

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(1)
สารบัญตาราง.....	(2)
สารบัญภาพ.....	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ.....	(7)
คำนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
การตรวจเอกสาร.....	4
อุปกรณ์และวิธีการ.....	22
อุปกรณ์.....	22
วิธีการ.....	25
ผลและวิจารณ์.....	37
สรุป.....	62
เอกสารและสิ่งอ้างอิง.....	63
ภาคผนวก.....	72
ภาคผนวก ก.....	73
ภาคผนวก ข.....	78
ภาคผนวก ค.....	81
ภาคผนวก ง.....	87

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงการพัฒนาการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ในพืชชนิดต่าง ๆ	11
2 ตัวอย่างพลาสมิดเวกเตอร์สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ 5'-UTR และ 3'-UTR ชนิดต่าง ๆ และระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายของต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์	18
3 การแสดงออกของยีน <i>uidA</i> แบบชั่วคราวของชิ้นเนื้อเยื่อใบยาสูบที่ถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He Biolistic® (Bio Rad gun) โดยใช้อนุภาคทองขนาด 1 ไมโครเมตร ที่เคลือบด้วยคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 2 วัน	42
4 จำนวนต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกในอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ spectinomycin ภายหลังจากการถ่ายยีนจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He Biolistic® (Bio Rad gun) ที่สภาวะต่าง ๆ	46
5 จำนวนต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ที่มียีน <i>aadA</i> ที่สภาวะต่าง ๆ ของการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He Biolistic® (Bio Rad gun) จำนวนทั้งหมด 26 โคลน	51
6 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>uidA</i> ยีน <i>aadA</i> และตำแหน่งการสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette เข้าที่ตำแหน่งเป้าหมายบริเวณยีน <i>rbcL</i> และยีน <i>accD</i> บนจีโนมคลอโรพลาสต์ของต้นยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกที่สภาวะการถ่ายยีนต่าง ๆ โดยเทคนิค PCR	58
ตารางผนวกที่	
1 แสดงประสิทธิภาพการถ่ายยีนจากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่ใบยาสูบด้วยเครื่องยิงอนุภาคในสภาวะการทดลองต่าง ๆ และคัดเลือกใบยาสูบบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 3 เดือน และผลการตรวจสอบจำนวนต้นยาสูบที่มียีน <i>aadA</i> ด้วยวิธี PCR	74
2 จำนวนขนาดดีเอ็นเอของจีโนมคลอโรพลาสต์ยาสูบที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III ทั้งหมด 41 แอปติเอ็นเอ	75
3 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)	79
4 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสูตร LB	80

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนที่จีโนมคลอโรพลาสต์ของยาสูบ (<i>Nicotiana tabacum</i>) ขนาด 155,939 คู่เบส ประกอบด้วยบริเวณลำดับเบส LSC, SSC, IR _A และ IR _B	5
2	การถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์ใบพืชหนึ่งเซลล์ (a) ซึ่งมีจำนวนชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ประมาณ 10,000 ชุดดีเอ็นเอ มากกว่าจำนวนชุดดีเอ็นเอของนิวเคลียสในสภาวะดิพลอยด์ (b) โดยระยะแรกของการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ (primary plastid transformation) การถ่ายยีนเป้าหมายที่เกิดขึ้นอาจจะแทรกเข้าไปในชุดดีเอ็นเอเพียงหนึ่งชุดจากชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ทั้งหมดของหนึ่งเซลล์พืช (c) ชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ของเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมายจะเกิดการแบ่งตัวภายใต้อาหารคัดเลือกที่เติมยาปฏิชีวนะความเข้มข้นสูง ทำให้เซลล์พืชมีชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ทั้งที่ ได้รับและไม่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมาย เรียกสภาวะนี้ว่า “heteroplasmic” (d) เซลล์พืชที่ทำการคัดเลือกนาน 2-3 ครั้ง เกิดการแบ่งตัวและสภาวะ cytoplasmic sorting ทำให้ได้ชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ที่ได้รับการถ่ายยีนเป้าหมายเหมือนกันทุกชุดดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ทั้งหมดของเซลล์ เรียกสภาวะนี้ว่า “homoplasmic”	7
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	10
4	การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้น X-Gluc กับเอนไซม์ β -glucuronidase ที่ให้ผลผลิตเป็นสารตกผลึกสีน้ำเงิน dibromoindigo	20
5	แผนที่โครงสร้างของคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ที่ใช้ในการทดลองการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์โดยวิธีการใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He Biolistic® (Bio Rad gun)	27

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
6	เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He Biolistic® (Bio Rad gun) ก : อุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายยีน ข : และขั้นตอนการเตรียมยิงอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วยคลอโรพลาสต์เวคเตอร์ pUM 75 เข้าสู่ใบยาสูบ คือ ค-ง : นำแผ่น rupture disk ใส่ลงใน rupture disk retaining cap จ : นำ rupture disk retaining cap ประกอบกับเครื่องตรงส่วนปลายของ gas acceleration tube ฉ : หยดอนุภาคทองคำที่ถูกเคลือบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอลงตรงกลางแผ่น macrocarrier ช : นำตะแกรงลวด (stopping screen) วางบน macrocarrier launch assembly ซ : นำ macrocarrier ที่แห้งมาวางบน stopping screen ในลักษณะคว่ำลง ปิดฝา macrocarrier launch assembly ฌ : ตำแหน่งของ macrocarrier launch assembly และลักษณะเนื้อเยื่อเป้าหมายภายในห้องเครื่อง	30
7	ชิ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายใบยาสูบที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมวางเรียงบริเวณตรงกลางจานเพาะ เลี้ยงร่วมกับพื้นที่การกระจายตัวของอนุภาค โดยตำแหน่งตรงกลางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร (c) และตำแหน่งรอบนอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร (a b d และ e) (ก) หลังจากนั้นนำใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนและพักพื้นนาน 2 วัน ตัดให้มีขนาดประมาณ 3x3 มิลลิเมตร (ข)	32
8	การเพาะเลี้ยงใบยาสูบบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 สัปดาห์ (ก) และการชักนำให้เกิดยอดจากใบยาสูบ (ข) ภายใต้ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส	37
9	การเพาะเลี้ยงใบยาสูบบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร 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) ภายใต้ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
10 การแสดงออกของยีน <i>uidA</i> แบบชั่วคราววิธี GUS histochemical assay ของเนื้อเยื่อใบยาสูบ ภายหลังได้รับการถ่ายยีนนาน 2 วัน เมื่อใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมและระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายต่างกัน คือ ก-ค : ชั้นเนื้อเยื่อเป้าหมายที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 650 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 9 และ 12 เซนติเมตร ตามลำดับ ง-ฉ : ชั้นเนื้อเยื่อเป้าหมายที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 9 และ 12 เซนติเมตร ตามลำดับ ช และ ซ คือ เนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเคลียสและเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ตามลำดับ	40
11 เปรียบเทียบจำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยต่อชั้นเนื้อเยื่อใบยาสูบของพื้นที่การกระจายตัวของอนุภาค ตำแหน่งตรงกลางเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร และตำแหน่งรอบนอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ภายหลังได้รับการถ่ายยีนนาน 2 วัน ภายใต้แรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 650 และ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 6 9 และ 12 เซนติเมตร ตามลำดับ	44
12 การเกิดขอยาสูบที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากได้รับการถ่ายยีนนาน 45-50 วัน (ก) และพัฒนาเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ (ข) ภายใต้ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส	45
13 ตัวอย่างการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>uidA</i> ในต้นยาสูบอายุ 3 เดือน ที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ <i>uidA</i>	48
14 ตัวอย่างการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>aadA</i> ในต้นยาสูบอายุ 3 เดือน ที่ต้านทานต่อการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ <i>aadA</i>	50
15 ตัวอย่างการตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของยีน <i>aadA</i> ใน chloroplast expression cassette จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่จีโนมของยาสูบ ด้วยวิธี PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ CP-F และไพรเมอร์ CP-R	52

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
16 ตำแหน่งของยีน <i>aadA</i> จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 ที่สอดแทรกเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ในต้นยาสูบด้วยกลไกการแลกเปลี่ยนยีน homologous recombination เมื่อตรวจสอบโดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ CP-F และ CP-R (→) พบว่า ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนต้องให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 820 คู่เบส ขณะที่ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ต้องให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 5.2 กิโลคู่เบส และแสดงตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์ <i>aadA</i> (●→) และไพรเมอร์ <i>uidA</i> (➤)	53
17 ตัวอย่างการตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette ตรงตำแหน่งยีน <i>aadA</i> จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่ตำแหน่งเป้าหมายบริเวณยีน <i>rbcL</i> บนจีโนมคลอโรพลาสต์ของยาสูบด้วยวิธี PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ <i>aadA</i> -R และไพรเมอร์ CP-F	56
18 ตัวอย่างการตรวจสอบตำแหน่งการสอดแทรกของชุดยีน chloroplast expression cassette ตรงตำแหน่งยีน <i>uidA</i> จากคลอโรพลาสต์เวกเตอร์ pUM 75 เข้าสู่ตำแหน่งเป้าหมายบริเวณยีน <i>accD</i> บนจีโนมคลอโรพลาสต์ในยาสูบด้วยวิธี PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ <i>uidA</i> -F และไพรเมอร์ CP-R	57
19 เทคนิค Southern blot ในการตรวจสอบตำแหน่งสอดแทรกของชุดยีนเป้าหมายทั้งยีน <i>uidA</i> และยีน <i>aadA</i> เข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ในตัวอย่างโคลนต่าง ๆ ของต้นยาสูบอายุ 3 เดือน ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยวิธี PCR แล้วว่ามียีน <i>aadA</i> โดยสกัดดีเอ็นเอของต้นยาสูบ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อโคลน แต่ละต้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด <i>Hind</i> III และทำปฏิกิริยาไฮบริดไคเซชันกับดีเอ็นเอตรวจสอบยีน <i>aadA</i> ที่ติดฉลากด้วย DIG โดยต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์นั้นต้องให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 4.2 กิโลเบส	60
ภาพผนวกที่	
1 ขนาดดีเอ็นเอของจีโนมคลอโรพลาสต์ยาสูบที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายโมเลกุล 1 kb DNA ladder จากบริษัท BioLabs	77
2 การถ่ายดีเอ็นเอจากแผ่นอะกาโรสเจลสู่แผ่นเมมเบรน	95

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

<i>aadA</i>	: aminoglycoside 3'-adenylytransferase
BA	: 6-benzyladenine
bp	: base pairs
EDTA	: ethylenediaminetetraacetate dehydrate
GUS	: β -glucuronidase
He	: helium gas
kp	: kilobase pairs
MS	: Murashige and Skoog medium
NAA	: α -naphthalene acetic acid
PCR	: polymerase chain reaction
PDS-1000/He	: Biolistic [®] particle delivery system model PDS-1000/He
PEG	: polyethylene glycol
pH	: logarithm of reciprocal of hydrogen (H^+) ion concentration
psi	: pound per square inch
Tween 20 [™]	: polyethylene sorbitan
X-Gluc	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide