บทที่ 4

วิธีการทดลอง

4.1 การถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสเข้าสู่ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*)

4.1.1 การเตรียม cotyledon explant ของผักบุ้ง

ล้างเมล็ดผักบุ้งประมาณ 300 เมล็ดหรือประมาณ 20 กรัม ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวความจุ 50 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายเอธานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ประมาณ 40 มิลลิลิตร เขย่าโดยการเอียงหลอดไปมา 5 นาที เทสารละลายเอธานอลทิ้ง ล้างเมล็ดผักบุ้งด้วยวิธีเดิมโดยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 นาที 3 ครั้ง แช่เมล็ดผักบุ้งไว้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำเมล็ดผักบุ้งที่พองตัวดีแล้วมาวางบนอาหารแข็งสูตร MS (ภาคผนวก ก ข้อ 2) 20 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาดความจุ 240 มิลลิลิตร 7 เมล็ดต่อ 1 ขวด โดยวิธีปราศจากเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน 7 วัน นำต้นอ่อนที่ได้มาตัดเอาส่วนโคนของใบเลี้ยงพร้อมก้านใบ (cotyledon explant) ดังแสดงในภาพที่ 4.1 โดยวิธีปราศจากเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.

ข.

ภาพที่ 4.1 การเตรียม cotyledon explant ของผักบุ้ง

ก. ลักษณะต้นผักบุ้งอายุ 7 วัน

ข. วิธีการตัดใบเลี้ยง ใช้ส่วนโคนของใบเลี้ยงพร้อมก้านใบ (cotyledon explant) ในกระบวนการถ่ายโอนยีน

4.1.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอย *A. tumefaciens* EHA101 ที่มียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *APR1*) เพื่อใช้ถ่ายโอนยีน *APR1* เข้าสู่ผักบุ้ง

พลาสมิด pBIH1/APR1 เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสของ *Arabidopsis thaliana* (ยีน *APR1*) ขนาด 1,558 เบส สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค.2) ที่ตำแหน่งเรสทริกชั่น *Xho*I และ *Xba*I โดยยีน *APR1* เข้าไปแทนที่ยีน *gus* ในพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ซึ่งพลาสมิด pBIH1-IG(SX) เป็นพลาสมิดที่ดัดแปลงมาจากพลาสมิด pBIH1-IG (Kimura และคณะ, 1993) (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค.1) โดยมีการเปลี่ยนลำดับเบสด้านปลาย 3' บริเวณช่วงท้าย (downsteam) ของยีน *gus* ซึ่งเป็นตำแหน่งจดจำของเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Sac*I ให้เป็นตำแหน่งจดจำของเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Xho*I

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA101 ซึ่งมีพลาสมิด pBIH1/APR1 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร YEP (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 1) และบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม 20 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีจำนวนเซลล์ 2.7 X 10^8 เซลล์/มิลลิลิตรนำมาทำให้เจือจาง 20 เท่าในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมอะซิโตไซริงโกน (acetosyringone ; 3',5'-Dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 2)

4.1.3 วิธีการทำทรานสฟอร์เมชั่นของผักบุ้ง

ใส่ cotyledon explant ของผักบุ้งจากข้อ 4.1.1 ประมาณ 200 ชิ้นลงในสารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA 101 ที่มีพลาสมิด pBIH1/APR1 20 มิลลิลิตร (ผลจากข้อ 4.1.2) ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบต่อนาที 2 ชั่วโมง นำ cotyledon explant มาซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ แล้ววางบนอาหารแข็งสูตร MS ซึ่งเติมอะซิโตไซริงโอนความเข้มข้นเดิม 40 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จำนวน 20 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน ล้าง cotyledon explant ประมาณ 100 ชิ้นโดยการแช่ในสารละลายเซฟโฟแทคซีม (cefotaxime) ความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.63 มิลลิโมลาร์) (ภาคผนวก ข ข้อ 3) 50 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดรูป

ชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเขย่าไปมาเป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายเซฟโฟแทคซีมทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ซับ cotyledon explant ให้แห้งด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ แล้ววางบนอาหารแข็งสูตร MMS (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ที่เติมสารละลายไธเดียซูรอน (thidiazuron) ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 4) และสารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 25 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จำนวน 15 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 ถึง 1.5 เดือน โดยย้าย cotyledon explant ไปยังอาหารแข็งสูตรเดิมจานใหม่ทุก 2 สัปดาห์

4.1.4 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ของผักบุ้ง

นำต้นผักบุ้งความสูงประมาณ 1-2 เซนติเมตร ที่เจริญจาก cotyledon explant (ผลจากข้อ 4.1.3) ไปปลูกบนอาหารแข็งสูตร MS ซึ่งเติมสารละลายไธเดียซูรอนและสารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นเดิม และเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 1 ; สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) ไม่สามารถเจริญได้ (ปวิชชุดา ลิชผล, 2544) ดังแสดงในภาพที่ 4.2) 20 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุในขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชความจุ 240 มิลลิลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน โดยทำการย้ายต้นอ่อนไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมขวดใหม่ทุก 2 สัปดาห์ ย้ายต้นอ่อนผักบุ้งที่ยังเจริญได้ ซึ่งคาดว่าได้รีบยีน *APR1* จาก *A. tumefacience* EHA101ที่มีพลาสมิด pBIH1/APR1 มาปลูกบนอาหารแข็งสูตรเดิม ซึ่งเติมสารละลายไธเดียซูรอน สารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นเดิม แต่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ 20 มิลลิลิตรบรรจุในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชความจุ 240 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิมเพื่อให้ผักบุ้งเจริญได้รวดเร็วขึ้น ต้นผักบุ้งสามารถงอกรากได้เองโดยไม่ต้องกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เมื่อได้ต้นผักบุ้งที่เจริญสมบูรณ์ดีแล้ว ทำการขยายพันธุ์โดยตัดที่ใต้ข้อของต้นผักบุ้งนำไปปลูกบนอาหารแข็งสูตรเดิมในสภาพปลอดเชื้อ หรือนำไปแช่น้ำประมาณ 3 วัน เพื่อให้งอกราก จากนั้นทดลองย้ายแต่ละพันธุ์ไปปลูกในดินเพื่อทดสอบว่าสามารถเจริญได้ในสภาพปกติที่ต้นผักบุ้งพันธุ์เดิมเจริญได้หรือไม่

ภาพที่ 4.2 การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินของผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) ที่ความเข้มข้น 0 , 25 , 50 , 75 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ปวิชชุดา ลิชผล, 2544)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากผักบุ้งตามวิธีของ Edwards และคณะ (1991)

ใส่ยอดของผักบุ้งประมาณ 1 กรัม ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ทำให้เย็นโดยการแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลว เติมไนโตรเจนเหลวลงไปจนเกือบเต็มหลอด บดยอดของผักบุ้งด้วยแท่งพลาสติกจนละเอียด เติมสารละลายเอ็กแทรกชั่นบัฟเฟอร์ (extraction buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 8) จำนวน 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนผักบุ้งที่บดแล้วละลายในเอ็กแทรกชั่นบัฟเฟอร์ ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที (20,600 X g) 2 นาที เก็บสารละลายส่วนน้ำ 600 ไมโครลิตร มาสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (phenol chloroform) (ภาคผนวก ข ข้อ 6) อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิมเป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนบนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม 5 นาที เก็บตะกอนและละลายตะกอนที่ได้ในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 8.0 (ภาคผนวก ข ข้อ 7) 50 ไมโครลิตร

4.3 การตรวจหายีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสในผักบุ้งโดยวิธี PCR

4.3.1 การสกัดพลาสมิด pBIH1/APR1 เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก (positive control)

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA101ที่มีพลาสมิด pBIH1/APR1 ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที (4,500 X g) 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งเติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข ข้อ 5.1) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที เติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข ข้อ 5.2) 200 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ โดยวิธีเอียงหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็ง 5 นาที และเติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข ข้อ 5.3) ผสมตามวิธีเดิม ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที (20,600 X g) 5 นาที ดูดเอาส่วนน้ำใสมาขจัดโปรตีนออกโดยการสกัดด้วยสารละลายฟีนอล

คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1:1 ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที (20,600 X g) 2 นาที ดูดเอาส่วนน้ำใสซึ่งอยู่ชั้นบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอโดยการเติมเอธานอลสัมบูรณ์ที่แช่เย็นอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส อัตราส่วน 2 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใสที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที (20,600 X g) 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลายเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม 2 นาที ดูดน้ำในหลอดไมโครฟิวจ์ที่ยังอาจเหลืออยู่ออกจนหมดด้วยไมโครปิเปต นำตะกอนไปทำให้แห้งในเครื่องดูดความชื้นภายใต้สูญญากาศเป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนที่ได้ในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่ –20 องศาเซลเซียส แยกอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอโดยการนำมาย่อยสลายด้วยอาร์เอ็นเอส (RNase) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

4.3.2 การตรวจหายีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสในผักบุ้งโดยวิธี PCR

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ ที่ใช้ในกระบวนการเพิ่มปริมาณยีน *APR1*โดยวิธี PCR คือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ prh1 และ prh2 (สินีนาฏ สายบาง, 2543) prh1 เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward) และ prh2 เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางกลับ (reverse) จับกับยีน *APR1* ด้วยเบสคู่สมตรงตำแหน่งลำดับเบสที่ 501-520 และลำดับเบสที่ 1004-1023 ตามลำดับ เมื่อใช้พลาสมิด pBIH1/APR1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ จะได้ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ขนาด 523 เบส (ภาพ ง.1 ภาคผนวก ง)

นำดีเอ็นเอของผักบุ้งที่สกัดได้ตามวิธีข้อ 4.2 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการPCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์คู่ใน (prh1 และ prh2) ใช้ชุดทำปฏิกิริยา PCR (PCR reagent Kit; Takara Shuzo, Japan) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycle; Perkin Elmer,CT,USA) ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

1. ดีเอ็นเอแม่แบบจำนวน 50 นาโนกรัมในปริมาตร	1.0 ไมโครลิตร
2. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ prh1 เข้มข้น 2.0 ไมโครโมลาร์	1.0 ไมโครลิตร
3. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ prh2 เข้มข้น 2.0 ไมโครโมลาร์	1.0 ไมโครลิตร
4. นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP , dTTP , dCTP และdGTP ความเข้มข้นชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์	0.8 ไมโครลิตร

5. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR ความเข้มข้น 10 เท่า	1.0 ไมโครลิตร
6. แอลเอแทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (LA *Taq* DNA polymerase) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.1 ไมโครลิตร
7. น้ำกลั่นปลอดเชื้อสำหรับปรับปริมาตรสุดท้าย	5.1 ไมโครลิตร
รวมปริมาตรปฏิกิริยา	10.0 ไมโครลิตร

บรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวทั้งหมด ยกเว้นดีเอ็นเอแม่แบบในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 200 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ ขั้นแรกกำหนดอุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็นที่ 94 องศาเซลเซียส เติมดีเอ็นเอแม่แบบหลังจากที่อุณหภูมิของปฏิกิริยาเท่ากับ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และกำหนดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งหมด 30 รอบ ปฏิกิริยา โดยในแต่ละรอบปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 20 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแม่แบบแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denaturation) 55 องศาเซลเซียส 20 วินาที เพื่อให้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) โดยการจับคู่ของเบสคู่สม 72 องศาเซลเซียส 1.30 นาที เพื่อให้แอลเอแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการนำนิวคลีโอไทด์มาต่อที่ปลายของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ (extension) ทิศทาง 5' ไปยัง 3' เมื่อครบ 30 รอบ ปฏิกิริยา กำหนดให้อุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR (PCR product) โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส หากต้นผักบุ้งที่นำมาสกัดดีเอ็นเอมียีน *APR1* จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส

4.4 การหาขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

การหาขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส เทอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายทีเออีบัฟเฟอร์ (TAE buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 27) สภาพหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye) (ภาคผนวก ข ข้อ 28) อัตราส่วน 10:1 โดยปริมาตรหยอดลงในหลุมซึ่งเกิดจากการดึงหวีออกจากอะกาโรสเจลที่แข็งตัวแล้ว หลุมละประมาณ 15 ไมโครลิตร ใช้ 100 เบสดีเอ็นเอแลดเดอร์ซึ่งเป็นสารละลายดีเอ็นเอขนาดความยาวต่างๆ ขนาดความยาวเพิ่มขึ้นทีละ 100 เบส ดีเอ็นเอสายที่ยาวที่สุดเท่ากับ 1,500 เบส และสายที่สั้นที่สุดเท่ากับ 100 เบส และใช้ 1 กิโลเบสดีเอ็นเอแลดเดอร์ซึ่งเป็นสารละลายดีเอ็นเอขนาดความยาวต่างๆ ขนาดความยาวเพิ่มขึ้นทีละหนึ่งกิโลเบส ดีเอ็นเอสายที่ยาวที่สุดเท่ากับ 12 กิโลเบส และ

สายที่สั้นที่สุดเท่ากับ 250 เบส เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบขนาดความยาวของแถบดีเอ็นเอ นำไปทำ อิเลคโตรโฟริซิสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) ซึ่งบรรจุสารละลายทีเออีบัฟเฟอร์ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาเกือบสุดขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบไมด์ โดยแช่แผ่นอะกาโรสเจลที่ได้ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลายทีเออีบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 15-30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร หาขนาดของแถบดีเอ็นเอจากกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของแถบดีเอ็นเอและระยะทางที่แถบดีเอ็นเอขนาดนั้นเคลื่อนที่ได้ของสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน บันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพราลอยด์ขาวดำ ความไวแสง 3,000 ใช้แผ่นกรองแสงสีเหลือง

4.5 การตรวจหายีนส่วนโปรโมเตอร์ชนิด Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35s ในผักบุ้งโดยวิธี PCR

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ตรวจหายีนส่วนโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35s โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward) คือ CaMV จับกับโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35s ที่ตำแหน่งเบสลำดับที่ 699-719 (ภาคผนวก ง ภาพที่ ง.3) และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางกลับ (reverse) คือ prh2 จับกับยีน *APR1* ที่ตำแหน่งลำดับเบสที่ 1004-1023 (ภาคผนวก ง ภาพที่ ง.1)

นำดีเอ็นเอของผักบุ้งที่สกัดได้ตามวิธีข้อ 4.2 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ตามวิธีข้อ 4.3 ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ CaMV และ prh2 เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไปและทิศทางกลับตามลำดับ วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส (ตามวิธีข้อ 4.4) หากต้นผักบุ้งที่นำมาสกัดดีเอ็นเอมียีนส่วนโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35s จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 เบส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR นี้จะต้องมีขนาดใหญ่กว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR ผลจากข้อ 4.3 ทั้งนี้เพราะยีน *APR1* สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) แทนที่ตำแหน่งยีน *gus* ซึ่งอยู่ที่ปลายด้าน 3' ของยีนส่วนโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35s (ภาคผนวก ง ภาพที่ ง.2)

4.6 การตรวจหายีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสโดยวิธี Southern hybridization

4.6.1 การติดฉลากโอลิโกนิวคลีโอไทด์ติดตาม (Oligonucleotide probe) ด้วยสารปลอดรังสีชุด DIG High Prime (Roche Diagnostics; Germany)

การติดฉลากโอลิโกนิวคลีโอไทด์ติดตามด้วยสารปลอดรังสีชุด DIG High Prime นี้เป็นการติดฉลากโอลิโกนิวคลีโอไทด์ด้วย Digoxigenin-11-dUTP โดยวิธี random primer ทำโดยนำชิ้นส่วนโอลิโกนิวคลีโอไทด์ติดตามขนาด 523 เบส (ซึ่งที่ได้จากกระบวนการ PCR เมื่อใช้พลาสมิด pBIH1/APR1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ prh1 และ prh2) จำนวน 1 ไมโครกรัม มาเติมลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่บรรจุอยู่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 16 ไมโครลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย DIG High Prime 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายอีดีทีเอเข้มข้น 0.2 โมลาร์ 2 ไมโครลิตร หรือแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4.6.2 การทำ Southern blot

นำดีเอ็นเอของผักบุ้งที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 4.2 มาตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Xba*I และ *Xho*I วิเคราะห์ผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส หลังการดูผลการย้อมสีเจลด้วยสารละลายเอธีเดียมโบรไมด์และดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ด้วยเวลาอันรวดเร็วและบันทึกผลด้วยการถ่ายภาพ นำแผ่นอะกาโรสเจลมาแช่ในสารละลายต่อไปนี้ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที สารละลายดีเนเจอร์บัฟเฟอร์ (denature buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 9) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง น้ำกลั่นปลอดเชื้อ เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง และสารละลายนิวทรอไลซ์เซชั่นบัฟเฟอร์ (neutralization buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 10) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนโดยวิธี Capillary transfer โดยการวางกระดาษกรอง Whatman 3 MM บนกระจกให้ปลายทั้งสองข้างของกระดาษกรองแช่อยู่ในภาชนะที่บรรจุสารละลาย 20X SSC บัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 11) วางแผ่นอะกาโรสเจลโดยให้ช่องสำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเออยู่ด้านล่าง ลงบนแผ่นกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยสารละลาย 20X SSC บัฟเฟอร์ วางทับแผ่นอะกาโรสเจลด้วยแผ่นไนลอนเมมเบรนชนิดไม่มีประจุ (neutral nylon membrane , Hybond-N+; Amersham; USA) ขนาดเท่าแผ่นอะกาโรสเจล และได้แช่ไว้ในสารละลาย 20X SSC แล้วเป็นเวลา 5 นาที โดยไม่ให้มีฟองอากาศแทรกอยู่ระหว่าง

แผ่นอะกาโรสเจลและแผ่นไนลอนเมมเบรน วางทับแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยแผ่นกระดาษกรอง Whatman 3 MM ขนาดเท่าแผ่นอะกาโรสเจล จำนวน 10 แผ่น วางทับแผ่นกระดาษกรอง Whatman 3 MM ด้วยแผ่นกระดาษซับน้ำขนาดเท่าแผ่นอะกาโรสเจล ปริมาณกระดาษซับน้ำที่ใช้หนาประมาณ 10 เซนติเมตร วางทับแผ่นกระดาษซับน้ำด้วยแผ่นกระจก วางแผ่นเหล็กหนักประมาณ 500 กรัม ลงบนแผ่นกระจก ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาแช่ในสารละลาย 2X SSC บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 15 นาที ซับแผ่นไนลอนเมมเบรนให้แห้งด้วยกระดาษกรอง Whatman 3 MM ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำแผ่นไนลอนเมมเบรนไปทำการตรึงดีเอ็นเอ ตรวจสอบประสิทธิภาพการย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน โดยการย้อมแผ่นอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธีเดียมโบรไมด์แล้วตรวจดูความเข้มของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

4.6.3 การตรึงดีเอ็นเอไว้บนแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยความร้อน

นำแผ่นไนลอนเมมเบรนแห้งที่มีดีเอ็นเอเกาะอยู่ จากข้อ 4.6.2 มาทำการตรึงดีเอ็นเอไว้บนแผ่นไนลอนเมมเบรนโดยการวางแผ่นไนลอนเมมเบรนไว้ระหว่างกระดาษกรอง Whatman 3 MM 2 แผ่น ห่อด้วยแผ่นอะลูมิเนียมแล้วอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.6.4 วิธีการทำไฮบริไดเซชั่น

นำแผ่นไนลอนเมมเบรนขนาด 5.1 X 5.9 เซนติเมตรที่มีดีเอ็นเอตรึงอยู่จากข้อ 4.6.3 มาใส่ในถุงไฮบริไดเซชั่น ขนาด 10 x 10 เซนติเมตร ที่มีสารละลายดิกอีซีไฮบริไดเซชั่นบัฟเฟอร์ (DIG easy hybridization buffer) 10 มิลลิลิตร ปิดปากถุงไฮบริไดเซชั่นด้วยความร้อน บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในขณะเดียวกันต้มโอลิโกนิวคลีโอไทด์ติดตามที่ติดด้วยสารปลอดรังสี DIG High Prime จากข้อ 4.6.1 จำนวน 5 ไมโครลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งทันที เปิดปากถุงไฮบริไดเซชั่นแล้วเติมโอลิโกนิวคลีโอไทด์ติดตามที่ติดฉลากและต้มแล้วลงไป ผสมให้เข้ากัน ปิดปากถุงด้วยความร้อนโดยไล่ฟองอากาศออกจากถุงให้หมด บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.6.5 วิธีการตรวจสอบสัญญาณไฮบริไดเซชั่น

เนื่องจากเบสยูริดีนบนสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ติดตามถูกติดฉลากด้วยสารประกอบดิกออกซิจินิน (digoxigenin) การตรวจสอบสัญญาณไฮบริไดเซชั่นจึงทำโดยการใช้แอนติดิกออกซิจินิน (antidioxigenin) ที่มีอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ติดอยู่ มาจับกับดิกออกซิจินินบนสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ติดตาม เมื่ออัลคาไลน์ฟอสฟาเทสย่อยสลายสารละลายผสมของไนโตรบลูเตตระโซเลียมคลอไรด์ และ 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินโดอิล-ฟอสเฟต (nitroblue tetrazolium chloride และ 5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate; (NBT/BCIP)) จะได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงินเข้ม การตรวจสอบสัญญาณไฮบริไดเซชั่นทำโดยการแช่แผ่นไนลอนเมมเบรนขนาด 5.1 X 5.9 เซนติเมตรจากข้อ 4.6.3 ในสารละลายต่อไปนี้ สารละลายวอชชิ้งบัฟเฟอร์ (washing buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 12) 100 มิลลิลิตรบ่มที่ 15-25 องศาเซลเซียส 1-5 นาที เขย่าไปมาเบาๆ สารละลายบล็อกกิ้ง (blocking solution) (ภาคผนวก ข ข้อ 14) 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 15-25 องศาเซลเซียส 30 นาที เขย่าไปมาเบาๆ สารละลายแอนติบอดี้ (antibody solution; Antidioxigenin-AP conjugate) (ภาคผนวก ข ข้อ 15) 20 มิลลิลิตร บ่มที่15-25 องศาเซลเซียส 30 นาที เขย่าไปมาเบาๆ ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลายวอชชิ้งบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 15-25 องศาเซลเซียส 15 นาที 2 ครั้ง เขย่าไปมาเบาๆ แช่ในสารละลายดีเทคชั่นบัฟเฟอร์ (detection buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 16) 20 มิลลิลิตร บ่มที่ 15-25 องศาเซลเซียส 2-5 นาที เขย่าไปมาเบาๆ และแช่ในสารละลายคัลเลอร์สับสเตรท (colour substrate solution; NBT/BCIP) (ภาคผนวก ข ข้อ 17) 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-16 ชั่วโมง ในที่มืดจนมีสีน้ำเงินเข้มเกิดขึ้น

4.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสโดย HPLC ตามวิธีของ Kanno และคณะ (1993)

4.7.1 การสกัดเอนไซม์ (crude enzyme) จากต้นผักบุ้ง

นำใบ ลำต้น และรากของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ 40 กรัม มาทำให้เย็นจนแข็งโดยการแช่ในไนโตรเจนเหลว เติมสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต-ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 ที่มีอีดีทีเอ 10 มิลลิโมลาร์ และเมอร์แคพโตเอธานอล 1 มิลลิโมลาร์ (0.2M KH_2PO_4-K_2HPO_4 buffer pH 8.0 + 10mM EDTA + 1mM mercaptoethanol) (ภาคผนวก ข ข้อ 22) 60 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดด้วยครกบด

ยา กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนน้ำที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (9,200 X g) 20 นาที จะได้ส่วนน้ำใส (crude enzyme) 20 มิลลิลิตร นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส

4.7.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส

ใส่ส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย สารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 9.5 25 ไมโครลิตร อะดีโนซีน 5'-ฟอสโฟซัลเฟต (adenosine 5'-phosphosulfate ;APS) เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ 5 ไมโครลิตร ไดไธโอทรีอิทอลเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 5 ไมโครลิตร โซเดียมซัลเฟตเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 125 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 23-25) ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 2 นาที เติมส่วนน้ำใส (crude enzyme) ที่ได้จากข้อ 4.7.1 0.34 มิลลิลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ต่ออีกเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 1 โมลาร์ 100 ไมโครลิตร กรองส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้งหมดด้วยหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีหัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน (Ultrafree-MC Centrifugal Filter Devices) (Millipore Corporation; Bedford USA) ปั่นเหวี่ยงที่ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที (5000 x g) 2 นาที ใช้ปฏิกิริยาที่ไม่เติมเอนไซม์เป็นชุดควบคุม ใช้ปฏิกิริยาที่ไม่เติมไดไธโอทรีอิทอลความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อยืนยันว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเอพีเอสไปเป็น 5'-AMP จากนั้นนำส่วนน้ำที่ได้ 40 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส โดยวิธี HPLC ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยใช้เครื่อง HPLC (ยี่ห้อShimadzu รุ่นLG-3A; Japan) คอลัมน์ (ยี่ห้อMerck ชนิดLichrocart48; Germany ขนาด 4 มิลลิเมตร X 25 เซนติเมตร) สภาวะที่ใช้วิเคราะห์เป็นดังนี้ ชะตัวอย่างที่วิเคราะห์แบบลำดับขั้น (isocratic step) โดยใช้เครื่อง ปั๊ม 2 เครื่อง อัตราการไหลรวมของตัวชะจากเครื่องปั๊มทั้งสองเท่ากับ 0.89 มิลลิลิตรต่อนาที เครื่อง ปั๊ม A ปล่อยสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.8 ที่มีเตทตระ-เอ็น-บิวทิล-แอมโมเนียม 10 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที เครื่อง ปั๊ม B ปล่อยอะซิโตไนไทร์ล อัตราการไหล 0.09 มิลลิลิตรต่อนาที การวิเคราะห์ทำที่ 40 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณ AMP ที่ได้จากการย่อยสลาย APS โดยเอพีเอสรีดักเตส ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ใช้สารละลายอะดีโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต เป็นสารละลายมาตรฐาน วิเคราะห์ปริมาณ AMP ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย AMP กับพื้นที่ใต้กราฟ เปรียบเทียบกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในน้ำสกัดจากผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์และ

ผักบุ้งพันธุ์เดิม กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์คือ ปริมาณของเอพีเอสรีดักเตสที่ก่อให้เกิด 5'-AMP 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9.5

4.7.3 การหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)

ผสมส่วนน้ำใสที่สกัดได้จากข้อ 4.7.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรกับสารละลายแบรดฟอร์ด (ภาคผนวก ข ข้อ 26) 5 มิลลิลิตร ให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ใช้สารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินเข้มข้นตั้งแต่ 0-60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน หาปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโบวายซีรัมอัลบูมินกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข ภาพที่ ข.1)

4.8 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในผักบุ้งโดย HPLC ตามวิธีของ Noctor และ Foyer (1998)

4.8.1 การเตรียมน้ำสกัดจากผักบุ้ง

นำใบ ลำต้นและราก ของผักบุ้งประมาณ 100 มิลลิกรัม มาทำให้เย็นจนแข็งโดยการแช่ในไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดด้วยครกบดยา เติมสารละลายเอกแทรคชั่นบัฟเฟอร์ 600 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 18) รอให้ผักบุ้งที่บดละเอียดละลายจนหมด ดูดสารละลายมาใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (15,500 X g) 30 นาที นำส่วนน้ำใสมาทำการวิเคราะห์ต่อไป

4.8.2 การติดฉลากน้ำสกัดจากผักบุ้งด้วยสารโมโนโบรโมบิเมน (monobromobimane)

ติดฉลากกลุ่มอะมิโนกลูตามิล (glutamyl amino group) นำน้ำสกัดจากผักบุ้งผลจากข้อ 4.8.1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายไดไธโอทรีอิทอล (Dithiothreitol; DTT) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 19) 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอ็น-ไซโคลเฮ็กซิล-2-อะมิโนอีเทนซัลโฟนิคแอซิด (N-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid; Ches) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9.3 (ภาคผนวก ข ข้อ 20) 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายโมโนโบรโมบิเมน (monobromobimane) ซึ่ง

ละลายในอะซิโตไนไทร์ล (acetonitrile) (ภาคผนวก ข ข้อ 21) 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

4.8.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนโดย HPLC

วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนโดย HPLC ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ใช้เครื่อง HPLC (ยี่ห้อ Walters รุ่น 3690; USA) มี autosampler และ mutisolvent delivery system (ยี่ห้อWalters, USA) คอลัมน์ (ยี่ห้อ Walters ชนิด Novatak48; USA ขนาด 3.9 มิลลิเมตร X 150 มิลลิเมตร) สภาวะที่ใช้แยกสารตัวอย่างเป็นดังนี้ ใช้สารละลายตัวชะ (mobile phase) 2 ชนิด คือ สารละลาย A (สารละลายเมธานอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีกรดอะซิติก 0.25 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.3 โดยการปรับด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์) และสารละลาย B (สารละลายเมธานอล 90 เปอร์เซ็นต์ ที่มีกรดอะซิติก 0.25 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.3 โดยการปรับด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์) ชะตัวอย่างที่วิเคราะห์โดยการแปรผันสัดส่วนของสารละลาย A และสารละลาย B ที่ใช้แบบเส้นตรง (linear gradient) และแบบลำดับขั้น (isocratic step) ดังนี้ ที่เวลา 0 นาที ใช้ 100 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย A ที่เวลา 30 นาที ใช้สารละลายผสม เพิ่มปริมาณแบบเส้นตรงระหว่างสารละลาย A และสารละลาย B เป็น 70 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย A และ 30 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย B ที่เวลา 40 นาที ใช้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมธานอล ที่เวลา 50 นาที ใช้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมธานอล ที่เวลา 60 นาที ใช้ 100 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย A อัตราการไหลรวมของสารละลายตัวชะเท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที วิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง fluorimetry (ยี่ห้อ Walters รุ่น474; USA) excitation ด้วยแสงความยาวคลื่น 384 นาโนเมตร และ emission ด้วยแสงความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร ใช้แผ่นกรองชนิดโอพีเอ (OPA; O-pthaladehyde) การวิเคราะห์ทำที่อุณหภูมิห้อง สารละลายมาตรฐานประกอบด้วยกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนเข้มข้นตั้งแต่ 1-4 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.1 นอร์มอล (ภาคผนวก ข ข้อ 29) เปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์และผักบุ้งพันธุ์เดิม

4.9 การศึกษาลักษณะภายนอกของผักบุ้งเมื่อเจริญในภาวะที่มีซัลเฟตความเข้มข้นสูง

ปลูกต้นผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์และผักบุ้งพันธุ์เดิมในเวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) หรือวัสดุปลูกที่ไม่มีสารอาหาร และรดด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากน้ำตาลซึ่งมีความเข้มข้นของซัลเฟตเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตรต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน ศึกษาลักษณะภายนอกของต้นผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์เปรียบเทียบกับผักบุ้งพันธุ์เดิม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย