รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุดปี 57

1.ชุดโครงการวิจัย:

2.โครงการวิจัย: โครงการวิจัยการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้เพื่อยืดอายุการบานของดอก

กิจกรรม -

กิจกรรมย่อย -

3.ชื่อการทดลอง : ผลของการส่งถ่ายยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) ต่อ การยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุล

Effect of Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) on Prolonging the longevity of *Dendrobium*

4.คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	: นางสาวยุพิน กสินเกษมพงษ์	สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน
ผู้ร่วมวิจัย	นางสาวอัมพิกา ปุนนจิต	สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน
	นางสาวศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล	สังกัด สถาบันวิจัยพืชไร่
ที่ปรึกษา	: นางสาว สุภาพ สุนทรนนท์	

5.บทคัดย่อ **:** การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) oxidase ในการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุล การทดลองนี้เป็นการทดลองต่อเนื่องจากงานทดลองของ จงวัฒนา และคณะ (2556) ซึ่งได้ศึกษาการส่งถ่ายยีน ACC oxidase ในกล้วยไม้หวายเอียสกุลไว้แล้ว และได้ทำการทดลองต่อโดยการชักนำต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเพื่อศึกษาและตรวจสอบกล้วยไม้หวายเอียสกุลที่ได้รับการส่งถ่ายยีนและนำมาเลี้ยงจนได้ต้นที่มีขนาดพร้อมนำออกปลูกแล้วและนำมา ตรวจสอบต้นที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *ACC oxidase* พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การคงอยู่ของยีน 4.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ในขณะที่การตรวจสอบด้วยการคัดเลือกในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin สามารถตรวจสอบได้ถึง 20 เปอร์เซ็นต์

6.คำนำ : กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ ที่นำรายได้เข้าประเทศปีละหลายพันล้านบาท ในปี 2551 มีการส่งออกกล้วยไม้มูลค่าประมาณ 3,300 ล้านบาท โดยประมาณ 70% (2400 ล้านบาท) มูลค่าส่งออกอยู่ในรูปดอกกล้วยไม้สด(สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร 2551) และไม้ตัดดอกที่มีการส่งออกมากที่สุด คือ กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* sp.) ปัญหาหนึ่งในการผลิตกล้วยไม้ตัดดอก คือ การเหี่ยวและดอกร่วงเร็วในระหว่างการขนส่ง การวางจำหน่าย และการใช้งาน ซึ่งการเหี่ยวของดอกไม้เป็นการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของพืชที่เกิดจากก๊าซเอทีลีน (Reid and Wu, 1992) ในกล้วยไม้มีรายงานว่าดอกกล้วยไม้ส่วนใหญ่จะเหี่ยวและหลุดร่วงอย่างรวดเร็วแม้เพียงได้รับก๊าซเอทีลีนในระดับความเข้มข้นต่ำ โดยกล้วยไม้แต่ละชนิดจะมีโดยการตอบสนองต่อก๊าซชนิดนี้แตกต่างกัน (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547)

ยีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทีลีนคือ ACC synthase (ACS) และ ACC oxidase (AOC) ซึ่งการที่เอทีลีนที่สร้างขึ้นจะไปแสดงผลที่ส่วนใดของพืชขึ้นอยู่กับตัวรับเอทีลีน (ethylene receptor) ของส่วนต่างๆของพืช ส่งผลให้ส่วนต่างๆของพืชมีความไว และตอบสนองต่อเอทีลีนแตกต่างกัน (Nadeau et al., 1993) ในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาการส่งถ่ายยีน antisense ACC synthase และ antisense ACC oxidase เข้าสู่พืชเพื่อยืดอายุการใช้งานของดอกไม้หลายชนิด Aida *et al*. (1998) ได้ศึกษาการส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase เข้าสู่ Cell ของ Torenia โดยใช้ Agrobacterium พบว่า Torenia ที่ดัดแปลงพันธุ์สามารถออกดอกที่บานนานกว่าพันธุ์เดิม 2 วัน การสร้างคาร์เนชั่นดัดแปลงพันธุ์ เพื่อเพิ่มระยะเวลาการบานของดอก โดยการสกัดยีนที่ควบคุมการสร้าง ACC oxidase จากคาร์เนชั่น ร่วมกับ ACC synthase จากพืชหลายชนิดแล้วนำมาต่อกับ Vector แบบกลับทิศทาง เพื่อให้เกิดการถอดรหัสเป็น antisense RNA โดยมี cauliflower mosaic virus 25S RNA promoter (CAMV 25S promoter) เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสแล้วจึงส่งถ่ายยีนชุดนี้เข้าสู่คาร์เนชั่น ผลปรากฏว่า ดอกคาร์เนชั่นที่เกิดจากการดัดแปลงพันธุ์มีการผลิต gas ethyline ลดลง และสามารถบานได้นานกว่าดอกคาร์เนชั่นปกติ (Adam and Yang, 1997 อ้างถึงใน Mol *et al.,* 1995) ดังนั้นการศึกษาการส่งถ่ายยีนควบคุมการสร้างก๊าซเอทีลีน เพื่อยืดอายุการบานของดอก จะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยในการปรับปรุงพันธุ์มีประสิทธิภาพ และรวดเร็วขึ้น

7.วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์ : เครื่องพีซีอาร์(Thermocycler; Perkin Elmer, Gene Amp PCR 9700) เครื่องมือแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดรักษาอุณหภูมิ อ่างน้ำชนิดตั้งอุณหภูมิ เครื่องมือบันทึกภาพดีเอ็นเอ ถังไนโตรเจนเหลว โกร่งบดยา กระติกน้ำแข็ง หลอดปั่นแยกตะกอนขนาด 1.5 ml ปิเปตดูดสารชนิดปรับปริมาตรได้ขนาด 0.5 -1 ml กระดาษพิมพ์ผลดีเอ็นเอ ตู้อบรักษาอุณหภูมิที่ 30-37 °C แบบเขย่าได้ (Incubator shaker) ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ เครื่องเขย่าแนวนอน ชั้นวางขวด/ petridish เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หม้อนึ่งความดัน มีดผ่าตัด ปากคีบ และเครื่องแก้วชนิดต่างๆสำหรับเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อและเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สารเคมี: สารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ที่มียีน antisense ACC oxidase สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน อาหารเหลว LB สารละลาย X-glue สารปฏิชีวนะ hygromycin สารเคมีต่างๆสำหรับเตรียมอาหาร MS สารเคมีสำหรับสกัด ดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ PCR เช่น ethanol extraction buffer Chloroform Isoamyl Isopropanol TE buffer RNase A 10X *Taq* buffer 25 mM $MgCl_2$ 10 mM dNTP *Taq* DNA polymerase และ Primer

-วิธีการ

1) การเพาะเลี้ยงโพรโตคอร์มกล้วยไม้

1.1 เพิ่มปริมาณโพรโตคดร์ม/ต้นอ่อนกล้วยไม้หวายเอียสกุลที่ได้รับการส่งถ่ายยีนและไม่ได้รับการส่งถ่ายpยีนในอาหารแข็งและเหลวสูตร ½MS + น้ำตาล 20 g/L pH 5.5-5.7 ทำการ sub culture และเปลี่ยนถ่ายอาหารต้นอ่อนทุกๆ 1 เดือน

1.2 เพาะเลี้ยงโพรโตคอร์มด้วยอาหารสังเคราะห์ NDM ที่เติมฮอร์โมน NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 1.0 มก./ล. ผงมันฝรั่ง 10 ก. /ล. และน้ำตาลมอลโทส 10 ก./ล. pH 5.4

2) การส่งถ่ายยีน *antisense ACC oxidase* สู่โพรโทคอร์มและ ต้นอ่อนกล้วยไม้หวายเอียสกุล

2.1 นำเชื้อ *A. tumefaciens* EHA105 ที่มียีน *antisense ACC oxidase* มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB+ kanamycin 50 mg/L

2.2 ย้ายโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB+ kanamycin50 mg/L เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 14 ชั่วโมง นำสารละลายที่มีเชื้อมาวัด OD_{550} ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 1.5 - 1.8

2.3 ดูดสารละลาย *A. tumefaciens* มาผสมในอาหารเหลวสูตร ½MS ที่เติม acetosyringone 100 µM ในอัตราส่วน 2 :1

2.4 นำโพรโตคอร์ม/ต้นอ่อนกล้วยไม้ขนาด 2-5 มิลลิเมตรที่เตรียมไว้ มาซับให้แห้งด้วยกระดาษปลอดเชื้อและทำแผลโดยใช้ปลายเข็มก่อนนำไปบ่มในอาหารเหลวสูตร ½MS + acetosyringone 100 µM ที่ผสมสารละลายที่มีเชื้อ *A. tumefaciens* ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที โดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที

2.5 ซับโพรโทคอร์มกล้วยไม้ให้แห้งด้วยกระดาษปลอดเชื้อ นำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะเป็นเวลา 3 วัน จนกระทั่งสังเกตเห็นการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* นำโปรโตคอร์มไปล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม 1,200 มก./ล. เป็นเวลา 5 นาที ซับโพรโทคอร์มให้แห้งด้วยกระดาษปลอดเชื้อ

2.6 นำโพรโทคอร์ม/ต้นอ่อนกล้วยไม้ไปเลี้ยง บนอาหารแข็งสูตร อาหารแข็ง NDM ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin 10 มก./ล. โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ25±2°C ภายใต้ความเข้มแสง 40 µmol m^{-2} s^{-1} 16 ชม.ต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน ทำการคัดเลือกโพรโทคอร์ม/ต้นอ่อนที่ได้รับการถ่ายยีน

3) การตรวจสอบการสอดแทรกของยีนด้วย **GUS assay**

หลังจากการถ่ายยีนนาน 3 วัน นำโพรโตคอร์มมาล้างด้วยสารละลาย cefotaxime ความเข้มข้น 1200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เกาะติดอยู่ภายนอกชิ้นพืช ซับเนื้อเยื่อบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ ใส่เนื้อเยื่อในหลอด microtube เติมสารละลาย X-glue ให้ท่วมชิ้นส่วนพืช นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืนหยุดปฏิกิริยาโดยดูดสารละลายออกแล้วเติม 70% ethanol เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากชิ้นพืชตรวจดูตำแหน่งที่เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืช

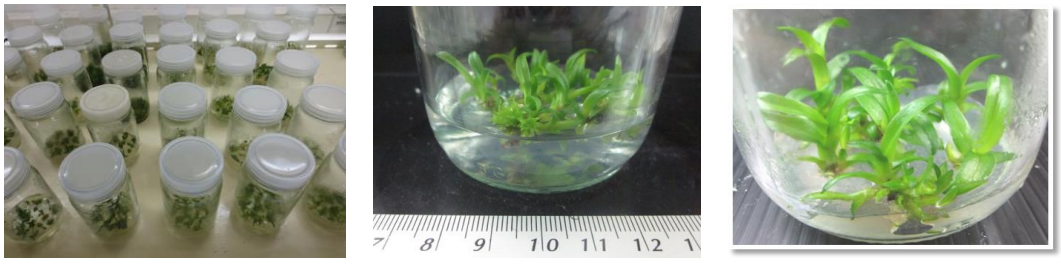
4) การตรวจสอบการสอดแทรกของยีน NOS, 35S และ Antisense ACC oxidase ด้วยเทคนิค PCR (ภาคผนวก)

-เวลาและสถานที่ ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2557
ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และสถาบันวิจัยพืชสวน

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

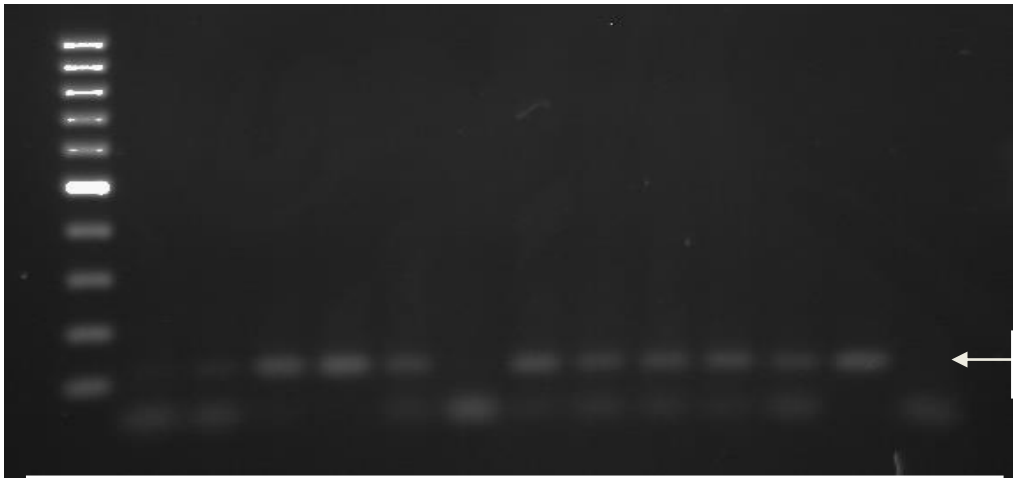
การตรวจสอบการสอดแทรกของยีนในกล้วยไม้หวายเอียสกุลด้วยเทคนิค PCR

จากการนำโพรโตคอร์มที่ผ่านการคัดเลือกไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนได้ประมาณ 200 โพรโตคอร์ม (5 flask) (ภาพที่ 1) และชักนำให้เกิดต้นซึ่งปัจจุบันมีต้นกล้วยไม้เอียสกุลที่ผ่านการคัดเลือกในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ประมาณ 40 ต้น คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2) แต่ส่วนใหญ่ยังมีขนาดเล็ก (plantlet) มีเพียง 12 ต้นที่มีขนาดโตสามารถตัดชิ้นส่วนไปตรวจสอบการสอดแทรกยีนด้วยเทคนิค PCR จากการตรวจสอบพบว่ามีเพียง 9 ต้น หรือ 4.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มียีน *ACC oxidase* สอดแทรกอยู่ (ภาพที่ 4,5,6) แสดงให้เห็นแม้จะคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะอาจจะมีบางโพรโตคอร์มที่แข็งแรงสามารถต้านทานสารปฏิชีวนะได้ทั้งที่ไม่มียีนเป้าหมาย หรืออาจจะเกิดการสูญหายของยีน(gene lost) ระหว่างที่มีการพัฒนาไปเป็นต้น จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบการสอดแทรกยีนด้วยเทคนิค PCR ในต้นที่โตเต็มที

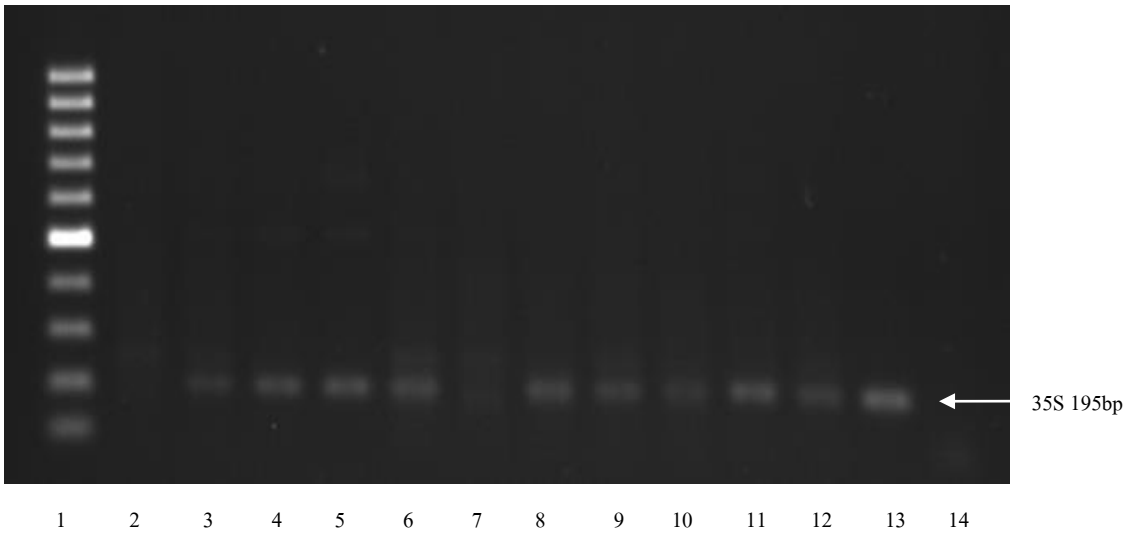


ภาพที่1. โปรโตคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้เอียสกุลที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium*ที่มียีน *antisense ACC oxidase*

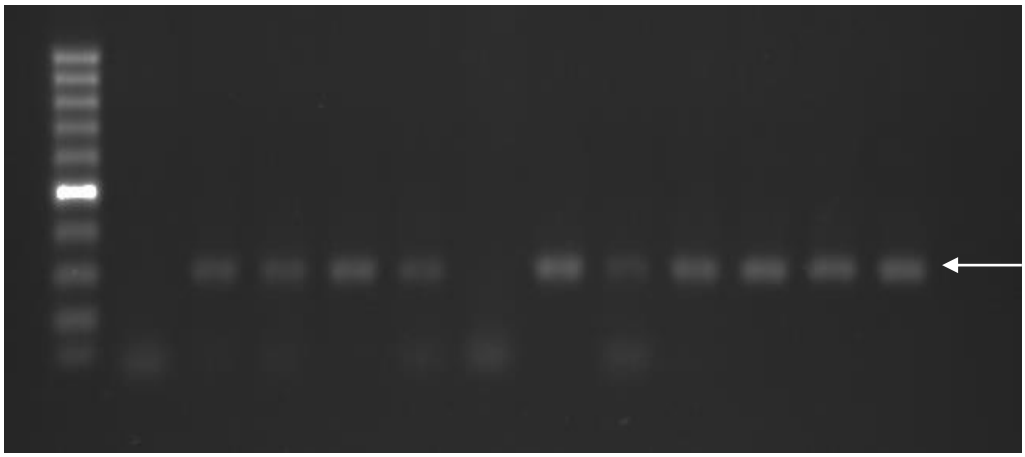
ภาพที่ 2 ต้นกล้วยไม้เอียสกุลที่ผ่านการคัดเลือกในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin



ภาพที่ 3 ภาพแสดงผลการตรวจสอบการสอดแทรกยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ NOS คู่กับ anti-NOS เป็นไพรเมอร์ โดย เลนที่ 1. คือ DNA ladder 100 bp 2,7. คือ ดีเอ็นเอกล้วยไม้เอียสกุลที่ไม่เกิดการสอดแทรกยีน 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 คือ ดีเอ็นเอกล้วยไม้เอียสกุลที่ผ่านการส่งถ่ายยีน 13. คือ พลาสมิด pCAMBIA 1304 14. คือ ดีเอ็นเอกล้วยไม้เอียสกุลที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน(control)



ภาพที่4 ภาพแสดงผลการตรวจสอบการสอดแทรกยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ 35S คู่กับ anti-35S เป็นไพรเมอร์ โดย เลนที่ 1. คือ DNA ladder 100 bp 2,7. คือ ดีเอ็นเอกล้วยไม้เอียสกุลที่ไม่เกิดการสอดแทรกยีน 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 คือ ดีเอ็นเอกล้วยไม้เอียสกุลที่ผ่านการส่งถ่ายยีน 13. คือ พลาสมิด pCAMBIA 1304 14. คือ ดีเอ็นเอกล้วยไม้เอียสกุลที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน



ภาพที่ 5 ภาพแสดงผลการตรวจสอบการสอดแทรกยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ ACC forward คู่กับ anti- ACC reward เป็นไพรเมอร์ โดย เลนที่ 1. คือ DNA ladder 100 bp 2,7. คือ ดีเอ็นเอกล้วยไม้เอียสกุลที่ไม่เกิดการสอดแทรกยีน 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 คือ ดีเอ็นเอกล้วยไม้เอียสกุลที่ผ่านการส่งถ่ายยีน 13. คือ พลาสมิด pCAMBIA1304 14. คือ ดีเอ็นเอกล้วยไม้เอียสกุลที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบต้นหวายเอียสกุลที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *ACC oxidase* โดยเทคนิค PCR พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การคงอยู่ของยีน 4.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การตรวจสอบด้วยการคัดเลือกในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin สามารถตรวจสอบได้ถึง 20 เปอร์เซ็นต์

10. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์:

ยีน ACC oxidase และวิธีการในการส่งถ่ายยีนที่ได้จากงานทดลองครั้งนี้สามารถนำไปเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ในพืชอื่นๆ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี): -

12. เอกสารอ้างอิง :

ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. โรงพิมพ์อัมรินทร์พริ้นติ้ง แอน พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน) กรุงเทพฯ. 283น.

เอกสาร การอบรมหลักการปรับปรุงพันธุ์พืช ระหว่างวันที่ 23 เมษายน – 27 เมษายน 2550 ความร่วมมือระหว่าง สวทช กับ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน . 142 น.

Aida R, T. Yoshida, K. Ichimura, R. Goto and M. Shibata. 1998. Extension of flower longevity in transgenic torenia plants incorporating ACC oxidase transgene. Plant Sci. 138: 91.101.

Murashige R.S. and Skoog, F. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 67: 603-607.

Mol, J.N.M., T.A. Holton and R.E. Kose. 1995. Floriculture: Genetic engineering of commercial Strains. Tibtech Sep; 13:31-39.

Nadeau, J. A.,Zhang, X.S., Nair, H. and O'Neill, S.D. 1993. Temporal and special regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in the pollination-induced senescence of orchid flower. Plant Physiology 103: 31-39.

Reid M.S. and M.J. Wu. 1992. Ethylene and flower senescence. J. of Plant Growth Regulation. 11: 37-43.

13. ภาคผนวก :

13.1 สูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS (Marashige and Skoog, 1962)

สารเคมี	ปริมาณ(มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.\ 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$MnSO_4.\ 4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.\ 5H_2O$	8.6
H_3BO_3	6.2

KI	0.33
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.\ 5H_2O$	0.025
$CoCl_2.H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.25
Nicotinic acid	0.5
Thiamine-HCL	0.1
Pyridoxine-HCL	0.5
Glycine	2.0
Myo-inositol	100
Agar	8000
Sucrose	2000
pH 5.7	

13.2 Luria Broth (LB medium) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

Bacto-tryptone 10 g/l

Bacto-yeast extract 5 g/l

NaCl 10 g/l

pH 7.2

(ถ้าเป็นอาหารแข็งให้เติม Bacto-agar 18 g/l)

13.3 วิธีการตรวจสอบการสอดแทรกของยีน NOS, 35S และ Antisense ACC oxidase ด้วยเทคนิค PCR

การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกล้วยไม้เอียสกุล ที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยวิธี *A. tumefaciens* และไม่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยวิธี *A. tumefaciens* จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

1. ตัดปลายใบของกล้วยไม้เอียสกุลที่ผ่านการส่งถ่ายยีน บดด้วยไนโตรเจนเหลวเติม extraction buffer 500 ulในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 1.5 มล.ผสมให้เข้ากัน
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที โดยทุกๆ 10 นาทีให้พลิกหลอดไปมา
3. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่
4. เติม Chloroform : Isoamyl (24 : 1) 500 ulผสมให้เข้ากัน
5. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่
6. เติม Isopropanol 500 ulพลิกไปมาเบาๆจนกระทั่งเห็นสายดีเอ็นเอ
7. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 1-2 นาทีเทสารละลายทิ้ง
8. เติม 95% ethanol 500 ulเดือดให้ตะกอนลอย นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที
9. เติม 95% ethanol 500 ulอีกครั้งหนึ่ง ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
10. เติม TE buffer ที่มี RNase A จำนวน 20 ulเพื่อละลายตะกอนเก็บสารละลาย DNA ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR 30 µl

1. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	19.7	µl
2. 10X *Taq* buffer	2.5	µl
3. 25 mM $MgCl_2$	0.8	µl
4. 10 mMdNTP	0.25	µl
5. Primer 1	1.75	µl
6. Primer 2	1.75	µl
7. *Taq* DNA polymerase (5 unit)	0.25	µl
8. DNA	3	µl

Primer ที่ใช้ในที่นี้คือ 35S, NOS และ ACC โดยในแต่ละปฏิกิริยาใช้ 35S คู่กับ Anti-35S, NOS คู่กับ Anti-NOS และ ACC-Forward คู่กับ ACC-Reverse โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองมีลำดับเบสดังนี้

35S มีลำดับเบสดังนี้คือ 5‘ GCT CCT ACA AAT GCC ATC A3’
Anti-35S มีลำดับเบสดังนี้คือ 5‘GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA3’
NOS มีลำดับเบสดังนี้คือ 5‘ GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3’
Anti-NOSมีลำดับเบสดังนี้คือ5‘ TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3’
ACC-Forward มีลำดับเบสดังนี้คือ5‘ ATC TCA CAA ATC CCCGATCT 3’

ACC-Reverse มีลำดับเบสดังนี้คือ5‘ AGC AAC TGA AGCCCA CAGAC 3’

เมื่อเตรียมสารละลายตามส่วนผสมของปฏิกิริยา 30 µl ในแต่ละหลอด นำแต่ละหลอดมาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) โดยตั้งอุณหภูมิ และจำนวนรอบดังนี้

ทดสอบ 35S, Anti-35S

ขั้นตอนที่ 1 Predenaturationตั้งอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวออกจากกัน

Annealing อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับดีเอ็นเอสายเดี่ยว

Extensionอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ *Taq* DNA polymerase ทำปฏิกิริยาสร้างดีเอ็นเอคู่ผสม

ขั้นตอนที่ 3 Final Extension อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

ในขั้นที่ 2 ทำซ้ำ 25 รอบ ขั้นตอนที่ 1 และ 3 ทำ 1 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยามาตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Agarosegel electrophoresisโดยใช้ความเข้มข้นของ electrophoresis (0.8% agarose gel ใน 1X TAE buffer ที่ 100 v. นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที)ตรวจผลภายใต้เครื่อง UV visible

ทดสอบ NOS, Anti-NOS

ขั้นตอนที่ 1 Predenaturationตั้งอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวออกจากกัน

Annealing อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 40 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับดีเอ็นเอสายเดี่ยว

Extensionอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ *Taq* DNA polymerase ทำปฏิกิริยาสร้างดีเอ็นเอคู่ผสม

ขั้นตอนที่ 3 Final Extension อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ในขั้นที่ 2 ทำซ้ำ 40 รอบ ขั้นตอนที่ 1 และ 3 ทำ 1 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยามาตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Agarosegel electrophoresisโดยใช้ความเข้มข้นของ

electrophoresis (0.8% agarose gel ใน 1X TAE buffer ที่ 100 v. นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที)ตรวจผลภายใต้เครื่อง UV visible

ทดสอบ ACC-Forward, ACC-Reverse

ขั้นตอนที่ 1 Predenaturationตั้งอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวออกจากกัน

Annealing อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับดีเอ็นเอสายเดี่ยว

Extensionอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ *Taq* DNA polymerase ทำปฏิกิริยาสร้างดีเอ็นเอคู่ผสม

ขั้นตอนที่ 3 Final Extension อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

ในขั้นที่ 2 ทำซ้ำ 35 รอบ ขั้นตอนที่ 1 และ 3 ทำ 1 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยามาตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Agarosegel electrophoresisโดยใช้ความเข้มข้นของ electrophoresis (0.8% agarose gel ใน 1X TAE buffer ที่ 100 v. นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที)ตรวจผลภายใต้เครื่อง UV visible