



การพัฒนาระบบ CRISPR/Cas ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์แบบจำเพาะลำดับเบส



ปัญจพร วงศ์พยัคฆ์

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การพัฒนาระบบ CRISPR/Cas ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์แบบจำเพาะลำดับเบส



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การพัฒนาระบบ CRISPR/Cas ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์แบบจำเพาะลำดับ
เบส "

ของ ปัญจพร วงศ์พยัคฆ์

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ดร.วณิดดา รุ่งรัมย์)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.ภาคภูมิ ทรัพย์สุนทร)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาติพงษ์ พงษ์เจริญ)

อนุมัติ

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มุณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

| | |
|-----------------|---|
| ชื่อเรื่อง | การพัฒนาระบบ CRISPR/Cas ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์แบบจำเพาะลำดับเบส |
| ผู้วิจัย | ปัญญาพร วงศ์พยัคฆ์ |
| ประธานที่ปรึกษา | ดร. ภาคภูมิ ทรัพย์สุนทร |
| ประเภทสารนิพนธ์ | วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2563 |
| คำสำคัญ | การคอนจูเกต, ระบบ CRISPR antimicrobial, การอยู่ร่วมกันระหว่างพลาสมิด, การคือยابปฏิชีวนะ, วิศวกรรมจุลินทรีย์ |

บทคัดย่อ

การใช้ระบบ CRISPR/Cas เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียอย่างจำเพาะต้องอาศัยการส่งระบบ CRISPR/cas ที่มีประสิทธิภาพ การส่ง CRISPR/cas ด้วย Phage transduction มีประสิทธิภาพการส่งสูง แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวพบข้อจำกัดคือเฟจหนึ่งตัวที่ถูกใช้เป็นเซลล์ผู้ให้ไม่สามารถส่งดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรียผู้รับหลายชนิดได้ ขณะที่การส่ง CRISPR/cas ด้วย Conjugation มีข้อดีคือสามารถส่งดีเอ็นเอระหว่างแบคทีเรียสามารถใช้เซลล์ผู้ให้ส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ผู้รับหลายชนิด อย่างไรก็ตามยังคงพบปัญหาด้านประสิทธิภาพการส่งที่ต่ำ งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาระบบการส่ง CRISPR/cas ด้วยวิธีการ conjugation ที่มีประสิทธิภาพการส่งและการกำจัดดีเอ็นเอเป้าหมายสูง ผู้วิจัยได้พัฒนาระบบการส่งให้มีประสิทธิภาพสูงโดยการส่ง CRISPR/cas บนพลาสมิดกลุ่ม R1162 ที่สามารถเคลื่อนย้ายได้ (Mobilizable plasmid) ร่วมกับพลาสมิดตัวช่วยกลุ่ม RK2 ที่สามารถถ่ายโอนตนเองได้ (Conjugative plasmid) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการส่งระบบ CRISPR/cas เข้าสู่แบคทีเรียเป้าหมาย และใช้การแทนที่พลาสมิดเป้าหมายด้วยพลาสมิดอื่นจากกลุ่มเดียวกัน (Incompatibility group) ช่วยเข้าไปแทนที่การแพร่กระจายของพลาสมิดเป้าหมายในกลุ่มประชากร ผลการทดลองพบว่าสามารถแทนที่พลาสมิดเป้าหมายได้ 100% แม้ใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับต่ำ (1:100) และไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะในคัดเลือก การนำส่งระบบ CRISPR/cas อย่างมีประสิทธิภาพสู่ประชากรแบคทีเรียมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาทางด้านจุลชีพ CRISPR และเครื่องมือทางพันธุกรรมสำหรับวิศวกรรมจุลินทรีย์ในอนาคต



Title DEVELOPMENT OF CRISPR/CAS ANTIMICROBIALS
AGAINST BASE-SPECIFIC BACTERIA

Author PANJAPORN WONGPAYAK

Advisor Pakpoom Subsoontorn, Ph.D.

Academic Paper M.S. Thesis in Biochemistry, Naresuan University, 2020

Keywords Conjugation, CRISPR antimicrobial, Plasmid incompatibility,
Antibiotics resistance, in situ microbiome engineering

ABSTRACT

The use of CRISPR/Cas for sequence-specific elimination of bacteria or resistance genes is a powerful tool for combating antibiotic resistance. However, this approach requires efficient delivery of CRISPR/Cas DNA cassette into the targeted bacterial population. Compared to phage transduction, plasmid conjugation can deliver DNA to a broader host range but often suffer from low delivery efficiency. Here, we developed a multi-plasmid conjugation system for efficient CRISPR/Cas delivery, target DNA elimination and plasmid replacement. The CRISPR/Cas system, delivered via a broad-host-range R1162 mobilizable plasmid, specifically eliminated targeted plasmid in recipient cells. Self-transmissible RK2 helper plasmid facilitated the spread of mobilizable CRISPR/Cas. The replacement of target plasmid with another plasmid from the same compatibility group helped to prevent re-entering of the target plasmid. Together, we showed that up to 100% of target plasmid from the entire recipient population could be replaced even at a low (1:100) donor-to-recipient ratio and in the absence of transconjugant selection. Such ability to modify genetic content of microbiota efficiently in the absence of selection will be critical for future development of CRISPR antimicrobials as well as genetic tools for in situ microbiome engineering.

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความกรุณาและการให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ดร.ภาควงศ์ ทรัพย์สุนทร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และแนะแนวทางปฏิบัติ ตลอดจนตรวจแก้ข้อบกพร่องต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อผู้วิจัยอย่างยิ่ง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณด้วยความเคารพอย่างสูง ขอขอบคุณ คุณพลิศา มหาชัย และเพื่อนร่วม PS Lab ทุกท่าน สำหรับข้อแนะนำและความช่วยเหลือในทุกด้านของการทำวิจัย อีกทั้งต้องขอบคุณเพื่อนนิสิตทุกท่านที่ให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัว ที่สนับสนุนให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน จนงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จด้วยดี รวมถึงขอบคุณทุกท่านที่ให้กำลังใจมาโดยตลอด

อนึ่ง ผู้วิจัยคาดหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ที่สนใจ คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีแก่งานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอน้อมบูชาพระคุณบิดา มารดา คณาจารย์ และผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ปัญญาพร วงศ์พยัคฆ์

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| ประกาศคุณูปการ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ช |
| สารบัญตาราง..... | ฌ |
| สารบัญภาพ..... | ญ |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| ชีวนิเวศน์จุลชีพ (Microbiota)..... | 1 |
| การวิศวกรรมประชากรจุลินทรีย์..... | 2 |
| การใช้ CRISPR/cas ตัดดีเอ็นเอจำเพาะลำดับเบส..... | 4 |
| จุดมุ่งหมายของการศึกษา..... | 7 |
| ขอบเขตของงานวิจัย..... | 7 |
| สมมุติฐานของการวิจัย..... | 8 |
| บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง..... | 9 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... | 13 |
| ภาพรวมของงานวิจัย..... | 13 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย..... | 17 |
| การทดสอบระบบ CRISPR/cas..... | 17 |
| การเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งระบบ CRISPR..... | 19 |

| | |
|--|----|
| การใช้ pHELP มีผลต่อการแพร่กระจายพลาสมิดเป้าหมาย | 22 |
| การแทนที่พลาสมิดเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของพลาสมิดเป้าหมาย (Plasmid replacement)..... | 24 |
| บทที่ 5 บทสรุปและอภิปรายผลการทดลอง..... | 30 |
| ข้อเสนอแนะ | 36 |
| บรรณานุกรม | 37 |
| บรรณานุกรม | 38 |
| ภาคผนวก | 42 |
| การสร้างพลาสมิด (Construction) | 43 |
| พลาสมิดในงานวิจัย..... | 46 |
| ผลการสูญเสียยีนคือยาปฏิชีวนะและยีนเรืองแสงสีเขียว (gfp)..... | 48 |
| ผลการแทนที่พลาสมิดเป้าหมายด้วยพลาสมิดใน Incompatibility group..... | 49 |
| ผลการเปลี่ยนสัดส่วนการเรืองแสงของเซลล์ในประชากรแบบกลุ่ม เมื่อมีพลาสมิดตัวช่วย | 49 |
| ผลการสูญเสียยีนคือยาปฏิชีวนะและการตายของแบคทีเรีย <i>A. baumannii</i> | 51 |
| ผลการตรวจสอบยีนเป้าหมายและพลาสมิด CRISPR โดยวิธี PCR..... | 52 |
| ผลการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอยีนเป้าหมายในฐานข้อมูล GenBank | 52 |
| ประวัติผู้วิจัย | 54 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|--|------|
| ตาราง 1 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการ digestion..... | 43 |
| ตาราง 2 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการ ligation | 44 |
| ตาราง 3 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการ Primer annealing | 44 |

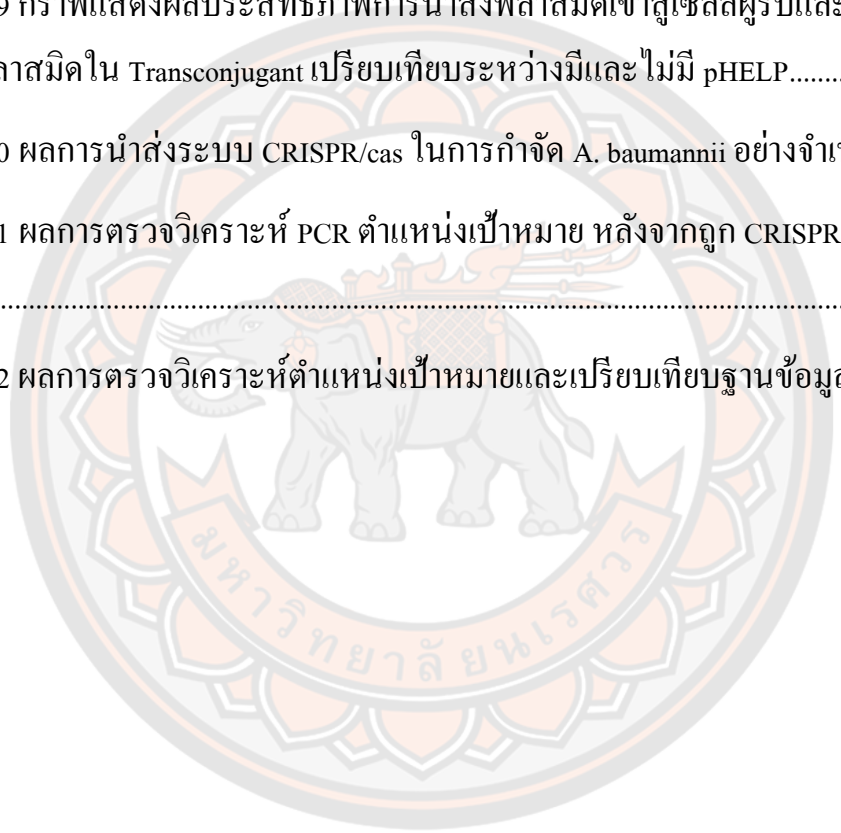


สารบัญภาพ

| | หน้า |
|--|------|
| ภาพ 1 ความสำคัญของชีวนิเวศน์จุลชีพ | 1 |
| ภาพ 2 วิธีการวิศวกรรมจุลชีพในแหล่งกำเนิด (in situ microbiome engineering) | 2 |
| ภาพ 3 เปรียบเทียบวิธีการกำจัดแบคทีเรียระหว่างแบบจำเพาะกับแบบไม่จำเพาะ | 4 |
| ภาพ 4 CRISPR/cas และการประยุกต์ใช้ | 5 |
| ภาพ 5 CRISPR antimicrobial | 6 |
| ภาพ 6 งานวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษา CRISPR antimicrobial (Citorik et al., 2014) | 9 |
| ภาพ 7 การนำส่งระบบ CRISPR antimicrobial ด้วยวิธีการ Conjugation (Citorik et al., 2014). | 10 |
| ภาพ 8 งานวิจัยก่อนหน้าเกี่ยวกับ CRISPR antimicrobial | 11 |
| ภาพ 9 ภาพรวมงานวิจัย | 13 |
| ภาพ 10 กระบวนการวัดประสิทธิภาพการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ | 14 |
| ภาพ 11 กระบวนการวัดประสิทธิภาพการทำงานของระบบ CRISPR | 15 |
| ภาพ 12 แผนภาพและกราฟแสดงประสิทธิภาพการนำส่ง CRISPR/cas | 17 |
| ภาพ 13 แผนภาพและกราฟแสดงประสิทธิภาพการนำส่ง CRISPR/cas และกำจัดพลาสมิด เป้าหมายในประชากรแบบผสม (*** $p < 0.001$) | 18 |
| ภาพ 14 พลาสมิดตัวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการส่งระบบ CRISPR | 20 |
| ภาพ 15 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการส่งระหว่างพลาสมิด p _{gNDM1} , pHELP และพลาสมิด p _{gNDM1} ร่วมกับ pHELP | 21 |
| ภาพ 16 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการส่งพลาสมิดร่วมกับ pHELP ที่ ระยะเวลาต่างกัน | 21 |

| | |
|---|----|
| ภาพ 17 พลาสมิดตัวช่วยแพร่กระจายพลาสมิดเป้าหมาย..... | 22 |
| ภาพ 18 ผลการแพร่กระจายของพลาสมิดเป้าหมาย โดย pHELP | 23 |
| ภาพ 19 แนวทางการแก้ปัญหาการแพร่กระจายของพลาสมิดเป้าหมาย..... | 24 |
| ภาพ 20 แนวทางการแก้ปัญหาการแพร่กระจายของพลาสมิดเป้าหมาย (ต่อ)..... | 24 |
| ภาพ 21 ระบบ CRISPR มีผลต่อการแทนที่พลาสมิดเป้าหมาย (***) $p < 0.001$ | 25 |
| ภาพ 22 ระบบ CRISPR มีผลต่อการแทนที่พลาสมิดเป้าหมาย (ต่อ) | 26 |
| ภาพ 23 ระบบ CRISPR มีผลต่อการแทนที่พลาสมิดเป้าหมาย (***) $p < 0.001$ (ต่อ) | 26 |
| ภาพ 24 สรุปชนิดพลาสมิดที่ให้ในการทดลอง..... | 27 |
| ภาพ 25 ประสิทธิภาพการนำส่งระบบ CRISPR และการแทนที่การแพร่กระจายพลาสมิด เป้าหมาย (** $p < 0.01$, เทียบ t-test ระหว่าง with pHELP กับ without pHELP)..... | 28 |
| ภาพ 26 การวิเคราะห์หา pINDM1 ในโคโลนีเรืองแสงสีเขียว | 29 |
| ภาพ 27 สรุปผลงานวิจัย..... | 30 |
| ภาพ 28 วิธีการนำส่งระบบ CRISPR ในงานวิจัยก่อนหน้า | 30 |
| ภาพ 29 ระบบ CRISPR บนพลาสมิดถ่ายโอนตัวเองได้ (Hamilton et al., 2019) | 31 |
| ภาพ 30 ระบบ CRISPR บนพลาสมิดถ่ายโอนตัวเองได้มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงาน ของ CRISPR (Dong et al., 2019) | 32 |
| ภาพ 31 การใช้ 2 พลาสมิดร่วมกันในการนำส่งระบบ CRISPR ในงานวิจัยก่อนหน้า (Ruotsalainen et al., 2019)..... | 33 |
| ภาพ 32 พลาสมิดกลุ่ม RK2 และ R1162 สามารถถ่ายโอนไปด้วยกัน (Cabezón et al., 1994) | 33 |
| ภาพ 33 ประสิทธิภาพการ Conjugation ของพลาสมิดกลุ่ม RK2..... | 34 |
| ภาพ 34 การศึกษาการส่งพลาสมิดมากกว่า 1 ชนิด เข้าสู่เซลล์..... | 35 |

| | |
|--|----|
| ภาพ 35 กระบวนการสร้างชิ้น Insert DNA ที่ใช้ประกอบเป็น pgEMPTY | 43 |
| ภาพ 36 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย | 47 |
| ภาพ 37 การเรืองแสงของยีน <i>gfp</i> หลังจากถูกนำส่ง pgGFP เข้าสู่เซลล์เป้าหมาย | 48 |
| ภาพ 38 แผนภาพและกราฟแสดงผลการวัดประสิทธิภาพการส่งระหว่างพลาสมิด pgNDM1 | 49 |
| ภาพ 39 กราฟแสดงผลประสิทธิภาพการนำส่งพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ผู้รับและการแทนที่ ของพลาสมิดใน Transconjugant เปรียบเทียบระหว่างมีและไม่มี pHELP..... | 50 |
| ภาพ 40 ผลการนำส่งระบบ CRISPR/cas ในการกำจัด <i>A. baumannii</i> อย่างจำเพาะ | 51 |
| ภาพ 41 ผลการตรวจวิเคราะห์ PCR ตำแหน่งเป้าหมาย หลังจากถูก CRISPR/cas ตัดทำลาย | 52 |
| ภาพ 42 ผลการตรวจวิเคราะห์ตำแหน่งเป้าหมายและเปรียบเทียบฐานข้อมูล..... | 53 |

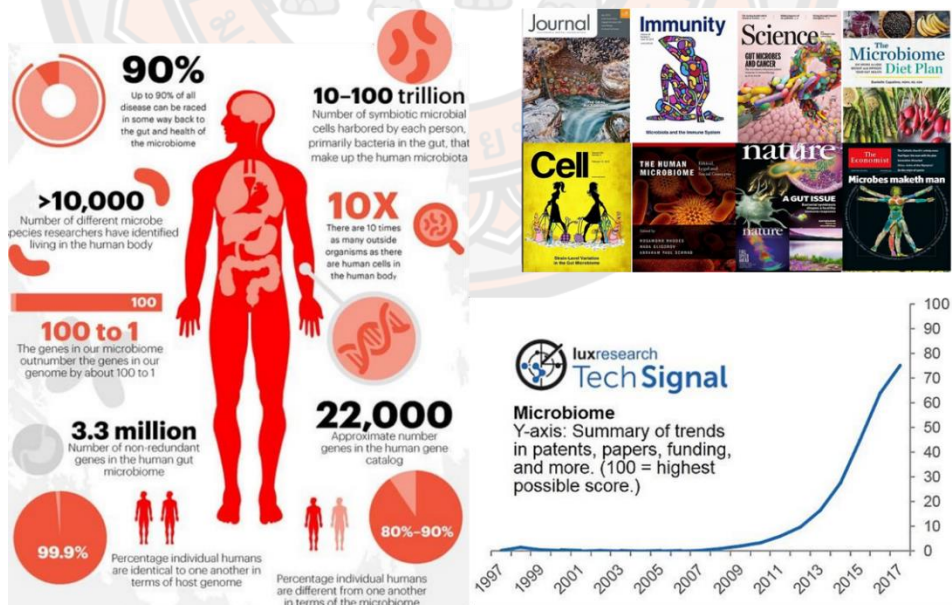


บทที่ 1

บทนำ

ชีวนิเวศน์จุลชีพ (Microbiota)

ร่างกายมนุษย์มีจุลชีพอาศัยอยู่เป็นปกติ จุลินทรีย์เหล่านี้ประกอบรวมกันขึ้นเป็นชีวนิเวศน์จุลชีพ (Microbiota) สามารถพบได้บนผิวหนัง ช่องปาก ระบบทางเดินอาหาร ลำไส้ รวมไปถึงมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันด้วย จุลชีพที่พบบนนั้นมีจำนวนของเซลล์มีมากกว่าจำนวนเซลล์ในร่างกายมนุษย์ 1-2 เท่า ปัจจุบันมีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของจุลชีพมีผลต่อความสัมพันธ์กับการเกิดโรค เช่น ลำไส้อักเสบ (Shimizu et al., 2018) อาการท้องเสีย (Li et al., 2021) เป็นต้น งานวิจัยบางฉบับรายงานว่าความสัมพันธ์ของจุลชีพกับมนุษย์ส่งผลถึงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Michaudel & Sokol., 2020) หรือการเผาผลาญอาหาร (Thursby & Juge., 2017) นอกจากนี้งานวิจัยก่อนหน้าได้ศึกษาความแตกต่างของจุลชีพในมนุษย์ พบว่ามนุษย์แต่ละคนมีจีโนมเหมือนกัน 99.9% แต่ที่จุลชีพเหมือนกันเพียง 80-90% (Mohajeri et al., 2018) ส่งผลให้มนุษย์มีความแตกต่างกันในเรื่องสุขภาพ ระบบเผาผลาญ หรือระบบย่อยอาหาร เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จุลชีพในมนุษย์จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างมาก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในสัตว์ ฟิช และสิ่งแวดลอม

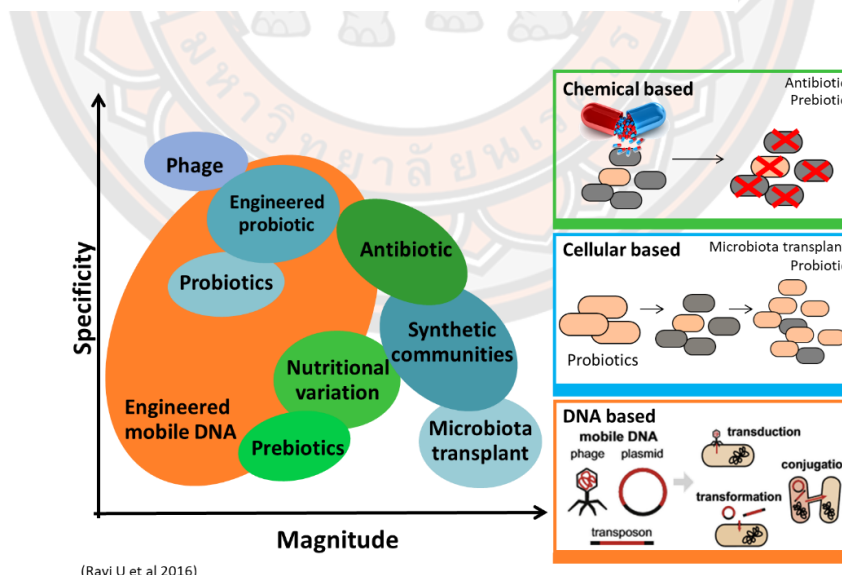


ภาพ 1 ความสำคัญของชีวนิเวศน์จุลชีพ

ปี 2018 นักวิเคราะห์ของ LUX RESEARCH ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับจำนวนการเผยแพร่ งานวิจัยด้านจุลชีพ ผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับจุลชีพ รวมถึงบริษัทที่ใช้เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับจุลชีพตั้งแต่ปี 1997 - 2017 พบว่า ช่วงปี 2012 มีอัตราการเผยแพร่งานวิจัยและการประยุกต์ใช้จุลชีพสูงขึ้น (ภาพ 1) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าจุลชีพมีความสำคัญอย่างยิ่ง หากต้องการใช้ประโยชน์จากจุลชีพที่ดีต้องอาศัยวิธีการจัดการกับจุลชีพที่ดีด้วย

การวิศวกรรมประชากรจุลินทรีย์

การจัดการและศึกษาประชากรจุลินทรีย์เดิมจำเป็นต้องอาศัยกระบวนการวิศวกรรมจุลินทรีย์ในกลุ่มประชากรที่มีคุณภาพ กระบวนการวิศวกรรมจุลินทรีย์แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีความจำเพาะและระดับการปรับเปลี่ยนกลุ่มประชากรจุลินทรีย์เดิมที่แตกต่างกัน กลุ่มที่ 1 คือวิธีการทางเคมี (Chemical base) เป็นการใช้สารเคมีในการปรับเปลี่ยนกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) การใช้พรีไบโอติก (Prebiotic) เป็นต้น กลุ่มที่ 2 คือวิธีการส่งเซลล์เข้าสู่กลุ่มประชากร (Cellular base) เป็นวิธีการส่งเซลล์เข้าสู่กลุ่มประชากรจุลินทรีย์เพื่อเข้าไปปรับสัดส่วนแบคทีเรียในกลุ่มประชากร เช่น การปลูกถ่ายจุลชีพประจำถิ่น (Microbiota transplant) การใช้พรีไบโอติก (Probiotic) เป็นต้น วิธีการที่ 3 คือวิธีการส่งดีเอ็นเอเข้าสู่ประชากรจุลินทรีย์และเข้าไปปรับเปลี่ยนระดับดีเอ็นเอของแบคทีเรีย เช่น การส่งพลาสมิด เป็นต้น

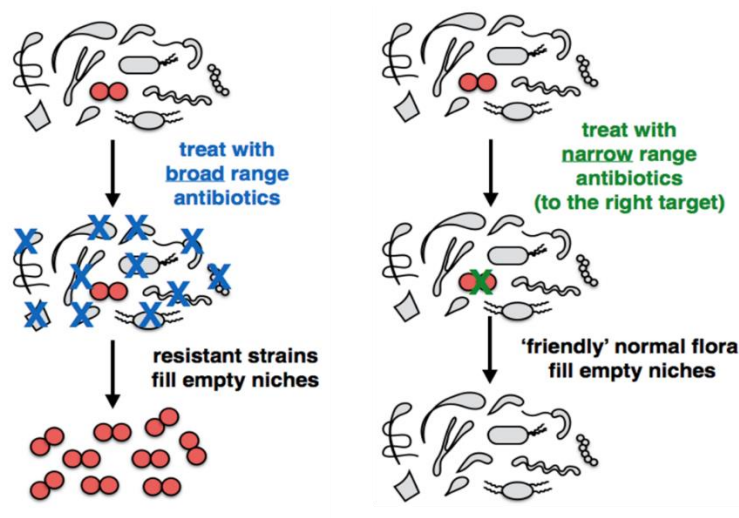


ภาพ 2 วิธีการวิศวกรรมจุลชีพในแหล่งกำเนิด (*in situ* microbiome engineering)

(Ravi et al., 2016)

วิธีทางเคมี เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะนั้น มีความจำเพาะต่ำ เนื่องจากไม่สามารถระบุเป้าหมายแบคทีเรียที่ต้องการกำจัดได้ เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะจะทำลายแบคทีเรียที่ไม่มีคุณสมบัติในการต้านยาปฏิชีวนะทุกตัว ขณะที่แบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ (Drug resistance bacteria) ยังคงรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนในกลุ่มประชากร ขณะที่วิธีการส่งเซลล์เข้าสู่กลุ่มประชากรยังคงมีความจำเพาะค่อนข้างต่ำเช่นเดียวกับการใช้สารเคมี เนื่องจากไม่สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียที่ต้องการให้เพิ่มจำนวนได้ อีกทั้งการเพิ่มแบคทีเรียเข้าสู่กลุ่มประชากรเดิมนั้น อาจถูกรบกวนจากแบคทีเรียประจำถิ่นส่งผลให้แบคทีเรียที่ส่งเข้าไปไม่สามารถอยู่ในสภาวะนั้นได้ อย่างไรก็ตามวิธีการส่งดีเอ็นเอนี้ จะมีความจำเพาะสูง เนื่องจากระบุตำแหน่งที่จะเข้าไปปรับเปลี่ยนระดับดีเอ็นเอของเป้าหมายได้ อีกทั้งดีเอ็นเอที่ส่งเข้าไปจะฝังตัวอยู่ในเซลล์ทำให้อยู่ในกลุ่มประชากรจุลินทรีย์เป็นระยะเวลาสั้น

การเลือกใช้วิธีการสำหรับวิศวกรรมจุลินทรีย์ในแหล่งกำเนิดเป็นต้องคำนึงถึงความจำเพาะ (Specificity) และระดับความสามารถเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์เดิม (Magnitude) 3 วิธีการที่กล่าวไปข้างต้น คือ ทางเคมี (ภาพ 2, สีเขียว) การส่งเซลล์ (ภาพ 2, สีฟ้า) และการส่งดีเอ็นเอ (ภาพ 2, สีส้ม) นั้น มีคุณสมบัติความจำเพาะและผลกระทบต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์เดิมแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น การปลูกถ่ายจุลินทรีย์ประจำถิ่น คือการล้างประชากรจุลินทรีย์กลุ่มเดิม และถ่ายโอนกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ทั้งกลุ่มใหม่เข้าไปแทนที่ ซึ่งจะมีความจำเพาะต่ำ เนื่องจากไม่สามารถระบุหรือแยกเฉพาะแบคทีเรียบางชนิดได้ อีกทั้งยังมีผลกระทบต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์เดิมอย่างมาก เนื่องจากการเปลี่ยนกลุ่มจุลินทรีย์ใหม่ทั้งหมดโดยไม่เหลือกลุ่มจุลินทรีย์เดิม ขณะที่ใช้เฟจ (Phage) คือการส่งเฟจเข้าไปในกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ ซึ่งมีความจำเพาะสูง เนื่องจากเฟจจะเข้าฝังตัวกับแบคทีเรียจำเพาะ ตรงกันข้ามการใช้เฟจมีผลกระทบต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ต่ำ เนื่องจากเข้าไปทำลายเฉพาะเจาะจงทำให้ไม่เป็นผลต่อประชากรจุลินทรีย์อื่น เป็นต้น



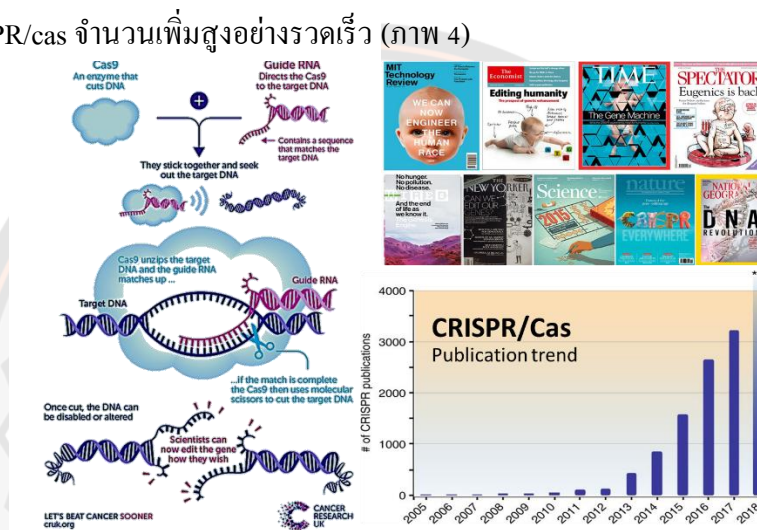
ภาพ 3 เปรียบเทียบวิธีการกำจัดแบคทีเรียระหว่างแบบจำเพาะกับแบบไม่จำเพาะ

ความจำเพาะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น การใช้ยาปฏิชีวนะที่มีความจำเพาะต่ำส่งผลให้เกิดการทำลายแบคทีเรียอื่นในกลุ่มประชากร ขณะที่แบคทีเรียคือยาสามารถอยู่รอด จากนั้นแบคทีเรียคือยาจะมีพื้นที่ในการเพิ่มปริมาณตัวเองในกลุ่มประชากรทำให้เกิดการแพร่กระจายของแบคทีเรียคือยา ทางตรงกันข้าม หากยาปฏิชีวนะที่ใช้มีความจำเพาะสูงจะสามารถเลือกทำลายเฉพาะแบคทีเรียเป้าหมายที่ต้องการโดยไม่กระทบต่อแบคทีเรียอื่นในกลุ่มประชากร งานวิจัยนี้มุ่งเน้นวิธีการวิศวกรรมบนพื้นฐานทางดีเอ็นเอ ซึ่งที่มีความจำเพาะสูงสามารถทำลายเป้าหมายที่เฉพาะเจาะจงและมีผลกระทบต่อกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ดั้งเดิมต่ำ (Ravi et al., 2016)

การใช้ CRISPR/cas ตัดดีเอ็นเอจำเพาะลำดับเบส

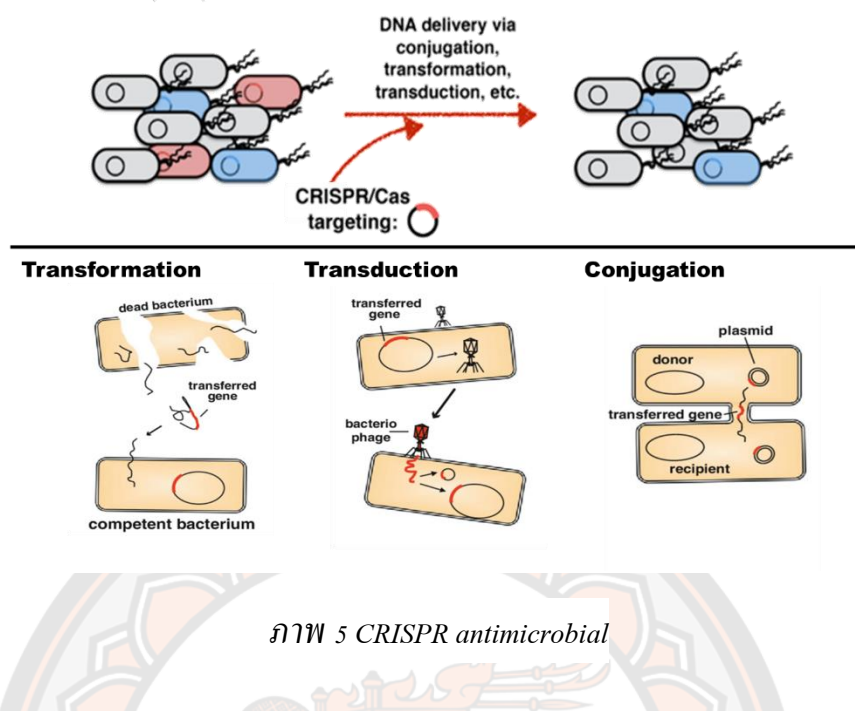
ระบบ Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) ค้นพบครั้งแรกใน *E. coli* ในปี ค.ศ.1987 (Ishino et al., 1987) มีลักษณะเป็นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเรียงตัวคล้ายคลึงกันเป็นสายสั้น พบได้ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม prokaryote ซึ่งต่อมาพบว่ามีโปรตีนที่ทำหน้าที่ร่วมกับ CRISPR โดยทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการคลายเกลียวดีเอ็นเอ (Helicase) และตัดทำลายสายดีเอ็นเอ (Endonuclease) เรียกว่า CRISPR-associated (Cas) ซึ่งมีหลายกลุ่มแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน โดยระบบ Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated (CRISPR/cas) ในธรรมชาติเปรียบเสมือนระบบภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียที่ช่วยในการต่อต้านดีเอ็นเอแปลกปลอมที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เช่น พลาสมิด (Plasmid) หรือไวรัสของแบคทีเรีย (Phages) (Marraffini and Sontheimer., 2008; Redman et al., 2016)

ระบบ CRISPR/cas ประกอบด้วยเอนไซม์ Cas ทำหน้าที่ตัดทำลายดีเอ็นเอและ Guide RNA (gRNA) ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งกลไกการทำงานเริ่มจากการรวมตัวกันระหว่าง gRNA กับเอนไซม์ Cas จากนั้น gRNA จะพาเอนไซม์ Cas ไปที่ดีเอ็นเอเป้าหมาย และเกิดการตัดทำลายดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะ ความจำเพาะและการเปลี่ยนดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างง่ายของระบบ CRISPR/cas ส่งผลให้ระบบ CRISPR/cas นั้น ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการทำ Genome editing สำหรับศึกษาการปรับเปลี่ยนจีโนมภายในเซลล์ด้วย ซึ่งจากการรวบรวมสถิติงานวิจัยเกี่ยวกับระบบ CRISPR/cas ย้อนหลัง พบว่ามีงานวิจัยที่ศึกษาและเผยแพร่เกี่ยวกับการใช้ระบบ CRISPR/cas จำนวนเพิ่มสูงอย่างรวดเร็ว (ภาพ 4)



ภาพ 4 CRISPR/cas และการประยุกต์ใช้

นอกจากนี้ระบบ CRISPR ยังถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการกำจัดแบคทีเรียแบบจำเพาะได้อีกด้วย โดยออกแบบ gRNA ให้ไปตัดทำลายดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ต้องการ เช่น หากต้องการกำจัดแบคทีเรียดีดื้อยา ให้ออกแบบ gRNA ที่ตรงกับลำดับเบสของยีนดื้อยานั้น เมื่อส่งระบบ CRISPR เข้าสู่เซลล์ ระบบ CRISPR จะกำจัดแบคทีเรียเป้าหมายด้วยการตัดทำลายยีนดื้อยาหรือทำให้เซลล์เป้าหมายตาย โดยไม่กระทบต่อแบคทีเรียอื่นในกลุ่มประชากร (ภาพ 5, บน)



ภาพ 5 CRISPR antimicrobial

การนำระบบ CRISPR มาประยุกต์ใช้สำหรับกำจัดแบคทีเรียเป้าหมาย จะต้องมีการนำส่งระบบ CRISPR เข้าสู่กลุ่มประชากรเซลล์ด้วยวิธีการ Transformation, Transduction หรือ Conjugation เป็นต้น โดยระบบ CRISPR จะมี gRNA มุ่งไปที่ดีเอ็นเอเป้าหมาย (ภาพ 5, แบคทีเรียสีแดง) เมื่อถูกนำส่งเข้าสู่กลุ่มประชากรแล้ว ระบบ CRISPR จะตัดทำลายแบคทีเรียเป้าหมายอย่างจำเพาะ โดยไม่กระทบแบคทีเรียตัวอื่น (ภาพ 5, บน) วิธีนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรียมี 3 วิธีนั้น มีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน Transformation คือการส่งดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรียโดยตรง อาศัยความพร้อมของเซลล์ในการรับดีเอ็นเอเข้าไป (Competent bacteria) การ Transformation เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดในการนำส่งดีเอ็นเอและมีข้อดีคือ ไม่ต้องอาศัยพาหะในการส่งดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย (Chung et al., 1989) อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของกระบวนการ Transformation คือต้องอาศัยสารเคมีในขั้นตอนการเตรียมเซลล์ให้พร้อมรับดีเอ็นเอ ซึ่งการทดลองในห้องปฏิบัติการสามารถใช้สารเคมีในการทำให้เซลล์พร้อมรับดีเอ็นเอได้ ในขณะที่สภาวะธรรมชาติแบคทีเรียไม่มีความพร้อมในการรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์และไม่สามารถใช้สารเคมีในธรรมชาติได้ ขณะที่ Transduction คือการส่งดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรียโดยอาศัยเฟจเป็นพาหะในการนำส่ง ซึ่งวิธีการใช้เฟจเป็นพาหะมีข้อดีคือ มีประสิทธิภาพการส่งดีเอ็นเอสูง เนื่องจากเฟจมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว เมื่อมีจำนวนพาหะมากก็จะสามารถส่งดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรียเป้าหมายได้มากขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของกระบวนการ Transduction คือ การที่เฟจจะสามารถส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรียได้ต้องอาศัย Receptor ที่เข้ากันได้ระหว่างเฟจกับแบคทีเรีย ดังนั้น เฟจหนึ่งตัวจะไม่สามารถนำไปใช้กับแบคทีเรียหลายชนิดได้ หากต้องการเปลี่ยนแบคทีเรียผู้รับจำเป็นต้องหาเฟจตัวใหม่ด้วย

นอกจากนี้ข้อจำกัดของการใช้เฟจคือสามารถนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรียได้ดีเมื่อเซลล์แบคทีเรีนั้นลอยอยู่ในสภาวะของเหลว (Planktonic cells) ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่ในธรรมชาติอยู่ในรูปแบบที่เกาะติดอยู่กับพื้นผิว (Biofilm) ขณะที่ Conjugation คือการส่งดีเอ็นเอระหว่างแบคทีเรียผู้ให้ (Donor) ไปยังแบคทีเรียผู้รับ (Recipient) โดยอาศัยการสร้างท่อส่งจากแบคทีเรียผู้ให้เพื่อส่งดีเอ็นเอไปยังแบคทีเรียผู้รับ ดีเอ็นเอที่ส่งไปยังแบคทีเรียผู้รับได้จำเป็นต้องมีลำดับดีเอ็นเอเครื่องหมายแสดงถึงความสามารถในการถูกถ่ายโอนไปยังแบคทีเรียผู้รับ (Origin of transfer) อีกทั้งการส่งดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ Conjugation นั้น ยังต้องอาศัยกลไกของ Conjugative gene ในการสร้าง Pilus ทำหน้าที่ดึงแบคทีเรียผู้ให้กับแบคทีเรียผู้รับมาอยู่ใกล้กัน จากนั้นจะมีกลไกการสร้างท่อระหว่างแบคทีเรียทั้งสองเพื่อถ่ายโอนดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามวิธี Conjugation สามารถปิดข้อจำกัดของ Transformation และ Transduction ได้ เนื่องจากการส่งด้วยวิธี Conjugation ไม่ต้องอาศัยสารเคมีในการทำให้แบคทีเรียพร้อมรับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ หากแบคทีเรียผู้ให้มีกลไก Conjugative gene และดีเอ็นเอมีลำดับดีเอ็นเอสัญญาณก็จะสามารถถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรียผู้รับได้ การส่งด้วยวิธี Conjugation เป็นการส่งระหว่างแบคทีเรียกับแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียผู้ให้หนึ่งชนิดสามารถนำไปใช้ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรียผู้รับได้หลายชนิด นอกจากนี้การส่งดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Conjugation นั้น ยังสามารถนำส่งดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อแบคทีเรียอยู่ในสภาวะ Biofilm ซึ่งในธรรมชาติแบคทีเรียส่วนมากอยู่ในสภาวะ Biofilm แต่อย่างไรก็ตาม การ Conjugation ยังคงมีประสิทธิภาพการส่งดีเอ็นเอต่ำเป็นสาเหตุให้งานวิจัยที่ผ่านมาใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับสูงถึง 300 ต่อ 1 อีกทั้งยังต้องมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการคัดเลือกร่วมด้วย (Citorik et al., 2014)

ดังนั้นผู้วิจัยมุ่งเน้นไปที่กระบวนการส่งดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรียเป้าหมายด้วยวิธีการ Conjugation ที่มีประสิทธิภาพการส่งดีเอ็นเอสูง มาประยุกต์ใช้กับการนำส่งระบบ CRISPR antimicrobial สำหรับกำจัดแบคทีเรียเป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพและกำจัดแบคทีเรียเป้าหมายอย่างเฉพาะเจาะจง

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

เพื่อพัฒนาระบบการนำส่ง CRISPR antimicrobial ประสิทธิภาพสูง บนพื้นฐานการนำส่งดีเอ็นเอแบบ Conjugation และการถ่ายโอนพลาสมิดมากกว่า 1 ชนิด (Multi-plasmid)

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาประสิทธิภาพการนำส่งระบบ CRISPR/cas เข้าสู่แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยวิธีการ Conjugation โดยใช้ Self-transmissible conjugative plasmid ร่วมกับระบบ CRISPR/cas เพื่อ

กำจัด พลาสมิดเป้าหมายในแบคทีเรียและแทนที่พลาสมิดเป้าหมายด้วยพลาสมิดในกลุ่ม Incompatibility group เดียวกัน

สมมติฐานของการวิจัย

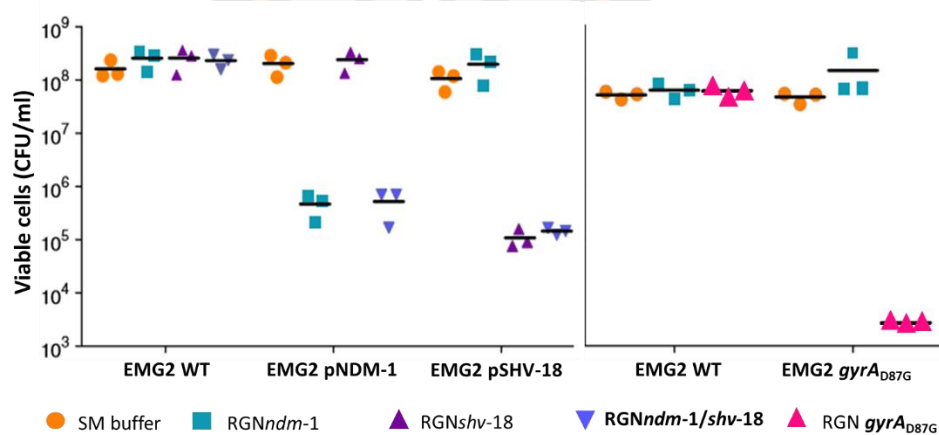
รูปแบบการนำส่งระบบ CRISPR/cas ร่วมกับ Self-transmissible conjugative plasmid ด้วยวิธีการ conjugation ประสิทธิภาพสูงเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย และเกิดกลไกการตัดทำลายดีเอ็นเอเป้าหมายภายในเซลล์อย่างจำเพาะ จากนั้นพลาสมิดแทนที่จะถูกนำส่งเข้าสู่เซลล์เพื่อป้องกันมิให้ พลาสมิดเป้าหมายกลับเข้าสู่เซลล์



บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

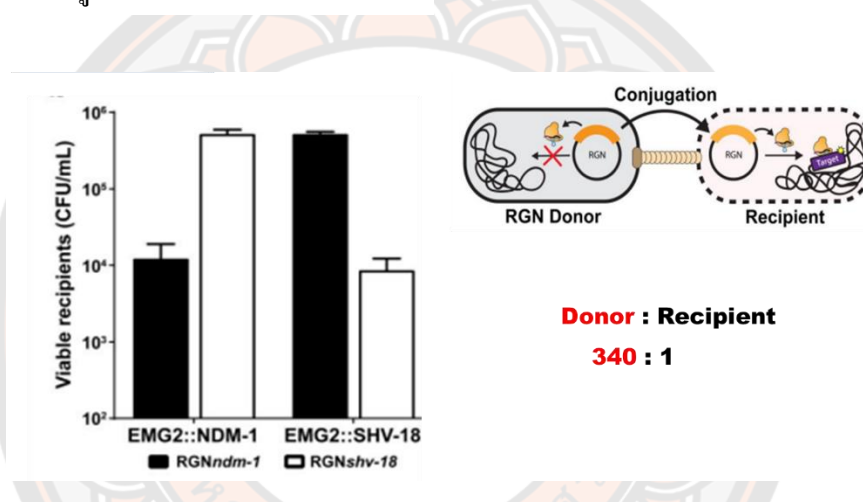
งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษา CRISPR antimicrobial ในการกำจัดแบคทีเรียอย่างจำเพาะสูง ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* (Citorik et al., 2014; Gomaa et al., 2014; Yosef et al., 2015; Dong et al., 2019; Wang et al., 2019) *Staphylococcus aureus* (Bikard et al., 2014; Ram et al., 2018) *Listeria monocytogenes* (Ram et al., 2018) และ *Zymomonas mobilis* (Cao et al., 2017)



ภาพ 6 งานวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษา CRISPR antimicrobial (Citorik et al., 2014)

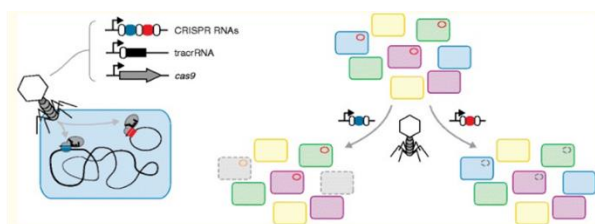
ตัวอย่างงานวิจัยปี 2014 ของ Citorik et al., ศึกษาการนำส่งระบบ CRISPR antimicrobial เข้าสู่แบคทีเรียเป้าหมายคือ *E. coli* ด้วยการส่งระบบ CRISPR/cas ที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นพลาสมิดคือยา พบว่าระบบ CRISPR/cas มีความจำเพาะสูง ตัดทำลายเฉพาะแบคทีเรียเป้าหมายอย่างเจาะจงโดยไม่ทำลายแบคทีเรียอื่น กราฟแสดงผลความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ผู้รับ (แกน X) และจำนวนที่รอดชีวิต (แกน Y) การทดลองนำส่งระบบ CRISPR ที่มียีนเป้าหมายคือยีนคือยา New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (NDM1) (ภาพ 6, จุดสีฟ้า) การส่งระบบ CRISPR ที่มียีนเป้าหมายคือยีนคือยา SHV extended-spectrum beta-lactamases 18 (SHV-18) (ภาพ 6, จุดสีม่วง) และการส่งระบบ CRISPR ทั้งสองชนิด (ภาพ 6, จุดสีน้ำเงิน) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เพียง SM buffer (ภาพ 6, จุดสีส้ม) พบว่าเมื่อระบบ CRISPR เข้าสู่เซลล์ผู้รับที่มีเป้าหมายจะเกิดกลไกการกำจัดเป้าหมาย ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลง ทางตรงกันข้าม เมื่อระบบ CRISPR เข้าสู่เซลล์ที่ไม่มีเป้าหมายก็จะไม่พบการลดลงของเซลล์นั้น ขณะที่การส่งระบบ CRISPR ทั้งสองชนิดไปด้วยกัน

ระบบ CRISPR สามารถทำงานและตัดทำลายเซลล์เป้าหมายได้อย่างจำเพาะ นอกจากนี้ Citorik et al., ยืนยันคุณสมบัติการตัดทำลายที่จำเพาะสูงนี้ด้วยการส่งระบบ CRISPR/cas ที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นเอนไซม์ gyrase ที่เกิดการกลายพันธุ์หนึ่งเบส (ภาพ 6, จุดสีเขียว) โดยศึกษาการส่งระบบ CRISPR/cas ระหว่างแบคทีเรียชุกควบคุมที่เอนไซม์ gyrase ปกติเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่มีการกลายพันธุ์หนึ่งเบสบนเอนไซม์ gyrase พบว่าระบบ CRISPR/cas สามารถเลือกตัดทำลายเฉพาะแบคทีเรียที่มีการกลายพันธุ์ที่เอนไซม์ gyrase จะเห็นได้ว่าระบบ CRISPR/cas นั้น มีความจำเพาะสูง แม้ว่าแบคทีเรียเป้าหมายจะมีความแตกต่างกันเพียงแค่ดีเอ็นเอหนึ่งเบส ระบบ CRISPR/cas ก็ยังคงสามารถเลือกทำลายเฉพาะแบคทีเรียเป้าหมายได้ ซึ่งการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นใช้วิธีการส่งระบบ CRISPR/cas เข้าสู่แบคทีเรียด้วยวิธี Transduction



ภาพ 7 การนำส่งระบบ CRISPR antimicrobial ด้วยวิธีการ Conjugation (Citorik et al., 2014).

Citorik และคณะ (2014) ศึกษาการส่งระบบ CRISPR/cas เข้าสู่แบคทีเรียเป้าหมายด้วยวิธี Conjugation ร่วมด้วยโดยส่งระบบ CRISPR จากเซลล์ผู้ให้ไปยังเซลล์ผู้รับ จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ผู้รับ (แกน X) และเซลล์รอดชีวิต (แกน Y) โดยนำส่งระบบ CRISPR ที่มีเป้าหมายคือยีน NDM1 (ภาพ 7, สีดำ) และระบบ CRISPR ที่มีเป้าหมายคือยีน SHV-18 (ภาพ 7, สีขาว) พบว่าระบบ CRISPR สามารถกำจัดเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามการ Conjugation มีประสิทธิภาพการนำส่งดีเอ็นเอต่ำ จึงทำให้การทดลองของ Citorik และคณะ (2014) ใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับสูง (340:1)



| Reference | PMID | CRISPR | Delivery | Target microbe | Host |
|--------------------|----------|-------------------------------|----------------------|---|-------|
| Gomaa et al 2014 | 24473129 | <i>E.coli</i> CRISPR/Cas3 | Transform | <i>E.coli</i> | - |
| Bikard et al 2014 | 25282355 | <i>S.pyogenes</i> CRISPR/Cas9 | Transduce | <i>S.aureus</i> | mouse |
| Citorik et al 2014 | 25240928 | <i>S.pyogenes</i> CRISPR/Cas9 | Transduce, Conjugate | <i>E.coli</i> | moth |
| Yosef et al 2015 | 26060300 | <i>E.coli</i> CRISPR/Cas3 | Transduce | <i>E.coli</i> | - |
| Ram et al 2018 | 30247487 | <i>S.pyogenes</i> CRISPR/Cas9 | ABDs | <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> | mouse |
| Dong et al 2019 | 30267758 | <i>S.pyogenes</i> CRISPR/Cas9 | Conjugate | <i>E.coli</i> | - |
| Wang et al 2019 | 31203365 | <i>S.pyogenes</i> CRISPR/Cas9 | Conjugate | <i>E.coli</i> | - |

ภาพ 8 งานวิจัยก่อนหน้าเกี่ยวกับ CRISPR antimicrobial

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษาการนำส่งระบบ CRISPR สำหรับใช้เป็นเครื่องมือกำจัดแบคทีเรียเป้าหมาย (ภาพ 8)

งานวิจัยของ Gomaa et al., แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดที่มี CRISPR/cas จะแข่งขันกับ จีโนม *E. coli* มีประสิทธิภาพการ transform เข้าสู่เซลล์ต่ำกว่าพลาสมิดควบคุม $\sim 1E+5$ เท่า (Gomaa et al., 2014) การลดต่ำลงของประสิทธิภาพการ transform โดย CRISPR/cas จะแข่งขันต่อตำแหน่งต่าง ๆ บนจีโนม มีความคล้ายคลึงกันโดยสถิติ ไม่ว่าจะตำแหน่งตัดมีขึ้นสำคัญหรือไม่ก็ตาม ดังนั้นการตายของเซลล์น่าจะเกิดจากการทำลายจีโนมโดยตรงมากกว่าการสูญเสียการทำงานของยีนตรงตำแหน่งตัด นอกจากนี้ Gomaa et al., ยังได้แสดงว่า CRISPR/cas สามารถถูกออกแบบให้ตัดลำดับเบสจำเพาะที่มีแต่ในแบคทีเรียบางสายพันธุ์ในกลุ่มประชากรผสม โดยจะฆ่าเซลล์ที่มีลำดับเบสจะเพาะตรงตำแหน่งตัดแต่ไม่ทำอันตรายต่อเซลล์อื่น ๆ

งานวิจัยของ Bikard et al., ใช้ไวรัส phiNM1 ในการส่ง CRISPR/cas ที่ถูกออกแบบให้ตัดลำดับเบสในยีนต้านยาปฏิชีวนะชนิด Kanamycin ในแบคทีเรียชนิด *S. aureus* (Bikard et al., 2014) วิธีนี้สามารถกำจัด *S. aureus* เกือบทั้งหมดที่มียีนต้าน Kanamycin (อัตราการรอด $\sim 1E-4$ ที่ Multiplicity of Infection ~ 20) แต่ไม่ทำอันตรายต่อ *S. aureus* ที่ไม่มียีนต้าน Kanamycin นอกจากนี้ Bikard et al., ยังแสดงให้เห็นว่าการกำจัด *S. aureus* แบบจำเพาะจะแข่งขันไม่ได้นำไปสู่การดื้อยาที่รวดเร็วเมื่อเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะ งานวิจัยอีกงานของ Citorik et al., ใช้ไวรัส M13 หรือการคอนจูเกชันด้วยพลาสมิด RP4 ในการส่ง CRISPR/cas ที่จำเพาะต่อยีน beta-lactamase (*bla*) ใน *E. coli* (Citorik et al., 2014) เช่นเดียวกับงานของ Bikard et al., งานวิจัยชิ้นนี้แสดง การกำจัด *E. coli* ที่

มียีน bla แต่ไม่ทำอันตรายต่อ *E. coli* อื่น ๆ ในประชากรผสม และนำไปสู่การเปลี่ยนแปลง ส่วนประกอบชนิดเซลล์ในประชากร

Cui & Bikard ศึกษาการตายของ *E. coli* จากการถูกตัดดีเอ็นเอสายคู่บนจีโนม โดยเอนไซม์ Cas9 (Cui & Bikard, 2016) การทดลองนี้ครอบคลุมตำแหน่งการตัดทั้งหมด 12 ตำแหน่งบนจีโนมของ *E. coli* สิ่งที่น่าสนใจคือมีเพียง 4 ตำแหน่ง จาก 12 ตำแหน่งที่ถูกตัดแล้วจะนำไปสู่การตายของเซลล์ สมมติฐานที่ตามมาคือ 8 ตำแหน่งที่เหลืออาศัยการซ่อมแซมดีเอ็นเอโดย HR เป็นไปได้ว่าการตัดจีโนมที่ตำแหน่งเหล่านี้มีประสิทธิภาพสูงไม่มากพอที่จะตัดจีโนมทุกชุดในเซลล์พร้อมกัน จึงสามารถเกิด HR เพื่อซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ถูกตัดได้ เพื่อพิสูจน์สมมติฐานนี้ คณะผู้วิจัยได้แสดงว่า 1) การให้ดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อซ่อมแซมแบบ HR สามารถกู้ชีวิตเซลล์ที่ถูกตัดจีโนมตรงตำแหน่งตายได้ 2) การป้องกัน HR โดยใช้โปรตีน Gam จาก ไวรัส Mu ทำให้ทุกตำแหน่งตัดเป็นตำแหน่งตาย ความต่างสำคัญระหว่างการทดลองนี้กับการทดลองก่อนหน้านี้โดย Gomaa et al., (Gomaa et al., 2014) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตัดจีโนมตรงตำแหน่งใด ๆ ทำให้เซลล์ตาย คือชนิดของเอนไซม์ Cas ที่ใช้ ซึ่งการทดลองของ Cui & Bikard ใช้ Cas9 เพียงแต่ตัดดีเอ็นเอสายคู่ ขณะที่การทดลองของ Gomaa et al., ใช้ Cas3/CasABCDE ซึ่งทั้งตัดดีเอ็นเอสายคู่และย่อยสลายดีเอ็นเอจากปลาย 3' ไป 5' ความสามารถของจุลินทรีย์ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอจะเป็นตัวกำหนดระดับความทนทานต่อการถูกทำลายดีเอ็นเอด้วย CRISPR/cas ตัวอย่างเช่น *Streptomyces coelicolor* สามารถซ่อมแซมดีเอ็นเออย่างมีประสิทธิภาพด้วย NHEJ (Tong et al., 2015) ขณะที่ *Clostridium cellulolyticum* จะถูกกำจัดแม้ว่าจะมีกลไก NHEJ อยู่ในเซลล์ (Xu et al., 2015) แบคทีเรียส่วนมากไม่มีกลไกการซ่อมแซมดีเอ็นเอแบบ NHEJ และมีแนวโน้มจะถูกกำจัด ถ้าจีโนมโดนตัดด้วย Cas และไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการซ่อมแซมแบบ HR (Bowater et al., 2006; Shuman et al., 2007)

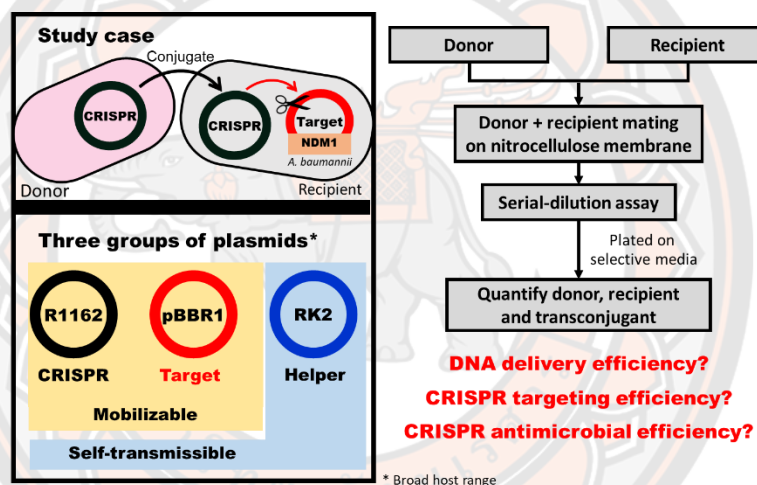
ดังนั้น การศึกษาก่อนหน้าเกี่ยวกับ CRISPR antimicrobial ไม่มีการรายงานผลเกี่ยวกับการส่งระบบ CRISPR/cas เข้าสู่กลุ่มประชากรที่มีประสิทธิภาพสูงด้วยวิธีการ Conjugation

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ภาพรวมของงานวิจัย

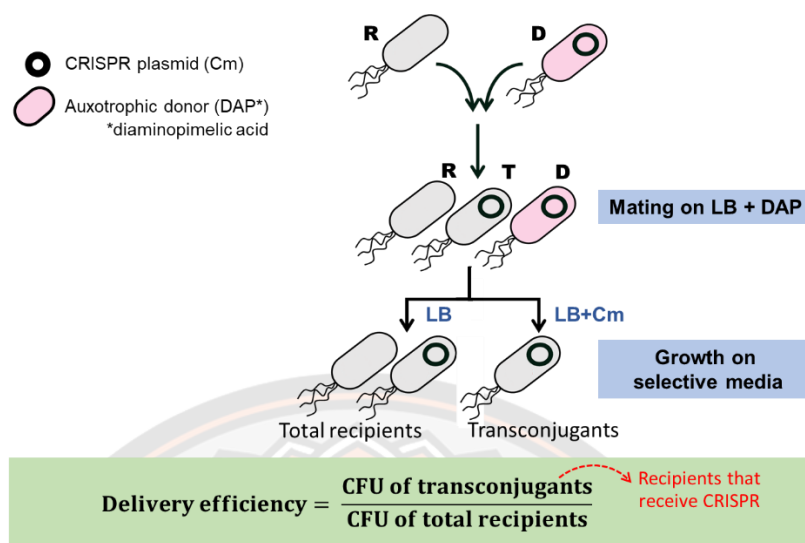
งานวิจัยนี้เป็นการนำส่งระบบ CRISPR/cas ด้วยวิธีการ Conjugation จากเซลล์ผู้ให้ไปยังเซลล์ผู้รับ เมื่อระบบ CRISPR/cas ถูกส่งเข้าสู่เซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิดเป้าหมายจะเกิดการตัดทำลายดีเอ็นเอเป้าหมายนั้น ระบบ CRISPR/cas ที่ใช้มีดีเอ็นเอเป้าหมายคือยีน NDM1 ซึ่งเป็นยีนที่สามารถพบได้ในแบคทีเรียที่ยากลุ่ม Beta-lactamase และพบในแบคทีเรียแกรมลบ (Negative bacteria) พลาสมิดเป้าหมายที่งานวิจัยนี้ใช้คือพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอบางส่วนของยีน NDM1 แยกมาจาก *Acinetobacter baumannii* (ภาพ 9)



ภาพ 9 ภาพรวมงานวิจัย

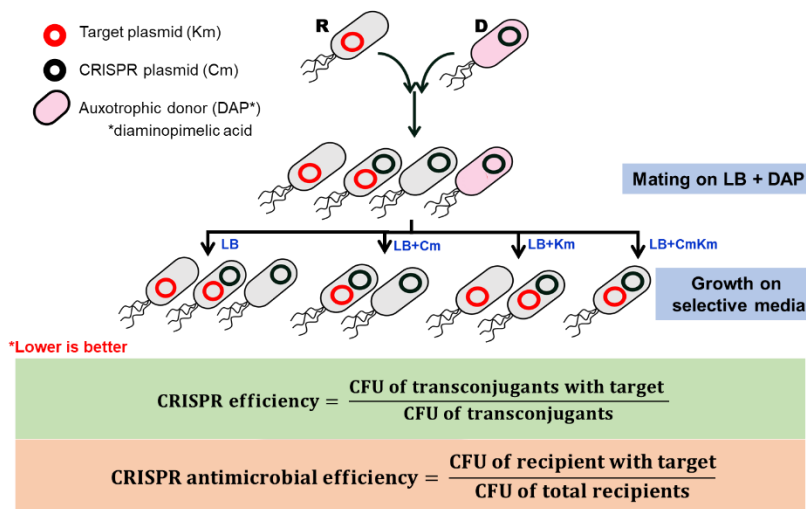
พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยประกอบด้วยพลาสมิด 3 กลุ่มหลัก คือ พลาสมิด CRISPR กลุ่ม R1162, พลาสมิดเป้าหมาย กลุ่ม pBBR1 และพลาสมิดตัวช่วย กลุ่ม RK2 ซึ่งพลาสมิดตัวช่วยนั้นจะถูกใช้ในการทดลองหลัง

การทดลองทั้งหมดของงานวิจัยนี้ใช้วิธีการ Conjugation เริ่มจากการนำเซลล์ผู้ให้ (Donor) ผสมกับเซลล์ผู้รับ (Recipient) และหยดลงบนแผ่น Nitrocellulose membrane เพื่อให้เซลล์เกิดการ Conjugation จากนั้นเซลล์ที่ได้จากการ Conjugation มาเจือจาง (Serial-dilution assay) และคัดเลือกลงบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะเฉพาะ เพื่อค้นหาเซลล์ผู้ให้ เซลล์ผู้รับและเซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิด (Transconjugant) และคำนวณประสิทธิภาพการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์และประสิทธิภาพการทำงานของระบบ CRISPR ตามลำดับ



ภาพ 10 กระบวนการวัดประสิทธิภาพการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

การวัดประสิทธิภาพการนำส่งระบบ CRISPR เพื่อต้องการทราบว่าจำนวนเซลล์ผู้รับทั้งหมดมีสัดส่วนเซลล์ที่รับ พลาสมิดและเปลี่ยนเป็น Transconjugant เท่าใด (ภาพ 10) กล่าวคือ หาจำนวนเซลล์ผู้รับที่รับพลาสมิด CRISPR โดยการทดลองเริ่ม Conjugation ด้วยการผสมระหว่างเซลล์ผู้ให้ *E.coli* EcGT2 ที่มีพลาสมิด CRISPR (pgNDM1) และเซลล์ผู้รับ *E.coli* SAR08 การทดลองนี้ใช้เซลล์ผู้ให้ *E.coli* EcGT2 ซึ่งเป็นแบคทีเรีย *E.coli* ที่ถูกดัดแปลงเป็น Auxotrophic (Δ asd::mCherry; Spec) ซึ่งต้องอาศัยอาหารที่มี Diaminopimelic acid (DAP) ในการเจริญเติบโต โดยผู้วิจัยเลือกใช้เซลล์ผู้ให้นี้ เนื่องจากสะดวกต่อการคัดเลือก Transconjugant กล่าวคือ ผู้วิจัยสามารถกำจัดเซลล์ผู้ให้ออกได้เพียงแค่เลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ไม่มี DAP ผสมอยู่ เมื่อผ่านกระบวนการ Conjugation บนแผ่น nitrocellulose ที่วางอยู่บนอาหาร LB ผสม DAP เซลล์ผู้รับบางส่วนจะรับพลาสมิด CRISPR เข้าสู่เซลล์เกิดเป็น Transconjugant จากนั้นผู้วิจัยจะคัดเลือกด้วยอาหาร LB ผสม Cm สำหรับหาจำนวน Transconjugant นำไปหารกับการคัดเลือกบนอาหาร LB สำหรับหาจำนวนเซลล์ผู้รับทั้งหมด เพื่อคำนวณประสิทธิภาพการนำส่งดีเอ็นเอ (ภาพ 10, สีเขียว)



ภาพ 11 กระบวนการวัดประสิทธิภาพการทำงานของระบบ CRISPR

ต่อมาผู้วิจัยจะคำนวณหาประสิทธิภาพการทำงานของระบบ CRISPR เพื่อต้องการทราบว่าจำนวน Transconjugant ที่รับเอาพลาสมิด CRISPR เข้าสู่เซลล์แล้ว มีสัดส่วนเซลล์ที่เกิดการสูญเสียพลาสมิดเป้าหมายเท่าใด (ภาพ 11, สีเขียว) โดยการทดลองส่งระบบ CRISPR จากเซลล์ผู้ให้ไปยังเซลล์ผู้รับนี้จำเป็นต้องมีพลาสมิดเป้าหมาย (pTNDM1) เข้ามาเกี่ยวข้อง เนื่องจากมีจุดประสงค์ที่จะวัดการกำจัดพลาสมิดเป้าหมาย การทดลองเริ่มจากการผสมเซลล์ผู้ให้กับเซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิดเป้าหมาย เมื่อผ่านกระบวนการ Conjugation บนแผ่น Nitrocellulose วางอยู่บนอาหาร LB ผสม DAP เซลล์ผู้รับบางส่วนจะรับพลาสมิด CRISPR เข้าสู่เซลล์เกิดเป็น Transconjugant เมื่อระบบ CRISPR เจอกับพลาสมิดเป้าหมายส่งผลให้ Transconjugant บางส่วนสูญเสียพลาสมิดเป้าหมาย โดยผู้วิจัยสามารถคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดพลาสมิดเป้าหมายได้จากจำนวนเซลล์ที่คัดเลือกบนอาหาร LB ที่มี CmKm สำหรับหาจำนวน Transconjugant ที่ยังคงมีพลาสมิดเป้าหมายอยู่ นำไปหาคับกับจำนวนเซลล์ที่คัดเลือกบนอาหาร LB ที่มี Cm สำหรับหาจำนวน Transconjugant ทั้งหมด นอกจากนี้ผู้วิจัยยังมีความประสงค์หาประสิทธิภาพโดยรวมของการส่งระบบ CRISPR เข้าไปกำจัดพลาสมิดเป้าหมาย กล่าวคือ ประสิทธิภาพการนำส่งระบบ CRISPR เข้าสู่เซลล์และประสิทธิภาพการทำงานของระบบ CRISPR ในการกำจัดแบคทีเรียเป้าหมาย เพื่อต้องการทราบว่าจำนวนเซลล์ผู้รับทั้งหมด มีสัดส่วนที่รับพลาสมิด CRISPR เข้าสู่เซลล์และยังคงมีพลาสมิดเป้าหมายเหลืออยู่เท่าใด (ภาพ 11, สีส้ม) โดยสามารถคำนวณได้จากจำนวนเซลล์ที่คัดเลือกบนอาหาร LB ผสม Km สำหรับคัดเลือกเซลล์ผู้รับที่คงเหลือพลาสมิดเป้าหมาย นำไปหาคับกับจำนวนเซลล์ที่คัดเลือกบนอาหาร LB สำหรับหาจำนวนเซลล์ผู้รับทั้งหมด ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้าแสดงประสิทธิภาพการทำงานของระบบ CRISPR โดยใช้สูตรแรกที่คำนวณเพียงแค่เซลล์ที่รับระบบ CRISPR เข้าไป

เท่านั้น ขณะทำงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การคำนวณภาพรวมทั้งประสิทธิภาพด้านการนำส่งระบบ CRISPR เข้าสู่เซลล์และประสิทธิภาพการทำงานของระบบ CRISPR

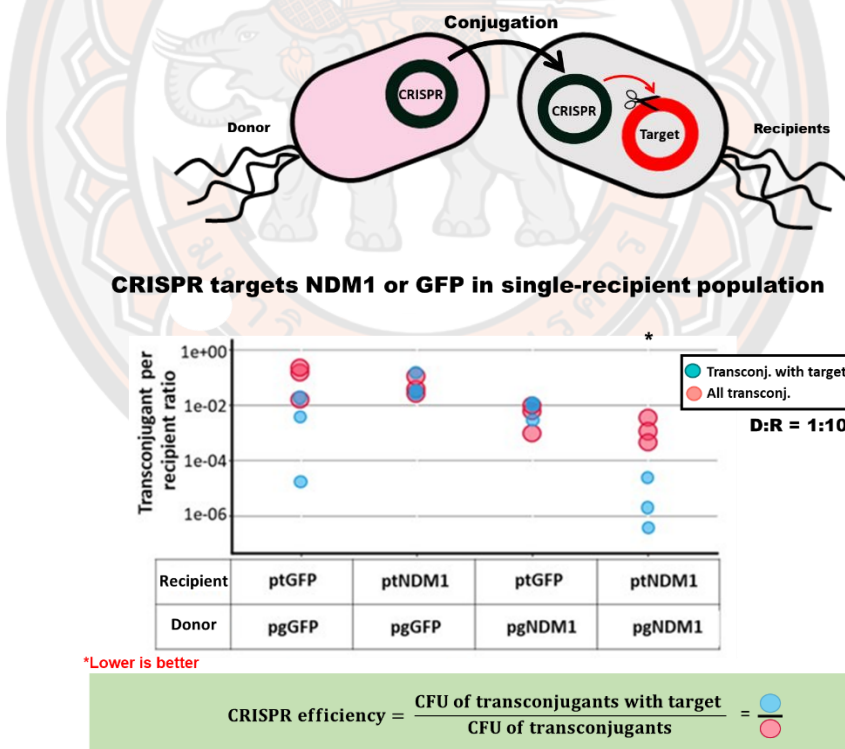
หมายเหตุ : รายละเอียดวัสดุ อุปกรณ์ และกระบวนการทดลองระบุในภาคผนวก



บทที่ 4 ผลการวิจัย

การทดสอบระบบ CRISPR/cas

ผู้วิจัยตรวจสอบการทำงานของระบบ CRISPR โดยการส่งระบบ CRISPR จากเซลล์ผู้ให้สู่เซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิดเป้าหมายด้วยวิธีการ Conjugation (ภาพ 12, บน) การทดลองนี้ผู้วิจัยมีเซลล์ผู้ให้ 2 ชนิดคือ เซลล์ผู้ให้ที่มีพลาสมิด CRISPR ที่มี Spacer ต่อยีน NDM1 (pgNDM1) และเซลล์ผู้ให้ที่มีพลาสมิด CRISPR ที่มี Spacer ต่อยีน *gfp* (pgGFP) นำส่งเข้าสู่เซลล์ผู้รับ 2 ชนิดคือ เซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิดเป้าหมาย NDM1 (ptNDM) และเซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิดเป้าหมายยีน *gfp* (ptGFP) ผู้วิจัยคาดหวังว่าเมื่อระบบ CRISPR ถูกส่งเข้าไปยังเซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิดเป้าหมายตรงกันกับ Spacer ในระบบ CRISPR พลาสมิดเป้าหมายในเซลล์ผู้รับนั้นจะถูกกำจัด ในทางตรงกันข้ามหากระบบ CRISPR ถูกส่งเข้าสู่เซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิดเป้าหมายไม่ตรงกับระบบ CRISPR ก็จะไม่เกิดการกำจัดพลาสมิดนั้น

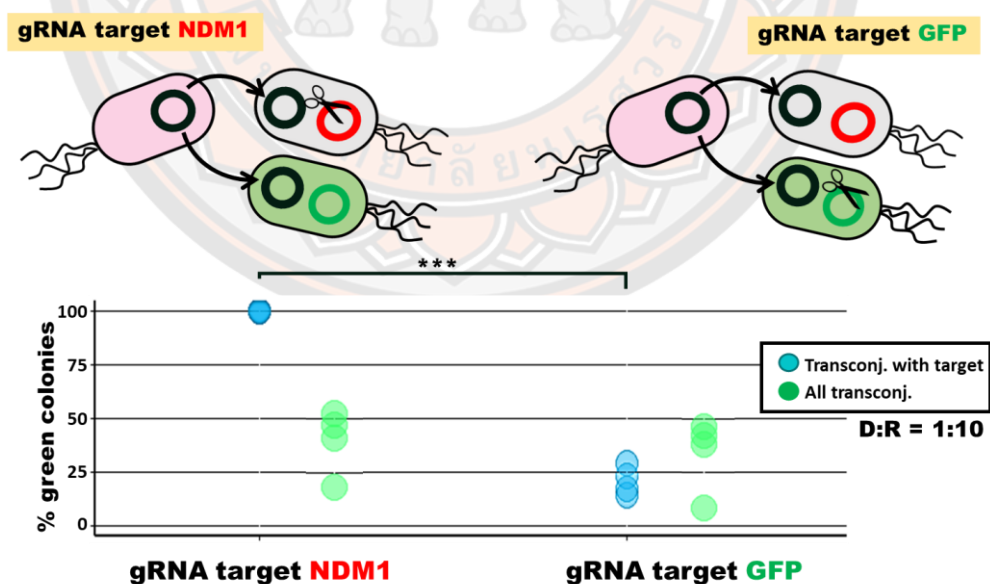


ภาพ 12 แผนภาพและกราฟแสดงประสิทธิภาพการนำส่ง CRISPR/cas

และกำจัดพลาสมิดเป้าหมายใน *E. coli*

(* $p < 0.05$: เทียบระหว่าง All Transconjugant และ Transconjugant with target)

ผลการทดลองพบการนำส่งระบบ CRISPR เข้าสู่เซลล์เป้าหมายเพื่อวัดประสิทธิภาพการทำงานของระบบ CRISPR (ภาพ 12) ชนิดเซลล์ผู้ให้และเซลล์ผู้รับแต่ละการทดลอง (แกน X) กับประสิทธิภาพการ Conjugation (แกน Y) ผู้วิจัยคัดเลือก Transconjugant ที่มีพลาสมิดเป้าหมายเหลืออยู่ (ภาพ 12, วงกลมสีฟ้า) และคัดเลือก Transconjugant ทั้งหมด (ภาพ 12, วงกลมสีชมพู) ซึ่งสามารถนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพการทำงานของระบบ CRISPR โดยการนำค่าของวงกลมสีฟ้ามาหารด้วยค่าของวงกลมสีชมพู พบว่า เมื่อเกิดการส่งระบบ CRISPR ที่มีเป้าหมายเข้าสู่เซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิดเป้าหมายไม่ตรงกัน ระบบ CRISPR จะไม่เกิดกระบวนการกำจัดพลาสมิดเป้าหมายจะเห็นได้จากกราฟจุดสีฟ้าและจุดสีชมพูจะซ้อนทับกัน กล่าวคือ Transconjugant ที่รับพลาสมิด CRISPR เข้าไปยังเซลล์เป้าหมายอยู่ภายในเซลล์ ขณะที่การส่งระบบ CRISPR เข้าสู่เซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิดเป้าหมายตรงกัน จะเห็นได้ว่าจากกราฟจุดสีฟ้าจะลดลงจากจุดสีชมพู กล่าวคือ Transconjugant ที่รับพลาสมิด CRISPR เข้าไปถูกกำจัดพลาสมิดเป้าหมาย โดยชุดการทดลองส่ง pgNDM1 เข้าสู่เซลล์เป้าหมายที่มี ptNDM1 มีจำนวน Transconjugant ที่เหลือพลาสมิดเป้าหมายลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ชุดการทดลองส่ง pgGFP เข้าสู่เซลล์เป้าหมายที่มี ptNDM1 มีจำนวน Transconjugant ที่เหลือพลาสมิดเป้าหมายลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ทดสอบยืนยันการทำงานของ ptGFP (ภาคผนวก)



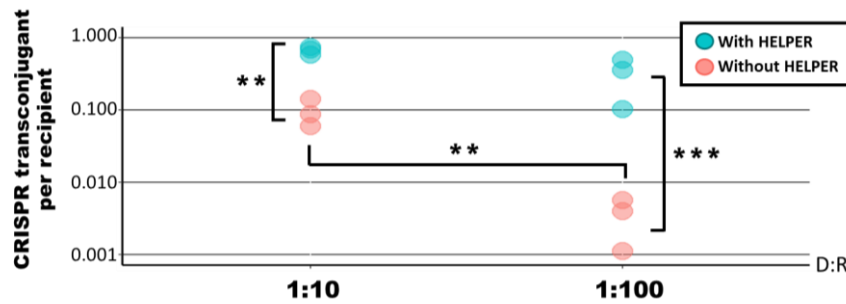
ภาพ 13 แผนภาพและกราฟแสดงประสิทธิภาพการนำส่ง CRISPR/cas และกำจัดพลาสมิดเป้าหมายในประชากรแบบผสม (***) $p < 0.001$

กรณีข้างต้นผู้วิจัยศึกษาการนำส่งระบบ CRISPR เข้าสู่เซลล์ผู้รับเป้าหมายทีละชนิด อย่างไรก็ตามในธรรมชาติแบคทีเรียอาศัยอยู่ร่วมกันมากกว่าหนึ่งชนิด ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการนำส่งระบบ CRISPR ในกลุ่มประชากรเซลล์ผู้รับแบบผสม

ผู้วิจัยนำส่งระบบ CRISPR ด้วยวิธีการ Conjugation เข้าสู่กลุ่มประชากรเซลล์ผู้รับแบบผสมระหว่างเซลล์ผู้รับที่มี pNDM1 และเซลล์ผู้รับที่มี ptGFP อัตราส่วนร้อยละ 50 ผู้วิจัยคาดหวังว่ากรณีที่ส่ง pgNDM1 เข้าสู่กลุ่มประชากรจะเกิดกระบวนการกำจัดเซลล์ผู้รับที่มี pNDM1 และเหลือเพียงเซลล์ผู้รับที่มี ptGFP ซึ่งโคโลนีที่พบจะมีการเรืองแสงสีเขียว ทางตรงกันข้ามกรณีที่ส่ง pgGFP เข้าสู่กลุ่มประชากรจะเกิดกระบวนการกำจัดเซลล์ผู้รับที่มี ptGFP และเหลือเพียงเซลล์ผู้รับที่มี pNDM1 ซึ่งโคโลนีที่พบจะไม่มีมีการเรืองแสงสีเขียว (ภาพ 13, บน) ผู้วิจัยทำการ Conjugation โดยกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชุดการทดลอง (แกน X) กับอัตราส่วนการเรืองแสงสีเขียวของโคโลนี (แกน Y) โดยคัดเลือก Transconjugant ที่มีพลาสมิดเป้าหมาย (ภาพ 13, วงกลมสีฟ้า) และคัดเลือก Transconjugant ทั้งหมด (ภาพ 13, วงกลมสีเขียว) พบว่าเมื่อคัดเลือก Transconjugant ที่มีพลาสมิดเป้าหมายอยู่ด้วยนั้น ชุดการทดลอง pgNDM1 มีโคโลนีเรืองแสงสีเขียวเพิ่มขึ้น 100% ขณะที่ชุดการทดลอง pgGFP มีโคโลนีเรืองแสงสีเขียวลดลงจากที่เริ่มต้น 50% เหลือเพียง 25% แต่อย่างไรก็ตาม การคัดเลือก Transconjugant ของทั้งสองชุดการทดลองไม่เห็นความเปลี่ยนแปลงของโคโลนีเรืองแสงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับสัดส่วนเซลล์เรืองแสงเริ่มต้น (50%) ดังนั้นการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าระบบ CRISPR สามารถกำจัดแบคทีเรียเป้าหมายได้อย่างจำเพาะ แต่อย่างไรก็ตามการนำส่งระบบ CRISPR เข้าสู่กลุ่มประชากรเซลล์ผู้รับนั้นมีประสิทธิภาพต่ำ เมื่อผู้วิจัยคัดเลือกเฉพาะ Transconjugant ที่มีพลาสมิดเป้าหมาย จะไม่เห็นผลของการกำจัดพลาสมิดเป้าหมายด้วยระบบ CRISPR

การเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งระบบ CRISPR

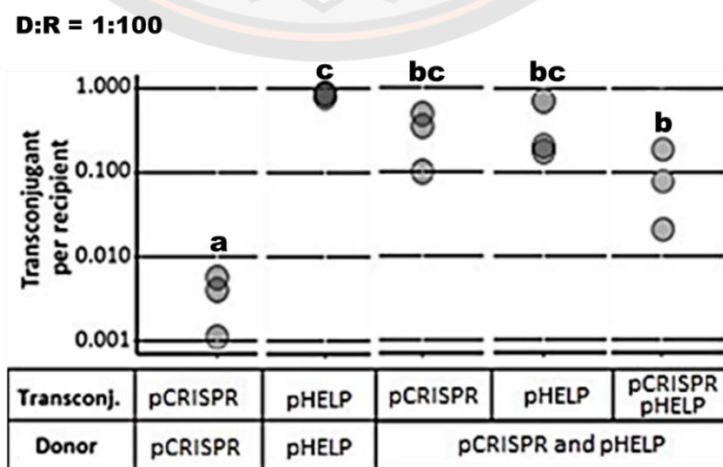
ต่อมาผู้วิจัยออกแบบระบบการนำส่งพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ที่มีประสิทธิภาพสูงด้วยการอาศัยพลาสมิดตัวช่วย (pHELP) เนื่องจากการทดลองก่อนหน้านี้อาศัยกลไกการ Conjugation ที่อยู่บนจีโนมของเซลล์ผู้ให้ ทำให้สามารถส่งพลาสมิดได้เฉพาะเซลล์ผู้รับที่อยู่ใกล้กับเซลล์ผู้ให้เท่านั้น ผู้วิจัยจึงออกแบบระบบส่งพลาสมิดที่มี pHELP อยู่ในระบบด้วย เนื่องจาก pHELP เป็นพลาสมิดตระกูล Conjugative plasmid ซึ่งสามารถถ่ายโอนตัวเองไปยังเซลล์ผู้รับได้ ผู้วิจัยคาดหวังว่าเมื่อมี pHELP อยู่ในเซลล์ผู้รับตัวที่หนึ่ง pHELP จะสามารถแพร่กระจายตัวเองและพลาสมิด CRISPR จากเซลล์ผู้รับตัวที่หนึ่งไปยังเซลล์ผู้รับตัวอื่นในประชากรได้



ภาพ 14 พลาสมิดตัวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการส่งระบบ CRISPR

(** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$)

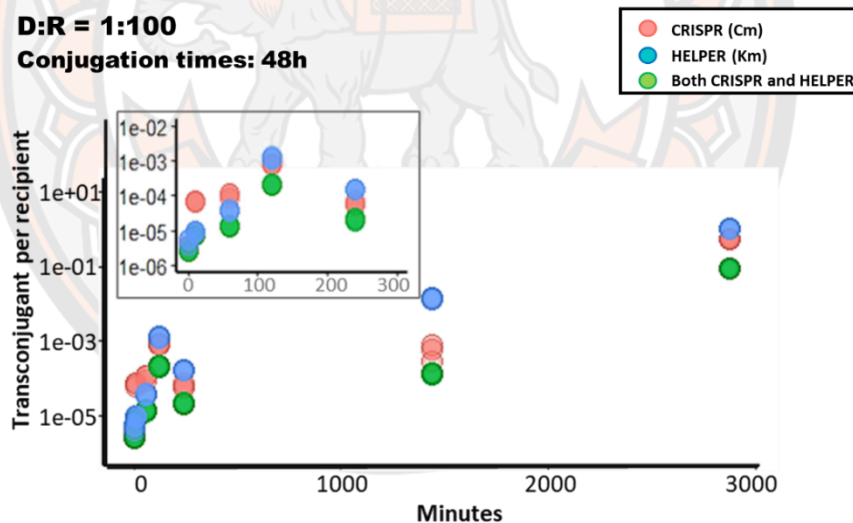
ผู้วิจัยทำการทดลอง Conjugation เปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองที่มี pHELP (ภาพ 14, วงกลมสีฟ้า) และชุดการทดลองที่ไม่มี pHELP (ภาพ 14, วงกลมสีชมพู) โดยทำการทดลอง 2 สถานะคือ อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับ 1:10 และ 1:100 (แกน X) และวัดประสิทธิภาพการส่งระบบ CRISPR เข้าสู่เซลล์ผู้รับ (แกน Y) ผลการทดลองพบว่า สถานะที่ไม่มี pHELP ที่อัตราส่วน 1:10 มีประสิทธิภาพการส่งระบบ CRISPR สูงกว่าที่อัตราส่วน 1:100 อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่สถานะที่มี pHELP อยู่ในระบบมีประสิทธิภาพการส่งระบบ CRISPR เข้าสู่เซลล์สูง แม้ว่าเมื่ออัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับสูงขึ้น การมี pHELP อยู่ก็ยังคงช่วยให้มีการนำส่งระบบ CRISPR สูงเช่นเดิม จะเห็นว่ากรณีที่ให้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับที่สูง (1:100) การมี pHELP ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการส่งระบบ CRISPR สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการไม่มี pHELP ดังนั้นการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า pHELP ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งระบบ CRISPR/cas เข้าสู่เซลล์ผู้รับได้ การทดลองต่อจากนี้จะใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับที่ 1:100 ทั้งหมด



ภาพ 15 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการส่งระหว่างพลาสมิด *pgNDM1*, *pHELP* และพลาสมิด *pgNDM1* ร่วมกับ *pHELP*

(*a, b* และ *c* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, *Turkey's test, p < 0.05*)

ต่อมาผู้วิจัยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพลาสมิด CRISPR และ *pHELP* ที่ถูกส่งเข้าสู่เซลล์ผู้รับร่วมกัน (ภาพ 15) จากการทดลองมีเซลล์ผู้ให้แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือเซลล์ผู้ให้ที่มี CRISPR, เซลล์ผู้ให้ที่มี *pHELP* และเซลล์ผู้ให้ที่มีทั้ง CRISPR และ *pHELP* (แกน X) โดยวัดประสิทธิภาพการส่งพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ (แกน Y) เมื่อส่งระบบ CRISPR เข้าสู่เซลล์เพียงหนึ่งพลาสมิด พบว่ามีประสิทธิภาพการส่งต่ำ (อัตราส่วน Transconjugant per Recipient = 0.001) ขณะที่การส่ง *pHELP* เข้าสู่เซลล์เพียงหนึ่งพลาสมิด พบว่ามีประสิทธิภาพการส่งสูง (อัตราส่วน Transconjugant per Recipient = 1) และเมื่อส่งพลาสมิดทั้งสองชนิดไปด้วยกันพบว่า พลาสมิด CRISPR มีประสิทธิภาพการส่งสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทางตรงกันข้าม *pHELP* มีประสิทธิภาพการส่งลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามพลาสมิดทั้งสองชนิดสามารถถูกนำส่งเข้าสู่เซลล์ผู้รับด้วยกัน



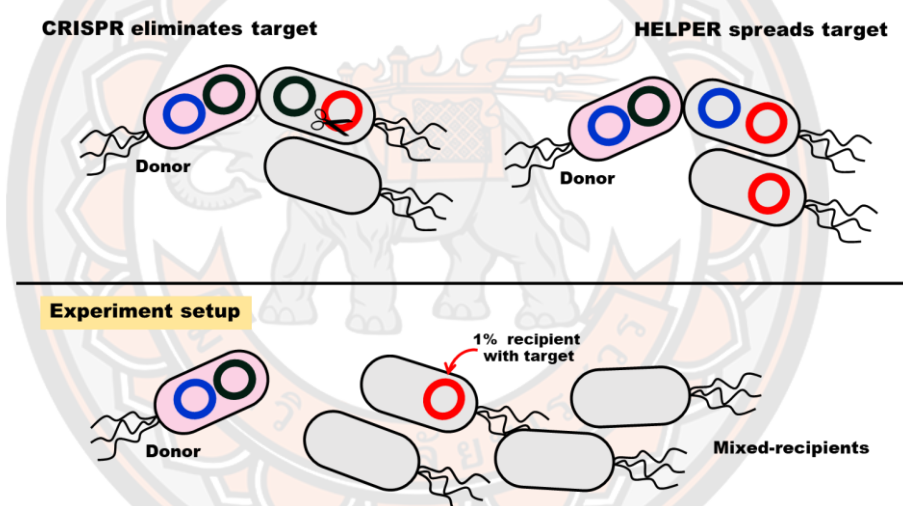
ภาพ 16 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการส่งพลาสมิดร่วมกับ *pHELP* ที่ระยะเวลาต่างกัน

ผู้วิจัยทดลองส่งพลาสมิด CRISPR และ *pHELP* เข้าสู่เซลล์ผู้รับด้วยวิธีการ Conjugation โดยมีระยะเวลา Conjugation ที่เวลา 0, 10, 60, 120, 240, 1440 และ 2880 นาที (ภาพ 16) โดยคัดเลือกพลาสมิด CRISPR (ภาพ 16, วงกลมสีชมพู) คัดเลือก *pHELP* (ภาพ 16, วงกลมสีฟ้า) และคัดเลือกทั้งพลาสมิด CRISPR และ *pHELP* (ภาพ 16, วงกลมสีเขียว) โดยกราฟแสดงความสัมพันธ์

ระหว่างระยะเวลา (แกน X) และประสิทธิภาพการถ่ายโอนพลาสมิด (แกน Y) ผลการทดลองพบว่าเมื่อพลาสมิดทั้งสองจะถูกถ่ายโอนไปยังเซลล์ผู้รับด้วยกันและมีประสิทธิภาพการส่งสูงขึ้นไปเรื่อยๆผ่านไป ดังนั้นการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า pHELP สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งระบบ CRISPR เข้าสู่เซลล์ผู้รับได้และจะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นไปเรื่อยๆผ่านไป

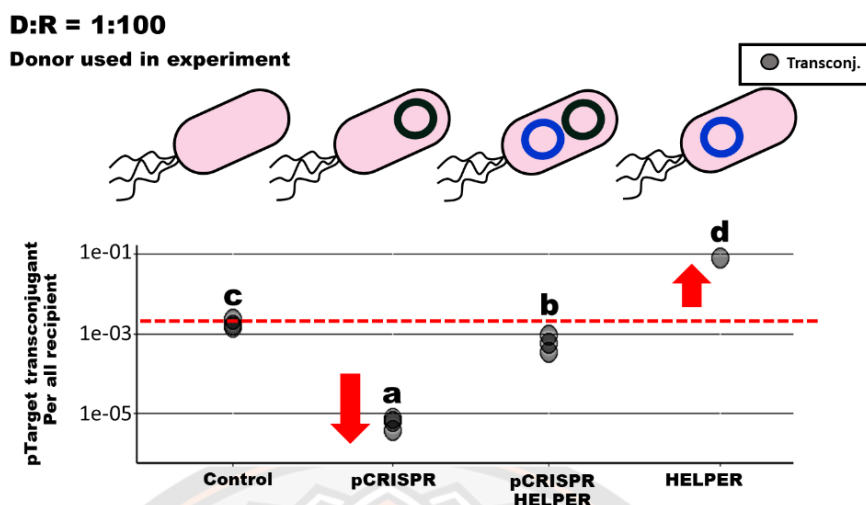
การใช้ pHELP มีผลต่อการแพร่กระจายพลาสมิดเป้าหมาย

งานวิจัยก่อนหน้านี้ใช้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ในการทดสอบระบบ CRISPR แต่งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ใช้พลาสมิดเป้าหมายที่สามารถเคลื่อนที่ได้ เนื่องจากดีเอ็นเอเป้าหมายในงานวิจัยนี้อยู่บนพลาสมิดเคลื่อนที่ได้ (Mobilizable plasmid) การใช้ pHELP ในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการส่งระบบ CRISPR นั้นมีผลกระทบต่อพลาสมิดเป้าหมายอย่างไร



ภาพ 17 พลาสมิดตัวช่วยแพร่กระจายพลาสมิดเป้าหมาย

การส่งพลาสมิดมากกว่าหนึ่งชนิดเข้าสู่เซลล์อาจเกิดขึ้นหลายรูปแบบเช่น ระบบ CRISPR ถูกส่งเข้าสู่เซลล์เป้าหมายก่อนและเกิดกระบวนการกำจัดพลาสมิดเป้าหมาย หรือ pHELP ถูกส่งเข้าสู่เซลล์เป้าหมายก่อนและไปแพร่กระจายพลาสมิดเป้าหมายในกลุ่มประชากร (ภาพ 17, บน) ผู้วิจัยออกแบบการทดลองเพื่อยืนยัน โดยการนำส่งพลาสมิด CRISPR และ pHELP ด้วยวิธีการ Conjugation เข้าสู่กลุ่มประชากรเซลล์ผู้รับแบบผสม โดยเพียง 1% ของเซลล์ผู้รับมีพลาสมิดเป้าหมาย pINDM1

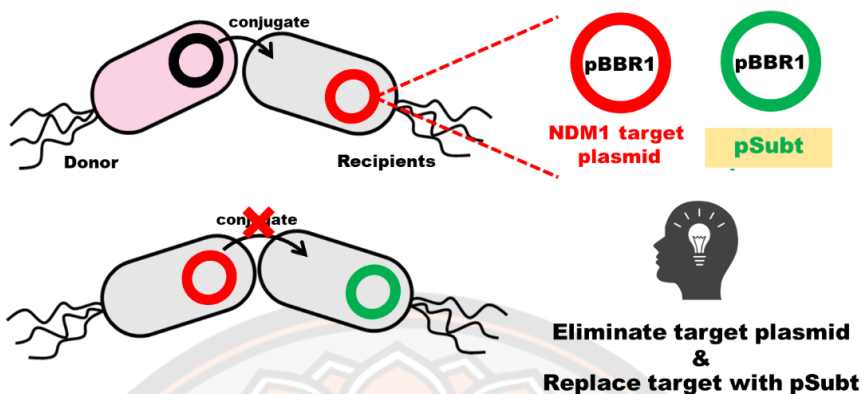


ภาพ 18 ผลการแพร่กระจายของพลาสมิดเป้าหมาย โดย pHELP

(a, b, c และ d มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, Turkey's test, $p < 0.05$)

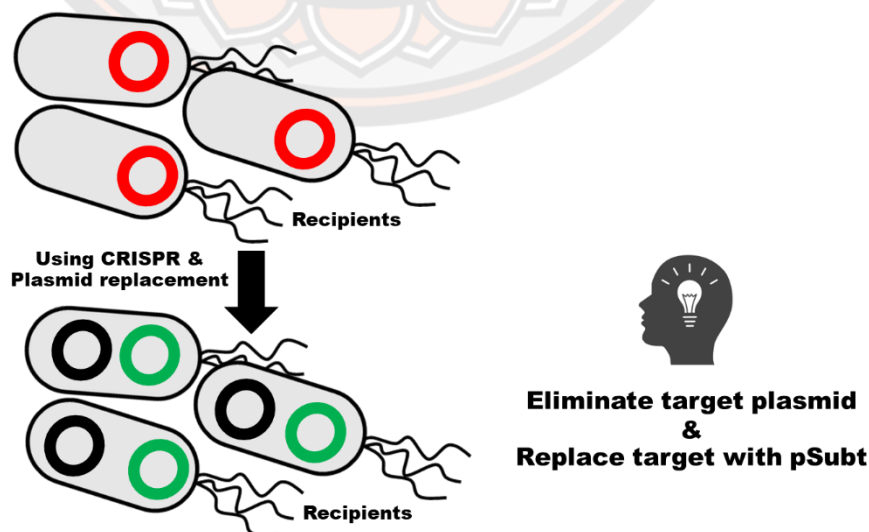
ผู้วิจัยทำการทดลอง 4 ชุดการทดลอง คือ เซลล์ผู้ให้ที่มีระบบ CRISPR, เซลล์ผู้ให้ที่มี pHELP, เซลล์ผู้ให้ที่มีทั้งระบบ CRISPR และ pHELP และชุดควบคุมที่เซลล์ผู้ให้ที่ไม่มีพลาสมิดใด (แกน X) วัดสัดส่วนของเซลล์ผู้รับที่ยังคงเหลือพลาสมิดเป้าหมาย (แกน Y) พบว่าชุดการทดลองควบคุม เมื่อผ่านการ Conjugation มีเซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 ที่ $1E-03$ โดยใช้ค่านี้เป็นค่าเริ่มต้น (ภาพ 18, เส้นประ) ของการมี พลาสมิดเป้าหมายอยู่ เมื่อส่งระบบ CRISPR เข้าสู่กลุ่มประชากร พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่มีพลาสมิด ptNDM1 ลดลง เนื่องจากระบบ CRISPR เข้าไปตัดทำลายพลาสมิดเป้าหมาย ขณะที่เมื่อส่ง pHELP เข้าสู่กลุ่มประชากร จำนวนเซลล์ที่มี ptNDM1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจาก pHELP เข้าไปแพร่กระจายพลาสมิด ptNDM1 ในกลุ่มประชากร การส่งพลาสมิดทั้งสองชนิด กล่าวคือ CRISPR และ pHELP เข้าสู่กลุ่มประชากร ทำให้จำนวนเซลล์ที่มีพลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 ลดลงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากเกิดการหักล้างกันระหว่างการกำจัดพลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 ด้วยระบบ CRISPR กับการแพร่กระจายพลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 ด้วย pHELP ดังนั้นการทดลองนี้สรุปได้ว่าการมี pHELP อยู่ในระบบการนำส่งนั้น สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งระบบ CRISPR เข้าสู่เซลล์ผู้รับ แต่อย่างไรก็ตาม pHELP ก็แพร่กระจายพลาสมิดเป้าหมายด้วย

การแทนที่พลาสมิดเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของพลาสมิดเป้าหมาย (Plasmid replacement)



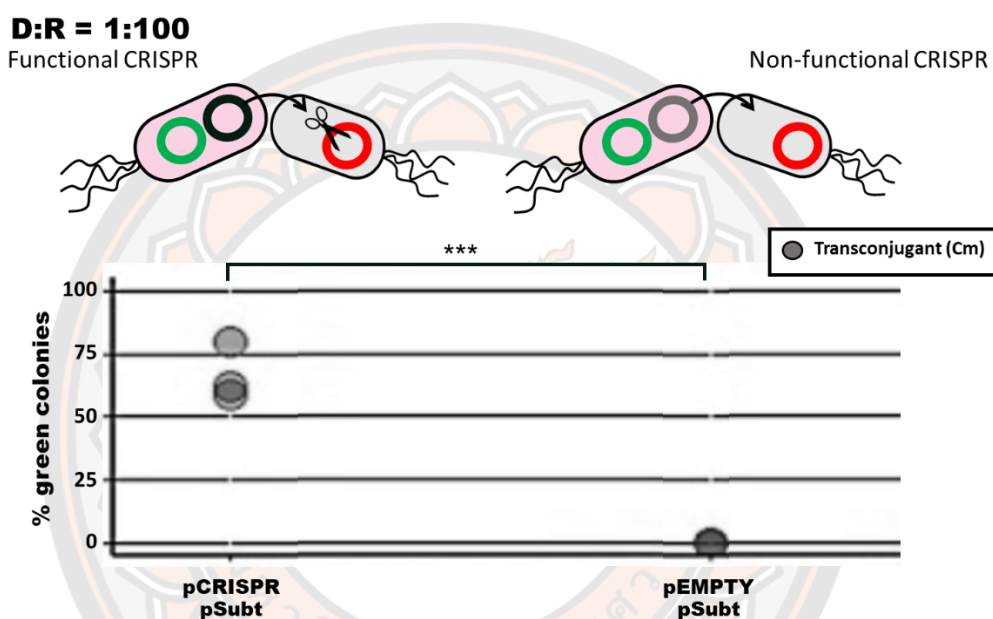
ภาพ 19 แนวทางการแก้ปัญหาการแพร่กระจายของพลาสมิดเป้าหมาย

ผู้วิจัยจึงหาแนวทางแก้ไขปัญหาการแพร่กระจายพลาสมิดเป้าหมาย พลาสมิดที่ถูกจัดเป็นกลุ่ม Incompatibility เดียวกันจะไม่สามารถอาศัยอยู่ร่วมกันภายในเซลล์ได้ (Novick, 1987) ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้พลาสมิดเป้าหมาย pNDM1 กลุ่ม pBBR1 หากต้องการพลาสมิดที่จะมาแทนที่นั้นต้องเป็นพลาสมิดกลุ่ม pBBR1 เช่นกัน การทดลองก่อนหน้ามีพลาสมิดที่เคยถูกนำมาใช้เป็นเป้าหมายในการทดสอบ CRISPR ที่กำจัดการยีน *gfp* ซึ่งเป็นพลาสมิดกลุ่ม pBBR1 เช่นกัน ผู้วิจัยจึงนำพลาสมิดดังกล่าวมาทดลองใช้เป็นพลาสมิดแทนที่ (pSubt) ผู้วิจัยคาดหวังว่าเมื่อมี pSubt อยู่ภายในเซลล์พลาสมิดเป้าหมาย pNDM1 จะไม่สามารถเข้ามาได้ (ภาพ 19)



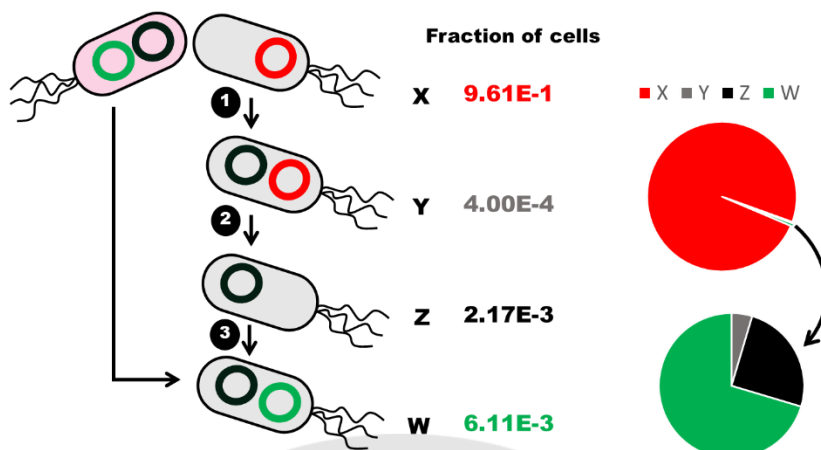
ภาพ 20 แนวทางการแก้ปัญหาการแพร่กระจายของพลาสมิดเป้าหมาย (ต่อ)

ผู้วิจัยจะใช้ CRISPR กำจัดพลาสมิดเป้าหมาย จากนั้นเกิดกระบวนการแทนที่ของพลาสมิด pSubt เข้าไปอยู่แทนที่พลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 ภายในเซลล์ (ภาพ 20) การทดลองที่ผู้วิจัย ออกแบบมีสองสถานะคือ สถานะที่ระบบ CRISPR สามารถทำงานได้ เมื่อเข้าสู่เซลล์เป้าหมายจะเกิดการกำจัดพลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 และเกิดกระบวนการแทนที่ด้วย pSubt ภายในเซลล์กับ สถานะที่ระบบ CRISPR ไม่ทำงาน เมื่อถูกส่งเข้าสู่เซลล์แล้วจะไม่เกิดกำจัดพลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 ทำให้ pSubt ไม่สามารถเข้าไปแทนที่พลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 (ภาพ 21, บน)



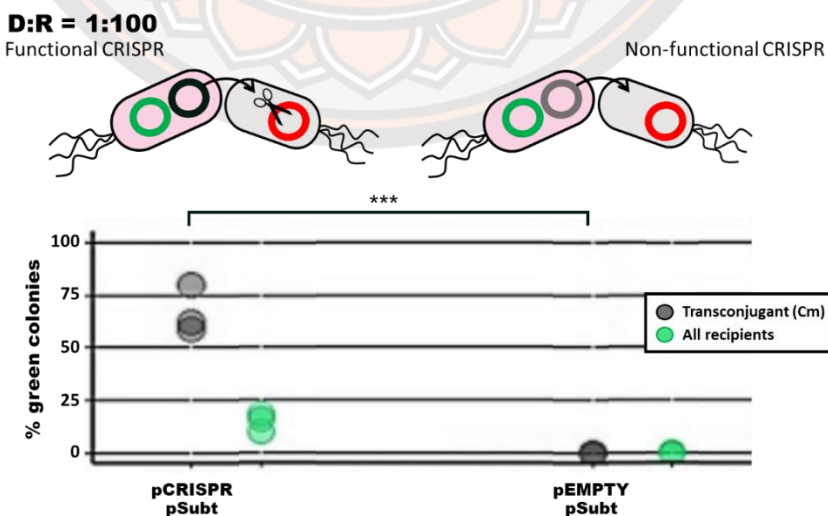
ภาพ 21 ระบบ CRISPR มีผลต่อการแทนที่พลาสมิดเป้าหมาย (***) $p < 0.001$)

จากกราฟผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ผู้ให้สองรูปแบบ (แกน X) กับ อัตราส่วน โคลโลนีเรืองแสงสีเขียว (แกน Y) พบว่าเมื่อระบบ CRISPR เข้าไปกำจัดพลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 ภายในเซลล์แล้ว จะเกิดกระบวนการแทนที่ด้วย pSubt โดยพบการเรืองแสงสีเขียวของ โคลโลนีเพิ่มขึ้น 75% ขณะที่ในสถานะที่ระบบ CRISPR ไม่ทำงานไม่พบการเรืองแสงสีเขียวของ โคลโลนี ซึ่งทั้งสองสถานะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 21) จากกราฟข้างต้น ผู้วิจัย คัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่ได้รับระบบ CRISPR เข้าไปเท่านั้น



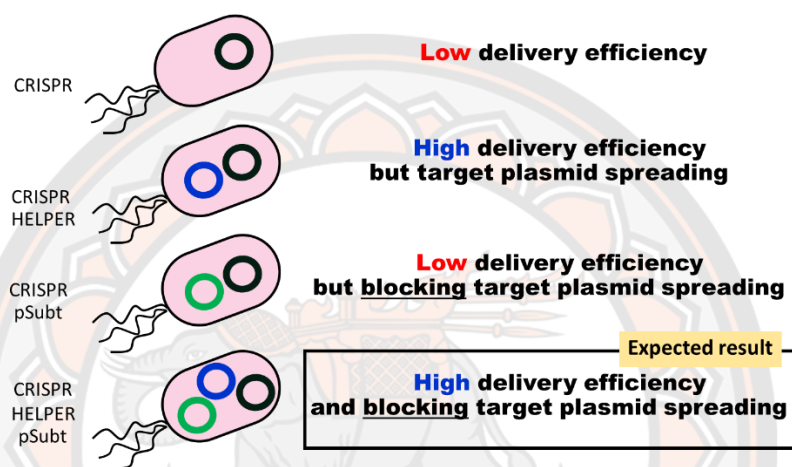
ภาพ 22 ระบบ CRISPR มีผลต่อการแทนที่พลาสมิดเป้าหมาย (ต่อ)

เมื่อ Conjugation พลาสมิดจากเซลล์ผู้ให้เข้าสู่เซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 เริ่มต้น (ภาพ 22, X) จะเกิดการรับพลาสมิด CRISPR เข้าสู่เซลล์ (ภาพ 22, Y) จากนั้นเมื่อระบบ CRISPR อยู่ในเซลล์กับพลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 จะเกิดการกำจัดพลาสมิดเป้าหมาย เหลือเพียงแต่พลาสมิด CRISPR ภายในเซลล์ (ภาพ 22, Z) เมื่อไม่มีพลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 แล้วจะเกิดกระบวนการแทนที่พลาสมิดทำให้ภายในเซลล์มี พลาสมิด pSubt เข้ามาอยู่ด้วย (ภาพ 22, W) จากผลการทดลองหาจำนวนเซลล์แต่ละชนิดหลังจากผ่านการ Conjugation พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่ไม่ได้รับพลาสมิด CRISPR เข้าไป แต่เมื่อวัดเฉพาะเซลล์ที่รับพลาสมิด CRISPR เข้าไปนั้น พบว่าส่วนใหญ่เซลล์ที่รับพลาสมิด CRISPR จะมีพลาสมิด pSubt ตามเข้าไปด้วยเสมอ (ภาพ 22, แผนภาพวงกลม)



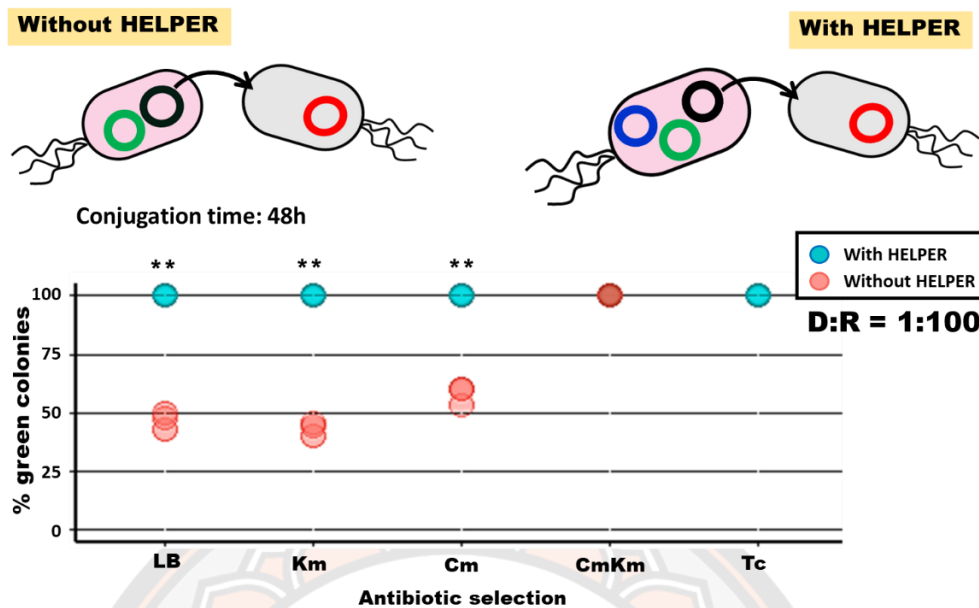
ภาพ 23 ระบบ CRISPR มีผลต่อการแทนที่พลาสมิดเป้าหมาย (***) $p < 0.001$ (ต่อ)

ดังนั้น จากกราฟสัดส่วนการเรืองแสงสีเขียวของโคโลนี เมื่อคัดเลือกเซลล์ผู้รับทั้งหมด พบว่ามีโคโลนีที่เรืองแสงสีเขียวมีสัดส่วนน้อยมาก (ภาพ 23, วงกลมสีเขียว) เมื่อเทียบกับการคัดเลือก Transconjugant ที่มีโคโลนีสีเขียว 75% ดังนั้นการทดลองนี้สรุปได้ว่า การใช้ pSubt ในการแทนที่พลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 สามารถป้องกันการกลับเข้ามาของพลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 ได้ แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้พบประสิทธิภาพการส่งระบบ CRISPR ที่ต่ำอีกครั้ง เนื่องจากในระบบการนำส่งไม่มี pHELP เหมือนการทดลองก่อนหน้า



ภาพ 24 สรุปชนิดพลาสมิดที่ให้ในการทดลอง

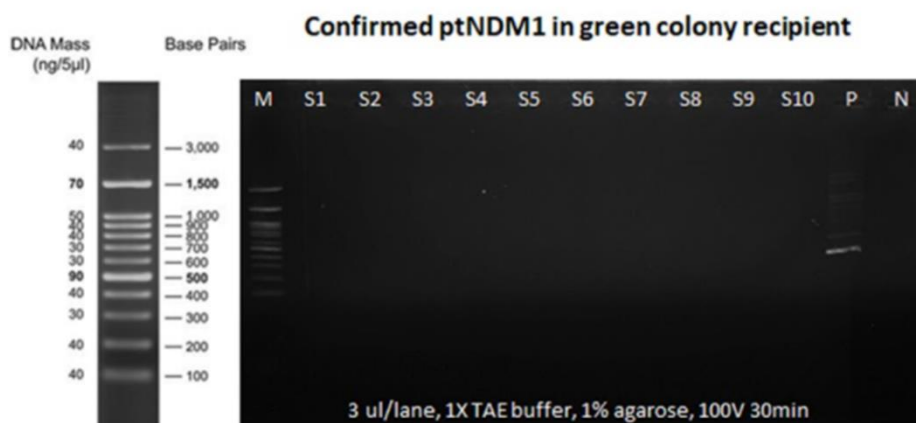
จากการทดลองก่อนหน้าสามารถสรุปเซลล์ผู้ให้ที่ใช้ในการทดลองได้ดังนี้ (ภาพ 24) เซลล์ผู้ให้ที่มี พลาสมิด CRISPR เพียงอย่างเดียว พบว่ามีประสิทธิภาพการถ่ายโอนต่ำ ต่อมาเป็นการนำ pHELP เข้ามาช่วยในระบบการนำส่ง ซึ่งเซลล์ผู้ให้จะมีพลาสมิด CRISPR ร่วมกับ pHELP พบว่ามีประสิทธิภาพการถ่ายโอนตัวเองและพลาสมิด CRISPR สูง แต่อย่างไรก็ตามการมี pHELP อยู่ในระบบเป็นผลให้พลาสมิดเป้าหมายแพร่กระจายในกลุ่มประชากร ต่อมาผู้วิจัยจึงแก้ไขปัญหาการแพร่กระจายของพลาสมิดเป้าหมายด้วยการใช้เซลล์ผู้ให้ที่มีพลาสมิด CRISPR และ pSubt ที่จะเป็นพลาสมิดแทนที่พลาสมิดเป้าหมาย ซึ่งสามารถป้องกันการแพร่กระจายของพลาสมิดเป้าหมายในกลุ่มประชากรได้ แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองการแทนที่ของพลาสมิดนั้น มีประสิทธิภาพการนำส่งพลาสมิดที่ต่ำ เนื่องจากไม่มี pHELP เป็นตัวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการส่ง ดังนั้น ในการทดลองถัดไป ผู้วิจัยจึงใช้เซลล์ผู้ให้ที่มีพลาสมิด 3 ชนิด คือพลาสมิด CRISPR, พลาสมิด pHELP และพลาสมิด pSubt ผู้วิจัยคาดหวังว่า pHELP จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งระบบ CRISPR เข้าไปกำจัดพลาสมิดเป้าหมาย และเกิดกระบวนการแทนที่พลาสมิดเป้าหมายด้วย pSubt



ภาพ 25 ประสิทธิภาพการนำส่งระบบ CRISPR และการแทนที่การแพร่กระจายพลาสมิด
เป้าหมาย (** $p < 0.01$, เทียบ t -test ระหว่าง with pHELP กับ without pHELP)

ผู้วิจัยทดสอบระบบ 3 พลาสมิดเปรียบเทียบกันระหว่างการมี pHELP (ภาพ 25, วงกลมสีฟ้า) และไม่มี pHELP (ภาพ 25, วงกลมสีชมพู) จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก (แกน X) และอัตราส่วนการเรืองแสงสีเขียวของโคโลนี (แกน Y) พบว่าในสถานะที่ไม่มี pHELP จำเป็นต้องมีการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะจึงจะเห็นสัดส่วนของโคโลนีที่เรืองแสงสีเขียว 100% ทางตรงกันข้ามหากไม่มีการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะ พบสัดส่วนโคโลนีที่เรืองแสงสีเขียวเพียง 50% ขณะที่สถานะที่มี pHELP อยู่ในระบบด้วย พบสัดส่วนโคโลนีเรืองแสงสีเขียว 100% แม้ว่าจะไม่มีการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะ ซึ่งการมี pHELP ก็กับการไม่มี pHELP นั้นมีสัดส่วนการเรืองแสงสีเขียวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการทดลองนี้คือจุดเด่นของงานวิจัยนี้ เนื่องจากผู้วิจัยสามารถปรับเปลี่ยนสัดส่วนในประชากรแบคทีเรียได้ 100% โดยที่ไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะ อีกทั้งการนำส่งพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ผู้รับด้วยวิธีการ Conjugation ในงานวิจัยนี้ใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับต่ำ

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ยืนยันผลการอยู่ร่วมกันไม่ได้ระหว่างพลาสมิด Incompatibility กลุ่มเดียวกัน ด้วยการนำโคโลนีที่มีการเรืองแสงสีเขียวบนอาหาร LB มาทำการตรวจหาพลาสมิด ptNDM1 ด้วยวิธีการ Colony PCR



M: Maker
S1-S10: Number of green colonies in LB
P: Positive control (used ptNDM1)
N: Negative control (used pSubt)

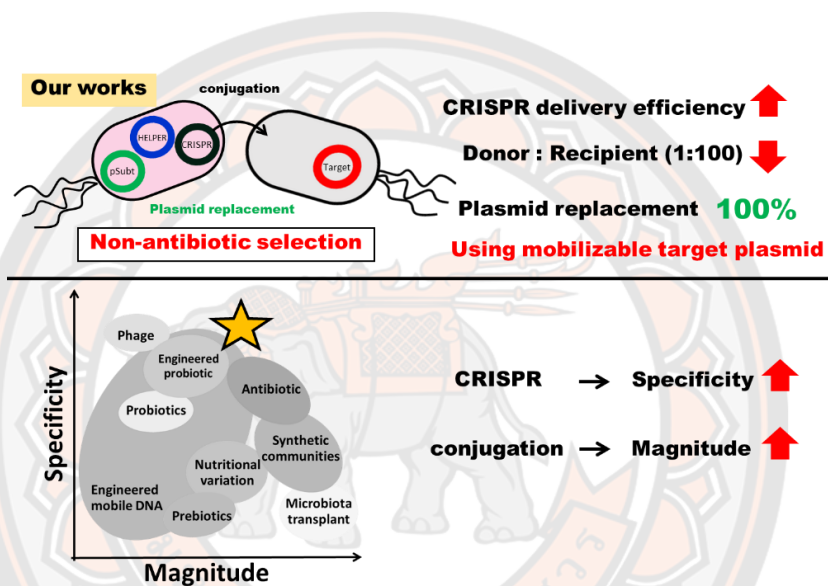
ภาพ 26 การวิเคราะห์หา *ptNDM1* ในโคโลนีเรืองแสงสีเขียว

จากภาพแสดงผลการรัน Agarose gel ของ PCR product ที่ได้จากการทำโคโลนี PCR เรียบร้อยแล้ว M=Maker, S1-S10=โคโลนีที่เรืองแสงสีเขียว, P=Positive control (*ptNDM1*) และ N=Negative control (*ptGFP*) ผลการทดลองพบว่าโคโลนีที่มีการเรืองแสงสีเขียว กล่าวคือ เซลล์ที่รับพลาสมิด pSubt เข้าไปในเซลล์ ไม่พบ พลาสมิด *ptNDM1* หลงเหลือภายในเซลล์ (ภาพ 26)

บทที่ 5

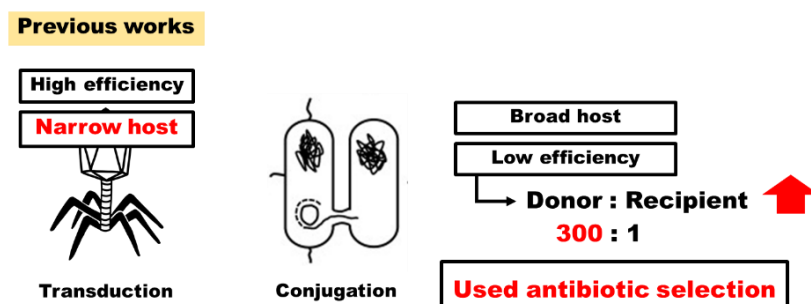
บทสรุปและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้บรรลุวัตถุประสงค์ในการพัฒนาระบบการนำส่ง CRISPR/cas สำหรับกำจัดแบคทีเรียเป้าหมายอย่างจำเพาะ โดยระบบการนำส่ง CRISPR ด้วยวิธีการ Conjugation ในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพสูง แม้ว่าจะใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับต่ำ (1 : 100) และไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะในการคัดเลือก นอกจากนี้ผู้วิจัยยังแสดงให้เห็นถึงการแทนที่พลาสมิดเป้าหมายได้ 100% อีกทั้งงานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่ใช้พลาสมิดเป้าหมายที่สามารถเคลื่อนที่ได้อีกด้วย (ภาพ 27, บน)



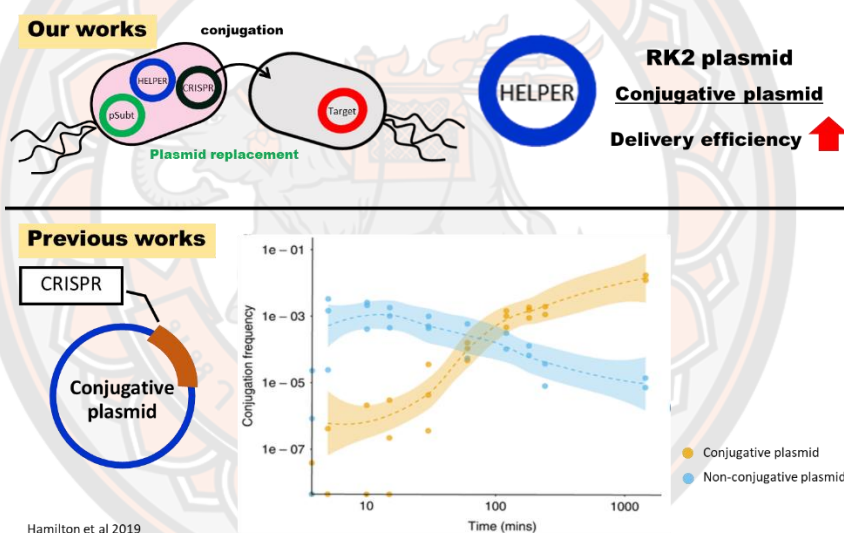
ภาพ 27 สรุปผลงานวิจัย

ระบบการนำส่งที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้น (ภาพ 27, ดาวสีเหลือง) โดยอาศัยความจำเพาะสูงของระบบ CRISPR และสามารถปรับเปลี่ยนสัดส่วนของกลุ่มประชากรแบคทีเรียอย่างกว้างด้วยการใช้ระบบ Conjugation



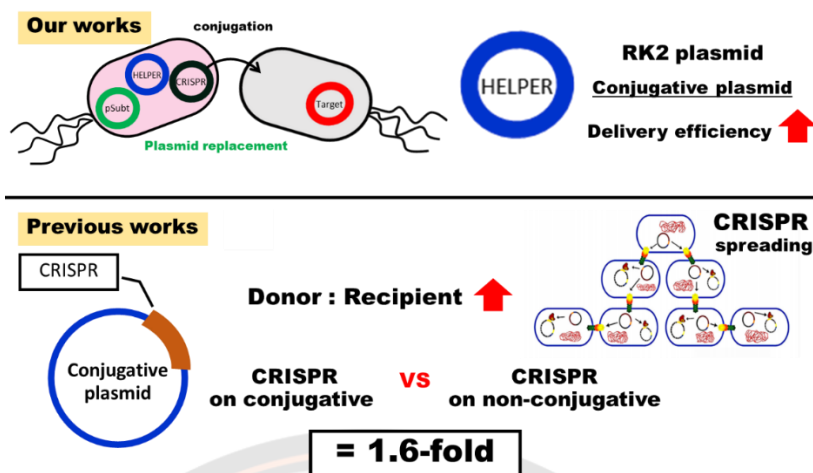
ภาพ 28 วิธีการนำส่งระบบ CRISPR ในงานวิจัยก่อนหน้า

งานวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษา CRISPR antimicrobial บางส่วนนิยมใช้วิธีการส่งระบบ CRISPR ด้วยวิธี Transduction การส่งด้วยวิธี Transduction นี้มีประสิทธิภาพการส่งสูง แต่ยังคงมีข้อจำกัดเรื่องการเป็นโฮสต์ช่วงแคบ กล่าวคือ เฟจหนึ่งชนิดไม่สามารถใช้กับแบคทีเรียหลายชนิดได้ (Yosef et al., 2017) จึงเป็นผลให้งานวิจัยบางส่วนใช้วิธีการส่งระบบ CRISPR ด้วยการ Conjugation โดยใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับสูง (300:1) และบางงานวิจัยมีการคัดเลือก Transconjugant ด้วยยาปฏิชีวนะเพื่อให้มีประสิทธิภาพการกำจัดแบคทีเรียเป้าหมาย (ภาพ 28) (Bikard et al., 2014; Citorik et al., 2014; Yosef et al., 20215; Hullahalli et al., 2017; Dong et al., 2019; Wang et al., 2019; Hamilton et al., 2019 and Rodrigues et al., 2019) ซึ่งผู้วิจัยแก้ไขปัญหาดังกล่าวด้วยการใช้พลาสมิดที่สามารถส่งถ่ายได้ด้วยตัวเอง (Self-transmissible plasmid) เพื่อช่วยในการส่งพลาสมิดไปยังเซลล์ผู้รับลำดับถัดไปเมื่อไม่มีเซลล์ผู้ให้ (ภาพ 29, บน)



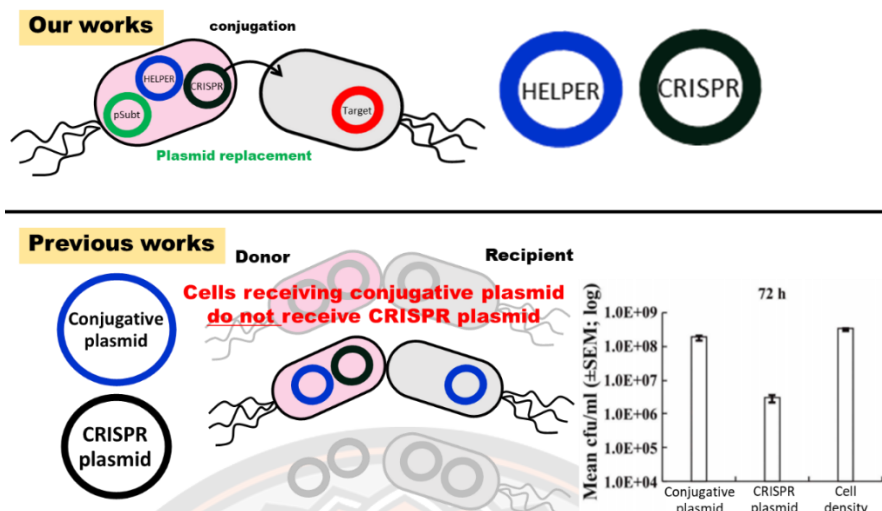
ภาพ 29 ระบบ CRISPR บนพลาสมิดถ่ายโอนตัวเองได้ (Hamilton et al., 2019)

Hamilton และคณะ (2019) ศึกษาการนำส่งระบบ CRISPR/cas ที่อยู่บนพลาสมิด Self-transmissible เปรียบเทียบกับระบบ CRISPR/cas บนพลาสมิดที่ไม่สามารถส่งถ่ายได้ด้วยตัวเอง พบว่าการใช้ พลาสมิด Self-transmissible มีผลทำให้ประสิทธิภาพการนำส่งระบบ CRISPR/cas สูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ Hamilton et al., ไม่ได้ศึกษาเปรียบเทียบว่าการที่ระบบ CRISPR/cas อยู่บน พลาสมิดที่ Self-transmissible นั้น มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของระบบ CRISPR/cas อย่างไร (Hamilton et al., 2019)



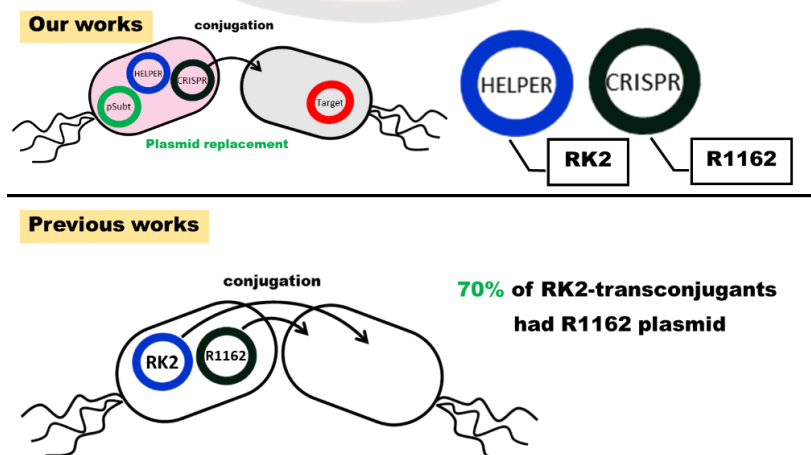
ภาพ 30 ระบบ CRISPR บนพลาสมิดถ่ายโอนตัวเองได้มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของ CRISPR (Dong et al., 2019)

Dong และคณะ (2019) ศึกษาการส่งระบบ CRISPR/cas บนพลาสมิด Self-transmissible โดยงานวิจัยของ Dong et al., พบว่าระบบ CRISPR/cas ที่อยู่บนพลาสมิด Self-transmissible มีประสิทธิภาพกำจัดดีเอ็นเอเป้าหมายสูงกว่าระบบ CRISPR/cas บนพลาสมิดที่ถ่ายถอดตัวเองไม่ได้ เพียง 1.6 เท่า (Dong et al., 2019) (ภาพ 30) และด้วยประสิทธิภาพการ Conjugation ที่ต่ำจึงทำให้งานวิจัยที่ผ่านมาจำเป็นต้องใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับสูง หรือบางงานวิจัยจำเป็นต้องอาศัยการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะร่วมด้วย แต่อย่างไรก็ตามการนำส่งระบบ CRISPR/cas เข้าสู่เซลล์เป้าหมายด้วยการใช้หนึ่งพลาสมิดยังคงมีข้อจำกัดด้านการปรับสัดส่วนจำนวนการจำลองตัวของพลาสมิดได้ เช่น ผู้วิจัยไม่สามารถเพิ่มจำนวนระบบ CRISPR/cas ให้มากกว่าการเพิ่มจำนวนของยีน Conjugative เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยเลือกใช้ระบบ CRISPR/cas บนพลาสมิดที่ไม่สามารถถ่ายโอนตัวเองได้ (Mobilizable plasmid) แยกกับพลาสมิด Self-transmissible เพื่อให้สะดวกในการปรับสัดส่วนระหว่างพลาสมิดทั้งสองชนิด (ภาพ 31)



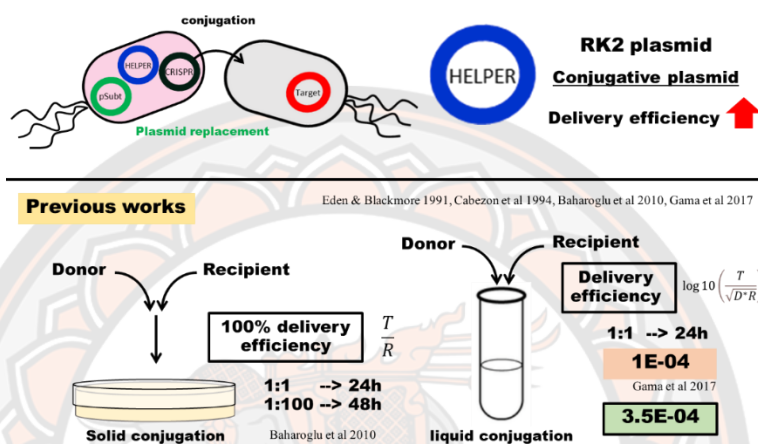
ภาพ 31 การใช้ 2 พลาสมิดร่วมกันในการนำส่งระบบ CRISPR ในงานวิจัยก่อนหน้า (Ruotsalainen et al., 2019)

Ruotsalainen และคณะ (2019) ใช้ระบบ CRISPR/cas บน Mobilizable plasmid ร่วมกับพลาสมิด Self-transmissible พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่รับพลาสมิด Self-transmissible แต่มีเซลล์ส่วนน้อยเพียงแค่อ้อยละ 1 ที่ได้รับระบบ CRISPR/cas บน Mobilizable plasmid โดย Ruotsalainen et al., สรุปไว้ว่าพลาสมิดทั้งสองชนิดนั้น ไม่ได้ถูกถ่ายโอนไปด้วยกัน ซึ่งงานวิจัยของ Ruotsalainen et al., ใช้ระบบ CRISPR/cas บน Mobilizable plasmid กลุ่ม p15A ร่วมกับพลาสมิด Self-transmissible กลุ่ม RK2 (Ruotsalainen et al., 2019) (ภาพ 31) ขณะที่งานวิจัยนี้ นำส่งดีเอ็นเอโดยใช้ระบบ CRISPR/cas บน Mobilizable plasmid กลุ่ม R1162 ร่วมกับพลาสมิด Self-transmissible กลุ่ม RK2 (ภาพ 32, บน)



ภาพ 32 พลาสมิดกลุ่ม RK2 และ R1162 สามารถถ่ายโอนไปด้วยกัน (Cabezón et al., 1994)

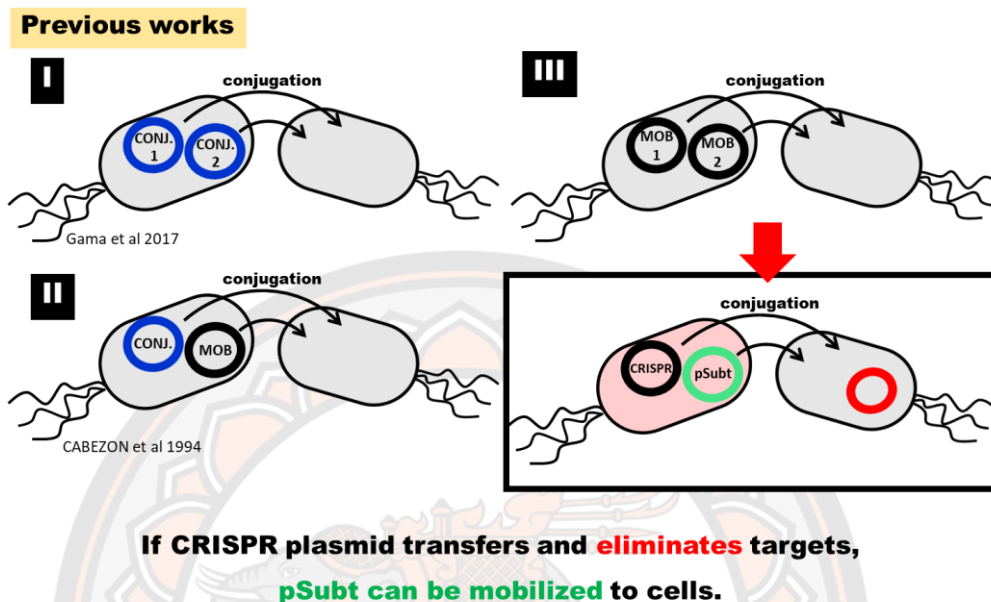
Cabezon และคณะ (1994) ศึกษาการส่ง Mobilizable plasmid กลุ่ม R1162 ร่วมกับ Self-transmissible กลุ่ม RK2 พบว่าพลาสมิดทั้งสองชนิดสามารถถูกส่งเข้าสู่เซลล์ผู้รับด้วยกัน โดยร้อยละ 70 ของเซลล์ที่รับพลาสมิด RK2 จะมีพลาสมิดกลุ่ม R1162 อยู่ร่วมด้วยภายในเซลล์ (Cabezon et al., 1994) (ภาพ 32) เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ ซึ่งพบว่าการมีอยู่ของพลาสมิด RK2 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกระจายพลาสมิดได้ 100%



ภาพ 33 ประสิทธิภาพการ Conjugation ของพลาสมิดกลุ่ม RK2 (Baharoglu et al., 2010, Gama et al., 2017)

งานวิจัยนี้พบว่าประสิทธิภาพการนำส่ง Self-transmissible กลุ่ม RK2 นั้น มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Eden & Blackmore 1991, Cabezon et al., 1994, Baharoglu et al., 2010, Gama et al., 2017) Baharoglu และคณะ (2010) วัดประสิทธิภาพ Conjugation ของพลาสมิด กลุ่ม RK2 ใน E.coli บนอาหารแข็งนาน 24 ชม. พบว่ามีประสิทธิภาพการนำส่ง 100% เมื่อใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับสูง (1:1) (Baharoglu et al., 2010) ในขณะที่ยานวิจัยนี้ใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับสูง (1:100) พบว่ามีประสิทธิภาพการนำส่ง 100% เมื่อใช้ระยะเวลาการ Conjugation 48 ชม. เมื่อเปรียบเทียบในด้านระยะเวลานั้น Gama และคณะ (2017) ได้วัดประสิทธิภาพการ Conjugation ในรูปแบบของเหลว ที่ระยะเวลา 1 ชม. โดยมีอัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับสูง (1:1) พบว่ามีค่าในการนำส่งที่ 1E-4 (Gama et al., 2017) ในขณะที่ยานวิจัยนี้ Conjugation บนอาหารแข็งที่ระยะเวลา 1 ชม. พบว่ามีค่าในการนำส่งที่ 3.5E-4 ดังนั้นค่าในการ Conjugation ในงานวิจัยนี้จึงอยู่ในลำดับความสำคัญตามที่รายงานก่อนหน้านี้ โดยค่าในการ Conjugation ของ RK2 ในงานวิจัยนี้สูงกว่าค่าที่วัดได้โดย Gama และคณะ (2017) เพียงเล็กน้อย

ซึ่งอาจเป็นเพราะสถานะหรือรูปแบบการ Conjugation ที่ต่างกัน โดยรูปแบบอาหารแข็งมีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพมากกว่าในรูปแบบของเหลว (ภาพ 33)



ภาพ 34 การศึกษาการส่งพลาสมิดมากกว่า 1 ชนิด เข้าสู่เซลล์

งานวิจัยก่อนหน้ามีการศึกษาการส่งพลาสมิดร่วมกันระหว่าง Self-transmissible กับ Mobilizable plasmid (Cabezon et al., 1994) การส่งพลาสมิดร่วมกันระหว่าง Self-transmissible กับ Self-transmissible (Gama et al., 2017) งานวิจัยก่อนหน้ารายงานพบว่าการมีอยู่ของ self-transmissible plasmid ภายในเซลล์จะยับยั้งหรือลดประสิทธิภาพการนำส่งพลาสมิด self-transmissible plasmid อีกชนิด (Gama et al., 2017) แต่ยังไม่มีการศึกษาการส่งพลาสมิดระหว่าง Mobilizable plasmid กับ Mobilizable plasmid ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการส่งพลาสมิดระหว่าง Mobilizable plasmid กับ Mobilizable plasmid ซึ่งพบว่า Mobilizable plasmid ตัวแรกเข้าสู่เซลล์ ส่งผลให้ Mobilizable plasmid ตัวถัดไปเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งมีความน่าสนใจอย่างยิ่ง ซึ่งระบบที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นคือ การนำระบบ CRISPR/cas มาอยู่บน mobilizable plasmid ลำดับที่ 1 ซึ่งเข้าสู่เซลล์เป้าหมายและตัดทำลายพลาสมิดเป้าหมาย จากนั้นพลาสมิด mobilizable plasmid ลำดับที่ 2 คือพลาสมิดแทนที่โดยจัดอยู่ในกลุ่ม pBBR1 ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกันกับพลาสมิดเป้าหมายจะเข้ามาในเซลล์เพื่อแทนที่พลาสมิดเป้าหมายที่ถูกตัดทำลาย กรณีที่ไม่มีพลาสมิด CRISPR/cas ลำดับที่ 1 พลาสมิดแทนที่ลำดับที่ 2 จะไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ กล่าวอีกนัยหนึ่งคือระบบ CRISPR/cas นับเป็นอาวุธในการบุกรุกเข้าเซลล์เพื่อกำจัดพลาสมิดและเปิดทางให้พลาสมิดลำดับที่ 2 เข้าไป

แทนที่พลาสมิดเป้าหมายเดิม (ภาพ 34) ผู้วิจัยคาดว่าระบบ CRISPR/cas อาจมีส่วนสำคัญในการบุกรุกเซลล์ในธรรมชาติ เนื่องจากระบบ CRISPR/cas นั้นสามารถพบได้ในพลาสมิดที่อยู่ภายในแบคทีเรียตามธรรมชาติ ซึ่งในสภาวะธรรมชาติแบคทีเรียมักมีพลาสมิดอยู่ภายในเซลล์มากกว่า 1 ชนิด (Dionisio et al., 2019) มากกว่า 25% ของพลาสมิดในธรรมชาติ เป็น mobilizable plasmid (Alderliesten et al., 2020)

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้แสดงผลประสิทธิภาพการนำส่งระบบ CRISPR/cas ที่ดีด้วยวิธีการ conjugation แต่ยังคงมีข้อจำกัดอยู่ 3 ประการที่ควรศึกษาต่อในอนาคต 1) ผู้วิจัยยังไม่ได้ทดลองระบบการนำส่งนี้ในแบคทีเรียกลุ่ม Non-E.coli นอกจากแบคทีเรีย *A.baumannii* (ภาคผนวก) ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ลดลงระหว่างเซลล์ผู้ให้กับเซลล์ผู้รับส่งผลให้มีประสิทธิภาพการ conjugation ต่ำในสภาวะอาหารเหลว ในทางกลับกันความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ลดลงดังกล่าวนี้ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของการ conjugation ในสภาวะอาหารแข็ง (Alderliesten et al., 2020) ดังนั้นผู้วิจัยคาดหวังว่าระบบการนำส่งในงานวิจัยนี้จะสามารถประยุกต์ใช้สำหรับนำส่ง CRISPR/cas ในแบคทีเรียกลุ่ม Non-E.coli บน biofilm ได้อย่างมีประสิทธิภาพนอกจากแบคทีเรีย *A.baumannii* 2) ระบบ CRISPR/cas ที่ส่งไปยังเซลล์เป้าหมายอาจเกิดการสูญเสียการทำงานจากการ Mutation ซึ่งระบบ CRISPR/cas ที่ทำงานผิดปกติหรือสูญเสียการทำงานอาจจะเป็นตัวรบกวนการทำงานของระบบ CRISPR/cas ที่ปกติ เช่น การมีระบบ CRISPR/cas ที่ผิดปกติอยู่ภายในเซลล์จะเป็นการป้องกันไม่ให้ระบบ CRISPR/cas ที่ใช้งานได้ปกติเข้าสู่เซลล์ เนื่องจากระบบ CRISPR/cas นั้นอยู่บนพลาสมิด ซึ่งพลาสมิดชนิดเดียวกันจะไม่สามารถอยู่ร่วมกันได้ภายในเซลล์ ดังนั้นงานวิจัยในอนาคตควรมีการศึกษาเกี่ยวกับพลาสมิดที่สามารถกำจัดตัวเองได้เมื่อสูญเสียการทำงาน (vector self-clearance) (Lazdins et al., 2020) และ 3) การใช้พลาสมิดหลายชนิดร่วมกันอาจส่งผลด้านการรวมตัวกันของพลาสมิด (plasmid recombination) ดังนั้น งานวิจัยในอนาคตควรคำนึงถึงการออกแบบพลาสมิดที่มีจุดมุ่งหมายเพื่อลดความน่าจะเป็นของการเกิด plasmid recombination ตัวอย่างเช่น ผู้วิจัยควรออกแบบพลาสมิดแต่ละชนิดที่ใช้ให้มีตำแหน่งที่เหมือนกัน (homology regions) น้อยที่สุด (Dionisio et al., 2019)

บรรณานุกรม



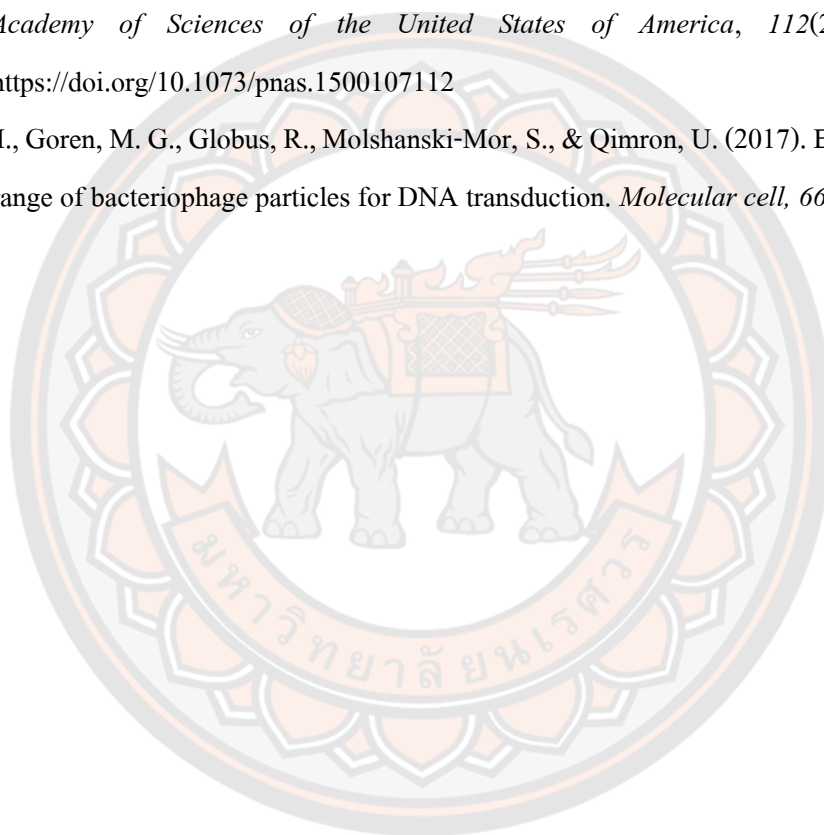
บรรณานุกรม

- Alderliesten, J. B., Duxbury, S. J. N., Zwart, M. P., De Visser, J. A. G. M., Stegeman, A., & Fischer, E. A. J. (2020). Effect of donor-recipient relatedness on the plasmid conjugation frequency: A meta-analysis. *BMC Microbiology*, *20*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01825-4>
- Aparicio, T., de Lorenzo, V., & Martínez-García, E. (2018). CRISPR/cas9-Based Counterselection Boosts Recombineering Efficiency in *Pseudomonas putida*. *Biotechnology Journal*, *13*(5), 1–10. <https://doi.org/10.1002/biot.201700161>
- Baharoglu, Z., Bikard, D., & Mazel, D. (2010). Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS Genetics*, *6*(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001165>
- Bikard, D., Euler, C. W., Jiang, W., Nussenzweig, P. M., Goldberg, G. W., Duportet, X., Fischetti, V. A., & Marraffini, L. A. (2014). Exploiting CRISPR-cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nature Biotechnology*, *32*(11), 1146–1150. <https://doi.org/10.1038/nbt.3043>
- Cabezón, E., Lanka, E., & De la Cruz, F. (1994). Requirements for mobilization of plasmids RSF1010 and ColE1 by the IncW plasmid R388: trwB and RP4 traG are interchangeable. *Journal of Bacteriology*, *176*(14), 4455–4458. <https://doi.org/10.1128/jb.176.14.4455-4458.1994>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020, October 28). *Biggest Threats and Data 2019*. CDC. <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>
- Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(7), 2172–2175.
- Citorik, R. J., Mimee, M., & Lu, T. K. (2014). Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature Biotechnology*, *32*(11), 1141–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt.3011>
- Dionisio, F., Zilhão, R., & Gama, J. A. (2019). Interactions between plasmids and other mobile genetic elements affect their transmission and persistence. *Plasmid*, *102*(December 2018), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2019.01.003>

- Dong, H., Xiang, H., Mu, D., Wang, D., & Wang, T. (2019). Exploiting a conjugative CRISPR/cas9 system to eliminate plasmid harbouring the mcr-1 gene from *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.017>
- Eden, P. A., & Blakemore, R. P. (1991). Electroporation and conjugal plasmid transfer to members of the genus *Aquaspirillum*. *Archives of Microbiology*, 155(5), 449–452. <https://doi.org/10.1007/BF00244960>
- Elhai, J., Vepritskiy, A., Muro-Pastor, A. M., Flores, E., & Wolk, C. P. (1997). Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, 179(6), 1998–2005. <https://doi.org/10.1128/jb.179.6.1998-2005.1997>
- Gama, J. A., Zilhão, R., & Dionisio, F. (2017). Conjugation efficiency depends on intra and intercellular interactions between distinct plasmids: Plasmids promote the immigration of other plasmids but repress co-colonizing plasmids. *Plasmid*, 93(April), 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.08.003>
- Gruber, C. J., Lang, S., Rajendra, V. K. H., Nuk, M., Raffl, S., Schildbach, J. F., & Zechner, E. L. (2016). Conjugative DNA transfer is enhanced by plasmid R1 partitioning proteins. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00032>
- Hamilton, T. A., Pellegrino, G. M., Therrien, J. A., Ham, D. T., Bartlett, P. C., Karas, B. J., Gloor, G. B., & Edgell, D. R. (2019). Efficient inter-species conjugative transfer of a CRISPR nuclease for targeted bacterial killing. *Nature Communications*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12448-3>
- Hullahalli, K., Rodrigues, M., & Palmer, K. L. (2017). Exploiting CRISPR-Cas to manipulate *Enterococcus faecalis* populations. *eLife*, 6, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.26664>
- Johnsborg, O., Eldholm, V., & Håvarstein, L. S. (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in Microbiology*, 158(10), 767–778. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.09.004>
- Kolatka, K., Kubik, S., Rajewska, M., & Konieczny, I. (2010). Replication and partitioning of the broad-host-range plasmid RK2. *Plasmid*, 64(3), 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.06.004>

- Lazdins, A., Maurya, A. P., Miller, C. E., Kamruzzaman, M., Liu, S., Stephens, E. R., ... & Kreft, J. U. (2020). Potentiation of curing by a broad-host-range self-transmissible vector for displacing resistance plasmids to tackle AMR. *PloS One*, *15*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225202>
- Li, Y., Xia, S., Jiang, X., Feng, C., Gong, S., Ma, J., ... & Yin, Y. (2021). Gut microbiota and diarrhea: an updated review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*.
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiological reviews*, *51*(4), 381.
- Michaudel, C., & Sokol, H. (2020). The gut microbiota at the service of immunometabolism. *Cell Metabolism*.
- Meyer, R. J., Lin, L. S., Kim, K., & Brasch, M. A. (1985). Broad host-range plasmid R1162: replication, incompatibility, and copy-number control. In *Plasmids in Bacteria* (pp. 173–188). Springer, Boston, MA.
- Mohajeri, M. H., Brummer, R. J., Rastall, R. A., Weersma, R. K., Harmsen, H. J., Faas, M., & Eggersdorfer, M. (2018). The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *European journal of nutrition*, *57*(1), 1–14.
- Reisner, A., Wolinski, H., & Zechner, E. L. (2012). In situ monitoring of IncF plasmid transfer on semi-solid agar surfaces reveals a limited invasion of plasmids in recipient colonies. *Plasmid*, *67*(2), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.01.001>
- Rodrigues, M., McBride, S. W., Hullahalli, K., Palmer, K. L., & Duerkop, B. A. (2019). Conjugative delivery of CRISPR-Cas9 for the selective depletion of antibiotic-resistant enterococci. *BioRxiv*, *July*, 1–14. <https://doi.org/10.1101/678573>
- Ronda, C., & Chen, S. P. (2019). Metagenomic engineering of the mammalian gut microbiome in situ. *Nature Method*, *17*(3), 139–148. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0301-y>.Metagenomic
- Ruotsalainen, P., Penttinen, R., Mattila, S., & Jalasvuori, M. (2019). Midbiotics: conjugative plasmids for genetic engineering of natural gut flora. *Gut Microbes*, *10*(6), 643–653. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1591136>
- Shimizu, K., Yamada, T., Ogura, H., Mohri, T., Kiguchi, T., Fujimi, S., & Shimazu, T. (2018). Synbiotics modulate gut microbiota and reduce enteritis and ventilator-associated pneumonia in patients with sepsis: a randomized controlled trial. *Critical care*, *22*(1), 1–9.

- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823-1836.
- Wang, P., He, D., Li, B., Guo, Y., Wang, W., Luo, X., Zhao, X., & Wang, X. (2019). Eliminating *mcr-1*-harbouring plasmids in clinical isolates using the CRISPR/cas9 system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(9), 2559–2565. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz246>
- Yosef, I., Manor, M., Kiro, R., & Qimron, U. (2015). Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(23), 7267–7272. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500107112>
- Yosef, I., Goren, M. G., Globus, R., Molshanski-Mor, S., & Qimron, U. (2017). Extending the host range of bacteriophage particles for DNA transduction. *Molecular cell*, 66(5), 721-728.





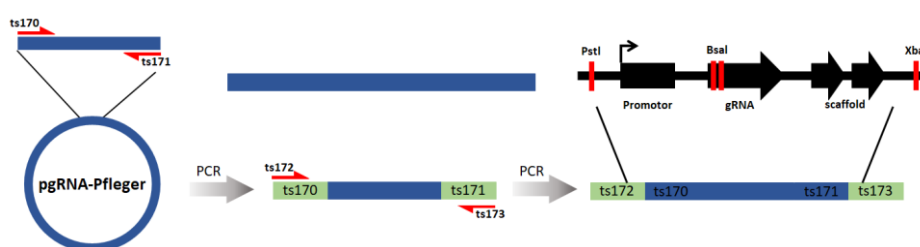
ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยนครพนม

การสร้างพลาสมิด (Construction)

การสร้างพลาสมิด pEMPTY ด้วยวิธี XbaI/PstI cloning

สร้าง pEMPTY ด้วยการนำ sgRNA ที่ถูกเพิ่มจุดตัดเอนไซม์ BsaI เพื่อให้ง่ายต่อการปรับเปลี่ยน sgRNA ของระบบ CRISPR/cas และยังมี การเพิ่มจุดตัดเอนไซม์ XbaI/PstI เพื่อใช้ในการเชื่อมต่อกับพลาสมิด backbone ด้วยวิธีการ XbaI/PstI digestion



ภาพ 35 กระบวนการสร้าง Insert DNA ที่ใช้ประกอบเป็น pEMPTY

การสร้างชิ้นส่วนที่ต้องการแทรกนั้น เป็นกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ซึ่งขั้นตอนการ PCR จะแบ่งเป็น 2 รอบ เนื่องจากมีไพรเมอร์ 2 คู่ ที่ทำหน้าที่ในการต่อตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ BsaI, PstI และ XbaI (ภาพ 3) โดยการ PCR รอบแรกจะใช้พลาสมิด pgRNA-Pflegger เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ร่วมกับไพรเมอร์ ts170 และ ts171 จากนั้นนำ PCR product ไปเป็นใช้ DNA template ในการทำ PCR รอบที่สอง โดยใช้ไพรเมอร์ ts172 และ ts173 จากนั้นนำไปใช้เป็น Insert DNA ในขั้นตอน XbaI/PstI cloning

Restriction digestion

ผสมสารเคมีดังตารางที่ 6 ในหลอด microtube จากนั้นนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37°C 1 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ และปรับอุณหภูมิ 80°C 20 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นทำการ ligation

ตาราง 1 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการ digestion

| สารเคมี | ปริมาตร |
|-------------------------|---------|
| ddH ₂ O | 12 ul |
| DNA (at least 50 ng/ul) | 5 ul |
| SmartCut | 2 ul |
| NEB XbaI | 0.5 ul |
| NEB PstI | 0.5 ul |

Ligation

ผสมสารเคมีดังตารางที่ 7 ในหลอด microtube จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16°C 30 นาที เพื่อกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ และปรับอุณหภูมิ 80°C 20 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นทำการ ligation

ตาราง 2 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการ ligation

| สารเคมี | ปริมาณ |
|----------------------------|--------|
| ddH ₂ O | 7 ul |
| Digested backbone (pgNDM1) | 4 ul |
| Digested insert DNA | 2 ul |
| T4 ligation buffer | 2 ul |
| T4 ligase | 2 ul |

เมื่อครบทั้งขั้นตอนการ digestion และขั้นตอนการ ligation แล้วนำดีเอ็นเอใน หลอดที่ได้ ไป transformation เข้าสู่ *E. coli* DH5a competent cells ด้วยวิธีการ TSS transformation

การสร้างพลาสมิด CRISPR มุ่งเป้าหมายที่ยีน *gfp*

การสร้างพลาสมิด pgGFP นั้น ถูกสร้างมาจาก pgEMPTY ด้วยการแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *gfp* ที่สังเคราะห์ขึ้นผ่านกระบวนการ Primer annealing ด้วยวิธีการ Golden Gate assembly

Primer annealing

ละลายไพรเมอร์ ts200 และ ts201 ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธ์ ให้ไพรเมอร์มีความเข้มข้น 100uM ผสมทั้ง 2 ไพรเมอร์ให้เข้ากัน โดยให้ปริมาตรสุดท้ายคือ 30 ul ดังตารางที่ 8

ตาราง 3 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการ Primer annealing

| สารเคมี | ปริมาณ |
|---|--------|
| 100 μM sense oligo (ts200) | 3 uL |
| 100 μM anti-sense oligo (ts201) | 3 uL |
| 10 x T4 ligation (polynucleotide kinase) buffer | 3 uL |
| น้ำกลั่นบริสุทธ์ | 18 uL |

นำไปต้มในน้ำเดือด 2 นาที และย้ายออกจากความร้อน นำดีเอ็นเอ (ไพรเมอร์ ts200 และ ts201) ที่ผ่านการต้มตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเตรียมพลาสมิด backbone สำหรับแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี GG โดยเติมพลาสมิด backbone 1 ul และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการแทรก (ts200/ts201 annealing) 0.75 ul จากนั้นผสม T4 DNA ligase buffer (NEB Golden Gate assembly Enzyme Mix) 2.5 ul และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์จนปริมาตรสุดท้ายคือ 25 ul จากนั้นนำไปป้อนในเครื่อง thermocycle ที่อุณหภูมิ 37°C 5 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 16°C 5 นาที จำนวน 30 รอบ เพื่อให้เกิดกระบวนการ digestion และ ligation จากนั้นตามด้วยอุณหภูมิ 65°C 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ หลังจากกระบวนการ GG ให้นำดีเอ็นเอที่ได้ในหลอดทำการ transformation เข้าสู่ *E. coli* DH5a ด้วยวิธีการ TSS transformation

การก่อสร้างพลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 และ ptGFP

การสร้างพลาสมิด ptNDM1 และ ptGFP นั้น ถูกสร้างมาจาก pSEVA231-CRISPR ด้วยการแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *gfp* (ptGFP) และชิ้นส่วนยีนบางส่วนของ NDM1 (ptNDM1) ที่สังเคราะห์ขึ้นผ่านกระบวนการ PCR โดยไพรเมอร์จะมีจุดตัดเอนไซม์ BsaI เชื่อมเข้ามาด้วย จากนั้นนำมา cloning ด้วยวิธีการ Golden Gate assembly (GG) โดยเริ่มจากการ PCR พลาสมิด pSEVA231-CRISPR ไพรเมอร์ ts151 และ ts152 สำหรับใช้เป็น backbone ในขั้นตอนการ GG และ PCR ยีน *gfp* จากพลาสมิด p1242 ด้วยไพรเมอร์ ts153 และ ts154 ในขณะที่เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน NDM1 จากแบคทีเรีย *A. baumannii* AB377 ด้วยไพรเมอร์ ts174 และ ts175 เมื่อเพิ่มจำนวนชิ้นยีนเรียบร้อยแล้ว จากนั้นเตรียมพลาสมิด backbone สำหรับแทรกชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี GG โดยเติมพลาสมิด backbone 1 ul จำนวน 2 หลอด (สำหรับ ptNDM1 และ ptGFP) และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ออกมาแทรก 0.75 ul (ชิ้นส่วนที่ PCR ข้างต้น) จากนั้นผสม T4 DNA ligase buffer (NEB Golden Gate assembly Enzyme Mix) 2.5 ul และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์จนปริมาตรสุดท้ายคือ 25 ul จากนั้นนำไปป้อนในเครื่อง thermocycle ที่อุณหภูมิ 37°C 5 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 16°C 5 นาที จำนวน 30 รอบ เพื่อให้เกิดกระบวนการ digestion และ ligation จากนั้นตามด้วยอุณหภูมิ 65°C 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ หลังจากกระบวนการ GG ให้นำดีเอ็นเอที่ได้ในหลอดทำการ transformation เข้าสู่ *E. coli* DH5a ด้วยวิธีการ TSS transformation

TSS transformation

Competent cell (DH5a)

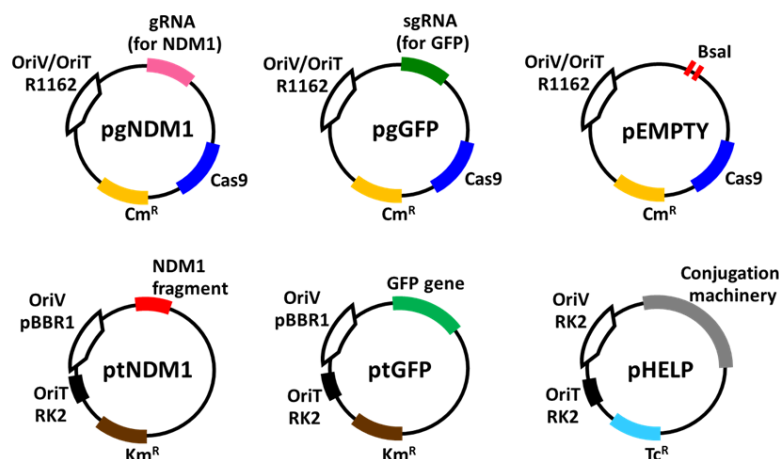
เลี้ยงโคโลนี *E.coli* DH5a ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ml นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C 16-24 ชั่วโมง คูดเชื้อ 50 ul ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 5 ml นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C 2-3 ชั่วโมง (วัดค่าความขุ่นที่ OD600 = 0.3-0.7) จากนั้นนำหลอดที่มีเชื้อวางลงบนน้ำแข็งเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C 5 นาทีและเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง ละลายตะกอนเชื้อด้วย TSS buffer (5g PEG 8000, 1.5 mL 1M MgCl₂ (or 0.30g MgCl₂.6H₂O), 2.5 ml DMSO and adjust to 50 ml by LB; pH 6.5) ปริมาตร 1 ml อย่างเบาๆ และเก็บ competent cells บนน้ำแข็งก่อนทำการทดลองต่อไป \

Heat shock

ผสมพลาสมิด 1 ul ใน competent cells 50 ul และบ่มที่อุณหภูมิห้องโดยวางบนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไป heat-shock ที่อุณหภูมิ 42°C 45 วินาที และย้ายลงบนน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว โดยวางหลอดเซลล์ที่ถูก heat-shock บนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติม อาหารเลี้ยงเชื้อ 450 ul และนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ผสมยาปฏิชีวนะตามความสามารถการต้านยาของพลาสมิด

พลาสมิดในงานวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาและพัฒนาาระบบนำส่งดีเอ็นเอด้วยวิธีการ conjugation ให้มีประสิทธิภาพสูง เพื่อส่งเสริมให้ระบบ CRISPR/cas เข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งงานวิจัยนี้ได้สร้างพลาสมิดเป้าหมายขึ้นเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดพลาสมิดเป้าหมายของระบบ CRISPR/cas ร่วมด้วย ซึ่ง พลาสมิดที่ใช้ทั้งหมด 6 ชนิด แบ่งออกเป็นพลาสมิดในกลุ่ม self-transmissible conjugative plasmid จำนวน 1 พลาสมิด ซึ่งเป็นพลาสมิดที่สามารถส่งถ่ายตัวเองไปยังเซลล์ผู้รับผ่านกลไกการสร้างท่อ (pili) และเป็น พลาสมิดกลุ่ม mobilizable plasmid จำนวน 5 พลาสมิด ซึ่งเป็นพลาสมิดที่สามารถอาศัยกลไกการ conjugation ของ self-transmissible conjugative plasmid ในการส่งถ่ายหรือเคลื่อนย้ายไปยังเซลล์ผู้รับ โดยพลาสมิดทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นพลาสมิดกลุ่ม broad host range ที่สามารถสร้างและจำลองตัวเองได้ในเซลล์ host หลายชนิด

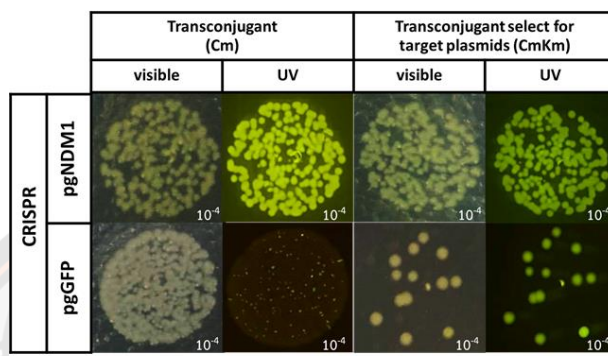


ภาพ 36 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง 6 ชนิด ดังภาพ 4 คือ 1) pgNDM1 ซึ่งเป็นพลาสมิดเดียวกันกับ pMM441 (Citorik et al., 2014) และเป็นพลาสมิดที่มีส่วนประกอบด้วย R1162 origin of replication/transfer, ตำแหน่ง CRISPR locus, เอนไซม์ cas9, gRNA มุ่งเป้าหมายไปที่ยีน NDM1 และยีนต้านยาปฏิชีวนะ Cm 2) pEMPTY เป็นพลาสมิดที่มีโครงสร้างจาก pgNDM1 แต่ถูกแทรกจุดตัดเอนไซม์ BsaI ตรงตำแหน่งของ gRNA เพื่อเป็นประโยชน์ในการปรับเปลี่ยนหรือกำหนดเป้าหมายให้ระบบ CRISPR/cas ซึ่งประกอบด้วย R1162 origin of replication/transfer, ตำแหน่ง CRISPR locus, เอนไซม์ cas9, gRNA ที่มีจุดตัดเอนไซม์ BsaI และยีนต้านยาปฏิชีวนะ Cm 3) pgGFP ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ถูกสร้างมาจาก pEMPTY ด้วยวิธีการ Golden Gate assembly (GG) โดยแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *gfp* เข้าไปด้วยเอนไซม์ BsaI ซึ่งประกอบด้วย R1162 origin of replication/transfer, ตำแหน่ง CRISPR locus, เอนไซม์ cas9, gRNA มุ่งเป้าหมายไปที่ยีน *gfp* และยีนต้านยาปฏิชีวนะ chloramphenicol 4) ptNDM1 เป็นพลาสมิดเป้าหมายของ pgNDM1 ซึ่งนำโครงพลาสมิดมาจากพลาสมิด pSEVA231-CRISPR (Aparicio et al., 2019) และแทรกลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน NDM1 ที่เป็นเป้าหมายของระบบ CRISPR เข้าไป ด้วยวิธีการ GG ซึ่งส่งผลให้พลาสมิดนี้ประกอบด้วย pBBR1 origin of replication, RK2 origin of transfer, ลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน NDM1 และยีนต้านยาปฏิชีวนะ Km 5) ptGFP เป็นพลาสมิดเป้าหมายของ pgGFP ซึ่งนำโครงพลาสมิดมาจากพลาสมิด pSEVA231-CRISPR เช่นเดียวกัน และถูกแทรกยีน *gfp* ที่เป็นเป้าหมายของระบบ CRISPR เข้าไป ด้วยวิธีการ GG ซึ่งส่งผลให้พลาสมิดนี้ประกอบด้วย pBBR1 origin of replication, RK2 origin of transfer, ยีน *gfp* และยีนต้านยาปฏิชีวนะ Km และ 6) pHELP เป็นพลาสมิด กลุ่ม Conjugative plasmid หรือพลาสมิดที่สามารถส่งถ่ายตัวเองได้ ซึ่ง pHELP นั้น

คือ pRL443 (Elhai et al., 1997) ประกอบด้วย RK2 origin of replication/transfer, Conjugative gene และยีนต้านยาปฏิชีวนะ Tc

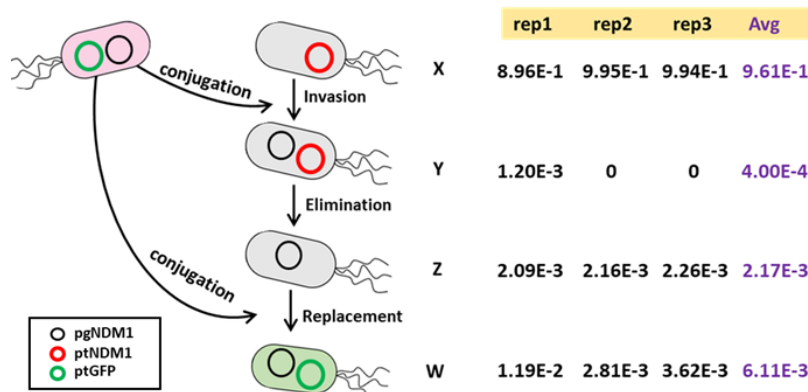
ผลการสูญเสียยีนต่อยาปฏิชีวนะและยีนเรืองแสงสีเขียว (*gfp*)



ภาพ 37 การเรืองแสงของยีน *gfp* หลังจากถูกนำส่ง *pgGFP* เข้าสู่เซลล์เป้าหมาย

ผู้วิจัยจึงนำเพลทอาหารที่ได้ผลดังกล่าวมายืนยันการสูญเสียยีน *gfp* โดยการนำมาส่องผ่านได้แสง UV (ภาพ 37) ซึ่งเซลล์ที่นำมาวิเคราะห์นั้นเป็นชุดการทดลองที่ส่ง *pgNDM1* หรือ *pgGFP* เข้าสู่เซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิด *ptGFP* ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เพลทที่ถูกเจือจาง $1E-4$ เท่า ก่อนนำมาหยดเพื่อวิเคราะห์ผล พบว่าเมื่อคัดเลือก Transconjugant ที่มีพลาสมิด *ptGFP* (แถว 2, CmKm) พบโคโลนีเรืองแสงสีเขียวจากการมองด้วยตาและการมองผ่านแสง UV ในขณะที่คัดเลือก Transconjugant ทั้งหมด (แถว 1, Cm) เซลล์ที่ส่ง *pgNDM1* มีโคโลนีสีเขียวเมื่อมองด้วยตาและมีการเรืองแสงสีเขียวเมื่อมองผ่านแสง UV ในขณะที่เซลล์ที่ส่ง *pgGFP* มีโคโลนีสีขาวปนเขียวเล็กน้อยเมื่อมองด้วยตาและพบการเรืองแสงสีเขียวเล็กน้อยเมื่อมองผ่านแสง UV ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการนำส่ง *pgGFP* เข้าไปกำจัด *ptGFP* นั้น อาจจะไม่สามารถกำจัดพลาสมิดออกจากเซลล์ได้ทั้งหมด แต่ส่งผลให้สูญเสียหน้าที่การเรืองแสงสีเขียวของยีน *gfp* ได้

ผลการแทนที่พลาสมิดเป้าหมายด้วยพลาสมิดใน Incompatibility group



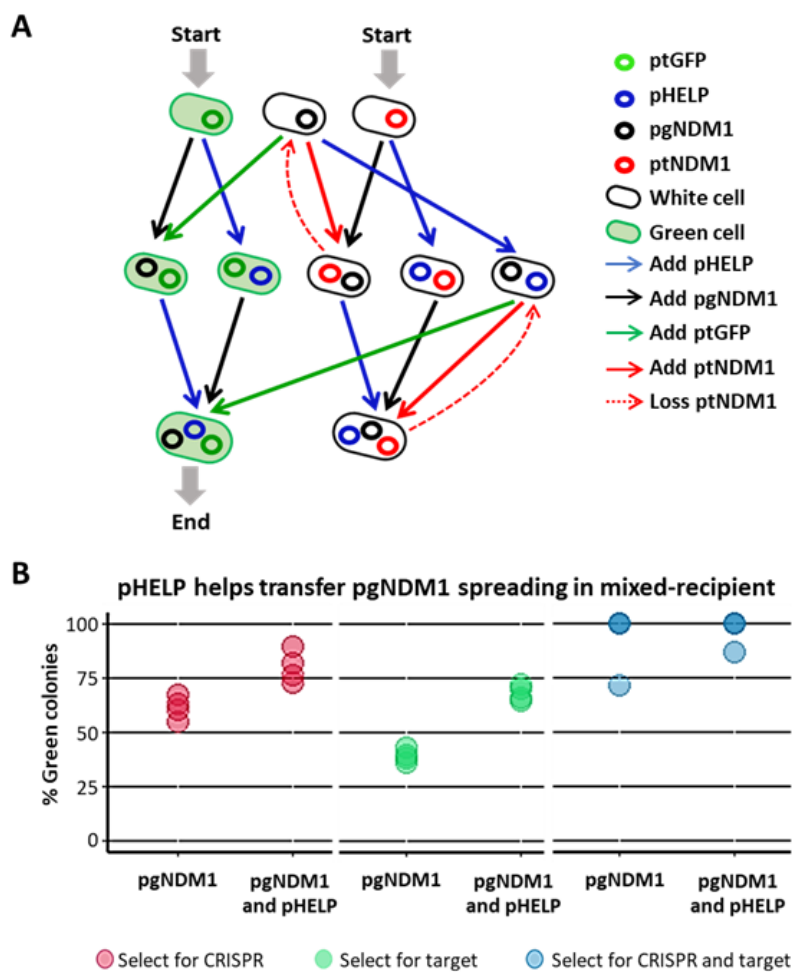
ภาพ 38 แผนภาพและกราฟแสดงผลการวัดประสิทธิภาพการส่งระหว่างพลาสมิด *pgNDM1* และ *ptGFP*

ผู้วิจัยนำพลาสมิด *pgNDM1* และ *ptGFP* ซึ่งเป็นพลาสมิดในกลุ่ม pBBR1-based เช่นเดียวกับ *ptNDM1* เข้าสู่เซลล์ผู้ให้ จากนั้นนำส่งพลาสมิดทั้ง 2 ชนิด (กล่าวคือ *pgNDM1* และ *ptGFP*) เข้าสู่เซลล์ผู้รับด้วยวิธีการ Conjugation โดยผลที่ผู้วิจัยคาดหวังคือ เมื่อ *pgNDM1* เข้าสู่เซลล์เป้าหมาย จะเกิดการกำจัดพลาสมิดเป้าหมายนั้นและเกิดการส่งพลาสมิด *ptGFP* เข้ามาตามลำดับ (ภาพ 38, A) โดยผู้วิจัยพบว่า เมื่อแบ่งเซลล์ออกเป็นกลุ่มจะเห็นได้ว่าเซลล์ในกลุ่ม Y เป็นกลุ่มที่พบน้อยที่สุด เพียงแค่ 0.0004 ในขณะที่เซลล์ในกลุ่ม Z และ W เป็นเซลล์ที่พบบ่อยตามมา ซึ่งเซลล์ในทั้ง 2 กลุ่มนี้มีค่า 2.17E-3 และ 6.11E-3 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า เมื่อ *pgNDM1* เข้าสู่เซลล์เป้าหมายแล้วเซลล์ส่วนใหญ่จะถูกกำจัดพลาสมิดเป้าหมายและถูกแทนที่พลาสมิดเป้าหมายด้วย *ptGFP* แต่อย่างไรก็ตาม เซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิดเป้าหมายนั้นยังคงได้รับ *pgNDM1* ที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เริ่มต้นนั้นคือเซลล์ในกลุ่ม X

ผลการเปลี่ยนสัดส่วนการเรืองแสงของเซลล์ในประชากรแบบกลุ่ม เมื่อมีพลาสมิดตัวช่วย

ผู้วิจัยได้ศึกษาและทดลองการส่งพลาสมิดร่วมกันระหว่างระบบ CRISPR/cas ร่วมกับพลาสมิดตัวช่วย หรือระบบ CRISPR/cas ร่วมกับพลาสมิดแทนที่ ซึ่งการนำส่งพลาสมิดทั้งสองชนิดดังกล่าวนี้มีผลให้ประสิทธิภาพการแพร่กระจายของระบบ CRISPR/cas สูงและมีระบบการแทนที่เพื่อป้องกันพลาสมิดตัวช่วยแพร่กระจายพลาสมิดเป้าหมาย ต่อมาผู้วิจัยได้นำระบบดังกล่าวมาศึกษาต่อในแบคทีเรียประชากรแบบผสม โดยแผนภาพแสดงให้เห็นถึงการมีพลาสมิด 4 ชนิด อยู่ในกลุ่มประชากร (ภาพ 39, A) ซึ่งประกอบด้วย pHELP (วงกลม, สีน้ำเงิน) *pgNDM1* (วงกลม, สีดำ)

ptNDM1 (วงกลม, สีแดง) และ ptGFP (วงกลม, สีเขียว) ในกลุ่มประชากรนั้นมีโอกาสที่พลาสมิดหลายชนิดอาจอยู่ร่วมกัน แต่มีเพียงพลาสมิด pgNDM1 และ ptNDM1 ไม่สามารถอยู่ร่วมกันได้ เนื่องจาก pgNDM1 มีระบบ CRISPR/cas คอยกำจัด ptNDM1 อยู่ ในขณะที่เซลล์ที่มีพลาสมิด ptGFP อยู่ภายในเซลล์ก็จะไม่สามารถพบพลาสมิด ptNDM1 ได้เช่นกัน เนื่องจากเป็นพลาสมิดใน Incompatibility group เดียวกัน



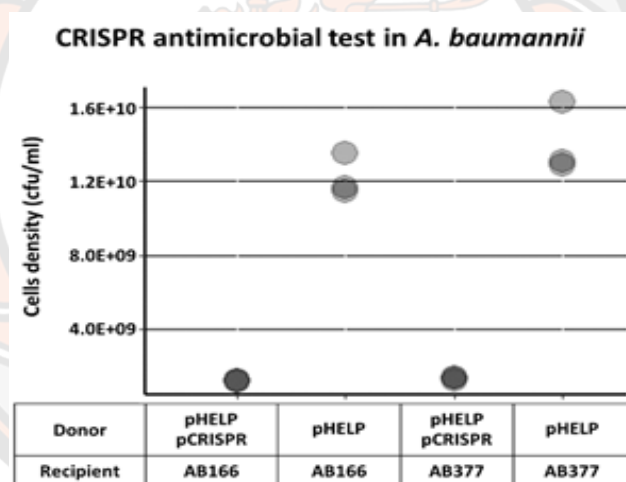
ภาพ 39 กราฟแสดงผลประสิทธิภาพการนำส่งพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ผู้รับและการแทนที่ของพลาสมิดใน *Transconjugant* เปรียบเทียบระหว่างมีและไม่มี pHELP

ผู้วิจัยระบบที่มี pHELP และ pgNDM1 มาทดสอบในกลุ่มประชากรแบบผสมที่ถูกผสมระหว่างเซลล์ผู้รับที่มีพลาสมิดเป้าหมาย ptNDM1 และเซลล์ที่มีพลาสมิดเป้าหมาย ptGFP ซึ่งกราฟแสดงอัตราส่วนโคโลนีสีเขียว (ภาพ 19, B) พบว่าเมื่อคัดเลือกพลาสมิดเป้าหมาย (วงกลม, สีเขียว) พบโคโลนีสีเขียวประมาณ 70-75% เมื่อมี pHELP ในการช่วยส่งเสริมการแพร่กระจายของ

pgNDM1 ในขณะที่พบโคลิฟอร์มสีเขียวประมาณ 30% เมื่อไม่มี pHELP และเมื่อคัดเลือกพลาสมิดที่มีระบบ CRISPR หรือ pgNDM1 (วงกลม, สีแดง) พบโคลิฟอร์มสีเขียว 75-80% เมื่อมี pHELP ในขณะที่พบโคลิฟอร์มสีเขียวประมาณ 65% เมื่อไม่มี pHELP โดยเมื่อคัดเลือกทั้ง pgNDM1 และพลาสมิดเป้าหมาย (ptNDM1 หรือ ptGFP) (วงกลม, สีฟ้า) พบโคลิฟอร์มสีเขียว 100% เมื่อมี pHELP ในขณะที่พบโคลิฟอร์มสีเขียวน้อยประมาณ 90% เมื่อไม่มี pHELP

ผลการสูญเสียยีนคือยาปฏิชีวนะและการตายของแบคทีเรีย *A. baumannii*

เมื่อศึกษาระบบ CRISPR/cas ใน *E. coli* แล้ว ผู้วิจัยจึงนำมาศึกษาต่อในแบคทีเรียกลุ่ม Non-*E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในโรงพยาบาล เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีรายงานว่า เป็นปัญหาอย่างมากทางกระทรวงสาธารณสุข เนื่องจากเป็นแบคทีเรียกลุ่มคือยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Multi-drug resistance bacteria) ซึ่งกำจัดยาก ผู้วิจัยจึงนำระบบ CRISPR/cas มาทดสอบประสิทธิภาพการกำจัด *A. baumannii*

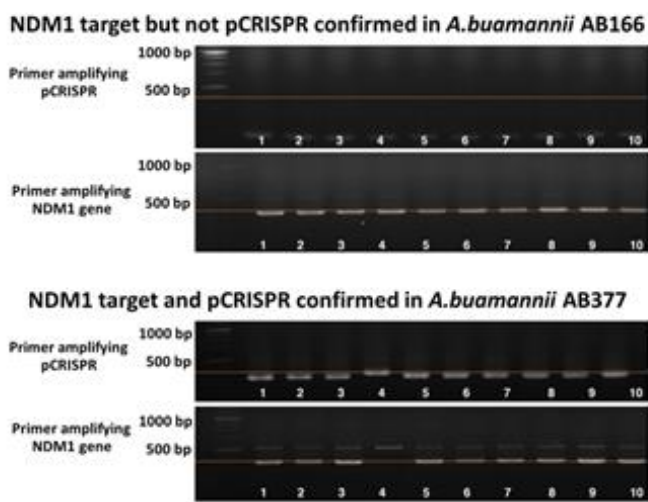


ภาพ 40 ผลการนำส่งระบบ CRISPR/cas ในการกำจัด *A. baumannii* อย่างจำเพาะ

ผู้วิจัยได้ทดสอบการนำส่งระบบ CRISPR/cas เข้าแบคทีเรียเป้าหมายในกลุ่ม non-*E. coli* เพื่อศึกษาการกำจัดแบคทีเรียอย่างจำเพาะ โดยผู้วิจัยนำส่ง pgNDM1 เข้าสู่เซลล์ *A. baumannii* สายพันธุ์ AB166 และ AB377 ซึ่งมียีน NDM1 ภายในเซลล์ โดยการ Conjugation ครั้งนี้อาศัยกลไกการ Conjugate ของ pHELP จากกราฟจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (ภาพ 40) พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ที่รอดชีวิตมีปริมาณลดลงเมื่อรับพลาสมิด pgNDM1 เข้าสู่เซลล์ โดยความหนาแน่นของเซลล์ AB166 และ AB377 ลดลง 90% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองควบคุม จะเห็นได้ว่าระบบ CRISPR/cas สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพใน *A. baumannii*

ผลการตรวจสอบยืนยันเป้าหมายและพลาสมิด CRISPR โดยวิธี PCR

จากผลการทดลองก่อนหน้าจะเห็นว่ามีความจำแนกเซลล์ที่รอดชีวิตจากการตัดทำลายยีน NDM1 ในเซลล์ *A. baumannii* ผู้วิจัยจึงจะวิเคราะห์ผลต่อด้วยวิธีการ Colony PCR เพื่อตรวจหาพลาสมิด pgNDM1 และยีน NDM1 ภายในเซลล์

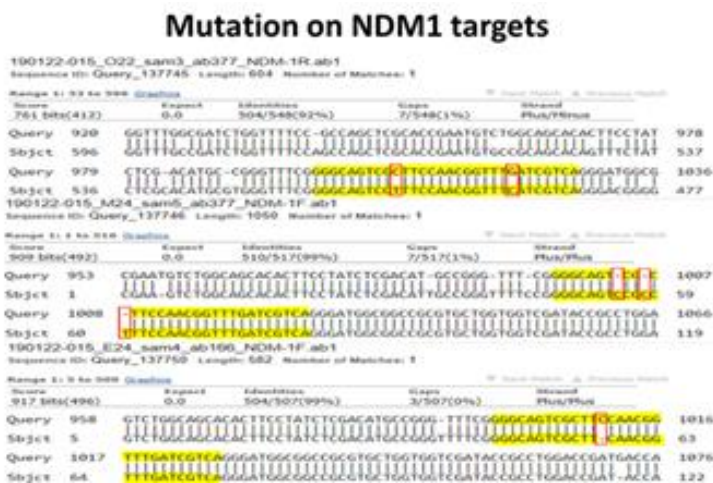


ภาพ 41 ผลการตรวจวิเคราะห์ PCR ตำแหน่งเป้าหมาย หลังจากถูก CRISPR/cas ตัดทำลาย

ผู้วิจัยได้ยืนยันผลการทดลองด้วยวิธีการ Colony PCR โดยเลือกโคโลนี *A. baumannii* สายพันธุ์ AB166 และ AB377 จำนวนอย่างละ 10 โคโลนี มาวิเคราะห์ผลหาพลาสมิด pgNDM1 ด้วยไพรเมอร์ ts18 และ ts19 และวิเคราะห์ผลยีน NDM1 ภายในเซลล์ด้วยไพรเมอร์ NDM_F และ NDM_R พบว่าสายพันธุ์ AB166 จำนวน 10 โคโลนีไม่พบ pgNDM1 ภายในเซลล์ แต่พบยีน NDM1 ทั้งหมด 10 โคโลนี ในขณะที่สายพันธุ์ AB377 จำนวน 10 โคโลนีพบ pgNDM1 ทั้งหมด 10 โคโลนี และไม่พบยีน NDM1 เพียง 1 โคโลนี

ผลการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอในเป้าหมายในฐานข้อมูล GenBank

ต่อมาผู้วิจัยนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ Colony PCR มาทำให้บริสุทธิ์และส่งวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอด้วยวิธีการ DNA sequencing ซึ่งผู้วิจัยส่งวิเคราะห์สายพันธุ์ละ 3 โคโลนี โดยเลือกจากความเข้มแถบดีเอ็นเอบน agarose gel



ภาพ 42 ผลการตรวจวิเคราะห์ตำแหน่งเป้าหมายและเปรียบเทียบฐานข้อมูล

ผู้วิจัยจึงเลือกโคโลนีที่มีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอที่พบ โดย AB166 โคโลนีที่ 4, 8 และ 9 AB377 โคโลนีที่ 3, 5 และ 9 มาสกัดดีเอ็นเอจาก Agarose gel และส่งวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธีการ DNA sequencing ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอพบการหายไปของลำดับดีเอ็นเอ (Deletion point) ใน AB166 จำนวน 1 โคโลนี และ AB377 จำนวน 1 โคโลนี ในขณะที่พบการกลายพันธุ์ (Mutation point) ใน AB377 จำนวน 1 โคโลนี

ดังนั้นสรุปได้ว่า CRISPR/cas สามารถตัดทำลายดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในทั้งใน E.coli และ Non-E.coli ซึ่งแต่ละตำแหน่งการตัดทำลายจะมีประสิทธิภาพที่ต่างกัน เช่น การตัดทำลายพลาสมิดเป้าหมายที่มียีน NDM1 ใน E.coli ส่งผลให้พลาสมิดนั้นถูกทำลายและหายไปจากเซลล์ ในขณะที่การตัดทำลายยีน *gfp* นั้น อาจจะตัดทำลายได้เพียงการแสดงออกของยีน *gfp* เท่านั้น แต่พลาสมิดไม่ได้ถูกกำจัดหายไป ในทางกลับกัน เมื่อส่งระบบ CRISPR/cas เข้าสู่ Non-E.coli ระบบ CRISPR/cas สามารถกำจัดแบคทีเรียได้เพียงบางส่วนอาจเป็นเนื่องมาจากผู้วิจัยไม่ทราบว่ายีน NDM1 นั้นอยู่บนส่วนใดของเซลล์ หากอยู่บนจีโนมอาจจะส่งผลให้เซลล์ตายได้ แต่หากอยู่บนพลาสมิดอาจส่งผลเพียงกำจัดพลาสมิดนั้นไปหรือสูญเสียการแสดงออกของยีนนั้น นอกจากนี้การวิเคราะห์ผลด้วย Sequencing ยังชี้ให้เห็นถึงการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนเป้าหมาย ซึ่งอาจเกิดจากการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ผิดพลาดของเซลล์