

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ ขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ กระจกตวง ปีกเกอร์ ปิเปต
2. มีดผ่าตัด
3. ปากคีบ (forceps)
4. จานเพาะเลี้ยง (Petridish)
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
6. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (microcentrifuge tube)
7. ตะแกรง
8. กระดาษทิชชู
9. กระดาษกรอง
10. กระดาษรองตัด

3.2 เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าแบบละเอียดตศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance)
2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
3. เตาอบไมโครเวฟ (microwave)
4. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow biohazard cabinet)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้ centrifuge (beckman)
6. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator shaker)
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
8. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
9. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิได้ (Inoculator)
10. ตู้อบ (hot air oven)
11. ก๊าซจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

12. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)
13. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
14. ชุดอุปกรณ์อิเล็กโตรโฟรีซิสชนิดแนวนอน (BIO-RAD, USA)
15. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply; BIO-RAD, USA)
16. เครื่องอิเล็กโตรโพลีเมอร์ (electroporator) รุ่น Gene Pulser II System (BIO-RAD, USA)
17. เครื่องส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กล้องถ่ายภาพ
18. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)

3.3 สารเคมี (ภาคผนวก ก)

3.4 พืชทดลอง

1. ยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.)
2. พิทูเนีย (*Petunia hybrida* Vilm.)
3. ข้าวสายพันธุ์คิตาอิเกะ (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica* cv. Kitaake)
4. ข้าวสายพันธุ์บือโปโล (*Oryza sativa* L. ssp. *Indica* cv. Ber Po Lo)

3.5 สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียและพลาสมิด

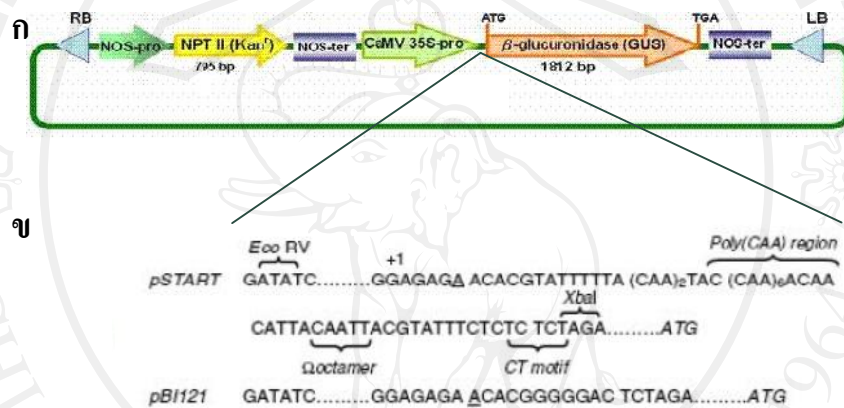
1. อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pSTART, LBA4404 (pSTART)
2. อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pSTART, LBA4404 (pSTART)
3. อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pSTART, EHA105 (pSTART)
4. อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pSTART, EHA105 (pSTART)

3.5.1 ความแตกต่างของสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรีย

1. อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 มีพลาสมิด pAL4404 และผลิตสารออกโทปิน เมื่อมีการนำไปใช้จะตัดบริเวณ T-DNA ซึ่งเป็นบริเวณที่ผลิตสารออกโทปินออกไป (Hoekema *et al.*, 1983) เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการส่งถ่ายยีนทั่วไป ส่วนใหญ่มักใช้ส่งถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงคู่ และพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิด (Cheng *et al.*, 1998)

2. อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 มีพลาสมิด pEHA105 และผลิตสารอะโกรปีน เมื่อมีการนำไปใช้จะตัดบริเวณ T-DNA ซึ่งเป็นบริเวณที่ผลิตสารอะโกรปีนออกไปและเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการติดเชื้อ (super virulent) (Hood *et al.*, 1986) เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Cheng *et al.*, 1998)

3.5.2 ความแตกต่างของพลาสมิด (ภาพ 3.1)



ภาพ 3.1 แสดงโครงสร้างพลาสมิด pBI121 และลำดับเบสตำแหน่ง 5'UTR หน้ายีน *gus* ในพลาสมิด pBI121 และ pSTART โดย ก) โครงสร้างของพลาสมิด pBI121 และ ข) ลำดับเบสตำแหน่ง 5'UTR หน้ายีน *gus* ของพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยที่พลาสมิด pSTART จะมีการเติม poly CAA และ CT motif บริเวณตำแหน่ง 5'UTR หน้ายีน *gus* (Francesca *et al.*, 2007)

3.6 วิธีการทดลอง

1. การเตรียม competent cell ของเชื้ออะโกราแบคทีเรีย

1. นำเชื้ออะโกราแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารสูตร LB broth (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 2 วัน
2. คูดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารสูตร LB broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตรและเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ประมาณ 4-5 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.5-1 ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
3. นำเชื้อมาแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที
4. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้น เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในสภาพเย็นที่เครื่องเขย่า ความเร็ว 350 รอบต่อนาที จนกว่าเซลล์จะละลาย
5. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในสภาพเย็นที่เครื่องเขย่า ความเร็ว 350 รอบต่อนาที จนกว่าเซลล์จะละลาย
6. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติม 10 % glycerol ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในสภาพเย็นที่เครื่องเขย่าความเร็ว 350 รอบ ต่อนาที จนกว่าเซลล์จะละลาย
7. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติม 10 % glycerol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่าในสภาพเย็นจนกว่าเซลล์จะละลาย
8. แบ่งเก็บเซลล์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ และนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสหรือ -80 องศาเซลเซียส

2. การส่งถ่ายพลาสมิดโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) (Dower *et al.*, 1988)

1. นำพลาสมิดใส่แยกลงใน competent cell ผสมให้เข้ากันในแต่ละหลอด จากนั้น แช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที
2. คูดสารละลายในแต่ละหลอดใส่ลงใน cuvette (เย็น) แล้วเช็ดให้แห้ง นำไปกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยเครื่อง electroporation ซึ่งใช้สนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่ 12.5 kV/cm^2 ความต้านทาน 200Ω และค่าปริมาณกระแสไฟฟ้า $2.5 \mu\text{F}$
3. คูดสารละลายในแต่ละหลอดที่ผ่านการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า ลงในหลอดอาหารสูตร LB broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
4. บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. นำเซลล์อะโกรแบคทีเรียมาเกลี่ยให้แห้งบนอาหารแข็งสูตร LB-S (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน
6. นำโคโลนีของอะโกรแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารสูตร LB-S เหลว ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 วันเพื่อเตรียมสกัดพลาสมิดต่อไป

3. การสกัดพลาสมิด (ดัดแปลงจาก Maniatis *et al.*, 1982)

1. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 2 คูดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เทสารละลายส่วนในทิ้ง
2. เติมสารละลาย BP1 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) จนกว่าเซลล์จะละลายเข้ากัน
3. เติมสารละลาย BP2 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ ประมาณ 10 ครั้ง
4. เติมสารละลาย BP3 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ ประมาณ 10 ครั้ง จากนั้น นำไปแช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที
5. ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้น คูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์หลอดใหม่

6. เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วเก็บไว้ที่ตู้
อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน
7. ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เท
สารละลายส่วนใสทิ้งไป
8. เติม 70% ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ และปั่นตกตะกอนที่
ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง
9. ผึ่งให้แห้ง (air dry) ที่อุณหภูมิห้อง
10. ละลายตะกอนพลาสติกด้วย deionize water ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
11. เติม RNase A ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37
องศาเซลเซียส ข้ามคืน
12. เตรียมพลาสติกไว้ตรวจเช็คต่อไป

4. การส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบโดยใช้เชื้ออะโกร แบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 (ดัดแปลงจาก Horsch *et al.*, 1985)

เนื่องจากยาสูบเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่นิยมนำมาศึกษาการส่งถ่ายยีน และประสบความสำเร็จใน
การส่งถ่ายยีน ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่ยาสูบ
เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของพลาสมิดโดยการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ
EHA105 ตามขั้นตอนดังนี้

1. เชื้อเชื้ออะโกรแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pSTART และ pBI121 ลงบนอาหารสูตร
LB-S จากนั้น เลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (inoculator) อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน
2. นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารสูตร LB-S เหลว ปริมาตร 20
มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน
3. ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 5-10 นาที จากนั้นละลายเซลล์ในอาหารสูตร TAS
เหลว (ภาคผนวก ข) วัดค่า OD₆₀₀ = 0.5- 1
4. ตัดใบของยาสูบให้มีขนาดประมาณ 1 cm × 1 cm แล้วนำไปเขย่าร่วมกับสารละลายอะโกร
แบคทีเรีย เป็นเวลา 5- 10 นาที
5. นำชิ้นส่วนใบยาสูบมาซบด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเลี้ยงใน
อาหาร co-culture สูตร TAS เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันในที่มืด

6. ล้างชิ้นส่วนใบยาสูบด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3- 4 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายเติมยาปฏิชีวนะซีฟิแทกซิม (cefotaxime) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรียส่วนเกิน จากนั้นซับเนื้อเยื่อด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

7. นำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในอาหารสูตร TSM (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ ย้ายอาหารทุกสัปดาห์ ในช่วงสัปดาห์แรกทำการสุมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient *gus* expression) ด้วยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987) หลังจากนั้นเมื่อสังเกตเห็นว่าชิ้นส่วนใบยาสูบมีการเกิดขอดจึงย้ายไปอาหารสูตร TRM (ภาคผนวก ข) เพื่อชักนำให้เจริญเป็นต้นต่อไป

5. การส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่ชิ้นส่วนใบพิทูเนียโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 (ดัดแปลงจาก Ingrid, 2006)

เนื่องจากพิทูเนียเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ จึงใช้พิทูเนียเป็นตัวแทนของพืชใบเลี้ยงคู่ในการศึกษาประสิทธิภาพของพลาสมิด โดยการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่พิทูเนียโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 ตามขั้นตอนดังนี้

1. เชื้อเชื้ออะโกรแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pSTART และ pBI121 ลงบนอาหารสูตร LB-S จากนั้น เลี้ยงเชื้อในตูบ่มเชื้อ (inoculator) อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

2. นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารสูตร LB-S เหลว ปริมาตร 20 มิลลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน

3. ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 5-10 นาที จากนั้นละลายเซลล์ในอาหารสูตร PAS เหลว (ภาคผนวก ข) วัดค่า $OD_{600}=0.5-1$

4. ตัดใบของพิทูเนียให้มีขนาดประมาณ 1 cm × 1 cm แล้วนำไปเขย่าร่วมกับสารละลายอะโกรแบคทีเรีย เป็นเวลา 15- 30 นาที

5. นำชิ้นส่วนใบพิทูเนียมาซับด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร co-culture สูตร PAS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันในที่มืด

6. ล้างชิ้นส่วนใบพิทูเนียด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3-4 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายเติมยาปฏิชีวนะซีฟิแทกซิม ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรียส่วนเกิน จากนั้นซับเนื้อเยื่อด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

7. นำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในอาหารสูตร PSM (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ ย้ายอาหารทุกสัปดาห์ ในช่วงสัปดาห์แรกทำการสุมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus*

แบบชั่วคราว (transient *gus* expression) ด้วยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987) หลังจากนั้น เมื่อสังเกตเห็นลักษณะของยอดจึงย้ายไปอาหารสูตร PRM (ภาคผนวก ข) เพื่อชักนำให้เจริญเป็นต้นต่อไป

6. การชักนำเมล็ดข้าวคิตาอิเกะให้เกิดแคลลัสและส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสของข้าวคิตาอิเกะ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 (ดัดแปลงจาก Hiei *et al.*, 1994)

ข้าวคิตาอิเกะเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและเป็นข้าวในกลุ่มจาโปนิกา ซึ่งได้มีการศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าวกลุ่มนี้อย่างแพร่หลาย ดังนั้น จึงได้ทดสอบประสิทธิภาพของพลาสมิด โดยการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสข้าวคิตาอิเกะโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 ตามขั้นตอนดังนี้

6.1 การชักนำเมล็ดข้าวคิตาอิเกะให้เกิดแคลลัส

นำเมล็ดข้าวคิตาอิเกะมาแกะเปลือกออกและฟอกฆ่าเชื้อ โดยแช่ใน 70% แอลกอฮอล์พร้อมเขย่า เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแช่ในสารละลายคลอโรกซ์เข้มข้น 25% และหยด tween 20 ประมาณ 2-3 หยด พร้อมเขย่า นาน 15 นาที 2 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดข้าวคิตาอิเกะมาล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 4- 5 ครั้ง หรือจนกว่าฟองจะหมด

นำเมล็ดข้าวคิตาอิเกะที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D (ภาคผนวก ข) โดยวางเมล็ดข้าวให้ส่วนที่เป็นคัพพะได้สัมผัสอาหาร จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่มีช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ย้ายอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อเตรียมไว้สำหรับเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการส่งถ่ายพลาสมิด

6.2 การส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสของข้าวคิตาอิเกะ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

1. เชื้อเชื้ออะโกรแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pSTART และ pBI121 บนอาหารสูตร LB-S จากนั้น เลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (inoculator) อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน
2. นำเอาโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ได้มาละลายในอาหาร AAM (ภาคผนวก ข) เติมนะซิโตไซริงโกน (acetosyringone) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ วัดค่า $OD_{600} = 0.02$ เขย่าสารละลายอะโกรแบคทีเรียร่วมกับแคลลัสข้าวคิตาอิเกะ เป็นเวลา 90 วินาที

3. นำแคลลัสมาจับด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและนำไปเลี้ยงในอาหาร co-culture สูตร N6D ที่เติมอะซิโตไซริงโกนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันในที่มืด

4. ล้างแคลลัสด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 4-5 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายเติมยาปฏิชีวนะ ซิโฟแทกซิมความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรียส่วนเกิน จากนั้นนำแคลลัสมาจับด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกสูตร N6D ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรและยาปฏิชีวนะซิโฟแทกซิมความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ย้ายอาหารทุก 2 สัปดาห์และทำการสุ่มแคลลัสเพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987)

5. นำแคลลัสที่สามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือกย้ายลงในอาหารสูตร REK (ภาคผนวก ข) เพื่อชักนำให้เจริญเป็นต้นต่อไป

7. การส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 (Yookongkaew *et al.*, 2007)

ข้าวกลุ่มอินดิกาเป็นข้าวที่มีการศึกษาและรายงานการส่งถ่ายยีนค่อนข้างน้อยเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำได้ยาก และประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนค่อนข้างต่ำ ดังนั้น จึงได้นำข้าวบือโปะโละมาศึกษาการส่งถ่ายยีน โดยใช้เป็นตัวแทนของข้าวกลุ่มอินดิกา อีกทั้งยังไม่มีรายงานการศึกษาการส่งถ่ายยีนในข้าวสายพันธุ์นี้มาก่อน โดยจะทำการศึกษการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวบือโปะโละ การทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซิน รวมไปถึงการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

7.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวบือโปะโละ

นำเมล็ดข้าวบือโปะโละมาแกะเปลือกออกและฟอกฆ่าเชื้อโดยแช่ใน 70% แอลกอฮอล์พร้อมเขย่า เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแช่ในสารละลายคลอโรกซ์เข้มข้น 25% หยดด้วย tween 20 ประมาณ 2-3 หยด พร้อมเขย่า นาน 15 นาที 2 ครั้ง และนำเมล็ดข้าวมาล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 4-5 ครั้ง หรือจนกว่าฟองจะหมด

นำเมล็ดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-TDZ (ภาคผนวก ข) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อ

เมล็ดมีการงอก ตัดส่วนรากและส่วนยอดออก โดยให้เหลือแต่ส่วนที่เป็นฐานของยอดประมาณ 3-4 มิลลิเมตรแล้วนำไปเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการส่งถ่ายพลาสมิด

7.2 การทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวบือโปะโละ

เนื่องจาก พลาสมิดที่ใช้ในการส่งถ่ายมียีน *nptII* ซึ่งเป็นยีนที่ต้านทานต่อกานามัยซิน ดังนั้นเนื้อเยื่อที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน *nptII* จะสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีการเติมกานามัยซินได้ ซึ่งก่อนที่จะส่งถ่ายพลาสมิดต้องมีการทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินก่อนเพื่อที่จะศึกษาว่าความเข้มข้นไหนมีผลทำให้เนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวบือโปะโละไม่สามารถเจริญเติบโตได้นำเนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวบือโปะโละ (ได้จากการทดลองที่ 7.1) มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS-TDZ ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 50 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์สังเกตและบันทึกผล

$$\% \text{ การรอดของเนื้อเยื่อปลายยอด} = \frac{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่รอด}}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมด}} \times 100$$

7.3 การส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

1. เชื้ออะโกรแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pSTART และ pBI121 บนอาหารสูตร LB-S จากนั้น เลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (inoculator) อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน
2. นำเอาโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตร LB-S เหลว ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน
3. ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นละลายเซลล์ในอาหารสูตร MS-TDZ-AS เหลว ปริมาตร 30 มิลลิลิตร วัดค่า $OD_{600} = 1.0$ เขย่าสารละลายอะโกรแบคทีเรียร่วมกับเนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวที่ตัดให้มีขนาด ประมาณ 3-4 มิลลิเมตร เป็นเวลา 15 นาที
4. นำเนื้อเยื่อปลายยอดมาจับด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและย้ายไปเลี้ยงในอาหาร co-culture สูตร MS-TDZ-AS อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ในที่มืด
5. ล้างเนื้อเยื่อปลายยอดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3-4 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายเติมยาปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรียส่วนเกิน

จากนั้นจับเนื้อเยื่อด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS-TDZ-S (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ย้ายอาหารทุกสัปดาห์ ในช่วงสัปดาห์แรกทำการสุมเนื้อเยื่อปลายยอดเพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987)

6. ย้ายเนื้อเยื่อที่รอดในอาหารคัดเลือกลงในอาหารสูตร MS-TDZ-R (ภาคผนวก ข)

7. นำใบข้าวไปสกัดดีเอ็นเอ โดยดัดแปลงวิธีการของ Doyle and Doyle (1990)

8. การส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่เซลล์ของข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

ในการศึกษาการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของข้าวบือโปะโละ จะต้องมีการศึกษาการชักนำเมล็ดให้เกิดแคลลัส การทดสอบความเข้มข้นของกานามัยซิน และการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นก่อน จากนั้นจึงทำการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่เซลล์ของข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 ดังนี้

8.1 ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 D ในการชักนำเมล็ดข้าวบือโปะโละให้เกิดแคลลัส

นำเมล็ดข้าวบือโปะโละมาแกะเปลือกออกและฟอกฆ่าเชื้อโดยแช่ใน 70% แอลกอฮอล์พร้อมเขย่าเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแช่ในสารละลายคลอโรกซ์เข้มข้น 25% หยดด้วย tween 20 ประมาณ 2-3 หยด พร้อมเขย่า นาน 15 นาที 2 ครั้ง และนำเมล็ดข้าวมาล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 4-5 ครั้ง หรือจนกว่าฟองจะหมด

นำเมล็ดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MSD (ภาคผนวก ข) และเติม 2,4 D ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 2 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางเมล็ดข้าวให้ส่วนที่เป็นคัพภะได้สัมผัสอาหาร จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่มีช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ย้ายอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผลของการเกิดแคลลัส

$$\% \text{ การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนเมล็ดที่ใช้ทั้งหมด}} \times 100$$

8.2 ทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสข้าวบือโปะโละ

เนื่องจาก พลาสมิดที่ใช้ในการส่งถ่ายมียีน *nptII* ซึ่งเป็นยีนที่ต้านทานต่อกานามัยซิน ดังนั้นเนื้อเยื่อที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน *nptII* จะสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีการเติมกานามัยซินได้ ซึ่งก่อนที่จะส่งถ่ายพลาสมิดต้องมีการทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินก่อนเพื่อที่จะศึกษาว่าความเข้มข้นไหนมีผลทำให้แคลลัสข้าวบือโปะโละไม่สามารถเจริญเติบโตได้

นำแคลลัสข้าวบือโปะโละ (จากการทดลองที่ 8.1) มาทดสอบความเข้มข้นของกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสข้าวบือโปะโละโดยการเติมกานามัยซินความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 50 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารสูตร MSD ที่มี 2,4 D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และสังเกตผล

8.3 การชักนำแคลลัสของข้าวบือโปะโละให้เกิดขึ้น

นำแคลลัสของข้าวบือโปะโละมาเลี้ยงในอาหาร 3 สูตร คือ RE1 (ดัดแปลงจาก Samiphak and Siwarungson, 2006) RE2 (ดัดแปลงจาก Zaidi *et al*, 2006) และ RE3 (ดัดแปลงจาก Lin and Zhang, 2005) (ภาคผนวก ข) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4-5 สัปดาห์ และย้ายอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นบันทึกการเกิดจุดเขียวและการเกิดต้น

$$\% \text{ การเกิดจุดเขียวและการเกิดต้น} = \frac{\text{จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียวหรือเกิดต้น}}{\text{จำนวนแคลลัสทั้งหมด}} \times 100$$

8.4 การส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสของข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

1. เชื้อเชื้ออะโกรแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pSTART และ pBI121 บนอาหารสูตร LB-S จากนั้น เลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (inoculator) อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน
2. นำเอาโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ได้มาละลายในอาหาร AAM (ภาคผนวก ข) เติมอะซิโตไซริงโคนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ วัดค่า $OD_{600}=0.5-1$ เขย่าสารละลายอะโกรแบคทีเรียร่วมกับแคลลัสข้าว เป็นเวลา 30 นาที
3. นำแคลลัสมาจับด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและนำไปเลี้ยงในอาหาร co-culture สูตร MSD-AS (ภาคผนวก ข) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ในที่มืด

4. ล้างแคลลัสด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 4-5 ครั้ง โดยครั้งสุดท้าย เดิมยาปฏิชีวนะ ซิโฟแทกซิม ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรียส่วนเกิน จากนั้นนำแคลลัสมาซบด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกสูตร MSD-S (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ย้ายอาหารทุก 2 สัปดาห์และทำการสุมแคลลัสเพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987)

5. นำแคลลัสที่สามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือกย้ายลงในอาหารที่ชักนำให้เป็นต้น และนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay และเทคนิคพีซีอาร์

การบันทึกผลประสิทธิภาพการส่งถ่ายในข้าวที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

$$\text{ประสิทธิภาพในการส่งถ่าย (\%)} = \frac{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีน } gus}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่ใช้ในการส่งถ่าย}} \times 100$$

9. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay

(Jefferson, 1987)

นำเนื้อเยื่อพืชที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดแล้ว มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987) (ภาคผนวก ข) โดยการสุมเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการส่งถ่าย

พลาสมิดมาแช่ในสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronic acid sodium salt (x-gluc) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ β -glucuronidase โดยในสารละลายประกอบด้วย phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ EDTA pH 7.0 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ potassium ferricyanide ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ potassium ferrocyanide ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ Triton X-100 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ x-gluc ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรณีที่เนื้อเยื่อมีสีเขียวทำการสกัดคลอโรฟิลล์ออกด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบจำนวนเนื้อเยื่อที่เกิดสีน้ำเงินภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

10. การสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงวิธีการของ Doyle and Doyle (1990)

1. นำเนื้อเยื่อพืชมาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวให้ได้ประมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวก์ ที่มี extraction buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมกันโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (vertex mixer)
2. นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พลิกหลอดกลับไปมาทุกๆ 10 นาที
3. เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาเบา ๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วดูดเอาส่วนใส (supernatant) ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวก์หลอดใหม่
4. เติม isopropanol ปริมาตรเป็น 1 เท่า ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปแช่ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมงหรือทิ้งไว้ 1 คืน
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethyl alcohol ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้ง จากนั้นนำไปผึ่งตะกอน (air dry) ดีเอ็นเอไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
6. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย deionnized water หรือ TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเขย่าเบา ๆ จนตะกอนละลายหมด
7. เติม RNase A เข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน
8. ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis หรือวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร

11. การตรวจสอบยีน *gus* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองที่ 10 มาเจือจางโดยใช้ deionized water ให้มีความเข้มข้นประมาณ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gus* ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มีขนาด 500 คู่เบส โดยมีลำดับเบสดังนี้

Forward primer 5'- ACCGTTTGTGTGAACAACGA-3'

Reward primer 5'-CATGACGACCAAAGCCAGTA-3'

องค์ประกอบพีซีอาร์

10x PCR buffer	2	μl
25 mM MgCl	1.6	μl
10 mM dNTPs	0.4	μl
primer (150pmole/μl)	1.5	μl
DNA template (20 ng/ μl)	1	μl
<i>Taq</i> polymerase(5U/ μl)	0.5	μl
deionize water to	20	μl

ปฏิกิริยาพีซีอาร์

Denaturation	94	องศาเซลเซียส	นาน	45	วินาที
Annealiing	68	องศาเซลเซียส	นาน	30	วินาที
Extension (30 cycle)	72	องศาเซลเซียส	นาน	50	วินาที
Final extension	72	องศาเซลเซียส	นาน	10	นาที