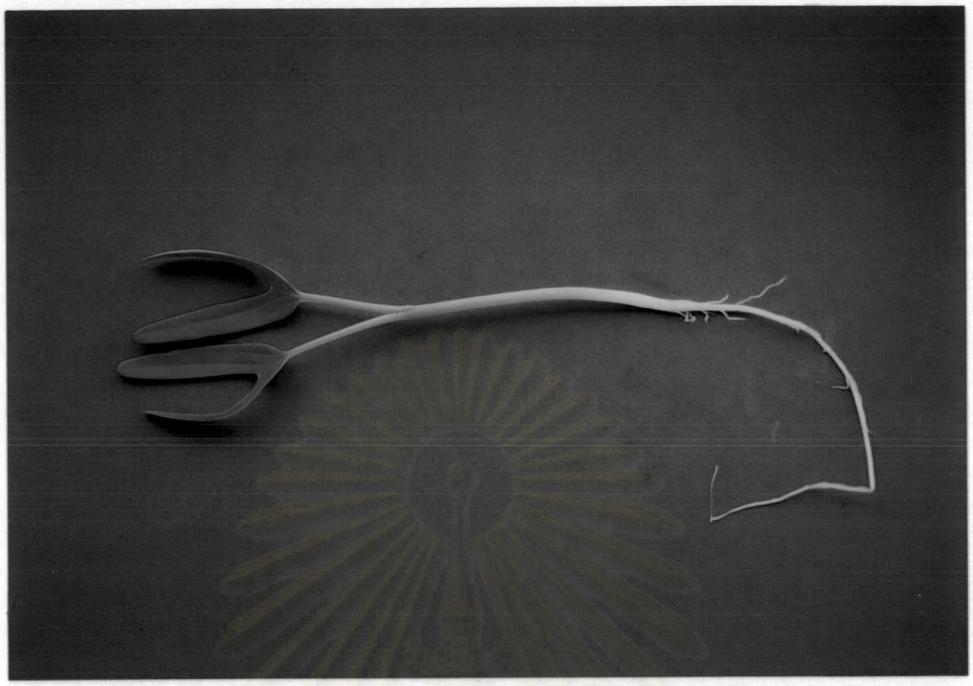
บทที่ 3

วิธีการทดลอง

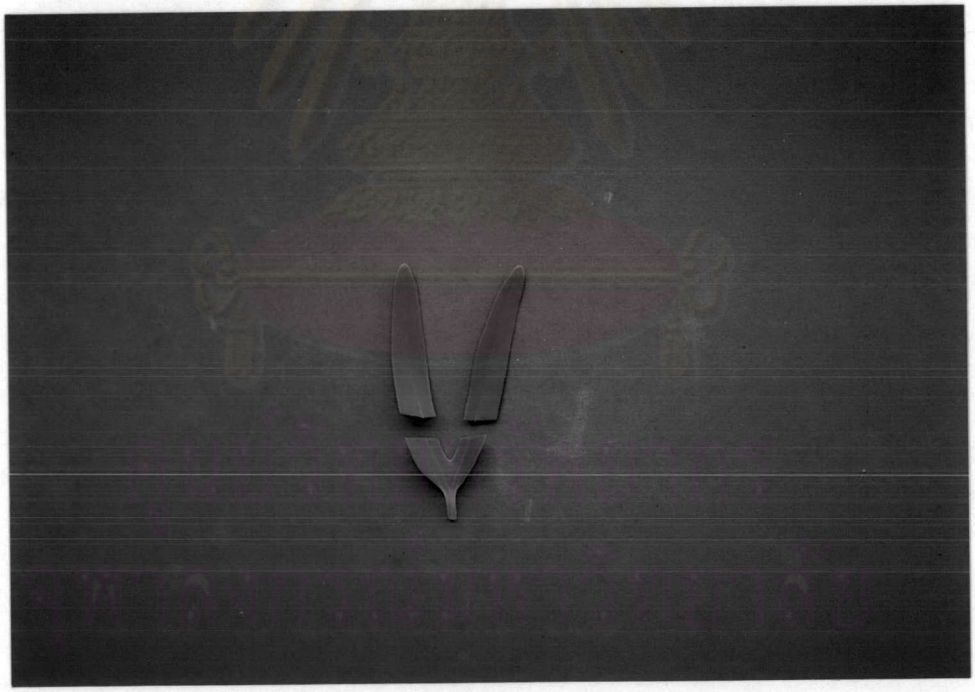
3.1 การเตรียม cotyledon explant ของผักบุ้ง

ล้างเมล็ดผักบุ้งประมาณ 300 เมล็ด หรือประมาณ 20 กรัม ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว ความจุ 50 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายเอธานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ประมาณ 40 มิลลิลิตร เขย่าโดยการเอียงหลอดไปมา เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายเอธานอลทิ้ง ล้างเมล็ดผักบุ้ง ด้วยวิธีเดิมโดยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 5 นาที 3 ครั้ง แช่เมล็ดผักบุ้งในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง นำเมล็ดผักบุ้งที่พองตัวดีแล้วมาวางบนอาหารแข็งสูตร MS (ภาคผนวก ก ข้อ 2) จำนวน 30 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขนาดความจุ 200 มิลลิลิตร จำนวน 7 เมล็ดต่อ 1 ขวด โดยวิธีปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน นำต้นอ่อนที่ได้มาตัดเอาส่วนโคนของใบเลี้ยงพร้อมก้านใบ (cotyledon explant) ดังแสดงในภาพที่ 3.1 โดยวิธีปราศจากเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(ก.)



(ข.)

ภาพที่ 3.1 การเตรียม cotyledon explant ของผักบุ้ง (ก.) ลักษณะต้นอ่อนของผักบุ้งอายุ 7 วัน (ข.) วิธีการตัดใบเลี้ยง ใช้ส่วนโคนของใบเลี้ยงพร้อมก้านใบ (cotyledon explant) ในกระบวนการถ่ายโอนยีน

3.2 การเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA 101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ซึ่งมียีนประมวลรหัสบีตา – กลูคูโรนิเดส

นำโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA 101 ซึ่งมีพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร YEP (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 6) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาปลูกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิมปริมาตร 10 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 25 มิลลิลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียสในที่มืด บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปลูกเชื้อเริ่มต้นที่ได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 วิธีการทำทรานสฟอร์เมชันของผักบุ้ง

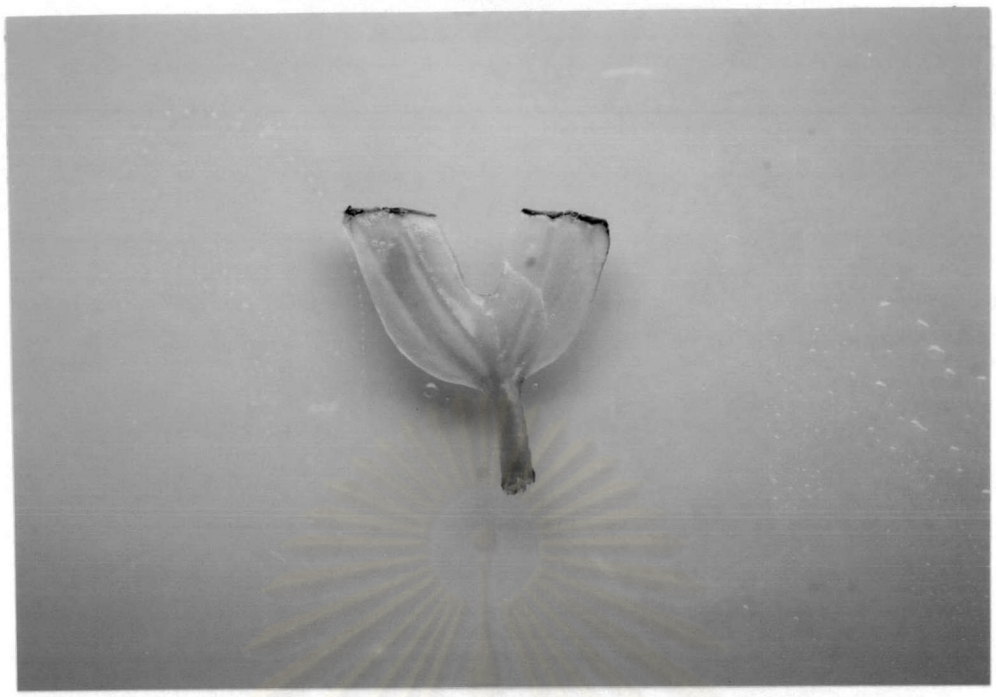
เติมสารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX) เข้มข้น 2.7×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร และสารละลายอะซิโตไซริงโอนความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 8) ลงในอาหารเหลวสูตร MS 30 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใส่ cotyledon explant ของผักบุ้งจาก ข้อ 3.1 ประมาณ 200 ชิ้นลงไป บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เรียกขั้นตอนข้างต้นนี้ว่า cocultivation นำ cotyledon explant มาซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ แล้ววางบนอาหารแข็งสูตร MS 25 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มม.จำนวน 20 ชิ้นต่อ 1 จานบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน ล้าง cotyledon explant ประมาณ 100 ชิ้น โดยการแช่ในสารละลาย เซฟโฟแทคซีม (cefotaxime) ความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.63 มิลลิโมลาร์) (ภาคผนวก ข ข้อ 9) 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายเซฟโฟแทคซีมทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง นำ cotyledon explant มาซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อแล้ววางบนอาหารแข็งสูตร MS 25 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลายไธเดียซูรอน (thidiazuron) ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 10) และ เซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มม. จำนวน 15 ชิ้นต่อ 1 จาน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง

ต่อวัน เป็นเวลา 1 ถึง 1.5 เดือน โดยย้าย cotyledon explant ไปยังอาหารแข็งชนิดเดิมจานใหม่ทุก 2 สัปดาห์

3.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ผักบุ้ง โดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens*

ทำการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ผักบุ้งเช่นเดียวกับข้อ 3.3 แต่แปรผันระยะการเจริญของ*A. tumefaciens* EHA101 ที่มี พลาสมิด pBIH1-IG(SX) ที่ใช้เป็น mid log phase (18 ชั่วโมง) late log phase (24 ชั่วโมง) หรือ stationary phase (36 ชั่วโมง) , แปรผันความเข้มข้นของเซลล์ของ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ที่ใช้เป็น 4.3×10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร 9.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรหรือ 1.8×10^{15} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ,แปรผันระยะเวลาการบ่มเชื้อร่วมกับ cotyledon explant (co-cultivation period) เป็น 30 นาที 1 ชั่วโมง หรือ 2 ชั่วโมง และแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของอะซิโตไซริงโอนที่ใช้เป็น 0, 50, 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ cotyledon explant 150 ชิ้นต่อ 1 ภาวะที่ทดสอบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจหายีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส (ยีน *gus*) ที่ถ่ายโอนมายังเซลล์ของผักบุ้ง โดยการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *gus* ที่ cotyledon explant ด้วยวิธี histochemical GUS assay ดังแสดงในรูปที่ 3.2 คำนวณค่าร้อยละของ cotyledon explant ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์บีตา-กลูคูโรนิเดสที่ภาวะต่างๆ แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน โดยคำนวณค่าประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน (transformation efficiency)จากร้อยละของจำนวน cotyledon explant ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์บีตา-กลูคูโรนิเดสต่อจำนวน cotyledon explant ทั้งหมดที่นำมาทดสอบ (Gamborg และ Phillip,1995)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(ก.)

(ข.)

ภาพที่ 3.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส (ยีน *gus*) ที่ cotyledon explant ของผักบุ้งโดยวิธี Histochemical GUS assay (ก.) cotyledon explant ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *gus* (ข.) cotyledon explant ที่มีการแสดงออกของยีน *gus* จะพบจุดสีน้ำเงินปรากฏอยู่

3.5 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ของผักบุ้ง

นำต้นอ่อนผักบุ้งความสูงประมาณ 1 – 2 ซม. ที่เจริญจาก cotyledon explant จากข้อ 3.4 มาปลูกบนอาหารแข็งสูตร MS ปริมาตร 30 มิลลิลิตรที่เติมสารละลายไธเดียซูรอนความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครโมลาร์ สารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นความเข้มข้นที่ผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) ไม่สามารถเจริญได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.7) ซึ่งบรรจุในขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 200 มิลลิลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน โดยทำการย้ายต้นอ่อนไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมขวดใหม่ทุก 2 สัปดาห์ เพื่อคัดเลือกขั้นแรก ย้ายต้นอ่อนผักบุ้งที่ได้ไปปลูกบนอาหารแข็งชนิดเดิมแต่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (สารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) ไม่สามารถเจริญได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.8) บ่มที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 1 เดือน เพื่อคัดเลือกขั้นที่สอง ต้นอ่อนผักบุ้งที่ยังสามารถเจริญบนอาหารชนิดนี้ได้คาดว่าได้รับยีน *gus* จาก *A. tumefaciens* EHA101 ย้ายต้นอ่อนผักบุ้งดังกล่าวไปปลูกบนอาหารแข็งสูตรเดิมแต่ปราศจากสารปฏิชีวนะ บ่มที่ภาวะเดิม เพื่อให้ต้นผักบุ้งเจริญได้รวดเร็วขึ้น ต้นผักบุ้งสามารถงอกรากได้เองโดยไม่ต้องกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เมื่อได้ต้นผักบุ้งที่เจริญสมบูรณ์ดีแล้ว ทำการขยายพันธุ์โดยตัดลำต้นถึงส่วนใต้ข้อ ดังแสดงในภาพที่ 4.9 นำไปแช่ในน้ำเพื่อให้มีการงอกรากและย้ายแต่ละพันธุ์ไปปลูกในดินเพื่อทดสอบว่าสามารถเจริญเติบโตในสภาพปกติที่ต้นผักบุ้งพันธุ์เดิมเจริญได้หรือไม่

3.6 การตรวจหากิจกรรมของ บีตา-กลูคูโรนิเดสในผักบุ้ง โดยวิธี histochemical GUS assay ใช้ 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินโดลิล บีตา-ดี-กลูคูโรไนด์ (X-Gluc) เป็นสารตั้งต้น

แช่ cotyledon explant จากข้อ 3.3 หรือชิ้นส่วนของต้นผักบุ้งเช่น ใบ ราก ลำต้นที่คาดว่าจะมียีน *gus* จากข้อ 3.5 ในสารละลาย 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินโดลิล บีตา-ดี-กลูคูโรไนด์ ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 12) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากำจัดคลอโรฟิลล์โดยการแช่ในสารละลายเอธานอลเข้มข้น 99.5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจดูสีของ cotyledon explant หรือชิ้นส่วนของต้นผักบุ้งภายใต้กล้องสเตอริโอ หากผักบุ้งมีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดส จะปรากฏสีน้ำเงินบน cotyledon explant หรือชิ้นส่วนของผักบุ้ง

3.7 การสกัดดีเอ็นเอจากผักบุ้งตามวิธีของ Edwards และคณะ (1991)

ใส่ยอดของผักบุ้งประมาณ 1 กรัม ลงในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ทำให้เย็นโดยการแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลว เติมไนโตรเจนเหลวลงไปจนเกือบเต็มหลอด บดยอดของผักบุ้งด้วยแท่งพลาสติกจนละเอียด เติมสารละลายเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์ (extraction buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 11) 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนผักบุ้งที่บดแล้วละลายในเอ็คแทรกชันบัฟเฟอร์ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที (20,600 x g) เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายส่วนน้ำ 600 ไมโครลิตร มาสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (phenol chloroform) (ภาคผนวก ข ข้อ 4) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วเดิม เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนบน เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอน ละลายตะกอนในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 5) 50 ไมโครลิตร

3.8 การตรวจหายีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส ในผักบุ้งโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.8.1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward primer) ขนาด 20 เบส คือ 5' GACGTTCCAACCACGTCTTC 3' ออกแบบและสังเคราะห์โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีนโปรโมเตอร์ชนิด Cauliflower mosaic virus 35s ตำแหน่งที่ 699-719 เบส ซึ่งอยู่ถัดจากยีน *gus* ทางด้าน 5' โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางกลับ (reverse primer) ขนาด 20 เบส คือ 5'CACGGGTTGGGGTTTCTAC 3' ออกแบบและสังเคราะห์โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *gus* ตำแหน่งที่ 13-32 เบส

3.8.2 วิธีการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส

นำดีเอ็นเอของผักบุ้งที่สกัดได้จากข้อ 3.7 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไปและทิศทางกลับ จากข้อ 3.8.1 ใช้ชุดทำปฏิกิริยา PCR (PCR reagent Kit; Takara Shuzo, Japan) และเครื่องเพิ่มปริมาณ

สารพันธุกรรมอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycle; Perkin Elmer) ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

1. ดีเอ็นเอแม่แบบจำนวน 50 นาโนกรัมในปริมาตร	1.0	ไมโครลิตร
2. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไปเข้มข้น 2.0 ไมโครโมลาร์	1.0	ไมโครลิตร
3. โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางกลับเข้มข้น 2.0 ไมโครโมลาร์	1.0	ไมโครลิตร
4. นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP เข้มข้นชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์	0.8	ไมโครลิตร
5. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR เข้มข้น 10 เท่า	1.0	ไมโครลิตร
6. แอลเอแทคดีเอ็นเอพอริเมอเรส (LA *Taq* DNA polymerase) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.1	ไมโครลิตร
7. น้ำกลั่นปลอดเชื้อสำหรับปรับปริมาตรสุดท้าย	5.1	ไมโครลิตร
รวม	10.0	ไมโครลิตร

บรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวทั้งหมด ยกเว้นแอลเอแทคดีเอ็นเอพอริเมอเรสในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 200 ไมโครลิตร ใส่หลอดลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ กำหนดอุณหภูมิของปฏิกิริยาขั้นแรกไว้ที่ 94 องศาเซลเซียสหลังจากที่อุณหภูมิของปฏิกิริยาเท่ากับ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที จึงเติมแอลเอแทคดีเอ็นเอพอริเมอเรส และกำหนดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของปฏิกิริยาในแต่ละรอบปฏิกิริยาเป็นดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแม่แบบแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denaturation) จากนั้นใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วินาที เพื่อให้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) โดยการจับคู่ของเบสคู่สม และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที เพื่อให้แอลเอแทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรสสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการนำนิวคลีโอไทด์มาต่อที่ปลายของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ (extension) ทิศทาง 5' ไปยัง 3' จำนวน 30 รอบปฏิกิริยา กำหนดให้อุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาทีเมื่อครบ 30 รอบปฏิกิริยาเพื่อหยุดปฏิกิริยา วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR (PCR product) โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส (Agarose gel electrophoresis) หากดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้เป็นยีน *gus* ที่ต้องการจริง ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ PCR จะมีขนาด 390 เบส

3.9 การตรวจหายีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินในผักบุ้งโดยวิธี PCR

3.9.1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์เพื่อตรวจหายีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไปขนาด 20 เบส คือ 5' TTCTACACAGCCATCG GTCC 3' โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางกลับ ขนาด 20 เบส คือ 5' GCGTGACCTA TTGCATCTCC 3' ออกแบบและสังเคราะห์โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีนประมวลรหัสไฮโกรมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส (*hpt*) ตำแหน่งที่ 58-77 เบส และตำแหน่งที่ 751-770 เบส ตามลำดับ

3.9.2 วิธีการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

นำดีเอ็นเอของผักบุ้งที่สกัดได้จากข้อ 3.7 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไปและทิศทางกลับจากข้อ 3.9.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ตามวิธีการข้อ 3.8.2 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส หากดีเอ็นเอของต้นผักบุ้งที่ใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบมียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 713 เบส

3.10 การหาขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส

การหาขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส เทอะกาโรสเจลเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)ในสารละลายทีเออีบัฟเฟอร์ (TAE buffer, ภาคผนวก ข ข้อ 1) สภาพหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye) (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ในอัตราส่วน 10:1 โดยปริมาตร หยอดลงในหลุมซึ่งเกิดจากการการดึงหวีออกจากอะกาโรสเจลที่แข็งตัวแล้วหลุมละประมาณ 10 ไมโครลิตร ใช้ดีเอ็นเอแลดเดอร์ซึ่งเป็นสารละลายดีเอ็นเอขนาดความยาวต่างๆ ดีเอ็นเอสายที่ยาวที่สุดเท่ากับ 1.2 กิโลเบส และสายที่สั้นที่สุดเท่ากับ 250 เบส เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบขนาดความยาวของแถบดีเอ็นเอ นำไปทำอิเลคโตรโฟริซิสในเจลแชมเบอร์(gel chamber) ซึ่งมีสารละลายทีเออีบัฟเฟอร์บรรจุอยู่ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาเกือบสุดขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์โดยแช่แผ่นอะกาโรสเจลที่ได้ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารละลายทีเออี

บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 15-30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร หาขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของดีเอ็นเอ และระยะทางที่แถบดีเอ็นเอนั้นเคลื่อนที่ได้ของสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน บันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพลารอยด์ขาวดำ ความไวแสง 3,000 ใช้แผ่นกรองแสงสีเหลือง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย