การคัดเลือก *ura3* auxotrophic mutant ที่มีประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันสูงในยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* UBU-1-3

Selection of *ura3* Auxotrophic Mutants with the Highest Transformation Efficiency from the Yeast *Kluyveromyces marxianus* UBU-1-3

พัชราภรณ์ สุ่มมาตย์ ชริดา ปุกหุต และ สนม โนนกลาง*

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

*E-mail: sanom@rocketmail.com

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยก uracil auxotrophic mutant จากยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-3 และ UBU-1-4 แล้วนำมาคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเมชันที่ดีที่สุด โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหารเหลว YPD นาน 18 ชั่วโมง แล้ว spread เซลล์บนอาหารที่เติม Fluoroorotic acid (FOA) ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง *URA3* หรือ *URA5* ในการศึกษาครั้งนี้เราสามารถแยก FOA^+ ได้ 64 ไอโซเลท หลังจากนั้นทำการจัดจำแนกไอโซเลทที่เป็น *ura3* auxotrophic mutant โดยทดสอบความสามารถในการ complement กับยีน Km*URA3* โดยใช้เทคนิคทรานสฟอร์มเมชัน จากการทดลองพบว่า มี FOA^+ จำนวน 28 ไอโซเลทที่สามารถ complement กับ Km*URA3* ได้ หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันเพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด

คำสำคัญ : การทรานสฟอร์มเมชัน auxotrophic mutant *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ UBU

Abstract

The objective of this study was to isolate uracil auxotrophic mutants in the yeast *Kluyveromyces marxianus* UBU-1-3 and UBU-1-4 strains and then select the isolated strains which had the highest transformation efficiency. To isolate uracil auxotrophic mutants, yeast cells were cultured in YPD broth for 18 h and then spread on Fluoroorotic acid (FOA) containing medium. In this medium, FOA can induce the mutation of *URA3* or *URA5* genes. Sixty-four FOA^+ isolates were obtained. Thereafter, *ura3* auxotrophic mutants were identified as complementary with Km*URA3* after transformation. Based on the results, 28 isolates were complementary with Km*URA3*. Transformation of Km*URA3* into each isolate was carried out to select the isolate which had the highest transformation efficiency.

Keywords: Transformation, Auxotrophic mutant, *Kluyveromyces marxianus* UBU strains

บทนำ

เชื้อยีสต์ทนร้อนในสกุล *Kluyveromyces* มีคุณสมบัติที่น่าสนใจหลายประการ เช่น สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (49 องศาเซลเซียส) มีอัตราการเจริญที่เร็ว สามารถเจริญบนแหล่งอาหารได้หลากหลายแหล่ง เป็นต้น ข้อดีของการนำเชื้อยีสต์ทนร้อนมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตสารชีวโมเลกุลคือ เราจะสามารถเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการหมักให้สูงขึ้นได้ โดยหากเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักที่ใช้ยีสต์ในกลุ่มไม่ทนร้อนหรือ mesophile จะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิการหมักอยู่ที่ประมาณ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้เกิดค่าใช้จ่ายในการหล่อเย็นเพื่อรักษาอุณหภูมิ [1]

จากความสามารถที่โดดเด่นของเชื้อยีสต์ทนร้อนในสกุล *Kluyveromyces* ส่งผลให้มีการศึกษาและแยกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ใหม่ๆ มากขึ้น เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งที่ผ่านมา ผศ. ดร. ชริดา ปุกหุต ได้แยกเชื้อยีสต์ทนร้อน 10 ไอโซเลท ได้แก่ สายพันธุ์ UBU-1-1, UBU-1-2, UBU-1-3, UBU-1-4, UBU-1-5, UBU-1-6, UBU-1-7, UBU-1-8, UBU-1-9 และ UBU-1-10 ซึ่งสามารถเจริญเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสอีกทั้งมีความสามารถในการผลิตเอทานอล [2] และจากการจัดจำแนกโดยใช้บริเวณ D1 D2 และ 18s ของยีน RNA พบว่าเชื้อยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ UBU ที่แยกได้อยู่ในสปีชี่ส์ *K. marxianus* จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาและพัฒนาสู่การประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม เช่น การพัฒนาให้มีความสามารถพิเศษที่เกี่ยวโยงกับการผลิตเอทานอลหรือการพัฒนาสำหรับการใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีนต่าง ๆ เพื่อการพัฒนาสายพันธุ์ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษากระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ของเชื้อยีสต์ทนร้อนและนำไปสู่การพัฒนาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมที่เหมาะสมสำหรับ

เชื้อยีสต์ทนร้อน ซึ่งได้มีการใช้ *K. marxianus* สำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร การผลิตเอนไซม์หลายชนิดเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน และสามารถใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออกของยีนและการผลิตโปรตีนได้ [3]

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมถูกนำไปใช้เพื่อปรับปรุงลักษณะของจุลินทรีย์ เทคนิคดังกล่าวคือเทคนิคทรานสฟอร์มเมชัน เป็นอีกเทคนิคหนึ่งซึ่งเป็นเทคนิคพื้นฐานที่ใช้ในการชักนำยีนหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจเข้าสู่เซลล์ของเชื้อยีสต์ เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญในการใช้สำหรับการปรับปรุงสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตให้มีลักษณะตามที่ต้องการหรือใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของยีนที่สนใจที่ไม่ทราบลำดับเบสมาก่อนโดยการใช้เทคนิคทรานสฟอร์มเมชันแบบสุ่ม จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า *K. marxianus* สามารถรับดีเอ็นเอเข้าสู่โครโมโซมแบบสุ่มได้ [4] มีการรายงานว่าการใช้ dithiothreitol, polyethylene glycol, lithium acetate และการเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนการทำ heat shock ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันของ episomal plasmid ได้ถึง $1.9x10^3$ trasformant/ug DNA และเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและรวดเร็ว [3] จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า polyethylene glycol มีผลช่วยเพิ่มขนาดของรูเยื่อหุ้มเซลล์ให้กว้างขึ้นในการทรานสฟอร์มเมชันโดยวิธี electroporation ของ *Schizoshaccaromyces pombe* [5] และ Li^+ ให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเมชันได้ดีที่สุดในบรรดา alkali cations เช่น Cs^+, Rb^+, K^+ และ Na^+ [6] จึงนำไปสู่การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทรานสฟอร์มเมชันให้มีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้นใน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-3 , 1-4 และ 1-5

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *K. marxianus* UBU-1-3, 1-4 และ 1-5 *ura3* auxotrophic mutant ที่มีประสิทธิภาพในการนำเข้าดีเอ็นเอแบบสุ่มได้สูง
2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเมชันแบบสุ่มของเชื้อ *K. marxianus* UBU-1-3 , 1-4 และ 1-5

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *K. marxianus* โดยสายพันธุ์ UBU-1-3, 1-4 และ 1-5 ใช้สำหรับการแยก Uracil auxotrophic mutant และสายพันธุ์ DMKU3-1042 ใช้สำหรับการสกัด chromosomal DNA เซลล์ยีสต์ถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร YPD agar ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

2. การแยก Uracil auxotrophic mutant

เพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองที่เติมอาหาร YPD broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดทำการเก็บตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 1 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไป spread บนอาหาร FOA นำไปบ่มที่ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วเก็บโคโลนีที่เจริญบนอาหาร FOA และ re-streak เชื้อให้บริสุทธิ์ จากนั้นยืนยันว่าเชื้อที่แยกได้เป็น uracil auxotrophic mutant โดยนำเชื้อมา re-streak บนอาหาร YPD agar, minimal medium และ uracil minimal medium เลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหาร YPD agar และ uracil minimal medium แต่ไม่เจริญบนอาหาร minimal medium

3. การเตรียม *URA3* linear DNA

เตรียม chromosomal DNA ของเชื้อ *K. marxianus* DMKU3-1042 โดยทำการสกัด DNA โดยใช้ E.Z.N.A.® Yeast DNA Kit (OMEGA. US) ซึ่งใช้เป็น Template ในการเตรียม linear DNA ด้วยการทำ PCR ซึ่งใช้คู่ไพรเมอร์ KmURA3-243 โดยมีลำดับเบส (5´->3´) คือ CCA-TCG-CCT-GAC-TCT-ATG-CAC-TAA-C และ KmURA3+849c โดยมีลำดับเบส (5´->3´) คือ TCT-GAT-CCG-AGT-ACA-CTC-GAA-CCT-C จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA โดยการทำ PCR เพื่อให้ได้ผลิตผล *URA3* PCR

4. การจำแนก *ura3* auxotrophic mutant

เชื้อ uracil auxotrophic mutant ซึ่งได้จากขั้นตอนที่แล้วอาจเป็น *ura3* หรือ *ura5* auxotrophic mutant จึงทำการคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่เป็น *ura3* auxotrophic mutant เท่านั้นโดยใช้เทคนิคทรานฟอร์เมชันตามวิธี Babiker *et al.* [4] ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในอาหาร YPD 2 ml แบบบ่มเขย่า จากนั้นเก็บเซลล์ 1 ml นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 200 µl transformation mixture (40% poly ethylene glycol, 100 mM dithiothreitol และ 1.00 mM litium acetate) แล้วทำการเติม transformation mixture ปริมาตร 50 µl และ PCR product ของ *URA3* ลงไปผสมให้เข้ากันโดย vortex จากนั้นทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการเติม minimal medium 150 µl แล้วจึงนำมา spread บนอาหาร minimal medium นำไปบ่มที่ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน *ura3* auxotrophic mutant จะสามารถเจริญบนอาหาร minimal medium แต่ *ura5* auxotrophic mutant จะไม่มีการเจริญ หลังจากนั้นเลือก 5 ไอโซเลทที่มีจำนวน CFU มากที่สุดมาทรานสฟอร์มเมชันอีกครั้งโดยในขั้นตอน heat shock 15 นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพื่อเปรียบเทียบผลการทรานส์ฟอร์เมชั่น ว่าสายพันธุ์ใดให้จำนวน CFU/ml มากกว่ากันภายใต้สภาวะเดียวกัน

5. ศึกษาผลของสารประกอบในทรานสฟอร์มเมชันที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเมชัน

นำไอโซเลทจากข้อที่ 4 มาทำการทดลองต่อโดยเลือกเพียง 1 ไอโซเลทที่มีจำนวน CFU/ml มากที่สุดมาทำการทรานสฟอร์มเมชันซ้ำอีกครั้ง เพื่อศึกษาอิทธิพลของการขาด dithiothreitol, polyethylene glycol หรือ lithium acetate ในสาร transformation mixture และความเข้มข้นของที่แตกต่างกันซึ่งส่งผลต่อการรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์หรือไม่ เพื่อหาความเข้มข้น ที่เหมาะสมและศึกษาผลของความเข้มข้นของ dithiothreitol, polyethylene glycol และ lithium acetate ที่ต่างกันต่อการรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

6. ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในขั้นตอน heat shock ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเมชัน

นำไอโซเลทจากข้อที่ 5 ที่มีจำนวน CFU/ml มากที่สุดมาทำการทรานสฟอร์มเมชัน โดยในขั้นตอน heat shock ทำการกำหนดอุณหภูมิต่าง ๆ คือ 45 47 49 องศาเซลเซียส และกำหนดเวลาที่ใช้คือ 15 30 60 และ 90 นาที เพื่อหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมของเชื้อในการรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

7. ศึกษาอิทธิพลของอายุของเซลล์ยีสต์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเมชัน

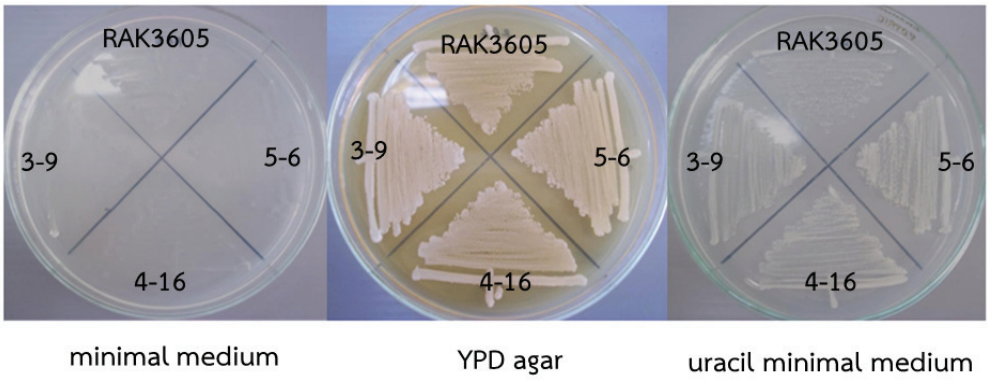
นำไอโซเลทจากข้อที่ 5 ที่มีจำนวน CFU/ml มากที่สุดมาทำการทรานสฟอร์มเมชัน โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร YPD อายุเซลล์ต่างกัน คือ 12 14 16 18 20 22 และ 24 ชั่วโมง เพื่อหาอายุเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมของเชื้อในการรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยก Uracil auxotrophic mutant

ในสภาวะปกติสำหรับการใช้ FOA ในการคัดแยก *ura3* mutant คือเมื่อเลี้ยงยีสต์บนอาหาร 5-FOA (5-Fluoroorotic acid) medium ยีน *URA3* หรือ *URA5* ในยีสต์สร้างสาร decarboxylase ซึ่งจะไปเปลี่ยน FOA ให้เป็น 5-fluorouracil ซึ่งเป็นสารพิษต่อเซลล์ทำให้เซลล์ตาย เซลล์บางเซลล์จึงกลายพันธุ์ยีน *URA3* หรือ *URA5* เพื่อความอยู่รอดของเซลล์

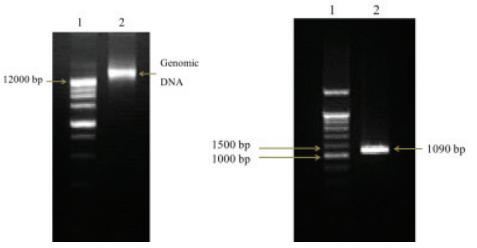
หลังจากการนำเซลล์ยีสต์ spread บนอาหาร FOA แล้วทำการบ่มเซลล์ที่สามารถเจริญบนอาหาร FOA ได้คือเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ยีน *URA3* หรือ *URA5* มีทั้งหมด 64 โคโลนี หลังจากที่ทำให้เชื้อบริสุทธิ์และนำไปยืนยันว่าเชื้อที่แยกได้เป็น uracil auxotrophic mutant โดยทดสอบการเจริญบนอาหาร YPD agar อาหาร minimal medium และอาหาร uracil minimal medium พบว่าทั้ง 64 ไอโซเลท สามารถเจริญบนอาหาร YPD agar และ uracil minimal medium แต่ไม่เจริญบนอาหาร minimal medium ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงตัวอย่างการเจริญของ uracil auxotrophic mutant บนอาหาร minimal medium YPD agar และอาหาร uracil minimal medium

2. การเตรียม *URA 3* linear DNA

หลังจากสกัดดีเอ็นเอโดย E.Z.N.A.® Yeast DNA Kit ยืนยันดีเอ็นเอที่สกัดได้โดย gel electrophoresis ซึ่งใช้ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เจลอะกาโรส พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอ (ภาพที่ 2a) เมื่อนำ chromosomal DNA มาเป็น Template ในการเพิ่มจำนวน *URA3* fragment โดยการทำ PCR ซึ่งใช้คู่ไพรเมอร์ KmURA3-243 และ KmURA3+849c จากนั้นนำ *URA3* PCR product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดโดยการทำ gel electrophoresis พบว่ามีขนาด 1,090 bp (ภาพที่ 2b)



(a) (b)

ภาพที่ 2 แสดงผล gel electrophoresis ของ chromosomal DNA (2a) และ *URA3* PCR product (2b)

3. การจำแนก *ura3* auxotrophic mutant

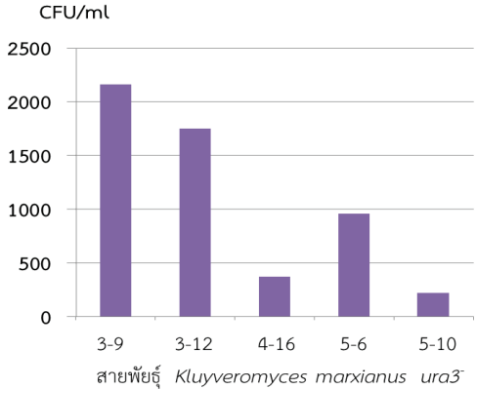
เนื่องจาก mutant ที่แยกได้บนอาหาร FOA เป็นได้ทั้ง *ura3* และ *ura5* mutant ดังนั้นจึงจำเป็นต้องจัดจำแนกว่ามีไอโซเลทใดว่าเป็น *ura3* mutant โดยทดสอบความสามารถในการรับ *URA3* เข้าสู่โครโมโซมแล้วสามารถเจริญบนอาหาร MM ได้ ซึ่งจะต่างกับ *ura5* mutant จะไม่สามารถเจริญได้ จากการทดลองพบว่าจากทั้งหมด 64 ไอโซเลท มีทั้งหมด 28 ไอโซเลท ซึ่งเป็น *ura3* auxotrophic mutant ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวน CFU/ml ของการทรานฟอร์เมชันเชื้อ *ura3* auxotrophic mutant ทั้ง 28 ไอโซเลท

รหัสเชื้อ	จำนวนโคโลนี (CFU/ml)	รหัสเชื้อ	จำนวนโคโลนี (CFU/ml)	รหัสเชื้อ	จำนวนโคโลนี (CFU/ml)	รหัสเชื้อ	จำนวนโคโลนี (CFU/ml)
3-1	5080	3-15	1040	5-2	40	5-8	2980
3-3	2220	3-16	4120	5-3	220	5-9	2100
3-7	2780	3-17	3920	5-3	220	5-10	5960
3-9	>6000	4-2	820	5-4	1660	5-11	4280
3-11	1400	4-16	>6000	5-5	2120	5-12	3300
3-12	>6000	4-20	>6000	5-6	4760	5-13	3700
3-13	2400	4-24	100	5-7	4100	5-14	3700
3-14	5260						

4. คัดเลือก *ura3* auxotrophic mutant สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเมชัน

หลังจากนำไอโซเลทที่มี CFU/ml ของการทรานฟอร์เมชันที่มีประสิทธิภาพมา 5 ไอโซเลท โดยเลือกมาตัวแทนละ 2 ไอโซเลทจากสายพันธุ์เดิมคือไอโซเลทรหัส 3-9 และ 3-12 จากสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ UBU-1-3 ไอโซเลทรหัส 4-16 และ จากสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ UBU-1-4 และ ไอโซเลทรหัส 5-6 และ 5-10 จากสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ UBU-1-5 เมื่อทั้ง 5 ไอโซเลทผ่านการทรานฟอร์เมชันอีกครั้งพบว่าไอโซเลทรหัส 3-9 มีจำนวน CFU/ml มากกว่าไอโซเลทอื่นดังแสดงในภาพที่ 3

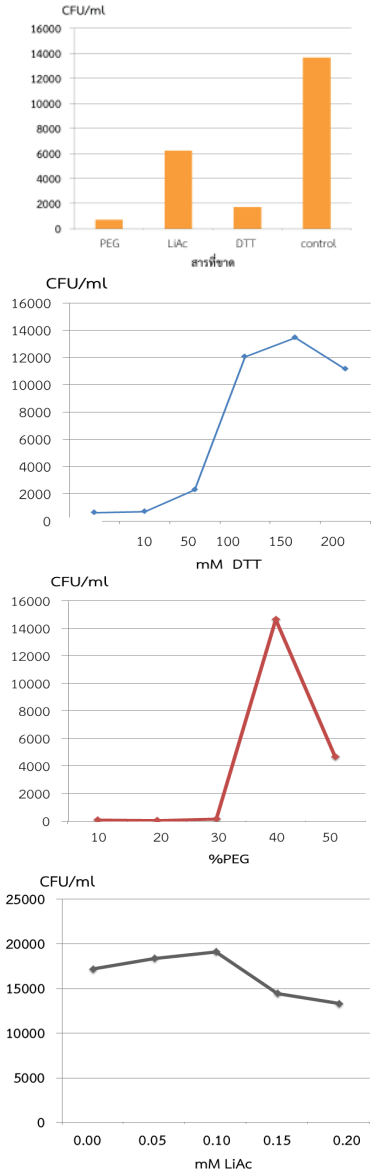


ภาพที่ 3 แสดงจำนวน CFU/ml ของการทรานสฟอร์เมชั่นเชื้อ *ura3* auxotrophic mutant ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่ผ่านการคัดเลือกจากทั้งหมด 28 ไอโซเลท

5. ศึกษาผลของสารประกอบใน transformation mixture ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเมชัน

ไอโซเลท 3-9 เมื่อทำการทดสอบอิทธิพลของการขาด dithiothreitol, polyethylene glycol หรือ lithium acetate ในสาร transformation mixture พบว่าสูตร เมื่อไม่เติม polyethylene glycol และ dithiothreitol ทำให้ประสิทธิภาพการทรานส์ฟอร์เมชันลดลงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และที่เมื่อไม่เติม lithium acetate ทำให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบพบว่า polyethylene glycol และ dithiothreitol มีผลอย่างมากต่อการรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของยีสต์ ส่วน lithium acetate เมื่อขาดจะส่งผลต่อการรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ลดลงกว่าเดิมดังแสดงในรูปภาพที่ 4(a)

การทดสอบอิทธิพลของความเข้มข้น dithiothreitol พบว่าที่ความเข้มข้น 150 mM ให้จำนวน transformant มากที่สุด รองลงมาคือ 100 mM แต่หากใช้x ความเข้มข้นที่ 50 mM หรือต่ำกว่า จำนวน transformant ลดลงอย่างมากดังแสดงในภาพที่ 4(b) เมื่อทดสอบอิทธิพลของความเข้มข้น polyethylene glycol พบว่าความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวน transformant มากที่สุด แต่เมื่อลดหรือเพิ่มความเข้มข้นส่งผลต่อการลดลงของ transformant อย่างมากดังแสดงในภาพที่ 4(c) อิทธิพลของความเข้มข้น lithium acetate ต่อประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเมชันพบว่าที่ความเข้มข้น 0.10 ให้ผล transformant จำนวนมากที่สุดคือ 19066 CFU/ml หากเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของ lithium acetate ส่งผลให้ transformant ลดลงเล็กน้อยดังภาพที่ 4(d)



ภาพที่ 4 จำนวน transformant (d) เมื่อทรานสฟอร์มด้วย *URA3* เข้าสู่ไอโซเลท 3-9 **(a)** จำนวน transformant เมื่อขาดองค์ประกอบต่าง ๆ ใน transformation mixture **(b)** จำนวน transformant เมื่อความเข้มข้น dithiothreitol ที่ต่างกัน **(c)** จำนวน transformant เมื่อความเข้มข้น polyethylene glycol ที่ต่างกัน **(d)** จำนวน transformant เมื่อความเข้มข้น lithium acetate ที่ต่างกัน

6. ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในขั้นตอน heat shock ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเมชัน

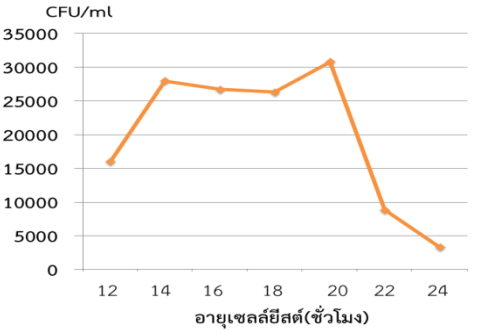
เมื่อทดสอบอิทธิพลของอุณหภูมิในขั้นตอน heat shock ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเมชันพบว่าที่ 45, 47 และ 49 องศาเซลเซียส มีระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำ heat shock คือ 60, 15 และ 15 นาที ตามลำดับแสดงว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นระยะเวลาที่ใช้จะลดลง และที่อุณหภูมิสูง องศาเซลเซียสนาน 15 นาที ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันสูงที่สุดเมื่อเทียบกับอุณหภูมิอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเมชันของเชื้อรหัส 3-9 ที่อุณหภูมิ 45 47 และ 49 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 15 30 60 และ 90 นาที

ผล transformation เชื้อรหัส 3-9			
เวลา (นาที)	จำนวน transformant (CFU/ml) ที่อุณหภูมิ heat shock (องศาเซลเซียส)		
	45	47	49
15	166	1413	833
30	666	1033	180
60	1386	406	20
90	946	166	13

11. ศึกษาอิทธิพลของอายุของเซลล์ยีสต์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเมชัน

ไอโซเลท 3-9 เมื่อผ่านการทรานสฟอร์มเมชันโดยใช้เซลล์ที่มีอายุการเลี้ยงที่แตกต่างกันในการทรานสฟอร์มเมชันพบว่า ที่อายุเซลล์ 14 – 20 ชั่วโมง ให้จำนวน transformant มากและมากที่สุดเมื่ออายุเซลล์ 20 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 20 พบว่า transformant ลดลงจำนวนมากดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 จำนวน transformant เมื่อทรานสฟอร์มด้วย *URA3* เข้าสู่ไอโซเลท 3-9 ใช้เซลล์ยีสต์ที่อายุแตกต่างกัน

สรุปและอภิปรายผล

จากการทดลองสามารถแยก *ura3* auxotrophic mutant ได้ทั้งหมด 28 ไอโซเลท จาก FOA^+ ทั้งสิ้น 64 ไอโซเลทซึ่งได้จากการกลายพันธุ์โดยใช้อาหารที่เติม 5-Fluoroorotic acid โดยอีก 36 ไอโซเลทอาจเป็น *ura5* auxotrophic mutant และจากการคัดเลือกเพียง 5 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพมาทดสอบประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มอีกครั้งพบว่า *ura3* auxotrophic mutant รหัส 3-9 มีประสิทธิภาพรับดีเอ็นเอเข้าสู่โครโมโซมได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบผลทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้เป็น CFU/ml และหลังจากทดลองศึกษาหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอน heat shock พบว่าที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ให้ประสิทธิภาพในการนำเข้าของดีเอ็นเอมากที่สุด สาร dithiothreitol และ polyethylene glycol มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของเชื้อยีสต์ เมื่อทดสอบหาความเข้มข้นขององค์ประกอบใน transformation mixture ที่ให้จำนวน transformant มากสุด คือ 40 เปอร์เซ็น polyethylene glycol 150 mM dithiothreitol และ 0.10 mM lithium acetate ส่วนอายุเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับใช้การทรานฟอร์เมชั่นคือ 14-20 ชั่วโมง ผลที่ได้จากการศึกษานี้ทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชันใน *Kluyveromyces marxianus* UBU-1-3, 1-5 และ 1-4 เพื่อที่นำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

เอกสารอ้างอิง

[1] สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ.** กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[2] Pukahuta C., Nonklang S., Suwannarit P., Hoshida H. and Akada R. 2009. "Screening of thermotolerant yeast for ethanol production at 45°C." **FerVAAP2009. The 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products with Joint Program. JSPS-NRCT Asian Core Program.** August 26-28, 2009. Kosa Hotel Khon Kean, Thailand.

[3] Daiane Felberg Antunes, Claudio Galvao de Souza Junior and Marcos Antonio de Morais Junior. 2000. "A simple and rapid method for litium acetate-mediated transformation of *Kluyveromyces marxianus* cells." **World Journal of Microbiology & Biotechnology;** 16: 653-654.

[4] Babiker M. A. Abdel-Banat, Sanom Nonklang, Hisashi Hoshida and Rinji Akada. 2008. "Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*." **Yeast 2010** ; 27: 29–39.

[5] Mark T. Hood and Chester Stachow. 1992 "Influence of Polyethylene Glycol on the Size of *Schizosaccharomyces pombe* Electropores." **Applies and Environmental Microbiology**; 58: 1201-1206.

[6] Hisao Ito, Yasuki Fukuda, Kousaku Murata and Akira Kimura. 1983. "Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations." **Journal of Bacteriology**; 153: 163-168.