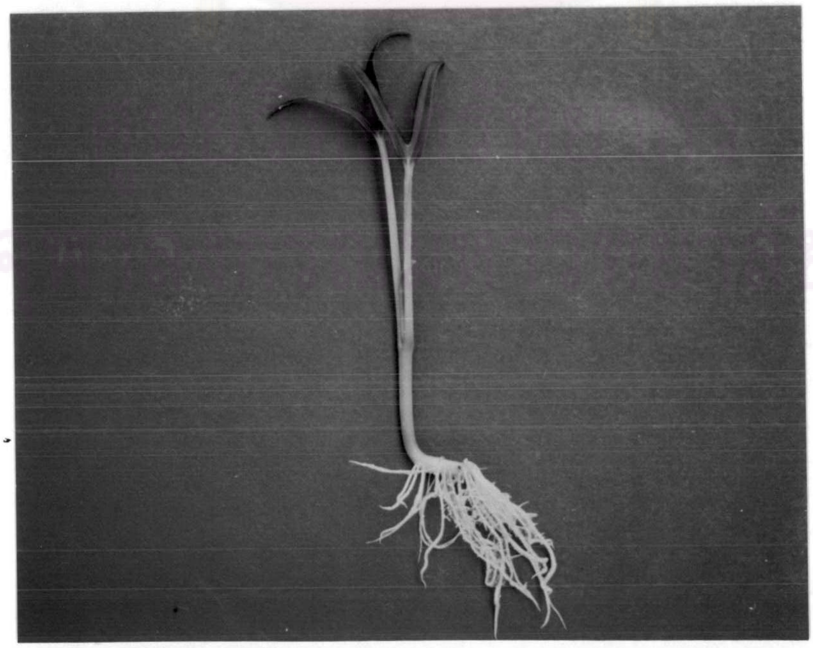
บทที่ 4

วิธีการทดลอง

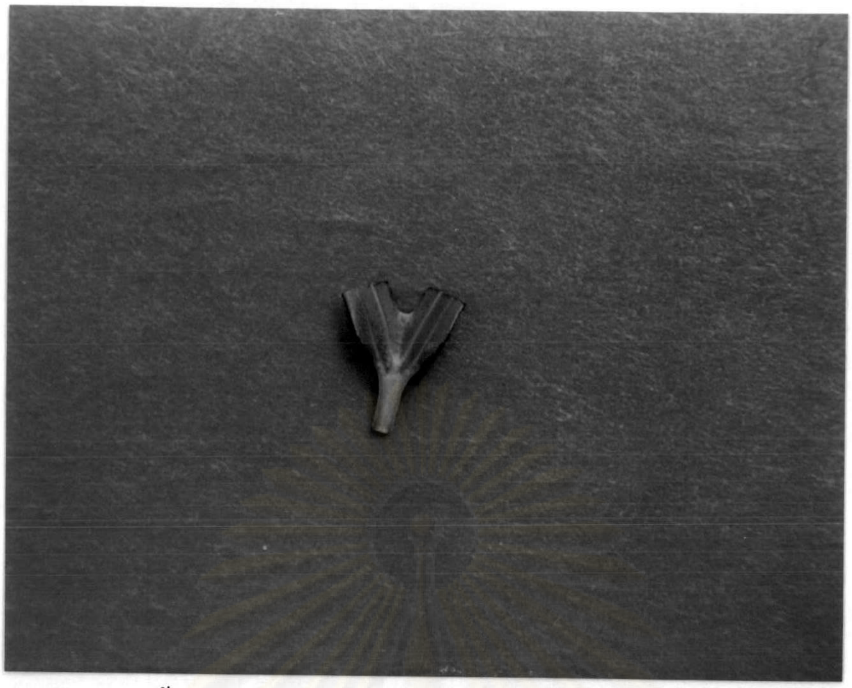
4.1 การถ่ายโอนยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสเข้าสู่ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*)

4.1.1 การเตรียม cotyledon explant ของผักบุ้ง

นำเมล็ดผักบุ้งประมาณ 300 เมล็ด หรือประมาณ 20 กรัม มาบรรจุในหลอดพลาสติกฝาเกลียวความจุ 50 มิลลิลิตร ล้างเมล็ดผักบุ้งโดยการเทสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอรเซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ประมาณ 40 มิลลิลิตรลงไป เขย่าโดยการเอียงหลอดไปมาประมาณ 5 นาที เทสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ทิ้ง ล้างเมล็ดผักบุ้งด้วยวิธีเดิมด้วยเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)ประมาณ 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นล้างเมล็ดผักบุ้งด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง แช่เมล็ดผักบุ้งไว้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง นำเมล็ดผักบุ้งที่พองตัวดีแล้วมาวางบนอาหารแข็งสูตร MS (ภาคผนวก ข ข้อ 2) จำนวน 20 มิลลิลิตรบรรจุอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาดความจุ 240 มิลลิลิตร จำนวน 7 เมล็ดต่อ 1 ขวด โดยวิธีปราศจากเชื้อ บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้ม 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน นำต้นอ่อนที่ได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.1 มาตัดเอาใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ (cotyledon explant) ดังแสดงในภาพที่ 4.2 โดยวิธีปราศจากเชื้อ



ภาพที่ 4.1 ต้นอ่อนผักบุ้งอายุ 7 วัน



ภาพที่ 4.2 ลักษณะใบเลี้ยงส่วนโคนใบที่ใช้สำหรับการถ่ายโอนยีน

4.1.2 การเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA 101 ที่มีพลาสมิด pBIH1- IG-RCS1 เพื่อใช้ถ่ายโอนยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตส (ยีน *rcs*1) เข้าสู่ผักบุ้ง

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 เป็นพลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสของข้าว (ยีน *rcs*1) สอดแทรกอยู่ที่ตำแหน่งเรสทริกชัน *Xba*I และ *Sac*I ของพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG ซึ่งเป็นการสอดแทรกเข้าไปแทนที่ยีนประมวลรหัสบีต้ากลูคูโรนิเดสในพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะชนิดไบนารี ได้รับมาจาก Dr. Nakamura Tatsuo, Research and Education Center for Genetic Information, Ikoma, Nara, Japan. รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 นี้มียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและกานามัยซินอยู่ในบริเวณ T-DNA ยีน *rcs*1 ได้มาจากการโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของข้าว (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) มีขนาด 1,290 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 321 ตัวโปรตีน RCS1 เป็นไอโซฟอร์มที่อยู่ในไซโตพลาสซึม (Nakamura และคณะ, 1999)

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA 101 ซึ่งมีพลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร YEP (ภาคผนวก ก ข้อ1) ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 6) บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม จำนวน 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบต่อ

นาทีในที่มืดเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ได้ *A. tumefaciens* EHA 101 ซึ่งมีพลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 จำนวน 2.7 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำมาทำให้เจือจาง 20 เท่า ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมอะซิโตไซริงโอน (acetosyringone; 3',5'-Dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ7)

4.1.3 วิธีการทำทรานสฟอร์เมชันของผักบุ้ง

นำ cotyledon explant ของผักบุ้งประมาณ 200 ชิ้นจากข้อ 4.1.1 มาแช่ในสารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA 101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 จากข้อ 4.1.2 จำนวน 20 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมงในที่มืด ซับ cotyledon explant ให้แห้งด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ นำไปวางบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมอะซิโตไซริงโอน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์จำนวน 25 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จำนวน 20 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน ล้าง cotyledon explant โดยการแช่ในสารละลายเซฟโฟแทคซีม (cefotaxime) ความเข้มข้นสุดท้าย 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 8) จำนวน 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยการเขย่าไปมาเป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายเซฟโฟแทคซีมทิ้งทำซ้ำ 2 ครั้ง แช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยการเขย่าไปมา เป็นเวลา 5 นาทีแล้วเทน้ำกลั่นปราศจากเชื้อทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง นำ cotyledon explant มาซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ แล้วนำมาวางบนอาหารแข็งสูตร MMS จำนวน 25 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลายไธเดียซูรอน (thidiazuron) ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 9) และเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งบรรจุในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จำนวน 10 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเชื้อ บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาว ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 ถึง 2 เดือน โดยย้าย cotyledon explant ไปยังอาหารแข็งชนิดเดิมจานใหม่ทุก 2 สัปดาห์

4.1.4 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ของผักบุ้ง

นำต้นผักบุ้งความสูงประมาณ 1-2 ซม. ที่เจริญขึ้นมาจาก cotyledon explant จากข้อ 4.1.3 มาปลูกบนอาหารแข็งสูตร MS ซึ่งเติมเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 มิลลิกรัมต่อลิตรและเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 25 มิลลิกรัมต่อลิตร สารปฏิชีวนะไฮ

โกรมัยซินที่ความเข้มข้นนี้ ผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) ไม่สามารถเจริญได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.3 (ปวิชชุดา, 2543) บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาว ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน ย้ายต้นผักบุ้งที่สามารถเจริญได้ ซึ่งคาดว่าเป็นต้นผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ไปปลูกบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารปฏิชีวนะ แต่ยังคงมีเซฟโฟแทคซิมที่ความเข้มข้นเดิมเพื่อให้ผักบุ้งเจริญได้เร็วขึ้น

ภาพที่ 4.3 ผลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้น 0 , 25 , 50 , 75 , 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) (ปวิชชุดา, 2543)

4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากผักบุ้ง (Edwards และคณะ, 1991)

แช่หลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรในไนโตรเจนเหลวเพื่อทำให้เย็น ใส่ยอดของต้นผักบุ้งประมาณ 1 กรัม ลงในหลอดไมโครฟิวส์ที่เย็น บดยอดของต้นผักบุ้งด้วยแท่งพลาสติกจนละเอียดเติมสารละลายเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์ (extraction buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 10) 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนผักบุ้งที่บดแล้วละลายในบัฟเฟอร์ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (15,500 g) เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายส่วนน้ำปริมาตร 600 ไมโครลิตรมาสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Phenol Chloroform Isoamyl Alcohol) (ภาคผนวก ข ข้อ 4) อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิมเป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนบนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอล

คลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์อีกครั้ง เก็บสารละลายส่วนบนเติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิมเป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้แห้งในเครื่องดูดความชื้นภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 15 นาที ละลายดีเอ็นเอในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 5) 30 ไมโครลิตร

4.3 การเตรียมพลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 ซึ่งมียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบของชุดควบคุมผลบวกในกระบวนการ PCR

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA 101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 ซึ่งเจริญบนอาหารแข็งสูตร YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม 10 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที (4,500 g) เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดไมโครฟิวส์เดิม ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิมเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำรวม 3 ครั้ง รวมเชื้อที่นำมาปั่นเหวี่ยง 4.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข ข้อ3.1) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข ข้อ3.2) 200 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ โดยการเอียงหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข ข้อ3.2) ผสมตามวิธีการข้างต้น ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที (20,600 g) เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนมาขจัดโปรตีนออกด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข ข้อ4) อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที (20,600 g) เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสชั้นบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอโดยการเติมเอธานอลสัมบูรณ์ที่เย็นในอัตราส่วน 2 เท่าของปริมาตรที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที (20,600 g) เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลายเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งในเครื่องดูดความชื้นภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 (ภาคผนวก ข ข้อ5) กำจัดอาร์เอ็นเอออก

จากดีเอ็นเอโดยการนำมาย่อยด้วยอาร์เอ็นเอส (RNAase) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

4.4 การตรวจหายีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้งโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งตามวิธีข้อ 4.2 และพลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 4.3 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward primer) หรือ *rcs*1-1 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5’ TGTCAGATCGATTCCTGACG 3’ และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ทิศทางกลับ (reverse primer) หรือ *rcs*1-2 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5’ TGATGGACTGGAAGAGCACC 3’ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ *rcs*1-1 และ *rcs*1-2 จับกับยีน *rcs*1 ที่เบสตำแหน่ง 49 – 68 และ 988 - 1007 ตามลำดับ (ภาคผนวก ค ข้อ 2) ใช้ชุดทำปฏิกิริยา PCR (PCR reagent Kit ; Takara Shuzo., Japan.) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycle รุ่น 2400 ; Perkin Elmer , CT., USA.) ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ 50 นาโนกรัมในปริมาตร	1.0 ไมโครลิตร
2. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ *rcs*1-1	
เข้มข้นสุดท้าย 0.2 ไมโครไมลาร์	1.0 ไมโครลิตร
3. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ *rcs*1-2	
เข้มข้นสุดท้าย 0.2 ไมโครโมลาร์	1.0 ไมโครลิตร
4. นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP , dTTP , dCTP, dGTP	
ความเข้มข้นชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์	0.8 ไมโครลิตร
5. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR	
ความเข้มข้น 10 เท่า	1.0 ไมโครลิตร
6. สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้าย	
10 มิลลิโมลาร์	1.0 ไมโครลิตร
7. แอลเอแทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (LA *Taq* DNA polymerase)	
ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.1 ไมโครลิตร
8. น้ำกลั่นปลอดเชื้อสำหรับปรับปริมาตรสุดท้าย	4.1 ไมโครลิตร
รวมปริมาตรปฏิกิริยา	10.0 ไมโครลิตร

บรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวทั้งหมด ยกเว้นแอลเอแทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 200 ไมโครลิตร ใส่หลอดลงไปในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ ขั้นตอนแรกกำหนดอุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็น 94 องศาเซลเซียส เติมแอลเอแทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรสหลังจากที่อุณหภูมิของปฏิกิริยาเท่ากับ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และกำหนดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งหมด 30 รอบปฏิกิริยา โดยในแต่ละรอบปฏิกิริยาเป็นดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสดีเอ็นเอแม่แบบจะแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denaturation) เป็นเวลา 20 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) โดยการจับคู่ของเบสคู่สมเป็นเวลา 20 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสแอลเอแทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรสสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการนำนิวคลีโอไทด์มาต่อที่ปลายของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ (extention) ทิศทาง 5' ไปยัง 3' เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบ 30 รอบปฏิกิริยา กำหนดให้อุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR (PCR product) โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส หากดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งมียีน *rcs*1 เมื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส

4.5 การหาขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

การหาขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ทำได้โดยเทอะกาโรสเจลเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายทีเออีบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 1) สภาพหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye) (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ในอัตราส่วน 10:1 โดยปริมาตร หยอดลงในหลุมซึ่งเกิดจากการดึงหวีออกจากอะกาโรสเจลที่แข็งตัวแล้ว หลุมละประมาณ 15 ไมโครลิตร ใช้ดีเอ็นเอของแลมบ์ดาฟาจซึ่งตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III และดีเอ็นเอแลดเดอร์ซึ่งเป็นสารละลายดีเอ็นเอขนาดความยาวต่างๆ โดยขนาดความยาวเพิ่มขึ้นทีละหนึ่งกิโลเบส ดีเอ็นเอสายที่ยาวที่สุดเท่ากับ 12 กิโลเบส และสายที่สั้นที่สุดเท่ากับ 250 เบส เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบขนาดความยาวของแถบดีเอ็นเอ นำไปทำอิเลคโตรโฟริซิสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) ซึ่งบรรจุสารละลายทีเออีบัฟเฟอร์ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาเกือบสุดขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์โดยแช่แผ่นอะกาโรสเจลที่ได้ ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายทีเออีบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 15-30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร หาขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบกับกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของแถบดีเอ็นเอกับระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ของสารละลาย

ดีเอ็นเอมาตรฐาน บันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพราารอยด์ขาวดำ ความไวแสง 3,000 ใช้แผ่นกรองแสงสีเหลือง

4.6 การหากิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้ง (Youssifian และคณะ, 1993)

4.6.1 การเตรียมสารสกัดจากผักบุ้ง

ใส่ส่วนปลายใบของใบที่ 2 ของต้นผักบุ้ง ราก หรือลำต้นผักบุ้งประมาณ 10 มิลลิกรัม โดยที่แต่ส่วนจะทำซ้ำ 3 ครั้ง ลงในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บดด้วยแท่งพลาสติกจนละเอียด เติมสารละลายเอ็กแทกชันบัฟเฟอร์ (extraction buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 11) ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (9,200 g) เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เก็บในน้ำผสมน้ำแข็ง

4.6.2 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford , 1976)

ดูดน้ำสกัดจากผักบุ้งที่ได้จากข้อ 4.6.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ที่มีสารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข ข้อ 12)

4.6.3 การหากิจกรรมของซิสเตอีนซินเตส (Youssifian และคณะ, 1993)

หากิจกรรมของซิสเตอีนซินเตส จากปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้โซเดียมซัลไฟด์และโออะซิติลแอลเซอรีนเป็นสับสเตรท และใช้ไพริดอกซอล 5' ฟอสเฟตเป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยา วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนที่เกิดขึ้นโดยทำปฏิกิริยากับสารละลายนินไฮดรินในสภาพที่เป็นกรด กรดอะมิโนซิสเตอีนให้ผลิตภัณฑ์สีชมพูซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (Gaitonde, 1967) โดยนำน้ำสกัดจากผักบุ้งที่ได้จากข้อ 3.7.1 ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1 ไมโครกรัม ผลการคำนวณจากข้อ 3.7.2 มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ซึ่งประกอบด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0 ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิโมลาร์ สารละลายไดไธโอทรีอิทอล ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ สารละลายไพริดอกซอล 5’ ฟอตเฟต ความเข้มข้นสุดท้าย 5 ไมโครโมลาร์ สารละลายโออะซิ

ติลแอลเซอรีน ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 2 มิลลิโมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก / ปริมาตร) 20 ไมโครลิตร เติมกรดอะซิติกเข้มข้น 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายนินไฮดริน (Ninhydrin solution) (ภาคผนวก ข ข้อ 13) 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยการนำไปแช่ในน้ำผสมน้ำแข็ง เติมเอธานอลสมบูรณ์ที่เย็นจำนวน 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ใช้หลอดที่หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก /ปริมาตร) ทันทีที่เวลาศูนย์เป็นตัวเทียบค่าในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของทุกการทดลอง คำนวณกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือจำนวนของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกรดอะมิโนซิสเตอีน 1 ไมโครโมลที่ภาวะที่ทดสอบภายในเวลา 1 นาที และกำหนดให้ค่า extinction coefficient ของกรดอะมิโนซิสเตอีนเท่ากับ 25,000 $M^{-1}cm^{-1}$ โดยทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

4.7 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในต้นผักบุ้งโดยวิธี HPLC (Noctor และ Christine, 1998)

4.7.1 การเตรียมน้ำสกัดจากผักบุ้ง

บดใบ ราก หรือลำต้นของผักบุ้ง 100 มิลลิกรัม ซึ่งเย็นจนแข็งด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่ง เติมสารละลายเอ็กแทกชันบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 14) 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนผักบุ้งที่บดแล้วละลายในสารละลายเอ็กแทกชันบัฟเฟอร์จนหมด ดูดสารละลายที่ได้ใส่หลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (25,000 g) เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสไปติดฉลากด้วยสารละลายโมโนโบรโมไบเมน (Monobromobimane)

4:7.2 การติดฉลากกลุ่มอะมิโนกลูตามิว (glutamyl amino group) ในน้ำสกัดจากผักบุ้งด้วยสารละลายโมโนโบรโมไบเมน

ใส่ส่วนใสที่ได้จากข้อ 4.7.1 จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร เติมสารละลายไดไธโอทรีอิทอล (Dithiothreitol :DTT) เข้มข้น 10 มิลลิ

โมลาร์ 20 ไมโครลิตร สารละลายเอ็น-ไซโคลเฮกซิล-2-อะมิโน-เอทานีซัลโฟริก แอซิด (N-cyclohexyl-2-ethanesulfonic acid) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 15) 100 ไมโครลิตร สารละลายโมโนโบรโมไบเมน เข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 16) 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดอะซิติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร / ปริมาตร) 800 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืดในน้ำผสมน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายที่ได้ประมาณ 500 ไมโครลิตรใส่หลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร อยู่ภายใน (Ultrafree-MC ของบริษัท Millipore Corporation ., USA.) ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที (4,500g) 5 นาที นำสารละลายที่ได้จากการกรอง (filtrate) ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนโดยวิธี HPLC

4.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนโดยวิธี HPLC

นำสารที่ได้จากการกรองจากข้อ 4.7.2 ไปวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนโดยวิธี HPLC ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลสภาวะของ HPLC ที่ใช้เป็นดังนี้

คอลัมน์ :Nova-Pak 48 (3.9 x 150 mm) , ยี่ห้อWaters รุ่น 3690 ของบริษัท Waters Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตัวตรวจสอบ : ชนิด fluorimeter รุ่น 474 ยี่ห้อ Waters ของบริษัท Waters Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา excitation ด้วยแสงความยาวคลื่น 384 นาโนเมตร และ emission ด้วยแสงความยาวคลื่น 462 นาโนเมตร

สารละลายตัวพา : A (เมธานอล 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) กรดอะซิติกเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.3 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์)

B (เมธานอล 90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) กรดอะซิติกเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร / ปริมาตร) ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.3 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์)

ฉีดตัวอย่างครั้งละ : 20 ไมโครลิตร

วิธีการชะคอลัมน์ :

นาทีที่ 0 ใช้สารละลาย A สัดส่วน 100 เปอร์เซ็นต์

นาทีที่ 30 ใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายตัวพา A และสารละลายตัวพา B สัดส่วน สารละลายตัวพา A จำนวน 70 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายตัวพา B จำนวน 30 เปอร์เซ็นต์

นาทีที่ 40 ใช้เมธานอลสัดส่วน 100 เปอร์เซ็นต์

นาทีที่ 60 ใช้สารละลายตัวพา A สัดส่วน 100 เปอร์เซ็นต์

อัตราการไหลของสารละลายตัวพา : 1 มิลลิลิตรต่อนาที
ทำที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายมาตรฐานที่ใช้ : กรดอะมิโนซิสเตอีนความเข้มข้นตั้งแต่ 1-4 มิลลิโมลาร์
กลูตาไธโอนความเข้มข้นตั้งแต่ 1-4 มิลลิโมลาร์

4.8 การศึกษาลักษณะการเจริญของต้นผักบุ้งเมื่อเจริญในภาวะที่มีซัลเฟตความเข้มข้นสูง

ปลูกต้นผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์และผักบุ้งพันธุ์เดิมในเวอร์มิคูไลต์ (vermiculite) หรือวัสดุปลูกที่ไม่มีสารอาหารในสภาพธรรมชาติ โดยที่แต่ละต้นทำ 2 ซ้ำ และรดด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากน้ำตาลซูโครส ซึ่งมีความเข้มข้นของซัลเฟตเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตรต่อวัน เป็นเวลาหนึ่งเดือน ศึกษาลักษณะภายนอกของต้นและเปรียบเทียบการเจริญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย