

# การศึกษาการคงอยู่ของพลาสมิดอนุพันธ์ที่มาจาก pBC16 ใน *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

## Study on segregational stability of pbc 16-derived plasmid in *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*

มณฑล เลิศคณาวณิชกุล (Monthon Lertcanawanichakul)<sup>1\*</sup>

### บทคัดย่อ

พลาสมิด pBCE ขนาด 6100 คู่เบส ได้มาจากการตัดชิ้นส่วน *EcoRI* (800 คู่เบส) ออกจากพลาสมิด pBCX ขนาด 6900 คู่เบส ซึ่งพลาสมิดทั้งสองชนิดประกอบด้วยพลาสมิดของแบคทีเรียแกรมบวก pBC16 และ พลาสมิดของแบคทีเรียแกรมลบ pBluescript II KS สามารถจำลองตัวได้ทั้งใน *Escherichia coli* และ *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) และสามารถแสดงออกยีนดื้อยาแอมพิซิลลินหรือเตตราไซคลินใน *E. coli* แต่สามารถแสดงออกเฉพาะยีนดื้อยาเตตราไซคลินใน *Bt* พลาสมิดทั้งสองชนิดมีความเสถียรภาพใน *Bt* แต่พบว่าพลาสมิด pBCX สามารถคงอยู่ได้ใน *Bt* subsp. *kurstaki* ดีกว่าพลาสมิด pBCE ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนดื้อยาเตตราไซคลิน

### Abstract

A 6100-base pair (bp) plasmid vector pBCE was derived from pBCX (6900-bp). A 800-bp *EcoRI* fragment of pBCX was deleted out and the remaining plasmid was religated. Both of them were comprised of Gram-positive plasmid pBC16 and Gram-negative plasmid pBluescript II KS. They act as bifunctional plasmids conferring ampicillin and tetracycline resistance in *Escherichia coli* but only tetracycline resistance in *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). They were structurally stable in both *E. coli* and *Bt*. However, pBCX was more segregationally stable than pBCE in *Bt* subsp. *kurstaki*, which may be correlated with tetracycline resistant gene expression.

คำสำคัญ: pBC16 pBluescript II KS บาซิลลัสธูริงจิส

Keywords: pBC16 pBluescript II KS *Bacillus thuringiensis*

<sup>1</sup>ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161

\*corresponding author, e-mail : lmonthon@wu.ac.th

## บทนำ

เนื่องจากพิษร้ายของสารเคมีสังเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารเคมีฆ่าแมลงที่มีพิษต่อสภาวะแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย (Aronson et al., 1986; Charnley, 1991; Crook and Jarret, 1991) จึงทำให้เทคโนโลยีในการควบคุมแมลงศัตรูพืชและ/หรือแมลงพาหะนำโรคได้พัฒนามาเป็นลำดับจากการใช้สารเคมีมาเป็นการใช้สิ่งมีชีวิตควบคุมกันเองแบบชีววิธี (biocontrol) โดยการประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคกับแมลง (entomopathogenic organisms) และเป็นชนิดที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติถึงขั้นมีการผลิตออกมาในรูปการค้าในลักษณะ biopesticide หรือ microbial insecticide สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้แมลงตายได้นั้นมีหลายชนิด เช่น ไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว มัยโคพลาสมา ริกเกตเซีย แต่ชนิดที่มีบทบาทและได้รับความนิยมสูงจนมีการผลิตออกมาในรูปของการค้ามากมายในขณะนี้ ตลอดจนมีการนำมาศึกษาค้นคว้าและวิจัยทางด้านพันธุวิศวกรรม คือ เชื้อแบคทีเรียกลุ่มรูปท่อนที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ได้แก่ กลุ่ม *Bacillus* species (spp.) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Charnley, 1991; Aronson et al., 1986)

Bt เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน สามารถสร้างสปอร์ได้ พบได้ทั่วไปในดิน (Aronson et al., 1986; Hofte and Whiteley, 1989; Charnley, 1991; Crook and Jarret, 1991) และมีรายงานการตรวจพบเชื้อดังกล่าวในซากแมลงหนอนไหม (silkworm), *Bombyx mori* เป็นครั้งแรกในญี่ปุ่นโดย Ishiwata (1901) โดยเป็นสาเหตุของโรค sotto disease (Martin and Travers, 1989; Charnley, 1991; Ohba, 1996) แต่พบว่าแมลงไม่ได้เป็นแหล่งปกติของเชื้อชนิดนี้ (Ohba, 1996) ความสามารถในการฆ่าหนอนแมลงเกิดขึ้นได้เพราะเชื้อสามารถผลิตสารพิษขึ้นมาได้ 2 ชนิด ในระยะของการเจริญคือ exotoxin ผลิตขึ้นในระยะที่เป็น vegetative cell (Geiser et al., 1986; Crook and Jarret, 1991) แต่ออกฤทธิ์ไม่จำเพาะต่อแมลงและมีฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ต่อกลุ่มสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย

จึงไม่น่าเชื่อที่ผลิตสารพิษชนิดนี้มาเป็น pesticide ส่วนสารพิษอีกชนิดหนึ่งที่เชื่อสามารถผลิตออกมาได้คือ delta ( $\delta$ ) endotoxin หรือ insecticidal crystal proteins (ICPs หรือ Cry proteins) ผลิตขึ้นในระยะของการสร้างสปอร์และมักพบอยู่ข้างๆ สปอร์ (parasporal inclusion) โดยถูกควบคุมจากยีน cry หลายชนิดและสามารถจำแนกออกจากกันโดยอาศัยคุณสมบัติความเหมือนกันทางโครงสร้างของยีนหรือรูปพื้นฐานของผลึกและ/หรือความสามารถในการผลิตสารโปรตีนที่จำเพาะต่อชนิดแมลง ได้แก่ โปรตีนที่มีความจำเพาะต่อแมลงในกลุ่ม Lepidoptera (Cry1) โปรตีนที่มีความจำเพาะต่อแมลงในกลุ่ม Lepidoptera- และ Diptera (Cry2) โปรตีนที่มีความจำเพาะต่อแมลงในกลุ่ม Coleoptera (Cry3) และโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อแมลงในกลุ่ม Diptera (Cry4) (Hofte and Whiteley, 1989; Ceron et al., 1995) ส่วน Cry5 และ Cry6 มีความจำเพาะต่อ nematode larvae และในปัจจุบันได้มีการแยกชนิดออกได้ถึง Cry31 ตามความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotides) ในยีน (Ceron et al., 1995; Crickmore et al., 1998; De Maagd et al., 2001) ผลึกสารโปรตีนเหล่านี้อยู่ในรูปของ protoxin และภายหลังที่หนอนแมลงกินเข้าไปโปรตีนจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ protease ในบริเวณทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ในสภาวะที่เป็นด่างแล้วจึงเปลี่ยนเป็นรูปสารพิษชนิด true toxin จับกับผนังของทางเดินอาหารส่วนกลางทำให้เกิดรูในชั้นของ peritrophic membrane และออร์แกเนลต่างๆ ที่มีเมมเบรนห่อหุ้มมีความผิดปกติไป ทำให้มีการสูญเสียสมดุลออสโมติก (osmotic imbalance) ทำให้หนอนแมลงตาย (Hofte and Whiteley, 1989; Charley, 1991) ยีนควบคุมการสร้างสารพิษส่วนใหญ่อยู่บนพลาสมิดและสามารถถูกตัดออกหรือนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะเพื่อเป้าหมายสำคัญของงานทดลองด้านการตัดต่อสารพันธุกรรมเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ Bt ให้มีฤทธิ์ในการทำลายหนอนแมลงเป้าหมายได้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม มักพบปัญหาพลาสมิดไม่เสถียรภาพในเชื้อดังกล่าว (Mettus and Macaluso, 1990; Gamel and Piot, 1992) ซึ่งอาจเนื่องมาจากใช้

พลาสมิดพาหะที่ได้มาจากเชื้อต่างชนิดกัน (heterologous species) เช่น เป็นพลาสมิดที่ได้มาจากเชื้อ *Escherichia coli* หรือ *Staphylococcus aureus* (Gamel and Piot, 1992) ดังนั้นจึงได้พยายามปรับปรุงพลาสมิดพาหะที่มีอยู่ในปัจจุบันที่ได้มาจากเชื้อ *Bacillus cereus* GP7 (pBC16) (Mettus and Macaluso, 1990) ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุลเดียวกับ *Bt* เพื่อป้องกันการเกิดความไม่เสถียรภาพ (instable) ที่อาจจะเกิดขึ้นใน *Bt* แต่พลาสมิดดังกล่าวยังขาดตำแหน่ง multi cloning sites (MCSs) ที่เหมาะสมเพื่อสอดใส่ชิ้นยีน ดังนั้นจึงได้มีการสร้างพลาสมิดพาหะอนุพันธุ์มาจาก pBC16 กับ pBluescript II KS เพื่อให้มีตำแหน่งของ MCSs มากขึ้นและไม่มี การตัดบางส่วนของดีเอ็นเอออกไปเพื่อให้เกิดความเสถียรภาพ (structural stability) เรียกพลาสมิดนี้ว่า pBCX อย่างไรก็ตามยังคงพบปัญหา segregational stability (Lertcanawanichakul and Wiwat, 2000) จึงได้พยายามทำการปรับปรุงพลาสมิดต่อไปเพื่อให้ได้พลาสมิดพาหะที่มี segregational stability สูงขึ้นเพื่อประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นพลาสมิดพาหะที่ดีที่สุดสำหรับปรับปรุงสายพันธุ์ *Bt* ในการนำมาใช้เป็น biocontrol ในอนาคตต่อไป

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

### 1. วิธีการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเซลล์ *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  หรือ *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 (*Btk* HD73) ที่มี พลาสมิด (pBCX หรือ pBCE) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (มิลลิลิตร) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ap) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มค.ก/ มิลลิลิตร) หรือ ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน (Tc) ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เลี้ยงเซลล์ *E. coli* หรือ *Btk* ที่มีพลาสมิด ตามลำดับ (รายละเอียดของเชื้อและพลาสมิดแสดงในตารางที่ 1) จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

## 2. การสร้าง shuttle plasmid pBCE จาก shuttle plasmid pBCX

สร้าง shuttle plasmid pBCE ด้วยการตัด shuttle plasmid pBCX (Lertcanawanichakul and Wiwat, 2000) ที่ตำแหน่ง *EcoRI* จากนั้นทำการเชื่อมกลับ (religate) ด้วย T4 DNA ligase (Biolabs) แล้วนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านชนิด *E. coli* DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี heat shock transformation ทำการคัดเลือก transformant ในจานเพาะเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการสกัดพลาสมิด pBCE จาก transformed *E. coli* DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี alkaline lysis จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้นำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Btk* HD73 ด้วยวิธี electroporation transformation ทำการคัดเลือก transformant ในจานเพาะเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการสกัดพลาสมิดจาก transformed *Btk* HD73 ด้วยวิธี alkaline lysis และทำการยืนยันพลาสมิดด้วยการนำไปวิ่งในวุ้นอะกาโรส (Sambrook et al., 1989)

## 3. การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

### 3.1 การเตรียมเซลล์พร้อมรับ (competent cell)

#### 3.1.1 *E. coli*

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5 $\alpha$  ประมาณ 8-10 โคลนินไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนที่ความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 6 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 50 mM CaCl $_2$ ) ที่แช่เย็นลงไป 30 มิลลิลิตร เพื่อทำการกระจายตะกอนเชื้อโดยเขย่าเบาๆ จากนั้นแช่ไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการปั่นเก็บตะกอนที่สภาวะเดิม และเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ลงไป 4 มิลลิลิตร กระจายตะกอนเชื้อเบาๆ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แบ่งเก็บเชื้อลงในหลอด microcentrifuge หรือนำไปใช้ได้ทันที

### 3.1.2 *Btk* HD73

เชื้อเชื้อ *Btk* HD73 ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี 0.5% glycerol แต่ไม่มียาปฏิชีวนะปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนที่ความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 6 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมสารละลาย EB (0.625 M sucrose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) ที่เข้มข้นลงไป 30 มิลลิลิตร เพื่อทำการกระจายตะกอนเชื้อโดยเขย่าเบาๆ จากนั้นแช่ไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการปั่นเก็บตกตะกอนที่สภาวะเดิม และเติมสารละลาย EB ลงไป 1 มิลลิลิตร กระจายตะกอนเชื้อเบาๆ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แบ่งเก็บเชื้อลงในหลอด microcentrifuge หรือนำไปใช้ได้ทันที

### 3.2 การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์

#### 3.2.1 heat shock transformation

ผสมพลาสมิด (pBCX หรือ pBCE) ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 200 นาโนกรัม (ไม่ควรเกิน 10 ไมโครลิตร) ต่อเซลล์พร้อมรับ *E. coli* ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำส่วนผสมไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และนำกลับมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ลงไปปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปบ่มเลี้ยงในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แบ่งเชื้อมาปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำจานเพาะเชื้อไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง

#### 3.2.2 electroporation transformation

ผสมพลาสมิด (pBCX หรือ pBCE) ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 1 มค.ก. (ไม่ควรเกิน 10

ไมโครลิตร) ต่อเซลล์พร้อมรับ *Btk* ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำส่วนผสมไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นถ่ายใส่ลงใน cuvette ขนาด 0.2 เซนติเมตร และนำกลับมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปให้กระแสไฟแบบ single discharge (2,500 โวลต์, 25 ไมโครฟารัด) ภายใต้เครื่อง electroporation (BioRad Gene-pulser) จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ลงไปปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปบ่มเลี้ยงในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แบ่งเชื้อมาปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำจานเพาะเชื้อไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 4. การศึกษาการคงอยู่ของพลาสมิดใน *Btk* HD73

#### 4.1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียาปฏิชีวนะ (สภาวะ non selective pressure)

สุ่มเลือก transformed *Btk* HD73 ที่มีพลาสมิดแต่ละชนิดมาชนิดละ 5 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ไม่มียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินแล้วทำการบ่มเลี้ยงที่สภาวะเดิม และให้ subculture ทุกวันจนครบ 30 วัน

#### 4.2 การศึกษา segregational stability

แบ่งเชื้อจากทุกหลอดที่เลี้ยงในสภาวะ non selective pressure ในแต่ละวันมาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อเชื้อ แล้วทำการกระจายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีและไม่มียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน โดยเทคนิค spread plate บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วคำนวณหาสัดส่วนของโคโลนีที่ต่อยาเตตราซัยคลินจากสูตร

$$\% \text{ tetracycline resistant colony} = \left( \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อแข็ง LB ที่มียา}}{\text{จำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อแข็ง LB ที่ไม่มียา}} \right) \times 100$$

## ผลการทดลอง

### 1. การทดสอบยืนยันพลาสมิด

สร้าง shuttle plasmid pBCE จาก shuttle plasmid pBCX [6900 คู่เบส (base pair; bp) (รูปที่ 1) ด้วยการตัดชิ้นส่วน *EcoRI* ออกไปประมาณ 800 bp ทำให้ขนาดของพลาสมิดลดลงเหลือ 6100 bp โดยสามารถยืนยันได้จากการนำพลาสมิดดังกล่าวที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *HindII* หรือ *EcoRI* มา run ใน 0.7 % วัฏจักรอะกาโรส ซึ่งพบว่าพลาสมิด pBCE ยังคงมี structural stability เพราะพลาสมิดที่สกัดออกมาจาก transformed *E. coli* DH5a และ transformed *Btk* HD73 มีขนาดเท่ากันโดยประมาณ 6100 bp ดังแสดงผลได้ดังรูปที่ 2

### 2. การศึกษา segregational stability ของพลาสมิด

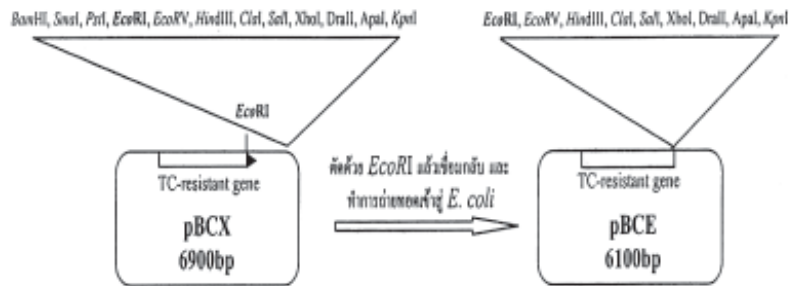
พลาสมิด pBCX มี segregational stability ภายในเชื้อ *Btk* HD73 ต่ำกว่าพลาสมิด pBCE ซึ่งคงอยู่ได้เพียง 3 รุ่น (passages) เท่านั้น ในขณะที่ พลาสมิด pBCX จะค่อยๆ ลดลงในแต่ละ passage ซึ่งสามารถแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของโคโลนีที่ดื้อยาเตตราไซคลิน (Tc) ได้ดังรูปที่ 3

## อภิปรายผลการทดลอง

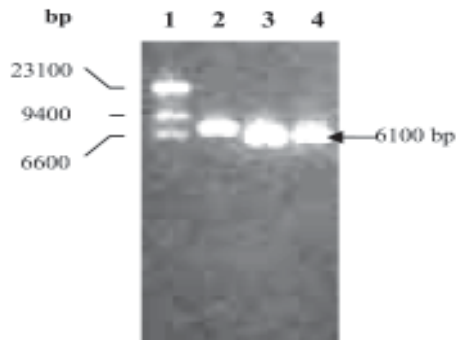
จากการศึกษา segregational stability ของ shuttle plasmid pBCX หรือ shuttle plasmid pBCE ใน *Btk* HD73 โดยการนำเชื้อที่มีพลาสมิดดังกล่าวไปเลี้ยงในสภาวะ non selective pressure อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 รุ่น (passages) แล้วนำเชื้อในแต่ละวันมากระจายลงบนจานเพาะเชื้อ LB ที่มีและไม่มียาปฏิชีวนะเตตราไซคลินเพื่อตรวจนับจำนวนโคโลนีและคำนวณเปอร์เซ็นต์ของ tetracycline resistant colony ปรากฏว่า pBCE ซึ่งเป็นพลาสมิด อนุพันธ์และมีขนาดเล็กกว่า

pBCX แต่พบว่ามี segregational stability ต่ำกว่า pBCX คืออยู่ได้เพียง 3 passages เท่านั้นซึ่งไม่สอดคล้องกับ Gamel and Piot (1992) ที่กล่าวว่าพลาสมิดขนาดเล็กจะมี segregational stability สูงกว่าพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่านอกจากขนาดของพลาสมิดมีผลต่อ segregational stability แล้วยังพบว่าขึ้นอยู่กับ copy number ของพลาสมิด (Old and Primrose, 1989) กล่าวคือพลาสมิดที่มี copy number สูงจะมี segregational stability สูงตามไปด้วยซึ่งอาจเนื่องมาจากพลาสมิดมีจำนวนมากในเซลล์ทำให้มีโอกาสสูงในการถ่ายทอดไปยังเซลล์รุ่นลูกได้มากกว่าพลาสมิดที่มี copy number ต่ำ (มีปริมาณพลาสมิดน้อย) นอกจากนี้ segregational stability ยังอาจขึ้นอยู่กับการใช้เชื้อเริ่มต้นในการบ่มเลี้ยงไม่เท่ากัน (Brigidi et al., 1996) หรือเกี่ยวข้องกับเวลาที่พลาสมิดพาหะมีขึ้นยืนสอดใส่เข้าไป (inserted gene) (Gruss and Ehrlich, 1988) แต่ในการทดลองนี้พลาสมิด pBCE และ pBCX ถูกสร้างมาจากพลาสมิด pBC16 กับ pBluescript II KS เหมือนกัน ดังนั้น copy number ของพลาสมิดน่าจะไม่มีแตกต่างกันและน่าจะไม่ใช่ปัจจัยของการเกิด segregational instability และไม่มีการสอดใส่ขึ้นยืนเข้าไปใน pBCE แต่มีการตัดบางส่วนของขึ้นยืนที่ควบคุมการดื้อยาเตตราไซคลิน (Tc) ตรงปลายด้าน 3' ซึ่งเกี่ยวข้องกับ terminator ใน pBC16 ออกไปโดยศึกษารายละเอียดได้จากแผนที่ยีนที่รายงานโดย Mettus and Macaluso (1990) ดังนั้นจึงอาจส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนดื้อต่อ Tc ลดประสิทธิภาพลงทำให้เกิด segregational instability ใน transformed cells ซึ่งแสดงให้เห็นได้จากเปอร์เซ็นต์ของ tetracycline resistant colony ที่ลดลง (รูปที่ 3)

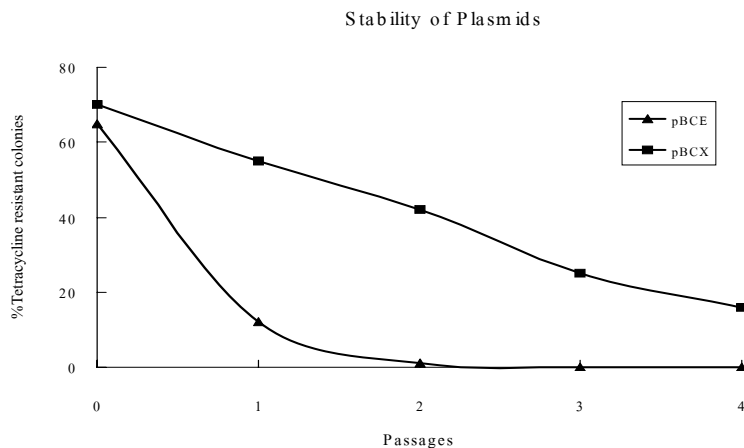




รูปที่ 1. แสดง plasmid maps ของ shuttle plasmid pBCX และ shuttle plasmid pBCE. pBCE ได้มาจาก pBCX ที่ถูกตัดชิ้นส่วนของ *EcoRI* ออกไป 800 bp ซึ่งเป็นตำแหน่งของ terminator (stem-loops structure) ของยีนดื้อยาเตตราไซคลิน แสดงให้เห็นเป็นหัวลูกศร (>) ใน pBCX



รูปที่ 2. แสดง electrophoretic patterns ของ shuttle plasmid pBCX ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* (lane 2), shuttle plasmid pBCE ที่สกัดได้จาก transformed *E. coli* DH5 $\alpha$  ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* (lane 3) และ shuttle plasmid pBCE ที่สกัดได้จาก transformed *Btk* HD73 ตัดด้วย เอนไซม์ *EcoRI* (lane 4) ขนาดของแถบดีเอ็นเอ  $\lambda$  DNA ที่ถูกตัดด้วย *HindIII* (lane 1) มีหน่วยเป็นคู่เบส (bp) ใช้เป็นดีเอ็นเอ มาตรฐาน



รูปที่ 3. แสดงการคงอยู่ของพลาสมิด pBCE และ pBCX ในเชื้อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 (transformants)

```

5' GGAATCATTG TCATTAGTTG GCTGGTTACC TTGAATGTAT ATAAACATTC
   Gly Ile Ile V al Ile Ser Tr p Leu Val Thr Leu Asn Val T yr Lys His Se
   TCAAAGGGAT TTCTAAATCG TTAAGGGATC AACTTTGGGA GAGAGTTCAA
   r Gln Arg Asp Phe End  $\Delta G = -12.4$ 
AATTGATCCT TTTTTTATAA CAGGAATTCA AATCTTTTTG TTCCATTAAA
                               EcoRI
GGGCGCGATT GCTGAATAAA AGATACGAGA GACCTCTCTT GTATCTTTTT
                                $\Delta G = -16.2$ 
TATTTTGAGT GGTTTTGICC GTTACATAGA AAACCGAAAG ACAATAAAAA
TTTTATC 3'
    
```

รูปที่ 4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของยีน Tc จาก pBC16. ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้อาจเป็นโครงสร้างของ stem-loop โดยลำดับที่เป็นตัวเอนขีดเส้นใต้และตัวปกติขีดเส้นใต้ใช้แทนตำแหน่ง terminator ที่ 1 (ก่อน EcoRI) มีค่า DG = -12.4 และ 2 (หลัง EcoRI) มีค่า  $\Delta G = -16.2$  ตามลำดับ (Mettus and Macaluso, 1990)

ตารางที่ 1. เซลล์เจ้าบ้านและพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์เจ้าบ้าน-พลาสมิด	คุณสมบัติ	แหล่ง
เซลล์เจ้าบ้าน <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lac</i> U169 (f 80 <i>lac</i> Z $\Delta$ 15) <i>hsd</i> R17 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Gibco BRL
<i>Btk</i> HD73	plasmid less strain, Cry-	<i>Bacillus</i> Genetic Stock-Center (BGSC)
พลาสมิด pBCX	shuttle plasmid ที่ประกอบด้วย pBC16 และ pBluescript II KS เชื่อมต่อที่ตำแหน่ง <i>Xba</i> I, <i>Ap</i> <sup>r</sup> <i>Tc</i> <sup>r</sup>	Lertcanawanichakul and Wiwat, 2000
pBCE	pBCX ที่ถูกตัดด้วย <i>Eco</i> RI, <i>Ap</i> <sup>r</sup> <i>Tc</i> <sup>r</sup>	การศึกษานี้

Cry- ไม่มี insecticidal crystal protein

*Ap*<sup>r</sup> ยีนควบคุมการดื้อยาแอมพิซิลลิน; *Tc*<sup>r</sup> ยีนควบคุมการดื้อยาเตตราซัยคลิน

พลาสมิดอนุพันธ์ที่ถูกสร้างขึ้นมาจาก pBC16 และ pBluescript II KS เรียกว่า pBCX มีตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* 2 ตำแหน่ง โดยพบอยู่ตรงส่วนปลายด้าน 3 ข ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *Tc* ของ pBC16 1 ตำแหน่งและตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ใน MCS ของ pBluescript II KS 1 ตำแหน่ง (Lertcanawanichakul and Wiwat, 2000) และเมื่อตัดตำแหน่งดังกล่าวออกไปในการทดลองนี้จะทำให้ได้พลาสมิดอนุพันธ์ใหม่ที่มีขนาดเล็กกว่าเดิม 800 คู่เบส เรียกว่า pBCE แต่พบว่าพลาสมิดอนุพันธ์ pBCE มี segregational stability ต่ำกว่า pBCX ทั้ง ๆ ที่มีขนาดเล็กกว่า ดังนั้นการเกิด instability ในกรณีนี้จึงอาจเกี่ยวข้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดื้อยา *Tc* ที่ถูกตัดออกไป โดยเทียบเคียงกับรายงานของ Mettus and Macaluso (1990) พบว่าตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ถูกตัดออกไปจาก pBCX ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* เป็นตำแหน่งของ terminator ที่จะสร้างโครงสร้าง stem loop ในสาย mRNA ของ ยีนดื้อยา *Tc* ใน pBC 16 แต่ที่น่าสนใจก็คือตำแหน่งที่เป็น terminator ของยีนดื้อยา *Tc* ใน pBC16 มีอยู่ด้วยกัน 2 ตำแหน่ง คือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ก่อนหน้า *EcoRI* 1 ตำแหน่ง และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่หลัง *EcoRI* 1 ตำแหน่ง (รูปที่ 4) โดยตำแหน่งที่เป็น terminator ที่แท้จริงที่จะสร้างโครงสร้าง stem loop คือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่หลัง *EcoRI* และได้ทดลองสอดใส่ชิ้นยีน crystal protein genes (*cry*) ที่ตำแหน่ง *EcoRI* ดังกล่าวใน pBC16 พบว่ายีน *cry* ที่ถูกสอดใส่เข้าไปสามารถแสดงออกได้ด้วยการใช้ promoter ที่ควบคุมการดื้อยา *Tc* ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการหยุดการแสดงออกเมื่อมาพบ terminator ตรงตำแหน่งหน้า *EcoRI* (Mettus and Macaluso, 1990)

นอกจากนี้ยังได้มีรายงานว่าแม้สอดใส่ชิ้นยีนโคติเนสต่อหลังตำแหน่ง terminator ที่ 2 (หลัง *EcoRI*) ในพลาสมิดอนุพันธ์ของ pBC16-pBluescript II KS (pBCX) ก็ยังคงมีการแสดงออกของยีนโคติเนสได้อย่างต่อเนื่องเช่นกัน (Lertcanawanichakul and Wiwat, 2000) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า terminator ทั้ง 2 ตำแหน่ง

ยังไม่สามารถสร้าง stem loop ที่แข็งแรงเพียงพอที่จะทำให้มีการหยุดการแปลรหัสยีนเป็นผลให้ยังคงมีการแสดงออกของยีนสอดใส่เมื่อทำการสอดใส่ชิ้นยีนเข้าไปหลังตำแหน่ง terminator ของทั้งสองตำแหน่ง นอกจากนี้การที่มีโครงสร้าง stem loop ที่ไม่แข็งแรงพอของสาย mRNA อาจทำให้สาย mRNA ดังกล่าวถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วย RNase เนื่องจากสาย mRNA ปกติก็มักจะถูกย่อยสลายด้วย RNase ในระยะเวลาเพียงไม่กี่วินาทีอยู่แล้วดังที่มีรายงานในยีน *cry* ของ *Bt* (Souza et al., 1993; Dervyn et al., 1995) ดังนั้นในกรณีนี้อาจเป็นผลทำให้การแปลรหัสยีนดื้อยา *Tc* เป็นไปได้น้อยเพราะสาย mRNA มีเหลืออยู่ในปริมาณน้อยเนื่องจากบางส่วนถูกย่อยสลายด้วย RNase ในระยะเวลาอันสั้นกว่าปกติเป็นเหตุให้ transformed *Bt* ที่มี pBCE ไม่สามารถดื้อต่อยา *Tc* และ/หรือดื้อต่อยา *Tc* ได้ในปริมาณน้อยกว่าปกติ ทำให้ตรวจพบโคโลนีของ transformed *Bt* ที่ดื้อต่อ *Tc* บนจานเพาะเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ *Tc* ได้บ้างแต่เป็นไปในปริมาณที่ไม่สม่ำเสมอ อีกทั้งการใช้ยีนดื้อยาปฏิชีวนะในการคัดเลือก transformed cells ก็มักจะเกิด segregational instability เมื่อเลี้ยงในสภาวะ non selective pressure เพราะว่า transformed cells มักจะเอาพลาสมิดออกนอกเซลล์เพราะไม่จำเป็นต้องใช้ยีนดื้อยาในการดำรงชีวิตอยู่รอดเนื่องจากเลี้ยงไว้ในสภาวะที่ไม่มียาปฏิชีวนะ จนกระทั่งทำให้มีการสูญเสียพลาสมิดไปเมื่อมีการถ่ายเชื้อต่อไปเรื่อยๆ (Lertcanawanichakul and Wiwat, 2000) แต่อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่ามียากลุ่มโปรตีน tubulin ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ช่วยทำให้เกิด stability ของพลาสมิดในเซลล์ให้สูงขึ้นใน *Bt* (Larsen et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่ง *EcoRI* ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนดื้อยา *Tc* ของ pBC16 ยังมีความเกี่ยวข้องกับการ mobilization ของพลาสมิด pBC16 ด้วย (Andrup et al., ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์)



## สรุปผลการทดลอง

Shuttle plasmid pBCX หรือ shuttle plasmid pBCE มี structural stability เมื่ออยู่ใน *Btk* HD73 (transformed *Btk* HD73) แต่จะมี segregational stability แตกต่างกันเมื่อเลี้ยงในสภาวะ non selective pressure ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับขนาดและ copy number ของพลาสมิด ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ได้ทำการสร้างพลาสมิดทั้ง 2 ชนิดมาจากพลาสมิดชนิดเดียวกันกล่าวคือ pBC16 กับ pBluscript II KS อีกทั้งไม่มีการสอดใส่ยีนอื่น (heterologous gene) เข้าไป ดังนั้นปัจจัยเกี่ยวกับ copy number จึงไม่น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับ segregational stability ดังนั้นยังคงเหลือเพียงขนาดของพลาสมิดที่น่าจะมีผลต่อ segregational stability ซึ่งโดยทั่วไปพบว่าพลาสมิดที่มีขนาดเล็กจะมี segregational stability สูงกว่าพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ แต่จากการทดลองนี้ปรากฏว่า pBCE (6100 bp) ที่มีขนาดเล็กกว่า pBCX (6900 bp) มี segregational stability ต่ำกว่า pBCX กล่าวคือสามารถคงอยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน *Btk* HD73 ได้เพียง 3 รุ่น (passages) ส่วน pBCX จะค่อย ๆ ลดลง แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีปัจจัยอื่นอีกเข้ามาเกี่ยวข้องกับ segregational instability ในเซลล์เจ้าบ้าน ดังเช่นความไม่สมบูรณ์ของยีนที่ใช้เป็นตัวคัดเลือก transformed cells และยังสามารถขึ้นอยู่กับการหมัก และการเติมอากาศในการบ่มเลี้ยงเชื้อ pH และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น (Brigidi et al., 1996) ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาในลำดับต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จากทุนสนับสนุนการพัฒนาข้อเสนอโครงการวิจัยผ่านสำนักวิชาและขอขอบคุณสำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือ

## เอกสารอ้างอิง

- Andrup, L., Jensen, G.B., Wileks, A., Smidt, L., Sorensen, E.K. and Rasmussen A. n.d. **Mobilization of “non-mobilizable” plasmids.** Available from URL: <http://www.ami.dk/research/andrup/posters/mobilization2.pdf>.
- Aronson, A.I., Beckman, W. and Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiol Rev** 50(1): 1-24.
- Brigidi, P., Gonzakez-Veray, R.A., Rossi, M. and Matteuzzi, D. 1996. Study of stability of recombinant plasmids during the continuous culture of *Bacillus sterothermophilus* NUB3621 in nonselective medium. **Biotechnol Bioengineer** 53: 507-514.
- Ceron, J., Ortiz, A., Quintero, R., Guereca, I. and Bravo, A. 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strains collection. **Appl Environ Microbiol** 61(11): 3826-3831.
- Charnley, A.K. 1991. Microbial pathogens and insect pest control. **Lett Appl Microbiol** 12: 149-157.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Dean, D.H. 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. **MMBR** 62(3): 807-813.
- Crook, N.E. and Jarret, P. 1991. Viral and bacterial pathogens of insects. **J Appl Bacteriol Symp Suppl** 70: 91S-96S.
- De Maagd, R.A., Bravo, A. and Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genet** 17(4): 193-199.

- Dervyn, E., Poncet, S., Klier, A. and Rapoport, G. 1995. Transcriptional regulation of the *cryIVD* gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **J Bacteriol** 177: 2283-2291.
- De Souza, M.T., Lacadet, M.M. and Lereclus, D. 1993. Full expression of the *cryIII* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. **J Bacteriol** 175: 2952-2960.
- Gamel, P.H. and Piot, J.C. 1992. Characterization and properties of a novel plasmid vector for *Bacillus thuringiensis* displaying compatibility with host plasmids. **Gene** 120: 17-26.
- Geiser, M., Schweitzer, S. and Grimm, C. 1986. The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* : Nucleotide sequence of the *kurhd1* gene of the subsp. *kurstaki* HD1. **Gene** 48: 109-118.
- Gruss, A. and Ehrlich, D. 1988. Insertion of foreign DNA into plasmids from Gram-positive bacteria induces formation of high-molecular-weight plasmid multimers. **J Bacteriol** 3: 1183-1190.
- Hofte, H. and Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol Rev** 53(2): 242-255.
- Ishiwata, S. 1901. On a type of severe flacherie (sotto disease). **Dainihon Sanshi Kaiho** 114: 1-5.
- Larsen, R.A., Cusumano, C., Fujioka, A., Lim-Fong, G., Patterson, P. and Pogliano, J. 2007. Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. **Genes & Development** 21: 1340-1352.
- Lertcanawanichakul, M. and Wiwat, C. 2000. Improved shuttle vector for expression of chitinase gene in *Bacillus thuringiensis*. **Lett Appl Microbiol** 31: 123-128.
- Martin, P.A.W. and Travers, R.S. 1989. World-wide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Appl Environ Microbiol** 55(10): 2437-2442.
- Mettus, A.M. and Macaluso, A. 1990. Expression of *Bacillus thuringiensis* d-Endotoxin genes during Vegetative growth. **Appl Environ Microbiol** 56(4): 1128-1134.
- Ohba, M. 1996. *Bacillus thuringiensis* populations naturally occurring on Mulberry Leaves possible source of the populations associated with silkworm rearing insectaries. **J Appl Bacteriol** 80: 56-64.
- Old, R.W. and Primrose, S.B. 1989. **Principles of Gene Manipulations** 4<sup>th</sup> edn. Oxford: Blackwell Scientific Publication.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual** 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.