

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนายีนคัดเลือกเพื่อใช้ในการปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน
สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสปีรูลินาให้มีความเสถียร

Development of selectable maker for stable transformation improvement
in cyanobacterium *Spirulina*

คณะผู้วิจัย

นางวัฒนา เจียมทน

นางสุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์

นางสาวสุดารัตน์ ดุลสวัสดิ์

รายงานการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณ ประจำปี 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ประจำปีงบประมาณ 2552

ชื่อโครงการวิจัย (Research Project)

ภาษาไทย การพัฒนายีนคัดเลือกเพื่อใช้ในการปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน
สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสไปรูลินาให้มีความเสถียร

ภาษาอังกฤษ Development of selectable maker for stable transformation improvement
in cyanobacterium *Spirulina*

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานวิจัย

สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
วิทยาเขตบางขุนเทียน
49 ซอยเทียนทะเล 25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน
กรุงเทพฯ 10150

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

นางวัฒนา เจียมตน
(Ms Wattana Jeamton)

ตำแหน่ง

นักวิจัย

สถานที่ทำงาน

สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน
49 ซอยเทียนทะเล 25 ถนนบางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม
เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

โทรศัพท์

0-2470-7513 โทรสาร 0-2452-3455

Email:

wattana@pdti.kmutt.ac.th
w_chetkul@yahoo.com

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัยที่เสนอ คิดเป็น 60 % ของงานวิจัยที่เสนอ

ผู้ร่วมโครงการวิจัย	นางสุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์ (Ms Supapon Cheevadhanarak)
ตำแหน่ง	รองศาสตราจารย์ ระดับ 6
สถานที่ทำงาน	สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี 49 ซอยเทียนทะเล 25 ถนนบางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์	0-2470-7469 โทรศัพท์ 0-2452-3455
E-mail:	supapon.che@kmutt.ac.th supaponche@yahoo.com
ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัยที่เสนอ คิดเป็น 10% ของงานวิจัยที่เสนอ	
ผู้ร่วมโครงการ	นางสาวสุดารัตน์ ดุลสวัสดิ์ (Ms Sudarat Dulsawat)
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยนักวิจัย
สถานที่ทำงาน	สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน 49 ซอยเทียนทะเล 25 ถนนบางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์	0-2470-7510 โทรศัพท์ 0-2452-3455
E-mail:	sudarat@pdti.kmutt.ac.th sudarat_d@yahoo.com
ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัยที่เสนอ คิดเป็น 30 % ของงานวิจัยที่เสนอ	

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณโครงการวิจัยหมวดเงินอุดหนุน ประจำปี
งบประมาณ 2552 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2551 ถึงเดือน
กันยายน 2552

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการค้นหา ยีน 16S rRNA บนฐานข้อมูลจีโนมของ *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 เพื่อนำมาใช้ในการพัฒนา ยีนคัดเลือกเพื่อพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* พบว่ามี ยีน 16S rRNA 2 ชุดบน scaffold08 และ scaffold58 ในลักษณะ operon ของ 16S rRNA-trRNA Ile-trRNA Ala-23S rRNA และได้ นำข้อมูลของ ยีน 16S rRNA บน scaffold58 และบริเวณใกล้เคียงมาพัฒนา ยีนคัดเลือกโดยการเปลี่ยนแปลงเบสของ ยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง 1130 จาก C₁₁₃₀ ไปเป็น G₁₁₃₀ และนำ ยีนคัดเลือกดังกล่าวมาพัฒนาพลาสมิดเพื่อใช้ในการส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ *Spirulina* จากการติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ transformant ที่ได้รับพลาสมิดที่มี ยีนคัดเลือก 16S rRNA ที่ถูกดัดแปลงเทียบกับเซลล์ transformant ที่ได้รับพลาสมิดควบคุมที่มี ยีน 16S rRNA ที่ไม่ได้ถูกดัดแปลงบนอาหารคัดเลือกที่มียา spectinomycin เข้มข้น 0.5 µg/ml ไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของเซลล์ transformant อย่างไรก็ตามเนื่องจากเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับพลาสมิดก็สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกที่มียา spectinomycin เข้มข้น 0.5 µg/ml เช่นกัน ซึ่งอาจเกิดจากยาที่ใช้มีประสิทธิภาพไม่ดี จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่า ยีนคัดเลือกที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *Spirulina* ได้หรือไม่

คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

ภาษาไทย ยีนคัดเลือก ขาปฏิชีวนะ อาร์เอ็นเอโอเปอรอน สไปรูลิน่า ระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอ การกลายพันธุ์

ภาษาอังกฤษ selectable marker, antibiotic, spectinomycin, 16S rRNA, rRNA operon, *Spirulina* transformation, mutation

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	4
บทคัดย่อ	5
สารบัญเรื่อง	6
สารบัญรูป	7
สารบัญตาราง	9
บทนำ	9
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	9
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	11
ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	10
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	14
วิธีดำเนินการวิจัย	17
เชื้อและพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง	17
เทคนิคทางด้าน molecular biology	17
การค้นหาลำดับ ribosomal RNA (rRNA) operon ของ <i>Spirulina</i> C1 จากฐานข้อมูลจีโนม	17
การออกแบบ primer เพื่อใช้ในการ mutagenesis ยีน 16S rRNA ของ rRNA operon ของ <i>Spirulina</i> C1 ที่ตำแหน่ง C ₁₁₃₀	17
การทำ mutation ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง C ₁₁₃₀	18
การสร้างพลาสมิดที่มี cassette ที่มียีน GFP แทรกอยู่ระหว่างบริเวณ upstream และ ยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate	19
การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ <i>Spirulina</i> ด้วยวิธี electroporation	20
การตรวจสอบ transformant โดยเทคนิค colony PCR	20
ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์	22
การค้นหาลำดับ ribosomal RNA (rRNA) operon ของ <i>Spirulina</i> C1 จากฐานข้อมูลจีโนม	22
การสร้างพลาสมิดที่มี cassette ที่มียีน GFP แทรกอยู่ระหว่างบริเวณ upstream และ ยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate	24
การส่งถ่ายพลาสมิดและคัดเลือก transformant	26
การตรวจสอบ transformant โดยเทคนิค colony PCR	27
สรุปและข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	30

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของ <i>E. coli</i> กับ <i>Spirulina</i> C1	12
รูปที่ 2 Structure of spectinomycin and its binding domain in 16S rRNA	14
รูปที่ 3 การจัดเรียงตัวของยีน 16S rRNA บนจีโนมของ <i>Spirulina</i> C1	22
รูปที่ 4 พลาสมิดต่างๆที่สร้างเพื่อใช้ในการพัฒนาพลาสมิดที่มียีนคัดเลือก 16S rRNA ที่ถูกดัดแปลง	25
รูปที่ 5 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ใช้ในการสร้างยีน 16S rRNA ที่มีการดัดแปลงที่ตำแหน่ง C ₁₁₃₀ ไปเป็น G ₁₁₃₀	26
รูปที่ 6 การติดตามเซลล์ transformant บนอาหารแข็งที่มียา	27
รูปที่ 7 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ยีน GFP ในเซลล์ transformant	28

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 primer ที่ใช้ในการสร้าง cassette ที่มียีน GFP แทรกอยู่ระหว่างบริเวณ upstream และยีน 16S rRNA ของ <i>Spirulina</i> C1 ที่ถูก mutate	18
ตารางที่ 2 การจัดเรียงตัวของยีน 16S rRNA บนจีโนมของ <i>Spirulina</i> C1	23

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันได้มีการนำ *Spirulina* มาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในด้านอาหารเสริมสุขภาพของมนุษย์ และอาหารสัตว์ เนื่องจากมีสารอาหารที่สำคัญหลายชนิดในปริมาณที่สูง เช่น โปรตีน กรดไขมันจำเป็น ไมอิมิตัว แกมมาลิโนเลนิก ไบโตามิน และเกลือแร่ อีกหลายชนิด (Ciferri, 1982) ใน *Spirulina* ยังมีสารชีวเคมีหลายชนิดที่มีรายงานว่ามีความสำคัญต่อสุขภาพและมีประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น phycocyanin polysaccharide และ sulfolipids ซึ่งช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน ลดภาวะการติดเชื้อ ป้องกันการเกิดมะเร็ง ลดการสะสมไขมันในเส้นเลือด ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และเป็นสารต้านไวรัส (Farooq *et al.*, 2004; Subhashini *et al.*, 2004; Kaji *et al.*, 2004; 2002; Hernandez-Corona *et al.*, 2002 ; Pinero Estrada *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่า *Spirulina* สามารถที่จะช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันและต้านทานการติดเชื้อในสัตว์ (AI-Batshan *et al.*, 2001; Qureshi *et al.*, 1996; Venkataraman *et al.*, 1994) จึงได้มีความสนใจที่จะใช้ *Spirulina* ในการเลี้ยงสัตว์เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะซึ่งอาจทำให้สัตว์นั้นคือต่อยา และอาจเกิดการสะสมของยาปฏิชีวนะในสัตว์ และเนื่องจาก *Spirulina* เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีการสังเคราะห์แสงได้เช่นเดียวกับพืช มีการเจริญเติบโตที่ง่ายไม่ซับซ้อน การพัฒนาการเพาะเลี้ยงมีไปจนถึงระดับอุตสาหกรรม (Belay, 1990) ทำให้ *Spirulina* ได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตสารชีวเคมีมูลค่าสูงในทางการค้า และมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อใช้ผลิตสารเคมีมูลค่าสูง ถึงแม้จะมีรายงานถึงการใช้ประโยชน์ของ *Spirulina* อย่างมากมาย แต่ความรู้ความเข้าใจทางด้านสรีระวิทยาต่างๆของ *Spirulina* โดยเฉพาะการผลิตสารชีวเคมีต่างๆของ *Spirulina* มีค่อนข้างจำกัด สาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งคือการขาดระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอซึ่งเป็นเครื่องมือที่สำคัญที่จะช่วยให้การศึกษาทางสรีระวิทยาต่างๆของ *Spirulina* มีความก้าวหน้ามากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ในปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาเพื่อหาข้อมูลทางด้านจีโนมของ *Spirulina* ทำให้การพัฒนาการส่งถ่ายดีเอ็นเอของสาหร่ายชนิดนี้มีความจำเป็นมากยิ่งขึ้น เพื่อนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาถึงคุณสมบัติและหน้าที่ของยีนต่างๆที่ได้มาจากข้อมูลจีโนม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งหวังที่จะพัฒนายีนคัดเลือกรที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการสร้างพลาสมิดเพื่อนำมาปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพและความเสถียร เพื่อนำไปใช้เป็นเครื่องมือที่สำคัญในการศึกษาสรีระวิทยา ชีวเคมี ตลอดจนอนุพันธุศาสตร์ ของ *Spirulina* เพื่อให้การศึกษาเหล่านี้ก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มศักยภาพของการใช้ประโยชน์จาก *Spirulina* เพิ่มขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อที่จะพัฒนายีนคัดเลือกรสำหรับการสร้างพลาสมิดที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina* ให้มีความเสถียร

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* ได้มีการพัฒนากันมาอย่างต่อเนื่อง แต่ระบบที่พัฒนาได้ยังไม่สมบูรณ์ ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายดีเอ็นเอต่ำ และ transformant ที่ได้ไม่เสถียร (Kawata *et al.*, 2004; Dulsawat, 2002; Toyamizu *et al.*, 2001; Chotayaporn, 1995 ; Kanoksilp, 1993) ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีทางด้านสาหร่าย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีเป็นหน่วยงานหนึ่งที่มีการศึกษาวิจัยเพื่อที่จะพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* มาอย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา พบว่าวิธีการส่งถ่ายโดย electroporation เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด และได้ทำการพัฒนาพลาสมิดหลายชนิดเพื่อใช้ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอ โดยที่พลาสมิดที่พัฒนาขึ้นมีทั้งที่สามารถแทรกเข้าไปแบบ single recombination (Cheevadhanarak, unpublished ; Kanoksilp, 1993; Chotayaporn, 1995) และ double recombination (Dulsawat, 2002) โดยใช้ยีนต้านยาปฏิชีวนะในการคัดเลือกภายใต้การควบคุมของ promoter ของ *Spirulian* เอง และของแบคทีเรีย ตามลำดับพบว่า transformant ที่ได้ไม่เสถียร ซึ่งความไม่เสถียรดังกล่าวอาจเกิดเนื่องจากความสามารถของ promoter ที่ใช้ในการควบคุมยีนต้านยาปฏิชีวนะไม่สูงพอ ทำให้ transformant สามารถโตได้เพียงช่วงระยะเวลาหนึ่งแล้วตายไปในที่สุด หรืออาจเกิดจากยีนต้านยาปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกไม่เหมาะสม โปรตีนที่สร้างจากยีนดังกล่าวอาจไม่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่ใช้เลี้ยง *Spirulina* เช่นเป็นสภาวะที่เป็นด่างสูงเป็นต้น ซึ่งปัญหาดังกล่าวพบได้เช่นเดียวกันในการพัฒนาระบบส่งถ่ายดีเอ็นเอของ archaeobacteria ที่มีสภาวะในการเจริญเติบโตค่อนข้างกดดัน เช่นในสภาวะที่อุณหภูมิสูง ความเค็มสูง หรือ ในสภาวะที่ pH ต่ำมาก ๆ เป็นต้น ซึ่งสภาวะกดดันดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมหรือทำลายโปรตีนต้านยาปฏิชีวนะได้ ซึ่งการแก้ปัญหของการขาดยีนคัดเลือกที่เหมาะสมเช่นนี้สามารถทำได้โดยการการสร้าง mutant ที่สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะแล้วคัดเลือกยีนที่ทำให้ mutant นั้นสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะมาใช้เป็นยีนติดตามในการพัฒนาระบบส่งถ่ายดีเอ็นเอใน wild type หรืออาจปรับปรุงยีนคัดเลือกโดยการ mutate ยีนที่ถอดรหัสสร้างโปรตีนที่เป็นเป้าหมายของยาปฏิชีวนะที่จะใช้คัดเลือก ทำให้ยาปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกไม่สามารถขัดขวางการทำงานของโปรตีนนั้นได้ เช่นการ mutate ยีน *gryB* ที่ถอดรหัสสร้างเอนไซม์ DNA gyrase subunit B ที่เป็นเป้าหมายของยา novobiocin มาใช้ในการพัฒนาพลาสมิดเพื่อใช้ในการคัดเลือก transformant และเป็นเครื่องมือในการศึกษาทางด้าน genetic system ของ halophilic archaeobacteria (Holmes and Dyal-Smith, 1990; 1991; Holmes *et al.*, 1991) หรือการทำ mutate ยีนของ *E. coli* ที่ถอดรหัสสร้าง 16S rRNA ซึ่งเป็นเป้าหมายของยา spectinomycin และ 23 S rRNA ซึ่งเป็นเป้าหมายของยา macrolide, lincosamide, streptogramin type B ตามลำดับ (Sigmund *et al.*, 1984) เป็นต้น ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้มีรายงานการปรับปรุงยีนคัดเลือกโดยการทำ mutate ยีน *rps12* ที่ถอดรหัสสร้าง ribosomal S12 protein ซึ่งเป็นเป้าหมายของยา streptomycin ทำให้เซลล์ที่มียีนที่ถูก mutate ดังกล่าวสามารถทนต่อยา streptomycin ได้ อย่างไรก็ตามยีนที่ถูก mutate ดังกล่าวมีลักษณะ recessive เมื่อเทียบกับยีนปกติจึงไม่เหมาะในการนำมาใช้เป็นยีนคัดเลือกทั่วไปแต่

เหมาะสำหรับใช้ในการทำ multiple gene replacement เพื่อสร้าง mutant ที่ปราศจากยีนด้านยาปฏิชีวนะ (Matsuoka *et al.*, 2001)

จากการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Spirulina* ของห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านสาหร่ายพบว่า *Spirulina* C1 มีความไวต่อยา chloramphenicol และ spectinomycin มากที่สุดที่ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g/ml}$ จากการสืบค้นรายงานการวิจัยพบว่ายาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดจะไปขัดขวางการทำงานของ ribosome ในการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ โดยพบว่ายา chloramphenicol จะไปมีผลต่อ 50S subunit ในขณะที่ยา spectinomycin จะมีผลที่ 30S subunit (Weisblum and Davies, 1968) และพบว่าการทำ mutate ยีนที่ถอดรหัสสร้าง 23S (Anderson *et al.*, 1984) และ 16S (Sigmund *et al.*, 1984) ที่เป็นองค์ประกอบของ 50S และ 30S subunit ทำให้เซลล์สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าวได้ และเนื่องจากยีนที่ถอดรหัสสร้าง 16S rRNA เป็นยีนที่มีลำดับเบสที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในทุกๆสิ่งมีชีวิต และจากการศึกษารายงานการวิจัยในหลายๆสิ่งมีชีวิตเช่นใน *Samonella* (O'Conner and Dahlberg, 2002), chloroplast ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* (Harris *et al.*, 1989) และ tobacco plant *Nichtiana tabacum* (Fromm *et al.*, 1987) พบว่าคุณสมบัติด้านทานต่อยา spectinomycin เกิดจากการ mutate ของยีน 16S rRNA โดยเฉพาะเบสที่ตรงกับตำแหน่ง C₁₁₉₂ ของ *E. coli* (Sigmund *et al.*, 1984) จึงเป็นยีนที่น่าสนใจที่จะนำมาปรับปรุงเพื่อพัฒนาเป็นยีนคัดเลือกใน *Spirulina*

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีทางด้านสาหร่ายได้ทำการโคลนยีน 16S RNA จาก *Spirulina* C1 และทำการเปรียบเทียบยีนที่โคลนได้กับ *E. coli* พบว่ามีความเหมือนกันมากกว่า 70% และจากการเปรียบเทียบพบว่าลำดับเบสในบริเวณตำแหน่งที่ 1002-1004 และที่ตำแหน่ง 1129-1131 ของ *Spirulina* C1 (รูปที่1) มีการอนุรักษ์ไว้เช่นเดียวกับที่พบในบริเวณตำแหน่ง 1063-1065 และ 1191-1193 ของ *E. coli* (Brink *et al.*, 1994) ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่มีการจับคู่สมกันเป็น upper stem ของโครงสร้าง helix 34 ของ 16S rRNA (รูปที่2) และเป็นบริเวณที่ spectinomycin เข้ามาจับ โดยเฉพาะที่ตำแหน่ง C₁₁₃₀ ซึ่งเป็นเบสที่ตรงกับตำแหน่ง C₁₁₉₂ ของ *E. coli* ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เมื่อถูก mutate แล้วจะทำให้เกิดคุณสมบัติด้านยาสูงที่สุดใน *E. coli* (รูปที่1) ดังนั้นทางห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีด้านสาหร่ายจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาเป็นคัดเลือกโดยการทำ mutation ยีนที่ถอดรหัสสร้าง 16S rRNA ของ *Spirulina* C1 ที่ตำแหน่ง C₁₁₃₀ จากนั้นนำยีนคัดเลือกที่พัฒนาได้มาใช้สร้างพลาสมิดเพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอให้มีความเสถียรต่อไป

รูปที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของ *E. coli* กับ *Spirulina* C1

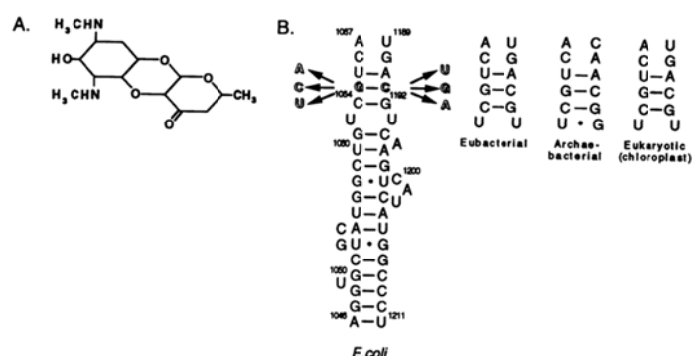
ลำดับเบสที่ถูกแรเงาแสดงถึงลำดับเบสที่มีการอนุรักษ์ไว้ในบริเวณ upper stem ของโครงสร้าง helix 34 ของ 16S rRNA ของ *E. coli* (Brink *et al.*, 1994) เบส C ที่ตำแหน่ง 1192 ของ *E. coli* คือตำแหน่งที่เมื่อถูก mutate แล้วทำให้เกิดความสามารถต้านยา spectinomycin

<i>E. coli</i>	1: AAATTGAAGAGTTTGTGATCGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAA	60
<i>Spirulina</i> C1	1: -----AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAA	53
	* * *	*** ***** ** *****
<i>E. coli</i>	61: GTCGAACGGTAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGTGCGGACGGGTGAGTAA	120
<i>Spirulina</i> C1	54: GTCGAACGGGCTCTTCGGAGCTA-----GTGGCGGACGGGTGAGTAA	95
	***** *	*****
<i>E. coli</i>	121: TGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAAATACTGAAACGGTAGCTAATACCGCAT	180
<i>Spirulina</i> C1	96: CACGTGAGAATCTGGCTCCCGGTCGGGGACAACAGAGGGAACTTCTGCTAATCCCGGAT	155
	** ** *	** ***** ***** ** *
<i>E. coli</i>	181: AACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATG	240
<i>Spirulina</i> C1	156: GAGCCGAAAGGTAAAAGATTTATCGCCGGGAG-----ATGAGCTCGCGTC	200
	* * *	*** ** *
<i>E. coli</i>	241: GGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA	300
<i>Spirulina</i> C1	201: TGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACTAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGA	260
	***** *	*****
<i>E. coli</i>	301: GGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGACGAGTGG	360
<i>Spirulina</i> C1	261: GGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGACGAGTGG	320
	*****	*****
<i>E. coli</i>	361: GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGATGAAGAAGGCCT	420
<i>Spirulina</i> C1	321: GGAATTTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGGGGAGGAAGGCTC	380
	***** *	***** ** *
<i>E. coli</i>	421: TCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATT	480
<i>Spirulina</i> C1	381: TTGGGTTGTAAACCCCTTTTCTCAAGGAAGAACAATGACGGT-----	424
	* *****	***** * * * *
<i>E. coli</i>	481: GACGTTACCCGAGGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	540
<i>Spirulina</i> C1	425: -----ACTTGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	478
	** *	*****
<i>E. coli</i>	541: GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCA	600
<i>Spirulina</i> C1	479: GAGGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTGTTCAAGTCT	538
	* *****	***** * * * *
<i>E. coli</i>	601: GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTC	660
<i>Spirulina</i> C1	539: GCTGTCAAAGACAGTGGCTTAAGTACTGAAAGGCAGTGGAACTGAACAGCTAGAGTACG	598
	* * * *	***** *****
<i>E. coli</i>	661: GTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACC	720
<i>Spirulina</i> C1	599: GTAGGGGACAGAGGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACC	658
	***** *	*****
<i>E. coli</i>	721: GGTGGCGAAGGCGGCCCTTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA	780
<i>Spirulina</i> C1	659: GGTGGCGAAGCGCTCTGCTGGGCGTAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCG	718
	***** *	*****
<i>E. coli</i>	781: AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTGCC	840
<i>Spirulina</i> C1	719: AATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTAACGATGGAAGCTAGGTGTAGCCTGT	778
	** *****	***** ** *
<i>E. coli</i>	841: CTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACG-CGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGC	899
<i>Spirulina</i> C1	779: ATCGACCCGGGCTGTGCCGAAGCTAACGCGTTAAGTTTCCGCGCTGGGGAGTACGCACGC	838
	* * * *	*****
<i>E. coli</i>	900: AAGGTTAAAGCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA	959
<i>Spirulina</i> C1	839: AAGTGTGAAAGCTCAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAA	898
	*** *	*****
<i>E. coli</i>	960: TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCAGAGATGG	1019
<i>Spirulina</i> C1	899: TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACAGGGCTTGACATGTCGGAATCTTGGTGAAGGCC	958
	*****	*****

```

E coli      1020:ATTGGTGCCTTCGGGAACGTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTG 1079
Spirulina C1 959:GAGAGTGCCTTCGGGAGCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTG 1018
          ***** * * * *****
E coli      1080:AAATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCTTATCTTTTGTGCCAGCGGTCCGG 1139
Spirulina C1 1019:AGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCTCGTCCTTAGTTGCCATCATTCA 1078
          * ***** * * * *****
E coli      1140:CCGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA 1199
Spirulina C1 1079:TGGGCACTTTAGGGAGAC-TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA 1137
          ** * * * *****
E coli      1200:CATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGC 1259
Spirulina C1 1138:CATCATGGCCCTTACGTCTCGGGTGACACACGTACTACAATGGGGGGACAAAGGGTAGC 1197
          ***** * * * *****
E coli      1260:GACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGATTGGAGTCTGCAA 1319
Spirulina C1 1198:CAAGACGCGAGTCTGAGCCAATCCCGTAAACCTCTCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAA 1257
          * ***** * * * *****
E coli      1320:CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACG 1379
Spirulina C1 1258:CTCGCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATCCG 1317
          **** * * ***** * * * *****
E coli      1380:TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGG 1439
Spirulina C1 1318:TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGAAGTTAGCCACGCCCGAAGTCGT 1377
          ***** * * * *****
E coli      1440:TAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTATG--ACTGGGGTGAAGTCG 1497
Spirulina C1 1378:TACTCTAACCGTTCGCGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCG 1437
          ** ***** * * * * * * * *****
E coli      1498:TAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTTA 1542
Spirulina C1 1438:TAACAAGGTA----- 1447
          *****

```



รูปที่ 2 Structure of spectinomycin and its binding domain in 16S rRNA (Brink et al., 1994)

(A) molecular structure of the aminoglycoside spectinomycin. (B) Proposed secondary structure of helix 34 and phylogenetic comparison of the upper stem. The sequence and secondary structure is according to Stern et al. (1988). Based on phylogenetic evidence, the basepairs C₁₀₆₆-G₁₁₉₀ and A₁₀₆₇-U₁₁₈₉ are assumed not to be formed. The upper stem formed by the regions 1063 -1065 and 1191-1193 is suggested to interact with spectinomycin (Fromm et al., 1987). For each group indicated, the consensus sequence of this upper stem is shown. The GIO1-C1192 basepair, which is subjected to mutational analysis, is presented with open letters. The mutations introduced are indicated with arrows.

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะซึ่งนิยมนำมาใช้ในการคัดเลือก transformant ในสายราหยาตีสีเขียวแถมน้ำเงินเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องพิจารณาในการพัฒนาระบบการส่งถ่ายยีน และเนื่องจากสายราหยาตีสีเขียวแถมน้ำเงินมีโครงสร้างและคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียแกรมลบ จึงได้มีการนำยาปฏิชีวนะ และยีนต้านต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในแบคทีเรียมาใช้กับสายราหยาตีสีเขียวแถมน้ำเงินด้วย เช่น ยา spectinomycin และยีนต้านยา *aadA* ซึ่งสร้างเอนไซม์ aminoglycoside adenylyltransferase สามารถนำมาใช้คัดเลือกสายราหยาตีสีเขียวแถมน้ำเงินทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและเป็นเส้นสาย (Wolk et al., 1993) ยา chloramphenicol และยีนต้านยา *cat* ซึ่งสร้างเอนไซม์ chloramphenicol acetyl transferase สามารถนำมาใช้คัดเลือกสายราหยาตีสีเขียวแถมน้ำเงินทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยว (Golden, 1983) และเป็นเส้นสาย (Rouhiainen, 2000 ; Thiel, 1989) ได้เช่นกัน และมีรายงานว่าสามารถนำมาใช้เป็นยีนคัดเลือกสำหรับการคัดเลือก transformant ของ *Spirulina* sp. ได้ (Kawata et al., 2004; Toyomizu et al., 2001 ; Kanoksilp, 1993 ; Chotayaporn, 1995) แต่ transformant ที่ได้ไม่เสถียร สำหรับยา ampicillin สามารถ

นำมาใช้คัดเลือกเฉพาะสายรหัสยีนที่เงินที่เป็นเซลล์เดี่ยว (Murphy *et al.*, 1990 ; Luque *et al.*, 1992) ซึ่งเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเท่านั้น เนื่องจาก ampicillin เป็นยาที่ไม่เสถียรที่อุณหภูมิสูง โดยมี activity เพียงแค่ 24-48 ชม. ภายใต้สภาวะการทดลอง (Sambrook *et al.*, 1989) จึงไม่เหมาะสมกับสายรหัสยีนที่เงินที่เป็นเส้นสายซึ่งมีการเจริญเติบโตช้า tetracycline และ rifampicin เป็นยาที่นำมาใช้คัดเลือก transformant ของ *Anabaena* sp. (Wolk, 1991) แต่เนื่องจากยาทั้งสองชนิดมีความไวต่อแสง จึงทำให้การนำไปใช้งานทำได้จำกัด

จากรายงานของ Weisblum และ Davies (1968) แสดงให้เห็นว่าการทำงานของยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะไปขัดขวางการทำงานของ ribosome มีผลทำให้การสร้างโปรตีนภายในเซลล์ถูกยับยั้ง ซึ่งยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดก็จะไปมีผลกับโครงสร้างหรือโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ ribosome แตกต่างกันไป เช่นยา chloramphenicol erythromycin และ lincomycin จะไปขัดขวางการทำงานของ large ribosomal (50S) subunit ของ ribosome ในขณะที่ยา streptomycin spectinomycin และ tetracycline จะไปขัดขวางการทำงานของ small ribosomal (30S) subunit ของ ribosome

Bilgin และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษาถึงการยับยั้งการสร้างโปรตีนโดยยา spectinomycin พบว่า spectinomycin จะไปขัดขวางการจับกันระหว่าง ribosome กับ elongation factor G (EF-G) ในขั้น polypeptide elongation มีผลทำให้การสร้างโปรตีนเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ ในปี 1983 Mark และคณะ พบว่าการทนต่อ spectinomycin ใน *E. coli* มีสาเหตุเกิดจากการเกิด mutation ของ rRNA operon ซึ่งต่อมา Sigmund *et al.* (1984) พบว่า ความสามารถในการทนต่อ spectinomycin ดังกล่าวเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบสที่ตำแหน่ง G₁₁₉₂ ของ 16S rRNA ไปเป็น A₁₁₉₂

Makosky และ Dahlberg (1987) พบว่าการทำ mutation ที่ตำแหน่ง C₁₁₉₂ ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ *E. coli* อย่างไรก็ดีพบว่าความสามารถในการทนต่อยาจะสูงที่สุดเมื่อเปลี่ยน เบสจาก C₁₁₉₂ ไปเป็น G₁₁₉₂ นอกเหนือจากการทำ mutation ที่ ตำแหน่ง C₁₁₉₂ จะมีต่อความสามารถต้านทานยา spectinomycin แล้ว Johanson และ Hughes (1995) พบว่าการทำ mutation ของ 16S rRNA ที่ตำแหน่ง C₁₀₆₆ สามารถทำให้เกิดคุณสมบัติต้านยา spectinomycin ได้เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ดีความสามารถทนต่อยาจะต่ำกว่าเมื่อทำ mutation โดยการเปลี่ยนเบสจาก C₁₁₉₂ ไปเป็น G₁₁₉₂ และพบว่า mutant ดังกล่าว จะไวต่อยาปฏิชีวนะ fusidic acid เพิ่มขึ้น ในขณะที่ mutant ที่ถูก mutate ที่ C₁₁₉₂ ไปเป็น G₁₁₉₂ จะมีความไวต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าวใกล้เคียงกับ wild type

จากการศึกษาของ Brink และคณะ (1994) พบว่านอกเหนือจากการเกิด mutation ของ 16S rRNA ที่ ตำแหน่ง C₁₁₉₂ จะทำให้เซลล์มีคุณสมบัติทนต่อ spectinomycin การทำ mutation ที่ตำแหน่ง G₁₀₆₄ ซึ่งเป็น nucleotide ที่สามารถจับคู่สมกับ nucleotide ที่ตำแหน่ง C₁₁₉₂ ในบริเวณ upper stem (รูปที่ 2) สามารถทำให้เซลล์มีคุณสมบัติทนต่อ spectinomycin ด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ Brink และคณะ (1994) ได้ทำการวิจัยเพื่อพิสูจน์สมมติฐานที่ว่า การเกิด mutation ของ 16S rRNA ที่ตำแหน่ง G₁₀₆₄ หรือ C₁₁₉₂ ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งเป็นผลทำให้การจับคู่สมของ nucleotide ทั้งสองตำแหน่งไม่สามารถเกิดขึ้นได้ จึงเป็นเหตุให้ spectinomycin ไม่สามารถเกาะกับ 16S rRNA และยับยั้งการสร้างโปรตีนได้

โดยการทำให้ compensatory mutation ที่ nucleotide ตำแหน่งที่ 1064 และ 1192 โดยการเปลี่ยนคู่เบส ตำแหน่งดังกล่าวจาก $G_{1064}C_{1192}$ ไปเป็น $C_{1064}G_{1192}$ หรือ $A_{1064}U_{1192}$ หรือ $U_{1064}-A_{1192}$ (รูปที่ 2) พบว่าความสามารถทนต่อยา spectinomycin ยังคงอยู่ ทำให้สามารถสรุปได้ว่าการจับคู่สมกันของ nucleotide G และ C ที่ตำแหน่ง 1064 และ 1192 ในบริเวณ upper stem ของ helix 34 เท่านั้นที่มีความสำคัญต่อการจับของ spectinomycin

จากการศึกษาถึงความสามารถในการสร้างโปรตีนของ 16S rRNA ที่ถูก mutate ที่ตำแหน่ง G_{1064} ด้วย nucleotide ต่างๆ รวมทั้งการทำให้ compensatory mutation ที่ตำแหน่ง G_{1064} และ C_{1192} พบว่ามีความสามารถใกล้เคียงกับ wild type (16S rRNA ที่ไม่ได้ถูก mutate) ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้บนอาหารที่มียา spectinomycin ยกเว้นกรณีการทำ compensatory mutation จาก $G_{1064}C_{1192}$ เป็น $C_{1064}G_{1192}$ ที่พบว่าความสามารถในการสร้างโปรตีนลดลงเหลือเพียง 20% ของ 16S rRNA ปกติ โดยพบว่า 16S rRNA ที่มีการทำให้ compensatory mutation ที่บริเวณดังกล่าวสามารถที่จะรวมกับ polypeptide อื่นๆได้เป็น 30S subunit แต่ 30S subunit ที่เกิดขึ้นไม่สามารถรวมกับ 50S subunit เพื่อสร้าง ribosome ได้อย่างปกติ ทำให้การสร้างโปรตีนภายในเซลล์น้อยกว่า wild type (Brink และคณะ, 1994)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เชื้อและพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

1.1 แบคทีเรียเอสเชอริเชีย คอไล สายพันธุ์ ดีเอช 5 แอลฟา (*E. coli* DH5 α) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งหรืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไลโซจีนีบรอต (Lysogeny broth, LB) ที่ 37 °C เพื่อใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการเพิ่มปริมาณและเก็บพลาสมิดต่างๆตลอดการทดลอง

1.2 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Zarrouk ที่อุณหภูมิ 30 °C ความเข้มแสง 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เพื่อใช้เป็นแหล่งของของดีเอ็นเอในการโคลนยีน 16S rRNA

1.3 พลาสมิด pMG241 หรือ pAG 69 (Jeamton, 2010) เป็นพลาสมิดที่มียีน *gfp* ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter ของ *S. platensis* C1 ใช้เป็นแหล่งในการโคลน cassette ของยีน GFP ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ phycocyanin promoter

2. เทคนิคทางด้าน molecular biology

เทคนิคทางด้าน molecular biology ส่วนใหญ่ที่ใช้ในงานวิจัยดำเนินการตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989)

3. การค้นหา ribosomal RNA (rRNA) operon ของ *Spirulina* C1 จากฐานข้อมูลจีโนม

ทำการค้นหา rRNA operon จากฐานข้อมูลจีโนมของ *Spirulina* C1 โดยการนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของ *Spirulina* C1 ที่ได้ทำการโคลนและหาลำดับเบสไว้แล้วในห้องปฏิบัติการ มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจีโนมของ *Spirulina* C1 จากนั้นทำการตรวจสอบลำดับเบสบริเวณใกล้เคียงของยีน 16S rRNA เพื่อค้นหาบริเวณที่คาดว่าจะจะเป็น rRNA operon ตลอดจนบริเวณ upstream และ downstream เพื่อนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นยีนคัดเลือก

4. การออกแบบ primer เพื่อใช้ในการ mutate ยีน 16S rRNA ของ rRNA operon ของ *Spirulina* C1 ที่ตำแหน่ง C₁₁₃₀

ทำการออกแบบ primer 4 คู่ (ตารางที่ 1) เพื่อใช้ในการ mutate ยีน 16S rRNA และเพื่อสร้าง cassette ที่มียีน GFP แทรกอยู่ระหว่างบริเวณ upstream และยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate ดังนี้

primer คู่ที่ 1 ประกอบด้วย sense primer คือ N_upstream(F)_BamHI และ antisense primer คือ N_upstream(R)_SalI ที่ออกแบบมาจากลำดับเบสในบริเวณ upstream ของยีน 16S rRNA โดยที่ปลายด้าน 5' ของ sense primer และ antisense primer มีลำดับเบสที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ BamHI และ SalI ตามลำดับ

primer คู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 เป็น primer ใช้ในการ mutate ยีน 16S rRNA ของ *Spirulina* C1 โดยที่ primer คู่ที่ 2 ประกอบด้วย sense primer คือ C_upstream(F)_SalI ที่ออกแบบมาจากลำดับเบสในบริเวณ upstream ของยีน 16S rRNA โดยที่ปลาย 5' ของ sense primer มีลำดับเบสที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ SalI และ antisense primer คือ C₁₁₃₀Mu_16S(R) ที่ออกแบบมาจากบริเวณของยีน 16S rRNA ที่ต้องการ mutate โดยที่ antisense primer นี้ได้มีการเปลี่ยนลำดับเบสเพื่อให้ยีน 16S rRNA ถูก mutate ที่ตำแหน่ง C₁₁₃₀ ให้เป็น G₁₁₃₀

primer คู่ที่ 3 ประกอบด้วย sense primer คือ C₁₁₃₀Mu_16S(F) ที่ออกแบบให้มีลำดับเบสที่ complement กับ C₁₁₃₀Mu_16S(R) เพื่อประโยชน์ในการทำ overlap extension PCR และ antisense primer คือ D_16S(R)_PstI ที่ออกแบบมาจากบริเวณ downstream ของยีน 16S rRNA โดยที่ปลาย 5' ของ antisense primer มีลำดับเบสที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ PstI

primer คู่ที่ 4 ประกอบด้วย sense primer คือ 430_PC promoter (F)_SalI ที่ออกแบบมาจากลำดับเบสในบริเวณ phycocyanin promoter ของ *Spirulina* C1 ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน GFP ในพลาสมิด pMG241 โดยที่ปลาย 5' ของ sense primer มีลำดับเบสที่จำเพาะต่อการตัดด้วยเอนไซม์ SalI และ antisense primer คือ rrnBT1(R)_SalI ที่ออกแบบมาจากลำดับเบสในบริเวณ rrnBT1 terminator ที่อยู่ downstream ของยีน GFP ในพลาสมิด pMG241 โดยที่ปลาย 5' ของ sense primer มีลำดับเบสที่จำเพาะต่อการตัดด้วยเอนไซม์ SalI

ตารางที่ 1 primer ที่ใช้ในการสร้าง cassette ที่มียีน GFP แทรกอยู่ระหว่างบริเวณ upstream และยีน 16S rRNA ของ *Spirulina* C1 ที่ถูก mutate

คู่ primer	Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ตำแหน่งบนจีโนมของ <i>S. platensis</i> C1 ใน scaffold58
1	N_upstream(F)_BamHI	CGCggatccGCATTGGCTTTCAGTCACATCC	357-378
	N_upstream(R)_SalI	ACGCgtcgacGCCAACCATCCATGATTAGG	651-670 (c)
2	C_upstream(F)_SalI	ACGCgtcgacGGTTCTACTTCACGCCTTCC	692-771
	C ₁₁₃₀ Mu_16S(R)	CATGATGACTTGACCTCATCCCCACC	2729-2754 (c)
3	C ₁₁₃₀ Mu_16S(F)	GGTGGGGATGA G GTCAAGTCATCATG	2729-2754
	D_16S(R)_PstI	AAAActgcagTATCATCGCACGATGTCCTG	3109-3128 (c)
4	430_PC promoter(F)_SalI	ACGCgtcgacTACTTAGTAAATTTGAAGAG	-
	rrnBT1(R)_SalI	ACGCgtcgacCTGGCAGTTTATGGC	-

5. การทำ mutation ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง C₁₁₃₀

ทำการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณ upstream จนถึงบริเวณยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate ที่มีขนาด 2062 คู่เบส และชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณยีน 16S ที่ถูก mutate จนถึงบริเวณ downstream ของยีน 16S rRNA ที่มีขนาด 399 คู่เบส ด้วย primer คู่ที่ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยใช้ genomic DNA ของ *Spirulina* C1 เป็น

template และให้ชื่อชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มได้ว่า “5’16S” และ “3’16S” จากนั้นทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอทั้งสองชิ้นด้วยเทคนิค overlap extension PCR โดยใช้ชิ้นดีเอ็นเอ “5’16S” และ “3’16S” อย่างละ 1 μ l เป็น template ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มี บริเวณ upstream และ ยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate ที่ตำแหน่ง C₁₁₃₀ ไปเป็น G₁₁₃₀ ที่มีขนาด 2437 คู่เบส ให้ชื่อ ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ว่า “Mu16S”

ทำการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณ upstream จนถึงบริเวณ downstream ยีน 16S rRNA เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมที่ยีน 16S rRNA ไม่ได้ถูก mutate ด้วย sense primer C_upstream(F)_SalI และ antisense primer D_16S(R)_PstI โดยใช้ ดีเอ็นเอจีโนมของ *Spirulina* C1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ให้ชื่อชิ้นดีเอ็นเอว่า “wt16S”

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณ upstream ของยีน 16S rRNA ด้วย primer คู่ที่ 1 โดยใช้ ดีเอ็นเอจีโนมของ *Spirulina* C1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และให้ชื่อดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ว่า “Up1” ซึ่งมีขนาด 314 คู่เบส

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้น ยีน GFP ที่อยู่ภายใต้การควบคุมด้วย phycocyanin promoter ด้วย primer คู่ที่ 4 โดยใช้พลาสมิด pMG241 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่ 50 μ l ประกอบด้วย คีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 mM พิซีอาร์บัพเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า (PCR buffer 1x) เอนไซม์แท็กดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase; Merck) 1.0 ยูนิต ดีเอ็นเอแม่แบบ (template) 100 ng และใช้ sense และ antisense primer อย่างละ 20-40 pmol โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) ดังนี้

95°C 4 นาที	1 รอบ
95°C 30 วินาที, 52°C 40 วินาที, 68°C 1-3 นาที	35 รอบ
68°C 10 นาที	1 รอบ

6. การสร้างพลาสมิดที่มี cassette ที่มียีน GFP แทรกอยู่ระหว่างบริเวณ upstream และ ยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate

ในเบื้องต้นได้ทำการสร้างพลาสมิดควบคุม ที่มียีน 16S rRNA ของ *Spirulina* C1 ที่ไม่ได้ถูก mutate โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่มีบริเวณ 3’ upstream region และยีน 16S rRNA หรือชิ้น “wt16S” ที่เพิ่มจำนวนได้ในข้อ 5 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM4 ที่ตำแหน่ง SalI และ PstI ได้พลาสมิด pAG 218 จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 5’ upstream ของยีน 16S rRNA หรือชิ้นดีเอ็นเอ Up1 ที่เพิ่มจำนวนได้ในข้อ 5 มาแทรกลงในพลาสมิด pAG 218 ที่ตำแหน่ง BamHI และ SalI ได้พลาสมิด pAG219 นำชิ้นดีเอ็นเอของ GFPcassette ที่เพิ่มจำนวนได้ในข้อ 5 มาแทรกลงในพลาสมิด pAG 219 ที่ตำแหน่ง SalI ได้พลาสมิด pAG 221 และ pAG222 ที่มียีน GFP แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันและตรงกันข้ามกับยีน 16S rRNA ตามลำดับ

ทำการสร้างพลาสมิดที่มียีน 16S rRNA ที่ถูก mutate โดยการตัดชิ้นดีเอ็นเอ Mu16S ที่สร้างและเพิ่มจำนวนได้ในข้อ 5 ด้วยเอนไซม์ *ApaI* และ *NcoI* จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ขนาด 374 คู่เบสซึ่งเป็นบริเวณที่มีเบสที่ถูก mutate จาก C₁₁₃₀ ไปเป็น G₁₁₃₀ ไปแทนที่ชิ้นดีเอ็นเอของ 16S rRNA ที่ไม่ได้ถูก mutate ของพลาสมิด pAG219 ได้พลาสมิด pAG220 นำชิ้นดีเอ็นเอของ GFP cassette ที่เพิ่มจำนวนได้ในข้อ 5 มาแทรกลงในพลาสมิด pAG220 ที่ตำแหน่ง *SaII* ได้พลาสมิด pAG 223 และ pAG224 ที่มี ยีน GFP แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันและตรงกันข้ามกับยีน 16S rRNA ตามลำดับ

7. การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Spirulina* ด้วยวิธี electroporation

ทำการเตรียม *Spirulina* competent เพื่อใช้ในการส่งถ่ายพลาสมิดโดยการนำเซลล์ *Spirulina* C1 ที่เลี้ยงไว้จนกระทั่ง OD₅₆₀ ≈ 0.4-0.5 มาปั่นแยกและล้างเซลล์ด้วย 1 mM HEPES pH 7.2 นับเซลล์ด้วย Haemocytometer และปรับเซลล์ให้มีความเข้มข้นเป็น 7×10^6 trichome/ml ด้วย 1 mM HEPES pH 7.2 จากนั้นทำการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการผสมเซลล์ 40 μ l กับพลาสมิด pAG221 pAG222 pAG223 และ pAG224 ปริมาณ 10 μ g ที่ละลายอยู่ในสารละลาย HEPES pH 7.2 100 μ l 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 μ F กระตุ้นแบบ single pulse เป็นเวลา 5 ms แล้วเติม Modified Zarrouk's medium ที่มี NaHCO₃ 5 g/l จำนวน 860 μ l ทันที บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C โดยให้แสงที่ความเข้ม 10 μ E m⁻² s⁻¹ เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำเซลล์ 100 μ l มา spread ลงบน Zarrouk's agar medium (NaHCO₃ 16.8 g/l) ที่มียา spectinomycin ความเข้มข้น 0 และ 0.5 μ g/ml จากนั้นบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 °C ในที่มีความเข้มแสง 10 μ E m⁻² s⁻¹ เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการเติมอาหารแข็งที่มียา spectinomycin ความเข้มข้น 0 และ 0.5 μ g/ml ลงบนเซลล์ที่เลี้ยงไว้ ทำการคัดเลือก transformant ที่ได้จากการส่งถ่ายพลาสมิด pAG223 และ pAG224 ที่ต้านทานต่อยา spectinomycin โดยการตรวจสอบการเจริญเปรียบเทียบกับ control ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดควบคุม pAG221 และ pAG222 และ control ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดทำ electroporation และเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดไม่ทำ electroporation

8. การตรวจสอบ transformant โดยเทคนิค colony PCR

ทำการตรวจสอบว่า transformant ที่ได้สามารถทนได้บนอาหารที่มียา spectinomycin เกิดจากการแทรกเข้าไปแทนที่ยีน 16S rRNA ในจีโนมของ transformant ด้วยยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate โดยอาศัยยีน GFP ที่ออกแบบให้แทรกอยู่ระหว่างบริเวณ upstream และ ยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate เป็นตัวติดตามด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ sense primer คือ GFP_*XbaI* (F) (5'-GCTCTAGATTTAAG AAGGAGATATACATATGAGTAAAGG-3') และ antisense primer คือ GFP_*PstI* (R) (5'-AACTGCAGGTCTGGACATTTATTTGTATAGTTC-3') ที่ออกแบบมาจากลำดับเบสในบริเวณยีนที่

ถอดรหัสเป็นโปรตีน GFP โดยที่ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้เป็นลำดับเบสที่สามารถจดจำได้โดยเอนไซม์ *XbaI* (TCTAGA) และ *PstI* (CTGCAG) ตามลำดับ ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่ 25 µl โดยใช้ colony ของ transformant เป็นแหล่งของดีเอ็นเอแม่แบบ ประกอบด้วย คีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 5 mM ฟิซาร์บัพเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า (PCR buffer 1x) เอนไซม์แทคคิเอ็นเอโพลิเมอเรส (*Taq* polymerase; Invitrogen) 0.5 ยูนิต แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) 2 mM และใช้ sense และ antisense primer อย่างละ 20 pmol โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) ดังนี้

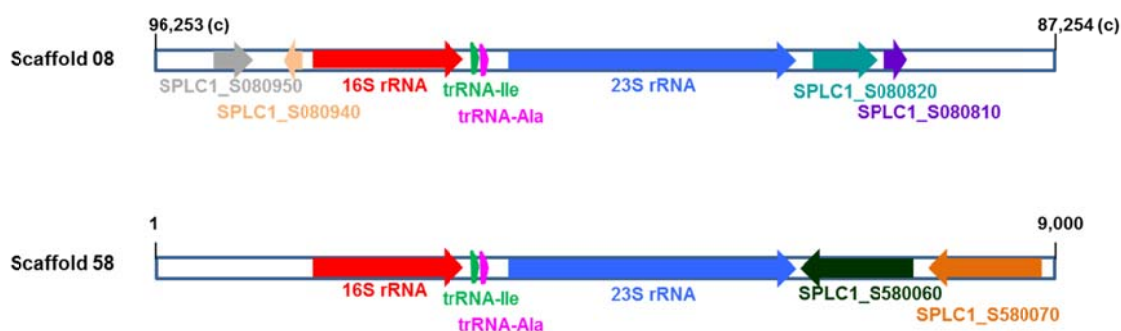
95°C 4 นาที	1 รอบ
95°C 30 วินาที, 52°C 40 วินาที, 72°C 1 นาที	35 รอบ
72°C 10 นาที	1 รอบ

ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

1. การค้นหา ribosomal RNA (rRNA) operon ของ *Spirulina* C1 จากฐานข้อมูลจีโนม

จากการนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของ *S. platensis* C1 ที่ได้โคลนไว้แล้วในห้องปฏิบัติการมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจีโนมของ *S. platensis* C1 พบว่ามียีน 16S rRNA อยู่ 2 ชุดที่มีความเหมือนกัน 100% อยู่บน scaffold08 และ scaffold58 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3 และจากการตรวจสอบบริเวณใกล้เคียงของยีน 16S rRNA ทั้งสองชุดดังกล่าวพบยีนที่ถอดรหัสเป็น tRNA-Ile tRNA-Ala และ 23S rRNA อยู่ในบริเวณ downstream ทำให้สันนิษฐานได้ว่ายีน 16S rRNA ทั้งสองชุดของ *Spirulina* C1 น่าที่จะมีการแสดงออกร่วมกันในลักษณะ rRNA operon ของ 16S rRNA-tRNA Ile-tRNA Ala-23S rRNA อย่างไรก็ตามใน rRNA operon ของ *Spirulina* ทั้ง 2 ชุดนั้นไม่พบยีนที่ถอดรหัสเป็น 5S rRNA ซึ่งมักพบอยู่ในบริเวณ downstream ของยีน 23S rRNA ของ rRNA operon ใน *E. coli* (Codon *et al.*, 1995)

จากการตรวจสอบบริเวณ upstream และ downstream ของ rRNA operon ทั้งสองชุด เพื่อหาบริเวณที่เหมาะสมในการแทนที่ยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการแทรกเข้าไปของยีน GFP ในจีโนมของ *Spirulina* ซึ่งบริเวณดังกล่าวควรเป็นบริเวณที่เมื่อถอดรหัสแล้วควรเป็นโปรตีนที่ไม่สำคัญในการเจริญเติบโตของ *Spirulina* หรือเป็นบริเวณที่ไม่ถอดรหัสเป็นโปรตีนใดๆ ซึ่งจากการตรวจสอบความสามารถในการถอดรหัสเป็นโปรตีนในบริเวณ upstream และ downstream ของ rRNA operon ทั้งสองชุด ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าในบริเวณ upstream ของยีน 16S rRNA ที่อยู่บน scaffold58 ไม่สามารถถอดรหัสให้เป็นโปรตีนใดๆ ดังนั้นจึงเลือกบริเวณดังกล่าวเพื่อใช้ในการออกแบบพลาสมิดที่มี cassette ที่มียีน GFP แทรกอยู่ระหว่างบริเวณ upstream และยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate เพื่อให้ cassette ดังกล่าวแทรกเข้าไปแทนที่ยีน 16S rRNA ในจีโนมของ *Spirulina*



รูปที่ 3 การจัดเรียงตัวของยีน 16S rRNA บนจีโนมของ *Spirulina* C1

จากการศึกษาข้อมูลของยีนและการแสดงออกของยีน rRNA ของ *E. coli* พบว่า ใน *E. coli* มี rRNA operon ทั้งหมด 7 ชุด ซึ่งทุกชุดจะมี promoter ในการควบคุมการแสดงออก 2 promoter คือ P1 และ P2 (Codon *et al.*, 1995) ซึ่ง promoter ทั้ง 2 จะอยู่ห่างกันประมาณ 100 เบส และ promoter ทั้งสองนี้จะอยู่ในบริเวณ upstream ของยีน 16S rRNA ขึ้นไปไม่เกิน 400 เบส ดังนั้นในการศึกษาจึงได้ออกแบบ cassette ที่มียีน GFP แทรกอยู่ระหว่างบริเวณ upstream ของยีน 16S rRNA ขึ้นไป 919 เบส เพื่อให้ไม่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของ rRNA operon ภายหลังการแทนที่ของบริเวณ upstream และยีน 16S rRNA ด้วย cassette ดังกล่าว

ตารางที่ 2 การจัดเรียงตัวของยีน 16S rRNA บนจีโนมของ *Spirulina* C1

Scaffold	Locus_Tag	Product	Size (bases)	Position on scaffold
Scaffold 08	SPLC1_S080810	Ribosomal protein S18	216	88605-88820 (c)
	SPLC1_S080820	RDD domain containing protein	591	89126-89716 (c)
	SPLC1_S080830	23S ribosomal RNA	2881	89803-92683 (c)
	SPLC1_S080900	trRNA-Ala	73	92885-92957 (c)
	SPLC1_S080910	trRNA-Ile	74	92973-93046 (c)
	SPLC1_S080920	16S ribosomal RNA	1477	93166-94642 (c)
	SPLC1_S080940	Hypothetical protein	114	94645-94758
	SPLC1_S080950	Transposase IS605	357	95207-95563 (c)
Scaffold 58	SPLC1_S580010	16S ribosomal RNA	1447	1611-3087
	SPLC1_S580020	trRNA-Ile	74	3207-3280
	SPLC1_S580030	trRNA-Ala	73	3296-3368
	SPLC1_S580040	23S ribosomal RNA	2881	3570-6450
	SPLC1_S580060	MscS Mechanosensitive ion channel	1125	6605-7729 (c)
	SPLC1_S580070	Mechanosensitive ion channel	1104	7756-8859 (c)

(c) หมายถึงดีเอ็นเอสายคู่สม (complementary stand)

2. การสร้างพลาสมิดที่มี cassette ที่มียีน GFP แทรกอยู่ระหว่างบริเวณ upstream และ ยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate

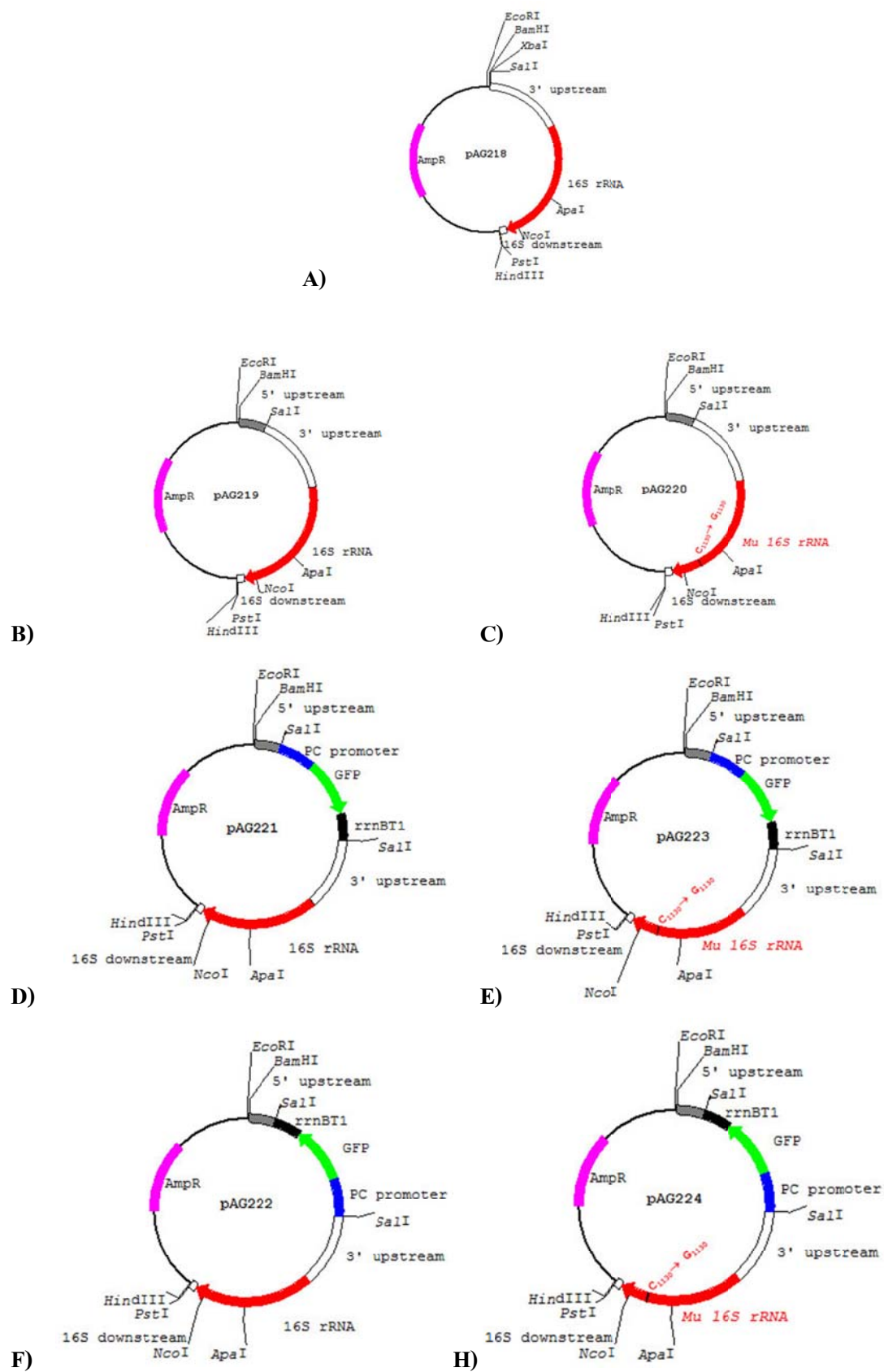
เพื่อที่จะสร้างพลาสมิดที่มี cassette ที่มียีน GFP แทรกอยู่ระหว่างบริเวณ upstream และยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate ของ *Spirulina* ในเบื้องต้นได้ทำการสร้างพลาสมิดควบคุมที่มียีน 16S rRNA ของ *Spirulina* ที่ไม่ได้ถูก mutate ก่อน โดยเริ่มจากการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอที่มีบริเวณ 3' upstream และยีน 16S rRNA หรือชิ้น “wt16S” โดยใช้ดีเอ็นเอจีโนม ของ *Spirulina* C1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาด 2437 คู่เบส (ดูรายละเอียดได้ในวิธีการดำเนินการวิจัย ข้อ 5 และ 6) นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM4 ที่ตำแหน่ง *SaII* และ *PstI* ได้พลาสมิด pAG 218 ดังแสดงในรูปที่ 4

ทำการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอ 5' upstream ของยีน 16S rRNA หรือชิ้นดีเอ็นเอ “Up1” โดยใช้ดีเอ็นเอจีโนม ของ *Spirulina* C1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ต้องการขนาด 314 คู่เบส นำผลิตภัณฑ์ขนาด 314 คู่เบสมาตัดด้วยเอนไซม์และแทรกลงในพลาสมิด pAG218 ที่ตำแหน่ง *BamHI* และ *SaII* ได้พลาสมิด pAG219 (รูปที่4)

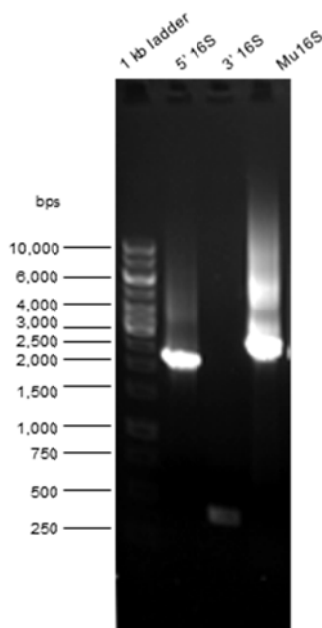
ทำการสร้างและเพิ่มจำนวนบริเวณ 3' upstream และยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate ในตำแหน่ง C₁₁₃₀ ไปเป็น G₁₁₃₀ หรือชิ้น “Mu 16S” ด้วย เทคนิค overlap extension PCR ซึ่งเริ่มจากการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณ 3' upstream จนถึงบริเวณยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate และชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณยีน 16S ที่ถูก mutate จนถึงบริเวณ downstream ของยีน 16S rRNA โดยใช้ดีเอ็นเอจีโนม ของ *Spirulina* C1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาด 2062 และ 399 คู่เบสตามลำดับ รูปที่ 5 และให้ชื่อชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มได้ว่า “5'16S” และ “3'16S” จากนั้นทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอทั้งสองชิ้นด้วย เทคนิค overlap extension PCR ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มี บริเวณ 3' upstream และ ยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate ที่ ตำแหน่ง C₁₁₃₀ ไปเป็น G₁₁₃₀ หรือชิ้น “Mu16S” ที่มีขนาด 2437 คู่เบส (รูปที่5)

ทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอ Mu16S ด้วยเอนไซม์ *ApaI* และ *NcoI* และนำชิ้นผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาด 374 คู่เบสซึ่งเป็นบริเวณของยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate ไปแทนที่ชิ้นดีเอ็นเอของ 16S rRNA ที่ไม่ได้ถูก mutate ของ พลาสมิด pAG219 ได้พลาสมิด pAG220 (รูปที่ 4)

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของ GFP cassette โดยใช้ พลาสมิด pMG241 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาด 1502 คู่เบส นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มาแทรกลงในพลาสมิด pAG 219 ที่ตำแหน่ง *SaII* ได้พลาสมิดควบคุม pAG221 และ pAG222 ที่มียีน GFP แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันและตรงกันข้ามกับยีน 16S rRNA ที่ไม่ได้ถูก mutate ตามลำดับ และนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มาแทรกลงในพลาสมิด pAG 220 ที่ตำแหน่ง *SaII* ได้พลาสมิด pAG223 และ pAG224 ที่มียีน GFP แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันและตรงกันข้ามกับยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate ตามลำดับ



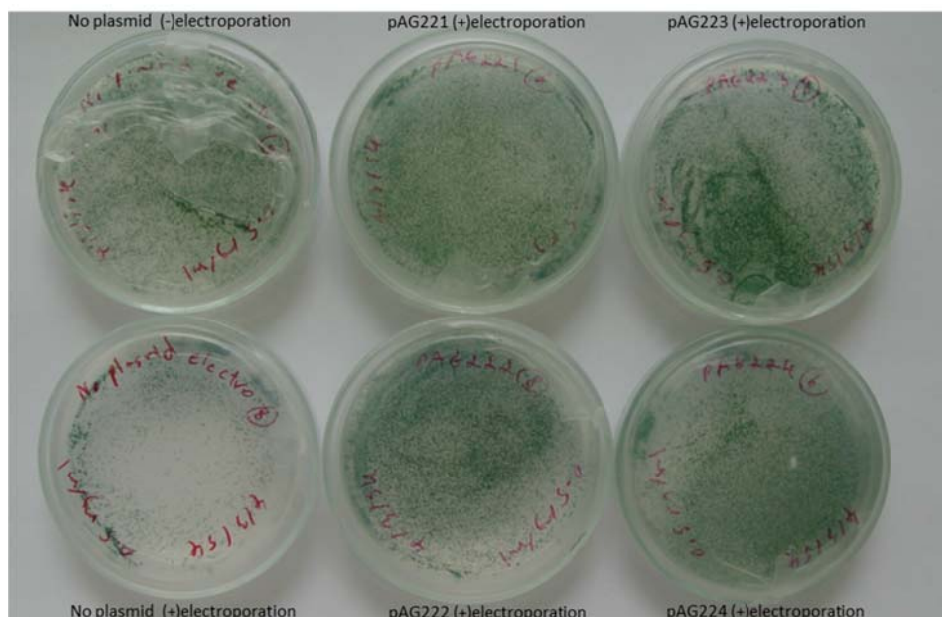
รูปที่ 4 พลาสมิดต่างๆที่สร้างเพื่อใช้ในการพัฒนาพลาสมิดที่มียีนคัดเลือก 16S rRNA ที่ถูกดัดแปลง



รูปที่ 5 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ใช้ในการสร้างยีน 16S rRNA ที่มีการดัดแปลงที่ตำแหน่ง C₁₁₃₀ ไปเป็น G₁₁₃₀

3. การส่งถ่ายพลาสมิดและคัดเลือก transformant

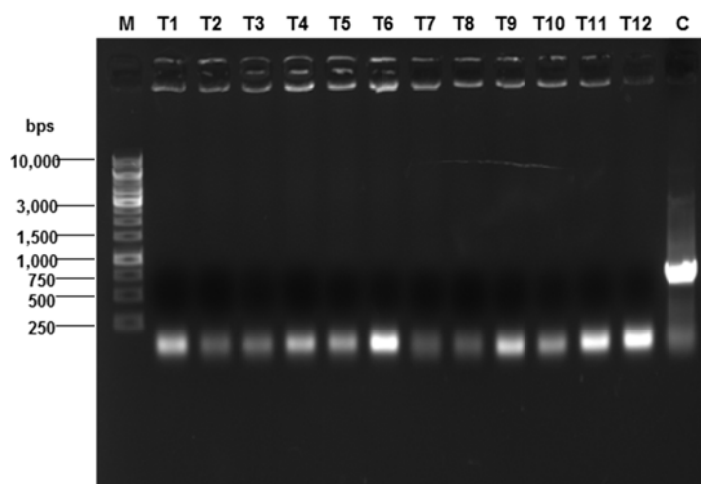
ทำการส่งถ่ายพลาสมิด pAG221 pAG222 pAG223 และ pAG224 ด้วยวิธี electroporation จากนั้นทำการคัดเลือก transformant ที่ได้รับพลาสมิด pAG 223 และ pAG 224 ที่มียีน 16S rRNA ที่ถูก mutate บนอาหารแข็งที่มียา spectinomycin 0.5 ug/ml เทียบกับเซลล์ transformant ที่ได้รับพลาสมิดควบคุม pAG221 และ pAG22 ที่มียีน 16S rRNA ที่ไม่ได้ถูก mutate รวมทั้งเซลล์ *Spirulina* ควบคุมซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดทำ electroporation และเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดไม่ทำ electroporation ซึ่งจากการติดตามการเจริญของเซลล์ดังกล่าวเป็นระยะเวลา 25 วัน ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการเจริญเติบโตระหว่างเซลล์ transformant ที่ได้รับพลาสมิด pAG223 (pAG223(+)) electroporation) และพลาสมิด pAG224 (pAG224(+)) electroporation) และเซลล์ transformant ควบคุมที่ได้รับพลาสมิด pAG221 (pAG221(+)) electroporation) และพลาสมิด pAG222 (pAG222(+)) electroporation) อย่างไรก็ตามในการติดตามพบว่ากรณีเซลล์ *Spirulina* ควบคุมซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดผ่านการทำ electroporation (No plasmid (+) electroporation) และเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดไม่ผ่านการทำ electroporation (No plasmid (-) electroporation) ก็สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่มียา spectinomycin ดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งโดยปกติแล้วเซลล์ *Spirulina* C1 จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารที่มียา spectinomycin ที่ความเข้มข้นดังกล่าว จึงมีผลทำให้ไม่สามารถแยกหรือคัดเลือกเซลล์ transformant ที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน 16S rRNA ที่ถูก mutate ออกจากเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดได้



รูปที่6 การติดตามเซลล์ *Spirulina* transformant บนอาหารแข็งที่มียา

4. การตรวจสอบ transformant โดยเทคนิค colony PCR

ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถเห็นความแตกต่างของการเจริญระหว่างเซลล์ transformant ที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน 16S rRNA ที่ถูก mutate กับเซลล์ transformant ที่ได้รับพลาสมิดควบคุมที่มียีน 16S rRNA ที่ไม่ถูก mutate และเซลล์ *Spirulina* ควบคุมที่ไม่ได้รับพลาสมิดได้ ในการวิจัยได้สุ่มนำเซลล์ transformant ที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิด pAG224 มาตรวจสอบการแทรกเข้าในของยีน GFP ในจีโนมของ transformant โดยเทคนิค colony PCR ซึ่งจากการสุ่ม colony ของ transformant มาทั้งหมด 12 colony เพื่อเป็นแหล่งของดีเอ็นเอแม่แบบในการทำ PCR เทียบกับปฏิกิริยาควบคุมที่ใช้พลาสมิดดีเอ็นเอ pAG224 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ไม่พบผลิตภัณฑ์ของยีน GFP ขนาด 700 คู่เบสในทุกๆเซลล์ transformant (รูปที่ 7) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า transformant ที่คัดเลือกมาเป็น transformant ปลอม (false transformant) เนื่องจากยาเสื่อมทำให้ไม่สามารถตรวจพบ ยีน GFP ใน transformant ที่เลือกมาได้ อย่างไรก็ตามก็อาจมี transformant บางตัวเป็น transformant จริง ที่จีโนมได้ถูกแทนที่ด้วย cassette ที่มียีน GFP แทรกอยู่ระหว่างบริเวณ upstream และยีน 16S rRNA ที่ถูก mutate แต่เนื่องจากโดยปกติแล้วไซยาโนแบคทีเรียจะมีจีโนมมากกว่า 1 ชุด ภายในเซลล์ ซึ่งถ้าการแทรกเข้าไปของยีน GFP ยังไม่สมบูรณ์ในจีโนมทุกชุดอาจทำให้ปริมาณของยีน GFP ที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบมีน้อยเกินไปจนไม่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีนี้ได้



รูปที่ 7 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ยีน GFP ในเซลล์ transformant

M: 1 kb ladder T1-T12: ผลิตภัณฑ์จากการใช้เซลล์ transformant T1-T10 ที่ได้รับพลาสมิด pAG224 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ C : ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาควบคุมที่ใช้พลาสมิดดีเอ็นเอ pAG224 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ในการวิจัยได้ทำการค้นหายีน 16S rRNA บนฐานข้อมูลจีโนมของ *Spirulina* C1 พบว่ามียีน 16S rRNA อยู่ 2 ชุดบน scaffold08 และ scaffold58 ตามลำดับ และพบว่า ยีน 16S rRNA น่าที่จะอยู่ในลักษณะ operon ของ 16S rRNA-trRNA Ile-trRNA Ala-23S rRNA ดังนั้นในการวิจัยจึงได้เลือกลำดับเบสของยีน 16S rRNA และบริเวณใกล้เคียงของข้อมูลจีโนมบน scaffold 58 มาใช้ในการออกแบบเพื่อพัฒนาคัดเลือกเพื่อใช้ในการปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* ให้มีการเสถียรโดยการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง C₁₁₃₀ ให้เป็น G₁₁₃₀ และนำชิ้นดีเอ็นเอที่มียีน 16S rRNA ที่ถูกเปลี่ยนแปลงลำดับเบส และดีเอ็นเอบริเวณใกล้เคียง มาพัฒนาพลาสมิด pAG223 และ pAG224 เพื่อใช้ในการถ่ายเข้าสู่ *Spirulina* โดยที่พลาสมิดทั้งสองจะมียีน GFP ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter ของ *Spirulina* C1 แทรกอยู่ในบริเวณ upstream ในทิศทางเดียวกันหรือตรงกันข้ามกับยีน 16S rRNA ที่ถูกคัดแปลงตามลำดับ พร้อมกันนี้ได้ทำการสร้างพลาสมิดควบคุม pAG221 และ pAG222 ที่มียีน 16S rRNA ที่ไม่ได้ถูกคัดแปลงในขณะที่คุณสมบัติอื่นๆจะเหมือนกับพลาสมิด pAG223 และ pAG224 ทุกประการ

ทำการส่งถ่ายพลาสมิดแต่ละชนิดที่สร้างได้เข้าสู่เซลล์ *Spirulina* C1 และติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ transformant ที่ได้รับพลาสมิด pAG223 และ pAG 224 บนอาหารแข็งที่มียา spectinomycin เทียบกับเซลล์ transformant ที่ได้รับพลาสมิดควบคุม pAG221 และ pAG222 ซึ่งจากการติดตามไม่พบความแตกต่างในการเจริญเติบโตของ เซลล์ transformant ที่ได้รับพลาสมิดทุกชนิด และไม่สามารถตรวจพบยีน GFP จากการสุ่มนำเซลล์ transformant ที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิด pAG224 มาทดสอบโดยเทคนิค colony PCR

ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยพบว่าเซลล์ควบคุมซึ่งไม่ได้รับพลาสมิดก็สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกแข็งที่มียา spectinomycin ที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml ได้ ซึ่งที่ความเข้มข้นดังกล่าวได้มีการทดสอบไว้แล้วว่าเซลล์ *Spirulina* C1 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ จึงสันนิษฐานได้ว่าในขณะที่ทำการทดลองยาที่ใช้ในการทดลองอาจมีประสิทธิภาพไม่ดี จึงเป็นเหตุให้ไม่สามารถคัดเลือกเซลล์ transformant ที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน 16S rRNA ที่ถูก mutate จากเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดได้ ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนว่ายีนคัดเลือกที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอได้หรือไม่ ควรที่จะมีการทำการทดลองซ้ำและควรที่จะตรวจสอบประสิทธิภาพของยาที่ใช้ก่อนทำการทดลองทุกครั้ง

นอกจากนี้เทคนิค colony PCR อาจไม่เหมาะสมในการนำมาตรวจสอบ การแทรกเข้าไปของดีเอ็นเอหรือยีนในจีโนมของ *Spirulina* ควรที่จะเลี้ยงเซลล์ transformant ไประยะเวลาหนึ่งให้ยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปนั้นสามารถที่จะแทรกเข้าไปในทุกๆจีโนม และสกัดดีเอ็นเอจีโนมมาตรวจสอบโดยเทคนิค PCR หรือ southern blot analysis ซึ่งจะให้ผลที่แม่นยำกว่า

เอกสารอ้างอิง

- Al-Batshan, H. A., Al-Mufarrej, S.I., Al-Homaidan, A. A., Qureshi, M. A. 2001. Enhancement of chicken macrophage phagocytic function and nitrite production by dietary *Spirulina platensis*. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 23:281-9.
- Anderson, L. M., Henkin, T. M., Chambliss, G. H. and Bott, K. F. 1984. New Chloramphenicol Resistance Locus in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 158: 386-388.
- Belay, A. 1990. Mass Culture of *Spirulina* Outdoors-The Earthrise Farms Experience. In: Vonshask, A. (Ed), *Spirulina platensis (Arthrospira platensis): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology* . Taylor & Francis, London, UK. pp. 131-158.
- Bilgin, N., Richter, A. A., Ehrenberg, M., Dahlberg, A. E. and Kurland, C.G. 1990. Ribosomal RNA and protein mutants resistant to spectinomycin. *EMBO J.* 9: 735-739.
- Brink, M. F., Brink, G. Ph. Verbeet, M. and de Boer, A. 1994. Spectinomycin interacts specifically with the residues G₁₀₆₄ and C₁₁₉₂ in 16S rRNA, thereby potentially freezing this molecule into an inactive conformation. *Nucleic Acids Res.* 22: 325-331.
- Chotayaporn, M. 1995. Transformation of *Spirulina platensis* Italy strain with a dominant selectable marker. Thesis. Master of Science. Biotechnology Division. King Mongkut's Institutes of Technology Thonburi. 87 p.
- Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol Rev.* 47: 551-578.
- Condon, C., Squires C., and Squires C. L. 1995. Control of rRNA Transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 59: 623-645.
- Dulsawat, S. 2002. Development of a gene transfer system for *Spirulina platensis* C1. Thesis. Master of Science. Biotechnology Division. King Mongkut's University of Technology Thonburi. 95 p.
- Farooq, S. M., Asokan, D., Sakthivel, R., Kalaiselvi, P. and Varalakshmi, P. 2004. Salubrious effect of C-phycoerythrin against oxalate-mediated renal cell injury. *Cli Chim Acta.* 348: 199-205.
- Fromm, H., Edelman, M., Aviv, D. and Galun, E. 1987. The molecular basis for rRNA-dependent spectinomycin resistance in *Nicotiana* chloroplasts. *EMBO J.* 6: 3233-3237.
- Golden, S. S. and Sherman, L. A. 1983. A hybrid plasmid is a stable cloning vector for the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *J Bacteriol.* 155:966-972.
- Harris, E. H., Burkhardt, B. D., Gillham, N. W. and Boynton, J. E. 1989. Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16S and 23S rRNA gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: correlation of genetic and physical maps of the chloroplast genome. *Genetics.* 123: 281-292.

- Hernandez-Corona, A., Nieves, I., Meckes, M., Chamorro, G. and Barron, B.L. 2002. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Res.* 56: 279-285.
- Holmes, M. L. and Dyall-Smith, M. L. 1990. A plasmid vector with a selectable marker for halophilic archaebacteria. *J. Bacteriol.* 172: 756-761.
- Holmes, M. L. and Dyall-Smith, M. L. 1991. Mutations in DNA gyrase result in novobiocin resistance in halophilic archaebacteria. *J. Bacteriol.* 173: 642-648.
- Holmes, M.L., Nuttall, S. D. and Dyall-Smith, M. L. 1991. Construction and use of halobacterial shuttle vectors and further studies on *Haloferax* DNA gyrase. *J Bacteriol.* 173: 3807-3813.
- Johanson, U., and Hughes, D. 1995. A new mutation in 16S rRNA of *Escherichia coli* conferring spectinomycin resistance. *Nucleic Acids Res.* 23:464-466.
- Kaji, T., Okabe, M., Shimada, S., Yamamoto, C., Fujiwara, Y., Lee, J.B. and Hayashi, T. 2004. Sodium spirulan as a potent inhibitor of arterial smooth muscle cell proliferation in vitro. *Life Sci.* 74: 2431-2439.
- Kaji, T., Fujiwara, Y., Inomata, Y., Homada, C., Yamamoto, C., Shimada, S., Lee, J.B. and Hayashi, Y. 2002. Repair of wounded monolayers of cultured bovine aortic endothelial cells is inhibited by calcium spirulan, a novel sulfated polysaccharide isolated from *Spirulina platensis*. *Life Sci.* 70: 1841-1848.
- Kanoksilp, S. 1993. Transformation of *Spirulina platensis*. Thesis. Master of Science. Biotechnology Division. King Monkut's Institute of Technology Thonburi. 108 p.
- Kawata, Y., Yano, S., Kojima, H. and Toyomizu, M. 2004. Transformation of *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC9438) with Tn5 transposase-transposon DNA-cation liposome complex. *Mar Biotechnol (NY)*. 6:355-363.
- Luque, I., Herrero, A., Flores, E. and Madueno, F. 1992. Clustering of genes involved in nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Mol Gen Genet.* 232:7-11.
- Makosky, P. C. and Dahlberg, A. E. 1987. Spectinomycin resistance at site 1192 in 16S ribosomal RNA of *E. coli*: an analysis of three mutants. *Biochimie.* 69: 885-889.
- Mark, L.G., Sigmund, C. D. and Morgan, E. A. 1983. Spectinomycin resistance due to a mutation in an rRNA operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 155:989-994.
- Matsuoka, M., Takahama, K. and Ogawa, T. 2001. Gene replacement in cyanobacteria mediated by a dominant streptomycin-sensitive *rps12* gene that allows selection of mutant s free from drug resistance markers. *Microbiol.* 147: 2077-2087.
- Murphy, R. C., Gasparich, G. E., Bryant, D. A. and Porter, R. D. 1990. Nucleotide sequence and further characterization of the *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 *recA* gene:

- complementation of a cyanobacterial *recA* mutation by the *Escherichia coli recA* gene. *J Bacteriol.* 172:967-976.
- O'Connor, M. and Dahlberg, A. E. 2002. Isolation of spectinomycin resistance mutations in the 16S rRNA of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and expression in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Curr Microbiol.* 45: 429-433.
- Pinero Estrada, J.E., Bescos, P.B. and Villar del Fresno, A. M. 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco.* 56: 497-500.
- Qureshi, M.A., Garlich, J. D. and Kidd, M. T. 1996. Dietary *Spirulina platensis* enhances humoral and cell-mediated immune functions in chickens. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 18: 465-476.
- Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiäinen, H., Buikema, W., Haselkorn, R. and Sivonen, K. 2000. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Mol Microbiol.* 37:156-167.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. 2nd ed. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 1.1-18.88.
- Sigmund, C. D., Ettayebi, M. and Morgan, E. A. 1984. Antibiotic resistance mutations in 16S and 23S ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Nucleic. Acids Res.* 12: 4653-4663.
- Stern, S., Weiser, B. and Noller, H. F. 1988. Model for the three-dimensional folding of 16S ribosomal RNA. *J Mol Biol.* 204:447-481.
- Subhashini, J., Mahipal, S.V. K., Reddy, M.C., Reddy, M. M., Rachamalla, A. and Reddanna, P. 2004. Molecular mechanisms in C- Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochem Pharmacol.* 68: 453-462.
- Thiel T, Poo H. 1989. Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *J Bacteriol.* 171:5743-5746.
- Toyomizu, M., Suzuki, K., Kawata, Y., Kojima, H. and Akiba, Y. 2001. Effective transformation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* using electroporation. *J Appl Phycol.* 13: 209-214.
- Venkataraman, L.V., Somasekaran, T. and Becker, E. W. 1994. Replacement value of blue-green alga (*Spirulina platensis*) for fishmeal and a vitamin-mineral premix for broiler chicks. *Br Poult Sci.* 35:373-381.
- Weisblum, B. and Davies, J. 1968. Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome. *Bacteriol. Rev.* 32: 493-528.
- Wolk, C. P. 1991. Genetic analysis of cyanobacterial development. *Curr Opin Genet Dev.* 1:336-341.

Wolk, C. P., Elhai, J., Kuritz, T. and Holland, D. 1993. Amplified expression of a transcriptional pattern formed during development of *Anabaena*. *Mol Microbiol.* 7:441-445.