

บทที่ 6

การส่งถ่ายยีน chitinase สู่อ้อยพันธุ์ Phil 66-07

1. บทนำ

Chitinase เป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส มีบทบาทในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิดนอกจากนี้ยังสามารถทำลายแมลงศัตรูพืชที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบหลักอยู่ในทางเดินอาหารของแมลง ดังนั้นหากสามารถส่งถ่ายยีน chitinase เข้าสู่เนื้อเยื่ออ้อย ก็จะสามารถส่งผลให้อ้อยต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูอ้อย ซึ่งจะช่วยลดการใช้สารกำจัดแมลง ทำให้ลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันด้านอุตสาหกรรมน้ำตาลในตลาดโลก ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้เพื่อทำการศึกษากการส่งถ่ายยีน chitinase สู่วัตถุเซลล์อ้อยพันธุ์ Phil 66-07 โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA1305.1) ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเซลล์อ้อยร่วมกับ *A. tumefaciens* สำหรับการถ่ายยีนโดยใช้เครื่อง particle bombardment ต้องศึกษาหา ระยะระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย และแรงดันของก๊าซฮีเลียมที่เหมาะสม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้างอ้อยแปลงพันธุ์ให้ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูอ้อย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 100 มก./ล. โดยใช้หัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มบนเครื่องเขย่าชนิด reciprocal shaker ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C เป็นเวลา 32 ชั่วโมง นำอาหารเหลวมาวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. tumefaciens* โดยวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ที่เวลาต่างๆคือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 และ 32 ชั่วโมง จากนั้นนำค่า OD_{600} ที่ได้ไปเขียนกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. tumefaciens*

การทดลองที่ 2 ผลของซีโฟแทกซิมต่อการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1)

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ในอาหารเหลว LB ที่มีกานามัยซิน 100 มก./ล. และเติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้นต่างๆกันคือ 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150 และ 175 มก./ล. บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* โดยนำอาหาร

เหลว LB มาวัดค่า OD₆₀₀ เพื่อตรวจสอบการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* จากนั้นนำอาหารเหลวที่ได้มาเชื้อ (streak) บนอาหารแข็ง LB เพื่อยืนยันผลการทดลอง โดยบ่มในอุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* บนอาหารแข็ง โดยสังเกตว่าเชื้อมีการเจริญบนอาหารแข็งหรือไม่

การทดลองที่ 3 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการบ่มแคลลส์อ้อยร่วมกับเชื้อ

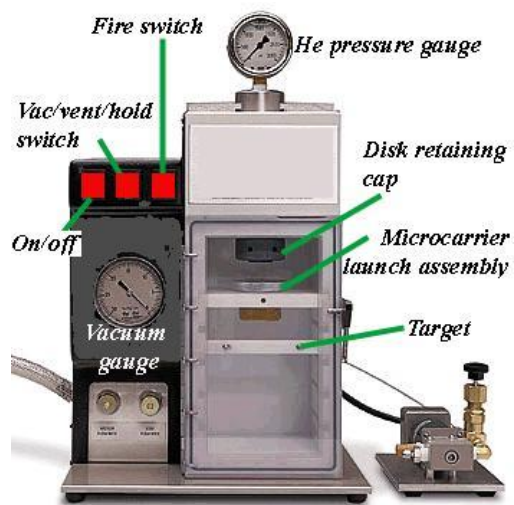
A. tumefaciens สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1)

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA1305.1) ที่มี chitinase ในอาหารเหลว LB ที่มีกาน้ำยจีน 100 มก./ล. เขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0–1.5 จากนั้นบ่มแคลลส์อ้อยอายุ 4 สัปดาห์ ร่วมกับ *Agrobacterium* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB โดยบ่มที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที นำแคลลส์อ้อยมาจับเชื้อ *Agrobacterium* ออก ด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ แล้วนำแคลลส์ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลส์ นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25±2 °C เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* โดยการล้างแคลลส์อ้อยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีซิโฟแทกซึม 500 มก./ล. 3 ครั้งๆละ 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วนำแคลลส์อ้อยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลส์ที่มี ไฮโกรมัยซิน 25 มก./ล. และซิโฟแทกซึม 500 มก./ล. นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25±2 °C เป็นเวลา 60 วัน สุ่มเลือกแคลลส์ไปตรวจสอบผลของการส่งถ่ายยีนโดยวิธี GUS assay โดยนำแคลลส์ที่บ่มร่วมกับ *Agrobacterium* เป็นระยะเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที แช่ในสารละลาย x-gluc นำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตสีฟ้าที่เกิดขึ้นบนแคลลส์

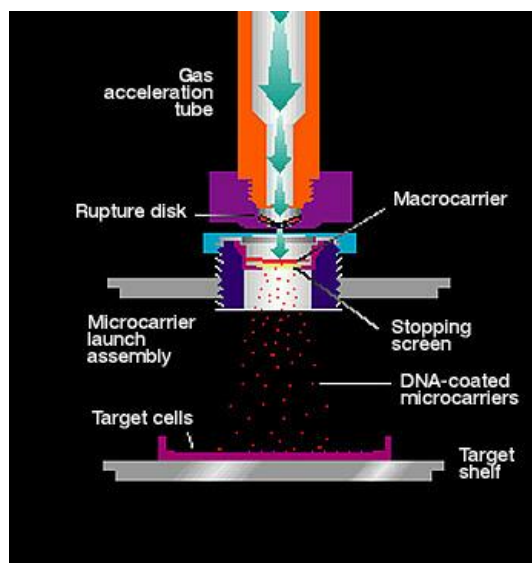
การทดลองที่ 4 การส่งถ่ายยีน chitinase สู่แคลลส์อ้อยพันธุ์ Phil 66-07 โดยใช้

เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment)

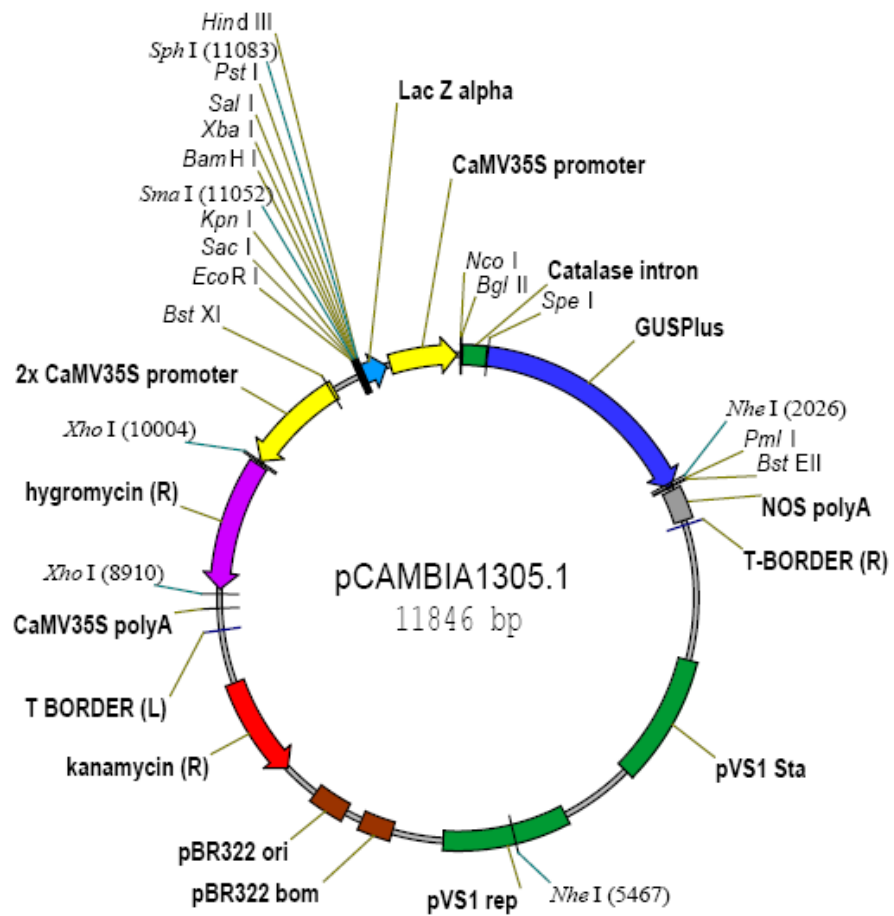
ทำการส่งถ่ายยีนสู่แคลลส์อ้อย โดยใช้เครื่อง particle bombardment รุ่น Biolistic PDS-1000 / He particle deliver system (Bio-Rad) (ภาพที่ 41 และ 42) โดยใช้กระสุนทั้งสแตนขนาด 1.1 μm แปรผันระยะการยิง (ระยะทางระหว่างจุดปล่อยกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย) 3 ระยะคือ 6, 9 และ 12 ซม. ใช้ rupture disc ที่ทนแรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว พลาสมิดที่ใช้คือ pCAMBIA 1305.1 ซึ่งสกัดจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (ภาพที่ 43) ที่มี chitinase (ภาพที่ 44) โดยมีขั้นตอนสกัด การล้าง และเคลือบกระสุน ดังแสดงในภาคผนวก ค



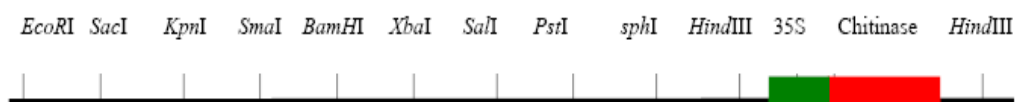
ภาพที่ 41 เครื่อง particle bombardment (Biolistic PDS-1000/He Diliver System)
ที่มา: www.science.ru.nl/instr/particlegun.html



ภาพที่ 42 ลักษณะการทำงานของเครื่อง particle bombardment
ที่มา: www.fisio.dipbsf.uninsubria.it/scuola/biolistic.html



ภาพที่ 43 แผนที่พลาสมิด pCambia 1305.1 ขนาด 11846 bp ที่มีโปรโมเตอร์คือ CaMV35s promoter ยีนเครื่องหมายคือ *nptII* gene ต้านทานต่อกานามัยซิน และยีน *hpt* ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน ยีนรายงานผลคือ *gus* gene
ที่มา: เกศสุนทร มณีวรรณ, 2548



ภาพที่ 44 แสดงส่วนของพลาสมิด pCambia 1305.1 ที่มียีน chitinase
ที่มา: เกศสุนทร มณีวรรณ, 2548

การทดลองที่ 4.1 การเปรียบเทียบแรงดันก๊าซฮีเลียมที่ใช้ในการส่งถ่ายยีน

นำแคลลัสของอ้อยอายุ 4 สัปดาห์ มาวางบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. โดยให้แคลลัสอ้อยอยู่ตรงกลางของจานเพาะเลี้ยงที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 ซม. ทำการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของอ้อย ใช้ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย เท่ากับ 9 ซม. rupture disc ขนาดทนแรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว ภายหลังการยิงย้ายแคลลัสอ้อยไปวางบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นย้ายแคลลัสอ้อยไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซิน 25 มก./ล. นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดต้นที่เติมไฮโกรมัยซิน 50 มก./ล. คัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินจำนวน 5 ชิ้น ไปทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี gus assay โดยนำแคลลัสมาแช่ในสารละลาย X-gluc นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 คืน ตรวจสอบสีฟ้าที่เกิดขึ้นบนแคลลัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 4.2 การเปรียบเทียบระยะทางระหว่างจุดปล่อยกระสุน (stopping screen) ถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย (target tissue)

นำแคลลัสของอ้อยที่มีอายุ 4 สัปดาห์ มาวางบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 3 ระยะคือ 6, 9 และ 12 ซม. ใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม เท่ากับ 900 ปอนด์/ตารางนิ้ว ภายหลังการยิง นำแคลลัสอ้อยไปเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นย้ายแคลลัสอ้อยไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซิน 25 มก./ล. นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดต้นที่เติมไฮโกรมัยซิน 50 มก./ล. นำแคลลัสอ้อยที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน ไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี gus assay โดยนำแคลลัสมาแช่ในสารละลาย X-gluc นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 คืน ตรวจสอบสีฟ้าที่เกิดขึ้นบนแคลลัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 5 การตรวจสอบการส่งถ่ายยีนในต้นอ่อนอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน chitinase

การทดลองที่ 5.1 การตรวจสอบต้นอ่อนอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน chitinase ด้วยวิธี gus assay

ทำการคัดเลือกอ้อยแปลงพันธุ์ที่ผ่านการส่งถ่ายยีน ที่สามารถเจริญบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน ทำการตัดใบของอ้อย แช่ใน 70% เอทานอล เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากใบอ้อย ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน gus ด้วยวิธี gus assay โดยนำใบอ้อยมาแช่ในสารละลาย

X-gluc นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน ตรวจสอบสีฟ้าที่เกิดขึ้นบนใบอ้อยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกต้นที่มีการแสดงออกของยีนไปทำการศึกษาต่อไป

การทดลองที่ 5.2 การศึกษากายวิภาคศาสตร์ของต้นอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน chitinase

นำต้นอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน ที่สามารถเจริญบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินและต้นอ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน โดยนำใบอ้อยมาแช่ในสารละลาย X-gluc นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน มาทำการตัดใบตามขวางด้วยใบมีดโกน ฝีกสไลด์ด้วยน้ำกลั่น ตรวจสอบสีฟ้าที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของใบอ้อย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 5.3 การตรวจสอบการสอดแทรกของยีน chitinase โดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน และที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้ particle bombardment และมีการแสดงออกของยีน *gus* โดยมีขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอดังแสดงในภาคผนวก ค

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างอ้อยมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละหลอดดังตารางที่ 1 โดยมี primer ที่ใช้ตรวจสอบได้แก่ primer 35S, NOS และ chitinase

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละหลอด

สารละลาย	ปริมาตร/reaction (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10x PCR buffer	2.5	1x
2. 25 mM MgCl ₂	1.5	1.5 mM
3. 10 mM dNTPs	2.5	0.32 mM
4. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	5.6	–
5. primer 1 (5 pmol/μl)	5	1 pmol/μl
6. primer 2 (5 pmol/μl)	5	1 pmol/μl
7. Tag DNA polymerase (5 unit/μl)	0.4	0.08 unit
8. DNA solution (200 ng/μl)	2.5	20 ng/l

การใช้ Primer ในการทดลองแต่ละ reaction คือ ใช้ 35S คู่กับ anti – 35S ใช้ NOS คู่กับ anti – NOS และใช้ chitinase (chi) คู่กับ anti-chi โดย primer ที่ใช้ในการทดลองมีลำดับเบสดังนี้

35S มีลำดับเบสคือ 5 ' GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3 '

anti – 35s มีลำดับเบสคือ 5' GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3'
 NOS มีลำดับเบสคือ 5' GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3'
 anti – NOS มีลำดับเบสคือ 5' TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3'
 chitinase มีลำดับเบสคือ 5' CTC CAT CAT ATC CCC CTC 3'
 anti – chitinase มีลำดับเบสคือ 5' ATC CAG AAC CAG AAC GCC 3'

เมื่อเตรียมสารละลายในแต่ละหลอดครบ จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

(DNA thermal cycle) โดยตั้งอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 predenaturation อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที

ขั้นตอนที่ 2 ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนย่อย ดังนี้

- denaturation อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 20 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวออกจากกัน

- annealing อุณหภูมิ 55 °C สำหรับ primer 35S และ NOS และอุณหภูมิ 60 °C สำหรับ primer chitinase เป็นเวลา 40 วินาที เพื่อให้ primer เข้าจับดีเอ็นเอสายเดี่ยว

- extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ Taq DNA polymerase ทำปฏิกิริยา สร้างดีเอ็นเอสายที่เข้าคู่กัน

ขั้นตอนที่ 3 – final extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 3 นาที

ในขั้นตอนที่ 2 ทำซ้ำ 40 รอบ สำหรับ primer 35S และ NOS และ 30 รอบ สำหรับ primer chitinase ในขั้นตอนที่ 1 และ 3 ทำ 1 รอบ หลังจากนั้นตรวจดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยความเข้มข้นของ agarose เท่ากับ 1.5 %

การทดลองที่ 6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน chitinase โดยเทคนิค RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในอวัยวะที่ได้รับการส่งถ่ายยีนและอวัยวะที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนมีการทดลองแบ่งออกเป็นขั้นตอนต่อไปนี้

การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA)

1. ชั่งตัวอย่างพืช 0.1 กรัม บดในโถรงปloidเชื้อโดยใช้ไนโตรเจนเหลว จนเป็นผงละเอียด
2. เทตัวอย่างพืชที่บดอย่างละเอียดลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. แล้วเติม RLT buffer ปริมาตร 450 µl
3. นำหลอดไปอุ่นที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 3 นาที จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดของเหลวด้านบนใส่หลอดใหม่
4. เติม 100% เอทานอล 0.5 เท่า ของปริมาตรเดิม แล้วใช้ปิเปตดูดของเหลวขึ้นลง
5. ย้ายของเหลวไปใส่ลงในหลอด RNeasy spin column แล้วปิดฝาเบาๆ นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที

6. เทสารละลายที่ตกลงไปที่หลอดด้านล่างทิ้งไป แล้วนำหลอดสวมกลับเข้าเหมือนเดิม
7. เติม RW1 buffer ปริมาตร 700 μ l ลงในหลอด RNeasy spin column นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที แล้วเทสารละลายที่ตกลงไปที่หลอดด้านล่างทิ้งไป แล้วนำหลอดสวมกลับเข้าเหมือนเดิม
8. เติม RPE buffer ปริมาตร 500 μ l ลงในหลอด RNeasy spin column นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที แล้วเทสารละลายที่ตกลงไปที่หลอดด้านล่างทิ้งไป แล้วนำหลอดสวมกลับเข้าเหมือนเดิม
9. เติม RPE buffer ปริมาตร 500 μ l ลงในหลอด RNeasy spin column นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทสารละลายที่ตกลงไปที่หลอดด้านล่างทิ้งไป แล้วนำหลอดสวมกลับเข้าเหมือนเดิม
10. นำหลอด RNeasy spin column นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำหลอดที่มีสารละลายที่ตกลงด้านล่างทิ้งไป
11. นำ RNeasy spin column สวมเข้ากับหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. ที่ตัดฝาแล้ว จากนั้นเติม RNase-free water 30 μ l ลงใน spin column membrane ปิดฝาเบาๆ นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
12. เก็บ RNA ที่ -80°C
13. วัดปริมาณอาร์เอ็นเอ โดยนำสารละลายดีเอ็นเอมา 5 μ l เติมน้ำกลั่น 995 μ l วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank
14. คำนวณปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สูตร

$$\text{RNA concentration } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \mu\text{g} / \text{ml} \times \text{dilution factor}$$

การกำจัดดีเอ็นเอ

1. นำ RNA ปริมาตร 1.12 μ l มาใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1 มล. แล้วเติม RNase-free water ปริมาตร 6.88 μ l
2. เติม RNase-free DNase 1 μ l
3. เติม 10x reaction buffer 1 μ l
4. จากนั้นนำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที

การสังเคราะห์ cDNA สายเดี่ยว

1. นำ RNA ที่ผ่านการกำจัดดีเอ็นเอ มาแบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 0.2 มล. หลอดละ 4 μ l จำนวน 2 หลอด (สำหรับหลอดที่เติมและไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase)
2. เติม oligodT primer หลอดละ 1 μ l
3. นำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาดังนี้
ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 70°C นาน 5 นาที

ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที

4. เก็บ ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

5. เตรียมสารทำปฏิกิริยา Reverse Transcriptase (RT) ประกอบด้วยส่วนประกอบดังนี้

ส่วนประกอบ	หลอดที่เติม RT	หลอดที่ไม่เติม RT
RNase-free water	6.1 ul	7.1 ul
5x Reaction buffer	4.0 ul	4.0 ul
25 mM MgCl ₂	2.4 ul	2.4 ul
10 mM dNTPs	1.0 ul	1.0 ul
Rnase inhibitor (40 unit/ ul)	0.5 ul	0.5 ul
Reverse transcriptase enzyme	1.0 ul	-
ปริมาตรรวม	15 ul	15 ul

6. จากนั้นดูด RNA ที่เตรียมไว้มาใส่หลอดที่เติม RT และไม่เติม RT

7. นำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 25 °C นาน 5 นาที

ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 42 °C นาน 60 นาที

ขั้นตอนที่ 3 อุณหภูมิ 70 °C นาน 15 นาที

8. เก็บ cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การสังเคราะห์ยีน chitinase และ TPI (Housekeeping gene)

1. นำ cDNA สายเดี่ยวที่ได้มาทำการสังเคราะห์ cDNA คู่ผสม โดยเทคนิค PCR โดยมี ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละหลอดดังตารางที่ 1 โดยใช้ไพรเมอร์ chitinase และ TPI ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน chitinase และ TPI ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองมีลำดับเบสดังนี้

chitinase มีลำดับเบสคือ 5 ' CTC CAT CAT ATC CCC CTC 3 '

anti-chitinase มีลำดับเบสคือ 5 ' ATC CAG AAC CAG AAC GCC 3 '

TPI มีลำดับเบสคือ 5 ' CAA TGA CTG GAG CAA CGT AG 3 '

anti-TPI มีลำดับเบสคือ 5 ' GTA ACA GAG CCT CCG TAG AT 3 '

2. นำส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละหลอดเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Predenaturation อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 20 วินาที

Annealing อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 40 วินาที

Extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที

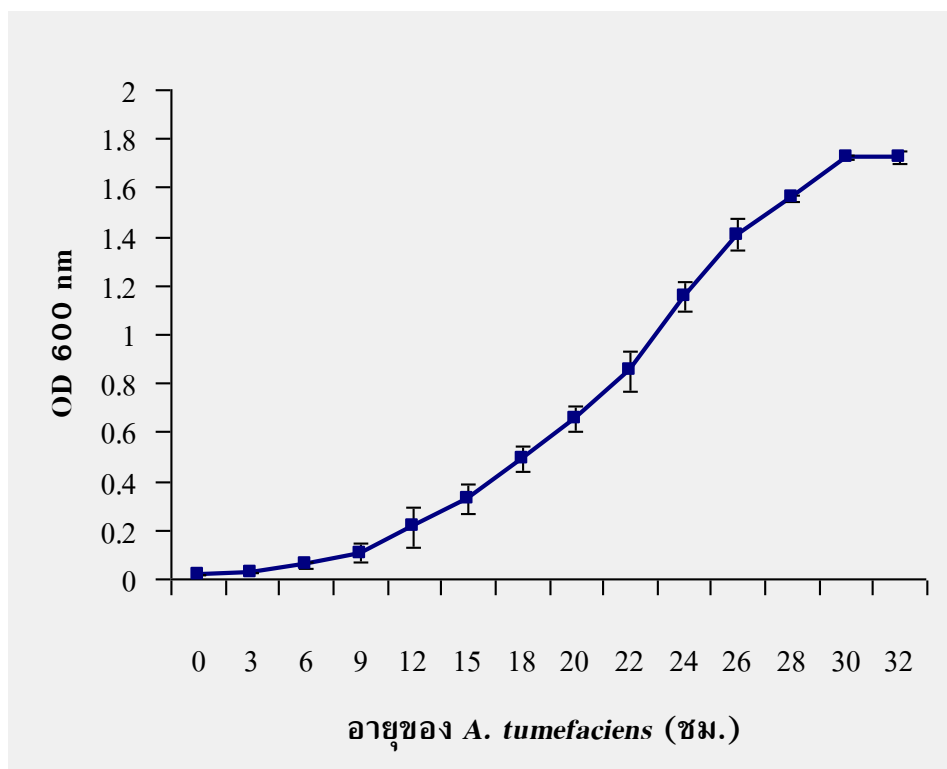
ขั้นตอนที่ 3 Final extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 3 นาที

ในขั้นตอนที่ 2 ทำซ้ำ 30 รอบ ขั้นตอนที่ 1 และ 3 ทำ 1 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยามาตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel 1.5 % และย้อมด้วย Ethidium bromide ตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV visible

3. ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1)

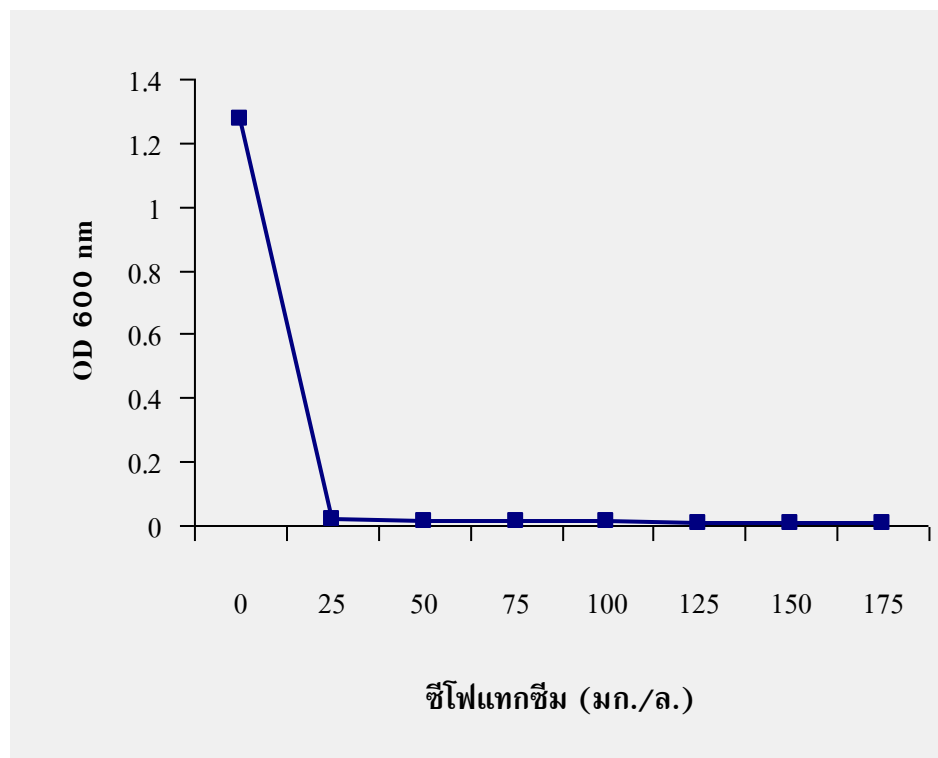
จากการเลี้ยง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 pCAMBIA 1305.1 (ที่มียีน chitinase) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 100 มก./ล. เขย่าบนเครื่องเขย่าด้วย ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 32 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของ *A. tumefaciens* โดยวัดความขุ่น ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) พบว่าเชื้อ *A. tumefaciens* มีการเจริญอย่างช้าๆ ในช่วง 0-9 ชั่วโมงซึ่งเป็นระยะ lag phase มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.01-0.10 และมีการเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 12 โดยพบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดในช่วงเวลา 24 - 30 ชั่วโมง มีค่า OD_{600} เท่ากับ 1.15-1.72 หลังจากนั้นจึงเข้าสู่ stationary phase การเจริญของเชื้อช้าลงแล้วคงที่ (ภาพที่ 45)



ภาพที่ 45 การเจริญของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่างๆ

ผลการทดลองที่ 2 ผลของซีโฟแทกซิมต่อการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1)

จากการศึกษาอิทธิพลของซีโฟแทกซิมต่อการเจริญของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ในอาหารเหลว LB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าในอาหารเหลว LB ที่ไม่เติมซีโฟแทกซิมเชื้อ *Agrobacterium* สามารถเจริญได้ปกติโดยวัดค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.275 แต่เมื่อเติมซีโฟแทกซิมลงในอาหารพบว่าสามารถกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* โดยอาหารเหลวที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 25 มก./ล. มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.016 อาหารมีลักษณะค่อนข้างใส และในอาหารเหลวที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 50, 75, 100, 125, 150 และ 175 มก./ล. มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.013, 0.011, 0.010, 0.009, 0.009 และ 0.007 ตามลำดับ (ภาพที่ 46) เมื่อนำเชื้อ *Agrobacterium* มาตรวจสอบการเจริญโดยการเชื้อลงบนอาหารแข็ง LB พบว่ามีการเจริญของเชื้อ *Agrobacterium* บนอาหารแข็ง LB ที่ไม่เติมซีโฟแทกซิมลักษณะโคโลนีของเชื้อมีลักษณะเป็นสีขาว แต่ในอาหารแข็ง LB ที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีการเจริญของเชื้อ *Agrobacterium* เกิดขึ้นเลย (ภาพที่ 47)



ภาพที่ 46 การวัดค่า OD₆₀₀ เปรียบเทียบการเจริญของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ในอาหารเหลว LB ที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง