บทที่ 4
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

4.1 การโคลนยีนโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33

4.1.1 การศึกษาการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

จากการศึกษาการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปหาความบริสุทธิ์ โดยการนำไปวัดค่า A_{260}/A_{280} พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ซึ่งถือว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์พอที่จะนำมาใช้ในการโคลนยีน[22] และเมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำ Agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่ทราบขนาด(DNA marker) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่อยู่ในช่วงที่มีขนาดใหญ่กว่า 23.1 kb แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ค่อนข้างสมบูรณ์สามารถสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอที่เป็นสายยาวได้ จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ทำ Genomic DNA library เพราะจะต้องนำดีเอ็นเอสายยาวที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้ได้เป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ซึ่งสามารถนำไปต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ ถ้าในขั้นตอนการสกัดทำให้จีโนมิคดีเอ็นเอขาดเป็นสายสั้น ๆ แล้ว จะไม่สามารถต่อชิ้นดีเอ็นเหล่านั้นกับดีเอ็นเอพาหะได้หรือต่อได้ยาก เนื่องจากปลายสายดีเอ็นเอที่ได้ไม่เป็นคู่สมกัน นอกจากนี้ยังไม่สามารถเลือกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนได้อีกด้วย จากผลการศึกษาการสกัดดีเอ็นเอพาหะ pUC19 โดยวิธี Alkaline lysis method พบว่าดีเอ็นเอพาหะที่สกัดได้เมื่อนำไปทำ Agarose gel electrophoresis แล้ว ได้แถบของดีเอ็นเอ 4 แถบขนาดต่าง ๆ กัน เป็นเพราะดีเอ็นเอพาหะที่สกัดได้มีรูปร่างหลายแบบซึ่งรูปร่างแต่ละแบบจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกัน ดีเอ็นเอวงกลมที่ขดเป็นเกลียว(superhelic circular DNA)จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่เป็นเส้น(linear DNA) ส่วนดีเอ็นเอวงกลมที่คลายเกลียว(open circular หรือ nick circular DNA) จะเคลื่อนที่ช้าที่สุด ทำให้เมื่อนำมาทำอิเล็คโตรโฟรีซิสแล้วจึงเห็นดีเอ็นเอมีหลายแถบ

4.1.2 การศึกษาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ในการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ให้ได้เป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ได้ทำการตัดดีเอ็นเอแบบจำกัดเวลาแต่ไม่จำกัดปริมาณเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้เอนไซม์ *Sau* 3AI. ปริมาณต่าง ๆ กัน พบว่า ปริมาณเอนไซม์ 0.03 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ จะให้แถบดีเอ็นเอที่มีช่วงขนาดตั้งแต่ เล็กกว่า 500 bp จนถึงประมาณ 9.4 kb และเอนไซม์ 0.015 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ จะให้แถบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 1 – 23 kb ซึ่งขนาดดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำ Genomic DNA library คือ อยู่ในช่วง 2-10 kb [17] จะเห็นได้ว่าเอนไซม์

ปริมาณ 0.03 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ จะให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 2 kb ด้วย จึงต้องทำการลดปริมาณเอนไซม์ลงเพื่อที่จะได้ตัดดีเอ็นเอได้น้อยลง ส่วนเอนไซม์ปริมาณ 0.015 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ จะให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 kb ด้วย จึงต้องเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้มากขึ้นเพื่อที่จะได้ตัดดีเอ็นเอได้มากขึ้น ดังนั้นจึงได้เลือกใช้เอนไซม์ปริมาณ 0.025 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 0.015 - 0.03 ยูนิท ในการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอ และใช้ระยะเวลาในการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอ 75 นาที จึงได้แถบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 2 – 10 kb ตามต้องการ การตัดดีเอ็นเอด้วยวิธีดังกล่าว เป็นการตัดดีเอ็นเอแบบสุ่ม เนื่องจากไม่ทราบตำแหน่งที่แน่นอนของยีนโปรติเอสที่ต้องการจึงได้เลือกใช้วิธีนี้ในการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอ เพราะดีเอ็นเอที่ได้จะมีขนาดต่าง ๆ กัน จึงมีโอกาสที่จะตัดได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนโปรติเอสที่สมบูรณ์ จากผลการศึกษาที่ได้จึงได้เลือกใช้ เอนไซม์ *Sau* 3AI ปริมาณ 0.025 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ และใช้เวลาในการตัดดีเอ็นเอ 75 นาที เป็นภาวะที่ใช้ในการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ให้มีขนาดเล็กลงเพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ในขั้นต่อไป โดยดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ที่สกัดได้ถูกนำมาตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Bam* HI ซึ่งจะให้ปลายที่เป็นคู่สมกับปลายจีโนมิคดีเอ็นเอที่ตัดด้วย เอนไซม์ *Sau* 3AI จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ปริมาณ 1 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ สามารถตัดดีเอ็นเอพาหะได้อย่างสมบูรณ์ โดยดูจากแถบของดีเอ็นเอพาหะบน agarose gel ก่อนที่จะทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI จะมีอยู่ 4 แถบ ภายหลังจากทำการตัดแล้วจะเหลือเพียงแถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 2.7 kb ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอพาหะ pUC19 (2,690 bp) แต่ในบางครั้งเอนไซม์ปริมาณ 1 ยูนิท ซึ่งเป็นปริมาณที่พอดีกับดีเอ็นเอที่ต้องการตัด ไม่สามารถตัดดีเอ็นได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่เตรียมได้จริงมากกว่าปริมาณที่คำนวณไว้ ซึ่งเกิดจากความผิดพลาดในขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอและเอนไซม์ เพราะในการเตรียมดีเอ็นเอและเอนไซม์จะเตรียมในปริมาณที่น้อยมากซึ่งอยู่ในหน่วยไมโครลิตร ทำให้เกิด pipetting error ได้ง่าย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้เอนไซม์ *Bam* HI ปริมาณ 2 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ในการตัดดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งเป็นปริมาณมากกว่าที่ศึกษาได้เพื่อป้องกันการเกิดปัญหาดังกล่าวขึ้น

4.1.3 การศึกษาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอพาหะและการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ภายหลังจากการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอและดีเอ็นเอพาหะด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ได้ทำการเชื่อมต่อจีโนมิคดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase จากนั้นจึงทำการ transform ดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell ที่เป็นเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli*

DH5α ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอพาหะ pUC19 แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้ไป spread ลงบนอาหารวุ้นที่เป็นนมพร่องไขมัน (Skim milk agar plate)ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ผสมอยู่ และทำการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *E. coli* DH5α เพื่อติดตามดูการเจริญเติบโตและดูการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน โดยปกติแล้ว *E.coli* DH5α จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารที่มีแอมพิซิลินผสมอยู่ แต่ถ้าได้รับการ transform ดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ซึ่งมียีนต้านยาแอมพิซิลินเข้าไปในเซลล์แล้ว ก็จะสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารที่มีแอมพิซิลิน จากเหตุผลดังกล่าวจึงใช้การเจริญเติบโตได้บนอาหารที่มีแอมพิซิลินทำการคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับการ transform ดีเอ็นเอสายผสมเข้าไปในเซลล์

4.1.4 ผลการตรวจสอบโคโลนีที่มียีนโปรติเอส

จากการตรวจสอบการเจริญได้ของเซลล์เจ้าบ้านบนอาหารวุ้นนมพร่องไขมันที่มีแอมพิซิลินผสมอยู่และดูการเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีซึ่งเกิดจากการย่อยซับสเตรทที่เป็นนมพร่องไขมันของเอนไซม์โปรติเอสที่โคลนได้บน skim milk agar plate พบว่า มี skim milk agar plate 1 แผ่นเกิด clear zone ขึ้นกระจายเต็มแผ่นอาหารเลี้ยง ภายหลังจากที่ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ เป็นเวลา 24 ชม. ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตออกมาเป็นของโคโลนีใด และเมื่อนำเอาโคโลนีที่อยู่ในบริเวณ clear zone จำนวน 11 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เป็นนมพร่องไขมัน แล้วทำการตรวจสอบแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 65^{0}ซ พบว่าทั้ง 11 โคโลนี ผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนออกมา ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดมาจากในขั้นตอนการลงเชื้อภายหลังจากทำการ transform แล้ว ทำโดยการ spread plate ซึ่งใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากเกินไปทำให้เชื้อไม่กระจายออกจากกันแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวเหมือนการลงเชื้อด้วยวิธี streak plate เมื่อเชื้อที่มียีนโปรติเอสเจริญขึ้นจึงเกิดการกระจายเป็นกลุ่มโคโลนีไม่กระจายเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ เมื่อนำโคโลนีบริเวณดังกล่าวซึ่งเป็นกลุ่มของโคโลนีที่มาจากเชื้อเดียวกันมาหาแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจึงพบว่าทั้ง 11 โคโลนีผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมา นอกจากนี้ยังต้องใช้เวลาถึง 24 ชม.ในการเลี้ยง *E.coli* DH5α ที่ได้รับการโคลนยีน จึงจะเห็นโคโลนีและ clear zone ได้ชัดเจนเนื่องจาก *E.coli* DH5α เจริญเติบโตได้ไม่ดีบนอาหารวุ้นที่เป็นนมพร่องไขมันซึ่งโคโลนีที่ได้มีขนาดเล็กกว่าโคโลนีของ *E.coli* DH5α ที่เลี้ยงในอาหารวุ้น LB medium มาก และอาหารวุ้นนมพร่องไขมันจะมีตะกอนนมกระจายอยู่ในวุ้นด้วย ทำให้สังเกตการเจริญเติบโตได้ยาก โดยทั่วไปแล้ว *E.coli* มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ระยะเวลาประมาณ 16 -18 ชม. ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เวลาใน

การเลี้ยงถึง 24 ชม. อาจทำให้เชื้อที่มียีนโปรติเอสเกิดการกระจายไปทั่วแผ่นวุ้นแล้ว ทำให้เมื่อนำโคโลนีที่อยู่ในบริเวณ clear zone มาหาแอคทิวิตี จึงพบว่าโคโลนีเหล่านั้นผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมาได้ และจากผลการศึกษาแอคทิวิตีที่ได้จึงเลือกโคโลนีที่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดมาทำการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน

4.1.5 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน

จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ Cloned TLS33 (เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* DH5α ที่มียีนโปรติเอสของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33) ในอาหารเหลวนมพร่องไขมันที่ผสมแอมพิซิลิน พบว่า Cloned TLS33 มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่เวลา 8 ชม. และมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่เวลา 12 ชม. ดังรูปที่ 3.6 ซึ่งต่างจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ที่มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่เวลา 12 ชม. และมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่เวลา 48 ชม.[14] เนื่องจาก *E.coli* DH5α มีการเจริญเติบโตดีกว่า *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ทำให้ดีเอ็นเอสายผสมที่อยู่ในเซลล์ของ *E.coli* DH5α มีการจำลองตัวเองมากตามไปด้วย ซึ่ง pUC19 เป็นดีเอ็นเอพาหะที่มีการจำลองตัวเองสูง (High copy number) ทำให้มีจำนวนโมเลกุลต่อเซลล์มาก[20] กล่าวคือ ในเซลล์เจ้าบ้าน 1 เซลล์จะมีโมเลกุลของ pUC 19 หลายร้อยโมเลกุล ทำให้มียีนโปรติเอสที่เชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC19 มากตามไปด้วย ดังนั้นจึงพบว่ามีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงมากที่เวลาใกล้เคียงกับเวลาที่ *E.coli* DH5α มีการเจริญเติบโตสูงสุด

จากการศึกษาแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ที่อุณหภูมิและพีเอช ต่าง ๆ กัน และศึกษาความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 พบว่า โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 มีพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาใกล้เคียงกับโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 คือมีพีเอชที่เหมาะสมในช่วงกว้าง และมีแอคทิวิตีสูงที่พีเอช 5 และ 7 เหมือนกัน การที่แอคทิวิตีของโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 ที่พีเอช 6 มีค่าต่ำ เป็นผลมาจาก $CaCl_2$ ที่เติมลงไปในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทำปฏิกิริยากับฟอสเฟตแล้วเกิดการตกตะกอน ทำให้เอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนได้ลดลง เพราะ $CaCl_2$ ช่วยทำให้เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ทนความร้อนได้เพิ่มขึ้น[14] เมื่อ $CaCl_2$ เกิดการตกตะกอน ทำให้ไม่มี calcium ไปจับกับบริเวณ calcium binding site ของโปรติเอส เอนไซม์โปรติเอสจึงทนความร้อนได้ลดลง แอคทิวิตีของเอนไซม์จึงลด

ลงด้วยเนื่องจากเอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพเป็นผลให้แอคทิวิตีของโปรติเอสที่พีเอช 6 มีค่าต่ำกว่าที่พีเอช 5 และ 7 เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 50-60 ^{0}ซ ซึ่งต่างจากโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 70-80 ^{0}ซ โดยโปรติเอสจาก Cloned TLS33 ทนต่อความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 40^{0}ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. ส่วนโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ทนต่อความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 75 ^{0}ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. จากผลการศึกษาที่ได้จะเห็นได้ว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาการโคลนยีนมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาและความคงทนต่อความร้อนลดลงเมื่อเทียบกับโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ทั้งนี้เป็นผลมาจากข้อเสียของการใช้ *E.coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน กล่าวคือ *E.coli* ไม่มีกลไกการดัดแปลงโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้น (Post-translational modification) และไม่มีกลไกการกำจัดเมทไธโอนีนที่ปลายโมเลกุลของโปรตีน (N-terminal methionine) เป็นผลให้โปรตีนมีการม้วนตัวที่ผิดรูป นอกจากนี้ยังไม่สามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ให้กับโปรตีนที่ต้องการพันธะดังกล่าวในการม้วนตัว (Folding) ทำให้โปรตีนที่สังเคราะห์ได้มีโครงรูปต่างไปจากเดิม [17,51] จากข้อเสียเหล่านี้ทำให้โปรติเอสที่ได้จาการโคลนยีนมีโครงรูปผิดไปจากเดิมและไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุล ซึ่งพันธะดังกล่าวทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีความเสถียรไม่เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่ายด้วยความร้อน[52] จากการศึกษาของ Takagi และคณะ[53] ได้ทำการดัดแปลงโมเลกุลเอนไซม์ Subtilisin E โดยการเติม cysteine ลงไปในโมเลกุลเพื่อให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ขึ้นในโมเลกุล และทำการศึกษาความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์ที่ถูกทำการดัดแปลงนี้โดยการวัดแอคทิวิตีที่เหลืออยู่ของเอนไซม์ภายหลังจากแช่เอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน พบว่าเอนไซม์ที่ได้รับการดัดแปลงให้มีพันธะไดซัลไฟด์นี้มีความคงทนต่อความร้อนสูงขึ้นและมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาสูงขึ้นกว่าเดิมจากที่ 50^{0}ซ เป็น 60^{0}ซ จากเหตุผลข้างต้นทำให้โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 มีความคงทนต่อความร้อนลดลงเป็นผลให้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีค่าลดลงตามไปด้วยเนื่องจากเอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพที่อุณหภูมิสูง ๆ อีกประการหนึ่งมีการศึกษาพบว่า[48] *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ผลิตเอนไซม์โปรติเอส อย่างน้อย 3 ชนิดที่มีขนาดมวลโมเลกุลต่างกัน คือ 36, 53 และ 71 kDa และมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 7-9 และ 70-90 ^{0}ซ ตามลำดับ ค่าที่วัดได้จึงเป็นค่าเฉลี่ย ส่วน Cloned TLS33 อาจเป็นชิ้นดีเอ็นเอของโปรติเอสตัวใดตัวหนึ่งหรือสองตัวรวมกัน ผลที่วัดได้จึงต่างไปจากเดิม

จากการศึกษาแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 พบว่า แอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีนที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ของ Cloned TLS33 มีค่าใกล้เคียงกันกับแอคทิวิตีของโปรติเอสที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 เป็นเพราะยีนโปรติเอสที่โคลนได้มีการแสดงออกไม่มากโดยสังเกตจากแอคทิวิตีของโปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีนที่เพิ่มมากขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อยประมาณ 1.2 เท่า โดยเปรียบเทียบจากแอคทิวิตีสูงสุดของ Cloned TLS33 และ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ที่ได้จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา ทำให้ *E.coli* สามารถหลั่งเอนไซม์โปรติเอสออกมานอกเซลล์ได้ ซึ่งโดยปกติแล้ว *E.coli* มีขีดจำกัดในการหลั่งโปรตีนออกมานอกเซลล์[17,51] ถ้ายีนที่โคลนได้มีการแสดงออกมาก โปรตีนจำนวนมากที่สังเคราะห์ได้จะจับตัวรวมกันเป็น Inclusion body อยู่ภายในเซลล์ทำให้เซลล์ของ *E.coli* ไม่สามารถขับโปรตีนเหล่านี้ออกมาได้ แต่ในการศึกษานี้ยีนโปรติเอสมีการแสดงออกไม่มากทำให้ *E.coli* สามารถหลั่งเอนไซม์โปรติเอสออกมานอกเซลล์ได้เหมือนกับ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ซึ่งจุดนี้เป็นจุดที่ต้องปรับปรุงต่อไปหลังจากได้ยีนโปรติเอสที่ต้องการแล้ว โดยการเปลี่ยนดีเอ็นเอพาหะและเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมต่อไป

4.1.6 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน

จากการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสจาก Cloned TLS33 โดยวิธี SDS polyacrylamide gel electrophoresis เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล พบว่า เอนไซม์โปรติเอสจาก Cloned TLS33 มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 65 kDa ซึ่งมีขนาดต่างจากที่ Sookkheo และคณะ[49] ได้ทำการศึกษาไว้ โดยจากการศึกษานั้นพบว่า โปรติเอสที่ผลิตได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 มีอยู่ด้วยกัน 3 ตัวคือ โปรติเอส S,N และ B มีขนาดมวลโมเลกุลตามลำดับดังนี้ 36 , 53 และ 71 kDa จะเห็นได้ว่า โปรติเอสที่ได้จาการโคลนยีนมีขนาดมวลโมเลกุลต่างไปจากโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ที่เป็นเช่นนี้เพราะ ยีนโปรติเอสที่โคลนได้นั้น ได้มาจากการตัดดีเอ็นเอแบบสุ่มเนื่องจากไม่ทราบตำแหน่งที่แน่นอนของยีนโปรติเอส ดังนั้นในขั้นตอนการตัดยีนโปรติเอสออกมาจากจีโนมิคดีเอ็นเออาจตัดยีนโปรติเอสมาได้ไม่ครบทั้งยีนทำให้โปรติเอสที่สังเคราะห์ได้มีขนาดมวลโมเลกุลต่างไปจากโปรติเอสของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 นอกจากนี้อาจเป็นแบบกรณีของการโคลนยีน Proteinase Ak.1 จากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus* sp Ak.1 ใน *E.coli* [46] พบว่าเกิดการรวม

กันของยีน Proteinase Ak.1 กับยีน *lac* Z ซึ่งอยู่ตรงตำแหน่ง multicloning site ของดีเอ็นเอพาหะ ทำให้โปรตีเอสที่ได้จากการโคลนยีนมีขนาดใหญ่กว่าโปรตีเอสที่ได้จาก *Bacillus* sp Ak.1

จากการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 โดยวิธี Zymography ชนิด SDS และ Native polyacrylamide gel electrophoresis พบว่า มีมวลโมเลกุลประมาณ 118 และ 93 kDa ตามลำดับ ขนาดมวลโมเลกุลที่หาได้โดยวิธี Zymography ทั้งสองชนิด มีขนาดต่างไปจากขนาดที่หาได้โดยวิธี SDS-PAGE เนื่องจาก การหาขนาดโดยวิธี Zymography เป็นการหาขนาดโดยดูจากแอคทิวิตีของเอนไซม์ซึ่งในการศึกษานี้ดูได้จากแถบใสที่เกิดขึ้นบนแผ่นเจล ซึ่งเกิดจากการย่อยขับสเตรทที่เป็นนมพร่องไขมันโดยเอนไซม์โปรตีเอสที่อยู่ตรงตำแหน่งนั้น ส่วนวิธี SDS-PAGE เป็นการหาขนาดโดยดูจากแถบของโปรตีนที่ย้อมติดสีบนแผ่นเจล ซึ่งบางทีแถบของโปรตีนที่ได้อาจเป็นแถบของโปรตีนชนิดอื่นที่ปนมากับเอนไซม์โปรตีเอสและไม่ใช่แถบของเอนไซม์ที่แท้จริง ซึ่งดูได้จากผลการทดลองที่ 3.18 รูปที่ 3.22 จะเห็นได้ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก Cloned TLS33 ประกอบไปด้วยยีนต่าง ๆ หลายยีนบนสายดีเอ็นเอที่โคลนได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ยีนเหล่านั้นเกิดการแสดงออก (expression) ของยีนพร้อมกับยีนโปรตีเอสด้วย ทำให้ *E.coli* ผลิตโปรตีนเหล่านั้นออกมาพร้อมกับเอนไซม์โปรตีเอส นอกจากนี้โมเลกุลของนมพร่องไขมันที่เติมลงไปในเจลอาจจะไปขวางการเคลื่อนที่ของโปรตีเอสทำให้โปรตีเอสเคลื่อนที่ได้ช้าลงถ้าทำการผสมนมพร่องไขมันในเจลไม่ดีพอหรือมีความเข้มข้นมากเกินไป จากเหตุผลดังกล่าวจึงเป็นผลทำให้การหาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากวิธี Zymography และ SDS-PAGE มีขนาดต่างกัน และจากขนาดของโปรตีเอสที่หาได้จากการทำ Zymography ทั้ง 2 ชนิด จะเห็นได้ว่าขนาดของโปรตีเอสที่ได้ต่างกันไม่มากนัก ทำให้ทราบว่าโปรตีเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 ประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) เพียงหน่วยเดียว

4.1.7 การศึกษาขนาดและลำดับเบสของยีนโปรตีเอสที่ได้จากการโคลนยีน

ผลการศึกษาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีนพบว่ามีมีขนาดประมาณ 3,123 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่หาได้จากการส่ง Cloned TLS33 ไปหาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีนที่ " Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica, Taipei , TAIWAN " พบว่าชิ้นดีเอ็นเอจาก Cloned TLS33 ที่โคลนได้มีขนาด 3,157 bp เมื่อทำการแปรลำดับเบสที่ได้ให้กลายเป็นลำดับกรดอะมิโน (translation) สามารถแปรลำดับเบสให้เป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 3 แบบ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีนประกอบไปด้วยยีนที่จะแปรไปเป็นลำดับกรดอะมิโนต่าง ๆ จำนวน 26 ยีนบนสายดีเอ็นเอที่โคลนได้โดยที่ยีนต่างๆ เหล่านั้นแสดงใน

รูปของ Open Reading Frame (ORF) ORF หาได้จากการแปรลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอให้กลายเป็นกรดอะมิโนโดยมีจุดเริ่มต้นของ ORF ตรงตำแหน่งเบสที่เป็น start codon (ATG) ซึ่งแปรไปเป็นกรดอะมิโนเมทไธโอนีน และมีจุดยุติการแปรรหัสตรงตำแหน่ง stop codon (TAA,TAG และ TGA) ซึ่งเป็นจุดสิ้นสุดของ ORF บนสายดีเอ็นเอ จากผลการศึกษาที่ได้ทำให้ทราบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้มียีนอื่นที่ไม่ใช่ยีนของเอนไซม์โปรติเอสปะปนมาด้วย และจากรูปที่ 3.22 แสดงให้เห็นว่าบนสายดีเอ็นเอที่โคลนได้ประกอบไปด้วยยีนที่มีขนาดเล็กประมาณ 100 - 500 bp หลายยีน ปกติแล้วยีนของเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนทั่ว ๆ ไปจะมีขนาดประมาณ 1,000 - 1,600 bp เช่น Serine proteinases (1,206 bp) จาก *Bacillus strain* Ak1[34], Carboxypeptidase *Taq* (1,536 bp) จาก *Thermus aquaticus* YT-1 [35] และ Aminopeptidase T(1,224 bp) จาก *Thermus aquaticus* YT-1 [54] เป็นต้น จะเห็นได้ว่ายีนที่อยู่บนสายดีเอ็นเอของ Cloned TLS33 มีขนาดเล็กกว่ายีนของเอนไซม์โปรติเอสทนความร้อนทั่วไป โดยยีนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีขนาดเพียง 585 bp ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากความผิดพลาดในการหาลำดับเบสเนื่องจากทำการหาลำดับเบสเพียงครั้งเดียว และลำดับเบสที่หามีความยาวมากทำให้อาจเกิดความผิดพลาดในการหาลำดับเบสได้ จากการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลลำดับเบสจาก GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST [31,50] พบว่า ลำดับเบสของ Cloned TLS33 ช่วงตำแหน่งที่ 742 – 944 เหมือนกันกับลำดับเบสของ *Bacillus subtilis* ช่วงตำแหน่งที่ 30,688 – 30,820 โดยมีความเหมือนกัน 82% และมีความเป็นไปได้ว่า *Bacillus stearothermophilus* TLS33 มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับ *Bacillus subtilis* แต่ระบุได้ไม่ชัดเจน เนื่องจากทำการเปรียบเทียบจากชิ้นดีเอ็นเอของ Cloned TLS33 ซึ่งมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 เพียง 3,157 bp ในขณะที่ *Bacillus subtilis* มี genome ขนาดประมาณ 4,214 kb [55] และบริเวณเบสที่เหมือนกันนั้นเหมือนกันแค่ช่วงสั้น ๆ ประมาณ 200 bp นอกจากนี้ยังระบุไม่ได้ว่า บริเวณที่เหมือนกันนั้นอยู่ในส่วนของยีนโปรติเอสหรือไม่เพราะยังไม่ทราบตำแหน่งที่แน่นอนของยีนโปรติเอสบนสายดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีน ดังนั้นจึงได้ทำการ Subcloning ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก Cloned TLS33 ให้มีขนาดเล็กลง เพื่อที่จะกำจัดยีนอื่นที่ไม่ใช่ยีนของเอนไซม์โปรติเอสออกไปและจะได้ทราบถึงลำดับเบสที่แท้จริงของยีนโปรติเอสที่โคลนได้

4.2 การทำ Subcloning ยีนโปรติเอส

4.2.1 การทำ Subcloning ยีนโปรติเอสจาก Cloned TLS33

หลังจากการโคลนยีนแล้วตำแหน่งตัดบนโมเลกุลของดีเอ็นเอสายผสมตรงจุดที่ทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอจะสูญเสียไป เนื่องจากเป็นการเชื่อมต่อปลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ต่างชนิด

กันทำให้ไม่สามารถใช้เอนไซม์ชนิดเดิมในการตัดดีเอ็นเอตรงตำแหน่งนั้นได้อีก จึงได้เลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Eco*R I ทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีนออกมาจาก Cloned TLS33 ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองมีจุดตัดบริเวณด้านหน้าและด้านหลังส่วนที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ พบว่าดีเอ็นเอสายผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Eco*R I ถูกตัดเป็น 2 ส่วนมีขนาด 2.7 kb และ 3.1 kb โดยขนาด 2.7 kb เป็นส่วนของดีเอ็นเอพาหะ และขนาด 3.1 kb เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีน จากนั้น agarose gel ตรงตำแหน่งของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.1 kb ถูกนำไปทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล พบว่า สกัดได้ดีเอ็นเอขนาด 3.1 kb ซึ่งเป็นขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีน และไม่มีดีเอ็นเอพาหะปะปนมาด้วยจึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการทำ Subcloning ในลำดับต่อไป

เนื่องจากดีเอ็นที่ได้จากการโคลนยีนมีขนาดใหญ่และมียีนอื่นที่ไม่ใช่ยีนโปรติเอสปะปนมาด้วย จึงได้ทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กลงเพื่อที่จะให้ได้ยีนโปรติเอสที่แท้จริงในการทำ Subcloning โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลจะถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau* 3AI แบบจำกัดปริมาณเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ไม่จำกัดเวลา พบว่า เอนไซม์ *Sau* 3AI ปริมาณ 0.025 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ และใช้เวลาในการตัดดีเอ็นเอ 60 นาที จะให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ กันตั้งแต่ 0.5 - 3.1 kb ซึ่งเหมาะแก่การทำ Genomic library เพราะดีเอ็นเอที่ได้มีหลายขนาด จึงมีโอกาสที่จะได้ยีนโปรติเอสที่ไม่มียีนอื่นปนมาด้วย จากผลการศึกษาที่ได้จึงได้เลือกใช้ปริมาณเอนไซม์และเวลาดังกล่าว เป็นภาวะที่ใช้ในการตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีน

หลังจากทำการตัดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลแล้ว ดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI แล้ว transform เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* DH5α จากนั้นเซลล์เจ้าบ้านจะถูกนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่เป็นนมพร่องไขมัน (Skim milk agar plate)ที่เติม แอมพิซิลินลงไป เพื่อตรวจสอบการขึ้นได้ของเซลล์เจ้าบ้านบนอาหารวุ้นนมพร่องไขมันที่มีแอมพิซิลินผสมอยู่และดูการเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนี พบว่ามี skim milk agar plate 2 แผ่น มีโคโลนีที่เกิด clear zone ขึ้นจำนวน 2 โคโลนี โดยให้ชื่อเป็น Subclone I และ Subclone II และได้ทำการตรวจสอบแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจากทั้งสองโคโลนีโดยวิธี Azocasein hydrolysis ซึ่ง Sinchaikul และคณะ[16] พบว่า ปริมาณเอนไซม์และเวลาที่เหมาะสมในการหาแอคทิวิตีของโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 คือ 0.1 ml และใช้เวลา 30 นาที ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้เปลี่ยนปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการหาแอคทิวิตีจาก 0.5 ml เป็น 0.1 ml และเปลี่ยนระยะเวลาที่ใช้ incubate จาก 60 นาที เป็น 30 นาที โดย incubate ที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ พบว่า Subclone I และ Subclone II มีแอคทิวิตีเท่ากับ 8.32 และ

8.06 U/ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า Subclone I และ Subclone II มีแอคทิวิตีสูงกว่าโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 ที่หาแอคทิวิตีโดยวิธีเก่า ดังนั้นจึงได้เลือกใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.1 ml และใช้เวลาในการ incubate 30 นาที ในการหาแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในขั้นตอนต่อไป

4.2.2 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ Subclone I และ Subclone II ในอาหารเหลวนมพร่องไขมันที่ผสมแอมพิซิลิน พบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่เวลา 24 ชม.เหมือนกัน จึงได้ทำการเลือกเก็บเอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone I และ Subclone II ที่เวลา 24 ชม. เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการ subcloning

จากการศึกษาแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอส ที่อุณหภูมิและพีเอช ต่าง ๆ กัน และศึกษาความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 พบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Subclone I และ Subclone II มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเหมือนกับ Cloned TLS33 คือที่ 50^{0}ซ ซึ่งต่างจากโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 80 ^{0}ซ เมื่อพิจารณาแอคทิวิตีที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของโปรติเอสแต่ละชนิดจะพบว่า โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 , Subclone I และ Subclone II มีค่าสูงกว่าโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ประมาณ 3 , 2.5 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาความคงทนต่อความร้อน พบว่า โปรติเอสจาก Subclone I และ Subclone II ทนต่อความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 50^{0}ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. ซึ่งเหมือนกับโปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 ส่วนโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ทนต่อความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 70 ^{0}ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าโปรติเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาและความคงทนต่อความร้อนเหมือนกับ Cloned TLS33 และมีแอคทิวิตีใกล้เคียงกันโดย Cloned TLS33 มีแอคทิวิตีสูงกว่า Subclone I และ Subclone II เล็กน้อย ส่วน Subclone I และ Subclone II มีแอคทิวิตีที่เกือบเท่ากัน ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากข้อจำกัดของ *E.coli* [17,51] ทำให้ยีนโปรติเอสที่โคลนใน *E.coli* เกิดการแสดงออกของยีนได้ไม่เต็มที่ทำให้ความคงทนต่อความร้อนของโปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีนลด

ลงเป็นผลให้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาลดลงไปด้วย การที่โปรติเอสจาก Cloned TLS33 มีแอคทิวิตีสูงกว่า Subclone I และ Subclone II น่าจะเป็นผลมาจากการทำ subcloning ให้ยีนที่โคลนได้มีขนาดเล็กลง อาจมียีนโปรติเอสบางส่วนถูกตัดออกไปทำให้โปรติเอสที่สังเคราะห์ได้ไม่สมบูรณ์ส่งผลให้เร่งปฏิกิริยาได้ลดลง แต่ยังคงมีแอคทิวิตีสูงกว่าโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 เพราะมีจำนวนยีนโปรติเอสต่อเซลล์มากซึ่งได้มาจากการโคลนยีนนั่นเอง จากการที่ Subclone I และ Subclone II มีแอคทิวิตีและคุณสมบัติเหมือนกัน สันนิษฐานได้ว่ายีนโปรติเอสที่โคลนลงใน Subclone I และ Subclone II อาจเป็นชิ้นเดียวกันที่มีขนาดเท่ากันหรือมีขนาดใกล้เคียงกัน เพราะในการ subcloning จะทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก Cloned TLS33 ซึ่งมีขนาด 3,157 bp ให้มีขนาดเล็กลงโดยใช้เอนไซม์ *Sau* 3AI ในการตัด และเนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอจาก Cloned TLS33 มีขนาดไม่ใหญ่มากจึงมีจุดตัดของเอนไซม์ *Sau* 3A ไม่กี่ตำแหน่งทำให้เมื่อตัดแล้วจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กันไม่มากนัก จึงมีโอกาสเป็นไปได้ที่จะโคลนยีนโปรติเอสที่มีขนาดเท่ากันหรือใกล้เคียงกันได้ จากการศึกษาแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ พีเอช (pH) ต่าง ๆ กัน พบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก Subclone I และ Subclone II มีพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 5 -9 ซึ่งเหมือนกับโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ส่วน Cloned TLS33 มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมกว้างกว่าคือ 5-10 โดยที่โปรติเอสทั้ง 4 ชนิดมีแอคทิวิตีดีที่สุดที่พีเอช 7 เหมือนกัน เมื่อพิจารณาแอคทิวิตีของโปรติเอสที่ พีเอช ต่าง ๆ พบว่า Subclone I และ Subclone II มีแอคทิวิตีที่พีเอชต่าง ๆ ใกล้เคียงกัน และมีแอคทิวิตีที่พีเอช 6 สูงกว่าที่พีเอช 5 ซึ่งต่างจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33 อาจเป็นเพราะการทำ subcloning ทำให้บริเวณส่วนที่เป็น calcium binding site ของโปรติเอสซึ่งช่วยทำให้โปรติเอสทนความร้อนได้ดีขึ้นถูกตัดออกไป ทำให้ calcium ที่เติมลงไปในบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อความทนความร้อนและแอคทิวิตีของโปรติเอส จึงเห็นได้ว่าโปรติเอสจาก Subclone I และ Subclone II มีแอคทิวิตีต่ำกว่า Cloned TLS33 และที่พีเอช 6 มีแอคทิวิตีสูงกว่าที่พีเอช 5 แอคทิวิตีของโปรติเอสจาก Cloned TLS33 , Subclone I และ Subclone II ที่พีเอชต่าง ๆ มีค่ามากกว่าโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 โดยโปรติเอสจาก Cloned TLS33 มีแอคทิวิตีมากที่สุด จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าโปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีนและ subcloning ยังคงมีพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเหมือนกับโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 โดยที่ข้อจำกัดของ *E.coli* ในการโคลนยีนไม่ค่อยมีผลต่อแอคทิวิตีของโปรติเอสที่ พีเอชต่าง ๆ

ผลการศึกษาแอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ของ Subclone I และ Subclone II พบว่า แอคทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ส่งออกนอกเซลล์ ของ Subclone I เท่ากับ 7.98 U/ml คิดเป็น 93.44 % ของแอคทิวิตีทั้งหมด ในขณะที่แอคทิวิตีภายในเซลล์เท่ากับ 0.56 U/ml คิดเป็น 6.56 % แอคทิวิตีของโปรติเอสที่ส่งออกนอกเซลล์ของ Subclone II เท่ากับ 7.26 U/ml คิดเป็น 87.22 % ของแอคทิวิตีทั้งหมด ในขณะที่แอคทิวิตีภายในเซลล์เท่ากับ 1.06 U/ml คิดเป็น 12.78 % จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II มีการส่งเอนไซม์โปรติเอสออกมานอกเซลล์มากกว่าที่ค้างอยู่ในเซลล์ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการ subcloning มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์โปรติเอสนอกเซลล์เหมือนกับโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33

จากการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของโปรติเอสจะเห็นได้ว่าค่าแอคทิวิตีที่วัดได้โดยการเปลี่ยนปริมาณเอนไซม์จาก 0.5 ml เป็น 0.1 ml และเวลาที่ใช้บ่มจาก 60 นาที เป็น 30 นาที มีค่าสูงขึ้นกว่าเดิมมาก โดยดูได้จากแอคทิวิตีของ Cloned TLS33 ซึ่งจากเดิมมีค่าประมาณ 1 U/ml เมื่อวัดด้วยวิธีเก่า และเมื่อวัดด้วยวิธีใหม่พบว่ามีค่าประมาณ 9 U/ml ที่เป็นเช่นนี้เป็นเพราะปริมาณซับสเตรทที่ใช้ในการหาแอคทิวิตีโดยวิธีเก่ามีปริมาณไม่เพียงพอต่อปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการหาแอคทิวิตี จึงทำให้วัดแอคทิวิตีเอนไซม์ได้น้อยกว่าความเป็นจริง และเมื่อทำการลดปริมาณเอนไซม์และเวลาลง ทำให้ซับสเตรทมีปริมาณเพียงพอต่อปริมาณเอนไซม์ จึงทำให้วัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ได้สูงขึ้น

4.2.3 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

จากการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone I และ Subclone II โดยวิธี SDS polyacrylamide gel electrophoresis เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล พบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II มีขนาดมวลโมเลกุลเท่ากันคือมีขนาดประมาณ 14 kDa จากการศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Zymography ชนิด SDS-PAGE พบว่า Subclone I และ Subclone II มีขนาดมวลโมเลกุลเท่ากันคือมีขนาดประมาณ 93 kDa และจากการศึกษา Zymography ชนิด Native-PAGE พบว่า Subclone I และ Subclone II มีขนาดมวลโมเลกุลเท่ากันคือมีขนาดประมาณ 68 kDa จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ยีนโปรติเอสที่โคลนลงใน Subclone I และ Subclone II มีขนาดที่เท่ากันหรือมีขนาดใกล้เคียงกันจึงทำให้โปรติเอสจากSubclone I และ Subclone II มีขนาดมวลโมเลกุลที่เท่ากัน และจากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าโปรติเอสที่ได้จากการทำ subcloning มี

ขนาดมวลโมเลกุลลดลงเมื่อเทียบกับ Cloned TLS33 แสดงให้เห็นว่ายีนโปรติเอสที่ได้จากการทำ subcloning นี้มีขนาดเล็กลงจากเดิมจึงทำให้เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II มีขนาดเล็กลง แต่ยังคงมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับโปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 จึงสันนิษฐานได้ว่ายีนโปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีนและการทำ subcloning เป็นยีนเพียงบางส่วนของเอนไซม์โปรติเอส โดยอาจเป็นยีนในส่วนของบริเวณ active site ทำให้โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีนและจากการทำ subcloning มีคุณสมบัติต่าง ๆ ใกล้เคียงกันแม้ขนาดของยีนและเอนไซม์ที่ได้จะแตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 แล้วจะมีคุณสมบัติหลายประการที่แตกต่างไป ซึ่งเป็นผลมาจากการโคลนได้ยีนโปรติเอสที่ไม่สมบูรณ์และข้อจำกัดของการใช้ *E.coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน นอกจากนี้บางทีแถบของโปรตีนที่ได้จาก SDS-PAGE อาจเป็นแถบของโปรตีนชนิดอื่นที่ปนมากับเอนไซม์โปรติเอสและไม่ใช่แถบของเอนไซม์ที่แท้จริง ซึ่งดูได้จากรูปที่ 3.36 จะเห็นได้ว่าชิ้นดีเอ็นเอประกอบไปด้วยยีน 4 ยีนบนสายดีเอ็นเอที่โคลนได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ยีนเหล่านั้นเกิดการแสดงออก (expression) ของยีนพร้อมกับยีนโปรติเอสด้วย ทำให้ *E.coli* ผลิตโปรตีนเหล่านั้นออกมาพร้อมกับเอนไซม์โปรติเอส หรือบางที Subclone I อาจมีดีเอ็นเอสายผสมมากกว่า 1 ชนิดอยู่ภายในเซลล์ เมื่อเวลานำโปรติเอสมาทำ SDS-PAGE แถบโปรตีนที่ได้อาจเป็นของโปรตีนอีกชนิดหนึ่งซึ่งมีขนาดเล็กที่อยู่บนดีเอ็นเอสายผสมอีกเส้นหนึ่งซึ่งไม่ใช่เส้นที่มียีนโปรติเอส ทำให้ขนาดของโปรติเอสที่หาได้จาก SDS-PAGE และ Zymography มีขนาดต่างกันมาก

4.2.4 การศึกษาขนาดของยีนโปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

ผลการศึกษาขนาดของยีนโปรติเอสจาก Subclone I พบว่ามีขนาดประมาณ 572 bp ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่หาได้จากการส่ง Subclone I ไปหาลำดับเบสของยีนโปรติเอสที่ " Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica, Taipei , TAIWAN " ซึ่งพบว่า มีขนาด 542 bp และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลลำดับเบสของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับเบสของ Subclone I ไม่เหมือนกับลำดับเบสที่มีข้อมูลอยู่ใน GenBank ทำให้บอกได้ว่า เอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ที่โคลนได้นี้ไม่เหมือนกับเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากแบคทีเรียชนิดอื่น นอกจากนี้ยังบอกได้อีกว่าตำแหน่งที่เหมือนกันของ Cloned TLS33 กับ *Bacillus subtilis* ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสนั้น เป็นตำแหน่งที่ไม่ใช่ตำแหน่งของยีนโปรติเอส เพราะลำดับเบสของยีนโปรติเอสที่ subclonig ได้ไม่มีบริเวณที่ตรงกันกับลำดับเบสของ *Bacillus subtilis* และจากการแปรลำดับเบสที่ได้ให้กลายเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่า มีความเป็นไปได้ที่ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก

Subclone I ประกอบไปด้วยยีนที่จะแปรไปเป็นลำดับกรดอะมิโนต่าง ๆ จำนวน 4 ยีนบนสายดีเอ็นเอที่โคลนได้ โดยที่ยีนต่างๆ เหล่านี้แสดงในรูปของ Open Reading Frame (ORF) จากผลดังกล่าวจึงยังสรุปไม่ได้ว่า ORF ใดที่เป็นยีนของโปรติเอส แต่สามารถบอกได้ว่าใน 4 ยีนนี้ มี 1 ยีนที่เป็นยีนของเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งการจะบอกได้ว่ายีนใดเป็นยีนของเอนไซม์โปรติเอสจะต้องทำการสกัดเอนไซม์โปรติเอสออกมาหาลำดับกรดอะมิโน โดยอาจจะดูจากปลาย N-terminal ของเอนไซม์ก็จะทราบตำแหน่งที่แท้จริงของเอนไซม์โปรติเอส หรืออาจจะทำการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอของยีนทั้ง 4 ออกมาแล้วทำการโคลนยีนที่ได้เพื่อให้ยีนต่าง ๆ เหล่านี้เกิดการแสดงออก (express) ก็จะทราบว่ายีนไหนที่เป็นยีนของเอนไซม์โปรติเอส เนื่องจาก Subclone II ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอสายผสมออกมาได้จึงไม่สามารถหาขนาดและลำดับเบสของ Subclone II ได้ ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าดีเอ็นเอสายผสมที่นำเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* DH5α อาจเกิดการรวมเข้ากับโครโมโซมของ *E.coli* DH5α จึงทำให้ Subclone II สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงที่มีแอมพิซิลิน และมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมาแต่ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอสายผสมออกมาได้

4.2.5 สรุปผลการทดลอง

ได้ทำการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI แล้วนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI แล้ว transform เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH5α และทำการเลือกโคโลนีที่มีแอคทิวิตีของ โปรติเอสสูงสุดมาทำการศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่โคลนได้ พบว่า Cloned TLS33 เจริญเติบโตได้ดีที่เวลา 8 ชม .และผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มากสุดที่เวลา 12 ชม. ซึ่งมีอุณหภูมิและพีเอช ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 50-60 ^{0}ซ และ pH 5 และ 7 ตามลำดับ มีความคงทนต่อความร้อนถึงอุณหภูมิ 40^{0}ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. ซึ่งต่างจากโปรติเอสที่ได้จาก Native strain ที่มีอุณหภูมิและพีเอช ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 70-80^{0}ซ และ pH 7 ตามลำดับ และมีความคงทนต่อความร้อนถึงอุณหภูมิ 75^{0}ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. Cloned TLS33 และ Native strain มีแอคทิวิตีของโปรติเอสภายนอกเซลล์มากกว่าภายในเซลล์เหมือนกัน จากการหาขนาดมวลโมเลกุลของโปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 โดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีขนาดประมาณ 65 kDa และจากวิธี Zymography ชนิด SDS-PAGE พบว่ามีขนาดประมาณ 118 kDa และชนิด Native-PAGE พบว่ามีขนาดประมาณ 93 kDa ชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้พบว่ามีขนาด 3,123 bp เมื่อทำการแปรลำดับเบสที่ได้ให้กลายเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่า มีความเป็น

ไปได้ที่ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีนประกอบไปด้วยยีนจำนวน 26 ยีนบนสายดีเอ็นเอ และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลลำดับเบสของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับเบสบางส่วนของ Clone TLS33 เหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus subtilis* เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้มียีนหลายยีนปนมาด้วยจึงได้ทำ Subcloning ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก Cloned TLS33 ให้มีขนาดเล็กลง เพื่อที่จะกำจัดยีนอื่นที่ไม่ใช่ยีนของเอนไซม์โปรติเอสออกไปและจะได้ทราบถึงตำแหน่งของยีนโปรติเอสที่แท้จริง

ดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Cloned TLS33 ถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco*RI แล้วนำไปทำ Agarose gel electrophoresis เพื่อแยกชิ้นดีเอ็นที่มียีนโปรติเอสออกจากดีเอ็นเอพาหะ เจลที่อยู่ตรงตำแหน่งชิ้นดีเอ็นที่มียีนโปรติเอสจะถูกนำมาสกัดเอาดีเอ็นเอออกมา จากนั้นชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI แล้วนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI แล้ว transform เข้าไปในเซลล์ *Escherichia coli* DH5α และทำการเลี้ยงบนอาหารวุ้นนมพร่องไขมันที่มีแอมพิซิลินผสมอยู่ พบว่ามีโคโลนีที่เกิดวงใสรอบโคโลนีจำนวน 2 โคโลนี จึงได้นำทั้ง 2 โคโลนีมาทำการศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่โคลนได้ โดยเทียบกับโปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 และ Native strain โดยให้ชื่อโคโลนีที่ได้จากการ subcloning เป็น Subclone I และ Subclone II พบว่า Subclone I และ Subclone II ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มากสุดที่เวลา 24 ชม. มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 50 ^{0}ซ และมีความคงทนต่อความร้อนถึงอุณหภูมิ 50^{0}ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. ใกล้เคียงกับโปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I, Subclone II,Cloned TLS33 และ Native strain มีพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ พีเอช 7 เหมือนกัน Subclone I และ Subclone II มีแอคทิวิตีของโปรติเอสภายนอกเซลล์มากกว่าภายในเซลล์เหมือนกันกับ Cloned TLS33 และ Native strain ขนาดมวลโมเลกุลของโปรติเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II หาโดยวิธี SDS-PAGE ได้ประมาณ 14 kDa เหมือนกัน และจากวิธี Zymography ชนิด SDS-PAGE และชนิด Native-PAGE พบว่ามีขนาดประมาณ 93 และ 68 kDa ตามลำดับ เหมือนกัน จึงสันนิษฐานได้ว่า Subclone I และ Subclone II มียีนโปรติเอสที่มีขนาดเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ยีนโปรติเอสที่ได้จาก Subclone I มีขนาด 572 bp ซึ่งเมื่อทำการแปรลำดับเบสที่ได้ให้กลายเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่า มีความเป็นไปได้ที่ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีนประกอบไปด้วยยีนจำนวน 4 ยีนบนสายดีเอ็นเอ โดยที่ 1 ใน 4 ยีนนั้น เป็นยีนของเอนไซม์โปรติเอส และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลลำดับเบสของ GenBank พบว่า

ลำดับเบสของ Subclone I ไม่เหมือนกับลำดับเบสที่มีข้อมูลอยู่ใน GenBank จึงสรุปได้ว่า ยีนโปรติเอสที่โคลนได้ไม่เหมือนกับยีนของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีผู้ศึกษาไว้

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University