

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

การถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายสไปรูลินาสายพันธุ์ TISTR 8217 โดยใช้กระแสไฟฟ้า พลาสมิด
ที่ใช้ในการถ่ายยีนคือ pBAD-TOPO[®]/*gus* ซึ่งประกอบด้วยยีนรายงานผล *gus* และยีนคัดเลือก *Amp*
โดยในการถ่ายยีนใช้เซลล์สาหร่ายสไปรูลินาที่เจริญอยู่ในระยะ exponential phase แยกผนังเซลล์
ออกโดยใช้ โลโซไซม์ ความเข้มข้น 0.035 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ ethylenediaminetetraacetic acid
(EDTA) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ตรวจสอบผล
การย่อยผนังเซลล์ และการเกิดเซลล์ไร้ผนัง (spheroplast) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า สามารถ
แยกเซลล์ไร้ผนัง ได้ 55 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์เริ่มต้น และเมื่อ นำเซลล์มาเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิด
เป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร Zarrouk ½ เท่า ซึ่งทำให้เซลล์ไร้ผนังพัฒนาเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์
ได้ 33 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 20 วัน และไม่พบเซลล์แตก การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ ไร้ผนังของ
สาหร่ายสไปรูลินา ด้วยความแรงกระแสไฟฟ้า 4 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร และนำเซลล์ที่ได้รับการ
ถ่ายยีนมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ½ เท่า ร่วมกับ สารปฏิชีวนะ ampicillin 300
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนแล้ว 15 วันมาตรวจสอบการแสดงออก
ของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay พบการติดสีน้ำเงินที่เซลล์ เมื่อนำเซลล์
ที่ติดสีน้ำเงินมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* และ pBAD-TOPO[®] ด้วยวิธี PCR พบการมีอยู่ของ
ชิ้นยีน *gus* ขนาด 1,800 คู่เบส และ ชิ้นส่วนของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] ขนาด 731 คู่เบส เมื่อนำ
เซลล์สาหร่ายไปตรวจยืนยันผลด้วยวิธี dot blot hybridization และวิธี Southern blot PCR พบ
ยีน *gus* ขนาด 1,800 คู่เบส แต่จากการตรวจสอบหลังการถ่ายยีน 30 วัน ไม่พบการติดสีน้ำเงิน และ
ไม่พบการมีอยู่ของยีน *gus* และ ชิ้นส่วนของพลาสมิด pBAD-TOPO[®] ด้วยวิธี PCR แสดงให้เห็น
ว่าการถ่ายยีนที่ได้ไม่มีความเสถียร