

การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์

อาจารย์ นุรฮัณนี หะยีญูโซะ

การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์

- จุลินทรีย์แยกจากธรรมชาติ มักสร้างสารที่สำคัญ
ทางการค้าในปริมาณต่ำ ก่อนนำไปใช้ใน
อุตสาหกรรมการหมัก ต้องพยายามทำให้จุลินทรีย์
ดังกล่าวสร้างผลผลิตสูงขึ้น

วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์

- ใช้อาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ - แต่การเพิ่มผลผลิตโดยวิธีนี้จะถูกจำกัดโดยความสามารถสูงสุดในการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน

วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์

- ▶ ใช้วิธีปรับปรุงยีนให้มีการเปลี่ยนแปลงไปและคัดเลือกมิวแทนท์ (mutant) ที่สร้างผลผลิตได้สูงขึ้นศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ที่ปรับปรุงสายพันธุ์แล้วอีกครั้ง ตามปกติการปรับปรุงพันธุ์กรรมของจุลินทรีย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมจะกระทำอย่างต่อเนื่อง (Continual genetic modification) เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงมากยิ่งขึ้นตลอดเวลา

วิธีปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม

- ▶ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (**induced mutation**)
- ▶ รีคอมบิเนชัน (**Recombination**)
- ▶ การโคลนยีน (**Gene cloning**)

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation)

- ▶ เป็นการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้มутаเจน เช่น สารเคมี หรือรังสี ที่ทำให้ยีนมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

- รีคอมบิเนชัน (**Recombination**)

- ▶ คือกระบวนการใด ๆ ก็ตามที่ทำให้ยีนจากเซลล์ต่างกันเกิดการรวมตัวกันได้ แต่ปัจจุบันความหมายของ **recombination** จะครอบคลุมทั้งกระบวนการที่ทำให้ยีนที่อยู่ในเซลล์เดียวกัน หรือมาจากสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันก็ได้

ชนิดของการกลายพันธุ์

Base insertion (+GG)

Base deletion (-AT)

DNA (one strand)

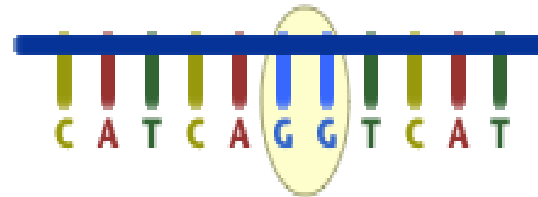
Normal



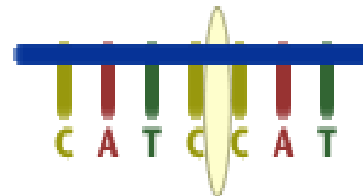
Single base change



Addition



Deletion



Effects of base insertion/deletion

ขึ้นกับจำนวนเบสที่หายหรือเพิ่มมา

จำนวนหาร 3 ลงตัว จำนวนหาร 3 ไม่ลงตัว

(in multiples of three) (not in multiples of three)

Loss or Increase of amino acid (s)

Non-functional products

► Premature protein



พันธุวิศวกรรม เป็นเทคนิคการสร้าง **DNA สายผสม** หรือ รีคอมบิแนนท์ DNA (recombinant DNA) ให้ ได้สิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะตามความต้องการ ซึ่งเทคนิคนี้ได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ภายหลังจากการค้นพบเอนไซม์ ในแบคทีเรียที่สามารถตัดสาย DNA บริเวณที่มีลำดับเบสจำเพาะ ซึ่งเรียกว่า “**เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)**” และสามารถเชื่อมสาย DNA ที่ถูกตัดแล้วมาต่อกันได้ด้วย **เอนไซม์ DNA ไลเกส (DNA ligase enzyme)**” ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถออกแบบรูปแบบ DNA สายผสมได้ หากทราบตำแหน่งหรือลำดับเบสในตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ



พันธุวิศวกรรม

การเชื่อมต่อสาย DNA
ด้วยเอนไซม์ DNA ไลเกส



เอนไซม์ตัดจำเพาะ

▶ เอนไซม์ตัดจำเพาะค้นพบเป็นครั้งแรกโดย แฮมิลตัน สมิธ (Hamilton Smith) และคณะ แห่งสถาบันแพทยศาสตร์จอห์น ฮอปกินส์ สหรัฐอเมริกา ในปี พ.ศ.2513 และต่อมาได้มีการค้นพบเอนไซม์ที่มีลักษณะเช่นนี้ แต่ตัดจำเพาะในตำแหน่งลำดับเบสต่างออกไปจนถึงปัจจุบันนี้มีการค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะมากกว่า 1,200 ชนิด ตัวอย่างในตาราง

(เอนไซม์ตัดจำเพาะ ลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งที่ตัดและผลผลิตจากการตัดของเอนไซม์)

จุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์	เอนไซม์	ลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งที่ตัด	ผลผลิตจากการตัดของเอนไซม์
<i>Bacillus amyloliquefaceins</i> H	<i>Bam</i> HI	$\begin{array}{c} 5' \dots \text{G} \downarrow \text{G-A-T-C-C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C-C-T-A-G} \uparrow \text{G} \dots 5' \end{array}$	$\begin{array}{c} 5' \dots \text{G} \quad \text{G-A-T-C-C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C-C-T-A-G} \quad \text{G} \dots 5' \end{array}$
<i>Escherichia coli</i> RY13	<i>Eco</i> RI	$\begin{array}{c} 5' \dots \text{G} \downarrow \text{A-A-T-T-C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C-T-T-A-A} \uparrow \text{G} \dots 5' \end{array}$	$\begin{array}{c} 5' \dots \text{G} \quad \text{A-A-T-T-C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C-T-T-A-A} \quad \text{G} \dots 5' \end{array}$
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>Hae</i> III	$\begin{array}{c} 5' \dots \text{G-G} \downarrow \text{C-C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C-C} \uparrow \text{G-G} \dots 5' \end{array}$	$\begin{array}{c} 5' \dots \text{G-G} \quad \text{C-C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C-C} \quad \text{G-G} \dots 5' \end{array}$
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	<i>Hind</i> III	$\begin{array}{c} 5' \dots \text{A} \downarrow \text{A-G-C-T-T} \dots 3' \\ 3' \dots \text{T-T-C-G-A} \uparrow \text{A} \dots 5' \end{array}$	$\begin{array}{c} 5' \dots \text{A} \quad \text{A-G-C-T-T} \dots 3' \\ 3' \dots \text{T-T-C-G-A} \quad \text{A} \dots 5' \end{array}$
<i>Streptomyces albus</i>	<i>Sal</i> I	$\begin{array}{c} 5' \dots \text{G} \downarrow \text{T-C-G-A-C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C-A-G-C-T} \uparrow \text{G} \dots 5' \end{array}$	$\begin{array}{c} 5' \dots \text{G} \quad \text{T-C-G-A-C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C-A-G-C-T} \quad \text{G} \dots 5' \end{array}$

จากตารางจะเห็นว่าเอนไซม์ที่ตัดจำเพาะแต่ละชนิดมีบริเวณลำดับเบสจำเพาะ และจุดตัดจำเพาะที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ EcoRI จะมีลำดับเบสจำเพาะในการตัดจะมีจำนวน 6 คู่เบส

ในขณะที่ HaeIII จะใช้เพียงสี่คู่เบส จุดตัดจำเพาะที่เกิดขึ้น จะได้สาย DNA หลังจากถูกตัดแล้วใน 2 รูปแบบ เช่นในกรณีของการตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI จุดตัดจำเพาะจะอยู่ระหว่างเบส G และ A ซึ่งหลังจากการตัดจะทำให้ได้ปลายสายเดี่ยวทั้ง 2 ปลาย ที่รอยตัดของสาย DNA ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวยื่นออกมา เรียกปลายสาย DNA ที่เกิดขึ้นเช่นนี้ว่า “ปลายเหนียว (sticky end)”

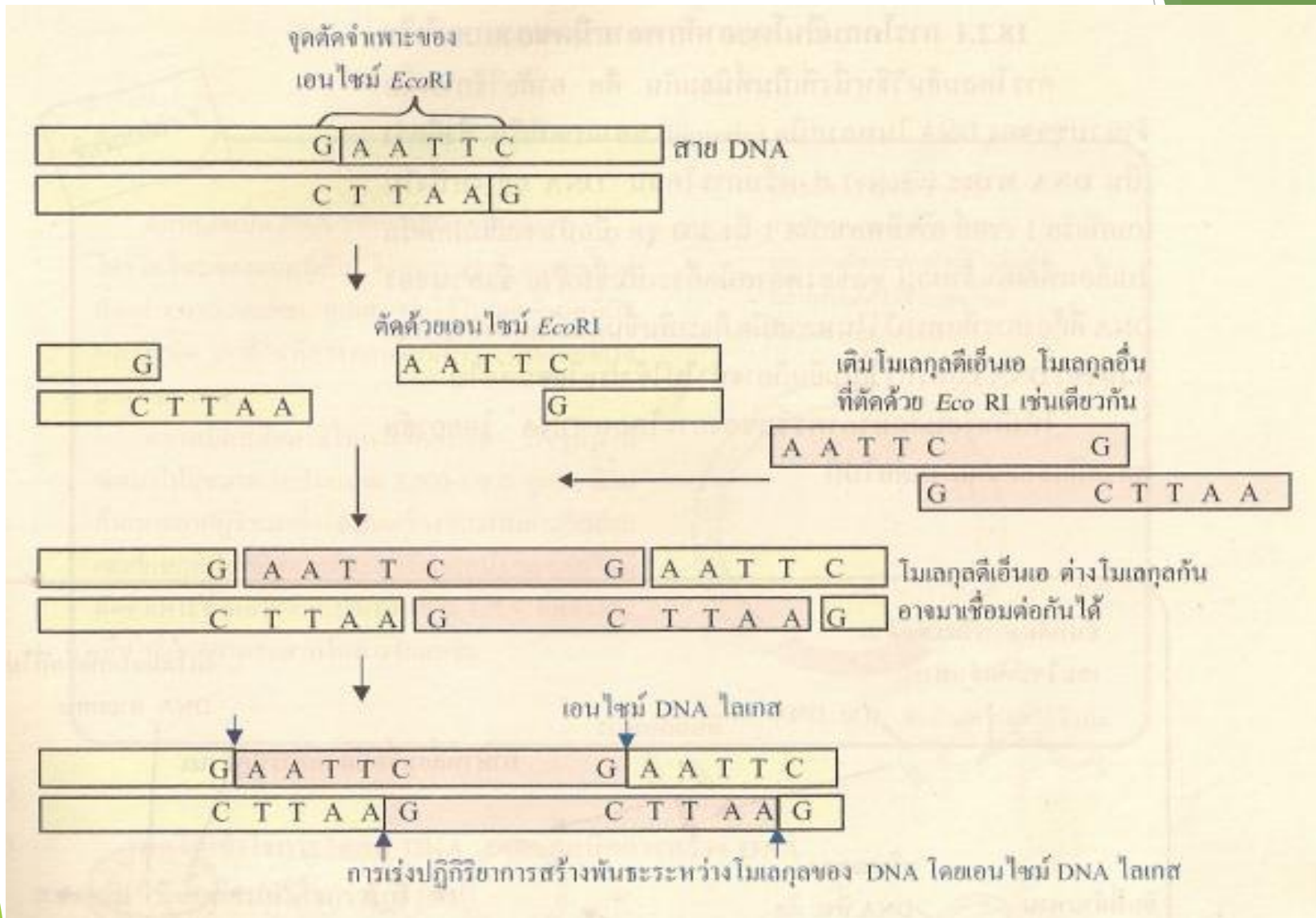
แต่ในกรณีของ HaeIII จุดตัดจำเพาะอยู่ระหว่าง G และ C (ดังตาราง) เมื่อตัดแล้วจะไม่เกิดปลายสาย DNA เป็นสายนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยว เนื่องจากจุดตัดของสาย DNA ทั้งสองเส้นอยู่ตรงกันพอดี ปลายรอยตัด DNA เช่นนี้เรียกว่า “ปลายทู่ (blunt end)”

แม้ว่าตำแหน่งการตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน แต่หากนักเรียนสังเกต จะพบว่าลักษณะร่วมกัน คือ การเรียงลำดับเบส ในบริเวณดังกล่าวในทิศทางจาก 5' ไปสู่ 3' จะเหมือนกันทั้งสองสายของสาย DNA

การเชื่อมต่อสาย DNA ด้วยเอนไซม์ DNA ไลเกส

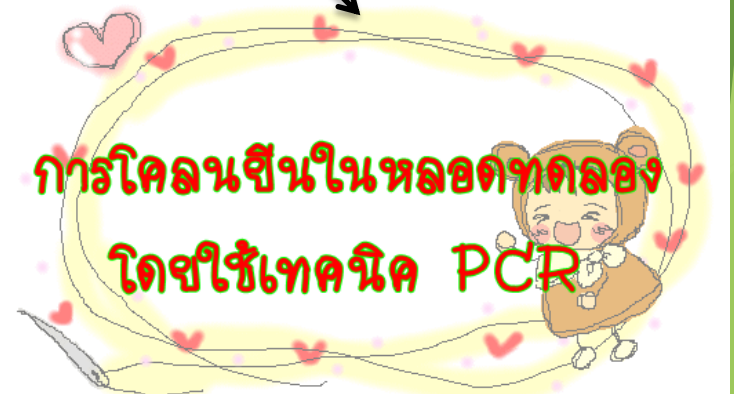
จากการตัดสาย DNA ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างชนิดกัน จะนำมาเชื่อมต่อกันได้ด้วยเอนไซม์ DNA ไลเกส ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะโคเวเลนต์ระหว่างสองโมเลกุลของ DNA ให้เชื่อมต่อกันได้จากการตัดและการเชื่อมต่อสาย DNA นี้ทำให้เกิดสาย DNA สายผสมเกิดขึ้น ดังภาพ

► (การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะและเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกสในการสร้างโมเลกุลดีเอ็นเอสายผสม)



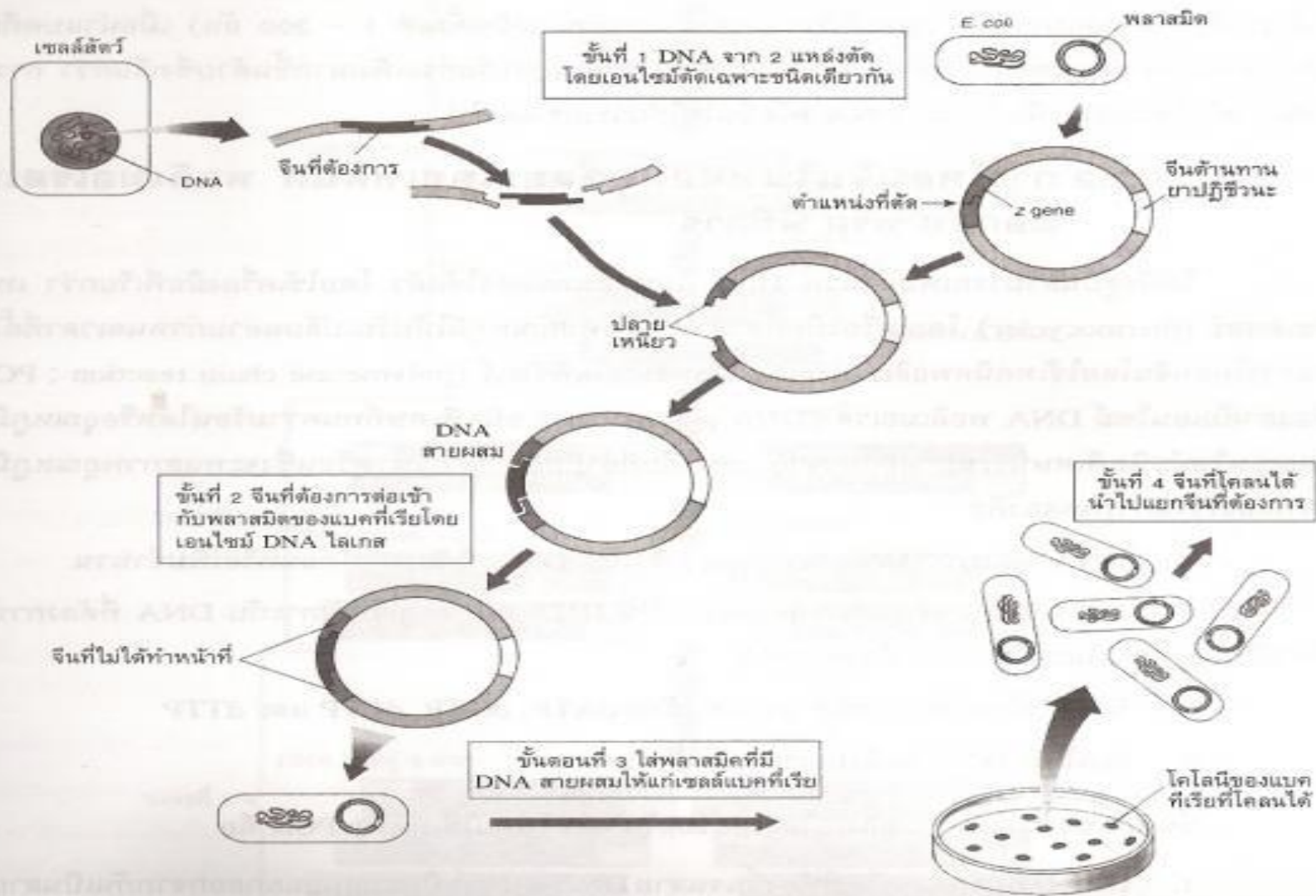


DNA สายผสมที่ได้จากการตัดและต่อยังไม่สามารถทำงานได้ต้องมีวิธีการที่จะดำรง DNA สายผสมให้คงอยู่และเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการศึกษาว่า สาย DNA เหล่านั้นควบคุมการสร้างโปรตีนชนิดใดและศึกษาว่า DNA ยีนอะไรบ้าง สิ่งที่สำคัญ คือ จะต้องเพิ่ม DNA ในบริเวณดังกล่าวให้มากพอที่จะศึกษาได้ การเพิ่ม DNA ที่เหมือนกันนั้นเรียกว่า “การโคลนดีเอ็นเอ (DNA cloning)” หาก DNA บริเวณดังกล่าวเป็นยีนก็อาจเรียกว่า “การโคลนยีน (gene cloning)”





การโคลนยีนวิธีหนึ่งที่เป็นที่นิยมกัน คือ อาศัยวิธีการเพิ่มจำนวนชุดของ DNA ในพลาสมิด (plasmid) ของแบคทีเรีย ซึ่งถือว่าเป็น DNA พาหะ (vector) สำหรับการโคลน DNA อย่างหนึ่งในแบคทีเรีย 1 เซลล์ อาจมีพลาสมิด 1 - 300 ชุด เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน ชุดของพลาสมิดก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งส่วนของ DNA ที่ต้องการที่แทรกไว้ในพลาสมิด ก็จะเพิ่มขึ้นตามโดยปริยาย หากส่วนของ DNA ที่แทรกไว้เป็นยีนก็อาจนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป



(ภาพนี้เป็นภาพการโคลน **DNA** โดยอาศัยพลาสมิด)



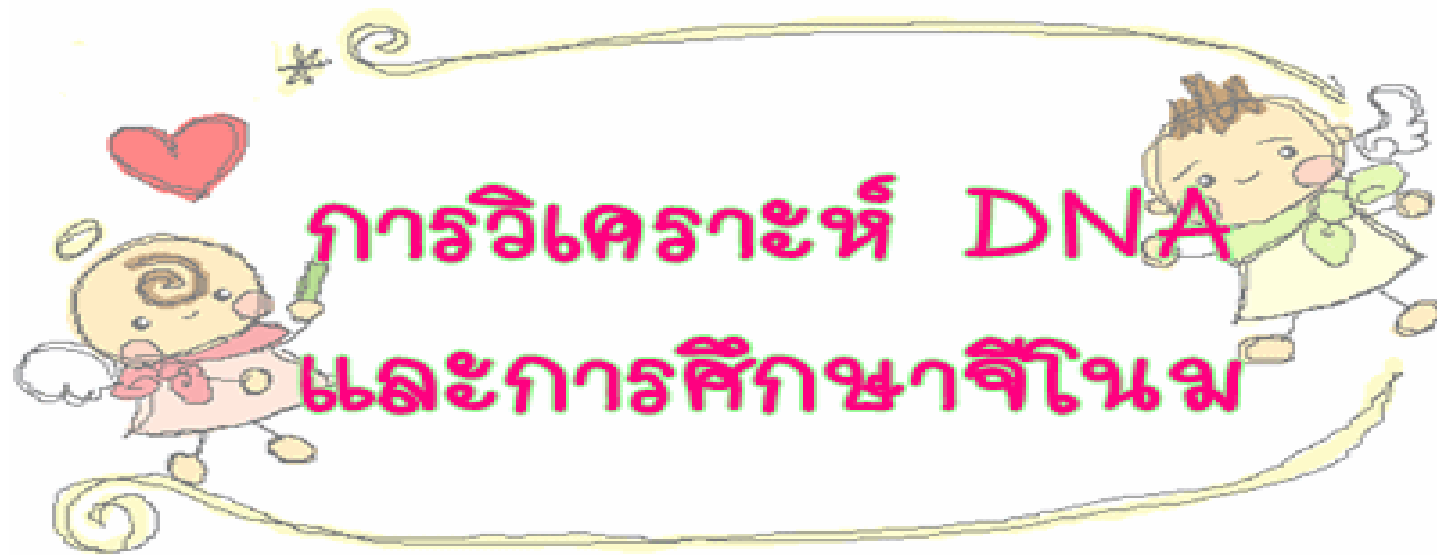
ในปัจจุบันสามารถเพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลองได้แล้ว โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า “เทอร์โมไซเคลอร์ (thermocycler)” โดยเครื่องมือนี้สามารถควบคุมอุณหภูมิให้ปรับเปลี่ยนตามกำหนดเวลาที่ตั้งไว้ได้ ในการโคลนยีนโดยใช้เทคนิคพอลิเมอร์เชนรีแอกชัน หรือ พีซีอาร์ (polymerase chain reaction ; PCR) นี้ต้องอาศัยเอนไซม์ DNA พอลิเมอร์ส (DNA polymerase) ชนิดพิเศษที่ทนความร้อนหรือทนที่ที่มีอุณหภูมิสูงได้ โดยเอนไซม์ชนิดพิเศษนี้ จะแยกออกมาจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณน้ำพุร้อนซึ่งจะทนสภาพอุณหภูมิสูง ได้



(เครื่องมือที่เรียกว่า "เทอร์มอไซเคิลอร์ (thermocycler)")

สิ่งที่ต้องใช้ในการทดลอง คือ

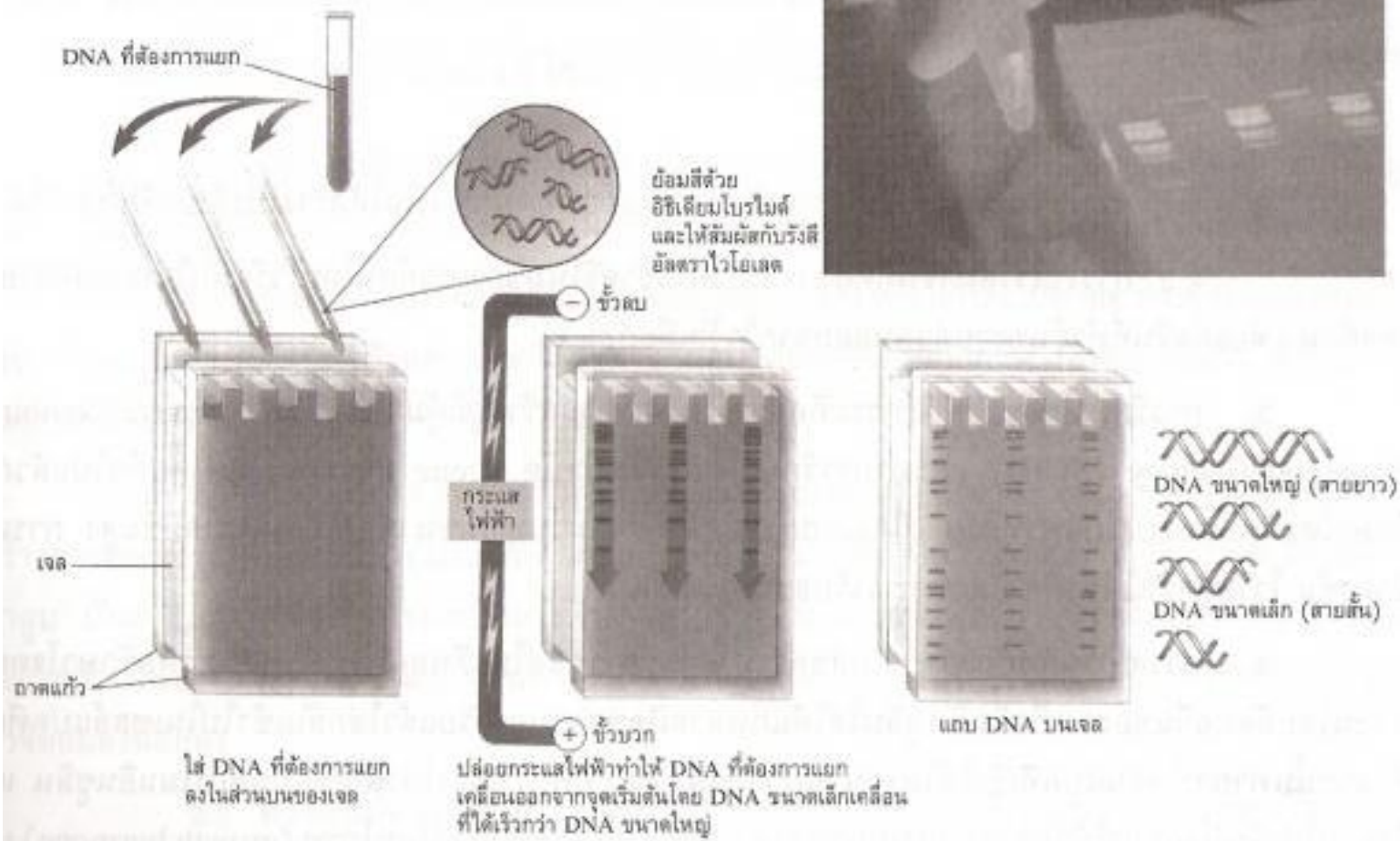
1. DNA แม่แบบ (DNA template) ซึ่งเป็น DNA ที่ต้องการโคลนหรือเพิ่มจำนวน
2. DNA ไพรมเมอร์ (DNA primer) เป็น DNA สายสั้นๆ ที่ใช้เกาะกับ DNA ที่ต้องการโคลนเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์สาย DNA
3. นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด ประกอบด้วย dATP (A) , dGTP (G) , dCTP (C) และ dTTP (T)
4. เอนไซม์ DNA พอลิเมอเรส ชนิดพิเศษ





ในการวิเคราะห์ DNA (DNA analysis) นั้นจะมีการแยก DNA ขนาดต่างๆ ออกจากกันโดยอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า “อิเล็กโทรโฟรีซิส

(gel electrophoresis)” โดยให้ DNA ที่ต้องการแยก (DNA ที่ขนาดต่างกัน) ออกจากกันวิ่งผ่านตัวกลางที่เป็นแผ่นวุ้น (ตัวกลางที่เป็นแผ่นวุ้น เช่น อะกาโรสเจล (agarose gel) หรือ พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel)) ที่อยู่ภายในสนามไฟฟ้า ตามปกติ DNA จะมีประจุเป็นลบ ดังนั้น DNA จะเคลื่อนเข้าหาขั้วบวกของสนามไฟฟ้า และ DNA ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า DNA ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ทำให้ DNA ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้มากและอยู่ใกล้ขั้วบวก ส่วน DNA ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ได้น้อย จึงอยู่ใกล้ๆกับจุดเริ่มต้น ทำให้แยก DNA ขนาดต่างๆ ออกจากกันได้



การประยุกต์ใช้ในเชิงการแพทย์และเภสัชกรรม

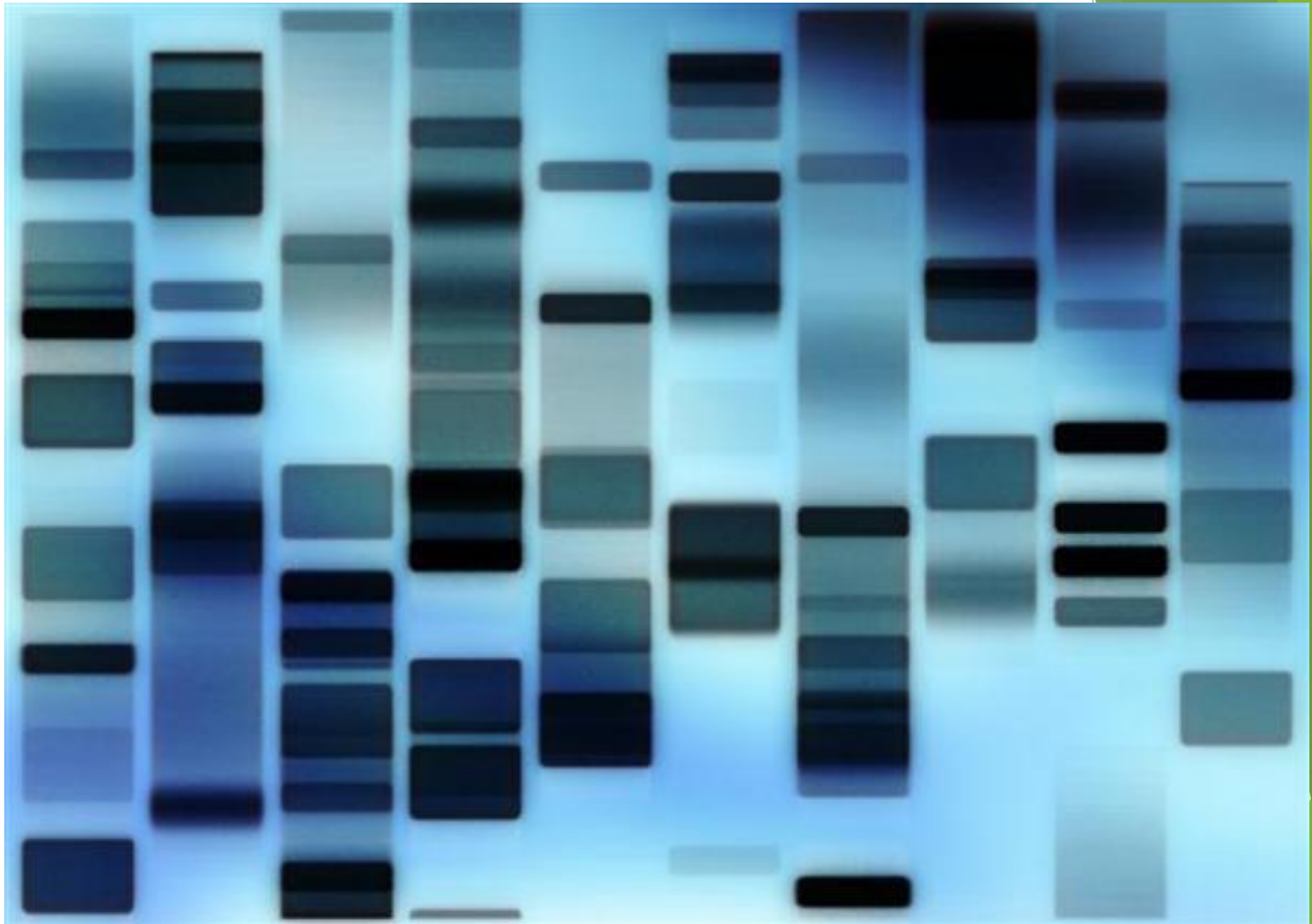


การวินิจฉัยโรค



ปัจจุบันมีการนำเอาเทคโนโลยีของDNA มาใช้ในการวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อต่างๆ เช่น เชื้อไวรัส โดยการใช้เทคนิคPCR เพื่อตรวจสอบว่ามีจีโนมของไวรัสอยู่ในสิ่งมีชีวิตนั้นหรือไม่ ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง และสามารถตรวจพบได้โดยมีตัวอย่างเพียงเล็กน้อย เทคนิคนี้ได้นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ HIV เป็นต้น

จาก ความรู้ทางพันธุศาสตร์ การค้นพบเครื่องหมายทางพันธุกรรมเชื่อมโยงกับแอลลีลที่ก่อโรค และลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมก่อนจะมีอาการของโรคหรือ เป็นเพียงพาหะ ซึ่งทำให้สามารถป้องกันการถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวได้อย่างถูกต้อง



(ลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprint))

พืชต้านทานแมลง



สร้างโดยการถ่ายยีนบีทีที่สร้างสารพิษจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ; BT สารพิษนี้ทำลายตัวอ่อนของแมลงบางประเภทอย่างเฉพาะเจาะจง ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น

พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มีคุณค่าทางอาหารเพิ่มขึ้น



นำยีนจากแดฟโฟดิล **Daffodils** และยีนจากแบคทีเรีย ***Erwinia breteria*** ถ่ายฝากให้กับข้าว ทำให้ข้าวสามารถสร้างวิตามินเอนเมล็ดได้ เรียกว่า ข้าวสีทอง ช่วยลดภาวะการขาดวิตามินในประเทศที่ขาดแคลนอาหารในโลก

พืชดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อยืดอายุของผลผลิตได้ยาวนาน ขึ้น

- ▶ นำยีนที่มีผลต่อเอทิลีนที่สังเคราะห์เอทิลีนใส่เข้าไปในผลไม้ เช่น มะเขือเทศ ทำให้มะเขือเทศสุกช้าลง เนื่องจากไม่มีการสร้างเอทิลีน ลดความเน่าเสียของมะเขือเทศ สามารถเก็บรักษาได้นานยิ่งขึ้นและขนส่งได้ระยะทางไกลขึ้น

