โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2563

เรื่อง การศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) แบบชั่วคราวในแหนใหญ่ *Spirodela polyrrhiza* L.

(Preliminary study of GFP transient Expression in *Spirodela polyrrhiza* L.)

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

1. นสภ.จิรภัทร บุตรพรหม รหัสนิสิต 59210148
2. นสภ.อภิสิทธิ์ สานิง รหัสนิสิต 59210218
3. นสภ.ธราเทพ วรเมธีสกุล รหัสนิสิต 59210242

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.นิพัฒธา อิสโร

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ ดร.สลิล ชั้นโรจน์

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2563

เรื่อง การศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) แบบชั่วคราวในแหนใหญ่ *Spirodela polyrrhiza* L.

(Preliminary study of GFP transient Expression in *Spirodela polyrrhiza* L.)

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

1. นสภ.จิรภัทร บุตรพรหม รหัสนิสิต 59210148
2. นสภ.อภิสิทธิ์ สานิง รหัสนิสิต 59210218
3. นสภ.ธราเทพ วรเมธีสกุล รหัสนิสิต 59210242

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.นิพัฒธา อิสโร

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ ดร.สลิล ชั้นโรจน์

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการส่งถ่ายยีนและศึกษาการแสดงออกของโปรตีนแบบชั่วคราวในแหนใหญ่ *Spirodela polyrhiza* L. โดยอาศัยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101 สำหรับยีนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ยีน GFP ที่อยู่ในพลาสมิด pB7WGY และประกอบด้วย *Bar* gene, และ spectinomycin resistance gene ซึ่งจัดเป็นยีนรายงานผล สำหรับการตรวจสอบการเรืองแสงของยีน GFP แบบชั่วคราวจะถูกตรวจสอบภายใต้กล้อง fluorescence microscope และโปรตีน GFP ที่ผลิตได้จากแหนใหญ่จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ western blot ตามลำดับ โดยโปรตีน GFP ที่ผลิตได้จากแหนใหญ่ในครั้งนี้จัดเป็นวิธีการศึกษาในระดับขั้นต้นเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางด้านการผลิตวัคซีนในรูปแบบที่กินได้ต่อโรคอุบัติการณ์ใหม่ ๆ ต่อไปในอนาคต

คณะผู้จัดทำงานวิจัย

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2563

เรื่อง การศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) แบบชั่วคราวในแหนใหญ่ *Spirodela polyrrhiza* L.

ผู้จัดทำโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ.จิรภัทร บุตรพรหม รหัสนิสิต 59210148
2. นสภ.อภิสิทธิ์ สานิง รหัสนิสิต 59210218
3. นสภ.ธราเทพ วรเมธีสกุล รหัสนิสิต 59210242

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. อ.ดร. นิพัฒธา อิสโร
2. อ.ดร. สลิล ชั้นโรจน์ (คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา)

บทคัดย่อ

แหนใหญ่ หรือ *Spirodela polyrhiza* L. เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวลอยน้ำขนาดเล็ก จัดอยู่วงศ์ Lemnaceae เป็นพืชที่นิยมนำมาใช้เป็นต้นแบบที่นิยมนำมาใช้ศึกษาทางชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพภายใต้พืชที่มีคุณค่า มีความหลากหลายต่อการนำมาใช้งานและเหมาะสำหรับการศึกษาการส่งถ่ายยีน GFP เข้าสู่แหนใหญ่ (*S. polyrrhiza)* โดยอาศัยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางด้านอื่นๆได้ ในการศึกษาครั้งนี้ ทางผู้วิจัยได้ทำการถ่ายโอนยีน GFP หรือโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเข้าสู่ใบของแหนใหญ่ โดยแหนใหญ่ที่ใช้ศึกษาเป็นแหนใหญ่ที่โตในจังหวัดชลบุรี

เก็บแหนใหญ่มาจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จำนวน 150 ต้น นำมาทำให้ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO เป็นระยะเวลา 2 นาที จากนั้นทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนพลาสมิดดีเอ็นเอ pB7WGY-GFP โดยอาศัยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* เข้าสู่แหนใหญ่ หลังจากนั้นทำการบ่มแหนใหญ่ลงบนอาหารแข็งสูตร MS, MS2 และ MS3 ภายใต้สภาวะสว่างและมืด เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน ผลที่ได้นั้นนำมาตรวจสอบด้วยการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) และทำการตรวจสอบโปรตีนที่ได้ด้วย SDS-PAGE และ Western blot ตามลำดับ

การเพิ่มจำนวนของแหนใหญ่ในอาหารเหลว E-media คิดเป็น 2.50, 2.72 และ 2.67% ณ เวลาการทำให้ปราศจากเชื้อที่ 1, 2 และ 3 นาที ตามลำดับ และมีค่าการปนเปื้อนของเชื้อสูงสุดคิดเป็น 4.48% ที่ 1 นาที แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน GFP ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน มีประสิทธิภาพในการเรืองแสงสูงสุดภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง และผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และการใช้ western blot โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ GFP ซึ่งแถบโปรตีนที่พบมีขนาด 28 กิโลดาลตัน พบในแหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน บนอาหาร MS เป็นเวลา 10 นาที สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน, แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่าย

โอนยีน บนอาหาร MS เป็นเวลา 10 นาที สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน และแหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน บนอาหาร MS เป็นเวลา 30 นาที สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำให้แหนใหญ่ปราศจากเชื้อคือ 2 นาที โดยแหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน GFP บนอาหาร MS เป็นเวลา **1**0 นาที สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการพัฒนามากที่สุด อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น ไม่แนะนำในการนำแหนใหญ่มาถ่ายโอนยีนแบบชั่วคราวโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ลงบนอาหารคัดเลือก MS2 และ MS3 ในช่วงเวลาสั้น ๆ ดังนั้น ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม คือ จำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงลงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 2 สัปดาห์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

(อ.ดร. นิพัฒธา อิสโร)

Senior Project Academic Year 2020

: Preliminary study of GFP transient expression in *Spirodela polyrrhiza* L.

By

1. Miss Jirapat Butprom ID 59210148
2. Mr. Apisit Saning ID 59210218
3. Mr. Tharatep Worrameteesakul ID 59210242

Advisor :

1. Dr. Nipatha Isaro
2. Dr. Salil Chanroj (faculty of science, Biotechnology department, Burapha university)

ABSTRACT

Spirodela polyrrhiza L. is the monocotyledonous free-floating aquatic plants and belonging to the members of the Lemnneceae family. It is the important model system used for study on plant biology and biotech protein factories. Based on their valuable target plant and various application, the feasibility of Green fluorescence protein (GFP) gene transformation of *S. polyrrhiza* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer may offer an extended range of application. In this study, we have attempted to transform the GFP gene encoding the GFP in frond of *S. polyrrhiza*, a widely Giant duckweed grown in Chonburi province.

Giant duckweeds (*S. polyrrhiza*) were collected from Faculty of Science, Burapha university (n=150) and steriled in 0.9% NaClO for 2 minutes. The recombinant plasmid pB7WGY-GFP used for *Agrobacterium transformation* in *S. polyrrhiza*. The transgenic *S. polyrrhiza* were incubated on 3 types of MS media such as MS, MS2 and MS3 under the dark and light incubations. The transgenic *S. polyrrhiza* were harvested on day 1, 2 and 3 and GFP expression at various time harvesting were observed under fluorescence microscope. The GFP protein was analyzed by SDS-PAGE and western blot, respectively.

The doubling time growing of *S. polyrrhiza* in E-media were 2.50, 2.72 and 2.67% at time duration of of the steriled samples (1, 2 and 3 minutes) and the highest percentage of contaminated sterile sample was 4.48% at 1 minute. The transgenic *S. polyrrhiza* on MS media after incubated for 3 days under the dark condition showed highest GFP fluorescence was observed under fluorescence microscope. But the GFP protein expression were detected by

western blot with polyclonal anti-GFP antibody only detected on MS-D-10-2, MS-L-10-3, and MS-L-30-3 at 28 kDa in size.

The optimal time for *S. polyrrhiza* sterilization was found at 2 minutes is the best time for steriled samples. The GFP-transferred to *S. polyrrhiza* by agroinfiltration method at 10 minutes on MS media and incubated for 3 days under the light condition was appropriate for the best growth and development of transgenic *S. polyrrhiza.* However, this preliminary results will not be provide the transgenic *S. polyrrhiza* on selective media MS2 and MS3 by transient transformation method using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer within short time harvesting. Thus, the suggestion in further work need to culture to selective media for 2 weeks.

Major Advisor.....

(Dr. Nipatha Isaro)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของโปรตีนแสงสีเขียว (GFP) แบบชั่วคราวในแหนใหญ่ *Spirodela polyrrhiza* L. โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาวิธีการ transform gene เข้าสู่แหนใหญ่โดย *S. polyrrhiza* โดยวิธี vacuum agroinfiltration และเพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน GFP ในแหนใหญ่ได้ งานวิจัยฉบับนี้ได้สำเร็จ และลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณท่านคณบดีคณะเภสัชศาสตร์และคณะเภสัชศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนจึงได้มีการวิจัยฉบับนี้ และขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.นิพัฒธา อิสโร ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอพระคุณอาจารย์ ดร.สลิล ชั้นโรจน์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ให้ความอนุเคราะห์ในการสนับสนุนห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และท้ายสุดขอขอบคุณ นายปรวีย์ สันติอาภรณ์ นิสิตปริญญาโท เจ้าหน้าที่และเพื่อนๆ ในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ได้ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ ตั้งแต่เริ่มวิจัยจนกระทั่งงานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

คณะผู้จัดทำ

1 เมษายน 2564

สารบัญ

		หน้า
คำนำ		ก
บทคัดย่อ		ข
ABSTRACT		ค
กิตติประกาศ		ง
สารบัญ		จ-ฉ
สารบัญรูปภาพ		ช
บทที่ 1	**บทนำ**	1
	ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
	วัตุประสงค์	2
	สมมติฐาน	3
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
	การนำไปใช้ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ทางด้านเภสัชกรรม	3
	กรอบแนวคิด	4
บทที่ 2	**วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง**	5
	แหนใหญ่ *(Spirodela polyrhiza L.)*	5
	บทบาทของ GFP	7
	การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช (plant transformation method)	9
บทที่ 3	**วิธีการดำเนินการวิจัย**	13
	วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	13
	วิธีดำเนินการทดลอง	15
บทที่ 4	**ผลการวิจัย**	22
	ผลการทดสอบการนำแหนใหญ่มาทำให้ปราศจากเชื้อ	22
	ผลการเจริญเติบโตของแหนใหญ่ในอาหารเพาะเลี้ยง	25
	ผลการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์	27
	ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	32
	ผลการวิเคราะห์ด้วย Western blot	36
บทที่ 5	**สรุปผลการวิจัย**	39
	เอกสารอ้างอิง	41

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก

ภาคผนวก (ก) เอกสารจริยธรรม 46
ภาคผนวก (ข) ผลการเรืองแสงของแหนใหญ่ 48
ภาคผนวก (ค) รายงานการเงิน 52

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ **หน้า**

1 ภาพแสดง *Spirodela polyrhiza* L. (Giant duckweed) 5
2 ภาพแสดงโครงสร้างของ green fluorescence protein (GFP) 7
3 ภาพแสดงผลการเรืองแสงในแหนใหญ่ 9
4 ภาพแสดงการออกแบบพลาสมิดดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับการแสดงของโปรตีน GFP ในแหนใหญ่ 16
5 ภาพแสดงอัตราการรอดของแหนใหญ่เมื่อทำให้ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO 22
6 ภาพแสดงอัตราการปนเปื้อนของเชื้อหลังจากการทำให้ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO 23
7 ภาพแสดงการเจริญเติบโตของแหนใหญ่เป็นสองเท่าหลังจากการทำให้ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO..... 24
8 ภาพแสดงการรอดและการปนเปื้อนของเชื้อหลังจากการทำให้ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO 24
9 ภาพแสดงการรอดของแหนใหญ่หลังจากการทำให้ปราศเชื้อด้วย 0.9% NaClO ระยะเวลา 2 นาที 25
10 ภาพแสดงการเพิ่มจำนวนของแหนใหญ่ 25
11 ภาพแสดงการรอดของแหนใหญ่หลังจากการถ่ายโอนยีนบนอาหารคัดเลือก MS 26
12 ภาพแสดงการรอดของแหนใหญ่หลังจากการถ่ายโอนยีนบนอาหารคัดเลือก MS2 26
13 ภาพแสดงการรอดของแหนใหญ่หลังจากการถ่ายโอนยีนบนอาหารคัดเลือก MS3 27
14 ภาพแสดงออกของโปรตีนเรืองแสง GFP ในอาหารแข็งสูตร MS 28
15 ภาพการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสง GFP ในอาหารแข็งสูตร MS2 29
16 ภาพการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสง GFP ในอาหารแข็งสูตร MS3 30
17 ภาพแสดงผลการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE 33
18 ภาพแสดงผลการวิเคราะห์ด้วย Western blot 36

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

แหนใหญ่ *Spirodela polyrhiza* L. (*S. polyrhiza* L.) จัดเป็นพืชลอยน้ำขนาดเล็ก มีใบลอยอยู่บนผิวน้ำ ส่วนรากจมอยู่ใต้น้ำ ชอบขึ้นตามหนองน้ำทั่วไป สามารถพบได้โดยทั่วไป ได้แก่ อเมริกาเหนือ ยุโรป และเอเชีย เป็นต้น โดยแหนใหญ่จัดอยู่ในพืชวงศ์ Lemnaceae เป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับสัตว์น้ำและ การปศุสัตว์ต่าง ๆ (1) อีกทั้งนิยมนำมาใช้ในการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อผลิตวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ (2) โดยข้อมูลพื้นฐานจากพืชตระกูลแหนใหญ่จัดเป็นกลุ่มที่ประกอบไปด้วยกลุ่มสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตในสัตว์ หรือมนุษย์ เพราะจัดเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรต (30-75%) โปรตีน (15.02-38.6%) ทั้งนี้แหนใหญ่จัดเป็นพืชที่โตได้ไว สามารถเพิ่มปริมาณได้สูงในช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงสั้น ๆ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีผลิตภัณฑ์จากแหนใหญ่เป็นจำนวนมากที่นำมาขายในท้องตลาด โดยจัดอยู่ในกลุ่มผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารยี่ห้อ Lantein® ซึ่งประกอบไปด้วยอนุพันธ์ของวิตามินบี 12 ในรูปของ adenosylcobalamin, methycobalamin และ hydroxocobalamin ที่มีประโยชน์ในการเสริมสร้างการเจริญเติบโต การทำงานของระบบประสาท และการส่งเสริมการสร้างเม็ดเลือด อีกทั้งยังช่วยในการเสริมสร้างกล้ามเนื้อสำหรับคนที่กินมังสวิรัติ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) ถึง 80% ในรูปของ alpha-linolenic acid (ALA) และ omega-3 ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง

ในปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืชจัดเป็นแขนงหนึ่งที่น่าสนใจและถูกนำมาใช้ในทางด้านการแพทย์ เช่น การผลิตยารักษาโรคต่าง ๆ การผลิตยารักษามะเร็ง การผลิตแอนติบอดี และการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันไวรัสชนิดต่าง ๆ หรือโรคอุบัติการณ์ใหม่ โดยอาศัยเซลล์พืชเป็นเซลล์เจ้าบ้าน ทั้งนี้ก่อนที่จะผลิตยาหรือวัคซีนในเซลล์พืชได้นั้นต้องอาศัยตัวนำพาหรือเทคนิคในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชที่อาศัยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* จัดเป็นเทคนิค indirection ในการขนถ่ายยีนเข้าสู่พืช โดยวิธีนี้สามารถขนส่งยีนได้ทั้งแบบ stable และ transient โดยวิธีการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชแบบ stable transformation นั้นเป็นการถ่ายยีนแบบถาวร ทำโดยนำดีเอ็นเอแปลกปลอม (foreign DNA) เข้าสู่ cell host อย่างถาวร ทำให้สามารถถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นได้ เป็นเทคนิคที่มีราคาสูง เหมาะสำหรับการศึกษา

ระยะยาว จึงนิยมนำมาใช้ในการประยุกต์เกี่ยวกับวัคซีนในพืช ส่วนเทคนิค transient transformation เป็นการถ่ายยีนแบบชั่วคราว ทำโดยนำดีเอ็นเอแปลกปลอม เข้าสู่ cell host เหมือนกันแต่เทคนิคนี้ไม่เกินการรวมเข้ากับจีโนมของ cell host จึงไม่สามารถถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นได้ แต่เทคนิคนี้สามารถขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว ราคาถูก จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสำหรับการศึกษาระยะสั้น ๆ ดังนั้นในขั้นตอนการทำ agroinfi ltration ที่เป็นการนำสารพันธุกรรมมาถ่ายโอนในแหนใหญ่นั้น ทางผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกวิธี transient ซึ่งจัดเป็นวิธีที่นิยมใช้และจัดเป็นเทคนิคที่ประสบความสำเร็จมาแล้วในหลายงานวิจัย โดยวิธีดังกล่าวเป็นเทคนิคที่ใช้เวลาสั้น ทำให้เมื่อถ่ายโอนสารพันธุกรรมสำเร็จแล้วสามารถตรวจสอบผลการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 1-2 วัน (3) และวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนที่สนใจ ด้วยการวิธี western blot เพื่อช่วยยืนยันการจับของโปรตีนที่สนใจได้อย่างจำเพาะ

สำหรับงานวิจัยชิ้นนี้จัดเป็นการศึกษาเทคนิคเบื้องต้นในการถ่ายโอนยีน GFP เข้าสู่แหนใหญ่ *S. polyrhiza* L. ที่พบในพื้นที่มหาวิทยาลัยบูรพา โดยอาศัยเชื้อ *A. tumefaciens* เป็นตัวนำพายีนที่สนใจเข้าสู่เซลล์พืช ภายใต้วิธี vacuum infiltration โดยทำการตรวจสอบช่วงเวลาของการถ่ายโอนยีนช่วงใดมีประสิทธิภาพได้ดีที่สุดภายใต้การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ได้ในแหนใหญ่ ด้วยวิธี western blot ที่จำเพาะต่อ GFP antibody อีกทั้งยังการตรวจสอบการเรืองแสงของยีน GFP ในแหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายฝากยีนภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อการนำยีนชนิดอื่น ๆ ที่สนใจเข้าสู่แหนใหญ่ *S. polyrhiza* L. ทางด้านการวิจัยและพัฒนาวัคซีนในรูปแบบที่กินได้โดยผ่านกระบวนการผลิตโปรตีน (วัคซีน) จากแหนใหญ่ ภายใต้การช่วยลดต้นทุนในการผลิตวัคซีน เนื่องจากการผลิตโปรตีนในพืชมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าเซลล์ชนิดอื่น ๆ ไม่จำเป็นต้องเก็บวัคซีนในตู้เย็น และช่วยกระจายวัคซีนสู่ประชากรในประเทศที่ห่างไกลความเจริญได้ ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้สามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนางานวิจัยในการค้นหาแหล่งการผลิตวัคซีนจากแหนใหญ่ในรูปแบบที่กินได้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการ transform gene เข้าสู่แหนใหญ่ *S. polyrhiza* L. โดยวิธี vacuum agroinfiltration
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียวในแหนใหญ่

สมมติฐาน

1. การถ่ายโอนยีน GFP เข้าสู่แหนใหญ่โดยใช้ *A. tumefaciens* ทำให้แหนใหญ่สามารถเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) ได้
2. สามารถตรวจสอบโปรตีนที่สกัดจากแหนใหญ่ด้วย SDS-PAGE และ Western blot ตามลำดับได้

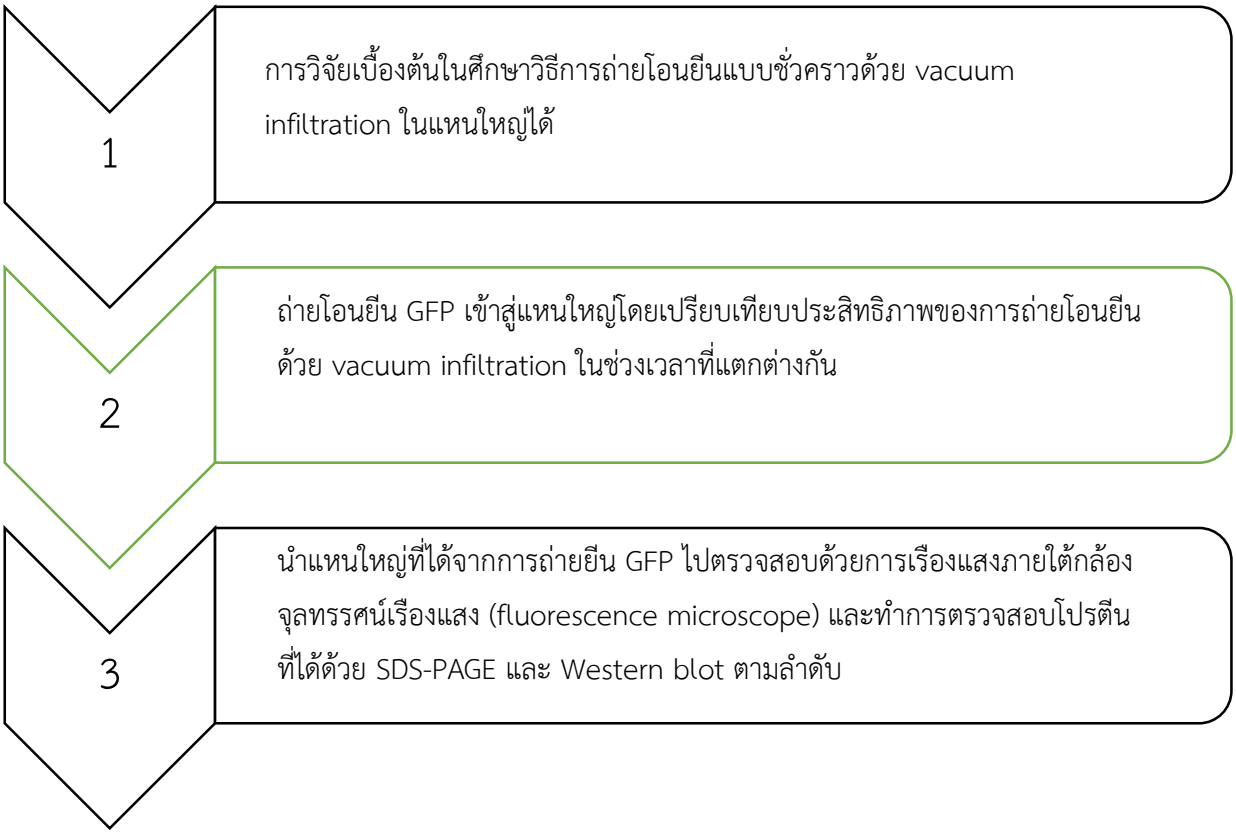
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาและประยุกต์ใช้การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ cell โดยการใช้ *A. tumefaciens* ในแหนใหญ่ได้
2. สามารถตรวจสอบโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) ในแหนใหญ่ได้

การนำไปใช้ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ทางด้านเภสัชกรรม

1. สามารถใช้เป็นต้นแบบของพืช (plant model) ในการถ่ายโอนยีน เข้าสู่แหนใหญ่ต่อไปในอนาคต
2. สามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยทางด้านการพัฒนาวัคซีนในรูปแบบที่กินได้จากแหนใหญ่
3. สามารถนำวิธีการที่ศึกษาได้ไปต่อยอดในการผลิตโปรตีนอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ต่อการนำไปใช้รักษาโรคต่าง ๆ (therapeutic protein) ในแหนใหญ่ต่อไปในอนาคต

กรอบแนวคิด


1
การวิจัยเบื้องต้นในศึกษาวิธีการถ่ายโอนยีนแบบชั่วคราวด้วย vacuum infiltration ในแหนใหญ่ได้
2
ถ่ายโอนยีน GFP เข้าสู่แหนใหญ่โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการถ่ายโอนยีนด้วย vacuum infiltration ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน
3
นำแหนใหญ่ที่ได้จากการถ่ายยีน GFP ไปตรวจสอบด้วยการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) และทำการตรวจสอบโปรตีนที่ได้ด้วย SDS-PAGE และ Western blot ตามลำดับ

บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

แหนใหญ่ *Spirodela polyrhiza* L.

แหนใหญ่เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวขนาดเล็กที่ลอยอยู่บนผิวน้ำ (4) จัดอยู่ในวงศ์ Lemnaceae ซึ่งประกอบด้วย 37 species และ 5 genus ได้แก่ Spirodela, Landoltia, Lemna, Wolffiella และ Wolffia (5) แหนใหญ่นั้นพบได้ง่ายตามบริเวณบ่อน้ำทั่วไป ลอยอยู่เป็นกลุ่ม ๆ ใบของแหนใหญ่มีลักษณะเป็นแผ่นเล็ก ๆ หรือวงรี เรียกว่า fronds ผิวใบเรียบด้านบนเส้นมีสีเขียว ด้านล่างสีออกแดง มีรากฝอยประมาณ 3-15 เส้น ดอกมีขนาดเล็กออกเป็นช่อประกอบด้วยดอกตัวเมีย 1 ดอก ดอกตัวผู้ 2 ดอก ยื่นออกจากถุงที่ซอกใบ มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (ออกดอกและเมล็ด) และแบบไม่อาศัยเพศ (vegetative fronds) เป็นการขยายพันธุ์โดยการสร้างของ fronds จากใบหลัก 1 ใบ (mother frond) จะได้ 2 ใบ (daughter frond) (**รูปที่ 1**) โดย fronds ที่เกิดขึ้นใหม่ยังคงติดอยู่ด้านข้างของ fronds หลัก (6)

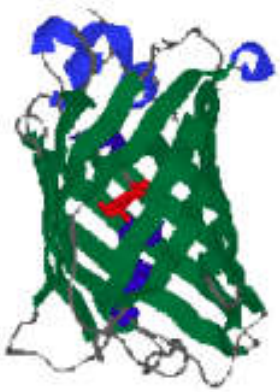
รูปที่ 1 *Spirodela polyrhiza* L. (Giant duckweed) (6)

แหนใหญ่สามารถเจริญเติบโตและปรับตัวได้ในเขตภูมิอากาศที่มีความหลากหลาย เช่น เขตร้อนและเขตอบอุ่น การเจริญเติบโตและการพัฒนาของแหนใหญ่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สารอาหาร อุณหภูมิ และ pH เป็นต้น แหนใหญ่มีการเติบโตที่ดีเหมาะสมในอาหารเลี้ยงพืชที่มีค่า pH ที่กว้างระหว่าง 5-7 (7) แหนใหญ่สามารถเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาสั้น ๆ (8) โดยมีค่าชีวมวล (biomass) ของแหนใหญ่สามารถเพิ่มเป็นสองเท่า (doubling time) ภายใน 16-48 ชั่วโมง องค์ประกอบหลักทางเคมีของแหนใหญ่ประกอบด้วยแป้ง (11.14-13.97%) โปรตีน (23.80-36.20%) (9) และอนุพันธ์ของวิตามินบี 12 ได้แก่ adenosylcobalamin, methycobalamin และ hydroxocobalamin เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) ในรูปของ alpha-linolenic acid (ALA) และ omega-3 จากองค์ประกอบต่าง ๆ เหล่านี้ จึงทำให้แหนใหญ่เป็นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่สูง จึงนิยมนำแหนใหญ่มาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ต่าง ๆ เนื่องจากแหนใหญ่มีปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่สูง เช่น อาหารปลา (10) สำหรับการเพาะเลี้ยงแหนใหญ่จำเป็นต้องปรับสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแหนใหญ่โดยองค์ประกอบที่สำคัญในอาหารเพาะเลี้ยง ได้แก่ กลุ่มสารเคมีชนิดต่าง ๆ กลุ่มสารอินทรีย์ ภายใต้การคัดเลือกองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงแหนใหญ่ในแต่ละสายพันธุ์นั้น ประกอบไปด้วยธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามิน ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยองค์ประกอบหลักที่สำคัญของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ กลุ่มสารอนินทรีย์ (inorganic compounds) เช่น nitrogen (N) , phosphorus (P) , potassium (K) , calcium (Ca) และ magnesium (Mg) และเกลือแร่ต่างๆ โดยมีปริมาณและสัดส่วนต่างๆ ที่ถูกปรับอย่างเหมาะสม การใช้อัตราส่วนในปริมาณที่สูงเกินไปอาจเป็นพิษต่อเซลล์พืชและการใช้อัตราส่วนในปริมาณที่ต่ำเกินไปเซลล์พืชอาจมีการเจริญเติบโตที่ไม่สมบูรณ์ (11) สำหรับกลุ่มสารอินทรีย์อื่น ๆ (organic compounds) ที่มีความสำคัญและจัดเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์พืช ได้แก่ น้ำตาล sucrose, glucose และ fructose กลุ่มวิตามิน เช่น B1, B3 และ C และ กลุ่มฮอร์โมนพืช ได้แก่ auxins ซึ่งมีหน้าที่ในการช่วยเพิ่มขนาดเซลล์ ช่วยเหนี่ยวนำรากกับแคลลัส และ cytokinins ที่ช่วยในการแบ่งเซลล์ เหนี่ยวนำการสร้างยอด เป็นต้น (12)

บทบาทของ GFP

Green fluorescence protein (GFP) คือ โปรตีนเรืองแสงสีเขียวที่พบได้ในแมงกะพรุน *Aequorea Victoria* ส่วนที่เรืองแสงเรียกว่า umbrella ภายใน cytoplasm ของเซลล์ประกอบด้วยส่วนที่จำเป็นในการเรืองแสงคือ photoprotein และ aequorin เป็นต้น โปรตีนชนิดนี้มีขนาดอยู่ที่ 27 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 238 ตัว โครงสร้างเป็นรูปทรงกระบอก (*β*-can) (**รูปที่ 2**) ประกอบด้วยสาย polypeptide 11 สาย เรียงตัวแบบ antiparallel เป็นรูปทรงกระบอก (สีเขียว) ภายในทรงกระบอกประกอบด้วยสาย polypeptide แบบเกลียวอัลฟ่า (สีน้ำเงิน) มีโครโมฟอร์ (สีแดง) บรรจุอยู่ตรงกลางและมีปลายเป็น peptide ชนิดเกลียว (สีฟ้า) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีความสามารถในการทนต่อค่า pH ในช่วง 5.5–12

GFP ทำหน้าที่เป็นแปรสัญญาณจากพลังงานที่ได้รับจากแสงสีฟ้า (chemiluminescence) ของโปรตีน aequorin เป็นแสงฟลูออเรสเซนต์สีเขียว (13) โดยถูกนำมาใช้เป็น marker gene ครั้งแรก เพื่อติดตามการรับรู้ภายในเซลล์ประสาทของหนอนตัวกลม (14) นอกจากนั้น GFP ยังถูกใช้ในชีววิทยาโมเลกุลในการแสดงออกของยีนซึ่งพิสูจน์การแสดงออกของยีนภายในสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์ เพื่อระบุตำแหน่งของเซลล์ที่จะมีการแสดงออกของโปรตีนเฉพาะที่จำเพาะ โดย GFP มีความสามารถดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 395 นาโนเมตร (excitation maximum) และปล่อยคลื่นแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 509 นาโนเมตร (emission maximum) ซึ่งเป็นคลื่นแสงสีเขียวทั้งคู่



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของ green fluorescent protein (GFP) (15)

ตัวอย่างโปรตีนเรืองแสงชนิดอื่น ๆ ได้แก่ Enhanced green fluorescence protein (EGFP) และ Yellow fluorescence protein (YFP) โดย EGFP ได้มาจากการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของกรดอะมิโน 2 ตัว บน GFP คือ กรดอะมิโน phenylalanine ลำดับที่ 64 เปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโน leucine และการเปลี่ยนกรดอะมิโน serine ลำดับที่ 64 เปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโน threonine ซึ่งทำให้เพิ่มคุณสมบัติในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ภายใต้แสงอัตราไวโอเลตได้มากกว่าเดิมและสามารถแสดงออก (expression) ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammlian cells) ได้สูงขึ้น โดยสามารถดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร ซึ่งเป็นคลื่นแสงสีน้ำเงินและปล่อยคลื่นแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 507 นาโนเมตร ซึ่งเป็นคลื่นแสงสีเขียว ในขณะเดียวกัน YFP จัดเป็นโปรตีนเรืองแสงสีเหลืองที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของกรดอะมิโนหลายตำแหน่งบน GFP โดยคุณสมบัติของ YFP สามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้ที่ 514 นาโนเมตรและปล่อยคลื่นแสงได้ที่ 530 นาโนเมตร (16) ยกตัวอย่างโดย YFP ถูกปรับให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ได้แก่ ypet, citrine และ venus ซึ่งช่วยเพิ่มความเข้มของการเรืองแสง, การเจริญเติบโตที่เร็วขึ้น, ช่วยเพิ่มความสามารถในการทนต่อค่า pH และเพิ่มคุณสมบัติในการทนต่อคลอไรด์ไอออนเมื่อเทียบกับรุ่นก่อนหน้า (17)

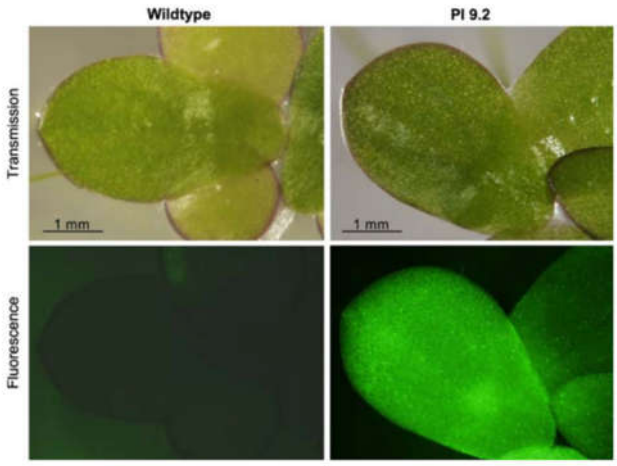
ประโยชน์ของ GFP

GPF เรืองแสงได้จากเซลล์โดยไม่ต้องอาศัยพลังงานได้นานตลอดอายุขัยของเซลล์ สามารถแสดงออกได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งยูคารีโอตและโปรคารีโอต จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย เช่น ใช้ติดตามการแสดงออกของยีน (marker gene), ติดตามจำนวนแบคทีเรียในกระบวนการย่อยสลาย ปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกับพืช และ ติดตามการอยู่รอดในระบบนิเวศวิทยา เป็นต้น

การนำส่ง GFP

การใส่ตัวติดตาม GFP เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเป้าหมายสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สารเคมีหรือการใช้กระแสไฟฟ้า เป็นต้น วิธีที่นิยมทั่วไปคือ การใช้สารแคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับความร้อน เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์รับเอาพลาสมิดเข้าไป ส่วนการใช้กระแสไฟฟ้าซึ่งจัดเป็นการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์สูงวิ่งผ่านเซลล์ในช่วงเวลาสั้น ๆ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูที่ใหญ่พอที่พลาสมิดจะผ่านเข้าไปในเซลล์ได้รูที่เกิดขึ้นเป็นแบบชั่วคราวได้ ดังนั้นหลังการหยุดให้กระแสไฟฟ้าก็จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ดังเดิม ตัวอย่างการศึกษาการถ่ายฝากยีนเข้าสู่แหนใหญ่ (*S. polyrhiza* L.) โดยใช้พลาสมิดที่ประกอบด้วย GFP แบบต่าง ๆ ได้แก่ pGFP , pGFP-HP1 , pPI-GFP และ pA5 เป็นต้น ภายใต้การควบคุมของยีน 35s หรือเรียกว่า 35s promoter มีหน้าที่สำคัญ

ในการควบคุมการแสดงออกของยีน GFP ในพืช และมีการใช้ยีน marker (selective marker gene) ในการคัดเลือกการแสดงออกของยีนที่สนใจหลังการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนจะโตได้ในอาหารคัดเลือกและเซลล์พืชปกติหรือเซลล์พืชที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนใดๆ โดยเซลล์ดังกล่าวนั้นจะตายบนอาหารคัดเลือก จากรายงานผลการศึกษาแสดงออกของยีน GFP พบว่าแหนใหญ่ทั่วไป (wild type) และแหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน GFP มาตรวจส่องผ่านแสง UV ผลที่ได้จากแหนใหญ่ทั้งสองสายพันธุ์สามารถมองเห็นด้วยแสงสีขาวได้ และเมื่อนำมาส่องการเรืองแสง fluorescence ที่ความยาวคลื่น 505–525 นาโนเมตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแหนใหญ่ทั่วไปไม่เรืองแสง ส่วนแหนใหญ่สายพันธุ์ PI 9.2 ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน GFP เกิดการเรืองแสงสีเขียว (18)



รูปที่ 3 ภาพแสดงตัวอย่างผลการเรืองแสงในแหนใหญ่ (18)

การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช (Plant Transformation method)

การถ่ายฝากยีนที่สนใจเข้าสู่พืช สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ กลุ่มเซลล์หรือเนื้อเยื่อของพืชเป้าหมายที่นำมาถ่ายฝากยีน วิธีการในการถ่ายฝากยีนเข้าสู่พืชสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่

1. การถ่ายฝากยีนโดยตรง (direct gene transfer) ได้แก่ การถ่ายฝากยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (Biolistic technique) การถ่ายฝากยีนโดยใช้เข็มฉีด (Microinjection) และการถ่ายฝากยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (Electroporation) เป็นต้น

2. การถ่ายฝากยีนโดยใช้พาหะ (vector-mediated gene transfer) ได้แก่ การถ่ายฝากยีนโดยใช้แบคทีเรีย *A. tumefaciens* (*A. tumefaciens*-mediated gene transfer) ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมและประสบความสำเร็จในการถ่ายฝากยีนเข้าสู่พืชได้หลากหลายชนิดและเหมาะสม ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้เลือกวิธีการถ่ายฝากยีนโดยใช้พาหะ (vector-mediated gene transfer) ซึ่งเป็นวิธีที่นำส่งยีนได้หลายชนิดและมีความเหมาะสมนำมาใช้กับการศึกษาครั้งนี้ โดยลักษณะของเชื้อ *A. tumefaciens* มีองค์ประกอบทางพันธุกรรมที่สำคัญในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช คือ T-DNA (transfer DNA) ในการสร้างเวคเตอร์เพื่อถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* ที่นิยมใช้ ในปัจจุบัน คือ binary vector เป็นการนำเอายีนที่ต้องการมาใส่ไว้ในพลาสมิดขนาดเล็กระหว่าง RB และ LB ในขอบเขตของ T-DNA เดิม เพื่อเพิ่มจำนวนใน *Escherichia coli* (*E.coli*) แล้วจึงถ่ายทอดพลาสมิดเข้าสู่ *A. tumefaciens* ซึ่งมี Ti- plasmid ที่ไม่มีส่วนของ T-DNA อยู่ ดังนั้น *A. tumefaciens* จะมีทั้ง Ti-plasmid และส่วนของ T-DNA ที่ได้รับเข้าไป และ integrative vector เป็นการนำยีนที่ต้องการใสในพลาสมิดขนาดเล็ก เพื่อเพิ่มจำนวนใน *E. coli* แล้วจึงถ่ายพลาสมิดจาก *E. coli* เข้าสู่ *A. tumefaciens* ที่มี Ti-plasmid อยู่พลาสมิดขนาดเล็กนี้สามารถเข้าไปแทรกอยู่ในส่วนของ T-DNA ทั้งหมดด้วยการเกิด recombination ดังนั้น *A. tumefaciens* จึงมี Ti-plasmid อยู่เพียงแค่ 1 พลาสมิด โดย *A. tumefaciens* มีความไวต่อสาร phenolic compounds ต่าง ๆ ได้แก่ acetocyringone ซึ่งเป็นสารที่พืชจะหลั่งเมื่อเกิดบาดแผล โดยสารนี้มีหน้าที่กระตุ้น Vir gene ต่าง ๆ เช่น VirA จะทำหน้าที่ในการกระตุ้น VirG, VirG จะทำหน้าที่โดยกระตุ้นการทำงานของ Vir protein อื่น ๆ และ VirD จัดเป็นเอนไซม์ endonuclease ที่มีหน้าที่ในการตัดพันธะ phosphodiester bond บนตำแหน่ง right border (RB) และ left border (LB) เพื่อให้ single strand T-DNA หรือ t-stand หลุดออก ซึ่ง Vir proteins ทั้งหมดมีหน้าที่เป็นตัวกลางในการขนส่ง T-DNA เข้าสู่ chromosomes ของเซลล์พืช หลังจากนั้นจะมีการแสดงออกของยีนที่เข้าไปในพืชโดยมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในลักษณะ crown gall formation

การถ่ายฝากยีนเข้าสู่พืชโดยใช้แบคทีเรีย *A. tumefaciens* หรือเรียกว่า indirection method (plant transformation) แบ่งได้เป็น 2 วิธีดังต่อไปนี้

1. Stable transformation ซึ่งวิธีเป็นการถ่ายยีนแบบถาวร ซึ่งจะเป็นการนำดีเอ็นเอแปลกปลอม (foreign DNA) เข้าสู่ cell host อย่างถาวร สามารถถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นได้ มีค่าใช้จ่ายในการ transform สูง ดังนั้นจึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสำหรับการศึกษาระยะยาว

2. Transient transformation เป็นการถ่ายยีนแบบชั่วคราวซึ่งจะเป็นการนำดีเอ็นเอแปลกปลอม (foreign DNA) เข้าสู่ cell host แต่ไม่ได้เกิดการรวมเข้ากับจีโนมของ cell host สามารถ

ขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว และค่าใช้จ่ายต่ำ ดังนั้นจึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสำหรับการศึกษาระยะสั้น ๆ ประมาณ 1-4 วัน (19) และเหมาะสมในการนำมาใช้ในศึกษาครั้งนี้

ตัวอย่างงานวิจัยที่มีการศึกษาในพืชกลุ่มเดียวกับแหนใหญ่ เช่น ไข่น้ำ (*Wolffia globosa*) จัดเป็นพืชที่มีความน่าสนใจต่อนักชีววิทยาหลายคนเนื่องจากเป็นพืชดอกที่มีขนาดเล็กที่สุดในโลก มีการนำมาใช้เป็นพลังงานชีวภาพ (bioenergy) หรือ biorefining และในการศึกษาระดับโมเลกุลพบว่า มีความซับซ้อนของจีโนมสูงและมีความไม่แน่นอนที่เกี่ยวกับวิธีการ transformation แบบ stable และมีการวิจัยพัฒนาการ transformation ทั้งชนิด stable และ transient ในไข่น้ำ โดยใช้ *A. tumefaciens* ในการขนส่งยีนเข้าสู่ไข่น้ำ พบว่าวิธี transformation แบบ transient มีการเพิ่มจำนวนของไข่นำสูงขึ้นถึง 21.8% ภายในระยะเวลา 18 วัน และ ขณะเดียวกัน transformation แบบ stable มีการใช้ส่วนของแคลลัสที่เกิด cluster พบว่ามีการจำนวนของไข่น้ำสูงขึ้นถึง 0.14% ภายในระยะเวลา 65 วัน (20) ดังนั้นจะเห็นว่าวิธีการ transient transformation เป็นวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนของไข่น้ำได้เร็วและมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธี stable transformation

Transient transgene expression ด้วยวิธี Agroinfiltration

การนำวิธี transient transgene expression มาใช้สำหรับการถ่ายโอนยีนที่สนใจหรือยีน GFP เข้าสู่แหนใหญ่สามารถทำได้หลายเทคนิค ดังต่อไปนี้ ได้แก่

1. Co-cultivation เป็นวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชแบบปลูกร่วมและเป็นวิธีที่ง่ายแต่มีประสิทธิภาพระดับต่ำ

2. Syringe infiltration เป็นวิธีการใช้เข็มในการนำส่ง มีประสิทธิภาพระดับกลาง โดยมีการทำลายเซลล์พืชบริเวณที่ฉีด

3. Vacuum infiltration เป็นวิธีแช่ต้นแหนใหญ่พร้อมในกับสารแขวนตะกอนที่มี *A. tumefaciens* ภายใต้ความดันต่ำ โดยกระบวนการนี้ทำให้ *A. tumefaciens* สัมผัสกับเซลล์ของต้นแหนใหญ่ ทำให้นำส่งยีนได้อย่างรวดเร็ว และสามารถทำได้ในปริมาณมาก ๆ

ในปี 2011 มาได้มีการพัฒนาเทคนิคการนำส่งยีนในกล้วย โดยใช้ *A. tumefaciens* ได้แก่ สายพันธุ์ (strain) EHA105, EHA101 และ LBA4404 เป็นต้น ภายใต้วิธีการ sonication และ vacuum infiltration โดยพบว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ประสบความสำเร็จและใช้เวลาเพียง 1 นาทีเท่านั้น (21) นอกจากนี้เคยมีการนำส่ง vector ZYMV-AGII ในพืชตระกูลแตง (22) *A. tumefaciens* KYRT เข้าสู่เมล็ดถั่วเหลืองภายในระยะเวลา 2 นาที (23) โดยอาศัยเทคนิค vaccum หรือ syringe

infiltration ในใบข้าว (24) ใบยาสูบ และใบเบญจมาศ เป็นต้น (25) หรือการใช้สองวิธีร่วมกันระหว่าง sonication ร่วมกับ vacuum อีกทั้งเคยมีการศึกษาการถ่ายโอนยีน EGFP นำส่งเข้าสู่ไข่น้ำ (26) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Lamnacea เช่นเดียวกับแหนใหญ่ จากที่กล่าวมาเห็นได้ว่ามีการนำส่งยีนด้วยวิธี vacuum infiltration กันอย่างแพร่หลายและประสบผลสำเร็จ ดังนั้น วิธีการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชอาศัยเทคนิค vacuum infiltration สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ภายในระยะเวลาอันสั้น รวดเร็วและได้ประสิทธิภาพ ภายใต้ช่วงเวลาและสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการนำมาใช้ในการพัฒนาวัคซีนในแหนใหญ่โดยมีการนำยีนที่สนใจและที่มีความสำคัญในการสร้างภูมิคุ้มกันต้านต่อเชื้อโรคต่าง เช่น วัคซีนไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดยมีการนำส่วนของ M2e peptide ที่มีตำแหน่ง epitope ที่สำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส โดยอาศัย *A. tumefaciens* strain CBE21 นำยีนที่สนใจเข้าไปในแหนใหญ่พบว่าแหนใหญ่สามารถผลิตโปรตีน M2e ในปริมาณ 40 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักพืชสดได้ (27)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำข้อมูลที่มีการรายงานวิจัยมาก่อนนำมาประยุกต์ใช้ โดยทำการศึกษาวิธีการเหนี่ยวนำยีน GFP เข้าไปในแหนใหญ่ภายใต้ช่วงเวลาของการถ่ายโอนยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* และศึกษาช่วงเวลาใดมีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนได้ดีที่สุด รวมถึงศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ได้ในแหนใหญ่ ด้วยวิธีการตรวจสอบโปรตีน GFP โดยวิธี western blot ที่ถูกจับด้วยแอนติบอดี GFP และตรวจสอบการเรืองแสงของยีน GFP ในแหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายฝากยีนภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 Autoclave (HICLAVE® HVA-85, Japan)

1.1.2 Auto pipette (Dragonlab, China)

1.1.3 Centrifuge (Hermile z 323 k, Germany)

1.1.4 Centrifuge (Faithful®, China)

1.1.5 Shaker (Gerhardt, Germany)

1.1.6 Hot air oven (SHEL LAB SL 1375 FX Sheldon manufacturing. Inc)

1.1.7 Spectrophotometer (Spectronic 15, India)

1.1.8 Analytical balance 4 digits (Mettler Toledo, USA)

1.1.9 Plasmid minikit (Omega bio-TEX, USA)

1.1.10 Laboratory film (Parafilm®, USA)

1.1.11 Water bath (KQY®, China)

1.1.12 pH meter (Ultrabasic UB-10, USA)

1.1.13 Refrigerator (Beko, Thailand)

1.1.14 Microwave (Toshiba®, Thailand)

1.1.15 Western blot (Bio-rad, USA)

1.2 สารเคมี

1.2.1 Glufosinate (Erabas®, Thailand)

1.2.2 Sodium hypochlorite (Haiter®, Thailand)

1.2.3 Yeast extract (Oxoid, USA)

1.2.4 Tryptone (Oxoid, USA)

1.2.5 Acetosyingone (P hytotech lab®, USA)

1.2.6 MS medium (Phytotech lab®, USA)

1.2.7 TEMED (Himedia®, India)

1.2.8 Coomassie brilliant blue R-250 (PanReac AppliChem®, Germany)

1.2.9 Methanol (QReC®, USA)

1.2.10 Ethanol (RCl Labscan™, USA)

1.2.11 Absolute Ethanol 99.9% (QReC®, USA)

1.2.12 Acetic acid (EMSURE®, USA)

1.2.13 Glycerol (Glentham life sciences, USA)

1.2.14 Phenylmethylsulfonyl fluoride (Goldbio, USA)

1.2.15 Rabbit monoclonal GFP antibody (Signaling tecnology®, USA)

1.2.16 Goat anti-rabbit IgG conjugated HRP antibody (Signaling tecnology®, USA)

1.2.17 Tween 20 (Glentham life sciences, USA)

1.2.18 Tween 80 (KC, Thailand)

1.2.19 Sucrose (Univar, USA)

1.2.20 Tris (Glentham life sciences, USA)

1.2.21 LB nutrient agar (Solarbio®, China)

1.2.22 Sodium chloride (Univar, USA)

1.2.23 Glycine (Glentham life sciences, USA)

1.2.24 Ammonium persulphate (Himedia®, India)

1.2.25 30% Acrylamide/Bis solution (Bio-Rad, USA)

1.2.26 Western blotting luminal reagent (Santa Cruz Biotechnology, Germany)

1.2.27 PVDF membrane (Bio-rad, USA)

1.2.28 Skimmed milks (Himedia®, India)

1.3 ยาปฏิชีวนะ

1.3.1 Ceftriaxone (T.P®, Thailand)

1.3.2 Gentamycin (Grand Pharmaceutical, China)

1.3.3 Spectinomycin (Goldbio, USA)

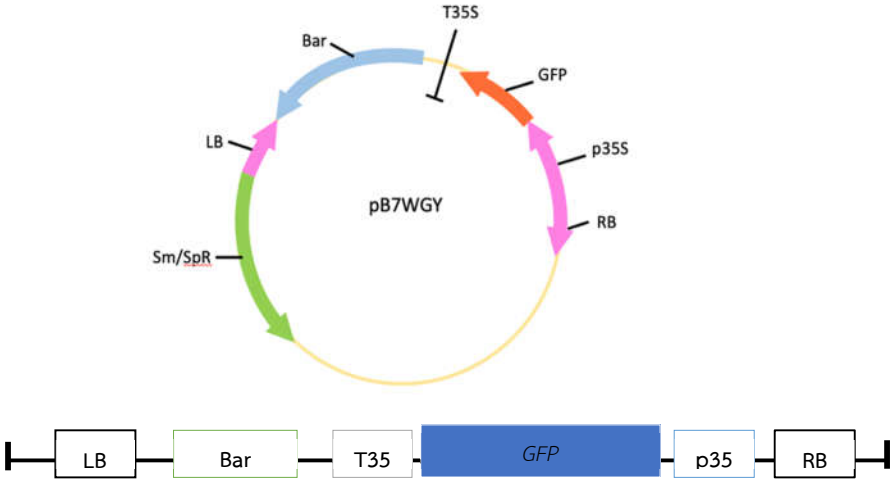
2. วิธีดำเนินการทดลอง

2.1 การเพาะเลี้ยงแหนใหญ่ในห้องทดลอง

เก็บตัวอย่างแหนใหญ่จากบริเวณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา 2-3 ครั้งเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกให้หมด แล้วนำมาตัดรากและล้างด้วยน้ำ DI (Deionized water) จนกำจัดสิ่งสกปรกออกหมดและแช่ในน้ำ DI เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยน้ำยา 0.9% NaClO นาน 2 นาที แล้วล้างต่อด้วยน้ำ DI จำนวน 3 รอบ รอบละ 1 นาที จากนั้นนำแหนใหญ่ไปเลี้ยงบนอาหาร MS ใส่แหนใหญ่ขวดละ 10-15 ต้น โดยเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นระยะเวลา 14 วัน แล้วถ่ายลงแหนใหญ่ในอาหารเหลวสูตร Hoagland's E เพื่อให้แหนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีแล้วเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า โดยเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นระยะเวลา 14 วัน

2.2 การเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอ็นเอ pB7WGY-GFP

รีคอมบิแนนพลาสมิดดีเอ็นเอ pB7WGY-GFP จัดเป็น binary Ti vector โดยรีคอมบิแนนพลาสมิดดีเอ็นเอ pB7WGY-GFP (**แสดงดังรูปที่ 4**) ประกอบด้วย streptomycin-spectinomycin resistance gene (SM/SpR), left border (LB), glufosinate resistance gene (Bar), terminator gene (T35S), green fluorescence protein (GFP) และ promoter gene (p35S) ตามลำดับ ซึ่งรีคอมบิแนนพลาสมิดดีเอ็นเอ pB7WGY-GFP สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* DH5α และสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ พลาสมิดที่มียีน GFP ที่ได้จะถูกเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมใช้สำหรับการถ่ายโอนยีนเข้าสู่แหนใหญ่ต่อไป



รูปที่ 4 ภาพแสดงการออกแบบพลาสมิดดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับการแสดงของโปรตีน GFP ในแหนใหญ่

2.3 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้านและการถ่ายโอนยีนในแหนใหญ่

2.3.1 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน *A. tumefaciens* GV3101

นำเชื้อ *A. tumefaciens* GV3101 จาก stock ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง LB medium (Lysogeny Broth) ปริมาตร 25 ml ที่มียาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml ปริมาตร 12.5 µl แล้วบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเชื้อที่สมบูรณ์ 1 colony ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 ml ที่มียาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml ปริมาตร 2.5 µl และเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่600 nm ให้อยู่ในช่วง 0.6-0.8 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงจนได้ส่วนที่เป็นตะกอน ละลายตะกอนด้วย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 20 mM ปริมาตร 500 µl และเติม glycerol ปริมาตร 214 µl บนน้ำแข็ง ผสมให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่หลอดและเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมทำเป็น stock หรือนำไปใช้สำหรับการทดลองถัดไป

2.3.2 การนำยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* สายพันธุ์ DH5α โดยอาศัยวิธี heat shock

นำพลาสมิด pB7WGY-GFP ลงในเชื้อ (*E.coli)* สายพันธุ์ DH5α นำไป heat shock ที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที แล้วแช่ในน้ำแข็งอีก 5 นาที นำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 µl บ่มเชื้อต่ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบที่ 170 rpm นาน 1 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงจนได้ส่วนที่เป็นตะกอน เทอาหารออก 800 µl ที่เหลือนำมา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แบบแข็ง

ที่เติม spectinomycin ความเข้มข้น 200 μg/ml ปริมาตร 50 μl เลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้ไปสกัดพลาสมิดและนำไปใช้สำหรับการทดลองถัดไป

2.3.3 การสกัดพลาสมิด pB7WGY-GFP

คัดเลือก 1 single colony ที่มีลักษณะสีขาวที่คาดว่าได้รับการถ่ายโอนยีน ใส่ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 ml ที่มี spectinomycin ความเข้มข้น 200 μg/ml ปริมาตร 10 μl แล้วทำการบ่มเป็นเวลา 16±8 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อที่โตใส่ eppendorf โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 5 นาที นำส่วนตะกอนที่ได้เติม solution I (ที่ผสม RNase A) ปริมาตร 250 μl ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อให้ตะกอนละลายและเพื่อทำลายผนังเซลล์ จากนั้นเติม solution II ปริมาตร 250 μl ลงไปเพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ในขั้นตอนนี้จะทำให้พลาสมิดเกิดการแยกออกมาจากเซลล์ โดยทำการพลิก eppendorf ไปมาจนใส จากนั้นทิ้งไว้ 5-10 นาที แล้วเติม solution III ปริมาตร 350 μl เพื่อปรับค่า pH ให้เป็นกลางและตกตะกอนพลาสมิด นำมาปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 10 นาที จากนั้นปิเปต supernatant ลงใน Hibind DNA Column 2 ml ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที แล้วเติม HBC buffer dilute 100% isopropanol 500 μl ปั่นเหวี่ยงต่อที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที นำ column มาเติม DNA wash buffer ที่ dilute ด้วย 100% EtOH ปริมาตร 700 μl ปั่นเหวี่ยงต่อที่ 12,000 rpm นาน 30 นาที (ทำซ้ำ 2 รอบ) เมื่อครบแล้วให้ปิเปตสารออก ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 10 นาที เพื่อทำให้ column แห้ง แล้วย้าย mini column ส่วนบนใส่ eppendorf เติม elution buffer ปริมาตร 30 μl เพื่อทำการชะล้างพลาสมิดออกจาก column แล้วนำมาปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 1 นาที นำพลาสมิดที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.4 การนำยีนเข้าสู่ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี heat shock

นำพลาสมิด pB7WGY-GFP ลงในเชื้อ *A. tumefaciens* แล้วทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสนาน 2 นาทีและต่อด้วยการบ่มบนน้ำแข็งนาน 30 นาที นำเซลล์ที่ได้ไป spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 μg/ml ปริมาตร 12.5 μl และ spectinomycin ความเข้มข้น 200 μg/ml ปริมาตร 50 μl ทำการเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จนปรากฏ colony สีขาวบนอาหาร

2.3.5 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่แหนใหญ่ (*Spirodela polyrrhiza* L.)

2.3.5.1 การเตรียมเซลล์

คัดเลือก colony จำนวน 1 single colony จากขั้นตอน 2.3.4 ลงไปในอาหารเหลว LB ปริมาตร 15 ml และเติมยาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 μg/ml ปริมาตร 7.5 μl และ spectinomycin ความเข้มข้น 200 μg/ml ปริมาตร 30 μl จากนั้นบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบแล้วจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 600 nm โดยค่า OD ต้องมีค่ามากกว่า 2 และทำการปิเปตอาหารเหลวที่มีเชื้อในอาหารใหม่ (10 % inoculum) ที่เติมยาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 μg/mlปริมาตร 25 μl และ spectinomycin ความเข้มข้น 200 μg/ml ปริมาตร 100 μl ความเร็วรอบในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 230 rpm เลี้ยงต่อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสง OD600 nm เท่ากับ 2 ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ 5,000 rpm นาน 10 นาที ทำการเทอาหารทิ้งและละลายตะกอนด้วยอาหารเหลว MS1 เติม 1% sucrose, 100 μM acetosyringone, 0.2% tween–80, pH 5.84 และทำการวัดค่า OD600 nm เท่ากับ 0.5 เพื่อใช้สำหรับขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่แหนใหญ่ต่อไป

2.3.5.2 การถ่ายโอนยีน GFP เข้าสู่แหนใหญ่

นำเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ละลายด้วยอาหาร MS เติม 1% sucrose, 100 μM acetosyringone , 0.2% tween–80, pH 5.84 ใส่ลงในขวด flask แล้วใส่แหนใหญ่ที่ผ่านการทำให้เกิดบาดแผล ทำการ vacuum เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที ภายใต้ความดันสุญญากาศ 60 mmHg เมื่อครบเวลาแล้ว นำมาพักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นซับแหนใหญ่บนกระดาษกรองพอหมาด แล้วย้ายแหนใหญ่ลงในขวดที่มีกระดาษกรองที่เติมด้วย MS1* ที่ประกอบไปด้วยอาหาร MS เติม 1% sucrose, 100 μM acetosyringone, pH 5.84 ปริมาตร 3-5 ml แล้วย้ายแหนใหญ่ลงไปในอาหารแข็งคัดเลือก ได้แก่ MS, MS2 และ MS3 โดย MS2 ประกอบด้วยอาหาร MS, 1% sucrose, 100 μM acetosyringone, 250 mg/l ceftriaxone, 0.8% agar, pH 5.84 และ MS3 ประกอบไปด้วยอาหาร MS, 1% sucrose, 100 μM acetosyringone, 250 mg/l ceftriaxone, 0.01 mM glufosinate, 0.8% agar, pH 5.84 โดยแบ่งเป็น 2 สภาวะ ได้แก่ ส่วนที่ 1 ทำการห่อ foil เพื่อกันแสง (ในสภาวะที่มืด) และส่วนที่ 2 ไม่ห่อ foil เพื่อให้แสง (ในสภาวะที่สว่าง) แล้วเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้การให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลานาน 1, 2 และ 3 วัน หลังจากนั้นให้ทำการเก็บข้อมูลแหนใหญ่ที่รอดตายบนอาหารคัดเลือกที่เติม (MS3) และไม่เติมสารกำจัดวัชพืช glufosinate (MS2) และเจริญโดยเพิ่มจำนวนหลังการเลี้ยงนาน 3-4 วัน ซึ่งทำให้สามารถแยกแหนใหญ่ที่ได้รับยีนคัดเลือก คือ bar gene ที่ต้านต่อสารกำจัดวัชพืช glufosinate ออกจากแหนใหญ่ที่ไม่ได้รับยีน GFP ได้ โดยให้ทำการเปรียบเทียบร่วมกับแหนใหญ่ที่

ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน GFP ให้จัดเป็นกลุ่มควบคุมแบบลบโดยเลี้ยงไว้บนอาหารแข็ง MS ที่เติม 1% sucrose

2.3.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน GFP จากการเรืองแสงด้วยด้วยกล้องจุลทรรศน์

นำแหนใหญ่ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนที่โตบนอาหาร MS ที่เติม 1% sucrose, MS2 และ MS3 รวมทั้งแหนใหญ่ที่ไม่ถูกถ่ายโอนยีนจัดเป็นกลุ่มควบคุมแบบลบโดยเลี้ยงไว้บนอาหารแข็ง MS ที่เติม 1% sucrose โดยนำแหนใหญ่จาก 54 ตัวอย่าง ๆ ละ 3 ต้น เทียบกับแหนใหญ่ที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน นำมา fix บนแผ่นสไลด์ แล้วนำไปตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้กล้อง fluorescence microscope (Nikon Eclipse TS2, Japan) ทำการคัดเลือกแหนใหญ่ที่ให้ผลการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนำมาใช้ในการสกัดโปรตีน

2.4 การสกัดโปรตีนและการตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี western blot

2.4.1 การสกัดโปรตีนจากแหนใหญ่ (*Spirodela polyrrhiza* L.)

นำใบแหนใหญ่ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนมาบดในไนโตรเจนเหลวเติมสารละลาย lysis buffer pH 8 ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris HCl, 300 mM NaCl, 2% glycerol, 1 mM PMSF ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนครบ 1,000 ml และปรับ pH เป็น 8 นำส่วนผสมที่สกัดได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายโปรตีนส่วนบน เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนบนแผ่นเจล SDS-PAGE และ western blot ต่อไป หรือเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.4.2 วิธีการวิเคราะห์โปรตีนบนแผ่นเจล SDS-PAGE

เตรียมกระจกสำหรับการเตรียมเจล SDS-PAGE และนำไปประกอบกับ electrophoresis set เริ่มต้นจากการเตรียม 12% separating gel ซึ่งประกอบไปด้วย DI ปริมาตร 1.65 ml, 30% acrylamine (29:1) ปริมาตร 2 ml, 1.5 M Tris HCl (pH 8.8) ปริมาตร 1.25 ml, 10% SDS ปริมาตร 50 µl, 10% AP ปริมาตร 50 µl และ TEMED ปริมาตร 4 µl ตามลำดับ จากนั้นบรรจุลง electrophoresis set แล้วทำการปิเปตน้ำ DI ตามลงไปจนล้นออกมา รอจนเจลแข็งตัว นาน 30 นาที เมื่อเสร็จขั้นตอนแรกแล้วจึงทำการเตรียม 4% spacer gel ซึ่งประกอบไปด้วย DI ปริมาตร 86.6 µl, 30% acrylamine (29:1) ปริมาตร 260 µl, 1.5 M Tris HCl (pH 6.8) ปริมาตร 394 µl, 10% SDS ปริมาตร 16 µl, 10% AP ปริมาตร 16 µl และ TEMED ปริมาตร 2 µl ตามลำดับ จากนั้นบรรจุลง electrophoresis set โดยใส่

หวีให้เกิดหลุม (well) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที เมื่อเจลแข็งตัวแล้วจึงดึงหวีออก นำกระจกไปต่อเข้ากับตัวประกบของ electrophoresis chamber จากนั้นเติม 1X SDS-Running buffer ปริมาตร 200 ml จาก 5X SDS-Running buffer ซึ่งประกอบด้วย Tris Base ปริมาณ 15.1 g, glycine ปริมาณ 72 g, SDS ปริมาณ 5 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนครบปริมาตร 1,000 ml ลงใน chamber ให้ท่วมเจลทั้งบนและล่าง ต่อมาทำการเติมสารสกัดโปรตีนที่เตรียมไว้ลงในหลุม ปริมาตร 20 µl ที่ผสมด้วย SDS loading dye และให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 80 โวลต์นาน 20 นาที แล้วปรับความต่างศักย์ให้สูงขึ้นที่ 120 โวลต์ จนสีของ SDS loading dye เคลื่อนไปชิดขอบเจลด้านล่างสุดของกระจก จากนั้นนำเจลออกจากกระจกและวางลงในสีย้อม staining solution ปริมาตร 20-25 ml (R-250 ปริมาณ 0.5 g, MeOH ปริมาตร 100 ml, acetic Acid ปริมาตร 50 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนครบปริมาตร 500 ml) ร่วมกับการเขย่าข้ามคืน จากนั้นจึงทำการล้างสีย้อมด้วย destaining solution (EtOH ปริมาตร 200 ml, acetic acid ปริมาตร 100 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนครบปริมาตร 1,000 ml) นาน 10 นาที 3-4 รอบ สลับกับการให้ความร้อน จนแผ่นเจลใส เห็นแถบโปรตีนชัดเจนและบันทึกภาพ

2.4.3 วิธีการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี western blot

นำสารสกัดโปรตีนจากกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม (wild type) ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีข้างต้น นำมาแยกบน 12% SDS-PAGE แล้วถ่ายโอนโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรนโดยอาศัย western buffer tank นำแผ่นเมมเบรนที่ได้ ไป blocking ด้วย 5% skimmed milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 90 rpm (skim milk ปริมาณ 1 g ใน TBST buffer ปริมาตร 20 ml) ซึ่ง TBST buffer ประกอบด้วย NaCl ปริมาณ 8 g, KCl ปริมาณ 0.2 g , Tris ปริมาณ 3 g จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนครบปริมาตร 1,000 ml แล้วเติม Tween ปริมาตร 1 ml) ต่อมานำมาล้าง TBST buffer ทิ้ง 1 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วย TBST buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วติดตามผล (detection) โดยการบ่มแผ่นเมมเบรนด้วย primary antibody (Rabbit monoclonal GFP antibody) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาล้าง TBST buffer ทิ้ง 1 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วย TBST buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาทีและบ่มต่อด้วย secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG conjugated HRP antibody) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วย TBST buffer ทิ้ง 1 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วย TBST buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาทีก่อนนำไปเคราะห์ผลและบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation ต่อไป

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

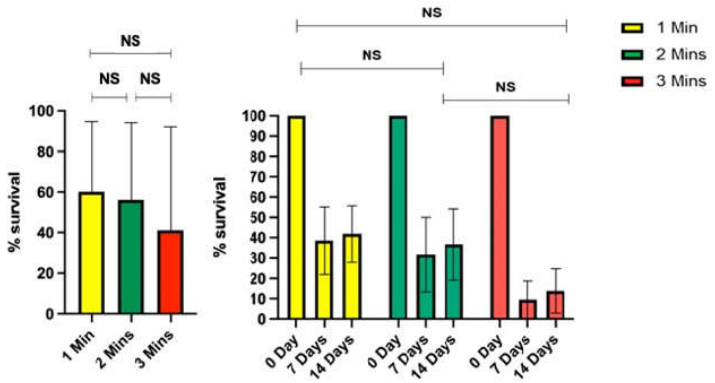
GraphPad Prism เวอร์ชั่น 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ถูกนำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองและการสร้างรูปแบบกราฟ วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ถูกนำมาใช้เพื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มการทดลองทั้งหมดที่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$) และข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลและวิเคราะห์ผลการวิจัย

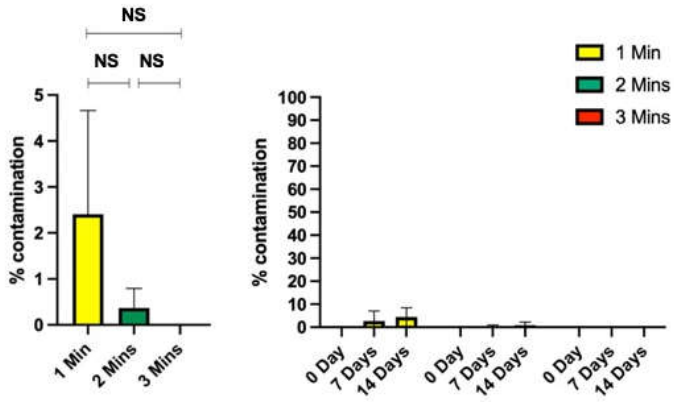
4.1 ผลการทดสอบการนำแหนใหญ่มาทำให้ปราศจากเชื้อ

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบปริมาณของ 0.9% NaClO ที่เหมาะสมในการทำให้แหนใหญ่ปราศจากเชื้อ ก่อนนำแหนใหญ่มาทำการเลี้ยงลงบนอาหารแข็งสูตร MS เพื่อเตรียมแหนใหญ่สำหรับการถ่ายโอนยีนในขั้นถัดไป โดยได้ทำการทดสอบ ณ เวลาที่ 1, 2 และ 3 นาทีตามลำดับ



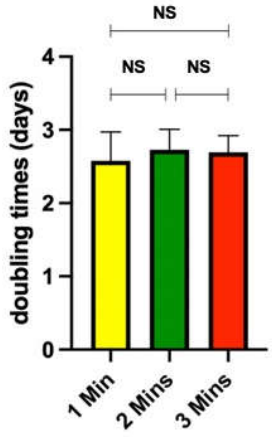
รูปที่ 5 แสดงอัตราการรอดของแหนใหญ่เมื่อทำให้ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO โดยค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, กลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ เมื่อ ($p<0.05$)

เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการรอดของแหนใหญ่ โดยการทำให้ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหารแข็งสูตร MS พบว่าแหนใหญ่ที่มีอัตราการรอดมากที่สุด มีการใช้ 0.9% NaClO ทำให้ปราศจากเชื้อที่ระยะเวลา 1 นาที อยู่ที่ 26.79 ± 23.26 และระยะเวลา 2 นาทีอยู่ที่ 56.11 ± 38.09 ตามลำดับ ส่วนแหนใหญ่ที่มีอัตราการรอดน้อยที่สุดมีการใช้0.9% NaClO ทำให้ปราศจากเชื้อที่ระยะเวลา 3 นาที อยู่ที่ 41.10 ± 51.05 ดังนั้น ระยะเวลาที่ทำให้แหนใหญ่ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClOเหมาะสมที่สุดคือ ระยะเวลา ที่ 1 นาที และ 2 นาทีตามลำดับ

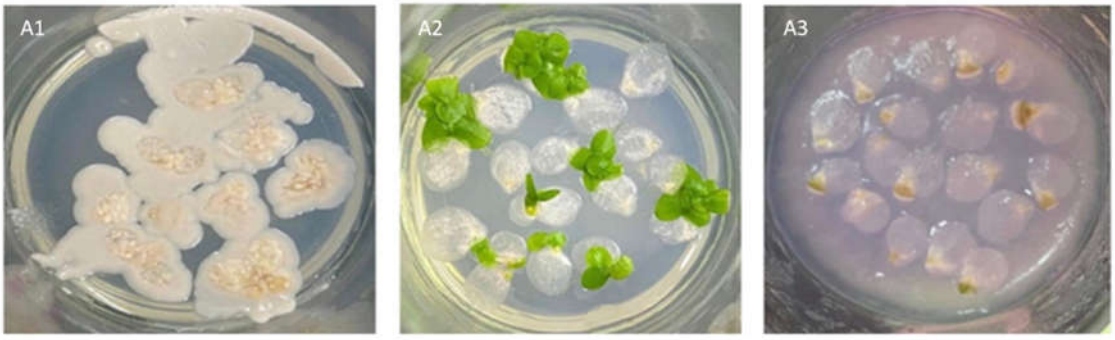


รูปที่ 6 แสดงอัตราการปนเปื้อนของเชื้อหลังจากการทำให้ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO โดยค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, กลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ ($p<0.05$)

เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการปนเปื้อนเชื้อของแหนใหญ่เมื่อทำให้ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเลี้ยงต่อในอาหาร MS medium พบว่าแหนใหญ่ที่มีอัตราการปนเปื้อนเชื้อมากที่สุด คือแหนใหญ่ทำให้ปราศจากเชื้อในระยะเวลา 1 นาที อยู่ที่ 2.405 ± 2.258 ส่วนแหนใหญ่ที่มีอัตราปนเปื้อนเชื้อน้อยที่สุดโดยทำให้ปราศจากเชื้อในระยะเวลา 2 นาทีอยู่ที่ 0.3706 ± 0.4243 และระยะเวลาที่ 3 นาทีไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อเลย ดังนั้นระยะเวลาที่ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 2 และ 3 นาที มีความเหมาะสมทำให้แหนใหญ่ปราศจากเชื้อได้อย่างเหมาะสมที่สุด



รูปที่ 8 แสดงการเจริญเติบโตของแหนใหญ่เป็นสองเท่าหลังจากการทำให้ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO โดยค่าเฉลี่ย, กลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ ($P<0.05$)



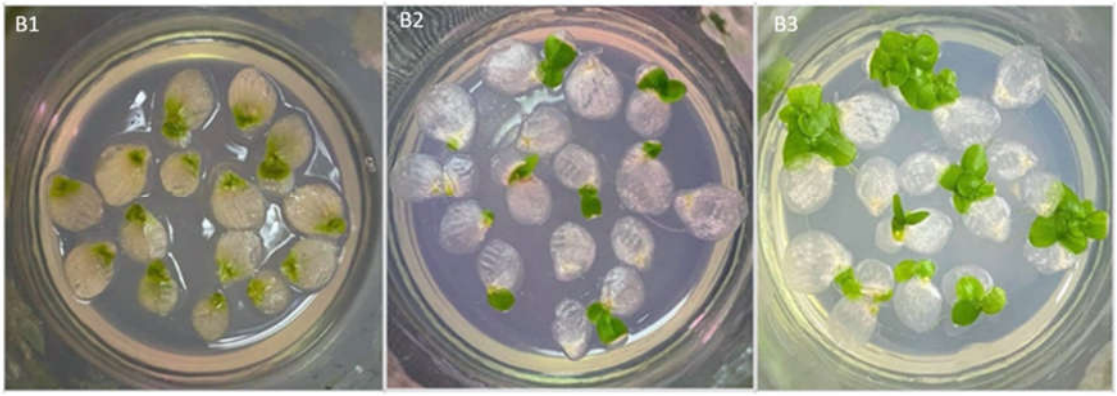
รูปที่ 7 แสดงการรอดและการปนเปื้อนของเชื้อหลังจากการทำให้ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO ในระยะเวลาแตกต่างกัน A1: 1 นาที, A2: 2 นาที และ A3: 3 นาที เป็นเวลา 14 วัน

เมื่อทำการเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนของแหนใหญ่ (doubling time) เมื่อทำให้ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO ในระยะเวลาที่แตกต่างกันโดยนำ แหนใหญ่ที่เลี้ยงในอาหาร MS medium มาเลี้ยงต่อในอาหาร E-medium พบว่าแหนใหญ่ที่มีการเพิ่มจำนวนน้อยที่สุด คือ การทำให้ปราศจากเชื้อในระยะเวลา 1 นาที การเพิ่มจำนวนของแหนใหญ่ 2.578 เท่า ส่วนแหนใหญ่ที่มีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด คือ แหนใหญ่ที่ทำให้ปราศจากเชื้อในระยะเวลา 2 และ 3 นาที การเพิ่มจำนวนของแหนใหญ่อยู่ที่ 2.729 เท่า, 2.693 เท่า ตามลำดับ ดังนั้น ระยะเวลาที่ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 1, 2 และ 3 นาที ทำให้แหนใหญ่เพิ่มจำนวนได้อย่างเหมาะสม ไม่ได้แตกต่างกัน

4.2 ผลการเจริญเติบโตของแหนใหญ่ในอาหารเพาะเลี้ยง

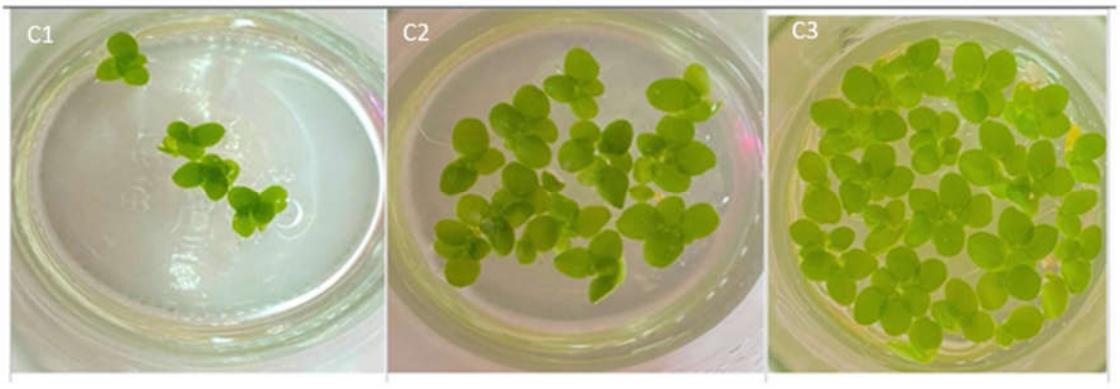
หลังจากการทำให้แหนใหญ่ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO ณ เวลาต่าง ๆ แล้วจึงทำการย้ายแหนใหญ่เพื่อเลี้ยงต่อลงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 14 วัน เพื่อปรับสภาพและมีชีวิตรอด จากนั้นจึงย้ายลงอาหารเหลวสูตร Hoagland's E ต่ออีก 14 วัน เพื่อเพิ่มจำนวนแหนใหญ่ก่อนนำแหนใหญ่มาถ่ายโอนยีน GFP ต่อไป

4.2.1 อาหารแข็งสูตร MS



รูปที่ 9 ภาพแสดงการรอดของแหนใหญ่หลังจากการทำให้ปราศเชื้อด้วย 0.9% NaClO ระยะเวลา 2 นาที B1 : 0 วัน, B2 : 7 วัน และ B3 :14วัน

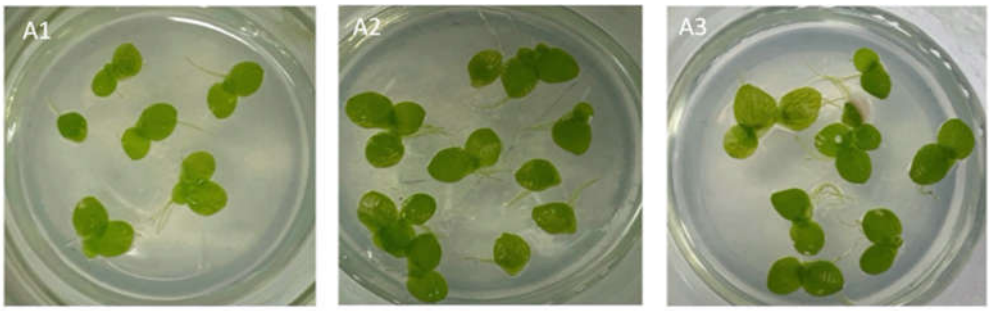
4.2.2 อาหารเหลวสูตร Hoagland's E



รูปที่ 10 ภาพแสดงการเพิ่มจำนวนของแหนใหญ่ใน C1: 0 วัน, C2: 7 วัน และ C3: 14วัน

4.2.3 อาหารคัดเลือกหลังการถ่ายโอนยีน MS, MS2 และMS3

หลังจากนำแหนใหญ่มาทำการถ่ายโอนยีน GFP แล้วจึงมีการนำแหนใหญ่มาเลี้ยงในอาหารคัดเลือก ซึ่งได้แก่ อาหารแข็งสูตร MS, MS2 (MS, 1% sucrose, 100 µM acetosyringone, 250 mg/l ceftriaxone, 0.8% agar, pH 5.84) และ MS3 (MS, 1% sucrose, 100 µM acetosyringone, 250 mg/l ceftriaxone, 0.01 mM glufosinate, 0.8% agar, pH 5.84) ในสภาวะสว่างและมืด บ่มเป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วันตามลำดับ เพื่อดูอัตราการรอดและการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงต่อไป

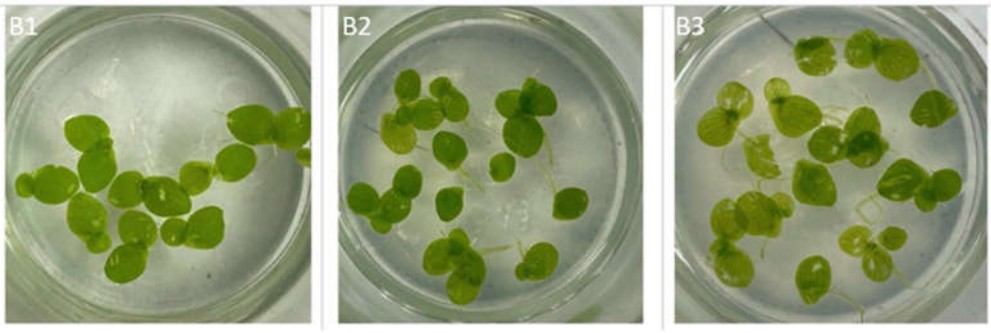


รูปที่ 11 ภาพแสดงการรอดของแหนใหญ่หลังจากการถ่ายโอนยีนบนอาหารคัดเลือก MS ซึ่งมีตัวอย่างดังนี้

A1: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน

A2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 1 วัน

A3: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 1 วัน

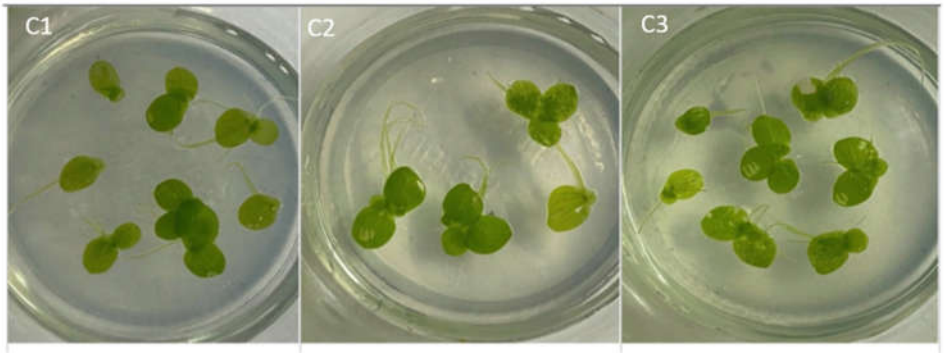


รูปที่ 12 ภาพแสดงการรอดของแหนใหญ่หลังจากการถ่ายโอนยีนบนอาหารคัดเลือก MS2 ซึ่งมีตัวอย่างดังนี้

B1: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 1 วัน

B2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 1 วัน

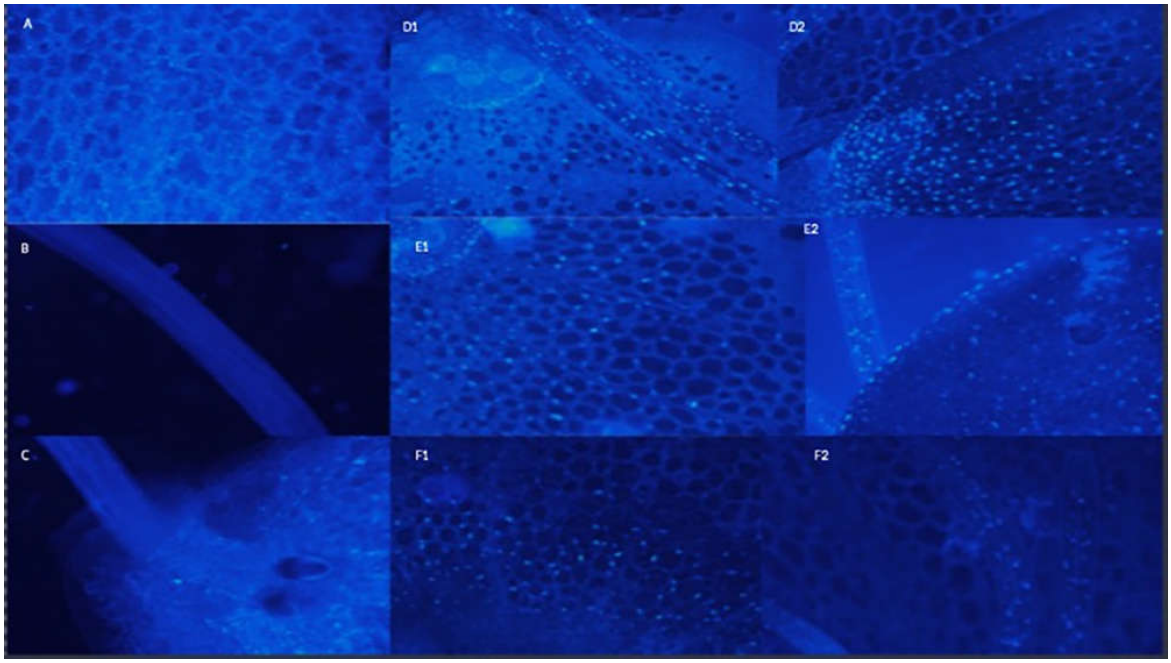
B3: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 1 วัน



รูปที่ 13 ภาพแสดงการรอดของแหนใหญ่หลังจากการถ่ายโอนยีนบนอาหารคัดเลือก MS3 ซึ่งมีตัวอย่างดังนี้
C1: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 1 วัน
C2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 1 วัน
C3: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน

4.3 ผลการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์

หลังจากทำการถ่ายโอนยีน GFP เข้าสู่แหนใหญ่ โดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นตัวนำในการพาเข้าสู่แหนใหญ่ ทั้งหมด 54 ตัวอย่าง ๆ ละ 3 ต้น และ Wild-type แล้วจึงมีการติดตามเพื่อตรวจสอบว่าแหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนได้มีการแสดงออกของยีน GFP หรือไม่ ซึ่งได้ทำการตรวจสอบโดยการนำแหนใหญ่มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) เพื่อติดตามการผลิตโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescence protein, GFP) โดยพบว่าแหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน GFP มีการผลิตโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเมื่อกระตุ้นด้วยแสงที่มีค่าพลังงานที่อยู่ในช่วงเดียวกัน หรือ สูงกว่า เช่น แสงสีเขียว (นาโนเมตร = 520-565 nm.) หรือ แสงสีน้ำเงิน (นาโนเมตร = 500-520 nm.) ในการตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยโปรตีนเรืองแสง GFP จะปรากฏเป็นสีเขียวอมเหลือง (นาโนเมตร = 520-590 nm.) และ Chlorophyll จะปรากฏเป็นสีแดง (นาโนเมตร = 625-740 nm.) (26) แต่เนื่องจากทางคณะผู้จัดทำมีเพียงแสงสีม่วง (นาโนเมตร = 380-435 nm.) (Epi-fluorescence) จึงได้ใช้สภาวะแสงดังกล่าว ภายใต้ฟิลเตอร์สีน้ำเงิน (blue filter) ได้ผลจากการส่องกล้องออกมาดั่งใน (รูปที่ 14, 15 และ 16 ตามลำดับ)



รูปที่ 14 ภาพแสดงออกของโปรตีนเรืองแสง GFP ในอาหารแข็งสูตร MS

A-C แหนใหญ่ทั่วไป (wild type)

D1: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

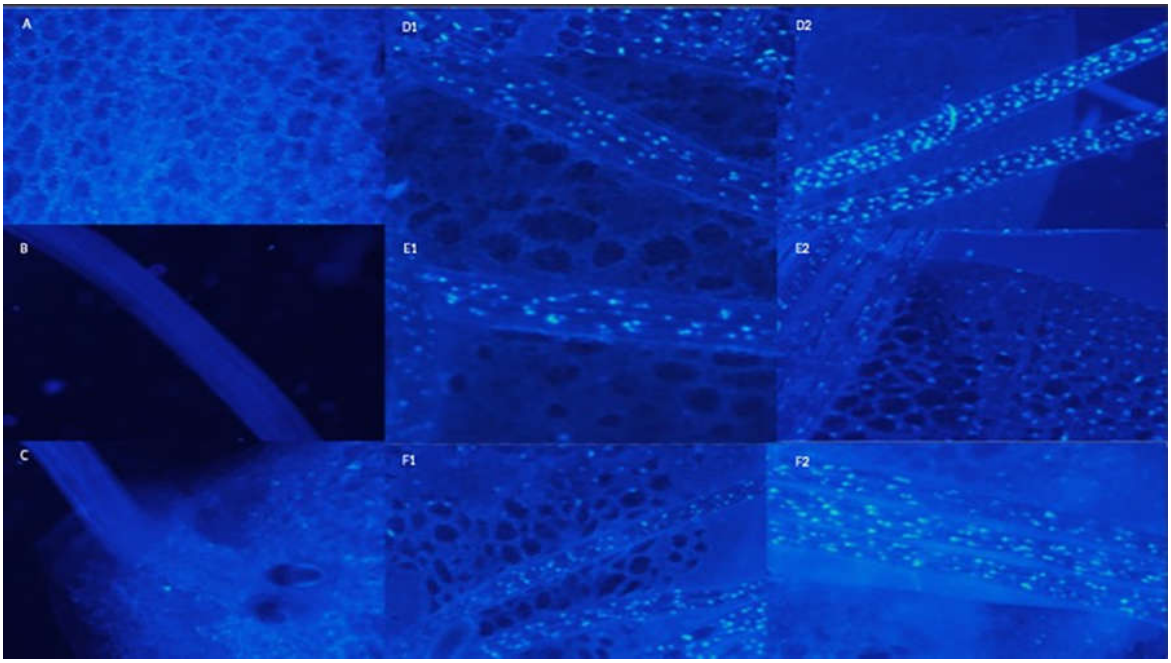
D2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

E1: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

E2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

F1: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

F2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 15 ภาพแสดงออกของโปรตีนเรืองแสง GFP ในอาหารแข็งสูตร MS2

A-C แหนใหญ่ทั่วไป (wild type)

D1: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

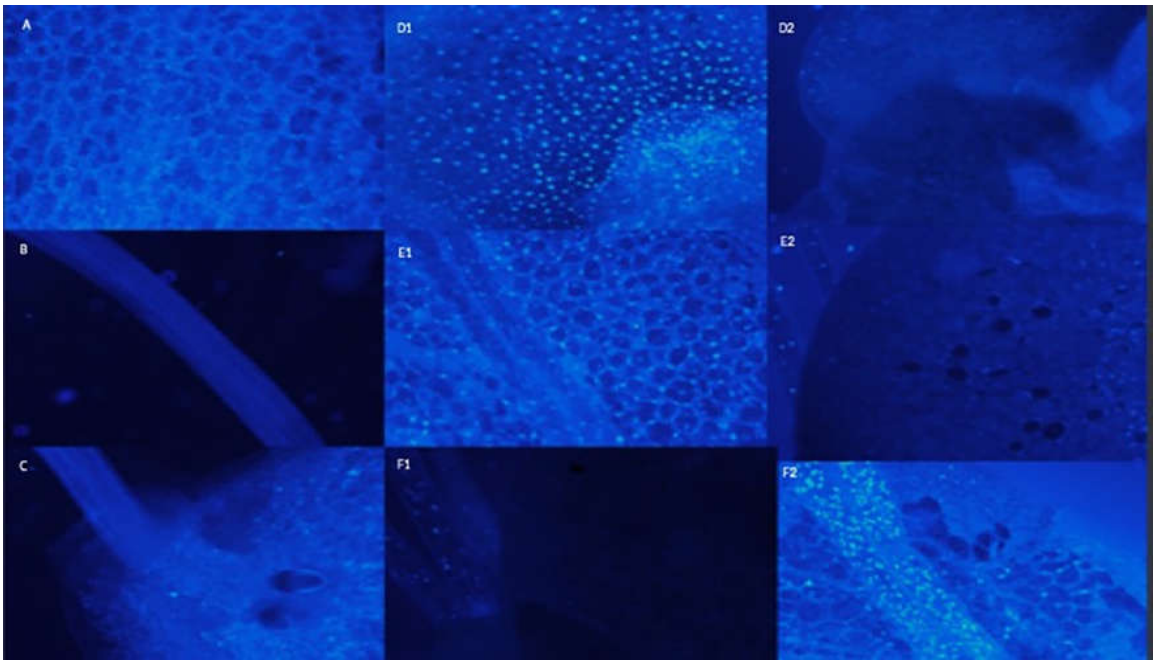
D2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

E1: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

E2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

F1: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

F2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 16 ภาพแสดงออกของโปรตีนเรืองแสง GFP ในอาหารแข็งสูตร MS3

A-C แหนใหญ่ทั่วไป (wild type)

D1: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

D2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

E1: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

E2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

F1: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

F2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

จากรูปภาพที่ 14, 15 และ 16 พบว่าเมื่อทำการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) โดยนำแหนใหญ่ที่ถ่ายโอนยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ไปตรวจสอบการเรืองแสงสีเขียวภายใต้การให้แสงสีม่วง ภายใต้ฟิลเตอร์สีน้ำเงิน (blue filter) ซึ่งเป็นขั้นตอนการตรวจสอบเบื้องต้น เพื่อที่จะพิสูจน์ว่าแหนใหญ่นั้นได้มีการถ่ายโอนยีน GFP ซึ่งการถ่ายโอนยีนนั้นเป็นการถ่ายโอนแบบไม่จำเพาะ กล่าวคือ ยีน GFP นั้นไม่สามารถกำหนดได้ว่าจะให้เข้าไปอยู่ในส่วนใดของแหนใหญ่ได้บ้าง ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่ายีน GFP นั้นมีการแทรกเข้าไปในส่วนของใบและรากของแหนใหญ่ จึงทำให้แหนใหญ่แต่ละต้นมีการ

แสดงออกของโปรตีนเรืองแสงที่ต่างกัน การส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) ในครั้งนี้ ตัวกล้องที่ใช้ไม่มีตัวแยกแสงในแต่ละช่วงแสง จึงไม่สามารถตัดการเรืองแสงรบกวนของคลอโรฟิลล์ออกได้ ซึ่งคลอโรฟิลล์มีช่วงของการดูดกลืนแสงที่ (นาโนเมตร = 400-500nm.) ส่วนโปรตีนเรืองแสงของเรามีค่าการดูดกลืนแสงที่ (นาโนเมตร = 515-530 nm.) ซึ่งพบว่าทั้งสองมีค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกัน จึงทำให้ภาพการเรืองแสงที่ได้อาจเกิดการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ร่วมด้วย หากแหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน GFP เข้าไปมากจะมีการเรืองแสงที่มากกว่าแหนใหญ่สายพันธุ์ทั่วไป (wild type) โดยจะสังเกตได้ว่าเมื่อกระตุ้นด้วยแสงสีฟ้าแหนใหญ่ที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน (wild type) จะไม่มีการเรืองแสงที่เมื่อเทียบกับแหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน โดยทางผู้จัดทำได้ทดลองนำแหนใหญ่มาถ่ายโอนยีนในช่วงเวลาที่ต่างกัน ได้แก่ ช่วงเวลาที่ 10, 20 และ 30 นาที เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ยีนจะถูกถ่ายเข้าไปในแหนใหญ่มากที่สุด หลังจากนั้นจึงทำการนำแหนใหญ่มาพักบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ได้แก่ อาหารแข็งสูตร MS, MS2 (MS, 1% sucrose, 100 μM acetosyringone, 250 mg/l ceftriaxone, 0.8% agar, pH 5.84) และ MS3 (MS, 1% sucrose, 100 μM acetosyringone, 250 mg/l ceftriaxone, 0.01 mM glufosinate, 0.8% agar, pH 5.84) เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วันตามลำดับ โดยทำการบ่มในสองสภาวะได้แก่ ที่สว่างและที่มืด ผลลัพธ์ที่ได้ จากรูปภาพที่ 14, 15 และ 16 สามารถตรวจสอบการเรืองแสงของโปรตีนเรืองแสง GFP ได้เบื้องต้น เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบ Western blot ต่อไป แหนใหญ่ที่ให้การเรืองแสงในใบและรากมากที่สุด โดยไม่เรียงลำดับ จำนวน 13 ตัวอย่าง ได้แก่

1.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน
2.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 2 วัน
3.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน
4.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 2 วัน
5.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน
6.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน
7.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน
8.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน
9.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน
10.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน
11.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน
12. แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน
13.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน

แหนใหญ่ที่ให้การเรืองแสงในใบและรากมาก รองลงมาจากข้างลำดับข้างต้น โดยไม่เรียงลำดับ จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่

1.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

2.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

3.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน

4.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

5.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน

6.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 2 วัน

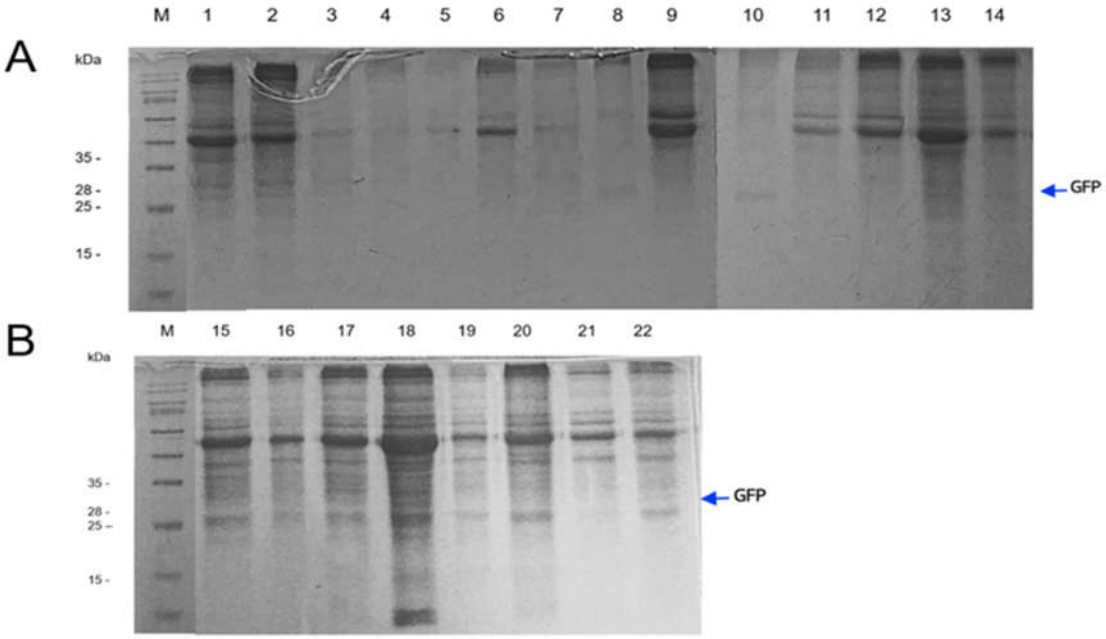
7.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน

8.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

สรุปผลการส่องกล้องจุลทรรศน์พบการเรืองแสงของโปรตีนเรืองแสงที่ยังไม่ทราบชนิด ซึ่งคาดว่าอาจจะเป็นโปรตีนเรืองแสง GFP แต่สภาวะในใช้ในการถ่ายโอนยีนของแหนใหญ่ อาจทำให้เกิดความเครียดของเซลล์จนนำไปสู่การสร้างโปรตีนเรืองแสงชนิดอื่นด้วยหรือไม่ จึงไม่อาจสรุปผลได้ว่าสภาวะในการถ่ายโอนใดมีความเหมาะสมที่สุดในขั้นตอนนี้ จึงต้องนำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนนี้ไปทดสอบต่อในขั้นตอนถัดไป

4.4 ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

เมื่อนำแหนใหญ่มาส่องโปรตีนเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้ว จึงต้องมีการยืนยันว่าแหนใหญ่นั้นมีการถ่ายโอนยีน GFP เบื้องต้น โดยทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งทางผู้จัดทำได้ทำการคัดเลือกแหนใหญ่ที่มีการเรืองแสงมากที่สุดจากทุกอาหารคัดเลือก MS, MS2 และ MS3 ในสภาวะสว่างและมืด ในขั้นตอนการส่องกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง ได้ผลการทดสอบดังนี้



รูปที่ 17 ภาพแสดงผล SDS-PAGE โดยมีตัวอย่างสารดังนี้

A และ B: M marker, 1.แหนใหญ่ทั่วไป (wild type), 2.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน, 3.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 2 วัน, 4. แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 5.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 2 วัน, 6.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน, 7.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 8.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 9.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน, 10.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 11.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน, 12.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 13. แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 14.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน, 15.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 16.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 17.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน, 18.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 19.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน, 20.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 2 วัน, 21.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน, 22. แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

จาก **(รูปที่ 17)** แสดงผลของการสกัดโปรตีนและรันเจล SDS-PAGE โดยแหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน GFP มีการแสดงออกของแถบโปรตีนที่ไม่ทราบชนิด อยู่ในช่วง 28 กิโลดาลตัน ซึ่งคาดว่าจะเป็นช่วงที่โปรตีนเรืองแสง GFP นั้นแสดงออก ซึ่งพบในตัวอย่าง ดังนี้

แถวที่ 1: Wild-type,

แถวที่ 2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน

แถวที่ 3: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 2 วัน

แถวที่ 4: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

แถวที่ 6: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน

แถวที่ 7: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

แถวที่ 8: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

แถวที่ 9: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน

แถวที่ 10: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

แถวที่ 11: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน

แถวที่ 12: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

แถวที่ 13: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน

แถวที่ 14: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน

เมื่อเทียบกับแถบโปรตีนของแหนใหญ่ทั่วไป (wild type) หรือ control ให้แถบโปรตีนในช่วงดังกล่าวเช่นกัน แต่จากผลการทดลองที่ได้พบว่า แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในแถวที่ 2-14 ส่วนใหญ่พบการแสดงออกของโปรตีนในช่วงดังกล่าว แต่มีการแสดงออกของแถบโปรตีนที่เจือจาง ไม่ชัดเจนซึ่งอาจเกิดขึ้นจากขั้นตอนการสกัดโปรตีน โดยการใช้ไนโตรเจนเหลว เพราะเมื่อนำแหนใหญ่มาบดลงในโกร่งแล้วทำให้เกิดการควบแน่นของน้ำในอากาศกลับลงมาเป็นน้ำ ทำให้สารสกัดโปรตีนจากแหนใหญ่นั้นเจือจางระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน จึงไม่เพียงพอสำหรับการนำมาวิเคราะห์โปรตีน ดังนั้นผู้จัดทำจึงได้มีการนำแหนใหญ่ที่มีการเรืองแสงรองลงมา ทำการสกัดโปรตีนและรันเจล SDS-PAGE ใหม่ โดยมีความระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อนของน้ำ เพื่อยืนยันว่าตัวอย่างแหนใหญ่สามารถแสดงผลอยู่ในช่วง 28 กิโลดาลตัน ซึ่งพบว่าในทุกตัวอย่างแสดงแถบโปรตีนในช่วงดังกล่าวได้และมีแถบที่ชัดเจนกว่าตัวอย่างก่อนหน้า ดังนี้

แถวที่ 15: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

แถวที่ 16: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

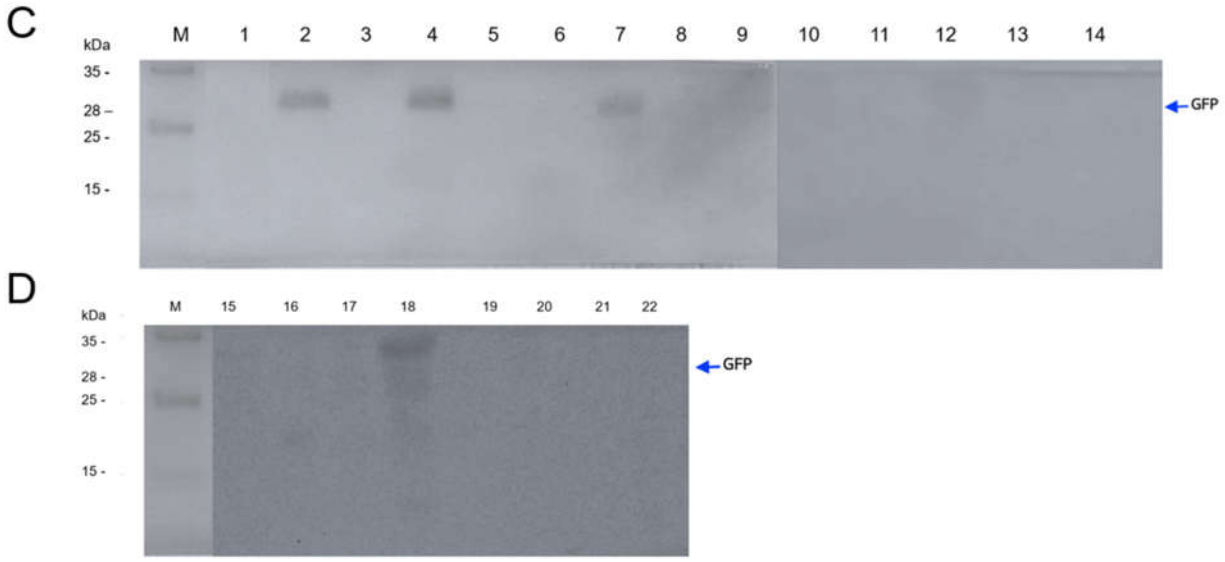
แถวที่ 17: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน

แถวที่ 18: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

แถวที่ 19: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน
แถวที่ 20: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 2 วัน
แถวที่ 21: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน
แถวที่ 22.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน

สรุปผลของการสกัดโปรตีนและรันเจล SDS-PAGE สามารถพบแถบของโปรตีนที่ยังไม่ทราบชนิด ซึ่งอยู่ในช่วง 28 กิโลดาลตัน ซึ่งคาดว่าจะเป็นช่วงที่โปรตีนเรืองแสง GFP จำนวน 21 ตัวอย่าง ซึ่งในตัวอย่างของแถบที่ 1-14 มีความเจือจางเนื่องจากการควบแน่นของน้ำที่ไม่เท่ากัน ทำให้ความเข้มข้นของสารสกัดไม่เท่ากันด้วย ทางคณะผู้จัดทำจึงได้ทำการตรวจสอบใหม่สามารถพบแถบของโปรตีนที่ชัดเจนขึ้นในตัวอย่างแถบที่ 15-22 จะเห็นได้ว่ามีการแสดงออกโปรตีนในช่วงดังกล่าว ว่าเป็นโปรตีนเรืองแสง GFP หรือไม่จึงต้องตรวจสอบในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วย Western blot

4.5 ผลการวิเคราะห์ด้วย Western blot



รูปที่ 18 ภาพแสดงผลการวิเคราะห์ด้วย western blot โดยมีตัวอย่างสารดังนี้

A และ B: M marker, 1.แหนใหญ่ทั่วไป (wild type), 2.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน, 3.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 2 วัน, 4. แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 5.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 2 วัน, 6.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน, 7.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 8.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 9.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน, 10.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 11.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน, 12.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 13. แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 14.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS3 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน, 15.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 16.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 3 วัน, 17.แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 1 วัน, 18.แหนใหญ่ที่ได้รับ

เมื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีการ western blot ด้วยการใช้แอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อโปรตีนเรืองแสง GFP (anti-rabbit IgG conjugated HRP antibody) จำนวน 4 ตัวอย่าง ดังนี้

แถวที่ 2: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน
แถวที่ 4: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน
แถวที่ 7: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน
แถวที่ 18: แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

โดยพบว่าแถบโปรตีนที่จำเพาะต่อโปรตีนเรืองแสง GFP มีขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแหนใหญ่ สามารถแสดงออกของโปรตีนเรืองแสง GFP ได้ ตามช่วงน้ำมวลโมเลกุลซึ่งตรงกับงานวิจัยก่อนหน้า (18) แถบโปรตีนที่พบใน western blot เมื่อเทียบกับ SDS-PAG ในแถวที่ 1-14 พบว่ามี 3 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก คือ แถวที่ 2, 4 และ 7 ซึ่งใน SDS-PAGE มีแถบที่มีสีจางกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแถวที่ 15-22 พบว่ามี 1 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก คือ แถวที่ 18 ซึ่งใน SDS-PAGE มีแถบที่มีสีเข้ม จากผลการเปรียบเทียบข้างต้น

จากผลการทดลองได้ว่าแสดงให้เห็นว่า แหนใหญ่สามารถแสดงออกของ โปรตีนเรืองแสง GFP ในอาหาร MS ได้มากที่สุด ส่วนในอาหาร MS2 ซึ่งมี ceftriaxone รองลงมา และในอาหาร MS3 มีทั้ง ceftriaxone และ glufosinate ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสง GFP ใน western blot เลย อาจเป็นเพราะกลไกในการยับยั้งการสร้างโปรตีน glutamine ทำให้การสังเคราะห์แสงในแหนใหญ่ลดลง และยังมีผลต่อการกดการสร้างโปรตีนอื่น ๆ จึงอาจเป็นไปได้ว่า การใส่แหนใหญ่ในอาหารทันทีคัดเลือก MS3 ทันทีจึงไม่เหมาะสม เนื่องจากโปรตีนเรืองแสง GFP และการทำงานของยีน Bar ในการต้าน glufosinate ต้องใช้เวลาในการแสดงออกของยีน (30) และทั้งในอาหาร MS2 และ MS3 มีประสิทธิภาพการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสง GFP ได้ต่ำกว่าอาหาร MS อาจเป็นสาเหตุมาจาก Ceftriaxone ที่สามารถกำจัด *A. tumefaciens* ที่กำลังเกาะบนผิวเซลล์ ทำให้ลดประสิทธิภาพในการโอนยีนเข้าสู่แหนใหญ่ในช่วงระยะเวลาการบ่มได้ ส่วนในช่วงระยะเวลาการบ่ม พบว่าในระยะเวลาการบ่มที่ 3 วัน, 2 วัน และ 1 วัน ให้ผลในการแสดงออกของโปรตีน GFP ดีสุดตามลำดับ เนื่องจากในโปรตีนมีความจำเป็นที่จะต้องใช้เวลาในการแสดงออก จากยีนที่ได้ถ่ายโอนเข้าสู่ในเซลล์ สอดคล้องกับผลในการทดลองคือ ในระยะเวลา 1 วัน ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสง GFP เลย แต่เริ่มพบในระยะเวลา 2 วัน และ 3 วัน จึงอาจเป็นไปได้ว่าในระยะเวลา 1 วันยังไม่เหมาะสมกับการเก็บตัวอย่าง ตามงานวิจัยที่เคยทดสอบกับแหนเล็ก (26) และข้าวบาร์เลย์ (29) พบว่าในช่วงเวลาการบ่มที่ 7-14 วัน มีประสิทธิภาพในการบ่มที่ดีที่ดีที่สุด จึงอาจเพิ่มเวลาในการบ่มเพื่อดูประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนที่แตกต่างกันต่อไป ส่วนในช่วง

ระยะเวลาการถ่ายโอนยีน พบว่า 10 นาที ให้ผลในการแสดงออกของโปรตีน GFP ดีสุด ส่วน 20 นาที และ 30 นาที ไม่แตกต่างกัน เมื่อเทียบกับงานวิจัย (26) พบว่า ระยะเวลาในการถ่ายโอนยีนที่เพิ่มขึ้นไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพให้การถ่ายโอนยีนได้ดีขึ้น ซึ่งอาจเป็นเพราะการปรับสภาพของเซลล์ที่ระยะเวลาน้อย ทำให้สามารถฟื้นฟู และมีประสิทธิภาพที่แสดงออกของโปรตีนได้รวดเร็ว แต่ในระยะเวลาที่ 20 นาที และ 30 นาที นั้นให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน ส่วนในช่วงสภาวะของการให้แสง พบว่า สภาวะสว่าง ให้ผลในการแสดงออกของโปรตีน GFP ดีกว่า สภาวะมืด ตามลำดับ อาจเป็นเพราะว่าพืชมีความจำเป็นที่จะต้องสังเคราะห์แสงในการดำรงชีวิต และช่วยในการผลิตโปรตีนในแหนใหญ่ได้ดีกว่าในสภาวะมืด

ดังนั้น จากผลการทดสอบ Western blot พบว่าอาหารที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสง GFP คือ ในอาหาร MS, สภาวะสว่าง, ระยะเวลาในการถ่ายโอนยีน 10 นาที และบ่มนาน 3 วัน

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำให้แหนใหญ่ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO ที่เวลา 1, 2 และ 3 นาที โดยคิดจากค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อทำการใช้ 0.9% NaClO ที่เวลา 2 และ 3 นาที พบว่ามีอัตราการปนเปื้อนของเชื้อที่ต่ำและไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากอัตรารอดในระยะเวลา 2 นาที มีอัตราการรอดของแหนใหญ่ที่สูงกว่า 3 นาที ดังนั้น ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำให้แหนใหญ่ปราศจากเชื้อด้วย 0.9% NaClO คือ 2 นาที แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ ($p<0.05$) เพื่อใช้ในการทำให้แหนใหญ่ปราศจากเชื้อ

จากการสังเกตการเรืองแสงของโปรตีนเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้แสงสีม่วง ภายใต้ฟิลเตอร์สีน้ำเงิน (blue filter) จำนวน 54 ตัวอย่าง ๆ ละ 3 ต้น พบว่าแหนใหญ่สามารถพบการเรืองแสงของโปรตีนเรืองแสงสีเขียวอมเหลืองได้ ซึ่งยังไม่ทราบว่าเป็นการเรืองแสงจากโปรตีนชนิดใด จึงได้ทำการคัดเลือกจากการเปรียบเทียบกับ Wild-type จำนวน 13 อย่างที่มีการเรืองแสงมากที่สุด และ 8 ตัวอย่าง ที่มีการเรืองแสงรองลงมา รวมทั้งหมด 21 ตัวอย่าง เพื่อใช้ในขั้นตอนการตรวจสอบโปรตีนถัดไป

จากตัวอย่างแหนใหญ่ ที่ได้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง มาวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blot พบการแสดงออกของแถบโปรตีนในช่วง 35-25 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นช่วงการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสง GFP ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนอยู่ประมาณ 28 กิโลดาลตัน ซึ่งจากการวิเคราะห์การแสดงออกของแถบโปรตีนที่ปรากฏบน SDS-PAGE พบการแสดงออกของโปรตีนที่คาดว่าอาจจะเป็นโปรตีนเรืองแสง GFP ได้หลายตัวอย่าง แต่เมื่อนำมาทดสอบ western blot พบว่ามี 4 ตัวอย่าง คือ แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะมืด บ่มเป็นเวลา 2 วัน, แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 10 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน, แหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 30 นาที ในอาหาร MS สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน และแหนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน 20 นาที ในอาหาร MS2 สภาวะสว่าง บ่มเป็นเวลา 3 วัน

สรุปได้ว่า แหนใหญ่สามารถพัฒนาและประยุกต์ใช้การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ cell โดยการใช้ agrobacterium ได้ ซึ่งในสภาวะที่มีความเหมาะสมคือ การเลี้ยงในอาหาร MS, สภาวะสว่าง, ระยะเวลาในการถ่ายโอนยีน 10 นาที และบ่มนาน 3 วัน โดยสามารถตรวจสอบโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) ในแหนใหญ่ด้วยวิธีการวิเคราะห์โปรตีน Western blot

คำแนะนำเพิ่มเติม

1. ควรมีระยะเวลาในการพักแหนใหญ่หลังจากการถ่ายโอนยีน เป็นระยะเวลา 2 วัน เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่พบการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสง GFP ใน Western blot และลงในอาหารคัดเลือกต่ออีก 7-14 วัน ช่วงเวลาดังกล่าวสังเกตการรอดและการตายของแหนใหญ่ รวมถึงระวังการเจริญเติบโตของ Agrobacterium บนอาหารคัดเลือกได้

2. แหนใหญ่ (Negative control) ควรทำการ Vacuum infiltration โดยใช้ Agrobacterium ที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน pB7WGY-GFP ด้วย เพื่อดูว่าสภาวะดังกล่าวอาจทำให้แหนใหญ่สร้างโปรตีนอื่นๆ ที่รบกวนการตรวจสอบผลการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้หรือไม่

3. การส่องกล้องเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เพื่อแยกการเรืองแสงของโปรตีนเรืองแสง GFP ให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น ควรเลือกใช้แสงสีเขียว (520-565 nm) หรือ แสงสีน้ำเงิน (500-520 nm) ในการตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยโปรตีนเรืองแสง GFP จะปรากฏเป็นสีเขียวอมเหลือง (520-590 nm) และ Chlorophyll จะปรากฏเป็นสีแดง (625-740 nm) วิธีนี้จะสามารถตรวจสอบการเรืองแสงเบื้องต้นได้ เพื่อคัดเลือกแหนใหญ่ที่พบการเรืองแสงของโปรตีนเรืองแสง GFP มากที่สุด เพื่อใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี western blot ต่อไป

4. ในขั้นตอนการบดแหนใหญ่ด้วยมือในโกร่ง โดยใช้ไนโตรเจนเหลว ควรมีความระมัดระวังน้ำที่เกิดจากการควบแน่น บริเวณผิวของโกร่งและน้ำที่เกาะอยู่บริเวณใบแหนใหญ่ เพื่อลดตัวแปรรบกวน จึงอาจซับน้ำทุกต้นก่อนนำมาลงในโกร่ง เพื่อให้ในแต่ละตัวอย่างมีระดับความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกัน

5. การตรวจสอบด้วยวิธี western blot ของคณะผู้จัดทำนั้น สามารถบอกได้แค่ข้อมูลเชิงคุณภาพ (Qualitative) แต่ไม่สามารถบอกข้อมูลเชิงปริมาณได้ (Quantitative) จึงแนะนำให้ใช้ โปรตีนเรืองแสง GFP มาตรฐาน ที่ทราบความเข้มข้น เพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน BSA แล้วนำสารตัวอย่างมาคำนวณเพื่อทราบปริมาณความเข้มข้นที่แน่นอนได้ ใช้เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนเรืองแสงที่ได้ในแต่ละสภาวะ เพื่อหาข้อสรุปวิธีที่ให้ผลตรวจสอบดีที่สุดได้

เอกสารอ้างอิง

1. Ogello EO, Munguti JM, Sakakura Y, Hagiwara A. Complete replacement of fish meal in the diet of Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.) grow-out with alternative protein sources. A review. International Journal of Advanced Research. 2014;2(8):962-78.

2. Rival S, Wisniewski J-P, Langlais A, Kaplan H, Freyssinet G, Vancanneyt G, et al. Spirodela (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: a case study, aprotinin. Transgenic research. 2008;17(4):503-13.

3. Jung M, Shin SH, Park JM, Lee SN, Lee MY, Ryu KH, et al. Detection of transgene in early developmental stage by GFP monitoring enhances the efficiency of genetic transformation of pepper. Plant Biotechnol Rep. 2011;5(2):157-67. doi: 10.1007/s11816-011-0168-1. Epub 2011 Jan 25.

4. Landolt E. The family of Lemnaceae-a monographic study. Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae). 1987;2.

5. W. P. A. Flow chart of dichotomous key to Lemnaceae in California. 2004.

6. Gaigher I, Short R. An evaluation of duckweed (Lemnaceae) as a candidate for aquaculture in South Africa. Aquaculture. 1986;15:81-90.

7. Zirschky J, Reed SC. The use of duckweed for wastewater treatment. Journal (Water Pollution Control Federation). 1988:1253-8.

8. ชันโรจน์ ส. evelopment of duckweed as a model aquatic-plant for basic research and application in biotechnology. Plant Cell Rep. 2557:72.

9. Li Y, Zhang F, Daroch M, Tang J. Positive effects of duckweed polycultures on starch and protein accumulation. Bioscience reports. 2016;36(5).

10. Leng R, Stambolie J, Bell R. Duckweed-a potential high-protein feed resource for domestic animals and fish. Livestock Research for Rural Development. 1995;7(1):36.

11. Silva JA, Uchida RS. Plant nutrient management in Hawaii's soils: approaches for tropical and subtropical agriculture. University of Hawaii; 2000.

12. Saad AI, Elshahed AM. Plant tissue culture media. Recent advances in plant in vitro culture. 2012:30-40.

13. Davis, S. J., & Vierstra, R. D. (1996). Soluble derivatives of green fluorescence protein (GFP) for use in Arabidopsis thaliana. *Weeds World*, *3*, 43-48.

14. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescence protein as a marker for gene expression. *Science*, *263*(5148), 802-805.

15. Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G., & Ward, W. W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescence protein. *Biochemistry*, *32*(5), 1212-1218.

16. Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescence protein. *Annual review of biochemistry*, *67*(1), 509-544.

17. Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., & Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescence protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature biotechnology*, *20*(1), 87-90.

18. Vunsh R, Li J, Hanania U, Edelman M, Flaishman M, Perl A, et al. High expression of transgene protein in Spirodela. Plant Cell Rep. 2007;26(9):1511-9.

19. Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A., & Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescence fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocols*, *1*(4), 2019.

20. Heenatigala PPM, Yang J, Bishopp A, Sun Z, Li G, Kumar S, et al. Development of Efficient Protocols for Stable and Transient Gene Transformation for *Wolffia Globosa* Using Agrobacterium. Front Chem. 2018;6:227.

21. Rustagi A, Jain S, Kumar D, Shekhar S, Jain M, Bhat V, et al. High efficiency transformation of banana [*Musa acuminata* L. cv. Matti (AA)] for enhanced tolerance to salt and drought stress through overexpression of a peanut salinity-induced pathogenesis-related class 10 protein. Molecular biotechnology. 2015;57(1):27-35.

22. Arazi T, Huang PL, Huang PL, Zhang L, Shiboleth YM, Gal-On A, et al. Production of antiviral and antitumor proteins MAP30 and GAP31 in cucurbits using the plant virus vector ZYMV-AGII. Biochemical and biophysical research communications. 2002;292(2):441-8.

23. Mariashibu TS, Subramanyam K, Arun M, Mayavan S, Rajesh M, Theboral J, et al. Vacuum infiltration enhances the Agrobacterium-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. Acta Physiologiae Plantarum. 2013;35(1):41-54.

24. Andrieu A, Breitler JC, Siré C, Meynard D, Gantet P, Guiderdoni E. An in planta, Agrobacterium-mediated transient gene expression method for inducing gene silencing in rice (Oryza sativa L.) leaves. Rice. 2012;5(1):1-12.

25. Nabeshima T, Doi M, Hosokawa M. Agrobacterium-mediated inoculation of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) plants with chrysanthemum stunt viroid. Journal of virological methods. 2016;234:169-73.

26. JAIPRASERT A. DEVELOPMENT OF DUCKWEED TRANSFORMATION TECHNIQUE FOR BIOLOGICAL APPLICATION: BURAPHA UNIVERSITY; 2018.

27. Firsov A, Tarasenko I, Mitiouchkina T, Shaloiko L, Kozlov O, Vinokurov L, et al. Expression and Immunogenicity of M2e Peptide of Avian Influenza Virus H5N1 Fused to Ricin Toxin B Chain Produced in Duckweed Plants. Front Chem. 2018;6:22.

28. Chanroj S, Padmanaban S, Czerny DD., Jauh G-Y, Sze H. K+ Transporter AtCHX17 with Its Hydrophilic C Tail Localizes to Membranes of the Secretory /Endocytic System: Role in Reproduction and Seed Set. Molecular Plant. 2013; 6(4): 1226-46.

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

30. Sauer, H., Wild, A., & Rühle, W. (1987). The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis II. The causes of inhibition of photosynthesis. Zeitschrift für Naturforschung C, 42(3), 270-278.

ภาคผนวก

ภาคผนวก (ก) เอกสารจริยธรรม

ภาคผนวก (ข) ผลการเรืองแสงของแหนใหญ่

ภาคผนวก (ค) รายงานการเงิน

ภาคผนวก ก

เอกสารจริยธรรม

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการรับรองจริยธรรมพันธุวิศวกรรมในพืช

ชื่อข้อเสนอโครงการวิจัย : การศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียวแบบชั่วคราวในแหนใหญ่ *Spirodela polyrrhiza* L.

สถาบันสังกัด : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการวิจัย : IBC 038/2563

ภาคผนวก ข

ผลการเรืองแสงของแหนใหญ่

ตารางที่ 1 ผลการเรืองแสงของแหนใหญ่

ลำดับที่	อาหารเลี้ยงพืช	ภาวะในการเลี้ยง	ระยะเวลาในการถ่ายโอนยีน (นาที)	ระยะเวลาในการบ่ม (วัน)	น้ำหนัก	Sample 1		Sample 2		Sample 3	
						ราก	ใบ	ราก	ใบ	ราก	ใบ
1.	MS	มืด	10	1	46.0	1	1	1	1	1	1
2.				2	79.0	1	1	1	1	1	1
3.				3	76.9	1	1	1	1	1	0
4.			20	1	91.5	1	0	1	0	1	1
5.				2	131.1	1	0	1	1	0	0
6.				3	189.0	1	0	1	1	1	0
7.			30	1	92.9	1	0	1	0	1	0
8.				2	21.0	1	0	1	0	1	0
9.				3	52.9	1	1	1	0	1	0
10		สว่าง	10	1	56.7	1	0	1	0	1	0
11				2	52.7	1	1	1	1	1	1
12				3	71.0	1	0	1	1	1	1
13			20	1	123.9	1	1	1	0	1	0
14				2	141.8	1	1	1	1	1	0
15				3	269.6	1	0	1	1	1	0
16			30	1	66.1	1	0	1	1	1	1
17				2	73.8	1	0	1	0	1	0
18				3	109.7	1	1	1	1	1	1
19	MS2	มืด	10	1	39.5	1	1	1	0	1	0
20				2	44.8	1	0	1	0	1	1
21				3	66.6	1	1	1	1	1	1
22			20	1	79.2	1	0	1	1	1	1
23				2	80.6	1	0	1	0	1	0

24				3	84.2	1	1	1	1	1	1
25			30	1	65.2	1	0	1	0	1	0
26				2	90.0	1	1	1	0	1	0
27				3	78.5	1	1	1	1	1	1
28		สว่าง	10	1	44.3	1	1	1	0	1	1
29				2	48.8	1	1	1	0	1	0
30				3	43.8	1	0	1	0	1	1
31			20	1	83.4	1	0	1	0	1	0
32				2	34.6	1	1	1	0	1	0
33				3	82.0	1	0	1	1	1	1
34			30	1	85.6	1	0	1	0	1	0
35				2	65.1	1	0	1	0	1	0
36				3	80.1	1	1	1	1	1	1
37	MS3	มืด	10	1	46.3	1	0	1	0	1	0
38				2	62.0	0	1	1	0	0	0
39				3	51.1	1	0	1	0	0	0
40			20	1	64.3	1	0	0	0	0	0
41				2	112.9	1	1	1	0	1	0
42				3	77.8	1	0	0	0	1	0
43			30	1	26.2	1	0	1	0	1	0
44				2	112.3	1	1	1	1	1	0
45				3	64.8	0	0	1	0	1	0
46		สว่าง	10	1	54.0	1	1	1	0	1	0
47				2	51.6	0	0	1	1	0	0
48				3	45.3	1	0	1	0	1	0
49			20	1	80.2	1	1	1	1	1	1
50				2	81.8	1	0	1	0	1	0
51				3	64.8	0	0	1	0	1	0

52			30	1	39.9	0	1	1	0	1	0
53				2	28.4	1	1	1	0	1	0
54				3	7.9	1	0	1	0	0	0
55	Negative control					0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ คือ แหนใหญ่กลุ่มที่มีน้ำหนักมากกว่า 80 mg และให้ผลการเรืองแสงทั้งใบและราก ไม่ต่ำกว่า 5 ใน 6 ส่วน

ภาคผนวก ค

แบบฟอร์มรายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ

การศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียว แบบชั่วคราวในแหนใหญ่ *Spirodela polyrrhiza* L.

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

นสภ. จิรภัทร บุตรพรหม รหัสนิสิต 59210148 (หัวหน้าโครงการวิจัย)

นสภ. อภิสิทธิ์ สานิง รหัสนิสิต 59210218

นสภ. ธราเทพ วรเมธีสกุล รหัสนิสิต 59210242

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 15/07/63 **ถึงวันที่** 01/04/64

ระยะเวลาดำเนินการ 1 **ปี** 5 **เดือน ตั้งแต่วันที่** 15/11/62

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 9000 **บาท เมื่อ** 26/01/64

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. หมวดวัสดุ - สารเคมี - ยาปฏิชีวนะ - ถุงมือยางและหน้ากากอนามัย	4,500	6,200	-
2. หมวดใช้สอย - ค่า Gel documentation	2,000	2,000	-
3. หมวดเตรียมเล่มจุลนิพนธ์ - ค่าพิมพ์และเข้าเล่มรายงาน	300	300	-
4. ค่าโปสเตอร์และลงทะเบียน	500	500	-
รวม	7,300	9,000	-

(.....)

อ.ดร. นิพัฒธา อิสโร

(อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัย)