บทที่ 4

วิธีการทดลอง

4.1 การตรวจสอบลำดับเบสของยีนที่คาดว่าเป็นยีนระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส พลาสติดไอโซฟอร์ม (plastid isoform) ของ *A. thaliana* (ยีน *SAT*1) จาก EST clone104E8T7

ยีน *SAT*1 จาก EST clone104E8T7 สอดแทรกอยู่บนพลาสมิด pGEM-*SAT*1 ซึ่งได้รับจาก Arabidopsis Biological Recource Center, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA ยีน *SAT*1 จาก EST clone104E8T7 ผ่านการหาลำดับเบสบางส่วนบริเวณ 400 เบสแรก และพบตำแหน่งเริ่มต้นของการถอดรหัสแล้ว ในงานวิจัยนี้จึงทำการหาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบความถูกต้องและหาบริเวณสิ้นสุดของการถอดรหัส

4.1.1 การค้นหาข้อมูลลำดับเบสของยีน *SAT*1

ค้นหาข้อมูลลำดับเบสของยีน *SAT*1 จากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information เครือข่าย http://www.ncbi.nlm.nih.gov เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบดีเอ็นเอไพร์เมอร์

4.1.2 การออกแบบดีเอ็นเอไพร์เมอร์

ออกแบบสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ ในกระบวนการพีซีอาร์จำนวน 4 สาย โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *SAT*1 (จากข้อ 4.1.1) ดีเอ็นเอไพร์เมอร์สายที่ 1 คือ JSAT1 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward primer) เลือกลำดับเบสตำแหน่งที่ 1-18 ซึ่งคลอบคลุมจุดเริ่มต้นของ ยีน *SAT*1 ดีเอ็นเอไพร์เมอร์สายที่ 2 คือ JSAT2 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ (reverse primer) เลือกลำดับเบสตำแหน่งที่ 968-987 ซึ่งคลอบคลุมจุดสิ้นสุดของยีน *SAT*1 ดีเอ็นเอไพร์เมอร์สายที่ 1 และ 2 นี้เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *SAT*1 ดีเอ็นเอไพร์เมอร์สายที่ 3 คือ JSAT3 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป เลือกลำดับเบสตำแหน่งที่ 219-239 ดีเอ็นเอไพร์เมอร์สายที่ 4 คือ JSAT4 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ เลือกลำดับเบสตำแหน่งที่ 679-699 ดีเอ็นเอไพร์เมอร์สายที่ 3 และ 4 นี้เพื่อใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ว่าเป็นยีน *SAT*1

4.1.3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอไพร์เมอร์

สังเคราะห์ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จำนวน 4 สาย (จากข้อ 4.1.2) โดยวิธี Solid Support CPG (Controled-Pore-Glass) ที่หน่วยบริการชีวภาพและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งชาติ ลำดับเบสของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทั้ง 4 สายแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ดีเอ็นเอไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *SAT*1 จำนวน 4 สาย

ดีเอ็นเอไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (เบส)	Tm (°C)
JSAT1	5'-TCTAGCGCATAAACCATGGCAACA-3'	24	68
JSAT2	5'-CTCGAGCAGTTACAAGAAAGAAAGA-3'	25	70
JSAT3	5'-TACGCTTCGATCACCATCTCA-3'	20	58
JSAT4	5'-ATCACCACTCTGTTTCCCTG-3'	20	60

4.1.4 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (Competent cell) *E. coli* DH5α

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *E.coli* DH5α ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียล ความเร็ว 200 รอบ/นาที 16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิม 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิตร บ่มที่สภาวะเดิมต่อจนกระทั่งค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร มีค่าระหว่าง 0.35-0.4 แช่ฟลาสก์ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในอ่างน้ำผสมน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,000 รอบ/นาที (9,820 X g) 20

นาที นำเซลล์ที่ได้มากระจายในน้ำกลั่นเย็นแล้วปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์อีกครั้งที่ภาวะเดิม กระจายเซลล์ที่ได้ในสารละลายกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) 125 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์อีกครั้งที่ภาวะเดิม กระจายเซลล์ที่ได้ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นเดิม 5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ภาวะเดิม กระจายเซลล์ที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYT (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ที่เย็น 0.125 มิลลิลิตร แบ่งเซลล์คอมพีเทนต์แขวนลอยที่ได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เย็นหลอดละ 40 ไมโครลิตร เก็บเซลล์คอมพีเทนต์แขวนลอยที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสทันที

4.1.5 การถ่ายโอนพลาสมิด pGEM-*SAT*1 เข้าสู่ *E. coli* DH5α โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน

เติมสารละลายดีเอ็นเอซึ่งมีพลาสมิด pGEM-*SAT*1 เข้มข้น 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จำนวน 1 ไมโครลิตร ลงในสารแขวนลอยเซลล์คอมพีเทนต์หลอมเหลว 40 ไมโครลิตร (ที่ได้จากข้อ 4.1.4) ผสมให้เข้ากัน ย้ายของผสมด้วยไมโครปิเปตไปยังอิเล็กโทรพอเรชันคิวเวต (electroporation cuvette) ที่เย็นโดยการแช่ไว้ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งโดยไม่มีฟองอากาศ คิวเวตต์มีช่องห่างระหว่างแผ่นอิเลคโทรด (electrode) เท่ากับ 0.2 ซม. แช่คิวเวตต์ในน้ำผสมน้ำแข็งต่ออีก 1 นาที นำไปทำอิเล็กโทรพอเรชัน โดยใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Gene Pulser apparatus; BioRad, USA.) ภาวะที่ใช้คือ ค่า field strength เท่ากับ 12.5 กิโลโวลต์/เซนติเมตร (kV/cm) ความต้านทานไฟฟ้า 250 โอมห์ 25 μF นำคิวเวตต์ที่ผ่านกระบวนการทำอิเล็กโทรพอเรชัน มาแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งทันที 2 นาที ย้ายส่วนผสมของปฏิกิริยาภายในคิวเวตต์ลงไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SOC 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก ข้อ 6) ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยวิธีปราศจากเชื้อ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที 1 ชั่วโมง เกลี่ยสารแขวนลอยเซลล์ 200 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 20 ชั่วโมง โคโลนีทรานสฟอร์แมนท์เท่านั้นที่สามารถเจริญได้

4.1.6 การคัดเลือกโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์โดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ (Colony PCR)

ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ (จากข้อ 4.1.5) ขีดสั้น ๆ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตรเดียวกับที่ใช้คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อที่เจริญตามรอยขีด

แต่ละเส้นที่ได้ แขวนลอยเซลล์ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 ไมโครลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 200 ไมโครลิตร แช่หลอดไมโครฟิวจ์ดังกล่าวในอ่างน้ำแข็ง เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย

1.สารละลายบัฟเฟอร์อีเอกซ์แทคความเข้มข้น 10 เท่า (Ex Taq 10x buffer; Takara, Japan)	1.0 ไมโครลิตร
2.นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP ความเข้มข้นชนิดละ 2.5 มิลลิโมลลาร์	0.80 ”
3. ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT3 และ JSAT4 ความเข้มข้นชนิดละ 2 ไมโครโมลลาร์	1.00 ”
4. อีเอกซ์แทคพอลิเมอเรส (Extaq polymerase; Takara, Japan) ความเข้มข้น 5 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.05 ”
5. น้ำกลั่นปลอดเชื้อสำหรับปรับปริมาตรสุดท้าย	1.15 ”
รวมปริมาตรปฏิกิริยา	5.00 ”

เติมส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้งหมดยกเว้นอีเอกซ์แทคพอลิเมอเรส ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีเซลล์แขวนลอยอยู่ดังกล่าวข้างต้น ใส่หลอดลงไปในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ กำหนดให้อุณหภูมิเป็น 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมอีเอกซ์แทคพอลิเมอเรส (Hot start PCR) จากนั้นกำหนดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งหมด 30 รอบปฏิกิริยา โดยในแต่ละรอบปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 96 องศาเซลเซียส 20 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแม่แบบแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denaturation) 58 องศาเซลเซียส 20 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT3 และ JSAT4 จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) โดยการจับคู่ของเบสคู่สม 72 องศาเซลเซียส 1.30 นาที เพื่อให้เอนไซม์อีเอ็กซ์แทคพอลิเมอเรสสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการนำนิวคลีโอไทด์มาต่อที่ปลายของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ (extention) ทิศทาง 5’ ไปยัง 3’ เมื่อครบ 30 รอบปฏิกิริยา กำหนดให้อุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ (PCR product) โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

4.1.7 การหาขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

เทอะกาโรสเจลในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข ข้อ 11) สภาพหลอมเหลวที่อุณหภูมิ ประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้เจล

แข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสารละลาย loading buffer ความเข้มข้น 6 เท่า (ภาคผนวก ข ข้อ 14) หยอดลงในหลุมซึ่งเกิดจากการดึงหวีออกจากเจลอะกาโรสที่แข็งตัวหลุมละประมาณ 20 ไมโครลิตร ใช้ดีเอ็นแลดเดอร์ (DNA ladder; New England Biolabs, Inc., USA) ซึ่งเป็นสารละลายดีเอ็นเอขนาดความยาวต่าง ๆ ตั้งแต่ 500 เบส ถึง 10 กิโลเบส หรือดีเอ็นเอ λ/*Hind* III (λ/ *Hind* III ; New England Biolabs, Inc., USA) ซึ่งเป็นสารละลายดีเอ็นเอขนาดความยาวต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.5 กิโลเบส ถึง 23 กิโลเบส เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบขนาดความยาวของดีเอ็นเอ ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) ซึ่งบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ใช้ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ หยุดปฏิกิริยาเมื่อแถบสีน้ำเงินของสารละลาย loading buffer เคลื่อนที่มาเกือบสุดขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมสีดีเอ็นเอซึ่งอยู่ในเจลอะกาโรสด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ โดยแช่แผ่นเจลอะกาโรสที่ได้ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 15) 5 นาที ล้างแผ่นเจลอะกาโรส โดยแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE เป็นเวลา 30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หาขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน บันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพรารอยด์ขาวดำ ความไวแสง 3,000 (ISO 3000) และเครื่อง Gel Documentation (Gel Documentation ; Bio-Rad, USA) โดยใช้โปรแกรม Quantity One version 4.4.1

4.1.8 การสกัดพลาสมิด pGEM-*SAT*1 จากโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์

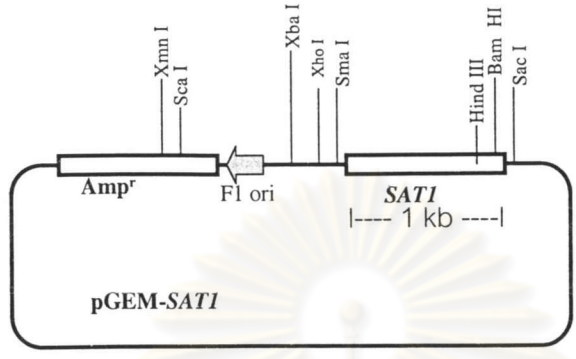
นำโคโลนีที่เป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่ตรวจพบยีน *SAT*1 โดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ (จากข้อ 4.1.6) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาสกัดพลาสมิด โดยถ่ายเชื้อที่ได้ 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,000 รอบ/นาที (4,500 X g) 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดไมโครฟิวส์เดิม ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำรวม 3 ครั้ง รวมเชื้อที่นำมาปั่นเหวี่ยง 4.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข ข้อ 7.1) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 10 นาที เติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข ข้อ 7.2) 200 ไมโครลิตร ผสมเบา ๆ โดยการเอียงหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็ง 5 นาที เติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข ข้อ 7.3) ผสมตามวิธีการข้างต้น ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที (20,600 X g) 5 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนมากำจัดโปรตีนออกด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร (ภาคผนวก ข ข้อ 12) ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที (20,600 X g)

5 นาที ดูดส่วนน้ำใสชั้นบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอโดยการเติมเอทานอลสัมบูรณ์ที่เย็นในอัตราส่วน 2 เท่าของปริมาตรที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที (20,600 X g) 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งในเครื่องดูดความชื้นภายใต้สุญญากาศ 15 นาที ละลายตะกอนในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) ค่าความเป็นกรดเบส 8.0 (ภาคผนวก ข ข้อ 8) กำจัดอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอโดยการนำมาย่อยด้วยอาร์เอ็นเอส (RNase) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 16) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง กำจัดเอนไซม์อาร์เอ็นเอสด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เช่นเดียวกับข้างต้น ละลายตะกอนในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดเบส 8.0 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพลาสมิดเจือจาง 1/50 เท่า ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณของพลาสมิดที่สกัดได้ เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่ –20 องศาเซลเซียส

4.1.9 การตัดยีน *SAT*1 ออกจากพลาสมิด pGEM-*SAT*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

นำพลาสมิด (ที่ได้จาก ข้อ4.1.8) มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sma*I และ *Sac*I และสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเรสทริกชันเอนไซม์ ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จำนวนหน่วยของเอนไซม์ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เพื่อตัดพลาสมิด pGEM-*SAT*1 (ดังแสดงในภาพที่ 4.1) ตรวจสอบผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แยกเอายีน *SAT*1 ขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ที่ต้องการออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ (QIAquick Gel Extraction Kit; QIAGEN Inc., USA.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



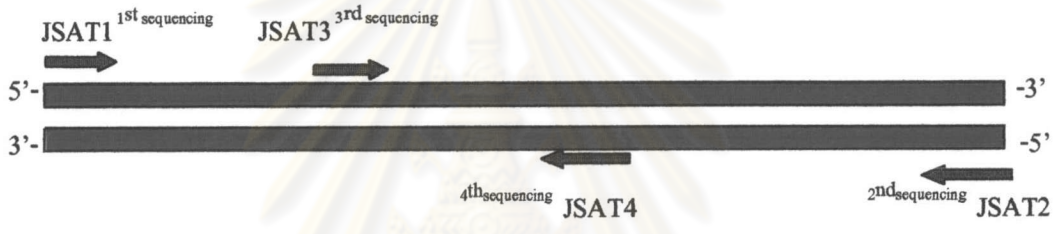
ภาพที่ 4.1 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pGEM-*SAT*1

4.1.10 การแยกดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกดีเอ็นเอ (QIAquick Gel extraction kit; QIAGEN Inc., USA.)

แยกดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ออกจากกันด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (ตามวิธีข้อ 4.1.7) ย้อมสีดีเอ็นเอซึ่งอยู่ภายในเจลอะกาโรส ด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร ความเข้มต่ำภายในระยะเวลาไม่เกิน 10 วินาทีเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเนื่องมาจากแสงอัลตราไวโอเลต หาแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดที่ต้องการ (ตามวิธีข้อ 4.1.7) ตัดแผ่นเจลอะกาโรสเพื่อแยกเอาชิ้นเจลเฉพาะตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการออกมา นำมาสับละเอียดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สกัดแยกเอาดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอ (QIAquick Gel Extraction Kit; QIAGEN Inc., USA.) เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ซึ่งอยู่ในรูปสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.1.11 การหาลำดับเบสของยีน *SAT*1

นำดีเอ็นเอที่แยกได้จากอะกาโรสเจล จากข้อ 4.1.9 มาหาลำดับเบสโดยวิธี Thermal cycle DNA sequencing ที่โครงการศูนย์ปฏิบัติการเครื่องมือรวม สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT1, JSAT2, JSAT3 และ JSAT4 (ดังภาพที่ 4.2) เปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสของยีน *SAT*1 ของ *Arabidopsis thaliana* พันธุ์ Columbia ในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) และฐานข้อมูล AIR (Arabiopsis Information Resource) หาจุดเริ่มต้น และจุดสิ้นสุดของการถอดรหัสของยีน *SAT*1



หมายถึง ยีน *SAT*1

หมายถึง ดีเอ็นเอไพรเมอร์สำหรับการหาลำดับเบส

ภาพที่ 4.2 ตำแหน่งของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ในการหาลำดับเบสของยีน *SAT*1

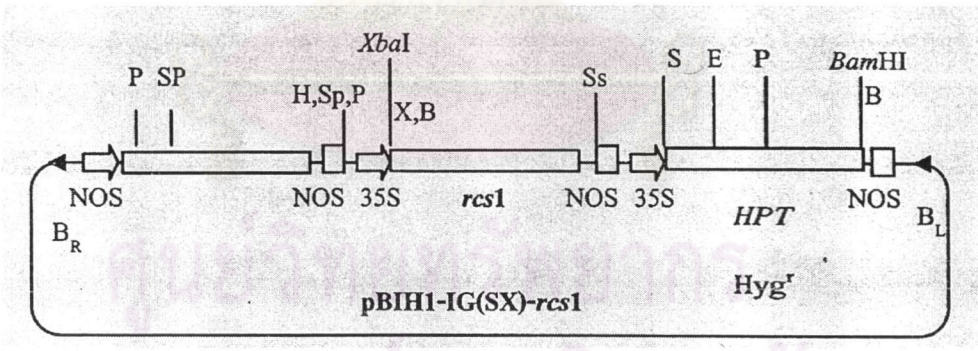
4.2 การสร้างพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 และพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1

4.2.1 การสกัดพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1

พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 เป็นพลาสมิดที่มียีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสของข้าวจ้าว (ยีน *rcs*1) สอดแทรกอยู่ที่ตำแหน่งเรสทริกชัน *Xba*I และ *Sac*I ของพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ซึ่งเป็นการสอดแทรกเข้าไปแทนที่ยีนระบุรหัสบีต้ากลูคูโรนิเดสในพลาสมิด

pBIH1-IG(SX) ซึ่งเป็นพลาสมิดชนิดไบนารี ได้รับมาจาก Dr. Nakamura **Tatsuo**, Research and Education Center for Genetic Information, Ikoma, Nara, Japan. พลาสมิด **pBIH1-IG(SX)-*rcs*1** นี้มียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและกานามัยซินอยู่ในบริเวณ T-DNA ยีน *rcs*1 ได้มาจากการโคลน คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของข้าวจ้าว (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) มีขนาด 1,290 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 321 ตัวโปรตีน RCS1 เป็นไอโซฟอร์มที่อยู่ในไซโตพลาสซึม (Nakamura และคณะ, 1999)

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 (ภาพที่ 4.4) ซึ่งเจริญบนอาหารแข็ง YEP (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 1) บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม 10 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบ/นาที 16-18 ชั่วโมง นำไปสกัดพลาสมิดตามวิธีข้อ 4.1.8



ภาพที่ 4.3 แผนที่เร สทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ขนาด 16 กิโลเบส เป็นพลาสมิดที่ยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสของข้าวจ้าว (*rcs*1) ขนาด 1,290 เบส สอดแทรกอยู่ที่ตำแหน่งเรสทริกชัน *Xba*I และ *Sac*I ของพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX)

อักษรย่อของเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ : P แทน *Pst*I, Sp แทน *Spn*I, H แทน *Hind* III, B แทน *BamH* I , S แทน *Sal* I , Sn แทน *SnaB*I , X แทน *Xba* I , Ss แทน *Sac* I , E แทน *EcoR* I

4.2.2 การถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 เข้าสู่ *E. coli* DH5α โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน

นำพลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 4.2.1 มาถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5α จากข้อ 4.1.4 ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ภาวะที่ใช้เช่นเดียวกับข้อ 4.1.5 เกลี่ยสารแขวนลอยเซลล์ 100 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โคโลนีที่เจริญได้คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์

4.2.3 การคัดเลือกโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์โดยวิธีพีซีอาร์ (PCR)

สกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ ใช้ rcs1-1 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward primer) ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5'-TGTCAGATCGATTCCTGACG- 3' และใช้ rcs1-2 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ (reverse primer) ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5'–TGATGGACTGGAAGAGCACC-3' ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ rcs1-1 และ rcs1-2 จับกับยีน *rcs*1 ที่เบสตำแหน่ง 49 – 68 และ 988 - 1007 ตามลำดับ ใช้ชุดทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR Reagent Kit ; Takara Bio Inc., Japan.) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุ กรรมอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycle รุ่น 2400; Perkin Elmer, USA.) ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบ ด้วย

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ 50 นาโนกรัมในปริมาตร	1.0	ไมโครลิตร
2. ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ rcs1-1 เข้มข้น2.0 ไมโครไมลาร์	1.0	”
3. ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ rcs1-2 เข้มข้น2.0 ไมโครโมลาร์	1.0	”
4. นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP , dTTP , dCTP, dGTP เข้มข้นชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์	0.8	”
5. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา พีซีอาร์ เข้มข้น 10 เท่า	1.0	”
6. อีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Ex *Taq* DNA polymerase) เข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.05	”

7. น้ำกลั่นปลอดเชื้อสำหรับปรับปริมาตรสุดท้าย	5.15	ไมโครลิตร
รวมปริมาตรปฏิกิริยา	10.0	”

บรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวทั้งหมด ยกเว้นอีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรสในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 200 ไมโครลิตร ใส่หลอดลงไปในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ ขั้นตอนแรกกำหนดอุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็น 96 องศาเซลเซียส เติมอีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรสหลังจากที่อุณหภูมิของปฏิกิริยาเท่ากับ 96 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และกำหนดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งหมด 30 รอบปฏิกิริยา โดยในแต่ละรอบปฏิกิริยาเป็นดังนี้ อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอแม่แบบจะแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denaturation) 20 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) โดยการจับคู่ของเบสคู่สม 20 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส อีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรสสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการนำนิวคลีโอไทด์มาต่อที่ปลายของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ (extention) ทิศทาง 5’ ไปยัง 3’ 90 วินาที เมื่อครบ 30 รอบปฏิกิริยา กำหนดให้อุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส 7 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส หากดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้เป็นพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ซึ่งมียีน *rcs*1 จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส

4.2.4 การสร้างพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1

4.2.4.1 การตัดพลาสมิด pGEM-*SAT*1 และพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยเรสทริกชันเรสทริกชันเอนไซม์

นำพลาสมิด pGEM-*SAT*1 และ พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ที่สกัดได้จาก ข้อ 4.1.8 และ 4.2.2 ตามลำดับ มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Sac*I และสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเรสทริกชันเอนไซม์ ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จำนวนหน่วยของเอนไซม์ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ ใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แยกเอาชิ้นยีน *SAT*1 ขนาดประมาณ 1 กิโลเบส และชิ้นพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ขนาดประมาณ 15 กิโลเบส ออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ (QIAquick Gel Extraction Kit; QIAGEN Inc., USA.)

4.2.4.2 การเชื่อมต่อยีน *SAT*1 กับพลาสมิด pBIH1-IG(SX) (Ligation)

เชื่อมยีน *SAT*1 ซึ่งตัดออกมาจากพลาสมิด pGEM-*SAT*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Sac*I กับพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ซึ่งได้จากการตัดพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกัน (ที่ได้จาก ข้อ 4.2.4.1) โดยผสมยีน *SAT*1 กับพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ในอัตราส่วน 10:1 ในปริมาตรสุดท้ายไม่เกิน 10 ไมโครลิตร เติมสารละลายที่ 1 ของชุดเชื่อมดีเอ็นเอ (Ligation kit; New England Biolabs, Inc., USA) ลงไปในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ถ่ายโอนปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligation reaction) ที่ได้เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5α โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (ตามวิธีข้อ 4.1.5) เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1

4.2.5 การสร้างพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1

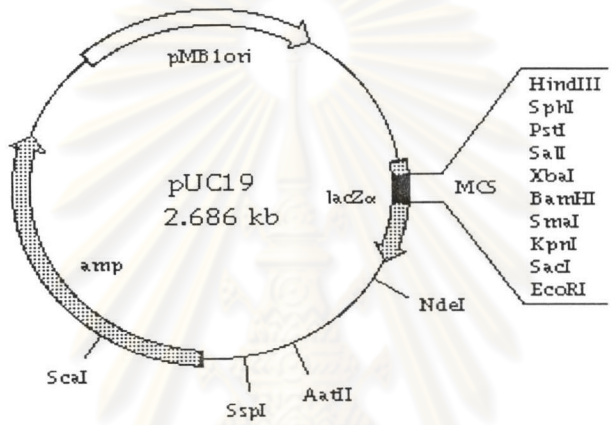
4.2.5.1 การตัดพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

นำพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ที่ได้จากข้อ 4.2.1 มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Bam*HI และสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเรสทริกชันเอนไซม์ ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จำนวนหน่วยของเอนไซม์ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แยกเอาชิ้นพลาสมิดที่ต้องการซึ่งประกอบด้วยยีน *rcs*1 และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (ยีน *HPT*) ขนาดประมาณ 3 กิโลเบส ออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ (QIAquick Gel Extraction Kit; QIAGEN Inc., USA.)

4.2.5.2 การดัดแปลงปลายชิ้นดีเอ็นเอ *rcs*1-*HPT*

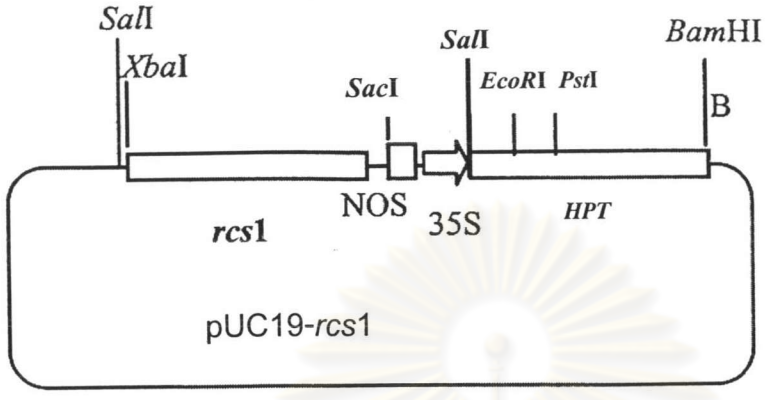
เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วยยีน *rcs*1 และ *HPT* ซึ่งตัดออกมาจากพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 (ที่ได้จากข้อ 4.2.5.1) กับพลาสมิด pUC19 (ภาพที่ 4.4) ซึ่งตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Bam*HI ที่แยกออกจากเจลอะกาโรส โดยผสม *rcs*1-*HPT* ต่อพลาสมิด pUC19 ในอัตราส่วน 1:1 ในปริมาตรสุดท้ายไม่เกิน 10 ไมโครลิตร เติมสารละลายที่ 1 ของชุดเชื่อมดีเอ็นเอ

(Ligation kit; New England Biolabs, Inc., USA) ลงไปในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ถ่ายโอนปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligation reaction) ที่ได้เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E.coli* DH5α โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (electroporation) เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด pUC19-*rcs*1



ภาพที่ 4.4 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC19

สกัดพลาสมิด pUC19-*rcs*1 (ภาพที่ 4.5) จาก *E. coli* DH5α มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sal*I และ *Bam*HI และสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเรสทริกชันเอนไซม์ ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แปรผันจำนวนหน่วยของเอนไซม์ที่ใช้ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เพื่อตัดพลาสมิด pUC 19-*rcs*1 แบบกึ่งสมบูรณ์ (partial digstion) ตรวจสอบผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แยกเอาชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบสที่ต้องการ ซึ่งประกอบด้วยยีน *rcs*1 และยีน *HPT* ออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ (QIAquick Gel extraction kit; QIAGEN Inc., USA.)



ภาพที่ 4.5 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC19-*rcs*1 ขนาดประมาณ 5 กิโลเบส

4.2.5.3 การเชื่อมต่อยีน *rcs*1-*HPT* กับพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1

เชื่อมยีน *rcs*1-*HPT* ซึ่งตัดแบบกึ่งสมบูรณ์ (ที่ได้จากข้อ 4.2.4.2) กับพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 ซึ่งตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sal*I และ *Bam*HI ที่แยกออกจากเจลอะกาโรส โดยผสมยีน *rcs*1-*HPT* ต่อพลาสมิดในอัตราส่วน 1:1 ในปริมาตรสุดท้ายไม่เกิน 5 ไมโครลิตร เติมสารละลายที่ 1 ของชุดเชื่อมดีเอ็นเอ (Ligation kit; New England Biolabs, Inc., USA) ลงไปในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร บ่มที่ 16 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีสกัดด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ใช้ปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ได้ถ่ายโอนเซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5α เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 แล้วสกัดพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 จากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ตามวิธีข้อ 4.1.8

4.2.6 การทำอิเล็กโทรพอเรชันของ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101

4.2.6.1 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ ของ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA101 ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด 48 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมและเติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที ในที่มืด 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิม และเติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ภาวะเดิมจนกระทั่งค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร มีค่าระหว่าง 0.5-1.0 (ประมาณ 5 ชั่วโมง) แช่ฟลาสก์ที่มีเชื้อเจริญลงในอ่างน้ำผสมน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,000 รอบ/นาที (9,820 X g) 4 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (N-S-Hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid) (ภาคผนวก ข ข้อ 17) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งปรับค่าความเป็นกรดเบสเป็น 7.0 โดยใช้โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (ภาคผนวก ข ข้อ 18) แขวนลอยเซลล์ที่ได้ในสารละลายกลีเซลรอลเข้มข้น 10เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) 100 ไมโครลิตร แบ่งสารแขวนลอยเซลล์คอมพีเทนต์ที่ได้ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 20 ไมโครลิตร เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส ทันที

4.2.6.2 การทำอิเล็กโทรพอเรชัน

เติมพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 หรือพลาสมิด pBIH1-IG-*SAT*1(SX)- *rcs*1 เข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ชนิดละ 0.5 ไมโครลิตร ลงในสารแขวนลอยเซลล์คอมพีเทนต์ *A. tumefaciens* EHA101 หลอมเหลว 20 ไมโครลิตร (ที่ได้จากข้อ 4.2.6.1) ผสมให้เข้ากัน ย้ายของผสมด้วยไมโครปิเปตไปยังอิเล็กโทรพอเรชันคิวเวตต์ที่เย็นโดยการแช่ไว้ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งโดยไม่มีฟองอากาศ คิวเวตต์มีช่องห่างระหว่างแผ่นอิเลคโทรด 0.2 เซนติเมตร แช่คิวเวตต์ในน้ำผสมน้ำแข็งต่ออีก 2 นาที นำไปทำอิเล็กโทรพอเรชัน โดยใช้เครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Gene Pulser apparatus; BioRad, USA.) ภาวะที่ใช้คือ ค่า field strength 12.5 กิโลโวลต์/เซนติเมตร (kV/cm) ความต้านทานไฟฟ้า 250 โอมห์ 25 μF นำคิวเวตต์ที่ผ่านกระบวนการทำอิเล็กโทรพอเรชัน มาแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งทันที 2 นาที ย้ายส่วนผสมในคิวเวตต์ลงไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YEP 300

ไมโครลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยวิธีปราศจากเชื้อ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที 3 ชั่วโมง เกลี่ยสารแขวนลอยเซลล์ 100 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 48 ชั่วโมง สกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์แล้วนำมาตรวจหายีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ต่อไป

4.2.7 การตรวจหายีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 โดยวิธีพีซีอาร์

4.2.7.1 การตรวจหายีน *SAT*1

นำพลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ ซึ่งคาดว่าเป็นพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 และพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 (ที่ได้จากข้อ 4.2.6.2) มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward primer) หรือ JSAT1 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5'-TCTAGCGCATAAACCATGGCAACA-3' และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ (reverse primer) หรือ JSAT2 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5'-CTCGAGCAGTTACAAGAAAGAAA GA- 3' ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT1 และ JSAT2 จับกับยีน *SAT*1 ที่เบสตำแหน่ง 1-18 และ 968-987 ตามลำดับ ใช้ชุดทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR reagent Kit ; Takara Bio Inc., Japan.) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycle รุ่น 2400; Perkin Elmer, USA.) หากดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้เป็น พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 หรือพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 ซึ่งมียีน *SAT*1 จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส

4.2.7.2 การตรวจหายีน *rcs*1

นำพลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ ซึ่งคาดว่าเป็นพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ rcs1-1 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward primer) ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5'-TGTCAGATCGATTC CTGACG-3' และใช้ rcs1-2 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ (reverse primer) ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5'–TGATGGACTGGAAGAGCACC-3' ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ rcs1-1 และ rcs1-2 จับกับยีน *rcs*1 ที่เบสตำแหน่ง 49 – 68 และ 988 - 1007 ตามลำดับ ใช้ชุดทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ ส่วนผสมของปฏิกิริยา และขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ ข้อ 4.2.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส หากดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้เป็นพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 ซึ่งมียีน *rcs*1 จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส

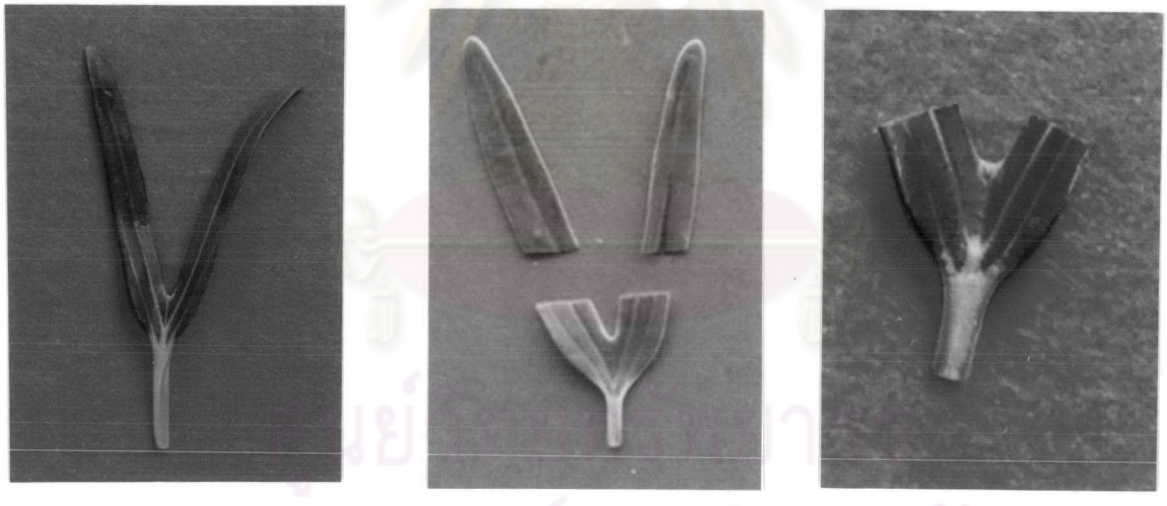
4.3 การถ่ายโอน ยีน *SAT*1 เพียงอย่างเดียว และยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 เข้าสู่ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*)

4.3.1 การเตรียม cotyledon explants ของผักบุ้ง

นำเมล็ดผักบุ้งประมาณ 300 เมล็ด หรือประมาณ 20 กรัม มาคัดเลือกเอาเฉพาะเมล็ดที่เปลือกไม่มีรอยแตกร้าวใส่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวความจุ 50 มิลลิลิตร ล้างเมล็ดผักบุ้งโดยการเทสารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 40 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าโดยการเอียงหลอดไปมา 5 นาที เทสารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์ทิ้ง ล้างเมล็ดผักบุ้งด้วยวิธีเดิมด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นล้างเมล็ดผักบุ้งด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 20 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 15 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง แช่เมล็ดผักบุ้งที่ได้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 16–18 ชั่วโมง หรือจนเมล็ดผักบุ้งพองตัวขึ้น นำเมล็ดผักบุ้งที่พองตัวดีแล้ว 7 เมล็ด มาวางบนอาหารแข็ง MS (ภาคผนวก ก ข้อ 4) 20 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาดความจุ 240 มิลลิลิตร โดยวิธีปราศจากเชื้อ บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้ม 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน 7 วัน นำต้นอ่อนที่ได้ มาตัดเอาใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ (cotyledon explants) (ภาพที่ 4.6) โดยวิธีปราศจากเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.



ข.

ภาพที่ 4.6 การเตรียม cotyledon explants ของผักบุ้ง

ก. ลักษณะต้นผักบุ้งอายุ 7 วัน

ข. วิธีการตัดใบเลี้ยง ใช้ส่วนโคนของใบเลี้ยงพร้อมก้านใบ (cotyledon explants) ในกระบวนการถ่ายโอนยีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.2 การเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 เพื่อใช้ถ่ายโอนยีน *SAT*1 และที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 -*rcs*1 เพื่อใช้ถ่ายโอนยีน *SAT*1ร่วมกับยีน *rcs*1เข้าสู่ผักบุ้ง

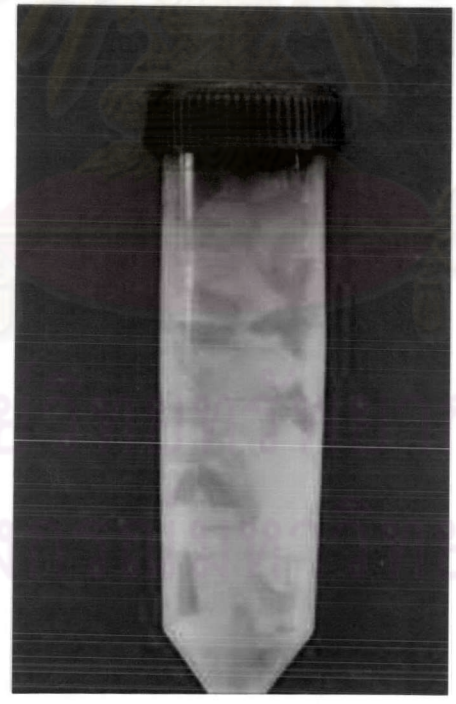
พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 เป็นพลาสมิดที่มียีนระบุรหัส *SAT*1 ได้มาจากการโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของ *Arabidopsis thaliana* ขนาด 989 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 314 ตัว โปรตีน *SAT*1 เป็นไอโซฟอร์มที่อยู่ในพลาสติด ส่วนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 เป็นพลาสมิดที่มียีนระบุรหัสซีสเตอีนซินเตสของข้าวจ้าว (ยีน *rcs*1) และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (ยีน *HPT*) สอดแทรกอยู่ที่ตำแหน่งเรสทริกชัน *Sal*I และ *Bam*HI ของพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 ซึ่งเป็นการสอดแทรกเข้าไปแทนที่ยีนระบุรหัสไฮโกรมัยซินในพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 นี้มียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและกานามัยซินอยู่ในบริเวณ T-DNA ยีน *rcs*1 ได้มาจากการโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของข้าวจ้าว (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) มีขนาด 1,290 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 321 ตัว โปรตีน RCS1 เป็นไอโซฟอร์มที่อยู่ในไซโตพลาสซึม (Nakamura และคณะ, 1999)

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA101 ซึ่งมีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 หรือมีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มในที่มืดที่ 28 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลวเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบ/นาที ในที่มืด 18 ชั่วโมง จะได้สารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 ซึ่งมีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 หรือพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 จำนวน 2.7 x 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร นำมาทำให้เจือจาง 20 เท่า ในอาหารเหลว MS ที่เติมอะซิโตไซริงโอน (acetosyringone; 3',5'-Dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 4)

4.3.3 วิธีการทำทรานสฟอร์เมชันของผักบุ้ง

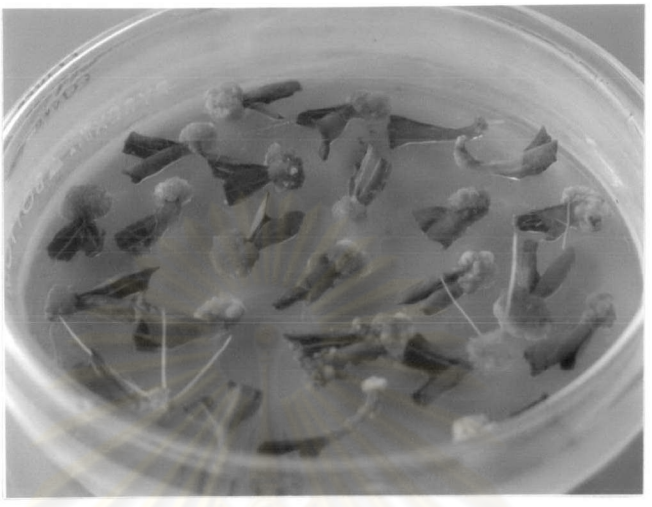
นำ cotyledon explants ของผักบุ้งประมาณ 200 ชิ้น (ที่ได้จากข้อ 4.3.1) มาแช่ในสารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 หรือมีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 20 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร (ภาพที่ 4.7) บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบ/นาที 2 ชั่วโมงในที่มืด ซับ

cotyledon explants ให้แห้งด้วยกระดาษกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อ นำไปวางบนอาหารแข็ง MS ที่เติมอะซิโตไซริงโอน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ 25 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จำนวน 20 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด 3 วัน แล้วนำ cotyledon explants มาล้างโดยการแช่ในสารละลายเซฟโฟแทคซีม (cefotaxime) ความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 5) 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าไปมา 15 นาที แล้วเทสารละลายเซฟโฟแทคซีมทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อโดยวิธีเดียวกัน 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง นำ cotyledon explants มาซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อ นำมาวางบนอาหารแข็ง MMS (ภาคผนวก ก ข้อ 5) จำนวน 25 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลายไธเดียซูรอน (thidiazuron) ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 6) และสารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จำนวน 15 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเชื้อ บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (ภาพที่ 4.8) ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 1 ถึง 2 เดือน โดยย้าย cotyledon explants ไปยังอาหารแข็งชนิดเดิมจานใหม่ทุก 2 สัปดาห์



Co-cultivation

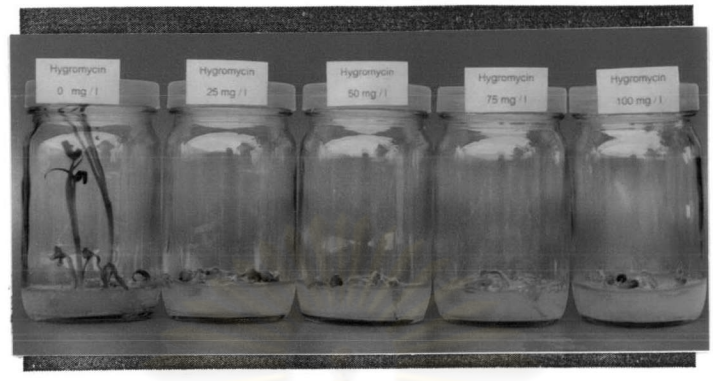
ภาพที่ 4.7 การทำทรานส์ฟอร์เมชันของผักบุ้ง



ภาพที่ 4.8 ลักษณะการเลี้ยงใบเลี้ยงส่วนโคน (cotyledon explants)ของผักบุ้งที่ผ่านการถ่ายโอนยีนภายใต้การควบคุมอุณหภูมิ และแสง

4.3.4 วิธีการคัดเลือกผักบุ้งแปลงพันธุ์

ย้าย cotyledon explants ซึ่งมีต้นอ่อนผักบุ้งเจริญขึ้นมา (ที่ได้จากข้อ 4.3.3) มาวางบนอาหารแข็ง MS 25 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้นนี้ผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) ไม่สามารถเจริญได้ (ปวิชชุดา ลิชผล, 2543) (ภาพที่ 4.9) อาหารบรรจุในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อความจุ 240 มิลลิลิตร 1 ชิ้นต่อ 1 ขวด บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็น เวลา 1 ถึง 2 เดือน โดยย้าย cotyledon explants ไปยังอาหารแข็งชนิดเดิมขวดใหม่ทุก 2 สัปดาห์ ต้นผักบุ้งซึ่งเจริญขึ้นมาจาก cotyledon explants ที่ไม่ตายเป็นเพราะทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ได้คาดว่าเป็นผักบุ้งแปลงพันธุ์



ภาพที่ 4.9 การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินของผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) ที่ความเข้มข้น 0 , 25 , 50 , 75 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ปวิชชุดา ลิชผล, 2544)

4.4 การสกัดดีเอ็นเอจากผักบุ้งตามวิธีของ Edward และคณะ (1991)

ใส่ใบผักบุ้งประมาณ 1 กรัม ลงในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ทำให้เย็นโดยการแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลว เติมไนโตรเจนเหลวลงไปจนเกือบเต็มหลอด บดใบผักบุ้งด้วยแท่งพลาสติกจนละเอียด เติมสารละลายเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์ (extraction buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 9) จำนวน 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนผักบุ้งที่บดแล้วละลายในเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์ ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (15.500 X g) 2 นาที เก็บสารละลายส่วนน้ำ 600 ไมโครลิตร มาสกัดด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วเดิมเป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนบนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เก็บสารละลายส่วนบนมาเติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม 5 นาที เก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปทำแห้งในเครื่องดูดความชื้นภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 15 นาที ละลายดีเอ็นเอในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) ค่าความเป็นกรดเบสเป็น 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร กำจัดอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอโดยการนำมาย่อยด้วยอาร์เอ็นเอส (RNase) ความเข้มข้นสุดท้าย 40

ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง กำจัดเอนไซม์อาร์เอ็นเอสโดยการสกัดด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เช่นเดียวกับข้างต้น นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาละลายในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) ค่าความเป็นกรดเบสเป็น 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่ –20 องศาเซลเซียส

4.5 การเตรียมพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 และ พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบของชุดควบคุมผลบวกในกระบวนการพีซีอาร์

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 หรือพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 ซึ่งเจริญบนอาหารแข็ง YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบ/นาที 16-18 ชั่วโมง นำไปสกัดพลาสมิดตามวิธีข้อ 4.1.8

4.6 การตรวจหา ยีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ในผักบุ้งโดยวิธีพีซีอาร์

4.6.1 การตรวจหา ยีน *SAT*1 ในผักบุ้ง

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งตามวิธี ข้อ 4.5 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ ใช้ JSAT1 และJSAT2 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ ตามลำดับ (ดูข้อ 4.2.6.2) ใช้ชุดทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR reagent Kit; Takara Bio Inc., Japan.) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycle รุ่น 2400; Perkin Elmer, USA.) บรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวทั้งหมดในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 200 ไมโครลิตร ใส่หลอดลงไปในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ ขั้นตอนแรกกำหนดอุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็น 96 องศาเซลเซียส 1 นาที และกำหนดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งหมด 30 รอบปฏิกิริยา โดยในแต่ละรอบปฏิกิริยาเป็นดังนี้ อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอแม่แบบจะแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denaturation) 20 วินาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) โดยการจับคู่ของเบสคู่สม 20 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส อีเอ็กซ์แทคพอลิเมอเรสสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการนำนิวคลีโอไทด์มาต่อที่ปลายของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ (extention) ทิศทาง 5’ ไปยัง 3’ 90 วินาที เมื่อครบ 30 รอบปฏิกิริยา กำหนดให้

อุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส 7 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส หากดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งมียีน *SAT1* เมื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลบส

4.6.2 การตรวจหา ยีน *rcs*1 ในผักบุ้ง

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งตามวิธี ข้อ 4.5 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ ใช้ rcs1-1และ rcs1-2 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ ใช้ชุดทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ ส่วนผสมของปฏิกิริยา และการกำหนดปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ ข้อ 4.6.1 แต่กำหนดอุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็น 96 องศาเซลเซียส 1 นาที ก่อนกำหนดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งหมด 30 รอบปฏิกิริยา และกำหนดให้อุณหภูมิที่ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) เป็น 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส หากดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งมียีน *rcs*1 เมื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส

4.7 การหากิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้ง (Youssifian และคณะ, 1993)

4.7.1 การเตรียมสารสกัดจากผักบุ้ง

นำใบผักบุ้ง 100 มิลลิกรัม มาทำให้เย็นจนแข็งโดยการแช่ในไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดด้วยครกบดยาที่สะอาด เติมสารละลายเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์ (extraction buffer) 2 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 9) ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที (9200 X g) 30 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บในน้ำผสมน้ำแข็ง ผักบุ้งแต่ละพันธุ์ทำ 3 ซ้ำ

4.7.2 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)

ดูดน้ำสกัดจากผักบุ้ง (ที่ได้จาก ข้อ4.7.1) 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ที่มีสารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent) (ภาคผนวก ข ข้อ 10) 5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลาย BSA (ภาคผนวก ข ข้อ 10 ภาพที่ ข .1)

4.7.3 การหากิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้งตามวิธีของ Youssifian และคณะ, 1993

หากิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสจากปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้โซเดียมซัลไฟด์และโอ-แอซีทิล-แอล-เซอรีน (O-acetyl-L-serine) เป็นสับสเตรท และใช้ไพริดอกซอล 5' ฟอสเฟต (Pyridoxal-5-phosphate) เป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยา วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนที่เกิดขึ้นโดยทำปฏิกิริยากับสารละลายนินไฮดรินในสภาพที่เป็นกรด กรดอะมิโนซิสเตอีนให้ผลิตภัณฑ์สีชมพูซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (Gaitonde, 1967) โดยนำน้ำสกัดจากผักบุ้ง (ที่ได้จาก ข้อ 4.6.1) ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1 ไมโครกรัม (ผลการคำนวณจาก ข้อ 4.6.2) มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์ บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเบส 8.0 ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิโมลาร์ สารละลายไดไธโอทรีอิทอล (Dithiothreitol) ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ สารละลายไพริดอกซอล-5'-ฟอตเฟต ความเข้มข้นสุดท้าย 5 ไมโครโมลาร์ สารละลายโอ-แอซีทิล-แอล-เซอรีน ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 2 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรสุดท้าย 100 ไมโครลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก / ปริมาตร) (ภาคผนวก ข ข้อ 19) 20 ไมโครลิตร เติมกรดอะซิติกเข้มข้น 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายนินไฮดริน (Ninhydrin solution) (ภาคผนวก ข ข้อ 13) 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยการนำไปแช่ในน้ำผสมน้ำแข็ง เติมเอทานอลสมบูรณ์ที่เย็น 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ใช้หลอดที่หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนัก /ปริมาตร) ทันทีที่เวลาศูนย์เป็นตัวเทียบค่าในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของทุกการทดลอง คำนวณกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือจำนวนของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกรดอะมิโนซิสเตอีน 1 ไมโครโมล ที่ภาวะที่ทดสอบภายในเวลา 1 นาที และกำหนดให้ค่า extinction coefficient ของกรดอะมิโนซิสเตอีนเท่ากับ 25000 $M^{-1}cm^{-1}$ โดยทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

4.8 การหากิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในผักบุ้งตามวิธีของ Baecker และ Wedding (1980)

หากิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจากปริมาณแอซีทิล-โคเอ (acetyl-CoA) ที่ลดลง เมื่อใช้ แอซีทิล-โคเอ และแอล-เซอรีน (L-serine) เป็นสับสเตรท ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์โอ-แอซีทิล-แอล-เซอรีน (O-acetyl-L-serine) โดยนำน้ำสกัดจากผักบุ้ง (ที่ได้จาก ข้อ 4.7.1) ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 15 ไมโครกรัม (ผลการคำนวณจาก ข้อ 4.7.2) มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเบส 8.0 ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิโมลาร์ สารละลายแอซีทิล-โคเอ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งบรรจุในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งปราศจากแอล-เซอรีน ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เริ่มปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายแอล-เซอรีน (L-serine) ความเข้มข้นสุดท้าย 1.0 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรสุดท้าย 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก / ปริมาตร) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 232 นาโนเมตร ใช้หลอดที่หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนัก /ปริมาตร) ทันทีที่เวลาศูนย์ เป็นตัวเทียบค่าในการวัดค่าการดูดกลืนแสง คำนวณกิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายแอซีทิล-โคเอ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ภาคผนวก ข ข้อ 20 ภาพที่ ข.2) กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือ จำนวนของเอนไซม์ที่ทำให้ แอซีทิล-โคเอ ลดลง 1 มิลลิโมลาร์ ที่ภาวะทดสอบในเวลา 1 นาที

4.9 การหากิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในผักบุ้งตามวิธีของ Kredich และ Tomkins (1966)

หากิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจากปริมาณโคเอ (CoA) ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ แอซีทิล-โคเอ และแอล-เซอรีน (L-serine) เป็นสับสเตรท ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์โอ-แอซีทิล-แอล-เซอรีน (O-acetyl-L-serine) โคเอที่ปล่อยออกมาจากแอซีทิล-โคเอ จะทำปฏิกิริยากับ 5,5'- ไดไธโอ-บิส-(2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) (5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) ได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไธโอไนโตรเบนโซอิก (thionitrobenzoic acid) ซึ่งวิเคราะห์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเบส 7.6 ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิโมลาร์ สารละลายแอซีทิล-โคเอ

ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 มิลลิโมลาร์ สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ และสารละลายแอล-เซอรีน ความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิโมลาร์ ซึ่งบรรจุในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มส่วนผสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เริ่มปฏิกิริยาโดยนำน้ำสกัดจากผักบุ้ง (ที่ได้จาก ข้อ 4.7.1) ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 15 ไมโครกรัม (ผลการคำนวณจาก ข้อ 4.7.2) มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยา ในปริมาตรสุดท้าย 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก / ปริมาตร) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ใช้หลอดที่หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนัก /ปริมาตร) ทันทีที่เวลาศูนย์ เป็นตัวเทียบค่าในการวัดค่าการดูดกลืนแสง คำนวณกิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายโคเอที่ความเข้มข้นต่างๆ (ภาค ผนวก ข ข้อ 20 ภาพที่ ข.3) กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือ จำนวนของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดโคเอ 1 มิลลิโมลาร์ ที่ภาวะทดสอบในเวลา 1 นาที

4.10 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในผักบุ้งโดย HPLC ตามวิธีของ Noctor และ Foyer (1998)

4.10.1 การเตรียมน้ำสกัดจากผักบุ้ง

นำใบของผักบุ้งประมาณ 100 มิลลิกรัม มาทำให้เย็นจนแข็งโดยการแช่ในไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดด้วยครกบดยา เติมสารละลายเอกแทรคชันบัฟเฟอร์ 600 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 21) รอให้ผักบุ้งที่บดละเอียดละลายจนหมด ดูดสารละลายมาใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (15,500 X g) 30 นาที นำส่วนน้ำใสมาทำการวิเคราะห์ต่อไป

4.10.2 การติดฉลากน้ำสกัดจากผักบุ้งด้วยสารโมโนโบรโมบิเมน (monobromobimane)

นำน้ำสกัดจากใบผักบุ้ง ผลจากข้อ 4.10.1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาติดฉลากกลุ่มอะมิโนกลูตามิล (glutamyl amino group) โดยใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายไดไธโอทรีอิทอล (Dithiothreitol; DTT) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 22) 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอ็น-ไซโคลเฮ็กซิล-2-อะมิโนอีเทนซัลโฟนิคแอซิด (N-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid; Ches) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 9.3 (ภาคผนวก

ข ข้อ 23) 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายโมโนโบรโมบิเมน (monobromobimane) ซึ่งละลายในอะซิโตไนไทร์ล (acetonitrile) (ภาคผนวก ข ข้อ 24) เข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 0.8 มิลลิลิตร แช่หลอดไมโครฟิวจ์ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ย้ายส่วนผสมทั้งหมดมาใส่ในหลอดไมโครฟิวส์ที่มีหัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน (Ultrafree-MC Centrifugal Filter Devices) (Millipore Corporation; Bedford USA) ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที (5,000 X g) 2 นาที นำส่วนใสที่ได้ 20 ไมโครลิตรไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอน

4.10.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนโดยวิธี HPLC

วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนโดยวิธี HPLC ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใช้เครื่อง HPLC (HP 1100, Hewlett Packard, USA) คอลัมน์ชนิด Hypersil ODS ขนาด 4.0 มิลลิเมตร X 125 มิลลิเมตร (Lichrospher-100, Hewlett Packard, USA) และใช้ detector ชนิด fluorometer ที่มี filter detector (excitation 384 nm และ emission ที่ 462 nm) (Hewlett Packard, USA) สภาวะที่ใช้แยกสารตัวอย่างเป็นดังนี้ ใช้สารละลายตัวชะ (mobile phase) 2 ชนิด คือ สารละลาย A (สารละลายเมธานอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีกรดอะซิติก 0.25 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดเบสเป็น 4.3 โดยการปรับด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์) และสารละลาย B (สารละลายเมธานอล 90 เปอร์เซ็นต์ ที่มีกรดอะซิติก 0.25 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดเบสเป็น 4.3 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีดคือ 20 ไมโครลิตร Retention time ของกรดอะมิโนซิสเตอีน และกลูตาไธโอนคือ 3.4 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ สารละลายมาตรฐานประกอบด้วยกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนเข้มข้นตั้งแต่ 1-10 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายเอกแทรคชันบัฟเฟอร์ เปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งแปลงพันธุ์และผักบุ้งพันธุ์เดิม

4.11 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้ง

ปลูกผักบุ้งแปลงพันธุ์ที่ได้จาก ข้อ 4.6 ผักบุ้งแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) ซึ่งทราบน้ำหนักในอาหารเหลว MS ซึ่งมีความเข้มข้นของซัลเฟตเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของซัลเฟตที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำที่เกิดจากกระบวนการทำเหมืองถ่านลิกไนต์ ที่ อ. แม่เมาะ จ. ลำปาง และมีน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร 30 มิลลิลิตร ซึ่ง

บรรจุอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขนาดความจุ 240 มิลลิลิตร ใช้ลูกแก้วในการพยุงลำต้นของผักบุ้ง ในสภาพปลอดเชื้อ (ภาพที่ 4.10) บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้ม 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำต้นผักบุ้งที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้งโดยวิธีปราศจากเชื้อ ชั่งน้ำหนัก หาปริมาตรและวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตของอาหารเหลว MS ก่อนและหลังการปลูกผักบุ้ง โดยวิธี Ion chromatography (ED50 Electrochemical Detector, Dionex, USA) ที่สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้คอลัมน์ชนิด IonPac AS11 ขนาด 4 x 250 มิลลิเมตร ใช้โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ เป็นสารละลายตัวชะ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีด 25 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลด้วย conductivity detector Retention time ของซัลเฟตคือ 3 นาที เปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตระหว่างผักบุ้งแปลงพันธุ์ และผักบุ้งพันธุ์เดิม

ภาพที่ 4.10 ลักษณะการปลูกผักบุ้งเพื่อทดสอบการดูดซับซัลเฟต

4.12 การศึกษาลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ของผักบุ้งเมื่อเจริญบนดิน

ปลูกต้นผักบุ้งแปลงพันธ์ที่มียีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิมในดิน เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ ศึกษาลักษณะภายนอกของต้นผักบุ้งแปลงพันธุ์เปรียบเทียบกับผักบุ้งพันธุ์เดิม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย