ปฏิบัติการบทที่ 8
การตรวจสอบ และวิเคราะห์การถ่ายฝากยีนในพืช

การวิเคราะห์ยีนที่สนใจว่ามีการถ่ายทอดเข้าสู่พืชที่ต้องการจริงหรือไม่ มีหลายวิธี เช่น การคัดเลือกบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ การทำ southern hybridization และการทำ polymerase chain reaction (PCR) เป็นต้น

สำหรับการทดลองนี้เลือกวิธีการทำ PCR เนื่องจากเป็นเทคนิคที่รวดเร็ว และแม่นยำในการวิเคราะห์หาเฉพาะยีนที่สนใจว่ามีการถ่ายทอดเข้าสู่พืชที่ต้องการจริงหรือไม่ ซึ่งวิธีการนี้เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่สนใจ โดยการใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีความยาวประมาณ 20-25 เบส และต้องมีลำดับเบสจำเพาะเจาะจงกับยีนที่สนใจด้วย ดังนั้นจึงเรียกโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ นี้ว่า ไพรเมอร์ (primer) ดังนั้นไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองมีอยู่ 2 ตัว คือ ตัวที่มีจำเพาะเจาะจงกับลำดับเบสบริเวณปลาย 3' ของสาย DNA สาย 5' ⟶ 3' และตัวที่มีจำเพาะเจาะจงกับลำดับเบสบริเวณปลาย 3' ของสาย DNA สาย 3' ⟶ 5'

หลักการทำ PCR คือ การนำไพรเมอร์ทั้งสองตัวใส่รวมกับ DNA ที่แยกได้จากเซลล์ทั้งหมด (genomic DNA) และใส่เอนไซม์ DNA polymerase จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิให้กับสาย DNA ที่แยกได้เพื่อเป็นการแยกสาย DNA จากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว และทำการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าไปจับบริเวณปลาย 3' ในส่วนที่มีเบสจำเพาะเจาะจงกับสาย DNA สายเดี่ยว แล้วทำการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase เพื่อให้เกิดการสร้างสายนิวคลีโอไทด์สายใหม่ต่อจากบริเวณที่เป็นไพรเมอร์ นอกจากสายนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นจะมีลำดับเบสจำเพาะเจาะจงกับสาย DNA ต้นแบบทั้งสองสาย ดังนั้น DNA จากเดิมที่เคยมี 1 โมเลกุลก็จะกลายเป็น 2 โมเลกุล ดังนั้นถ้าหากต้องการเพิ่มปริมาณโมเลกุล DNA จึงต้องทำวิธีการเช่นเดิมซ้ำต่อไป คือการเพิ่มอุณหภูมิให้กับสาย DNA ทำให้ DNA สายคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยว ลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าไปจับบริเวณปลาย 3' ในส่วนที่มีเบสจำเพาะเจาะจงกับสาย DNA สายเดี่ยว และปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงาน

ของเอนไซม์ DNA polymerase เพื่อให้เกิดการสร้างสายนิวคลีโอไทด์สายใหม่ต่อจากบริเวณที่เป็นไพรเมอร์ ทำเช่นนี้ประมาณ 30-40 รอบ ปริมาณ DNA จะเพิ่มขึ้นในอัตราส่วน 2^n (n คือ จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา)

<u>วิธีการทดลอง</u>

- วิธีการสกัด DNA จากพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายยีน

1. สกัด DNA จากพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายยีน โดยวิธีของ Qiu และคณะ (2007)
2. วิเคราะห์หายีนที่ต้องการศึกษาในพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายยีน โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ในสภาวะที่เหมาะสม พร้อมกับใช้เอนไซม์ DNA polymerase และ specific primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนที่ต้องการศึกษา โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งมี DNA ของพืชทดลอง 2 ไมโครลิตร
3. ทำการตรวจสอบ DNA ที่ได้จากการทำ PCR มาแยกโดยวิธี electrophoresis ที่มีตัวกลางเป็น agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1% (v/w) ในสารละลาย 1X TBE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 110 โวลต์ 60 นาที
4. ย้อม DNA ด้วย ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที
5. วิเคราะห์แถบ DNA ที่สนใจภายใต้รังสียูวี

ผลการทดลอง

……
……
……
……
……
……
……
……
……
……

สรุปผลการทดลอง

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

……

ให้นักศึกษาวาดภาพแสดงขั้นตอนการส่งถ่ายยีนโดยย่อให้เข้าใจ

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....