1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

Spirulina platensis เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมายในปัจจุบัน ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร ในรูปของอาหารเสริมสุขภาพ และอาหารสัตว์ เนื่องจาก *Spirulina* มีคุณค่าทางอาหารสูง เช่น มีโปรตีนมากกว่าร้อยละ 60 รวมถึงโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ซัลโฟลิปิด (sulfolipid) และวิตามินต่างๆ เป็นต้น รวมถึงยังสามารถผลิตสารในกลุ่มของ phytonutrient ซึ่งมีบทบาทในการเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) [Belay et al., 1993] รวมถึงกรดไขมันจำเป็น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง γ-linolenic acid (GLA), 18:3 (Δ9, 12, 6) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของกระบวนการสังเคราะห์ prostaglandin ทั้งในมนุษย์และสัตว์ จึงทำให้ได้รับความสนใจนำไปใช้ในอุตสาหกรรมด้านเภสัชกรรมด้วย นอกจากนั้น *Spirulina* ยังเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในด้านสิ่งแวดล้อมเนื่องจากมีความสามารถในการดึงเอาของเสียที่มีพิษ เช่น โลหะหนัก (ตะกั่ว, แคดเมียม, ปรอท, ทองแดง) ออกจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมได้ [Chojnacka et al., 2004; Chojnacka et al., 2005; Chen and Pan, 2005] เพราะสารที่ขับออกมาจากเซลล์ของ *Spirulina* เป็น bactericidal activity และในอนาคต *Spirulina* ยังถูกมองเป็นแหล่งพลังงานทางเลือก (biofuel) ที่สำคัญอีกด้วย เนื่องจากสามารถใช้ของเสียจากภาคอุตสาหกรรม เช่น น้ำทิ้ง ไอเสีย (ก๊าซ CO_2) และแสงมาเป็นสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโตและสร้าง triacylglycerols (TAG) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการผลิต biodiesel [Hu et al., 2008] และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการผลิต bioethanol ดังนั้น *Spirulina* จึงเป็นทางออกที่สำคัญสำหรับการแก้ปัญหาต่างๆ ทั้งปัญหาการขาดแคลนอาหาร ปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม และปัญหาทางด้านพลังงาน ซึ่งเป็นสาเหตุของปัญหาสำคัญของโลกในปัจจุบัน คือ "สภาวะโลกร้อน" (global warming)

จากการที่ *Spirulina* นั้นมีความสามารถที่หลากหลาย ดังนั้นการที่จะเพิ่มความสามารถของ *Spirulina* ให้มีเหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆได้อย่างเต็มที่นั้น จำเป็นต้อง (1) ทำการศึกษาเพื่อค้นหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานในแต่ละด้าน (2) ทำการศึกษาเพื่อค้นหากลไกการควบคุมการทำงานในระดับยีนของแต่ละกระบวนการที่สนใจ และ (3) ทำการพัฒนาสายพันธุ์ของ *Spirulina* โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งการศึกษาข้อ (2) และ (3) ใน *Spirulina* นั้นมีข้อจำกัดสำคัญอยู่ เนื่องจากยังไม่มีระบบถ่ายทอดยีน (genetic transformation) จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นในปี พ.ศ. 2549 ทางมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มจธ.) ร่วมกับศูนย์พันธวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) ในการดำเนินการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของ *Spirulina* (*Spirulina* genome sequencing project) ซึ่งคาดว่าโครงการดังกล่าวนี้จะแล้วเสร็จภายในปี พ.ศ. 2552 และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมที่ได้จะเป็นแหล่งข้อมูลสำหรับการศึกษาด้านต่างๆในระดับอนูพันธุศาสตร์ของ *Spirulina* ต่อไป

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะนำเอาข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของ *Spirulina* มาทำการวิเคราะห์และค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดยีนจากภายนอกเซลล์ (exogenous DNA) เข้าสู่ภายในเซลล์ของ *Spirulina* เพื่อนำไปสู่การพัฒนาระบบการขนส่งยีน (genetic transformation) ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ natural transformation เนื่องจากกระบวนนี้มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดยีนเข้าสู่เซลล์สูงกว่าวิธีการ electroporation ที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน (มากกว่า 17 เท่า) [Onai et al., 2004] และการใช้ electrical shock ยังส่งผลให้เกิด *Spirulina* กลายพันธุ์ที่ไม่ต้องการ (unexpected mutations) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะทำให้กระบวนการพัฒนาสายพันธุ์ *Spirulina* ที่มีลักษณะตามต้องการนั้นมีขั้นตอนเพิ่มขึ้น คือขั้นตอนของการ

คัดเลือกสายพันธุ์ ซึ่งจะทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับกระบวนการถ่ายทอดยีนที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสบนจีโนม รวมทั้งความเข้าใจในความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของยีนและหน้าที่ของยีน จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธุ์ของ *Spirulina* เนื่องจากจะช่วยลดทั้งระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการศึกษาลงได้ ซึ่งจะทำให้เกิดการพัฒนาสายพันธุ์ของ *Spirulina* ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงสุด

1.2 ผลสำเร็จของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.2.1 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เผยแพร่ผลงานวิจัยในรูปสิ่งตีพิมพ์และงานประชุมวิชาการในระดับชาติและระดับนานาชาติ
- การถ่ายทอดเทคโนโลยีไปสู่หน่วยงานวิจัยที่มีความสนใจในการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Spirulina* เช่น กลุ่มวิจัย Algal biotechnology ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เป็นต้น เพื่อทำการพัฒนาระบบการถ่ายทอดยีนในสาหร่าย *Spirulina* และนำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์ของ *Spirulina* ในที่สุด

1.2.2 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

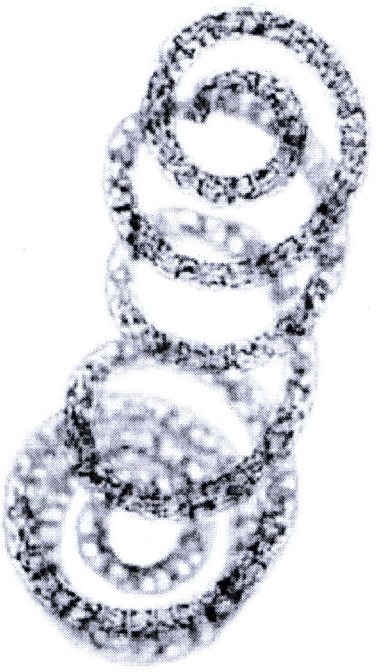
- ส่งมอบรายงานการวิจัย ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลเกี่ยวกับ ยีนและโปรตีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดยีนใน *Spirulina* (ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน และหน้าที่ของโปรตีนเหล่านั้น เป็นต้น) ให้กับกลุ่มวิจัยที่สนใจ (Algal biotechnology ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี) เพื่อนำไปทำการพัฒนาระบบการถ่ายทอดยีนใน *Spirulina* ให้มีประสิทธิภาพต่อไป

1.3 การวิจัยที่เกี่ยวข้อง และคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่ทำ (Related work and similar studies)

1.3.1 สไปรูลินา (Spirulina)

Spirulina เป็นสาหร่ายหลายเซลล์ มีสีเขียวแกมน้ำเงิน มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า ดูจากกล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะเป็นสาย บิดเป็นเกลียว มีความยาวประมาณ 50-500 ไมครอน มีความกว้างประมาณ 3-8 ไมครอน สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อยในอุณหภูมิประมาณ 28-34 องศาเซลเซียส การสืบพันธุ์เป็นแบบไม่มีเพศ คือแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสอง มีองค์ประกอบหลายอย่างที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายที่น่าสนใจ คือมีปริมาณโปรตีนมากกว่า 60 % ของน้ำหนักแห้ง และเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดี ทั้งยังเป็นแหล่งของไวตามิน โดยเฉพาะไวตามินบี คอมเพล็กซ์ นอกจากนี้ยังมี เบต้าแคโรทีนสูง ผนังเซลล์ไม่มีเซลล์ลูโลส เหมือนสาหร่ายสีเขียวทั่วๆไป จึงเป็นข้อดี สำหรับนำมาเป็นอาหารของมนุษย์ เพราะในร่างกายของมนุษย์ ไม่มีเอ็นไซม์ย่อยเซลล์ลูโลสได้

คำว่า *Spirulina* มาจากภาษา ลาติน Helex หรือ Spiral (เกลียว) ซึ่งหมายถึง รูปร่างที่มีลักษณะเส้นหมุนรอบขึ้นไปเหมือน กันหอย ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1: สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina*

1.3.2 ความสำคัญของ *Spirulina*

- **ใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์ และสัตว์ (human food and animal feed supplements)**

  Spirulina เป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์ ที่มีการบริโภคกันมาเป็นเวลานาน และไม่มีรายงานว่าเป็นพิษต่อมนุษย์ และสัตว์ นอกจากนั้น *Spirulina* ยังมีสารต่างๆที่มีประโยชน์ ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ยับยั้งการทำงานของไวรัส (against virus attack) และเซล์มะเร็ง (tumor cells) ช่วยป้องกันและลดภาวะโลหิตจาง (anemmia) ช่วยในกระบวนการเผาผลาญไขมัน และกรดไขมัน ลดภาวะไขมันอุดตันในเส้นเลือด เป็นต้น ส่วนในการใช้เป็นอาหารสัตว์ พบว่าช่วยเพิ่มสีสันให้กับไข่แดง เร่งการเจริญเติบโตในปลา รวมถึงกระตุ้นภูมิคัมกันในกุ้ง เป็นต้น ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของ *Spirulina* ทั้งในแง่ของ สารอาหาร การมีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน การที่ไม่มีสารพิษในตัวทำให้ *Spirulina* มีความเหมาะสมที่นำมาใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์ เป็นอาหารสัตว์ และเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่จะช่วยในการปกป้องสภาวะขาดสารอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 1.1

- **ใช้ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม**

Spirulina เป็นจุลชีพที่มีการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อมทั้งในภาคเกษตรกรรม และอุตสาหกรรม เนื่องจาก (1) สามารถนำของเสียชีวภาพมาใช้เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโต [Olguin, 2003; Chuntapa et al., 2003] (2) ลดปริมาณก๊าซ CO_2 ที่มีอยู่ในน้ำเสีย และอากาศ (waste air) [Olguin, 2003; Chuntapa

et al., 2003] และ (3) ช่วยในการดึง (remove) โลหะหนักออกจากน้ำทิ้งภาคอุตสาหกรรม เช่น ตะกั่ว, แคดเมียม และทองแดง เป็นต้น [Chojnacka et al., 2004; Chojnacka et al., 2005; Chen and Pan, 2005]

ตารางที่ 1.1: ผลของ *Spirulina* ที่มีต่อสุขภาพของมนุษย์ และสัตว์ [Belay, A., 2002]

Type of studies	**Effects**	**Reference**
In vitro	Phycocyanin inhibited 2,2'-azobis (2 midinoprapane) dihydroxychloride (AAPH)-induced human erythrocyte haemeolysis in the same way as trolox and ascorbic acid, two well known antioxidants.	Romay and Gonzalez, 2000
Rats	Phycocyanin also showed anti-inflammatory activity in a sub-chronic cotton pellet granuloma test where sterile cotton pellets were implanted in the axillae of rats.	Romay et al., 1998
Rats	A similar hepatoprotective effect as above was seen in actual feeding experiment in rats with an oil extract of *Spirulina* or its defatted fraction.	Torres-Durran et al., 1999
Human	In ischemic heart disease patients *Spirulina* supplementation significantly lowered blood chloresterol, triglycerides, LDL and VLDL cholesterol, and higher HDL cholesterol. Supplementation with 4 g/day *Spirulina* showed a higher effect in reducing serum total cholesterol and LDL levels than 2 g/day.	Ramamoorthy and Premakumari, 1996
Rats	Liver levels of triglycerides and phospholipids in rats fed a diet supplemented with 5% *Spirulina* were significantly lower than rats fed either 60% glucose or 60% fructose.	De Rivera, 1993
In vitro	Calcium spirulan (Ca-SP) from *Spirulina platensis* found to inhibit the replication of several enveloped viruses including *Herpes simplex* virus type I (HSV-1), human cytomegalovirus (HVMV), measles virus, mumps virus, influenzae A virus, and HIV-1 virus.	Hayashi et al., 1996
Prawns	Prawns fed with *Spirulina* could clear *Vibrio parahaemolyticus,* a pathogen of prawns, from the hemolymph at half the time taken by control prawns fed with basal diet.	Lee, 1999
Channel catfish	Peritoneal phagocytes from fish fed *Spirulina* enhanced phagocytosis to zymosan and chemotaxis to *E ictaluri* exoantigen.	Duncan and Klesius, 1996

➢ **ใช้เป็นแหล่งพลังงานทางเลือก (Renewable energy source)**

สาหร่าย (algae) เป็นแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ในอนาคตที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตลิปิด และคาร์โบไฮเดรตได้ในปริมาณสูง (ลิปิด สามารถนำไปผลิตเป็น biodiesel และคาร์โบไฮเดรต นำไปผลิตเป็น bioethanol) และเมื่อเปรียบเทียบกับพืชแล้ว พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่า โดยสาหร่ายสามารถเพิ่มปริมาณเป็นสองเท่าได้ในเวลาไม่กี่ชั่วโมงเมื่อเจริญเติบโตในสภาวะที่เหมาะสม ดังนั้นเมื่อเทียบผลผลิตต่อพื้นที่ 10,000 ตารางเมตร ข้าวโพดผลิตเอทานอลได้ราว 2,500 ลิตรต่อปี ส่วนถั่วเหลืองผลิตไบโอดีเซลได้ราว 560 ลิตรต่อปี แต่ในทางทฤษฎี สาหร่ายจะสามารถผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพได้มากกว่า 45,000 ลิตรต่อปี นอกจากนั้นยังสามารถพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงให้สามารถใช้ของเสียต่างๆ ทั้งของเสียจากน้ำ และ อากาศที่เกิดขึ้นจากภาคอุตสาหกรรมมาเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่าย และที่สำคัญ ข้อได้เปรียบของสาหร่ายเมื่อเทียบกับพืช คือสามารถพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแบบปิดขึ้นมาได้ จึงทำให้ปริมาณการผลิตของสาหร่ายไม่จำเป็นต้องขึ้นอยู่กับฤดูกาลเช่นดียวกับในพืช ดังนั้นสาหร่ายจึงเป็นสิ่งมีชีวิตในฝันของโลกปัจจุบัน เนื่องจากสามารถช่วยแก้ปัญหาสำคัญของโลกทั้งหลายได้ ทั้งปัญหาสิ่งแวดล้อม ปัญหาทางด้านพลังงาน และปัญหาทางด้านอาหาร เป็นต้น

และ *Spirulina* เป็นหนึ่งในสาหร่ายที่มีศักยภาพเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ในประเทศไทย เนื่องจากมีการศึกษาและวิจัยในด้านต่างๆมาเป็นเวลานานแล้ว จึงทำให้มีความรู้ที่สำคัญในหลายๆด้านอยู่มากมาย เช่น สภาวะในการเลี้ยง ระบบการจัดการและการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เป็นต้น แม้ว่า *Spirulina* จะมีความสำคัญในแง่ต่างๆ และมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น แต่ความรู้ที่เกี่ยวกับ genetic system นั้นมีเพียงเล็กน้อย รวมทั้งความเข้าใจใน *Spirulina* เพื่อนำไปสู่แนวทางในการพัฒนาระบบการถ่ายทอดยีนที่มีประสิทธิภาพ การปรับปรุงสายพันธุ์ ค วามรู้ที่เกี่ยวข้องกระบวนการสังเคราะห์สารชีวเคมี และ metabolic pathway ของสารชีวเคมีนั้น เพื่อที่นำไปใช้ในการพัฒนาการใช้ประโยชน์จาก *Spirulina* อย่างสูงสุดนั้นยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับระบบการถ่ายทอดยีนของ *Spirulina* จะเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญที่จะช่วยในการเพิ่มศักยภาพในการศึกษาทางด้าน genetic system ใน *Spirulina* และนำไปสู่ความเข้าใจ และการพัฒนา *Spirulina* อย่างก้าวกระโดดในหลายๆด้าน

1.3.3 กระบวนการถ่ายทอดยีน (genetic transformation)

จุลินทรีย์ในธรรมชาติสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันได้ โดยการพัฒนาหรือปรับปรุงความสามารถในการดำรงชีวิต (phenotypic traits) ให้เหมาะสมกับสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรม อาจเกิดขึ้นโดยการกลายพันธุ์ (gene mutations) การลดยีนที่ไม่จำเป็นออกจากเซลล์ (differential gene loss) การเปลี่ยนแปลงยีนภายในเซลล์ (intramolecular recombination) หรือการรับยีนที่จำเป็นจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ (lateral gene transfer) [Averhoff, 2004] ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงได้นำเทคนิคเหล่านี้มาพัฒนาเพื่อใช้ในการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ ให้แสดงออกในลักษณะทางพันธุกรรมที่ต้องการ โดยวิธีส่งถ่ายสารพันธุกรรมจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ (lateral gene transfer) เป็นวิธีที่มีการนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด เนื่องจากวิธีการอื่นๆ เช่น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ นั้นต้องใช้ระยะเวลานานในการปฏิบัติ ส่วนเทคนิค differential gene loss และ intramolecular recombination มักทำให้เซลล์ไม่เกิดการแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรมตามที่ต้องการ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

การส่งถ่ายสารพันธุกรรมจากภายนอกเข้าสู่เซลล์สามารถปฏิบัติได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีการใหญ่ๆ คือ

1. วิธีการทางกายภาพ (physical methods)

เป็นวิธีการส่งถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายโดยตรง เช่น การส่งถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) การส่งถ่ายยีนโดยใช้เข็มฉีด (microinjection) การส่งถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (biolistic technique)

2. วิธีการทางชีวภาพ (biological methods)

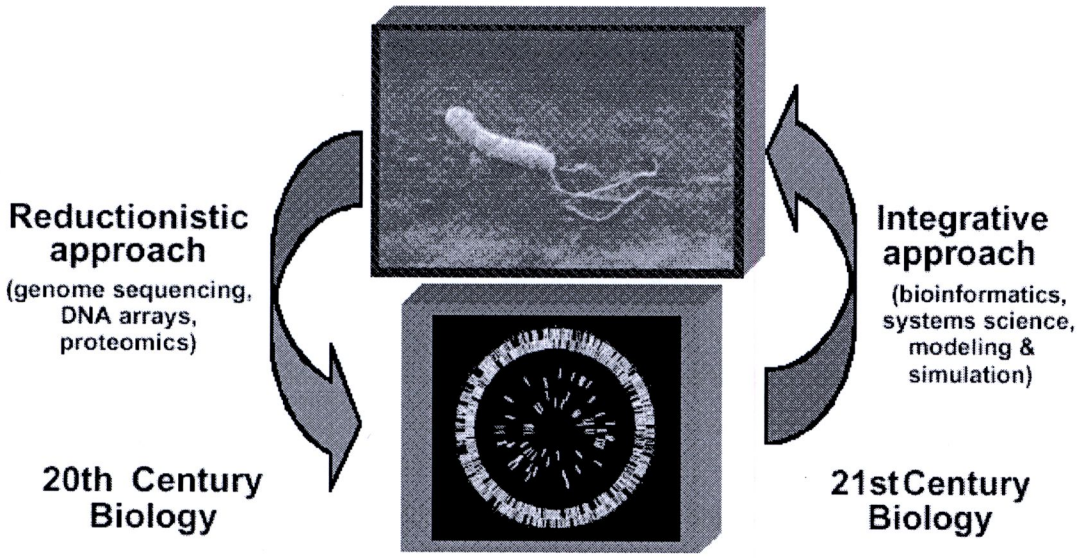
เป็นวิธีการส่งถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม มี 3 เทคนิค คือ ทรานสฟอร์เมชัน (transformation) ทรานสดักชัน (transduction) และ คอนจูเกชัน (conjugation)

จากการศึกษาที่ผ่านมาในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria) พบว่าการส่งถ่ายยีนด้วยวิธีทางชีวภาพ มีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการส่งถ่ายยีนด้วยวิธีทางกายภาพ ตัวอย่างเช่น ใน *Thermosynechococcus sp.* สายพันธุ์ BP-1 มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนด้วยวิธีทางชีวภาพ (natural transformation) เทียบกับการส่งถ่ายยีนด้วยวิธีทางกายภาพ (electroporation) สูงกว่าถึง 17 เท่า [Onai et al., 2004] นอกจากนั้นวิธีการใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) มักจะชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในลักษณะที่ไม่ต้องการ (unexpected mutations) เป็นจำนวนมาก [Brun et al., 1989] ดังนั้นการส่งถ่ายยีนด้วยวิธีทางชีวภาพ (natural transformation) จึงเป็นวิธีการที่ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงลักษณะทางพันธุกรรม (genetic modification) ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายๆชนิด เช่น *Synechocystis sp.* PCC6803 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 และ *Synechococcus elongatus* PCC 6301 เป็นต้น

1.3.4 การศึกษาทางชีววิทยา แบบ in silico (In silico biology)

ในช่วงทศวรรษที่ 20 (20th century) ข้อมูลทางชีววิทยาส่วนใหญ่นั้นได้มาจากการศึกษาในลักษณะของการที่จะพยายามทำความเข้าใจไปทีละยีน หรือทีละโปรตีน (individual cellular component) แต่ในทศวรรษถัดมา (21th century) ข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequence) มีการเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก และเป็นการเพิ่มอย่างรวดเร็ว (จากการที่รู้จีโนมของสิ่งมีชีวิต) ดังนั้นการศึกษาเพื่อให้ได้มาของข้อมูลทางชีววิทยาจึงมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างมาก โดยจะเป็นการศึกษาแบบหลายๆยีน หรือหลายๆโปรตีนไปพร้อมกัน (high-throughput technology) ตัวอย่างของเทคนิคหรือวิธีการเหล่านั้น ได้แก่ (1) Proteomics (2) DNA microarrays (3) Genome sequencing เป็นต้น และข้อมูลที่ได้จากศึกษาด้วยวิธีเหล่านี้จะมีเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการวิเคราะห์ข้อมูลจะเน้นไปที่การศึกษาความสัมพันธ์ (interaction) ของกลุ่มยีน หรือ กลุ่มโปรตีนเหล่านั้น (integrative analysis) โดยอาศัยความรู้ทางด้าน bioinformatics เข้ามาช่วย ซึ่งการศึกษาในลักษณะนี้จะช่วยให้เข้าใจถึงกลไกต่างๆที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้อย่างเป็นระบบ [Covert et al., 2001]

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 19 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 249964
เลขเรียกหนังสือ



รูปที่ 1.2: เป็นการแสดงการเปลี่ยนแปลงของการศึกษาทางด้านชีววิทยา จากการศึกษาทีละยีนแยกกัน (reductionistic approach) ไปเป็นการศึกษาหลายๆยีนไปพร้อมกัน (integrative approach) [Covert et al., 2001]

1.3.5 การหาหน้าที่ของยีนโดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนม

เมื่อปลายปีพ.ศ. 2548 โครงการศึกษาลำดับพันธุกรรมในจีโนมของ *Spirulina*ได้ถูกจัดตั้งขึ้น เพื่อทำการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในจีโนมของ *Spirulina* รวมถึงการระบุตำแหน่งและหน้าที่ของยีนบนจีโนมที่น่าจะมีการแสดงออกเป็นโปรตีนใน *Spirulina* เพื่อจะทำให้รู้ถึงยีนทั้งหมดที่มีอยู่ใน *Spirulina*อย่างสมบูรณ์ อันเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่สำคัญ และนำไปสู่ความเข้าใจ และการพัฒนางานวิจัยของ*Spirulina*ในด้านต่างๆ และก่อให้เกิดงานวิจัยอื่นๆที่มีประโยชน์ เช่น metabolic pathway reconstruction การศึกษา *in silico* modeling การพัฒนาระบบการถ่ายถอดยีนที่มีประสิทธิภาพ การปรับปรุงสายพันธุ์ การศึกษาด้าน transcriptome การศึกษาการตอบสนองของ*Spirulina*ต่อสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง การศึกษาด้านการวิเคราะห์หน้าที่ของยีนในจีโนม (genome annotation) การวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลระหว่างจีโนมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ (comparative genome) รวมถึงการสร้างฐานข้อมูลเพื่อทำการจัดเก็บข้อมูลที่เป็นประโยชน์ของ *Spirulina* (database construction)

การทำนายหาหน้าที่ของยีนโดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมสามารถทำได้โดย

(1.) *Sequence similarity search*

การทำนายหาหน้าที่ของยีนด้วยเทคนิค sequence similarity search เป็นวิธีการพื้นฐานในการศึกษาหาหน้าที่ของยีนจากสิ่งมีชีวิตที่เราสนใจ โดยทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับของกรดอะมิโน กับยีนอื่นที่มีการศึกษาวิเคราะห์หน้าที่มาก่อน ซึ่งสามารถทำนายหน้าที่ให้กับยีนที่ยังไม่รู้หน้าที่ (unknown genes หรือ hypothetical genes) โดยอาศัยข้อมูลจากอีกยีนมาใช้ เมื่อทั้งสองยีนมีความคล้ายคลึง (similarity) กันเพียงพอ

1.1 Orthologs

คือยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับของกรดอะมิโนคล้ายกัน (homology) โดยทั้งสองยีนมีต้นกำเนิดเดียวกัน (common ancestor) และวิวัฒนาการมาอยู่ในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน ดังนั้นทั้งสองยีนนี้จึงน่าจะมีหน้าที่เดียวกัน (similarity function) [Schuler, 2001]

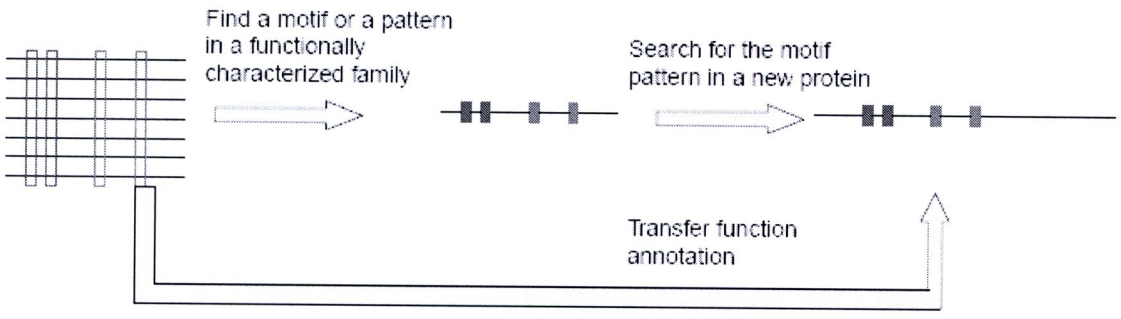
1.2 Paralogs

คือยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับของกรดอะมิโนคล้ายกัน (homology) โดยคาดว่าเกิดจากกระบวนการ gene duplication ซึ่งทั้งสองยีนนี้พบอยู่ในสิ่งมีชีวิตเดียวกัน ดังนั้นทั้งสองยีนนี้จึงน่าจะถูกพัฒนามาเพื่อให้มีหน้าที่ที่แตกต่างกัน (difference function) [Schuler, 2001]

การทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับของกรดอะมิโนสามารถทำได้หลายวิธี คือ (1) ทำการเปรียบเทียบทั้งยีน (entire length) ที่รู้จักกันในชื่อของ "global alignment" วิธีการนี้ไม่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน เนื่องจากความยาวของยีนมีผลโดยตรงต่อความคล้ายคลึงระหว่างยีนที่นำมาเปรียบเทียบกัน ดังนั้นจึงมักให้ผลลัพธ์ที่ได้มีความแม่นยำน้อยลง เมื่อยีนที่นำมาเปรียบเทียบกันมีขนาดแตกต่างกันมาก (มาจากสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการห่างกันมาก) ซึ่งวิธีที่ถูกเลือกมาใช้ในปัจจุบันคือ (2) การเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณ (certain regions) ที่เรียกว่า "local alignment" โดยเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบยีนด้วยเทคนิค local alignment ที่รู้จักกันดีคือ BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool, ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ซึ่งโปรแกรมนี้จะทำการค้นหายีนในฐานข้อมูลเพื่อหายีนที่มีความคล้ายคลึงกับยีน (homologous genes) ที่เราสนใจออกมา [Altschul et al., 1997] แต่การเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณ (local alignment) เพียงอย่างเดียวนั้น ไม่สามารถสรุปหน้าที่ของยีนที่สนใจได้โดยต้องพิจารณาด้วยว่าบริเวณที่เหมือนกันนั้น เป็นบริเวณที่ทำหน้าที่ของโปรตีนเหล่านั้นหรือไม่ (function region หรือ domain region)

(2.) *Domain and motif analysis*

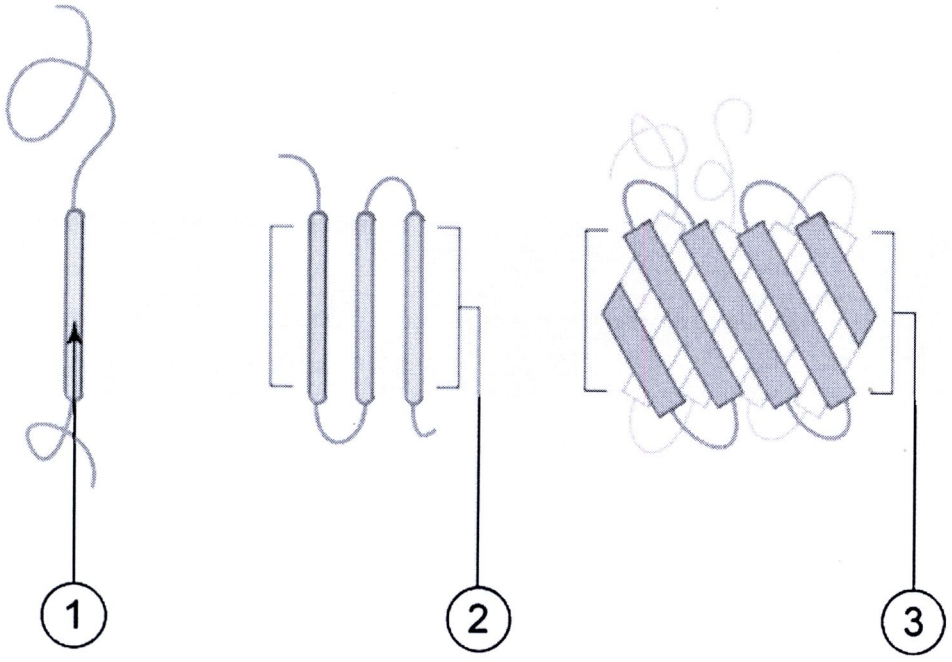
การวิเคราะห์หา domain regions และ motif regions สามารถทำได้โดยเริ่มจากการเปรียบเทียบลำดับของลำดับของกรดอะมิโนของกลุ่มโปรตีนที่มีคาดว่าจะมีหน้าที่เดียวกันกับโปรตีนที่เราสนใจ (query protein) โดยเทคนิคที่เรียกว่า "multiple sequences alignment" จะทำให้พบบริเวณที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved regions) ซึ่งบริเวณเหล่านี้จะถูกเรียกว่า "motif" หลังจากนั้นจึงนำรูปแบบของ motif ที่พบไปทำการค้นหาเทียบกับโปรตีนที่เราสนใจ (query protein) ถ้าพบรูปแบบของ motif ดังกล่าวในโปรตีนที่เราสนใจ ดังนั้นโปรตีนที่เราสนใจจึงน่าที่จะมีหน้าที่ (predicted function) เดียวกันกับกลุ่มโปรตีนเหล่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3: วิธีการทำนายหน้าที่ของโปรตีนโดยการวิเคราะห์ motif patterns [Ofran et al., 2005]

(3.) *Transmembrane regions prediction*

Transmembrane proteins คือโปรตีนที่มีส่วนหนึ่งของโปรตีนที่สามารถแทรกสอดเข้าไปอยู่ใน cell membrane ได้โดยโครงสร้างของส่วนที่เป็น transmembrane region ที่พบมี 2 ลักษณะ คือ (1) Alpha-helical และ (2) beta-barrel ดังแสดงในรูปที่ 1.4 การทำนายหาบริเวณที่เป็น transmembrane regions สามารถวิเคราะห์จากโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนเหล่านั้น ซึ่งในปัจจุบันมีโปรแกรมที่ช่วยในการทำนายหา transmembrane regions อยู่หลายโปรแกรมด้วยกันดังแสดงไว้ในตารางที่ 1.2 การวิเคราะห์หา transmembrane regions มีความสำคัญต่อการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ natural transformation เนื่องจากโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการนำ exogenous DNA เข้าสู่ในเซลล์มักเป็น transmembrane proteins ดังนั้นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ natural transformation ส่วนใหญ่จึงเป็น transmembrane proteins ด้วยเช่นเดียวกัน



รูปที่ 1.4: แสดง transmembrane regions ชนิดต่างๆที่สามารถแทรกสอดเข้าไปใน cell membranes ได้ (1). a single transmembrane α-helix (bitopic membrane protein) (2). a polytopic α-helical protein (3). a transmembrane β-barrel

ตารางที่ 1.2: Software and databases that can be used as sources of bacterial genome annotations

Names	Comments	URL
GenBank	Annotated collection of all publicly available DNA sequences (data is shared among GenBank, EMBL, and DDBJ)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/
UniProt	High-quality database of protein sequences and annotations that is used by many sequence annotation systems as a source of functional predictions	http://www.pir.uniprot.org/
CyanoBase	Online resource for access to data on genomic information about the cyanobacterium	http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/
COGs	The database represent a phylogenetic classification of the proteins encoded in complete genomes, including bacteria, archaea, unicellular eukaryotes, and multicellular eukaryotes	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG
KEGG	A knowledgebase for systematic analysis of gene functions in terms of the networks of genes and molecules	http://www.genome.ad.jp/kegg/
Artemis	Software for viewing and editing sequence annotations	http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/
BLAST	Software for sequence database searching and one of the most important components of sequence analysis systems	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
ClustalW2	Multiple sequence alignment program for DNA or proteins	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html

ตารางที่ 1.2 (ต่อ): Software and databases that can be used as sources of bacterial genome annotations

Pfam	Large database of protein families and domains that can be used to categorize new sequences	http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/
TMpred	Program makes a prediction of membrane-spanning regions and their orientation.	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html
tmHMM	Software for predicting transmembrane regions in protein sequences	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
InterPro	Database of protein families, domains, repeat	http://www.ebi.ac.uk/interpro/
SMART	The database contains Swiss-Prot, SP-TrEMBL and stable Ensembl proteomes that can use to explore domain architectures, or want to find exact domain counts in various genomes	http://smart.embl-heidelberg.de/
BLOCKS	The motif database that represent protein or domain families by several short, ungapped multiple alignment fragments	http://www.blocks.fhcrc.org/

1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการ

ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดยีน (genetic transformation) ของ *Spirulina platensis* C1 โดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม *Spirulina* เพื่อนำไปสู่การพัฒนาระบบการถ่ายทอดยีนให้มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้น

1.5 ขอบเขตงานวิจัย

ในการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดยีน (genetic transformation) ของ *Spirulina platensis* C1 จะมุ่งเป้าไปที่การถ่ายทอดยีนด้วยวิธี natural transformation เนื่องจากกระบวนการ natural transformation นั้นมีจุดเด่นกว่ากระบวนการถ่ายทอดยีนด้วยวิธีอื่นๆ ดังนี้ (1) การคัดเลือกหาเซลล์ที่ได้รับ DNA จากภายนอก (transformants) นั้นสามารถทำได้ง่ายกว่า (2) ในการถ่ายทอดยีนเข้าสู่เซลล์ที่ต้องการนั้นกระบวนการ natural transformation จะใช้เวลาน้อยกว่า (3) มีประสิทธิภาพสูงกว่า [Blomqvist, et al., 2006] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษายีนของ *Spirulina* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดยีน (genetic transformation) ด้วยวิธี natural transformation ตั้งแต่ (1) ยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการสร้าง pilus filament ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักที่ช่วยในการนำ DNA จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ (2) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างช่องทาง (channel) สำหรับให้ DNA จากภายนอกผ่าน outer membrane (3) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ pilus filament (4) ยีนที่เกี่ยวข้องกับนำ DNA ผ่าน cytoplasmic membrane เข้าสู่ภายในเซลล์ โดยหวังว่าความรู้ที่ได้จากงานนี้จะช่วยให้การพัฒนากระบวนการถ่ายทอดยีนของ *Spirulina* มีความก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว และนำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์ของ *Spirulina platensis* ให้มีศักยภาพตามที่ต้องการของแต่ละกลุ่มงานมากยิ่งขึ้น

1.6 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

ขั้นตอนการวิจัย	เดือนที่ 1-3	เดือนที่ 4-6	เดือนที่ 7-9	เดือนที่ 10-12
1. รวบรวมยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดยีน ○ Cyanobacteria ○ Bacteria	↔			
2. การวิเคราะห์และค้นหายีน (โปรตีน) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดยีนด้วยวิธีการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน (homology-based method)	↔	↔		
3. การวิเคราะห์เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนแบบหลายโปรตีน (multiple sequence alignment)		↔	↔	
4. การวิเคราะห์ Domain และ Motif ของโปรตีนที่สนใจ			↔	↔
5. การวิเคราะห์หา transmembrane regions ของโปรตีนที่สนใจ				↔
6. สรุปและเขียนรายงาน				↔