# บทที่ 3

# วัสดุอุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา

## วัสดุอุปกรณ์

### 1. พืชทดลอง

1.1 **เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์และสวีทเชอรี** (*Lycopersicon esculentum* Mill. cultivar Seedatip and Sweet Cherry)

จากห้องปฏิบัติการเมล็ด ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2. **เมล็ดพันธุ์ยาสูบ** (*Nicotiana tabacum.* L. cultivar *Virginia Coker* 341 )

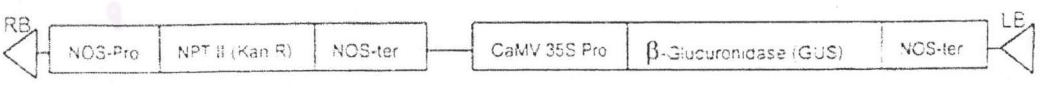
ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ได้จากโรงงานยาสูบ และทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3. **เมล็ดพันธุ์พิทูเนีย** (*Petunia hybrida.* L. )

เป็นเมล็ดพันธุ์พิทูเนียลูกผสมจัดจำหน่ายโดยบริษัท Yate

### 2. สายพันธุ์แบคทีเรีย

*Agrobacterium tumefaciens* strains LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI121(Jefferson และคณะ,1987) โดยมียีนต้านทาน Kanamycin และ *gus* gene แผนภาพของ T-DNA บนพลาสมิด pBI 121 เป็นดังรูปที่ 2




รูปที่ 2 โครงสร้างของ T-DNA บนพลาสมิด pBI 121

3. **วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และ** *Agrobacterium*-mediated transformation

- เครื่อง Autoclave
- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- อลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum foil)
- กระบอกฉีดยา และเข็มฉีดยา (Syringe and needle)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (ตู้อบ 25 องศาเซลเซียส)
- ปากคีบ
- มีดผ่าตัด
- ห่วงสำหรับเขี่ยเชื้อ
- pH meter
- เครื่องเขย่า
- ตู้ถ่ายเชื้อ
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- เครื่องชั่งชนิดหยาบ และชนิดละเอียด
- ไมโครปิเปต และ pipette tip
- จานเพราะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ( Petri dish )
- กระบอกตวง
- ขวดรูปชมพู่

4. **วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบ** β-glucuronidase **โดยวิธี** Histochemical assay

- ใบมีดโกน, microtome
- ปากคีบ
- หลอดทดลองขนาดเล็ก
- suction flask พร้อม Vacuum pump
- ตู้อบอุณหภูมิ 37°C
- สไลด์ และกระจกปิดสไลด์
- กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. **วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบ transgenic plant ด้วยวิธี PCR**

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (microcentrifuge)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)
- เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
- ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
- หลอด microcentrifuge
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- ไมโครปิเปตและทิป (micropipette and tip)
- centrifuge tube screw cap ขนาด 50 มิลลิลิตร
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งของกรัม
- เครื่องกำเนิดแสง UV (UV transluminater)
- ชุดแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (DNA gel electrophoresis)
- โกร่งบด
- กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Programmable Thermal Controller รุ่น PTC-100$^{tm}$)

6. **สารเคมี**

**6.1 สารเคมีที่ใช้ในการทำความสะอาดเมล็ดพันธุ์**

- chlorox (20% Sodium hypochloride)
- tween- 20
- น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

**6.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและ *Agrobacterium*-mediated transformation**

- MS complete stock solution (ภาคผนวก)
- medium P (ภาคผนวก)
- feeder medium

  medium B (ภาคผนวก)

KDMS medium (ภาคผนวก)

- Regeneration medium 3 สูตรประกอบด้วย
  - Regeneration medium I (Fillatti และคณะ, 1987)
  - Regeneration medium II (Attathom และคณะ, 1991)
  - Regeneration medium III (Medium C, Roekel และคณะ, 1993)
- MG/L medium (ภาคผนวก)
- antibiotics

  kanamycin

  cefotaxime

  vancomycin

**6.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Histochemical assay (ภาคผนวก)**

**6.4 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR**

- specific primers

ที่เฉพาะเจาะจงต่อ *NPTII* gene โดยการใช้ลำดับของยีนตามที่ออกแบบโดย Brown และคณะ,(1993) อ้างถึงใน Radchuk และคณะ,(2002) และทำการสังเคราะห์ primers โดย Proligo primers probes USA. ลำดับของเบสมีดังนี้

5' -ATGATTGAACAAGATGGATTG-3' และ

5'-GAAGAACTCGTCAAGAAGCCG-3'

- DyZyme DNA polymerase (Holfmann –LaRoche Inc.USA.)
- DNTPs
- PCR buffer ประกอบด้วย
  - Tris-HCL pH 8.8
  - $MgCl_2$
  - Triton X-100
- agarose
- DNA marker (ภาคผนวก)
- ethidium bromide
- loading dye ประกอบด้วย
  - 0.25% (w/v) Bromophenol blue

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 50% (v/v) glycerol

**6.5 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA**

- DNA extraction buffer (CTAB) (ภาคผนวก)
- ไนโตรเจนเหลว สำหรับแช่ตัวอย่าง
- phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1)
- isopropanol
- 70% และ 95% ethanol
- TE buffer ประกอบด้วย 10 mM Tric-Cl, pH 8.0
  1 mM EDTA
- 3M sodium Acetate ($CH_3COONa$) pH 5.2
- sterilized distilled water

**วิธีการทดลอง**

**1. การศึกษาแคลลัสที่จะนำมาใช้เป็น Feeder cells**

**1.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัสของยาสูบและพิทูเนีย**

**1.1.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากใบยาสูบ**

นำใบยาสูบจากต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง สูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.1mg/l ในสภาพปลอดเชื้อ ให้ความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 35 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ด้วยระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส จนได้แคลลัส ศึกษาลักษณะของแคลลัสยาสูบที่เกิดขึ้น

**1.1.2 การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากใบพิทูเนีย**

นำใบพิทูเนียจากต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1.0 mg/l ในสภาพปลอดเชื้ออุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 35 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ด้วยระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน จนได้แคลลัส ศึกษาลักษณะของแคลลัสพิทูเนียที่เกิดขึ้น

**1.2 การศึกษาความสามารถในการรีเจนเนอเรทของแคลลัสชนิดต่างๆ บน feeder medium**

**1.2.1 ศึกษาความสามารถในการรีเจนเนอเรทของแคลลัสยาสูบชนิดต่างๆ บน feeder medium**

แยกแคลลัสของยาสูบที่ได้จากข้อ 1.1 ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกัน แต่ละชนิดตัดให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร KDMS (ภาคผนวก) ซึ่งดัดแปลงมาจากสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (1962) จำนวน 10 ขวด นำไปวางบนชั้นให้ได้รับแสงความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 35 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส สังเกตและบันทึกผลการเจริญเปลี่ยนแปลงของแต่ละชนิดเป็นยอดจากแคลลัสชนิดต่างๆ

**1.2.2 การศึกษาความสามารถในการ regenerate ของแคลลัสพิทูเนียบน feeder medium**

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.2.1 โดยการนำแคลลัสของพิทูเนียมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Medium B (ภาคผนวก) สังเกตและบันทึกผลการพัฒนาไปเป็นยอดจากแคลลัสของพิทูเนีย

**1.3 การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์แขวนลอยของยาสูบและพิทูเนีย**

**1.3.1 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของยาสูบ**

นำแคลลัสของยาสูบที่มีความสามารถในการรีเจนเนอเรท ตามข้อ 1.2.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 3 แบบ ดังนี้

แบบที่ 1 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.1mg/l

แบบที่ 2 เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.1mg/l เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้ว subculture ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม IAA 0.1mg/l และ kinetin 1.0 mg/l

แบบที่ 3 เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยสูตร MS ที่เติม IAA 0.1mg/l และ kinetin 1.0 mg/l

โดยนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยปริมาตร 25 ลูกบาศก์เซนติเมตรในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 125 ลูกบาศก์เซนติเมตร วางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 80-120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 35 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ประมาณ

80-120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 35 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ประมาณ 4-5 สัปดาห์ โดยทำการ subculture เป็นระยะๆ ทุก 2 สัปดาห์ ลงในอาหารเหลวสูตรเดิม ยกเว้นแบบที่ 2 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.1mg/l เป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้น subculture ลงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม IAA 0.1mg/l และ kinetin 1.0 mg/l จนสิ้นสุดการทดลอง สังเกตลักษณะการเจริญของเซลล์แขวนลอยเป็นเวลา 80 วัน

### 1.3.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของพิทูเนีย

นำแคลลัสพิทูเนียที่มีความสามารถรีเจนเนอเรท ตามข้อ 1.2.2 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร medium P (ภาคผนวก) ปริมาตร 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 125 ลูกบาศก์เซนติเมตร วางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 80 -120 รอบ/นาที ความเข้มแสงประมาณ 35 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ 24 ชั่วโมงต่อวัน ประมาณ 4-5 สัปดาห์ โดยทำการ subculture เป็นระยะๆ ทุก 2 สัปดาห์ โดยทำการ subculture ลงในอาหารเดิม หลังจากนั้นสังเกตลักษณะการเจริญ ของเซลล์แขวนลอยที่ได้ทุกๆ 10 วัน เป็นเวลา 80 วัน

## 1.4 การศึกษาความสามารถในการรีเจนเนอเรทของเซลล์แขวนลอยของยาสูบและพิทูเนียบน feeder medium

### 1.4.1 การศึกษาความสามารถในการรีเจนเนอเรทของเซลล์แขวนลอยของยาสูบบน feeder medium

เปลี่ยนอาหารที่เตรียมขึ้นใหม่ให้เซลล์แขวนลอยของยาสูบที่ได้จากข้อ 1.3.1 โดยให้อาหารสูตรเดิม ใช้ inoculum ในอัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร หลังจากนั้น 10 วัน ปิเปตเซลล์แขวนลอยมาเกลี่ยบนผิวหน้าของอาหารกึ่งแข็งที่ใช้เป็น feeder medium สูตร KDMS (ภาคผนวก) ที่อยู่ในขวดแก้วนำไปวางบนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสง เป็นเวลาวันละ16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเจริญของแคลลัส การเกิดยอด และการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (browning) ทุกๆ 10 วัน เป็นเวลา 80 วัน

### 1.4.2 การศึกษาความสามารถในการ regenerate ของเซลล์แขวนลอย ของพิทูเนีย บน feeder medium

นำเซลล์แขวนลอยของพิทูเนียที่ได้จากข้อ 1.3.2 มาเปลี่ยนอาหารเหลวสูตร medium P ที่เตรียมขึ้นใหม่โดยการปิเปตเซลล์แขวนลอยมาเลี้ยงในอัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร หลังจากนั้น 10 วัน ปิเปตเซลล์แขวนลอยมาเกลี่ยบนผิวหน้าของอาหารกึ่งแข็งที่ใช้เป็น feeder medium สูตร Medium B (ภาคผนวก) ที่อยู่ในขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำไปวางบน

ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสงเป็นเวลาวันละ16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเจริญของแคลลัส การเกิดยอดและการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (browning) ทุกๆ 10 วัน เป็นเวลา 80 วัน

2. **การศึกษาสูตรอาหารและขั้นตอนที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศโดยใช้ *A. tumetaciens***

การศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์สีดาทิพย์ และพันธุ์สวีทเซอรี โดยใช้ใบเลี้ยงขนาดกว้างประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากต้นกล้ามะเขือเทศที่เลี้ยงในหลอดทดลองอายุ 2-3 สัปดาห์ ในอาหารกึ่งแข็งสูตร medium A และใช้ *A. tumetaciens* strains LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ซึ่งมียีนต้านทาน Kanamycin และ GUS gene เพื่อเป็นยีนเครื่องหมาย และยีนรายงานผล ตามลำดับ โดยทำการศึกษาชนิดและวิธีการเตรียมที่เหมาะสมของ feeder cells ความจำเป็นในการทำ preculture และ ชนิดของ regeneration medium

**การเตรียม feeder layer plates**

เตรียมก่อนที่จะใช้ 1 วัน โดยนำเซลล์แขวนลอยจากข้อ 1.3 ที่ subculture ไว้เป็นเวลา 10 วัน ล่วงหน้า จำนวน 0.5 มิลลิลิตรมาเกลี่ยบนผิวหน้าของอาหารกึ่งแข็งที่ใช้เป็น feeder สูตร KDMS สำหรับยาสูบ และสูตร medium B สำหรับพิทูเนีย ที่อยู่ในขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วปิดทับด้วยกระดาษกรองที่ตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำ feeder layer plate ไปวางบนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 35 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

**การทำ preculture**

นำใบเลี้ยงจากต้นกล้ามะเขือเทศที่มีขนาดและอายุตามที่ระบุไว้ข้างต้น มาตัดปลายทั้งสองด้านออกเล็กน้อยด้วยมีดที่คมและระมัดระวังใบเลี้ยงไม่ให้เกิดรอยช้ำและเสียหายซึ่งจะมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นแคลลัส และการเกิดต้นใหม่ได้ นำใบเลี้ยงที่ตัดปลายทั้งสองด้านแล้วมา preincubate บน feeder layer นำไปวางบนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 35 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ต่อไป

**regeneration medium ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด**

หลังจากทำ cocultivation แล้วทำการชักนำให้เกิดยอดบน regeneration medium ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบอาหาร regeneration medium 3 สูตร ดังนี้

medium I (regeneration medium ที่เตรียมตามวิธีของ Fillatti และคณะ,1987)

medium II (regeneration medium ที่เตรียมตามวิธีของ Attathom และคณะ,1991)

medium III (Medium C ที่เตรียมตามวิธีของ Roekel และคณะ,1993) โดย ในการทดลองทั้งหมดได้วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 18 treatment ดังตารางที่ 1 ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ตัวอย่างใบเลี้ยง ขั้นตอนในการศึกษาสูตรอาหาร และขั้นตอนที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศโดยใช้ *A. tumefaciens* มี ดังนี้

## 2.1 การถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ

### 2.1.1 การเตรียม *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI121

ทำการเตรียม *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม 1 - 5 X$10^8$ cfu./ml และอยู่ในระยะ late log phase ซึ่งทำให้มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูง ตามวิธีของ รักชนก โคโต (2543)

### 2.1.2 การ preculture เนื้อเยื่อใบเลี้ยงมะเขือเทศบน feeder layer plate สำหรับการทดลองที่ 1-3 7-9 และ 13-15

นำใบเลี้ยงต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์และพันธุ์สวีทเซอรีที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาทำการ preculture บนกระดาษกรองใน feeder layer plate นำไปวางบนชั้นให้ได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 35μmol.$m^{-2}$.$s^{-1}$ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนชุดการทดลองที่เหลืออีก 9 การทดลอง ใช้ใบเลี้ยงที่ไม่ได้ทำ preculture (ตารางที่ 1)

### 2.1.3 การทำ cocultivation และ regeneration

เลือกชิ้นเนื้อเยื่อใบเลี้ยงมะเขือเทศที่ทำการ preculture ไว้ครบ 24 ชั่วโมง และใบเลี้ยงไม่ได้ทำ preculture สำหรับอีก 9 treatment ที่เหลือใช้เฉพาะชิ้นเนื้อเยื่อใบเลี้ยงมะเขือเทศที่สด สมบูรณ์ และมีสีเขียว มาตัดบริเวณปลายทั้ง 2 ด้านออกอีกเล็กน้อยอย่างเบามือ และใช้มีดที่คม ระมัดระวังอย่าให้เกิดรอยช้ำและเสียหายซึ่งจะมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นแคลลัส และการเกิด

ต้นใหม่ได้ นำชิ้นเนื้อเยื่อใบเลี้ยงมะเขือเทศที่ได้ลงแช่ในเชื้อ *A. tumefacians* ที่เตรียมไว้ จากข้อ 2.1.1 เป็นเวลา 20-25 นาที แล้วนำมาซับบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นย้ายชิ้นใบเลี้ยงวางลงบน feeder layer plate ที่เตรียมใหม่ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วในตอนต้นของข้อ 2 วางให้ด้านท้องใบหงายขึ้นด้านบน ทำ cocultivation ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบกำหนดย้ายใบเลี้ยงมาวางบนอาหารกึ่งแข็งสำหรับชักนำให้เกิดยอด ( Regeneration medium) จำนวน 3 สูตร (Fillatti และคณะ,1987, Attathom และคณะ ,1991, Roekel และคณะ, 1993) ที่มียาปฏิ ชีวนะ vancomycin 500 μg/ml เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายใบเลี้ยงมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร กึ่งแข็งสำหรับชักนำให้เกิดยอด (Regeneration medium) 3 สูตร ที่มียาปฏิชีวนะ cefotaxime 400 μg/ml และ kanamycin 100 μg/ml ทำการ subculture ทุก 2 สัปดาห์ และเมื่อเริ่มเกิดยอดให้ทำการลดปริมาณ zeatin ใน regeneration medium ลงครึ่งหนึ่ง หลังจากนี้เมื่อได้ยอดที่สมบูรณ์ย้ายลงในอาหารกึ่งแข็งสำหรับชักนำให้เกิดราก พัฒนาเป็นต้นที่สมบรูณ์ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่** 1 แสดง treatment ทั้งหมดในการทดลองนี้

| Treatment number | Type of Feeder Cells | Media For Feeder Cells | Pre culture | Media for transformation and regeneration |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Tobacco | MS + 2,4-D 0.1 μg/ml | + | Medium I |
| 2 | Tobacco | MS + 2,4-D 0.1 μg/ml | + | Medium II |
| 3 | Tobacco | MS + 2,4-D 0.1 μg/ml | + | Medium III |
| 4 | Tobacco | MS + 2,4-D 0.1 μg/ml | - | Medium I |
| 5 | Tobacco | MS + 2,4-D 0.1 μg/ml | - | Medium II |
| 6 | Tobacco | MS + 2,4-D 0.1 μg/ml | - | Medium III |
| 7 | Tobacco | MS+kinetin 1 μg/ml +IAA 0.1 μg/ml | + | Medium I |
| 8 | Tobacco | MS+kinetin 1 μg/ml +IAA 0.1 μg/ml | + | Medium II |
| 9 | Tobacco | MS+kinetin 1 μg/ml +IAA 0.1 μg/ml | + | Medium III |
| 10 | Tobacco | MS+kinetin 1 μg/ml +IAA 0.1 μg/ml | - | Medium I |
| 11 | Tobacco | MS+kinetin 1 μg/ml +IAA 0.1 μg/ml | - | Medium II |
| 12 | Tobacco | MS+kinetin 1 μg/ml +IAA 0.1 μg/ml | - | Medium III |
| 13 | Petunia | MS salts + Petunia vitamin + casein hydrolysate | + | Medium I |
| 14 | Petunia | MS salts + Petunia vitamin + casein hydrolysate | + | Medium II |
| 15 | Petunia | MS salts + Petunia vitamin + casein hydrolysate | + | Medium III |
| 16 | Petunia | MS salts + Petunia vitamin + casein hydrolysate | - | Medium I |
| 17 | Petunia | MS salts + Petunia vitamin + casein hydrolysate | - | Medium II |
| 18 | Petunia | MS salts + Petunia vitamin + casein hydrolysate | - | Medium III |

โดยในการทดลองแต่ละชุดจะมีการทำ Positive control และ Negative control ดังนี้

Positive control ทำโดย นำเอาชิ้นส่วนของพืชผ่านการ cocultivation มาเลี้ยงบน Regenerated medium ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ

Negative control ทำโดย นำเอาชิ้นส่วนของพืชที่ไม่ได้ผ่านการ cocultivation มาเลี้ยงบน regenerated medium ที่มียาปฏิชีวนะ

**2.2 วิธีเก็บผลการทดลอง**

เก็บผลการทดลอง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อใบเลี้ยงมะเขือเทศ ทุก 2 สัปดาห์ หลังจากย้ายลงใน regeneration medium ได้แก่ การวัดขนาดใบเลี้ยง การเกิด browning และนับจำนวนยอดที่เกิดใหม่ ที่มีขนาดตั้งแต่ 0.3 เซนติเมตรขึ้นไป เปอร์เซนต์จำนวนขวดที่มีการเกิดยอด ค่าเฉลี่ยของจำนวนใบเลี้ยงที่มีการเกิดยอดต่อขวด จำนวนยอดที่เกิดใหม่ต่อชิ้นใบเลี้ยง และความสูงเฉลี่ยของยอดโดยวัดจากโคนถึงปลายใบที่สูงที่สุด

**2.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ**

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

**2.4 ตรวจสอบความเป็น Transgenic plant**

**2.4.1 ตรวจสอบโดยวิธี Histochemical assay ของ GUS-activity**

โดยการตรวจสอบการทำงานของเอ็นไซม์ $\beta$-glucuronidase ด้วยวิธี Histochemical assay ตามวิธีของ Stomp (1992) เพื่อตรวจสอบ การแสดงออกของ Reporter gene ในต้นมะเขือเทศที่คาดว่าจะเป็น Transgenic plant ตรวจสอบปฏิกิริยา GUS enzyme โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตสีน้ำเงินของผลิตภัณฑ์ (dichloro - dibromoindigo) ที่เกิดขึ้น

**2.4.2 ตรวจสอบโดยวิธี PCR**

**2.4.2.1 ศึกษา condition ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวน DNA**

**- ศึกษา annealing temperature ที่เหมาะสม**

นำ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 มาทำการสกัดตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) (ภาคผนวก) นำพลาสมิดที่สกัดได้มาทำ PCR โดยใช้ปริมาณ DNA สุทธิ 100 µg (ตามวิธีการของ Radchuk และคณะ 2002) (ภาคผนวก ก) คือ โดยมีรอบปฏิกิริยา 33 รอบ ประกอบด้วย เป็น 94°C 1 นาที, 60°C 1 นาที และ 72°C 2 นาที ตามลำดับ และทำการเพิ่มและลดอุณหภูมิในขั้นตอน primer annealing

เป็นที่ 61, 62, 63, 65 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นำ DNA ที่ได้จากการทำ PCR แล้วมาแยกแถบ DNA ด้วยเครื่องแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน 0.8 % agarose gel หลังจากนั้นนำเจลที่ได้มาทำการย้อมด้วย Ethedium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสง UV

**- ศึกษาความเข้มข้นของ primers ที่เหมาะสม**

ทำการทดลองตามวิธีเดียวกันกับข้างต้น โดยใช้อุณหภูมิจำเพาะที่ให้ผลดีที่สุด โดยใช้ปริมาณ DNA สุทธิ 100 ไมโครกรัมแต่ทำการแปรความเข้มข้นของ primers ที่ 1 , 5 และ 10 μM

**2.4.2.2 ตรวจสอบต้นมะเขือเทศที่คาดว่าจะเป็น Transgenic plant ด้วยวิธี PCR**

ทำการทดลองตามวิธีที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2.4.2.1 โดยนำต้นมะเขือเทศที่คาดว่าจะเป็น transgenic plant และต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมาสกัด DNA โดยวิธี CTAB (ภาคผนวก ก) เป็น DNA template แล้วนำปฏิกิริยาที่ได้มาตรวจสอบผลโดยการนำมาแยกบน 0.8% agarose gel ด้วยเครื่องแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วย 1 mg/l ethedium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสง UV แล้วบันทึกผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย