ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249964

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การใช้ประโยชน์จากข้อมูลจีโนมของสไปรูลิน่าเพื่อการศึกษากระบวนการ
ถ่ายทอดยีนเพื่อประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์และอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ

Use of *Spirulina* Genomic Information for the Study of the DNA Uptake System:
Implications for Strain Improvement and Biotechnological Industry Development

ผู้วิจัย

นายเตวิช วรปรีดา
นางสาวสุดารัตน์ ดลสวัสดิ์
นางวัฒนา เจียมดน
นางสุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์

จัดทำโดย

สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

รายงานนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ประจำปีงบประมาณ 2553

b00255205

249964

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249964

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การใช้ประโยชน์จากข้อมูลจีโนมของสไปรูลิน่าเพื่อการศึกษากระบวนการถ่ายทอดยีนเพื่อประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์และอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ

Use of *Spirulina* Genomic Information for the Study of the DNA Uptake System: Implications for Strain Improvement and Biotechnological Industry Development

ผู้วิจัย

นายเตวิช วรปรีดา
นางสาวสุดารัตน์ ดลสวัสดิ์
นางวัฒนา เจียมดน
นางสุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

จัดทำโดย

สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

รายงานนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ประจำปีงบประมาณ 2553

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2553

---

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การใช้ประโยชน์จากข้อมูลจีโนมของสไปรูลิน่าเพื่อการศึกษากระบวนการถ่ายทอดยีนเพื่อประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์และอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ

(ภาษาอังกฤษ) Use of *Spirulina* Genomic Information for the Study of the DNA Uptake System: Implications for Strain Improvement and Biotechnological Industry Development

2. หน่วยงานที่รับผิดชอบงานวิจัย สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ถนนประชาอุทิศ ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

3. ผู้วิจัย

3.1 หัวหน้าโครงการ: นายเตวิช วรปรีดา
คุณวุฒิ: ปริญญาโท (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาความเชี่ยวชาญ: เทคโนโลยีชีวภาพ และชีวสารสนเทศ
สถานที่ทำงาน: หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาวิศวกรรมชีวเคมีและโรงงานต้นแบบ
สังกัด ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)
เลขที่ 49 ซอยเทียนทะเล 25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน
กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์: 02-4707531
โทรสาร: 02-4523455
ประสบการณ์ในงานวิจัย Bioinformatics and metabolic pathway reconstruction
ความรับผิดชอบต่อโครงการที่เสนอ คิดเป็น 15% ของงานทั้งหมด

3.2 ผู้ร่วมวิจัย: นางวัฒนา เจียมตน
คุณวุฒิ: ปริญญาโท (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สถานที่ทำงาน: สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)

เลขที่ 49 ซอยเทียนทะเล 25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน
กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์: 02-470-7503
โทรสาร: 02-452-3455
E-mail: wattana@pdti.kmutt.ac.th, w_chetkul@yahoo.com
ประสบการณ์ในงานวิจัย: Gene manipulation in cyanobacteria
Gene transfer in cyanobacteria
ความรับผิดชอบต่อโครงการที่เสนอ คิดเป็น 15% ของงานทั้งหมด

ผู้ร่วมวิจัย นางสาวสุดารัตน์ ดลสวัสดิ์
คุณวุฒิ: ปริญญาโท (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สถานที่ทำงาน สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)
เลขที่ 49 ซอยเทียนทะเล 25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน
กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์ 02-470-7503
โทรสาร 02-452-3455
E-mail: sudarat_d@yahoo.com
ประสบการณ์ในงานวิจัย Gene manipulation in cyanobacteria,
Gene transfer in cyanobacteria
ความรับผิดชอบต่อโครงการที่เสนอ คิดเป็น 15% ของงานทั้งหมด

3.3 ที่ปรึกษาโครงการ: ผศ. ดร. สุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์
คุณวุฒิ: ปริญญาเอก (จุลชีววิทยา)
สาขาความเชี่ยวชาญ: อณูพันธุศาสตร์ และชีวสารสนเทศ
สถานที่ทำงาน: สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)
เลขที่ 49 ซอยเทียนทะเล 25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน
กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์: 02-4523452 ต่อ 4134
โทรสาร: 02-4523455
ประสบการณ์ในงานวิจัย Bioinformatics for microbial lipid metabolism
ความรับผิดชอบต่อโครงการที่เสนอ คิดเป็น 5% ของงานทั้งหมด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2553 ตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2553

บทคัดย่อ

249964

ไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดสามารถส่งถ่ายดีเอ็นเอผ่านระบบ natural transformation ที่มี pilus ชนิด IV หรือ T4P เป็นตัวช่วย ตัวอย่างเช่น *Synechocystis* sp. PCC 6803 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียต้นแบบในการศึกษาระบบ complex pili ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ motility และ natural competence และ *T. elongatus* BP-1 เป็นไซยาโนแบคทีเรียต้นแบบในการศึกษากลไกของกระบวนการสังเคราะห์แสงในระดับโมเลกุล และ circadian clock โดย T4P ประกอบด้วย pilin หลายหน่วยย่อยซึ่งทำงานร่วมกับ biogenesis/ assembly components รวมอยู่กับ pilus fiber โดย T4P มีส่วนเกี่ยวข้องกับ กระบวนการต่าง ๆ เช่น cell adhesion twitching motility และ natural transformation

จากการศึกษาใน *Spirulina* โดยเปรียบเทียบ (similarity search) ยีนในกลุ่ม T4P ที่ได้จากแบคทีเรียหลายชนิดกับลำดับเบสบนจีโนมของ *Spirulina* พบว่ามากกว่า 10 ORF ที่มี homologous กับยีนที่เกี่ยวข้องกับ biogenesis ของระบบ pilus ชนิด IV โดยจำแนกเป็นกลุ่มได้ดังนี้ กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง pilus filament ได้แก่ ยีน *pilA* และ *pilD* กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง outer-membrane channel ได้แก่ยีน *pilQ* และ *omp85* กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ pilus motilityได้แก่ ยีน *pilB pilG* และ *pilT* และกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการนำ ดีเอ็นเอ ผ่าน cytoplasmic membrane ได้แก่ *comEA comEC* และ *comFA*

ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลจีโนมของ *Spirulina* กับไซยาโนแบคทีเรีย 11 สายพันธุ์ ทั้งที่เป็นสายพันธุ์น้ำจืด และน้ำเค็มซึ่งมีลำดับเบสบนจีโนมครบสมบูรณ์ พบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้นได้แก่ *Synechocystis sp.* PCC 6803, *Anabaena sp.* PCC7120, *T. elongatus* BP-1, *S. elongatus* PCC 6301 และ *Spirulina* ที่มียีนสำหรับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ natural transformation ครบ และอย่างน้อย 3 สายพันธุ์ที่มีงานวิจัยแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการนำ DNA จากภายนอกเข้าสู่เซลล์ ได้แก่ *Synechocystis sp.* PCC 6803 *T.elongatus* BP-1 *S. elongatus* PCC 6301 และสิ่งที่น่าสนใจคือทั้ง 3 สายพันธุ์นี้มียีน *pilA*1 มากกว่า 1 copy ในขณะที่ *Spirulina* มียีน *pilA1* รวมทั้งยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องเพียงอย่างละ 1 copy ยกเว้นยีน *pilT* ที่มี 3 copy ดังนั้นจากผลการศึกษาเปรียบเทียบยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์แสดงให้เห็นว่า *Spirulina* อาจมีความสามารถในส่วนนี้เช่นเดียวกัน

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3
บทคัดย่อ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญภาพ	6
สารบัญตาราง	7
1. บทนำ	8
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	8
1.2 ผลสำเร็จของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	9
1.3 การวิจัยที่เกี่ยวข้อง และคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่ทำ	9
1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการ	18
1.5 ขอบเขตงานวิจัย	19
1.6 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ	19
2. วิธีการดำเนินงานวิจัย	20
3. ผลการดำเนินงานวิจัย	22
3.1 DNA receptor (ComEA)	22
3.2 Membrane channel protein (ComEC)	24
3.3 The ATP-binding protein (ComFA/ComF)	26
3.4 Secretin (PilQ)	28
3.5 Chloroplast outer envelope membrane protein (Omp85) หรือ Pilot protein	29
3.6 Pilus retraction protein (PilT)	30
3.7 Pilus Biogenesis protein (PilB)	32
3.8 The polytopic membrane protein (PilG)	33
3.9 Type 4 prepilin peptidase (PilD)	35
3.10 Prepilin protein (PilA)	36
3.11 ผลการเปรียบเทียบยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งถ่ายยีนของไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ	37
4. สรุปและข้อเสนอแนะ	38
5. เอกสารอ้างอิง	40

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1.1:	*สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Spirulina*	10
รูปที่ 1.2:	*แสดงการเปลี่ยนแปลงของการศึกษาทางด้านชีววิทยา*	14
รูปที่ 1.3:	*วิธีการทำนายหน้าที่ของโปรตีนโดยการวิเคราะห์ motif patterns*	15
รูปที่ 1.4:	*transmembrane regions ชนิดต่าง ๆที่สามารถแทรกสอดเข้าไปใน cell membranes*	16
รูปที่ 2.1:	*ภาพรวมของขั้นตอนการหารยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งถ่ายยีนในสาหร่าย Spirulina*	21
รูปที่ 3.1(A):	*Hydropathy plot ของเอนไซม์ ComEA*	23
รูปที่ 3.1(B):	*แสดงการเปรียบเทียบโครงสร้างของเอนไซม์ PY01430014V03 ของ Spirulina เปรียบเทียบกับไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น*	23
รูปที่ 3.2:	*วิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่าง ComEA ของไซยาโนแบคทีเรีย*	24
รูปที่ 3.3:	*แสดงผลการเปรียบเทียบ amino acid sequence บริเวณที่เป็น competence domain ของโปรตีน ComEC*	25
รูปที่ 3.4:	*แสดงการเปรียบเทียบโครงสร้างของโปรตีน PY01540002V03 ของ Spirulina เทียบกับโปรตีน ComEC ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น*	26
รูปที่ 3.5:	*ผลการเปรียบเทียบ amino acid sequence ของโปรตีน ComF*	27
รูปที่ 3.6:	*แสดงการเปรียบเทียบโครงสร้างของ secretin proteins*	28
รูปที่ 3.7:	*แสดงการเปรียบเทียบโครงสร้างของ pilot proteins*	29
รูปที่ 3.8:	*แสดงผลการเปรียบเทียบ amino acid sequence ของโปรตีน PilT*	31
รูปที่ 3.9:	*แสดงบริเวณที่เป็น domains สำคัญของโปรตีน PilB*	32
รูปที่ 3.10:	*แสดงการเปรียบเทียบ amino acid sequence ระหว่างโปรตีนในกลุ่ม PilG*	34
รูปที่ 3.11:	*แสดงผลการค้นหา domain ของโปรตีน PY01350049V03 ของ S. platensis*	35
รูปที่ 3.12:	*เปรียบเทียบตำแหน่งที่จะถูกตัดโดยโปรตีน PilD ของโปรตีนในกลุ่ม PilA*	36
รูปที่ 4.1:	*ภาพรวมของกระบวนการ DNA uptake system*	39

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.1:	*ผลของ Spirulina ที่มีต่อสุขภาพของมนุษย์ และสัตว์*	*11*
ตารางที่ 1.2:	*Software and databases that can be used as sources of bacterial genome annotations*	*17*
ตารางที่ 3.1:	*แสดงค่าความคล้ายคลึงกันระหว่าง amino acid sequence ของโปรตีนกลุ่ม ComF*	*27*
ตารางที่ 3.2:	*แสดงค่าความคล้ายคลึงกันระหว่าง amino acid sequence ของโปรตีนกลุ่ม PilG*	*33*
ตารางที่ 3.3:	*ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA uptake system ในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ*	*37*
ตารางที่ 4.1:	*รายชื่อยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA uptake system*	*38*