

การศึกษาการคงอยู่ของพลาสมิด pHentAI ใน *Bacillus subtilis* Study on Segregational Stability of pHentAI in *Bacillus subtilis*

อรอนงค์ สมทรัพย์¹ และ มณฑล เลิศคนawanichakul^{2*}
On-anong Somsap¹ and Monthon Lertcanawanichakul^{2*}

บทคัดย่อ

โคลนยีนแบคทีริโอซิน entAI จาก *Enterococcus faecium* N15 เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 α และ *Bacillus subtilis* ISW1214 ด้วยพลาสมิดพาหะ pHY300PLK ให้ชื่อว่า pHentAI ซึ่งแสดงการคงอยู่ของยีนเมื่อศึกษาด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *XbaI* และตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าประกอบด้วยชิ้นยีนขนาด 4.87 kb ของ pHY300PLK และ 0.7 kb ของ entAI และยังคงแสดงการคงอยู่ของยีน entAI เมื่อทำการย้ายพลาสมิดลูกผสม pHentAI เข้าสู่ *B. subtilis* ISW1214 เมื่อศึกษาด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แต่พบว่ามีการถ่ายทอด พลาสมิดลูกผสมไปยังรุ่นลูกได้เพียงแค่ 6 รุ่น ภายใต้สภาวะที่ไม่มียาปฏิชีวนะ

คำสำคัญ : เอนเทอโรคอคคัส ฟีเชียม เอ็น15 การคงอยู่ของพลาสมิด บาซิลลัส ซับติลิส ไอเอสดับเบิลยู1214 เอชเชอริเชีย โคลิดีเอ็ม 5 แอลฟา

Abstract

Bacteriocin gene, entAI, from *Enterococcus faecium* N15 was subcloned into *E. coli* DH5 α by using pHY300PLK as shuttle plasmid vector by means of transformation method. The recombinant bacteriocin gene, pHentAI, was digested with *EcoRI* and *XbaI* showed the structural stability, comprised of 4.87 kb fragment of pHY300PLK and 0.70 kb fragment of entAI gene when analysed by means of agarose gel electrophoresis. Then, pHentAI was transformed into *B. subtilis* ISW1214, showed the structural stability when analysed by means of polymerase chain reaction (PCR). The segregational stability of pHentAI was approximately 6 passages under non-selective condition.

Keywords : *Enterococcus faecium* N15, segregation stability, *B. subtilis* ISW1214, *E. coli* DH5 α

¹ นิสิตบัณฑิตศึกษา สาขาชีวเวชศาสตร์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80160

² ผศ. ดร. สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80160

* Corresponding author : E-mail : lmonthon@wu.ac.th

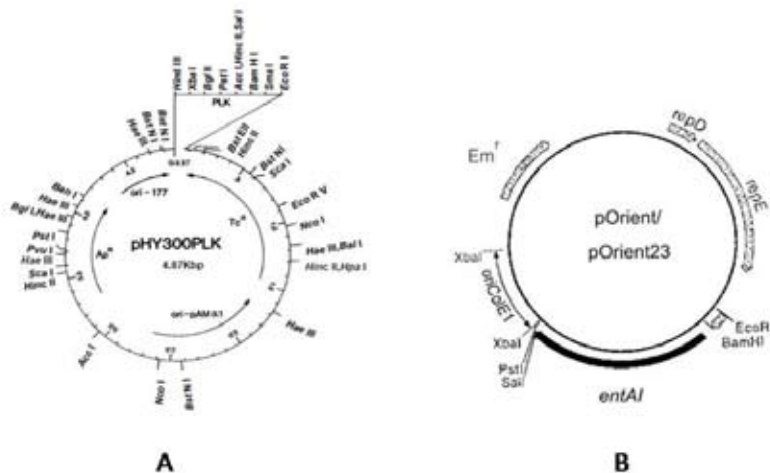
จากงานประชุมวิชาการระดับชาติครั้งที่ 22 ปี 2555

คำนำ

แบคทีเรียโอซินหมายถึงเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จากไรโบโซมและออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียซึ่งมีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotics) คือมีฤทธิ์ในการยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีสกุลใกล้เคียงกัน โดยพบว่าแบคทีเรียโอซินสามารถสร้างได้ทั้งจากแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบและแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก [1] และแบคทีเรียโอซินตัวแรกที่มีการค้นพบมีชื่อว่าคอลิซิน (colicin) ซึ่งผลิตจาก *Escherichia coli* เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแบคทีเรีย *E. coli* และแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae ค้นพบโดย Gratia ในปี ค.ศ. 1925 [2] แต่แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกเป็นที่ได้รับความสนใจมากที่สุด เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัยและมักใช้ในอาหารหมักและถนอมอาหารซึ่งอาจหมักตามธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรืออาจเติมแบคทีเรียแลคติกในรูปเชื้อตั้งต้นลงในอาหารภายใต้สภาวะควบคุมและจากรายงานของ [3] สามารถแยกเชื้อ *Enterococcus faecium* N15 จาก nuka (Japanese rice-bran paste) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินซึ่งจัดอยู่ใน class IIa และออกฤทธิ์ในการต้านทั้ง *L. monocytogenes* และ *B. circulans* JCM 2504 ได้ ปัจจุบันมีการจัดจำแนกแบคทีเรียโอซินออกเป็น 5 classes ดังนี้ Class I มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน) Class II มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน) ไม่มีอนุพันธ์ของกรดอะมิโนแลนไธนีน ซึ่ง class II มีสมาชิกมากที่สุดและมีฤทธิ์ในการต้าน *Listeria* spp. [4-5] Class III แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้มีขนาดใหญ่ ไม่ทนความร้อน ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ เฮลเวติซิน J (helveticin J) และเอนเทอโรไลซิน A (enterolysin A) Class IV แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้มีโมเลกุลและ/หรือลิพิดในโครงสร้างด้วยนอกเหนือจากส่วนที่เป็นโปรตีน ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้เช่น ลิโคซิน S (leucocin S) และแลคโตซิน 27 (lactocin 27) ซึ่งจะมีส่วนของไกลโคโปรตีนในโครงสร้างหรือ มีเอนเทอโรซิน 52 (mesenterocin 52) ซึ่งจะพบส่วนของลิพิดโปรตีนในโครงสร้างเป็นต้น [4] Class V แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นวงกลมเนื่องเกิดจากการเชื่อมต่อกันของสายเปปไทด์ระหว่างส่วนของปลายอะมิโน (N-terminus) และส่วนปลายคาร์บอกซิล (C-terminus) เช่น แกสเซอร์ซิน A (gasseracin A) เซอคูลาริน A (circularin A) และเอนเทอโรซิน AS-48 (enterocin AS-48) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียดั้งเดิมอาจยังมีปริมาณน้อยมากเนื่องจากมีการเก็บไว้ในเซลล์หรือการทำงานของระบบการควบคุมกระบวนการถอดรหัสไม่มีประสิทธิภาพที่ดีพอที่จะผลิตแบคทีเรียโอซินในปริมาณสูงได้ และนอกจากนี้เพื่อต้องการพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียดั้งเดิมที่ไม่มีความสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินให้เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินได้รวมถึงมีงานวิจัยที่สนับสนุนว่าการโคลนยีนผลิตสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรียดั้งเดิมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านชนิดใหม่ให้ผลผลิตในปริมาณที่สูงขึ้น ตัวอย่างเช่น Zhao และคณะ [6] ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *Pel A* ซึ่งเป็นยีนผลิตเอนไซม์ pectate lyase A จากเชื้อ *Aspergillus nidulans* โดยอาศัย expression vector VBSzqx และเมื่อทำการย้าย VBSzqx-*Pel A* เข้าสู่ *B. subtilis* ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านชนิดใหม่พบว่ามี การแสดงออกของยีน *Pel A* และมีการผลิตเอนไซม์ pectate lyase A ได้สูงสุดถึง 620 ยูนิต/มิลลิลิตร ดังนั้นจึงได้มีความพยายามปรับปรุงการแสดงออกของยีนแบคทีเรียโอซินจากกลุ่มของแบคทีเรียดั้งเดิมโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนแบคทีเรียโอซินในเซลล์เจ้าบ้านชนิดใหม่สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการโคลนยีนแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Ent. faecium* N15 [3] เข้าสู่ *B. subtilis* ISW1214 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) ซึ่งมีคุณสมบัติ คือ ไม่มีพลาสมิด ไม่คือต่อยาปฏิชีวนะ และไม่สร้างสารแล้วปล่อยออกนอกเซลล์ โดยอาศัยพลาสมิด pHY300PLK เป็นพลาสมิดเวกเตอร์ซึ่งสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวน

เตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ pHY300PLK หรือ pOrient23 จาก E. coli DH5 α ด้วยชุดสกัด QiAprep Miniprep Spin (QIAGEN, Germany)

พลาสมิด pHY300PLK (Takara Shuza C., Ltd, Kyoto, Japan) ใช้เป็น shuttle plasmid vector ซึ่งสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและมีการแสดงออกของยีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะเตตราไซคลินทั้งในเชื้อ *E. coli* และ *B. subtilis* (ภาพที่ 1 A) พลาสมิด pOrient23 [7] เป็นพลาสมิดลูกผสมที่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและมีการแสดงออกของยีนดื้อยาอิริโทรมัยซิน (Er) ทั้งใน *E. coli* และ *enterococci* และใช้พลาสมิดชนิดนี้เป็นแหล่งของยีน *entAI* (0.70 kb) ซึ่งเป็นยีนแบคทีริโอซินจาก *Ent. faecium* N15 (ภาพที่ 1 B)



ภาพที่ 1 แผนที่ยีนของ pHY300PLK (A) และแผนที่ยีนของ pOrient23 (B)

ตัดชิ้นยีน *entAI* จากพลาสมิด pOrient23 และตัดพลาสมิดพาหะ pHY300PLK ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *XbaI* ตรวจเช็คด้วยการทำ agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการเชื่อมต่อยีน *entAI* และพลาสมิด pHY300PLK ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase และทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *B. subtilis* ISW1214 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) ตามด้วยการคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB) ที่มียาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (tetracycline) ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่คัดเลือกได้ไปตรวจสอบยืนยันแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาตกโซ่พอลิเมอร์

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติครั้งที่ 22 ปี 2555

การศึกษาการคงอยู่ของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมใน *B. subtilis* ISW1214

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียาปฏิชีวนะ (non selective pressure)

สุมเลือกทรานส์ฟอร์แมนท์ *B. subtilis* ISW1214 [*B. subtilis* ISW1214 (pHentAI)] จำนวน 3 โคโลนี มาแยกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินความเข้มข้น 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (Cocono, Thailand) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อจากทุกๆ หลอดๆ ละ ประมาณ 1 loop ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB หลอดใหม่ที่ไม่มียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อที่สภาวะเดิมเป็นเชื้อรุ่นที่ 1 และถ่ายเชื้อต่อไปจากรุ่นที่ 1 จนถึงรุ่นที่ 30 (ระยะเวลา 30 วัน)

การศึกษา segregational stability

แบ่งเชื้อจากทุกหลอดที่เลี้ยงในสภาวะ non selective pressure ในแต่ละวัน (วันที่ 0 ถึงวันที่ 30) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและทำเจือจางแบบ 10 เท่า กระจายสารแขวนลอยเจือจางเชื้อลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีหรือไม่มียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของโคโลนีที่ดื้อยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินจากสูตร

$$\%Tetracycline\ resistant\ colony = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ} \times 100}{\text{จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารแข็ง LB ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ}}$$

การศึกษา structural stability

สุมโคโลนีจากการทำ segregational stability โดยสุม ISW(1), ISW(2), ISW(3) transformed *B. subtilis* ISW1214 ของวันที่ 6 จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีและไม่มียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน มาทำการสกัดและยีนยัดดีเอ็นเอโดยวิธี freeze-thaw หรือคั้นรูปในการแช่แข็งหรือการละลายในการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C โดยมี positive control คือ *entAI* ที่มีขนาดดีเอ็นเอ 700 bp แล้วทำการยีนยัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอร์โดยใช้คู่ของไพรเมอร์และสภาวะในการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ [3]

ผลการวิจัย

การสร้างพลาสมิดลูกผสม pHentAI

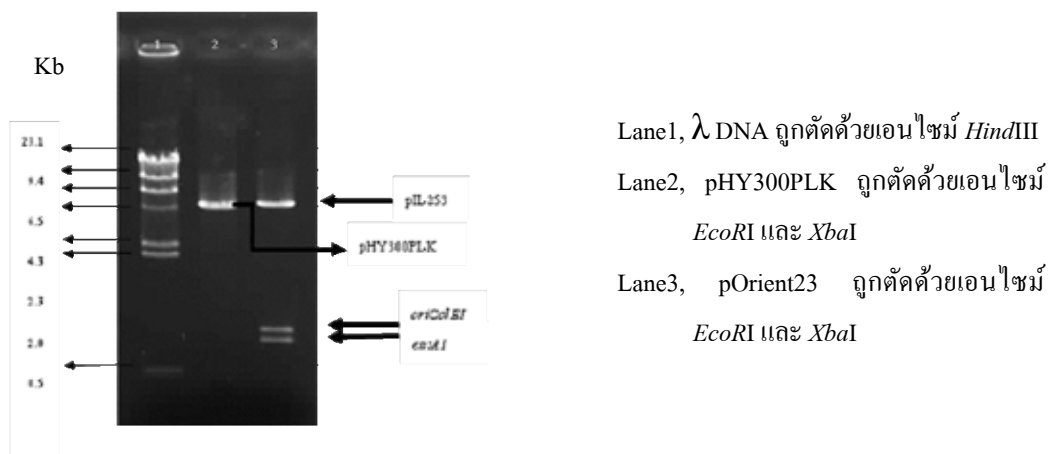
เมื่อตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pHY300PLK และ pOrient23 ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *XbaI* พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาด 4.87 kb ของ pHY300PLK (Lane 2 ภาพที่ 2) และแถบดีเอ็นเอ 3 ขนาดคือ 5.9, 0.89 และ 0.7 kb ของ pOrient23 (Lane 3 ภาพที่ 2) เชื่อมพลาสมิด pHY300PLK และชิ้นยีน *entAI* ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase แล้วย้ายสู่ *E. coli* DH5 α โดยวิธี heat shock transformation ปรากฏว่าได้ทรานส์ฟอร์แมนท์ทั้งหมด 2 ไอโซเลท ตั้งชื่อว่า pHentAI (4) และ pHentAI (6) ตามลำดับและสกัดพลาสมิดลูกผสมจาก *E. coli* DH5 α (ภาพที่ 3A) ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *XbaI* เพื่อตรวจสอบความเสถียรของโครงสร้างพลาสมิดลูกผสม (Structural stability) ดังกล่าวพบว่าทั้ง pHentAI (4) และ pHentAI (6) ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 4.87 kb ของ pHY300PLK และ 0.70 kb ของ *entAI* (Lane 4-5 ภาพที่ 3B)

ศึกษาการคงอยู่ของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมใน *B. subtilis* ISW1214

พลาสมิดลูกผสม pHentAI นำเข้าสู่เชื้อ *B. subtilis* ISW1214 ด้วยวิธี competent cell transformation พบว่าได้ทรานส์ฟอร์มเม้นท์ 3 ไอโซเลท คือ ISW(1), ISW(2), ISW(3) แล้วศึกษาการคงอยู่ของพลาสมิดดังกล่าวใน *B. subtilis* ISW1214 ภายใต้สภาวะที่ไม่มียาปฏิชีวนะพบว่า การคงอยู่ของ pHentAI ใน *B. subtilis* ISW1214 จะค่อยๆ ลดลงในแต่ละรุ่น และสามารถคงอยู่ได้เพียง 6 รุ่น (ภาพที่ 4) ศึกษาความเสถียรโครงสร้างพลาสมิดลูกผสมด้วยการสุมโคโลนีจากการทำ segregational stability จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีและไม่มียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินพบว่าการคงอยู่ของยีนภายใต้สภาวะที่มียาปฏิชีวนะ แต่ไม่พบการคงอยู่ของพลาสมิดภายใต้สภาวะที่ไม่มียาปฏิชีวนะเนื่องจากไม่แสดงแถบดีเอ็นเอ เมื่อตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 5)

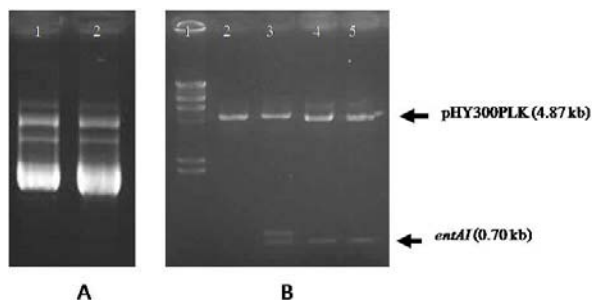
สรุปผลการวิจัย

เมื่อทำการย้ายยีนยีนแบคทีเรียโอซิน *entAI* จาก *Ent. faecium* N15 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยพลาสมิดพาหะ pHY300PLK ได้พลาสมิดลูกผสมชื่อ pHentAI ซึ่งมีการคงอยู่ของยีนเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือด้วยวิธี PCR และตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสทั้งใน *E. coli* DH5 α และ *B. subtilis* ISW1214 เมื่อย้าย pHentAI เข้าสู่เชื้อ *B. subtilis* ISW1214 แสดงการคงอยู่ของพลาสมิดแต่มีการถ่ายทอดพลาสมิดลูกผสมได้เพียง 6 รุ่น เมื่อเลี้ยงในสภาวะไม่มียาปฏิชีวนะ



ภาพที่ 2 แสดง Agarose gel electrophoresis patterns ของ pOrient23 และ pHY300PLK ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Xba*I

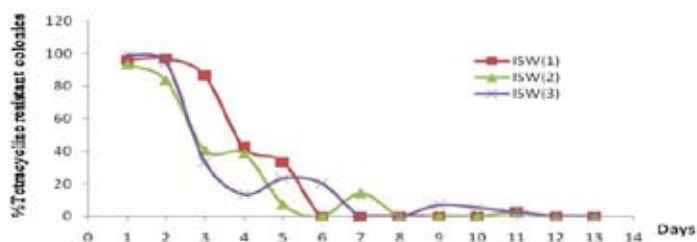
จากงานประชุมวิชาการระดับชาติครั้งที่ 22 ปี 2555



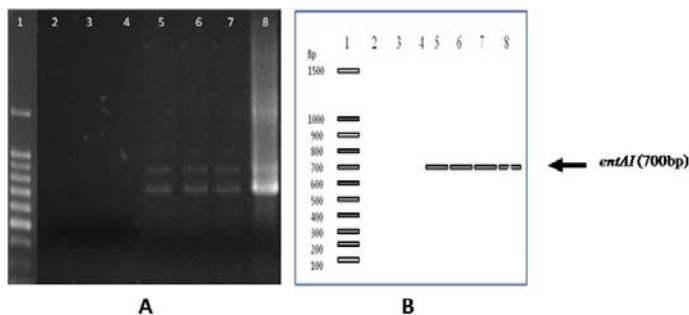
ภาพที่ 3 แสดง Agarose gel electrophoresis patterns ของพลาสมิด pHentAI (A) และแถบดีเอ็นเอจาก (A) ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *XbaI* (B)

A: lane 1, pHentAI(4); lane 2, pHentAI(6) ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *XbaI*

B: lane 1, λ DNA ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII*; lane 2, pHY300PLK = 4.87 Kb; lane 3, pOri23 = (pOri253 = 5.9 Kb, *oriColE* = 0.89 Kb, *entAI* = 0.7 Kb); lane 4, pHentAI(4) = (4.87 Kb, 0.7 Kb); lane 5, pHentAI(6) = (4.87 Kb, 0.7 Kb) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *XbaI*



ภาพที่ 4 การคงอยู่ของพลาสมิด pHentAI ในเชื้อ *B. subtilis* ISW1214 เลี้ยงทรานส์ฟอร์ม์แมนทีในสภาวะ non-selective pressure (LB broth)



ภาพที่ 5 แสดง Agarose gel electrophoresis patterns ของ *entAI* ใน transformed *B. subtilis* ISW 1214 จากการศึกษ structural stability ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

Lane 1, 100bp DNA Ladder marker; Lane 2-4, พลาสมิด pHentAI จาก ISW(1), ISW(2), ISW(3) รุ่นที่ 6 ภายใต้สภาวะที่ไม่มียาปฏิชีวนะ; Lane 5-7, พลาสมิด pHentAI จาก ISW(1), ISW(2), ISW(3) รุ่นที่ 6 ภายใต้สภาวะที่มียาปฏิชีวนะ; Lane 8, *entAI* (positive control)

อภิปรายผลการวิจัย

ปัจจุบันนี้แบคทีเรียโอซินได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในทางด้านอุตสาหกรรม ทางด้านการศึกษาและทั้งในด้านการแพทย์เนื่องจากแบคทีเรียโอซินเป็นโปรตีนที่มีการออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียและนอกจากนี้ยังเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีสกุลใกล้เคียงกัน [1] เพื่อต้องการพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียดั้งเดิมที่ไม่มีความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินให้เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเปลี่ยนพาหะเพื่อการถ่ายโอนยีน (subclone) ผลิตแบคทีเรียโอซินจาก *Ent. faecium* N15 เข้าสู่เชื้อ *E. coli* DH5 α และเชื้อ *B. subtilis* ISW1214 โดยใช้พลาสมิดพาหะ pHY300PLK ให้ชื่อว่า pHentAI และจากการศึกษาการคงอยู่ของ pHentAI ใน *B. subtilis* ISW1214 ภายใต้สภาวะที่ไม่มียาปฏิชีวนะพบว่าพลาสมิดถูกผสมดังกล่าวดังกล่าวสามารถคงอยู่ในเซลล์เข้าบ้านได้เพียง 6 รุ่นเท่านั้นเนื่องจากพลาสมิดถูกชนิดนี้ถูกทำให้มีการแสดงออกและการคงอยู่ภายใต้สภาวะที่ไม่มียาปฏิชีวนะ ดังนั้นในสภาวะที่ไม่มียาปฏิชีวนะอาจทำให้พลาสมิดถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์ copy number จึงลดลงและจากการศึกษาของ Ghosh และคณะ [8] รายงานว่าการคงอยู่ของพลาสมิดจะถูกควบคุมโดยระบบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของพลาสมิดเหล่านั้น ทั้งนี้พบว่าการสูญหายของ พลาสมิดเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการแบ่งเซลล์เนื่องจากการกระจายที่ไม่สม่ำเสมอรวมถึงมีปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อการคงอยู่ของพลาสมิดดังตัวอย่าง เช่น โครงสร้างของพลาสมิด copy number และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ [9,10] เช่น เมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงทำให้การคงอยู่ของพลาสมิดใน *Streptomyces lividans* ลดลง [11] พบว่าที่พีเอชต่ำจะเพิ่มการคงอยู่ของพลาสมิดใน *Yersinia enterocolitica* [12] เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* ในอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลให้การคงอยู่ของพลาสมิดจะลดลง [13] นอกจากนี้พบว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลต่อการคงอยู่ของพลาสมิดด้วย [14] รวมถึงการแสดงออกที่มากเกินไปของยีนที่อยู่บนพลาสมิดด้วยเช่นกัน [15],[13],[16] ดังนั้นการศึกษาการคงอยู่ของพลาสมิดภายใต้สภาวะที่ไม่มียาปฏิชีวนะเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียให้มีการผลิตแบคทีเรียโอซินในระดับที่สูงขึ้นรวมถึงลดการใช้ยาปฏิชีวนะ

เอกสารอ้างอิง

- [1] อรอนงค์ พริ้งสุลกะ. (2550). แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. วารสารวิทยาศาสตร์. มศว, 23(2), 145-160.
- [2] Konisky J. (1982). Colicins and other bacteriocins with established modes of action. **Annual Review of Microbiology**. 36, 125-144.
- [3] Losteinkit C, Uchiyama K, Ochi S, Takaoka T, Nagahisa K, shioya S. (2001). Characterization of Bacteriocin N15 Produced by Enterococcus faecium N15 and Cloning of the Related Genes. **Bioscience and Bioengineering**. 4, 390-395.
- [4] Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Review**. 12, 39-85.
- [5] Nes IF, Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. 70, 113-128.

- [6] Zhao, Q., Ding, R., Kang, Y., Chen, J. (2008). Expression of pectate lyase A from *Aspergillus nidulans* in *Bacillus subtilis*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**. 24, 2607–2612.
- [7] Lercanawanichakul M. (2007). Construction of plasmid Vector for Expression of bacteriocin N15-Encoding Gene and Effect of Engineered Bacteria on *Enterococcus faecalis*. **Current Microbiology**. 54, 108-112.
- [8] Ghosh S. K, Hajra S, Paek A and Jayaram M. (2006). Mechanisms for Chromosome and Plasmid Segregation. **Annual Review Biochemistry**. 75, 211-241.
- [9] Remaut E., Stanssens P., Fiers W. (1981). Plasmid vectors for high efficiency expression controlled by the *pt* promoter of coliphage lambda. **Gene**. 15, 81-93.
- [10] Stueber D., Bujard H. (1982). Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes. **EMBO Journal**. 1, 1399-1404.
- [11] Wrigley-Jones C.A., Richards H., Thomas C.R., Ward J.M. (1993). Stability of plasmid vector pIJ303 in *Streptomyces lividans* TK24 during laboratory-scale fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**. 41, 48-155.
- [12] Li, H., Bhaduri, S. and Magee, W.E. (1998). Maximizing plasmid stability and production of released proteins in *Yersinia enterocolitica*. **Applied Environment and Microbiology**. 64, 1812-1815.
- [13] Corchero, J. L. and Villaverde, A. (1998). Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. **Biotechnology and Bioengineering**. 58, 625–632.
- [14] O'Kennedy R, Houghton CJ, Patching JW. (1995). Effects of growth environment on. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 44(1-2), 126-132
- [15] Glick, B.R. (1995b). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances*. 13, 247–261.
- [16] Bhattacharay S.K., Dubey, A.K. (1995). Metabolic burden as reflected by maintenance coefficient of recombinant *Escherichia coli* overexpression target gene. **Biotechnology Letters**. 17, 1155-1160.