

บทที่ 7

การส่งถ่ายยีน chitinase สู่อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94

1. บทนำ

Chitinase เป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส มีบทบาทในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดนอกจากนี้ยังสามารถทำลายแมลงศัตรูพืชที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบหลักอยู่ในทางเดินอาหารของแมลง ดังนั้นหากสามารถส่งถ่ายยีน chitinase เข้าสู่เนื้อเยื่ออ้อย ก็จะส่งผลให้อ้อยต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูอ้อย ซึ่งจะช่วยลดการใช้สารกำจัดแมลง ทำให้ลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันด้านอุตสาหกรรมน้ำตาลในตลาดโลก ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้เพื่อทำการศึกษการส่งถ่ายยีน chitinase สู่แคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ซึ่งได้ทำการศึกษายู่ 2 วิธีคือ วิธีที่ 1 การใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ซึ่งภายในมียีน chitinase ซึ่งเป็นยีน chitinase ที่ได้จากข้าว และ พลาสมิด PBI121 ซึ่งภายในมียีน chitinase ซึ่งเป็นยีน chitinase ที่ได้จากเชื้อรา และวิธีที่ 2 การใช้เครื่อง particle bombardment

2. อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94

ร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1)

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA1305.1) ที่มียีน chitinase ในอาหารเหลว LB ที่มีกานามัยซิน 100 มก./ล. เขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0-1.5 จากนั้นบ่มแคลลัสอ้อย ร่วมกับ *Agrobacterium* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB โดยบ่มเป็นเวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 90 นาที นำแคลลัสอ้อยมาชุบเชื้อ *Agrobacterium* ออก ด้วยกระดาษทิชชู ปลอดเชื้อ แล้วนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มก./ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว 10% นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 °C เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* โดยการล้างแคลลัสอ้อยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีซิโฟแทกซิม 300 มก./ล. นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วนำแคลลัสอ้อยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มก./ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว 10% ที่มีไฮโกรมัยซิน 30 มก./ล. และซิโฟแทกซิม 300 มก./ล. นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 °C เป็นเวลา 7 วัน สุ่มเลือกแคลลัสไปตรวจสอบผลของการส่งถ่ายยีนโดย

วิธี GUS assay โดยนำแคลลัสที่บ่มร่วมกับ *Agrobacterium* เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 90 นาที แช่ในสารละลาย x-gluc นำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตสีฟ้าที่เกิดขึ้นบนแคลลัส

การทดลองที่ 2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (PBI 121)

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (PBI 121) ที่มีเอนไซม์ chitinase ในอาหารเหลว LB เติมนานามัยซิน 100 มก./ล. เชยบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0-1.5 จากนั้นบ่มแคลลัสอ้อย ร่วมกับ *Agrobacterium* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB โดยบ่มที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 90 นาที นำแคลลัสอ้อยมาชุบเชื้อ *Agrobacterium* ออก ด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ แล้วนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มก./ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว 10% นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25±2 °C เป็นเวลา 3 วัน แล้วกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* โดยการล้างแคลลัสอ้อยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีซีโฟแทกซึม 300 มก./ล. นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วนำแคลลัสอ้อยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มก./ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว 10% ที่มิกานามัยซิน 1,250 มก./ล. และซีโฟแทกซึม 300 มก./ล. นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25±2 °C เป็นเวลา 30 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายยีนที่เวลาต่างๆ กัน

การทดลองที่ 3 การส่งถ่ายยีน chitinase สู่แคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment)

ทำการส่งถ่ายยีนสู่แคลลัสอ้อย โดยใช้เครื่อง particle bombardment รุ่น Biolistic PDS-1000/He particle deliver system (Bio-Rad) โดยใช้กระสุนทั้งสแตนเลส ขนาด 1.1 μm แปรผันระยะการยิง (ระยะทางระหว่างจุดปล่อยกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย) 3 ระยะคือ 6, 9 และ 12 ซม. ใช้ rupture disc ที่ทนแรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว พลาสติกที่ใช้คือ pCAMBIA 1305.1 ซึ่งสกัดจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มีเอนไซม์ chitinase จากข้าว และ พลาสติก PBI 121 ซึ่งสกัดจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มีเอนไซม์ chitinase จากข้าว โดยมีขั้นตอนสกัด การล้าง และเคลือบกระสุน ดังแสดงในภาคผนวก ค

การทดลองที่ 3.1 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 ภายหลังจากการยิงย้ายแคลลัสย้ายไปวางบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นย้ายแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิด pCAMBIA 1305.1 ไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซิน 30 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 แล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดต้นที่เต็มไฮโกรมัยซิน 50 มก./ล. คัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินจำนวน 10 ชิ้น ไปทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี gus assay โดยนำแคลลัสมาแช่ในสารละลาย X-gluc นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 คืน ตรวจสอบสีฟ้าที่เกิดขึ้นบนแคลลัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิด PBI 121 นำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารที่มีกานามัยซิน 1,250 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายยีนที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว

การทดลองที่ 3.2 การเปรียบเทียบระยะทางระหว่างจุดปล่อยกระสุน (stopping screen) ถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย (target tissue)

นำแคลลัสของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ มาวางบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 3 ระยะคือ 6, 9 และ 12 ซม. ใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม เท่ากับ 900 ปอนด์/ตารางนิ้ว ภายหลังจากการยิง นำแคลลัสย้ายไปเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นย้ายแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิด pCAMBIA 1305.1 ไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซิน 30 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 แล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดต้นที่เต็มไฮโกรมัยซิน 50 มก./ล. คัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินจำนวน 10 ชิ้น ไปทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี gus assay โดยนำแคลลัสมาแช่ในสารละลาย X-gluc นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 คืน ตรวจสอบสีฟ้าที่เกิดขึ้นบนแคลลัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิด PBI 121 นำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารที่มีกานามัยซิน 1,250 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายยีนที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว

การทดลองที่ 4 การตรวจสอบการส่งถ่ายยีนในแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน chitinase

การทดลองที่ 4.1 การตรวจสอบการสอดแทรกของยีน chitinase โดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากแคลลัส้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน และที่ผ่านการส่งถ่ายยีน โดยใช้พลาสมิด pCAMBIA1305.1 และ PBI121 ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอดังแสดงในภาคผนวก ค

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

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

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'	} เมื่อใช้พลาสมิด pCAMBIA1305.1
anti-chitinase	มีลำดับเบสคือ 5' ATC CAG AAC CAG AAC GCC 3'	
chitinase	มีลำดับเบสคือ 5' ACG CAA ACG CCG TCT ACT TCA CCA A 3'	} เมื่อใช้พลาสมิด PBI121
anti-chitinase	มีลำดับเบสคือ 5' GCA TCC CAG AAC ATG CTG CCT CCC A 3' '	

เมื่อเตรียมสารละลายในแต่ละหลอดครบ จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle) โดยตั้งอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้

ทดสอบ 35S, Anti-35S

ขั้นตอนที่ 1 Predenaturation ตั้งอุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวออกจากกัน

Annealing อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว

Extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้ Taq DNA polymerase ทำปฏิกิริยาสรางดีเอ็นเอคู่ผสม

ขั้นตอนที่ 3 Final extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที

ในขั้นตอนที่ 2 ทำซ้ำ 25 รอบ ขั้นตอนที่ 1 และ 3 ทำ 1 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยามาตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel 1.5% (w/v) และย้อมด้วย Ethidium bromide ตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV visible

ทดสอบ NOS, Anti-NOS

ขั้นตอนที่ 1 Predenaturation ตั้งอุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 20 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวออกจากกัน

Annealing อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 40 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว

Extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ Taq DNA polymerase ทำปฏิกิริยาสรางดีเอ็นเอคู่ผสม

ขั้นตอนที่ 3 Final extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

ในขั้นตอนที่ 2 ทำซ้ำ 40 รอบ ขั้นตอนที่ 1 และ 3 ทำ 1 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยามาตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel 1.5% และย้อมด้วย Ethidium bromide ตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV visible

ทดสอบ chitinase-Forward, chitinase-Reverse เมื่อใช้พลาสมิด pCambia1305.1

ขั้นตอนที่ 1 Predenaturation อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวออกจากกัน

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 20 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวออกจากกัน

Annealing อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 40 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว

Extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ Taq DNA polymerase ทำปฏิกิริยาสรางดีเอ็นเอคู่ผสม

ขั้นตอนที่ 3 Final extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 3 นาที

ในขั้นตอนที่ 2 ทำซ้ำ 40 รอบ ขั้นตอนที่ 1 และ 3 ทำ 1 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยามาตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel 1.5% และย้อมด้วย Ethidium bromide ตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV visible

ทดสอบ chitinase-Forward, chitinase-Reverse เมื่อใช้พลาสมิด PBI121

ขั้นตอนที่ 1 Predenaturation ตั้งอุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 7 นาที

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวออกจากกัน

Annealing อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว

Extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ *Taq* DNA polymerase ทำปฏิกิริยาสรางดีเอ็นเอคู่ผสม

ขั้นตอนที่ 3 Final extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

ในขั้นตอนที่ 2 ทำซ้ำ 30 รอบ ขั้นตอนที่ 1 และ 3 ทำ 1 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยามาตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel 1.0% และย้อมด้วย Ethidium bromide ตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV visible

การทดลองที่ 4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน chitinase โดยเทคนิค RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนและอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิด pCAMBIA1305.1 และ PBI121 มีการทดลองแบ่งออกเป็นขั้นตอนต่อไปนี้

การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA)

1. ชั่งตัวอย่างพืช 0.1 กรัม บดในโถรงปโหลดเชื้อโดยใช้ไนโตรเจนเหลว 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 µl ลงในหลอด RNeasy spin column นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที แล้วเทสารละลายที่ตกลงไปที่หลอดด้านล่างทิ้งไป แล้วนำหลอดสวมกลับเข้าเหมือนเดิม
8. เติม RPE buffer ปริมาตร 500 µl ลงในหลอด RNeasy spin column นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที แล้วเทสารละลายที่ตกลงไปที่หลอดด้านล่างทิ้งไป แล้วนำหลอดสวมกลับเข้าเหมือนเดิม

9. เติม RPE buffer ปริมาตร 500 μl 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 μl ลงใน spin column membrane ปิดฝาเบาๆ นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

12. เก็บ RNA ที่ -80°C

13. วัดปริมาณอาร์เอ็นเอ โดยนำสารละลายดีเอ็นเอมา 5 μl เติมน้ำกลั่น 995 μl วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น 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 μl มาใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1 มล. แล้วเติม RNase-free water ปริมาตร 6.88 μl

2. เติม RNase-free DNase 1 μl

3. เติม 10x reaction buffer 1 μl

4. จากนั้นนำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที

การสังเคราะห์ cDNA สายเดี่ยว

1. นำ RNA ที่ผ่านการกำจัดดีเอ็นเอ มาแบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 0.2 มล. หลอดละ 4 μl จำนวน 2 หลอด (สำหรับหลอดที่เติมและไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase

2. เติม oligodT primer หลอดละ 1 μl

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'	} เมื่อใช้พลาสมิด pCAMBIA1305.1
anti-chitinase	มีลำดับเบสคือ 5' ATC CAG AAC CAG AAC GCC 3'	
chitinase	มีลำดับเบสคือ 5' ACG CAA ACG CCG TCT ACT TCA	} เมื่อใช้พลาสมิด PBI121
	CCA A 3'	
anti-chitinase	มีลำดับเบสคือ 5' GCA TCC CAG AAC ATG CTG CCT	
	CCC A 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 95 °C เป็นเวลา 7 นาที

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที

Annealing อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 นาที

Extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนที่ 3 Final extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

ในขั้นตอนที่ 2 ทำซ้ำ 30 รอบ ขั้นตอนที่ 1 และ 3 ทำ 1 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยามาตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel 1.0 % และย้อมด้วย Ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้เครื่อง UV visible

3. ผลการทดลอง

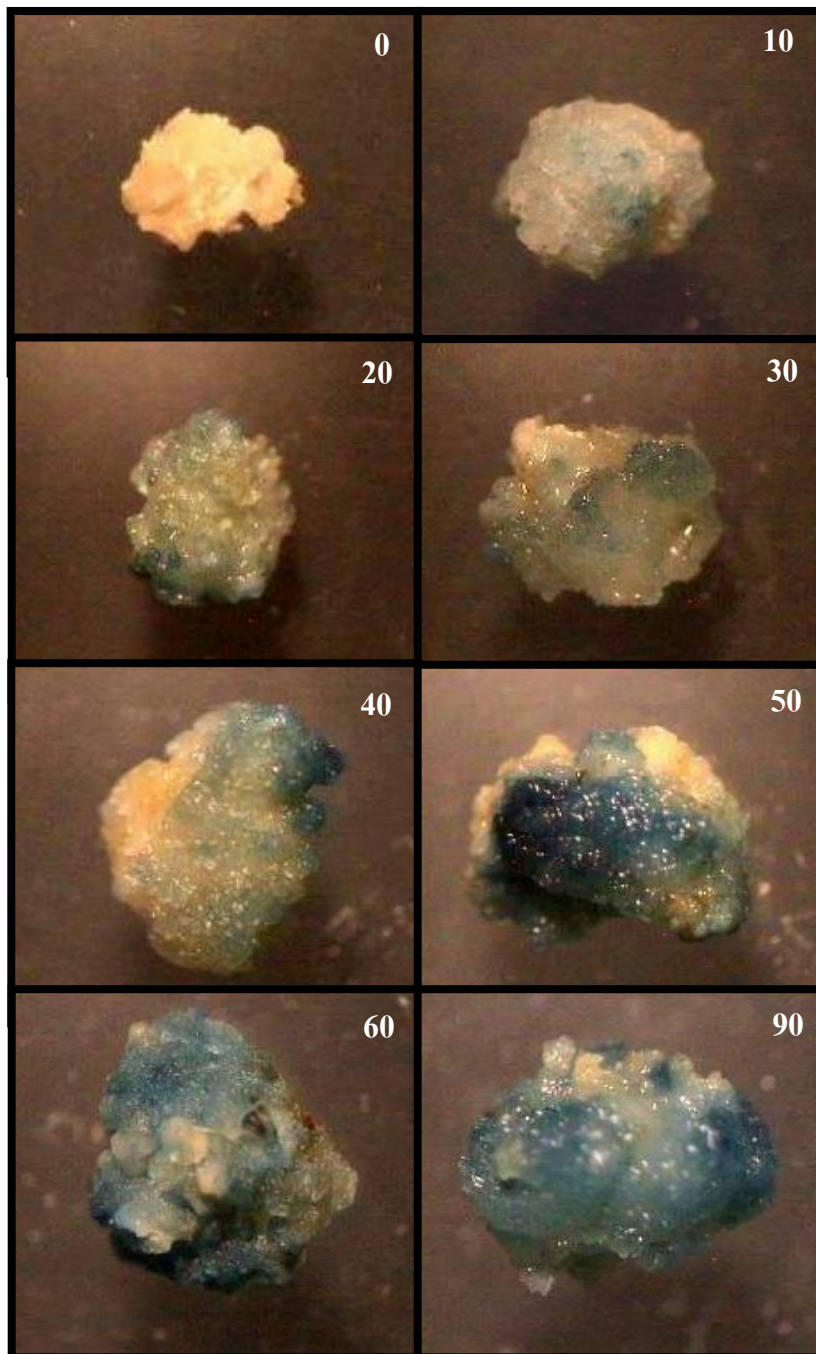
ผลการทดลองที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ร่วมกับแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 เป็นเวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 90 นาที พบว่า เมื่อคัดเลือกแคลลัสอ้อยที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินมาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยสามารถประเมินระดับการแสดงออกของยีนเป็น 4 ระดับคือ 0 ไม่มีการแสดงออกของยีน *gus* +1 มีการแสดงออกของยีน *gus* ต่ำ เนื้อเยื่อมีสีฟ้าเล็กน้อย +2 มีการแสดงออกของยีน *gus* ปานกลาง เนื้อเยื่อมีสีฟ้าปรากฏค่อนข้างมาก +3 มีการแสดงออกของยีน *gus* สูง เนื้อเยื่อมีสีฟ้าปรากฏมาก +4 มีการแสดงออกของยีน *gus* สูงมาก เนื้อเยื่อมีสีฟ้าเข้มปรากฏมากที่สุด จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาในการบ่มแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ร่วมกับ *Agrobacterium* 50, 60 และ 90 นาที มีระดับการแสดงออกของยีนสูงสุดโดยให้ค่าความเข้มสีฟ้ามากที่สุด (ตารางที่ 3 และภาพที่ 63) เมื่อนำเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ที่ระยะเวลาการบ่ม 50, 60 และ 90 นาที เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุดคือ 100% และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 64)

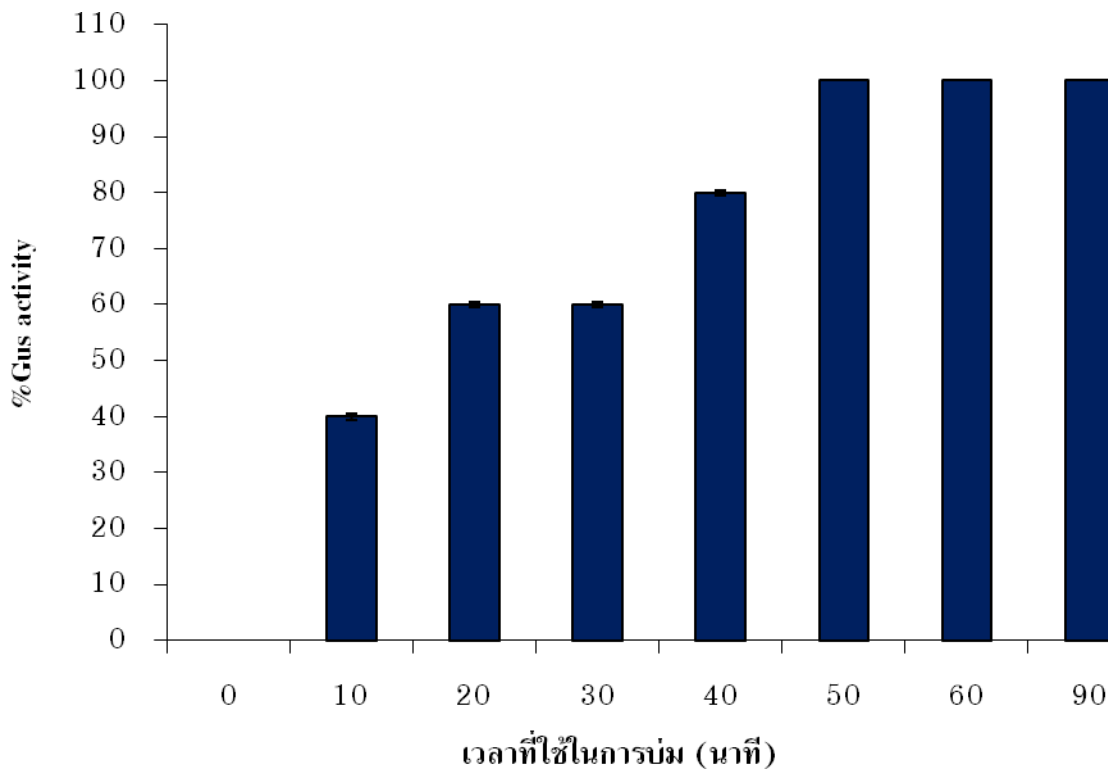
ตารางที่ 3 ระดับการแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* พันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ในระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 90 นาที

เวลาที่ใช้ในการบ่ม (นาที)	ระดับการแสดงออกของยีน
0	0
10	++
20	++
30	+++
40	+++
50	++++
60	++++
90	++++

หมายเหตุ; ++++ ดีที่สุด +++ ดีมาก ++ ดี + ปานกลาง 0 ไม่มี



ภาพที่ 63 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่
 บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* พันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ในระยะเวลา 0,
 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 90 นาที



ภาพที่ 64 เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* พันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ในระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 90 นาที

ผลการทดลองที่ 2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (PBI 121)

จากการทดลองบ่มแคลลัสอ้อย ร่วมกับ *Agrobacterium* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB โดยบ่มที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 90 นาที เมื่อทำการนับจำนวนแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกด้วยอาหารที่มีกานามัยซินเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ในแต่ละระยะการบ่มมีจำนวนแคลลัสที่ต้านทานต่อกานามัยซินแตกต่างกันออกไป (ดังตารางที่ 4) โดยจำนวนแคลลัสที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่เติมกานามัยซินมากที่สุดเมื่อใช้ระยะเวลาในการบ่ม 30 นาที ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การต้านทานต่อกานามัยซินเท่ากับ 72%

ตารางที่ 4 จำนวนแคลลัส้อยู่ที่ผ่านการบ่มร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (PBI 121) ระยะเวลาต่างๆ กัน ที่ต้านทานต่อกานามัยซินเป็นเวลา 30 วัน

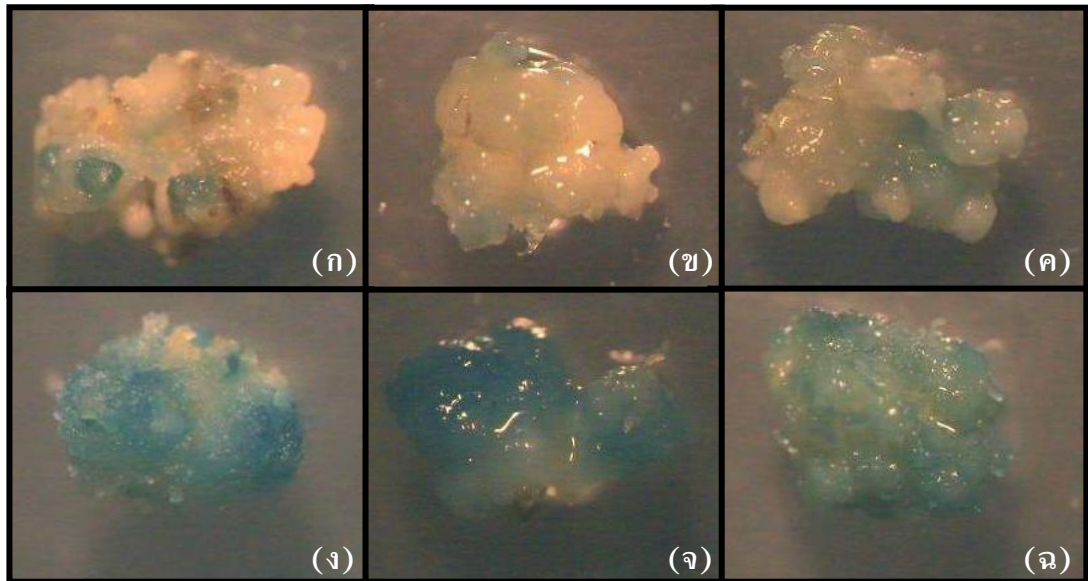
เวลาที่ใช้ในการบ่ม (นาทีก)	จำนวนแคลลัสที่รอดชีวิต		เปอร์เซ็นต์การต้านทาน ต่อกานามัยซิน (%)
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	
0	50	0	0
10	50	18	36
20	50	23	46
30	50	36	72
40	50	27	54
50	50	11	22
60	50	8	16
90	50	4	8

ผลการทดลองที่ 3 การส่งถ่ายยีน chitinase สู่แคลลัส้อยู่พันธุ์มิตรผล 99-94 โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment)

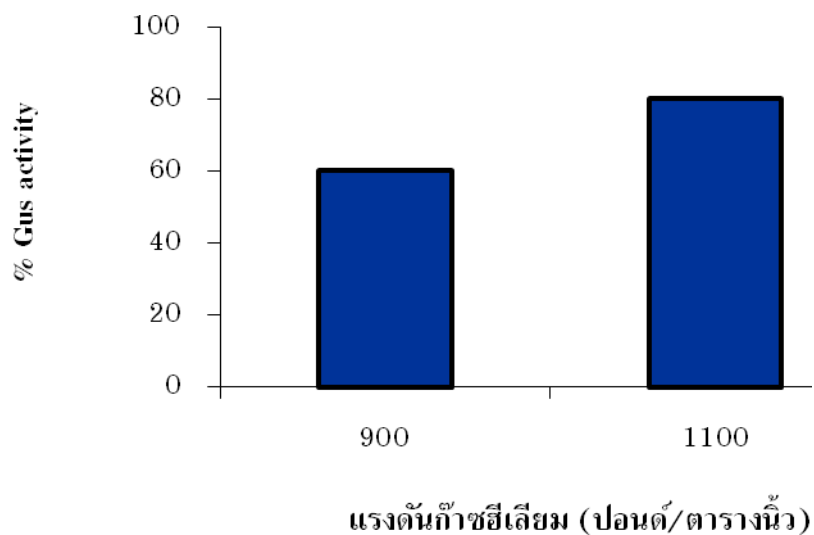
ผลการทดลองที่ 3.1 การเปรียบเทียบแรงดันก๊าซฮีเลียมที่ใช้ในการส่งถ่ายยีน

เมื่อนำแคลลัส้อยู่ที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิด pCAMBIA 1305.1 ซึ่งมียีน chitinase และใช้ rupture disc ขนาดทนแรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน gus ด้วยวิธี GUS assay พบว่า การส่งถ่ายยีนโดยใช้ความดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ /ตารางนิ้ว มีความเข้มของสีฟ้าที่เกิดจากการแสดงออกของยีน gus สูงสุดและสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน gus มากกว่าความดัน 900 ปอนด์/ตารางนิ้ว คือมีค่าเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 65 และ 66)

เมื่อนำแคลลัส้อยู่ที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิด PBI 121 ซึ่งมียีน chitinase และใช้ rupture disc ขนาดทนแรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว มานับจำนวนแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกด้วยอาหารที่มีกานามัยซินเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า จำนวนแคลลัสที่ต้านทานต่อกานามัยซินมีความแตกต่างกัน โดยจำนวนแคลลัสที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่เติมกานามัยซินมากที่สุดเมื่อใช้ แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การต้านทานต่อกานามัยซินเท่ากับ 25.73% (ดังตารางที่ 5)



ภาพที่ 65 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสกล้วยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่ทำการถ่ายยีนโดยใช้เครื่อง particle bombardment แรงดันก๊าซฮีเลียม 900 (ก-ค) และ 1100 psi (ง-ฉ)



ภาพที่ 66 เปอร์เซนต์การแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสกล้วยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่ทำการถ่ายยีนโดยใช้เครื่อง particle bombardment แรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1,100 psi

ตารางที่ 5 จำนวนแคลลัสย่อยที่ต้านทานต่อกานามัยซิน โดยใช้พลาสมิด PBI 121

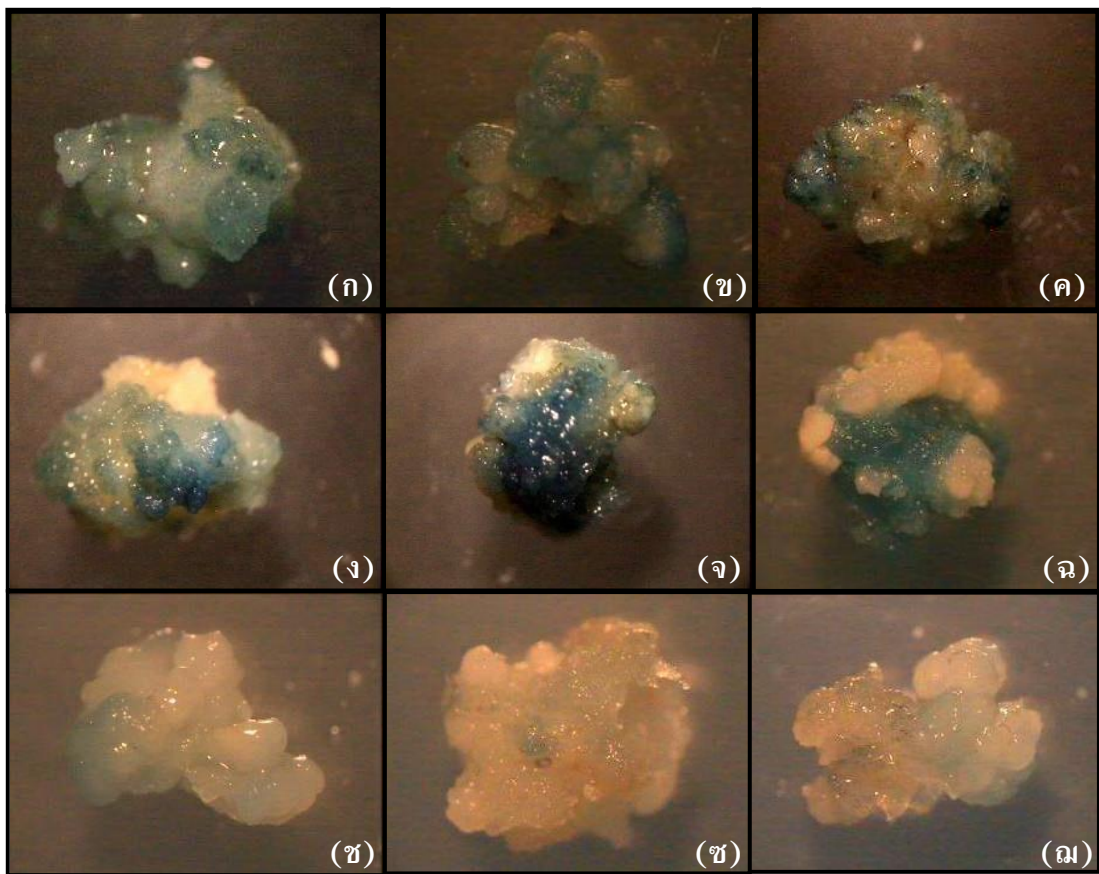
ที่ rupture disc ขนาดทนแรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว

Rupture disc ขนาดทน แรงดันก๊าซฮีเลียม ปอนด์/ตารางนิ้ว	จำนวนแคลลัสที่รอดชีวิต		เปอร์เซ็นต์การต้านทาน ต่อกานามัยซิน (%)
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	
900	312	42	13.46
1,100	307	79	25.73

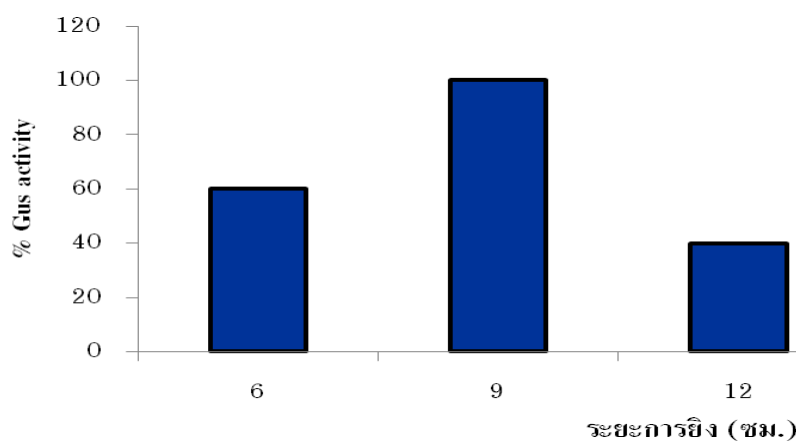
ผลการทดลองที่ 3.2 การเปรียบเทียบระยะทางระหว่างจุดปล่อยกระสุน (stopping screen) ถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย (target tissue)

จากการส่งถ่ายยีนสู่แคลลัสของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 โดยใช้พลาสมิด pCAMBIA 1305.1 และใช้กระสุนทั้งสแตน ขนาด 1.1 μm มีระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 3 ระยะ คือ 6, 9 และ 12 ซม. ใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม เท่ากับ 900 ปอนด์/ตารางนิ้ว เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่เต็มไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 25 มก./ล. เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีน พบว่ามีการแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสของอ้อยที่ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมายทั้ง 3 ระยะคือ 6, 9 และ 12 ซม. โดยที่ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 ซม. มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด มีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าความเข้มข้นของสีฟ้าจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด ในขณะที่ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 และ 12 ซม. มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* เท่ากับ 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และความเข้มของสีฟ้าในแคลลัส ที่ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมายระยะ 6 ซม. สูงกว่าระยะ 12 ซม. (ภาพที่ 67 และ 68)

การส่งถ่ายยีนสู่แคลลัสของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 โดยใช้พลาสมิด PBI 121 และใช้กระสุนทั้งสแตน ขนาด 1.1 μm ที่ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6, 9 และ 12 ซม. และใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม เท่ากับ 900 ปอนด์/ตารางนิ้ว โดยทดสอบจากแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกด้วยอาหารที่มีกานามัยซินความเข้มข้น 1,250 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน พบว่าจำนวนแคลลัสที่ต้านทานต่อกานามัยซินมีความแตกต่างกัน โดยจำนวนแคลลัสที่สามารถเจริญและมีชีวิตรอดมากที่สุดได้จากระยะยิง 9 ซม. ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การต้านทานต่อกานามัยซิน เท่ากับ 20.32% (ดังตารางที่ 6)



ภาพที่ 67 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่ทำการถ่ายยีนโดยใช้เครื่อง particle bombardment แรงดันก๊าซฮีเลียม 900 psi ที่ระยะการยิง 6 ซม. (ก-ค) 9 ซม. (ง-ฉ) 12 ซม. (ช-ณ)



ภาพที่ 68 เปอร์เซนต์การแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่ทำการถ่ายยีนโดยใช้เครื่อง particle bombardment แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 psi ที่ระยะการยิง 6 ซม. 9 ซม. และ 12 ซม.

ตารางที่ 6 จำนวนแคลลัสอ้อยที่ต้านทานต่อกานามัยซินเป็นเวลา 30 วัน โดยใช้พลาสมิด PBI 121 ที่ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6, 9 และ 12 ซม.

ระยะห่างระหว่างจุดปล่อย กระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย (ซม.)	จำนวนแคลลัสที่รอดชีวิต		เปอร์เซ็นต์การต้านทาน ต่อกานามัยซิน (%)
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	
6	315	38	12.06
9	310	63	20.32
12	308	17	5.52

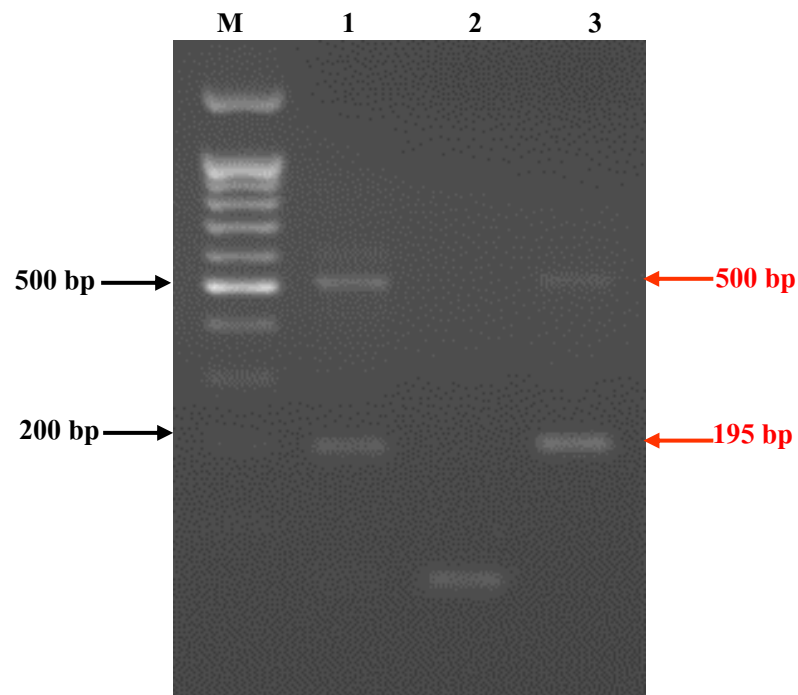
ผลการทดลองที่ 4 การตรวจสอบการส่งถ่ายยีนในแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน chitinase

ผลการทดลองที่ 4.1 การตรวจสอบการสอดแทรกของยีน chitinase โดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

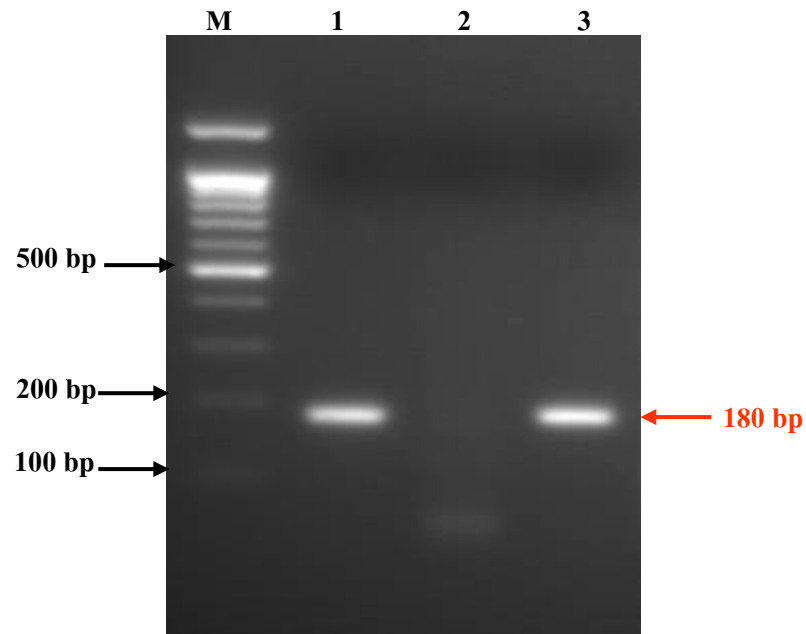
จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่ผ่านการส่งถ่ายยีน chitinase โดยใช้ *A. tumefaciens* ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA1305.1 และดีเอ็นเอของแคลลัสอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน มาทำการตรวจการสอดแทรกของยีนโดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer 3 ชนิด คือ 35S, NOS และ chitinase พบว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน เมื่อตรวจสอบด้วย gel electrophoresis โดยใช้ 35S เป็นไพรเมอร์ พบขึ้นดีเอ็นเอขนาด 500 และ 195 คู่เบส เมื่อใช้ NOS เป็นไพรเมอร์ พบขึ้นดีเอ็นเอขนาด 180 คู่เบส เมื่อใช้ chitinase เป็นไพรเมอร์ พบขึ้นดีเอ็นเอขนาด 464 คู่เบส ภายในแคลลัสของอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ซึ่งเท่ากับขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 แสดงว่ามีการสอดแทรกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปสู่แคลลัสของอ้อย ในขณะที่แคลลัสอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนตรวจไม่พบดีเอ็นเอเหล่านี้ (ภาพที่ 69, 70 และ 71)

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน chitinase โดยใช้ *A. tumefaciens* ซึ่งมีพลาสมิด PBI121 และดีเอ็นเอของแคลลัสอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน มาทำการตรวจการสอดแทรกของยีนโดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer 3 ชนิด คือ 35S, NOS และ chitinase พบว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแคลลัสอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน เมื่อตรวจสอบด้วย gel electrophoresis โดยใช้ 35S เป็นไพรเมอร์ พบขึ้นดีเอ็นเอขนาด 195 คู่เบส เมื่อใช้ NOS เป็นไพรเมอร์ พบขึ้นดีเอ็นเอขนาด 180 คู่เบส เมื่อใช้ chitinase เป็นไพรเมอร์ พบขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1200 คู่เบส ภายในแคลลัสของอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ซึ่งเท่ากับขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพลาสมิด PBI 121

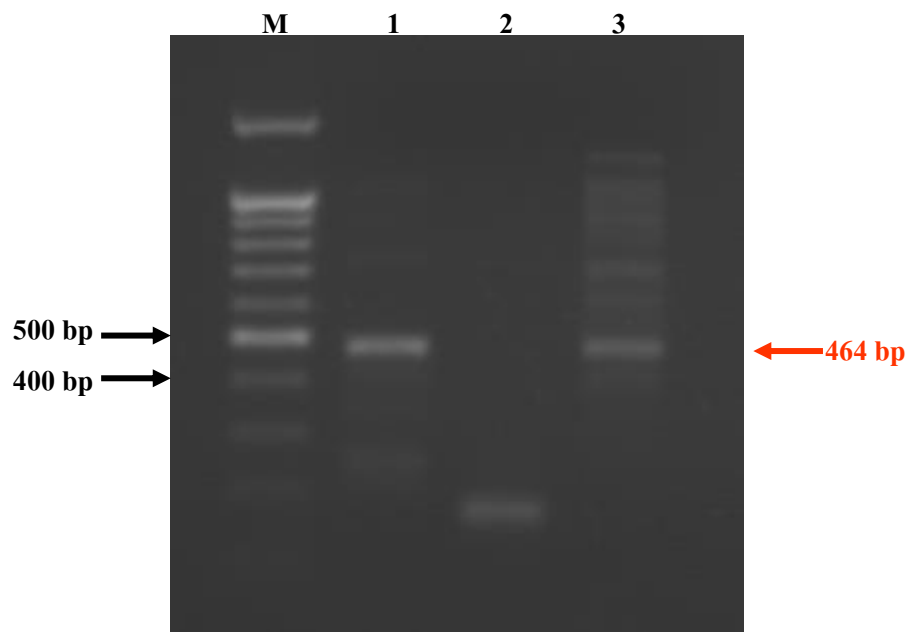
แสดงว่ามีการสอดแทรกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปสู่เซลล์ของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ในขณะที่
เซลล์อ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนตรวจไม่พบดีเอ็นเอเหล่านี้ (ภาพที่ 72, 73 และ 74)



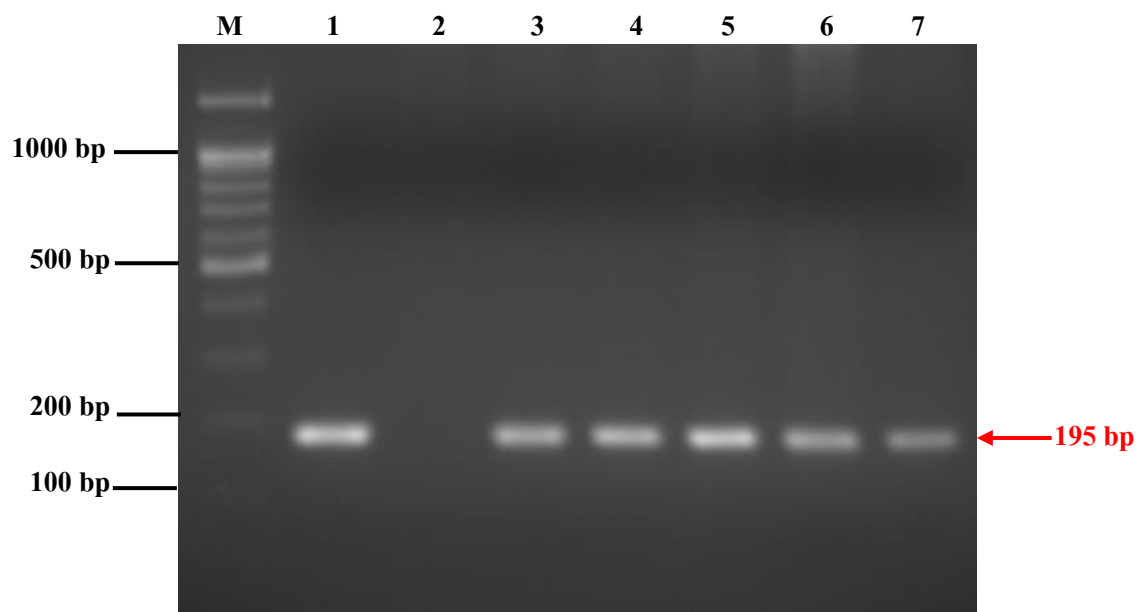
ภาพที่ 69 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S คู่กับ
anti-35S เลน M = 100 bp DNA Ladder, เลน 1 = พลาสมิด
pCAMBIA1305.1, เลน 2 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน, เลน 3 = ดี
เอ็นเอของอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens*



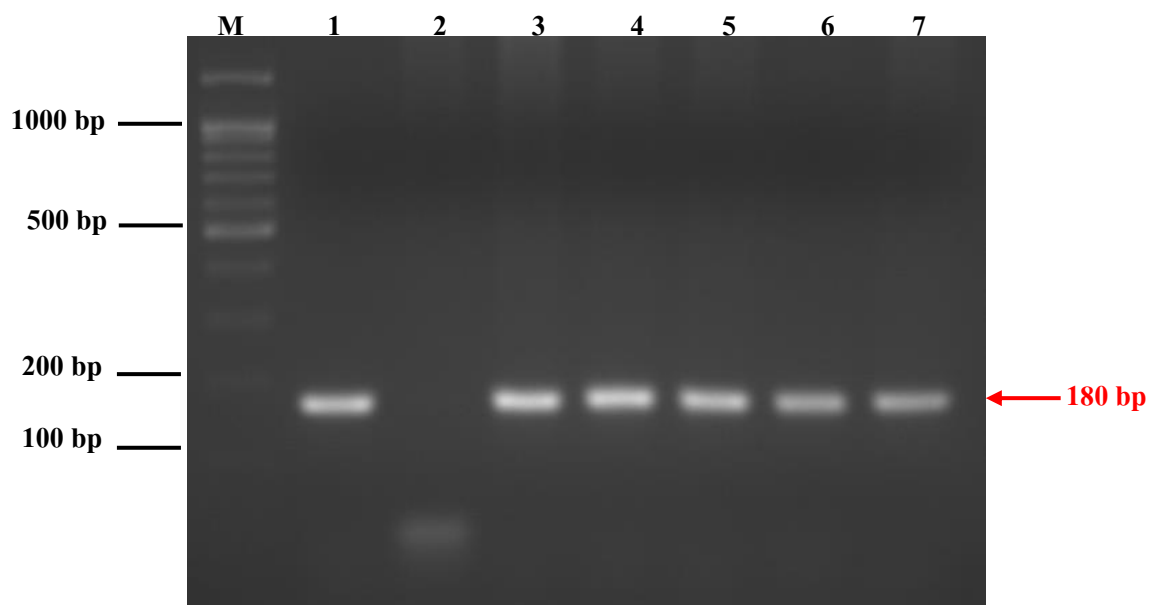
ภาพที่ 70 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS คู่กับ anti-NOS เลน M = 100 bp DNA Ladder, เลน 1 = พลาสมิด pCAMBIA1305.1, เลน 2 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน, เลน 3 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens*



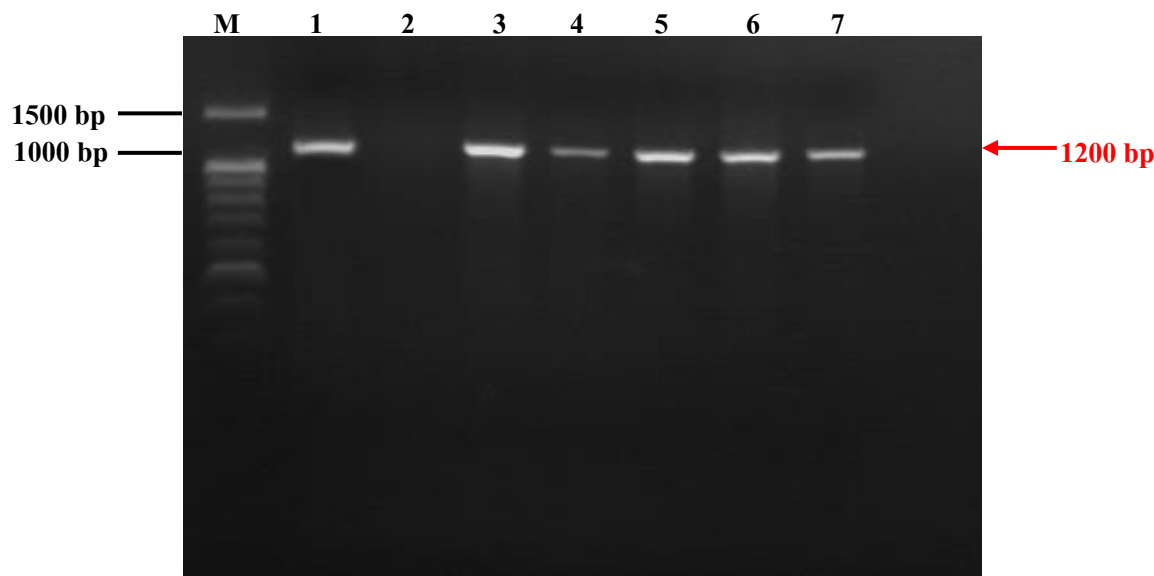
ภาพที่ 71 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ chitinase คู่กับ anti-chitinase เลน M = 100 bp DNA Ladder, เลน 1 = พลาสมิด pCAMBIA1305.1, เลน 2 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน, เลน 3 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens*



ภาพที่ 72 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S คู่กับ anti-35S เลน M = 100 bp DNA Ladder, เลน 1 = พลาสมิด pCAMBIA1305.1, เลน 2 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน, เลน 3-7 ดีเอ็นเอของอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens*



ภาพที่ 73 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS คู่กับ anti-NOS เลน M = 100 bp DNA Ladder, เลน 1 = พลาสมิด pCAMBIA1305.1, เลน 2 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน, เลน 3 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens*



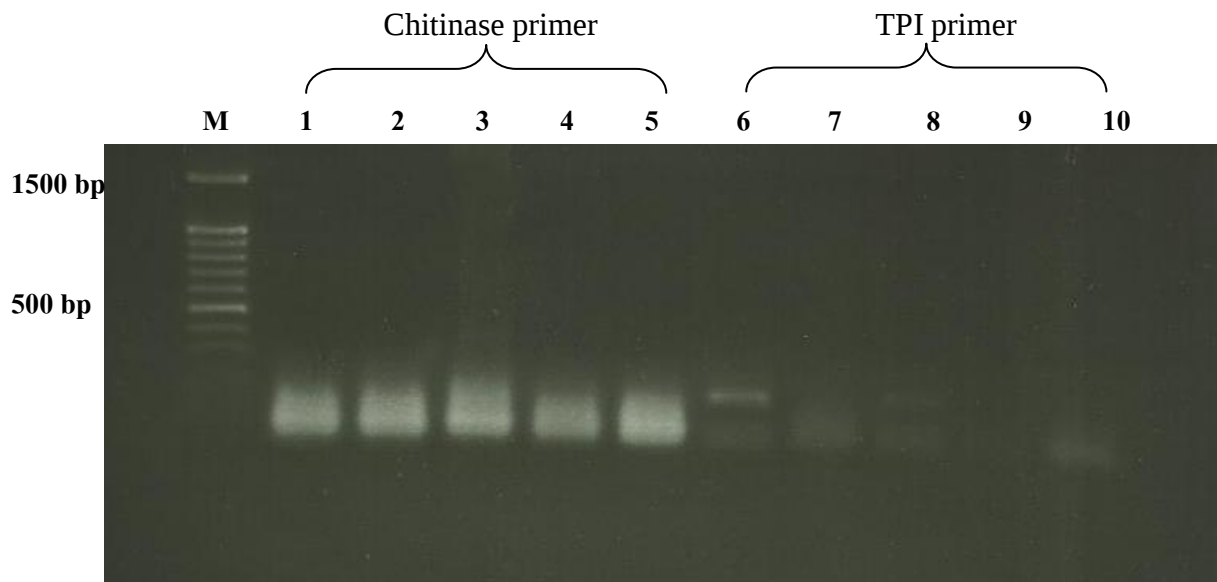
ภาพที่ 74 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ chitinase คู่กับ anti-chitinase เลน M = 100 bp DNA Ladder, เลน 1 = พลาสมิด pCAMBIA1305.1, เลน 2 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน, เลน 3-7 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens*

ผลการทดลองที่ 4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน chitinase โดยเทคนิค RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

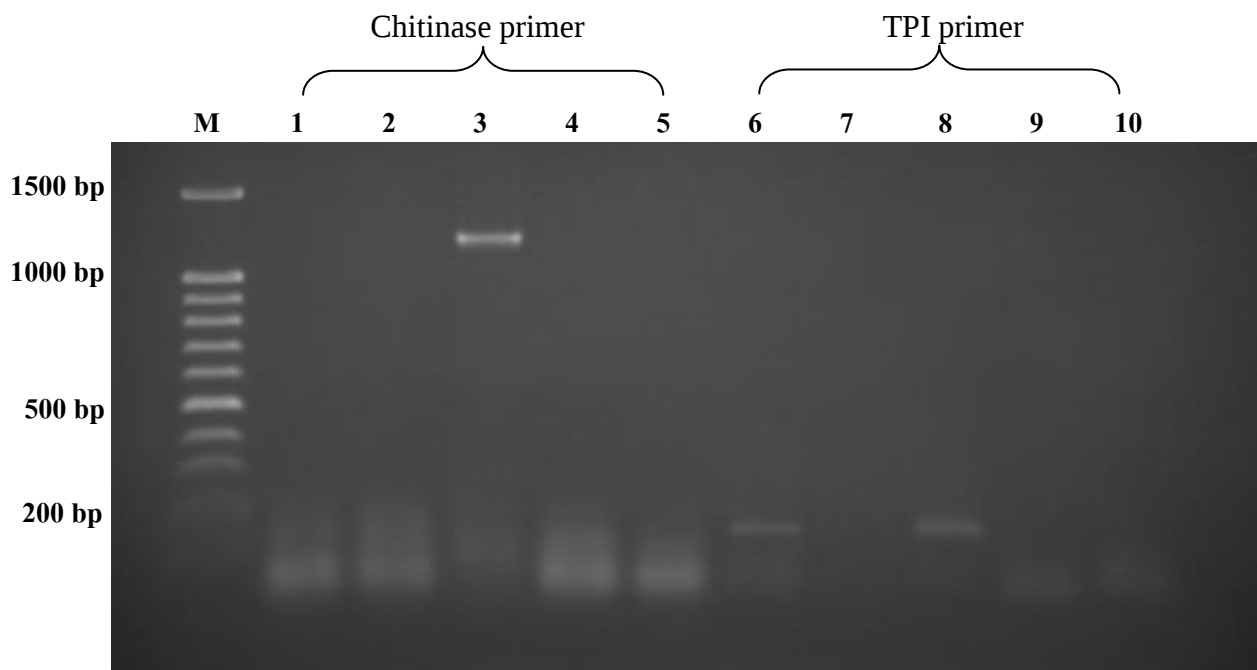
จากการนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่ผ่านการส่งถ่ายยีน chitinase ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA1305.1 และอาร์เอ็นเอของอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน มาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primer 2 ชนิด คือ chitinase และ TPI พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ chitinase ไม่พบแถบดีเอ็นเอ (ที่คาดว่าจะพบ) ขนาด 464 คู่เบส ในอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน และเมื่อใช้ไพรเมอร์ TPI พบแถบดีเอ็นเอขนาด 176 คู่เบส ในตัวอย่างอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนและอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนรวมกับการเติมเอนไซม์ reverse transcriptase ส่วนอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนและอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนแต่ไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว (ภาพที่ 74)

จากการนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน chitinase ซึ่งมีพลาสมิด PBI121 และอาร์เอ็นเอของอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน มาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primer 2 ชนิด คือ chitinase และ TPI พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ chitinase พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบส ในอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนรวมกับการเติมเอนไซม์ reverse transcriptase ส่วนอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนแต่ไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase และอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว และเมื่อใช้ไพรเมอร์

TPI พบแถบดีเอ็นเอขนาด 176 คู่เบส ในตัวอย่างอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนและอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนร่วมกับการเติมเอนไซม์ reverse transcriptase ส่วนอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนและอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนแต่ไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว (ภาพที่ 75)



ภาพที่ 75 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน เมื่อใช้พลาสมิด pCAMBIA1305.1 โดยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ chitinase คู่กับ anti-chitinase (เลน 1-5) และใช้ไพรเมอร์ TPI คู่กับ anti-TPI (เลน 6-10) เลน M = 100 bp DNA Ladder, เลน 1 และ 6 = อ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีนและเติมเอนไซม์ reverse transcriptase, เลน 2 และ 7 = อ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีนและไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase, เลน 3 และ 8 = อ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนและเติมเอนไซม์ reverse transcriptase, เลน 4 และ 9 = อ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนและไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase , เลน 5 และ 10 = น้ำ



ภาพที่ 76 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนเมื่อใช้พลาสมิด PBI121 โดยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ chitinase คู่กับ anti-chitinase (เลน 1-5) และใช้ไพรเมอร์ TPI คู่กับ anti-TPI (เลน 6-10) เลน M = 100 bp DNA Ladder, เลน 1 และ 6 = อ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีนและเติมเอนไซม์ reverse transcriptase, เลน 2 และ 7 = อ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีนและไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase, เลน 3 และ 8 = อ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนและเติมเอนไซม์ reverse transcriptase, เลน 4 และ 9 = อ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนและไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase , เลน 5 และ 10 = น้ำ

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ร่วมกับ *A. tumefaciens* มีความจำเป็น เนื่องจากถ้าบ่มแคลลัสอ้อยร่วมกับ *A. tumefaciens* นานเกินไปจะทำให้แคลลัสติดเชื้อและตายหรือมีอัตราการเจริญลดลง จากการทดลองพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ร่วมกับ *A. tumefaciens* pCAMBIA 1305.1 และ pBI 121 คือ 50 และ 30 นาที ตามลำดับ Manickavasagum *et al.* (2004) รายงานว่าการบ่มแคลลัสอ้อยร่วมกับ *A. tumefaciens* เป็นเวลานานจะเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนแต่ไม่ควรเกิน 4 วันเพราะจะเพิ่มปัญหาในการกำจัด *A. tumefaciens* แต่อย่างไรก็ดี เวลาที่เหมาะสมในการบ่ม คือ 2 ถึง 4 วัน

จากการศึกษาการส่งถ่ายยีนโดยใช้ particle bombardment ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 และมียีน chitinase โดยใช้ rupture disc ขนาดทนแรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่า ความเข้มข้นของไฟฟ้าในแคลลัสอ้อยที่เกิดจากการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แรงดันก๊าซ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว ส่วนการส่งถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิด pBI 121 ซึ่งมียีน chitinase และใช้ rupture disc ขนาดทนแรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว พบว่า จำนวนแคลลัสที่ต้านทานต่อกานามัยซินมีความแตกต่างกัน โดยจำนวนแคลลัสที่สามารถเจริญและมีชีวิตรอดได้ในอาหารที่เติมกานามัยซินดีที่สุดคือ แคลลัสที่ได้จากการยิงโดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การต้านทานต่อกานามัยซินเท่ากับ 25.73%

จากการส่งถ่ายยีนสู่แคลลัสของอ้อยโดย particle bombardment ใช้พลาสมิด pCAMBIA 1305.1 และใช้กระสุนทังสเตน ขนาด 1.1 μm มีระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6, 9 และ 12 ซม. ใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม เท่ากับ 900 ปอนด์/ตารางนิ้ว มาตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีน พบว่าระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 ซม. มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด มีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีความเข้มข้นของไฟฟ้า สูงสุด ในขณะที่ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 และ 12 ซม. มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* เท่ากับ 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการส่งถ่ายยีนสู่แคลลัสของอ้อยโดยใช้ พลาสมิด pBI 121 และใช้กระสุนทังสเตน ขนาด 1.1 μm มีระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6, 9 และ 12 ซม. โดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมเท่ากับ 900 ปอนด์/ตารางนิ้ว พบว่า แคลลัสที่อยู่ในระยะการยิง 9 ซม. สามารถเจริญได้ในอาหารที่เติมกานามัยซินดีที่สุด ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การต้านทานต่อกานามัยซินเท่ากับ 20.32%

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน chitinase โดยใช้ *A. tumefaciens* ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 และดีเอ็นเอของแคลลัสอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน มาทำการตรวจการสอดแทรกของยีนโดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer 3 ชนิด คือ 35S, NOS และ chitinase พบว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของอ้อยที่ได้รับ

การส่งถ่ายยีน เมื่อตรวจสอบด้วย gel electrophoresis โดยใช้ 35S เป็นไพรเมอร์ พบชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 500 และ 195 คู่เบส เมื่อใช้ NOS เป็นไพรเมอร์ พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 180 คู่เบส เมื่อใช้ chitinase เป็นไพรเมอร์ พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 464 คู่เบส ในแคลลัสของอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ซึ่งเท่ากับขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 แสดงว่ามีการสอดแทรกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าสู่แคลลัสของอ้อยในขณะที่แคลลัสอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนตรงไม่พบดีเอ็นเอเหล่านี้

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน chitinase โดยใช้ *A. tumefaciens* ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 มาทำการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer 3 ชนิด คือ 35S, NOS และ chitinase พบว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแคลลัสอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน เมื่อตรวจสอบด้วย gel electrophoresis โดยใช้ 35S เป็นไพรเมอร์ พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 195 คู่เบส เมื่อใช้ NOS เป็นไพรเมอร์ พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 180 คู่เบส เมื่อใช้ chitinase เป็นไพรเมอร์ พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบส ในแคลลัสของอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ซึ่งเท่ากับขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพลาสมิด pBI 121

จากการนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน chitinase ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 มาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primer 2 ชนิด คือ chitinase และ TPI (House keeping gene) พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ chitinase ไม่พบแถบดีเอ็นเอ(ที่คาดว่าจะพบ) ขนาด 464 คู่เบส ในอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน และเมื่อใช้ไพรเมอร์ TPI พบแถบดีเอ็นเอขนาด 176 คู่เบส ในตัวอย่างอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

จากการนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน chitinase ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 และอาร์เอ็นเอของอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน มาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primer 2 ชนิด คือ chitinase และ TPI พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ chitinase พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบส ในอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน และเมื่อใช้ไพรเมอร์ TPI พบแถบดีเอ็นเอขนาด 176 คู่เบส ในตัวอย่างอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนและอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน เพราะ TPI ซึ่งเป็น House keeping gene เป็นยีนที่สามารถพบได้ในพืชทั่วไป Arencibia *et al.* (1997)

อาจสรุปผลจากการทดลองได้ว่า สามารถถ่ายยีน chitinase ที่มีอยู่ใน pBI 121 สู่อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ได้ แต่ไม่สามารถถ่ายยีน chitinase ที่มีอยู่ใน pCAMBIA 1305.1 สู่อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ได้