

# ปฏิบัติการ บทที่ 6

## การแยกโพรโทพลาสต์

### บทนำ

#### การแยกโพรโทพลาสต์จากโปรโตครอมของกล้วยไม้

โพรโทพลาสต์ คือ เซลล์ร่างกาย (somatic cell) ที่ไม่มีผนังเซลล์ มีเพียงเซลล์เมมเบรนที่หุ้มนิวเคลียสและไซโทพลาซึมไว้ เนื่องจากโพรโทพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ดังนั้นจึงทำให้สะดวกต่อการไม่ยีนหรือสารพันธุกรรมที่เราสนใจเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้เกิดพันธุ์ใหม่ตามที่ต้องการ

ปี 1982 เริ่มมีการใช้วิธีการในการแยกโพรโทพลาสต์ โดย Kiercher แต่ไม่ประสบความสำเร็จเพราะมีโพรโทพลาสต์ออกมาน้อย Cocking (1960) ได้ทดลองใช้เอนไซม์ cellulase แยกโพรโทพลาสต์จากส่วนปลายรากพืช

Takebe, Otsuki and Aoki (1986) ได้แยกโพรโทพลาสต์แบบวิธีการและใช้เอนไซม์ร่วมด้วยทำให้สามารถแยกโพรโทพลาสต์จากยาสูบได้จำนวนมาก แต่มีปัญหาคือไม่สามารถเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ให้เจริญเป็นแคลลัสได้ และในปี 1986 Takebe, Labib and Melckers ได้เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์จากใบยาสูบจนสามารถ regenerate เป็นต้นได้เป็นครั้งแรก

#### วิธีการแยกโพรโทพลาสต์ ทำได้ 2 วิธีคือ

##### 1. วิธีการ (mechanical method)

เป็นวิธีการแรกที่ มนุษย์ใช้ในการแยกโพรโทพลาสต์ ออกจากเนื้อเยื่อของพืช โดยเอาเนื้อเยื่อพืชมาแช่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง (hypertonic solution) น้ำในเซลล์พืชจะถูกดึงออกมาภายนอกทำให้โพรโทพลาสต์หดตัวลงคือเซลล์เกิด plasmolysis ส่วนเยื่อหุ้มเซลล์จึงแยกออกจากผนังเซลล์ แล้วตัดเนื้อเยื่อพืชเป็นชิ้นบาง ๆ แล้วนำไปแช่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นน้อย (hypotonic solution) โพรโทพลาสต์ จะพองตัวและหลุดออกมา

##### 2. วิธีใช้เอนไซม์ (enzymatic method)

เป็นวิธีที่สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้สมบูรณ์และมีปริมาณมาก โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และเพคตินเนส (pectinase) มาย่อยสลายผนังเซลล์จะได้ส่วนที่เหลือเป็นโพรโทพลาสต์

### ขั้นตอนการแยกโพรโทพลาสต์

นำโปรโตค็อกคัสมาย่อยโดยใช้เอนไซม์ pectinase ซึ่งจะทำหน้าที่ย่อยสารประกอบเพคตินและสารประกอบที่เชื่อมติดกันให้แยกออกมาเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ย่อยบนเครื่องเขย่าเบา ๆ เมื่อเซลล์หลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ แล้วจึงใช้เอนไซม์ cellulase ซึ่งทำหน้าที่ย่อยผนังเซลล์ออกจนได้ โพรโทพลาสต์

### วิธีการเลี้ยงโพรโทพลาสต์

1. เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารแข็ง

1.1 Plating method

1.2 Feeder layer

2. เลี้ยงในอาหารเหลว

2.1 suspension or drop culture

2.2 micro-drop culture

2.3 microchamber technique

### ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการแบ่งตัวของโพรโทพลาสต์

1. ความเข้มข้นของโพรโทพลาสต์ ควรมีความเข้มข้น  $5 \times 10^4 - 10^5$  โพรโทพลาสต์ต่อ มิลลิลิตร

2. การที่เซลล์โพรโทพลาสต์สร้างผนังเซลล์เร็วทำให้เป็นอุปสรรคในการรวมกันของโพรโทพลาสต์

3. การเก็บโพรโทพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหาร ควรเก็บโพรโทพลาสต์ที่แยกใหม่ ๆ ในที่ ๆ มีแสงสลัว เพราะถ้าได้รับแสงทันทีโพรโทพลาสต์อาจตายได้

4. อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเลี้ยงโพรโทพลาสต์คือ 25-29 องศาเซลเซียส



