



ผลของการระดมยิงกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกด้วยพลาสมา

ชานนท์ ใจชื่น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อเรื่อง

ผลของการระดมยิงกรดคือออกซีไรโบนิวคลีอิกด้วยพลาสมา

โดย

ชานนท์ ใจชื่น

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.รัฐพร จันทร์เดช)

วันที่ 30 เดือน พ.ค. พ.ศ. 54

กรรมการที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ อนันตลาโกชัย)

วันที่ 30 เดือน พ.ค. พ.ศ. 54

กรรมการที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชู เหลียง เต็ง)

วันที่ 30 เดือน พ.ค. พ.ศ. 54

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร

(อาจารย์ ดร.มยุรา ศรีกัลยานุกุล)

วันที่ 30 เดือน พ.ค. พ.ศ. 54

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จำเนียร ยศราช)

ประธานกรรมการบัณฑิตศึกษา

วันที่ 31 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2554

ชื่อเรื่อง	ผลของการระดมยิงกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกด้วยพลาสมา
ชื่อผู้เขียน	นายชานนท์ ใจชื่น
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.รัฐพร จันทระเดช

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของพลาสมาที่มีต่อดีเอ็นเอ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งตัวอย่างของดีเอ็นเอที่ใช้คือ พลาสมิด pUC19 และ *LacZ* gene โดยจะถูกยิงด้วยพลาสมาที่อยู่ในรูปของไอออนในโครเจน ซึ่งวิธีการจะให้ bias ที่แตกต่างกันที่ 2.5, 3.5 และ 5 กิโลโวลต์ และปริมาณไอออนที่แตกต่างเช่นกันที่ 0.5 , 1 , 2 และ 4×10^{15} ions / cm² โดยตัวอย่างของดีเอ็นเอทั้งสองที่ผ่านการเหนี่ยวนำจะถูกส่งถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α แล้วสังเกตการกลายพันธุ์ จากการศึกษพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของความถี่ของการกลายพันธุ์ อันเกิดจากการกำหนด 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

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 4×10^{15} ions/cm²). Plasma treated DNA and DNA fragments were transferred into the bacteria, *Escherichia coli* DH5 α , 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 เต็ง กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้คำแนะนำแนวทางในการทดลอง ช่วยเหลือในการวางแผนการทดลองและให้คำแนะนำในทุกๆ ด้าน รวมทั้งยังกรุณาช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อน และน้องๆ ที่ห้องปฏิบัติการวิจัย Molecular Unit ทุกคน พี่โอ้ , พี่โค้ง , พี่ฝน , พี่แดงโม , พี่มะเหมี่ยว , เจียม , ปอและพี่ปู นักศึกษาปริญญาเอกสาขาฟิสิกส์ ที่คอยให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับการทำวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ คุณแม่ ที่คอยให้คำปรึกษา , คอยรับฟังปัญหาและคอยให้กำลังใจเสมอมาในการทำงานวิจัย และสุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกๆ ท่านที่ให้ความรู้แก่ลูกศิษย์คนนี้ให้มีวิชาความรู้เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาสังคมและประเทศชาติต่อไป

และขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยนี้ เพื่อพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีให้มีประโยชน์สำหรับการพัฒนาต่อไป

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
ไอออนบีมกับงานทางด้านการเกษตรกรรม (การปรับปรุงพันธุ์พืช)	10
การกลายพันธุ์ (Mutation)	12
กระบวนการเกิดการกลายพันธุ์	13
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	18
วัสดุอุปกรณ์และ สารเคมี	18
วิธีการทดลอง	20
บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์	28
ผลของพลาสมาต่อพลาสมิด pUC19	28
ผลของพลาสมาต่อ <i>LacZ</i> gene	36
วิจารณ์ผลการทดลอง	50

(7)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

51

บรรณานุกรม

54

ภาคผนวก

57

ภาคผนวก ก สารเคมี

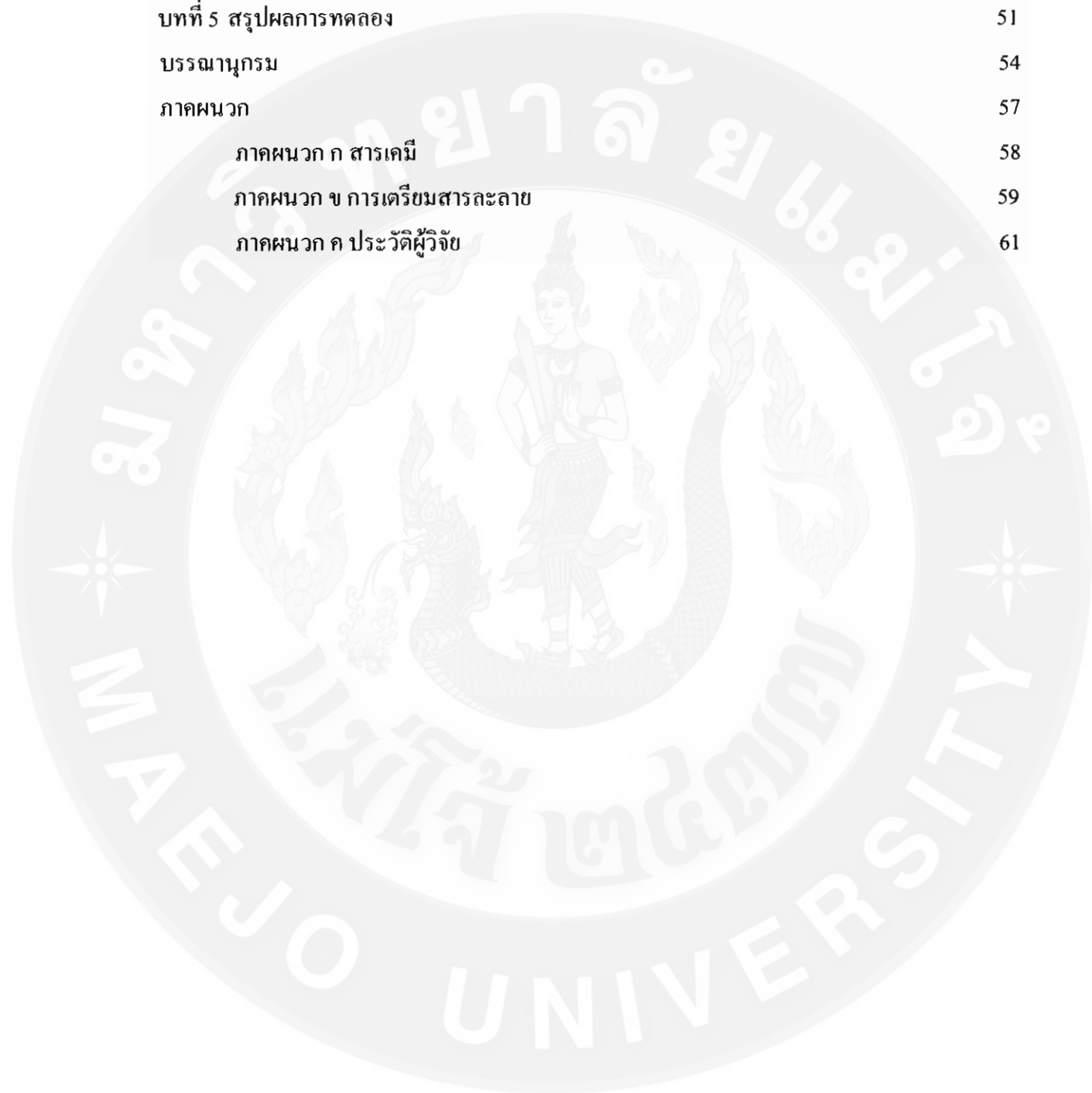
58

ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลาย

59

ภาคผนวก ค ประวัติผู้วิจัย

61



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงสถานะในการใช้พลาสมิด pUC19 ไปเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา	20
2 แสดงการตั้งโปรแกรมการเกิดปฏิกิริยา	21
3 Master Mix ของปฏิกิริยา PCR	21
4 แสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค Colonies PCR	22
5 แสดงสถานะในการใช้ชิ้นส่วนของ <i>LacZ</i> gene ไปเหนี่ยวนำให้เกิดการ กลายพันธุ์ด้วยพลาสมา	25
6 แสดงการตั้ง โปรแกรมการเกิดปฏิกิริยา	26
7 Master Mix ของปฏิกิริยา PCR	26
8 แสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค Colonies PCR	26
9 แสดงสถานะในการใช้พลาสมิด pUC19 ที่เหนี่ยวนำด้วยพลาสมา	28
10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง dosage กับ bias ต่อความถี่ของการ เกิดการกลายพันธุ์ในสถานะเงื่อนไขที่มีการกำหนด dosage : 2×10^{15} ions/cm ² คงที่ และ bias : 2.5 , 3.5 และ 5.0 kV	30
11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Dosage กับ Bias ต่อความถี่ของการ เกิดการกลายพันธุ์ในสถานะเงื่อนไขที่มีการกำหนด dosage : 1×10^{15} , 2×10^{15} และ 4×10^{15} ions/cm ² และ bias : 2.5 kV คงที่	31
12 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของพลาสมิด pUC19 ที่ตำแหน่งของ <i>LacZ</i> gene ของโคลน P2	34
13 แสดงผลของเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ในโครเจนไอออน) ในโคลน P2	35
14 แสดงสถานะในการใช้ <i>LacZ</i> gene ที่เหนี่ยวนำด้วยพลาสมา	36
15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง dose กับ bias ต่อความถี่ของการ เกิดการกลายพันธุ์ในสถานะเงื่อนไขที่มีการกำหนด dosage : 5×10^{14} , 1×10^{15} และ 2×10^{15} ions/cm ² และ bias : 2.5 kV (คงที่)	38

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 <i>LacZ</i> gene ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา (โคลน L1)	45
18	แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสจากการใช้ <i>LacZ</i> gene ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา (โคลน L10)	46
19	แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสจากการใช้ <i>LacZ</i> gene ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา (โคลน L18)	47
20	แสดงผลของเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ในโครเจนไอออน) ในโคลน L1	48
21	แสดงผลของเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ในโครเจนไอออน) ในโคลน L10	48
22	แสดงผลของเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ในโครเจนไอออน) ในโคลน L18	49

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	สายอากาศ (Antenna)	4
2	แชนเบอร์แบบกลีบบะเพือง	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 : 2×10^{15} (คงที่) กับ Bias 2.5 , 3.5 และ 5.0 kV	30
10	กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง Dose : 1×10^{15} , 2×10^{15} และ 4×10^{15} กับ Bias 2.5 kV (คงที่)	31
11	การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ P1	32
12	การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ P2	33
13	การคัดเลือกโคโลนีสีขาวจากการนำ <i>LacZ gene</i> ไปเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา	37
14	กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง Dosage : 5×10^{14} , 1×10^{15} และ 2×10^{15} กับ Bias 2.5 kV (คงที่)	38
15	กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง Dosage : 2×10^{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

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันเทคโนโลยีที่ทันสมัยมีบทบาทต่องานวิจัยในด้านต่างๆ โดยเฉพาะการประยุกต์ระหว่างเทคโนโลยีต่างสาขาวิชาเข้าด้วยกัน เช่น ฟิสิกส์และชีววิทยา เกิดเป็นสาขาวิชาใหม่คือ Bio-physics ทำให้เกิดแนวคิดหรือองค์ความรู้ใหม่ๆ ที่มีแนวโน้มจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ การบูรณาการเทคโนโลยีสมัยใหม่ด้านต่างๆ เข้ากับงานวิจัยต่างสาขาได้รับความสนใจมากขึ้นเรื่อยๆ โดยตัวอย่างของการประยุกต์ความรู้ทางฟิสิกส์เข้ากับงานทางด้านชีววิทยา เช่น การประยุกต์เทคโนโลยีลำไอออนพลังงานต่ำ (low-energy ion beam) มาใช้ในส่งถ่ายสารพันธุกรรม (DNA) เข้าสู่แบคทีเรีย (Anuntalabhochai *et al.*, 2001) และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมมะลิด้วยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยลำไอออนพลังงานต่ำ (Anuntalabhochai *et al.*, 2004) เป็นต้น ซึ่งยังคงมีการพัฒนาเทคโนโลยีดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง

เทคโนโลยีทางด้านพลาสมา เป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากได้มีการประยุกต์เทคนิคดังกล่าวเข้ากับงานทางด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ ตลอดจนการปรับปรุงวัสดุทางการแพทย์ให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น แต่พบว่าการประยุกต์เทคนิคพลาสมากับงานทางด้านชีววิทยายังมีอยู่ค่อนข้างน้อย

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้นำพลาสมามาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านชีววิทยา โดยเป็นการศึกษาผลของการระดมยิงพลาสมาของก๊าซไนโตรเจนต่อสารพันธุกรรม (DNA) ซึ่งข้อมูลที่ได้จะใช้ประกอบเป็นแนวทางในการประยุกต์เทคนิคดังกล่าวกับงานทางด้านชีววิทยาและการเกษตร เช่น การปรับปรุงพันธุ์พืช แบคทีเรีย หรือแม้แต่การส่งถ่ายยีนต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการระดมยิงพลาสมาต่อดีเอ็นเอ
2. เพื่อศึกษาอิทธิพลของ Dosage กับ Bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation frequency)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เข้าใจผลของการระดมยิงพลาสมาต่อดีเอ็นเอ
2. ทำให้ทราบเงื่อนไขของระบบพลาสมาในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

นิยามของพลาสมา

พลาสมา (plasma) เป็นคำที่มาจากภาษากรีก (Greek) ซึ่งหมายถึงเบ้าหลอมหรือแม่พิมพ์ (mold) หรือทอเป็นเนื้อขึ้นมา (fabricate) ในเชิงฟิสิกส์พลาสมาคือสภาวะหนึ่งของสสาร นอกเหนือจากสถานะของ ของแข็ง ของเหลว และก๊าซ สถานะต่าง ๆ เหล่านี้ถูกนิยามด้วยขนาดของแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล (binding force) หรืออะตอมของสสาร ค่าแรงยึดเหนี่ยวในของแข็งจะมีมากแต่เมื่อได้รับการกระตุ้นจากพลังงานภายนอกของแข็งก็สามารถเปลี่ยนสถานะของแข็งเป็นของเหลวหรือก๊าซ และในขณะเดียวกันถ้าของเหลวถูกกระตุ้นจากพลังงานภายนอกก็สามารถเปลี่ยนสถานะของของเหลวเป็นก๊าซได้ และเมื่อก๊าซถูกกระตุ้นจากพลังงานภายนอกทำให้เกิดการแตกตัว (ionization) ก๊าซก็อาจเปลี่ยนสถานะเป็นพลาสมาได้

คุณลักษณะของพลาสมา คือการมีสถานะของก๊าซที่มีอนุภาคที่มีประจุเชิงสะท้อนหรือก๊าซซึ่งประหนึ่งเป็นกลางทางไฟฟ้า (Quasineutral gas of charge) ประกอบด้วยอนุภาคที่มีประจุและอนุภาคที่เป็นกลาง โดยแสดงพฤติกรรมร่วมกัน (collective behavior) (Chen, 1984) และซึ่งก็คือ การเคลื่อนที่ของอนุภาคในพลาสมา ไม่เพียงแต่จะขึ้นกับเงื่อนไขในบริเวณอนุภาคนั้นๆ แต่ยังขึ้นกับสถานะของพลาสมาที่อยู่บริเวณห่างไกลออกไปอีกด้วย กล่าวคือเมื่ออนุภาคประจุภายในพลาสมามีการเคลื่อนที่ อนุภาคเหล่านี้สามารถทำให้เกิดความหนาแน่นของประจุบวกและลบในบริเวณหนึ่งๆ ซึ่งทำให้เกิดสนามไฟฟ้าขึ้น นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของอนุภาคประจุยังทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดสนามแม่เหล็กอีกด้วย ทั้งสนามไฟฟ้าและสนามแม่เหล็กนี้เองที่ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของประจุตัวอื่นๆ ที่อยู่ไกลออกไป เราจึงมองได้ว่าพลาสมามีลักษณะคล้ายก้อนเจลลีนุ่มที่สามารถเคลื่อนไหวเปลี่ยนรูปร่างได้ แต่ยังรวมตัวกันอยู่เป็นกลุ่มก้อน (พันธ์วัฒน์, 2546)

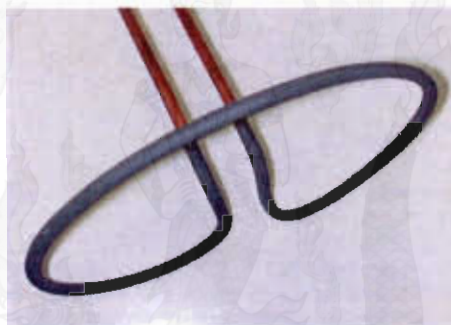
ระบบผลิตพลาสมาโดยการดิสชาร์จแบบเหนี่ยวนำด้วยคลื่นวิทยุ (นิรุต, 2545)

แหล่งพลาสมาซึ่งผลิตพลาสมาแบบเหนี่ยวนำ (inductively coupled plasma, ICP) อย่างง่ายสามารถให้พลาสมาความหนาแน่นสูงได้มากถึง 10^{10} - 10^{12} cm⁻³ (Anders, 2000) พลาสมาที่ผลิตได้มีความเสถียรและสะอาด แหล่งผลิตชนิดนี้ประกอบด้วย แชนเบอร์สุญญากาศ แหล่งกำเนิดคลื่นวิทยุที่ให้กำลังแก่ขดลวดเหนี่ยวนำ (RF induction coil) จะเหนี่ยวนำให้เกิดสนามไฟฟ้าซึ่งจะทำให้เกิดการแตกตัวของก๊าซบางส่วนภายในแชนเบอร์ จะรักษาภาพพลาสมานั้นไว้

องค์ประกอบของระบบผลิตพลาสมาแบบเหนี่ยวนำ

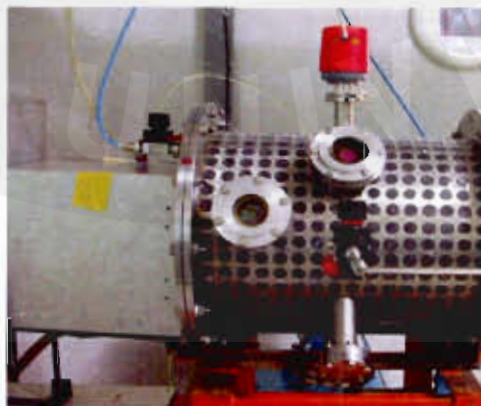
1. แหล่งกำเนิดคลื่นวิทยุความถี่ (RF generator) 13.56 เมกะเฮิรต์ Dresslor รุ่น HPG 1365 สามารถให้กำลังสูงสุด 6.5 กิโลวัตต์ มีระบบระบายความร้อนด้วยน้ำ มีตัวปรับสัญญาณคลื่นวิทยุให้มีความสมดุลโดย matching box โดยสามารถให้กำลังคลื่นวิทยุได้ทั้งแบบต่อเนื่องและแบบห้วง ในการทดลองนี้ทำการทดลองเฉพาะแบบต่อเนื่อง

2. สายอากาศ (Antenna) สำหรับห้องปฏิบัติการนี้ได้ใช้สายอากาศเป็นแบบประเภทขดลวดเหนี่ยวนำอยู่ในแชมเบอร์



ภาพ 1 สายอากาศ (Antenna)

3. แชมเบอร์พลาสมาแบบกลีบมะเฟืองรูปทรงกระบอก ทำจากสแตนเลสเส้นผ่านศูนย์กลาง 31.2 ซม. ยาว 42.5 ซม. พ้นหนา 6.0 มม. ที่ผิวด้านนอกถูกเจาะโดยรอบลึก 4.0 มม. เพื่อฝังแม่เหล็กถาวรแบบกระดุมขนาด 18.0 มม. หนา 5.0 มม. รอบๆ จำนวน 611 เม็ด และที่ฝาปิดทั้งสองด้านอีก 88 เม็ด โดยการจัดวางแบบ broken-line cusp ความเข้มสูงสุดของสนามแม่เหล็กมีค่า 2.2 กิโลเกาส์ และที่ผิวด้านในวัดความเข้มของสนามแม่เหล็กได้ 670 เกาส์ (Suanpoot *et al.*, 1998)



ภาพ 2 แชมเบอร์แบบกลีบมะเฟือง

4. ระบบสร้างความต่างศักย์แรงดันสูงแบบห้วง (pulse high-volt generator)
ระบบสร้างความต่างศักย์แรงดันสูงแบบห้วง สามารถสร้างแรงดันลบได้ตั้งแต่ 2.5 – 30 กิโลโวลต์
ความถี่ 1 – 2,000 เฮิรท์ ความกว้างของช่วงความถี่ (pulse widths) 5 -100 ไมโครวินาที



ภาพ 3 ระบบสร้างความต่างศักย์แรงดันสูงแบบห้วง

5. การสร้างระบบให้แรงดันสูง (High Voltages) ระบบให้แรงดันสูงเดิมมีช่วง
การทำงานที่ 2.5 -30 กิโลโวลต์ ซึ่งสูงเกินกว่าความต้องการในการทดลองที่ได้ออกแบบไว้ ดังนั้น
จึงได้ทำการออกแบบสร้างระบบให้แรงดันใหม่ให้มีช่วงการทำงานอยู่ที่ 1 – 1000 โวลต์ เพื่อ
รองรับกับการใช้งานที่ต้องการแรงดันต่ำกว่าเดิมในงานทางด้านชีววิทยา



ภาพ 4 ระบบจ่ายไฟฟ้าและระบบจ่ายแรงดันที่สร้างเสร็จ

6. Holder เป็นวัสดุที่ใช้สำหรับใส่ตัวอย่างโดยมีลักษณะเป็นหลุม 9 หลุม



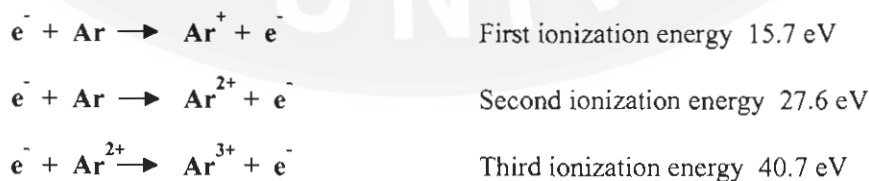
ภาพ 5 ลักษณะของ Holder

กระบวนการเกิดระบบพลาสมา (Process of Plasma system) (เกษม, 2549)

1. การแตกตัว (Ionization)

คือการทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากอะตอม เนื่องจากอะตอมหรือโมเลกุลของก๊าซได้รับพลังงาน หรือความร้อนจากภายนอกมากเพียงพอที่จะเปลี่ยนสถานะเป็นพลาสมา หรือการให้ศักย์ของคลื่นความถี่วิทยุ (RF generator) ที่มีการลดความดันของก๊าซลงมาอยู่ที่ 1 mbar ซึ่งกระบวนการที่แตกตัวเป็นไอออน อิเล็กตรอนที่เกาะอยู่กับอะตอมจะหลุดออกมา ทำให้อะตอมกลายเป็นไอออนและเกิดการเรืองแสง (Glow discharge) เปลี่ยนสถานะเป็นพลาสมา จะได้ชนิดของก๊าซที่มีการเปล่งแสง แสงเหนือม่วง (Ultraviolet) ที่เกิดขึ้น และความถี่แสงในช่วงที่มองเห็นด้วยตาเปล่าจะอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 400 – 700 นาโนเมตร ลักษณะการเรืองแสงตัวอย่าง เช่น ก๊าซอาร์กอนให้แสงชมพูอมม่วง ไนโตรเจนให้แสงสีน้ำเงิน การแตกตัวและค่าพลังงานมีค่าดังนี้

Ionization energy of Argon



Ionization energy of Nitrogen



1.1 การถูกกระตุ้น (Excitation)

การส่งผ่านอย่างกะทันหันของพลังงาน ย่อมทำให้อิเล็กตรอนกระโดดไปยังระดับที่มีพลังงานสูงกว่าในอะตอม กระบวนการนี้คือกระบวนการกระตุ้นสถานะของอะตอม ตัวอย่างเช่น

(* คือสถานะกระตุ้น)



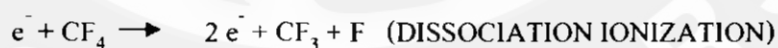
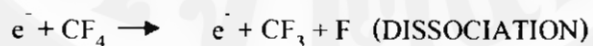
1.2 การแยกตัวออก (Dissociation)

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยก๊าซถูกกระทำโดยศักย์ของคลื่นความถี่วิทยุ กระบวนการนี้ได้แก่ กระบวนการแยกตัวของก๊าซออกซิเจน (O_2) สามารถแตกตัวได้เป็นออกซิเจน 2 อะตอม อย่างไรก็ตาม monoatom gas เช่น ก๊าซอาร์กอน (Ar) ทุกชนิดไม่สามารถที่จะแยกตัวได้

กระบวนการแยกตัวออก ตัวอย่างเช่น



ผลลัพธ์ของการแยกตัวออก คือการเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี ผลที่ได้จะมีปฏิกิริยาไวกว่าปฏิกิริยาของโมเลกุลเดิม การแยกอาจเกิดควบคู่กับการแตกตัวหรือไม่ก็ได้ ตัวอย่างเช่น



ผลการเรืองแสงของก๊าซที่ลดความดัน และศักย์ของคลื่นวิทยุที่กระตุ้น จะสังเกตเห็นพลาสมาที่เปล่งแสงที่เรียกว่า glow discharge ซึ่งแสงของพลาสมาที่เปล่งออกมาเนื่องมาจากพลังงานภายนอกที่ทำให้เวเลนซ์อิเล็กตรอนถูกกระตุ้นจากสถานะพื้นเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในสถานะถูกกระตุ้น

โดยปรกติอิเล็กตรอนสามารถอยู่ในสถานะกระตุ้นได้เพียงช่วงสั้นมาก ๆ คือโดยประมาณ 10^{-18} s จากนั้นเวเลนซ์อิเล็กตรอนจะกลับคืนสู่สถานะพื้น และปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าความถี่ของแสงในช่วงที่มองเห็น

แสงพลาสมาที่เปล่งออกมา จะแสดงถึงลักษณะก๊าซที่แตกตัว เช่น ก๊าซอาร์กอนจะเปล่งแสงเป็นสีชมพูอมม่วง และก๊าซไนโตรเจนจะเปล่งแสงเป็นสีน้ำเงิน

ผลการเรืองแสงของก๊าซที่ลดความดัน และศักย์ของคลื่นวิทยุที่กระตุ้น พลาสมา ซึ่งจะประกอบไปด้วย active species ตัวอย่างเช่น กรณีของก๊าซออกซิเจน อะตอมของก๊าซออกซิเจนจะเกิดออกซิไดซ์ กับโมเลกุลสารอินทรีย์ เช่น วัสดุเซลลูโลส พอลิเมอร์ ผ้า และอื่น ๆ และสามารถทำความสะอาดชิ้นงานได้

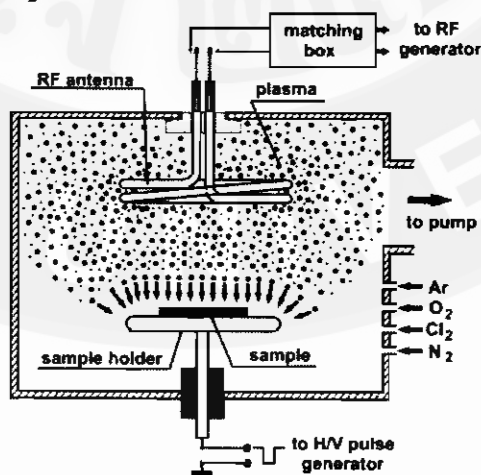
1.3 การแลกเปลี่ยนประจุ (Charge exchange)

คือการถ่ายเทประจุกับอะตอม จะเกิดขึ้นได้ง่ายมาก หากเป็นการแลกเปลี่ยนไอออนกับอะตอมของธาตุเดียวกัน ตัวอย่างเช่น



1.4 การถ่ายเทโมเมนตัม (Momentum transfer)

เป็นกลไกเบื้องต้นสำหรับการเปลี่ยนแปลงโมเมนตัมของแรงจากการชนของอะตอม กรณีก๊าซที่เป็นกลาง การถ่ายเทโมเมนตัมของอิเล็กตรอน ไม่ได้มีความสำคัญของการรบกวนมากนักของก๊าซที่เป็นกลาง แต่เป็นกระบวนการที่สามารถเกิดพลาสมาได้ เช่นกรณีก๊าซไนโตรเจนตามสมการ



ภาพ 6 กระบวนการเกิดระบบพลาสมา

หลักการหรือกระบวนการเกิดระบบพลาสมา ได้นำไปใช้ประโยชน์ในงานทางด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ และอุตสาหกรรมทางการแพทย์ โดยงานทางด้านต่าง ๆ ทำให้ผลิตภัณฑ์นั้นมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ ช่วยเพิ่มมูลค่าในอุตสาหกรรมนั้น ๆ ซึ่งคุณสมบัติที่เกิดขึ้นอย่างเช่น การป้องกันการกันเปื้อน เพื่อการยืดเกาะที่ดีขึ้น และช่วยป้องกันความชื้นของผลิตภัณฑ์ได้ จากคุณสมบัตินั้นล้วนแล้วเกิดจากการนำพลาสมามาประยุกต์ใช้

พลาสมาเป็นเทคนิคหนึ่งทางศาสตร์ของฟิสิกส์ที่นำมาประยุกต์ใช้ เพื่อเพิ่มคุณสมบัติต่าง ๆ เพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ เมื่อมีการเปรียบเทียบเทคนิคพลาสมากับเทคนิคฟิสิกส์อื่น ๆ เช่น เทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำ ซึ่งช่วงระยะแรกเทคนิคลำไอออนได้นำมาใช้ในงาน Electronic device fabrication และ Material modification ต่อมาได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในงานด้านต่าง ๆ มากขึ้นนอกเหนือจากงานทางด้านฟิสิกส์ เช่น การแพทย์ การรักษาโรคมะเร็งด้วยโปรตอน และไอออนมวลหนัก งานทางด้านโบราณคดีโดยการไอโซโทปแกมมันตรังสีปริมาณน้อยที่ปนอยู่ท่ามกลางไอโซโทปเสถียรจำนวนมากเพื่อหาอายุของวัตถุโบราณ ส่วนงานด้านเคมีวิเคราะห์ธรณีวิทยา เช่น การเปลี่ยนสีของอัญมณี สำหรับงานทางด้านวัสดุศาสตร์ จะเกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพื้นผิวโลหะ ภายหลังต่อมาได้มีการประยุกต์นำเอาเทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำนำมาใช้กับงานทางด้านชีววิทยา และการเกษตร ได้แก่ ไอออนบีมกับงานทางการส่งถ่ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และ ไอออนบีมกับงานทางการเกษตร (การปรับปรุงพันธุ์พืช)

ไอออนบีมกับงานทางด้านชีววิทยา

ได้มีรายงานการส่งถ่ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยใช้เทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำชักนำการส่งถ่าย *Gus* gene (beta - glucuronidase) และ *cat* gene (Chloramphenical acetyltransferase) เข้าสู่เซลล์แขวนลอย และเอ็มบริโอของข้าว โดยใช้ลำไอออนของอาร์กอน พบว่าเซลล์แขวนลอยและเอ็มบริโอของข้าว มีการแสดงออกของ *Gus* gene ซึ่งในการส่งถ่ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เข้าสู่เซลล์พืชนี้ยังไม่ทราบกลไกแน่ชัด แต่มีข้อสันนิษฐานว่า อาจเกิดจาก 2 กลไก คือ (1) เมื่อเซลล์ถูกระดมยิงด้วยลำไอออนจะมีผลทำให้เกิดรูบนผนังเซลล์ และเชื้อหุ้มเซลล์ทำให้พลาสมิดถูกส่งเข้าสู่เซลล์ได้ (2) เมื่อเซลล์ถูกระดมยิงด้วยลำไอออน จะทำให้ภายในเซลล์มีประจุเป็นบวกเพิ่มมากขึ้น ทำให้ดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ (Yu et. al., 1993)

ต่อมา Vilaithong *et al.* (2000) ได้ทดลองส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย และเนื้อเยื่อพืชพบว่าการใช้ลำไออนของไนโตรเจนโมเลกุล สามารถทะลุทะลวงเข้าสู่เซลล์พืชได้ดี และใช้ลำไออนของอาร์กอนในการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

ซึ่งในปีถัดมา Anuntalabhochai *et al.* (2001) ได้ทำการทดลองส่งถ่าย พลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* โดยใช้ลำไออนพลังงานต่ำของไนโตรเจนและอาร์กอนได้ประสบผลสำเร็จ

ไอออนบีมกับงานทางด้านเกษตรกรรม (การปรับปรุงพันธุ์พืช)

ได้มีการใช้ลำไออนพลังงานต่ำในการปรับปรุงพันธุ์ของธัญพืช ได้ทำการทดลองใช้ลำไออนไนโตรเจนพลังงานต่ำเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวพบว่าลำไออนก่อให้เกิดความเสียหายต่อเมล็ดข้าวต่ำ, ต้นข้าวที่ได้มีความทนทานต่อโรคสูง , ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตสั้น, ให้คุณภาพผลผลิตสูง และนำเทคนิคนี้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ข้าวสายพันธุ์ใหม่ 11 สายพันธุ์ (Yu *et al.*, 1991) ต่อมา Wu and Yu (2001) ใช้ลำไออนของไนโตรเจนอะตอมระดมยิงเมล็ดข้าวสาลี เพื่อดู Radiobiology effect โดยเฉพาะผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม (Chromosome aberration) ซึ่งจากการทำ Cytological genetic พบว่าลำไออนมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในระยะไมโอติก หรือไมโอติก ซึ่งความผิดปกตินี้จะพบมากขึ้นเมื่อใช้ปริมาณไอออนเพิ่มขึ้น ซึ่งชนิดของความผิดปกติที่พบคือ Acentric fragments , Chromosome deletions, Lagging chromosomes, Chromosome bridge และ Micronuclei โดยชนิดของความผิดปกติที่พบมากที่สุด คือ Chromosome bridge , Lagging chromosomes และ Fragment ส่วนลักษณะที่เกิดการกลายพันธุ์ คือ ไม่มีการสร้างเกสรตัวผู้ในส่วนของดอก ทำให้ไม่มีเมล็ด นั่นคือ ลักษณะเป็นหมัน นอกจากนี้ยังพบว่า 2% ของต้นพืชได้สูญเสียลักษณะต้านทานต่อโรค จากการศึกษาจึงได้สรุปว่าลำไออนพลังงานต่ำมีประสิทธิภาพสูง ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช ได้มีการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ระหว่างลำไออนของฮีเลียม, คาร์บอน และนีออน กับรังสีแกมมา โดยทำการทดลองในข้าวสาลีพบว่าลำไออนพลังงานต่ำสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวสาลีได้ดีกว่าการใช้รังสีแกมมา

ในปีเดียวกันนี้ได้มีการใช้ ลำไออนพลังงานต่ำในการปรับปรุงพันธุ์ในไม้ดอก โดยได้ทำการทดลองใช้ลำไออนพลังงานต่ำของคาร์บอน และฮีเลียม ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในดอกกุหลาบ 2 สายพันธุ์คือ Orange Rosamini และ Red Minimo โดยระดมยิงลำ

ไอออนที่บริเวณตาข้างของดอก พบว่าลักษณะที่กลายพันธุ์ คือ ลักษณะของดอก , จำนวนกลีบดอก, ขนาดของดอก และสีของดอก โดยพบว่าสีของดอกที่พบจะมีสีเข้มกว่ารุ่นพ่อแม่ แต่ไม่ได้เปลี่ยนแปลงรุนแรงจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ขาว หรือชมพู (Yamaguchi *et al.*, 2003) และ Okamura *et al.* (2003) ได้เห็นย่นำให้เกิดการกลายพันธุ์ในดอกคาร์เนชั่น

ในปีต่อมา Anuntalabhochai *et al.* (2004) ใช้ลำไอออนของไนโตรเจนที่ระดับพลังงาน 60 kV, ปริมาณไอออน 1, 4 และ 8×10^{16} ion/cm² ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวท่า พบว่าลักษณะที่เกิดการกลายพันธุ์คือ Leaf blade และ Stem sheath เปลี่ยนเป็นสีเขียว

จะเห็นว่าเทคนิคทางฟิสิกส์โดยเฉพาะเทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำเข้ามามีบทบาทในงานทางด้านชีววิทยามากขึ้น โดยเมื่อมีเปรียบเทียบกับพลาสมา จึงทำให้ได้มีการนำพลาสมามาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านชีววิทยาให้มากขึ้น ซึ่งในช่วงเวลานี้ได้มีงานทดลองที่นำเทคนิคพลาสมาไปใช้กับงานทางด้านชีววิทยา เช่น

งานทางด้านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้พลาสมาระดมยิงให้เกิดการแตกหักของพลาสมิด โดย Sarapirom *et al.* (2010) ได้มีการนำพลาสมาทดลองเป็นครั้งแรก โดยมีการทดลองกับพลาสมิด pGFP ซึ่งจะมีการแสดงออกเป็นสีเขียว เมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ซึ่งเมื่อถูกระดมยิงด้วยพลาสมาแล้วพบโคโลนีของแบคทีเรียเป็นสีขาว และสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพลาสมิด

Yang *et al.* (1997) ได้ทดลองนำไอออนบีมจากก๊าซไนโตรเจนไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน Ds M13mp18 DNA แล้ววิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของบริเวณของ *LacZ gene* โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเบสแบบ transition (50 %) , transversion (45 %) และ deletion (5 %) ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเบสแบบ transition จะพบแบบไซโตซีนไปเป็นไทมีน และ อะดีนีนไปเป็นกวานีน ส่วนการเปลี่ยนแปลงของเบสแบบ transversion พบแบบไซโตซีนไปเป็น อะดีนีน และไซโตซีนไปเป็นกวานีน ซึ่งเหตุผลดังกล่าวเป็นสาเหตุของการเกิดการกลายพันธุ์

และ Quan *et al.* (2003) ได้มีการทดลองนำไอออนบีมจากก๊าซคาร์บอนไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน Ds M13mp18 DNA แล้ววิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของบริเวณของ *LacZ gene* โดยมีการเปรียบเทียบระหว่างสถานะสุญญากาศกับสถานะการชักนำ พบว่าการเปลี่ยนแปลงเพียงหนึ่งเบสคิดเป็น 96.8 % ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเกี่ยวข้องกับ base substitution โดยเฉพาะแบบ transversion (49.6 %) และ transition (39.6 %) ซึ่งผลดังกล่าวเหมือนกับการใช้รังสีแกมมาในการชักนำโดยมีการทดลองที่คล้ายกัน ซึ่งสามารถบอกได้ว่าไอออนมีผลต่อ *LacZ gene* โดยตรงไม่ใช่การสุม เมื่อมีการเปรียบเทียบกับข้อมูลในการทดลองการใช้รังสีแกมมา

จะเห็นว่างานทางด้านฟิสิกส์สามารถที่จะนำมาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านชีววิทยาได้ ซึ่งจะเห็นว่าเน้นไปทางด้านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสามารถวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ได้ ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ *LacZ* gene เป็นตัวบ่งชี้ถึงผลของพลาสมา โดย *LacZ* gene เป็นบริเวณหนึ่งที่อยู่บนพลาสมิด pUC19 ซึ่งหลักการคือเป็นการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เรียกว่า β -galactosidase เมื่อนำพลาสมิดส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ผู้รับแล้วนำเซลล์นั้นเลี้ยงบนอาหารที่ใส่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและใส่สาร IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) ซึ่งเป็นสารที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β -galactosidase (inducer) พร้อมกับสาร X - gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์นี้ โดยเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดจะไม่สามารถเจริญขึ้นได้ ส่วนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดจะเจริญได้และสามารถผลิตเอนไซม์ β -galactosidase โดยจะย่อยสาร X - gal เกิดเป็นสีฟ้าขึ้นทำให้มีโคโลนีเป็นสีฟ้า

ทำให้มีแนวคิดที่จะนำเทคนิคพลาสมา มาทดลองกับเรื่องการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) เป็นขั้นเริ่มต้น เพื่อที่จะใช้เป็นความรู้พื้นฐานในการต่อยอดการทดลองให้สูงขึ้นต่อไป

การกลายพันธุ์ (Mutation)

หมายถึงการเปลี่ยนแปลงในลำดับเบสในดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถเกิดได้เองตามธรรมชาติ (Spontaneous mutation) หรือเกิดจากการเหนี่ยวนำ (Induced mutation) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอสามารถที่จะถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่ไปยังรุ่นลูกหลานได้ การกลายพันธุ์ยังอาจหมายถึงการเพิ่ม (Duplication) การขาดหาย (Deletion) ของโครโมโซม การเปลี่ยนแปลงกลับทิศทางของส่วนของโครโมโซม (Inversion) หรือเกิดการย้ายสลับที่ระหว่างโครโมโซมที่ต่างคู่กัน (Translocation) หรือโครโมโซมทำให้การปรากฏลักษณะภายนอก (Phenotype) ของสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนแปลงไปลักษณะของสิ่งมีชีวิตที่แสดงลักษณะปกติ เรียกว่า วายด์ไทป์ (Wide type) ส่วนสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเปลี่ยนไป เรียกว่า ตัวกลายพันธุ์ (Mutant) สารก่อการกลายพันธุ์ (Mutagen) อาจเป็นสารเคมี หรือรังสี ทำให้เกิดการกลายได้ ซึ่งกระบวนการที่ก่อการกลายที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ หรือจากการเหนี่ยวนำ จะเรียกว่า กระบวนการกลายพันธุ์ (Mutagenesis)

ชนิดของการกลายพันธุ์มี 4 ระดับ

1. การกลายพันธุ์แบบเฟรมชิฟต์ (Frameshift mutation) การกลายพันธุ์นี้มีการเพิ่มหรือหายไปของนิวคลีโอไทด์จากโมเลกุลดีเอ็นเอเพียง 1 โมเลกุลทำให้การอ่านรหัสของพันธุกรรมเปลี่ยนไปจากเดิม เป็นผลให้โปรตีนที่สร้างจากยีนไม่สามารถทำงานได้จากปกติ

2. การกลายพันธุ์แบบพอยท์ (Point mutation หรือ gene mutation) การกลายพันธุ์ชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงหนึ่งคู่ จะเรียกว่าการกลายพันธุ์แบบพอยท์ หรือบางครั้งเรียกว่า การกลายพันธุ์แบบแทนที่ (Substitution mutation) การกลายพันธุ์แบบพอยท์ มีหลายแบบคือ

2.1 การกลายพันธุ์แบบไซเลนท์ (Silent mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นแล้วไม่มีผลต่อลักษณะภายนอกที่ปรากฏของเซลล์นั้น ตัวอย่างเช่น เบสคู่สมเปลี่ยนไปแต่รหัส (Codon) นั้นยังคงแปลรหัสของกรดอะมิโนตัวเดิม

2.2 การกลายพันธุ์แบบมิสเซนส์ (Missense mutation) เป็นการเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมมีผลให้เปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนในโปรตีน เช่น การเปลี่ยนเบสในสายนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 4 จากเบส G ไปเป็น A ทำให้แปลรหัสเป็นอาร์จินีนแทนที่จะเป็นไกลซีน หรือการเปลี่ยนเบสในนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 15 จากอะดีนีนเป็นไทมีน ทำให้ได้ฟีนิลอะลานีนแทนที่จะเป็นลิวซีน นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์แบบมิสเซนส์บางชนิดสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ในสภาวะหนึ่งแต่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ในสภาวะหนึ่ง การกลายพันธุ์แบบนี้เรียกว่า condition mutation นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นแล้วทำให้โปรตีนทำหน้าที่ไม่เต็มที่ จะเรียกว่าเป็นการกลายพันธุ์แบบลิกกี้ (Leaky mutation) เช่น ในแบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ทำให้ประสิทธิภาพเสียไป

2.3 การกลายพันธุ์แบบนอนเซนส์ (Nonsense mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ทั้งไม่ว่าจะเป็นการแทนที่ การเพิ่มเข้ามาหรือขาดหายไป ทำให้รหัสในยีนเปลี่ยนแปลงเป็นรหัสหยุดการแปลรหัส (UAG, UGA หรือ UAA) ทำลายพอลิเปปไทด์สั้น รหัสหยุดมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า นอนเซนส์ โคดอน (Nonsense codon) โดยสายพอลิเปปไทด์ที่สั้นหรือยาวกว่าปกตินี้มีผลต่อรูปร่างและการทำหน้าที่

2.4 การกลายพันธุ์แบบสับเพรสชัน (Suppression mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นแล้วไปลดการกลายพันธุ์ที่มีอยู่เดิมทำให้ได้ลักษณะ wide type กลับคืนมา เช่น เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ได้รหัสหยุดเป็นนอนเซนส์ เมื่อเกิดการกลายพันธุ์อีกครั้งทำให้มีการสร้างโปรตีนต่อไปได้จนถึงรหัสหยุดที่แท้จริง (ดาวรุ่ง, 2546)

กระบวนการเกิดการกลายพันธุ์แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1. การกลายพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติ (Spontaneous mutation)

จะมีความถี่ประมาณ 1 ในล้านที่เกิดจาก 2 ปัจจัยใหญ่ ๆ ได้แก่ ปัจจัยภายในพืช และปัจจัยทางสภาพแวดล้อม

1.1 ปัจจัยภายในพืช

- องค์ประกอบทางพันธุกรรม เป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นในจีโนมไทป์ของพืชเอง เช่น พืชที่มีการเปลี่ยนแปลงใน โครงสร้างของโครโมโซม ได้แก่ Inversion heterozygote หรือ Translocation heterozygous มีผลทำให้ได้เซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนยีนมาก หรือน้อยกว่าปกติ ในพืชบางชนิดมีเอ็นพีเอสอยู่ภายในจีโนม เช่น Transposable element หรือ Transposon ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษในการเคลื่อนย้ายตำแหน่งจากโครโมโซมหนึ่งไปยังที่ตำแหน่งใด ๆ ก็ได้ในจีโนม มีผลทำให้ได้ลักษณะใหม่ออกมา เช่น การเกิดจุดสีม่วงในเมล็ด ลำต้น หรือใบของข้าวโพด

- สภาพทางสรีระ พบว่าในพืชมีการปลูกเปรียบเทียบระหว่างเมล็ดเก่าที่เก็บไว้เป็นเวลานาน กับเมล็ดที่เพิ่งเก็บเกี่ยว เมื่อนำเมล็ดทั้งสองชนิดมาปลูก พบว่าเมล็ดที่เก็บไว้เป็นเวลานานให้ต้นพืชที่มีการแปรผันทางพันธุกรรมสูงกว่าต้นพืชที่ได้จากเมล็ดที่เก็บเกี่ยวใหม่ การที่เก็บเมล็ดไว้นาน ๆ ทำให้มีอัตราการกลายพันธุ์สูง ทั้งนี้เพราะในเมล็ดมีกระบวนการเมตาบอลิซึมเกิดขึ้น และมีพวกเมตาบอลิต์ และของเสียต่าง ๆ เกิดขึ้นภายในเซลล์ของเมล็ด สารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสิ่งที่ก่อกลายพันธุ์ขึ้นได้เองตามธรรมชาติ

1.2 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

- อาหาร พบว่าการปลูกพืชในแหล่งที่ขาดแร่ธาตุบางอย่างมีผลต่อการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ เช่น การปลูก Tradescantia ในดินที่ขาดแมกนีเซียม เมื่อตรวจดูโครโมโซม พบว่ามีการแตกหักของโครโมโซมมากกว่าปกติ

- อุณหภูมิ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงวันหนึ่ง ๆ ถ้าสูงมาก หรือต่ำมาก อาจมีผลต่ออัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติที่มีอยู่เดิมบริเวณนั้น

- รังสีในสิ่งแวดล้อม ในธรรมชาติมีแหล่งให้รังสีชนิดต่าง ๆ เช่น รังสีจากการสลายตัวของพวก Radionuclide เช่น ยูเรเนียม, ทอเรียม ซึ่งกระจายทั่วไปบนพื้นโลก และปัจจัยอย่างหนึ่งในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังมีรังสีคอสมิกที่มาจากนอกโลกด้วย (สิรินุช, 2540)

2. การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ (Induced mutation)

เป็นการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งมีหลายวิธี (Gottschalk และ Wolff, 1983) คือ

2.1 การใช้รังสี แบ่งเป็น 2 ประเภท

- รังสีที่ก่อให้เกิดไอออนในเซลล์ ได้แก่ รังสีเอกซ์ , แกมมา , คอสมิก , อัลฟา , เบตา , อิเล็กตรอน , โปรตอน , นิวตรอน และ อนุภาคอื่นๆ ที่มีการเคลื่อนที่เร็ว รังสีเหล่านี้มีอำนาจทะลุทะลวงผ่านสิ่งต่างๆ ได้สูง
- รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออนในเซลล์ ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet) รังสีนี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านสิ่งต่างๆ ต่ำกว่ากลุ่มของรังสีที่ก่อให้เกิดไอออนในเซลล์

2.2 การใช้สารเคมี แบ่งตามปฏิกิริยาที่เข้าทำกับดีเอ็นเอ แบ่งเป็น 7 ชนิด

(Milling and Wassom, 1997)

Alkylation สารเคมีกลุ่มนี้จัดว่ามีคุณสมบัติก่อการกลายพันธุ์ได้ดี ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยาแอลคิลเลชันกับหมู่ฟอสเฟตของเบสพิวรีน และไพริมิดีน เช่น Ethyl methane sulphonate (EMS) , Ethyleneimine (EI) และ Diethyl sulphate (DES) เป็นต้น

Arylation สารเคมีกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นพวกสารปฏิชีวนะ และพวก Polycyclic aromatic hydrocarbon เช่น Aflatoxin B1 , Benz (a) pyrene และ Acetylaminofluorene (s-AF) เป็นต้น

Intercalation สารเคมีกลุ่มนี้ทำงานโดยแทรกตัวเข้าไปในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เช่น Actinomycin D , Acridine orange และ Acriflavin เป็นต้น

Base analogue incorporation เป็นกลุ่มของสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายกับนิวคลีโอไทด์เบส สารเคมีในกลุ่มนี้ จะเข้าไปแทนที่เบสจริงเมื่อดีเอ็นเอมีการจำลองตัวเอง เช่น 5-bromouracil (5-BU) เป็นเบส analogue ของไทมีน , 2-Aminopurine เป็นเบส analogue ของ อะดีนีน และกัวนีน

Deamination สารเคมีนี้มีความสามารถในการเคลื่อนย้ายหมู่อะมิโนออกไปจากเบสกวานีน , ไทมีน , ไซโตซีน และอะดีนีนได้ ทำให้คุณสมบัติในการจับคู่เบสต่างไปจากเดิม เช่น Nitrogen acid และ Sodium bisulphate เป็นต้น

Metaphase poison สารเคมีกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการทำงานคล้ายกับ Colchicines มีชื่ออื่นเรียกว่า C-mitotic agent ทำปฏิกิริยาโดยการขัดขวางการเกิดเส้นใยสปินเดิล (Spindle fiber) และขัดขวางการแยกจากกันของโครโมโซม โดยจะรวมกับโปรตีนของไมโครทิวบูล (Microtubules) และยังสามารถเปลี่ยนโครงสร้างของโครโมโซม และเพิ่มจำนวนพลอยดี (Ploidy) ได้ เช่น Hydroquinole และ Vinblastin

Enzyme inhibitor สารเคมีกลุ่มนี้ทำงานโดยขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ เช่น ขัดขวางการสังเคราะห์ไทมีน ทำให้เกิดสภาวะขาดแคลนไทมีน มีผลทำให้เกิดความผิดพลาดในกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ โดยนำเบสอื่นเข้ามาแทนที่ไทมีน เป็นเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ เช่น Caffeine , Azaserine และ Hydroxyurea เป็นต้น

2.3 การเหนี่ยวนำทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการเหนี่ยวนำชักนำให้เกิดแคลลัส หรือเลี้ยงในสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย เมื่อกลุ่มเซลล์ได้พัฒนาเป็นต้นพืช พบว่าพืชที่เกิดใหม่มีลักษณะแตกต่างกันไป แสดงว่าได้เกิดการเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมขึ้น ลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้เรียกว่า Somaclonal variation สามารถคัดเลือกลักษณะที่ดีไปใช้ประโยชน์ในการสร้างพันธุ์ใหม่ได้ (Novak, 1990)

2.4 การกลายพันธุ์เนื่องจากการสอดแทรกของดีเอ็นเอ (DNA insertional-mutation)

ชิ้นส่วนหรือลำดับเบสดีเอ็นเอที่สอดแทรกเข้าไวยังยีนมีผลทำให้การทำงานของยีนเปลี่ยนไป ทำให้ลักษณะฟีโนไทป์ที่ควบคุมยีนนั้นเปลี่ยนแปลงไปด้วย การนำลำดับดีเอ็นเอดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ที่รู้จักทั่วไปคือ

Transposable element ในสิ่งมีชีวิตตั้งแต่แบคทีเรียจนถึงพืช และสัตว์ พบว่ามีระดับดีเอ็นเอที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวน (Replication) และสามารถแยกตัวเองเคลื่อนย้ายไปสอดแทรกลำดับดีเอ็นเอของตัวเองเข้าไยยังตำแหน่งต่างของจีโนมได้ เรียกลำดับของจีโนมนี้ว่า Transposon (Fedoroff, 1982) ตัวอย่างเช่น การเกิด Variegation เป็นลักษณะการเกิดจุดต่างเป็นลายสลับสี หรือ บริเวณกลีบของดอกพิทูเนีย . ดอกกรักเร และการแต้มสีบนเมล็ดข้าวโพด เป็นต้น (Wessler et al., 1995 : Matsubara et al., 2005)

T-DNA ในการที่ T-DNA สามารถสอดแทรกเข้าไปยังจีโนมของพืชที่บุงกรุกได้ ซึ่งบางครั้งอาจสอดแทรกเข้าไประหว่างยีน ซึ่งมีผลการทำงานของยีนนั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางฟีโนไทป์ได้ เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเหนี่ยวนำด้วยรังสี หรือ สารเคมีก่อกลายพันธุ์ ซึ่งในปี 1991 มีรายงานการนำ T-DNA เข้าไปในจีโนมของ *Arabidopsis thaliana* โดยวิธีการบ่มร่วมกันระหว่างเมล็ดที่สกัดกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* พบว่าได้ Transformants มากกว่า 8,000 ชนิด และเป็นพันธุ์กลายที่แท้จริงมากกว่า 1,000 ชนิด (Feldmann, 1991)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์และ สารเคมี

1.1 เครื่องมือ/อุปกรณ์

1.1.1 เครื่องผลิตพลาสมาโดยการดิสชาร์จแบบเหนี่ยวนำด้วยคลื่นวิทยุ

- เครื่องผลิตพลาสมาโดยการดิสชาร์จแบบเหนี่ยวนำด้วยคลื่นวิทยุ ได้รับความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือจาก ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1.1.2 เครื่อง PCR (Thermal cycler)

1.1.3 เครื่อง Electrophoresis

1.1.4 เครื่อง UV

1.1.5 คิวเวต (cuvette)

1.1.6 เครื่อง electroporater

1.1.7 เครื่อง incubator

1.1.8 Holder

1.1.9 เครื่อง Microwave

1.1.10 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)

1.1.11 เครื่องเขย่า (shaker)

1.1.12 เครื่อง spectrophotometer

1.1.13 เครื่อง water bath

1.2 สารเคมี

1.2.1 Plasmid extraction buffer (ภาคผนวก)

1.2.2 ชุดสกัดพลาสมิด Mini kit

1.2.3 Chloroform

1.2.4 Iso-propanal (แช่ตู้เย็น)

1.2.5 Ethanol 70 % (แช่ตู้เย็น)

1.2.6 Master Mix (สำหรับ PCR)

1.2.8 Agarose gel / Agar gel

1.2.9 TBE 1X buffer (ภาคผนวก)

1.2.10 DNA marker (ภาคผนวก)

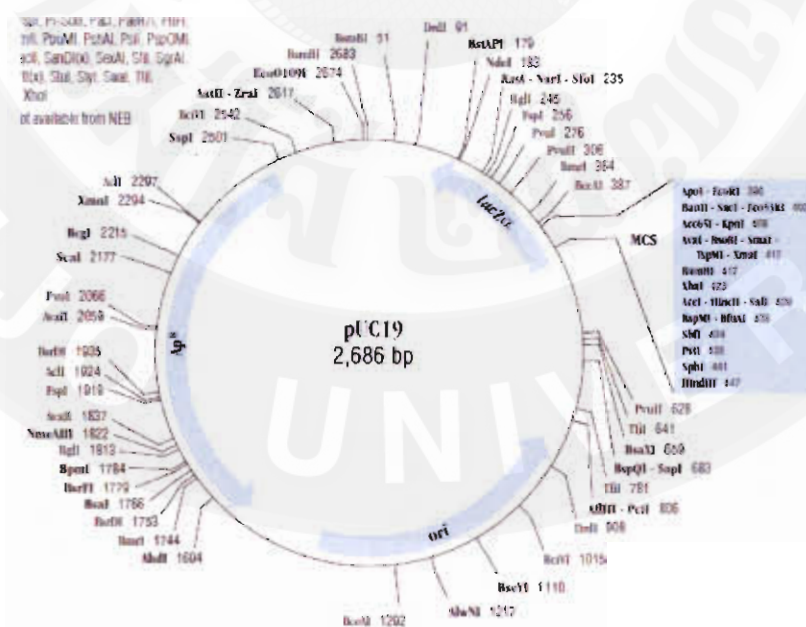
1.2.11 Loading buffer (ภาคผนวก)

1.2.12 Ethidium Bromide (ภาคผนวก)

1.3.1 พลาสมิด pUC19

- จากบริษัท Clontech ซึ่งมีขนาด 2,686 bp โดยมีขึ้น *Amp^r* เป็นขึ้นเครื่องหมายเพื่อใช้ในการคัดเลือก และพลาสมิดดังกล่าวจะมี *LacZ* gene เป็นขึ้นรายงานผล ที่จะมี การแสดงออกของ β -galactosidase ซึ่งมีลักษณะฟีโนไทป์เป็นสีน้ำเงิน

- ทำการตัดชิ้นส่วนของ *LacZ* gene จากพลาสมิด pUC19 ด้วยเอนไซม์ตัด me (*NdeI* / *HindIII*) ซึ่งจะได้ชิ้นส่วนของ *LacZ* gene โดยมีขนาดเท่ากับ



ภาพ 7 พลาสมิด pUC19

2. วิธีการทดลอง

- แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

2.1 การใช้พลาสมา pUC19 ไปเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยพลาสมา

2.1.1 การเตรียมพลาสมา pUC19

เริ่มจากการลงเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pUC19 ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาประมาณ 16 – 18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการเขย่ามาสกัดพลาสมิดด้วยชุด kit (วิธีการตามข้อ 8) แล้ววัดความเข้มข้นของพลาสมิด ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นที่ 260 นาโนเมตร (ปริมาณที่ใช้ 3 ไมโครกรัม)

2.1.2 ทำการดูดสารละลายพลาสมิด pCU19 ลงใน holder ทั้ง 9 หลุมแล้วทำให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อประมาณ 30 นาที และนำเข้าสู่เครื่องพลาสมา โดยใช้สภาวะเงื่อนไขดังนี้

สภาวะเงื่อนไขที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยพลาสมา

- Gas = Nitrogen (N_2)
- Flow rate = 4.00 sccm
- RF power = 50 watt
- Frequency = 50 Hz
- Phuse leugth = 10 μ s

ตาราง 1 แสดงสภาวะในการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมาที่ใช้พลาสมิด pUC19

Dose (ion / cm^2)	Bias (kV)	Time (min)
1×10^{15}	2.5	6.30
2×10^{15}	2.5	19.08
2×10^{15}	3.5	17.16
2×10^{15}	5.0	26.14
4×10^{15}	2.5	38.17

2.1.3 ทำการละลายพลาสติกที่อยู่บน holder ด้วยน้ำ dH₂O

2.1.4 ทำการส่งถ่ายพลาสติกที่ผ่านการชักนำด้วยพลาสติกเข้าสู่ *E. coli*

สายพันธุ์ DH5 α

2.1.5 นับจำนวนโคโลนีสีขาวและสีน้ำเงิน ทำการบันทึกเพื่อนำไป

คำนวณความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์เพื่อใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่าง Dosage และ Bias

2.1.6 การคัดเลือกโคโลนีสีขาวด้วยเทคนิค Colonies PCR โดยวิธีการคือ

- ทำการ pick single colony นำไปเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเป็นระยะเวลา 1 – 2 ชั่วโมงในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ซึ่งจะใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR โดยตั้งโปรแกรมดังตาราง

ตาราง 2 แสดงการตั้งโปรแกรมการเกิดปฏิกิริยา

ขั้นตอน (Step)	อุณหภูมิ (Temperature : °C)	เวลา (Time)
- Warm up	94	2 นาที
- 3 Step cycling		
Denaturation	94	30 วินาที
Primer annealing	65	30 วินาที
Primer extention (35 cycle)	72	45 วินาที
- Final extention	72	5 นาที

- เตรียม Master Mix โดยสารละลายตามลำดับดังตาราง

ตาราง 3 Master Mix ของปฏิกิริยา PCR

องค์ประกอบ (Component)	ความเข้มข้นเริ่มต้น (Stock)	ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration)
Taq buffer	10X	1X
MgCl ₂	25 มิลลิโมล	2.5 มิลลิโมล
dNTP (Mix)	10 มิลลิโมล	0.2 มิลลิโมล
Primers	100 ไมโครโมล	10 ไมโครโมล
Taq DNA polymerase	0.5 ยูนิต / ไมโครลิตร	0.4 ไมโครลิตร
dH ₂ O		
Total volume / rxn		19 ไมโครลิตร

ตาราง 4 แสดงรายชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค Colonies PCR

รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' → 3'
pUC19 Forward primer	GCT TGT CTG TAA GCG GAT GC
pUC19 Reverse primer	GCG GGC AGT GAG CGC AAC GC

- เติม DNA template ของแต่ละตัวอย่างจำนวน 1 ไมโครลิตร ต่อปฏิกิริยา แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (Shaker) 10 – 20 วินาที แล้วใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วต่ำ 4 – 5 วินาที

- นำไปใส่เครื่อง PCR แล้วกดเครื่องให้ทำงาน

2.1.7 นำ PCR product ไปตรวจสอบโดยเทคนิค Gel electrophoresis หรือ เก็บไว้ในตู้ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปตรวจสอบ

2.1.8 นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่คัดเลือกด้วยเทคนิค Colonies PCR ไปลงในอาหาร LB 3 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาประมาณ 16 – 18 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยชุด kit โดยมีวิธีการดังนี้

- นำเชื้อที่ผ่านการเขย่าเทใส่ eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้ง

- เติม PD1 buffer (เพิ่ม RNase A) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่อง vortex (อย่าเขย่าแรง) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

- เติม PD2 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน (อย่าใช้เครื่อง vortex) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

- เติม PD3 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน (อย่าใช้เครื่อง vortex) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 3 นาที

- เตรียม PD column ปริมาตรขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วดูดสารละลายส่วนใสจากขั้นตอนที่ 8.4 ลงใน PD column และ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 30 วินาที

- เติม W1 buffer ลงใน PD column ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเติม Wash Buffer (เพิ่ม ethanol) ปริมาตร

600 ไมโครลิตร ลงใน PD column และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 30 วินาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge อีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้แห้ง

- ข้าย PD column ที่แห้งแล้วใส่ลงใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่

- เติม Elution Buffer หรือ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ column แล้วคั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที หรือจนกว่า Elution Buffer หรือ TE จะดูดซับหมด และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 2 นาที ซึ่งจะได้สารละลายชิ้นส่วนของ *LacZ gene*

2.1.9 ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) โดยส่งตัวอย่างพลาสมิดไปยัง First BASE Laboratories , Malaysia เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และใช้โปรแกรม CLUSTALW ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

2.2 การเหนี่ยวนำ *LacZ* gene ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยพลาสมา

2.2.1 การเตรียม *LacZ* gene

ทำการตัดชิ้นส่วนของ *LacZ* gene จากพลาสมิด pUC19 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) คือ *NdeI* / *HindIII* แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนำไปตรวจสอบโดยทำ Gel electrophoresis ซึ่งจะให้เห็นส่วนของ *LacZ* gene ที่มีขนาดเท่ากับ 264 bp เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอ marker (*Lambda* / *PstI*) เมื่อส่องภายใต้เครื่อง UV แล้วทำการแยกชิ้นส่วนดังกล่าวออกจากเจล โดยมีวิธีการคือ

- ตัดแถบชิ้นส่วนของ *LacZ* gene ออกจากเจลใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- เติม TBE Conversion Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม Binding Buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงใน eppendorf tube ที่มีเจลอยู่ และนำไปบ่มด้วยเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีหรือจนกว่าเจลจะละลาย
- เติม silica powder suspension ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มด้วยเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยทำ 2 – 3 ครั้ง
- นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 5 วินาที และเทสารละลายส่วนใสทิ้ง ซึ่งจะเหลือแต่ตะกอนของ silica powder และเติม washing buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ละลายตะกอน silica powder กับ washing buffer ด้วยเครื่องเขย่า และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 5 วินาที และเทสารละลายส่วนใสทิ้ง โดยทำขั้นตอนนี้ 3 ครั้ง
- เมื่อเสร็จขั้นตอนสุดท้ายของวิธีที่ 1.4 แล้วผึ่งตะกอน silica powder ให้แห้งประมาณ 10 – 15 นาที
- เติม deionized water (dH_2O) หรือ TE และนำไปบ่มด้วยเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 30 วินาที และดูดสารละลายส่วนใสใส่ eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.2.2 ทำการดูดสารละลายของ *LacZ* gene (ปริมาณที่ใช้ 2 ไมโครกรัม) ลงใน holder ทั้ง 9 หลุมและทำให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อประมาณ 30 นาที แล้วนำเข้าเครื่องพลาสมาตามเงื่อนไขดังนี้

สภาวะเงื่อนไขที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยพลาสมา

- Gas = Nitrogen (N_2)
- Flow rate = 4.00 sccm
- RF power = 50 watt
- Bias voltage = 2.5 kV
- Frequency = 50 Hz
- Phuse leugth = 10 μ s

ตาราง 5 แสดงสภาวะในการเหนี่ยวนำชิ้นส่วนของ *LacZ* gene ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยพลาสมา

Dose (ion / cm^2)	Bias (kV)	เวลา (Time)
5×10^{14}	2.5	3.00 นาที
1×10^{15}	2.5	7.00 นาที
2×10^{15}	2.5	14.08 นาที
2×10^{15}	3.5	19.08 นาที
2×10^{15}	5.0	21.28 นาที

2.2.3 นำชิ้นส่วนของ *LacZ* gene ที่ผ่านการชักนำด้วยพลาสมาแล้ว ทำการละลายด้วยน้ำ dH_2O (20 ไมโครลิตร)

2.2.4 นำชิ้นส่วนของ *LacZ* gene ที่ผ่านการชักนำด้วยพลาสมา มาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ (vector) ด้วยปฏิกิริยา Ligation โดยบ่มในเครื่อง PCR ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และทำการส่งถ่ายดีเอ็นเอสายผสม (Recombinant DNA) เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

2.2.5 นับจำนวนโคโลนีสีขาวและสีน้ำเงิน ทำการบันทึกเพื่อนำไปคำนวณความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์เพื่อใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่าง Dose และ Bias

2.2.6 การคัดเลือกโคโลนีสีขาวด้วยเทคนิค Colonies PCR โดยวิธีการมีดังนี้

- ทำการ pick single colony นำไปเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเป็นระยะเวลา 1 – 2 ชั่วโมงในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ซึ่งจะใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR โดยตั้งโปรแกรมดังตาราง

ตาราง 6 แสดงการตั้งโปรแกรมการเกิดปฏิกิริยา

ขั้นตอน (Step)	อุณหภูมิ (Temperature : °C)	เวลา (Time)
- Warm up	94	2 นาที
- 3 Step cycling		
Denaturation	94	30 วินาที
Primer annealing	65	30 วินาที
Primer extension (35 cycle)	72	45 วินาที
- Final extension	72	5 นาที

- เตรียม Master Mix โดยสารละลายตามลำดับดังตาราง

ตาราง 7 Master Mix ของปฏิกิริยา PCR

องค์ประกอบ (Component)	ความเข้มข้นเริ่มต้น (Stock)	ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration)
Taq buffer	10X	1X
MgCl ₂	25 มิลลิโมล	2.5 มิลลิโมล
dNTP (Mix)	10 มิลลิโมล	0.2 มิลลิโมล
Primers	100 ไมโครโมล	10 ไมโครโมล
Taq DNA polymerase	0.5 ยูนิต / ไมโครลิตร	0.4 ไมโครลิตร
dH ₂ O		
Total volume / rxn		19 ไมโครลิตร

ตาราง 8 แสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค Colonies PCR

รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'→ 3'
Forward primer	GCT TGT CTG TAA GCG GAT GC
Reverse primer	GCG GGC AGT GAG CGC AAC GC

- เติม DNA template ของแต่ละตัวอย่างจำนวน 1 ไมโครลิตร ต่อปฏิกิริยา แล้วผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องผสม (Shaker) 10 – 20 วินาที แล้วใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วต่ำ 4 – 5 วินาที

- นำไปใส่เครื่อง PCR แล้วกดเครื่องให้ทำงาน

2.2.7 นำ PCR product ไปตรวจสอบโดยเทคนิค Gel electrophoresis หรือ เก็บไว้ในตู้ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปตรวจสอบ

2.2.8 นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่คัดเลือกด้วยเทคนิค Colonies PCR ไปลงในอาหาร LB 3 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน เพื่อทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุด kit

2.2.9 ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) โดยส่งตัวอย่างพลาสมิดไปยัง First BASE Laboratories , Malaysia เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และใช้โปรแกรม CLUSTALW ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิธีการคำนวณความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ (Mutation frequency)

$$\text{Mutation frequency} = \frac{\text{No. of white colonies (mutant)}}{\text{Total No. of colonies (blue \& white)}} \times 100$$

วิธีคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความถี่ของรูปแบบการกลายพันธุ์

ซึ่งรูปแบบการกลายพันธุ์แบ่งเป็น 4 ประเภทคือ Transition , Transversion , Deletion และ Insertion โดยจำนวนที่เกิดขึ้น (Number of occurrence) ทำการนับที่ละตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงในโคลนที่เป็น mutant เปรียบเทียบกับ control และบันทึกจำนวนตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด เพื่อใช้ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความถี่ของรูปแบบการกลายพันธุ์ (ดังสมการด้านล่าง)

$$\text{Frequency (\%)} = \frac{\text{Number of occurrence}}{\text{Total No. of occurrence}} \times 100$$

บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของการระดมยิงพลาสมาต่อดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอที่ใช้คือ พลาสมิด pUC19 และชิ้นส่วนของ *LacZ* gene โดยก๊าซที่ใช้คือ ก๊าซไนโตรเจน จากการทดลองได้ศึกษาผลของพลาสมาต่อดีเอ็นเอ และบันทึกจำนวนโคโลนีทั้งหมด (ทั้งโคโลนีสีน้ำเงินและสีขาว) ,ลักษณะทางฟิโนไทป์ , วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส และผลของพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) ต่อชนิดของเบส

1. ผลของพลาสมาต่อพลาสมิด pUC19

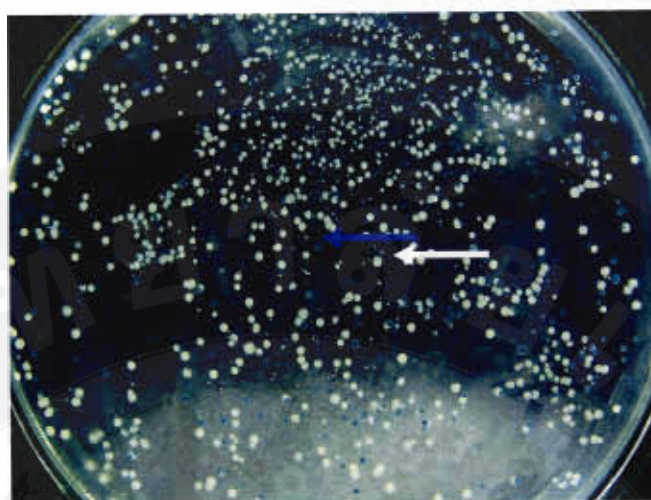
จากการนำพลาสมิด pUC19 ไปเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา โดยแสดงสภาวะเงื่อนไขในตารางที่ 9 ซึ่งเป็นการกำหนด dosage และ bias ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์

ตาราง 9 แสดงสภาวะในการเหนี่ยวนำพลาสมิด pUC19 ด้วยพลาสมา

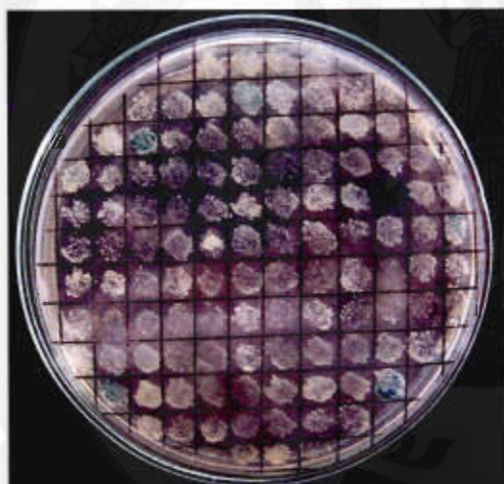
Dosage (ion / cm ²)	Bias (-kV)	Time (min)
1x10 ¹⁵	2.5	6.30
2x10 ¹⁵	2.5	19.08
2x10 ¹⁵	3.5	17.16
2x10 ¹⁵	5.0	26.14
4x10 ¹⁵	2.5	38.17

1.1 การคัดเลือกโคโลนีสีขาวจากการนำพลาสมิด pUC19 ไปเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา

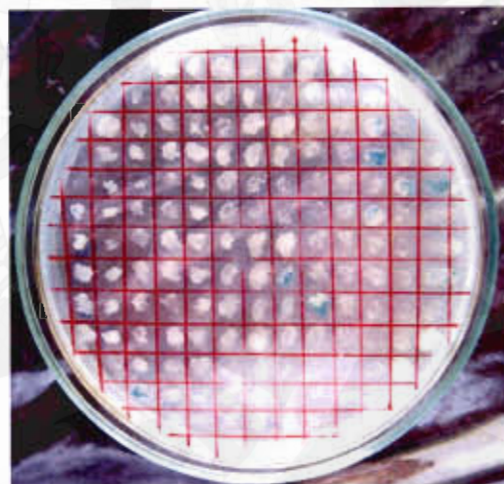
หลังจากการนำพลาสมิด pUC19 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา ส่งถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* (DH5 α) ซึ่งจากการสังเกตลักษณะทางฟิโนไทป์พบทั้งโคโลนีสีน้ำเงินและสีขาวกระจายอยู่บนเพลท ดังภาพ 8A และทำการเลือกโคโลนีสีขาวไป re-streak เป็นจำนวน 5 ร่อง เพื่อสังเกตความเสถียรของโคโลนีสีขาว และทำการบันทึกจำนวนโคโลนีทั้งหมด ดังตาราง 11 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง dosage และ bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์



(A)



(B)



(C)

ภาพ 8 การคัดเลือกโคโลนีสีขาวจากการนำพลาสมิด pUC19 ไปเหนี่ยวนำด้วยพลาสติก

(A) คือ ภาพการกระจายของโคโลนีสีน้ำเงินและสีขาวจากการส่งถ่ายพลาสมิด pUC19 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยพลาสติกเข้าสู่แบคทีเรีย (บริเวณลูกศรสีขาวคือ โคโลนีสีขาว และบริเวณลูกศรสีน้ำเงินคือ โคโลนีสีน้ำเงิน)

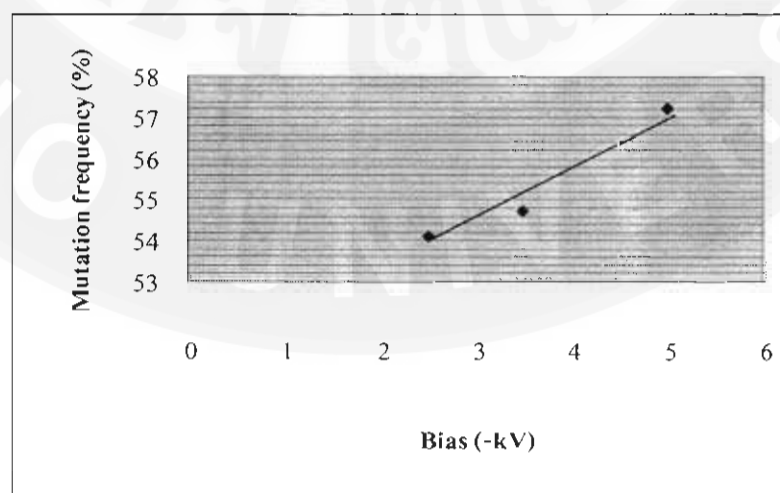
(B , C) คือ ภาพการคัดเลือกโคโลนีสีขาวมา re-streak เป็นจำนวน 5 รูน

1.2 ความสัมพันธ์ระหว่าง Dosage กับ Bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ที่ใช้พลาสมิด pUC19 เหนี่ยวนำด้วยพลาสมา

จากการบันทึกจำนวนโคโลนีทั้งหมด (ทั้งโคโลนีสีน้ำเงินและสีขาว) เพื่อใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่าง dosage กับ bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation frequency) โดยตาราง 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง dosage กับ bias ซึ่งเป็นสภาวะที่ใช้ในการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา โดยใช้พลาสมิด pUC19 พบว่าในเงื่อนไขที่ dosage : 2×10^{15} ions/cm² คงที่ และ bias 2.5 , 3.5 และ 5.0 kV สามารถทำให้ความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation frequency) นั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามสภาวะเงื่อนไขที่มีการเพิ่มของ bias (ภาพ 9)

ตาราง 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง dosage กับ bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ในสภาวะเงื่อนไขที่มีการกำหนด dosage : 2×10^{15} ions/cm² คงที่ และ bias : 2.5 , 3.5 และ 5.0 kV

Dosage ions / cm ²	Bias (-kV)	Total No. of observed colonies	No. of white colonies (mutant)	Mutation frequency (%)
2×10^{15}	2.5	2896	1568	54.1
2×10^{15}	3.5	3023	1655	54.7
2×10^{15}	5.0	3222	1842	57.2

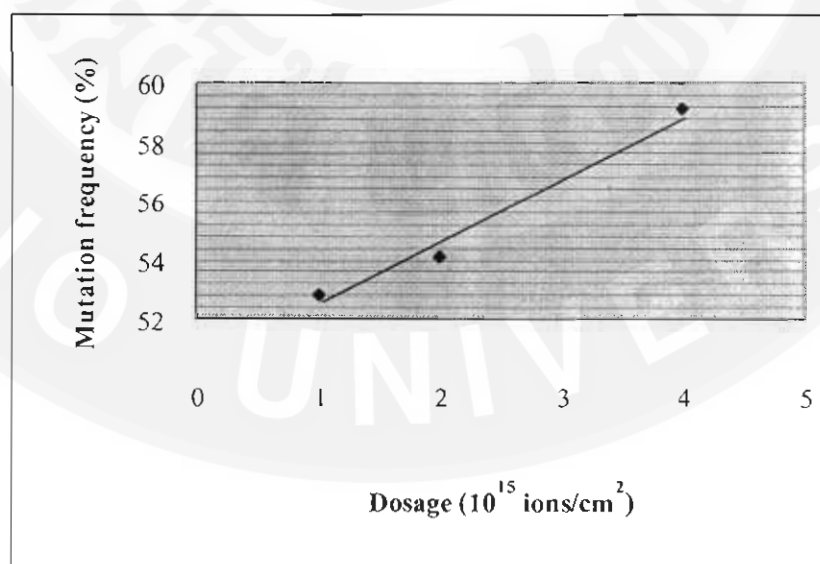


ภาพ 9 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง Dosage : 2×10^{15} ions / cm² (คงที่) กับ Bias 2.5 , 3.5 และ 5.0 kV

ส่วนในสถานะเงื่อนไขการใช้ dosage : 1×10^{15} , 2×10^{15} และ 4×10^{15} ions / cm² และ bias 2.5 kV (คงที่) ดังตาราง 11 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง dosage กับ bias พบว่าส่งผลต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation frequency) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามสถานะเงื่อนไขที่มีการเพิ่มของ dosage (ภาพ 10) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับการเพิ่ม bias

ตาราง 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Dosage กับ Bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ในสถานะเงื่อนไขที่มีการกำหนด dosage : 1×10^{15} , 2×10^{15} และ 4×10^{15} ions/cm² และ bias : 2.5 kV (คงที่)

Dosage ions / cm ²	Bias (-kV)	Total No. of observed colonies	No. of white colonies (mutant)	Mutation frequency (%)
1×10^{15}	2.5	2249	1188	52.8
2×10^{15}	2.5	2896	1568	54.1
4×10^{15}	2.5	2681	1584	59.1



ภาพ 10 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง Dosage : 1×10^{15} , 2×10^{15} และ 4×10^{15} ions / cm² กับ Bias 2.5 kV (คงที่)

1.3 การเปรียบเทียบลำดับเบสของพลาสมิด pUC19 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วย

พลาสมา

หลังจากการคัดเลือกโคโลนีสีขาวพร้อมกับ subculture โคโลนีสีขาว 5 รุ่น และสกัด พลาสมิดที่ได้คัดเลือก เพื่อส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท First base ที่ประเทศมาเลเซีย โดยส่งพลาสมิดไปหาลำดับเบสเป็นจำนวน 35 โคลน โดยได้ใช้สัญลักษณ์แทนแต่ละโคลนคือ P (P1-P35) และเมื่อได้ข้อมูลแล้วนำมาวิเคราะห์ 2 โคลน (P1 , P2)

โดยภาพที่ 11 เป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ P1 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบตำแหน่ง promoter (บริเวณขีดเส้นใต้) , ตำแหน่ง start codon จนถึงตำแหน่ง stop codon ซึ่งเป็นส่วนของ *LacZ* gene ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส โดยไม่สอดคล้องกับลักษณะของฟีนอไทป์ที่ปรากฏขึ้นที่มีโคโลนีเป็นสีขาว ซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในบริเวณอื่นของพลาสมิด pUC19 ทำให้ส่งผลต่อลักษณะของโคโลนีของแบคทีเรียเป็นสีขาวส่วนโคลนอื่นๆ เมื่อมีการวิเคราะห์ลำดับเบสก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุเดียวกัน

	Plac promoter -35	Plac promoter -10	
pUC19	CATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTG		540
P1	CATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTG		540

	Start codon →		
pUC19	AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGT		600
P1	AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGT		600

pUC19	ACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTT		660
P1	ACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTT		660

pUC19	ACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCGACACATCC		720
P1	ACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCGACACATCC		720

pUC19	CCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTT		780
P1	CCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTT		780

pUC19	GCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGG		840
P1	GCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGG		840

	Stop codon		
pUC19	TATTTACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG		895
P1	TATTTACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG		895

ภาพ 11 การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ P1

ภาพ 12 เป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ P2 ในตำแหน่งของ promoter (บริเวณขีดเส้นใต้), ตำแหน่ง start codon จนถึงตำแหน่ง stop codon ซึ่งเป็นส่วนของ *LacZ* gene พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในบริเวณของ *LacZ* gene ทั้งหมด 131 ตำแหน่ง โดยจะแสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสดังตาราง 12 ซึ่งเป็นการแสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของพลาสมิด pUC19 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในบริเวณ *LacZ* gene ของโคลน P2 นี้ จะส่งผลต่อลักษณะทางฟีโนไทป์ที่เกิดขึ้นที่ทำให้โคโลนีของแบคทีเรียเป็นสีขาว

	Plac promoter -35	Plac promoter -10	
P2	<u>TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTT</u> GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTC		60
pUC19	<u>TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTT</u> GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTC		60

	Start codon	→	
P2	CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAG		120
pUC19	CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAG		120

P2	AGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT-----CGCTGGTGCGTAACGCCAGCTCCA--		169
pUC19	AGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGG		180
	*****	** * *	*****
P2	-----TCTGATTTTCTTCCATCAACGAGGCTTTGAGTGTATCCAGCAATTTGCGGATTAC		224
pUC19	AAAACCCCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGC		240
	** * * * *	** * *	** * *
P2	CTCAATGTTATCAG--CTTCATCAAGGTCTTCATAAAACAGTTCCGCCGACGGG-----		276
pUC19	GTAATAGCGAAGAGGCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCG		300
	* * * * *	*****	* * * *
P2	-----CTGATA-----TTTCCCTTTAACCATACGTCCAG-----CATAT		310
pUC19	AATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATAT		360
	*****	*****	*****
	Stop codon		
P2	GGTGAACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG		348
pUC19	GGTGAACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG		398

ภาพ 12 การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ P2

บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ บริเวณ โปรโมเตอร์ของ Plac promoter -35 และ Plac promoter -10

1.4 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของพลาสมิด pUC19 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยฟลาสมา

จากการวิเคราะห์ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบ Transition 28 % แบบ Transversion 34 % ในขณะที่ พบการเปลี่ยนแปลงแบบ Deletion คิดเป็น 38 % จึงสรุปได้ว่าใน P2 พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบ Deletion มากที่สุด ดังตาราง 12

ตาราง 12 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของพลาสมิด pUC19 ที่ตำแหน่งของ *LacZ* gene ของโคลน P2

Mutational type	Number of occurrence	Frequency (%)
Transition	36	28
A → G	4	3
G → A	7	5
C → T	17	13
T → C	8	7
Transversion	45	34
A:G → C:T	21	16
C:T → A:G	24	18
Deletion	50	38
-A	12	9
-G	16	12
-C	13	10
-T	9	7
Total	131	100

1.5 ผลของไอออนพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) ต่อชนิดของเบสของ พลาสมิด pUC19 ที่ตำแหน่ง ของ *LacZ* gene

จากการวิเคราะห์ผลของไอออนพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) ที่ sensitivity ต่อเบสของ พลาสมิด pUC19 ของโคลน P2 ที่ตำแหน่งของ *LacZ* gene พบว่าเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) มากที่สุดคือ เบส Cytosine (C) โดยคิดเป็น 33 % ซึ่งมากกว่าเบส G > T > A ตามลำดับ ดังตาราง 13

ตาราง 13 แสดงผลของเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) ในโคลน P2

เบส (Base)	No. base change occurred	Radiosensitivity (%)
A	24	18
G	36	27
*C	43	33
T	28	22

หมายเหตุ : * คือ เบสที่ sensitivity ต่อไอออนของพลาสมามากที่สุด

2. ผลของพลาสมาต่อ *LacZ* gene

จากการนำ *LacZ* gene ไปเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา โดยแสดงสถานะเงื่อนไขในตารางที่ 14 ซึ่งเป็นการกำหนด dosage และ bias ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์

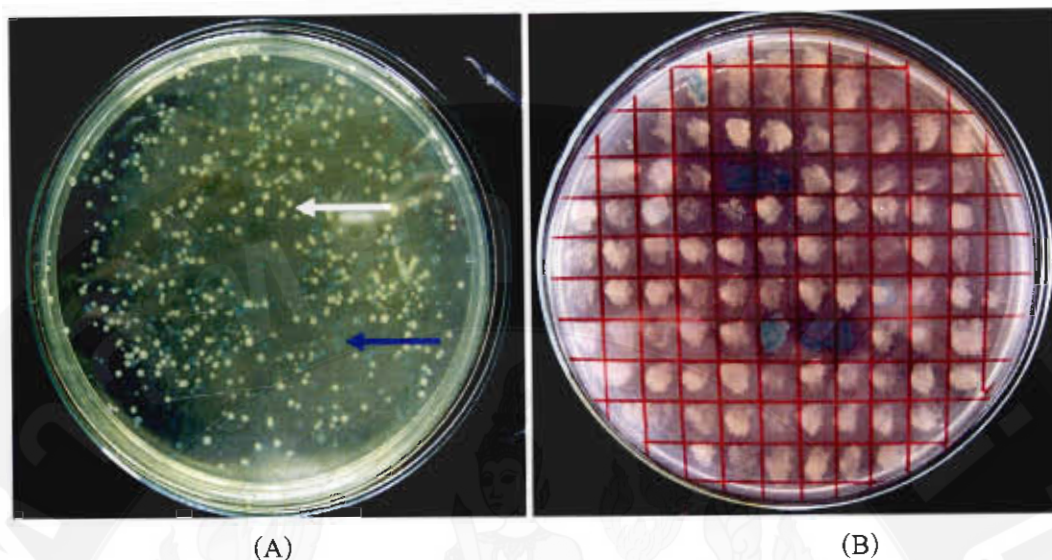
ตาราง 14 แสดงสถานะในการใช้ *LacZ* gene ที่เหนี่ยวนำด้วยพลาสมา

Dosage (ion / cm ²)	Bias (-kV)	Time (min)
5x10 ¹⁴	2.5	7.00
1x10 ¹⁵	2.5	14.08
2x10 ¹⁵	2.5	19.08
2x10 ¹⁵	3.5	21.28
2x10 ¹⁵	5.0	38.17

2.1 การคัดเลือกโคโลนีสีขาวจากการนำ *LacZ* gene ไปเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา

หลังจากนำ *LacZ* gene ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา และนำมาเชื่อม (ligation) กับดีเอ็นเอพาหะ (vector) และส่งถ่ายเข้าสู่สายแบคทีเรีย *E. coli* (DH5 α) พบว่า สังเกตเห็นโคโลนีสีน้ำเงินและสีขาว และคัดเลือกโคโลนีสีขาว (ดังภาพ 13A และ 13B) ไป re-streak เป็นจำนวน 5 รูน เพื่อสังเกตความเสถียรของโคโลนีสีขาว และทำการบันทึกจำนวนโคโลนีทั้งหมด เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง dosage และ bias ค่อดัชนีของการเกิดการกลายพันธุ์

จากผลการเหนี่ยวนำ *LacZ* gene ด้วยพลาสมา พบว่าพลาสมามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสใน *LacZ* gene ซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกในระดับฟีโนไทป์ ดังภาพ 13 ซึ่งจะสังเกตเห็นโคโลนีสีขาว (ลูกศรชี้สีขาว) กระจายกับโคโลนีสีน้ำเงิน (ลูกศรชี้สีน้ำเงิน) และคัดเลือกโคโลนีสีขาวพร้อมกับการ subculture



ภาพ 13 การคัดเลือกโคโลนีสีขาวจากการนำ *LacZ* gene ไปเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา

(A) คือ ภาพการกระจายของโคโลนีสีน้ำเงินและสีขาวจากการส่งถ่าย *LacZ* gene ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมาเข้าสู่แบคทีเรีย (บริเวณลูกศรชี้สีขาวคือ โคโลนีสีขาว, บริเวณลูกศรชี้สีน้ำเงินคือโคโลนีสีน้ำเงิน)

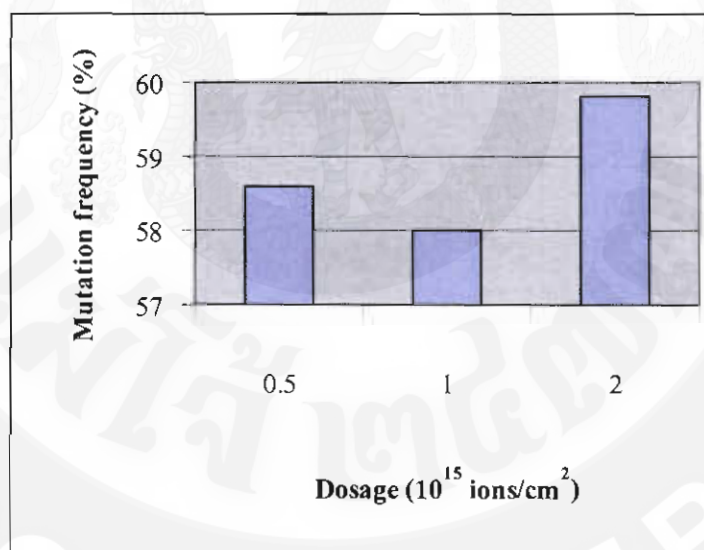
(B) คือ ภาพการคัดเลือกโคโลนีสีขาวมา re-streak เป็นจำนวน 5 ร่อง

2.2 ความสัมพันธ์ระหว่าง Dosage กับ Bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ที่ใช้ *LacZ* gene ไปการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา

จากการบันทึกจำนวนโคโลนีทั้งหมด (ทั้งโคโลนีสีน้ำเงินและสีขาว) เพื่อใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่าง dosage กับ bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation frequency) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ดังตาราง 15 โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง dosage กับ bias ซึ่งเป็นสถานะที่ใช้ในการเหนี่ยวนำ *LacZ* gene ด้วยพลาสมา พบว่าในเงื่อนไขที่กำหนดการใช้ dosage : 5×10^{14} , 1×10^{15} และ 2×10^{15} ions / cm² และ bias 2.5 kV (คงที่) ซึ่งเป็นการเพิ่ม dosage จะเห็นว่าความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ที่ dosage : 5×10^{14} , 1×10^{15} และ 2×10^{15} เท่ากับ 58.6 , 58.0 และ 60.0 % ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ในการทดลองที่ใช้ *LacZ* gene ไปเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา ในสถานะเงื่อนไขที่มีการเพิ่ม dosage ให้ผลไม่แตกต่างกัน ดังภาพ 14

ตาราง 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง dose กับ bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ใน
สถานะเงื่อนไขที่มีการกำหนด dosage : 5×10^{14} , 1×10^{15} และ 2×10^{15} ions/cm² และ bias :
2.5 kV (คงที่)

Dosage ions / cm ²	Bias (-kV)	Total No. of observed colonies	No. of white colonies (mutant)	Mutation frequency (%)
5×10^{14}	2.5	1013	594	58.6
1×10^{15}	2.5	1128	653	58.0
2×10^{15}	2.5	1725	1031	59.8



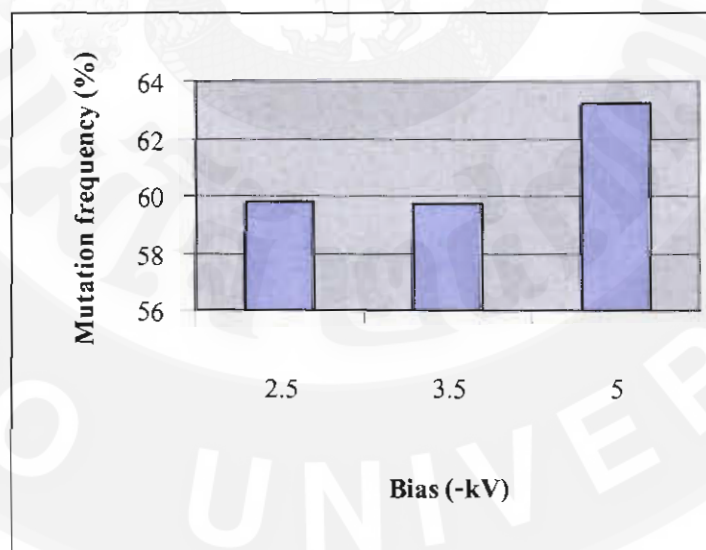
ภาพ 14 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง Dosage : 5×10^{14} , 1×10^{15} และ 2×10^{15} ions / cm²
กับ Bias 2.5 kV (คงที่)

ในขณะเงื่อนไขที่ใช้ dosage : 2×10^{15} ions / cm² คงที่ และใช้ Bias 2.5 , 3.5 และ 5.0kV ซึ่งเป็นการเพิ่ม bias จะเห็นว่าความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ที่ bias : 2.5 , 3.5 และ 5.0 kV เท่ากับ 59.8 , 59.7 และ 63.2 % ซึ่งจะเห็นว่าความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ในการทดลองที่

ใช้ *LacZ* gene ไปเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา ในสภาวะเงื่อนไขที่มีการเพิ่ม bias (ดังภาพ 15) ให้ผลไม่แตกต่างกัน ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับสภาวะเงื่อนไขที่มีการเพิ่ม dosage

ตาราง 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Dosage กับ Bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ในสภาวะเงื่อนไขที่มีการกำหนด dosage : 2×10^{15} ions/cm² (คงที่) และ bias : 2.5 , 3.5 และ 5.0 kV

Dosage ions / cm ²	Bias (kV)	Total No. of observed colonies	No. of white colonies (mutant)	Mutation frequency (%)
2×10^{15}	2.5	1725	1031	59.8
2×10^{15}	3.5	970	579	59.7
2×10^{15}	5.0	964	610	63.2



ภาพ 15 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่าง Dosage : 2×10^{15} ions/cm² (คงที่) กับ Bias 2.5 , 3.5 และ 5.0 kV

2.3 การเปรียบเทียบลำดับเบสของ *LacZ* gene ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วย

พลาสมา

หลังจากการคัดเลือกโคโลนีสีขาวพร้อมกับ subculture โคโลนีสีขาว 5 รุ่ง และ สกัดพลาสมิดที่ได้คัดเลือกและเพื่อส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First base ประเทศมาเลเซีย โดยส่งไปหาลำดับเบสเป็นจำนวน 25 โคลน โดยได้ใช้สัญลักษณ์แทนแต่ละโคลนคือ L (L1-L25) และเมื่อได้ข้อมูลแล้วนำมาวิเคราะห์เป็นจำนวน 5 โคลนคือ L1 , L6 , L10 , L18 และ L20 ซึ่งภาพที่ 16 เป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ โคลน L6 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสดำแหน่งที่ 136 (บริเวณขีดเส้นใต้) ของ *LacZ* gene ซึ่งเกิดการกลายพันธุ์แบบ deletion ของเบส C ทำให้เกิด frame-shift ขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดการกลายพันธุ์

L6 : Nucleotide sequence

L6	ATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGG	60
pUC19	ATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGG	60

<i>HindIII</i>		
L6	CATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTT	120
pUC19	CATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTT	120

136		
L6	ACCCAACCTTAATCGC-TTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG	179
pUC19	ACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG	180

L6	GCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATG	239
pUC19	GCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATG	240

<i>NdeI</i>		
L6	CGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGT	299
pUC19	CGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGT	300

L6	ACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG	323
pUC19	ACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG	324

ภาพ 16 การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ L6

บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ บริเวณเบส C หายไปที่ตำแหน่ง 136 บริเวณของ *LacZ* gene เมื่อเทียบกับ pUC19 (control)

ภาพที่ 17 เป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ โคลน L20 พบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่งจุดตัด เอนไซม์ *Hind*III (บริเวณขีดเส้นใต้) ที่ตำแหน่ง 71 ของ *LacZ* gene ซึ่งเกิดการกลายพันธุ์แบบ deletion ของเบส T ทำให้เกิด frame-shift ขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดการกลายพันธุ์

L20 : Nucleotide sequence

L20	ATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGG	60
pUC19	ATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGG	60

<i>Hind</i> III		
L20	CATGCAAGCTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTT	119
pUC19	CATGCAAGCTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTT	120

L20	ACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG	179
pUC19	ACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG	180

L20	GCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATG	239
pUC19	GCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATG	240

<i>Nde</i> I		
L20	CGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGT	299
pUC19	CGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGT	300

L20	ACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG	323
pUC19	ACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG	324

ภาพ 17 การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ L20

บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ บริเวณที่เบส T หายไปในบริเวณจุดตัดของเอนไซม์ *Hind*III ที่ตำแหน่ง 71 ที่บริเวณของ *LacZ* gene เมื่อเทียบกับ pUC19 (control)

ภาพ 18 เป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ L1 โดยมีการเปรียบเทียบเฉพาะส่วนของ *LacZ* gene ในตำแหน่งของ start codon จนถึงตำแหน่งของ stop codon ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสทั้งหมด 143 ตำแหน่ง ซึ่งแสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับในตารางที่ 17

L1: Nucleotide sequence

	Start codon	
L1	ATG ACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGG	60
pUC19	ATG ACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGG	60

L1	CATGCAAGCTTGCAGTGCTGAATTATAGCTATCGATTTTATCTTGAGGCTGAGCTCTTGG	120
pUC19	CATGCAAGCTTG--GCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGG--AAAACCCCTGG	116
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * *	
L1	TAAAAACTTATAGCAAACTCATAAAAAATTAAACAGAAGCTCTGAAGACCTTGTATTTTT	180
pUC19	CGTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCC---CTTTCGCCAGCTGGCGTAAT-	171
	* *	
L1	ATCAAATAATACCCCTTGAACCTATTACAAACGCATCTTTTTTTCTTGAATATCTAT	240
pUC19	AGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAG---TTGCGCAGCCTGAATGGCGAA	228
	* *	
L1	GGGGTGTTCTTTGACTCTGACAAAGATGAAATCTCATC--TATTTTGTTTT-CATATGG	297
pUC19	TGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGG	288
	** *	
	Stop codon	
L1	TGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGC ATAG	333
pUC19	TGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGC ATAG	324

ภาพ 18 การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ L1

ภาพที่ 19 เป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ L10 โดยมีการเปรียบเทียบเฉพาะส่วนของ *LacZ* gene ในตำแหน่งของ start codon จนถึงตำแหน่ง stop codon ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสทั้งหมด 126 ตำแหน่ง ซึ่งแสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับในตารางที่ 18

L10 : Nucleotide sequence

Start codon

L10	ATG ACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGG 60
pUC19	ATG ACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGG 60

L10	CATGCAAGCTTGTGACAGGGGTAAACGTTGGCAATAATTT--TCTGCCGCATGCGGGT 118
pUC19	CATGCAAGCT---TGGCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGC 117
	***** * * * * * * * * * * * * * * *
L10	GTTGCATAA----AACGTGTT----ACGTTCCCTTTATCGACAGGTCAGGT----- 160
pUC19	GTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA 177
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L10	-----CACCGCTCACCCG--CCGACGAGAAAGCAAC---ACTGAC--ATG----CTA 201
pUC19	GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTG 237
	***** * * * * * * * * * * * * * * *
L10	AAGCAAAAATAG-----ATGAATAAGTTGAGTTGT-----GCATATGGTGCACTCTC 249
pUC19	ATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACTCTC 297
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
	Stop codon
L10	AGTACAATCTGCTCTGATGCCGC TAG 276
pUC19	AGTACAATCTGCTCTGATGCCGC TAG 324

ภาพ 19 การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ L10

ภาพที่ 20 เป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ L18 โดยมี การพิจารณาเฉพาะส่วนของ *LacZ* gene ในตำแหน่งของ start codon จนถึงตำแหน่ง stop codon ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสทั้งหมด 142 ตำแหน่ง ซึ่งแสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลง ของลำดับในตารางที่ 19

L18 : Nucleotide sequence

Start codon

L18	ATG ACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGG 60
pUC19	ATG ACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGG 60

L18	CATGCAAGCTTAAACT---CATAATTTAAAAAGATAAATATAAAATATCAATGAGTC 117
pUC19	CATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTT 120
	***** ** * * * * * * * * * *
L18	AATCAATAATAATTTGGCATCACGAGACACATCACAGAGGAATATTATGAGCACAGAAAC 177
pUC19	ACCCAAC-----TTAATCGCCTTGACGACATCCC-----CCTTCGCCAGCTGGCGT 168
	* *** ** * * * * * * * * * *
L18	AATTGAAATATTCAATAATAGTGATGAATGGGCAAATCAACTAAAACACGCATTATCGAA 237
pUC19	AATAGCGAA----GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC--AGTTGCGCAGC-CTGAA 221
	*** * * * * * * * * * * * *
L18	AGGAGAAAATCTGGCATTACTACATGGTTTAACTCCTGATATCCTTGATAGAATATAT-G 296
pUC19	TGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCG 281
	** *** * * * * * * * * * * *
	Stop codon
L18	CATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGC ATAG 339
pUC19	CATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGC ATAG 324

ภาพ 20 การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่าง pUC19 (control) กับ L18

2.4 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสใน *LacZ* gene ที่ผ่านการเหนี่ยวนำ

ด้วยพลาสมา

หลังจากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแล้ว ได้ทำการวิเคราะห์รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ซึ่งพบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบ transition และ transversion คิดเป็น 38 % และ 53 % ในขณะที่พบแบบ deletion และ insertion คิดเป็น 2 % และ 8 % ตามลำดับ โดยในโคลน L1 พบการเปลี่ยนแปลงแบบ transversion มากที่สุด ดังตาราง 17

ตาราง 17 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสจากการใช้ *LacZ* gene ไปเหนี่ยวนำด้วย พลาสมา (โคลน L1)

Mutational type	Number of occurrence	Frequency (%)
Transition	53	37
A → G	6	4
G → A	14	9
C → T	25	17
T → C	8	7
Transversion	75	53
A:G → C:T	37	26
C:T → A:G	38	27
Deletion	3	2
-G	3	2
Insertion	12	8
+A	4	3
+G	2	1
+C	3	2
+T	3	2
Total	143	100

ในตาราง 18 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของโคลน L10 ซึ่งพบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบ transition และ transversion คิดเป็น 27 % และ 31 % ตามลำดับ ในขณะที่พบแบบ deletion และ insertion คิดเป็น 41 % และ 2 % ตามลำดับ โดยในโคลน L10 พบการเปลี่ยนแปลงแบบ deletion มากที่สุด ดังตารางที่ 18

ตาราง 18 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสจากการใช้ *LacZ* gene ไปเหนี่ยวนำด้วย พลาสมา (โคลน L10)

Mutational type	Number of occurrence	Frequency (%)
Transition	33	27
A → G	6	5
G → A	13	10
C → T	12	10
T → C	2	2
Transversion	39	31
A:G → C:T	10	8
C:T → A:G	29	23
Insertion	3	2
+G	1	1
+T	2	1
Deletion	51	41
-A	12	10
-G	11	9
-C	17	13
-T	11	9
Total	126	100

ในตาราง 19 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของโคลน L18 ซึ่งพบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบ transition และ transversion คิดเป็น 37 % และ 47% ตามลำดับ ในขณะที่พบแบบ deletion และ insertion คิดเป็น 3 % และ 13 % ตามลำดับ โดยในโคลน L18 พบการเปลี่ยนแปลงแบบ transversion มากที่สุด ดังตารางที่ 19

ตาราง 19 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสจากการใช้ *LacZ* gene ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยฟลาสมา (โคลน L18)

Mutational type	Number of occurrence	Frequency (%)
Transition	53	37
A → G	4	3
G → A	21	15
C → T	19	13
T → C	9	6
Transversion	66	47
A:G → C:T	19	13
C:T → A:G	47	34
Deletion	4	3
-G	2	1.5
-C	2	1.5
Insertion	19	13
+A	12	8
+G	3	2
+C	1	1
+T	3	2
Total	142	100

2.5 ผลของไอออนพลาสมา (ในโครเจนไอออน) ต่อชนิดของเบสของ *LacZ*

gene

เมื่อวิเคราะห์ผลของไอออนพลาสมา (ในโครเจนไอออน) ต่อชนิดของเบสของ *LacZ* gene ทั้ง 3 โคลนคือ L1, L10 และ L18 ซึ่งในโคลน L1 พบว่าเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ในโครเจนไอออน) มากที่สุดคือ เบส Cytosine (C) คิดเป็น 33 % ซึ่งมากกว่าเบส $G > T > A$ ตามลำดับ ดังตารางที่ 20

ตาราง 20 แสดงผลของเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ในโครเจนไอออน) ในโคลน L1

เบส (Base)	No. Base change occurred	Radiosensitivity (%)
A	25	17
G	41	29
*C	47	33
T	30	21

หมายเหตุ : * คือ เบสที่ sensitivity ต่อไอออนของพลาสมามากที่สุด

ในตาราง 21 แสดงผลของไอออนพลาสมาที่ sensitivity ต่อชนิดของเบสในโคลน L10 พบว่าเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ในโครเจนไอออน) มากที่สุดคือ เบส Cytosine (C) คิดเป็น 33 % ซึ่งมากกว่าเบส $T > G > A$ ตามลำดับ ดังตาราง 21

ตาราง 21 แสดงผลของเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ในโครเจนไอออน) ในโคลน L10

เบส (Base)	No. Base change occurred	Radiosensitivity (%)
A	23	18
G	30	24
*C	41	33
T	32	25

หมายเหตุ : * คือ เบสที่ sensitivity ต่อไอออนของพลาสมามากที่สุด

ในตาราง 22 แสดงผลของไอออนพลาสมาที่ sensitivity ต่อชนิดของเบสในโคลน L18 พบว่าเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ในโครเจนไอออน) มากที่สุดคือ เบส Cytosine (C) คิดเป็น 35 % ซึ่งมากกว่าเบส $G > T > A$ ตามลำดับ ดังตารางที่ 22

ตาราง 22 แสดงผลของเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ในโครเจนไอออน) ในโคลน L18

เบส (Base)	No. Base change occurred	Radiosensitivity (%)
A	25	17.6
G	36	25.4
*C	50	35
T	31	22

หมายเหตุ : * คือ เบสที่ sensitivity ต่อไอออนของพลาสมามากที่สุด

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการใช้พลาสมาในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการระดมยิงดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอที่ใช้คือพลาสมิด pUC19 และ *LacZ* gene โดยใช้ไอออนของไนโตรเจน โดยจะเห็นว่า ผลของพลาสมาส่งผลต่อพลาสมิด pUC19 และ *LacZ* gene ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ เพราะพลาสมา (ไอออนของไนโตรเจน) ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเบสในพลาสมิด pUC19 (โดยเฉพาะบริเวณของ *LacZ* gene) และใน *LacZ* gene โดยรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของเบสส่วนใหญ่จะพบแบบ deletion และ transversion (A/G ไปเป็น C/T และ C/T ไปเป็น A/G) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำในงานวิจัยของ Yang *et al.* (1997) โดยการทดลองใช้ ไอออนของไนโตรเจนเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *LacZ* gene ซึ่งพบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงแบบ transition (50 %) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งให้ผลแตกต่างจากเทคนิคพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) โดยรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของเบสในลักษณะดังกล่าวและมีการเปลี่ยนแปลงในบริเวณของ *LacZ* gene จึงส่งผลต่อลักษณะทางฟีโนไทป์ทำให้แบคทีเรียเป็นสีขาว

เมื่อพิจารณาในกรณีเบสที่ sensitivity ต่อพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) มากที่สุดคือเบส Cytosine (C) ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Chang *et al.* (2003) ที่ใช้เทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำมาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Arabidopsis* ซึ่งเป็นไอออนของไนโตรเจน พบว่าเบสที่ sensitivity ต่อลำไอออนพลังงานต่ำ (ไนโตรเจนไอออน) มากที่สุดคือเบส Thymine (T) ซึ่งต่างจากเทคนิคพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) แต่เบส C และ T อยู่ในกลุ่มของไพริมิดีน (pyrimidine) โดยอาจกล่าวได้ว่าเบสที่ sensitivity ต่อไนโตรเจนไอออนของไอออนบีมและพลาสมาจะเป็นกลุ่มของ ไพริมิดีน (pyrimidine)

ในส่วนของ dosage และ bias เป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยในการทดลองนี้ได้ทดลองกำหนดสภาวะเงื่อนไข dosage และ bias ขึ้น โดยพบว่าสภาวะเงื่อนไขของ dosage และ bias ที่กำหนดขึ้นนั้น มีผลต่อพลาสมิด pUC19 และ *LacZ* gene ซึ่งจะเห็นได้ว่า dosage และ bias มีผลต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์โดยตรง โดยที่เมื่อเพิ่ม dosage ก็เป็นการเพิ่มปริมาณของไอออน ส่วนการเพิ่ม bias เปรียบเสมือนการเพิ่มพลังงานให้กับไอออน โดยการเพิ่มทั้ง 2 เงื่อนไขจะมีผลทำให้ความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น

ซึ่งจะเห็นว่าการนำเทคนิคพลาสมามาทดลองกับงานทางด้านชีววิทยาก็สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้เช่นกันที่นอกเหนือจากเทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำ ดังเช่นผลการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Sarapirom *et al.* (2010) ได้ศึกษาการระดมยิงดีเอ็นเอด้วยพลาสมา โดยดีเอ็นเอที่ใช้เป็นพลาสมิด pGFP (ขนาด 3344 bp) ซึ่งเมื่อนำพลาสมิดดังกล่าวมาระดมยิงด้วยพลาสมาโดยใช้

ไอออนของไนโตรเจนและอาร์กอนพบว่าพลาสมาส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและรูปร่างของพลาสมิด pGFP โดยผลการทดลองดังกล่าวยังไม่สามารถระบุได้ว่าพลาสมาสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ แต่ในผลการทดลองนี้สามารถระบุได้ว่าพลาสมาสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ เมื่อวิเคราะห์ชนิดของการกลายพันธุ์พบทั้งแบบ transition , transversion , deletion และ insertion ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดการกลายพันธุ์

ซึ่งจากการทดลองนี้เป็นการศึกษาต่อยอดจากการศึกษาของ Sarapirom *et. al.* (2010) โดยจากผลการศึกษาทั้งสองการทดลองสามารถยืนยันได้ว่าเทคนิคพลาสมาสามารถประยุกต์ใช้กับงานทางด้านชีววิทยาได้และจะยังมีการศึกษาเทคนิคพลาสมาต่อไปว่าจะมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับเทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำที่มีการประยุกต์ใช้กับงานด้านต่างๆ หรือไม่ เพื่อที่จะพัฒนาเทคนิคพลาสมาในงานการส่งถ่ายดีเอ็นเอ หรือการเหนี่ยวนำให้เกิดการพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยเฉพาะ พืชเศรษฐกิจ เช่น ข้าว , ไม้ดอก หรือใช้เป็นเทคนิคในการค้นหายีนต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การนำเทคนิคพลาสมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการระดมยิงดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอที่ใช้คือพลาสมิด pUC19 และ *LacZ* gene โดยใช้ไอออนของไนโตรเจน และหลังจาก ดีเอ็นเอที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมา และทำการส่งถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย บันทีกจำนวนโคโลนีทั้งหมด , ลักษณะทางฟีโนไทป์ , วิเคราะห์รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส และผลของพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) ต่อชนิดของเบส พบว่า

1. ผลของพลาสมาต่อพลาสมิด pUC19

พบว่าจากการเหนี่ยวนำพลาสมิด pUC19 ด้วยพลาสมา พบว่าพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ทั้งในระดับฟีโนไทป์และจีโนไทป์ โดยในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง dosage กับ bias ต่อความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ พบว่ามีแนวโน้มเป็นไปในทางเดียวกันคือในสถานะเงื่อนไขที่มีการเพิ่ม dosage และ bias (คงที่) หรือการเพิ่ม bias และ dosage (คงที่) ส่งผลทำให้ความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยที่ความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์อยู่ในช่วง 54.1 – 57.2 % และ 52.8 – 59.1 % ตามลำดับ

และการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส พบมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของโคลน P2 โดยเฉพาะมีการเปลี่ยนแปลงในบริเวณของ *LacZ* gene ซึ่งมีผลทำให้โคโลนีของแบคทีเรียเป็นสีขาว และรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโคลน P2 พบการเปลี่ยนแปลงแบบ deletion มากที่สุดโดยคิดเป็น 38 % และในการวิเคราะห์ผลของไอออนพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) ต่อชนิดของเบสพบว่าเบส Cytosine (C) เป็นเบสที่มี radiosensitivity ต่อพลาสมามากที่สุด ซึ่งคิดเป็น 33 % โดยมากกว่าเบส $G > T > A$ ตามลำดับ

2. ผลของพลาสมาต่อ *LacZ* gene

ในขณะที่ผลของพลาสมาต่อ *LacZ* gene พบว่าพลาสมา (ไนโตรเจนไอออน) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เช่นเดียวกับการทดลองที่ใช้พลาสมิด pUC19 โดยในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง dosage กับ bias ซึ่งในสถานะเงื่อนไขแรกที่มี dosage : 5×10^{14} , 1×10^{15} และ 2×10^{15} ions/cm² และ bias 2.5 kV (คงที่) พบว่าความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์อยู่ที่ 58.6 , 5.80 และ 5.98 % ตามลำดับ ส่วนในสถานะเงื่อนไขที่สอง dosage : 2×10^{15} ions/cm² (คงที่) และ bias : 2.5 , 3.5 และ 5.0 kV พบว่าความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ อยู่ที่ 59.8 , 59.7

และ 63.2 % ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าในแต่ละเงื่อนไขความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ให้ผลไม่แตกต่างกัน

ซึ่งในการทดลองทั้ง 2 นี้ไม่สามารถเปรียบเทียบได้เพราะความแตกต่างของขนาดที่ต่างกันมากถึง 10 เท่า และรูปร่างของพลาสมิด pUC19 กับ *LacZ* gene โดยรูปร่างของพลาสมิด pUC19 มีอยู่ 3 รูปแบบ คือ relax , supercoil และ linear ซึ่งทั้ง 3 รูปแบบนี้มีผลต่อการบดบังการทำงานของพลาสมา (ในโครเจนไอออน)

ส่วนการวิเคราะห์รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส พบมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโคลน L1 , L6 , L10 , L18 และ L20 มีผลทำให้โคโลนีของแบคทีเรียเป็นสีขาว และรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโคลน L6 พบแบบ deletion ของเบส C ที่ตำแหน่ง 136 (บริเวณของ *LacZ* gene) และในโคลน L20 พบแบบ deletion ของเบส T ที่ตำแหน่ง 71 (บริเวณจุดตัดของเอนไซม์ *HindIII* ของบริเวณ *LacZ* gene) ในขณะที่ยกการเปลี่ยนแปลงของ L1 , L10 และ L18 พบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงแบบ transversion 53 % , deletion 41 % และ transversion 47 % ตามลำดับ

และการวิเคราะห์ผลของไอออนพลาสมา (ในโครเจนไอออน) ต่อชนิดของเบสของทั้ง 3 โคลนคือ L1 , L10 และ L18 พบว่าเบสที่ radiosensitivity ต่อพลาสมา (ในโครเจนไอออน) มากที่สุดคือเบส Cytosine (C) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองที่ใช้พลาสมิด pUC19 ซึ่งในโคลน L1 คิดเป็น 33 % มากกว่าเบส G > T > A ตามลำดับ , โคลน L10 คิดเป็น 33 % มากกว่าเบส T > G > A ตามลำดับ และโคลน L18 คิดเป็น 35 % มากกว่าเบส G > T > A ตามลำดับ

บรรณานุกรม

- เกษม หมั่นธรรม. 2549. การปรับปรุงคุณภาพกระดาษด้วยระบบพลาสมความดันบรรยากาศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 75 น.
- ดาวรุ่ง กังวานพงศ์, ทิพย์มณี ภาระตศิลป์, ปรีศนา จริยวิทย์วัฒน์, ศรีสุลักษณ์ ธีรานุกพัฒนา และหัตยา กาวิวงศ์. 2546. พันธุศาสตร์. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, น. 287 – 293.
- นิรุต ศุสดี. 2545. การวัดอุณหภูมิอิเล็กตรอนและความหนาแน่นของพลาสมาอาร์กอนที่ได้จากการ ดิสชาร์จด้วยคลื่นวิทยุใน 챔เบอร์พลาสมาแบบกลีบมะเฟือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 60 น.
- พัชรวดี ทองคำคุณ. 2551. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในผักสลัด (*Lactuca sativa* L.) ห้าสายพันธุ์ โดยลำไยออนพลังงานต่ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 80 น.
- พันธุ์วัฒน์ ไชยวรรณ. 2546. การใช้พลาสมาอุณหภูมิต่ำเพื่อปรับปรุงสมบัติการไม่ซึมน้ำของ ผ้าไหม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 123 น.
- สิริสุข ตามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชารังสีประยุกต์และ ไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, น. 3 – 13 , 44.
- Anders, A. 2000. Ed., **Handbook of Plasma Immersion Ion Implantation and Deposition**. New York: Jonh Wiley & Sons. 727 p.
- Anuntalabhochai, S., R. Chandej, B. Phanchaisri, Yu L. D., T. Vilaithong and I. G. Brown. 2001. Ion beam induce deoxyribose nucleic acid transfer. **Applied Physics Letters**. 78, 16: 2393 – 2395.
- Anuntalabhochai S., R. Chandej, B. Phanchaisri, Yu L. D., S. Promthep, S. Jamjod and T. Vilaithong. 2004. **Mutation Induction In Thai purple Rice by Low-energy Ion Beam**. Proceeding of the Ninth Asia Pacific Conference (9th APFC), Hanoi, Veitnam. October 25 – 31, 2004.
- Chen, F. F. 1984. **Introduction to Plasma Physics and Controlled Fusion**. New York: Jonh Wiley & Sons. 423 p.

- Fedoroff, N. 1982. Introduction to transposable controlling element in maize. Maize for Biological Research. Edited by F. Sheridan. **Plant Molecular Biology Association**. 203-211.
- Feldmann, K. A. 1991. T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis : mutation spectrum. **The Plant Journal**. 71-82.
- Gottschalk, W. and G. Wolff. 1993. Induced Mutations in Plant Breeding. **Springer-Verlag**, 238 p.
- Malling, H. V. and J. S. Wassom. 1977. **Action of Mutagenic Agent. Handbook of Teratology**. 1: Edited by J. G. Wilson and F. Clarke Fraser. Plenum Publishing Corporation. 99-146.
- Martin C. and K.R. Steven. 2006. **Green Fluorescent Protein: Properties , Application and Protocol**. New York: John Wiley & Sons. 443 p.
- Matsubaru, K., H. Kodama, H. Kokubun, H. Watanabe and T. Ando. 2005. Two novel transposable elements in a cytochrome P450 gene govern anthocyanin biosynthesis of commercial petunias. **Gene** (258): 121 – 126.
- Novak, F. J. 1990. Plant Tissue Culture Techniques for Mutation Breeding. A Training Manual. Joint FAO/IAEA Programme, IAEA Laboratories-Seibersdorf, Austria. **Plant Breeding Unit**. 194 p.
- Okamura, M., N. Yasuno, M. Ohtsuka, A. Tanaka, N. Shikazono and Y. Hase. 2003. Wide variety of Flower-color and shape mutant regenerated from leaf culture irradiated with ion beam. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. B** (206): 574 – 578.
- Sarapirom, S., K. Sangwijit, S. Anuntalabhochai and L. D. Yu. 2010. Plasma immersion low-energy-ion bombardment of naked DNA. **Surface & Coatings Technology** (204): 2960-2965.
- Suanpoot, P., T. Vilaithong, W. M. Rhodes and D. Boonyawan. 1998. Plasma parameters Characterization of a DC multicusp plasma chamber operating in He , Ar and Xe gas. **J. Plasma Fusion Res.** (1): 526 p.
- Vilaithong, T., L. D. Yu, C. Alisi, B. Phanchaisri, P. Apavatjirut and S. Anuntalabhochai. 2000. A study Of low-energy ion beam effect on outer plant cell structure for exogenous macromolecule transferring. **Surface & Coating Technology**. 128 – 129 , 133 – 138.

- Wang, Q., G. Zhang, Y-h. Du, Y. Zhao and G-y. Qui. 2003. Low-energy (30 keV) carbon ion induced mutation spectrum in the *LacZ* gene of M13mp18 double-stranded DNA. **Mutation Research** (528): 55 – 60.
- Wessler, S. R., T. G. Bureau and S.G. White,. 1995. LTR- retrotransposons and MITEs: Important players in the evolution of plant genomes. **Genomes and Evolution**. 814 – 821.
- Wu, L. and Z. Yu. 2001. Radiobiology effects of a low-energy ion beam on wheat. **Radiation and Environmental Biophysics** (40): 53 – 57.
- Yamagushi, H., S. Nagatomi, T. Morishita, K. Deki, A. Tanaka, N. Shikazono and Y. Hase. 2003. Mutation Induced with ion beam irradiation in rose. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. B** (206): 561 – 564.
- Yang, J., W. Lijun, L. Li, W. Liadao, Y. Zengliang and X. Zhihong. 1997. Sequence analysis of mutation induced by ion beam irradiation in double-stranded M13mp18DNA. **SCIENCE IN CHINA (Series C)**. 40, 1: 107-112.
- Yu, Z., J. Yang, L. Wu., W. Cheng, J. He and Y. Huo. 1993. Transferring Gus gene into intact rice cell by low energy ion beam. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. B** (80): 1328 – 1331.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมี

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมเจล และบัฟเฟอร์

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris-base)

Boric acid

Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)

Agarose (Usb, USA)

Agar

Ethidium bromide

Bromophenol blue

Xylene cyanol

Sucrose

1.2 Restriction enzyme

- *Nde*I

- *Hind*III

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลาย

Plasmid extraction buffer

BP1	stock	1 ml	10 ml
50 mM Tris-HCl	2 M	25 μ l	250 μ l
10 mM EDTA	0.5 M	20 μ l	200 μ l
dH ₂ O	-	0.95 ml	9.5 ml

BP2	stock	1 ml	10 ml
200 mM NaOH	10 M	20 μ l	200 μ l
1% SDS	20 %	50 μ l	500 μ l
dH ₂ O	-	0.93 ml	9.3 ml

BP3

3M Potassium acetate

DNA marker

Lambda DNA (ตัดด้วย *Pst*I)

Ethidium bromide 10 mg/ml

ชั่ง Ethidium bromide 1 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กวนด้วย เมกนาติกสเตอโร จนกระทั่งสารละลายละลายหมดซึ่งอาจใช้เวลาหลายชั่วโมง จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในการเตรียมสารนี้ต้องใช้ความระมัดระวังอย่างมาก โดยสวมถุงมือและอย่าหายใจเอาผงของ Ethidium bromide เข้าไป เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen

TE buffer (Tris-EDTA buffer)

1. Tris-Hcl 10 mM
2. EDTA 1 mM

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน ก่อนนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Loading buffer

1. Bromophenol blue 0.25% (w/v)
2. Xylene cyanol FF 0.25% (w/V)
3. Sucrose 40% (w/v)

ผสมสารทั้งสามตัวเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ตามต้องการก่อนนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10X Tris borate buffer (10X TBE buffer)

- | | | |
|-----------------------------|-----|-----------|
| 1. Tris base | 108 | กรัม |
| 2. boric acid | 55 | กรัม |
| 3. 0.5 มิลลิโมล EDTA pH 8.0 | 40 | มิลลิลิตร |

ละลายสารในข้อ 1.1 และ 1.2 โดยน้ำกลั่นจากนั้นผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล

นายชานนท์ ใจชื่น

เกิดเมื่อ

29 เมษายน 2528

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2546 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนท่าบ่อ
จังหวัดหนองคาย

พ.ศ. 2550 ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยแม่โจ้
จังหวัดเชียงใหม่