

แบคทีริโอเฟจ: ชีววิทยาและการประยุกต์ใช้ Bacteriophages: Biology and Applications

ปาริชาติ พุ่มขจร และ พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ*

Parichat Phumkhachorn and Pongsak Rattanachaikunsopon*

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University.

*E-mail: rattanachaikunsopon@yahoo.com

Received: May 08, 2018

Revised: Nov 28, 2018

Accepted: Jan 25, 2019

บทคัดย่อ

แบคทีริโอเฟจหรือเฟจคือไวรัสที่บุกรุกแบคทีเรีย แบคทีริโอเฟจมีอยู่เป็นจำนวนมากบนโลกและพบอาศัยอยู่ในทุกระบบนิเวศ แบคทีริโอเฟจถูกค้นพบมานานกว่าร้อยปี คุณสมบัติของแบคทีริโอเฟจไม่ต่างจากไวรัสโดยทั่วไปคือมีความหลากหลายทั้งในด้านรูปร่างและชนิดของสารพันธุกรรม สารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจอาจเป็น DNA หรือ RNA อย่างใดอย่างหนึ่งและถูกห่อหุ้มไว้ด้วยโปรตีนหรือแคปซิด แคปซิดของแบคทีริโอเฟจอาจมีรูปร่างเป็นรูปหลายเหลี่ยม มีลักษณะเป็นเส้นใย หรือมีลักษณะเป็นส่วนหัวและหาง ในการเริ่มต้นบุกรุกเซลล์แบคทีเรีย แบคทีริโอเฟจจะต้องไปยึดเกาะกับโครงสร้างด้านนอกของโฮสต์เซลล์ก่อน โดยแบคทีริโอเฟจใช้ส่วนที่เป็นโปรตีนยึดเกาะ (attachment protein) ไปจับกับที่รับ (receptor) ซึ่งอยู่บนผิวเซลล์ ในเซลล์ที่ติดเชื้อแบคทีริโอเฟจสามารถมีวงจรชีวิตได้สองแบบคือไลติกหรือไลโซจีนิค คณะกรรมการระหว่างประเทศเกี่ยวกับอนุกรมวิธานของไวรัส (ICTV) ได้จัดแบคทีริโอเฟจไว้ในอันดับ (order) *Caudovirales* ตามรูปร่างและชนิดของสารพันธุกรรม มากกว่า 96% ของแบคทีริโอเฟจเป็นแบคทีริโอเฟจที่มีหางและมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ หลังจากที่มีการค้นพบแบคทีริโอเฟจ นักวิจัยจำนวนมากมองเห็นถึงศักยภาพของแบคทีริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรีย และเชื่อว่าน่าจะสามารถนำแบคทีริโอเฟจมาใช้เป็นยารักษาโรคได้ แต่แนวคิดในการต่อยอดงานวิจัยดังกล่าวได้หยุดชะงักลงหลังจากที่มีการค้นพบยาปฏิชีวนะ ปัจจุบันแบคทีริโอเฟจได้กลายมาเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับนักเทคโนโลยีชีวภาพ แบคทีริโอเฟจถูกนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น เป็นพาหะสำหรับการโคลนนิ่ง (cloning vector) เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสำหรับควบคุมโรคติดเชื้อ (phage therapy) เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยชนิดแบคทีเรียก่อโรค (phage typing) เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีริโอเฟจยังถูกนำไปใช้ในงานบางอย่าง (phage display) เพื่อให้โปรตีนที่สนใจไปปรากฏอยู่บนโปรตีนที่ผิวด้านนอกของแบคทีริโอเฟจ ในบทความนี้ได้กล่าวสรุปเกี่ยวกับการนำแบคทีริโอเฟจไปประยุกต์ใช้ในงานเหล่านี้

คำสำคัญ : แบคทีริโอเฟจ เฟจ การประยุกต์ใช้

Abstract

Bacteriophages or phages are viruses that infect bacteria. Bacteriophages are the most abundant viral entity on earth and exist in all the ecosystems. Bacteriophages were discovered over one hundred year ago. Like other types of viruses, bacteriophages vary in their shape and genetic makeups (genome). Bacteriophage genomes can consist of either DNA or RNA, surrounded by a protein coat. The capsid of a bacteriophage can be polyhedral, filamentous or head-tail structure. To start an infection, a bacteriophage virion has to first attach onto the surface of their host cell by the recognition of receptors on its host and phage attachment protein. In host cell, bacteriophages can propagate in two possible life cycles; lytic cycle and lysogenic cycle. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) classifies the bacteriophages under an order *Caudovirales* according to morphology and nucleic acid type. Over 96% of bacteriophages are tailed and contain double-stranded DNA. After the discovery of bacteriophages, many researchers thought about the potential of bacteriophages on killing bacteria, which could possibly make them as therapeutic agents. But most of this research effort stopped soon after the discovery of antibiotics. Today, bacteriophages have become an important instrument to biotechnologists. They have been exploited for various purposes like cloning vectors for gene cloning, antibacterial agents for controlling of infection, and effective diagnostics for detection of bacterial pathogens. They are also being used for phage display systems for revealing the peptide of interest on phage coat protein. In this review article all these applications have been summarized.

Keywords: Bacteriophage, phage, application

1. บทนำ

แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) หรือเรียกสั้น ๆ ว่า เฟจ (phage) คือไวรัสของแบคทีเรีย (bacterial virus) แบคทีริโอเฟจเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก มีการดำรงชีวิตแบบปรสิตและจำเป็นต้องอาศัยอยู่ในเซลล์ (obligate intracellular parasite) แบคทีเรียที่แบคทีริโอเฟจอาศัยเรียกว่า โฮสต์ (host) แบคทีริโอเฟจนับเป็นไวรัสที่มีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนสารชีวโมเลกุลของระบบนิเวศ เพราะสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียที่มีอยู่จำนวนมากในสิ่งแวดล้อม ทำให้ได้สารชีวโมเลกุลที่อยู่ในเซลล์เหล่านั้นกลับคืนสู่ธรรมชาติ และสามารถถูกนำกลับไปใช้ได้โดยสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นต่อไป แบคทีริโอเฟจสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย แบคทีริโอเฟจมีความจำเพาะ (specific) ต่อโฮสต์ค่อนข้างสูง โฮสต์ของแบคทีริโอเฟจบางชนิดจึงอาจเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเท่านั้น เมื่อแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ถูกบุกรุก (infect) ด้วยแบคทีริโอเฟจ แบคทีริโอเฟจจะเพิ่มจำนวนโดยอาศัยกลไกภายในเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อสร้างโปรตีนและสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ วิธีการดำรงชีวิตของแบคทีริโอเฟจภายในเซลล์อาจเป็นแบบ lytic cycle หรือแบบ lysogenic cycle ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีริโอเฟจ การจัดจำแนกแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage classification) อาศัยเกณฑ์หลายอย่าง เช่น ความจำเพาะต่อโฮสต์ รูปร่างของแบคทีริโอเฟจ และชนิดของสารพันธุกรรม เป็นต้น การศึกษาชีววิทยาของแบคทีริโอเฟจจนเข้าใจธรรมชาติของแบคทีริโอเฟจ ช่วยให้สามารถนำแบคทีริโอเฟจไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น เทคโนโลยีชีวภาพ การแพทย์และอุตสาหกรรม

2. การค้นพบแบคทีริโอเฟจ

“phage” มาจากคำว่า “phagein” ในภาษากรีกซึ่งแปลว่า “กิน” สาเหตุที่ใช้คำนี้เป็นชื่อเรียกไวรัสที่มีโฮสต์เป็นแบคทีเรียน่าจะเนื่องมาจากแบคทีริโอเฟจมีความสามารถในการกำจัดหรือทำลายแบคทีเรีย หรือมี antibacterial activity นั่นเอง ความสามารถดังกล่าวนี้ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Ernest Hanbury Hankin นักจุลชีววิทยาชาวอังกฤษเมื่อประมาณปี ค.ศ. 1896 เขาพบว่าน้ำจากแม่น้ำ Ganga river และ Yamuna river ในประเทศอินเดียมีสิ่งมีชีวิตบางอย่างที่สามารถฆ่าหรือทำลายแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคอหิวาตกโรค (cholera) ได้ โดยสิ่งมีชีวิตดังกล่าวมีขนาดเล็กมาก สามารถผ่านแผ่นกรองจุลินทรีย์ (membrane filterable) และไม่ทนความร้อน (heat labile) [1] อย่างไรก็ตามการค้นพบของ Hankin ในขณะนั้นยังไม่ค่อยได้รับการยอมรับมากนัก

ต่อมาในปี ค.ศ. 1915 Frederick William Twort นักจุลชีววิทยาชาวอังกฤษได้พบปรากฏการณ์ของไวรัสที่สามารถทำให้แบคทีเรีย *Micrococcus* เกิดการเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่เรียกว่า “transmissible glassy transformation” โดยเขาเชื่อว่าไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ภายในเซลล์แบคทีเรียและสามารถ

ทำลายแบคทีเรียได้ อีกสองปีต่อมา (ปี ค.ศ. 1917) Felix d’Herelle นักจุลชีววิทยาชาวฝรั่งเศส-แคนาดาค้นพบปรากฏการณ์ของไวรัสอีกลักษณะหนึ่ง คือ เป็นจุดใสขนาดเล็ก (ต่อมาเรียกว่า plaque) ที่เกิดจากไวรัสไปทำลายแบคทีเรีย *Shigella* ซึ่งเจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และเรียกลักษณะดังกล่าวนี้ว่า “bacteriophage phenomenon” ผลงานของเขาได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในเวลาต่อมา ดังนั้นจึงถือว่า d’Herelle เป็นนักวิทยาศาสตร์คนแรกที่เรียกไวรัสของแบคทีเรียว่า “แบคทีริโอเฟจ” [1] และทำให้แบคทีริโอเฟจเป็นที่รู้จักตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา อย่างไรก็ตามเมื่อกล่าวถึงบุคคลที่ค้นพบแบคทีริโอเฟจมักจะอ้างอิงและให้เกียรติแก่นักวิทยาศาสตร์ทั้งสองท่านคือ Twort และ d’Herelle เนื่องจากเป็นผู้ที่ค้นพบแบคทีริโอเฟจในเวลาใกล้เคียงกัน แตกต่างกันเพียงปรากฏการณ์ของแบคทีริโอเฟจที่พบเท่านั้น

3. โครงสร้างของแบคทีริโอเฟจ

แบคทีริโอเฟจมีขนาดตั้งแต่ 20-200 นาโนเมตร (nanometer; nm) มีโครงสร้างหรือส่วนประกอบสำคัญคือสารพันธุกรรม (genome) หรือกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) และมีโปรตีนห่อหุ้มสารพันธุกรรมไว้เรียกว่าแคปซิด (capsid) ซึ่งมักมีรูปร่างเป็นรูปหลายเหลี่ยม (polyhedral) โปรตีนหน่วยย่อยที่มาประกอบกันเป็นโครงสร้างแคปซิดเรียกว่า capsomer (หรือ capsomere) สารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจอาจเป็น DNA หรือ RNA อย่างใดอย่างหนึ่ง ทั้งนี้สารพันธุกรรมอาจมีรูปร่างเป็นเส้น (linear) เป็นวง (circular) หรือแบ่งเป็นหลายอัน (segmented) [2] แบคทีริโอเฟจบางชนิดมีเพียงสารพันธุกรรมหุ้มด้วยแคปซิดเพียงเท่านั้น แต่บางชนิดมีโครงสร้างเป็นท่อยาวยาวต่อออกมาจากแคปซิด จึงทำให้รูปร่างดูเหมือนมีส่วนหัว (head) และส่วนหาง (tail) และเรียกแบคทีริโอเฟจกลุ่มนี้ว่า tailed bacteriophage (Figure 1) นอกจากนี้ที่ส่วนหางยังอาจพบโครงสร้างอื่น ๆ เพิ่มเติมได้ด้วย เช่น base plate, tail fiber เป็นต้น [3] การมีหาง การยึด-หดได้ของหาง ชนิดของโฮสต์ และการมีไขมันหุ้มแคปซิดไว้อีกชั้นหนึ่งซึ่งเรียกว่า เอนเวลลอป (envelope) มีส่วนช่วยในการจำแนกชนิดของแบคทีริโอเฟจ [4]

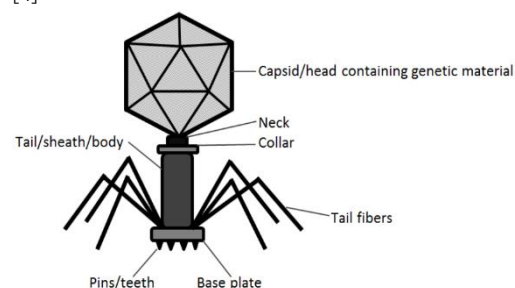


Figure 1 Structure tailed bacteriophage [5]

4. การบุกรุกเข้าสู่เซลล์

การบุกรุก (penetration) ของแบคทีริโอเฟจเข้าสู่โฮสต์เซลล์ (host cell) เป็นขั้นตอนที่สำคัญของการติดเชื้อ (infection) ขั้นตอนนี้มีความจำเพาะ (specificity) สูงมาก กล่าวคือแบคทีริโอเฟจชนิดใดชนิดหนึ่งมักจะบุกรุกแบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียวสายพันธุ์หนึ่งเท่านั้น แบคทีริโอเฟจที่มีโฮสต์เพียงชนิดเดียวจัดเป็น narrow-host range bacteriophage อย่างไรก็ตาม แบคทีริโอเฟจบางชนิดสามารถบุกรุกโฮสต์ได้มากกว่าหนึ่งชนิดหรืออาจบุกรุกแบคทีเรียต่าง الجنس (genus) แต่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม แบคทีริโอเฟจที่สามารถบุกรุกโฮสต์ได้หลายชนิดจัดเป็น broad-host range bacteriophage [6]

ความจำเพาะระหว่างแบคทีริโอเฟจกับโฮสต์เกิดขึ้นโดยอาศัยการจับกันระหว่างตำแหน่งที่อยู่บนไวรัส (virion) ของแบคทีริโอเฟจเรียกว่า attachment site กับตำแหน่งที่อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียเรียกว่า receptor site ซึ่งอาจอยู่ที่ flagella และ cell wall (Figure 2) จากนั้นสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจจะถูกนำเข้าสู่เซลล์และเข้าสู่กระบวนการเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจต่อไป แบคทีริโอเฟจบางชนิดสามารถปล่อยเฉพาะสารพันธุกรรมเข้าไปภายในเซลล์โดยวิธีการฉีดสารพันธุกรรม (genome injection) ซึ่งมีกลไกคล้ายกับการฉีดยา (syringe-like mechanism) และทิ้งโครงสร้างอื่นไว้นอกเซลล์ (Figure 3)

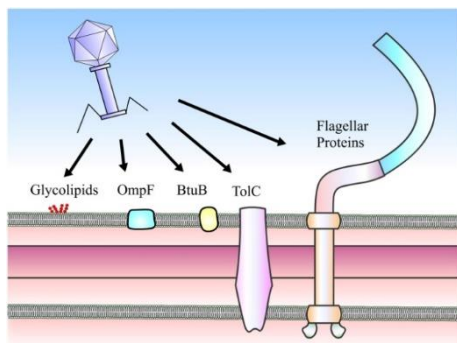


Figure 2 Specificity between a bacteriophage and receptor sites on a host cell: glycolipids (O antigen และ Vi antigen), integral membrane protein (เช่น OmpF, BtuB และ TolC), flagella protein (เช่น FliC, FliJ และ FliK) [9]

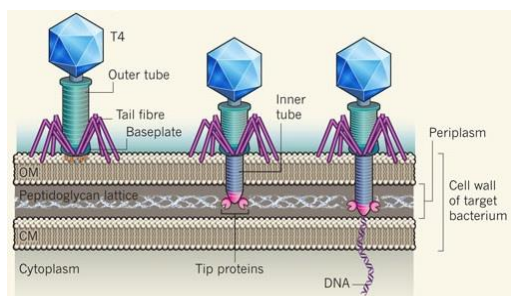


Figure 3 Genome injection [10]

5. การดำรงชีวิตภายในเซลล์

การเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage replication) ภายในเซลล์แบคทีเรียสามารถแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ lytic cycle และ lysogenic cycle หรือ lysogeny (Figure 4) การเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจเริ่มต้นจากขั้นตอนแรก คือ การยึดเกาะของแบคทีริโอเฟจกับโฮสต์ เรียกว่า attachment หรือ adsorption โดยอาศัยความจำเพาะระหว่างโปรตีนโครงสร้างของแบคทีริโอเฟจและโปรตีนบนผิวเซลล์ของโฮสต์ตามที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นแบคทีริโอเฟจจะปล่อยสารพันธุกรรมเข้าไปภายในเซลล์ และใช้กลไกต่างๆ ภายในเซลล์เพื่อการเพิ่มจำนวน โดยเริ่มจากการสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพันธุกรรม (genome replication) จากนั้นจึงสร้างโปรตีนโครงสร้างที่เป็นส่วนประกอบของแบคทีริโอเฟจ (structural protein) แล้วนำส่วนประกอบต่างๆ ที่ถูกสร้างขึ้นเหล่านั้นมารวมกัน (assembly) กลายเป็นแบคทีริโอเฟจ จำนวนมากเกิดขึ้นภายในเซลล์ เรียกว่า progeny phage แล้วสร้างเอนไซม์บางอย่างออกมาทำลายเยื่อหุ้มเซลล์จนทำให้โฮสต์เซลล์แตกเพื่อปลดปล่อย (release) progeny phage ออกมาสู่ภายนอก การเพิ่มจำนวนในลักษณะเช่นนี้ของแบคทีริโอเฟจ เรียกว่า lytic cycle และแบคทีริโอเฟจที่ดำรงชีวิตแบบนี้เรียกว่า lytic phage หรือ virulent phage

แบคทีริโอเฟจบางชนิดหลังจากปล่อยสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์แล้วไม่ทำให้เกิดการสร้าง progeny phage ภายในเซลล์และไม่ทำให้เซลล์แตก แต่กลับนำสารพันธุกรรมเข้าไปแทรก (integrate) อยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรีย สารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจที่แทรกอยู่ในโครโมโซมในลักษณะเช่นนี้เรียกว่า prophage เมื่อแบคทีเรียแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน (binary fission) สารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจจะยังคงแทรกอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรียทุกเซลล์ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ prophage สามารถคงอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียไปได้หลายรุ่น (generation) โดยไม่ทำให้เซลล์ตาย แต่อาจทำให้แบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์ เรียกว่า phage conversion [7] การเพิ่มดำรงชีวิตของแบคทีริโอเฟจในลักษณะเช่นนี้เรียกว่า lysogenic cycle และแบคทีริโอเฟจที่ดำรงชีวิตแบบนี้เรียกว่า lysogenic phage หรือ temperate phage ในบางสภาวะ prophage อาจหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรียและกลับเข้าสู่การเพิ่มจำนวนแบบ lytic cycle ได้ เรียกปรากฏการณ์เช่นนี้ว่า induction ซึ่งอาจเกิดขึ้นเองโดยไม่ทราบสาเหตุ (spontaneous induction) หรือเกิดจากการกระตุ้นด้วย inducing agent บางอย่าง เช่น แสง UV และ mitomycin C เป็นต้น [8] ดังนั้น lysogenic phage จึงเป็นแบคทีริโอเฟจที่จะต้องสามารถแทรกสารพันธุกรรมเข้าไปในโครโมโซมและสามารถกลับสู่ lytic cycle ได้ด้วยในบางสภาวะ แต่ lytic phage จะสร้าง แบคทีริโอเฟจใหม่และปล่อยออกนอกเซลล์เพียงอย่างเดียวเท่านั้น

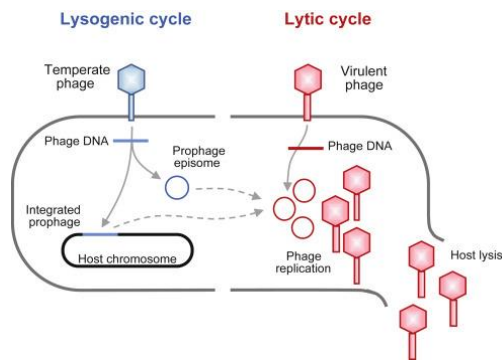


Figure 4 Lytic cycle and lysogenic cycle [11]

6. กลไกการทำลายโฮสต์

วงจรชีวิตของ lytic phage ทุกชนิดสิ้นสุดลงด้วยการทำให้โฮสต์แตก (lysis) เพื่อปลดปล่อย progeny phage หรือแบคทีเรียโอฟาจที่สร้างใหม่ออกจากเซลล์ แบคทีเรียโอฟาจทุกชนิดทำให้เซลล์แตกโดยการทำลาย peptidoglycan (PG) หรือ murein ที่ผนังเซลล์ peptidoglycan เป็นโครงสร้างที่ช่วยเสริมความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์ทนต่อแรงดันออสโมติก และทำให้เซลล์แบคทีเรียสามารถคงรูปอยู่ได้ peptidoglycan พบได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยในแบคทีเรียแกรมลบจะมี outer membrane หุ้มอยู่ด้านนอกสุดอีกชั้นหนึ่ง ดังนั้นหาก peptidoglycan ถูกทำลายหรือเสียหายย่อมส่งผลกระทบต่อเยื่อหุ้มเซลล์ และสามารถทำให้เซลล์ไม่ทนทานต่อแรงดันภายในเซลล์ได้อีกต่อไปและทำให้เซลล์แตกในที่สุด

แบคทีเรียโอฟาจทุกชนิดที่มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA (dsDNA) สามารถทำลาย peptidoglycan ของโฮสต์ได้โดยการสร้างเอนไซม์ endolysin และ holin และมีกลไกทำให้เซลล์แตกเรียกว่า holin-endolysin lytic system [12] (Figure 5) จากการศึกษากลไกการทำลาย peptidoglycan ของแบคทีเรียโอฟาจพบว่า ตำแหน่งการออกฤทธิ์ทำลาย peptidoglycan ของเอนไซม์ endolysin ทำให้สามารถแบ่ง endolysin ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ (1) lysozyme (2) transglycosidase (3) amidase และ (4) endopeptidase

7. การจัดจำแนกแบคทีเรียโอฟาจ

หน่วยงานที่ทำหน้าที่กำหนดเกณฑ์และวิธีการจัดจำแนกไวรัสเพื่อใช้เป็นมาตรฐานเดียวกันคือ International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) โดยได้จัดจำแนกไวรัสออกเป็น 3 order, 61 family และ 241 genus การตั้งชื่อไวรัสโดยทั่วไปจะใช้ภาษาละตินหรือกรีก ชื่อ order จะลงท้ายด้วย -virales ชื่อ family จะลงท้ายด้วย -viridae ชื่อ subfamily จะลงท้ายด้วย -virinae และชื่อ genus จะลงท้ายด้วย -virus แบคทีเรียโอฟาจทุกชนิดถูกจัดอยู่ใน order Caudovirales โดยแบ่งออกเป็น 13 family และ 30 genus เมื่อพิจารณารูปร่างของแบคทีเรียโอฟาจพบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น

4 กลุ่มใหญ่ (Table 1) ดังนี้ (1) tailed phage คือแบคทีเรียโอฟาจที่มีหาง (2) polyhedral phage คือแบคทีเรียโอฟาจที่มีหัวมีรูปร่างหลายเหลี่ยม (3) filamentous phage คือ แบคทีเรียโอฟาจที่มีลักษณะคล้ายเส้นใย และ (4) pleomorphic phage คือแบคทีเรียโอฟาจที่มีรูปร่างไม่แน่นอน แบคทีเรียโอฟาจส่วนใหญ่มีสารพันธุกรรมเป็น dsDNA (Figure 6) มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่มีสารพันธุกรรมเป็น single-stranded DNA (ssDNA), single-stranded RNA (ssRNA) หรือ double-stranded RNA (dsRNA) แบคทีเรียโอฟาจที่ค้นพบแล้วส่วนใหญ่เป็นพวก tailed phage

tailed phage มีอยู่ประมาณ 96% ของแบคทีเรียโอฟาจทั้งหมด ลักษณะโดยทั่วไปของแบคทีเรียโอฟาจ กลุ่มนี้คือ ส่วนหัวมีลักษณะสมมาตรแบบลูกบาศก์ (cubic symmetry) อาจเป็น polyhedral หรือ icosahedral โปรตีนโครงสร้างของส่วนหางมีการเรียงตัวแบบเกลียวเรียกว่า helical tail สารพันธุกรรมมีลักษณะเป็นเส้น ชนิด double-stranded DNA ซึ่งมีเพียงอันเดียว สารพันธุกรรมถูกล้อมรอบด้วยแคปซิด แต่ไม่มีเอนเวลลอป ขนาดของสารพันธุกรรมและความยาวของส่วนหางแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียโอฟาจ สารพันธุกรรมอาจมีขนาดตั้งแต่ 17 จนถึงมากกว่า 700 กิโลเบส (kilobase; kb) และส่วนหางอาจมีความยาวตั้งแต่ 10 ถึง 800 นาโนเมตร tailed phage แบ่งออกเป็น 3 family [13] คือ (1) *Myoviridae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอฟาจชนิดที่หางสามารถยืด-หดได้ มี sheath หุ้มรอบหาง และมีแกนกลางอยู่ในส่วนหางเรียกว่า central tube แบคทีเรียโอฟาจกลุ่มนี้พบอยู่ประมาณ 25% ของ tailed phage ทั้งหมด และแบ่งย่อยออกเป็น 6 genus คือ T4, P1, P2, Mu, SPO1 และ ϕ H (2) *Siphoviridae* เป็น แบคทีเรียโอฟาจที่มีหางยาว แต่ไม่สามารถยืด-หดได้ แบคทีเรียโอฟาจกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดของ tailed phage เนื่องจากพบได้ประมาณ 61% ของ tailed phages ทั้งหมด สามารถแบ่งออกเป็น 6 genus คือ λ , T1, T5, L5, c2 และ ψ M และ (3) *Podoviridae* เป็น แบคทีเรียโอฟาจที่มีหางสั้น พบได้ประมาณ 14% ของ tailed phage ทั้งหมด แบ่งออกเป็น 3 genus คือ T7, P22 และ ϕ 29

8. แบคทีเรียโอฟาจและการประยุกต์ใช้

หลังจากที่มีการค้นพบแบคทีเรียโอฟาจและทราบว่าแบคทีเรียโอฟาจมีความสามารถในการทำลายแบคทีเรีย ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์หลายท่านจึงเชื่อว่าแบคทีเรียโอฟาจน่าจะสามารถนำมาใช้เป็นสารที่ใช้ในการรักษาโรค (therapeutic agent) ได้ แต่หลังจากที่มีการค้นพบยาปฏิชีวนะในช่วงหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 บทบาทของแบคทีเรียโอฟาจในการรักษาโรคก็ลดน้อยลง แต่กลับมีการศึกษาแบคทีเรียโอฟาจเพื่อใช้เป็นเครื่องมือสำหรับใช้ในงานทางด้านไบโอเทคโนโลยีเป็นสำคัญ จนกระทั่งปัจจุบันแบคทีเรียโอฟาจก็ยังนับว่ามีความสำคัญอย่างมากในงานทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล ความรู้เกี่ยวกับ แบคทีเรียโอฟาจในปัจจุบันค่อนข้างก้าวหน้ามาก และมีการนำแบคทีเรียโอฟาจไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้านดังนี้

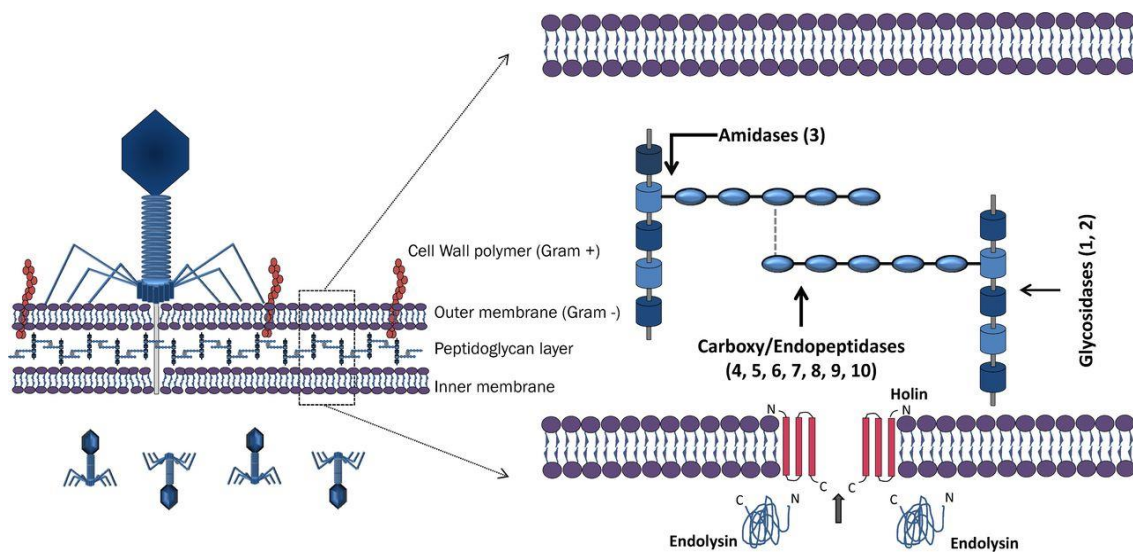


Figure 5 Host cell lysis by holin-endolysin lytic system [12]

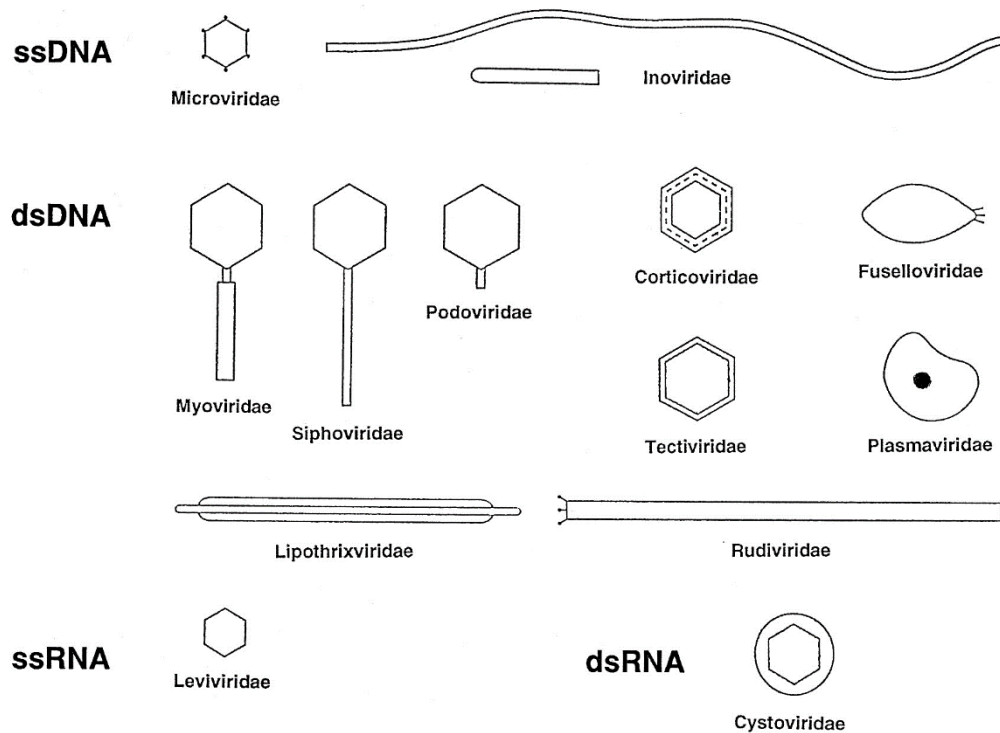


Figure 6 Classification of bacteriophages [2]

Table 1 Classification of bacteriophages [2]

Shape	Nucleic acid	Families	Genera	Examples	Members	Characteristics
Tailed	DNA, ds, L	<i>Myoviridae</i>	6	T4	1243	Tail contractile
	DNA, ds, L	<i>Siphoviridae</i>	6	λ	3011	Tail long, noncontractile
	DNA, ds, L	<i>Podoviridae</i>	3	T7	696	Tail short
Polyhedral	DNA, ss, C	<i>Microviridae</i>	4	ϕ X174	40	-
	DNA, ds, C, T	<i>Corticoviridae</i>	1	PM2	3	Complex capsid, lipids
	DNA, ds, L	<i>Tectiviridae</i>	1	PRD1	18	Internal lipoprotein vesicle
	RNA, ss, L	<i>Leviviridae</i>	2	MS2	39	Envelope, lipids
	RNA, ds, L, S	<i>Cystoviridae</i>	1	ϕ 6	1	
Filamentous	DNA, ss, C	<i>Inoviridae</i>	2	Fd	57	Filaments or rods
	DNA, ds, L	<i>Lipothirixviridae</i>	1	TTV1	6	Envelope, lipids
	DNA, ds, L	<i>Rudoviridae</i>	1	SIRV1	2	Resembles TMV
Pleomorphic	DNA, ds, C, T	<i>Plasmaviridae</i>	1	L2	6	Envelope, lipids, no capsid
	DNA, ds, C, T	<i>Fuselloviridae</i>	1	SSV1	8	Spindle-shaped, no capsid

C = circular; L = linear; S = segmented; T = superhelical; ss = single-stranded; ds = double-stranded

8.1 Phage therapy

phage therapy คือการนำแบคทีริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรีย [14] แบคทีริโอเฟจที่นำมาใช้ในงานนี้ต้องเป็น lytic phage เพราะสามารถทำลายแบคทีเรียเป้าหมายให้ลดน้อยลงหรือหมดไปในที่สุด หลังจากที่มีการค้นพบแบคทีริโอเฟจ (ปี ค.ศ. 1917) แม้ว่าจะมีนักวิทยาศาสตร์เริ่มหันมาสนใจศึกษาเกี่ยวกับแบคทีริโอเฟจและให้ความสำคัญกับงานด้าน phage therapy กันมากขึ้น โดยหวังว่าจะนำแบคทีริโอเฟจมาใช้เป็นยารักษาโรค แต่การวิจัยเกี่ยวกับ phage therapy ในซีกโลกตะวันตก (อเมริกาและยุโรปตะวันตก) แทบจะหยุดชะงักหรือเลิกราไป (ในราวปี ค.ศ. 1940) เนื่องจากข้อถกเถียงในเรื่องความปลอดภัยของการใช้แบคทีริโอเฟจเพื่อการรักษา ประกอบกับเป็นยุคของการค้นพบยาปฏิชีวนะ แต่ประเทศที่ยังคงให้ความสนใจศึกษาแบคทีริโอเฟจอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่มีการค้นพบแบคทีริโอเฟจเป็นต้นมาคือรัสเซียและประเทศในยุโรปตะวันออก ส่งผลให้ข้อมูลและผลงานวิจัยเกี่ยวกับ phage therapy ที่มีตีพิมพ์เผยแพร่ในยุคแรกๆ ที่เป็นภาษาอังกฤษจึงมีไม่มากนัก [15]

การนำ phage therapy ไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อได้ผลค่อนข้างดีทั้งในคนและในสัตว์ (Table 2) เช่น สามารถนำ

แบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Shigella dysenteriae* ไปใช้ในการรักษาโรคบิด (bacillary dysentery) ที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวในคน สามารถนำแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* และ *Proteus* ไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่มีหนอง (suppurative infection) ในคนที่ติดเชื้อเหล่านี้ สามารถนำแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Klebsiella pneumoniae* ไปใช้ในการรักษาโรคไขสันหลังอักเสบ (cerebrospinal meningitis) ที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวในทารกแรกเกิด สามารถนำแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *E. coli* ไปใช้ในการรักษาโรคท้องร่วง (diarrhea) ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อดังกล่าวที่พบในลูกหมู ลูกวัวและลูกแกะ และสามารถนำแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *E. coli* ไปใช้ในการรักษาภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) และโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) ที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวในไก่และในลูกวัว เป็นต้น

phage therapy มีข้อดีที่เหนือกว่าการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอยู่หลายประการ ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้ (Table 3) (1) แบคทีริโอเฟจมีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย (high specificity) มากกว่ายาปฏิชีวนะซึ่งมักจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแบบ broad-spectrum inhibition ดังนั้นแบคทีริโอเฟจจึงสามารถกำจัดหรือทำลายแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคให้หมดไป

Table 2 Examples of phage therapy for treatment of bacterial infections in human and animals [18]

Infection	Causative agent
Suppurative skin infection	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i>
Gastrointestinal, head, neck, skin infection	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i>
Suppurative infection	<i>Staphylococcus</i> , Gram-negative bacteria
Brucellosis	<i>Brucella abortus</i>
Conjunctivitis, dermatitis, pharyngitis, rhinitis	<i>Enterococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>
Recurrent subphrenic abscess	<i>E. coli</i>
Cerebrospinal meningitis	<i>K. pneumoniae</i>
Recurrent furunculosis	<i>Staphylococcus</i>
Diarrhea in calves	<i>E. coli</i>
Septicemia, meningitis in chickens and calves	<i>E. coli</i>

Table 3 Comparison between treatment of bacterial infections by antibiotics and by phage therapy [19]

	Antibiotics	Phage therapy
Specificity	Broad spectrum, affecting more than the targeted organism	Generally species or strain specific
Side effects	Many, including allergies and intestinal disorders	No side effects
Resistance	Occurs and is not limited to targeted bacteria	Occurs, but can be linked to host virulence attenuation. Also, phage can co-evolve with host
Development	Time-consuming and expensive	Rapid

โดยเชื่อนั้นไม่สามารถกลับมาก่อโรคได้อีก หรือเรียกว่า ช่วยลดการเกิด secondary infection จากเชื้อเดิม (2) แบคทีเรียโอเฟจสามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่อได้เจอกับโฮสต์ ดังนั้นการใช้แบคทีเรียโอเฟจเพื่อการรักษาโรคติดเชื้อจึงไม่จำเป็นต้องให้แบคทีเรียโอเฟจซ้ำ (repeated administration) トラバタที่โฮสต์ยังอยู่แบคทีเรียโอเฟจก็จะยังคงสามารถเพิ่มจำนวนได้และทำลายโฮสต์จนกว่าโฮสต์จะหมดไป (3) ต้นทุนการผลิตแบคทีเรียโอเฟจเป็นยารักษาโรคมีราคาถูกกว่าการผลิตยาปฏิชีวนะมาก (4) การใช้แบคทีเรียโอเฟจในการรักษาโรคไม่มีผลข้างเคียง (side-effect) ต่อผู้ใช้ (5) โอกาสที่แบคทีเรียก่อโรคจะติดต่อแบคทีเรียโอเฟจแม้ว่าจะเป็นไปได้ แต่เนื่องจากแบคทีเรียโอเฟจมักมี receptor site อยู่บนโครงสร้างที่เป็นปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ของแบคทีเรีย ดังนั้นหากแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่เป็น receptor site เพื่อป้องกันการบุกรุกของแบคทีเรียโอเฟจ มักส่งผลให้แบคทีเรียนั้นสูญเสียความสามารถในการก่อโรคหรือมีความสามารถในการก่อโรคลดต่ำลงด้วย ประเด็นนี้จะตรงกันข้ามกับการรักษาด้วยยา

ปฏิชีวนะโดยสิ้นเชิง กล่าวคือเมื่อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะแบคทีเรียนั้นกลับดูเหมือนยิ่งทวีความรุนแรงในการก่อโรคได้มากขึ้น เพราะยาที่มีใช้อยู่ไม่สามารถควบคุมแบคทีเรียได้ โรคติดเชื้อแบคทีเรียที่เคยรักษาได้ผล กลับกลายเป็นโรคที่รักษาไม่ได้และอาจส่งผลกระทบต่อผู้ติดเชื้อถึงขั้นเสียชีวิตได้ (6) การหาแบคทีเรียโอเฟจมาใช้ในการเจริญของแบคทีเรียทำได้ง่ายกว่าและใช้เวลาน้อยกว่าการพัฒนาาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามข้อเสียอย่างหนึ่งของแบคทีเรียโอเฟจเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะคือ เนื่องจากแบคทีเรียโอเฟจมีความจำเพาะสูง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุก่อนจึงจะเลือกใช้แบคทีเรียโอเฟจที่เหมาะสมได้ แต่ปัญหานี้สามารถแก้ได้โดยการใช้แบคทีเรียโอเฟจหลายชนิดรวมกันเพื่อการรักษา เรียกว่า phage cocktail [16] ปัจจุบันงานทางด้าน phage therapy มีผู้ให้ความสนใจมากขึ้นเรื่อย ๆ ทั้งนี้เนื่องจากปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียหลายชนิดซึ่งมีแนวโน้มที่จะรุนแรงมากขึ้นในอนาคต จนทำให้นักวิทยาศาสตร์หลายท่านเป็นกังวลว่าโลกของเราจะกลับเข้าสู่ยุคก่อนที่จะมีการค้นพบยาปฏิชีวนะ (pre-antibiotic era)

อีกครั้ง ส่งผลให้ในระยะหลัง (นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 เป็นต้นมา) งานวิจัยเกี่ยวกับการค้นหาแบคทีเรียโอเฟจใหม่ที่มีจำเพาะต่อแบคทีเรียก่อโรคทั้งในคนและสัตว์มีมากขึ้น [4] และหวังว่าแบคทีเรียโอเฟจน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการแก้ปัญหาการรักษาโรคติดเชื้อที่ดื้อยาได้ [17]

8.2 Phage cloning vector

phage cloning vector หมายถึงการนำแบคทีเรียโอเฟจไปใช้เป็น DNA พาหะสำหรับการเพิ่มจำนวนยีน (gene cloning) ที่สนใจ ซึ่งการใช้แบคทีเรียโอเฟจมีประสิทธิภาพดีกว่าพลาสมิด (plasmid) หลายเท่า แบคทีเรียโอเฟจที่นิยมนำมาใช้เป็น cloning vector เช่น λ และ M13 เป็นต้น [20] เพื่อให้เข้าใจถึงการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจเป็น cloning vector ในที่นี้จึงขอยกตัวอย่างของแบคทีเรียโอเฟจ λ ซึ่งเป็น temperate phage มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA ขนาดประมาณ 49 kb มีโฮสต์คือ *E. coli* และบุกรุกเข้าสู่โฮสต์เซลล์โดยวิธี genome injection หลังจากสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์แล้วปลายของสารพันธุกรรมสามารถจับกันเองได้ เนื่องจากที่ปลายทั้งสองด้านมีส่วนที่เป็น single-stranded DNA ยื่นออกมา และมีลำดับเบส complementary กัน ตำแหน่งนี้เรียกว่า *cos* site

λ gt10 เป็น cloning vector ชนิด insertion vector (Figure 7) มีการตัดเอาชิ้นบางส่วนที่ไม่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจออกไป จนมีขนาดสารพันธุกรรมลดลงเหลืออยู่ประมาณ 40 kb สามารถบรรจุสารพันธุกรรมที่มีขนาดไม่เกิน 52 kb ซึ่งหมายถึงขนาดของ cloning vector รวมกับ DNA fragment ที่ต้องการจะแทรก (insert) เข้าไป cloning vector นี้สามารถแทรก DNA fragment ที่มีขนาดตั้งแต่ 8-10 kb และที่สำคัญคือในตำแหน่ง *cl* gene ของ vector นี้มีจุดตัดของเอนไซม์ *EcoRI* อยู่ ดังนั้นจึงสามารถนำ DNA fragment ที่ถูกตัดด้วย *EcoRI* เข้าไปแทรกอยู่ใน vector นี้ได้ การแทรก DNA fragment เข้าไปที่ตำแหน่ง *cl* gene ส่งผลให้ยีนดังกล่าวสูญเสียหน้าที่และไม่สามารถสร้างโปรตีน *Cl* ได้ หลังจากที่ทำ ligation เพื่อให้ได้ recombinant DNA ทำ *in vitro* assembly เพื่อให้ได้ไวรัสออนแบคทีเรียโอเฟจที่สมบูรณ์แล้วนำไป infect โฮสต์ที่เหมาะสมคือ *E. coli* Hfl strain (Hfl =

High frequency lysogeny) เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของ *cII* gene แบคทีเรียโอเฟจที่มี recombinant DNA เป็นสารพันธุกรรม จะไม่สามารถเข้าสู่ lysogenic cycle ได้ แต่จะเข้าสู่ lytic cycle เท่านั้น จึงทำให้เกิด clear plaque เมื่อนำไปเลี้ยงร่วมกับโฮสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถนำแบคทีเรียโอเฟจตรงตำแหน่งนั้นไปเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนได้ต่อไป

8.3 Phage typing

phage typing หมายถึงการนำแบคทีเรียโอเฟจมาใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดแบคทีเรียวิธีนี้อาศัยความจำเพาะระหว่างแบคทีเรียโอเฟจและแบคทีเรีย ทำให้สามารถการจำแนกแบคทีเรียได้ถึงระดับยีน (genus) และสปีชีส์ (species) [21] การทดสอบทำได้โดยใช้ไลติกเฟจที่ทราบชนิดของโฮสต์มาใช้เพื่อทดสอบ แบคทีเรียโอเฟจหลายชนิดเหล่านี้รวมเรียกว่าชุดแบคทีเรียโอเฟจ (phage panel) และอาศัยความไว (susceptibility) ของแบคทีเรียต่อแบคทีเรียโอเฟจ เมื่อแบคทีเรียโอเฟจใดมีความสามารถในการบุกรุกและเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรียทดสอบ (bacterial sample) จะพบการตายของแบคทีเรียชนิดนั้นบนผิวหน้าอาหารแข็ง (agar surface) โดยปรากฏเป็นจุดใส (plaque หรือ clear zone) เกิดขึ้นบน lawn of bacteria (Figure 8) ดังนั้นจึงสามารถบอกได้ว่าแบคทีเรียทดสอบนั้นเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อแบคทีเรียโอเฟจใดและน่าจะเป็นแบคทีเรียใด

phage typing สามารถบอกชนิดของแบคทีเรียได้ถึงระดับสายพันธุ์ (strain) เช่น *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์หนึ่งถูกบุกรุกได้โดยแบคทีเรียโอเฟจหลายชนิด และไม่ถูกบุกรุกโดยแบคทีเรียโอเฟจบางชนิด ดังนั้น *Staphylococcus aureus* ต่างสายพันธุ์กันจึงมีรูปแบบการถูกบุกรุกด้วยแบคทีเรียโอเฟจ (phage typing patterns) ที่ต่างกัน phage typing นับว่ามีประโยชน์อย่างมากสำหรับงานทางระบาดวิทยา เช่น การตรวจ phage typing ของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) เปรียบเทียบกับ phage typing ของแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ที่อยู่ภายนอกร่างกาย (เช่น ผิวหนัง) ของบุคลากรทางการแพทย์ (เช่น แพทย์และพยาบาล) รวมทั้ง

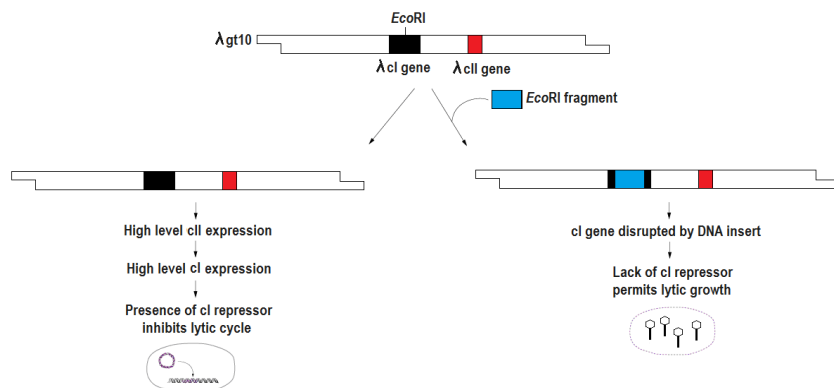


Figure 7 Use of λ gt10 as a cloning vector

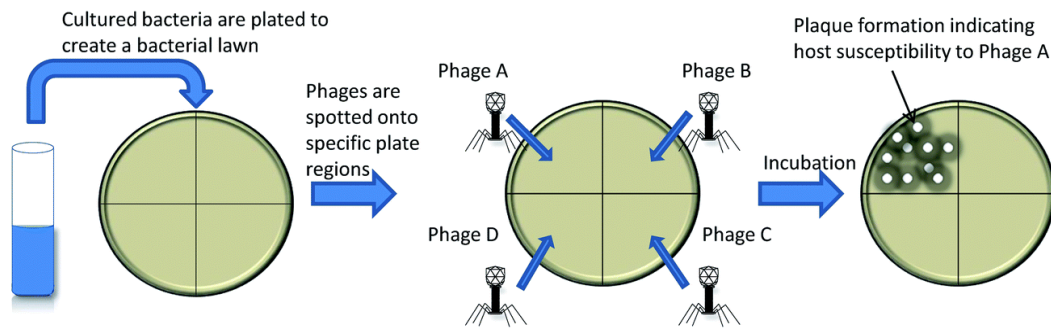


Figure 8 Phage typing [21]

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ต้องใช้กับผู้ป่วย (เช่น สายสวน) ซึ่งช่วยให้ทราบแหล่งที่มาของเชื้อที่ปนเปื้อนในโรงพยาบาล นอกจากนี้ phage typing ยังสามารถใช้ในการติดตามการระบาดหรือการแพร่กระจายของแบคทีเรียในแต่ละชุมชนหรือท้องถิ่น และช่วยให้ทราบแหล่งที่มาของเชื้อที่กำลังระบาดอยู่ในขณะนั้น ทั้งนี้ *Salmonella typhi* ซึ่งเป็นสาเหตุของไข้ไทฟอยด์สามารถจำแนกได้มากกว่า 100 ชนิดโดยวิธี phage typing

phage typing สามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับงานทางด้านพันธุวิศวกรรม โดยการนำยีนบางชนิดที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่สามารถเรืองแสงได้ (bio-luminescent protein) เช่น green fluorescent protein (GFP) ใส่เข้าไปในสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอเฟจ ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียโอเฟจที่มียีน GFP ไปบุกรุกโฮสต์ จะส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนและสร้างโปรตีนดังกล่าวขึ้นภายในเซลล์ซึ่งการเรืองแสงของแบคทีเรียที่ถูกบุกรุกด้วยแบคทีเรียโอเฟจชนิดนี้สามารถตรวจวัด (detect) ได้ด้วยเครื่องมือพิเศษ วิธีนี้สามารถใช้ในการติดตามแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในน้ำและอาหาร [22] เช่น *E. coli* O157:H7 เป็นต้น

8.4 Phage display

phage display เป็นการสร้างเปปไทด์ (peptide) ที่สนใจให้ปรากฏหรือแสดง (display) อยู่บนโครงสร้างด้านนอกของแบคทีเรียโอเฟจ (เช่น แคปซิด) ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural proteins) ของแบคทีเรียโอเฟจโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม [15] อาจกล่าวได้ว่า phage display เป็นการเชื่อมความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่สนใจ และการแสดงออกของยีนนั้น (genotype-phenotype linkage) บน วิริโอออน ของแบคทีเรียโอเฟจ วิธีนี้ทำให้สามารถ “display” โปรตีนหลากหลายชนิดบนวิริโอออนของแบคทีเรียโอเฟจ เช่น เปปไทด์สายสั้น ๆ (short peptide) โปรตีนบางส่วน (protein domain) โปรตีนทั้งโมเลกุล (whole protein) ชิ้นส่วนของแอนติบอดี (antibody fragment) โปรตีนที่เป็น receptor และเอนไซม์ ปัจจุบันเทคนิค phage display ถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง เช่น การคัดค้นยารักษาโรค การพัฒนาวัคซีน ศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (protein-protein

interaction และ receptor-ligand characterization) และการหาวิธีควบคุมหรือทำลายไวรัส เป็นต้น [23]

แบคทีเรียโอเฟจที่นิยมนำมาใช้ในงาน phage display คือแบคทีเรียโอเฟจในกลุ่ม filamentous phage (เช่น Ff, M13, fd และ f1) แบคทีเรียโอเฟจที่นิยมใช้มากที่สุดในงาน phage display คือ M13 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6-7 nm มีความยาวประมาณ 900 nm มีสารพันธุกรรมขนาด 6.4 kb และเป็นชนิด (+) single stranded DNA มีโฮสต์คือ *E. coli* โครงสร้างที่เป็น attachment site ของ M13 คือโปรตีน pIII (adsorption protein) ซึ่งพบอยู่ที่ปลายด้านหนึ่งของวิริโอออน และมี receptor site อยู่ที่ sex pilus (F pilus) ของแบคทีเรีย สารพันธุกรรมของ M13 กำหนดการสร้างโปรตีน 10 ชนิด (pl-pX) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามหน้าที่ [24] คือ (1) replication proteins ได้แก่ pII, pX และ pV (2) morphogenesis proteins ได้แก่ pI และ pIV (3) structural proteins ได้แก่ pVIII, pIII, pVI, pVII และ pIX โปรตีนกลุ่มนี้ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยตามจำนวนที่พบ คือ major protein (pVIII) พบมาก และ minor protein (pIII, pVI, pVII, pXI) พบน้อย การดำรงชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจ M13 ภายในเซลล์จะไม่ทำให้เซลล์แตก แต่สามารถสร้าง progeny phage และปล่อยออกนอกเซลล์ได้ ดังนั้นแบคทีเรียที่ติดเชื้อยังคงสามารถเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้ แต่ด้วยอัตราการเจริญที่ช้าลง

การทำ phage display จำเป็นต้องอาศัย vector เช่น phagemid ซึ่งมักมียีนที่ควบคุมการสร้าง coat protein ชนิดใดชนิดหนึ่ง หลักการของ phage display มีดังนี้ (Figure 9) นำยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่สนใจ (displayed peptide) แทรกเข้าไปใน phagemid เพื่อให้ยีนนั้นไปเชื่อมต่อกับยีนที่ควบคุมการสร้าง structural protein (หรือ phage coat protein) โดยทั่วไปนิยมใช้ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน pIII หรือ pVIII (แบคทีเรียโอเฟจแต่ละวิริโอออนสามารถสร้างโปรตีน pIII ได้ประมาณ 3-5 copy และสร้างโปรตีน pVIII ได้มากถึง 2700 copy) จากนั้นจึงนำ recombinant phagemid ไปทำ transformation เพื่อนำเข้าสู่โฮสต์เซลล์ หากโปรตีนที่แทรกเข้าไปนั้นมีการแสดงออก จะปรากฏอยู่ที่ N-terminus ของโปรตีน

pIII หรือ pVIII บนไวรัสของแบคทีริโอเฟจ โดยทั่วไป pVIII เหมาะกับการ display โปรตีนหรือเปปไทด์ขนาดเล็ก (ประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียง 6-7 ตัว) ส่วน pIII เหมาะแก่การ display โปรตีนขนาดใหญ่ (อาจประกอบด้วยกรดอะมิโนมากถึง 38 ตัวแต่ต้องไม่ทำให้แบคทีริโอเฟจสูญเสียความสามารถในการบุกรุกเซลล์แบคทีเรีย) เมื่อ phagemid ที่มี DNA fragment ซึ่งกำหนดการสร้างโปรตีนที่สนใจถูกนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้ว phagemid จะเพิ่มจำนวน (replicate) ได้เช่นเดียวกับ plasmid และในขณะเดียวกันก็มีการสร้าง fusion protein (โปรตีนที่สนใจและโปรตีนโครงสร้างของแบคทีริโอเฟจ) เกิดขึ้นภายในเซลล์ด้วย เซลล์แบคทีเรียที่มี phagemid vector อยู่ภายในจะไม่สร้าง progeny phage จนกระทั่งเซลล์นั้นถูกบุกรุกด้วย helper virus แบคทีริโอเฟจที่เกิดขึ้นใหม่ภายในเซลล์นี้จึงจะมีโปรตีนที่สนใจปรากฏอยู่บนไวรัสและถูกปล่อยออกนอกเซลล์ [25]

การทำ phage display สามารถสร้าง (construct) phage display library ซึ่งมีโปรตีนที่แตกต่างกันให้ปรากฏอยู่บนไวรัสของแบคทีริโอเฟจแต่ละไวรัส และเกิดขึ้นพร้อมกันใน

คราวเดียว ดังนั้นการคัดเลือกไวรัสที่สนใจจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญ การคัดเลือกไวรัสที่สนใจสามารถทำได้โดยวิธี biopanning [26] (Figure 10) คือนำ phage display library ไปเติมลงใน microtiter plate ซึ่งกั้นหลุมติด (immobilize) ไว้ด้วยกับโมเลกุล (ligand หรือ receptor) ที่สามารถจับกับโปรตีนที่แสดง (display) อยู่บนโครงสร้างด้านนอกของแบคทีริโอเฟจได้อย่างจำเพาะล้างแบคทีริโอเฟจ ส่วนเกินที่ไม่สามารถจับกับโมเลกุลดังกล่าวทิ้งไป จากนั้นแยก (elution) แบคทีริโอเฟจที่จับกับโมเลกุลที่ติดไว้กั้นหลุมและนำไปเพิ่มจำนวนในโฮสต์ วิธีนี้ทำให้ได้แบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์ที่มีโปรตีนที่สนใจติดอยู่ที่โครงสร้างด้านนอกตามที่ต้องการ และยังทราบชนิดโปรตีนที่แบคทีริโอเฟจนั้นสามารถจับ (binding) ได้ด้วยการทำ biopanning สามารถทำซ้ำหลายรอบได้ (2-4 รอบ) เพื่อให้แน่ใจว่า แบคทีริโอเฟจที่แยกได้มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่ติดไว้ที่กั้นหลุม เมื่อนำสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจที่คัดเลือกได้นี้ไปศึกษาต่อ สามารถทราบลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนที่ปรากฏอยู่บนไวรัสของแบคทีริโอเฟจนั้น [27]

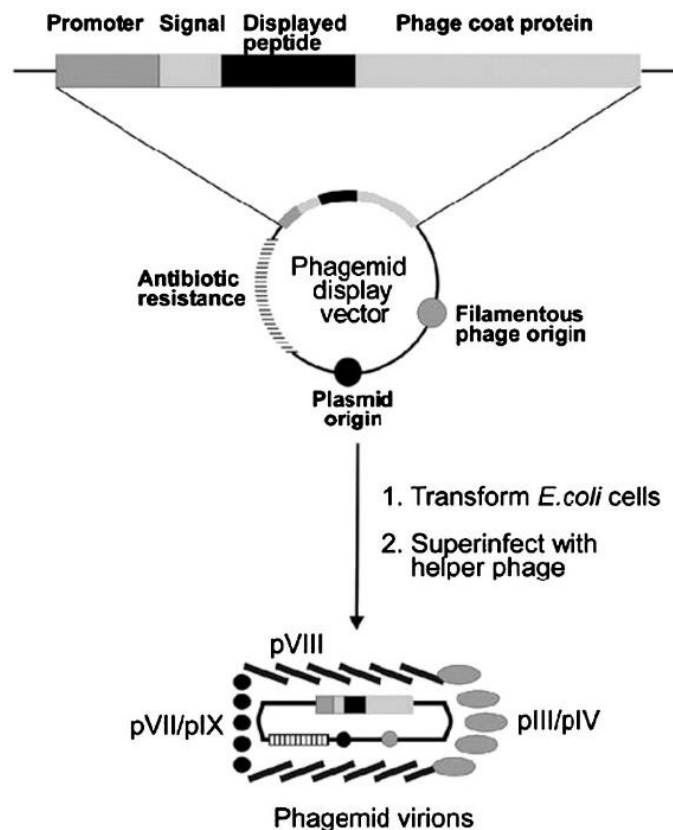


Figure 9 Phage display by using phagemid vector [25]

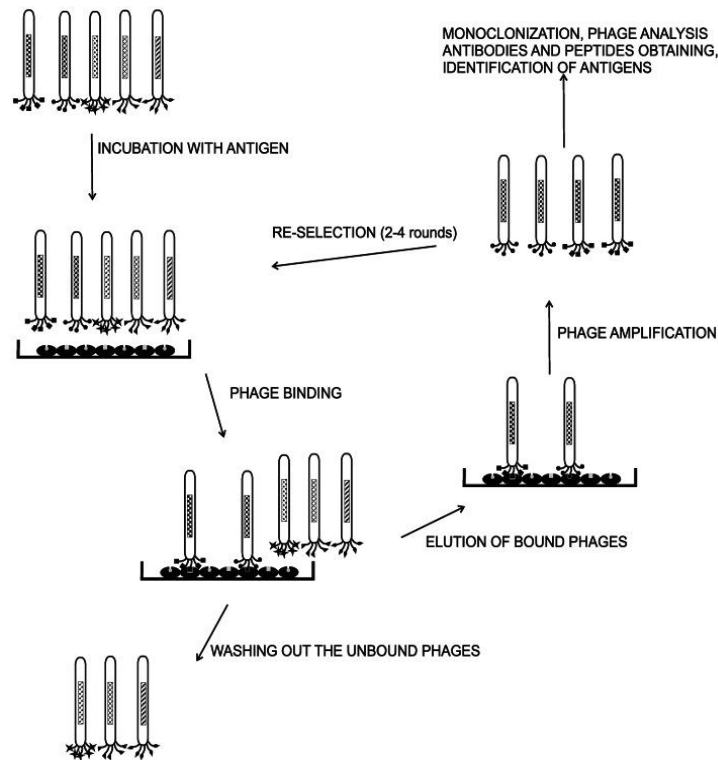


Figure 10 Selection of interested bacteriophages by biopanning [26]

เอกสารอ้างอิง

- [1] Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. and Morris, J. G. Jr. 2001. "Bacteriophage therapy". **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 45: 649-659.
- [2] Ackermann, H. W. 2003. "Bacteriophage observations and evolution". **Research in Microbiology**. 154: 245-251.
- [3] Leiman, P. G. and et al. 2003. "Structure and morphogenesis of bacteriophage T4". **Cellular and Molecular Life Sciences**. 60: 2356-2370.
- [4] Sharma, S. and et al. 2017. "Bacteriophages and its applications: an overview". **Folia Microbiologica**. 62: 17-55.
- [5] Doss, J. and et al. 2017. "A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms". **Viruses**. 9(13): 50.
- [6] Ross, A., Ward, S. and Hyman, P. 2016. "More is better: selecting for broad host range bacteriophages". **Frontiers in Microbiology**. 7: 1352.
- [7] Takeda, Y. and Murphy, J. R. 1978. "Bacteriophage conversion of heat-labile enterotoxin in *Escherichia coli*". **Journal of Bacteriology**. 133(1): 172-177.
- [8] Weinbauer, M. G. and Suttle, C. A. 1996. "Potential significance of lysogeny to bacteriophage production and bacterial mortality in coastal waters of the gulf of Mexico". **Applied and Environmental Microbiology**. 62(12): 4374-4380.
- [9] Chaturongakul, S. and Ounjai, P. 2014. "Phage-host interplay: examples from tailed phages and gram-negative bacterial pathogens". **Frontiers in Microbiology**. 5: 442.
- [10] Cotter, P. 2011. "Microbiology: Molecular syringes scratch the surface". **Nature**. 475: 301-303.
- [11] Fortier, L. C. 2017. "The contribution of bacteriophages to the biology and virulence of pathogenic clostridia". **Advances in Applied Microbiology**. 101: 169-200.
- [12] Oliveira, H. and et al. 2013. "Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins". **Journal of Virology**. 87(8): 4558-4570.
- [13] Ackermann, H. W. 1998. "Tailed bacteriophages: the order caudovirales". **Advances in Virus Research**. 51: 135-201.
- [14] Abedon, S. T. and et al. 2011. "Phage treatment of human infections". **Bacteriophage**. 1(2): 66-85.

- [15] Haq, I. U. and et al. 2012. "Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review". **Virology Journal**. 9(9): 1-8.
- [16] Chan, B. K., Abedon, S. T. and Loc-Carrillo, C. 2013. "Phage cocktails and the future of phage therapy". **Future Microbiology**. 8(6): 769-783.
- [17] Roach, D. R. and Debrabieux, L. 2017. "Phage therapy: awakening a sleeping giant". **Emerging Topics in Life Sciences**. 1: 93-103.
- [18] Inal, J. M. 2003. "Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics". **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**. 51: 237-244.
- [19] Semler, D. D., Lynch, K. H. and Dennis, J. J. 2012. "The promise of bacteriophage therapy for *Burkholderia cepacia* complex respiratory infections". **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 1(27): 1-12.
- [20] Chauthaiwale, V. M., Therwath, A. and Deshpande, V. V. 1992. "Bacteriophage lambda as a cloning vector". **Microbiological Reviews**. 56(4): 577-591.
- [21] van de Merwe, R. G. and et al. 2014. "Phage-based detection of bacterial pathogens". **Analyst**. 139: 2617-2626.
- [22] Schmelcher, M. and Loessner, M. J. 2014. "Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens". **Bacteriophage**. 4: e28137: 1-14.
- [23] Bakhshinejad, B., and Sadeghizadeh, M. 2014. "Bacteriophages and their applications in the diagnosis and treatment of hepatitis B virus infection". **World Journal of Gastroenterology**. 20(33): 11671-11683.
- [24] Rami, A. and et al. 2017. "An overview on application of phage display technique in immunological studies". **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 7(7): 599-602.
- [25] Qi, H. and et al. 2012. "Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction". **Journal of Molecular Biology**. 417: 129-143.
- [26] Bazan J. Calkosinski, I. and Gamian, A. 2012. "Phage display-a powerful technique for immunotherapy". **Human Vaccine & Immunotherapeutics**. 8(12): 1817-1828.
- [27] Arap, M. A. 2005. "Phage display technology-Application and innovations". **Genetics and Molecular Biology**. 28(1), 1-9.