บทที่ 5

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะมิเดสใน *E. aerogenes* ที่สามารถสลายอะคริลาไมด์เป็นกรดอะคริลิกและแอมโมเนีย (Buranasilp and Charoenpanich, 2011) เริ่มด้วยการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ที่มีขนาดมากกว่า 23 กิโลคู่เบส และไม่พบการฉีกขาดของโครโมโซมอลดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์โดยอิเล็กโทรโฟริซิสเจลอะกาโรส แสดงถึงโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีสำหรับนำมาใช้ในการศึกษาทางชีวโมเลกุลต่อไป (Sambrook et al., 1989) จากนั้นนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งไม่มีจุดตัดบนยีนอะมิเดสใน *Enterobacter* spp. เพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสในการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ และตรวจสอบการตัดด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสเจลอะกาโรส พบแถบดีเอ็นเอสีขาวลากยาวและมีขนาดต่ำกว่า 23 กิโลคู่เบส แสดงถึงการตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ เมื่อนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอะมิเดสโดยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของยีนอะมิเดสใน *Enterobacter* spp. ที่เคยมีรายงานมาแล้วในฐานข้อมูลโลก พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดใกล้เคียงกับระยะห่างระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ ผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาโดยใช้ข้อมูลพื้นฐานในการเลือกใช้โคดอนร่วมกับการแปลลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของยีนอะมิเดสใน *Enterobacter* spp. เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่มีความจำเพาะและสามารถเข้าจับได้ดีกับช่วงยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่ใช้ในการศึกษา รวมทั้งความสำเร็จในการใช้เทคนิคพีซีอาร์หาและเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่ไม่ทราบตำแหน่งบนโครโมโซมของ *E. aerogenes* ได้ แต่การพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดอื่นที่ไม่มีความจำเพาะร่วมด้วย อาจเนื่องมาจากการใช้ดีเจนเนเรซีไพรเมอร์ที่มีโอกาสในการจับกับโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *E. aerogenes* ในตำแหน่งที่ต่างกันหลากหลายเมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์นั่นเอง จากนั้นเมื่อนำผลิตภัณพีซีอาร์ที่มีขนาดจำเพาะตามต้องการมาทำบริสุทธิ์และเชื่อมเข้าในชิ้นยีน *lacZ* ของพลาสมิด pUC 118 ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์บีตา-กาแลคโตซิเดส ทำการทรานฟอร์เมชั่นเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5α แล้วคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารที่มีส่วนประกอบของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-gal และ IPTG ที่เป็นสับสเตรทและตัวเหนี่ยวนำของยีน lacZ มาสกัดพลาสมิดสายผสมและวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสเจลอะกาโรส พบแถบพลาสมิดมีขนาดสูงกว่า pUC118 เล็กน้อย จึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บรรจุอยู่ ซึ่งยืนยันได้จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII ซึ่งอยู่ที่บริเวณโคลนของพลาสมิด pUC 118 เมื่อนำโคลนที่ได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับ

นิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล พบว่าชิ้นยีนที่แยกได้มีความเหมือนกับเอนไซม์ในกลุ่มไนไตร์เลส/ไซยาไนด์ไฮโดรเลสและอะมิเดสหรืออะมิโดไฮโดรเลส ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำงานร่วมกันในการตัดพันธะระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C-N bond-cleaving enzyme) ที่พบในแบคทีเรียพวกที่สามารถสลายสารกลุ่มไนไตร์ลและเอไมด์ รวมทั้งอะคริลาไมด์ด้วย (Fournand et al., 1998; Hirrlinger et al., 1996; Hughes et al., 1998)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้มาทำการออกแบบไพรเมอร์ชุดใหม่ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอะมิเดสในช่วงที่ขาดหายไป โคลนเข้าพลาสมิด pTG19-T ที่มีปลายโอลิโกไทมีน นำมาหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบความเหมือนกับเอนไซม์ในกลุ่มเดิมแสดงถึงความจำเพาะของยีนอะมิเดสจาก *E. aerogenes* ที่หาได้ในการวิจัยนี้ และเมื่อรวมผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้ทั้งยีน ของยีนอะลิฟาติกอะมิเดสใน *E. aerogenes* และเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูลโลก พบความเหมือนมากกว่าร้อยละ 80 กับเอนไซม์อะมิเดสหรืออะมิโดไฮโดรเลสในแบคทีเรียตระกูลเดียวกัน เช่น *Enterobacter* spp. และ *Klebsiella* spp. รวมทั้งยีนอะมิเดสที่มีการโคลนเข้าสู่ *E. coli* หรือเซลล์ให้อาศัยอื่น เช่น Salmonella spp. อีกด้วย ผลการวิจัยที่ได้ยิ่งยืนยันถึงความสำเร็จในการใช้เทคนิคพีซีอาร์หาและเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ที่ใช้ในการวิจัยนี้

เมื่อใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจำลองเป็นโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์อะมิเดสจาก *E. aerogenes* พบว่าเอนไซม์มีโครงสร้างเป็นโปรตีนก้อนกลมแบบ α/β ที่ประกอบด้วย แอลฟา-ฮีลิกซ์ จำนวน 6 เกลียวและบีตา-ชีท 6 สายที่จับกันเป็นแผ่นเรียบ 2 แผ่น ที่มีความคล้ายคลึงร้อยละ 45 กับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไนตราเลสจาก *Xanthomonas campestris* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนและไนโตรเจนที่ไม่ใช่พันธะเพปไทด์ และเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์อะมิเดสที่คาดเดาไว้ พบว่าในบริเวณแอคทีฟประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยา 3 ตัว คือ กรดอะมิโนซิสเตอีน กรดอะมิโนไลซีน และกรดอะมิโนกลูตาเมท ซึ่งเคยมีรายงานว่าเป็นกรดอะมิโนที่รับผิดชอบต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะมิเดสและเอนไซม์ไนตราเลส ที่เกี่ยวข้องกับการสลายเอไมด์ รวมทั้งอะคริลาไมด์อีกด้วย ผลการทดลองที่ได้แสดงถึงความสำเร็จในการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณชิ้นยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการโคลนและแสดงออกยีนดังกล่าวในระบบโปรคาริโอต (Prokaryotic system) ต่อไป