

การถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ในยาสูบ

Chloroplast Transformation in Tobacco

คำนำ

ปัจจุบันพืชดัดแปรพันธุกรรม (Genetics Modified Plants, GMPs) หรือ พืชแปลงพันธุ์ (transgenic plant) มีบทบาทสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชในการสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะพิเศษเพิ่มขึ้น เช่น พืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช พืชต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช ตลอดจนการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ โดยความสำเร็จของพืชดัดแปรพันธุกรรมเกิดจากการนำความรู้และเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ที่เป็นการตัดต่อยีนจากสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์หนึ่งเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) แล้วนำกลับเข้าไปในสิ่งมีชีวิตอีกสายพันธุ์หนึ่งด้วยกระบวนการถ่ายยีน (Belize, 2002) ซึ่งนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตพืช เพื่อลดปัญหาด้านระยะเวลาและปัญหาจากการปรับปรุงพันธุ์แบบปกติ (conventional breeding) (กษิตศ, 2544)

การถ่ายยีนในพืช โดยส่วนใหญ่เป็นการถ่ายยีนเป้าหมายสู่นิวเคลียส ทำให้เกิดคำถามและความวิตกกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosafety) ของพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมาย โดยยีนเป้าหมายที่ถ่ายเข้าสู่พืชนั้นมีโอกาสแพร่กระจายผ่านทางละอองเกสรสู่สิ่งแวดล้อม เช่น การแพร่กระจายของละอองเกสรและเมล็ดจากต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชสู่พืชสายพันธุ์เดียวกันหรือวัชพืชสายพันธุ์ใกล้เคียง ทำให้พืชที่ไม่ใช่เป้าหมายได้รับยีนดังกล่าวและไม่สามารถทำลายด้วยสารกำจัดวัชพืชชนิดนั้น ๆ (Daniell *et al.*, 1998) หรือ ละอองเกสรที่มียีนเป้าหมายมีโอกาสที่จะก่ออันตรายต่อแมลงที่มีประโยชน์ในการช่วยผสมพันธุ์พืช เช่น ผีเสื้อ ส่งผลให้ระบบนิเวศเสียสมดุล เช่น การถ่ายยีน *Bt* เข้าสู่ฝ้ายเพื่อกำจัดหนอนเจาะสมอฝ้าย (Losey *et al.*, 1999)

แนวทางหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าว คือ การถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ (chloroplast transformation) (Bogorad, 2000) เนื่องจากคลอโรพลาสต์เป็นแหล่งพันธุกรรมแหล่งหนึ่งของเซลล์พืชที่อยู่ในไซโตพลาสซึม มีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมผ่านทางต้นแม่ (maternal inheritance) เป็นการถ่ายทอดยีนผ่านทางไข่ของต้นแม่แต่ไม่ถ่ายทอดทางละอองเกสรของต้นพ่อ ดังนั้นยีนเป้าหมายจึงไม่สามารถถ่ายทอดผ่านทางละอองเกสรจากพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

เข้าสู่พืชสายพันธุ์ใกล้เคียงชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้การถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์มีข้อดีมากกว่าการถ่ายยีนเข้าสู่นิวเคลียสหลายประการ เช่น ทำให้พืชที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์มีระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายสูงขึ้น สามารถถ่ายยีนเป้าหมายในลักษณะที่เป็นโอเปอรอน (operon) ทำให้มีการแสดงออกของกลุ่มยีนภายใต้การควบคุมโปรโมเตอร์เดียวกันและไม่ปรากฏตำแหน่งยีนเป้าหมายสอดแทรกอยู่บนโครโมโซมมากกว่า 1 ตำแหน่ง (Bel *et al.*, 2001) ทำให้มีความสนใจศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ในพืชหลายชนิด เช่น *Arabidopsis* (Yoshimoto *et al.*, 2001) และพืชมะเขือ (Zubko *et al.*, 2004) ยาสูบเป็นพืชต้นแบบชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาการถ่ายยีน เนื่องจากยาสูบมีข้อมูลทางพันธุกรรมของคลอโรพลาสต์ที่สมบูรณ์ (Wakasugi *et al.*, 1998) และทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อพัฒนาเป็นต้นได้ง่าย (Svab *et al.*, 1990 และ Svab and Maliga, 1993)

วัตถุประสงค์

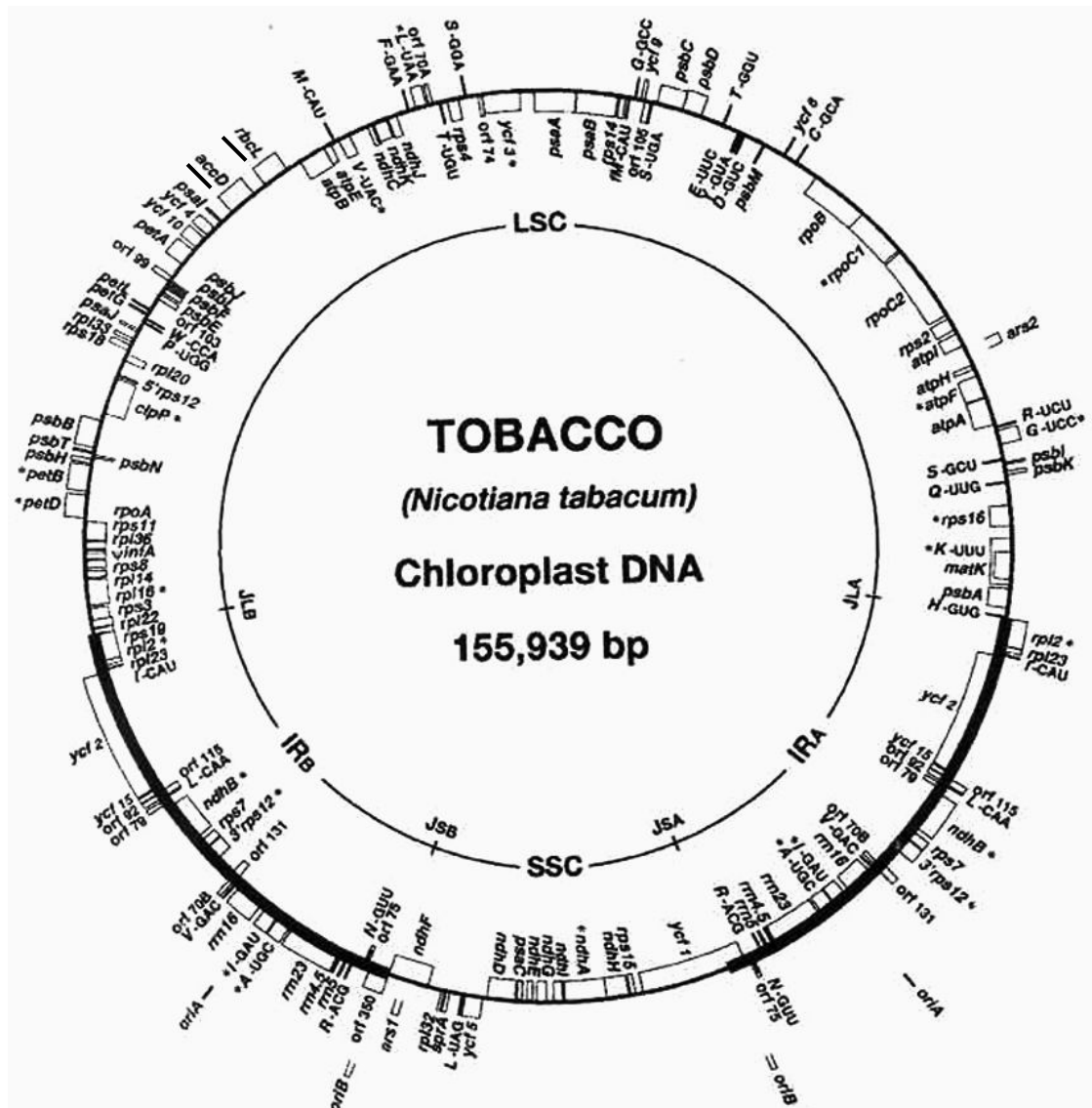
1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีนจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์เข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ยาสูบด้วยเครื่องยิงอนุภาค
2. ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *uidA* แบบชั่วคราวด้วยวิธี GUS histochemical assay ของปัจจัยที่ใช้ในการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคและพื้นที่การกระจายตัวของอนุภาค
3. คัดเลือกใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์และตรวจสอบต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกในระดับโมเลกุล

ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะและหน้าที่ของคลอโรพลาสต์

คลอโรพลาสต์ เป็นแหล่งพันธุกรรมหนึ่งของเซลล์พืช นอกเหนือจากแหล่งพันธุกรรมในนิวเคลียส (nucleus) และ ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) คลอโรพลาสต์มีวิวัฒนาการมาจากไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ทำหน้าที่โดยตรงเกี่ยวกับการสังเคราะห์แสง คลอโรพลาสต์พบส่วนใหญ่ในส่วนของพืชที่ได้รับแสง มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช บางชนิดเป็นรูปทรงกลมรี รูปไข่ รูปจานหรือถ้วย เป็นต้น ในพืชชั้นสูงคลอโรพลาสต์มักเป็นรูปกลมรี คล้ายไข่ ยาว 5-8 ไมโครเมตร หนา 3-4 ไมโครเมตร (Buchanan *et al.*, 2000) คลอโรพลาสต์เป็นออร์แกเนลล์ (organelle) ที่ประกอบด้วยเมมเบรน 2 ชั้น คล้ายกับไมโทคอนเดรีย คือ เมมเบรนชั้นนอกและชั้นใน ภายในคลอโรพลาสต์มีลักษณะเป็นของเหลวเรียกว่า สโตรมา (stroma) บริเวณเมมเบรนของไทลาคอยด์ (thylakoids) มีรงควัตถุทำหน้าที่เก็บเกี่ยวพลังงานแสง เพื่อใช้กระตุ้นการแตกตัวของน้ำ (H_2O) และเกิดพลังงาน ATP กับ NADPH ส่วนไทลาคอยด์ที่เรียงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ เรียกว่า กรานัม (granum) แต่ละกรานัมเชื่อมต่อกันเป็นระบบด้วยสโตรมาไทลาคอยด์ (stroma thylakoids) หรือสโตรมาลามลลา (stroma lamellae) ส่วนดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) ไรโบโซม (ribosomes) และเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์แสงอยู่ในสโตรมา (Salisbury, 1992 and Ross, 1991)

จีโนมคลอโรพลาสต์ เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่รูปวงแหวนและมีการจำลองตัวของดีเอ็นเอแบบ double rolling-circle model จีโนมคลอโรพลาสต์ในพืชทั่ว ๆ ไป แบ่งเป็น 4 ส่วน คือ ส่วน large region of single-copy genes (LSC) กับ small region of single-copy genes (SSC) อย่างละ 1 ส่วน และส่วนของ inverted repeat ชุด A (IR_A) และ ชุด B (IR_B) (Buchanan *et al.*, 2000) ในพืชชั้นสูง จีโนมคลอโรพลาสต์มีขนาด 120-160 กิโลเบส (kb) เช่น จีโนมคลอโรพลาสต์ของยาสูบมีขนาด 155,939 คู่เบส (bp) (ภาพที่ 1) และ ข้าวมีขนาดเป็น 134,525 คู่เบส จำนวนยีนประมาณ 130 ยีน เป็นยีนสร้าง rRNA ชนิด 16s 23s 4.5s และ 5s ยีนที่สร้าง tRNA ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง เช่น ยีน *psbA* (Staub and Paliga, 1993) และ open reading frames (ORFs) ที่ยังไม่รู้หน้าที่อย่างชัดเจน (Russell, 2001) เนื่องจากแผนที่จีโนมคลอโรพลาสต์ของยาสูบได้มีการศึกษาและมีข้อมูลอย่างละเอียด ดังนั้นคลอโรพลาสต์ของยาสูบจึงเป็นเป้าหมายที่ใช้เป็นต้นแบบในการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ต่อไป



ภาพที่ 1 แผนที่จีโนมคลอโรพลาสต์ของยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ขนาด 155,939 คู่เบส ประกอบด้วยบริเวณลำดับเบส LSC, SSC, IR_A และ IR_B

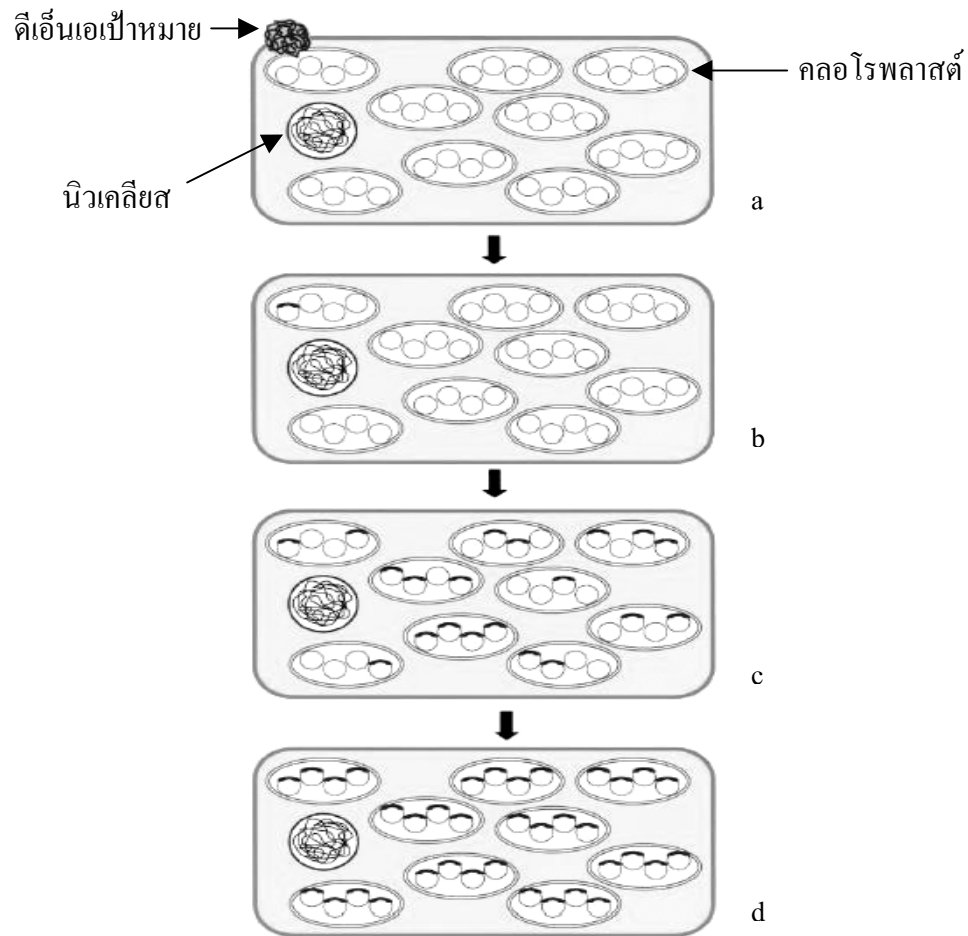
ที่มา: Wakasugi *et al.* (1998)

2. ข้อได้เปรียบของการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์

นักวิจัยหลายท่านให้ความสำคัญต่อการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีข้อได้เปรียบมากกว่าการถ่ายยีนเข้าสู่นิวเคลียสพืชหลายประการ (Carrer, 2001 และ Carrer *et al.*, 1993 และ Daniell *et al.*, 1998 และ Svab *et al.*, 1990) ได้แก่

2.1 ระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายและการสะสมโปรตีนเป้าหมายสูง

ในเซลล์พืชหนึ่งเซลล์คลอโรพลาสต์มีจำนวนดีเอ็นเอมากกว่านิวเคลียส ซึ่งคิดเป็น 10-20 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ เพราะสถานะที่เซลล์เป็นดิพลอยด์ (diploid plant cell, 2n) นิวเคลียสมีจำนวนชุดดีเอ็นเอเป็น 2 ชุด ขณะที่คลอโรพลาสต์มีจำนวนชุดดีเอ็นเอประมาณ 10,000 ชุด (ภาพที่ 2a) โดยคำนวณจากจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์ใบยาสูบหนึ่งเซลล์ที่มีประมาณ 50-100 คลอโรพลาสต์ต่อเซลล์ 10-20 นิวคลีโอไทด์ต่อจีโนมคลอโรพลาสต์ และ 5-10 ชุดดีเอ็นเอต่อนิวคลีโอได์ (nucleoid) (Bel *et al.*, 2001 และ Bock, 2001b) แม้ว่าการถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์จะเกิดการถ่ายยีนเข้าสู่ชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์เพียงหนึ่งชุดดีเอ็นเอ (ภาพที่ 2b) เมื่อนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีนเป้าหมายมาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนาระดับความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ที่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมาย ส่งผลให้ภายในเซลล์เกิดสภาวะที่มีชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ 2 แบบ คือ ชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์แบบที่ได้รับและไม่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมาย เรียกสภาวะนี้ว่า “heteroplasmic” (ภาพที่ 2c) และจากการแบ่งเซลล์หลาย ๆ รอบ รวมทั้งการเกิด cytoplasmic sorting ซึ่งเป็นกระบวนการคัดแยกพันธุกรรมในไซโตพลาสซึมที่ทำให้ชุดดีเอ็นเอทั้งหมดของคลอโรพลาสต์หรือไมโทคอนเดรียมีลักษณะพันธุกรรมเหมือนกันทุกชุดดีเอ็นเอ (Anil, 2001) ดังนั้นเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมายประกอบด้วยชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ที่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมายทุกชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ (ประมาณ 10,000 ชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์ใบพืชหนึ่งเซลล์) เรียกสภาวะนี้ว่า “homoplasmic” (ภาพที่ 2d) การถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ของพืชที่ทำให้มีการแสดงออกของยีนเป้าหมายในทุกชุดดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ของเซลล์พืชหนึ่งเซลล์ ส่งผลให้ระดับโปรตีนเป้าหมายสูงกว่าการถ่ายยีนเข้าสู่นิวเคลียส (Bock, 2001a) สอดคล้องกับรายงานของ Kota *et al.* (1999) ซึ่งได้ทดลองถ่ายยีน (*Bt*) *Cry2Aa2* เข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ของใบยาสูบ ที่มีจำนวนชุดดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ 5,000-10,000 ชุดดีเอ็นเอต่อเซลล์ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคมีระดับโปรตีน (*Bt*) *Cry2Aa2* สูงถึง 2-3 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนทั้งหมด และสร้างโปรตีนสูงกว่าพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่นิวเคลียสถึง 20-30 เท่า



ภาพที่ 2 การถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์พืชหนึ่งเซลล์ (a) เซลล์พืชหนึ่งเซลล์มีจำนวนชุดดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ประมาณ 10,000 ชุด มากกว่าจำนวนชุดดีเอ็นเอของนิวเคลียสในสภาวะดิพลอยด์ (b) ในระยะแรกของการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ (primary plastid transformation) ยีนเป้าหมายอาจแทรกเข้าไปในชุดดีเอ็นเอเพียงหนึ่งชุดจากชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ทั้งหมดของหนึ่งเซลล์พืช (c) ชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ของเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมายจะเกิดการแบ่งตัว ทำให้เซลล์พืชมีชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมาย เรียกสภาวะนี้ว่า “heteroplasmic” (d) เซลล์พืชที่ผ่านการคัดเลือกในอาหารคัดเลือกที่เดิมสารปฏิชีวนะความเข้มข้นสูงนาน 2-3 ครั้ง เกิดการแบ่งตัวและสภาวะ cytoplasmic sorting ทำให้ได้ชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ที่มีถ่ายยีนเป้าหมายเหมือนกันทุกชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ทั้งหมดของเซลล์ เรียกสภาวะนี้ว่า “homoplasmic”

ที่มา: Bock (2001a)

2.2 สามารถถ่ายยีนเป้าหมายในลักษณะโอเปอรอนได้

คลอโรพลาสต์เป็นออร์แกเนลล์ที่วิวัฒนาการมาจากไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ทำให้สามารถแปลรหัสจาก polycistronic mRNA เป็นโปรตีนเชิงซ้อนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนแบบโอเปอรอน de Cosa *et al.* (2001) รายงานการถ่ายยีนโอเปอรอนคล้ายโปรคาริโอต หรือ multiple genes เช่น *Bt cry2Aa2* operon (ซึ่งประกอบด้วย 3 ยีน ภายใต้โปรโมเตอร์เดียวกัน) เข้าสู่คลอโรพลาสต์ของยาสูบโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค พบว่า ใบอ่อนของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *Bt cry2Aa2* operon มีโปรตีน Bt cry2Aa2 สูงถึง 45.30 เปอร์เซ็นต์ และในใบแก่ของยาสูบพบปริมาณโปรตีน Bt cry2Aa2 เป็น 46.10 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด หลังจากนั้นนำหนอนเจาะสมอฝ้ายอายุ 10 วัน มาทดสอบกินใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนดังกล่าว พบว่า โปรตีน Bt cry2Aa2 เข้าไปยับยั้งบริเวณผนังกระเพาะอาหารของหนอนเจาะสมอฝ้ายทำให้เซลล์เสียหายและหนอนตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการแสดงออกของ multiple genes ในพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่นิวเคลียสเกิดจากการถ่ายยีนเป้าหมายครั้งละหนึ่งยีนจนครบจำนวน multiple genes ทำให้ระดับการแสดงออกของแต่ละยีนแตกต่างกัน (de Cosa *et al.*, 2001)

2.3 ไม่เกิดการแพร่กระจายของยีนเป้าหมายจากพืชตัดแปรพันธุกรรมสู่สิ่งแวดล้อมหรือพืชสายพันธุ์ใกล้เคียง

การถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์สามารถแก้ไขปัญหการแพร่กระจายของละอองเกสรจากต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนสู่สิ่งแวดล้อมหรือวัชพืชสายพันธุ์ใกล้เคียง เช่น พืชปลูกที่ได้รับการถ่ายยีนที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชเข้าสู่นิวเคลียสอาจจะแพร่กระจายยีนดังกล่าวสู่พืชสายพันธุ์เดียวกันหรือพืชสายพันธุ์ใกล้เคียง ทำให้พืชที่ไม่ใช่เป้าหมายต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชและทำลายด้วยสารกำจัดวัชพืชดังกล่าวได้ยาก (Daniell *et al.*, 1998) และละอองเกสรของพืชที่ได้รับการถ่ายยีน *Bt* อาจเป็นอันตรายต่อแมลงที่มีประโยชน์ต่อการผสมพันธุ์พืช เช่น ผีเสื้อ (Losey *et al.*, 1999) เนื่องจากคลอโรพลาสต์มีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมทางต้นแม่ (maternal inheritance) เซลล์สืบพันธุ์จากฝ่ายแม่จะถ่ายทอดพันธุกรรมในไซโตพลาสซึมให้กับลูก ส่วนเซลล์สืบพันธุ์จากฝ่ายพ่อจะถ่ายทอดพันธุกรรมเฉพาะในนิวเคลียสเท่านั้น (ประดิษฐ์, 2543) ทำให้พืชที่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่ไซโตพลาสซึม (transplastomic plant) ไม่เกิดการแพร่กระจายของยีนเป้าหมายสู่สิ่งแวดล้อมผ่านทางละอองเกสร และวิธีการหนึ่งที่สามารถกำจัดยีนคัดเลือกที่เป็นยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ หลังจากการถ่ายยีนเป้าหมายและคัดเลือกพืชได้แล้ว เพื่อป้องกันยีนดังกล่าวแพร่ไปในสิ่งมีชีวิตอื่น โดยการออกแบบพลาสมิดเวกเตอร์ที่มีโปรโมเตอร์

และเทอร์มินเตอร์ที่มีลำดับเบสที่ซ้ำกันหลายชุดและอาศัย native recombination ในการกำจัด ยีนคัดลอกออก (Iamtham and Day, 2000)

2.4 สามารถถ่ายยีนเป้าหมายไปสู่ตำแหน่งที่จำเพาะบนจีโนมคลอโรพลาสต์

การถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ไม่เกิดการสอดแทรกของยีนเป้าหมายมากกว่า 1 ตำแหน่ง เนื่องจากคลอโรพลาสต์มีโครงสร้างของโครมาตินที่ไม่ซับซ้อนและวิธีการถ่ายยีนด้วย กระบวนการการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของลำดับเบสคู่สม ที่เรียกว่า “homologous recombination” ระหว่างชิ้นส่วนลำดับเบสบนจีโนมคลอโรพลาสต์กับพลาสมิดเวกเตอร์ (plasmid vector) ดังภาพที่ 3 (Boynton *et al.*, 1988 และ Staub and Maliga, 1992-1995)

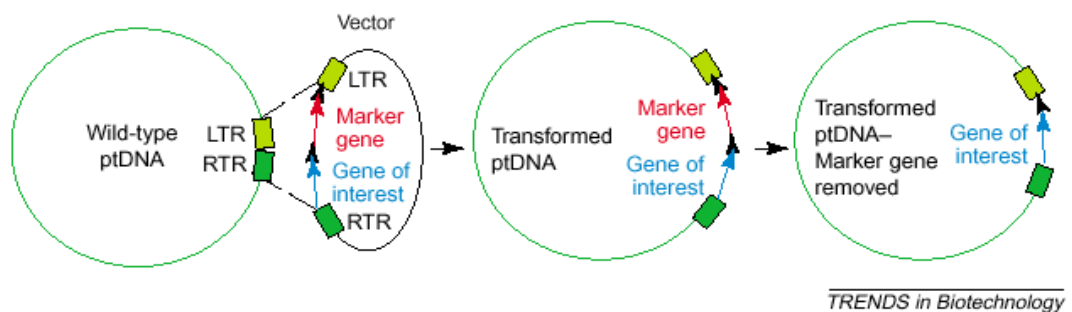
การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของลำดับเบสคู่สม (homologous recombination) เป็นวิธีการ ถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์อย่างจำเพาะเจาะจง โดยพลาสมิดเวกเตอร์มียีนเป้าหมายถูกขนานข้าง ด้วยชิ้นส่วนลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับชิ้นส่วนลำดับเบสเป้าหมายบนจีโนมคลอโรพลาสต์ เมื่อพลาสมิดเวกเตอร์ถ่ายเข้าสู่เซลล์คลอโรพลาสต์จะเกิดการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างยีนเป้าหมาย จากพลาสมิดเวกเตอร์และ intergenic spacer จากจีโนมคลอโรพลาสต์ (Bel *et al.*, 2001 และ Maliga, 2003) ทำให้ยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ (ภาพที่ 3)

การส่งถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ เป็นวิธีการหนึ่งในการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม ของพืชให้มีลักษณะตามที่ต้องการ พืชที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์และสามารถ แสดงออกลักษณะตามที่ยีนนั้นควบคุม เรียกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์นี้ว่า “พืชดัดแปรพันธุกรรมคลอโรพลาสต์” หรือ “transplastomic” (Svab *et al.*, 1990) จากข้อได้เปรียบต่าง ๆ ดังกล่าว ทำให้นักวิทยาศาสตร์หันมาให้ความสนใจในการผลิตพืชดัดแปรพันธุกรรม คลอโรพลาสต์เพิ่มมากขึ้น

3. ความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์

นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจและความสำคัญของการผลิตพืชแปรพันธุกรรม คลอโรพลาสต์อย่างกว้างขวาง ซึ่งความสำเร็จของการสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรมคลอโรพลาสต์ รายงานครั้งแรกในสาหร่ายเซลล์เดียว *Chlamydomonas reinhardtii* โดยนำเซลล์ปกติมาชักนำให้ เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการตัดลำดับเบสบางส่วนของยีน *atpB* บนจีโนมคลอโรพลาสต์ ทำให้

เซลล์สาหร่ายไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์แสง หลังจากนั้นทำการถ่ายยีน *atpB* ของคลอโรพลาสต์จากเซลล์สาหร่ายปกติเข้าสู่เซลล์กลายพันธุ์โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค พบว่าเซลล์กลายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน *atpB* มีความสามารถในการสังเคราะห์แสง โดยวิธีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณลำดับเบสที่เข้ากันได้ ในคลอโรพลาสต์ของเซลล์กลายพันธุ์กับเซลล์ปกติ (Boynton *et al.*, 1988) จากการศึกษาดังกล่าวเป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนาการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ในพืชชั้นสูง



ภาพที่ 3 แสดงการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ด้วยการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของลำดับเบสคู่สม (homologous recombination) 2 ตำแหน่ง ระหว่างจีโนมคลอโรพลาสต์ (ptDNA) และเวกเตอร์ (vector) ที่ขนานข้างด้วยลำดับเบสคู่สม left target regions (LTR) และ right target regions (RTR) จีโนมคลอโรพลาสต์ที่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมายสามารถกำจัดยีนคัดเลือก (selectable marker gene) ออกจากจีโนมได้

ที่มา: Maliga (2003)

Svab *et al.* (1990) รายงานการศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ในชั้นสูงที่ประสบความสำเร็จครั้งแรกในยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) โดยนำยีน 16s rRNA จากคลอโรพลาสต์มาชักนำก่อให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ point mutation ส่งผลให้มีการแสดงออกที่สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin และ streptomycin ถ่ายเข้าสู่ใบยาสูบด้วยวิธีการยิงอนุภาค หลังจากนั้นนำใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร RMOP ที่มีส่วนประกอบของสารปฏิชีวนะ spectinomycin เซลล์ใบยาสูบที่ได้รับยีน 16s rRNA ที่กลายพันธุ์สามารถพัฒนาและเจริญเติบโตเป็นต้นยาสูบได้โดยวิธีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณลำดับเบสที่เข้ากัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Boynton *et al.* (1988) นอกจากนี้การถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ในพืชชั้นสูงชนิดอื่น ๆ ที่ประสบความสำเร็จ ได้แก่ *Arabidopsis thaliana* (Sikdar *et al.*, 1998)

มันฝรั่ง (Sidorov *et al.*, 1999) ถั่วเหลือง (Zhang *et al.*, 2001) มะเขือเทศ (Ruf *et al.*, 2001) ผักกาด (*Brassica napus* L.) (Dovzhenko, 2001) oilseed rape (Hou *et al.*, 2003) และ *Lesquerella fendleri* (Skarjinskaia *et al.*, 2003) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการพัฒนาการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ในพืชชั้นสูงชนิดต่าง ๆ

ชนิดพืช	วิธีการถ่ายยีน	อ้างอิง
<i>Nicotiana tabacum</i> (Tobacco)	เครื่องยิงอนุภาค	Svab <i>et al.</i> (1990)
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	PEG-mediated transformation	O' Neill <i>et al.</i> (1993)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	เครื่องยิงอนุภาค	Sikdar <i>et al.</i> (1998)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Microinjection	Daniell (1999)
<i>Solanum tuberosum</i> (Potato)	เครื่องยิงอนุภาค	Sidorov <i>et al.</i> (1999)
<i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomato)	เครื่องยิงอนุภาค	Ruf <i>et al.</i> (2001)
<i>Glycine max</i> (L.) Merr. (Soybean)	เครื่องยิงอนุภาค	Zhang <i>et al.</i> (2001)
<i>Brassica napus</i> L.	เครื่องยิงอนุภาค	Dovzhenko (2001)
Oilseed rape	เครื่องยิงอนุภาค	Hou <i>et al.</i> (2003)
<i>Lesquerella fendleri</i>	เครื่องยิงอนุภาค	Skarjinskaia <i>et al.</i> (2003)
cotton	เครื่องยิงอนุภาค	Kumer <i>et al.</i> (2004)
petunia	เครื่องยิงอนุภาค	Zubko <i>et al.</i> (2004)

การพัฒนาการสร้างพืชตัดแปรพันธุกรรมคลอโรพลาสต์ในพืชชนิดอื่น ๆ ต้องมีระบบการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ที่มีประสิทธิภาพ (Bock, 2001a และ Carrer, 2001) ได้แก่ (1) ต้องเป็นวิธีการที่สามารถส่งถ่ายยีนเป้าหมายผ่านผนังเซลล์พืช (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) และ เมมเบรน 2 ชั้น ของคลอโรพลาสต์ (outer membrane และ inner membrane) เข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ (2) ยีนคัดเลือก (selectable marker gene) ที่นำมาใช้ในวิธีการถ่ายยีนนี้ต้องสามารถแสดงออกลักษณะของยีนนั้นในคลอโรพลาสต์ได้ (3) พืชที่ทำการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ต้องมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้น transplastomic ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4. วิธีการส่งถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่คลอโรพลาสต์

การถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์เป็นวิธีการถ่ายยีนที่ไม่พบรายงานว่ามีเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสที่สามารถเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ (Bock, 2001a) ดังนั้นการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ต้องเป็นวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง โดยใช้พาหะเป็นตัวนำยีนเข้าสู่เซลล์ และสามารถทะลุผ่านชั้นเมมเบรนของคลอโรพลาสต์ คือ

4.1 การถ่ายยีนโดยใช้สารเคมีชนิด polyethylene glycol

เทคนิคนี้ใช้เฉพาะกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่เป็นโปรโตพลาสต์ (เซลล์ที่กำลังจัดผนังเซลล์ออก) และพืชที่สามารถพัฒนาจากโปรโตพลาสต์เป็นต้นได้เท่านั้น (Koop *et al.*, 1996 และ O' Neill *et al.*, 1993) จากการศึกษาของ O' Neill *et al.* (1993) พบว่า การถ่ายยีนในพลาสต์ติดกลายพันธุ์ 16s rRNA ของ *Nicotiana tabacum* ที่แสดงความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ streptomycin และ spectinomycin เข้าสู่โปรโตพลาสต์ของ *Nicotiana plumbaginifolia* ด้วยการใช้สารเคมี polyethylene glycol โดยนำพลาสมิดเวกเตอร์ pIDS411 และ pTB116 จากภายนอกเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มพลาสต์ติด (plastid envelope) เข้าสู่จีโนมพลาสต์ติด โดยพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่โปรโตพลาสต์และต้องเคลื่อนที่จากตำแหน่งไซโตพลาสซึมไปยังพลาสต์ติดแบบสุ่ม ทำให้ยีนเป้าหมายไม่สามารถสอดแทรกเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ได้ทุกชุด วิธีการถ่ายยีนนี้มีประสิทธิภาพต่ำในการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ และไม่สามารถใช้กับพืชชนิดอื่น ๆ ได้อย่างกว้างขวาง แต่การถ่ายยีนด้วยสารเคมีชนิด PEG นี้ มีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการถ่ายยีนด้วยวิธีการใช้เครื่องยิงอนุภาค (Daniell, 1999 และ Sidebottom, 2002)

4.2 การถ่ายยีนด้วยการฉีดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การฉีดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ (Sidebottom, 2002) แต่วิธีการฉีดดีเอ็นเอนั้นจะชักนำให้เกิดความร้อนระหว่างโลหะกับของเหลว ซึ่งสามารถทำลายพลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านหลอดฉีดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.1 ไมโครเมตร และเซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย (Daniell, 1999)

4.3 การถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค

การถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคเป็นวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ที่มีประสิทธิภาพ และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง (ตารางที่ 1) เนื่องจากเป็นวิธีการที่ใช้ในการถ่ายยีนหรือดีเอ็นเอเข้าสู่พืช โดยใช้การยิงยีนเข้าสู่เซลล์พืช ป็นหรือดีเอ็นเอถูกเคลือบบนอนุภาคโลหะเล็ยขนาดเล็ก ได้แก่ อนุภาคทองคำ หรืออนุภาคทังสเตน ที่ทำหน้าที่เป็นตัวนำยีนหรือดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยใช้แรงดันจากก๊าซเป็นตัวผลักดันอนุภาคโลหะทะลุผ่านผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมาย (Klein *et al.*, 1987) การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างพืชแปลงพันธุกรรมและสามารถใช้ตัวอย่างจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบ (Svab *et al.*, 1990) แคลลัส (Maliga, 2001) เซลล์แขวนลอย (suspension cells) (Daniell *et al.*, 1990) และชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธีนี้สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ง่าย วิธีการถ่ายยีนนี้มีต้นทุนสูงแต่ให้ประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการอื่น ๆ (Bel *et al.*, 2001, Daniell, 1999 และ Sidebottom, 2002)

5. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ด้วยเครื่องยิงอนุภาค

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค แบ่งออกเป็น 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยทางกายภาพ (abiotic parameters) และปัจจัยทางชีวภาพ (biotic parameters) (คอลลินส์, 2535) รวมทั้งองค์ประกอบของเวกเตอร์ ได้แก่ ลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการแสดงออก (promoter) ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (selectable marker genes) และยีนรายงานผล (reporter genes)

5.1 ปัจจัยทางกายภาพ (Abiotic parameters)

ปัจจัยทางกายภาพ คือ ปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ ได้แก่ ชนิดของอนุภาค (particle composition) ขนาดของอนุภาค (particle size) อัตราเร็วในการยิง (velocity) และระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายในการยิงอนุภาค (target distance) เป็นต้น

5.1.1 ชนิดของอนุภาค (Particle composition)

อนุภาคที่ใช้ในการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ อนุภาคทองคำและอนุภาคทังสเตน (Klein *et al.*, 1987) เนื่องจากอนุภาคทั้งสองชนิดเป็นโลหะธาตุเฉื่อย ทำให้อนุภาคไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอและเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์พืชต่ำ อนุภาคสามารถทำให้มีขนาดเล็กตามที่ต้องการ และมีความสามารถในการทะลุผ่านเข้าสู่เซลล์สูง โดยอนุภาคทองคำแต่ละโมเลกุลมีขนาดและรูปร่างที่สม่ำเสมอมากกว่าอนุภาคทังสเตน (Randolph-Anderson *et al.*, 1995) และไม่เกิดการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เหมือนอนุภาคทังสเตน (Birch and Bower, 1994)

5.1.2 ขนาดของอนุภาค (Particle size)

ขนาดของอนุภาคที่ใช้ในการเคลื่อนยีนหรือดีเอ็นเอมีความสำคัญต่อการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืช ถ้าขนาดอนุภาคที่ใช้มีขนาดใหญ่ไม่เหมาะสมต่อชนิดเนื้อเยื่อเป้าหมาย ทำให้พืชเกิดความเสียหายและไม่สามารถเจริญเติบโตได้ จากรายงานของ Svab *et al.* (1990) ศึกษาการถ่ายยีน 16sDNA mutation โดยใช้อนุภาคทังสเตนขนาด 1 ไมโครเมตร เคลือบพลาสมิดดีเอ็นเอ pZS148 ขนาด 9.6 kb เข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ของใบยาสูบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Svab and Maliga (1993) กล่าวว่า อนุภาคทังสเตนขนาด 1 ไมโครเมตร เคลือบพลาสมิดดีเอ็นเอ pZS197 มีขนาดอนุภาคที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน *aadA* เข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ของใบยาสูบได้ดีที่สุด แต่การถ่ายยีน *gfp* (Green Fluorescent Protein) เข้าสู่พลาสต์ของเซลล์แขวนลอยของยาสูบ รายงานว่าการใช้อนุภาคทองคำขนาด 0.4 ไมโครเมตร มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนมากกว่าการถ่ายยีนด้วยอนุภาคทองคำขนาด 1 ไมโครเมตร ถึง 4 เท่า (Langbecker *et al.*, 2004) ส่วนการศึกษาการถ่ายยีน *gfp* เข้าสู่คลอโรพลาสต์ในใบมันฝรั่ง (Sidorov *et al.*, 1999) และใบของถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr. (Zang *et al.*, 2001) รายงานว่า อนุภาคทองคำขนาด 0.6 ไมโครเมตร เป็นขนาดอนุภาคที่เหมาะสมที่สุดต่อการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ ดังนั้นขนาดของอนุภาคที่เหมาะสมจึงแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่นำมาถ่ายยีน

5.1.3 แรงดันก๊าซฮีเลียม (Helium pressure) และระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายในการยิงอนุภาค (Target distance)

แรงดันก๊าซฮีเลียมในการยิงดีเอ็นเอเข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ โดยอัตราเร็วในการยิงมีความสัมพันธ์กับสถานะ

ศุญญาภาสภายในตู้และระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายในการยิงอนุภาค (Birch and Bower, 1994) Sidorov *et al.* (1999) รายงานการศึกษาการถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาคสู่ใบมันฝรั่งที่ระดับแรงดันก๊าซฮีเลียมและระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายในการยิงอนุภาคระดับต่าง ๆ จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน GUS พบว่า การใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายในการยิงอนุภาคเท่ากับ 9 เซนติเมตร มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ในใบมันฝรั่งสูงที่สุด สำหรับการถ่ายยีนใน *Arabidopsis thaliana* ระดับแรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายในการยิงอนุภาคเท่ากับ 9 เซนติเมตร และระดับแรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายในการยิงอนุภาคเท่ากับ 12 เซนติเมตร เป็นระดับที่เหมาะสมในการถ่ายยีน *aadA* เข้าสู่ใบ (Sikdar *et al.*, 1998)

5.2 ปัจจัยทางชีวภาพ (Biotic parameters)

ปัจจัยทางชีวภาพเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ ได้แก่ แหล่งที่มาของเนื้อเยื่อ (tissue source) และอายุของเนื้อเยื่อ (tissue age)

5.2.1 แหล่งที่มาของเนื้อเยื่อ (Tissue source)

การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคสามารถถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ (Galun and Breiman, 1997) จากการศึกษาของ Boynton *et al.* (1988) รายงานว่า ชนิดของเนื้อเยื่อเป้าหมายมีผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งระดับชั่วคราว (transient expression) และระดับถาวร (stable transformation) โดยเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ใช้ในการถ่ายยีนต้องเป็นเนื้อเยื่อที่มีความสามารถในการชักนำการเกิดต้น transplastomic อย่างมีประสิทธิภาพ จากรายงานการศึกษาของ Svab *et al.* (1990) พบว่า ใบยาสูบสามารถนำมาเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีนกลายพันธุ์ 16s rRNA เข้าสู่คลอโรพลาสต์ สอดคล้องกับรายงาน Svab and Maliga (1993) ที่นำใบยาสูบใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีน *aadA* แหล่งที่มาของเนื้อเยื่อนอกจากใบยาสูบ คือ เซลล์แขวนลอย (suspension cells) จากใบยาสูบอายุ 4 วัน ที่มีน้ำหนักสด 100 มิลลิกรัม สามารถใช้เป็นเซลล์ตั้งต้นในการถ่ายยีนที่ผลิต chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) ด้วยวิธีการยิงอนุภาค (Daniell *et al.*, 1990)

5.2.2 อายุของเนื้อเยื่อ (Tissue age)

ความเหมาะสมของสภาพเนื้อเยื่อเป้าหมายที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญต่อการถ่ายยีน โดยการใช้อายุของเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการถ่ายยีน จากการศึกษาของ Daniell *et al.* (2001) รายงานว่า ใบยาสูบอายุ 2 เดือน มีความเหมาะสมต่อการถ่ายพลาสมิดเวกเตอร์ pLD-BADH ทำให้เกิดต้น transplastomic จำนวนเฉลี่ยสูงถึง 23 ต้น ต่อชิ้นใบยาสูบ ในพืช *Lesquerella fendleri* อายุใบ 6 สัปดาห์ เหมาะสมสำหรับเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีน *aadA16gfp* ที่แสดงออกให้โปรตีน aminoglycoside 3" - adenylyltransferase (AAD)-GFP มีประสิทธิภาพความสำเร็จคิดเป็นต้น transplastomic 1 โคลน ต่อการถ่ายยีน 25 ครั้ง (Skarjinskaia, 2003)

5.3 ตำแหน่งควบคุมการแสดงออก (Promoter) ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (Selectable marker genes) และ ยีนรายงานผล (Reporter genes)

นอกจากปัจจัยทางชีวภาพและปัจจัยทางกายภาพที่มีผลในการถ่ายยีน แล้วยังมีตำแหน่งควบคุมการแสดงออกเหนือยีน (Promoter) ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (Selectable marker genes) และยีนรายงานผล (Reporter genes) ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ด้วยเครื่องยิงอนุภาค เนื่องจากยีนเป้าหมายต้องสามารถแสดงออกลักษณะของยีนนั้นภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์และเทอร์มินเตอร์ในคลอโรพลาสต์ได้ (Carrer, 2001) และถูกคัดเลือกด้วยยีนคัดเลือกหรือยีนรายงานผล

5.3.1 ตำแหน่งควบคุมการแสดงออก หรือโปรโมเตอร์ (Promoter)

โปรโมเตอร์เป็นตำแหน่งดีเอ็นเอที่ควบคุมการแสดงออกที่อยู่เหนือยีนซึ่งเป็นบริเวณที่เอนไซม์อาร์เอ็นเอโพลิเมอเรส (RNA polymerase) จดจำและจะเข้ามาจับเพื่อเริ่มต้นการถอดรหัส (transcription) (ประดิษฐ์, 2543) ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่อยู่ถัดไป โปรโมเตอร์ที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์เป็นโปรโมเตอร์ที่ได้รับมาจากยีนของคลอโรพลาสต์ เช่น โปรโมเตอร์จากยีน *psbA* 16s rRNA (*rrn*) *rbcL* *trnV* และ *rps* 16 (Heifetz, 2000) โดยการควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่ถูกถ่ายเข้าไปในจีโนมคลอโรพลาสต์นั้นต้องมี promoter cassette (PL) คือ โปรโมเตอร์ ร่วมกับ translation control sequence ชนิดต่าง ๆ ดังตารางที่ 2 ซึ่งโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายใน

จีโนมคลอโรพลาสต์ คือ plastid 16s ribosomal RNA promoter (*Prrn*) เนื่องจาก *Prrn* เป็นโปรโมเตอร์ของยีน 16s rDNA ในกลุ่มยีน *rrn* ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายสูงกว่าโปรโมเตอร์ชนิดอื่น ๆ ในจีโนมคลอโรพลาสต์ (เช่น โปรโมเตอร์ *psbA*) (Maliga, 2002) ซึ่ง Yoshimoto *et al.* (2001) รายงานว่า การถ่ายยีน *gus* เข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ *Arabidopsis thaliana* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *Prrn* และพบโปรตีน GUS สูงถึง $1.2 \text{ pmol min}^{-1} \mu \text{ protein}^{-1}$ ซึ่งมากกว่าโปรโมเตอร์ *psbA* และ *tac* นอกจากนี้โปรโมเตอร์ *Prrn* มีความสามารถในการควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายได้ในพืชหลายชนิด เช่น *Arabidopsis thaliana* (Isono *et al.*, 1997) และยาสูบ (Sakai *et al.*, 1998) และมีการสร้างโปรตีนเป้าหมายในระดับที่แตกต่างกันตั้งแต่ระดับต่ำ 0.001 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ถึงระดับสูงเท่ากับ 45.0 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ (Maliga, 2002) นอกจากนี้ translation control sequence ยังส่งเสริมระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายเพิ่มขึ้น โดย translation control sequence เป็นลำดับเบสที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งประกอบด้วย (1) mRNA 5'-untranslated region (UTR) หรือ 5'-translation control region (TCR) ที่ประกอบด้วย 5'-UTR และ N-terminal segment ของ coding region ที่ทำให้ mRNA ไม่ถูกทำลายได้ (mRNA stability) และเป็นตำแหน่งแรกที่ไรโบโซมเข้ามาจับเพื่อเริ่มต้นการสังเคราะห์โปรตีน (Maliga, 2003) (2) mRNA 3'-UTR หรือ Terminator-cassette (T-cassette) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับ mRNA stability และเป็นลำดับเบสที่สิ้นสุดการสังเคราะห์โปรตีน (Maliga, 2003 และ Maliga, 2002) ดังนั้นความสำเร็จของการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ต้องอาศัยพลาสมิดเวกเตอร์ที่ประกอบด้วย โปรโมเตอร์ที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายในจีโนมคลอโรพลาสต์ได้ และ translation control sequence ที่ส่งเสริมให้ mRNA ไม่ถูกทำลายได้ง่ายและเกิดการสังเคราะห์โปรตีน

5.3.2 ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (Selectable marker genes)

ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกเป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการที่สามารถคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนออกจากเซลล์ปกติ (สุรินทร์, 2536) โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชปกติและไม่อันตรายต่อพืชแปลงพันธุ์ จากการศึกษาของ Svab *et al.* (1990) รายงาน การศึกษาการถ่ายยีนด้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่สร้างจากการชักนำยีน 16s rDNA ของจีโนมคลอโรพลาสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ point mutation ตรงลำดับเบสที่ 278 คู่เบส ถ่ายเข้าสู่ใบยาสูบด้วยเครื่องยิงอนุภาคสามารถคัดเลือกต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งมีลักษณะด้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin และ streptomycin ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 2 ตัวอย่างพลาสมิดเวกเตอร์สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ที่ประกอบด้วย
 โปรโมเตอร์ 5'-UTR และ 3'-UTR ชนิดต่าง ๆ และระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย
 ของต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์

Protein	Total Soluble Protein (TSP) concentration	Plasmid	Promoter	5' -UTR	N-terminal fusion	Coding region	3' -UTR
GUS	2.5%	pJS80	psbA	psbA	–	uidA	psbA
NPTII	2.5%	pHK31	Prrn	atp B	–	neo	rbcL (1)
NPTII	7.0%	pHK30	Prrn	atp B	atp B และ 14AA	neo	rbcL (1)
NPTII	4.0%	pHK60	Prrn	atp B	atp B และ 14AA ^c	neo	rbcL (1)
NPTII	4.7%	pHK35	Prrn	rbcL	–	neo	rbcL (1)
NPTII	10.8%	pHK34	Prrn	rbcL	rbcL และ 14AA	neo	rbcL (1)
NPTII	0.31%	pHK64	Prrn	rbcL	rbcL และ 14AA ^c	neo	rbcL (1)
NPTII	23.0%	pHK40	Prrn	T7 g10	–	neo	rbcL (1)
NPTII	16.4%	pHK38	Prrn	T7 g10	T7 g10 และ 14AA	neo	rbcL (1)
TetC	25.0%	pJST10	Prrn	T7 g10	–	tetC-AT	rbcL (1)
TetC	10.0%	pJST11	Prrn	atpB	–	tetC-GC	rbcL (1)
TetC	10.0%	pJST12	Prrn	T7 g10	–	tetC-AT	rbcL (1)
EPSPS	0.2%	PMON38773	Prrn	T7 g10	–	CP4bact	rps16 (2)
EPSPS	>10.0%	PMON45259	Prrn	T7 g10	GFP และ 14AA	CP4synt	rps16 (2)
GFP	5.0%	PMON30125	Prrn(3)	rbcL	–	gfp	rps16 (2)
GFP	5.0%	MR220	Prrn(3)	rbcL	–	gfp	rps16 (2)
AAD-GFP	8.0%	pMSK56	Prrn(1)	atp B	atp B และ 14AA	aadA-gfp	psbA
PAT	>7.0%	pKO3	Prrn(1)	atpB	atp B และ 14AA	s-bar	rbcL (1)
Cry1Ac	5.0%	pZS224	Prrn(3)	rbcL	–	cry1A(c)	rps16 (2)

ที่มา: Maliga (2003)

โดยรายงานของ Svab and Maliga (1993) พบว่า การถ่ายยีน *aadA* ได้จากการแยกเชื้อ *Escherichia coli* ที่สร้างโปรตีน aminoglycoside 3"-adenyltransferase ด้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin และ streptomycin โดยตรงมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์เพิ่มสูงถึง 100 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การถ่ายยีนกลายพันธุ์ 16s rDNA ที่ด้านทานต่อสารปฏิชีวนะชนิดเดียวกันเข้าสู่ใบยาสูบด้วยการใช้เครื่องยิงอนุภาคภายใต้ปัจจัยการถ่ายยีนเหมือนกัน Carrer *et al.* (1993) รายงานการศึกษาของยีน *nptII* (neomycin phosphotransferase gene) ที่ด้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin สามารถใช้เป็นยีนเครื่องหมายและแสดงออกลักษณะยีนนั้นในคลอโรพลาสต์ใบยาสูบในระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Huang *et al.* (2002) พบว่า ยีน *aphA-6* จาก *Acinetobacter baumannii* ที่ให้โปรตีน aminoglycoside phosphotransferases สามารถด้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin

สารปฏิชีวนะ spectinomycin (ชื่อการค้า Trobicin) เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycoside ที่ผลิตมาจากแบคทีเรีย *Streptomyces spectabilis* กลไกการทำงานของสารปฏิชีวนะ spectinomycin ในเซลล์พืชนั้น โดยไปยับยั้งการทำงานของไรโบโซมขนาด 70s (ตำแหน่ง 30s) (Ahler *et al.*, 2003) และขัดขวางการเคลื่อนที่ของเปปไทด์ tRNA จากตำแหน่ง P เป็นตำแหน่ง A (Marins, 2004) ทำให้คลอโรพลาสต์ไม่สามารถสังเคราะห์แสงให้แก่เซลล์พืช จึงทำให้เซลล์พืชมีลักษณะสีขาวและตายในที่สุด

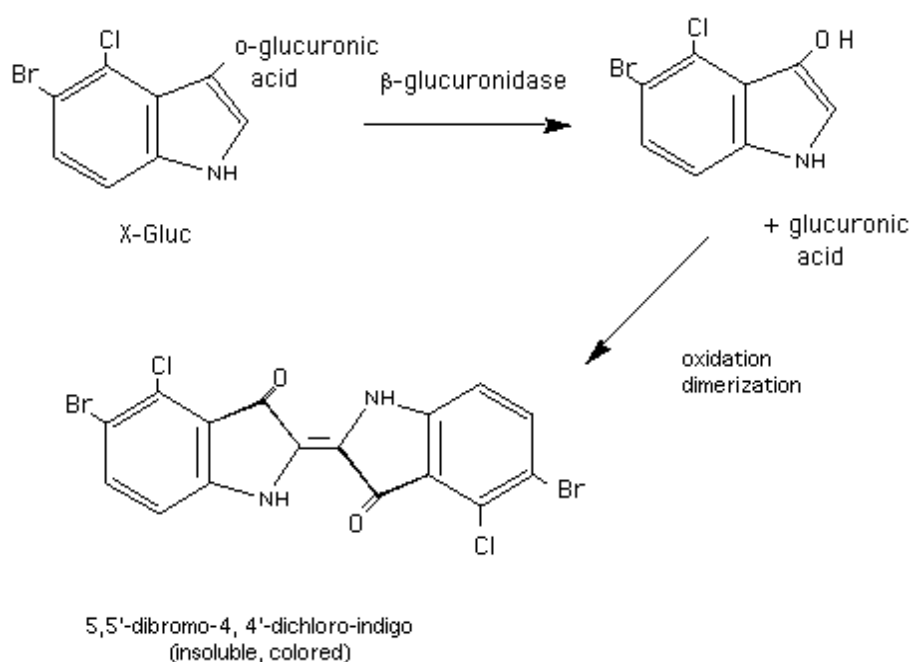
ยีน *bar* (bialaphos resistance gene) เป็นยีนเครื่องหมายที่สามารถแสดงออกในคลอโรพลาสต์ และได้จากการแยกเชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* ซึ่งยีน *bar* สร้างเอนไซม์ phosphinothricin acetyltransferase (PAT) ด้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม phosphinothricin (PPT) ได้แก่ bialaphos และ glufosinase โดยกลไกการทำงานของเอนไซม์นี้จะเกี่ยวกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glutamine synthetase (GS) ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน glutamine เมื่อมีการสะสมในปริมาณสูงก่อให้เกิดการยับยั้งขบวนการสังเคราะห์แสง แต่มีประสิทธิภาพสูงในการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ (Lutz *et al.* , 2001)

Daniell *et al.* (2001) รายงานการใช้ยีน betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) จากผักขม (spinach) เป็นยีนเครื่องหมายในการถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ของยาสูบ โดยปราศจากการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ นำใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารตั้งต้น betaine aldehyde (BA) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ ใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน BADH สามารถสร้างเอนไซม์ glycine betaine ที่ย่อยสลายสาร BA เป็นสาร glycine betaine ที่ไม่เป็น

อันตรายต่อเซลล์พืช ยีนเครื่องหมาย BADH เป็นยีนที่ใช้ในการคัดเลือกพืช transplastomic ได้ แต่ไม่สามารถนำมาใช้ในกลุ่พืชที่มียีนนี้อยู่แล้ว เช่น พืชตระกูล Chenopodiaceae และ Poaceae

5.3.3 ยีนรายงานผล (Reporter genes)

ยีนรายงานผล ทำหน้าที่เป็นยีนตรวจสอบการแสดงออกของยีนซึ่งไม่มีบทบาทในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน การรายงานผลของยีนเพื่อยืนยันว่าโปรโมเตอร์ที่ถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนได้ (สุรินทร์, 2536) จากการศึกษาของ Staub and Maliga (1992) รายงานว่า ยีนรายงานผล *uidA* สร้างเอนไซม์ β -glucuronidase (GUS) ที่ได้จาก การแยกเชื้อ *Escherichia coli* stain K 12 สามารถแสดงออกในคลอโรพลาสต์ของยาสูบ การตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucuronidase ทำตามวิธี GUS histochemical assay ที่ตรวจสอบกับสารตั้งต้น 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide (X-Gluc) โดยเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน *uidA* ที่มีการแสดงออกให้เอนไซม์ β -glucuronidase มาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น X-Gluc แสดงผลให้สารตกผลึกสีน้ำเงิน ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้น X-Gluc กับเอนไซม์ β -glucuronidase ที่ให้ผลผลิตเป็นสารตกผลึกสีน้ำเงิน dibromoindigo

ที่มา: Gallagher (1992)

ส่วนยีน *gfp* มาจาก *Aequorea victoria* สร้างโปรตีน green fluorescent protein (GFP) เป็นยีนรายงานผลที่แสดงผ่านการมองเห็น (visual marker) ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต โดยไม่ต้องทำ histochemical assay โดยการรายงานผลของยีน *gfp* เกิดจากโปรตีน GFP ดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตจึงปรากฏตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ (Khan and Maliga, 1999)

การถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์เป็นวิธีหนึ่งของการถ่ายยีนที่ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ในการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของการถ่ายยีนแทนการถ่ายยีนเข้าสู่นิวเคลียสพืช เนื่องจากการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์มีข้อดีมากกว่าการถ่ายยีนเข้าสู่นิวเคลียส ได้แก่ ระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายสูงถึง 10-50 เท่าของการแสดงออกของยีนเป้าหมายจากการถ่ายยีนเข้าสู่นิวเคลียส สามารถแสดงออกของยีนเป้าหมายที่เป็นลักษณะ polycistronic ไม่ปรากฏการเกิด position effects และไม่ถ่ายทอดยีนเป้าหมายผ่านทางละอองเกสรของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนสู่สิ่งแวดล้อม (Heifetz, 2000) การถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์มีข้อได้เปรียบมากมายดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นการศึกษานี้จึงต้องการหาสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ โดยใช้ยาสูบเป็นพืชต้นแบบในการศึกษา เนื่องจากยาสูบเป็นพืชที่ค้นพบข้อมูลแผนที่ยีนในจีโนมคลอโรพลาสต์อย่างสมบูรณ์แล้วและมีระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ง่าย ซึ่งในการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ของยาสูบครั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์กับการถ่ายยีนลักษณะตามต้องการด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He (Bio Rad gun) เพื่อผลิตพืชสายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะต้านทานต่อโรค แมลง และศัตรูพืช ตลอดจนมีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มสูงขึ้นและสามารถนำมาผลิตเป็นวัคซีนที่รับประทานได้ (edible vaccine) ได้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

ต้นยาสูบปลอดเชื้อ (*Nicotiana tabacum*)

2. วัสดุอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีน

- 2.1 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่งและ 4 ตำแหน่ง
- 2.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)
- 2.3 ตู้อบ (hot air oven)
- 2.4 หม้อนึ่งความดัน (autoclave machine)
- 2.5 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ กระบอกตวง ปีกเกอร์ ปิเปตแก้ว
- 2.6 ตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet)
- 2.7 มีดผ่าตัด ปากคีบ (forceps) จานเพาะเลี้ยง (Petri dish) และตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2.8 เครื่องยิงอนุภาคนิวเคลียส PDS-1000/He Biolistic® (BioRad gun)
- 2.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเครื่อง vortex
- 2.10 ชั้นวางเนื้อเยื่อพืช

3. วัสดุอุปกรณ์ในการตรวจสอบการถ่ายยีนในระดับพันธุศาสตร์โมเลกุล

- 3.1 ใ้ดักกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
- 3.2 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer รุ่น GeneQuant pro)
- 3.3 เครื่อง PCR ของบริษัท PERKIN ELMER รุ่น GeneAmp PCR system 2400
- 3.4 เครื่องอิเล็กโตรโฟเรซิส TOYOBO GelMate 2000
- 3.5 เครื่องถ่ายภาพเจลอะกาโรสของบริษัท Vilber Lourmat รุ่น TCX-20 M
- 3.6 เครื่อง hybridizer รุ่น Biometra Compact Line OV4
- 3.7 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ Southern blot

4. สารเคมี

4.1 สารเคมีที่ใช้การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ภาคผนวก ข)

4.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ α -naphthalene acetic acid (NAA) และ 6-benzyladenine (BA)

4.3 สารเคมีที่ใช้ในการเคลือบอนุภาคพลาสติกดีเอ็นเอ

4.4 สารเคมีที่ใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ได้แก่ spectinomycin และ streptomycin

4.5 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *uidA* โดยวิธี GUS histochemical assay (ภาคผนวก ง)

4.6 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอพืช เช่น ไนโตรเจนเหลว สารละลาย CTAB เป็นต้น (ภาคผนวก ง)

4.7 สารเคมีที่ใช้ในการแยกขนาดดีเอ็นเอ เช่น อะกาโรสเจล สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ และสารละลาย TE

4.8 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบตำแหน่งของยีนหมายในต้นพืชที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค Southern blot เช่น 10XSSC สารละลาย washing buffer (ภาคผนวก ง)

5. พลาสมิดดีเอ็นเอที่ใช้ในการถ่ายยีน

คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ภายใต้อิทธิพลของ Manchester university, Manchester, UK.

6. ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการถ่ายยีน (Iamtham and Day, 2000)

6.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหา ยีนคัดเลือก *aadA*

aad A-F : 5'-CgT CAT CgA gCg CCA TCT CgA A-3'

aad A-R : 5'-Tgg CTC gAA gAT ACC TgC Aag AAT-3'

6.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหา ยีนรายงาน β -glucuronidase (*uidA*)

uid A-F : 5'-gCg TTA CAA gAA AgC Cgg gCA AT-3'

uid A-R : 5'-CAC AgT TTT CgC gAT CCA gAC TgA ATg-3'

6.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์

CP-F : 5'-AgC AgT ggA CgT TTT ggA TAA gTA A-3'

CP-R : 5'-gCA TgA AAA TAC AAT AgA TgA ATA g-3'

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ใบยาสูบอายุ 2 สัปดาห์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตัดให้มีขนาดประมาณ 3x3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย 30.0 กรัมต่อลิตร และวุ้น 7.0 กรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ (Svab *et al.*, 1990) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพสูตรอาหารในการชักนำใบยาสูบให้พัฒนาเป็นต้น

บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนยอดที่เกิด และสังเกตลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นจากการชักนำผ่านแคลลัส เพื่อนำระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนี้ไปใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน

จากการศึกษาของ Svab *et al.* (1990) รายงานว่า สารปฏิชีวนะ spectinomycin ที่ระดับความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกเซลล์ทำให้ใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตายหมด จึงได้ทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลกับพืชทดลอง โดยนำใบยาสูบเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง ที่เติม BA ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ นาน 3 เดือน

บันทึกผลการทดลองลักษณะสีของชิ้นเนื้อเยื่อใบยาสูบ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) หน่วยทดลองละ 5 ซ้ำ

3. การถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS 1000/He Biolistic® (Bio Rad gun)

3.1 การเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมาย

การศึกษากการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ของยาสูบ นำใบอ่อนของยาสูบอายุ 2 สัปดาห์ ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมวางเรียงเป็นรูปวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง โดยเติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Svab *et al.*, 1990) บริเวณตรงกลางบนจานเพาะเลี้ยง ดังภาพที่ 7ก

3.2 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลอง

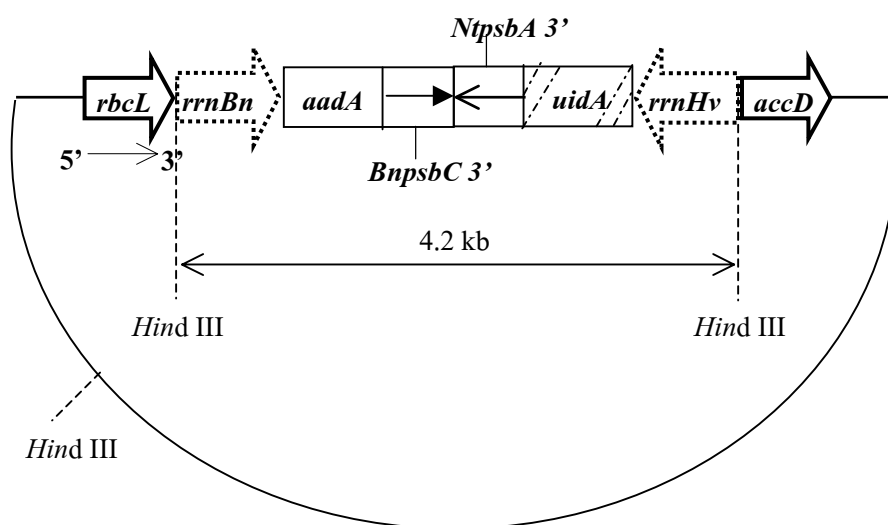
พลาสมิดดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ยาสูบ คือ คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ที่มียีน *uidA* เป็นยีนรายงานผล ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *rrnHv* ร่วมกับ ribosome binding site ของยีน *rbcL* จาก *Hordeum vulgare* และ 3' untranslated region ของยีน *psbA* จาก *Nicotiana tabacum* (*NtpsbA* 3') และยีน *aadA* เป็น selectable marker gene ที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin และ

streptomycin ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *rrnBn* ร่วมกับ ribosome binding site ของยีน *rbcL* จาก *N. tabacum* และ 3'untranslated region ของยีน *psbC* จาก *Brassica napus* (*BnpsbC* 3') โดยยีน *uidA* และยีน *aadA* คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ถูกขนานไปด้วยชิ้นส่วนลำดับเบสของยีน *rbcL* และยีน *accD* ที่เป็นเบสคู่สมกับจีโนมคลอโรพลาสต์ ดังภาพที่ 5

การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลอง โดยการเพิ่มปริมาณ *E. coli* สายพันธุ์ DH-5 α ที่บรรจุพลาสมิดดีเอ็นเอดังกล่าวในอาหารสูตร LB (ภาคผนวก ข) ที่เติมสารปฏิชีวนะ แอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงนาน 14-16 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี QIAGEN plasmid maxi kit (ภาคผนวก ค)

3.3 การเตรียมอนุภาคทองคำ

ซึ่งผงทองคำที่มีอนุภาคขนาด 1.0 ไมโครเมตร จำนวน 60 มิลลิกรัม ใส่ในหลอด ไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วล้างด้วยเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิตร หมุนเหวี่ยง (vortex) นาน 2 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อตกตะกอนอนุภาคโดยการปั่นเหวี่ยง คูณส่วนใสทิ้ง ทำขั้นตอนการล้างด้วยเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ซ้ำจำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นล้างอนุภาคด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อปริมาตร 1 มิลลิตรโดยเขย่าให้ตะกอนของอนุภาคกระจายตัว นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทำให้อนุภาคตกตะกอนแล้วดูดน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง เก็บอนุภาคที่ได้ใน กลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 มิลลิตร เขย่าอนุภาคให้กระจายตัวก่อนแบ่งใส่หลอด ไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำอนุภาคทองคำนี้ไปใช้ในการเคลือบพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป



rrnBn = *Brassica napus* 16s ribosomal RNA promoter + RBS *N. tabacum rbcL*

BnpsbC = 3' untranslated region *B. napus psbC* gene

NtpsbA = 3' untranslated region *N. tabacum psbA* gene

rrnHv = *Hordeum vulgare* 16s ribosomal RNA promoter + RBS *H. vulgare rbcL*

ภาพที่ 5 แผนที่โครงสร้างคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ที่ใช้ในการทดลองการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์โดยวิธีการใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He Biolistic® (Bio Rad gun) (Iamtham and Day, 2000)

3.4 การเคลือบอนุภาคทองคำด้วยพลาสมิดีเอ็นเอ

นำอนุภาคทองคำที่เตรียมในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้อนุภาคกระจายตัว หลังจากนั้นเติมพลาสมิดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากันและเติมสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลาย spermidine ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (เติมสารละลายอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว) ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ดูดส่วนใสทิ้งและล้างด้วย เอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างเบา ๆ แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที ดูดน้ำใสทิ้ง หลังจากนั้นล้างตะกอนด้วยเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมโดยการเขย่าอย่างเบา ๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที อีกครั้งหนึ่ง ดูดส่วนใสทิ้งและเติมเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมโดยการเขย่าอย่างเบา ๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Hunold *et al.*, 1994) จะได้อนุภาคทองคำที่ถูกเคลือบด้วยพลาสมิดีเอ็นเอซึ่งพร้อมนำไปใช้ในการถ่ายยีน

3.5 การยิงอนุภาคที่ถูกเคลือบพลาสมิดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ

PDS 1000/He[®] Biolistic (Bio Rad gun)

การถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค PDS 1000/He[®] Biolistic (Bio Rad gun) (ภาพที่ 6ก) ต้องทำความสะอาดอุปกรณ์ทุกชิ้น (ภาพที่ 6ข) ด้วยการเช็ดด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเครื่องยิง ได้แก่ แผ่นกั้นความดันแก๊ส (rupture disk) และ macrocarrier ด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที แล้วนำชิ้นมาวางบนกระดานรองที่นิ่งฆ่าเชื้อให้แห้งก่อนใช้งาน ใส่แผ่น rupture disk ตามขนาดที่ต้องการลงใน rupture disk retaining cap (ภาพที่ 6ค-ง) โดยในการทดลองนี้เลือกใช้ขนาดความดัน 650 และ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) แล้วนำเข้าไปประกอบกับเครื่องตรงส่วนปลายของ gas acceleration tube ภายในตู้ยิง (ภาพที่ 6จ) จากนั้นประกอบแผ่น macrocarrier เข้ากับ macrocarrier holder แล้วหยดอนุภาคทองคำที่ถูกเคลือบด้วยพลาสมิดีเอ็นเอ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงตรงกลางแผ่น macrocarrier (ภาพที่ 6ฉ) ทิ้งไว้ให้แห้ง ใช้ปากคีบหยิบตะแกรงลวด (stopping screen) วางบน macrocarrier launch assembly (ภาพที่ 6ช) หลังจากนั้นนำ macrocarrier ดังกล่าวที่แห้งมาวางบน stopping screen ในลักษณะคว่ำลง ปิดฝา macrocarrier launch assembly (ภาพที่ 6ซ) แล้วนำแผ่น macrocarrier launch assembly ที่มีอนุภาคทองคำซึ่งเคลือบด้วยพลาสมิดีเอ็นเอ วางในช่องตำแหน่งบนสุดของห้องเครื่องยิง ที่ระยะห่าง

ระหว่างส่วนปลายของ rupture disk retaining cap และส่วนบนสุดของ macrocarrier launch assembly (gas distance) เท่ากับ $3/8$ นิ้ว (ภาพที่ 6ฉ) นำจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป้าหมายที่เตรียมไว้ วางบนชั้นวาง (target shelf) ในระดับที่ต่ำลงมาจาก macrocarrier launch assembly ที่ระยะห่าง เนื้อเยื่อเป้าหมาย (target distance) เท่ากับ 6 9 และ 12 เซนติเมตร พร้อมเปิดฝาจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไว้ ปิดฝาห้องเครื่องยิงให้สนิท

หลังจากนั้นเปิดวาล์วใหญ่บนถังแก๊สฮีเลียมและหมุนปรับระดับความดันแก๊สไปที่ ระดับเหนือกว่าความดันที่ต้องการใช้อีก 200 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เปิดปั๊มสุญญากาศ เปิด power on และเปิด main switch บนส่วนควบคุมข้าง ๆ ห้องเครื่องยิง โดยกดปุ่ม vac เพื่อให้ในห้องเครื่องยิงเป็นสุญญากาศจนถึงระดับ 28 นิ้วปรอท (in.Hg) แล้วกดปุ่ม vac ไปที่ hold เมื่อเกิดไฟ สีแดงติดที่ปุ่ม fire จึงกดปุ่ม fire ค้างไว้ เมื่อเกิดแรงดันคล้ายเสียงระเบิดภายในห้องเครื่องยิงจึง ปลดมือจากปุ่ม fire กดปุ่ม vac เป็น vent เพื่อระบายอากาศภายในห้องเครื่องยิงจนถึงระดับ 0 ก่อนเปิดฝาห้องเครื่องยิง ปิดฝาจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและนำเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ผ่านการถ่ายยีนออกไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส (ตามวิธีการทดลองที่ 1) ในที่มีด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน จึงนำไปยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนมาตัดให้มีขนาดประมาณ 3×3 มิลลิเมตร ก่อนทำการสุมเนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีนมาตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีน *uidA* แบบชั่วคราว (transient expression) ด้วยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson *et al.*, 1987) จากนั้นคัดเลือก เซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสที่เดิมสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ นาน 3 เดือน



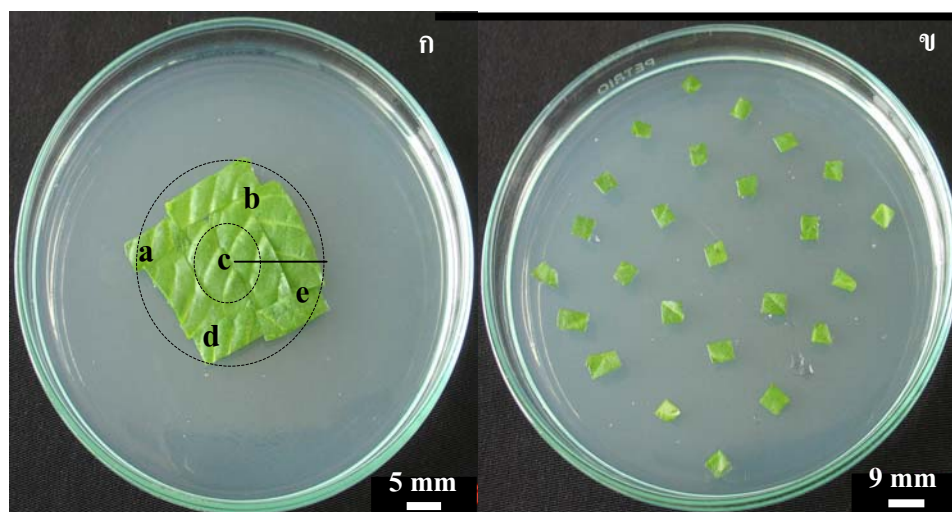
ภาพที่ 6 เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He Biolistic® (Bio Rad gun) ก : อุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่าย
 ยิง ข : และขั้นตอนการเตรียมยิงอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยพลาสติกดีเอ็นเอ pUM 75 เข้าสู่ใบ
 ยาสูบ คือ ค-ง : นำแผ่น rupture disk ใส่ลงใน rupture disk retaining cap
 จ : นำ rupture disk retaining cap ประกอบกับเครื่องตรงส่วนปลายของ gas acceleration
 tube ฉ : หยดอนุภาคทองคำที่ถูกเคลือบด้วยพลาสติกดีเอ็นเอลงตรงกลางแผ่น macrocarrier
 ช : นำตะแกรงลวด (stopping screen) วางบน macrocarrier launch assembly
 ซ : นำ macrocarrier ที่แห้งมาวางบน stopping screen ในลักษณะคว่ำลง ปิดฝา macrocarrier
 launch assembly ฅ : ตำแหน่งของ macrocarrier launch assembly และตำแหน่งของ
 จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีตัวอย่างใบยาสูบอยู่ตรงกลาง โดยสามารถปรับระดับนี้ได้
 (6 9 และ 12 เซนติเมตร)

4. การตรวจสอบการถ่ายยีน

4.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *uidA* แบบชั่วคราว (transient expression)

นำใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนซึ่งเพาะเลี้ยงนาน 2 วัน (ภาพที่ 7ก) มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *uidA* (เอนไซม์ β -glucuronidase) แบบชั่วคราวด้วยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson *et al*, 1987) โดยกลุ่มเนื้อเยื่อยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนที่มีขนาดประมาณ 3x3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 7ข) มาแช่ในสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide (X-Gluc) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นซับสเตรตของเอนไซม์ β -glucuronidase สารละลาย sodium-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 และ TritonX-100 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นำมาเก็บในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ง) ทำการเปรียบเทียบปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนร่วมกับพื้นที่การกระจายตัวของอนุภาค ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ระดับแรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 650 และ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 6 9 และ 12 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนพื้นที่การกระจายตัวของอนุภาค (ภาพที่ 7ก) คือ พื้นที่ตำแหน่งตรงกลางเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร (c) และพื้นที่ตำแหน่งรอบนอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร (a b d และ e) นำเนื้อเยื่อใบยาสูบดังกล่าวมาตรวจนับจำนวนจุดสีน้ำเงินภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

วางแผนการทดลองแบบ CRD จัดตั้งทดลองแบบแฟกทอเรียล ปัจจัย 2X3 ในแต่ละทรีทเมนต์มี 5 ซ้ำ บันทึกข้อมูล โดยการนับจำนวนจุดสีน้ำเงินภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT)



ภาพที่ 7 ชิ้นเนื้อเยื่อเป่าหมายใบยาสูบที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมวางเรียงบริเวณตรงกลางจานเพาะ เลี้ยงร่วมกับพื้นที่การกระจายตัวของอนุภาค โดยตำแหน่งตรงกลางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร (c) และตำแหน่งรอบนอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร (a b d และ e) (ก) หลังจากนั้นนำใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนและพักพืชนาน 2 วัน ตัดให้มีขนาดประมาณ 3x3 มิลลิเมตร (ข)

4.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเป่าหมายด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืช

การสกัดดีเอ็นเอต้นพืชที่ด้านทานจากการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือก และต้นพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยดัดแปลงจากวิธีของ Aldrich and Cullis (1993) นำชิ้นเนื้อเยื่อจากส่วนใบ 1-2 ใบ ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ และแช่ลงในไนโตรเจนเหลว บดที่ละเอียดอย่างให้ละเอียดจนเป็นผง แล้วเติมบัฟเฟอร์ CTAB extraction (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บส่วนใสด้านบน นำมาใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย chloroform: isoamyl alcohol อีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นนำส่วนใสที่ได้เติมสารละลาย sodium acetate (NaOAc) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติมเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตร 1.2

เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันอย่างเบา ๆ โดยการกลับลอดไปมา แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและเติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมอย่างเบา ๆ นำมาตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งหนึ่ง แล้วนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาผึ่งให้แห้ง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ตรวจสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น GeneQuant *pro* ที่ค่าดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.2.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่ Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากข้อ 4.2.1 มาทำการตรวจหา ยีน *uidA* ยีน *aadA* และยีนคลอโรพลาสต์บางส่วนตรงบริเวณตำแหน่งเป้าหมาย (ยีน *rbcL* และยีน *accD*) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่อง PCR ของบริษัท PERKIN ELMER รุ่น GeneAmp PCR system 2400 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *uidA* ยีน *aadA* และยีนคลอโรพลาสต์บางส่วนตรงบริเวณตำแหน่งเป้าหมายมาตรวจหา ยีนด้วยการเปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอจากพืชที่อยู่รอดจากการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือก ดีเอ็นเอจากพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น negative control และพลาสมิดดีเอ็นเอ pUM 75 ที่เป็น positive control ภายใต้อาณัติผสมและการทำปฏิกิริยา PCR ตามภาคผนวก ง เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณมาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) บนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 40 นาที และย้อมอะกาโรสเจลที่ได้ด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำสะอาด นาน 10 นาที ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อตรวจหาขนาดของแถบดีเอ็นเอ

4.3 การตรวจสอบตำแหน่งของยีน *aadA* ในต้นพืชที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Southern blot

4.3.1 การแยกขนาดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำดีเอ็นเอต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin และดีเอ็นเอของต้นพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แต่ละตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม และ

คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III มาแยกขนาดด้วย เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 8 ชั่วโมง และย้อมอะกาโรสเจลที่ได้ด้วยสารละลาย เอธิเดียมโบรไมด์ นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำสะอาดนาน 10 นาที ตรวจสอบผลภายใต้แสง อัลตราไวโอเลต

4.3.2 การย้ายจีโนมิกดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรสสู่แผ่นเมมเบรนสำหรับการตรวจสอบ ตำแหน่งของยีน *aadA*

หลังจากการแยกขนาดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วนำ แผ่นเจลอะกาโรสที่ได้มาล้างสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ออกด้วยสารละลาย depurination buffer เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งสีของสาร bromophenol blue เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง เทสารละลายทิ้งและหยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ก่อนการแยกดีเอ็นเอสายคู่ เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วยการเติมสารละลาย denaturation จนท่วมแผ่นเจลอะกาโรส เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง เทสารละลายทิ้งและล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย neutralization เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง และปรับสมดุลด้วยสารละลาย 10XSSC เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้น เตรียมการย้ายจีโนมิกดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรสสู่แผ่นเมมเบรน โดยตัดกระดาษ Whatman 3 MM ที่ใช้เป็นสะพานมีขนาดใหญ่กว่าเจลวางลงในแชมเบอร์ที่มีสารละลาย 10XSSC ซึ่งกระดาษ Whatman 3 MM ต้องดูดซึมสารละลายและต้องไม่เกิดฟองอากาศ ก่อนวางกระดาษ Whatman 3 MM สำหรับรองแผ่นเจลที่มีขนาดใหญ่กว่าเจลแต่เล็กกว่าสะพานที่ดูดซึมสารละลาย นำแผ่นเจลวาง คว่ำหน้าลง และวางแผ่นไนลอนเมมเบรนที่มีขนาดเท่ากับเจลโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศเพราะ ฟองอากาศจะขัดขวางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจากเจลสู่ไนลอนเมมเบรน จากนั้นวางกระดาษ Whatman 3 MM ขนาดเท่ากับเจลจำนวน 3 แผ่น และกระดาษทิชชูที่มีขนาดเท่ากับเจล ความสูง ประมาณ 6 นิ้ว ที่อยู่ในระดับระนาบกับพื้น วางทับลงบนเจล ตามลำดับ ก่อนวางแผ่นหนักรุ่น ขนาด ประมาณ 500 กรัม (ภาคผนวก ง) นาน 16-24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาทำ สัญลักณ์เพื่อบอกตำแหน่งของดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่าง เติมสารละลาย 2XSSC เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิ ห้อง นาน 10 นาที แล้วอบแผ่นไนลอนเมมเบรนที่วางบนกระดาษ Whatman 3 MM ให้แห้งที่

อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อที่จะนำไปพรีไฮบริไดเซชันและไฮบริไดเซชันในขั้นตอนต่อไป

4.3.3 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe)

การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR Labeling of DNA Probes โดยนำคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *aadA* ในการทำปฏิกิริยา PCR (ภาคผนวก ง) เติม dNTP ผสมที่มีการติดฉลากดีเอ็นเอด้วย Digoxigenin-11-dUTP, alkali labile ของบริษัท Roche ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *aadA* นำ PCR product หรือ PCR DIG probe synthesis มาตรวจสอบการติดฉลากดีเอ็นเอด้วยการเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอระหว่างดีเอ็นเอที่ผ่านการติดฉลากกับดีเอ็นเอที่ไม่ติดฉลาก โดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟริซิส บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที (ภาคผนวก ค) หลังจากนั้นนำ PCR DIG probe synthesis ที่ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม มาปรับความเข้มข้นเป็น 2 นาโนกรัม เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการไฮบริไดเซชัน

4.3.4 การไฮบริไดเซชัน

นำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 4.3.2 มาพรีไฮบริไดเซชัน โดยเติมสารละลาย prehybridization ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ลงในเครื่อง hybridizer รุ่น Biometra Compact Line OV4 ส่วนดีเอ็นเอตรวจสอบจากข้อที่ 4.3.3 นำมาปริมาณ 1 ไมโครลิตรในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แช่ในน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที เติมลงในสารละลาย hybridization ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง

4.3.5 การตรวจสอบผลการไฮบริไดเซชัน

นำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 4.3.4 มาล้างด้วยสารละลาย low stringency buffer ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง เทสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย high stringency buffer ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย

washing buffer (ภาคผนวก ค) เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที เทสารละลายทิ้ง เดิมสารละลาย blocking buffer เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง นำแผ่นไนลอนเมมเบรนนี้มาเติมสารละลาย Anti-Digoxigenin-AP ของบริษัท Roche ในอัตราส่วนระหว่าง Anti-Digoxigenin-AP กับสารละลาย blocking buffer เป็น 1 ไมโครลิตรต่อ 5,000 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที และล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย washing buffer เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง เทสารละลายทิ้ง เดิมสารละลาย detection buffer เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลการไฮบริไดเซชันโดยนำแผ่นไนลอนเมมเบรนวางลงบนสารละลายที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลาย CDP-star (บริษัท Roche) กับสารละลาย detection buffer เป็น 1 ไมโครลิตร ต่อ 500 ไมโครลิตร บนถุงพลาสติกและได้ฟองอากาศออกให้หมด นาน 5 นาที ก่อนทำการรีดสารละลายที่อยู่ภายในถุงพลาสติกออกให้หมด ด้วยกระดาษทิชชูและปิดถุงพลาสติกให้สนิท แล้วนำไปประกบกับแผ่นฟิล์ม (Kodak Medical X-ray Film General Purpose Blue) ในห้องมืด นาน 15 นาที และล้างแผ่นฟิล์มด้วยสารละลาย developer น้ำ สารละลาย fixer และน้ำ ตามลำดับ ตรวจสอบผลที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม

5. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการวิจัยของสาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

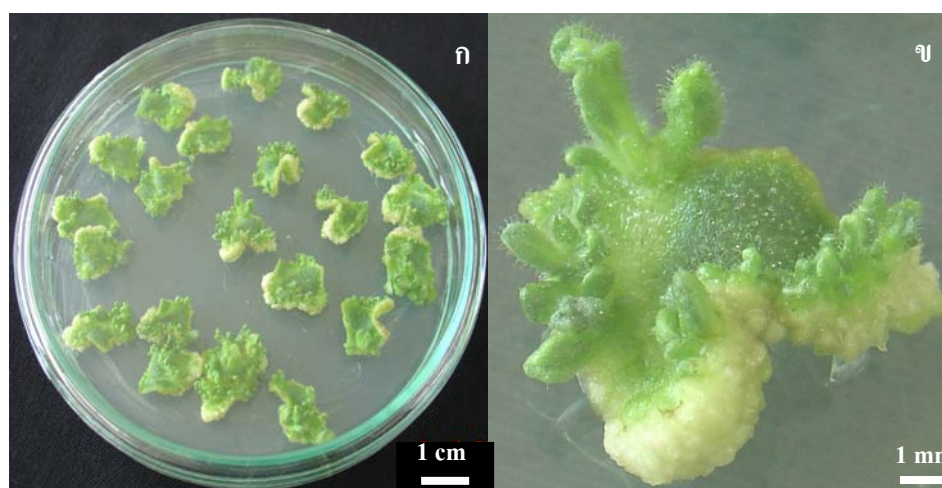
6. ระยะเวลาการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่ เดือนมีนาคม 2546 สิ้นสุดการทดลอง เดือนมกราคม 2549

ผลและวิจารณ์

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

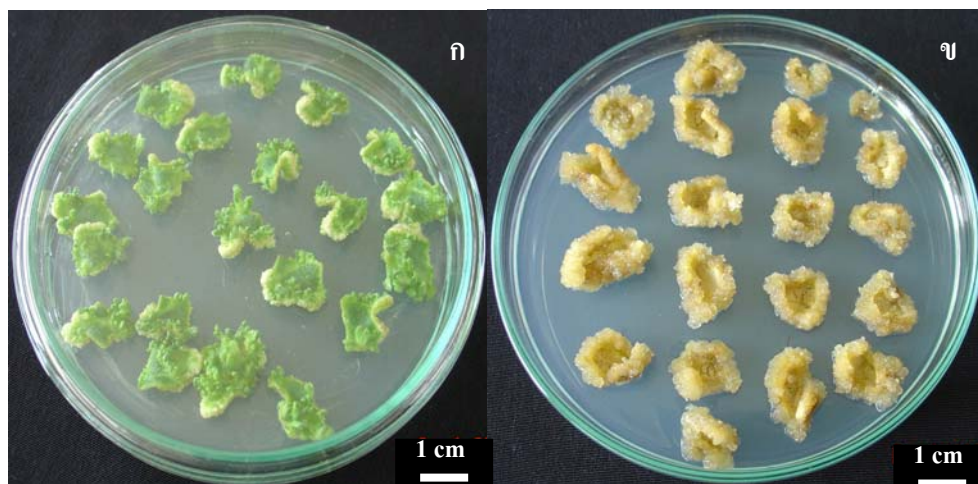
การทดสอบสูตรอาหารสังเคราะห์ในการชักนำใบยาสูบพัฒนาเป็นต้น โดยนำใบยาสูบอายุ 2 สัปดาห์ ตัดให้มีขนาดประมาณ 3x3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 8ก) พบว่า เกิดการชักนำใบยาสูบเป็นกลุ่มเซลล์สีเขียวและพัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก (ภาพ 8ข) ซึ่งมีจำนวนยอดเฉลี่ย 15.73 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อยาสูบ (ไม่แสดงข้อมูล) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Svab *et al.* (1990) และ Newell *et al.* (2003) เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นสารกลุ่มไซโตไคนิน (BA) ร่วมกับสารกลุ่มออกซิน (NAA) ที่มีผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช คือสารไซโตไคนินกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์พัฒนาขึ้นเป็นลำต้น ขณะที่สารออกซินกระตุ้นให้เกิดการขยายขนาดและการยึดตัวของเซลล์ (ฟิรเดซ, 2529) ทำให้กลุ่มเซลล์เหล่านี้พัฒนากลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำใบยาสูบให้เกิดยอด เพื่อใช้ในการศึกษาการถ่ายยีนต่อไป



ภาพที่ 8 การเพาะเลี้ยงใบยาสูบบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 สัปดาห์ (ก) และการชักนำให้เกิดยอดจากใบยาสูบ (ข) ภายใต้อุณหภูมิ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตร ต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน

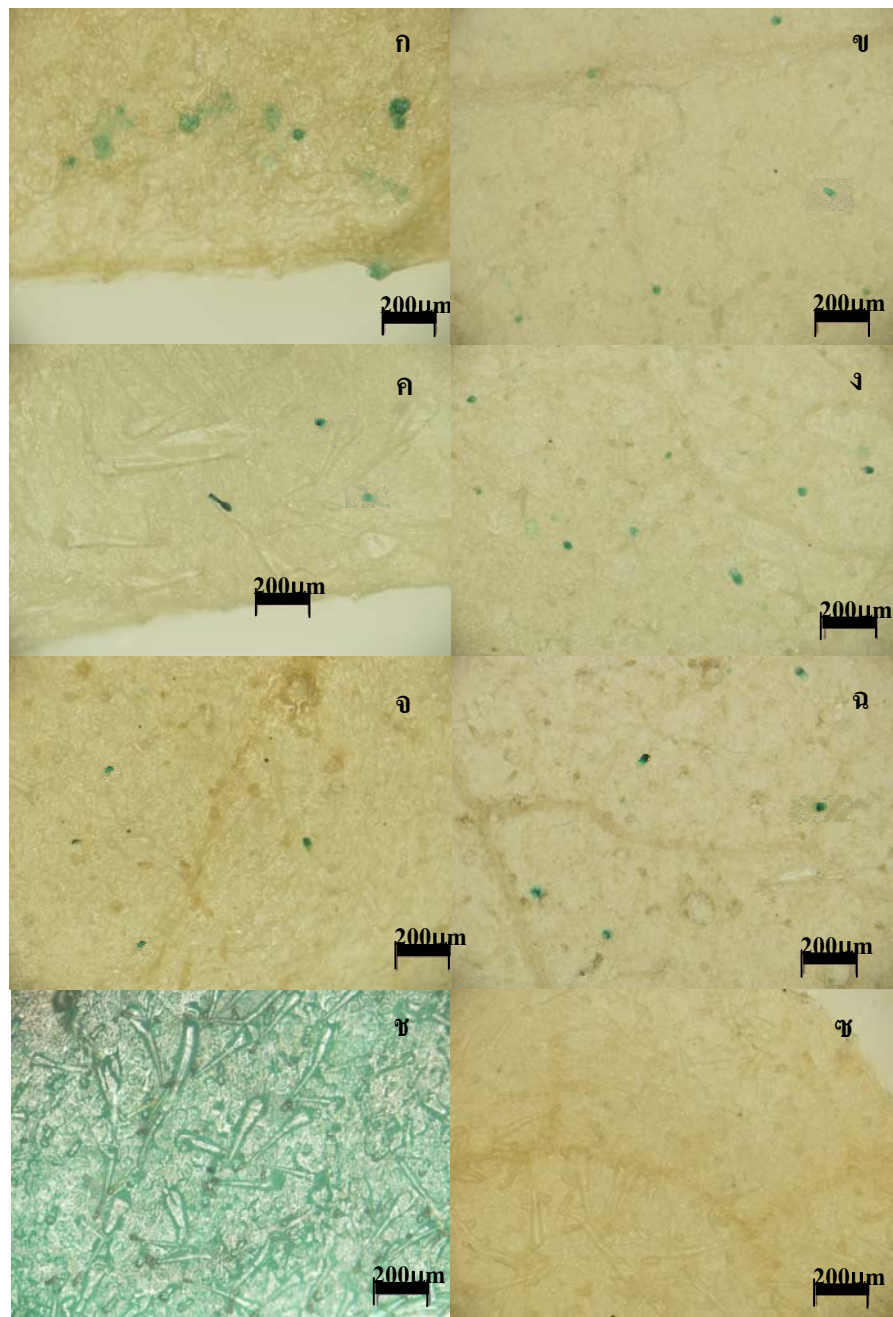
การถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ต้องมียีนคัดเลือก (selectable marker gene) เพื่อช่วยในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนออกจากเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยยีนคัดเลือกนี้จะแทรกอยู่ในส่วนของคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ดังภาพที่ 5 ซึ่งเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนจะแสดงลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่จำเพาะตอยีนนั้น ๆ ในการศึกษาครั้งนี้คือ สารปฏิชีวนะ spectinomycin ซึ่งต้องทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ spectinomycin ที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้คัดเลือก โดยนำใบยาสูบอายุ 2 สัปดาห์ ตัดให้มีขนาดประมาณ 3x3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามรายงานการศึกษาของ Svab *et al.* (1990) (ภาพที่ 9ก) ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ นาน 3 เดือน พบว่า สารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการทำลายเนื้อเยื่อใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนทำให้มีลักษณะสีขาวซีดและตายในที่สุด (ภาพที่ 9ข) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Svab *et al.* (1990) โดยเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีลักษณะสีขาวซีด เนื่องจากสารปฏิชีวนะ spectinomycin ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของไรโบโซมในพลาสต์ โดยเข้าจับกับโปรตีนของไรโบโซมขนาด 30s และขัดขวางการเคลื่อนที่ของเปปไทด์ tRNA จากตำแหน่ง P เป็นตำแหน่ง A (Marins, 2004) ดังนั้นในการศึกษาถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์จึงสามารถเลือกใช้สารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนออกจากเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 9 การเพาะเลี้ยงใบยาสูบบนอาหารชักนำให้เกิดแคลัสสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) เปรียบเทียบกับใบยาสูบที่คัดเลือกบนอาหารคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ นาน 3 เดือน ใบยาสูบมีลักษณะขาวซีดและตายในที่สุด (ข) ภายใ้ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

3. การตรวจสอบการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ยาสูบ

นำใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนโดยใช้คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ Biolistic PDS-1000/He Biolistic® (Bio Rad gun) โดยใช้อนุภาคทองคำขนาด 1 ไมโครเมตร ภายใ้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 650 และ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 6, 9 และ 12 เซนติเมตร ตามลำดับ มาตรฐานตรวจสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนตามวิธีต่าง ๆ ดังนี้



ภาพที่ 10 การแสดงออกของยีน *uidA* แบบชั่วคราววิธี GUS histochemical assay ของเนื้อเยื่อ
 ใบยาสูบ ภายหลังได้รับการถ่ายยีนนาน 2 วัน เมื่อใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมและระยะห่างของ
 เนื้อเยื่อเป้าหมายต่างกัน คือ ก-ค : ชิ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 650 ปอนด์ต่อ
 ตารางนิ้ว ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6.9 และ 12 เซนติเมตร ตามลำดับ
 ง-จ : เนื้อเยื่อเป้าหมายที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะห่างของ
 เนื้อเยื่อเป้าหมาย 6.9 และ 12 เซนติเมตร ตามลำดับ ข และ ช คือ เนื้อเยื่อที่ได้รับการ
 ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อและเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ตามลำดับ

3.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *uidA* แบบชั่วคราว

จากการสุมขึ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ผ่านการถ่ายยีนเป็นเวลา 2 วัน มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *uidA* แบบชั่วคราว พบว่า ทุกสภาวะปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนร่วมกับพื้นที่การกระจายตัวของอนุภาคที่ใช้ในการถ่ายยีนสามารถเกิดการแสดงออกของยีน *uidA* เป็นจุดสีน้ำเงิน (ภาพที่ 10) ซึ่งจุดสีน้ำเงินดังกล่าวสามารถหาประสิทธิภาพในการถ่ายยีนจากคลอโรฟลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่เนื้อเยื่อใบยาสูบได้จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์จำนวนขึ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายที่มีจุดสีน้ำเงินและจำนวนจุดสีน้ำเงินต่อขึ้นเนื้อเยื่อเป้าหมาย

3.1.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีน

ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนระหว่างระดับแรงดันก๊าซฮีเลียม (650 และ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) ร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย (6 9 และ 12 เซนติเมตร) พบว่า ในทุกสภาวะการทดลองเกิดจุดสีน้ำเงินที่ให้เปอร์เซ็นต์จำนวนขึ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายที่มีจุดสีน้ำเงินไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า สภาวะการทดลองที่ระดับแรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่าสภาวะการทดลองที่ระดับแรงดันก๊าซฮีเลียม 650 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เมื่อพิจารณาระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ใช้ในการถ่ายยีน พบว่า ระดับแรงดันก๊าซฮีเลียมทั้งสองระดับ (650 และ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) ให้เปอร์เซ็นต์จำนวนขึ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายที่มีจุดสีน้ำเงินมากที่สุดที่ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายน้อยสุด คือ 6 เซนติเมตร (62.46 และ 76.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เมื่อระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายเพิ่มสูงขึ้นเป็น 9 และ 12 เซนติเมตร เปอร์เซ็นต์จำนวนขึ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายที่มีจุดสีน้ำเงินมีแนวโน้มลดลง (ตารางที่ 3) แสดงว่าระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ใกล้กว่าอาจได้รับดีเอ็นเอที่ถูกเคลือบบนอนุภาคทองจากแรงผลักดันของก๊าซฮีเลียมได้มากกว่าเนื้อเยื่อเป้าหมายที่อยู่ไกล เมื่อพิจารณาปัจจัยของแรงดันก๊าซฮีเลียม พบว่า การใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว มีแนวโน้มเกิดการแสดงออกของยีนที่ถูกถ่ายเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ได้สูงกว่าการใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 650 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อาจเกิดจากแรงดันก๊าซฮีเลียมที่สูงช่วยขับเคลื่อนอนุภาคทองที่เคลือบดีเอ็นเอไว้และนำดีเอ็นเอทะลุเข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อเป้าหมายได้ดีที่ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายใกล้คือ 6 เซนติเมตร แม้ว่าระดับแรงดันก๊าซฮีเลียมสูงมีโอกาสนี้เนื้อเยื่อเกิดความเสียหายได้มากเมื่อเปรียบเทียบกับแรงดันก๊าซฮีเลียมต่ำแต่เนื้อเยื่อเป้าหมายสามารถฟื้นตัวและอยู่รอดได้ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนด้วยคลอโรพลาสต์เวกเตอร์สูงซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Hou *et al.* (2003) และ Skarjinskaia *et al.* (2003) ดังนั้นสภาวะการถ่ายยีนที่

ระดับแรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่ใบยาสูบได้สูงที่สุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายที่มีจุดสีน้ำเงินสูงถึง 76.27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในพืชเนื้อที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร เกิดการแสดงออกของยีน *uidA* สูงที่สุด (Zubko *et al.*, 2004)

ตารางที่ 3 การแสดงออกของยีน *uidA* แบบชั่วคราวของชิ้นเนื้อเยื่อใบยาสูบที่ถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He Biolistic® (Bio Rad gun) โดยใช้อนุภาคทองขนาด 1 ไมโครเมตร ที่เคลือบด้วยคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 2 วัน

ระดับแรงดันก๊าซฮีเลียม (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)	ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์ของจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดจุดสีน้ำเงิน	จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยต่อชิ้นเนื้อเยื่อเป้าหมาย
650	6	62.46a	5.43a
	9	60.75a	2.41a
	12	48.46a	1.59a
1,100	6	76.27a	4.91a
	9	56.37a	1.31a
	12	69.95a	2.40a

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติด้วยการวิเคราะห์การเปรียบเทียบแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ C.V. เท่ากับ 33.84 เปอร์เซ็นต์

$$\text{เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดจุดสีน้ำเงิน} = \frac{\text{ชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดจุดสีน้ำเงิน}}{\text{ชิ้นเนื้อเยื่อนำมาตรวจสอบทั้งหมด}} \times 100$$

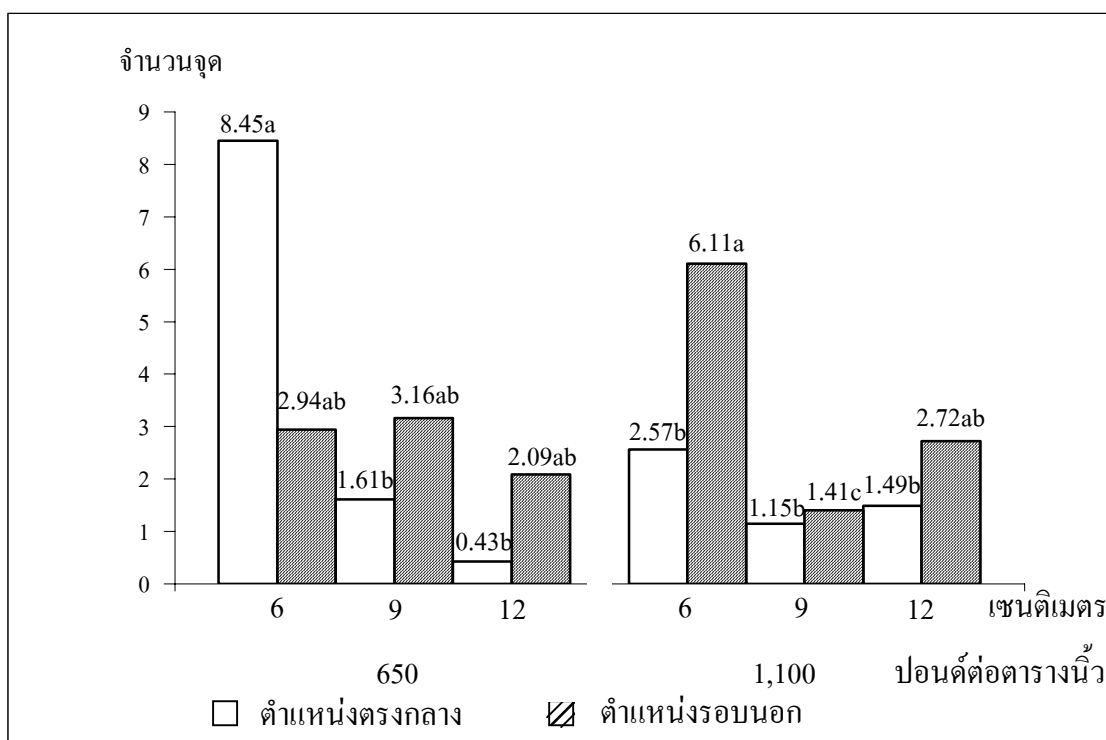
เมื่อพิจารณาจำนวนจุดสีน้ำเงินต่อชิ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 650 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร เท่ากับ 5.43 จุด เมื่อเพิ่มระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายเป็น 9 และ 12 เซนติเมตร จำนวนจุดสีน้ำเงินต่อชิ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายลดลง (2.41 และ 1.59 จุด ตามลำดับ) เมื่อใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร มีจำนวนจุดสีน้ำเงินต่อชิ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายสูงที่สุดถึง 4.91 จุด

รองลงมาคือ ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 12 (2.40 จุด) และ 9 เซนติเมตร (1.31 จุด) ตามลำดับ ดังตารางที่ 3 แต่ Yoshimoto *et al.* (2001) รายงานว่าใน *Arabidopsis* ที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร เกิดการแสดงออกของยีน *uidA* จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์สูงที่สุด

3.1.2 พื้นที่การกระจายตัวของอนุภาค

พื้นที่การกระจายตัวของอนุภาคตำแหน่งตรงกลางเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร และตำแหน่งรอบนอกเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร (ภาพที่ 7ก) เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *uidA* แตกต่างกัน จากภาพที่ 11 แสดงให้เห็นว่า ตำแหน่งตรงกลาง (ภาพที่ 7ก) ภายใต้แรงดันก๊าซฮีเลียม 650 และ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว มีจำนวนจุดสีน้ำเงินต่อชิ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายลดลงเมื่อระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายเพิ่มขึ้น กล่าวคือ แรงดันก๊าซฮีเลียม 650 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 9 และ 12 เซนติเมตร มีจำนวนจุดสีน้ำเงินต่อชิ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายเท่ากับ 8.45 1.61 และ 0.43 จุด ตามลำดับ สอดคล้องกับผลจากแรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ซึ่งที่ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 9 และ 12 เซนติเมตร ให้จำนวนจุดเท่ากับ 2.57 1.15 และ 1.49 จุด ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า การใช้แรงดันในการขับเคลื่อนอนุภาคทองที่ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายใกล้มีการกระจายของอนุภาคน้อยกว่าที่ระยะไกลทำให้อนุภาคทองเข้าสู่ตำแหน่งตรงกลางได้มากจึงพบจุดสีน้ำเงินมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของลาวัลย์ (2543)

สำหรับจำนวนจุดสีน้ำเงินต่อชิ้นส่วนเป้าหมายตำแหน่งรอบนอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร พบว่า แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ระยะห่างเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร มีจำนวนจุดสีน้ำเงินต่อชิ้นส่วนเป้าหมายสูงที่สุดถึง 6.11 จุด และต่ำที่สุดที่ระยะห่างเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร (1.41 จุด) แต่แรงดันก๊าซฮีเลียม 650 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ระยะห่างเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินต่อชิ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายสูงที่สุดถึง 3.16 จุด และต่ำที่สุดที่ระยะห่างเนื้อเยื่อเป้าหมาย 12 เซนติเมตร เท่ากับ 2.09 จุด ดังภาพที่ 11



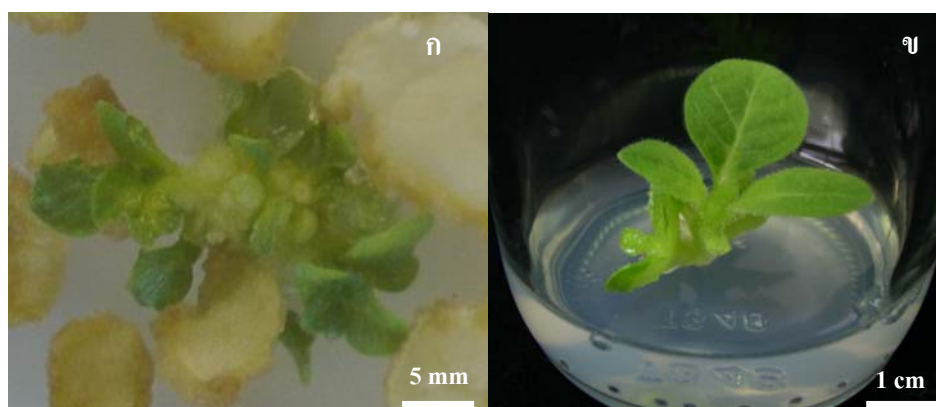
ภาพที่ 11 เปรียบเทียบจำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยต่อชิ้นเนื้อเยื่อใบยาสูบของพื้นที่การกระจายตัวของอนุภาค ตำแหน่งตรงกลางเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร และตำแหน่งรอบนอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ภายหลังได้รับการถ่ายยีนนาน 2 วัน ภายใต้แรงดันก๊าซซีเลียมที่ 650 และ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 6 9 และ 12 เซนติเมตร ตามลำดับ

3.2 การคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก

การคัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่มีโอกาสได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารคัดเลือกเป็นขั้นตอนแรกในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน (Maliga, 2003 และ Langbecker *et al.*, 2004) โดยการถ่ายยีนจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ภายใต้แรงดันก๊าซซีเลียม (แรงดันก๊าซซีเลียม 650 และ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) ร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย (ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 6 9 และ 12 เซนติเมตร) ที่แตกต่างกันเข้าสู่โคมคลอโรพลาสต์ยาสูบจากนั้นคัดเลือบบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ พบว่า ใบยาสูบที่ผ่านการคัดเลือกลาน 45-50 วัน เกิดแคลลัสสีเขียวที่เซลล์เกาะกันอย่างหลวม (friable callus) ซึ่งพัฒนาเป็นยอดได้ ขณะที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อบางส่วนมีลักษณะสีขาวซีดซึ่งไม่สามารถเจริญเติบโตและ

พัฒนาต่อ (ภาพที่ 12ก) จากนั้นเมื่อนำยอดยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin ดังกล่าว มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ spectinomycin และยอดดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 12ข)

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบที่เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายทั้งหมดจำนวน 390 ครั้ง ได้ต้นที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ทั้งหมดจำนวน 76 โคลน ดังตารางที่ 4 โดยต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin อาจเกิดจากสาเหตุ 3 ประการ คือ (1) ยีน *aadA* สอดแทรกเข้าสู่โครโมโซมของนิวเคลียส (2) ยีน *aadA* สอดแทรกเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ หรือ (3) เกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติของคลอโรพลาสต์ ทำให้เซลล์พืชต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin และ streptomycin (Svab and Maliga, 1993, Hou *et al.*, 2003 และ Langbecker *et al.*, 2004) ดังนั้นต้องทำการตรวจสอบต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin ในระดับโมเลกุลต่อไป



ภาพที่ 12 การเกิดยอดยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากได้รับการถ่ายยีนนาน 45-50 วัน (ก) และพัฒนาเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ (ข) ภายใต้ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 จำนวนต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกในอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ spectinomycin ภายหลังจากได้รับการถ่ายยีนจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He Biolistic® (Bio Rad gun) ที่สภาวะต่าง ๆ

แรงดันก๊าซ ฮีเลียม (psi)	ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย (cm)			แรงดันก๊าซ ฮีเลียม (psi)	ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย (cm)		
	6	9	12		6	9	12
650	1A	1B	1C	1,100	1D	1E	1F
	2A	2B	2C		2D	2E	2F
	3A	3B	3C		3D	3E	3F
		4B	4C		4D	4E	4F
		5B	5C		5D	5E	5F
		6B	6C		6D	6E	6F
		7B	7C		7D	7E	7F
		8B	8C		8D	8E	8F
		9B	9C		9D	9E	9F
		10B	10C		10D	10E	10F
		11B	11C		11D	11E	11F
		12B	12C		12D		12F
		13B	13C		13D		13F
			14C		14D		14F
			15C		15D		15F
			16C				16F
			17C				
			18C				

4. การตรวจสอบการถ่ายยีนในระดับโมเลกุล

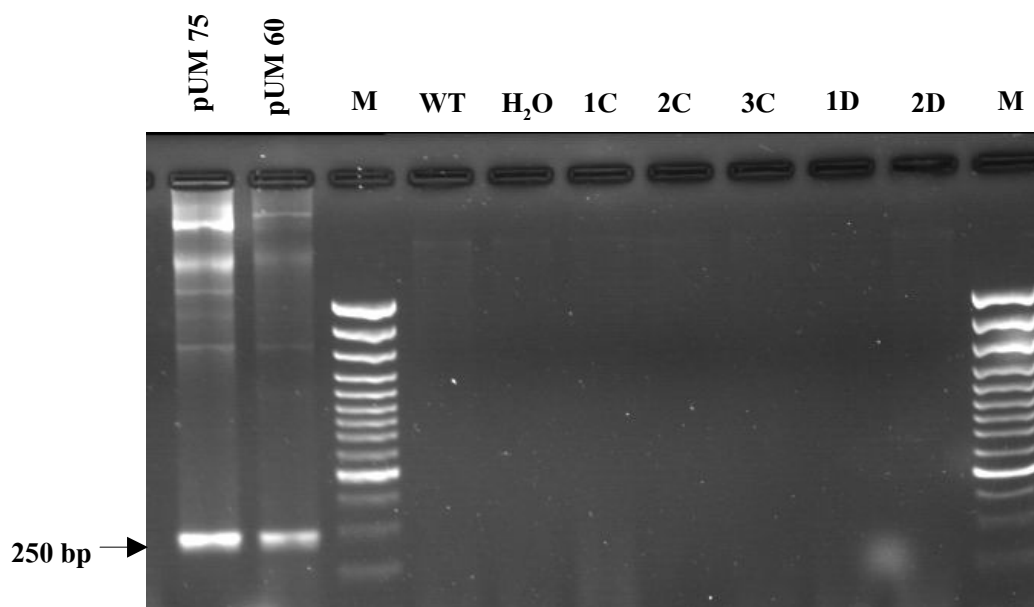
การตรวจสอบการถ่ายยีนในระดับโมเลกุลเพื่อแสดงให้เห็นว่ายีน *aadA* สอดแทรกเข้าสู่ตำแหน่งจีโนมของคลอโรพลาสต์ยาสูบในตำแหน่งเป้าหมายที่ยีน *rbcL* และยีน *accD* ทำโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ Polymerase Chain Reaction (PCR) และเทคนิค Southern blot

4.1 การตรวจสอบการถ่ายยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR

นำดีเอ็นเอจากต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin นาน 3 เดือน (จากผลการทดลอง 3.2) มาตรวจสอบการถ่ายยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ตรวจสอบยีน *uidA* ยีน *aadA* และตำแหน่งการสอดแทรกเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ยาสูบ เพื่อทำการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aadA* ในจีโนมพืชและการสอดแทรกของยีนนี้เข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ยาสูบในตำแหน่งเป้าหมายที่ยีน *rbcL* และยีน *accD*

4.1.1 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *uidA*

เมื่อใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *uidA* ด้วยไพรเมอร์ของยีน *uidA* พบว่า ดีเอ็นเอของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ไม่ปรากฏแถบ ดีเอ็นเอขนาดเท่ากับยีน *uidA* จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 (250 คู่เบส) เช่นเดียวกับดีเอ็นเอจากต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 13) แสดงว่ายีน *uidA* ไม่สอดแทรกเข้าสู่จีโนมของยาสูบอย่างถาวร แต่มีการแสดงออกของยีน *uidA* แบบชั่วคราว (ผลการทดลองที่ 3.1) เนื่องจากการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราวนั้นเป็นการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่เข้าสู่เซลล์พืชภายใน 48-72 ชั่วโมง ภายหลังได้รับการถ่ายยีน แต่ยีนเป้าหมายอาจจะไม่สอดแทรกเข้าสู่จีโนมของพืช (Janssen, 2002) หรืออาจจะเกิดจากการฉีกขาดของคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 (ขนาด 15.3 กิโลเบส) ในขั้นตอนการเคลือบดีเอ็นเอบนอนุภาคทองในวิธีการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคที่ทำให้บางส่วนของยีน *uidA* ฉีกขาดออกจากกัน ดังนั้นอาจจะทำให้ไม่มีส่วนของยีน *uidA* เชื่อมอยู่กับคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ส่งผลให้ไม่มียีน *uidA* ที่ไม่สามารถเข้าร่วมกับจีโนมพืชได้และไม่มีลำดับเบสที่ไพรเมอร์ของยีน *uidA* สามารถเข้าไปจับได้ จึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการ (250 คู่เบส) สอดคล้องกับรายงานของกรีธา (2547) และ Heifetz (2000) ว่าเทคนิคการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคที่ใช้พลาสมิดดีเอ็นเอขนาดใหญ่ในการถ่ายยีนอาจจะเกิดการฉีกขาดของพลาสมิดดีเอ็นเอได้ง่ายซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนต่าง ๆ การถ่ายยีน



ภาพที่ 13 ตัวอย่างการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *uidA* ในต้นยาสูบอายุ 3 เดือน ที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *uidA*

M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย 100 bp DNA ladder plus จากบริษัท Fermentas
pUM 60 คือ คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 60 ที่มียีน *uidA* ขนาด 250 คู่เบส (positive control)

pUM 75 คือ คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ที่มียีน *uidA* ขนาด 250 คู่เบส (positive control)

WT คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

1C 2C 3C 1D 2D คือ ดีเอ็นเอของต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

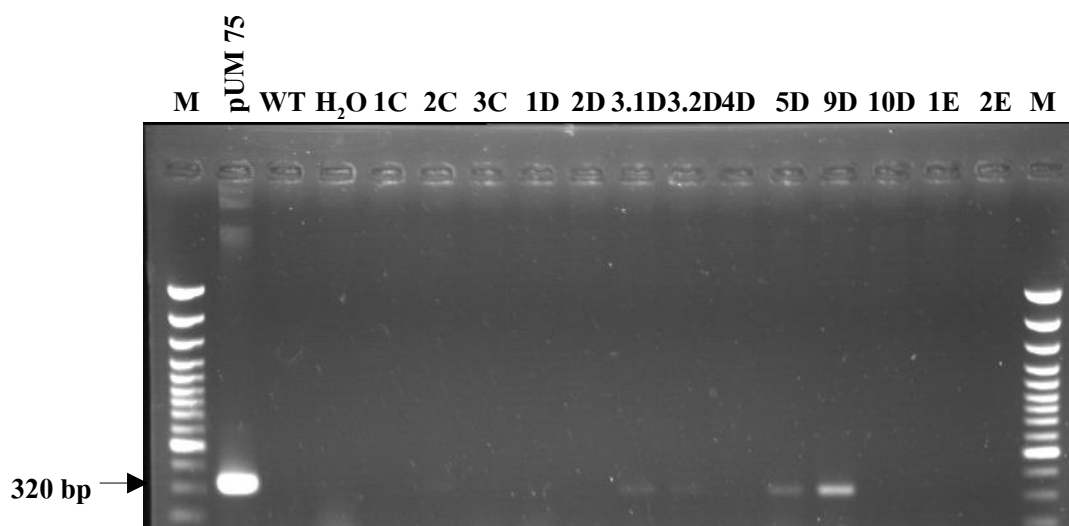
4.1.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aadA*

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aadA* ในจีโนมของต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin ด้วยไพรเมอร์ *aadA* ดังภาพที่ 14 พบว่า ผล PCR ของต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin โคลนที่ 3.1D 3.2D 5D และ 9D ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 320 คู่เบส ซึ่งเท่ากับขนาดดีเอ็นเอของยีน *aadA* จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 แต่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *aadA* จากต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและน้ำกลั่น แสดงว่าต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin ดังกล่าวมียีน *aadA* สอดแทรกเข้าสู่จีโนมของยาสูบ

จากการศึกษาการถ่ายยีนในทุกสภาวะการทดลองมีจำนวนเนื้อเยื่อเป้าหมายทั้งหมด 390 ครั้ง เมื่อทำการคัดเลือกด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารคัดเลือก พบว่า มีต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ทั้งหมดจำนวน 76 โคลน (ตารางที่ 4) ซึ่งทำการตรวจสอบโดยวิธี PCR พบต้นยาสูบที่มียีน *aadA* สอดแทรกอยู่ในจีโนมพืชเพียงจำนวน 26 โคลน (ตารางที่ 5) การที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนน้อย อาจเนื่องมาจากการกระจายตัวของอนุภาคทองที่ใช้ในการยิงเข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายในแต่ละครั้งอาจจะมีกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ ทำให้โอกาสที่พลาสมิดดีเอ็นเอเคลื่อนบนอนุภาคทองที่ถูกยิงเข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายในแต่ละครั้งได้ไม่เท่ากันและส่งผลให้ยีนเป้าหมายที่ต้องการถ่ายยีนเข้าสู่พืชน้อยกว่าการกระจายตัวของอนุภาคทองที่สม่ำเสมอ นอกจากนี้การถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อความสำเร็จในเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนหลายประการ เช่น การศึกษาของ Langbecker *et al.* (2004) รายงานว่าขนาดของอนุภาคทองมีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมพลาสต์ติด (plastid) ของเซลล์แขวนลอยยาสูบ โดยการถ่ายยีนด้วยอนุภาคทองที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยถึง 0.4 ไมโครเมตรมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่าการถ่ายยีนด้วยอนุภาคทองที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ 3-4 เท่า ส่วนต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin แต่ไม่สามารถตรวจพบการสอดแทรกยีน *aadA* เข้าสู่จีโนมพืชจำนวน 50 โคลน คิดเป็น 65.79 เปอร์เซ็นต์ของต้นที่รอดชีวิตทั้งหมด (ข้อมูลดังกล่าวได้จากการนำจำนวนโคลนยาสูบที่ไม่มียีน *aadA* ทั้งหมดคูณหนึ่งร้อยและหารด้วยจำนวนโคลนยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ทั้งหมด) การที่ต้นยาสูบผ่านการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกแต่ไม่ปรากฏการมีอยู่ของยีน *aadA* อาจเนื่องมาจากขั้นตอนการคัดเลือกเนื้อเยื่อใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารคัดเลือกที่ใช้การคัดเลือกบนอาหารแข็งเพียงอย่างเดียว ทำให้เนื้อเยื่อใบยาสูบบริเวณขอบใบไม่ได้สัมผัสกับอาหารคัดเลือกซึ่งสามารถชักนำเนื้อเยื่อใบยาสูบดังกล่าวให้เกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นยาสูบที่เจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ ขณะที่ Svab *et al.*, 1990 และ Hou *et al.*, 2003

รายงานว่า ยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin และ streptomycin เกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติของยีน 16s rRNA ในคลอโรพลาสต์บริเวณลำดับเบสที่ 278 คู่เบส สอดคล้องกับผลการทดลองของ Hou *et al.* (2003) และ Sidorov *et al.* (1999) ที่รายงานว่า การคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ spectinomycin ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin และ streptomycin จำนวนมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองนี้ พบว่า ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *aadA* จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ทั้งหมด (26 โคลน) ดังตารางที่ 5 อาจมียีน *aadA* สอดแทรกเข้าอยู่ในนิวเคลียสหรือจีโนมคลอโรพลาสต์ซึ่งทำให้เนื้อเยื่อแสดงความต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ดังนั้นต้องตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของยีน *aadA* ต่อไป



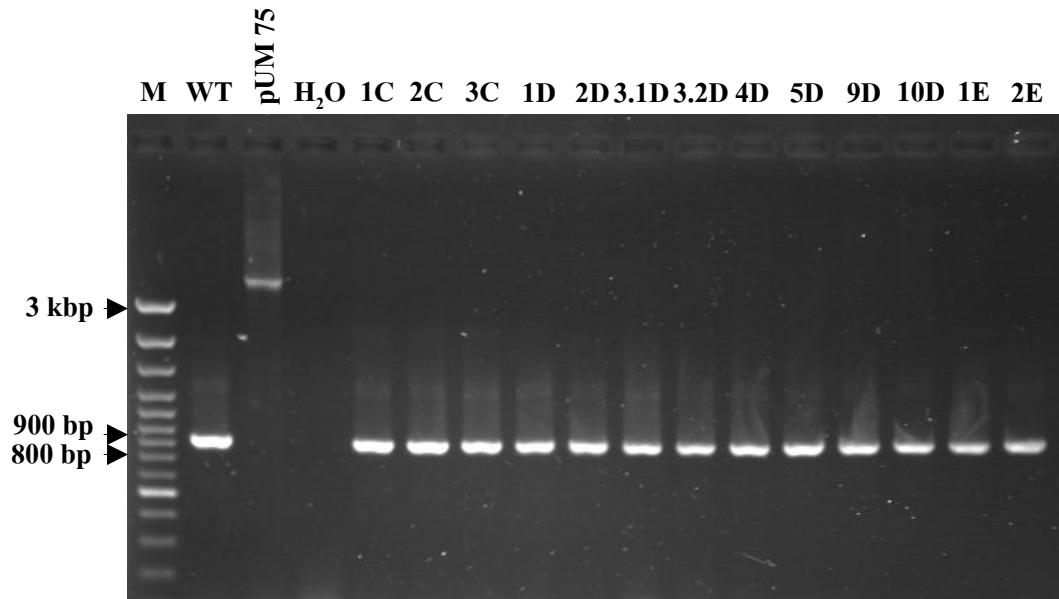
ภาพที่ 14 ตัวอย่างการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aadA* ในต้นยาสูบอายุ 3 เดือน ที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยวิธีปฏิกิริยาถูกละ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *aadA*
 M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย 100 bp DNA ladder plus จากบริษัท Fermentas
 WT คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)
 pUM 75 คือ คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ที่มียีน *aadA* ขนาด 320 คู่เบส (positive control)
 1C 2C 3C 1D 2D 3.1D 3.2D 4D 5D 9D 10D 1E และ 2E คือ ดีเอ็นเอของต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 5 จำนวนต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ที่มี ยีน *aadA* ที่สภาวะต่าง ๆ ของการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He Biolistic® (Bio Rad gun) จำนวนทั้งหมด 26 โคลน

ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้า		
หมายเหตุ (cm)	แรงดันก๊าซฮีเลียม (psi)	
	650	1,100
6	1A 2A	1D 3D 4D 5D 9D 11D 12D
9	1B 2B 3B 6B 7B 10B 11B 12B	7E
12	1C 2C 4C 7C	3F 11F 12F 13F

4.1.3 การตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของยีน *aadA* จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่จีโนมของยาสูบ

การตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของ chloroplast expression cassette จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่จีโนมของยาสูบด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CP-F และ CP-R จากภาพที่ 15 พบว่า ผล PCR ของต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin ทุกโคลนปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอของต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (WT) คือ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 820 คู่เบส แสดงว่าต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin มีการสอดแทรกของ chloroplast expression cassette จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 บริเวณอื่นที่ไม่ใช่ตำแหน่งเป้าหมายของยีน *rbcL* และ ยีน *accD* ในจีโนมของคลอโรพลาสต์ โดยเปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์นั้นต้องปรากฏขนาดดีเอ็นเอที่มากกว่า 820 คู่เบส ดังภาพที่ 16 เนื่องจากไพรเมอร์ CP-F และไพรเมอร์ CP-R ที่เป็นจุดเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน *rbcL* และยีน *accD* ของคลอโรพลาสต์ โดยตำแหน่งของยีนทั้งสองนี้เป็นตำแหน่งที่ยีน *aadA* จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 สอดแทรกเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ ดังนั้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์นั้นต้องปรากฏขนาดดีเอ็นเอประมาณ 5.2 กิโลเบส (ภาพที่ 16) โดยการตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของยีน *aadA* ในเบื้องต้นครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายีน *aadA* จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ไม่มีการสอดแทรกเข้าสู่คลอโรพลาสต์ในตำแหน่งเป้าหมายที่กำหนด (ดังตารางที่ 6) ซึ่งต้องทำการยืนยันตำแหน่งการสอดแทรกของยีน *aadA* ด้วยเทคนิค Southern blot ต่อไป



ภาพที่ 15 ตัวอย่างการตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของยีน *aadA* ใน chloroplast expression cassette จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่จีโนมของยาสูบด้วยวิธี PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ CP-F และไพรเมอร์ CP-R

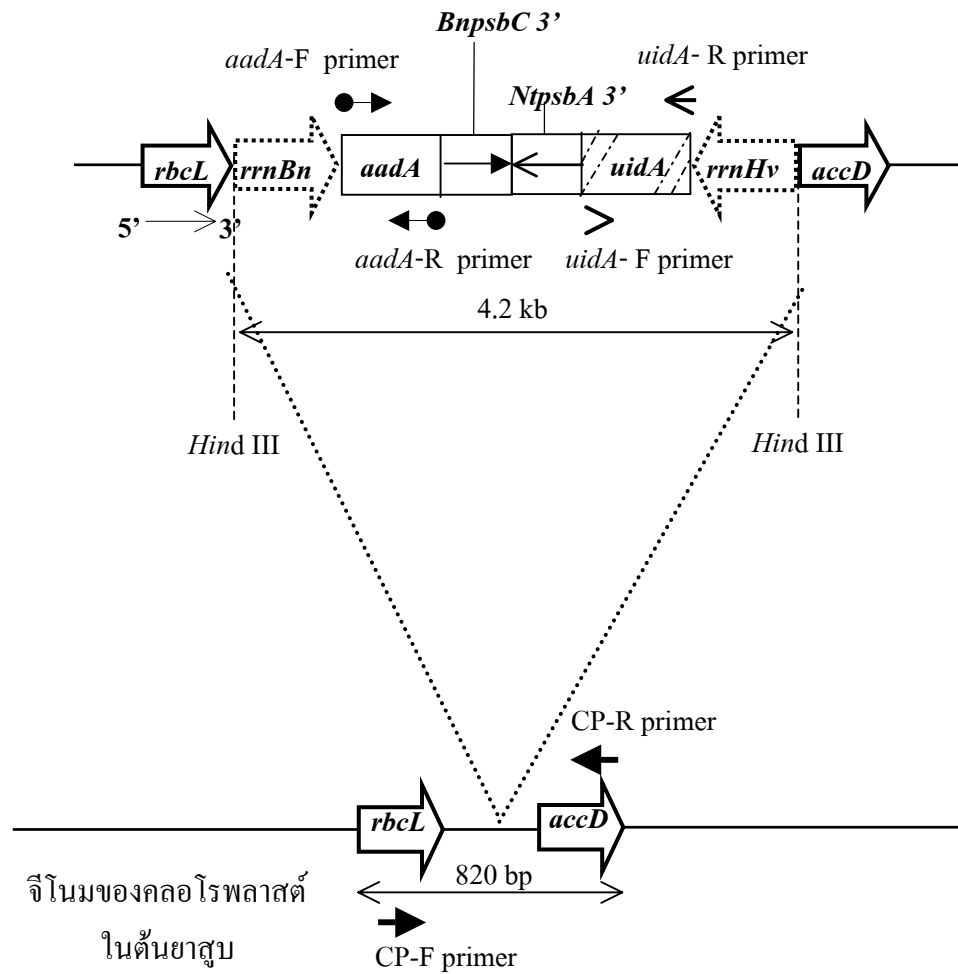
M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย 100 bp DNA ladder plus จากบริษัท Fermentas

WT คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

pUM 75 คือ คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 (positive control)

1C 2C 3C 1D 2D 3.1D 3.2D 4D 5D 9D 10D 1E และ 2E คือ ดีเอ็นเอของต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75



ภาพที่ 16 ตำแหน่งของยีน *aadA* จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ที่สอดแทรกเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ในต้นยาสูบด้วยกลไกการแลกเปลี่ยนยีน homologous recombination เมื่อตรวจสอบโดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ CP-F และ CP-R (→) พบว่า ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนต้องให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 820 คู่เบส ขณะที่ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ต้องให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 5.2 กิโลคู่เบส และแสดงตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์ *aadA* (●→) และไพรเมอร์ *uidA* (>)

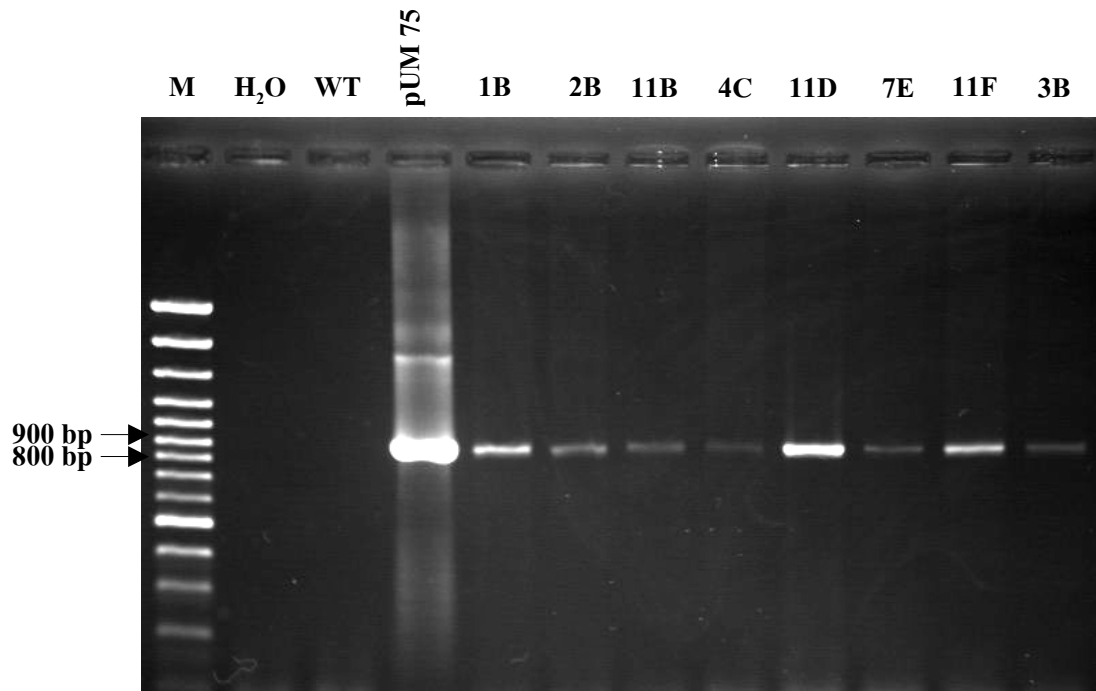
4.1.4 การตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette เพียงบางส่วนเข้าที่ตำแหน่งเป้าหมายของจีโนมคลอโรพลาสต์ยาสูบ

การตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette เพียงบางส่วน คือ ยีน *aadA* หรือยีน *uidA* เข้าที่ตำแหน่งเป้าหมายในจีโนมของคลอโรพลาสต์ยาสูบด้วยเทคนิค PCR คือ การตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette เข้าที่ตำแหน่งเป้าหมายยีน *rbcL* บนจีโนมคลอโรพลาสต์ของยาสูบที่ด้านทานต่อการคัดเลือกการมีอยู่ของยีน *aadA* ด้วยไพรเมอร์ CP-F และไพรเมอร์ *aadA*-R พบว่า ดีเอ็นเอของยาสูบที่มีการสอดแทรกของยีน *aadA* เข้าสู่จีโนมของยาสูบจำนวน 26 โคลน (จากผลการทดลองที่ 4.12) ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 880 คู่เบส เท่ากับขนาดดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ขณะที่ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (WT) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอดังกล่าว (ภาพที่ 17) แสดงว่า ต้นยาสูบดังกล่าวนี้มีการสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette ที่ยีน *aadA* เข้าที่ตำแหน่งเป้าหมายบริเวณยีน *rbcL* บนจีโนมของคลอโรพลาสต์ยาสูบ (ตารางที่ 6) เนื่องจากต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ด้วยกลไก homologous recombination สามารถตรวจสอบการสอดแทรกของยีนเป้าหมายด้วยไพรเมอร์ CP-F ซึ่งมีความจำเพาะจงต่อยีน *rbcL* ในจีโนมของคลอโรพลาสต์และไพรเมอร์ *aadA*-R ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *aadA* (ภาพที่ 16) โดยไพรเมอร์ทั้งสองชนิดนี้ใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยยีน *aadA* เป็นยีนเป้าหมายจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ที่โคลนขึ้นมาจากแบคทีเรีย (Goldschmidt-Clermont, 1991) ทำให้ยีน *aadA* ไม่มีปรากฏในจีโนมของพืชตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงมีเฉพาะต้นยาสูบที่มียีนสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette คือ ยีน *aadA* เข้าที่ตำแหน่งเป้าหมายที่ยีน *rbcL* ของจีโนมคลอโรพลาสต์เท่านั้นที่ตรวจสอบได้ด้วยไพรเมอร์ CP-F และไพรเมอร์ *aadA*-R ให้ผลดังภาพที่ 16

ส่วนการตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette ของยีน *uidA* เข้าที่ตำแหน่งเป้าหมายบริเวณยีน *accD* บนจีโนมคลอโรพลาสต์ของยาสูบดังกล่าว ด้วยไพรเมอร์ CP-R และไพรเมอร์ *uidA*-F พบว่า ดีเอ็นเอของยาสูบที่มีการสอดแทรกของยีน *aadA* เข้าสู่จีโนมของยาสูบจำนวน 26 โคลน (จากผลการทดลองที่ 4.12) และต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (WT) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเลย ขณะที่คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับ 900 คู่เบส (ภาพที่ 18) แสดงว่า ต้นยาสูบดังกล่าวไม่มีการสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette ของยีน *uidA* (ตารางที่ 6) ทำให้การตรวจสอบด้วยการเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ *uidA*-F ไม่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอของยาสูบ ดังกล่าวจึงไม่มีจุดเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างไพรเมอร์ *uidA*-F และไพรเมอร์ CP-R ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ 4.1.1 ถ้าเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายชุดยีน chloroplast expression cassette ของยีน *uidA* เข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์นั้นต้องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *uidA*-F และไพรเมอร์ CP-R เป็นจุดเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (ภาพที่ 16) และปรากฏขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 900 คู่เบส

ดังนั้นในการศึกษาการถ่ายยีนจากชุดยีน chloroplast expression cassette ของคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ด้วยเครื่องยิงอนุภาคมีเพียงยีน *aadA* ที่สอดแทรกเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ที่ตำแหน่งเป้าหมายบริเวณยีน *rbcL* เนื่องจากในขั้นตอนการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกซึ่งใช้สารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งป็นตัวคัดเลือกยาสูบที่มียีน *aadA* เท่านั้น ขณะที่ยีน *uidA* ไม่ได้สอดแทรกเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ที่ตำแหน่งเป้าหมายบริเวณยีน *accD* เนื่องจากจีโนมของยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin ไม่ค้นพบการมีอยู่ของยีน *uidA* ตามผลการทดลองที่ 4.1.1 ซึ่งอาจจะเกิดจากการนิกลาภของดีเอ็นเอบริเวณยีน *uidA* ในระหว่างขั้นตอนการถ่ายยีน เมื่อดีเอ็นเอเหล่านี้ได้ถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชจะทำให้ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ได้ง่าย เช่น เอนไซม์ exonuclease ที่ทำหน้าที่ในการย่อยดีเอ็นเอในทิศทางปลาย 5' ไปปลาย 3' หรือ ในทิศทางปลาย 3' ไปปลาย 5' (Cooper, 2000) ฉะนั้นต้องทำการยืนยันตำแหน่งการสอดแทรกของยีน *aadA* จากชุดยีน chloroplast expression cassette เข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ด้วยเทคนิค Southern blot ต่อไป



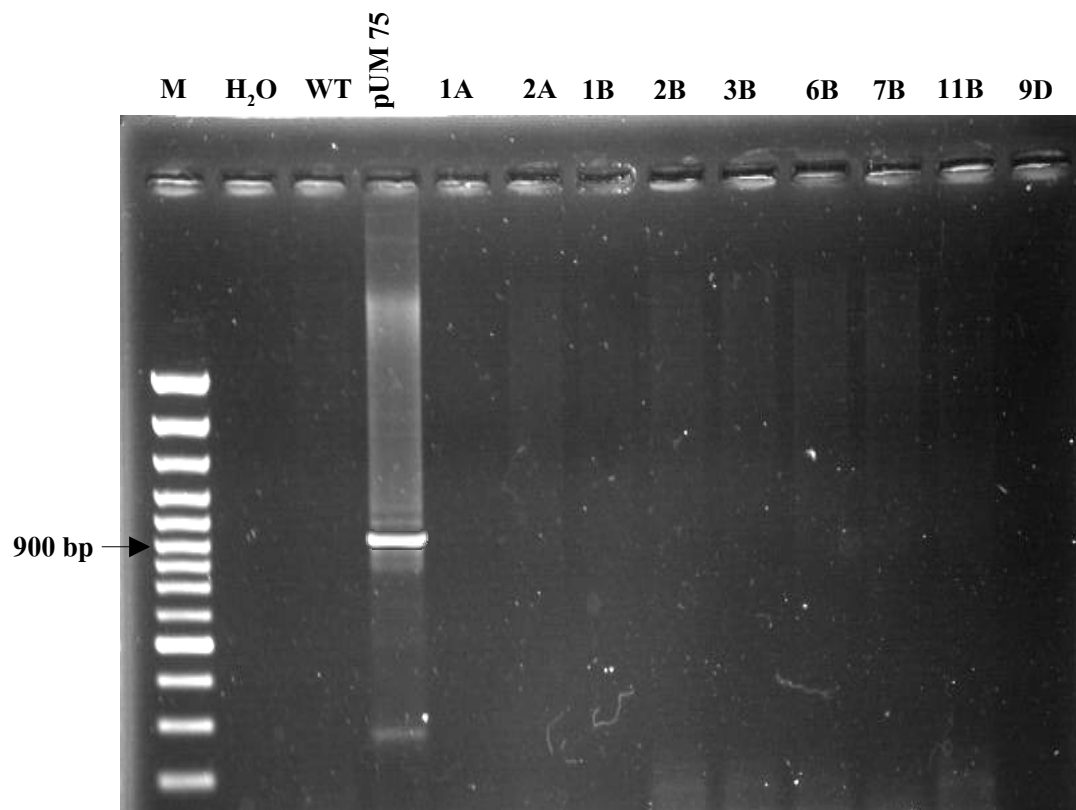
ภาพที่ 17 ตัวอย่างการตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette ตรงตำแหน่งยีน *aadA* จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่ตำแหน่งเป้าหมาย บริเวณยีน *rbcL* บนจีโนมคลอโรพลาสต์ของยาสูบด้วยวิธี PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ *aadA*-R และไพรเมอร์ CP-F

M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย 100 bp DNA ladder plus จากบริษัท Fermentas

WT คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

pUM 75 คือ คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ที่มีขนาดดีเอ็นเอ 880 คู่เบส (positive control)

1B 2B 11B 4C 11D 7E 11F และ 3B คือ ดีเอ็นเอของต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 18 ตัวอย่างการตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette ตรงตำแหน่งยีน *uidA* จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่ตำแหน่งเป้าหมาย บริเวณยีน *accD* บนจีโนมคลอโรพลาสต์ในยาสูบด้วยวิธี PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ *uidA-F* และไพรเมอร์ CP-R

M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย 100 bp DNA ladder plus จากบริษัท Fermentas

WT คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

pUM 75 คือ คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ที่มีขนาดดีเอ็นเอ 900 คู่เบส (positive control)

1A 2A 1B 2B 3B 6B 7B 11B และ 9D คือ ดีเอ็นเอของต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *uidA* ยีน *aadA* และตำแหน่งการสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette เข้าที่ตำแหน่งเป้าหมายบริเวณยีน *rbcL* และยีน *accD* บนจีโนมคลอโรพลาสต์ของต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกที่สภาวะการถ่ายยีนต่าง ๆ โดยเทคนิค PCR

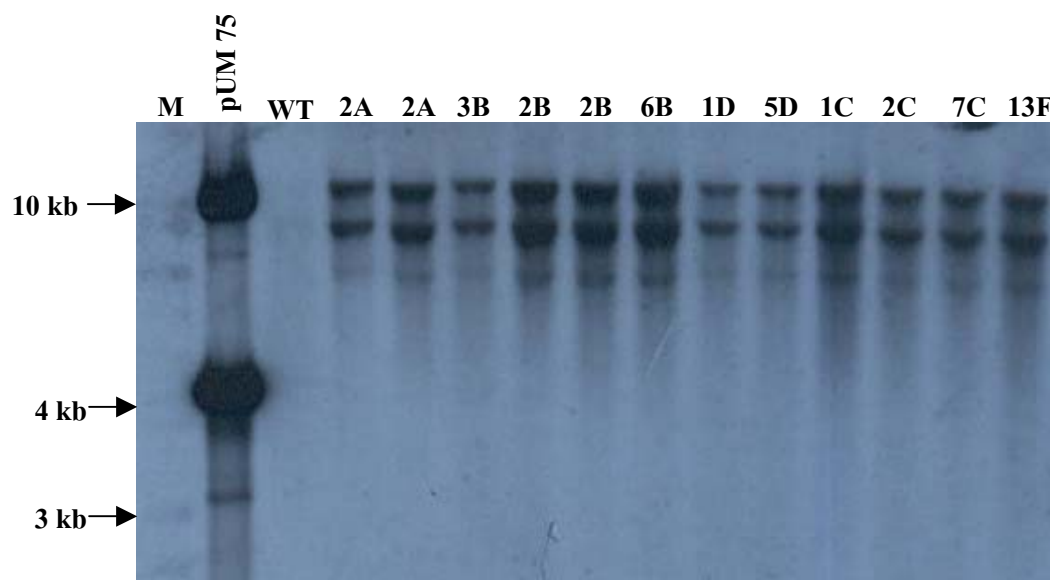
ผลการตรวจสอบ โคลนยาสูบ \ PCR	<i>uidA</i> -F / <i>uidA</i> -R	<i>aadA</i> -F / <i>aadA</i> -R	CP-F /CP-R	CP-F / <i>aadA</i> -R	<i>uidA</i> -F /CP-R
1A	-	+	-	+	-
2A	-	+	-	+	-
1B	-	+	-	+	-
2B	-	+	-	+	-
3B	-	+	-	+	-
6B	-	+	-	+	-
7B	-	+	-	+	-
10B	-	+	-	+	-
11B	-	+	-	+	-
12B	-	+	-	+	-
1C	-	+	-	+	-
2C	-	+	-	+	-
4C	-	+	-	+	-
7C	-	+	-	+	-
1D	-	+	-	+	-
3D	-	+	-	+	-
4D	-	+	-	+	-
5D	-	+	-	+	-
9D	-	+	-	+	-
11D	-	+	-	+	-
12D	-	+	-	+	-
7E	-	+	-	+	-
3F	-	+	-	+	-
11F	-	+	-	+	-
12F	-	+	-	+	-
13F	-	+	-	+	-

หมายเหตุ += มีแถบดีเอ็นเอ -= ไม่มีแถบดีเอ็นเอ

4.2 การยืนยันตำแหน่งสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette เข้าที่ตำแหน่งเป้าหมายบนจีโนมคลอโรพลาสต์ด้วยวิธี Southern blot

ทำการยืนยันตำแหน่งการสอดแทรกของยีน *aadA* เข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ ยาสืบด้วยวิธี Southern blot ซึ่งตั้งสมมุติฐานผลการทดลองจากวิธี Southern blot ของจีโนมิก ดีเอ็นเอต้นยาสืบที่ได้รับการถ่ายชุดยีน chloroplast expression cassette (ยีน *aadA* และยีน *uidA*) เข้าสู่ตำแหน่งเป้าหมายที่ยีน *rbcL* และยีน *accD* ในจีโนมคลอโรพลาสต์ซึ่งจะถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III โดยเมื่อทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *aadA* ต้องให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 4.2 กิโลเบส ดังภาพที่ 16 เมื่อนำคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 และจีโนมิก ดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของต้นยาสืบจากผลการทดลองที่ 4.1.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III แล้วทำการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นย้ายจีโนมิกดีเอ็นเอจากเจลไปสู่ในลอนเมมเบรนและทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *aadA* พบว่า คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ที่ใช้เป็น positive control ปรากฏขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 4.2 กิโลเบส ซึ่งขนาดดีเอ็นเอดังกล่าวนี้เป็นขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายหรือ ชุดยีน chloroplast expression cassette ที่ต้องการถ่ายทอดจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ด้วยกลไก homologous recombination (ภาพที่ 16) ขณะที่ต้นยาสืบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ spectinomycin ซึ่งมียีน *aadA* สอดแทรกอยู่ในจีโนมพืชปรากฏขนาดดีเอ็นเอมากกว่า 4.2 กิโลเบส หลายแถบ ดีเอ็นเอ (ภาพที่ 19) อาจเกิดจากการสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette เพียงบางส่วน (ยีน *aadA*) เข้าที่ตำแหน่งเป้าหมายบริเวณยีน *rbcL* ในจีโนมคลอโรพลาสต์ ทำให้ตำแหน่งการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III เปลี่ยนแปลงไปจากสมมุติฐานที่ได้ตั้งไว้ในตอนต้น โดยอาจจะทำให้ตำแหน่งในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III จำเพาะเจาะจงที่ตำแหน่งลำดับเบสระหว่างบริเวณยีน *aadA* และยีน *uidA* ในชุดยีน chloroplast expression cassette เปลี่ยนแปลงเป็นตำแหน่งลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงระหว่างบริเวณยีน *aadA* และบริเวณลำดับเบสอื่น ๆ ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ในจีโนมคลอโรพลาสต์ซึ่งจีโนมคลอโรพลาสต์มีลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ทั้งหมด 41 ตำแหน่ง ดังภาคผนวก ก ส่งผลให้การตรวจสอบในปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *aadA* มีแถบดีเอ็นเอมากกว่า 4.2 กิโลเบส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hamilton *et al.* (1996) ที่รายงานว่า การตรวจสอบและยืนยันการมีอยู่ของยีน NPTII และยีน HYG ขนาดดีเอ็นเอ 150 กิโลเบส ที่ได้รับการถ่ายยีนจากเวกเตอร์ BIBAC เข้าสู่จีโนมยาสืบด้วยเทคนิค Southern blot ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ปรากฏแถบดีเอ็นเอหลายขนาด เนื่องจากยีนเป้าหมายบางส่วนอาจจะสูญหายใน

ขบวนการการถ่ายยีน ทำให้มียีนเป้าหมายเพียงบางส่วนที่สอดแทรกเข้าสู่จีโนมและส่งผลให้ตำแหน่งในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เลื่อนไปจากตำแหน่งเดิมในจีโนมของยาสูบ



ภาพที่ 19 เทคนิค Southern blot ในการตรวจสอบตำแหน่งสอดแทรกของชุดยีนเป้าหมายทั้งยีน *uidA* และยีน *aadA* เข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ในตัวอย่างโคลนต่าง ๆ ของต้นยาสูบอายุ 3 เดือน ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยวิธี PCR แล้วว่ามียีน *aadA* โดยสกัดดีเอ็นเอของต้นยาสูบ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อโคลน แต่ละต้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hind III* และทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชันกับดีเอ็นเอตรวจสอบยีน *aadA* ที่ติดฉลากด้วย DIG โดยต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์นั้นต้องให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 4.2 กิโลเบส

M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายโมเลกุล 1 kb DNA ladder จากบริษัท Fermentas

pUM 75 คือ คลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 (positive control)

WT คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

2A 2B 3B 6B 1D 5D 1C 2C 7C และ 13F คือ ดีเอ็นเอของต้นยาสูบ (ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อโคลน) ที่ตรวจสอบโดยวิธี PCR ว่ามียีน *aadA*

การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกของประเทศไทยที่รายงานการถ่ายยีนจาก
คลอโรพลาสต์เวกเตอร์เข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ ดังนั้นจึงเป็นข้อมูลพื้นฐานและนำไปประยุกต์ใช้
กับการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ในพืชชนิดอื่น ๆ เพื่อผลิตพืชสายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะ
ต้านทานต่อโรค แมลง และศัตรูพืช ตลอดจนมีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มสูงขึ้นและสามารถนำมา
ผลิตเป็นวัคซีนที่รับประทานได้ (edible vaccine) ได้ต่อไป

สรุป

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์เข้าสู่ยาสูบด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He Biolistic® (Bio Rad gun) สรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำเนื้อเยื่อจากใบยาสูบพัฒนาเป็นต้น และสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถใช้คัดเลือกเซลล์ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนออกจากเซลล์ปกติ

2. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายชุดยีนจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่ใบยาสูบที่ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *uidA* แบบชั่วคราวเท่านั้น คือ การถ่ายยีนที่ระดับแรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร โดยมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงที่สุดซึ่งมีเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายที่มีจุดสีน้ำเงินเท่ากับ 76.27 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพสูงในการแสดงออกของยีนในพื้นที่การกระจายตัวของอนุภาคทั้งตำแหน่งตรงกลางที่เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร และตำแหน่งรอบนอกที่เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร

3. การตรวจสอบต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะที่ใช้เป็นตัวตรวจสอบในระดับโมเลกุล จากทุกสถานะการถ่ายยีนไม่พบต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือก ปรากฏการสอดแทรกของชุดยีนเป้าหมายทั้งยีน *uidA* และยีน *aadA* จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่ตำแหน่งเป้าหมายบริเวณยีน *rbcL* และยีน *accD* บนจีโนมคลอโรพลาสต์ในยาสูบ แต่ปรากฏการสอดแทรกของชุดยีนเป้าหมายตำแหน่งยีน *aadA* เข้าที่ตำแหน่งยีน *rbcL* บนจีโนมคลอโรพลาสต์ของยาสูบจำนวน 26 โคลน ทำให้มีการแสดงออกของยีน *aadA* แต่ไม่มีการแสดงออกของยีน *uidA* แบบถาวร

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิริยา สังข์ทองวิเศษ. 2547. ระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมสำหรับถั่ว *Stylosanthes hamata*

พันธุ์ Verano. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กษิตศ ดิษฐบรรจง. 2544. การสร้างสิ่งมีชีวิต (พืช) ที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม, น. 6-13. ใน
ชยานิจ ดิษฐบรรจง, บุญเรือน เรืองวิเศษ, ปัญจมาภรณ์ ขอดคำเนิน, จารุวัธย์ เกดนุ่ม,
กาญจนา บุญฟัก และ สุนันท์ เหมราช . เทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร.
สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและนิวเคลียร์เทคนิค, กรุงเทพฯ.

คอลลิנס, จี. บี. 2535. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช, 13-24 น. ใน นิตยศรี แสงเดือน (ผู้รวบรวม). เอกสาร
ประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง Gene Transfer Technology. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 256 น.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2546. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
398 น.

พีรเดช ทองอำไพ. 2529. ฮอโมนพืชและสารสังเคราะห์ : แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศ
ไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. วิชาการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 196 น.

ลาวัลย์ ชัยวิรัตน์กุล. 2543. การถ่ายฝากยีน Chymotrypsin inhibitor จากถั่วพูเข้าไปในข้าว
พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2536. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ. 272 น.

Ahlert, D., S. Ruf and R. Bock. 2003. Plastid protein synthesis is required for plant development
in tobacco. **PNS.** 100(26): 15730-15735.

- Aldrich, K.J. and C.A. Cullis. 1993. RAPD analysis in flax : optimization of yield and reproducibility using Klen *Taq*1 DNA polymerase, chelex 100 and gel purification of genomic DNA. **Plant Mol. Biol. Rep.** 11: 128 –141.
- Anonymous. 2001. **NEBcutter V2.0**. Available Source:
<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>, February 15, 2005.
- Anil, D. 2001. Engineered chloroplast snip out antibiotic resistance genes. **ISB News Report** . February: 1-11.
- Bel, A. V., J. Hibberd, D. Prufer and M. Knoblauch. 2001. Novel approach in plastid transformation. **Curr. Opin. in Biotech.** 12: 144-149.
- Belize, F. J. 2002. Transgenic, transplastomic and other genetically modified plants: a Canadian perspective. **Biochimie.** 84: 1111-1118.
- Birch, R. G. and R. Bower. 1994. Principles of gene transfer using particle bombardment, pp. 3-37. *In* N.S. Yang and P. Christou (eds.). **Particle Bombardment Technology for Gene Transfer**. The Oxford University Press, Oxford. 202 p.
- Bock, R. 2001a. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. **J. Mol. Biol.** 312: 425-438.
- _____. 2001b. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. **J. Mol. Biol.** 312: 425-438. Cited Bendich, A.J. 1987. Why do chloroplast and mitochondria contain so many copies of their genome. **BioEssays.** 6 : 279-282.
- Bogorad, L. 2000. Engineering chloroplast: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. **Trends Biotechnol.** 18: 257-263.

- Boynton, J. E., N. W. Gillham, E. H. Harris, J. P. Hosler, A. M. Johnson, A. R. Jones, B. L. Randolph-Anderson, D. Robertson, T. M. Klein, K. B. Shark and J. C. Sanford. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. **Science**. 240: 1534-1538.
- Buchanan, B. B., W. Gruissem and R. L. Jones. 2000. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Courier Companies, Inc., USA. 1,367 p.
- Carrer, H. 2001. Transformation technologies for higher plant cell organelles. Available Source: <http://www.uni-muenster.de/Biologie.IBBP/Bock/html/transformation.htm>, May 20, 2002.
- _____, T. N. Hockenberry, Z. Svab and P. Maliga. 1993. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. **Mol. Gen. Genet.** 241: 49-56.
- Cooper, G. M. 2000. **The Cell: A Molecular Approach**. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., U.S.A.. 689 p.
- Daniell, H. 1999. New tools for chloroplast genetic engineering. **Nature Biotechnol.** 17: 855-856.
- _____, J. Vivekanada, B. L. Nielsen, G. N. Ye, K. K. Tewari, and J. C. Sanford. 1990. Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 87: 88-92.
- _____, R. Datta, S. Varma, S. Gray and S. B. Lee. 1998. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. **Nature Biotechnol.** 16: 345-348.
- _____, B. Muthukumar and S. B. Lee. 2001. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. **Curr Genet.** 39: 109-116.

- de Cosa, B., W. Moar, S. B. Lee, M. Miller and H. Daniell. 2001. Overexpression of the *Bt cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. **Nature Biotechnol.** 19: 71-74.
- Dovzhenko, A. 2001. Towards plastid transformation in rapeseed (*Brassica napus* L.) and sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Ludwig-Maximilians University, Munchen. 142 p.
- Gallagher S. R. 1992. **GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression.** Academic Press, Inc., San Diego, California, U.S.A.. 221 p.
- Galun, E. and A. Breiman. 1997. **Transgenic Plants: with an appendix on intellectual properties & commercialisation of transgenic plants.** Imperial College Press, USA.. 376 p.
- Goldschmidt-Clermont, M. 1991. Transgenic expression of aminoglycoside adeninetransferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation in *Chlamydomonas*. **Nucleic Acids Res.** 19: 4083-4089.
- Hamilton, C. M., A. Frary, C. Lewis and S. T. Tanksley. 1996. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93: 9975-9979.
- Heifetz, P.B. 2000. Genetic engineering of the chloroplast. **Biochimic.** 82: 655-666.
- Hou, B. K., Y. H. Zhou, L. H. Wan, Z. L. Zhang, G. F. Shen, Z. H. Chen and Z. M. Hu. 2003. Chloroplast transformation in oilseed rape. **Transgenic Res.** 12: 111-114.
- Huang, F. C., S. M. J. Klaus, S. Herz, Z. Zou, H. U. Koop and T. J. Golds. 2002. Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA-6* gene and kanamycin selection. **Mol. Genet. Genomics.** 268: 19-27.

- Hunold, R., R. Bromer and G. Hahne. 1994. Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. **Plant J.** 5: 593-604.
- Iamtham, S. and A. Day. 2000. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. **Nature Biotechnol.** 18: 1172-1176.
- Isono, K., Y. Niwa, K. Satoh and H. Kobayashi. 1997. Evidence for transcriptional regulation of plastid photosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana* roots. **Plant Physiol.** 114: 623-630.
- Janssen, D. 2002. The arts introducing nucleic acids into cells. Available Source: http://www.keepmedia.com/pubs/GenomicsProteomics/2002/09/01/242622/?extID=100478data=transient_expression. January 24, 2006.
- Jefferson, R.A. T. A. Kavanagh and M. W. Bevan. 1987. GUS fusion system: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO J.** 5 : 387-405.
- Khan, M. S. and P. Maliga. 1999. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. **Nature Biotechnol.** 17: 910-915.
- Klein, T. M., E. D. Wolf, R. Wu and J. C. Sanford. 1987. High-velocity microprojectile for delivering nucleic acids into living cells. **Nature.** 327: 70-73.
- Kota, M., H. Daniell, S. Varma, S. F. Garczynski, F. Gould and W. J. Moar. 1999. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplast confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 96: 1840-1845.
- Koop, H. U., K. Steinmüller, H. Wagner, C. Roßler, C. Eibl and L. Sacher. 1996. Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. **Planta.** 199: 193-201.

- Kumer, S., A. Dhingra and H. Daniell. 2004. Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. **Plant Mol Biol.** 56(2): 203-16.
- Langbecker, C. L., G. N. Ye, D. L. Broyles, L. L. Duggan, C. W. Xu, P. T. J. Hajdukiewicz, C. L. Armstrong and J. M. Staub. 2004. High-frequency transformation of undeveloped plastids in tobacco suspension cells. **Plant Physiol.** 135: 39-46.
- Liocoln, J. E., S. Folmer, R. M. Bostock, and D. G. Gilchirst. 1998. Construction of a plant transient expression vector which coexpresses the marker β -glucuronidase. **Plant Mol Biol Reprtr.** 16: 1-4.
- Losey J. E., L. S. Rayor and M. E. Carter. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature.** 399: 214.
- Lutz, K. A., J. E. Knapp and P. Maliga. 2001. Expression of *bar* in the plastid genome confers herbicide resistance. **Plant Physiol.** 125: 1585-1590.
- Maliga, P. 2001. Plastid engineering bears fruit. **Nature Biotechnol.** 19: 826-827.
- . 2002. Engineering the plastid genome of higher plants. **Curr. Opin. Plant. Biol.** 5: 164-172.
- . 2003. Progress towards commercialization of plastid transformation technology. **Trend in Biotech.** 21: 20-28.
- Marinus, G. M. 2004. Antibacterail agents II. **Madical Pharma.** 1-4.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.

- Newell, C. A., I. B. Machin, J. M. Hibberd and J. C. Gray. 2003. Expression of green fluorescent protein from bacterial and plastid promoters in tobacco chloroplasts. **Transgenic Res.** 12: 631-634.
- O' Neill, C., G. V. Horvath, E. Horvath, P. J. Dix and P. Medgyesy. 1993. Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. **Plant J.** 3: 729-738.
- Randolph-Anderson B., J. E. Boynton, J. Dawson, E. Dunder, R. Eskes, N. W. Gillham, A. Johnson, P. S. Periman, J. Suttie and W. C. Heiser. 1995. **Sub-micron gold particles are superior to larger particles for efficient biolistic transformation of organelles and some cell types. BioRad Technical Bulletin no. 2015.** 35.
- Ruf, S., M. Hermann, I. J. Berger, H. Carrer and R. Bock. 2001. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. **Nature Biotechnol.** 19: 870-875.
- Russell, P. J. 2001. **iGenetics.** Person Education, Inc., San Francisco. 202 p.
- Sakai, A., T. Suzuki, Y. Miyazawa, S. Kawano, T. Nagata and T. Kuroiwa. 1998. Comparative analysis of plastid gene expression in tobacco chloroplast and proplastids: Relationship between transcription and transcript accumulation. **Plant Cell Physiol.** 36: 581-589.
- Salisbury, F. B. and C. W. Ross. 1992. **Plant Physiology.** 4th ed. Wadsworth, Inc., California. 682 p.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatics. 1989. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual.** 2 nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 553 p.

- Sidebottom, C. 2002. Genetic transformation of chloroplasts. Available Source:
http://www.usask.ca/agriculture/plantsci/classes/plsc416/projects_2002/christine/webpage/, May 20, 2003.
- Sidorov, V. A., D. Kasten, S. Z. Pang, P. T. J. Hajdukiewicz, J. M. Staub and N. S. Nehra. 1999. Stable chloroplast transformation in potato using use of green fluorescent protein as a plastid marker. **The Plant J.** 19: 209-216.
- Sikdar, S. R., G. Serino, S. Chaudhuri and P. Maliga. 1998. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Rep.** 18: 20-24.
- Skarjinskaia, M., Z. Svab and P. Maliga. 2003. Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicacea. **Transgenic Res.** 12: 115-122.
- Staub, J. M. and P. Maliga. 1992. Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. **Plant Cell.** 4: 39-45.
- _____. 1993. Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the *psbA* mRNA. **The EMBO.** 12(2): 601-606.
- _____. 1995. Expression of a chimeric *uidA* gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids. **The Plant J.** 7: 845-848.
- Svab, Z., P. Hajdukiewicz and P. Maliga. 1990. Stable transformation of plastid in higher plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 87: 8527-8530.
- _____, and P. Maliga. 1993. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 90: 913-917.
- Wakasugi, T., M. Sugita, T. Tsudzuki and M. Sugira. 1998. Update gene map of tobacco chloroplast DNA. **Plant Mol Biol Reprtr.** 16: 231-241.

- Yoshimoto, K., M. Sakaiya, K. Isono and H. Kobayashi. 2001. Comparison of strength of endogenous and exogenous gene promoters in *Arabidopsis* chloroplasts. **Plant Biotech.** 18 (2): 135-142.
- Zhang, X. H., A. R. Portis and J. M. Widholm. 2001. Plastid transformation of soybean suspension cultures. **J. Plant Biotech.** 3: 39-44.
- Zubko, K. M., E. I. Zubko, K. V. Zuilen, P. Meyer and A. Day. 2004. Stable transformation of petunia plastids. **Transgenic Res.** 13: 523-530.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางผนวกที่ 1 แสดงประสิทธิภาพการถ่ายยีนจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่ใบยาสูบ ด้วยเครื่องยิงอนุภาคในสภาวะการทดลองต่าง ๆ และคัดเลือกใบยาสูบบนอาหาร คัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 เดือน และผลการตรวจสอบจำนวนต้นยาสูบที่มียีน *aadA* ด้วยวิธี PCR

ระดับ แรงดันก๊าซฮีเลียม (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)	ระยะห่างของ เนื้อเยื่อเป้า หมาย (เซนติเมตร)	จำนวนครั้ง การถ่ายยีน (ครั้ง)	จำนวนต้นยาสูบ ที่ต้านทานต่อ สารปฏิชีวนะ spectinomycin (โคลน)	จำนวนต้นยาสูบที่ มียีน <i>aadA</i> (โคลน)
650	6	65	3	2
	9	65	13	8
	12	65	18	4
1,100	6	65	15	7
	9	65	11	1
	12	65	16	4
รวม		390	76	26

ตารางผนวกที่ 2 จำนวนขนาดดีเอ็นเอของจีโนมคลอโรพลาสต์ยาสูบที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
Hind III ทั้งหมด 41 แถบดีเอ็นเอ

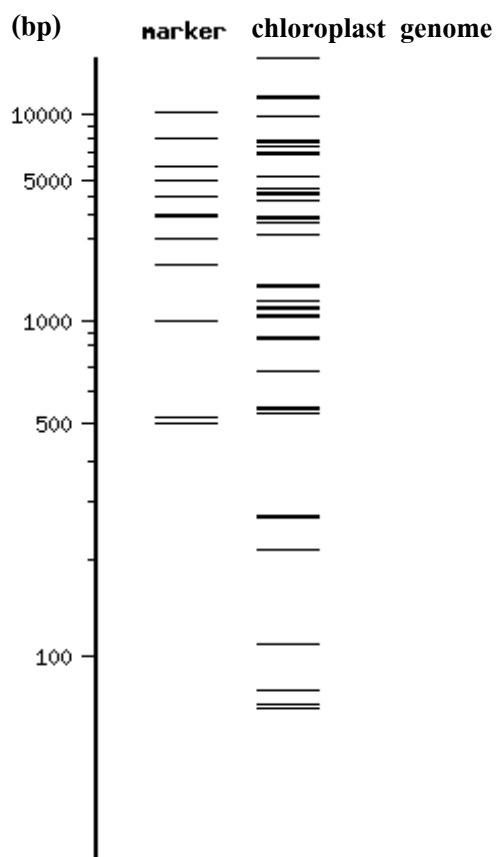
ลำดับที่	ลำดับเบสที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III	ขนาดดีเอ็นเอ (คู่เบส)
1	110,772-131,854	21,083
2	52,383-63,868	11,486
3	87,228-98,530	11,303
4	144,096-155,398	11,303
5	72,723-82,474	9,752
6	28,609-36,406	7,798
7	98,531-106,200	7,670
8	136,426-144,095	7,670
9	63,869-71,344	7,476
10	45,372-52,382	7,011
11	16,772-23,617	6,846
12	1-5,362	5,362
13	36,407-40,904	4,498
14	40,905-45,209	4,305
15	82,475-86,617	4,143
16	24,832-28,608	3,777
17	13,919-16,771	2,853
18	5,363-8,094	2,732
19	11,344-13,918	2,575
20	9,214-11,295	2,082
21	108,416-109,728	1,313
22	132,898-134,210	1,313
23	71,345-72,508	1,164
24	8,095-9,213	1,119

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	ลำดับเบสที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III	ขนาดคิเอ็นเอ (คู่เบส)
25	107,318-108,415	1,098
26	134,211-135,308	1,098
27	109,729-110,771	1,043
28	131,855-132,897	1,043
29	106,201-107,046	846
30	135,580-136,425	846
31	23,618-24,306	689
32	155,399-155,943	545
33	86,684-87,227	544
34	24,307-24,831	525
35	107,047-107,317	271
36	135,309-135,579	271
37	72,509-72,722	214
38	45,261-45,371	111
39	86,618-86,683	66
40	45,210-45,260	51
41	11,296-11,343	48

ที่มา Anonymous (2001)

ภาพผนวกที่ 1 ขนาดดีเอ็นเอของจีโนมคลอโรพลาสต์ยาสูบที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III
เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายโมเลกุล 1 kb DNA ladder จากบริษัท BioLabs



ที่มา Anonymous (2001)

ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ 3 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)

ธาตุอาหาร	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
<u>Macronutrients</u>	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00
KH_2PO_4	170.00
<u>Micronutrients</u>	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.90
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.14
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
<u>Fe-EDTA solution</u>	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.25
<u>Organic compounds</u>	
Myo-inositol	100.00
Glycine	2.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50
Thiamine-HCl	0.50
<u>Other</u>	
Sucrose	30,000.00
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	5.70

ตารางผนวกที่ 4 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสูตร LB

สารเคมี	ปริมาณต่อ 1 ลิตร (กรัม)
Bacto tryptone	10.00
Bacto yeast extract	5.00
NaCl	10.00
Agar	15.00
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	7.00

ภาคผนวก ค

1. การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์

1.1 เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH-5 α ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในเครื่องเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 12-16 ชั่วโมง

1.2 นำข้อ 1.1 ไปวัดค่า OD ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่า OD เท่ากับ 0.4 จากนั้น นำเชื้อแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงปั่นเหวี่ยง 2,000 $\times g$ นาน 15 นาที

1.3 เทส่วนใสด้านบนทิ้ง เติมสารละลาย RF1 (100 mM KCl, 50 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 30 mM potassium acetate, 10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 15% glycerol และปรับ pH 5.8) ปริมาตร 1/3 ของ ปริมาตรอาหารที่เลี้ยงเชื้อ ค่อย ๆ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตต์ดูดขึ้นลงอย่างเบา ๆ แช่ใน น้ำแข็งนาน 15 นาที

1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงปั่นเหวี่ยง 2,000 $\times g$ นาน 15 นาที แล้วเทส่วนใสด้านบนทิ้ง

1.5 นำตะกอนที่ได้จากข้อ 1.4 มาเติมสารละลาย RF2 (10 mM MOPS pH 6.8, 10 mM KCl, 75 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 15 % glycerol และปรับ pH 6.8) ปริมาตร 1/25 ของปริมาตรอาหาร ที่เลี้ยงเชื้อ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตต์ดูดขึ้นลงอย่างเบา ๆ แช่ในน้ำแข็ง นาน 15 นาที

1.6 แบ่งสารละลายคอมพิเทนต์เซลล์ใส่ไมโครหลอดเซนตริฟิวจ์ หลอดละ 100 ไมโครลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2. การนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพิเทนต์เซลล์

2.1 เติมสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร ลงในคอมพิเทนต์เซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (จากข้อ 1.6) แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที

2.2 นำมาทำ heat shock โดยแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที แล้วแช่ ในน้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที

2.3 เติมหาอาหาร LB ลงไป 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำมาเพาะเลี้ยงที่เครื่องเขย่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง

2.4 คุกอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 2.3 จำนวน 200 ไมโครลิตร มาเกลี่ย (spread) ให้ทั่วผิวน้ำอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง

3. การสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียวิธี QIAGEN plasmid maxi kit

3.1 นำลูปป้ายแบคทีเรียสีขาว 1 โคโลนี ที่ได้จากข้อ 2.4 ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ บรรจุอาหาร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นในเครื่องเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง

3.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์จากข้อ 3.1 ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด โดยแต่ละขวดบรรจุอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปปั่นในเครื่องเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง

3.3 นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงจากข้อ 3.2 ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงปั่นเหวี่ยง 6,000 xg นาน 15 นาที เทของเหลวใสส่วนบนทิ้ง นำไปแช่ในน้ำแข็ง

3.4 ใส่สารละลาย P1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.5 เติมหาสารละลาย P2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างเบา ๆ โดยกลับหลอดไปมาประมาณ 10 ครั้ง และปั่นที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

3.6 จากข้อ 3.5 เติมหาสารละลาย P3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างเบา ๆ โดยกลับหลอดไปมาประมาณ 10 ครั้ง และแช่ในน้ำแข็งนาน 20 นาที

3.7 นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงปั่นเหวี่ยง 25,000 xg นาน 30 นาที หลังจากนั้นเทของเหลวใสด้านบนลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ ระวังอย่าให้ตะกอนสีขาวติดลงมา

3.8 จากข้อ 3.7 นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงปั่นเหวี่ยง 25,000 xg นาน 15 นาที และเทของเหลวใสด้านบนที่มีพลาสติกดีเอ็นเอลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่

3.9 นำคอลัมน์สำหรับสกัดพลาสติกดีเอ็นเอมาชะล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย QBT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำของเหลวจากข้อ 3.8 ใส่ลงในคอลัมน์และทิ้งของเหลวที่ไหลผ่านคอลัมน์

3.10 ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย QC ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง

3.11 แยกพลาสติกดีเอ็นเอในคอลัมน์ด้วยสารละลาย QF ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และเก็บของเหลวที่ไหลผ่านคอลัมน์ลงในหลอดหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

3.12 เติมนเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 0.7 เท่าของปริมาตรสารละลาย ปิดฝาให้แน่น แล้วผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา

3.13 นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงปั่นเหวี่ยง 15,000 xg นาน 30 นาที แล้วเทของเหลวด้านบนทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดหลุดออก

3.14 ใส่เอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 1 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่แรงปั่นเหวี่ยง 15,000 xg นาน 10 นาที แล้วเทเอธานอลทิ้งไป

3.15 เปิดฝาให้ตะกอนพลาสติกดีเอ็นเอแห้ง

3.16 ใส่สารละลาย TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 200 ไมโครลิตร แล้วเก็บสารละลายพลาสติกดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยยูวีแอมป์โซรปชัน

นำดีเอ็นเอในสารละลาย TE มาเจือจางในอัตราส่วนดีเอ็นเอต่อ dH₂O เท่ากับ 1 ต่อ 99 จากนั้นนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากเครื่อง Spectrophotometer รุ่น GeneQuant *pro* คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นดีเอ็นเอ} = (A_{260}) \times (50 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม}) \times \text{dilution factor} \\ (\text{ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม})$$

การตรวจคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยการหาค่าอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} ที่สามารถอธิบายได้ดังนี้

1. 1.8-2.0 คือ ดีเอ็นเอที่เตรียมเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่สายบริสุทธิ์
2. มากกว่า 2.0 คือ ดีเอ็นเอที่เตรียมมีอาร์เอ็นเอปนอยู่มาก
3. น้อยกว่า 1.8 คือ ดีเอ็นเอที่เตรียมมีโปรตีนปนอยู่

5. การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส

5.1 เตรียมอะกาโรส 0.8 % โดยชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 0.5xTBE ปริมาตร 100 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องไมโครเวฟนาน 3 นาที

5.2 เทสารละลายอะกาโรสที่อุณหภูมิเย็นลงในถาดรองที่มีหวีเสียบอยู่ โดยเจลมีความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร อย่าให้เกิดฟองอากาศ

5.3 ทิ้งเจลให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที แล้วดึงหวีออกจากเจลอย่างระมัดระวัง

5.4 นำแผ่นเจลจากข้อ 5.3 ใส่ลงในเครื่องอิเล็กโตรโฟลิซิสและเติมน้ำบัฟเฟอร์ 0.5xTBE ให้ท่วมเจลอย่างน้อย 1-2 มิลลิเมตร

5.5 ผสมดีเอ็นเอกับ 6X loading dye (0.25 % bromophenol blue และ 30 % glycerol) ให้เข้ากันและหยอดลงในช่องว่างของร่องหวี

5.6 ปิดฝาเครื่องและเปิดกระแสไฟฟ้า โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นานประมาณ 50 นาที

5.7 นำแผ่นเจลจากข้อ 5.6 ซ้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 15 นาที แล้วนำแผ่นเจลล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5 นาที

5.8 นำแผ่นเจลที่ได้ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพ

ภาคผนวก ง

1. การตรวจสอบการแสดงออกของ *uidA* ด้วยวิธี Histochemical Assay (Jefferson *et. al*, 1987)

1.1 การเตรียมสารละลาย X-gluc substrate ทำได้โดยชั่งสาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide (Sigma) น้ำหนัก 0.1044 กรัม ละลายในสารละลาย dimethylformamide ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.2 การเตรียมสารละลายต่าง ๆ ดังนี้

ความเข้มข้นสารละลาย	ความเข้มข้นสารละลายที่ต้องการ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1.0 M NaPO ₄ (pH 7.0)	0.1 M	100.0
5.0 mM K ₃ Fe (CN) ₆ : potassium ferricyanide	0.5 mM	100.0
5.0 mM K ₄ Fe (CN) ₆ : potassium ferrocyanide	0.5 mM	100.0
0.25 M Na ₂ EDTA (pH 7.0)	10 mM	40.0
0.02 M X-gluc substrate	1.0 mM	50.0
10 % Triton X-100	1.0 %	10.0
dH ₂ O		600.0

1.3 นำสารละลายจากข้อ 1.2 มาผสมให้เข้ากัน แล้วใส่เนื้อเยื่อพืชที่ต้องการตรวจสอบลงในสารละลายดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง และดูดสารละลายทิ้ง

1.4 เติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ใหม่ทุก ๆ 6-12 ชั่วโมง จนเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการตรวจสอบมีสีขาวซีด

1.5 ตรวจสอบจุดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชจากข้อ 1.4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืช (Aldrich and Cullis, 1993)

2.1 บัฟเฟอร์ CTAB Extraction

สารเคมี	ความเข้มข้น
CTAB	2 %
NaCl	1.4 M
EDTA pH 8.0	20 mM
Tris -HCl pH 8.0	100 mM
b-mercaptanethanol	0.2 % (v/v)

2.2 สารละลายโซเดียมอะซิเตท

สารเคมี	ความเข้มข้น
sodium acetate pH 5.2	3 M

2.3 สารละลาย TE (pH 8.0)

สารเคมี	ความเข้มข้น
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

3. การตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยวิธี PCR

3.1 ส่วนผสมในการตรวจสอบการถ่ายยีน *uidA* ด้วยวิธี PCR ปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร

ส่วนผสมของสารเคมี	ความเข้มข้นที่ต้องการ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
10x PCR buffer	1x	2.0
2 mM dNTP	0.2 mM	2.0
25 mM MgCl ₂	1.5 mM	1.2
20 μM Primer <i>uidA</i> -F	1.0 μM	1.0
20 μM Primer <i>uidA</i> -R	1.0 μM	1.0
5 U <i>Taq</i> DNA polymerase	2.0 U	0.4
DNA sample	50-100 ng	1.0
dH ₂ O		<u>11.4</u>
Total volume		<u><u>20.0</u></u>

3.2 ส่วนผสมในการตรวจสอบการถ่ายยีน *aadA* ด้วยวิธี PCR ปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร

ส่วนผสมของสารเคมี	ความเข้มข้นที่ต้องการ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
10x PCR buffer	1x	2.0
2 mM dNTP	0.2 mM	2.0
25 mM MgCl ₂	1.5 mM	1.2
20 μM Primer <i>aadA</i> -F	1.0 μM	1.0
20 μM Primer <i>aadA</i> -R	1.0 μM	1.0
5 U <i>Taq</i> DNA polymerase	2.0 U	0.4
DNA sample	50-100 ng	1.0
dH ₂ O		<u>11.4</u>
Total volume		<u><u>20.0</u></u>

3.3 ส่วนผสมในการตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกชุดยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนม
 คลอโรพลาสต์ของยาสูบด้วยวิธี PCR ปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร

ส่วนผสมของสารเคมี	ความเข้มข้นที่ต้องการ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
10x PCR buffer	1x	2.0
2 mM dNTP	0.2 mM	2.0
25 mM MgCl ₂	1.5 mM	1.2
20 μM Primer CP-F	1.0 μM	1.0
20 μM Primer CP-R	1.0 μM	1.0
5 U <i>Taq</i> DNA polymerase	2.0 U	0.4
DNA sample	50-100 ng	1.0
dH ₂ O		<u>11.4</u>
Total volume		<u><u>20.0</u></u>

3.4 นำส่วนผสมต่าง ๆ จากข้อ 3.1 และ 3.2 ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง GeneAmp PCR
 system 2400 ของบริษัท PERKIN ELMER ที่สภาวะอุณหภูมิและเวลา ดังนี้

	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
	96	2.00
Denature	96	0.45
Annealing	62	0.45
Extension	72	0.50
	72	5.00
	4	α

} 35 รอบ

4. การตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยวิธี Southern Blot

4.1 สารละลายที่ใช้ในการแยกขนาดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส

4.1.1 สารละลาย 5x TBE

สารเคมี	ความเข้มข้น
Tris-base	54.0 g/l
H ₃ BO ₃	27.5 g/l
EDTA pH 8.0	10.0 mM
เติม dH ₂ O จนปริมาตรรวมเป็น	1,000 ml

4.1.2 บัฟเฟอร์ 6x loading dye

สารเคมี	ความเข้มข้น
bromophenol blue	0.25 %
glycerol	30 %

4.2 สารละลายที่ใช้สำหรับวิธี Southern Blot

4.2.1 deurination solution

สารเคมี	ความเข้มข้น
HCl	0.25 M

4.2.2 denaturation solution

สารเคมี	ความเข้มข้น
NaOH	0.5 M
NaCl	1.5 M

4.2.3 neutralization solution

สารเคมี	ความเข้มข้น
Tris-HCl pH 7.5	0.5 M
NaCl	1.5 M

4.2.4 สารละลาย 10XSSC

สารเคมี	ความเข้มข้น
sodium citrate	150.0 mM
NaCl	1.5 M

4.2.5 สารละลาย 2XSSC

สารเคมี	ความเข้มข้น
sodium citrate	30 mM
NaCl	0.3 M

4.2.6 standard hybridization buffer

สารเคมี	ความเข้มข้น
SSC	5X
N-lauroylsarcosine (sarkosyl)	0.1 %
SDS	0.2 %
blocking solution	1 %

4.2.7 low stringency buffer

สารเคมี	ความเข้มข้น
SSC	2X
SDS	0.1 %

4.2.8 high stringency buffer

สารเคมี	ความเข้มข้น
SSC	0.5X
SDS	0.1 %

4.2.9 maleic acid buffer

สารเคมี	ความเข้มข้น
maleic acid pH 7.5	0.1 M
NaCl	0.15 M

4.2.10 washing buffer

สารเคมี	ความเข้มข้น
maleic acid buffer pH 7.5	1X
Tween 20	0.3 %

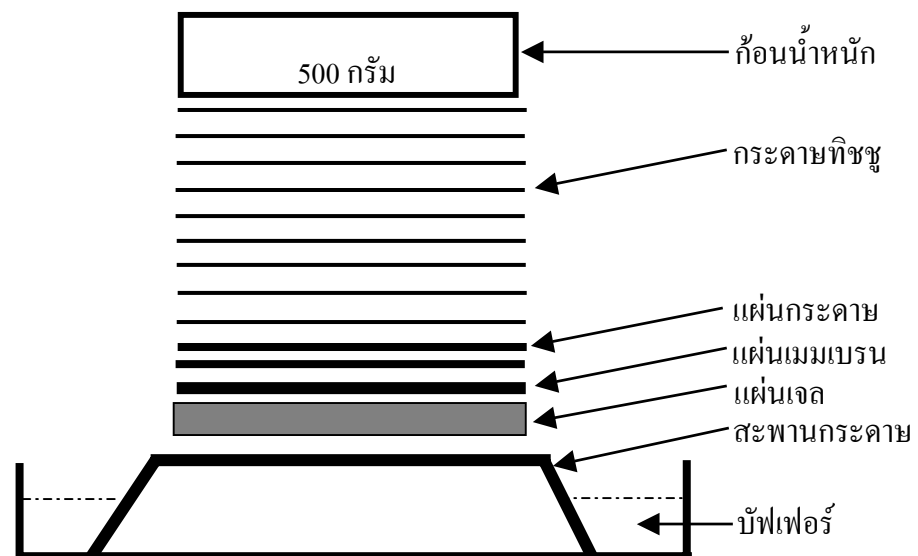
4.2.11 blocking buffer

สารเคมี	ความเข้มข้น
maleic acid buffer pH 7.5	1X
blocking solution	1 %

4.2.12 detection buffer

สารเคมี	ความเข้มข้น
Tris-HCl pH 9.5	0.1 M
NaCl	0.1 M

5. ขั้นตอนการถ่ายติเ็นเอจากอะกาโรสเจลสู่ในลอนเมมเบรน



ภาพผนวกที่ 2 การถ่ายติเ็นเอจากแผ่นอะกาโรสเจลสู่แผ่นเมมเบรน

ที่มา : Sambrook *et al.*, 1989