รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เพดิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธธิธาดา, สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล,เลิศลักษณ์ เงินศิริ และ อมรา ทองปาน. 2536. **การขยายพันธุ์พืชในมะเขือเทศโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. เกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสตร์). 27: 269-277

พรทิพย์ ธนูทอง บุญเรือน เพียรงาม สุธาทิพย์ ฤกษ์วรชัย ,2529.**การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆของต้นมะเขือเทศ**. วารสารวิชาการเกษตร. 4:186-191 (2529)

พัชรา ลิปนะเวช, สายสุนี แก้วเทศ และ ศุภจิตรา ชัชวาลย์. 2545. **ผลของยาปฏิชีวนะบางชนิดต่อ *Agrobacterium tumefaciens* และการเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดยอดของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์** (*Lycopersicon esculentum* Mill.cv. Seedatip) วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ (Section T) 1(2): 335-348.

รัชนก โคโต. 2543. **การแสดงออกของ*TGG1* ในพืชวงศ์** Solanaceae **บางชนิด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์.คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศศิธร วุฒิวณิชย์ และศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2538. การทดสอบความต้านทานโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย. **วารสารเกษตรศาสตร์(วิทยาศาสตร์)**. 29:435-444.

สุรชัย มัจฉาชีพ. 2535. **พืชเศรษฐกิจในประเทศไทย**. โรงพิมพ์แพร่พิทยา. กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2539. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 2525. **หลักวิชาพืชสวน**. กรุงเทพฯ.

ภาษาอังกฤษ

Attathom, S., Siriwong, P., Kositratana, W. and Sutabutra, T. 1991. Improvement of Transformation efficiency of *Agrobacterium* Mediated Gene Transfer in Tomato. **Kasetsart Journal (Nat. Sci. Suppl.)** 25: 15-20.

Berger,B.R.and Christie,P.J. 1994. Genetic Complementation Analysis of the *Agrobacterium tumefaciens vir B* operon : *vir* B_2 through *vir* B_{11} Are Essential Virulence Genes. **Journal of Bacteriology**. 176(12):3646-3660.

Bloch, W. 1991. A Biochemical Perspective of the Polymerase Chain Reaction. **Biochemistry**. 30(11) : 2735-2747.

Caltin, D.W. 1990. The effect of antibiotic on the inhibition of callus induction and plant regeneration from cotyledons of sugarbeet (*Beta vulgaris*). **Plant Cell Reports.** 9 : 285-288.

Chan,L., Li,C.M., Nester,E.W. 2000. Transformed DNA (T-DNA)-associated Proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are Exported Independently of *vir* B. **Proceeding of the national Academy Science. USA**. 97 (13) : 7545-7550.

Cangelosi, G.A., Martinetti, G., Leigh, J.A., Lee, C.C., Theines, C.,and Nester, E.W. 1989. Role of *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export of b-1,2 glycan. **Journal of Bacteriology**. 171: 1609-1615.

Chen, P.Y., Wang, C.K., and To, K.Y. 2002. **Complete sequence of the binary vector pBI 121**. Institute of BioAgricultural Science Academia, Sinica, Taipei, Taiwan.

Chyi, Y.S., and Phillips, G.C. 1987. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Lycopersicon based on conditions favorable for regeneration. **Plant Cell Reports**. 6 : 105-108.

Das, A. and Xie, Y.H. 2000. The *Agrobacterium* T-DNA Transport Pore Proteins *vir* B_9, *vir* B_8, *vir* B_{10} Interact With One Another. **Journal of Bacteriology**. 182(3) :758-763.

Davis, M.E., Lineberger, R.D. and Miller, A.R. 1991. Effects of tomato cultivar, leaf-age, and bacterial strain on transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell tissue and Organ Culture**. 24 :115-121.

De la Pena, A., Lorz, H., and Schell, J. 1987. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral Tillers. **Nature**. 325 : 274-276.

Dodds,J.H. and Roberts,L.W. 1985. **Experiments in plant tissue cultures**. Cambridge University press. USA.

Erlich, Gelfand, D.H. and Saiki, R.K. 1988. Specific DNA amplification. **Nature** 331 : 461-462.

Erlich, H.A., Gelfand, D. and Sninsky, J.J. 1991. Recent Advance in the Polymerase Chain Reaction. **Science**. (351) :1643-1651.

Escudero, J., Neuhaus, G. and Hohn, B. 1995. Intracellular *Agrobacterium* Can Transfer DNA To the Cell Nucleus of The Host Plant. **Proceedings of the National Academy of Science**. 92 : 230-243

Fillatti, J.J., Kiser.,Rose,B. and Comai, L. 1987. **Efficiency transformation of tomato and introduction and expression of a gene for herbicide tolerance.** In: *Tomato biotechnology*. Nevins, D.J. and Jones, R.A. (eds.) Alan R. Liss, New York, 199-210.

Firoozabady, E.,and Kuehnle, A.R. 1995. *Agrobacterium* – Mediated transformation. **Plant Cell , Tissue and Organ Culture : Fundamental Methods**. pp.181-195. Springer-Verlag. Germany.

Fullner,K.J., Cuno Lora,J., Nester E.W. 1996. Pillus Assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer Genes. **Science**. 23 (273) : 1107-1109.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima. K. 1968. Nutrient Requirement of suspension culture of Soybean root Cells. **Experimental Cell Research**. 50: 151-158.

Gasser, C.S., Fraley, R.T. 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. **Science**. 244: 1293-1299.

Gelvin,S.B. 2000. *Agrobacterium* And Plant Gene. Involved in T-DNA Transfer and Integration. **Annu. Rew. Plant Physiol. Plant. Mol. Bio**.51: 223-250.

Godwin, I., Todd, G., Ford-Lloyd, B., and Newburg, H.J., 1991. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated. Transformations vary according to plant species. **Plant Cell Reports**. 9: 671-675.

Grierson, D. and Corey, S.N. 1998. **Plant Molecular Biology**. New York : Chapman and Hall. USA.

Griesbach, R.J. 1994. An improved method for transforming plants through electrophoresis. **Plant science**. 102: 81-89.

Hapfelmeier, S., Dmoke, N., Zumbryski, P.C. and Baron, C. 2000, *vir*B_6 Is Required for Stabilization of *Vir*B_5 and *Vir*B_3 and Formation of *Vir*B_7 Homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**. 182(16) : 4505-4511.

Hauptmann,R.M., Vasil,V., Ozias-Akins,P., Tabaeizadeh,Z., Rogers,S.G.,Fraley,R.T., Horsch,R.B. and Vasil,I.K. 1988. Evaluation of Selectable Markers for Obtaining Stable Transformations in the *Gramineae*. **Plant Physiology**. 86: 602-606.

Holford, P. and Newbury,H.J. 1992. The Effects of Antibiotics and Their Breakdown Products on The in Vitro Growth of *Antirrhinum majus*. **Plant Cell Reports**. 11: 93-96.

Horsh R.B., Fry, J.G., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Roger, S.G., and Eraley, R.T. 1995. A Simple and general method for transferring genes into plant. **Science**. 227 : 1229-1231.

Jacq, B., Lesobre, O., Sangwan, R.S. and Sangwan-Norreel, B.S. 1993. Factors influencing T-DNA transfer in A-mediated transformation of sugarbeet. **Plant Cell Reports**. 12 : 621-624.

James, D.J., Uratsu, S., Cheng, J., Negri, P., Viss, P. and Dandekar, A.M. 1993. Acetosyringone and osmoprotectants like betain or protein Synergistically enhances *Agrobacterium*-mediated. Transformation of apple. **Plant Cell Reports**. 12: 559-563.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Jefferson, R.A., Burgess, S.M. and Hirsh, D. 1986 β-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. **Proceeding of the National Acedamy of Sciences USA**. 83: 8447-8451.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. 1987. GUS fusion : β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO Journal**. 6(13) : 3901-3907.

Jin, S., Prusti, R.K., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G. and Nester E.W. 1990. Phosphorylation of the *vir* G Protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the Autophosphorylated *vir* A Protein: Essential Role in Biological Activity of *vir* G. **Journal of Bacteriology**. 172 (9) : 4945-4950.

Kalayawudhipong, P., Attathom, S. and Visessuwan, R. 1990. Regeneration of Seeda Tomato Plants from Isolated Protoplasts. **Kasetsart J. (Nat. Sci. Suppl.)** 24 : 6-11.

Kalogeraki, V.S., Zhu, J., Stryker,J.L. and Winans, S.C. 1999. The Right End of the *vir* Region of and Octopine-type Ti Plasmid Contains Four New Member of the *vir* Regulon That Are not Essential for Pathogenesis. **Jounal of Bacteriology**. 182(6) : 1774-1778.

Kuchnle, A.R. and Sugii, N. 1992. Transformation of Dendrobium Orchid using particle bombardment of protocorms. **Plant Cell Reports**. 11 : 484-488.

Lea and Peter, J. 1993. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. The Bath Press, Avon, Great Britain. England.

Lin,J.J., Assad-Garcia,N. And Kou,J. 1995. Plant Hormone effect of antibiotics on The Transformation Efficiency of Plant Tissues By *Agrobacterium tumefaciens* Cells. **Plant Science**.109: 171-177.

Lin,J.J.,Assad-Garcia, N. And Kuo, J. 1994. Effects of *Agrobacterium* Cell Concentration on the Transformation Efficiency of Tobacco and *Arabidopsis thaliana*. **Focus**. 16: 72-77.

Ling, H.Q., Kriseleit, D., Ganal, M.W. 1998. Effect of tricarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Plant Cell Reports**. 17:843-847.

Mathias R.J. and Boyd,L.A. 1986. Cefotaxime Stimulates Callus Growth, Embryogenesis and Regeneratation in Haxaploid Bread Wheat (*Triticum aestivum* LEM.THELL). **Plant Science**. 46: 217-223.

McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsch R., Fraley R. 1986. Leaf Disc Transformation of cultivated tomato (*L. Esculentum*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**. 5: 81-84.

Murashige,T.and Skoog.,F., 1962 Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture., **Physiologia plantarum**. 15: 473-497.

Niedz, R., Rutter, S.M., Hardley, L.W. and Sink, K.C. 1985. Plant Regeneration from leaf protoplasts of six Tomato cultivars. **Plant Science**. 39 : 199-204.

Pan, S., Q., Charles, T., Jin, S., Wu, Z., and Wester, E.N. 1993. Performed Dimeric state of the Sensor Protein *vir* A is involved in Plant *Agrobacterium tumefaciens* Signal Transfunction. **Proceeding of the National Academy of Science**. 90: 9939-9943.

Pollock K.,Barfield,D.G. and Shields,R. 1983. The toxicity of Antibiotics to plant Cell Cultures. **Plant cell Reports**. 2:36-39.

Radchuk, V.V., Ryschka, U., Schumann, G. and Klocke, E. 2002. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea var. botrytis*) by direct DNA uptake into mesophyll protoplasts. **Physiological plantalum**. 114: 429-438.

Roekel, J.S.C., Damm B; Melchers, L.S. and Hoekema,A. 1993. Factors influencing Transformation Frequency of Tomato *Lycopersicon esculentum*. **Plant cell Reports**.12:644-647.

Rogers, H.J. and Parkes, H.C. 1999 Direct PCR amplification from leaf discs. **Plant Science** 143: 183-186.

Sarma K S., Evans,N.E. and Selby,C. 1995. Effact of Carbenicillin and Cefotaxime on Somatic Embryogenesis of Sitka Spruce(*Picea sitchensis*(Bong.)Carr.). **Journal of Experimental Botany**. 46(292):1779-1781.

Schott, M, 1995. **Selectable marker and reporter genes**. In gene transfer to plant, Potrykys,I and spangenberg, G Springer-Verlag Berlin Heildeberg. New York.

Stachel, S.E., Messens, E., Montagu, M.V. and Zumbryski, P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**. 318(19 - 26) :624-629.

Stomp, A.M. 1992. **Histochemical localization of β-Glucoronidase**. In S.R.Gallagher (ed.). GUS Protocal: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression, pp. 103-173. Academic Press, Inc.

Streips, U.N., 1991. **Modern microbial genetics**. A Johnviley&Sons, inc., Publication, U.S.A.

Subba Rao, N.S. 1982. **Advance in Agriculture Microbiology**. London Butterworth Scientific. England. 704 pp.

Suzuki, K., Hallori, Y., Uraji, M., Ohta, N., Iwata, K., Murata, K., Kata, A., Yosida, K., 2000. Complete Nucleotide Sequence of a Plant Tumor-inducing Ti plasmid. **Gene**. 242 : (1-2) 331-336.

Szuromi, P. 1996. Pilli for plants. **Science**. 23 (273) :1023

Uchimiya, A., Fushimi, T., Hashimoto, H., Harada, H., Syono, K., and Sugawara, Y. 1986. Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-Treted protoplasts of rice (*Oryza Sativa* L.). **Molecular General Genetics**. 204 : 204-207.

Wen-Tao Peng,W.T., Lee,Y.W.and Nester,E.W. 1998. The Phenolic Recognition Profile of the *Agrobacterium tumefaciens vir* A Protein are Broadened by a High Level of the Sugar Binding Protein Chre. **Journal of Bacteriology**. 180 (21) : 5632-5638.

Wilson, K.J., Hughes, S.G., and Jefferson, R.A. 1992. The ***Escherichia coli* gus operon: Indection and Expression of the gus operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria**. In S.R. Gallagher (ed.). GUS Protocal : Using the *Gus* Gene as as Reporter of Gene Expression, pp. 10-20. Academic Press, Inc.

Yang, J., Lee, H.J., Shin, D.H., Oh, S., K., Seon, J.H. 1999. Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. **Plant Cell Reports**. 18 : 978-984.

Yepes, L.H., Adhwinckles H.S. 1994. Factor that effect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 37 : 257-269.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

1. **ส่วนประกอบอาหารสูตร** Murashige and Skoog **ปริมาตร 1ลิตร** (Murashige and Skoog, 1962.)

Inorganic salts

NH_4NO_3	Ammonium nitrate	1,650	มิลลิกรัม
KNO_3	Potassium nitrate	1,900	มิลลิกรัม
KN_2PO_4	Potassium phosphate dibasic Anhydrous	170	มิลลิกรัม
$MgSO_4$ $7H_2O$	Magnesium sulfate	370	มิลลิกรัม
$CaCl_2$ $2H_2O$	Calcium chloride, dihydrate	440	มิลลิกรัม
$MnSO_4$ $4H_2O$	Manganese sulfate	22.3	มิลลิกรัม
$FeSO_4$ $7H_2O$	Ferrous sulfate	27.8	มิลลิกรัม
Na_2EDTA	Disodium ethylenediaminetetra-Acetate	37.3	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$ $7H_2O$	Zinc sulfate	8.6	มิลลิกรัม
H_2BO_3	Boric acid	6.2	มิลลิกรัม
KI	Potassium iodide	0.83	มิลลิกรัม
$CuSO_4$ $5H_2O$	Copper sulfate pentahydrate	0.25	มิลลิกรัม
Na_2MoO_4 $2H_2O$	Sodium molybdate	0.025	มิลลิกรัม
$CoCl_2$ $6H_2O$	Cobalt Chloride	0.025	มิลลิกรัม

Organic constituents

Sucrose	30.0	กรัม
Glycine	2.0	มิลลิกรัม
Myo-inositol	100.0	มิลลิกรัม
Nicotinic acid	0.5	มิลลิกรัม
Pyridoxine-HCl	1.0	มิลลิกรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thiamine-HCl	1.0 มิลลิกรัม
Agar	8.0 มิลลิกรัม

2. **ส่วนประกอบอาหารสูตร** Medium B (feeder medium) **ปริมาตร 1 ลิตร**(Roekel, **และคณะ**,1993)

MS medium salt สำหรับอาหาร 1 ลิตร 1x

B5 vitamin 1x

Zeatin riboside 2.0 มิลลิกรัม

IAA 0.1 มิลลิกรัม

Sucrose 3%

Agar 0.7%

pH 5.8

- **ส่วนประกอบของ** B5 vitamin (Gamborg, **และคณะ**.1968)

Myo-inositol	100 mg/l
Nicotinic acid	1.0 mg/l
Pyridoxine HC	1.0 mg/l
Thiamine HCL	10 mg/l

3. **ส่วนประกอบอาหารสูตร** KDMS (feeder medium) **ปริมาตร 1ลิตร** (Attathom.**และคณะ** 1991)

MS medium salt สำหรับอาหาร 1 ลิตร

B5 vitamin 1x

Sucrose 3%

Agar 0.8%

2,4 D 0.2 มิลลิกรัม

Kinetin 0.1 มิลลิกรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. **ส่วนประกอบอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย สูตร** Medium P **ปริมาณ 1 ลิตร (Roekel, และคณะ,1993)**

MS medium salt สำหรับอาหาร 1 ลิตร

Petunia vitamin	1x
Sucrose	3%
2,4 D	1 มิลลิกรัม
Kinetin	0.5 มิลลิกรัม
Casien hydrolysate	0.2%

pH 6.5

- ส่วนประกอบของ Petunia vitamin

Thiamine HCL	9.9 mg/l
Pyridoxine HCL	9.5 mg/l
Nicotinic acid	9.0 mg/l
Myo-inositol	100 mg/l

5. **ส่วนประกอบอาหารสูตร** regeneration medium

5.1 **ส่วนประกอบอาหารสูตร** Medium C **ปริมาตร 1 ลิตร** (Roekel, **และคณะ**,1993)

MS medium salt สำหรับอาหาร 1 ลิตร

B5 vitamin	1x
Sucrose	3%
Agar	0.7%
Zeatin Riboside	2 มิลลิกรัม
IAA	0.1 มิลลิกรัม

pH 5.8

- ส่วนประกอบของ B5 vitamin (Gamborg *et al.* 1968)

Myo-inositol	100 mg/l
Nicotinic acid	1.0 mg/l
Pyridoxine HC	1.0 mg/l
Thiamine HCL	10 mg/l

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 **ส่วนประกอบอาหารสูตร** regeneration medium (Attathom, **และคณะ** 1991)

MS medium salt สำหรับอาหาร 1 ลิตร

B_5 vitamin	1x
Sucrose	3%
Agar	0.2 mg/l
Kinetin	0.1 mg/l
Zeatin	1 mg/l

5.3 **ส่วนประกอบอาหาร** regeneration medium **ปริมาตร** 1 **ลิตร**(Fillatti **และคณะ** 1987)

MS medium salt สำหรับอาหาร 1 ลิตร

Sucrose	20 กรัม
Myo-inositol	100 มิลลิกรัม
Nitsch's vitamins	
Zeatin	2 มิลลิกรัม
Thiamine	0.5 มิลลิกรัม
Agar	9 กรัม

pH 6.0 with KOH

- ส่วนประกอบของ Nitsch's Vitamins

Thiamine HCL	0.5 mg/l
Glycine	2.0 mg/l
Nicotinic acid	5.0 mg/l
Pyridoxine HCL	0.5 mg/l
Folic acid	0.5 mg/l
Biotin	0.05 mg/l

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. **ส่วนประกอบอาหารสูตร** Mg/L**สำหรับเลี้ยง** *Agrobacterium* **ปริมาณ 1 ลิตร**

Bacto Yeast Extract	2.5	กรัม
Tryptone	5.0	กรัม
Biotin	1.0	มิลลิกรัม
D-Manitol	5.0	กรัม
Potassium phosphate dibasic anhydrous (KH_2PO_4)	0.25	กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	0.1	กรัม
Sodium glutamate	1.16	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5.0	กรัม
Agar(สำหรับอาหารกึ่งแข็ง)	15.0	กรัม

pH 7.0

7. **สารเคมีที่ใช้ในการทำ** Histochemical assay

0.1 M $NaPO_4$ Buffer pH 7.0

10 mM EDTA pH 7.0

0.5 mM Potassium Ferricyanide

0.5 mM Potassium Ferrocyanide

1.0 mM X-Gluc

0.1 % Triton X-100

8. **การเตรียม** DNA marker λ Hind III / EcoR I (50 μl)

ประกอบด้วย

λ DNA (total 10 μl)	20 μl
H_2O	22 μl
EcoR I buffer (10X)	5 μl
Hind III	1.5 μl

Digest 37°C 1 hr.

Use 1 μl each + Dye 1 μl

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. **สูตรของสารละลายที่ใช้ในการสกัด** plasmid (Minipreparation of Plasmid DNA)

Solution I

50 mM glucose

25 mM Tris Cl (pH8.0)

10 mM EDTA (pH8.0)

Solution II

0.2 N NaOH

1% SDS

Solution III

5 M potassium acetate 60 ml.

Glacial acetic acid 11.5 ml.

H_2O 28.5 ml.

10. **วิธีการเตรียม** TE buffer **ปริมาตร 1 ลิตร**

นำเอา 10 mi 1M Tris-HCl pH 8.0

2 ml of Na_2 EDTA pH 8.0

นำมาละลายใน deionized H_2O แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. สูตรของสารละลายที่ใช้ในการศึกษายีน *NPT II*

สารละลาย	ส่วนประกอบ
DNA extraction Buffer (CTAB)	2% w/v CTAB 1.4 M NaCl 0.2% β-mercapto 20 mMEDTA 100 mM Tris-HCl 2% PVP
DNA loading dye	0.25% bromphenol blue 0.25% xylene cyanol FF 15% Ficoll

12. วิธีการสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB

1. บดเนื้อเยื่อพืชประมาณ 0.1 กรัม กับไนโตรเจนเหลว ให้เป็นผงละเอียดด้วยโกร่งบดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2. เติม CTAB buffer ซึ่งอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 65°C โดยใช้อัตราส่วน 6 มิลลิลิตรต่อเนื้อเยื่อพืช 1 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. เทส่วนผสมทั้งหมด ใส่ในหลอดพลาสติก 1.5 ml ที่มีฝาปิด ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมา

4. Incubate ที่ 60°C เป็นเวลา 30 นาที

5. เติม phenol: chloroform: Isoamyl-alcohol (25:24:1) โดยใช้ปริมาณเท่ากันกับสารละลายที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ

6. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 60,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที 4°C และดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่

7. เติม Chloroform โดยใช้ ปริมาตรเท่ากันกับสารละลายที่ดูดมาได้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้วิธีพลิกหลอดกลับไปกลับมาแล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 18,000 รอบ/นาที ทำ 2 ครั้ง แล้วดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่

8. NaOAc โดยใช้ปริมาตร 1/10 ของสารละลายที่ดูดมาได้ และ cold isopropanol โดยใช้ปริมาตร 0.6 ของสารละลายที่ดูดมาได้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้วิธีพลิดหลอดกลับไปกลับมา

9. Incubate ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

10. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11. เท Isopropanol ออก จะเหลือตะกอน (pellet) ติดอยู่ที่ก้นหลอด เติม 70% ethanol ที่แช่เย็น นำไปปั่นเหวี่ยง Impulse

12. เท Ethanol ออกแล้วปล่อยให้ ethanol ระเหยจนหมด ด้วย Vacuum pump

13. ละลาย DNA ในหลอดด้วย TE buffer (ปริมาณที่ใช้ขึ้นกับปริมาณ DNA ที่สกัดได้)

14. เติม RNase 0.5 μl incubate 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 เซนติเมตร

15. ปรับปริมาตรให้เป็น 250 μl ด้วย TE

16. เติม phenol-Chloroform-isoamyl alcohol โดยใช้ปริมาตรเท่ากันกับสารละลายที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ

17. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูด สารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่

18. เติม Chloroform โดยใช้ปริมาตรเท่ากันกับสารละลายที่ดูดมาได้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้วิธีพลิกหลอดกลับไปกลับมา แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทำ 2 ครั้ง ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่

19. เติม NaOAC โดยใช้ปริมาตร 1 ใน 10 ของ สารละลายที่ดูดมาได้ และ Iced cold absolute ethanol โดยใช้ปริมาตรเป็น 2 เท่าของสารละลายที่ดูดมาได้

20. Incubate ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

21. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

22. เทสารละลายส่วนบนทิ้ง จะเหลือตะกอน (pellet) ติดอยู่ที่ก้นหลอด แล้วล้างด้วย 70% ethanol ที่แช่เย็น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (แบบ impulse)

23. ทิ้งสารละลายส่วนบน จะเหลือตะกอน (pellet) ติดอยู่ที่ก้นหลอด แล้วเปลี่ยนให้ Ethanol ระเหยจนหมดโดย air dried ด้วยเครื่อง Vacuum pump

24. ละลาย pellet DNA ในหลอดด้วย TE buffer (ปริมาณที่ใช้ขึ้นกับปริมาณ DNA ที่สกัดได้)

25. วัดความเข้มข้นของสารละลายด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm. โดยใช้ TE buffer เป็น blank

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. **วิธีการสกัด** plasmid (Sambrook **และคณะ**., 1989)

1. นำ *Agrobacterium* ที่เลี้ยงใน broth มา 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด
2. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส
3. เทสารละลายชั้นบนทิ้ง แล้วเติม Solution I เขย่าให้เข้ากัน โดยเติมในอัตราส่วน cell suspension 1 มิลลิลิตร:Solution I 100 มิลลิลิตร
4. เติม Solution II ลงไป พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ อย่าเขย่าแรงๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
5. เติม Solution III 5.2 มิลลิลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ นำไปแช่เย็น เป็นเวลา 5 นาที
6. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000-10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่
7. เติม ethanol 95% ประมาณ 2 เท่า ของสารละลายในหลอด ผสมให้เข้ากันโดยวิธีพลิกหลอดกลับไปกลับมา
8. ปั่นด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที
9. เท ethanol ทิ้ง เหลือแต่ pellet ปล่อยให้ ethanol ระเหยออกจนหมด (air dried)
10. ละลาย DNA ในหลอดด้วย TE buffer (ปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณ DNA ที่สกัดได้)
11. วัดความเข้มข้นของสารละลายด้วยเครื่องวัด การดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยใช้ TE เป็น blank

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

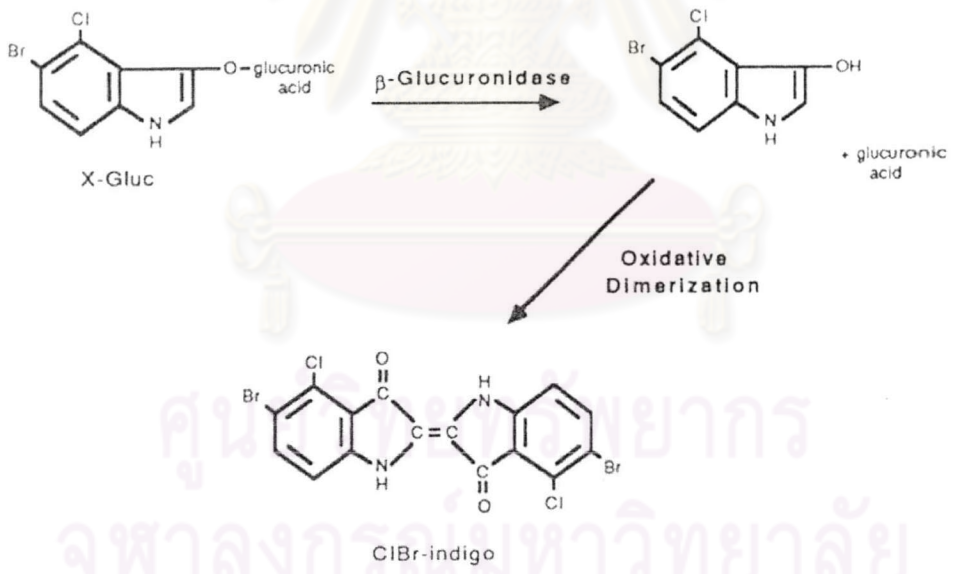
14. **วิธีการตรวจสอบ** Transgenic plant

14.1 **การตรวจสอบ** β-glucuronidase **ด้วยวิธี** Histochemical assay(GUS)

เป็นการศึกษาการแสดงออกของ reporter ยีน ว่ามีการแสดงออกที่อวัยวะ เนื้อเยื่อ หรือเซลล์ใดของพืชที่กำลังศึกษาอยู่ โดยอาศัยการทำงานของ *gus* A ยีน

gus A ยีนเป็นยีนที่สังเคราะห์เอ็นไซม์ β-glucuronidase เดิมเรียก *uidA* gene ได้มีการใช้ยีนนี้เป็นยีนรายงานผล (Reporter gene) ในการศึกษาการแสดงออกของยีนพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งยีนนี้จะไม่พบในพืชชั้นสูง gus gene เป็นยีนที่ได้จาก *E.coli* (Jefferson และคณะ, 1986)

โดยในการตรวจสอบจะใช้สารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยา GUS enzyme คือ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronidase (X-gluc) ซึ่งจะถูกทำสลายโดย GUS ดังปฏิกิริยา ตามที่แสดงในรูปที่ 26



รูปที่ 26 ปฏิกิริยาการสลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronidase (Xgluc) โดยเอ็นไซม์ GUS

14.2 การขยายยีนในหลอดทดลอง (GENE AMPLIFICATION)

เทคนิคการขยายยีนในหลอดทดลอง Polymerase Chain Reaction,(PCR) ได้มีรายงาน การนำเทคนิคนี้มาใช้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1985 โดย Saiki และคณะ โดยการทำการเพิ่ม ขยายยีนในหลอดทดลอง เป็นเทคนิคที่นิยมใช้มากในการวิจัยด้าน พันธุวิศวกรรมในปัจจุบัน การขยายยีนในหลอดทดลองเป็นปฏิกริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เฉพาะบริเวณที่ต้องการ และมีความยาวที่ต้องการได้โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวพอเหมาะ และมีการเรียง ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำเพาะ 2 สาย ทำหน้าที่เป็น Specific primers มีดีเอ็นเอ ที่สกัดจากสิ่งที่มี ชีวิตที่ทำการศึกษาเป็นแม่พิมพ์ การสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ทำได้โดยใช้เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอรเรส ที่สกัดมาจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตในที่อุณหภูมิสูงได้ ดังนั้นเอ็นไซม์ชนิดนี้มีความ ทนทานต่อความร้อนสูงและสามารถทำงานได้ดี ที่อุณหภูมิสูงและ (60 - 90 องศาเซลเซียส) จึงสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอซ้ำกันหลาย ๆ ครั้ง ในหลอดทดลองหลอดเดียวได้ดีทำให้ได้ผลิตผล คือ ดีเอ็นเอสายใหม่มีปริมาณเพิ่มขึ้นมากมาย สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการวิจัยทาง พันธุวิศวกรรมด้านต่าง ๆ ได้ต่อไป (Bloch, 1991)

เทคนิค PCR มีการใช้เอ็นไซม์ DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาขั้น denaturation ปฏิกิริยาแต่ละรอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการให้ความร้อนแก่ สารละลาย DNA ที่อุณหภูมิสูง (90-98^{o}c) เพื่อให้ DNA เกลียวคู่คลายเกลียวออกเป็นสายเดี่ยว ขั้นที่ 2 primer binding หรือ primer annealing เป็นการลดอุณหภูมิลงมาให้เหมาะสมกับการจับกันระหว่าง primer ขั้นที่ 3 primer extension เป็นการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3'-OH ของ primer โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase (Erlich และคณะ, 1988, Erlich และคณะ, 1991, Bloch, 1991)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการทำ PCR (PCR Procedure) (Radchuk **และคณะ**, 2002)

1. เติมสารต่างๆ ให้ครบตามตาราง

สาร	ปริมาณ (ml)	ความเข้มข้น
100 mg/μl genomic DNA	1 μl	100 ng
10x Reaction buffer	1.25 μl	1x
2 U/ μl taq. DNA polymerase	0.25 μl	0.5 U
2.5 mMdNTP	1 μl	0.2 mM
10 μM Primer A	1.25 μl	1 μM
10 μM Primer B	1.25 μl	1 μM
H_2O	6.5 μl	-
Total	12.5 μl	

2. เขย่าให้สารผสมกันให้ทั่ว
3. Incubate หลอดใน thermocycler ที่ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที
4. ทำการขยายชิ้น DNA ทั้งหมด 33 รอบ โดยแบ่งเป็น
   denature 94 องศาเซลเซียส 1 นาที
   annealing 55 องศาเซลเซียส 1 นาที
   Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที
5. Incubate ต่อ 10 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส และสามารถเก็บตัวอย่างที่ได้ไว้ที่-20 องศาเซลเซียส
6. วิเคราะห์ DNA ที่ขยายเพิ่มปริมาณด้วย agarose gel electrohoresis และย้อมด้วย Ethedium bromide

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นางสายสุนี แก้วเทศ เกิดวันที่ 15 สิงหาคม พ.ศ. 2501 ที่จังหวัดเชียงใหม่ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร ในปีการศึกษา 2523 ปัจจุบันรับราชการตำแหน่ง อาจารย์2 ระดับ 7 โรงเรียนปิยชาติพัฒนา ในพระราชูปถัมภ์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารีฯ ช่วยราชการ โรงเรียนเทพศิรินทร์ และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2542

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย