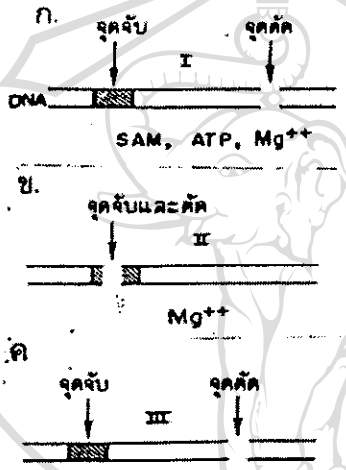
บทที่ 2
ทบทวนเอกสาร

ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (สุรินทร์, 2543)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclese) โดยทั่วไปจะมีความแตกต่างกันอยู่ 3 ประการ คือ ชนิดหน่วยในโมเลกุลของเอนไซม์ โคแฟคเตอร์ (cofactor) และวิธีการตัดดีเอ็นเอ (DNA cleavage) เอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดจะมีจุดจับและจุดตัดที่แตกต่างกัน (รูป 1)



รูป 1 ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่มีความแตกต่างที่ จุดจับ จุดตัด และสับสเตรท ที่ต้องใช้ ก. Type I ข. Type II ค. Type III
ที่มา : นิตย์ศรี (2536)

เอนไซม์ตัดจำเพาะไทป์ I (type I) สามารถตัดและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอ โดยการเติมหมู่เมธิล (methyl group) เข้าไปที่เบสบางตัว ณ ตำแหน่งจดจำ เช่น เอนไซม์ที่พบใน *Escherichia coli* K 12 (รูป 2) จะสามารถเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งที่ 6 ของเบส A เป็นต้น โมเลกุลของเอนไซม์ดังกล่าวจะมีความสลับซับซ้อน ประกอบไปด้วยโพลีเปปไทด์ (polypeptides) 3 ชนิด วิธีการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ชนิดนี้จะใช้วิธีการจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำที่จำเพาะ (recognition site) และตัดสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่ไม่เจาะจงซึ่งห่างออกไป 400-7,000 คู่เบส โดยอาศัยแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ATP และ S-adenosylmethionine (SAM)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5'-A*ACNNNNNNGT GC-3'

3'-T TGNNNNNNCA*CG-5'

รูป 2 ลักษณะการเติมหมู่เมธิลลงในสายดีเอ็นเอเพื่อป้องกันการตัดจากเอนไซม์ตัดจำเพาะ
ที่มา : สุรินทร์ (2543)

N คือเบสใดๆ ที่จับคู่กันในระหว่าง 2 สายของดีเด็นเอ ส่วน A* คือ ตำแหน่งที่มีการเติมหมู่เมธิลเพิ่มเข้าไป เอนไซม์นี้จะตัดดีเอ็นเอต่อเมื่อไม่มีหมู่เมธิลที่เบส A ของทั้งสองสาย ณ บริเวณจดจำ แต่ถ้าดีเอ็นเอนั้นมีหมู่เมธิลอยู่ที่เบส A เพียงแค่สายเดียว เอนไซม์จะทำการเติมหมู่เมธิลให้กับเบส Aในอีกสายหนึ่งที่ว่างอยู่ และไม่ตัดดีเอ็นเอนั้น

ในแบคทีเรียพวกที่เจริญอยู่ในทางเดินอาหาร เช่น *E. coli* โพลีเปปไทด์ทั้ง 3 ชนิดของเอนไซม์นี้เกิดจากยีนที่อยู่ใกล้กันบนโครโมโซม (chromosome) คือ *hsd R*, *hsd M* และ *hsd S* โดยที่ *hsd M* และ *hsd S* จะสร้างเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ร่วมกัน (Dicistronic mRNA) และให้โพลีเปปไทด์ 2 ชนิด ที่มีหน้าที่เติมหมู่เมธิลให้แก่เบส ส่วน *hsd* R จะช่วยให้เกิดการสังเคราะห์โพลีเปปไทด์ที่มีหน้าที่ตัดดีเอ็นเอ

เอนไซม์ตัดจำเพาะไทป์ II (type II) มีหน้าที่ในการเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่เพียงอย่างเดียว ส่วนการเติมหมู่เมธิลให้กับเบสจะอาศัยอาศัยเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง คือ เอนไซม์เมธิลเลส (methylase) รูปแบบการตัดดีเอ็นเอจะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำ หรือที่จุดใกล้กับบริเวณจดจำ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน แต่ในการดำเนินกิจกรรม เอนไซม์ต้องการเฉพาะแมกนีเซียมไอออนเท่านั้น (Mg^{2+}) ยกเว้นเอนไซม์บางชนิด เช่น เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Fgo*I ที่แยกได้จาก *Fervidobacterium gondwanense* AB39^{T} ที่ต้องการแมงกานีส (Mn^{2+}) เป็นโคแฟคเตอร์ (Andrews *et al.*, 1998)

เอนไซม์ตัดจำเพาะไทป์ III (type III) มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะและเติมหมู่เมธิลในขณะเดียวกัน การตัดดีเอ็นเอจะเกิดห่างจากบริเวณจดจำประมาณ 25-27 คู่เบส ต้องการ ATP และแมกนีเซียมไอออนเป็นโคแฟคเตอร์ ไม่จำเป็นต้องมี S-adenosylmethionine แต่ถ้ามี S-adenosylmethionine เอนไซม์จะมีกิจกรรมที่ดีขึ้น และจะสามารถเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะได้ ยีนที่กำหนดการสร้างโพลีเปปไทด์ทั้ง 2 ชนิด ของเอนไซม์ชนิดนี้มีตำแหน่งอยู่ใกล้ๆ กัน ในส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมของ *E. coli* บางสายพันธุ์ ยีนที่ควบคุมการสร้าง mRNA จะแยกกันเป็น 2 หน่วย คือ หน่วยที่ทำหน้าที่ตัดดีเอ็นเอและหน่วยที่ทำหน้าที่เติมหมู่เมธิล โมเลกุลของเอนไซม์ตัดจำเพาะไทป์ III จะประกอบไปด้วยโพลีเปปไทด์ 2 ชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอนไซม์ไทป์ I และ III จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดไม่แน่นอน และมีการแข่งขันกันระหว่างกิจกรรมการตัดดีเอ็นเอและการเติมหมู่เมธิล จึงไม่นิยมใช้ในการตัดต่อดีเอ็นเอ ในขณะที่เอนไซม์ไทป์ II สามารถตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นส่วนที่แน่นอน จึงนิยมนำมาใช้ในการตัดต่อดีเอ็นเอ ปัจจุบันมีการค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะประมาณ 400 ชนิด แต่มีบริเวณจดจำที่แตกต่างกันประมาณ 90 แบบ (ตาราง 1) ดังนั้นจึงมีเอนไซม์บางชนิดที่มีบริเวณจดจำเหมือนกันซึ่งเรียกว่า ไอโซชิโซเมอร์ (isoshizomer) แม้ว่าจะมีบริเวณจดจำเหมือนกันแต่ไม่จำเป็นที่จะต้องตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน เช่น *Xma*I และ *Sma*I เป็นไอโซชิโซเมอร์ แต่ตัดดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งที่ต่างกัน (รูป 3) (สุรินทร์,2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 เอนไซม์ตัดจำเพาะไทป์ IIที่แยกได้จากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

แบคทีเรีย	เอนไซม์	ลำดับเบสที่จดจำและบริเวณที่ตัด
Bacillus amyloliquefaciens	*Bam*HI	G/GATCC
Bacillus globigii	*Bgl*II	A/GATCT
Escherichia coli RY 13	*Eco*RI	G/AA*TTC
Haemophilus influenza Rd	*Hin*dIII	A*/AGCTT
Haemophilus parainfluenzae	*Hpa*I	GTT/AAC
Klebsiella pneumoniae	*Kpn*I	GGTAC/C
Providencia stuartii	*Pst*I	CTGCA/G
Serratia marcescens	*Sma*I	CCC/GGG
Streptomyces albus G	*Sal*I	G/TCGAC
Xanthomonas malvacearum	*Xma*I	C/CCGGG
Xanthomonas oryzae	*Xor*I	CGATC/G
Anabaena variabilis	*Ava*I	C/PyCGPuG
Haemophilus aegypticus	*Hae*I	[A or T] GG/CC [T or A]
Haemophilus aegypticus	*Hae*II	PuGCGC/Py
Haemophilus influenzae	*Hind*II	GTPy/PuAC
Anabaena variabilis	*Ava*II	G/G [A or T] CC
Escherichia coli RV 245	*Eco*RII	/CC* [A or T] GG
Haemophilus aegypticus	*Hae*III	GG/C*C
Haemophilus haemolyticus	*Hha*I	GC*G/C
Haemophilus parainfluenzae	*Hpa*II	C/C*GG
Morexella bovis	*Mbo*I	/GATC

ที่มา : สุรินทร์ (2543)

หมายเหตุ A* คือ N^6 - methyladenine

C* คือ 5- methylcytosine

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

*Xma*I 5'-C/CCGGG-3' *Sma*I 5'-CCC/GGG-3'

3'-GGGCC/C-5' 3'-GGG/CCC-5'

รูป 3 ไอโซชิโซเมอร์ของ *Xma*I และ *Sma*I
ที่มา : สุรินทร์ (2543)

ลักษณะการตัดลำดับเบสในสายดีเอ็นเอ

การตัดลำดับเบสในสายดีเอ็นเอของเอนไซม์ตัดจำเพาะจะเกิดได้ 3 รูปแบบ คือ

1. ตัดจากปลาย 5' ทำให้ได้ปลายเหนียวของปลาย 5' (sticky end, cohesive end, overlapping end) เช่น *Eco*RI (รูป 4), *Hind*II และ *Mbo*I เป็นต้น

5'-G/AATTC-3' ---------→ 5'-G..... AATTC-3'

3'-CTTAA/G-5' 3'-CTTAA..... G-5'

รูป 4 รูปแบบการตัดดีเอ็นเอที่ปลาย 5'
ที่มา : สุรินทร์ (2543)

กิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนี้จะทำให้ได้ดีเอ็นเอสองสายที่มีลักษณะสมมาตรกัน (palindromic sequence) แต่เอนไซม์ตัดจำเพาะไทป์ II บางชนิดอาจจะตัดดีเอ็นเอแล้วได้ลักษณะที่ไม่สมมาตรกัน (non-palindromic sequence) เช่น *Aar*I (รูป 5)

5'-CACCTGCNNNN/

3'-GTGGACGNNNNNNNN/

รูป 5 รูปแบบการตัดดีเอ็นเอที่ไม่สมมาตรกันของ *Aar*I
ที่มา : Grigaite *et al.* (2002)

2. ตัดจากปลาย 3' ทำให้ได้ปลายเหนียวของปลาย 3' เช่น *Pst*I, *Hha*I, *Kpn*I เป็นต้น ตัวอย่าง *Kpn*I (รูป 6) ซึ่งจะได้ดีเอ็นเอสองสาย ที่มีลักษณะสมมาตรกัน เหมือนกับการตัดแบบที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5'-GGTAC/C-3' ---------→ 5'-GGTAC……..C-3'

3'-C/CATGG-5' 3'-C……..CATGG-5'

รูป 6 รูปแบบการตัดดีเอ็นเอที่ปลาย 3'

ที่มา : สุรินทร์ (2543)

3. ตัดแล้วได้ปลายทู่ (blunt end) เช่น *Sma*I (รูป 7) และ *Hae*III เป็นต้น

5'-CCC/GGG-3' ----------→ 5'-CCC……..GGG-3'

3'-GGG/CCC-5' 3'-GGG…….CCC-5'

รูป 7 รูปแบบการตัดดีเอ็นเอแบบได้ดีเอ็นเอปลายทู่

ที่มา : สุรินทร์ (2543)

รูปแบบการตัดนี้จะได้ดีเอ็นเอเส้นคู่ที่มีปลายทู่ทั้งสองด้าน ไม่มีปลายเหนียวเหมือนกับรูปแบบการตัด 2 แบบข้างต้น

ระบบการเรียกชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ (อ้างโดย นิตย์ศรี, 2536)

Smiths and Nathans (1973) ได้เสนอหลักเกณฑ์เกี่ยวกับระบบการเรียกชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อความสะดวกและง่ายต่อการเข้าใจ เนื่องจากปัจจุบันมีการค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใหม่จำนวนมาก โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้คือ

1. ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิตใดๆ ประกอบด้วยชื่อ จีนัส และ สปีชีส์ ชื่อของเอนไซม์ตัดจำเพาะ จะมาจากอักษรตัวใหญ่ตัวแรกจากชื่อ จีนัส (genus) และอักษรตัวเล็กสองตัวแรก จากชื่อสปีชีส์ (species) รวมเป็นอักษรทั้งหมด 3 ตัว เช่น *Escherichia coli* = *Eco* เป็นต้น

2. สายพันธุ์หรือชนิดแบคทีเรีย ใช้อักษร 3 ตัวแรกของสายพันธุ์และเลขโรมันแสดงถึงชนิดของเอนไซม์ เขียนในระดับต่ำกว่า (subscript) อักษร 3 ตัวแรก เช่น Eco_R ในกรณีระบบ R-M ที่มาจากไวรัส หรือพลาสมิด ชื่อย่อของเซลล์เจ้าบ้าน เขียนโดยใช้ระบบเดียวกัน เช่น $Eco_{R\,I}$ เป็นต้น ในกรณีที่เอนไซม์ตัดจำเพาะมีมากกว่า 1 ชนิด จะแสดงให้เห็นดังนี้

Eco_{RI} เป็นเอนไซม์ที่มาจาก *E.coli* สายพันธุ์ R ตัวที่1

Eco_{RII} เป็นเอนไซม์ที่มาจาก *E.coli* สายพันธุ์ R ตัวที่2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เอนไซม์ตัดจำเพาะทุกตัวมีชื่อทั่วไปคือ endonuclease R ดังนั้นชื่อเต็มของเอนไซม์ตัดจำเพาะจะมีข้อความดังกล่าวนำอยู่ข้างหน้า เช่น endonuclease R Hin_{dIII} ในทำนองเดียวกันเอนไซม์ในระบบ modification ซึ่งมีชื่อทั่วไปคือ methylase M ดังนั้นชื่อเต็มของเอนไซม์ในระบบดังกล่าวจึงถูกเขียนเป็น methylase M Hin_{dIII}

เพื่อให้สะดวกในการเขียนชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงอนุโลมให้มีการดัดแปลงได้ในรูปแบบดังต่อไปนี้

- ระบบ subscript ที่ต้องพิมพ์ให้อยู่คนละระดับ จะสามารถพิมพ์ไว้ในระดับเดียวกันได้ เช่น *Eco*RI และ *Hin*dIII เป็นต้น
- ถ้ามีเฉพาะเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เกี่ยวข้องเท่านั้น ไม่จำเป็นต้องใส่ endonuclease R ไว้

การคำนวณความถี่และจำนวนจุดตัดบนดีเอ็นเอของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (สุรินทร์, 2543)

ถ้าสมมุติให้โอกาสในการกระจายตัวของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดบนสายดีเอ็นเอ เท่ากัน โอกาสหรือความถี่ที่จะพบบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะหนึ่งๆ จะสามารถคำนวณได้จากสมการ (1)

$$\text{ความถี่} = 1/4^{N} \qquad (1)$$

N คือ จำนวนนิวคลีโอไทด์ในบริเวณจดจำ

ดังนั้นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีบริเวณจดจำ ซึ่งประกอบด้วยการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ 4 นิวคลีโอไทด์จะมีโอกาสพบจุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็น $1/4^4$ หรือ 1/256 นั่นคือทุกๆ 256 นิวคลีโอไทด์ บนสายดีเอ็นเอ จะมีจุดตัด 1 จุด ด้วยวิธีการนี้จะสามารถคำนวณหาจำนวนจุดตัดของดีเอ็นเอที่ทราบขนาดได้จากสมการ (2)

$$\text{จำนวนจุดตัด} = \text{ขนาดของดีเอ็นเอ (คู่เบส)} \times \text{ความถี่} \qquad (2)$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แต่การคำนวณจุดตัดแบบนี้บางครั้งอาจไม่ถูกต้องตรงกับความเป็นจริง เนื่องจากการกระจายตัวของนิวคลีโอไทด์ แต่ละชนิดบนสายดีเอ็นเอที่ไม่เท่ากัน

นิเวศวิทยาของน้ำพุร้อน (ประวิทย์, 2533)

สิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่สามารถอยู่รอดได้ในน้ำพุร้อน จะต้องอาศัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต ซึ่งขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้ คือ

ปัจจัยทางกายภาพ

1. แสงสว่าง เป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการผลิต ความเข้มข้นของแสงสว่างมีผลต่อผู้ผลิตขั้นปฐมภูมิ (primary producer)

2. อุณหภูมิ น้ำพุร้อนที่มีช่วงอุณหภูมิคงที่ทำให้สิ่งมีชีวิตในบริเวณนั้นอยู่รอดได้ แต่สิ่งมีชีวิตใหม่ไม่อาจเกิดขึ้นได้

3. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ น้ำพุร้อนที่น้ำมีสภาพเป็นกรดจะมีการออกซิไดซ์ไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้กลายเป็นกรดกำมะถัน อันเป็นการจำกัดการกระจายของสิ่งมีชีวิตเกิดขึ้น

ปัจจัยทางเคมี

1. ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำพุร้อน มีผลต่อชนิดและจำนวนของสิ่งมีชีวิต ปกติการละลายของออกซิเจนในน้ำจะต่ำเมื่ออุณหภูมิของน้ำมีค่าสูง

2. ความเข้มข้นของอินทรีย์สาร ในน้ำพุร้อนส่วนใหญ่จะมีความเข้มข้นของอินทรีย์สารต่ำ จึงเป็นปัจจัยจำกัดชนิดของจุลินทรีย์ที่จะเจริญ

ปัจจัยทางชีวภาพ

1. ความสมดุลทางชีวภาพ ในน้ำพุร้อนขนาดใหญ่จะมีความสมดุลของมวลชีวภาพ เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของสิ่งมีชีวิตอยู่เสมอ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตอยู่ในภาวะคงตัว

2. การถ่ายทอดพลังงานในน้ำพุร้อนขนาดใหญ่ ห่วงโซ่อาหารจะประกอบด้วยผู้ผลิต ผู้บริโภค และผู้ย่อยสลาย เช่นเดียวกับระบบนิเวศทั่วไป

ชนิดของน้ำพุร้อน

Ramingwong *et al.* (1978 อ้างโดย ประวิทย์, 2533) แบ่งน้ำพุร้อนตามลักษณะที่ปรากฏได้ 3 ชนิด ดังนี้

1. Seep spring มีลักษณะเป็นแอ่งเล็ก ๆ มีน้ำขัง หรือเป็นร่องเล็กที่มีน้ำไหล

2. Pool spring มีลักษณะเป็นบ่อหรือแอ่ง ซึ่งอาจเป็นบ่อที่มีน้ำใสหรือมีโคลนตมผสมอยู่ด้วย

3. Geyser มีลักษณะเป็นบ่อหรือแอ่ง มีน้ำพุพุ่งขึ้นมาเหนือผิวดิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบคทีเรียทนร้อน (Thermotolerant bacteria) (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการอุณหภูมิในการเจริญต่างกัน ดังนั้นสามารถจัดจำพวกของแบคทีเรียตามอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตได้ดังนี้

1. Psychophile เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่าจุดเยือกแข็งถึง 15 องศาเซลเซียส

2. Mesophile เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง ระหว่าง 25-40 องศาเซลเซียส

3. Thermophile เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง ระหว่าง 45-60 องศาเซลเซียส

แบคทีเรียหลายชนิดสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้ เรียกจุลินทรีย์พวกนี้ว่า "Thermotolerant" หรือพวก "Thermoduric" ซึ่งบางพวกก็อาจไม่สร้างสปอร์ ซึ่งพวก Thermotolerant ส่วนใหญ่มักสร้างเอนโดสปอร์ ที่มีชีวิตอยู่ได้ในอุณหภูมิที่ vegetative cell เกือบจะตายในทันที ตัวอย่างเช่น เอนโดสปอร์ของ *Bacillus* สามารถทนความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือมากกว่า แม้ว่าสปอร์ ถูกฆ่าที่อุณหภูมินี้บ้างแต่อัตราการตายจะช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ vegetative cell เนื่องจากเอนโดสปอร์มีปริมาณน้ำน้อยกว่าใน vegetative cell จึงช่วยให้ทนความร้อนได้ดีกว่า และยังพบว่าโปรตีนจะทนต่อการสลายในที่แห้งได้มากกว่าในรูปของสารละลาย ซึ่งโปรตีนในสปอร์มักจะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายและอยู่รวมกับองค์ประกอบอื่น เช่น lipids เป็นต้น (รัศมิกร, 2544)

จุลินทรีย์พวก thermotolerant bacteria สามารถอยู่รอดได้ และเจริญในอุณหภูมิสูงเนื่องจากมีคุณสมบัติดังนี้ (Campbell and Pace, 1968 อ้างโดย ประวิทย์, 2533)

1. เอนไซม์และโครงสร้างที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมีคุณสมบัติทนความร้อนสูง

2. เยื่อหุ้มเซลล์ทนต่อความร้อนสูง เนื่องจากมีลิปิดจำนวนมากบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งละลายกรดไขมัน ทำให้ได้เยื่อหุ้มเซลล์คงตัวจึงสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง

3. สามารถสร้างส่วนประกอบของเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้อย่างรวดเร็ว เซลล์จะมีอัตราเมตาโบลิซึมสูงในสภาวะที่อุณหภูมิสูง ทำให้มีการขนส่งสับสเตรทและของเสียเข้าออกจากเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว

4. สามารถปรับตัวทางสรีรวิทยาให้ทำงานได้ดีในอุณหภูมิสูง หรือเท่ากับสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตามปรกติแบคทีเรียที่เจริญในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงจะผลิต bioactive compound บางชนิด เช่น เอนไซม์ ซึ่งมีความสามารถในการทำงานที่อุณหภูมิสูง คุณสมบัติของการคงความสามารถในการทำงานที่อุณหภูมิสูง (thermostability) เป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของเอนไซม์ ที่จะวิจัยเพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ทั้งนี้หากสามารถเลี้ยงแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ทนร้อนที่สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง ตั้งแต่อุณหภูมิห้องถึงอุณหภูมิสูง และสกัดเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ที่อุณหภูมิห้อง โดยที่เอนไซม์ไม่แปรสภาพพร้อมกับสูญเสียความสามารถในการทำงาน จะเป็นการประหยัดต้นทุนการผลิต เพราะไม่ต้องใช้ระบบความเย็นควบคุมอุณหภูมิ (cooling system) และ ระบบให้ความร้อนในการบ่มเชื้อ นอกจากนี้อุณหภูมิสูงยังป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (ปานมุก, 2547)

ชนิดของดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

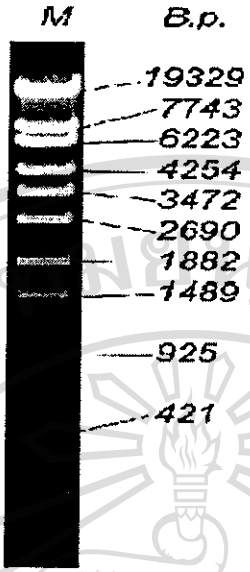
1. *dam*⁻ λ DNA (Lambda DNA) (Bioron GmbH, 2004)

dam⁻ λ DNA สกัดจาก phage lambda มีความยาวประมาณ 48,000 คู่เบส เป็น phage lambda ที่ไม่มี adenine methylase นิยมใช้ *dam*⁻ λ DNA ในการทดสอบหากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะเอนโดนิวคลีเอส เนื่องจากเป็นดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง (linear DNA) มี recognition site สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะเอนโดนิวคลีเอสหลายชนิด และการที่ไม่มี adenine methylase ยังทำให้การย่อยดีเอ็นเอสมบูรณ์ขึ้น นอกจากนี้ยังมีการนำ *dam*⁻ λ DNA มาใช้เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ตัดจำเพาะเอนโดนิวคลีเอสชนิดต่างๆ เพื่อให้ได้เป็น standard marker สำหรับใช้งานด้านเทคนิคอิเลคโตรโฟริซิส เช่น *dam*⁻ λ DNA x *Sty* I-digest เป็น Marker 6 โดย *Sty* I จะตัด *dam*⁻ λ DNA ได้ 10 ชิ้น ขนาด 19.33, 7.74, 6.22, 4.25, 3.47, 2.69, 1.88, 1.49, 0.93 และ 0.42 kbp (รูป 8)

2. pBR322 DNA (New England Biolabs Inc., 2007a)

pBR322 DNA เป็นเวคเตอร์ที่ใช้ในการโคลนนิ่ง ลักษณะโมเลกุลเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ม้วนเป็นวง มีความยาว 4,361 คู่เบส โดยปกติแล้ว pBR322 DNA มักจะมียีนที่ดื้อต่อ ampicillin และ tetracycline อีกทั้งยังสามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วย chloramphenicol มวลโมเลกุลของ pBR322 DNA เท่ากับ 2.83×10^6 daltons

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 8 การตัด *dam*⁻ λ DNA โดย *Sty* I
ที่มา: Bioron GmbH (2004)

3. pUC19 DNA (New England Biolabs Inc., 2007b)

pUC19 DNA ใช้เป็นเวคเตอร์ในการโคลนนิ่งเข้าสู่ *E.coli* ลักษณะโมเลกุลเป็นดีเอ็นเอสายคู่ขนาดเล็ก ม้วนเป็นวง มีความยาว 2,686 คู่เบส ภายในโมเลกุลของ pUC19 DNA ประกอบไปด้วยตำแหน่งที่ใช้ในการโคลนนิ่ง 54 เบส อีกทั้งยังประกอบไปด้วยตำแหน่งจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบ hexanucleotide sequence ที่แตกต่างกันถึง 13 ชนิด

4. ϕX174 DNA (New England Biolabs Inc., 2007c)

ϕX174 DNA เป็นดีเอ็นเอที่แยกได้จาก bacteriophage ϕX174 *am3 cs70* มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 1.70×10^6 daltons และมีความยาว 5,386 คู่เบส ϕX174 DNA ประมาณ 85% จะมีรูปร่างม้วนเป็นวง การใช้งานดีเอ็นเอนี้จะต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนโดยวิธี cesium chloride density gradient centrifugation

5. ColE1 (Lovett *et al.*, 1974)

ColE1 DNA หรือ plasmid E1 มีลักษณะดีเอ็นเอเป็นแบบเกลียว แยกได้จาก *E. coli* ขนาดโมเลกุลเท่ากับ 4.2×10^6 daltons และมีความยาว 6,646 คู่เบส

6. Adenovirus 2 DNA (Sergeant *et al.*, 1974)

Adenovirus 2 DNA หรือ Ad2 DNA เป็นดีเอ็นเอสายคู่ ขนาด 2.3×10^7 daltons มีความยาว 36,000 คู่เบส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เบื้องต้น

การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เบื้องต้น สามารถทำได้หลายวิธีการ ซึ่งแต่ละวิธีล้วนมีหลักการที่แตกต่างกัน ในทางปฏิบัติโดยทั่วไป นิยมใช้เพียง 2 วิธีการ ดังต่อไปนี้คือ

1. ไอออน เอกส์เชนจ์ โครมาโตกราฟฟี (Ion exchange chromatography) (Amersham Biosciences, 2002a)

Ion exchange chromatography (IEX) จะเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ การแยกขึ้นอยู่กับประจุสุทธิของโปรตีน ซึ่งจะขึ้นอยู่กับจำนวน acidic และ basidic residue ในโปรตีน และค่า pH กับ ionic strength ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะ (eluting buffer) ในการเลือกใช้บัฟเฟอร์ ควรเลือกชนิด anionic buffer เช่น phosphate กับ cation exchange chromatography และชนิด cation buffer เช่น Tris สำหรับ anion exchange chromatography

ต้องทำการปรับ pH และ ionic strength ของ protein sample เป็นอันดับแรกก่อนเริ่มดำเนินการ เพื่อให้โปรตีนจับตัวกับเจลได้ดี ดังนั้นเมื่อเติมตัวอย่าง (sample) ลงบนคอลัมน์ โปรตีนในตัวอย่างจะจับตัวกับเจลทันที ทำให้โปรตีนรวมอยู่ในบริเวณเดียวกัน (concentrating effect) ดังนั้นในการทำโครมาโตกราฟี ปริมาณของตัวอย่างจะไม่มีผลต่อการแยกมากนักเหมือนกับเทคนิค gel filtration chromatography ในขณะที่อัตราการไหล (flow rate) มีความสำคัญมาก อย่างไรก็ตาม ปริมาณโปรตีนสูงสุดที่สามารถจับกับเจลได้ ขึ้นกับความสามารถในการเคลื่อนผ่าน (dynamic capacity) และความสามารถในการจับกับเจล (available capacity) ณ อัตราการไหลนั้นๆ หลังจากนั้นจะมีการเติม eluting buffer ตามไป เพื่อชะโปรตีนที่ค้างอยู่ในคอลัมน์ ให้หลุดออกมา ณ เวลาต่าง ๆ eluting buffer จะมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือ เพิ่มความเข้มข้นของเกลือ เพื่อชะเอาเอนไซม์ที่ต้องการศึกษาออกจากคอลัมน์ วิธีการชะโปรตีนออกมี 2 แบบ คือ linear gradient (ค่อยๆ เปลี่ยนสภาวะของบัฟเฟอร์) และ step gradient (เปลี่ยนสภาวะของบัฟเฟอร์ทันที)

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อ resolution ของ IEX คือ gel selectivity อนุภาคของเจล อัตราการไหลผ่าน ความชันของ gradient ค่า pH ที่เลือกใช้ในการแยก ส่วนความยาวของคอลัมน์ไม่มีผลมากนักต่อการแยก แต่ส่วนใหญ่นิยมใช้คอลัมน์ที่มีขนาดสั้น เพื่อลดอัตราการเจือจางของโปรตีนเนื่องจากการชะของบัฟเฟอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. เจล ฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟฟี (Gel filtration chromatography) (Amersham Biosciences, 2002b)

Gel filtration (GF) chromatography สามารถแยกโมเลกุลของ globular protein ตามขนาด เช่น มวลโมเลกุล ซึ่งประกอบไปด้วยคอลัมน์ที่มี polymeric gel ที่มีลักษณะเป็น cross-linked polysaccharide ในบางกรณีอาจใช้ polyacrylamide เป็น media โดยที่สามารถกำหนดขนาดรูในเจลได้ crude enzyme จะถูกเติมลงด้านบนของคอลัมน์ โปรตีนจะถูกชะโดยบัฟเฟอร์ที่ทราบปริมาตรผ่าน gel matrix ดังนั้นโปรตีนจะอยู่ใน eluting buffer หรืออาจเรียกว่า mobile phase เจลหรือ stationary phase จะทำหน้าที่เหมือนเขาวงกตแบบสามมิติที่โปรตีนขนาดเล็กลอดผ่านได้ และทำให้การชะของโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็กช้าลง ดังนั้นโปรตีนขนาดใหญ่จะผ่านคอลัมน์ออกมาเป็นอันดับแรก ทำให้มีการแยกส่วนของโปรตีนตามขนาดของโมเลกุล ขนาดของ globular protein จะมีความสัมพันธ์กับมวลโมเลกุลของโปรตีนนั้นๆ วิธีนี้จึงสามารถประมาณมวลโมเลกุลของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ศึกษาในรูป native form

Resolution ของ gel filtration chromatography ขึ้นอยู่กับความยาวของคอลัมน์ อัตราการไหลของบัฟเฟอร์ ขนาดช่องระหว่างอนุภาคของเจล และขนาดอนุภาคของเจล โดยทั่วไปประสิทธิภาพหรือ resolution จะเพิ่มเมื่อขนาดของอนุภาคเจลเล็กลง และเมื่อเพิ่มความยาวของคอลัมน์ แต่ถ้าคอลัมน์ยาวจนเกินไปจะทำให้ประสิทธิภาพการแยกน้อยลง เนื่องมาจากว่าโปรตีนจะถูกเจือจางมากเกินไป ทำให้ความกว้างของพีคในโครมาโตแกรมมากขึ้น อย่างไรก็ตามเทคนิค gel filtration chromatography สามารถแยกโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพดีพอสมควรในสภาวะที่เหมาะสมและสภาวะปกติ (mild condition) เอนไซม์ที่ได้ไม่สูญเสียความสามารถในการทำงานของแต่ทว่าเอนไซม์ที่สนใจจะถูกเจือจางอยู่ใน eluting buffer เพราะว่าความยาวของคอลัมน์ที่ต้องใช้ปริมาตร eluting buffer มากกว่าโครมาโตกราฟฟีชนิดอื่นๆ

ตัวอย่างโปรตีนที่แยกโดย gel filtration ได้นั้น ควรมีปริมาตรในช่วง 2-5% ของปริมาตรเจลในคอลัมน์ทั้งหมด เพื่อลดผลของการเจือจางของโปรตีนในตัวอย่าง จึงทำให้ต้องจำกัดปริมาตรของตัวอย่างที่จะนำไปเติมลงบนคอลัมน์ในช่วงข้างต้น

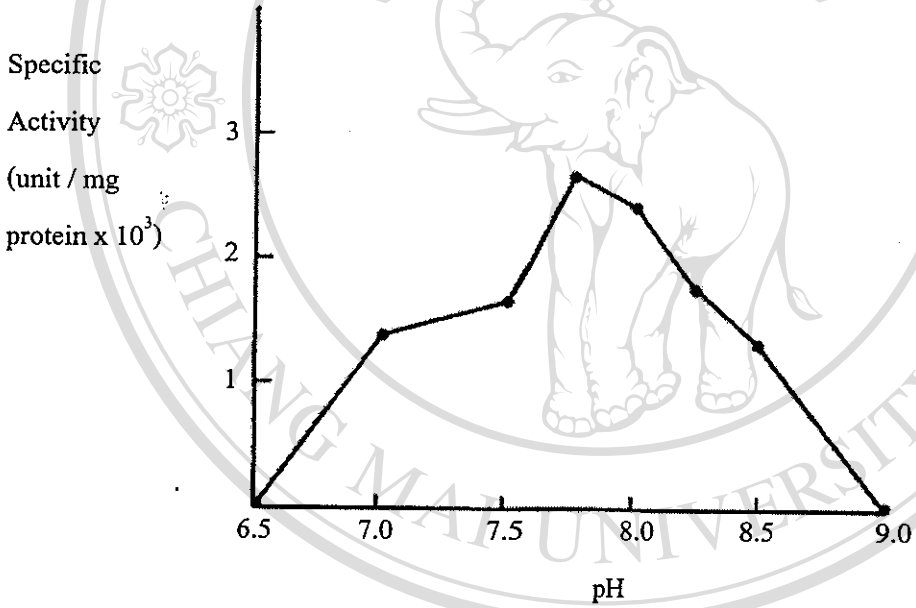
นอกจากที่ gel filtration สามารถแยกโปรตีนตามขนาด เทคนิคนี้ยังนำไปประยุกต์ใช้ ใน buffer exchange หรือ desalting เทคนิคนี้สามารถแยกโปรตีนออกจากเกลือได้อย่างสิ้นเชิง เนื่องจากโมเลกุลเกลือเป็นโมเลกุลที่เล็กมากเมื่อเทียบกับเอนไซม์หรือโปรตีนใดๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติการค้นพบและศึกษาเอนไซม์ตัดจำเพาะ ไทป์ II จากแบคทีเรียทนร้อน

Sato *et al.* (1977) ได้ค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะจากแบคทีเรียทนร้อนชนิดแรก (*Taq*I) จากเชื้อ *Thermus aquaticus* ซึ่งสามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 70°C มีตำแหน่งจดจำและตัดดีเอ็นเอที่ T/CGA และในปีเดียวกัน Catterall and Welker (1977) ได้ทำการสกัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*1503 จากแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus stearothermophilus* สายพันธุ์ 1503-4R ซึ่งมีการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 55 °C ในอาหารที่มีส่วนผสมของ 2% trypticase, 0.5% yeast extract, 0.5% glucose และเกลือแร่ต่าง ๆ ได้แก่ $FeCl{\cdot}6H_20$, $MnCl_2{\cdot}4H_20$ และ $MgSO_4{\cdot}7H_20$

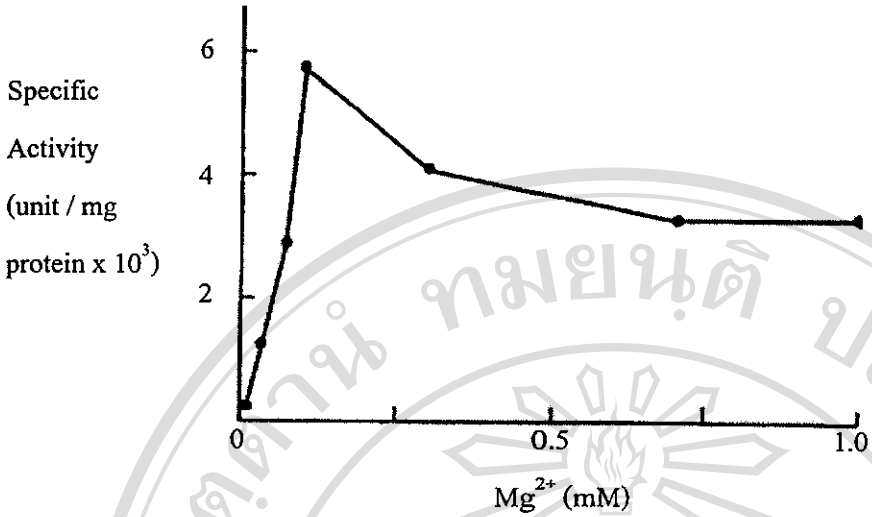
เอนไซม์ *Bst*1503 สามารถทำงานได้ดีที่ pH ระหว่าง 7.0-8.5 โดยมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่ pH 7.5-8.0 (รูป 9)



รูป 9 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*1503
ที่มา : Catteral and Welker (1977)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*1503 ต้องการความเข้มข้นของ Mg^{2+}ที่ระดับ 0.2 mM ซึ่งจะทำให้ได้ค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุด (รูป 10) สำหรับ Mn^{2+} สามารถใช้แทน Mg^{2+} ได้ในปริมาณที่เท่ากัน แต่กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์จะลดลงจากเดิมประมาณ 10 เท่า สำหรับ Ca^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+} และ Co^{2+} ไม่สามารถใช้ทดแทน Mg^{2+} ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 10 ความเข้มข้นของ Mg^{2+}ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*1503
ที่มา : Catteral and Welker, 1977

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*1503 ทำงานที่อุณหภูมิระหว่าง 25-75 °C แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 55-65 °C และพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*1503 จะยังคงสภาพการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิไม่เกิน 65°C ในการบ่มด้วยเวลา 2 ชั่วโมง

หลังจากทดลองหามวลโมเลกุลและสับยูนิตของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*1503 พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีลักษณะโมเลกุลเป็นแบบ tetramer (4 สับยูนิต) ซึ่งแต่ละสับยูนิตมีขนาด 46,000 dalton ดังนั้นมวลโมเลกุลรวมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*1503 จึงเท่ากับ 184,000 dalton

จากผลการทดลองตัดดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ ได้แก่ TP-1C, λvir, SV40 และ pSC101 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*1503 เพื่อระบุตำแหน่งตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*1503 เป็น isoshizomer กับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

Prangishvili *et al.* (1985) ได้ค้นพบเอนไซม์ทนร้อน *Sua*I ซึ่งสกัดมาจากเชื้อที่ชอบทั้งกรดและความร้อนคือ *Sulfolobus acidocaldarius* สายพันธุ์ DSM 639 โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 82°C หลังจากทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sua*I ต้องการ Mg^{2+} เป็นโคแฟคเตอร์ ซึ่งค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 5 mM อีกทั้งยังต้องการ KCl ความเข้มข้นในช่วง 10-30 mM ค่า pH ที่เหมาะต่อกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อยู่ในช่วง 7.5-8.0 และช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 60-70°C เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sua*I จะไม่คงตัวเมื่อถูกบ่มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลานาน 30 นาที

หลังจากทำการทดลอง double digestion ของเอนไซม์ *Sua*I พบว่าเอนไซม์ *Sua*I เป็น isoshizomer ของเอนไซม์ *Bsp*RI ซึ่งตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง GG/CC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

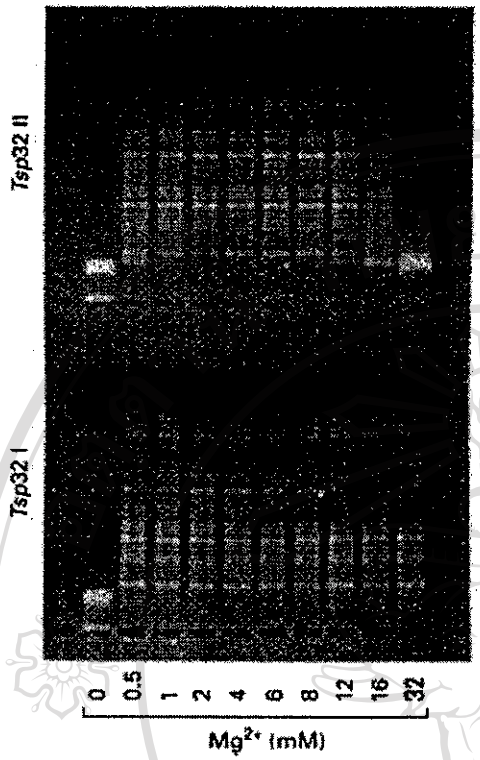
Welch and Williams (1995a) ได้ทำการแยกเชื้อ *Thermus* spp. 127 ไอโซเลต จากน้ำพุร้อนที่มีค่า pH อยู่ในช่วงปานกลางค่อนไปทางด่าง โดยเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกได้จาก อุทยานแห่งชาติ Yellow stone ในประเทศสหรัฐอเมริกา ที่อุณหภูมิ 73°C pH 8.5 และจะแสดงค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อนี้มีชื่อว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*52I ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 44 Kdalton

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*52I มีกิจกรรมได้ที่ช่วง pH 5.5-8.5 ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 8 mM และต้องการ NaCl ที่ 25 mM เอนไซม์ตัดจำเพาะนี้สามารถทนความร้อนได้สูงถึง 79 °C เป็นเวลา 10 นาที

หลังจากทำการตรวจหาตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์บนดีเอ็นเอ โดยใช้ primer 2 ชนิด ปรากฏว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*52I สามารถจดจำตำแหน่งเบสในลักษณะที่เรียกว่า pentanucleotide sequence หรือจดจำเบสได้ 5 ตัว ได้แก่ GC(A หรือ T)GC และตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง G/C(A หรือ T)GC ซึ่งพบว่าเป็นตำแหน่งตัดใหม่

จากนั้นในปีเดียวกัน Welch and Williams (1995b) ยังได้ค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะอีก 2 ชนิดคือ *Tsp*32I และ *Tsp*32II จากเชื้อไอโซเลตเดียวกัน คือเชื้อ *Thermus* sp. พบว่าเอนไซม์ทั้งสองมีตำแหน่งจดจำและตัดดีเอ็นเอที่คล้ายกับตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Taq*I กล่าวคือมีบริเวณที่จดจำและตัดคือ T/CGA แต่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tsp*32II มีความสามารถในการทนอุณหภูมิที่สูงกว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*I ถึง 12°C (เอนไซม์ *Tsp*32 II ทนอุณหภูมิได้สูงถึง 84°C เป็นเวลา 5 นาที) และคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น ค่า pH ที่เหมาะสม ค่า NaCl ที่เหมาะสม มีค่าใกล้เคียงกัน แต่แตกต่างกันตรงที่ *Tsp*32I มีความต้องการ $MgCl_2$ อยู่ในช่วง 0.5-2.0 mM ส่วน *Tsp*32II ต้องการ $MgCl_2$ ที่สูงกว่าคือ 2.0-4.0 mM (รูป 11)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 11 ความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tsp*32I และ *Tsp*32II

ที่มา : Welch and Williams (1995b)

เมื่อนำไอโซเลตของเชื้อ *Thermus* sp. นี้ไปทดลองเลี้ยงบนอาหารแข็ง ปรากฏว่า เชื้อที่เจริญเป็นเชื้อเดี่ยว แยกเป็นโคโลนี อย่างชัดเจนจำนวน 12 โคโลนี จึงนำเชื้อแต่ละโคโลนีไปทำการสกัดเอนไซม์ และทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ปรากฏว่าไม่มีโคโลนีใดเลยที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ *Tsp*32I และ *Tsp*32II แยกออกจากกัน จึงสรุปได้ว่าภายในเชื้อ *Thermus* sp.นี้มีเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดอยู่ด้วยกัน

Welch and Williams (1995c) ยังได้ทำการศึกษาเชื้อ *Thermus* sp. ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนในเขตตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศไอซ์แลนด์ โดยพบเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด จากเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะไทป์ II ทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tsp*4CI และ *Tsp*8EI ซึ่งเอนไซม์ *Tsp*4CI เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใหม่โดยจดจำและตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเบส ACN/GT (N คือเบสชนิดใดก็ได้) เอนไซม์ *Tsp*4CI นี้สามารถทนความร้อนได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 76°C เป็นเวลา 10 นาที ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tsp*8EI เมื่อทำการหาตำแหน่งจดจำและตัดดีเอ็นเอโดยวิธี DNA sequencing พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนี้เป็น isoshizomer ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

*Bgl*I โดยมีตำแหน่งตัดและจดจำดังนี้ GCCNNNN/NGGC แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tsp*8EI มีข้อดีกว่าเอนไซม์ *Bgl*I ตรงที่สามารถทนความร้อนได้สูงถึง 78°C เป็นเวลา 10 นาที ในขณะที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*I เป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากเชื้อพวก mesophilic bacteria ที่มีชื่อว่า *Bacillus globigii* ที่ไม่ทนอุณหภูมิสูงมากนัก ดังนั้นเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tsp*4CI และ *Tsp*8EI จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้เอนไซม์กลุ่มทนอุณหภูมิสูง

Repin *et al.* (1995) ค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น isoshizomer ชนิดใหม่อีก 29 ชนิดจากดินชนิดต่าง ๆ ในประเทศรัสเซีย (ตาราง 2) จากจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งสิ้น 235 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ปรากฏในการทดลองนี้เป็น *Bacillus spp.* ทั้งหมด

ตาราง 2 เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมดที่พบจากเชื้อแบคทีเรียในดินประเทศรัสเซีย

Species	Enzyme	Prototype	Site (cut)[a]
1. *Bacillus coagulans*	*Bco*27I	*Hpa*II	C/CGG
2. *B. species*	*Bse*QI	*Hae*III	GG/CC
3. *B. stearothermophilus*	*Bst*II	*Bst*NI	CC/WGG
4. *B. stearthermophilus*	*Bst*2I	*Bst*NI	CC/WGG
5. *B. species*	*Bse*16I	*Bst*NI	CC/WGG
6. *B. species*	*Bse*17I	*Bst*NI	CC/WGG
7. *B. species*	*Bse*24I	*Bst*NI	CC/WGG
8. *B. stearthermophilus*	*Bst*38I	*Bst*NI	CC/WGG
9. *B. stearthermophilus*	*Bst*100I	*Bst*NI	CC/WGG
10. *B. coagulans*	*Bco*6I	*Fsp*I	TGCGCA
11. *B. circulans*	*Bci*29I	*Cla*I	AT/CGAT
12. *B. coagulans*	*Bco*102I	*Bcl*I	T/GATCA
13. *B. coagulans*	*Bse*118I	*Cfr*10I	R/CCGGY
14. *B. coagulans*	*Bco*163I	*Sfe*I	C/TRYAG
15. *B. species*	*Bse*15I	*Ara*I	C/YCGRG
16. *B. species*	*Bse*17I	*Bcl*I	T/GATCA
17. *B. species*	*Bse*634I	*Cfr*10I	R/CCGGY
18. *B. coagulans*	*Bco*5I	*Ear*I	CTCTTC(1/4)
19. *B. stearothermophilus*	*Bst*11I	*Bsr*I	ACTGG(1/-1)
20. *B. stearothermophilus*	*Bst*12I	*Bbv*I	GCAGG(8/12)
21. *B. coagulans*	*Bco*102II	*Bbv*II	GAAGAC(2/6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 (ต่อ)

Species	Enzyme	Prototype	Site (cut)[a]
22. *B. coagulans*	*Bco*116I	*Ear*I	CTCTTC(1/4)
23. *B. species*	*Bse*ZI	*Ear*I	CTCTTC(1/4)
24. *B. schiegelii*	*Bse*4I	*Bsi*YI	CCN_5/N_2GG
25. *B. species*	*Bse*8I	*Bsa*BI	$GATN_2/N_2ATC$
30. *B. species*	*Bse*64I	*Bst*EII	G/GTNACC
31. *B. schlegelii*	*Bsc*107I	*Bsi*YI	CCN_5/N_2GG
32. *B. species*	*Bse*T9I	*Bst*EII	G/GTNACC
33. *B. species*	*Bse*T10I	*Bst*EII	G/GTNACC

ที่มา : Repin *et al.*, 1995

[a] R=A หรือ G; Y=C หรือ T; W=A หรือ T; N=A, G, C หรือ T; เครื่องหมาย / คือตำแหน่งตัดบนดีเอ็นเอ

Welch and Williams (1996) ทำการสกัดเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียทนร้อน *Thermus sp.* โดยแยกจากน้ำพุร้อนบริเวณเกาะ Sao Miguel ใน Azores ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สกัดได้มีชื่อว่า *Tsp*49I ซึ่งมีตำแหน่งจดจำที่เหมือนกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae*II คือ สามารถจดจำตำแหน่งเบส ACGTได้ แต่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae*II มีตำแหน่งตัดที่ 5'-A/CGT-3' ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tsp*49I มีตำแหน่งตัดที่ 5'-ACGT/-3'

ค่า pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tsp*49I ประมาณ 9.0 และค่าความเข้มข้นของ Mg^{2+}ที่เหมาะสมคือ 2 mM อีกทั้งเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้ยังสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 80°C นาน 10 นาที

นอกจากนี้ยังได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ไทป์ II ได้อีก 2 ไอโซเลต ไอโซเลตแรกแยกได้จากประเทศไอซ์แลนด์ สกัดได้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tsp*IDSI และไอโซเลตที่สองแยกได้จากประเทศนิวซีแลนด์ สกัดได้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tsp*WAM8AI โดยพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสามชนิด (*Tsp*49I, *Tsp*IDSI และ *Tsp*WAM8AI) เป็น neoisoshizomer ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae*II กล่าวคือ สามารถจดจำลำดับเบสได้เหมือนกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae*II แต่ตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเบสแตกต่างกัน ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีคุณสมบัติทนต่อความร้อน และต้องการค่า pH และความเข้มข้นของ Mg^{2+}ที่คล้ายคลึงกัน แต่มีความต้องการปริมาณ NaCl และ KCl ที่แตกต่างกัน (ตาราง 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 คุณสมบัติของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tsp*49I, *Tsp*IDSI, *Tsp*WAM8AI และ *Mae*II

Enzyme	Recognition sequence	Clevage site	pH optima	$MgCl_2$ (mM)	NaCl (mM)	KCl (mM)	Heat stability (°C)
*Tsp*49I	ACGT	ACGT/	9.0	2.0	0	0	82
*Tsp*IDSI	ACGT	ACGT/	9.5	2.0	50	100	78
*Tsp*WAMSAI	ACGT	ACGT/	8.5	2.0	0	0	80
*Mae*II	ACGT	A/CGT	10.0	12.0	150	150	55

ที่มา : Welch and Williams (1996)

Welch *et al.* (1998) ได้เก็บตัวอย่างดินจากน้ำพุร้อนในประเทศต่าง ๆ ที่ตั้งอยู่ใน 4 ทวีป เช่น ประเทศนิวซีแลนด์ ไอซ์แลนด์ ญี่ปุ่น อเมริกา โปรตุเกส และ เกาะ Sao Miguel ใน Azores ปรากฏว่าแยกเชื้อแบคทีเรียจีนัส *Thermus* ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ไทป์ IIได้ทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วย *Thermus thermophilus* *Thermus aquaticus* *Thermus filiformis* *Thermus thermophilus* *Thermus scotoductus* และ *Thermus brockianus* (ตาราง 4) ซึ่งเชื้อทั้งหมดมีการยืนยันสายพันธุ์โดยวิธี DNA/DNA homology และ 16S rRNA

ตาราง 4 รหัสเชื้อ ชนิดของเชื้อ และ สถานที่ที่แยกเชื้อจีนัส *Thermus* ได้

*Taq*I code	*Thermus* isolate	*Thermus* species	Geographic origin
A	YSS20	*T. aquaticus*	USA
B	Ork2A3	*T. filiformis*	New Zealand
C	GK24	*T. thermophilus*	Japan
D	Vi4a	*T. scotoducts*	Portugal
E	JK51	*T. brockiamus*	Iceland
F	RQ1	*T. thermophilus*	Azores

ที่มา : Welch *et al.* (1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการศึกษาการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 6 ชนิดที่แยกได้ เป็น isoshizomer ของเอนไซม์ *Taq*I เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 6 ชนิดมีคุณสมบัติบางประการ ดังตาราง 5

ตาราง 5 คุณสมบัติที่แตกต่างกันของเอนไซม์ตัดจำเพาะจากเชื้อจีนัส *Thermus* ที่แยกได้จากการทดลองของ Welch *et al.* (1998)

*Taq*I code	pH optimum	Optimum Mg^{2+} (mM)	Optimum Na^{+} (mM)	Thermal stability (°C)*	KCl concn required to elute the enzyme from the P11 column (M)	NaCl concn required to elute the enzyme from the DEAE-Sephacel column (M)
A	9.5-10.0	1.0†	75	73	0.35	0.25
B	9.5-10.0	2.5	75	84	0.5	0
C	9.5-10.0 and 8.0-8.5	1.0†	75	68	0.35	0.25
D	9.5-10.0	2.5	75	73	0.6	0.1
E	9.5-10.0	2.0	75	75	0.5	0.1
F	9.5-10.0	2.0	75	78	0.35	0.25

* บ่มเอนไซม์เป็นเวลานาน 5 นาที

† เอนไซม์ตัดจำเพาะจะถูกยับยั้งการทำงานเมื่อค่าความเข้มข้นของ Mg^{2+} มากกว่า 5.0 mM

Altintas *et al.* (1998) ได้ทดลองทำเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*Iให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีใหม่ ซึ่งเป็นการใช้เทคนิค 2 ชนิดควบคู่กัน ได้แก่ เทคนิค HPLC (high-performance liquid chromatography) และ ion-exchange chromatography พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*I ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีใหม่นี้จะมี กิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงขึ้นกว่าการใช้วิธีเก่า โดยพบว่าหลังจากทำเอนไซม์ *Taq*I ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีใหม่แล้ว ปรากฏว่าวัดปริมาณเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*I ได้ 4000 U ซึ่งได้จากเซลล์ของ *Thermus aquaticus* เพียงแค่ 2 กรัม ในขณะที่การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเดิม (ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC) พบว่าวัดปริมาณของ *Taq*I ได้เพียง 4000-32000 U จากเซลล์ของ *Thermus aquaticus* ที่มีปริมาณมากถึง 200 กรัม จึงสรุปได้ว่า การใช้เทคนิค HPLC ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มีประสิทธิภาพในการคงเหลือผลผลิตของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*I ได้มากกว่าการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเดิม จึงมีประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์อื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

Morgan *et al.* (1998) ได้ทำการทดลองสกัดเอนไซม์ตัดจำเพาะจากเชื้อแบคทีเรียชนิด extremely thermostable bacteria ที่มีชื่อว่า *Pyrococcus* sp. สายพันธุ์ GI-H ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 85°C เอนไซม์ตัดจำเพาะที่สกัดได้นี้มีชื่อว่า *Psp*GI ซึ่งเป็น isoshizomer กับ เอนไซม์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัดจำเพาะ *Eco*RII โดยตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 5'-/CCWGG-3' (W คือ A หรือ T) เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Psp*GI สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 65-85°C

Andrews *et al.* (1998) ได้สกัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Fgo*I จากเชื้อ thermophilic anaerobe ที่มีชื่อว่า *Fervidobacterium gondwanense* สายพันธุ์ AB39 ซึ่งแยกมาจากบริเวณ Great Artesian Basin ในประเทศออสเตรเลีย เชื้อที่แยกได้ทั้งหมดได้นำไปเลี้ยงในอาหาร TYEG (trypticase yeast extract glucose) ที่อุณหภูมิ 65°C พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะมีกิจกรรมที่ดีในช่วงอุณหภูมิ 55-70°C และสามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 70 °C เป็นเวลานาน 60 นาที ต้องการค่า pH สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงระหว่าง 6.5-8.5 สามาถใช้ Mn^{2+} แทน Mg^{2+} สำหรับเป็นปัจจัยร่วมในการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์ แต่ไม่สามารถใช้ Co^{2+} Ca^{2+} Cu^{2+} หรือ Zn^{2+} ได้

ในการหาตำแหน่งจดจำและตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Fgo*I โดยวิธี mapping มีการใช้ primer 2 ชนิดคือ pSK1599 และ pSK2179 ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Fgo*I สามารถตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 5'-C/TAG-3' ซึ่งปรากฏว่าเป็น isoshizomer ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae*I และ *Bfa*I โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดหลังนี้ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง ดังนั้นเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Fgo*I จึงมีประโยชน์ในการใช้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง และสามารถดำเนินกิจกรรมได้ในช่วง pH ที่กว้างมาก

Al-Awadhi *et al.* (1998) แยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* สายพันธุ์ B7S จากดินที่ปนเปื้อนไปด้วยน้ำมันดิบในทะเลทรายของประเทศคูเวต ซึ่งในฤดูร้อนดินบริเวณนี้จะมีอุณหภูมิสูงถึง 50°C เอนไซม์ตัดจำเพาะที่แยกได้มีชื่อว่าเอนไซม์ *Bst*B7SI และเป็น isoshizomer กับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cfr*10I โดยมีตำแหน่งจดจำและตัดที่ R/CCGGY (R คือ A หรือ G และ Y คือ C หรือ T) เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cfr*10I แยกได้จากเชื้อ *Citrobacter freundii* ซึ่งเป็น mesophilic bacteria จึงเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง ในขณะที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*B7SI ทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 70°C เป็นเวลานาน 5 นาที

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*B7SI ต้องการค่า pH ในการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์ที่ pH 9.7 และสามารถทำงานได้โดยมีความเข้มข้นของ Mg^{2+} ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 10-50 mM แต่ถ้าความเข้มข้นมากกว่า 50 mM จะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ขึ้น สำหรับ Ca^{2+} Sr^{2+} Zn^{2+} ไม่สามารถนำมาใช้เป็นปัจจัยร่วมในการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*B7SI แทนที่ Mg^{2+} ได้ กรณีที่ในระหว่างการทำกิจกรรมของเอนไซม์ไม่มี NaCl และ KCl กิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*B7SI จะลดลงครึ่งหนึ่ง

Saavedra *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนในระบบ restriction-modification ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*VI โดยใช้วิธี fluorescence spectroscopy พบว่า การที่มี S-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

adenosyl-L-methionine หรือ SAM ในระหว่างการทำกิจกรรมของเอนไซม์ จะส่งผลให้เกิดความแตกต่างของรูปร่างโปรตีน ที่อุณหภูมิ 20°C และ 55°C และ รูปร่างของโปรตีนในระบบ restriction-modification จะแตกต่างกันที่อุณหภูมิที่เอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดสามารถทำงานได้ดีที่สุด

Steponaviciene *et al.* (1999) ได้ค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะ ไทป์ II ชนิดใหม่ เอนไซม์ดังกล่าวคือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bse*SI ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus stearothermophilus* สายพันธุ์ Jo 10-553 เอนไซม์นี้สามารถจดจำและตัดที่ตำแหน่ง 5'-G(G หรือ T)GC(A หรือ T)/C-3' ซึ่งเป็นตำแหน่งตัดใหม่ที่ไม่เคยมีผู้ค้นพบมาก่อน

Vikute *et al.* (2001) ได้ทำการตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ไทป์ II จากแบคทีเรียจีนัส *Thermus* จำนวน 140 ไอโซเลต ปรากฏว่ามีไอโซเลตที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ไทป์ II ทั้งสิ้น 45 ไอโซเลต (ตาราง 6) โดยมีรูปแบบการตัดดีเอ็นเอต่างกัน 18 ชนิด ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ 16 ชนิดแรกเป็น isoshizomer ของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เคยมีการค้นพบก่อนหน้านี้แล้ว และพบเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีการค้นพบมาก่อนอีก 2 ชนิด ได้แก่ *Tat*I และ *Tau*I ซึ่งแยกได้จากเชื้อ *Thermus aquaticus* สายพันธุ์ CBA 1-311 และ *Thermus aquaticus* สายพันธุ์ Ma2 3-1 ตามลำดับ โดยมีการระบุตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิดด้วยเทคนิค double digestion ซึ่งมี M13mp18 DNA เป็นสับสเตรท มีการตรวจหาตำแหน่งตัดและจดจำโดยวิธี DNA sequencing ปรากฏว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tat*I มีตำแหน่งตัดดีเอ็นเอที่ W/GTACW (W คือ A หรือ T) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tau*I มีตำแหน่งตัดดีเอ็นเอที่ GCSG/C

Svadbina *et al.* (2003) ได้ทำการสกัดเอนไซม์ตัดจำเพาะจากแบคทีเรียทนร้อน จีนัส *Bacillus* อีกชิ้งเป็นแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Bacillus sp.* สายพันธุ์ LU4 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่สกัดได้มีชื่อว่า *Bsp*LU4I สามารถจดจำและตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง C/YCGRG (Y คือ C หรือ T และ R คือ A หรือ G) ซึ่งเป็น isoshizomer ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava*I

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6 กิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ไทป์ II ทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการสกัดเอนไซม์จากเชื้อจีนัส *Thermus*

Prototype[a]	Recognition sequence	REBASE[b]	REs found in this study[c]
1. *Tsp*EI	AATT	+	3
2. *Mae*II	ACGT	+	2
3. *Fnu*DII	CGCG	-	2
4. *Mbo*I	GATC	+	1
5. *Hae*III	GGCC	+	-
6. *Taq*I	TCGA	+	5
7. *Msc*I	TTAA	+	1
8. *Tsp*4CI	ACNGT	+	6
9. *Eco*RII	CCWGG	+	-
10. *Tsp*RI	CASTG	+	-
11. *Tfi*I	GAWTC	+	-
12. *Bbv*I	GCAGC	-	1
13. *Tau*I	GCSGC	-	2
14. *Tse*I	GCWGC	+	-
15. *Ava*II	GGWCC	+	-
16. *Tsp*45I	GTSAC	+	-
17. *Stu*I	AGGCCT	-	3
18. *Pvu*II	CAGCTG	-	10
19. *Xma*III	CGGCCG	+	1
20. *Xho*I	CTCGAG	-	1
21. *Eco*RV	GATATC	+	-
22. *Bse*PI	GCGCGC	-	2
23. *Sdu*I	GDGCHC	+	-
24. *Hgi*AI	GWGCWC	-	1
25. *Cfr*10I	RCCGGY	+	-
26. *Xho*II	RGATCY	+	-
27. *Bsp*MII	TCCGGA	+	-
28. *Taq*I	WGTACW	-	1
29. *Tth*111I	GACNNNGTC	+	-
30. *Bgl*I	GCCNNNNNGGC	+	1
31. *Bsr*I	ACTGG	+	-
32. *Ace*III	CAGCTC	-	2
33. *Tth*111II	CAARCA	+	-
34. *Mbo*II	GAAGA	+	-
35. *Taq*II	GACCGA, CACCCA	+	-

ที่มา : Vikute *et al.* (2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

a เอนไซม์ตัดจำเพาะต้นแบบที่แยกได้จากแบคทีเรียจีนัส *Thermus* จะพิมพ์ด้วยตัวหนา

b เครื่องหมาย + แสดงว่ากิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวพบในแบคทีเรียจีนัส *Thermus* ในฐานข้อมูลของ REBASE

- แสดงว่ากิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวไม่พบในแบคทีเรียจีนัส *Thermus* ในฐานข้อมูลของ REBASE

c คือ จำนวนของไอโซเลตที่ปรากฏกิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ไทป์ II ที่เป็น isoshizomer กับเอนไซม์ตัดจำเพาะต้นแบบชนิดต่าง ๆ

Sharma *et al.* (2003) ได้ทำการค้นหาเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใหม่ หรือ isoshizomer ชนิดใหม่จากเชื้อพวกที่ทนร้อน จนกระทั่งค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bfl*I จากเชื้อ *Anoxybacillus flavithermus* ซึ่งแยกได้จากดินบนภูเขาหิมาลัยทางตอนเหนือของประเทศอินเดีย อีกทั้งยังพบ isoshizomer ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsi*YI จากเชื้อ *Bacillus* sp. และพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนี้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 50-65°C แต่จะทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60°C

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bfl*I สามารถทำงานได้ดีในทุก ๆ บัฟเฟอร์ในช่วงเกลือ NaCl ระหว่าง 6-150 mM และ $MgCl_2$ ระหว่าง 6-15 mM

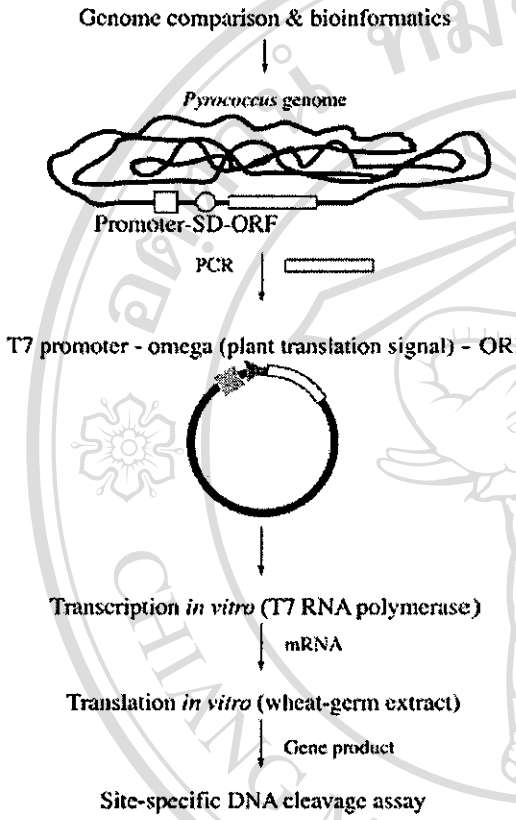
จากการทดสอบผลของ glycerol กับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bfl*I (โดยอาจเป็นสาเหตุของการเกิด star activity) ปรากฏว่า ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์สามารถเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์แบบในความเข้มข้นของ glycerol ระหว่าง 20-50% และพบว่าที่ความเข้มข้น glycerol มากกว่า 60% ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จะไม่สมบูรณ์ แต่จะไม่ปรากฏ star activity ในทุก ๆ ความเข้มข้นของ glycerol

ปานมุก และคณะ (2547) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตเอนไซม์ตัดจำเพาะทนร้อนจากดินบริเวณที่เกิดไฟป่าในดอยโมคคัลลาน ดินจากน้ำพุร้อนสันกำแพง น้ำพุร้อนโป่งเดือด และ น้ำพุร้อนแม่ตะมาน ทั้งสิ้น 116 ไอโซเลต พบเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ตัดจำเพาะไทป์ II ทั้งสิ้น 9 ไอโซเลต คิดเป็น 8 % สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ตัดจำเพาะไทป์ II ได้เป็น 6 กลุ่มตามรูปแบบการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เชื้อผลิตขึ้นมา

Ishikawa *et al.* (2005) ค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใหม่คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pab*I จากเชื้อ *Pyrococcus abyssi* ซึ่งเป็นเชื้อ hyperthermophilic archaeon โดยในการทดลองนี้มีการใช้วิธี genome comparison กับเชื้อ *Pyrococcus horikoshii* และเทคนิค Wheat-germ-based cell-free translation assay (รูป 12) เพื่อทดสอบหาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pab*I โดยพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pab*I สามารถจดจำและตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง GTA/C นอกจากนั้นยังพบว่าโปรตีนที่มี *pabI* gene อยู่ด้วยนั้น สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 90°C เป็นเวลา 15 นาที มีค่า pH ที่ใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 6.0 และความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 100-120 mM โดยจากข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการทดลองนี้ได้มีการสันนิษฐานว่าโปรตีนชนิดที่มี *pabI* gene นี้เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้าง 3 มิติชนิดใหม่



รูป 12 วิธีการทดลองหาตำแหน่งจดจำและตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pab*I โดยเทคนิค Wheat-germ-based cell-free translation assay

ที่มา : Ishikawa *et al.* (2005)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved