บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษา

พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ผศ. ดร วราภรณ์ แสงทอง สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และ อ.ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) กรุงเทพมหานคร

พันธุ์ข้าวเมล็ดสีขาวได้แก่ ข้าวพันธุ์ Kitaake Sasanishiki Nipponbare กข6 และขาวดอกมะลิ 105

พันธุ์ข้าวเมล็ดสีแดงได้แก่ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง และสังข์หยดพัทลุง

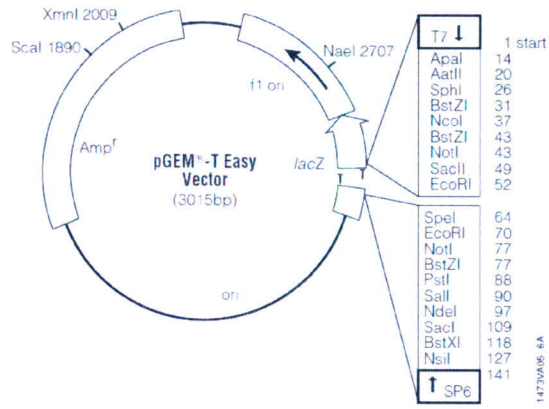
พันธุ์ข้าวเมล็ดสีดำได้แก่ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา

อะโกรแบคทีเรียม

อะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 และ EHA105 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา

พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

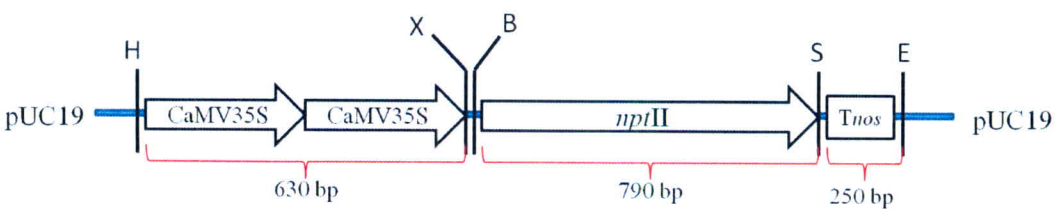
พลาสมิด pGEM-T Easy (Promega, USA) สำหรับโคลนยีน *OSB2* จากข้าวพันธุ์ต่างๆ เพื่อนำไปหาลำดับเบส (ภาพ 7)



ภาพ 7 แผนที่พลาสมิด pGEM T-Easy

ที่มา: www.promega.com, 2009

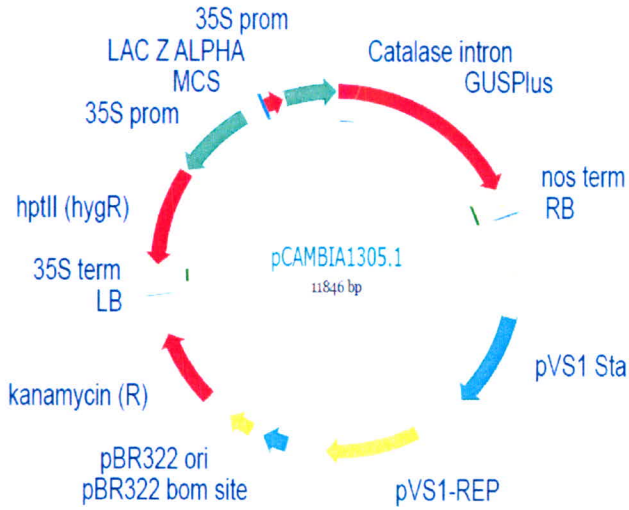
พลาสมิด p2CA สำหรับสร้างชุดยีนได้รับความอนุเคราะห์จากอ.ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) กรุงเทพมหานคร พลาสมิด p2CA ประกอบด้วยชุดยีน *npt*II ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ 35s Promoter และ *nos* terminator ภายในพลาสมิด pUC19 (ภาพ 8)



ภาพ 8 แผนที่พลาสมิด p2CA

หมายเหตุ สัญลักษณ์ H คือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dII, X คือ *Xba*I, B คือ *Bam*HI, S คือ *Sac*I และ E คือ *Eco*RI

พลาสมิด pCAMBIA1305.1 ซึ่งประกอบด้วยชุดของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยให้ยีนทำงานภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator ซึ่งเป็น T-DNA vector เพื่อใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม (ภาพ 9)



ภาพ 9 แผนที่พลาสมิด pCAMBIA1305.1

ที่มา: Yrgene., 2014

วัสดุและอุปกรณ์

1. Racks
3. กระบอกตวง
4. กระติกน้ำแข็ง
5. กระดาษทิชชู
6. ขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 12 ออนซ์
7. ขวดรูปชมพู่ (flask)
10. จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Petri dish)
11. ช้อนตักสาร
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์
13. ตะแกรง
14. ถ้วยใส่สาร
15. ทัพพี
16. ทิป (Tip)
18. บีกเกอร์ (Becker)

19. ปากคีบ (forcep)

20. ปิเปตแก้ว

21. ไมโครปิเปต (micropipette)

22. พลาสติกแรป (Plastic wrap)

23. หลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร

24. ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)

25. หลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

26. หลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

เครื่องมือ

1. กล้องสเตอริโอ SD 3045 (Olympus, Japan)

2. เครื่อง spectrophotometer (Perkin Elmer, USA)

3. เครื่อง Thermal Cycler ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น T100 (BioRad, USA)

4. เครื่อง Vortex GENIE-2 (Scientific industry, USA)

5. เครื่องกวนสารและให้ความร้อน (Jenway 1000, UK)

6. เครื่องเขย่า Mini Rocker MR-1 (Bio san, USA)

7. เครื่องเขย่า Innova 2100 (New Brunswick Scientific, USA)

8. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ Orbital Shakering Incubation (Shall Lab, USA)

9. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PG802-S (Mettler Toledo, Switzerland)

10. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285 (Mettler Toledo, Switzerland)

11. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง แบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Harrier 18/80 Refrigerated (Sanyo, UK)

12. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Biofuge Pico (Sorvall, Germany)

13. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Universal 32R (Hettich, Germany)

14. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง Sartorius Professional Meter PP-50 (Sartorius, Germany)

15. เครื่องอิเล็คโทรฟอริซิส MyRun Intelligent Electrophoresis Unit (Tokyo, Japan)

16. เครื่องอิเล็คโทรฟอริซิส Mupid-exu Submarine Electrophoresis system (Advance, Japan)

17. ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส (Haier, Thailand)

18. ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส

19. ตู้ปลอดเชื้อ ClassIIA/B3 biology safety (Forma scientific, USA)

20. ตู้อบแห้ง ED115 (E2) (BINDER, Norway)

21. ไมโครเวฟ รุ่น Intell wave (LG, Chaina)

22. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

23. อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (Julabo, Germany)

สารเคมี

1. Absolute ethanol (MERCK, Germany)

2. Acetic acid (Merck, Germany)

3. Agarose (Invitrogen, USA)

4. Alkaline lysis solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl PH 8.0, 10 mM EDTA)

5. Alkaline lysis solution II (0.2 N NaOH, 1% w/v SDS)

6. Alkaline lysis solution III (3M Na-Acetate pH 5.8 with glacial acetic acid)

7. Ammonium nitrate (QReC, New Zealand)

8. Ammonium peroxydisulfate (VWR BDH Prolabo, EC)

9. Ammonium sulphate (Ajax finechem, New Zealand)

10. A-Naphthaleneacetic acid (NAA) (phytotechnology, USA)

11. Boric acid (Fisher scientific, UK)

12. Bromophenol blue (Fisher scientific, UK)

13. Calcium chloride dehydrate (Merck, Germary)

14. Cassamino acids powder (Bio Basic Inc., Canada)

15. Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (Bio Basic Inc., Canada)

16. Chloroform (LAB-SCAN, Thailand)

17. Cobalt (II) chloride (Ajax finechem, New Zealand)

18. Copper (II) Sulfate (Fisher scientific, UK)

19. Diaminoethanetetra-acid disodium salt (EDTA) (Fisher scientific, UK)

20. Diethy pyrocarbonate (DEPC) (Euro clone, Italy)

21. Dimethyl sulfoxid (DMSO) (Merck, Germany)

22. di-Potassium hydrogen orthophosphate anhydrous (Fisher scientific, UK)

23. di-Sodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Fisher scientific, UK)

24. D-Glucose anhydrous (Fisher scientific, UK)

25. D-Sorbitol (Bio Basic Inc., Canada)

26. Gelzan-CM (Phytotechnology, USA)

27. Glycine (Fisher scientific, UK)

28. Glycerol (Merck, Germany)

29. Hydrochloric acid (Merck, Germany)

30. IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside) (Bio Basic Inc., Canada)

31. Iron (II) sulfate (Fisher scientific, UK)

32. Isoproponol (Merck, Germany)

33. Kinetin (6-furturylaminopurine) (Phytotechnology, USA)

34. L-Arginine (Fluka, Switzerland)

35. L-Asparagine (Sigma, Germany)

36. L-Aspartic acid (Sigma, Germany)

37. L-Glutamine (Fluka, Switzerland)

38. L-Proline (Phytotechnology, USA)

39. Lysis buffer (5 mM EDTA, 10% w/v sucrose, 0.2% w/v SDS, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.05w/v bromophenol blue)

40. Magnesium choride Hexahydrate (Bio Basic Inc, Canada)

41. Magnesium sulfate (Fisher scientific, UK)

42. Magnesium (II) sulphate, monohydrate (Ajax finechem, New Zealand)

43. Moltose (Monohydrate) (Merck, Germany)

44. Myo-Inositol (Bio Basic Inc., Canada)

45. Nicotinic acid (Fluka, Switzerland)

46. Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) (Phytotechnology, USA)

47. Potassium chloride (Merck, Germany)

48. Potassium dichromate (Fisher scientific, UK)

49. Potassium dihydrogen orthophosphate (Fisher scientific, UK)

50. Potassium hexaacyanoferrate(II) (Ferrocyanide) (Fisher scientific, UK)

51. Potassium hexaacyanoferrate(III) (Ferrocyanide) (Fisher scientific, UK)

52. Potassium hydroxide (Merck, Germany)

53. Potassium iodide (Ajax finechem, New Zealand)

54. Potassium nitrate (Merck, Germany)

55. Pyridoxine hydrochloride (Fluka, Switzerland)

56. Sodium chloride (Merck, Germany)

57. Sodium dihydrogen orthophosphate dehydrate (Fisher scientific, UK)

58. Sodium hydroxide (Merck, Germany)

59. Sodium-L-Ascorbate (Bio Basic Inc, Canada)

60. Sodium pyrophosphate tatrebasic decahydrate (Sigma Aldrich, Japan)

61. Sucrose (BDH Laboratory, England)

62. Tri-Sodium citrate dehydrate (VWR BDH Prolabo, EC)

63. Trizol (Invitrogen, USA)

64. Vitamin B1 Hydrochloride (Thiamine. HCl) (Fluka, UK)

65. X-gal (Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-galactopyranoside) (Bio Basic Inc., Canada)

66. X-Gluc (100 mM X-Gluc in Dimethylformamide) (Bio Basic Inc, Canada)

67. Yeast extract (Bio Basic Inc, Canada)

68. Zinc sulphate (Ajax finechem, New Zealand)

69. 2-mercaptoethanol (BIO BASIC INC, Thailand)

70. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (Phytotechnology, USA)

71. 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone (acetosyringone) (Sigma Aldrich, Germany)

72. 10 % Sodium hypochlorite (UNION Science, Thailand)

73. สีย้อมดีเอ็นเอ SYBR saft DNA gel stain (Invitrogen, USA)

สารปฏิชีวนะที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารปฏิชีวนะกานามัยซิน (Kanamycin) (Bio scientific Inc, USA)
2. สารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม (Cefotaxime) (Siam Bheasach, Thailand)
3. สารปฏิชีวนะไทเมนทิน (Timentin) (Caisson, USA)
4. สารปฏิชีวนะไรแฟมพิซิน (Rifampicin) (Siam Bheasach, Thailand)
5. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicillin) (Sigma, Germany)
6. สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (Hygromycin) (Caisson, USA)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

1. GeneRuler ™ 100 bp Ladder Plus (Fermentas, USA)
2. λ/*Eco*RI + *Hind*III (Fermentas, USA)
3. 1 kp DNA leader (Fermentas, USA)

เอนไซม์ที่ใช้ในการวิจัย

1. *Bam*HI - HF (New England Biolab, USA)
2. *Eco*RI - HF (New England Biolab, USA)
3. *Hin*dIII - HF (New England Biolab, USA)
4. *Sac*I - HF (New England Biolab, USA)

ชุดทดลองสำเร็จรูป (Kit) ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ชุด Superscript III First-Stand Synthesis System (Invitrogen, USA)
2. ชุดแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล Nucleospin Extract II Kit (Machery-Nagel, Germany)
3. ชุดสกัดพลาสมิด Nucleospin Plasmid (Machery-Nagel, Germany)

4. ชุดโคลนสำเร็จรูป pGEM-T Easy Kit (Promega, USA)

5. บัฟเฟอร์สำเร็จรูป Go Taq® Green Master Mix (Promega, USA)

6. บัฟเฟอร์สำเร็จรูป Red dye PCR Master Mix (MERCK, Germany)

วิธีการดำเนินวิจัย

วิธีการดำเนินวิจัยแบ่งออกเป็น 7 ขั้นตอน ดังนี้

1. การตรวจสอบยีน *OSB2* โดยเทคนิค PCR

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว

1.2 การตรวจสอบยีน *OSB2* ด้วยเทคนิค PCR

2. การค้นหายีน *OSB2* ด้วยเทคนิค RT-PCR

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าว

2.2 การค้นหายีน *OSB2* โดยเทคนิค RT-PCR

3. การโคลนยีน *OSB2* เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy

3.1 การแยกบริสุทธิ์ยีน *OSB2* จากเจล

3.2 การเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy และส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competent cell

3.3 การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening)

3.4 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

4. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* จากโคโลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก

5. การสร้างชุดยีนที่ประกอบด้วยยีน *OSB2* ภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator

5.1 การเตรียมพลาสมิด p2CA และชิ้นยีน *OSB2*

5.2 การเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA แล้วถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cell

5.3 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA ด้วยขนาด (Rapid size screening)

5.4 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

5.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* จากโคโลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก

6. การสร้างพลาสมิดที่มีชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

6.1 การเตรียมพลาสมิด pCAMBIA1305.1 และชุดยีน dual 35sP:: *OSB2*::T*nos*

6.2 การเชื่อมชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* เข้าสู่ pCAMBIA1305.1

6.3 การคัดเลือกพลาสมิดจากการเชื่อมชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* เข้ากับพลาสมิด pCAMBIA1305.1

6.4 การส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่มีชิ้นยีน *OSB2* เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 และ EHA105 และคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยเทคนิค PCR

7. การถ่ายยีน *OSB2* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 แล้ววิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับจากการถ่ายยีน

7.1 การชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัส

7.2 การเตรียมอะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPI01_B2S

7.3 การถ่ายยีนและทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยวิธี GUS assay

7.4 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน และชักนำให้เกิดต้น

7.5 การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

1. การตรวจสอบยีน *OSB2* โดยเทคนิค PCR

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว

- บดใบข้าวให้ละเอียดโดยการใช้ไนโตรเจนเหลวและลูกปืน ร่วมกับการ vortex

- เติมสารละลาย mCTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide) ที่มี 1 % (v/v) 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นผสมโดยใช้เครื่อง vortex

- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยผสมให้เข้ากันทุก 10 และ 20 นาที

- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

- ย้ายส่วนใสไปยังหลอดใหม่ และเติม RNase A ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ต่อสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

- เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือ 1 เท่า ของปริมาตรสารละลาย mCTAB และผสมให้เข้ากันโดยการ vortex

- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

- ย้ายส่วนใสไปยังหลอดใหม่ และเติมคลอโรฟอร์มอีกครั้ง จากนั้นปั่นเหวี่ยง แล้วย้ายส่วนใสด้านบนไปหลอดใหม่

- เติม 3 M sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 เท่าของสารละลาย และเติม cold-absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย จากนั้นผสมให้เข้ากันเพียงเล็กน้อย จะสังเกตเห็นตะกอนขุ่นสีขาว หากไม่พบตะกอน อาจแช่สารละลายในหลอดไมโครทิวป์ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

- ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- เทส่วนใสทิ้ง และเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างตะกอน

- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง

- ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

1.2 การตรวจสอบยีน *OSB2* ด้วยเทคนิค PCR

เตรียมปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบยีน *OSB2* โดยใช้ไพรเมอร์ OSB1F และ OSB2R ที่จำเพาะต่อส่วนหนึ่งของยีน *OSB2* ซึ่งมี PCR product ขนาดประมาณ 410 bp โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2x Go Taq® Green Master Mix	1X	10
10 µM OSB2F	0.5 µM	1
10 µM OSB2R	0.5 µM	1
DNA Template (เจือจาง 1:5)	-	1
dH_2O	-	7
รวม	-	20

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
Annealing	60 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

วิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปเจลภายใต้แสงยูวี สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 410 bp

2 การค้นหายีน *OSB2* ด้วยเทคนิค RT-PCR

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าว

2.1.1ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ

ขั้นตอน Homogenization

บดใบข้าวหลังเพาะอายุ 4 สัปดาห์ และเมล็ดอ่อนในระยะน้ำนมหลังจากออกดอกประมาณ 15 วัน ให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว แล้วเติม Trizol Reagent (Invitrogen, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครทิวป์

ขั้นตอน Phase separation

บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 0.2 มิลลิลิตร พลิกกลับหลอด เป็นเวลา 5 วินาที แล้วบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

ขั้นตอน RNA precipitation

ย้ายชั้นน้ำใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอน RNA wash

ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ (ที่เย็น) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และล้างตะกอนอีกครั้งหนึ่ง

ขั้นตอน Redissolving the RNA

ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วตากตะกอนให้แห้งแล้วเติม DEPC treat water (free RNase) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

2.1.2 การกำจัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNaseI (New England Biolab, USA) เมื่อสกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนแล้วทำการกำจัดดีเอ็นเอโดยเติมส่วนประกอบของปฏิกิริยา ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอที่สกัดได้	25
10X Reaction buffer with $MgCl_2$	3
DEPC-treated water	1
DNaseI	1
รวม	30

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 25 mM EDTA ปริมาตร 6 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 5 mM EDTA) บ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย agarose gel electrophoresis

2.1.3 การสังเคราะห์ First Strand cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription

นำอาร์เอ็นที่สกัดได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription โดยใช้ไพรเมอร์ oligo (dT) ตามวิธีการของชุดสำเร็จรูป Superscript III First-Stand Synthesis System (Invitrogen, USA) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา First-Strand cDNA Synthesis ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอทั้งหมด	8
ไพรเมอร์ (50 μM Oligo (dT))	1
10 mM dNTP mix	1
DEPC-treat water	-
รวม	10

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำหลอดมาวางบนน้ำแข็งทันที อย่างน้อย 1 นาที แล้วเตรียม cDNA synthesis Mix โดยมีองค์ประกอบดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X RT buffer	2
25 M $MgCl_2$	4
0.1 M DTT	2
RNase OUT (40 U/μl)	1
Superscript III RT (200 U/μl)	1
รวม	10

เติมองค์ประกอบ cDNA synthesis Mix ที่เตรียมปริมาตร 10 ไมโครลิตร และผสมเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำออกมาวางบนน้ำแข็งทันที นำหลอดมา Spin down และเติม RNaseH 1 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บอาร์เอ็นเอที่ – 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้หรือนำไปทำพีซีอาร์ต่อไป

2.2 การค้นหายีน *OSB2* โดยเทคนิค RT-PCR

ค้นหายีน *OSB2* จาก cDNA ที่มาจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าว 12 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OSB2cdsF และ OSB2cdsR ซึ่งจำเพาะต่อ coding sequence ของยีน *OSB2* โดยมีองค์ประกอบ ดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2x Go Taq® Green Master Mix	1X	10
10 µM OSB2cdsF	0.5 µM	1
10 µM OSB2cdsR	0.5 µM	1
cDNA	-	1
dH_2O	-	7
รวม	-	20

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	40 รอบ
Annealing	68 องศาเซลเซียส	3 นาที	40 รอบ
Extension	68 องศาเซลเซียส	3 นาที	40 รอบ
Final Extension	68 องศาเซลเซียส	5 นาที	

จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophorsis โดยใช้ 1% agarose ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาด 1,300 bp

3. การโคลนยีน *OSB2* เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy

3.1 การแยกบริสุทธิ์ยีน *OSB2* จากเจล

หลังจากทำ RT-PCR แล้วทำการแยกดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophorsis โดยใช้ 1% agarose gel ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอโดยใช้ Nucleospin Extract II Kit (Machery-Nagel, Germany) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- ตัดเจลที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่ต้องการจากการทำ RT-PCR ใส่ในหลอดไมโครทิวป์

- ชั่งน้ำหนักเจล แล้วเติม Buffer NT (อัตราส่วนน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัม : buffer NT 200 ไมโครลิตร)

- บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการผสมด้วยการพลิกหลอดทุกๆ 2-3 นาที เพื่อช่วยให้เจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

- หลังจากที่เจลละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำ column ใส่ใน collection tube จากนั้นดูดสารละลายเจลที่ละลายแล้วใส่ column ครั้งละ 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทำซ้ำจนกว่าสารละลายหมด

- ทิ้งสารละลายที่ผ่าน column ใน collection tube ทิ้ง

- จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

- เทส่วนใสที่ไหลผ่าน column ทิ้ง

- เติม Buffer NT3 600 ไมโครลิตร (NT3: Absolute ethanol = 1:4) จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสที่ไหลผ่านทิ้ง

- ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อทำให้ column แห้งและกำจัด Buffer NT3 จนหมด

- จากนั้นย้ายคอลัมน์มาวางใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Buffer NE 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที

- นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

- นำดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์ได้ไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy ต่อไป

3.2 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy และส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competent cell

3.2.1 การเตรียม competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี $CaCl_2$

- นำ glycerol stock ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α มา streak ลงบนอาหารแข็งสูตร LB ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 15-17 ชั่วโมง)

- เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน

- นำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.55

- ปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเทอาหารออกให้หมด

- ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 50 μM $CaCl_2$ (ที่เย็น) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลง จากนั้นเติม 50 μM $CaCl_2$ (เย็น) อีก 16 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปต จากนั้นบ่มในน้ำแข็งนาน 20 นาที

- ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสทิ้งทั้งหมด ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 50 μM $CaCl_2$ (เย็น) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติม glycerol เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ (ผ่านการฆ่าเชื้อ) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปต จากนั้นแบ่งเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บเซลล์ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3.2.2 การเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy เตรียมองค์ประกอบปฏิกิริยา ligation ดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2X Rapid Ligation buffer T4 DNA Ligase	5
pGEM-T Easy vector	0.5
PCR Product	3.5
T4 DNA Ligase	1
รวม	10

บ่มข้ามคืน อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และส่งถ่ายเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5 α และ spread บนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร X-gal และ IPTG 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลลเซียส

3.2.3 การส่งถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat Shock

- นำปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมในหลอดที่มี competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
- บ่มใน water bath อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที
- บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที
- เติมอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร
- จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที
- ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อที่ 11,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที
- ปิเปตส่วนใสทิ้ง 800 ไมโครลิตร แล้วละลายตะกอนเซลล์ จากนั้นทำการ spread เชื้อบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ spread ด้วย X-gal (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ IPTG (20 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
- ทำการบันทึกผลจำนวนโคโลนีสีฟ้าและสีขาวที่ได้จากการถ่ายฝากพลาสมิด และคัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวมาทำการตรวจสอบต่อไป

3.3 การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด (Rapid size srenning)

นำโคโลนีสีขาวที่ได้จากการเชื่อมชิ้นยีนกับดีเอ็นเอพาหะมาคัดเลือกด้วยขนาด โดยเปรียบเทียบกับโคโลนีสีฟ้า โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- นำโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที
- ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วทิ้งส่วนใส
- เติม Lysis buffer 50 ไมโครลิตร (5mM EDTA, 10% w/v sucrose, 0.25% w/v SDS, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.05% w/v bromophenol blue) ผสมด้วยการ vortex

- นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

- เมื่อครบเวลาย้ายไปบ่มในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที

- จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

- นำสารละลายที่ได้ 20 ไมโครลิตร มาแยกด้วย 1% agarose gel electrophoresis ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบโคโลนีสีขาว

3.4 การคัดเลือกโคโลนีสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

3.4.1 การเตรียมพลาสมิดสำหรับปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis ดังนี้

- นำ glycerol stock ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pGEM-T Easy ซึ่งมีชิ้นยีน *OSB2* มา streak ลงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง)

- เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะ แอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน

- เก็บเซลล์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ทำ 2 รอบ รอบละ 1.5 มิลลิลิตร

- เทอาหารออกให้หมด เก็บเซลล์ที่ได้ไปทำการสกัดพลาสมิด

- ละลายเซลล์ที่ได้ด้วย Alkaline lysis solution l (แช่เย็น) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการ vortex

- เติม Alkaline lysis solution ll ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา 4-6 ครั้ง จนกระทั่งสารละลายหนืดและใส (ห้าม Vortex) แช่หลอดในน้ำแข็ง 5 นาที

- เติม Alkaline lysis solution lll ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา แช่ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายส่วนใสไปหลอดใหม่

- เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 เท่าของสารละลายที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา

- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายส่วนใส (supernatant) ใส่หลอดใหม่

- เติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา แช่ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 -15 นาที

- ปิเปตส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นปิเปตส่วนน้ำทิ้ง ล้างเช่นนี้ 2 ครั้ง

- ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายกลับด้วยน้ำกลั่นที่มีเอนไซม์ RNase แล้วเก็บพลาสมิดที่ -20 องสาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3.4.2 ปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* competent cell คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม โดยนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เมื่อได้โคลนที่มีชิ้นยีน *OSB2* ขนาดประมาณ 1300 bp ทำการสกัดพลาสมิดด้วย Nucleospin® Plasmid (Machery-Nagel, Germany) และส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส โดยมีขั้นตอนดังนี้

- เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน

- เก็บเซลล์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ทำ 2 รอบ รอบละ 1.5 มิลลิลิตร

- เทอาหารออกให้หมด เก็บเซลล์ที่ได้ไปทำการสกัดพลาสมิด โดยวิธี Nucleospin® Plasmid

- ขั้นตอนต่อไปทำให้เซลล์แตก โดยเติม Buffer A1 250 ไมโครลิตร ละลายตะกอนให้หมดโดยการ Vortex

- เติม Buffer A2 250 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมา 6-8 ครั้ง ห้าม Vortex ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

- เติม Buffer A3 300 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมา 6-8 ครั้ง ห้าม Vortex ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

- ปิเปตส่วนใสใส่ลงใน column ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

- ล้างเมมเบรนใน column โดยเติม Buffer A4 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

- เทส่วนใสที่ผ่าน column ทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

- จากนั้นย้าย column ไปยังหลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

- เติม Buffer AE 35 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

- ได้พลาสมิดที่สกัดจากดีเอ็นเอสายผสมที่สะอาดเพื่อทำการทดลองต่อไป และสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* จากโคโลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก

เมื่อนำพลาสมิดที่คัดเลือกไปวิเคราะห์ลำดับเบส บริษัท 1st Base DNA Sequencing (Malaysia) นำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBlank โดยนำลำดับดีเอ็นเอของยีนจากข้าวแต่ละพันธุ์มาเปรียบเทียบด้วยด้วยโปรแกรม ClustalX (version 1.83) และ GeneDoc (version 2.7)

5. การสร้างชุดยีนที่ประกอบด้วยยีน *OSB2* ภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator

5.1 การเตรียมพลาสมิด p2CA และ ชิ้นยีน *OSB2*

5.1.1 การเตรียมพลาสมิด p2CA

นำพลาสมิด p2CA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I เพื่อตัดชิ้นยีนเดิมออกซึ่งโคลนอยู่ระหว่าง *Bam*HI/*Sac*I sites แล้วจึงแยกบริสุทธิ์พลาสมิด p2CA ที่ตัดแล้วจากเจลเพื่อนำไปเชื่อมกับยีน *OSB2* ต่อไป โดยตัดพลาสมิดตามปฏิกิริยาดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10X NEB buffer cutsmart	4
*Bam*HI-HF	2
*Sac*I -HF	2
พลาสมิด	30
dH_2O	2
รวม	40

5.1.2 การเตรียมชิ้นยีน *OSB2*

เตรียมชิ้นยีน *OSB2* โดยนำพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มีชิ้นยีน *OSB2* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI แล้วจึงแยกบริสุทธิ์ชิ้นยีน *OSB2* ขนาดประมาณ 1300 bp ออกจากพลาสมิด pGEM-T Easy เพื่อนำไปเชื่อมกับพลาสมิด p2CA ต่อไป โดยตัดพลาสมิดตามปฏิกิริยาดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10X NEB buffer 4	3
*Eco*RI-HF	2
พลาสมิด	15
dH_2O	10
รวม	30

หลังจากตัดพลาสมิดทั้งสองด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำการแยกดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophorsis โดยใช้ 1% agarose gel ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตัดเจลที่มีขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอโดยใช้ Nucleospin Extract II Kit (Machery-Nagel, Germany) แล้วการทำสร้างปลายพลาสมิด p2CA และชิ้นยีน *OSB2* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้เป็น blunt end เนื่องจากลำดับเบสของยีน *OSB2* มีบริเวณจำจดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I จึงไม่สามารถตัดชิ้นยีนให้มีปลาย *Bam*HI และ *Sac*I เพื่อเชื่อมเข้าสู่พลาสมิด p2CA ที่บริเวณ *Bam*HI และ *Sac*I จึงทำการสร้างปลายพลาสมิด p2CA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I และชิ้นยีน *OSB2* ให้เป็น blunt end สำหรับปฏิกิริยา ligation เพื่อเชื่อมต่อชิ้นยีน

เข้ากับพลาสมิด โดยมีขั้นตอนตามชุดสำเร็จรูป End-It™ DNA End-Repair Kit (Epicentre, U.S.A.) ดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
DNA to end-repair	16.5
10X end-repair buffer	2.5
dNTP mix	2.5
ATP	2.5
End-repair enzyme mix	1
dH_2O	-
รวม	25

บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำชิ้นยีน *OSB2* เชื่อมเข้ากับพลาสมิด p2CA ในขั้นตอนต่อไป

5.2 การเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA แล้วถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cell

5.2.1 คำนวณความเข้มข้นและหาอัตราส่วนระหว่าง vector และ insert ในปฏิกิริยาการเชื่อม

เมื่อแยกบริสุทธิ์พลาสมิด p2CA (vector) และชิ้นยีน *OSB2* (insert) คำนวณความเข้มข้นดีเอ็นเอจากเจล เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณอัตราส่วนความเข้มข้นของ vector และ insert ในปฏิกิริยาการเชื่อม (ligation) จากสูตร

$$\frac{V}{I} = \frac{1}{3} \times \frac{\text{ความยาวดีเอ็นเอพาหะ (bp)}}{\text{ความยาว insert (bp)}} \times \frac{660}{660}$$

ขนาดพลาสมิด p2CA เท่ากับ 3,000 bp

ขนาดชิ้นยีน *OSB2* เท่ากับ 1,300 bp

ดังนั้น

$$\frac{V}{I} = \frac{1}{3} \times \frac{3{,}000 \text{ bp}}{1{,}300 \text{ bp}} \times \frac{660}{660} = \frac{1}{1.3}$$

ดังนั้น ถ้าใช้ insert ความเข้มข้น 1.3 นาโนกรัม ต้องใช้ vector 1 นาโนกรัม

ถ้าใช้ insert ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ต้องใช้ vector = 77 นาโนกรัม

5.2.2 การเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* กับเวกเตอร์ p2CA และถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cell

เมื่อคำนวณอัตราส่วนระหว่างพลาสมิดและ insert แล้ว จากนั้นเชื่อมชิ้นยีนกับดีเอ็นเอพาหะ p2CA ทำโดย เติมสารประกอบต่างๆ โดยมีปริมาตรดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10X buffer T4 DNA Ligase	1
พลาสมิด p2CA (ความเข้มข้น 41.66 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	3
ยีน *OSB2* (ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	5
T4 DNA Ligase	1
รวม	10

บ่มข้ามคืน อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส จากนั้นส่งถ่ายเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock และ spread บนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.3 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA ด้วยขนาด (Rapid size screening)

นำโคโลนีที่ได้จากการเชื่อมชิ้นยีนกับดีเอ็นเอพาหะมาคัดเลือกด้วยขนาด โดยเปรียบเทียบกับพลาสมิด p2CA ที่มีชิ้นยีน *npt*II ขนาด 790 bp และพลาสมิด p2CA ที่ตัดชิ้นยีน *npt*II ออกแล้ว self-ligation โดยมีขั้นตอนตามหัวข้อที่ 3.3

5.4 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* competent cell คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม โดยนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII เมื่อได้โคลนที่มีชิ้นยีน *OSB2* ที่ประกอบด้วย dual 35s Promoter และ *nos* Terminator ขนาดประมาณ 2,300 bp ทำการสกัดพลาสมิดด้วย Nucleospin® Plasmid และส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

5.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* จากโคโลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก

เมื่อนำพลาสมิดที่คัดเลือกไปวิเคราะห์ลำดับเบส บริษัท 1st Base DNA Sequencing (Malaysia) แล้วนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBlank เพื่อวิเคราะห์ว่าโคลนนั้นมียีน *OSB2* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator อีกทั้งเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *OSB2* ในโคลนที่ได้กับลำดับเบสยีน *OSB2* ที่โคลนได้ก่อนหน้านี้จากข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ ด้วยโปรแกรม ClustalX (version 1.83) และ GeneDoc (version 2.7)

6. การสร้างพลาสมิดที่มีชุดยีน dual 35sP:*OSB2*: T*nos* สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

เมื่อคัดเลือกดีเอ็นเอสายสายผสมที่ถูกต้องซึ่งมียีน *OSB2* ภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator จากนั้นสร้าง construct ซึ่งประกอบด้วยชุดของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยโดยให้ยีนทำงานภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator โดยใช้ T-DNA vector คือ pCAMBIA1305.1 เพื่อใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวด้วยอะโกรแบคทีเรียม โดยทำการสกัดพลาสมิด p2CA ที่มียีน *OSB2* และ pCAMBIA1305.1 จากนั้นตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII เพื่อเตรียมชิ้น insert และพลาสมิดสำหรับปฏิกิริยา ligation ต่อไป

6.1 การเตรียมพลาสมิด pCAMBIA1305.1 และชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos*

เตรียมพลาสมิด pCAMBIA1305.1 และชิ้นยีน *OSB2* จาก p2CA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII จากนั้นทำการตกตะกอนพลาสมิด โดยตกตะกอนตามขั้นตอนดังนี้

- ทำการ heat inactivation โดยการนำปฏิกิริยาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

- เติม 3 M sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 เท่าของสารละลาย และเติม cold-absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย จากนั้นผสมให้เข้ากัน แช่ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หรือข้ามคืน

- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- เทส่วนใสทิ้ง และเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างตะกอน

- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง

- ตากตะกอนพลาสมิดให้แห้งจากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

- นำพลาสมิดที่ตัดและตกตะกอนมาเชื่อมต่อเข้ากับชิ้นยีน *OSB2* ต่อไป

ส่วนการเตรียมชิ้นยีน *OSB2* ที่ประกอบด้วย dual 35sP::*OSB2*::T*nos* นำปฏิกิริยาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาแยกขนาดระหว่างพลาสมิดและยีนโดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์ยีน *OSB2* ที่มีขนาดทั้งหมด 2,300 bp จากเจล ตามวิธีการของ NucleoSpin Extraction Kit (Macherey-Nagel, Germany) แล้วนำชิ้นยีนมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ต่อไป

6.2 การเชื่อมชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* เข้าสู่ pCAMBIA1305.1

6.2.1 คำนวณความเข้มข้นและหาอัตราส่วนระหว่าง vector และ insert ในปฏิกิริยาการเชื่อม

เมื่อแยกบริสุทธิ์พลาสมิด pCAMBIA1305.1 (vector) และชิ้นยีน *OSB2* (insert) คำนวณความเข้มข้นดีเอ็นเอจากเจล เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณอัตราส่วนความเข้มข้นของ vector และ insert ในปฏิกิริยาการเชื่อม (ligation) จากสูตร

$$\frac{V}{I} = \frac{1}{3} \times \frac{\text{ความยาวดีเอ็นเอพาหะ (bp)}}{\text{ความยาว insert (bp)}} \times \frac{660}{660}$$

ขนาดพลาสมิด pCAMBIA1305.1 เท่ากับ 11,846 bp

ขนาดชิ้นยีน *OSB2* กับ Promoter และ Terminator เท่ากับ 2,300 bp

ดังนั้น

$$\frac{V}{I} = \frac{1}{3} \times \frac{11{,}846 \text{ bp}}{2{,}300 \text{ bp}} \times \frac{660}{660} = \frac{1.7}{1}$$

ดังนั้นถ้าใช้ vector 1.7 นาโนกรัม ต้องใช้ insert 1 นาโนกรัม

6.2.2 การเชื่อมชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* เข้าสู่ pCAMBIA1305.1

เมื่อคำนวณอัตราส่วนระหว่างพลาสมิดและ insert แล้ว จากนั้นเชื่อมชิ้นยีนกับดีเอ็นเอพาหะ โดยมีปริมาตรดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10X buffer T4 DNA Ligase	1
พลาสมิด pCAMBIA1305.1	ตามความเข้มข้นที่คำนวณ
ยีน *OSB2* ที่มี Promoter และ Terminator	ตามความเข้มข้นที่คำนวณ
T4 DNA Ligase	1
รวม	10

บ่มข้ามคืน อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส จากนั้นส่งถ่ายเข้าสู่ competenrt cell ของ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock และ spread บนอาหาร LB ที่มีกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

6.3 การคัดเลือกพลาสมิดจากการเชื่อมชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* เข้าสู่ pCAMBIA1305.1

คัดเลือกพลาสมิดจากการเชื่อมชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* เข้าสู่ pCAMBIA1305.1 ด้วยขนาดโดยเปรียบเทียบกับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ด้วยวิธี Rapid size screening จากนั้นคัดเลือกพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dII โดยคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดที่ประกอบด้วยชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* ขนาด 2,300 bp

6.4 การส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่มียีน *OSB2* เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 และ EHA105 และคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยเทคนิค PCR

6.4 1 การเตรียม competent cell ของอะโกรแบคทีเรียม

- นำเชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 และ EHA105 มา streak ลงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

- เลือกโคโลนีเดี่ยว จำนวน 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน

- นำเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 17 ชั่วโมง จนได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.55

- ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อที่นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเทอาหารออกให้หมด

- ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 50 μM $CaCl_2$ (ที่เย็น) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลง จากนั้นเติม 50 μM $CaCl_2$ (ที่เย็น) อีก 16 มิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็ง เป็นเวลา 20 นาที

- ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายออกให้หมด

- เติม 50 μM $CaCl_2$ (ที่เย็น) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติม glycerol เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปต

- แบ่งเก็บใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 มิลลิลิตร โดยเมื่อทำการปิเปตเสร็จให้รีบแช่หลอดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นจึงนำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

6.4.2 การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม

- นำสารละลายพลาสมิด ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมในหลอดที่มี competent cell ของอะโกรแบคทีเรียม ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

- แช่หลอดในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 90 วินาที

- บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

- เติมอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง

- ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อที่ 11,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที

- ปิเปตส่วนใสทิ้ง 800 ไมโครลิตร แล้วละลายตะกอนเซลล์กับสารละลายให้เข้ากัน ทำการ spread สารละลายตะกอนเซลล์ลงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และกานามัยซินเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

- นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

6.4.3 การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยเทคนิค PCR

ทำการคัดเลือกโคโลนีสายผสมโดยสกัดพลาสมิดด้วย Alkaline solution จากนั้นทำการคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OSB2* โดยมีปฏิกิริยาดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2X GoTaq® Green Master Mix	1X	7.5
10 µM OSB2cdsF	0.5 µM	0.75
10 µM OSB2cdsR	0.5 µM	0.75
พลาสมิด	-	0.5
dH_2O	-	5.5
รวม	-	15

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
Annealing	68 องศาเซลเซียส	3 นาที	
Extension	68 องศาเซลเซียส		
Final Extension	68 องศาเซลเซียส	5 นาที	

จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นยีน *OSB2* ขนาดประมาณ 1,300 bp แล้วนำพลาสมิดที่มียีน *OSB2* ไปใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 ต่อไป

7. การถ่ายยีน *OSB2* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 แล้ววิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน

7.1 การชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัส

- แกะเปลือกเมล็ดแก่ของข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65
- นำเมล็ดที่แกะเปลือกใส่ในหลอดพลาสติก และฟอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที
- ฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium hypochlorite เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30-35 มิลลิลิตร
- ทำการฟอกฆ่าเชื้อโดยนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเทสารละลายทิ้ง
- ล้างเมล็ดข้าวด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 4-5 ครั้ง ครั้งละประมาณ 35-40 มิลลิลิตร โดยล้างเอาเยื่อหุ้มเมล็ดออกให้หมด
- ซับเมล็ดข้าวให้แห้งบนกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- วางเมล็ดข้าวบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส N6D โดยให้ส่วนของเอ็มบริโออยู่บนผิวของอาหาร โดยวางประมาณ 15 เมล็ดต่อจานเพาะเลี้ยง
- นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 สัปดาห์ แล้วเตรียมแคลลัสสำหรับการถ่ายยีน โดยคัดเลือกแคลลัสที่มีลักษณะสีเหลืองอ่อน กลม และแน่น ย้ายไปยังอาหารใหม่สูตร N6D และเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

7.2 การเตรียมอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPI01_B2S

- นำอะโกรแบคทีเรียมมา streak บนอาหารสูตร LB ที่มีไรแฟมพิซินและกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
- เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

- นำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติมกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะซิโตไซริงกอน ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

- นำไปเลี้ยงในที่มืด เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

- วัดค่าความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

- ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนอะโกรแบคทีเรียม โดยเทสารแขวนลอยอะโกรแบคทีเรียมลงในหลอดพลาสติก และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- เทส่วนใสทิ้ง และละลายตะกอนกลับด้วยอาหารเหลวสูตร 2N6 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

- เจือจางความเข้มข้นของสารแขวนลอยอะโกรแบคทีเรียมสำหรับการถ่ายยีนให้ได้ ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.15 ด้วยอาหารเหลวสูตร 2N6 ให้ปริมาตรสุดท้าย 35 มิลลิลิตร และเติมอะซิโตไซริงกอน ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

7.3 การถ่ายยีนและทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยวิธี GUS assay

ขั้นตอนการบุกรุกเชื้อและการเพาะเลี้ยงร่วม

- ย้ายแคลลัสลงในตะแกรง เติมสารแขวนลอยอะโกรแบคทีเรียมลงไป แล้วทำการบุกรุกเชื้อเป็นเวลาประมาณ 90 วินาที

- วางตะแกรงบนกระดาษซับ เพื่อซับเอาอะโกรแบคทีเรียมส่วนเกินออก เพาะเลี้ยงแคลลัสร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมบนอาหารสูตร 2N6 ที่มีอะซิโตไซริงกอน ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ขั้นตอนการล้างแคลลัสเพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรียมและคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน

- นำแคลลัสหลังจากการเพาะเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมใส่ในหลอดพลาสติก

- เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 35-40 มิลลิลิตร จากนั้นกลับหลอดไปมา โดยล้างน้ำกลั่นประมาณ 5 ครั้ง หรือจนกว่าน้ำกลั่นที่ล้างจะใส

- ล้างแคลลัสครั้งสุดท้ายด้วยอาหารเหลวสูตร 2N6 ที่มีไทเมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

- เทแคลลัสลงในตะแกรง แล้วซับบนกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว

- วางแคลลัสบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 1 สูตร N6D ที่มีไทเมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มีแสง อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

- ย้ายแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 1 ไปยังอาหารใหม่สูตร N6D ที่มีไทเมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มีแสง อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยวิธี GUS assay

- นำแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมเป็นเวลา 3 วัน และล้างเอาอะโกรแบคทีเรียมส่วนเกินออกแล้ว ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย X-gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide) ให้ท่วมเนื้อเยื่อแคลลัส

- นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- ล้างแคลลัสด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์

- เก็บข้อมูลและบันทึกผลการทดลองโดยบันทึกจำนวนแคลลัสที่ทดสอบทั้งหมด และจำนวนแคลลัสที่เกิดสีฟ้า แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่พบจุดสีฟ้า

7.4 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน และชักนำให้เกิดต้น

คัดเลือกแคลลัสหลังจากการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกสูตร N6D ที่มีไทเมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และย้ายแคลลัสที่รอดไปยังอาหารใหม่สูตร N6D ที่มีไทเมนทินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มีแสง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และบันทึกจำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือก

ชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้น โดยย้ายแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 ไปยังอาหารสูตรชักนำเกิดต้น ซึ่งเป็นอาหารสูตร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายแคลลัสไปยังอาหารใหม่สูตรเดิม ทุกๆ 2 สัปดาห์ จนกว่าจะได้ต้น

เมื่อได้ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน ย้ายไปยังอาหารสูตร MS ดัดแปลง เพื่อชักนำให้เกิดราก เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายต้นข้าวปลูกในกระถาง เพาะเลี้ยงในโรงเรือนกระจก

7.5 การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับจากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าว แล้วนำมาเป็นแม่พิมพ์ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OSB2* คือ OSB2cdsF และ OSB2cdsR ซึ่งได้ PCR product ขนาดประมาณ 1,300 bp โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2x Go Taq® Green Master Mix	1X	10
10 µM OSB2cdsF	0.5 µM	1
10 µM OSB2cdsR	0.5 µM	1
DNA Template (เจือจาง 1:5)	-	1
dH_2O	-	7
รวม	-	20

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
Annealing	68 องศาเซลเซียส	3 นาที	
Extension	68 องศาเซลเซียส		
Final Extension	68 องศาเซลเซียส	5 นาที	

วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค gel electrophoresis ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปเจลภายใต้แสงยูวี สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,300 bp

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุล อาคารจุฬาภรณ์ หลักสูตรวิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

โรงเรือนกระจก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

เริ่มดำเนินการ 1 ตุลาคม 2554

สิ้นสุด 31 พฤษภาคม 2557