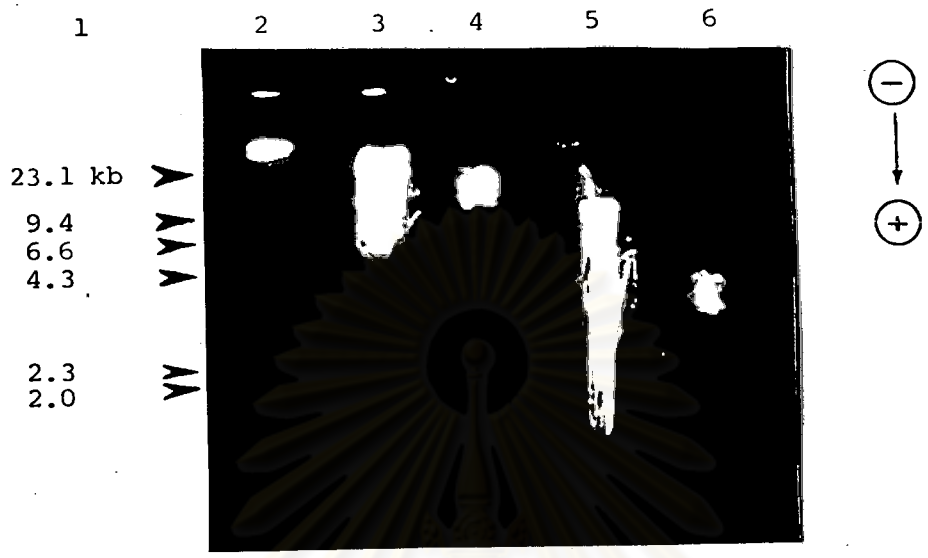
3.2.3 สภาวะเหมาะสมของ ligation

ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของ ligation ได้ใช้ชิ้นของพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ที่มีปลายเป็น Hind III และ EcoR I ขนาดประมาณ 7 และ 2.5 kb เป็นต้นแบบ

ปัจจัยต่าง ๆ ที่ทดลองมีดังนี้

ก. ผลของการแยกสาย DNA ด้วยความร้อนก่อน ligation

รูปที่ 9 ผลของการย่อยโครโมโซมของ E. coli ATCC 11105 ด้วยเอนไซม์ Hind III และ EcoRI บน 0.7 % agarose gel electrophoresis



ช่องที่ 1 คือ standard λ -DNA ซึ่งย่อยด้วย Hind III

" 2 คือ โครโมโซม E. coli ATCC 11105

" 3 คือ ชิ้นของโครโมโซม E. coli ATCC 11105 ซึ่งถูกย่อยบางส่วนด้วย Hind III DNA ขนาดประมาณ 9-16 kb. จะเป็นส่วนที่ถูกแยกไปทำการทดลองต่อไป

" 4 คือ ลักษณะของชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 9-16 kb.ซึ่งแยกจากช่องที่ 3

" 5 คือ ลักษณะชิ้นส่วนของ DNA จากช่องที่ 4 ซึ่งถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย EcoR I DNA ขนาดประมาณ 3-4.3 kb. จะเป็นส่วนที่นำไปทำการทดลองต่อไป

" 6 คือ ลักษณะชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 3-4.3 kb. ที่แยกจากช่องที่ 5 ซึ่งจะนำไปทำ ligation ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 ผลของการย่อยพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ด้วยเอนไซม์ Hind III และ EcoRI บน 0.7 % Agarose gel electrophoresis

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช่องที่ 1 คือ standard λ -DNA ซึ่งย่อยด้วย Hind III

" 2 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pSY 343

" 3 คือ ชิ้นพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ซึ่งถูกย่อยด้วย Hind III ได้ชิ้นขนาด 9.5 kb.

" 4 คือ ชิ้นพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 จากช่องที่ 3 ซึ่งถูกย่อยด้วย EcoR I ได้ชิ้นขนาด 7 และ 2.5 kb. ตามลำดับ

" 5 คือ ชิ้นพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ขนาดประมาณ 7 kb. ที่แยกได้จากช่องที่ 4 ซึ่งจะนำไปทำ ligation ต่อไป

" 6 คือ ชิ้นพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ขนาดประมาณ 2.5 kb. ที่แยกได้จากช่องที่ 4

เมื่อนำชิ้น DNA มาบ่มรวมกันที่ 65°ซ. 5 นาที ก่อนนำไปทำ ligation พบว่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ transformation ให้สูงกว่าการไม่บ่มชิ้น DNA ก่อนทำ ligation ประมาณ 3 เท่า (ตารางที่ 5)

ข. ผลของปริมาณ T4-DNA ligase

ปริมาณ T4-DNA ligase ที่แปรตั้งแต่ 11-176 หน่วยต่อปริมาณ DNA 1 ไมโครกรัม ไม่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของ transformation อย่างมีสัยสำคัญ ภายหลังจากการทำ ligation (ตารางที่ 6)

ค. ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ T4-DNA ligase

อุณหภูมิที่ใช้ในการ ligation ตั้งแต่ 4 ถึง 16°ซ. ไม่ให้ผลกระทบต่อประสิทธิภาพของ transformation อย่างมีนัยสำคัญภายหลังจากการทำ ligation (ตารางที่ 7)

ง. ผลของเวลาที่ใช้ในการ ligation

เวลาที่ใช้ในการ ligation ที่อุณหภูมิ 12.5°ซ. ตั้งแต่ 15 ถึง 20 ชั่วโมง ไม่ให้ผลกระทบต่อประสิทธิภาพของ transformation อย่างมีนัยสำคัญภายหลังจากการทำ ligation (ตารางที่ 8)

3.2.4 สภาวะเหมาะสมของ transformation

ประสิทธิภาพของ transformation หรือความถี่ของ transformation แสดงถึงจำนวน Competent cells ที่ได้รับพลาสมิดเข้าไปต่อ 1 ไมโครกรัม ซึ่งในที่นี้ใช้พลาสมิดตีเอนเอ pSY 343 เป็นต้นแบบศึกษา ทำการ transformation โดยวิธีที่กล่าวไว้ในวิธีการทดลอง เลือก transformant บนอาหารอุดม LB เสริม Kanamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ศึกษาผลของการเตรียม Pompetent cells ที่เหมาะสม 2 แบบคือ

ก. $CaCl_2$ treated - method

จากการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพของ transformation ของทั้ง E. coli HB 101 และ E. coli C 600 นั้นพบสูงประมาณกัน ประสิทธิภาพสูงสุดที่พบคือประมาณ 5.2×10^3 โคโลนีต่อ 1 ไมโครกรัมของพลาสมิดตีเอนเอ pSY 343 (รูปที่ 11)

ตารางที่ 5 ผลของการแยกสาย DNA ด้วยความร้อนก่อน ligation

ใช้ชิ้นพลาสมิดตีเอนเอ pSY 343 ที่มีปลายเป็น Hind III และ EcoRI ขนาดประมาณ 7 และ 2.5 kb. อัตราส่วน 3:1 ตามลำดับ เข้มข้น 1 ไมโครกรัม DNA ต่อ 10 ไมโครลิตร ligation ด้วย T4-DNA ligase 44 unit ที่ 12.5°ซ. นาน 15 ชั่วโมง เลือก transformant บนอาหารอุดม LB เสริม Kanamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สภาวะการบ่มชิ้น DNA	Efficiency of transformation ($\times 10^3$ colony/1 μg DNA)
65°ซ. 5 นาที	4.9 ± 0.1
อุณหภูมิห้อง	1.5 ± 0.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ผลของปริมาณ T4-DNA ligase

ใช้ยีนพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ที่มีปลายเป็น Hind III และ EcoRI ขนาดประมาณ 7 และ 2.5 kb. อัตราส่วน 3:1 ตามลำดับ เข้มข้น 1 ไมโครกรัม DNA ต่อ 10 ไมโครลิตร บ่มยีน DNA 65°ซ. 5 นาที ก่อน ligation ที่ 12.5°ซ. นาน 15 ชั่วโมง เลือก transformant บนอาหารอุดม LB เสริม Kanamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณ T4-DNA ligase (unit)	Efficiency of transformation ($\times 10^3$ colony/1 µg DNA)
176	5.0 ± 0.2
88	5.0 ± 0.1
44	4.9 ± 0.1
22	4.8 ± 0.2
11	4.5 ± 0.1
5	2.0 ± 0.2
1	1.5 ± 0.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ T4-DNA ligase

ใช้ยีนพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ที่มีปลายเป็น Hind III และ EcoRI ขนาดประมาณ 7 และ 2.5 kb.อัตราส่วน 3:1 ตามลำดับ เข้มข้น 1 ไมโครกรัม DNA ต่อ 10 ไมโครลิตร บ่มยีน DNA 65°ซ. 5 นาที ก่อน ligation ด้วย T4-DNA ligase11 หน่วย นาน 15 ชั่วโมง เลือก transformant บนอาหารอุดม LB เสริม Kanamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Incubation temperature (°C)	Efficiency of transformation ($\times 10^3$ colony/1 µg DNA)
4.0	4.2 ± 0.2
12.5	4.5 ± 0.1
16.0	4.4 ± 0.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

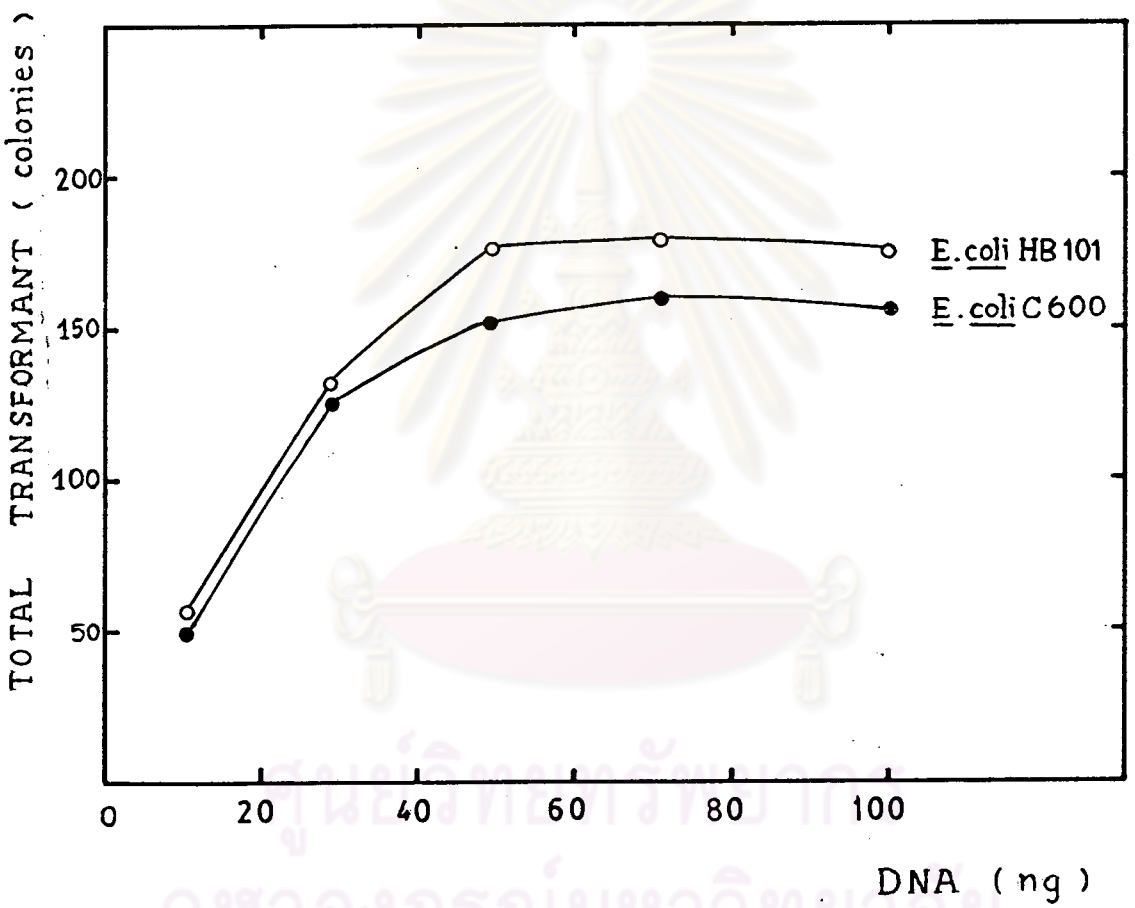
ตารางที่ 8 ผลของเวลาที่ใช้ในการ ligation

ใช้ยีนพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ที่มีปลายเป็น Hind III และ EcoRI ขนาดประมาณ 7 และ 2.5 kb. อัตราส่วน 3:1 ตามลำดับ เข้มข้น 1 ไมโครกรัม DNA ต่อ 10 ไมโครลิตร บ่มยีน DNA 65°ซ. 5 นาที ก่อน ligation ด้วย T4-DNA ligase 11 หน่วย ที่ 12.5°ซ. เลือก transformant บนอาหารอุดม LB เสริม Kanamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ligation time (hr.)	Efficiency of transformation ($\times 10^3$ colony/1 µg DNA)
5	2.1 ± 0.1
15	4.5 ± 0.1
20	4.4 ± 0.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ที่ใช้กับจำนวน transformant ทั้งหมดที่ได้จากการ transformation เมื่อเตรียม competent cell โดยวิธี $CaCl_2$ treated-method



เลือก transformant บนอาหารที่เสริมด้วย Kanamycin 50 ug/ml ที่ 30°ซ. เวลา 1 ชั่วโมง ภายหลังการ transformation

ข. DMSO treated - method

จากการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพของ transformation ของ E. coli HB 101 และ E. coli C 600 นั้นพบสูงประมาณกัน มีประสิทธิภาพเท่ากับ 2.0×10^4 โคโลนี ต่อ 1 ไมโครกรัมของพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 (รูปที่ 12)

การเตรียม Competent cells โดยวิธี DMSO treated - method นั้นเมื่อ transform แล้วพบว่ามีประสิทธิภาพของ transformation สูงกว่าการเตรียม Competant cells โดยวิธี $CaCl_2$ treated - method ประมาณ 4 เท่า

3.2.5 Selective medium สำหรับการคัดเลือก transformant

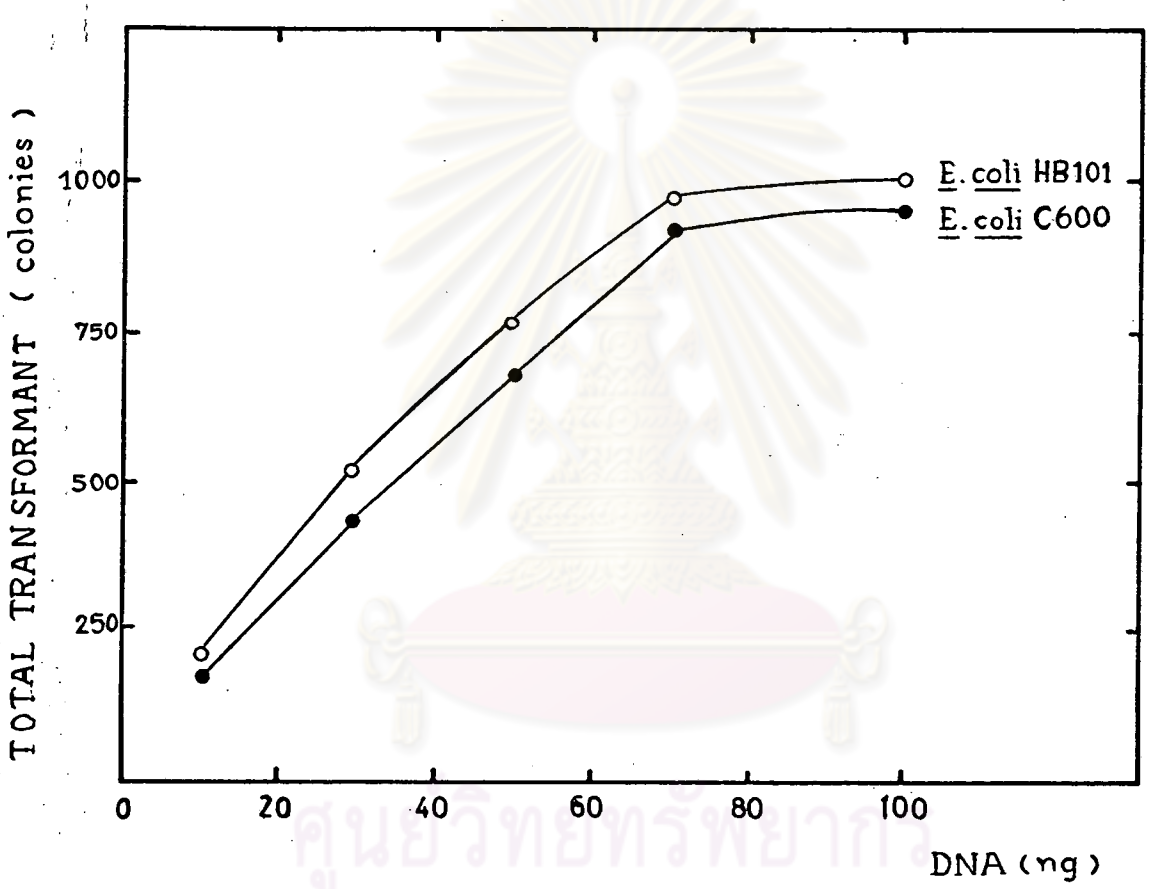
เนื่องจากในการ clone ยีน PA ในงานวิจัยนี้ อาศัยการต้านยาเพนนิซิลินจี เป็นเครื่องหมาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบหาความเข้มข้นสูงสุดของเพนนิซิลินจี ที่สามารถระงับการเจริญของแบคทีเรียอย่างสิ้นเชิง ในการทดลองนี้ได้ใช้อาหารอุดม LB เสริม PAA 0.1 เปอร์เซ็นต์ เสริมด้วยเพนนิซิลินจี ปริมาณต่าง ๆ กัน กระจายแบคทีเรียประมาณ 10^6 เซลล์ต่อจานเพาะเชื้อ บ่มที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง

พบว่าเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระงับการเจริญของ E. coli ATCC 11105 ในขณะที่ E. coli HB 101 และ E. coli C 600 ทั้งที่มีและไม่มีพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ต้องการปริมาณเพนนิซิลินจี 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อระงับการเจริญเติบโตของเชื้อในปริมาณเดียวกัน (ตารางที่ 9)

ดังนั้น Selective medium สำหรับการคัดเลือก transformant ในงานวิจัยนี้จึงใช้อาหารอุดม LB เสริม PAA 0.1 เปอร์เซ็นต์ เสริมเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ส่วนผลการทดสอบ E. coli HB 101 และ E. coli C 600 ทั้งที่มีและไม่มีพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 เกี่ยวกับความสามารถในการผลิตเอนไซม์ PA และเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถสร้างเอนไซม์ทั้งสองได้เลย ดังนั้น E. coli HB 101 และ E. coli C 600 จึงเหมาะสมสำหรับใช้เป็นเซลล์เจ้าเรือนในการทดลองต่อไป

รูปที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ที่ใช้กับจำนวน transformant ทั้งหมดที่ได้จากการ transformation เมื่อเตรียม competent cell โดยวิธี DMSO treated-method



เลือก transformant บนอาหารที่เสริมด้วย Kanamycin 50 µg/ml ที่ 30°ซ เวลา 1 ชั่วโมง ภายหลังการ transformation

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านเพนนิซิลินจีของแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย เจริญเชื้อในอาหารอุดม LB เสริม PAA 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 30°ซ. 10 ชั่วโมง นำเชื้อมาเจือจางให้ได้ 1×10^{6} เซลล์ต่อ 0.1 มิลลิลิตร กระจายเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร บนอาหารแข็งอุดม LB เสริม PAA 0.1 เปอร์เซ็นต์ และเพนนิซิลินจี ปริมาณต่าง ๆ กัน บ่มที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนโคโลนีที่เจริญได้				
	E.coli ATCC 11105	E.coli HB 101	E.coli HB 101 (pSY 343)	E.coli C 600	E.coli C 600 (pSY 343)
LB	1×10^{6}	1×10^{6}	1×10^{6}	1×10^{6}	1×10^{6}
LB + PAA	1×10^{6}	1×10^{6}	1×10^{6}	1×10^{6}	1×10^{6}
LB + PAA + Pen G 50 µg/ml	5×10^{5}	1×10^{2}	2×10^{2}	1×10^{2}	2×10^{2}
LB + PAA + Pen G 100 µg/ml	3×10^{3}	32	34	30	33
LB + PAA + Pen G 150 µg/ml	58	0	0	0	0
LB + PAA + Pen G 200 µg/ml	0	0	0	0	0
LB + PAA + Pen G 300 µg/ml	0	0	0	0	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.6 ลำดับขั้นการทำ Molecular cloning

ขั้นที่ 1. เตรียมชิ้นส่วนของโครโมโซม E. coli ATCC 11105 ที่มีปลายเป็น Hind III และ EcoR I ขนาด 3.4 - 4.4 kb. (รูปที่ 9)

ขั้นที่ 2. เตรียมชิ้นส่วนของพลาสมิดตีเอนเอ pSY 343 ที่มีปลายเป็น Hind III และ EcoR I ขนาด 7 kb. (รูปที่ 10)

ขั้นที่ 3. นำชิ้นส่วนของ DNA จากขั้นที่ 1 และขั้นที่ 2 มาผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 ความเข้มข้น 9 ไมโครกรัมต่อ 90 ไมโครลิตร แล้วทำการ ligation (รูปที่ 13)

ขั้นที่ 4. นำ DNA ที่เชื่อมเรียบร้อยแล้วจากขั้นที่ 3. ไป transform เข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน E. coli HB 101 ซึ่งเตรียมเป็น Competent cell โดยวิธี DMSO treated - method พบ transformant ที่สามารถต้านยาเพนนิซิลินจี ขนาด 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 119 ตัว เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ Serratia marcescens ATCC 27117 พบ transformant 1 ตัวเท่านั้นที่ทำให้เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่ามีแอคติวิตีของ PA ให้ชื่อว่า "Q_{69}" และพลาสมิดตีเอนเอให้ชื่อว่า "pJR 69" ซึ่งเมื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมส โดยวิธี Microiodometric ในจานเพาะเชื้อแล้ว พบว่า Q_{69} และอีก 28 ตัวไม่ผลิตเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมส แต่อีก 90 ตัวผลิตเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมส

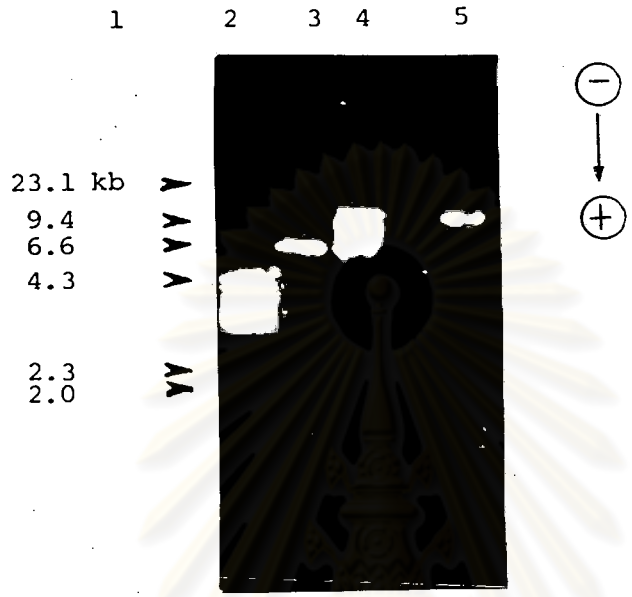
3.3 สมบัติของ transformant Q_{69} (E. coli HB 101 ที่มีพลาสมิดตีเอนเอ pJR 69)

3.3.1 ลักษณะการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ Q_{69}

ก. รูปแบบของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้บ่มเชื้อ

เนื่องจากพลาสมิดพาหะที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็น Runaway replication plasmid สามารถเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยการเปลี่ยนอุณหภูมิ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญ, การผลิตเอนไซม์ PA และปริมาณพลาสมิดตีเอนเอ pJR 69 ของ Q_{69}

รูปที่ 13 ผลของการ ligation ชิ้น DNA จาก E. coli ATCC 11105 กับชิ้นของพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 บน 0.7 % agarose gel electrophoresis



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช่องที่ 1 คือ standard λ -DNA ซึ่งย่อยด้วย Hind III

" 2 คือ ชิ้น DNA ของโครโมโซม E. coli ATCC 11105 ที่ถูกย่อยด้วย Hind III และ EcoR I ขนาดประมาณ 3 - 4.3 kb.

" 3 คือ ชิ้นของพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ที่ถูกย่อยด้วย Hind III และ EcoR I ขนาดประมาณ 7 kb.

" 4 คือ ligation ชิ้น DNA จากช่องที่ 2 และ 3

" 5 คือ Recombinant plasmid DNA pJR 69 สกัดจาก transformant Q_{69} ซึ่งได้จากการ transform DNA จากช่องที่ 4 เข้า E. coli HB 101

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พบว่า Q_{69} ซึ่งเป็น E. coli HB 101 ที่มีพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ไม่สามารถเจริญในอาหารอุดม LB ที่ 37°ซ. แต่เจริญได้ดีพอประมาณที่อุณหภูมิ 30°ซ. ถ้าเทียบกับ E. coli HB 101 ที่ไม่มีพลาสมิด Q_{69} มีแอคติวิตีสูงสุดของ PA 85.7 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งพบที่ Early stationary phase ของแบคทีเรีย (ตารางที่ 10) เมื่อลองเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยการเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญไปที่ 30°ซ. เป็นเวลา 1, 2, 3 หรือ 5 ชั่วโมง แล้วย้ายกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ. พบว่าการเจริญเท่าเดิมหรือลดลงเล็กน้อย แต่แอคติวิตีสูงสุดของ PA สูงขึ้นจากค่าที่สูงสุดได้ จากการเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญไปที่ 37°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วย้ายกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ. คือประมาณ 355 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 10)

จากการสกัดพลาสมิดดีเอนเอโดยวิธีสัดพบว่า การเจริญ Q_{69} ที่อุณหภูมิ 30°ซ. จะทำให้มีปริมาณพลาสมิดดีเอนเอน้อย แต่เมื่อให้เจริญที่ 30°ซ. จนกระทั่ง $O.D._{660}$ ประมาณ 0.1 หน่วยแล้วย้ายไปเจริญที่ 37°ซ. เป็นเวลา 1, 2, 3, หรือ 5 ชั่วโมง จึงนำกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ. พบว่า ปริมาณพลาสมิดดีเอนเอมากขึ้นตามลำดับ แต่ก็ไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับแอคติวิตีของ PA ที่เพิ่มขึ้น น่าสังเกตว่าปริมาณของพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 น้อยกว่าพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 เล็กน้อย (ตารางที่ 11)

อาจสรุปได้ว่า การเจริญ Q_{69} ที่ 30°ซ. จนกระทั่ง $O.D._{660}$ ประมาณ 0.1 หน่วย แล้วย้ายไปเจริญที่ 37°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงนำกลับมาเจริญที่ 30°ซ. นั้น เป็นรูปแบบของอุณหภูมิที่ให้แอคติวิตีของ PA สูงสุด จึงได้ใช้รูปแบบของการบ่มเชื้อในลักษณะนี้ทุก ๆ การทดลองที่เกี่ยวข้องกับ Q_{69}

ข. ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมตามข้อ ก. พบว่า Q_{69} สามารถเจริญได้ดีในอาหารอุดม LB ทั้งที่เสริมและไม่เสริม PAA หรือกลูโคสโดยที่การเจริญในอาหารอุดม LB จะให้แอคติวิตีของ PA สูงที่สุด คือประมาณ 355 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเสริม PAA 0.05, 0.1 หรือ 0.2 เปอร์เซนต์ พบว่าการเจริญสูงสุดใกล้เคียงกันกับเมื่อไม่เสริม PAA แต่มีแอคติวิตีของ PA ต่ำกว่าเมื่อไม่เสริม PAA เล็กน้อย (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 10 ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ Q_{69} เมื่อเจริญในอาหารอุดม LB

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้บ่มเชื้อ	การเจริญสูงสุด (Klett unit)	แอคติวิตีสูงสุดของ PA* (units/mg protein)
1. 30°ซ. (15 ช.ม.)	260 ± 2	85.7 ± 0.2
2. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (13 ช.ม.)	189 ± 3	200.1 ± 0.2
3. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (1 ช.ม.) → 30°ซ. (12 ช.ม.)	260 ± 4	280.0 ± 0.4
4. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (2 ช.ม.) → 30°ซ. (11 ช.ม.)	250 ± 2	355.0 ± 0.3
5. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (3 ช.ม.) → 30°ซ. (10 ช.ม.)	248 ± 2	300.0 ± 0.3
6. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (5 ช.ม.) → 30°ซ. (8 ช.ม.)	245 ± 3	250.2 ± 0.2

หมายเหตุ * 1 unit คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 นาโนโมล PABA ต่อนาที เมื่อวัดโดยวิธีของ Szewezuk โดยที่ค่าแอคติวิตีสูงสุดพบในเซลล์ที่เจริญในระยะ Early stationary phase

2 - 6 การเปลี่ยนอุณหภูมิจากที่ 30°ซ. เป็นที่ 37°ซ. ก็เพื่อเพิ่มจำนวนชุดของพลาสมิดดีเอนเอ ดังนั้นการนำไปบ่มที่ 37°ซ. เวลาต่างกันก็คือการ amplify พลาสมิดดีเอนเอปริมาณต่างกันนั่นเอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อปริมาณพลาส่มิดดีเอนเอของ Q_{69} (*E. coli* HB 101 ที่มี pJR 69) และ *E. coli* HB 101 ที่มี pSY 343 เมื่อเจริญในอาหารอุดม เป็นเวลาทั้งสิ้น 15 ชั่วโมง

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้บ่มเชื้อ	ปริมาณพลาส่มิดดีเอนเอ (µg/cell 1 g wet weight	
	Q_{69} (*E. coli* HB 101 ที่มี pJR 69)	*E. coli* HB 101 ที่มี pSY 343
1. 30°ซ. (15 ช.ม.)	25	50
2. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (13 ช.ม.)	375	450
3. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (1 ช.ม.) → 30°ซ. (12 ช.ม.)	100	150
4. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (2 ช.ม.) → 30°ซ. (11 ช.ม.)	150	200
5. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (3 ช.ม.) → 30°ซ. (10 ช.ม.)	200	250
6. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (5 ช.ม.) → 30°ซ. (8 ช.ม.)	250	300

หมายเหตุ * 1 unit คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 นาโนโมล PABA ต่อนาที เมื่อวัดโดยวิธีของ Szewezuk

ค่าแอคติวิตีสูงสุดพบในเซลล์ที่เจริญในระยะ Early stationary phase

2-6 การเปลี่ยนอุณหภูมิจากที่ 30°ซ. เป็นที่ 37°ซ. ก็เพื่อเพิ่มจำนวนชุดของพลาส่มิดดีเอนเอ ดังนั้นการนำไปบ่มที่ 37°ซ. เวลาต่างกันก็คือการ amplify พลาส่มิดดีเอนเอปริมาณต่างกันนั่นเอง

ตารางที่ 12 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ Q_{69} เมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอุณหภูมิไปที่ 37°ซ. 2 ชั่วโมง จึงนำกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ. 11 ชั่วโมง

อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญสูงสุด (Klett unit)	แอคติวิตีสูงสุดของ PA* (units/mg protein)
LB	250 ± 2	355.0 ± 0.3
LB + PAA 0.05 %	250 ± 2	320.2 ± 0.3
LB + PAA 0.1 %	254 ± 3	322.0 ± 0.2
LB + PAA 0.2 %	258 ± 3	328.1 ± 0.2
LB + Glucose 0.1 %	342 ± 5	6.0 ± 0.3
LB + Glucose 0.2 %	360 ± 3	5.8 ± 0.2
LB + Glucose 0.5 %	360 ± 2	5.5 ± 0.2

หมายเหตุ * 1 unit คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 นาโนโมลของ PABA ต่อนาที เมื่อวัดโดยวิธีของ Szewezuk

ค่าแอคติวิตีสูงสุดพบในเซลล์ที่เจริญในระยะ Early stationary phase ภายหลังบ่มเชื้อเป็นเวลาทั้งสิ้น 15 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเติมกลูโคส่จะทำให้การเจริญของเชื้อสูงขึ้นจาก 250 K.U. เป็น 360 K.U. ซึ่งการเจริญสูงสุดในกรณีนี้ โดยใช้กลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ การเพิ่มกลูโคส่สูงกว่านี้ไม่ช่วยให้การเจริญเพิ่มสูงขึ้น แต่ทว่าในขณะที่การเจริญสูงขึ้นนั้น แอคติวิตีสูงสุดของ PA กลับลดลงจาก 355 ลงมาเหลือ 5.8 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ค. เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส่ของ Q_{69} กับ E. coli ATCC 11105

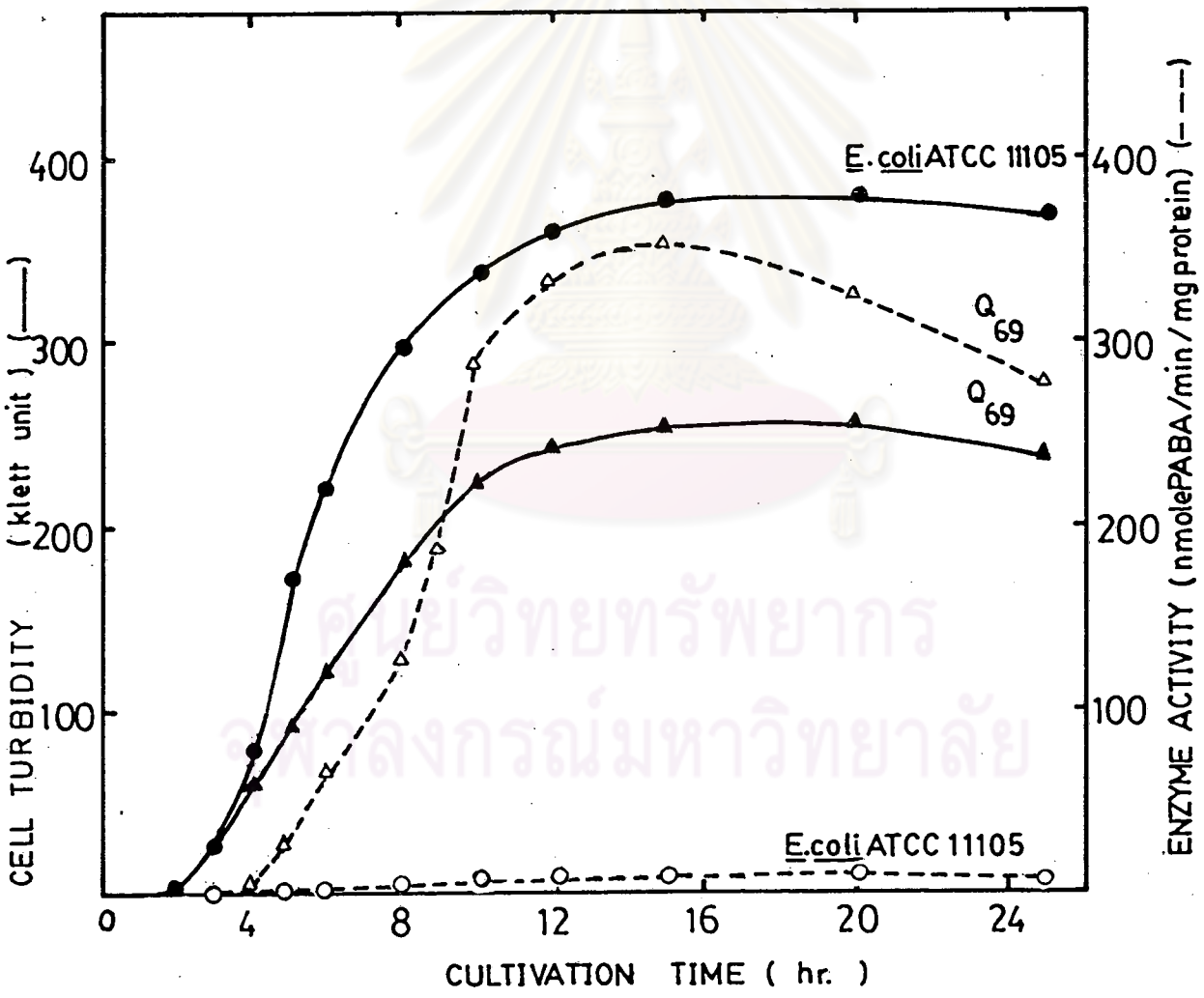
ถ้าใช้ LB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเจริญสูงสุดของ E. coli ATCC 11105 สูงกว่า Q_{69} ประมาณ 1.5 เท่า แต่แอคติวิตีสูงสุดของ PA กลับต่ำมาก พบเพียง 4.2 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่พบแอคติวิตีสูงสุดของ PA ใน Q_{69} ถึง 355 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งแตกต่างกันถึง 83 เท่า และใน Q_{69} จุดที่พบแอคติวิตีของ PA สูงสุดนั้นเป็นจุดที่มีการเจริญสูงสุดด้วย คือเมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะ early stationary phase (รูปที่ 14)

การเสริมด้วย PAA พบว่าช่วยเพิ่มการเจริญสูงสุดของ E. coli ATCC 11105 คือจากเดิม 383 เป็น 405 K.U. โดยการเจริญของมันจะเข้าสู่ stationary phase ด้วยเวลาบ่มเดียวกันคือประมาณ 20 ชั่วโมง และแอคติวิตีสูงสุดของ PA ก็เพิ่มจาก 4.2 เป็น 38.3 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ด้วยเวลาบ่มเดียวกันคือ 10 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะ Mid log phase แต่ในอาหารชนิดเดียวกันนี้ พบว่า PAA ไม่ช่วยเพิ่มการเจริญ และแอคติวิตีของ PA ของ Q_{69} แต่อย่างใด และจุดที่พบแอคติวิตีของ PA สูงสุดนั้น เป็นจุดที่มีการเจริญสูงสุดด้วย คือเมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 15 ชั่วโมง (รูปที่ 15) น่าสังเกตว่าลักษณะการผลิต PA ที่สัมพันธ์กับการเจริญของทั้ง E. coli ATCC 11105 และ Q_{69} นั้นคล้ายคลึงกัน คือในช่วงแรกแอคติวิตีของ PA จะเพิ่มขึ้นตามการเจริญของแบคทีเรีย จนกระทั่งแอคติวิตีของ PA สูงสุด จากนั้นแอคติวิตีของ PA จะค่อย ๆ ลดต่ำลงในขณะที่การเจริญของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยแล้วคงที่

ในอาหารที่เสริมกลูโคส่นั้น การเจริญของ E. coli ATCC 11105 จะลดลงจากเดิม 383 เป็น 150 K.U. แต่ใน Q_{69} กลับเพิ่มจากเดิม 250 เป็น 360 K.U. ซึ่งแอคติวิตีสูงสุดของ PA ในทั้งสองกรณียังคงมีค่าต่ำมากเช่นเดียวกัน (รูปที่ 16)

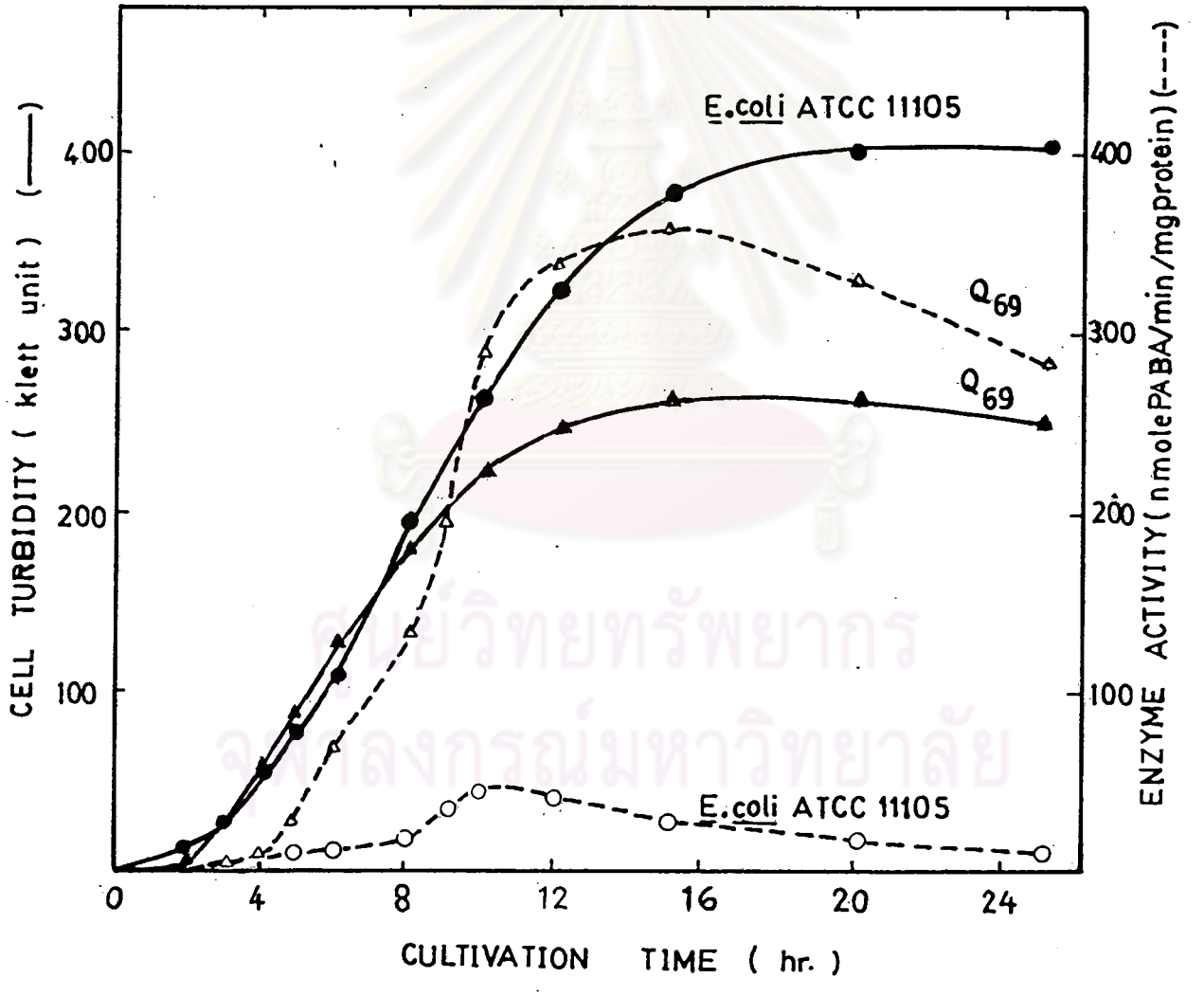
รูปที่ 14 ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ Q_{69} และ E. coli ATCC 11105 ในอาหารอุดม LB

เมื่อ Q_{69} เจริญที่ 30°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญไปที่ 37°ซ. 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำกลับไปเจริญต่อที่ 30°ซ. และ E. coli ATCC 11105 เจริญที่ 30°ซ.



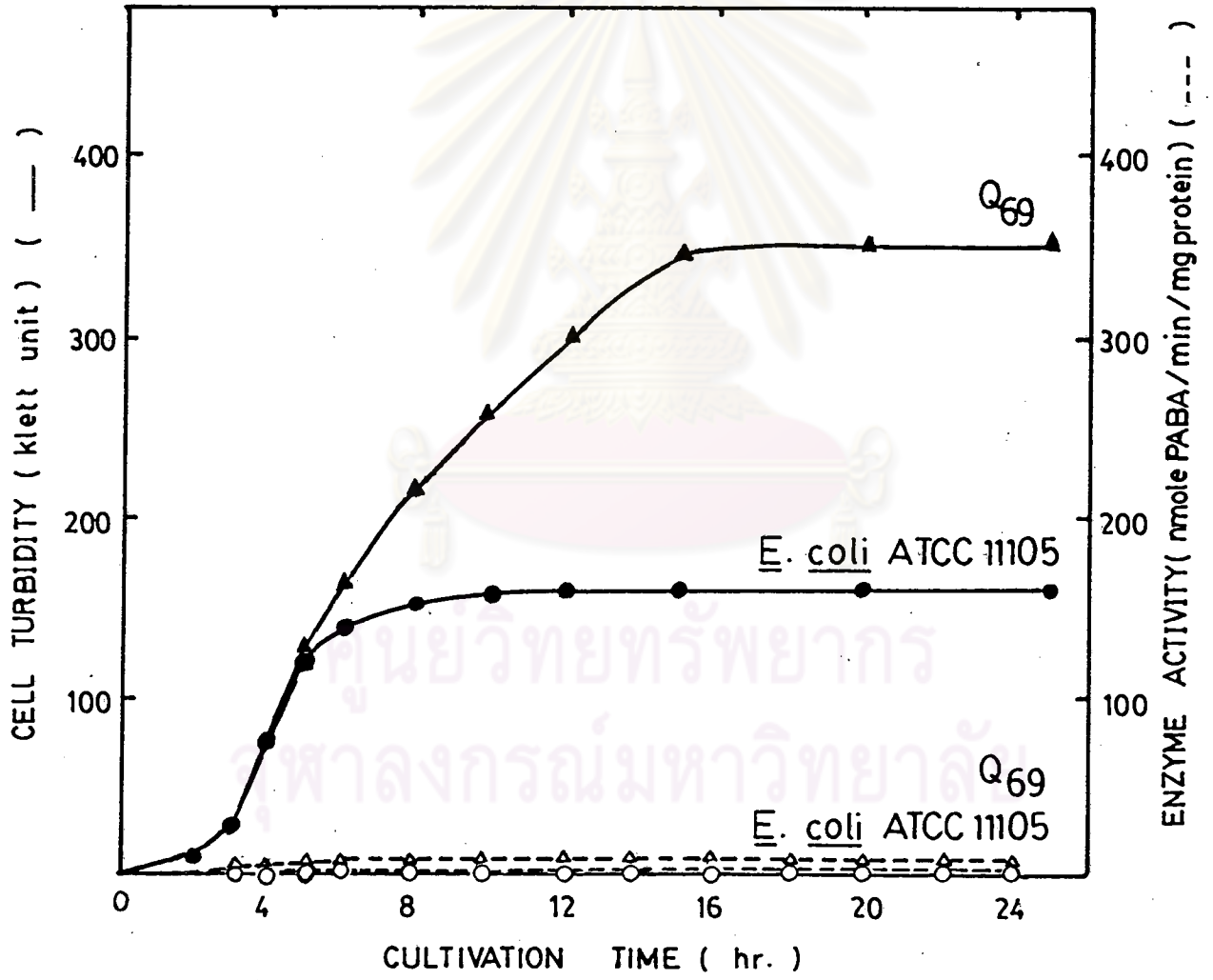
รูปที่ 15 ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ Q_{69} และ E. coli ATCC 11105 ในอาหารอุดม LB เสริม PAA 0.1 %

เมื่อเจริญ Q_{69} ที่ 30°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญไปที่ 37°ซ. 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำกลับไปเจริญต่อที่ 30°ซ. และเจริญ E. coli ATCC 11105 ที่ 30°ซ.



รูปที่ 16 ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ Q_{69} และ E. coli ATCC 11105 ในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส 0.2 %

เมื่อเจริญ Q_{69} ที่ 30°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญไปที่ 37°ซ. 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำกลับไปเจริญต่อที่ 30°ซ. และเจริญ E. coli ATCC 11105 ที่ 30°ซ.



3.3.2 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส ของ Q_{69}

เมื่อได้พบว่า สภาวะที่เหมาะสมของการเจริญ Q_{69} เพื่อให้ได้แอคติวิตีของสูงสุดนั้น คือการเจริญที่ 30^{o}ซ. จนกระทั่ง $O.D._{660}$ = 0.1 หน่วย เปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญไปที่ 37^{o}ซ. 2 ชั่วโมง แล้วนำกลับมาเจริญต่อที่ 30^{o}ซ. 11 ชั่วโมง จึงทดสอบการแสดงออกของยีนบีตา-แลคตาเมสในสภาวะนี้ จากการทดลองพบว่า ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-แลคตาเมสอยู่เลย

3.3.3 สมบัติของพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ของ Q_{69}

ก. เปรียบเทียบปริมาณพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ต่อการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ Q_{69}

เมื่อเจริญ Q_{69} ในอาหารอุดม LB ที่ 30^{o}ซ. จนกระทั่ง $O.D._{660\ nm}$ เท่ากับ 0.1 หน่วย เปลี่ยนมาเจริญที่ 37^{o}ซ. 2 ชั่วโมง แล้วย้ายกลับไปเจริญที่ 30^{o}ซ. อีก 6 ชั่วโมง เติม Mitomycin C 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ติดตามการเจริญ การผลิตเอนไซม์ PA และปริมาณพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 เปรียบเทียบกับเมื่อไม่เติม Mitomycin C พบว่า หลังจากเติม Mitomycin C มีการเจริญลดลงอย่างช้า ๆ ในขณะที่แอคติวิตีของ PA ลดลงอย่างรวดเร็ว สัมพันธ์กับปริมาณพลาสมิดดีเอนเอที่ลดลงอย่างรวดเร็วด้วยเช่นกัน (รูปที่ 17 ก) การเจริญและปริมาณพลาสมิดดีเอนเอของ pJR 69 ของ Q_{69} มีลักษณะเดียวกับ E. coli HB 101 ที่มี pSY 343 (รูปที่ 17 ข)

ข. ขนาดและ Restriction site ของ pJR 69 ของ Q_{69}

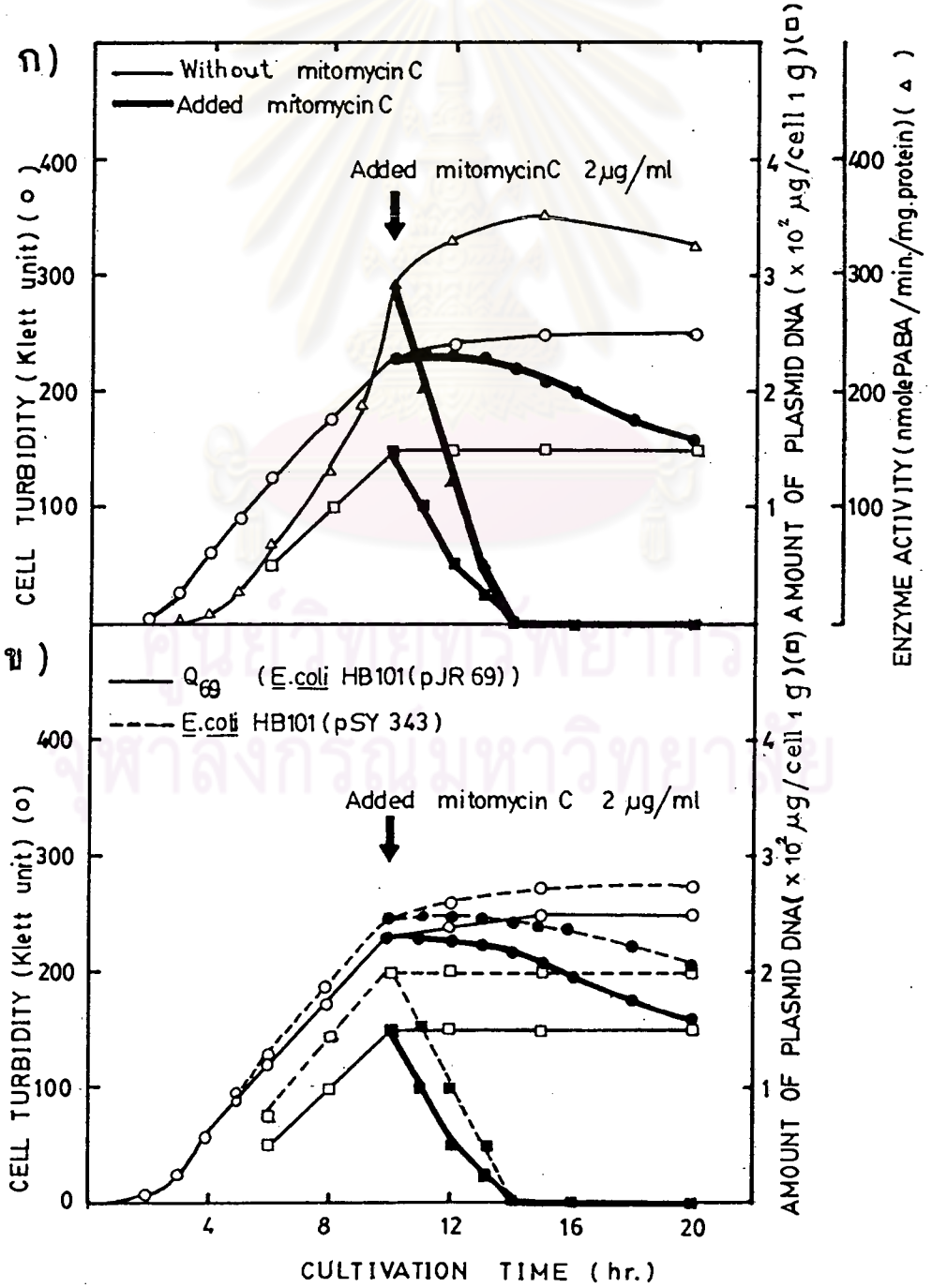
ภายหลังการตรวจสอบขนาดพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ในลักษณะของการไม่ย่อยและย่อยด้วยเอนไซม์ Hind III และ/หรือ EcoR I แล้วเปรียบเทียบขนาดของชิ้น DNA กับขนาดมาตรฐานของ λ-DNA ซึ่งย่อยด้วย Hind III พบว่า pJR 69 มีขนาดประมาณ 11 kb. เมื่อย่อยด้วย Hind III และ EcoR I จะได้ชิ้น DNA 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 7 และ 4 kb. (รูปที่ 18)

3.3.4 ความคงอยู่ (stability) ของพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ของ Q_{69}

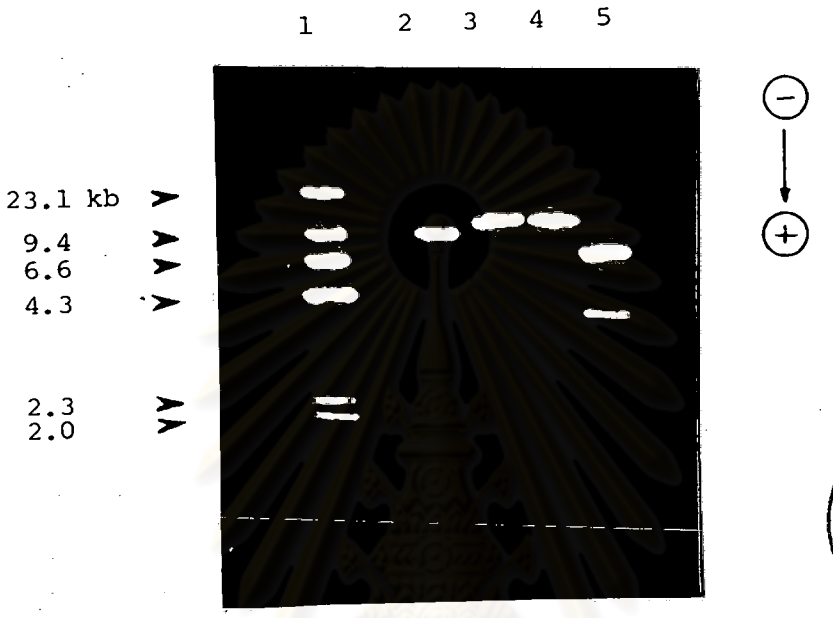
ทดสอบความสามารถในการคงอยู่ของพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 และความสามารถในการผลิต PA ของ Q_{69} โดย

รูปที่ 17 ก) ลักษณะของการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสที่สัมพันธ์กับเวลา, ความขุ่น และปริมาณพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ของ Q_{69} เมื่อเจริญในอาหารอุดม LB ที่ 30°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนมาเจริญที่ 37°ซ. 2 ชั่วโมง แล้วย้ายกลับไปเจริญที่ 30°ซ. อีก 6 ชั่วโมง เติม Mitomycin C 2 µg/ml เปรียบเทียบกับไม่เติม

ข) ลักษณะของปริมาณพลาสมิดดีเอนเอที่สัมพันธ์กับเวลาและความขุ่นของ Q_{69} เมื่อเจริญในสภาวะเช่นเดียวกับ ก. เติมและไม่เติม Mitomycin C เปรียบเทียบกับ E. coli HB 101 ที่มี pSY 343



รูปที่ 18 ผลของการศึกษาขนาด และ restriction site ของพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ของ Q_{69} บน 0.7 % agarose gel electrophoresis



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช่องที่ 1 คือ standard λ -DNA ซึ่งย่อยด้วย Hind III

" 2 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69

" 3 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ซึ่งย่อยด้วย EcoR I

" 4 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ซึ่งย่อยด้วย Hind III

" 5 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ซึ่งย่อยด้วย Hind III และ EcoR I

ก. เก็บเชื้อในอาหารเหลว LB ที่มีกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ที่ -20°ซ. นาน 4 เดือน ในระหว่างนั้น เมื่อนำมาเจริญในอาหารอุดม LB พบว่ายังคงความสามารถเป็นการผลิต PA และมีปริมาณพลาสมิดดีเอนเอเป็นปกติเช่นเดิม

ข. สตรีค (streak) เชื้อบนอาหารแข็ง LB เสริมเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าใน 10 passage Q_{69} ยังคงสามารถผลิต PA และมีปริมาณพลาสมิดดีเอนเอเป็นปกติเช่นเดิม (การนำเชื้อจากที่เก็บในกลีเซอรอลมาสตรีคลงจานแม่ (Master plate) ครั้งที่ 1 ถือเป็น passage ที่ 1 และการนำเชื้อจากจานแม่มาสตรีคต่อลงบนจานเพาะเชื้อใหม่ ถือเป็น passage ที่ 2 เช่นนี้เรื่อยไป)

3.4 การแยก Catabolite derepressed mutant จาก Q_{69}

เนื่องจาก Q_{69} (E. coli HB 101 ที่มี pJR 69) สามารถเจริญได้ดีในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ PA จึงได้ทำการกลายพันธุ์ Q_{69} เพื่อเลือกมิวแตนท์ที่สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ PA ได้ดีในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส โดยใช้วิธีการกลายพันธุ์ 2 วิธีคือ

3.4.1 การกลายพันธุ์ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต

เนื่องจาก E. coli HB 101 เป็น rec A มิวแตนท์ จึงมีความไว (Sensitive) ต่อรังสีอุลตราไวโอเลตอย่างมาก ดังนั้นการกลายพันธุ์ Q_{69} ซึ่งก็คือ E. coli HB 101 ที่มี pJR 69 จึงจำเป็นต้องเคลื่อนย้ายพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก Q_{69} ไปสู่ E. coli C 600 ก่อน

ก. การเคลื่อนย้ายพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก Q_{69} (E. coli HB 101 ที่มี pJR 69) ไปสู่ E. coli C 600

สกัดพลาสมิด pJR 69 จาก Q_{69} ทำการ transformation เข้าสู่ E. coli C 600 จากนั้นคัดเลือก transformant E. coli C 600 ที่มี pJR 69 บนอาหารอุดม LB ที่เสริม Penicillin G 200 µg/ml ทดสอบการสร้าง PA โดยวิธี Microbiological test พบว่าบริเวณใสรอบโคโลนีของ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 เท่ากับของ Q_{69} (E. coli HB 101 ที่มี pJR 69) (รูปที่ 20)

ข. กราฟความอยู่รอด (survival curve)

การ expose Q_{69} และ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต 15 วัตต์ในระยะห่าง 30 เซนติเมตร บนอาหารอุดมเสริม penicillin G 200 µg/ml พบว่า % survival ของ Q_{69} เมื่อฉายรังสี 10 วินาที เป็น 1.01×10^{-5} % และเมื่อฉายรังสีนานกว่า 10 วินาที จะไม่พบการอยู่รอดของ Q_{69} เลย ในขณะที่ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 ที่เวลา 0 วินาที มี 100 % survival ในช่วง 10 วินาทีแรก พบว่า % survival ลดลงอย่างเร็วมากเหลือเพียง 2.57×10^{-3} % และในช่วงเวลา 10-60 วินาที พบว่า % survival ลดลงอย่างช้า ๆ (รูปที่ 19) ดังนั้นการกลายพันธุ์ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 ในการทดลองต่อไปจะเลือกฉายรังสีอุลตราไวโอเลต 25 วินาที เนื่องจากมี % survival เป็น 1.8×10^{-4} % เมื่อใช้เซลล์เริ่มต้นเป็น 5.5×10^{7} เซลล์ จะได้ survival ประมาณ 100 โคโลนี

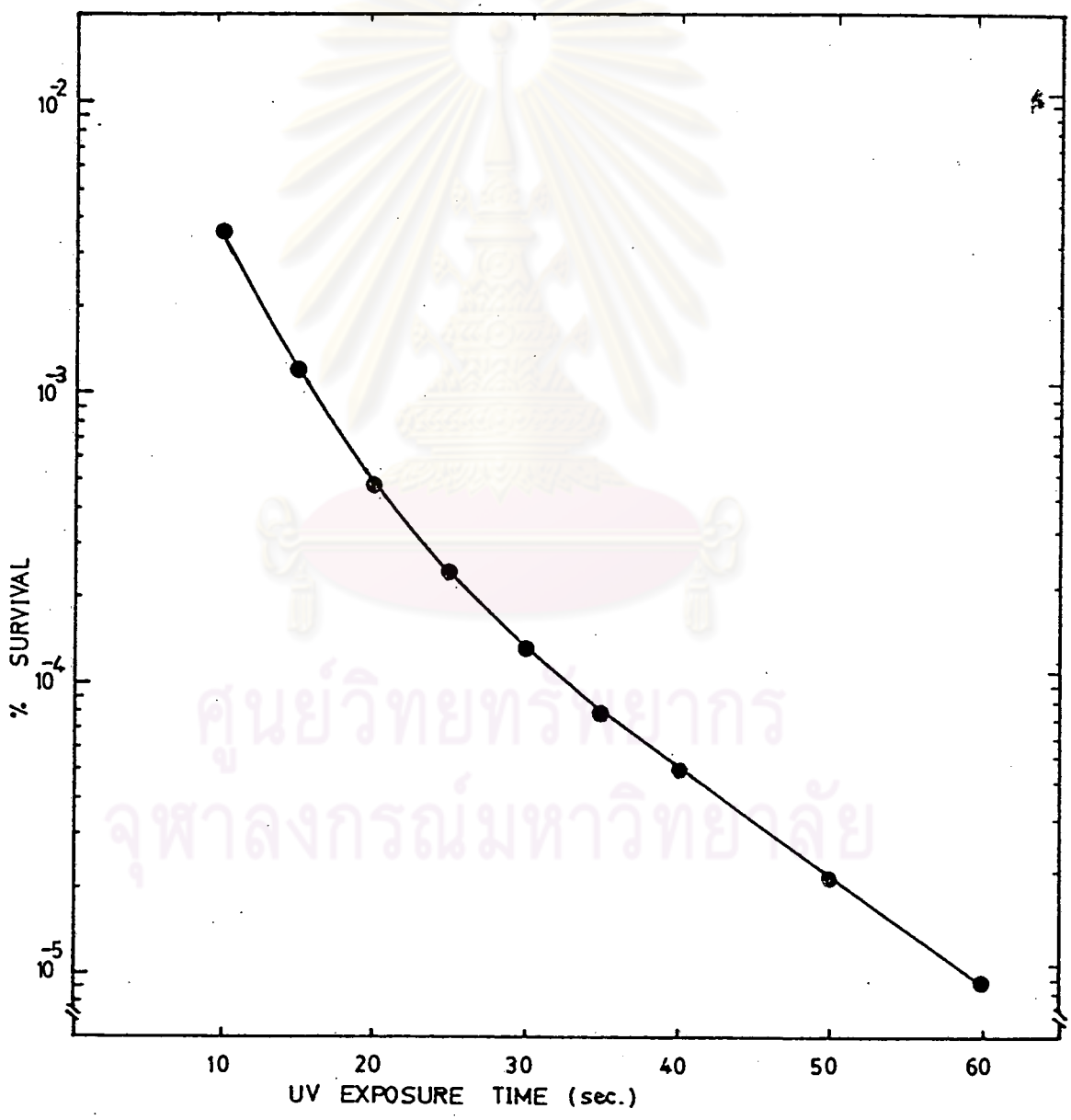
ค. การกลายพันธุ์ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต

ผลการกลายพันธุ์ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 โดยใช้รังสีอุลตราไวโอเลต 15 วัตต์ ในระยะ 30 เซนติเมตร เป็นเวลา 25 วินาที จากเซลล์ตั้งต้น 5.5×10^{9} โคโลนี สามารถแยก survival ทั้งสิ้น 7,894 โคโลนีในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส 0.2 % เสริม penicillin G 200 µg/ml เมื่อนำไปทดสอบการสร้าง PA โดยวิธี Microbiological test พบ Catabolite derepressed mutant 9 ตัว ให้ชื่อว่า R_1-R_9 ตัวที่แสดงบริเวณใสโดยยับยั้งการเจริญของ Serratia marcescens ATCC 27117 สูงสุด คือ R_9 (รูปที่ 20) โดยที่เมื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ บีตา-แลคตาเมส โดยวิธี Microiodometric พบว่า R_1-R_9 ไม่ผลิตเอนไซม์ บีตา-แลคตาเมส

3.4.2 การกลายพันธุ์ด้วย NTG

จากการกลายพันธุ์ Q_{69} (E. coli HB 101 ที่มี pJR 69) ด้วย NTG ตามขั้นตอนที่กล่าวแล้วในวิธีการทดลอง พบว่า จากเซลล์เริ่มต้น 1.5×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจาก treat ด้วย NTG มี survival cell ประมาณ 2×10^{3} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อ Enrichment โดยการ treat ด้วยเพนนิซิลินจี 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 ถึง 50 นาทีแล้ว สามารถแยกมิวแตนท์ที่เจริญบนอาหารอุดมแข็ง LB เสริมกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ทั้งสิ้น 128 ตัว เมื่อนำไปทดสอบ

รูปที่ 19 Survival curve ของ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 เมื่อถูกกลายพันธุ์ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลตบนอาหารเลี้ยงเชื้ออุตม LB เสริม Penicillin G 200 µg/ml



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20 การทดลอบการผลิต PA ของ Q_{69}, E. coli C-600 ที่มี pJR 69 และมิวแตนท์ 9 ตัวที่แยกได้จากการกลายพันธุ์ E. coli C-600 ที่มี pJR 69 ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต

LB/Pen G	คือ	LB เสริม เพนนิซิลิน จี 200 µg/ml
LB/Glucose/Pen G	คือ	LB/Pen G เสริมกลูโคส 0.2 %
11105	คือ	E. coli ATCC 11105 เป็นสายพันธุ์ Wild type ที่มียีน PA
Q_{69}	คือ	E. coli HB 101 ที่มี pJR 69 ซึ่งได้จากการ clone ยีน PA จาก E. coli ATCC 11105 ต่อเข้ากับ pSY 343
Q_{69C}	คือ	E. coli C 600 ที่มี pJR 69
R_{1-9}	คือ	Catabolite dereperssed mutant ที่แยกได้จากการกลายพันธุ์ Q_{69C} ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต

เจริญแบคทีเรียบนอาหารอุดมแข็ง (LB - agar) ที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วย 10 % (V/V) S. marcescens ATCC 27117 ใน nutrient soft agar ที่เสริม เพนนิซิลิน จี 5 mg/ml จำนวน 5 ml บ่มที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีที่ผลิต PA

รูปที่ 20 การทดสอบการผลิต PA ของ Q_{69}, E. coli C 600 ที่มี pJR 69 และมิวแตนท์อีก 9 ตัวที่แยกได้จากการกลายพันธุ์ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต

LB/Pen G

LB/Glucose/Pen G

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสร้าง PA โดยวิธี Microbiological test พบ catabolite derepressed mutant 5 ตัว ให้ชื่อว่า S_1-S_5 ตัวที่แสดงบริเวณใสโดยยับยั้งการเจริญของ Serratia marcescens ATCC 27117 สูงสุดคือ S_5 (รูปที่ 21) โดยที่เมื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมสโดยวิธี Microiodometric พบว่า S_1-S_5 ไม่ผลิตเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมส

3.5 สมบัติของ Catabolite derepressed mutant R_9 (E. coli C 600 ที่มี pJR 69) ซึ่งได้จากการกลายพันธุ์ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต

3.5.1 ลักษณะการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลสของ R_9

ก. รูปแบบของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้บ่มเชื้อ

โดยการใช้การทดลองเพื่อหารูปแบบของการเจริญเพื่อให้ได้แอคติวิตีของ PA สูงสุดใน R_9 เช่นเดียวกับการทดลองใน Q_{69} พบว่าการเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30°ซ. เป็น 37°ซ. นาน 2 ชั่วโมง แล้วย้ายกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ. จะให้แอคติวิตีของ PA สูงสุดคือ 661.8 นาโนโมล PABA ต่อนาที ต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 13) ค่าแอคติวิตีสูงสุดของ PA พบที่ Early Stationary phase ของแบคทีเรีย เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ดังรูปที่ 23

การเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอนเอใน R_9 อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนอุณหภูมิของการเจริญ มีลักษณะสอดคล้องกับ Q_{69} (ตารางที่ 14)

อาจสรุปได้ว่า การเจริญ R_9 ที่ 30°ซ. จนกระทั่ง $O.D._{660}$ ประมาณ 0.1 หน่วย แล้วย้ายไปเจริญที่ 37°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงนำกลับมาเจริญที่ 30°ซ. นั้น เป็นรูปแบบของอุณหภูมิที่ให้แอคติวิตีของ PA สูงสุด จึงได้ใช้รูปแบบของการบ่มเชื้อในลักษณะนี้ทุก ๆ การทดลองที่เกี่ยวข้องกับ R_9

ข. ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมตามข้อ ก. พบว่า R_9 สามารถเจริญและให้แอคติวิตีสูงสุดของ PA ได้ใกล้เคียงกันเมื่อเจริญในอาหารอุดม LB ทั้งที่เสริมและไม่เสริม PAA (ตารางที่ 15)

รูปที่ 22 แสดงการเจริญของ R_9 ในอาหารอุดม LB ที่เสริมด้วยกลูโคส

รูปที่ 21 การทดสอบการผลิต PA ของ Q_{69}, E. coli ATCC 11105 และมิวแตนท์ 5 ตัว ที่แยกได้จากการกลายพันธุ์ Q_{69} ด้วย NTG

LB/Pen G	คือ	LB เสริมเพนนิซิลิน จี 200 µg/ml
LB/Glucose/Pen G	คือ	LB/Pen G เสริมด้วยกลูโคส 0.2 %
11105	คือ	E. coli ATCC 11105 เป็นสายพันธุ์ Wild type ที่มียีน PA
Q_{69}	คือ	E. coli HB 101 ที่มี pJR 69 ซึ่งได้จากการ clone ยีน PA จาก E. coli ATCC 11105 ต่อเข้ากับ pSY 343
S_{1-5}	คือ	Catabolite derepressed mutant ซึ่งแยกได้จากการกลายพันธุ์ Q_{69} ด้วย NTG

เจริญแบคทีเรียบนอาหารอุดมแข็ง (LB-agar) ที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง แล้วเทับด้วย 10 % (V/V) S. marcescens ATCC 27117 ใน nutrient soft agar ที่เสริมเพนนิซิลิน จี 5 mg/ml จำนวน 5 ml บ่มที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีที่ผลิต PA

รูปที่ 21 การทดสอบการผลิต PA ของ Q_{69}, E. coli ATCC 11105 และมิวแตนท์ 5 ตัว ที่แยกได้จากการกลายพันธุ์ Q_{69} ด้วย NTG

LB/Pen G

LB/Glucose/Pen G

ตารางที่ 13 ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ เมื่อเจริญในอาหารอุดม เสริมกลูโคส 0.2 %

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้บ่มเชื้อ	การเจริญสูงสุด (Klett unit)	แอคติวิตีสูงสุดของ PA* (units/mg protein)
1. 30°ซ. (15 ช.ม.)	385 ± 4	89.2 ± 0.4
2. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (13 ช.ม.)	250 ± 3	357.0 ± 0.2
3. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (1 ช.ม.) → 30°ซ. (12 ช.ม.)	375 ± 2	500.1 ± 0.3
4. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (2 ช.ม.) → 30°ซ. (11 ช.ม.)	360 ± 5	661.8 ± 0.2
5. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (3 ช.ม.) → 30°ซ. (10 ช.ม.)	356 ± 2	562.3 ± 0.4
6. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (5 ช.ม.) → 30°ซ. (8 ช.ม.)	324 ± 3	408.2 ± 0.3

หมายเหตุ * 1 unit คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 นาโนโมล PABA ต่อนาที เมื่อวัดโดยวิธีของ Szewezuk

ค่าแอคติวิตีสูงสุดพบในเซลล์ที่เจริญในระยะ Early stationary phase

2-6 การเปลี่ยนอุณหภูมิจากที่ 30°ซ. เป็นที่ 37°ซ. ก็เพื่อเพิ่มจำนวนชุดของพลาสมิดดีเอนเอ ดังนั้นการนำไปบ่มที่ 37°ซ. เวลาต่างกันก็คือการ amplify พลาสมิดดีเอนเอปริมาณต่างกันนั่นเอง

ตารางที่ 14 ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อปริมาณพลาสมิดดีเอนเอของ R_9 เปรียบเทียบกับ Q_{69} เมื่อเจริญในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส 0.2 % เป็นเวลาทั้งสิ้น 15 ชั่วโมง

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้บ่มเชื้อ	ปริมาณพลาสมิดดีเอนเอ (µg/cell 1 g. wet weight)	
	R_9	Q_{69}
1. 30°ซ. (15 ช.ม.)	25	25
2. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (13 ช.ม.)	375	375
3. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (1 ช.ม.) → 30°ซ. (12 ช.ม.)	100	100
4. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (2 ช.ม.) → 30°ซ. (11 ช.ม.)	150	150
5. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (3 ช.ม.) → 30°ซ. (10 ช.ม.)	200	200
6. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (5 ช.ม.) → 30°ซ. (8 ช.ม.)	250	250

หมายเหตุ * 1 unit คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 นาโนโมล PABA ต่อนาที เมื่อวัดโดยวิธีของ Szewezuk

ค่าแอคติวิตีสูงสุดพบในเซลล์ที่เจริญในระยะ Early stationary phase

2-6 การเปลี่ยนอุณหภูมิจากที่ 30°ซ. เป็นที่ 37°ซ. ก็เพื่อเพิ่มจำนวนชุดของพลาสมิดดีเอนเอ ดังนั้นการนำไปบ่มที่ 37°ซ. เวลาต่างกัน ก็คือการ amplify พลาสมิดดีเอนเอ ปริมาณต่างกันนั่นเอง

ตารางที่ 15 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ R_9 เมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอุณหภูมิไปที่ 37°ซ. 2 ชั่วโมง จึงนำกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ. 11 ชั่วโมง

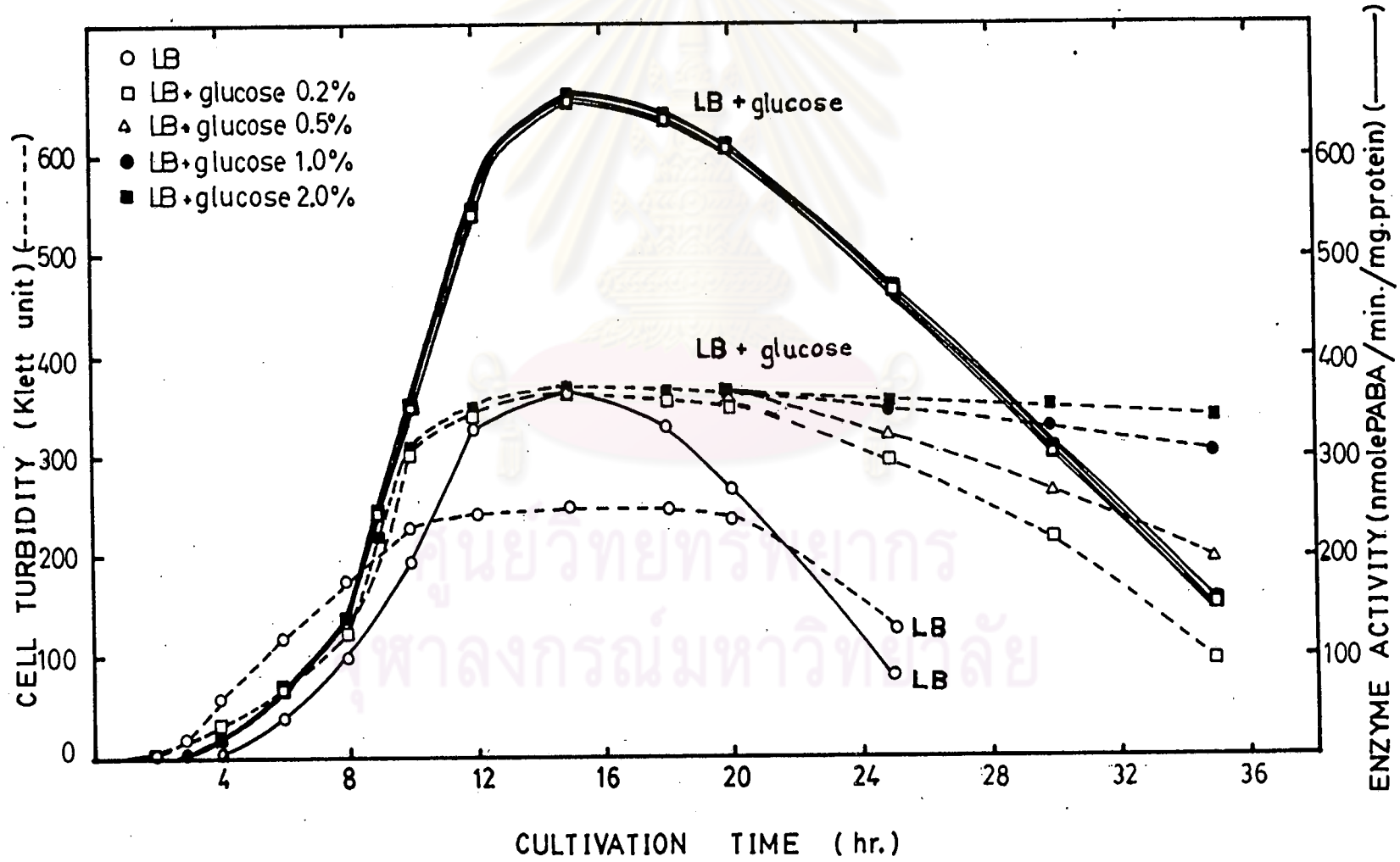
อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญสูงสุด (Klett unit)	แอคติวิตีสูงสุดของ PA* (units/mg protein)
LB	255 ± 3	362.1 ± 0.2
LB + PAA 0.1 %	256 ± 4	360.0 ± 0.3
LB + Glucose 0.2 %	360 ± 5	661.8 ± 0.2
LB + Glucose 0.5 %	362 ± 3	661.9 ± 0.3
LB + Glucose 1 %	365 ± 3	662.1 ± 0.4
LB + Glucose 2 %	368 ± 4	662.3 ± 0.3

หมายเหตุ * 1 unit คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 นาโนโมลของ PABA ต่อนาที เมื่อวัดโดยวิธีของ Szewezuk

ค่าแอคติวิตีสูงสุดพบในเซลล์ที่เจริญในระยะ Early stationary phase ภายหลังบ่มเชื้อเป็นเวลาทั้งสิ้น 15 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22 เปรียบเทียบการเจริญและแอคติวิตีของ PA ของ R_9 ในอาหารอุดม LB และ LB เสริมกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กัน เมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้ว เปลี่ยนอุณหภูมิไปที่ 37°ซ. 2 ชั่วโมง จึงนำกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริมาณต่าง ๆ กัน ในการทดลองนี้ได้ยืดเวลาการบ่มเชื้อนานถึง 36 ชั่วโมง เพื่อติดตามความแปรปรวนของแอคติวิตีของ PA กับความขุ่นของเชื้อ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ถ้าเสริมกลูโคส่ค่าการเจริญสูงสุดจะเพิ่มจากเดิม 255 เป็น 368 K.U. เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 15 ชั่วโมง และที่เวลาเดียวกันนี้แอคติวิตีสูงสุดของ PA เพิ่มจากเดิม 362.1 เป็น 662.3 นาโนโมล PABA ต่อนาที ต่อมิลลิกรัมโปรตีน จะเห็นว่าเมื่อมีการเจริญเพิ่มขึ้น 1.4 เท่า แอคติวิตีสูงสุดของ PA จะเพิ่มขึ้น 1.8 เท่าด้วย จากนั้นแอคติวิตีของ PA จะลดลงอย่างช้า ๆ แต่ถ้าเวลาในการบ่มเชื้อนานกว่า 20 ชั่วโมง แอคติวิตีของ PA จะลดลงอย่างรวดเร็ว น่าสังเกตว่าความขุ่นภายหลัง 20 ชั่วโมง มีการลดลงด้วย การลดลงจะช้าเร็วต่างกันขึ้นกับปริมาณกลูโคส่ที่เสริมลงไป ถ้ามีปริมาณกลูโคส่มาก การลดลงก็จะช้ามากด้วย

ค. เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ R_9 กับ Q_{69}

เพื่อให้เห็นถึงผลของกลูโคส่ต่อการเจริญและแอคติวิตีของ PA ที่แตกต่างกันระหว่าง Q_{69} กับ R_9 จึงได้นำกราฟการเจริญและการผลิตเอนไซม์ PA มาเปรียบเทียบกันอีกครั้งหนึ่ง ในรูปที่ 23 จะเห็นได้ว่า การกลายพันธุ์ช่วยให้แอคติวิตีสูงสุดของ PA เพิ่มขึ้นจากเดิม 5.8 เป็น 661.8 นาโนโมล PABA ต่อนาที ต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 114 เท่า ในขณะที่พบการเจริญสูงสุดยังคงเดิม และลักษณะการผลิต PA ที่สัมพันธ์กับการเจริญของ R_9 ในส่ภาวะนี้ เป็นเช่นเดียวกับ Q_{69} ที่เจริญใน LB กล่าวคือ ในช่วงแรกแอคติวิตีของ PA จะเพิ่มขึ้นตามการเจริญของแบคทีเรีย จนกระทั่งแอคติวิตีของ PA สูงสุด จากนั้นแอคติวิตีของ PA จะค่อย ๆ ลดต่ำลงในขณะที่ค่าความขุ่นคงที่

3.5.2 การตรวจส่อบแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส่ของ R_9

ในส่ภาวะที่พบแอคติวิตีสูงสุดของ PA ของ R_9 ได้นำเซลล์ไปตรวจส่อบแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส่ ผลปรากฏว่า ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ในส่ภาวะนี้แต่อย่างใด

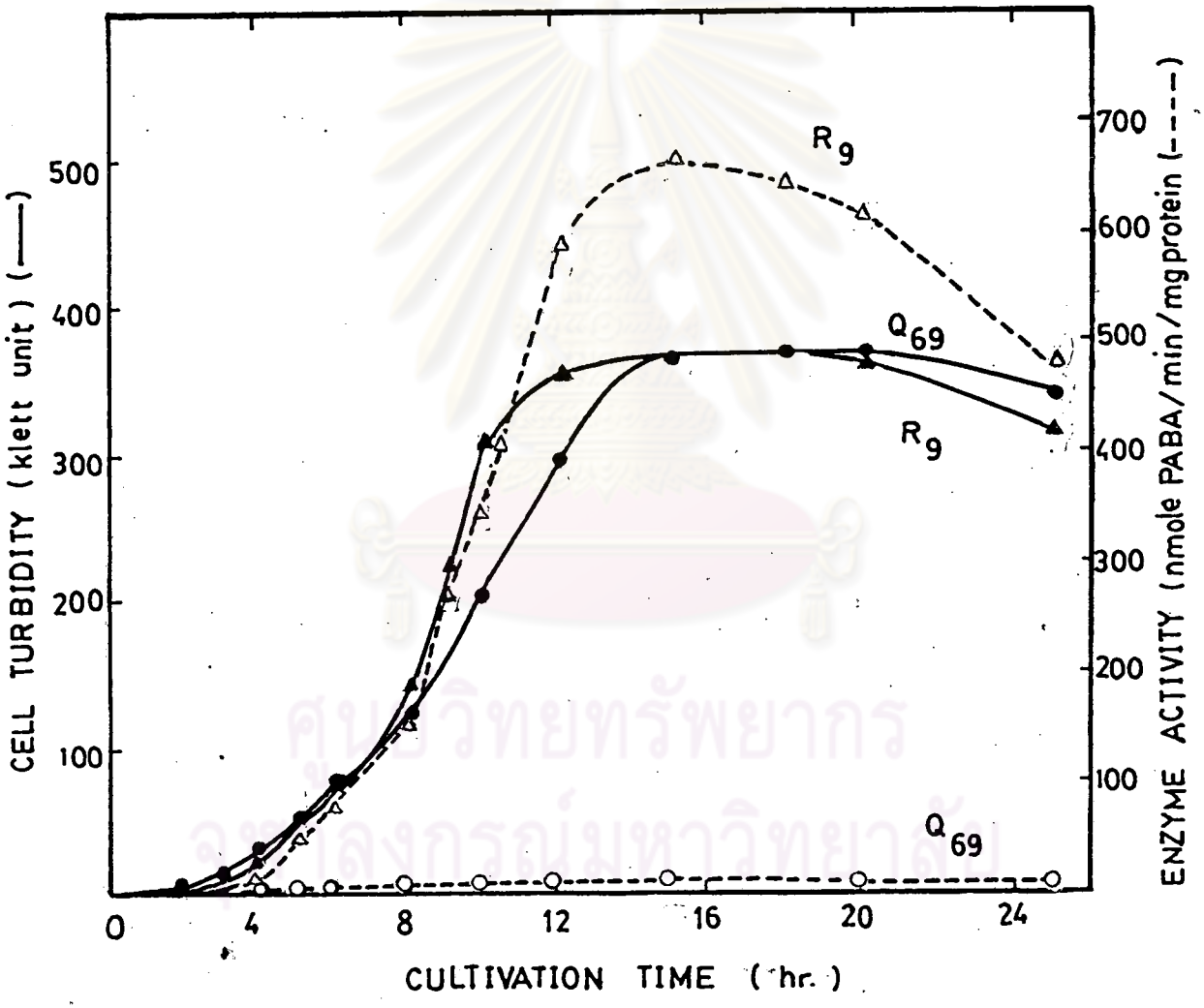
3.5.3 ส่มบัติของพลาส่มิดดีเอนเอ pJR 69 ของ R_9

ก. ตำแหน่งของความผิดปกติอันก่อให้เกิดคุณส่มบัติ Catabolite derepressed ของ R_9

เมื่อส่กัดพลาส่มิดดีเอนเอ pJR 69 จาก R_9 แล้วเคลื่อนย้ายเข้าสู่

รูปที่ 23 ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลสของ R_9 และ Q_{69} ในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส 0.2 %

เมื่อเจริญที่ 30°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญไปที่ 37°ซ. 2 ชั่วโมง จึงนำกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ.



E. coli C 600 จากนั้นทดสอบความสามารถในการผลิต PA ในเซลล์เจ้าเรือนตัวใหม่โดยวิธี Microbiological test พบว่า เมื่อเจริญบนอาหารอุดม LB สามารถสร้าง PA ได้ แต่ถ้าให้เจริญบนอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์จะไม่สามารถสร้าง PA ได้เลย แสดงว่าความผิดปกติอันก่อให้เกิดคุณสมบัติ Catabolite derepressed ของ R_9 นั้นอาจเกิดที่ main chromosome ของเซลล์เจ้าเรือนของ R_9 ไม่ใช่ที่พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 โดยตรง (รูปที่ 24)

ข. ขนาดและ Restriction site ของ pJR 69 ของ R_9

จากการตรวจสอบขนาดของพลาสมิดดีเอนเอ และ Restriction site ของ pJR 69 ของ R_9 เปรียบเทียบกับ pJR 69 ของ Q_{69} พบว่า พลาสมิดดีเอนเอจากทั้ง R_9 และ Q_{69} มีขนาดประมาณ 11 kb. ประกอบด้วย Hind III 1 site และ EcoRI 1 site โดยเมื่อย่อยด้วย Hind III และ EcoRI จะได้ชิ้น DNA 2 ขนาดคือ ประมาณ 7 และ 4 kb. (รูปที่ 25)

3.5.4 ความสามารถในการดำรงคุณสมบัติ Catabolite derepressed ของ R_9

ทดสอบความสามารถในการดำรงคุณสมบัติ Catabolite derepressed ของ R_9 โดย

ก. เก็บเชื้อในอาหารเหลว LB ที่มีกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ -20°ซ. นาน 2 เดือน ในระหว่างนั้น เมื่อนำมาเจริญในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส พบว่ายังคงสามารถผลิต PA ได้เหมือนเดิม

ข. สตรีค (streak) เชื้อบนอาหารแข็ง LB เสริมเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าใน passage แรกสามารถผลิต PA ได้เหมือนเดิม แต่ใน passage ที่สองสามารถผลิต PA ได้ลดลง และใน passage ที่สามไม่สามารถผลิต PA ได้เลย เมื่อตรวจสอบปริมาณพลาสมิดดีเอนเอโดยการสกัดพลาสมิดวิธีสัด พบว่าใน passage ที่สองมีปริมาณพลาสมิดดีเอนเอลดลง และใน passage ที่สามไม่มีพลาสมิดดีเอนเออยู่เลย

รูปที่ 24 การทดสอบการผลิต PA ของ R_9 และ E. coli C 600 ที่ได้รับพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก R_9 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ โดยวิธี Microbiological test

LB/Pen G	คือ	LB เสริมเพนนิซิลิน จี 200 µg/ml
LB/Glucose/Pen G	คือ	LB/Pen G เสริมกลูโคส 0.2 %
R_9	คือ	Catabolite derepressed mutant ซึ่งแยกได้จากการกลายพันธุ์ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต
R_9^*	คือ	E. coli C-600 ที่ได้รับพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก R_9

เจริญแบคทีเรียบนอาหารอุดมสูตรต่าง ๆ ที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วย 10 % (V/V) S. marcescens ATCC 27117 ใน nutrient soft agar ที่เสริมด้วยเพนนิซิลิน จี 5 mg/ml จำนวน 5 ml บ่มที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีที่ผลิต PA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 24 การทดสอบการผลิต PA ของ R_9 และ E. coli C 600 ที่ได้รับพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก R_9 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ โดยวิธี Microbiological test

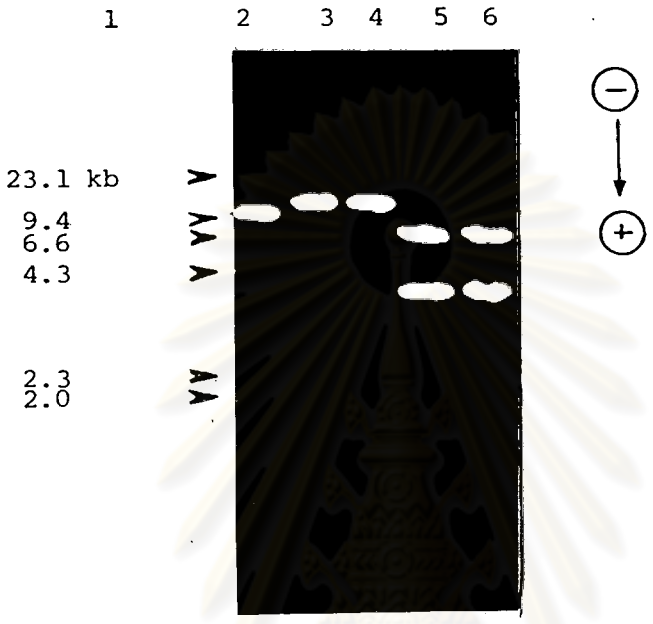
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LB/Pen G

LB/Glucose/Pen G

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 25 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ของ R_9 บน 0.7 % agarose gel electrophoresis



ช่องที่ 1 คือ standard λ DNA ซึ่งย่อยด้วย Hind III

" 2 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก R_9

" 3 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก R_9 ย่อยด้วย EcoR I

" 4 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก R_9 ย่อยด้วย Hind III

" 5 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก R_9 ย่อยด้วย Hind III และ EcoR I

" 6 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก Q_{69} ย่อยด้วย Hind III และ EcoR I

3.6 สมบัติของ Catabolite derepressed mutant S_5 (*E. coli* HB 101 ที่มี pJR 69) ซึ่งได้จากการกลายพันธุ์ Q_{69} ด้วย NTG

3.6.1 ลักษณะการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ S_5

ก. รูปแบบของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้บ่มเชื้อ

โดยการใช้การทดลองเพื่อหารูปแบบของการเจริญเพื่อให้ได้แอคติวิตีของ PA สูงสุดใน S_5 เช่นเดียวกับการทดลองใน Q_{69} พบว่า ถ้าเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยการเจริญที่ 37°ซ. 1 ชั่วโมงจะให้แอคติวิตีของ PA สูงสุดประมาณ 650.1 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 16) ค่าแอคติวิตีสูงสุดของ PA พบที่ Early Stationary phase ของแบคทีเรีย เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ดังรูปที่ 26

การเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอนเอใน S_5 อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนอุณหภูมิของการเจริญมีลักษณะสอดคล้องกับ Q_{69} (ตารางที่ 17)

อาจสรุปได้ว่า การเจริญ S_5 ที่ 30°ซ. จนกระทั่ง O.D.$_{660\ nm}$ประมาณ 0.1 หน่วย แล้วย้ายไปเจริญที่ 37°ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำกลับมาเจริญที่ 30°ซ. นั้นเป็นรูปแบบของอุณหภูมิที่ให้แอคติวิตีของ PA สูงสุด จึงได้ใช้รูปแบบของการบ่มเชื้อในลักษณะนี้ทุก ๆ การทดลองที่เกี่ยวข้องกับ S_5

ข. ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมตามข้อ ก. พบว่า S_5 มีคุณสมบัติการเจริญและให้แอคติวิตีของ PA เมื่อเจริญในอาหารอุดมเสริมและไม่เสริม PAA เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 18)

คุณสมบัติของS_5เมื่อเจริญใน LB เสริมด้วยกลูโคสก็เป็นเช่นเดียวกับ R_9 ยกเว้นแต่ว่า การเจริญสูงสุดพบเมื่อเสริมด้วยกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ แทน 0.2 เปอร์เซ็นต์ที่พบใน R_9 และแอคติวิตีสูงสุดของ PA เพิ่มขึ้นเป็น 651.2 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 18)

ค. เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ S_5 กับ Q_{69}

เพื่อให้เห็นถึงผลของกลูโคสต่อการเจริญ และแอคติวิตีของ PA ที่แตกต่าง

ตารางที่ 16 ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ S_5 เมื่อเจริญในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส 0.2 % เป็นเวลาทั้งสิ้น 15 ชั่วโมง ซึ่งเป็นจุดที่พบการเจริญและแอคติวิตีของ PA สูงสุด

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ	การเจริญสูงสุด (Klett unit)	แอคติวิตีสูงสุดของ (units/mg protein)
1. 30°ซ. (15 ช.ม.)	390 ± 3	87.5 ± 0.2
2. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (13 ช.ม.)	254 ± 2	350.2 ± 0.4
3. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. ($\frac{1}{2}$ ช.ม.) → 30°ซ. ($12\frac{1}{2}$ ช.ม.)	386 ± 2	589.0 ± 0.4
4. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (1 ช.ม.) → 30°ซ. (12 ช.ม.)	378 ± 4	650.1 ± 0.3
5. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (2 ช.ม.) → 30°ซ. (11 ช.ม.)	362 ± 2	621.3 ± 0.3
6. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (3 ช.ม.) 30°ซ. (10 ช.ม.)	358 ± 3	582.2 ± 0.2
7. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (5 ช.ม.) → 30°ซ. (8 ช.ม.)	330 ± 3	414.7 ± 0.3

หมายเหตุ * 1 unit คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 นาโนโมล PABA ต่อนาที เมื่อวัดโดยวิธีของ Szewezuk

ค่าแอคติวิตีสูงสุดพบในเซลล์ที่เจริญในระยะ Early stationary phase

2-7 การเปลี่ยนอุณหภูมิจากที่ 30°ซ. เป็นที่ 37°ซ. ก็เพื่อเพิ่มจำนวนชุดของพลาสมิดตีเอนเอ ดังนั้นการนำไปบ่มที่ 37°ซ. เวลาต่างกันก็คือการ amplify พลาสมิดตีเอนเอ ปริมาณต่างกันนั่นเอง

ตารางที่ 17 ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อปริมาณพลาสมิดดีเอนเอของ S_5 เปรียบเทียบกับ Q_{69} เมื่อเจริญในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส 0.2 % เป็นเวลาทั้งสิ้น 15 ชั่วโมง

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้บ่มเชื้อ	ปริมาณพลาสมิดดีเอนเอ (μg/cell 1 g. wet weight)	
	S_5	Q_{69}
1. 30°ซ. (15 ช.ม.)	25	25
2. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (13 ช.ม.)	375	375
3. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. ($\frac{1}{2}$ ช.ม.) → 30°ซ. ($12\frac{1}{2}$ ช.ม.)	50	50
4. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (1 ช.ม.) → 30°ซ. (12 ช.ม.)	100	100
5. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (2 ช.ม.) → 30°ซ. (11 ช.ม.)	150	150
6. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (3 ช.ม.) → 30°ซ. (10 ช.ม.)	200	200
7. 30°ซ. (2 ช.ม.) → 37°ซ. (5 ช.ม.) → 30°ซ. (8 ช.ม.)	250	250

หมายเหตุ * 1 unit คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 นาโนโมล PABA ต่อนาที เมื่อวัดโดยวิธีของ Szewezuk

ค่าแอคติวิตีสูงสุดพบในเซลล์ที่เจริญในระยะ Early stationary phase

2-7 การเปลี่ยนอุณหภูมิจากที่ 30°ซ. เป็นที่ 37°ซ. ก็เพื่อเพิ่มจำนวนชุดของพลาสมิดดีเอนเอ ดังนั้นการนำไปบ่มที่ 37°ซ. เวลาต่างกัน ก็คือการ amplify พลาสมิดดีเอนเอ ปริมาณต่างกันนั่นเอง

ตารางที่ 18 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ S_5 เมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอุณหภูมิไปที่ 37°ซ. 1 ชั่วโมง จึงนำกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ. 12 ชั่วโมง

อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญสูงสุด (Klett unit)	แอคติวิตีสูงสุดของ (units/mg protein)
LB	260 ± 4	360.0 ± 0.2
LB + PAA 0.1 %	260 ± 1	358.4 ± 0.3
LB + Glucose 0.2 %	378 ± 4	650.1 ± 0.3
LB + Glucose 0.5 %	392 ± 2	650.3 ± 0.3
LB + Glucose 1 %	410 ± 3	651.2 ± 0.2
LB + Glucose 2 %	411 ± 2	651.5 ± 0.4

หมายเหตุ * 1 unit คือ ปริมาณเอนเซม์ที่ทำให้เกิด 1 นาโนโมลของ PABA ต่อนาที เมื่อวัดโดยวิธีของ Szewezuk

ค่าแอคติวิตีสูงสุดพบในเซลล์ที่เจริญในระยะ Early stationary phase ภายหลังบ่มเชื้อเป็นเวลาทั้งสิ้น 15 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กันระหว่าง Q_{69} กับ S_5 จึงได้นำกราฟการเจริญและการผลิตเอนไซม์ PA มาเปรียบเทียบกันอีกครั้งหนึ่ง ในรูปที่ 26 จะเห็นได้ว่า การกลายพันธุ์ช่วยให้การเจริญสูงสุดเพิ่มขึ้นจากเดิม 360 เป็น 410 K.U. คิดเป็น 1.1 เท่า และยังช่วยให้แอคติวิตีสูงสุดของ PA เพิ่มขึ้นจากเดิม 5.8 เป็น 651.2 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 112 เท่า และลักษณะการผลิต PA ที่สัมพันธ์กับการเจริญของ S_5 ในสภาวะนี้เป็นเช่นเดียวกับ R_9 ดังกล่าวแล้วในข้อ 3.5.1 ค.

3.6.2 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมสของ S_5

ในสภาวะที่พบแอคติวิตีสูงสุดของ PA ของ S_5 ได้นำเซลล์ไปตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมส ผลปรากฏว่า ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ในสภาวะนี้แต่อย่างใด

3.6.3 สมบัติของพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ของ S_5

ก. ตำแหน่งของความผิดปกติอันก่อให้เกิดคุณสมบัติ Catabolite derepressed ของ S_5

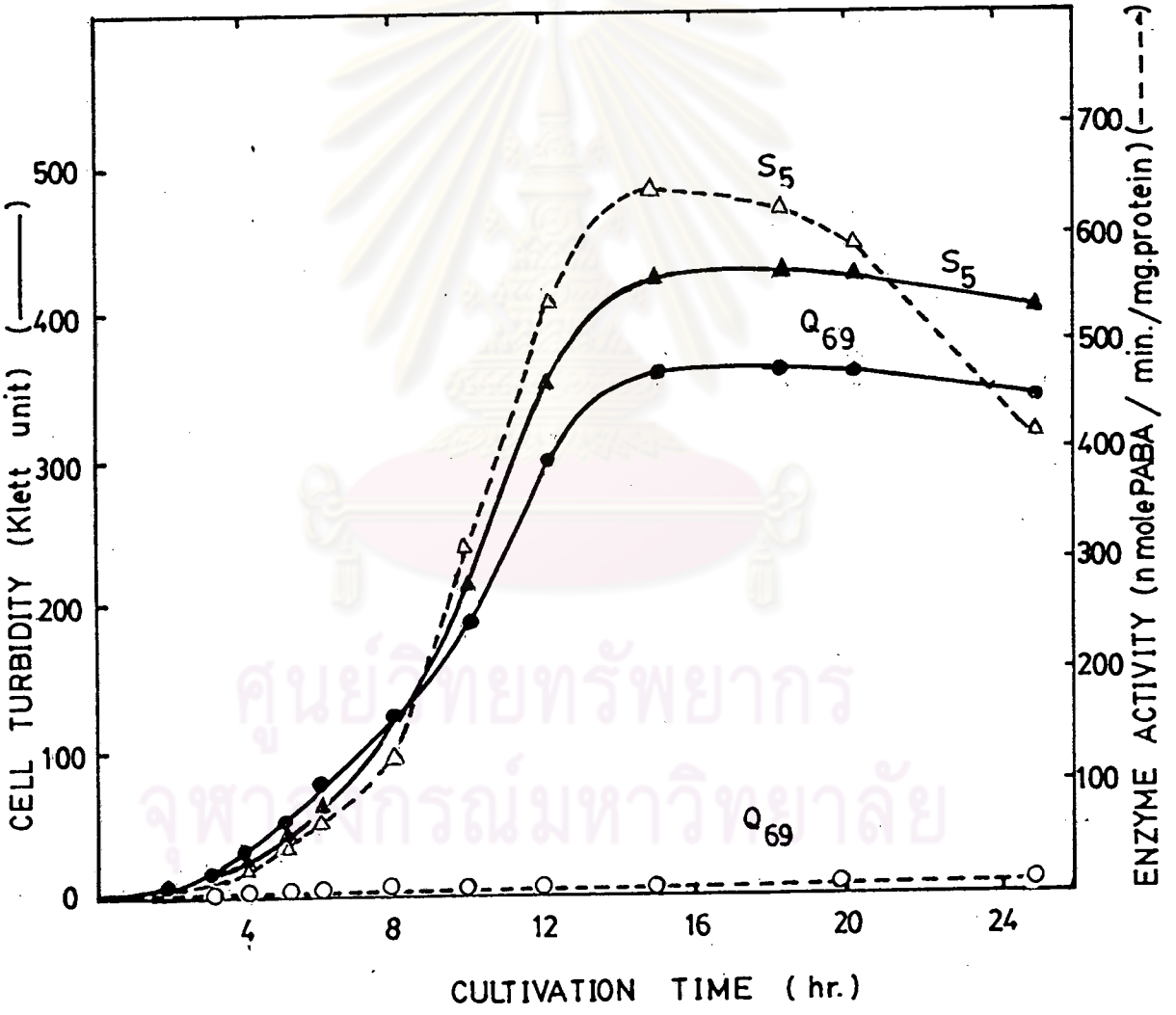
เมื่อสกัดพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก S_5 แล้วเคลื่อนย้ายเข้าสู่ *E. coli* HB 101 จากนั้นทดสอบความสามารถในการผลิต PA ในเซลล์เจ้าเรือนตัวใหม่โดยวิธี Microbiological test พบว่าเมื่อเจริญบนอาหารอุดม LB สามารถสร้าง PA ได้ และเมื่อเจริญบนอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายังคงสามารถสร้าง PA ได้ แต่มี inhibition zone indices เล็กกว่า S_5 ซึ่งยืนยันผลการทดลองโดยการใช้สภาวะการเจริญเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1 ก. ในอาหารอุดมเสริมกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าให้แอคติวิตีสูงสุดเพียง 159.3 นาโนโมล PABA ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งต่ำกว่า S_5 ประมาณ 4 เท่า แสดงว่าความผิดปกติอันก่อให้เกิดคุณสมบัติ Catabolite derepressed ของ S_5 นั้นอาจเกิดที่ main chromosome ของเซลล์เจ้าเรือนของ S_5 และที่พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ด้วย (รูปที่ 27)

ข. ขนาดและ Restriction site ของ pJR 69 ของ S_5

จากการตรวจสอบขนาดของพลาสมิดดีเอนเอ และ Restriction site ของ pJR 69 ของ S_5 เปรียบเทียบกับ pJR 69 ของ Q_{69} พบว่า พลาสมิดดีเอนเอจากทั้ง S_5 และ Q_{69} มีขนาดประมาณ 11 kb. ประกอบด้วย Hind III 1 site และ EcoR I

รูปที่ 26 ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ S_5 และ Q_{69} ในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส 1 %

เมื่อ S_5 เจริญที่ 30°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญไปที่ 37°ซ. 1 ชั่วโมง จึงนำกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ. และ Q_{69} ใช้ลักษณะเช่นเดียวกับ S_5 แต่เจริญที่ 37°ซ. 2 ชั่วโมง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 27 การทดสอบการผลิต PA ของ S_5 และ E. coli HB 101 ที่ได้รับพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก S_5 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ โดยวิธี Microbiological test

LB/Pen G คือ LB เสริมเพนนิซิลิน จี 200 µg/ml

LB/Glucose/Pen G คือ LB/Pen G เสริมกลูโคส 0.2 %

S_5 คือ Catabolite derepressed mutant ซึ่งแยกได้จากการกลายพันธุ์ Q_{69} ด้วย NTG

S_5^* คือ E. coli HB 101 ที่ได้รับพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก S_5

เจริญแบคทีเรียบนอาหารอุดมสูตรต่าง ๆ ที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วย 10 % (V/V) S. marcescens ATCC 27117 ใน nutrient soft agar ที่เสริมด้วยเพนนิซิลิน จี 5 mg/ml จำนวน 5 ml บ่มที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีที่ผลิต PA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 27 การทดสอบการผลิต PA ของ S_5 และ E. coli HB 101 ที่ได้รับพลาสมิดดีเอนเอจาก S_5 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ โดยวิธี Microbiological test

LB/Pen G

LB/Glucose/Pen G

site โดยเมื่อย่อยด้วย Hind III และ EcoRI จะได้ชิ้น DNA 2 ขนาดคือ ประมาณ 7 และ 4 kb. (รูปที่ 28)

3.6.4 ความสามารถในการดำรงคุณสมบัติ Catabolite derepressed ของ S_5

ทดสอบความสามารถในการดำรงคุณสมบัติ Catabolite derepressed ของ S_5 โดย

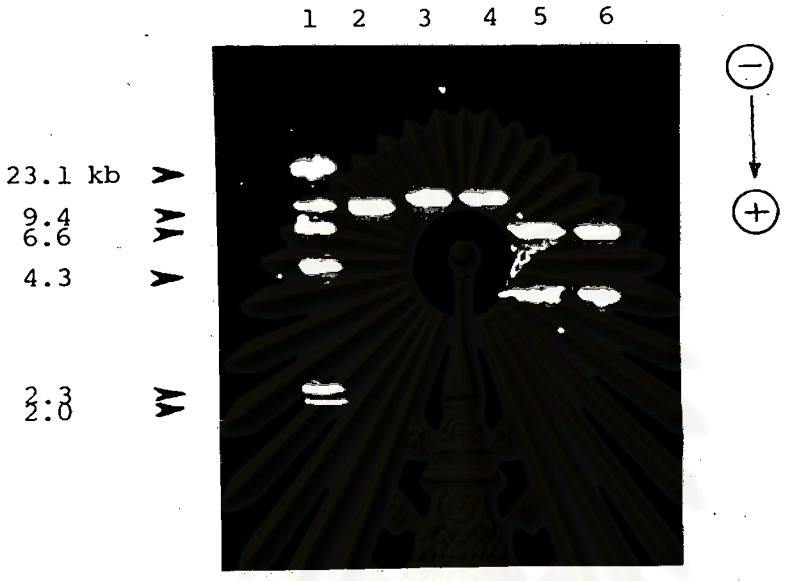
ก. เก็บเชื้อในอาหารเหลว LB ที่มีกลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์ -20°ซ. นาน 1 เดือน ในระหว่างนั้น เมื่อนำมาเจริญในอาหารอุดม LB เสริมกลูโคส พบว่า ยังคงสามารถผลิต PA ได้เหมือนเดิม

ข. สตรีค (streak) เชื้อบนอาหารแข็ง LB เสริมเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าใน 10 passage S_5 ยังคงสามารถผลิต PA และมีปริมาณพลาสมิดดีเอนเอเป็นปกติเช่นเดิม

3.7 เปรียบเทียบค่าแอคติวิตีสูงสุดของ PA เมื่อวัดโดยใช้สับสเตรทเป็นเพนนิซิลิน จี และ PAAB ใน E. coli ATCC 11105, Q_{69}, R_9 และ S_5

ตารางที่ 19 แสดงค่าแอคติวิตีของ PA ที่วัดโดยใช้สับสเตรทต่างกัน คิดเป็นหน่วยของเอนไซม์ต่อ 1 กรัมน้ำหนักเปียกของเซลล์ พบว่า ค่าที่ได้จากการวัดโดยวิธีของ Balasingham คือใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรท (มีหน่วยเป็นไมโครโมล 6-APA) มีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากการวัดโดยวิธีของ Szewezuk คือใช้ PAAB เป็นสับสเตรท (มีหน่วยเป็นไมโครโมลของ PABA) อยู่ประมาณ 2.0-2.3 เท่า ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันในทั้ง 4 สายพันธุ์ เป็นที่น่าสังเกตว่าความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ PA ที่ได้จาก E. coli ATCC 11105 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ได้จากการทำ Molecular cloning และการกลายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน เพราะเมื่อใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรทก็พบว่าค่าที่วัดได้สูงกว่าวัดเมื่อใช้ PAAB เป็นสับสเตรทประมาณ 2.0-2.3 เท่าเสมอ แสดงว่า การทำ Molecular cloning และการกลายพันธุ์ไม่ทำให้ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ PA เปลี่ยนแปลงไป

รูปที่ 28 ผลการศึกษาขนาดและ restriction site ของพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ของ S_5 บน 0.7 % agarose gel electrophoresis



ช่องที่ 1 คือ standard λ DNA ซึ่งย่อยด้วย Hind III

" 2 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก S_5

" 3 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก S_5 ย่อยด้วย EcoR I

" 4 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก S_5 ย่อยด้วย Hind III

" 5 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก S_5 ย่อยด้วย Hind III และ EcoR I

" 6 คือ พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก Q_{69} ย่อยด้วย Hind III และ EcoR I

ตารางที่ 19 แอคติวิตีสูงสุดของ PA ของ E. coli ATCC 11105, Q_{69}, R_9 และ S_5 เมื่อวัดโดยใช้สับสเตรทเป็น Phenyl acetyl-4-amino benzoic acid (วิธีของ Szewezuk) เปรียบเทียบกับเมื่อวัดโดยใช้สับสเตรทเป็น Penicillin G โดยตรง (วิธีของ Balasingham) แบคทีเรียทุกสายพันธุ์เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ โดยใช้สภาวะของอุณหภูมิที่ให้แอคติวิตีของ PA สูงที่สุดในแต่ละสายพันธุ์ ดังที่ระบุในผลการทดลองข้างต้น

E. coli ATCC 11105 คือ สายพันธุ์ Wild type ที่มียีน PA

Q_{69} คือ E. coli HB 101 ที่มี pJR 69 ซึ่งได้จากการ clone ยีน PA จาก E. coli ATCC 11105 ต่อเข้ากับ pSY 343

R_9 คือ Catabolite derepressed mutant ซึ่งแยกได้จากการกลายพันธุ์ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต

S_5 คือ Catabolite derepressed mutant ซึ่งแยกได้จากการกลายพันธุ์ Q_{69} ด้วย NTG

(1) วิธีของ Szewezuk คือ วัดแอคติวิตีของ PA โดยใช้ Phenyl acetyl-4-aminobenzoic acid เป็นสับสเตรท แอคติวิตี 1 unit หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของ PABA ต่อนาที

(2) วิธีของ Balasingham คือ วัดแอคติวิตีของ PA โดยใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรท แอคติวิตี 1 unit หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของ 6-APA ต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 แอคติวิตีสูงสุดของ PA ของ E. coli ATCC 11105, Q_{69}, R_9 และ S_5 เมื่อวัดโดยใช้สับสเตรทเป็น PAAB (วิธีของ Szewezuk) เปรียบเทียบกับเมื่อวัดโดยใช้สับสเตรทเป็นเพนนิซิลินจีโดยตรง (วิธีของ Balasingham)

ชื่อสายพันธุ์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญสูงสุด (Klett unit)	แอคติวิตีสูงสุดของ PA (units/g.cell wet weight)		Relative วิธี (2) / วิธี (1)
			วิธี (1)	วิธี (2)	
E. coli ATCC 11105	LB	383	0.3	0.6	2.0
	LB + PAA 0.1 %	405	2.9	6.7	2.3
	LB + Glucose 0.2 %	150	0.3	0.7	2.3
Q_{69}	LB	250	28.8	57.8	2.0
	LB + PAA 0.1 %	254	26.2	55.0	2.1
	LB + Glucose 0.2 %	360	0.4	0.8	2.0
R_9	LB	255	29.4	67.6	2.3
	LB + PAA 0.1 %	256	29.3	64.5	2.2
	LB + Glucose 0.2 %	360	50.3	105.6	2.1
S_5	LB	260	29.3	61.3	2.1
	LB + PAA 0.1 %	260	29.1	66.9	2.3
	LB + Glucose 1 %	410	49.5	108.9	2.2