สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการสร้างเวคเตอร์ที่มียีนรายงานผล GFP และการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนีย โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

T061825

นางสาวฐารินี สุสันทัด

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิท.
ว319ก
2547

เลขหมู่ 61825
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 21 ก.ค. 2549

b 11603604
i

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A Study of the Construction of *Agrobacterium* Transformation Vector with GFP Marker and *Petunia* Transformation

Miss Tharinee Susantad

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาการสร้างเวคเตอร์ที่มียีนรายงานผล GFP และการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนียโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

นักศึกษา นางสาวฐารินี สุสันทัด

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. กนกพร สมพรไพลิน

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ ดร. กนกพร สมพรไพลิน	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาการสร้างเวคเตอร์ที่มียีนรายงานผล GFP และการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนียโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

นักศึกษา นางสาวฐารินี สุสันทัด

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. กนกพร สมพรไพลิน

บทคัดย่อ

การสร้างเวคเตอร์สำหรับการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม ที่สามารถแสดงออกในพืชซึ่งมียีนรายงานผล GFP และขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้ศึกษาสำหรับการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนีย เวคเตอร์ใหม่ที่เรียกว่า pBI:GFP สร้างขึ้นจากการรวมชิ้นส่วนของเวคเตอร์ pTH2 และ pBI121 โดยตัดชิ้นส่วน CaMV35S:GFP:nos-ter จาก pTH2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III กับ *Eco*RI แล้วเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pBI121 ที่ปราศจากชิ้นส่วน CaMV35S:GUS:nos-ter ในบริเวณ T-DNA จากนั้นทำการคัดเลือกและยืนยันเวคเตอร์ที่ได้ด้วยการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก่อนถ่ายโอนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 สำหรับการเจริญเป็นต้นใหม่ของพิทูเนีย พบว่าการเจริญเป็นต้นใหม่ที่บริเวณริมขอบใบพิทูเนียบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นมีประสิทธิภาพสูง จึงใช้เป็นอาหารสำหรับการเจริญเป็นต้นใหม่หลังการถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยอะโกรแบคทีเรียม หลังจากการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีเวคเตอร์ pBI121 หรือ pBI:GFP เข้าสู่ใบพิทูเนีย เป็นเวลา 2 เดือน ปรากฏว่ามีชิ้นใบประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดแคลลัส และแคลลัสที่ได้นี้สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	A Study of the Construction of *Agrobacterium* Transformation Vector with GFP Marker and *Petunia* Transformation
Name	Miss Tharinee Susantad
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2004
Special Project Advisor	Dr. Kanokporn Sompornpailin

Abstract

The construction of plant-expression vector with GFP marker via *Agrobacterium* and tissue culture protocol, was studied for *Petunia* transformation. The new vector, pBI:GFP, was constructed by combination of fragments from pTH2 and pBI121 vectors. The CaMV35S:GFP:nos-ter cassette was cut with *Hind*III and *Eco*RI from pTH2 and ligated to pBI121 without the CaMV35S:GUS:nos-ter cassette in T-DNA region. The vector was selected and confirmed by restriction enzyme analysis before introducing to *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. In part of *Petunia* regeneration, somatic embryos directly formed at cut edges of *Petunia* leaf on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1.5 mg/l BA and 0.01 mg/l NAA in high efficiency. Thus, this medium was used for *Petunia* regeneration after *Agrobacterium* transformation. *A. tumefaciens* LBA4404 containing pBI121 or pBI:GFP was used for transformation to *Petunia* leaves. After 2 months, approximately 3 % of *Petunia* leaves show callus induction. This callus could be resistant to kanamycin selection medium.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล และ ดร. กนกพร สมพรไพลิน ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนช่วยแก้ไขรูปเล่มโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณ พี่รุทธิ์ มณีประเสริฐ พี่ณัฐกานต์ สุโกมล พี่ชมพูนุช พรเจริญนพ และเพื่อนๆ ชั้นปี 4 ทุกคน ที่ได้คอยช่วยเหลือและให้คำแนะนำตลอดการทำโครงงานพิเศษนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ธุรการ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ผู้ให้กำเนิด ผู้ที่คอยอบรมสั่งสอนและส่งเสริมให้ข้าพเจ้ามีการศึกษาที่ดีเสมอมา

นางสาวฐารินี สุสันทัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 กรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีน	4
2.2 การถ่ายฝากยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium*	7
2.3 ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การสร้างเวคเตอร์ที่มี GFP marker	14
3.2 การหาความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของพิทูเนีย	16
3.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนีย	17
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	
4.1 การสร้างเวคเตอร์ที่มียีนรายงานผล GFP	18
4.2 การหาความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของพิทูเนีย	23
4.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนีย	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 34
เอกสารอ้างอิง 36
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 38
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการทดลอง 40
ภาคผนวก ค เวคเตอร์ 46
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ทางสถิติ 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างยีนเครื่องหมายและยีนรายงายผลที่ใช้ในพืช	12
2	ลักษณะของชิ้นใบพิทูเนียที่ถูกชักนำบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน BA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์	24
3	เปอร์เซ็นต์ของลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบพิทูเนียที่ถูกชักนำด้วยฮอร์โมน BA และ NAA ในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์	26
4	เปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นใหม่ที่เจริญจากใบพิทูเนียที่ถูกชักนำด้วยฮอร์โมน BA และ NAA ในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์	28
5	เปอร์เซ็นต์ของลักษณะชิ้นใบพิทูเนียหลังการถ่ายโอนยีนบนอาหารสูตร G และ H ที่ 4, 8 และ 12 สัปดาห์	30
6	เปอร์เซ็นต์ของลักษณะชิ้นใบพิทูเนียหลังการถ่ายโอนยีนบนอาหารสูตร G และ P ที่ 4 สัปดาห์	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แมงกระพรุน *Aequorea victoria*	4
2	โครงสร้าง 3 มิติของกรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีน	5
3	การเรืองแสงของ *A. victoria*	5
4	การเรืองแสงของลูมิโซม	6
5	วัฏจักรฟอสเตอร์	6
6	กลไกการบุกรุกเข้าเซลล์พืชของ *Agrobacterium*	8
7	พลาสมิด Ti แสดงลำดับเบสบริเวณขอบเขตของ T-DNA	9
8	โคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pBI121 ซึ่งเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน	18
9	โคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pTH2 ซึ่งเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน	18
10	ผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pBI121	19
11	ผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pTH2	19
12	ผลการตัดพลาสมิด pBI121 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI	20
13	ผลการตัดพลาสมิด pTH2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI	20
14	ผลการแยกชิ้นส่วนเวคเตอร์ pBI121 กับยีน *GUS* จากเจล	21
15	ผลการแยกชิ้นส่วนเวคเตอร์ pTH2 กับยีน *gfp* จากเจล	21
16	โคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อเวคเตอร์ pBI121 กับยีน *gfp* ที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน	22
17	ผลการสกัดพลาสมิด pBI:GFP จากโคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อเวคเตอร์ pBI121 กับยีน *gfp*	22
18	ผลการตัดพลาสมิด pBI:GFP ที่ได้จากการเชื่อมต่อเวคเตอร์ pBI121 กับยีน *gfp* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่		หน้า
19	แสดงลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบ 4 แบบ	25
20	กราฟแสดงผลของฮอร์โมนในแต่ละสูตรต่อลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบในแบบที่ 4	27
21	กราฟแสดงผลของฮอร์โมนในแต่ละสูตรต่อจำนวนต้นใหม่ที่เจริญในแบบที่ 4	29
22	โคโลนีของอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่ผ่านการถ่ายโอนเวคเตอร์ pBI:GFP ซึ่งเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน	30
23	โคโลนีของอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีเวคเตอร์ pBI121 ที่มียีน *GUS* ซึ่งเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน	30
24	แสดงลักษณะของชิ้นใบหลังการถ่ายโอนยีน 3 แบบ	31
25	แคลลัสที่เกิดขึ้นหลังการถ่ายโอนยีนบนอาหารสูตร G และ H ที่ 13 สัปดาห์	32
26	แคลลัสและกลุ่มเซลล์ที่เกิดขึ้นหลังการถ่ายโอนยีนบนอาหารสูตร G ที่ 5 สัปดาห์	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

Green Fluorescent Protein (GFP) เป็นโปรตีนพิเศษชนิดหนึ่งพบในแมงกะพรุน *Aequorea victoria* ที่สามารถเรืองแสงสีเขียวได้ โปรตีนนี้ประกอบด้วยสายของกรดอะมิโน 238 โมเลกุลเรียงต่อกัน เมื่อเกิดการสร้างพันธะกันภายในสายเกิดเป็นโครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure) ซึ่งภายในจะพบโครงสร้างเล็กๆ ที่เรียกว่าโครโมฟอร์ (Chromophore) ที่เกิดจากการยึดกันของกรดอะมิโนลำดับที่ 65 – 67 ด้วยพันธะโคเวาเลนต์ในลักษณะวงแหวนปิดโดยเมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะปลดปล่อยแสงสีเขียวออกมา (www.plantsci.cam.ac.uk)

เนื่องจาก GFP สามารถเรืองแสงได้เองโดยไม่ต้องการสารตั้งต้นหรือโคแฟกเตอร์ใดๆจึงมีการนำมาใช้เป็นยีนรายงายผล (Reporter gene) (Freydoun และคณะ, 2000; Sean และคณะ, 2000; Tian และคณะ, 1999) ยีน *gfp* ที่ได้จากการโคลน cDNA ของ *A. victoria* นั้นถูกนำมาดัดแปลงเพื่อใช้ในงานด้านพันธุวิศวกรรมโดยนำยีน *gfp* มาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอของโปรตีนที่สนใจแล้วถ่ายลงในสิ่งมีชีวิต ภายในระยะเวลาไม่นานก็จะสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลง หรือรูปแบบของโปรตีนชนิดนี้ได้ภายในเซลล์ที่มีชีวิตในสภาพธรรมชาติ (Sean และคณะ, 2000; Tian และคณะ, 1999) ข้อได้เปรียบของยีน *gfp* เมื่อเทียบกับยีนรายงานผลชนิดอื่น คือ ใช้เวลาไม่นานที่จะเห็นผลในการแสดงออกของยีน ติดตามผลได้แบบ Real-time คือสามารถติดตามผลได้ตลอดในช่วงที่พืชนั้นมีการเจริญเติบโต (Finer และคณะ, 2000) มีความคงตัวสูงถึงแม้ทำการ Sub-culture หลายครั้ง (Tian และคณะ, 1999) และสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไปได้ การตรวจสอบผลนั้นทำได้สะดวกไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีราคาแพง (Sean และคณะ, 2000) จากเหตุผลข้างต้นทำให้มีการใช้ GFP กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืช เช่น ใช้ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนจากอะโกรแบคทีเรียมในหัวบีท (Zhang และคณะ, 2001) ทานตะวัน (Muller และคณะ, 2001) ข้าวฟ่าง (Jeoung และคณะ, 2002) *Theobroma cacao* (Maximova และคณะ, 2003) และใช้เป็นยีนรายงานผลใน creeping bengrass (Yu และคณะ, 2000) ไม้เนื้อแข็ง (Tian และคณะ, 1999) บาร์เลย์ (Murray และคณะ, 2004) เป็นต้น

สำหรับพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) จัดเป็นพืชต้นแบบ (model) ที่ใช้ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ โดยเฉพาะในการวิเคราะห์การควบคุมของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารแอนโทไซยานิน ทั้งนี้ยังเป็นต้นพืชที่มีวงจรชีวิตสั้นจึงสะดวกต่อการใช้ศึกษาการถ่ายโอนดีเอ็นเอ ใช้ระยะเวลาใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญเป็นต้นใหม่ (regeneration) สั้น (Napoli และคณะ, 1990) เจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่มีอากาศร้อน (van der Meer, 1999)

ในการทดลองครั้งนี้ เป็นการศึกษาแนวทางการสร้างเวคเตอร์ที่มียีนเครื่องหมาย GFP สำหรับการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนียโดยอะโกรแบคทีเรียม รวมทั้งศึกษาแนวทางที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของพิทูเนีย และการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนียหรือพืชอื่นๆ รวมไปถึงการตรวจสอบการแสดงออกของ GFP

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อสร้างเวคเตอร์ที่มี GFP สำหรับการถ่ายโอนยีนในพืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

1.2.2 ศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นพืชทดลองและการเจริญเป็นต้นใหม่

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 การศึกษาเทคนิคการสร้างเวคเตอร์ที่มียีนรายงานผล GFP จากเวคเตอร์ที่มีอยู่

1.3.2 ศึกษาหาความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของพิทูเนีย

1.3.3 ศึกษาแนวทางการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชทดลอง

1.3.4 ตรวจสอบพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1.4.1 การสร้างเวคเตอร์ที่มี GFP marker

1.4.1.1 การเพิ่มปริมาณพลาสมิด

1.4.1.2 การตัดและแยกชิ้นส่วนพลาสมิดที่สนใจ

1.4.1.3 การเชื่อมชิ้นส่วนพลาสมิด

1.4.1.4 การถ่ายโอนดีเอ็นเอและตรวจสอบชิ้นส่วนที่ได้

1.4.2 การหาความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของพิทูเนีย

1.4.2.1 นำชิ้นใบของพิทูเนียที่เพาะเลี้ยงไว้มาตัดให้เกิดรอยแผล

1.4.2.2 วางบนผิวหน้าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนแตกต่างกัน

1.4.2.3 บ่มในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.4.2.4 ตรวจผลเมื่อครบ 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนีย

1.4.3.1 ถ่ายเวคเตอร์ pBI121 ที่มียีน *gfp* หรือ pBI:GFP เข้าอะโกรแบคทีเรียม

1.4.3.2 คัดเลือกอะโกรแบคทีเรียมที่คาดว่าน่าจะมีเวคเตอร์

1.4.3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชทดลอง

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 เวคเตอร์ที่มียีนรายงานผล GFP

1.5.2 ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของพืชทดลอง

1.5.3 แนวทางในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 กรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีน (http://www.biochemtech.uni-halle.de/PPS2/projects/jonda/)

2.1.1 ลักษณะทั่วไป

2.1.1.1 แมงกระพรุน *Aequorea victoria*

Aequorea victoria เป็นแมงกระพรุนชนิดหนึ่งที่สามารถเรืองแสงได้ที่บริเวณขอบของโครงสร้างคล้ายร่มโดยแสงที่เรืองออกมามีต้นกำเนิดจากเซลล์ที่เรืองแสงได้ (photogenic cells) จำนวน 6,000 – 7,000 เซลล์ซึ่งในไซโทพลาสซึมของเซลล์เหล่านี้จะมีเม็ดแกรนูลขนาดเล็กมากมายอัดอยู่กันอย่างหนาแน่น แกรนูลนี้ประกอบด้วยโปรตีนที่ร่วมกันทำงานในการเรืองแสง 2 ชนิด คือ อีควอริน (aequorin) ที่ถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยแคลเซียมไอออนแล้วปลดปล่อยแสงสีน้ำเงินและกรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีนหรือจีเอฟพี ที่จะดูดรับพลังงานแสงเหล่านี้แล้วปลดปล่อยพลังงานแสงสีเขียวออกมา

รูปที่ 1 แมงกระพรุน *Aequorea victoria*
ที่มา www.plantsci.cam.ac.uk

2.1.1.2 โครงสร้าง 3 มิติของกรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีน

กรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีนมีโครงสร้าง 3 มิติที่แปลกไปจากโปรตีนชนิดอื่นซึ่ง Yang และคณะ, 1996 ได้ทำการศึกษาและให้ชื่อว่า beta-can ดังรูปที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2 โครงสร้าง 3 มิติของกรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีน

โครงสร้าง beta-can นี้ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 238 โมเลกุลเรียงต่อกันเป็นเส้นสายโดยด้านนอกของโครงสร้างนั้นเกิดจากสาย beta 11 สายที่ขดขนานและอัดตัวกันแน่นทำให้เกิดเป็นรูปร่างทรงกระบอก (เส้นสีเขียว) ส่วนบริเวณภายในมีสาย alpha-helix พันอยู่โดยรอบ (เส้นสีน้ำเงิน) โดยที่กลางสายของ alpha-helix นี้มีการทำพันธะกันของกรดอะมิโนลำดับที่ 65 – 67 เกิดเป็นวงแหวนขึ้นเรียกว่าโครโมฟอร์ (สีแดง) ซึ่งมีหน้าที่ในการเรืองแสง อีกทั้งยังมีเส้นสายเกลียวสั้นๆ (เส้นสีเทา) ที่อยู่ตามขอบของโครงสร้าง โดยโครงสร้างรูปทรงกระบอกนี้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 อังสตรอม สูงประมาณ 40 อังสตรอม

2.1.2 คุณสมบัติของกรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีน

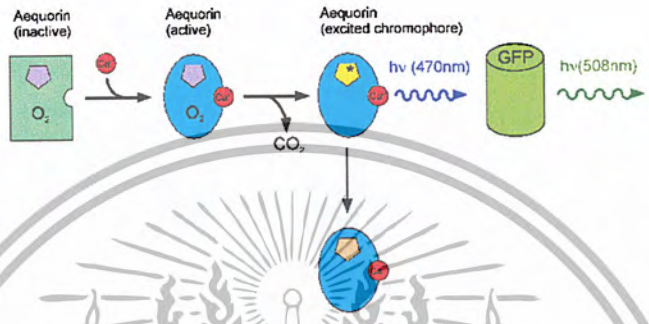
ในเซลล์ที่สามารถเรืองแสงได้ในแมงกระพรุน *A. victoria* นั้นมีโปรตีน 2 ชนิดที่ทำงานร่วมกันอยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่าลูมิโซมคือ อีควอริน (aequorin) ที่ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมไอออนแล้วจะเรืองแสงสีน้ำเงิน กับกรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีนที่ดูดรับพลังงานแสงสีน้ำเงินแล้วปลดปล่อยแสงสีเขียวออกมา ดังรูปที่ 3

รูปที่ 3 การเรืองแสงของ *A. victoria*

ทั้งนี้สามารถอธิบายกลไกในการเรืองแสงของลูมิโซมได้จากรูปที่ 4 โดยในขั้นแรกอีควอรินที่อยู่ในรูปไม่ว่องไว (inactive aequorin) จะถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมไอออนทำให้อยู่

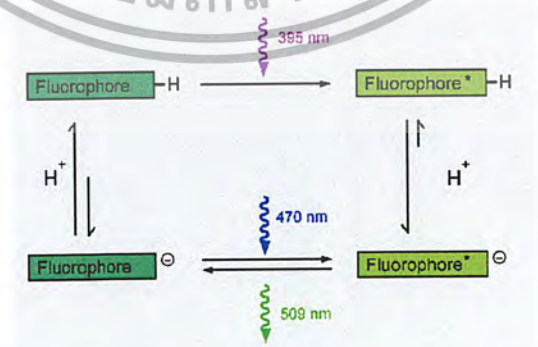
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในรูปที่ว่องไว และมีการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาซึ่งจะทำให้โครโมฟอร์ของมันอยู่ในสถานะกระตุ้นที่ต้องปลดปล่อยพลังงานสูงออกมาเป็นแสงสีน้ำเงินที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร จากนั้นกรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีนจะดูดซับพลังงานเหล่านี้แล้วปลดปล่อยพลังงานที่ต่ำกว่าออกมาเป็นแสงสีเขียวที่ความยาวคลื่น 508 นาโนเมตร



รูปที่ 4 การเรืองแสงของลูมิโซม

เมื่อกรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีนรับพลังงานแสงสีน้ำเงิน โครโมฟอร์ของมันที่อยู่ในรูปฟีโนเลท (ล่างซ้าย) จะเข้าสู่สถานะกระตุ้น (ล่างขวา) แล้วปล่อยพลังงานแสงสีเขียวออกมา แต่ทั้งนี้ถ้าโครโมฟอร์ (ล่างซ้าย) ได้รับโปรตอนมันจะเปลี่ยนเป็นรูปไฮดรอกซีแทน ซึ่งเมื่อได้รับพลังงานสีม่วงจะเข้าสู่สถานะกระตุ้น (บนขวา) ที่มีความไม่เสถียรจึงต้องปลดปล่อยโปรตอนออกมาทำให้มันกลับมาอยู่ในรูปฟีโนเลทในสถานะกระตุ้นตามเดิม (ล่างขวา) ซึ่งสามารถปลดปล่อยพลังงานแสงสีเขียวได้เช่นกัน เกิดเป็นวัฏจักรขึ้น เรียกวัฏจักรนี้ว่า วัฏจักรฟอสเตอร์ ตามชื่อนักวิทยาศาสตร์ผู้ค้นพบ ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 วัฏจักรฟอสเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ข้อได้เปรียบของกรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีน

นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการปรับปรุงยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์กรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีน เพื่อให้มีโครงสร้างที่ง่ายต่อการนำไปประยุกต์ใช้เป็นยีนรายงานผลในงานด้านพันธุ-วิศวกรรมหรืองานวิจัยด้านอื่นเป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากกรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีนมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับยีนรายงานผลอื่นๆ ดังนี้

1. สามารถเรืองแสงได้เอง
2. ใช้ได้กับสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) โดยตัวอย่างที่ใช้ไม่จำเป็นต้องตรึงหรือทำให้ตาย
3. ติดตามโปรตีนที่เราสนใจได้ในเซลล์ที่เจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยงหรือในธรรมชาติ
4. ใช้ระยะเวลาไม่นานในการติดตามและสามารถติดตามการเรืองแสงได้ตลอดเวลา (real-time)
5. มีความคงตัวสูงถึงแม้ทำการ sub-culture หลายครั้ง
6. สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไปได้
7. การตรวจสอบผลทำได้สะดวก ไม่ต้องใช้สารเคมีราคาแพง

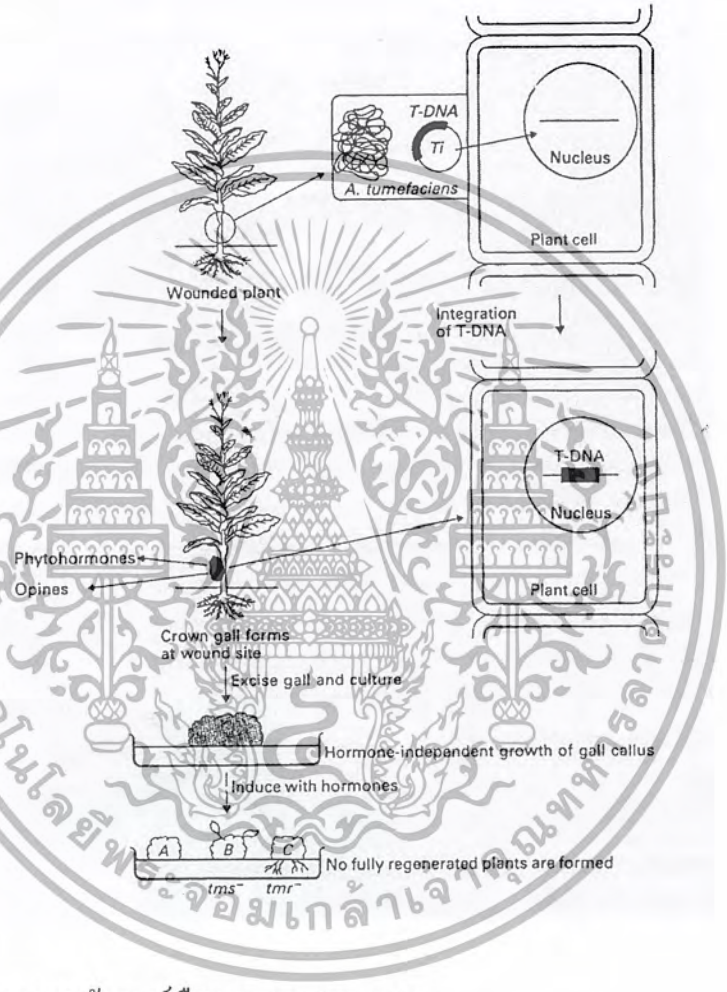
2.2 การถ่ายฝากยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* (สุรินทร์, 2545)

Agrobacterium เป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งอยู่ในดิน สามารถบุกรุกเข้าสู่ต้นพืชได้บริเวณที่มีบาดแผล ทำให้เกิดเป็นปุ่มปม (tumour) หรือก้อนเนื้อตรงจุดนั้น เรียกว่า crown gall disease เมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นปุ่มปมนี้มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ จะสามารถคงสภาพเช่นเดิมอยู่ได้ คือ เจริญเติบโตได้เร็วและโตได้ไม่จำกัดในสภาพแคลลัส โดยไม่จำเป็นต้องใส่ฮอร์โมนหรือสารเร่งการเจริญเติบโตอื่นใด แม้ว่าจะกำจัดแบคทีเรียออกไปแล้วก็ตาม แต่จะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ เนื้อเยื่อดังกล่าวนี้จะสร้างสารพวกโอปีน (opine) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่พบได้ไม่บ่อยนัก สารโอปีนที่เซลล์สร้างขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เข้าบุกรุกพืช ที่พบมาก คือ ออกโทปีน (octopine) และโนปาลีน (nopaline) สารโอปีนที่เซลล์พืชสร้างขึ้นนี้จะเป็นอาหารของแบคทีเรีย *Agrobacterium* นั้นอีกต่อหนึ่ง

หลังจากเซลล์พืชได้รับการถ่ายโอนชิ้นส่วนของ T-DNA T-DNA นี้จะเข้าไปรวมกับโครโมโซมพืชแล้วจะทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อปุ่มปมและผลิตสารโอปีน ซึ่ง T-DNA นี้เป็นส่วนหนึ่งของพลาสมิด Ti (tumour inducing plasmid) เชื้อ *Agrobacterium* ที่พบพลาสมิดชนิดนี้คือ *Agrobacterium tumefaciens* เชื้อ *Agrobacterium* อีกชนิดหนึ่งทำให้เกิดรากบริเวณที่มีการบุกรุกของแบคทีเรียคือ *Agrobacterium rhizogenes* ซึ่งมีพลาสมิด Ri (root inducing plasmid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดจากการบุกรุกของ *Agrobacterium tumefaciens* จะมีดีเอ็นเอบางส่วนของพลาสมิด Ti ขนาดประมาณ 20 กิโลเบสถูกถ่ายทอดเข้าไปและแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช (รูปที่ 6) เรียกดีเอ็นเอส่วนนี้ว่า T (transferred) DNA



รูปที่ 6 กลไกการบุกรุกเข้าเซลล์พืชของ *Agrobacterium*

พลาสมิด Ti ที่พบมากมี 2 ชนิดแบ่งตามอนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่สร้างขึ้น คือชนิดออก-โทปีนและโนปาลีน มีส่วนของ virulence (*vir*) gene ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช T-DNA ซึ่งภายในมียีนที่กำหนดการสร้างสารโอปีน เช่น nopaline synthase (*nos*), agroclinopine synthase (*acs*), octopine synthase (*ocs*) และ agropine synthesis ส่วนอื่นๆคือ จุดเริ่มต้นการจำลองโมเลกุล (*ORI*) ส่วนที่ควบคุมการส่งถ่ายพลาสมิดโดยวิธี conjugation (*tra*) ยีนที่กำหนดให้เซลล์แบคทีเรียสามารถใช้สารบางชนิดเป็นแหล่งพลังงานได้ ได้แก่ arginine catabolism (*arc*), nopaline cetabolism (*noc*), agroclinopine catabolism (*agc*), octopine catabolism

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(*occ*) และ agropine catabolism (*agr*) เมื่อแบคทีเรียส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชแล้ว เซลล์ของพืชบริเวณที่ถูกบุกรุกจึงสามารถสร้างสารโอปีนขึ้นได้ตามชนิดของพลาสมิด Ti นั้น ส่วน *Agrobacterium* ก็สามารถเจริญเติบโตโดยใช้สารโอปีนที่พืชสร้างขึ้นเป็นแหล่งพลังงานได้ เนื่องจากมียีนที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารโอปีนดังกล่าว เมื่อกำจัดแบคทีเรียออกไปพืชจะยังคงสังเคราะห์สารโอปีนได้ เนื่องจาก T-DNA ถูกส่งเข้าไปอยู่ในเซลล์พืชอย่างถาวร

ในส่วนของ T-DNA นอกจากจะมียีนที่กำหนดการสังเคราะห์สารโอปีนแล้ว ยังมียีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชพวกออกซินและไซโตไคนินด้วย เป็นเหตุให้เซลล์พืชที่ได้รับ T-DNA มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็วและไม่จำกัด เกิดเป็นเนื้อเยื่อปุ่มปมที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากได้

ขอบเขตของ T-DNA ที่จะส่งถ่ายไปยังเซลล์พืช กำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ (terminal repeat) 25 คู่เบส 2 ข้างของ T-DNA (ดังรูปที่ 7) เรียกว่า left border (LB) และ right border (RB)

รูปที่ 7 พลาสมิด Ti แสดงลำดับเบสบริเวณขอบเขตของ T-DNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลไกการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชควบคุมโดยกลุ่มยีน *virulence* ที่อยู่ในพลาสมิด Ti กลุ่มยีนนี้ประกอบด้วย

virA มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุม โดยจดจำสารประกอบพวก phenolic ซึ่งผลิตจากพืช และไปกระตุ้นยีน *virG*

virG มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมเช่นเดียวกัน โดยเป็นตัวกระตุ้นให้มีการลอกรหัสของยีนอื่นๆในกลุ่ม

virD จะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของดีเอ็นเอที่จุดขอบเขตทางขวาและซ้ายของ T-DNA คือ RB และ LB ทำให้เกิด T-DNA สายเดี่ยว (T-strand) สำหรับส่งไปยังเซลล์พืช

virC เกี่ยวข้องกับการกำหนดสายพันธุ์ของแบคทีเรียและชนิดของพืชที่จะบุกรุก (host range determination) แต่ยังไม่ทราบว่ามีวิธีการอย่างไร

virE เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวเพื่อให้ T-DNA มีความคงตัวในระหว่างและหลังจากที่มีการส่งถ่ายยีน

virB เป็นโปรตีนที่ไปจับตัวที่เยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อเป็นช่องทางให้ T-DNA ผ่านไปยังเซลล์พืช

กลไกการส่งถ่ายยีนโดยรวมคล้ายกับการส่งถ่ายพลาสมิดในการจับคู่ conjugation ของแบคทีเรีย กระบวนการส่งถ่ายกระตุ้นโดยสารประกอบ phenolic จากพืช คือ acetosyringone (AS) ซึ่งพืชปล่อยออกมาเนื่องจากเกิดบาดแผล และการส่งถ่ายจะควบคุมโดยยีน *chv* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรีย และ *vir gene* ที่อยู่บนพลาสมิด Ti โดย T-DNA จะถูกตัดโดยเอนไซม์ซึ่งเป็นผลผลิตของยีน *virD* ที่ขอบเขตทั้งสองข้าง แล้วจึงส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชในแบบดีเอ็นเอสายเดี่ยว ทิศทางการส่งถ่ายจะเริ่มจากขอบเขตทางขวา (RB) ไปเรื่อยๆ ส่วน RB นี้เป็นส่วนที่จำเป็นมากสำหรับการส่ง T-DNA ส่วนขอบเขตทางซ้าย (LB) ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดปลายของชิ้นดีเอ็นเอที่จะส่งเท่านั้น แม้ว่าจะไม่มีส่วน LB การส่ง T-strand ก็เกิดขึ้นได้ แต่จะมีขนาดไม่แน่นอน เพราะการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ทางปลายจะเป็นแบบสุ่ม

ข้อสังเกตที่น่าสนใจคือ ยีนที่อยู่ใน T-DNA ทั้งหมดนั้นเหมือนกับยีนของพืชแต่อยู่ในพลาสมิดของแบคทีเรีย ยีนเหล่านี้มีโปรโมเตอร์ซึ่งเหมือนกับโปรโมเตอร์ของพืชและมีส่วนเทอร์มิเนเตอร์และตำแหน่งที่ใช้เติมเบส polyA ที่พบในยูคาริโอต โดยยีนเหล่านี้จะไม่มีการแสดงออกในเซลล์ของ *Agrobacterium* แต่แสดงออกในเซลล์ของพืชที่ได้รับ T-DNA เมื่อยีนเหล่านี้แสดงออกแล้วมีผลไปเหนี่ยวนำให้ยีนในเซลล์แบคทีเรียทำงานได้ และเป็นประโยชน์ต่อเซลล์แบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนสำคัญที่ทำให้มีการส่ง T-DNA จาก *Agrobacterium*ไปยังพืชคือส่วนของ *vir gene* และตำแหน่ง RB และ LB ของ T-DNA ส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างสารโอปีนและฮอร์โมนพืชที่อยู่ภายใน T-DNA นั้นไม่มีหน้าที่ในการส่งถ่าย T-DNA แต่อย่างใด ดังนั้นการใช้พลาสมิด Ti เป็นเวคเตอร์สำหรับถ่ายฝากยีนให้กับพืช จะทำโดยแทนที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชและสารโอปีนด้วยยีนที่ต้องการ เมื่อมีการส่ง T-DNA เข้าไปในพืช พืชก็จะได้รับยีนที่สอดใส่ไว้แทน แต่เนื่องจากพลาสมิด Ti เป็นพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ประมาณ 200 กิโลเบส การเตรียมพลาส-มิดและการตัดต่อยีนที่ต้องการเข้าไปในพลาสมิดทำได้ยาก พลาสมิดที่มีขนาดใหญ่มากนั้น โอกาสที่จะพบตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดๆ เพียง 1 ตำแหน่งเป็นไปได้ยากหรือแทบไม่มีเลย พบว่า *vir gene* มีผลต่อการส่งยีนที่อยู่ระหว่าง RB และ LBได้โดยไม่จำเป็นต้องมีตำแหน่งอยู่ใกล้หรืออยู่บนพลาสมิดโมเลกุลเดียวกันกับส่วนของยีนที่อยู่ระหว่าง RB และ LB นั้น การสร้างเวคเตอร์เพื่อถ่ายฝากยีนผ่าน *Agrobacterium* มี 2 แบบ คือ

ก. Binary vector เวคเตอร์นี้แยกเอาส่วนของ RB และ LB มาไว้ในพลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 10 กิโลเบส ส่วน *vir gene* ยังคงอยู่ในพลาสมิด Ti ที่มีขนาดใหญ่ซึ่งอยู่ใน *Agrobacterium* ระหว่าง RB และ LB ซึ่งอยู่ในพลาสมิดเล็กนั้น ประกอบด้วยยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในพืชและตำแหน่งที่ใช้สอดใส่ยีนเพื่อใส่ยีนที่ต้องการลงไป ส่วนนอกของพลาสมิดประกอบด้วยจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุลในแบคทีเรีย *Agrobacterium* และ *E. coli* และยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในเซลล์แบคทีเรีย เพื่อใช้สำหรับเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน *E. coli* เมื่อตัดต่อยีนที่ต้องการลงในตำแหน่งภายในขอบเขตของ T-DNA เดิมแล้วนำมาใส่ใน *E. coli* แล้วจึงถ่ายพลาสมิดจาก *E. coli* ไปสู่ *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด Ti แต่เป็นพลาสมิดที่ไม่มีส่วนของ T-DNA เมื่อนำ *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิดทั้งสองชนิดไปบุกรุกเซลล์พืช จะมีการส่งชิ้นดีเอ็นเอตั้งแต่ส่วน RB ถึง LB ซึ่งรวมเอายีนที่ต้องการและยีนเครื่องหมายที่ใช้ในพืชเข้าไปในเซลล์พืช โดยการทำงานของ *vir gene* และยีนบนโครโมโซมของ *Agrobacterium*

ข. Cointegrate vector เวคเตอร์แบบนี้ทำโดยตัดเอาส่วนของยีนที่ทำหน้าที่สร้างฮอร์โมนพืชและสารโอปีนบางส่วนออกไปจาก T-DNA ของพลาสมิด Ti แล้วแทนที่ด้วยดีเอ็นเอที่มาจากพลาสมิดของ *E. coli* และมีพลาสมิดขนาดเล็กอีกอันหนึ่งประกอบด้วยยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในแบคทีเรีย ยีนที่เครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในพืช บริเวณที่จะสอดใส่ยีนที่ต้องการ และจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุลใน *E. coli* เท่านั้น เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน *E. coli* เมื่อตัดต่อยีนที่ต้องการลงในตำแหน่งที่ใช้โคลนยีนแล้วจึงถ่ายพลาสมิดลงใน *E. coli* และถ่ายพลาสมิดไปยัง *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด Ti แบบที่อธิบายไว้ตอนต้น เนื่องจากพลาสมิดเล็กที่ใช้โคลนยีนนี้ ไม่มีจุดเริ่มต้นในการจำลองโมเลกุลใน *Agrobacterium* จึงไม่สามารถจะคงอยู่อย่างอิสระได้ เนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนของ T-DNA ของพลาสมิด Ti มีส่วนของดีเอ็นเอจากพลาสมิดของ *E. coli* อยู่ดังนั้นจะเกิด recombination ทำให้พลาสมิดเล็กที่ใส่เข้าไป เข้าไปอยู่ภายในขอบเขตของ T-DNA ทั้งหมด เมื่อนำ *Agrobacterium* นี้ไปบุกรุกเซลล์พืช *Agrobacterium*จะส่งยีนทั้งหมดที่อยู่ใน T-DNA ดังกล่าวเข้าไปในเซลล์พืช

2.3 ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช

ยีนเครื่องหมาย (marker gene) และยีนรายงานผล (reporter gene) มีข้อแตกต่างกัน คือ ยีนเครื่องหมายเป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการที่ทำให้คัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนที่ถ่ายฝากลงไปได้ง่ายๆเพื่อตรวจสอบผลสำเร็จของการถ่ายฝากยีน ส่วนยีนรายงานผลเป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางอย่าง ที่ทำให้ทราบได้ว่าส่วนของโปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับยีนนั้นมีการแสดงออกมาหรือไม่ และแสดงออกมาได้มากน้อยเพียงใดในเซลล์หรือในเนื้อเยื่อส่วนใด ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืชนั้นอาจจะเป็นยีนชนิดเดียวกันก็ได้ ถ้าใช้เป็นยีนเครื่องหมายก็จะต่ออยู่กับโปรโมเตอร์ที่ทราบแล้วว่าทำงานได้ตลอดเวลาและในเนื้อเยื่อทุกชนิดของพืช แต่ถ้าใช้เป็นยีนรายงานผลก็จะต่ออยู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นโปรโมเตอร์ ตัวอย่างยีนที่ใช้มากแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างยีนเครื่องหมายและยีนรายงายผลที่ใช้ในพืช

ตัวอย่างยีน	เอนไซม์หรือโปรตีนที่สร้างได้	ลักษณะที่แสดงออก
ยีนเครื่องหมาย		
hpt	hygromycin phosphotransferase	ต้านทาน hygromycin
dhfr	dihydrofolate reductase	ต้านทาน methotrexate
CAT	chloramphenical acetyltransferase	ต้านทาน chloramphenical
NPT II	neomycin phosphotransferase	ต้านทาน kanamycin
ยีนรายงานผล		
CAT	chloramphenical acetyltransferase	
GUS	beta-glucuronidase	
nos	nopaline synthase	
luc	luciferase	
β-gal	beta-galactosidase	
gfp	green fluorescent protein	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรโมเตอร์สำหรับการแสดงออกของยีนในพืชที่ใช้กันมาก คือโปรโมเตอร์จากยีน nopaline synthase (nos promotor) ซึ่งอยู่ในส่วนของ T-DNA ของพลาสมิด Ti และโปรโมเตอร์จากไวรัสของกระหล่ำ cauliflower mosaic virus (CaMV 35S promotor) ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพและแสดงออกได้ในเซลล์พืชทุกประเภท จึงเป็นโปรโมเตอร์ที่นำมาใช้กันมากในการถ่ายฝากยีนในพืช เพื่อให้มีการแสดงออกของยีนหรือโปรโมเตอร์ที่มาจากพืชที่ต้องการทดสอบ เช่น โปรโมเตอร์จากยีนแอคตินของข้าว (rice actin promotor)

ข้อควรคำนึงในการใช้เวคเตอร์เพื่อถ่ายฝากยีนในพืช คือ ยีนที่จะถ่ายเข้าไปต้องควบคุมโดยโปรโมเตอร์ที่แสดงออกได้ในเซลล์ของพืช นิยมใช้พลาสมิดที่มีส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุลใน *E. coli* อยู่ด้วยเพื่อใช้เพิ่มปริมาณ ในกรณีที่ใช้ *Agrobacterium* เวคเตอร์ที่ใช้ต้องมีส่วนของ RB และ LB ของ T-DNA หรือมีส่วนที่เหมือนกับส่วนของดีเอ็นเอที่ใส่ไว้ในพลาสมิด Ti ของ *Agrobacterium* เพื่อให้เกิดการแทรกตัวเข้าไปรวมกัน ดังที่กล่าวแล้ว ส่วนการถ่ายฝากยีนโดยวิธีอื่นใช้เวคเตอร์ใดๆก็ได้ แต่ใช้ยีนเครื่องหมายและวิธีตรวจสอบแบบเดียวกัน นอกจากวิธีถ่ายฝากยีนในพืชตามที่กล่าวมาแล้ว มีความพยายามที่จะใช้ไวรัสของพืชเป็นสื่อและวิธีอื่นๆอีก แต่ยังไม่แพร่หลาย เป็นวิธีที่ใช้เฉพาะห้องปฏิบัติการหนึ่งเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสร้างเวคเตอร์ที่มี GFP marker

3.1.1 การเพิ่มปริมาณพลาสมิด pBI121 และ pTH2

ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pBI121 และ pTH2 เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ NAVA BLUE (ภาคผนวก ข) แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าน่าจะมีพลาสมิดโดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินสำหรับพลาสมิด pBI121 และแอมพิซิลินสำหรับพลาสมิด pTH2 จากนั้นสกัดพลาสมิดจากโคลนที่เลือกได้

3.1.2 การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดส่วนของพลาสมิด

นำพลาสมิด pBI121 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI เพื่อทำการแยกเวคเตอร์ pBI121 กับยีน *GUS* ซึ่งให้เอนไซม์เบต้ากลูคูโรนิเดส มีปฏิกิริยาดังนี้

10X buffer M	24	ไมโครลิตร
*Hin*dIII (15 unit/µl)	12	ไมโครลิตร
*Eco*RI (12 unit/µl)	15	ไมโครลิตร
พลาสมิด pBI121	180	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	9	ไมโครลิตร

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

สำหรับพลาสมิด pTH2 จะนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI เช่นเดียวกัน เพื่อทำการแยกเวคเตอร์ pTH2 กับยีน *gfp* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์กรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีนหรือจีเอฟพี มีปฏิกิริยาดังนี้

10X buffer M	20	ไมโครลิตร
*Hin*dIII (15 unit/µl)	8	ไมโครลิตร
*Eco*RI (12 unit/µl)	8	ไมโครลิตร
พลาสมิด pTH2	145	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	19	ไมโครลิตร

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 การแยกชิ้นส่วนของเวคเตอร์กับชิ้นดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอของพลาสมิดทั้งสองมาทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากกัน โดยอิเลคโทรโฟริซีส จากนั้นทำให้ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (ภาคผนวก ข) ในขั้นตอนนี้จะได้เวคเตอร์ pBI121 กับยีน *gfp* บริสุทธิ์

3.1.4 การเชื่อมยีน *gfp* กับเวคเตอร์ pBI121 โดยมีปฏิกิริยา ดังนี้

ยีน *gfp*	4	ไมโครลิตร
เวคเตอร์ pBI121	4	ไมโครลิตร
10X buffer M	1	ไมโครลิตร
T4 ligase (3 unit/µl)	1	ไมโครลิตร

บ่มที่ 22 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

จากนั้นถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อยีน *gfp* กับเวคเตอร์ pBI121 เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ NAVA BLUE แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าน่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน (ภาคผนวก ข) และสกัดพลาสมิดจากโคลนที่เลือกได้

3.1.5 การตรวจเวคเตอร์ที่มีชิ้นส่วนของยีน *gfp* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดที่ได้ข้อ 3.1.4 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI ตามปฏิกิริยาดังนี้

10X buffer M	1	ไมโครลิตร
*Hin*dIII (15 unit/µl)	0.3	ไมโครลิตร
*Eco*RI (12 unit/µl)	0.2	ไมโครลิตร
พลาสมิดจากการโคลนที่คาดว่า		
มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่	2	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	6.5	ไมโครลิตร

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การหาความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของพิทูเนีย

3.2.1 นำชิ้นใบของพิทูเนียมาตัดให้เกิดรอยแผล

3.2.2 วางชิ้นใบบนผิวหน้าอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่แตกต่างกัน 15 สูตร สูตรละ 10 ซ้ำ

อาหารสูตร A ที่มี MS เสริมด้วย BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร B ที่มี MS เสริมด้วย BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร C ที่มี MS เสริมด้วย BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร D ที่มี MS เสริมด้วย BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร E ที่มี MS เสริมด้วย BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร F ที่มี MS เสริมด้วย BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร G ที่มี MS เสริมด้วย BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร H ที่มี MS เสริมด้วย BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร I ที่มี MS เสริมด้วย BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร J ที่มี MS เสริมด้วย BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร K ที่มี MS เสริมด้วย BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร L ที่มี MS เสริมด้วย BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร M ที่มี MS เสริมด้วย BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร N ที่มี MS เสริมด้วย BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร O ที่มี MS เสริมด้วย BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2.3 บ่มในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงส่องสว่าง

3.2.4 ตรวจผลเมื่อ 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนีย

3.3.1 การถ่ายเวคเตอร์ pBI:GFP เข้าอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 หลังจากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ที่คาดว่าน่าจะมีเวคเตอร์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน (ภาคผนวก ข)

3.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนีย

3.3.2.1 นำอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ที่มียีน *NPTII* ซึ่งให้ความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะคานาไมซินกับยีน *GUS* ที่อยู่ในบริเวณ T-DNA มาถ่ายโอนเข้าสู่ใบพิทูเนีย (ภาคผนวก ข)

3.3.2.2 นำอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ที่มียีน *NPTII* กับยีน *gfp* ที่อยู่ในบริเวณ T-DNA (จากข้อ 3.3.1) มาถ่ายโอนเข้าสู่ใบพิทูเนีย (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
61825

บทที่ 4

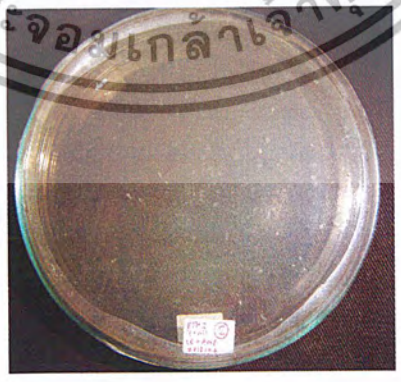
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การสร้างเวคเตอร์ที่มี GFP marker

4.1.1 การเพิ่มปริมาณพลาสมิด pBI121 และ pTH2

หลังจากถ่ายโอนพลาสมิด pBI121 และ pTH2 เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ NAVA BLUE แล้ว ทำการเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซินสำหรับพลาสมิด pBI121 และแอมพิซิลินสำหรับ pTH2 เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่คาดว่าได้รับยีน ได้ผลดังรูปที่ 8 และ 9

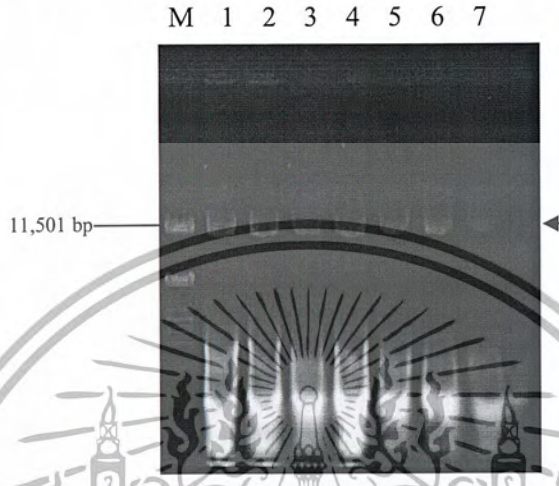
รูปที่ 8 โคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pBI121 ซึ่งเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน



รูปที่ 9 โคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pTH2 ซึ่งเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ ซึ่งตรวจผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 10 และ 11



รูปที่ 10 ผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pBI121
(1-7 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน)

รูปที่ 11 ผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pTH2
(1-9 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน)

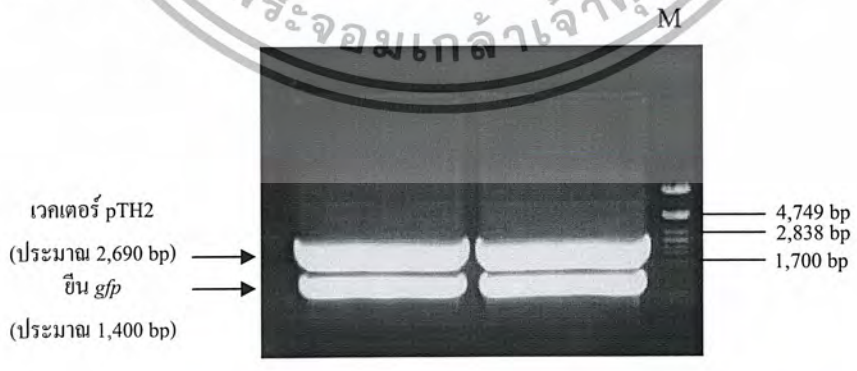
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดส่วนของพลาสมิด

นำโคลนหมายเลข 5, 6 และ 7 ของพลาสมิด pBI121 มารวมกันแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI เพื่อทำการแยกเวคเตอร์ pBI121 กับยีน *GUS* ซึ่งตรวจผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 12

รูปที่ 12 ผลการตัดพลาสมิด pBI121 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI
(M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

สำหรับพลาสมิด pTH2 นั้นก็ทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI เช่นกัน โดยนำโคลนหมายเลข 8 และ 10 มารวมกันเพื่อแยกเวคเตอร์ pTH2 กับยีน *gfp* ซึ่งตรวจผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 13

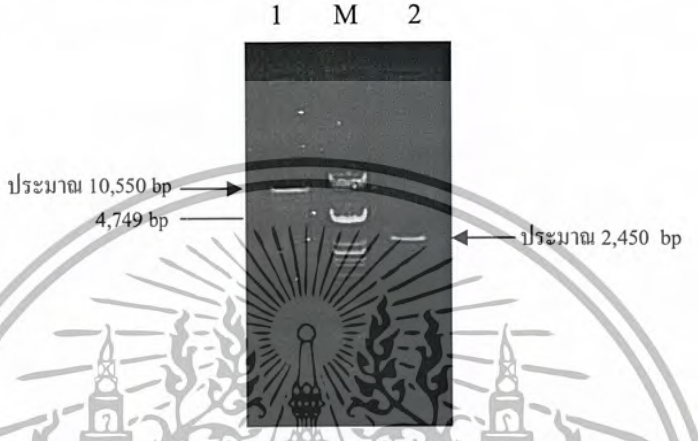


รูปที่ 13 ผลการตัดพลาสมิด pTH2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI
(M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การแยกชิ้นส่วนของเวคเตอร์กับชิ้นดีเอ็นเอ

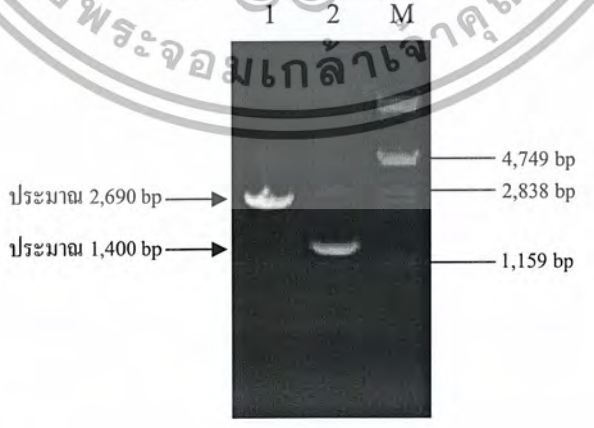
ทำการแยกชิ้นส่วนของเวคเตอร์ pBI121 กับยีน *GUS* ออกจากกันและทำให้ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยตรวจผลจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 ผลการแยกชิ้นส่วนเวคเตอร์ pBI121 กับยีน *GUS* จากเจล

(1 คือ เวคเตอร์ pBI121 ที่ปราศจากยีน *GUS*, 2 คือ ยีน *GUS*, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

และแยกชิ้นส่วนของเวคเตอร์ pTH2 กับยีน *gfp* ออกจากกันและทำให้ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยตรวจผลจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 50 โวลต์เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 ผลการแยกชิ้นส่วนเวคเตอร์ pTH2 กับยีน *gfp* จากเจล

(1 คือ เวคเตอร์ pTH2 ที่ปราศจากยีน *gfp*, 2 คือ ยีน *gfp*, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

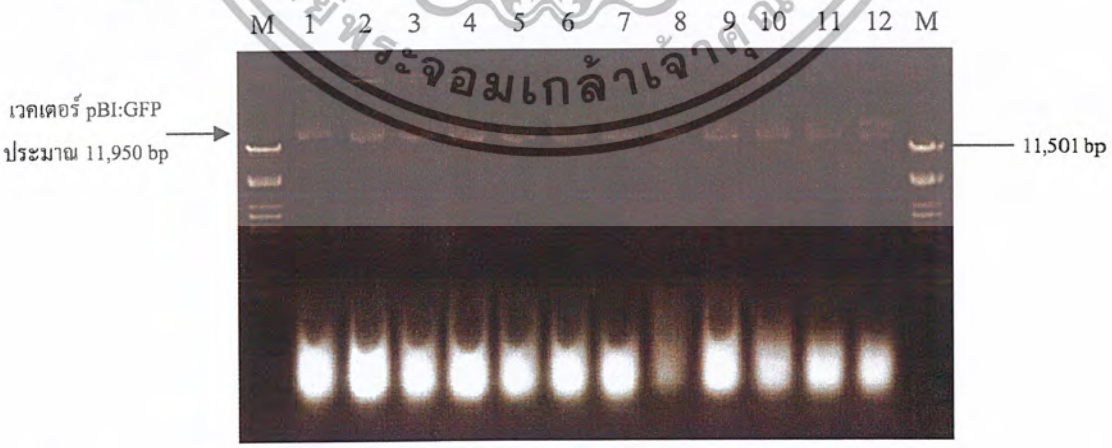
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 การเชื่อมยีน *gfp* กับเวคเตอร์ pBI121ที่ปราศจากยีน *GUS*

เมื่อนำเวคเตอร์ pBI121 ที่ปราศจากยีน *GUS* กับยีน *gfp* ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์แล้ว เชื่อมต่อกันและถ่ายโอนเข้าใน *E. coli* สายพันธุ์ NAVA BLUE แล้วทำการเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน เพื่อทำการคัดเลือกเซลล์ที่คาดว่าได้รับการถ่ายโอนยีน ได้ผลดังรูปที่ 16

รูปที่ 16 โคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อเวคเตอร์ pBI121 กับยีน *gfp* ที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน

จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่เลือกได้ ซึ่งตรวจผลจากการทำอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 50 โวลต์เปรียบเทียบกับดีเอ็น-เอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 ผลการสกัดพลาสมิด pBI:GFP จากโคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็น-เอที่ได้จากการเชื่อมต่อเวคเตอร์ pBI121 ที่ปราศจากยีน *GUS* กับยีน *gfp*
(1-12 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5 การตรวจเวคเตอร์ที่มีชิ้นส่วนของยีน *gfp* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดจากข้อ 4.1.4 หมายเลข 1 ถึง 12 มาทดสอบผลการเชื่อมต่อโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI ซึ่งตรวจผลจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ความเข้มข้นเจล 0.7 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 50 โวลต์เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 18

รูปที่ 18 ผลการตัดพลาสมิด pBI:GFP ที่ได้จากการเชื่อมต่อเวคเตอร์ pBI121 กับยีน *gfp* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI

(1-12 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิด pBI:GFP ที่นำมาตัด, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

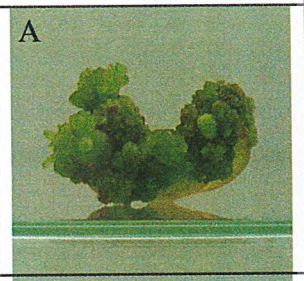
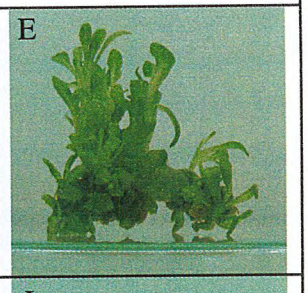
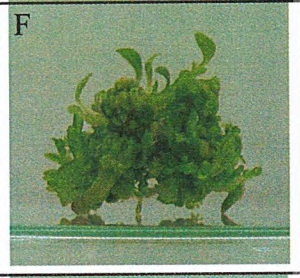
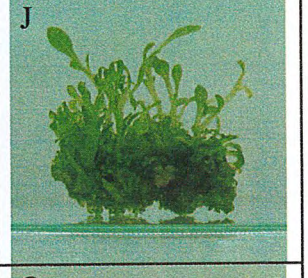
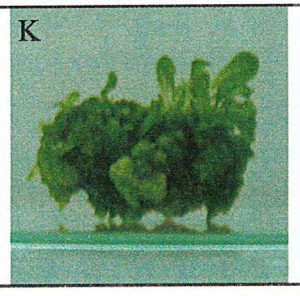
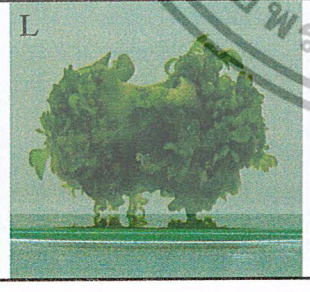
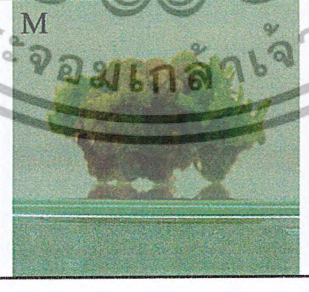
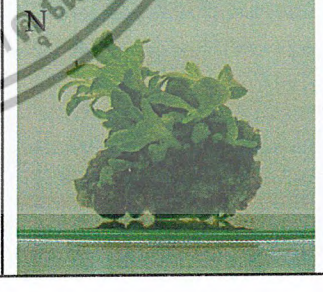
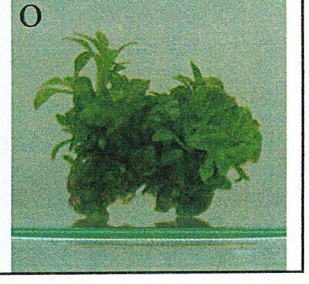
จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเวคเตอร์ pBI121 กับ ยีน *gfp* นั้นมีการเชื่อมต่อกัน เกิดเป็นเวคเตอร์ใหม่ เรียกว่า pBI:GFP ทำให้สรุปได้ว่าสามารถสร้างเวคเตอร์ที่มี GFP marker ได้

4.2 การหาความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของพิทูเนีย

หลังจากที่ได้วางชิ้นใบบนผิวหน้าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่แตกต่างกัน 15 สูตร สูตรละ 10 ซ้ำ ได้ผลดังตารางที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

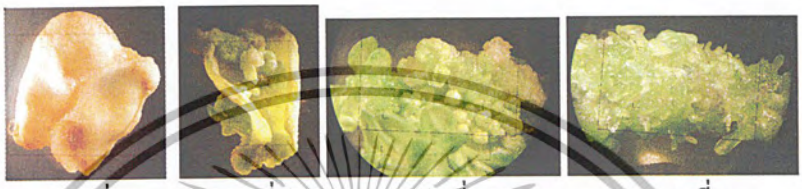
ตารางที่ 2 ลักษณะของชิ้นใบพิทูเนียที่ถูกชักนำบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน BA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

BA \ NAA	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)				
	0	0.01	0.02	0.03	0.04
1.0	 A	B	C	D	 E
1.5	 F	G	H	I	 J
2.0	 K	 L	 M	 N	 O

จากผลที่ได้จะแยกพิจารณาเป็น 2 ลักษณะตามลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบและจำนวนต้นใหม่ที่เจริญ ดังนี้

4.2.1 พิจารณาลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบ

โดยแบ่งเกณฑ์แยกระดับลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบเป็น 4 แบบ ดังรูปที่ 19



แบบที่ 1 แบบที่ 2 แบบที่ 3 แบบที่ 4

รูปที่ 19 แสดงลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบ 4 แบบ

แบบที่ 1 คือ เนื้อเยื่อใบตาย

แบบที่ 2 คือ เนื้อเยื่อใบเกิดเป็นแคลลัสมีปริมาณน้อยและมีสีเหลือง-เขียว

แบบที่ 3 คือ เนื้อเยื่อใบเกิดเป็นแคลลัสมีปริมาณมาก มีสีเขียว แต่ยังไม่มีการพัฒนาไปต้นใหม่

แบบที่ 4 คือ เนื้อเยื่อใบส่วนใหญ่มีการพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่มีสีเขียวสมบูรณ์

เมื่อทำการบันทึกผลที่ 6 สัปดาห์ในรูปเปอร์เซ็นต์ของเนื้อเยื่อใบแต่ละลักษณะ ได้ผลดังตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ของลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบพิทูเนียที่ถูกชักนำด้วยฮอร์โมน BA และ NAA ในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

เกณฑ์การพัฒนาของเนื้อเยื่อใบ		1	2	3	4
อาหาร MS เสริมฮอร์โมนในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร					
BA 1.0	(สูตร A)[a]		80	20	
BA 1.0 NAA 0.01	(สูตร B)[a]		60	40	
BA 1.0 NAA 0.02	(สูตร C)[c, d]			70	30
BA 1.0 NAA 0.03	(สูตร D)[c, d]			70	30
BA 1.0 NAA 0.04	(สูตร E)[b, c]			100	
BA 1.5	(สูตร F)[d]			40	60
BA 1.5 NAA 0.01	(สูตร G)[d]		10		90
BA 1.5 NAA 0.02	(สูตร H)[d]		10	10	80
BA 1.5 NAA 0.03	(สูตร I)[c, d]			40	60
BA 1.5 NAA 0.04	(สูตร J)[d]		10		90
BA 2.0	(สูตร K)[c, d]			70	30
BA 2.0 NAA 0.01	(สูตร L)[d]			40	60
BA 2.0 NAA 0.02	(สูตร M)[a, b]		40	60	
BA 2.0 NAA 0.03	(สูตร N)[b, c]			100	
BA 2.0 NAA 0.04	(สูตร O)[b, c]			100	

หมายเหตุ

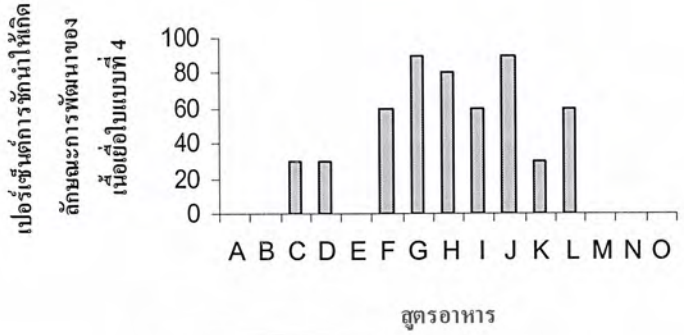
a คือ ค่าเฉลี่ยของลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบแบบที่ 1 ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95 เปอร์เซ็นต์

b คือ ค่าเฉลี่ยของลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบแบบที่ 2 ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95 เปอร์เซ็นต์

c คือ ค่าเฉลี่ยของลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบแบบที่ 3 ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95 เปอร์เซ็นต์

d คือ ค่าเฉลี่ยของลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบแบบที่ 4 ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 กราฟแสดงผลของฮอร์โมนในแต่ละสูตรต่อลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบในแบบที่ 4

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่าสูตร G, H และ J สามารถชักนำให้เกิดลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบที่ 4 ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงแต่เนื่องจากรูปที่ 20 พบว่าสูตร G และ H ชักนำให้เกิดแคลลัสในปริมาณมากและมีการพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์กว่า จึงถูกเลือกใช้เพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

4.2.2 พิจารณาจำนวนต้นใหม่ที่เจริญ

โดยแบ่งเกณฑ์แยกระดับปริมาณต้นใหม่ที่เจริญเป็น 4 แบบ ดังนี้

แบบที่ 1 คือ 0 – 4 ต้น

แบบที่ 2 คือ 5 – 9 ต้น

แบบที่ 3 คือ 10 – 14 ต้น

แบบที่ 4 คือ 15 ต้นขึ้นไป

และเมื่อบันทึกผลที่ 6 สัปดาห์ในรูปเปอร์เซ็นต์ของปริมาณต้นใหม่ทั้ง 4 แบบ ได้ผลดังตารางที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นใหม่ที่เจริญจากใบพิทูเนียที่ถูกชักนำด้วยฮอร์โมน BA และ NAA ในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

เกณฑ์จำนวนต้นใหม่ที่เจริญ		1	2	3	4
อาหาร MS เสริมฮอร์โมนในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร					
BA 1.0	(สูตร A)[a]	100			
BA 1.0 NAA 0.01	(สูตร B)[a]	100			
BA 1.0 NAA 0.02	(สูตร C)[b, c]		30	40	30
BA 1.0 NAA 0.03	(สูตร D)[b, c, d]	10	20		70
BA 1.0 NAA 0.04	(สูตร E)[d]				100
BA 1.5	(สูตร F)[d]				100
BA 1.5 NAA 0.01	(สูตร G)[c, d]	10			90
BA 1.5 NAA 0.02	(สูตร H)[d]				100
BA 1.5 NAA 0.03	(สูตร I)[b, c, d]	10		20	70
BA 1.5 NAA 0.04	(สูตร J)[c, d]				100
BA 2.0	(สูตร K)[b, c]	20		30	50
BA 2.0 NAA 0.01	(สูตร L)[b, c, d]		20	30	50
BA 2.0 NAA 0.02	(สูตร M)[a]	60	20	20	
BA 2.0 NAA 0.03	(สูตร N)[c, d]		10	20	70
BA 2.0 NAA 0.04	(สูตร O)[b]		30	60	10

หมายเหตุ

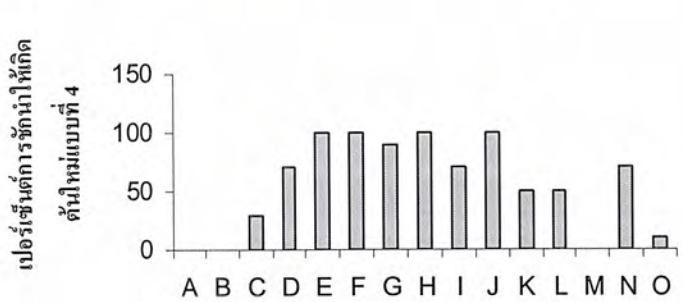
a คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นใหม่ที่เจริญแบบที่ 1 ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95 เปอร์เซ็นต์

b คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นใหม่ที่เจริญแบบที่ 2 ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95 เปอร์เซ็นต์

c คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นใหม่ที่เจริญแบบที่ 3 ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95 เปอร์เซ็นต์

d คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นใหม่ที่เจริญแบบที่ 4 ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 21 กราฟแสดงผลของฮอร์โมนในแต่ละสูตรต่อจำนวนต้นใหม่ที่เจริญในแบบที่ 4

จากตารางที่ 4 สูตร E, F, G, H และ J ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในปริมาณที่มากแต่สูตร E และ F มีการพัฒนาแคลลัสในแบบที่ 4 ต่ำอีกทั้งสูตร J ลักษณะต้นใหม่ที่ได้ไม่ค่อยสมบูรณ์นักจากรูปในตารางที่ 2 จึงเลือกสูตร G และ H มาใช้ในการทดลองต่อไปเช่นกัน แต่ถึงอย่างไรเมื่อพิจารณาลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบประกอบกับการพิจารณาจำนวนต้นใหม่ที่เจริญ สามารถสรุปได้ว่าสูตร G (BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้มีการเจริญเป็นต้นใหม่ของพิทูเนียดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนีย

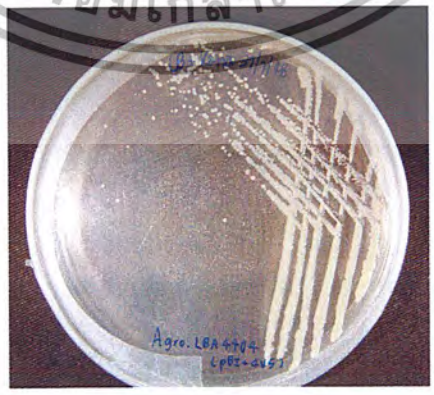
4.3.1 การถ่ายเวคเตอร์ pBI:GFP เข้าอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404

เมื่อถ่ายโอนเวคเตอร์ pBI:GFP (จากข้อ 4.1.4) เข้าอะโกรแบคทีเรียมแล้วเลี้ยงเซลล์ในอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน ได้ผลดังรูปที่ 22

รูปที่ 22 โคโลนีของอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่ผ่านการถ่ายโอนเวคเตอร์ pBI:GFP ซึ่งเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน

4.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนีย

4.3.2.1 นำอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ที่มียีน *NPTII* ซึ่งให้ความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะคานาไมซินกับยีน *GUS* ที่อยู่ในบริเวณ T-DNA มาถ่ายโอนเข้าสู่ใบพิทูเนีย



รูปที่ 23 โคโลนีของอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีเวคเตอร์ pBI121 ที่มียีน *GUS* ซึ่งเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากที่ให้อะโกรแบคทีเรียมถ่ายโอนยีน *GUS* ที่อยู่ในบริเวณ T-DNA เข้าใบพิทูเนีย แล้วชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่บนอาหารแข็ง MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน 2 สูตร คือ

1. สูตร G มี BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (50 ซ้ำ)
2. สูตร H มี BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร (50 ซ้ำ)

เหตุผลที่ใช้อาหาร 2 สูตรนี้เนื่องจากให้ปริมาณต้นใหม่มากและเกิดการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบในแบบที่ 4 มากที่สุดโดยทำการติดตามลักษณะชิ้นใบที่ 4, 8 และ 12 สัปดาห์ ซึ่งแบ่งเกณฑ์ของลักษณะชิ้นใบเป็น 3 แบบ ดังรูปที่ 24 และบันทึกผลในรูปเปอร์เซ็นต์ของแต่ละลักษณะ ได้ผลดังตารางที่ 5

แบบที่ 1 แบบที่ 2 แบบที่ 3

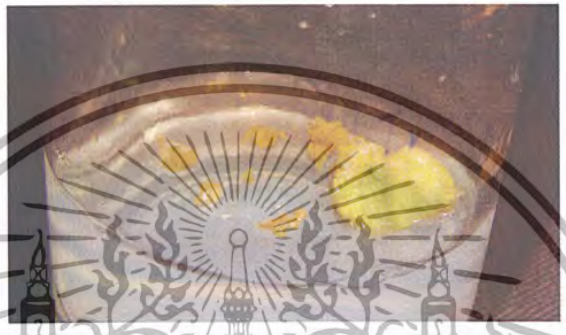
รูปที่ 24 แสดงลักษณะของชิ้นใบหลังการถ่ายโอนยีน 3 แบบ
แบบที่ 1 คือ ชิ้นใบตาย
แบบที่ 2 คือ ชิ้นใบมีสีเขียวบริเวณริมขอบใบและสีเหลืองเกือบทั้งใบ
แบบที่ 3 คือ ชิ้นใบมีสีเขียวสมบูรณ์

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ของลักษณะชิ้นใบพิทูเนียหลังการถ่ายโอนยีนบนอาหารสูตร G และ H ที่ 4, 8 และ 12 สัปดาห์

เกณฑ์ลักษณะชิ้นใบ	ที่ 4 สัปดาห์			ที่ 8 สัปดาห์			ที่ 12 สัปดาห์		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<u>อาหาร MS เสริมฮอร์โมนในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร</u>									
BA 1.5 NAA 0.01 (สูตร G)	0.82	9.84	89.34	4.25	76.60	19.15	93.62	6.38	-
BA 1.5 NAA 0.02 (สูตร H)	2.80	15.89	81.31	68.29	26.83	4.88	97.56	2.44	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 5 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปลักษณะชิ้นใบจะกลายเป็นแบบที่ 1 มากขึ้นแสดงให้เห็นว่าชิ้นใบส่วนใหญ่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนแต่ทั้งนี้ที่ 13 สัปดาห์พบการเจริญของเซลล์บางเซลล์เกิดเป็นแคลลัสขนาดเล็กที่อยู่ริมขอบใบซึ่งคาดว่าเป็นเซลล์ที่น่าจะได้รับส่วน T-DNA โดยในสูตร H พบ 1 แคลลัสจาก 1 ชิ้นใบ ส่วนสูตร G พบ 7 แคลลัสจาก 3 ชิ้นใบ ซึ่งนำมาเลี้ยงรวมกันบนอาหารสูตร G ดังรูปที่ 25



รูปที่ 25 แคลลัสที่เกิดขึ้นหลังการถ่ายโอนยีนบนอาหารสูตร G และ H ที่ 13 สัปดาห์

อย่างไรก็ตามแคลลัสที่เกิดขึ้นนี้อาจเจริญไปเป็นต้นใหม่หรือไม่ก็ได้ เนื่องจากเซลล์ที่เจริญไปเป็นแคลลัสบริเวณนี้อาจไม่ได้สัมผัสกับอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซินโดยตรง ดังนั้นควรเลี้ยงแคลลัสนี้ต่อไปเรื่อยๆเพื่อดูว่าเจริญเป็นต้นใหม่หรือไม่ อีกทั้งควรทำการตรวจสอบโดยการตัดชิ้นส่วนของแคลลัสไปจุ่มในสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β -D-glucuronide (X-gluc) หากแคลลัสได้รับ T-DNA ซึ่งมีทั้งยีนต้านทานยาปฏิชีวนะคานาไมซินและยีน *GUS* อยู่จะสามารถผลิตเอนไซม์ GUS ซึ่งจะย่อยพันธะของ X-gluc ทำให้โมเลกุล X หลุดออกมาเกิดเป็นสีน้ำเงิน

4.3.2.2 นำอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ที่มียีน *NPTII* กับยีน *gfp* ที่อยู่ในบริเวณ T-DNA (จากข้อ 4.3.1) มาถ่ายโอนเข้าสู่ใบพิทูเนีย ซึ่งหลังจากที่ให้อะโกรแบคทีเรียมถ่ายโอนยีน *gfp* ที่อยู่ในบริเวณ T-DNA เข้าใบพิทูเนียแล้วชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่บนอาหารแข็ง MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน 2 สูตร คือ

1. สูตร G มี BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (122 ซ้ำ)
2. สูตร P มี BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IAA 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร (107 ซ้ำ)

ทั้งนี้จากการทดลองข้อ 4.3.2.1 พบว่าต้องใช้เวลาในการเกิดแคลลัสที่คาดว่าน่าจะได้รับยีนนานถึง 13 สัปดาห์ เพราะฉะนั้นจึงมีการปรับเปลี่ยนขั้นตอนในการถ่ายโอนยีน ซึ่งประยุกต์วิธีการมาจาก Napoli และคณะ, 1990 กับ van der Meer, 1999 โดยมีการเติม acetosyringone ด้วยเพื่อเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

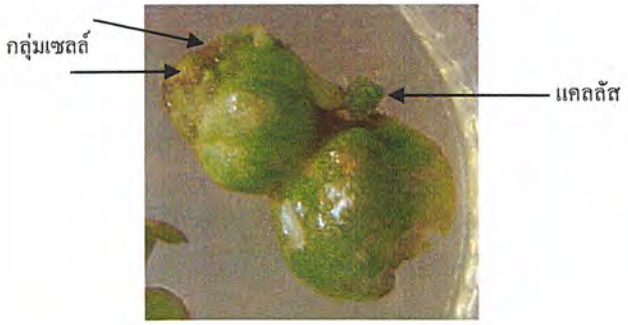
ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนของอะโกรแบคทีเรียม จะเห็นว่ามีการใช้อาหารสูตร P เพิ่มเข้ามา เนื่องจากเป็นสูตรอาหารที่ Napoli และคณะ ใช้ในการชักนำให้มีการเจริญเป็นต้นใหม่ของพิทูเนีย อีกทั้งยังใช้ฮอร์โมน IAA ซึ่งเป็นฮอร์โมนธรรมชาติ (BA เป็นฮอร์โมนสังเคราะห์) ทำให้เปรียบเทียบความสามารถในการชักนำเมื่อเทียบกับสูตร G ที่หาได้จากการทดลองข้างต้นด้วย

โดยทำการติดตามลักษณะชิ้นใบ (ดังรูปที่ 24) ที่ 4 สัปดาห์ ได้ผลในรูปเปอร์เซ็นต์ของแต่ละลักษณะ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ของลักษณะชิ้นใบพิทูเนียหลังการถ่ายโอนยีนบนอาหารสูตร G และ P ที่ 4 สัปดาห์

เกณฑ์ลักษณะชิ้นใบ	ที่ 4 สัปดาห์		
	1	2	3
อาหาร MS เสริมฮอร์โมนในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร			
BA 1.5 NAA 0.01 (สูตรG)	5.61	29.91	64.49
BA 1.0 IAA 0.20 (สูตรP)	3.31	24.98	71.71

จากตารางที่ 6 พบว่าที่ 4 สัปดาห์นั้นยังมีลักษณะของชิ้นใบในแบบที่ 3 อยู่ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง และมีแนวโน้มว่าน่าจะกลายเป็นแบบที่ 1 มากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป เนื่องจากโอกาสที่เซลล์จะได้รับการถ่ายโอนยีนนั้นน้อยมาก แต่ยังพบว่าที่ 5 สัปดาห์หลังการถ่ายโอนยีน มีการเจริญของเซลล์เกิดเป็นแคลลัส 1 แคลลัสและมีการกระจายตัวของกลุ่มเซลล์ที่มีสีเขียวสมบูรณ์ อยู่ริมขอบใบของ 1 ใน 122 ชิ้นใบทั้งหมดของสูตร G ซึ่งคาดว่าทั้งกลุ่มเซลล์และก้อนแคลลัสนี้น่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน เนื่องจากสามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน แต่ทั้งนี้ยังไม่พบการเจริญดังกล่าวในอาหารสูตร P ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 แคลลัสและกลุ่มเซลล์ที่เกิดขึ้นหลังการถ่ายโอนยีนบนอาหารสูตร G ที่ 5 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 การสร้างเวคเตอร์ที่มี GFP marker

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณพลาสมิด pTH2 กับ pBI121 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI แล้วแยกเอาชิ้นส่วนของยีน *gfp* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ที่รุนแรง (CaMV 35S) จาก pTH2 กับเวคเตอร์ pBI121 ที่เป็นเวคเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกในพืช มาทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อ ปรากฏว่าชิ้นส่วนทั้งสองเชื่อมต่อกันเป็นเวคเตอร์ใหม่ เรียกว่า pBI:GFP จึงสรุปได้ว่าสามารถสร้างเวคเตอร์ที่มียีนรายงานผล GFP ได้

5.2 การหาความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของพิทูเนีย

จากอาหารแข็ง MS 15 สูตรที่ประกอบด้วย BA กับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าอาหารที่เสริม BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรที่สามารถชักนำให้พิทูเนียเจริญเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุด ทั้งด้านลักษณะทางการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบและจำนวนต้นใหม่ที่เกิดขึ้น

5.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนีย

ทั้งนี้นำเชื้ออะโกรแบคทีเรียมดิสอาร์มสายพันธุ์ LBA4404 ที่ในบริเวณ T-DNA มียีน *NPTII* ที่ให้คุณสมบัติต้านยาปฏิชีวนะคานาไมซินกับยีน *GUS* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ CaMV 35S มาถ่ายโอนเข้าสู่ใบพิทูเนีย 100 ใบ แล้วเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่ 2 สูตร (สูตร G กับ H) ที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซินในการคัดเลือกพบว่าเกิดแคลลัส 7 แคลลัสขึ้น อย่างไรก็ตามแคลลัสที่เกิดขึ้นนี้อาจได้รับการถ่ายโอนยีนจริงหรืออาจเจริญจากที่ไม่ได้สัมผัสกับอาหารคัดเลือกโดยตรง จึงควรมีการทดสอบโดยอาศัยคุณสมบัติของ GUS โดยตรง

สำหรับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมดิสอาร์มสายพันธุ์ LBA4404 ที่ในบริเวณ T-DNA มียีน *NPTII* กับยีน *gfp* ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ CaMV 35S มาถ่ายโอนเข้าสู่ใบพิทูเนีย 229 ใบแล้วเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่ 2 สูตร (สูตร G กับ P) ที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซินคัดเลือก พบว่าที่ 5 สัปดาห์เกิด 1 แคลลัสและกลุ่มเซลล์กระจายอยู่ริมขอบใบ ซึ่งคาดว่าน่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเห็นว่าในการถ่ายโอนเวคเตอร์ pBI:GFP นั้นเกิดแคลลัสในระยะเวลาที่สั้นกว่า ทั้งนี้เนื่องจากมีการปรับบางขั้นตอนในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนีย โดยมีการเติม acetosyringone ด้วย ซึ่งช่วยให้การถ่ายโอนยีนโดยอะโกรแบคทีเรียมนั้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Finer, KR., and Finer, JJ. 2000. Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-treated soybean cotyledons. Lett Appl Microbiol. 30(5). 406-10.

Freydoun, G., and Strommer, J. 2000. Green fluorescent protein as an all-purpose reporter in *Petunia*. Plant molecular biology reporter. 18. 219-226.

van der Meer, IM. 1999. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Petunia* leaf disks. Methods in molecular biology. 111. 327-334.

Jeoung, JM., Krishnaveni, S., Muthukrishnan, S., Trick, HN., and Liang, GH. 2002. Optimization of *Sorghum* transformation parameters using genes for green fluorescent protein and beta-glucuronidase as visual markers. Hereditas. 137(1). 20-8.

Maximova, S., Miller, C., Antunez de Mayolo, G., Pishak, S., Young, A., and Guiltinan, MJ. 2003. Stable transformation of *Theobroma cacao L.* and influence of matrix attachment regions on GFP expression. Plant cell rep. 21(9). 872-83.

Muller, A., Iser, M., and Hess, D. 2001. Stable transformation of Sunflower (*Helianthus annuus L.*) using a non-meristematic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker. Transgenic res. 10(5). 435-44.

Murray, F., Brettell, R., Matthews, P., Bishop, D., and Jacobsen, J. 2004. Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four Barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. Plant cell rep. 22(6). 397-402.

Napoli, C., Lemiex, C., and Jorgenson, RA. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant cell. 2. 279-289.

Sean, R., David, W., Joel, S., and Chris, R. 2000. Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cell of *Arabidopsis* at a high frequency. PNAS. 97(7). 3718-3723.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tian, L., Levee, V., Mentag, R., Charest, PJ., and Seguin, A. 1999. Green fluorescent protein as a tool for monitoring transgene expression in forest tree species. Tree Physiol. 19(8). 541-546.

Yu, TT., Skinner, DZ., Liang, GH., Trick, HN., Huang, B., and Muthukrishnan, S. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of creeping bentgrass using GFP as a reporter gene. Hereditas. 133(3). 229-33.

Zhang, CL., Chen, DF., McCormac, AC., Scott, NW., Elliott, MC., and Slater, A. 2001. Use of the GFP reporter as a vital marker for *Agrobacterium*-mediated transformation of Sugar beet (*Beta vulgaris L.*). Mol Biotechnol. 17(2). 109-17.

http://www.biochemtech.uni-halle.de/PPS2/projects/jonda/

http://www.plantsci.cam.ac.uk

กนกพร สมพรไพลิน. 2545. บทปฏิบัติการวิชาพันธุวิศวกรรม. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กนกพร สมพรไพลิน. 2546. บทปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางพืช เรื่อง การถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ของต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2545. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani)

Bacto tryptone	10	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	5	กรัม/ลิตร
NaCl	10	กรัม/ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติม Agar 15 กรัม/ลิตร)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YEB

Bacto beef extract	5	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	1	กรัม/ลิตร
Bacto peptone	5	กรัม/ลิตร
Sucrose	5	กรัม/ลิตร
$MgSO_4$	2	มิลลิโมลาร์

ปรับพีเอชให้เป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติม Agar 15 กรัม/ลิตร)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2XYT

Bacto tryptone	16	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	10	กรัม/ลิตร
NaCl	10	กรัม/ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติม Agar 15 กรัม/ลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

Bacto tryptone	2	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	0.2	กรัม/ลิตร
NaCl	0.0585	กรัม/ลิตร
KCl	0.0186	กรัม/ลิตร
$MgCl_2$	10	มิลลิโมลาร์
$MgSO_4$	10	มิลลิโมลาร์

5. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOC

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB	1	ลิตร
กลูโคสเข้มข้น 2 โมลาร์	10	มิลลิลิตร

6. อาหารชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของพิทูเนีย

6.1 สำหรับการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนียโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม วิธีที่ 1

สูตร G : อาหารแข็ง MS เสริมด้วย	BA	1.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
	NAA	0.01	มิลลิกรัมต่อลิตร
สูตร H : อาหารแข็ง MS เสริมด้วย	BA	1.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
	NAA	0.02	มิลลิกรัมต่อลิตร

6.2 สำหรับการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนียโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม วิธีที่ 2

สูตร G : อาหารแข็ง MS เสริมด้วย	BA	1.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
	NAA	0.01	มิลลิกรัมต่อลิตร
สูตร P : อาหารแข็ง MS เสริมด้วย	BA	1.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
	IAA	0.20	มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ขั้นตอนการทดลอง

1. การแยกดีเอ็นเอจากเจล (Amersham Biosciences Crop.)

1.1 ทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิสเพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วตัดเจลส่วนที่มีชิ้นดีเอ็นเอนั้นใส่ในหลอดเอพเพนดรอฟ

1.2 เติม capture buffer ลงในหลอดจากข้อ 1 ในอัตราส่วน capture buffer 10 ไมโครลิตร ต่อเจลหนัก 10 มิลลิกรัม

1.3 บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5-15 นาที จนกว่าเจลจะละลายหมด

1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่ำ เพื่อให้ของเหลวในหลอดตกลงมารวมกัน

1.5 ย้ายของเหลวในหลอดเอพเพนดรอฟไปใส่ในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ (GFX column) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที

1.6 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอจะจับกับคอลัมน์

1.7 เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์อันเดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.8 ย้ายจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ใส่ในหลอดเอพเพนดรอฟหลอดใหม่ แล้วเติมน้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 20 ไมโครลิตร ลงไปในคอลัมน์ เพื่อละลายดีเอ็นเอที่ติดกับคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที

1.9 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ที่ใส่ในหลอดเอพเพนดรอฟไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.10 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ออก จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในหลอดเอพเพนดรอฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การทำคอมพีเทนท์เซลล์ (กนกพร, 2545)

2.1 ถ่ายเชื้อ *E. coli* 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

2.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 ลงในอาหาร 2XYT ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เชื้อปริมาตรเท่ากับ 1-2 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จนวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้ประมาณ 0.4-0.5

2.3 นำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.4 เทส่วนอาหารทิ้ง แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ TFB buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2.5 วางบนน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.6 เทส่วนใสทิ้ง แล้ววางหลอดบนน้ำแข็ง ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ TFB buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2.7 เติม DMSO 30 ไมโครลิตร เขย่าให้ผสมกันพอดี

2.8 แบ่งเซลล์แขวนลอยลงในหลอดเอพเพนดรอฟ หลอดละ 200 ไมโครลิตร

2.9 เก็บเซลล์ที่ -70 องศาเซลเซียส

3. การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์โดยวิธี heat-shock และการคัดเลือกโคลน

(Promega, Co., Ltd.)

3.1 การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์

3.1.1 นำคอมพีเทนท์เซลล์ซึ่งเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส มาละลายโดยวางบนน้ำแข็ง

3.1.2 ดูดคอมพีเทนท์เซลล์ที่ละลายแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเอพเพนดรอฟซึ่งแช่บนน้ำแข็ง แล้วเติม ligation solution และผสมให้เข้ากันโดยการปีเปตขึ้นลง วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

3.1.3 นำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

3.1.4 เติมอาหาร SOC ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าได้รับเวคเตอร์ pBI121 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่

3.2.1 เตรียมเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะคานาไมซิน สเปรดเซลล์แขวนลอยที่เหลือบนเพลตที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

4. การสกัดพลาสมิด (Promega, Co., Ltd)

4.1 ถ่ายโอนโคโลนีเดี่ยวบนเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะคานาไมซิน ลงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะคานาไมซิน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

4.2 นำสารละลายแขวนลอยของเซลล์ใส่หลอดเอพเพนดรอฟ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการเก็บเซลล์

4.3 เทส่วนอาหารทิ้ง แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้ง โดยใช้ TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นวางหลอดบนน้ำแข็ง

4.4 เติม Solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที

4.5 เติม Solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที

4.6 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

4.7 ย้ายของเหลวส่วนบนไปใส่หลอดเอพเพนดรอฟใหม่ แล้วเติมเอทานอลเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

4.8 นำไปเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที

4.9 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลทิ้ง

4.10 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

4.11 นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลทิ้ง

4.12 ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูหรือใช้เดซิเคเตอร์

4.13 ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งมี RNase เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.14 เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การเตรียมเชื้อและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมโดยวิธี Freeze-thaw

(กนกพร, 2546)

5.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมในอาหารเหลวสูตร YEB หรือ LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซสเซียส นานข้ามคืน

5.2 นำสารละลายเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาวางบนน้ำแข็ง 10 นาที

5.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

5.4 เทอาหารส่วนบนทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาละลายในแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บนน้ำแข็ง

5.5 นำเซลล์แขวนลอยในแคลเซียมคลอไรด์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเอพเพนดรอฟใหม่และผสมเวคเตอร์ที่มียีนที่สนใจประมาณ 2 ไมโครกรัม โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง บนน้ำแข็ง

5.6 นำสารละลายนี้แช่ในไนโตรเจนเหลวจนเป็นน้ำแข็ง แล้วนำมาไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จากนั้นเติมอาหาร YEB 1 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง

5.7 นำสารละลายดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

5.8 เทอาหารส่วนบนทิ้งไป ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งด้วยอาหารสูตร YEB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

5.9 สเปรดเซลล์บนอาหารแข็งสูตร YEB ที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนียโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม วิธีที่1

(กนกพร, 2546)

6.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมดิสอาร์มสายพันธุ์ LBA4404/pBI121 ที่มียีน *NPTII* ซึ่งให้เอนไซม์นีโอไมซินฟอสโฟทรานส์เฟอเรส และยีน *GUS* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ที่รุนแรง (35S CaMV) ในอาหารเหลวสูตร YEB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน นานข้ามคืน อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที

6.2 นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในอาหารเหลวสูตร YEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.8

6.3 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

6.4 เทส่วนอาหารทิ้งไป แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งในสารละลายซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์กับ Tween-80 0.5 เปอร์เซ็นต์

6.5 นำใบของพิทูเนียที่ปราศจากเชื้อมาทำให้เกิดบาดแผลโดยตัดให้เป็นชิ้นและจุ่มในเซลล์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 6.4 เป็นเวลา 60 วินาที

6.6 นำชิ้นส่วนของพืชดังกล่าววางบนเพลตที่มีกระดาษทิชชูซึ่งปราศจากเชื้อเพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรียมส่วนเกินออก

6.7 วางชิ้นส่วนของพืชบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่จากข้อ 3.2.2

6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีการให้แสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากบ่มเนื้อเยื่อประมาณ 2-3 วัน อะโกรแบคทีเรียมจะย้ายส่วน T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช ตรงบริเวณรอยตัดของพืช และ T-DNA นี้จะเข้าไปรวมกับโครโมโซมพืช

6.9 ย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ที่สามารถฆ่าอะโกรแบคทีเรียมได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีการให้แสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน

6.10 ทำการย้ายชิ้นส่วนพืชบนอาหารใหม่ตามข้อ 6.9 ทุกๆ 2 สัปดาห์และคัดเลือกต้นที่คาดว่าได้รับยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนียโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม วิธีที่ 2

(กนกพร, 2547)

7.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่ได้จากการถ่ายโอนยีนข้อ 3.3.1 โดยนำ 1 โคโลนีเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตรที่มีคานาไมซิน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที นานข้ามคืน

7.2 นำสารละลายเซลล์จากข้อ 7.1 ทั้งหมดมาเจือจางด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เสริมด้วย acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ ซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

7.3 นำใบของพิทูเนียที่ปราศจากเชื้อมาทำให้เกิดบาดแผลโดยตัดให้เป็นชิ้นและจุ่มในเซลล์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 7.2 เป็นเวลา 5-10 นาที

7.4 นำชิ้นส่วนของพืชดังกล่าววางบนเพลตที่มีกระดาษชูซึ่งปราศจากเชื้อเพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรียมส่วนเกินออก

7.5 วางชิ้นส่วนของพืชบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ 2 สูตร (ภาคผนวก ก)

7.6 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีการให้แสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากบ่มเนื้อเยื่อประมาณ 2-4 วัน อะโกรแบคทีเรียมจะย้ายส่วน T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช ตรงบริเวณรอยตัดของพืช และ T-DNA นี้จะเข้าไปรวมกับโครโมโซมพืช

7.7 ย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ที่สามารถฆ่าอะโกรแบคทีเรียมได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีการให้แสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน

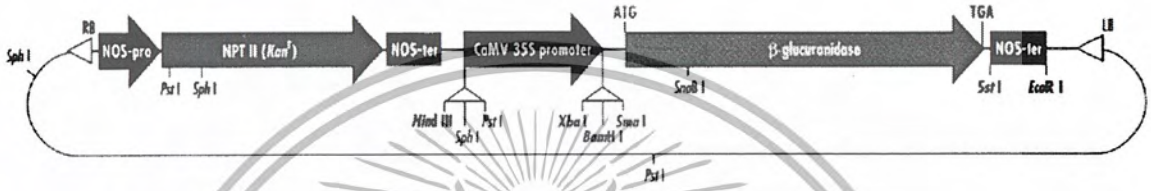
7.8 ทำการย้ายชิ้นส่วนพืชบนอาหารใหม่ตามข้อ 7.7 ทุกๆ 2 สัปดาห์และคัดเลือกต้นที่คาดว่าได้รับยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

เวคเตอร์

1. pBI121



pBI121

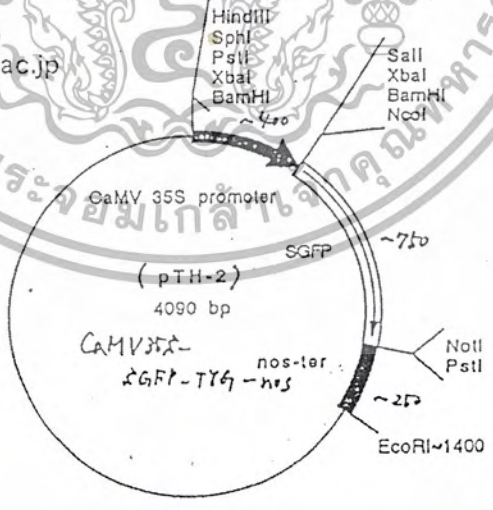
Sma I

TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG

Xba I BamH I

from Clontech catalogue 1996 / 97

2. pTH2



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบ

ANOVA

A.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	34.800	14	2.486	9.021	.000
Within Groups	37.200	135	.276		
Total	72.000	149			

B.

	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Duncan A	10	1.2000			
B	10	1.4000			
M	10	1.6000	1.6000		
E	10		2.0000	2.0000	
N	10		2.0000	2.0000	
O	10		2.0000	2.0000	
C	10			2.3000	2.3000
D	10			2.3000	2.3000
K	10			2.3000	2.3000
I	10			2.4000	2.4000
F	10				2.6000
L	10				2.6000
H	10				2.7000
G	10				2.8000
J	10				2.8000
Sig.		.110	.123	.147	.074

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

2. จำนวนต้นใหม่ที่เจริญ

ANOVA

A.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	147.560	14	10.540	18.673	.000
Within Groups	76.200	135	.564		
Total	223.760	149			

B.

	N	Subset for alpha = .05			
	B.	1	2	3	4
Duncan	A.	10	1.0000		
	B	10	1.0000		
	M	10	1.6000		
	O	10		2.8000	
	C	10		3.0000	3.0000
	K	10		3.1000	3.1000
	D	10		3.3000	3.3000
	L	10		3.3000	3.3000
	I	10		3.5000	3.5000
	N	10			3.6000
	G	10			3.7000
	J	10			3.7000
	E	10			4.0000
	F	10			4.0000
	H	10			4.0000
	Sig.		.093	.069	.077	.080

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้