

(1)

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (1)

สารบัญตาราง (2)

สารบัญภาพ (3)

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (6)

คำนำ 1

ตรวจเอกสาร 3

อุปกรณ์และวิธีการ 21

ผลและวิจารณ์ 34

สรุป 56

เอกสารและสิ่งอ้างอิง 57

ภาคผนวก 64

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV (p2/CMCP) กับทรานส์ยีนจากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และสายพันธุ์ KN 1.2.3 โดยใช้โปรแกรม DNASTAR (LaserGene)	45
2 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน ในส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV (p2/CMCP) กับทรานส์ยีนจากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และสายพันธุ์ KN 1.2.3 โดยใช้โปรแกรม DNASTAR (LaserGene)	45

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 อาการโรคใบด่างจุดวงแหวนที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV)	7
2 อนุภาคเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ (PRSV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม โปทีไวรัส (Potyvirus)	8
3 โครงสร้างยีนของเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ (PRSV) แสดงส่วนของยีนที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีนชนิดต่าง ๆ จากปลายด้าน 5' ไปสู่ ปลายด้าน 3'	15
4 แผนภาพของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนสายพันธุ์ เชียงใหม่ (PRSV-CMCP) แสดงตำแหน่งของ restriction enzymes <i>AluI</i> และ <i>TaqI</i>	27
5 แถบ total RNA ของมะละกอพันธุ์แขกนวลปกติไม่ถ่ายยีน และมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรม แยกขนาดด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer	35
6 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนระดับอาร์เอ็นเอ ในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ ด้วยเทคนิค northern blot hybridization โดยทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับ PRSV-CP probe	36
7 total RNA หลังการกำจัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ RQ1 RNase-Free DNase และแยกขนาดด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer	38
8 แถบ cDNA ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนจากการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR ของมะละกอพันธุ์แขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 รุ่น R ₀	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
9 แอบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบต่างจูดวงแหวนจากพลาสติกสายผสม โดยการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และแยกขนาดด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer	41
10 การจัดเรียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV (PRSV-CP)	42
11 การเปรียบเทียบการจัดเรียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PRSV (PRSV-CP) ของมะละกอแขนกลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 ด้วยโปรแกรม ClustalW version 1.83	43
12 small RNA ที่แยกได้จากมะละกอแขนกลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 วิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE	47
13 การตรวจสอบขนาดของ small RNA ของมะละกอแขนกลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 โดยแยกขนาดใน 7.5M urea 15% polyacrylamide gel	48
14 แอ็บ small RNA ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบต่างจูดวงแหวนจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 รุ่น R ₀ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค northern blot hybridization	49
15 แอบดีเอ็นเอของพลาสติกสายผสมที่สกัดจากโคลนต่างๆ ของ papaya cDNA library โดยวิธี alkaline lysis และวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer	52
16 แอบดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ด้วยเอ็นไซม์ <i>EcoRI</i> และวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
17 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนอื่นจากมะละกอแซกนวลดัดแปลงพันธุกรรมเปรียบเทียบกับมะละกอแซกนวลปกติไม่ถ่ายยีน ด้วยเทคนิค dot blot hybridization	54
 ภาพผนวกที่	
1 ภาพจำลองโครงสร้างของพลาสมิดสายผสม p2/CMCP ขนาด 6.7 กิโลเบส ที่ใช้สำหรับถ่ายยีน PRSV-CP ของเชื้อ PRSV สายพันธุ์เชียงใหม่ในพลาสมิดพาหะ pUC 19 ให้กับมะละกอ	48

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

PCR	=	polymerase chain reaction
RT-PCR	=	reverse transcription-polymerase chain reaction
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
CDP- <i>strat</i> TM	=	Disodium-2-chloro-5-(4-methoxyspiro{ 1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo[3.3.1.1. ^{3,7}]-decan}-4-yl)phenyl phosphate
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
IPTG	=	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
X-gal	=	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-galactopyranoside
bp	=	base pair
DEPC	=	diethylpyrocarbonate
LB	=	luria Bertani broth
OD	=	optical density
PCI	=	Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol
EDTA	=	ethylene diamine tetraacetic acid
<i>lac Z</i> gene	=	β -galactosidase gene
35S promoter	=	35S promoter from <i>Cauliflower mosaic virus</i>
CP gene	=	coat protein gene
PBS	=	pBluescript