บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 วัสดุอุปกรณ์ครุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 ครุภัณฑ์

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ	Model 25	ISSCO., Thailand
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์	Autoclave model HA-3D	Hirayama Manufacturing Corporation., Japan
เครื่องอบไมโครเวฟ	MC - 300 TE	NEC
ตู้อบ	-	Memmert., Germany
เครื่องเหวี่ยง	KUKUSAN H - 18 Auto series	Biomed group Co. Ltd., Japan
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	PHM 83 autocal pH meter	Radiometer, Copenhagen
เครื่องเขย่า	Vortex - Genic Model K550 GE No. 18309	Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y. 11716, U.S.A.
เครื่องชั่ง	1. ทศนิยม 2 ตำแหน่ง	Sartorius., Germany
	2. ทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Sartorius., Germany

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
กล้องจุลทรรศน์	1. Nikon UFX - II Type 104 , 115 พร้อมกล้องถ่ายภาพ Nikon FX - 35A	Nikon., Japan
	2. Nikon SMZ - 10	Nikon., Japan
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	JSM - T20	Balzers
เครื่องทำให้ตัวอย่างแห้ง	CPD 020	Balzers
เครื่องฉาบผิวตัวอย่าง	SCD 040	Balzers

2.1.2 <u>เมล็ดพันธุ์ฝ้ายที่ใช้ในการทดลอง</u>

เมล็ดพันธุ์ฝ้ายที่เจริญเต็มที่ ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก คุณชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา กรมวิชาการเกษตร ซึ่งมี 2 พันธุ์ คือ ศรีสำโรง 2 (<u>Gossypium hirsutum</u> L.) และ ฝ้ายน้อย (<u>G. arboreum</u> L.) (ลักษณะเมล็ดพันธุ์ฝ้าย ดังรูปในภาคผนวกที่ 2)

2.1.3 <u>สารเคมี</u>

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
<u>สารควบคุมการเจริญเติบโต</u> (growth regulator)	
NAA (1- napthalene acetic acid)	Fluka., Switzerland
2,4-D (2,4- dichlorophenoxy acetic acid)	Fluka., Switzerland

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
kinetin	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
zeatin	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
BA (Benzyladenine)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
<u>สารเคมีที่ใช้แยกเซลล์ไร้ผนัง</u>	
เซลลูเลส (cellulase) "onozuka" R-10	Yakult Honsha., Japan
มาเซโรไซม์ (macerozyme) "onozuka" R-10	Yakult Honsha., Japan
<u>สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย</u>	
<u>กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด</u>	
กลูตารัลดีไฮด์ 50% (glutaraldehyde 50% solution)	Fluka., Switzerland
เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)	BDH., England
โมโนโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (monosodiumhydrogen phosphate)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodiumhydrogen phosphate)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
<u>สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ</u> (surface sterilant)	
คลอรอกซ์ (สารที่มี NaOCl 5.25 % เป็นองค์ประกอบ)	ลีเวอร์บราเธอร์ (ประเทศไทย)
สารจับใบ (Tween 20)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
<u>สารที่ใช้ตรวจการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสง</u>	
ไนโตร-บลู เตตราโซเลียม(nitro-blue tetrazolium)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
แมนนิทอล (mannitol)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
<u>สารเคมีในการย้อมเซลล์พืช</u> (staining reagent)	
ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท (fluorescein diacetate)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
คอลโคฟลูออร์ไวท์ (calcofluor white)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
พาราโรซานิลีน (pararosaniline)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (potassium metabisulfite)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
อะซีโตออซีน (acetoorcein)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
8-ไฮดรอกซีควิโนลิน (8- hydroxyquinoline)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.

สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ เป็นสารเคมีอยู่ในระดับเกรดวิเคราะห์ (analytical reagent) สั่งซื้อจากบริษัท Sigma Chemicals Co., U.S.A. ทั้งสิ้น

2.2 <u>อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ</u>

2.2.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้สูตรอาหาร MS (MS salt) ของ Murashige and Skoog (1962) และเสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ของ Gamborg <u>et al</u>. (1986) (ภาคผนวกที่ 3)

2.2.2 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง ใช้อาหารสูตร 1/2 MS (MS salt) เสริมด้วยวิตามินตามสูตร UM ของ Uchimiya and Murashige (1974) (ภาคผนวกที่ 3) และใช้ แมนนิทอล 7 เปอร์เซ็นต์, กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารปรับแรงดันออสโมซิสและแหล่งต้นตอคาร์บอน พร้อมกับเสริมด้วยกลูตามีน 1 มิลลิโมลาร์, NH_4NO_3 5 มิลลิโมลาร์, $CaCl_2$ 3 มิลลิโมลาร์, H_3BO_3 50 ไมโครโมลาร์และ $ZnSO_4$ 30 ไมโครโมลาร์

2.3 สภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องที่ประกอบด้วยชั้นสำหรับวางเนื้อเยื่อเลี้ยงในที่มืดและที่สว่าง โดยมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25±2 °ซ. ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

2.4 การเพาะปลูกต้นฝ้าย

2.4.1 การเพาะปลูกต้นฝ้ายเพื่อขยายพันธุ์

นำเมล็ดฝ้ายที่ได้รับมาจากกรมวิชาการเกษตร ซึ่งมีขนปุยสีขาวติดอยู่กับเมล็ดฝ้ายออก โดยใช้กรดซัลฟุริกเข้มข้น หยดลงบนเมล็ดฝ้ายทีละหยด พร้อมกับคนเมล็ดฝ้ายให้ทั่ว จนกระทั่งขนปุยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหมด จากนั้นเติมน้ำกรอง (filtered water)ลงไปพร้อมกับใส่โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์พอประมาณ เพื่อลดสภาวะความเป็นกรดลง ล้างออกด้วยน้ำกรองหลาย ๆ ครั้ง นำเมล็ดฝ้ายที่ขจัดขนปุยแล้วออกผึ่งแดดให้แห้ง

ใช้เมล็ดฝ้ายที่เตรียมได้ไปปลูกลงกระถางใช้ดินร่วนซุย ตั้งกระถางให้ได้รับแสงแดดจัด ในเรือนปลูกต้นไม้ รดน้ำให้ความชื้นทุกเช้าเย็น

2.4.2 การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนฝ้ายปลอดเชื้อ

ใช้เมล็ดฝ้ายที่ผ่านการนำขนปุยออกแล้ว(ข้อ 2.4.1) ไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่มีทวีน 20 (Tween 20) ปริมาณ 1-2 หยด เป็นเวลา 20 นาที ล้างเมล็ดให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง นำไปเพาะลงในวุ้น (agar) ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ และนำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 อาหารแข็งสำหรับเพาะเลี้ยงแคลลัส

เตรียมอาหารสูตร MS และวิตามินตามสูตร B5 เสริมด้วย NAA 2, 4 มก./ล. kinetin 1 มก./ล. และ 2,4-D 0.1 มก./ล. kinetin 0.1 มก./ล. น้ำตาลกลูโคส 30 มก./ล. ปรับ pH 5.7 เติมผงวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ นำไปต้มจนวุ้นละลายทั่วกัน เทใส่ขวดสำหรับเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.6 อาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

ทำการเตรียมอาหารตามวิธีข้อ 2.5 แต่ไม่ใส่วุ้นเทใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

2.7 การเตรียมสารละลายเอนไซม์สำหรับแยกเซลล์ไร้ผนัง

ชั่งเอนไซม์เซลลูเลสและมาเซโรไซม์ อัตราส่วนที่เหมาะสม ละลายเอนไซม์ลงในสารละลายล้างเซลล์ไร้ผนัง (washing solution) (ภาคผนวกที่ 4) ทำการวัดค่าความเป็นกรด - ด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช ปรับให้ได้ pH 5.6 ด้วยกรดเกลือ (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน millipore filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

2.8 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังเช่นเดียวกับอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่วไป เพียงแต่องค์ประกอบและสารบางอย่างต่างกันไปบ้าง สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังนี้ (ภาคผนวกที่ 3) ใช้ทั้งอาหารเหลวและอาหารแข็งจิงเตรียมอาหารเหลวให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า เมื่อจะเลี้ยงในอาหารเหลวก็นำสารละลายอาหารมาผสมกับน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และเมื่อจะทำเป็นอาหารแข็งก็นำสารละลายอาหารมาผสมกับวุ้นที่เตรียมไว้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการในการทดลองต้องการวุ้นเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์

2.9 การเตรียมเนื้อเยื่อพืชสำหรับเพาะเลี้ยง

นำต้นอ่อนฝ้ายที่เพาะได้ (ข้อ 2.4.2) อายุ 7 วัน ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อมาตัดส่วนใบเลี้ยง (cotyledon) ให้มีขนาด 4x4 มิลลิเมตร ส่วนไฮโปคอทิลตัดให้ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร บนจานเพาะเชื้อ (petri dish) โดยใช้มีดผ่าตัดปลอดเชื้อ จากนั้น ใช้ปากคีบชุบแอลกอฮอล์ลนไฟปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจับชิ้นส่วนพืชที่ต้องการไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (ภาคผนวกที่ 3) ที่บรรจุอยู่ในขวดปิดฝา นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.10 วิธีการชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction)

ในการชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เกิดจากส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิล นำเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้ตามวิธีข้อ 2.9 วางบนอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 ทำการแปรผันชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งในกลุ่มออกซิน (NAA, 2,4-D) และกลุ่มไซโตไคนิน

(kinetin, zeatin) ไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ติดตามสังเกตการเกิดแคลลัสตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยงจนครบ 4 สัปดาห์ คำนวณศักยภาพของการเกิดแคลลัสโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมด}} \times 100$$

พร้อมทั้งถ่ายภาพลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น ประกอบการศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญของแคลลัสที่ได้จากฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อยในแต่ละสภาวะ การเพาะเลี้ยงแคลลัสแบบต่อเนื่องทำได้ โดยตัดแบ่งแคลลัสออกจากชิ้นแคลลัสเดิมให้มีขนาดประมาณ 4x4 มิลลิเมตร และทำการถ่ายแคลลัสไปสู่อาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์

2.11 วิธีการจำแนกชนิดของแคลลัส

ทำการคัดเลือกชนิดของแคลลัสที่เกิดขึ้น เพื่อนำไปชักนำให้เกิดต้นโดยการนำแคลลัสที่เกิดขึ้น (จากข้อ 2.10) มากระจายเซลล์ออก โดยใช้แท่งแก้วปลายมนกดลงบนแคลลัสให้เซลล์ที่กระจายอยู่ในอาหารเหลว ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์ขึ้นมา 1 หยด ใส่บนสไลด์ นำไปตรวจดูลักษณะเซลล์และองค์ประกอบภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสามัญ (light microscope) ของบริษัท Nikon รุ่น UFX II กำลังขยาย 10, 20, 40 เท่า

2.12 การเพาะเลี้ยงเซลล์ฝ้ายในอาหารเหลว

นำแคลลัสทั้งที่เกิดจากส่วนใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลของฝ้ายทั้งสองชนิด (species) ที่เกิดจากการเจริญบนอาหารที่เหมาะสมใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ที่มี

อาหารสูตร MS (ข้อ 2.6) โดยใช้แคลลัสหนักประมาณ 4 กรัม ต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ความถี่ 110-120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้น นำเซลล์มากรองผ่านแผ่นไนลอนขนาดความกว้างของรู 80 ไมโครเมตร เพื่อขจัดเซลล์ขนาดใหญ่ออกไป เก็บเซลล์ที่กรองได้แบ่งใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ความถี่ 110-120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 °ซ. ให้แสงสว่าง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

2.13 <u>การติดตามการเจริญของเซลล์</u>

2.13.1 <u>การติดตามการเจริญของแคลลัส</u>

<u>การหาน้ำหนักสด</u> ติดตามการเจริญของแคลลัส โดยสุ่มตัวอย่าง 10 ขวด ชั่งน้ำหนักแคลลัสสดด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ติดตามการเพิ่มของน้ำหนักทุกสัปดาห์

<u>การหาน้ำหนักแห้ง</u> แคลลัสที่ชั่งหาน้ำหนักสดแล้วนำไปอบในตู้อบแห้ง อุณหภูมิ 60 °ซ. จนน้ำหนักแคลลัสคงที่ ติดตามการเจริญทุกสัปดาห์

2.13.2 <u>การติดตามการเจริญของเซลล์ในอาหารเหลว</u>

ดูดเซลล์แขวนลอย (ข้อ 2.12) 10 มิลลิลิตร (3 ซ้ำ) ด้วยปิเปตปลายตัด นำเซลล์ไปกรองผ่านกระดาษของ (whatman เบอร์ 1) ที่ทราบน้ำหนักโดยวิธี suction นำเซลล์บนกระดาษกรองไปอบในตู้อบจนน้ำหนักคงที่

2.14 การชักนำให้เกิดต้น (plant regeneration)

2.14.1 การชักนำให้เกิดต้นผ่านทางออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis)

ย้ายแคลลัสที่เจริญบนอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตรของ B5 เสริมด้วย NAA 2,4 มก./ล., kinetin 1 มก./ล. และ 2,4-D 0.1 มก./ล., kinetin 0.1 มก./ล. ลงบนอาหารสูตรเดิม แต่เปลี่ยนแปลงแหล่งต้นตอคาร์บอนจากเดิมใช้กลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์เปลี่ยนเป็นน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซนต์ โดยทำการทดลองชุดควบคุมที่ใช้น้ำตาลกลูโคสควบคู่ไปด้วยกัน หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ย้ายแคลลัสลงในอาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS (ไม่มี NH_4NO_3 แต่เพิ่ม KNO_3 เป็น 2 เท่า) เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 เติมกลูตามีน 15 มิลลิโมลาร์ แปรผันความเข้มข้นของ kinetin ในระดับ 0, 0.1, 0.5, 1 มก./ล. และเคซีนไฮโดรไลเซตระดับ 0, 50, 100, 150, 200, 250 มก./ล. เพาะเลี้ยงแคลลัสในสภาวะมาตรฐาน ติดตามการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสทุกสัปดาห์

2.14.2 การชักนำให้เกิดต้นผ่านทางเอมบริโอเจเนซิส (embryogenesis)

หลังจากทำการย้ายแคลลัสไปสู่อาหารที่เปลี่ยนแหล่งต้นตอคาร์บอนจากกลูโคสเป็นซูโครสแล้ว 4 สัปดาห์ นำส่วนหนึ่งของแคลลัสมาบดให้มีขนาดเล็กลงด้วยแท่งแก้วปลายมน ย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเฉพาะ 2,4-D 0.1 มก./ล. หลังจากนั้น อีก 4-6 สัปดาห์ย้ายลงอาหารเดิมแต่เปลี่ยนปริมาณความเข้มข้นของ 2,4-D ให้เพิ่มขึ้น โดยการแปรปริมาณระดับ 0.1, 0.25, 0.5 และ 5 มก./ล. ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 1 สัปดาห์ จากนั้น ย้ายแคลลัสที่อยู่ในอาหารเหลวไปสู่อาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS

(ไม่มี NH_4NO_3 เพิ่ม KNO_3 เป็น 2 เท่า) เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 เติมกลูตามีน 15 มิลลิโมลาร์ แปรผันความเข้มข้นของ kinetin ในระดับ 0, 0.1, 0.5, 1 มก./ล. และเคซีนไฮโดรไลเซตระดับ 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 มก./ล. นำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 25±2 °ซ. ใช้ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ติดตามการเปลี่ยนแปลงทุกสัปดาห์

2.15 <u>ระยะการแบ่งเซลล์และจำนวนโครโมโซมในเซลล์รากฝ้าย</u>

นำเซลล์รากของฝ้ายทั้งพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย จากต้นอ่อนที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อ และรากที่ได้มาจากการชักนำให้เกิดต้น ผ่านทางออร์แกโนเจเนซิส ตัดส่วนปลายรากที่มีลักษณะขุ่นยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แช่ในสารละลาย 8 - hydroxyphenolene นาน 16-20 ชั่วโมง เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการตรึงลักษณะของโครโมโซมด้วยกรดอะซิติก - เอทธานอล (1:3) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นำรากมาล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่น ย้อมสีโดยแช่รากในกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัลอุ่นให้ร้อนโดยลนด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ ประมาณ 8-12 นาที ย้ายรากออกจากกรดไฮโดรคลอริกใส่ลงใน Schiff's reagent เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้ายชิ้นส่วนรากไปใส่ในน้ำกลั่น เซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสจะติดสีแดงเข้ม ตัดเฉพาะส่วนสีแดงเข้มวางลงบนสไลด์ หยดสีอะซีโตออร์ซีน 1 หยด ปิดด้วย cover slip ทับตรงบริเวณที่มีสี ค่อย ๆ ใช้ปลายดินสอเรียบ ๆ เคาะเนื้อเยื่อให้เซลล์กระจายออก ทำการตรวจดูระยะการแบ่งเซลล์และนับจำนวนโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้กำลังขยาย 100 เท่า (การเตรียมสีย้อมดูจากภาคผนวกที่ 5)

2.16 การเตรียมเนื้อเยื่อฝ้ายที่จะนำมาใช้ในการแยกเซลล์ไร้ผนัง (protoplast)

ส่วนของเซลล์พืชที่นำมาเป็นแหล่งในการแยกเซลล์ไร้ผนัง คือ ใบเลี้ยงของต้นฝ้าย แคลลัสและเซลล์แขวนลอยของเซลล์ฝ้ายเพาะเลี้ยง

ทำการเพาะเมล็ดฝ้ายพันธุ์ศรีสำโรง 2 และฝ้ายน้อย (ข้อ 2.4.2) ใช้ส่วนใบเลี้ยงของฝ้ายที่คลี่ออกเต็มที่อายุ 7 วัน นำมาแยกเซลล์ไร้ผนัง

ทำการชักนำให้เกิดแคลลัส เซลล์แขวนลอยของเซลล์ฝ้ายเพาะเลี้ยง โดยใช้มีดตัดส่วนของใบเลี้ยงให้มีขนาด 4x4 มิลลิเมตร และส่วนไฮโปคอทิลยาว 5 มิลลิเมตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อและนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เสริมด้วยวิตามินตามสูตร B5 และเติม 2,4-D 0.1 มก./ล. kinetin 0.1 มก./ล. จนเกิดแคลลัสขึ้น จากนั้น เตรียมเซลล์แขวนลอย โดยนำแคลลัสประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของอาหารและสารควบคุมการเจริญ-เติบโตชนิดเดียวกันแต่ไม่ใส่วุ้น ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร สภาวะของการเพาะเลี้ยงแคลลัสในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 °ซ. สำหรับเซลล์แขวนลอยก็เช่นเดียวกัน แต่ทำการเขย่าที่ความถี่ 110-120 รอบต่อนาที ทำการเปลี่ยน-อาหารบ่อย ๆ 2 วันต่อครั้ง เซลล์ที่ได้นำไปใช้เป็นแหล่งของเซลล์ไร้ผนัง

2.17 การแยกเซลล์ไร้ผนัง

2.17.1 การแยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยงของต้นฝ้าย

เตรียมสารละลายเอนไซม์ที่มีส่วนผสมของเอนไซม์เซลลูเลสและมาเซโรไซม์ ในสารละลายล้างเซลล์ไร้ผนัง (ภาคผนวกที่ 4)

ตัดใบเลี้ยงมาวางบนจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อนานประมาณ 3 นาที ทำการลอกผิวใบด้านล่าง (lower epidermis)ออก โดยใช้มีดกดก้านใบเลี้ยง แล้วใช้ปากคีบปลายโค้งคีบผิวด้านล่างออกแล้วค่อย ๆ ลอกให้หมด จากนั้น ใช้มีดตัดใบเลี้ยงที่ลอกผิวออกแล้วให้เป็นแถบขนาดเล็ก (2x5 มิลลิเมตร) ใช้ใบเลี้ยงจำนวน 0.3 กรัมน้ำหนักสด

นำใบเลี้ยงที่ตัดเป็นแถบใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ขนาด 15x60 มิลลิเมตร ที่มีสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25±2 °ซ. ให้มีการเขย่า 110-120 รอบต่อนาที หลังจากนั้น นำไปทำให้เซลล์ไร้ผนังบริสุทธิ์

2.17.2 <u>การทำให้เซลล์ไร้ผนังบริสุทธิ์</u>

นำส่วนผสมของใบเลี้ยงและสารละลายเอนไซม์ จากข้อ 2.17.1 เทผ่านผ้ากรอง (nylon net) มีรูขนาด 110 ไมโครเมตร เพื่อขจัดสิ่งสกปรกออกซึ่ง ได้แก่ เซลล์ที่ย่อยไม่หมด และเศษเซลล์ขนาดใหญ่ ของเหลวที่กรองได้ (filtrate) ค่อย ๆ ดูด (ด้วยพลาสเจอร์ปิเปต) ใส่หลอดเซนติฟิวจ์ ขนาด 10 มิลลิลิตรที่มีน้ำตาลซูโครส 21 เปอร์เซ็นต์ 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เซลล์ไร้ผนังจะลอยอยู่ส่วนบน ส่วนที่อยู่ก้นหลอดจะเป็นเศษเซลล์และสิ่งที่ไม่ต้องการ (debris) ใช้พลาสเจอร์ปิเปตค่อย ๆ ดูดส่วนเซลล์ไร้ผนังใส่หลอดเซนติฟิวจ์อันใหม่ เติมสารละลายล้างเซลล์ไร้ผนัง (ภาคผนวกที่ 4) ลงไป 5 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เซลล์ไร้ผนังจะตกอยู่ที่ก้นหลอด ดูดเซลล์ไร้ผนังใส่หลอดใหม่ แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยวิธีการเดียวกันซ้ำ 3 ครั้ง

2.17.3 <u>การแยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนแคลลัสและเซลล์แขวนลอย</u>

ใช้แคลลัสและเซลล์แขวนลอย 0.5 และ 0.3 กรัมน้ำหนักสด

ตามลำดับ นำไปแยกเซลล์ไร้ผนังด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการแยกจากส่วนใบเลี้ยง โดยเพิ่มช่วงเวลาการทำให้เซลล์ไร้ผนังบริสุทธิ์ด้วยการปั่นแยกจาก 5 นาทีเป็น 10 นาที

ในการทดลองจะทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการแยกเซลล์ไร้ผนังจากส่วนใบเลี้ยงของต้นฝ้าย แคลลัสและเซลล์แขวนลอยของเนื้อเยื่อฝ้ายเพาะเลี้ยง

2.18 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง

นำเซลล์ไร้ผนังที่เตรียมได้จากส่วนต่างๆ (ข้อ 2.17) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (ภาคผนวกที่ 3) ที่เตรียมไว้ โดยนำเซลล์ไร้ผนัง $2x10^5$ เซลล์ไร้ผนังต่อมิลลิลิตร ผสมกับอาหารเหลว 2 มิลลิลิตร จะได้เซลล์ไร้ผนังหนาแน่น $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในจานเพาะเชื้อขนาด 15x60 มิลลิเมตร นำไปเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25±2 °ซ. หมุนเขย่าเบา ๆ เพื่อป้องกันการตกตะกอนของเซลล์ไร้ผนัง

หลังจากเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังในอาหารจนเกิดการสร้างผนังเซลล์ (cell wall) นำเซลล์มาเจริญต่อในอาหารเดิมที่เตรียมในสภาพอาหารแข็ง ทำการหลอมอาหารแข็งแล้วเทอาหารที่อุ่น (40-45 °ซ.) ลงไปในจานเพาะเชื้อผสมกับเซลล์ไร้ผนัง ให้ความเข้มข้นของเซลล์ไร้ผนังเป็น $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ค่อย ๆ หมุนจานเพาะเชื้อไปมาให้เซลล์ไร้ผนังกระจายสม่ำเสมอทั่วทั้งจาน ทิ้งให้อาหารแข็งปิดขอบจานเพาะเชื้อด้วยพาราฟิล์ม นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปวางคว่ำในที่ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 °ซ. สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทุกวันหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และถัดมาทุก ๆ สัปดาห์เป็นเวลา 1-2 เดือน

2.19 การตรวจนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังและการย้อมเซลล์เพื่อศึกษาการมีชีวิต

2.19.1 การนับจำนวนเซลล์ไร้ผนังด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)

ฮีมาไซโตมิเตอร์เป็นสไลด์มีช่องแบ่งไว้แน่นอน และมีขอบยกสูงจากบริเวณขีด เมื่อจะทำการตรวจนับเซลล์ไร้ผนังที่เตรียมอยู่ในสารละลายล้างเซลล์ไร้ผนัง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำได้โดยปิดทับช่องสี่เหลี่ยมซึ่งมีช่องแบ่งด้วยกระจกปิดสไลด์ ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดสารแขวนลอยเซลล์ไร้ผนังแล้วแตะปลายปิเปตด้านแหลมที่มีช่องระหว่างสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ให้ตัวอย่างซึมเข้าไปในบริเวณช่อง ตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า จากนั้น คำนวณปริมาณเซลล์ไร้ผนังต่อไป (ดูภาคผนวกที่ 6)

2.19.2 การย้อมเซลล์ไร้ผนังที่มีชีวิต

เตรียมสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท โดยละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท 5 มิลลิกรัมในอะซีโตน 1 มิลลิลิตร แล้วเก็บในตู้เย็นที่ 20 °ซ. เวลาใช้ทำให้เจือจางโดยปิเปตสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซเตท 20 ไมโครลิตร แล้วทำให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น สารละลายนี้เตรียมแล้วใช้ทันที การย้อมเซลล์ทำโดยหยดเซลล์ไร้ผนังที่ทำให้บริสุทธิ์อยู่ในสารละลายล้างเซลล์ไร้ผนังปริมาตร 1 มิลลิลิตร 1 หยด แล้วจิ้งหยดสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตทที่เจือจางแล้ว 1 หยด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เซลล์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ คำนวณหาจำนวนเซลล์ไร้ผนังที่มีชีวิตจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์ไร้ผนังที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ไร้ผนังที่เรืองแสง}}{\text{จำนวนเซลล์ไร้ผนังทั้งหมด}} \times 100$$

2.19.3 การตรวจนับเซลล์ไร้ผนังที่สามารถสังเคราะห์แสง

นำไนโตร-บูล เตตราโซเลียม 0.001 กรัม ละลายในสารละลายที่ประกอบด้วยแมนนิทอล 0.7โมลาร์ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 10 มิลลิโมลาร์ และ Hepes 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.6 1 มิลลิลิตร (0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) การย้อมเซลล์ไร้ผนังที่เตรียมได้ในสารละลายล้างเซลล์ไร้ผนัง 1 มิลลิลิตร โดยการดูดเซลล์ไร้ผนัง (ความหนาแน่นประมาณ 10^5) มา 1 หยด ผสมกับสารละลาย-ไนโตรบลู เตตราโซเลียม 1 หยด ตั้งทิ้งไว้ที่ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สามัญ (light microscope) เซลล์ที่มีการสังเคราะห์แสงจะติดสีย้อมเป็นสีม่วงน้ำตาล ส่วนเซลล์ที่ไม่มีการสังเคราะห์แสงจะไม่ติดสีย้อม คำนวณหาจำนวนเซลล์ที่มีความสามารถสังเคราะห์ได้จากการติดสีย้อม จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์ไร้ผนังที่สังเคราะห์แสงได้} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ไร้ผนังที่ติดสีย้อม}}{\text{จำนวนเซลล์ไร้ผนังทั้งหมด}} \times 100$$

2.20 การวัดขนาดเซลล์ไร้ผนัง

นำเซลล์ไร้ผนังที่แยกได้อยู่ในสารละลายล้างเซลล์ไร้ผนัง มาหยดลงบนสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ของบริษัท Nikon รุ่น UFX II ทำการวัดโดยใช้ occular micrometer สวมติดกับกล้อง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ไร้ผนังใช้ขนาดกำลังขยาย 10 เท่า

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.21 การย้อมเซลล์ไร้ผนังเพื่อศึกษาการสร้างผนังเซลล์

ดูดสารแขวนลอยที่มีเซลล์ไร้ผนังซึ่งเลี้ยงอยู่ในอาหารเหลว มาตรวจดู

i17159655

การสร้างผนังเซลล์ด้วยการย้อมด้วยคอลโคฟลูออร์ไวท์ (calcofluor white) (เตรียมสีย้อมโดยใช้คอลโคฟลูออร์ไวท์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์) โดยผสมสารแขวนลอยของเซลล์ไร้ผนังกับสารละลายคอลโคฟลูออร์ไวท์ อย่างละ 1 หยด นาน 5 นาที แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เซลล์ที่มีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นเท่านั้นจึงจะเรืองแสงสีฟ้า

2.22 <u>ลักษณะทางอิเลคตรอนไมโครสโคปีของฝ้ายไร้ผนัง</u>

ทำการศึกษาลักษณะของเซลล์ฝ้ายไร้ผนังกับเซลล์ฝ้ายปกติจากส่วนของใบเลี้ยง เพื่อดูความแตกต่างภายนอกของเซลล์ไร้ผนังและเซลล์ฝ้ายปกติด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เตรียมเซลล์ฝ้ายปกติจากส่วนของใบเลี้ยง โดยลอกผิวใบด้านล่างของใบเลี้ยง แล้วตัดใบเลี้ยงให้เป็นแถบเล็ก ๆ (2x5 มิลลิเมตร) นำไปใส่ลงในจานเพาะเชื้อขนาด 15x60 มิลลิเมตร ที่มีส่วนผสมของมาเซโรไซม์ในสารละลายล้างเซลล์ไร้ผนัง เนื่องจากมาซิโรไซม์จะช่วยให้เซลล์ของใบเลี้ยงแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ นำไปเขย่าที่ความถี่ 110-120 รอบต่อนาทีในที่มืดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

การเตรียมเซลล์ไร้ผนังจากส่วนของใบเลี้ยง (ข้อ 2.17)

หลังจากนั้น นำเซลล์ที่เตรียมได้มาดอง (fix) ในกลูตารัลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ 4 °ซ. จากนั้น ล้างกลูตารัลดีไฮด์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (ภาคผนวกที่ 7) แล้วนำมาดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทธานอล 30, 50, 70, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ขั้นตอนละ 10 นาที ตามลำดับ ในระดับเอทธานอล 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ทำ 2 ครั้ง ในขณะที่ทำการเตรียมตัวอย่างนี้ใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

รองรับเซลล์ไร้ผนังและเซลล์ปกติ และไม่ให้ตัวอย่างแห้งเนื่องจากจะทำให้เซลล์ไร้ผนังแตกหรือเซลล์ปกติเปลี่ยนรูปร่างไป โดยดัดแปลงจากวิธีของ เวคิน นพนิตย์(252 จากนั้น ทำให้ตัวอย่างแห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) ด้วยเครื่อง critical point dryer นำตัวอย่างที่แห้งมาติดบนสตับ (stub) ด้วย silver point ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ แล้วฉาบด้วยทองคำ 99 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความหนา 10-20 นาโนเมตร ด้วยเครื่องฉาบทองแบบ sputtering นำตัวอย่างที่ฉาบทองแล้วไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ถ่ายภาพที่ได้ประกอบการศึกษา