บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเพิ่มยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสโดยกระบวนการ Polymerase chain reaction (PCR)

3.1.1 การค้นหาข้อมูลยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส

ค้นหาข้อมูลลำดับเบส ของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสของพืช *Arabidopsis thaliana* จากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information เครือข่าย http//:www.ncbi.nlm.nih.gov/ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบดีเอ็นเอไพร์เมอร์

3.1.2 การออกแบบดีเอ็นเอไพร์เมอร์

ออกแบบสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้เป็นดีเอ็นไพร์เมอร์ ในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR จำนวน 5 สาย โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *prh19* (Gutierrez-Marcos และคณะ 1996) ดังแสดงในภาพที่ 3.1 ดีเอ็นเอไพร์เมอร์สายที่ 1 และสายที่ 2 คือ Prh3 และ Prh4 ตามลำดับ อยู่ที่ตำแหน่งซึ่งครอบคลุมจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของการถอดรหัสโดย Prh3 เลือกข้อมูลลำดับเบสตำแหน่งที่ 42 - 68 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป (Forward) และ Prh4 เลือกข้อมูลลำดับเบสตำแหน่งที่ 1561-1589 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ(Reverse) เติมสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์บริเวณจดจำของเอนไซม์ เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I เข้าไปที่ปลาย 5′ ของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4 ตามลำดับ เพื่อใช้ในการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะในขั้นตอนการโคลนยีน ดีเอ็นเอไพร์เมอร์สายที่ 3 และ สายที่4 คือ Prh1 และ Prh2 โดย Prh1 เลือกลำดับเบสตำแหน่งที่ 501-520 และ Prh2 เลือกลำดับเบสตำแหน่งที่ 1004-1023 เป็นสายดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไปและทิศทางกลับตามลำดับ สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนช่วงนี้ใช้เพื่อการตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนจากดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4 ว่าเป็นยีนที่ต้องการ และดีเอ็นเอไพร์เมอร์สายที่ 5 คือ Prh5 เลือกลำดับเบสตำแหน่งที่ 176-198 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป และใช้ร่วมกับดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh4 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ สายดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนช่วงนี้ จะ

เป็นยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสที่ปราศจากสายเปปไทด์ขนส่ง เนื่องจากตำแหน่งของลำดับเบสที่ 1-175 เป็นช่วงของยีนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่ง (Gutierrez-Marcosและคณะ1996) ซึ่งไม่มีความจำเป็นต่อการแสดงออกของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส การออกแบบดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh5 ที่ปลายด้าน 5′ ได้เติมสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์บริเวณจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I เพื่อใช้ในการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ นอกจากนั้นการเพิ่มบริเวณจดจำของเอนไซม์ เรสทริกชัน *Nde*I นี้จะมีผลทำให้มีการเติมจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสเข้าไปด้วย

```
          10         20         30         40         50         60
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
GGAATTCCTC GAGCTACGTC AGGGCAAAAA TCCAATTTTT GCTGTGAAGA TGGCAATGTC  60
                                (Prh3) TCTAGA          *START CODON
TGTAAATGTT TCTTCTTCTT CGTCTTCTGG GATCATAAAC TCTCGTTTCG GTGTTTCATT 120

GGAGCCAAAA GTTTCGCAAA TTGGTTCGTT GAGGTTATTG GATCGTGTTC ATGTTGCTCC 180
                                              (Prh5) CATATG *TP
TGTGTCTCTG AATCTATCTG GGAAGCGATC ATCATCTGTT AAACCTTTAA ACGCTGAACC 240

AAAGACAAAG GATTCAATGA TTCCTCTTGC GGCAACAATG GTAGCAGAAA TTGCAGAGGA 300

AGTTGAAGTG GTTGAGATTG AGGATTTTGA AGAGCTTGCT AAGAAGTTAG AGAATGCTTC 360

ACCTCTTGAG ATTATGGACA AAGCTCTTGA GAAATACGGG AACGATATCG CCATTGCATT 420

TAGTGGTGCA GAAGATGTTG CTCTTATTGA GTACGCTCAT TTGACTGGGA GGCCATTTAG 480

AGTATTTAGT TTGGATACAG GGAGGTTGAA TCCTGAGACG TATCGGTTTT TCGATGCGGT 540
                          (Prh1)
GGAGAAGCAC TATGGGATTA GGATTGAGTA TATGTTTCCT GATTCTGTTG AGGTTCAAGG 600

TTTGGTTAGG AGCAAGGGAT TGTTCTCTTT TTATGAGGAT GGTCATCAGG AGTGTTGCCG 660

TGTTCGAAAG GTGAGACCTT TGAGGCGTGC TCTCAAGGGT TTAAAGGCTT GGATTACTGG 720

TCAGAGGAAA GATCAATCTC CGGGGACAAG GTCTGAGATT CCGGTTGTTC AGGTTGATCC 780

GGTGTTTGAA GGTTTGGATG GTGGAGTTGG TAGTTTGGTG AAGTGGAATC CGGTTGCGAA 840

TGTTGAAGGG AATGATGTTT GGAACTTCTT GAGGACTATG GATGTTCCGG TTAACACATT 900

GCATGCGGCA GGGTATATAT CGATTGGATG TGAGCCTTGC ACGAAAGCGG TTTTACCGGG 960

TCAGCACGAG AGAGAAGGGA GATGGTGGTG GGAAGATGCT AAAGCCAAGG AATGTGGACT 1020
                                          (Prh2)
TCACAAAGGG AATGTCAAAG AAAACTCCGA TGATGCTAAA GTGAACGGGG AATCGAAATC 1080

CGCTGTTGCA GATATCTTTA AGAGTGAGAA TCTTGTGACT TTGAGCAGGC AGGGGATTGA 1140

GAATTTGATG AAGTTGGAGT TCCGTAAAGA GCCTTGGATC GTCGTGCTTT ATGCTCCGTG 1200

GTGCCCCTTT TGTCAAGCCA TGGAAGCATC GTATGATGAA CTGGCGGCTA AATTGGCTGG 1260

AAGTGGGGAT AAGGTTGCCA AATTCAGAGC AGATGGTGAC CAGAAGGAGT TTGCTAAGCA 1320

GGAATTGCAG CTCGGTAGCT TCCCTACCAT TCTGGTTTTC CCTAAGAACT CATCGAGACC 1380

GATCAAGTAT CCGTCTGAGA AGAGAGATGT TGAGTCTTTG ACTTCGTTCT TGAATCTTGT 1440
```

```
CCGATAAGTA AACCACAAAA CCAGTCGACA TTTCTATGAG GAATAAGAAT TATATCTTCG 1500
     *STOP CODON
TCTCGTTCCA GATTGCTAGA ACAGATGAAG TTGGTGTTTG GAGAATCAAT TCAAAGCTTT 1560

GGATCACAAA GTCAGAGATA AGCTCTGCTA CAAAGCTTGA GTAATTGCAG TATTGTAAGA 1620
                                  GCAG (Prh4)
TTTATAAAGT TGCGATAGTG TTGATTCTTC ATGTAAATGT GTGGTGTCTA TTAAAATCAA 1680

GCCTCTGTTT CTTCTTTGCT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT 1740

TTTTTTTT                                                          1748
```

ภาพที่ 3.1 แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทั้ง 3 คู่บนลำดับเบสของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (*prh19*) ของพืช *A. thaliana*

* **ATG** start codon หมายถึงจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสโปรตีน
* **TAA** stop codon หมายถึงจุดสิ้นสุดของการถอดรหัสโปรตีน
* **GCT** TP หมายถึงจุดตัดของสายเปปไทด์ขนส่ง (transit peptide cleavage site)
* **TCTAGA** หมายถึงบริเวณจดจำของเอนไซม์ เรสทริกชัน *Xba*I
* **CATATG** หมายถึงบริเวณจดจำของเอนไซม์ เรสทริกชัน *Nde*I
* **CTCGAG** หมายถึงบริเวณจดจำของเอนไซม์ เรสทริกชัน *Xho*I

3.1.3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอไพร์เมอร์

สังเคราะห์ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จำนวน 5 สาย จากข้อ 3.1.2 โดยวิธี Solid Support-CPG (Conrtolled-Pore-Glass) ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

3.1.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส โดยใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA) สายเดี่ยว ซึ่งเตรียมโดยการนำ Total RNA ที่สกัดจาก ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล เมล็ด ของ *A. thaliana* มาทำรีเวิร์สทรานคริปชัน (reverse transcription) เพื่อสังเคราะห์สายคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอแล้วย่อยสลาย mRNA ด้วยอาร์เอ็นเอเอส ใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอสายเดี่ยวนี้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ คือ Prh3 และ Prh4 จากข้อ 3.1.3 ใช้ชุดทำปฏิกิริยา PCR

(PCR reagent Kit; Takara Shuzo,Japan) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer,C.T,USA) ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

1. ดีเอ็นเอแม่แบบจำนวน 50 นาโนกรัมในปริมาตร	10.0 ไมโครลิตร
2. ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ 2 สาย สายละ 0.2 ไมโครโมลาร์	10.0 ไมโครลิตร
3. นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP ความเข้มข้นชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์	8.0 ไมโครลิตร
4. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR ความเข้มข้น 10 เท่า	10.0 ไมโครลิตร
5. ไพโรเบสดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (*Pyrobest* DNA polymerase) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
6. น้ำกลั่นปลอดเชื้อสำหรับปรับปริมาตรสุดท้าย	51.5 ไมโครลิตร
รวมปริมาตรปฏิกิริยา	100.0 ไมโครลิตร

บรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวทั้งหมด ยกเว้นดีเอ็นเอแม่แบบในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 200 ไมโครลิตร ใส่หลอดลงไปในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ ขั้นแรกกำหนดอุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็นที่ 94 องศาเซลเซียส เติมดีเอ็นเอแม่แบบหลังจากที่อุณหภูมิของปฏิกิริยาเท่ากับ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และกำหนดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งหมด 30 รอบปฏิกิริยา โดยในแต่ละรอบปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสดีเอ็นเอแม่แบบจะแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denaturation) เป็นเวลา 20 วินาที ที่อุณหภูมิ 55 - 58 องศาเซลเซียสดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) โดยการจับคู่ของเบสคู่สมเป็นเวลา 20 วินาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสไพโรเบสดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Pyrobest DNA polymerase) สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการนำนิวคลีโอไทด์มาต่อที่ปลายของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ (extension) ทิศทาง 5′ ไปยัง 3′ เป็นเวลา 1.5 นาที เมื่อครบ 30 รอบปฏิกิริยา กำหนดให้อุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR (PCR product) โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส แยกเอาชิ้นดีเอ็นหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR ที่ต้องการออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ (prep-A-Gene; BioRad,USA) มาตรวจสอบว่าเป็นดีเอ็นที่ต้องการ โดยนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ตามวิธีข้างต้นอีกครั้งหนึ่ง แต่ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 และ Prh2 จากข้อ 3.1.2 หากเป็น

ดีเอ็นเอที่ต้องการจริงผลของกระบวนการ PCR ครั้งที่สองนี้จะได้ชิ้นดีเอ็นเอเช่นเดียวกันแต่มีขนาดสั้นกว่าชิ้นดีเอ็นที่ได้จากกระบวนการ PCR ครั้งแรก

3.2 การหาขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

การหาขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส เทเจลอะกาโรสเข้มข้น 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข ข้อ 8) สภาพหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye) (ภาคผนวก ข ข้อ 9) ในอัตราส่วน 10:1 โดยปริมาตร หยอดลงในหลุมซึ่งเกิดจากการดึงหวีออกจากเจลอะกาโรสที่แข็งตัวแล้ว หลุมละประมาณ 15 ไมโครลิตร ใช้ดีเอ็นเอแลมป์ดาซึ่งย่อยด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Hin*dIII และ ดีเอ็นเอแลดเดอร์ซึ่งเป็นสารละลายดีเอ็นเอขนาดความยาวต่างๆ โดยขนาดความยาวเพิ่มขึ้นทีละ 100 เบส ดีเอ็นเอสายที่ยาวที่สุดเท่ากับ 1,500 เบส และสายที่สั้นที่สุดเท่ากับ 100 เบส เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบขนาดความยาวของแถบดีเอ็นเอ นำไปทำอิเลคโตรโฟริซิสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) ซึ่งบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ TAE จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาเกือบสุดขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบไมด์โดยแช่แผ่นเจลอะกาโรสที่ได้ ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัม/มล. ของสารละลายบัฟเฟอร์ TAE เป็นเวลา 15-30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร หาขนาดและความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบขนาดและความเข้มในการเรืองแสงที่ปรากฏกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน บันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพราอยด์ขาวดำ ความไวแสง 3000 ใช้แผ่นกรองแสงสีเหลือง

3.3 การเตรียมพลาสมิดพาหะ

3.3.1 การสกัดพลาสมิดเพื่อใช้เป็นพลาสมิดพาหะ

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดพาหะที่ต้องการ ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม /มล. (ภาคผนวก ข ข้อ 4) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิมจำนวน 5 มล. ซึ่งบรรจุ

อยู่ในหลอดทดลองขนาด 16 x150 มม.บ่มบนเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาตร 1.5 มล. ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มม. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 4,000 x g เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งเติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข ข้อ 1.1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข ข้อ 1.2) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ โดยวิธีเอียงหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที และเติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข ข้อ 1.3) ผสมตามวิธีเดิมข้างต้นแล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 15,000 x g เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาส่วนใสนำมาขจัดโปรตีนออกโดยนำมาสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ในอัตราส่วน 1:1 ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 13,500 x g เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาน้ำส่วนใสซึ่งอยู่ชั้นบนมาตกตะกอนเอาดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอโดยการเติมเอธานอลสัมบูรณ์ที่เย็นในอัตราส่วน 2 เท่าของปริมาตรน้ำที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 15,000 x g เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลายเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (V/V) 1 มล. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ และความเร็วรอบเดิม เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 2 นาที ดูดน้ำในหลอดไมโครฟิวจ์ที่ยังอาจเหลืออยู่ออกจนหมดด้วยไมโครปิเปต นำตะกอนไปทำให้แห้งในเครื่องดูดความชื้นภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนที่ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ TE ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 (ภาคผนวก ข ข้อ 3) เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส แยกอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอโดยการนำมาย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.3.2 การตัดพลาสมิดพาหะด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน

นำพลาสมิดพาหะที่ได้จากข้อ 3.3.1 มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์เรสทริกชัน ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จำนวนหน่วยของเอนไซม์ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เรสทริกชันแต่ละชนิด เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส แยกเอาชิ้นพลาสมิดที่ถูกตัดออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ

3.4 การแยกเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ (Prep-A- Gene;BioRad, USA.)

นำปฏิกิริยาที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR หรือปฏิกิริยาการตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ เรสทริกชัน หรือของผสมของชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวต่างๆ กัน มาทำให้ดีเอ็นเอขนาดและลักษณะต่างกันแยกออกจากกัน ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริส ย้อมสีดีเอ็นเอซึ่งอยู่ภายในเจลอะกาโรสด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัม/มล. ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ภายในระยะเวลาไม่เกิน 10 วินาที เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเออันเนื่องมาจากแสงอัลตราไวโอเลต ตัดแผ่นเจลอะกาโรสเพื่อแยกเอาชิ้นเจลเฉพาะตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกมา แล้วนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 15,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที ให้ชิ้นเจลทั้งหมดมารวมกันที่ก้นหลอดเพื่อหาปริมาตรโดยประมาณของเจล เติมสารละลายบายดิงบัฟเฟอร์ (binding buffer) ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรเจล บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเจลหลอมเหลวอย่างสมบูรณ์ เติม Prep-A-Gene matrix จำนวน 5 ไมโครลิตรต่อดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ระหว่างนั้นเอียงหลอดเพื่อผสมไปมาเบาๆ เป็นระยะ ๆ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที ดูดสารละลายในหลอดทิ้งด้วยไมโครปิเปต เติมสารละลายบายดิงบัฟเฟอร์จำนวน 50 เท่าของจำนวน matrix ลงไปในหลอดไมโครฟิวจ์ซึ่งมี matrix ที่ดีเอ็นเอเกาะอยู่ ปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิมดูดสารละลายในหลอดทิ้งทำซ้ำอีก 1 ครั้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลายวอชบัฟเฟอร์ (wash buffer) จำนวน 50 เท่าของจำนวน matrix ปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิม ทำซ้ำ 3 ครั้ง แยกเอาดีเอ็นเอที่เกาะอยู่บน matrix ออกโดยเติมสารละลายอิลูชันบัฟเฟอร์ (elution buffer) ปริมาตร 1:1 ของ ปริมาตร matrix ที่เติมลงไป ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 2 นาที ดูดแยกเอาส่วนน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอแขวนลอยอยู่โดยมิให้มี matrix ปนเปื้อนมา นำส่วนน้ำใสนี้มาปั่นเหวี่ยงซ้ำที่ภาวะเดิมเพื่อแยกเอา matrix ที่อาจปนเปื้อนออกให้สมบูรณ์ เก็บส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่และปราศจาก matrix ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้นี้มีความบริสุทธิ์มาก สามารถนำมาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน หรือนำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเออื่นโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์อื่นอีก

3.5 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิดพาหะ (Ligation)

เชื่อมดีเอ็นเอ กับพลาสมิดพาหะซึ่งตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน ที่แยกออกจากเจลอะกาโรสตามวิธีข้อ 3.4 โดยผสมดีเอ็นเอกับพลาสมิดพาหะในอัตราส่วน 5:1 ในปริมาตรสุดท้ายไม่เกิน 5 ไมโครลิตร เติมสารละลายที่ 1 ของชุดเชื่อมดีเอ็นเอ (Ligation kit; Takara Shuzo, Japan) ลงไปในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตรบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.6 การทำทรานสฟอร์เมชัน (Transformation)

3.61 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (Competent cell)

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *E.coli* JM109 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร SOB (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ปริมาตร 20 มล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 100 มล. เขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 0.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร SOB ปริมาตร 100 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที จนกระทั่งค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรมีค่าระหว่าง 0.4-0.6 แช่ฟลาสก์ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 2,000 x g เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ที่ได้มากระจายในสารละลาย RF I (ภาคผนวกข ข้อ 7.1) ปริมาตร 10 มล. ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์อีกครั้งที่ภาวะเดิม กระจายเซลล์ที่ได้ในสารละลาย RF II (ภาคผนวก ข ข้อ 7.2) ปริมาตร 3 มล. ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แบ่งเซลล์คอมพีเทนต์แขวนลอยที่ได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล.ที่เย็น ปริมาตรหลอดละ 150 ไมโครลิตร เก็บเซลล์คอมพีเทนต์แขวนลอยไว้ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียสทันที

3.6.2 วิธีการทำทรานสฟอร์เมชัน (Transformation) และการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ (Transformant)

เติมรีคอมบิแนนต์พลาสมิด จำนวน 100 นาโนกรัม ซึ่งอยู่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาเชื่อมดีเอ็นเอในปริมาตรไม่เกิน 5 ไมโครลิตร หรือพลาสมิดพาหะจำนวน 100 นาโนกรัมในปริมาตรไม่เกิน 2 ไมโครลิตร ลงในเซลล์คอมพีเทนต์แขวนลอยอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จำนวน 150 ไมโครลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. จากข้อ 3.6.1 นำไปแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที โดยห้ามเขย่า จากนั้นย้ายหลอดปฏิกิริยาไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วย้ายกลับมาแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB ปริมาตร450 ไมโครลิตรลงไปผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์โดยเกลี่ยเซลล์แขวนลอยจำนวน 150 ไมโครลิตรบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. ไอโซโพรพิว-บีตา-ดี-ไธโอกาแลคโตไซด์ (Isopropyl-β-D-thiogalactoside; IPTG) เพื่อเป็นสารเหนี่ยวนำ 40 ไมโครกรัมต่อมล. และ X-gal ซึ่งเป็นสับสเตรทของบีตากาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 20 ชั่วโมง จะได้โคโลนีสีฟ้า และโคโลนีสีขาวเจริญบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ โคโลนีทรานสฟอร์แมนต์จะเป็นสีขาว หรือคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์โดยเกลี่ยเซลล์แขวนลอยจำนวน 150 ไมโครลิตรบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 20 ชั่วโมง เฉพาะโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์ที่สามารถเจริญได้

3.7 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์โดยวิธีโคโลนีแครกกิง (Colony cracking)

ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์เดี่ยว นำมาขีดสั้นๆ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตรเดียวกับที่ใช้คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ จากข้อ 3.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อที่เจริญตามรอยขีดแต่ละเส้นที่ได้แล้วนำเซลล์มาแขวนลอยในสารละลายแครกกิง (cracking solution) (ภาคผนวก ข ข้อ 11) ปริมาตร 10-20 ไมโครลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสมสารเพื่อให้เซลล์กระจายตัวสม่ำเสมอ บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เซลล์ที่แขวนลอยในสารละลายแครกกิงจะแตก นำสารละลายที่ได้ทั้งหมดมาตรวจหารีคอมบิแนนต์พลาสมิดโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส รีคอมบิแนนต์พลาสมิดจะมีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ

3.8 การทำอิเลคโตรพอเรชัน (Electroporation)

3.8.1 การเตรียมเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 สำหรับทำอิเลคโตรพอเรชัน

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA101 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร YEP (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อ มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมและเติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม จำนวน 50 มล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในที่มืด เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาณ 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิม และเติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิมจำนวน 50 มล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่ภาวะเดิมจนกระทั่งค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร มีค่าระหว่าง 0.5 – 1.0 (ประมาณ 5 ชั่วโมง) แช่ฟลาสก์ที่มีเชื้อเจริญลงในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 2,000 x g เป็นเวลา 4 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (N-S-Hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.0 โดยใช้โปรตัสเซียมไฮดรอกไซด์ แขวนลอยเซลล์ที่ได้ในกลีเซลรอลเข้มข้น 10%(ปริมาตร/ปริมาตร) จำนวน 100 ไมโครลิตร แบ่งสารแขวนลอยเซลล์เจ้าบ้านที่ได้ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. จำนวนหลอดละ 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียสทันที

3.8.2 การทำอิเลคโตรพอเรชัน

เติมรีคอมบิแนนต์พลาสมิดเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 0.5 ไมโครลิตรลงในสารแขวนลอยเซลล์เจ้าบ้าน *A. tumefaciens* EHA101 หลอมเหลวจำนวน 20 ไมโครลิตร ผลจากข้อ 3.8.1 ผสมให้เข้ากัน ย้ายของผสมของปฏิกิริยาด้วยไมโครปิเปตไปยังคิวเวตต์ (cuvette) ที่เย็นโดยการแช่ไว้ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งโดยไม่มีฟองอากาศ คิวเวตต์มีช่องห่างระหว่างแผ่นอิเลคโทรด (electrode) เท่ากับ 0.2 ซม. แช่คิวเวตต์ในน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที นำไปทำอิเลคโตรพอเรชัน โดยใช้เครื่องอิเลคโตรพอเรชัน (Gene Pulser apparatus; BioRad, USA.) ภาวะที่ใช้คือ ค่า field strength เท่ากับ 12.5 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร (kV/cm) ความต้านทานไฟฟ้า 250 โอมห์ นำคิวเวตต์ที่ผ่านกระบวนการทำอิเลคโตรพอเรชัน มาแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที ย้ายส่วนผสมของปฏิกิริยาภายในคิวเวตต์ลงไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร YEP ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บรรจุในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. โดย

วิธีปราศจากเชื้อ บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เกลี่ยสารแขวนลอยเซลล์จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. (ดังภาคผนวก ค ข้อ 6) บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.9 การโคลนดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ PCR

เชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ PCR จากข้อ 3.1 ซึ่งแยกออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอตามวิธีข้อ 3.4 กับพลาสมิดพาหะ pUC18 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I ตามวิธีการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิดพาหะตามวิธีข้อ 3.5 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 ตามวิธีข้อ 3.6 คัดเลือกโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์สีขาวที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และนำมาตรวจหาพลาสมิดซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 โดยวิธีโคโลนีแครกกิงตามวิธีข้อ 3.7

3.9.1 การตรวจสอบขั้นต้นว่ารีคอมบิแนนต์พลาสมิด มียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสสอดแทรกอยู่ โดยการตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน

การออกแบบดีเอ็นเอไพเมอร์ ได้เติมบริเวณจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I ที่ปลายด้าน 5′ ของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh 4 ตามลำดับ ทำให้ดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทั้ง 2 สายนี้ มีบริเวณจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I ที่ปลาย 5′ ตรวจสอบว่ายีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสสอดแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิดโดย นำโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์ซึ่งได้ตรวจสอบโดยวิธีโคโลนีแครกกิงแล้วพบว่ามีพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pUC18 นำมาสกัดเอาพลาสมิดตามวิธีข้อ 3.3 นำพลาสมิดที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I วิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส หากมียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสสอดแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส และ 2.6 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส และขนาดของพลาสมิดพาหะ pUC18 ตามลำดับ

3.9.2 การตรวจสอบเพื่อยืนยันว่ารีคอมบิแนนต์พลาสมิด มียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสสอดแทรกอยู่โดยวิธี PCR

นำรีคอมบิแนนต์พลาสมิดซึ่งตรวจสอบขั้นต้นแล้วว่าเมื่อตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I แล้วได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส (ผลจากข้อ 3.9.1) มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ในกระบวนการ PCR ตามวิธีข้อ 3.1 ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh 3 และ Prh4 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ถ้ารีคอมบิแนนต์พลาสมิดมียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสสอดแทรกอยู่ จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส

3.10 การหาลำดับเบส

หาลำดับเบสของดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนต์พลาสมิดจากข้อ 3.9.2 โดยวิธี Thermal Cycle DNA Sequencing ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โดยใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ซึ่งใช้สำหรับพลาสมิดพาหะ pUC18 (universal primers) ทิศทางไปและทิศทางกลับเพื่อหาลำดับเบสของดีเอ็นเอสอดแทรกในบริเวณสอดแทรก (multiple cloning site) ของพลาสมิดพาหะ pUC18 ลำดับเบสที่ได้เป็นลำดับเบสด้านปลาย 5′และ 3′ ของดีเอ็นเอสอดแทรก ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 ในการหาลำดับเบสช่วงกลางของดีเอ็นเอสอดแทรก นำผลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส วิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนจากข้อมูลลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม Blast จาก NCBI เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากลำดับเบสของดีเอ็นเอสอดแทรก กับลำดับกรดอะมิโนของเอพีเอสรีดักเตส

3.11 การทดสอบการแสดงออกของดีเอ็นเอจากข้อ 3.10 โดยวิธีคอมพลีเมนเตชัน

3.11.1 การทำให้ดีเอ็นเอจากข้อ 3.10 แสดงออกได้ใน *E .coli* โดยตัดยีนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่งออก

ยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสของ *A. thaliana* ประกอบด้วย 2 ส่วน คือยีนส่วนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส และยีนส่วนประมวลรหัสสายเปปไตด์ขนส่ง (transit peptide) ลำดับเบสตำแหน่งที่ 1-175 ทำหน้าที่ขนส่งเอพีเอสรีดักเตสไปยังคลอโรพลาสต์ ยีนประมวลรหัสสายเปปไตด์ขนส่งนี้จะถูกตัดออกที่บริเวณเยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์ เพื่อที่จะทำให้ดีเอ็นเอสอด

แทรกจากข้อ 3.10 สามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* จึงทำการขจัดยีนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่งคือเบสลำดับที่ 1-175 ออก โดยใช้รีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ตรวจสอบแล้วว่ามีดีเอ็นเอสอดแทรก ซึ่งสามารถถอดรหัสเป็นเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอพีเอสรีดักเตสทุกประการเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ตามวิธีข้อ 3.1 โดยใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh5 และ Prh4 วิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส จากนั้นแยกเอาดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส ออกจากเจลอะกาโรส นำมาตรวจสอบว่าเป็นยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสโดยนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ในกระบวนการ PCR ซ้ำอีกครั้งหนึ่งโดยใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 และ Prh2 หากดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้เป็นยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส

3.11.2 การโคลนยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสซึ่งปราศจากยีนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่ง

นำดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ PCR ที่ตรวจสอบแล้วว่าเป็นยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสที่ปราศจากยีนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่งจากข้อ 3.11.1 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E.coli* JM109 และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ตามวิธีข้อ 3.6 ตรวจหารีคอมบิแนนต์พลาสมิดในโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์โดยวิธีโคโลนีแครกกิง ตามวิธีข้อ 3.7

3.11.3 การหาทิศทางการเชื่อมต่อ(orientation) ของดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด

สกัดเอารีคอมบิแนนต์พลาสมิดจากโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์ผลจากข้อ 3.11.2 นำมาตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของดีเอ็นเอสอดแทรก โดยตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน 2 ชนิด คือ *Nde*I และ *Bam*HI ยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสที่ปราศจากยีนประมวลรหัสเปปไทด์ขนส่งจะมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ เรสทริกชัน *Nde*I ที่ปลาย 5′ และปลายด้าน 3′ หลังชิ้นดีเอ็นเอจะมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Nde*I ของพลาสมิด pUC18 (แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC18 ดังแสดงในภาพที่ ค 1 ภาคผนวก ค) ตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของดีเอ็นเอสอดแทรกจากขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เมื่อนำปฏิกิริยา

ข้างต้นมาวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส หากจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสของยีนสอดแทรกอยู่ในทิศทางที่ถูกต้อง คือจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสของยีนอยู่ในทิศทางเดียวกับการถอดรหัสของโปรโมเตอร์ *lac* (*lac* promoter) จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 2.4, 1.4 และ 0.2 กิโลเบส

3.11.4 การทดสอบชนิดของยีนโดยวิธีคอมพลีเมนเตชัน (complementation test)

3.11.4.1 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์

เตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ของ *E. coli* JM96 ได้มาจาก *E. coli* Genetic Stock Center (Yale university; USA) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนซิสเตอีน เนื่องจากยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตส หรือยีน *cysH* ถูกทำให้ผ่าเหล่า ตามวิธีข้อ 3.6.1 จากนั้นทำทรานสฟอร์เมชันโดยใช้รีคอมบิแนนต์พลาสมิด ซึ่งมียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสที่ปราศจากยีนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่ง เชื่อมอยู่ในทิศทางซึ่งจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสของยีนอยู่ในทิศทางเดียวกับการถอดรหัสของโปรโมเตอร์ *lac* ผลจากข้อ 3.11.3 และพลาสมิดพาหะ pUC18 (เพื่อใช้เป็นการทดลองเปรียบเทียบ ; control experiment) คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ต้องการ โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์สีขาว นำมาขีดสั้นๆ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร M9 (ภาคผนวก ก ข้อ 4) ซึ่งเติมกรดอะมิโน 18 ชนิด ยกเว้นกรดอะมิโนซิสเตอีน และกรดอะมิโนเมไธโอนีน ความเข้มข้นชนิดละ 25 ไมโครกรัมต่อมล. จากนั้นนำไปขีดสั้นๆ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดเติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. และเติม IPTG ซึ่งเป็นสารเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน ซึ่งถอดรหัสภายใต้โปรโมเตอร์ *Lac* ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัมต่อมล. คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ต้องการจากความสามารถในการเจริญบนทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร M9 ที่ปราศจากกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีน และบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB โคโลนีทรานสฟอร์แมนต์ที่มีพลาสมิดพาหะ pUC18 จะเป็นสีฟ้า ใช้เข็มเขี่ยเชื้อย้ายโคโลนีสีฟ้ามาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

3.11.4.2 การทดสอบคอมพลีเมนเตชันของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* JM96 3 ชนิด คือชนิดที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส ชนิดที่มีพลาสมิดพาหะ pUC18 ผลจากข้อ 3.11.4.1 และชนิดที่ไม่มีพลาสมิดพาหะ pUC18 ที่เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB

และโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* JM109 ซึ่งเจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB (เพื่อใช้เป็นการทดลองเปรียบเทียบ) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดียวกัน จำนวน 30 มล. ซึ่งเติม IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัมต่อมล. ในฟลาสก์ขนาด 125 มล. บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเซลล์แขวนลอยที่ได้ ขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร M9 2 ชนิด คือชนิดซึ่งเติมกรดอะมิโนทุกชนิดที่ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 25 ไมโครกรัมต่อมล. และชนิดซึ่งเติมกรดอะมิโนทุกชนิดที่ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 25 ไมโครกรัมต่อมล. ยกเว้นกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีน เติม IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจหาการเจริญของเชื้อทุกชนิดที่ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด เฉพาะ *E. coli* JM96 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิดซึ่งมียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส และ *E. coli* JM109 เท่านั้นที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร M9 ที่ปราศจากกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีน

3.12 การทดสอบว่าเอพีเอสรีดักเตสสามารถทำให้ *E. coli* นำกำมะถันซัลเฟตมาสร้างเป็นกรดอะมิโนซิสเตอีน หรือกรดอะมิโนเมไธโอนีนได้เพิ่มมากขึ้น

3.12.1 การเตรียมพลาสมิดพาหะ pET5b และการเชื่อมต่อดีเอ็นเอจากข้อ 3.11.3 กับพลาสมิดพาหะ pET5b

สกัดพลาสมิดพาหะ pET5b (Promega, USA.) ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ใช้ทดสอบการแสดงออกของยีนสอดแทรก (expression vector) จาก *E. coli* JM109 ตามวิธีข้อ 3.3 พลาสมิดพาหะ pET5b มีบริเวณควบคุมการถอดรหัสของยีน T7 (T7 transcription cotrol region) ก่อนตำแหน่งสอดแทรกของยีน (multiple cloning site) (ดังแสดงในภาพที่ ค 2 ภาคผนวก ค) ยีนสอดแทรกในพลาสมิดพาหะ pET5b จะสามารถแสดงออกได้เมื่อใช้ *E.coli* JM109DE3 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เนื่องจากบนโครโมโซมของ *E. coli* JM109DE3 มียีนประมวลรหัสการสังเคราะห์ T7 อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (T7 RNA polymerase) ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *lacUV5* (*lacUV5* promoter) IPTG สามารถเหนี่ยวนำให้โปรโมเตอร์ทำงานได้ จากนั้นตัดพลาสมิด pET5b ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI โดยตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเป็นตำแหน่งในบริเวณสอดแทรก (multiple cloning site) ของพลาสมิดพาหะ pET5b ตรวจสอบผลโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟลิซิส แยกเอาพลาสมิดพาหะ pET5b ที่ถูกตัดด้วย

เอนไซม์เรสทริกชัน*Nde*I และ *Bam*HI ออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอขนาดความยาวประมาณ 1.4 กิโลเบส ผลจากข้อ 3.11.3 ซึ่งแยกออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ กับพลาสมิดพาหะ pET5b ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI

3.12.2 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิดจากข้อ 3.12.1 เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109

นำรีคอมบิแนนต์พลาสมิดจากข้อ 3.12.1 มาทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 ตามวิธีข้อ 3.6 เพื่อเพิ่มจำนวนรีคอมบิแนนต์พลาสมิด คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์จากความสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ตรวจหารีคอมบิแนนต์พลาสมิดโดยวิธีโคโลนีแครกกิงตามวิธีข้อ 3.7

3.12.3 การตรวจสอบรีคอมบิแนนต์พลาสมิดจากข้อ 3.12.2 ว่ามียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสที่ปราศจากสายเปปไทด์ขนส่งสอดแทรกอยู่

นำทรานสฟอร์แมนต์ที่พบว่ามีพลาสมิดขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดพาหะ pET5b ผลจากข้อ 3.11.2 มาสกัดเอาพลาสมิด ตรวจหายีนสอดแทรกในตำแหน่งสอดแทรก (multiple cloning site) ของพลาสมิดพาหะ pET5b โดยนำรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI วิเคราะห์จำนวนและแถบดีเอ็นที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟลิซิส หากมียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสที่ปราศจากสายเปปไทด์ขนส่งสอดแทรกอยู่ จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1.4 กิโลเบส พลาสมิดพาหะ pET5b จะปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอขนาด 4.3 กิโลเบส

3.12.4 การทดสอบว่าเอพีเอสรีดักเตสสามารถทำให้ *E. coli* นำกำมะถันซัลเฟต มาสร้างเป็นกรดอะมิโนซิสเตอีน และกรดอะมิโนเมไธโอนีน ได้เพิ่มมากขึ้น

3.12.4.1 การทำทรานสฟอร์เมชันและการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ของ *E. coli* JM109DE3

เตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109DE3 (Promega, USA.) ตามวิธีข้อ 3.6 ทำทรานสฟอร์เมชันโดยเติมพลาสมิดพาหะ pET5b หรือรีคอมบิแนนต์พลาสมิดซึ่งมียีนประมวล

รหัสเอพีเอสรีดักเตสสอดแทรกผลจากข้อ 3.12.3 ลงในเซลล์คอมพลีเทนต์ *E. coli* JM109DE3 และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อลิตร

3.12.4.2 การทดสอบกระบวนการนำซัลเฟตมาสร้างเป็นกรดอะมิโนซิสเตอีน และกรดอะมิโนเมไธโอนีน โดย *E. coli* JM109DE3

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* JM109DE3, *E. coli* JM109DE3 ที่มีพลาสมิดพาหะ pET5b และ *E. coli* JM109DE3 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิดซึ่งมียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสที่ปราศจากยีนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่งสอดแทรกอยู่ (ผลจากข้อ 3.12.4.1) *E. coli* JM109DE3 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ส่วน *E. coli* JM109DE3 ที่มีพลาสมิดพาหะ pET5b และ *E. coli* JM109DE3 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิดซึ่งมียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสที่ปราศยีนประมวลรหัสสายเปปไทด์ขนส่ง เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อ 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร M9 ซึ่งเติมกรดอะมิโน 18 ชนิด ยกเว้นกรดอะมิโนซิสเตอีน และกรดอะมิโนเมไธโอนีน ความเข้มข้นชนิดละ 25 ไมโครกรัมต่อมล. เติม IPTG ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมล. ปริมาตร 50 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ปลูกเชื้อเป็นการทดลองชุดควบคุม บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสติดตามการเจริญโดยวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 2,000 x g เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณของกำมะถันซัลเฟตที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับปริมาณกำมะถันซัลเฟตในการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ โดยวิธีตกตะกอนกำมะถันซัลเฟตด้วยแบเรียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ข)

3.13 การถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101

3.13.1 การเตรียมพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX)

สกัดพลาสมิดพาหะ pBIHI-IG(SX) ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งใน *E. coli* และ *A. tumefaciens* EHA101 ตามวิธีข้อ 3.3 พลาสมิดพาหะ pBIHI-IG(SX) เป็นพลาสมิดซึ่งดัดแปลงจาก พลาสมิด pBIHI-IG โดยการเปลี่ยนลำดับเบสด้านปลาย 3′ บริเวณช่วงท้าย (downsteam) ของยีน *Gus* ให้เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชัน *Xho*I (แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pBIHI-IG(SX) ดังแสดงในภาพที่ ค 3 ภาคผนวก ค) นำพลาสมิดพาหะ pBIHI-IG(SX) ที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I ซึ่งจะมีผลทำให้พลาสมิดพาหะที่ได้ปราศจากยีน *Gus* วิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส แยกเอาแถบดีเอ็นเอขนาด 15 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิดพาหะ pBIHI-IG(SX) ที่ปราศจากยีน *Gus* ออกจากเจลอะกาโรส ด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอตามวิธีข้อ 3.4

3.13.2 การสร้างรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส

นำพลาสมิดพาหะ pBIHI-IG(SX) ที่เตรียมได้จากข้อ 3.13.1 มาเชื่อมต่อกับยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสซึ่งได้ตรวจสอบแล้วว่าสามารถถอดรหัสเป็นเอพีเอสรีดักเตสได้จริง โดยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีนนี้ กับลำดับกรดอะมิโนของเอพีเอสรีดักเตส และได้ตรวจสอบแล้วว่าสามารถแสดงออกได้ ยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสนี้ได้มาจากการตัดดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด ผลจากข้อ 3.9.2 ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I นำรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ได้มาทรานสฟอร์มเข้าสู่ เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 ตามวิธีข้อ 3.6 เพื่อเพิ่มจำนวนรีคอมบิแนนต์พลาสมิด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 20 ชม. คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์จากความสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ซึ่งมีรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ต้องการโดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์ นำไปขีดสั้นๆ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. และนำไปกวนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดียวกันจำนวน 5 มล. บรรจุในหลอดทดลองขนาด 16x150 มม. เพื่อปลูกเชื้อส่วนที่เหลือลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว บ่มอาหาร

เลี้ยงเชื้อแข็งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาสกัดเอาพลาสมิดตามวิธีข้อ 3.3 ตรวจสอบยืนสอดแทรกว่าเป็นยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส โดยการนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I วิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสจะปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส พลาสมิดพาหะ pBIHI-IG(SX) จะปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 15 กิโลเบส

3.13.3 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิดจากข้อ 3.13.2 เข้าสู่ *A. tumefaciens* EHA101 โดย วิธีอิเลคโตรพอเรชัน (Electroporation) และการตรวจสอบโคโลนีทรานสฟอร์-แมนต์ที่ได้ว่ามียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสโดยวิธีโคโลนี PCR

ถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสเข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 โดยวิธีอิเลคโตรพอเรชันตามวิธีข้อ 3.8 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ โดยวิธี colony PCR โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์เดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA101 มาขีดเป็นเส้นสั้นๆ ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วนำไปแกว่งในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ซึ่งเตรียมตามวิธีข้อ 3.1 ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh 1 และ Prh2 ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนปริมาตรของดีเอ็นเอแม่แบบและใช้ปรับปริมาตรสุดท้าย ส่วนผสมของปฏิกิริยาบรรจุในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 200 ไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยกระบวนการ PCR ตามวิธีข้อ 3.1 แต่เพิ่มอุณหภูมิและเวลาในขั้นแรกเป็นที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำให้เซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 แตก ดีเอ็นเอทั้งหมดภายในเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่นำมาแกว่งในส่วนผสมของปฏิกิริยาจะทำหน้าที่เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส โคโลนีทรานสฟอร์แมนต์ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ต้องการ หรือมียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส