

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 สายพันธุ์พืชที่ใช้ในการทดลอง

1.1.1 กล้วยไม้หวายเอื้องสกุล

1.1.2 กล้วยไม้หวายแจกเกอลินโทมัส

1.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.1 ตู้ปลอดเชื้อ พร้อมตะเกียง

1.2.2 มีดและใบมีดผ่าตัด

1.2.3 ปากคืบ

1.2.4 เอธานอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

1.2.5 จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.6 ขวดแก้วรูปชมพู่(flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

1.2.7 ขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.8 ซ้อนตักโปรโตคอร์ม

1.2.9 ผ้าสำหรับเช็ดทำความสะอาดซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

1.2.10 ฟอยล์

1.2.11 เครื่องเขย่า

1.2.12 เตามไโครเวฟ

1.2.13 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้ออัตโนมัติ (autoclave)

1.2.14 พาราฟิล์ม

1.3 อาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษา

1.3.1 อาหารสังเคราะห์สูตรที่ใช้ขยายโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีน โทมัสและเฮยสกูล ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MSVW คือ อาหารเหลวสูตรดัดแปลง VW ที่เติมวิตามินของสารอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมน้ำตาล 20 กรัม น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร และแคลเซียมไตรฟอสเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 ผสมกับอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมและปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.7-5.8

1.3.2 อาหารสังเคราะห์สูตรที่ใช้ปรับสภาพโปรโตคอร์มก่อนถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาค ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MSM คือ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมน้ำตาล แมนนิทอล 0.8 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร และวุ้นผง 8 กรัมต่อลิตร

1.3.3 อาหารสังเคราะห์สูตรที่ใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อหลังการถ่ายยีน ได้แก่ อาหารสังเคราะห์ MSH คือ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

1.3.4 อาหารสังเคราะห์สูตรชักนำให้เป็นต้น ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตร MS

2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตัดต่อยีน

2.1 สายพันธุ์แบคทีเรีย

แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ XL1-Blue

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดต่อยีน

2.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.2.2 หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.2.3 ไมโครปิเปต (micropipette) พร้อมทิพ (tip) ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.2.4 เตาไมโครเวฟ (microwave oven)

2.2.5 นาฬิกาจับเวลา (timer)

2.2.6 ไขมีดผ่าตัด

2.2.7 แวนตากันแสงอัลตราไวโอเลต

- 2.2.8 หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 2.2.9 เทอร์โมมิเตอร์
- 2.2.10 ตู้ปลอดเชื้อพร้อมอุปกรณ์ ได้แก่ เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แท่งแก้วสำหรับกระจายเชื้อ (spreader) และตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2.2.11 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
- 2.2.12 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้แก่ ถาดเจล หัว และ electrophoresis chamber
- 2.2.13 เครื่อง Digital Gel Documentation และ Analysis System (SYSGENE)
- 2.2.14 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge)
- 2.2.15 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge)
- 2.2.16 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
- 2.2.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้ (water bath)
- 2.2.18 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator shaker)
- 2.2.19 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator)
- 2.2.20 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงอัตราไวโอเลต (spectrophotometer)
- 2.2.21 เครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (automatic DNA sequencer)
- 2.2.22 เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Mastercycler[®] gradient, บริษัท Eppendorf)

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการตัดต่อยีน

- 2.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
 - 2.3.1.1 อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตร Luria-Bertani Broth (LB; Bacto tryptone 10 กรัม Bacto yeast extract 5 กรัม และ NaCl 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ)
 - 2.3.1.2 อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตร Luria-Bertani Agar (LA; LB 1 ลิตร ที่เติมวุ้นผง 15 กรัม)
 - 2.3.1.3 อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตร SOC (Bacto tryptone 20 กรัม Bacto yeast extract 5 กรัม และ NaCl 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร แล้วเติม 250mM KCl 10 มิลลิลิตร)

2.3.2 สารปฏิชีวนะ

2.3.2.1 แอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ampicillin sodium salt, บริษัท Sigma)

2.3.2.2 กานามัยซิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (kanamycin sulfate, บริษัท Fluka)

2.3.3 พลาสมิด (Plasmid)

2.3.3.1 พลาสมิดที่มีขึ้นที่ต้องการ ดังตารางที่ 4

2.3.3.2 พลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอเวกเตอร์ในการถ่ายยีนซึ่งมีโปรโมเตอร์ เทอร์มิเนเตอร์ และยีนคัดเลือก (selectable marker gene) ดังตารางที่ 4

2.3.4 สารละลาย GTE (50mM glucose, 25mM Tris-HCl, pH8.0 และ 10mM EDTA) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.3.5 สารละลาย glycerol 30 เปอร์เซ็นต์

2.3.6 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (10M NaOH)

2.3.7 สารละลาย SDS (sodium dodecyl sulfate) 10 เปอร์เซ็นต์ ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.3.8 สารละลายโพแทสเซียมอะซิเตท (3M potassium acetate) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.3.9 สารละลาย phenol: chloroform (1: 1, V/V)

2.3.10 ไอโซโพรพานอล (isopropanol)

2.3.11 เอทานอล

2.3.12 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

2.3.13 สารละลายบัฟเฟอร์ TE (10mM Tris-HCl, pH8.0 และ 1mM EDTA) ที่นึ่งฆ่าเชื้อ

2.3.14 น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.3.15 สารละลาย 1X TAE buffer (4mM Tris acetate และ 0.1mM EDTA) ที่นึ่งฆ่าเชื้อ

2.3.16 สารละลาย 6X loading dye (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene- cyanol และ 30% glycerol ละลายในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว)

2.3.17 เจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8เปอร์เซ็นต์ (อะกาโรส 0.8 กรัม ละลายใน 1X TAE buffer 100 มิลลิลิตร)

2.3.18 สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3.19 Gene Clean Kit (บริษัท Bio101)

2.3.20 TSS (LB, 10% (w/v) PEG, 5% (v/v) DMSO, 50 mM MgCl₂)

2.3.21 อนุเอนม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

2.3.21.1 *Kpn* I พร้อมบัฟเฟอร์ (บริษัท Promega)

2.3.21.2 *Xba* I พร้อมบัฟเฟอร์ (บริษัท Promega)

2.3.21.3 *Hind* III พร้อมบัฟเฟอร์ (บริษัท Promega)

2.3.21.4 *EcoR* I พร้อมบัฟเฟอร์ (บริษัท Promega)

2.3.21.5 *Pst* I พร้อมบัฟเฟอร์ (บริษัท Fermentus)

2.3.21.6 *Sma* I พร้อมบัฟเฟอร์ (บริษัท Fermentus)

2.3.21.7 *Nco* I พร้อมบัฟเฟอร์ (บริษัท Fermentus)

2.3.22 เอนเอนม์ไลเกส (T4 DNA ligase) พร้อมบัฟเฟอร์ (บริษัท Promega)

ตารางที่ 2 พลาสมิดที่มีอินที่ดองการและพลาสมิดที่ใช้เป็นคเอนเอนเวคเอนรเอนการถ่ายยเอน

พลาสมิด	ยเอน	โพรโอมเอนรเอน	เอนรับความอนุเอนเอนห้จาก
pCYP75B4	<i>f3</i> <i>h</i>		Prof. Kazuki Saito
pP450CRFRED	<i>f3</i> <i>5</i> <i>h</i>		Prof. Dr. Joachim Schroeder
pTG0063	-	Actin-1	Richard Jefferson, CAMBIA
pMNK1005	<i>hptII</i>	Ubi-1	CSIRO, Plant industry
pREXH-1	<i>hptII</i>	CaMV35S	

3. อุปกรณ์และสารเคมเอนที่ใช้ในการถ่ายยเอน

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายยเอนโดยเอนรเอนยเอนอนุภาค

3.1.1 เอนรเอนยเอนอนุภาค (Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System, บริษัท Bio-Rad)

3.1.2 Rupture disk 1,100 psi (บริษัท Bio-Rad)

3.1.3 Macrocarrier (บริษัท Bio-Rad)

3.1.4 Stopping screen (บริษัท Bio-Rad)

3.1.5 เอนรเอนกเอนนคเอนลเอนเสยขความถเอนสูง (sonicator)

3.1.6 หลอดไมโครเอนนคเอนรเอนฟวเอนจขนาด 1.5 มลลเอนลเอนร ที่ผ่านการนเอนงเอนเอนเอนเอนเอน

- 3.1.7 ไมโครปิเปต พร้อมทิว ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- 3.1.8 ตู้ปลอดเชื้อพร้อมตะเกียงและปากคีบ
- 3.1.9 ถังก๊าซฮีเลียม
- 3.1.10 ปีมล
- 3.1.11 เครื่องผสมสาร
- 3.1.12 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้
- 3.1.13 นาฬิกาจับเวลา
- 3.1.14 กระตักน้ำแข็ง
- 3.1.15 ผ้าสำหรับเช็ดทำความสะอาดซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- 3.1.16 พาราฟิล์ม

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาค

- 3.2.1 อนุภาคทองขนาด 1.5-3.0 ไมโครเมตร (บริษัท Aldrich)
- 3.2.2 พลาสมิด pF3'HTG4 (A), pF3'HPREXH2 (A), pF3'5'HTG24 (S)
- 3.2.3 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (2.5M CaCl_2)
- 3.2.4 สารละลาย 1M Spermidine
- 3.2.5 สารละลาย polyethylene glycol (m.w.1450) 25 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.6 สารละลาย 10X DNA loading buffer (150 mM NaCl และ 10 mM Tris-HCl pH

8.0)

- 3.2.7 เอทานอลบริสุทธิ์
- 3.2.8 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.9 น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบผลการถ่ายยีน

4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบผลการถ่ายยีน

- 4.1.1 โกร่งบดยา
- 4.1.2 ช้อนตัก

- 4.1.3 หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 4.1.4 ไมโครปิเปต (micropipette) พร้อมทิพ (tip) ซึ่งนั่งฆ่าเชื้อแล้ว
- 4.1.5 กล่องโฟม
- 4.1.6 ปีกเกอร์
- 4.1.7 กระตักสำหรับใส่ไนโตรเจนเหลว
- 4.1.8 ปากคีบ
- 4.1.9 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ
- 4.1.10 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง
- 4.1.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้
- 4.1.12 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้แก่ ถาดเจล หัว และ

electrophoresis chamber

- 4.1.13 เครื่อง Digital Gel Documentation และ Analysis System (SYSGENE)
- 4.1.14 เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Mastercycler[®] gradient, บริษัท Eppendorf)
- 4.1.15 กล่องพลาสติก
- 4.1.16 ปากคีบปลายแบน
- 4.1.17 เครื่องเขย่า (rocking platform)
- 4.1.18 แผ่นไนลอน Hybond[™] N+ hybridization transfer membrane (บริษัท

Amersham Biosciences)

- 4.1.19 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator)
- 4.1.20 ตู้อบสำหรับไฮบริไดเซชัน (hybridization oven)
- 4.1.21 ฟิล์ม X-omat[™] (บริษัท Kodak)
- 4.1.22 เครื่องซังสาร
- 4.1.23 แผ่นฟิล์มพลาสติก (wrap)
- 4.1.24 นาฬิกาจับเวลา
- 4.1.25 กระดาษกรอง 3 M
- 4.1.26 ถังมือยาง
- 4.1.27 ถังพลาสติกใส

4.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากพืช

4.2.1 ไนโตรเจนเหลว

4.2.2 Sabai Kit (Plant Molecular Biology Laboratory ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

4.2.3 สารละลายคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol) อัตราส่วน 24 : 1

4.2.4 ไอโซโพรพานอล (isopropanol)

4.2.5 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

4.2.6 สารละลายบัฟเฟอร์ TE (10mM Tris-HCl, pH8.0 และ 1mM EDTA)

4.2.7 เอนไซม์ RNase (DNase free) ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำพีจีอาร์

4.3.1 สารละลาย 10mM dNTP (deoxy nucleotide triphosphate, บริษัท Promega)

4.3.2 สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (25mM MgCl₂, บริษัท Perkin Elmer)

4.3.3 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase II พร้อมบัฟเฟอร์ (บริษัท Finenzyme)

4.3.4 เอนไซม์ *i-Taq* DNA polymerase พร้อมบัฟเฟอร์ (บริษัท iNtRON Biotechnology)

4.3.5 เอนไซม์ pfu DNA polymerase พร้อมบัฟเฟอร์ (บริษัท Fermentus)

4.3.4 ไพรมเมอร์ (primer) ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ดังตารางที่ 5

4.4 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Southern hybridization

4.4.1 สารละลาย depurination (0.25M HCl)

4.4.2 สารละลาย denaturation (1.5M NaCl และ 0.5M NaOH)

4.4.3 สารละลาย neutralization (1.5M NaCl และ 0.5M Tris-HCl, pH7.5)

4.4.4 Gene Images Random Prime Labeling Kit (บริษัท Amersham Biosciences)

4.4.5 สารละลาย hybridization buffer (5x SSC, 0.1% SDS, 5% dextran sulphate และ 5% liquid block (บริษัท Amersham Biosciences))

4.4.6 สารละลาย 10x SSC

4.4.7 สารละลาย 2x SSC

4.4.8 สารละลาย buffer A, pH9.5 (0.1 M Tris-HCl และ 0.3 M NaCl)

4.4.9 พลาสมิด pF3'HTG4 (A), pF3'HPREXH2 (A), pF3'5'HTG24 (S) และ pMNK1005

4.4.10 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* (บริษัท Promega) *XbaI* และ *NcoI* (บริษัท Fermentus)

4.4.11 Gene Images CDP-starTM Detection Kit (บริษัท Amersham Biosciences)

4.4.12 สารละลาย developer และสารละลาย fixer สำหรับล้างแผ่นฟิล์ม

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับเบส
1. <i>f3'h</i>	F3'H(S) 182	5'-AACTAGTATGATCAGTGCCGCCGT-3'
	F3'HPer(A) 227	5'-CATTCCACCGTGCTAGATG-3'
2. <i>f3'5'h</i>	F3'5'H(S) 207	5'-TTCTAGACACCATGGCGGTCTTTTT-3'
	F3'5'H(A) 206	5'-AGACCCGGGTCAAGGAGAATAAG-3'
3. <i>Actin -1</i>	Actin1(S) 101	5'-GTGCTATGCACGATCCATACAAG-3'
4. <i>nos</i>	Nos(A) 188	5'-GAGGATTCAATCTTAAGAACTT-3'
5. <i>hptII</i>	HPT(S) 135	5'-ATGTCCTGCGGGTAAATAGC-3'
	HPT(A) 136	5'-GCCTCCAGAAGAAGATGTTG-3'

วิธีการ

1. การเตรียมเนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่ใช้ในการทดลอง

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หวายแจกเกอลินโทมัสและกล้วยไม้หวายเอียสกุลระยะโปรโตคอร์มในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ผสมกับอาหารสังเคราะห์ MS อย่างละครึ่ง เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยทำการแบ่งเนื้อเยื่อโปรโตคอร์มย้ายลงอาหารใหม่ทุก ๆ 2 สัปดาห์

ก่อนทำการถ่ายยีนให้เลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MSM คืออาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมน้ำตาลแมนนิทอล 0.8 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลทราย 2 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.8 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มแรงดันออสโมติก โดยวางเรียงเป็นกลุ่มรูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 เซนติเมตร นาน 1 วัน แล้วนำไปใช้ในการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค

หลังการคัดเลือกโปรโตคอร์มที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ชักนำโปรโตคอร์มให้เป็นต้นโดยนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2. การตัดต่อยีน

2.1 การตัดต่อยีน $f3'h$ เข้ากับเวกเตอร์ในรูปแบบ antisense orientation

ยีน $f3'h$ คือ ยีนที่สำคัญในการสังเคราะห์เอนไซม์ Flavonoid-3'-hydroxylase ($F3'H$) ซึ่งสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เกิดกระบวนการสร้างอนุพันธ์ cyanidin ที่ทำให้เกิดการสร้างสารสีแดงในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ดังนั้นจึงทดลองยับยั้งการสร้างเอนไซม์ $F3'H$ เพื่อคาดหวังว่าจะสามารถยับยั้งวิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cyanidin แล้วเปลี่ยนวิธีไปทำให้เกิดการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ delphinidin แทน โดยการถ่ายยีน $f3'h$ ในทิศทาง antisense เข้าไปในกล้วยไม้ ยีน $f3'h$ ที่ใช้ในการทดลองนี้มีขนาด 1,572 คู่เบส เป็นยีนที่นำมาจากพืชฤาษีผสม (*Perilla*

frutescens) ที่อยู่ในพลาสมิด pCYP75B4 ซึ่งเกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *KpnI* ด้านปลาย 5' และ *XbaI* ด้านปลาย 3' เชื่อมต่อกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pBluescript SK⁻ (Kitada *et al.*, 2001)

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการตัดต่อยีน *f3'h* เข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ที่สามารถแสดงออกได้ในพืช 2 ชนิด คือ pTG0063 และ pREXH-1 ซึ่งดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ Act-1 เทอร์มิเนเตอร์ nos และมียีนต้านทานแอมพิซิลินเป็นยีนคัดเลือกในแบคทีเรีย ดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ CaMV 35S จำนวน 7 ชุด เทอร์มิเนเตอร์ nos มียีนต้านทานสารไฮโกรมัยซินเป็นยีนคัดเลือกในพืชและยีนต้านทานแอมพิซิลินเป็นยีนคัดเลือกในแบคทีเรีย ทำการตัดต่อยีน *f3'h* เข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ทั้ง 2 เวกเตอร์ในทิศทาง antisense ตามหลักการโคลนยีนวิธีของ Sambrook *et al.* (1989) โดยการนำพลาสมิด pCYP75B4 ดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 และดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *XbaI* (บริษัท Promega) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำพลาสมิดที่ตัดแล้วไปแยกขนาดด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส ตัดเจลบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยมีดที่สะอาด นำเจลที่ได้ไปสกัดเอาดีเอ็นเอออกโดยใช้ UltraCleanTM Kit (บริษัท Mo. Bio. Laboratories) ตามวิธีข้อ 2.3 ตรวจสอบปริมาณของชิ้นยีน *f3'h* และชิ้นดีเอ็นเอเวกเตอร์ที่สกัดออกจากเจลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วทำการต่อชิ้นยีนเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 และดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (บริษัท Promega) ตามวิธีข้อ 2.5 หลังจากนั้นนำพลาสมิดสายผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ด้วยวิธี Heat shock transformation เหมือนดังวิธีในข้อ 2.7 โดยคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดสายผสมบนอาหาร LA ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ได้มาเพิ่มปริมาณและแยกพลาสมิดด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์มเพื่อคัดเลือกโคลนอย่างคร่าว ๆ แล้วจึงนำโคลนที่มีพลาสมิดสายผสมที่ต้องการมาแยกพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis เพื่อใช้ในการตรวจสอบต่อไป

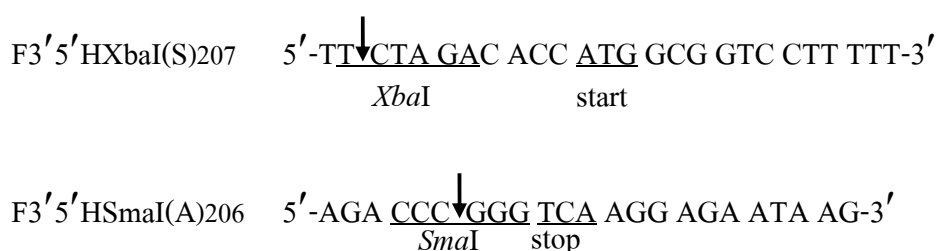
2.2 การตัดต่อยีน *f3'5'h* เข้ากับเวกเตอร์ในรูปแบบ sense orientation

ยีน *f3'5'h* เป็นยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ Flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างแอนโทไซยานิดินชนิด delphinidin ซึ่งกำหนดการสร้างสีดอกไม้สีน้ำเงินหรือสีม่วง (Shimada, 1999) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการทดลองถ่ายยีน *f3'5'h* ใน

ทิศทาง sense เข้าไปในกล้วยไม้ เพื่อคาดหวังว่ายีนที่ถ่ายเข้าไปนี้จะมีการแสดงออกโดยการผลิต เอนไซม์ F3'5'H ซึ่งจะไปทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ delphinidin ยีน *f3'5'h* ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้นำมาจากแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) มีขนาด 1,529 คู่เบส อยู่ในพลาสมิด pP450CRFRED ซึ่งตำแหน่งเริ่มต้นของการแปลรหัส (start codon) ด้านปลาย 5' ได้รับการดัดแปลงเปลี่ยนตำแหน่งไปและเพิ่มตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *NcoI* เช่นเดียวกันด้านปลาย 3' ได้รับการดัดแปลงตัดส่วนของรหัสหยุดการแปล (stop codon) ออกไป และเพิ่มตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *SaI* เพื่อใช้ติดต่อกับยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ P450 reductase ขนาดประมาณ 2,318 คู่เบส (Kaltenbach *et al.*, 1999)

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการตัดต่อยีน *f3'5'h* ในทิศทาง sense เข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 ซึ่งประกอบด้วยโปรโมเตอร์ Act-1 เทอร์มิเนเตอร์ nos และมียีนต้านทานแอมพิซิลินเป็นยีนคัดเลือกในแบคทีเรีย โดยทำตามหลักการโคลนยีนวิธีของ Sambrook *et al.* (1989) เช่นเดียวกับการตัดต่อยีน *f3'h* แต่เนื่องจากยีน *f3'5'h* ในพลาสมิด pP450CRFRED ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตัดต่อเข้ากับเวกเตอร์ TG0063 อีกทั้งด้านปลาย 5' และ 3' ของยีน *f3'5'h* มีการดัดแปลงไปดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์ให้มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ที่เหมาะสม (ภาพที่ 4) ซึ่งสามารถนำไปใช้ตัดต่อเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ดังกล่าวได้ ในการออกแบบครั้งนี้ไพรเมอร์ด้านปลาย 5' คือ F3'5'H *XbaI*(S)(207) ออกแบบให้มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *XbaI* และรหัสของ start codon เดิมอยู่ด้วย และไพรเมอร์ด้านปลาย 3' คือ F3'5'H *SmaI*(A)(206) ออกแบบให้มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *SmaI* และรหัสของ stop codon นำไพรเมอร์นี้ไปใช้เพิ่มปริมาณชิ้นยีน *f3'5'h* ในพลาสมิด pP450CRFRED ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในชุดน้ำยาของ Taq DNA Polymerase II (บริษัท Finenzyme) ซึ่งสารละลายรวมประกอบด้วยพลาสมิด pP450CRFRED10 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer ที่มี $MgCl_2$ 10 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ sense 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ antisense 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ DNA Polymerase II 2 ไมโครลิตร และเติมน้ำจนมีปริมาตรครบ 100 ไมโครลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Mastercycler[®] gradient (บริษัท Eppendorf) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ, 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ, 72 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วนำมาตรวจสอบความถูกต้องโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *NcoI* จากนั้นนำมาใช้ในการตัดต่อเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์โดยการนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ

SmaI แล้วเชื่อมต่อกับคิเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันโดยเอนไซม์ T4 DNA ligase หลังจากนั้นนำพลาสมิดสายผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ด้วยวิธี heat shock transformation คัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดสายผสมบนอาหาร LA ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำโคโลนีที่ได้มาเพิ่มปริมาณและแยกพลาสมิดด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์มเพื่อคัดเลือกโคลนอย่างคร่าว ๆ แล้วจึงนำโคลนที่มีพลาสมิดสายผสมที่ต้องการมาแยกพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis



ภาพที่ 4 ไพรมเมอร์ F3'5'H XbaI(S)(207) และไพรมเมอร์ F3'5'HSmaI(A)(206)

2.3 การสกัดคิเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลโดยวิธี UltraClean™ Kit (บริษัท Mo. Bio. Laboratories)

แยกขนาดคิเอ็นเอที่ตัดเอนไซม์ไว้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่สะอาด เมื่อนำมาส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตให้ใช้มีดที่สะอาดตัดแถบคิเอ็นเอขนาดที่ต้องการออกจากอะกาโรสเจล โดยตัดให้แนบชิดกับขอบแถบคิเอ็นเอที่ต้องการให้มากที่สุด อย่าให้เจลดิดมามาก แล้วนำไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้ชุดน้ำยาสกัดคิเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ Ultra salt 3 เท่า ละลายอะกาโรสเจลนำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมดแล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เขย่า Ultra bind ด้วยเครื่องเขย่าประมาณ 1 นาที ให้ silica กระจ่ายตัวสม่ำเสมอ ดูดมาใช้ 6 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดแล้วเกาะผสมให้ silica กระจ่ายตัวสม่ำเสมอทั่วทั้งหลอดเพื่อจับกับคิเอ็นเอ ตั้งบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ตกตะกอนด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้งให้หมด ล้างตะกอนด้วย Ultra wash 1 มิลลิลิตร โดยการเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าประมาณ 5-10 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้งให้หมด (ถ้าคิเอ็นเอมีขนาดมากกว่า 15 กิโลเบสให้

บ่มไว้ก่อน 5 นาทีแล้วจึงนำมาตกตะกอน) ล้างตะกอนด้วย Ultra wash 1 มิลลิลิตร ซ้ำอีกครั้ง แล้วตกตะกอนให้แห้งประมาณ 5-10 นาที ละลายดีเอ็นเอออกจากตะกอนโดยการเติม TE buffer ประมาณ 15-30 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นดูดลง บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูสารละลายส่วนบนเก็บใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่โดยไม่ให้ silica ติดมาด้วย แบ่งดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส

2.4 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ที่มีโปรโมเตอร์ เทอร์มินเตอร์ และยีนคัดเลือกที่เหมาะสม โดยการใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (2.5 ยูนิตต่อ 100 ไมโครลิตร) (บริษัท Promega) ด้วยอัตราส่วนปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ 3 ไมโครกรัมต่อดีเอ็นเอพาหะ 1 ไมโครกรัม ใน 1x reaction buffer แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียสข้ามคืน

2.5 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านสำหรับเพิ่มปริมาณพลาสมิดโดยใช้สารละลาย TSS

เลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ที่ได้จากโคลนนิ่งเดี่ยวในหลอดแก้วซึ่งบรรจุอาหาร LB broth 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำเชื้อ 1 มิลลิลิตรไปเลี้ยงต่อใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร LB broth 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.4-0.6 นำแบคทีเรียที่ได้มาเทใส่หลอดกั่นกลมขนาด 50 มิลลิลิตรที่แช่เย็น แล้วแช่น้ำแข็งนาน 20 นาที ตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารทิ้ง เติม 0.5-1 มิลลิลิตรของ TSS (Transformation and storage solution) (LB, 10% (w/v) PEG, 5% (v/v) DMSO, 50 mM MgCl₂) ที่เย็น 4 องศาเซลเซียส เขย่าเบา ๆ ให้เซลล์กระจายทั่ว ๆ และทำให้เซลล์เย็นอยู่ตลอดเวลาด้วยการแช่น้ำแข็ง แบ่ง competent cell 100 ไมโครลิตรใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.6 การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านโดยวิธี heat shock transformation

เติมพลาสมิดสายผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ต้องการกับเวกเตอร์จำนวน 10-20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มี competent cell 100 ไมโครลิตร ที่แช่เย็นอยู่ตลอดเวลา ผสมให้เข้ากันและแช่ในน้ำแข็งนาน 15-30 นาที นำไปจุ่มในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แล้วรีบนำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 15 นาที นำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร SOC (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ และ 20 mM glucose) จำนวน 800 ไมโครลิตรในหลอดแก้ว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วนำมาเทใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทอาหารส่วนบนทิ้งให้เหลือประมาณ 200 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นดูกลงให้เซลล์กระจายสม่ำเสมอ แล้วนำมาเกลี่ยลงบนอาหาร LA ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินหรือกานามัยซินขึ้นอยู่กับอินด้านทานของพลาสมิดสายผสมจำนวน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.7 การสกัดพลาสมิดโดยวิธี phenol choloform extraction

นำโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวซึ่งคาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร LA ที่ผสมแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยโคโลนีขึ้นมาจัดเป็นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ นำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ขูดเซลล์แบคทีเรียใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มี TE 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเติมฟีนอลคลอโรฟอร์ม (1:1 โดยปริมาตร) 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที นำสารละลายส่วนบน 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับเวกเตอร์ที่เป็นพาหะก่อนได้รับการเชื่อมต่อซันดิเอ็นเอเข้าไป

2.8 การสกัดพลาสมิดโดยวิธี Alkaline lysis

เลี้ยงแบคทีเรียที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่ต้องการในอาหาร LB broth 2 มิลลิลิตร ที่ใส่สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์โดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 2-3 นาที เทอาหารส่วนบนออก เติม 200 ไมโครลิตรของ GTE (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) เติมสารละลาย fresh lysis (0.2 N NaOH + 1 % SDS = 1:1) ที่เตรียมใหม่ก่อนใช้ 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับลดไปมา แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที เติม 3 M potassium acetate ที่เย็น 300 ไมโครลิตร กลับลดไปมาให้เข้ากัน แช่น้ำแข็งนาน 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนประมาณ 700 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอลประมาณ 0.6 เท่าของสารละลายที่ดูดมา บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ประมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เทเอทานอลทิ้งและดูดออกให้หมด ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-10 นาที แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ประมาณ 20-30 ไมโครลิตร

2.9 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ใช้สารละลายดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ loading dye ความเข้มข้น 6 เท่า แล้วตรวจสอบด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วยสารเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที แช่ในน้ำกลั่นนาน 10 นาที แล้วนำมาตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3. การตรวจสอบพลาสมิดสายผสม

3.1 การตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้ว่าทำการตัดต่อยีนที่ต้องการเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ได้หรือไม่และเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ในทิศทางใด โดยการใช้พลาสมิด 1 ไมโครลิตร ผสมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ 0.5 ไมโครลิตร ใน 10 x

buffer ตามที่บริษัทแนะนำ 1 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตรวจสอบพลาสมิดสายผสมที่ได้จากการตัดต่อยีน *f3'h* เข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* เพื่อตรวจสอบขนาดของพลาสมิดสายผสมที่ได้ และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *XbaI* เพื่อตรวจสอบขนาดชิ้นยีนที่ต่อเข้าไป ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* เพื่อตรวจสอบทิศทางของยีนที่ต่อเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์

ตรวจสอบพลาสมิดสายผสมที่ได้จากการตัดต่อยีน *f3'h* เข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* เพื่อตรวจสอบขนาดของพลาสมิดสายผสมที่ได้ และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *XbaI* เพื่อตรวจสอบขนาดชิ้นยีนที่ต่อเข้าไป ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* เพื่อตรวจสอบทิศทางของยีนที่ต่อเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์

ตรวจสอบพลาสมิดสายผสมที่ได้จากการตัดต่อยีน *f3'5'h* เข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* เพื่อตรวจสอบขนาดของพลาสมิดสายผสมที่ได้ และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *SmaI* เพื่อตรวจสอบขนาดชิ้นยีนที่ต่อเข้าไป ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* เพื่อตรวจสอบทิศทางของการต่อเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์

3.2 การตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำพลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 2 มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนที่สนใจชนิดต่างๆตามตารางที่ 5 ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ชุดน้ำยาของ *i-Taq*TM DNA Polymerase (บริษัท iNtRON Biotechnology) ซึ่งสารละลายรวมประกอบด้วยดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, Enhancer) 2 ไมโครลิตร, 2.5 mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์อย่างละ 0.4 ไมโครลิตร, *i-Taq* 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำจนมีปริมาตรครบ 20 ไมโครลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Mastercycler[®] gradient, บริษัท Eppendorf) ตรวจสอบผลที่ได้โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A) ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 กับ F3'H(S)182, F3'HPer(A)227 กับ Nos(A)188, Act1(S)101 กับ F3'H(S)182 และ Act1(S)101 กับ Nos(A)188 โดยตั้งระดับอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pF3'HPREXH2(A) ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 กับ F3'H(S)182, F3'HPer(A)227 กับ Nos(A)188 และ HPT(S)135 กับ HPT(A)136 โดยตั้งระดับอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 รอบ ยกเว้นคู่ไพรเมอร์ HPT(S)135 กับ HPT(A)136 ตั้งอุณหภูมิ annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pF3'5'HTG24(S) ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'5'HXbaI(S)207 กับ F3'5'HSmaI(A)206, Act1(S)101 กับ F3'5'HSmaI(A)206, F3'5'HXbaI(S)207 กับ Nos(A)188 และ Act1(S)101 กับ Nos(A)188 โดยตั้งระดับอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 รอบ

3.3 การตรวจสอบพลาสมิดสายผสมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A) 50 นาโนกรัม มาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (5'-GAGGATTCAATCTTAAGAAACTT-3') และ dideoxy chain termination ready reaction kit (บริษัท Perkin-Elmer สหรัฐอเมริกา) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง DNA thermal cycle 9600 ด้วยระดับอุณหภูมิดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที, 50 องศาเซลเซียส 15 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 25 รอบ หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง automatic DNA sequencer นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้บางส่วนมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนที่มีรายงานในต่างประเทศด้วยเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> เพื่อใช้เป็นข้อมูลยืนยันว่ามียีน *y3'h* ในพลาสมิดสายผสมต่อเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 ในทิศทาง antisense

4. การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

ทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินของกล้วยไม้หวายลูกผสมแจคเกอลีน โทมัสและเอชสกุลที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยนำโปรโตคอร์มจากข้อ 1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MSW นาน 2 สัปดาห์ หลังจากตัดแบ่งเนื้อเยื่อ มาตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.3 ถึง 0.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง บนอาหารสูตร MSH ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผล นำโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตมาคัดเลือกต่อบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลาอีก 4 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือกโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตมาคัดเลือกต่อบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สังเกตบันทึกผลการทดลองและถ่ายภาพเก็บไว้

5. การถ่ายยีนเข้าโปรโตคอร์มกล้วยไม้ด้วยเครื่องยิงอนุภาค

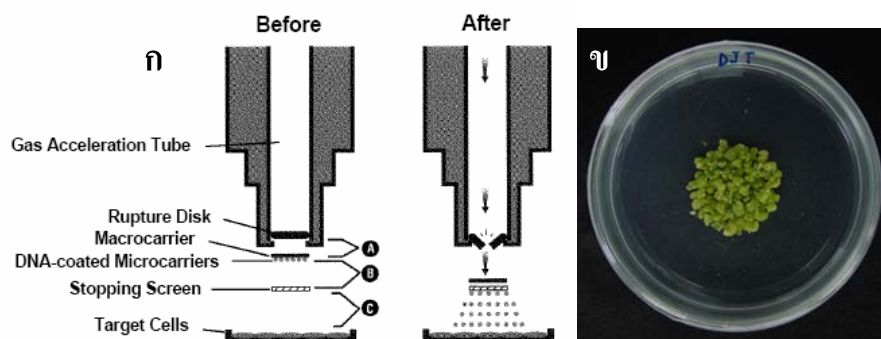
5.1 การเคลือบอนุภาค

การเคลือบอนุภาคทองด้วยพลาสติกใช้วิธีของ Christou (1991) ซึ่งสารละลายต่างๆที่ใช้ในการเคลือบอนุภาคทองนี้จำเป็นต้องแช่เย็นโดยมีขั้นตอนดังนี้ ชั่งอนุภาคทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-3.0 ไมโครเมตร จำนวน 40 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเอธานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) นาน 1 นาที หมุนเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดเอธานอลบริสุทธิ์ออก ทำซ้ำอีกครั้ง แล้วเติมเอธานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายทองใส่หลอดใหม่หลอดละ 100 ไมโครลิตร นำสารละลายมากระจายอนุภาคทอง 100 ไมโครลิตร ด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง นาน 15 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที ดูดเอธานอลออก ละลายอนุภาคทองด้วยน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วละลายอนุภาคทองด้วยพลาสติก 40 นาโนกรัม ที่ผสมกับบัฟเฟอร์ 10X loading DNA 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย 1M spermidine 2 ไมโครลิตร และสารละลาย 25

เปอร์เซ็นต์ PEG 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 2.5 M CaCl_2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างน้อย 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างอนุภาคทองด้วยเอธานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วละลายอนุภาคทองด้วยเอธานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งจะนำไปใช้ในการยิงอนุภาค โดยใช้ยิงครั้งละ 10 ไมโครลิตร

5.2 การถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค

นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่ต้องการถ่ายยีนมาวางเป็นวงกลมตรงกลางอาหาร MS ที่มี 0.25 M mannitol ให้อยู่ในรัศมี 2.5 เซนติเมตร ก่อนทำการยิง 1 คืน ใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System โดยสภาวะที่ใช้ในการยิงอนุภาคคือใช้ความดันของก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และดูดอากาศออกจากตู้ยิงเพื่อให้เกิดสภาวะสูญญากาศที่ 25 นิ้วปรอท ซึ่งขั้นตอนในการยิงอนุภาคมีดังต่อไปนี้ ล้าง rapture dish ด้วย isopropanol เพื่อเป็นการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อจากนั้นวางลงใน holder เคลือบให้สนิทกับขอบ หมุน holder ให้ติดกับหัวยิง ใช้ไมโครปิเปตดูดอนุภาคทองที่เคลือบด้วยพลาสติก 10 ไมโครลิตร มาหยดและกระจายอนุภาคทองบนแผ่น macrocarrier ที่ผ่านการนั่งฆ่าเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปวางลงใน stopping plate ที่มี stopping screen นำ stopping plate ไปใส่ที่ชั้นที่ติดกับหัวยิง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่วางโปรโตคอร์มเป็นวงกลมมาไว้ที่ชั้นห่างจากหัวยิง 9 เซนติเมตร เปิดฝาจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกแล้วเปิดปั๊มดูดอากาศออกจากภายในตู้ ให้มีแรงดูดที่ 25 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว กดปุ่มยิง (fire) ค้างไว้ เมื่อถึงแรงดันที่กำหนดคือ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว rapture dish ก็จะแตกออก แรงดันจะผลักดันให้อนุภาคทองที่เคลือบผิวไว้ด้วยพลาสติกตกลงบนโปรโตคอร์ม เมื่อแรงดันที่มาตรวัดตกลง เปิดปั๊ม ventilation และรองแรงดันอากาศภายในเป็น 0 นิ้วปรอท จึงนำจานที่มีโปรโตคอร์มออกจากตู้ ภายหลังการถ่ายยีนให้นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อทำการพักฟื้นจากความบอบช้ำเป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือกต่อไป



ภาพที่ 5 ส่วนประกอบการทำงานของเครื่องยิงอนุภาค (ก) และลักษณะการวางโปรโตคอร์มก่อนนำไปถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค (ข)

5.3 การคัดเลือกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก

หลังจากถ่ายยีนเข้าโปรโตคอร์มและพักฟื้นบนอาหาร MSM ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน ให้ย้ายโปรโตคอร์มมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MSH ซึ่งเตรียมจากอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ผสมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ต่อจากนั้นย้ายโปรโตคอร์มที่มีชีวิตรอดมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MSH ที่ผสมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แล้วคัดเลือกโปรโตคอร์มที่มีชีวิตรอดมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MSH ที่ผสมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ นำโปรโตคอร์มที่มีชีวิตรอดมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ MSH ที่ผสมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 25 มิลลิกรัมต่อลิตร อีกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และเลี้ยงต่อบนอาหารที่ลดความเข้มข้นสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเหลือ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อไปอีก 4 สัปดาห์ ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS เพื่อชักนำให้พัฒนาไปเป็นต้นต่อไป เมื่อเพาะเลี้ยงชักนำต้นให้เจริญเติบโตพอที่จะตัดใบได้ จึงนำไปมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบการถ่ายยีนในขั้นตอนต่อไป

6. การตรวจสอบและวิเคราะห์ผลของการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีน

6.1 การสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้ด้วยวิธี Sabai Kit

บดตัวอย่างใบในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผง ตักใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 1 ใน 3 ของหลอด (ประมาณ 100 มิลลิกรัม ของตัวอย่าง) สกัดดีเอ็นเอด้วย Sabai Kit (Plant Molecular Biology Laboratory ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) โดยเติมบัฟเฟอร์ DA ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 500 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ DB ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารนาน 10 วินาที บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำมาตั้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เติมนิวคลีโอฟอร์มที่ผสมไอโซเอมิลแอลกอฮอล์สัดส่วน 24 ต่อ 1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารนาน 10 วินาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที คัดสารละลายใสส่วนบนประมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติมนิวคลีโอโซฟพานอลที่แช่เย็น ปริมาณ 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ 30 วินาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที คัดสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 80 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลที่เย็น ปริมาณ 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที คัดสารละลายทิ้งให้หมด ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำ 30 ไมโครลิตร

6.2 การตรวจสอบยีนที่ถ่ายเข้ากล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 5.1.1 มาตรวจสอบยีนที่ถ่ายเข้าไปด้วยด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนที่สนใจชนิดต่างๆตามตารางที่ 3 ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ชุดน้ำยาของ pfu-DNA Polymerase (บริษัท Fermentus) ซึ่งสารละลายรวมประกอบด้วยดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 0.4 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์อย่างละ 1 ไมโครลิตร, pfu 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำจนมีปริมาตรครบ 20 ไมโครลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Mastercycler[®] gradient, บริษัท Eppendorf) ตรวจสอบผลที่ได้โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตรวจสอบยีน *hptII* ด้วยคู่ไพรเมอร์ HPT(S)135 กับ HPT(A)136 โดยตั้งระดับอุณหภูมิ ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 60 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจสอบยีน *3'h* ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 กับ Nos(A)188 โดยตั้งระดับอุณหภูมิ ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 53 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจสอบยีน *3'5'h* ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'5'HXbaI(S)207 กับ F3'5'HSmaI (A)206 โดยตั้งระดับอุณหภูมิ ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 53 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 รอบ

6.3 การทำ Southern hybridization

6.3.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 5.1.1 จำนวน 30 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ใช้บัพเฟอร์ตามที่บริษัทแนะนำในปฏิกิริยารวม 30 ไมโครลิตร โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งตัดในเนื้อยีน 1 ตำแหน่งเพื่อตรวจสอบจำนวนยีนที่ถ่ายเข้าไป ดังนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน *3'h* และ *3'5'h* มาตัด 1 ตำแหน่งด้วยเอนไซม์ *XbaI* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อให้เกิดการตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ จากนั้นแบ่งดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร มาตรวจสอบการตัดของเอนไซม์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตัดอย่างสมบูรณ์แล้วจึงนำดีเอ็นเอทั้งหมดมาแยกขนาดชั้นดีเอ็นเอที่ต้องการบนเจลอะกาโรส 0.7 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TAE ที่ 4v/cm โดยแต่ละโคลนเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอจากพีชปกติและแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส และเตรียมดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชั้นดีเอ็นเอที่สนใจด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากข้อ 5.1.2 มาแยกขนาดบนเจลอะกาโรส 0.7 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส เช่นกัน

จากนั้นบันทึกภาพพร้อมกับวางไม้บรรทัดเพื่อใช้เปรียบเทียบกำลังขยายของภาพ ภายได้แสงอัลตราไวโอเลต

6.3.2 การย้ายดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรสไปสู่แผ่นในล่อนเมมเบรน

การย้ายดีเอ็นเอที่จะตรวจสอบจากเจลอะกาโรสไปสู่แผ่นในล่อนเมมเบรน โดยนำแผ่นเจลอะกาโรสที่ได้จากข้อ 5.2.1 แช่ลงในสารละลาย depurination (0.25M HCl) เขย่าเบา ๆ ด้วย rocking platform ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที หรือจนกว่าสีของ bromphenol blue จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อ เขย่าเบา ๆ 1 ครั้ง เทน้ำทิ้งแล้วเติมสารละลาย denaturation (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพจากดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อ เขย่าเบา ๆ 1 ครั้ง เทน้ำทิ้งแล้วเติมสารละลาย neutralizing (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl) จนท่วมเจล เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างเจลในสารละลาย neutralizing อีกครั้ง นาน 20 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อ เขย่าเบา ๆ 1 จากนั้นย้ายดีเอ็นเอจากเจลลงบนแผ่นในล่อนเมมเบรน Hybond™ N+ hybridization transfer membrane (บริษัท Amersham Biosciences) โดยตัดแผ่นในล่อนเมมเบรนให้มีขนาดเท่ากับเจล ย้ายดีเอ็นเอไปสู่แผ่นในล่อนโดยใช้หลักการ upward capillary transfer (Southern, 1975) โดยใช้สารละลาย 10X SSC ช่วยในการพาขึ้นดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปสู่แผ่นในล่อน นาน 18-20 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ปากคีบดึงแผ่นในล่อนเมมเบรนออกจากเจล โดยดึงจากด้านใดด้านหนึ่ง ทำเครื่องหมายตำแหน่งช่องของเจลและด้านที่สัมผัสกับเจลไว้ นำแผ่นเจลที่เหลือไปตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และจุ่มแผ่นในล่อนเมมเบรนด้วย 5X SSC นาน 5 วินาที แล้วนำไปฟุ้งบนกระดาษกรองให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำการยิดดีเอ็นเอกับแผ่นในล่อนเมมเบรนด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV-crosslinking) นาน 1 นาที แล้วอบแผ่นในล่อนเมมเบรนด้วยความร้อน 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หากยังไม่ได้นำไปทำไฮบริโดเซชันสามารถเก็บแผ่นในล่อนเมมเบรนที่ย้ายดีเอ็นเอไว้แล้วในถุงพลาสติกที่แห้งและสะอาดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.3.3 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบหรือโพรบ

เตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบหรือโพรบโดย Gene Images Random Prime Labeling Kit (RPN 3520) วิธีทำตามคำแนะนำของบริษัท Amersham Biosciences เตรียมโพรบสำหรับยีน *β3'h* โดยการนำชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส ที่ได้จากการสังเคราะห์ยีน *β3'h* ที่อยู่บนพลาสมิด pF3'HTG4(A) ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 และ Nos(A)188 ความเข้มข้น 70 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำ 10 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาทีแล้วแช่น้ำแข็งทันที นาน 5 นาที แล้วแบ่งดีเอ็นเอที่ต้ม 10 ไมโครลิตร (ประมาณ 350 นาโนกรัม) มาติดฉลากดีเอ็นเอโดยเติม nucleotide mix 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ 2.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ Klenow (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ได้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ ห่อฟอยล์แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ถ้าเก็บโพรบนานควรเติม EDTA ให้ได้ความเข้มข้น 20 mM ห่อฟอยล์แบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -30-50 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน เตรียมโพรบสำหรับยีน *β3'5'h* โดยการนำชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส ที่ได้จากการสังเคราะห์ยีน *β3'5'h* ที่อยู่บนพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'5'HXBal(S)207 กับ F3'5'HSmaI (A)206 มาเตรียมโพรบตามวิธีดังกล่าวข้างต้น และเตรียมโพรบสำหรับตรวจสอบยีน *hprtII* จากชิ้นดีเอ็นเอขนาด 550 คู่เบส ที่ได้จากการสังเคราะห์ยีน *hprtII* ในพลาสมิด pMNK1005 ด้วยคู่ไพรเมอร์ HPT(S)135 กับ HPT(A)136 ด้วยวิธีการเดียวกัน

6.3.4 การไฮบริไดเซชันโดยใช้วิธีของ Hybridization Kit (บริษัท Amersham Biosciences)

อุ่นไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์ (5x SSC, liquid block เจือจาง 20 เท่า, 0.1% SDS, 5% dextran sulphate) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ใช้ปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร ต่อตารางเซนติเมตร จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนจากข้อ 5.2.2 แช่ในสารละลาย 5x SSC ประมาณ 60 นาที ที่อุณหภูมิ 65 ให้เปียกทั่วก่อนนำมาใส่หลอดไฮบริไดเซชัน บ่มไนลอนเมมเบรนในไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เขย่าเบา ๆ 60 stokes ต่อนาที นานอย่างน้อย 30 นาที ด้วยตู้อบสำหรับไฮบริไดเซชัน (Hybridization oven) เตรียมดีเอ็นเอโพรบจากข้อ 5.2.3 ปริมาณ 12 ไมโครลิตร ผสมน้ำให้มีปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วนำมาแช่น้ำแข็งทันที นำดีเอ็นเอโพรบหมุนเหวี่ยงแบบ briefly spin ก่อนเติมโพรบลงในสารละลายไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์ที่บ่มไนลอนเมมเบรน ใช้ปิเปตดูดดีเอ็นเอโพรบใส่ในหลอดไฮบริไดเซชัน

บัฟเฟอร์อย่างรวดเร็ว เขย่าผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วรีบนำหลอดไฮบริไดเซชันใส่ตู้อบ เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเขย่าเบา ๆ ต่อที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

6.3.5 การตรวจสอบผลการไฮบริไดเซชัน

นำแผ่นในล่อนเมมเบรนออกจากไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์อย่างระมัดระวัง รีบใส่ในบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างทันที ห้ามปล่อยให้เมมเบรนแห้ง ล้างแผ่นในล่อนเมมเบรนด้วย 2x SSC ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาตร 2-5 มิลลิลิตรต่อตารางเซนติเมตร เขย่าเบา ๆ นาน 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เทบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างทิ้ง เติม liquid blocking agent เจือจาง 1 ใน 10 ด้วยบัฟเฟอร์ A (100mM Tris-HCl, 300mM NaCl, pH 9.5) ใช้สารละลายอย่างน้อย 0.75-1 มิลลิลิตรต่อตารางเซนติเมตร ของแผ่นในล่อนเมมเบรน เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง หรือจนแน่ใจว่าไม่มีฟอง เจือจาง anti-fluorescein-APconjugate 1:5,000 ด้วย 0.5 % bovine serum albumin ในบัฟเฟอร์ A เทสารละลาย liquid blocking agent ทิ้ง เติมสารละลาย Antibody conjugate ด้วยปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรต่อตารางเซนติเมตร ของแผ่นในล่อนเมมเบรน เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เทสารละลายออก เก็บไว้ใช้ครั้งต่อไป ล้างแผ่นเมมเบรนใน 0.3 % Tween20 ด้วยบัฟเฟอร์ A ปริมาตรมากเกินไปพอประมาณ 2-5 มิลลิลิตรต่อตารางเซนติเมตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที 3 ครั้ง ดึงแผ่นเมมเบรนผ่านขอบภาชนะเพื่อกำจัดน้ำส่วนเกินออก วางแผ่นเมมเบรนให้หงายขึ้นบนแผ่นพลาสติก (saran wrap) ห้ามเมมเบรนแห้ง รีบหยด CDP™ Star (บริษัท Amersham Bioscience) 30-40 ไมโครลิตรต่อตารางเซนติเมตร ของแผ่นในล่อนเมมเบรน ลงบนผิวหน้าของแผ่นในล่อนเมมเบรน ทิ้งไว้ 2-5 นาที ดึงในล่อนเมมเบรนขึ้นเพื่อให้สารละลายออกจากในล่อนเมมเบรนโดยแตะขอบในล่อนเมมเบรนกับ saran wrap ห่อในล่อนเมมเบรนด้วย saran wrap ริดสารละลายออกให้หมด ห้ามสารละลายหรือความชื้นออกมานอกห่อ วางกระดาษกรองในฟิล์มคาสเซ็ท วางแผ่นในล่อนเมมเบรนที่ห่อแล้วหงายขึ้น นำคาสเซ็ทเข้าห้องมืด แล้วประกบแผ่นในล่อนเมมเบรนด้วยแผ่นฟิล์ม X-omat™ X (บริษัท Kodak) ในที่มืดทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แต่ถ้าเป็นผลผลิตจากพีซีอาร์ยีนให้ประกบแผ่นฟิล์ม 10 วินาที นำฟิล์มออก ล้างแผ่นฟิล์มด้วยสารละลาย develop และ fixer (บริษัท Kodak) ในเวลาที่เหมาะสม ตรวจสอบภาพที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มเปรียบเทียบกับภาพที่ถ่ายเก็บไว้