บทที่ 1
บทนำ

1.1 เอนไซม์

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biocatalyst) ที่มีประสิทธิภาพ สามารถเร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็วและมีความจำเพาะเจาะจงสูง โดยไม่ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงขึ้น เอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นก้อนกลม (globular protein) และมีบริเวณที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่เรียกว่าบริเวณเร่ง (active site) โดยที่เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีโครงรูป (Conformation) และบริเวณเร่งที่จำเพาะซึ่งถูกกำหนดโดยการเรียงตัวที่แน่นอนของกรดอะมิโน การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดจากการจับกันระหว่างซับสเตรทกับบริเวณเร่งของเอนไซม์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรท(enzyme substrate complex) ซึ่งซับสเตรทจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป เอนไซม์หลายชนิดต้องอาศัยปัจจัยร่วม (cofactor) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ไม่ใช่โปรตีนในการเร่งปฏิกิริยา โดยที่ปัจจัยร่วมอาจเป็นไอออนของโลหะ หรือเป็นสารอินทรีย์ที่เป็นอนุพันธ์ของวิตามินที่เรียกว่าโคเอนไซม์ (coenzyme) เอนไซม์เกือบทุกชนิดมีโครงสร้างเป็นโปรตีนจึงเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ด้วยปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพได้เช่น ความร้อน ความเป็นกรดเป็นด่าง ตัวทำละลายอินทรีย์และสารที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพได้ นอกจากนี้อุณหภูมิและพีเอช(pH) ยังมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กล่าวคือเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา (optimum temperature and pH) ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิและพีเอชที่ทำให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเกิดได้สูงสุด ถ้าอุณหภูมิและพีเอชเปลี่ยนแปลงไปจากช่วงที่เหมาะสมจะทำให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาลดลงอันเนื่องมาจากสภาวะในการเกิดปฏิกิริยาไม่เหมาะสม หรือเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ โดยปกติเอนไซม์จะถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซลล์เรียกเอนไซม์เหล่านี้ว่า เอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular enzymes) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ภายนอกเซลล์(Extracellular enzymes) ที่เซลล์สร้างขึ้นและขับออกมาภายนอกเซลล์เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาต่างๆในสิ่งแวดล้อมรอบเซลล์ เพื่อที่เซลล์จะได้นำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมาใช้ได้ จากชนิดการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ สามารถแบ่งเอนไซม์ออกเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 6 กลุ่มดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 การแบ่งชนิดของเอนไซม์ตามชนิดการเร่งปฏิกิริยา[1]

Classification	Type of Reaction Catalyzed
1 Oxidoreductases	Oxidation-Reduction reactions
2. Transferases	Transfer of functional groups
3. Hydrolases	Hydrolysis reaction
4. Lyases	Group elimination to form double bonds
5. Isomerases	Isomerization
6. Ligases	Bond formation coupled with ATP hydrolysis

1.2 เอนไซม์โปรติเอส [2,3]

เอนไซม์โปรติเอส (proteases,E.C.3.4) เป็นเอนไซม์ที่สิ่งมีชีวิตผลิตขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ให้ได้เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ หรือกลายเป็นกรดอะมิโนอิสระ โดยการสลายพันธะเปปไทด์ในสภาวะที่มีน้ำอยู่ในสารละลาย โดยปรกติเอนไซม์โปรติเอสเมื่อสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ ๆ จะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (Inactive form) ซึ่งเรียกว่า (proenzyme) หรือ ไซโมเจน (zymogen) เพื่อป้องกันการย่อยสลายโปรตีนภายในเซลล์และจะอยู่ในรูปที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เมื่ออยู่ในสภาพที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) จากตับอ่อนจะถูกสังเคราะห์ขึ้นในรูปของไคโมทริปซิโนเจนซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ หลังจากนั้นจะถูกส่งไปยังลำไส้เล็กและทำให้อยู่ในรูปที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้โดยการตัดกรดอะมิโนบางส่วนออกไป โดยอาศัยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) ในลำไส้เล็กช่วย

เอนไซม์โปรติเอสจำแนกตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยาสลายพันธะเปปไทด์ได้ 2 ชนิด ดังนี้ [3,4,5]

1.2.1 Exopeptidase เป็นโปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์ตรงปลายสายโพลิเปปไทด์ โดยแบ่งออกเป็นโปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์ที่ปลายอะมิโน (N-terminal) ซึ่งเรียกว่า aminopeptidase ได้แก่ Leucine aminopeptidase และโปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์ที่ปลายคาร์บอกซิล (C-terminal) ซึ่งเรียกว่า carboxypeptidase ตัวอย่างเช่น carboxypeptidase A เป็นต้น exopeptidase ส่วนใหญ่ จะทำหน้าที่ย่อยพันธะเปปไทด์ของสายเปปไทด์ที่เป็นสายสั้นๆ หรือชิ้นส่วนของโปรตีนขนาดเล็กจึงมีชื่อเรียกว่า peptidase

1.2.2 Endopeptidase เป็นโปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์ที่อยู่ในสายโพลิเปปไทด์ที่ไม่ใช่บริเวณส่วนปลายสาย โดยที่ Endopeptidase จะทำหน้าที่ย่อยโปรตีนหรือโพลิเปปไทด์สายยาว จึงมีชื่อเรียกว่า proteinase ซึ่ง Endopeptidase สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มตามลักษณะกลไกการเร่งปฏิกิริยา

1.2.2.1 Serine protease เป็นโปรติเอสที่มีกรดอะมิโนเซอรีน อยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งกรดอะมิโนเซอรีนมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่ม serine protease ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช (pH) ที่เป็นกลางถึงพีเอชสูง เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ chymotrypsin trypsin และ elastase เป็นต้น

1.2.2.2 Thiol protease โปรติเอสกลุ่มนี้ทำงานได้ดีในสภาพพีเอชที่เป็นกลาง พบได้ในพืช แบคทีเรีย และ ใน lysosome ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยจะมีกรดอะมิโน cystein อยู่ในบริเวณเร่งและมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ papain และ ficin เป็นต้น

1.2.2.3 Acid protease เป็นโปรติเอสที่ทำงานได้ดีในสภาพที่เป็นกรดและไม่พบว่ามีกรดอะมิโนตัวใดที่มีบทบาทสำคัญต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ pepsin และ chymosin (rennin)

1.2.2.4 Metalloprotease เป็นโปรติเอสที่มีไอออนของโลหะอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์และมีส่วนร่วมในการเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ไอออนของโลหะบางชนิดยังมีผลในการกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ สารเคมีที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่สารที่เป็น metal chelating agent เช่น ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ซึ่งจะไปจับกับอะตอมของโลหะในโมเลกุลของเอนไซม์ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขึ้นทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ metalloprotease ยังแบ่งออกเป็นกลุ่ม neutral protease และ alkali protease ซึ่ง neutral protease จะมีไอออนของสังกะสีอยู่ในโมเลกุลและทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง ส่วน alkali protease จะมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า neutral protase และทำงานได้ดีในช่วง พีเอชประมาณ 7-9

1.3 ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส[6,7]

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีนให้ได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ หรือกลายเป็นกรดอะมิโนอิสระ เพื่อนำกรดอะมิโนเหล่านั้นมาใช้ในกระบวนการต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น โปรติเอสไม่เพียงแต่จะมีความสำคัญเฉพาะต่อกระบวนการในสิ่งมีชีวิต

แต่ยังมีความสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมเกี่ยวกับอาหาร เช่น การผลิตขนมปัง การผลิตเนยแข็ง และการทำให้เนื้อสัตว์อ่อนนุ่ม นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกหนังและการผลิตสารซักฟอก(detergent) โดยเอนไซม์โปรติเอสส่วนใหญ่จะถูกใช้ในอุสาหกรรมที่เกี่ยวกับสารซักฟอกเป็นส่วนใหญ่คิดเป็นร้อยละ 89 ของปริมาณการซื้อขายเอนไซม์โปรติเอสทั้งหมด โปรติเอสส่วนใหญ่ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมาจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ โดยโปรติเอสจากแบคทีเรียมีปริมาณการใช้สูงกว่าโปรติเอสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ในขั้นตอนการผลิตทางอุตสาหกรรมนั้นจะต้องใช้ความร้อนเข้าช่วย ทำให้เอนไซม์โปรติเอสเกิดการเสียสภาพธรรมชาติไปเนื่องจากความร้อน จึงได้ผลผลิตต่ำกว่าที่ควรและต้นทุนการผลิตสูงขึ้นเนื่องจากต้องซื้อเอนไซม์โปรติเอสมาใช้ในขบวนการผลิตใหม่ จึงได้มีการนำเอาเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อน (Thermostable protease) มาใช้ในอุตสาหกรรมแทนเอนไซม์โปรติเอสที่ไม่ทนความร้อน เพราะอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นในกระบวนการผลิตทำให้อัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนสูงขึ้นและใช้เวลาในการเกิดผลิตภัณฑ์ลดลง ลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำและเอนไซม์ไม่สูญเสียสภาพได้ง่ายเนื่องจากความร้อน เอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนส่วนใหญ่ได้มาจากแบคทีเรียทนความร้อนที่แยกออกมาจากแหล่งต่างๆ เช่น จากน้ำทิ้งโรงงาน จากดินใกล้แหล่งน้ำพุร้อน หรือจากแหล่งน้ำพุร้อนเป็นต้น โปรติเอสทนความร้อนส่วนใหญ่ที่ได้รับความสนใจมักเป็นโปรติเอสนอกเซลล์ (Extracellular protease) เพราะช่วยลดขั้นตอนในการแยกเอนไซม์ออกมา

Hatadilok และคณะ [8] ได้ทำการแยกแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus* sp. PS719 จากดินบริเวณแหล่งน้ำพุร้อน พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสนอกเซลล์จัดอยู่ในพวก alkaline protease มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 9 และ 75 ^{o}ซ ตามลำดับ โดยขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เริ่มจากการแยกเอนไซม์ออกจากน้ำเลี้ยงและตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจากนั้นนำไปทำ Ion-exchange chromatography และ Affinity chromatography ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ที่ได้มีมวลโมเลกุลประมาณ 42 kDa Tsuchiya และคณะ [9] ทำการแยกเอนไซม์ alkaline serine protease และทำให้บริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนความร้อน *Thermoactinomyces* sp. HS 682 พบว่ามีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 11.5-13.0 และ 70 ^{o}ซ ตามลำดับ โดยเอนไซม์โปรติเอสที่ได้สามารถย่อยพันธะเปปไทด์และเอสเทอร์ได้ดี นอกจากนี้ยังมีผู้ทำการศึกษาการแยกเอนไซม์และทำให้บริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนความร้อนต่างๆอีก เช่น การแยกเอนไซม์ carboxypeptidase Taq จากแบคทีเรียทนความร้อน *Thermus aquaticus* YT-1[10] การแยกเอนไซม์โปรติเอส จาก *Streptomyces thermovulgaris* [11]

จาก *Bacillus pumilus* Y1 ที่แยกได้จากน้ำทิ้งจากการทำเต้าหู้[12] และแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* Sy8 ที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพในแมลง[13]

เนื่องจากแบคทีเรียในธรรมชาติผลิตเอนไซม์ออกมาได้ในปริมาณน้อยทำให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการที่จะนำไปใช้ประโยชน์ นอกจากนี้ในการเลี้ยงแบคทีเรียทนความร้อนจะต้องใช้อุปกรณ์ในการเลี้ยงที่ให้อุณหภูมิสูงได้ เพราะแบคทีเรียทนความร้อนเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงเช่น *Bacillus* sp. PS719 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นต้น ดังนั้นจึงมีผู้นำความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนเพื่อเพิ่มปริมาณและลดข้อจำกัดในการผลิตเอนไซม์ขึ้น เช่น ทำการเพิ่มจำนวนยีน (Gene cloning) ของเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ที่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิห้อง ให้สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนออกมาได้ นอกจากนี้ยังได้มีการดัดแปลงยีนของเอนไซม์โปรติเอสให้สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่มีแอคทิวิตีและความทนความร้อนสูงขึ้นอีกด้วย

ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาการเพิ่มจำนวนยีนของเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนจากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ซึ่งแยกได้จากแหล่งน้ำพุร้อนเทพพนมในจังหวัดเชียงใหม่ สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสนอกเซลล์ที่ทนความร้อนได้ จากการศึกษาของ Sinchaikul และคณะ[14,15] พบว่า *Bacillus stearothermophilus* TLS33 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 65 °ซ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนมพร่องไขมัน (skim milk) ผสมอยู่และผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนที่จัดอยู่ในประเภทนิวทรัลเมทัลโลโปรติเอส (Neutral Metalloprotease) ซึ่งมีซิงค์ไอออน (Zinc ion) อยู่ในโมเลกุลมีพีเอช (pH) และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 5-8 และ 70-80 °ซ ตามลำดับ สามารถย่อยซับสเตรทได้หลายชนิดจึงเหมาะแก่การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมและใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ แต่เนื่องจากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในขั้นตอนต่อไปได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการเพิ่มจำนวนยีน (Gene cloning) ของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TLS33 เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการศึกษาเอนไซม์โปริเอสทนความร้อนและพัฒนาเทคนิคต่างๆ ในการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ในลำดับต่อไป

1.4 เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม [16,17,18]

พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) หมายถึง กระบวนการเปลี่ยนแปลงสารทางพันธุกรรมเพื่อให้ได้สิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ ซึ่งมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม

เริ่มมีขึ้นหลังจากมีการพบเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เมื่อปี 1970 ซึ่งใช้ในการตัดต่อดีเอ็นเอ ต่อมาได้มีการพัฒนาการตัดต่อดีเอ็นเอและการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของ *Escherirchai coli* โดยการนำดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกับ replicon ซึ่งเป็นหน่วยของดีเอ็นเอ ที่สามารถจำลองตัวเอง (replicate) ได้ในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่ง replicon เรียกได้อีกอย่างว่า ดีเอ็นเอพาหะ (vector) หรือ cloning vector จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้าไปในดีเอ็นเอพาหะทำให้ได้ดีเอ็นเอโมเลกุลใหม่ที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเออื่นอยู่รวมกับดีเอ็นเอพาหะเรียกดีเอ็นเอสายใหม่นี้ว่าดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) การนำดีเอ็นเอที่ต้องการมาตัดต่อกับดีเอ็นเอพาหะแล้วนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการนี้เรียกว่า การโคลนยีน (gene cloning) ขั้นตอนสำคัญต่างๆ ในการโคลนยีนคือ

- การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการโคลน
- การเตรียมดีเอ็นเอพาหะ
- การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการกับดีเอ็นเอพาหะ
- การนำเอาดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน
- การคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับดีเอ็นสายผสม

1.4.1. การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการโคลน

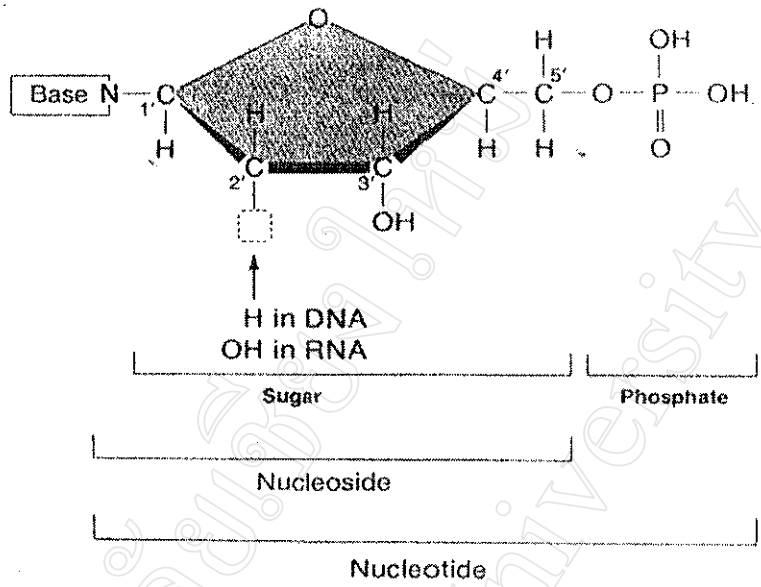
1.4.1.1 สารพันธุกรรม

ก. กรดนิวคลีอิค (nucleic acid)

กรดนิวคลีอิคจัดเป็นสารทางพันธุกรรมที่บรรจุข้อมูลพันธุกรรม(genetic information) ในรูปของยีน (gene) กรดนิวคลีอิคแบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ

- กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิค (Deoxyribonucleic acid หรือ DNA) ทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมซึ่งสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้
- กรดไรโบนิวคลีอิค (Ribonucleic acid หรือ RNA) ทำหน้าที่นำข้อความทางพันธุกรรมไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน และช่วยในการสังเคราะห์โปรตีนอีกด้วย

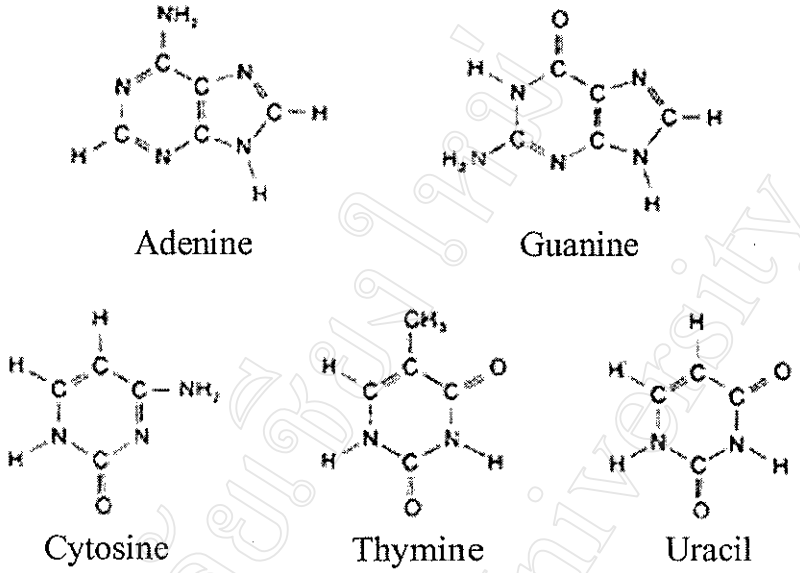
กรดนิวคลีอิคคือสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยหน่วยเล็กๆ ที่เรียกว่านิวคลีโอไทด์มาต่อกันเป็นสาย นิวคลีโอไทด์มีส่วนประกอบ 3 ส่วนคือ (รูปที่ 1.1)



รูป 1.1 องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ แสดงความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ และความแตกต่างระหว่างนิวคลีโอไซด์และนิวคลีโอไทด์[18]

ก.1 น้ำตาลไรโบส (Cyclic Ribose Sugar) กรดนิวคลีอิคมี 2 ชนิดคือดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ซึ่งต่างกันตรงที่องค์ประกอบของน้ำตาลห้าคาร์บอนที่เรียกว่าน้ำตาลไรโบส (ribose) ในดีเอ็นเอน้ำตาลไรโบสไม่มีกรุ๊ป OH ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (2'-OH) จึงเป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose) ส่วนในอาร์เอ็นเอจะเป็นน้ำตาลไรโบสปกติ

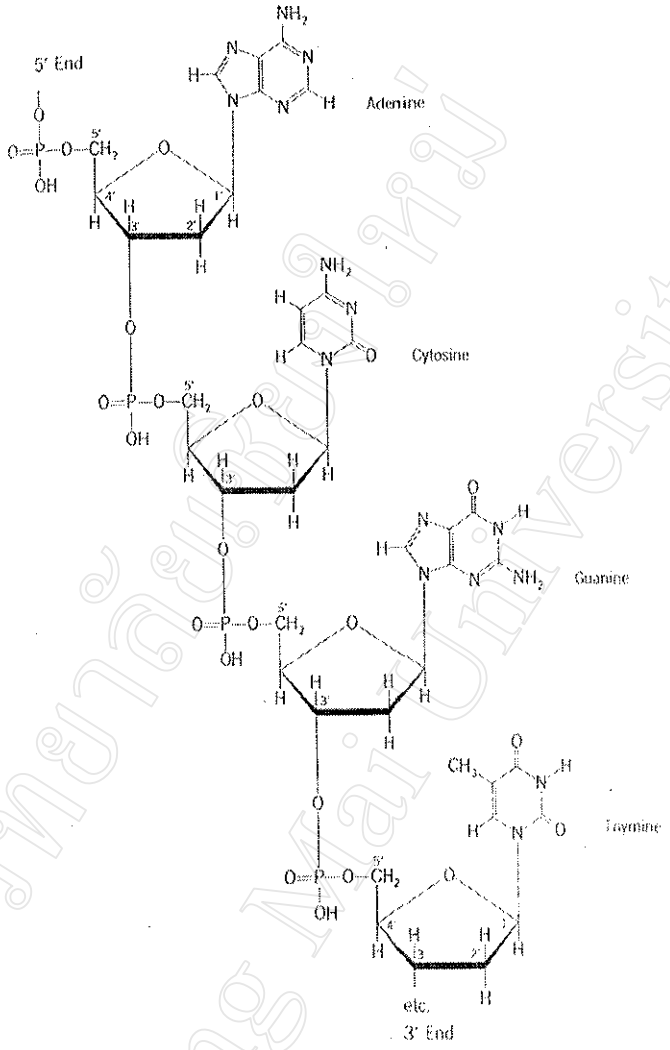
ก.2 เบส (Base) เบสจะต่อกับน้ำตาลไรโบสตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 โดยพันธะ เอ็นไกลโคซิดิก (N-glycosidic bond) เบสในกรดนิวคลีอิคแบ่งเป็นเพียวรีน (purine) และ ไพริมิดีน (pyrimidine) (รูปที่ 1.2) เบสพวกเพียวรีน ได้แก่อะดินีน (adenine หรือ A) และ กัวนีน (guanine หรือ G) เบสจำพวกไพริมิดีนได้แก่ไทมีน (thymine หรือ T) และไซโตซีน (cytosine หรือ C) ในอาร์เอ็นเอจะพบเบสยูเรซิล (uracil หรือ U) แทนไทมีน



รูปที่ 1.2 เบสที่พบในกรดนิวคลีอิค อะดินีนและกัวนีนเป็นอนุพันธ์ของเพียวรีน ไซโตซีน ไทมีน และยูเรซิลเป็นอนุพันธ์ของไพริมิดีน[18]

ก.3 ฟอสเฟต (Phosphate) ฟอสเฟตต่อกับน้ำตาลไรโบสตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 โดยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ฟอสเฟตเป็นกลุ่มที่ทำให้กรดนิวคลีอิกมีประจุเป็นลบ

น้ำตาลไรโบสเมื่อต่อกับเบสเพียงอย่างเดียวจะเรียกว่า นิวคลีโอไซด์ (nucleoside) นิวคลีโอไทด์แต่หน่วยในสายโพลีนิวคลีโอไทด์จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างปลาย 5′- phosphate ของนิวคลีโอไทด์หน่วยหนึ่งกับปลาย 3 ′-OH ของอีกหน่วยหนึ่งที่ติดกัน ดังรูปที่ 1.3 ดังนั้นสายโพลีนิวคลีโอไทด์ จะมีปลายข้างหนึ่งเป็นปลาย 5′-phosphate กับปลายอีกข้างหนึ่งเป็นปลาย 3 ‘- OH

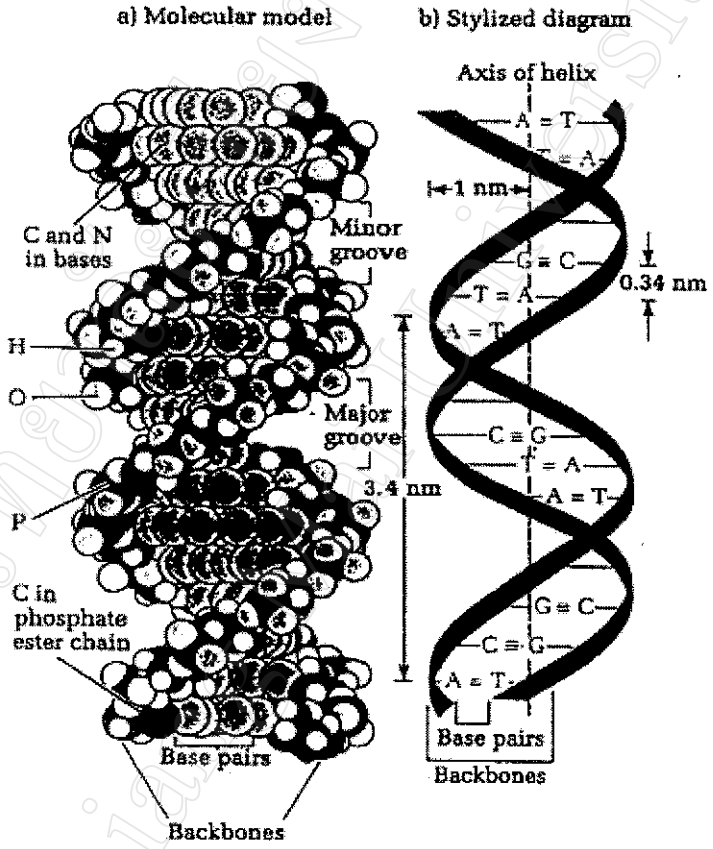


รูปที่ 1.3 สูตรโครงสร้างของ polydeoxyribonucleotide[19]

ข. โครงสร้างของดีเอ็นเอ

โครงสร้างดีเอ็นเอ จะมีลักษณะเป็นเกลียวคู่ (double helix) โดยมีสายโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สายพันรอบกันในลักษณะเวียนขวา (right-handed helix) และมีทิศทางตรงข้ามกัน (antiparallel) (รูปที่1.4) สายโพลีนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ระหว่างเบส A กับ T (เบสคู่สม หรือ basepair) และระหว่างเบส G กับ C ที่อยู่กันคนละสาย จำนวนพันธะไฮโดรเจนระหว่าง เบส A กับ T มี 2 พันธะและระหว่างเบส G กับ C มีอยู่ 3 พันธะ ภายในสายโพลินิวคลีโอไทด์เดียวกัน เบสแต่ละตัวจะอยู่ห่างกันประมาณ 3.4 อังสตรอม (A°) เส้นผ่านศูนย์กลางของดีเอ็นเอเท่ากับ 20 อังสตรอม ดีเอ็นเอเกลียวคู่เมื่อม้วนตัว 1 รวบ (helical

term) จะมีจำนวนเบสคู่สมในหนึ่งรอบเท่ากับ 10คู่ ดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่กล่าวมาจัดเป็นแบบ B ซึ่งเป็นแบบที่พบทั่วไปในเซลล์สิ่งมีชีวิต ดีเอ็นเอที่มีลักษณะการบิดตัวเป็นเกลียวคู่เวียนขวาได้แก่พวก A,B และ C-DNA แต่ถ้าบิดเป็นเกลียวคู่เวียนซ้ายได้แก่ Z-DNA ซึ่งดีเอ็นเอจะมีโครงสร้างเป็นแบบใดขึ้นอยู่กับปริมาตรน้ำ ชนิดของเบสและโลหะอิออนที่จับอยู่กับดีเอ็นเอ



รูปที่ 1.4 โครงสร้างของดีเอ็นเอ[18]

อาร์เอ็นเอเป็นโพลินิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวถูกสร้างมาจากดีเอ็นเอ (single-stranded) อาร์เอ็นเอมี 3 ชนิดคือ ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA หรือ rRNA) เป็นส่วนประกอบของไรโบโซมซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน ทรานเฟอร์อาร์เอ็นเอ (transfer RAN หรือ tRNA) ทำหน้าที่นำกรดอะมิโนไปให้ไรโบโซมเพื่อการสังเคราะห์โปรตีนและ เมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ (mesenger RNA หรือ mRNA) เป็นรหัสที่ถอดจากดีเอ็นเอเพื่อทำหน้าที่เป็นต้นแบบสำหรับการแปลรหัสเพื่อสร้างโปรตีน

ค. ความสำคัญของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ

ดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ทำหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมในรูปของการเรียงตัวของเบส การเรียงตัวของเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ จะเป็นตัวกำหนดการเรียงตัวของกรดอะมิโนในโปรตีนด้วย ลำดับการเรียงตัวของเบสในดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่ทำหน้าที่เป็นหน่วยพันธุกรรมนั้นเรียกว่ายีน (gene)

ง. คุณสมบติที่สำคัญของดีเอ็นเอมี 3 ประการด้วยกันคือ

ง.1 การจำลองตัวเอง (self-replication) ดีเอ็นเอสามารถจำลองตัวเองได้ ซึ่งดีเอ็นเอสายใหม่ซึ่งสร้างขึ้นจะมีโครงสร้างหรือลำดับเบสเหมือนสายเดิมทุกประการ

ง.2 การสังเคราะห์โปรตีน บนสายโพลินิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ จะประกอบด้วยยีนหลายยีน แต่ละยีนจะควบคุมลักษณะและองค์ประกอบของโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งลักษณะและองค์ประกอบของกรดอะมิโนต่าง ๆ จะถูกควบคุมโดยลำดับการเรียงตัวของเบสในแต่ละยีน ในการสังเคราะห์โปรตีนจะประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

ง.2.1 Transcription เป็นขบวนการสร้างอาร์เอ็นเอจากดีเอ็นเอ โดยที่อาร์เอ็นเอจะมีลำดับเบสบนสายโพลินิวคลีโอไทด์เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ รหัสหรือการเรียงตัวของเบสบนอาร์เอ็นเอ โดยเฉพาะ m-RNA จะเป็นตัวบ่งบอกถึงลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนที่จะถูกสังเคราะห์ขึ้น ในเซลล์สัตว์ชั้นสูง (Eukaryotic cell) จะมีท่อนดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ยีน (non coding DNA) กระจายอยู่ทั่วไป ดีเอ็นเอส่วนนี้เรียกว่า อินทรอน (Intron) ดีเอ็นเอส่วนนี้จะถูกถอดข้อความออกมาเป็นส่วนของ m-RNA ด้วย ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ต้องการ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตัดเอาส่วนนี้ออกจากโมเลกุลของ m-RNA โดยวิธีที่เรียกว่า RNA splicing [20] ทำให้ได้ m-RNA ที่เป็นส่วนของรหัสจริง ๆ เท่านั้น

ง.2.2 Translation เป็นขบวนการสังเคราะห์โปรตีน โดยอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่าง m-RNAและ t-RNA ไรโบโซม และเอนไซม์ต่างๆอย่างมีระเบียบ

ง.3 การผ่าเหล่า เป็นการทำให้ดีเอ็นเอมีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นที่ลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เป็นผลให้ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นเปลี่ยนแปลงไป

จ. พันธุกรรมในแบคทีเรีย

การศึกษาดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตพบว่า ดีเอ็นเอมีขนาดและรูปร่างต่างๆกันไป โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างเป็นเกลียวคู่หรือดีเอ็นเอสายเดี่ยว อาจจะอยู่ในรูปแบบเส้นตรง (Linear)

หรืออาจจะเชื่อมปลายทั้งสองเข้าด้วยกันเป็นวงกลม (circular) หรืออาจจะม้วนตัวเป็น superhelix ก็ได้ ดีเอ็นเอทั่วไปจะอยู่ในรูปเกลียวคู่ จากการศึกษาพันธุกรรมในแบคทีเรียพบว่าประกอบด้วยดีเอ็นเอที่ไม่มีฮีสโตนอยู่เป็นดีเอ็นเอเส้นคู่ที่มีรูปร่างเป็นวงแหวนมีการเรียงตัวเป็นลูป (loop) แต่ละลูปมีการม้วนบิดตัวที่เรียกว่า ซูปเปอร์คอยล์(suppercoil) ขนาดของดีเอ็นเอ ก็จะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรีย ส่วนพลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมของนิวเคลียส บางครั้งพลาสมิดสามารถแทรกเข้าไปอยู่ในโครงสร้างของโครโมโซมได้ ซึ่งเรียกพลาดมิดชนิดนี้ว่า อีพิโซม (Episome) ดีเอ็นเอที่เป็นพลาสมิดจะมีรูปร่างที่เป็นวงแหวนเส้นคู่ สามารถจำลองตัวเองได้เช่นเดียวกับดีเอ็นเอของเซลล์ โครงสร้างดีเอ็นเอแบบต่างๆในสิ่งมีชีวิตแสดงไว้ในตารางที่ 1.2

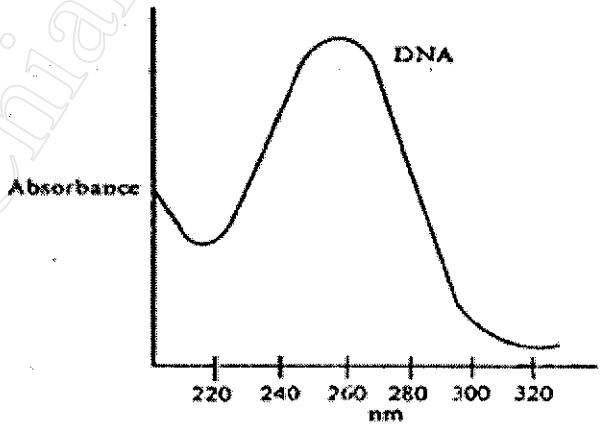
ตารางที่ 1.2 โครงสร้างดีเอ็นเอแบบต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตหลายแบบ[21]

แหล่ง	โครงสร้างดีเอ็นเอ
∅ x 174 DNA (ไวรัสในแบคทีเรีย)	วงแหวนคู่ (double strand, circular)
T_2 (ไวรัสในแบคทีเรีย)	วงแหวนเดี่ยว (single strand, circular)
λ (ไวรัสในแบคทีเรีย)	เกรียวคู่ (double strand, linear)
Parvovirus (ไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์)	เส้นเดี่ยว (single strand, linear)
โครโมโซมของสัตว์ พืช แบคทีเรีย	วงแหวนคู่ (double strand, circular)
พลาสมิด	วงแหวนคู่ (double strand, circular)

1.4.1.2 การแยกดีเอ็นเอออกจากเซลล์แบคทีเรีย

การแยกจีโนมิคดีเอ็นเอ (Genomic DNA หรือ Chromosomal DNA) จากเซลล์แบคทีเรียทำได้โดยการทำให้เซลล์แตกก่อน โดยขั้นแรกจะย่อยผนังเซลล์แบคทีเรียด้วยเอ็นไซม์ต่างๆ ส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (protease) เช่น proteinase K และ Lysozyme จากนั้นจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) เพื่อให้เซลล์แตกและปล่อยดีเอ็นออกมา ส่วนโปรตีนที่ปะปนมากับดีเอ็นเอจะถูกกำจัดออกโดยการใช้สารละลายฟีนอลอิ่มตัวเพื่อทำให้โปรตีนเสียสภาพและเกิดการตกตะกอน ทำให้กำจัดโปรตีนออกไปได้ง่าย แล้วจึงทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้นโดยการเติมเอนไซม์ RNase ลงไปเพื่อกำจัด อาร์เอ็นเอที่ปนมากับดีเอ็นเอออกไปแล้วทำการกำจัดเอนไซม์ RNase ออกไปด้วยสารละลายฟีนอลอิ่มตัว เมื่อได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์แล้วจะเติมเกลือแอมโมเนียมอะซิเตรตหรือโซเดียมอะซิเตรตลงไปในสารละลายดีเอ็นเอเพื่อช่วยในการตก

ตะกอนดีเอ็นเอให้ดียิ่งขึ้น การตกตะกอนดีเอ็นเอทำได้โดยการเติมเอทานอล(ethanol)ลงไป 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอหรือเติมด้วยไอโซโพรพานอล (Isopropanol) 0.6 -1 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอแล้วนำไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อแยกตะกอนดีเอ็นเอออกมา กรดนิวคลีอิคเช่นดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ จะดูดกลืนแสงเหนือม่วง(Ultraviolet) ได้ดีที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 260 นาโนเมตร (nm) อันเนื่องมาจากโมเลกุลของดีเอ็นเอมีเบสเพียวรีนและไพริมิดีน ซึ่งเป็นพวกอะโรมาติก (aromatic) เป็นองค์ประกอบ ในสภาพสารละลายดีเอ็นเอที่เป็นสายคู่ (double strand) ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (μg/ml) จะมีค่าการดูดกลืนแสง (absobance) ที่ 260 นาโนเมตร (A_{260}nm) เท่ากับ 1 โดยที่ % G+C จะมีผลเพียงเล็กน้อยต่อค่านี้ ขณะที่ดีเอ็เอที่เป็นสายเดี่ยว(single strand) ที่มีความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร เท่ากับ 1 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ว่าบริสุทธิ์เพียงพอหรือไม่ ดูได้จากอัตราส่วนการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่ 260 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) ถ้าค่าที่ได้อยู่ในช่วงระหว่าง 1.8 ถึง 2.0 แสดงว่าเป็นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์[22] ถ้าหากมีค่ามากกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปะปนอยู่ แต่ถ้ามีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปะปนอยู่ นอกจากนี้การตรวจคุณภาพยังสามารถทำได้โดยการทำ Scaning ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ตั้งแต่ความยาวคลื่น 230 ถึง 320 นาโนเมตร ซึ่งควรจะได้ peak เดียวที่ความยาวคลื่น (Wavelength) ประมาณ 260 นาโนเมตร ดังรูปที่ 1.5



รูปที่ 1.5 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของ ดีเอ็นเอ[21]

1.4.2 การเตรียมดีเอ็นเอพาหะ[17,21]

เวคเตอร์ (vector) หรือดีเอ็นเอพาหะ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมและเป็นตัวนำยีนที่ต้องการโคลนเข้าไปจำลองตัวและแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้ได้ดีเอ็นเอลูกผสมจำนวนมาก มีการถ่ายทอดไปยังเซลล์ลูกได้เมื่อเซลล์เจ้าบ้านมีการแบ่งตัว เนื่องจากความแตกต่างของเซลล์เจ้าบ้านทำให้เซลล์แต่ละชนิดต้องใช้เวคเตอร์ที่แตกต่างกันออกไป โดยในระบบแบคทีเรียและยีสต์ ดีเอ็นเอสายผสม (rDNA) ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนจะจำลองตัวเองได้นอกโครโมโซม ขณะที่เชื้อรา พืชหรือ เซลล์สัตว์ ดีเอ็นเอสายผสมจะต้อง Integrate เข้าไปรวมกับดีเอ็นเอของโครโมโซมและจำลองตัวเองไปพร้อมๆกับโครโมโซม

เวคเตอร์ในปัจจุบันมีหลายชนิดมีทั้งที่ดัดแปลงมาจากเวคเตอร์ดั้งเดิมและที่พบใหม่จากเชื้อต่าง ๆ บางชนิดก็ถูกสร้างให้สามารถจำลองตัวเองได้ในเซลล์เจ้าบ้านมากกว่า 1 ชนิดซึ่งเรียกว่า Shutter vector เช่นสามารถจำลองตัวเองได้ทั้งใน E.coli และ Yeast เวคเตอร์ในแต่ละระบบยังแยกคร่าวๆได้เป็น เวคเตอร์สำหรับโคลนยีนทั่วไป เวคเตอร์สำหรับใช้ในการแสดงออกของยีน (Expression vector) เป็นต้น

1.4.2.1 ชนิดของดีเอ็นเอพาหะ

ก. พลาสมิด (Plasmid)

พลาสมิด คือ สารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซมของแบคทีเรีย มีลักษณะเป็นดีเอ็นเอสายคู่รูปวงกลม (circular) และ supercoil มีขนาดแตกต่างกันไป ตั้งแต่เล็กกว่า 1×10^6 ดัลตัน (Dalton) ถึงขนาดใหญ่กว่า 200×10^6 ดัลตัน เมื่อเทียบกับโครโมโซมแล้วจะมีขนาดเล็กกว่าประมาณ 100 ถึง1,000 เท่า พลาสมิดมีจุดตั้งต้นการจำลองตัว (Origin of replication ,ORI) อยู่บนโมเลกุล ฉะนั้นจึงสามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตัวเอง คุณสมบัติเด่นอีกประการหนึ่งคือ มักมียีนซึ่งควบคุมลักษณะทางกรรมพันธุ (Phenotype) สำคัญๆอยู่ด้วยเช่น ความต้านทานยาปฏิชีวนะ โลหะหนัก หรือสารพิษต่างๆ

ชนิดของพลาสมิด

ก.1 พลาสมิด F (F Plasmid หรือ Fertility Factor)

พลาสมิดกลุ่มนี้สามารถเคลื่อนย้ายตัวเองจากภายในเซลล์ของแบคทีเรียตัวหนึ่งไปสู่อีกตัวหนึ่งที่ไม่มีพลาสมิด F ได้ นอกจากนี้ยังสามารถแทรกตัวเองเข้าในโครโมโซมของแบคทีเรียและควบคุมการเคลื่อนย้ายยีนในโครโมโซมของแบคทีเรียนั้นๆ ไปยังแบคทีเรียอีกตัวหนึ่งได้

ก.2 พลาสมิด R (R plasmid หรือ Drug resistance plasmid)

ลักษณะสำคัญของพลาสมิด R คือ สามารถทำให้เซลล์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราได้ นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดความสามารถในการดื้อยาปฏิชีวนะไปให้แบคทีเรียตัวอื่นๆ ที่ไม่มีคุณสมบัตินั้นๆได้ พลาสมิด R ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 2 ส่วน คือ RTF (resistance transfer factor) และ r determinant (drug resistance gene) RTF บรรจุยีนที่ทำหน้าที่ในการถ่ายแบบเพื่อเพิ่มจำนวนโมเลกุล (copy number) ของพลาสมิด R สำหรับ r determinant จะบรรจุยีนดื้อยาปฏิชีวนะ ยีนดื้อยาที่พบในพลาสมิดชนิด R ได้แก่ยีนดื้อยา ampicillin (Amp), chloramphenicol (Cam) , streptomycin (Str) , kamamycin (Sul) พลาสมิด R ชนิดเล็กที่ไม่ถ่ายทอดระหว่างเซลล์ได้ถูกใช้เป็นรากฐานในการพัฒนาพาหะ(vector) นำยีนที่สนใจเข้าในเซลล์เป้าหมายในการศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรม

ก.3 พลาสมิด Col (Col plasmid หรือ Colicinogenic plasmid)

พลาสมิด Col เป็นพลาสมิดที่พบใน *E.coli* จัดอยู่ในกลุ่มพลาสมิดที่เรียกว่า bacteriocinogenic plasmid ซึ่งสร้างโปรตีน bacteriocins ในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน ซึ่งโปรตีนกลุ่มนี้มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียชนิดอื่นโดยไปเกาะที่ผนังเซลล์และยับยั้งการถ่ายแบบ การถอดรหัสและแปลรหัส และระบบการสร้างพลังงานในเซลล์

พลาสมิดบางชนิดมีกลไกการจำลองตัวเองขึ้นอยู่กับการจำลองตัวของโครโมโซมด้วย ทำให้จำนวนโมเลกุลของพลาสมิดต่อเซลล์จำกัดเรียกพลาสมิดชนิดนีว่า " Stringent plasmid " ส่วนพลาสมิดที่ได้รับการพัฒนาเป็นดีเอ็นเอพาหะสำหรับใช้ในการโคลนยีนคือ Relaxed plasmid ซึ่งเป็นพลาสมิดที่อาศัยกลไกการจำลองตัวของโครโมโซมน้อย สามารถจำลองตัวได้โดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA Polymerase I & III) รวมทั้ง อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส และปัจจัยอื่นซึ่งมีอยู่แล้วในเซลล์เจ้าบ้าน โดยไม่ต้องสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่เพื่อการจำลองตัวเองโดยเฉพาะผิดกับโครโมโซมและพลาสมิดชนิด Stringent ทำให้พลาสมิดชนิด Relax มีจำนวนโมเลกุลต่อเซลล์มาก

คุณสมบัติของพลาสมิดที่จะใช้เป็นพาหะได้ดีคือ

- ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ทำให้คัดเลือกเซลล์ได้ง่าย
- มีจำนวนชุด (copy number) สูง
- มี 1 cutting site สำหรับ restriction enzyme แต่ละตัวบนตำแหน่ง multicloning site

ข. ฝาจ (Phage หรือ bacteriophage)

ฝาจเป็นดีเอ็นเอพาหะที่บรรจุอยู่ในปลอกหุ้มที่เป็นโปรตีน ชนิดไวรัสทำลายแบคทีเรีย ฝาจเป็นโมเลกุลดีเอ็นเอสายคู่อยู่ในรูปเส้นตรง (Linear) ภายในอนุภาคฝาจที่ปลายทั้งสองด้านของดีเอ็นเอเป็นปลายเหนียวและเป็นเบสคู่สมซึ่งกันและกัน เรียกตำแหน่งปลายเหนียวนี้ว่า "ตำแหน่งคอส" (cos site) หลังจากที่อนุภาคฝาจเกาะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียเจ้าบ้านแล้ว ฝาจจะฉีดดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์นั้นเรียกว่า การบุกรุก (Infection) เมื่อดีเอ็นเออยู่ภายในเซลล์ตำแหน่งคอสทั้งสองจะมาเชื่อมต่อกัน ทำให้โมเลกุลกลายเป็นวงกลมที่มีรอยแหว่ง (nick) ต่อมาดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase) จากเซลล์เจ้าบ้านจะมาซ่อมแซมรอยแหว่งนี้ทำให้ได้โมเลกุลวงกลมที่สมบูรณ์ ดีเอ็นเอรูปวงกลมนี้จะเป็นแม่แบบสำหรับการถอดระหัส(Transcription) ในช่วงแรกๆ ที่ฝาจเข้าไปอยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน หลังจากนั้นฝาจจะเลือกดำเนินวงจรชีวิตแบบใดแบบหนึ่งระหว่างวงจรชีพแบบทำลายเซลล์ (Lytic cycle) หรือแบบแฝงตัวในเซล (Lysogenic cycle) โดยขึ้นอยู่กับสมดุลระหว่างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ของยีนจากฝาจและเซลล์เจ้าบ้าน

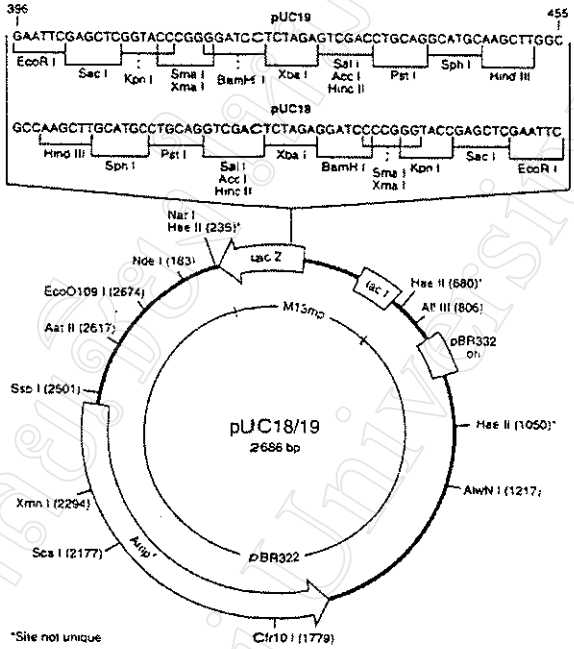
ค. คอสมิด (Cosmid)

คอสมิด เป็นดีเอ็นเอพาหะที่รวมเอาข้อดีของพลาสมิดและฝาจเข้าด้วยกัน เกิดขึ้นจากการตัดต่อเอา "ตำแหน่งคอส" จากฝาจมาแทรกเข้าไปในพลาสมิด ทำให้สามารถใช้คอสมิดในทำนองเดียวกันกับที่ใช้พลาสมิดได้ แต่ที่พิเศษกว่า คือ สามารถตัดต่อดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดตั้งแต่ 35-45 กิโลเบส เข้ากับคอสมิด แล้วบรรจุดีเอ็นเอสายผสมนั้นเข้าไปในปลอกหุ้มฝาจแล้วทำการ Infect เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านได้เหมือนฝาจ

1.4.2.2 การเตรียมดีเอ็นเอพาหะจากแบคทีเรีย

ในการศึกษานี้ ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้คือ พลาสมิด pUC19 (รูปที่ 1.6) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอพาหะที่มียีนดื้อยาแอมพิซิลลินและมี multicoling site อยู่บนยีน lac Z (lac operon) ยีนดังกล่าวควบคุมการสร้างเปปไทด์ชนิดอัลฟา(α- peptide) ของเอ็นไซม์ (β - Galactosidase) ซึ่งหากใช้ร่วมกับเซลล์เจ้าบ้านที่ผลิตส่วนที่เหลือของเอนไซม์ จะทำให้ได้เซลล์ที่สมบูรณ์สามารถย่อยสารเคมีชื่อ X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3Indoly-D-Galactoside) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินได้ โดยใช้สารเหนี่ยวนำ (Inducer) คือ IPTG (Isopripyl thio-galactoside) กระตุ้นให้ยีนผลิตเอนไซม์ β - Galactosidase ออกมา ตำแหน่งของ multicloning site จะแทรกอยู่ตรงกลางยีนที่ควบคุมเปปไทด์อัลฟา ดังนั้นเมื่อมีการสอดแทรกดีเอ็นเอเป้าหมายลงไปที่ตำแหน่งดังกล่าว ก็จะไม่มี

เอนไซม์ β - Galactosidase ที่สมบูรณ์เกิดขึ้น โคโลนี (colony) ของแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอสายผสมจะปรากฏเป็นโคโลนีไม่มีสี ส่วนโคโลนีของแบคทีเรียที่มีแต่เวคเตอร์จะเป็นสีน้ำเงิน



รูปที่ 1.6 พลาสมิด pUC19[23]

การเตรียมพลาสมิด โดยวิธีอาศัยสารละลายด่างในการทำให้เซลล์แตก (Akaline lysis method) เสนอโดย Brinboim และ Doly [24] เป็นวิธีที่ใช้แยกพลาสมิดออกมาโดยการกำจัดโครโมโซมออกไปด้วยการใช้ pH สูงและสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือมาก จะทำให้สภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอทั้งพลาสมิดและโครโมโซมเสียไป (Denature) แต่เมื่อปรับ pH ให้เป็นกลาง เฉพาะพลาสมิดซึ่งเป็นดีเอ็นเอขนาดเล็กจะ Renature กลับคืนมาได้ ในการเตรียมพลาสมิดจะใช้ SDS ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกออกและใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นตัวทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพธรรมชาติส่วนโปรตีนจะถูกกำจัดออกไปโดยใช้สารละลายฟีนอลอิ่มตัวและทำการแยกตะกอนโครโมโซมและโปรตีนออกโดยการ centrifugation

1.4.3 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการกับดีเอ็นเอพาหะ

เมื่อเตรียมจีโนมิคดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ที่บริสุทธิ์จากแบคทีเรียแล้วจะทำการตัดเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนออกมาโดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) แล้วจึงนำชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะด้วยเอ็นไซม์ในกลุ่ม (Modifying enzyme) เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายผสมแล้วนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านในลำดับต่อไป

1.4.3.1 **เอนไซม์ที่ใช้ในงานทางด้านพันธุวิศวกรรม**

ก. เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

เอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นเอนไซม์ที่จดจำ sequence เฉพาะเจาะจงที่เรียกว่า Recognition sequence ของดีเอ็นเอสายคู่และสามารถตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ในสายดีเอ็นเอได้ ทำให้สายดีเอ็นเอขาดออกจากกันได้ เอนไซม์ตัดจำเพาะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ

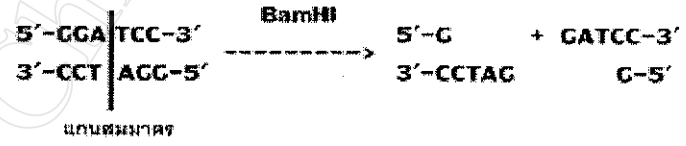
ก.1 Type I enzyme เป็น Bifunctional enzyme ทำหน้าที่ Restriction และModification

ก.2 Type II enzyme เป็นเอนไซม์ที่มี Endonuclease และ Methylase อยู่แยกจากกัน

ก.3 Type III enzyme เป็น Bifunctional enzyme ทำหน้าที่ Restriction และ Modification

เอนไซม์ Type I และ Type III เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีคุณสมบัติทั้งดีเอ็นเอและเติม Methyl group ลงบนเบสของดีเอ็นเอได้ เอนไซม์ทั้งสองต้องการ ATP ในการทำปฏิกิริยา ส่วนที่แตกต่างของเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มนี้คือ Type I จะจับกับดีเอ็นเอในบริเวณอื่นที่ห่างจากบริเวณที่เอนไซม์นี้ตัดดีเอ็นเอถึง 100-1,000 bp ขณะที่ Type III จะตัดดีเอ็นเอบริเวณ 24-26 bp ที่อยู่ Downstream จากบริเวณ recognition sequence

ส่วน Type II เป็นเอนไซม์ที่ใช้กันมากในงานพันธุวิศวกรรม เอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 แบบ ที่อยู่แยกจากกัน คือมีเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่จดจำและตัดดีเอ็นเอที่บริเวณจำเพาะและมีเอ็นไซม์ Methylase ทำหน้าที่เติม Methyl group ให้แก่ Adinine หรือ Cytosine และทำหน้าที่ Modify ที่ recognition sequence เดียวกัน เอ็นไซม์ Type II จะจดจำและตัด sequence ขนาด 4-6 bp ที่เป็น Palindrome (ลำดับเบสที่สมมาตร) ในสายดีเอ็นเอดังรูปที่ 1.7



รูปที่ 1.7 การตัดดีเอ็นเอที่เป็น palindrom โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI

แต่มีเอนไซม์ 2-3 ชนิดที่ตัด sequence ที่ไม่มี symmetry ได้ ถ้าหากเอนไซม์ตัดสายดีเอ็นเอแล้วทำให้ปลายสายดีเอ็นเอสายใดสายหนึ่งยื่นออกมาจะเรียกปลายนั้นว่าปลายเหนียว (cohesive end หรือ sticky end) ซึ่งปลายที่ยื่นออกมาอาจเป็นปลาย 5′ หรือ 3′ ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ตัด แต่ถ้าการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของสายทั้งสองตรงกันก็จะได้ปลายทู่

(blunt end หรือ flush end) แม้ว่าเอนไซม์แต่ละชนิดจะจำและตัด sequence ที่ต่างกันออกไป แต่ก็มีเอนไซม์หลายตัวที่มาจากแหล่งต่างๆกันที่จดจำ sequence ที่เหมือนกันได้แต่อาจตัดที่ตำแหน่งต่างกันใน sequenceนั้นๆ เรียกเอนไซม์เหล่านี้ว่า Isoschizomer ในการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางครั้งตำแหน่งในการตัดอาจคลาดเคลื่อนไปได้เนื่องจากสภาวะในการตัดไม่เหมาะสมเช่น pH ที่สูงขึ้น มีเกลือหรือกลีเซอรอลมากเกินไป ทำให้เอนไซม์ตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งผิดไปจากเดิม เรียกลักษณะที่เกิดขึ้นนี้ว่า Star activity

ข. Modifying enzyme

เป็นเอ็นไซม์หลายชนิดที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่เรียกรวม ๆ กันว่า DNA หรือ RNA modifying enzyme ตัวอย่างเช่น เอนไซม์เชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligase) เอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดกลุ่มฟอสเฟตที่ปลายดีเอ็นเอออก (Alkaline phosphatase) และเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอนำรหัส (Reverse transcriptase) เป็นต้น

ข.1 เอ็นไซม์ T4 ligase

เป็นเอ็นไซม์ที่ใช้ในการการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ มีอยู่ 2 ชนิดคือ

ข.1.1 T4 DNA ligase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างปลายดีเอ็นเอสายคู่ 2 ปลายที่จะมาเชื่อมต่อกันโดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็นปลาย 3'-ไฮดรอกซิลและอีกปลายหนึ่งเป็นปลาย 5'-ฟอสเฟต ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะต้องใช้ ATP ในการเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์นี้สามารถเชื่อมต่อดีเอนเอทั้งชนิดปลายเหนียวและปลายทู่ นอกจากนั้นยังสามารถซ่อมแซมรอยแหว่ง (nick) ที่เกิดบนสายใดสายหนึ่งบนโมเลกุลของดีเอ็นเอได้อีกด้วย ในกรณีที่ต้องการเชื่อมต่อดีเอ็นเอชนิดปลายทู่ จะต้องใช้ดีเอ็นเอและเอนไซม์นี้ในปริมาณที่สูงกว่ากรณีของดีเอ็นเอชนิดปลายเหนียว

ข.1.2 T4 RNA ligase เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเหมือนกับ T4 DNA ligase แต่ที่พิเศษกว่าคือสามารถเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่เป็นสายเดี่ยวและสายคู่ได้

ข.2 เอนไซม์ Alkaline phosphatase

เป็นเอนไซม์ที่ใช้กำจัดกลุ่มฟอสเฟตออกจากปลาย 5'ฟอสเฟต ของโมเลกุลดีเอ็นเอ โดยเลือกกำจัดกลุ่มฟอสเฟตที่ปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอพาหะหรือดีเอ็นเอเป้าหมาย ส่วนใหญ่แล้วจะเลือกกำจัดที่ปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอพาหะ เพื่อป้องกันไม่ให้ปลายทั้งสองของดีเอ็นเอพาหะที่ถูก

ตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะจับตัวกับคืนรูปเดิม ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะลดลง

1.4.3.2 การตัดดีเอ็นเอเป้าหมายและดีเอ็นเอพาหะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ก. การตัดดีเอ็นเออย่างไม่สมบูรณ์ (Partial digestion)

ในการทำ Gene cloning จากดีเอ็นเอชิ้นใหญ่ๆเช่นโครโมโซมและไม่รู้ Cutting site ของยีน จะต้องเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ครอบคลุมทั้งยีนที่ต้องการโดยที่เอนไซม์จะไม่ไปตัดภายในยีนที่ต้องการซึ่งจะทำให้ได้ยีนไม่ครบทั้งยีน ดังนั้นเพื่อลดการเสี่ยงและเพิ่มโอกาสในการที่จะได้ยีนที่ครบสมบูรณ์ จึงนิยมการตัดดีเอ็นแบบไม่สมบูรณ์ (Partial digestion) โดยใช้เอนไซม์ที่มี recognition site เพียง 4 bp เช่น *Sau* 3AI ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันมาก โดย *Sau* 3AI จะตัด sequence ตรงตำแหน่ง ↓GATC ปลายที่ได้จากตัดด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI สามารถต่อกับดีเอ็นเอพาหะที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI หรือ *Bgl* II ได้ เอนไซม์ที่มี Recognition site เพียง 4 bp จะให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ กันมากกว่า เอนไซม์ที่มี recognition site 6 bp ทำให้มีโอกาสที่จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการและสมบูรณ์มากกว่า วิธีการตัดโครโมโซมหรือ Genomic DNA ด้วย *Sau* 3AI อย่าง ไม่สมบูรณ์เลือกทำได้สองแบบคือ วิธีจำกัดปริมาณเอนไซม์แต่ไม่จำกัดเวลา โดยจะใช้เวลาในการตัดดีเอ็นเอแตกต่างกัน และวิธีจำกัดเวลาในการตัดดีเอ็นเอ แต่ไม่จำกัดปริมาณเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์ปริมาณต่าง ๆ กันในการตัดดีเอ็นเอ ซึ่งทั้งสองวิธีจะให้แถบของ ดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ กันเมื่อนำไปทำ Agarose gel electrophoresis เมื่อดู pattern จากเจลและเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับ Standard marker ก็จะเลือกใช้ความเข้มข้นหรือเวลาที่เหมาะสมที่ *Sau* 3AI ตัดดีเอ็นเอแล้วได้แถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่อยู่ในช่วงขนาดระหว่าง 2-10 kb เพื่อใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอที่ต้องการต่อไป ดีเอ็นเอที่เตรียมได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้ ก่อนที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป จะต้องหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะก่อนโดยใช้ความร้อนช่วยหรือเติม EDTA pH 8.0 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 20 mM แล้วจึงสกัดด้วยฟีนอลบัฟเฟอร์และทำการตกตะกอนดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้ในงานต่อไป

ข. การตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ (complete digestion)

เป็นการตัดดีเอ็นเอที่ทราบตำแหน่งในการตัด (cutting site) ที่แน่นอนบนโมเลกุลของดีเอ็นเอ ในการทำ Gene cloning การตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์จะใช้ในการตัดดีเอ็นเอพาหะเป็นส่วนใหญ่ เพราะทราบตำแหน่งในการตัดบนโมเลกุลของดีเอ็นเอพาหะที่แน่นอน โดยจะเลือกใช้

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งตัดบนดีเอ็นเอพาหะและให้ปลายที่เป็นคู่สม (Complementary) กันกับปลายของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ เช่น ชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI สามารถต่อได้กับดีเอ็นเอพาหะที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI หรือ *Bgl* I เป็นต้น ในการตัดดีเอ็นเอแบบสมบูรณ์ โดยทั่วไปจะใช้เอนไซม์ 2-3 ยูนิท ต่อดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ภาวะที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอจะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่จะใช้ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดก็จะมีภาวะที่ใช้ในการตัดแตกต่างกันออกไป

1.4.3.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ต้องการกับดีเอ็นเอพาหะด้วยเอนไซม์เชื่อมต่อ

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอแบ่งออกเป็น 3 ประเภทคือ

ก. การเชื่อมต่อระหว่างปลายเหนียว ซึ่งเกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน เมื่อทำการตัดดีเอ็นเอเป้าหมายและดีเอ็นเอพาหะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะทำให้ปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมายและดีเอ็นเอพาหะมีปลายที่เป็นคู่สมกัน (Complementary) การเชื่อมปลายเหนียวประเภทนี้จึงเป็นการเชื่อมต่อที่ง่ายและเกิดขึ้นได้เร็ว

ข. การเชื่อมต่อระหว่างปลายเหนียวที่ตัดด้วยเอนไซมที่ตัดจำเพาะต่างชนิดกันแต่ให้ปลายเหนียวที่เป็นคู่สม เอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดตัดลำดับเบสประจำ (recognition sequence) แล้วให้ปลายเหนียวที่เป็นคู่สมกับปลายเหนียวที่เกิดจากเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่นได้ ปลายเหนียวทั้งสองสามารถเชื่อมต่อกันได้สนิท แต่อย่างไรก็ตามหลังจากเชื่อมต่อกันแล้ว ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะสูญเสียตำแหน่งตัดจำเพาะ (restriction site) ของเอนไซม์ทั้งสองไปเพราะการเรียงลำดับเบสที่ตำแหน่งนั้นผิดไปจากเดิม

ค. การเชื่อมต่อระหว่างปลายทู่ ดีเอ็นเอปลายทู่สามารถเชื่อมต่อกันได้โดยไม่จำกัดว่าจะเป็นปลายทู่ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดใดเพราะไม่ต้องอาศัยปัจจัยการเป็นเสคู่สมซึ่งกันและกัน แม้ว่าการเชื่อมต่อระหว่างปลายทู่จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าดีเอ็นเอปลายเหนียว แต่ก็สามารถเกิดขึ้นได้โดยการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไลเกสหรือใช้เวลาในการเชื่อมต่อนานขึ้น

ในการศึกษานี้เป็นการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI กับดีเอ็นเอพาหะที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองจะให้ปลายที่เป็นคู่สมกัน ในการเชื่อมต่อจะใช้ดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่าปริมาณของดีเอ็นเอพาหะประมาณ 3 เท่าและใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ในการเชื่อมต่อ โดยใช้สภาวะในการเชื่อมต่อที่อุณหภูมิประมาณ 23-26 ^{o}ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจะหยุดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อด้วย EDTA แล้วจึงนำดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ไป transform เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านในลำดับต่อไป

1.4.4 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน เป็นขั้นตอนสำคัญที่จะทำให้ยีนที่สนใจเข้าไปเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เจ้าบ้านและทำให้ยีนเกิดการแสดงออก (Express) โดยการสร้างโปรตีนจากยีนที่ใส่เข้าไป การนำยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านทำได้หลายวิธีคือ การทำ Competent transformation ซึ่งเป็นวิธีที่กระทำได้ง่าย และเป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับงานทดลองหลายชนิด เช่น การโคลนยีน การสร้างพลาสมิดขึ้นมาใหม่ เป็นต้น และอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพคือ วิธีกากระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้ากระตุ้นให้ดีเอ็นเอเข้าเซลล์ (Electroporation) โดยกระแสไฟฟ้าจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงชั่วคราวในผนังเซลล์ ทำให้ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้

การเลือกเซลล์เจ้าบ้านจะต้องเลือกใช้เซลล์เจ้าบ้านที่ดีเอ็นเอพาหะสามารถ replicate ได้ในเซลล์เจ้าบ้านชนิดนั้น ในที่นี่จะใช้ *Escherichia coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้านและพลาสมิด pUC 19 ซึ่งสามรถ replicate ได้ในเซลล์เจ้าบ้านชนิดนี้ *E.coli* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (Gram negative) ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านกันอย่างแพร่หลายเพราะเป็นเชื้อที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว แต่ที่สำคัญคือ ดีเอ็นเอพาหะประเภทพลาสมิดที่มีจุดตั้งต้นการจำลองตัว (Origin of replication) แบบ ColE1 จาก *E.coli* นั้น มีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนโมเลกุลด้วยตนเองและเพิ่มได้หลายโมเลกุล ดังนั้นดีเอ็นเอเป้าหมายจึงมีจำนวนมากตามไปด้วย ข้อดีและข้อเสียของ *E.coli* ในฐานะเซลล์เจ้าบ้านแสดงไว้ในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 ข้อดีและข้อเสียของ *E.coli* ในฐานะเซลล์เจ้าบ้าน

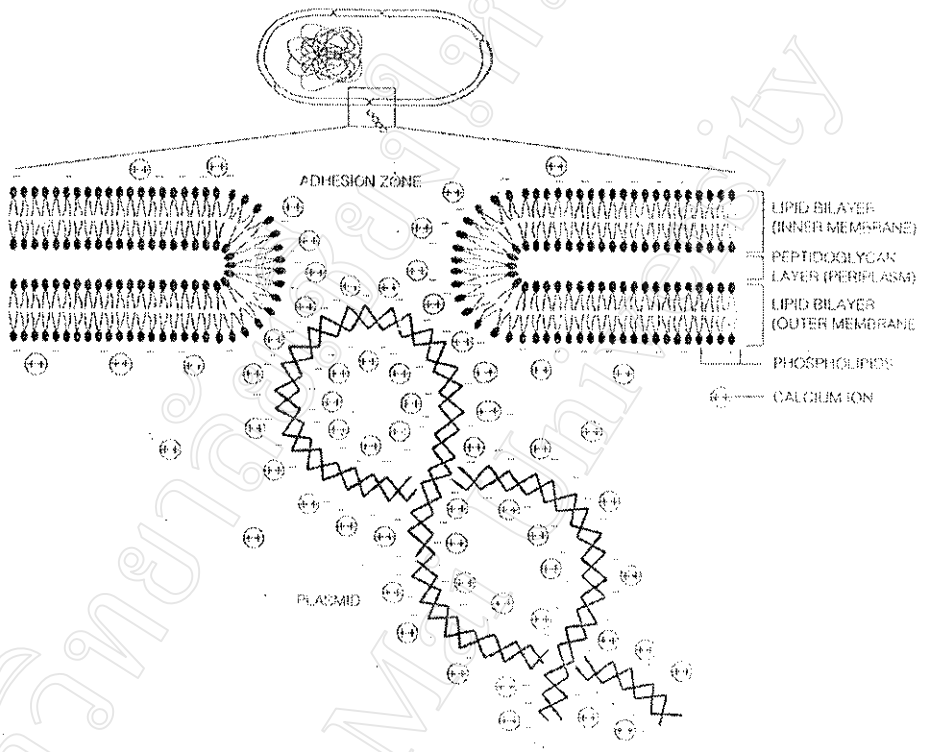
ข้อดี	ข้อเสีย
1. มีพันธุกรรม (Genome) และคุณสมบัติทางเคมี ซึ่งได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง และเป็นที่รู้จักกันดี	1. ไม่มีกลไกการกำจัดอินทรอน (Intron) หากโคลนยีนที่มีอินทรอนใน E.coli จะได้อาร์เอ็นเอนำรหัส (mRNA) ซึ่งมีอินทรอนอยู่ครบถ้วน เพราะเซลล์ของ E.coli ขาดเอนไซม์และปัจจัยในการตัดอินทรอนออก
2. มีเวคเตอร์ให้เลือกใช้หลายประเภท ได้แก่ พลาสมิด ฝาจแลมบ์ดา ฝาจรูปแท่ง คอสมิด และฝาจมิด	2. ไม่มีกลไกดัดแปลงโปรตีน กล่าวคือไม่สามารถเติมกลุ่มโมเลกุลต่างๆ ดังต่อไปนี้ให้กับโปรตีนได้ อาทิ (ก) กลุ่มน้ำตาลที่ตำแหน่ง N และ O

ตารางที่ 1.3 (ต่อ)

	(N และ O-Linked glycosylation) (ข) กลุ่มฟอสเฟต (Phosphorylation) (ค) กลุ่มอะเซทธิล (Acetylation) (ง) กลุ่มพาลมิเตท (Palmitation) นอกจากนี้ยังไม่สามารถกำจัดเมทไธโอนีนที่ต้นโมเลกุลของโปรตีน (N-Terminal methionine) อีกด้วย
3. มีพลาสมิดซึ่งอยู่ตัว (เสถียรภาพสูง) และมีจำนวนโมเลกุลต่อเซลล์มาก	3. มีขีดจำกัดในการขับโปรตีนออกนอกเซลล์
4. สามารถผลิตโปรตีนในปริมาณมาก	4. ไม่สามารถสร้างพันธะไดซัลฟ์ไฮดริล (Disulfhydryl bridge) ทำให้โปรตีนซึ่งต้องการพันธะดังกล่าวในการม้วนตัว (folding) ไม่มีโครงสร้างดังที่ควรจะมี
	5. ส่วนใหญ่แล้วโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นจากยีนที่สอดเข้าไปในเวคเตร์ จะเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (Insoluble) และไม่อยู่ตัว (Unstable)

การ transform เป็นการนำเอาดีเอ็นเอพาหะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยอาศัย Divalent cation ในการทำให้เซลล์เจ้าบ้านสามารถรับและนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ (Competent cells) ซึ่งวิธีนี้เสนอโดย Mandel และ Higa [25] โดยการนำเซลล์เจ้าบ้านไปแช่ในสารละลาย $CaCl_2$ ที่อุณหภูมิ ต่ำประมาณ 0 ^{o}ซ ซึ่งจะทำให้เซลล์เจ้าบ้านกลายเป็น Competent cells และเมื่อเติมดีเอ็นเอพาหะลงไปแล้วใช้ความร้อนกระตุ้น (Heat shock) เป็นเวลา 1-2 นาที ก็จะทำให้ดีเอ็นเอพาหะเข้าไปอยู่ในเซลล์เจ้าบ้านได้เนื่องจาก cation และความเย็นจะไปทำให้ประจุลบบนโมเลกุลของดีเอ็นเอพาหะและเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ของเซลล์เจ้าบ้านกลายเป็นกลาง (รูปที่ 1.8) และเมื่อใช้ความร้อนกระตุ้นโดยการนำไปแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 ^{o}ซ ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจะเกิดความไม่สมดุลของอุณหภูมิระหว่างภายนอกกับภายในเซลล์เจ้าบ้าน จึงเกิดการดึงเอาโมเลกุลของดีเอ็นเอพาหะเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านได้ [26] จากนั้น

จะนำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมวุ้น (agar) เพื่อทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมเข้าไป



รูปที่ 1.8 กลไกการเกิด transformation ของเซลล์เจ้าบ้าน[26]

1.4.5 การคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม[17,18]

การคัดเลือกโคโลนีของเซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมเข้าไป ในขั้นแรกจะต้องคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอพาหะเข้าไปออกจากโคโลนีที่ไม่ได้รับดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งโคโลนีที่ไม่ได้รับดีเอ็นเอพาหะจะถูกกำจัดออกได้ง่ายโดยการผสมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมตาม Marker gene บนดีเอ็นเอพาหะที่เลือกใช้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจะทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมออกจากโคโลนีที่ได้รับแต่ดีเอ็นเอพาหะเพียงอย่างเดียวซึ่งจะทำได้โดยการใช้ Marker gene อีกยีนบนดีเอ็นเอพาหะช่วยในการคัดเลือกเช่น การใช้วิธีดูสีของโคโลนีเป็นต้น หลังจากนั้นจะทำการคัดเลือกหาโคโลนีที่มียีนที่ต้องการต่อไป ซึ่งการคัดเลือกโคโลนีที่มียีนที่ต้องการสามารถกระทำได้ 3 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1.4.5.1 **การคัดเลือกโดยอาศัยลักษณะทาง** Phenotype

วิธีนี้ต้องอาศัยการแสดงออกของยีนที่ต้องการและยีนนั้นต้องแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านได้ การคัดเลือกอาจดูวงใสรอบโคโลนี(Clear zone) (รูปที่ 1.9) หรือดูการขึ้นได้หรือไม่ได้บนอาหารพิเศษสำหรับเชื้อที่มียีนนั้นๆเป็นต้น ซึ่งวิธีการคัดเลือกเหล่านี้จะเฉพาะเจาะจงสำหรับแต่ละยีน

รูปที่ 1.9 ลักษณะการเกิดวงใสรอบโคโลนี (Clear zone)

1.4.5.2 **การทำ** Colony hybridization

ไฮบริไดเซชันเป็นการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกัน โดยอาศัยดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันนี้ติดสลากด้วยสารไอโซโทปเพื่อทำเป็นดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) ซึ่งดีเอ็นเอติดตามอาจเป็นสายดีเอ็นเอที่เป็นรหัสส่วนหนึ่งของยีนที่ต้องการติดตาม ขั้นตอนแรกจะเป็นการย้ายโคโลนีที่ต้องการตรวจสอบไปไว้บนแผ่นเมมเบรน แล้วอาศัยขบวนการ Hybridization ของ probe โดยส่งไปเกาะยึดกับดีเอ็นเอที่ต้องการ ที่ปะปนอยู่กับดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านบนแผ่นเมมเบรน แล้วทำการตรวจหาดีเอ็นเอติดตามที่เกาะติดอยู่บนแผ่นเมมเบรนโดยการนำแผ่นเมมเบรนไปประกบกับฟิล์มเอ็กเรย์(Autoradiography) แล้วล้างฟิล์มดู ก็จะทราบว่าโคโลนีไหนที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่มียีนที่ต้องการอยู่ ปัจจุบันสามารถติดสลากดีเอ็นเอติดตามด้วยสารที่ไม่ใช่ไอโซโทปเช่น biotin และ digoxiginin(DIG) ได้ โดยในการตรวจสอบการ hybridization จะใช้แอนติบอดีของสารเหล่านั้นในการตรวจสอบ ซึ่งการทำ Colony hybridization นี้ไม่จำเป็นต้องอาศัยการแสดงออกของยีนก็สามารถตรวจสอบหาโคโลนีที่ต้องการได้

1.4.5.3. **วิธีทางอิมมิวโนเคมี** (Immunochemical method)

เป็นวิธีการตรวจสอบหาโคโลนียีนซึ่งสร้างโปรตีนที่เราต้องการอยู่ภายในเซลล์โดยจะทำการย้ายโคโลนีที่ต้องการตรวจสอบไปไว้บนแผ่นเมมเบรน แล้วทำให้เซลล์รั่วออกโดยใช้ไอคลอโรฟอร์มหลังจากนั้นจะนำแผ่นเมมเบรนไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีของโปรตีนจากยีนที่ต้องการที่ติดสลากด้วยสารไอโซโทป โคโลนีที่มียีนและสร้างโปรตีนจากยีนที่ต้องการออกมาก็จะจับกับแอนติบอดีและเมื่อนำไปทำ autoradiography ก็จะทราบโคโลนีที่มียีนที่ต้องการ นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นที่ไม่ใช้สารไอโซโทปแต่จะใช้แอนติบอดีอีกชนิดหนึ่งคือ การใช้แอนติบอดีต่อแอนติบอดีซึ่งจะจับได้กับแอนติบอดีตัวแรก นำมาติดสลากด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase หรือ Alkaline phosphatase แล้วเติมซับสเตรทลงไปก็จะเกิดสีขึ้นบนแผ่นเมมเบรนตรงบริเวณที่มีปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ก็จะทำให้ทราบถึงโคโลนีที่มียีนที่ต้องการได้

การคัดเลือกโดยอาศัยลักษณะทาง phenotype เป็นการคัดเลือกที่ค่อนข้างง่ายและรวดเร็วแต่ก็ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของดีเอ็นเอพาหะและยีนที่ต้องการโคลนยีนอีกด้วย ในการศึกษานี้จะทำการคัดเลือกโคโลนีที่มียีนที่ต้องการโดยดูจากการเจริญได้ของโคโลนีและการเกิดวงใสรอบโคโลนี บนอาหารวุ้นที่เป็นนมพร่องไขมัน (Skim milk agar plate) ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินลงไป

1.5. **การทำ Subcloning**

เป็นการโคลนยีนจากยีนที่ได้รับการโคลนลงในดีเอ็นเอพาหะแล้วอีกที่หนึ่ง ซึ่งมีวัตถุประสงค์แตกต่างกันออกไป เช่น subcloning เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ต้องการ โดยการเปลี่ยนดีเอ็นเอพาหะหรือเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม หรือทำเพื่อหาลำดับเบสของยีนที่ต้องการ โดยการทำ subcloning จะเหมือนกับการทำ gene cloning แต่จะต่างกันบ้างในบางขั้นตอนขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทำ subcloning นั้นๆ เช่น อาจจะต้องเปลี่ยนเอนไซม์ตัดจำเพาะในการตัดเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากดีเอ็นเอพาหะ เนื่องจากดีเอ็นเอพาหะสูญเสียบริเวณตัดจำเพาะไปจากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการกับดีเอ็นเอพาหะที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างชนิดกัน หรือในกรณีที่เปลี่ยนดีเอ็นเอพาหะหรือเซลล์เจ้าบ้านก็จะต้องใช้วิธีการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและการคัดเลือกโคโลนีที่มียีนที่ต้องการต่างไปจากเดิม ขึ้นอยู่กับระบบดีเอ็นเอพาหะและเซลล์เจ้าบ้านที่ต้องการทำ subcloning แต่หลักการทั่วไปยังคงเหมือนเดิมเหมือนกับการทำ gene cloning คือมีการตัดยีนที่สนใจออกมาแล้วนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ จากนั้นจะนำดีเอ็นเอสายผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและทำการคัดเลือกโคโลนีที่มียีนที่ต้องการออกมาเพื่อทำการศึกษาในลำดับต่อไป

1.6 เทคนิคที่เกี่ยวข้องในการศึกษาการโคลนยีนเอนไซม์โปรติเอส

1.6.1 การหาแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

ในการหาแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสนอกเซลล์ จากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TLS33 Sinchaikul และคณะ[14,15] ใช้ซับสเตรทที่เป็นโปรตีนที่มีสี (Chromogenic protein) คือ Azocasein ในการหาแอคทิวิตี ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์โปรติเอสคือหมู่เอโซซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ หนึ่งหน่วยโปรติเอส (1 unit) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ตกตะกอนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 ต่อหนึ่งชั่วโมง

1.6.2 การหาปริมาณโปรตีน[21]

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทำได้หลายวิธีโดยอาจแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในโปรตีน เช่นวิธีของ Kjeldahl และวิธีของ Nessler กลุ่มที่2 เป็นวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ของโปรตีนเช่น A_{280} กลุ่มที่ 3 เป็นวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มองเห็นได้เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับสารเคมีแล้วเช่น วิธี Biuret วิธีของ Lowry วิธีจับสี Coomassie เป็นต้น

วิธีการหาปริมาณโปรตีนส่วนมาก ใช้หลักการเกิดสีโดยการเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนบางกลุ่มและวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ซึ่งค่าโปรตีนที่วัดได้อาจเบี่ยงเบนไปขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนเหล่านั้น โดยแต่ละวิธีจะมีความไว(sensitivity) ต่อการวิเคราะห์และข้อจำกัดที่แตกต่างกัน สำหรับในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีหาปริมาณโปรตีน 2 วิธีดังนี้

1.6.2.1. วิธี Ultraviolet spectrophotometry

ทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งเกิดจากกลุ่มฟีนอล (phenolic group) ของกรดอะมิโนไทโรซีนและกลุ่มอินโดล(Indolic group) ของกรดอะมิโนทริปโตเฟนของโปรตีน มีความสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ค่า A_{280} ที่วัดได้จะขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนและชนิดของสารละลายที่โปรตีนอยู่ ถ้าสารละลายตัวอย่างเป็นโปรตีนชนิดเดียวจะได้ค่า A_{280} แปรผันตรงกับความเข้มของโปรตีนวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว ความไวในการตรวจสอบโปรตีนประมาณ 0.1 มก./มล.

1.6.2.2 **วิธี** Protein-Dye Binding **หรือวิธี** Bradford [27]

วิธีของ Bradford อาศัยหลักการจับกันของโปรตีนกับสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G250 ในสารละลายกรด แรงส่วนใหญ่ที่ใช้ในการจับเป็นแรงที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) รวมกับแรงส่วนน้อยที่เป็นแรงดึงดูดระหว่างประจุตรงกันข้าม(Ionic interaction) โดยสี Coomassie จะจับกับส่วนไม่ชอบน้ำของโปรตีนที่มีหมู่ alkyl ของกรดอะมิโนประเภท aromatic และ aliphatic นอกจากนี้สียังมีประจุลบอยู่ที่หมู่ sulphonate จึงจับกับประจุบวกของโปรตีนที่มีหมู่ alkyl เมื่อสี Coomassie จับกับโปรตีนสีจะเปลี่ยนรูปจากสารประกอบเชิงซ้อนสีแดงซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น465 นาโนเมตร เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และค่า A_{595} จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของโปรตีน ความไวในการตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธีนี้อยู่ในช่วง 1-20 ไมโครกรัม/มล. เมื่อใช้วิธีไมโคร (Micro method) และ10-100 ไมโครกรัม/มล.เมื่อใช้วิธีมาตรฐาน(standard method)

ในการหาปริมาณโปรตีนซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณต้องทำกราฟมาตรฐานควบคู่ไปด้วยเพื่อใช้ในการหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง โดยนำโปรตีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนมาทำการตรวจสอบไปพร้อมๆกันกับสารตัวอย่างด้วย โปรตีนมาตรฐานที่นิยมใช้คือ Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้นที่ใช้จะขึ้นอยู่กับความไวในการตรวจสอบในแต่ละวิธี

1.6.3 **อัลตราฟิลเตรชัน** (Ultrafiltration)

เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารที่มีโมเลกุลต่างกันออกจากกันโดยอาศัยขนาดและรูปร่างของสารในการแยก โดยสารจะถูกกรองผ่าน semipermeable membrane ที่กำหนดขนาดรู (Molecular weight cut-off) ของเมมเบรนไว้ ภายใต้สภาวะความดันสูง สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่ารูของเมมเบรนก็จะผ่านออกไปได้ส่วนสารที่มีขนาดโมเลกุลที่ต้องการซึ่งจะใหญกว่ารูของเมมเบรนก็จะยังคงค้างอยู่ภายในอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำอัลตราฟิลเตรชัน ปัจจุบันมีบริษัทผลิตอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์หลายบริษัทได้ทำชุดอุปกรณ์สำเร็จรูป (Kit) สำหรับการทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น อาทิ เช่น ชุด Viva spin ของบริษัท Vivascience และ ชุด Macrosep ของบริษัท Pall Filtron ซึ่งมีหลักการทำงานคล้ายกันโดยอาศัยหลักการเดียวกันกับอัลตราฟิลเตรชัน กล่าวคือเป็นการกรองสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่าที่ต้องการออกไปโดยการกรองผ่าน เมมเบรนที่มีรูพรุน โดยขนาดรูของเมมเบรนมีให้เลือกหลายขนาดซึ่งกำหนดเป็น molecular weight cut–off เหมือนกับเมมเบรนของอัลตราฟิลเตรชั่น ความดันที่ใช้เกิดจากแรงหนีศูนย์กลางของสารที่เกิดจากการ centrifuge ซึ่งจะต่างจากอัลตราฟิลเตรชันที่ใช้ความดันของก๊าซไนโตรเจน

1.6.4 อิเลคโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) [17,21,28]

อิเลคโตรโฟรีซิสเป็นวิธีแยกและวิเคราะห์ชีวโมเลกุลโดยอาศัยหลักว่า ชีวโมเลกุลที่มีประจุต่างกันย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน สารชีวโมเลกุลที่สำคัญหลายชนิด เช่นโปรตีนและกรดนิวคลีอิคเป็นสารที่มีประจุบนโมเลกุลกล่าวคือ โปรตีนมีประจุได้เนื่องจากการแตกตัวของหมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิลและหมู่อื่นๆ ใน side chain ที่ค่า pH หนึ่งๆสารละลายโปรตีนแต่ละชนิดจะมีปริมาณของประจุสุทธิแตกต่างกัน ถ้า pH ของบัฟเฟอร์เท่ากับ pHi (pI) ของโปรตีน โปรตีนก็จะไม่เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ถ้า pH ต่ำกว่า pHi โปรตีนจะมีประจะสุทธิเป็นบวกก็จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ(cathode) แต่ถ้า pH สูงกว่า pHi โปรตีนจะมีประจะสุทธิเป็นลบก็จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก (anode)ในทำนองเดียวกันโมเลกุลของกรดนิวคลีอิค(DNA,RNA) จะแสดงประจุลบตรงส่วนที่เป็นหมู่ฟอสเฟต อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้า จะขึ้นอยู่กับปริมาณประจุบนโมเลกุลนั้นๆ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของโมเลกุลอีกด้วย การแยกสารชีวโมเลกุลโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสนั้นจะมีตัวกลางเป็นที่รองรับให้โปรตีนหรือกรดนิวคลีอิคเคลื่อนที่ผ่านไป ซึ่งตัวกลางนั้นต้องมีคุณสมบัติเฉื่อยได้แก่ strach gel, polyacrylamide ,agar และ agarose เป็นต้น

1.6.4.1 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

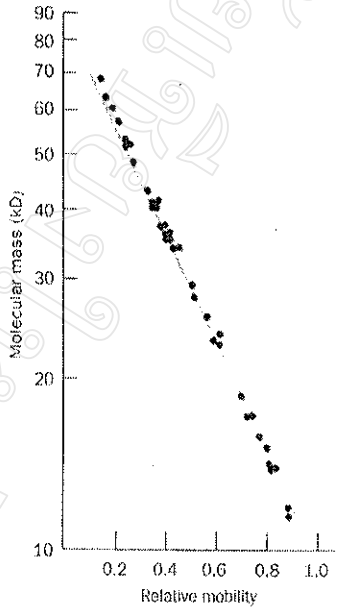
เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีน โดย Polyacrylaminde เตรียมได้จากปฏิกิริยา polymerization ของ acrylamide monomer โดยมี N,N-methylene –bis-acrylamind(BIS) เป็นตัวเชื่อมให้เป็นโพลิเมอร์ โดยใช้ ammonium persulphate เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา แล้วใช้ N,N,N,N-tetrametyl ethylenediamine(TEMED) เป็นตัวเร่งฏิกิริยา เจลที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นตาข่ายสามมิติมีรูพรุน ความพรุนของเจลขึ้นอยู่กับสัดส่วนของ acrylamide monomer และ BIS คือแสดงเป็น %T และ %C กล่าวคือ %T เป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโมโนเมอร์ทั้งหมด (Acrylaminde+BIS)และ %C เป็นปริมาณของ BIS จากโมโนเมอร์ทั้งหมด ขนาดของรูพรุนจะลดลงเมื่อ %T เพิ่มขึ้น โดยทั่วไป %T จะมีค่าอยู่ระหว่าง 3-30% ขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีนที่ต้องการ

ในการแยกโปรตีนด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซิส โปรตีนที่มีประจุจะถูกบังคับให้เคลื่อนที่ในสนานไฟฟ้าไปยังขั้วไปฟ้าที่มีประจุตรงข้าม การเคลื่อนที่นี้จะถูกต้านโดยปฏิกิริยาระหว่างสารกับร่างแหของเจลซึ่งทำหน้าที่เป็น Molecular sieve ดังนั้น การเคลื่อนที่ของโปรตีน จึงขึ้นอยู่กับขนาดรูปร่างและประจุสิทธิของโปรตีน

ก) SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [17,29,30]

Sodium dodesyl sulfate (SDS) เป็นสารซักฟอก (detergent) ซึ่งเป็น anionic detergent สามารถจับกับโปรตีนตรงบริเวณที่เป็น hydrophobic และแยกโปรตีนออกเป็น subunit โดย SDS จับกับโปรตีนในอัตราส่วน 1 โมเลกุลต่อกรดอะมิโน 2 ตัว การจับของ SDS ยังทำให้เกิดประจุลบ บนโมเลกุลของโปรตีน โดยมีจำนวนประจุต่อมวลเท่ากัน และทำให้โมเลกุลของโปรตีนเหยียดเป็น random coil เหมือนกันหมดเนื่องจากการผลักกันของประจุลบบนโมเลกุลของ SDS

ในการทำ SDS-PAGE จะใช้ SDS, β-mercaptoethanol และความร้อนช่วยในการทำให้โปรตีนเสียสภาพจากโตรงสร้างจตุรภูมิให้กลายเป็น random coil โดย β-mercaptoethanol จะสลายพันธะไดซัลไฟด์บนโมเลกุลของโปรตีน ส่วนความร้อนจะทำลายพันธะไฮโดรเจนและ SDS จะทำให้โปรตีนเหยียดออกและทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีประจุสิทธิเป็นลบ ซึ่งเมื่อนำไปทำอิเลคโตรโฟรีซิส โปรตีนจะเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดมวลโมเลกุลเพียงอย่างเดียว โดยจะเป็นการเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวก เป็นอัตราส่วนผกผันกับค่า log ของมวลโมเลกุล ถ้าทำการเปรียบเทียบระยะทางที่โปรตีนนั้นๆเคลื่อนที่ (Relative mobility,RM) เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีนซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่โปรตีนที่ทราบมวลโมเลกุล(โปรตีนมาตรฐาน) เคลื่อนที่กับค่า log มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ก็จะสามารถทราบมวลโมเลกุลของโปรตีนนั้นๆได้ โดยกราฟความสัมพันธ์จะมีลักษณะเป็นเส้นตรงดังรูปที่ 1.10



รูปที่ 1.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่โปรตีนมาตรฐานเคลื่อนที่กับค่า log มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (กราฟมาตรฐานโปรตีน) [1]

การเห็นแถบโปรตีนบนเจลได้จะต้องทำการย้อมสีโปรตีนบนเจล ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีเช่น การย้อมสีด้วยวิธี Silver staining วิธี Copper Staining และวิธีที่นิยมทำกันมากคือวิธีย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 ซึ่งแถบโปรตีนที่มีปริมาณโปรตีน 0.1-1 ไมโครกรัม จะให้สีน้ำเงินที่เห็นได้ชัดเจนบนเจล

การทำ SDS-PAGE จะทำให้โปรตีนอยู่ในสภาพที่สูญเสียโครงรูปทางธรรมชาติไปแล้ว ถ้าเป็นเอนไซม์ก็จะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีก มวลโมเลกุลที่ได้จะเป็นเพียงน้ำหนักของหน่วยย่อยของโปรตีนเท่านั้นซึ่งจะต่างจาก Native Polyacrylamide gel electrophoresis และ Gel filtration ที่จะบอกถึงมวลโมเลกุลของโปรตีนในสภาพธรรมชาติได้

ข) Native Polyacrylamide gel electrophoresis[17]

เป็นวิธีการทำอิเลคโตรโฟรีซิสที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติเช่น กรณีต้องการแยกโปรตีนชนิดต่างๆออกจากกันหรือในกรณีของเอนไซม์ที่ต้องทำ activity stain หลังจากการแยกด้วยอิเลคโตรโฟรีซิส และในกรณีที่ต้องการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในสภาพที่เป็น Oligomer ไม่ใช่สภาพที่เป็นหน่วยย่อย(subunit) เป็นต้น วิธีการทำ Native PAGE จะเหมือนกับการทำ SDS-PAGE จะต่างกันเพียงแต่ไม่ใส่ SDS และ mercaptoethanol และการเตรียมสารตัวอย่างก็ไม่ต้องนำไปต้มเหมือนกัน SDS-PAGE

ในการศึกษานี้จะทำการศึกษา Activity stain ของเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อน โดยการแยกด้วยอิเลคโตรโฟรีซิสที่เรียกว่า Zymography ซึ่งวิธีทำจะคล้ายกับ SDS-PAGE และ Native PAGE ทำโดยการผสมนมพร่องไขมัน(skim milk) ซึ่งเป็นซับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนลงใน polyacrylamide gel แล้วทำการแยกเอนไซม์ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส จากนั้นนำเจลที่ได้ไปแช่สารละลาย Triton X-100 เพื่อกำจัดโปรตีนที่ติดอยู่บนผิวเจลและสารเคมีที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพออกไป แล้วนำเจลไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 65 ^{o}ซ เพื่อเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสให้ทำการย่อยซับสเตรทที่เป็นนมพร่องไขมัน เจลที่ได้จะถูกนำไปย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 แล้วทำการล้างสีย้อมโปรตีนออก(Destain) ก็จะได้แผ่นเจลสีน้ำเงินที่เกิดจากการจับกันของสีย้อมโปรตีนกับนมพร่องไขมันที่ผสมอยู่ใน acrylamide gel ซึ่งบริเวณที่มีเอนไซม์โปรติเอสอยู่จะเห็นเป็นแถบใสบนพื้นเจลสีน้ำเงิน เนื่องมาจาก เอนไซม์โปรติเอสจะทำการย่อยนมพร่องไขมันทำให้บริเวณที่มีเอนไซม์อยู่ไม่มีนมพร่องไขมันเหลือจับกับสีที่ย้อมบริเวณนั้นจึงย้อมสีไม่ติดและเมื่อนำระยะทางที่เอนไซม์เคลื่อนที่มาเขียนกราฟความสัมพันธ์

ระหว่างค่า Rm และ log มวลโมเลกุลเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ใส่ลงไปในเจลด้วยก็จะหาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ในสภาพที่เป็นธรรมชาติได้

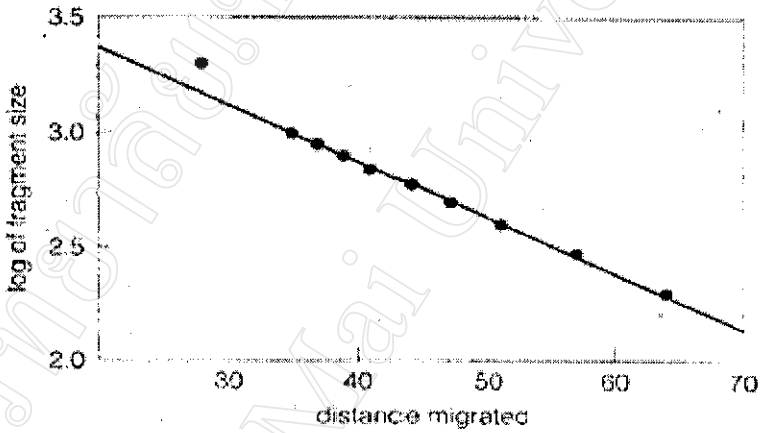
1.6.4.2 Agarose gel electrophoresis[17,21]

Agarose gel electrophoresis ใช้ในการแยกขนาดและศึกษาปริมาณกรดนิวคลีอิค สามารถแยกดีเอ็นเอได้หลายขนาดตั้งแต่ 70 bp จนถึง 800,000 bp โดยกรดนิวคลีอิคมีประจุเป็นลบที่ pH ที่เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนตัวจากขั้วลบ (cathode) ไปยังขั้วบวก (anode) โดยมี agarose gel ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ galactopyranose ที่สกัดจากสาหร่ายทะเล เป็นตัวกลางในการเคลื่อนที่ของกรดนิวคลีอิค ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ผ่านเจลได้ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็กโดยระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่จะแปรผกผันกับ log 10 ของจำนวนเบสในโมเลกุล ส่วนรูปร่างของดีเอ็นเอที่มีผลต่อการแยกนั้นพบว่า ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันแต่มีรูปร่างต่างกัน จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกัน ดีเอ็นเอวงกลมที่ขดเป็นเกลียว(superhelic circular DNA)จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่เป็นเส้น(linear DNA) ส่วนดีเอ็นเอวงกลมที่คลายเกลียว(open circular หรือ nick circular DNA) จะเคลื่อนที่ช้าที่สุด นอกจากนี้ความสามารถในการแยกยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวกลาง โดยเจลที่มีความเข้มข้นน้อย จะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุลใหญ่ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านได้เร็วกว่าเจลที่มีความเข้มข้นมาก ดังนั้นเจลที่มีความเข้มข้นน้อยจึงเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่และเจลที่มีความเข้มข้นสูงเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ดังตารางที่ 1.4

ตารางที่ 1.4 ช่วงที่เหมาะสมในการแยกดีเอ็นเอโดย agarose gel [21]

Agarose (%)	Optimal range of separation linear DNA (kb)
0.3	60 - 5.0
0.6	20 - 1.0
0.7	10 – 0.8
0.9	7 – 0.5
1.2	6 – 0.4
1.5	4 – 0.2
2.0	3 – 0.1

กรดนิวคลีอิคที่แยกได้จะปรากฏเป็นแถบ (electropherogram) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยการย้อมสีที่มีคุณสมบัติเรืองแสง(fluorescent dye) ภายใต้แสง UV เช่น Ethidium bromide ซึ่งจะเข้าไปสอดแทรก(Intercalate) ระหว่างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอและเรืองแสงในช่วงความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่ำถึง 10 ไมโครกรัมได้ การหาขนาดของดีเอ็นเอสามารถหาได้จากการเปรียบเทียบระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่กับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่ดีเอ็นเอที่ทราบขนาด (DNA marker) เคลื่อนที่ กับค่า log ของขนาด DNA marker (รูปที่ 1.11) ซึ่งจะเหมือนกับการหาขนาดโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE



รูปที่ 1. 11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่ DNA marker เคลื่อนที่กับขนาด ของ DNA marker [31]

1.6.5 การแยกดีเอ็นเอออกจากเจล [17]

การแยกดีเอ็นเอออกจากเจลเป็นการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจล เพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ในขั้นตอนต่อไป การแยกดีเอ็นเอออกจากเจลสามาถทำได้หลายวิธี เช่น

1.6.5.1 การแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้หลักการ Adsorption เป็นการใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก agarose gel ไปติดบน Solid support เช่น DEAE-cellulose หรือ Glassmilk จากนั้นจึงใช้สารละลายเกลือแยกดีเอ็นเอออกจาก solid support ในภายหลัง วิธีนี้เหมาะสำหรับแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก

1.6.5.2 การแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้าหลักการคือ การให้ดีเอ็นเอที่อยู่ในเนื้อเจลอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมแล้วผ่านกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ดีเอ็นเอจะถูกแยกออกจากเนื้อเจลวิ่งไปทางขั้วบวกและถูกเก็บกั้นไว้ด้วย Dialysis membrane,

High salt buffer หรือ membrane cap ซึ่งวิธีนี้ดีเอ็นเอที่ได้จะมีปริมาณ 70-95% ของปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น

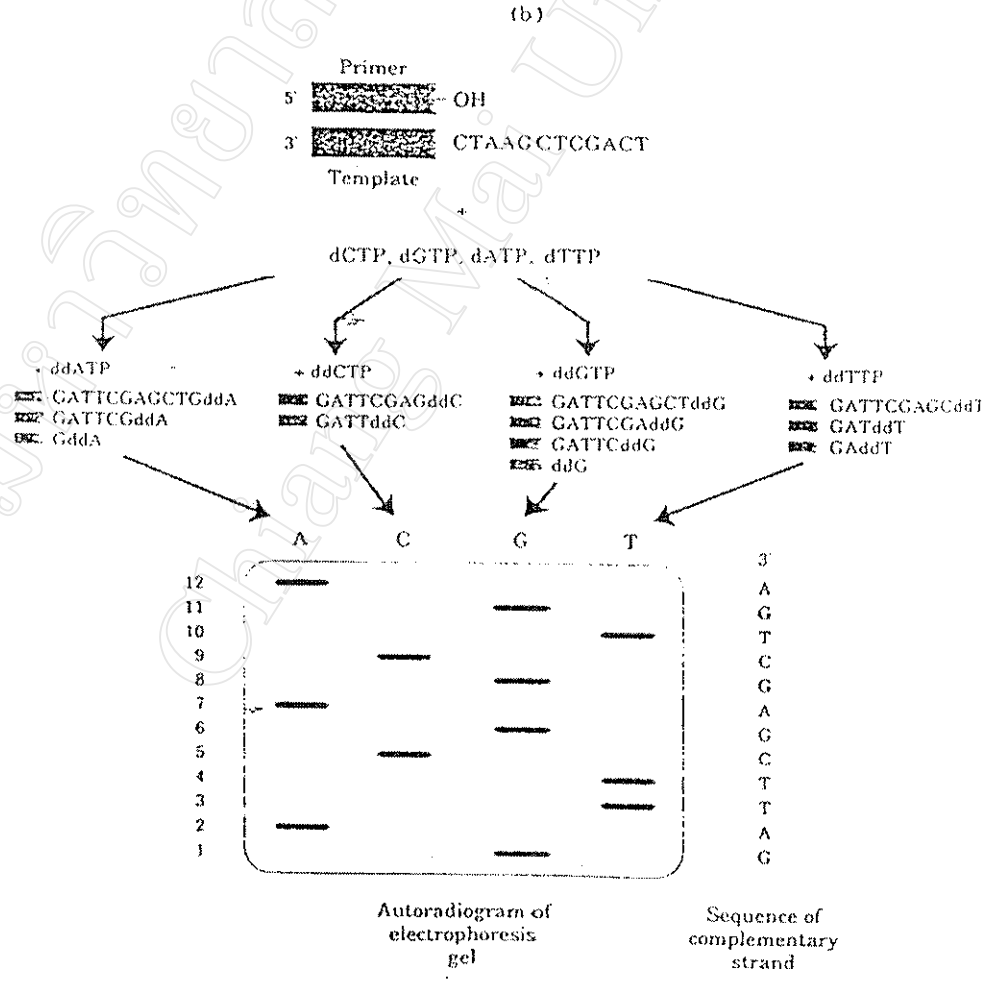
1.6.5.3 การแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยการสกัดด้วยฟีนอล ทำได้โดยการละลายเจลโดยใช้ความร้อนช่วย จากนั้นจึงใช้สารละลายฟีนอลสกัดโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ปนมากับเจลออก แล้วจึงทำการตกตะกอนโปรตีนออกมา วิธีการนี้ให้ % Recovery ต่ำสาเหตุเกิดจากการสูญเสียดีเอ็นเอระหว่างขั้นตอนการสกัด

ในการศึกษานี้จะทำการแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ Kit ที่มีชื่อทางการค้าว่า Concert Rapid Gel Extraction-system มีหลักการแยกดังนี้คือ จะทำการละลาย agarose gel ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วย sodium perchlorate และใช้ความร้อนเข้าช่วยซึ่งดีเอ็นเอที่ละลายอยู่ในสารละลาย agarose จะถูกจับด้วย silica membrane จากนั้น agarose จะถูกกำจัดออกไปโดยใช้อัลกอฮอล์และ wash buffer เหลือแต่ดีเอ็นเอติดอยู่ที่เมมเบรน แล้วจึงทำการชะดีเอ็นเอออกจากเมมเบรนในภายหลัง วิธีการนี้สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาด ตั้งแต่ 40bp จนถึง 10kb ออกจากเจลได้

1.6.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) [32,33]

โดยทั่วไปขั้นตอนสุดท้ายของการศึกษาวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่โคลนได้คือการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอนั้น การหาลำดับเบสกระทำได้สองวิธี วิธีแรกเป็นวิธีทางเคมีพัฒนาโดย Alan Maxan และ walter Gilbert วิธีนี้ เป็นการใช้สารเคมีตัดดีเอ็นเอที่เบสอย่างจำเพาะเจาะจง (Base-specific chemical cleavage) ทำโดยการนำดีเอ็นเอสายเดี่ยวมาตัดด้วยสารเคมีจำเพาะแบบสุ่มด้วยภาวะการตัดดีเอ็นเอ 1 ครั้งต่อดีเอ็นเอ 1 โมเลกุล แล้วนำไปทำอิเลคโตรโฟรีซิส ซึ่งวิธีนี้ใช้เวลามากนอกจากนี้สารเคมีที่ใช้ยังเป็นพิษอีกด้วย อีกวิธีหนึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เป็นวิธีใช้เอนไซม์(Enzymatic method) ซึ่งพัฒนาโดย Fedrich Sanger และคณะ[33] วิธีนี้สายดีเอ็นเอที่จะหาลำดับเบสจะถูกใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมาโดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase I และต้องอาศัย dideoxynucleoside triphosphate(ddNTP) ซึ่งที่ตำแหน่ง 3´ ของน้ำตาลตาลไรโบสจะเป็น3´-H แทน3´-OH ทำให้นิวคลีโอไทด์นี้สามารถเข้าไปต่อกับสายดีเอ็นเอที่กำลังสังเคราะห์ได้แต่นิวคลีโอไทด์ตัวถัดไปจะเข้ามาต่อไม่ได้ ทำให้การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอต้องหยุดลงตรงตำแหน่งที่ ddNTP เข้าไปต่อ ดังนั้นวิธีการหาลำดับเบสนี้จึงเรียกว่า Dideoxy chain termination method การหาลำดับเบสด้วยวิธีนี้จะต้องทำปฏิกิริยาแยกกันในสี่หลอดสำหรับเบสแต่ละตัว ในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอที่เป็นแม่แบบ, primer,

เอนไซม์ DNA polymerase, deoxynucleotide(dNTP) ทั้ง 4 ตัว (dGTP, dATP, dATT, dCTP) และ dideoxynucleotide 1 ตัวสำหรับแต่ละปฏิกิริยาเพื่อเป็นตัวหยุดการสร้างสายดีเอ็นเอ ในแต่ละปฏิกิริยา dideoxynucleotide นี้จะมีปริมาณจำกัด เพื่อให้การหยุดปฏิกิริยาสร้างสายดีเอ็นเอเป็นแบบสุ่ม ซึ่งจะทำให้สายดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น มีความยาวไม่เท่ากัน หลังจากนั้นสายดีเอ็นเอเหล่านี้ในแต่ละปฏิกิริยาจะถูกนำมาแยกออกจากกันด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ผลที่ได้คือจะเกิดแถบของเส้นดีเอ็นเอเรียงกันแบบขั้นบันไดในเจล การหาลำดับเบสด้วยวิธีนี้แสดงไว้ในรูปที่ 1.12 ในปัจจุบันการหาลำดับเบสสามารถทำได้ง่ายขึ้นโดยใช้เครื่องมือ หาลำดับเสแบบอัตโนมัติ (Automated DNA sequencer) ซึ่งเครื่องหาลำดัลเบสแบบอัตโนมัตินี้ใช้หลักการหาลำดับเบสแบบเดียวกับวิธี Sanger แต่เป็นแบบอัตโนมัติทำให้สามารถหาลำดับเบสได้นับพันเบสในเวลาเพียงหนึ่งสัปดาห์



รูปที่ 1.12 การหาลำดับเบสด้วยวิธี Dideoxy chain termination [33]

1.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการโคลนยีนของเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อน

จากรายงานการศึกษาของ Maciver และคณะ [34] ซึ่งได้ทำการโคลนยีนของเอนไซม์เซอรีนโปรติเอสทนความร้อนจากแบคทีเรีย *Bacillus strain* Ak1 ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH5α โดยใช้ ดีเอ็นเอพาหะ pJLA 602 โดย Maciver และคณะ ทำการแยกจีโนมิคดีเอ็นเอของแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus strain* Ak1 ออกมาย่อยเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ด้วยเอนไซม์ตัดยีน จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการแยกเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนออกมาโดยวิธี Southern blots ซึ่ง primer ที่ใช้ทำเป็น probe ได้มาจากการสังเคราะห์ขึ้นโดยอาศัยความเป็น homology ของลำดับกรดอะมิโน ของเอนไซม์เซอรีนโปรติเอสที่ได้จากแบคทีเรียทนความร้อนชนิดต่าง ๆ ตรงบริเวณ conserve active site ชิ้นดีเอ็นเอที่แยกออกมาได้จะถูกนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ แล้วทำการ transform เข้าไปในแบคทีเรียเจ้าบ้าน จากนั้นทำการเลี้ยงแบคทีเรียเจ้าบ้านที่อุณหภูมิ 28 $^{\circ}$ซ และเมื่อทำการกระตุ้นแบคทีเรียเจ้าบ้านให้ผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนออกมาโดยการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเป็น 42 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 1-2 ชม. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 2-5 ชม. พบว่าแบคทีเรียเจ้าบ้านสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนนอกเซลล์ออกมาได้ โดยดูจากวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี บนอาหารเลี้ยง Casein-agar plate และเมื่อทำการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Azocasein assay พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากการโคลนยีนมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่ 8.5 และ 70-90° ซ ตามลำดับ ซึ่งเหมือนกับเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus strain* Ak1 จากการหาขนาดของยีนโปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีนพบว่ามีขนาด 1,206 bp Lee และคณะ [10,35] ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ Carboxypeptidase Taq ซึ่งเป็นเมทัลโลโปรติเอสทนความร้อนที่ได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* YT-1 โดยเอนไซม์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 8 และ 80°ซ ตามลำดับ จากการศึกษาการโคลนยีนของเอนไซม์ Carboxypeptidase taq ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* โดยใช้วิธีของ Sambrook และคณะ ซึ่งจีโนมิคดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* YT-1 จะถูกแยกออกมาแล้วทำการย่อยเป็น ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นจะทำการแยกเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ผลิตเอนไซม์ Carboxypeptidase taq ออกมาโดยวิธี Southern blots ดีเอ็นเอที่แยกออกมาได้ ถูกนำไปใส่ในดีเอ็นเอพาหะ pBR 322 แล้วนำไป transform ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Esherichia coli* HB 101 โดยพบว่าแบคทีเรียเจ้าบ้านซึ่งเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนได้ที่เวลา 9 ชั่วโมง ภายหลังจากทำการโคลนยีนของเอนไซม์ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน ซึ่งตรวจสอบได้จากการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์โดยวิธี

Ninhydrin method ยีนโปรติเอสที่โคลนได้มีขนาด 1,536 bp เอนไซม์มีมวลโมเลกุลประมาณ 56 kDa จัดอยู่ในพวก Zinc-dependent metallo-carboxypeptidase Motoshima และคณะ [36] ได้ทำการทดลองนำยีนของ Aminopeptidase Th(AP-Th) และ Aminopeptidase II (AP II) ซึ่งเป็นยีนของเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนที่ได้จากแบคทีเรียทนความร้อน *Thermus thermophilus* HB8 และ *Bacillus Stearothermophilus* NCIB 8924 ตามลำดับ ทำการโคลนยีนโดยใช้วิธีของ Sambrook และคณะ ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Esherichia coli* MV1184 โดยใช้ดีเอ็นเอพาหะ pEXP7 พบว่าแบคทีเรียเจ้าบ้านสามารถผลิตเอนไซม์ Aminopeptidase Th และ Aminopeptidase II ได้ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในขณะที่แบคทีเรีย*Thermus thermophilus* HB8 และ *Bacillus stearothermophilus* NCIB 8924 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ที่ 75°ซ และ 55°ซ ตามลำดับ Nishiya และคณะ [37] ได้ทำการโคลนยีนโปรติเอสทนความร้อนเพื่อหาขนาดและตำแหน่งของยีนโปรติเอส (nprS gene) จากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TELENE โดยทำการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TELENE ด้วยวิธี partial digestion โดยใช้เอนไซม์ *Sau* 3AI แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pTB53 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI แล้วทำการ transform เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *B.subtilis* MT-2 พบว่ามี 1 โคโลนีบน Casein agar plate (LC agar plate) ที่เกิดวงใสรอบโคโลนี ซึ่งเมื่อนำโคโลนีที่ได้มาแยกดีเอ็นเอสายผสมออกมาแล้วนำมาหาขนาดของยีนที่แทรกเข้าไปในดีเอ็นเอพาหะ พบว่ามีขนาดประมาณ 18 กิโลเบส (kbp) จากนั้น Nishiya และคณะได้ทำ Sub cloning ยีนที่ได้โดยการทำ partial digestion ด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI เพื่อให้ได้ชิ้นยีนที่มีขนาดเล็กลงแล้วทำการโคลนลงในเซลล์เจ้าบ้านเพื่อทำการตรวจสอบหายีนโปรติเอส (nprS gene) ซึ่งพบว่า nprS gene มีขนาด 1,653 bp และมีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ เอนไซม์ Neutral protease จากแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* ชนิดอื่น

นอกจากนี้ยังมีผู้ทำการศึกษาการโคลนยีนของเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากแบคทีเรียทนความร้อนชนิดอื่นอีก เช่น การศึกษาการโคลนยีนเอนไซม์อัลคาไลโปรติเอสทนความร้อน (Thermostable alkali protease) จากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus smithii* [38]และ *Bacillus sp.no*.AH-101 [39] การศึกษาการโคลนยีนเอนไซม์แอซิดโปรติเอสทนความร้อน (Thermostable acid protease) จากแบคทีเรียทนความร้อน *Sulfolobus acidocaldarius*[40,41]และการศึกษาการโคลนยีนเอนไซม์เซอรีนโปรติเอสทนความร้อน (Thermostable serine protease) จากแบคทีเรียทนความร้อน *Thermus thermophilus* [42] , *Thermus aquaticus* [43,44,45] ,*Bacillus sp*.Ak.1 [46] และ *Bacillus caldolyticus* [47] เป็นต้น

Sinchaikul และคณะ[14,15] พบว่าแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ซึ่งแยกได้จากแหล่งน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่ สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนได้ โดยเอนไซม์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 5-8 และ 70-80^{o}ซ ตามลำดับ สามารถย่อยโปรตีนได้หลายชนิด นอกจากนี้ Sookkheo และคณะ[48] ได้ทำการศึกษาการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียชนิดนี้ พบว่าประกอบด้วยเอนไซม์โปรติเอส 3 ชนิด คือ ชนิด S , N และ B โดยโปรติเอส S มีอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 70^{o}ซ และ 8.5 ตามลำดับ มีความคงทนความร้อนที่อุณหภูมิ 72^{o}ซ เป็นเวลา 30 นาที จัดอยู่ในประเภท Alkaline metalloprotease ส่วนโปรติเอส N และ B มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 85 และ 90 ^{o}ซ มี pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 7.5 และ 7 มีความคงทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 78 และ 90 ^{o}ซ ตามลำดับ โปรติเอส S , N และ B มีมวลโมเลกุลประมาณ 36 ,53 และ 71 kDa ตามลำดับ จากการหาขนาดมวลโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE และ Zymography โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 นี้มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา และความคงทนความร้อนสูงซึ่งเหมาะที่จะนำไปใช้ในงานด้านต่างๆ แต่เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้ผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมาได้ในปริมาณค่อนข้างน้อยและต้องเลี้ยงในที่ที่มีอุณหภูมิสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนยีนของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน เพื่อให้แบคทีเรียเจ้าบ้านสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนออกมาได้ ซึ่งผลงานวิจัยที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลและแนวทางในการศึกษาและพัฒนาวิธีการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ในลำดับต่อไป และเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนที่ผลิตได้จากการเพิ่มจำนวนยีนยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานด้านต่าง ๆ ได้อีกด้วย

1.8 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนยีนและการแสดงออกของยีนเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ในแบคทีเรียเจ้าบ้านที่เหมาะสม และศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้ เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงและการนำไปใช้ประโยชน์