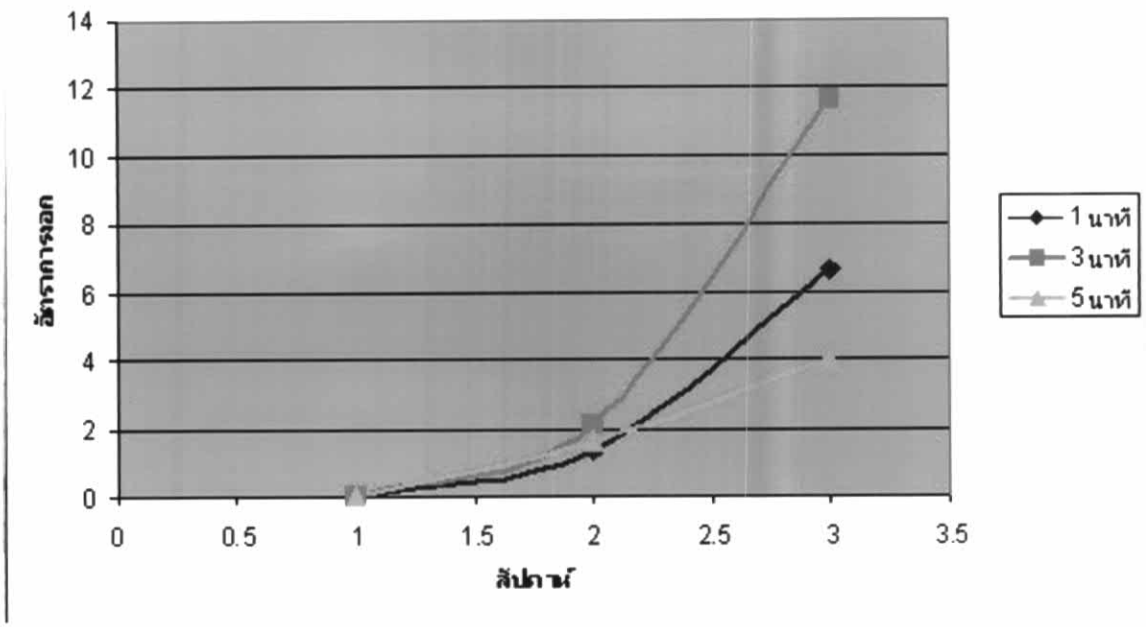
บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมเนื้อเยื่อกระสังเพื่อใช้ในการทดลอง
การเพาะเมล็ด

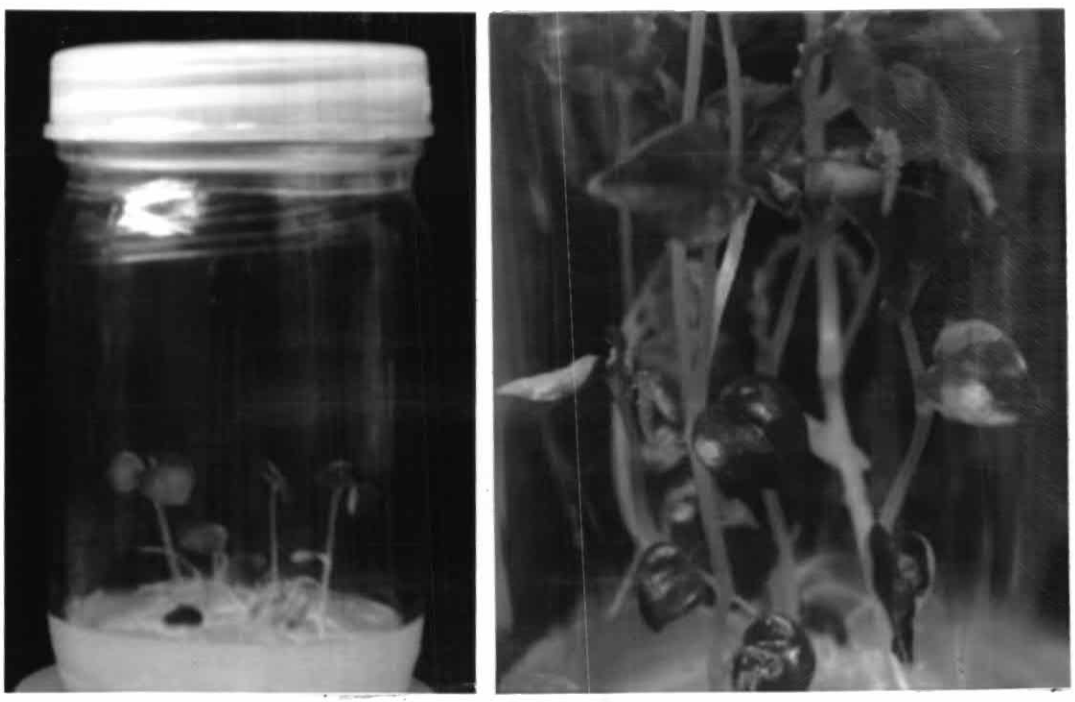
ภายหลังการนำเมล็ดพันธุ์กระสังที่เก็บได้จากเรือนเพาะชำภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย มาเป็นวัสดุที่ใช้ในการวิจัย โดยการฟอกฆ่าเชื้อด้วย 0.25% $HgCl_2$ พบว่าเมล็ดสามารถงอกต้นอ่อนได้ภายใน 1-3 สัปดาห์



ภาพที่ 2 อัตราการงอกของเมล็ดกระสังที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วย 0.25% เมอร์คิวริกคลอไรด์

การทดสอบภาวะการฟอกฆ่าเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆกัน กับเมล็ดพบว่าเมล็ดกระสังที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วย 0.25% $HgCl_2$ ที่เวลา 0 1 3 และ 5 นาทีมีอัตราการอยู่รอดโดยไม่ปนเปื้อนและมีจำนวนเมล็ดที่งอกคิดเป็นร้อยละ 8 38.33 และ 18.67 ตามลำดับ โดยพบว่าต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดมีความสมบูรณ์ไม่มีลักษณะผิดปกติที่เกิดจากผลของการฟอกฆ่าเชื้อด้วย $HgCl_2$ ต้นอ่อนมีความแข็งแรงสามารถเจริญเติบโตได้ดีและภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์ ต้นอ่อนจะเจริญจนมีความสูง 1.5 – 1.7 เซนติเมตร และมีใบเขียว 2 - 3 ใบ และเมื่อนำต้นอ่อนที่ได้ย้ายลง

ในอาหารแข็งสูตรพื้นฐาน MS ต้นอ่อนจะสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ภายในเวลา 4 สัปดาห์ ต้นสมบูรณ์ที่ได้มีใบ 6-8 ใบ ลำต้นอวบใสมีสีเขียวอ่อน มีราก 8-10 รากต่อต้น ในการทดลองด้วยระบบดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้โดยการตัดบริเวณส่วนของข้อ แล้วนำไปวางลงในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ซึ่งจะพบการงอกของตาข้างเป็นของยอดภายในเวลา 1 สัปดาห์ และสามารถเจริญเป็นต้นที่ใช้สำหรับการทดลองได้ภายในระยะเวลา 1 เดือน จึงได้คัดเลือกเวลาที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดกระสังเป็น 3 นาทีและใช้ตลอดการทดลอง (ภาพที่ 3)



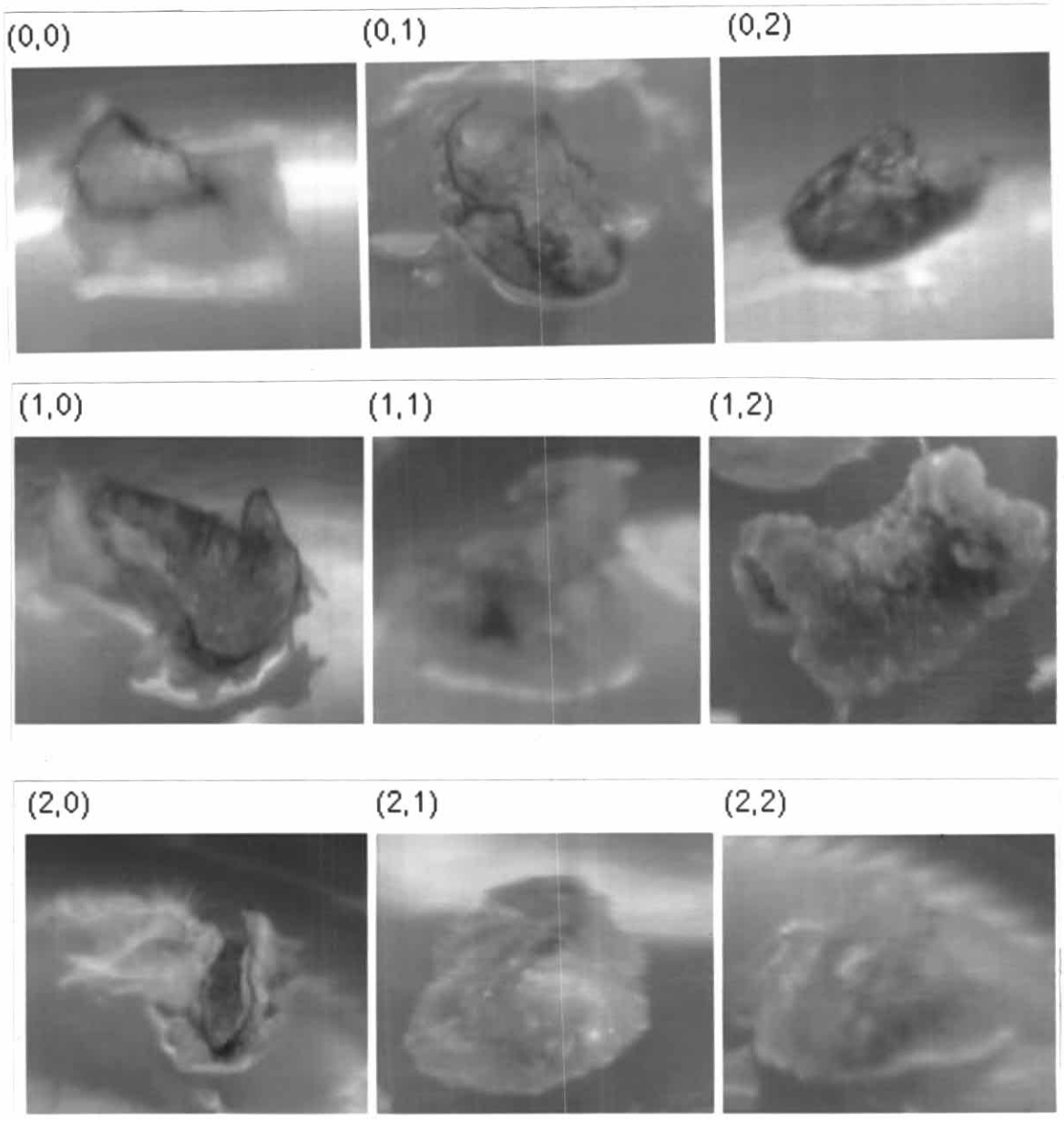
ภาพที่ 3 ต้นกระสังที่ได้จากการเพาะเมล็ดหลังจากย้ายลงในอาหารสูตรMS เป็นเวลา 2 สัปดาห์(ซ้าย)และต้นกระสังปลอดเชื้อที่สามารถนำไปใช้ในการทดลอง(ขวา)

4.2 การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระสังเพื่อรองรับระบบการถ่ายยีน

ในการพัฒนาระบบการถ่ายยีนจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระสังให้สามารถดำเนินการได้ครบวงจรให้สามารถชักนำการเจริญได้จากเนื้อเยื่อใบจนได้เป็นแคลลัสและจากเนื้อเยื่อแคลลัสจนเจริญไปเป็นต้นสมบูรณ์ ในการทดลองเริ่มจากการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส โดยพบว่า เมื่อนำใบกระสังปลอดเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงโดยใช้ใบอ่อนใบที่ 2 – 4 จากยอด มาตัดให้มีขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร แล้วนำไปวางบนอาหารแข็งที่ใช้ในการทดสอบการชักนำให้เกิดแคลลัสโดยใช้สารเร่งการเจริญเติบโตของพืช 2 คือ NAA และ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับได้แก่ 0 1.0 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการทดสอบสูตรอาหาร จำนวน 9 สูตร (ภาพที่ 4) โดยเก็บผลการทดลองเมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าสำหรับอาหารชุดควบคุมคืออาหารแข็งสูตรพื้นฐาน MS ที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิด ใบกระสังเริ่มมีสีอ่อนซีดจากบริเวณขอบของชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งชิ้น เนื้อเยื่อและตายภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์ ขณะที่ชุดการทดลองที่มีระดับความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้นเป็น 0 และ kinetin 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าขอบของชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มมีสีน้ำตาลไหม้และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งชิ้นภายในเวลา 2 สัปดาห์เช่นเดียวกัน และเมื่อความเข้มข้นของของสารเร่งการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้นเป็น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ไม่มี kinetin (kinetin 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าขอบของชิ้นเนื้อเยื่อมีสีน้ำตาลไหม้ในสัปดาห์แรก ส่วนในสัปดาห์ที่ 2 เริ่มมีรากงอกออกมาจากเส้นใบ

ผลการทดลองในชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ Kinetin 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารเร่งการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมและ Kinetin 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์แรกเนื้อเยื่อใบมีสีเขียวสด ขอบใบตอบสนองโดยการโค้งงอ ใบจะอวบน้ำมากขึ้น บริเวณขอบใบเริ่มสังเกตุเห็นกลุ่มเซลล์เล็กๆและขอบใบมีขนาดหนาขึ้น จากนั้นในสัปดาห์ที่ 2 ชิ้นเนื้อเยื่อม้วนเป็นก้อนมีความหนามากขึ้น กลายเป็นกลุ่มเซลล์แคลลัส สีเขียวสดจับตัวกันแน่น มีการขยายขนาดค่อนข้างเร็ว (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่เติม
สารเร่งการเจริญเติบโต NAA และ kinetin

เมื่อ (0,0) = NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
(0,1) = NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
(0,2) = NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
(1,0) = NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
(1,1) = NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

(1,2) = NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

(2,0) = NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(2,1) = NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

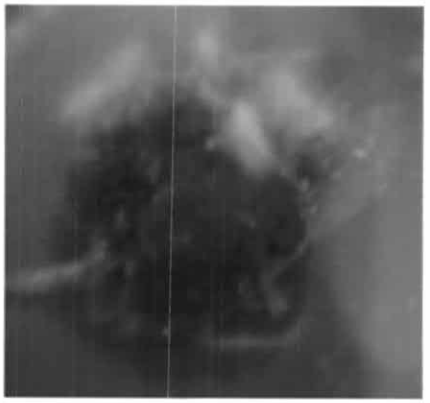
(2,2) = NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เนื่องจากในการทดสอบสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสทั้งหมดจำนวน 9 สูตรอาหาร และมีเพียง 4 สูตรอาหารเท่านั้นที่ชักนำให้เกิดแคลลัส จึงได้ทำการวัดและบันทึกผลขนาดของแคลลัสเฉพาะใน 4 สูตรอาหาร ทำการบันทึกทุกสัปดาห์ จากสัปดาห์ที่ 4

ผลการทดลองพบว่าในทุกชุดการทดลองที่เหลือแคลลัสมีสีเขียวสด โดยแคลลัสในอาหารทดสอบที่มีความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต NAA 1.0 และ Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดเฉลี่ยใหญ่ที่สุด รองลงมาคืออาหารทดสอบที่มีความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต NAA 1.0 หรือ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่างก็ให้ขนาดเฉลี่ยของแคลลัสใกล้เคียงกัน ขณะที่ในอาหารทดสอบที่มีความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต NAA และ Kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะมีขนาดเฉลี่ยเล็กที่สุด ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าแคลลัสในอาหารทดสอบที่มีความเข้มข้น NAA 2.0 และ Kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เริ่มมีตุ่มรากงอกออกมา ส่วนขนาดเฉลี่ยของแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ เรียงตามลำดับคือแคลลัสที่ใช้จากสูตรอาหาร NAA 1.0 และ Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1.0 และ Kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 2.0 และ Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 5 พบว่ามีเพียงอาหารทดสอบที่มีความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต NAA 1.0 และ Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้นที่แคลลัสมีการเจริญตามปกติส่วนสูตรอาหารทดสอบ 2 สูตรที่เหลือคือ NAA 1.0 และ Kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 2.0 และ Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สังเกตุพบว่าเริ่มมีตุ่มรากงอกออกมา (ภาพที่ 5)

(1,1)

(2,1)



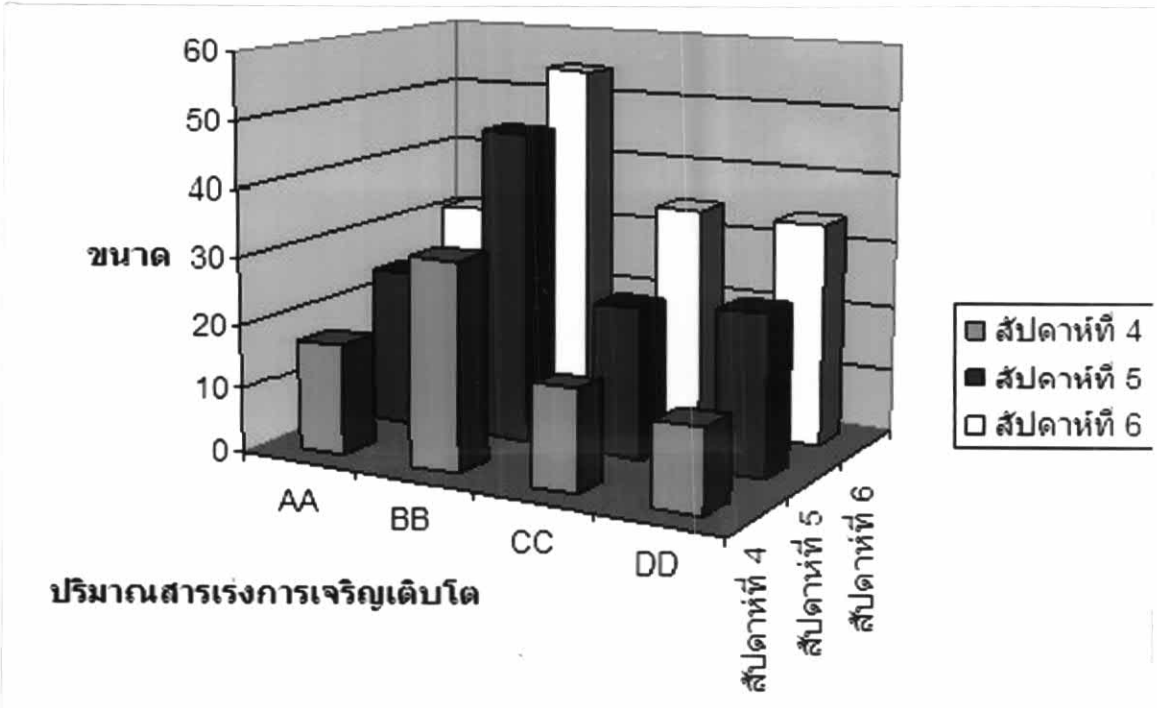
(2,2)

ภาพที่ 5 แคลลัสในอาหารที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส NAA และ Kinetin เมื่อเวลาผ่านไป 4 และ 5 สัปดาห์ ตามลำดับ

เมื่อ (1,1) = NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

(2,1) = NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

(2,2) = NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 6 การชักนำให้เกิดแคลลัสโดยใช้อาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่เติมสารเร่งการเจริญโต NAA และ kinetin

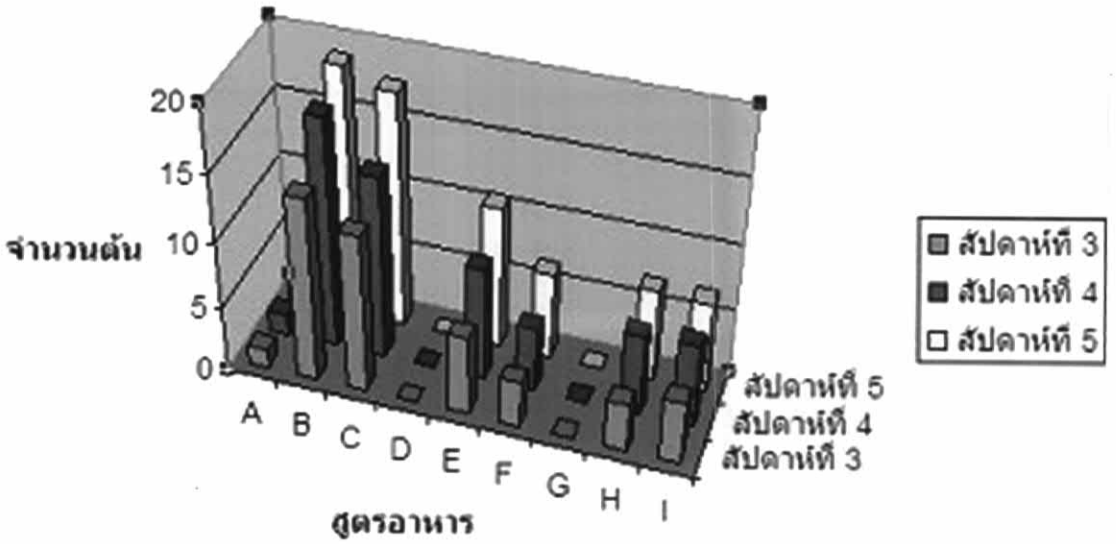
เมื่อ AA = NAA 1 และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

BB = NAA 1 และ kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

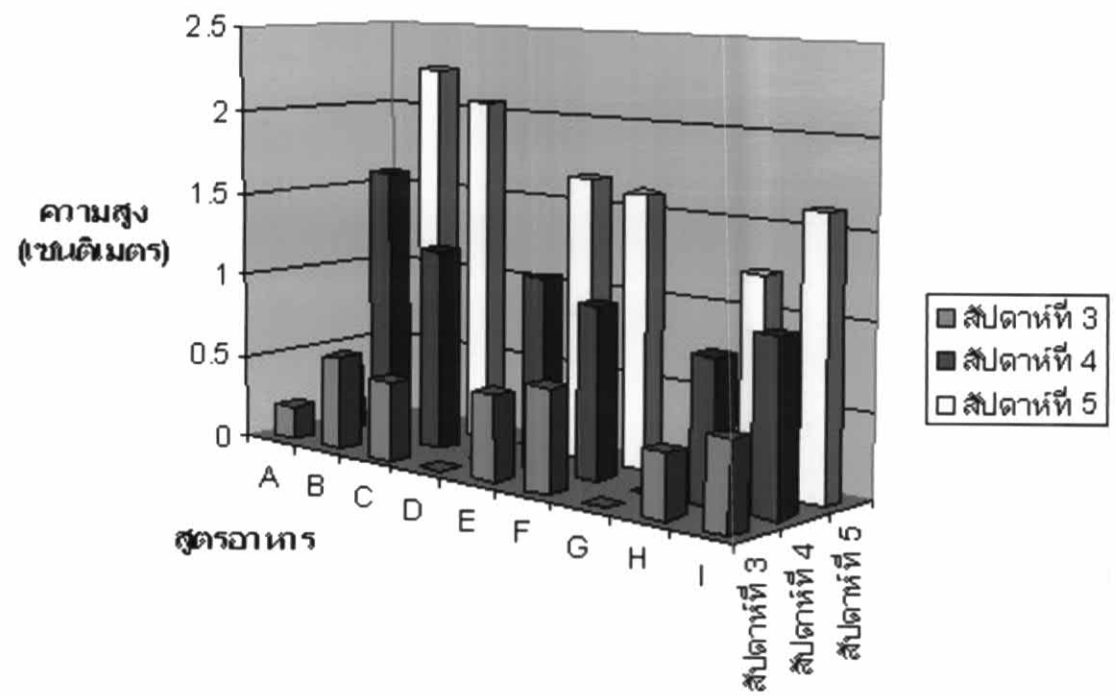
CC = NAA 2 และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

DD = NAA 2 และ kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภายหลังการนำแคลลัสที่ได้จากการชักนำโดยใช้สารเร่งการเจริญเติบโต NAA และ kinetin จากขั้นตอนที่ผ่านมา มาชักนำให้เกิดต้น โดยตัดแคลลัสให้มีขนาดก้อนละ 0.3 x 0.3 เซนติเมตร จากนั้นย้ายลงในอาหารแข็งสูตรพื้นฐาน MS ที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต NAA 0 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 0 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารที่เติม kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยไม่มี NAA แคลลัสจะเจริญไปเป็นยอดและให้จำนวนยอดกระสังสูงที่สุด รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติม kinetin 5 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยไม่มี NAA ให้จำนวนยอดใกล้เคียงกับสูตรแรก ในอาหารที่เติม NAA ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนยอด ขณะเดียวกันอาหารที่เติมเฉพาะ NAA ไม่พบว่ามียอดเกิดขึ้น



ภาพที่ 7 จำนวนยอดของกระสังในอาหารพื้นฐานสูตร MS ที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต NAA และ kinetin



ภาพที่ 8 ความสูงเฉลี่ยของยอดกระสังในอาหาร MS ที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต NAA และ kinetin

เมื่อ A = NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

B = NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

C = NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

D = NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

E = NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

F = NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

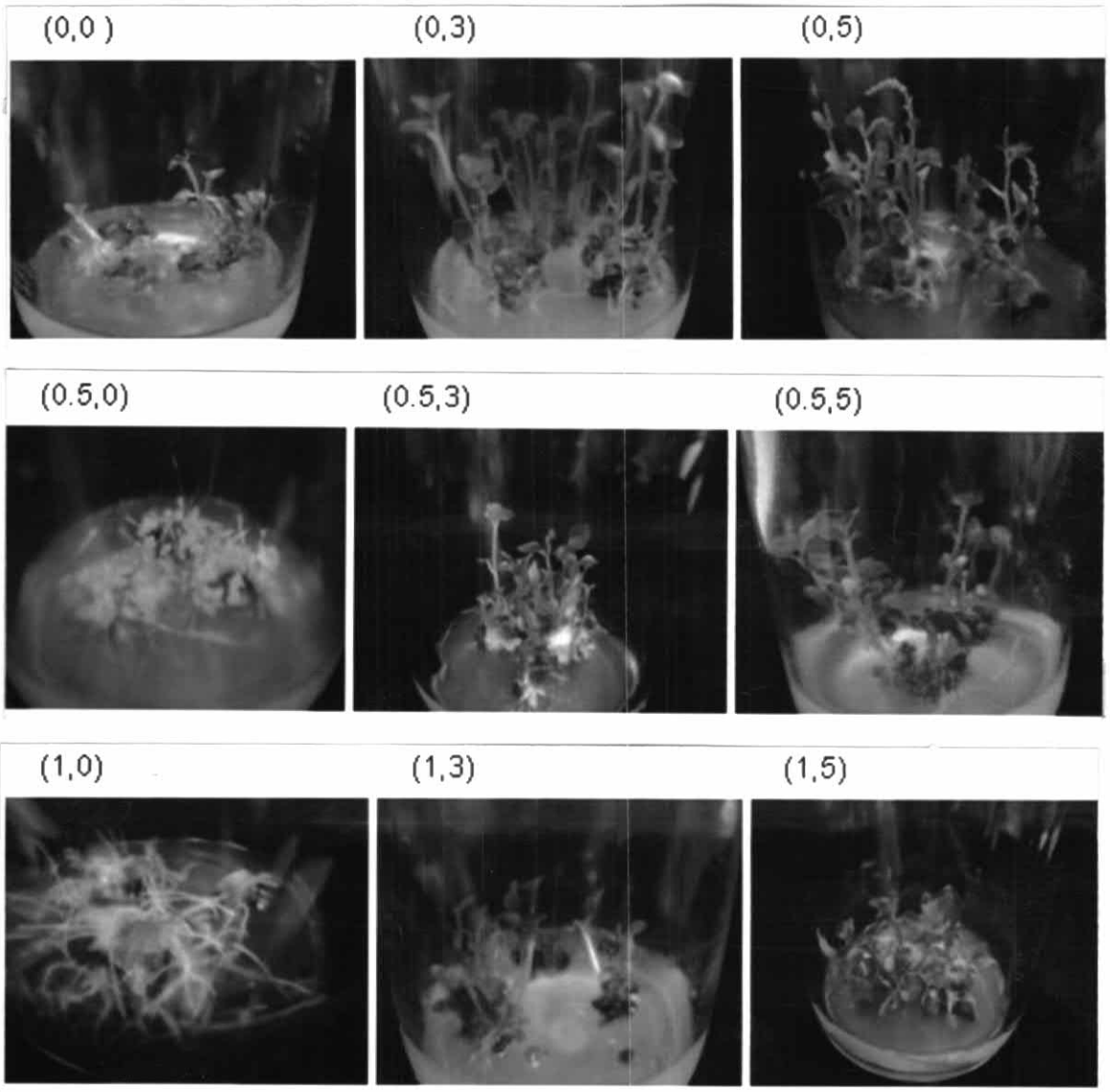
G = NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

H = NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

I = NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ขณะที่ในอาหาร MS ที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต kinetin เพียงอย่างเดียวให้ความสูงของยอดอ่อนกระสังสูงที่สุดและสูงใกล้เคียงกันในสองสูตรอาหารคือ kinetin 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนในอาหารที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต NAA เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อความสูงของยอดอ่อนกระสัง

สรุป ระยะเวลาในการพัฒนาจากใบกลายเป็นแคลลัสใช้เวลา 1 เดือน และระยะเวลาในการพัฒนาจากแคลลัสจนเป็นต้นใช้เวลา 3 สัปดาห์(ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ต้นกระสังที่ได้จากการชักนำโดยใช้อาการสูตรพื้นฐาน MS เติมสารเร่งการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเพื่อชักนำให้เกิดต้น

เมื่อ (0,0) = NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(0,3) = NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

(0,5) = NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

(0.5,0) = NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

(0.5,3) = NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

(0.5,5) = NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

(1,0) = NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

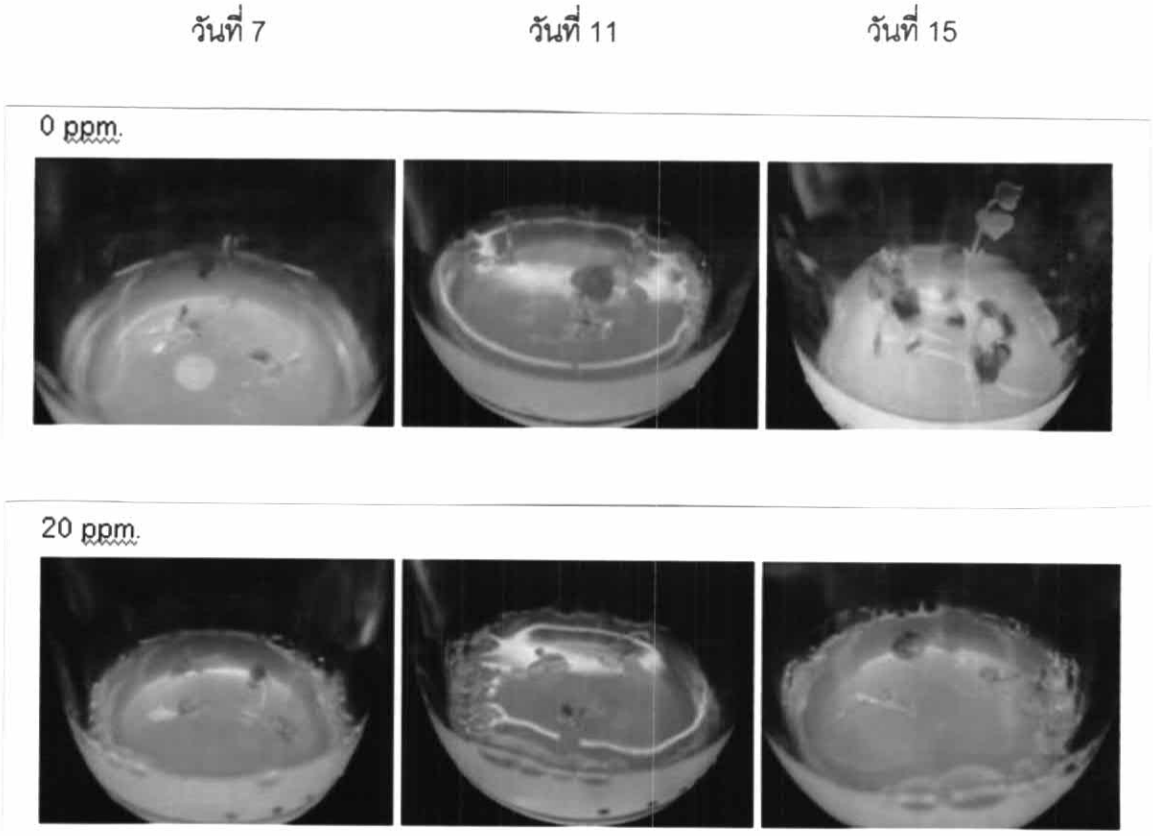
(1,3) = NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

(1,5) = NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

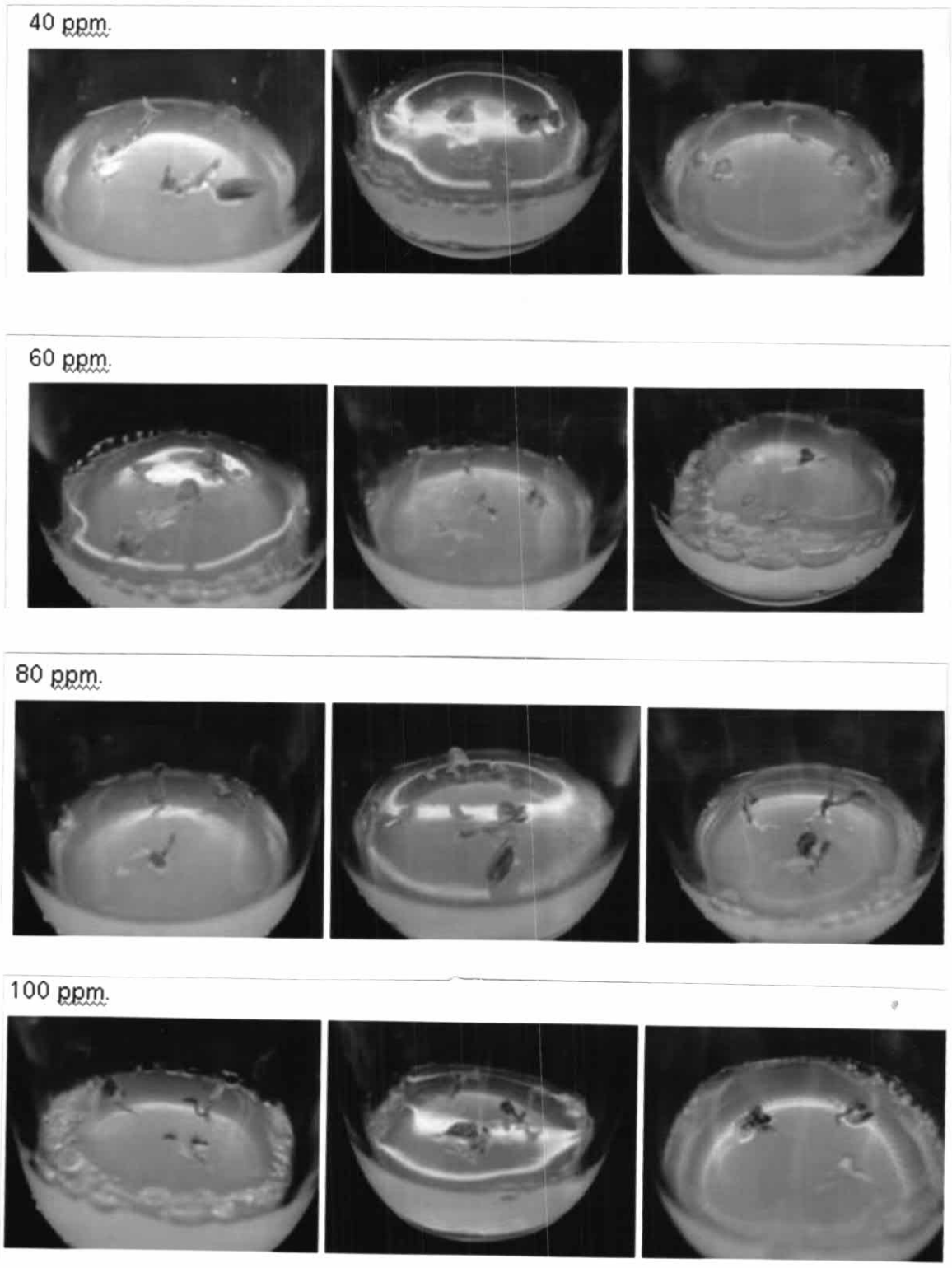
4.3 ทดสอบความต้านทานของชิ้นเนื้อเยื่อต่อยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสเพื่อใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อกระสังที่ได้รับการถ่ายยีน

นำยอดกระสังยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ที่มีใบอ่อน 3 ใบ ไปทดสอบความต้านทานต่อยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส โดยนำชิ้นส่วนของยอดกระสังที่ตัดเรียบร้อยแล้วไปวางบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มียาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสความเข้มข้น 20 40 60 80 100 ppm.

ในระยะ 7 วันแรกของการทดสอบพบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสความเข้มข้น 60 80 และ 100 ppm. จะพบชิ้นเนื้อเยื่อที่ตายลง ขณะที่ในอาหารที่เติมยาปราบวัชพืชเบียลาฟอสความเข้มข้น 20 และ 40 ppm. ชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณที่สัมผัสกับอาหารโดยตรงจะมีสีอ่อนลงสามารถมองเห็นเส้นใบ แต่ยังไม่พบว่าชิ้นเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำตาล หรือตายในระยะเวลา 11 วันของการทดสอบพบว่าชิ้นเนื้อเยื่อที่ตายเพิ่มขึ้นในแต่ละสูตรอาหาร ส่วนชิ้นที่รอดบริเวณที่สัมผัสกับอาหารจะมีสีอ่อนลงจนซีด และมีบางส่วนกลายเป็นสีน้ำตาล และภายในระยะเวลา 14 วัน จะพบว่าในอาหารสูตรที่มีความเข้มข้นของเบียลาฟอส 100 ppm. ชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมดกลายเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 10)

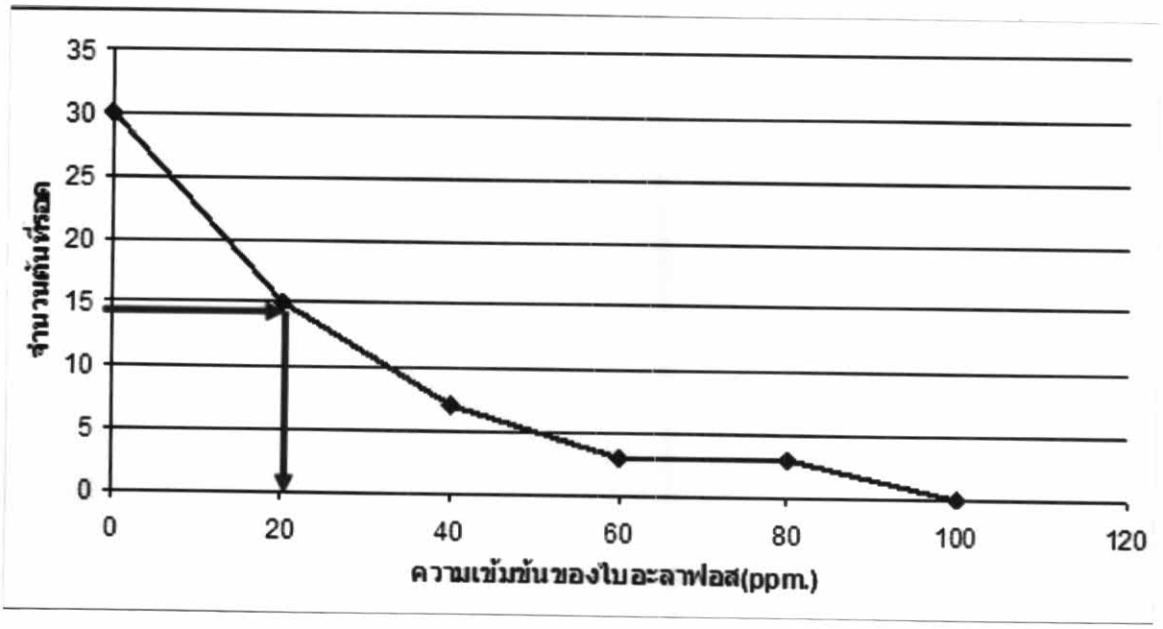


ภาพที่ 10 ทดสอบความต้านทานของเนื้อเยื่อกระสังต่อยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส



ภาพที่ 10 ทดสอบความต้านทานของเนื้อเยื่อกระสังต่อยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

เมื่อนำอัตราการตายที่ความเข้มข้นของยาปราบวัชพืชต่างกันมาหาค่าความสัมพันธ์ควบคู่ไปกับการหาความเข้มข้นที่มีอัตราการตาย 50% (LD 50) พบว่า เป็นดังภาพที่ 11

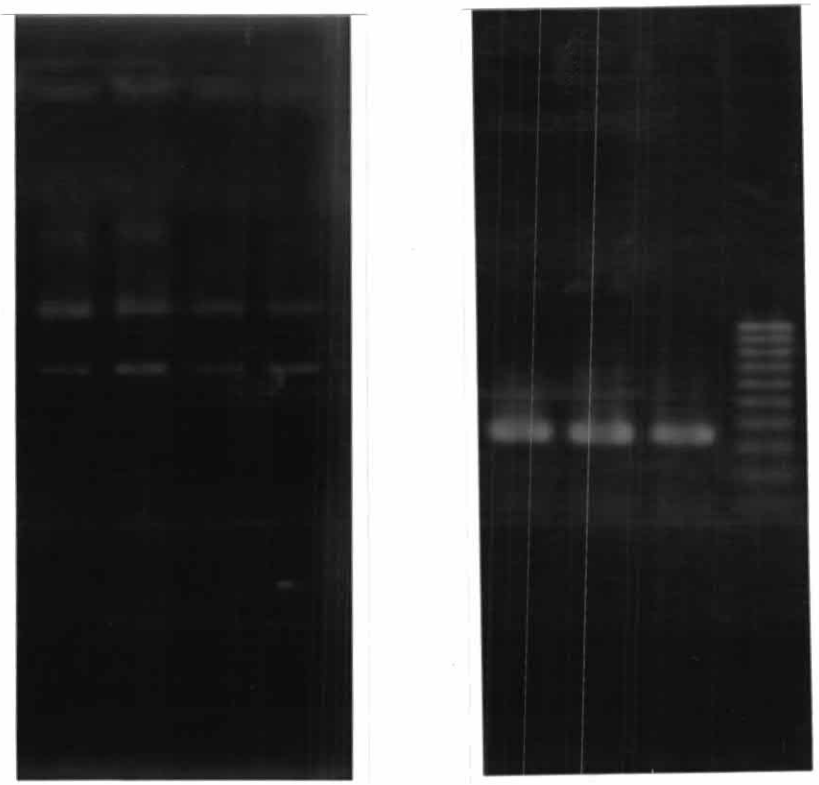


ภาพที่ 11 อัตราการตายของเนื้อเยื่อกระสังที่ทดสอบความต้านทาน
ต่อยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสที่ LD_{50}

จากกราฟ ความเข้มข้นของยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสที่มีความเหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีชี้วัดความสามารถในการต้านทานต่อยาปราบวัชพืช ในกระสังที่ได้รับการถ่ายยีนโดยดูได้จากค่า LD_{50} (lethal dose 50) พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์เนื้อเยื่อกระสังที่ระดับความเข้มข้นที่ 20 ppm. มีอัตราการตายครึ่งหนึ่งหรือ 50% ของจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด

4.4 ระบบการถ่ายยีน โดยใช้ยีน *bar* ที่ต้านทานยาปราบวัชพืช bialaphos เป็นต้นแบบศึกษา

การพัฒนาระบบการถ่ายยีนเข้าสู่กระสังอาศัยหลักการ electrical pulse โดยใช้ยีน *bar* เป็นมาร์เกอร์ โดยในขั้นต้นได้ดำเนินการถ่ายพลาสมิด *pBIC BAR* เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธีทางเคมีร่วมกับการทำ heat shock (Sambrook *et al.*, 1989) เพื่อใช้เป็นต้นเชื้อในการสร้างดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียชนิดเหลว (LB broth) เพื่อเพิ่มปริมาณ ตรวจสอบการดำรงอยู่ของยีนจากการสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี middle scale plasmid preparation (Sambrook *et al.*, 1989) และตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้าหลังการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำเพาะด้วยเทคนิคพีซีอาร์



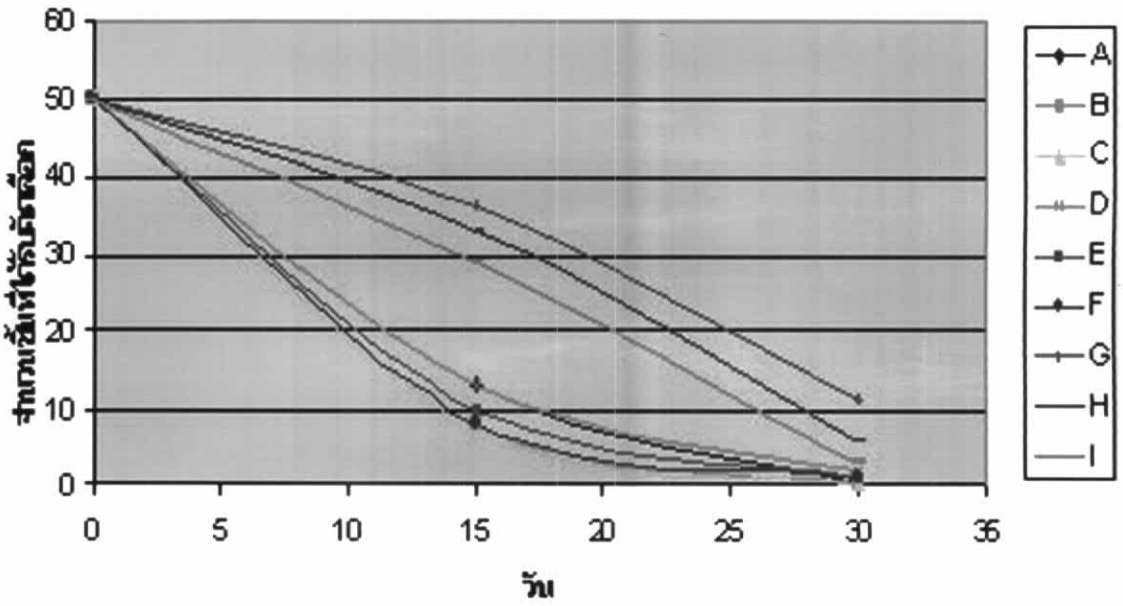
ภาพที่ 12 ขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอ pBIC BAR และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ของยีน *bar*

เมื่อ A = พลาสมิดดีเอ็นเอ pBIC BAR

B = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ของยีน *bar*

จากภาพพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณชิ้นยีน *bar* ด้วยความจำเพาะขนาด 400 นิวคลีโอไทล์ ซึ่งเป็นการชี้ชัดถึงการปรากฏของยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ bialaphos

ในการทดสอบความเป็นไปได้ในการถ่ายยีนตามหลักการ electrical pulse พบว่าเมื่อนำพลาสมิด pBIC BAR มาศึกษาการถ่ายยีนเข้าในแคลลัสกระสัง โดยใช้กระแสไฟฟ้ากระแสตรงที่ความต่างศักย์ที่ 50 โวลท์(electrical pulse) เป็นเวลา 20 40 และ 60 วินาที ตามลำดับ ร่วมกับสารละลายโพลีเอทิลีนไกลคอล 6,000 และแคลเซียมคลอไรด์ (PEG) เข้มข้น 1% 5% 10% และ$CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 1 mM จากนั้นย้ายชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนแล้วลงในอาหารสูตร MS ที่เติมยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส 20 ppm. เพื่อใช้คัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 13 ศึกษาระบบการถ่ายยีนโดยใช้ยีน *bar* เป็นต้นแบบและคัดเลือกโดยใช้ยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

เมื่อ A = 10% PEG + $CaCl_2$ ร่วมกับ electrical pulse เวลา 20 วินาที

B = 10% PEG + $CaCl_2$ ร่วมกับ electrical pulse เวลา 40 วินาที

C = 10% PEG + $CaCl_2$ ร่วมกับ electrical pulse เวลา 60 วินาที

D = 5 % PEG + $CaCl_2$ ร่วมกับ electrical pulse เวลา 20 วินาที

E = 5 % PEG + $CaCl_2$ ร่วมกับ electrical pulse เวลา 40 วินาที

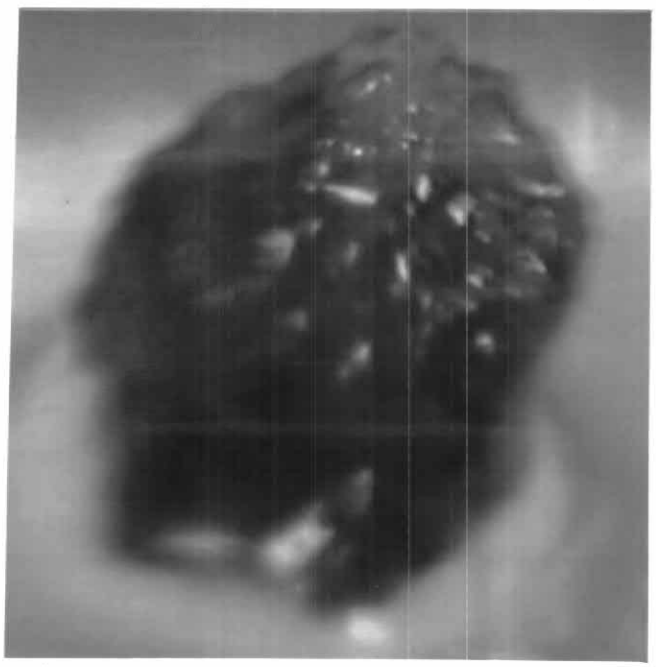
F = 5 % PEG + $CaCl_2$ ร่วมกับ electrical pulse เวลา 60 วินาที

G = 1 % PEG + $CaCl_2$ ร่วมกับ electrical pulse เวลา 20 วินาที

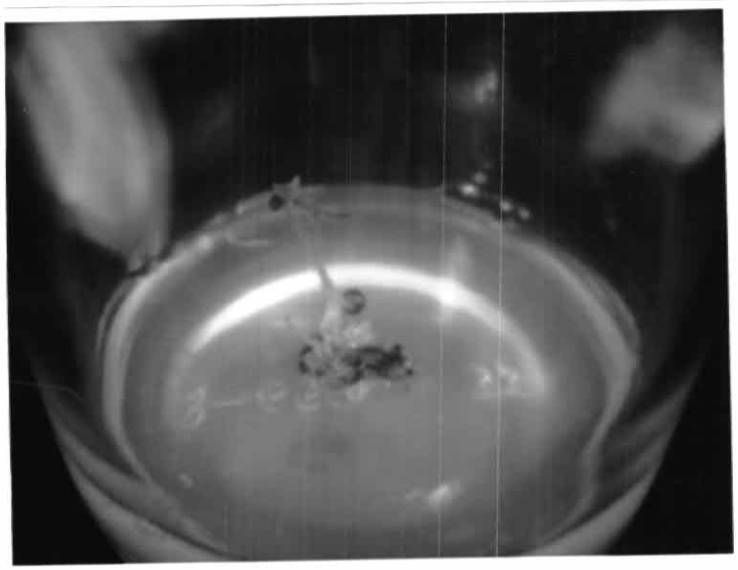
I = 1 % PEG + $CaCl_2$ ร่วมกับ electrical pulse เวลา 40 วินาที

H = 1 % PEG + $CaCl_2$ ร่วมกับ electrical pulse เวลา 60 วินาที

ในชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของ 10% PEG และ 5 % PEG ร่วมกับ electrical pulse ไม่พบชิ้นเนื้อเยื่อต้านทานยาปราบวัชพืช ส่วนในชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของ PEG เป็น 1% ร่วมกับ electrical pulse ที่เวลา 20 40 และ 60 วินาที พบว่าการดำเนินการ electrical pulse ที่เวลา 20 นาที จะให้ชิ้นของเนื้อเยื่อที่ต้านทานต่อยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส โดยเนื้อเยื่อที่ต้านทานยังคงแสดงลักษณะสีที่เป็นสีเช่นเดิม



ภาพที่ 14 ชิ้นเนื้อเยื่อแคลลัสของกระสังที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

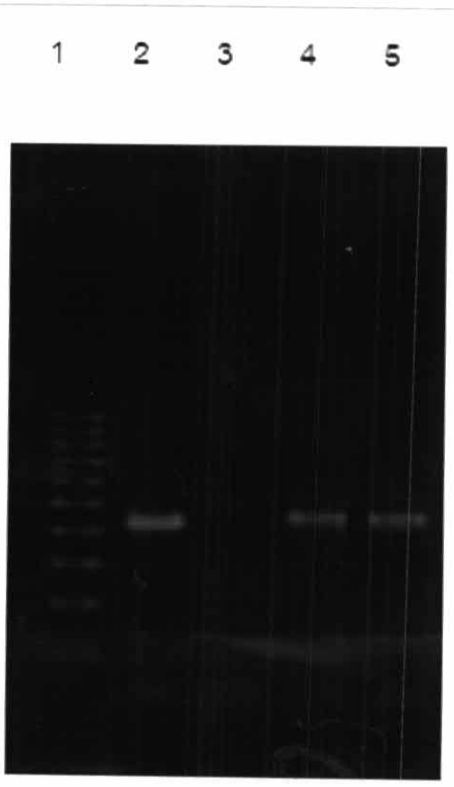


ภาพที่ 15 ต้นกระสังที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

การตรวจสอบสภาวะการถ่ายยีน ดำเนินการโดยเทคนิค PCR ตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับส่วนของยีน *bar*

จากการทดลองเมื่อนำต้นกระสังที่ได้รับการถ่ายยีนต้านทานต่อยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสไปตรวจสอบต่อโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอ การถ่ายยีนและการตรวจสอบ

ภายหลังการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการปรากฏของยีน *bar* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง พบดีเอ็นเอขนาด 400 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดสอดคล้องกับดีเอ็นเอที่ใช้เป็นมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ มีขนาดเท่ากันกับขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ชุดควบคุมบวก โดยที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *bar* จากต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 16 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ดีเอ็นเอของกระสัง
ที่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบเทียบกับขนาดของดีเอ็นชุดควบคุม

เมื่อ 1 = ดีเอ็นเอมาตรฐาน
2 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอ pBIC BAR
3 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากจีโนมดีเอ็นเอกระสังที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
4 – 5 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากจีโนมดีเอ็นเอกระสัง
ที่ได้รับการถ่ายยีน pBIC BAR

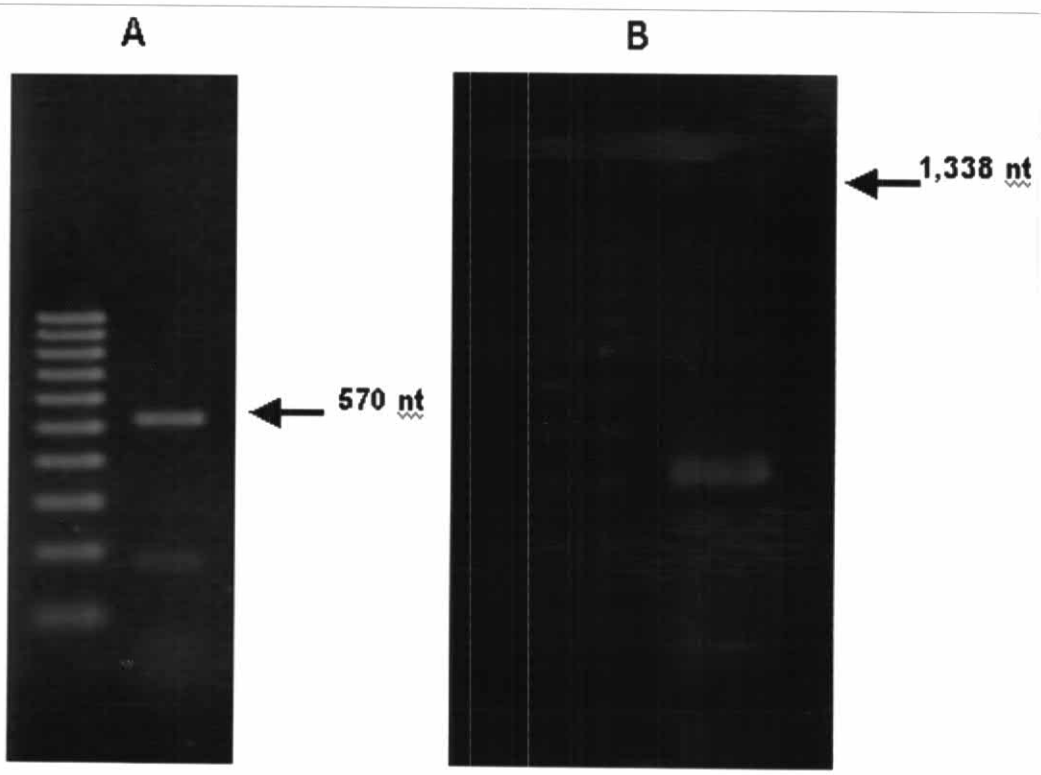
ทำนองเดียวกัน การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในกระสัง โดยวัดจากระดับการสังเคราะห์ mRNA ของยีน *bar* ที่ถ่ายเข้าสู่กระสังพบว่าภายหลังการสกัดอาร์เอ็นเอจากชิ้นเนื้อเยื่อของกระสังที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสที่ผ่านการทำลายดีเอ็นเอแล้วมาตกตะกอนซ้ำ

ด้วย 8 M LiCl (Sambrook *et al.*, 1989) เพื่อทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบซ้ำอีกครั้งด้วยปฏิกิริยา RT-PCR กับไพร์เมอร์เฉพาะต่อยีน *bar* mRNA พบว่าเนื้อเยื่อต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสมีการสังเคราะห์ mRNA เนื่องจากการตรวจพบขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดเท่ากันกับขนาดดีเอ็นเอของชุดควบคุมผลการทดลองบ่งชี้ให้เห็นถึงความสำเร็จในการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชเข้าสู่เนื้อเยื่อกระสังโดยใช้ electrical pulse

4.5 การสังเคราะห์โครงสร้างของชุดของยีน Glucocerebrosidase เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่กระสัง

การทดลองนี้มุ่งเน้นการประยุกต์ การใช้กระสังเป็นโมเดลในการศึกษาการแสดงออกของยีนเป้าหมายซึ่งในที่นี้ได้แก่ยีน GBA เพื่อให้ยีนเกิดการแสดงออก การถ่ายยีน GBAจากมนุษย์จำเป็นต้องอาศัยโครงสร้างยีนที่เหมาะสมผลการทดลองเริ่มจากการ

สกัด RNA รวมจากเลือดโดยใช้ RNA Blood Minikit (Qaigen, Germany) ได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณเหมาะสมโดยวัดได้ 1.7 µg/µl การตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาร์เอ็นเอที่สกัดได้โดยการแยกด้วยสนามไฟฟ้า พบแถบอาร์เอ็นเอที่mRNA ครอบคลุมทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ไพร์เมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน GBA และชุดสังเคราะห์ cDNA Super Scrip II Kit (Invitrogen Corporation, USA) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ cDNA ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์(Promega, USA)ได้ขนาด 570 นิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอขนาด 570.นิวคลีโอไทล์เป็นชิ้นส่วนทางด้าน 5' ของยีน GBA ขณะที่ดีเอ็นเอขนาด 1338 นิวคลีโอไทล์ เป็นส่วนด้าน 3' ของยีน GBA ซึ่งทั้งสองชิ้นมีบริเวณเชื่อมต่อกันที่ตำแหน่ง 423 ถึง 570 เมื่อมารวมกันจะได้ดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,900 นิวคลีโอไทล์ เมื่อแยกด้วยสนามไฟฟ้าเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานตามลำดับ



ภาพที่ 17 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี RT-PCR เทียบกับดีเอ็นขนาดมาตรฐาน

เมื่อ A = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน GBA ชิ้นหัว
เมื่อ B = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน GBA ชิ้นท้าย

การสังเคราะห์ในขั้นต่อไปเริ่มจากการเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีนเข้าด้วยกันโดยวิธี ligation และ PCR amplification จากการทดลองสามารถเพิ่มชิ้นส่วนของ 35S ซึ่งเป็นบริเวณโปรโมเตอร์ที่ได้จากพลาสมิด *pBIC BAR* ขนาด 300 นิวคลีโอไทด์ แล้วนำมาเชื่อมต่อกับ GBA ส่วนหัว จากนั้นต่อเข้ากับส่วนของชิ้นท้าย แล้วนำไปโคลนเข้า *pBICBAR* คัดเลือกและเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง (LM broth)ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินได้โคโลนีที่ต้านทานมากกว่า 20 โคโลนี คัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดเอ็นเอไปตรวจสอบเพียง 20 โคโลนี โดยแยกโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว(LB broth) ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน แยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี small-scale (Sambrook *et al.*, 1989) ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน GBA และเทคนิค PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้สอดคล้องกับขนาดที่คาดหวัง 1,900 นิวคลีโอไทด์ซึ่งสอดคล้องกับชุดทดลองบวก

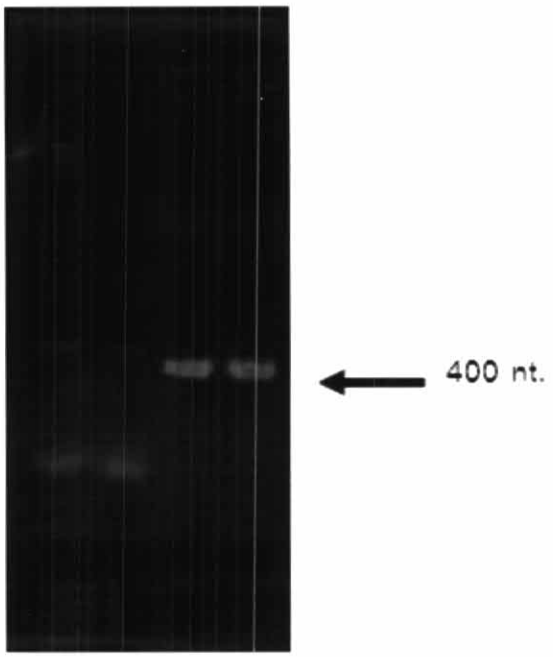
4.6 ถ่ายยีน glucocerebrocidase เข้าสู่เนื้อเยื่อกระสัง

ภายหลังการถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน glucocerebrocidase เข้าสู่เนื้อเยื่อกระสัง โดยใช้เงื่อนไขในการถ่ายยีนในการทดลอง ดังนี้ ใช้การละลาย PEG 1% และ$CaCl_2$ 1mM ร่วมกับไฟฟ้ากระแสตรง 50 โวลล์ เป็นเวลา 20 วินาที พบว่าจากการทดลอง 100 ชิ้นพบชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้านทานต่อยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสที่ใช้ร่วมในการคัดเลือก 2 ชิ้น ภายหลังการตัดย้ายชิ้นเนื้อเยื่อลงในอาหารที่เติมยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสและเติมสารเร่งการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดต้นเป็นจำนวนมาก ภายหลังจากการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อนาน 2 เดือนจะได้ต้นกระสังที่ต้านทานต่อยาปราบวัชพืชทั้งหมด 3 ต้น

ภาพที่ 18 เนื้อเยื่อแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน glucocerebrocidase

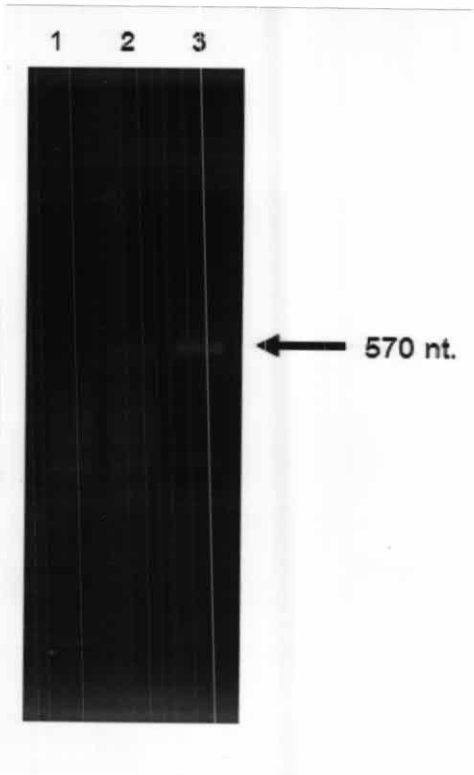
ภาพที่ 19 ต้นกระสังได้รับการถ่ายยีน glucocerebrocidase

การตรวจสอบเชิงลึกโดยใช้เทคนิคอนูซีววิทยาพบว่า ต้นกระสังที่ต้านทานต่อยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี CTAB แล้วนำมาตรวจสอบโดยเทคนิค PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน glucocerebrocidase ได้



ภาพที่ 20 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้กระสังที่ได้รับการถ่ายยีน glucocerebrocidase เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเทียบกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *bar* ที่มีขนาด 400 nt.

จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนซ้ำอีกครั้ง โดยใช้เทคนิค RT-PCR ดำเนินการในลักษณะเดียวกับที่รายงานในขั้นตอนการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *bar* โดยพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน GBA เดียวกัน ให้แถบดีเอ็นที่มีขนาดเท่ากัน



ภาพที่ 21 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน glucocerebrocidase โดยใช้เทคนิค RT-PCR

เมื่อ 1 = RT-PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากกระสังที่ได้รับการถ่ายยีน ต้นที่ 1

2 = RT-PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากกระสังที่ได้รับการถ่ายยีน ต้นที่ 2

3 = RT-PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจาก pBICBARGBA