บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและถ่ายยีน

3.1.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและถ่ายยีน

ตู้ปลอดเชื้อ

ขวดแก้วที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 4 ออนซ์

ตะเกียงแอลกอฮอล์

มีด และใบมีดผ่าตัด

ขวดรูปชมพู่

บีกเกอร์

ปากคีบ

ผ้าสะอาด

จานเลี้ยงเชื้อ

กล้องถ่ายรูป

สำลี

กระดาษซับ

หม้อนึ่งความดัน

ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กระบอกตวง

เครื่องชั่งสารเคมี

พีเอช มิเตอร์

ทิปขนาด 10 100 และ1000 ไมโครลิตร

หลอดสกรูแคป 50 มิลลิลิตร

CU Pulser (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ , 2550)

3.1.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและถ่ายยีน

อาหารสูตร MS (Murashike and Skoog, 1962)(ภาคผนวก)

ผงวุ้น(agar)

กลูโคส

โซเดียมไฮดรอกไซด์(1N NaOH)

ไฮโดรคลอริก (1N HCl)

ฮอร์โมนแนพทาลีนอซิติกแอซิด (NAA)

ฮอร์โมนไคเนติน

แอลกอฮอล์ 95% และ 70%

เมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.25%

น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

โพลีเอทธิลีนไกลคอล (MW 6,000)

แคลเซียมคลอไรด์

3.1.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์โครงสร้างของยีน

3.1.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โครงสร้างของยีน

เครื่องปั่นตกตะกอน (MIKRO 12-24 Hettich Zentrifugen, Germany)

เครื่องเจลแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า (Mupid Advance Co., LTD, Japan)

เครื่องส่องดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต UV (Ultra Lum Electronic Dual Light™ Transilluminator, USA)

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (พีซีอาร์) (BIO RAD Gene Cycler™, USA)

เครื่องชั่งไฟฟ้า (Libror EL-120HA(Shimadzu, Japan)

ตู้เขี่ยเชื้อ (Augusta Safty Cabinet (Lio Lab Co,.Ltd, Thailand)

ไมโครเวฟ

เครื่องควบคุมอุณหภูมิ -20

หลอดไมโครเซนตริฟิว

ทิปขนาด 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร

ไมโครปิเปต

3.1.2.2 **สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์โครงสร้างของยีน**

แอลกอฮอล์ 95 % (Merck, Germany)

อะกาโรส (Promega, USA)

แอมโมเนียมอะซีเตต (Sigma Co., USA)

โบรโมฟีนอลบลู (Phamacia, USA)

ไดโซเดียม เอทิลีนไดอะไมน์ เตตราซิติก เอซิด : EDTA(Merck, Germany)

เอทิเดียมโบรไมด์ (Gibco BRL)

กรดไฮโดรคลอริก (Merck, Germany)

ฟีนอล (Sigma Co., USA)

คลอโรฟอร์ม (Merck, Germany)

ไอโสเอมิล แอลกอฮอลล์ (Merck, Germany)

โซเดียมคลอไรด์ (Merck, Germany)

โซเดียม โดเดซิลซิลซัลเฟต (Merck, Germany)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, Germany, Germany)

100 bp ดีเอ็นเอแลดเดอร์ (New England Biolabs, USA)

ยาปฏิชีวนะ แอมปิซิลินและกานามัยซิน(Sigma, USA)

เอนไซม์

- *Eco*RI (New England BioLabs, USA)
- RNaseA (Sigma, USA)
- *Stu*I (New England Biolabs, USA)
- T4 DNA ligase(Promega, USA)
- *Taq* DNA polymerase(Promega, USA)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 เนื้อเยื่อกระสังและการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นวัสดุวิจัย

เมล็ดพันธุ์กระสังที่ใช้ในการทดลองได้ตัวอย่างเมล็ดจากเรือนเพาะชำ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เริ่มจากการนำเมล็ดที่เก็บไว้มาฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์เข้มข้น 0.25 % เป็นเวลา 1-5 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง และนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ ลงปลูกในขวดสำลีประกอบไปด้วยซุบน้ำสะอาดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพาะเมล็ดในสภาวะดังกล่าว ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อเมล็ดงอกจึงย้ายลงในอาหารแข็งสูตรพื้นฐาน MS (Murashike and Skoog, 1962) เพื่อให้เจริญเป็นต้นสำหรับใช้เป็นแหล่งวัสดุวิจัยในรูปใบที่ปลอดเชื้อต่อไป

3.2.1.1 การศึกษาการชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นแคลลัสและพัฒนาแคลลัสเป็นต้น

การชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นแคลลัส ทำโดยนำใบกระสังปลอดเชื้อที่ได้จากขั้นตอนแรกตัดให้มีขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช แนพทาลีนอซิติกแอซิด (napthalene acetic acid : NAA) ตามความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 0 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารเร่งการเจริญเติบโตไคเนติน(kinetin) ความเข้มข้นต่างกันได้แก่ 0 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยออกแบบการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองชุดการทดลองละ 10 ซ้ำ บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลง การวัดการเจริญเติบโตจากขนาดของชิ้นเนื้อเยื่อที่เปลี่ยนไป เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความเข้มของแสง 3000 ลักษ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ คัดเลือกองค์ประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ให้แคลลัสที่ดีที่สุด มาใช้เพิ่มปริมาณแคลลัสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาการชักนำให้เกิดการพัฒนาจากแคลลัสเป็นต้น เริ่มจากการนำแคลลัสที่ชักนำได้ในขั้นตอนที่ผ่านมาขนาด 0.3 x 0.3 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช NAA ระดับความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 0 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช kinetin ความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับได้แก่ 0 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองเช่นเดียวกันกับการศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส บันทึกผลจำนวนยอดที่ชักนำได้ ความสูงของแต่ละยอด โดยบันทึกผลทุกสัปดาห์ จากสัปดาห์ที่ 4-สัปดาห์ที่ 6

3.2.1.2 ผลของยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส(Bialaphos ; Basta TX®) ต่อชิ้นเนื้อเยื่อกระสังและขนาดความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีชี้วัดความสามารถในการต้านทาน

นำเนื้อเยื่อส่วนของยอดอ่อนของกระสัง ที่ได้จากขั้นตอนแรก มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารละลายยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส ความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับได้แก่ 0 20 40 60 80 และ 100 ppm โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองชุดทดลองละ 10 ซ้ำแต่ละซ้ำมีจำนวนเนื้อเยื่อ 3 ยอด บันทึกผลการเจริญเติบโต อัตราการรอดที่ 50 % เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 27 เซลเซียส ด้วยสภาวะเดียวกันกับการทดลองเบื้องต้น

3.2.2 ศึกษาระบบในการถ่ายยีน โดยใช้ยีน *BAR* เป็นต้นแบบ

เพิ่มปริมาณพลาสมิด pBIC BAR โดยถ่ายพลาสมิด *pBIC BAR* เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธีทางเคมีร่วมกับการทำ heat shock (Sambrook *et al.*, 1989) จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียชนิดเหลว (LB broth) เพื่อเพิ่มปริมาณ สกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์ middle scale plasmid preparation (Sambrook *et al.*, 1989) ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้าและการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำเพาะด้วยเทคนิคพีซีอาร์

พลาสมิด pBIC BAR ที่ได้นำมาศึกษาการถ่ายยีนเข้าในแคลลัสกระสัง โดยการนำแคลลัสมาผ่านสนามไฟฟ้าที่สร้างขึ้น โดยเครื่องกำเนิดสนามไฟฟ้า CU pulser (electrical pulse) ร่วมกับสารละลายโพลีเอทธลีนไกลคอล 6000 และแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 1 mM (ภาคผนวก) โดยใช้กระแสไฟฟ้ากระแสตรงที่ 50 โวลล์ แปรผันระยะเวลาเป็น 3 ระดับได้แก่ 20 40 และ 60 วินาทีอย่างใดอย่างหนึ่งตามลำดับและเปรียบเทียบความเข้มข้นของโพลีเอธิลีนไกลคอล 3 ระดับได้แก่ 1% 5% และ10% วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองชุดการทดลองละ 10 ซ้ำมีเนื้อเยื่อซ้ำละ 3 ชิ้นโดยทำการคัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส โดยการย้ายชิ้นเนื้อเยื่อที่ถ่ายยีนแล้วลงในอาหารสูตรพื้นฐานMSที่เติมยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสที่ได้เลือกความเข้มข้นไว้ เน้นคัดเลือกชิ้นของแคลลัสที่มีสีเขียว ย้ายแคลลัสที่ต้านทานลงในอาหารแข็งสูตรพื้นฐานMS ที่มีสารชักนำการเจริญเติบโตของพืชที่ช่วยชักนำให้เกิดต้นและยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสความเข้มข้นที่ได้เลือกไว้

3.2.3 การตรวจสอบสภาวะการถ่ายยีนโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

นำชิ้นส่วนแคลลัสของต้นกระสังที่ต้านทานยาปราบวัชพืชที่ได้ 100 มิลลิกรัม มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Murray and Thomson, 1980) ละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ในสารละลาย TE ที่มี Rnase ละลายอยู่ 30 µl นำดีเอ็นเอที่ได้ตรวจสอบการปรากฏของ *bar* ยีน โดยใช้คู่ไพรเมอร์

ที่จำเพาะต่อโครงสร้าง bar ยีน โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที จำนวน 40 รอบ นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ตรวจภายใต้สนามไฟฟ้า เพื่อตรวจสอบกับขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากชุดควบคุม

นำต้นกระสังที่ได้รับยีน pBIC BAR ไปสกัด แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิค พีซีอาร์ (Promega, USA) โดยใช้ คู่ primer pBIC BAR ที่ออกแบบไว้

การตรวจสอบอัตราการแสดงออกของ bar ยีน เริ่มจากการสกัดอาร์เอ็นเอ จากเนื้อเยื่อที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส 100 มิลลิกรัม โดยการใช้สารลาย Trizol™(Invitrogen, USA) ควบคู่กับการใช้สารเคมี อาร์เอ็นเอที่ได้มาละลายในสารละลาย 30 µl TE ที่มี Rnase และ Dnase 5 u. ละลายอยู่ นำอาร์เอ็นเอมาตกตะกอนซ้ำในสารละลาย 8 M. LiCl ตามวิธีที่ได้รายงานไว้ (Sambrook *et al.*, 1989) ตรวจสอบอาร์เอ็นเอ โดยปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับส่วนของ bar ยีน

3.2.4 โครงสร้างยีน GBA ที่ใช้ในการถ่ายยีน

ออกแบบและสังเคราะห์ primer บนพื้นฐานของข้อมูลของยีน Glucocerebrosidase (NM_000157) (ภาคผนวก) ที่ปรากฏในฐานข้อมูล DNA databank (Gen Bank) (Benson *et al.*, 2004) ครอบคลุมทั้งชิ้นส่วนของยีนตั้งแต่บริเวณที่เป็นรหัสเริ่มต้นจนถึงบริเวณรหัสหยุดโดยมีรายละเอียดของไพรเมอร์ดังตาราง

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน glucocerebrocidase (*GBA*)

Fragment	Primer	Fragment size (nt)
5' portion GBA	Forward: 5'- atg gag ttt tca agt cct tcc aga-3' Reverse: 5'-ccc gaa ttc tgc gga tgg aga agt cac-3'	570
3' portion GBA	Forward: 5'-atg ggg ccc atc cag gct aat cac -3' Reverse: 5'-ccc gaa ttc tca ctg gcg acg cca cag -3'	1338

นำไพรเมอร์ที่ได้ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA เริ่มจากการ สกัด RNA จากเลือดโดยใช้ RNA Blood Minikit (Qaigen, Germany)จากนั้นสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse

transcription โดยใช้ Super Scrip II Kit (Invitrogen, USA) และทำปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 60 นาที อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค พีซีอาร์ (Promega, USA)โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ข้างต้นและทำปฏิกิริยาดังนี้ที่ อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 40 รอบ แล้วทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยสนามไฟฟ้า

ต่อชิ้นส่วนหัวเข้าด้วยกันด้วยปฏิกิริยา ligation PCR amplification (Kuribara *et al.*, 2002) จนได้ชิ้นดีเอ็นเอตลอดทั้งยีน เชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน glucocerebrocidase เข้ากับ pBICBAR จากนั้น ถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้เข้าสู่ competent cell สายพันธุ์ DH5α (Sambrook *et al.*, 1989) คัดเลือกและเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง (LM broth)(ภาคผนวก)ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน เพื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอไปตรวจสอบ โดยการนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว(LB broth) ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน แล้วสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี small-scale (Sambrook *et al.*, 1989) ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้โดยการแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า พลาสมิดที่ได้นำไปใช้สำหรับศึกษาระบบการถ่ายยีน

3.2.5 ถ่ายยีน glucocerebrocidase เข้าสู่เนื้อเยื่อกระสัง

ถ่ายยีน glucocerebrocidase เข้าสู่เนื้อเยื่อกระสัง โดยใช้กระแสไฟฟ้าและสารละลาย pulsing solution ที่ใช้ในการถ่ายยีนที่เหมาะสมจากการทดลองข้างต้น ย้ายแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนลงในอาหารที่สูตรพื้นฐานที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและเติมยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการคัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน จากนั้น 2 สัปดาห์ ย้ายชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้านทานยาปราบวัชพืชลงในอาหารพื้นฐานสูตรMS ที่เติมฮอร์โมนชักนำให้เกิดต้น จากนั้นนำส่วนของต้นที่คาดว่าจะได้รับยีน glucocerebrocidase มาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB (Murray and Thomsons, 1980) นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ glucocerebrocidase ต่อยีน และตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยเทคนิค RT-PCR ด้วยไพรเมอร์เดียวกัน นำผลิตภัณฑ์ cDNA ที่ได้ ไปตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน ด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ ตามวิธีที่รายงานใน Chaumpluk *et al.*, 2006 โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน glucocerebrocidase เพื่อยืนยันผล