บทที่ 3

เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ เชื้อจุลินทรีย์ และพืชทดลอง

1. เครื่องมือ

1.1 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.

1.2 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Agarose gel electrophoresis equipment) ของบริษัท Mupid, Japan.

1.3 เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV Transilluminator) รุ่น Universal Hood ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Ltd., USA.

1.4 อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์ของบริษัท Polaroid, USA.

แผ่นกรองแสงสีเหลือง

ฟิล์มโพลารอยด์ ความไวแสง 3000 (ISO3000)

Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One version 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.

1.5 เครื่องเขย่า (Shaker)

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบรีซิโปรคอล รุ่น Gyromax TM737 ของบริษัท Amerex Instrument, USA.

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (Water bath Shaker) เขย่าแบบรีซิโปรคอล รุ่น 1086 ของบริษัท Gesellschaft fer lobortechnik (GFL)., Germany; รุ่น SS40-D ของบริษัท Grant Instruments (Cambridge) LTD., England.

1.6 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น BE600 ของบริษัท Memmert, Germany.

1.7 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS325 ของบริษัท Tomy Seiko, Japan.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น PP-50 ของบริษัท Metrohm, Switzerland.

1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.

- หัวปั่นเหวี่ยง (Rotor) หัวขนาดเล็กรุ่น RA 50J
- หัวปั่นเหวี่ยง (Rotor) หัวขนาดใหญ่รุ่น RA 228J

1.10 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV/VIS Spectrophotometer) รุ่น UV 160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

1.11 เครื่องชั่งรุ่น PB3002 และ AG204 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.

1.12 ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar Flow รุ่น H2 ของบริษัท Lab Service, Thailand.

1.13 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U332 ของบริษัท Sanyo, Japan.

1.14 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส รุ่น ULT1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA.

1.15 ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot Air Oven) รุ่น Schutzart ของบริษัท Memmert, Germany.

1.16 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน

1.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Kottermenn, Germany.

1.18 เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. สารเคมี

2.1 สารเคมี

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นระดับเพื่อการวิเคราะห์ (Analytical grade)

2.2 เอนไซม์

เรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ในขั้นตอนการโคลนยีนของบริษัท New England Biolabs, Inc., USA.

2.3 ชุดทำปฏิกิริยา พีซีอาร์ (พีซีอาร์ reagent Kit) ของบริษัท Takara Bio Inc., Japan.

2.4 ชุดเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligation Kit Ver2) ของบริษัท New England Biolabs, Inc., USA.

2.5 ชุดสกัดพลาสมิด(QIAprep Spin Miniprep Kit) ของบริษัท QIAGEN Inc., USA. และของบริษัทSigma-Aldrich Co., USA.

2.6 ชุดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจล(QIAquick Gel Extraction Kit) ของบริษัท QIAGEN Inc., USA.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. จุลินทรีย์ พลาสมิด และโอลิโกนิวคลีโอไทด์

3.1 จุลินทรีย์

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย	จีโนไทป์/ฟีโนไทป์	รายการอ้างอิง
E. coli สายพันธุ์ DH5α	ต้านต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน	สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ประเทศไทย
E.coli pGEM-*SAT*1	*E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pGEM-*SAT*1	สร้างในการทดลองนี้
E.coli pBIH1-IG(SX)-*rcs*1	*E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1	สร้างในการทดลองนี้
E.coli pBIH1-IG(SX)-*SAT*1	*E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1	สร้างในการทดลองนี้
E.coli pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1	*E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1	สร้างในการทดลองนี้
E.coli pUC19-*rcs*1	*E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pUC19-*rcs*1	สร้างในการทดลองนี้
A. tumefaciens สายพันธุ์ EHA101	*A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pEHA101	Hood และคณะ, 1986
A. tumefaciens pBIH1-IG(SX)-*rcs*1	*A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1	Nakamura และคณะ, 1999
A. tumefaciens pBIH1-IG(SX)-*SAT*1	*A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1	สร้างในการทดลองนี้
A. tumefaciens pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1	*A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1	สร้างในการทดลองนี้

3.2 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 พลาสมิด

พลาสมิด	จีโนไทป์/ฟีโนไทป์	รายการอ้างอิง
pGEM-7Zf(+)	Ap^r, α lac/MSC	บริษัท Promega, USA
pGEM-*SAT*1	Ap^r, α lac/MSC มียีน *SAT*1 สอดแทรกอยู่ที่ตำแหน่ง *Sma*I และ *Bam*HI ในบริเวณสอดแทรกของพลาสมิด pGEM-7Zf(+)	Arabidopsis Biological Recource Center, Ohio StateUniversity, Columbus, Ohio, USA
pBIH1-IG(SX)-*rcs*1	Km^r, Hg^r มียีน *rcs*1 สอดแทรกอยู่ที่ตำแหน่ง *Xba*I และ *Sac*I ในบริเวณ T-DNA	Nara Institute of Science and Technology, Japan.
pBIH1-IG(SX)-*SAT*1	Km^r, Hg^r แทนที่ยีน *rcs*1 ในพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยยีน *SAT*1	สร้างในการทดลองนี้
pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1	Km^r, Hg^rมียีน *SAT*1 และ *rcs*1 สอดแทรกอยู่ที่ตำแหน่ง *Xba*I และ *Sac*I และ *Sal*I และ *Bam*HI ในบริเวณ T-DNA ตามลำดับ	สร้างในการทดลองนี้
pUC19	Ap^r, α lac/MSC	บริษัท invitrogen , USA
pUC19-*rcs*1	Ap^r, α lac/MSC มียีน *rcs*1 และ *HPT* สอดแทรกอยู่ที่ตำแหน่ง *Sal*I และ *Bam*HI ในบริเวณสอดแทรกของพลาสมิด pUC19	สร้างในการทดลองนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (T_m)	รายการอ้างอิง
rcs1-1	5' TGTCAGATCGATTCCTGACG 3' (60°C)	Nara Institute of Science and Technology, Japan.
rcs1-2	5' TGATGGACTGGAAGAGCACC 3' (62°C)	Nara Institute of Science and Technology, Japan.
JSAT1	5'-TCTAGCGCATAAACCATGGCAACA-3' (70°C)	ออกแบบในการทดลองนี้
JSAT2	5'-CTCGAGCAGTTACAAGAAAGAAAGA-3' (68°C)	ออกแบบในการทดลองนี้
JSAT3	5'-TACGCTTCGATCACCATCTCA-3'(58°C)	ออกแบบในการทดลองนี้
JSAT4	5'-ATCACCACTCTGTTTCCCTG-3' (60°C)	ออกแบบในการทดลองนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. พืชทดลอง

พืชทดลองที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.4

ตารางที่3.4 พืชทดลอง

พืชทดลอง	จีโนไทป์/ฟีโนไทป์	รายการอ้างอิง
เมล็ดพันธุ์ผักบุ้งจีน (*Ipomoea aquatica* Forsk)	เมล็ดผักบุ้งจีนที่ไม่ได้รับถ่ายโอนยีน	บริษัทเจียไต๋ จำกัด, ประเทศไทย
Wild type	ต้นผักบุ้งจีนพันุ์เดิมที่ไม่ได้รับการรถ่ายโอนยีน	สร้างในการทดลองนี้
RCS1	ผักบุ้งจีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *rcs*1	อังคณา โพธิ์ไกร, 2545
SAT1/II	ผักบุ้งจีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *SAT*1	สร้างในการทดลองนี้
SR3	ผักบุ้งจีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1	สร้างในการทดลองนี้
SR10	ผักบุ้งจีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1	สร้างในการทดลองนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย