

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การถ่ายโอนสารพันธุกรรมเข้าสู่ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) โดยเทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำ

ผู้เขียน

นายศาสตรา ลาดปะละ

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโกชัย

### บทคัดย่อ

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ยีสต์โดยเทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำ ได้ใช้ในโตรเจนไอออนที่ระดับพลังงาน 50-60 keV และปริมาณไอออนในช่วง  $0.1-10 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> ระดมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าเมื่อระดับพลังงานและปริมาณไอออนเพิ่มขึ้นมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ลดลง และปริมาณไอออนที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ยีสต์มากที่สุดคือ 4, 6, 8 และ  $10 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> ตามลำดับ ต่อมาได้เลือกพลังงานที่ 50 keV และปริมาณไอออนที่ 0.5, 1 และ  $2 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> เพื่อทดลองส่งถ่ายพลาสมิด pYES2 เข้าสู่ยีสต์ พบว่าทุกปริมาณไอออนสามารถส่งถ่ายพลาสมิด pYES2 ได้

ในการศึกษาระยะเวลาเพื่อใช้บ่มพลาสมิด pYES2 สำหรับส่งถ่ายเข้าสู่ยีสต์ด้วยระยะเวลาบ่ม 5, 10, 30, และ 60 นาที ปริมาณพลาสมิดที่ใช้คือ 1 µg/ml ผลการทดลองพบว่าที่ระยะเวลา 10, 30 และ 60 นาที จะส่งถ่าย pYES2 เข้าสู่ยีสต์ได้ โดยที่ระยะเวลาการบ่ม 5 นาทีไม่สามารถส่งถ่าย pYES2 เข้าสู่ยีสต์ได้ ต่อมาได้ศึกษาปริมาณของพลาสมิด pYES2 ที่สามารถส่งถ่ายเข้าสู่ยีสต์ได้โดยใช้ 50, 100, 300, 500 และ 700 ng/ml และใช้ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ผลการทดลองพบว่าที่ปริมาณ 300, 500 และ 700 ng/ml สามารถให้ผลการส่งถ่าย pYES2 เข้าสู่ยีสต์ได้ ในขณะที่ใช้ความเข้มข้นของพลาสมิด 50 และ 100 ng/ml พบว่าไม่สามารถส่งถ่ายได้

ในการศึกษาถึงแสดงออกของ *GFP* และ *lipolic acid synthetase* gene ในยีสต์ โดยโคลน *GFP* gene จาก pGFP ขนาด 716 bp ตรงตำแหน่ง *HindIII* กับ *EcoRI* เข้าสู่ pYES2 (pYGFP) และ *lipase* gene ขนาด 900 bp จาก *Bacillus licheniformis* ที่มีใน database ด้วยวิธี PCR เข้าสู่ pYES2 (pYlip1) ภายหลังจากนั้นส่งถ่ายเข้าสู่ยีสต์และชักนำให้ *GFP* และ *lipolic acid synthetase* gene แสดงออกโดยเลี้ยงในอาหาร induce medium เป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบการแสดงออกของ pYGFP

เรืองแสงสีเขียวภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ส่วน pYlip1 ตรวจพบแถบโปรตีนขนาด 34 kDa ด้วย  
เทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

**Thesis Title** Genetic Transfer into Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) By Low Energy Ion Beam Technique

**Author** Mr. Sattra Ladpala

**Degree** Master of Science (Biology)

**Thesis Advisor** Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai

### Abstract

Low energy ion beam technique at energy range 50-60 keV with ions fluences of  $0.1-10 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> was applied to bombard the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) using nitrogen ions. With increasing of energy level and ion fluence, percentages of survival decreased. At the 4, 6 and  $8 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> provided greater percentages of survival than other fluences. Then at 50 keV energy with ion fluences at  $0.5, 1$  and  $2 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> were chosen to transfer pYES2 into *S. cerevisiae*. All the ion fluences were able to introduce pYES2 into *S. cerevisiae*

Consequently, incubation time of pYES2 transferring was investigated. At the 1 µg/ml of pYES2 was used to transfer at different incubation times of 5, 10, 30 and 60 minutes respectively. At the incubate time at 10, 30 and 60 minutes showed the positive result whereas at 5 minutes did not. In addition, different plasmid concentrations of pYES2 at 50, 100, 300, 500 and 700 ng/ml were analyzed for plasmid transferring at incubation time of 30 minutes. At the higher concentrations of 300, 500 and 700 ng/ml provided a better plasmid transfer into yeast cells than of 50 and 100 ng/ml

Finally, both *GFP* and *lipoic acid synthetase* gene from pGFP and *Bacillus licheniformis* respectively were subcloned into pYES2 and designed pYGFP and pYLip, subsequently transfomed into the yeast cells. After 10 hour of induction, the expression of both genes were analyzed. pYGFP exhibited high intensity of GFP protein in yeast cells whereas pYLip1 showed additional band at 34 kDa analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis