เมตาจีโนมิกส์ : เปิดโลกแห่งจีโนมจุลินทรีย์ในธรรมชาติ

Metagenomics: Uncover the World of Microbial Genomes in Nature

อัชฌา บุญมี*

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

Atcha Boonme*

Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen 40002

บทคัดย่อ

วิธีการเมตาจีโนมิกส์เป็นวิธีการที่ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในหนึ่งชุมชีพ (community) หรือในตัวอย่างธรรมชาติ โดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอออกมาจากตัวอย่างที่ต้องการศึกษาโดยตรง ไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นวิธีการเมตาจีโนมิกส์จึงครอบคลุมไปถึงการศึกษาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (unculturable microbes) ซึ่งพบว่ามีมากถึงร้อยละ 99 ของจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างธรรมชาติ วิธีการทางเมตาจีโนมิกส์เริ่มตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม จากนั้นจึงวิเคราะห์ดีเอ็นเอเหล่านั้นด้วยวิธีการต่าง ๆ กันไป ซึ่งส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่การค้นหายีนที่ถอดรหัสสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและยาชนิดใหม่ ๆ โดยวิธีที่นำมาใช้ค้นหาสารชีวภาพใหม่ ๆ จากฐานข้อมูลเมตาจีโนม (metagenomic library) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีหลัก ๆ คือ การอ้างอิงจากคุณสมบัติจำเพาะที่ต้องการศึกษา (function-based screening) หรืออ้างอิงจากลำดับเบสของยีนที่ต้องการ (sequence-based screening) ที่ผ่านมามีชีวโมเลกุลมากมายที่ถูกค้นพบด้วยวิธีเมตาจีโนมิกส์ เช่น DNA polymerase, lipase, cellulase, protease หรือยีนที่สร้างสารปฏิชีวนะ โดยสรุปวิธีเมตาจีโนมิกส์นับเป็นเครื่องมือที่สำคัญและจำเป็นที่ใช้ในการค้นหาสารชีวโมเลกุลใหม่ ๆ และใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในชุมชีพ การค้นพบยีนชนิดใหม่ ๆ ทำให้เราทราบถึงโครงสร้างและหน้าที่ของจุลินทรีย์ภายในชุมชีพ ซึ่งอาจจะนำไปสู่การใช้แก้ปัญหาทั้งด้านการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรมได้

คำสำคัญ : เมตาจีโนมิกส์, การวิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์, ความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์

Abstract

Metagenomics is a genomic analysis of a population of microorganisms in one community or one environmental sample by direct isolation of environmental DNA. Since no culture-based method is required, metagenomics therefore includes a study of unculturable microbes, which are as many as 99 % of the total

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** atcha@kku.ac.th

microorganisms in environmental sample. Metagenomic approaches start from direct isolation of nucleic acids from environmental sample, then different methods can be used to analyze the isolated DNA. So far, the main application area of metagenomics is mining of metagenomes for genes encoding novel biocatalysts and drugs. In principle, the techniques for the recovery of novel biomolecules from metagenomic library can be divided into two main approaches: function-based and sequence-based screening. A large number of novel biomolecules have been idientified by metagenomics approach such as DNA polymerase, lipase, cellulase, protease, antibiotics. In conclusion, metagenomics is an important and indispensable tool for the identification of novel biomolecules and analysis of the genetic diversity of microbial communities. Discovery of new genes can provide insight into microbial community structure and function that can be used to solve medical, agricultural, or industrial problems.

Keywords: metagenomics, genomic analysis of microorganisms, genetic diversity of microbial communities

1. บทนำ

โพรแคริโอตเป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีสัดส่วนของจำนวนประชากรมากที่สุด โดยประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ จำนวน 106 ถึง 108 ชนิด [1] จีโนมของจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งรวมของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย ซึ่งที่ผ่านมานั้นเอนไซม์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ได้ถูกค้นพบจากจุลินทรีย์ที่ถูกคัดแยกจากตัวอย่างธรรมชาติโดยวิธีแบบดั้งเดิม ซึ่งนักวิจัยจะเพาะจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงซึ่งมีส่วนประกอบที่แตกต่างกันไปตามคุณสมบัติจำเพาะของจุลินทรีย์ที่ต้องการคัดแยก อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้นั้นมิได้เป็นตัวแทนของชุมชีพจุลินทรีย์ (microbial community) จำนวนมากที่มีอยู่ในตัวอย่างธรรมชาติดังที่ Staley และ Konopka [2] ได้รายงานถึงปรากฏการณ์ที่สังเกตพบจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงและได้เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “great plate count anomaly” ซึ่งหมายความถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนชุมชีพจุลินทรีย์ที่ประมาณค่าโดยวิธีเจือจางและเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงกับวิธีประมาณโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ [2] ความแตกต่างนี้พบมากเป็นพิเศษในตัวอย่างที่เป็นแหล่งน้ำ ซึ่งเมื่อนำจำนวนชุมชีพจุลินทรีย์ที่ได้จากวิธีนับโคโลนีบนอาหารเพาะเลี้ยง (plate count) มาเปรียบเทียบกับจำนวนชุมชีพจุลินทรีย์ที่ได้จากการย้อมสีเซลล์ที่มีชีวิตในตัวอย่างด้วย acridine orange นั้น พบว่ามีความแตกต่างของจำนวนประชากรตั้งแต่ 104 ถึง 106 ชนิด [3] และได้มีการศึกษาลำดับเบส *16S rRNA* จากสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากตัวอย่างดิน จากการคำนวณในระดับพื้นฐานพบว่าในดิน 1 กรัม จะพบจีโนมอยู่ประมาณ 3,000 ถึง 11,000 จีโนม ซึ่งมีเพียงร้อยละ 1 หรือน้อยกว่าเท่านั้นที่สามารถได้มาจากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ [4]

เพื่อเลี่ยงข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงดังกล่าวข้างต้น Pace และคณะ [4] ได้เสนอความคิดในการใช้วิธีการทางอณูวิทยาเพื่อเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมจากตัวอย่างธรรมชาติเป็นครั้งแรก และต่อมาในปี 1991 นักวิจัยกลุ่มนี้ก็ได้รายงานว่าสามารถเพิ่มจำนวนสาร

พันธุกรรมจากธรรมชาติในฝาจเวคเตอร์ได้เป็นครั้งแรก [5] ต่อมา Healy และคณะ ประสบความสำเร็จในการสร้าง metagenomic library หรือในครั้งนั้นคณะนักวิจัยได้เรียกว่า zoolibraries จากสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากชุมชีพจุลินทรีย์ที่เจริญบนหญ้าแห้งในห้องปฏิบัติการ และจากฐานข้อมูลนี้ได้มีรายงานการค้นพบจุลินทรีย์ซึ่งมีการแสดงออกของเอนไซม์ที่มีกิจกรรมย่อยสลายเซลลูโลส [6] นอกจากนี้ได้เริ่มมีการค้นพบลำดับเบสของยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียในกลุ่ม Archaea ที่ได้มาจากตัวอย่างน้ำทะเล ซึ่งไม่เคยมีรายงานว่าสามารถเพาะเลี้ยงมาก่อนอีกด้วย [7] ต่อมา Rondon และคณะ ได้ใช้คำว่า “metagenomics” ในการเรียกวิธีการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ [8]

2. เมตาจีโนมิกส์คืออะไร

คำนิยามเบื้องต้นของเมตาจีโนมิกส์ คือ การวิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในหนึ่งชุมชีพ (community) โดยคำนิยามนั้นจะแตกต่างจาก genomics ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ดีเอ็นเอในจีโนมของเซลล์หนึ่งเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตหนึ่งชนิดเท่านั้น [9] ในภาษากรีก คำแปลที่เหมาะสมที่สุดของคำว่า “meta” ก็คือ “เกินกว่า” หรือ “เหนือกว่า” (หรือคำว่า beyond ในภาษาอังกฤษ) ดังนั้นศัพท์คำนี้จึงแปลได้ว่า “การศึกษาจีโนมที่เกินกว่าหนึ่งจีโนมขึ้นไป” [9] ศัพท์คำนี้ได้ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในงานตีพิมพ์เมื่อปี ค.ศ.1998 ในงานวิจัยศึกษาจุลินทรีย์ในดินโดยใช้การโคลนดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติด้วยวิธีแบบสุ่ม [10] ต่อมาคำนิยามนี้ก็ได้เปลี่ยนแปลงไป โดยได้รวมถึงการศึกษาใด ๆ ก็ตามที่เป็นการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทั้งหมด (ในที่นี้คือจุลินทรีย์) ในหนึ่งชุมชีพ ตัวอย่างของการวิเคราะห์ เช่น การศึกษาโดยตรงถึงความหลากหลายของลำดับเบสของยีน *16S rRNA* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ไปจนถึงการสกัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมโดยไม่ต้องเพาะเชื้อ [11] ทั้งนี้อาจจะมีข้อโต้แย้งว่า ถ้ามีการเพาะเลี้ยงเชื้อในตัวอย่าง ๆ หนึ่งก่อนเพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนประชากรสิ่งมีชีวิตที่สนใจให้มากขึ้น หรือเพื่อให้สปอร์ในตัวอย่างนั้น ๆ แตกออกมาก่อนแล้วจึงทำการศึกษา ก็อาจจะเรียกว่าเป็นวิธีเมตาจีโนมิกส์ ได้เช่นกัน ดังนั้นคำนิยามดังกล่าวจึงควรที่จะมีไว้แบบกว้าง ๆ ไม่จำกัดให้เฉพาะลงไปให้มากนัก [9] โดยสรุปแล้วคำนิยามที่ใช้ในปัจจุบันของเมตาจีโนมิกส์คือการศึกษาดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างธรรมชาติ ซึ่งรวมถึงจีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในหนึ่งตัวอย่าง ทั้งนี้จุลินทรีย์ที่อยู่ในตัวอย่างธรรมชาติที่ศึกษานั้นส่วนใหญ่เพาะเลี้ยงไม่ได้ (unculturable) ดังนั้นเมตาจีโนมิกส์จึงครอบคลุมไปถึงการศึกษาจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงไม่ได้ด้วย

3.แนวทางในการศึกษาเมตาจีโนมิกส์

กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเมตาจีโนมิกส์นั้น เริ่มตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมโดยตรง จากนั้นจึงวิเคราะห์ดีเอ็นเอเหล่านั้นโดยใช้แนวทางหลัก ๆ 3 แนวทาง คือ

3.1 ดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้จะถูกนำไปใช้เป็น template เพื่อเพิ่มจำนวนในส่วนลำดับเบสของยีน *16S rRNA* หรือ *18S rRNA* ด้วยวิธีการ polymerase chain reaction (PCR) เพื่อศึกษาชนิดจุลินทรีย์ในชุมชีพนั้น ๆ [12]

3.2 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะถูกนำเข้าสู่เวคเตอร์พาหะที่เหมาะสมและนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน เพื่อสร้างเป็น metagenomic library [13] เพื่อศึกษาวิเคราะห์

คุณสมบัติที่น่าสนใจได้ นับตั้งแต่การบ่งชี้ลำดับวิวัฒนาการ (phylogenic marker) เช่น การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *16S rRNA* ยีน *recA* หรือยีนอื่น ๆ ด้วยวิธี hybridization หรือ multiplex PCR [7] จนไปถึงการค้นหาเอนไซม์หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ [14] ซึ่งแบ่งออกได้เป็นวิธีคัดเลือกโดยอ้างอิงคุณสมบัติจำเพาะที่ต้องการศึกษา (function-based) หรือคัดเลือกโดยอ้างอิงลำดับเบสของยีนที่ต้องการ (sequence-based) [14,15]

3.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดของ metagenome ที่สกัดมาได้ ซึ่งวิธีการนี้ได้กลายเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ โดยใช้เทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสที่พัฒนาขึ้นใหม่ เช่น pyrosequencing [17]

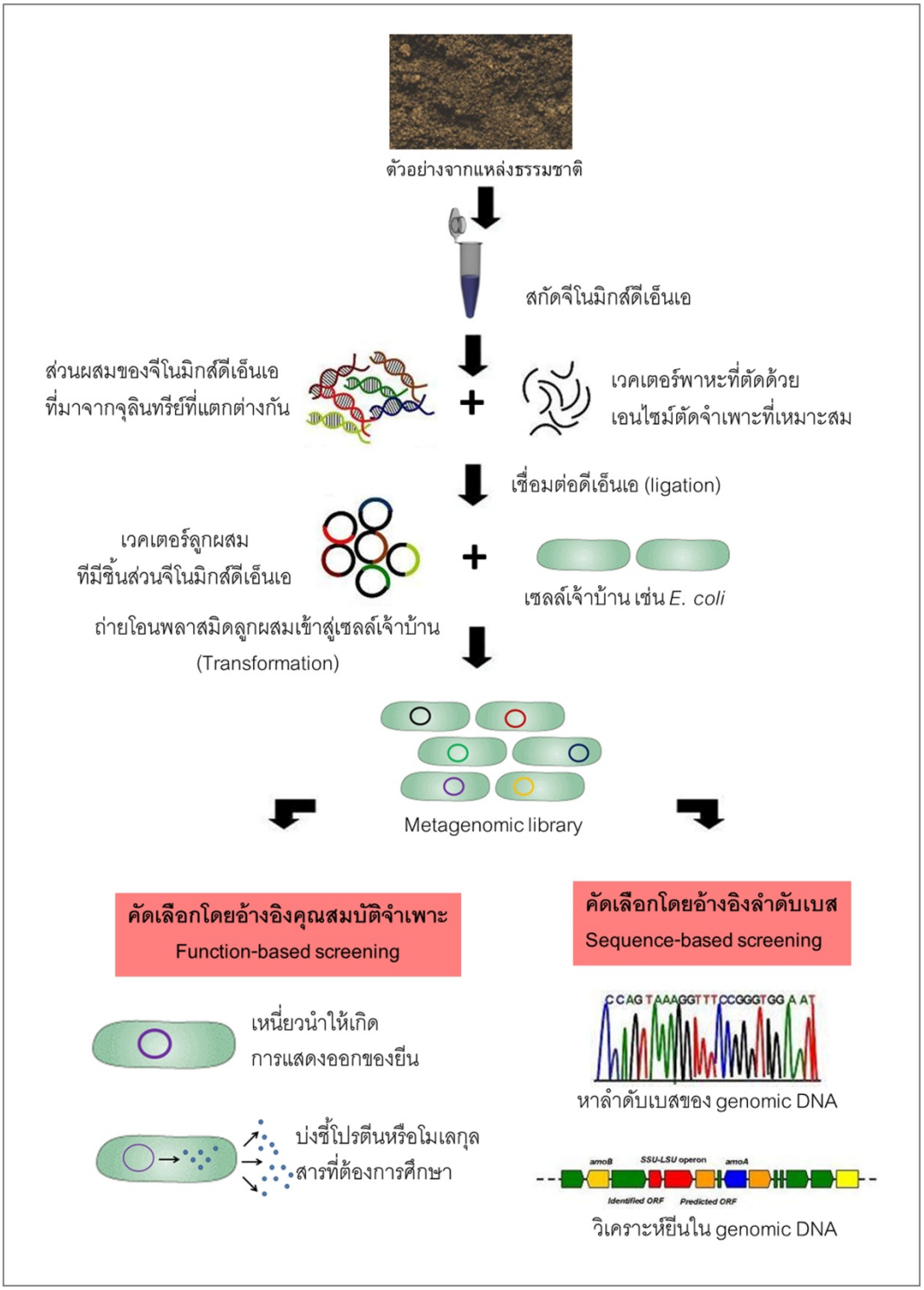
4. การคัดเลือกเอนไซม์หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก metagenomic library

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในตอนต้นว่าเทคนิคที่ใช้ในการค้นพบสารชีวภาพใหม่ ๆ จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีคัดเลือกโดยอ้างอิงจากคุณสมบัติจำเพาะที่ต้องการศึกษา หรือคัดเลือกโดยอ้างอิงจากลำดับเบสของยีนที่ต้องการ [14,15] (รูปที่ 1) ซึ่งทั้ง 2 วิธี นี้ประกอบไปด้วยการโคลนดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและการสร้าง metagenomic library ซึ่งอาจจะมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหรือขนาดใหญ่ก็ได้ จากนั้น metagenomic library เหล่านี้จะถูกนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรีย *Escherichia coli* [12,14] แต่เนื่องจากรูปแบบการแสดงออกของยีนระหว่างโพรแคริโอตที่อยู่ต่างกลุ่มอนุกรมวิธานกันนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และกิจกรรมของเอนไซม์ที่สามารถตรวจสอบพบได้ด้วยวิธีการโคลนนิ่งแบบสุ่มใน *E. coli* นั้นมีเพียงร้อยละ 40 เท่านั้น [18] จึงได้มีการใช้เซลล์เจ้าบ้านที่เป็นแบคทีเรียชนิดอื่นเพิ่มเติมเข้ามาเพื่อขยายขอบเขตในการตรวจสอบกิจกรรมของสารชีวภาพที่ต้องการจาก metagenomic library ให้กว้างมากขึ้น เซลล์เจ้าบ้านอื่น ๆ ที่ได้มีการนำมาใช้ในการสร้าง metagenomic library ตัวอย่าง เช่น *Streptomyces* spp. [19], *Thermus thermophilus* [20], *Sulfolobus solfataricus* [21] และแบคทีเรียในกลุ่ม *Proteobacteria* อีกหลายชนิด [22]

Metagenomic library ได้ถูกสร้างโดยใช้เวคเตอร์พาหะหลากหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยพลาสมิดจะรับชิ้นดีเอ็นเอที่เล็กกว่า 15 กิโลเบส ในขณะที่ฟอสมิด คอสมิด และโครโมโซมจำลองของแบคทีเรีย (BAC, bacterial artificial chromosome) จะรับชิ้นดีเอ็นเอได้ถึง 40 กิโลเบส [23] ซึ่งการเลือกใช้ระบบเวคเตอร์พาหะใดนั้นขึ้นอยู่กับคุณภาพของดีเอ็นเอ ยีนเป้าหมาย และวิธีการในการคัดเลือก [15] โดย library ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กสามารถใช้ในการบ่งชี้สารชีวภาพที่แสดงออกจากยีนเดี่ยว ๆ หรือ operon ขนาดเล็ก ในขณะที่ library ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะถูกใช้เมื่อต้องการกลุ่มยีนขนาดใหญ่ที่ต้องแสดงออกร่วมกัน ซึ่งกลุ่มยีนเหล่านี้มักจะเกี่ยวข้องกับ pathway ที่ซับซ้อน [15]

4.1 การคัดเลือกเอนไซม์หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีอ้างอิงคุณสมบัติจำเพาะที่ต้องการศึกษา (function-based screening)

ในการคัดเลือกและคัดแยกยีนที่สร้างชีวโมเลกุลใหม่ ๆ นั้น ส่วนใหญ่จะยึดเอากิจกรรมหรือคุณสมบัติจำเพาะของโคลนซึ่งมี metagenomic library เป็นหลัก และเนื่องจากวิธีการนี้ไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลลำดับเบส จึงเป็นวิธีเดียวที่จะสามารถค้นพบยีนประเภทใหม่หรือชนิดใหม่ที่สร้างชีวโมเลกุลที่มี



รูปที่ 1 วิธีการสร้างและคัดเลือกเอนไซม์หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก metagenomic library (ดัดแปลงจาก Handelsman, 2005) [24]

หน้าที่ซึ่งเป็นที่รู้จักอยู่แล้วหรือมีหน้าที่ใหม่โดยสิ้นเชิง [16] ที่ผ่านมาได้มีผู้นำแนวทางการคัดเลือกด้วยวิธีการนี้มาประยุกต์ใช้เพื่อค้นหาชีวโมเลกุลใหม่ ๆ โดยแบ่งออกเป็น 3 วิธีการย่อย ๆ ด้วยกัน คือ การตรวจสอบฟีโนไทป์ของกิจกรรมที่ต้องการ [25] complementation ของเซลล์เจ้าบ้านหรือสายพันธุ์กลายของเซลล์เจ้าบ้าน [26] และการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน [26-28]

ในวิธีการตรวจสอบฟีโนไทป์นั้น โดยส่วนใหญ่จะใช้สารเคมีที่เป็นสีย้อมและสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำหรือที่มีกลุ่มโครโมฟอร์ติดอยู่ใส่รวมเข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะทำให้สังเกตความแตกต่างของโคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์หรือมีคุณสมบัติที่สามารถเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นได้ง่ายขึ้นโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่มีโคโลนีที่ต้องการอยู่ [16]

ส่วนในวิธีการคัดเลือกโดยใช้หลักการ complementation ของเซลล์เจ้าบ้านหรือสายพันธุ์กลายของเซลล์เจ้าบ้านนั้น สิ่งที่จำเป็นคือยีนเป้าหมายจะต้องสามารถทำให้เซลล์เจริญได้ในสภาวะที่ใช้คัดเลือก เทคนิคนี้ได้ช่วยทำให้การคัดเลือกโคลนที่ต้องการจาก metagenomic library ที่มีความซับซ้อนและประกอบไปด้วยโคลนนับล้านโคลนนั้นง่ายและรวดเร็วขึ้น วิธีการนี้นับว่ามีความจำเพาะสูงมากและแทบจะไม่มี false positive เลย [26]

ในปี ค.ศ. 2005 Uchiyama และคณะ ได้นำเสนอวิธีคัดเลือกในแบบที่สามขึ้น วิธีนี้เรียกว่า substrate-induced gene expression screening (SIGEX) ซึ่งสามารถคัดเลือกโคลนได้ครั้งละจำนวนมาก (high-throughput) โดยวิธีการนี้จะใช้โพรโมเตอร์ร่วมกับเวคเตอร์พาหะที่มียีน *gfp* (green fluorescence protein) หลักการของวิธีการนี้มาจากข้อเท็จจริงที่ว่า การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายสารต่าง ๆ นั้นส่วนใหญ่จะถูกกระตุ้นโดยสารตั้งต้นที่จำเพาะและมักจะมีโพรโมเตอร์ตั้งอยู่ใกล้กับยีนนั้น ๆ [27] ในวิธี SIGEX นี้ เมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจะถูกโคลนอยู่ด้านหน้าของยีน *gfp* ซึ่งทำให้การแสดงออกของยีน *gfp* อยู่ภายใต้การควบคุมของโพรโมเตอร์ที่อยู่ในเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ โคลนที่มีการแสดงออกของยีน *gfp* หลังจากเติมสารตั้งต้นที่สนใจลงไปจะถูกแยกออกมาโดยวิธีการ fluorescence-activated cell sorting [27] ข้อเสียของวิธีนี้คืออาจมีการกระตุ้นการแสดงออกยีนโดยปัจจัยอื่นที่ไม่ใช่สารตั้งต้นจำเพาะ

นอกจากนี้ยังมีรูปแบบของการคัดเลือกที่มีความคล้ายคลึงกันกับวิธี SIGEX อีกหนึ่งวิธีคือวิธีที่เรียกว่า metabolite-regulated expression (METREX) [29] วิธีนี้ใช้ในการบ่งชี้โคลนในเมตาจีโนมิกส์ที่สร้างโมเลกุลขนาดเล็ก โดยจะมีตัวรับรู้ชีวภาพ (biosensor) อยู่ในเซลล์เดียวกันกับเวคเตอร์พาหะที่มีชิ้นเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ตัวรับรู้ชีวภาพนี้จะดักจับโมเลกุลขนาดเล็กซึ่งถูกผลิตจากยีนในเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ และสามารถแพร่กระจายไปได้ทั่วเซลล์ ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นสัญญาณให้กับตัวรับรู้ชีวภาพเพื่อไปกระตุ้นระบบการควบคุมการทำงานของยีนที่เรียกว่า quorum sensing อีกต่อหนึ่ง ส่วนประกอบหลักของตัวรับรู้ชีวภาพก็คือโพรโมเตอร์ที่เป็นของระบบ quorum sensing โดยโพรโมเตอร์นี้จะควบคุมยีน *gfp* ซึ่งจะใช้เป็นยีนรายงานผล (reporter gene) เมื่อระดับความเข้มข้นของโมเลกุลสัญญาณที่ผลิตโดยยีนใน metagenomic library เกินระดับต่ำสุด green fluorescent protein (GFP) ก็จะถูกผลิตขึ้น หลังจากนั้นโคลนที่มี GFP อยู่ก็จะถูกคัดแยกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescence [29]

ต่อมาในปี ค.ศ. 2010 และ Uchiyama และ

Miyazaki ได้นำเสนอวิธีการคัดเลือกซึ่งอิงการกระตุ้นการแสดงออกของยีนอีกหนึ่งวิธีคือวิธีที่มีชื่อว่า product induced gene expression (PIGEX) ในระบบนี้กิจกรรมของเอนไซม์จะถูกตรวจจับโดยการแสดงออกของยีน *gfp* เช่นกัน ซึ่งยีน *gfp* จะถูกกระตุ้นโดยผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นของเอนไซม์ที่ต้องการคัดเลือก [28]

4.2 การคัดเลือกเอนไซม์หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีอ้างอิงลำดับเบสของยีนที่ต้องการ (sequence-based screening)

การประยุกต์ใช้วิธีที่อ้างอิงลำดับเบสนั้นจะต้องมีการออกแบบไพร์เมอร์หรือดีเอ็นเอที่จะใช้สำหรับตรวจสอบซึ่งจะได้มาจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนหรือโปรตีนที่ทราบอยู่แล้ว ซึ่งจะสามารถคัดแยกได้เฉพาะยีนหรือโปรตีนที่มีความแตกต่างบางส่วนเท่านั้น อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ทำให้มีการค้นพบยีนที่สร้างเอนไซม์ใหม่ ๆ เช่น เอนไซม์ที่ย่อยสลายสาร dimethylsulfoniopropionate (DMSP) [30] เอนไซม์ dioxygenase [31] nitrite reductase [32] [Fe-Fe]-hydrogenase [33] [NiFe] hydrogenase [34] hydrazine oxidoreductase [35] chitinase [36] และ glycerol dehydratase [14]

ได้มีการรวมวิธี PCR ผสานเข้ากับเทคนิค pyrosequencing ของ amplicon ที่ได้จากกระบวนการ PCR เพื่อที่จะทำให้สามารถศึกษาลำดับเบสของยีนที่สนใจซึ่งมีอยู่ในกลุ่มชุมชีพจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษาได้อย่างครอบคลุมมากขึ้น ข้อมูลของลำดับเบสที่รวบรวมจากวิธีการดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการออกแบบดีเอ็นเอ probe ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการกู้ยีนเป้าหมายให้ได้ครบสมบูรณ์ (full-length) เรียกวิธีการนี้ว่า gene-targeted metagenomics(GT-metagenomics) [37]

5. ตัวอย่างของชีวโมเลกุลที่ได้รับการค้นพบจากวิธีเมตาจีโนมิกส์

นอกเหนือจากตัวอย่างชีวโมเลกุลที่ได้ยกมาข้างต้นแล้ว ได้มีการค้นพบชีวโมเลกุลมากมายจาก metagenomic library ทั้งที่เป็นชีวโมเลกุลชนิดใหม่และที่เป็นชีวโมเลกุลซึ่งเป็นที่รู้จักอยู่แล้ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น DNA polymerase [26] lipase [38] esterase [39] cellulase [6] chitinase [365] protease [40] oxidoreductase [35] bacterial alkaline protease [41] nitrilase [42] methyl coenzyme M reductase A [43]

นอกจากนี้ยังมีการค้นพบยีนและโปรตีนอื่น ๆ เช่น ยีนที่สร้างสารปฏิชีวนะ [44] ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงแป้งและน้ำตาลหลายโมเลกุล เช่น alpha-amylase [46] alpha-glucosidase [16] ยีนที่สร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของ 4-hydroxybutyrate [45] ยีนที่สร้างเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์ biotin [47] ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ aromatic hydrocarbons [48] RadA protein [49] proteorhodopsin [50] เมมเบรนโปรตีน [51]

จนถึงปัจจุบันนี้เอนไซม์ที่ถูกค้นพบบ่อยที่สุดจากเมตาจีโนมคือ lipase และ esterase [15,16]

6. บทสรุป

วิธีการเมตาจีโนมิกส์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาในงานวิจัยหลาย ๆ ด้าน ทำให้นักวิจัยสามารถเข้าถึงข้อมูลจีโนมของเชื้อที่เพาะเลี้ยงไม่ได้ และยังทำให้เกิดการค้นพบยีนใหม่ ๆ ได้รวดเร็วขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้วิธีการเมตาจีโนมิกส์ยังสามารถนำไปใช้กับงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้อย่างมาก มาย แต่วิธีการนี้ก็ยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง เช่น

เจ้าบ้านที่ใช้ในการสร้าง metagenomic library ยังนิยมใช้ *E. coli* ซึ่งจะทำให้พลาดโอกาสในการพบชีวโมเลกุลจากจุลินทรีย์กลุ่มยูแคริโอต หรือหากยีนที่แสดงออกโปรตีนที่สนใจอยู่ในดีเอ็นเอชิ้นแทรกขนาดใหญ่ อาจตรวจสอบไม่พบในวิธีการ function-based screening แต่อย่างไรก็ดีการประยุกต์ใช้วิธีเมตาจีโนมิกส์ได้ทำให้เกิดการค้นพบชีวโมเลกุลชนิดใหม่เป็นจำนวนมาก ซึ่งนับว่าได้เอื้อให้นักวิทยาศาสตร์เข้าใจถึงองค์ ประกอบและหน้าที่ของชุมชีพจุลินทรีย์ในธรรมชาติมากยิ่งขึ้น และทำให้สามารถนำข้อมูลความรู้ที่ได้จากจากชุมชีพจุลินทรีย์ต่าง ๆ ไปใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรม

7. เอกสารอ้างอิง

[1] Sleator, R.D., Shortall, C. and Hill, C., 2008, Metagenomics, Lett. Appl. Microbiol. 47: 361-366.

[2] Staley, J.T. and Konopka, A., 1985, Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats, Annu. Rev. Microbial. 39: 321-346.

[3] Grimes, D.J., Atwell, R.W., Brayton, P.R., Palmer, L.M., Rollins, D.M., Roszak, D.B., Singleton, F.L., Tamplin, M.L. and Colwell, R.R., 1986, The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments, Microbiol. Sci. 3: 324-329.

[4] Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J. and Olsen, G.J., 1985, Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences, ASM News 51: 4–12.

[5] Schmidt, T.M., DeLong, E.F. and Pace, N.R., 1991, Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing, J. Bacteriol. 173: 4371-4378.

[6] Healy, F.G., Ray, R.M., Aldrich, H.C., Wilkie, A.C., Ingram, L.O. and Shanmugam, K.T., 1995, Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocelluloses, Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 667-674.

[7] Stein, J.L., Marsh, T.L., Wu, K.Y., Shizuya, H. and DeLong, E.F., 1996, Characterization of uncultivated prokaryotes: Isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon, J. Bacteriol. 178: 591-599.

[8] Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J. and Goodman, R.M., 2000, Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms, Appl. Environ. Microbiol. 66: 2541-2547.

[9] Gilbert, J.A. and Dupont, C.L., 2011, Microbial metagenomics: Beyond the genome, Annu. Rev. Marine Sci. 3: 347-371.

[10] Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J. and Goodman, R.M., 1998,

Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products, Chem. Biol. 5: 245-249.

[11] Chen, K. and Pachter, L., 2005, Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities, PLoS Comp. Biol. 1: 106-112.

[12] Duan, C.J. and Feng, J.X., 2010, Mining metagenomes for novel cellulase genes, Biotechnol. Lett. 32: 1765-1775.

[13] Handelsman, J., 2004, Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68: 669-685.

[14] Knietsch, A., Bowien, S., Whited, G., Gottschalk, G. and Daniel, R., 2003, Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures, Appl. Eenviron. Microbiol. 69: 3048-3060.

[15] Daniel, R., 2005, The metagenomics of soil, Nat. Rev. Microbiol. 3: 470-478.

[16] Ferrer, M., Beloqui, A., Timmis, K.N. and Golyshin, P.N., 2009, Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 16: 109-123.

[17] Simon, C. and Daniel, R., 2009, Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches, Appl. Microbiol. Biotechnol. 85: 265-276.

[18] Gabor, E.M., Alkema, W.B. and Janssen, D.B., 2004, Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques, Environ. Microbiol. 6: 879-886.

[19] Wang, G.Y., Graziani, E., Waters, B., Pan, W., Li, X., McDermott, J., Meurer, G., Saxena, G., Andersen, R.J. and Davies, J., 2000, Novel natural products from soil DNA libraries in a *streptomycete* host, Organic Lett. 2: 2401-2404.

[20] Angelov, A., Mientus, M., Liebl, S. and Liebl, W., 2009, A two-host fosmid system for functional screening of (meta)genomic libraries from extreme thermophiles, Syst. Appl. Microbiol. 32: 177-185.

[21] Albers, S.V., Jonuscheit, M., Dinkelaker, S., Urich, T., Kletzin, A., Tampe, R., Driessen, A.J. and Schleper, C., 2006, Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus, Appl. Environ. Microbiol. 72: 102-111.

[22] Craig, J.W., Chang, F.Y., Kim, J.H., Obiajulu, S.C. and Brady, S.F., 2010. Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse proteobacteria, Appl. Environ. Microbiol. 76: 1633-1641.

[23] Simon, C. and Daniel, R., 2011, Metagenomic analyses: past and future trends, Appl. Environ. Microbiol. 77: 1153-1161.

[24] Handelsman, J., 2005. How to Find New Antibiotics: Metagenomics could be the way to mine the soil beneath our feet. The Scientist, 19(19), p. 20.

[25] Gloux, K., Berteau, O., El Oumami, H., Beguet, F., Leclerc, M. and Dore, J., 2011, A metagenomic beta-glucuronidase uncovers a core adaptive function of the human intestinal microbiome, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108: 4539-4546.

[26] Simon, C., Herath, J., Rockstroh, S. and Daniel, R., 2009, Rapid identification of genes encoding DNA polymerases by function-based screening of metagenomic libraries derived from glacial ice, Appl. Environ. Microbiol. 75: 2964-2968.

[27] Uchiyama, T., Abe, T., Ikemura, T. and Watanabe, K., 2005, Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes, Nat. Biotechnol. 23: 88-93.

[28] Uchiyama, T. and Miyazaki, K., 2010, Product-induced gene expression, a product-responsive reporter assay used to screen metagenomic libraries for enzyme-encoding genes, Appl. Environ. Microbiol. 76: 7029-7035.

[29] Williamson, L.L., Borlee, B.R., Schloss, P.D., Guan, C., Allen, H.K. and Handelsman, J., 2005, Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor, Appl. Environ. Microbiol. 71: 6335-6344.

[30] Varaljay, V.A., Howard, E.C., Sun, S. and Moran, M.A., 2010, Deep sequencing of a dimethylsulfoniopropionate-degrading gene (dmdA) by using PCR primer pairs designed on the basis of marine metagenomic data, Appl. Environ. Microbiol. 76: 609-617.

[31] Zaprasis, A., Liu, Y.J., Liu, S.J., Drake, H.L. and Horn, M.A., 2010, Abundance of novel and diverse tfdA-like genes, encoding putative phenoxyalkanoic acid herbicide-degrading dioxygenases, in soil, Appl. Environ. Microbiol. 76: 119-128.

[32] Bartossek, R., Nicol, G.W., Lanzen, A., Klenk, H.P. and Schleper, C., 2010, Homologues of nitrite reductases in ammonia-oxidizing archaea: diversity and genomic context, Environ. Microbiol. 12: 1075-1088.

[33] Schmidt, O., Drake, H.L. and Horn, M.A., 2010, Hitherto unknown [Fe-Fe]-hydrogenase gene diversity in anaerobes and anoxic enrichments from a moderately acidic fen, Appl. Environ. Microbiol. 76: 2027-2031.

[34] Maro´ti, G., Tong, Y., Yooseph, S., Baden-Tillson, H., Smith, H.O., Kovacs, K.L., Frazier, M., Venter, J.C. and Xu, Q., 2009, Discovery of [NiFe] hydrogenase genes in metagenomic DNA: cloning and heterologous

expression in *Thiocapsa roseopersicina*, Appl. Environ. Microbiol. 75: 5821-5830.

[35] Li, M., Hong, Y., Klotz, M.G. and Gu, J.D., 2010, A comparison of primer sets for detecting 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase genes of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine sediments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86: 781-790.

[36] Hjort, K., Bergstrom, M., Adesina, M.F., Jansson, J.K., Smalla, K. and Sjoling, S., 2010, Chitinase genes revealed and compared in bacterial isolates, DNA extracts and a metagenomic library from a phytopathogen-suppressive soil, FEMS Microbiol. Ecol. 71: 197-207.

[37] Iwai, S., Chai, B., Sul, W.J., Cole, J.R., Hashsham, S.A. and Tiedje, J.M., 2010, Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment, ISME J. 4: 279-285.

[38] Henne, A., Schmitz, R.A., Bomeke, M., Gottschalk, G. and Daniel, R., 2000, Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol. 66: 3113-3116.

[39] Elend, C., Schmeisser, C., Leggewie, C., Babiak, P., Carballeira, J.D., Steele, H.L., Reymond, J.L., Jaeger, K.E. and Streit, W.R., 2006, Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases, Appl. Environ. Microbiol. 72: 3637-3645.

[40] Waschkowitz, T., Rockstroh, S. and Daniel, R., 2009, Isolation and characterization of metallo-proteases with a novel domain structure by construction and screening of metagenomic libraries, Appl. Environ. Microbiol. 75: 2506-2516.

[41] Gupta, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P., 2002, Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 15-32.

[42] DeSantis, G., Zhu, Z., Greenberg, W.A., Wong, K., Chaplin, J., Hanson, S.R., Farwell, B., Nicholson, L.W., Rand, C.L., Weiner, D.P., Robertson, D.E. and Burk, M.J., 2002, An enzyme library approach to biocatalysis: Development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives, J. Am. Chem. Soc. 124: 9024-9025.

[43] Hallam, S.J., Girguis, P.R., Preston, C.M., Richardson, P.M. and DeLong, E.F., 2003, Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes associated with methane-oxidizing archaea, Appl. Environ. Microbiol. 69: 5483-5491.

[44] MacNeil, I.A., Tiong, C.L., Minor, C., August, P.R., Grossman, T.H., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., Phillips, T., Narula, S., Sundaramoorthi, R., Tyler, A., Aldredge, T., Long, H., Gilman, M., Holt, D. and Osburne, M.S., 2001, Expression and isolation of antimicrobial small

molecules from soil DNA libraries, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3: 301-308.

[45] Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R.A. and Gottschalk, G., 1999, Construction of environmental DNA libraries in Escherichia coli and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3901-3907.

[46] Richardson, T.H., Tan, X., Frey, G., Callen, W., Cabell, M., Lam, D., Macomber, J., Short, J.M., Robertson, D.E. and Miller, C., 2002, A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase, J. Biol. Chem. 277: 26501-26507.

[47] Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T. and Streit, W.R., 2001, Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia, Appl. Environ. Microbiol. 67: 89-99.

[48] Marchesi, J.R. and Weightman, A.J., 2003, Comparing the dehalogenase gene pool in cultivated alpha-halocarboxylic acid-degrading bacteria with the environmental metagene pool, Appl. Environ. Microbiol. 69: 4375-4382.

[49] Sandler, S.J., Hugenholtz, P., Schleper, C., DeLong, E.F., Pace, N.R. and Clark, A.J., 1999, Diversity of *radA* genes from cultured and uncultured archaea: comparative analysis of putative RadA proteins and their use as a phylogenetic marker, J. Bacteriol. 181: 907-915.

[50] de la Torre, J.R., Christianson, L.M., Beja, O., Suzuki, M.T., Karl, D.M., Heidelberg, J. and DeLong, E.F., 2003, Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 12830-12835.

[51] Majernik, A., Gottschalk, G. and Daniel, R., 2001, Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na(+)(Li(+))/H(+) antiporter activity on *Escherichia coli*: Characterization of the recovered genes and the corresponding gene products, J. Bacteriol. 183: 6645-6653.