ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246732

ผลของการระดมยิงกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิคด้วยพลาสมา

ชานนท์ ใจชื่น

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2554

b00251375

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

246732

ผลของการระดมยิงกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิคด้วยพลาสมา

ชานนท์ ใจชื่น

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ใบรับรองวิทยานิพนธ์
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อเรื่อง
ผลของการระดมยิงกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิคด้วยพลาสมา

โดย
ชานนท์ ใจชื่น

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา ....
(อาจารย์ ดร.รัฐพร จันทร์เดช)
วันที่ 30 เดือน พ.ค. พ.ศ. 54

กรรมการที่ปรึกษา ....
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย)
วันที่ 30 เดือน พ.ค. พ.ศ. 54

กรรมการที่ปรึกษา ....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ยู เหลียง เติ้ง)
วันที่ 30 เดือน พ.ค. พ.ศ. 54

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร ....
(อาจารย์ ดร.มยุรา ศรีกัลยานุกูล)
วันที่ 30 เดือน พ.ค. พ.ศ. 54

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว ....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จำเนียร ยศราช)
ประธานกรรมการบัณฑิตศึกษา
วันที่ 31 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2554

ชื่อเรื่อง ผลของการระดมยิงกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิคด้วยพลาสมา
ชื่อผู้เขียน นายชานนท์ ใจชื่น
ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.รัฐพร จันทร์เดช

บทคัดย่อ

246732

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของพลาสมาที่มีต่อดีเอ็นเอ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งตัวอย่างของดีเอ็นเอที่ใช้คือ พลาสมิด pUC19 และ *LacZ* gene โดยจะถูกยิงด้วยพลาสมาที่อยู่ในรูปของไอออนไนโตรเจน ซึ่งวิธีการจะให้ bias ที่แตกต่างกันที่ 2.5, 3.5 และ 5 กิโลโวลต์ และปริมาณไอออนที่แตกต่างเช่นกันที่ 0.5, 1, 2 และ 4×10^{15} ions / cm^2 โดยตัวอย่างของดีเอ็นเอทั้งสองที่ผ่านการเหนี่ยวนำจะถูกส่งถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α แล้วสังเกตการกลายพันธุ์ จากการศึกษาพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของความถี่ของการกลายพันธุ์อันเกิดจากการกำหนด bias และปริมาณของไอออน ซึ่งความเสียหายของยีน *LacZ* มีผลต่อการเกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย ซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำของพลาสมา และการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอยืนยันความเสียหายของยีน *LacZ* และเผยถึงชนิดของความเสียหายโดยการเกิด deletion ในพลาสมิด pUC19 และการ transversion ใน *LacZ* gene และเบสไซโตซีนที่มี radiation-sensitivity สูงสุด

Title	Effect of Plasma Immersion Ion Implantation on Deoxyribonucleic Acid
Author	Mr. Chanon Jaichuen
Degree of	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Dr. Ruttaporn Chundet

ABSTRACT

246732

This study was conducted to investigate the effect of plasma immersion ion implantation on DNA as a method of mutation induction. Samples of plasmid DNA pUC19 and a DNA fragment containing the *LacZ* gene were directly bombarded with nitrogen plasma immersion ion implantation of varied biases (2.5, 3.5 and 5 kV) and varied fluences (0.5, 1, 2 and 4 x 10^{15} ions/cm^{2}). Plasma treated DNA and DNA fragments were transferred into the bacteria, *Escherichia coli* DH5α, to observe mutation induction. Mutation frequencies as a function of the bias voltage for fixed fluences and as a function of fluence for fixed bias, were found to increase in direct proportion with bias or fluence. Damage in the *LacZ* gene was then identified to determine the kinds of mutation induced by plasma implantation on the DNA. DNA sequencing confirmed the damage to the *LacZ* gene and revealed the dominant types of damage: deletion of pUC19, transversion in the *LacZ* gene fragment and mutation of the base cytosine (C) with highest radiosensitivity.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.รัฐพร จันทร์เดช ประธานกรรมการที่ปรึกษา ได้ให้คำแนะนำแนวทางในการทดลอง ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์ทั้งด้านการศึกษาและได้กรุณาอบรมสั่งสอน และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยดีตลอดมาจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย และ รองศาสตราจารย์ ดร.ยูเหลียง เติ้ง กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้คำแนะนำแนวทางในการทดลอง ช่วยเหลือในการวางแผนการทดลองและให้คำแนะนำในทุกๆ ด้าน รวมทั้งยังกรุณาช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อน และน้องๆ ที่ห้องปฏิบัติการวิจัย Molecular Unit ทุกคน พี่โอ๋ , พี่โด่ง , พี่ฝน , พี่แตงโม . พี่มะเหมี่ยว , เจียม , ปอและพี่ปู นักศึกษาปริญญาเอกสาขาฟิสิกส์ ที่คอยให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับการทำวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ คุณแม่ ที่คอยให้คำปรึกษา , คอยรับฟังปัญหาและคอยให้กำลังเสมอมาในการทำงานวิจัย และสุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกๆ ท่านที่ให้ความรู้แก่ลูกศิษย์คนนี้ให้มีวิชาความรู้เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาสังคมและประเทศชาติต่อไป

และขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยนี้ เพื่อพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีให้มีประโยชน์สำหรับกับการพัฒนาต่อไป

ชานนท์ ใจชื่น

พฤษภาคม 2554

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(10)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
นิยามของพลาสมา	3
ระบบผลิตพลาสมาโดยการดิสชาร์จแบบเหนี่ยวนำด้วยคลื่นวิทยุ	3
องค์ประกอบของระบบผลิตพลาสมาแบบเหนี่ยวนำ	4
กระบวนการเกิดระบบพลาสมา (Process of Plasma system)	6
ไอออนบีมกับงานทางด้านการส่งถ่ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ	9
ไอออนบีมกับงานทางด้านเกษตรกรรม (การปรับปรุงพันธุ์พืช)	10
การกลายพันธุ์ (Mutation)	12
กระบวนการเกิดการกลายพันธุ์	13
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	18
วัสดุอุปกรณ์และ สารเคมี	18
วิธีการทดลอง	20
บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์	28
ผลของพลาสมาต่อพลาสมิด pUC19	28
ผลของพลาสมาต่อ *LacZ* gene	36
วิจารณ์ผลการทดลอง	50

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 51
บรรณานุกรม 54
ภาคผนวก 57
ภาคผนวก ก สารเคมี 58
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลาย 59
ภาคผนวก ค ประวัติผู้วิจัย 61

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตาราง		หน้า
1	แสดงสภาวะในการใช้พลาสมิด pUC19 ไปเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา	20
2	แสดงการตั้งโปรแกรมการเกิดปฏิกิริยา	21
3	Master Mix ของปฏิกิริยา PCR	21
4	แสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค Colonies PCR	22
5	แสดงสภาวะในการใช้ชิ้นส่วนของ *LacZ* gene ไปเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยพลาสมา	25
6	แสดงการตั้งโปรแกรมการเกิดปฏิกิริยา	26
7	Master Mix ของปฏิกิริยา PCR	26
8	แสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค Colonies PCR	26
9	แสดงสภาวะในการใช้พลาสมิด pUC19 ที่เหนี่ยวนำด้วยพลาสมา	28
10	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง dosage กับ bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ในสภาวะเงื่อนไขที่มีการกำหนด dosage : 2 x 10^{15} ions/cm^2 คงที่ และ bias : 2.5 , 3.5 และ 5.0 kV	30
11	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Dosage กับ Bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ในสภาวะเงื่อนไขที่มีการกำหนด dosage :1x10^{15}, 2 x 10^{15} และ4x10^{15} ions/cm^2 และ bias : 2.5 kV คงที่	31
12	แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของพลาสมิด pUC19 ที่ตำแหน่งของ *LacZ* gene ของโคลน P2	34
13	แสดงผลของเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) ในโคลน P2	35
14	แสดงสภาวะในการใช้ *LacZ* gene ที่เหนี่ยวนำด้วยพลาสมา	36
15	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง dose กับ bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ในสภาวะเงื่อนไขที่มีการกำหนด dosage : 5x10^{14} , 1x10^{15} และ 2 x 10^{15} ions/cm^2 และ bias : 2.5 kV (คงที่)	38

ตาราง หน้า

16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Dosage กับ Bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ในสภาวะเงื่อนไขที่มีการกำหนด dosage : 2×10^{15} ions/cm^2 (คงที่) และ bias : 2.5 , 3.5 และ 5.0 kV 39
17 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสจากการใช้ *LacZ* gene ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา (โคลน L1) 45
18 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสจากการใช้ *LacZ* gene ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา (โคลน L10) 46
19 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสจากการใช้ *LacZ* gene ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา (โคลน L18) 47
20 แสดงผลของเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) ในโคลน L1 48
21 แสดงผลของเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) ในโคลน L10 48
22 แสดงผลของเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) ในโคลน L18 49

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	สายอากาศ (Antenna)	4
2	แชมเบอร์แบบกลีบมะเฟือง	4
3	ระบบสร้างความต่างศักย์แรงดันสูงแบบห้วง	5
4	ระบบจ่ายไฟฟ้าและระบบจ่ายแรงดันที่สร้างเสร็จ	5
5	ลักษณะของ Holder	6
6	กระบวนการเกิดระบบพลาสมา	8
7	พลาสมิด pUC19	19
8	การคัดเลือกโคโลนีสีขาวจากการนำพลาสมิด pUC19 ไปเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา	29
9	กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง Dosage : 2 x 10^{15} (คงที่) กับ Bias 2.5 , 3.5 และ 5.0 kV	30
10	กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง Dose : 1 x 10^{15} , 2 x 10^{15} และ 4 x 10^{15} กับ Bias 2.5 kV (คงที่)	31
11	การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ P1	32
12	การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ P2	33
13	การคัดเลือกโคโลนีสีขาวจากการนำ *LacZ gene* ไปเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา	37
14	กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง Dosage : 5 x 10^{14}, 1 x 10^{15}และ 2 x 10^{15} กับ Bias 2.5 kV (คงที่)	38
15	กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง Dosage : 2 x 10^{15} (คงที่) กับ Bias 2.5 , 3.5 และ 5.0 kV	39
16	การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ L6	40
17	การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ L20	41
18	การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ L1	42
19	การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ L10	43
20	การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ L18	44