# บทที่ 2

# วัสดุอุปกรณ์สารเคมีและวิธีทดลอง

## 2.1วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

### 2.1.1 เครื่องมือ

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงแบบควบคุมอุณหภูมิได้ ( Refrigerated-Centrifuge)
- เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงขนาดเล็ก (High Speed Microcentrifuge)
- เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking waterbath)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)
- เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer)
- ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette)
- ชุดอุปกรณ์อีเลคโตรโฟรีซีส ( Agarose Gel Electrophoresis )

ประกอบด้วย Horizontal Electrophoresis Tank และ Power Supply

- เครื่องรีดพลาสติก (Heat sealing machine)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- เครื่องกำเนิดแสงอุลตร้าไวโอเลต (UV- transilluminator)
- เครื่องตรวจวัดรังสี (Geiger counter)
- เครื่องเขย่า (Shaker)
- เตาต้ม (hot plate)
- เครื่องชั่ง

2.1.2 พืชทดลอง

พืชตระกูลยาสูบชนิด *Nicotiana plumbaginifolia* ที่ผ่านการถ่ายจีนโดยตรง โดยการผสมสารละลายดีเอ็นเอ ที่เตรียมจากพลาสมิด pGP6 ซึ่งมียีน NPT หรือ APH ( Cherdshewasart, 1993 )

2.1.3 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- ภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จานเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 cm

ขวดฝาเกลียว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 cm สูง 8.5 cm

- ชุดกรองสำหรับทำปลอดเชื้อ ประกอบด้วย

Millipore filter holder ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 mm

Millipore filter ขนาดรูกรอง 0.45 $\mu$m

กระบอกฉีดยาขนาดปริมาตร 20 ml

- อุปกรณ์สำหรับเตรียมชิ้นส่วนของพืชและย้ายเนื้อเยื่อพืช

  ปากคีบ (forcep)

  มีดผ่าตัดเบอร์ 11 พร้อมด้ามมีดเบอร์ 3

- ตู้ย้ายเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ (Larminar air flow)

- ห้องสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ควบคุมอุณหภูมิ 25° ซ ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

### 2.1.4 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการปลูกเลี้ยงพืชทดลอง

- กระถางพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 cm สูง 14 cm
- ดิน
- ปุ๋ยอินทรีย์
- ขุยมะพร้าว

### 2.1.5 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

- ถ้วยบดและแท่งบด
- กระติกใส่น้ำแข็ง
- ถังใส่ไนโตรเจนเหลว
- spatula
- หลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 ml
- หลอดไมโครฟิวจ์ ขนาด 2.2 ml และ 1.5 ml
- พาสเจอร์ปิเปตปลายงอ
- หลอดแก้ว (test tube)
- ปิเปต
- parafilm

### 2.1.6 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการทำ Agarose Gel Electrophoresis

- ถาดสำหรับเทเจล (gel chamber)
- ที่ตักเจล
- comb
- กล้องถ่ายรูป
- ฟิลม์ถ่ายรูป (Kodak,Tri-X 400)

### 2.1.7 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการทำ Southern Blot

- Nylon membrane (Hybond-N,Amersham)
- Blotting tank
- กระดาษ Whatman 3 MM
- กระดาษซับ
- แผ่นกระจก
- Saran wrap

### 2.1.8 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการทำ Prehybridization,Hybridization และ Autoradiograph

- ถุงพลาสติกชนิดหนา
- Sephadex G-50
- Syringe ขนาด 1 ml
- หลอดไมโครฟิวจ์
- ถุงมือยาง
- Saran wrap
- X-ray film

- Film cassette
- ขาตั้งสำหรับหนีบ syringe
- เข็มฉีดยาขนาด 25 G
- กล่องพลาสติก
- กรรไกร
- กระดาษ Whatman 3 MM
- parafilm

## 2.1.9 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

  มีองค์ประกอบดังภาคผนวกข้อ 30

- สูตรอาหารคัดเลือก MS + คานาไมซิน

  ใช้อาหารสูตร MS ผสมยาปฏิชีวนะคานาไมซิน ( Sigma )

## 2.1.10 สารเคมีสำหรับฆ่าและกำจัดเชื้อ

- เอธิลแอลกอฮอล์ 70% และ 95%
- คลอร็อกซ์ (clorox)
- Tween 20

## 2.1.11 สารเคมีสำหรับลดระดับการเติมอนุมูลเมทธิลที่เบส cytosine

ใช้สารที่เป็น analog ของ cytidine คือ 5-azacytidine ( 4-Amino -1-β- D-ribofuranosyl-5-triaza-2[1H]-one) ( $C_8H_{12}N_4O_5$ ) FW.244.2 (Sigma)

## 2.1.12 สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

- liquid nitrogen
- Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol (25:24:1)
- Urea extraction buffer ; 168 g urea , 25 ml 5 M NaCl , 20 ml 1 M Tris-HCl pH 8.0, 16 ml $Na_2EDTA$ pH 8.0, 20 ml 20% sarkosyl, 190 ml $H_2O$
- TE buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM $Na_2EDTA$ pH 8.0
- 4.4 M ammonium acetate pH 5.2 ; 105 ml deionized water, 50 ml glacial acetic acid , 45 ml ammonium hydroxide
- Isopropyl alcohol
- Ethanol 70%
- 20 mg/ml RNase

## 2.1.13 สารเคมีสำหรับการทำ Agarose Gel Electrophoresis

- TBE buffer : 89 mM Tris-HCl , 2.5 mM $Na_2$ EDTA , 89 mM boric acid pH 8.3
- Agarose gel (Type II Sigma): 0.8% in TBE buffer
- Tracking dye solution : 0.25% bromphenol blue , 0.25% xylene cyanol, 15% Ficoll type 400 in $H_2O$
- Staining solution: 0.5 $\mu$g/ml ethidium bromide

## 2.1.14 สารเคมีสำหรับการทำ Southern Blot

- Depurination solution: 0.25 M HCl

- Denaturation solution: 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH
- Neutralization solution: 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.2
- 20 X SSC: 175.3 g NaCl, 88.2 g sodium citrate pH 7.2
- 2 X SSC: 17.53 g NaCl, 8.82 g sodium citrate pH 7.2

**2.1.15 สารเคมีสำหรับการทำ Prehybridization , Hybridization และ Autoradiograph**

- Prehybridization solution: 0.36 M NaCl,20 mM Tris-HCl pH 7.5 2 mM $Na_2EDTA$, 1% SDS, 0.5% skimmed milk powder, Salmon Sperm DNA 200 $\mu g/ml$, $H_2O$
- Random Primed DNA Labelling Kit (Boehringer)
- 0.3% Orange-G : 0.3 g Orange-G , 100 ml 0.5 M $Na_2EDTA$ pH 8.0
- $T_{10}E_1NaCl_{50}$ : 10 mM Tris-HCl pH 8.0 , 1 mM $Na_2EDTA$ pH 8.0, 50 mM NaCl
- Wash solution: 2 X SSC+ 0.5% SDS, 0.2 X SSC+0.5% SDS
- Film developing solution

**2.1.16 สารเคมีสำหรับการตัดดีเอ็นเอ**

- Restriction endonuclease: MspI 10 $u/\mu l$, HpaII 10 $u/\mu l$ และ EcoRI 10 $u/\mu l$ (Biolabs)
- 10 X restriction buffer (Biolabs)
- 40 mM spermidine (Sigma)

2.1.17 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ดีเอ็นเอของแลมด้า ( lamda-DNA ) ถูกตัดอย่างสมบูรณ์ด้วย restriction enzyme ; PstI

2.1.18 เครื่องแก้วและสารละลาย

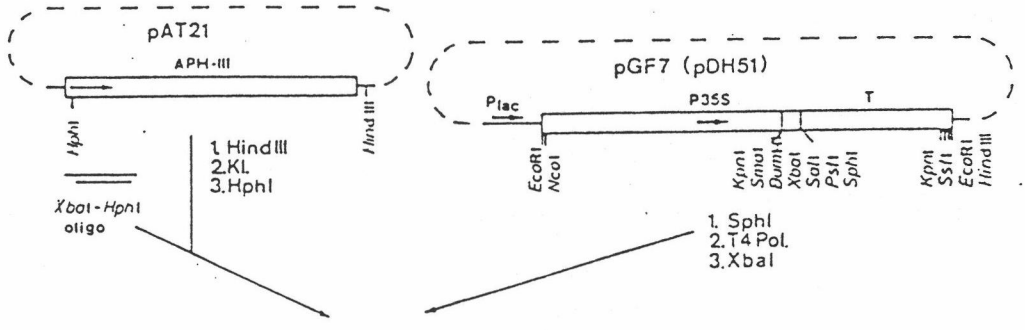
เครื่องแก้วและสารละลายทุกชนิดที่ใช้ ในการศึกษาดีเอ็นเอ จะต้องสะอาดปราศจากเอนไซม์ nuclease ด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

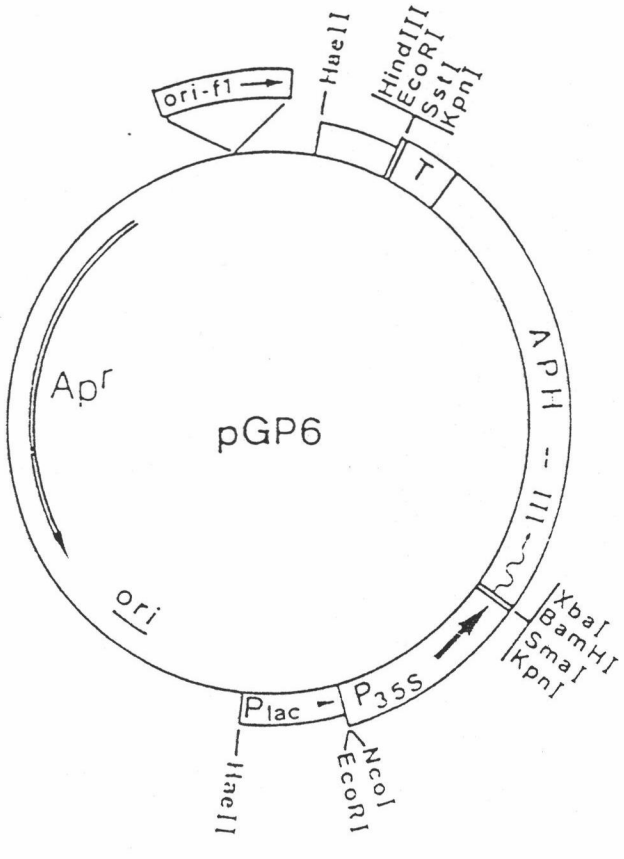
2.2 ขั้นตอนการวิจัย

2.2.1 ศึกษาการจำแนกระดับ ของการเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT ในเมล็ดรุ่น $R_3$

พืชที่ใช้ในการทดลอง คือพืชตระกูลยาสูบชนิด *N. plumbaginifolia* ที่ได้ผ่านการถ่ายจีนโดยตรง โดยวิธี PEG - transformation ( Gharti-Chhetri et al., 1992 ) โดยการผสมสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมจากพลาสมิด pGP6 ( ขนาด 4.2 kb ) ซึ่งมีจีน NPT หรือ จีน APH ( ขนาด 1.6 kb ) ( รูปที่ 2 ) เซลล์พืชที่มีการแสดงออกของจีนดังกล่าว จะทำให้สามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้บนสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็ง MS ซึ่งมีคานาไมซินผสมอยู่ในขนาดความเข้มข้น 100 mg/l โดยสามารถเจริญเติบโตแตกใบและรากเป็นปกติ ในขณะที่เซลล์พืชที่ไม่มีจีนชนิดนี้หรือจีนชนิดนี้ไม่แสดงออกจะเจริญเติบโตได้ถึงขั้นแตกใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลเท่านั้น ซึ่งเซลล์ทั้งหมดจะตายในเวลาต่อมา เป็นผลให้เห็นใบเลี้ยงมีลักษณะสีขาวซีด

นำพืชในรุ่น $R_2$ ที่กำเนิดมาจากโคลนเดียวกัน และมีลักษณะเริ่มต้นเป็น




รูปที่ 7 แสดง restriction map ของพลาสมิด pGP6 (Pietrzak และคณะ)

monogenic จำนวน 26 ตัวอย่างมาทำการผสมเกสรแบบ selfing แล้วนำเมล็ดที่ได้จากการผสมดังกล่าว ไปเพาะลงบนสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีคานาไมซินความเข้มข้น 100 mg/l ศึกษาอัตราส่วนจำนวนต้นที่ต้านคานาไมซินต่อจำนวนต้นที่ไม่ต้านคานาไมซิน

### 2.2.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 5-azacytidine ในการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ที่ถูกยับยั้งการแสดงออก

นำเมล็ดพืชในรุ่น $R_3$ ที่มีความผิดปกติในการแสดงออกของจีน กลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของจีนอย่างสมบูรณ์ มาทำการกระตุ้นการแสดงออกของจีนโดยใช้สาร 5-azacytidine ที่ความเข้มข้น 1,10,100 $\mu$M เพื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 5-azacytidine ในการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT

### 2.2.3 ศึกษาการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ที่ถูกยับยั้งด้วย 5-azacytidine

ภายหลังจากการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 5-azacytidine สำหรับการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT แล้ว จะทำการผสม 5-azacytidine ที่ความเข้มข้นดังกล่าวลงในสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็ง MS เพื่อใช้ศึกษาประสิทธิภาพ ในการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPTในเมล็ดกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกอย่างสมบูรณ์ และกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกเพียงบางส่วน

### 2.2.4 ศึกษาการแสดงออกของจีน NPT ในประชากรรุ่นต่อไป ( $R_4$ ) ภายหลังได้รับ 5-azacytidine

ทำการคัดเลือกต้นพืชที่มีความสามารถในการต้านคานาไมซิน บนสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็ง MS ที่มีคานาไมซิน 50 และ 100 mg/l ร่วมกับ 100 $\mu$M 5-azacytidine นำไปปลูกบนกระถางดินภายหลังสัปดาห์ที่ 6 เมื่อต้นพืชเริ่มมีดอกทำการผสมเกสรทั้ง selfing

และ back-crossing การเจริญเติบโตเต็มที่ของเมล็ดจะเกิดหลังจาก การผสมเกสร ประมาณ 2 สัปดาห์ ทำการเก็บรวบรวมเมล็ดที่ได้ แล้วนำไปทดสอบ โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็ง MS ที่มีคานาไมซิน 100 mg/l ในสภาพปลอดเชื้อ แล้วศึกษาสัดส่วนจำนวนต้นยาสูบที่สามารถแสดงออกของจีน NPT ได้ใหม่ และทำการศึกษา rooting test เพื่อประเมินว่า การเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT เกิดขึ้นในระยะก่อนการสร้างเมล็ด หรือภายหลังการสร้างเมล็ด

## 2.2.5 ศึกษาดีเอ็นเอเปรียบเทียบก่อนและหลังการกระตุ้นด้วย 5-azacytidine

เก็บรวบรวมใบของต้นพืชทดลองรุ่น $R_2$ และรุ่น $R_3$ ในระยะก่อนการสร้างดอก ทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากใบ ตัดดีเอ็นเอด้วย restriction enzyme ; EcoRI เพื่อพิสูจน์ว่าจีน NPT ยังคงปรากฏอยู่เป็นปกติ จากนั้นจึงนำตัวอย่างดีเอ็นเอเดิมไปตัดด้วย isoschizomeric enzymes ; MspI และ HpaII ซึ่ง HpaII เป็น 5-methyl-cytosine sensitive restriction enzyme แยกชิ้นดีเอ็นเอแต่ละขนาดออกจากกันโดยวิธี agarose gel electrophoresis ถ่ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลสู่แผ่นไนลอนโดยวิธี Southern blot จากนั้นทำการตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของจีน NPT ความยาว 1.6 kb ซึ่งแยกได้จากการตัดพลาสมิด pGP6 ด้วย restriction enzyme ; EcoRI ทำการติดฉลากดีเอ็นเอโพรบไว้ด้วย $\alpha$-$^{32}$P Random primer labelling โดยใช้ Random primed labelling kit ล้างดีเอ็นเอโพรบ แล้วตรวจสอบสัญญาณ autoradiogram ที่เกิดขึ้นบนฟิล์มเอ็กซเรย์

ข้อมูลจากสัดส่วนของจำนวนต้นยาสูบ ที่สามารถเกิดการแสดงออกของจีน NPT ได้ใหม่ จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับแบบแผนของสัญญาณ autoradiogram ความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์ได้จะบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการใช้ 5-azacytidine ในการใช้เป็นสารกระตุ้นการแสดงออกของจีนดังกล่าว

## 2.3 วิธีทดลอง

### 2.3.1. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดยาสูบในสภาพปลอดเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog,1962) ซึ่งมีองค์ประกอบตามภาคผนวกข้อ 30 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ภายหลังการฆ่าเชื้อปล่อยให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 40-50° ซ นำไปเทลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ปริมาตรจานละ 25 มิลลิลิตร ในสภาพปลอดเชื้อ ปล่อยให้อาหารเย็นลงจนแข็งตัว ในอาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS ที่ผสมคานาไมซิน ให้ใส่สารละลายคานาไมซินความเข้มข้น 100 mg/ml ที่ผ่านการกรองด้วยชุดกรอง millipore filter ขนาดรูกรอง 0.45 $\mu$m ก่อนแล้ว โดยปรับความเข้มข้นของคานาไมซิน ตามการทดลอง คือ

- อาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS + 50 mg/l คานาไมซิน
- อาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS + 100 mg/l คานาไมซิน

ในอาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS ที่ผสมคานาไมซิน และให้ 5-azacytidine ร่วมด้วยให้ใส่สารละลาย 5-azacytidine ความเข้มข้น 0.05 mM ที่ผ่านการกรองด้วยชุดกรอง millipore filter ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร โดยปรับให้มีความเข้มข้นของ 5-azacytidine ตามการทดลอง คือ

- อาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS + 50 mg/l คานาไมซิน + 1 $\mu$M 5-azacytidine
- อาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS + 50 mg/l คานาไมซิน + 10 $\mu$M 5-azacytidine

- อาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS + 50 mg/l คานาไมซิน +
  100 $\mu$M 5-azacytidine
- อาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS + 100 mg/l คานาไมซิน +
  1 $\mu$M 5-azacytidine
- อาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS + 100 mg/l คานาไมซิน +
  10 $\mu$M 5-azacytidine
- อาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS + 100 mg/l คานาไมซิน +
  100 $\mu$M 5-azacytidine
- อาหารชุดควบคุมคือ อาหารกึ่งแข็งสูตร MS

2.3.2 การเพาะเลี้ยงเมล็ดยาสูบในสภาพปลอดเชื้อ

นำตัวอย่างเมล็ดยาสูบมาห่อด้วยผ้าขาวบาง มัดด้วยเชือกให้แน่น นำมาทำให้ปลอดเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ผสมด้วย Tween 20 2-3 หยด เป็นเวลาประมาณ 25-30 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้งๆละ 15 นาที คลี่ผ้าขาวบางให้กางออก ผึ่งเมล็ดยาสูบให้แห้ง นำเมล็ดที่ผึ่งให้แห้งแล้วมาโปรยลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยง ให้กระจายสม่ำเสมอ ในจำนวนประมาณ 200 เมล็ด/จานอาหาร พันขอบจานอาหารด้วย parafilm 2-3 ชั้น นำไปเลี้ยงบนชั้นในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและแสง โดยมีอุณหภูมิ 25° ซ ความเข้มแสงที่ระดับเนื้อเยื่อพืช 1500 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลอง โดยการนับจำนวนเมล็ดที่มีใบแท้เกิดขึ้น

2.3.3 การศึกษาลักษณะของต้นอ่อนในสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS ผสมคานาไมซิน

ลักษณะของต้นอ่อนยาสูบชนิดนี้ ที่มีการแสดงออกของจีน NPT สามารถแบ่งลักษณะการแสดงออกได้เป็น 3 ลักษณะ คือ

- ลักษณะที่แสดงจีน NPT เต็มที่ พิจารณาจากการที่พืชทดลองสามารถมีการเจริญเติบโตได้ปกติบนสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS ผสมคานาไมซิน

- ลักษณะที่ไม่แสดงจีน NPT พิจารณาจากการที่พืชทดลอง ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ปกติบนสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS ผสมคานาไมซิน

- ลักษณะที่แสดงจีน NPT บางส่วน พิจารณาจากการที่พืชทดลองมีการเจริญเติบโตได้บางส่วนบนสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS ผสมคานาไมซิน

## 2.3.4. การปลูกเลี้ยงพืชทดลองในเรือนต้นไม้

ภายหลังการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อประมาณ 3 สัปดาห์ เมล็ดจะเริ่มมีการแตกรากและใบ เมื่อต้นพืชมีใบแท้ประมาณ 3-4 ใบ ทำการย้ายจากจานเพาะเลี้ยงไปปลูกในกระถางดิน โดยผสมดิน : ปุ๋ยอินทรีย์ : ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 3:1:1 ภายหลังจากสัปดาห์ที่หกเป็นต้นไป ต้นพืชจะเริ่มมีดอก การเจริญเติบโตเต็มที่ของเมล็ดจะเกิดหลังจากการผสมเกสร ประมาณสองสัปดาห์ ทำการเก็บรวบรวมเมล็ดจากต้นพืชทดลอง นำมาผึ่งให้แห้งแล้วบรรจุในภาชนะฝาปิด เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ

## 2.3.5. การศึกษา rooting test

ภายหลังการเพาะเลี้ยงพืชทดลองรุ่น $R_3$ ที่ได้รับการกระตุ้นให้กลับมามีการแสดงออกของจีน NPT ได้ใหม่ ในเรือนเพาะเลี้ยง ตัดยอดอ่อนของต้นพืชในระยะก่อนออกดอก นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ เวลา 25-30 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว ล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง นำไปปักลงบนอาหารคัดเลือกกึ่งแข็ง MS และอาหารคัดเลือกกึ่งแข็ง MS ที่มีคานาไมซิน 50 mg/l และ 100 mg/l นำไปเลี้ยงบนชั้นในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและแสง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยมีอุณหภูมิ 25° ซ ความเข้มแสงที่ระดับเนื้อเยื่อพืช 1500 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

2.3.6. การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากใบ โดยใช้วิธี Osmotic lysis method (Cherdshewasart, 1991a)

เก็บรวบรวมใบพืชทดลองในระยะก่อนการสร้างดอกประมาณ 2-3 ใบต่อต้นทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นซับใบให้แห้ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70° ซ

นำใบพืชที่เก็บไว้ที่ -70° ซ มาบดด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด ใส่ตัวอย่างในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี urea extraction buffer 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติม Phenol: Chloroform : Isoamylalcohol (25:24:1) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ปั่นแยกด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นบน นำมาเติม 1 มิลลิลิตร 4.4 M ammonium acetate pH 5.2 ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเติม 7 มิลลิลิตร isopropanol ผลิกกลับหลอดจนดีเอ็นเอตกตะกอน ทำการเก็บดีเอ็นเอที่ได้มาละลายด้วย TE 1 มิลลิลิตร เติม RNase ความเข้มข้น 20 mg/ml 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัด RNA บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 30 นาทีสกัดซ้ำด้วย Phenol : Chloroform : Isoam lalcohol (25:24:1) แล้วทำการตกตะกอนดีเอ็นเอซ้ำอีกครั้ง โดยการเติม 4.4 M ammonium acetate pH 5.2 100 ไมโครลิตร และ isopropanol 1.1 มิลลิลิตร ผลิกกลับหลอดจนดีเอ็นเอตกตะกอน เก็บเกี่ยวตะกอนดีเอ็นเอแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol ที่เย็น 500 ไมโครลิตร ระเหย ethanol ให้หมด แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer

2.3.7. การตรวจวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเจือจาง (100 เท่า) ด้วย TE buffer โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ TE buffer 990 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรโดยใช้ TE เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ ไปคำนวณหาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยดูจากอัตราส่วนระหว่าง

ค่า $OD_{260}$ และ $OD_{280}$ ถ้าหากดีเอ็นเอมีอัตราส่วนของ $OD_{260}/OD_{280}$ ประมาณ 1.8 แสดงว่า เป็นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มีคุณภาพดี สำหรับการวัดปริมาณนั้นดูจากค่า $OD_{260}$ โดยเทียบจาก 1 $OD_{260}$ จะมีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ/มิลลิลิตร

2.3.8.การทำ Agarose Gel Electrophoresis ( Maniatis et al., 1982 )

เตรียม 0.8 % agarose gel (น้ำหนัก/ปริมาตร) ชั่ง agarose gel ใส่ใน TBE buffer pH 8.3 หยด ethedium bromide 1 หยดเล็กๆ นำไปต้มจนกระทั่ง agarose gel ละลายเป็นเนื้อเดียวกันในบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิลดลงประมาณ 60° ซ นำไปเทใน gel chamber ที่มีช่องสำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอ (comb) ตั้งอยู่แล้ว ตั้งทิ้งไว้จน gel แข็งตัวแล้วจึงดึง comb ออก เท TBE buffer จนท่วม gel ให้มีระดับสูงกว่า gel ประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ผสมดีเอ็นเอ และสีติดตาม (tracking dye) แล้วหยอดลงในช่องบน agarose gel ด้วยไมโครปิเปต นำ gel chamber ไปวางใน electrophoresis tank ต่อขั้วอิเลคโทรดเข้ากับ power supply โดยให้กระแสวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่คงที่ ทิ้งไว้จนสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนมาใกล้ถึงขอบ gel อีกด้านหนึ่ง ปิด power supply แล้วนำ gel ไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอบน agarose gel โดยส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพ

2.3.8 การตรวจสอบจีน NPT ในจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลอง โดยการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ; EcoRI

ผสม reaction mixture ตามลำดับคือ

น้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสสำหรับปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 40 $\mu$l

10 $\mu$g plant DNA

4 $\mu$l 40 mM spermidine

I18813343

4 $\mu$l 10 X restriction buffer

100 unit restriction enzyme

บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ ข้ามคืน วันรุ่งขึ้นทำการแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยการทำ agarose gel electrophoresis หลังจากนั้นจึงทำการตรวจสอบ โดยการติดฉลากด้วย $\alpha$-$^{32}$P labelled 1.6 kb EcoRI fragment ของพลาสมิด pGP6 ซึ่งเป็นชิ้นส่วนทั้งหมดของจีน NPT ( รูปที่ 2 )

**2.3.10 การจำแนกความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยการตัดด้วย isoschizomeric enzymes** ( Cherdshewasart, 1991c )

ในการทดลองเลือกใช้ isoschizomeric enzymes ; MspI และ HpaII เพื่อพิสูจน์ว่าดีเอ็นเอของพืชทดลองมีจีน NPT ที่อยู่ในสภาพถูกยับยั้ง เนื่องจากการเกิดการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ดีเอ็นเอโดยที่เอนไซม์ทั้งสองจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณจดจำเหมือนกัน คือ

↓
CCGG

GGCC
↑

ถ้าหากจีน NPT ไม่ถูกเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่บริเวณ internal cytosine จะสามารถตัดดีเอ็นเอได้ด้วยเอนไซม์ MspI และ HpaII แต่ในทางตรงกันข้าม ถ้าหากจีน NPT ถูกเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่บริเวณดังกล่าว จะสามารถตัดดีเอ็นเอได้ด้วยเอนไซม์ MspI เท่านั้น ส่วน HpaII จะไม่สามารถตัดได้ ( David et al., 1974 ; Quemada et al., 1987 ; Mc Clelland and Nelson, 1988 ) )

ผสม reaction mixture เหล่านี้ตามลำดับ คือ

น้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสสำหรับปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 40 $\mu$l

10 $\mu$g plant DNA

4 $\mu$l 40 mM spermidine

4 $\mu$l 10X restriction buffer

100 unit restriction enzyme : MspI,HpaII

บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ ข้ามคืน วันรุ่งขึ้นทำการแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยการทำ agarose gel electrophoresis หลังจากนั้นจึงทำการตรวจสอบ โดยการติดฉลากด้วย $\alpha$-$^{32}$P labelled 1.6 kb EcoRI fragment ของพลาสมิด pGP6 ซึ่งเป็นชิ้นส่วนทั้งหมดของจีน NPT ( รูปที่ 2 )

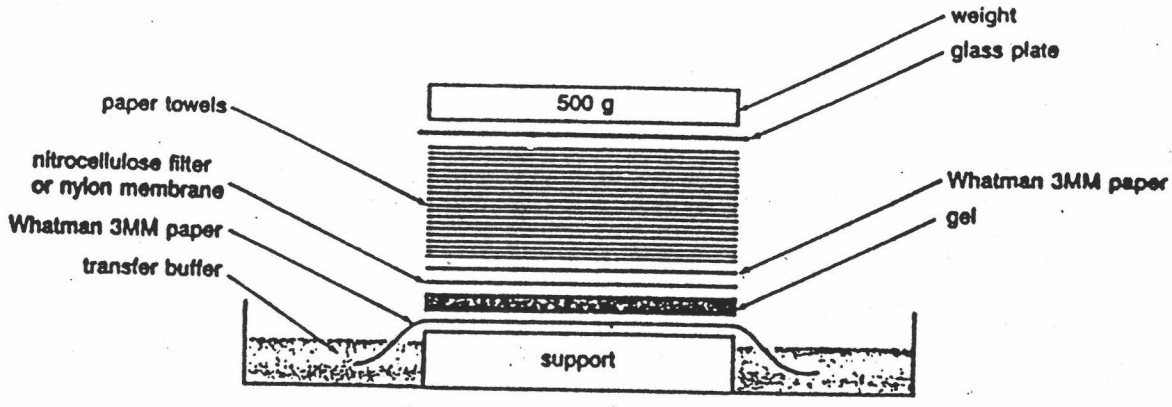
2.3.11.การทำ Southern Blot ( Southern, 1975 )

หลังจากที่ทำการแยกขนาดดีเอ็นเอบน agarose gel eletrophoresis แล้ว ทำการ depurinate โดยวางเจลลงในถาด แช่ใน 0.25 M HCl นาน 30 นาที พร้อมกับเขย่าเบาๆตลอดเวลา ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอส ทำการ denaturation ด้วย denaturation solution (1.5 M NaCl,0.5 M NaOH) 2 ครั้ง เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอส ทำการ neutralization ด้วย neutralization solution (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH7.2) 2 ครั้ง นาน 30 นาที พร้อมกับเขย่าเบาๆตลอดเวลา ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอส เทสารละลาย 20 X SSC (175.3 g NaCl,88.2 g sodium citrate pH 7.0)ลงในอ่างแก้วสำหรับทำ bloting วางกระจกพาดขอบอ่าง ตัดกระดาษกรอง Whatman 3 MM 2 แผ่น ชุบด้วยสารละลาย 20 X SSC ให้ชุ่ม วางพาดบนกระจก ให้ปลายของกระดาษจุ่มลงในสารละลาย 20 X SSC รีดฟองอากาศออกให้หมด นำกระดาษกรอง Whatman 3 MM ที่ตัดให้มีขนาดเท่ากับเจล ชุบด้วย 20 X SSC ให้ชุ่มมาวางซ้อนกัน 2 แผ่น วางแผ่นเจลคว่ำบนกระดาษกรอง รีดฟองอากาศออกให้หมด นำแผ่น membrane (Hybond-N) ที่ตัดให้มีขนาดเท่ากับแผ่นเจล ชุบด้วย 2 X SSC ให้ชุ่ม วางประกบกับแผ่นเจล อย่าให้มีฟองอากาศ วางกระดาษกรอง Whatman 3 MM ที่ชุบ

ด้วย 20 X SSC ลงบนแผ่น membrane นำกระดาษซับ มาวางซ้อนกันบนกระดาษกรอง ให้สูงประมาณ 10 cm วางแผ่นกระจกทับกระดาษซับอีกที นำน้ำหนักประมาณ 500 g มาวางทับบนกระจก ดังรูปที่ 3 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งแผ่นเจลถูกซับเป็นแผ่นแห้งแบน ล้างแผ่น membrane ด้วยสารละลาย 2 X SSC แล้วซับแผ่น membrane ให้แห้งด้วยกระดาษ Whatman 3 MM ทำการ fix ดีเอ็นเอกับแผ่น membrane โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 80° ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บไว้ในสภาพแห้งที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปศึกษาต่อไป ตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายดีเอ็นเอจากเจลไปสู่แผ่นไนลอน โดยการนำเจลส่วน ที่เหลือมาย้อมด้วย ethedium bromide แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อตรวจดูดีเอ็นเอที่อาจตกค้างอยู่

2.3.12.การติดฉลากดีเอ็นเอโพรบด้วย $\alpha$-$^{32}$P ( Cherdshewasart,1991b )

ทำการdenature ดีเอ็นเอโพรบ 100 ng ($10^{-2}\mu g/\mu l$)ปริมาณสองเท่าของที่จะใช้ผสมใน labelling mixture โดยใส่ใน หลอดไมโครฟิวจ์ ขนาด 1.5 ml เจาะรูด้วยเข็มขนาด 25 G ปิดให้สนิทด้วย parafilm ต้มในน้ำเดือด 5-10 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีโดยแช่ในน้ำแข็ง ติดฉลากดีเอ็นเอโพรบด้วย $^{32}$P โดยใช้ random-primed labelling kit (Bochringer-Mannheim) ซึ่งประกอบด้วย dCTP, dTTP, dGTP, buffer, $\alpha$-$^{32}$PdATP และ Klenow enzyme นำ random - primed labelling reaction mixture ไป incubate ที่อุณหภูมิ 37° ซ, 30 นาที หยุดปฏิกิริยา โดยการเติม 0.3 % Orange-G ใน 0.5 M $Na_2EDTA$ pH 8.0 30 $\mu$l เตรียม Sephadex G-50 column โดยใช้ syringe ขนาด 1 ml ล้าง column ด้วย $T_{10}E_1NaCl_{50}$ buffer 3 ครั้ง load reaction mixture แล้วทำการชะ (elute) column ด้วย $T_{10}E_1NaCl_{50}$ เก็บส่วนที่ผ่านออกมาจาก column ทุกๆ 3 หยด นำไปตรวจสอบความเข้มของสัญญาณด้วย Geiger Counter เพื่อแยกส่วนที่เป็น incorporated ออกจาก non-incorporated ให้ได้มากที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการทำ hybridization




รูปที่ 8 แสดงการทำ Southern blot transfer

2.3.12 การทำ Hybridization ( Cherdshewasart, 1991b )

เติม prehybridization solution ลงในถุงพลาสติกชนิดหนา สำหรับใส่ membrane ในอัตราส่วน 10 ml/100 $cm^2$ membrane นำไป incubate ใน shaking water bath อุณหภูมิ 65° ซ ข้ามคืน ทำการ denature labelled probe ที่แยกได้โดยการต้มใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ ขนาด 1.5 ml เจาะรูฝาปิดด้วยเข็มขนาด 25 G ปิดให้สนิทด้วย parafilm ต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีโดยนำไปแช่ในน้ำแข็ง เปิดปากถุงพลาสติกใส่ membrane เท prehybridization solution เก่าทิ้ง เติม fresh perhybridization solution ลงไปครึ่งปริมาตร เติม denatured labelled probe ลงในถุงพลาสติก รีดฟองอากาศภายในถุงออกให้หมด ปิดปากถุงให้สนิท ด้วยเครื่องรีดพลาสติกนำไป incubate ใน shaking water bath อุณหภูมิ 65° ซ ข้ามคืนวันรุ่งขึ้นล้าง hybridized membrane ด้วย 2 X SSC + 0.5% SDS ซ้ำ 2 ครั้งๆละ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง membrane ด้วย 2 X SSC + 0.5% SDS ซ้ำ 2 ครั้งๆละ 30 นาที ในกล่องพลาสติกบน shaking water bath อุณหภูมิ 65° ซ ตามด้วย 0.2 X SSC + 0.5 % SDS 2 ครั้งๆละ 30 นาที บน shaking water bath อุณหภูมิ 65° ซ ซับแผ่น membrane พอหมาดด้วยกระดาษกรอง Whatman 3 MM ห่อแผ่น membrane ด้วยแผ่นพลาสติก นำแผ่น membraneไปประกบกับ X-ray film ที่อุณหภูมิ -70° ซ , 3-4 คืน จากนั้นนำแผ่น X-ray film ไปล้างด้วยน้ำยา developer และ fixer ตรวจสอบสัญญาณ autoradiogram ที่ปรากฏ

2.3.14. การทำ Rehybridization ( Cherdshewasart, 1991b )

ในกรณีที่ต้องการล้างดีเอ็นเอโพรบออกจากแผ่น membrane ทำได้โดยการล้างแผ่น membrane ด้วย 0.4 M NaOH ที่อุณหภูมิ 45° ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตามด้วย 0.1 X SSC ,0.1% (w/v)SDS และ 0.2 M Tris-HCl pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 45° ซ , 15 นาที ทำการตรวจสอบ ว่ายังมีดีเอ็นเอโพรบติดค้างอยู่ที่แผ่น membrane โดยนำไป

ประกบกับ X-ray film เพื่อตรวจดูสัญญาณในวันรุ่งขึ้น

## 2.3.15. การทำ Serial dilution ของพลาสมิด pGP6 ตัดด้วย isoschizomeric enzymes ; MspI, HpaII

นำพลาสมิด pGP6 ความเข้มข้น 1 mg/ml มาทำ serial dilution $10^{0}$, $10^{-1}$ $10^{-2}$,$10^{-3}$,$10^{-4}$,$10^{-5}$ และ $10^{-6}$ $\mu g/\mu l$ ย่อยด้วย isoschizomeric enzymes ; MspI, HpaII แล้วแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis

จากนั้นทำ Southern blot, prehybridization และ โพรบด้วย $\alpha$-$^{32}$PdATP labelled 1.6 kb EcoRI fragment ของพลาสมิด pGP6 เพื่อดูว่าชิ้นส่วนใดมาจากส่วนที่มียีน NPT อยู่