ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันจุลินทรีย์มีบทบาทสูงมากต่ออุตสาหกรรมทางชีวภาพ (bioindustry) ทั้งนี้ เพราะผลิตภัณฑ์หลายชนิดได้จากขบวนการสังเคราะห์ของจุลินทรีย์ เช่น เอนไซม์ , ยาปฏิชีวนะ , ไวตามิน เป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้จะต้องมีการปรับปรุงสายพันธุ์ (strain improvement) อยู่สม่ำเสมอเพื่อให้สามารถเพิ่มผลผลิตได้สูงซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิต การทำให้เกิดการผ่าเหล่า (mutagenesis) ของจุลินทรีย์ นับว่าเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้เป็นวิธีที่ใช้เวลามาก เพราะการผ่าเหล่าเกิดขึ้นแบบสุ่ม (random) ทำให้โอกาสที่จะเกิดการกลายพันธุ์ตรงตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผลิตภัณฑ์เป็นไปได้ต่ำ ต่อมามีผู้เริ่มหันมาสนใจวิธีการทางพันธุวิศวกรรม (Genetic Engineering) ซึ่งสามารถดัดแปลงหรือปรับปรุงชิ้นส่วนดีเอนเอที่เป็นรหัสของยีนที่สนใจได้โดยตรง และเคลื่อนย้ายยีนที่ต้องการเข้าสู่จุลินทรีย์ที่เหมาะสม เพื่อให้สร้างผลิตภัณฑ์ใหม่หรือเพิ่มผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้

Streptomycetes เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม Actinomycetes ที่มีความสำคัญมากในทางอุตสาหกรรมกลุ่มหนึ่ง เนื่องจากสามารถผลิตสารที่เป็นประโยชน์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ซึ่งพบว่า 70-80% ของยาปฏิชีวนะในปัจจุบันนี้ผลิตมาจาก Streptomycetes (1) เช่น เตตราไซคลิน (tetra cycline) , กานามัยซิน (kanamycin) เป็นต้น นอกจากนี้ Streptomycetes ยังผลิตเอนไซม์หลายชนิด (2) เช่น โปรเนส (pronase) , ไซแลเนส (xylanase), กลูโคสไอโซเมอเรส (glucose isomerase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทส (3)

มีผู้รายงานการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Streptomyces* โดยการโคลนยีนที่เป็นรหัสของโปรตีนที่ต้องการมากมาย เพื่อเพิ่มผลผลิตหรือให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ ซึ่งจะได้กล่าวถึงรายละเอียดต่อไป (4,5,6,7,8)

การโคลนยีนใน Streptomycetes มีสิ่งสำคัญที่เกี่ยวข้อง ดังนี้ (9, 10,11,12,13)

1. Streptomyces ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host)

ในการโคลนยีนเข้าสู่ Streptomycetes การคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมมีความสำคัญอย่างมาก เซลล์เจ้าบ้านที่ดีไม่ควรจะแสดงคุณสมบัติของยีนที่ต้องการจะโคลน เช่น ถ้าจะโคลนยีนกานามัยซิน Streptomyces นั้น ก็ควรจะมีคุณสมบัติไม่ต้านยากานามัยซิน (kanamycin sensitive strain) นอกจากนั้นจะต้องไม่มี restriction system หรือแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (DNase) ที่สามารถจะมาทำลายชิ้นส่วนดีเอนเอที่นำเข้าไปได้ ซึ่งการแสดงออกของคุณสมบัติเหล่านี้อาจยับยั้งได้ โดยวิธีการผ่าเหล่า (mutation) เซลล์เจ้าบ้านเหล่านี้เสียก่อนนำมาใช้ เนื่องจากการทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ต้องทำให้เซลล์อยู่ในรูปโปรโตพลาสต์ (protoplast) เสียก่อน ดังนั้น จึงต้องศึกษาการเกิดโปรโตพลาสต์และรีเจนเนอเรชันโปรโตพลาสต์ของเซลล์เจ้าบ้าน โดยโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้แล้วจะต้องมีประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 10^5 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอนเอ ทั้งนี้เพราะเมื่อทำการเชื่อมยีนเข้าพลาสมิดพาหะแล้ว ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจะลดลงอีกประมาณ 100 เท่า และถึงแม้ว่าจะทำการกำจัดหมู่ฟอสเฟต ที่ปลายของพลาสมิดพาหะแล้วก็ตาม ความถี่ของการเกิดทรานสฟอร์เมชันที่จะพบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมีค่าประมาณ 50% เท่านั้น (49)

2. ดีเอนเอพาหะ

ปัจจุบันมีดีเอนเอพาหะหลายชนิด ที่สามารถนำมาใช้ในการโคลนยีนของ Streptomyces (11) ดีเอนเอพาหะที่นิยมใช้ คือ พลาสมิด ซึ่งแบ่งออกเป็นประเภทที่เพิ่มจำนวนชุดได้สูง (high copy number vector) ได้แก่ pIJ101 (14), pIJ702 (15) เป็นต้น ซึ่งจะมีจำนวนชุดเพิ่มได้สูงถึง 40-300 ชุด ต่อโครโมโซม และอีกประเภทหนึ่ง คือ พลาสมิดที่เพิ่มจำนวนชุดได้ต่ำ (low copy number vector) ได้แก่ pIJ61(16), SCP2 (17,18), SLP1(19) เป็นต้น ซึ่งมีจำนวนชุดเพิ่มได้ 1-5 ชุดต่อโครโมโซม พลาสมิดที่ใช้เป็นพาหะเหล่านี้ จะมีส่วนของยีนต้านยา

เป็นยีนเครื่องหมาย (marker) ได้แก่ ยีนต้านยาไธโอสเตรพตอน (thiostrepton, tsr) ซึ่งโคลนโดย Thompson และคณะ (20) ยีนต้านยานี้เป็นที่นิยมใช้กันมากเพราะ Streptomycetes เกือบทุกชนิดจะขาดคุณสมบัติในการต้านยาปฏิชีวนะนี้ นอกจากนั้นยังมียีนต้านยานีโอมัยซิน (neomycin, aph) (20) , อีรีโธรมัยซิน (erythromycin, mls) (16), ไวโอมัยซิน (viomycin , vph) (21) และ ไฮโกรมัยซิน (hygromycin, hyg) (22) ยีนเครื่องหมายเหล่านี้จะมีประโยชน์สำหรับคัดเลือกโคลนที่ต้องการ

พลาสมิด pIJ702 และ pIJ699 เป็นพลาสมิดที่เพิ่มจำนวนได้หลายชุดต่อโครโมโซม และเป็นที่นิยมมากในการใช้เป็นพลาสมิดพาหะเพื่อโคลนยีนของ *Streptomyces* (5,6,7,8) ดังนั้นจึงจะกล่าวถึงสมบัติของพลาสมิดทั้งสองโดยละเอียดดังนี้

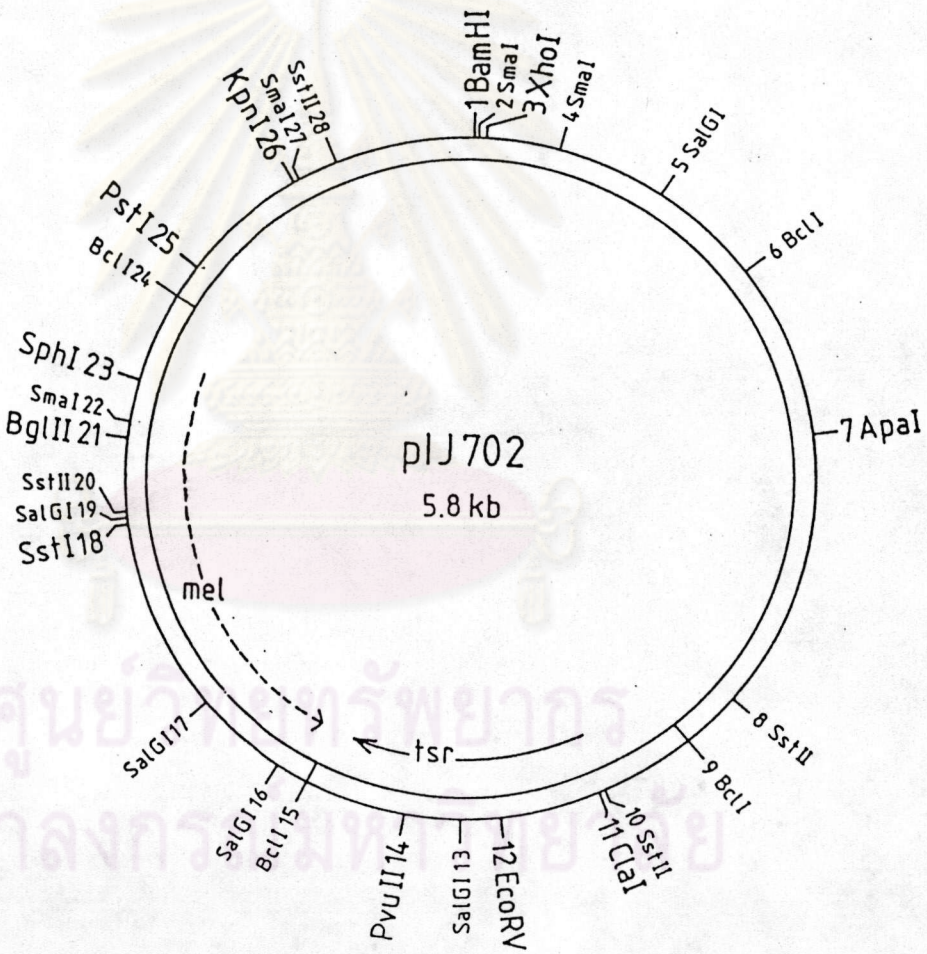
2.1 พลาสมิดพาหะ pIJ702

พลาสมิดพาหะ pIJ702 เป็นพลาสมิดที่เหมาะสมสำหรับเซลล์เจ้าบ้านหลายชนิด (broad host-range) ใน *Streptomyces* เนื่องจากเป็นอนุพันธ์ของ pIJ101 (14) สร้างขึ้นโดย Katz และคณะ (15) มีขนาด 5.8 กิโลเบส ซึ่งมีส่วนของไทโรซิเนสยีน (tyrosinase ,mel) จาก *S. antibioticus* และยีนต้านยาไธโอสเตรพตอนจาก *S. azureus* คุณสมบัติของยีนไทโรซีเนสจะทำให้ *Streptomyces* สร้างรงควัตถุสีดำ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไทโรซีน (tyrosine) โดยเปลี่ยนไทโรซีนเป็นเมลานิน (melanin) pIJ702 มีตำแหน่งที่ถูกตัดโดยเรสทริกชันเอนไซม์หลายชนิดตามรูปที่ 1 โดยเฉพาะตำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์จำเพาะบนไทโรซีเนสยีน ได้แก่ BglII , SphI และ SstI ซึ่งการโคลนยีนเข้าสู่ตำแหน่งเหล่านี้จะเป็นเครื่องหมายบอกได้ว่า ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยโคลนที่ได้จะไม่ให้รงควัตถุสีดำ ตำแหน่ง BglII เป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ตัดเพื่อเชื่อมกับชิ้นส่วนของดีเอนเอมาก เพราะปลายเหนียว (sticky end) ของพลาสมิด สามารถเข้าจับเบสคู่สมได้กับชิ้นส่วนของดีเอนเอ ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ BamHI , XhoII , BclI , Sau3A1 และ MboI นอกจากนั้น ยังพบว่าโครโมโซมอลดีเอนเอของ *Streptomyces* มีลำดับเบส GATC ปรากฏอยู่มากจึงนิยมตัดโครโมโซมอลดีเอนเอด้วยเอนไซม์ Sau3A1 หรือ MboI ซึ่งจดจำลำดับเบส 4 ตัว คือ GATC (9)

รูปที่ 1 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pIJ702 (13)

mel = tyrosinase gene

tsr = thiostrepton resistant gene

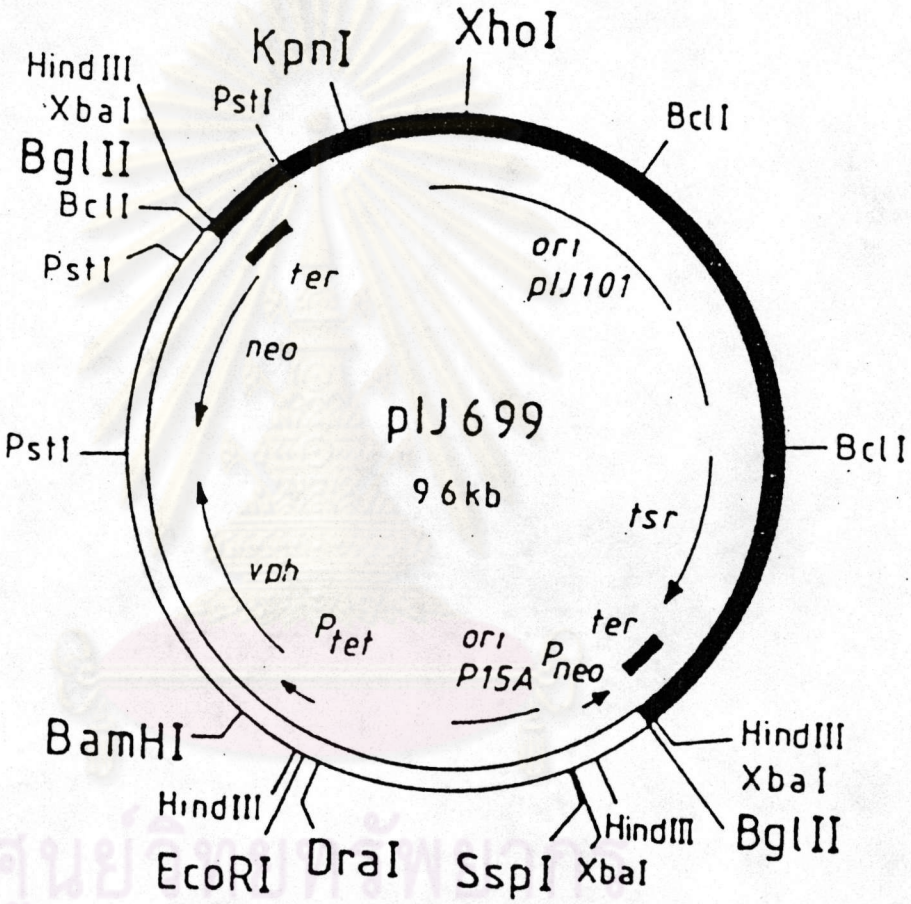


ซึ่งสามารถนำชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอ ที่ได้มาเชื่อมกับพลาสมิด pIJ702 ที่ถูกตัดด้วย BglII ได้

2.2 พลาสมิดพาหะ pIJ699

พลาสมิดพาหะ pIJ699 เป็นพลาสมิดชนิด positive-selection vector ตัวแรกของ *Streptomyces* มีขนาด 9.6 กิโลเบส สร้างขึ้นโดย Kieser และ Melton (23) แบ่งออกเป็น 2 ส่วนโดยการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ BglII ดังแสดงในรูปที่ 2 ส่วนแรกขนาด 5 กิโลเบส ประกอบด้วย ori และยีนต้านยาไธโอสเตรพตอน (tsr) จากพลาสมิด pIJ101 ที่ปลายทั้งสองข้างของส่วนนี้จะเป็น transcriptional terminator (ter) ของ *E. coli* phage fd ซึ่งอยู่ในลักษณะ inverted repeat ซึ่งถ้าปลายทั้งสองนี้อยู่ติดกันจะทำให้พลาสมิดนี้ไม่เสถียร ดังนั้น ชิ้นส่วนดีเอนเอนี้จะถูกแยกออกโดยชิ้นดีเอนเอส่วนที่สองขนาด 4.6 กิโลเบส ซึ่งจะทำให้พลาสมิดคงอยู่ได้ (viability) ดังนั้น เมื่อนำชิ้นส่วนขนาด 5 กิโลเบสของพลาสมิดนี้มาใช้ในการโคลนยีน และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ พลาสมิดที่ปรากฏในเซลล์ จะเป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเสมอ (positive-selection) เพราะถ้าชิ้นส่วนนี้เชื่อมตัวเอง จะเป็นผลให้ไม่เสถียรในเซลล์ (non-viability) เนื่องจากสมบัติของ inverted repeats (long uninterrupted perfect palindromes) ดังกล่าว นอกจากนั้นการแสดงออกของยีนที่ถูกโคลนจะขึ้นกับโปรโมเตอร์ (promotor) ของยีนนั้น ๆ โดยไม่ขึ้นกับโปรโมเตอร์บนพลาสมิด ที่อาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนให้เพิ่มขึ้นหรือลดลง ทั้งนี้ เนื่องจากการอ่านรหัสจะหยุดเมื่ออ่านถึงส่วนของยีน ter พลาสมิดนี้จึงเหมาะสมที่จะใช้ศึกษาการควบคุมกลไกของยีนที่ถูกโคลน (regulation)

รูปที่ 2 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pIJ699 (23)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ทรานสฟอร์เมชัน (Transformation)

ทรานสฟอร์เมชันคือการที่พลาสมิดดีเอนเอ หรือดีเอนเอเปลือย (naked DNA) ใด ๆ ผ่านเข้าไปสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ และสามารถเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการของจุลินทรีย์นั้นได้ โดยดีเอนเอเปลือยนั้นอาจไปรวม (integrate) อยู่กับโครโมโซมของจุลินทรีย์นั้น (24)

ในการเกิดทรานสฟอร์เมชันของจุลินทรีย์ทำได้สองวิธี คือทำให้เซลล์อยู่ในสภาพ competent cell หรืออยู่ในรูปโปรโตพลาสต์ ซึ่งรวมไปถึงสเฟียโรพลาสต์ (spheroplast) และ ออโตพลาสต์ (autoplast) ด้วย สำหรับ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบสามารถรับดีเอนเอเปลือยให้เข้าสู่เซลล์ได้ เมื่อถูกชักนำให้เซลล์อยู่ในสภาพ competent cell ได้ด้วยแคลเซียมคลอไรด์ (25)

สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกที่นิยมใช้ศึกษาทางพันธุศาสตร์มากคือแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *B. subtilis* และ *B. megaterium* เนื่องจากเจริญได้ง่ายและสามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นโปรโตพลาสต์ง่าย โดยการทำลายผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ (26,27) ซึ่งวิธีการเตรียมเซลล์ให้เป็นโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์สามารถนำมาใช้กับ *Streptomyces* ได้เช่นกัน (28,29) เนื่องจากโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* ส่วนใหญ่จะไว (sensitive) ต่ออุณหภูมิสูง ดังนั้นในการบ่มเซลล์กับไลโซไซม์จึงควรทำที่อุณหภูมิต่ำกว่า 37°ซ (30)

การทรานสฟอร์มพลาสมิดเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงจะต้องศึกษาถึง การเกิดโปรโตพลาสต์และการรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสต์เป็นสำคัญ ดังจะกล่าวถึงดังนี้

3.1 การเตรียมโปรโตพลาสต์

ในการเตรียมโปรโตพลาสต์นั้น อายุของเชื้อที่จะนำมาเตรียมมีความสำคัญมาก ซึ่งจะมีผลต่อการรีเจนเนอเรชันของโปรโตพลาสต์ด้วย จากรายงานโดยทั่วไป (30,31,32) พบว่า *Streptomyces* จะเกิดโปรโตพลาสต์และรีเจนเนอเรทได้ดีเมื่อมีอายุอยู่ในระยะ log phase ซึ่งอาจจะเป็นช่วงต้น (early log phase) ตอนกลาง (mid-log phase) หรือตอนปลาย (late-log phase) ก็ได้ขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละชนิด นอกจากนั้นยังมีรายงานถึงการเติมไกลซีน (glycine) ในอาหารเลี้ยง

เชื้อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดโปรโตพลาสต์ เนื่องจากไกลซีนจะไปแทนที่ตำแหน่งอะลานีน (L-alanine และ D-alanine) ในชั้นของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ของผนังเซลล์ ซึ่งการแทนที่ที่ตำแหน่งใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ซึ่งจะเป็นผลจะทำให้ cross-link ของผนังเซลล์อ่อนแอลง จึงถูกทำลายด้วยไลโซไซม์ได้ง่ายขึ้น (33) อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไกลซีนก็ยังแตกต่างกันในแต่ละชนิดของ *Streptomyces* (10,31,32,34,35)

Sagara และคณะ (34) เป็นกลุ่มแรกที่รายงานการเกิดโปรโตพลาสต์ของ S. *griseoflavus* โดยเติมไกลซีน 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยพบว่าผนังเซลล์จะถูกย่อยสลายด้วยไลโซไซม์ดีขึ้น แต่การเจริญของเซลล์จะถูกยับยั้ง Okanishi (31) รายงานว่า S. *grisus* และ S. *venezualae* จะเกิดโปรโตพลาสต์ได้ดีเมื่อเติมไกลซีน 0.8 และ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ จากรายงานของ Hopwood และคณะ (10,35) ยืนยันว่าไกลซีนมีผลต่อการเกิดโปรโตพลาสต์จริง โดยศึกษาใน *Streptomyces* 5 ชนิด พบว่าความเข้มข้นของไกลซีนแปรผันตั้งแต่ 1.0-4.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่อย่างไรก็ตามมีผู้รายงานว่า *Streptomyces* บางชนิด การเติมไกลซีนไม่มีผลต่อการเกิดโปรโตพลาสต์ (36,37)

นอกจากปัจจัยที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ในการทดลองที่จะทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ลดลง เช่น เกิดการจับกลุ่มกันของโปรโตพลาสต์ที่แตกแล้ว เป็นตะกอนไม่แขวนลอยในบัฟเฟอร์ (protoplast clumping) เกิดเนื่องมาจากการแขวนลอยโปรโตพลาสต์โดยการปั่นผสมแบบวอร์เทกซ์ (vortex) หรือเกิดจากการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็วสูงหรือใช้เวลานาน (30) นอกจากนั้นเครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองที่มีคราบของน้ำยาล้างเครื่องแก้ว (detergent) ต่างๆ หลงเหลืออยู่ จะทำให้โปรโตพลาสต์แตกได้ง่าย ดังนั้นจึงควรกำจัดน้ำยาล้างเครื่องแก้วโดยแช่เครื่องแก้วในกรดไนตริกเจือจาง (nitric acid) (9)

3.2 การรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสต์

การรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสต์ ขึ้นอยู่กับอายุของเชื้อที่นำมาเตรียมโปรโตพลาสต์เช่นกัน Baltz (32) รายงานว่า S. *fradiae* และ S. *grisiofuscus* จะรีเจนเนอเรทได้สูงสุดเมื่อใช้เชื้อที่อยู่ในระยะ log phase Baltz และ Matsushima (38) ยังพบว่าอุณหภูมิที่เลี้ยงเชื้อก่อนนำมาเตรียมโปรโตพลาสต์มีความสำคัญมากต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการรีเจนเนอเรท โดยศึกษาใน *Streptomyces* 4 ชนิด พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมจะแปรผันตั้งแต่ 29-37°ซ และยังพบว่า การรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสต์ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ยังเกิดปรากฏการณ์ยับยั้งการเจริญของตัวเอง (auto-inhibition) ซึ่ง Hopwood และคณะ (35) ก็พบปรากฏการณ์นี้ใน S. *acrimycini* ด้วยเช่นกัน โดยโปรโตพลาสต์ที่รีเจนเนอเรทได้ก่อน หรือส่วนที่ไม่ใช่โปรโตพลาสต์ (non-protoplasted units) จะยับยั้งการรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสต์ที่เหลือ ทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่รีเจนเนอเรทได้ลดต่ำกว่าความเป็นจริง ดังนั้นจะต้องทำการเจือจางโปรโตพลาสต์ก่อนจะเกลี่ยลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีรายงานว่าการกำจัดความชื้นออกเป็นบางส่วน (partial dehydration) ของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับการรีเจนเนอเรทประมาณ 15-20% จะช่วยป้องกันปรากฏการณ์นี้ได้ (30)

จากการศึกษาการสร้าง และ การรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสต์ในเบื้องต้นโดย Okanishi และคณะ (31) ต่อมา Bibb และคณะ (39) พบว่าการทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอนเอ เข้าสู่โปรโตพลาสต์ใน *Streptomyces* จะให้ความถี่สูง (high frequency) เมื่อใช้สารโพลีเอธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) เป็นตัวชักนำ Matsushima และ Baltz (40) รายงานว่าความเข้มข้นของ PEG มีผลต่อการทรานสฟอร์มพลาสมิด pFT105 ใน S. *fradiae* โดย ที่ความเข้มข้น PEG 55% จะเกิดการทรานสฟอร์มดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม PEG ที่ใช้อาจขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุล และ ขึ้นกับบริษัทที่ผลิตด้วย เช่น การทรานสฟอร์มพลาสมิดใน S. *kasugaensis* พบว่า PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 ให้ผลการทรานสฟอร์มดีกว่าใช้ PEG น้ำหนักโมเลกุล 1000 (41) นอกจากนั้น อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อและอายุของ

เชื้อก่อนนำมาเตรียมโปรโตพลาสต์ก็มีผลต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มด้วย Thompson และคณะ (21) พบว่าใช้เชื้อ S. *lividans* JI1326 ระยะระหว่าง log phase และ stationary phase เตรียมโปรโตพลาสต์ จะได้ทรานสฟอร์แมนท์สูงกว่าใช้เชื้อระยะ stationary phase

จากการศึกษาการทรานสฟอร์มพลาสมิดใน S. *lividans* และ S. *coelicolor* A3(2) พบว่าเมื่อพลาสมิดอยู่ในรูปวงแหวนปิด (covalently closed circular , cccDNA) โดยมีขนาดไม่เกิน 60 กิโลเบส จะได้ 10^6-10^7 ทรานสฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมพลาสมิด (13) แต่ถ้าหากว่าพลาสมิดอยู่ในรูปวงแหวนเปิด (open circular) หรืออยู่ในรูปเส้น (linear form) ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มจะลดต่ำลง (42)

ถ้าเชื้อ *Streptomyces* มี restriction system ในตัวเอง ก็จะเป็นผลให้เกิดทรานสฟอร์เมชันต่ำลง ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในสมบัติของเซลล์เจ้าบ้านที่ดี ข้างต้น Bailey และ Winstanley (43) รายงานว่าการบ่มโปรโตพลาสต์ของ S. *clavuligerus* ที่อุณหภูมิ 45°ซ 10 นาที ก่อนนำมาทำทรานสฟอร์เมชันจะเพิ่มประสิทธิภาพได้มากกว่าเดิมถึง 100 เท่า ซึ่ง Engel (44) ก็ใช้วิธีนี้กับ S. *tendae* เช่นกันเพื่อยับยั้ง restriction system

4. <u>การโคลนยีนใน *Streptomyces*</u>

จากความสำคัญของ *Streptomyces* ที่สามารถผลิตยาปฏิชีวนะและเอนไซม์หลายชนิด จึงมีผู้หันมาสนใจใช้เทคนิคการโคลนยีนเพื่อเพิ่มผลผลิตหรือได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ หลังจากที่ Bibb และคณะ (39)ได้ศึกษาถึงการทรานสฟอร์เมชันของพลาสมิดใน *Streptomyces* แล้ว ก็เริ่มศึกษาการโคลนยีนที่ผลิตยาปฏิชีวนะใน *Streptomyces* (42) พร้อมกันกับ Thompson และคณะเช่นกัน (20) นับได้ว่าเป็นรายงานเริ่มต้นของการศึกษาการโคลนยีนใน *Streptomyces* ต่อจากนั้นก็มีรายงานการโคลนยีนของการสร้างยาปฏิชีวนะต่างๆเช่น กานามัยซิน (kanamycin) (45) , ไวโอมัยซิน (viomycin) (21) , แอคติโนโรดิน (actinorhodin) (46) เป็นต้น นอกจากนั้น Hopwood และคณะ (4) สามารถผลิตยาปฏิชีวนะชนิดใหม่โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม

โดยการโคลนกลุ่มของยีนที่ผลิตแอคติโนโรดิน (act) จาก S. *coelicolor* A3(2) เข้าสู่ *Streptomyces* sp.AM-7161 ซึ่งผลิตยาปฏิชีวนะมีเดอมัยซิน (medermycin), S. *violaceoruber* Tü22 ซึ่งผลิตยากราเนาติซิน (granaticin) และมิวแตนท์ของ Tü22 ซึ่งไม่สามารถผลิตกราเนาติซินได้ พบว่าเซลล์เจ้าบ้านสามารถผลิตยาปฏิชีวนะลูกผสม (hybrid antibiotics) ชนิดใหม่เพิ่มขึ้น ได้แก่ มีเดอโรดินเอ (mederrhodin A) , มีเดอโรดินบี (mederrhodin B) , ไดไฮโดรกราเนาติซิน (dihydrogranaticin) ,ไดไฮโดรกราเนาติโรดิน (dihydrogranatirhodin) ซึ่งยาปฏิชีวนะใหม่เหล่านี้ เกิดจากการแสดงออกของยีนโครงสร้าง (structural gene) ของ act และยีนที่ผลิตยาปฏิชีวนะของเชื้อเหล่านั้นเอง

นอกจากยาปฏิชีวนะแล้ว ยังมีการศึกษาการโคลนยีนสร้างเอนไซม์ใน *Streptomyces* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตด้วย Kendal และ Cullum (5) ทำการโคลนอะกาเรสยีน (agarase gene) จาก S. *coelicolor* A3(2) เข้าสู่ S. *lividans* 66 โดยใช้พลาสมิดพาหะ pIJ702 พบว่าสามารถได้โคลนที่ผลิตอะกาเรสได้เพิ่มขึ้นถึง 500 เท่า Mondou และคณะ (6) ศึกษาการโคลนไซแลเนสยีนใน S. *lividans* โดยใช้พลาสมิด pIJ702 เช่นกันพบว่าสามารถเพิ่มการผลิตไซแลเนสได้ 60 เท่า ขณะที่ Iwasaki และคณะ (7) สามารถเพิ่มแอคติวิตีของไซแลเนสใน S. *lividans* TK21ได้ 10-70 เท่า โดยการโคลนไซแลเนสยีนจาก *Streptomyces* sp.No.36a เข้าไป เอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญสูงและผลิตโดย *Streptomyces* คือกลูโคสไอโซเมอเรสซึ่ง Marcel และคณะ (8) ได้ศึกษาการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสและไซลูโลสไคเนส (xylulose kinase) ใน S. *violaceoniger* โดยใช้พลาสมิดพาหะ pUT206 ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของ pIJ702 พบว่าสามารถเพิ่มแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสและไซลูโลสไคเนสได้ 5-20 เท่า และ 10-14 เท่าตามลำดับ

จากรายงานการโคลนยีนต่าง ๆ ที่กล่าวมา ส่วนใหญ่พบว่านิยมใช้ S. *lividans* หรือ S. *coelicolor* A3(2) เป็นเซลล์เจ้าบ้านเนื่องจากได้มีการศึกษาทางสรีรวิทยาและทางพันธุศาสตร์มาอย่างละเอียด (13) ปัจจุบันนอกจากจะทำการโคลนยีนในกลุ่ม *Streptomyces* ด้วยกันแล้ว Ghangas และคณะ (47) ยังสามารถ

โคลนไซแลเนสยีนจาก *Thermomonospora fusca* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Actinomycetes เข้าสู่ *E. coli* และ *S. lividans* ได้สำเร็จอีกด้วย

กาญจนา (49) ได้รายงานสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างไซแลเนสใน *Streptomyces* sp.42-9 โดยใช้กากรำข้าว ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมทำน้ำมันพืช เป็นแหล่งอาหาร พบว่าสามารถผลิตไซแลเนสได้ 1.8-2.0 หน่วย/มล. ประโยชน์ของน้ำตาลไซโลสที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนด้วยไซแลเนสนี้นอกจากจะนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมทำโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) และเอธานอลแล้ว ยังพบว่าไซโลสเป็นสารเหนี่ยวนำในการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสโดยจุลินทรีย์หลายชนิด เอนไซม์นี้มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทส (3)

จากรายงานถึงความสำเร็จ ในการโคลนยีนหลายชนิดใน *Streptomyces* ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะนำเทคโนโลยีของการโคลนยีนมาปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces* sp.190-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย และมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (48,58) ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตไซแลเนสได้ด้วย ทั้งนี้เพราะการสร้างกลูโคสไอโซเมอเรสโดย *Streptomyces* sp.190-1 ต้องการไซโลสเป็นสารเหนี่ยวนำ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจะทำการโคลนไซแลเนสยีนจาก *Streptomyces* sp.42-9 (49) เข้าสู่ *Streptomyces* sp.190-1 โดยใช้พลาสมิดพาหะ pIJ702 และ pIJ699

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย