



การผลิตและตรวจสอบโปรตีน β -glucuronidase (GUS) ในเนื้อเยื่อ ผลของ มะละกอ และ กล้วย โดยใช้วิธีการถ่ายยีนแบบชั่วคราว Production and detection of β glucuronidase (GUS) protein in fruit tissue of papaya (*Carica papaya* L.) and banana (*Musa acuminata* L.) using *Agrobacterium* transient transformation

ศันสนีย์ นานเจริญ^{1,2*}, ราตรี คูหาพิทักษ์ธรรม³, อัญจนา บุญชด³, นุชนาด วารินทร์³ และปาริชาติ เบิร์นส^{1,2,3}
Sunsanee Nacharoen^{1,2*}, Ratre Koochapitakthum³, Anjana Bhunchoth³, Nuchnard Warin³ and Parichart
Burns^{1,2,3}

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานับถือศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการ
การอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

³ ห้องปฏิบัติการวิจัยด้านพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย คลองหลวง ปทุมธานี 12120

* Correspondent author: nongsunsa@gmail.com

บทคัดย่อ

การสร้างโปรตีนที่สนใจ และการศึกษาประสิทธิภาพของโปรโมเตอร์ในผล จำเป็นต้องอาศัยการถ่ายยีน
เข้าสู่พืชเป้าหมาย การถ่ายยีนแบบชั่วคราวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อผลโดยตรงเป็นวิธีการ
ที่สะดวก รวดเร็ว และสามารถทราบผลอย่างชัดเจนว่ายีนหรือโปรโมเตอร์ที่ใช้สามารถแสดงออก และสามารถผลิต
โปรตีนที่ต้องการได้ การวิจัยนี้ศึกษาระบบการถ่ายยีนแบบชั่วคราวเข้าสู่เนื้อเยื่อผลของไม้ผล 2 ชนิดได้แก่ กล้วย (*Musa
acuminata* L.) และ มะละกอ (*Carica papaya* L.) ด้วยวิธีการใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่
มี plant expression vector คือ pCAMBIA1304 ซึ่งมียีนรายงานผล β -glucuronidase (GUS) โดยถ่ายยีนเข้าเนื้อเยื่อ
ผล 2 ระยะ คือ ระยะผลดิบ และ ผลเต็ม ศึกษาเปรียบเทียบปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนได้แก่ ระยะการ
พัฒนาของผล ปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรีย และ เวลาที่ใช้ในการแช่ชิ้นเนื้อเยื่อพืชในสารแขวนลอยเชื้อ ตรวจสอบผลการ
ถ่ายยีนโดยศึกษาจากการติดสีน้ำเงินภายในชิ้นเนื้อเยื่อของพืช และตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucuronidase
ที่ถูกสร้างขึ้นภายในเนื้อเยื่อของพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ผลการทดลองพบว่าการถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่
ระดับความเจือจาง 1:10 และ ระยะเวลาในการแช่ชิ้นเนื้อเยื่อพืชในสารแขวนลอยเชื้อนาน 30 นาที ให้ผลการถ่ายยีนดี
ที่สุดกับผลไม้ทั้ง 2 ชนิด และนอกจากนั้นวิธีการถ่ายยีนจากการศึกษานี้ยังสามารถนำไปใช้ถ่ายยีนแบบชั่วคราวเข้า
สู่ผลมะเขือเทศ ซึ่งเป็นพืชต้นแบบ ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน โปรโมเตอร์ และรวม
ถึงการผลิตโปรตีนได้อีกด้วย

Abstract

Heterologous protein production and determination of fruit specific promoter require gene transformation into target plant host. Fruits transformed gene by *Agrobacterium* is the convenient and rapid method. The outcome is clearly revealed by producing heterologous and functional protein. In this study, two fruit plant species for heterologous protein production, banana and papaya were transiently transformed with In this study, two fruit plants; banana (*Musa acuminata* L.) and papaya (*Carica papaya* L.) were determined the GUS gene expression and heterologous protein production after transiently transformation with *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 containing a plant expression vector, *pCambia1304* with β -glucuronidase (GUS) gene as a reporter gene during mature fruit and color break fruit. Factors influencing transformation efficiency including fruit developmental stages, bacterial concentration and incubation time were investigated. The transformation efficiency was determined by GUS staining and GUS enzymatic activity. The results showed that bacterial dilution at 1:10 for 30 min, was exhibited the most effective results in both fruit. This method was also applicable to tomato, a fruit model commonly used for gene expression, promoter and protein production.

คำสำคัญ: β - glucuronidase กล้วย มะละกอ การถ่ายยีนแบบชั่วคราวโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

Keywords: β - glucuronidase, banana, papaya, *Agrobacterium* transient transformation

1. บทนำ

การใช้พืชเป็นแหล่งผลิตโปรตีน เช่น แอนติบอดี วัคซีนและเอนไซม์ มีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อแบคทีเรีย คือระบบการแสดงออกของพืชมีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการแปลรหัส (post translational modification) เช่น glycosylation ซึ่งจำเป็นต่อการทำงานของโปรตีนบางชนิด นอกจากนั้นพืชยังสามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก และมีต้นทุนการผลิตต่ำ (1) การใช้ผล (fruit) อาทิ มะเขือเทศ กล้วย และมะละกอเป็นแหล่งในการผลิตโปรตีนเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากผลมีข้อดีหลายประการด้วยกัน เช่น ผลไม่สามารถรับประทานสดได้โดยไม่ต้องผ่านขบวนการสัคต (2) ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ผลมีขนาดใหญ่ มีจำนวนมาก และอยู่เป็นผลเดี่ยว หรือรวมกันเป็นกลุ่ม ทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยว และผลิตโปรตีนได้ปริมาณมากในแต่ละครั้ง การถ่ายยีนเข้าสู่พืชมี 2 แบบ ได้แก่ แบบถาวร และแบบชั่วคราว แม้ว่าแบบถาวรจะมีความเหมาะสมในการผลิตโปรตีนในปริมาณมาก แต่

ต้องมีระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ดีสำหรับการพัฒนาเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนให้สามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการศึกษาค่อนข้างนาน เช่น การ regenerate somatic embryo ของกล้วย (3) และไม้ยืนต้น เช่น พืชตระกูลส้ม (4) การถ่ายยีนแบบชั่วคราวโดยการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชโดยตรง มีข้อได้เปรียบที่สามารถทราบผลการแสดงออกของยีนได้เร็ว ใช้ตัวอย่างน้อย สามารถทดสอบได้หลายปัจจัยพร้อมกัน และไม่ต้องมีระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรองรับการพัฒนาให้เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ เช่น การทดสอบหลายปัจจัยสำหรับการถ่ายยีนในพืชหลายชนิดพร้อมกันใน ผลแอปเปิล สาลี่ ท้อ สตอเบอร์รี่ มะเขือเทศ และส้ม พร้อมกัน (5)

ยีน β -glucuronidase (*GUS*) เป็นยีนรายงานผลที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากการแสดงออกของยีน *GUS* ในเนื้อเยื่อพืชสามารถตรวจสอบได้ง่าย และชัดเจน โดยดูจากการติดสีน้ำเงินของเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี histochemical assay และตรวจสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นภายในเนื้อเยื่อพืชด้วยวิธี enzymatic activity assay (6) ดังนั้นการศึกษากการ

แสดงออกของยีนในผลโดยใช้ยีน *GUS* เป็นยีนรายงาน ผลจึงมีประโยชน์สามารถใช้ตรวจสอบปริมาณ และประสิทธิภาพของ heterologous protein ที่ถูกสร้างขึ้น ภายในผลได้

สำหรับรูปแบบในการถ่ายยีนเข้าสู่ผลนั้น จากรายงานที่ผ่านมามักจะใช้ การฉีดสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เข้าสู่ผล (7) ซึ่งต้องใช้เวลานานในการให้เชื้อเจริญเพื่อส่งถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์พืช และต้องใช้ตัวอย่างพืชและสารเคมีสำหรับตรวจสอบปริมาณมากจึงทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง และเนื่องจากต้องใช้ตัวอย่างพืชจำนวนมากจึงทำให้เกิดความแปรปรวน อันเนื่องมาจากความหลากหลายของตัวอย่างพืช ซึ่งทำให้การเปรียบเทียบลักษณะคุณภาพและปริมาณในแต่ละซ้ำเกิดความยากลำบาก การศึกษาในครั้งนี้ต้องการพัฒนาวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่ผลมะละกอและกล้วย ซึ่งเป็นพืชที่ใช้เป็นแหล่งในการสร้างโปรตีน ได้อย่างสะดวก รวดเร็ว ประหยัด และสามารถตรวจวัดการแสดงออกของยีนได้ ทั้งลักษณะทางคุณภาพและปริมาณ นอกจากนี้ยังได้มีการทดสอบวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่ผลที่ได้พัฒนาขึ้นในครั้งนี้กับมะเขือเทศซึ่งเป็นพืชต้นแบบที่นิยมใช้ศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายยีนเข้าสู่ผลด้วย

2. วิธีวิจัย

2.1 การคัดเลือกพืชทดลอง

คัดเลือกผล มะละกอ และกล้วย ระยะผลดิบ และผลเต็ม โดยแบ่งระยะการพัฒนาของผลจากรูปทรง ลักษณะของสีเปลือก และการพัฒนาของเมล็ด มะละกอรยะผลดิบเลือกใช้มะละกอที่มีผิวสีเขียวเข้ม เมล็ดภายในมีสีเทา สำหรับระยะผลเต็มใช้มะละกอที่เปลือกเริ่มมีจุดแต้มสีส้มเกิดขึ้นและเมื่อนำมาผ่าแล้ว เมล็ดภายในมีสีดำ กล้วยระยะผลดิบเลือกที่เปลือกมีสีเขียว ลักษณะผลยังเห็นเป็นเหลี่ยมอยู่เล็กน้อย สำหรับกล้วยระยะผลเต็มใช้กล้วยที่ผลไม่มีเหลี่ยมแล้ว เปลือกมีสีเขียวอ่อนออกเหลือง มะเขือเทศดิบเลือกที่มีเปลือกสีเขียว หรือสีเปลือกไข่ ระยะผลเต็มเลือกที่เปลือกมีสีเหลืองอมส้ม

2.2 การเตรียมเนื้อเยื่อผลสำหรับการใช้ในการถ่ายยีน

นำผลมะละกอ กล้วย และมะเขือเทศ ทั้งสองระยะมาล้างทำความสะอาดบริเวณผิวด้วยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮเพอร์คลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำผล มะละกอ และกล้วย ที่ล้างทำความสะอาดแล้วมาหั่นเป็นชิ้นขนาด 1x1 เซนติเมตรหนา 0.2-0.3 มิลลิเมตร จำนวน 5 ชิ้น ค่อยๆ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ นำชิ้นเนื้อเยื่อของผลที่เตรียมไว้มาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮเพอร์คลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่ผสม Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ในสารละลาย cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ทำแผลที่บริเวณชิ้นเนื้อเยื่อโดยใช้ใบมีดผ่าตัดกรีดเป็นแผลยาวขนาด 0.3 - 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3-4 แผล

2.3 การเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 บรรจุ plant expression vector *pCambia-1304* (Cambia, Australia) ซึ่งมียีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล โดยมีโปรโมเตอร์ *CaMV35S* เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียบนอาหารคัดเลือก YEP (Bacto tryptone 10 g/l, yeast extract 10 g/l, NaCl 5 g/l, agarose 15 g/l pH 7.0) ซึ่งใส่สารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 วัน จากนั้นย้ายโคโลนีเดี่ยวของเชื้อมาเลี้ยงต่อในอาหาร YEP ชนิดเหลว ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งใส่สารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรและสาร acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เขย่าเชื้อด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส จนเชื้อมีความเข้มข้นในช่วงดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.8 -1.00 เจือจางเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 1:10 1:50 และ 1: 100 ด้วยอาหารเหลว MS (8) และเติมสาร acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ผสมสารแขวนลอยเชื้อให้เข้ากัน

2.4 การถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อผล

แช่ชิ้นเนื้อเยื่อผลที่เตรียมไว้ซึ่งผ่านการทำความสะอาดแล้วในสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 1:10 1:50 และ 1: 100 เป็นเวลานาน 10 20 และ 30 นาที ตามลำดับ และแช่ชิ้นเนื้อเยื่ออีกส่วนหนึ่งในอาหารเหลว MS นาน 10 20 และ 30 นาทีตามลำดับเช่นเดียวกัน เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (negative control) แล้วนำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และใช้สารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ความเข้มข้น 1:10 เวลา 20 นาที สำหรับการถ่ายยีนเข้ามะเขือเทศ ซึ่งเป็นผลไม้ต้นแบบ (Fruit model) สำหรับการผลิตโปรตีนในพืช

2.5 การตรวจสอบการถ่ายยีนโดยวิธี GUS histochemical assay

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ภายในเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS Histochemical assay โดยดูการติดสีน้ำเงินของชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ β -glucuronidase นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีนครบ 24 ชั่วโมงแล้ว มาล้างในสารละลาย cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาซ้ำ 3 ครั้ง ซับน้ำส่วนเกินที่ติดมากับชิ้นเนื้อเยื่อออกแล้วนำเนื้อเยื่อนั้นมาแช่ในสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) (0.05 mM X-Gluc in 10 mM Na_2HPO_4 , 10 mM NaH_2PO_4 0.1% Triton X-100, 0.5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ และ 0.5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และการแช่ตัวอย่างในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 15-20 นาที จำนวน 2 ครั้ง เพื่อให้เห็นการติดสีน้ำเงินชัดเจนขึ้นด้วย หรือจนกระทั่งเห็นว่าคลอโรฟิลล์หมด แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* จากการติดสีน้ำเงินภายในชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน

2.6 การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อผลที่ได้รับการถ่ายยีน GUS

นำเนื้อเยื่อผลที่ได้รับการถ่ายยีนและล้างด้วยวิธีการข้างต้น มาบดด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียด เติม GUS extraction buffer (50 mM Sodium phosphate;

pH 7.0 10 mM Dithiothreitol, 1 mM Disodium EDTA, 0.1% Sodium lauryl sarcosine, 0.1% Triton X-100) ในอัตราส่วนเนื้อเยื่อผล 1 กรัม ต่อ buffer 3 มิลลิตร และ Proteinase inhibitor (Sigma, USA) อัตราส่วน 3:100 (กรัม ต่อ ไมโครลิตร) นำไป vortex นาน 2 นาที และหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อวินาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นมากขึ้นด้วย Protein concentrator (Piece, Germany) ที่มี molecular weight cut off 20 กิโลดาลตัน โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 g นาน 20 นาที หรือจนกว่าจะได้โปรตีนที่มีความเข้มข้นตามต้องการ ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนใสที่สกัดได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ด้วยวิธี Bradford (9) แล้วนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ทันที หรือเก็บไว้ในอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ได้นาน 2 วัน

2.7 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucuronidase จากเนื้อเยื่อผลที่ได้รับการถ่ายยีน

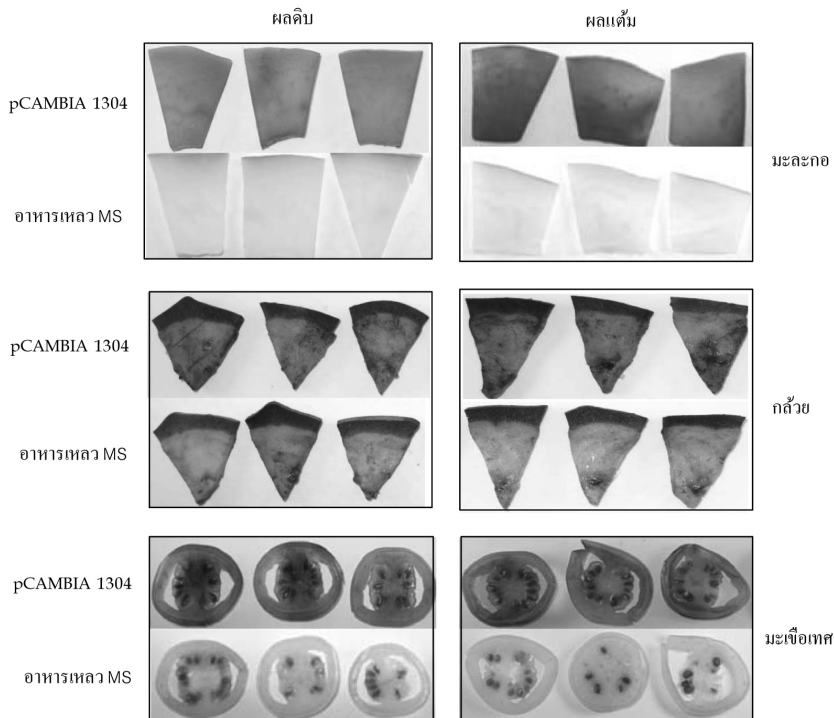
นำโปรตีนที่สกัดได้ 100 ไมโครกรัม ใส่ลงใน GUS assay buffer (1.2 mM 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide; MUG, 10 mM β -mercaptoethanol ใน 1x reaction buffer) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1xStop buffer (BIORAD, USA) ปริมาตร 1 มิลลิตร ตรวจสอบการสร้าง 4-methylumbelliferone (4-MU) ด้วยเครื่อง spectrofluorometer (Shimadzu, Japan) ที่ emission และ excitation ความยาวคลื่น 360 และ 460 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ 4-MU มาตรฐาน ตามวิธีการของผู้ผลิต และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Statistical Analysis System (SAS)

3. ผลการวิจัยและอภิปราย

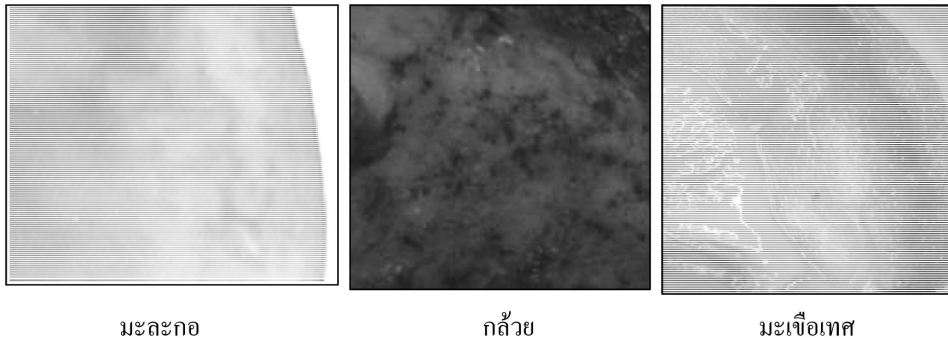
3.1 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ในเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนแบบชั่วคราวด้วยวิธี GUS Histochemical assay

อะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL-1 สามารถส่งถ่ายยีน GUS เข้าไปในชิ้นผลของมะละกอและกล้วยได้ โดยเห็นได้จากการติดสีน้ำเงินในชิ้นเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน และนอกจากนี้วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่ผลด้วยวิธีการดังกล่าวยังสามารถนำไปใช้กับผลมะเขือเทศได้ด้วย สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนคือ การใช้สารแขวนลอยเชื้อเจือจางอัตรา 1:10 และเวลาในการแช่ชิ้นเนื้อเยื่อในสารแขวนลอยเชื้อนาน 30 นาที มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้ดีที่สุดในพืชทั้งสองชนิด เนื่องจากพบว่าชิ้นเนื้อเยื่อติดสี น้ำเงินเข้มทั่วทั้งชิ้นเนื้อเยื่อและมีความสม่ำเสมอในลักษณะเดียวกันในทุกชิ้นที่ทำการศึกษา และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อผลที่แช่ในอาหารเหลว MS (negative control) ไม่พบการติดสีน้ำเงิน ดังรูปที่ 1 เมื่อครบ 24 ชั่วโมงภายหลังการถ่ายยีนพบว่าเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนการถ่ายยีนยังคงอยู่ในสภาพดี เนื้อเยื่อไม่

เหี่ยวหรือละลาย ลักษณะการติดสีในส่วนใหญ่จะพบในเนื้อเยื่อผล ท่อลำเลียง (vascular tissues) และบริเวณที่มีบาดแผล สำหรับมะละกอพบว่าติดสีน้ำเงินเข้มทั่วทั้งชิ้นทั้งในระยะผลดิบและผลแก่ แต่สำหรับกล้วยพบว่ามีการติดสีน้ำเงินเฉพาะในส่วนหนึ่งของเนื้อเยื่อผลเท่านั้น ไม่พบการติดสีน้ำเงินที่เปลือกผลซึ่งมีสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ และลักษณะการติดสีน้ำเงินในเนื้อเยื่อผลของกล้วยมีลักษณะที่แตกต่างกับมะละกอ โดยพบว่ามีการติดสีน้ำเงินเป็นลักษณะของจุดประเล็ก ๆ กระจายอยู่และจะมีบริเวณที่ติดเข้มเป็นบางจุด และพบอีกว่าไม่ติดสีน้ำเงินที่บริเวณบาดแผล ซึ่งแตกต่างกับมะละกอที่พบการติดสีน้ำเงินเข้มทั่วทั้งชิ้นเนื้อเยื่อ และสำหรับมะเขือเทศจะเห็นได้ว่าการติดสีน้ำเงินในเนื้อเยื่อผล ท่อลำเลียง เมล็ดและเจล ดังรูปที่ 2



รูปที่ 1. ลักษณะการติดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน GUS ในเนื้อเยื่อผล มะละกอ และ กล้วย ระยะผลดิบ และผลแก่ที่แช่ในสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ความเข้มข้นอัตรา 1:10 นาน 30 นาที ภายหลังจากการถ่ายยีนแบบชั่วคราว นาน 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อผลที่แช่ในอาหารเหลว MS ตรวจสอบผลด้วยวิธี Histochemical assay สำหรับมะเขือเทศ ใช้สารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ความเข้มข้นอัตรา 1:10 นาน 20 นาที (นำมาแสดง 3 ชิ้น จาก 5 ชิ้น ที่ทำการทดลอง)

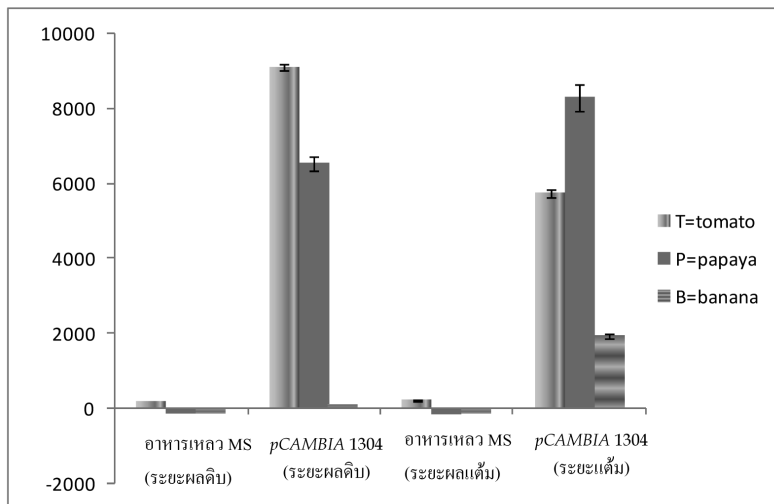


รูปที่ 2. ภาพถ่ายภาพแสดงการติดสีน้ำเงินภายในเนื้อเยื่อผลของ มะละกอ กล้วยและมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีน GUS

3.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucuronidase จากเนื้อเยื่อผลที่ได้รับการถ่ายยีน

ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucuronidase สูงสุดในมะละกอรยะผลเต็ม (8347.15 $\pm$ 352.52 nmolMU/min/ μ g) และมะละกอรยะผลดิบ (6653.35 $\pm$ 182.32 nmolMU/min/ μ g) ตามลำดับ สำหรับในกล้วย นั้นพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -glucuronidase ค่อนข้างต่ำคือ ในผลเต็มวัดได้ 2181.01 $\pm$ 8.97 nmolMU/min/ μ g และในผลดิบวัดได้ 411.13 $\pm$ 1.29 nmolMU/min/ μ g ตามลำดับ ดังรูปที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับระยะผลดิบและผล

เต็ม พบว่าระยะผลเต็มให้ค่า GUS enzymatic activity สูงกว่าระยะผลดิบซึ่งมีลักษณะเดียวกันในมะละกอและกล้วย ในมะเขือเทศพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -glucuronidase ในระยะผลเต็มวัดได้ 5,736.27 $\pm$ 275.73 nmolMU/min/ μ g และในระยะผลดิบ วัดได้ 9095.72 $\pm$ 83.34 nmolMU/min/ μ g ตามลำดับ ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucuronidase ที่วัดได้สอดคล้องกับผลการติดสีน้ำเงินซึ่งเกิดจากการแสดงออกของยีน GUS ภายในเนื้อเยื่อพืชทั้งสามชนิด



รูปที่ 3. กิจกรรมของเอนไซม์ GUS จากเนื้อเยื่อผลของมะละกอ กล้วย และมะเขือเทศ ระยะผลดิบและผลเต็มที่แช่ในสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ความเข้มข้นอัตรา 1:10 นาน 30 นาทีภายหลังจากได้รับการถ่ายยีนแบบชั่วคราว นาน 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อผลที่แช่ในอาหารเหลว MS สำหรับมะเขือเทศ ใช้สารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ความเข้มข้นอัตรา 1:10 นาน 20 นาที

3.3 การอภิปรายผล

การถ่ายยีนแบบชั่วคราวด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เตรียมเข้าผลด้วยวิธีการหั่นเป็นชิ้น พบว่าได้ผลดี สะดวก รวดเร็ว ไม่มีขบวนการที่ซับซ้อน และสามารถนำไปใช้กับพืชที่มีผลขนาดใหญ่และ เนื้อแข็ง อย่างมะละกอและกล้วยได้ สำหรับมะเขือเทศ ซึ่งประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ วิธีการนี้จะดีกว่าวิธีการฉีดเชื้อ อะโกรแบคทีเรียเข้าไปในผลที่มีรายงานมาก่อน เนื่องจากแรงดันภายในผลจะทำให้ฉีดเชื้อเข้าไปได้ยาก จึงทำให้ปริมาณเชื้อที่เข้าไปภายในผลน้อย และไม่สม่ำเสมอ จนอาจเกิดการกระจายตัวของเชื้อที่ไม่ทั่วถึงกัน (5) ใช้วิธีการแช่ชิ้นเนื้อเยื่อในสารแขวนลอยเชื้อ ทำให้เนื้อเยื่อทุกบริเวณได้มีโอกาสสัมผัสกับเชื้อโดยตรงจึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีน ภายหลังการถ่ายยีนครบ 24 ชั่วโมง เนื้อเยื่อผลยังมีสภาพดี มีการติดสีน้ำเงินเข้มทั่วทั้งชิ้นเนื้อเยื่อ เมื่อเปรียบเทียบชนิดของพืชพบว่าประสิทธิภาพในการถ่ายยีนมีความแตกต่างกันเนื่องจาก ผลกล้วยมีปริมาณแป้งสูง และ มีการผลิตสารประเภท phenolic (10) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของเปลือกและเนื้อกล้วยเป็นสีน้ำตาล ซึ่งขัดขวางการเข้าสู่เซลล์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าผลกล้วยลดลงโดยเฉพาะกล้วยในระยะผลดิบ รายงานที่มีมาก่อนโดยวิธี vacuum-infiltrated และเก็บเนื้อเยื่อภายหลังการถ่ายยีนในที่มืดนาน 3 วัน (11) การติดสีน้ำเงินภายในเนื้อเยื่อผลไม่แตกต่างกับการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งใช้เวลาเพียง 24 ชั่วโมง การใช้สารละลายที่มีความเป็นกรดอ่อนๆ เช่น กรด salicylic หรือ กรด ascorbic เจือจาง อาจช่วยลดการสร้างสาร phenolic (12) และ ช่วยทำให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพดีขึ้น ส่วนผลที่มียางแต่สามารถล้างออกได้เช่นมะละกอไม่พบปัญหาสามารถถ่ายยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การถ่ายยีนเข้าผลในระยะเต็มมีประสิทธิภาพดีกว่าในระยะผลดิบในมะละกอและกล้วย อาจเนื่องจากในผลเต็ม เซลล์ผลจะเรียงตัวกันอย่างหลวมๆ ไม่อัดแน่นเหมือนผลดิบและมีผนังเซลล์ที่บางกว่า จึงทำให้โอกาสที่เชื้ออะโกรแบคทีเรียจะเข้าสู่เนื้อเยื่อหรือเซลล์จึงเป็นไปได้ง่ายกว่าในผลดิบ

สำหรับการสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อผล เพื่อนำไปวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์สามารถทำได้ง่าย

รวดเร็ว จึงช่วยลดการเสื่อมสลายของโปรตีนได้ การติดสีน้ำเงินของชิ้นเนื้อเยื่อพืชมีความสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ GUS โดยจะเห็นได้ว่าเมื่อเนื้อเยื่อมีสีเข้มมากก็จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ GUS ที่สูงด้วย ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาการสร้างและการทำงานของโปรตีนที่สนใจในผล และตรวจสอบโดยวิธีการอาทิ การย้อม (histochemical) การทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้วิธีนี้นี้ยังสามารถนำมาใช้ทดสอบโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกในผล ซึ่งจะช่วยให้ทราบผลได้อย่างรวดเร็ว และสามารถนำมาปรับใช้ได้กับผลไม้ที่มีลักษณะที่แตกต่างกัน

4. สรุป

การถ่ายยีนแบบชั่วคราวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เตรียม เข้าสู่เนื้อเยื่อผลมะละกอ และ กล้วยวิธีการหั่นชิ้น สามารถถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช และทราบผลการแสดงออกของยีนได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง วิธีการนี้มีประสิทธิภาพดี พืชที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถผลิตโปรตีนภายในเนื้อเยื่อผล และสามารถตรวจวัดปริมาณและการทำงานของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นได้ ซึ่งวิธีการถ่ายยีนแบบชั่วคราวที่ได้พัฒนานี้ขึ้นสามารถใช้เป็นเครื่องมือสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน และการสร้างโปรตีน ที่มีความเฉพาะในผล เบื้องต้นก่อนที่จะมีการถ่ายยีนแบบถาวรเข้าสู่พืชต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- (1) Rainer F, Neil E. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research*. 2000; 9: 279–299.
- (2) Rainer F, Eva S, Stefan S, Paul C, Richard MT. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol*. 2004;7: 152–158.
- (3) Ghosh A, Ganapathi TR, Pravendra N, Bapat VA. Establishment of embryogenic cell suspension cultures and *Agrobacterium*-mediated transformation in an important Cavendish banana cv. Robusta (AAA). *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2009;97: 131-139.
- (4) Li DL, Tan B, Duan YX, Guo WW. Regeneration of transgenic citrus plants from the trimmed shoot/root region of etiolated seedlings. *Biol Plant*. 2009;53: 578–582.
- (5) Spolaore S, Trainotti L, Casadoro G. A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by *Agrobacterium*. *J Exp Bot*. 2001;52: 845–50.
- (6) Jefferson RA. Assaying chimeric genes in plants: the gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep*. 1987;5: 387–405.
- (7) Orzaez D, Mirabel S, Wieland WH, Antonio G. Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol*. 2006;140: 3–11.
- (8) Murashige T, Skoog FA. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962;15: 473-497.
- (9) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72: 248-254.
- (10) Debabandya M, Sabyasachi M, Chandra B S, Digvir S J. Post-harvest processing of banana: opportunities and challenges. *Food Bioprocess Technol*. 2011;4: 327–339.
- (11) BT, Damares CM. *Agrobacterium*-mediated transient expression system in banana immature fruits. *Afr J Biotechnol*. 2009;8: 4039-4042.
- (12) Deepak K, Daya S M, Binayak C, Prabhat K. Pericarp browning and quality management of litchi fruit by antioxidants and salicylic acid during ambient storage. *J Food Sci Technol*. 2011: May: 1-6.