ผลการทดลองและข้อวิจารณ์

การปรับปรุงประสิทธิภาพระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *Spirulina platensis* C1 ด้วยการใช้ยีน methylase และการยับยั้งการทำงานของ restriction enzyme

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *S. platensis* C1 ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ด้วยการสร้างพลาสมิดที่มียีน methylase สำหรับป้องกันการถูกย่อยจาก restriction enzyme ที่วิเคราะห์ได้จากจีโนมของ *Spirulina* และมี expression cassette ของยีนต้านยาปฏิชีวนะเพื่อใช้คัดเลือก transformant และมียีนเรืองแสง green fluorescent protein (*gfp*) เพื่อใช้ติดตามพลาสมิดที่ส่งถ่ายเข้าไปใน *Spirulina* อยู่ภายใต้การควบคุมของ promoter ของ *Spirulina* ซึ่ง cassette ดังกล่าวจะแทรกอยู่บริเวณตรงกลางยีนสร้าง restriction enzyme ที่ใช้เป็น homologous sequence ของ *Spirulina* เพื่อให้พลาสมิดสามารถแทรกเข้าไปยับยั้งการทำงานของยีนสร้าง restriction enzyme ในโครโมโซมของ *Spirulina* ได้อย่างเสถียรแบบ double homologous recombination จากนั้นทำการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Spirulina* ด้วยวิธี electroporation โดยใช้ยีนต้านยาปฏิชีวนะ และยีนเรืองแสง *gfp* สำหรับการคัดเลือก transformant และทำการตรวจหาพลาสมิดใน transformant ด้วยวิธี PCR

1. การสร้างพลาสมิดที่ใช้สำหรับการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *S. platensis* C1

เนื่องจากผลที่ได้จากการศึกษาเบื้องต้นของโครงการวิจัยเรื่อง การตรวจหาและวิเคราะห์ระบบเอนไซม์ restriction-modification ในจีโนม *Spirulina platensis* C1 ที่ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณปี 52 พบว่า *Spirulina* มี restriction enzyme ชนิดที่ II จำนวน 9 ชนิด และจากการศึกษาในเบื้องต้นที่พบว่า จากจำนวนเอนไซม์ทั้งหมด 9 ชนิด เอนไซม์ *Ban*I และ *Hind*VP มีความน่าจะเป็นในการย่อยดีเอ็นเอได้ด้วยความถี่สูงสุด และน่าจะมีผลต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* มากที่สุด ดังนั้นเพื่อปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *Spirulina* ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ในการทดลองได้ทำการสร้างพลาสมิดที่มียีน *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 ของยีนต้านยา spectinomycin และยีน *gfp* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter แทรกเข้าไปยับยั้งการทำงานของยีนสร้าง restriction enzyme *Ava*I บนจีโนมของ *Spirulina* ได้อย่างเสถียรแบบ double homologous recombination โดยมีขั้นตอนการสร้างพลาสมิดดังนี้

1.1 การโคลนยีนสร้าง restriction และ methylase enzyme จาก *Spirulina*

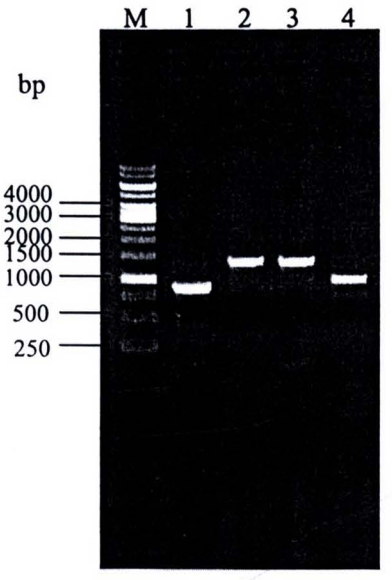
จากการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนม *Spirulina* ในเบื้องต้นที่พบว่า จากจำนวนเอนไซม์ชนิดที่ II ทั้งหมด 9 เอนไซม์ เอนไซม์ *Ban*I และ *Hind*VP มีความน่าจะเป็นในการย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอได้ด้วยความถี่ที่มากที่สุด เพื่อป้องกันไม่ให้พลาสมิดถูกย่อยด้วยเอนไซม์ดังกล่าว ในการทดลองได้ทำการโคลนยีนสร้างเอนไซม์ *Ban*I methylase ขนาด 1.2 kb จากจีโนม *Spirulina* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่ออกแบบให้มีปลายที่ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xba*I (ดูวิธีดำเนินงานวิจัย) ซึ่งพบว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ 1.2 kb ซึ่งเป็นขนาดของยีนสร้างเอนไซม์ *Ban*I methylase (รูปที่ 2, lane ที่ 3) จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Easy แล้วทำการส่งถ่ายพลาสมิดที่สร้างได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α จากนั้นทำการคัดเลือก transformant ที่ได้รับพลาสมิดบนอาหาร LB ที่มียา ampicillin ความเข้มข้น 100 μg/ml และ X-Gal และทำการตรวจสอบยีน *Ban*I methylase ที่โคลนได้ในพลาสมิดด้วยการทำ PCR โดยใช้ primer T7 และ SP6 ซึ่งมีความจำเพาะกับพลาสมิด pGEM®-T Easy พบว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ 1.2 kb (รูป 3A, lane ที่ 5) ซึ่งเมื่อนำไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสของยีนที่บริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย พบว่า ยีนที่โคลนได้เป็นยีน *Ban*I methylase ที่มีลำดับเบสที่เหมือนกันกับยีน *Ban*I methylase ของ *Spirulina* โดยพลาสมิดที่สร้างได้มีชื่อว่า พลาสมิด pAG148 ยีน *Ban*I methylase เป็นยีนสร้างเอนไซม์ methylase ที่สามารถป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Ban*I ได้ โดยการเติมหมู่ methyl ที่ตำแหน่ง cytosine ที่อยู่ข้างในของลำดับเบส GGYRC^{m}C ซึ่งเป็นบริเวณจดจำเดียวกันกับเอนไซม์ *Ban*I ทำให้เอนไซม์ *Ban*I ไม่สามารถย่อยดีเอ็นเอได้ [66]

เพื่อที่จะโคลนยีนสร้างเอนไซม์ *Hind*VP methylase ในการทดลองได้ทำการโคลนยีน *Hind*VP methylase ขนาด 1 kb จากจีโนม *Spirulina* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่ออกแบบให้มีปลายที่ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Xba*I และ *Pst*I พบว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ 1 kb ซึ่งเป็นขนาดของยีนสร้างเอนไซม์ *Hind*VP methylase (รูปที่ 2, lane ที่ 4) จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Easy แล้วทำการส่งถ่ายพลาสมิดที่สร้างได้เข้าสู่ *E. coli* จากนั้นทำการคัดเลือก transformant ที่ได้รับพลาสมิดบนอาหาร LB ที่มียา ampicillin ความเข้มข้น 100 μg/ml และ X-Gal และทำการตรวจสอบยีน *Hind*VP methylase ที่โคลนได้ในพลาสมิดด้วยการทำ PCR พบว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ 1 kb (รูป 3A, lane ที่ 1) ซึ่งเมื่อนำไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสของยีน พบว่า ยีนที่ได้เป็นยีนที่มีลำดับเบสที่ตรงกันกับยีน *Hind*VP methylase ของ *Spirulina* โดยพลาสมิดที่สร้างได้มีชื่อว่า พลาสมิด pAG147 ยีน *Hind*VP methylase สามารถ methylate ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง cytosine ตรงกลางของลำดับเบส GR^{m}CGYC ซึ่งเป็นบริเวณจดจำเดียวกันกับเอนไซม์ *Hind*VP ทำให้ restriction enzyme *Hind*VP ไม่สามารถไปย่อยดีเอ็นเอได้ [67]

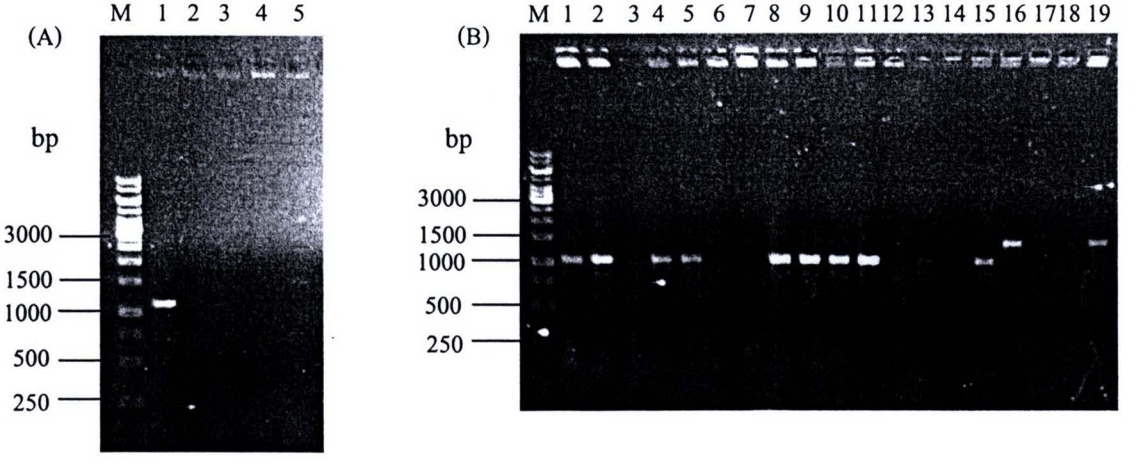
จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ expression cassette ของยีนต้านยา spectinomycin และ *gfp* ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter และ terminator ซึ่งเป็นส่วนที่จะเข้าไปแทรก

ในโครโมโซมของ *Spirulina* พบว่า ยีนต้านยา spectinomycin มีตำแหน่งที่สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Ava*I ได้ 1 ตำแหน่ง ดังนั้นเพื่อป้องกันไม่ให้พลาสมิดที่ส่งถ่ายถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Ava*I ในการทดลองได้ทำการโคลนยีนสร้าง *Ava*I restriction enzyme เพื่อใช้เป็น homologous sequence สำหรับให้ expression cassette แทรกเข้าไปยับยั้งการทำงานของยีน *Ava*I ซึ่งการโคลนยีนสร้าง *Ava*I restriction enzyme ส่วนแรก ขนาด 0.9 kb จากจีโนม *Spirulina* ด้วยวิธี PCR ได้ใช้ primer ที่ออกแบบให้มีปลายที่ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Sal*I พบว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ 0.9 kb ซึ่งเป็นขนาดของยีนสร้างเอนไซม์ *Ava*I (รูปที่ 2, lane ที่ 1) จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Easy แล้วทำการส่งถ่ายพลาสมิดที่สร้างได้เข้าสู่ *E. coli* จากนั้นทำการคัดเลือก transformant ที่ได้รับพลาสมิดบนอาหาร LB ที่มียา ampicillin ความเข้มข้น 100 μg/ml และ X-Gal และทำการตรวจสอบยีน *Ava*I ที่โคลนได้ในพลาสมิดด้วยการทำ PCR พบว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ 0.9 kb (รูป 3B, lane ที่ 1-15) โดยพลาสมิดที่สร้างได้มีชื่อว่า พลาสมิด pAG145

เพื่อที่จะโคลนยีนสร้างเอนไซม์ *Ava*I ส่วนที่สอง ในการทดลองได้ทำการโคลนยีน *Ava*I ขนาด 1.2 kb จากจีโนม *Spirulina* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่ออกแบบให้มีปลายที่ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Spe*I และ *Eco*RI พบว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ 1.2 kb ซึ่งเป็นขนาดของยีนสร้างเอนไซม์ *Ava*I (รูปที่ 2, lane ที่ 2) จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Easy แล้วทำการส่งถ่ายพลาสมิดที่สร้างได้เข้าสู่ *E. coli* จากนั้นทำการคัดเลือก transformant ที่ได้รับพลาสมิดบนอาหาร LB ที่มียา ampicillin ความเข้มข้น 100 μg/ml และ X-Gal และทำการตรวจสอบยีน *Ava*I ที่โคลนได้ในพลาสมิดด้วยการทำ PCR พบว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ 1.2 kb (รูป 3B, lane ที่ 16 และ 19) โดยพลาสมิดที่สร้างได้มีชื่อว่า พลาสมิด pAG146 ยีน *Ava*I เป็นยีนที่สามารถสร้าง restriction enzyme *Ava*I ซึ่งสามารถจดจำดีเอ็นเอที่มีลำดับเบส C/YCGRG และตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งระหว่างเบส C ตัวแรกและ Y (C/T) ตัวที่สองได้ [68]



รูปที่ 2 แสดงผลการเพิ่มจำนวนยีนสร้าง methylase และ restriction enzyme จากจีโนมิคดีเอ็นเอของ *Spirulina* ด้วยวิธี PCR lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder; lane 1, ยีนสร้าง *Ava*I restriction enzyme ส่วนแรก; lane 2, ยีนสร้าง *Ava*I restriction enzyme ส่วนที่สอง; lane 3, ยีนสร้าง *Ban*I methylase enzyme และ lane 4, ยีนสร้าง *Hind*VP methylase enzyme



รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบยีนสร้าง methylase และ restriction enzyme ที่โคลนในพลาสมิด pGEM®-T Easy ด้วยวิธี PCR lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder; (A) lane 1, ยีนสร้าง *Hind*VP methylase enzyme และ lane 5, ยีนสร้าง *Ban*I methylase enzyme; (B) lane 1-15, ยีนสร้าง *Ava*I restriction enzyme ส่วนแรก; lane 16 และ 19, ยีนสร้าง *Ava*I restriction enzyme ส่วนที่สอง

1.2 การสร้างพลาสมิดที่มี cassette ของยีน methylase อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter

เพื่อที่จะให้ยีนสร้างเอนไซม์ methylase สามารถแสดงออกใน *Spirulina* ได้อย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ในการทดลองได้ทำการสร้างพลาสมิดที่มียีน methylase อยู่ภายใต้การควบคุมของ promoter ของ *Spirulina* และมี terminator สำหรับป้องกันการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ผ่าน expression cassette และเป็นตัวหยุดการแสดงออกของ expression cassette โดยในการโคลน *rrnB* terminator ขนาด 300 bp สำหรับป้องกันการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ผ่าน expression cassette ของยีนต้านยา spectinomycin และยีน *gfp* ได้ใช้ primer ที่ออกแบบให้มีปลายที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Kpn*I (ดูวิธีดำเนินงานวิจัย) ทำการโคลน terminator จากพลาสมิด pAG127 พบว่า ได้ PCR product ขนาดประมาณ 300 bp (รูปที่ 4, lane ที่ 1) จากนั้นนำ terminator ที่โคลนได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Kpn*I แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM4 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Kpn*I เช่นเดียวกัน จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหารที่มียา ampicillin และทำการทดสอบพลาสมิดที่สร้างได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Kpn*I พบว่า ได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น คือ ขนาด 300 bp และ 2.9 kb ของ *rrnB* terminator และพลาสมิด pGEM4 ตามลำดับ (รูปที่ 5, lane ที่ 2) ซึ่งพลาสมิดที่สร้างได้มีชื่อว่า pAG149

สำหรับการโคลน *rrnB* terminator เพื่อใช้สำหรับหยุดการแสดงออกของ expression cassette ขนาด 300 bp ในการทดลองได้ทำการโคลน *rrnB* terminator จากพลาสมิด pAG127 โดยใช้ primer ที่ออกแบบให้มีปลายที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Hind*III พบว่า ได้ PCR product ขนาดประมาณ 300 bp (รูปที่ 4, lane ที่ 2) จากนั้นนำ PCR Product มาตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Hind*III แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pAG149 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Hind*III เช่นเดียวกัน ทำการคัดเลือกโคลนบนอาหารที่มียา ampicillin และทำการทดสอบพลาสมิดที่สร้างได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Hind*III พบว่า ได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น คือ ขนาด 300 bp และ 3.2 kb ของ *rrnB* terminator และพลาสมิด pAG149 ตามลำดับ (รูปที่ 5, lane ที่ 4) ซึ่งพลาสมิดที่สร้างได้ใหม่มีชื่อว่า pAG150

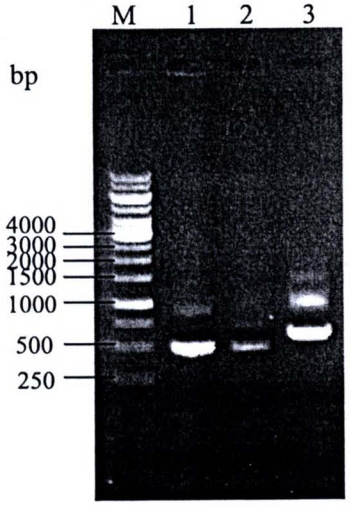
สำหรับการโคลน phycocyanin promoter ขนาด 300 bp เพื่อใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์ *Ban*I และ *Hind*VP methylase ในการทดลองได้ใช้ primer ที่ออกแบบให้มีปลายที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ *Bam*HI ทำการโคลน promoter จากพลาสมิด pAG127 พบว่า ได้ PCR product ขนาดประมาณ 300 bp (รูปที่ 4, lane ที่ 3) จากนั้นนำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ *Bam*HI แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pAG150 ที่มี terminator ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ *Bam*HI เช่นเดียวกัน จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหารที่มียา ampicillin และทำการทดสอบพลาสมิดที่สร้างได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ *Bam*HI พบว่า ได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น คือ ขนาด 300 bp และ 3.5 kb ของ phycocyanin promoter และ

พลาสมิด pAG150 ตามลำดับ (รูปที่ 5, lane ที่ 6) ซึ่งพลาสมิดที่สร้างได้ใหม่มีชื่อว่า pAG151 Jeamton และคณะ (2010) [69] ได้ทำการทดลองส่งถ่ายพลาสมิด pMG249 ซึ่งมียีน *gfp* อยู่ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter ของ *Spirulina* เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α และ *Synechococcus* สายพันธุ์ PCC 7942 พบว่ายีน *gfp* สามารถเรืองแสงได้ทั้งใน *E. coli* และ *Synechococcus* แสดงให้เห็นว่า phycocyanin promoter ที่โคลนได้จาก *Spirulina* สามารถนำมาใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนได้มีประสิทธิภาพดี การควบคุมการแสดงออกของยีนใน *Spirulina* โดยอาศัย promoter ของตัว *Spirulina* เองน่าจะทำให้ยีนมีการแสดงออกที่มีประสิทธิภาพดีกว่าการควบคุมการแสดงออกของยีนภายใต้ promoter ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น การควบคุมการแสดงออกของยีน *smtA* ซึ่งสร้าง type II metallothionine จาก *Synechococcus* PCC 7942 ภายใต้ phycocyanin promoter ของ *Synechococcus* sp. NKBG 15041c ทำให้ *Synechococcus* สามารถทนต่อโลหะหนัก $CdCl_2$ ได้ถึง 4 μM [70] การควบคุมการทำงานของยีน *lux*AB ของ *E. coli* ภายใต้ strong promoter *psb*AI ของ *Anabaena* sp. สายพันธุ์ PCC 7120 มีผลทำให้ยีนเรืองแสงได้ใน *Anabaena* [54] เช่นเดียวกับการควบคุมการแสดงออกของยีนเรืองแสง *lux*AB และ *gfp* ภายใต้ *isi*AB promoter ของ *Synechocystis* 6803 มีผลทำให้ยีนเหล่านี้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นได้อย่างรวดเร็ว [59] เป็นต้น

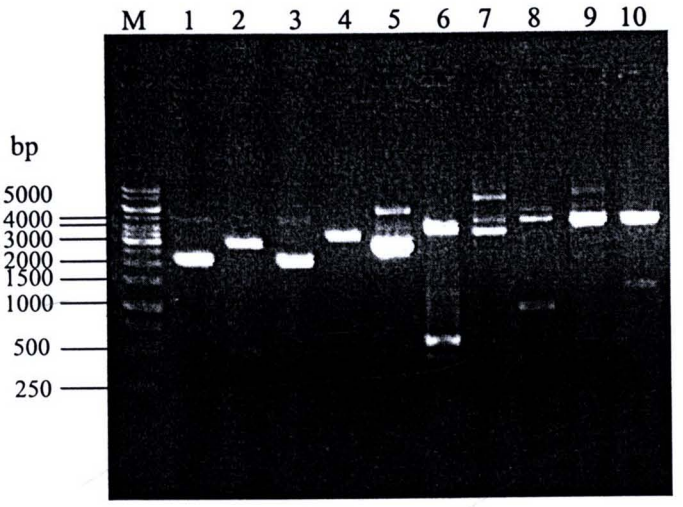
เพื่อสร้างพลาสมิดที่มียีน methylase อยู่ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter ของ *Spirulina* ในการทดลองได้ทำการตัดยีนสร้างเอนไซม์ *Hind*VP methylase ขนาดประมาณ 1 kb ออกจากพลาสมิด pAG147 ด้วยเอนไซม์ *Xba*I และ *Pst*I แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pAG151 ซึ่งมี phycocyanin promoter และ terminator ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I และ *Pst*I เช่นเดียวกัน จากนั้นทำการทดสอบพลาสมิดที่มียีน methylase ดังกล่าวโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I และ *Pst*I พบว่าได้ดีเอ็นเอขนาด 1 และ 3.8 kb ของยีนสร้างเอนไซม์ *Hind*VP methylase และพลาสมิด pAG151 ตามลำดับ (รูปที่ 5, lane ที่ 8) ซึ่งพลาสมิดที่สร้างได้ใหม่มีชื่อว่า pAG152

สำหรับการสร้างพลาสมิดที่มียีนสร้างเอนไซม์ *Ban*I methylase อยู่ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter ของ *Spirulina* ในการทดลองได้ทำการตัดยีนสร้างเอนไซม์ *Ban*I methylase ขนาดประมาณ 1.2 kb ออกจากพลาสมิด pAG148 ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xba*I แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pAG152 ซึ่งมียีนสร้างเอนไซม์ *Hind*VP methylase อยู่ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter และมี terminator ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xba*I เช่นเดียวกัน จากนั้นทำการทดสอบพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xba*I พบว่า ได้ดีเอ็นเอขนาด 1.2 kb และ 4.8 kb ของยีนสร้างเอนไซม์ *Ban*I methylase และพลาสมิด pAG152 ตามลำดับ (รูปที่ 5, lane ที่ 10) ซึ่งพลาสมิดที่สร้างได้มีชื่อว่า pAG153 โดยพลาสมิด pAG153 ที่สร้างได้จะถูกนำมาใช้สำหรับการสร้างพลาสมิดต่อไปในข้อ 1.4

ปัจจุบันได้มีการนำพลาสมิดซึ่งได้มีโคลนยีน methylase ไว้แล้ว มาใช้สำหรับการ methylate ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น การใช้พลาสมิด pRL528 ซึ่งมียีนสร้างเอนไซม์ *Ava*I และ *Ava*II methylase มาใช้ในการ methylate พลาสมิดเพื่อป้องกันการถูกย่อยจากเอนไซม์ *Ava*I และ *Ava*II ตามลำดับ [25, 43] หรือการใช้พลาสมิด pRL623 ที่มียีนสร้างเอนไซม์ *Ava*III methylase ที่สามารถ methylate ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง *Ava*III เพื่อป้องกันการถูกย่อยจากเอนไซม์ *Ava*III ใน *Anabaena* sp. สายพันธุ์ 7120 [21] เช่นเดียวกับการส่งถ่ายดีเอ็นเอด้วยวิธี conjugation ที่มีการนำ helper plasmid ซึ่งมียีนสร้างเอนไซม์ *Ava*I, *Ava*II และ *Ava*III methylase มาใช้ในการ methylate พลาสมิดที่ต้องการในแบคทีเรียก่อนการส่งถ่ายเข้าสู่ *Anabaena* ซึ่งมีผลทำให้พลาสมิดที่ส่งถ่ายไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Ava*I (*Asp*I) *Ava*II (*Asp*II) และ *Ava*III (*Asp*III) ใน *Anabaena* [21] โดยการ methylate พลาสมิดด้วยวิธีดังกล่าวได้มีการนำมาใช้ในแบคทีเรียหลายชนิดเช่นเดียวกัน [71-73]



รูปที่ 4 แสดงผลการเพิ่มจำนวน *rrnB* terminator และ phycocyanin promoter จากพลาสมิด pAG127 ด้วยวิธี PCR lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder; lane 1, *rrnB* terminator ที่มีปลายที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Sac*I-*Kpn*I; lane 2, *rrnB* terminator ที่มีปลายที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Pst*I-*Hind*III และ lane 3, phycocyanin promoter ของ *Spirulina*

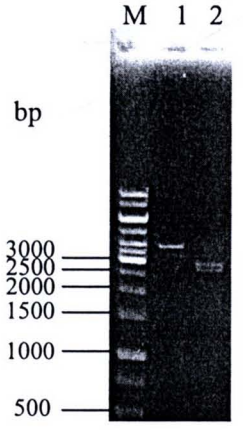


รูปที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิดที่สร้างได้ซึ่งมียีน methylase อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter และมี terminator lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder; lane 1, พลาสมิด pAG149 (control); lane 2, พลาสมิด pAG149 ตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Kpn*I ; lane 3, พลาสมิด pAG150 (control); lane 4, พลาสมิด pAG150 ตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Hind*III; lane 5, พลาสมิด pAG151 (control); lane 6, พลาสมิด pAG151 ตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ *Bam*HI; lane 7, พลาสมิด pAG152 (control); lane 8, พลาสมิด pAG152 ตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I และ *Pst*I; lane 9, พลาสมิด pAG153 (control) และ lane 10, พลาสมิด pAG153 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xba*I

1.3 การสร้างพลาสมิดที่มี cxpression cassette ของยีนต้านยา spectinomycin และ *gfp* อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter

เพื่อให้ยีนที่นำมาใช้สำหรับคัดเลือก transformant มีการแสดงออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการทดลองได้ทำการสร้างพลาสมิดที่มียีนต้านยา spectinomycin และ *gfp* สำหรับใช้คัดเลือก transformant อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter โดยการตัด expression cassette ที่มียีนต้านยา spectinomycin และ *gfp* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter และมี *rrnB* terminator ขนาดประมาณ 2.4 kb ออกจากพลาสมิด pAG127 ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Hind*III แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pBluescriptII SK$^-$ ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Hind*III เช่นเดียวกัน จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหารที่มียา spectinomycin แล้วทำการทดสอบพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Hind*III พบว่า ได้ดีเอ็นเอขนาด 2.4 และ 3 kb ของ expression cassette และพลาสมิด pBluescriptII SK$^-$ (รูปที่ 6, lane ที่ 2) ซึ่งพลาสมิดที่สร้างได้ใหม่มีชื่อว่า pAG154 spectinomycin เป็นยาที่ได้มีการนำมาใช้คัดเลือก tranformant กันอย่างกว้างขวางทั้งในพืช และสิ่งมีชีวิตพวก prokaryote ต่าง ๆ ในไซยาโนแบคทีเรียพบว่า มีการนำยา spectinomycin มาใช้ในการ

คัดเลือก transformant ทั้งในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลเดียวและที่เป็นเส้นสาย ที่ความเข้มข้นโดยทั่วไปประมาณ 1-20 μg/ml [46, 47, 74] โดยจากการศึกษาใน *Spirulina* พบว่า *Spirulina* มีความไวต่อยา spectinomycin ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดคือ 0.5 μg/ml (S. Cheevadhanarak, unpublished result) นอกจากใช้ยีนต้านยา spectinomycin สำหรับการคัดเลือก tranformant แล้ว ยีน *gfp* ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเช่นกัน เนื่องจากมีความไวสูง สามารถแสดงออกได้แบบ real time ไม่ต้องการ substrate และไม่มีปัญหาเรื่อง background [59, 75] จึงได้มีการนำยีน *gfp* มาใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ทั้งใน prokaryote และ eukaryote



รูปที่ 6 แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิดที่สร้างได้ซึ่งมี expression cassette ของยีนต้านยา spectinomycin และยีน *gfp* อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter และมี terminator lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder; lane 1, พลาสมิด pAG154 (control) และ lane 2, พลาสมิด pAG154 ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Hind*III

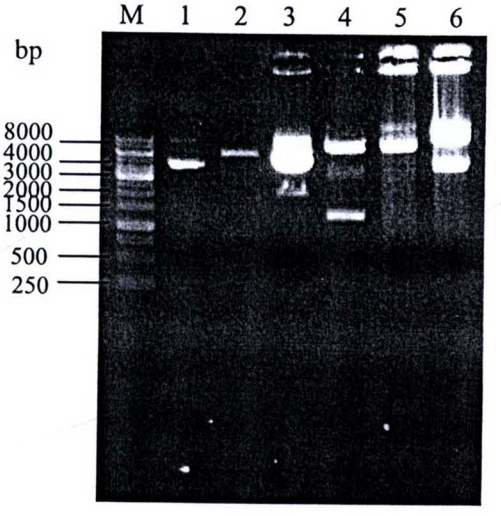
1.4 การสร้างพลาสมิดที่สามารถแทรกเข้าไปยับยั้งการทำงานของยีนสร้าง restriction enzyme ในโครโมโซมของ *Spirulina* แบบ double homologous recombination

เพื่อให้พลาสมิดที่มี expression cassette ของยีน *gfp* และยีนต้านยา spectinomycin ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter สามารถแทรกเข้าไปในโครโมโซมของ *Spirulina* ได้อย่างเสถียรและไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ใน *Spirulina* ในการทดลองได้ทำการการตัดยีนสร้างเอนไซม์ restriction *Ava*I ส่วนแรก ขนาด 900 bp ออกจากพลาสมิด pAG145 ที่สร้างได้จากข้อ 1.1 ด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Sal*I แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pAG154 ที่สร้างได้จากข้อ 1.3 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Sal*I เช่นเดียวกัน จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหารที่มียา

spectinomycin แล้วทำการทดสอบพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Sal*I พบว่า ได้ดีเอ็นเอขนาด 0.9 และ 5.4 kb ของยีนสร้างเอนไซม์ *Ava*I และพลาสมิด pAG154 ตามลำดับ (รูปที่ 7, lane ที่ 2) ซึ่งพลาสมิดที่สร้างได้มีชื่อว่า pAG155

เพื่อสร้างพลาสมิดที่สามารถแทรกเข้าไปในโครโมโซมของ *Spirulina* ได้แบบ double homologous recombination ในการทดลองได้ทำการตัดยีนสร้างเอนไซม์ restriction *Ava*I ส่วนที่สอง ขนาด 1.2 kb ออกจากพลาสมิด pAG146 ที่สร้างได้จากข้อ 1.2 ด้วยเอนไซม์ *Spe*I และ *Eco*RI แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pAG155 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Spe*I และ *Eco*RI จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหารที่มียา spectinomycin แล้วทำการทดสอบพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Spe*I และ *Eco*RI พบว่า ได้ดีเอ็นเอขนาด 1.2 และ 6.3 kb ของยีนสร้างเอนไซม์ *Ava*I และพลาสมิด pAG154 ตามลำดับ (รูปที่ 7, lane ที่ 4) ซึ่งพลาสมิดที่สร้างได้มีชื่อว่า pAG156 จากนั้นทำการตัด expression cassette ของยีนสร้างเอนไซม์ methylase *Ban*I และ *Hind*VP ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter และ terminator ออกจากพลาสมิด pAG153 ที่สร้างได้ในข้อ 1.2 ด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Not*I แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pAG156 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Not*I จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหารที่มียา spectinomycin แล้วทำการทดสอบพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Not*I พบว่า ได้ดีเอ็นเอขนาด 2.7 และ 7.5 kb ของ expression cassette และพลาสมิด pAG156 ตามลำดับ (รูปที่ 7, lane ที่ 6) ซึ่งพลาสมิดที่สร้างได้มีชื่อว่า pAG157 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีน *Ban*I และ *Hind*VP methylase และมี cassette ของยีน *gfp* และยีนต้านยา spectinomycin อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter แทรกอยู่ตรงกลางยีนสร้าง restriction enzyme *Ava*I ที่ใช้เป็น homologous sequence ของ *Spirulina* ทำให้พลาสมิดที่สร้างได้มีคุณสมบัติที่สามารถแทรกเข้าไปในโครโมโซมของ *Spirulina* ได้อย่างเสถียรแบบ double homologous recombination และไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ใน *Spirulina* จากการศึกษาใน *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ PCC 7942 และ *Synechocystis* sp. สายพันธุ์ PCC 6803 พบว่า การเข้าไปแทรกของพลาสมิดในโครโมโซมแบบ double homologous recombination มีประสิทธิภาพดีกว่าการเข้าไปแทรกของพลาสมิดในโครโมโซมแบบ single homologous recombination 100 และ 1,000 เท่า ตามลำดับ [76] [45, 77] Dong และคณะ (2010) [78] ได้ทดลองส่งถ่ายพลาสมิดที่ไม่ได้ผ่านการ methylation เข้าไปใน *Clostridium acetobulyticum* SMB009 ซึ่งเป็น mutant ที่ถูก disrupt ยีนสร้าง type II restriction enzyme Cac824I พบว่า พลาสมิดที่ไม่ผ่านการ methylation สามารถส่งถ่ายเข้าไปในเซลได้ประสิทธิภาพดีเท่ากันกับพลาสมิดที่ผ่านการ methylation โดยการ disrupt ยีนสร้าง restriction enzyme ไม่มีผลต่อ metabolism หรือการเจริญเติบโตของเซล เช่นเดียวกับการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าไปใน mutant ที่ได้ disrupt ยีนสร้าง restriction enzymes ต่าง ๆ ของไซยาโนแบคทีเรีย *Thermosynechococcus elongatus* [16], *Borrelia burgdorferi* [79] และ *E. coli* สายพันธุ์ E2348/69 [80] ที่พบว่า สามารถทำให้ดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการทำ methylation ส่งถ่ายเข้าไปในเซลได้

อย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการทดลองจึงได้ใช้ยีนสร้าง restriction enzyme เป็น homologous sequence สำหรับให้พลาสมิดเข้าไปแทรกในโครโมโซมของ *Spirulina* เพื่อยับยั้งการทำงานของ restriction enzyme ซึ่งพลาสมิด pAG157 ที่สร้างได้ถูกนำไปตรวจสอบความสามารถในการ methylate ดีเอ็นเอต่อไปในข้อ 2

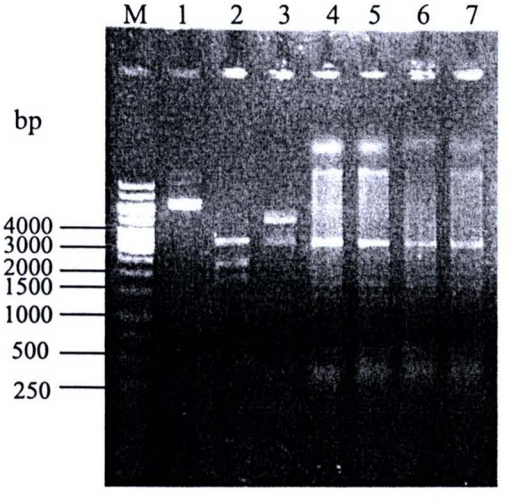


รูปที่ 7 แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิดที่สร้างได้ซึ่งมียีนสร้างเอนไซม์ methylase ที่สามารถป้องกันการถูกย่อยจาก restriction enzymes และมี cassette ของยีนต้านยา spectinomycin และ *gfp* อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter แทรกอยู่ระหว่าง homologous sequence ของ *Spirulina* ทำให้พลาสมิดมีคุณสมบัติที่สามารถแทรกเข้าไปในโครโซมของ *Spirulina* ได้แบบ double homologous recombination ตัดด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ กัน lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder; lane 1, พลาสมิด pAG155 (control); lane 2, พลาสมิด pAG155 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Sal*I; lane 3, พลาสมิด pAG156 (control); lane 4, พลาสมิด pAG156 ตัดด้วยเอนไซม์ *Spe*I และ *Eco*RI; lane 5, พลาสมิด pAG157 (control) และ lane 6; พลาสมิด pAG157 ตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Not*I

2. การทดสอบผลการ methylation ของยีนสร้างเอนไซม์ *Ban*I และ *Hind*VP methylase ต่อการป้องกันการถูกย่อยจาก restriction enzyme *Ban*I *Hind*VP และ crude extract ของ *Spirulina*

เพื่อตรวจสอบว่ายีนสร้างเอนไซม์ *Ban*I และ *Hind*VP methylase ที่สร้างในพลาสมิด pAG157 สามารถป้องกันพลาสมิดจากการถูกย่อยด้วย restriction enzyme *Ban*I *Hind*VP และ crude extract ของ *Spirulina* ได้หรือไม่ ในการทดลองได้ทำการย่อยพลาสมิด pAG157 ด้วยเอนไซม์ *Ban*I และ *Bsa*HI (isoschizomer ของเอนไซม์ *Hind*VP) ซึ่งเป็นเอนไซม์ทางการค้า และ crude extract ของ *Spirulina* พบว่า พลาสมิด pAG157 สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Ban*I *Bsa*HI และ crude

extract ของ *Spirulina* (รูปที่ 8, lane ที่ 2-7) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ยีนสร้างเอนไซม์ *Ban*I และ *Hind*VP methylase ไม่สามารถ methylate พลาสมิด pAG157 เพื่อป้องกันการถูกย่อยจาก restriction enzyme ได้ ทั้งนี้คาดว่า อาจเกิดจากยีน *Ban*I และ *Hind*VP methylase ของ *Spirulina* ไม่สามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* แต่จะแสดงออกได้ใน *Spirulina* หรืออาจเกิดจากยีน methylase ของ *Spirulina* ไม่สามารถแสดงออกได้เนื่องจาก gene ของ *Spirulina* ไม่ function Card และคณะ (1990) [81] ได้ทำการโคลนยีนสร้าง *Hpa*II restriction และ methylase enzyme จาก *Haemophilus parainfluenzae* เข้าไปใน *E. coli* แต่พบว่า ยีนสร้าง restriction enzyme ไม่สามารถแสดงออกได้ ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากยีนสร้าง restriction enzyme ไม่สามารถแสดงออกได้ดีใน *E. coli* Zhao และคณะ (2006) [30] ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนสร้าง methylase enzymes ในจีโนมของ *Spirulina platensis* ด้วยวิธี RT-PCR พบว่า จากจำนวนยีนสร้างเอนไซม์ methylase 18 ยีน มี 6 ยีน ที่ไม่มีการแสดงออก เพื่อเป็นการทดสอบสมมติฐานดังกล่าว ในการทดลองจึงได้ทำการส่งถ่ายพลาสมิด pAG157 ซึ่งมียีนสร้างเอนไซม์ methylase เข้าสู่ *Spirulina* เปรียบเทียบกับพลาสมิด pAG156 ซึ่งไม่มียีนสร้างเอนไซม์ methylase ในข้อ 3 ต่อไป



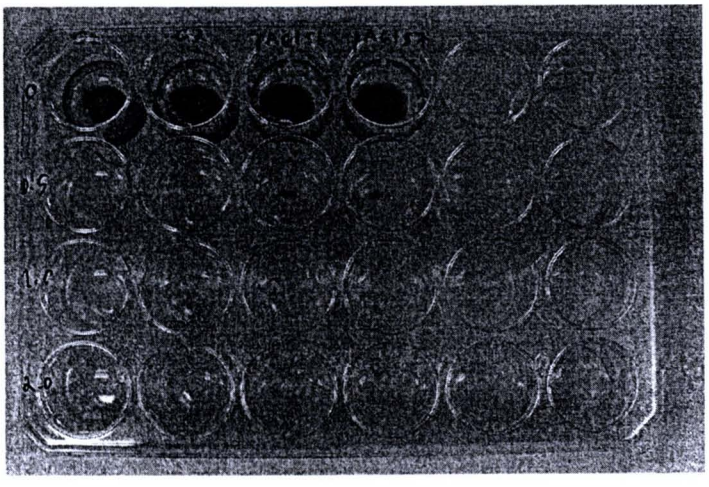
รูปที่ 8 แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิด pAG157 ที่สร้างได้ซึ่งมียีนสร้างเอนไซม์ methylase ย่อยด้วย restriction enzymes ทางการค้า และ crude extract ของ *Spirulina* lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder; lane 1, พลาสมิด pAG157 (control); lane 2, พลาสมิด pAG157 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bsa*HI; lane 3, พลาสมิด pAG157 ตัดด้วยเอนไซม์ *Ban*I; lane 4, พลาสมิด pAG157 ตัดด้วย crude extract ของ *Spirulina* ใน NEB buffer 1, lane 5, พลาสมิด pAG157 ตัดด้วย crude extract ของ *Spirulina* ใน NEB buffer 2; lane 6, พลาสมิด pAG157 ตัดด้วย crude extract ของ *Spirulina* ใน NEB buffer 3 และ lane 7, พลาสมิด pAG157 ตัดด้วย crude extract ของ *Spirulina* ใน NEB buffer 4

3. การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Spirulina* ด้วยวิธี electroporation

เพื่อศึกษาผลของยีน methylase ในการป้องกันการถูกย่อยของพลาสมิดจาก restriction enzymes ใน *Spirulina* ในการทดลองได้ทำการส่งถ่ายพลาสมิด pAG157 ที่มียีน methylase และพลาสมิด pAG156 ซึ่งไม่มียีน methylase เข้าสู่ *S. platensis* C1 ด้วยวิธี electroporation เนื่องจากการส่งถ่ายดีเอ็นเอโดยใช้วิธี conjugation ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้กับไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย เช่น *Anabaena* sp. PCC 7120 เป็นต้น [21, 44, 82] พบว่า ไม่สามารถนำมาใช้ส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *S. platensis* C1 ได้ (S. Cheevadhanarak, unpublished result) เช่นเดียวกับวิธีทางเคมีที่นำมาใช้สำหรับการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *E. coli* ที่พบว่าไม่สามารถนำมาใช้ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Spirulina* ได้เช่นกัน [7] ในการทดลองจึงได้ทำการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Spirulina* ด้วยวิธี electroporation เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ส่งถ่ายดีเอ็นเอได้กับไซยาโนแบคทีเรียทั้งที่เป็นเซลเดียวและเส้นสาย [17, 22, 42, 43, 83] โดยในปี 2536 ศรีสุพร [7] ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Spirulina* สายพันธุ์ C1 พบว่า เซล *Spirulina* มีความพร้อมในการรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซล (competent) ได้ดีในช่วง early ถึง mid log phase เนื่องจากในระยะนี้เซลมีความแข็งแรงสมบูรณ์ สามารถซ่อมแซมผนังเซลได้ดี เมื่อถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า ในขณะที่ช่วง late log phase *Spirulina* เริ่มที่จะไม่สามารถรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลได้ Zang และคณะ (2007) [17] ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Synechocystis* PCC 6803 พบว่า การส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลที่เลี้ยงในระยะ mid log phase มีประสิทธิภาพดีกว่าเซลที่เลี้ยงในระยะ late log phase ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้เซล *Spirulina* ที่เลี้ยงในช่วง mid log phase สำหรับการส่งถ่ายดีเอ็นเอด้วยวิธี electroporation นอกจากนี้สภาวะที่ใช้ในการทำ electroporation ของการทดลองนี้ คือที่ความแรงของสนามไฟฟ้า 4 kV/cm ความจุกระแสไฟฟ้า 25 μF ความต้านทานกระแสไฟฟ้า 200 Ω และกระตุ้นแบบ single pulse นาน 5 ms พบว่า ตรงกันกับสภาวะที่ใช้ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอด้วยวิธี electroporation เข้าสู่ *S. platensis* สายพันธุ์ NIES-39 [10]

เพื่อตรวจหาเซล *Spirulina* ที่ได้รับพลาสมิด pAG156 และ pAG157 ในการทดลองได้ทำการคัดเลือกเซลที่ได้รับพลาสมิดบนอาหารที่มียา spectinomycin ความเข้มข้น 0 0.5 1 และ 2 μg/ml และดูการเรืองแสงของยีน *gfp* ที่อยู่ในพลาสมิดภายใต้กล้อง fluorescent microscope ซึ่งจากการทดลอง พบว่า ไม่สามารถคัดเลือก transformation ที่ได้รับพลาสมิด pAG156 หรือ pAG157 บนอาหารแข็งที่มียา spectinomycin ได้ โดยพบว่า เซลที่ได้รับพลาสมิด และเซลที่ไม่ได้รับพลาสมิดบนอาหารที่มียา spectinomycin ความเข้มข้น 1 และ 2 μg /ml เซลตายในระยะเวลาประมาณ 3-5 วัน บนอาหารที่มียา spectinomycin ความเข้มข้น 0.5 μg /ml เซลตายในระยะเวลาประมาณ 7-10 วัน ในขณะที่บนอาหารที่ไม่มียา spectinomycin พบว่า เซลสามารถเจริญเติบโตได้ปกติ จากการดูการเรืองแสง GFP ของเซลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไม่สามารถมองเห็นการเรืองแสงของเซลได้ ซึ่งอาจเกิดจากการเรืองแสงของยีน *gfp* ถูกรบกวนโดยแสงของรงควัตถุต่าง ๆ

ที่อยู่ภายในเซล *Spirulina* [84] จากผลการทำ electroporation พบว่า ไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เนื่องจากเซล *Spirulina* ที่ไม่ได้รับพลาสมิด (control) ทั้งที่ผ่านการทำ electroporation และไม่ได้ทำ electroporation ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มียา spectinomycin ได้ ในขณะที่บนอาหารที่ไม่มียา spectinomycin พบว่า เซลที่ได้รับพลาสมิด และเซลที่ไม่ได้รับพลาสมิดสามารถเจริญเติบโตเป็นโคโลนีได้ในระยะเวลาประมาณ 10-14 วัน และสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าในระยะเวลาประมาณ 30 วัน แต่อย่างไรก็ดี จากการทดลองสามารถคัดเลือก transformant ที่ได้รับพลาสมิด pAG156 และ pAG157 บนอาหารเหลวที่มียา spectinomycin ความเข้มข้น 0.5 μg/ml ได้ (รูปที่ 9) ในขณะที่ความเข้มข้นยา spectinomycin 1 และ 2 μg /ml พบว่า ไม่สามารถคัดเลือก transformant ได้ โดยเซลตายในระยะเวลาประมาณ 5-7 วัน เซลที่ได้รับพลาสมิด pAG157 ซึ่งมียีน methylase มีประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอเท่า ๆ กันกับเซลที่ได้รับพลาสมิด pAG156 ที่ไม่มียีน methylase ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยีนสร้างเอนไซม์ methylase ของ *Spirulina* อาจไม่ function ใน *Spirulina* แต่พลาสมิดบางส่วนอาจสามารถหลุดรอดจากการถูกย่อยด้วย restriction enzymes ใน *Spirulina* และสามารถแทรกเข้าไปในโครโมโซมของ *Spirulina* ได้อย่างมีประสิทธิภาพแบบ double homologous recombination ซึ่งจากการศึกษาการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ PCC 7942 และ *Synechocystis* sp. สายพันธุ์ 6803 ที่พบว่า การเข้าไปแทรกของพลาสมิดแบบ double integration มีประสิทธิภาพมากกว่าแบบ single integration 100 และ 1000 เท่า ตามลำดับ [45, 46] ซึ่งเซลของ transformant ที่คัดเลือกได้ถูกนำไปตรวจสอบผลการได้รับพลาสมิดด้วยวิธี PCR ในข้อ 4

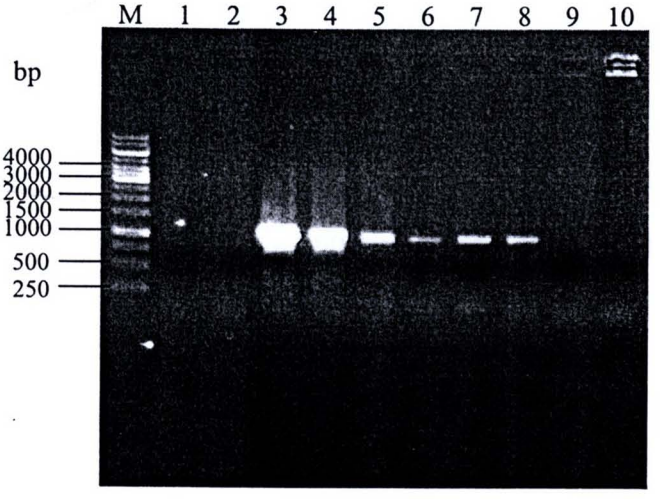


รูปที่ 9 แสดงผล transformant ที่ได้จากการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Spirulina* โดยเปรียบเทียบระหว่างเซล *Spirulina* ที่ไม่ได้รับพลาสมิดไม่ผ่านการทำ electroporation (C1) และผ่านการทำ electroporation (C2) ที่เป็น control และเซลที่ได้รับพลาสมิด pAG157 ซึ่งมียีนสร้างเอนไซม์ methylase และ pAG156 ซึ่งไม่มียีนสร้างเอนไซม์ methylase บนอาหารเหลวที่มียา spectinomycin ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

4. การตรวจหาพลาสมิดใน transformant ด้วยวิธี PCR

เพื่อที่จะแสดงให้เห็นว่า transformant ที่ต้านทานต่อยา spectinomycin เป็นผลมาจากการที่เซลได้รับพลาสมิดที่ส่งถ่ายเข้าไป ในการทดลองทำโดยนำเซลของ *Spirulina* ที่ได้รับพลาสมิด pAG156 หรือ pAG157 ซึ่งต้านทานต่อยา spectinomycin ความเข้มข้น 0.5 μg/ml จากข้อ 3 มาเพิ่มปริมาณยีนต้านยา spectinomycin โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อยีนต้านยา spectinomycin ซึ่งจากการทดลอง พบว่า ไม่ตรวจพบยีนต้านยา spectinomycin จาก transformant ที่ได้รับพลาสมิด pAG156 และ pAG157 (รูปที่ 10, lane ที่ 1-2) ซึ่งอาจเกิดจากสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน PCR ยังไม่เหมาะสม และเมื่อนำ transformant ดังกล่าวไป subculture ต่อในอาหารที่มียา spectinomycin ความเข้มข้น 0.5 μg/ml เพื่อเตรียมเป็น template สำหรับหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยีนต้านยา spectinomycin พบว่า transformant ไม่สามารถอยู่รอดได้ แสดงให้เห็นว่า transformant ที่ได้ไม่เสถียร เช่นเดียวกับที่มีรายงานการศึกษาการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่พบว่า transformant ที่ได้ไม่เสถียรเช่นเดียวกัน Kawata และคณะ (1993) [85] ได้ทำการส่งถ่ายดีเอ็นเอ 3 แบบ คือ 1) พลาสมิด pHSG397 จาก *E. coli* 2) พลาสมิด pHSG397 ที่ถูกตัดให้เป็น linear ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ 3) พลาสมิด pHSG397 ที่มีการปรับปรุงให้มียีนต้านยา *cat* แทรกอยู่ระหว่าง homologous sequence ของ *Spirulina* เข้าสู่ *Spirulina* ด้วยวิธี electroporation พบว่า สามารถคัดเลือก transformant ได้ แต่อย่างไรก็ตาม transformant ที่ได้ไม่เสถียร เช่นเดียวกับ Kojima และคณะ (2001) [86] ได้ทำการส่งถ่ายพลาสมิด pLOFcatLx ซึ่งมียีนต้านยา *cat* และ *lux*AB ที่ไม่มี promoter ในการควบคุมแทรกอยู่ตรงกลาง Tn10 และมียีนสร้างเอนไซม์ Tn10 transposae เข้าสู่ *Spirulina* sp. สายพันธุ์ M-135 ด้วยวิธี conjugation โดยอาศัยหลักการที่เมื่อพลาสมิดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของ *Spirulina* sp. จะอาศัย promoter ของยีนต่าง ๆ ใน *Spirulina* สำหรับควบคุมการแสดงออกของยีน *cat* และ *lux*AB ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่า ไม่สามารถคัดเลือก transformant ที่ต้านทานต่อยา chloramphenicol ได้ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Spirulina* sp. โดยใช้ Tn5-transposase DNA complex [86] ซึ่งจากผลการทำ PCR และการตรวจหา activity ของเอนไซม์ CAT พบว่า สามารถคัดเลือก transformant ได้ แต่ transformant ที่ได้ก็ไม่เสถียรเช่นเดียวกัน ต่อมา Toyomizu และคณะ (2001) [10] ได้ทำการส่งถ่ายพลาสมิด pHSG399 ซึ่งมียีนต้านยา *cat* อยู่ภายใต้การควบคุมของ *E. coli* promoter ที่ถูกตัดให้เป็น linear ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI เข้าสู่ *Spirulina* sp. สายพันธุ์ NIES-39 ที่ผ่านการ sonicate แล้วด้วยวิธี electroporation พบว่าสามารถคัดเลือก transformant ที่ต้านทานต่อยา chloramphenicol และสามารถตรวจพบ activity ของเอนไซม์ CAT รวมทั้งพลาสมิด pHSG399 ได้ แต่อย่างไรก็ตาม transformant ที่ได้ยังคงไม่เสถียรหลังจากที่ได้ทำการ subculture หลายครั้ง เช่นเดียวกับรายงานของ Kawata และคณะ (2004) [11] ที่ได้ทำการส่งถ่าย PCR product ของ Tn5 ที่ผ่านการเติมหมู่ methyl (*in vitro* methylation) ซึ่งมียีนต้านยา *cat* อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter Tn5 transposase และ cation liposome

complex เข้าสู่ *Spirulina* สายพันธุ์ C1 ที่ผ่านการ sonicate ด้วยวิธี electroporation พบว่า สามารถคัดเลือก transformant ที่ต้านทานต่อยา chloramphenicol และตรวจพบดีเอ็นเอใน transformant ได้ แต่อย่างไรก็ตาม transformant ที่ได้ยังคงไม่เสถียรเช่นเดียวกัน ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจาก *Spirulina* ยังมี restriction enzyme อื่น ๆ ที่สามารถย่อยดีเอ็นเอได้ จึงทำให้ดีเอ็นเอที่ส่งถ่ายไม่สามารถคงอยู่ใน *Spirulina* ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาการส่งถ่ายพลาสมิด pDUCA7 และ pRL489 ที่ผ่านการเติมหมู่ methyl (*in vivo* methylation) เพื่อป้องกัน restriction enzyme ใน *Chroococcidiopsis* สายพันธุ์ 171 584 และ 057 ด้วยวิธี electroporation หรือ conjugation ที่พบว่า transformant ไม่สามารถอยู่รอดได้ ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากในเซลยังคงมี restriction enzyme อื่น ๆ ที่สามารถย่อยดีเอ็นเอได้อีก จึงทำให้การส่งถ่ายดีเอ็นเอไม่ประสบผลสำเร็จ [43]



รูปที่ 10 แสดงผลการตรวจหายีนต้านยา spectinomycin จาก *Spirulina* ที่ทนต่อยา spectinomycin ความเข้มข้น 0.5 μg/ml ด้วยวิธี PCR lane M, GenRuler™ 1 kb DNA ladder; lane 1-2, เซล *Spirulina* ที่ได้รับพลาสมิด pAG156 และ pAG157 ตามลำดับ เพิ่มจำนวนด้วย primer ที่จำเพาะต่อยีนต้านยา spectinomycin; lane 3-4, พลาสมิด pAG156 และ pAG157 เพิ่มจำนวนด้วย primer ที่จำเพาะต่อยีนต้านยา spectinomycin (positive control); lane 5-8, เซล *Spirulina* ที่ได้รับพลาสมิด pAG156, pAG157, เซล *Spirulina* ที่ไม่ได้รับพลาสมิดไม่ผ่านการทำ electroporation และผ่านการทำ electroporation ตามลำดับ เพิ่มจำนวนด้วย primer ที่จำเพาะต่อยีน *Hind*VP methylase (positive control); lane 9-10, เซล *Spirulina* ที่ไม่ได้รับพลาสมิดไม่ผ่านการทำ electroporation และผ่านการทำ electroporation เพิ่มจำนวนด้วย primer ที่จำเพาะต่อยีนต้านยา spectinomycin (negative control)