การแยกโปรโตพลาสต์จากใบพืช

นางสาวจันทร์วิภา รัตนอานันต์
นักวิจัย ชำนาญการ
ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. ม.เกษตรศาสตร์

โปรโตพลาสต์ (protoplast) หมายถึง เซลล์พืชที่ผ่านกระบวนการย่อยเอาผนังเซลล์ (cell wall) ออก สามารถนำมาใช้สร้างลูกผสมที่ไม่สามารถรวมกันได้ตามธรรมชาติ protoplast สามารถแยกได้จาก ใบ กลีบดอก ราก แคลลัส ละอองเกสร หรือ cell suspension แต่ที่นิยมได้แก่ ใบ และ cell suspension เนื่องจากเนื้อเยื่อมีผนังเซลล์ไม่หนาเกินไป และภายหลังการเพาะเลี้ยงสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ดี

โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยง protoplast นั้นจะต้องประกอบด้วยการแยก protoplast (protoplast isolation) การรวม protoplast (protoplast fusion) และการเลี้ยง protoplast (protoplast culture) แต่สำหรับบทความนี้จะเป็นปฏิบัติการแยก protoplast เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับผู้สนใจศึกษา หรือต้องการมาอบรมในหลักสูตรเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช (protoplast) ซึ่งหน่วยงานได้จัดขึ้นเป็นประจำทุกปี

สำหรับการแยก protoplast นั้น สามารถทำได้ 2 วิธี ดังนี้

1. การแยกโดยวิธีกล (mechanical isolation)

- แช่เนื้อเยื่อพืชในสารละลายน้ำตาล หรือเกลือของแคลเซียม/โปแตสเซียม ที่มีความเข้มข้นสูง (hypertonic solution) กว่าสารละลายภายในเซลล์
- น้ำในเซลล์พืชจะถูกดึงออกมาภายนอกทำให้ protoplast หดตัวลง (plasmolysis)
- ตัดเนื้อเยื่อพืชเป็นชิ้นบางๆ ให้เยื่อหุ้มเซลล์แยกออกจากผนังเซลล์
- แช่สารละลายที่มีความเข้มข้นน้อย (hypotonic solution) เป็นการลดแรงดันออสโมติกของสารละลายที่ล้อมรอบชิ้นส่วนพืช
- เกิดการดูดน้ำเข้าไปภายในเซลล์ เซลล์ขยายขนาดใหญ่ขึ้น protoplast จะพองตัว และหลุดออกมา
- วิธีนี้อาจได้ปริมาณ protoplast ออกมาน้อย เหมาะกับเซลล์ที่มีขนาดใหญ่

2. การใช้เอนไซม์

เนื่องจากผนังเซลล์ประกอบด้วย cellulose, hemi cellulose และชั้นระหว่างเซลล์ (middle lamella) ซึ่งมีเพกทิน (pectin) เป็นองค์ประกอบ จึงอาจต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกันเพื่อย่อยผนังเซลล์ เช่น cellulase, hemi cellulase และ pectinase ขั้นตอนการแยกด้วยเอนไซม์ มี 2 รูปแบบ คือ

1) แยกทีละเอนไซม์ คือแยก cellulose ก่อนด้วย cellulase และแยก pectin ด้วย pectinase

2) ใช้เอนไซม์ผสม คือแยก cellulose และ pectin ไปพร้อมๆ กันด้วย cellulase และ pectinase

<u>การแยกโปรโตพลาสต์จากใบเบญจมาศ</u>

- บทปฏิบัติการนี้จะต้องทำให้ตู้ปลอดเชื้อ **(figure 2-A)** และอุปกรณ์ทุกอย่างที่จะนำมาสัมผัสกับ protoplast จะต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclaved) แล้ว
- การแยก protoplast จากใบเบญจมาศจะใช้ทั้งวิธีกล และการใช้เอนไซม์ร่วมด้วย โดยเอนไซม์ที่ใช้คือ Cellulase R-10 ผสมกับ Pectolyase Y-23
- ใบเบญมาศนั้นจะต้องเป็นใบที่มีอายุ 5 สัปดาห์ ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต

ซึ่งขั้นตอนในปฏิบัติการแยก protoplast มีดังนี้

1. ตัดใบเบญจมาศประมาณ 50 ใบ หรือประมาณ 1.0 กรัม ลงในจานแก้ว (petri dish) ขนาดเล็ก หยด washing solution* (สารละลายน้ำตาล และเกลือของแคลเซียมที่มีความเข้มข้นสูง ในที่นี่จะใช้ Mannitol ผสมกับ $CaCl_2.2H_2O$) 2-3 หยด เพื่อให้ protoplast หดตัว

2. วางใบทับซ้อนกันประมาณ 10 ใบ ซอยบางๆ โดยใช้ใบมีดโกนที่คม และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดแยกผนังเซลล์ออกจาก protoplast ระวังไม่ให้ protoplast ได้รับอันตราย

3. เติม washing solution (สารละลายน้ำตาล และเกลือของแคลเซียมที่มีความเข้มข้นต่ำ) 1-2 หลอด ให้ท่วมใบพืชที่หั่นละเอียด ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้เกิดการดูดน้ำเข้าไปภายในเซลล์ เมื่อเซลล์ขยายขนาดใหญ่ขึ้น protoplast จะพองตัวหลุดออกมาจากผนังเซลล์

4. ดูด washing solution ทิ้ง เติมเอนไซม์ Cellulase R-10 ที่ผสมกับ Pectolyase Y-23 **(figure 1-A)** นำไปเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า (shaker) แบบวน ที่ความเร็วรอบ 40 rpm นาน 2-3 ชั่วโมง ระหว่างรอให้ครบเวลาสามารถนำสารละลาย protoplast ไปศึกษาด้วยกล้องชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) **(figure 2-C)** เพื่อดูจำนวน protoplast ว่าออกมามากพอหรือยัง

5. เมื่อครบ 2-3 ชั่วโมง นำสารละลาย protoplast ไปกรองด้วยผ้ากรองที่มีรูขนาด 75 – 150 μm ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดของ protoplast ของพืชแต่ละชนิด และล้างด้วย washing solution **(figure 1-B)**

6. เมื่อได้ protoplast จำนวนมากพอนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ชนิดที่เป็น swinging bucket rotor **(figure 2-B)** ความเร็วรอบ 750 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายด้านบนออกทิ้งด้วย pasteur pipette อย่างเบามือจะได้ protoplast ที่แยกส่วนอยู่ด้านล่าง **(figure 1-C)**

7. เติม washing solution ลงไปประมาณ 2-3 หยด กระจาย protoplast ที่เกาะกันที่ก้นหลอดบนฝ่ามืออย่างช้าๆ และเติม washing solution ลงไปอีก 1-2 หลอด จากนั้นทำ resuspended โดยใช้ pasteur pipette ดูดสารละลายเข้าและออก ให้ปลายหลอดจมอยู่ภายใต้สารละสาย อย่าให้เกิดฟองอากาศเพราะจะทำให้ protoplast แตก และได้จำนวนน้อย

8. นำ protoplast ไป centrifuge **(figure 2-B)** ที่ความเร็วรอบ 750 rpm นาน 3 นาที เป็นจำนวน 2-3 ครั้ง เป็นการล้างเอนไซม์ และ washing solution ออกจาก protoplast ระหว่างนั้นสามารถหยด protoplast บนสไลด์ไปศึกษารูปร่าง และจำนวนของ protoplast ได้ **(figure 1-D)**

9. ทำ protoplast ให้บริสุทธิ์ (protoplast purification) ด้วย sucrose 20 % โดยหยอด protoplast ลงใน sucrose 20 % ซึ่งบรรจุใน vol. flask ขนาด 10 ml อย่างช้าๆ จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 750 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ protoplast แยกชั้น

10. เก็บ protoplast ที่เกิดเป็น band ตรงกลางใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด เติม washing solution ลงไป 1 ml. แล้วนำไปหยดบนสไลด์นับเซลล์ Haemacytometer **(figure 2-D)** เพื่อนับจำนวน protoplast

11. เติมอาหารลงไปเจือจางให้ protoplast มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นั่นคือมี $1x10^5$ protoplast/ml จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อไป

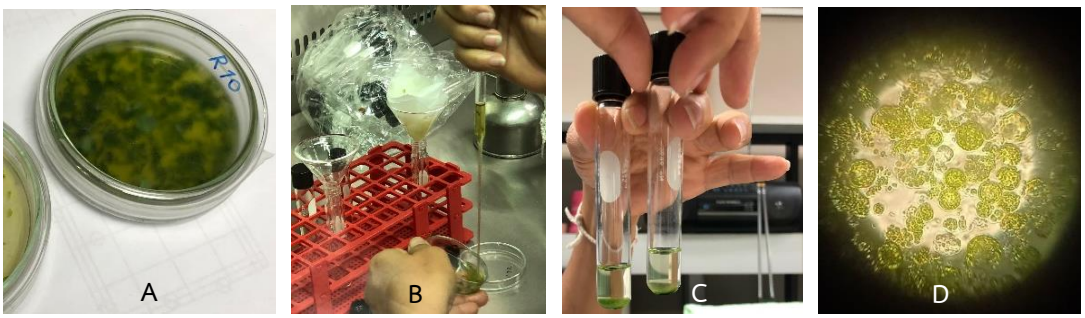

Figure 1 ขั้นตอนการแยก protoplast จากใบเบญจมาศ

A ใบเบญจมาศแช่ในเอนไซม์ B การกรอง และการเก็บ protoplast

C protoplast ที่ได้หลังจาก centrifuge D protoplast ที่ได้จากใบเบญจมาศ

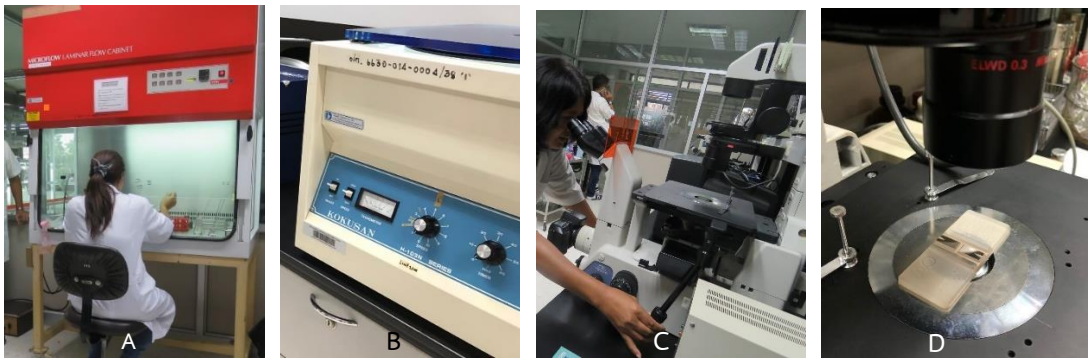

Figure 2 เครื่องมือที่ใช้ในการแยก protoplast จากใบเบญจมาศ

A ตู้ปลอดเชื้อ (Micro flow) B เครื่อง Centrifuge (swinging bucket rotor)

C กล้องชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope) D สไลด์นับเซลล์ (Haemacytometer)

เอกสารอ้างอิง

Toan Khac Nguyen, Suong Tuyet Thi Ha, JinHee Lim. 2019. Optimization of Protoplast Isolation Methods from Leaves in *Chrysanthemum morifolium* ‘Jinba’. Annals of Biological Sciences, 7 (1):16-1

Salak Phansir, Rommanee Charoensub, Ploenchit Plasilmongkon, Chanwipa Boon- in and Takeshi Taniguchi. 2546. การรวมและการถ่ายยีนส์เข้าสู่โปรโตพลาสต์ของปอสา (Somatic hybridization and direct uptake DNA of paper mulberry protoplasts) โครงการถ่ายทอดงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษจากปอสา. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.