วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

วิธีการดำเนินการวิจัย

Restriction enzyme เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอในไซยาโนแบคทีเรีย และเนื่องจากในการศึกษาเบื้องต้นของทุนวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินปี 2552 เรื่องการตรวจหาและวิเคราะห์ระบบเอนไซม์ restriction-modification ในจีโนม *Spirulina platensis* C1 พบว่า *Spirulina* สายพันธุ์ C1 มี restriction enzyme ชนิดที่ II อยู่ 9 ชนิด ดังนั้นเพื่อป้องกันไม่ให้พลาสมิดถูกย่อยด้วย restriction enzymes ใน *Spirulina* และสามารถแทรกเข้าไปในโครโมโซมของ *Spirulina* ได้อย่างเสถียร ในงานวิจัยนี้จะทำการสร้างพลาสมิดที่มีคุณสมบัติคือ (1) มียีน methylase ของ *Spirulina* สำหรับป้องกันไม่ให้พลาสมิดถูกย่อยด้วยเอนไซม์ใน *Spirulina* (2) มียีนต้านยา spectinomycin สำหรับใช้คัดเลือก transformant ของทั้ง *E. coli* และ *Spirulina* (3) มียีนเรืองแสง *gfp* สำหรับติดตามพลาสมิดที่ส่งถ่ายเข้าไปใน *Spirulina* โดยดูการเรืองแสงภายใต้แสง UV (4) มี promoter ของ *Spirulina* สำหรับควบคุมการแสดงออกของยีน methylase ยีนต้านยา spectinomycin และยีน *gfp* และ (5) มียีนสร้าง restriction enzyme ของ *Spirulina* เป็น homologous sequence สำหรับเป็นบริเวณให้พลาสมิดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของ *Spirulina* แบบ double homologous recombination เพื่อยับยั้งการทำงานของยีนสร้าง restriction enzyme ใน *Spirulina* ซึ่งเมื่อทำการสร้างพลาสมิดเสร็จแล้ว จะนำพลาสมิดที่สร้างได้มาย่อยด้วย crude extract ของ *Spirulina* และย่อยด้วยเอนไซม์ *Ban*I และ *Bsa*HI (isoschizomer ของเอนไซม์ *Hind*VP) เพื่อตรวจสอบความสามารถในการป้องกันการถูกย่อยจาก restriction enzymes ของ *Spirulina* และทำการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Spirulina* ด้วยวิธี electroporation โดยใช้ยีนต้านยา spectinomycin สำหรับการคัดเลือก transformant จากนั้นทำการตรวจหาพลาสมิดใน transformant ด้วยวิธี PCR โดยมีวิธีการดำเนินงานวิจัย ดังนี้

1. เชื้อและการเพาะเลี้ยง

1.1 ไซยาโนแบคทีเรีย *S. platensis* C1 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Avigad Vonshak, Algal Biotechnology, Ben-Gurian University of the Negev, ประเทศอิสราเอล) เลี้ยงในอาหารแข็งหรืออาหารเหลว Zarrouk [60] ที่อุณหภูมิ 30 °C ที่ความเข้มแสง 80 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ เพื่อใช้เป็นเซลเจ้าบ้านสำหรับการส่งถ่ายดีเอ็นเอ

1.2 *E. coli* DH5α เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ 37°C ไว้สำหรับการเก็บและสร้างพลาสมิดต่างๆ ตลอดการทดลอง [61]

2. พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

2.1 พลาสมิด pGEM®-T Easy (Promega, USA) ใช้เป็นเวกเตอร์ในการโคลนยีน *Ava*I restriction enzyme, *Hind*VP และ *Ban*I methylase enzyme

2.2 พลาสมิด pBluescript II SK⁻ (Amersham Pharmacia, USA) ใช้เป็นเวกเตอร์ในการโคลน expression cassette ของยีนต้านยา spectinomycin และยีน *gfp* ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter ของ *Spirulina* และ *rrnB* terminator เพื่อใช้ยับยั้งการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ผ่าน cassette ของยีนต้านยา spectinomycin และ *gfp*

2.3 พลาสมิด pAG127 ใช้เป็นแหล่ง expression cassette ของยีนต้านยา spectinomycin และยีน *gfp* ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter ของ *Spirulina* และ *rrn*B terminator โดยพลาสมิด pAG127 ได้ถูกสร้างไว้ในห้องปฏิบัติการสำหรับใช้ในการพัฒนาระบบการส่งถ่ายยีนในโครงการวิจัย1 ปี 50

2.4 พลาสมิด pGEM4 (Promega, USA) ใช้เป็นเวกเตอร์ในการโคลน phycocyanin promoter เพื่อใช้ในการควบคุมการแสดงออกของ *Hind*VP methylase และ *Ban*I methylase และการโคลน *rrn*B terminator

3. การสร้างพลาสมิดที่ใช้สำหรับการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *S. platensis* C1 (รูปที่ 1)

3.1 การโคลนยีนสร้าง restriction และ methylase enzyme จาก *Spirulina*

จากการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนม *Spirulina* ในเบื้องต้นที่พบว่า จากจำนวนเอนไซม์ชนิดที่ II ทั้งหมด 9 เอนไซม์ เอนไซม์ *Ban*I และ *Hind*VP มีความน่าจะเป็นในการย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอได้ด้วยความถี่ที่มากที่สุด (ตารางที่ 1) และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ expression cassette ของยีนต้านยา spectinomycin ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter และ terminator ซึ่งเป็นส่วนที่จะเข้าไปแทรกในโครโมโซมของ *Spirulina* พบว่า ยีนต้านยา spectinomycin มีตำแหน่งที่สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Ava*I ได้ 1 ตำแหน่ง ดังนั้นเพื่อป้องกันพลาสมิดและ expression cassette ของยีนต้านยาปฏิชีวนะจากการถูกย่อยด้วย restriction enzyme ใน *Spirulina* ให้ได้มากที่สุด ในการทดลองได้ทำการโคลนยีนสร้างเอนไซม์ methylase *Ban*I (SP10450088V04) และ *Hind*VP (SP80080010V04) เพื่อใช้ป้องกันพลาสมิดจากการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ใน *Spirulina* และทำการโคลนยีนสร้างเอนไซม์ restriction *Ava*I (SP80010040V04) เพื่อใช้เป็น homologous sequence สำหรับการเข้าไปแทรกเพื่อยับยั้งการทำงานของยีนสร้างเอนไซม์ restriction *Ava*I ในจีโนมแบบ double homologous integration โดยในการโคลนยีนสร้าง restriction *Ava*I ส่วนแรกจากจีโนมิคดีเอ็นของ *Spirulina* ได้ทำการออกแบบ primer จากภายในบริเวณ coding region ของยีน restriction *Ava*I ถึง downstream sequence ของยีน โดยออกแบบ primer ให้มีปลายที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Sal*I ซึ่งได้ดีเอ็นเอที่มีความยาวขนาด 900 bp โดย primer ที่นำมาใช้ คือ

Res*Ava*I-*Hind*III (F) primer: 5'-CCCAAGCTTACGAGCCACACCTTATGTTGC-3' และ Res*Ava*I-*Sal*I (R) primer: 5'-ACGCGTCGACAACTCCTACAGATCGCACAGC-3' ใน reaction ที่ประกอบด้วย 0.2 mM dNTP 2 mM $MgSO_4$ 1xPCR buffer 0.4 pmol primer จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Spirulina* และ 1 U Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen, USA) โดยสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนคือ 95 ^{0}C 2 นาที จำนวน 1 รอบ 95 ^{0}C 30 วินาที 55^{0}C 30 วินาที และ 72^{0}C 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72^{0}C 7 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วนำไป subclone ลงในพลาสมิด pGEM®-T Easy ได้พลาสมิดใหม่ที่มีชื่อว่า pAG145 ซึ่งมีขนาดประมาณ 3900 bp

สำหรับการโคลนยีนสร้าง *Ava*I restriction enzyme ส่วนที่สอง ได้ทำการออกแบบ primer จากบริเวณด้านปลาย coding region ของยีนสร้างเอนไซม์ *Ava*I methylase enzyme ซึ่งอยู่ด้านหน้ายีนสร้าง *Ava*I restriction enzyme ครอบคลุมไปจนถึง coding region บางส่วนของยีนสร้าง *Ava*I restriction enzyme โดยออกแบบ primer ให้มีปลายที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Spe*I และ *Eco*RI ซึ่งได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 bp คือ Met*Ava*I-*Spe*I (F) primer: 5'-GGACTAGTCATAGCAGATATCCAGGAAGTC-3' และ Met*Ava*I-*Eco*RI (R) primer: 5'-GGAATTCACTAATCCCAGCATAACGCAC-3' ใน reaction ที่ประกอบด้วย 0.2 mM dNTP 2 mM $MgSO_4$ 1xPCR buffer 0.4 pmol primer จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Spirulina* และ 1 U Platinum® Taq High Fidelity โดยมีสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนคือ 95 ^{0}C 2 นาที จำนวน 1 รอบ 95 ^{0}C 30 วินาที 55^{0}C 30 วินาที และ 72^{0}C 1.5 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72^{0}C 7 นาที จำนวน 1 รอบแล้วนำไป subclone ลงในพลาสมิด pGEM®-T Easy ได้พลาสมิดใหม่ชื่อว่า pAG146 ซึ่งมีขนาดประมาณ 4200 bp

สำหรับการโคลนยีน methylase *Hind*VP ขนาดประมาณ 1 kb ได้ทำการออกแบบ primer จากบริเวณ upstream ถึง downstream ของยีน โดยออกแบบให้มี ribosome binding site และมีปลายที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Xba*I และ *Pst*I คือ *Hind*VP-*Xba*I (F) primer: 5'-GCTCTAGA*AAGGAG*GTGAACTATGAGAACTATAGATTTG-3' และ *Hind*VP-*Pst*I (R) primer: 5'-AACTGCAGGTCAATTAAAGAGGCTAAGTTGTA-3' ใน reaction ที่ประกอบด้วย 0.25 mM dNTP 1xPCR buffer 0.4 pmol primer จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Spirulina* และ 0.02 U KOD Xtreme™ Hot Start DNA polymerase (Novagen, USA) โดยมีสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนคือ 94 ^{0}C 2 นาที จำนวน 1 รอบ 98 ^{0}C 10 วินาที 55^{0}C 30 วินาที และ 68^{0}C 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ 68^{0}C 7 นาที จำนวน 1 รอบ เนื่องจากเอนไซม์ KOD ไม่มีคุณสมบัติที่สามารถเติมเบส A overhang ที่ปลาย PCR product ในระหว่างการทำ PCR ทำให้ไม่สามารถนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Easy ได้โดยตรง ในการทดลองจึงได้ทำการเติมเบส A ที่ปลาย PCR product ด้วยเอนไซม์ Taq DNA polymerase ใน reaction ที่ประกอบด้วย 0.2 mM dATP 1xPCR buffer 2.5 mM $MgCl_2$ PCR product และ 5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 70 ^{0}C เป็นเวลา 30

นาที แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Easy ได้พลาสมิดใหม่ชื่อว่า pAG147 ซึ่งมีขนาดประมาณ 4000 bp

ในส่วนของการโคลนยีน methylase *Ban*I ขนาดประมาณ 1.2 kb ได้ทำการออกแบบ primer จากบริเวณ upstream ถึง downstream ของยีน รวมทั้งมี ribosome binding site และมีปลายที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xba*I คือ *Ban*I-*Bam*HI (F) primer: 5'-CGGGATCC*AAGGAG*CTTTATAGAAAATGAAAACCGT-3' และ *Ban*I-*Xba*I (R) primer: 5'-GCTCTAGAGCTTAGGGAAATTTATGGTT-3' ใน reaction ที่ประกอบด้วย 0.25 mM dNTP 1xPCR buffer 0.4 pmol primer จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Spirulina* และ 0.02 U KOD Xtreme™ Hot Start DNA polymerase (Novagen, USA) โดยมีสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนคือ 94 ^{0}C 2 นาที จำนวน 1 รอบ 98 ^{0}C 30 วินาที 55^{0}C 30 วินาที และ 68 ^{0}C 1.5 นาที จำนวน 30 รอบ และ 68^{0}C 7 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นทำการเติมเบส A ที่ปลาย PCR product แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Easy ได้พลาสมิดใหม่ชื่อว่า pAG148 ซึ่งมีขนาดประมาณ 4200 bp โดยยีนสร้างเอนไซม์ restriction และ methylase ที่โคลนลงในพลาสมิด pGEM®-T Easy ได้ถูกส่งไปวิเคราะห์ความถูกต้องของลำดับเบสของยีนที่บริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย

Enzyme name	DNA									
	pUC19	pGEM 4	pBR 322	pBlue2 SK^{-}	pACY C184	pGEM3Z FP^{+}	pEMB L8M	*rrnB* terminator	Phycocyanin promoter	Spec^{R} gene
*Ava*I	1	1	1	2	1	1	1	0	0	1
*Ban*I	4	5	9	4	10	4	3	0	1	0
*Hind*III	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
*Hind*VP	3	5	6	1	4	2	2	1	0	1
*Nhe*I	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0
*Nsp*HI	3	3	4	1	2	3	3	0	0	0
*Nsp*V	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
*Pvu*II	2	1	1	2	2	2	2	0	0	0
*Sna*BI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนจุดตัดบนดีเอ็นเอที่สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ ใน *Spirulina* C1

3.2 การสร้างพลาสมิดที่มี cassette ของยีน methylase อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter

จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่า promoter ของ *E. coli* ที่นำมาใช้ควบคุมการแสดงออกของยีน methylase ยังไม่มีประสิทธิภาพดีพอเมื่อนำมาใช้กับ *Spirulina* ดังนั้นเพื่อให้ยีน methylase มีการแสดงออกที่ดีขึ้น ในการทดลองได้ทำการสร้าง expression cassette ที่มียีนสร้างเอนไซม์ methylase *Ban*I และ *Hind*VP อยู่ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter ของ *Spirulina* และมี terminator สำหรับป้องกันการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ผ่าน expression cassette และเป็นตัวหยุดการแสดงออกของ expression cassette

สำหรับการโคลน *rrnB* terminator เพื่อใช้ป้องกันการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ผ่าน expression cassette ขนาดประมาณ 300 bp จากพลาสมิด pAG127 ได้ใช้ primer ที่ออกแบบให้มีปลายที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Kpn*I คือ *rrnBT1T2–Sac*I (F) primer: 5'-CGAGCTCGTTGGCGGATGAGAGAAG-3' และ *rrnBT1T2-Kpn*I (R) primer: 5'-GGGGTACCTCATGAGCGGATACATA-3' ใน reaction ที่ประกอบด้วย 0.2 mM dNTP 2 mM $MgSO_4$ 1xPCR buffer 0.4 pmol primer พลาสมิด pAG127 และ 1 U Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen, USA) โดยมีสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนคือ 95 ^{0}C 2 นาที จำนวน 1 รอบ 95 ^{0}C 30 วินาที 55 ^{0}C 30 วินาที และ 72 ^{0}C 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72 ^{0}C 7 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM4 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Kpn*I ได้พลาสมิดใหม่ชื่อว่า pAG149 ซึ่งมีขนาดประมาณ 3200 bp จากนั้นทำการโคลน *rrnB* terminator เพื่อใช้สำหรับหยุดการแสดงออกของ expression cassette ขนาด 300 bp จากพลาสมิด pAG127 โดยใช้ primer *rrnBT1T2–Pst*I (F) primer: 5'-AACTGCAGTTGGCGGATGAGAGAAG-3' และ *rrnBT1T2-Hind*III_*Not*I (R) primer: 5'-CCCAAGCTTATAAGAATGCGGCCGCTCATGAGCGGATACATA-3' แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pAG149 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Hind*III ได้พลาสมิดใหม่ชื่อว่า pAG150 ซึ่งมีขนาดประมาณ 3500 bp จากนั้นทำการโคลน phycocyanin promoter ขนาด 300 bp จากพลาสมิด pAG127 ด้วยวิธี PCR โดยการออกแบบ primer ให้มีปลายที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ *Bam*HI คือ PC promoter-*Kpn*I (F) primer: 5'-CGGGGTACCTACTTAGTAAATTTTGAAGAGACTTTAATAAATTTTAACA-3' และ PC promoter-*Bam*HI (R) primer: 5'-CGGGATCCCATCACCTTCACCC TCTCCACTGACAGAAAATTTGTGCCC-3' ใน reaction ที่ประกอบด้วย 0.2 mM dNTP 2 mM $MgSO_4$ 1xPCR buffer 0.4 pmol primer พลาสมิด pAG127 และ 1 U Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen, USA) โดยมีสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน คือ 95 ^{0}C 2 นาที จำนวน 1 รอบ 95 ^{0}C 30 วินาที 55 ^{0}C 30 วินาที และ 72 ^{0}C 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72 ^{0}C 7 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pAG150 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ *Bam*HI ได้พลาสมิดใหม่ชื่อว่า

pAG151 ซึ่งมีขนาดประมาณ 3800 bp จากนั้นทำการตัดยีน methylase *Hind*VP ขนาดประมาณ 1 kb จากพลาสมิด pAG147 ที่สร้างได้จากข้อ 3.1 ด้วยเอนไซม์ *Xba*I และ *Pst*I แล้วนำไปเชื่อมต่อกับ phycocyanin promoter ในพลาสมิด pAG151 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I และ *Pst*I เช่นเดียวกัน ได้พลาสมิดใหม่ชื่อว่า pAG152 ซึ่งมีขนาดประมาณ 4800 bp จากนั้นทำการตัดยีน *Ban*I methylase ขนาดประมาณ 1200 bp ออกจากพลาสมิด pAG148 ที่สร้างได้จากข้อ 3.1 ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Xba*I แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pAG152 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เดียวกัน ได้พลาสมิดใหม่ชื่อว่า pAG153 ซึ่งมีขนาดประมาณ 6000 bp

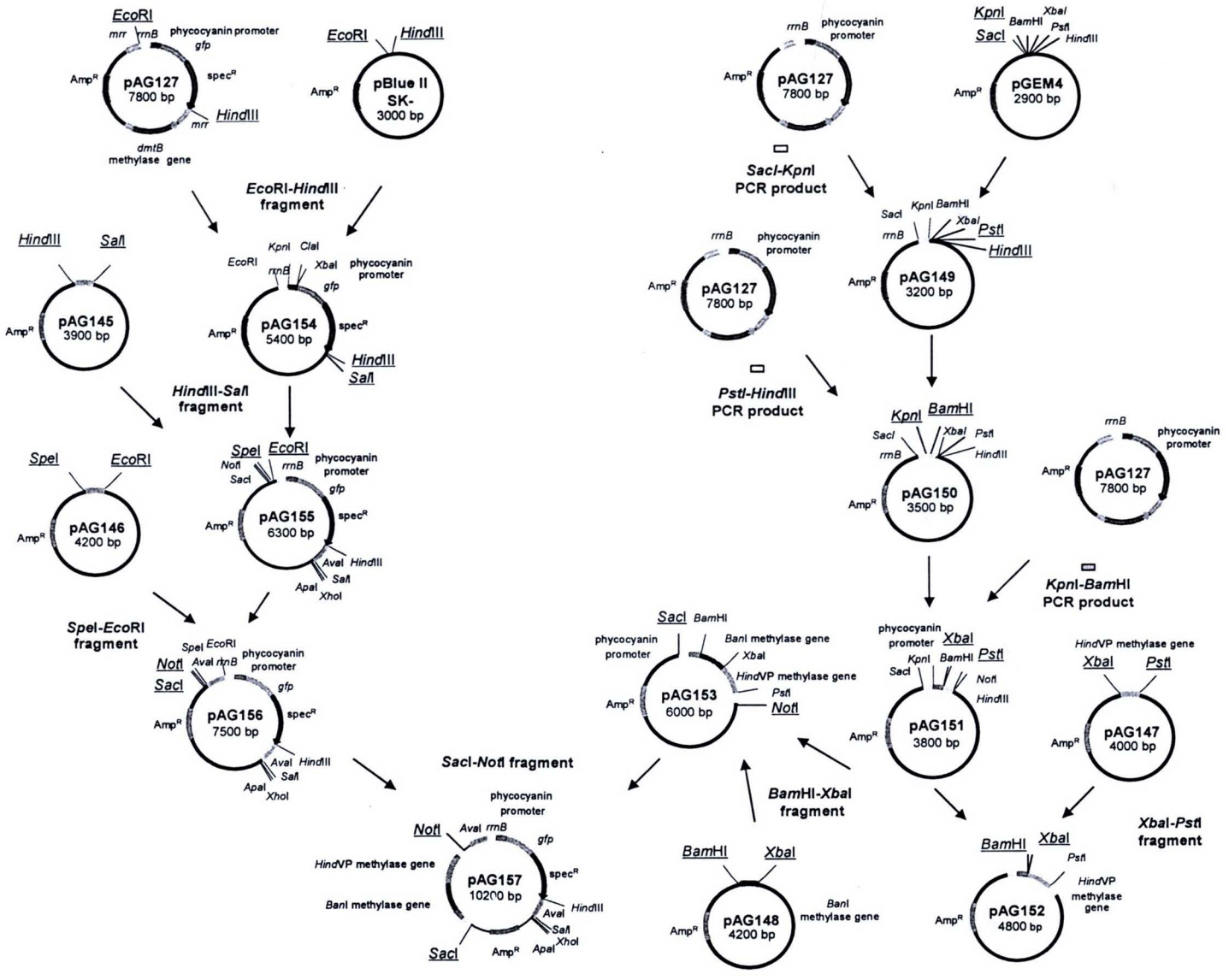
3.3 การสร้างพลาสมิดที่มี cxpression cassette ของยีนต้านยา spectinomycin และ *gfp* อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter

เพื่อให้ยีนที่ใช้คัดเลือกมีการแสดงออกได้ดีใน *Spirulina* ในการทดลองได้ทำการสร้าง expression cassette ที่มียีนต้านยา spectinomycin และ *gfp* 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 จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pBluescriptII SK⁻ ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Hind*III เช่นเดียวกัน ได้พลาสมิดใหม่ชื่อว่า pAG154 ซึ่งมีขนาดประมาณ 5400 bp

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

เพื่อที่จะให้พลาสมิดที่สร้างได้สามารถแทรกเข้าไปในจีโนมของ *Spirulina* ได้อย่างเสถียร และไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของ *Spirulina* ในการทดลองได้ทำการสร้างพลาสมิดที่มี expression cassette ของยีนต้านยา spectinomycin และยีน *gfp* แทรกอยู่ระหว่างชิ้นดีเอ็นเอของยีนสร้าง restriction enzyme ซึ่งใช้เป็น homologus sequence สำหรับให้ expression cassette แทรกเข้าไปในจีโนม *Spirulina* ได้แบบ double homologous recombination ซึ่งได้มีการศึกษาพบว่าการเข้าไปแทรกของพลาสมิดแบบ double homologous recombination จะมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายดีเอ็นเอดีกว่า และได้ transformant ที่มีความเสถียรกว่าแบบ single homologous recombination [45, 46] การสร้างพลาสมิดทำโดยการตัดยีนสร้างเอนไซม์ restriction *Ava*I ส่วนแรก ขนาด 900 bp ออกจากพลาสมิด pAG145 ที่สร้างได้จากข้อ 3.1 ด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Sal*I แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pAG154 ที่สร้างได้จากข้อ 3.3 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Sal*I เช่นเดียวกัน ได้พลาสมิดใหม่ชื่อว่า pAG155 ซึ่งมีขนาดประมาณ 6300 bp จากนั้นทำการตัดยีนสร้าง restriction enzyme *Ava*I ส่วนที่สอง ขนาดประมาณ 1200 bp ออกจากพลาสมิด pAG146 ที่สร้างได้จากข้อ 3.1

ด้วยเอนไซม์ *Spe*I และ *Eco*RI แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pAG155 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เดียวกัน ได้พลาสมิดใหม่ชื่อว่า pAG156 ซึ่งมีขนาดประมาณ 7500 bp จากนั้นทำการตัด expression cassette ของยีนสร้างเอนไซม์ methylase *Ban*I และ *Hind*VP ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter และ terminator ในข้อ 3.2 ขนาดประมาณ 2700 bp ออกจากพลาสมิด pAG153 ด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Not*I แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pAG156 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Not*I ได้พลาสมิดใหม่ชื่อว่า pAG157 ซึ่งมีขนาดประมาณ 10200 bp โดยพลาสมิด pAG156 และ pAG157 เป็นพลาสมิดที่ได้นำมาใช้สำหรับการส่งถ่ายเข้าสู่ *Spirulina* ในข้อ 6



รูปที่ 1 แสดงการขั้นตอนการสร้างพลาสมิดที่ใช้สำหรับการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina*

4. การสกัด crude extract จาก *Spirulina*

เพื่อใช้ crude extract ซึ่งมี restriction enzymes ของ *Spirulina* สำหรับทดสอบผลของยีน methylase ต่อการป้องกันพลาสมิดจากการถูกย่อยด้วย restriction enzyme ในการทดลองได้ทำโดยการเลี้ยงเซล *Spirulina* ในอาหารเหลว Zarrouk ที่อุณหภูมิ 30 ^{0}C ความเข้มแสง 80 $Em^{-2}S^{-1}$ เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm จนกระทั่งเซลเจริญเติบโตอยู่ในช่วง exponential (OD_{560} ~ 0.4) ทำการกรองเซลแยกออกจากอาหาร จากนั้นทำการล้างเซลด้วย DNase buffer (40 mM Tris-HCl [pH7.4], 6 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$ และ 0.1% Triton X-100) และน้ำกลั่น 3 ครั้ง เพื่อลดปริมาณเอนไซม์ nuclease ที่เกาะติดที่ผนังเซลของ *Spirulina* เนื่องจากได้มีรายงาน พบว่า *Spirulina* มีเอนไซม์ nuclease อยู่ที่ผนังเซล [62, 63] และการล้างเซลด้วย DNase buffer หรือน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง สามารถช่วยลดปริมาณเอนไซม์ nuclease ให้น้อยลงได้ [64] จากนั้นทำการบดเซลเพื่อสกัด crude extract ที่มี restriction enzme ออกจาก *Spirulina* แล้วละลายเซลที่ได้ในสารละลาย sodium phosphate buffer (20 mM sodium phosphate buffer, 7 mM β–mercaptoethanol, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ 1 mM EDTA, pH 8.0) 500 µl จากนั้นนำไปแยกส่วนใสโดยการ centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเก็บเฉพาะส่วนใส ซึ่งจะได้ crude extract ที่มี restriction enzymes ของ *Spirulina* สำหรับใช้ทดสอบผลการ methylation ต่อไปในข้อ 5

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

เพื่อทดสอบว่า ยีนสร้างเอนไซม์ methylase *Ban*I และ *Hind*VP ที่สร้างได้ในพลาสมิด pAG157 สามารถป้องกันพลาสมิดจากการถูกย่อยด้วย restriction enzymes ใน *Spirulina* ในการทดลองได้นำพลาสมิด pAG157 ไปย่อยด้วย restriction enzymes ทางการค้า *Ban*I และ *Bsa*HI (isoschizomer ของเอนไซม์ *Hind*VP) และ crude extract ของ *Spirulina* สำหรับการย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้า ในการทดลองได้ทำใน reaction ที่ประกอบด้วย 1xNEB buffer 4 1xBSA พลาสมิด pAG157 และ 10 U restriction enzyme *Ban*I หรือ *Bsa*HI (Biolab, England) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลโดยวิธี gel electrophoresis สำหรับการย่อยด้วย crude extract ของ *Spirulina* ในการทดลองได้ทำใน reaction ที่ประกอบด้วย 1xNEB buffer 1-4 1xBSA พลาสมิด pAG157 และ crude extract ของ *Spirulina* แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจสอบผลการย่อยโดยวิธี gel electrophoresis

6. การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *S. platensis* C1 ด้วยวิธี electroporation

เพื่อศึกษาการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *S. platensis* C1 ด้วยวิธี electroporation การทดลองทำโดยนำเซล *Spirulina* ที่เลี้ยงไว้มาปั่นแยกและล้างเซลด้วย 1 mM HEPES pH 7.2 นับเซลด้วย Haemacytometer และปรับเซลให้มีความเข้มข้นเป็น 7×10^6 trichome/ml ด้วย 1 mM HEPES pH 7.2 ผสมเซล 40 µl กับพลาสมิด pAG156 หรือ pAG157 ความเข้มข้น 10 µg ที่อยู่ใน HEPES pH 7.2 100 µl ใน cuvette (ความกว้างระหว่าง electrode 2 mm) แช่ในน้ำแข็งประมาณ 10 นาที นำไปกระตุ้นด้วยความแรงสนามไฟฟ้า (field strength) 4 kV/cm ด้วยเครื่อง Gene pulser & Pulse controller (BioRad) โดยปรับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (voltage) 0.8 kV ความต้านทาน 200 Ω ความจุไฟฟ้า (capacitance) 25 µF กระตุ้นแบบ single pulse เป็นเวลา 5 ms แล้วเติม Modified Zarrouk's medium ที่มี $NaHCO_3$ 5 g/l 1 ml ทันที บ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{0}C โดยให้แสงที่ความเข้ม 10 µE m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำเซล 100 µl มา spread ลงบนอาหารแข็ง Zarrouk's agar medium ($NaHCO_3$ 16.8 g/l) และเลี้ยงในอาหารเหลวที่มียา spectinomycin ความเข้มข้น 0 0.5 1 และ 2 µg/ml spectinomycin เป็นยาที่ทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนโดยการจับที่ไรโบโซมชนิด 30s มีผลทำให้ tRNA ไม่สามารถเคลื่อนที่จากตำแหน่ง A (Aminoacyl) ไปยัง P (Peptidyl) เพื่อสังเคราะห์โปรตีนได้ จึงทำให้เซลตาย ซึ่งการทำงานของ spectinomycin สามารถถูกยับยั้งได้โดยปฏิกิริยา adenylation (การส่งถ่ายหมู่ adenosyl ไปยังหมู่ hydroxyl ของ spectinomycin) ของเอนไซม์ adenyltransferase ที่สร้างมาจากยีนต้านยา spectinomcyin หรือการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีน *rpsE* ซึ่งทำหน้าที่สร้างโปรตีนชนิด S5 ที่เป็นส่วนประกอบของไรโบโซมชนิด 30s ซึ่งมีผลทำให้ spectinomycin ไม่สามารถไปจับที่ไรโบโซมชนิด 30s ได้ [65] จากนั้นบ่มเซลที่อุณหภูมิ 30 ^{0}C ในที่มีความเข้มแสง 10 µE m^{-2} s^{-1} ทำการคัดเลือก transformant ที่ต้านทานต่อยา spectinomycin และเรืองแสง GFP โดยการตรวจสอบการเจริญเปรียบเทียบกับ control ซึ่งเป็นเซลที่ไม่ได้รับพลาสมิดทำ electroporation และเซลที่ไม่ได้รับพลาสมิดไม่ทำ electroporation

7. การตรวจหาพลาสมิดใน transformant ด้วยวิธี PCR

เพื่อที่จะแสดงให้เห็นว่า transformant ที่ต้านทานต่อยา spectinomycin เป็นผลมาจากการที่เซลได้รับพลาสมิดที่ส่งถ่ายเข้าไป ในการทดลองทำโดยการนำเซลของ transformant ที่คัดเลือกได้มาสกัด total genomic DNA เพื่อใช้เป็น template (กรณีทำ negative control ใช้เซลของ *Spirulina* ที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด) โดยใช้ spec (F) primer 5'-TCACGCAACTGGTCCAGAAC-3' และ spec (R) primer 5'-CGACTACCTTGGTGATCTCG-3' ใน reaction ขนาด 50 µl ซึ่งประกอบด้วย 0.25 mM dNTP 1x PCR buffer 0.4 pmol primer 1 mM $MgCl_2$ และ 5 Units Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) ในเครื่อง PerkinElmer (USA)

โดยมีสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนคือ 94 ^{0}C 2 นาที จำนวน 1 รอบ 94 ^{0}C 30 วินาที 55^{0}C 30วินาที และ 72^{0}C 1.0 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72^{0}C 7 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นทำการตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

ขั้นตอนการวิจัย	เดือนที่ 1-3	เดือนที่ 4-6	เดือนที่ 7-9	เดือนที่ 10-12
1. การสร้างพลาสมิดที่ใช้สำหรับการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* 1.1การสร้างพลาสมิดที่มี cassette ของยีนต้านยา spectinomycin อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter 1.2การสร้างพลาสมิดที่มียีน methylase เพื่อป้องกันการถูกย่อยจาก restriction enzyme ใน *Spirulina* 1.3การสร้างพลาสมิดที่สามารถแทรกเข้าไปยับยั้งการทำงานของยีนสร้าง restriction enzyme ในโครโมโซมของ *Spirulina* แบบ double homologous recombination	←	→		
2. การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Spirulina* ด้วยวิธี electroporation		←	→	
3. การตรวจหาพลาสมิดใน transformant ด้วยวิธี PCR			←	→
4. การวิเคราะห์ transformant ด้วยวิธี Southern blot analysis			←	→
5. การทดสอบความเสถียรของ transformant				← →
สรุปและเขียนรายงาน				← →

ผลสำเร็จของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากการศึกษาวิจัยจะทำให้ทราบถึง แนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* และได้ลักษณะของพลาสมิดที่เหมาะสมที่สามารถป้องกันการถูกย่อยจาก restriction enzyme ที่ตรวจพบใน *Spirulina* และสามารถแทรกเข้าไปในโครโมโซมของ *Spirulina* ได้อย่างเสถียร ซึ่งข้อมูลและวิธีการที่ได้จะนำไปสู่การพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่มีความเสถียร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานวิจัยที่ศึกษาอณูพันธุศาสตร์ของ *Spirulina* และอุตสาหกรรมการ

เพาะเลี้ยง *Spirulina* ที่ต้องการใช้ระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาระบบชีววิทยาต่าง ๆ ของ *Spirulina* ตลอดจนการใช้ *Spirulina* เป็นเซลเจ้าบ้านสำหรับการผลิต heterologous protein และการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มการผลิตสารชีวเคมีมูลค่าสูงต่างๆในระดับอุตสาหกรรม