ชี้
SB
608
.C88ธ
ฉ14ว๓
2550
C.2

สำนักหอสมุด
ว.วท.ชม.86 C.2
23 พ.ย. 2550

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

พืชที่ใช้ในการทดลอง

1. พิทูเนีย *(Petunia axillaris)* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุต้น 1 – 2 เดือน โดยเลือกใบที่มีขนาดประมาณ 0.5×1.5 เซนติเมตร

2. ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุต้น 1 – 2 เดือน โดยเลือกใบที่มีขนาดประมาณ 1.5×3 เซนติเมตร

3. ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.)

3.1 ช่อดอกย่อย (floral primodia (*f*) หรือ coinflorescence) (ภาคผนวก ค ภาพ 33 (ก)

3.2 ต้นที่มีลักษณะคล้ายยอด (retarded shoot) (ภาคผนวก ค ภาพ 33 (ข)

แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

1. แบคทีเรียที่ใช้คือ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO / pSCV1.6

2. พลาสมิดที่ใช้ มี 4 ชนิด คือ pSCV1.6, pBI121, pCAMBIA1303 และ pCAMBIA1304

การค้นหายีน Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) จากกลีบดอก (petal) ของปทุมมา

1. การเตรียมอาร์เอ็นเอ (total RNA)

1.1 การเตรียมตัวอย่างพืชทดลอง

นำกลีบดอกของปทุมมามาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ –80 $^{\circ}$C เพื่อนำไปใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA)

1.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ

1.2.1 นำตัวอย่างที่บดละเอียด 50-100 mg ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่มีTRIZOL® Reagent ปริมาตร 1 ml ผสมตัวอย่างกับ reagent โดยวิธี vortex และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที

1.2.2 เติม chloroform ปริมาตร 0.2 ml พลิกหลอดกลับไปมาเบา ๆ นาน 15 วินาที จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 นาที

1.2.3 นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 2-8 °C แล้วจึงดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (aqueous phase) ใส่หลอดใหม่

1.2.4 เติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 0.5 ml พลิกหลอดกลับไปมาจากนั้น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

1.2.5 นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 2-8 °C เทส่วนใสด้านบนทิ้งไปเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอน หลังจากนั้นล้างตะกอนโดยเติม 75 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 1 ml นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 7,500 g นาน 5 นาที ที่ 2-8 °C

1.2.6 นำตะกอนอาร์เอ็นเอมาทำให้แห้งโดยวิธี air dry ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำที่ปราศจาก RNase (Rnase-free water) ปริมาตร 20 µl

1.2.7 ตรวจสอบอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วย 1.4 เปอร์เซ็นต์ agarose/EtBr electrophoresis โดยจะสังเกตเห็นแถบ 28S และ18S ribosomal RNA

2. การสังเคราะห์ First Strand cDNA (RevertAid^{TM} First Strand cDNA Kit, Fermentas, U.S.A.)

เตรียมสารละลายลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วย อาร์เอ็นเอทั้งหมด 0.1-5 µg , oligo(dT)$_{18}$primer 0.5 µg และ deionized water ให้ครบ 20 µl ผสมให้เข้ากันเบา ๆ บ่มที่ 70°C นาน 5 นาที จากนั้นแช่หลอดบนน้ำแข็งแล้วเติม 1x reaction buffer, RiboLock^{TM} Ribonuclease inhibitor 20 Unit/reaction และเติม dNTPs 1 mM (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37°C นาน 5 นาที จากนั้นเติม RevertAid^{TM}M-MuLV Reverse Transcriptase 200 Unit/reaction บ่มที่ 42°C นาน 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยความร้อนที่ 70°C นาน 10 นาที เก็บ First Strand cDNA ไว้ที่ -70°C

3. การขยายปริมาณ cDNA ที่เข้ารหัส Dihydroflavonol 4-reductase gene (*DFR* gene) ด้วยเทคนิค RT-RCR

3.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้บริเวณอนุรักษ์ (Conserved domain) ของ *DFR* gene จาก Dianthus, Fragaria, Cymbidium, Ipomoea, Petunia, Lilium, Prim.cons. โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาใช้ออกแบบเป็นไพรเมอร์ แสดงดังตารางที่ 1

ตาราง 1 แสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในการแยก *DFR* gene จากดอกปทุมมา ด้วยเทคนิค RT-RCR

รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' 3'
DFR F2 (Forward primer)*	GG(ATGC) TT(TC) AT(ACT) GG(ATGC) AT(AT) TGG
DFR R5 (Rerward primer)*	GG(ATCG) AC(GA) TT(GA) TA(TC) TC(ATCG) GG

* สังเคราะห์โดยบริษัท Operon Technology, Alamada, U.S.A

3.2 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 µl ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วย 1x reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 0.1เปอร์เซ็นต์ Triton X-100), 2 mM $MgCl_2$, dNTPs (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) อย่างละ 200 µM, ไพรเมอร์ DFR F2 และ DFR R5 อย่างละ 0.5 µg, Taq DNA polymerase 2.5 Unit/reaction และ 1^{st}cDNA (DNA template) 40 ng ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionize water จากนั้นจึงดำเนินการเพิ่มขยายปริมาณ 1^{st} cDNA ด้วยเครื่อง PCR

3.3 เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition) ในเทคนิค RT- PCR

แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR

ตาราง 2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR เพื่อแยกดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส

อุณหภูมิ	94 °C	94 °C	50 °C	72 °C	72 °C	4 °C
ระยะเวลา	2 นาที	45 วินาที	45 วินาที	1 นาที	10 นาที	α
จำนวนรอบ		←——— 35 รอบ ———→				

ตาราง 3 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR เพื่อแยกดีเอ็นเอขนาดประมาณ 850 คู่เบส

อุณหภูมิ	94°C	94 °C	53 °C	72°C	72 °C	4°C
ระยะเวลา	2 นาที	45 วินาที	45 วินาที	1 นาที	10 นาที	∝
จำนวนรอบ		←——— 35 รอบ ———→				

4. การวิเคราะห์โดย Agarose electrophoresis

4.1 เตรียม agarose ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1 x TBE buffer (ภาคผนวก) แล้วนำไปต้มจน agarose ละลายตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิ 50°C

4.2 ทำความสะอาดถาดเจล และหวีเสียบ (comb) ให้สะอาดด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol แล้วนำถาดเจลไปประกอบเข้ากับบล็อก

4.3 วางหวีเสียบลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดเจล เพื่อให้เกิดช่องเล็ก ๆ สำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ

4.4 เท agarose ลงในถาดเจลที่เตรียมไว้โดยให้แผ่น agarose มีความหนาประมาณ 3-5 mm ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

4.5 เททับผิวหน้าของเจลด้วย 1 x TBE buffer เพื่อไม่ให้เจลแห้ง และสะดวกต่อการดึงหวีเสียบออก

4.6 นำถาด agarose gel ออกจากบล็อกแล้ววางถาดลงในอ่าง electrophoresis โดยให้ด้านที่หวีเสียบอยู่ทางขั้วลบ

4.7 เท 1 x TBE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่น agarose gel โดยให้ระดับ 1 x TBE buffer อยู่เหนือผิวเจลประมาณ 1-3 mm

4.8 ผสม 1 x loading buffer (ภาคผนวก) กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ และดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย แล้วค่อย ๆ หยอดลงในช่องของ agarose gel

4.9 ปิดฝาอ่าง electrophoresis แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 50 นาที หรือเมื่อแถบสีล่างของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่อีกปลายด้านหนึ่งของเจลโดยห่างจากด้านล่างถาดประมาณ 1 cm แล้วจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

4.10 ย้อมดีเอ็นเอโดยนำแผ่น agarose gel ไปแช่ใน EtBr นาน 10 นาที จากนั้นย้ายไป แช่น้ำอีก 5 นาที เพื่อล้าง EtBr ส่วนเกิน

4.11 นำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูแบนดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมกับบันทึกภาพไว้

4.12 ตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการโดยดูขนาดเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานเก็บไว้ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่ 4°C จนกว่าจะนำมาแยกเอาดีเอ็นเอออก

5. การ clone ชิ้นส่วน *DFR* gene (Inst/Aclone™PCR Product Cloning Kit, Fermentus, U.S.A)

5.1 องค์ประกอบในปฏิกิริยาการเชื่อม (Ligation)

เตรียมสารละลายปริมาตร 30 µl ประกอบด้วย plasmid vector pTZ57R (ภาคผนวก) 0.165 µg, purified PCR fragment 0.54 pmol, 1x ligation, PEG 4000 solution, T4 DNA ligase 5 Unit และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionized water จากนั้นบ่มที่ 22°C นาน 12 ชั่วโมง

5.2 Transformation โดยใช้ The TransformAid™Bacterial Transformation System

5.2.1 เตรียม E.*coli* สายพันธุ์ DH5-α โดยเลี้ยงเซลล์ใน TransformAid™C-Medium ปริมาตร 2 ml จากนั้นเขย่าที่ 37°C นาน 12 ชั่วโมง

5.2.2 เติมเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยง12 ชั่วโมง ปริมาตร 1/10 ของ TransformAid™C-Medium จากนั้นบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที

5.2.3 บ่ม LB-Ampicillin/X-gal agar plate ที่ 37 °C อย่างน้อย 20 นาที

5.2.4 เตรียม TransformAid™T-Solution โดยการผสม T-solution (A) กับ T-solution (B) ในปริมาตร 1:1 จากนั้นเก็บ TransformAid™T-Solution ไว้บนน้ำแข็ง

5.2.5 เก็บเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ 20 นาทีโดยใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml และนำไป centrifuge ที่ความเร็วสูงสุด 4 °C เป็นเวลา 1 นาที

5.2.6 ทิ้งส่วนใสและ resuspend ตะกอนเซลล์ด้วย TransformAid™T-Solution ปริมาตร 300 µl จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที

5.2.7 centrifuge เซลล์อีกครั้งที่ความเร็วสูงสุด 4 °C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใส

5.2.8 resuspend ตะกอนเซลล์ด้วย TransformAid™T-Solution ปริมาตร 120 µl จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที

5.2.9 เตรียม ligation mixture โดยแบ่งใส่ eppendrof ขนาด 1.5 ml หลอดละ 15 µl และวางบนน้ำแข็งนาน 2 นาที

5.2.10 เติมเซลล์ที่แขวนลอยปริมาตร 60 µl ในแต่ละหลอดของ ligation mixture จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที

5.2.11 กระจายเซลล์บน LB-Ampicillin/x-gal agar plate ที่อุ่นที่ 37°C จากนั้นบ่มเซลล์ที่ 37°C นาน 12 ชั่วโมง

6. การตรวจสอบแบคทีเรียที่ได้รับดีเอ็นเอลายผสม (Recommbinant DNA)

6.1 การแยกพลาสมิดโดยวิธี Alkaline

6.1.1 เลือกโคโลนีสีขาวจากแบคทีเรียที่เจริญบน LB-Ampicillin/x-gal agar plate โดยนำมาเลี้ยงใน LB- Ampicillin both ที่ 37 °C เขย่านาน 12 ชั่วโมง

6.1.2 นำเชื้อ 1.5 ml ใส่ลงใน microtube ปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนใสเก็บเฉพาะตะกอนเซลล์

6.1.3 นำตะกอนเซลล์มาเติม solution I ปริมาตร 300 µl vortex ให้เข้ากัน จากนั้นเติม solution II ปริมาตร 300 µl และกลับหลอดไปมาเบาๆ 4 ครั้ง และเติม solution III ปริมาตร 300 µl เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ จะเห็นตะกอนสีขาว ๆ เกิดขึ้น แช่ต่อในน้ำแข็งอีก 10 นาที

6.1.4 นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกตะกอนทิ้ง เก็บส่วนใสมาเติมด้วย absolute ethanol ที่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของน้ำใส

6.1.5 ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่ –20 °C นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °Cนาน10 นาทีและแยกเอาตะกอนพลาสมิดมาละลายด้วย 0.05 M Tris, 0.1 M NaOAc (pH 8)

6.1.6 เติม absolute ethanol ที่เย็น 2 เท่าของปริมาตรน้ำใส เขย่าให้เข้ากัน นำไปไว้ที่ –20 °C นาน 30 นาที และปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 10 นาที

6.1.7 ทิ้งส่วนใส และนำตะกอนพลาสมิดล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 500 µl จากนั้นนำมาปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 5 นาที

6.1.8 นำตะกอนพลาสมิดมาทำให้แห้งโดยวิธี air dry แล้วละลายด้วย TE ปริมาตร 20 µl

6.1.9 ตรวจสอบพลาสมิดโดยการทำ agarose gel electrophoresis

6.2 การตรวจสอบพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme)

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 µl ซึ่งประกอบด้วย 1x buffer, plasmid 2 µg,. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 15 Unit และ *Hind* III 15 Unit ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย sterile water จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C นาน 12 ชั่วโมง ตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยทำ agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับแทบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Molecular Marker)

7. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์(Sequencing) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกได้

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกได้เบื้องต้นด้วยวิธี Silver Sequencing (Silver Sequencing kit, Promega, U.S.A.)

7.1 ปฏิกิริยาการหาลำดับเบส (Sequencing Reaction)

7.1.1 เตรียมปฏิกิริยา 4 ปฏิกิริยาในแต่ละหลอดโดยเติม ddGTP, ddATP, ddTTP และ ddCTP ปริมาตร 2 µl ลงในแต่หลอดของ microcentrifuge tube ขนาด 0.2 ml และเก็บไว้บนน้ำแข็ง

7.1.2 เตรียม Master mixture ซึ่งประกอบด้วย plasmid template DNA จำนวน 1-2 pmol, DNA sequencing 1.5x Buffer, Primer (T7 หรือ SP6) 4.5 pmol และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย Nuclease-Free water ให้เท่ากับ 16 µl จากนั้นเติม Sequencing Grade *Taq* DNA polymerase 5 Unit ผสมให้เข้ากัน

7.1.3 แบ่งสารละลายจาก Master mixture ปริมาตร 4 µl ลงในหลอดที่มี d/ddNTP Mix ผสมให้เข้ากัน และปั่นให้สารละลายข้างผนังหลอดตกลง

7.1.4 วาง reaction tube ใน thermal cycler ซึ่งมีเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition) ดังตาราง 4

7.1.5 เมื่อครบเวลาแล้ว เติม DNA Sequencing Stop Solution ปริมาตร 3 µl ผสมให้เข้ากัน

ตาราง 4 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค Silver Sequencing (Sequencing kit, Promega, U.S.A.)

อุณหภูมิ	95°C	95 °C	42°C	70°C	4°C
ระยะเวลา	2 นาที	30 วินาที	30 วินาที	1 นาที	α
จำนวนรอบ	←——— 50 รอบ ———→				

7.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดย Polyacrylamide gel electrophoresis

7.2.1 เตรียม 6 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide (ภาคผนวก)

7.2.2 เตรียมกระจก โดยล้างกระจกทั้งสองด้านให้สะอาด แล้วเช็ดให้แห้งโดยใช้กระดาษเช็ดกระจก (Kimwipes EX-L) จากนั้นเช็ดด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol อีกครั้ง แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง

7.2.3 เตรียมกระจกอีกด้าน IPC (integral Plate/chamber) โดยเช็ดด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นหยดน้ำยาเคลือบกระจก (clear view) เช็ดให้ทั่ว เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเจลติดกับกระจก ด้านนี้ แล้วจึงเช็ดด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง

7.2.4 นำแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้แล้วมาเช็ดด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol 1 ครั้ง รอให้แห้งแล้วจึงผสม bind silane ปริมาตร 1.5 µl กับ 0.5เปอร์เซ็นต์ acetic acid/ 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 1 ml แล้วเช็ดซ้ำด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol อีก 3 รอบจนแน่ใจว่าทั่วทั้งแผ่นกระจก

7.2.5 ประกบตัวกระจกทั้งสองเข้าด้วยกัน โดยวาง spacer ไว้ตรงกลางระหว่างกระจกทั้งสองแผ่นที่ขอบทั้งสองด้านของกระจก แล้วประกอบชุดกระจกให้แน่นด้วยตัวยึด

7.2.6 นำ 6 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide ปริมาตร 50 ml มาเติม 10 เปอร์เซ็นต์ APS ปริมาตร 300 µl และ TEMED ปริมาตร 100 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงในชุดกระจกที่เตรียมไว้ โดยเทช้า ๆ ในแนวราบ เอียงเล็กน้อยเพื่อให้เจลไหลทั่วทั้งแผ่น ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วสอด comb ด้านเรียบเข้าไปในเนื้อเจล ทิ้งให้เจลเซตตัวที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2-3 ชั่วโมง

7.2.7 นำชุดกระจกที่มี polyacrylamide gel แข็งตัวแล้วนำมาประกอบกับชุด gel electrophoresis ชนิดแนวตั้ง เท 1x TBE buffer ลงใน chamber ให้ท่วมระดับขอบกระจกที่ประกบกัน ทิ้งไว้สักครู่ให้ buffer ซึมลงในเนื้อกระจก แล้วจึงถอด comb ออก ล้างเอาเศษชิ้นส่วน

ของเจลออกจากช่อง จากนั้นจึงวาง comb ลงไปใหม่ โดยเอาด้านที่มีปลายแหลมลง เพื่อให้เกิดช่องสำหรับหยอดตัวอย่าง

7.2.8 นำ reaction ของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาให้ความร้อนที่ 70 °C นาน 2 นาที จากนั้นจึงหยอดแต่ละ reaction ลง 6 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel ปริมาตร 3-3.5 µl แล้วจึงต่อเข้ากับกระแสไฟฟ้า 60 W โดยให้กระแสไฟฟ้าตัวอย่างที่หยอดครั้งแรก ประมาณ 45 นาที จากนั้นหยอดตัวอย่างชุดที่สองตาม และให้กระแสไฟฟ้าอีกประมาณ 70 นาที แล้วจึงปิดเครื่องส่งกระแสไฟฟ้า (power supply)

7.2.9 แกะชุดกระจกที่ประกบออกจากกัน แล้วนำแผ่นกระจกใส่ใน fixer solution (ภาคผนวก) เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่าประมาณ 30 นาที แล้วล้างด้วย ultrapure water 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที เพื่อล้าง acetic acid ออกให้หมด

7.2.10 จากนั้นนำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาใส่ใน silver staining solution (ภาคผนวก) แล้วเขย่าบนเครื่องเขย่าประมาณ 30 นาที แล้วล้างด้วย ultrapure water นาน 6 วินาที จากนั้นจึงนำไปแช่ใน developer solution (ภาคผนวก) เขย่าจนเห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยเทผสม fixer solution กับ developer solution ในขณะที่ยังเขย่าอยู่ แล้วเขย่าต่อไปอีกประมาณ 2-5 นาที และล้างด้วย ultrapure water อีกครั้ง

7.2.11 นำแผ่นกระจกมาตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วบันทึกภาพเก็บไว้

7.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

อ่านลำดับนิวคลีไทด์โดยอ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏตามลำดับ reaction (A, T, C, G) ที่เรียงไว้จากด้านล่างไปยังด้านบนของกระจก โดยด้านล่างของกระจกเป็นด้าน 5' และด้านบนเป็น 3' ของสายดีเอ็นเอ

การเตรียมยีนเพื่อการส่งถ่ายเข้าสู่เนื้อเยื่อปทุมมา พิทูเนีย และยาสูบ

ในการส่งถ่ายยีนนี้จะแบ่งออกเป็น 2 การทดลองคือ

1. **ส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปทุมมา พิทูเนีย และยาสูบโดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วย พลาสมิด 4 ชนิด**

ที่มี marker gene คือ *Gus* gene ภายใต้การทำงานของ 35S promoter ดังนี้ *A. tumefaciens* AGLO / pSCV1.6 , *A. tumefaciens* AGLO / pBI121 , *A. tumefaciens* AGLO / pCAMBIA1303 and *A. tumefaciens* AGLO / pCAMBIA1304

1.1 การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO โดยวิธี Triparental mating

1.1.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. Coil* ที่มีพลาสมิดดังกล่าวแต่ละชนิด และ *E. Coli* ที่มี พลาสมิด pRK2013 ในอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะ100 mg/l Kanamycinบ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง รวมทั้ง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ที่ไม่มีพลาสมิดเวกเตอร์ ในอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะ 50 mg/l Rifamplicin บ่มที่อุณหภูมิ 28° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.1.2 เลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มาเลี้ยงร่วมกันโดยบ่มที่อุณหภูมิ 28° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ที่ได้รับมีพลาสมิดแต่ละชนิด โดยนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มี 50 mg/l Rifampicin และ 100 mg/l Kanamycin

1.1.3 ตรวจสอบขนาดพลาสมิดทั้ง 4 ชนิดใน *A. tumefaciens* โดยการเตรียมพลาสมิดแต่ละชนิด แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Agarose gel eletrophoresis เพื่อดูว่าขนาดของโมเลกุลเท่ากับขนาดของพลาสมิดที่ใส่ไปหรือไม่

2. ส่งถ่ายยีนด้วยวิธี Antisense technique ของยีน *DFR* เข้าสู่เนื้อเยื่อปทุมมาพิทูเนีย และยาสูบโดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO

2.1 ย้ายยีนสังเคราะห์เอนไซม์ *DFR* เข้าเชื่อมต่อในพลาสมิด vector pBI121 โดยทิศทาง Antisense

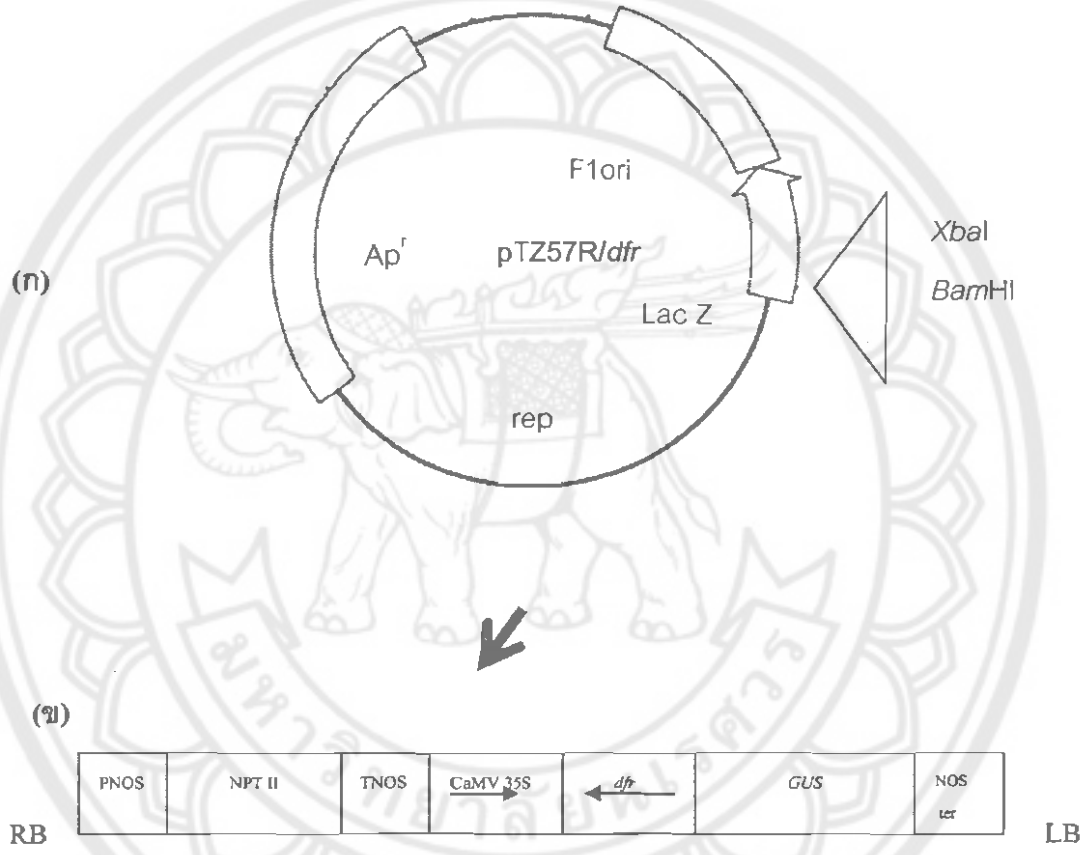
2.1.1 เตรียมพลาสมิด pBI 121 จากเชื้อ *E.coli* เพื่อใช้เป็นพลาสมิด Vector ในการส่งถ่ายยีน โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pBI121 จากการสกัดมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI

2.1.2 เตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ pTZ57R ซึ่งบรรจุชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *DFR* ซึ่งมีขนาดประมาณ 850 bp ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI

2.1.3 นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pBI 121 และ pTZ57R ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วมาทำ agarose gel electrophoresis เพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ

2.1.4 นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pBI 121มาเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนซีดีเอ็นเอของยีน *DFR* ขนาด 850 bp ตรงตำแหน่งเดียวกับที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI ซึ่งจะเชื่อมต่อกันแบบ antisense แล้วนำไปส่งถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli*

2.1.5 ตรวจสอบพลาสมิด pBI121ที่มีชิ้นส่วนยีน *DFR* โดยการเตรียม พลาสมิดดีเอ็นเอ จากเชื้อ *E.coli* ที่ได้รับพลาสมิดดังกล่าว แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากนั้นจึงนำไปทำ agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Molecular Marker)



ภาพ 4 ย้ายยีนสังเคราะห์เอนไซม์ DFR เข้าเชื่อมต่อในพลาสมิด vector pBI121 โดยทิศทาง Antisense

(ก) pTZ57R/*DFR*

(ข) pBI121/*DFR* ซึ่งมี RB, right border of T-DNA; และ LB, left border of the T-DNA;

PNOS, nopaline synthase gene promoter; NPT II, neomycin phosphotransferase; TNOS,

2.2 การส่งถ่ายพลาสมิด ดีเอ็นเอ(pBI121/ *DFR*)เข้าสู่ *A. tumefaciens* ด้วยวิธีเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation)

2.2.1 การเตรียมพลาสมิดจากเชื้อ *E.coli* โดย เลือกหนึ่งโคโลนี *E.coli* ที่ผ่านการ ส่งถ่าย พลาสมิดดีเอ็นเอ pBI121 ซึ่งบรรจุยีน *DFR*

2.2.1.1 เตรียมพลาสมิดจากเชื้อ *E.coli* โดย เลือกหนึ่งโคโลนี *E.coli* ที่ผ่านการส่งถ่าย พลาสมิดดีเอ็นเอ pBI 121 ซึ่งบรรจุยีน *DFR* โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้วถ่ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่ Kanamycin ความเข้มข้น 100 µg/ml ในหลอดทดลอง ปริมาณ 2 ml/หลอด

2.2.1.2 นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 1 คืน

2.2.1.3 ถ่ายเชื้อลงใน centrifuge tube ขนาด 1.5 ml ปริมาณ 1.5 ml ปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ระยะเวลา 2 นาที แล้วเท สารละลายใสส่วนบน supernatant) ทิ้ง เติมสารละลาย BP1 (50 mM Tris-HCl 1และ 10 mM EDTA) ปริมาณ 300 ml แล้วละลายเซลล์ที่ตกตะกอนให้อยู่ในลักษณะของเซลล์แขวนลอยด้วยเครื่อง vortex

2.2.1.4 เติมสารละลาย BP2 (200 mM NaOH และ 1เปอร์เซ็นต์ SDS) ปริมาณ 300 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการพลิกกลับไปกลับมา ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

2.2.1.5 เติมสารละลาย 3 M Potassium acefrate pH 5.0 ปริมาณ 300 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการพลิกกลับไปกลับมานำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 10 – 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ระยะเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาสารละลายใสส่วนบนมาใสใน centrifuge tube ขนาด 1.5 ml ใหม่

2.2.1.6 เติม isopropanol 700 µl แช่ในตู้แข็งนาน 10 – 12 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ระยะเวลา 10 นาที แล้วเทสารละลายใสส่วนบนทิ้ง

2.2.1.7 เติม 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol 100 µl ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ระยะเวลา 3 นาที เทสารละลายใสส่วนบนทิ้ง และคว่ำ centrifuge tube จนแห้ง

2.2.1.8 เติมสารละลาย TE buffer ปริมาณ 20 µl

2.2.2 การเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์เพื่อนำไปใช้ในการทรานสฟอร์เมชันด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน(Electroporetion)

2.2.2.1 นำเซลล์ *Agrobacterium* ที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหาร LB มาแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งนาน 15-20 นาที ปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 3500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที เทสารละลายใสส่วนบนทิ้ง

2.2.2.2 เติมสารละลาย 10 mM HEPES ปริมาณ 100 ml ละลายเซลล์ที่ตกตะกอนให้อยู่ในลักษณะของเซลล์แขวนลอยอย่างช้า ๆ ปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว4000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที เทสารละลายใสส่วนบนทิ้งแล้วทำซ้ำอีกครั้ง

2.2.2.3 เติมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1 ml แบ่งเก็บเซลล์แขวนลอยในหลอด centrifuge tube ขนาด 1.5 ml ปริมาณ 100 /หลอด เก็บในตู้แช่งอุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปใช้ในการทรานสฟอร์เมชันด้วยวิธีอิเล็คโตรโพเรชันต่อไป (โดยใช้เงื่อนไขของเครื่องอิเล็คโตรโพเรเตอร์ คือ สนามไฟฟ้าที่ 12.5 kV/cm ความต้านทาน 200 และค่าปริมาณกระแสไฟฟ้า 2.5)

2.2.2.4 ละลายเซลล์คอมพิเทนท์ และเติมพลาสมิดดีเอ็นเอ(pBI121/ *DFR*)ทันที จากนั้นผสมเข้ากัน แล้วแช่ในน้ำแข็ง นาน 15-20 นาที

2.2.2.5 ถ่ายส่วนผสมที่ได้ลงใน cuvettes จากนั้นเช็ดให้แห้งแล้วนำไปกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า

2.2.2.6 ดูดส่วนผสมจาก cuvette แล้วถ่ายลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลวสูตร LB ปริมาณ 1 ml นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 28 °C ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 150 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

2.2.2.7 ทำการเจือจางเชื้อด้วยน้ำกลั่นจากนั้นนำไป Spread plates บนอาหารแข็งสูตร LB ที่มี 50 mg/l Rifampicin และ 100 mg/l Kanamycin ความเข้มข้น 100 g/ml ปริมาณเชื้อ 50 / จานเลี้ยงเชื้อนำไปเลี้ยงต่อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C ระยะเวลา 2 คืน

2.2.2.8 แล้วคัดเลือกโคโลนีของ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ (pBI121/ *DFR*) ด้วยการตัดด้วย restriction enzyme

วิธีการส่งถ่ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* เข้าสู่พืชทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อการส่งถ่ายยีน

1.1 **พิทูเนีย** *(Petunia axillaris)*

1.1.1 **ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดพิทูเนีย โดยนำเมล็ดแช่แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์** นาน 5 นาที แล้วนำไปแช่คลอรอกซ์ 10เปอร์เซ็นต์ tween20 1-2 หยด เขย่านาน 20 นาที จากนั้น ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับเอาน้ำออกด้วยกระดาษกรอง

1.1.2 นำเมล็ดที่ได้ไปวางบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีฮอร์โมนให้แสง fluorescent (day light) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 ρmol/m^2/วินาที ระยะห่างจากไฟ 1.5 ฟุต อุณหภูมิ 25-26 °C

1.1.3 จากนั้นนำใบจากต้นที่เจริญเติบโตเป็นต้นสมบูรณ์อายุประมาณ 3 สัปดาห์ มาเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดยอด (shoot) ในอาหาร MS-PT (MS medium ที่มี 1.0 mg/l BAP และ 0.1 mg/l NAA) ให้แสง fluorescent(day light)เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 ρmol/m^2/วินาที ระยะห่างจากไฟ 1.5 ฟุต อุณหภูมิ 25-26 °C (Peterman and Melan. 1997)

1.1.4 เลือกใบจากต้นที่มีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ ตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 cm^2 เพื่อใช้ในการส่งถ่ายยีน

1.2 ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*)

1.2.1 ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) พันธุ์เวอร์จีเนีย K326 โดยนำเมล็ดแช่แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที แล้วนำไปแช่คลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ tween20 1-2 หยด เขย่านาน 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับเอาน้ำออกด้วยกระดาษกรอง

1.2.2 นำเมล็ดที่ได้ไปวางบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีฮอร์โมนให้แสง fluorescent (day light) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 ρmol/m^2/วินาที ระยะห่างจากไฟ 1.5 ฟุต อุณหภูมิ 25-26 °C

1.2.3 จากนั้นนำใบจากต้นที่เจริญเติบโตเป็นต้นสมบูรณ์อายุประมาณ 3 สัปดาห์มาเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดยอด (shoot) ในอาหาร MS-TB (MS medium ที่มี 1.0 mg/l BAP และ 0.1 mg/l NAA) ให้แสง fluorescent (day light) เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 ρmol/m^2/วินาที ระยะห่างจากไฟ 1.5 ฟุต อุณหภูมิ 25-26 °C (Peterman and Melan. 1997)

1.2.4 เลือกใบจากต้นที่มีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ ตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 cm^2 เพื่อใช้ในการส่งถ่ายยีน

1.3 ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.)

พืชที่ใช้ในการทดลองคือช่อดอกย่อย(coinflorescence)ในสภาพธรรมชาติและต้นที่มีลักษณะคล้ายยอด (retarded shoot) ของปทุมมาที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

1.3.1 ช่อดอกย่อย (coinflorescence)

1.3.1.1 นำช่อดอกย่อยของปทุมมา ฟอกฆ่าเชื้อด้วย แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที

1.3.1.2 จากนั้นนำมาฟอกด้วย Mercuric chloride 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3-5 ครั้ง

1.3.1.3 นำส่วนช่อดอกย่อยปทุมมาที่ฟอกฆ่าเชื้อ มาใช้ในการส่งถ่ายยีนต่อไป

1.3.2 ต้นที่มีลักษณะคล้ายยอด (retarded shoot)

1.3.2.1 นำส่วนของช่อดอกย่อยที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-CI ที่มี 10 mg/l BA และ 0.1 mg/l IAA เพื่อให้ช่อดอกเกิดการผันกลับเป็นต้น (Topoonyanont et al., 2004)

1.3.2.2 หลังจากนั้น 1 เดือน ย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงต่อบนอาหารดัดแปลงสูตร MS – CM (0.1 mg l^{-1} IAA, 4 mg l^{-1} IMA and 0.5 mg l^{-1} TDZ) โดยจะให้แสง fluorescent (day light) เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 ρmol/m^2/วินาที อุณหภูมิ 25-26 °C

1.3.2.3 หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 เดือน ช่อดอกย่อยจะมีการพัฒนาและเจริญผันกลับไปเป็นต้น (retarded shoot)

1.3.2.4 ตัดเอาเนื้อเยื่อ retarded shoot ของปทุมมาขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 cm^2 เพื่อใช้ในการส่งถ่ายยีนต่อไป

2. การส่งถ่ายโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO

(ดัดแปลงจากวิธีการของ Peterman & Melan 1997) ดังขั้นตอนต่อไปนี้

2.1 เลี้ยง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ในอาหารเหลวสูตร LB ที่มี 50 mg/l Rifampicin และ 100 mg/l Kanamycin โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 °C เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 2 คืน

2.2 นำ 1 ml ของ *A. tumefaciens* ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 ml ที่มีสารปฏิชีวนะจากนั้นเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลาหนึ่งคืน

2.3 นำแบคทีเรียมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที 5 นาที อุณหภูมิ 4 °C

2.4 ละลายเซลล์แบคทีเรียที่ได้ด้วยอาหารสูตร MS - 20 (MS medium + 2 เปอร์เซ็นต์ sucrose + 100 μm acetonesyringone + 0.1 M betain hydrochloride pH5.7) ให้ได้ค่า OD_{600} = 0.4 – 0.6 จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20-25 °C นาน 3 - 5 ชั่วโมง

2.5 นำชิ้นส่วนของพืชมาแช่ในสารละลายแบคทีเรีย นาน 30 นาที

2.6 นำชิ้นส่วนของพืช (ส่วนใบของพิทูเนีย ยาสูบ ช่อดอกย่อย (coinflorescence)และretarded shoot ของปทุมมา) มาซับด้วยกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยอาหาร MS-20 ที่วางบนอาหารสูตร MS - TB เป็นเวลา 2 วัน ในที่มืด เรียกวิธีการนี้ว่า co-cultivation เพื่อให้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช

2.7 นำชิ้นส่วนของพืชดังกล่าวมาล้างเพื่อกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* โดยล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3-5 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นที่มี 400 mg/l Cefotaxim เป็นเวลา 30 นาที

2.8 นำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นของพืชแต่ละชนิด สำหรับ พิทูเนียในอาหาร MS-PB ยาสูบ ในอาหาร MS-TB ช่อดอกย่อย(coinflorescence) ปทุมมาในอาหาร MS-CI และ retarded shoot ปทุมมา ในอาหาร MS–CM ที่มีสารปฏิชีวนะ400 mg/l Cefotaxim และ 50 mg/l Kanamycin ย้ายเนื้อเยื่อทุก ๆ 2 สัปดาห์

2.9 หลังจากพืชพัฒนาเป็นต้นและมีขนาดประมาณ 2 cm จึงนำมาตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีน โดยเทคนิค GUS Histochemical assay และเทคนิค Polymerase chain Reaction (PCR) สำหรับ *GUS* gene และ 35S promoter ต่อไป

การตรวจสอบพืชตัวอย่างที่ทำการส่งถ่ายยีน

1. การตรวจสอบโดยเทคนิค GUS Histochemical assay (Jefferson, Kavanagh & Bevan,1987)

1.1 เตรียม X-Gluc buffer (1 mM X-gluc, 50 mM EDTA, 50 mM NaH_2PO_4, 1 mM potassium ferricyanide, 1 mM potassium ferrocyanide, 0.1 เปอร์เซ็นต์ triton X-100)

1.1.1 นำเนื้อเยื่อมาล้างให้สะอาดด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol

1.1.2 แช่เนื้อเยื่อใน X-Gluc buffer นำไปบ่มที่ 37 °C ใช้เวลา 2 ชั่วโมง หรืออาจทิ้งไว้หนึ่งคืน โดยจะเขย่าตลอดเวลา

1.1.3 ล้างชิ้นเนื้อเยื่อด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปต้มใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol

1.1.4 ตรวจสอบการเกิดจุดสีน้ำเงิน ในเนื้อเยื่อโดยส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามมิติ (stereo microscope) บันทึกภาพ (การตรวจสอบผลการส่งถ่ายพลาสมิดเกิดขึ้นจากการทำงานของ GUS gene จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง GUS (β-glucuronidase) และสารตั้งต้น X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronide) โดยสังเกตจากการปรากฏของสีน้ำเงินขึ้น

2. การตรวจสอบโดยใช้ปฏิกิริยา PCR

2.1 การเตรียมดีเอนเอพืชเพื่อปฏิกิริยาPCR วิธีการเตรียมดีเอ็นเอ ดังนี้

2.1.1 บดพืชตัวอย่างประมาณ 0.1 g ให้ละเอียด ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml. เติม extraction buffer ปริมาตร 400 µl ผสมกันอย่างแรงโดยใช้ vortex mixer แล้วนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.1.2 นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอาส่วนใสใส่ eppendorf tube ใหม่

2.1.3 เติม 1 เท่า chloroform : isoamyl alcohol (24:1) เขย่าให้เข้ากันอย่างเบา ๆ แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอา supernatant ใส่หลอดใหม่

2.1.4 ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol 0.6 เท่า (v/v) ที่อุณหภูมิ -70°C ใช้เวลา 2 ชั่วโมง

2.1.5 นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.1.6 ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ละลายจนหมด จากนั้นเติม RNase A นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาที

2.1.7 สกัดด้วย 1 เท่า phenol ลงในหลอดสารละลาย ผสมให้เข้ากันอย่างเบา ๆ แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอา supermatant ใส่หลอดใหม่

2.1.8 เติม chloroform 1 เท่า (v/v) พลิกหลอดกลับไปกลับมาเบา ๆ แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอา supernatant ออกมาใส่หลอดใหม่

2.1.9 ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol 0.6 เท่า (v/v) ที่อุณหภูมิ -70°C ใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง

2.1.10 ปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer

2.2 ปฏิกิริยา PCR สำหรับการตรวจสอบ *GUS* gene (Stummer et al., 1995) ด้วยเทคนิค PCR

เงื่อนไขสำหรับปฏิกิริยา PCR

DNA template (10 ng/μl)	1	μl
10x PCR buffer	2	μl
50 mM$MgCl_2$	0.5	μl
25 mM dNTP	0.2	μl
Primer 1 (20 pmol/μl)	1	μl
Primer 2 (20 pmol/μl)	1	μl
Taq DNA polymerase	0.5	unit
steriled ddH_2O	13.8	μl
total volume	20	μl

ลำดับของ primer สำหรับ *GUS* gene ที่ใช้มีดังนี้ (Gibco URL , USA)

GUS 1 : 5' -CTG TAG AAA CCC CAA CCC GTG- 3'

GUS 2 : 5' -CAT TAC GCT GCG ATG GAT CCC-3'

จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในเครื่อง PCR โดยมีเงื่อนไขปฏิกิริยาดังนี้

94°C 2 นาที

94°C 30 วินาที

62°C 30 วินาที — 30 รอบ

72°C 45 วินาที

72°C 5 นาที

2.3 ปฏิกิริยา PCR สำหรับการตรวจสอบ 35S promoter (Tozzini et al., 1995) ด้วยเทคนิค PCR

เงื่อนไขสำหรับปฏิกิริยา PCR

DNA template (10 ng/μl)	1	μl
10x PCR buffer	2	μl
50 mM$MgCl_2$	0.5	μl
25 mM dNTP	0.2	μl
Primer 1 (20 pmol/μl)	1	μl
Primer 2 (20 pmol/μl)	1	μl
Taq DNA polymerase	0.5	unit
steriled ddH_2O	13.8	μl
total volume	20	μl

ลำดับของ primer สำหรับ 35S promoter ที่ใช้มีดังนี้ (Gibco URL , USA)

Sense : 5' –GCT CCT ACA AAT GCC ATC A- 3'

Antisense : 5' –GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3'

จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในเครื่อง PCR โดยมีเงื่อนไขปฏิกิริยาดังนี้

94°C 3 นาที

94°C 1 นาที
67°C 1 นาที
72°C 1 นาที
} 10 รอบ

94°C 1 นาที
62°C 1 นาที
72°C 1 นาที
} 20 รอบ

72°C 5 นาที

จากนั้น ตรวจสอบผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis