บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

Spirulina เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมายทั้งในด้านอาหารเสริมสุขภาพ อาหารสัตว์ และการวิจัยทางการแพทย์ เนื่องจาก *Spirulina* มีโปรตีนมากกว่าโปรตีนจากแหล่งธรรมชาติอื่น ๆ มีวิตามินและแร่ธาตุหลายชนิด มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะ γ-linolenic acid และ phytonutrient ต่าง ๆ ในทางการแพทย์พบว่า สารสกัดที่ได้จาก *Spirulina* สามารถช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้ร่างกาย และต้านทานต่อโรคต่าง ๆ เช่น ลดความดันโลหิตสูง ลดโคเลสเตอรอลในเลือด บำรุงหัวใจ ต้านทานต่อไวรัสและมะเร็ง เป็นต้น [1-3] และเนื่องจาก *Spirulina* เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีการสังเคราะห์แสงได้เช่นเดียวกับพืช มีการเจริญเติบโตที่ง่ายไม่ซับซ้อน การพัฒนาการเพาะเลี้ยงมีไปจนถึงระดับอุตสาหกรรม [3] จึงทำให้ *Spirulina* ได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นแบบจำลองการเพาะเลี้ยงให้กับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ รวมถึงมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นเซลเจ้าบ้าน สำหรับการผลิตสารชีวเคมีมูลค่าสูงในระดับอุตสาหกรรม ถึงแม้จะมีรายงานถึงการใช้ประโยชน์ของ *Spirulina* อย่างมากมาย แต่ความรู้ความเข้าใจทางด้านชีววิทยาต่างๆของ *Spirulina* โดยเฉพาะการผลิตสารชีวเคมีต่างๆ ของ *Spirulina* มีค่อนข้างจำกัด สาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งคือการขาดระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอซึ่งเป็นเครื่องมือที่สำคัญที่จะช่วยทำให้การศึกษาชีววิทยาต่างๆของ *Spirulina* มีความก้าวหน้ามากยิ่งขึ้น [4] นอกจากนี้ในปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาเพื่อหาข้อมูลทางด้านจีโนมของ *Spirulina* จึงทำให้การพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความจำเป็นมากยิ่งขึ้น เพื่อนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาถึงคุณสมบัติและหน้าที่ของยีนต่างๆ ที่ได้มาจากข้อมูลจีโนม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะอาศัยข้อมูลลำดับเบสที่ใกล้เสร็จสมบูรณ์ของ *S. platensis* C1 มาใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกและโคลนยีน methylase และยีน restriction enzyme จาก *S. platensis* C1 เพื่อนำมาพัฒนาพลาสมิดที่มีความสามารถป้องกันการย่อยของ restriction enzyme ของ *S. platensis* โดยอาศัยยีน methylase และยับยั้งการทำงานของ restriction enzyme โดยใช้ยีน restriction enzyme เป็น homologous sequence เพื่อให้ยีนคัดเลือกแทรกเข้าไปในจีโนมของ *Spirulina* แบบ double homologous recombination ซึ่งงานวิจัยนี้หวังว่า การแก้ไขปัญหาเรื่องของเอนไซม์ที่มีอยู่ใน *Spirulina* โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากจีโนม *Spirulina* จะมีผลทำให้การส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นแนวทางไปสู่การพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่มีความเสถียร เพื่อนำไปใช้เป็นเครื่องมือที่สำคัญในการศึกษาสรีระวิทยา ชีวเคมี ตลอดจนอณูพันธุศาสตร์ ของ *Spirulina* เพื่อให้การศึกษาเหล่านี้ก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มศักยภาพของการใช้ประโยชน์จาก *Spirulina* ได้มากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *Spirulina* ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ด้วยการส่งถ่ายพลาสมิดที่มียีน methylase ของ *Spirulina* เพื่อป้องกันการถูกย่อยจาก restriction enzyme ใน *Spirulina* และมียีนสร้าง restriction enzyme ของ *Spirulina* เป็น homologous sequence สำหรับให้พลาสมิดแทรกเข้าไปยับยั้งการทำงานของยีนสร้าง restriction enzyme ใน *Spirulina* แบบ double homologous recombination

โดยมีเป้าหมายที่จะนำวิธีการที่ได้มาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนา และปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *Spirulina* ให้มีความเสถียรเพื่อที่จะใช้ระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* สำหรับการศึกษาวิจัย และปรับปรุงสายพันธุ์ *Spirulina* ในอนาคต

ขอบเขตของโครงการวิจัย

เพื่อปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *Spirulina* ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ในการวิจัยจะทำโดยการสร้างพลาสมิดที่มียีน methylase ของ *Spirulina* ที่สามารถป้องกันการถูกย่อยจาก restriction enzyme ที่วิเคราะห์ได้จากข้อมูลจีโนม *Spirulina* รวมทั้งสร้างพลาสมิดที่มียีนต้านยา spectinomycin และยีน *gfp* เพื่อใช้คัดเลือก transformant อยู่ภายใต้การควบคุมของ promoter ของ *Spirulina* โดยยีนต้านยา spectinomycin และยีน *gfp* จะแทรกอยู่บริเวณตรงกลางยีนสร้าง restriction enzyme ของ *Spirulina* ที่ใช้เป็น homologous sequence เพื่อให้พลาสมิดสามารถแทรกเข้าไปยับยั้งการทำงานของยีนสร้าง restriction enzyme ใน *Spirulina* ได้อย่างเสถียรแบบ double homologous recombination ซึ่งเมื่อทำการสร้างพลาสมิดเสร็จแล้ว จะนำพลาสมิดที่สร้างได้มาย่อยด้วย crude extract ของ *Spirulina* และย่อยด้วยเอนไซม์ *Ban*I และ *Bsa*HI (isoschizomer ของเอนไซม์ *Hind*VP) เพื่อตรวจสอบความสามารถในการป้องกันการถูกย่อยจาก restriction enzyme ของ *Spirulina* จากนั้นจะทำการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Spirulina* ด้วยวิธี electroporation และทำการคัดเลือก transformant บนอาหารที่มียา spectinomycin และทำการตรวจหาพลาสมิดใน transformant ด้วยวิธี PCR และ Southern blot จากนั้นทำการทดสอบความเสถียรของ transformant โดยการ subculture ลงในอาหารที่มียาและไม่มียา และทำการตรวจหาพลาสมิดซ้ำด้วยวิธี PCR และ Southern blot

ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

Restriction enzyme เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอในไซยาโนแบคทีเรียเนื่องจากจะไปย่อยดีเอ็นเอที่ส่งถ่ายเข้าไปในเซล มีผลทำให้ประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอลดลง หรือทำได้ไม่สำเร็จ ถึงแม้ในไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มี restriction enzyme จะไม่มีปัญหาเรื่องของการส่งถ่ายดีเอ็นเอ แต่ในไซยาโนแบคทีเรียอีกหลายสายพันธุ์ก็ประสบปัญหากับการถูกย่อยของดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์เหล่านี้ *Spirulina* เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจ

อย่างมากในการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอ แต่การพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอก็ยังคงทำได้ไม่สำเร็จ ถึงแม้จะพยายามพัฒนามาเป็นเวลานานกว่า 10 ปี และมีการศึกษาหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายดีเอ็นเอแล้วก็ตาม [4] ซึ่งปัจจัยที่ทำให้ยังไม่สามารถพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* ได้สำเร็จนั้น ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดเนื่องจากมีได้หลายปัจจัย เช่น การไม่พบพลาสมิดใน *Spirulina* [1] หรือมี phage ที่สามารถ infect เข้าสู่ *Spirulina* ได้ [5] ทำให้ไม่สามารถพัฒนาพลาสมิดหรือเวคเตอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอ หรือการค้นพบว่า *Spirulina* มี restriction enzyme อยู่หลายชนิด ซึ่งอาจไปย่อยดีเอ็นเอที่ส่งถ่ายเข้าไปในเซล [4, 6] เป็นต้น ซึ่งการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่ผ่านมาของห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพด้านสาหร่าย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดย Kanoksilp (1993) [7] Chotayaporn (1995) [8] และ Dulsawat (2002) [9] ที่ได้พยายามศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายดีเอ็นเอ และแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่คาดว่าจะเป็นอุปสรรคต่อการส่งถ่ายดีเอ็นเอแล้ว แต่ก็ไม่สามารถพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอได้สำเร็จ เช่นเดียวกับการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *S. platensis* สายพันธุ์ NIES-39 โดย Toyomizu และคณะ (2001) [10] และสายพันธุ์ C1 โดย Kawata และคณะ (2004) [11] ที่ไม่ประสบความสำเร็จ จากรายงานของทั้งสองกลุ่มวิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่า restriction enzyme น่าจะเป็นปัญหาสำคัญต่อการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Spirulina* จากสมมติฐานดังกล่าว ทางห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพด้านสาหร่ายจึงได้ทำการตรวจสอบและพบว่า *S. platensis* C1 มี restriction enzyme ที่สามารถย่อยดีเอ็นเอได้ นอกจากนี้จากการวิเคราะห์เบื้องต้นจากข้อมูลที่ใกล้เสร็จสมบูรณ์ของ *Spirulina* พบว่า *S. platensis* C1 มี restriction enzyme อยู่ 4 ชนิดคือ ชนิดที่ I II III และ IV โดยมี restriction enzyme ชนิดที่ II ที่เป็น isoschizomer กับ เอนไซม์ชนิดต่างๆ อยู่มากถึง 9 ชนิด คือ *Sna*BI (TACGTA) *Nhe*I (GCTAGC) *Nsp*HI (RCATGY) *Pvu*II (CAGCTG) *Hind*III (AAGCTT) *Nsp*V (TTCGAA) *Hind*VP (GRCGYC) *Ban*I (GGYRCC) และ *Ava*I (CYCGRG) ซึ่งชนิดของ restriction enzyme ที่พบเป็นจำนวนมากนี้น่าจะเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *S. platensis* C1 ดังนั้นการป้องกันดีเอ็นเอไม่ให้ถูกย่อยจากเอนไซม์ดังกล่าว น่าที่จะเป็นวิธีการที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* ได้ อย่างไรก็ดีการที่จะป้องกันดีเอ็นเอไม่ให้ถูกย่อยจากเอนไซม์ทุกชนิดที่ตรวจพบเป็นไปได้ค่อนข้างยาก ซึ่งวิธีการหนึ่งที่ทางห้องปฏิบัติการได้ทำการทดลองใช้ crude extract ที่คาดว่าจะมีเอนไซม์ methylase ทุกชนิดของ *Spirulina* มาใช้ในการ methylate ดีเอ็นเอก่อนการส่งถ่าย แต่ก็ยังไม่สามารถป้องกันการถูกย่อยได้อย่างสมบูรณ์ อีกแนวทางหนึ่งที่จะสามารถป้องกันดีเอ็นเอหรือพลาสมิดไม่ให้ถูกย่อยจากเอนไซม์ดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพคือ การพัฒนาพลาสมิดไม่ให้มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ดังกล่าวหรือมีน้อยที่สุด ซึ่งสามารถทำได้โดยการเลือกใช้หรือดัดแปลงลำดับเบสของพลาสมิดให้มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ดังกล่าวน้อยที่สุด ร่วมกับการเลือกใช้ยีน methylase ของ *Spirulina* ที่สามารถป้องกันการย่อยของ

เอนไซม์ชนิดที่ตรวจพบตำแหน่งจดจำในพลาสมิดมากที่สุด นอกจากนี้การออกแบบพลาสมิดให้ไปยับยั้งการสร้าง restriction enzyme ชนิดที่ตรวจพบตำแหน่งจดจำบนพลาสมิดเป็นจำนวนมากก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* ดังนั้นเพื่อที่จะหาชนิดของพลาสมิด และยีน methylase ของ *Spirulina* เพื่อนำมาใช้ในการพัฒนาพลาสมิด คณะผู้วิจัยได้นำลำดับเบสของพลาสมิด 5 ชนิดที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ pUC19 pBR322 pBluescriptII (SK$^-$) pACYC184 และ pGEM3Z (f$^+$) มาตรวจหาตำแหน่งที่สามารถถูกย่อยด้วย restriction enzyme ทั้ง 9 ชนิด โดยใช้โปรแกรม Vector NTI Suite 8 พบว่า ตำแหน่งที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Ban*I และ *Hind*VP เป็นตำแหน่งที่พบมากที่สุดบนพลาสมิด ดังนั้นเอนไซม์ *Ban*I และ *Hind*VP จึงน่าที่จะย่อยดีเอ็นเอได้ด้วยความถี่ที่มากที่สุดและมีผลต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* มากที่สุด นอกจากนี้จากการตรวจสอบตำแหน่งที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์บน expression cassette ของยีนต้านยา spectinomycin ที่จะนำมาใช้คัดเลือก transformant พบว่า expression cassette ดังกล่าวมีตำแหน่งที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Ava*I ใน *Spirulina*ได้ เพื่อปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *Spirulina* ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น งานวิจัยนี้จะทำการสร้างพลาสมิดที่มียีน *Ban*I และ *Hind*VP methylase ของ *Spirulina* เพื่อป้องกันการถูกย่อยจาก restriction enzyme *Ban*I และ *Hind*VP และมียีนสร้าง restriction enzyme *Ava*I ของ *Spirulina* เพื่อใช้เป็น homologous sequence สำหรับให้ expression cassette แทรกเข้าไปบนจีโนมของ *Spirulina* ได้อย่างเสถียรแบบ double homologous recombination และมีผลยับยั้งการทำงานของยีนสร้าง restriction enzyme *Ava*I ใน *Spirulina* ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำมาเชื่อมโยงกับงานพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* ที่มีอยู่ ร่วมกับความรู้ที่ได้รับจากการศึกษาอื่น ๆ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพและมีความเสถียร ซึ่งจะทำให้สามารถใช้ระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่มีอยู่ใน *Spirulina* สำหรับการศึกษาวิจัย และปรับปรุงสายพันธุ์ รวมทั้งการใช้ *Spirulina* เป็นเซลเจ้าบ้านสำหรับการผลิตสารชีวเคมีมูลค่าสูงต่าง ๆ ได้ในระดับอุตสาหกรรม

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอ เป็นเครื่องมือที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการศึกษาอณูพันธุศาสตร์ของไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากจะช่วยทำให้การศึกษากระบวนการทางชีววิทยา และการปรับปรุงสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียทำได้ง่ายขึ้น ปัจจุบันไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์มีระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอแล้ว แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีไซยาโนแบคทีเรียอีกจำนวนหนึ่งที่ยังไม่สามารถพัฒนาให้มีระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอได้สำเร็จ โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่น่าสนใจทั้งในระดับงานวิจัยและอุตสาหกรรม เช่น *Spirulina* ดังนั้นเพื่อที่จะศึกษาและปรับปรุงสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียที่สนใจให้มีคุณสมบัติตามต้องการ จำเป็นต้องมีการพัฒนาให้ไซยาโนแบคทีเรียเหล่านั้นมีระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่เหมาะสม [12] ซึ่งการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอในไซยาโนแบคทีเรีย เพื่อให้

ได้ระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพและได้ transformant ที่มีความเสถียรนั้น จำเป็นต้องพิจารณาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการส่งถ่ายดีเอ็นเอ และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายดีเอ็นเอ เช่น วิธีการในการส่งถ่ายดีเอ็นเอ สายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย อายุเซลที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายดีเอ็นเอ ปริมาณ ขนาด และรูปแบบของดีเอ็นเอที่ใช้ส่งถ่าย รวมทั้งสภาวะที่ใช้เลี้ยงเซล เช่น แสง และสารอาหาร เป็นต้น [13] [14, 15] [16, 17] แต่อย่างไรก็ตาม นอกจากปัจจัยดังที่กล่าวมาแล้ว ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ได้มีรายงานว่าเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอในไซยาโนแบคทีเรีย เช่น restriction enzyme ที่มีอยู่ภายในเซลเจ้าบ้าน ที่จะมีผลทำให้การส่งถ่ายดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพลดลง หรือทำได้ไม่สำเร็จเนื่องจากไปย่อยดีเอ็นเอที่ส่งถ่ายเข้าไปในเซล

ในการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอในไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์ พบว่า restriction enzymes ที่มีอยู่ภายในเซลไม่มีผลต่อระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอ เช่น ใน *Synechocystis* sp. สายพันธุ์ 6803 *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ 7942 [18] และ *Nostoc* sp. สายพันธุ์ 73102 [19, 20] แต่ก็ยังมีไซยาโนแบคทีเรียอีกจำนวนหนึ่งที่พบว่า restriction enzyme เป็นปัญหาสำคัญต่อการพัฒนาการส่งถ่ายดีเอ็นเอ เช่น ใน *Anabaena* sp. สายพันธุ์ PCC 7120 ซึ่งมี restriction enzyme 3 ชนิดคือ *Asp*I, *Asp*II และ *Asp*III พบว่า ประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอโดยวิธี conjugation ลดลงเป็น exponential phase กับจำนวนของตำแหน่งที่สามารถถูกตัดด้วย restriction enzyme [21] Thiel และ Poo (1989) [22] พบว่าการส่งถ่ายพลาสมิดที่ไม่ได้ methylate ที่ตำแหน่ง *Ava*II เพียงตำแหน่งเดียวใน *Anabaena* sp. สายพันธุ์ M-131 มีผลทำให้ประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอด้วยวิธี electroporation ลดลง 100 เท่า เช่นเดียวกับการศึกษาใน *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ 7002 ที่พบว่า ประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอลดลง 100 เท่า เมื่อไม่ได้ methylate พลาสมิดที่ตำแหน่งซึ่งถูกตัดได้ด้วย *AquI* เพียงตำแหน่งเดียว [23, 24] Elhai และ Wolk (1988) [25] พบว่าการส่งถ่ายดีเอ็นเอด้วยวิธี conjugation ใน *Anabaena* sp. มีประสิทธิภาพลดลง 5-13 เท่า เมื่อไม่ได้ methylate พลาสมิดในตำแหน่งซึ่งสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Ava*II และการส่งถ่ายพลาสมิดที่ไม่ได้ methylate ที่ตำแหน่ง *Ava*I ทำให้การส่งถ่ายดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพลดลง 25-50 เท่า นอกจากการป้องกันพลาสมิดไม่ให้ถูกย่อยโดยการ methylate พลาสมิดก่อนการส่งถ่ายเข้าสู่เซลแล้ว การป้องกันโดยการพัฒนาสายพันธุ์ที่มีการทำลายยีนที่สร้าง restriction enzyme เพื่อใช้เป็นเซลเจ้าบ้านก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอได้ เช่น จากการวิเคราะห์จีโนมของ *Thermosynechococcus elongatus* สายพันธุ์ BP-1 พบว่า มียีน *tll 2230* ซึ่งสร้าง restriction enzyme ชนิดที่ I อยู่ 1 เอนไซม์ และเมื่อได้ทำการสร้าง mutant โดยการ disrupt ยีนที่สร้าง restriction enzyme ดังกล่าว แล้วทำการทดลองส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าไปในเซล mutant ที่สร้างได้ พบว่า การส่งถ่ายดีเอ็นเอด้วยวิธี electroporation มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น 5 เท่า เมื่อเทียบกับการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน wild type ซึ่งแม้แต่พลาสมิดบางชนิดที่สร้างขึ้นและไม่สามารถส่งถ่ายเข้าสู่เซล wild type ได้เลย ก็สามารถส่งถ่ายเข้าไปในเซล mutant ดังกล่าวได้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สำเร็จ [16] ดังนั้นแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอในไซยาโนแบคทีเรียจึงสามารถทำได้โดยการตรวจหา restriction enzyme ที่มีอยู่ในไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ แล้วทำการ methylate พลาสมิดที่ตำแหน่งซึ่งสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ที่ตรวจพบในไซยาโนแบคทีเรียนั้น ซึ่งการทำ methylation สามารถทำได้ 2 วิธีคือ การทำ methylation ในหลอดทดลอง (*in vitro* methylation) โดยใช้เอนไซม์ methylase ที่มีขายทางการค้า หรือการใช้ crude extract ของไซยาโนแบคทีเรียร่วมกับ S-adenosylmethionine ในการ methylate พลาสมิด [26] และการ methylation ในสิ่งมีชีวิต (*in vivo* methylation) โดยการส่งถ่ายพลาสมิดที่มียีน methylase เข้าสู่ *E. coli* [22] นอกจากนี้การกำจัดตำแหน่งที่สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ [27] รวมทั้งการกลายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียไม่ให้สร้างเอนไซม์ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ปรับปรุงประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอในไซยาโนแบคทีเรียได้เช่นกัน [21]

นอกจากที่กล่าวมาแล้ว การศึกษาข้อมูลที่ได้จากการหาลำดับเบสจีโนม เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะช่วยให้เข้าใจถึงปัญหาและอุปสรรคที่ทำให้การพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอไม่ประสบความสำเร็จ หรือมีประสิทธิภาพไม่ดี เนื่องจากทำให้ทราบข้อมูลยีน และโปรตีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการส่งถ่ายดีเอ็นเอ เช่น ยีนสร้างเอนไซม์ restriction-modification และยีน ที่เกี่ยวข้องกับการ uptake ดีเอ็นเอต่าง ๆ เป็นต้น จากการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมของ *Helicobacter pylori* สายพันธุ์ 26695 และ J99 ซึ่งยังไม่มีระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพ พบว่า *H. pylori* มีระบบเอนไซม์ restriction-modification อยู่มากกว่า 20 เอนไซม์ (>4% ของจีโนม) [28] ซึ่งจำนวนที่มากดังกล่าวน่าที่จะเป็นปัจจัยหนึ่งที่เป็นปัญหาที่สำคัญต่อการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *H. pylori* ในการศึกษาถึงผลของการยับยั้งการทำงานของยีน *recJ* (*sll1354*) ซึ่งทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ exonuclease ที่สามารถย่อยดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ โดยใช้ข้อมูลจีโนมของ *Synechocystis* 6803 พบว่าการยับยั้งดังกล่าวมีผลทำให้การส่งถ่ายดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น 2 เท่า [14] นอกจากนี้จากการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการส่งถ่ายดีเอ็นเอด้วยวิธี natural transformation ใน *Synechocystis* 6803 โดยใช้ข้อมูลจากจีโนมพบว่า ยีน *comF* เกี่ยวข้องกับความสามารถในการส่งถ่ายดีเอ็นเอด้วยวิธี natural transformation โดยพบว่าการยับยั้งการทำงานของยีน *comF* มีผลทำให้ไม่สามารถส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Synechocystis* ได้ [29] ใน *Spirulina* เองได้มีการศึกษาข้อมูลจากจีโนมที่ยังไม่เสร็จสมบูรณ์โดย Zho และคณะ (2006) [30]เพื่อวิเคราะห์ระบบ restriction modification ที่คาดว่าเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการพัฒนาระบบการส่งถ่ายยีน พบว่า มี restriction enzyme อยู่มากมาย คือ เอนไซม์ชนิดที่ I จำนวน 6 เอนไซม์ และมีเอนไซม์ชนิดที่ II จำนวน 11 เอนไซม์ (ซึ่งแบ่งเป็นเอนไซม์ที่มี restriction และ methylase enzyme ที่เป็นคู่กันจำนวน 4 เอนไซม์ และ methylase enzyme ที่ไม่มี restriction enzyme ที่เป็นคู่กัน (solitary methylase) จำนวน 7 เอนไซม์)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 9 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 249934

นอกเหนือจากความรู้ความเข้าใจถึง ระบบเอนไซม์ restriction-modification ของเซลเจ้าบ้านเพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาและปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นแล้ว ความรู้ความเข้าใจถึงปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอจะช่วยทำให้การศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอ เป็นไปอย่างมีระบบและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

การเลือกใช้วิธีการในการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์นับเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องพิจารณาก่อนเลือกนำมาใช้ ซึ่งวิธีการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่สามารถนำมาใช้ได้กับไซยาโนแบคทีเรียมีอยู่ด้วยกัน 3 วิธีคือ 1. Natural transformation เป็นวิธีการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าไปในเซลด้วยวิธีทางธรรมชาติโดยไม่ต้องอาศัยสารเคมีหรือกระแสไฟฟ้า เซลสามารถรับดีเอ็นเอเข้าไปได้โดยการบ่มเซลกับดีเอ็นเอที่อุณหภูมิที่เหมาะสม วิธีนี้พบครั้งแรกใน *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ PCC 7943 [31] ต่อมาพบว่าสามารถนำมาใช้ได้อย่างกว้างขวางกับไซยาโนแบคทีเรียอื่น ๆ ที่เป็นเซลเดียว เช่น *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ PCC 7942 [32] *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ PCC 6301 [33] และ *Synechocystis* sp. สายพันธุ์ PCC 6803 [34] เป็นต้น สำหรับกลไกการส่งถ่ายยีนด้วยวิธีนี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก แต่จากการศึกษาจีโนมของ *Synechocystis* sp. สายพันธุ์ 6803 ทำให้พอทราบว่า hybrid protein (เอนไซม์ endonuclease/cardiolipin synthetase และ DNA-binding competence protein) ที่ถูกสร้างโดยยีน *slr0197* มีความจำเป็นสำหรับการรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซล [35, 36] แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่าวิธีนี้สามารถใช้ได้กับไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย 2. Conjugation เป็นวิธีการส่งถ่ายดีเอ็นเอโดยอาศัยการสัมผัสกันระหว่างเซลในการส่งถ่ายดีเอ็นเอจากแบคทีเรียเซลหนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกเซลหนึ่งโดยอาศัย broad-host-range plasmid เช่น RP4 [27, 37] วิธีนี้นิยมใช้กับไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย แต่ในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลเดียวก็สามารถนำมาใช้ได้เช่นเดียวกัน โดยการส่งถ่ายดีเอ็นเอต้องอาศัยพลาสมิด 3 ชนิดคือ conjugative plasmid helper plasmid และ cargo plasmid ซึ่งถึงแม้วิธีนี้จะสามารถนำมาใช้กับไซยาโนแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ แต่ก็มีข้อเสียคือ ขั้นตอนการทำค่อนข้างยุ่งยากและต้องกำจัด *E. coli* ที่ปนเปื้อน วิธีนี้จึงไม่เป็นที่นิยมมากนัก 3. Electroporation เป็นวิธีการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลโดยอาศัยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์สูงวิ่งผ่านเซลในช่วงเวลาสั้น ๆ ทำให้เยื่อหุ้มเซลเกิดรูชั่วคราว ซึ่งมีขนาดใหญ่พอที่ดีเอ็นเอสามารถผ่านเข้าไปในเซลได้ ซึ่งเยื่อหุ้มเซลสามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้เมื่อนำไปเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม [18, 38] วิธี electroporation พบว่ามีข้อดีมากกว่าวิธี conjugation คือ เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและสะดวกรวดเร็ว ไม่มีปัญหาการปนเปื้อน *E. coli* สามารถส่งถ่ายพลาสมิดในรูป circular หรือ linear ก็ได้ [12, 39] ซึ่งวิธีการนี้นิยมใช้กับไซยาโนแบคทีเรียทั้งที่เป็นเซลเดียวและเป็นเส้นสายเนื่องจากมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีอื่น ๆ [17, 40]

นอกจากการมีระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่เหมาะสมแล้ว พลาสมิดที่นำมาใช้ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอเช่นเดียวกัน เนื่องจากพลาสมิดที่สามารถส่งถ่ายเข้าสู่เซลได้นั้น อาจไม่สามารถเพิ่มจำนวนหรืออยู่รอดได้ภายในเซล ถึงแม้ได้มีการค้นพบ

พลาสมิดมากมายในไซยาโนแบคทีเรีย [41] แต่พลาสมิดเหล่านี้ก็ไม่สามารถนำมาใช้กับไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาพลาสมิดใหม่ ๆ ที่สามารถนำมาใช้ส่งถ่ายดีเอ็นเอในไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งปัจจุบันพลาสมิดที่สามารถพัฒนาให้ใช้กับไซยาโนแบคทีเรียได้อย่างกว้างขวางมี 2 ชนิดคือ 1. Replicating shuttle vector เป็น vector ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งใน *E. coli* และไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากมี origin of replication ของทั้ง *E. coli* และไซยาโนแบคทีเรียอยู่ด้วยกัน เช่น RSF1010 และ pDU1 เป็นต้น [41, 42] แต่อย่างไรก็ตาม vector เหล่านี้ก็ไม่สามารถนำมาใช้ได้กับไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ เช่น พลาสมิดที่สร้างจาก pDU1 ของ *Nostoc* sp. สายพันธุ์ PCC 7524 สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างมีประสิทธิภาพใน *Chroococcidiopsis* sp. [43]และ *Anabaena* sp. [37] แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน *Synechococcus* sp. และ *Synechocystis* sp. [44] เป็นต้น 2. Integrative หรือ non-replicating vector เป็น vector ที่สามารถส่งถ่ายเข้าสู่ไซยาโนแบคทีเรียแต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ เนื่องจากไม่มี origin of replication แต่จะอาศัยการเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของไซยาโนแบคทีเรียเนื่องจากมีส่วนที่เป็น homologous กับโครโมโซมของไซยาโนแบคทีเรีย [44] ซึ่งลักษณะการเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมมี 2 แบบคือ 1. เป็นการเข้าไปแทรกของพลาสมิดทั้งวงในโครโมโซม (single integration) และ 2. เป็นการเข้าไปแทรกเฉพาะบางส่วนของพลาสมิดโดยอาศัยบริเวณที่มี homology กับโครโมโซม (double integration) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการเข้าไปแทนที่แบบที่สองนี้พบว่า มีประสิทธิภาพมากกว่าแบบแรก เช่น การศึกษาการส่งถ่ายพลาสมิดใน *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ PCC 7942 และ *Synechocystis* sp. สายพันธุ์ 6803 พบว่า การเข้าไปแทรกของพลาสมิดแบบ double integration มีประสิทธิภาพมากกว่าแบบ single integration 100 เท่า และ 1000 เท่า ตามลำดับ [45, 46] อย่างไรก็ตาม ในไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์ เช่น *Anabaena* sp. สายพันธุ์ PCC 7120, 29413 [39] และ *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 [16] พบว่า การเข้าไปแทรกของพลาสมิดแบบ single integration มีประสิทธิภาพมากกว่าแบบ double integration

ยีนต้านยาปฏิชีวนะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องนำมาพิจารณาในการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอ เนื่องจากสามารถนำมาใช้คัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด (transformant) จากไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่ได้รับพลาสมิด โดยเซลที่ได้รับพลาสมิดที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะจะสามารถสร้างสารที่ไปยับยั้งการทำงานของยาปฏิชีวนะ ทำให้เซลนั้นสามารถเจริญเติบโตได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มียา ซึ่งในการนำยาปฏิชีวนะมาใช้สำหรับคัดเลือก transformant นั้นจำเป็นต้องพิจารณาชนิดของยาที่ไซยาโนแบคทีเรียมีความไว (sensitive) และหาความเข้มข้นของยาที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือก transformant และเนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียมีโครงสร้างและคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียแกรมลบ จึงได้มีการนำยาปฏิชีวนะ และยีนต้านยาปฏิชีวนะที่ใช้ได้กับแบคทีเรียมาใช้กับไซยาโนแบคทีเรียด้วย เช่น ยา spectinomycin และยีนต้านยา *aadA* ซึ่งสร้างเอนไซม์ aminoglycoside adenyltransferase สามารถใช้คัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียทั้งที่เป็นเซลเดียวและเป็น

เส้นสาย [47] ยา chloramphenicol และยีนต้านยา *cat* ซึ่งสร้างเอนไซม์ chloramphenicol acetyl transferase สามารถนำมาใช้คัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียทั้งที่เป็นเซลเดียว [48, 49] และเป็นเส้นสาย [22, 50] ได้เช่นกัน โดยมีรายงานว่าสามารถนำมาใช้เป็น selective marker สำหรับการคัดเลือก transformant ของ *Spirulina* sp. ได้ [7, 8, 10] สำหรับยา ampicillin สามารถนำมาใช้คัดเลือกเฉพาะไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลเดียว [51, 52] ซึ่งเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเท่านั้น เนื่องจาก ampicillin เป็นยาที่ไม่เสถียรที่อุณหภูมิสูง โดยมี activity เพียงแค่ 24-48 ชม. ภายใต้สภาวะการทดลอง [53] จึงไม่เหมาะกับไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายซึ่งมีการเจริญเติบโตช้า tetracycline และ rifampicin เป็นยาที่นำมาใช้คัดเลือก transformant ของ *Anabaena* sp. [54] แต่เนื่องจากยาทั้งสองชนิดมีความไวต่อแสง จึงทำให้การนำไปใช้งานทำได้จำกัด นอกจากนี้พบว่า ยา erythromycin puromycin และ hygromycin [27, 31, 55, 56] ซึ่งปกตินิยมใช้คัดเลือก transformant ของแบคทีเรียแกรมบวก สามารถนำมาใช้กับไซยาโนแบคทีเรียได้เช่นกัน และพบว่า ยา hygromycin นอกจากสามารถใช้คัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์แล้วยังสามารถนำมาใช้เป็น selective marker สำหรับการคัดเลือก transformant ของ *Spirulina* sp. ได้ด้วย [57]

นอกเหนือจากปัจจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้ว ความสำเร็จของการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการแสดงออกของยีนที่ใช้ในการคัดเลือก transformant ด้วย ถึงแม้ว่ามียีนต้านยาปฏิชีวนะมากมายที่สามารถแสดงออกได้ในไซยาโนแบคทีเรีย แต่การควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้โดยอาศัย promoter ของยีนต้านยาปฏิชีวนะเองก็ไม่ได้มีประสิทธิภาพในไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ เช่น ยีนต้านยา spectinomycin/streptomycin ที่ถูกควบคุมโดย promoter ของตัวมันเองสามารถใช้คัดเลือก transformant ที่ต้านทานต่อยาได้ใน *Anabaena* sp. สายพันธุ์ 7120 [58] แต่ไม่สามารถใช้คัดเลือกได้ใน *Anabaena variabilis* สายพันธุ์ 29413 [39] เป็นต้น ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาโดยการนำเอา promoter ของไซยาโนแบคทีเรียมาใช้ควบคุมการแสดงออกของยีนในไซยาโนแบคทีเรียด้วยกันเอง เช่น การนำ *psbA* promoter ของ *Anabaena* sp. สายพันธุ์ PCC 7120 มาใช้ควบคุมการแสดงออกของยีน *luxAB* [54] พบว่ายีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับการศึกษาใน *Synechocystis* sp. สายพันธุ์ PCC 6803 ซึ่งพบว่า การนำ induce promoter ของ *isiAB* มาใช้ควบคุมการแสดงออกของยีน *luxAB* และ *gfp* มีผลทำให้เซลเรืองแสงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อถูก induce ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็ก และมีความเข้มข้นเกลือสูง [59]