ความหลากหลายของอาร์เคียในบ่อน้ำร้อนเบตง จังหวัดยะลา ประเทศไทย

Diversity of Archaea in the Betong Hot Spring, Yala Province, Thailand

สุมาลี นวลนึก[1] วราภรณ์ วุฑฒะกุล[1] และกาญจนา ศรีนิติวรวงศ์[1]

Sumalee Nualnuek[1], Varaporn Vuddhakul[1] and Kanchana Srinitiwarawong[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายของอาร์เคียในบ่อน้ำร้อนเบตง จังหวัดยะลา โดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยา ได้นำตัวอย่างดินตะกอนจากบ่อน้ำร้อนที่ระดับความลึก 10-20 เซนติเมตร ดินตะกอนมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 และอุณหภูมิของน้ำ ณ จุดที่เก็บตัวอย่าง คือ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการสกัดเมตาจีโนมิกดีเอนเอ จากตัวอย่างดินตะกอนด้วยวิธี SDS-based เมตาจีโนมิก ดีเอนเอที่ได้นำมาใช้เป็นดีเอนเอแม่แบบในการเพิ่มจำนวน 16S rDNA gene ของอาร์เคีย ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาด 1.1 kb จากนั้นโคลนลงในเวคเตอร์ pGEM-T easy และถ่ายโอนเข้าไปใน *E. coli* DH5α คัดเลือกโคลนโดยเทคนิค blue-white colony selection จากโคลนที่ได้ซึ่งมีสีขาวทั้งหมด 230 โคลนสุ่มคัดเลือกมา 40 โคลน เพื่อนำมาวิเคราะห์รูปแบบของดีเอนเอ ด้วยเทคนิค RFLP ซึ่งใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I ทำให้ได้ กลุ่มของ 16S rDNA gene อาร์เคียที่แตกต่างกัน 9 กลุ่ม

คำสำคัญ : บ่อน้ำร้อน เมตาจีโนมิกดีเอ็นเอ RFLP

ABSTRACT

The diversity of archaea in the Betong hot spring in Yala province, Thailand was investigated by a culture-independent molecular method. The hot spring sediment sample was taken at 10–20 cm below the surface, with pH of 8 and a water temperature of 65°C. Metagenomic DNA was extracted from the sediment sample by the SDS-based DNA extraction method. With Archaea-16S rDNA specific primers, the 1.1 kb PCR products were amplified from the metagenomic DNA. The PCR products were then cloned into a pGEM-T easy vector and transformed into *E. coli* DH5α. The transformants were selected by blue-white colony selection; subsequently, the 40 of 230-white colonies were randomly selected and RFL analysis was performed using *Rsa*I. Nine Archaea groups were differentiated.

Key Words : Hot spring, Metagenomic DNA, RFLP

E-mail : Ann_ka204@hotmail.com

[1] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112

คำนำ

การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในอดีตจะทำโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ การทดสอบทางชีวเคมี ตลอดจนการใช้กล้องจุลทรรศน์ ทำให้มีข้อจำกัดในการที่จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับจำนวน และชนิดของจุลินทรีย์ที่มีอยู่จริงในสิ่งแวดล้อม นับตั้งแต่ Giovannoni *et al*, 1990 ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในทะเลซากัสโซ (Sagasso sea) โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน 16S rRNA gene โดยตรงจากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม จนกระทั่งปัจจุบันมีการศึกษาบทบาทของยีนใน เมตาจีโนมิก ดีเอนเอหรือเรียกว่า the culture-independence, metagenomic approach วิธีการดังกล่าวนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแนวทางที่จะศึกษานิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก และเป็นที่ยอมรับว่าเทคนิคทางอณูชีววิทยาได้เพิ่มพูนความรู้เกี่ยวกับความอุดมสมบูรณ์ ความหลากหลาย และบทบาทของโปรคาริโอตที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ อากาศ และดิน เป็นต้น (Case *et al*, 2006) การศึกษาเมตาจีโนมจึงเป็นแนวทางที่จะนำไปสู่การค้นพบผลิตผลใหม่และสิ่งมีชีวิตใหม่ๆ ตลอดจนเข้าใจในบทบาทของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกันในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ

การศึกษาเมตาจีโนมในบริเวณที่มีสภาวะรุนแรง (extreme condition) เช่น แถบขั้วโลก ทะเล และ น้ำพุร้อน จัดว่าเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่น่าสนใจ สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ที่อาศัยอยู่ในสภาวะที่รุนแรงดังกล่าวคือแบคทีเรียและอาร์เคีย เรียกว่า extremophiles โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อน เรียกว่า thermophiles ซึ่งสามารถที่จะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิมากกว่า 45 องศาเซลเซียส บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิมากกว่า 80 องศาเซลเซียส เรียกกว่า hyperthermophiles (Madigan and Marrs, 1997) จากการศึกษาของ Kanokratana *et al* (2004) ได้รายงานความหลากหลายของแบคทีเรียและอาร์เคีย จากบ่อน้ำพุร้อนในประเทศไทยซึ่งกว่า 80% เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่จัดเป็นพวก thermophile ที่ยังไม่มีการรายงานว่าเคยพบที่ใดมาก่อน อาร์เคียจัดเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาในแง่ความหลากหลาย วิวัฒนาการ ตลอดจนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่น เอนไซม์ โปรติเอส ไลเปส เซลลูเลส ไคติเนส และอะไมเลส ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร สิ่งทอ และอาหารสัตว์ เป็นต้น (Burg, 2003)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะหาความหลากหลายของอาร์เคียในดินตะกอนจากบ่อน้ำร้อนเบตง จังหวัดยะลา

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินตะกอน 1 ตัวอย่างที่ระดับความลึกประมาณ 10-20 เซนติเมตร จากบ่อน้ำร้อนเบตง จังหวัดยะลา ตั้งอยู่ในภาคใต้ของประเทศไทย

การสกัดเมตาจีโนมิก ดีเอนเอจากดินตะกอนด้วยวิธี SDS- based DNA (Zhou *et al.*,1996)

ชั่งตัวอย่างดิน 1g เติม lysis buffer 2.7 ml (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Sodium phosphate pH 8.0, 1.5 M NaCl และ 1% (CTAB) และเติม protinase K (10 mg/ml) 20 µl เขย่าในแนวนอนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 20% SDS 300 µl บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปเซนตริฟิวก์ที่ความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ถ่าย supernatant

จากนั้นทำการสกัดเมตาจีโนมิก ดีเอนเอซ้ำอีกครั้ง ถ่าย supernatant ไปรวมกับ supernatant ที่ได้ในครั้งแรก สกัด supernatant ด้วย 1 volume chloroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v) นำไปเซนตริฟิวก์ที่ความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บของเหลวด้านบนนำไปตกตะกอน เมตาจีโนมิก ดีเอนเอ ด้วย 0.7 volume isopropanol จากนั้นนำไปเซนตริฟิวก์ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน เมตาจีโนมิก ดีเอนเอ ด้วย 70% ethanol ที่แช่เย็น เซนตริฟิวก์ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็น 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอน เมตาจีโนมิก ดีเอนเอด้วย 1X TE buffer

เพิ่มจำนวน 16S rDNA gene ของอาร์เคีย จากเมตาจีโนมิก ดีเอนเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ 16S rDNA gene ของอาร์เคีย (archaea forward 16S rDNA sequence 5'-ACGGGGCGCAGCAGGCGCGA-3´)และ(archaea reverse 16S rDNA sequence 5'- ACGGCTACCTT GTTACGACTT- 3´) (Yeates *et al*, 1998) ทำการเพิ่มปริมาณในหลอดทดลอง ซึ่งประกอบด้วย 200 µM dNTP, 0.2 µM primer, 0.5 units *Pfu*:*Taq* DNA polymerase, 1X reaction buffer และเมตาจีโนมิก ดีเอนเอ และปรับปริมาตรเป็น 20 µl ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.45 นาที จำนวน 35 รอบ นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ มาทำการวิเคราะห์โดยใช้อะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ตัดแถบดีเอนเอที่ได้ เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAgen gel extraction kit

โคลนนิ่งชิ้นส่วน 16S rDNA gene ของอาร์เคีย

ทำการเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์ 16S rDNA ของอาร์เคีย เข้ากับ pGEM-T Easy Vector จากนั้นทำการถ่ายโอนเข้า *Escherichia coli* DH5α ด้วยวิธี electroporation แล้วนำมาเลี้ยงบน LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะ transformants ที่มีโคโลนีสีขาว

สกัดพลาสมิดลูกผสมจากโคลนด้วยเทคนิค alkaline lysis (Sambrook and Russell, 2001)

นำโคลนที่สุ่มคัดเลือกไว้แล้ว โดยแต่ละโคลนจะนำมาเลี้ยงใน อาหารเหลว LB/ampicillin ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเซนตริฟิวก์ที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติม solution I ปริมาตร 100 µl เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม solution II 200 µl ผสมให้เข้ากัน และsolution III 150 µl ผสมให้เข้ากัน นำไป เซนตริฟิวก์ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนใส เติม phenol:chloroform (1:1 v/v) ผสมให้เข้ากัน นำไปเซนตริฟิวก์ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายส่วนใสชั้นบนในหลอดใหม่ ตกตะกอนด้วย 2 volume absolute ethanol ล้างตะกอนพลาสมิดด้วย 70% ethanol นำไปเซนตริฟิวก์ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ละลายด้วย 1X TE buffer แล้วนำมาวิเคราะห์พลาสมิด โดยการทำอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซีส

คัดเลือกพลาสมิดลูกผสมของ 16S rDNA gene อาร์เคียด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

นำพลาสมิดที่สกัดได้ในข้างต้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ซึ่งมีตำแหน่งขนาบอยู่ทั้งสองข้างของชิ้นส่วน 16S rDNA gene ที่สอดแทรกอยู่ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ว่ามีชิ้นส่วนที่ต้องการอยู่ด้วยการทำอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซีส

จัดกลุ่มของ 16S rDNA gene อาร์เคีย ด้วยเทคนิค RFLP

นำพลาสมิดลูกผสมที่ยืนยันแล้วว่ามีชิ้นส่วน 16S rDNA gene ของอาร์เคีย จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I และวิเคราะห์รูปแบบของดีเอนเอด้วยการทำอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นก็จัดรูปแบบต่างๆ ที่ได้ออกเป็นกลุ่ม

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสกัดเมตาจีโนมิก ดีเอนเอ

จากการสกัดเมตาจีโนมิก ดีเอนเอ ในดินตะกอนของบ่อน้ำร้อนเบตง จังหวัดยะลา ซึ่ง ณ จุดที่เก็บตัวอย่างมีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 8.0 เมตาจีโนมิก ดีเอนเอที่ได้มีลักษณะสีเหลืองอ่อน เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจล อิเล็คโตโฟรีซิส จะได้เมตาจีโนมิก ดีเอนเอส่วนใหญ่มีขนาดประมาณ 23 kb (Figure 1)

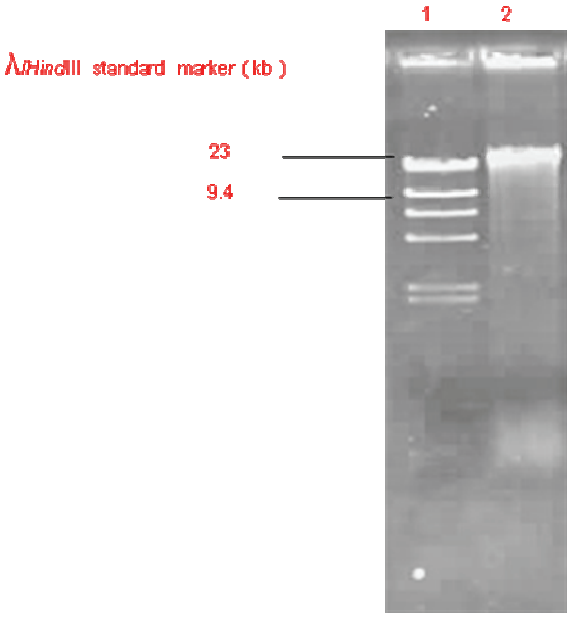

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of the metagenomic DNA. Lane 1: λ/*Hind*III standard marker Lane 2: Metagenomic DNA from hot spring sediment sample.

การเพิ่มจำนวน 16S rDNA gene ของอาร์เคียโดยเทคนิคพีซีอาร์

จากการเพิ่มจำนวน 16S rDNA gene ของอาร์เคีย ผลการทดลองได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 1.1 kp (Figure 2)

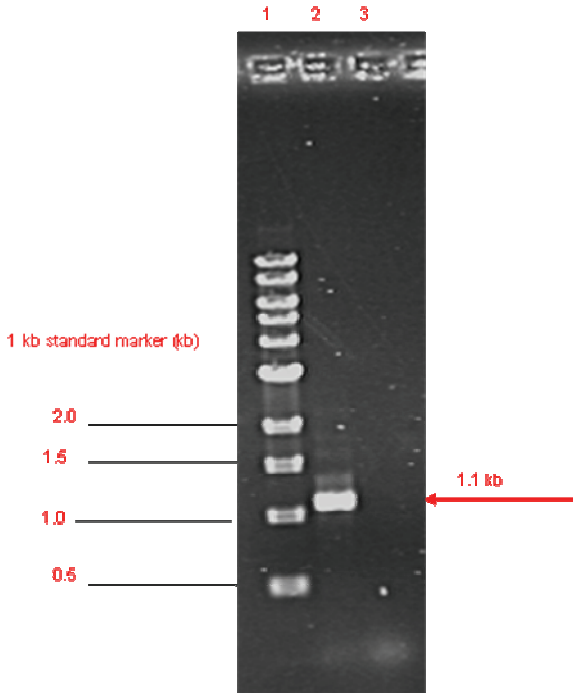

Figure 2 Agarose gel eletrophoresis of 1.1 kb of 16S rDNA PCR products using archaea primers. Lane 1: 1 kb standard marker Lane 2: PCR products Lane 3: Negative control.

การวิเคราะห์ 16S rDNA gene ของอาร์เคีย ด้วยวิธี RFLP

จากการสุ่มเลือกทรานฟอร์แมนที่ได้ของ 16S rDNA ของอาร์เคียจำนวน 40 โคลนจากทั้งหมด 230 โคลน มาวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Rsa*I ผลการทดลองเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่าทุกพลาสมิดลูกผสมที่คัดเลือกมามีชิ้นส่วนของ 16S rDNA gene ของอาร์เคียอยู่ โดยจะเห็นในส่วนของเวคเตอร์ (3.0 kb) และชิ้นส่วน 16S rDNA gene (1.1 kb) พบว่ามีอยู่อย่างชัดเจน (Figure 3)

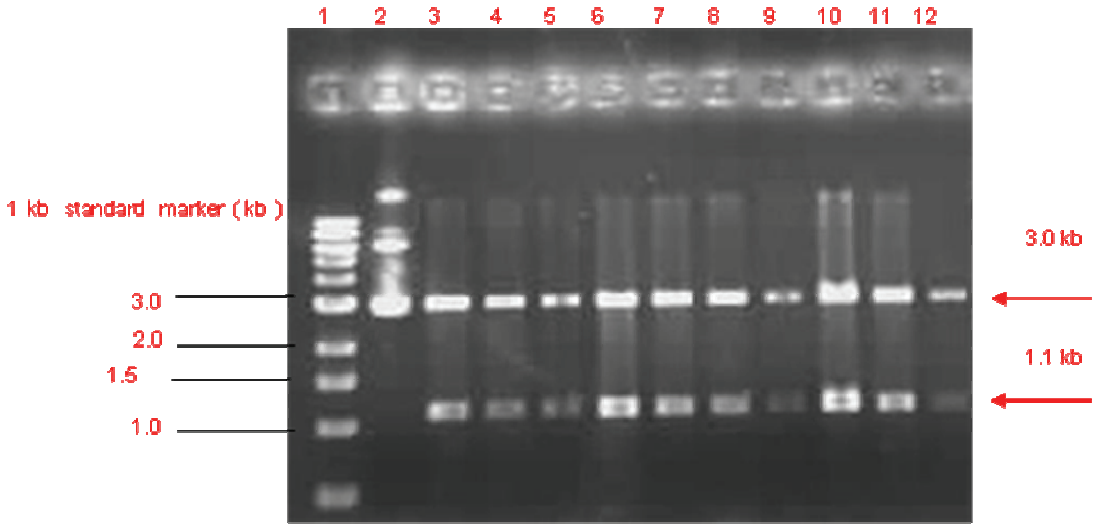

Figure 3 The recombinant plasmid was cut by *Eco*RI. Lane 1: 1 kb standard marker Lane 2: Uncut recombinant plasmid Lane 3-12: recombinant plasmid cut by *Eco*RI.

เมื่อได้พลาสมิดลูกผสมที่ตรวจสอบแล้วว่ามีชิ้นส่วนดีเอนเอที่ต้องการอยู่จริง จะนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I สามารถย่อยชิ้นส่วนพลาสมิดลูกผสมของอาร์เคียได้รูปแบบต่างๆ ทั้งหมด 9 กลุ่ม (Figure 4) แต่เนื่องจากว่าอาร์เคียที่อยู่ในดินตะกอนมีหลากหลายชนิดที่อยู่รวมกัน ซึ่งอาจจะมีอาร์เคียบางชนิดที่มีตำแหน่งที่ให้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I เข้าตัดได้ในตำแหน่งที่เหมือนกัน ดังนั้นก็จะต้องหาเอนไซม์ตัดจำเพาะอื่นๆ มาตัดเพิ่ม เช่น *Sau3*AI และ *Hae*III เพื่อที่จะได้จัดกลุ่มรูปแบบดีเอนเอต่างๆ ได้ถูกต้อง

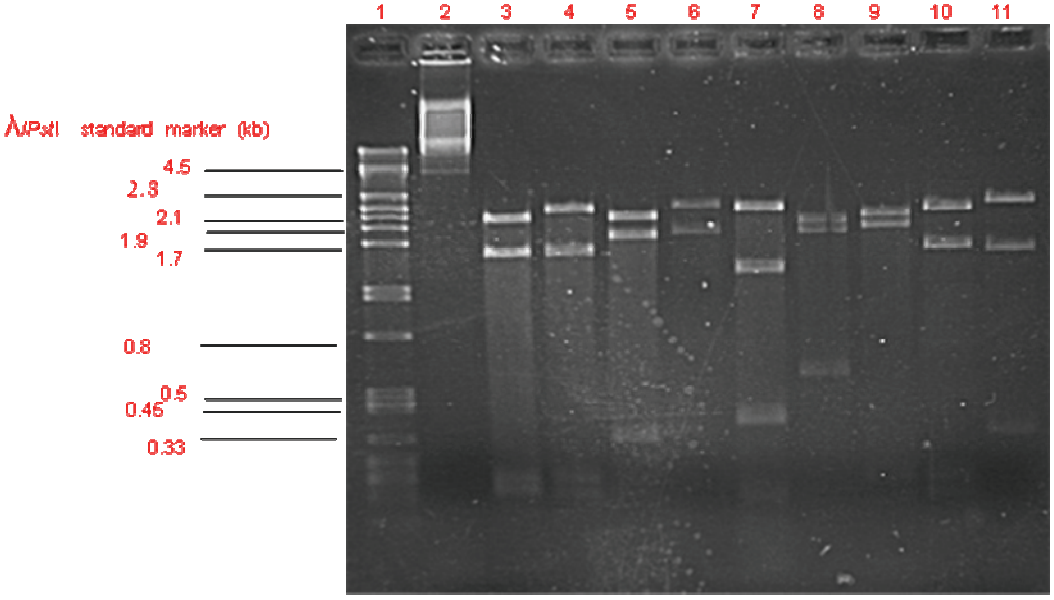

Figure 4 The recombinant plasmid was cut by *Rsa*I. Lane 1: λ/*Pst*I standard marker Lane 2: Uncut recombinant plasmid Lane 3-11: recombinant plasmid cut by *Rsa*I.

สรุป

จากการศึกษาหาความหลากหลายของอาร์เคีย โดยใช้ 16S rDNA gene ซึ่งเปรียบเสมือนยีนลายเซ็น (Signature gene) จึงสามารถใช้เป็นยีนที่นำมาหาความหลากหลายของอาร์เคียแต่ละชนิด ที่มีอยู่ในดินตะกอนจากบ่อน้ำร้อนเบตง จังหวัดยะลา เมื่อคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมแล้วด้วยวิธี RFLP ปรากฏว่าทำให้ได้รูปแบบของดีเอนเอที่แตกต่างกัน 9 กลุ่ม ซึ่งจะเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มเพื่อทำการหาลำดับเบสต่อไป ทำให้จะได้ทราบชนิดของอาร์เคียที่ทำการศึกษาจากดินตะกอนในบ่อน้ำร้อนเบตง จังหวัดยะลา ว่าเป็นอาร์เคียชนิดใดบ้างที่อาศัยอยู่ร่วมกันได้ในสภาวะที่รุนแรง (extreme condition) นี้ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัย จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

เอกสารอ้างอิง

Burg, VD.B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. Current Opinion in Microbiology 6: 213-218.

Case, R.J., Y. Boucher, I.Dahllof, C. Holmstrom, W.F. Doolittle, and S. Kjelleberg. 2006. Use of 16S rRNA and *rpo*B Genes as Molecular Ecology Studies. mApplied and Environmental Microbiology 73: 278-288.

Giovannoni, S.J., T.B. Britschgi, C.L. Moyer and K.G. Field. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. Nature 345: 60-63.

Kanokratana, P., S. Chanapan, K. Pootanakit and L. Eurwilaichitr. 2004. Diversity and abundance of Bacteria and Archaea in the Bor Khlueng hot Spring in Thailand. Basic Microbiology 44: 430-444.

Madigan, M.T. and B.L. Marrs. 1997. Extremophiles. Scientific. 82-87.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning : A Laboratory Manual Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, United States of America.

Yeates, C., M.R. Gillings, A.D. Davison, N. Altavilla and D.A. Veal. 1998. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. Biological Procedures Online 1: 40-47.

Zhou, J., M.A. Bruns and J.M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of divers composition. Appl Environ Microbiol 62: 316-22.