ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249934

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การปรับปรุงประสิทธิภาพระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *Spirulina platensis* C1 ด้วยการใช้ยีน methylase และการยับยั้งการทำงานของ restriction enzyme

Improvement of a gene transfer efficiency of *Spirulina platensis* C1 by using methylase genes and inhibiting host cell restriction

ผู้วิจัย
นางสาวสุดารัตน์ ดุลสวัสดิ์
นางวัฒนา เจียมตน
นางสุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์

รายงานนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ปีงบประมาณ 2553

b10254763 249934

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249934

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การปรับปรุงประสิทธิภาพระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *Spirulina platensis* C1 ด้วยการใช้ยีน methylase และการยับยั้งการทำงานของ restriction enzyme

Improvement of a gene transfer efficiency of *Spirulina platensis* C1 by using methylase genes and inhibiting host cell restriction

ผู้วิจัย
นางสาวสุดารัตน์ ดุลสวัสดิ์
นางวัฒนา เจียมตน
นางสุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รายงานนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ปีงบประมาณ 2553

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2553

---

1. ชื่อโครงการวิจัย

การปรับปรุงประสิทธิภาพระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *Spirulina platensis* C1 ด้วยการใช้ยีน methylase และการยับยั้งการทำงานของ restriction enzyme

Improvement of a gene transfer efficiency of *Spirulina platensis* C1 by using methylase genes and inhibiting host cell restriction

2. หน่วยงานหลักที่รับผิดชอบงานวิจัย

สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)
เลขที่ 49 ซ. เทียนทะเล 25 ถ. บางขุนเทียน-ชายทะเล
แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

3. คณะผู้วิจัย

3.1 ที่ปรึกษาโครงการ	นางสุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์ (Mrs. Supapon Cheevadhanarak)
ตำแหน่ง	รองศาสตราจารย์ ระดับ 8 คุณวุฒิ Ph. D. (Microbiology)
สถานที่ทำงาน	สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพคณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน) เลขที่ 49 ซ. เทียนทะเล 25 ถ. บางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์	0-2470-7464 **โทรสาร** 0-2452-3455
Email	supapon.che@kmutt.ac.th, supaponche@yahoo.com
ประสบการณ์ในงานวิจัย	Molecular biology and gene manipulation in cyanobacteria

3.2 หัวหน้าโครงการ	นางสาวสุดารัตน์ ดุลสวัสดิ์ (Ms. Sudarat Dulsawat)
ตำแหน่ง	นักวิจัย คุณวุฒิ M. Sc. (Biotechnology)
สถานที่ทำงาน	สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน) เลขที่ 49 ซ. เทียนทะเล 25 ถ. บางขุนเทียน-ชายทะเล

แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

โทรศัพท์ 0-2470-7503 **โทรสาร** 0-2452-3455

Email sudarat_d@yahoo.com

ประสบการณ์ในงานวิจัย Gene manipulation in cyanobacteria

Gene Transfer in cyanobacteria

3.3 ผู้ร่วมวิจัย นางวัฒนา เจียมตน (Mrs. Wattana Jeamton)

ตำแหน่ง นักวิจัย คุณวุฒิ M. Sc. (Biotechnology)

สถานที่ทำงาน สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)

เลขที่ 49 ซ. เทียนทะเล 25 ถ. บางขุนเทียน-ชายทะเล

แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

โทรศัพท์ 02-470-7503 **โทรสาร** 02-452-3455

Email wattana@pdti.kmutt.ac.th, w_chetkul@yahoo.com

ประสบการณ์ในงานวิจัย Gene manipulation in cyanobacteria

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนโครงการวิจัยเงินงบประมาณประจำปี 2553 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2552 ถึงเดือนกันยายน 2553

249934

บทคัดย่อ

Restriction enzyme เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina* เนื่องจากมีผลทำให้การส่งถ่ายดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพลดลง หรือทำได้ไม่สำเร็จ เพื่อปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *Spirulina* ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ในการทดลองได้ทำการสร้างพลาสมิดที่มียีน *Ban*I และ *Hind*VP methylase สำหรับป้องกันการถูกย่อยจาก restriction enzyme *Ban*I และ *Hind*VP ใน *Spirulina* และมี expression cassette ของยีนต้านยา spectinomycin และยีน *gfp* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter ของ *Spirulina* แทรกอยู่ระหว่างยีนสร้าง restriction enzyme *Ava*I ที่ใช้เป็น homologous sequence เพื่อให้พลาสมิดสามารถแทรกเข้าไปยับยั้งการทำงานของยีนสร้างเอนไซม์ *Ava*I ในจีโนมได้แบบ double homologous recombination แล้วทำการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Spirulina* ด้วยวิธี electroporation จากผลการทดลอง พบว่าสามารถคัดเลือก transformant ที่ได้รับพลาสมิดในอาหารเหลวที่มียา spectinomycin ความเข้มข้น 0.5 μg/ml ได้ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำ transformant ที่คัดเลือกได้ไปตรวจหายีนต้านยา spectinomycin ด้วยวิธี PCR พบว่า ไม่ตรวจพบยีนต้านยา spectinomycin ใน transformant และเมื่อนำ transformant ที่คัดเลือกได้ไป subculture ในอาหารที่มียา spectinomycin ความเข้มข้น 0.5 μg/ml พบว่า transformant ไม่สามารถอยู่รอดได้ แสดงให้เห็นว่า transformant ที่ได้ไม่เสถียร ซึ่งอาจเกิดจากพลาสมิดที่ส่งถ่ายเข้าไปสามารถคงตัวอยู่ในเซลได้ระยะหนึ่ง แล้วถูกย่อยด้วยเอนไซม์อื่น ๆ ที่มีอยู่ใน *Spirulina* จึงทำให้สามารถเลี้ยง *Spirulina* อยู่บนอาหารที่มียา spectinomycin ได้ระยะหนึ่งแล้วตายไปในที่สุด ซึ่งถึงแม้ในการทดลองนี้จะได้ transformant ที่ไม่เสถียร แต่วิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นมาสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอของ *Spirulina* ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นด้วยการป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกย่อยด้วย restriction enzymes ใน *Spirulina* ได้

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3
บทคัดย่อ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญภาพ	6
สารบัญตาราง	7
บทนำ	8
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	8
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	9
ขอบเขตของโครงการวิจัย	9
ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	9
การทบทวนวรรณกรรม/ สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	11
วิธีดำเนินงานวิจัย	17
แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ	27
ผลสำเร็จของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	27
ผลการทดลองและข้อวิจารณ์	29
สรุปและข้อเสนอแนะ	45
เอกสารอ้างอิง	47

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงการขั้นตอนการสร้างพลาสมิดที่ใช้สำหรับการพัฒนาระบบการส่งถ่ายดีเอ็นเอใน *Spirulina*	24
รูปที่ 2	แสดงผลการเพิ่มจำนวนยีนสร้าง methylase และ restriction enzyme จากจีโนมิคดีเอ็นเอของ *Spirulina* ด้วยวิธี PCR	32
รูปที่ 3	แสดงผลการตรวจสอบยีนสร้าง methylase และ restriction enzyme ที่โคลนในพลาสมิด pGEM®-T Easy ด้วยวิธี PCR	32
รูปที่ 4	แสดงผลการเพิ่มจำนวน *rrnB* terminator และ phycocyanin promoter จากพลาสมิด pAG127 ด้วยวิธี PCR	35
รูปที่ 5	แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิดที่สร้างได้ซึ่งมียีน methylase อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter และมี terminator	36
รูปที่ 6	แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิดที่สร้างได้ซึ่งมี expression cassette ของยีนต้านยา spectinomycin และยีน *gfp* อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter และมี terminator	37
รูปที่ 7	แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิดที่สร้างได้ซึ่งมียีนสร้างเอนไซม์ methylase ที่สามารถป้องกันการถูกย่อยจาก restriction enzymes และมี cassette ของยีนต้านยา spectinomycin และ *gfp* อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Spirulina* promoter แทรกอยู่ระหว่าง homologous sequence ของ *Spirulina* ตัดด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ กัน	39
รูปที่ 8	แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิด pAG157 ที่สร้างได้ซึ่งมียีนสร้างเอนไซม์ methylase ย่อยด้วย restriction enzymes ทางการค้า และ crude extract ของ *Spirulina*	40
รูปที่ 9	แสดงผล transformant ที่ได้จากการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Spirulina*	42
รูปที่ 10	แสดงผลการตรวจหายีนต้านยา spectinomycin จาก *Spirulina* ที่ทนต่อยา spectinomycin ความเข้มข้น 0.5 μg/ml ด้วยวิธี PCR	44

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงจำนวนจุดตัดบนดีเอ็นเอที่สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ ใน *Spirulina* C1	20