การดัดแปลงพันธุกรรมของไหมอีรี *Philosamia ricini* Boisduval (Lepidoptera : Saturniidae) โดยอาศัยพาหะ *piggyBac* transposable element

GENETIC MODIFICATION OF ERI SILKWORM, *Philosamia ricini* Boisduval (LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE) USING *piggyBac* TRANSPOSABLE ELEMENT VECTOR

พรพิมล รักษาพล
PHORNPHIMON RAKSAPON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชากีฏวิทยาและสิ่งแวดล้อม
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2550

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การดัดแปลงพันธุกรรมของไหมอีรี่ *Philosamia ricini* Boisduval (Lepidoptera: Saturniidae) โดยอาศัยพาหะ *piggyBac* transposable element

GENETIC MODIFICATION OF ERI SILKWORM, *Philosamia ricini* Boisduval (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE) USING *piggyBac* TRANSPOSABLE ELEMENT VECTOR

T074534

พรพิมล รักษาพล

PHORNPHIMON RAKSAPON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชากีฏวิทยาและสิ่งแวดล้อม
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2550

GENETIC MODIFICATION OF ERI SILKWORM, *Philosamia ricini* Boisduval (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE) USING *piggyBac* TRANSPOSABLE ELEMENT VECTOR

PHORNPHIMON RAKSAPON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN ENTOMOLOGY AND ENVIRONMENT
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2007

COPYRIGHT 2007

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การดัดแปลงพันธุกรรมของไหมอีรี่ *Philosamia ricini* Boisduval (Lepidoptera: Saturniidae) โดยอาศัยพาหะ *piggyBac* transposable element
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพรพิมล รักษาพล
รหัสประจำตัว	45062901
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	กีฏวิทยาและสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.อำมร อินทร์สังข์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.วรเดช จันทรสร ผศ.นพ.ดร. เผด็จ สิริยะเสถียร

บทคัดย่อ

มีความสำเร็จครั้งแรกในการดัดแปลงพันธุกรรมของไหมอีรี่ *Philosamia ricini* Boisduval โดยอาศัย *piggyBac* transposable element เป็นพาหะนำยีนภายใต้การควบคุมการทำงานของ BmA3 promoter และมี EGFP เป็นยีนรายงานผล โดยทำการฉีดสารละลาย DNA ของ *piggyBac* ร่วมกับ helper plasmid ซึ่งมียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ transposase เข้าสู่ไข่ไหมอีรี่ในช่วงที่ pole cell กำลังมีการแบ่งตัว จำนวน 5,011 ฟอง ไข่ไหมที่ได้รับการฉีดฟัก จำนวน 192 ฟอง คิดเป็นอัตรารอด 3.89 เปอร์เซ็นต์ สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัย (G_0) จำนวน 67 ตัว แต่มีเพียง 5 ตัว หรือคิดเป็น 2.60 เปอร์เซ็นต์ที่มีการรับ EGFP ที่พบการแสดงออกของยีน EGFP ซึ่งสามารถสังเกตได้ภายใต้กล้อง fluorescent หรือตรวจโดยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อนำตัวเต็มวัยมาผสมกับไหมอีรี่สายพันธุ์ปกติพบว่ามี 2 คู่ หรือคิดเป็น 2.98 เปอร์เซ็นต์ ของประสิทธิภาพการดัดแปลงพันธุกรรมที่สามารถออกลูกและตรวจพบการแสดงออกของยีน EGFP หรือตรวจพบยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์ และยืนยันโดยวิเคราะห์ลำดับเบสในไหมรุ่นถัดมา

Thesis Title	Genetic Modification of Eri Silkworm, *Philosamia ricini* Boisduval (Lepidoptera: Saturniidae) Using *piggyBac* Transposable Element Vector
Student	Miss Phornphimon Raksapon
Student ID	45062901
Degree	Master of Science
Program	Entomology and Environment
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Ammorn Insung
Thesis Co Advisor	Assoc. Prof. Dr. Warlardej Chantrasorn Asst. Prof. Dr. Padet Siriyasatien

ABSTRACT

The first successful germline transformation of eri silkworm, *Philosamia ricini* Boisduval using *piggyBac* transposon was demonstrated. The *piggyBac* transposable element vector consists of the enhance green fluorescent protein (EGFP) gene under control of the BmA3 promoter was used. DNA solution of the *piggyBac* and the helper plasmid encodes the *piggyBac* transposase were microinjected into eri silkworm embryos. Among 5,011 microinjected preblastoderm embryos of *P. ricini*, 192 larvae were hatched which was 3.89% survival rate. And there were 67 larvae developed to be adults, only five adults were found positively to EGFP under a fluorescent microscope or PCR, which refered as 2.60% transformation rate. The G_0 adults were mated with wild type adults, 2 transgenic lines were established or refered as 2.98% transformation efficiency. EGFP expression was observed under a fluorescence microscope and the EGFP gene was detected by PCR as well as DNA sequencing in subsequence generations.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.อำมร อินทร์สังข์ อาจารย์ควบคุมวิทยานิพนธ์ และรศ.ดร.วรเดช จันทรสร อาจารย์ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกลาเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ให้กำลังใจ และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.นพ.ดร.เผด็จ สิริยะเสถียร อาจารย์ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ สารเคมี ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.มยุรา สุนย์วีระ ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกลาเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ ผศ.ดร.อมรรัตน์ พรหมบุญ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เพื่อความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ทิพย์วดี อรรถธรรม ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์ไหมอีรี่เพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้พร้อมทั้งข้อคิดต่างๆ อันก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการศึกษาค้นคว้า และเป็นแนวทางในการจัดทำวิทยานิพนธ์จนประสบความสำเร็จ

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการเลี้ยงไหม อุปกรณ์การเลี้ยงไหม จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ประจำปี 2550 บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทบวงมหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ๆ ทุกคน ที่ให้กำลังใจ และช่วยเหลือสนับสนุนทุกๆ ด้านตลอดมา และขอขอบคุณเพื่อนๆ และน้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่านตลอดจนผู้ที่สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ได้

พรพิมล รักษาพล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VIII

สารบัญภาพ.....IX

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

1.3 สถานที่ดำเนินการวิจัย.....2

1.4 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย.....2

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 ไหมอีรี่.....3

2.1.1 ลักษณะทางชีววิทยาของไหมอีรี่.....3

2.1.2 ลักษณะรังและเส้นใยไหมอีรี่.....5

2.1.2.1 โครงสร้างทางกายภาพของเส้นไหม.....5

2.1.2.2 โครงสร้างทางเคมีของเส้นไหม.....6

2.2 การดัดแปลงพันธุกรรมแมลง.....6

2.2.1 ขั้นตอนการดัดแปลงพันธุกรรมแมลง.....7

2.2.2 องค์ประกอบในการดัดแปลงพันธุกรรมแมลง.....7

2.2.2.1 วิธีการถ่ายยีน.....7

2.2.2.2 ยีนพาหะ.....8

2.2.2.3 ยีนรายงานผล.....12

2.2.2.4 โปรโมเตอร์.....12

2.2.2.5 ยีนที่มีประโยชน์ในการดัดแปลงพันธุกรรมแมลง.....13

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....16

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.1 สัตว์ทดลอง......16

3.2 อุปกรณ์......16

3.3 สารเคมี......17

3.4 วิธีการ......17

3.4.1 การเลี้ยงไหมอีรี่ 17

3.4.2 การเตรียมไข่ไหมเพื่อฉีดสารละลาย DNA......18

3.4.3 การฉีดสารละลาย DNA เข้าสู่ไข่ไหม......19

3.4.4 การเตรียมสารละลาย DNA ของ *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid......20

3.4.4.1 การเตรียมเชื้อ *E.coli* ให้เป็นคอมพีเทนต์เซลล์......20

3.4.4.2 การถ่ายโอนพลาสมิด DNA เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์หรือการทำ Transformation และ การตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิด DNA......21

3.4.4.3 การสกัดพลาสมิด DNA โดยใช้ Perfectprep® Plasmis Midi......22

3.4.4.4 การวัดหาปริมาณ DNA โดยใช้ Spectrophotometer......23

3.4.4.5 การตรวจวิเคราะห์ DNA โดยการแยกขนาด DNA ในเจลอะกาโรสภายใต้สนามไฟฟ้า......23

3.4.4.6 การตรวจหายีน EGFP จากพลาสมิด DNAโดยเทคนิคพีซีอาร์......24

3.4.5 การตรวจหายีน EGFP ในไหมอีรี่......25

3.4.5.1 การตรวจสอบการเรืองแสง EGFP ภายใต้กล้อง fluorescent 25

3.4.5.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์ 25

3.4.5.2.1 การสกัดจีโนมิค DNA โดยใช้ DNeasy Tissue Kit 25

3.4.5.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน EGFP จากจีโนมิค DNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ 26

3.4.6 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส 26

3.4.6.1 การทำให้ DNA บริสุทธิ์จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์......26

3.4.6.2 การถ่ายทอดยีน EGFP และตรวจสอบโคลนที่ได้......27

3.4.6.2.1 การแยก DNA ให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล......27

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.6.2.2 การเชื่อม DNA ผลผลิตกับ DNA พาหะ........27
3.4.6.2.3 การตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิด DNA........29
3.4.6.2.3.1 การคัดเลือกโคลนจากฟีโนไทป์........29
3.4.6.2.3.2 การตรวจสอบขนาดชิ้นส่วน DNA ที่ทำการสอดแทรกในพลาสมิด DNA........30
3.4.7 การวิเคราะห์ลำดับเบส........31
3.4.8 การศึกษาการถ่ายทอดของยีน EGFP........31

บทที่ 4 ผลการวิจัย........33
4.1 ผลการเตรียมสารละลาย DNA ของ *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid........33
4.1.1 การแยกขนาดพลาสมิด DNA ของ *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid........33
4.1.2 การตรวจหายีน EGFP ใน *piggyBac* transposable element vector โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์........34
4.2 ผลการตรวจหายีน EGFPในรุ่น G_0........36
4.2.1 การตรวจสอบการเรืองแสง EGFPโดยจะตรวจดูการแสดงออกของยีน EGFP ในหนอนไหมอีรี่ภายใต้กล้อง fluorescent........36
4.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์........37
4.2.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing)........38
4.2.3.1 การคัดเลือกโคลนจากฟีโนไทป์........38
4.2.3.2 การตรวจสอบขนาดชิ้นส่วน DNA ที่ทำการสอดแทรกในพลาสมิด........39
4.2.3.3 การวิเคราะห์ลำดับเบส........40
4.3 การศึกษาการถ่ายทอดของยีน........41

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการวิจัย........42
5.1 การเตรียมไข่ไหมอีรี่เพื่อฉีดสารละลาย DNA........42

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

5.2 การฉีดสารละลาย DNA เข้าสู่ไข่ไหม......42

5.3 การเตรียมสารละลาย DNA ของ *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid......43

5.4 การตรวจหายีน EGFP ในไหมอีรี่......44

5.5 การศึกษาการถ่ายทอดของยีน EGFP......45

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ......46

บรรณานุกรม......47

ภาคผนวก......54

ประวัติผู้เขียน......61

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนของ *Drosophila melanogaster* w^{m} โดยใช้ *piggyBac* vectorและ helper.......11
3.1 ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับกระบวนการพีซีอาร์.......25
3.2 อัตราส่วนของสารในการเชื่อมของ insert DNA เข้ากับ vector (pGEM$^{\circledR}$-T Easy).......28
3.3 อัตราส่วนของสารในการย่อยพลาสมิด pGEM$^{\circledR}$-T Easy ด้วย restriction enzyme.......31
4.1 ผลการฉีดสารละลาย DNA ของ *piggyBac* transposable element vector เข้าสู่ ไข่ไหมอีรี่...35

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของ transposable elements (TE) 9

2.2 ก. โครงสร้างของพลาสมิด pPIGA3GFP ซึ่งต่อไว้กับยีน EGFP 10

ข. โครงสร้างของ pHA3PIG ซึ่งเป็น helper พลาสมิด 10

3.1 วงจรชีวิตของไหมอีรี่ 18

3.2 ลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของไข่ไหมอีรี่ 19

3.3 ก. เครื่องจ่ายสารปริมาณน้อย และกล้องจุลทรรศน์ 20

ข. ทิศทางการฉีดสารละลาย DNA เข้าสู่เซลล์ 20

3.4 การดำเนินงานในขั้นตอนเชื่อม DNA 29

3.5 ขั้นตอนการทดลองโดยสรุป 32

4.1 การเคลื่อนที่ของพลาสมิด DNA ของ pPIGA3GFP และ pHA3PIG 33

4.2 DNA ผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายส่วนของยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้พลาสมิด DNA ที่สกัดเป็นแม่แบบโดยใช้ไพรเมอร์ GFPBACF และ GFPBACR ในการตรวจสอบยีน 34

4.3 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน EGFP ในไหมอีรี่ภายใต้กล้อง fluorescent 36

4.4 DNAผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายส่วนของยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้จีโนมิค DNA ที่สกัดได้จากผีเสื้อไหมอีรี่รุ่น G_0 เป็นแม่แบบโดยใช้ไพรเมอร์ GFPBACF และ GFPBACR ในการตรวจสอบยีน 37

4.5 การคัดเลือกโคลนจากฟีโนไทป์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแอมพิซิลิน และ X-Gal 38

4.6 ผลการย่อยพลาสมิดที่ได้จากการโคลนผลิตภัณฑ์ DNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ GFPBACF และ GFPBACR แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI 39

4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไหมรุ่น G_1 (KML2/1) 40

4.8 การถ่ายทอดยีน EGFP ในไหมอีรี่ 41

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แมลงที่ให้เส้นใยมีหลายชนิด แต่ที่รู้จักกันแพร่หลายคือ ไหมบ้านหรือไหมเลี้ยง *Bombyx mori* Linn. ซึ่งเป็นแมลงที่เฉพาะเจาะจงต่อชนิดของพืชอาหาร สามารถเจริญได้เมื่อเลี้ยงด้วยใบหม่อนเท่านั้น เส้นใยที่นำมาทอเป็นผ้าไหมเป็นที่นิยมของคนไทยและต่างชาติ แต่ในช่วง 30 ปี ที่ผ่านมามีผู้สนใจเกี่ยวกับเส้นใยและผลิตภัณฑ์จากไหมชนิดอื่นๆ ที่แปลกใหม่ และมีเอกลักษณ์เฉพาะตัว จึงมีการสำรวจและศึกษาไหมป่าชนิดต่างๆ เพื่อหาประโยชน์จากเส้นใย ดังนั้นไหมป่าจึงมีส่วนอย่างมากในการกระตุ้นอุตสาหกรรมไหมให้ตื่นตัว โดยเฉพาะประเทศที่มีความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยี เช่น ญี่ปุ่น อินเดีย และจีน

ไหมป่า (wild silkworm or non – mulberry silkworm) มี 8 ชนิด ที่ให้เส้นใย ได้แก่ *Antheraea pernyi*, *A. yamamai*, *A. proylei*, *A. assamensis*, *A. mylitta*, *A. paphia*, *Philosamia ricini* และ *P. cynthia* แต่มีเพียง 3 ชนิด คือไหมทาซาร์ (tasar silkworm, *A. mylitta*) ไหมมูก้า (muga silkworm, *A. assama*) และไหมอีรี่ (eri silkworm, *P. ricini*) ที่มีการเลี้ยงเป็นอาชีพในประเทศแถบเอเชีย เช่น จีน ญี่ปุ่น อินเดีย เกาหลี ไหมอีรี่เป็นชนิดเดียวที่สามารถเลี้ยงได้อย่างสมบูรณ์ครบวงจรชีวิต ส่วนไหมมูก้าและไหมทาซาร์นั้นในช่วงผสมพันธุ์ต้องปล่อยบนต้นพืชอาหาร มิฉะนั้นผีเสื้อจะไม่ยอมผสมพันธุ์ (พิสิษฐ์ เสพสวัสดิ์ และ เตือนจิตต์ สัตยาวิรุทธิ์. 2520)

การใช้ประโยชน์จากไหมอีรี่ เช่น นำเส้นใยไปทอผ้า คุณสมบัติที่โดดเด่นของเส้นใย คือมีความเลื่อมมันเป็นเงา สวยงาม แข็งแรง ทนทานต่อการกัดกร่อนของเหงื่อไคล มีความนุ่ม ไม่สากระคายมือ ไม่เพียงแต่ใช้ทำเครื่องนุ่งห่มเท่านั้นยังสามารถนำไปใช้เป็น ผ้าม่าน ผ้านวม ผ้าคลุมโต๊ะ และสิ่งประดิษฐ์อื่นๆ นอกจากนี้แล้วสามารถนำไปพัฒนาเป็นกระดาษกรองที่มีคุณภาพเหมาะสำหรับใช้ในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์เพราะเส้นใยสานกันได้ละเอียด มีความเหนียว ทนทาน และไม่เปียกน้ำง่าย รังไหมบดเหมาะสมอย่างยิ่งในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ เนื่องจากมีกรดอะมิโนที่เป็นประโยชน์ 17 ชนิด ผลึกของผงไหมอีรี่สามารถป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) 80 เปอร์เซ็นต์ (กอบกุล แสนนามวงษ์ และคณะ. 2549) ส่วนไข่และตัวหนอนใช้เป็นอาหารเลี้ยงแมลงที่เป็นประโยชน์ด้าน การกำจัดแมลงศัตรูพืช เช่น ใช้ไข่ไหมเลี้ยงแตนเบียนสกุล *Anastatus* และ *Ooencyrtus* ที่ใช้ในการกำจัดมวนลำไยและมวนลิ้นจี่ซึ่งเป็นศัตรูของไม้ผล ใช้ตัวหนอนเลี้ยงมวนพิฆาต *Evocanthecona furcellata* ซึ่งเป็นมวนตัวห้ำที่ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะดูดกินเฉพาะตัวอ่อนของแมลงศัตรูสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น หนอนกระทู้ หนอนแก้วส้ม หนอนร่าน หนอนบุ้ง

(ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2544) ใช้ดักแด้เป็นอาหารของคน และสัตว์ เพราะมีคุณค่าทางโภชนาการสูง คือมีโปรตีนสูงถึง 65.63 เปอร์เซ็นต์ และมีไขมัน 25.26เปอร์เซ็นต์ (ศิวิลัย สิริมังครารัตน์. 2547)

วัตถุประสงค์หลักของการพัฒนาพันธุ์ไหม คือต้องการให้ได้ไหมที่มีความต้านทานโรค เติบโตเร็วและมีผลผลิตสูง แนวทางในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ไหมสามารถทำได้โดยการนำไหมที่มีคุณลักษณะที่ต้องการต่างๆมาผสมพันธุ์และคัดเลือกไหมที่มีลักษณะตามที่ต้องการ อย่างไรก็ตาม กระบวนการดังกล่าวก็ประสบปัญหาหลายด้านเช่น การคัดเลือกไหมเพื่อให้ได้คุณลักษณะที่ดีหลายอย่างต้องอาศัยเวลาและเงินทุนสูง ในปัจจุบันความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์และอณูชีววิทยาได้มีการพัฒนาไปมากโดยเฉพาะความรู้ทางด้านอณูชีววิทยาของแมลง (insect molecular biology) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการสร้างแมลงแปลงพันธุ์ (transgenic insects) ขึ้นสำเร็จในอนาคตจึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถสร้างแมลงที่มีความต้านทานต่อเชื้อโรคหรือแมลงที่มีลักษณะตามที่ต้องการ โดยอาศัยการส่งถ่ายยีนที่มีลักษณะตามที่เราต้องการเข้าสู่แมลง ถึงแม้จะมีความสำเร็จในการสร้างไหมบ้านแปลงพันธุ์ขึ้นมาได้ (Nagaraju *et al.* 1996; Tamura *et al.* 2000; Handler. 2002; Imamura *et al.* 2003; Guo *et al.* 2004 and Wu and Cau. 2004) แต่หากเราต้องการพัฒนาพันธุ์ไหมอีรี่ดัดแปลงพันธุกรรมขึ้นมาจำเป็นต้องทำการศึกษาเพื่อทดสอบว่า *piggyBac* transposable element นั้นจะสามารถส่งถ่ายยีนในไหมอีรี่ได้หรือไม่เนื่องจากความสามารถในการส่งถ่ายยีนของ *piggyBac* transposable element ในแมลงต่างชนิดกันนั้นแตกต่างกัน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทดสอบความสามารถในการส่งถ่ายยีนของ *piggyBac* transposable element vector ในไหมอีรี่

1.3 สถานที่ดำเนินการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการเลี้ยงไหม ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ใช้เวลาในการดำเนินการวิจัยตั้งแต่เดือนมกราคม 2548- มีนาคม 2550

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบความสามารถในการถ่ายยีนของ *piggyBac* transposable element ในไหมอีรี่ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์ไหมอีรี่ในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2. 1 ไหมอีรี่

2.1.1 ลักษณะทางชีววิทยาของไหมอีรี่

ไหมอีรี่ Eri silkworm (*P. ricini* Boisduval) เป็นผีเสื้อกลางคืนอยู่ในอันดับ Lepidoptera วงศ์ Saturniidae มีวงจรชีวิต 45–60 วัน ประกอบด้วย 4 ระยะ คือ

1. ระยะไข่ มีลักษณะรูปร่างกลมรี สีขาวครีม แม่ผีเสื้อวางไข่เรียงกันเป็นกลุ่ม ไข่จะฟักภายใน 7 วัน ในช่วงฤดูร้อน แต่ในช่วงฤดูหนาว ไข่จะฟักภายใน 24 วัน ไข่ที่ออกมาในวันแรกๆ และวันถัดไปนั้นมีความแข็งแรงทัดเทียมกันถ้าให้ฟักตามปกติ แต่ถ้านำไข่ไปเก็บไว้ในที่เย็นเพื่อยืดเวลาฟัก สามารถเก็บได้เพียง 3 วัน หากเก็บนานเกินไปเปอร์เซ็นต์การฟักจะลดลง (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2535)

2. ระยะหนอน มี 5 วัย

วัย 1 กะโหลกกว้าง 0.8-0.9 มิลลิเมตร หนอนแรกฟัก จะมีสีเหลืองอ่อน หัวสีน้ำตาลดำ รอยต่อระหว่างปล้องของลำตัวมีสีดำ ลำตัวแต่ละปล้องมีตุ่มขนสีดำ แต่ละตุ่มจะมีขน 5 เส้น และมีจุดดำเล็กๆ 8 จุด หนอนแรกฟักมักรวมอยู่เป็นกลุ่ม เคลื่อนไหวช้า จะกินอาหารเมื่ออายุครบ 1 วัน หนอนวัยนี้ใช้ระยะเวลาในการเจริญ 2-3 วัน

วัย 2 กะโหลกกว้าง 1.30-1.35 มิลลิเมตร ลำตัวสีเหลืองอ่อน หัวสีน้ำตาลดำ ปล้องของลำตัวมองเห็นชัดขึ้น ปล้องที่ติดกับหัวจะมีแถบดำ 2 แถบ ตุ่มขนบนลำตัวมีสีดำ แต่ละปล้องมี 6 ตุ่ม มีจุดสีดำบนแต่ละปล้อง 5 จุด หนอนวัยนี้ใช้ระยะเวลาในการเจริญ 4-5 วัน

วัย 3 กะโหลกกว้าง 1.95-2.20 มิลลิเมตร ลำตัวสีขาวนวล หัวสีดำ ตุ่มขนบนลำตัวมีสีขาวทั้งหมด จุดสีดำข้างลำตัวแต่ละปล้องเรียงเป็นแถวขนานกับลำตัว หนอนวัยนี้ใช้ระยะเวลาในการเจริญ 4-5 วัน

วัย 4 กะโหลกกว้าง 3.05-3.30 มิลลิเมตร หนอนสีขาวนวล หัวสีเหลืองอ่อน ลำตัวปล้องสุดท้ายสีเหลืองอ่อน ตุ่มขนมีสีขาว ซึ่งจะเปลี่ยนไปมีลักษณะคล้ายหนามสีขาว มีไขเคลือบอยู่ตามข้างลำตัวมีจุดสีดำ จุดเรียงเป็นแถวขนานกับลำตัวทั้งสองข้าง หนอนวัยนี้ใช้ระยะเวลาในการเจริญ 5-6 วัน

วัย 5 กะโหลกกว้าง 4.10-4.60 มิลลิเมตร หนอนสีขาวนวล หัวสีเหลือง รูหายใจข้างลำตัวมองเห็นได้ชัด ลำตัวปล้องสุดท้ายมีสีเหลืองอ่อน เมื่อหนอนโตเต็มที่วัดได้ 5.5-6.5 เซนติเมตร ผิวหนังจะเหี่ยวย่นสีเหลืองใส หนอนวัยนี้ใช้ระยะเวลาในการเจริญ 7-9 วัน

3. ระยะดักแด้ ลักษณะดักแด้เป็นแบบ obtected type สีน้ำตาล ยาวประมาณ 2.5-3.0 เซนติเมตร กว้างประมาณ 1.1-1.3 เซนติเมตร ตัวเมียมักโตกว่าตัวผู้ ดักแด้ตัวเมียมีลักษณะคล้ายเครื่องหมาย + อยู่ที่ช่องเปิดอวัยวะเพศ ส่วนตัวผู้จะเป็นจุดตรงที่ดังกล่าว ระยะดักแด้ใช้เวลานานถึง

18-22 วัน สำหรับการเข้าดักแด้ เมื่อหนอนโตเต็มที่จะหยุดกินอาหาร และถ่ายของเสียออกมาจนหมดกระเพาะ แล้วจะเดินไปมาเพื่อหาที่เหมาะสมต่อการเข้าดักแด้จึงต้องเตรียมที่ทำรัง (จ่อ) ไว้ให้สำหรับทำรัง จากนั้นจะเริ่มทำรังหุ้มตัวเอง โดยการคายสารออกมาจากต่อม silk glands สารนี้เมื่อถูกอากาศจะแข็งตัวเป็นเส้นใย หนอนจะทำรังภายใน 3-4 วัน แล้วพักตัวอยู่ในรังแล้วเริ่มเข้าดักแด้ ซึ่งรังไหมมีสีขาว ยาวประมาณ 4.8-5.5 เซนติเมตร กว้างประมาณ 1.8-2.4 เซนติเมตร น้ำหนักรังสด 1 รังโดยเฉลี่ย 2.5 กรัม น้ำหนักเปลือกรัง 1 รังโดยเฉลี่ย 23 เซนติกรัม เปอร์เซ็นต์เปลือกรัง 11-12 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตรังต่อกล่อง (20,000 ฟอง) 35-40 กิโลกรัม

4. ระยะตัวเต็มวัย แม่ผีเสื้อที่แข็งแรงสมบูรณ์จะวางไข่ได้ประมาณ 200-300 ฟอง ผีเสื้อไหมอีรี่เป็นผีเสื้อขนาดใหญ่ เมื่อกางปีกเต็มที่จะยาวถึง 4-5 นิ้ว ปีกมีสีน้ำตาลดำและมีเส้นขวางกลางปีกสีขาว ตรงกลางของแต่ละปีกจะมีรูปพระจันทร์ครึ่งเสี้ยวสีเหลืองขาวตัดขอบด้วยสีดำ ตัวผู้และตัวเมียจะจับคู่กันหลังจากออกจากรังได้ 2-3 ชั่วโมง การผสมพันธุ์ใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง แต่เวลา 2-4 ชั่วโมงก็เพียงพอต่อการให้ไข่ฟักเป็นตัวได้ ตัวเมียวางไข่ในเวลากลางคืน ผีเสื้อไม่บินและไม่กินอาหาร

ไหมอีรี่นิยมเลี้ยงกันกว้างขวางในประเทศอินเดีย จีน ญี่ปุ่น ปากีสถาน พม่า และเนปาล สำหรับในประเทศไทย (Wongtong *et al.* 1980) เคยมีรายงานการเลี้ยงไหมอีรี่อย่างได้ผลดีที่ดอยอ่างขาง และดอยปุย จังหวัดเชียงใหม่ ศิวิลัย สิริมังครารัตน์ และคณะ (2542) ได้ทำการทดลองเลี้ยงไหมอีรี่เพื่อเพิ่มรายได้แก่ผู้ปลูกมันสำปะหลังในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่สามารถผลผลิตได้ปีละ 3 รุ่น และมีรายได้เพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงไหมเพื่อเสริมการปลูกมันสำปะหลังประมาณ 964.32 บาทต่อไร่ ไหมอีรี่เป็นพวก multivoltine สามารถเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้ 4-6 รุ่นใน 1 ปี (พิสิษฐ์ เสพสวัสดิ์ และ เตือนจิตต์ สัตยาวิรุทธ์. 2520) มีพืชอาหารหลักคือ ใบละหุ่ง (*Ricinus communis*) และยังมีพืชอาหารชนิดอื่นๆ อีกเช่น มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) มะละกอ (*Carica papaya*) อ้อยช้าง (*Heteropanax fragrans*) สันปลาช่อน (*Gmelina arborea*) และมะยมป่าหรือหางไก่ (*Ailanthus sp.*) แต่พบว่า หนอนไหมอีรี่เจริญเติบโตครบวงจรเมื่อเลี้ยงด้วยใบละหุ่งและมันสำปะหลังเท่านั้น ไหมอีรี่ที่เลี้ยงด้วยใบมันสำปะหลังสามารถเจริญเติบโตดีทัดเทียมกับการเลี้ยงด้วยใบละหุ่ง และการเด็ดใบมันสำปะหลังไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ จะไม่มีผลกระทบต่อผลผลิต และหากเด็ดไปเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ กลับทำให้ผลผลิต มันสำปะหลังเพิ่มขึ้น (ทิพย์วดี อรรถธรรม และคณะ. 2534 และทิพย์วดี อรรถธรรม และคณะ. 2535) อย่างไรก็ตามได้มีการทดลองเลี้ยงไหมอีรี่ด้วยอาหารเทียมพบว่า อาหารเทียมที่มีถั่วไลม่าเป็นส่วนผสม สามารถเจริญได้ครบวงจร (กรรณิการ์ จ้อยเจริญ. 2525)

2.1.2 ลักษณะรังและเส้นใยไหมอีรี่

รังไหมมีสีขาว เหลือง น้ำตาล สีใบไผ่ และสีชมพู เส้นใยสานหลวมกว่ารังไหมบ้าน เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-1.5 เซนติเมตร ยาว 4-5 เซนติเมตร รูปร่างยาววงรี ปลายข้างหนึ่งค่อนข้างแหลม อีกข้างหนึ่งจะเปิดเป็นช่องเล็กๆเพื่อให้ผีเสื้อออกจากรังได้ ต่างจากไหมบ้านซึ่งรังปิดทุกด้าน เส้นใยไหมอีรี่เป็นเส้นสั้นๆ ต่างจากไหมบ้าน ที่เส้นใยเป็นเส้นเดียวยาวตลอด ดังนั้นการดึงเส้นใยออกจากรังต้องใช้วิธีปั่นฝ้าย เส้นไหมปั่นเป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมการปั่นฝ้ายมาก เพราะเส้นใยมีความเหนียวและยาวกว่าเส้นใยจากฝ้าย มีความมันวาวและราคาดีกว่าฝ้าย ในปัจจุบันอุตสาหกรรมไหมปั่นต้องอาศัยวัตถุดิบจากเศษไหมบ้านที่เสีย สาวไม่ได้ ซึ่งวัตถุดิบนี้ไม่เพียงพอต่อการส่งโรงงานไหมปั่น ในแคว้นอัสสัม ประเทศอินเดียมีความต้องการเส้นไหมอีรี่มากกว่าไหมบ้าน เพราะไหมอีรี่มีความหนานุ่ม ไม่สากระคายมือเหมือนไหมทาร์ซาร์ มีคุณภาพความทนทานดีกว่าไหมบ้าน ดูดซับเหงื่อและระบายอากาศได้ดี ซักทำความสะอาดง่ายโดยไม่ต้องซักแห้ง เส้นไหมที่ผลิตได้จะมีความเงามัน สวยงาม แปลกตาเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2544) โรงสาวไหมและทอผ้าของรัฐบาลอินเดียรับซื้อรังเปล่าไหมอีรี่ราคากิโลกรัมละ 250-300 รูปี (กอบกุล แสนนามวงศ์ และคณะ. 2548) (1 รูปี เท่ากับ 0.6 บาท)

ปัจจุบันอุตสาหกรรมไหมปั่นต้องอาศัยวัตถุดิบจากเศษไหมหม่อนหรือรังไหมหม่อนที่เสียและสาวไม่ได้ ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้มีไม่เพียงพอจะป้อนโรงงานไหมปั่น อย่างไรก็ตามอาจดึงเส้นใยจากรังไหมอีรี่ด้วยวิธีการสาวได้เช่นกัน โดยใช้เครื่องสาวไหมพื้นบ้านที่เกษตรกรมีอยู่หรือเครื่องสาวไหมแบบใหม่ที่มีการพัฒนาปรับปรุงขึ้นมาใช้ การดึงเส้นใยจากรังไหมอีรี่ไม่ต้องต้มรัง โดยยังมีดักแด้อยู่ในรังเพราะรังเป็นแบบรังเปิด สามารถตัดเปลือกรังหรือรอให้ผีเสื้อออกมาก่อนจึงนำรังไปต้ม ทำให้ไม่ขัดต่อความรู้สึกของผู้ใช้ที่ไม่ต้องการฆ่าตัวไหม (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549)

ไหมสามารถสร้างเส้นใยประมาณ 7-8 เซนตริเมตรต่อวินาที การสังเคราะห์โปรตีนในเส้นไหมทำในเซลล์ของต่อมไหมที่อยู่ในตัวของหนอนไหม สารไหมเหลว (liquid silk) จะถูกขับออกมาทางไหมส่วนท้าย (posterior silk gland) หลังจากนั้นส่งไปยังต่อมไหมส่วนกลาง (middle silk gland) ระหว่างที่อยู่ในต่อมไหมส่วนกลาง สารไหมเหลวจะเปลี่ยนเป็นเจลาติน (gelatin) ส่วนเซริซิน (sericin) ถูกขับออกจากส่วนอื่นของต่อมไหมส่วนกลาง เพื่อที่จะเคลือบเจลาติน หลังจากนั้นเจลาตินของไฟโบรอินจะมีความเหนียวขึ้นโดยอาศัยการส่ายหัวของหนอนไหม การเคลื่อนไหวนี้เกิดที่ต่อมไหมส่วนหน้า หลังจากที่ใยไฟโบรอิน 2 เส้นรวมกันเป็นเส้นใยไหมโดยเคลือบด้วยกาวเซริซิน เมื่อผ่านรูเล็กๆ (orifice of spinneret) ออกมากลายเป็นเส้นใยที่นำมาใช้เป็นสิ่งทอ (โมโตอิ มินากาวะ และคณะ. 2530)

2.1.2.1 โครงสร้างทางกายภาพของเส้นไหม

ภาพตัดขวางของเส้นไหม ประกอบด้วยเส้นใยที่เรียกว่า ไฟโบรอิน 2 เส้น ล้อมรอบด้วยกาวเซริซิน ซึ่งไม่เป็นส่วนของเส้นใย เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็คตรอน พบว่าในเส้นใยไฟโบรอิน 1 เส้นจะมีไฟบริล 900-1,400 เส้น เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.4 ไมครอน รวมทั้งมีไฟบริล

รูปร่างคล้ายสายรัดที่ผิวของเส้นใยมีขนาดกว้าง 0.6-0.8 ไมครอน โครงสร้างของไหมป่าเกือบเหมือนกับไหมบ้าน พื้นที่หน้าตัดของใยไฟโบรอิน 1 เส้น ประกอบด้วยพื้นที่ชั้นนอกสุดของเส้นใยประมาณ 80 ตารางไมครอน ชั้นกลางประมาณ 100 ตารางไมครอน และชั้นในประมาณ 60 ตารางไมครอน แสดงให้เห็นถึงความไม่สม่ำเสมอ เส้นไหมป่ามีรูปร่างหน้าตัดเป็นสามเหลี่ยมหน้าจั่วถึงรูปไข่ มีพื้นที่หน้าตัด 120-260 ตารางไมครอน ทั้งนี้จะแตกต่างกันตามชนิดและลักษณะตามสภาพแวดล้อม

ลักษณะตามยาวหรือผิวของเส้นไหม ผิวของเส้นไหมบ้านชั้นนอกมีกาว เซริซินมาก และมีโครงสร้างเป็นคลื่นมากมาย ไปตามแนวความยาวปกคลุมเส้นใยไฟโบรอิน ผิวของเส้นไหมที่ลอกกาวเซริซินออกหมดแล้ว ประกอบด้วยไฟบริลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.04-0.05 ไมครอน ในแนวยาวของเส้นใยประสานเป็นโครงสร้างท่อบางๆ พันเกลียวเข้าด้วยกันเรียงตัวเป็นตาข่ายและโครงสร้างเป็นท่อพุ่งไปตามแนวยาวโดยมีช่องว่าง 0.2-0.3 ไมครอน โครงสร้างของไหมอีรี่มีลักษณะคล้ายไหมบ้านมาก โดยทั่วไปแล้วเส้นไหมบ้านลึกซึ้ง ส่วนไหมป่าให้ความเงามันมากเหมือนโลหะ(โมโตอิ มินากาวะ และคณะ. 2530)

2.1.2.2 โครงสร้างทางเคมีของเส้นไหม

ไหมบ้านทั่วไปมีไฟโบรอิน 70 เปอร์เซ็นต์ เซริซิน 20-30 เปอร์เซ็นต์ เส้นใยจากรังไหม 97 เปอร์เซ็นต์ เป็นโปรตีนบริสุทธิ์และมีส่วนประกอบอื่นๆ เพียงเล็กน้อย เช่น ขี้ผึ้ง คาร์โบไฮเดรต วัตถุมีสี และสารอนินทรีย์ ส่วนไหมป่ามีไฟโบรอิน 75-90 เปอร์เซ็นต์ เซริซิน 5-20 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณเส้นใยมากกว่าเส้นใยไหมบ้านทั้งส่วนประกอบอื่นก็มีมากกว่า เช่นคาร์โบไฮเดรต (โมโตอิ มินากาวะ และคณะ. 2530) ซึ่งในไหมอีรี่มีไฟโบรอินประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ (Nakazawa *et al.* 2003)

2.2 การดัดแปลงพันธุกรรมแมลง

แมลงแปลงพันธุ์นับเป็นความก้าวหน้าทางด้าน recombinant DNA อย่างหนึ่ง ได้จากการใส่ยีนแปลกปลอม (exogenous gene) เข้าไปในตัวอ่อนและยีนแปลกปลอมนี้ได้เข้ารวมกับสารพันธุกรรมของแมลง ซึ่งช่วงที่ตัวอ่อนมีการเจริญเติบโต ยีนแปลกปลอมนี้อาจแทรกอยู่ในเซลล์หลายชนิดในตัวอ่อนรวมถึงเซลล์สืบพันธุ์ หากแมลงแปลงพันธุ์ไม่เป็นหมันยีนแปลกปลอมนี้จะถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ (ปรีชา ประเทพา. 2543; ศิริพร สิทธิประณีต. 2543 และสุรางค์ นุชประยูร และคณะ. 2546)

2.2.1 ขั้นตอนการดัดแปลงพันธุกรรมแมลง

Hoy (1994) ได้กล่าวถึงขั้นตอนการดัดแปลงพันธุกรรมแมลง เพื่อสร้างแมลงที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการมีขั้นตอน ดังนี้

1. กำหนดลักษณะที่ต้องการให้มีในแมลง ควรเป็นลักษณะที่พบเห็นในธรรมชาติและเป็นลักษณะที่มีประโยชน์อย่างมากกับแมลง เช่น ความต้านทานต่อโรคหรือสารเคมี

2. ค้นหาแหล่งของยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการ โดยศึกษารายละเอียดของยีนนั้นๆ ซึ่งอาจมีในแมลงต่างชนิด พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ เนื่องจากข้อมูลเหล่านี้จำเป็นอย่างยิ่งต่อการตัดและตกแต่งยีนแปลกปลอมก่อนการถ่ายเข้าสู่ germ line ของแมลง

3. วิเคราะห์ระบบที่ควบคุมการทำงานของยีน เพื่อพัฒนาระบบแบบเดียวกันนี้ให้เกิดขึ้นในแมลงที่ต้องการถ่ายยีน เช่น ข้อมูลของ DNA ที่เป็น regulatory sequences ไม่ว่าจะเป็นโปโมเตอร์ หรือ enhancers ที่จะช่วยให้ยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปสามารถทำงานได้ในแมลง

4. พัฒนาเทคนิคการตัดแต่งยีน การเพิ่มปริมาณยีน การจัดยีนพาหะ และการถ่ายยีน โดยต้องประเมินการแสดงออกของยีน และ regulatory sequences ที่ใช้ควบคุมการทำงานของยีนในสิ่งมีชีวิตอื่นก่อนที่จะถ่ายยีนแปลกปลอมเข้าสู่แมลง ต้องปรับเปลี่ยนเทคนิคให้เหมาะสมกับแมลงแต่ละชนิด เนื่องจากไม่มีเทคนิคใดเทคนิคหนึ่งที่ใช้ได้กับแมลงทุกชนิด

5. ตรวจสอบประสิทธิภาพและความสำเร็จของการถ่ายยีน เพื่อยืนยันว่ายีนแปลกปลอมนี้ได้เข้ารวมกับสารพันธุกรรมของแมลง สามารถถ่ายทอดไปยังแมลงรุ่นต่อ ๆ ไป และสามารถแสดงลักษณะที่ต้องการได้

6. การประเมินความเหมาะสมในการดำรงชีวิตของแมลงดัดแปลงพันธุกรรม และประเมินผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการปล่อยไปในธรรมชาติ จึงจำเป็นต้องมีการทดลองในห้องปฏิบัติการ โรงเรือน และในแปลงทดลองก่อนปล่อยแมลงดัดแปลงพันธุกรรม ไปในธรรมชาติ

อย่างไรก็ตามการถ่ายยีนเข้าสู่แมลงแตกต่างจากจุลินทรีย์มาก เพราะแมลงมีวงจรชีวิตที่ซับซ้อนและยังมีความหลากหลายในกลุ่มแมลงด้วยกันเอง จึงต้องเข้าใจในกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตและพัฒนาของแมลง (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2545)

2.2.2 องค์ประกอบในการดัดแปลงพันธุกรรมแมลง

การดัดแปลงพันธุกรรมแมลงจะประสบผลสำเร็จจะต้องประกอบด้วย วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่แมลง พาหะนำยีน (vector) ยีนรายงานผล (reporter gene) และโปรโมเตอร์ (promoter)

2.2.2.1 วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่แมลง

วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่แมลงได้พัฒนาและมีการนำมาทดลองใช้ที่ประสบความสำเร็จกับหลายวิธี ได้แก่

1. การใช้เข็มฉีดส่งถ่ายยีนเข้าไปในแมลง (microinjection) เป็นการใช้เข็มฉีดส่งถ่ายยีนเข้าไปในแมลง เป็นการฉีดสารละลาย DNA ผ่านเปลือกไข่เข้าไปในตัวอ่อนของแมลง (embryo) ที่อยู่

ในระยะ preblastoderm เพื่อส่งถ่ายยีนเข้าไปในตัวอ่อน ซึ่งเทคนิคที่ใช้กับแมลงแต่ละชนิดแตกต่างกัน แมลงบางชนิดต้องทำให้เปลือกไข่อ่อนตัวและแห้งลงเล็กน้อยก่อน เพื่อให้สามารถใช้เข็มฉีดเข้าไปโดยไม่เป็นอันตรายต่อตัวอ่อนของแมลง วิธีการนี้เป็นวิธีที่ตรงไปตรงมา และมีประสิทธิภาพสูง แต่ต้องใช้เวลานานมากเพราะต้องเก็บรวบรวมไข่จำนวนมาก ทำการฉีดทีละฟอง ซึ่งยุ่งยาก โดยอุปกรณ์ที่จำเป็นคือ ชุดของ microinjector ซึ่งประกอบด้วย microsyringe ขนาดประมาณ 25 ไมโครลิตร และ microneedle ซึ่งเป็นหลอดแก้วขนาดเล็กที่ส่วนปลายถูกดึงให้เรียวเล็กมีเส้นผ่านศูนย์กลางด้านในประมาณ 2-4 ไมครอน microneedle ดังกล่าวอาจบังคับด้วยมือหรือต่อเข้ากับอุปกรณ์บังคับที่เรียกว่า micromanipulator ซึ่งจะควบคุมปริมาณ DNA ในการฉีดแต่ละครั้งได้โดยอัตโนมัติ

2. การแช่เอ็มบริโอในสารแขวนลอย DNA เป้าหมาย ซึ่งจำเป็นต้องละลายเปลือกไข่บางส่วนก่อนเพื่อให้ DNA ผ่านเข้าไปในเอ็มบริโอได้ การใช้ DNA ท่อนสั้นๆ จะได้ผลดีกว่าการใช้ DNA ทั้งหลาย แต่วิธีนี้ให้เปอร์เซ็นต์ transformation ที่ค่อนข้างต่ำมาก

3. การถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค (gene gun) คือใช้แรงดันในการขับเคลื่อนอนุภาคโลหะที่เคลือบผิวภายนอกไว้ด้วย DNA ที่จะถ่ายเข้าสู่เซลล์แมลงให้เข้าไปในเซลล์แมลง

4. การนำยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) เป็นการทำให้เซลล์เปิดรับ DNA เมื่อกระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านเซลล์ รูในเยื่อหุ้มเซลล์จะเปิดกว้างขึ้นทำให้ผนังเซลล์เปิดรับยีนแปลกปลอมเพื่อส่งถ่ายยีนเข้าไปในเซลล์แมลง ในปัจจุบันยังต้องมีการปรับเปลี่ยนวิธีการถ่ายยีนให้เหมาะสมกับแมลงแต่ละชนิด เพื่อช่วยให้การถ่ายยีนเข้าสู่แมลงประสบความสำเร็จมากขึ้น

5. ไลโพเฟกชัน (lipofection) เป็นการนำยีน หรือ DNA ที่เราต้องการ หุ้มด้วยเยื่อไขมัน (lipidbilayer) แล้วนำไปใส่รวมกับเซลล์ที่เลี้ยงอยู่ DNA จะเข้าไปในเซลล์ได้ เพราะไขมันที่เคลือบ DNA นั้นจะรวมตัวกับเซลล์เมมเบรน ซึ่งประกอบด้วยไขมันเป็นส่วนมาก

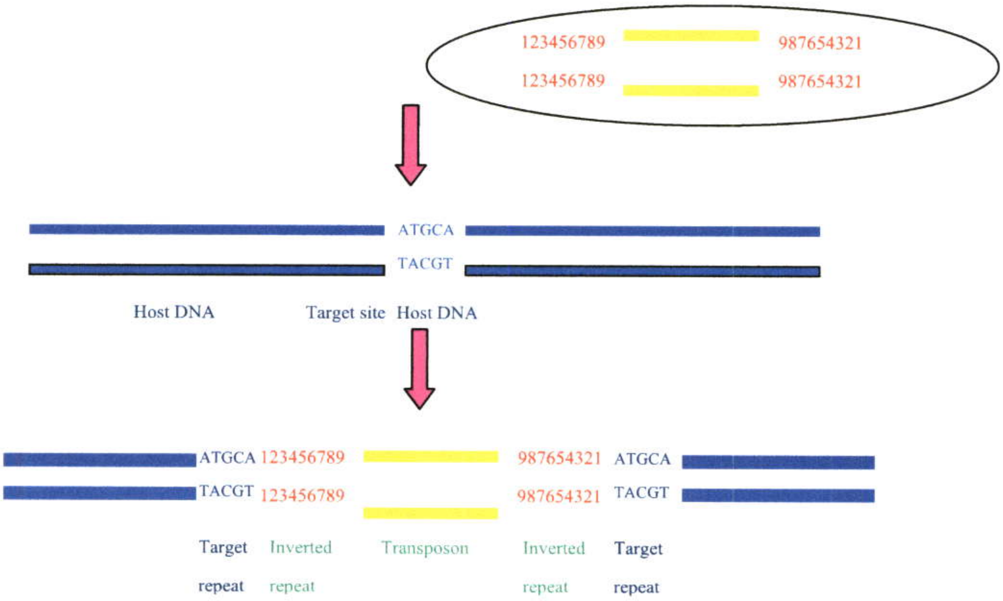
2.2.2.2 พาหะนำยีน (vector)

เนื่องจากชิ้นส่วน DNA หรือยีนที่เราต้องการไม่สามารถเพิ่มจำนวนด้วยการจำลองตัวเองได้ในเซลล์ผู้รับ ดังนั้นจึงต้องมีการเชื่อมต่อพาหะ ที่มีคุณสมบัติคือ มีส่วนของ DNA ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นในการจำลองตัวเอง (origin of replication) ทำให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งพาหะนำยีนมีหลายรูปแบบได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการส่งถ่ายยีน แต่ปัญหาที่มักเกิดขึ้นคือ ยีนที่ต้องการเข้าไปเชื่อมกับโครโมโซมของแมลงมีอัตราที่ต่ำมาก ตัวอย่างพาหะที่นิยมนำมาใช้ในการส่งถ่ายยีนในแมลงได้แก่

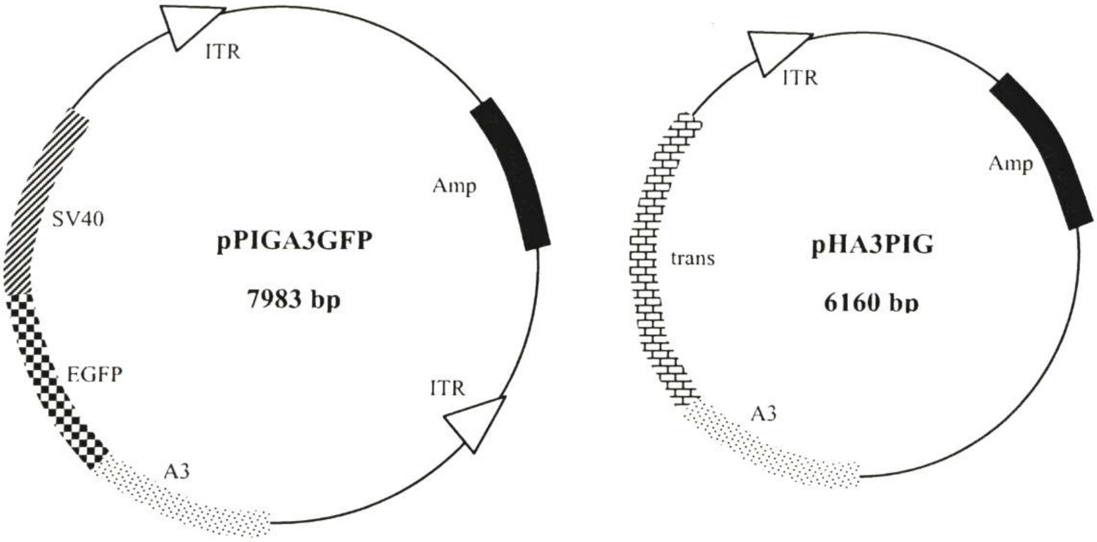
1. transposable elements (TE) เป็นชิ้นส่วน DNA ที่สามารถเคลื่อนที่จากที่หนึ่งไปอีกที่หนึ่งได้ ซึ่งมี 2 ประเภท คือ autonomous TE ซึ่งเป็นพาหะที่มีเอนไซม์ที่พร้อมสำหรับการตัดและเชื่อมต่อ DNA ด้วยตัวเอง อีกประเภทคือ non autonomous TE ซึ่งไม่มีเอนไซม์สำหรับการตัดและเชื่อมต่อ DNA ด้วยตัวเอง ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์จากแหล่งอื่น เช่น helper plasmid ขั้นตอนการเคลื่อนที่ของ TE

เริ่มจากการตัดที่ปลายของ TE ซึ่งมีการเรียงลำดับเบสแบบ inverted repeats ก่อนนำไปเชื่อมกับ DNA ที่อยู่ไกลออกไป ซึ่งการเคลื่อนย้ายของ TE ทำให้ส่วน polydeoxyribonucleotide นั้นหายไป หรือเพิ่มเข้ามา เป็นสาเหตุการกลายพันธุ์ชนิดหนึ่ง (Lewin. 1994) ลักษณะโครงสร้างของ transposable elements (TE) ดังภาพที่ 2.1

การส่งถ่ายยีนทำโดยการฉีด transposable element ซึ่งจะนำยีนเข้าไปเชื่อมติดกับโครโมโซมของแมลง เช่น P element (P ย่อมาจาก paternal contributing cell type) ซึ่งเป็น vector ที่ได้มาจากแมลงหวี่ในธรรมชาติ (Russell. 1998) ซึ่งสามารถแพร่กระจายได้ดีในแมลงสกุล *Drosophila* เท่านั้น ปัจจุบันมี transposable element ที่นิยมนำมาใช้ในการทดลองสร้างแมลงแปลงพันธุ์อยู่ 4 ชนิด คือ *Minos* ได้จากแมลงหวี่ *Drosophila hydei* (Franz and Savakis. 1991) *Mariner* ได้จากแมลงหวี่ *D. mauritiana* (Medhora *et al.* 1991) *Hermes* ได้จากแมลงวันบ้าน *Musca domestica* (Jasinskiene *et al.* 1998) และ *piggyBac* ได้จากผีเสื้อหนอนคืบกะหล่ำ *Trichoplusia ni* (Cary *et al.* 1989) มีรายงานประสิทธิภาพของการถ่ายยีนของ *Drosophila melanogaster* w^m โดยใช้ *piggyBac* vector และ helper vector (Shirk and Bossin. 2007) ดังตารางที่ 2.1 การศึกษานี้ใช้พลาสมิดคือ *piggyBac* ร่วมกับ helper พลาสมิดโดยแสดงโครงสร้าง ดังภาพที่ 2.2


123456789
987654321
123456789
987654321
ATGCA
TACGT
Host DNA
Target site
Host DNA
ATGCA 123456789
987654321 ATGCA
TACGT 123456789
987654321 TACGT
Target repeat
Inverted repeat
Transposon
Inverted repeat
Target repeat

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของ transposable elements (TE) (Lewin. 1994) *piggyBac* เป็นชิ้นส่วน DNA ที่สามารถเคลื่อนที่จากที่หนึ่งไปอีกที่หนึ่งได้ ค้นพบครั้งแรกว่าเป็นสารที่ทำให้เกิดจากการกลายพันธุ์ของ baculovirus ที่แยกจาก cell line ของ *T. ni* TE-368 พบแพร่กระจายในเซลล์สืบพันธุ์ แต่ไม่พบในส่วนอื่น (Handler *et al.* 1998) *piggyBac* เป็น DNA สายสั้นๆ ความยาวเท่ากับ 2.4 kb ที่มีส่วนปลาย 5' และ 3' ซ้ำกัน สามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ เรียกว่า inverted terminal repeat (ITR) ซึ่งมี 13 bp (Prudhomme and Couble. 2002) ภายใน *piggyBac* มีเอนไซม์ transposase ทำหน้าที่ในการจดจำ DNA เป้าหมายที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น TTAA บนโครโมโซม เมื่อ *piggyBac* แทรกเข้าไปในยีน อาจจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ หรืออาจจะทำให้เกิดการเพิ่มหรือขาดหายไปของชิ้นส่วนบนโครโมโซม (Cummins. 2001 ; Handler. 2002)



ก. ข.

A3	ย่อมาจาก cytoplasmic actin A3 promoter
EGFP	ย่อมาจาก enhanced green fluorescent protein gene
SV40	ย่อมาจาก simian vacuolating virus 40 gene
ITR	ย่อมาจาก inverted terminal repeats
trans	ย่อมาจากยีน enzyme transposase
Amp	ย่อมาจาก ampicillin –resistance gene

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของพลาสมิด และ helper พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง (Tamura *et al.* 2000)
ก. แสดงโครงสร้างของพลาสมิด pPIGA3GFP ซึ่งต่อไว้กับยีน EGFP
ข. แสดงโครงสร้างของ pHA3PIG ซึ่งเป็น helper พลาสมิด

ตารางที่ 2.1 ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนของ *Drosophila melanogaster* w^m โดยใช้ *piggyBac* vector และ helper vector (Shirk and Bossin. 2007)

vector/Helper	Concentration of V/H (ng/µl)	Number eggs injected	G_0 Adults Mated	%Matings GFP Positive	% G_1 Progeny GFP Positive
pB[3xP3GFPafm] (3.7 kb)/phsp-pBac	600:400	720	23 (3%)	17	ND*
	600:400	376	32 (9%)	16	63-97 (x =80%)
	600:100	1072	59 (6%)	18	ND*
	600:10	1876	56 (3%)	30	3-100 (x =31%)
	300:200	637	18 (3%)	16	ND*
	300:200	913	88 (10%)	63	3-100 (x =42%)
	300:200	633	27 (4%)	19	ND*
	300:200	978	67 (7%)	33	ND*
	300:200	928	161 (17%)	19	ND*
pPIGA3GFP (4.5 kb)/phsp-pBac	300:200	1123	113 (10%)	31	ND*
pB[3xP3GFP,6A2xlA1] (6.7 kb)/phsp-pBac	300:200	1065	23 (2%)	9	ND*
	300:200	1054	37 (3.5%)	8	ND*
pB[PUbnlsGFP] (5.9 kb)/phsp-pBac	150:100	1405	62 (4%)	18	2-24

2. การใช้ gene coding yeast recombinase FLP ที่แยกมาจากยีสต์ *Saccharomyces cervisiae* ซึ่งสามารถส่งถ่ายยีนเข้าไปตรงตำแหน่งจำเพาะไม่ใช่แบบสุ่มเหมือนวิธีอื่น ๆ

3. การใช้ Baculovirus expression vector คือตัดแต่งยีนเป้าหมายเข้าไปในไวรัสของแมลงชนิด nucleopolyhedrovirus และให้อยู่ภายใต้การควบคุมของ polyhedrin promoter เมื่อให้เชื้อไวรัสกับแมลง การแสดงออกของยีนจะเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ เช่นได้ผลผลิตของยีนที่ต้องการในปริมาณมาก แต่ไวรัสนี้ทำให้เกิดโรคกับแมลงและทำให้แมลงตายได้ การพัฒนา non-lethal baculovirus ขึ้นมาใช้จะช่วยขจัดข้อจำกัดนี้ได้

4. ไวรัสหลายชนิดถูกพัฒนานำมาใช้เป็นพาหะในการส่งถ่ายยีนในสิ่งมีชีวิต เช่น ไวรัสในกลุ่ม Alphaviruses (วงศ์ Togaviridae) แต่ยังมีข้อจำกัดคือ ไวรัสพาหะที่พ่วงยีนที่สนใจอยู่ด้วย (recombinant virus) เมื่อเพิ่มปริมาณด้วยการเพาะเลี้ยงใน cell culture ไปนาน ๆ จะเกิดกระบวนการ

คัดเลือกเหลือแต่ไวรัสที่ไม่มียีน การฉีดไวรัสพาหะเข้าไปในแมลงด้วยวิธี microinjection นั้นสามารถฉีดสารแขวนลอยไวรัสเข้าไปในแมลงได้เพียง 10 พิโคลิตร ซึ่งเท่ากับใช้อนุภาคไวรัส 100 อนุภาคโดยประมาณต่อเอ็มบริโอ ซึ่งไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการเชื่อมติดกับโครโมโซมของแมลงได้ การเพิ่มปริมาณไวรัสมากขึ้นอาจทำให้เข็มฉีดอุดตันและการเพิ่มขนาดของเข็มอาจเป็นอันตรายต่อเอ็มบริโอของแมลงได้ (Atkinson *et al.* 2001)

2.2.2.3 ยีนรายงานผล (reporter gene)

การคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถทำได้โดยอาศัย reporter gene ซึ่งเป็นยีนที่บ่งชี้การควบคุมการแสดงออกของยีน เช่นยีน *rosy*$^{+}$ ที่สร้างเอนไซม์ xanthine dehydrogenase (XDH) เพื่อสร้างสีตา ยีน cinnabar (cn) ที่สร้างเอนไซม์ Kyneurine 3-hydroxylase ใช้ในการสร้างสีตาสีแดง GFP (green fluorescent protein) เป็น reporter gene เป็นโปรตีนที่ได้จากแมงกระพรุน *Aequorea victoria* มี ขนาด 27 kDa ให้แสงสีเขียวที่ความยาวคลื่น 509 นาโนเมตร (Berghammer *et al.* 1999; Horn *et al.* 2002) มองเห็นได้ภายใต้กล้อง fluorescent จากการศึกษาเลือกใช้ EGFP (enhanced green fluorescent protein) มีขนาด 29 kDa ให้แสงสีเขียวที่ความยาวคลื่น 488-507 (The Enhanced Green/Red Fluorescence Proteins (EGFP/ERFP). 2007) เป็น reporter gene มีคุณสมบัติเหมือน GFP ซึ่งมีข้อดีคือง่ายต่อการตรวจสอบและสามารถผลิตได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งในแบคทีเรีย อาร์โทรโปดา ปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไม่เป็นพิษ และยังมีความคงทนแม้แมลงจะตายมากกว่า 14 วัน อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดคือ ต้องตรวจสอบในระยะที่ยังไม่โตเป็นตัวเต็มวัย เนื่องจากอาจมีการบดบังของลักษณะที่คล้ายกระดูกสันหลังภายนอกที่ห่อหุ้มลำตัว (exoskeleton) แสงอาจผิดเพี้ยนเนื่องจากการรวมกับอาหารในท่อขับถ่าย (malpighian tubules) นอกจากนี้การให้แสงสว่างมากๆในช่วงการปล่อยให้แสงถูกฟิล์มในขณะถ่ายรูป อาจมีผลกระทบกับแมลง (Handler and James. 2000 ; Horn and Wimmer. 2002)

2.2.2.4 โปรโมเตอร์ (promoter)

โปรโมเตอร์ (promoter) หมายถึงลำดับของนิวคลีโอไทด์บน DNA ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งโปรโมเตอร์จะแสดงการควบคุมการแสดงออกของยีนได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอวัยวะของแมลง ดังนั้นการสกัดแยกโปรโมเตอร์ออกมาวิเคราะห์คุณสมบัติทำให้สามารถนำมากำหนดการแสดงออกของยีนที่ต้องการได้ ปัจจุบันโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายยีนแมลง ได้แก่ heat shock 70 (*hsp70*) จะแสดงออกเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิฉับพลัน *actin 5C* , α13-tubulin, metallothionein (*Mtn*) เป็นต้น สำหรับใน *piggyBac* vector Prudhomme and Couble. (2002) รายงานมีโปรโมเตอร์ 3 ชนิด ที่สามารถรวมเข้า vector ได้ คือ transposon promoter (Handler *et al.* 1998) , *D. melanogaster* hsp70 promoter (Handler and Harrell. 2001) และ cytoplasmic actin A3 promoter (Tamura *et al.* 2000) ซึ่งโปรโมเตอร์ทั้ง 3 ชนิดนี้ สามารถแสดงออกได้ในทุกส่วนของเนื้อเยื่อสัตว์

2.2.2.5 ยีนที่มีประโยชน์ในการดัดแปลงพันธุกรรมแมลง

การดัดแปลงพันธุกรรมของแมลงมีวัตถุประสงค์หลัก เพื่อสร้างลักษณะที่ต้องการในแมลง ยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นอาจเป็นยีนที่มีอยู่แล้วในแมลง แต่ต้องการการปรับเปลี่ยนเพื่อให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น หรือเป็นยีนที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ลักษณะพันธุกรรมที่ควบคุมด้วยยีนเดี่ยวๆ (single gene) จะประสบความสำเร็จในการนำมาใช้ หรือปรับเปลี่ยนมากกว่าลักษณะที่ควบคุมด้วยกลุ่มของยีน (multiple genes) ตัวอย่างของยีนที่มีศักยภาพ ในการนำมาใช้ในแมลง Hoy (1996) ได้แก่

1. ยีนควบคุมความต้านทานต่อสารกำจัดแมลง (insecticide resistance genes) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด เช่น parathion hydrolase gene (*opd*) จากแบคทีเรีย *Pseudomonas* และ amplification core and esterase B1 gene จากยุง ทำให้ต้านทานต่อสารกำจัดแมลงชนิด organophosphorus ยีน cyclodiene และ acetylcholinesterase (*Ace*) จาก *D. melanogaster* ต้านทานต่อสารกำจัดแมลงหลายชนิด และ cytochrome P450-B1 gene (*CYP6A2*) ต้านทานต่อ DDT การทดลองส่งถ่าย organophosphate-degrading gene (*opd* gene) เข้าไปในหนอนกระทู้ *Spodoptera frugiperda* โดยใช้ baculovirus expression vector พบว่ามีการผลิตและสะสมผลผลิตของ *opd* gene

2. multidrug resistance genes เช่น metalloprotease (*Mpr*) หรือ P-glycoprotein (*Pgp*) gene ซึ่งแยกได้จากแมลงหวี่ หากส่งถ่ายยีนนี้เข้าสู่แมลงจะสามารถสร้างแมลงที่ต้านทานต่อสารเคมีหลายชนิดซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์สำหรับผึ้ง เพื่อป้องกันอันตรายจากสารพิษต่างๆ ที่มีปะปนในธรรมชาติ

3. antifreeze protein genes เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ทำให้แมลงสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในที่ที่มีอากาศหนาวจัดถึงจุดเยือกแข็ง ซึ่งพบยีนนี้ใน wolf-fish, Anar chichas lupas เทคโนโลยีนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการสร้างแมลงศัตรูธรรมชาติให้ทนต่ออากาศหนาวจัด เพราะทำให้สามารถนำแมลงศัตรูธรรมชาติจากเขตร้อนหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพไปใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชในประเทศเขตหนาวได้

4. catalase gene และ copper zinc superoxide dismutase gene โปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีนทั้งสองทำให้แมลงมีชีวิตยาวขึ้น ดังนั้นอาจใช้ประโยชน์จากยีนนี้ทำให้แมลงศัตรูธรรมชาติหรือแมลงที่เป็นประโยชน์อื่นๆ มีชีวิตยาวขึ้น

การสร้างแมลงแปลงพันธุ์ประสบความสำเร็จครั้งแรกในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) โดย Rubin and Spradling (1982) ใช้วิธีการใช้เข็มฉีดส่งถ่ายยีนเข้าไปในแมลง โดยถ่ายยีน *rosy*$^{+}$ ซึ่งเป็นยีนที่สร้างเอ็นไซม์ xanthine dehydrogenase (XDH) เป็น marker โดยประกอบเข้ากับ P element แล้วนำมาฉีดเข้าไปในตัวอ่อนของแมลงหวี่ที่เป็น *rosy* mutant (ซึ่งไม่มี XDH และมีตาสีขาวเนื่องจากไม่มีเอ็นไซม์ในการสร้างสีตา) และพบว่า P element สามารถส่งถ่าย (transpose) ยีน *rosy*$^{+}$ เข้าไปในโครโมโซมของแมลงหวี่ *rosy* mutant โดยวิธีการใช้เข็มฉีดส่งถ่ายยีนเข้าไปได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยดูจากสีตาที่กลับมามีสีตาแบบปกติ นอกจากนี้ ยีน *rosy*$^{+}$ ยัง

สามารถถ่ายทอดไปยังแมลงหวี่รุ่นต่อๆไปได้ด้วย ต่อมาได้มีการทดลองสร้างยุงแปลงพันธุ์โดยอาศัยวิธีการเดียวกับที่ทำในแมลงหวี่ (McGrane *et al.* 1988) ได้สำเร็จ แต่อัตราของ P element ที่รวมเข้าไปในโครโมโซมของยุงต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่ทำในแมลงหวี่ จึงได้มีการหา transposable element อื่นมาทดแทน P element ปัจจุบันมี element ที่นิยมนำมาใช้ในการทดลองสร้างแมลงแปลงพันธุ์อยู่ 4 ชนิดคือ *Minos*, *Mariner*,*Hermes* และ *piggyBac* ซึ่งได้ใช้วิธีการใช้เข็มฉีดส่งถ่ายยีนเข้าไปในยุงและแมลงต่างๆ และให้อัตราการรวมของยีนเข้าสู่โครโมโซมได้ดีกว่า P element ความสำเร็จของการใช้ element ดังกล่าวเช่น การใช้ *Mariner* ซึ่งมีส่วนของยีนที่สร้างเอนไซม์ซึ่งใช้ในการสร้างสีตาสีแดง (*cinnabar* eye color) ที่ได้จากแมลงหวี่ ฉีดเข้าไปในตัวอ่อนยุงลาย (*Aedes aegypti*) สายพันธุ์ซึ่งมีสีตาสีขาว (kh^{w}) พบว่ายุงลายสายพันธุ์ตาขาวสามารถสร้างสีตาสีแดงได้ (Cornel *et al.* 1997; Coates *et al.* 1998; Jasinskiene *et al.* 1998; Siriyasatien 2000 and Sethuraman and O'Brochta. 2005) การใช้ *Hermes* ซึ่งมียีนที่ควบคุมการสร้างสารเรืองแสง EGFP ของแมงกระพรุน ฉีดเข้าไปในไข่ของยุงลาย (Pinkerton *et al.* 2000) และในยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* พบว่าสามารถถ่ายทอดยีนดังกล่าวสู่รุ่นลูกได้ (Allen *et al.* 2001) การใช้ *Minos* ซึ่งมียีนEGFP ฉีดเข้าไปในไข่ยุงก้นปล่อง *Anopheles stephensi* (Catteruccia *et al.* 2000) พบว่ายุงสามารถเรืองแสงสีเขียวได้และเมื่อนำยุงที่มี EGFP มาผสมพันธุ์กับยุงสายพันธุ์ปกติ (wild type) พบว่า EGFP ยีนสามารถถ่ายทอดไปสู่ยุงรุ่นต่อๆไปได้ สำหรับการใช้ *piggyBac* ซึ่งมีส่วนของยีน cinnabar (cn) ฉีดเข้าไปในยุงลายสายพันธุ์ตาขาวทำให้ยุงดัดแปลงพันธุกรรมสามารถสร้างสีตาแดงได้ (Lobo *et al.* 2002) นอกจากนี้ยังมีการใช้ *piggyBac* vector ร่วมกับ helper vector ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกันใน mediteranean fruitfly (*Cratitis capitata*) สายพันธุ์ตาสีขาว พบว่าสามารถเปลี่ยนสีตาเป็นสีเหลืองถึงส้มแดง (Handler *et al.* 1998) ส่วนการใช้ *piggyBac* ร่วมกับ EGFP ใน red four beetle (*Mamestra brassicae*) พบว่าสามารถเรืองแสงได้ และสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นต่อๆไปได้ (Mandrioli and Wimmer. 2003)

ปัจจุบันได้มีความสำเร็จในการสร้างไหมบ้าน *B. mori* แปลงพันธุ์ขึ้นมาได้ Tamura *et al.* (2000) ใช้วิธีการใช้เข็มฉีดส่งถ่ายยีนเข้าไปในไข่ไหม โดยใช้พาหะ *piggyBac* transposable element ซึ่งมียีน EGFP เป็น marker พบว่าไหมสามารถเรืองแสงสีเขียวได้ และยีน EGFP สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นต่อๆไปได้ Zhong *et al.* (2007) เปรียบเทียบประสิทธิภาพของพาหะ *piggyBac* ซึ่งเป็นพาหะเดียวกันกับ Tamura *et al.* โดยใช้เข็มฉีดส่งถ่ายยีนเข้าไปในไข่ไหมบ้าน 3 สายพันธุ์ พบว่าประสิทธิภาพในการถ่ายยีนในไหม Nistari stain (สายพันธุ์อินเดีย) สูงกว่า Golden-yellow cocoon (สายพันธุ์เวียดนาม) และ Jiaqin (สายพันธุ์จีน) ตามลำดับ Thomus *et al.* (2002) ใช้เข็มฉีดส่งถ่ายยีนเข้าไปในไข่ไหมบ้านโดยใช้พาหะ *piggyBac* ซึ่งมียีน EGFP เป็น marker โดยฉีดทั้งด้าน anterior และ posterior พบว่า อัตราการฟักของไข่ที่ฉีดด้าน posterior จะสูงกว่า แต่ความสามารถในการส่งถ่ายยีนจะน้อยกว่าไข่ที่ฉีดด้าน anterior ส่วน Yamamoto (2003) ใช้เข็มฉีดส่งถ่ายยีน EGFP

โดยมีพาหะ *piggyBac* เป็นพาหะนำยีนเข้าไปในไวรัสของแมลงชนิด nucleopolyhedrovirus (NPV) เมื่อให้เชื้อไวรัสกับแมลง การแสดงออกของยีน EGFP เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ Tomita *et al.* (2002) ดัดแปลงพันธุกรรมไหมบ้านให้สามารถสร้างรังที่มีคอลลาเจนของมนุษย์ ด้วยการใช้เข็มฉีดส่งถ่ายยีนเข้าไปในไข่ไหม โดยใช้พาหะ *piggyBac* ซึ่งมียีน EGFP เป็น marker ซึ่งคอลลาเจนสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านวงการแพทย์รวมถึงการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนเนื้อเยื่อที่สูญเสียหรือหมดสภาพโดยใช้วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) (Ramshaw *et al.* 1996) คอลลาเจน เป็นสารสังเคราะห์ที่เลียนแบบคอลลาเจนในธรรมชาติ โดยส่วนใหญ่สกัดจากสัตว์ เช่น วัว หมู ทำให้มีโอกาสแพ้ได้ ก่อนฉีดจึงต้องทดสอบก่อนว่าแพ้หรือไม่ (Cooperman and Michaeli. 1984) โครงสร้างคอลลาเจนของคนและสัตว์มีความใกล้เคียงกัน จึงได้นำคอลลาเจนของสัตว์มาใช้ในคน ดังนั้นการผลิตคอลลาเจนโดยสกัดจากรังไหมจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณคอลลาเจนให้สูงขึ้น ถึงแม้จะมีความสำเร็จในการสร้างไหมแปลงพันธุ์ขึ้นมาได้ หากต้องการพัฒนาดัดแปลงพันธุกรรมไหมอีรี่ขึ้นมาก็ต้องทำการศึกษาเพื่อทดสอบว่า *piggyBac* transposable element นั้นจะสามารถส่งถ่ายยีนในไหมอีรี่ได้หรือไม่ เนื่องจากความสามารถในการส่งถ่ายยีนของ *piggyBac* ในแมลงต่างชนิดกันนั้นแตกต่างกัน

การดัดแปลงพันธุกรรมไหมอีรี่โดยอาศัย *piggyBac* transposable element เพื่อทดสอบความสามารถในการส่งถ่ายยีน หาก DNA พาหะนี้สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไปได้ ในอนาคตมีความเป็นไปได้ว่าจะสามารถสร้างไหมที่มีความต้านทานต่อเชื้อโรค สามารถผลิตเส้นใยที่มีคุณภาพและผลผลิตสูง สามารถสร้างสีของเส้นใยตามต้องการ โดยการใส่ยีนจากภายนอกให้เกิดการแสดงออกในไหมดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ยังอาจส่งถ่ายยีนที่สร้างโปรตีน เพื่อผลิตวัคซีนหรือโปรตีนที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ โดยการเลี้ยงไหมอีรี่ดัดแปลงพันธุกรรมซึ่งสามารถลดต้นทุนในการผลิต

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง และพลาสมิด

ไหมอีรี่ ได้รับอนุเคราะห์สายพันธุ์เริ่มต้นจาก รศ.ดร.ทิพย์วดี อรรถธรรม ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

พลาสมิด DNA ของ pPIGA3GFP ซึ่งเป็น *piggyBac* transposable element vector และ pHA3PIG ซึ่งเป็น helper plasmid ดังภาพที่ 2.2 ได้รับอนุเคราะห์จาก Dr.Toshiki Tamura จาก Insect Gene Engineering Laboratory, National Institute of Agrobiological Science, Japan

3.2 อุปกรณ์

1. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubater)
3. เครื่องชั่งอิเล็คโทรนิค (digital balancing)
4. เครื่องปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)
5. ตู้ไมโครเวฟ (microwave)
6. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส และ – 80 องศาเซลเซียส (refrigurator)
7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ (autoclave)
8. เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge)
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometry)
11. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (thermal cycler)
12. เครื่องอิเล็คโตรโฟเรซีส (electrophoresis)
13. เครื่องจ่ายสารปริมาณน้อย (microapplicator)
14. เครื่อง Gel Photodocumentation System
15. กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
16. กล้องฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.3 สารเคมี (ภาคผนวก)

1. สารเคมีที่ใช้ในการทำให้ไข่ไหมปราศจากเชื้อ
2. สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Lueria-Bertani broth(LB), LB agar, SOB solution และ SOC medium
3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ (competent cell)
4. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบโคลน
5. ชุดสกัดพลาสมิด DNA (Perfectprep® Plasmid Midi) ของบริษัท Eppendorf.
6. สารละลายที่ในการตรวจวิเคราะห์ DNA โดยวิธีแยกขนาด DNA ในอะกาโรสเจลภายใต้กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)
7. สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ของบริษัท Invitrogen
8. สารเคมีและชุดสกัดจีโนมิค DNA (DNeasy Tissue Kit) ของบริษัท QIAGEN®
9. ชุดแยก DNA ออกจากผลผลิตพีซีอาร์ (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit) ของบริษัท Amersham Bioscience
10. ชุดแยก DNA ให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล (Perfectprep® Gel Clean up) ของบริษัท Eppendorf
11. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อม DNA ของบริษัท Invitrogen
12. ชุดสกัดพลาสมิด DNA (QIA Spin Miniprep Kit)ของบริษัท QIAGEN®
13. สารเคมีที่ใช้ในการย่อย DNA(restriction enzyme) ของบริษัท Invitrogen

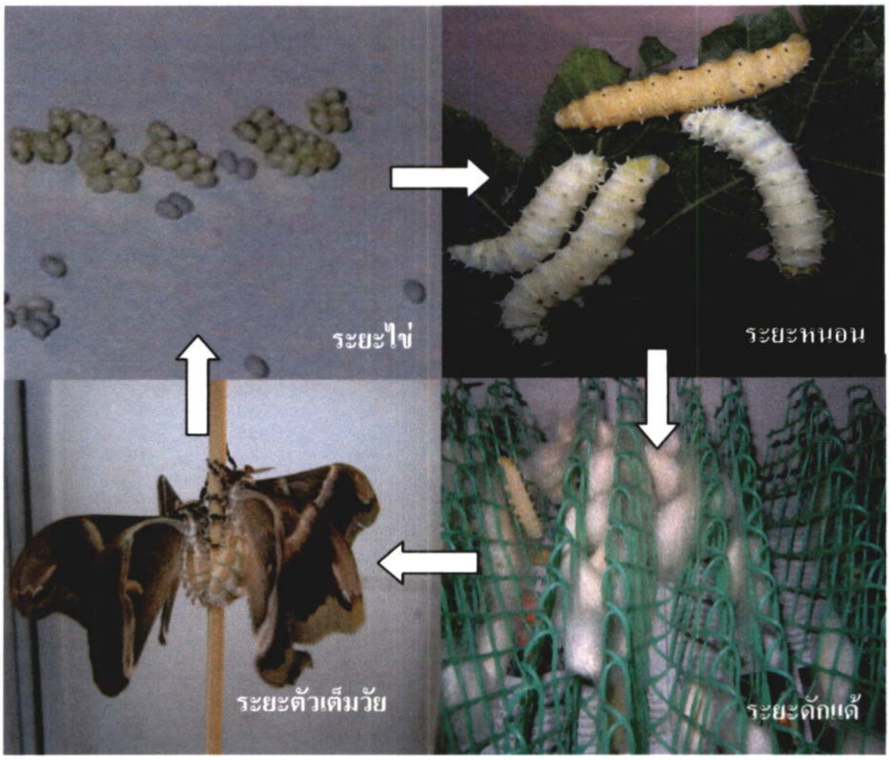
3.4 วิธีการ

3.4.1 การเลี้ยงไหมอีรี่

ทำการเลี้ยงไหมอีรี่ในห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยทำการเลี้ยงไหมภายในกล่องพลาสติกขนาด 10 x 28 x 10 เซนติเมตร กล่องละ 5 ตัว โดยเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ให้ใบละหุ่งซึ่งปลูกไว้ในแปลงทดลองเป็นอาหารโดยหั่นละเอียดให้หนอนวัยแรกวันละครั้ง ฉีกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้หนอนวัย 2 ถึงวัย 3 วันละ 2 ครั้ง และให้ทั้งใบจนกระทั่งในวัยส่วนในวัย 4 และ 5 วันละ 3 ครั้ง การให้อาหารจะวางใบละหุ่งในกล่องเลี้ยงพลาสติก หนอนจะขึ้นมาเกาะที่ใบละหุ่ง จากนั้นย้ายใบละหุ่งใส่กล่องเลี้ยงพลาสติกกล่องใหม่ วิธีนี้เป็นการถ่ายมูลหนอนโดยไม่ต้องจับตัวหนอน เลี้ยงจนหนอนสุกพร้อมจะเข้าดักแด้ ซึ่งลำตัวจะเป็นสีเหลือง นำหนอนใส่จ่อให้ถักใยเข้าดักแด้ เมื่อเข้าดักแด้แล้วนำดักแด้แขวนร้อยด้วยเชือก ผีเสื้อจะออกมาจากดักแด้ ทำการจับคู่ผีเสื้อให้เกาะ

74534

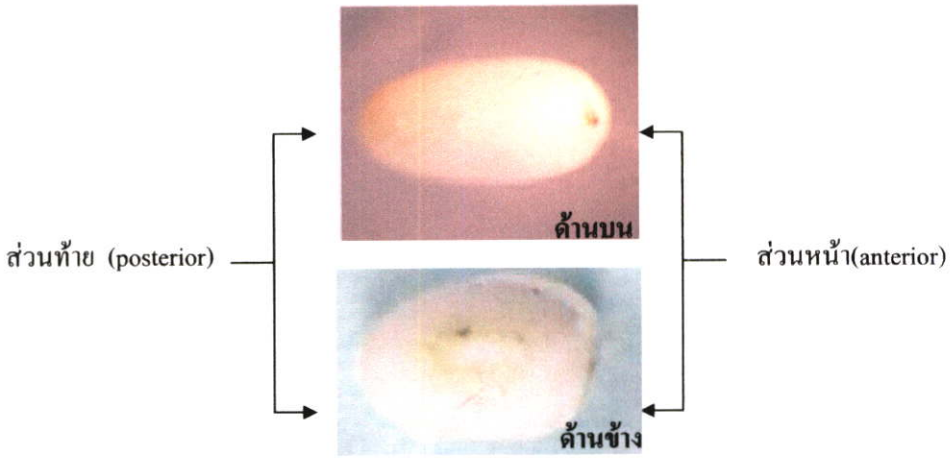
บนไม้ตะเกียบที่แขวนไว้ในกรง ผีเสื้อจะผสมพันธุ์และวางไข่บนไม้ตะเกียบ ซึ่งวงจรชีวิตของไหมอีรี่แสดงดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 วงจรชีวิตของไหมอีรี่

3.4.2 การเตรียมไข่ไหมอีรี่เพื่อฉีดสารละลาย DNA

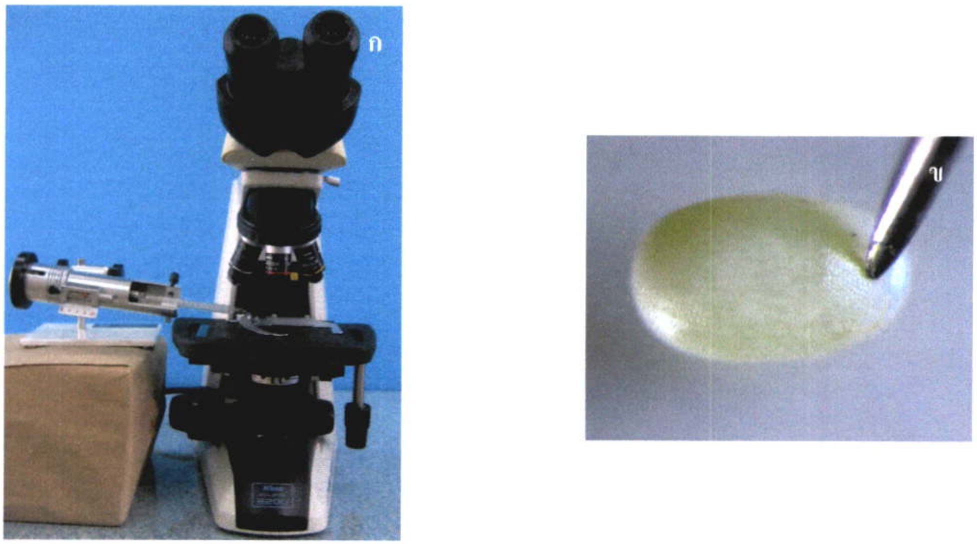
การฉีดสารละลาย DNA เข้าไปในไข่ไหมอีรี่ที่ได้รับการผสมแล้วในช่วงที่ pole cell กำลังมีการแบ่งตัว (ไข่มีอายุ 2- 4 ชั่วโมง) โดยทำให้ไข่ไหมออกโดยการใช้ถุงสีดำคลุมกรงเลี้ยงไหมเพื่อจำลองสภาพมืดเนื่องจากไหมเป็นผีเสื้อกลางคืนดังนั้นพฤติกรรมส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นในเวลากลางคืน เมื่อไหมออกไข่เก็บไข่ไหมโดยใช้พู่กันเขี่ยลงจานเพาะเชื้อ (plate) จากนั้นทำให้ไข่ปลอดเชื้อโรคด้วยการแช่ในสารละลาย formaldehyde 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด และทำให้แห้งด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปวางบนสไลด์ โดยการจัดเรียงจะจัดให้ไปในทิศทางเดียวกันโดยลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของไข่ไหมอีรี่แสดง ดังภาพที่ 3.2 แล้วทำการติดไข่ไหมด้วยกาวลาเท็กซ์ (latex) รอจนกาวแห้งสนิทแล้วนำไปฉีดสารละลาย DNA



ภาพที่ 3.2 ลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของไข่ไหมอีรี่

3.4.3 การฉีดสารละลาย DNA เข้าสู่ไข่ไหมอีรี่

นำไข่ไหมที่จัดเรียงแล้วไปฉีดสารละลาย DNAโดยใช้เครื่องจ่ายสารปริมาณน้อย (microapplicator) ซึ่งประกอบกับกระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยา (disposable needle) เบอร์ 27 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรูเข็ม 0.45 มิลลิเมตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังภาพที่ 3.3 ก แล้วทำการฉีดสารละลาย *piggyBac* transposable element vector : helper plasmid ในอัตราส่วน 1 : 1 ความเข้มข้น 400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.25 ไมโครลิตร เข้าไปในไข่ไหมด้านส่วนท้าย (Siriyasatien and Thavara. 2007 and Uhlirova *et al.* 2002) ดังภาพที่ 3.3 ข เนื่องจากอยู่ใกล้เซลล์สืบพันธุ์ (sex cell) โดย DNA จะค่อยๆ ซึมเข้าไปในไข่ แล้วปิดรอยฉีดด้วยกาวแห้งเร็ว (cyanoacrylate) จากนั้นนำไข่ไหมไปเก็บในที่มีความชื้นสูงโดยใช้กระดาษกรองที่ชุ่มน้ำเป็นตัวให้ความชื้น เมื่อตัวอ่อนฟักนำไปตรวจสอบการเรืองแสง EGFP ภายใต้กล้อง fluorescent และเลี้ยงจนเป็นตัวเต็มวัยต่อไป



ภาพที่ 3.3 ก เครื่องจ่ายสารปริมาณน้อย และกล้องจุลทรรศน์
ข ทิศทางการฉีดสารละลาย DNA เข้าสู่ไข่ไหมอีรี่

3.4.4 การเตรียมสารละลาย DNA ของ *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid

ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยในการฉีดสารละลาย DNA จะใช้ DNA ของ *piggyBac* transposable element vector ร่วมกับ helper plasmid ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่สร้างเอนไซม์ transposase ซึ่งจำเป็นในการส่งถ่ายยีนของ *piggyBac* ซึ่งทั้ง vector และ helper นี้ได้รับอนุเคราะห์จาก Dr.Toshiki Tamura ที่ Insect Gene Engineering Laboratory, National Institute of Agrobiological Science, Japan

3.4.4.1 การเตรียมเชื้อ *E.coli* ให้เป็นคอมพีเทนต์เซลล์

เพื่อนำ DNA ของ *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid เข้าสู่ *E.coli* DH5α โดยทำให้เซลล์ผู้รับ (*E.coli*) ให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะรับ DNA ภายนอกก่อน เรียกว่า คอมพีเทนต์เซลล์(competent cell) โดยใช้สารบางชนิด เช่น $CaCl_2$ หรือ ไอออนบวกอื่นๆ เช่น Mg^{2+}, Rb^{+}, Co^{2+}, K^{+} TB solution, และ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นต้น นำเซลล์ที่อยู่ในสภาพที่พร้อมนี้มาใส่รวมกับพลาสมิดที่ตัดต่อกับ DNA เรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส DNA จากพลาสมิดจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ทนต่อเอนไซม์ DNase ที่ผนังเซลล์ของ *E.coli* แล้วทำให้ส่วนผสมของเซลล์และพลาสมิดนี้เปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ด้วยวิธีการ heat shock โดยนำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที สารประกอบเชิงซ้อนของ DNA จะแทรกเข้าสู่เซลล์ได้ตามวิธีการของ Inoue *et al.* (1990)

1. นำเชื้อ *E.coli* DH5α จาก glycerol stock มาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

2. เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยว ใส่ลงในหลอดที่บรรจุ SOB solution จำนวน 2 มิลลิลิตร เลี้ยงโดยเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อทำหัวเชื้อ (starter)

3. ใส่หัวเชื้อ จำนวน 5 ไมโครลิตรใส่ลงในฟลาสก์ที่บรรจุ SOB solution จำนวน 250 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส จนกระทั่งจนถึง early log phase โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5-0.6 ซึ่งใช้เวลาเลี้ยงประมาณ 16-18 ชั่วโมง

4. แช่ฟลาสก์เลี้ยงเชื้อลงน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนำมาปั่นที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บเซลล์ เทส่วนใส (supernatant) ทิ้ง ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง

5. ล้างเซลล์โดยเติม TB solution ที่แช่เย็น จำนวน 80 มิลลิลิตรแช่ไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที

6. เก็บเซลล์โดยปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส

7. ละลายตะกอนของเซลล์โดยเติม TB solution ที่แช่เย็น จำนวน 20 มิลลิลิตร และ DMSO จำนวน 1.4 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ

8. แบ่งเซลล์คอมพีเทนต์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่แช่เย็นไว้แล้ว หลอดละ 100 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.4.4.2 การถ่ายโอนพลาสมิด DNA เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์หรือการทำ transformation และการตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิด DNA

1. นำคอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียมไว้ จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมกับพลาสมิด *piggyBac* จำนวน 5 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที เพื่อทำให้ DNA เกาะที่ permeable site ที่ผนังเซลล์ของ *E.coli* DH5 α

2. กระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) โดยแช่ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที หลังจากนั้นนำกลับมาแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเหลว SOC จำนวน 900 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. นำมา spread ลงบน LB agar plate ปริมาณ 100 ไมโครลิตรที่มี แอมพิซิลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

การตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิด DNA นั้นการใช้พลาสมิด DNA ที่เป็น DNA พาหะสามารถคัดเลือกโดยใช้การแสดงออกของยีนที่มีในพลาสมิด DNA ซึ่ง *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid มียีนที่ต้านทานยาแอมพิซิลิน ซึ่ง *E.coli* DH5α ที่ได้รับการถ่ายทอด DNA พาหะเข้าไปจะสามารถเจริญได้ในอาหารที่มียาแอมพิซิลิน

3.4.4.3 การสกัดพลาสมิด DNA โดยใช้ Perfectprep® Plasmis Midi

การใช้ชุดสกัด DNA บน column จะมี silica gel membrane ที่มีความสามารถในการจับเฉพาะ DNA เท่านั้นในสภาพ buffer ที่เหมาะสม จึงเป็นการแยก DNA ออกจากสิ่งที่ไม่ต้องการต่างๆ โดยชะล้างออกไปด้วยใช้เอธิลแอลกอฮอล์ ที่มีใน DPS (buffer salt solution) จากนั้นชะล้าง DNA ซึ่งติดอยู่ที่ column ด้วย elution buffer ที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำหรือน้ำเปล่า ที่มี pH 7.0-8.5 ซึ่งการสกัดพลาสมิด DNA โดยใช้ Perfectprep® Plasmid Midi มีวิธีการดังนี้

1. เขี่ยเชื้อ *E.coli* DH5 α ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pPIGA3GFP และ pHA3PIG ซึ่งเป็น helper พลาสมิด จำนวน 1 โคโลนี ใส่ในหลอดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth จำนวน 3 มิลลิลิตร ที่มียาแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อทำหัวเชื้อ (starter)

2. ใส่หัวเชื้อ จำนวน 5 ไมโครลิตรใส่ลงในฟลากส์ ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth 50 มิลลิลิตร ซึ่งมียาแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

3. นำเชื้อที่ได้มาปั่นที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง

4. ละลายตะกอนของเซลล์ใน solution I (buffered resuspension solution) ที่แช่เย็นจำนวน 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

5. เติม solution II (alkaline lysis solution) จำนวน 4 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วแช่น้ำแข็ง 5 นาที

6. เติม solution III (neutralization solution) ที่แช่เย็นจำนวน 4 มิลลิลิตรกลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนใสไว้

7. เติม PDBM (DNA binding matrix suspension in guanidinium salt) ที่แช่เย็น จำนวน 10 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาหลายครั้ง แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่ spin column ที่สวมทับด้วยหลอดเซนตริฟิวส์ นำไปปั่นที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และทิ้งส่วนที่ถูกกรองออกมา

8. เติม DPS (buffer salt solution) จำนวน 10 มิลลิลิตร ใน spin column ปั่นที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และทิ้งส่วนที่ถูกกรองออกมา แล้วนำไปปั่นอีกครั้งให้ spin column แห้ง จากนั้นแล้วนำไปสวมทับกับหลอดใหม่

9. เติม elution buffer จำนวน 3 มิลลิลิตรใน spin column ปั่นที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

10. ตกตะกอนพลาสมิด DNA โดยเติม 5 M NaCl จำนวน 70 ไมโครลิตรและ mussel glycogen จำนวน 70 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเติมเอธิลแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ 6 มิลลิลิตร ปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

11. ล้างตะกอนพลาสมิด DNA 5 ครั้ง เพื่อให้ได้ DNA ที่บริสุทธิ์โดยเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเพื่อให้ตะกอนหลุดจากด้านข้างหลอดแล้วนำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอธิลแอลกอฮอล์ออกจนหมด คว่ำหลอดทิ้งไว้เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้ตะกอน DNA แห้ง

12. ละลายตะกอน DNA ด้วยสารละลาย 5 mM KCl (pH 7.0), 0.5 mM NaH_2PO_4 แล้วจึงเก็บพลาสมิด DNA ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.4.4. 4 การวัดหาปริมาณ DNA โดยใช้ spectrophotometer

การวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร โดย DNA สามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย DNA จากสูตรความเข้มข้นของ DNA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260}x 50 x dilution factor

ถ้าค่า A_{260}ที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่ามีความเข้มข้นของ DNA สายคู่ (double-stranded DNA; ds-DNA) เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่า A_{260}/A_{280} ที่อยู่ในช่วง 1.65-1.85 แสดงว่า DNA ที่สกัดได้บริสุทธิ์หรือมีคุณภาพดี แต่ถ้าค่าต่ำกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนและฟีนอลปะปนอยู่ในสารละลาย หรือถ้ามากกว่า 1.85 แสดงว่ามี RNA ปนอยู่ในสารละลาย

หากพบว่า DNA สกัดได้ไม่บริสุทธิ์ หรือค่าความเข้มข้นของ DNA น้อยเกินไป จำเป็นต้องตกตะกอน DNA ใหม่ โดยเริ่มวิธีการสกัดพลาสมิด DNA โดยใช้ Perfectprep® Plasmid Midi ดังข้อ 3.4.4.3 ใหม่ตั้งแต่ข้อที่ 10 แล้วจึงเก็บพลาสมิด DNA ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาฉีดสารละลายเข้าเข้าสู่ไข่ไหม ต้องปรับความเข้มข้นสุดท้ายของ *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid ให้ได้เท่ากับ 400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.4.4.5 การตรวจวิเคราะห์ DNA โดยการแยกขนาด DNA ในเจลอะกาโรส ภายใต้สนามไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

1. ชั่งอะกาโรสชนิดผง 0.4 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 1X TAE buffer จำนวน 40 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อมิลลิลิตร) เจล)
2. นำไปทำให้เดือดในเตาไมโครเวฟจนอะกาโรสละลายหมดทิ้งไว้ให้อุ่น (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส)

3. เทเจลลงในถาด (tray) แล้ววางหวี (comb) ไว้ทางส่วนบน ทิ้งไว้ให้ เจลแข็งตัวจึงถอดหวีออก จากนั้นนำเจลที่อยู่ในถาดไปวางบนเครื่องแยกขนาดชิ้นส่วนพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าตามแนวราบ เทสารละลาย 1X TAE buffer ลงในเครื่องจนท่วมแผ่นเจล

4. ผสมพลาสมิด DNA ที่ได้ผสมกับสีติดตาม (6x loading dye) ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 บนกระดาษพาราฟิล์ม (parafilm) นำส่วนผสมทั้งหมดมาหยอดลงในหลุมบนแผ่นเจล (1 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง) โดยใช้ 1 กิโลเบส marker ซึ่งเป็นแถบ DNA มาตราฐาน อยู่ด้านหน้าของถาดเจลเช่นเดียวกันกับ positive control และ negative

5. ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องกำเนิดใช้ความต่างศักดิ์ไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที หรือจนสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลเคลื่อนที่มาใกล้เกือบถึงขอบเจลอีกด้านประมาณ 1 - 2 เซนติเมตร

6. นำเจลไปแช่ในกล่องพลาสติกที่บรรจุน้ำยาย้อม DNA (ethidium bromide 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที และ ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที

7. นำแผ่นเจลไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Gel Photodocumemtation System ซึ่งสามารถมองเห็นแถบสีของ DNA ที่ติดสีย้อม ethidium bromide แล้ว จากนั้นทำการบันทึกภาพและนำไปวิเคราะห์ผล

3.4.4.6 การตรวจหายีน EGFP จากพลาสมิดDNAโดยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerlase chain reaction, PCR)

การใช้เทคนิคพีซีอาร์เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณหรือจำนวนของ DNAเป้าหมาย ซึ่งเป็นบริเวณเล็กๆ ในสาย DNA ให้มีปริมาณมากขึ้น ในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งการตรวจสอบต้องอาศัยองค์ประกอบ คือ DNA แม่แบบ (DNA template) ไพรเมอร์ (primer) dNTP ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่จะเข้าไปต่อกับส่วนของไพรเมอร์ให้เป็นสาย DNA *Taq* polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ ที่สังเคราะห์สาย DNA และบัพเฟอร์ที่ทำให้ปฏิกริยาสมบูรณ์ DNA แม่แบบ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้จีโนมิค DNA จากผีเสื้อไหมอีรี่ที่มีการแสดงออกของยีน EGFP ภายใต้กล้อง fluorescent โดยใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบไว้คือ

GFPBAC F-5’- ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3’

GFPBAC R-5’-CGTCCATGCCGAGAGTGATCC-3’

การเกิดปฏิกริยาพีซีอาร์ ต้องอาศัยสารละลายที่มีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.1 และสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมดังนี้

1. initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ
2. PCR ประกอบด้วย
    - denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที
    - annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที
    - extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที

    35 รอบ
3. final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ
4. เก็บผลผลิต ที่ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับกระบวนการพีซีอาร์

สาร	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
25 mM $MgCl_2$	2.5
10XPCR buffer	2.5
2mM dNTP	2.5
0.5μM Primer Forword	1.5
0.5μM Primer Reverse	1.5
Taq DNA polymerase	0.1
Template (พลาสมิด DNA 10-50 ng/μl)	1
น้ำกลั่น	13.4
รวม	25

3.4.5 การตรวจหายีน EGFP ในไหมอีรี่

3.4.5.1 การตรวจสอบการเรืองแสง GFP ภายใต้กล้อง fluorescent โดยจะตรวจดูการแสดงออกของยีน EGFP ในช่วงที่หนอนแรกฟักภายใต้กล้อง fluorescent

3.4.5.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์

3.4.5.2.1 การสกัดจีโนมิค DNA โดยใช้ DNeasy Tissue Kit ของบริษัท QIAGEN®

1. บดส่วนปลายท้องของผีเสื้อไหมอีรี่ประมาณ 50 มิลลิกรัม ด้วย plastic pestle ซึ่งจะมีรูปร่างพอดีกับหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1,500 ไมโครลิตร ซึ่งบรรจุ PBS จำนวน 180 ไมโครลิตร บดจนแหลกละเอียด

2. เติม proteinase K จำนวน 20 ไมโครลิตร และ AL (lysis buffer ที่มี guanidine hydrochloride) จำนวน 200ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส โดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. เติมเอธิลแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร

4. ดูดส่วนผสมที่ได้ลงใน column ที่สวมทับด้วยหลอดเซนตริฟิวส์ นำไปปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งส่วนที่ถูกกรองออกไป

5. ย้าย colum ลงหลอดใหม่ เติม AW1 (wash buffer 1ที่มี guanidine hydrochloride) จำนวน 500 ไมโครลิตร ปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนที่ถูกกรองออกไป

6. ย้าย colum ลงหลอดใหม่ แล้วเติม AW2 (wash buffer 1 ที่มี sodium azide) จำนวน 500 ไมโครลิตร ปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนที่ถูกกรองออกมา แล้วย้าย colum ลงหลอดใหม่

7. เติม AE (elution buffer) จำนวน 200ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงเก็บจีโนมิค DNA ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.4.5.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน EGFP จากจีโนมิค DNA โดยเทคนิคพีซีอาร์

นำตัวอย่างจีโนมิค DNA มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์ เงื่อนไขเดียวกับข้อ 3.4.4.6 โดยใช้จีโนมิค DNA เป็นแม่แบบ (template) จำนวน 10ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 4.4 ไมโครลิตร แทนปริมาตรเดิมในตารางที่ 3.1 แล้ววิเคราะห์ DNA โดยวิธีแยกขนาด DNA ในอะกาโรสเจลภายใต้กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis) ต่อไป

3.4.6 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing)

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส สามารถส่งตัวอย่างได้ 2 วิธี

3.4.6.1 การทำให้ DNA บริสุทธิ์จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit) ของบริษัท Amersham Bioscience

1. เติม capture buffer จำนวน 500 ไมโครลิตร ลงใน GFX column ที่สวมทับด้วย collection tube แล้ว

2. ใส่ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงใน column ผสมสารโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง 4-6 ครั้ง นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนที่ถูกกรองออกมา

3. สวมทับ column ใน collection tube เดิมอีกครั้ง แล้วเติม wash buffer จำนวน 500 ไมโครลิตร ลงใน column นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนที่ถูกกรองออกมา

4. สวมทับ column ในหลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม elution buffer จำนวน 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที เก็บสารละลาย DNA ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป โดยใช้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัมต่อ 15 ไมโครลิตร

3.4.6.2 ถ่ายทอดยีน EGFP และตรวจสอบโคลนที่ได้

3.4.6.2.1 การแยก DNA ให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล (Perfectprep® Gel Clean up) ของบริษัท Eppendorf

1. เมื่อตรวจพบ DNA ที่มีผลผลิตตามต้องการแล้วทำการตัดเจลแยกแถบ DNA ที่ต้องการใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ที่ทราบน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเจล

2. เติม binding buffer จำนวน 3 เท่าของน้ำหนักเจล (เช่นน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัม ต้องเติม binding buffer จำนวน 300 ไมโครลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที โดยเขย่าทุก 2-3 นาที โดยใช้เครื่องผสมสาร จนเจลละลายหมด

3. เติม isopropanol จำนวน 1 เท่าของน้ำหนักเจล กลับหลอดไปมาเพื่อผสมให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนผสมทั้งหมดลงใน QIAquick spin column ที่สวมทับด้วยหลอดเก็บ นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนที่ถูกกรองออกไป

4. ล้าง DNA ที่เกาะอยู่ที่ column โดยเติม dilution buffer จำนวน 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนที่ถูกกรองออกไป

5. ย้าย column ลงหลอดใหม่ เติม elution buffer 25 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลาย DNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.6.2.2 การเชื่อม DNA ผลผลิตกับ DNA พาหะ

นำ DNA ที่ได้จากข้อ 3.4.6.2.1 มาเชื่อมต่อกับ DNA พาหะ (vector) ซึ่งการทดลองนี้ใช้ pGEM®-T Easy ของบริษัท Promega® ตามอัตราส่วนดังตาราง 3.3 ซึ่งสามารถคำนวนอัตราส่วนของ ในการเชื่อม DNA ผลผลิต (insert DNA) และ DNA พาหะ (vector) ซึ่งใช้ pGEM®-T Easy

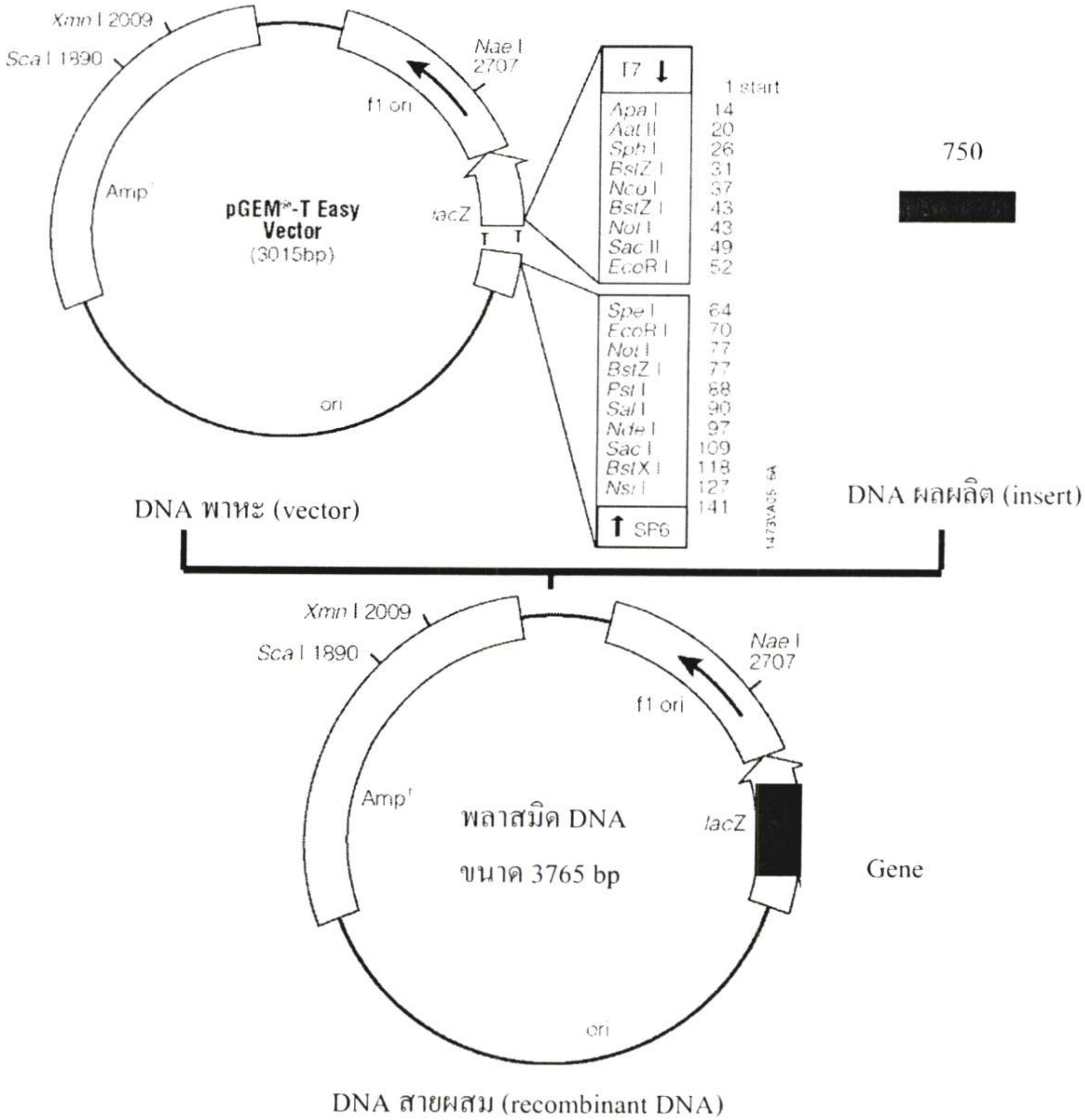
$$\text{ความเข้มข้นของ insert} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ vector X ขนาดของ insert X อัตราส่วน}}{\text{ขนาดของ vector}}$$

1. ละลายส่วนประกอบต่างๆ ที่มีอัตราส่วนดังตาราง 3.2 บนน้ำแข็ง
2. ผสมให้เข้ากันเบาๆ ในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการถ่ายโอน DNA เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* DH5α หรือการทำ transformation ตามวิธีการที่ 3.4.4.2

ตารางที่ 3.2 อัตราส่วนของสารในการเชื่อมของ insert DNA เข้ากับ vector (pGEM®-T Easy)

องค์ประกอบ	ขนาด/ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
insert DNA	2
vector (pGEM®-T Easy)	1
2xLigation buffer	5
T4 DNA ligase	1
น้ำ	1
ปริมาตรรวม	10

การคัดเลือกโดยการใช้การแสดงออกของยีนที่มีใน DNA พาหะ ได้แก่ ยีนที่ให้ลักษณะต่อต้านต่อยาแอมพิซิลิน โดยที่ *E.coli* ที่ได้รับการถ่ายทอด DNA พาหะนั้นจะสามารถเจริญได้ในอาหารที่มียาแอมพิซิลิน นอกจากนี้ยังใช้เทคนิค blue/white screening เนื่องจากพลาสมิด pGEM®-T Easy มี *lac Z* ที่ผลิตเอนไซม์ ß – galactosidase จะย่อยสาร X-Gal เกิดเป็นโคโลนีสีฟ้า แต่เมื่อ *lac Z* ได้รับชิ้นส่วน DNA เข้าไปสอดแทรก ถูกแยกออกจากกัน จึงไม่สามารถผลิตเอนไซม์ ß – galactosidase ได้ เกิดเป็นโคโลนีสีขาว


Xmn I 2009
Sca I 1890
Nae I
2707
f1 ori
Amp^r
pGEM®-T Easy
Vector
(3015bp)
lacZ
T T
ori
T7
1 start
Apa I 14
Aat II 20
Sph I 26
BstZ I 31
Nco I 37
BstZ I 43
Not I 43
Sac II 49
EcoR I 52
Spe I 64
EcoR I 70
Not I 77
BstZ I 77
Pst I 88
Sal I 90
Nde I 97
Sac I 109
BstX I 118
Nsi I 127
141
SP6
1473VA05_6A
750
DNA พาหะ (vector)
DNA ผลผลิต (insert)
Xmn I 2009
Sca I 1890
Nae I
2707
f1 ori
Amp^r
พลาสมิด DNA
ขนาด 3765 bp
lacZ
Gene
ori
DNA สายผสม (recombinant DNA)

ภาพที่ 3.4 การดำเนินงานในขั้นตอนเชื่อม DNA (ดัดแปลงจาก Promega. 2007)

3.4.6.2.3 การตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิด pGEM®-T Easy DNA

3.4.6.2.3.1 การคัดเลือกโคลนจากฟีโนไทป์

การคัดเลือกโดยการใช้การแสดงออกของยีนที่มีใน DNA พาหะ ได้แก่ ยีนที่ให้ลักษณะต่อต้านต่อยาแอมพิซิลิน โดยที่ *E.coli* ที่ได้รับการถ่ายทอด DNA พาหะนั้นจะสามารถเจริญได้ในอาหารที่มียาแอมพิซิลิน นอกจากนี้ยังใช้เทคนิค blue/white screening เนื่องจากพลาสมิด pGEM®-T Easy มี *lac Z* ที่ผลิตเอนไซม์ ß – galactosidase จะย่อยสาร X-Gal เกิดเป็นโคโลนีสีฟ้า แต่เมื่อ *lac Z*

ได้รับชิ้นส่วน DNA เข้าไปสอดแทรก ถูกแยกออกจากกัน จึงไม่สามารถผลิตเอนไซม์ ß – galactosidase ได้ เกิดเป็นโคโลนีสีขาว

3.4.6.2.3.2 การตรวจสอบขนาดชิ้นส่วน DNA ที่ทำการสอดแทรกในพลาสมิด DNA

3.4.6.2.3.2.1 การสกัดพลาสมิด DNA ด้วย Fast Plasmid ^{TM}Mini

1. นำโคลนที่คัดเลือกได้จาก 3.4.6.2.3.1 มาเลี้ยงในหลอดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth จำนวน 3 มิลลิลิตร ที่มียาแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน
2. นำเซลล์ที่ได้ปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง
3. ละลายตะกอนของเซลล์ใน lysis solution จำนวน 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. ดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน spin column ที่สวมทับด้วย collection tube นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนที่ถูกกรองออกมา
5. เติม wash buffer จำนวน 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนที่ถูกกรองออกมา ปั่นอีกครั้งเพื่อให้ spin column แห้ง
6. เติม elution buffer จำนวน 50 ไมโครลิตร ปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1นาที แล้วเก็บสารละลาย DNA บริสุทธิ์ ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์ในขั้นต่อไป

3.4.6.2.3.2.2 การตรวจสอบโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิด DNA ที่สกัดได้จาก 3.4.6.2.3.2.1 มาตรวจสอบชิ้นส่วน DNA ที่สอดแทรกโดยใช้เอนไซม์ ตัดจำเพาะตัดส่วนที่สอดแทรก โดยที่ DNA พาหะ pGEM®-T Easy มีบริเวณที่ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Eco*R I อยู่ 2 ตำแหน่งคือบริเวณหัวและท้าย จึงสามารถตรวจสอบขนาดของยีนที่สอดแทรกเข้าไปได้ โดยใช้อัตราส่วนตามตารางที่ 3.3 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบขนาดของ DNA ในอะกาโรสเจลภายใต้กระแสไฟฟ้า โดยเปรียบเทียบกับขนาดของ DNA มาตรฐาน

ตารางที่ 3.3 อัตราส่วนของสารในการย่อยพลาสมิด pGEM®-T Easy ด้วย restriction enzyme (*Eco*RI enzyme)

องค์ประกอบ	ขนาด/ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
พลาสมิด DNA	2
*Eco*RI enzyme(10U/µl)	1
10X REACT®3	1
น้ำ	6
ปริมาตรรวม	10

3.4.7 การวิเคราะห์ลำดับเบส

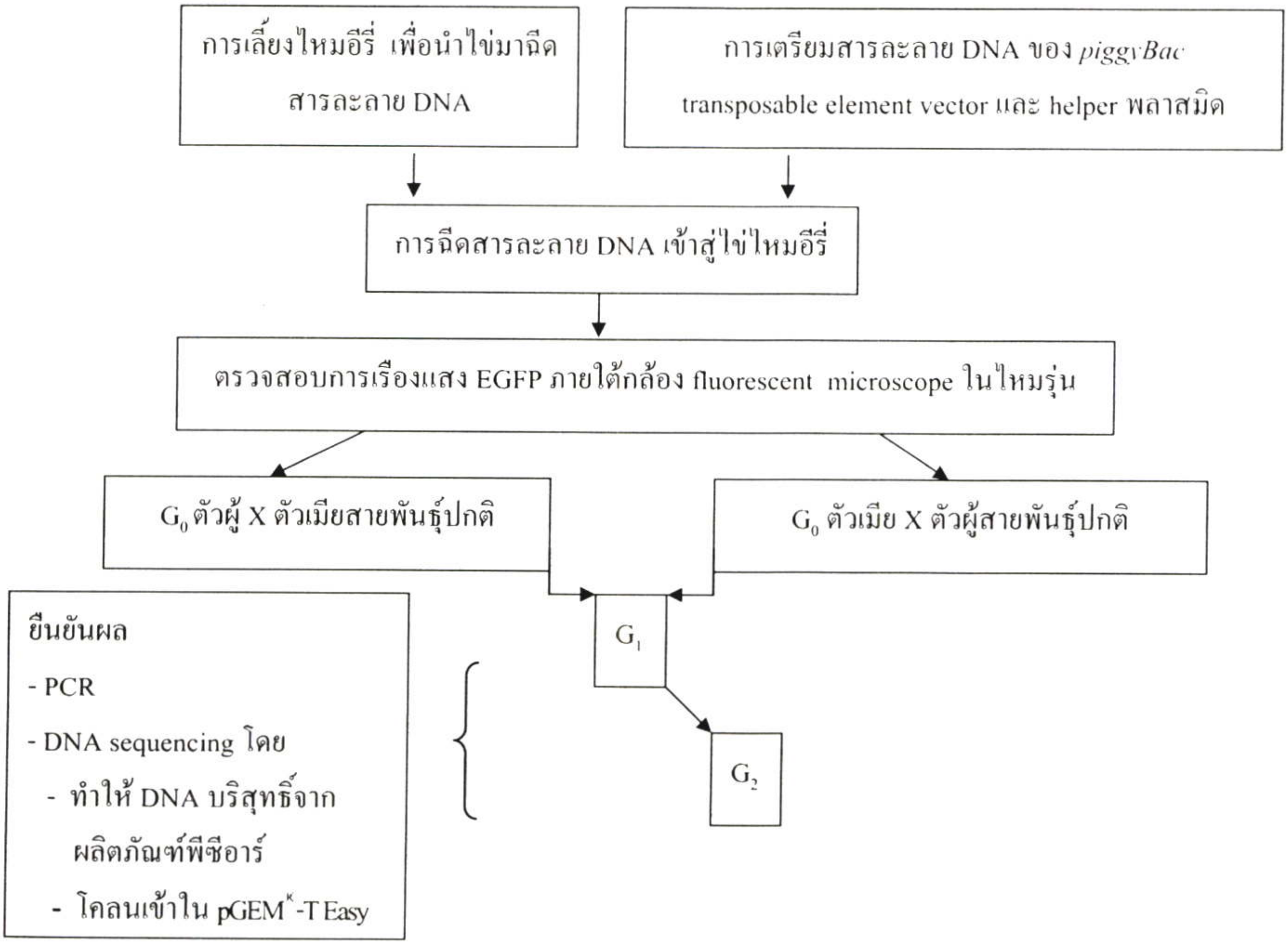
การหาลำดับเบสอาจทำได้ 2 วิธี คือ วิธีทางเคมี และวิธีใช้เอนไซม์ ซึ่งในที่นี่จะกล่าวถึงการหาลำดับเบสโดยวิธี ใช้เอนไซม์ DNA polymerase I (ซึ่งสังเคราะห์จาก T7) ทำหน้าที่สังเคราะห์สาย DNA สายใหม่ที่มีเบสคู่สมกับ DNA แม่แบบ การทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการ primer ในการเริ่มต้น จากนั้นจะนำนิวคลีโอไทด์เข้าต่อที่ปลาย 3' OH ของปฏิกิริยา (ทิศทางการสังเคราะห์ คือ 5'⟶ 3') ซึ่งการสังเคราะห์จะสิ้นสุดเมื่อมีการนำ 2,3 dideoxy nucleotide tiphophate (dd NTP) เข้าต่อที่ปลาย 3'OH ของ primer [บางครั้งอาจใช้เอนไซม์ Klenow fragment (คือเอนไซม์ DNA polymerase I ที่ตัดคุณสมบัติ 5'⟶ 3'exonuclease) แทน DNA polymerase I] ขั้นตอนการทำ DNA sequencing มีดังนี้

โดยนำพลาสมิดที่ตรวจสอบว่ามียีนสอดแทรกที่มีขนาดตามต้องการไปตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้ primer T7 และ SP6 เพื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีในฐานข้อมูล GenBank

3.4.8 การศึกษาการถ่ายทอดของยีน EGFP

ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน (transformation efficiency) ความคงทนของยีนที่ถูกส่งถ่ายเข้าไป (stability of the transgene) และอัตราการถ่ายทอดของยีนที่ถูกส่งถ่ายเข้าไปสู่ไหมรุ่นต่อๆไป หาได้โดยอาศัย EGFP เป็น reporter gene โดยการนำไหมที่ได้จากการฉีด DNA และมีการแสดงออกของยีน EGFP (G_0) ไปผสมพันธุ์กับไหมที่ไม่ได้รับการฉีด DNA (wild type) และตรวจหา EGFP ในไหมรุ่นใหม่ที่ได้ (G_1) ซึ่งหากสามารถตรวจพบแสดงได้ว่าเกิดการแปลงพันธุ์อย่างถาวร (stable transformation) เมื่อทำการผสมไหมที่มีการแปลงพันธุ์กับไหมสายพันธุ์ปกติ (wild type) และสามารถตรวจหา EGFP ได้ในรุ่นต่อไปย่อมแสดงว่ายีนที่ถูกส่งถ่ายไปมีความถาวร (stability) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพในการส่งถ่าย ยีนของ *piggyBac* ในไหมอีรี่ได้เช่นกัน ขั้นตอนการทดลองกล่าวโดยสรุปดังภาพที่ 3.5

ในการศึกษาครั้งนี้ แมลงจะถูกเลี้ยงในห้องประตู 2 ชั้น และเข้าได้เฉพาะนักวิจัยเท่านั้น หลังจากการวิจัยแมลงที่ได้ดัดแปลงพันธุกรรมทั้งหมดจะถูกทำลายโดยแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์


การเลี้ยงไหมอีรี่ เพื่อนำไข่มาฉีดสารละลาย DNA
การเตรียมสารละลาย DNA ของ *piggyBac* transposable element vector และ helper พลาสมิด
การฉีดสารละลาย DNA เข้าสู่ไข่ไหมอีรี่
ตรวจสอบการเรืองแสง EGFP ภายใต้กล้อง fluorescent microscope ในไหมรุ่น
G_0 ตัวผู้ X ตัวเมียสายพันธุ์ปกติ
G_0 ตัวเมีย X ตัวผู้สายพันธุ์ปกติ
G_1
G_2
ยืนยันผล
- PCR
- DNA sequencing โดย
- ทำให้ DNA บริสุทธิ์จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์
- โคลนเข้าใน pGEM^{R}-T Easy

ภาพที่ 3.5 ขั้นตอนการทดลองโดยสรุป

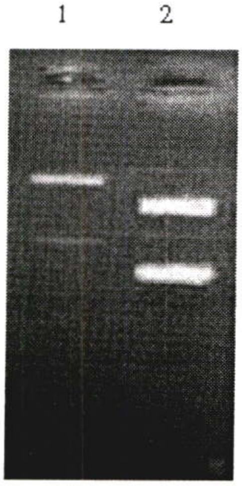
บทที่ 4

ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการฉีดสารละลาย DNA ของ *piggyBac* transposable element vector เข้าสู่ไข่ไหมอีรี่ที่ได้รับการผสมแล้วในช่วงที่ pole cell กำลังมีการแบ่งตัว (ไข่มีอายุไม่เกิน 4 ชั่วโมง) โดยในการฉีดสารละลาย DNA ซึ่งใช้พลาสมิด DNA ของ *piggyBac* transposable element vectors ร่วมกับ helper plasmid ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่สร้างเอนไซม์ transposase ซึ่งจำเป็นในการส่งถ่ายยีนของ *piggyBac* ซึ่งทั้ง vector และ helper นี้ได้รับอนุเคราะห์จาก Dr.Toshiki Tamura ที่ Insect Gene Engineering Laboratory, National Institute of Agrobiological Science, Japan

4.1 ผลการเตรียมสารละลาย DNA ของ *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid

4.1.1 การแยกขนาดพลาสมิด DNA ของ *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid



ช่องที่ 1 พลาสมิด DNA ของ *piggyBac* transposable element vector

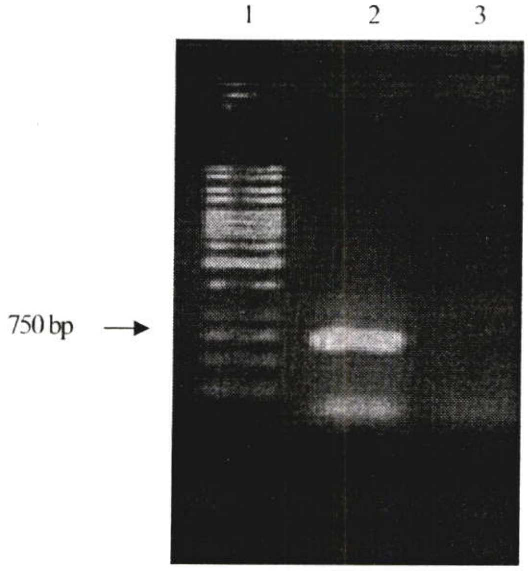
ช่องที่ 2 พลาสมิด DNA ของ helper plasmid

ภาพที่ 4.1 การเคลื่อนที่ของ DNA ของ *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid

จากการถ่ายโอนพลาสมิด DNA เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* DH5α แล้วตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิด โดยใช้การแสดงออกของยีนที่มีในพลาสมิด ซึ่งมียีนที่ต้านทานยาแอมพิซิลิน แล้วนำมาแยกขนาดโดยวิธีแยกขนาด DNA ในอะกาโรสเจลภายใต้กระแสไฟฟ้า ซึ่งการเคลื่อนที่ของ DNA ดังภาพที่ 4.1 ซึ่ง DNA ของ *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid

พบการเคลื่อนที่ของ DNA แยกเป็น 2 แถบ เป็นการเคลื่อนที่ของพลาสมิดที่มีโครงร่างต่างกัน คือ เมื่อพลาสมิดอยู่ในรูปร่างเป็นวงแหวนปลายปิดและพันเป็นเกลียวซ้อนเรียก supercoiled มีความเสถียรมากที่สุด จึงเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเมื่ออยู่ใน รูปเส้นตรงและคลายเป็นเส้นเรียก linear และรูปวงแหวนปลายเปิด และคลายเป็นวงเพียงวงเดียวเรียก relaxed ตามลำดับ สำหรับ *piggyBac* ที่ประกอบด้วยยีน EGFP สามารถนำไปยืนยันโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์อีกครั้ง

4.1.2 การตรวจหายีน EGFP ใน *piggyBac* transposable element vectors โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์



ช่องที่ 1 DNA มาตราฐาน 1 kb ladder

ช่องที่ 2 ยีน EGFP ที่ได้จากพีซีอาร์ ซึ่งใช้พลาสมิด DNA ของ *piggyBac* transposable element vectors แม่แบบ

ช่องที่ 3 Negative control โดยใช้น้ำแทน DNA แม่แบบ

ภาพที่ 4.2 DNA ผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายส่วนของยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้พลาสมิด DNA ที่สกัดเป็นแม่แบบโดยใช้ไพรเมอร์ GFPBACF และ GFPBACR ในการตรวจสอบยีน

ผลการตรวจสอบยีน EGFP ใน *piggyBac* transposable element vectors โดยเทคนิคพีซีอาร์ ดังภาพที่ 4.2 พบยีน EGFP ที่มีขนาด 750 คู่เบส ซึ่งมีอยู่ใน *piggyBac* transposable element vector จากนั้นนำไปทำการฉีดร่วมกับ helper plasmid เข้าไปในไข่ไหมอีรี่ เมื่อไข่ฟักการตรวจสอบการเรืองแสง GFP ภายใต้กล้อง fluorescent ต่อไป

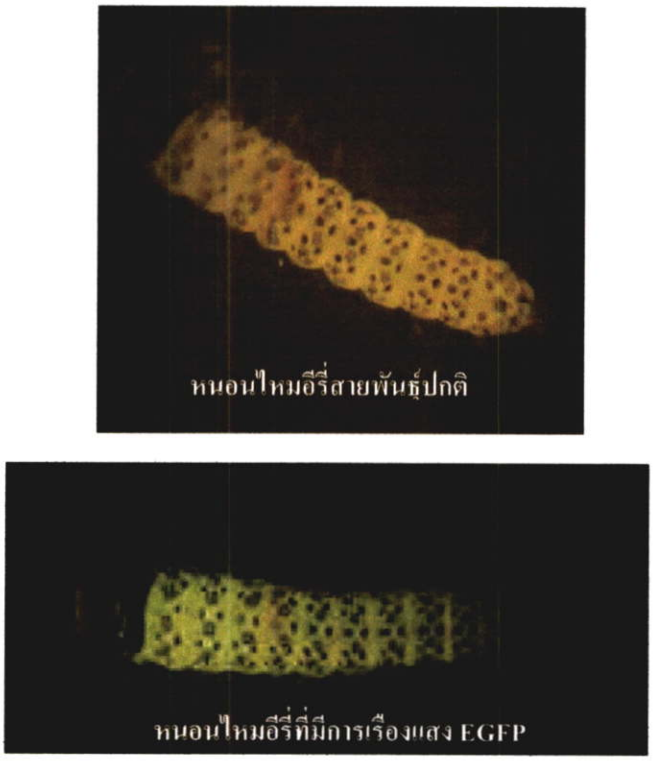
ตารางที่ 4.1 ผลการฉีดสารละลาย DNA ของ *piggyBac* transposable element vector เข้าสู่ ไข่ไหมอีรี่

ครั้งที่	จำนวน(ฟอง)		จำนวน(ตัว)				เปอร์เซ็นต์	
	ไข่ที่ฉีด	ไข่ฟัก	รอดเป็นตัวเต็มวัย	ผีเสื้อผสมพันธุ์	ผีเสื้อรุ่น (G_0) มียีน EGFP	ผีเสื้อรุ่น (G_0) ถ่ายยีน EGFP สู่รุ่น G_1	ผีเสื้อรุ่น (G_0) มียีน EGFP	ประสิทธิภาพการดัดแปลงพันธุกรรม
1	227	5	0	0	0	0	0	0
2	490	11	2	0	0	0	0	0
3	402	13	4	0	0	0	0	0
4	487	14	5	1	0	0	0	0
5	467	21	6	2	1	0	4.76	1
6	542	19	8	6	1	1	5.26	25
7	551	23	6	2	0	0	0	0
8	870	31	13	8	1	0	3.23	0
9	975	55	23	9	2	1	3.64	8.7
รวม	5,011	192	67	28	5	2.60	2	2.98

ผลการฉีดสารละลาย DNA ของ *piggyBac* transposable element vector เข้าสู่ ไข่ไหมอีรี่ ดังตารางที่ 4.1 จำนวน 5,011 ฟอง สามารถฟักได้ 192 ฟอง คิดเป็น 3.83 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำหนอนแรกฟักมาตรวจสอบการเรืองแสง GFP ภายใต้กล้อง fluorescent พบ 7 ตัว คือ KML1, KML2, KML3 , KML4, KML5, KML6 และ KML7 ที่มีการแสดงของยีน EGFP แต่สามารถรอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัยได้ 5 ตัว คือ KML1, KML2, KML5, KML6 และ KML7 ของตัวเต็มวัยทั้งหมด 67 ตัว จากนั้นนำตัวเต็มวัยทั้งหมดมาตรวจหายีน EGFP ซึ่งมีขนาด 750 คู่เบส ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบไหมที่มียีน EGFP จำนวน 5 ตัว คิดเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ คือ KML1, KML2 และ KML5 ซึ่งเป็นไหมที่มีการแสดงออกของยีน EGFP ภายใต้กล้อง fluorescent ส่วนอีก 2 ตัว คือ KML8 และ KML9 เป็นตัวที่มียีน EGFP เมื่อตรวจหาโดยเทคนิคพีซีอาร์ แต่ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน EGFP ภายใต้กล้อง fluorescent สำหรับ KML3, KML4, KML6 และ KML7 ที่มีการแสดงออกของยีน EGFP ภายใต้กล้อง fluorescent แต่ตายในระยะหนอนวัน 1 ซึ่งไม่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้ เมื่อตรวจหาโดยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามียีน EGFP

4.2 ผลการตรวจหายีน EGFP ในรุ่น G_0

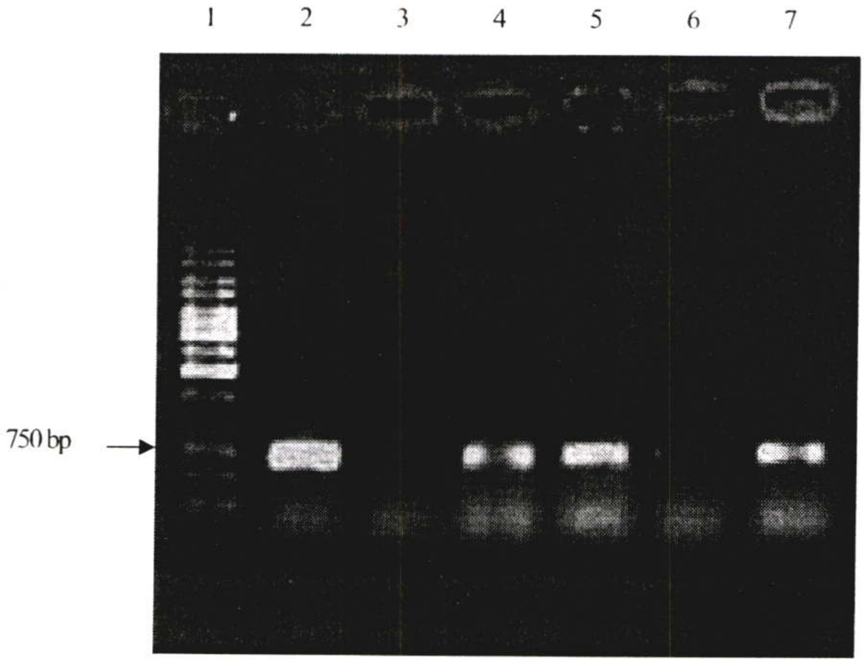
4.2.1 การตรวจสอบการเรืองแสง GFP โดยจะตรวจดูการแสดงออกของยีน EGFP ในหนอนไหมอีรี่ภายใต้กล้อง fluorescent



ภาพที่4.3 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน EGFP ในไหมอีรี่ภายใต้กล้อง fluorescent

หลังจากฉีดสารละลาย DNA เข้าสู่ไข่ไหมประมาณ 7-8 วัน ไข่จะฟักเป็นตัวหนอน ตรวจดูการแสดงออกของยีน EGFP ในหนอนไหมอีรี่ในช่วงแรกฟักภายใต้กล้อง fluorescent ปรากฏมีการเรืองแสงสีเขียว ในไหมที่มียีน EGFP ส่วนไหมสายพันธุ์ปกติจะไม่เห็นการเรืองแสง ดังภาพที่ 4.3 จากนั้นทำการตรวจหายีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerlase chain reaction, PCR) ต่อไป

4.2.2 การตรวจหาของยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์



ช่องที่ 1 DNA มาตราฐาน 1 kb ladder

ช่องที่ 2 Positive control โดยใช้พลาสมิด DNA ของ *piggyBac* transposable element vector

ช่องที่ 3 Negative control โดยใช้จีโนมิค DNA ที่สกัดได้จากผีเสื้อไหมอีรี่สายพันธุ์ปกติเป็นแม่แบบ

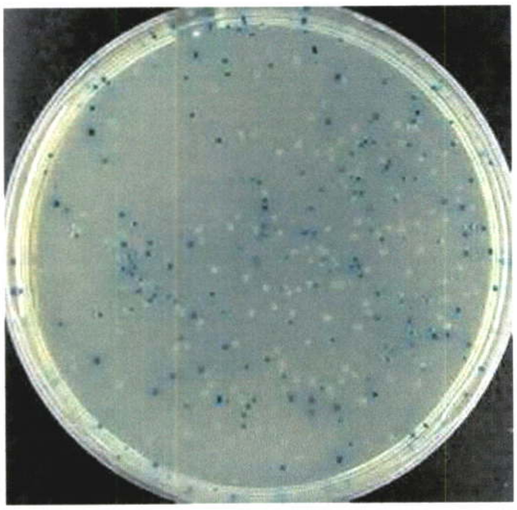
ช่องที่ 4-7 จีโนมิค DNA ที่สกัดได้จากผีเสื้อไหมอีรี่ ที่ได้รับการฉีดสารละลาย DNA *piggyBac* transposable element vector (G_0)

ภาพที่ 4.4 DNA ผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มขยายส่วนของยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้จีโนมิค DNA ที่สกัดได้จากผีเสื้อไหมอีรี่รุ่น G_0 เป็นแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ GFPBACF และ GFPBACR ในการตรวจสอบยีน

การตรวจสอบยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้จีโนมิค DNA ที่สกัดได้จากผีเสื้อไหมอีรี่รุ่น G_0 ทั้งหมดที่รอดเป็นตัวเต็มวัยเป็นแม่แบบ ดังภาพที่ 4.4 พบยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์ ที่มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส จากนั้นจึงเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยทำการเชื่อมพลาสมิด pGEM$^{®}$-T Easy เข้ากับ DNA ที่แยกมา แล้วถ่ายลง *E.coli* DH5 α ต่อไป

4.2.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing)

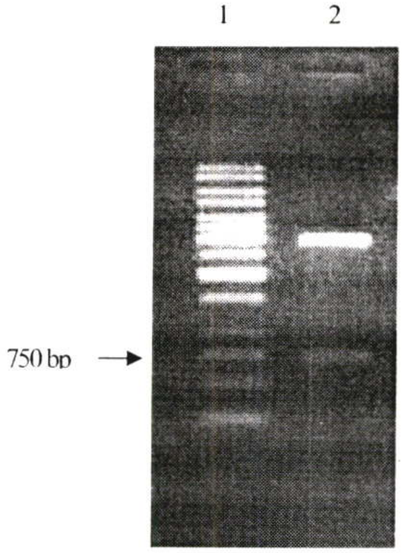
4.2.3.1 การคัดเลือกโคลนจากฟีโนไทป์



ภาพที่ 4.5 การคัดเลือกโคลนจากฟีโนไทป์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแอมพิซิลิน และ X-Gal+IPTG

จากการเชื่อมพลาสมิด pGEM®-T Easy เข้ากับ DNA ที่แยกมา แล้วถ่ายลง *E.coli* DH5 α คัดเลือกโคลนที่มีโคโลนีสีขาวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแอมพิซิลิน และ X-Gal ดังภาพที่ 4.5 จากนั้นสกัดพลาสมิด DNA แล้ว นำมาตรวจสอบขนาด DNA ที่แทรกสอดในพลาสมิด DNA ต่อไป

4.2.3.2 การตรวจสอบขนาดชิ้นส่วน DNA ที่ทำการสอดแทรกในพลาสมิด



ช่องที่ 1 DNAมาตราฐาน 1 kb ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิดที่ได้จากการโคลน ในรุ่น G_0

ภาพที่ 4.6 ผลการย่อยพลาสมิดที่ได้จากการโคลนผลิตภัณฑ์ DNA โดยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ GFPBACF และ GFPBACR แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI

เมื่อสกัดพลาสมิดจากโคลนที่ได้ด้วยชุดสกัดพลาสมิด Fast Plasmid ™Mini แล้วนำมาตรวจสอบขนาด DNA ที่แทรกสอดโดยใช้เอนไซม์ที่ตัดเฉพาะส่วนที่แทรกสอด ซึ่งเวคเตอร์ pGEM®-T Easy ตรงส่วนหัวและส่วนท้ายจะมีบริเวณที่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI 2 ตำแหน่ง ดังภาพที่ 3.4 จึงทำให้สามารถตรวจสอบขนาดของยีนที่สอดแทรกเข้าไป จากรูปพบว่าช่องที่ 2 มีชิ้น DNA สอดแทรกตามขนาด 750 คู่เบส ซึ่งเท่ากับขนาดของยีน EGFP ดังภาพที่ 4.6 จึงทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

4.2.3.3 การวิเคราะห์ลำดับเบส

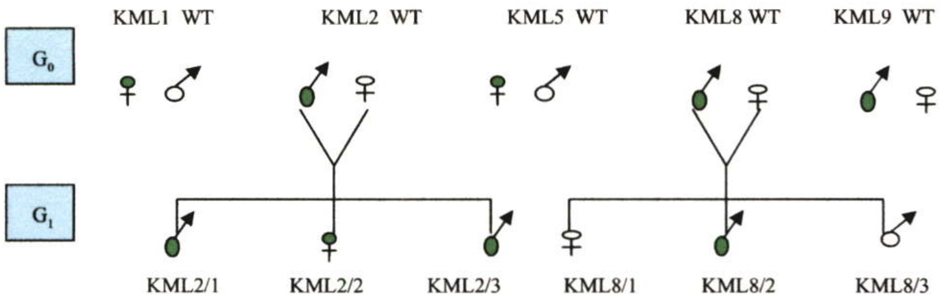
การวิเคราะห์ลำดับเบสจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ KML2/1 โดยใช้ไพรเมอร์ GFPBACF มีลำดับเบสดังภาพที่ 4.7 ที่มีความคล้ายคลึงกับ AF323988.1 EGFP expression vector Ad-EGFP, complete sequence ที่ 99 เปอร์เซ็นต์

CCGAATGGTGAGAGGGCGAGGATGGTCTAGGCGAGGACGGCATAACCTCGGCTTGTT
CAGGCGTGTCCGGCGAGGGGGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG
TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGA
CCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCT
TCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACG
ACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC
CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAA
GCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGA
ACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAG
CTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCC
GACAACCACTACCTGTACACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCG
CGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGTATCCTCTCGGCATGGA
CGAAGAAGCACTACCAAACTCTGAAGTGCCGCCAGTAGAGAGACTGCTCAGCGAAG
AACGAAGGGAGCTGTCACTATGTCGGCATTTGGGCCATCTGTTAGTCTGGCTGTGGC
ATATTTATCA

ภาพที่ 4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไหมรุ่น G_1 (KML2/1)

4.3 การศึกษาการถ่ายทอดของยีน

จากผลการตรวจหายีน EGFP โดยการทำพีซีอาร์ พบว่ามียีน EGFP ในตัวเต็มวัยรุ่น G_0 จำนวน 5 ตัว KML1, KML2, KML5, KML8 และ KML9 ซึ่งตัวเต็มวัยที่มีการแสดงออกของยีน EGFPโดยเทคนิค พีซีอาร์ เมื่อนำเต็มวัยรุ่น G_0 มาผสมกับสายพันธุ์ปกติ พบว่ามีเพียง 2 ตัวเท่านั้น คือ KML2, KML8 ที่สามารถออกไข่ได้ตามปกติ เมื่อเลี้ยงไหมรุ่น G_1 จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย นำมาผสมกับสายพันธุ์ปกติ พบว่าการฟักเป็นไปตามปกติ จากนั้นสุ่มตัวเต็มวัยรุ่น G_1 ของ KML2, KML8 อย่างละ 3 ตัว (กำหนดให้เป็น KML2/1, KML2/2, KML2/3 และ KML8/1, KML8/2, KML8/3 ตามลำดับ) ตรวจดูการแสดงออกของยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า รุ่น G_1 ของ KML2 (KML8/1, KML8/2, KML8/3) มียีน EGFP ทุกตัว ส่วนแต่ใน รุ่น G_1 ของ KML8 (KML8/2) มียีน EGFP เพียงตัวเดียวเท่านั้น ซึ่งการถ่ายทอดยีน EGFP ในไหมอีรี่แสดงดังภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 การถ่ายทอดยีน EGFP ในไหมอีรี่

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 การเตรียมไข่ไหมอีรี่เพื่อฉีดสารละลาย DNA

การผสมพันธุ์ของผีเสื้อไหมอีรี่ส่วนมากมักเกิดขึ้นในตอนกลางคืนของวันที่ออกเป็นตัวเต็มวัย ผีเสื้อจะผสมพันธุ์กันนานตลอดทั้งคืนจนถึงเช้า ถ้าปล่อยให้ผสมพันธุ์ ผีเสื้อจะผสมเรื่อยๆ จนเย็นของอีกวัน แต่เวลาเพียงแค่ 3 ชั่งโมงก็เพียงพอสำหรับให้ไข่ได้รับการผสมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (พิสิษฐ์ เสพสวัสดิ์ และเตือนจิตต์ สัตยาวิรุทธิ์. 2520) จากการเตรียมไข่ไหมอีรี่เพื่อฉีดสารละลาย DNA นั้น ไข่ไหมได้จากการผสมพันธุ์ของผีเสื้อเป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 12 ชั่วโมง) ซึ่งอาจเป็นเวลาที่นานเกินไปอาจจะมีผลกระทบต่อการวางไข่ของแม่ผีเสื้อ แต่เนื่องจากการจำลองสภาพมืดโดยการใช้ถุงสีดำคลุมกรงเลี้ยงไหมในช่วงกลางวันผีเสื้อจะไม่ผสมพันธุ์ ดังนั้นจึงต้องปล่อยให้ผีเสื้อผสมพันธุ์ตอนกลางคืน จากนั้นแยกผีเสื้อตัวผู้ และตัวเมียออกจากกัน ผีเสื้อตัวเมียจะเริ่มออกไข่ทันที และจะออกไข่มากขึ้นเมื่อจำลองสภาพมืด โดยการใช้ถุงสีดำคลุมกรงเลี้ยงไหม ทำการเก็บไข่ที่มีอายุ 2-4 ชั่วโมง (คาดว่าเป็นช่วงที่ pole cell กำลังมีการแบ่งตัว) เนื่องจากจะมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ระยะนี้ คล้ายกับการเตรียมไข่ไหมบ้านเพื่อนำมาฉีดสารละลาย DNA ซึ่งใช้ไข่ที่มี อายุ 1-2 ชั่วโมง (Zhong *et al.* 2007; Yamamoto *et al.* 2003; Uhlirova *et al.* 2001 and Tamura *et al.* 2000) อายุไม่เกิน 4 ชั่วโมง (Thomus *et al.* 2002) และอายุ 3-5 ชั่งโมง (Imura *et al.* 2003) ซึ่งขั้นตอนการเตรียมไข่เพื่อใช้ในการฉีด เริ่มตั้งแต่ การรวบรวมไข่ให้ได้หลายฟองในการฉีดแต่ละครั้ง การล้าง จัดเรียงทิศทาง การรอให้กาวแห้ง ประกอบกับความชำนาญของผู้ทดลองยังไม่มากนัก จึงทำให้เวลาคลาดเคลื่อนบ้าง อาจมีผลทำให้การเข้าแทรกตัวของ *piggyBac* ในไหมอีรี่น้อยลง ในช่วงที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

5.2 การฉีดสารละลาย DNA เข้าสู่ไข่ไหม

การฉีดสารละลาย DNA เข้าสู่ไข่ไหม โดยวิธีการใช้เข็มส่งถ่ายเข้าไปในแมลง (microinjection) โดยใช้เครื่องจ่ายสารปริมาณน้อย (microapplicator) ซึ่งประกอบกับกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาเบอร์ 27 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรูเข็ม 0.45 มิลลิเมตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเครื่องมือที่ใช้นี้เป็นเครื่องมือที่หาง่าย ราคาไม่แพง เคลื่อนย้ายสะดวก สามารถใช้ฉีดเข้าสู่ไข่ไหมอีรี่ที่มีขนาดประมาณ 1.5-2.0 มิลลิเมตร นับว่ามีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับไข่แมลงชนิดอื่นๆ แต่อัตราการฟักของไข่ไหมหลังจากฉีดมีค่า 3.89 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นค่าที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Tamura *et al.* (2000) ซึ่งทำการดัดแปลงพันธุกรรมไหมบ้านโดยใช้เครื่องมือ คือ microinjector เป็นเครื่องที่ทันสมัย ออกแบบเหมาะสมกับการฉีดไข่ไหมที่เล็กกว่าไหม

อีรี่ประมาณ 3-4 เท่าโดยประมาณ ทำการศึกษาในไหม 2 สายพันธุ์ พบว่าสามารถฟักได้ถึง 32.5-65.7 เปอร์เซ็นต์ จึงแสดงให้เห็นว่าเทคนิคที่เพิ่งเริ่มใช้ในไหมอีรี่ยังไม่สมบูรณ์ หากมีการดัดแปลงเครื่องมือเพียงเล็กน้อย คือใช้เข็มที่มีขนาดเล็กลง คาดว่าจะทำให้อัตราการฟักเพิ่มขึ้น เนื่องจากเข็มฉีดยาที่นำมาใช้ เป็นเข็มที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ ทำลายพื้นที่ผิวของเปลือกไข่ และส่วนของเซลล์ไข่ค่อนข้างมาก มีผลต่อการพัฒนาเป็นตัวอ่อน สำหรับการฉีดสารละลาย DNA เข้าสู่ไข่ไหม จะฉีดด้านส่วนท้าย เนื่องจากอยู่ใกล้เซลล์สืบพันธุ์ (Siriyasatien and Thavara. 2007 and Uhlirova *et al.* 2002) และควรเป็นด้านบนของส่วนท้าย (dorsal posterior) เพราะหากเป็นด้านล่างของส่วนท้าย (ventral posterior) จะเป็นบริเวณที่เซลล์สืบพันธุ์กำลังเจริญโดยตรง (Thomous *et al.* 2002)

5.3 ผลการเตรียมสารละลาย DNA ของ *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid

ในช่วงการเตรียมเชื้อ *E.coli* DH5α ให้เป็นคอมพีเทนต์เซลล์ เพื่อนำ DNA ของ *piggyBac* transposable element vector และ helper plasmid เข้าสู่ *E.coli* DH5α ระยะที่ดีที่สุดในการทำเป็นคอมพีเทนต์ คือเซลล์ที่เจริญถึงระยะ log phase ในขั้นตอนการผสมพลาสมิด DNA และคอมพีเทนต์เซลล์ ต้องทำด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากคอมพีเทนต์เซลล์อยู่ในสภาพที่อ่อนแอ ง่ายต่อการถูกทำลาย ต้องทำในที่เย็นตลอดเวลา เมื่อถ่ายโอนพลาสมิด DNA เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ แล้วตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิด โดยใช้การแสดงออกของยีนที่มีในพลาสมิด ซึ่งมียีนที่ต้านทานยาแอมพิซิลิน จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิด DNA แล้วนำมาวัดหาปริมาณ DNA โดยใช้ spectrophotometer เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ซึ่ง A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.65-1.85 แสดงว่า DNA ที่สกัดได้บริสุทธิ์หรือมีคุณภาพดี ดังนั้นในช่วงการสกัด มีการล้างสิ่งที่ไม่ต้องการออกไปจาก column โดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์ 70 % ล้างถึง 5 ครั้ง เพื่อให้ได้ DNA ที่มีความบริสุทธิ์มาก ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ DNA โดยการแยกขนาด DNAในเจลอะกาโรสภายใต้สนามไฟฟ้า ในการแยกขนาดพลาสมิด DNA ของ *piggyBac* transposable element vectors และ helper plasmid พบว่า DNA แยกเป็น 2 แถบ เป็นการเคลื่อนที่ของพลาสมิดที่มีโครงร่างต่างกันคือเมื่อพลาสมิดอยู่ ในรูป supercoiled มีความเสถียรมากที่สุด จึงเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเมื่ออยู่ในรูป linear และ relaxed ตามลำดับ ซึ่งประสิทธิภาพของการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยวิธี transformation ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น รูปร่างและขนาดของพลาสมิด supercoil จะเข้าเซลล์ดีกว่า linear หรือ relaxed พลาสมิดที่มีขนาดเล็กจะเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายกว่าขนาดใหญ่ ถ้าขนาดใหญ่เกิน 15 กิโลเบส ประสิทธิภาพจะต่ำมาก (ศิริพร สิทธิประณีต. 2532 และ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536) จากนั้นทำการตรวจหายีน EGFP

จากพลาสมิด DNA โดยใช้ไพรเมอร์ GFPBACF และ GFPBACR ในการตรวจสอบยีน EGFP ซึ่งมีขนาดประมาณ 750 คู่เบส โดยเทคนิคพีซีอาร์ ก่อนนำสารละลาย DNA ไปฉีดเข้าสู่ไข่ไหม

5.4 การตรวจหายีน EGFP ในไหมอีรี่

เมื่อนำหนอนแรกฟักมาตรวจสอบการเรืองแสง GFP ภายใต้กล้อง fluorescent พบมี 7 ตัว ที่มีการแสดงของยีน EGFP หรือตรวจพบยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์ แต่สามารถรอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัยได้ 5 ตัว (จากตัวเต็มวัยทั้งหมด 67 ตัว) จากนั้นนำตัวเต็มวัยทั้งหมดมาตรวจหายีน EGFP ซึ่งมีขนาด 750 คู่เบส ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ GFPBACF และ GFPBACR พบไหมที่มียีน EGFP จำนวน 5 ตัว (คิดเป็น 2.60 เปอร์เซ็นต์ที่มีการรับยีน EGFP) เป็นไหมที่มีการแสดงออกของยีน EGFP ภายใต้กล้อง fluorescent 3 ตัว และไม่แสดงออก 2 ตัว สำหรับในตัวที่ไม่มีการแสดงออกของยีน EGFP ภายใต้กล้อง fluorescent แต่มียีน EGFP เมื่อตรวจหาโดยเทคนิคพีซีอาร์ อาจมีสาเหตุมาจาก ปริมาณการแสดงออกน้อยจนไม่สามารถแยกระหว่างสายพันธุ์ปกติและตัวที่ได้รับการถ่ายยีน หรืออาจเนื่องมาจากหนอนที่ฟักออกมาจากไข่เป็นเวลาหลายชั่วโมงก่อนนำมาตรวจการแสดงออกของยีน EGFP ภายใต้กล้อง fluorescent ลำตัวมีขนาดใหญ่ขึ้น ผนังลำตัวหนาขึ้นจึงอาจมองเห็นยาก สำหรับอีก 2 ตัวที่มีการแสดงออกของยีน EGFP ภายใต้กล้อง fluorescent แต่ไม่สามารถเจริญได้เป็นตัวเต็มวัย เมื่อนำมาตรวจหายีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามียีน EGFP ทั้ง 2 ตัว ซึ่งการแสดงออกของยีน EGFP ภายใต้กล้อง fluorescent จะตรวจพบในเฉพาะระยะหนอนแรกฟักเท่านั้น Thomus *et al.* (2002) ดัดแปลงพันธุกรรมไหมโดยใช้ *piggyBac* vector และ BM-Actin 3 promoter เป็นโปรโมเตอร์ และ GFP เป็นยีนรายงานผล ปรากฏว่ามีการแสดงออกของยีน GFP ภายใต้กล้อง fluorescent ทุกระยะ Yamamoto *et al.* (2002) ใช้ *piggyBac* เป็น vector และ *Drosophila hsp* 70 promoter เป็นโปรโมเตอร์ และ GFP เป็นยีนรายงานผล พบว่ามีการแสดงออกของยีน GFP ภายใต้กล้อง fluorescent ในระยะไข่ และ ระยะหนอน 1.9-4.1 เปอร์เซ็นต์ และสามารถถ่ายทอดได้ ในรุ่นต่อไปได้ ส่วน Uhlirova *et al.* (2002) ใช้ vector และโปรโมเตอร์ตัวเดียวกัน และ GFP เป็นยีนรายงานผล พบ 0.48-1.72 เปอร์เซ็นต์ สามารถถ่ายทอดได้ และมีการแสดงออกของยีน GFP ภายใต้กล้องในระยะไข่ หนอน และผีเสื้อ

จากนั้นการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส สามารถส่งวิเคราะห์ตัวอย่างได้ 2 วิธี วิธีแรกคือการทำให้ DNA บริสุทธิ์จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ส่วนอีกวิธีคือทำการเชื่อมพลาสมิด pGEM®-T Easy ซึ่งเป็น DNA พาหะ เข้ากับ DNA ผลผลิต ถ่ายลง *E.coli* DH5 α โดยต้องทำให้ DNA บริสุทธิ์ด้วยชุดแยก DNA ให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจลโดยใช้ (Perfectprep® Gel Clean up) เนื่องจากมีแถบ DNA ขึ้นมากกว่า 1 แถบ จึงต้องตัดเอาเฉพาะแถบ DNA ที่สนใจ แล้วทำการถ่ายโอน DNA เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* DH5α หรือการทำ transformation จากนั้นตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิด DNA โดยการคัดเลือกโคลนจากฟีโนไทป์โดยการใช้การแสดงออกของยีนที่มีใน DNA พาหะ

ได้แก่ ยีนที่ให้ลักษณะต่อต้านต่อยาแอมพิซิลิน โดยที่ *E.coli* ที่ได้รับการถ่ายทอด DNA พาหะนั้นจะสามารถเจริญได้ในอาหารที่มียาแอมพิซิลิน และเทคนิค blue/white screening เมื่อได้ขนาด DNA ที่ต้องการ จากเทคนิคพีซีอาร์ คือ 750 คู่เบส ทำการการแยก DNA ออกจากเจลหรือผลิตภัณฑ์ PCR แล้วไปเชื่อมต่อกับ DNA พาหะ pGEM$^{®}$-T Easy ถ่ายโอนDNAเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* DH5α จากนั้นนำตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Eco*R I อยู่ 2 ตำแหน่ง คือบริเวณหัวและท้าย จึงสามารถตรวจสอบขนาดของยีนที่สอดแทรกเข้าไปได้ นำพลาสมิดที่ได้จากการ transform ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกันกับยีน AF323988.1 EGFP expression vector Ad-EGFP, complete sequence ถึง 99 เปอร์เซ็นต์

5.5 การศึกษาการถ่ายทอดของยีน EGFP

เมื่อนำตัวเต็มวัยมาผสมพันธุ์กับสายพันธุ์ปกติ พบว่ามีเพียง 2 ตัว คือ KML2 และ KML8 ที่สามารถผลิตรุ่น G_1ที่มียีน EGFP เมื่อตรวจหาโดยเทคนิคพีซีอาร์ แสดงว่าสามารถถ่ายทอดสู่รุ่น G_1 ได้ ส่วนอีก 3 ตัว คือ KML1, KML5 และ KML9 มีการผสมพันธุ์แต่ไข่ที่ได้จากการฟัก ไม่สามารถผลิตรุ่น G_1ได้ แสดงว่าตัวเต็มวัยเป็นหมัน นำไหมรุ่น G_1 มาเลี้ยงจนเป็นตัวเต็มวัย สุ่มตัวเต็มวัยรุ่น G_1 ที่มียีน EGFP อย่างละ 3 ตัว มาผสมกับสายพันธุ์ปกติ พบว่า รุ่น G_1 ของ KML2 (KML8/1, KML8/2, KML8/3) มียีน EGFP ทุกตัว ส่วนแต่ใน รุ่น G_1 ของ KML8 (KML8/2) มียีน EGFP เพียงตัวเดียวเท่านั้น เมื่อเลี้ยงไหมรุ่น G_2 จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย นำมาผสมกับรุ่นลูกของ G_1 ที่มียีน EGFP พบว่าการฟักเป็นไปตามปกติเพียงบางแม่เท่านั้น และตรวจพบยีน EGFP ในตัวเต็มวัยรุ่น G_2 เมื่อตรวจหาโดยเทคนิคพีซีอาร์ จากการสุ่มตัวอย่างมาตรวจหายีน EGFP เพียง 3 ตัว นับว่าเป็นการสุ่มที่น้อย เนื่องจากตัวเต็มวัยตัวเมียที่ออกมาจากดักแด้ จะไข่หลังจากเป็นตัวเต็มวัย 1 วันแม้ไม่ได้รับการผสม ดังนั้นจะต้องได้รับการผสมพันธุ์กับสายพันธุ์ปกติทันที หากสายพันธุ์ปกติตัวผู้ออกช้ากว่าตัวเมียเพียง 1 วัน เท่ากับตัวเมียที่รุ่นแม่มียีน EGFP จะไม่ได้รับการผสมเลย อีกปัญหาที่สุ่มตัวอย่างน้อยเพราะในช่วงการทดลองนั้นใบละหุ่งขาดแคลน เนื่องจากน้ำท่วมแปลงละหุ่งเกือบ 2 สัปดาห์ ทำให้ต้นละหุ่งตายทุกต้น ดังนั้นในการให้อาหารแต่ละมื้อจำเป็นต้องหาใบละหุ่งนอกแปลงทดลองมาเลี้ยง จึงต้องทำการสำรวจพื้นที่ที่มีต้นละหุ่ง เพื่อนำใบมาเป็นอาหารให้กับหนอนไหมอีรี่

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การดัดแปลงพันธุกรรมไหมอีรี่โดยอาศัย *piggyBac* transposable element เป็นพาหะนำยีน เพื่อทดสอบความสามารถในการส่งถ่ายยีนภายใต้การควบคุมการทำงานของ BmA3 promoter และมี EGFP เป็นยีนรายงานผล ร่วมกับการทำงานของ helper plasmid ซึ่งมียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ transposase ใช้สำหรับการตัดและเชื่อมต่อ DNA ทำการฉีดสารละลาย DNA ทั้ง 2 เข้าสู่ไข่ไหมอีรี่ในช่วงที่ pole cell กำลังมีการแบ่งตัว โดยใช้เครื่องจ่ายสารปริมาณน้อย (microapplicator) ซึ่งประกอบกับกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาเบอร์ 27 พบการแสดงออกของยีน EGFP ซึ่งสามารถสังเกตได้ภายใต้กล้อง fluorescent หรือตรวจโดยเทคนิคพีซีอาร์ คิดเป็น 2.60 เปอร์เซ็นต์ที่มีการรับยีน EGFP เมื่อนำตัวเต็มวัยมาผสมกับไหมอีรี่สายพันธุ์ปกติพบว่าสามารถถ่ายทอดสู่ไหมรุ่น G_1 และรุ่น G_2 ได้ เห็นได้ว่าความสามารถในการส่งถ่ายยีนโดยอาศัย *piggyBac* transposable element เป็นพาหะนำยีน ในไหมอีรี่สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไปได้ นับว่าการดัดแปลงพันธุกรรมไหมอีรี่ประสบผลสำเร็จเป็นครั้งแรก

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะสามารถตรวจพบยีน EGFP โดยเทคนิคพีซีอาร์ แต่ยังควรต้องยืนยันการ integration ของยีนนี้โดย Southern blotting และตรวจหาตำแหน่งการแทรกตัวของ *piggyBac* ใน จีโนมิคของไหมดัดแปลงพันธุกรรมโดยเทคนิค inverse PCR เนื่องจากปัญหาด้านเวลาและงบประมาณจึงยังไม่สามารถทำเทคนิคดังกล่าวในการศึกษาครั้งนี้

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถสร้างไหมอีรี่แปลงพันธุ์ได้โดยวิธีการใช้เข็มส่งถ่ายเข้าไปในแมลง (microinjection) ด้วยเครื่องมือที่หาได้ง่าย ราคาไม่แพง คือเครื่องจ่ายสารปริมาณน้อย (microapplicator) ประกอบกับกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาเบอร์ 27 โดยอาศัยพาหะ *piggyBac* transposons ซึ่งความรู้ที่ได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสร้างไหมต้านทานโรค สามารถผลิตเส้นใยที่มีคุณภาพและผลผลิตสูง สามารถสร้างสีของเส้นใยตามต้องการโดยการใส่ยีนจากภายนอกให้เกิดการแสดงออกในไหมดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ยังอาจส่งถ่ายยีนที่สร้างโปรตีน เพื่อผลิตวัคซีนหรือโปรตีนที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ โดยการเลี้ยงไหมอีรี่ดัดแปลงพันธุกรรมซึ่งสามารถลดต้นทุนในการผลิต

บรรณานุกรม

กรรณิการ์ จ้อยเจริญ. 2525. "การปรับปรุงสูตรอาหารเทียมเพื่อเลี้ยงไหมป่าอีรี่." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขากีฏวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กฤตพร ชูเส้ง. 2546. "ด้ายปั่นมือจากไหมป่าอีรี่." วิทยานิพนธ์คหกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขา คหกรรมศาสตร์บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กอบกุล แสนนามวงษ์ เยาวภา สุกฤตานนท์ และประชาชาติ นพเสรีย์. 2548. "ไหมป่าที่อัสสัม." **กสิกร.** 78(1) : 17-21.

กอบกุล แสนนามวงษ์ เยาวภา สุกฤตานนท์ และประชาชาติ นพเสรีย์. 2549. "ไหมป่าอีรี่เส้นใยใหม่ของผ้าไหม". **กสิกร.** 79(3) : 37-40.

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2544. "ไหมป่าอีรี่ : สายพันธุ์ไหมที่มีคุณค่าและศักยภาพ." **วารสารกีฏและสัตววิทยา.** 23(3) : 185-192.

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2545. "การถ่ายยีนในแมลง." **วารสารกีฏและสัตววิทยา.** 24(2) : 136-145.

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549, 24 กรกฎาคม. **"ไหมอีรี่ สู่อุตสาหกรรมรักบ้านเกิด." เดลินิวส์.** หน้า 12.

ทิพย์วดี อรรถธรรม วาสนา กันหสุต และสุธรรม อารีกุล. 2534. **การเลี้ยงไหมป่าอีรี่ด้วยพืชอาหารชนิดต่างๆ.** กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทิพย์วดี อรรถธรรม สุธรรม อารีกุล พรรณนภา ศักดิ์สูง พิมล อารีกุล และ บัณฑิต จริโมภาส. 2535. **การเลี้ยงไหมอีรี่เพื่อการพัฒนาอีสาน.** กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรีชา ประเทพา. 2543 **เทคโนโลยีชีวภาพ : การปรับแต่งพันธุวิศวกรรมของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม.** มหาสารคาม : มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

พิสิษฐ์ เสพสวัสดิ์ และเตือนจิตต์ สัตยาวิรุทธ์. 2520. "ข้อมูลบางประการของไหมป่า." **กสิกร.** 50(3) : 148-157.

วิโรจน์ แก้วเรือง และสุทธิสันต์ พิมพะสาลี. 2548. "เก็บไหมป่ามาเลี้ยง." **กสิกร**. 78(3) : 57-62.

ศิริพร สิทธิประณีต. 2532. **พันธุวิศวกรรม : ปฏิบัติการเบื้องต้น**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริพร สิทธิประณีต. 2543. "การสร้างสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม." หน้า 1-20 ใน **การประชุมเชิงปฏิบัติการจีเอ็มโอ : สิ่งมีชีวิตแต่งพันธุ์**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิวิลัย สิริมังครารัตน์ ทิพย์วดี อรรถธรรม วีรศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ ปรีชา สิงหา และวราพิชญ์ พัฒนเศรษฐานนท์. 2542. **การเพิ่มรายได้แก่เกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลังในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือด้วยการเลี้ยงไหมป่าอีรี่.** กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิวิลัย สิริมังครารัตน์ เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และอนันต์ พลธานี. 2547. "คุณค่าทางโภชนาการของไหมอีรี่ *Philosamia ricini* B. ที่เลี้ยงด้วยใบมันสำปะหลัง." หน้า 430-436. ใน **สัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติประจำปี 2547**. จังหวัดขอนแก่น : คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุธรรม อารีกุล ทิพย์วดี อรรถธรรม และ วราพิชญ์ พัฒนเศรษฐานนท์. 2533. **การเลี้ยงไหมอีรี่เพื่อการพัฒนาอีสาน.** กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรางค์ นุชประยูร จินตนา จิรถาวร และณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์. 2546. **เวชศาสตร์โมเลกุล**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โมโตอิ มินากาวะ เออิอิชิ คาวาอิ และเข็มชัย เหมาะจันทร. 2530. **วิทยาการไหมเล่ม 1**. กรุงเทพฯ : กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม.

Allen, M.L., O'Brochta, D.A., Atkinson, P.W. and Levesque, C.S. 2001. "Stable germ-line transformation of *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae)." **Med. Entomol**. 38(5) : 701-710.

Atkinson, P.W., Pinkerton, A.C. and O'Brochta, D.A. 2001. "Genetic transformation systems in insects." **Ann. Rev. Entomol**. 46 (1) : 317-346.

Berghammer, A.J., Klinger, M. and Wimmer, E.A. 1999. "A universal marker for transgenic insect. " **Nature**. 402 : (6760) : 307-371.

Cary, L.C., Goebel, M., Corsaro, B.G., Wang, H.G., Rosen, E. and Fraser, M.J. 1989. "Transposon mutagenesis of baculoviruses : analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. " **Virology**. 172(1) : 156-169.

Catteruccia, F., Nolan, T., Loukeris, T.G., Blass, C., Savakis, C., Kafatos, F.C. and Crisanti, A. 2000. "Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi.*" **Nature**. 405(6789) : 959-962.

Coates, C.J., Jasinskiene, N., Miyashiro, L. and James, A.A. 1998. "*Mariner* transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti.*" **Proc. Natl. Acad. Sci.** 95(7) : 3748-3751.

Cooperman, L. and Michaeli, D. 1984. "The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study" **J. Am. Acad. Dermatol**. 10(4) : 638–646.

Cornel, A.J., Benedict, M.Q., Salazar, R.C., Howells, A.J. and Collins, F.K. 1997. "Transient expression of the *Drosophila melanogaster cinnab*ar gene rescues eye color in the white eye (WE) strain of *Aedes aegypti.*" **Insect Biochem. Mol. Biol**. 27(12) : 993-997.

Cummins, J. 2001. **Terminator insects - a primer *piggyBac* a name to remember**. [Online]. Available : www.i-sis.org.uk/piggybac-pr.php.

The enhanced green/red fluorescence proteins (EGFP/ERFP). 2007. [Online]. Available : http://www.biovision.com/updated/egfp.html

Franz, G. and Savakis, C. 1991. "Minos, a new transposable element from *Drosophila hydei*, is a member of the *Tc1*-like family of transposons." **Nucleic. Acids. Res.** 19 (23) : 6646.

Guo, X.Y., Dong, L., Wang, S.P., Gue, T.Q., Wang, J.Y. and Lu, C.D. 2004. "Introduction of foreign genes into silkworm eggs by electroporation and its application in transgenic vector test." **Acta. Biochim. Biophys. Sin.** 36(5) : 323-330.

Handler, A.M. 2002. "Use of the *piggyBac* transposon for germ-line transformation of insects." **Insect Biochem. Mol. Biol**. 32 (10) : 1211-1220.

Handler, A.M., McCombs, S.D., Fraser, M.J. and Saul, S.H. 1998. "The lepidopteran transposon vector *piggyBac* mediates germ-line transformation in the mediterranean fruit fly." **J. Biol. Chem**. 95(13) : 7520-7525.

Handler, A.M. and James, A.A. 2000. **Insect Transgenesis Methods & Applications.** London : CRC Press.

Handler, A.M. and Harrell, R.A. 2001. "Transformation of the caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, with a *piggyBac* vector marked with polyubiquitin-regulated GFP." **Insect. Biochem. Mol. Biol.** 31(2) : 199-205.

Harrison, R.L. and Bonning, B.C. 1999. "Genetic engineering of biocontrol agents for insects." pp. 243-280. In Rechcigl J.E. and Rechcigl N.A. (eds). **Biological and Biotechnological control of insects pests**. London : CRC Press.

Horn, C., Bernhard, G.M., Schmid, F.S. and Wimmer, E.A. 2002. "Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. " **Insect Biochem. Mol. Biol**. 32 (10) : 1221-1235.

Horn, C. and Wimmer, E.A. 2002. "Highly sensitive fluorescent transformation marker for *Drosophila transgenesis*. " **Dev. Genes. Evol**. 210(12) : 623-629.

Hoy, M.A. 1994. **Insect Molecular Genetics : An Introduction to Principles and Applications.** San Diego : Academic Press.

Hoy, M.A. 1996. "Novel arthropod biological control agents. " 164-185. In Persley G.L. ED. **Biotechnology and Integrated Pest Management.** Biotechnology in Agriculture No.15 Walling-ford : CAB International.

Imamura, M., Nakai, J., Inoue, S., Quan, G. X., Kanda, T. and Tamura, T. 2003. "Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. " **Gene**. 165 (3) : 1329-1340.

Inoue ,H., Nojima, H. and Okayama, H. 1990. "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. " **Gene.** 96(1) : 23-28.

Jasinskiene, N., Coates, C.J., Benedict, M.Q., Cornel, A.J., Salazar, R.C., James, A.A. and Collins, F.H. 1998. "Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, using the *Hermes* element from the house fly." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 95(7) : 3743-3747.

Lewin, B. 1994. **Genes V**. New York : Oxford University Press.

Lobo, N.F., Hua, V.A., Li, X., Nolen, B.M. and Fraser, M.J. 2002. "Germline transformation of the yellow fewer mosquito, *Aedes aegypti*, mediated by transpositional insertion of a *piggyBac* vector." **Insect Mol Biol**. 11(2) : 1-10.

Mandrioli, M. and Wimmer, E.A. 2003. "Stable transformation of a *Mamestra brassicae* (Lepidoptera) cell line with the lepidopteran-derived transposon *piggyBac*." **Insect Biochem. Mol. Biol**. 33(1) : 1-5.

McGrane, V., Carlson, J.O., Miller, B.R. and Beaty, B.J. 1988. "Microinjection of DNA to *Aedes triseriatus* ova and detection of integration." **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 39(5) : 502 - 510.

Medhora, M., Maruyama, K. and Hartl, D.L. 1991. "Molecular and functional analysis of the *Mariner* mutator element *Mos l* in *Drosophila*. " **Genetics**. 128 : 311-318.

Nagaraju, J., Kanda, T., Yukuhiro, K., Chavancy, G., Tamura, T. and Couble, P. 1996. "Attempt at transgenesis of the silkworm (*Bombyx mori* L.) by egg–injection of foreign DNA." **Appl. Entomol. Zool**. 31(4) : 587-596.

Nakazawa, Y., Bamba, M., Nishio, S. and Asakura, T. 2003. "Tightly winding structure of sequential model peptide for repeated helical region in *Samia cynthia ricini* silk fibroin studied with solid-state NMR ." **Protein Sci**. 12(4) : 666-671.

Pinkerton, A.C., Michel, K., O'Brochta, D.A. and Atkinson, P.W. 2000. "Green fluorescent protein as a genetic marker in transgenic *Aedes aegypti*." **Insect Mol. Biol**. 9(1) : 1-10.

Presnail, J.K. and Hoy, M.A. 1992. "Stable genetic transformation of beneficial artropod by microinjection. " **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 89(16) : 7732-7736.

Promega. 2007. **pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems.** [Online]. Available : www.promega. com.

Prudhomme, J.C. and Couble. P. 2002. "Perspectives in silkworm (*Bombyx mori*) transgenesis." **Cur. Sci**. 83(4) : 432-438.

Ramshaw, J.A.M., Werkmeister, J.A. and Glattauer, V. 1996. "Collagen-based biomaterials." **Biotechnol. Genet. Eng. Rev**. 13(5) : 335–382.

Rubin, G.M. and Spradling, A.C. 1982. "Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors." **Science**. 218(4570) : 348-353.

Russell, P.J. 1998. "Transposable element." pp. 654-678. In Russell P.J. ED. ***Genetics* 5th ED**. The Benjamin/Cummings Publishing Company.

Sethuraman, N. and O'Brochta, D.A. 2005. "The *Drosophila melanogaster* cinnabar gene is a cellautonomous genetic marker in *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae)." **J. Med. Entomol**. 42 (4) : 716-718.

Shirk, P. D. and Bossin, H. 2001. "Development of *piggyBac* transposon-derived gene vectors and their utilization for transgenic insects." 71-76. In **Prospects for the Development of Insect Factories**. Proceedings from a joint international symposium of insect COE research program and insect factory research project.

Siriyasatien, P. 2000. "An assessment of hepatitis B vaccine delivery by transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. " PhD Thesis. TheUniversity of Liverpool.

Siriyasatien, P. and Thavara, U. 2007. "Genetically modified mosquitoes : a new strategy to control mosquito borne diseases. " **TJVM.** 36(4) : 9-19.

Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas, J.L., Mauchamp, B., Chavancy, G., Shirk, P., Fraser, M., Prudhomme, J.C. and Couble, P. 2000. "Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector." **Nat. Biotechnol**. 18(1) : 81-84.

Thomas, J. L., Rocha, M. D., Besse, A., Mauchamp, B. and Chavancy, G. 2002. "3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards." **Insect Biochem. Mol. Biol**. 32(3) : 247-253.

Tomita, M., Munetsuna, H., Sato, T., Adachi, T., Hino, R., Hayashi, M., Shimizu, K., Nakamura, N., Tamura, T., Yoshizato, K. 2003. "Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons." **Nat. Biotechnol.** 21 (1) : 52-56.

Uhlirova, M., Asahina, M., Riddiford, L.M. and Jindra, M. 2002. "Heat-inducible transgenic expression in the silkmoth *Bombyx mori* ." **Dev. Genes Evol**. 212(3) : 145-151.

Wongtong, S., Areekul, P., Onlamoon,A. and Tragoolgarn, S. 1980. "Research on wild silkworm cultivation in the highland of northern thailand." Final Report, June 1976-June 1980. Kasetsart University, Bangkok.

Wu, X. F. and Cau, C. P. 2004. "Targeting of human aFGF gene into silkworm, *Bombyx mori* L. through homologous recombination." **J. Zhejiang. Univ. Sci**. 5 (6) : 644-650.

Yamamoto, M., Yamao, M., Nishiyama, H., Sugihara, S., Nagaoka, S., Tomita, M., Yoshizato, K., Tamura, T. and Mori, H. 2004. "New and highly efficient method for silkworm transgenesis using *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus and *piggyBac* transposable elements." **Biotechnol. Bioeng**. 88(7) : 849-853.

Zhong, B., Li, J., Chen, J., Ye, J. and Yu, S. 2007. "Comparison of transformation efficiency of *piggyBac* transposon among three different silkworm *Bombyx mori* strains." **Acta. Biochim. Biophys. Sin.** 39 (2) : 117-122.

ภาคผนวก

1 สารเคมีที่ใช้ในการทำให้ไข่ไหมปราศจากเชื้อ

1.1 formaldehyde 5 เปอร์เซ็นต์

1.2 เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

1.3 น้ำกลั่น

2 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Luria-Bertani broth(LB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

peptone	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
yeast extract	0.5	กรัม

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น ปรับ pH 7.0 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2 LB agar ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

peptone	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
yeast extract	0.5	กรัม
agar	1.5	กรัม

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ยกเว้น agar ในน้ำกลั่น ปรับ pH 7.0 ด้วย NaOH จากนั้นเติม agar แล้วปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3 SOB solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

yeast extract	0.5	กรัม
tryptone	2	กรัม
1 mM NaCl	1	มิลลิลิตร
1M KCl	0.25	มิลลิลิตร
1 mM $MgCl_2$	1	มิลลิลิตร
1 mM $MgSO_4$	1	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น ปรับ pH 7.0 ด้วย NaOH หรือ HCl แล้วปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.4 SOC medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

yeast extract	0.5	กรัม
bacto tryptone	2	กรัม
NaCl	0.06	มิลลิลิตร
KCl	0.02	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ปรับปริมาตรเท่ากับ 98 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำให้ปลอดเชื้อโดยการอบ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเติม 1M $MgSO_4$ จำนวน 1 มิลลิลิตร และ 2M glucose จำนวน 1 มิลลิลิตร ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วย 0.2 µfilter

3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์

3.1 TB solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

PIPES	0.3	กรัม
$CaCl_2$	0.17	กรัม
KCl	1.86	กรัม

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น ปรับ pH 6.7 ด้วย KOH หรือ HCl จากนั้นเติม $MnCl_2$ 1.09 กรัม แล้วปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วย 0.2 µfilter เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2 dimethyl sulfoxide (DMSO) แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบโคลน

4.1 แอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายแอมพิซิลิน 0.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเท่ากับ 10 มิลลิลิตร กรองด้วย 0.2 µfilter เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส นำมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส ก่อนเติมยาปฏิชีวนะ

4.2 bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactoside(X-Gal solution) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลาย bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactoside 20 มิลลิกรัมใน dimethylformamide (DMF) 1 มิลลิลิตร เก็บในหลอดกันแสง เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

4.3 isopropyl thio- ß-D-galactoside (IPTG solution) ความเข้มข้น 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลาย isopropyl thio- ß-D-galactoside120 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จนละลายดีแล้วกรองด้วย 0.2 µfilter เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

5 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิด DNA (Perfectprep® Plasmid Midi) ของบริษัท QIAGEN®

5.1 solution I (buffered resuspension solution)

5.2 solution II (alkaline lysis solution)

5.3 solution III (neutralization solution)

5.4 PDBM (DNA binding matrix suspension in guanidinium salt)

5.5 DPS (buffer salt solution)

5.6 mussel

5.7 glycogen

5.8 spin column

5.9 เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

5.10 elution buffer (5mM KCl ,0.5mM NaH_2PO_4 pH7.0)

6. สารละลายที่ในการตรวจวิเคราะห์ DNA โดยวิธีแยกขนาด DNA ในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

6.1 สารละลาย 10 เท่า TAE ปริมาตร 1 ลิตร

tris-HCl	48	กรัม
$CH_3COONa_3H_2O$	16.4	กรัม
Na_2EDTA	7.44	กรัม

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น ปรับ pH 7.7 ด้วย glacial acetic acid แล้วปรับปริมาตรเท่ากับ 1ลิตร

6.2 สารละลาย loading buffer

bromophenol blue	0.01	กรัม
tris-HCl (pH 6.8)	1.25	มิลลิลิตร
glycerol	5	มิลลิลิตร

ผสม bromophenol blue และ tris-HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 5 มิลลิลิตร แล้วเติม glycerol 5 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

6.3 DNA มาตรฐาน 1 กิโลเบส ของบริษัท Fermentas ®

7. สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) ของบริษัท Fermentas®

7.1 10xPCR buffer

7.2 2mM dNTP

7.3 $MgCl_2$

7.4 *Taq* DNA polymerase

8. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดจีโนมิค DNA (DNeasy Tissue Kit) ของบริษัท QIAGEN®

8.1 phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 1 ลิตร

NaCl	8.3	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	1.15	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น ปรับpH 7.4 ด้วย NaOH หรือ HCl แล้วปรับปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8.2 ATL (tissue lysis buffer)

8.3 proteinase K

8.4 AL (lysis buffer ที่มี guanidine hydrochloride)

8.5 AW_1 (wash buffer 1 ที่มี guanidine hydrochloride)

8.6 AW_2 (wash buffer 1 ที่มี sodium azide)

8.7 AE (elution buffer)

8.8 spin colunm

9. ชุดแยก DNA ออกจากผลผลิตพีซีอาร์ (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit) ของ บริษัท Amersham Bioscience

9.1 capture buffer

9.2 GFX column

9.3 wash buffer

9.4 elution buffer

10. ชุดแยก DNA ให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจลโดยใช้ Perfectprep® Gel Clean up ของบริษัท Eppendorf

10.1 binding beffer

10.2 Isopropanol

10.3 dilution wash buffer

10.4 elution buffer

10.5 spin column

11. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อม DNA ของบริษัท Invitrogen

11.1 T4 DNA ligase

11.2 T4 DNA ligase buffer

11.3 น้ำกลั่น

12. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิด DNA (QIA Spin Miniprep Kit) ของบริษัท QIAGEN®

12.1 lysis solution

12.2 wash buffer

12.3 elution buffer

12.4 fast plasmid spin column assembly

13. สารเคมีที่ใช้ในการย่อย DNA

*Eco*RI (*Eschericia coli* RY 13) ของบริษัท Invitrogen

13.1 *Eco*RI enzyme(10U/µl)

13.2 10X REACT® 3

13.3 น้ำกลั่น

5'G↓AATT C 3'
3'C TTAA↑G 5'

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นามสกุล	นางสาวพรพิมล รักษาพล
วัน เดือน ปี เกิด	7 มิถุนายน พ.ศ. 2522
ที่อยู่	115 ถนนนางลาด ตำบลคูหาสวรรค์ อำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง 93000
ประวัติการศึกษา	2541 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสตรีพัทลุง จังหวัดพัทลุง 2545 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ จังหวัดสงขลา ปัญหาพิเศษปริญญาตรี เรื่อง สภาวการณ์ของโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนม อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง (Monitoring of clinical mastitis in dairy farms of paphayom district phatthalung province)