บทที่ 2
วารสารปริทรรศน์

2.1 ประวัติการค้นพบ (Duckworth, 1976)

ฟาจจัดเป็นไวรัสกลุ่มที่สามที่ถูกค้นพบรองจากไวรัสสัตว์และไวรัสพืช มีรายงานเกี่ยวกับฟาจครั้งแรกในปี ค.ศ. 1915 โดย Frederick W. Twort สามารถแยกฟาจที่ทำลายเซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่มไมโครคอคไค (micrococci) และบาซิลไล (bacilli) ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร ในขณะนั้นเขาสรุปว่าเกิดจากไวรัสแต่ไม่ได้ทำการศึกษาต่อ ต่อมาในปี ค.ศ.1917 Felix d'Herrell ได้ทำการทดลองกับผู้ป่วยโรคบิดซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Shigella dysenteriae* d'Herrele แยกเชื้อนี้จากอุจจาระของผู้ป่วยและทำการกรองของเหลวออกจากอุจจาระนั้นด้วย จากนั้นนำของเหลวที่กรองได้ผสมลงไปในอาหารเหลวที่สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. dysenteriae* และนำไปสเปรด (spread) ลงบนจานเพาะเชื้อ เมื่อทิ้งไว้ข้ามคืน พบว่าอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อมีลักษณะใส และบนจานเพาะเชื้อไม่มี *S. dysenteriae* เจริญ เขาจึงสรุปว่าของเหลวที่กรองได้เป็นสิ่งมีชีวิตที่มองไม่เห็น นั่นคือไวรัส แต่เป็นไวรัสของแบคทีเรีย จึงเรียก ไวรัสนี้ว่า แบคเทอริโอฟาจ ซึ่งมีความหมายว่าผู้กินแบคทีเรีย (bacteria eater)

2.2 คุณสมบัติทั่วไปของฟาจ

ฟาจเป็นออบลิเกตพาราไซต์ของแบคทีเรีย นั่นคืออนุภาคฟาจที่เป็นอิสระสามารถมีชีวิตอยู่ได้ด้วยตัวเอง แต่การเพิ่มจำนวนของอนุภาคจะเกิดขึ้นเฉพาะในเซลล์แบคทีเรียเท่านั้น แม้ว่าฟาจส่วนใหญ่มียีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนหลายชนิด แต่ฟาจจำเป็นต้องใช้ระบบการสังเคราะห์โปรตีน (protein-synthesizing system) กรดอะมิโน และระบบการสร้างพลังงาน (energy-generating system) ของเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้นการที่ฟาจจะสามารถเพิ่มจำนวนอนุภาคได้จะต้องอยู่ในเซลล์แบคทีเรียที่มีเมตาบอลิซึมเท่านั้น ฟาจแต่ละอนุภาคจะมีกระบวนการเพื่อการดำรงชีวิตดังนี้

1. การป้องกันอันตรายของกรดนิวคลีอิคจากสิ่งแวดล้อมทางเคมี ซึ่งอาจจะทำให้โมเลกุลของกรดนิวคลีอิคของฟาจเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ เช่น การแตกหักของโมเลกุลกรดนิวคลีอิคอันเป็นสาเหตุของการกลายพันธุ์
2. การส่งกรดนิวคลีอิคของฟาจเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย
3. การทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อฟาจไปเป็นเซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนของฟาจอยู่ภายใน
4. การปลดปล่อยอนุภาคฟาจใหม่จากเซลล์แบคทีเรีย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฟาจทุกชนิดจะมีกระบวนการต่างๆเพื่อการดำรงชีวิตในรูปแบบดังกล่าวข้างต้น แต่อาจจะมีความแตกต่างกันในรายละเอียดของกระบวนการ (Maloy et al., 1994)

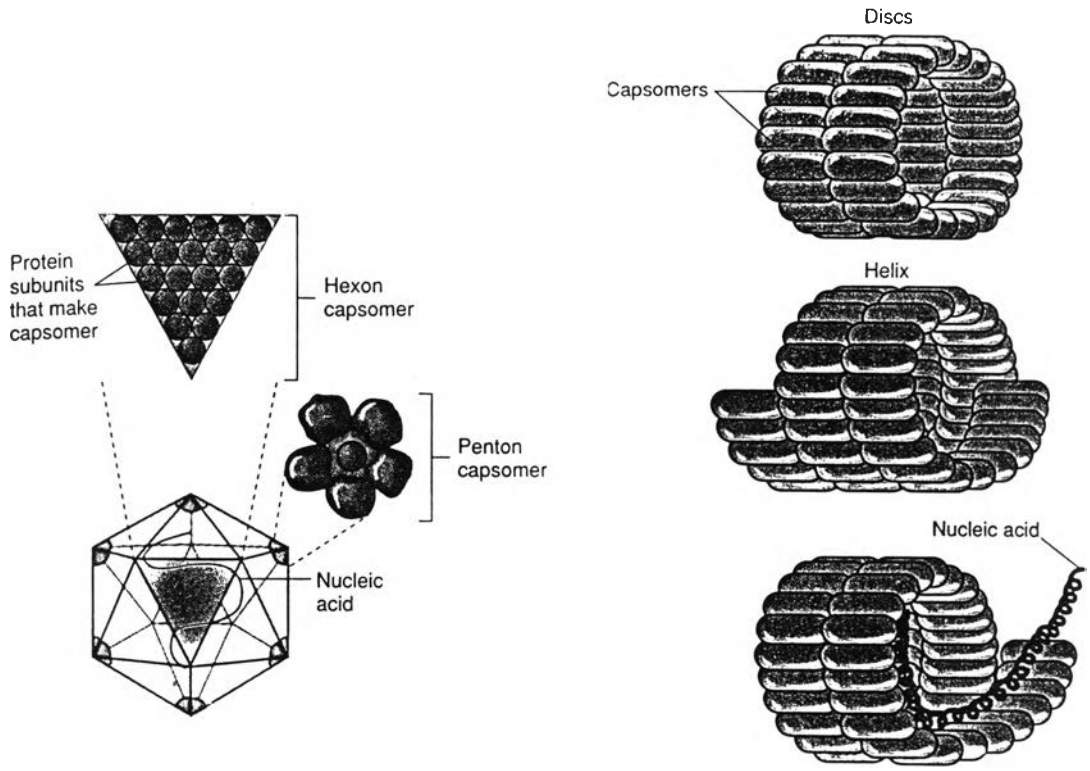
2.3 โครงสร้างพื้นฐานของฟาจ

โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคฟาจประกอบด้วย

2.3.1 แคพซิด (capsid) คือ โปรตีนห่อหุ้ม (protein coat) ทำหน้าที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิคไว้ภายใน เพื่อป้องกันการย่อยสลายจากเอนไซม์นิวคลีเอส แคพซิดประกอบด้วยแคพโซเมอร์ (capsomer) หลายหน่วยมาเรียงต่อกัน ทำให้เกิดรูปร่างได้หลายแบบ ได้แก่ รูปทรงหลายเหลี่ยม (polyhedral) และสายยาว (filamentous) เป็นต้น

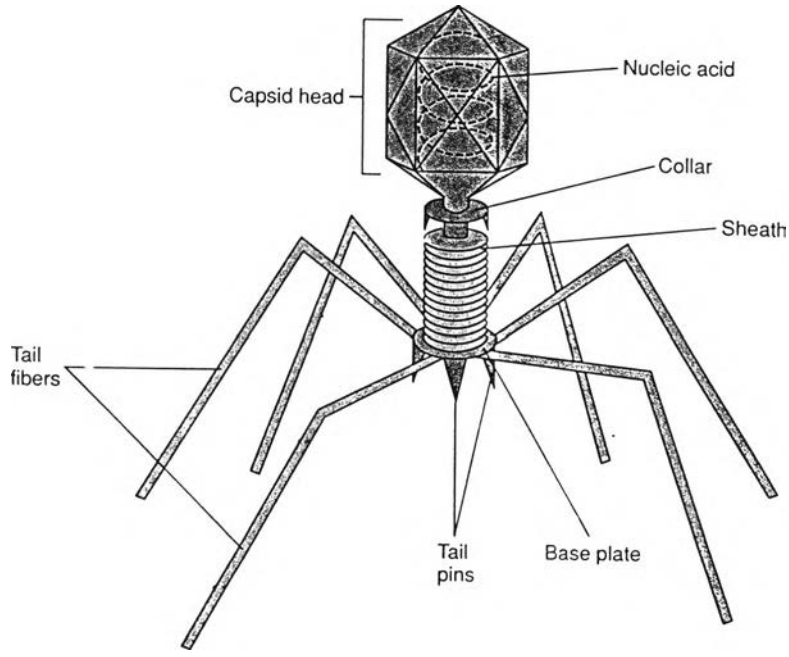
แคพซิดรูปทรงหลายเหลี่ยมที่รู้จักกันดี นั่นคือ รูปทรงแบบไอโคซาฮีดรัล (icosahedral shape) ซึ่งรูปแบบที่ง่ายที่สุด คือ มีมุมยอด 12 มุม แต่ละมุมประกอบด้วย แคพโซเมอร์ 5 หน่วยมาประกอบกันหรือเรียกว่า เพนตอน (penton) และมีหน้าของสามเหลี่ยมด้านเท่า 20 หน้าซึ่งเกิดจากแคพโซเมอร์ 6 หน่วยหรือเรียกว่า เฮกซอน (hexon) มาเรียงตัวรอบส่วนเพนตอน (ดังแสดงในรูปที่ 2.1) โครงสร้างนี้บางครั้งจะเรียกว่า ส่วนหัว (head) ซึ่งในฟาจแต่ละชนิดมีขนาดแตกต่างกัน หากมีขนาดใหญ่และมีความซับซ้อนมากนั้นเกิดจากการแบ่งย่อยของหน้าสามเหลี่ยมมากขึ้น แต่ยังคงมี 12 มุมเช่นเดียวกัน

แคพซิดที่มีรูปร่างเป็นสายยาวนั้น เกิดจากการเรียงตัวของแคพโซเมอร์แบบขดเป็นเกลียว โดยมีกรดนิวคลีอิคเป็นแกนกลาง (ดังแสดงในรูปที่ 2.1) นอกจากนี้ในฟาจที่มีโครงสร้างซับซ้อน (complex structure) จะพบว่าส่วนหางของฟาจ (tail) แคพโซเมอร์มีการเรียงตัวแบบขดเป็นเกลียวเช่นกัน มีลักษณะเป็นท่อ (tube) ที่ตรงกลางกลวง ส่วนหางของฟาจมีโครงสร้างอื่นๆ ได้แก่ ซีทห่อหุ้ม (tail sheath) แผ่นฐาน (base plate) ใยหาง (tail fiber) เป็นต้น (ดังแสดงในรูปที่ 2.2) ส่วนหางมีหน้าที่ในการเกาะติดกับรีเซพเตอร์ (receptor) บนผิวเซลล์แบคทีเรีย และช่วยในการส่งผ่านกรดนิวคลีอิคเข้าสู่เซลล์ (Bradley, 1967 ; Luria et al., 1978)



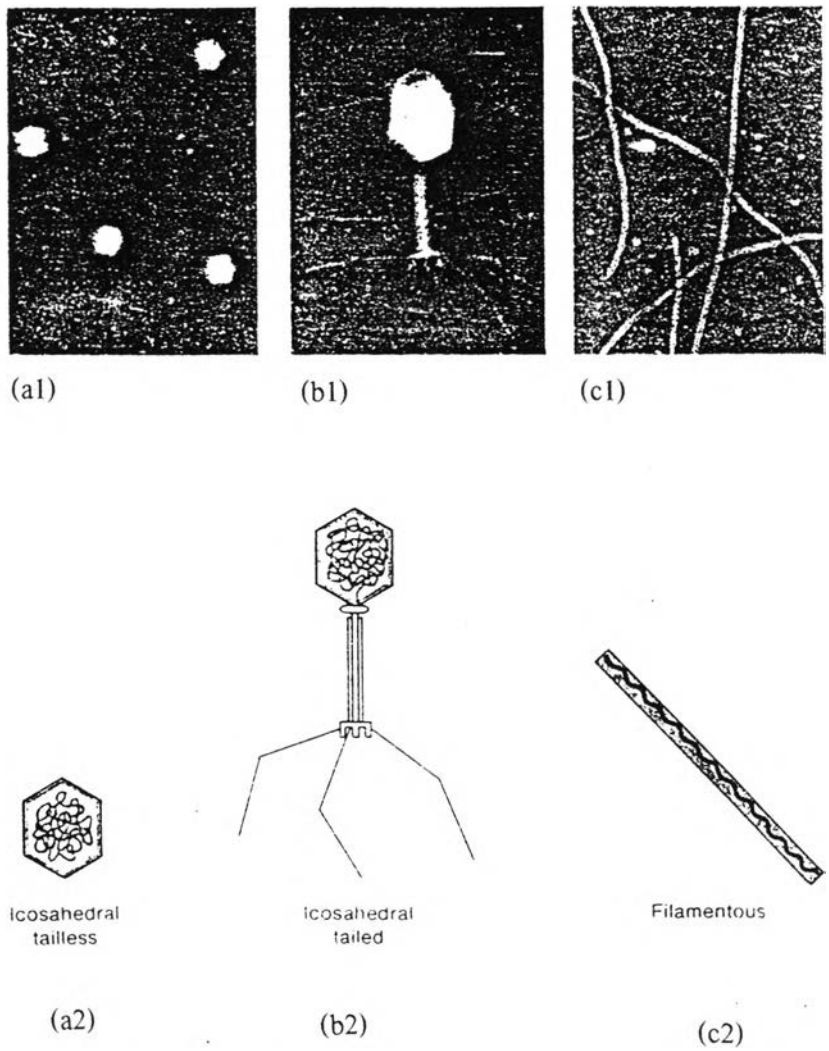
(a) (b)

รูปที่ 2.1 โครงสร้างและการเรียงตัวของแคพซิดรูปทรงไอโคซาฮีดรัล (a) และรูปร่างสายยาว (b) (Talaro and Talaro, 1996)



รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบต่างๆของอนุภาคฟาจ (Bradley, 1967)

จากการเรียงตัวของแคพโซเมอร์ซึ่งเป็นโครงสร้างแคพซิดทำให้เกิดรูปร่างพื้นฐานของฟาจ 3 แบบ คือ รูปทรงไอโคซาฮีดรัลและไม่มีส่วนหาง (icosahedral tailless) รูปทรงไอโคซาฮีดรัลและมีส่วนหาง (icosahedral tailed) และเป็นสายยาว (filamentous) (ดังแสดงในรูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 รูปร่างอนุภาคพื้นฐาน 3 แบบของฟาจ รูปทรงไอโคซาฮีดรัลและไม่มีส่วนหางของฟาจ ϕX174 (a1), รูปทรงไอโคซาฮีดรัลและมีส่วนหางของฟาจ T4 (b1), และรูปร่างสายยาวของฟาจ M13 (c1) จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน และเป็นรูปไดอะแกรมแสดงรูปร่างอนุภาคฟาจทั้ง 3 แบบ (a2), (b2) และ (c2) (Maloy et al., 1994)

2.3.2 กรดนิวคลีอิค (nucleic acid)

ในแต่ละอนุภาคของฟาจทุกชนิดจะมีกรดนิวคลีอิคบรรจุอยู่เพียงรูปแบบเดียวเท่านั้น โดยกรดนิวคลีอิคของฟาจแต่ละชนิดจะมีรูปแบบต่างๆกัน ดังนี้ ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA) ดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA) และอาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA)

ในฟาจที่มีส่วนหัวเป็นรูปทรงหลายเหลี่ยมนั้น ความยาวของกรดนิวคลีอิคจะยาวกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมาก ดังนั้นกรดนิวคลีอิคจะอัดตัวแน่นอย่างมากอยู่ในบริเวณที่ว่างหรือโพรงภายในแคพซิด ส่วนกรดนิวคลีอิคในฟาจที่มีรูปร่างเป็นสายยาวจะฝังตัวกับแคพโซเมอร์ที่ขดเป็นเกลียวและจะอยู่ในรูปที่ขยายตัวออกไป (Dimmock and Primrose, 1988 ; Morgan, 1993)

2.4 การจัดจำแนกฟาจ

Bradley (1967) ได้ทำการจัดจำแนกฟาจโดยอาศัยรูปร่างของฟาจจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนและชนิดของกรดนิวคลีอิคออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ (ดังแสดงในรูป 2.4) (Bradley, 1967)

A. มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) และมีส่วนหางที่มีชีทที่หดตัวได้หุ้ม (contractile sheath) อนุภาคมีลักษณะตรง และบริเวณส่วนปลายของอนุภาคมักจะมีโครงสร้างอื่น เช่น ใยหาง แผ่นฐาน เป็นต้น มีกรดนิวคลีอิคเป็นดีเอ็นเอสายคู่

B. มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่มีความยาวมากกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมาก และไม่มีชีทที่หดตัวได้ห่อหุ้ม อาจมีหรือไม่มีโครงสร้างบริเวณปลายอนุภาคก็ได้ มีกรดนิวคลีอิคเป็นดีเอ็นเอสายคู่

C. มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่มีความยาวสั้นกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวและไม่สามารถหดตัวได้ มีกรดนิวคลีอิคเป็นดีเอ็นเอสายคู่

D. รูปหกเหลี่ยม ที่ประกอบด้วยแคพโซเมอร์ขนาดใหญ่และมีปุ่ม (knob) เกาะอยู่บนมุมยอดของแคพซิด มีกรดนิวคลีอิคเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

E. รูปหกเหลี่ยมที่ประกอบด้วยแคพโซเมอร์ขนาดเล็ก มีกรดนิวคลีอิคเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว

F. รูปร่างสายยาว มีกรดนิวคลีอิคเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

นอกจากนี้ Reanney และ Ackermann (1982) ได้ทำการจัดจำแนกฟาจเป็น 7 กลุ่มหลัก คือ A-G ซึ่งในกลุ่ม A-F นั้นนอกจากจะใช้รูปร่างของอนุภาคและชนิดของกรดนิวคลีอิคในการจัดจำแนกเช่นเดียวกับวิธี Bradley แล้ว ในแต่ละกลุ่มหลักยังมีการแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย

โดยอาศัยขนาดของแคพซิดมาเป็นหลักเกณฑ์ในการจำแนกด้วย ทำให้สามารถแบ่งออกเป็น 17 กลุ่มย่อย และมีเพิ่มขึ้นมาอีกหนึ่งกลุ่ม คือ กลุ่ม G ซึ่งเป็นฟาจที่มีรูปร่างไม่แน่นอนและมีกรดนิวคลีอิคเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (Reanney and Ackermann, 1982)

คณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดหมวดหมู่ไวรัส (International Committee for Taxonomy of Viruses : ICTV) ได้ทำการพัฒนาการจัดจำแนกหมวดหมู่โดยอาศัยหลักเกณฑ์ 3 ประการ คือ ชนิดกรดนิวคลีอิค จำนวนสายของกรดนิวคลีอิค (nucleic acid strandedness) การมีหรือไม่มีเอนเวโลบ (envelope) หุ้มอนุภาค เพื่อใช้เป็นเกณฑ์การเรียกชื่อฟาจในระดับแฟมิลี่ (family) (Matthews, 1982) ดังแสดงในรูปที่ 2.5

2.5 การเพิ่มจำนวนอนุภาคฟาจ

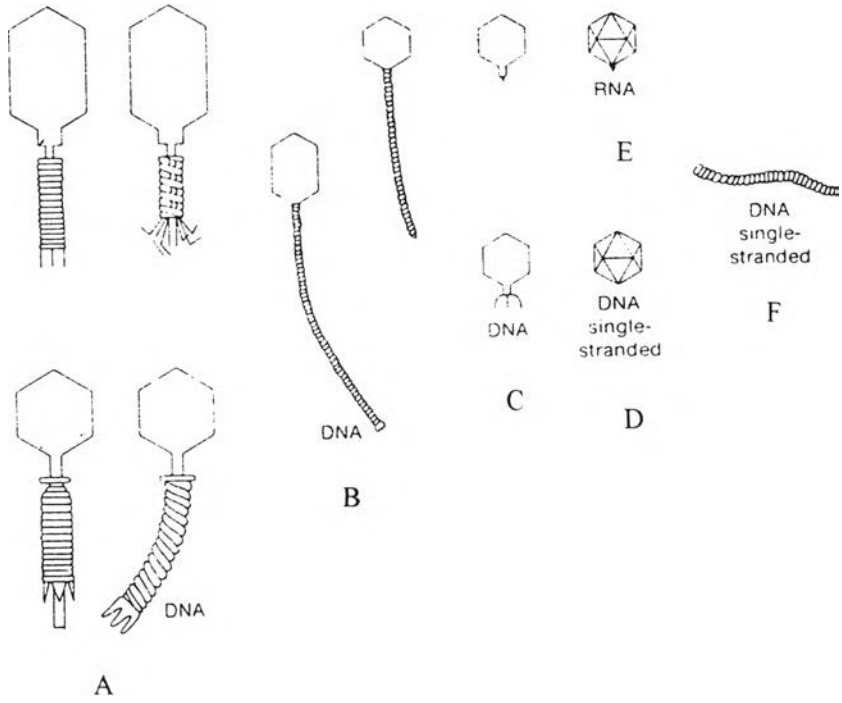
กลไกการเพิ่มจำนวนอนุภาคฟาจในแบคทีเรียสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ ไลติคไซเคิลและไลโสเจนิคไซเคิล

ไลติคไซเคิล (Lytic cycle)

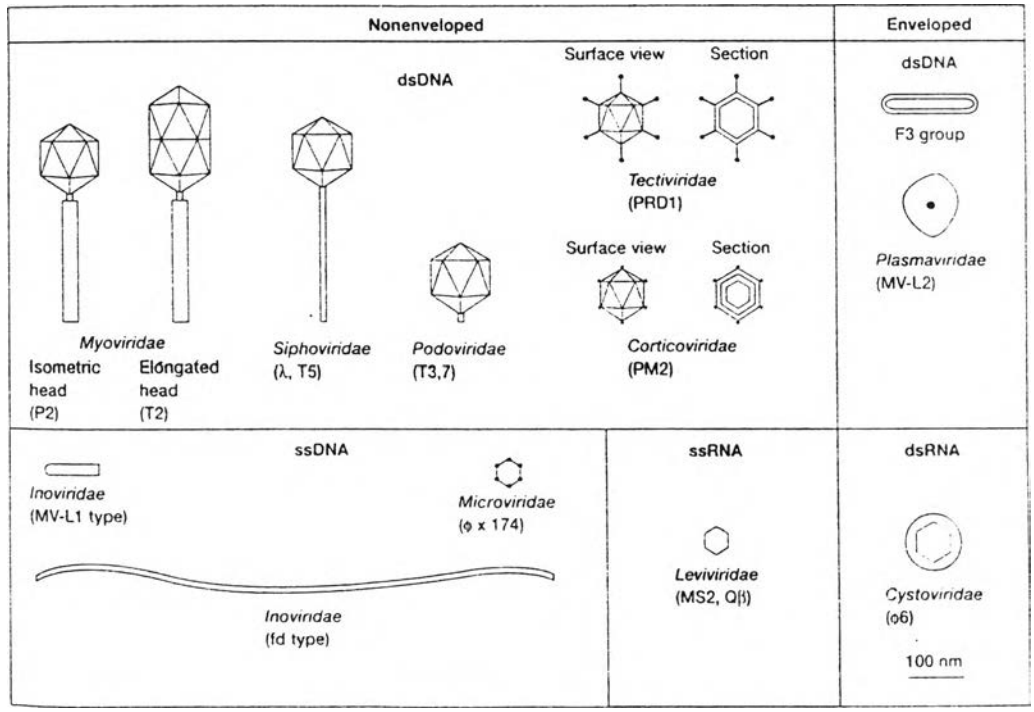
ฟาจที่สามารถเพิ่มจำนวนในไลติคไซเคิลเรียกว่า ไวรูเลนต์ฟาจ (virulent phage) ซึ่งขั้นตอนสุดท้ายของไซเคิลนั้นจะทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการแตก (lysis) และตายได้ (Duckworth, 1987) ตัวอย่างของไวรูเลนต์ฟาจได้แก่ ที-อีเวนฟาจ (T-even phage : T_2, T_4 และ T_6) เป็นต้น มีการศึกษากลไกต่างๆของไลติคไซเคิลอย่างมากในฟาจกลุ่มที-อีเวนฟาจ โดยมี *E. coli* เป็นโฮสท์ ฟาจเหล่านี้ได้มีการศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติทางโมเลกุลมากพอจนสามารถใช้เป็นแบบจำลองของกลไกการเพิ่มจำนวนของฟาจได้ ไลติคไซเคิลประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ (ดังแสดงในรูปที่ 2.6)

1. การเกาะติด (Attachment)

ฟาจจะใช้ปลายของส่วนหางหรือเรียกส่วนนี้ว่าตำแหน่งเกาะติดของฟาจ (attachment site) จับกับตำแหน่งรีเซพเตอร์ (receptor site) ที่จำเพาะบนผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยการเกาะติดนี้มีการสร้างพันธะด้วยแรงที่อ่อนระหว่างสองตำแหน่ง โดยธรรมชาติตำแหน่งรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์แบคทีเรียมีหลายชนิด เช่น โปรตีน เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ไลโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) กรดไทโคอิค (teichoic acid) รวมทั้งแฟลกเจลลา (flagella) และพิลไล (pilli) เป็นต้น ซึ่งโดยปกติรีเซพเตอร์เหล่านี้จะมีหน้าที่อื่น เช่น เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์หรือส่วนประกอบของแคปซูล (capsule) มากกว่าจะทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ให้ฟาจ (Furukawa et al., 1983 ; Maloy et al., 1994)



รูปที่ 2.4 การจำแนกฟาจด้วยวิธีการของ Bradley โดยอาศัยรูปร่างและชนิดของกรดนิวคลีอิค (Bradley, 1967)



รูปที่ 2.5 การจัดจำแนกและเรียกชื่อฟาจในระดับแฟมิลี (Matthews, 1982)

2. การส่งผ่านกรดนิวคลีอิคของฟาจเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Penetration)

หลังจากเกิดการเกาะติดแล้ว ส่วนชีทที่หดตัวได้ของส่วนหางจะหดตัว ทำให้ส่วนแกนหาง (tail core) ผ่านเข้าสู่ผิวเซลล์จนถึงชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และส่งผ่านกรดนิวคลีอิคจากส่วนหัวผ่านส่วนแกนหางเข้าสู่ไซโตพลาสซึมโดยที่แคพซิดของฟาจยังคงอยู่ภายนอก ดังนั้นกรดนิวคลีอิคจะเข้าสู่เซลล์โดยไม่ผ่านสื่อกลางใด (Furukawa et al., 1983)

ฟาจบางชนิดมีหางที่ยาวจะสามารถส่งผ่านกรดนิวคลีอิคเข้าสู่ไซโตพลาสซึมได้ แต่ฟาจที่มีส่วนหางสั้นจะส่งผ่านไปยังเพอริพลาสซึม (periplasm) ในบริเวณเพอริพลาสมิค (periplasmic space) ซึ่งเป็นชั้นที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนฟาจที่ไม่มีส่วนหางนั้นฟาจจะทำให้แคพซิดแตกออกก่อน และปล่อยกรดนิวคลีอิคไปที่ผนังเซลล์ก่อนเข้าสู่เซลล์ (Maloy et al., 1994) และฟาจที่มีรูปร่างเป็นสายยาวพบว่าแคพซิดจะเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วย (Campbell, 1996)

3 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อไปสู่กระบวนการสร้างอนุภาคฟาจ

หลังจากที่แบคทีเรียเกิดการติดเชื้อแล้ว ความสามารถในการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) การถอดรหัส (transcription) จะลดลงจนไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้อีก เป็นเพราะดีเอ็นเอของแบคทีเรียเกิดการแตกหักหรือโปรตีนของฟาจที่สังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ไปรบกวนการถอดรหัส (Mathews, 1977 ; Maloy et al., 1994)

4. การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิคและโปรตีนของฟาจ

เมื่อดีเอ็นเอของฟาจเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิคของฟาจจะเริ่มต้นจากการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA : messenger RNA) จากดีเอ็นเอของฟาจ โดยอาศัยอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) ของแบคทีเรีย ซึ่งเอ็มอาร์เอ็นเอที่เกิดขึ้นในช่วงนี้เรียกว่าเอ็มอาร์เอ็นเอช่วงต้น (early mRNA) และจะเกิดการแปลรหัส (translation) ไปเป็นโปรตีนและเอนไซม์ที่สำคัญ เช่น ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสของฟาจเอง เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนชุด (copy) ดีเอ็นเอของฟาจและควบคุมเมตาบอลิซึมในเซลล์แบคทีเรีย หลังจากนั้นมีการถอดรหัสช่วงหลังจากการเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอของฟาจ โดยใช้อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสของฟาจเอง จะได้เอ็มอาร์เอ็นเอช่วงหลัง (late mRNA) ซึ่งเมื่อแปลรหัสออกมาจะได้โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของอนุภาคฟาจ เช่น แคพซิด

ส่วนหาง รวมทั้งเอนไซม์และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการประกอบโครงสร้างฟาจและการปลดปล่อยอนุภาคฟาจรุ่นใหม่

5. การประกอบเป็นรูปร่างของอนุภาคฟาจ (Morphogenesis)

ในกระบวนการนี้อาศัยโปรตีน 2 กลุ่ม คือ โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของฟาจและโปรตีนช่วยในการประกอบโครงสร้าง ซึ่งโปรตีนกลุ่มที่สองจะไม่เป็นส่วนหนึ่งของอนุภาคฟาจ การประกอบโครงสร้างจะแยกส่วนหัวและส่วนหาง โดยส่วนหัวนั้นดีเอ็นเอของฟาจจะรวมตัวกับโปรตีนจำเพาะอัดแน่นเข้าไปในแคพซิด สำหรับส่วนหางจะประกอบกับโครงสร้างอื่นๆของหางก่อน จากนั้นทั้งสองส่วนจะมาเชื่อมต่อกันจนเป็นอนุภาคสมบูรณ์ โดยทั่วไปในเซลล์แบคทีเรีย 1 เซลล์สามารถผลิตฟาจได้ 50-100 อนุภาค ทั้งนี้จำนวนอนุภาคฟาจขึ้นกับความจำเพาะของฟาจและแบคทีเรียด้วย (Luria et al., 1978 ; Maloy et al., 1994)

6. การปลดปล่อยอนุภาคฟาจรุ่นใหม่ออกจากเซลล์แบคทีเรีย (Release)

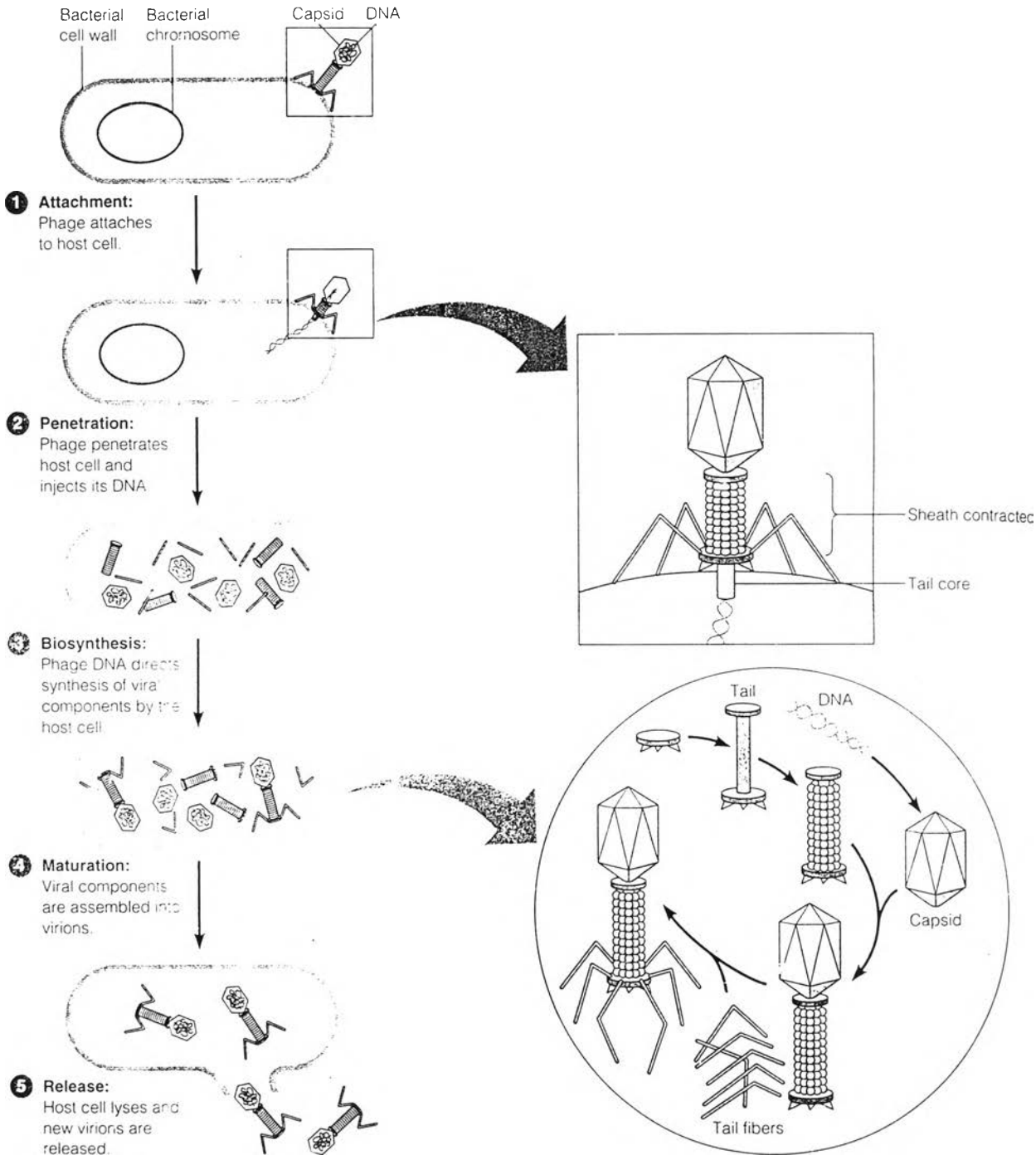
ขั้นตอนสุดท้ายของการติดเชื้อจากฟาจ คือ ฟาจจะสังเคราะห์เอนไซม์ 2 ชนิดเพื่อทำลายเซลล์แบคทีเรีย คือ เอนไซม์โฮลิน (holin) เพื่อย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ และไลโซไซม์เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและฟาจถูกปล่อยออกมาภายนอก (Young, 1992 ; Maloy et al., 1994)

ไลโสเจนิคไซเคิล (Lysogenic cycle)

ฟาจที่มีการเพิ่มจำนวนแบบไลโสเจนิคไซเคิล หรือเพิ่มจำนวนในไลโสเจนิคเซลล์เรียกว่า เทมเพอเรตฟาจ (temperate phage) ซึ่งฟาจประเภทนี้จะไม่ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (Bradley, 1967 ; Duckworth, 1987) ตัวอย่างของเทมเพอเรตฟาจ คือ แลมดาฟาจ (lambda phage) การศึกษาไลโสเจนิคไซเคิลนั้นจะใช้แลมดาฟาจที่มี *E. coli* เป็นโฮสท์เป็นแบบจำลอง ไลโสเจนิคไซเคิลประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ (ดังแสดงในรูปที่ 2.7)

1. ฟาจจะทำการเกาะติดกับแบคทีเรียในตำแหน่งที่จำเพาะและปล่อยดีเอ็นเอสายตรงเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

2. ดีเอ็นเอสายตรงของฟาจจะเปลี่ยนเป็นรูปวงแหวนปิด



รูปที่ 2.6 ไลติค ไซเคิลของ T-even phage (Tortora et al., 1995)

3. ดีเอ็นเอของฟาจในรูปวงแหวนปิด ในช่วงแรกจะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและถอดรหัสโดยอาศัยเอนไซม์จากแบคทีเรีย เมื่อได้เอ็มอาร์เอ็นเอของฟาจแล้ว จะเกิดการแปลรหัสและได้โปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า โปรตีนควบคุม (repressor protein) ซึ่งจะเข้าขัดขวางการทำงานของอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นโครงสร้างอนุภาคของฟาจและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการปลดปล่อยฟาจ (release) ดังนั้นจึงไม่เข้าสู่ไลติคไซเคิล จากนั้นดีเอ็นเอของฟาจในรูปวงแหวนปิดของฟาจจะเข้าสอดแทรก (integration) กับดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ซึ่งจะเรียกฟาจในช่วงนี้ว่า โปรฟาจ (prophage) และเรียกแบคทีเรียนี้ว่า ไลโสเจน (lysogen) โปรฟาจจะมีการเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่มีโปรฟาจอยู่ในโครโมโซม จะไม่เกิดการติดเชื้อจากฟาจชนิดเดียวกันอีกครั้ง เรียกว่า มีภูมิคุ้มกัน (immunity) เป็นเพราะว่าเมื่อดีเอ็นเอของฟาจเข้าสู่ไลโสเจนเซลล์จะไม่มีการถอดรหัส เพราะโปรตีนควบคุมจะเข้าขัดขวางการทำงานของอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนต่อไปได้ (Maloy et al., 1994 ; Campbell, 1996)

4. การชักนำเข้าสู่ไลติคไซเคิล (Induction)

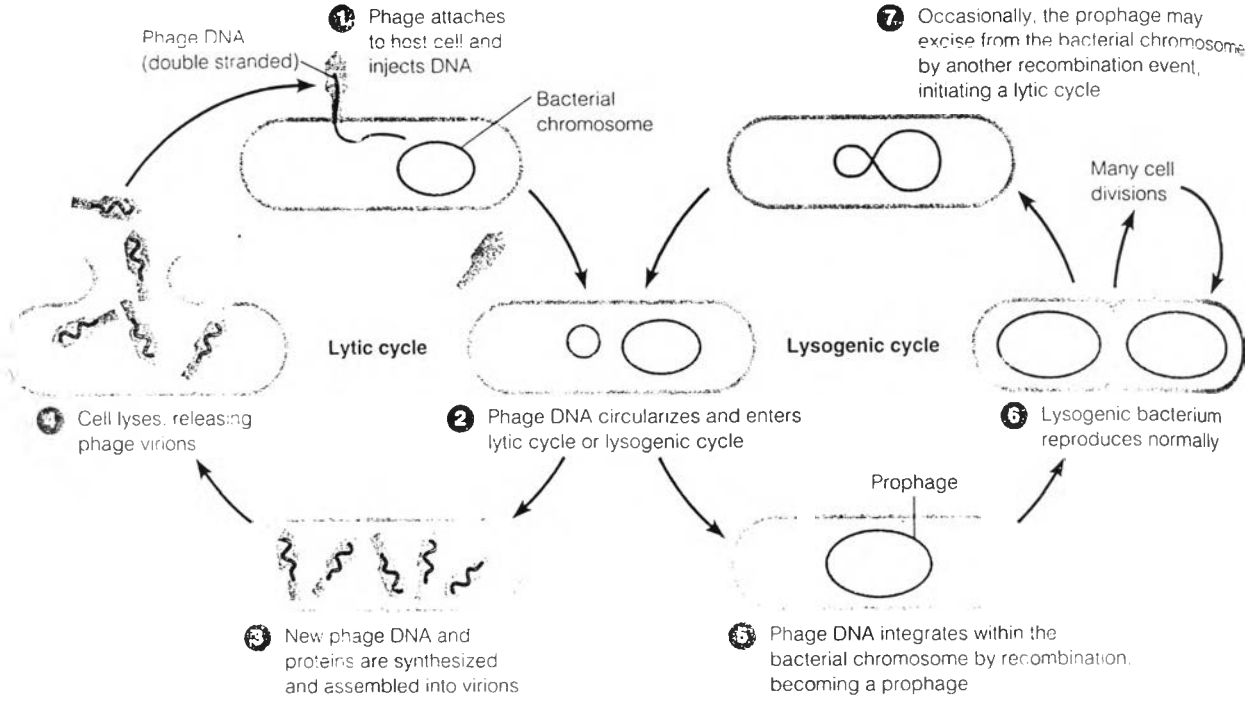
เมื่อแบคทีเรียไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ สามารถทำให้โปรฟาจหลุดออกจากโครโมโซมแบคทีเรียและเข้าสู่ไลติคไซเคิลเพื่อผลิตอนุภาคฟาจรุ่นใหม่ การชักนำโปรฟาจเข้าสู่ไลติคไซเคิลนั้นจะมีความเกี่ยวข้องกับการลดระดับลงของโปรตีนควบคุม การชักนำเข้าสู่ไลติคไซเคิลนั้นสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือเกิดจากการตอบสนองของแบคทีเรียที่มีต่อสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสงอุลตราไวโอเลตหรือสารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เป็นต้น (Luria et al., 1978)

2.6 การเพาะเลี้ยงฟาจ

การเพาะเลี้ยงฟาจเพื่อเพิ่มปริมาณให้มากขึ้น ทำได้โดยการนำฟาจไปเพิ่มจำนวนในโฮสท์เซลล์ของแบคทีเรียที่มีแอคติวิตีของการเจริญเติบโต ซึ่งการเพาะเลี้ยงฟาจนั้นสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. <u>การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว</u>

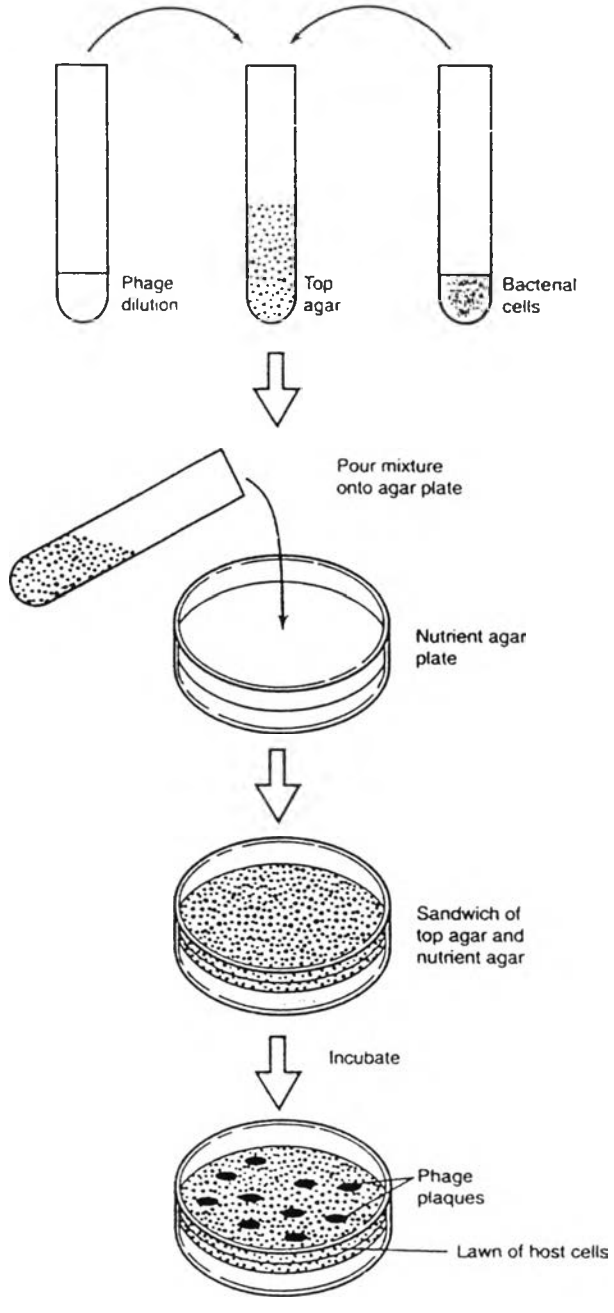
นำฟาจและแบคทีเรียใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ฟาจจะเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียและทำให้เซลล์แตก ซึ่งทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีลักษณะใสเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแต่การเจริญของเซลล์แบคทีเรียเพียงชนิดเดียว (Wistreich and Lechtman, 1980)



รูปที่ 2.7 ไลโสเจนิค ไซเคิลของแลมดาฟาจ (Tortora et al., 1995)

2. <u>การเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นในจานเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น</u> (double agar layer method)

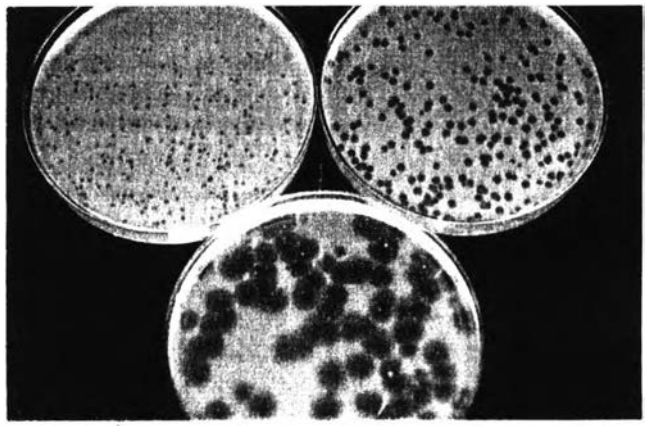
นำฟาจและแบคทีเรียมาผสมกันในอาหารวุ้นเหลว (soft agar) ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเทลงบนอาหารวุ้นแข็งในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มทิ้งไว้ พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญบนชั้นของอาหารวุ้นเหลวหรือชั้นบนสุดของจานเพาะเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเป็นชั้นบางๆ ครอบคลุมบนผิวอาหารวุ้น เรียกว่า ลอน (lawn) ส่วนแบคทีเรียที่ถูกฟาจเข้าทำลายจะเกิดการแตกและปลดปล่อยอนุภาคฟาจรุ่นใหม่ออกมา จากนั้นอนุภาคใหม่จะเข้าทำลายเซลล์ข้างเคียงต่อไป ทำให้ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียเป็นบริเวณหนึ่ง เกิดเป็นบริเวณใสขึ้นบนลอนแบคทีเรีย เรียกว่า พล๊าค (plaque) ดังแสดงในรูปที่ 2.8 ซึ่งวิธีนี้นอกจากเป็นการเพาะเลี้ยงฟาจแล้วสามารถใช้เป็นวิธีการแยกฟาจได้อีกด้วย (Bradley, 1967 ; Brock et al., 1994)



รูปที่ 2.8 การเพาะเลี้ยงฟาจด้วยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น (double agar layer method) (Brock et al., 1994)

2.7 ลักษณะของพล๊าค

เมื่อไวรูเลนต์ฟาจเกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียจะให้พล๊าคที่มีลักษณะใส (clear plaque) เป็นเพราะบริเวณที่เป็นพล๊าคนั้นแบคทีเรียเกิดการแตกสลายและตายจนหมด ส่วนเทมเพอเรตฟาจจะให้พล๊าคที่มีลักษณะขุ่น (turbid plaque) เพราะบริเวณกลางพล๊าคนั้นยังคงมีแบคทีเรียที่เป็นไลโสเจนเจริญอยู่ (Goyal, 1987) ลักษณะพล๊าคใสและขุ่น แสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ลักษณะของพล๊าค รูปบน : ลักษณะพล๊าคใสของฟาจ T_2 และ T_4
รูปล่าง : ลักษณะพล๊าคขุ่นของแลมดาฟาจ (Black, 1999)

2.8 การนับจำนวนฟาจ

การนับจำนวนฟาจจะใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณพล๊าคที่เกิดขึ้น (plaque assay) เนื่องจากเป็นที่ทราบกันว่า พล๊าคที่เกิดขึ้นบนลอนแบคทีเรียแต่ละพล๊าคนั้นจะเกิดจากการติดเชื้อของฟาจเพียง 1 อนุภาค ดังนั้นการนับจำนวนพล๊าคที่เกิดขึ้นจากฟาจแขวนลอย (phage suspension) ตั้งต้นที่มีการเจือจางแบบให้มีค่าลดลงระดับละสิบเท่า (serial ten fold dilution) นำจำนวนพล๊าคและอัตราการเจือจางมาคำนวณ จะได้จำนวนฟาจในรูปของค่าความสามารถในการเกิดพล๊าค (Plaque forming units : PFU) แม้ว่าค่าความสามารถในการเกิดพล๊าคจะไม่ใช่จำนวนฟาจที่แท้จริง แต่เป็นอัตราส่วนที่สามารถใช้ประมาณจำนวนฟาจได้อย่างเหมาะสม (Luria et al., 1978 ; Morgan, 1993)

2.9 โฮสท์-เรนจ์ (Host range)

ฟาจที่มีความสามารถในการทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียได้หลายชนิด (species) หรือตระกูล (genus) เรียกว่า ฟาจมีโฮสท์-เรนจ์ ซึ่งเกิดจากการเกาะติดของฟาจกับรีเซพเตอร์บนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่มีความใกล้ชิดกัน ดังนั้นความสามารถของการเกาะติดของฟาจกับรีเซพเตอร์ที่จำเพาะนี้จึงเป็นปัจจัยที่จำกัดจำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อของฟาจชนิดนั้นๆได้ (Lomovskaya et al., 1980 ; Coetzee, 1987)

อีกประการหนึ่งโฮสท์-เรนจ์กว้างหรือแคบ ยังขึ้นอยู่กับสิ่งขัดขวางหรือป้องกันภายในเซลล์แบคทีเรีย ที่เรียกว่า Host controlled restriction and modification system ซึ่ง restriction เป็นระบบการป้องกันการบุกรุกของดีเอ็นเอแปลกปลอมเข้าสู่เซลล์ และ modification เป็นระบบการป้องกันการย่อยสลายดีเอ็นเอของแบคทีเรียเอง ซึ่งทั้ง 2 ระบบจะพบในแบคทีเรียทั่วไป โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ 2 ชนิดคือ เอนโดนิวคลีเอส (endonuclease) และเมทิลเลส (methylase) เมื่อดีเอ็นเอของฟาจเข้าสู่เซลล์ เอนโดนิวคลีเอสสามารถจำตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะบนดีเอ็นเอของฟาจ เพื่อทำการย่อยดีเอ็นเอเป็นชิ้นเล็ก ทำให้ดีเอ็นเอของฟาจไม่เกิดการเพิ่มจำนวน แต่ถ้าหากในเซลล์มีเมทิลเลสที่จำเพาะกับดีเอ็นเอฟาจ ซึ่งจะทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่งจำเพาะบนดีเอ็นเอของฟาจ ทำให้สามารถต้านทานการย่อยสลายของนิวคลีเอสได้ ดังนั้นโฮสท์-เรนจ์ของฟาจนั้นจะขึ้นอยู่กับความสามารถของดีเอ็นเอของฟาจที่จะต้านทานต่อเอนโดนิวคลีเอสนั่นเอง (Kruger et al, 1983 ; Sanders, 1987 ; Levy et al.,1988)

2.10 การประยุกต์ใช้ฟาจในด้านต่างๆ

1. <u>การใช้ฟาจในการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย</u>

ฟาจบางชนิดสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว ทั้งนี้เป็นเพราะความจำเพาะกับรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์แบคทีเรีย และการมีระบบการป้องกันตัวเองของแบคทีเรียหรือ Host controlled restriction and modification system เป็นตัวกำหนด ดังนั้นจึงได้มีการนำฟาจมาใช้จัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียชนิดเดียวกัน โดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคที่มีความเหมือนกันมาก เช่น *Salmonella typhi* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) หรือ *Staphylococcus aureus* เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ อาศัยเทคนิคของ phage typing ทำให้การวินิจฉัยเชื้อเป็นไปอย่างรวดเร็วและถูกต้อง ฟาจที่นำมาใช้จัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียนั้นจะต้องเป็นไวรูเลนต์ฟาจ มีความเสถียร เจริญเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียอย่างรวดเร็วและให้พล๊าคที่ชัดเจน (DuBow, 1994 ; Black, 1999)

2. <u>ทรานสดักชัน</u> (Transduction)

ทรานสดักชัน คือ ปรากฏการณ์ที่ฟาจสามารถถ่ายทอดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากเซลล์หนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่งได้ แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ ทรานสดักชันแบบทั่วไป และทรานสดักชันแบบจำเพาะ

<u>ทรานสดักชันแบบทั่วไป</u> (generalized transduction)

เป็นการถ่ายทอดดีเอ็นเอแบบสุ่มและจะเกิดขึ้นโดยไวรูเลนต์ฟาจในขณะที่ฟาจเกิดการติดเชื้อ ดีเอ็นเอของแบคทีเรียจะถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และในขั้นตอนการประกอบอนุภาคฟาจใหม่ที่สมบูรณ์นั้น ชิ้นดีเอ็นเอของแบคทีเรียจะถูกบรรจุเข้าไปในส่วนหัวของฟาจ และเมื่อฟาจอนุภาคใหม่ที่มีดีเอ็นเอของแบคทีเรียบรรจุอยู่เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียเซลล์ใหม่ ทำให้เกิดการถ่ายทอดดีเอ็นเอไปสู่เซลล์ใหม่ด้วย ตัวอย่างฟาจที่เกิดทรานสดักชันแบบนี้ คือ ฟาจ P22 ที่มี *Salmonella typhimurium* เป็นโฮสท์ (Luria et al., 1978 ; Maloy et al., 1994)

<u>ทรานสดักชันแบบจำเพาะ</u> (specialized transduction)

เป็นการถ่ายทอดดีเอ็นเอโดยเทมเพอเรตฟาจ ซึ่งมีการศึกษาอย่างมากในแลมดาฟาจของ *E. coli* เมื่อแลมดาฟาจเกิดการติดเชื้อ ดีเอ็นเอของฟาจจะเข้าสอดแทรกในดีเอ็นเอของ *E. coli* หรือคือโปรฟาจ โดยจะเข้าสอดแทรกในตำแหน่งระหว่างยีน *gal* และยีน *bio* บนโอเปอรอนและเมื่อถูกชักนำเข้าสู่ไลติคไซเคิล โปรฟาจจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ของ *E. coli* ซึ่งทำให้มียีน *gal* และยีน *bio* ติดมากับดีเอ็นเอของฟาจด้วย หลังจากประกอบเป็นอนุภาคฟาจใหม่ที่มียีน *gal* หรือยีน *bio* อย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองยีน ดังนั้นเมื่อเกิดการติดเชื้อกับ *E.coli* ที่ไม่สามารถใช้กาแลคโตสหรือไม่สามารถสังเคราะห์ไบโอตินได้นั้นเปลี่ยนแปลงเป็นสามารถใช้กาแลคโตสหรือสร้างไบโอตินได้ตามลำดับ ฟาจที่เกิดทรานสดักชันแบบจำเพาะสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นพาหะในงานด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์ได้ (Luria et al., 1978 ; Maloy et al., 1994)

2.11 แอคติโนฟาจ (Actinophage)

แอคติโนฟาจ คือ ฟาจที่สามารถเกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซิทีส (actinomycetes) มีการศึกษาครั้งแรกโดย Wieringa และ Wiebols ในปี 1936 (Dowding, 1973) การศึกษาแอคติโนฟาจส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาแอคติโนฟาจที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อกับสเตรปโตมัยซิทีส (Streptomycetes) เช่น ฟาจ ϕC31, R4 และ SH10 เป็นต้น ทั้งนี้สืบเนื่องมาจากนักวิทยาศาสตร์มีความสนใจที่จะพัฒนาแอคติโนฟาจเป็นพาหะสำหรับงานด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์ของสเตรปโตมัยซิทีส (Donadio et al., 1986 ; Kuhn et al., 1987 ; Diaz et al., 1989)

นอกจากนี้ยังมีแอคติโนฟาจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแอคติโนมัยซิทีสกลุ่มอื่น เช่น ϕFR114, ϕFR113 และ ϕFR371 แยกมาจาก *Faenia rectivirigula* (Schneider et al., 1987) ϕ-115A แยกจาก *Thermoactinomyces* sp. และ ϕ-150A แยกจาก *Micropolospora* sp. (Kurup and Heinzen., 1978)

Ackermann และคณะ (1985) ให้ความหมายของแอคติโนฟาจว่า นอกจากเป็นฟาจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซิทีสแล้ว ยังรวมถึงฟาจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแอคติโนมัยซิทีสด้วย เช่น Corynebacteria และ Propionibacteria เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.1

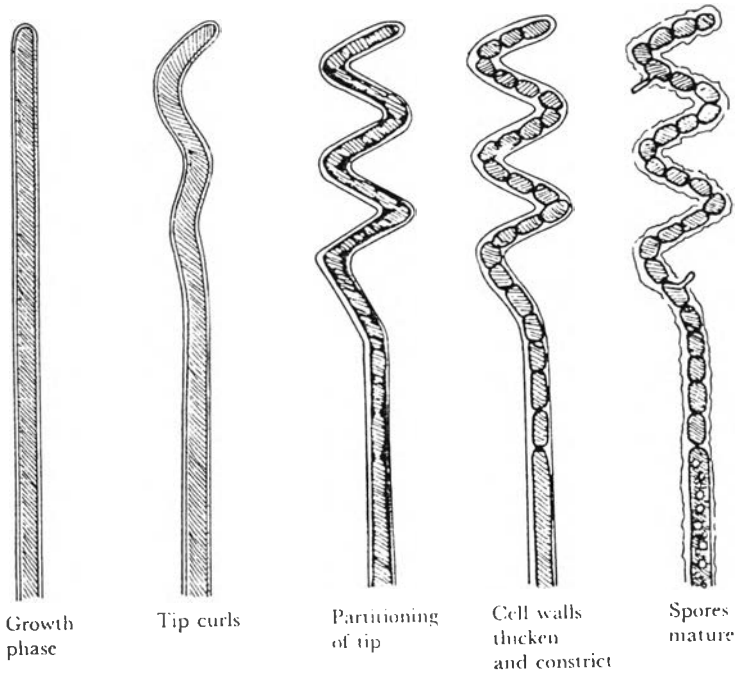
ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างของแอคติโนฟาจที่เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียที่ไม่อยู่ในกลุ่มแอคติโนมัยซิทีส (Ackermann et al., 1985)

แบคทีเรีย	แอคติโนฟาจ
Corynebacterium sp.	β, A
Arthobacter sp.	Arp, ϕAC8010, AN25-S1
Kurthia sp.	7/26
Propionibacterium sp.	P-a-1
Actinomyces sp.	AV-1
Bifidobacterium sp.	Bir
Mycobacterium sp.	13, lacticola, Leo
	R1-Myb

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

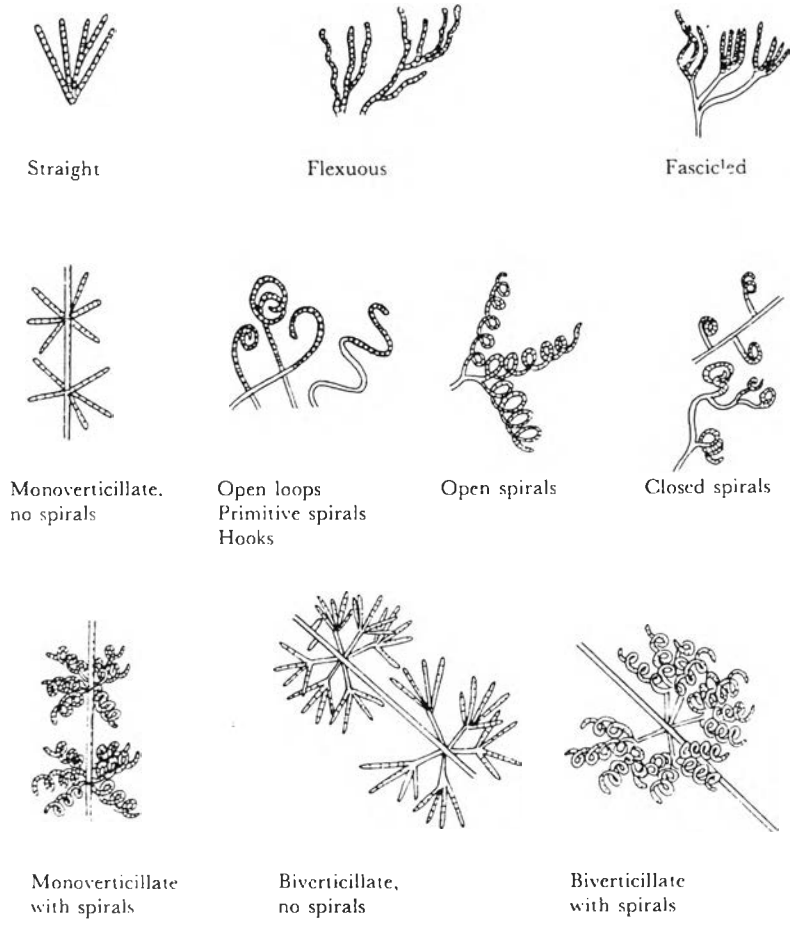
2.12 ลักษณะทั่วไปของสเตรปโตมัยซิทีส (Streptomycetes)

สเตรปโตมัยซิทีสเป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งของแอคติโนมัยซิทีสที่มีจำนวนสายพันธุ์มากและมีความหลากหลายสูง ติดสีแกรมบวก มัยซิเลียมมีความกว้าง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ความยาวไม่แน่นอน และภายในมัยซิเลียมไม่มีผนังกั้น การเจริญของสเตรปโตมัยซิทีสจะเกิดขึ้นที่ปลายมัยซิเลียมพร้อมกับการแตกกิ่งก้านสาขาของมัยซิเลียมด้วย สเตรปโตมัยซิทีสสร้างสปอร์ที่เรียกว่า โคนิเดีย โดยจะสร้างขึ้นบนมัยซิเลียมที่เจริญในอากาศหรือแอเรียลมัยซีเลียม (aerial mycelium) ซึ่งการสร้างสปอร์เกิดขึ้นโดยการเกิดผนังกั้นแอเรียล มัยซีเลียม ทำให้แยกเป็นเซลล์เดี่ยว (Wildermuth, 1970 ; Williams et al., 1983) ดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 การสร้างโคนิเดียของสเตรปโตมัยซิทีส (Wildermuth, 1970)

สปอร์ของสเตรปโตมัยซิทีสจะต่อกันเป็นสายตั้งแต่ 5-50 สปอร์หรือมากกว่านั้น ไม่เคลื่อนที่ ลักษณะบนผิวสปอร์มีตั้งแต่ผิวเรียบ ลักษณะเป็นหนามยื่นออกมา จนถึงขรุขระ การเรียงตัวของสายของสปอร์แบ่งออกเป็นหลายลักษณะ เช่น การเรียงตัวแบบสายตรง (straight) และสายโค้งงอ (flexuous) การเรียงตัวเป็นลักษณะตะขอ (hook) ลูป (loop) หรือขดเป็นเกลียว (spirals) เป็นต้น (Pridham et al., 1958) ดังแสดงในรูปที่ 2.11 โคนิเดียและแอเรียลมัยซีเลียม มักจะเกิดการสร้างรงควัตถุ (pigment) เมื่อโคโลนีเจริญเต็มที่ ในบางครั้งมัยซิเลียมที่เจริญในอาหารหรือซับสเตรตมัยซีเลียม (substrate mycelium) สร้างรงควัตถุได้เช่นกัน ส่วนประกอบผนังเซลล์ของสเตรปโตมัยซิทีส คือ L,L-diaminopimelic acid และปริมาณของ G+C ในสายดีเอ็นเอ คือ 69-78 % (Lechevalier and Lechevalier, 1993 ; Williams et al., 1983)



รูปที่ 2.11 โครงสร้างการเรียงตัวของสายสปอร์ของสเตรปโตมัยซิทีส (Pridham et al., 1958)

สเตรปโตมัยซิทีสมีความสำคัญต่อระบบนิเวศน์ธรรมชาติ โดยเฉพาะในดินจะพบสเตรปโตมัยซิทีสเป็นจำนวนมาก โดยอาจพบ 1-20 เปอร์เซนต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบภายในดิน (Lechevalier and Lechevalier, 1993) และยังพบว่าดินที่ได้มาจากเกษตรกรรม 1 กรัม สามารถแยกสเตรปโตมัยซิทีสได้ 10^8 ซี.เอฟ.ยู (CFU : Colony-forming unit) (Labeda and Shearer, 1990) สเตรปโตมัยซิทีสมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในดิน โดยสามารถผลิตเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) เซลลูเลส (cellulase) และ ซูโลบิไลส์ ลิกนิน (solubilise lignin) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายในดินและสามารถย่อยซับสเตรตที่ย่อยสลายได้ยากในภาวะที่มีอ๊อกซิเจน เช่น เพคติน (pectin) ลิกนิน (lignin) ไคติน (chitin) และ เคอราติน (keratin) เป็นต้น (Willington et al., 1990 ; Lechevalier and Lechevalier, 1993)

นอกจากนี้สเตรปโตมัยซิทีสยังมีความสำคัญทางการแพทย์และเทคโนโลยีชีวภาพ คือเป็นแหล่งผลิตที่สำคัญของสารปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) เททราซัยคลิน (tetracyclin) คลอแรมฟินิคอล (cloramphenicol) นีโอมัยซิน (neomycin) และอีรีโทรมัยซิน (erythromycin) เป็นต้น รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์และวิตามินด้วย แม้ว่าสเตรปโตมัยซิทีสส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระ (saprophytes) แต่มีส่วนน้อยที่สามารถก่อโรคในพืชและสัตว์ได้ เช่น *Streptomyces scabies* เป็นสาเหตุของการเกิดสะเก็ดแผลบนมันฝรั่งและหัวบีท (Lechevalier and Lechevalier, 1993)

2.13 การศึกษาแอคติโนฟาจของสเตรปโตมัยซิทีสในดิน

เนื่องจากกลุ่มของแอคติโนมัยซิทีสที่พบมากที่สุดในดิน คือ สเตรปโตมัยซิทีส ดังนั้นการศึกษาแอคติโนฟาจที่อาศัยอยู่ในดินจึงมุ่งเน้นไปที่แอคติโนฟาจที่มีความจำเพาะกับสเตรปโตมัยซิทีสนั่นเอง แอคติโนฟาจหลายตัวถูกแยกจากสิ่งแวดล้อมธรรมชาติและนำไปศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ แต่การศึกษาเกี่ยวกับการดำรงชีวิตของฟาจในสิ่งแวดล้อมธรรมชาติยังมีน้อยมาก (Herron and Wellington, 1990)

Sykes และ Wellington (1978) พบว่าแอคติโนฟาจจำนวนมากกว่า 60 เปอร์เซนต์ที่แยกจากดินนั้นจะถูกดูดซับไว้ด้วยอนุภาคเคโอลิไนท์ (kaolinite) ที่อยู่ในดิน

Sykes และคณะ (1981) พบว่าแอคติโนฟาจจะมีความเสถียรอยู่ในดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5.5 ถึง 9.0 และแอคติวิตีของแอคติโนฟาจจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำหรือสูงกว่านี้ แอคติโนฟาจจะดำรงชีวิตอยู่ในดินได้ดีเมื่อดินนั้นมีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลางและสามารถดำรงชีวิตได้ช่วงระยะหนึ่งเมื่อดินมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6.0

จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการศึกษาการดำรงชีวิตของแอคติโนฟาจที่เป็นอนุภาคอิสระในดิน ซึ่ง Reanney และคณะ (1983) รายงานว่าในความเป็นจริงแล้วมีความเป็นไปได้มากที่ฟาจส่วนใหญ่ในธรรมชาติจะดำรงชีวิตในรูปของไลโสเจน ดังนั้น Herron และ Wellington (1990) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของสเตรปโตมัยซิทีสและแอคติโนฟาจในดิน โดยการนำสปอร์ของสเตรปโตมัยซิทีสและแอคติโนฟาจที่มีความจำเพาะกัน ใส่ลงไปในดิน 2 ชนิด คือ ดินที่ฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อที่มีการเติมไคติน (chitin) และแป้ง (soluble starch) บ่มทิ้งไว้ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าในช่วงแรกของการทดลองในดินทั้งสองชนิดจะมีสารอาหารจำนวนมาก สเตรปโตมัยซิทีสเกิดการงอกเป็นมัยซีเลียมและเกิดการติดเชื้อโดยแอคติโนฟาจ ทำให้ในช่วงนี้ตรวจพบปริมาณแอคติโนฟาจอิสระจำนวนมาก แต่หลังจากบ่มไว้หลายวันในดินที่มีการฆ่าเชื้อปริมาณสารอาหารลดลง การเจริญของสเตรปโตมัยซิทีสเข้าสู่ช่วงการเป็นสปอร์ (sporulation) โดยในช่วงนี้จะพบแอคติโนฟาจในรูปของไลโสเจนและจะตรวจพบไปจนถึงวันที่ 60 ของการทดลอง แต่ในดินที่ไม่ฆ่าเชื้อไม่สามารถตรวจหาไลโสเจนได้ ทั้งนี้เป็นเพราะว่าในดินนั้นมีสารอาหารเพียงพอจากการดำรงชีวิตร่วมกันของจุลินทรีย์หลายชนิดในดิน ซึ่งทำให้สเตรปโตมัยซิทีสมีการเจริญในช่วงมัยซิเลียมสั้นและไม่เข้าสู่ช่วงการเป็นสปอร์ จึงพบแต่การเพิ่มจำนวนของอนุภาคแอคติโนฟาจอิสระ ซึ่ง Herron และ Wellington ได้สรุปว่าเทมเพอเรตฟาจสามารถถ่ายทอดยีนไปสู่ประชากรของสเตรปโตมัยซิทีสได้ในดินที่มีไลโสเจนเซลล์ที่มีความทนทาน และสามารถเกิดการกระจายของยีนไปสู่สเตรปโตมัยซิทีสด้วยการปล่อยอนุภาคฟาจโดยวิธีธรรมชาติ (spontaneous release) ในช่วงเวลาที่ดินมีสารอาหารเพียงพอ (Herron and Wellington, 1990)

2.14 การแยกแอคติโนฟาจจากดิน

การแยกแอคติโนฟาจจากดินสามารถทำได้ 2 วิธีคือ วิธีการนับจำนวนโดยตรงและวิธีการส่งเสริมการเจริญ ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้จะตรวจสอบอนุภาคแอคติโนฟาจโดยอาศัยการแตกของโฮสท์จากวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น

วิธีการนับจำนวนโดยตรง (direct counts)

เป็นวิธีที่ประมาณจำนวนของแอคติโนฟาจที่มีชีวิตอยู่ต่อน้ำหนักดิน โดยนำตัวอย่างดินที่ทราบน้ำหนักมาทำการเจือจางและกำจัดแบคทีเรียออกไปด้วยวิธีการกรองหรือทำลายเซลล์ด้วยคลอโรฟอร์ม จากนั้นตรวจสอบการติดเชื้อของแอคติโนฟาจกับโฮสท์ที่คาดว่าจะเกิดการติดเชื้อหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ ซึ่งจำนวนพล๊าคที่เกิดขึ้นจะแสดงถึงจำนวนอนุภาคแอคติโนฟาจในดินที่จำเพาะกับโฮสท์ที่ใช้ ดังนั้นการแยกแอคติโนฟาจด้วยวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับการ

เลือกชนิดสายพันธุ์ของโฮสท์ที่ใช้ จำนวนแอคติโนฟาจที่ได้นั้นสามารถบอกถึงจำนวนอนุภาคทั้งหมดของฟาจที่อาศัยอยู่ในดินได้ (Williams et al., 1987 ; Williams, 1994)

วิธีการส่งเสริมการเจริญ (enrichment procedures)

เป็นวิธีที่อาศัยกระบวนการบ่ม (incubation) ของตัวอย่างดินในอาหารเหลวกับโฮสท์สายพันธุ์ที่ต้องการให้เกิดการติดเชื้อในความเข้มข้นสูง ช่วงเวลาที่ใช้ในกระบวนการบ่มนั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เหมาะสมกับการเจริญของโฮสท์ที่ต้องการแยกแอคติโนฟาจ หลังจากบ่มแล้วแยกอนุภาคดินออก และนำส่วนน้ำใสที่ได้ไปกำจัดแบคทีเรียออกด้วยการกรองหรือทำลายเซลล์ด้วยคลอโรฟอร์ม ตรวจสอบการติดเชื้อของอนุภาคแอคติโนฟาจกับโฮสท์สายพันธุ์ที่ทำการบ่ม วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและมีประสิทธิภาพในการแยกฟาจในดินที่จำเพาะกับโฮสท์จีนัสอื่นๆได้ เช่น *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Rhizobium* sp. เป็นต้น (Williams et al., 1987)

สำหรับการแยกแอคติโนฟาจที่จำเพาะกับสเตรปโตมัยซิทีสในดินส่วนใหญ่จะใช้วิธีการส่งเสริมการเจริญ โดยนำตัวอย่างดินมาบ่มกับสปอร์หรือมัยซิเลียมของสเตรปโตมัยซิทีสที่ต้องการแยกฟาจในอาหารเหลว ทำการเขย่าที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจสอบแอคติโนฟาจด้วยการทำอาหารวุ้นสองชั้น (Dowding, 1973 ; Anne et al., 1984 ; Greene and Goldberg, 1985) นอกจากนี้อาหารเหลวที่ใช้บ่มตัวอย่างดินอาจมีการเติมแร่ธาตุ สารอาหาร และสารปฏิชีวนะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกแอคติโนฟาจ (Diaz et al., 1989)

2.15 ลักษณะเฉพาะทั่วไปของแอคติโนฟาจ

การศึกษาลักษณะเฉพาะของฟาจที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม ซึ่งรวมถึงแอคติโนฟาจนั้นจะอาศัยหลักเกณฑ์ในการศึกษาดังนี้ คือ ลักษณะของพล๊าค การเป็นไลโสเจนของโฮสท์ รูปร่างอนุภาคแอคติโนฟาจ การตรวจสอบโฮสท์-เรนจ์ และหลักเกณฑ์อื่นๆ เช่น การทนต่อคลอโรฟอร์ม ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิต่างๆ ชนิดของกรดนิวคลีอิค เป็นต้น เพื่อนำลักษณะเฉพาะนี้ไปใช้ในการจัดหมวดหมู่ฟาจและเป็นข้อมูลในการศึกษาฟาจทางด้านพันธุศาสตร์ต่อไป (Goyal, 1987)

ลักษณะของพล๊าค

เมื่อทำการตรวจสอบแอคติโนฟาจด้วยการทำอาหารวุ้นสองชั้น พบว่าฟาจแต่ละชนิดจะให้พล๊าคที่มีรูปร่าง และความขุ่นของพล๊าคแตกต่างกัน ซึ่งสามารถใช้ความ

แตกต่างนี้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกฟาจได้ การศึกษารูปร่างของพล๊าคจะดูจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพล๊าคและลักษณะขอบของพล๊าค ส่วนความขุ่นของพล๊าคมี 2 ลักษณะเช่นเดียวกับฟาจทั่วไป คือ พล๊าคที่มีลักษณะใสซึ่งเป็นลักษณะของไวรูเลนต์ฟาจ และพล๊าคทีมีโฮสท์เซลล์เจริญอยู่กลางพล๊าคซึ่งเป็นลักษณะของเทมเพอเรตฟาจ (Clair and McCoy, 1958 ; Dowding and Hopwood, 1973)

การเป็นไลโสเจนของโฮสท์

เป็นการตรวจสอบการเป็นไลโสเจนิคของโฮสท์ หรือโปรฟาจ โดยนำโฮสท์ที่เจริญกลางพล๊าคของพล๊าคที่มีลักษณะขุ่นมาทำการเพิ่มจำนวน ตรวจสอบการมีภูมิคุ้มกันนั่นคือไม่เกิดการติดเชื้อซ้ำจากฟาจตัวเดิม (Stuttard, 1982) และการตรวจสอบการชักนำโปรฟาจเข้าสู่ไลติคไซเคิล (Chater and Carter., 1979 ; Schneider et al., 1990 ; Maloy et al., 1994)

การศึกษารูปร่างอนุภาคแอคติโนฟาจ

การศึกษารูปร่างอนุภาคแอคติโนฟาจจะศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านด้วยวิธีการย้อมแบบเนกาทีฟ (negative staining) โดยจะทำการย้อมด้วยยูรานิลอะซิเตต (uranyl acetate) (Chater and Carter, 1979 ; Stuttard and Dwyer, 1981) หรือโพแทสเซียม ฟอสโฟทังสเตต (potassium phosphotungstate) (Dowding, 1973 ; Hranueli et al., 1979)

Ackermann และคณะ (1985) ทำการรวบรวมแอคติโนฟาจที่จำเพาะกับแอคติโนมัยซิทีสหลายจีนัส เพื่อนำมาจัดจำแนกหมวดหมู่ พบว่ารูปร่างอนุภาคแอคติโนฟาจเป็นแบบรูปทรงไอโคซาฮีดรัลที่มีส่วนหาง ไม่พบแบบรูปทรงไอโคซาฮีดรัลที่ไม่มีส่วนหางหรือรูปร่างแบบสายยาว Ackermann และคณะ ได้จัดหมวดหมู่แอคติโนฟาจโดยใช้รูปร่างของอนุภาคเป็นเกณฑ์พบว่าอยู่ในกลุ่ม A1, A2, B1, B2, C1 และ C2 ซึ่งตรงกับการจัดจำแนกกลุ่มของฟาจโดยวิธีของ Bradley (1967) ในกลุ่ม A, B และ C

สำหรับอนุภาคแอคติโนฟาจที่จำเพาะกับสเตรปโตมัยซิทีสส่วนใหญ่ที่ทำการศึกษาแล้วนั้นส่วนใหญ่จะมีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่ยาวแบบหดตัวไม่ได้และบางอนุภาคพบแผ่นฐานด้วย ซึ่งเมื่อทำการจำแนกกลุ่มด้วยวิธีการของ Bradley พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม B ขนาดของส่วนหัวและส่วนหางของแต่ละอนุภาคมีความแตกต่างกัน (Hranueli et al., 1979 ; Klaus et al., 1981 ; Donadio et al., 1986)

การตรวจสอบโฮสท์-เรนจ์

แอคติโนฟาจแต่ละชนิดสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับโฮสท์สายพันธุ์อื่นๆนอกเหนือจากสายพันธุ์ที่ตัวเองถูกแยกออกมาได้ นั่นคือถ้าทำให้จำนวนโฮสท์เกิดการติดเชื้อได้หลายสายพันธุ์ แสดงว่าฟาจชนิดนั้นมีโฮสท์-เรนจ์กว้าง และหากแอคติโนฟาจมีความจำเพาะกับโฮสท์สายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง แสดงว่ามีโฮสท์-เรนจ์แคบ ทั้งนี้ความกว้างหรือแคบของโฮสท์-เรนจ์จะถูกจำกัดด้วยความจำเพาะของแอคติโนฟาจกับรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์โฮสท์และระบบป้องกันภายในโฮสท์เซลล์ (Lomovskaya et al., 1980)

Chater และ Carter (1979) รายงานว่าแอคติโนฟาจ R4 มีโฮสท์-เรนจ์กว้างโดยตรวจสอบการติดเชื้อกับสเตรปโตมัยซิทีสสายพันธุ์ต่างๆ 36 สายพันธุ์ พบว่าสามารถเกิดการติดเชื้อได้ 18 สายพันธุ์ แต่ไม่เกิดการติดเชื้อกับ *Nocardia mediterranei*

Klaus และคณะ (1981) พบว่าแอคติโนฟาจ SH10 มีโฮสท์-เรนจ์กว้าง สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับสเตรปโตมัยซิทีสได้ 28 สายพันธุ์จากสายพันธุ์ทดสอบทั้งหมดจำนวน 36 สายพันธุ์และไม่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแอคติโนมัยซิทีสจีนัสอื่น ได้แก่ *Oerskovia* sp., *Nocardia* sp., *Rhodococcus* sp., *Promicromonospora* sp., *Micropolyspora* sp., *Actinomadura* sp. และ *Micromonospora* sp.

Diaz และคณะ (1989) รายงานว่าแอคติโนฟาจจำนวน 9 ชนิดที่แยกได้จาก *Streptomyces antibioticus* นั้นแต่ละชนิดมีโฮสท์-เรนจ์แตกต่างกัน เมื่อตรวจสอบการติดเชื้อกับสเตรปโตมัยซิทีสทั้งหมด 31 สายพันธุ์ พบว่าแอคติโนฟาจ ϕA9 ทำให้เกิดการติดเชื้อกับสเตรปโตมัยซิทีส 7 สายพันธุ์ ส่วน ϕA3 และ ϕA8 ทำให้เกิดการติดเชื้อ 19 สายพันธุ์ และไม่พบว่ามีแอคติโนฟาจที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับจีนัส *Saccharopolyspora* sp., *Nocardia* sp. และ *Micromonospora* sp. ทั้งนี้เป็นเพราะส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซิทีสแต่ละจีนัสมีส่วนประกอบแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแอคติโนฟาจ 8 ชนิดไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับ *S. albus* G ยกเว้น ϕA7 ทั้งนี้ *S. albus* G สามารถผลิตเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส *Sal*GI ดังนั้นบนจีโนมของแอคติโนฟาจที่มีบริเวณจำเพาะต่อการย่อยของ *Sal*GI จะถูกย่อยด้วย *Sal*GI จึงไม่สามารถเกิดการติดเชื้อกับ *S. albus* G แต่ ϕA7 สามารถเกิดการติดเชื้อจึงแสดงว่าบนจีโนมไม่มีบริเวณจำเพาะต่อการย่อยของ *Sal*GI

การที่แอคติโนฟาจมีโฮสท์-เรนจ์กว้างนั้นจะมีความเป็นไปได้ในการเป็นตัวกลางของการถ่ายทอดยีนไปสู่สเตรปโตมัยซิทีสได้หลายสายพันธุ์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำแอคติโนฟาจไปพัฒนาเป็นพาหะ (Klaus et al., 1981) สำหรับแอคติโนฟาจหลายชนิด เช่น SH10 , R4 จะไม่เกิดการติดเชื้อกับแอคติโนมัยซิทีสจีนัสอื่นได้นอกเหนือจากสเตรปโตมัยซิทีส ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกสเตรปโตมัยซิทีส ออกจากแอคติโนมัยซิทีสจีนัสอื่นได้ทำนอง

เดียวกับการศึกษาของ Prauser (1976) ซึ่งใช้แอคติโนฟาจเป็นเครื่องบอกความแตกต่างระหว่างจีนัสแอคติโนมัยซิทีสที่มีส่วนประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกัน เช่น *Streptomyces* sp., *Nocardia* sp. และ *Actinomadura* sp. ซึ่งชนิดของผนังเซลล์ (cell wall type) มีส่วนประกอบเป็น L,L-Diaminopimelic acid (L,L-DAP: cell wall type 1), *meso*-DAP (cell wall type 4) และ *meso*-DAP (cell wall type 3) ตามลำดับ (Williams et al., 1980)