บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

4.1 ปัญหาที่เกี่ยวข้องกับความเสถียร และแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสใน Q69 และ S5

จากการที่พบปัญหาเกี่ยวกับการลดลงของแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส จากที่เคยรายงานโดยนางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ ทั้ง ๆ ที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันนั้น อาจสันนิษฐานว่า

เนื่องจากเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสเป็นเอนไซม์หนึ่งในไม่กี่ชนิดใน E.coli ที่ต้องการกระบวนการ maturation อย่างซับซ้อน จึงจะทำหน้าที่ได้อย่างถูกต้อง (Bruns และคณะ, 1985) ดังนั้นการที่นำพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ที่มียีนเพนนิซิลิน เอซิเลสตัดจาก E.coli ATCC 11105 เข้า E.coli HB101 นั้น การเปลี่ยนแปลงเซลล์เจ้าเรือน จึงอาจให้ผลกระทบต่อการ maturation ได้

ครั้งแรกได้ลองพยายามเปลี่ยนสายพันธุ์ E.coli HB101 ให้เป็น E.coli BD817 ซึ่งมีความแตกต่างที่เด่นชัดคือ E.coli BD817 จะมีความบกพร่องที่ยีน ung โดยจะไม่ซ่อม uracil ขณะแปลรหัส ทั้งยังมียีน $R^- M^+$ ซึ่งหมายความว่าไม่มีการสร้าง endonuclease และมี DNA methylation ซึ่งจากลักษณะพิเศษดังกล่าว น่าจะทำให้พลาสมิดดีเอนเอมีความเสถียรมากขึ้น และมีคุณสมบัติเหมาะที่จะเป็นเซลล์เจ้าเรือนได้ดีกว่า E.coli HB101

แต่ครั้นเมื่อเปลี่ยนแปลงเซลล์เจ้าเรือนแล้ว สถานะการณ์ก็ไม่ดีขึ้น ตรงกันข้ามกลับเลวลงเรื่อง ๆ จนในที่สุดได้สูญเสียทั้งแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส และพลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69}

ในขณะที่กำลังค้นคว้าหาสาเหตุการลดลงของแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสนั้น เราได้พยายามใช้ความรู้เชิงเปรียบเทียบระหว่าง ความเป็นไปได้ในการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส กับการเพิ่มผลผลิตของ dna Z ถึง 100 เท่า เมื่อตัดดีเอนเอบางส่วนที่ไม่จำเป็นในการถอดรหัสของ dna Z ออกบ้าง (Yasuda และคณะ, 1983) และยังมีการทดลองสนับสนุนจาก Matsuda และ Komatsu ในปี 1985 แต่ทำการทดลองในยีน 7β-(4-Carboxy-

butanamide) Cephalosporanic acid ดังนั้นจึงได้พุ่งความสนใจไปที่ดีเอนเอส่วนเกินบนยีน เพนนิซิลิน เอซิเลส ซึ่งมีขนาดประมาณ 1 กิโลเบสติดกับปลาย EcoRI (Bruns และคณะ, 1985) ใน pJR_{69} จึงเกิดแนวความคิดจะสร้าง deletion mutant ขึ้นมา

4.2 ปัญหาเกี่ยวกับการสร้าง deletion mutant

การสร้าง deletion mutantได้ใช้หลักทำการทดลอง 2 แนวทาง คือ หาตำแหน่งของเอนไซม์เรสตริกชั่นที่เหมาะสมในการตัดดีเอนเอ ส่วนที่ไม่จำเป็นทิ้งไป หรือ อีกแนวทางหนึ่งคือใช้เอนไซม์ S_1 nuclease ย่อยดีเอนเอส่วนดังกล่าว

จากการทดลองพบว่า แผนผังเรสตริกชั่นของ pJR_{69} ดังที่รายงานไว้นั้น ไม่มีตำแหน่งใดที่เหมาะสมในการตัดดีเอนเอส่วนเกิน ซึ่งเป็นเป้าของการวิจัยได้เลย จึงได้เลี่ยงมาใช้ S_1 nuclease ปริมาณต่ำ ๆ แม้ว่าจะทราบดีว่า S_1 nucleaseนั้นจะตัดสายดีเอนเอที่เป็นรอยหักด้วยก็ตาม (Maniatis และคณะ, 1982)

ผลจากการแยกทรานสฟอรแมนท์ ซึ่งได้จากการทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอนเอที่ผ่านการย่อยด้วย S_1 nuclease แล้ว เป็นข้อยืนยันได้ว่า พลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} ที่ย่อยด้วย EcoRI ก่อนนำมาย่อยด้วย S_1 nuclease คงมีรอยหักหลายตำแหน่ง แต่อย่างไรก็ตาม ยังนับว่าโชคดีที่ได้พบทรานสฟอรแมนท์ที่เหมาะสมตัวหนึ่งคือ VU1/9 เมื่อสกัดพลาสมิดดีเอนเอ ปรากฏว่าพบพลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} ขนาด 5.5 กิโลเบส ซึ่งสามารถถอดรหัสของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส แล้วพบแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ ปรากฏการณ์เช่นนี้ต้องนับว่าพิเศษจริง ๆ เพราะขณะนั้นสายพันธุ์ที่มี pJR_{69} ได้สูญเสีย แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ไปหมดสิ้นแล้ว แต่น่าสังเกตว่าพลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} ในสายพันธุ์ VU1/9 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ที่เป็นเช่นนี้คาดว่ายีนบางส่วนของ ori ที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของพลาสมิดดีเอนเอ บน pCR_{28} อาจจะถูก S_1 nuclease ตัดออกไป

ด้วยเหตุนี้เองทำให้เราเชื่อว่าจะต้องสร้างพลาสมิดดีเอนเอลูกผสมขึ้นมาใหม่อีกครั้ง โดยการนำยีนเพนนิซิลิน เอซิเลสจาก pCR_{28} มารวมกับยีนดีเอนเอที่มี ori จาก pSY343

จากการหาแผนผังเรสตริกชั่นของ pCR_{28} (รูปที่ 15) ได้คาดหวังว่า ยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส ควรจะอยู่ติดกับปลาย Hind III จึงได้ตัดยีนดีเอนเอ Hind III Bgl II ขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส แล้วนำมาเชื่อมกับยีนดีเอนเอ Hind III Bam HI ที่คาดว่ามี ori อยู่ ขนาดประมาณ 7.5 กิโลเบส (รูปที่ 16)

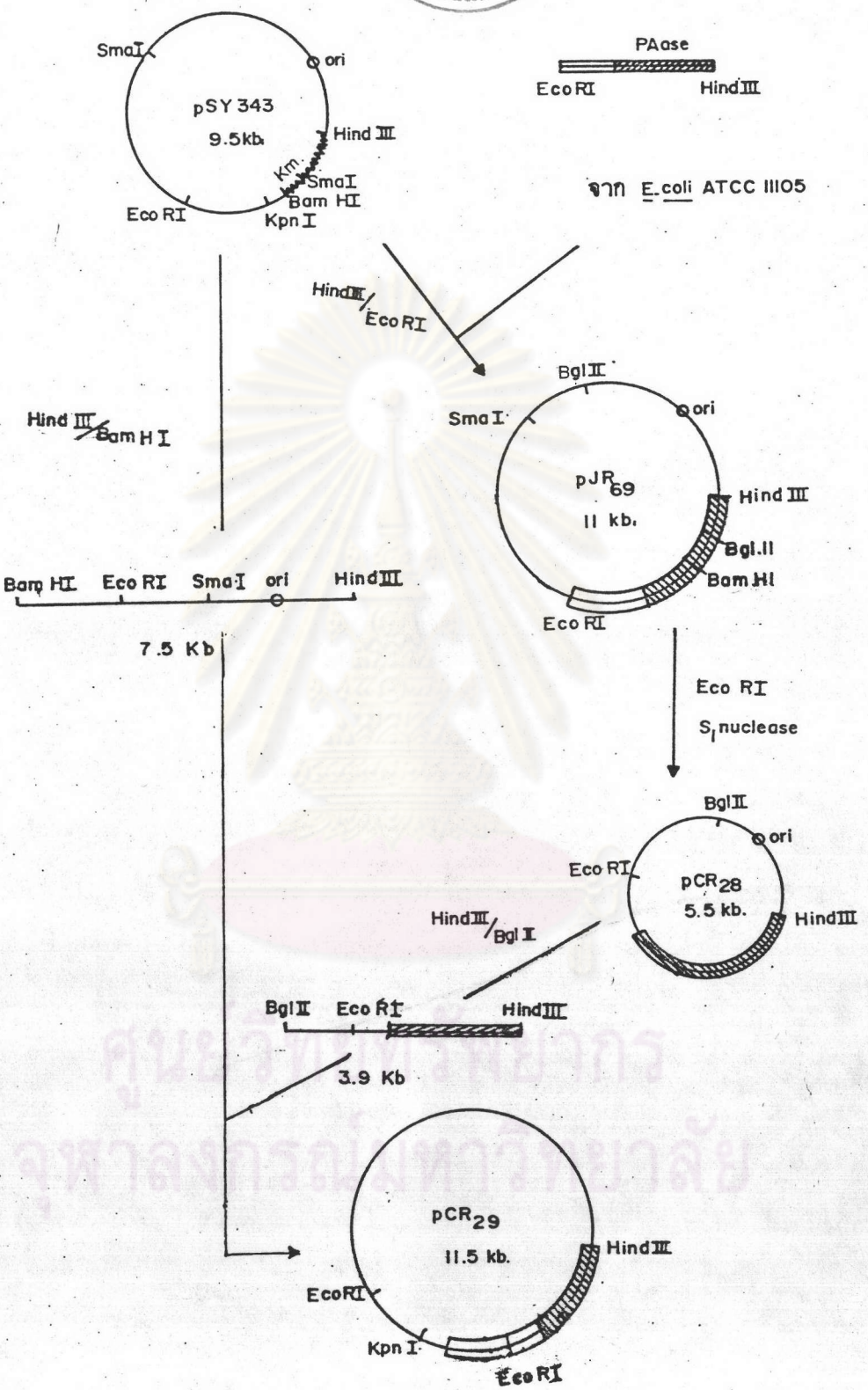
ด้วยเหตุว่า pSY343 เป็นพลาส์มิดดีเอนเอที่ค่อนข้างเส่ถียร และให้แอคติวิตีในการต้านยา คานามัยซินสูง ทั้งยังเพิ่มปริมาณพลาส์มิดดีเอนเอได้สูงอีกด้วย (Yasuda และคณะ, 1983; Matsuda และ Komatsu, 1985) ดังนั้นในการส่ร้างพลาส์มิดดีเอนเอลูกผส่มขึ้นใหม่นี้จึงได้พยายามคงยีนส่วนของ pSY343 ไว้ให้มากที่สุด โดยใช้ตำแหน่งเอนไซม์เรส่ตริกชั่น Hind III Bam HI เพื่อตัดยีนต้านยาคานามัยซิน ออกโดยไม่รบกวนดีเอนเอส่วนที่เหลือ ซึ่งต่างจากการส่ร้าง pJR_{69} ที่ได้ต่อยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส่ในตำแหน่งที่ pSY343 ถูกตัดดีเอนเอที่นอกเหนือจากยีนต้านยาคานามัยซินออกไปด้วยอีกประมาณ 0.5-1 กิโลเบส่ ดังนั้นจากลักษณะพลาส์มิดดีเอนเอลูกผส่มที่ส่ร้างขึ้นใหม่นี้น่าจะมีความส่ามารถในการถอดรหัส่ยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส่ให้เอนไซม์ที่ทำงานได้ดี นอกจากนี้ยังเพิ่มจำนวนพลาส์มิดดีเอนเอได้ และน่าจะมีความเส่ถียรมากขึ้นกว่า pJR_{69}

พบว่าส่มมุติฐานที่คาดไว้เป็นความจริง เนื่องจากส่ามารถแยกได้ส่ายพันธุ์ W21 จากการส่ร้างพลาส์มิดดีเอนเอดังกล่าว และยังพบด้วยว่า แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส่มากกว่า E.coli ATCC 11105 ประมาณ 21 เท่า เมื่อเจริญทั้งส่องส่ายพันธุ์ใน LB เส่ริม PAA 0.02% และ $MgCl_2$ 1 mM (ตารางที่ 21) และพลาส์มิดดีเอนเอ pCR_{29} ที่ส่กัดจากนั้นพบว่ามีขนาดประมาณ 11.5 กิโลเบส่ และมีความส่ามารถเพิ่มจำนวนได้ (รูปที่ 18) หลังจากถ่ายเชื้อ (subculture) ไป 20 ครั้ง ก็ยังคงพบพลาส์มิดดีเอนเอ pCR_{29} และยังคงพบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส่ เช่นเดิม (ผลการส่ร้างพลาส์มิดดีเอนเอ รวมไว้ในรูปที่ 26)

จากการพิจารณารูปแบบของการเจริญและแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส่เทียบกับ Q69 และ S5 นั้น พบว่า มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 20, 7 และ 8 ตามลำดับ) นอกจากนั้นในขณะที่มีการเพิ่มจำนวน พลาส์มิดดีเอนเอที่ 37 °ซ. อัตราการเจริญก็ต่ำลงมากด้วยซึ่งส่อดคล้องกับรายงานของ Uhlin และคณะในปี 1979 ซึ่งได้ทำการทดลองกับพลาส์มิดดีเอนเออนุพันธ์ของ pSY343 เช่นเดียวกัน

4.3 <u>ปัญหาเกี่ยวกับการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส่ใน W21</u>

น่าสังเกตว่า ในการเจริญเซลล์เพื่อหาแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส่ ตามวิธีของนางส่าวจรัญญา เงินประเส่ริฐศิรินั้น ได้ใช้อาหารสู่ตร LB (ไม่เส่ริม PAA) เพียงอย่างเดียว แต่ทว่า เราได้พบปรากฏการณ์ที่แตกต่างไปตั้งแต่แยก VU1/9 และ V1/7 กล่าวคือส่ายพันธุ์ทั้งส่อง



รูปที่ 26 แสดงการสร้างพลาสมิด ดีเอนเอ pJR_{69}, pCR_{28} และ pCR_{29}

ต้องการ PAA อยู่ด้วย จึงจะให้แอคติวิตีเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส (รูปที่ 12.1 และ 12.3) และในกรณีของ W21 ก็พบปรากฏการณ์ที่เป็นเช่นเดียวกันนี้ ดังนั้นเป็นเรื่องที่เข้าใจได้ไม่ยากนัก กล่าวคือ เราเชื่อว่าการสร้าง pJR_{69} นั้น อาจจะมิได้ตัด Regulatory gene ของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส จาก E.coli ATCC 11105 มาด้วย (วิทยานิพนธ์ ของนางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ) แต่การทำ subculture ไปนาน ๆ E.coli อาจจะพัฒนา Regulatory gene ของเพนนิซิลิน เอซิเลสได้ หรืออีกประการหนึ่งอาจเป็นไปได้ว่า โปรตีนบางชนิดของเซลล์เจ้าเรือนเองมีการปรับรูปร่างให้มีลักษณะคล้ายกับโปรตีนกดตัน ของโอเปอรอนยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส ดังนั้นโปรตีนดังกล่าวจึงมีความสามารถจับกับโอเปอเรเตอร์ยีนบนโอเปอรอนของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส จากสมมุติฐานดังกล่าวจึงอาจจะอธิบายได้ว่า เหตุใด สายพันธุ์ VU1/9, V1/7 และ W21 จึงต้องการตัวชักนำ เหมือนใน E.coli ATCC 11105 ต้นตอเดิม

ได้มีการรายงานมาล่วงหน้าแล้วว่า เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสนั้น เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน Pen G ให้เป็น PAA และ 6-APA (Vandamme, 1980) ดังสมการ

$$\text{Penicillin G} \xrightarrow{\text{PAase}} \text{PAA} + \text{6-APA}$$

ซึ่งมีค่า Km 0.02 (Vandamme, 1980) ดังนั้นถ้าเป็นไปตามนี้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ก็น่าจะขึ้นกับ อัตราส่วนของ PAA/Pen G ด้วย แม้ว่าอยู่ในสภาพของ whole cell ก็ตาม การที่พบว่า การสร้างวงใสใน VU1/9 นั้นปรับเปลี่ยนไปตามอัตราส่วนของPAA/Pen G. คือถ้ามี PAA/Pen G. = 0.54/1 ค่าวงใสจะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.3 ซม. PAA/Pen G. = 5.4/1 วงใสจะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ดังนั้น การพบวงใสใน in vivo จึงให้ผลเช่นเดียวกับผลจาก in vitro (ตารางที่ 7)

จากรายงานของ Caulcott และคณะในปี ค.ศ. 1985 ได้กล่าวว่า Magnesium ที่เติมลงในอาหาร มีบทบาทสำคัญในการทำให้พลาสมิดดีเอนเอ มีความเสถียรมากขึ้น ต่อมายังได้พบว่า $MgCl_2$ ที่เพิ่มลงในอาหารในการทดลองนี้ ได้ช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสขึ้น 2 เท่า (ตารางที่ 5) ปรากฏการณ์นี้ คาดได้ว่า Mg^{2+} นอกจากจะไปมีบทบาททำให้พลาสมิดดีเอนเอมีความเสถียรมากขึ้นแล้ว Mg^{2+} ยังไปช่วยเป็น แอคติเวเตอร์ของกระบวนการใดกระบวนการหนึ่งที่มีผลให้แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส เพิ่มขึ้น โดยอาจจะทำให้

conformation ของโปรตีนในผนังเซลล์เหมาะกับการขนส่ง เพนนิซิลินจี เข้าเซลล์ และยังอาจช่วยทำให้ conformation ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ maturation ตามโมเดลของ Randall และคณะ ที่ได้รายงานไว้ในปีค.ศ. 1984 ให้มีรูปร่างที่เหมาะสมกับการทำงานอีกด้วย (รูปที่ 4)

นอกจากนี้ยังพบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงขึ้น 2 เท่า เมื่อทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะขาดอาหาร และเพิ่ม เพนนิซิลินจี 100 ไมโครกรัมต่อมล. เป็นปัจจัยร่วมในการทำให้เซลล์เกิดความเครียด ปรากฏการณ์นี้อาจตั้งสมมุติฐานว่า ppGpp ซึ่งมีรายงานว่าเซลล์จะผลิตขึ้น ขณะที่เซลล์กำลังขาดอาหารนั้น จะไปเบ็ดโอเปอรอนต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต รวมทั้งยังไปกระตุ้นการทำงานของ Starvation dependent protease ซึ่งจะมีหน้าที่ย่อยโปรตีนชนิดต่าง ๆ (Davis และ Dulbecco, 1980) ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่าส่วนหนึ่งของเอนไซม์ที่เซลล์สร้างขึ้นมา เพื่อดำรงชีวิตให้อยู่รอดในสภาวะที่มีเพนนิซิลินจีด้วยนั้นน่าจะมีทั้งโปรเพนนิซิลิน เอซิเลส และเอนไซม์ proteolytic ที่จำเป็นต่อการ maturation ของเพนนิซิลิน เอซิเลส เพื่อเร่งทำลายเพนนิซิลิน จี ที่ผ่านเข้าเซลล์ ดังนั้นจึงพบ แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงขึ้น

จากการเพิ่มของแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยการปรับปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าว ทำให้ W21 มีแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลินเพิ่มจาก E.coli ATCC 11105 ประมาณ 21 เท่าแล้ว การเพิ่มขึ้นของ แอคติวิตีรวม ก็นับว่ามีความสำคัญอันหนึ่ง เช่นกัน ในกรณี Q69 และ S5 ของนางสาวจรัญญา เงินประเสริฐศิริ อาศัยการมิวเตชั่น Q69 ด้วย NTGได้สายพันธุ์ S5 ซึ่งมีสมบัติ Catabolic derepress ดังนั้น จึงเพิ่ม glucose ลงในอาหารที่เลี้ยง ทำให้เพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 250 KU ใน Q69 เป็น 410 KU ใน S5 (รูปที่ 7 และ 8) สำหรับสายพันธุ์ W21 ยังไม่มี คุณสมบัติเกี่ยวกับ Catabolic กล่าวคือเมื่อเสริม glucose ลงในอาหารจะพบแอคติวิตีของ เพนนิซิลิน เอซิเลสลดลง (ตารางที่ 5) การวิจัยนี้ได้เพิ่มแอคติวิตีรวมโดยการเพิ่มความขุ่นก่อนนำเซลล์เพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอ หลังจากนั้นยังได้ปรับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มพลาสมิดดีเอนเอ อีกด้วย ทำให้ได้ความขุ่นเพิ่มจาก 425 KU เป็น 600 KU (ตารางที่ 8)

4.4 ปัญหาเกี่ยวกับเพิ่มจำนวนพลาสมิด ดีเอนเอ

แม้ว่าจะได้พบสภาวะที่ทำให้ แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของ W21 เพิ่มขึ้นจากค่าต่ำ ๆ (ตารางที่ 5) จนสูงถึง 450 nmole PABA/min/ml คัลเจอร์ และ 715 nmole PABA/min/ml คัลเจอร์แล้วก็ตาม แต่เราก็คาดว่าน่าจะมีทางเพิ่มให้สูงได้มากกว่านี้ เนื่องด้วยเหตุนี้จึงสันนิษฐานว่า การขยายจำนวนยุดของพลาสมิดในสายพันธุ์ E.coli BD817 อาจน้อยเกินไป จึงได้พยายามหาสายพันธุ์ขึ้นมาใหม่ที่อาจขยายจำนวนพลาสมิดได้เพิ่มสูงขึ้น โดยอาศัยหลักการที่ว่า สายพันธุ์ใดที่มีจำนวนยุดของพลาสมิดมากกว่า ย่อมจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลสมากกว่า ดังนั้นจึงน่าจะทน เพนนิซิลินจี ในปริมาณสูงได้ดีกว่าด้วย ซึ่งถ้าเป็นจริงก็จะเป็นข้อได้เปรียบในการเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการได้โดยวิธีการ sibling

ผลจากการ sibling ครั้งที่ 1 โดยการฆ่าเซลล์ที่อยู่ใน log phase ด้วยเพนนิซิลิน จี 5 มก.ต่อมล. ปรากฏว่าแยกได้สายพันธุ์ X25 ซึ่งมีแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลส = 810 nmole PABA/min/mg. protein และด้วยหลักการเดียวกันนั้นได้ทำ sibling อีกครั้งหนึ่ง โดยฆ่าเซลล์ X25 ด้วยเพนนิซิลิน จี 10 มก.ต่อมล. จึงคัดได้สายพันธุ์ Y324 ซึ่งมีแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส 1111 nmole PABA/min/mg. protein จะเห็นว่าอาศัยการ sibling นี้จะสามารถเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่เกิด spontaneus mutation ขึ้นแล้วได้คุณสมบัติที่เหมาะสมตามความต้องการดังกล่าวโดยไม่ต้องใช้การกลายพันธุ์ใด ๆ จากการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพของการเลือกมิวแตนท์ที่ได้ ทั้งรุ่น X25 และ Y324 จะมีประสิทธิภาพประมาณ 10^{-5} และ 10^{-6} ของจำนวนเซลล์ที่ใช้เลือกตามลำดับ จะเห็นว่าเป็นค่าที่เป็นไปได้ของการเกิด spontaneus mutation ซึ่งเป็นจริงตามหลักการของการ sibling selection

นอกจาก sibling selection จะเป็นวิธีการที่ง่าย เหมาะที่จะแยกสายพันธุ์ที่มีจำนวนยุดของพลาสมิดดีเอนเอ pCR_{29} จำนวนสูงแล้ว ยังเป็นวิธีการที่ป้องกันการสูญเสียความเสถียรของพลาสมิด ดีเอนเอไปในตัวอีกด้วย เพราะทุกครั้งที่ sibling จะคัดเลือกสายพันธุ์ที่เสถียรโดยฆ่าสายพันธุ์ที่เพิ่มพลาสมิด ดีเอนเอ จำนวนยุดน้อยและที่ขาดความเสถียรจากสายพันธุ์ที่ได้จากกระบวนการ sibling เป็นข้อพิสูจน์ได้ว่า การตัดต่อยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส จาก E.coli ATCC 11105 มาต่อกับ run away replication plasmid นั้นเป็นวิธีการที่มีข้อได้เปรียบสูง กล่าวคือ สามารถเพิ่มจำนวนยุดโดยการเปลี่ยนอุณหภูมิการเลี้ยงแบคทีเรียจาก

30° ไปเป็น 37°ซ. ดังนั้นจึงไม่มีผลข้างเคียง เช่นเดียวกับการขยายจำนวนชุดของพลาสมิดดีเอนเอ ดังเช่นพลาสมิดพาหะตัวอื่น ๆ ที่นิยมใช้อยู่เช่น pBR 322 หรืออนุพันธ์ของมันก็ตาม นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนชุดโดยปรับอุณหภูมิจาก 30° ไปเป็น 37°ซ. นั้น ต้องทำที่เซลล์ในระยะเริ่มต้น (early phase) จึงไม่พัวพันกับกระบวนการถอดรหัสของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส รวมทั้งยังให้ประโยชน์กับการเพิ่ม แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส โดยกลไกบางอย่างอีกด้วย ตัวอย่างเช่น ถ้าเป็นการเพิ่มชุดพลาสมิดดีเอนเอ โดยบทบาทของ Chloramphenicol อาจจะต้องเพิ่มจำนวนชุดณ. late log phase จะเห็นว่านอกจากจะต้องเติมยาปฏิชีวนะเข้ามาในคัลเจอร์แล้ว ยังต้องมาเกี่ยวพันกับ maturation ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสอีกด้วย ซึ่งเราคาดว่า maturation ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสนี้เกิดได้ดีในขณะทำ Starvation ของเซลล์

อีกประการหนึ่ง การที่ใช้ run away plasmid ที่สามารถขยายจำนวนชุด จากการปรับอุณหภูมิ 30°ซ. ไปเป็น 37°ซ. นั้น ทำให้แยกกระบวนการเรพลิเคชั่นออกไปจากกระบวนการถอดรหัส และแปลรหัสผลก็คือ สามารถปรับตัวแปรต่าง ๆ ได้หลายตัวแปร ตัวอย่างเช่น เพิ่มความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นก่อนขยายจำนวนชุดของพลาสมิดดีเอนเอก็ช่วยทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส มีปริมาณสูงขึ้น หรือการทำ starvation ก็ทำได้ในคัลเจอร์แทบทุกวัฏภาค (phase) (ตารางที่ 8) ประการสุดท้ายจากการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา แลคตาเมส ใน W21ปรากฏว่าไม่พบ แอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งนับว่าเป็นสมบัติที่ดีอีกประการหนึ่งของ W21

<u>สรุปผลการวิจัย</u>

1. ได้สร้าง deletion mutant โดยการทรานสฟอรม deletion plasmid จากการย่อย pJR_{69} ที่เปิดปลาย EcoRI และย่อยต่อด้วย S_1 nuclease ซึ่ง deletion mutant ที่นำมาศึกษาให้ชื่อว่า VU1/9 และ V1/7 ทั้งสองสายพันธุ์มีสมบัติต่างกัน ทั้งความสามารถในการให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และขนาดของพลาสมิดดีเอนเอ

2. ได้สร้างพลาสมิดดีเอนเอ pCR_{29} จากชิ้นส่วนของ pSY343 และชิ้นส่วนของ pCR_{28} ได้พลาสมิดตัวใหม่มีชื่อว่า pCR_{29} ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้เช่นเดียวกับ pCR_{28} เมื่อทดสอบความเสถียรของ pCR_{29} และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสหลังจาก subculture ไป 20 ครั้ง ก็ยังคงพบสมบัติทั้งสองคงสภาพเดิม

3. สายพันธุ์ W21 (E.coli BD817 ที่มี pCR_{29}) จะสามารถให้แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสสูงสุด เมื่อเจริญใน LB เสริม $MgCl_2$ 1 mM PAA 0.02%จนได้ความขุ่น 45 KU แล้วจึงนำไปเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอที่ 37°ซ. 2 ชม. ทำ 4 ชม. และให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 500 nmolePABA/min/mg. protein ช่วงที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดคือช่วงหลังจากเจริญเซลล์ไปแล้ว 15 ถึง 20 ชม.

4. โดยอาศัยหลักการของ sibling selection ทำให้สามารถสร้างวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่คงความเสถียร และเพิ่มจำนวนชุดของพลาสมิด ดีเอนเอ pCR_{29} ไว้ได้ ดังที่ได้ทำการแยก X25 จาก W21และ Y324 จาก X25 ตัวแปรของการถอดการแปลรหัสของ X25 และ Y324 เหมือน W21 ยกเว้นแต่ว่า แอคติวิตีสูงสุดมีค่าเท่ากับ 810 nmolePABA/min/mg. protein ใน X25 และ 1111 nmolePABA/min/mg. protein ใน Y324 ตามลำดับ

5. โดยการปรับค่าความขุ่นของเซลล์ ในกระบวนการขยายจำนวนชุดจากพลาสมิดดีเอนเอ จะสามารถเพิ่มความขุ่นสูงสุดของ W21, X25 และ Y324 จากปกติ 425 KU ไปเป็น 600 KU ซึ่งเป็นการเพิ่มแอคติวิตีรวมของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสอีกวิธีหนึ่ง

ข้อเสนอแนะของการวิจัย

เพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จากสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้จากการวิจัยนี้ สามารถทำได้โดยการทำ sibling selectionเลือกบน LB เสริม PAA 0.02% $MgCl_2$ 1 mM และ เพนนิซิลินจีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ ๆ ตราบเท่าที่ ปริมาณเพนนิซิลินจีนั้นไม่มีผลต่อการหยุดยั้งการเจริญของเซลล์