

ข้อควรรู้เกี่ยวกับ พลาสมิด

โดย สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง

ในช่วงต้นปี 2557 นี้ นักวิจัยหลายท่านได้รายงานถึงความก้าวหน้าในการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรค กุ้งตายด่วน (EMS/AHPND) ด้วย PCR ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าสาเหตุของโรคนี้คือ เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* (VP) ที่มีความรุนแรงต่อกุ้งซึ่งคาดว่าเกิดจากพลาสมิดที่อยู่ในเซลล์ของแบคทีเรีย VP ที่มีความแตกต่างไปจากพลาสมิดชนิดอื่นๆ ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโรค EMS/AHPND โดยวิธี PCR นี้ใช้ไพรเมอร์ที่ ออกแบบมาจากพลาสมิดนั่นเอง

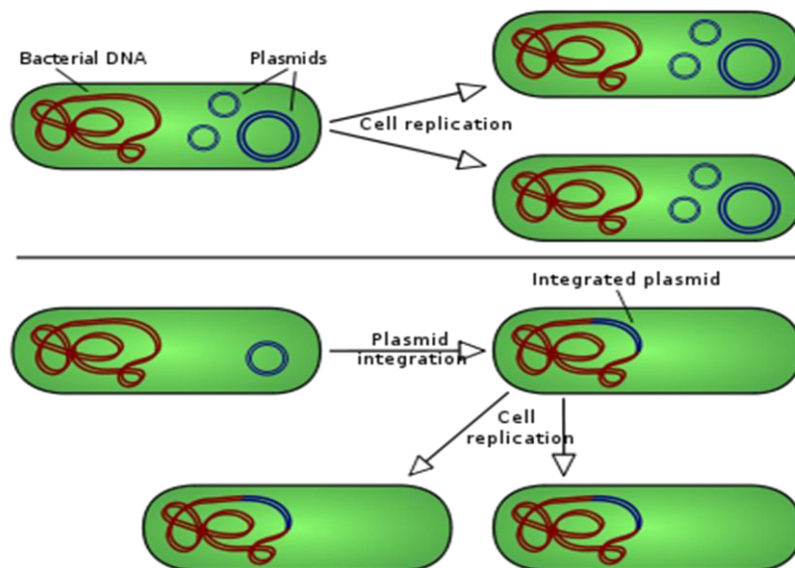


ที่มา <http://egtheory.wordpress.com/2013/05/>

รูปที่ 1 พลาสมิด แลโครโมโซม ในเซลล์แบคทีเรีย

พลาสมิด (Plasmid) คืออะไร หลายท่านอาจไม่คุ้นเคยกับคำว่าพลาสมิดนัก ในปีค.ศ. 1952 Joshua Lederberg ได้ตั้งชื่อ พลาสมิด (Plasmid) สำหรับใช้เรียก สารพันธุกรรมส่วนเล็กๆ ที่อยู่ในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมหลักของแบคทีเรีย ดังนั้น พลาสมิด ก็คือสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซมของแบคทีเรีย ในธรรมชาติสามารถพบพลาสมิดในแบคทีเรียหลายชนิดและในยูแคริโอตบางชนิด มีขนาดตั้งแต่ไม่กี่พันคู่เบสจนถึงมากกว่าแสนคู่เบส มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ แต่ในบางกรณีจะอยู่ในรูปของวงกลม มีการพันกันในลักษณะเกลียวซ้อนเกลียวและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent bonds) มักมียีนที่ทำให้แบคทีเรียมีคุณสมบัติพิเศษ เช่น ทำให้ผลิตยาปฏิชีวนะได้ ทำให้เกิดความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ มีความต้านทานต่อโลหะหนัก ผลิตสารพิษฆ่าแบคทีเรียอื่นได้ หรือสามารถย่อยสลายโมเลกุลบางอย่างได้ พลาสมิดมีความสามารถในการแบ่งตัวได้อย่างอิสระและอยู่เป็นอิสระโดยไม่ต้องรวมตัว

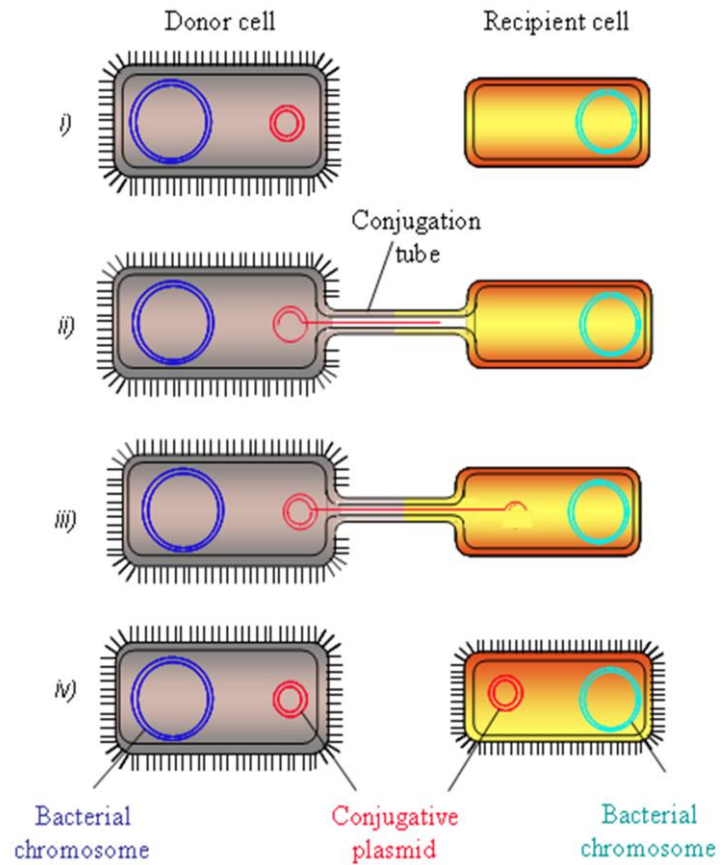
กับยีนของเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (Non-integrating plasmids) หรือสามารถแทรกเข้าไปติดกับ DNA ของแบคทีเรียเสมือนเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซมแบคทีเรียและสามารถแบ่งตัวไปพร้อมๆกัน (Integrating plasmids)



ที่มา : <http://en.wikipedia.org/wiki/Plasmid>

รูปที่ 2 การแบ่งตัวของดีเอ็นเอของพลาสมิด ในเซลล์แบคทีเรีย

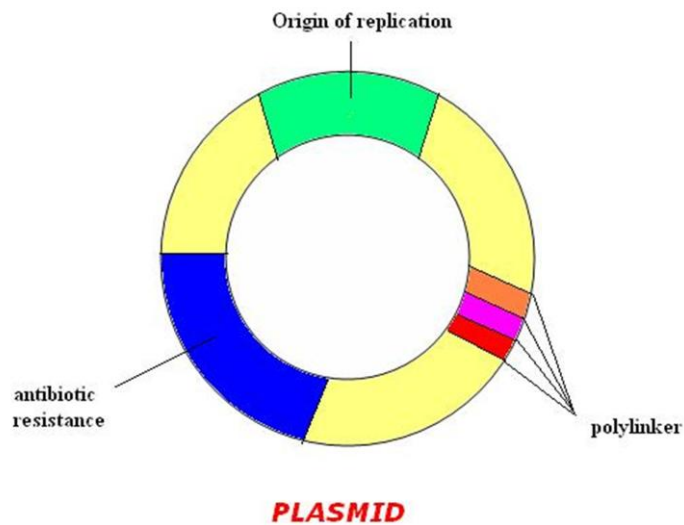
พลาสมิด จัดว่าเป็น Bacterial Mobile Genetic Elements คือส่วนพันธุกรรมของแบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่ได้ ซึ่งการเคลื่อนที่ในที่นี้หมายถึง การเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งอื่นๆ บนโครโมโซมเดียวกัน หรือเคลื่อนที่ไปยังแบคทีเรียเซลล์อื่นๆ บางชนิดสามารถส่งถ่ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้โดยกระบวนการ conjugation ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่แบคทีเรียมาจับคู่กัน แล้วถ่ายทอดสารพันธุกรรมให้แก่กัน แบคทีเรียเซลล์หนึ่งจะเป็นผู้ให้ (donor) อีกเซลล์หนึ่งจะเป็นผู้รับ (recipient) ส่วนพลาสมิดบางชนิดที่ไม่สามารถส่งถ่ายจากเซลล์หนึ่งไปยังเซลล์หนึ่งได้เรียกว่าพลาสมิดแบบ non conjugative แต่ในเทคโนโลยีปัจจุบันพลาสมิดกลุ่มนี้จะถูกส่งเข้าไปในเซลล์ที่ต้องการได้ในห้องปฏิบัติการ โดยอาศัยกระบวนการ transformation เป็นปรากฏการณ์การเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรม หรือ DNA จากแบคทีเรียหนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกเซลล์หนึ่ง ซึ่งกระบวนการนี้ถูกนำมาใช้ในการโคลนยีน ทำให้พลาสมิดมีการเปลี่ยนแปลงทางสารพันธุกรรมและได้ถูกนำมาใช้ในด้านพันธุวิศวกรรมที่เรียกว่า เทคนิคการทำรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (Recombinant DNA Technology) ซึ่งพลาสมิดสามารถส่งผ่านยีนได้ถึง 20 ยีนต่อครั้ง โดยพลาสมิดสามารถทำหน้าที่ได้หลายอย่าง ดังนี้



ที่มา: <http://wiki.biomine.skelleftea.se/wiki/index.php/Conjugation>

รูปที่ 3 การส่งผ่านดีเอ็นเอของพลาสมิด จากการ conjugation ของเซลล์แบคทีเรีย 2 เซลล์

1. ส่งผ่านยีนดีเอ็นเอและแพร่กระจายยีนนั้นในร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ โรคที่เกิดขึ้นจากกรณีนี้สามารถรักษาได้
2. ส่งผ่านยีนที่เกี่ยวข้องกับการขบวนการย่อยและเผาผลาญ ซึ่งมีประโยชน์ในการย่อยสลายสารมลพิษจากสิ่งแวดล้อม
3. สามารถผลิตโปรตีนต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย
4. ส่งผ่านยีนที่เพิ่มความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรีย เช่น โรคแอนแทรกซ์ โรคบาดทะยัก



ที่มา <https://sites.google.com/site/shivsbiotechportfolio/plasmids-structure-and-function>

รูปที่ 4 โครงสร้างของพลาสมิด

ชนิดของพลาสมิด

พลาสมิดแบ่งออกเป็น 5 ชนิด ดังนี้

1. Resistance-® Plasmids พลาสมิดชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการจับคู่ถ่ายทอดยีน (Conjugation) ของแบคทีเรีย โดยมักจะส่งผ่านยีนซึ่งถอดรหัสพันธุกรรมสำหรับยีนดื้อยาปฏิชีวนะหรือสารพิษ นอกจากนี้ยังถอดรหัสพันธุกรรมสำหรับยีนที่ทำหน้าที่ในการสร้าง conjugation pili ซึ่งมีหน้าที่ส่งผ่าน Resistance plasmid จากแบคทีเรียผู้ให้ ไปยังแบคทีเรียผู้รับ ทำให้แบคทีเรียชนิดอื่นๆ เกิดการดื้อยาขึ้น
2. Degradative plasmids พลาสมิดชนิดนี้มีความสามารถในการย่อยสลายอินทรีย์สารจากพืชหรือสัตว์ที่ตายแล้ว โดยจะใช้อินทรีย์สารในขบวนการชีวสังเคราะห์เพื่อผลิตพลังงานและนำสารนั้นกลับมาใช้ใหม่
3. Fertility Plasmids พลาสมิดชนิดนี้ทำหน้าที่ในการส่งผ่าน tra-genes ซึ่งใช้ในขบวนการจับคู่ถ่ายทอดยีน มีประโยชน์ในการส่งผ่านสารทางพันธุกรรมระหว่างแบคทีเรีย
4. Col Plasmids พลาสมิดชนิดนี้ทำหน้าที่ผลิตยาปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแบคทีเรียสายพันธุ์ก่อโรคอื่นๆ โดยจะเข้าไปอาศัยในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน ยาปฏิชีวนะชนิดนี้เรียกว่า colicin

5. Virulence Plasmids พลาสมิดชนิดนี้มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงแบคทีเรียให้กลายเป็นเชื้อก่อโรค โดยการส่งผ่านยีนที่ทำให้เกิดโรค

การใช้พลาสมิดใน Gene Therapy

พลาสมิดถูกนำมาใช้ในการสอดแทรกยีนที่มีคุณสมบัติในการรักษาโรคเข้าสู่ร่างกายมนุษย์เพื่อต่อต้านกับโรค พลาสมิดสามารถเปลี่ยนแปลงและเพิ่มจำนวนได้ง่ายในเซลล์แบคทีเรีย มีความสามารถในการกำหนดเซลล์เป้าหมายที่มีคุณสมบัติคือช่วยกระตุ้นยีนในการรักษาโรค ไม่พบอันตรายของพลาสมิดเหมือนที่พบในไวรัส

การใช้พลาสมิดใน Recombinant DNA Technology

พลาสมิดถูกนำมาใช้ในเทคนิคการทำรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอในหลายๆ วัตถุประสงค์ เช่น การส่งผ่านยา โดยใช้พลาสมิดในการสอดแทรกยีนที่สนใจเข้าสู่ร่างกาย นอกจากนั้นยังเกี่ยวข้องกับการคัดลอกและการทำลายแบคทีเรียก่อโรคในร่างกายอีกด้วย การสอดแทรกฮอร์โมนอินซูลินเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ถือเป็นเทคนิคการทำรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอโดยใช้พลาสมิดที่ทำครั้งแรกในมนุษย์ ซึ่งประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี และยังมี การสอดแทรก growth hormone ของมนุษย์เข้าสู่ mammalian cells ของสัตว์ด้วย

Virulence Plasmids : พลาสมิดที่ทำให้แบคทีเรียให้กลายเป็นเชื้อก่อโรค

แบคทีเรียสายพันธุ์ก่อโรคนั้นแตกต่างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงกันที่ไม่ก่อโรค เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์ก่อโรคมียีนเกี่ยวกับปัจจัยก่อความรุนแรง (Virulence factors) ซึ่งช่วยในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและทำให้เกิดการติดเชื้อ ปัจจัยเหล่านี้จะถูกถอดรหัสทางพันธุกรรมโดยโครโมโซมของเจ้าบ้านหรือถูกส่งผ่านโดยองค์ประกอบที่สามารถส่งผ่านยีนได้ เช่น transposons, viral prophages และพลาสมิด เป็นต้น พลาสมิดที่สร้างความรุนแรงมักจะถูกถ่ายทอดระหว่างเจ้าบ้าน โดยการจับคู่ถ่ายทอดยีน พลาสมิดเหล่านี้จะมีขนาดใหญ่เนื่องจากมีหน้าที่ในการส่งผ่านยีนที่สร้างความรุนแรงหลายๆ ยีน และยังทำหน้าที่ถ่ายทอดพลาสมิดและรักษาสภาพของพลาสมิดเองอีกด้วย ความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมักจะเกิดจากการถอดรหัสพันธุกรรมของพลาสมิดขนาดใหญ่ที่อยู่ภายนอกโครโมโซม พลาสมิดเหล่านี้จะรักษาสภาพให้อยู่ในปริมาณ copy น้อยๆ เพื่อลดการเผาผลาญพลังงานของแบคทีเรียเจ้าบ้าน ซึ่งการคงสภาพลักษณะนี้อาจเสี่ยงต่อการหายไปของพลาสมิดในระหว่างการแบ่งตัวของเซลล์เจ้าบ้าน การแบ่งตัวและการรวมตัวใหม่ของพลาสมิดจะทำให้เกิดการผลิต plasmid multimers ที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการรวมกลุ่มกันของพลาสมิดและอาจเพิ่มความเสี่ยงในการหายไปของพลาสมิด ซึ่ง multimer resolution system จะช่วยในการรักษาสภาพของพลาสมิดให้คงที่ไม่เกิดการสูญหาย โดยระบบนี้จะทำหน้าที่ในการเพิ่มจำนวน copy ของพลาสมิดให้เพียงพอต่อการรวมกลุ่มกัน สำหรับเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดในระหว่างการแบ่งเซลล์จะถูกทำลายลงโดยกลไกหนึ่งของ

ระบบนี้ และสุดท้ายจะเกิดการรวมกลุ่มกันของใหม่พลาสมิดกลายเป็นเซลล์ลูก (Daughter cells) โดยผ่านกระบวนการรวมตัวของโครโมโซมที่มีการแบ่งตัว (Mitotic segregation) การทำงานของระบบดังกล่าวนี้เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านแต่ละเซลล์จะต้องได้รับพลาสมิดอย่างน้อย 1 copy หลังจากการแบ่งเซลล์แต่ละครั้ง เนื่องจากพลาสมิดที่ก่อความรุนแรงนั้นจะถอดรหัสพันธุกรรมสำหรับการก่อความรุนแรงด้วยและการรักษาสภาพของพลาสมิดถือว่ามีความสำคัญต่อการสร้างความรุนแรงให้แก่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านเป็นอย่างยิ่ง

เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ที่เรารู้จักกันดีนั้น มีสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงก่อโรคในคน ได้แก่ สายพันธุ์ (serotype) O3:K6 ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษหรือกระเพาะและลำไส้อักเสบ ซึ่งจัดได้ว่า O3:K6 นี้เป็น pandemic strain เพราะเกิดการระบาดไปทั่วโลก เกิดจากการกินอาหารโดยเฉพาะอาหารทะเลที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป โดยสายพันธุ์ดังกล่าวมีปัจจัยก่อความรุนแรงของเชื้อคือ มียีนสร้างสารพิษ Thermostable direct hemolysin (TDH) ซึ่งสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดรูบนผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงทำให้เซลล์แตกและเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรค EMS/AHPND ในกุ้งนั้นตรวจไม่พบยีนที่สร้างสารพิษ TDH ที่ก่อโรคในคน

เอกสารอ้างอิง

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536. เวคเตอร์. ในพันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. หน้า 85-110. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Amna Adnan. Plasmids : Types, Function and Applications <http://www.biotecharticles.com/Other-Article/Plasmids-Types-Functions-and-Applications-187.html>. 2010-06-28.

Austin , S. and Sengupta, M. 2011. Prevalence and Significance of Plasmid Maintenance Functions in the Virulence Plasmids of Pathogenic Bacteria. INFECTION and IMMUNITY, 79 (7) : 2502–2509.

Flegel, T.W. Announcement regarding free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND).

http://www.biotech.or.th/en/images/stories/Workshops/2013/Announcement_AHPND%20Detection%20Method.pdf

Japan Science and Technology Agency (JST). Unique sequences of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from EMS/AHPNS shrimp by comparative genome analysis. URL <http://www.jst.go.jp/EN/index.html> Jan. 9, 2014.

National Cheng Kung University's Website. NCKU-Thailand Research Team Releases a PCR-Based Method to Detect Early Mortality Syndrome (EMS) of Shrimp. January 7, 2014.