

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

ถั่วฮามาต้า สายพันธุ์ เวอร์ราโน (*Stylosanthes hamata* cv. Verano)

2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ พร้อมตะเกียง มีดผ่าตัด ปากคีบ แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับทำความสะอาด

2.2 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ภาคผนวกที่ 1)

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอโรกซ์ และ Tween 20

2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น 2,4-D BA IBA

3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตัดต่อยีนและถ่ายยีนเข้าสู่พืช

3.1 แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-blue และ DH5α สำหรับใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการเพิ่มปริมาณพลาสมิด

3.2 แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 สำหรับเป็นพาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

3.3 พลาสมิด pDrive ที่มียีน VP1 พลาสมิด pBI121 และ พลาสมิด pCAMBIA1300

3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดต่อยีน

- 3.4.1 ตู้ปลอดเชื้อพร้อมอุปกรณ์
- 3.4.2 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส
- 3.4.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge)
- 3.4.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (low speed centrifuge)
- 3.4.5 เครื่องผสมสาร (vortex)
- 3.4.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้ (water bath)
- 3.4.7 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator shaker)
- 3.4.8 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator)
- 3.4.9 เครื่อง gel documentation system พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล

3.5 สารเคมีที่ใช้ในการตัดต่อยีน

- 3.5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสูตร Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวกที่ 2)
- 3.5.2 สารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก ได้แก่ ไฮโกรมัยซิน และ กานามัยซิน
- 3.5.3 สารเคมีสำหรับเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส
- 3.5.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)
- 3.5.5 เอนไซม์ไลเกส (ligase)

4. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

4.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากพืช

- 4.1.1 Tris HCl
- 4.1.2 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- 4.1.3 sodium chloride (NaCl)
- 4.1.4 sodium dodecyl sulfate (SDS)
- 4.1.5 sodium bisulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)

4.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

4.2.1 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *VP1* (ได้จากลำดับของนิวคลีโอไทด์ของไวรัสปากและเท้าเปื่อยที่รายงานใน GenBank) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 660 คู่เบส

VP1 Forward 5'GGGGGATCCACCATGACCACCTCTGCGGGTGAGTC 3'

VP1 Reverse 5'GGGTCTAGACTACTGTTTTGCGGGTGCCACAATC 3'

4.2.2 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีนคัดเลือก *hygromycin phosphotransferase (hpt)* (ได้จากลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน *hpt* ที่รายงานใน GenBank) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส

HPT-2 Forward 5'-CCTGAACTCACCGCGACG-3'

HPT-2 Reverse 5'-AAGACCAATGCGGAGCATATA-3'

4.2.3 สารละลาย 10 mM dNTP mixed

4.2.4 สารละลาย 25mM MgCl₂

4.2.5 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase พร้อมบัฟเฟอร์

5. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบแอนติบอดีต่อโปรตีน VP1 ในพืช

5.1 ชุด Mini-protein II electrophoresis cell (Biorad)

5.2 ชุด Electro-eluter Model 422 (Biorad)

5.3 ชุดสารเคมีในการย้อมสี Coomassie brilliant blue staining

5.4 nitrocellulose membrane

5.5 blocking agent และ ซีรัมหมูที่ติดเชื้อไวรัสโรคปากเท้าเปื่อย

วิธีการ

1. การเตรียมพืชที่ใช้ในการทดลอง

ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแก้วฮามาต้า โดยทดสอบ 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการชักให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส และการชักนำยอดให้เกิดราก ซึ่งเพาะเลี้ยงตามวิธีการของ กิริยา (2547) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1.1 การชักนำให้เกิดแคลลัส

ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดแก้วฮามาต้า โดยแช่เมล็ดในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที และฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยคลอโรกซ์ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (sodium hypochlorite 1.8 เปอร์เซ็นต์ (V/V)) ที่เติม tween 20 1-2 หยด แช่ 20 นาที จากนั้นฟอกด้วยคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (sodium hypochlorite 1.2 เปอร์เซ็นต์ (V/V)) ที่เติม tween 20 1-2 หยด แช่ 15 นาที ล้างด้วยน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เก็บไว้ในที่มืด 5-6 วัน จากนั้นนำออกมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 สัปดาห์ เพื่อให้ได้ต้นอ่อนที่สมบูรณ์ จากนั้นชักนำให้เกิดแคลลัสโดยตัดชิ้นส่วน hypocotyl มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.7 และเปลี่ยนอาหารทุกเดือนเพื่อให้ได้แคลลัสที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน

1.2 การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอด

ภายหลังจากการถ่ายยีนจะต้องนำแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารคัดเลือกมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดยอด ดังนั้นจึงได้ทดสอบเบื้องต้นโดยใช้แคลลัสที่ได้จากข้อ 1.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 15 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ เดือน

1.3 การชักนำให้เกิดรากจากยอดที่พัฒนามาจากแคลลัส

ตัดยอดที่ได้จากขั้นตอนที่ 1.2 ขนาดยาว 1 เซนติเมตรมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ เดือน

1.4 การย้ายปลูก

นำต้นที่มีรากสมบูรณ์จากข้อ 1.3 มาปรับสภาพ โดยนำขวดเพาะเลี้ยงมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำต้นออกมาล้างวันออกให้หมด แช่ในยาถอนรา ประมาณ 30 นาทีแล้วปลูกในกระถางที่ใส่ดินที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว รดน้ำให้ชุ่ม คลุมกระถางด้วยถุงพลาสติกประมาณ 1-2 สัปดาห์ จนกระทั่งต้นตั้งตัวได้แล้วจึงเปิดปากถุงแล้วย้ายไปปลูกในโรงเรือนเพาะชำ

2. การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้กำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* และประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการกำจัดเซลล์ถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

2.1 การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ cefotaxime

ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime (ชื่อการค้า claraxin ของบริษัทสยามฟาร์มาซูติคอล จำกัด) ที่ใช้ในการกำจัด *A. tumefaciens* ซึ่งอาจมีผลต่อการพัฒนาเป็นยอดของแคลลัสของถั่วฮามาต้า โดยการตัดแบ่งแคลลัสถั่วฮามาต้าให้มีขนาด 5x5 มิลลิเมตรหนา 2 มิลลิเมตร นำชิ้นแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0 100 200 300 400 500 และ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นนำชิ้นแคลลัสทั้งหมดย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอดตามการทดลองที่ 1.2 เป็นเวลา

3 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองที่รีพลิเคตละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 ขึ้น บันทึกเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของแคลลัสที่พัฒนาเป็นยอด และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นแคลลัส

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และกานามัยซินในการกำจัดเซลล์ถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

2.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (hygromycin)

ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (Sigma) ที่เหมาะสมที่จะทำให้แคลลัสถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตายหมด โดยการนำส่วนของแคลลัสที่มีขนาด 5x5 มิลลิเมตร หนา 2 มิลลิเมตร มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (Sigma) ความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 และ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองที่รีพลิเคตละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 ขึ้น บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัส และขนาดของแคลลัสที่รอดชีวิต

2.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin)

ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่เหมาะสมที่จะทำให้แคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตายหมด โดยนำแคลลัสขนาด 5x5 มิลลิเมตร หนา 2 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (ชื่อการค้า kanamycin sulfate ของบริษัท เอ เอ็น บี ลาปอราตอรี จำกัด) ความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 และ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองที่รีพลิเคตละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 ขึ้น บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัส และขนาดของแคลลัสที่รอดชีวิต

3. การสร้างพลาสมิดสำหรับการถ่ายยีน และการตรวจสอบพลาสมิด

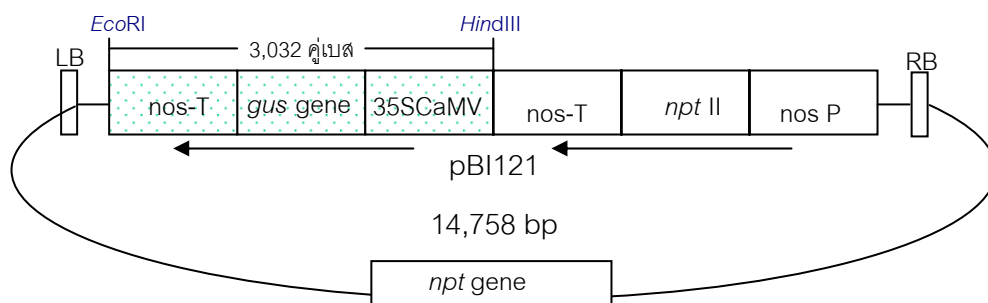
3.1 การสร้างพลาสมิดที่ใช้สำหรับการถ่ายยีน VP1 เข้าสู่พืช

นำพลาสมิด pBI121 ซึ่งมีขนาด 14,758 คู่เบส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *EcoRI* ได้ดีเอ็นเอขนาด 11,726 และ 3,032 คู่เบส เลือกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3,032 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยส่วนของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และส่วนของยีน *gus* ต่อกับเทอร์มินเตอร์ *nos-T* (ภาพ 7ก และภาพที่ 8) จากนั้นนำพลาสมิด pCambia1300 ขนาด 8,958 คู่เบส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *EcoRI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 8,907 และ 51 คู่เบส (ภาพที่ 7ข และภาพที่ 8) เชื่อมดีเอ็นเอชิ้นที่มีขนาด 8,907 คู่เบสจากพลาสมิด pCambia1300 เข้ากับชิ้นดีเอ็นเอ 3,032 คู่เบสที่ได้จากพลาสมิด pBI121 ด้วยเอนไซม์ T-4 DNA ligase (Promega) ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และทำการถ่ายพลาสมิดที่ตัดต่อได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี heat shock (ภาคผนวกที่ 8) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินเป็นสารคัดเลือก นำโคโลนีที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน และสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep miniprep (Qiagen) (ภาคผนวกที่ 6) จากนั้นตรวจสอบพลาสมิดที่ได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ เลือกโคลนที่มีพลาสมิดขนาด 11,932 คู่เบส ให้ชื่อว่า pCAB13121 (ภาพที่ 7ค และภาพที่ 9) พลาสมิดนี้มีส่วนของ T-DNA ที่ประกอบด้วยยีนที่ใช้คัดเลือกคือ ยีน *hpt* ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกราไมซินภายใต้การควบคุมของ โปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มินเตอร์ *nos-T* และมีส่วนของยีน *gus* ที่มีโปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มินเตอร์คือ *nos-T*

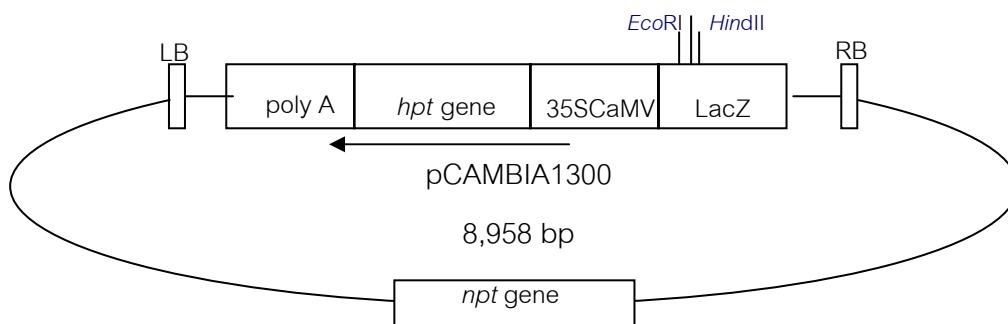
จากนั้นนำพลาสมิด pCAB13121 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *SacI* เพื่อแยกเอาส่วนของยีน *gus* ขนาด 1,894 คู่เบสออกจากพลาสมิด และเลือกชิ้นส่วนขนาด 10,038 คู่เบสไว้ (ภาพที่ 7ค) และนำพลาสมิด pDriveVP1 ซึ่งมียีน *VP1* อยู่มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *SacI* โดยตัดแบบไม่สมมาตร เนื่องจากในยีน *VP1* มีบริเวณที่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* ได้ด้วย จากนั้นนำมาแยกขนาดบนอะกาโรสเจล เลือกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 722 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของยีน *VP1* (ภาพที่ 10) จากนั้นสกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIAquick gel extraction (Qiagen) ตามวิธีการในภาคผนวกที่ 7 และต่อชิ้นดีเอ็นเอของยีน *VP1* เข้ากับชิ้นพลาสมิด pCAB13121 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *SacI* ที่มีขนาด 10,038

คู่เบส ด้วยเอนไซม์ T-4 DNA ligase (Promega) ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ยีน *VP1* เข้าแทนที่ยีน *gus* ที่ถูกตัดออกไป จากนั้นถ่ายพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α แล้วคัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน และนำมาเพิ่มปริมาณในอาหารคัดเลือก จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep miniprep (Qiagen) ตามภาคผนวกที่ 6 ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ให้ชื่อพลาสมิดใหม่ว่า pCABVP1 ซึ่งมีขนาด 10,767 คู่เบส (ภาพที่ 11 และภาพที่ 12)

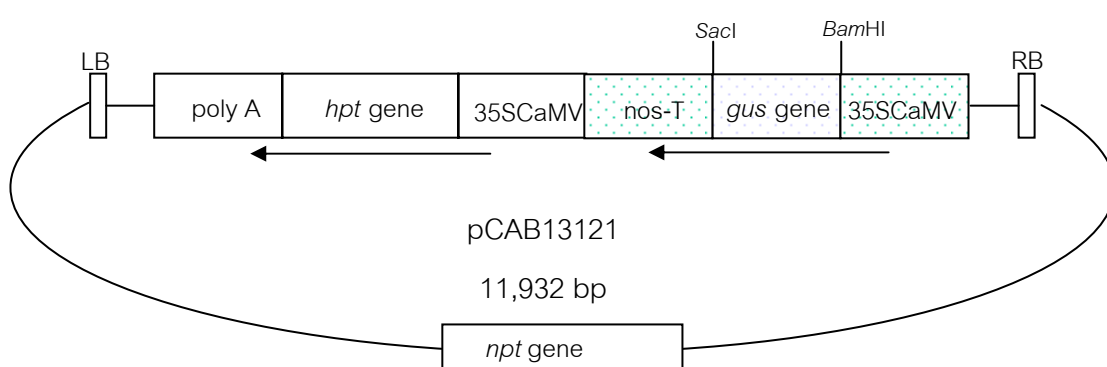
ก. พลาสมิด pBI121



ข. พลาสมิด pCAMBIA1300

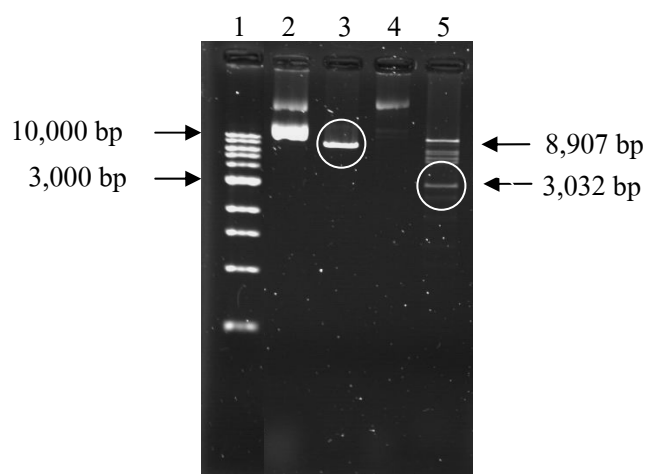


ค. พลาสมิด pCAB13121



ภาพที่ 7 โครงสร้างของพลาสมิด pBI121(ก) pCAMBIA1300(ข) และ pCAB13121(ค)

โดยที่พลาสมิด pCAB13121 ขนาด 11,932 คู่เบส ได้จากการตัดพลาสมิด pBI121 ด้วยเอนไซม์ *HindIII* และ *EcoRI* นำชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3,032 คู่เบส ต่อเข้ากับพลาสมิด pCAMBIA1300 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน ได้เป็น พลาสมิด 13121 ขนาด 11,932 คู่เบส



ภาพที่ 8 การตรวจสอบพลาสมิด pCambia1300 ขนาด 8,958 คู่เบส และ พลาสมิด pBI121 ขนาด 14,758 คู่เบส โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII*

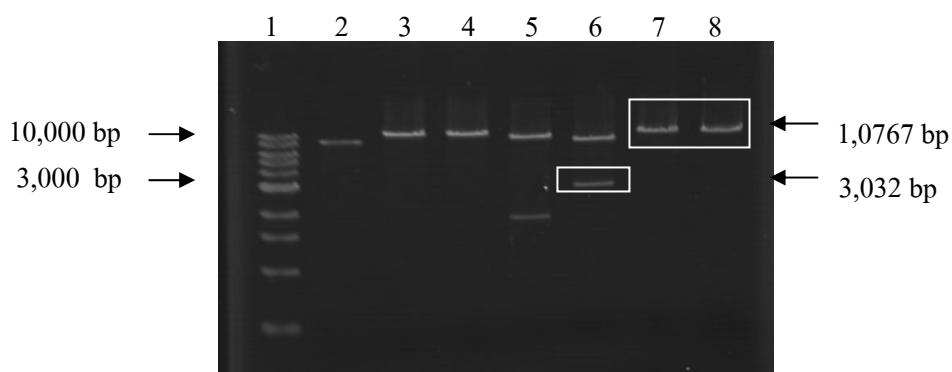
ช่องที่ 1 1 kb DNA ladder marker

ช่องที่ 2 พลาสมิด pCambia1300 ไม่ตัด

ช่องที่ 3 พลาสมิด pCambia1300 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 8,907 และ 51 คู่เบส (ไม่ปรากฏบนเจล)

ช่องที่ 4 พลาสมิด pBI121 ไม่ตัด

ช่องที่ 5 พลาสมิด pBI121 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาด 11,726 และ 3,032 คู่เบส



ภาพที่ 9 การตรวจสอบพลาสมิด pCAB13121 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ช่องที่ 1 1 kb DNA ladder marker

ช่องที่ 2 พลาสมิด pCAB1300 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII*
ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 8,907 และ 51 คู่เบส

ช่องที่ 3 พลาสมิด pCAB13121 ตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI*
ได้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 11,939 คู่เบส

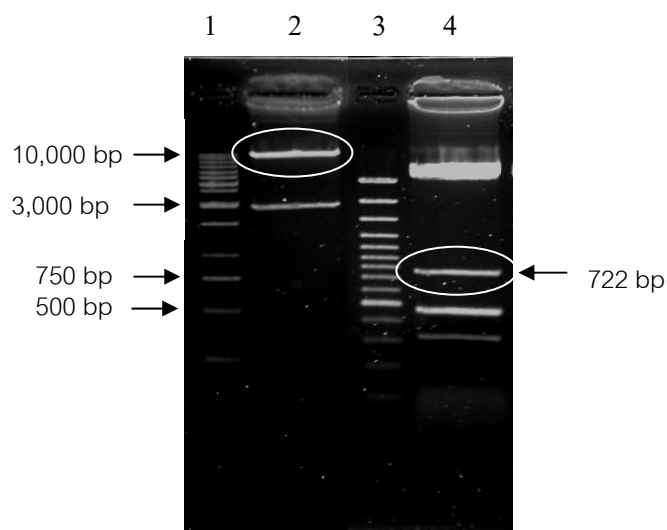
ช่องที่ 4 พลาสมิด pCAB13121 ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI*
ได้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 11,939 คู่เบส

ช่องที่ 5 พลาสมิด pCAB13121 ตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* และ *SacI*
ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 10,045 และ 1,894 คู่เบส

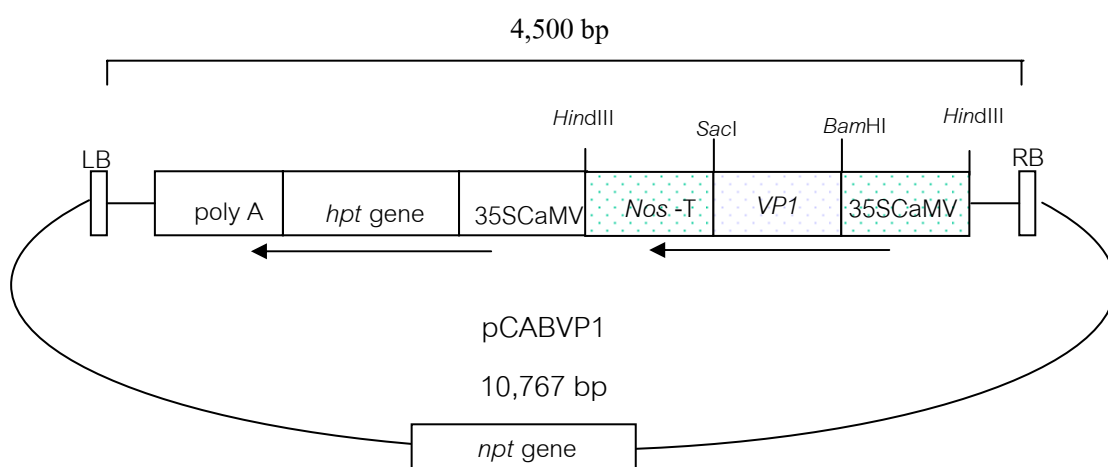
ช่องที่ 6 พลาสมิด pCAB13121 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII*
ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 8,907 และ 3,032 คู่เบส

ช่องที่ 7 พลาสมิด pCAB13121 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*
ได้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 10,939 คู่เบส

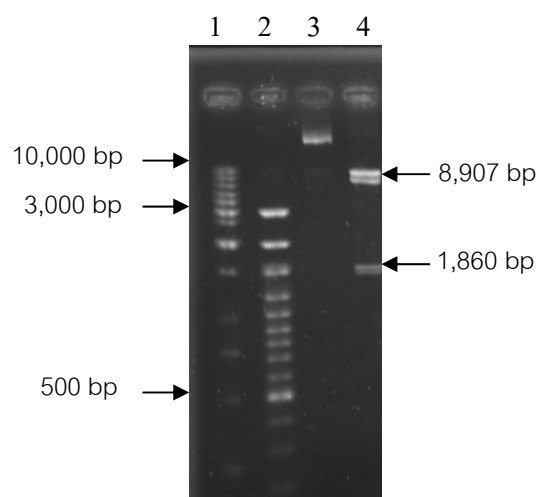
ช่องที่ 8 พลาสมิด pCAB13121 ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII*
ได้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 10,939 คู่เบส



ภาพที่ 10 พลาสมิด pCAB13121 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I เพื่อเลือกชิ้น ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 10,045 คู่เบส และตัดพลาสมิด pDriveVP1 ด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I แบบไม่สมบูรณ์ เลือกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 722 คู่เบสซึ่งเป็น ส่วนของยีน *VP1* นำชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองมาต่อกันเพื่อสร้างพลาสมิด pCABVP1
 ช่องที่ 1 1 kb DNA ladder marker
 ช่องที่ 2 พลาสมิด pCAB13121 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I
 ช่องที่ 3 100 bp DNA ladder plus marker
 ช่องที่ 4 พลาสมิด pDriveVP1 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I



ภาพที่ 11 โครงสร้างของพลาสมิด pCABVP1 ขนาด 10,767 คู่เบส ซึ่งมีความยาวจาก left border ถึง right border ขนาด 4,500 คู่เบส ที่จะถูกถ่ายเข้าสู่โครโมโซมของพืชโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ



ภาพที่ 12 พลาสมิด pCABVP1 ตรวจสอบจุดตัดบนพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *HindIII*

ช่องที่ 1 1 kb DNA ladder marker

ช่องที่ 2 100 bp DNA ladder plus marker

ช่องที่ 3 พลาสมิด pCABVP1

ช่องที่ 4 พลาสมิด pCABVP1 ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII*

ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 8,907 คู่เบสและ 1,860 คู่เบส

3.2 โคลนพลาสมิด pCABVP1 เข้า *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

นำพลาสมิด pCABVP1 ที่ได้จากข้อ 3.1 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดนี้ โดยใช้วิธี heat shock transformation แล้วเลี้ยง *E. coli* บนอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน โคโลนีที่เจริญได้ในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะนั้นจะประกอบด้วยเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pCABVP1 เข้าไป เนื่องจากในพลาสมิดนั้นมียีน *nptII* ที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ จากนั้นนำโคโลนีที่ได้มาเพิ่มปริมาณ และสกัด

พลาสมิดออกจากเซลล์ของ *E. coli* ด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Miniprep (Qiagen) และนำพลาสมิดที่ได้มาตรวจสอบอีกครั้งว่าเป็นพลาสมิด pCABVP1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งอยู่ในพลาสมิด เช่น เอนไซม์ *HindIII* *EcoRI* หรือ *SacI* เพื่อเป็นการตรวจสอบโคลนของ *E. coli* ที่ได้ว่ามียีนที่ต้องการ และเป็นการตรวจสอบทิศทางการขึ้นดีเอ็นเอต่อเข้ากับพลาสมิดด้วย

4. การนำพลาสมิด pCABVP1 เข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

การนำพลาสมิด pCABVP1 เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 โดยใช้วิธี electroporation ทำโดยวิธีการดังต่อไปนี้

- 4.1 เตรียม competent cell ของอะโกรแบคทีเรีย ตามวิธีในภาคผนวกที่ 5
- 4.2 เตรียมพลาสมิด pCABVP1 ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมในปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่ไว้ในน้ำแข็ง
- 4.3 เตรียมอาหาร YM broth 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด 15 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ 3)
- 4.4 ละลาย competent cell ของอะโกรแบคทีเรียแล้วแช่ในน้ำแข็ง
- 4.5 คูด competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเติมลงในพลาสมิด pCABVP1 ในข้อ 4.2 ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน

4.6 เตรียมเครื่อง electroporation โดยมี parameter ดังนี้

voltage	2.5	kV
field strength	12.5	kV/cm
capacitor	25	μF
resistance	200	Ω
time constant	3.8	msec

4.7 ดูส่วนผสมในข้อ 4.5 ใส่ลงใน electroporation cuvette ขนาดช่อง 0.2 เซนติเมตร โดยพยายามอย่าให้มีฟองอากาศแล้ว ใส่ลงใน chamber slide กดปุ่มปล่อยกระแสไฟเข้าเครื่อง electroporation

4.8 เติมหอาหาร YM broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด electroporation cuvette ทันที แล้วดูดของเหลวทั้งหมดกลับมาสใส่ในหลอดที่เตรียมไว้ในข้อ 4.3

4.9 นำสารละลายเซลล์ในข้อ 4.8 ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเขย่า 250 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง

4.10 นำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยง 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อให้เซลล์ ตกตะกอนแล้วดูดอาหารออก

4.11 ละลายตะกอนเซลล์ ใน YM broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

4.12 เกลี่ยเซลล์แขวนลอยแบบคี่เรียบบนอาหารแข็งสูตร YM ที่มีสารปฏิชีวนะ กานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

4.13 นำโคโลนีที่ได้จากข้อ 4.12 มาตรวจสอบพลาสมิดที่อยู่ภายในเซลล์ โดยใช้วิธี พิธีอาร์เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *VP1* และยีน *hpt* ก่อนที่จะนำเซลล์นั้นไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อที่จะใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

5. การถ่ายยีน VP1 เข้าสู่แคลลัสถั่วฮามาต้าโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ

เลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCABVP1 ในอาหาร YM broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งจะได้เซลล์แขวนลอยเชื้อที่มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5-0.8 จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์โดยใช้ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออกแล้วละลายตะกอนเซลล์โดยใช้อาหารสูตร MS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติม acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์

นำแคลลัสถั่วฮามาต้ามีสีเขียวสม่ำเสมอมาตัดตามขวางให้มีขนาด 5x5 มิลลิเมตรหนา 2 มิลลิเมตรจำนวน 100 ชิ้น ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เตรียมไว้ข้างต้นในปริมาณ 50 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้ชิ้นส่วนสัมผัสกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียประมาณ 30 นาที จากนั้นตักชิ้นแคลลัสวางลงบนกระดาษซับที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับเอาเชื้ออะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกจากชิ้นส่วนพืช แล้วนำชิ้นแคลลัสที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ โดยเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสในที่มีदनาน 36-48 ชั่วโมง จากนั้นล้างเชื้ออะโกรแบคทีเรียออกจากแคลลัสด้วยอาหาร MS ที่เติม cefotaxime 500 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วซับด้วยกระดาษที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม cefotaxime 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย แล้วย้ายมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติม cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยการย้ายไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นนำแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอด และนำยอดที่ได้มาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อชักนำให้เกิดราก และนำออกปลูกทดสอบต่อไป

6. การตรวจสอบและวิเคราะห์ผลของการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีน

6.1 การตรวจสอบต้นที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR: polymerase chain reaction)

6.1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบพืช

สกัดดีเอ็นเอจากใบของต้นถั่วฮามาต้าที่ได้จากการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือก และจากต้นถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) โดยนำใบถั่ว 1-2 ใบใส่ในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำแช่ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) แล้วนำมาบดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้วแล้วเติม extraction buffer (ภาคผนวกที่ 9) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ใน water bath นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสหลอดใหม่ จากนั้นเติม sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ โดยใช้ ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรน้ำใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสหลอดใหม่ และเติม chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ เป็น เวลา 15 นาที และนำมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดน้ำใส ด้านบนใสหลอดใหม่ แล้วเติมเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรน้ำใส ผสม ให้เข้ากันเบา ๆ โดยการกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง และเติม เอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมเบา ๆ เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอแล้วนำมาปั่น ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เทน้ำใสทิ้ง หลังจากนั้นนำตะกอนดีเอ็นเอที่ ได้มาผึ่งให้แห้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ ตรวจสอบ ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานบนเจล อะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์

6.1.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *VP1* และยีน *hpt* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 6.1.1 มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *VP1* ด้วยวิธีพีซีอาร์ จะได้ชิ้นส่วนของยีน *VP1* ขนาด 660 คู่เบส โดยใช้ไพรเมอร์

VP1 Forward 5' GGGGGATCCACCATGACCACCTCTGCGGGTGAGTC 3' และ

VP1 Reverse 5' GGGTCTAGACTACTGTTTTGCGGGTGCCACAATC 3'

ส่วนการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *hpt* ด้วยวิธีพีซีอาร์ จะได้ชิ้นส่วนของยีน *hpt* ขนาด 800 คู่เบส โดยใช้ไพรเมอร์

hpt Forward 5' CCT GAA CTC ACC GCG ACG 3' และ

hpt Reverse 5' AAG ACC AAT GCG GAG CAT ATA 3'

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำโดยนำส่วนผสมต่าง ๆ ใส่เครื่อง Gene Amp®PCR System 2400 ของบริษัท Perkin Elmer โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา อุณหภูมิ และเวลา ตามรายละเอียดในภาคผนวกที่ 10.3-10.5

6.2 การตรวจสอบต้นที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธี Southern blot analysis

6.2.1 การเตรียมจีโนมดีเอ็นเอสำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีน

แยกจีโนมดีเอ็นเอจากพืชที่ได้รับการถ่ายยีนตามวิธีในข้อ 6.1.1 แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI นำไปแยกขนาดบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5x TBE buffer ย้อมเจลในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต และบันทึกภาพ จากนั้นแช่แผ่นเจลในน้ำ เขย่าเบา ๆ 10 นาที และปรับสภาพดีเอ็นเอโดยแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ depurination (0.25 N HCl) เขย่าเบา ๆ นาน 10 นาที หลังจากนั้นแช่แผ่นเจลในสารละลายบัฟเฟอร์ denaturation (0.5 N NaOH ผสมกับ 1.5 M NaCl) 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ neutralization (0.5 M Tris HCl, pH8.0 ผสมกับ 1.5 M NaCl) 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที โดยทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำแผ่นเจลวางคว่ำ

หน้าลงบนกระดาษ Whatman 3 MM ที่ชุ่มด้วยสารละลาย 10x SSC (0.3 M sodium citrate, 3 M NaCl) ซึ่งวางอยู่บนกระดาษ Whatman 3 MM แผ่นยาวที่ปลายทั้งสองข้างจุ่มในสารละลาย 10x SSC โดยพยายามอย่าให้มีฟองอากาศใต้แผ่นเจล นำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่มีประจุบวก (Roche Applied Science) ที่แช่น้ำกลั่นแล้ว มาวางบนแผ่นเจลแล้ววางกระดาษ Whatman 3 MM ทับบนแผ่นเมมเบรน โดยไล่ฟองอากาศออกให้หมด แล้ววางกระดาษซับซ้อนด้านบนให้สูงประมาณ 5 เซนติเมตร (วัดหลังจากใช้แรงกด) นำวัสดุหรือก้อนน้ำหนักรัดทับด้านบน ตั้งไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อให้ดีเอ็นเอจากเจลเคลื่อนย้ายขึ้นไปบนแผ่นไนลอนเมมเบรน เมื่อครบเวลานำแผ่นเมมเบรนไปแช่ในสารละลาย 2x SSC เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับแผ่นเมมเบรน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชันต่อไป

6.2.2 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) ด้วยวิธี PCR Labeling

ใช้พลาสมิด pCABVP1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ โดยใช้ความเข้มข้นของพลาสมิด 10 พิโคกรัม และใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน VP1 และ ยีน *hpt* โดยใช้ไพรเมอร์ Forward และ Reverse อย่างละ 0.25 ไมโครโมลาร์และใช้ PCR DIG probe synthesis kit (Roche Applied Science) และติดตามดีเอ็นเอตรวจสอบโดยวิธีพีซีอาร์โดยใช้โปรแกรมพีซีอาร์เช่นเดียวกับที่ใช้ในการโคลนนิ่งและตรวจสอบยีน (ภาคผนวกที่ 10.3 -10.5)

6.2.3 การทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชัน

นำแผ่นเมมเบรนที่ได้จากข้อ 6.2.1 มาแช่ในสารละลายไฮบริดเซชัน (ประกอบด้วย 5xSSC, 0.1% sarkosal, 0.02% SDS, 1% blocking solution) โดยเติมสารละลายไฮบริดเซชันลงในถุงพลาสติกที่ใส่เมมเบรน (ใช้ปริมาตรสารละลาย 10 มิลลิลิตรต่อ 100 ตารางเซนติเมตร ของแผ่นเมมเบรน) ไล่ฟองอากาศออกจากถุงให้หมด ปิดปากถุงให้สนิทและบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอตรวจสอบที่ได้จากข้อ 6.2.2 ปริมาตร 2 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ เติมน้ำ 50 ไมโครลิตร แล้วต้มในน้ำเดือด 10 นาที นำมาแช่ในน้ำแข็งแล้วเติมสารละลายไฮบริดเซชันปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำสารละลายดังกล่าวไปเติม

ลงในถุงที่ใส่เมมเบรนเพื่อทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน ปิดปากถุงแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

6.2.4 การตรวจสอบผลการไฮบริไดเซชัน

นำแผ่นไนลอนเมมเบรนจากข้อ 6.2.3 มาล้างในสารละลาย low stringency buffer (2xSSC และ 0.1% SDS) โดยเติมสารละลายให้ท่วมแผ่นไนลอนเมมเบรน เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย high stringency buffer (0.5xSSC และ 0.1% SDS) เขย่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างด้วย maleic acid buffer (ภาคผนวก 11) ที่เติม Tween 20 ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างด้วย blocking solution (ภาคผนวกที่ 11) เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 30-60 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วเติมสารละลาย antibody solution ใน blocking solution (อัตราส่วน 1:10,000) เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วย washing buffer 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างด้วย detection buffer เป็นเวลา 3 นาที (ภาคผนวกที่ 11) เทสารละลายทิ้ง แล้วหยดสารละลาย CDP-starTM ที่เจือจางในสารละลาย detection buffer (อัตราส่วน 1:200) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตารางเซนติเมตร ลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน ที่อยู่ในถุงพลาสติกแล้วปิดปากถุงให้สนิท จากนั้นนำไปประกบกับแผ่นฟิล์มในหิ้งมืดนาน 10 นาที ล้างแผ่นฟิล์มด้วยสารละลาย developer และ fixer แล้วตรวจดูผลภาพที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม

6.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

6.3.1 สกัดอาร์เอ็นเอจากต้นถั่วฮามาต้าโดยใช้ Rneasy Mini kit (Qiagen)

นำใบถั่วฮามาต้า 100 มิลลิกรัมมาบดในไนโตรเจนเหลว เติมนัฟเฟอ์ RLT เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำมาใส่ในหลอด QIA shredder spin column ปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายใส่ที่ได้ใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติมเอทานอล 0.5 เท่าของสารละลายใส่ (ประมาณ 225 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ปิเปต จากนั้นนำสารละลายที่ได้ใส่ลงในหลอด Rneasy mini spin column ปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ล้าง Rneasy

column ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ REP 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ย้าย Rneasy column ใส่หลอด 1.5 ไมโครลิตรหลอดใหม่ และเติมน้ำ Rnase free 40 ไมโครลิตร ปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายอาร์เอ็นเอสำหรับนำไปใช้ทำปฏิกิริยา RT-PCR

6.3.2 การทำ RT-PCR โดยใช้ Qiagen one step RT-PCR kit

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาโดยใช้ส่วนผสมต่าง ๆ ดังนี้

น้ำ RNase free	12	ไมโครลิตร
5X Qiagen one step RT-PCR buffer	4	ไมโครลิตร
dNTP mix (10 mM)	0.8	ไมโครลิตร
Primer VP1 F (10 μ M)	0.5	ไมโครลิตร
Primer VP1 R (10 μ M)	0.5	ไมโครลิตร
Qiagen one step RT-PCR enzyme mix	0.8	ไมโครลิตร
Template (RNA จากข้อ 6.3.1)	1	ไมโครลิตร
Total volume	<u>20</u>	ไมโครลิตร

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยนำส่วนผสมต่าง ๆ ใส่เครื่อง Gene Amp[®] PCR System 2400 ของบริษัท Perkin Elmer โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Reverse transcription	50 °C	30	นาที	
Initial PCR activation step	95 °C	15	นาที	
Denaturing	95 °C	1	นาที	} 35 รอบ
Annealing	55 °C	1	นาที	
Extension	72 °C	1	นาที	
Final extension	72 °C	10	นาที	

เมื่อครบกำหนดเวลา นำส่วนผสมปฏิกิริยาที่ได้ไปแยกขนาดอาร์เอ็นเอโดยใช้เจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ย้อมเจลในสารละลายเอทิดีเอ็มโบรไมด์ ตรวจดูแถบอาร์เอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพเจล

6.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP1 ด้วยวิธี western blot analysis

6.4.1 การแยกโปรตีนจากเนื้อเยื่อพืช

นำใบกล้วยมาตำประมาณ 2-3 ใบบดในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.03M Tris pH 8.0, 0.05% NaN₃) 500 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จะได้โปรตีนละลายอยู่ในส่วนของสารละลายใส จากนั้นดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่เพื่อเก็บไว้ตรวจสอบตามวิธีการในข้อ 6.4.2-6.4.4 ต่อไป

6.4.2 ขั้นตอนการทำ SDS-PAGE

6.4.2.1 ประกอบกระจกของชุด Mini-proteinII electrophoresis cell (Biorad) สำหรับเท polyacrylamide gel

6.4.2.2 ผสม 10% separating gel (ภาคผนวกที่ 12) เทลงในกระจกที่เตรียมไว้ให้เหลือขอบกระจกด้านบนประมาณ 1 นิ้ว

6.4.2.3 เติมน้ำในส่วนที่เหลือให้เต็มเพื่อให้ผิวหน้าของ separating gel เรียบ เจลจะแข็งภายใน 30 นาที

6.4.2.4 เมื่อเจลด้านล่างแข็งดีแล้ว เทน้ำด้านบนออก เตรียมเจลในส่วน of stacking gel (ภาคผนวกที่ 12) เทลงในกระจกส่วนที่เหลือแล้วใส่ comb เพื่อให้เกิดช่อง แล้วทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เจลแข็ง

6.4.2.5 ประกอบชุดกระจกและเจลเข้ากับเครื่อง Mini-proteinII electrophoresis cell และเติม running buffer (ภาคผนวกที่ 12) ลงใน tank

6.4.2.6 ผสม loading buffer (ภาคผนวกที่ 12) กับโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ (ที่ได้จากข้อ 6.3.1) อัตราส่วน 1:1 และนำไปต้ม 5 นาที แล้วนำมาปั่นตกตะกอนที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

6.4.2.7 นำตัวอย่างน้ำใสจากข้อ 6.4.2.6 หยอกลงช่องเจลตามลำดับที่เตรียมไว้ในข้อ 6.4.2.6

6.4.2.8 ให้กระแสไฟฟ้าที่ 20 โวลต์ จน dye ที่อยู่ใน loading buffer วิ่งไปถึงรอยต่อระหว่าง stacking gel กับ separating gel จึงเพิ่มกระแสไฟฟ้าเป็น 120 โวลต์ จน dye วิ่งไปจนสุดเจล

6.4.2.9 แกะเจลออกจากชุดอุปกรณ์ แล้วนำไปตรวจสอบโปรตีนที่แยกขนาดได้ โดยย้ายโปรตีนลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน เพื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี western blot analysis ต่อไป

6.4.3 ขั้นตอนการย้ายโปรตีนลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

6.4.3.1 นำโปรตีนที่แยกด้วยการทำ SDS-PAGE ในข้อ 6.4.2 มาย้ายลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน โดยเริ่มจากการประกอบชุด western blot analysis (Biorad) โดยจัดให้มีการเรียงตัวของชั้นต่าง ๆ จากซ้ายไปขวา เริ่มจาก ฟองน้ำ กระดาษกรอง เจลที่ได้จากข้อ 6.4.2 ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน กระดาษกรอง และฟองน้ำตามลำดับ ใช้ transfer buffer เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า

6.4.3.2 ให้กระแสไฟฟ้าที่ 150 mA เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้โปรตีนถูกย้ายไปบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แล้วแกะแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนออกจากชุดเครื่องมือ เพื่อนำไปตรวจสอบโดยวิธี western blot

6.4.4 ขั้นตอนการทำ western blot

6.4.4.1 นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้จากข้อ 6.4.3 มา block ด้วย skim milk เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ใน PBS นาน 1 ชั่วโมง

6.4.4.2 หลังจาก block แล้วแช่เมมเบรน ในซีรัมของหนูที่ติดเชื้อโรคปาก และทำเปื่อย (เจือจางด้วย 1X PBS อัตราส่วน 1:100) นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเมมเบรน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ด้วย PSB ผสมกับ 0.05% Tween 20

6.4.4.3 นำเมมเบรนมาแช่ใน recombinant protein G biotin conjugate ที่เจือจางด้วย 1X PBS อัตราส่วน 1:4,000 นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเมมเบรน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาทีด้วย PSB ผสม 0.05% Tween 20

6.4.4.4 เติม Peroxidase Conjugated Streptavidin (Sigma) ที่เจือจางด้วย 1X PBS อัตราส่วน 1:4,000 นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเมมเบรน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ด้วย PSB ผสมกับ 0.05% Tween 20

6.4.4.5 หยด liquid DAB substrate ให้ทั่วเมมเบรน แล้วอ่านผลแถบสีของโปรตีนที่เกิดขึ้นใน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการล้างด้วยน้ำกลั่น

6. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

7. ระยะเวลาทำการทดลอง

เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2546 ถึง เดือนเมษายน พ.ศ.2549