หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง และสรุปผลการวิจัย

1. การรอดชีวิตของ Phage P1 ในบัฟเฟอร์ที่ 4 °ซ

โดยปรกติ Bacteriophage จะสูญเสียการดื้นตัว (biological activity) ได้ง่าย เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน ปัจจัยภายนอกต่าง ๆ เช่น pH , ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ,ชนิดของบัฟเฟอร์ และอุณหภูมิที่ใช้เก็บ จะมีบทบาทต่อการอยู่รอดของมัน (Billing,E.1969) จากผลการทดลองหาเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของ Phage P1 เมื่อเก็บไว้ในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 ที่ 4 °ซ พบว่า ไตเตอร์ของ Phage P1 ค่อย ๆ ลดลงตามเวลาที่เก็บ อย่างไรก็ดี ในเวลา 1 สัปดาห์ ไตเตอร์นี้จะลดลงเพียง 24 เปอร์เซนต์ จึงนับว่า วิธีเตรียม และ เก็บ Phage P1 ที่ใช้นี้ดีพอสมควร และเพียงพอที่จะใช้ในการเก็บ Phage P1 สำหรับการทดลองตลอดทุกขั้นตอนได้

2. ประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำยีนของ Phage P1

จากผลการทดลองพบว่า เปอร์เซนต์การเหนี่ยวนำยีนของ Phage P1 เมื่อใช้ Klebsiella pneumoniae เป็นเซลเจ้าเรือน จะมีค่าแปรปรวนระหว่าง 1.6-6.8 $\times 10^{-5}$ ขึ้นกับขนาดของ m.o.i. ที่ใช้ เมื่อเทียบค่าที่ได้นี้ กับค่าเปอร์เซนต์การเหนี่ยวนำยีนที่พบเมื่อใช้ Escherichia coli เป็นเซลเจ้าเรือน คือ 1.00-1 $\times 10^{-5}$ (Lennox,E.S. 1955) จะเห็นได้ว่า Phage P1 จะเหนี่ยวนำยีนเข้า Klebsiella pneumoniae ได้ต่ำกว่าของ Escherichia coli เล็กน้อย อย่างไรก็ตาม ค่าที่ได้นี้ ก็สอดคล้องกับค่าที่รายงานไว้จาก Goldberg,R.B.;Bender,R.A.;and Streicher,S.L.(1974) , Streicher,S.;Gurney,E.;and Valentine,R.C.(1971).

การเหนี่ยวนำยีนของ Phage P1 เป็นแบบ generalized transduction (Stent,G.S.,and Calender,R.1978)กล่าวคือ โอกาสที่จะเหนี่ยวนำยีนทุกส่วนของโครโมโซมของเซลเจ้าเรือนมีเท่าเทียมกัน และมีความสามารถที่จะนำยีนได้เท่ากับขนาดโครโมโซมที่ส่วนหัวของมัน คือ ประมาณ 66 X 10^6 ดัลตัน (Yarmolimsky,M.B. 1977) เนื่องจาก โครโมโซมของแบคทีเรียมีขนาดประมาณ 2.5 X 10^9 ดัลตัน (Mandelstam,J.,and Mc.Quillen,K.1976) ดังนั้น การที่เปอร์เซนต์เหนี่ยวนำยีนเท่ากับ 1.6-6.8 X 10^{-5} โอกาสที่จะได้ทรานสดัคแตนท์จึงเท่ากับ1.6-6.8X10^{-7} ด้วยเหตุนี้ ในขั้นตอนการทดลองกลายพันธุ์ และ เหนี่ยวนำยีน จึงจำเป็นต้องเตรียม Phage P1ไว้ให้มีจำนวนมากพอที่จะทำทรานสดัคชั่นที่ m.o.i. มีค่ามากกว่า 1.0 เพื่อจำนวนทรานสดัคแตนท์ขั้นสุดท้ายจะได้มีมากพอ และโอกาสได้มิวแตนท์ที่ต้องการสูงพอสมควรด้วย

3. <u>การเหนี่ยวนำยีนโดย Phage P1 ที่กลายพันธุ์</u>

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า ระหว่างขั้นตอนของการกลายพันธุ์ มีการสูญเสียไตเตอร์ของ Phage P1 มาเป็นลำดับ จนถึงขั้นตอนสุดท้ายก่อนนำมาเหนี่ยวนำยีน เหลือ Phage P1 อยู่เพียง 0.6 เปอร์เซนต์ ของ Phage P1 เริ่มต้น ดังนั้น เพื่อจะให้ได้จำนวน Phage P1 มากถึง 1 X 10^{10} ก่อนการทรานสดัคชั่น (เพื่อมี m.o.i. มากกว่า 1) จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเตรียม Phage P1 เริ่มต้นการทดลองให้มีไตเตอร์สูงมาก คือ อย่างน้อย ต้องไม่ต่ำกว่า 1 X 10^{12} การใช้ไตเตอร์ที่ต่ำกว่านี้ จะมีผลให้โอกาสที่จะคัดเลือกได้มิวแตนท์ที่ต้องการ ประสบความล้มเหลว

วิธีการเพิ่มไตเตอร์ของ Phage P1 มีสองแบบ คือ การใช้อาหารแข็ง และอาหารเหลว (Swanstrom,M.,and Adams,M.H.1951 , Wolf,B.;Newman,A.;and Glaser,D.A.1968) ทั้งสองวิธี จะให้ไตเตอร์สูงสุดประมาณ 1 - 5 X 10^{11} ต่อมิลลิลิตร ดังนั้น จึงจำเป็นต้องเตรียมเพิ่มจำนวน Phage P1 ให้มีปริมาตรมาก ๆ แล้วจึงตกตะกอนโดยใช้ PEG กับ โซเดียมคลอไรด์ จากนั้นจึงกระจายตัวในบัฟเฟอร์ที่มีปริมาณลดลง 10 ถึง 100 เท่า จึงจะได้ Phage P1 ที่มี ไตเตอร์สูงถึง 10^{12} ตามต้องการ

จากการทดลองนี้พบว่า Polyethylene Glycol 4000 มีความสามารถในการตกตะกอน Phage P1 ได้ 40 - 60 เปอร์เซนต์

ข้อมูลที่ได้เกี่ยวกับรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Phage P1 ในช่วงการกลายพันธุ์ เป็นจุดสำคัญยิ่งของการคัดเลือกมิวแตนท์โดยวิธีการนี้ ความระมัดระวังในทุกขั้นตอนของการทดลอง และ ความถูกต้องแม่นยำในการประเมินค่าทรานสดัคแตนท์ที่จะได้ เป็นส่วนสำคัญที่สุดในความสำเร็จของการแยกมิวแตนท์ในขั้นปลาย

4. ลักษณะทั่ว ๆ ไป ของมิวแตนท์ที่แยกได้

การเลือกใช้ Hydroxylamine เป็นมิวตาเจน สำหรับขบวนการกลายพันธุ์นี้ สืบเนื่องจากกลไกการกลายพันธุ์ของ Hydroxylamine มีฤทธิ์อ่อน คือ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เบสตัวเดียวในนิวคลีโอไทด์ โดยเฉพาะไซโตซีน และ คุณสมบัติการให้ lethal effect น้อยกว่า (Freese,E.;Bautz,E.;and Freese,E.B.1961) และ โอกาสที่จะได้มิวแตนท์ที่เกิดจาก point mutation มีมาก ซึ่งตรงข้ามกับการใช้มิวตาเจนอื่น เช่น N-methyl-N'-mitro-N-nitrosoguanidineซึ่งมีผลให้เกิด double mutation หรือ deletion มากกว่า (Adelberg,E.A.;Mandel,M.; and Chen,G.C.C,1965)

จากผลการคัดเลือกมิวแตนท์จากอาหารแข็งที่มีสารต้นตอไนโตรเจนจำกัด พบลักษณะโคโลนีซึ่งปรากฏต่างจาก wild typeอย่างเห็นได้ชัดสองแบบ คือ แบบที่หนึ่ง ให้โคโลนีใส แบนราบ และมีขนาดเล็ก ซึ่งลักษณะดังกล่าวเหมือนกับลักษณะของ nif มิวแตนท์ ซึ่ง Streicher,S.;Gurney,E.;and Valentine,R.C.(1971) พบจากการกลายพันธุ์ Klebsiella pneumoniae M5a1 ด้วย N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine (NTG)ส่วนแบบที่สอง ให้โคโลนีขุ่น นูน และมีสีน้ำตาลเหมือนกับ wild type ต่างกันเฉพาะขนาดที่เล็กกว่าเท่านั้น การปรากฏสีของโคโลนีเป็นสีน้ำตาล ชี้บ่งว่ามิวแตนท์พวกนี้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ เพราะเอนไซม์ไนโตรจีเนส ประกอบด้วย Iron sulfur โปรตีน เป็นส่วนสำคัญ และการสะสมของเอนไซม์นี้จำนวน

มาก ทำให้สีน้ำตาลของโปรตีนดังกล่าวเด่นชัดขึ้น (Streicher,S.,and Valentine, R.C.1976)

5. คุณสมบัติของ nif มิวแตนท์

5.1 การเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

การที่พบว่า nif มิวแตนท์ ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน ชี้บ่งว่า การกลายพันธุ์ทำให้ Klebsiella pneumoniae M5a1 สูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนส เมื่อเติมต้นตอไนโตรเจนปริมาณจำกัดลงในอาหารแล้ว พบโคโลนีแบนราบ ขนาดเล็ก แสดงว่า เซลเจริญได้บ้างจากปริมาณไนโตรเจนที่เติมลงไป ซึ่งลักษณะแตกต่างจาก wild type ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้อย่างชัดเจน

ผลการทดสอบการให้สีบน 6-Cyanopurine เพลท พบว่า nif มิวแตนท์จะให้สีต่างกันเป็นสามกลุ่ม คือ สีม่วงเข้ม สีม่วงอ่อน และ สีขาว ผลการทดลองนี้เทียบได้กับการทดลองของ MacNeil,D.,and Brill,W.J.(1973) ซึ่งเขาได้ใช้ 6-Cyanopurine เป็นตัวแจงจีโนไทป์ของ nif มิวแตนท์ โดยพบว่า มิวแตนท์ที่ให้สีขาวบน 6-Cyanopurine เพลท เป็นมิวแตนท์ที่มีความผิดปรกติที่ยีนควบคุม (Regulatory gene) เพราะมิวแตนท์พวกนี้ นอกจากไม่พบแอคติวิตี้ของการรีดิวส์อะเซทีลีนแล้ว ยังไม่พบ nif โปรตีนถูกถอดระหัสอีกด้วย (Roberts,G.P.,et al.1978) สำหรับมิวแตนท์ที่ให้สีม่วง พบว่ามีความผิดปรกติที่ยีนโครงสร้าง (structural gene) มิวแตนท์พวกนี้ ถ้าเสริมด้วย component บางอย่าง จะหวลคืนแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีน in vitro ได้ โดยใช้ความรู้ดังกล่าวในการเปรียบเทียบจะพบว่า ในจำนวน nif มิวแตนท์ 50 ตัว ที่นำมาทดสอบ 11 ตัวซึ่งให้สีขาวบน 6-Cyanopurine เพลท ควรมีความผิดปรกติที่ยีนควบคุม และอีก 39 ตัว ที่ให้สีม่วงบน 6-Cyanopurine เพลท ควรมีความผิดปรกติที่ยีนโครงสร้าง

5.2 การเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

จากการหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยวัดความสามารถในการรีดิวส์อะเซทีลีน ของ nif มิวแตนท์ที่ได้จากการเจริญเติบโต เมื่อเติมกลูตามีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงไปด้วยนั้น พบว่า แม้ความขุ่นของเซลจะสูง 0.1 - 0.2 หน่วย $O.D._{420}$ แต่ก็ไม่ปรากฏแอคติวิตี้ของการรีดิวส์อะเซทีลีน ในขณะที่ wild type ภายใต้สภาวะเดียวกัน พบแอคติวิตี้สูงถึง 6.0 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง แสดงว่า ความสามารถในการเจริญเติบโตของ nif มิวแตนท์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจนยังคงอยู่ และข้อชี้แนะที่ตามมาก็คือ ขบวนการให้พลังงานและอำนาจรีดิวส์ ของมิวแตนท์มิได้สูญเสียไปแต่อย่างใด เหตุผลที่สนับสนุนคำอธิบายนี้อีกอย่างหนึ่ง ก็คือ ความล้มเหลวในการเจริญเติบโตของ nif มิวแตนท์ ถ้าปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน เพราะในสภาวะอันนี้ เซลจะต้องสร้างอนุมูลแอมโมเนียมขึ้นใช้เอง

5.3 การหาเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่น กับ his D

การที่พบว่า nif มิวแตนท์ ให้ค่าเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นแตกต่างกันตั้งแต่ 45 - 85 เปอร์เซนต์ ให้ความหมายได้เป็นสองนัย คือ หนึ่ง ยืนการตรึงไนโตรเจนควรอยู่รวมกันเป็นโอเปอรอนใหญ่ใกล้ยีนการสังเคราะห์ฮีสติดีน สอง ตำแหน่งความผิดปรกติของยีนของ nif มิวแตนท์บนโอเปอรอนไนโตรจีเนสต่างกัน เนื่องจากเซลตัวรับเป็นตัวเดียวกัน คือ his D ดังนั้น nif มิวแตนท์ที่ให้ค่าเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นสูง ๆ ควรหมายความว่า มียีนที่ผิดปรกตินั้นอยู่ใกล้ his มากกว่าตัวที่มีเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นต่ำ ข้อที่น่าสังเกต คือ เมื่อเปรียบเทียบค่าเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่น กับการให้สีบน 6-Cyanopurine เพลท จะพบว่า nif มิวแตนท์ที่ให้สีขาวบน 6-Cyanopurine เพลทซึ่งมีความผิดปรกติที่ยีนควบคุม จะอยู่ใกล้ his มากที่สุด ส่วน nif มิวแตนท์ที่ให้สีม่วงบน 6-Cyanopurine เพลท จะมีตำแหน่งไกลออกไป ข้อมูลนี้เป็นเช่นเดียวกับข้อมูลที่ได้จากการหาตำแหน่งแผนผังกรรมพันธุ์ของโอเปอรอนของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยการใช้วิธีการทางพันธุศาสตร์ของคนอื่น ๆ(MacNeil,T.,et al.1978)

5.4 การคอนจูเกท ระหว่าง nif มิวแตนท์ กับ Escherichia coli K12 JC5466 (RP41)

Escherichia coli K12 JC5466 มี RP41 เป็น P พลาสมิด ซึ่งนำยีนต้านยาสามชนิด คือ คานามัยซิน แอมพิซิลลิน และ เตตราซัยคลิน พร้อมยีน nif^+ และ his^- (Dixon,R.;Cannon,F.;and Kondorosi,A.1976) RP41 นี้ เป็นพลาสมิดที่มีขอบเขตของเซลเจ้าเรือนกว้าง (Datta,N.,and Hedges,R.W.1972) จึงควรที่จะเคลื่อนย้ายข้ามสายพันธุ์แบคทีเรียได้ พบว่า RP41 เคลื่อนเข้าสู่ nif มิวแตนท์ได้ด้วยความถี่ $1 - 5 \times 10^{-4}$ ต่อแบคทีเรียตัวรับ 1 ตัว คุณสมบัติซึ่งบ่งชี้ว่า พลาสมิดดังกล่าวเคลื่อนเข้าสู่ nif มิวแตนท์จริง คือ การพบความสามารถต้านยาปฏิชีวนะทั้งสามชนิดเกิดขึ้นทันทีในรีคอมบิแนนท์ที่แยกได้ นอกจากนี้ ยังเชื่อว่า ยีนไนโตรจีเนสก็ถูกนำตามเข้าไปด้วย เนื่องจากรีคอมบิแนนท์ทุกตัวสามารถเจริญได้ในอาหารที่ปราศจากต้นตอไนโตรเจนแล้ว ให้ลักษณะโคโลนีเหมือน wild type ทุกประการ

ผลการทดลองนี้ ยังแสดงว่า การคอนจูเกทข้ามสายพันธุ์ระหว่าง Klebsiella pneumoniaeและ Escherichia coli เกิดขึ้นได้ และ nif^+ จาก P พลาสมิด ที่เคลื่อนย้ายตามเข้าไป สามารถถอดถ่ายระหัสเป็นเอนไซม์ไนโตรจีเนสทดแทนส่วนที่ถูกกลายพันธุ์ไปได้ด้วย

5.5 การเจริญเติบโตของรีคอมบิแนนท์ และ wild type ในภาวะตรึงไนโตรเจน

ในการคอนจูเกทพลาสมิดต้านยาที่มีnif^+ เข้าสู่ nif มิวแตนท์นั้น ถ้าเซลเจ้าเรือนเดิมสามารถเคลื่อนพลาสมิด 1 หน่วย เข้าสู่ nif มิวแตนท์ 1 เซลแล้ว ย่อมแสดงว่า รีคอมบิแนนท์ที่ได้ ควรจะมียีนการตรึงไนโตรเจนอยู่เป็นสองเท่าของเดิม แต่จากผลการติดตามลักษณะการเจริญเติบโตของ wild type และ รีคอมบิแนนท์ภายใต้ภาวะการตรึงไนโตรเจน พบว่า การเจริญของรีคอมบิแนนท์กลับช้ากว่า wild type เสมอ ในทุกระดับความเข้มข้นของกลูตามีน ย่อมแสดงว่า แม้จะได้รับยีนการตรึง

ไนโตรเจนเพิ่มขึ้น แต่ยังมีความไม่สมบูรณ์บางประการในกลไกการถอดระหัสการตรึงไนโตรเจน อยู่

ถ้าพิจารณาถึงรูปแบบการตรึงไนโตรเจน จากแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีน เห็นได้ว่า ทั้ง wild type และ รีคอมบิแนนท์ มีรูปแบบเหมือนกัน กล่าวคือ มีแอคติวิตี้สูงสุดที่ประมาณกึ่งกลางระยะเจริญพันธุ์ และแอคติวิตี้จะลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเซลเข้าสู่ stationary phase ข้อมูลนี้ชี้แนะว่า พลาสมิดและโครโมโซม น่าจะมีขบวนการถอดระหัสเป็นเอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นแบบเดียวกัน

5.6 การตรึงไนโตรเจนของรีคอมบิแนนท์ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน

ทราบกันแล้วว่า เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกถอดระหัสได้ ถ้ามีปริมาณสารต้นตอไนโตรเจนต่ำลง (Parejko,R.A.;and Wilson,P.W.1970) ดังนั้น การวัดแอคติวิตี้ของการรีดิวส์อะเซทีลีนของเซลที่เจริญภายใต้บรรยากาศอาร์กอน แทนบรรยากาศไนโตรเจน จึงเน้นการทดสอบปริมาณของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ได้จากการถอดและแปลระหัส โดยอาศัยปริมาณจำกัดของกลูตามีนเท่านั้น ผลการทดลองพบว่า การเจริญตั้งแต่ต้นจนถึงจุด ที่ให้แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนสูงสุดของทั้ง wild type และรีคอมบิแนนท์ จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด สิ่งที่พบแตกต่างกัน คือ ค่าแอคติวิตี้สูงสุดของ wild type เดิม จะสูงกว่าของรีคอมบิแนนท์ที่ได้อย่างมีนัยสำคัญ สิ่งเหล่านี้ชี้แนะว่า อาจมีความแตกต่างของกลไกการถอดระหัส หรือ ความคงตัวของโปรตีนที่ถูกถอดระหัสระหว่าง wild type และ รีคอมบิแนนท์

เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตี้จำเพาะของการรีดิวส์อะเซทีลีนของรีคอมบิแนนท์กับเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่น และ การให้สีบน 6-Cyanopurine เพลท ของ nif มิวแตนท์เดิม พบข้อที่น่าสนใจ คือ รีคอมบิแนนท์ที่มาจาก nif มิวแตนท์ที่ให้สีขาว ซึ่งผิดปรกติที่ยีนควบคุม จะมีแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนสูงกว่ากลุ่มที่มาจาก nif มิวแตนท์ที่ให้สีม่วง และ ผิดปรกติที่ยีนโครงสร้าง ข้อมูลนี้ชี้แนะว่า โอกาสซึ่งยีนของพลาสมิดและ ของโครโมโซมถูกถอดถ่ายระหัสออกมา น่าจะเท่าเทียมกัน แต่ความแตกต่างเกิดที่

เอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ถูกถอดระหัสออกมามีความตื่นตัวต่างกัน กล่าวคือ โปรตีนที่ถอดระหัสจากมิวแตนท์ที่มีความผิดปรกติที่ยีนควบคุม น่าจะตื่นตัวทั้งหมด จึงสามารถถอดแบบได้ยีนโครงสร้างที่มีความตื่นตัวต่อการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด แต่ใน nif มิวแตนท์ที่ผิดปรกติที่ยีนโครงสร้าง เมื่อถูกสั่งการ จะถอดระหัสได้โปรตีนที่ตื่นตัว และ ไม่ตื่นตัวปนกัน แอคติวิตี้ของการรีดิวส์อะเซทีลีนที่ได้จึงต่ำลง

สรุปได้ว่า การใช้พลาสมิดต้านยาที่มียีนการตรึงไนโตรเจนอยู่ด้วย อาจใช้เป็นสื่อจำแนกความแตกต่างของจีโนไทป์ของ nif มิวแตนท์ได้

6. การทดสอบคุณสมบัติของ partial nif มิวแตนท์

6.1 คุณสมบัติเบื้องต้น

จากลักษณะการเจริญ และ สีของโคโลนีของ partial nif มิวแตนท์ ซึ่งไม่ต่างจาก wild type บนอาหารที่ไม่มีต้นตอไนโตรเจน แสดงว่า partial nif มิวแตนท์ มีการสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนสได้ แต่ที่พบขนาดโคโลนีเล็กกว่า อาจเนื่องมาจาก มีการตรึงไนโตรเจนต่ำลง หรือ การนำผลผลิตขั้นปลายของการตรึงไนโตรเจนไปใช้ได้ไม่เต็มที่

ผลการหาแอคติวิตี้ของการรีดิวส์อะเซทีลีนในอาหารที่มี และ ไม่มีกลูตามีน พบว่า P2 มีแอคติวิตี้สูง ใกล้เคียงกับ wild type ขณะที่ P4 และ P7 มีแอคติวิตี้ต่ำกว่า บ่งชี้ว่า มิวแตนท์ทั้งสามตัวนี้ มีเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ตื่นตัว แต่มีประสิทธิภาพแตกต่างกัน

6.2 การตรึงไนโตรเจนเมื่อ มีสารต้นตอคาร์บอนต่างชนิดกัน

การที่รูปแบบในการใช้สารต้นตอคาร์บอนสามชนิด คือ กลูโคส แมนนิทอล และ กลูโคเนท ของ P2 ไม่ต่างจาก wild type และมีแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนเกิดได้มากตามปรกติ แต่การเจริญของเซลช้าและต่ำกว่า wild type ควรจะหมายความ

ว่า ความสามารถในการผลิต ATP และ อำนาจรีดิวส์ เพื่อป้อนปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนของมิวแตนท์ตัวนี้ ควรเหมือนกันกับ wild type ดังนั้น เมื่อมิวแตนท์ให้ค่าเจริญตัวสูงสุดต่ำกว่า wild type ขณะที่ค่าแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนเท่า ๆ กัน น่าจะหมายความว่า มิวแตนท์ได้ใช้ ATP และ อีเลคตรอนที่ถูกส่งมา เพื่อผลิตอนุมูล - แอมโมเนียมไม่เต็มที่ หรือ หย่อนประสิทธิภาพ เมื่อเทียบกับ wild type อันที่จริงแล้ว ความหมายอีกอย่างหนึ่งก็คือ ทั้งมิวแตนท์และ wild type มีการตรึงไนโตรเจนเหมือนกัน แต่ต่างกันที่การนำเอาอนุมูลแอมโมเนียมไปใช้ กล่าวคือ มิวแตนท์ใช้อนุมูลแอมโมเนียมเพื่อการเจริญเติบโตต่ำกว่า wild type สำหรับในกรณีหลังนี้ เราทราบกันแล้วว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องมีอยู่สองตัว คือ Glutamine synthetase และ Glutamate synthase (Nagatani,H.;Shimizu,M.;and Valentine,R.C.1971)และ เอนไซม์ทั้งสองตัวนี้ ถูกตรึงตำแหน่งยีนห่างไปจากโอเปอรอนของฮีสติดีน (Bachmann,B.J.; Low,K.B.;and Taylor,A.S.1976) จึงไม่น่าจะเข้ามามีบทบาทในตัวมิวแตนท์ที่แยกได้นี้ สรุปก็คือ P2 และ wild type ควรมีความแตกต่างกันที่ความสามารถในการนำเอาอำนาจการรีดิวส์ และ ปริมาณ ATPไปเปลี่ยนเป็นอนุมูลแอมโมเนียมนั่นเอง

จากการศึกษาที่ผ่านมา เกี่ยวกับตำแหน่งเกาะติด (binding site) ของสับสเตรทต่าง ๆ ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส in vitro พบว่า อย่างน้อยที่สุด จะมีตำแหน่งเกาะติดของสับสเตรทของเอนไซม์ตัวนี้ 5 ตำแหน่ง (Zumft,W.G.,and Mortenson,L.E.1975)ในจำนวนนี้ ตำแหน่งเกาะติดของไนโตรเจน และ อะเซทีลีนเป็นคนละตำแหน่งกัน ดังนั้น ถ้าการกลายพันธุ์เกิดที่ตำแหน่งการรีดิวส์ไนโตรเจนตำแหน่งเดียว การรีดิวส์อะเซทีลีนก็จะคงเป็นปรกติ แต่การเจริญของเซลจะต่ำลง เนื่องจากการรีดิวส์ไนโตรเจนเป็นอนุมูลแอมโมเนียมเกิดน้อยลง อย่างไรก็ดี เนื่องจากการส่งผ่านอีเลคตรอน และ การป้อนพลังงานจากกลูโคสเกิดขึ้นได้ปรกติ แต่การรีดิวส์ไนโตรเจนลดลง จะเกิดการสะสมของอีเลคตรอนมากขึ้นในเซล ซึ่ง Dalton,H.,and Mortenson, L.E. (1972) เชื่อว่า กรณีเช่นนี้ ปฏิกิริยา ATP-dependent Hydrogen Evolution น่าจะเกิดมากขึ้น

สำหรับ P4 และ P7 นั้น มีรูปแบบของการรีดิวส์อะเซทีลีนต่ำ การเจริญของเซลสูงตามปรกติ แต่การใช้สารต้นตอคาร์บอนสามชนิดไม่ต่างกันเลย ซึ่งผลที่ได้นี้ต่างจาก wild type อย่างชัดเจน ข้อมูลนี้อาจแสดงว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำ ATP และ อำนาจการรีดิวส์มาใช้ มีความผิดปรกติบางประการ ทำให้แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนต่ำลง ขณะที่การเจริญของเซลปรกติ ส่วนความขุ่นของเซลซึ่งเท่า ๆ กัน อาจมาจากสาเหตุหลายประการ เช่น การสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนสเกิดน้อยลง แต่ประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนอาจดีขึ้น หรือ การเจริญเติบโตสืบเนื่องจากการใช้กลูตามีนเป็นสารต้นตอไนโตรเจนเป็นส่วนมาก หรือ สาเหตุที่ยังอธิบายไม่ได้อื่น ๆ

แม้ผลที่ทดลองที่ได้ ไม่สามารถสรุปตำแหน่งการผิดปรกติของยีนได้แน่ชัด แต่สิ่งที่น่าสนใจ คือ การพบโคโลนีที่เล็กลงของ partial nif มิวแตนท์ มีผลมาจากลักษณะสองประการ คือ การมีแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนต่ำ แต่เซลเจริญได้ดี และมี - แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนสูงขณะที่เซลเจริญได้น้อย

6.3 ประสิทธิภาพในการใช้กลูโคสของ partial nif มิวแตนท์ เทียบกับ wild type

การทดลองนี้ ไม่เติมต้นตอไนโตรเจนลงในอาหารที่ทดสอบ เพื่อแน่ใจว่า การเจริญของเซลที่วัดได้ทั้งหมด ต้องได้อนุมูลแอมโมเนียมมาจากการตรึงไนโตรเจนเท่านั้น

ผลการทดลองพบว่า ปริมาณกลูโคสที่ใช้ของ wild typeและ partial nif มิวแตนท์ทั้งสาม ไม่มีความต่างกัน กล่าวคือ สามารถใช้กลูโคสได้เท่ากัน เมื่อเซลเจริญถึง stationary phase แต่อัตราการใช้กลูโคสของ wild typeเร็วกว่า partial nif มิวแตนท์ ชี้บ่งว่า การเมตาบอไลส์กลูโคส เพื่อป้อนพลังงานแก่ขบวนการตรึงไนโตรเจน ไม่แตกต่างกัน

การทดสอบใน P2 พบว่า มีความแตกต่างของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสที่ใช้ กับ ความขุ่นของเซลอย่างเห็นได้ชัด และมีนัยสำคัญทางสถิติ สนับสนุนสมมติฐานในข้อ 6.2 ที่ว่า น่าจะเกิดความผิดปรกติที่ตำแหน่งการเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียม หรือ การนำแอมโมเนียมไปใช้ และ ไม่น่าจะมีความผิดปรกติของการนำ ATP หรือ อำนาจการรีดิวส์มาใช้ เพราะการรีดิวส์อะเซทีลีนเป็นเอทีลีน ยังคงเกิดได้ตามปรกติ ฉะนั้น ตำแหน่งเกาะติดของอะเซทีลีน , ATP และ อำนาจการรีดิวส์ควรจะไม่เปลี่ยนแปลง

สำหรับ P4 และ P7 นั้น พบแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนต่ำ ขณะที่เซลสามารถเจริญได้ แม้ไม่มีต้นตอไนโตรเจน ย่อมแสดงว่า มีการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นได้ตามปรกติ ฉะนั้น น่าจะผิดปรกติที่ยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับตำแหน่งเกาะติด หรือ การรีดิวส์ - อะเซทีลีน หรือ การเปลี่ยนแปลงที่ทำให้ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น แม้จะมีปริมาณเอนไซม์ลดลง

แม้การอธิบายผลที่ได้จากการทดสอบ partial nif มิวแตนท์ ยังหาข้อสรุปไม่ได้ แต่จากการพบคุณสมบัติเหล่านี้ ช่วยให้มองเห็นว่า ระบบการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส มีความสลับซับซ้อน และน่าศึกษาอย่างยิ่ง เชื่อว่า มิวแตนท์ที่สร้างขึ้นเหล่านี้ น่าจะช่วยคลี่คลายความรู้เกี่ยวกับขบวนการตรึงไนโตรเจนได้บ้าง ถ้านำไปศึกษาลึกลงไปถึงระดับโมเลกุล ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการปรับปรุงประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้ในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

คุณสมบัติของ nif มิวแตนท์ที่แยกได้

1. สูญเสียคุณสมบัติการตรึงไนโตรเจน ในขณะที่คุณสมบัติอื่น ๆ เหมือนเดิมทุกประการ

2. การตรึงไนโตรเจนที่เสียไปนี้ อาจเนื่องมาจากความผิดปรกติของยีนที่ตำแหน่งต่าง ๆ กัน โอกาสที่ผิดปรกติที่ยีนโครงสร้าง จะประมาณสามเท่าของยีนควบคุม

3. สามารถคอนจูเกทข้ามสายพันธุ์กับ Escherichia coli ซึ่งมีพลาสมิดต้านยา และยีนการตรึงไนโตรเจนเชื่อมติดอยู่ ด้วยความถี่ $1 - 5 \times 10^{-4}$ และ ภายหลังการคอนจูเกท ยีนการตรึงไนโตรเจนยังอยู่ได้ในรูปของพลาสมิดอีกด้วย

4. รูปแบบและโอกาสที่ยีนตรึงไนโตรเจนบนพลาสมิด ถูกถอดถ่ายระหัสเป็นเอนไซม์ไนโตรจีเนส ควรเหมือนและเท่าเทียมกับยีนการตรึงไนโตรเจนบนโครโมโซม

คุณสมบัติของ partial nif มิวแตนท์ที่แยกได้

1. มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน แต่ธรรมชาติของขบวนการผิดไปจาก wild type เดิม

2. partial nif มิวแตนท์บางตัว ให้คุณสมบัติในขั้นต้น ที่บ่งชี้ว่า ประสิทธิภาพการใช้สารต้นตอคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตต่ำกว่า wild type

3. partial nif มิวแตนท์บางตัว ให้คุณสมบัติในขั้นต้นที่บ่งชี้ว่า ประสิทธิภาพการใช้สารต้นตอคาร์บอนอาจเท่าเดิม แต่อาจมีความผิดปรกติที่ขบวนการรีดิวส์อะเซทีลีน ซึ่งเป็นดัชนีชี้บ่งความสามารถในการตรึงไนโตรเจนทางอ้อม

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัยนี้

1. ชี้แนะว่า การสร้างมิวแตนท์ของขบวนการตรึงไนโตรเจน โดยวิธีการเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส (Localized Mutagenesis) เป็นวิธีการที่มีข้อได้เปรียบเหนือการกลายพันธุ์ที่โครโมโซมของแบคทีเรียโดยตรง ซึ่งสนับสนุนข้อดีเด่นของการใช้วิธีดังกล่าว ในการสร้างมิวแตนท์ ดังนี้

1.1 โอกาสที่จะได้มิวแตนท์ ชนิดที่เป็น point mutationมีสูง

1.2 การที่โครโมโซมของแบคทีเรียถูกกลายพันธุ์เพียงช่วงแคบ ๆ และใช้มิวตาเจน อย่างอ่อน ช่วยให้มิวแตนท์ที่แยกได้ ปลอดจากผลข้างเคียงหลายประการ

1.3 การคัดเลือกมิวแตนท์ ทำในช่วงโครโมโซมแคบ โอกาสที่จะได้มิวแตนท์ที่ต้องการ คือ มีความผิดปรกติที่โอเปอรอนของเอนไซม์ไนโตรจีเนส มีมากขึ้น

1.4 คุณสมบัติของมิวแตนท์ที่แยกได้ จะเป็นอิสระแก่กัน เพราะวิธีการแยกมิได้ผ่านขบวนการ enrichmentจึงทำให้โอกาสในการได้มิวแตนท์ที่ฟีโนไทป์ต่างกันมีมาก

1.5 คุณสมบัติที่ต่างกันของฟีโนไทป์ จะมีมูลเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีนที่โอเปอรอนที่ต้องการ เพราะการแยกโดยวิธีการเหนี่ยวนำยีน มีค่าเท่ากับการตรึงตำแหน่งของยีนที่ผิดปรกติอยู่ในตัว

2. สร้างวิธีจำแนกจีโนไทป์ของ nifมิวแตนท์ โดยการใช้พลาสมิดต้านยาที่มียีนการตรึงไนโตรเจนเชื่อมติดอยู่ (RP41) เป็นสื่อ

3. พบฟีโนไทป์ใหม่ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส คือ partial nif มิวแตนท์ซึ่งมีการตรึงไนโตรเจนที่ผิดไปจาก wild type เดิม เนื่องจากเป็นฟีโนไทป์ที่ยังไม่มีผู้ใดรายงานว่าพบมาก่อน จึงเหมาะที่จะใช้เป็นตัวแบบ เพื่อศึกษาการตรึงไนโตรเจนในระดับโมเลกุล เพื่อให้เข้าใจบทบาทอันแท้จริงของปฏิกิริยาที่เอนไซม์ไนโตรจีเนสทำหน้าที่เป็นตัวเร่งอยู่