บทที่ 4

วิธีการทดลอง

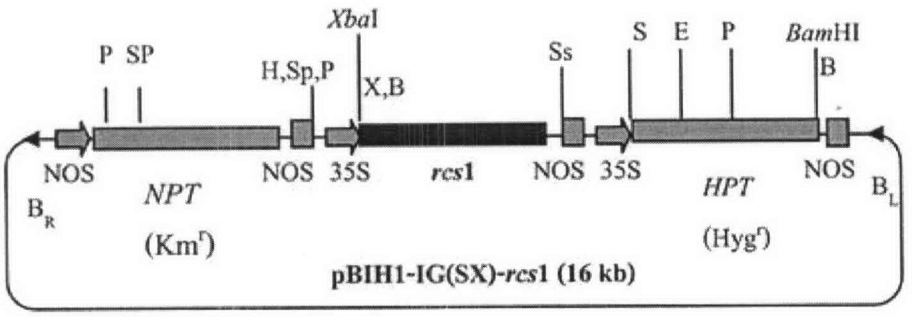
4.1 การสร้างพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1

4.1.1 การสกัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. Coli* ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (ภาคผนวก ก ข้อ1) ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ1) และสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ2) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที 16 ชั่วโมง นำเซลล์ *E. Coli* ที่ได้มาสกัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด ด้วยชุดสกัดพลาสมิด(QIAprep Spin Miniprep Kit; QIAGEN Inc., USA.) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพลาสมิดเจือจาง 1/50 เท่า ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ280 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณของพลาสมิดที่สกัดได้

4.1.2 การตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำรีคอมบิแนนต์พลาสมิด(ที่ได้จาก ข้อ4.1.1) มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ*Bam*HI และสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จำนวนหน่วยของเอนไซม์ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เพื่อตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 (ดังแสดงในภาพที่ 4.1) ตรวจสอบผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟเรซิส แยกเอาชิ้นพลาสมิดที่ต้องการออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ (QIAquick Gel Extraction Kit; QIAGEN Inc., USA.)



ภาพที่ 4.1 แผนที่เรสทริกชั่นของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1

4.1.3 การแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ออกจากกัน และการหาขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรส เจลอิเลคโตรโฟเรซิส

เทอะกาโรสเจล ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข ข้อ11) สภาพหลอมเหลวที่อุณหภูมิ ประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสารละลาย loading buffer ความเข้มข้น 10 เท่า (10x loading buffer; Takara, Japan) หยอดลงในหลุมซึ่งเกิดจากการดึงหวีออกจากเจลอะกาโรสที่แข็งตัว หลุมละประมาณ 20 ไมโครลิตร ใช้ดีเอ็นเอ เค. บี. แลดเดอร์ (kb ladder; Stretegene,USA) ซึ่งเป็นสารละลายดีเอ็นเอขนาดความยาวต่าง ๆ ตั้งแต่ 250 เบส ถึง 12 กิโลเบส เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบขนาดความยาวของดีเอ็นเอ ทำอิเลคโตรโฟเรซิส ในเจลแชมเบอร์(gel chamber) ซึ่งบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ใช้ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ หยุดปฏิกิริยาเมื่อแถบสีน้ำเงินของสารละลาย loading buffer เคลื่อนที่มาเกือบสุดขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ โดยแช่แผ่นเจลอะกาโรสที่ได้ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 5 นาที ล้างแผ่นเจลอะกาโรส โดยแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE เป็นเวลา 30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร ความเข้มต่ำ หาขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน บันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพรารอยด์ขาวดำ ความไวแสง 3,000 (ISO 3000)

4.1.4 การแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกดีเอ็นเอ
(QIAquick Gel extraction kit; QIAGEN Inc., USA.)

แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ออกจากกันด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟเรซิส(ตามวิธีข้อ 4.1.3) ย้อมสีดีเอ็นเอซึ่งอยู่ภายในเจลอะกาโรส ด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร ความเข้มต่ำภายในระยะเวลาไม่เกิน 10 วินาที เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเนื่องมาจากแสงอัลตราไวโอเลต หาแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดที่ต้องการ(ตามวิธีข้อ 4.1.3) ตัดแผ่นเจลอะกาโรสเพื่อแยกเอาชิ้นเจลเฉพาะตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการออกมา นำมาสับละเอียดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สกัดแยกเอาดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอ(QIAquick Gel extraction kit; QIAGEN Inc., USA.) เก็บดีเอ็นที่สกัดได้ซึ่งอยู่ในรูปสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.1.5 การเชื่อมต่อยีนระบุรหัสซีสเตอีนซินเตส(ยีน *rcs*1) กับพลาสมิดพาหะ pUC19
(Ligation)

เชื่อมยีน*rcs*1 ซึ่งตัดออกมาจากรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ*Bam*HI(ที่ได้จาก ข้อ 4.1.2) กับพลาสมิดพาหะ pUC19 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันที่แยกออกจากเจลอะกาโรส(ตามวิธีข้อ 4.1.4) โดยผสมยีน *rcs*1ต่อพลาสมิดพาหะในอัตราส่วน 1:1 ในปริมาตรสุดท้ายไม่เกิน 5ไมโครลิตร เติมสารละลายที่ 1 ของชุดเชื่อมดีเอ็นเอ (Ligation kit; New England Biolabs, Inc., USA) ลงไปในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายฟีนอล:คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ อัตราส่วน 25:24:1 โดยปริมาตร (ภาคผนวก ข ข้อ 12) ใช้ปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอ(Ligation reaction) ที่ได้ทรานสฟอร์มเซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5αโดยวิธีอิเลคโตรพอเรชัน(Electroporation)(ตามวิธีข้อ 4.1.6) เพื่อเพิ่มจำนวนรีคอมมิแนนต์พลาสมิด pUC19-*rcs*1

4.1.6 การทำอิเลคโตรพอเรชัน (Electroporation) ของ *E. coli* DH5α

4.1.6.1 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (Competent cell)

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5α ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งLB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 20 มิลลิลิตร ที่

บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่า ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียล ความเร็ว 200 รอบ/นาที 16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 0.5 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิม 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิมต่อจนกระทั่งค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร มีค่าระหว่าง 0.35-0.4 แช่ฟลาสก์ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในอ่างน้ำผสมน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,000 รอบ/นาที (9,820xg) 20 นาที นำเซลล์ที่ได้มากระจายในน้ำกลั่นเย็นแล้วปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์อีกครั้งที่ภาวะเดิม กระจายเซลล์ที่ได้ในสารละลายกลีเซอรอลเข้มข้น10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 125 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์อีกครั้งที่ภาวะเดิม กระจายเซลล์ที่ได้ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นเดิม 5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ภาวะเดิม กระจายเซลล์ที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYT (ภาคผนวก ก ข้อ2) ที่เย็น 0.125 มิลลิลิตร แบ่งเซลล์คอมพีเทนต์แขวนลอยที่ได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เย็นหลอดละ 40 ไมโครลิตร เก็บเซลล์คอมพีเทนต์แขวนลอยที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสทันที

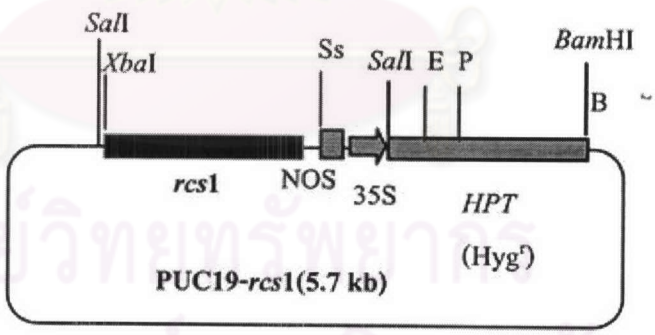
4.1.6.2 การทำอิเลคโตรพอเรชัน

เติมปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอ(ที่ได้จากข้อ 4.1.5) ซึ่งมีดีเอ็นเอเข้มข้น 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และคาดว่ามีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC19-*rcs*1 จำนวน 1 ไมโครลิตร ลงในสารแขวนลอยเซลล์คอมพีเทนต์หลอมเหลว 40 ไมโครลิตร (ที่ได้จากข้อ4.1.6.1) ผสมให้เข้ากันย้ายของผสมด้วยไมโครปิเปตไปยังอิเลคโตรพอเรชันคิวเวตต์ (electroporation cuvette) ที่เย็นโดยการแช่ไว้ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งโดยไม่มีฟองอากาศ คิวเวตต์มีช่องห่างระหว่างแผ่นอิเลคโทรด (electrode) เท่ากับ 0.2 เซนติเมตร แช่คิวเวตต์ในน้ำผสมน้ำแข็งต่ออีก 1 นาที นำไปทำอิเลคโตรพอเรชัน โดยใช้เครื่องอิเลคโตรพอเรชัน (Gene Pulser apparatus; BioRad, USA.) ภาวะที่ใช้คือ ค่า field strength เท่ากับ 12.5 กิโลโวลต์/เซนติเมตร (kV/cm) ความต้านทานไฟฟ้า 250 โอมห์ 25 μF นำคิวเวตต์ที่ผ่านกระบวนการทำอิเลคโตรพอเรชัน มาแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งทันที 2 นาที ย้ายส่วนผสมของปฏิกิริยาภายในคิวเวตต์ลงไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SOC 1 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยวิธีปราศจากเชื้อ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที 1 ชั่วโมง เกลี่ยสารแขวนลอยเซลล์ 200 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง โคโลนีที่ได้คาดว่าเป็นโคโลนีของเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC19-*rcs*1

4.1.7 การเตรียมยีนระบุรหัสซีสเตอีนซินเตส(ยีน *rcs*1) เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1

นำรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC 19-*rcs*1(ดังแสดงในภาพที่4.2) ซึ่งสกัดจาก *E. coli* DH5α(ที่ได้จากข้อ 4.1.6) มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จำนวนหน่วยของเอนไซม์ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง แล้วนำพลาสมิดที่ได้มาตัดซ้ำด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I แบบกึ่งสมบูรณ์(partial digestion) โดยวิธีการแปรผันปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ เจือจางเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอมไซม์ตัดจำเพาะ สภาวะอื่นที่ใช้เช่นเดียวกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ตรวจสอบผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟเรซิส แยกเอาชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ(ประมาณ 3 กิโลเบส) ประกอบด้วยยีน *rcs*1 และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน(ยีน*HPT*) ออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ (QIAquick Gel extraction kit; QIAGEN Inc., USA.)



ภาพที่ 4.2 แผนที่เรสทริกชั่นของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC19-*rcs*1

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

เชื่อมยีน *rcs*1-*HPT* (ที่ได้จากข้อ 4.1.7) กับพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I และ *Bam*HI ที่แยกออกจากเจลอะกาโรส(ตามวิธี ข้อ 4.1.4) โดยผสมยีน *rcs*1-*HPT* ต่อพลาสมิดในอัตราส่วน 1:1 ในปริมาตรสุดท้ายไม่เกิน 5 ไมโครลิตร เติม

สารละลายที่ 1 ของชุดเชื่อมดีเอ็นเอ (Ligation kit; New England Biolabs, Inc., USA) ลงไปในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร บ่มที่ 16 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีสกัดด้วยสารละลายฟีนอล:คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลอัลกอฮอลล์ อัตราส่วน 25:24:1 โดยปริมาตร ใช้ปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ได้ทรานสฟอร์มเซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5α(ตามวิธีข้อ 4.1.6) เพื่อเพิ่มจำนวนรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 แล้วสกัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดจากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ด้วยชุดสกัดพลาสมิด (QIAprep Spin Miniprep Kit; QIAGEN Inc., USA.)

4.1.9 การทำอิเลคโตรพอเรชัน (Electroporation) ของ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101

4.1.9.1 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA101 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YEP (ภาคผนวก ก ข้อ3) 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% (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 (9,820xg) 4 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (N-S-Hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid) เข้มข้น 1มิลลิโมลาร์ ซึ่งปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.0 โดยใช้โปรตัสเซียมไฮดรอกไซด์ แขวนลอยเซลล์ที่ได้ในสารละลายกลีเซรอลเข้มข้น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 100 ไมโครลิตร แบ่งสารแขวนลอยเซลล์คอมพีเทนต์ที่ได้ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ปราศจากเชื้อ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 20 ไมโครลิตร เก็บที่ -70 องศาเซลเซียสทันที

4.1.9.2 การทำอิเลคโตรพอเรชัน

เติมรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1- IG(SX)-*SAT*1- *rcs*1(ที่ได้จากข้อ 4.1.8) เข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จำนวน 0.5 ไมโครลิตรลงในสารแขวนลอยเซลล์

คอมพีเทนต์ *A. tumefaciens* EHA101 หลอมเหลว 20 ไมโครลิตร(ที่ได้จากข้อ 4.1.9.1) ผสมให้เข้ากัน ย้ายของผสมด้วยไมโครปิเปตไปยังอิเลคโตรพอเรชันคิวเวตต์ที่เย็นโดยการแช่ไว้ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งโดยไม่มีฟองอากาศ คิวเวตต์มีช่องห่างระหว่างแผ่นอิเลคโทรด 0.2 เซนติเมตร แช่คิวเวตต์ในน้ำผสมน้ำแข็งต่ออีก 2 นาที นำไปทำอิเลคโตรพอเรชัน โดยใช้เครื่องอิเลคโตรพอเรชัน (Gene Pulser apparatus; BioRad, USA.) ภาวะที่ใช้คือ ค่า field strength 12.5 กิโลโวลต์/เซนติเมตร (kV/cm) ความต้านทานไฟฟ้า 250 โอมห์ 25 μF นำคิวเวตต์ที่ผ่านกระบวนการทำอิเลคโตรพอเรชัน 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

4.1.10 การตรวจหายีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตส (ยีน *rcs*1) และยีนระบุรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส (ยีน *SAT*1) โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.1.10.1 การตรวจหายีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตส (ยีน *rcs*1)

นำพลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ ซึ่งคาดว่าเป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1- IG(SX)-*SAT*1- *rcs*1(ที่ได้จากข้อ 4.1.9) มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้ *rcs*1-1 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward primer) ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5' TGTCAGATCGATTCCTGACG 3' และใช้ *rcs*1-2 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ(reverse primer) ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5' ATGGACTGGAAGAGCACC 3' ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ *rcs*1-1 และ *rcs*1-2 จับกับยีน *rcs*1 ที่เบสตำแหน่ง 49 – 68 และ 988 - 1007 ตามลำดับ(ภาคผนวก ค ข้อ1) ใช้ชุดทำปฏิกิริยา PCR (PCR reagent Kit ; Takara Bio Inc., Japan.) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycle รุ่น 2400 ; Perkin Elmer , USA.) ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ 50 นาโนกรัมในปริมาตร	1.0 ไมโครลิตร
2. ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ *rcs*1-1 เข้มข้น2.0 ไมโครไมลาร์	1.0 ไมโครลิตร

3. ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ *rcs*1-2
เข้มข้น2.0 ไมโครโมลาร์ 1.0 ไมโครลิตร
4. นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP , dTTP , dCTP, dGTP
เข้มข้นชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์ 0.8 ไมโครลิตร
5. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR
เข้มข้น 10 เท่า 1.0 ไมโครลิตร
6. อีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Ex *Taq* DNA polymerase)
เข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร 0.05 ไมโครลิตร
7. น้ำกลั่นปลอดเชื้อสำหรับปรับปริมาตรสุดท้าย 5.15 ไมโครลิตร
รวมปริมาตรปฏิกิริยา 10.0 ไมโครลิตร

บรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวทั้งหมด ยกเว้นอีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 200 ไมโครลิตร ใส่หลอดลงไปในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ ขั้นตอนแรกกำหนดอุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็น 96 องศาเซลเซียส เติมอีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรสหลังจากที่อุณหภูมิของปฏิกิริยาเท่ากับ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ กำหนดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งหมด 30 รอบ ปฏิกิริยา โดยในแต่ละรอบ ปฏิกิริยาเป็นดังนี้ อุณหภูมิ 96องศาเซลเซียสดีเอ็นเอแม่แบบจะแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว(denaturation) 20 วินาที อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) โดยการจับคู่ของเบสคู่สม 20 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส อีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรสสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการนำนิวคลีโอไทด์มาต่อที่ปลายของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ (extention) ทิศทาง 5' ไปยัง 3' 90 วินาที เมื่อครบ 30 รอบปฏิกิริยา กำหนดให้อุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส 7 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR (PCR product) โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟเรซิส หากดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้เป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1- IG(SX)-*SAT*1- *rcs*1ซึ่งมียีน *rcs*1 จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส

4.1.10.2 การตรวจหายีนระบุรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส (ยีน *SAT*1)

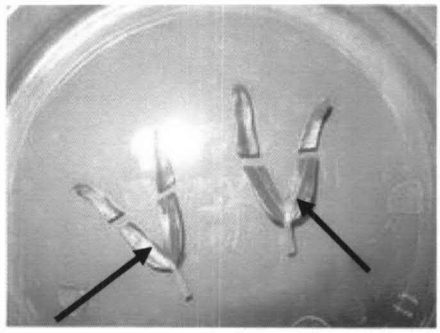
นำพลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ ซึ่งคาดว่าเป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1- IG(SX)-*SAT*1- *rcs*1(ที่ได้จากข้อ 4.1.9) มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward primer) หรือ *JSAT*3 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5' TACGCTTCGATCCATCTCA 3' และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ (reverse primer) หรือ *JSAT*4 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5' ATCACCACTCTGTTTCCCTG 3'

ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ *JSAT*3 และ *JSAT*4 จับกับยีน *SAT*1 ที่เบสตำแหน่ง 219-239 และ 679-699(ภาคผนวก ค ข้อ2) ตามลำดับ ใช้ชุดทำปฏิกิริยา PCR (PCR reagent Kit ; Takara Bio Inc., Japan.) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycle รุ่น 2400 ; Perkin Elmer , USA.) ส่วนผสมของปฏิกิริยา วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (ขั้นตอนการเติมอีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส) การกำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในแต่ละรอบปฏิกิริยา และจำนวนรอบปฏิกิริยา เหมือนวิธีการตรวจหายีน *rcs*1 (ข้อ 4.1.10.1) วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟเรซิส หากดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้เป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1- IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1ซึ่งมียีน *SAT*1 จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส

4.2 การถ่ายโอนยีนระบุรหัสซีสเตอีนซินเตส (ยีน *rcs*1) และยีนระบุรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส (ยีน *SAT*1) เข้าสู่ผักบุ้งจีน(*Ipomoea aquatica* Forsk.)

4.2.1 การเตรียม cotyledon explant ของผักบุ้ง

นำเมล็ดผักบุ้งประมาณ 300 เมล็ด หรือประมาณ 20 กรัม มาใส่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวความจุ 50 มิลลิลิตร ล้างเมล็ดผักบุ้งโดยการเทสารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 40 มิลลิลิตรลงไป เขย่าโดยการเอียงหลอดไปมา 5 นาที เทสารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์ทิ้ง ล้างเมล็ดผักบุ้งด้วยวิธีเดิมด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นล้างเมล็ดผักบุ้งด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง แช่เมล็ดผักบุ้งที่ได้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 16 – 18 ชั่วโมง นำเมล็ดผักบุ้งที่พองตัวดีแล้ว 7 เมล็ด มาวางบนอาหารแข็งMS (ภาคผนวก ข ข้อ 4) 20 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาดความจุ 240 มิลลิลิตร โดยวิธีปราศจากเชื้อ บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้ม 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน 7 วัน นำต้นอ่อนที่ได้ มาตัดเอาใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ (cotyledon explant) ดังแสดงในภาพที่ 4.3 โดยวิธีปราศจากเชื้อ



ภาพที่ 4.3 ลูกศรแสดงลักษณะใบเลี้ยงส่วนโคนใบที่ใช้สำหรับการถ่ายโอนยีน

4.2.2 การเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA 101 ที่มีพลาสมิด pBIH1- IG(SX)-*SAT*1- *rcs*1 เพื่อใช้ถ่ายโอนยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตส (ยีน *rcs*1) และยีนระบุรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส (ยีน *SAT*1) เข้าสู่ผักบุ้ง

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1- IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 เป็นพลาสมิดที่มียีนระบุรหัสซีสเตอีนซินเตสของข้าว (ยีน *rcs*1) และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินสอดแทรกอยู่ที่ตำแหน่งเรสทริกชัน *Sal*I และ *Bam*HI ของพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 ซึ่งเป็นการสอดแทรกเข้าไปแทนที่ยีนระบุรหัสไฮโกรมัยซินในพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1- IG-*SAT*1-*rcs*1 นี้มียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และกานามัยซินอยู่ในบริเวณ T-DNA ยีน *rcs*1 ได้มาจากการโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของข้าว (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) มีขนาด 1,290 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 321 ตัว โปรตีน RCS1 เป็นไอโซฟอร์มที่อยู่ในไซโตพลาสซึม(Nakamura และคณะ, 1999) ยีน *SAT*1 ได้มาจากการโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของ *Arabidopsis thaliana* มีขนาด 989 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 314 ตัว โปรตีน SAT1 เป็นไอโซฟอร์มที่อยู่ในพลาสติด

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA 101 ซึ่งมีพลาสมิด pBIH1- IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YEP (ภาคผนวก ก ข้อ3) ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มในที่มืดที่ 28 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ในที่มืด 18 ชั่วโมง จะได้สารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA 101 ซึ่งมีพลาสมิด 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 ข้อ4)

4.2.3 วิธีการทำทรานสฟอร์เมชันของผักบุ้ง

นำ cotyledon explant ของผักบุ้งประมาณ 200 ชิ้น(ที่ได้จากข้อ 4.2.1) มาแช่ในสารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA 101 ที่มีพลาสมิด pBIH1- IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1(ที่ได้จากข้อ 4.2.2) 20 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบ/นาที 2 ชั่วโมงในที่มืด ซับ cotyledon explant ให้แห้ง ด้วยกระดาษกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อ นำไปวางบนอาหารแข็ง MS ที่เติมอะซิโตไซริงโอน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ 25 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จำนวน 20 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด 3 วัน แล้วนำ cotyledon explant 200 ชิ้นมาล้างโดยการแช่ในสารละลายเซฟโฟแทคซีม(cefotaxime)ความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ5) 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าไปมา 15 นาที แล้วเทสารละลายเซฟโฟแทคซีมทิ้งทำซ้ำ 2 ครั้ง ล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อโดยวิธีเดียวกัน 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง นำ cotyledon explant มาซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อ นำมาวางบนอาหารแข็ง MMS จำนวน 25 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลายไธเดียซูรอน (thidiazuron) ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ6) และสารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จำนวน 10 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเชื้อบ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาว ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 1 ถึง 2 เดือน โดยย้าย cotyledon explant ไปยังอาหารแข็งชนิดเดิมจานใหม่ทุก 2 สัปดาห์

4.2.4 วิธีการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ของผักบุ้ง

ย้าย cotyledon explant ซึ่งมีต้นอ่อนผักบุ้งเจริญขึ้นมา(ที่ได้จากข้อ 4.2.3) มาวางบนอาหารแข็งสูตร MMS 25 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้นนี้ผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) ไม่สามารถเจริญได้ (ปวิชชุดา, 2543) อาหารบรรจุในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาดความจุ 240 มิลลิลิตร โดยวิธีปราศจากเชื้อ 2 ชิ้นต่อ 1 ขวด บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ผักบุ้งที่เจริญขึ้นมาจาก cotyledon explant และไม่ตายเพราะทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร คาดว่าเป็นผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์

4.3 การสกัดดีเอ็นเอจากผักบุ้ง(Edwards และคณะ, 1991)

แช่หลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรในไนโตรเจนเหลวเพื่อทำให้เย็น ใส่ยอดของต้นผักบุ้งประมาณ 1 กรัม ลงในหลอดไมโครฟิวส์ที่เย็น บดยอดของต้นผักบุ้งด้วยแท่งพลาสติกจนละเอียดเติมสารละลายเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์ (extraction buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 14) 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนผักบุ้งที่บดแล้วละลายในบัฟเฟอร์ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที (15,500 g) เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายส่วนน้ำปริมาตร 600 ไมโครลิตรมาสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ (Phenol Chloroform Isoamyl Alcohol) (ภาคผนวก ข ข้อ 12) อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิมเป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนบนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์อีกครั้ง เก็บสารละลายส่วนบนเติมไอโซโพรพานอล(isopropanol) อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิมเป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้แห้งในเครื่องดูดความชื้นภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 15 นาที ละลายดีเอ็นเอในน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร

4.4 การเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1- IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 ซึ่งมียีนระบุรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส (ยีน *SAT*1) และยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตส (ยีน *rcs*1) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบของชุดควบคุมผลบวกในกระบวนการ PCR

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA 101 ที่มีพลาสมิด pBIH1- IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 ซึ่งเจริญบนอาหารแข็ง YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม 10 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบ/นาที 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,000 รอบ/นาที (4,500Xg) 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดไมโครฟิวส์เดิม ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำรวม 3 ครั้ง รวมเชื้อที่นำมาปั่นเหวี่ยง 4.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข ข้อ7.1) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 10 นาที เติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข ข้อ7.2) 200 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ โดยการเอียงหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็ง 5 นาที เติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข ข้อ7.3) ผสมตามวิธีการข้างต้น ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที (20,600Xg) 5 นาที ดูดน้ำ

ใสส่วนบนมากำจัดโปรตีนออกด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที (20,600Xg) 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสชั้นบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอโดยการเติมเอทานอลสัมบูรณ์ที่เย็นในอัตราส่วน 2 เท่าของปริมาตรที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที (20,600Xg) 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งในเครื่องดูดความชื้นภายใต้สุญญากาศ 15 นาที ละลายตะกอนในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 (ภาคผนวก ข ข้อ8) กำจัดอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอโดยการนำมาย่อยด้วยอาร์เอ็นเอส (RNAase) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่ –20 องศาเซลเซียส

4.5 การตรวจหายีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตส (ยีน *rcs*1) และยีนระบุรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส (ยีน *SAT*1) ในผักบุ้งโดยวิธี Polymerase Chain Reaction

4.5.1 การตรวจหายีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตส (ยีน *rcs*1) ในผักบุ้ง

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้ง(ตามวิธี ข้อ4.3) มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ *rcs*1-1และ *rcs*1-2 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ ตามลำดับ ใช้ชุดทำปฏิกิริยา PCR (PCR reagent Kit ; Takara Bio Inc., Japan.) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycle รุ่น 2400 ; Perkin Elmer , USA.) ส่วนผสมของปฏิกิริยา วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (ขั้นตอนการเติมอีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส) การกำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในแต่ละรอบปฏิกิริยา และจำนวนรอบปฏิกิริยา เหมือนวิธีการตรวจหายีน *rcs*1 (ข้อ 4.1.10.1) วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟเรซิส หากดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งมียีน *rcs*1 เมื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส

4.5.2 การตรวจหายีนประมวลรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส (ยีน *SAT*1) ในผักบุ้ง

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้ง(ตามวิธี ข้อ4.3) มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ *JSAT*3 และ*JSAT*4 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป และดีเอ็นเอไพร์

เมอร์ทิศทางกลับ ตามลำดับ ใช้ชุดทำปฏิกิริยา PCR (PCR reagent Kit ; Takara Bio Inc., Japan.) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycle รุ่น 2400 ; Perkin Elmer , USA.) ส่วนผสมของปฏิกิริยา วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (ขั้นตอนการเติมอีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส) การกำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในแต่ละรอบปฏิกิริยา และจำนวนรอบปฏิกิริยา เหมือนวิธีการตรวจหายีน *SAT*1(ข้อ 4.1.10.2) วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟเรซิส หากดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งมียีน *SAT*1เมื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส

4.6 การหากิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้ง (Youssifian และคณะ, 1993)

4.6.1 การเตรียมสารสกัดจากผักบุ้ง

ใส่ใบผักบุ้ง 10 มิลลิกรัม ลงในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บดด้วยแท่งพลาสติกจนละเอียด เติมสารละลายเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์ (extraction buffer) 600 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ9) ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที (9200Xg) 30 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เก็บในน้ำผสมน้ำแข็ง

4.6.2 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford , 1976)

ดูดน้ำสกัดจากผักบุ้ง(ที่ได้จาก ข้อ4.6.1) 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ที่มีสารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent) 1 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล 50ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข ข้อ10)

4.6.3 การหากิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้ง (Youssifian และคณะ, 1993)

หากิจกรรมของซิสเตอีนซินเตส จากปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้โซเดียมซัลไฟด์และโอออะซิติลแอลเซอรีน(O-acetyl-L-serine) เป็นสับสเตรท และใช้ไพริดอกซอล 5' ฟอสเฟต(Pyridoxal-5-phosphate) เป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยา วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน

ซิสเตอีนที่เกิดขึ้นโดยทำปฏิกิริยากับสารละลายนินไฮดรินในสภาพที่เป็นกรด กรดอะมิโนซิสเตอีนให้ผลิตภัณฑ์สีชมพูซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (Gaitonde, 1967) โดยนำน้ำสกัดจากผักบุ้ง(ที่ได้จาก ข้อ4.6.1) ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1 ไมโครกรัม (ผลการคำนวณจาก ข้อ4.6.2) มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0 ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิโมลาร์ สารละลายไดไธโอทรีอิทอล(Dithiothreitol) ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ สารละลายไพริดอกซอล 5' ฟอสเฟต ความเข้มข้นสุดท้าย 5 ไมโครโมลาร์ สารละลายโออะซิติลแอลเซอรีน ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย โซเดียมซัลไฟต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 2 มิลลิโมลาร์ ในปริมาณสุดท้าย 100 ไมโครลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก / ปริมาตร) 20 ไมโครลิตร เติมกรดอะซิติกเข้มข้น 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายนินไฮดริน (Ninhydrin solution)(ภาคผนวก ข ข้อ13) 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยการนำไปแช่ในน้ำผสมน้ำแข็ง เติมเอทานอลสมบูรณ์ที่เย็น 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ใช้หลอดที่หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนัก /ปริมาตร) ทันทีที่เวลาศูนย์เป็นตัวเทียบค่าในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของทุกการทดลอง คำนวณกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตส (ภาคผนวก ค ข้อ 1)โดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือจำนวนของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกรดอะมิโนซิสเตอีน 1 ไมโครโมลาร์ ที่ภาวะที่ทดสอบภายในเวลา 1 นาที และกำหนดให้ค่า extinction coefficient ของกรดอะมิโนซิสเตอีนเท่ากับ 25000 $M^{-1}cm^{-1}$ โดยวัดกิจกรรมของเอมไซม์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

4.7 การหากิจกรรมของเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสในผักบุ้ง(Baecker และคณะ, 1980)

หากิจกรรมของเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส จากปริมาณอะซิติล-โคเอ(acetyl-CoA) ที่ลดลง เมื่อใช้อะซิติล-โคเอ และแอล-เซอรีน (L-serine) เป็นสับสเตรท ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์โออะซิติลแอลเซอรีน(O-acetyl-L-serine) โดยนำน้ำสกัดจากผักบุ้ง(ที่ได้จาก ข้อ4.6.1) ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1 ไมโครกรัม (ผลการคำนวณจาก ข้อ4.6.2) มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0 ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิโมลาร์ สารละลายอะซิติล-โคเอ ความเข้มข้นสุดท้าย0.1 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) ทันทีที่เวลาศูนย์เป็นตัวเทียบค่าในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของทุกการทดลอง คำนวณกิจกรรมของเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสจากปริมาณอะซิติล-โคเอ (acetyl-CoA) ที่ลดลง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน(ภาคผนวก ค ข้อ 2) โดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือ จำนวนของเอมไซม์ที่ทำให้อะซิติล-โคเอ(acetyl-CoA) ลดลง 1 มิลลิโมลาร์ ที่ภาวะที่ทดสอบภายในเวลา 1 นาที โดยวัดกิจกรรมของเอมไซม์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

4.8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้ง

ปลูกผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และ *rcs*1 ผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) ซึ่งทราบน้ำหนักในอาหารเหลว MS ซึ่งมีความเข้มข้นของซัลเฟตเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของซัลเฟตที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำที่เกิดจากกระบวนการทำเหมืองถ่านลิกไนต์ ที่ อ. แม่เมาะ จ. ลำปาง และมีน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขนาดความจุ 200 มิลลิลิตร ใช้ลูกแก้วในการพยุงลำต้นของผักบุ้ง ในสภาพปลอดเชื้อ บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้ม 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลาสองสัปดาห์ นำต้นผักบุ้งที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้งโดยวิธีปราศจากเชื้อ ชั่งน้ำหนัก วัดปริมาตร และวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวสูตร MS หลังการปลูกผักบุ้งเพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณซัลเฟตที่ผักบุ้งดูดซับไป วิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตโดยวิธีHPLC ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น ED50 Electrochemical Detector ของบริษัท dionex, USA. คอลัมน์ชนิด IonPac AS11 ขนาด 4x250 มิลลิเมตร ใช้โปแตสเซียมโฮดรอกไซด์เข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ เป็นสารละลายตัวชะ (eluent) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีด 25 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลด้วย conductivity detector Retention time ของซัลเฟต คือ 4.23 นาที เปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตระหว่างผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และ *rcs*1 ผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม