



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ *Spirulina platensis* โดยใช้กระแสไฟฟ้า

Certain Factors Affecting Transformation of *Spirulina platensis* by Electroporation

นามผู้วิจัย นางสาวปิยนารถ ศรีชัย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันท์เปรม, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันท์เปรม, Ph. D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม, Ph. D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสิงห์ มตาวินยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ *Spirulina platensis* โดยใช้กระแสไฟฟ้า

Certain Factors Affecting Transformation of *Spirulina platensis* by Electroporation

โดย

นางสาวปิยนารถ ศรีชัย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปิยนารถ ศรชัย 2553: ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ *Spirulina platensis*
โดยใช้กระแสไฟฟ้า ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.
82 หน้า

การถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลินาสายพันธุ์ TISTR 8217 โดยใช้กระแสไฟฟ้า
พลาสมิดที่ใช้ในการถ่ายยีนคือ pBAD-TOPO[®]/*gus* ซึ่งประกอบด้วยยีนรายงานผล *gus* และยีน
คัดเลือก *Amp* โดยในการถ่ายยีนใช้เซลล์สาหร่ายสไปรูลินาที่เจริญอยู่ในระยะ exponential
phase แยกผนังเซลล์ออกโดยใช้ โลโซไซม์ ความเข้มข้น 0.035 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ
ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่ 37 องศา
เซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการย่อยผนังเซลล์ และ การเกิดเซลล์ไร้ผนัง
(spheroplast) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า สามารถแยกเซลล์ไร้ผนัง ได้ 55 เปอร์เซ็นต์ ของ
เซลล์เริ่มต้น และเมื่อ นำเซลล์มาเพาะเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร
Zarrouk ½ เท่า ซึ่งทำให้เซลล์ไร้ผนังพัฒนาเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ได้ 33 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา
20 วัน และไม่พบเซลล์แตก การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ ไร้ผนังของสาหร่ายสไปรูลินา ด้วยความแรง
กระแสไฟฟ้า 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร และนำเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนมาเพาะเลี้ยงในอาหาร
สูตร Zarrouk ½ เท่า ร่วมกับ สารปฏิชีวนะ ampicillin 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำ
เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนแล้ว 15 วันมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี
GUS histochemical assay พบการติดสีน้ำเงินที่เซลล์ เมื่อนำเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินมาตรวจสอบการ
มีอยู่ของยีน *gus* และ pBAD-TOPO[®] ด้วยวิธี PCR พบการมีอยู่ของยีน *gus* ขนาด 1,800 คู่
เบส และ ชิ้นส่วนของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] ขนาด 731 คู่เบส เมื่อนำเซลล์สาหร่ายไปตรวจ
ยีนอันผลด้วยวิธี dot blot hybridization และวิธี Southern blot PCR พบ ยีน *gus* ขนาด 1,800 คู่
เบส แต่จากการตรวจสอบหลังการถ่ายยีน 30 วันไม่พบการติดสีน้ำเงิน และไม่พบการมีอยู่ของ
ยีน *gus* และ ชิ้นส่วนของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] ด้วยวิธี PCR แสดงให้เห็นว่าการถ่ายยีนที่ได้
ไม่มีความเสถียร

Piyanast Sornchai 2010: Certain Factors Affecting Transformation of *Spirulina platensis* by Electroporation. Master of Science (Agricultural Biotechnology),
Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program.
Thesis Advisor: Assistant Professor Sermsiri Chanprame, Ph.D. 82 pages.

Transformation of *Spirulina platensis* strain TISTR 8217 by electroporation was done. The recombinant plasmids, pBAD-TOPO[®]/*gus* contained *gus* reporter gene and *Amp* as the selectable marker gene. *S. platensis* in the exponential phase of growth was used for spheroplast isolation by enzymatic treatment using lysozyme at the concentration of 0.035% (w/v) with 0.08 % (w/v) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The reaction was incubated at 37 °C for 3 hours. The percentage of spheroplast isolation was verified by microscopic examination. The results indicated that 55% of initial cells were produced spheroplast. The isolated spheroplasts were then cultured in ½ x Zarrouk medium for regeneration. The highest percentage of regenerated spheroplasts of 33% was obtained after 20 days in culture. For electroporation field strength of 4 kv/cm was used. Selection of transformed cell was done in 300 ug/ml ampicillin containing ½ x Zarrouk medium. The putative transformed *S. platensis* was determined for transient expression by Gus histochemical assay and the existence of *gus* gene and pBAD-TOPO[®] by PCR technique. The result showed 1,800 base pair of *gus* and 731 base pair of a part of pBAD-TOPO[®]. The existence of *gus* gene was confirmed by dot blot hybridization and Southern PCR hybridization technique, which also found the 1,800 bp of *gus* gene. But 30 day after transformation *gus* gene and pBAD-TOPO[®] were not found using PCR technique. It was indicated that transformation in *S. platensis* is not stable.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. เสริมศิริ จันทร์เปรม ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
รศ.ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม และ รศ.ดร. ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้
คำปรึกษาเสมอมา ทั้งในด้านการเรียน การค้นคว้าวิจัยตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งสำเร็จ
สมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ ดร. ภาสันต์ สารทูลทัต ประธานคณะกรรมการสอบ
วิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร. กุลนาถ อปสุวรรณ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้ความกรุณาตรวจทานแก้ไข
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและ
วิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ
ที่ให้การสนับสนุนการว่าจ้างเป็นบัณฑิตผู้ช่วยวิจัย และ สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย
เพื่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืชและ
ถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจในการทำ
วิทยานิพนธ์ให้แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อเกษม คุณแม่มาลี ศรีชัย และ น.ส.ปิยนุช ศรีชัย
รวมทั้งทุกคนในครอบครัว ที่คอยให้ความรัก กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษาแก่ข้าพเจ้า
จนสำเร็จจุล่งด้วยดีตลอดมา

ปิยนารด ศรีชัย

พฤษภาคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	25
อุปกรณ์	25
วิธีการ	27
ผลและวิจารณ์	39
สรุปผลการทดลอง	59
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	60
ภาคผนวก	68
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและสารเคมี	69
ภาคผนวก ข วิธีการสกัดพลาสมิดและการถ่ายยีน	78
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	82

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบของกรดอะมิโนในสาหร่ายสไปรูลิน่า	8
2	ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ไลโซไซม์ 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซ็นต์ ต่อการแยกเซลล์ไร้น้ำของสาหร่ายสไปรูลิน่าสายพันธุ์ TISTR 8217 ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง	41
3	ผลของสารปฏิชีวนะ ampicillin ต่อเซลล์ไร้น้ำของสาหร่ายสไปรูลิน่าสายพันธุ์ TISTR 8217 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk เข้มข้น ½ เท่า ร่วมกับสารปฏิชีวนะ ampicillin ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	45
4	เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดสีน้ำเงินการแสดงออกของยีน <i>gus</i> แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay หลังจากทำการถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความแรงของสนามไฟฟ้าต่างกัน 4-6 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร	53
ตารางผนวกที่		
1	องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Zarrouk (1966)	70
2	องค์ประกอบของอาหาร Luria-Bertani Media (LB) สำหรับเลี้ยงเชื้อ <i>A. tumefaciens</i>	70
3	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>gus</i> ด้วยวิธี GUS histochemical assay	71
4	การเตรียมส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)	72
5	การเตรียมส่วนผสมสำหรับทำดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR	74
6	สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำ dot blot hybridization	75
7	สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำ Southern hybridization	76

สารบัญภาพ

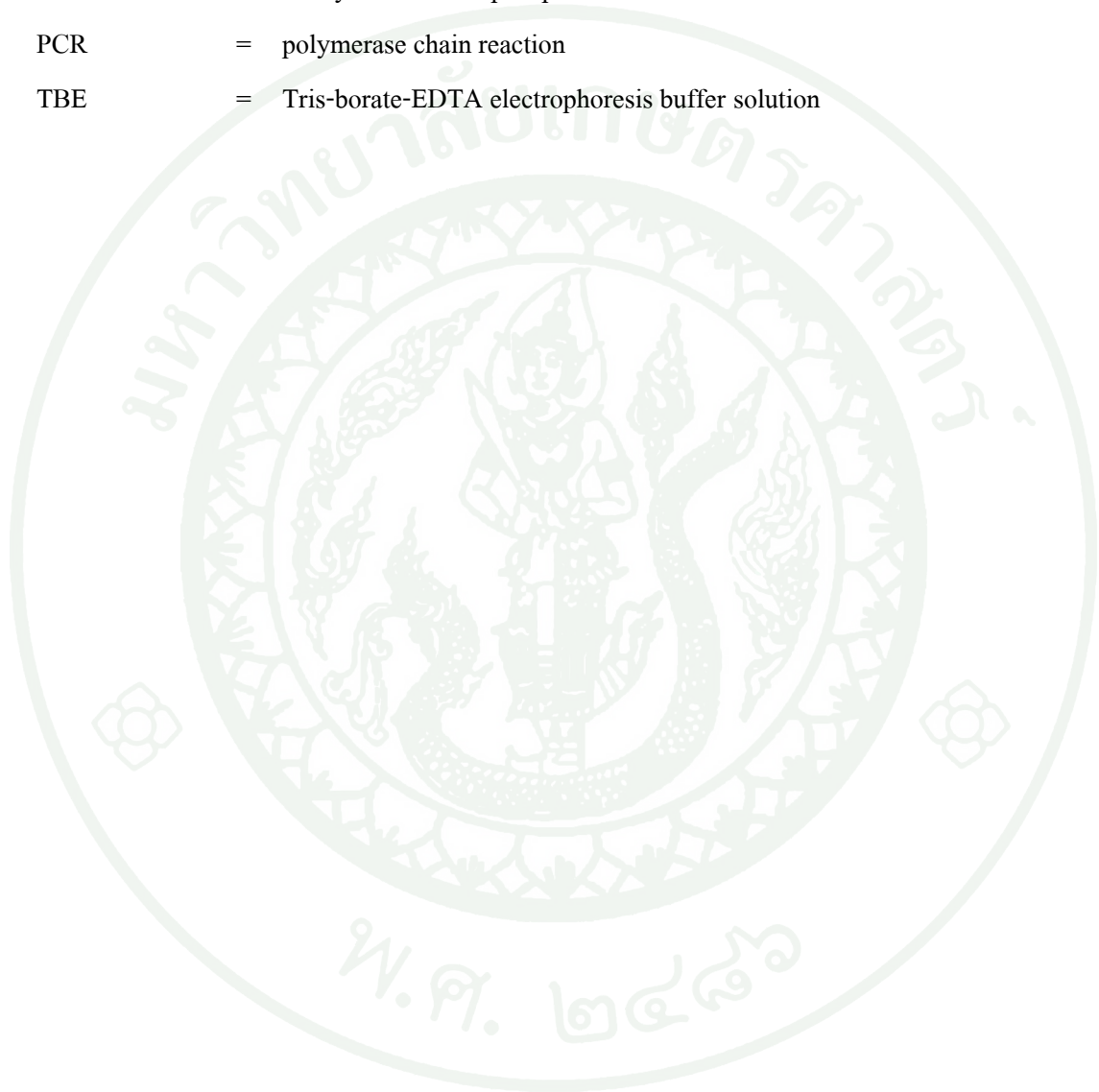
ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะรูปร่างสาหร่าย <i>Spirulina platensis</i> (ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40X)	4
2	วงจรชีวิตของสาหร่ายสไปรูลินา	6
3	ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา	11
4	ช่วงการเจริญ (growth phase) ของสาหร่าย	15
5	รูปแบบของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าจะเกิดช่องว่างที่เชื่อมเซลล์	19
6	โครงสร้างของพลาสมิด pBI121 (ก.) และ พลาสมิด pBAD TOPO [®] TA (บริษัท Invitrogen) (ข.)	31
7	รูปแบบการเจริญเติบโตของสาหร่ายเกลียวทอง (<i>Spirulina platensis</i>) สายพันธุ์ TISTR 8217 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้ม 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 1 เดือน ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT (1 = ระยะ lag phase, 2 = ระยะ exponential phase, 3 = ระยะ retardation phase, 4 = ระยะ stationary phase, 5 = ระยะ death phase)	39
8	เซลล์ไร้น้ำสาหร่ายสไปรูลินาสายพันธุ์ TISTR 8217 ที่แยกได้โดยใช้ไลโซไซม์ 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์และบ่มเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อทดสอบกับสาหร่ายสไปรูลินาที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ที่อายุต่างกัน	41
9	พัฒนาการในระยะต่างๆของเซลล์ไร้น้ำของสาหร่ายเกลียวทอง สายพันธุ์ TISTR 8217 ที่ตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน	42
10	การพัฒนาของเซลล์ไร้น้ำของสาหร่ายเกลียวทอง สายพันธุ์ TISTR 8217 ไปเป็นเซลล์ระยะต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ดัดแปลงเป็นเวลา 20 วัน	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
11	การพัฒนาเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลิน่า สายพันธุ์ TISTR 8217 ที่ได้รับกระตุ้นเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความแรงของสนามไฟฟ้า(Field strength) จาก 4 ถึง 8 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ½ เท่า ในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้ม 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ตลอดเวลาเป็นระยะเวลา 1 เดือน (ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT)	47
12	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR เมื่อตรวจสอบโคโลนีที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบางส่วนของพลาสมิด pBAD-TOPO® เมื่อนำมาแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แลบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 731 คู่เบส	49
13	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR เมื่อตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน <i>gus</i> แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แลบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 1,800 คู่เบส	50
14	ลักษณะการติดสีน้ำเงินของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายยีนตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound หลังได้รับการถ่ายยีน 15 วัน	52
15	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>gus</i> (ก) และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบางส่วนของพลาสมิด pBAD-TOPO® (ข) แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์	55
16	การตรวจวิเคราะห์การมีอยู่ของยีน <i>gus</i> ในสาหร่ายสไปรูลิน่าหลังจากที่ได้รับการถ่ายยีนพลาสมิด pBAD-TOPO®/ <i>gus</i> ด้วยความแรงกระแสไฟฟ้าที่ 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 15 วัน	56
17	การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>gus</i> โดยเทคนิค Southern PCR hybridization ในสาหร่าย สไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ กระแสไฟฟ้า 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตรเป็นเวลา 15 วัน (ก.) ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR เปรียบเทียบการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยเทคนิค Southern PCR hybridization (ข.)	58

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

GUS	=	β -glucuronidase
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
PCR	=	polymerase chain reaction
TBE	=	Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer solution



ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ *Spirulina platensis* โดยใช้กระแสไฟฟ้า

Certain Factors Affecting Transformation of *Spirulina platensis* by Electroporation

คำนำ

ปัจจุบันนี้สาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina platensis*) หรือสาหร่ายเกลียวทอง เป็นสาหร่ายที่มีมูลค่าสูงทางเศรษฐกิจทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เนื่องจากคุณค่าทางอาหารที่มีมาก เช่น มีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 60 – 70 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง มีวิตามิน เกลือแร่ กรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิดในปริมาณที่สูง ในปัจจุบันนี้มีการนำสาหร่ายสไปรูลิน่ามาใช้ประโยชน์ในหลายรูปแบบ เช่น ใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพสำหรับมนุษย์ หรือใช้เป็นอาหารสัตว์เพื่อเร่งการเจริญเติบโต และเพิ่มสีส้มที่สวยงามของเนื้อและผิวหนังสัตว์ เช่น ใช้ผสมในอาหารปลาหมอสี และอาหารไก่ นอกจากนี้ยังมีรังควัตถุที่สามารถเพิ่มมูลค่าของสาหร่ายสไปรูลิน่าอีกหลายชนิด เช่น ไฟโคไซยานิน เบต้าแคโรทีน คลอโรฟิลล์เอ ซึ่งนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ ผลิตภัณฑ์ ไอศกรีม และสีผสมอาหาร นอกจากนี้ไฟโคไซยานินยังเป็นรงควัตถุที่สามารถนำไปพัฒนาใช้ในงานด้าน microscopy immunoassay เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเรืองแสงอีกด้วย (Herrera *et al.*, 1989) และในทางการแพทย์มีรายงานว่าสามารถใช้ผลิตวิตามินเอ ยารักษาโรคมะเร็ง ยาลดความดันโลหิต ยาลดคลอเรสเตอรอลในเลือด และเป็นอาหารเสริมสุขภาพสำหรับมนุษย์ได้อย่างดี (เจียมจิตต์, 2528)

จากการที่สาหร่ายสไปรูลิน่ามีประโยชน์มากรวมถึงมีวงจรชีวิตสั้นประมาณ 1 วัน ภายใต้อุณหภูมิห้องทดลอง และ 3–5 วัน ในสภาวะธรรมชาติ และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) 0.3 ต่อวันในสภาวะห้องทดลอง (Santillan, 1982) และในทางปฏิบัติสามารถที่จะเลี้ยงและเก็บเกี่ยวได้ตลอดทั้งปี จึงได้มีการผลิตสาหร่ายสไปรูลิน่าในทางการค้าขึ้นในหลายประเทศ เช่น เม็กซิโก สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ไต้หวัน และประเทศไทย ดังนั้นหากสามารถปรับปรุงกระบวนการผลิต เพิ่มคุณภาพและปริมาณของผลผลิตได้ก็จะเป็นการสร้างมูลค่าได้มากยิ่งขึ้น ซึ่งการปรับปรุงผลผลิตอาจทำได้โดยการนำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้ ซึ่งจะทำให้ได้สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการและใช้เวลาน้อย และวิธีนี้ยังเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากกว่า

วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์แบบเดิมที่ใช้วิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งผลที่ได้เป็นไปได้โดยไม่
สามารถควบคุมได้

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพและหาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม
ในการถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยวิธีการใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) โดยใช้
ยีนรายงานผล (reporter gene) คือ ยีน *gus* เพื่อใช้เป็นแนวทางที่สามารถนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์
เพื่อเพิ่มคุณค่าสาหร่ายสไปรูลิน่าให้มากขึ้น โดยวิธีพันธุวิศวกรรมต่อไป



วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อความสำเร็จของการถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลีนาโดย
วิธีใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)



การตรวจเอกสาร

"สาหร่าย" หมายถึง พืชชั้นต่ำที่มีคลอโรพลาสต์ สามารถสังเคราะห์แสงได้ ไม่มีส่วนที่เป็นราก ลำต้น ใบ ที่แท้จริง มีขนาดตั้งแต่เล็กมากประกอบด้วยเซลล์เดียว ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จนถึงขนาดใหญ่ยาวเป็นเมตรประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก อาจมีลักษณะเป็นเส้นสายหรือมีลักษณะคล้ายพืชชั้นสูง โดยมีส่วนที่คล้ายราก ลำต้น และใบรวมเรียกว่า thallus (กาญจนภาชน์, 2527)

1. สาหร่ายสีโปรตีน

สาหร่ายสีโปรตีน (*Spirulina* sp.) หรือสาหร่ายเกลียวทอง (ภาพที่ 1) คือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) จัดเป็นแพลงก์ตอนพืชที่มีขนาดเล็กจนมองด้วยตาเปล่าแทบไม่เห็น สาหร่ายสีโปรตีนาก่อกำเนิดมานาน จากหลักฐานการพบฟอสซิลซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะมีอายุประมาณ 3.5 พันล้านปี สาหร่ายชนิดนี้มีลักษณะเซลล์เรียงตัวกันเป็นสายยาวเรียกว่า ไตรโครม (trichome) สาหร่ายสีโปรตีนถูกจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานอยู่ในคิวิชัน Cyanophyta วงศ์ Oscillatoriaceae (Venkataraman , 1983)



ภาพที่ 1 ลักษณะรูปร่างสาหร่าย *Spirulina platensis* (ภาพจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X)

สาหร่ายชนิดนี้ภายในเซลล์ไม่มีนิวเคลียส ไม่มีคลอโรพลาสต์ แต่มีไทลาคอยด์กระจายทั่วไป พผนังเซลล์คล้ายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ โดยผนังเซลล์ชั้นนอกมีลักษณะคล้ายเมือกประกอบด้วย lipopolysaccharides ส่วนผนังเซลล์ชั้นในเป็นชั้นของ peptidoglycan โดยทั่วไปแล้วสาหร่ายสีโปรตีนประกอบด้วยเซลล์รูปทรงกระบอกหลายเซลล์มาเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย และมี

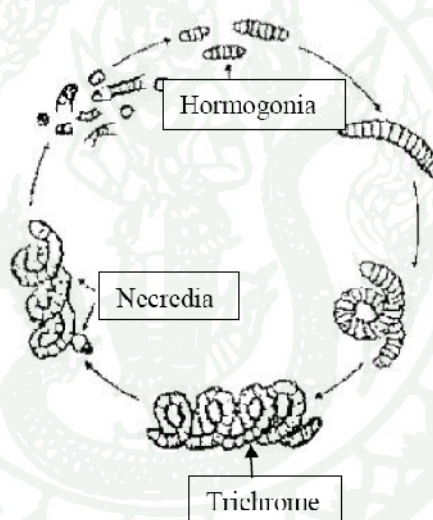
ลักษณะบิดเป็นเกลียว ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่ทำให้สาหร่ายสไปรูลินาแตกต่างจากสาหร่ายชนิดอื่น แต่การบิดเป็นเกลียวจะกลายเป็นเส้นตรงได้ภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม ทำให้บางครั้งพบว่าสาหร่ายสไปรูลินาคล้ายกับสาหร่ายขนแมว (*Oscillatoria* sp.) มาก (กาญจนภานันท์, 2527) สาหร่ายสไปรูลินาประกอบด้วยเซลล์รูปทรงกระบอกหลายเซลล์เรียงต่อกันเป็นเส้นสายที่ไม่แตกแขนง เรียกว่า trichome เส้นสายจะบิดเป็นเกลียวตามลักษณะของสกุล (genus) ความกว้างของเกลียว (helix) ระยะห่างระหว่างเกลียว (pitch) และความยาวของ trichome (length) จะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิด (species) แต่อย่างไรก็ดีสาหร่ายสไปรูลินาชนิดเดียวกัน เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน ขนาดและรูปร่างก็อาจจะแตกต่างกันด้วย พบว่าสาหร่าย *S. platensis* ที่เจริญในสูตรอาหารที่ต่างกันจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่างกันและสาหร่ายที่เจริญในถึงน้ำที่มีการหมุนเวียนตลอดเวลาจะเข้มข้นกว่า และมีขนาดโคโรมาสั้นกว่าสาหร่ายที่เจริญในถึงน้ำที่ไม่มีการหมุนเวียน ทั้งนี้เป็นการปรับตัวให้สามารถเคลื่อนที่ไปตามการหมุนเวียนของน้ำได้สะดวกขึ้น และสาหร่ายที่เจริญอยู่ในถึงน้ำที่ไม่มีการหมุนเวียนของน้ำจะมีสีซีดกว่า เนื่องจากน้ำจะมีอุณหภูมิสูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่อได้รับความร้อนจากดวงอาทิตย์และความเข้มของแสงที่สาหร่ายได้รับเป็นเวลานานจะทำให้สี (pigment) อ่อนลง รวมทั้งจะมีการปล่อยสารบางชนิดออกมา (สุชาติ และคณะ, 2531) ตัวเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลินานั้น ไม่มีเยื่อเมือก (mucous membrane) ปกคลุมเหมือนกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั่วไป และผิวของเซลล์ไม่มีจุลินทรีย์มาเกาะ รวมทั้งมีความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ที่จะทำอันตรายต่อเซลล์ได้สูง และสาหร่ายสไปรูลินาสายพันธุ์ที่ทนความร้อนสูงจะสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 35 – 40 องศาเซลเซียส ซึ่งคุณสมบัติในเรื่องนี้สามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ทั้งหลายได้นอกจากนี้ยังมีความสามารถทนต่อรังสีอัลตราไวโอเลตได้สูง และภายในเซลล์มีเม็ดอากาศเล็กๆ อยู่ จึงมีความสามารถในการลอยตัวสูง

ชื่อเรียกสาหร่ายสไปรูลินาเป็นชื่อเรียกทับศัพท์ภาษาอังกฤษซึ่งมาจากชื่อสกุล คือ *Spirulina* มีความหมายว่าเกลียว เพราะโดยปกติเซลล์ของสาหร่าย สไปรูลินาจะบิดเป็นเกลียวส่วนชื่อสาหร่ายเกลียวทองเป็นชื่อที่ คุณเจียมจิตต์ บุญสม อดีตนักวิชาการของกรมประมงซึ่งเป็นคนแรกที่ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสไปรูลินาในประเทศไทยตั้งขึ้นโดยให้เหตุผลในการตั้งว่ามีลักษณะเป็นเกลียวและมีค่าดังทอง จึงตั้งชื่อว่า สาหร่ายเกลียวทอง (เจียมจิตต์, 2528)

วงจรชีวิตของสาหร่ายสไปรูลินา (Richmond, 1986) เริ่มจากไตรโคม (Trichome) ที่โตเต็มที่เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์พิเศษที่เรียกว่านิคริเดีย (Necredia) หลังจากนั้น นิคริเดียแตกออกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ หลายสายแต่ละสายประกอบด้วย 2-4 เซลล์ เรียกแต่ละสายว่า ฮอร์โมโกเนีย (Hormogonia) จากนั้นปลายทั้งสองด้านของฮอร์โมโกเนียค่อยๆ ม้วนเป็นเกลียว

เซลล์ของฮอร์โมโกเนียเพิ่มจำนวนโดยวิธี cell fusion และเจริญต่อไปเป็นไตรโคม ลักษณะเซลล์ของฮอร์โมโกเนียมีสีซีดเพราะในไซโตพลาสซึมมีกรานูล (Granule) น้อย แต่เมื่อเจริญไปเป็นไตรโคมที่โตเต็มที่ภายในไซโตพลาสซึมจะมีกรานูลเพิ่มขึ้นทำให้เซลล์มีสีเขียวเข้มน้ำเงินมากขึ้น (ภาพที่ 2)

สำหรับการแพร่กระจายของสาหร่ายสไปรูลีนาพบได้ทั้งในทวีปอเมริกา แอฟริกา และเอเชีย ในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็มแต่ส่วนใหญ่พบในน้ำจืด เจริญเติบโตดีในน้ำที่มีความเป็นด่างสูง ซึ่งสิ่งมีชีวิตอื่นเจริญเติบโตได้ค่อนข้างยาก (กาญจนภาชน์, 2527) ในประเทศไทยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และพบสาหร่ายสไปรูลีนาได้ง่ายในน้ำที่ค่อนข้างเสียหรือในบ่อบำบัดน้ำเสีย (จิระพรรณ, 2536)



ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของสาหร่ายสไปรูลีนา (ที่มา: Richmond , 1986)

2. ประโยชน์ของสาหร่ายสไปรูลีนา

สาหร่ายสไปรูลีนาเป็นสาหร่ายที่ชาวพื้นเมืองในทวีปอเมริกา และแอฟริกาใช้เป็นอาหารประจำวันมาเป็นเวลาหลายพันปี มีรายงานว่าชาวพื้นเมืองชนชาติชาด (Chad) ซึ่งอยู่ใจกลางทะเลทรายสะฮารา เก็บสาหร่ายสไปรูลีนาจากทะเลสาบ โจฮานน์ นำไปตากแห้ง บดเป็นผงใช้ผสมกับแป้งสาลีทำขนมปัง ทำซูป หรือทำขนมหวาน และยังเป็นอาหารหลักประจำวันมาจนถึงปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์เริ่มสนใจศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับสาหร่ายสไปรูลีนา เมื่อ 50 ปีก่อนและพบว่า

สาหร่ายสไปรูลินามีโปรตีนสูง ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด (ตารางที่ 1) มีวิตามิน แกลีอแร์ และรงควัตถุหลายชนิด และมีไขมันต่ำ (Siangdung *et al.*, 1996) ทำให้สาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นอาหารธรรมชาติที่มีโปรตีน วิตามิน แกลีอแร์ และอื่นๆ อยู่ในสภาพสมดุล และย่อยได้ง่ายจัดเป็นอาหารที่ปลอดภัย และไม่เกิดผลข้างเคียงถ้ารับประทานในปริมาณมากหรือติดต่อกันเป็นเวลานาน (เจียมจิตต์, 2535)

นอกจากเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารสูง สาหร่ายสไปรูลิน่ายังใช้เป็นยารักษาโรคได้หลายชนิด จึงมีการศึกษาโดยนักวิจัยในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น จีน อเมริกา อินเดีย รัสเซีย ฝรั่งเศส และเยอรมัน เป็นต้น ซึ่งรายงานเบื้องต้นคือการทดลองใช้สาหร่ายสไปรูลิน่ารักษาโรคในระยะแรก Nakamura (1982) แพทย์ชาวญี่ปุ่นรายงานว่า สารซัลโฟลิด และแคลเซียมสไปรูลานในสาหร่ายสไปรูลิน่า สามารถต้านไวรัสได้ ส่วนเบต้าแคโรทีนซึ่งมีมากในสาหร่ายสไปรูลิน่าก็มีรายงานว่าช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งได้เช่นกัน และกรดอะมิโนบางชนิดที่มีอยู่ใน สาหร่ายสไปรูลิน่าเช่น กรดกลูตามิก ทรีปโตเฟน เฟนิลอลานีน ช่วยป้องกันการเสื่อมของประสาท และช่วยกระตุ้นสารซีโรโทนินให้สมองรู้สึกผ่อนคลาย และส่วนของอาร์จินินจะช่วยในการแก้ไขปัญหาสมรรถภาพทางเพศ เนื่องจากอาร์จินินเป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดคือน้ำอสุจิ

นอกจากนี้สาหร่ายสไปรูลิน่าสามารถรักษาแผลมีหนองได้เป็นอย่างดีเพราะมีปริมาณโปรตีนและซีตที่อินอยู่ในปริมาณที่สูง (เจียมจิตต์, 2535) อีกทั้งยังใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์เนื่องจากสาหร่ายสไปรูลิน่ามีคุณค่าทางอาหารสูง อุดมไปด้วย วิตามินบี 12 และโปรตีนสูง นอกจากนั้นยังมีสารไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระทั้งในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิต รวมทั้งยังช่วยสร้างระบบภูมิคุ้มกันแก่ร่างกาย ช่วยควบคุมปริมาณและความหนาแน่นของเม็ดเลือดแดง ช่วยคลายความอ่อนเพลีย เร่งประสิทธิภาพการทำงานของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย ช่วยบำรุงเลือด สร้างเม็ดเลือดใหม่ให้ร่างกายช่วยยับยั้งผมร่วงได้ ช่วยกระตุ้นการงอกของเส้นผม และช่วยให้ผมดำขึ้น เนื่องจากให้สารอาหารกับรากผม ทำให้เม็ดสีเพิ่มขึ้น และ ผมดำขึ้น และเนื่องจากเซลล์สาหร่ายไม่มีเซลลูโลส (Cellulose) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้ถึง 85-95 เปอร์เซ็นต์ (สรวีศ, 2543)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในสาหร่ายสไปรูลิน่า

ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง)
กรดอะมิโนจำเป็น (Essential amino acid)	
ไอโซลิวซีน (Ile)	4.13
ลูซีน (Leu)	5.80
ไลซีน (Lys)	4.00
เมไทโอนีน (Met)	2.17
เฟนิลอะลานีน (Phe)	3.95
ทรีโอนีน (Thr)	4.17
ทริปโตเฟน (Try)	1.13
วาลีน (Val)	6.00
กรดอะมิโนไม่จำเป็น (Non-Essential amino acid)	
อะลานีน (Ala)	5.82
อาร์จินีน (Arg)	5.98
กรดแอสปาร์ติก (Asp)	6.43
ซิสเทอีน (Cys)	0.67
กรดกลูตามิก (Glu)	8.94
ไกลซีน (Gly)	3.46
ฮิสติดีน (His)	1.08
โพรลีน (Pro)	2.97
เซรีน (Ser)	4.00
ไทโรซีน (Tyr)	4.60

ที่มา: Richmond (1986)

จากประโยชน์ที่กล่าวมาแล้วนั้นสาหร่ายสไปรูลินายังสามารถนำไปใช้เลี้ยงสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่ว่าจะเป็นสุนัข แพะ วัว ไก่ นก หมู กุ้ง ปลา (Menasveta *et al.*, 1993) ซึ่งมีงานวิจัยที่น่าสนใจดังนี้ คือการทดสอบประโยชน์ และหาอัตราการใช้ที่เหมาะสมของสาหร่ายสไปรูลินาในกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาววามาไม รวมไปถึงการป้องกันโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ ระยะโพสท์ลาร์วา และระยะวัยรุ่น (Benjamas, 2003) ในส่วนของสัตว์ปีกจำพวกไก่ เป็ด และนกที่ไข่สามารถนำมารับประทานได้จะมีการให้สาหร่ายสไปรูลินาสดเพื่อเร่งสีของไข่แดงให้เข้มมากขึ้น ซึ่งมีผลทางการตลาด (สุชาติ, 2530) นอกจากนี้จะเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตสูงแล้ว ยังประกอบไปด้วยแคโรทีน ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นวิตามินเอ เมื่อนำไปทดลองและใช้เป็นส่วนผสมของปลาประเภทสวยงาม เนื่องจาก เบตา- แคโรทีนจากสาหร่ายจะช่วยเร่งสีผิวของปลาให้สวยเข้มขึ้น Stanley and Jones (1976) ได้ทดลองนำสาหร่ายสไปรูลินาผสมของอาหารเลี้ยงปลา bigmouth buffalo และปลา blue tilapia พบว่าปลาทั้งสองชนิดมีการเจริญเติบโตดีมาก แต่เมื่อลดปริมาณของสาหร่ายลง อัตราการเจริญเติบโตก็ลดลงด้วย

นอกเหนือจากประโยชน์ทางอาหารและการรักษาโรคแล้ว สาหร่ายสไปรูลินายังมีประโยชน์ด้านอื่นอีก เช่น สารสกัดไฟโคไซยานินในสาหร่ายสไปรูลินาซึ่งให้สีน้ำเงินหรือสีฟ้าสามารถนำไปใช้เป็นสีผสมอาหาร ยา หรือเครื่องสำอางก็ได้ และสารสกัดแคโรทีนอยด์ซึ่งให้ส้มหรือสีแดง ช่วยในการเปลี่ยนสีของเนื้อเยื่อของสัตว์ที่บริโภคสไปรูลินาให้แดงมากขึ้นได้ (Menasveta *et al.*, 1993) และยังมีรายงานการใช้สาหร่ายสไปรูลินาช่วยควบคุมคุณภาพของน้ำและใช้บำบัดน้ำเสียได้อีกด้วยหรือใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพจากน้ำทิ้งที่เลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา เพราะขณะที่สาหร่ายสังเคราะห์แสงไม่เพียงแต่จะให้ออกซิเจนแก่แหล่งน้ำเท่านั้น แต่สาหร่ายยังต้องการไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจากแหล่งน้ำเพื่อใช้ในการดำรงชีวิตอีกด้วย (Ciferri and Tiboni, 1985) Soong (1980) ได้ทดลองนำของเสียจากการเน่าสลายของมูลสัตว์มาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ของเสียดังกล่าวยังไม่สมบูรณ์ จึงมีกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก จะเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับสาหร่ายได้ และ พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ดี นฤมล และคณะ (2529) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* โดยใช้น้ำทิ้งจากบ่อบำบัดที่ 5 ของโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดี

3. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า มีองค์ประกอบสำคัญได้แก่ คุณภาพและปริมาณอาหาร หรือปุ๋ย แสงสว่าง อุณหภูมิ คุณภาพน้ำ การหมุนเวียนของน้ำ (ธิดา, 2542)

แสงสว่าง

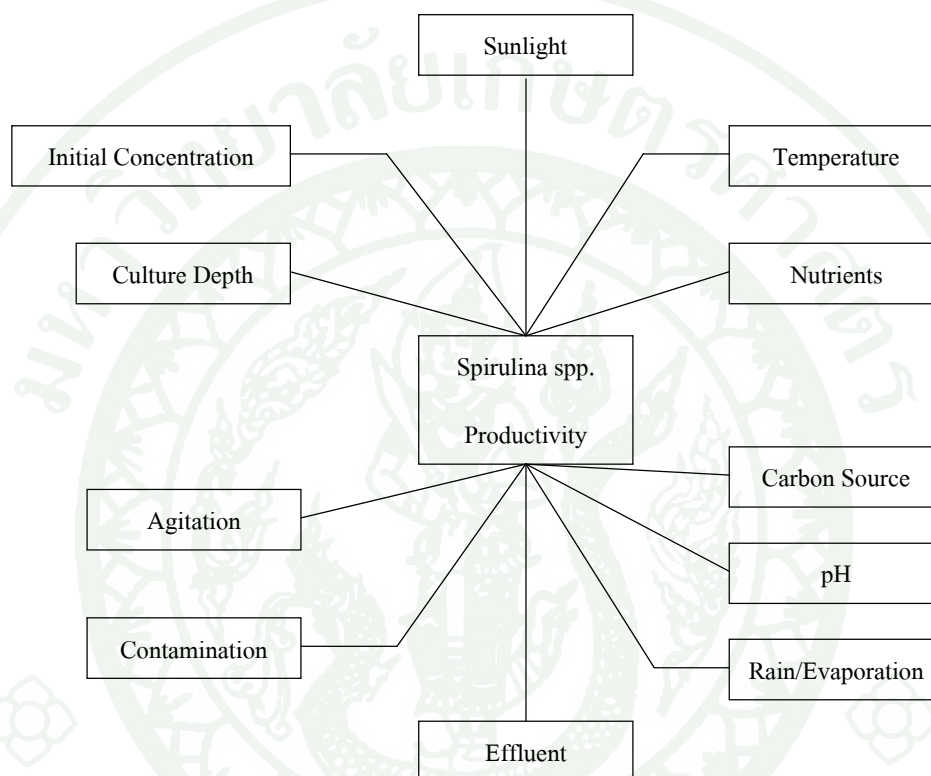
การเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลิน่า ก็คล้ายๆกับพืชสีเขียวทั่วไป คือ ต้องอาศัยแสงสว่างในการสังเคราะห์แสง ในประเทศอินเดียมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ และพบว่าสาหร่ายเจริญดีที่ความเข้มของแสง 30–35 กิโลลักซ์ (Vankataraman, 1983) สำหรับการเพาะเลี้ยงในประเทศไทย ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงระดับอุตสาหกรรมสามารถเพาะเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ และให้ได้รับแสงสว่างจากดวงอาทิตย์โดยตรง ปรากฏว่าให้ผลผลิตสูงเป็นที่น่าพอใจ (นฤมล และคณะ, 2529) จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าแสงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของสาหร่ายสไปรูลิน่าอยู่ในช่วง 3,000-5,000 ลักซ์ (อาภารัตน์, 2539) (ภาพที่ 3)

อย่างไรก็ตามสาหร่ายสไปรูลิน่าที่เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มของแสงสูงเกินไปพบว่า การเติบโตของสาหร่ายจะเพิ่มมากขึ้นแต่จะมีผลไปยับยั้งการหายใจของเซลล์สาหร่าย รวมทั้งชักนำให้เกิด gas vacuole เป็นจำนวนมาก เป็นสาเหตุให้สาหร่ายลอยอยู่ผิวน้ำในขณะที่เดียวกันจะลดการสร้าง phycolibosome ที่เป็นสารสีจำพวกโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (van Eykelenburg, 1979)

อุณหภูมิ

เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญและการแพร่กระจายของสาหร่ายเช่นกัน เพราะสาหร่ายแต่ละชนิดสามารถแพร่พันธุ์ได้ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่านั้น สาหร่ายสไปรูลิน่า สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 15-50 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่ทำให้สาหร่ายสไปรูลิน่า เจริญเติบโตดีที่สุดคือประมาณ 32-42 องศาเซลเซียส เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอย่างรวดเร็วประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส จะทำให้สาหร่ายไม่สามารถปรับตัวได้ จึงทำให้หยุดการเจริญเติบโต (Araoz *et al.*, 1998) และจากการทดลองเพาะเลี้ยงที่เมืองไมซอร์ (Mysore) ทางตอนใต้ของประเทศอินเดีย ซึ่งมีอุณหภูมิในฤดูร้อน (มีนาคม – มิถุนายน) สูงถึง 40 องศาเซลเซียส อีกทั้งช่วงเวลากลางคืนของฤดูหนาว (ตุลาคม – ธันวาคม) อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส พบว่า การเจริญเติบโตของสาหร่าย

สไปรูลิน่าลดลง ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส และสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส (Vankataraman, 1983) สำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงในประเทศไทย โดย สุชาติ และคณะ (2531) พบว่าอุณหภูมิของน้ำในถังเพาะเลี้ยงขณะน้ำนิ่งเมื่อเวลา 13.00 น. มีอุณหภูมิเท่า 39 องศาเซลเซียส แต่เมื่อกวนน้ำพบว่าอุณหภูมิลดลงเหลือเพียง 35 องศาเซลเซียส สาหร่ายสามารถเจริญได้ดีขึ้น



ภาพที่ 3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า (ที่มา: Vankataraman (1983))

เนื่องจากสาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นแพลงก์ตอนคือลอยอยู่ในน้ำ ดังนั้นการทำให้น้ำหมุนวนจะทำให้ทุกเส้นสายของสาหร่ายสไปรูลิน่ามีโอกาสผลัดเปลี่ยนหมุนเวียนกันรับแสงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสง ทำให้อุณหภูมิของน้ำมีค่าใกล้เคียงกันทั้งภาชนะ และทำให้มีออกซิเจนเพียงพอสำหรับการหายใจในตอนกลางคืน อย่างไรก็ตาม ข้อสำคัญคือต้องให้เกิดการเคลื่อนของมวลน้ำอย่างทั่วถึงแต่ไม่รุนแรง เพื่อไม่ให้สาหร่ายสไปรูลิน่าตกตะกอนตายอยู่ก้นถังหรือบ่อเพาะ และไม่ให้เส้นสายของสาหร่ายสไปรูลิน่าบอบช้ำแตกหัก เนื่องจากเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลิน่าบอบบางแตกหักง่าย (พงษ์เทพ และอดิเรก, 2539) นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มอากาศทำให้เซลล์ของ

สาหร่ายมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ในสภาพที่ไม่มีการหมุนเวียนของสารอาหาร เซลล์สาหร่ายจะจับตัวกันเป็นกลุ่ม และมีอัตราการเจริญลดลง นอกจากนั้นการหมุนเวียนของสารอาหารยังทำให้เซลล์ของสาหร่ายสามารถสัมผัสธาตุอาหารอย่างทั่วถึงและทำให้สามารถดูดซึมธาตุอาหารไปใช้ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดความแตกต่างของอุณหภูมิที่ผิวน้ำกับที่ระดับลึกลงไป ถ้าหากไม่มีการหมุนเวียนของสารอาหารแล้วจะทำให้อุณหภูมิที่ผิวน้ำสูงและเมื่ออุณหภูมิของน้ำสูงถึงระดับหนึ่งจะไปยับยั้งการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสไปรูลินา ถึงที่เพาะเลี้ยงควรมีความลึกประมาณ 20 – 25 เซนติเมตร เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการใช้แสงของสาหร่าย (สุมาลี, 2535; Venkataraman, 1983)

ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เป็นตัวบ่งบอกถึงความสามารถในการละลายของ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Venkataraman, 1983) หรือปริมาณคาร์บอนไบคาร์บอเนต (สุมนทิพย์, 2529) ในอาหารที่เลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา ซึ่งมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ สาหร่ายสไปรูลินา (Becker and Venkataraman, 1982) สำหรับค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 8-11 โดยสาหร่ายจะลดการเจริญเติบโตเมื่อค่า pH สูงกว่า 11 หรือต่ำกว่านั้น ดังนั้นการเพาะเลี้ยงในเชิงการค้าจึงนิยมปรับค่า pH ของน้ำที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายให้มีค่าอยู่ระหว่าง 8.5-11.0 ซึ่งนอกจากจะทำให้สาหร่ายโตได้ดีแล้วยังมีผลทำให้แพลงก์ตอนในกลุ่มอื่นรวมทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคเจริญเติบโตไม่ได้อีกด้วย แต่จากการรายงานของธิดา (2542) พบว่าเมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้ ค่า pH ของน้ำเพิ่มมากขึ้นด้วย เนื่องจากสาหร่าย สไปรูลินานำเอาคาร์บอนจาก โซเดียมไบคาร์บอเนตไปใช้ จึงทำให้เกิดโซเดียมไอออน (Na^+) ในน้ำมากขึ้น ซึ่งค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีผลต่อกระบวนการต่างๆ ทางชีววิทยาของเซลล์ (Ciferri and Tiboni, 1985) เนื่องจากค่า pH จะมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย ในสถานะที่มีค่า pH 10-11 ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย สไปรูลินา อาจทำให้มีการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนียสูงถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้เป็นพิษต่อสาหร่ายได้ (Ogbonna *et al.*, 2000)

ธาตุอาหารหลัก

คาร์บอนที่สาหร่ายสไปรูลินาสามารถนำไปใช้ได้อยู่ในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินานิยมใช้โซเดียมไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน

(ชิดา, 2542) โดยปริมาณที่เหมาะสม คือ 16.8 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าได้อีกด้วย (Takahira and Shuichi, 1978) คาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของสาหร่าย ในสาหร่ายมีปริมาณคาร์บอนประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (เจียมจิตต์, 2531) การเติมสารอาหารอื่นลงไปให้อาหารที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่ามากขึ้นจะไม่ส่งผลต่อการเจริญของสาหร่าย หากปริมาณคาร์บอนในอาหารมีอยู่อย่างจำกัด (Becker and Vankataraman, 1982) สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า ในปัจจุบันพบว่าโซเดียมไบคาร์บอเนตมีความจำเป็นต่อการเจริญของสาหร่ายสไปรูลิน่ามากกว่าโซเดียมไนเตรท ทั้งนี้เพราะโซเดียมไบคาร์บอเนตจะทำหน้าที่เป็นแหล่งให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และในขณะเดียวกันยังเป็นตัวป้องกันไม่ให้ระดับความเป็นกรด-ด่าง เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว (Nakamura, 1982; Richmond, 1986)

ไนโตรเจน เป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญและน้ำหนักแห้งของสาหร่าย การขาดไนโตรเจนในสาหร่าย สไปรูลิน่าทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และอาร์เอ็นเอ (RNA) ลดลง แต่จะมีคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น (Hosakul, 1972; Denesi *et al.*, 2002) สาหร่ายสไปรูลิน่าสามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งในรูปของอินทรีย์สารและอนินทรีย์สารในรูปของเกลือแอมโมเนีย (NH_4^+) ไนเตรท (NO_3^-) และไนไตรท์ (NO_2^-) (Chuntapa, 2003) โดยทั่วไปพบว่าสาหร่ายจะใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนก่อนการใช้ไนเตรท (Ogbona, 2000) แต่การใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้อาหารมีสภาพเป็นกรดก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสาหร่ายได้ หรือไนไตรท์ที่มีปริมาณเข้มข้นสูงเกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีผลไปยับยั้งการเจริญของสาหร่าย อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสาหร่ายสไปรูลิน่าเจริญได้ดีเมื่อมีการเติมโซเดียมไนเตรท ลงในอาหาร 2.5 กรัมต่อลิตร (พิมพรรณ และอารักษ์, 2531; สุมาลี, 2535; Kaplan *et al.*, 1986) ไนโตรเจนที่ได้จากการเตรียมโซเดียมไนเตรท 20.7 กรัมต่อลิตร สามารถให้ผลผลิตสาหร่ายได้ 1.992 กรัมต่อลิตร (Costa *et al.*, 2001) Denesi *et al.* (2002) พบว่า การเติมยูเรียลงในอาหาร 5.6 กรัม ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าจะไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสาหร่ายสไปรูลิน่า ไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ได้แก่ อามีน (amine) ยูเรีย (urea) กลูตามีน (glutamine) แอสพาราจีน (asparagine) (Baldia *et al.*, 1990; Ogbona, 2000; Denesi *et al.*, 2002) ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อของ เมทาบอลิซึมภายในเซลล์ ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสไปรูลิน่า จากรายงานการวิเคราะห์พบว่าในเซลล์สาหร่ายมีไนโตรเจนคิดเป็นร้อยละ 1-10 ของน้ำหนักแห้ง สาหร่าย สไปรูลิน่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปไนเตรท 42-1250 มิลลิกรัมต่อลิตร (Takahira and Shuichi, 1978)

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าอีกธาตุหนึ่ง และเป็นตัวจำกัดการเจริญเติบโต ฟอสฟอรัสมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ โดยเฉพาะการถ่ายทอดพลังงานและกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิก ในสาหร่ายสไปรูลิน่า พบว่ามีฟอสฟอรัส 0.69 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง สาหร่ายสไปรูลิน่าสามารถใช้สารอาหารจำพวกฟอสเฟตที่มีในอาหารเพาะเลี้ยงได้ถึง 60-99 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งฟอสฟอรัส การเติมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 กรัมต่อลิตรลงไปในการช่วยให้อาหารช่วยให้อาหารสาหร่ายสไปรูลิน่าเจริญได้ดี (Kaplan *et al.*, 1986) ในแหล่งน้ำธรรมชาติพบฟอสฟอรัสในรูปอนินทรีย์ฟอสเฟต สาหร่ายสไปรูลิน่าสามารถใช้ฟอสฟอรัสของสารอินทรีย์ฟอสเฟตได้ดีกว่าอนินทรีย์ฟอสเฟต (Baldia *et al.*, 1994) การขาดฟอสฟอรัสของสาหร่ายมีผลใกล้เคียงกับการขาดไนโตรเจนคือ ทำให้ปริมาณโปรตีนคลอโรฟิลล์เอ และอาร์เอ็นเอ (RNA) ของสาหร่ายลดลง แต่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น เคยมีรายงานว่าสารจำพวกฟอสฟอรัสบางชนิด เช่น โบแตสเซียมไดซัลเฟตและไดโบแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงในอาหารไม่ได้ทำให้การเจริญของสาหร่ายเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีปริมาณฟอสเฟตที่มากเกินไปสาหร่ายก็ไม่สามารถที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้นได้ ทำให้เป็นการสูญเสียโดยเปล่าประโยชน์ (พิมพรรณ และอารักษ์, 2531; Chaudhari *et al.*, 1980)

ธาตุอาหารรอง

ธาตุอาหารรองเป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการในปริมาณน้อย แต่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลที่สำคัญ เช่น เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่ช่วยในการเจริญเติบโต (สุมาลี, 2535) แร่ธาตุรองที่สำคัญ เช่น เหล็ก แมงกานีส โบรอน ทองแดง สังกะสี โมลิบดีนัม วานาเดียม โคบอลต์ นิกเกิล ซิลิกา และเซเลเนียม (ถัดดา, 2540)

การระเหยของน้ำ เป็นสิ่งสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในสภาพกลางแจ้ง โดยเฉพาะในฤดูร้อนซึ่งมีอุณหภูมิสูง (Venkataraman, 1983)

ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์สาหร่าย ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์สาหร่ายมีความสัมพันธ์กับความเข้มของแสงที่จะสามารถผ่านลงไปใต้น้ำได้ ถ้าความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายต่ำเกินไป แสงส่องผ่านลงไปใต้น้ำได้มาก ซึ่งอาจทำให้สาหร่ายตายได้ เนื่องจากกระบวนการโฟโตออกซิเดชัน ในทางกลับกัน หากความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นสูงเกินไปจะทำให้เกิดการบังกันเองของเซลล์สาหร่าย ทำให้การรับพลังงานแสงและประสิทธิภาพในการหายใจ

ลดลง ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายที่เหมาะสมของสาหร่ายสไปรูลิน่าในการเพาะเลี้ยง คือ 225–250 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้งต่อลิตร (Venkataraman, 1983)

4. การเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลิน่า

ช่วงการเจริญเติบโต (growth phase) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในระบบปิด (closed system) ซึ่งเรียกว่า batch culture เป็นการนำเชื้อสาหร่ายมาใส่ในอาหารใหม่ สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่อัตราการเจริญจะลดลงจนกลายเป็นศูนย์ในที่สุด เนื่องจากสาหร่ายทนไม่ได้ต่อสารพิษที่ปลดปล่อยออกมาจำนวนมาก หรือเนื่องจากมีแร่ธาตุอาหาร แสงสว่าง ไม่เพียงพอ (Richmond, 1983) สาหร่ายขนาดเล็กที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์แบบง่ายๆ โดยการแบ่งเซลล์ จะมีระยะการเจริญเติบโตแบ่งออกเป็น 5 ระยะ ดังนี้ แสดงในภาพที่ 4 (ยูวดี, 2543)



ภาพที่ 4 ช่วงการเจริญ (growth phase) ของสาหร่าย

4.1 ระยะปรับตัว (lag phase or inductional phase) เป็นระยะที่เซลล์ปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ เช่น แสง อุณหภูมิ และธาตุอาหาร ฯลฯ ระยะนี้เซลล์ จะไม่มีการเจริญเติบโต ฉะนั้น หากเซลล์ไม่สามารถปรับตัวได้ เซลล์จะตายลง การที่จะผ่านระยะปรับนี้ได้เร็วหรือช้าขึ้น ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของเซลล์ และความอุดมสมบูรณ์ของอาหารที่เลี้ยง ถ้าสภาพทั้งสองเหมาะสมก็จะสามารถเข้าสู่ระยะต่อไปได้เร็วขึ้น

4.2 ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (exponential phase or log phase) เป็นระยะที่มีการเจริญเติบโต และแพร่ขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ระยะนี้จะนานเท่าใดขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหาร และคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เคมี ของสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงแสงสว่าง รวมทั้งผลผลิตนอกเซลล์ สภาวะรวมของสิ่งแวดล้อม ลักษณะการเจริญเติบโต ในระยะนี้เป็นแบบที่รวดเร็วในระยะแรก และจะค่อยๆ ช้าลงตามลำดับ (ธิดา, 2542)

4.3 ระยะเฉื่อย (retardation phase or phase of declining relative growth) เป็นช่วงที่มีการเจริญเติบโตช้าลงเพราะขาดแคลนอาหาร เช่น ไนโตรเจน เหล็ก คาร์บอน หรือออกซิเจน เพราะปริมาณเซลล์เกิดหนาแน่นเกินไป การเสียดสีของค่า pH เพราะเกิดแอมโมเนียขึ้นมาก หรือแสงสว่างลดลงเนื่องจากเซลล์เกิดการบังกันเอง (auto-shading) วิธีแก้ไขให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็นปกติได้โดยการเติมธาตุอาหารที่ขาดแคลน ถ้ามีตะกอนของเฟอริกฟอสเฟต อาจแก้ไขโดยเติมสารอีเลเตอร์ เช่น โซเดียมอีดีทีเอ (NaEDTA) ลงไปละลายตะกอนเหล็ก ส่วนการป้องกันการขาดแคลนคาร์บอนและออกซิเจนนั้นอาจทำได้โดยการเขย่าภาชนะตลอดเวลา หรือใช้การพ่นอากาศ ซึ่งนอกจากจะเพิ่มคาร์บอนและออกซิเจนแล้ว ยังช่วยให้เกิดการผสมผสานของมวลน้ำในภาชนะเลี้ยง ทำให้เซลล์ได้รับแสงสว่างโดยทั่วถึงอีกด้วย

4.4 ระยะคงที่ (stationary phase) เป็นระยะที่มีการเจริญเติบโตหยุดนิ่ง เนื่องจากธาตุอาหารลดน้อยลงและเกิดสารพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึม หรือการสลายตัวของเซลล์เพิ่มขึ้น

4.5 ระยะตาย (death phase) เป็นระยะที่เซลล์หยุดการเจริญเติบโตโดยสิ้นเชิงเนื่องจากธาตุอาหารหมดลง เซลล์จะเริ่มตายและการตายจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และรวดเร็วขึ้น ฉะนั้นความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงคือ ควบคุมการเลี้ยงให้มีกราฟการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียลนานที่สุดเท่าที่จะทำได้ (ศักดิ์ดา, 2543)

5. การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลินา

การนับเซลล์ (cell counts) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก ในการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย อุปกรณ์ที่ใช้คือกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) และสไลด์นับเซลล์ (counting slide or counting chamber) สไลด์มีหลายชนิดให้เลือกใช้ตามความหนาแน่นของตัวอย่างและขนาดของเซลล์ในตัวอย่างที่นับ ชนิดที่นิยมใช้คือ Sedgwick-Rafter counting chamber ความจุ 1 มิลลิลิตร

Palmer Maloney chamber ความจุ 0.1 มิลลิลิตร และสไลด์นับเม็ดเลือด (haematometer หรือ haemacytometer) ความจุ 0.004 มิลลิลิตร

การวัดการกระจายของแสงหรือความขุ่น (light scattering or turbidity) เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดในการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์ ข้อดีของวิธีนี้ คือ วัดง่ายและสะดวกข้อมูลที่ได้เป็นค่าของมวลชีวภาพ (biomass) ที่เพิ่มขึ้นโดยวัดจากค่าความขุ่น อุปกรณ์ที่ใช้เรียกว่า colorimeter หรือ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ถ้าจำนวนเซลล์ไม่หนาแน่นนักจำนวนเซลล์จะมีความสัมพันธ์แบบเรขาคณิตกับความเข้มของแสง กล่าวคือ ความเข้มของแสงจะลดลงเมื่อจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น

การวัดน้ำหนักแห้ง (dry weight measurement) เหมาะกับสาหร่ายชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เดี่ยวที่นับจำนวนเซลล์ไม่ได้ ฉะนั้นจึงนิยมใช้กับสาหร่ายชนิดที่เป็นเส้น วิธีวัดจะวัดทุกวันแล้วนำมาเขียนกราฟ เริ่มการวัดโดยเก็บตัวอย่างจากภาชนะเลี้ยง ก่อนเก็บควรกวนตัวอย่างให้เข้ากันดีเสียก่อน กรองสาหร่ายให้ออกจากน้ำโดยการปั่นให้ตกตะกอน (centrifugation) รินน้ำใส่ภาชนะล้าง ข้างบนออก นำตัวอย่างไปอบแห้ง ถ้าใช้เครื่องกรอง (membrane filter) ควรล้างสาหร่ายบนแผ่นกรองให้สะอาดปราศจากเกลือหรือสิ่งปนเปื้อนด้วยสารอาหารอย่างเจือจางหรือน้ำกลั่นที่เป็นกลาง ไม่ควรล้างสาหร่ายน้ำเค็มด้วยน้ำกลั่นเพราะจะทำให้เซลล์แตก อุณหภูมิที่อบแห้งประมาณ 70-110 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10-12 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ นำแผ่นกรองออกจากตู้อบในโถดูดความชื้น (desiccators) นาน 15-30 นาที (ถ้าใส่แผ่นกรองหรือเยื่อกรองในหลอดแก้วควรนำหลอดแก้วเข้าตู้อบพร้อมตัวอย่างด้วย) รายงานผลเป็นน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร หรือพื้นที่ของน้ำที่ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่าย

การวัดคลอโรฟิลล์ (chlorophyll determination) เริ่มแรกให้เก็บตัวอย่างจากภาชนะเลี้ยง กรองเซลล์หรือแยกเซลล์ออกโดยการปั่นให้ตกตะกอน ต่อจากนั้นจึงสกัดสารสี (pigment) โดยเติมสารละลายเคมี ชนิดที่นิยมใช้ได้แก่ อะซิโตน เมทานอล อีเทอร์ เมื่อสกัดสารสีออกจากเซลล์แล้วให้กรองอีกครั้งหนึ่งเพื่อกำจัดตะกอนและสิ่งปนเปื้อนออกให้หมด นำสารละลายที่กรองได้ใส่ในหลอดแก้วที่ใช้สำหรับวัดค่าคลอโรฟิลล์ (ลัดดา, 2543)

6. การถ่ายยีนในสาหร่าย

การถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายในปัจจุบันสามารถทำได้สำเร็จแล้วในสาหร่ายหลายชนิด เนื่องจากเทคนิคและขั้นตอนในปัจจุบันมีการพัฒนาขึ้น การถ่ายยีนในสาหร่ายมีหลายวิธี ส่วนใหญ่

เป็นการถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer) เป็นการถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายโดยตรงโดยไม่มีพาหะเป็นตัวนำ

การถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายโดยใช้สารเคมี

เป็นการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์สาหร่ายโดยอาศัยการช่วยของสารเคมีเช่น CaCl_2 ที่อุณหภูมิประมาณ 0 องศาเซลเซียส จะช่วยให้ดีเอ็นเอแตกตะกอนและจับกับผนังเซลล์และเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นดีเอ็นเอ ถูกกระตุ้นให้เข้าไป หลักการที่ใช้เป็นหลักการเดียวกับวิธี heat shock

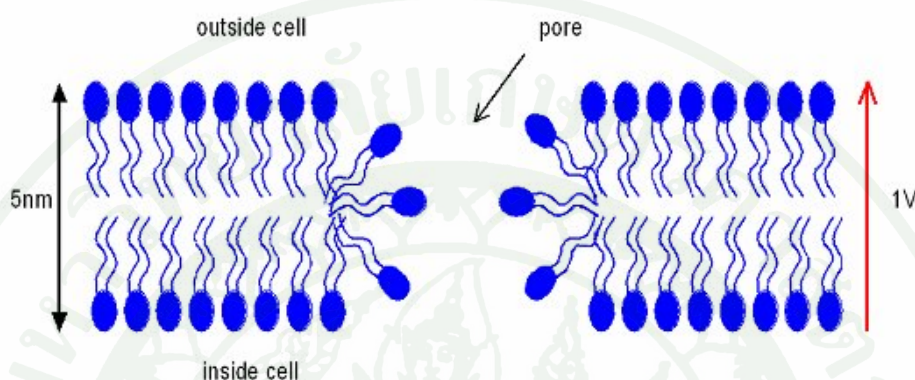
การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment)

เป็นการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยอาศัยหลักการใช้แรงดันของก๊าซเฉื่อย เช่น ก๊าซฮีเลียม ขับดันอนุภาคโลหะขนาดเล็กประมาณ 1 ไมครอน ซึ่งโดยทั่วไปใช้อนุภาคทังสเตนหรือทองคำ อนุภาคเหล่านี้จะถูกเคลือบด้วยดีเอ็นเอ และขับดันให้เคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงทะลุผ่านผนังเซลล์ของสาหร่าย ซึ่งการถ่ายยีนวิธีนี้นิยมกันมากในสาหร่ายที่มีขนาดใหญ่จำพวก สาหร่ายสีน้ำตาล สาหร่ายสีแดง ซึ่งวิธีนี้ไม่เหมาะกับสาหร่ายขนาดเล็กหรือสาหร่ายเซลล์เดียว เพราะจะทำให้ผนังเซลล์ได้รับความเสียหายสูง

การถ่ายยีนโดยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (electroporation)

เป็นวิธีการที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดเป็นโพรงหรือช่องด้วยการจ่ายกระแสไฟฟ้าที่แรงและเร็วแก่เซลล์ ทำให้ศักย์ไฟฟ้าเคมีบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหัน ความต่างศักย์ที่เกิดขึ้นระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ จะทำให้ lipid bilayer บริเวณ aqueous pores เปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะที่ชั้นไขมันข้าง hydrophilic pore โดยทำให้ทิศทางการวางของไขมันส่วนที่ชอบน้ำหันเข้าสู่ช่องว่าง ส่วนด้านที่ไม่ชอบน้ำจะหันเข้าสู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้

เยื่อหุ้มเซลล์บริเวณนั้นเกิดช่องว่างขึ้นและเกิดการชักนำความต่างศักย์ถ่ายเทที่เยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane potential) ทำให้สารที่ต้องการเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่านช่องเปิดนี้จะเป็นอยู่ได้ชั่วขณะหนึ่ง เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไปความต่างศักย์ระหว่างภายนอกกับภายในจะลดลงจนกลับเข้าสู่สภาวะปกติ ชั้นของ lipid bilayer จะกลับเข้าสู่สภาพเดิมทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ปิดลง (Prausnitz *et al.*, 1995) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 รูปแบบของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าจะเกิดช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์

ที่มา: Prausnitz *et al.* (1995)

อย่างไรก็ตาม ศักย์ไฟฟ้ายังมีผลต่อความกว้างและการคืนกลับของช่องเปิด ความกว้างของช่องที่เปิดออกจะเป็นไปตามความแรงของไฟฟ้า electroporation เป็นเทคนิคควบคุมได้ง่ายซึ่งสามารถใช้ได้ทั้งเซลล์ของพวก prokaryotic และ eukaryotic และในส่วนของวิธีการนำส่งยีนโดยวิธี electroporation เป็นการนำส่งยีนโดยไม่ใช้ไวรัส (nonviral) จึงมีข้อดีตรงที่ไม่ต้องหาไวรัสเวกเตอร์เพื่อใส่ยีนลงไปไวรัส นอกจากนี้ยังสามารถใส่ยีนหรือ DNA เข้าลงไปได้โดยไม่จำกัดขนาดและเกิดการต่อต้านของภูมิคุ้มกัน

7. รายงานการใช้การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)

มีรายงานการใช้วิธี electroporation ในการถ่ายยีนเข้าสู่จุลินทรีย์ต่างๆ อย่างแพร่หลายเช่น Powell *et al.* ในปี 1988 รายงานว่าการถ่ายยีนในแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) ซึ่งมีผนังเซลล์ในชั้น peptidoglycan ที่หนาโดยทั่วไปจะต้องมีการย่อยผนังเซลล์ออกก่อน แต่การใช้วิธี electroporation พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดสามารถรับยีนได้โดยไม่ต้องย่อยผนังเซลล์

ก่อนเช่น ใน *Lactobacillus casei* *Lactobacillus lacti* และ *Streptococcus thermophilus* เป็นต้น (Klebe *et al.*, 1983)

สำหรับในไซยาโนแบคทีเรียมีรายงานว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงเช่นกัน เช่น ใน *Fremyella diplosiphon* โดยเฉพาะการถ่ายพลาสมิดขนาดใหญ่เข้าสู่เซลล์ (Bruns *et al.*, 1989) สำหรับในสาหร่ายเซลล์เดียวมีการรายงานเช่นกัน เช่น ใน *Synechocystis* PCC6803 โดยวิธีนี้มีข้อดี

กว่าวิธีอื่นเนื่องจากนอกจากทำได้ง่ายและรวดเร็วแล้วยังไม่ต้องกำจัด *E. coli* ที่อาจปนเปื้อนในการถ่ายยีนอีกด้วย และยังพบอีกว่าวิธี electroporation ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าการถ่ายยีนโดยใช้สารเคมี PEG และ CaCl_2

ศรีสุพร (2536) รายงานการถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลิน่า สายพันธุ์อิตาลี่ด้วยวิธี การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยมีขั้นตอนทานยาปฏิชีวนะคือ Chloramphenicol เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกพบว่าสามารถ ตรวจพบยีนคัดเลือก ได้หลังจากการถ่ายยีนภายใน 5 วัน

แต่อย่างไรก็ตามการใช้วิธี electroporation ก็มีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงหลายปัจจัยโดยเฉพาะในเรื่องของกระแสไฟฟ้า โดยรายงานของ Theil and Poo (1989) ได้ทำการทดลองหาความแรงสนามไฟฟ้าและเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดใน *Anabaena* sp. M131 โดยใช้พลาสมิด pRL6 และใช้เซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 1mM HEPES และใช้ ปริมาณสารแขวนลอยเซลล์ 40 ไมโครลิตรต่อพลาสมิด 5 ไมโครกรัม ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดคือ 2.4×10^4 เซลล์ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ เมื่อกระตุ้นด้วยความแรงไฟฟ้า 6 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ในเวลา 5 มิลลิวินาที

อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการถ่ายยีนในสาหร่ายสไปรูลิน่าซึ่งปัจจุบันงานที่ศึกษาส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนและกรดอะมิโน ยีนที่สร้างเอนไซม์ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการเติมพันธะคู่ของกรดไขมัน ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการศึกษา การถ่ายยีนโดยใช้วิธี electroporation เข้าสู่สาหร่ายสไปรูลิน่าโดยใช้พลาสมิด pHSG 399 เพื่อพัฒนาให้สาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายยีนเป็น recombinant enzymes สำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ (Masaaki *et al.*, 2000)

8. ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า

8.1 ช่วงของการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายสไปรูลินาที่มีความสามารถในการยอมให้พลาสมิดเข้าสู่เซลล์

Golden *et al.* พบว่าในการถ่ายยีนเข้าสู่ *A. nidularis* เซลล์สาหร่ายในช่วง exponential phase ประสิทธิภาพการถ่ายยีนจะสูงกว่าเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนในช่วง stationary phase และช่วงอื่นๆ สุชาติ (2530) ได้เพาะเลี้ยง *Spirulina maxima* โดยใช้อาหารสูตร Zarrouk และพบว่าระยะ exponential phase อยู่ประมาณวันที่ 6-24 ของรอบระยะการเพาะเลี้ยง 40 วันและเมื่อนำเซลล์

สาหร่ายในระยะนี้ไปทำการทดลองเซลล์สาหร่ายมีคุณภาพที่ดีกว่าระยะอื่นๆ Poster (1987) รายงานว่าในสาหร่าย *A. nidularis* UTEX625 พบว่าประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดเมื่อใช้เซลล์ในช่วงการเจริญระยะท้ายของ exponential phase และประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำสุดเมื่อใช้เซลล์ที่อยู่ในช่วง stationary phase จากรายงานทั่วไปมักพบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้งหลายจะมีประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงในช่วง exponential phase เนื่องจากเซลล์ในระยะนี้มีความสมบูรณ์และมีการพัฒนาได้ ต่อเนื่องหากได้รับการถ่ายยีนโดยกระแสไฟฟ้าแล้วผนังเซลล์อาจจะได้รับการเปลี่ยนแปลงได้ถ้าเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนไม่สมบูรณ์อาจจะทำให้เซลล์ตายหลังจากการถ่ายยีน

8.2 ลักษณะผนังเซลล์ของเซลล์สาหร่ายสไปรูลินาที่ได้รับการถ่ายยีน

สำหรับสาหร่ายเซลล์เดียนั้นนิยมใช้วิธีการถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า ซึ่งข้อจำกัดที่สำคัญคือ ผนังเซลล์ที่มีไขมันและหนา จะเป็นตัวขวางกั้น มีผลทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลงอย่างมาก จึงมีความจำเป็นต้องเอาผนังเซลล์ออกเพื่อให้ได้เซลล์ไร้ผนัง (spheroplast) สำหรับใช้เป็นเซลล์เป้าหมายในการถ่ายยีน การย่อยผนังเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ไร้ผนังทำได้โดยใช้เอนไซม์หลายชนิด จึงมีความจำเป็นต้องลอกเอาผนังเซลล์ออกเพื่อให้ได้เซลล์ไร้ผนัง (spheroplast) สำหรับใช้เป็นเซลล์เป้าหมายในการถ่ายยีน (Ping *et al.*, 2005) การย่อยผนังเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ไร้ผนังทำได้โดยใช้เอนไซม์หลายชนิด (Gan *et al.*, 2004) ซึ่งชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยผนังเซลล์มีผลต่อจำนวนและคุณภาพของเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้ และมีผลต่อการพัฒนาของเซลล์ไร้ผนังไปเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ด้วยเช่นกัน โลโซไซม์เป็นเอนไซม์ที่มีรายงานว่าเหมาะสมสำหรับใช้แยกเซลล์ไร้ผนังใน Cyanobacteria หลายชนิด (Abo-Shady *et al.*, 1992) เช่น *Anabaena* sp. และ *Nostoc flagelliforme* (Ping *et al.*, 2005) โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิด

และสายพันธุ์ของสาหร่าย ดังนั้นเพื่อเป็นพื้นฐานงานวิจัยด้าน พันธุวิศวกรรมในสาหร่ายเกลียวทอง งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถแยกเซลล์ไรรีฟงได้ในปริมาณมาก เซลล์อยู่ในสภาพสมบูรณ์ และสามารถนำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ เพื่อให้ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทองให้เป็นเซลล์ใหม่ที่มีสมบูรณ์ เพื่อใช้เซลล์ไรรีฟงดังกล่าวเป็นเซลล์เป้าหมายสำหรับการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการถ่ายยีนต่อไป

8.3 ค่าความต่างศักย์กระแสไฟฟ้า

การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้านั้นต้องอาศัยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าสูงวิ่งผ่านเซลล์ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดช่องซึ่งมีขนาดพอที่พลาสมิดดีเอ็นเอสามารถผ่านเข้าไปได้ และเยื่อหุ้มเซลล์จะคืนสภาพปกติได้ หลังจากนำไปเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อไป แต่ถ้าใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่มากกว่าค่า critical voltage จะทำให้ผนังเซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมและคืนสู่สภาพปกติได้ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด

Neumann *et al.* (1989) รายงานว่า ความแรงของสนามไฟฟ้ามีผลอย่างมากต่อความอยู่รอดของเซลล์ และประสิทธิภาพในการถ่ายยีนของเซลล์แตกต่างกันไป ขนาดของเซลล์สาหร่ายก็เป็นส่วนสำคัญ โดยพบว่าเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กมักจะใช้ความแรงของสนามไฟฟ้ามากกว่าเซลล์สาหร่ายขนาดใหญ่ Chiang *et al.* (1992) พบว่า *Anabaena* sp. สายพันธุ์ M131 ใช้ความแรงของสนามไฟฟ้า 6 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตรด้วยเวลา 5 มิลลิวินาที พบประสิทธิภาพการถ่ายยีนที่สูงที่สุด และ *Fremyella diplosiphon* ใช้ความแรงของสนามไฟฟ้า 10 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตรด้วยเวลา 5 มิลลิวินาที พบประสิทธิภาพการถ่ายยีนที่สูงที่สุดเช่นกัน

8.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

ไซยาโนแบคทีเรียจำนวนมากพบว่าเป็นแหล่งที่มี endonuclease ซึ่งสามารถที่จะย่อยดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซึ่งจำเพาะต่อเอนไซม์นั้น และเอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่สามารถจดจำและมีลำดับเบสเดียวกันกับเอนไซม์ที่พบในแบคทีเรีย ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะเหล่านี้เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการถ่ายยีน เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้จะย่อยดีเอ็นเอที่ได้รับการถ่ายยีนเข้ามาในเซลล์พลาสมิดที่ทำการถ่ายยีนมีตำแหน่งซึ่งสามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายตำแหน่งก็จะทำให้การถ่ายยีนมีโอกาสไม่ประสบความสำเร็จมากยิ่งขึ้น

9. ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (selectable marker gene) และ ยีนรายงานผล (reporter gene)

ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (selectable marker gene)

เป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการที่ทำให้สามารถคัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนออกจากกลุ่มของเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกที่นิยมใช้ในการถ่ายยีน ได้แก่ ยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)* เป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin และยีน *neomycin phosphotransferase II (nptII)* เป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นต้น

ยีนรายงานผล (reporter gene)

เป็นยีนที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายยีนในเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยไม่เกี่ยวข้องกับการแสดงลักษณะความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหรือสารคัดเลือกอื่นๆ และสามารถใช้ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเหล่านี้ได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ตรวจสอบได้ง่าย ยีนรายงานผลที่นิยมใช้กันมาก คือ ยีน *β -glucuronidase (gus)* และยีน *green fluorescent protein (gfp)*

ยีน *β -glucuronidase (gus)*

เป็นยีนที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ K12 ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *β -glucuronidase* ซึ่งสามารถ hydrolysis กับสารตั้งต้นที่ไม่มีสี คือ สาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) ได้เป็นสารที่มีสีน้ำเงินเข้มบนเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนนี้เข้าไปและมีความคงทนสูงไม่ละลายในแอลกอฮอล์ (Jefferson *et al.*, 1987) เรียกการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ว่า GUS histochemical assay แต่หลังจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธีนี้จะทำให้เนื้อเยื่อพืชถูกทำลาย ทำให้ไม่สามารถนำเนื้อเยื่อไปใช้ประโยชน์ต่อได้ (Kamate *et al.*, 2000)

10. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (transient expression detection) และ การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบถาวร (stable transformant)

10.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (transient expression detection)

เป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในพืช มักใช้การตรวจสอบยีนรายงานผล (reporter gene) ซึ่งเป็นยีนที่สามารถติดตามได้ง่าย ทำให้ทราบว่ายีนที่ถ่ายเข้าไปนั้นเข้าไปในเซลล์พืชหรือไม่ ยีนรายงานผลที่นิยมมากที่สุดคือ ยีน *gusA* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase เมื่อ hydrolysis กับสารละลาย X-Gluc ทำให้ได้สารที่มีสีน้ำเงินเข้มบนเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน และมีความคงทนสูงไม่ละลายในแอลกอฮอล์ ฉะนั้นถ้าสร้างพลาสมิดที่มียีนรายงานผลเกาะติดกับยีนอื่นที่ต้องการ เมื่อตรวจสอบยีนรายงานผลแล้วให้ผลเป็นบวก จะสามารถคาดหวังได้ว่ายีนที่ต้องการนั้นเข้าไปในเซลล์พืชด้วย อย่างไรก็ตามถ้าตรวจสอบยีนรายงานผลเร็วเกินไป ผลบวกที่ได้ จะไม่สามารถยืนยันได้ว่ายีนเหล่านั้นเข้าไปเชื่อมต่อกับจีโนมของพืชได้อย่างถาวร แต่เป็นวิธีที่ชั่ววูบ ยีนได้เข้าไปในเซลล์พืชเท่านั้น

10.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบถาวร (stable transformant)

เป็นการตรวจสอบการเข้าเชื่อมต่อของยีนเข้ากับจีโนมของพืชอย่างถาวร เป็นการตรวจสอบหลังจากการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยอาหารคัดเลือกลิ้นสุดแล้ว การตรวจสอบสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

10.2.1 การตรวจสอบโดยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) เป็นการตรวจสอบการเข้าเชื่อมต่อของยีนเข้ากับสิ่งมีชีวิตเป้าหมายของสายหายแต่ไม่สามารถบอกได้ว่ายีนนั้นสามารถแสดงออกได้หรือไม่ ข้อดีของการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ คือ สามารถตรวจสอบได้เร็วแม้มีปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย ใช้เนื้อเยื่อน้อยและทราบผลได้ภายในเวลา 3-4 ชั่วโมง ส่วนข้อเสีย คือ เกิด false positive ได้ง่ายและเครื่องมือมีราคาแพง

10.2.2 การตรวจสอบโดยเทคนิค Southern hybridization เป็นการตรวจสอบการเข้าเชื่อมต่อของยีนเข้ากับจีโนมของสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย โดยอาศัยหลักของดีเอ็นเอที่สามารถจับคู่กันได้ (complementary) ระหว่าง ดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบกับดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวตรวจสอบ (probe) และเป็นวิธีการที่ใช้ในการวินิจฉัยจำนวนและขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (อุไรวรรณ, 2545)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina platensis*) สายพันธุ์ TISTR 8217 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2. วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า และ การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า

2.1 เครื่องมือ และ อุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ซึ่งประกอบด้วย
ชั้นวางขวดพร้อมระบบไฟให้แสงสว่าง เครื่องเขย่า เครื่องควบคุมอุณหภูมิและเครื่องให้อากาศ

2.2 เครื่องมือ และ อุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า ได้แก่
หม้อนึ่งความดัน ตู้อบ เตาไมโครเวฟ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องกวนสารเคมีแท่งแม่เหล็ก เครื่องวัด
ความเป็นกรดด่าง ซ้อนดักสาร และเครื่องแก้วต่างๆ เช่น กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์

2.3 เครื่องมือ และ อุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการเตรียมเซลล์สำหรับการถ่ายยีนและการถ่ายยีน
โดยใช้กระแสไฟฟ้า ได้แก่ เครื่องถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (BioRad MiniPulser Electroporation
System) กล้องจุลทรรศน์แบบ compound เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) เครื่อง
ปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

2.4. เครื่องมือ และ อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแยกเซลล์ไร้ผนัง ได้แก่
กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ การถ่ายยีนในระดับโมเลกุล ได้แก่ เครื่อง Thermocycler
(Biometra®) สำหรับทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) เครื่องถ่ายภาพเจล
พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล (gel documentation system) เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า
(gel electrophoresis) อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ Southern blot เป็นต้น

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า ได้แก่ สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร Zarrouk (Zarrouk, 1966) (ภาคผนวก ก ตารางที่1)

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการถ่ายยีน ได้แก่ HEPES และสารปฏิชีวนะ ได้แก่ ampicillin (A.N.B. Laboratories Co., Ltd.)

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ tryptone, yeast extract, sodium chloride และ วุ้นผง

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ได้แก่ QIAprep miniprep[®] spin column kit (บริษัท QIAGEN)

3.5 สารเคมีที่ใช้ในการแยก spheroplast ได้แก่ lysozyme (บริษัท ไบโอบีลิก) และ ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

3.6. สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987) ได้แก่ disodium hydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4), sodium dihydrogen phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), potassium ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), potassium ferrocyanide ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$), ethylenediamine tetra acetic acid disodium salt dihydrate (Na_2EDTA), Triton X-100 และสาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) (บริษัท Fermentas)

4. ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนรายงานผล

4.1 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีนรายงานผล β -glucuronidase (*gus*) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1800 คู่เบส (กัญจนนา, 2548)

GUS-(forward) : 5'-ATGTTACGTCCTGTAGAAACC-3'

GUS-(reverse) : 5'-TCATTGTTTGCCTCCCTGCTG -3'

4.2 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pBAD-TOPO® TA Expression Kit ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 731 คู่เบส (บริษัท Invitrogen)

pBAD-(forward) 5'-ATGCCATAGCATTTTTATCC -3'

pBAD-(reverse) 5'-GATTTAATCTGTATCAGG -3'

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยง และการแยกเซลล์ไฝนังสาหร่ายสไปรูลิน่า

1.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่า

นำสาหร่ายสไปรูลิน่า สายพันธุ์ TISTR 8217 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Zarrouk (Zarrouk, 1966) ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร ในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงโดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ความเข้ม 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อย่างต่อเนื่องตลอดเวลา ให้อากาศโดยการเป่าอากาศลงในขวดเพาะเลี้ยง บันทึกผลการเจริญเติบโตด้วยวิธีชั่งน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสไปรูลิน่าตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Santillan (1982) โดยสุ่มดูดอาหารเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์สาหร่ายแขวนลอยอยู่ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตรวจสอบทุก 2 วัน ครั้งละ 3 ซ้ำ เป็นระยะเวลา 1 เดือน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

1.2 การแยกเซลล์ไฝนัง

นำเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสไปรูลิน่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk อายุ 4-30 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน โดยใช้เซลล์แขวนลอย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ดูดส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดส่วนสีทิ้งแล้วเติมสารละลายไลโซโซม (lysosome) ที่ความเข้มข้นต่างกัน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย ไลโซโซม (บริษัท ไบโอเบสิก) ความเข้มข้น 0.025 0.035 หรือ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า หลอดทุก 15 นาที เพื่อป้องกันเซลล์ตกตะกอน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนเซลล์ไร้ผนัง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกชั่วโมงจนครบสามชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ CRD นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของไลโซโซมที่เหมาะสมในการแยกเซลล์ไร้ผนัง

1.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังให้เป็นเซลล์ที่สมบูรณ์

เมื่อแยกเซลล์ไร้ผนังได้โดยใช้ความเข้มข้นของไลโซโซมที่เหมาะสมแล้วจึงนำเซลล์ไร้ผนังที่ได้มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสูตรต่างๆ คือ Zarrouk, Zarrouk เข้มข้น $\frac{1}{2}$ เท่า, Zarrouk เข้มข้น 2 เท่า, Zarrouk ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 2 เท่า และ Zarrouk ที่มีความเข้มข้นของ NaHCO_3 2 เท่า โดยนำเซลล์ไร้ผนังที่ได้มาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมอาหารแต่ละสูตรลงไป 900 ไมโครลิตร วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงโดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อย่างต่อเนื่องตลอดเวลา เติมน้ำเพิ่มทุก 4 วัน เพื่อให้ปริมาตรอาหารคงที่ บันทึกผลโดยตรวจสอบการพัฒนารูปร่างของเซลล์ไร้ผนังภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 20 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังของสาหร่ายเกลียวทองให้เป็นเซลล์ที่สมบูรณ์

2. การทดสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลีนาโดยวิธีใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)

2.1 การทดสอบสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์สาหร่ายสไปรูลีนาที่ได้รับการถ่ายยีน

นำเซลล์ไรฟ์ผนังสาหร่ายสไปรูลีนาที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Zarrouk ที่ได้จากการทดลองที่ 1.3 มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำมา ตรวจสอบนับเซลล์ และปรับให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 4×10^6 spheroplast ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ไรฟ์ผนังสาหร่ายสไปรูลีนา 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลวสูตร Zarrouk ที่ได้จากการทดลองที่ 1.3 ร่วมกับสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่มีระดับความเข้มข้น 50 150 300 600 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปลี่ยนอาหารและสารปฏิชีวนะทุก 4 วัน เพื่อให้ปริมาณอาหาร และความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ ampicillin คงที่ เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ใช้หลอดฟลูออเรสเซนซ์ที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อย่างต่อเนื่องตลอดเวลา บันทึกผลการทดลองตรวจสอบการพัฒนารูปร่าง และการเปลี่ยนแปลงสีของเซลล์ไรฟ์ผนังสาหร่าย สไปรูลีนาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT เพื่อหาความเข้มข้นสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่เหมาะสมในการคัดเลือกเซลล์สาหร่ายสไปรูลีนาที่ได้รับการถ่ายยีน

2.2 การศึกษาความแรงของสนามไฟฟ้า (Field strength)

การศึกษาค้นหาความแรงของสนามไฟฟ้าที่จะทำให้เซลล์ไรฟ์ผนังสาหร่ายสไปรูลีนา เมื่อได้รับการถ่ายยีนแล้วยังสามารถพัฒนาเป็นเซลล์สาหร่ายสไปรูลีนาที่สมบูรณ์ได้ โดยค่าความแรงของสนามไฟฟ้าที่ศึกษาอยู่ในช่วง 4 ถึง 8 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ศึกษาช่วงละ 3 ชั่วโมง โดยนำเซลล์ไรฟ์ผนังสาหร่ายสไปรูลีนา มาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ล้างเซลล์ด้วย 1 mM HEPES pH 7.2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ปรับความเข้มข้นทำให้เซลล์มีความเข้มข้นประมาณ 4×10^6 spheroplast ต่อมิลลิลิตร ใส่ลงใน cuvette ขนาดกว้าง 2 มิลลิเมตร เติมน้ำแข็ง นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า โดยเครื่องถ่ายยีนด้วยกระแสไฟฟ้า (BioRad MiniPulser Electroporation System) และนำเซลล์ไรฟ์ผนังสาหร่ายสไปรูลีนามาเลี้ยงในอาหาร Zarrouk สูตรเหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1.3 เพื่อให้สามารถพัฒนาเป็นเซลล์สาหร่าย

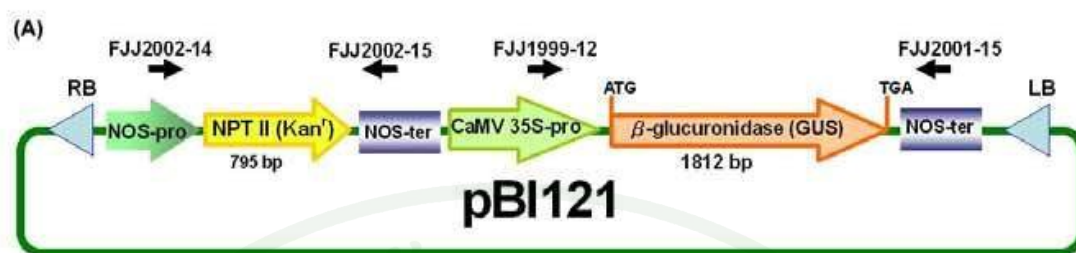
สไปรูลิน่าที่สมบูรณ์ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน บันทึกผลการทดลองโดยตรวจสอบการพัฒนารูปร่างของเซลล์ใ้ผนังภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดย วิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3. การถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลิน่าโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)

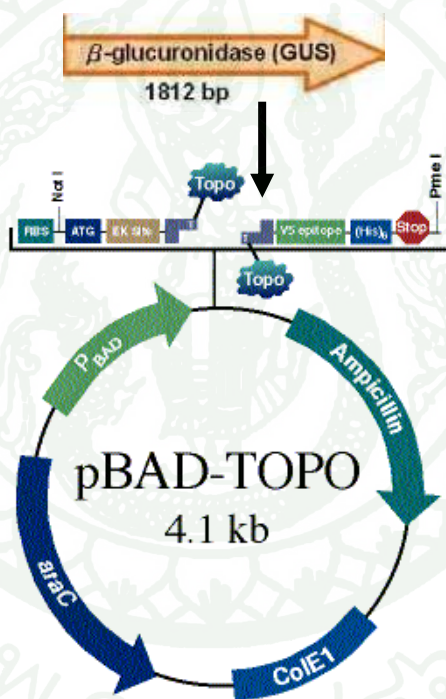
3.1. การสร้างพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/gus

การสร้างพลาสมิดที่ใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลิน่า เริ่มจากนำพลาสมิด pBI121 ขนาด 14,758 คู่เบส (ภาพที่ 6ก.) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* ซึ่งจะได้ ดีเอ็นเอขนาด 2,100 และ 12,658 คู่เบส นำมาแยกบนอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำมาตรวจสอบขนาดชิ้นยีน และเลือกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2,100 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของยีน *gus* และ 35SCaMV โปรโมเตอร์ โดยนำมาสกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย QIAquick extraction (บริษัท Qiagen) (ภาคผนวก ข) นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสผ่าน website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ตรวจสอบลำดับเบสที่เป็นจุดเริ่มต้น และจุดสิ้นสุดของยีน *gus* เพื่อนำมาสร้างไพรเมอร์สำหรับใช้สังเคราะห์ และเพิ่มปริมาณในส่วนเฉพาะของยีน *gus* โดยไม่มีส่วนของ 35SCaMV โปรโมเตอร์ หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณยีน *gus* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และนำมาแยกขนาดบนอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ เลือกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,800 คู่เบส และนำมาสกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIAquick extraction (ภาคผนวก ข) หลังจากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา ligation กับพลาสมิด pBAD-TOPO[®] ที่มีขนาด 4.1 กิโลเบส และมีส่วนของปลายทู่ (blunt end) (ภาพที่ 6ข.) โดยใช้ pBAD-TOPO[®] TA Expression Kit (บริษัท invitrogen) โดยผลจากปฏิกิริยา ligation จะได้พลาสมิด pBAD-TOPO[®]/gus หลังจากนั้นนำพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/gus มาตรวจสอบการเชื่อมต่อโดยนำไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรีย *เจ้าบ้าน* (transformation) ตามวิธีการของบริษัท invitrogen (ภาคผนวก ข) แล้วเลือกโคโลนีเดียวที่เจริญบนอาหารคัดเลือก (อาหารสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 200 มิลลิกรัมต่อลิตร) มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep miniprep[®] spin column kit และตรวจสอบขนาดพลาสมิดที่ได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* ซึ่งมีจุดตัดตำแหน่งเดียวในพลาสมิด pBAD-TOPO[®] และนำมาแยกขนาดบนอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพลาสมิด pBAD-TOPO[®] ที่มียีน *gus* อยู่จะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 5.9 กิโลเบส จากนั้นจึงนำพลาสมิดที่สกัดขึ้นใหม่นี้ไปใช้สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลิน่าต่อไป

ก. พลาสมิด pBI121



ข. พลาสมิด pBAD TOPO[®] (บริษัท Invitrogen)



ภาพที่ 6 โครงสร้างของพลาสมิด pBI121(ก.) และพลาสมิด pBAD TOPO[®] (บริษัท Invitrogen)
(ข.)

3.2 การถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลีนาโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)

นำพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/gus เข้าสู่สาหร่ายสไปรูลีนาโดยใช้กระแสไฟฟ้าใช้ spheroplast ของสไปรูลีนาชนิด ที่ได้จากการทดลองที่ 1.2 นำมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ

10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ล้างเซลล์ด้วย 1 mM HEPES pH 7.2 ปรับให้เซลล์มีความเข้มข้นประมาณ 4×10^6 spheroplast ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอย spheroplast ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ผสมกับพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* ความเข้มข้น 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตรใส่ลงใน cuvette ที่กว้าง 2 มิลลิเมตร นำไปแช่น้ำแข็งนาน 10 นาที แล้วจึงนำไปกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า โดยเครื่องถ่ายยีนด้วยกระแสไฟฟ้ารุ่น BioRad MiniPulser Electroporation System ใช้ค่าความแรงสนามไฟฟ้า (field strength) 4 5 และ 6 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ย้ายเซลล์ไร้ผนังที่ได้รับการถ่ายยีนลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิตรหลังจากนั้นเติมอาหาร Zarrouk สูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1.3 เพื่อการปรับสภาพของสาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เทอาหารทิ้ง เปลี่ยนอาหารและสารปฏิชีวนะ ampicillin 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ทุก 4 วัน เพื่อให้ปริมาณอาหาร และความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ ampicillin คงที่เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ใช้หลอดฟลูออเรสเซนซ์ที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อย่างต่อเนื่องตลอดเวลา บันทึกผลการทดลองตรวจสอบการพัฒนารูปร่าง และการเปลี่ยนแปลงสีของเซลล์ไร้ผนังสาหร่ายสไปรูลิน่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3 การตรวจสอบการแสดงออกและการมีอยู่ของยีน

3.3.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS

histochemical assay (Jefferson *et al.*, 1987)

นำสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายยีนจากการทดลองที่ 3.2 หลังจากการถ่ายยีนที่ 15 และ 30 วัน มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว โดยนำสาหร่ายสไปรูลิน่าทั้ง 3 ทริตเมนต์ ทริตเมนต์ละ 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้สาหร่ายสไปรูลิน่า 100 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที คูส่วนใสทิ้ง นำมาแช่ในสารละลาย X-gluc solution mix (ภาคผนวก ก, ตารางที่ 3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากเซลล์โดยแช่ในเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นำสาหร่ายมาตรวจสอบการเกิดสีน้ำเงินบนเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound บันทึกจำนวนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทริตเมนต์โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์บนอาหารคัดเลือก

นำเซลล์สาหร่ายสไปรูลินาที่ได้รับการถ่ายยีนมาแล้ว 15 และ 30 วัน มาเลี้ยงในอาหารเหลว Zarrouk สูตรดัดแปลงที่เหมาะสมกับเซลล์ไรฟ์นัง และเติมสารปฏิชีวนะ ampicillin (เลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.1) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารสูตรเดิมทุก 4 วัน โดยเซลล์ที่รอดชีวิตจากการเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือกลักษณะนี้ถือว่าเป็นเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน

3.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* และ pBAD-TOPO[®] ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

นำสาหร่ายสไปรูลินาที่ได้รับการถ่ายยีนแล้วสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารคัดเลือกละที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR ซึ่งมีวิธีการดังนี้

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากสาหร่ายสไปรูลินา

นำสาหร่ายสไปรูลินา ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเซลล์ ตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เติม 10% SDS 20 ไมโครลิตร และ ProteinaseK (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 8 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม iso-propanol จำนวน 0.6 เท่าของ ส่วนใสที่ดูตามผสม ให้เข้ากัน และแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอ 2 ครั้ง ด้วย 70% เอทานอล 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1xTE ปริมาณ 15 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพบน 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ เอธิเดียม โบรไมด์

3.3.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ในสาหร่ายสไปรูลิน่าที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 8.3.1 มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *gus* (กัญจนนา, 2549) คือ GUS-(forward): 5'-ATGTTACGTCCTGTAGAAACC-3' และ GUS(reverse): 5'-TCATTGTTTGCCTCCCTGCTG-3' ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,800 คู่เบส และตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pBAD-TOPO® (บริษัท invitrogen) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบางส่วนของพลาสมิด คือ pBAD- (forward) 5'-ATGCCATAGCATT TTTTATCC-3' และ pBAD- (reverse) 5'-GATTTAATCTGTATCAGG-3' ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 731 คู่ ซึ่งการทำปฏิกิริยา PCR ทั้งสองใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR และกำหนดอุณหภูมิโดยใช้โปรแกรมเฉพาะของแต่ละปฏิกิริยา (ภาคผนวก ก ตารางที่ 4) โดยใช้เครื่องเครื่อง Thermocycle (บริษัท Biometra®) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

3.4 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ด้วยเทคนิค dot blot hybridization

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ด้วยเทคนิค dot blot hybridization ประกอบด้วยหลายขั้นตอน ได้แก่การเตรียม DNA blot การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) ของยีน *gus* การทำปฏิกิริยา hybridization และการตรวจสอบผลการ hybridization ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

3.4.1 การเตรียม DNA blot

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลิน่าที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตัวอย่างละ 2 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยวแล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที ต่อจากนั้นนำมาหยดลงบนไนลอนเมมเบรน ผึ่งไนลอนเมมเบรนให้แห้ง ก่อนนำไนลอนเมมเบรนไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 40 วินาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับไนลอนเมมเบรน

3.4.2 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) สำหรับปฏิกิริยา hybridization ด้วยเทคนิค PCR labeling

ใช้พลาสมิด pBI121 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบโดยใช้พลาสมิดปริมาณ 200 พิโคกรัม และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับยีน *gus* (กัญจนา, 2549) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ GUS-forward และ GUS-reverse อย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ และติดฉลากดีเอ็นเอตรวจสอบด้วย PCR DIG Labeling kit (บริษัท Roche Applied Science) ใช้อุณหภูมิและเวลาเช่นเดียวกับปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus*

3.4.3 การทำปฏิกิริยา hybridization

นำในลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 3.4.1 มา pre-hybridization ในสารละลาย hybridization (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 6) โดยเติมสารละลาย hybridization ลงในหลอด hybridization ที่ใส่ในลอนเมมเบรน ใช้ปริมาตรสารละลาย 10 มิลลิลิตร ต่อพื้นที่ในลอนเมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอตรวจสอบที่ได้จากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที หลังจากนั้นเติมสารละลาย hybridization ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดดังกล่าว แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดไปเติมลงในหลอด hybridization ที่มีในลอนเมมเบรนอยู่เพื่อทำปฏิกิริยา hybridization โดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

3.4.4 การตรวจสอบผลการ hybridization

นำในลอนเมมเบรนที่ผ่านการ hybridization แล้วจากข้อ 3.4.3 มาล้างด้วยสารละลาย low stringency buffer (ภาคผนวก ก ตารางที่ 6) โดยเติมสารละลายให้ท่วมในลอนเมมเบรนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วล้างด้วยสารละลาย high stringency buffer (ภาคผนวก ก ตารางที่ 6) โดยเบาๆ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วจึงล้างในลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย washing buffer (ภาคผนวก ก ตารางที่ 6) ที่เติม Tween 20 ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ แช่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ย้ายในลอนเมมเบรนลงในถุงพลาสติก เติมสารละลาย blockingsolution (ภาคผนวก ก ตารางที่ 6) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในถุงและปิดปากถุงให้สนิท

นำไปแช่เบาๆ บนเครื่องแช่ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปในลอนเมมเบรนไปแช่ในสารละลาย anti-digoxigenin conjugated alkaline phosphatase ที่เจือจาง 1 : 10,000 ส่วนในสารละลาย blocking solution แช่เบาๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างในลอนเมมเบรนด้วย washing buffer 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วปรับสภาพในลอนเมมเบรนด้วยการแช่ในลอนเมมเบรนลงในสารละลาย detection buffer (ภาคผนวก ก ตารางที่ 6) นาน 3 นาที โดยไม่ต้องแช่ ย้ายในลอนเมมเบรนมาวางลงบนแผ่นพลาสติก ผสมสารละลาย detection buffer เข้ากับ chemiluminescent substrate (CDP star™) ในอัตราส่วน 1:500 ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร แล้วนำไปเคลี่ยลงบนในลอนเมมเบรนให้ทั่ว วางในลอนเมมเบรนไว้ในที่มีคนาน 15 นาที แล้วจึงรีดเอาสารละลายส่วนเกินทิ้ง นำในลอนเมมเบรนไปประกบกับแผ่นฟิล์มโดยทำในห้องมืดนาน 10-60 นาที เมื่อครบกำหนดจึงล้างฟิล์มด้วยสารละลาย developer และ fixer แล้วตรวจดูภาพที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม

3.5 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ในจีโนมของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิค Southern PCR hybridization

3.5.1 การเตรียมแผ่นในลอนเมมเบรนสำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ในสาหร่ายสไปรูลิน่าโดยเทคนิค Southern PCR hybridization

ภายหลังจากการตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR แยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี อิเล็กโตรโฟริซิส ตรวจสอบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลด้วย UV-transilluminator แล้ว จึงทำการย้ายดีเอ็นเอนี้ไปยังในลอนเมมเบรน (Hybond-N⁺ บริษัท Amersham) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ล้างแผ่นเจลด้วยสารละลาย depurination (ภาคผนวก ก ตารางที่ 8) ปริมาตร 250 มิลลิตร ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ จากนั้นปรับสภาพดีเอ็นเอโดยแช่เจลในสารละลาย denaturation (ภาคผนวก ก ตารางที่ 7) ปริมาตร 250 มิลลิตร ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนเดิมอีกครั้งล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ จากนั้นเติมสารละลาย neutralization (ภาคผนวก ก ตารางที่ 7) แช่เบาๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เทสารละลายทิ้งทำซ้ำขั้นตอนเดิมอีกครั้งล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์

เตรียมชุดอุปกรณ์สำหรับการย้ายดีเอ็นเอจากเจลมาอยู่บนในลอนเมมเบรนโดยวางกระดาษ Whatman 3 MM ใช้เป็นสะพานในอ่างที่มีสารละลาย 10X SSC (0.3 M sodium citrate และ 3 M NaCl) นำเจลที่ได้จากขั้นตอนด้านบนมาแช่ในสารละลาย 10X SSC ปริมาตร 200 มิลลิตร ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วนำแผ่นเจลวางคว่ำลงบนกระดาษ Whatman 3 MM

จากนั้นนำไบนอนเมมเบรนวางบนแผ่นเจล วางทับด้วยกระดาษ 3MM จำนวน 3 แผ่น แล้ววางทับด้วยกระดาษซับหลายๆชั้นให้มีความหนาประมาณ 20 เซนติเมตร จากนั้นวางวัตถุที่มีน้ำหนักประมาณ 0.5 กิโลกรัม ทับบนกระดาษซับอีกชั้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้แถบดีเอ็นเอเคลื่อนย้ายจากแผ่นเจลขึ้นมา ติดอยู่บนไบนอนเมมเบรน จากนั้นลอกไบนอนเมมเบรนออกจากเจลแล้วนำมาแช่ในสารละลาย 2X SSC นาน 5 นาที ตากไบนอนเมมเบรนให้แห้ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับไบนอนเมมเบรนและนำไปทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันในขั้นตอนต่อไป

3.5.2 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) สำหรับทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันด้วยเทคนิค PCR labeling

ใช้พลาสมิด pBI121 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบโดยใช้ความเข้มข้นของพลาสมิด 250 พิโคกรัม และใช้ไพรเมอร์ที่จับจำเพาะในยีน *gus* ซึ่งใช้ส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยา และ อุณหภูมิเช่นเดียวกับปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* (ภาคผนวก ก ตารางที่ 5)

3.5.3 การทำปฏิกิริยา hybridization

นำไบนอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 3.5.1 มา pre-hybridization ในสารละลาย hybridization (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 7) โดยเติมสารละลาย hybridization ลงในหลอด hybridization ที่ใส่ไบนอนเมมเบรน ใช้ปริมาตรสารละลาย 10 มิลลิลิตร ต่อพื้นที่ไบนอนเมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอตรวจสอบที่ได้จาก ข้อ 3.5.2 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที หลังจากนั้นเติมสารละลาย hybridization ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดดังกล่าว แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดไปเติมลงในหลอด hybridization ที่มีไบนอนเมมเบรนอยู่เพื่อทำปฏิกิริยา hybridization โดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

3.5.4 การตรวจสอบผลการ hybridization

นำไนลอนเมมเบรนที่ผ่านการ hybridization แล้วจากข้อ 3.5.3 มาตรวจผลการ hybridization โดยมีขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 3.4.4

4. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

5. ระยะเวลาการทดลอง

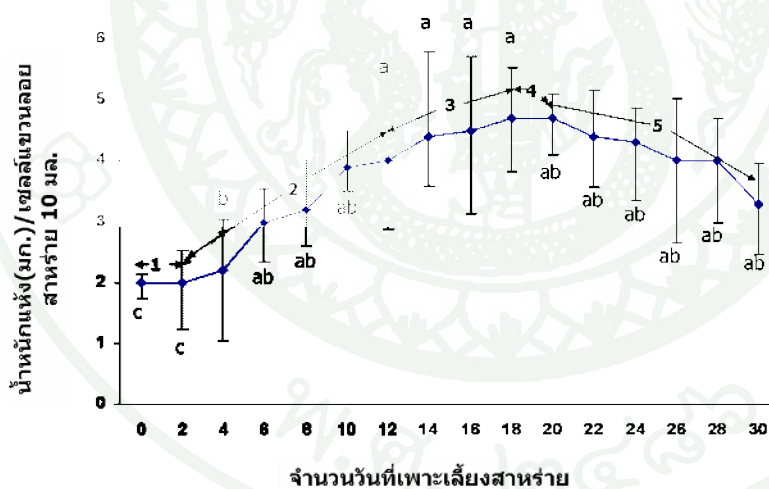
เริ่มการทดลองตั้งแต่ เดือนมิถุนายน 2549 สิ้นสุดการทดลอง เดือนกุมภาพันธ์ 2553

ผลและวิจารณ์

1. การเพาะเลี้ยงและการแยกเซลล์ไ้ผนังสาหร่ายเกลียวทอง

1.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเกลียวทอง สายพันธุ์ TISTR 8217

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายเกลียวทอง สายพันธุ์ TISTR 8217 พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตแบบ Sigmoid curve โดยมีการเจริญเติบโตในระยะ exponential phase จนถึงระยะ stationary phase อยู่ในช่วงวันที่ 2-20 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 7) โดยวันที่ 2 คือวันที่เริ่มเข้าสู่ระยะ exponential phase และวันที่ 18 เริ่มเปลี่ยนเข้าสู่ระยะ stationary phase และสิ้นสุดระยะนี้ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจึงเข้าสู่ระยะ death phase ซึ่งเซลล์มีน้ำหนักแห้งลดลงอย่างชัดเจน เนื่องจากประชากรเซลล์มีมากขึ้นทำให้หาอาหารอาจไม่เพียงพอ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สุชาติ (2530) ที่เพาะเลี้ยง *Spirulina maxima* โดยใช้อาหารสูตร Zarrouk และพบว่าระยะ exponential phase อยู่ประมาณวันที่ 6-24 ของรอบระยะการเพาะเลี้ยง 40 วัน



ภาพที่ 7 รูปแบบการเจริญเติบโตของสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina platensis*) สายพันธุ์ TISTR 8217 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้ม 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาทีตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 1 เดือน ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT (1 = ระยะ lag phase, 2 = ระยะ exponential phase, 3 = ระยะ retardation phase, 4 = ระยะ stationary phase, 5 = ระยะ death phase) (ยูวดี, 2543)

1.2 การแยกเซลล์ไฝผนังจากสาหร่ายเกลียวทอง

จากการศึกษาเอนไซม์ไลโซไซม์ความเข้มข้น 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซ็นต์ ที่มีผลต่อการแยกเซลล์ไฝผนังของสาหร่ายเกลียวทอง ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง (ตารางที่ 2) พบว่า ที่ความเข้มข้นของไลโซไซม์ 0.035 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ย่อยเซลล์ที่อายุ 8 วัน มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ไฝผนังที่แยกได้สูงที่สุด โดยไม่พบเซลล์แตกหรือเซลล์ที่เสียหาย ส่วนความเข้มข้นที่ให้ผลดีรองลงมาคือ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่อายุ 6 วัน และ 0.025 เปอร์เซ็นต์ ที่ย่อยเซลล์อายุ 10 วัน แต่อย่างไรก็ตามจากการสังเกตพบว่าที่ความเข้มข้นของไลโซไซม์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีเซลล์แตกเพิ่มมากขึ้นเมื่อบ่มนาน 3 ชั่วโมง

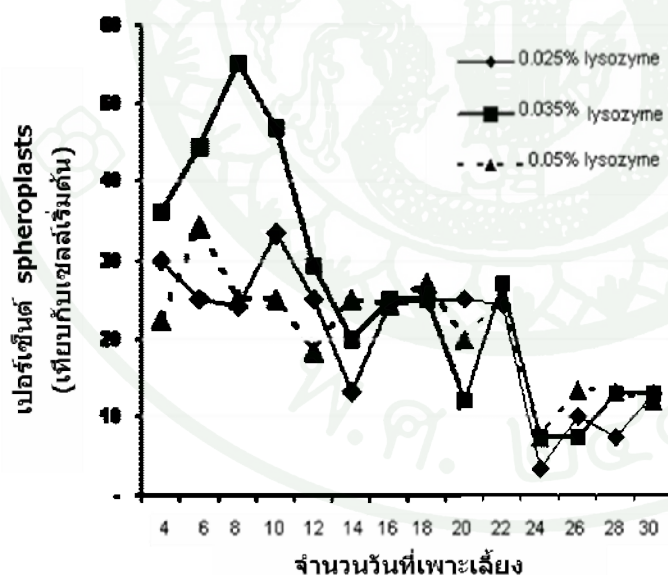
เมื่อพิจารณาอายุของสาหร่ายพบว่าช่วงระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายเกลียวทองที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์ไฝผนังสูงอยู่ในช่วงระยะ exponential phase คือ ช่วงวันที่ 6-10 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 8) ซึ่งเป็นระยะที่มีการแบ่งเซลล์สูงที่สุด เซลล์มีความแข็งแรงสมบูรณ์เนื่องจากได้รับอาหารและปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสม จึงทำให้สามารถแยกเซลล์ไฝผนังได้จำนวนมาก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ping *et al.*, (2005) ซึ่งได้รายงานว่า ความเข้มข้นของไลโซไซม์ที่เหมาะสมสำหรับใช้แยกโปรโตพลาสต์ของ Cyanobacteria ชนิดต่าง ๆ เช่น *Anabaena* sp. และ *Nostoc flagelliforme* อยู่ในช่วง 0.03–0.4 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และปัจจัยทางกายภาพในการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีผลต่อความสมบูรณ์แข็งแรงของเซลล์

จากงานวิจัยนี้พบว่าวิธีการที่เหมาะสมในการแยกเซลล์ไฝผนังของสาหร่ายเกลียวทองสายพันธุ์ TISTR 8217 คือใช้สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk อายุ 8 วัน นำมาย่อยผนังเซลล์ออกโดยใช้ไลโซไซม์ความเข้มข้น 0.035 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม EDTA ความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้ได้เซลล์ไฝผนังมากที่สุดถึง 55 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับการใช้ไลโซไซม์ความเข้มข้น 0.025 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ไลโซไซม์ 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซ็นต์ ต่อการแยกเซลล์ไฝผนังของสาหร่ายสไปรูลิน่า สายพันธุ์ TISTR 8217 ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของ ไลโซไซม์ (%)	จำนวนวันเพาะเลี้ยงที่ได้ เซลล์ไฝผนังมากที่สุด	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ เซลล์ไฝผนังสูงที่สุด ^{1/}	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ ไฝผนังตลอดการ ทดลอง ^{1/}
0.025	10	33.3 b	20.22 b
0.035	8	55 a	26.25 a
0.05	6	34.17 b	19.64 b
เฉลี่ย	8	40.82	22.04
F-test		*	*

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวดังไม่มีมีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

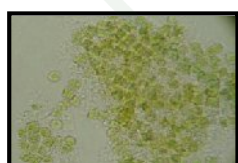


ภาพที่ 8 เซลล์ไฝผนังสาหร่ายสไปรูลิน่าสายพันธุ์ TISTR 8217 ที่แยกได้โดยใช้ไลโซไซม์ 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซ็นต์ และบ่มเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมงเมื่อทดสอบกับสาหร่ายสไปรูลิน่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ที่อายุต่างกัน

1.3 การพัฒนาของเซลล์ไร้ผนังสำหรับสายสาหร่ายสีเขียว

จากการทดสอบอาหารสูตร Zarrouk ดัดแปลง จำนวน 5 สูตร สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังของสาหร่ายเกลียวทอง สายพันธุ์ TISTR 8217 ที่ได้จากการย่อยตามวิธีการที่เหมาะสมตามที่กล่าวแล้ว โดยตรวจสอบการพัฒนาของเซลล์หลังจากการเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่ตรวจพบ 4 ลักษณะ (ภาพที่ 9) คือ 1) เซลล์แตก พบเซลล์ลักษณะกลมที่ผนังเซลล์มีความเสียหาย มีลักษณะของเซลล์ไม่สมบูรณ์ มีสีเขียว 2) hormogonia เซลล์รูปทรงกระบอกยื่นออกมาจากเซลล์กลม 3) segment เซลล์รูปทรงกระบอกเรียงต่อกันเป็นสายยาว มีปลายทู่ และ 4) trichome เซลล์รูปทรงกระบอกเรียงตัวกันเป็นสายยาวและบิดเป็นเกลียว ทั้งนี้การพัฒนาของเซลล์สาหร่ายเกลียวทองตามปกติ นั้น ลักษณะที่ 4 คือ trichome จัดว่ามีการพัฒนาได้ดีที่สุด รองลงมาคือ segment และ hormogonia ตามลำดับ (Richmond, 1986)

หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วันพบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังของสาหร่ายเกลียวทอง สายพันธุ์ TISTR 8217 ให้พัฒนาเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ คือสูตร Zarrouk เข้มข้น $\frac{1}{2}$ เท่า ที่สามารถเพาะเลี้ยงให้เซลล์เจริญเติบโตพัฒนาจากเซลล์ไร้ผนังเป็นเซลล์ที่มีลักษณะ trichome ได้ถึง 33 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบเซลล์แตก สูตรอาหารที่ให้ผลรองลงมาคือสูตร Zarrouk ปกติ ซึ่งเซลล์ไร้ผนังสามารถพัฒนาเป็น trichome ได้ 11-12 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่พบเซลล์แตกเช่นกัน แตกต่างจากสูตรอาหารในกลุ่มที่เหลือ คืออาหารสูตร Zarrouk เข้มข้น 2 เท่า สูตร Zarrouk ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 2 เท่า และ สูตร Zarrouk ที่มีความเข้มข้นของ NaHCO_3 2 เท่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่เซลล์ไร้ผนังไม่สามารถเจริญเติบโต ได้พบลักษณะเซลล์แตกทั้งหมด (ภาพที่ 10)



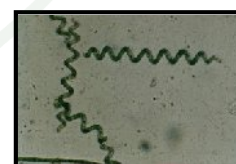
เซลล์แตก (40x)



hormogonia (100x)

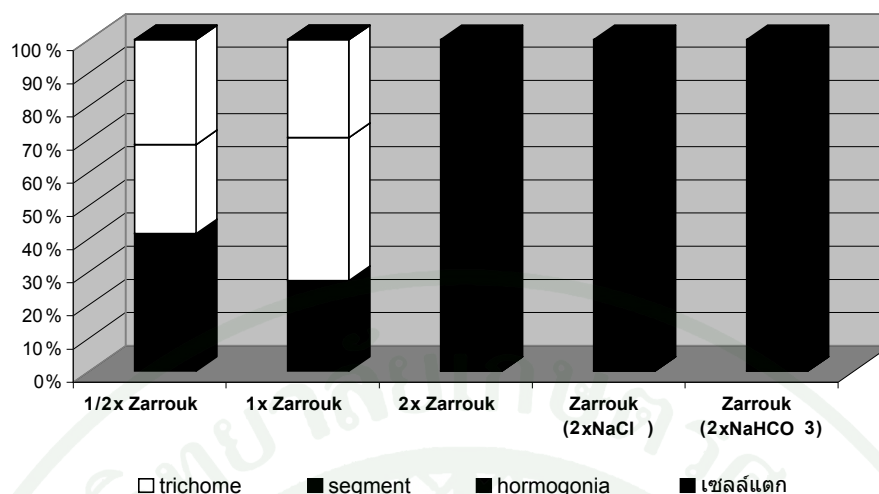


segment (100x)



trichome (40x)

ภาพที่ 9 พัฒนาการในระยะต่างๆของเซลล์ไร้ผนังของสาหร่ายเกลียวทอง สายพันธุ์ TISTR 8217 ที่ตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน



ภาพที่ 10 การพัฒนาของเซลล์ไร้ผนังของสาหร่ายเกลียวทอง สายพันธุ์ TISTR 8217 ไปเป็นเซลล์ระยะต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk คัดแปลงเป็นเวลา 20 วัน

2. การทดสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนโดยวิธีกระแสไฟฟ้า

ในการถ่ายยีนโดยวิธีกระแสไฟฟ้ามีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงหลายปัจจัย เช่น อายุ และลักษณะของเซลล์เป้าหมายที่ได้รับการถ่ายยีน ความแรงของสนามไฟฟ้า ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะในการคัดเลือกเซลล์ที่มีชีวิตรอดหลังการถ่ายยีน เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด แต่ในการทดลองครั้งนี้ปัจจัยที่สำคัญในการถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลินาโดยใช้กระแสไฟฟ้า คือ การศึกษาความแรงของสนามไฟฟ้าที่เหมาะสม และการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ

2.1 การทดสอบสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์สาหร่ายที่ได้รับการถ่ายยีน

ในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์สาหร่ายนั้นนอกจากมีการถ่ายยีนรายงานผล (reporter gene) และยีนที่สนใจเข้าสู่พืช แล้วมักจะมีการถ่ายยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือก (selectable marker gene) ควบคู่ไปด้วย เพื่อช่วยในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน การใช้ยีนคัดเลือกที่เหมาะสมจึงเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งซึ่งช่วยให้การถ่ายยีนเข้าสู่พืชประสบผลสำเร็จ โดยยีนเครื่องหมายที่แทรกเข้าไปรวมตัวอยู่ในจีโนมของพืชหลังจากการถ่ายยีนจะทำให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนจะสามารถแสดงลักษณะต้านทานต่อสารเคมีต่างๆ ที่จำเพาะกับยีนที่ใช้ในการคัดเลือก ทำให้เซลล์ดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนนั้นๆ

จะไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ (Komari *et al.*, 1996) ยีนคัดเลือกส่วนใหญ่มักเป็นยีนที่สร้างความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ (Miki and McHugh, 2004)

สารที่ใช้ในการคัดเลือกต้องสอดคล้องกับยีนคัดเลือกที่ใช้ และความเข้มข้นของสารคัดเลือกต้องเหมาะสมต่อชนิดและพันธุ์สายร้าย เนื่องจากการใช้ความเข้มข้นที่ระดับต่ำเกินไปจะทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญเติบโตได้ มีผลทำให้การคัดเลือกล้มเหลวไม่ประสบความสำเร็จ และในทางตรงกันข้ามการใช้สารคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้นสูงเกินไป อาจทำให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนนั้นสามารถทนทานต่อสารคัดเลือกได้ในระดับความเข้มข้นหนึ่งเท่านั้น นอกจากนี้เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ตายอาจปล่อยสารชนิดอื่นที่เป็นพิษมายับยั้งการเจริญหรือไปขัดขวางการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนที่ยังมีชีวิตอยู่ (Zhang *et al.*, 2005) ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบหาระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิดเพื่อใช้กำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมนั้นเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนจะสามารถมีชีวิตรอดได้ ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะตาย ซึ่งมักจะเลือกความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตายทั้งหมด

เนื่องจากในพลาสมิด pBAD-TOPO[®] ที่ถ่ายเข้าสู่สายร้ายสไปรูลิनाมียีนคัดเลือกที่ทำให้เซลล์ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ ampicillin และไม่มีรายงานการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ใช้เป็นสารคัดเลือกในสายร้ายสไปรูลิना ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทดสอบความทนทานของเซลล์สายร้ายสไปรูลิनाต่อสารปฏิชีวนะ ampicillin เพื่อให้ทราบความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนต้านทาน ampicillin ตายหมดภายใน 4 สัปดาห์ โดยนำเซลล์ไร้ผนังสายร้ายสไปรูลิना ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Zarrouk ½ เท้า มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำมาตรวจนับเซลล์ และปรับให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 4×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ไร้ผนังสายร้ายสไปรูลิना 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลวสูตร Zarrouk ½ เท้า ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50, 150, 300, 600 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 วัน

จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ไร้ผนังสายร้าย ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Zarrouk ½ เท้า ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin เซลล์สายร้ายสไปรูลิनाยังคงเจริญและมีเซลล์ใหม่เกิดขึ้น สำหรับเซลล์สายร้ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Zarrouk ½ เท้า ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความ

เข้มข้น 600 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง พบว่าเซลล์ไม่มีการเจริญเติบโต และจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองและตายภายใน 1-2 สัปดาห์ ส่วนเซลล์ไร้ผนังสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสัปดาห์ที่ 1-2 เซลล์สาหร่ายยังคงมีสีเขียวและเซลล์เจริญเติบโตขึ้นเล็กน้อย แต่เซลล์สาหร่ายดังกล่าวจะค่อยๆ เป็นสีเหลืองซีดและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจนตายทั้งหมดภายในสัปดาห์ที่ 4 และที่ความเข้มข้น 50 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 80 และ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยในสัปดาห์ที่ 1-2 เซลล์สาหร่ายยังคงมีสีเขียวและเซลล์เจริญเติบโตขึ้นเล็กน้อย แต่จะมีเซลล์สาหร่ายบางส่วนค่อยๆ เป็นสีเหลืองซีด ต่อมาในสัปดาห์ที่ 3-4 เซลล์จะเริ่มพัฒนาเป็นระยะต่างๆ มากขึ้น และมีสีเขียวเข้มขึ้น (ตารางที่ 3) ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ทำให้เซลล์ไร้ผนังสาหร่ายสไปรูลีนาตายทั้งหมดภายในสัปดาห์ที่ 4 คือ ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 3 ผลของสารปฏิชีวนะ ampicillin ต่อเซลล์ไร้ผนังของสาหร่ายสไปรูลีนา สายพันธุ์ TISTR 8217 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรสูตร Zarrouk เข้มข้น $\frac{1}{2}$ เท่า ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 0-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	การมีชีวิตรอด (ร้อยละ)	ลักษณะการเปลี่ยนแปลง
0	100	เซลล์ spheroplast เจริญได้ตามปกติ
50	80	เซลล์ spheroplast เจริญได้แต่มี บางส่วนสีซีดเหลืองและตาย
150	50	เซลล์ spheroplast ไม่มีการพัฒนา บางส่วนสีซีดเหลือง และตาย
300	0	เซลล์ spheroplast มีสีน้ำตาลเหลือง
600	0	เซลล์ spheroplast มีสีน้ำตาลเหลือง
1,000	0	เซลล์ spheroplast มีสีน้ำตาลเหลือง

2.2 ผลการศึกษาความแรงของสนามไฟฟ้า (field strength) ที่มีผลต่อเซลล์ spheroplast ของสาหร่ายสไปรูลิน่า

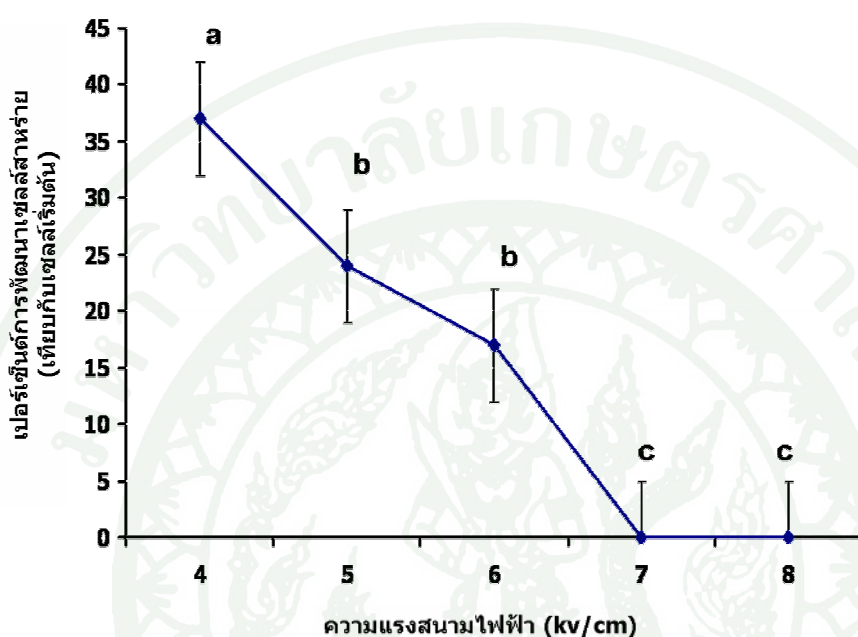
การถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลิน่าโดยใช้กระแสไฟฟ้า มีปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งในการถ่ายยีนคือ ความแรงของสนามไฟฟ้า เนื่องจากสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะต่อความแรงของสนามไฟฟ้าแตกต่างกัน ความแรงของสนามไฟฟ้าที่มากเกินไปจะส่งผลกระทบต่อผนังเซลล์สาหร่าย อาจทำให้เกิดความเสียหายของผนังเซลล์มากเกินไป

การศึกษาช่วงของความแรงสนามไฟฟ้าที่ยังคงทำให้เซลล์ไร้ผนังสาหร่ายสไปรูลิน่าพัฒนาเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความแรงของสนามไฟฟ้าในช่วง 4 ถึง 8 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร เพื่อหาค่าที่เหมาะสมสำหรับความแรงสนามไฟฟ้าที่ยังคงทำให้เซลล์ spheroplast ของสาหร่ายสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์สาหร่ายที่สมบูรณ์ได้ในระยะเวลา 1 เดือน

เมื่อทดลองกระตุ้นเซลล์ด้วยความแรงของสนามไฟฟ้าจาก 4 ถึง 8 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร โดยใช้เครื่องถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้ารุ่น BioRad MiniPulser Electroporation System ซึ่งไม่สามารถกำหนดค่าระยะเวลาได้นั้นพบว่า กระแสไฟฟ้า 4-8 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร มีระยะเวลาในการให้กระแสไฟฟ้าอยู่ในช่วง 2-4 มิลลิวินาที ซึ่งผลต่อเซลล์สาหร่ายนั้นพบว่า เมื่อความแรงของสนามไฟฟ้าเพิ่มขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การ regeneration ลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 11) และนอกจากนี้การใช้ความแรงของสนามไฟฟ้าที่สูงขึ้นตั้งแต่ 6-8 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร เมื่อนำเซลล์ spheroplast ไปเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ½ เท่า พบว่าทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีน้ำเงินจาง ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากความแรงของสนามไฟฟ้าที่สูงขึ้นทำให้ผนังเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลิน่าเกิดการทะลุมากขึ้นจนไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ ทำให้สารต่างๆ ภายในเซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่าโดยเฉพาะสารในกลุ่มไฟโคไซยานินซึ่งมีสีน้ำเงินหลุดออกมามากขึ้น จึงทำให้สีของอาหารเพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินจางๆ และทำให้เซลล์ตายได้ในที่สุด

จากการทดลองนี้พบว่าความแรงสนามไฟฟ้าที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลิน่า คือ 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ซึ่งทำให้เกิดการพัฒนาเซลล์ไร้ผนังมากที่สุดถึง 37 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ การใช้ความแรงสนามไฟฟ้าที่ 5 และ 6 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ที่มีผลทำให้มีการพัฒนาเซลล์ไร้ผนังรองลงมาคือ 24 และ 17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับการใช้ความแรงสนามไฟฟ้าที่ 7 และ 8 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ซึ่งผล

ดังกล่าวนี้สอดคล้องกับงานวิจัย ศรีสุพร (2536) ที่รายงานว่าความแรงของสนามไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับสาหร่ายสไปรูลิน่าสายพันธุ์อิตาเลียอยู่ในช่วง 3-6 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร และในรายงานของ Chaing *et al.*, (1992) ที่รายงานว่าความแรงของสนามไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับ *Anabaena* sp. สายพันธุ์ M131 ที่ 6 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร และใช้เวลา 5 มิลลิวินาที



ภาพที่ 11 การพัฒนาเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลิน่า สายพันธุ์ TISTR 8217 ที่ได้รับการกระตุ้นเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความแรงของสนามไฟฟ้า (field strength) จาก 4 ถึง 8 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ½ เท่าในห้องควบคุม อุณหภูมิที่ 30 องศา เซลเซียส ให้แสงที่ความเข้ม 55 ไมโคร โมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ตลอดเวลาเป็นระยะเวลา 1 เดือน (ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT)

3. การถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลิน่า

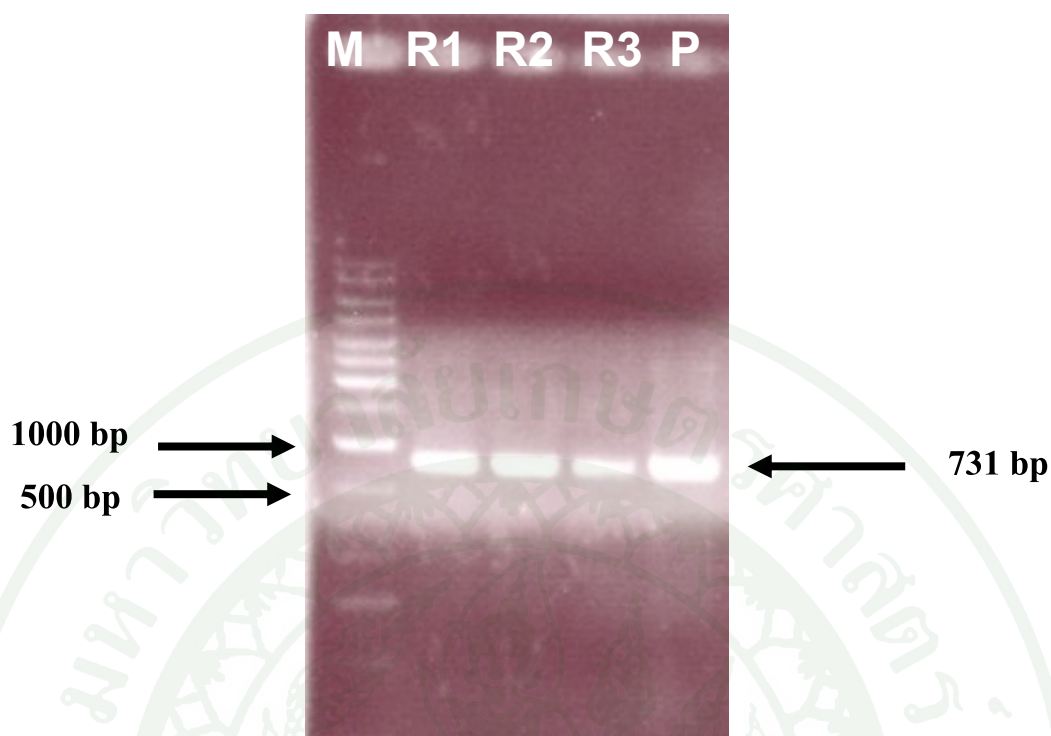
3.1 การสร้างพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/gus สำหรับการถ่ายยีน

นำพลาสมิด pBI121 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* แล้วนำมาแยกขนาดบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แล้วเลือกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2,100 คู่เบส ซึ่งมี

ส่วนของ 35SCaMV โปรโมเตอร์ และยีน *gus* โดยสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIA quick extraction (Qiagen) เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนของยีน *gus* โดยใช้ไพรเมอร์ GUS- (forward) และ GUS- (reverse) (กัญจนนา, 2549) ซึ่งจะได้อินทรีย์ส่วนดีเอ็นเอขนาด 1,800 คู่เบส แล้วจึงนำมาแยกขนาดบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์อีกครั้ง แล้วสกัดดีเอ็นเอขนาด 1,800 คู่เบส ออกจากเจลโดยใช้ QIA quick extraction (บริษัท Qiagen) หลังจากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ส่วนนี้อีกครั้ง เพื่อให้มีปริมาณยีน *gus* มากพอสำหรับนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pBAD-TOPO[®]

เมื่อทำปฏิกิริยา ligation เพื่อเชื่อมต่อกับพลาสมิด pBAD-TOPO[®] ที่มีขนาด 4.1 กิโลเบส เข้ากับยีน *gus* ที่มีขนาด 1,800 คู่เบส ที่ได้จากวิธีการข้างต้นแล้ว จะได้ พลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* ซึ่งเมื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อโดยนำไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (ภาคผนวก ก) แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin และตรวจสอบ โคลนีเดี่ยวที่ รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือkd ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ pBAD-(forward) และ pBAD-(reverse) (บริษัท invitrogen) เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของ บางส่วนของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วจะได้ขนาดยีน 731 คู่เบส และใช้ไพรเมอร์ GUS- (forward) และ GUS-(reverse) เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว จะได้ขนาดยีน 1,800 คู่เบส โดยตรวจสอบทั้ง 2 ส่วนในโคลนีเดี่ยวทั้ง 3 โคลนีที่รอดบน อาหารสูตรคัดเลือก

ผลการทดลองพบว่า หลังจากนำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ไปวิเคราะห์ขนาดของ ดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที แล้วย้อมเจลในสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ เมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้แสง อัลตราไวโอเลต พบว่า ทั้ง 3 โคลนีที่นำมาตรวจสอบพบแถบยีนดีเอ็นเอขนาด 731 คู่เบส เมื่อใช้ ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] (ภาพที่ 12) และพบยีนดีเอ็นเอ ขนาด 1,800 คู่เบส เมื่อใช้ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบยีน *gus* (ภาพที่ 13) แสดงว่าพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* มียีน *gus* เชื่อมต่อกับพลาสมิด pBAD-TOPO[®] แล้วสามารถนำพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* ที่เตรียมได้นี้ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลิน่าต่อไปได้

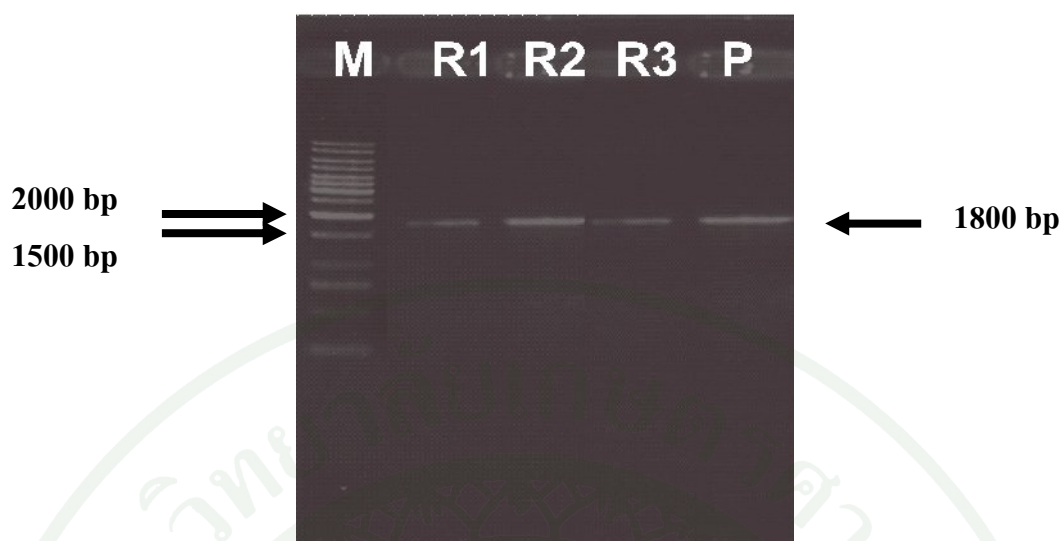


ภาพที่ 12 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR เมื่อตรวจสอบโคโลนีที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบางส่วนของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] เมื่อนำมาแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 731 คู่เบส

M = 1 kb DNA ladder marker (บริษัท Fermentas)

R1-R3 = ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้โคโลนีเดี่ยวที่เกิดจากปฏิกิริยา ligation ของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] และยีน *gus* (พลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus*) โคโลนีที่ 1-3 ตามลำดับ

P = positive control ผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่ใช้พลาสมิด pBAD-TOPO[®] เป็น ดีเอ็นเอต้นแบบ



ภาพที่ 13 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR เมื่อตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gus* แยกขนาด
 จินดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แลบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 1,800 คู่เบส
 M = 1 kb DNA ladder marker (บริษัท Fermentas)
 R1-R3 = ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้โคลนเดี่ยวที่เกิดจากปฏิกิริยา ligation ของ
 พลาสมิด pBAD-TOPO[®] และยีน *gus* (พลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus*) โคลน
 ที่ 1-3 ตามลำดับ
 P = positive control ผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่ใช้พลาสมิด pBI121 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

3.2 การถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลินาโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)

จากการทดลองที่ผ่านมาเมื่อทดสอบปัจจัยที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลินาพบว่า ช่วงความแรงของกระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลินานั้นอยู่ในช่วง 4 ถึง 6 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร และเมื่อถ่ายพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* เข้าสู่สาหร่ายสไปรูลินาเรียบร้อยแล้ว จะนำสาหร่ายสไปรูลินาที่ได้รับการถ่ายยีนนั้นไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมคือ Zarrouk ½ เท่า ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลังจากนั้นนำพลาสมิด pBADTOPO /*gus* เข้าสู่เซลล์ไร้นั่งสาหร่ายสไปรูลินาโดยวิธีใช้กระแสไฟฟ้า โดยใช้เครื่องถ่ายยีนด้วยกระแสไฟฟ้ารุ่น BioRad MiniPulser Electroporation System ด้วยความแรงค่าสนามไฟฟ้า (field strength) 4, 5 และ 6 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร หลังจาก

นั้นย้ายเซลล์สาหร่ายออกจาก cuvette ไปเพาะเลี้ยงโดยใช้หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมน้ำอาหาร Zarrouk ½ เท่า 1 มิลลิลิตรที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน โดยในวันที่ 15 และ 30 วัน สุ่มเซลล์มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธีการต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.3 การตรวจสอบการถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) เข้าสู่สาหร่ายสไปรูลิน่า

3.3.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวด้วยวิธี GUS histochemical assay

นำสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยความแรงของสนามไฟฟ้า 4-6 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ทรีตเมนต์ละ 5 ชั่วโมง มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวด้วยวิธี GUS histochemical assay (ตารางผนวกที่ 3) (Jefferson *et al.*, 1987) โดยใช้เซลล์แขวนลอยสาหร่ายสไปรูลิน่า 100 ไมโครลิตร ตรวจสอบการเกิดสีน้ำเงินบนเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound บันทึกจำนวนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4) พบว่า ตรวจสอบพบการติดสีน้ำเงินเฉพาะเซลล์สาหร่ายที่ได้รับความแรงกระแสไฟฟ้าที่ 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร เฉพาะภายหลังจากการถ่ายยีน 15 วันเท่านั้น (ภาพที่ 14) จำนวนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินสุ่มตรวจจาก 100 ไมโครลิตรของเซลล์แขวนลอยสาหร่าย สไปรูลิน่า โดยสุ่มครั้งละ 2 ไมโครลิตร จำนวน 10 ครั้ง เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การติดสีน้ำเงินได้เป็น 40 เปอร์เซ็นต์

สำหรับทรีตเมนต์อื่นๆ ตรวจไม่พบการติดสีน้ำเงินในเซลล์สาหร่าย ทั้งนี้อาจเกิดได้จากความแรงของสนามไฟฟ้าที่มีมากขึ้นจากการทดลองที่ใช้ความแรงสนามไฟฟ้าที่ 5-6 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ทำให้เซลล์ตายหรือผนังเซลล์เสียหายมากเกินไปจึงไม่สามารถซ่อมแซมกลับมาได้ พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ศรีสุพร (2536) ได้ทำการถ่ายยีนพลาสมิด pACYC 184 เข้าสู่สาหร่ายสไปรูลิน่าสายพันธุ์อิตาลี โดยใช้ความแรงกระแสไฟฟ้าที่ 6-8 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ทำให้เกิดสารละลาย Zarrouk เป็นสีน้ำเงิน และ Chassy และคณะ (1988) ซึ่งทำการถ่ายยีนในไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้กระแสไฟฟ้ารายงานผลเช่นเดียวกัน คือ ผลของความแรงสนามไฟฟ้าที่มากขึ้นจะทำให้เกิดช่องว่างขนาดใหญ่ของผนังเซลล์ไซยาโน

แบคทีเรีย ซึ่งแม้ว่าเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสม แต่ผนังเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ ทำให้ส่วนประกอบต่างๆภายในเซลล์จะหลุดออกมา โดยเฉพาะรงควัตถุที่อยู่ในชั้นไทลาคอยด์ที่เชื่อมติดกับชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้อาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์มีสีฟ้า ซึ่ง Dower และ คณะรายงานว่าประสิทธิภาพสูงสุดในการถ่ายยีนโดยกระแสไฟฟ้ากับสาหร่ายหลายชนิดจะเกิดในช่วงของความแรงของกระแสไฟฟ้าที่จำกัดเท่านั้น

อีกกรณีหนึ่งพบว่า ความแรงของกระแสไฟฟ้าที่มากเกินไปนั้นจะทำให้เซลล์เกิดช่องว่างขนาดใหญ่ และผนังเซลล์ไม่สามารถกลับสู่สภาพปกติได้ทำให้เซลล์ตายเป็นจำนวนมาก และสำหรับวันที่ 30 หลังจากได้รับการถ่ายยีนนั้นตรวจสอบแล้วไม่พบการติดสีน้ำเงินอาจเนื่องมาจากความไม่เสถียร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ศรีสุพร (2536) ที่ได้ถ่ายยีนพลาสมิด pACYC184 เข้าสู่สาหร่ายสไปรูลิน่าสายพันธุ์อีตาลีด้วยกระแสไฟฟ้าพบว่า ความแรงของสนามไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สุดคือ 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ความต้านทาน 200 โอห์ม เป็นเวลา 5 วินาที เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของบางชิ้นส่วนของพลาสมิด pACYC184 หลังจากวันที่ 20 ของการถ่ายยีนไม่พบการมีอยู่ของพลาสมิด เช่นเดียวกับในการทดลองครั้งนี้พบการติดสีน้ำเงินเพียงในวันที่ 15 หลังการถ่ายยีนเท่านั้น



ภาพที่ 14 ลักษณะการติดสีน้ำเงินของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายยีนตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound หลังได้รับการถ่ายยีน 15 วัน

ก. เซลล์ไร้ผนังสาหร่ายที่ไม่ติดสีน้ำเงิน

ข. และ ค. เซลล์ไร้ผนังที่ติดสีน้ำเงิน

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดสีน้ำเงินการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay หลังจากการถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความแรงของสนามไฟฟ้า 4-6 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร

ความแรงของสนามไฟฟ้า (kv/cm)	เวลา (เฉลี่ย) ที่ได้รับ กระแสไฟฟ้า มิลลิวินาที	ระยะเวลาการตรวจสอบ หลังการถ่ายยีน	เปอร์เซ็นต์ เซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน
4	3.0	15	40
		30	0
5	2.8	15	0
		30	0
6	3.1	15	0
		30	0

3.3.2 การคัดเลือกเซลล์ไร้ผนังสาหร่ายที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก

ในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์สาหร่ายนอกจากยีนรายงานผลแล้ว ยังมียีนเครื่องหมายที่ช่วยในการคัดเลือกเซลล์สาหร่ายที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งหลังจากการถ่ายยีนจะทำให้เซลล์สาหร่ายที่ได้รับการถ่ายยีนเหล่านี้มีลักษณะต้านทานต่อสารเคมีต่างๆที่มีในพลาสมิดที่ถ่ายเข้าไปในเซลล์ ทำให้เซลล์ดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตในอาหารคัดเลือกได้

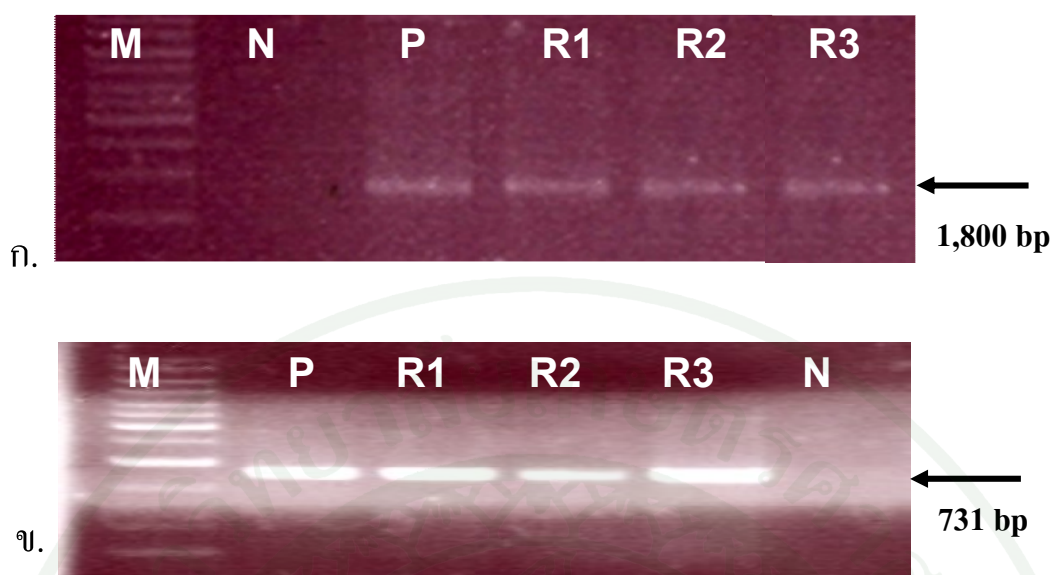
จากการทดลองนี้เมื่อนำเซลล์ไร้ผนังสาหร่ายสไปรูลินาที่ได้รับการถ่ายยีนแล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ½ เท่า เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงโดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้ม 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อย่างต่อเนื่องตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารสูตรเดิมทุกสัปดาห์ เซลล์ที่รอดชีวิตจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกนี้เป็นเซลล์ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน จากการทดลองพบว่า เซลล์ไร้ผนังสาหร่ายสไปรูลินาที่ได้รับการถ่ายยีน และ ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* เมื่อเวลา 15 วัน และให้ผลบวกซึ่งได้จากทริทเมนต์ที่ใช้ความแรงสนามไฟฟ้า 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร มีชีวิตรอดอยู่ได้จนถึงวันที่ 20 เมื่อเลี้ยงในอาหารคัดเลือก จากนั้นเซลล์สาหร่ายเริ่มมีสีเหลือง และ เมื่อเพาะเลี้ยงไปจนถึง 4 สัปดาห์พบว่าเซลล์สาหร่ายตายทั้งหมด ในส่วนของทริทเมนต์อื่นๆไม่พบการเจริญเติบโตของเซลล์

สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรคัดเลือก ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการตรวจสอบการติดสีน้ำเงินผลการทดลองที่ 3.3.1

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังสาหร่ายสไปรูลินาหลังจากได้รับการถ่ายยีนในอาหารคัดเลือกแล้ว พบว่าเมื่อ 20 วันเซลล์สาหร่ายเริ่มมีการตาย อาจเนื่องจากเมื่อเซลล์สาหร่ายเริ่มมีการพัฒนาเซลล์ไปในระยะต่างๆ มีการสร้างเซลล์ใหม่ๆเกิดขึ้น ทำให้มีโอกาสน้อยที่ถ่ายเข้าไปนั้นอาจไม่เกิดการถ่ายทอดไปยังเซลล์ที่สร้างขึ้นใหม่ จึงทำให้สาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารคัดเลือกได้ ซึ่งสอดคล้องรายงานของ ศรีสุพร (2536) ได้ถ่ายยีนพลาสมิด pACYC 184 เข้าสู่สาหร่ายสไปรูลินาสายพันธุ์อิตาลี โดยใช้ความแรงกระแสไฟฟ้าที่ 6-8 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร มี chloramphenicol เป็นสารปฏิชีวนะคัดเลือก พบเซลล์สาหร่ายตายเมื่อ 20 วันหลังการถ่ายยีนเนื่องจากพลาสมิดไม่สามารถที่จะถ่ายทอดและเพิ่มจำนวนได้ ทำให้เซลล์สามารถทนอยู่ได้ในระยะเวลาหนึ่งเท่านั้นและตายในที่สุด

3.3.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* และบางส่วนของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] ในสาหร่ายสไปรูลินาที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

จากการนำไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gus* และบางส่วนของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ ดีเอ็นเอของสาหร่ายสไปรูลินาที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* เป็นเซลล์ต้นแบบโดยทดสอบภายหลังการถ่ายยีน 15 วัน ด้วยความแรงกระแสไฟฟ้า 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* และบางส่วนของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] เปรียบเทียบกับสาหร่ายสไปรูลินาที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยนำผลจากปฏิกิริยา PCR ไปวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที แล้วย้อมเจลในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ เมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่า ทุกซ้ำของสาหร่าย สไปรูลินาที่ได้รับการถ่ายยีนพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,800 คู่เบสของยีน *gus* (ภาพที่ 15 ก.) และขนาด 731 คู่เบสของบางส่วนของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] (ภาพที่ 15 ข.) แสดงถึง การมีอยู่ของพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* ในสาหร่ายที่ได้รับการถ่ายยีนที่ความแรงของสนามไฟฟ้า 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ซึ่งผลสอดคล้องกับการตรวจสอบการติดสีน้ำเงินในการทดลองที่ 3.3.1 และการคัดเลือกเซลล์ไร้ผนังสาหร่ายที่ได้รับการถ่ายยีนในการทดลองที่ 3.3.2.



ภาพที่ 15 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *gus* (ก) และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบางส่วนของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] (ข) เมื่อนำมาแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

M = 1 kb DNA ladder marker (บริษัท Fermentas)

N = negative control คือผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้สารห่ายสไปรูลินาที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบ

P = positive control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ใช้พลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* เป็นต้นแบบ

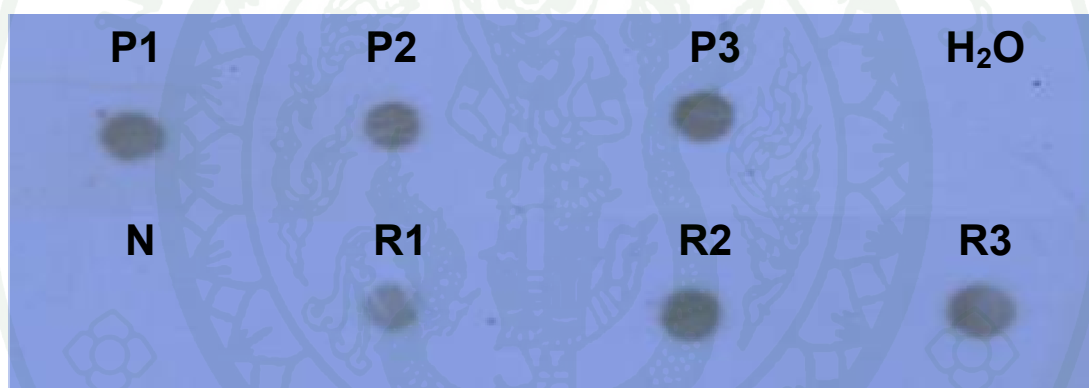
R1-R3 = ผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่ใช้สารห่ายสไปรูลินาที่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบซ้ำที่ 1 -3 ตามลำดับ

3.3.4 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ในสารห่ายสไปรูลินาที่ได้รับการถ่ายยีนพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* โดยเทคนิค dot blot hybridization

จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ด้วยเทคนิค dot blot hybridization โดยสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอของสารห่ายสไปรูลินาที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* หลังจากได้รับการถ่ายยีน 15 วัน โดยหดยดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ลงบนไนลอนเมมเบรน จากนั้นนำมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* โดยนำมาไฮบริดเชกซ์กับดีเอ็นเอตัวตรวจสอบของยีน *gus* ที่ติดฉลากด้วยสารไร้งังสี digoxigenin (DIG) แล้วนำไปตรวจสอบผลโดยนำ

ในลอนเมมเบรนไปประกบกับแผ่นฟิล์ม x-ray หากมีการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบจะให้ผลเป็นสัญญาณสีดำนบนแผ่นฟิล์ม โดยในการตรวจสอบนี้ใช้ดีเอ็นเอจากสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น negative control และดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* และ pBI121 รวมไปถึงผลจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน *gus* เป็น positive control

จากการทดลองพบว่า พบสัญญาณสีดำนบนแผ่นฟิล์มเมื่อตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *gus* ในทั้งหมด 3 ซ้ำของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ผ่านการถ่ายยีน และให้ผลเหมือนกันกับดีเอ็นเอต้นแบบ (positive control) (ภาพที่ 16) แสดงว่ามียีน *gus* อยู่ในเซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่า ส่วนสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่ปรากฏสัญญาณสีดำนบนแผ่นฟิล์ม ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR



ภาพที่ 16 การตรวจวิเคราะห์การมีอยู่ของยีน *gus* ในสาหร่ายสไปรูลิน่าหลังจากที่ได้รับการถ่ายยีนพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* ด้วยความแรงกระแสไฟฟ้าที่ 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 15 วัน

P1 = positive control ดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus*

P2, P3 = positive control ดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pBI121 ซึ่งมียีน *gus* อยู่

H₂O = negative control (dH₂O)

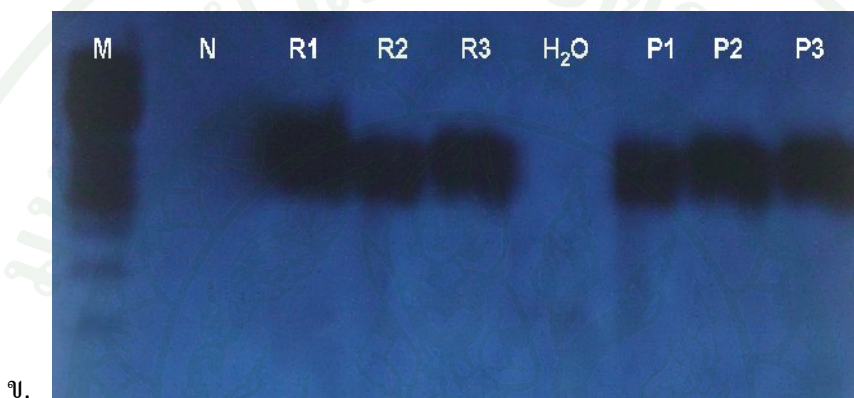
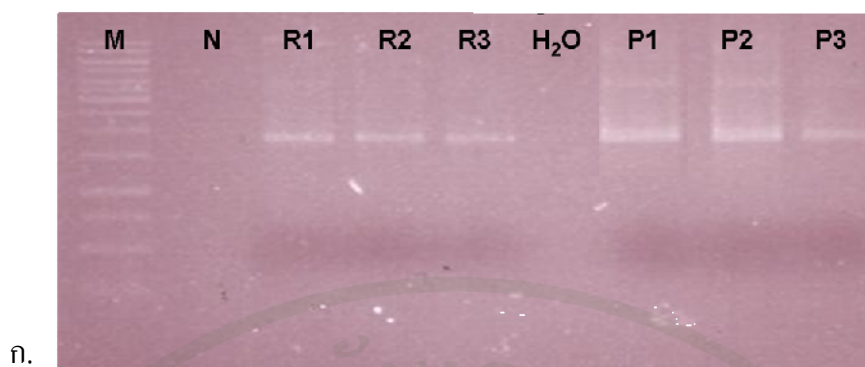
N = negative control ดีเอ็นเอที่ได้จากสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

R1- R3 = ดีเอ็นเอที่ได้จากสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายยีนซ้ำที่ 1-3

3.3.5 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ในสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายยีน พลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* โดยเทคนิค Southern PCR hybridization

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ที่เข้าไปรวมกับจีโนมของสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization เพื่อยืนยันว่า ยีน *gus* เข้าไปรวมตัวกับจีโนมของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเลือกทดสอบเฉพาะสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR และ dot blot hybridization แล้วให้ผลเป็นบวก และใช้ดีเอ็นเอจากสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น negative control และ ดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* และ pBI121 รวมไปถึง ผลจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน *gus* เป็น positive control

จากการนำผลผลิต PCR ที่ได้จากข้อ 3.3.3. มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้ายดีเอ็นเอลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน ซึ่งหากมีการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR กับดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบจะให้ผลเป็นสัญญาณสีดำนบนแผ่นฟิล์ม จากการทดลองพบว่า พบแถบสัญญาณสีดำนบนแผ่นฟิล์ม (ภาพที่ 17 ข.) ที่ตำแหน่งเดียวกับแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธี PCR (ภาพที่ 17 ก.) ซึ่งมีขนาดขึ้นดีเอ็นเอประมาณ 1,800 คู่เบส ในทุกซ้ำของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายยีน และให้ผลเหมือนกันกับที่ทดสอบในดีเอ็นเอต้นแบบ (positive control) ซึ่งแสดงว่ามียีน *gus* ส่วนสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่ปรากฏสัญญาณสีดำนบนแผ่นฟิล์ม ซึ่งการทดลองนี้เป็นการยืนยันผลว่าสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus* ที่ตรวจสอบผลเป็นบวกจากวิธี PCR และ dot blot hybridization มียีน *gus* อยู่จริง



ภาพที่ 17 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* โดยเทคนิค Southern PCR hybridization ในสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตรเป็นเวลา 15 วัน (ก.) ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR เปรียบเทียบการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยเทคนิค Southern PCR hybridization (ข.)

M = 1 kb DNA ladder marker (บริษัท Fermentas)

P1 = positive control ดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pBAD-TOPO[®]/*gus*

P2, P3 = positive control ดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pBI121

H₂O = negative control (dH₂O)

N = negative control ดีเอ็นเอที่ได้จากสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

R1-R3 = ดีเอ็นเอที่ได้จากสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้รับการถ่ายยีนซ้ำที่ 1-3

สรุปผลการทดลอง

สำหรับเชื้อยีสของ สายพันธุ์ TISTR 8217 มีการเจริญเติบโตในอาหาร สูตร Zarrouk ในรอบระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 30 วัน เป็นแบบ sigmoid curve โดยมีการเจริญเติบโตในระยะ exponential phase จนถึงระยะ stationary phase ประมาณวันที่ 4-20 ของการเพาะเลี้ยง และวิธีการที่เหมาะสมในการแยกเซลล์ไฝของสายพันธุ์นี้ คือการใช้สายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk อายุ 6-10 วัน นำมาย่อยผนังเซลล์ออกโดยใช้ไลโซไซม์ความเข้มข้น 0.035 เปอร์เซ็นต์ และเติม EDTA ความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้ได้เซลล์ไฝมากที่สุดถึง 55 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำให้เซลล์ไฝพัฒนาเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ½ เท่า ที่สามารถเพาะเลี้ยงให้เซลล์เจริญเติบโตพัฒนาจากเซลล์ไฝเป็นเซลล์ที่มีลักษณะ trichome ได้ถึง 33 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 20 วัน และไม่พบเซลล์แตก

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ ampicillin ใช้ในการคัดเลือกเซลล์ไฝของสายพันธุ์นี้ ที่ได้รับการถ่ายยีน คือ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวนี้สามารถกำจัดเซลล์สายพันธุ์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ทั้งหมดภายใน 4 สัปดาห์

ความแรงสนามไฟฟ้า (field strength) ที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่สายพันธุ์นี้ คือการใช้กระแสไฟฟ้าอยู่ในช่วง 4-6 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ซึ่งช่วงความแรงสนามไฟฟ้านี้ ยังคงทำให้เซลล์ไฝสามารถพัฒนาเจริญเป็นเซลล์สายพันธุ์นี้ได้ปกติ

การถ่ายยีนเข้าสู่สายพันธุ์นี้ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษาข้างต้น แล้วคัดเลือกในอาหารเหลวคัดเลือกสูตร Zarrouk ½ เท่า ร่วมกับ สารปฏิชีวนะ ampicillin พบว่าเซลล์ไฝของสายพันธุ์นี้ได้รับความแรงกระแสไฟฟ้าที่ 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตรสามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้หลังการถ่ายยีน 20 วัน

เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* และ pBAD-TOPO® ด้วยเทคนิค PCR พบว่าการมีอยู่ของยีน *gus* และชิ้นส่วนของพลาสมิด และ pBAD-TOPO® และพบการมีอยู่ของยีน *gus* เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization และ Southern PCR hybridization ภายหลังจากเพาะเลี้ยงสายพันธุ์นี้ที่ได้รับการถ่ายยีนที่ความแรงสนามไฟฟ้า 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 15 วัน ในอาหารคัดเลือก แต่เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน พบว่าสายพันธุ์นี้ตายทั้งหมด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กาญจนาภรณ์ ลีวมนันต์. 2527. สาหร่าย. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กัญญา แซ่เตียว. 2549. การถ่ายยีน VP 1 จากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่ตัวฮามาต้า.
วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิระพรรณ สุขศรีงาม. 2536. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทองในของเสียจากอุตสาหกรรม
พื้นบ้าน. รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม.

เจียมจิตต์ บุญสม. 2528. โครงการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทอง, น.25-32.
ในการสัมมนาวิชาการประจำปี 2528. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

เจียมจิตต์ บุญสม (ผู้แปล). 2531. ความลับของสาหร่ายเกลียวทอง. สำนักงานคณะกรรมการวิจัย
แห่งชาติ กรุงเทพฯ.

เจียมจิตต์ บุญสม. 2535. สาหร่ายเกลียวทอง. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สาขา
เกษตรศาสตร์และชีววิทยา. กรุงเทพฯ.

ธิดา เพชรมณี. 2542. คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงน้ำชายฝั่ง
จ.สงขลา, สงขลา.

นฤมล ศุกจรรยา, บุษบา บุญนาค และ พิสมัย ภูริสินธิ์. 2529. การผลิตสาหร่ายเกลียวทอง
(*Spirulina* spp.) จากโรงงานน้ำทิ้งเป้งมันสำปะหลัง. น. 104 - 155. ใน รายงานการวิจัย
และพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อประโยชน์และเพื่อกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานเป้งมันสำปะหลังใน
ระดับห้องปฏิบัติการ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.

พงษ์เทพ ฟองสมุทร และ อติเรก เต็มกันทา. 2539. การศึกษาวิธีการกวนที่เหมาะสมในบ่อ
สำหรับ *Spirulina platensis* ที่ใช้น้ำเสียจากการผลิตกระดาษสา, น. 45-47. ใน รายงานการ
วิจัย คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

พิมพ์พรณ ดันสกุล และ อารักษ์ จันทศิลป์. 2531. การเพาะเลี้ยง *Spirulina* spp. ในน้ำทิ้งจาก
โรงงานยางพารา. วารสารสงขลานครินทร์ 10: 149-155.

ยุวดี พิรพรพิศาล. 2543. บทปฏิบัติการสำหรับรายวิชา. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่,
เชียงใหม่.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2543. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศรีสุพร กนกศิลป์. 2536. ทรานฟอร์มเมชันของสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina platensis*).
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.

สรวิศ เผ่าทองสุข. 2543. สาหร่าย ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่าย
ในประเทศไทย, น.1-113. ใน เอกสารเผยแพร่ชุดโครงการ “อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ” สกว.
ชุดที่ 2. สกว, กรุงเทพฯ.

สุชาติ อิงธรรมจิตต์. 2530. สาหร่ายเกลียวทอง. วารสารการประมง. 39: 615-622.

สุชาติ อิงธรรมจิตต์, ชัยประดิษฐ์ แก้วปากำ, บรรจง โลกกระเทียม, เฉลิมวรรณ คงสงวนชัย
และ เขียมจิตต์ บุญสม. 2531. การทดสอบเบื้องต้นโดยการใช้จากกองปลาสดเลี้ยง
สาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina* spp.). รายงานการประชุมวิชาการประมง (16-18 กันยายน).
สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ.

- สุมาลี ตูลยอนุกิจ. 2535. ผลของระดับความเข้มข้นต่างๆของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสใน
 สูตรอาหาร Zarrouk ต่อการเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina* sp.). วิทยานิพนธ์ปริญญา
 โท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุมนทิพย์ บุนนาค. 2529. สาหร่ายเกลียวทอง. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น 14(3):
 153-159.
- อาภารัตน์ มหาขันธ์. 2539. คลังเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่าย ความหลากหลายทางชีวภาพเพื่อการ
 นำไปใช้ประโยชน์. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 11(2):3-18.
- อุไรวรรณ วิจารณ์กุล. 2545. ดีเอ็นเอเทคโนโลยี. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏ
 พิบูลสงคราม, พิษณุโลก.
- Abo-Shady, M., S.M. Souod, A. Raheem, R. Shanshoury and Y. A. G. Mahmoud. 1992.
 Protoplasts from the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. **World Journal of
 Microbiology and Biotechnology** 8: 385-38.
- Araoz, R., M. Lebert and D.P. Hader. 1998. Translation activity under ultraviolet radiation and
 temperature stress in the cyanobacterium *Nostoc* sp. **Journal of Photochemistry and
 Photobiology** 45: 115-120.
- Baldia, S. F., T. Nishijima and Y. Hata. 1990. Effect of physio-chemical factors and nutrients
 on the growth of *Spirulina platensis* isolated from Lake Kojima, Japan. **Nippon Suisan
 Gakkaishi** 57: 481-490.
- Baldia, S. F., K. Fukami, T. Nishijima, and Y. Hata. 1994. Growth responses of *Spirulina
 platensis* to some physio – chemical factors and the kinetics of phosphorus utilization.
Fisheries Science 61: 331-335.

- Becker, E. W. and L.V. Venkataraman. 1982. **Biotechnology and Exploitation of Algae.**
The Indian Approach German Agency for Technical Cooperation (GTZ) , Postfach.
- Benjamas, C. 2003. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks.
Aquaculture 22: 355-366.
- Bruns, B.U., W.R. Briggs and A.R Grossman. 1989. Molecular characterization of phycobilisome
regulatory mutant of *Freymyella diplosiphon*. **Journal of Bacteriology** 2: 901-908.
- Chanawongse, L., Y.K. Lee, B. Bunnag and M. Tanticharoen. 1994. Productivity of the
cyanobacterium *Spirulina platensis* in cultures using sunlight. **Bioresource Technology**
48: 143-148.
- Chassy, B.M., A. Mercenier and J. Flickinger. 1988. Transformation of bacteria by
electroporation. **Biotechnology** 6: 303-309.
- Chaudfari, P. P., K. P. Krishnamoorthi and M. Vittalrao. 1980. Growth potential of *Spirulina*
sp., a blue green algae in sewage. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences**
89: 203-211.
- Chiang, G.G., M. Schaefer and A. Grossman. 1992. Transformation of the filamentous
cyanobacterium *Freymyella diplosiphon* by conjugation or electroporation.
Plant Physiology Biochemistry 30: 315-325.
- Chuntapa. B., S. Powtongsook and P. Menasveta. 2003. Water quality contral using *Spirulina*
platensis in shrimp culture tank. **Aquaculture** 220: 355-366.
- Ciferri, O. and O. Tiboni. 1985. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*.
Annual Review of Microbiology 39: 503-526.

- Costa J.A.V., K.L. Cozza, L. Oliveira and G. Magagnin. 2001. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. **World Journal of Microbiology** 17: 439-442.
- Denesi, E. D., E. L. Rang, C. O. Yagui, C. M. Carvalho and S. Sato. 2002. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy** 23: 261-269.
- Dower, W.J., J. Miller and C. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Biotechnology** 16: 6127-6145.
- van Eykelenburg, C. 1979. The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity. **Antonie van Leeuwenhoek** 45: 369-390.
- Gan, X., X. Tang and C. Shi. 2004. Preparation and regeneration of spheroplasts from *Arthrospira platensis*. **Journal of Applied Phycology** 16: 513-517.
- Herrera, A., S. Boussiba and V. Napoleone. 1989. Recovery of c-phycocyanin from *Spirulina maxima*. **Journal of Applied Phycology** 1: 325-331.
- Hosakul, K. 1972. **The Selection and Growth Characteristics of some Local Microalgae Tolerating High Temperature**. Thesis in Master of Science in Microbiology, Kasetsart University Bangkok.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric gene in plant : the *gus* gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter** 5: 378-405.
- Kamate, K., I.D. Rodriguez-Liorente, M. Scholte, P. Durand, P. Ratet, E. Kondorosi, A. Kondorosi and T.H. Trinh. 2000. Transformation of floral organs with *GFP* in *Medicago truncatula*. **Plant Cell Reports** 19: 647-653.

- Kaplan, D., A. Richmond, E. Dubinsky and S. Aaronson. 1986. Algal Nutrition, pp. 1847-1998. In A. Richmond, (ed.) **CRC Handbook of Microalgae Mass Culture**. CRC Press.
- Klebe, R. J., J. V. Harriss, Z. D. Sharp and M. G. Douglas. 1983. A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. **Gene** 25: 333-341.
- Komari, T., Y. Hiei, Y. Saito, N. Murai and T. Kumashiro. 1996. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. **The Plant Journal** 10: 165-174.
- Masaaki, S., K. Yoshikazu and H.K. Yukio. 2000. Effective transformation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* using electroporation. **Journal of Applied Phycology** 13: 209-214.
- Menasveta, P., W. Worawattanamateekul, T. Latscha and J.S. Clark. 1993. Correction of black tiger prawn (*Penaeus monodon*, Fabricius) coloration by astaxanthin. **Aquacultural Engineering** 12: 203-213.
- Miki, B. and S. McHugh. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **Biomedical and Life Sciences** 107: 193-232.
- Nakamura, H. 1982. **Spirulina Food for Hungry World**. University of the Trees Press, California.
- Neumann, E. 1989 **Electroporation**. Plenum Press, New York.

- Ogbonna, J.C., H. Yoshizawa and H. Tanaka. 2000. Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. **Journal of Applied Phycology** 12: 277-284.
- Ping, Y., Z. Yi-jun and G. Hou-liang. 2005. Induction of vacuolated spheroplasts and isolation of vacuoles in cyanobacteria. **Journal of Applied Phycology** 41: 366-369.
- Poster, R.D. 1987. Transformation in cyanobacteria. **Microbiology** 13: 111-132
- Prausnitz, M.R., V.G. Bose and R. Langer. 1995. Electroporation. pp. 393-405. In E.W. Smith, (ed.). **Percutaneous Penetration Enhancers**. H.I. CRC Press.
- Richmond, A. 1986. **Handbook of Microalgal Mass Culture**. CRC Press, Florida.
- Santillan, C. 1982. Mass production of *Spirulina platensis*. **Experientia** 38: 40-43.
- Siangdung, W., B. Bunnag and M. Tanticharoen. 1996. Effect of temperature and NAD on D-12 desaturase of *Spirulina platensis*. pp. 147-148. In **The 1st European Phycological Congress**, Germany.
- Soong, P. 1980. Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan, pp. 97-133. In G. Shelef and C.J. Soeder (eds.). **Algae Biomass**. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Stanley, J.G. and J.B. Jones. 1976. Feeding algae to fish. **Aquaculture** 7: 219 – 223.
- Takahira, O. and A. Shuichi. 1978. CO₂ Assimilation and growth of a blue green algae *Spirulina platensis*, in continuous culture. **Journal Applied Biotechnology** 28: 515-521.

Theil, T. and H. Poo. 1989. Transformation of a filamentous cyanobactrium by electroporation. **Journal of Bacteriology** 71: 5743-5746.

Venkataraman, L. 1983. **A monograph on *Spirulina platensis***, CFTRI Press, Mysore.

Zarrouk C. 1966. Contribution a l'estude d'une cyanophyceé. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. **Experientia** 39: 1077-1083

Zhang, S., L.H. Zhu, X.Y. Li, A. Ahlman and M. Welander. 2005. Infection by *Agrobacterium tumefaciens* increased the resistance of leaf explants to selection agents in carnation (*Dianthus caryophyllus* L. and *D. chinensis*). **Plant Sciences** 168: 137-144.





ตารางผนวกที่ ก1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Zarrouk (1966)

ธาตุอาหาร	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
<u>Macronutrients</u>	
NaHCO ₃	16.8
NaNO ₃	2.50
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
K ₂ HPO ₄	0.50
K ₂ SO ₂	1.00
NaCl	1.00
<u>Fe-EDTA solution</u>	
Na ₂ -EDTA	0.01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.08

ตารางผนวกที่ ก2 องค์ประกอบของอาหาร Luria-Bertani Media (LB) (Maniatis *et al.*, 1982)
สำหรับเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens*

สารเคมี	กรัมต่อลิตร
Bacto tryptone	10.0
Bacto yeast extract	5.0
NaCl	10.0
ปรับให้ได้ pH 7.0	
agar	15.0

ตารางผนวกที่ ก3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS Histochemical assay
(Jefferson *et al.*, 1987)

เตรียมสารละลาย X-Gluc substrate โดยชั่งสาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) (บริษัท Fermentas) ปริมาณ 0.1044 กรัม ละลายในสารละลาย dimethylformamide ปริมาตร 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส) นำสารละลายดังกล่าวมาผสมรวมกัน เขย่าส่วนผสมนี้ให้เข้ากัน แล้วนำเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการตรวจสอบมาบ่มร่วมกับสารละลายดังกล่าว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วดูดสารละลายทิ้งเดิมเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเปลี่ยนเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ใหม่ทุกๆ 2 ชั่วโมง ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนกว่าเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการตรวจสอบจะไม่มีสีเขียว แล้วนำเนื้อเยื่อไปตรวจสอบการเกิดจุดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ โดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ดังตาราง

ความเข้มข้นของสารละลาย	ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1.0 M Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	0.1 M	100.0
5.0 mM K ₃ Fe(CN) ₆	0.5 mM	100.0
5.0 mM K ₄ Fe(CN) ₆	0.5 mM	100.0
0.25 M Na ₂ EDTA (pH 7.0)	10 mM	40.0
0.02 M X-gluc substrate	1.0 mM	50.0
10% Trion X-100	1.0%	10.0
dH ₂ O		600.0
Total Volume		1000

ตารางผนวกที่ ก4 การเตรียมส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.1 ส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ของยีน *β -glucuronidase (gus)* (1X/20 μ l)

ความเข้มข้นของสารประกอบ ปฏิกิริยา PCR	ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
10 X PCR buffer	1 X	2.0
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	2.0
1 mM dNTP mix	250 μ M	5.0
5 μ M Primer GUS456-F	0.125 μ M	0.5
5 μ M Primer GUS1375-R	0.125 μ M	0.5
5U/ μ l <i>Taq</i> polymerase	0.5U	0.1
50-100 ng DNA template		2.0
dH ₂ O		7.9
Total volume		20

4.2 ส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] (1X/20 μ l)

ความเข้มข้นของสารประกอบ ปฏิกิริยา PCR	ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
10 X PCR buffer	1 X	2.0
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	2.0
1 mM dNTP mix	250 μ M	5.0
5 μ M Primer pBAD-F	0.125 μ M	0.5
5 μ M Primer pBAD-RV	0.125 μ M	0.5
5U/ μ l <i>Taq</i> polymerase	0.5U	0.1
50-100 ng DNA template		2.0
dH ₂ O		7.9
Total volume		20

4.3 การทำปฏิกิริยา PCR นำส่วนผสมต่างๆ ใส่เครื่อง Thermocycler (Biometra®)
โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

	<i>gus</i>			pBAD-TOPO®	
	96 °C	2 นาที		94 °C	2 นาที
Denaturing	96 °C	20 วินาที	} 30 รอบ	Denaturing	94 °C 15 วินาที
Annealing	55 °C	1 นาที		Annealing	65 °C 30 วินาที
Extention	72 °C	2 นาที		Extention	72 °C 30 วินาที
	72 °C	5 นาที		72 °C	5 นาที
	16 °C	∞		16 °C	∞

ตารางผนวกที่ ก5 การเตรียมส่วนผสมสำหรับทำดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR

5.1 ส่วนผสมสำหรับการทำดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR ของยีน *gus*

ความเข้มข้นของสารประกอบ ปฏิกิริยา PCR	ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ	ปริมาตรที่ใช้ (1X/50 μ l)
10 X PCR buffer	1 X	5.0 μ l
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5.0 μ l
10 X PCR DIG label	1 X	5.0 μ l
5 μ M Primer GUS-F	0.125 μ M	1.25 μ l
5 μ M Primer GUS-R	0.125 μ M	1.25 μ l
5U/ μ l <i>Taq</i> polymerase	0.5U	5 μ l
10 ng DNA template	200 pg	2.0 μ l
dH ₂ O		25.5 μ l
Total volume		50 μ l

5.2 การทำดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR นำส่วนผสมต่างๆ ใส่เครื่อง Thermocycler (Biometra[®]) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

	<i>gus</i>	
	96 °C	2 นาที
Denaturing	96 °C	20 วินาที
Annealing	55 °C	1 นาที
Extention	72 °C	2 นาที
	72 °C	5 นาที
	16 °C	∞

} 30 รอบ

ตารางผนวกที่ 6 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำ dot blot hybridization

สารเคมี	ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ
Hybridization buffer	
SSC	5X
N-lauroylsarcosine	0.1%
SDS	0.02%
Blocking solution (1:10 dilution of stock 10X blocking solution)	1X
Low stringency buffer	
SSC	2x
SDS	0.1%
high stringency buffer	
SSC	0.1x
SDS	0.1%
Washing buffer	
Maleic acid buffer	1x
Tween 20	0.3%
Maleic acid buffer	
Maleic acid	0.1 M
NaCl	0.15 M
pH 7.5 (Adjusted with NaOH)	
Blocking solution	
Dilute 10X blocking solution 1:10 with Maleic acid buffer	
Detection buffer	
Tris-HCl	0.1 M
NaCl	0.1 M
pH 9.5 (Adjusted with NaOH)	

ตารางผนวกที่ ก7 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำ Southern hybridization

สารเคมี	ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ
Depurination solution	
HCl	250 mM
Denaturation solution	
NaCl	1.5 M
NaOH	0.5 M
Neutralization solution	
NaCl	1.5 M
Tris-HCl, pH 8.0	0.5 M
pH 7.5	
Hybridization buffer	
SSC	5X
N-lauroylsarcosine	0.1%
SDS	0.02%
Blocking solution	1X
(1:10 dilution of stock 10X blocking solution)	
Low stringency buffer	
SSC	2x
SDS	0.1%
high stringency buffer	
SSC	0.1x
SDS	0.1%
Washing buffer	
Maleic acid buffer	1x
Tween 20	0.3%

ตารางผนวกที่ ก7 (ต่อ)

Maleic acid buffer

Maleic acid 0.1 M

NaCl 0.15 M

pH 7.5 (Adjusted with NaOH)

Blocking solution

Dilute 10X blocking solution 1:10 with

Maleic acid buffer

Detection buffer

Tris-HCl 0.2 M

NaCl 0.2 M

pH 9.5 (Adjusted with NaOH)



1. การสกัดพลาสมิดโดยวิธีของ QIAprep Purification of Plasmid DNA Miniprep (บริษัท QIAGEN)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่มีพลาสมิด pCambia1304 ในอาหาร LB broth ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เมื่อครบกำหนดแล้วนำเซลล์แขวนลอยเชื้อไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทอาหาร LB broth ที่ละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 (Resuspension buffer : 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, RnaseA 100 μ g/ml) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ 4-6 ครั้ง แล้วย้ายเซลล์แขวนลอยเชื้อลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติimbัฟเฟอร์ P2 (Lysis buffer : 200 mM NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ 4-6 ครั้ง เติimbัฟเฟอร์ N3 (Neutralization buffer : 3 M potassium acetate, pH 5.5) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ 4-6 ครั้ง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายส่วนใสด้านล่างลงใน QIAprep spin column จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง เติimbัฟเฟอร์ PB (Equilibration buffer : 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanol, 0.15% TritonX-100) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที นำส่วนใสด้านล่างทิ้ง เติimbัฟเฟอร์ PE (1 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanol) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง เพื่อล้าง QIAprep spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีอีกครั้ง เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่ยังเหลืออยู่ออกให้หมด ย้าย QIAprep spin column วางลงบนหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้นเติimbัฟเฟอร์ EB (10 mM Tris-HCl pH 8.0) หรือน้ำ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ได้พลาสมิดในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ด้านล่าง

2. การเตรียม competent cell ของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ในอาหาร SOB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยขึ้นมา 400 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหาร SOB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นำเซลล์แขวนลอยเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ประมาณ 0.2-0.4 นำเซลล์แขวนลอยเชื้อใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่เย็น แล้วแช่หลอดในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเชื้อเบาๆ ด้วยสารละลาย RF1 (10 mM KCl 50 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 30 mM potassium acetate 10 mM $CaCl_2$ 15% glycerol และปรับ pH 5.8) ปริมาตร 1/3 เท่าของปริมาตรอาหาร SOB แล้วแช่หลอดในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเชื้อเบาๆ ด้วยสารละลาย RF2 (10 mM MOPS 10mM KCl 75 mM $CaCl_2$ 15% glycerol และปรับ pH 6.8) ปริมาตร 1/25 เท่าของปริมาตรอาหาร SOB แบ่ง competent cell ที่ได้ ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่เย็น หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บ competent cell ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 4-6 ชั่วโมงก่อนใช้ ส่วนที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (ในการเตรียม competent cell ต้องแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา)

3. การถ่ายยีนเข้าสู่ *E.coli* โดยวิธี Heat Shock

เตรียม Chemically Competent *E.coli* (บริษัท Invitrogen) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มี Competent cell ทั้งหมด 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที และ จุ่มลงในน้ำที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 90 วินาทีแช่น้ำแข็ง 5 นาที เติมน้ำ SOB medium 250 ไมโครลิตร นำมาเขย่าที่ 200 รอบต่อวินาที 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อวินาที 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง 250 ไมโครลิตร เขย่าส่วนที่เหลือให้เข้ากันแล้ว นำสารละลายเซลล์มาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรทั้งหมด นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีที่ขึ้นและเลือกโคโลนีทั้งหมด 10 โคโลนีเพื่อมาตรวจสอบโดย วิธี PCR

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวปิยนารถ ศรีชัย
วัน เดือน ปี ที่เกิด	28 กุมภาพันธ์ 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาระดับปริญญาตรี ปีการศึกษา 2548 ภาควิชา วิทยาศาสตร์ประมง คณะเทคโนโลยีเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
การสนับสนุนการศึกษาที่ได้รับ	เป็นบัณฑิตผู้ช่วยวิจัย ศูนย์ความเป็นเลิศ เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและ วิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงาน คณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ