บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สารเคมีและสารละลาย

Acrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)

Ampicillin (Bio Basic Inc, Canada)

Ammnonium peroxydisulfate (USB corporation, USA)

Bisacrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)

Boric acid (Merck, Germany)

Chloroform (Lab Scan, Ireland)

dNTPs (Fermentus, USA)

Dithiothreitol (DTT) (Invitrogen, USA)

EDTA (Fisher Scientific, USA)

Ethanol (Merck, USA)

Ethidium bromide (Bio Basic Inc, Canada)

Isopropanol (Merck, Germany)

IPTG (US Biological, USA)

N,N' –dimethyl-formamide (Bio Basic Inc, Canada)

Oligonucleotide primer (Bio Basic Inc, Canada)

Silver nitrate (Merck, Germany)

Sodium chloride (Merck, Germany)

Sodium carbonate (Merck, Germany)

Sodium hydroxide (Merck, Germany)

TEMED (USB corporation, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Tris (USB corporation, USA)

Trizol™ reagent (Invitrogen, USA)

X-gal (USB corporation, USA)

pGEM®-T vector (Promega, USA)

DH 5α Escherichia coli competent cell (Invitrogen, USA)

Agar-Agar (O.V. chemcal, Thailand)

Agarose (Gibco/BRL, USA)

Peptone (Scharlau, Spain)

Lambda DNA/AvaII (Fermentus, USA)

Yeast extract (Scharlau, Spain)

3.1.2 ชุดทดสอบ

pGEM®-T vector System Kit (Promega, USA)

GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Germany)

GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit for Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA)

RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Germany)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) Balances, Model AB204 (Mettler-Toledo, Switzerland)
2) CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA)
3) Electrophoresis for agarose gel, Gel-Mate 2000 (Toyobo, Japan)
4) Electrophoresis, vertical apparatus, Hoefer SQ3 (Amersham pharmacia biotech, USA)
5) Power Supply, Model E833 (Consort, Belgium)
6) Gel documentation (Model Gene Genius & gene Tools, USA)
7) Gel dryer, Model GD 2000 (Amersham Bioscience, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

8) Hot Air Oven, Model ULE 400 (Memmert, Germany)
9) PCRThermocycler, PTC-100™ (MJ research, USA)
10) Spectrophotometer UV/visible light (UV-VIS Biowave S2100, Germany)
11) ThermoShaker, Model DKSI001a (Daiki, Korea)
12) Magnetic Stirrer, Model HS115 (HL Instrument, Thailand)
13) Microcentrifuge tube 1.5 ml (Sorenson, Bioscience. Inc., USA)
14) PCR tube (Sorenson, Bioscience. Inc., USA)
15) pH meter (Model CG 842, Inc., USA)
16) Pipette, 0.2 µl (CappAero, Denmark)
17) Pipette, 20, 200, 1000 µl (Gilson, France)
18) Refrigerated Bench Top Centrifuge, Model Universal 32 R (Hettich, Germany)
19) Sequencer, Hoefer SQ3 (Amersham pharmacia biotech, USA)
20) Vortex mixer, Genie II Model G560E (Scientific Industries, USA)

3.3 สัตว์ทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ลูกสุกร 2 กลุ่ม คือ ลูกสุกรพันธุ์พื้นเมือง และลูกสุกรสายพันธุ์ทางการค้า ในระยะก่อนหย่านมอายุ 14 วัน (ภาพ 6) จำนวนกลุ่มละ 3 ตัว (รวมจำนวน 6 ตัว) ลูกสุกรพันธุ์พื้นเมืองได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับลูกสุกรสายพันธุ์ทางการค้า ถูกเลี้ยงที่ฟาร์มสุกรของสถานีวิจัยทางการเกษตรแม่เหียะ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ลูกสุกรทั้งหมดถูกเก็บลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม (jejunum) เพื่อใช้ศึกษา adhesion test และจำแนกยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(ก)

(ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 6 ลูกสุกรพันธุ์พื้นเมือง (ก) และสุกรสายพันธุ์ทางการค้า (ข)

3.4 การจำแนกฟีโนไทป์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านม

3.4.1 การเตรียม brush border จากลำไส้ของลูกสุกร

วิธีการเตรียม brush border ของลำไส้ลูกสุกร ดัดแปลงจากวิธีการของ Baker *et al*. (1997) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) ตัวอย่างลำไส้ส่วนเจจูนั่ม (Jejunum) ยาว 2 เซนติเมตร ถูกเก็บและผ่าตามความยาวของลำไส้เพื่อล้างทำความสะอาดด้วยสารละลาย PBS pH 7.4 (ภายใน 2 ชั่วโมงหลังการชำแหละซาก)
2) เก็บ brush border จากลำไส้เล็กโดยการขูดผิวเมือก (mucosal surface) จากเนื้อเยื่อของผนังลำไส้ด้วย glass microscope slide และนำผิวเมือกไปล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 10 ml
3) ปั่นล้างที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที เพื่อเก็บ brush border
4) ละลายตะกอน brush border ด้วยสารละลาย PBS ที่แช่เย็น จำนวน 5 ml ที่มี gentamicin (1 mg/ml) และ sodium azide (3 mM) จำนวน 100 µl และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

3.4.2 เชื้อ *Escherichia coli*

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ O157 ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร ซึ่งมีการแสดงออกของ K88 fimbriae (Jeyasingham *et al.*, 1999) เชื้อดังกล่าวถูกเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) เชื้อ *E. coli* O157 ถูกเพาะเลี้ยงใน LB-broth จำนวน 5 ml โดยเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
2) นำเซลล์ที่ได้ไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย และเทอาหารเลี้ยงเชื้อออก
3) เจือจางเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลาย PBS ให้ได้ ค่า O.D. $_{520\ nm}$ ประมาณ 1.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3 Brush border adhesion test

การทดสอบการยึดเกาะของเชื้อกับ brush border ถูกทดสอบตามวิธีของ Phyton (2003)

1) ผสม brush border จำนวน 1 ml เข้ากับ เซลล์แบคทีเรีย จำนวน 1 ml
2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที
3) ดูดเชื้อแบคทีเรียจำนวน 20 µl ลงบนสไลด์
4) ตรวจสอบการยึดเกาะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscopy)

% การยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกับ brush border พิจารณาจากการสุ่มนับ brush border ประมาณ 40 brush border โดยคำนวณดังสูตร

$$\% \text{ การยึดเกาะ} = \frac{\text{จำนวน brush border ถูกยึดเกาะโดยเชื้อแบคทีเรียสองเซลล์ขึ้น}}{\text{Brush border จำนวน 40 brush border จากการสุ่มนับ}} \times 100$$

หาก brush border ถูกยึดเกาะโดยเชื้อแบคทีเรียสองเซลล์ขึ้นไป มากกว่า 10% ขึ้นไปถือว่าอ่อนแอต่อโรคท้องร่วง และหาก brush border ถูกยึดเกาะโดยเชื้อแบคทีเรียสองเซลล์ขึ้นไป แต่ต่ำกว่า 10% ถือว่าต้านทานต่อโรคท้องร่วง

3.5 การสกัด RNA

brush border ของลูกสุกรอายุประมาณ 14 วัน ที่มีลักษณะตัวรับต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* ถูกสกัด RNA โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) ชั่งตัวอย่าง brush border ประมาณ 0.5 กรัม ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml และเติม Trizol™ reagent ปริมาตร 250 µl โฮโมจิไนซ์ (homogenized) ด้วยกระบอกเข็มฉีดยา (ขนาด 5 ml) ให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน และบ่มสารผสมดังกล่าว ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที
2) เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 70 µl เขย่าด้วยมือ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 นาที
3) นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4) ดูดสารละลายใสส่วนบน ใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่

5) เติม isopropanol ปริมาตร 2 ใน 3 ส่วนของสารละลายที่ได้จาก ข้อ 4 เขย่าด้วยมือเบา ๆ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

6) นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{o}C นาน 15 นาที และเทสารละลายส่วนใสออก

7) ล้างตะกอน RNA จำนวน 2 ครั้ง ด้วยเอธานอล จำนวน 1 ml โดยปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{o}C นาน 5 นาที

8) ตากตะกอน RNA ให้แห้ง และละลายตะกอน RNA ด้วย DEPC treated water จำนวน 30 µl (หรือขึ้นอยู่กับขนาดของตะกอน RNA)

3.6 DNase digestion

เพื่อกำจัด genomic DNA ที่ปนเปื้อนออกจาก total RNA ตัวอย่างสารละลาย RNA ปริมาตร 10 µl ถูกนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ DNase I ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 ^{o}C เป็นเวลา 10 นาที และส่วนผสมของปฏิกิริยามีรายละเอียดดังนี้

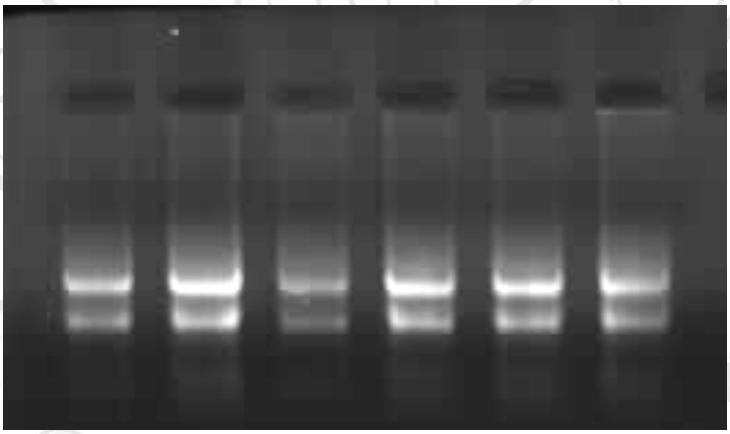
สารละลาย RNA	10	µl
10X DNase buffer	4	µl
dH_2O	16	µl
DNase I (Fermentus) (1U/µl)	10	µl
ปริมาตรรวม	40	µl

3.7 RNA clean up

เมื่อทำการกำจัด genomic DNA ที่ปนเปื้อนออกแล้ว RNA ถูกให้บริสุทธิ์โดยการกำจัดส่วนของเอนไซม์ DNase I และองค์ประกอบอื่น ๆ ออกจาก RNA ด้วยชุดสกัด RNeasy Mini Kit (Qiagen) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1) ปรับปริมาตร RNA ด้วย RNase free water ให้ครบ 100 µl
2) เติม RLT buffer จำนวน 350 µl
3) เติม เอธานอลที่แช่เย็น จำนวน 250 µl
4) ดูดสารละลายทั้งหมด จำนวน 700 µl ใส่ใน column
5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 วินาที
6) ย้าย column ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2.0 ml
7) เติม RPE buffer ปริมาตร 500 µl ปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 วินาที เพื่อกำจัดสารละลายที่ไม่ต้องการออก
8) นำ column ไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 2 นาที เพื่อทำให้ column แห้ง
9) ย้าย column ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ และเติม RNase free water จำนวน 25 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที และนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 นาที จากนั้นเติม RNase free water จำนวน 10 µl และปั่นซ้ำที่ความเร็วและอุณหภูมิเช่นเดิม
10) ตรวจสอบคุณภาพของ RNA ที่แยกได้ บน 1.2% Agarose Gel ที่มี formaldehyde ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (ภาพ 7) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 280 nm



ภาพ 7 แสดงการปรากฏของแถบอาร์เอ็นเอบน 1.2 % FA gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.8 β-actin PCR amplification

ปฏิกิริยา PCR ของ β-actin ถูกใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของ genomic DNA ใน RNA ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ DNase I โดยมีส่วนผสมดังนี้

1) ทำ PCR ด้วยชุดไพร์เมอร์ ของ β-actin

สารละลาย RNA	1.000	µl
10X Taq buffer	1.000	µl
Forward primer β-actin (10 mM) (5'-GAGAAGCTCTGCTACGTCGA-3')	0.200	µl
Reverse primer β-actin (10 mM) (5'-CAGACAGCACCGTGTTGGC-3')	0.200	µl
dNTP (2.5 mM each)	0.250	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	0.600	µl
dH_2O	6.725	µl
Taq DNA polymerase (Fermentus) (5U/µl)	0.025	µl
ปริมาตรรวม	10.000	µl

โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา PCR มีรายละเอียดดังนี้

รอบที่ 1	denaturation:	$94^{O}C$	3	นาที	
รอบที่ 2	denaturation:	$94^{O}C$	30	วินาที	} จำนวน 35 รอบ
	annealing:	$58^{O}C$	30	วินาที	
	extension	$72^{O}C$	1	นาที	
รอบที่ 3	extension	$72^{O}C$	5	นาที	

2) ตรวจสอบผลของ PCR บน Agarose gel electrophoresis (1%) ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต total RNA ที่บริสุทธิ์ (ไม่มีการปนเปื้อนโดย genomic DNA) จะไม่เกิด PCR product

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.9 DDRT-PCR

ตัวอย่าง RNA ของลูกสุกรที่ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* ถูกนำมาวิเคราะห์หายีนที่แสดงออกแตกต่างกันใน brush border โดยใช้เทคนิค DDRT-PCR ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอนย่อย คือ การสังเคราะห์ first strand cDNA และการคัดกรองยีนที่แสดงออกแตกต่างกัน

3.9.1 การสังเคราะห์ first strand cDNA

ในขั้นตอนการสังเคราะห์ first strand cDNA มีรายละเอียดดังนี้

1) เตรียมส่วนผสมของ RNA, oligo $dT_{12}VG$ และ dNTPs ที่มีสัดส่วนดังต่อไปนี้

สารละลาย RNA	5	µl
oligo $T_{12}VG$ (100mM)	1	µl
dNTP (2.5 mM each)	1	µl
dH_2O	5	µl
ปริมาตรรวม	12	µl

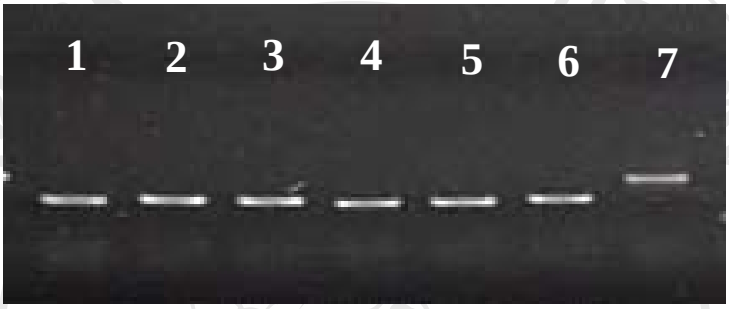
2) นำส่วนผสมดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวางบนน้ำแข็ง
3) เติมส่วนผสมของเอนไซม์ SuperscriptIII reverse transcriptase (Invitrogen) จำนวน 8 µl ที่ประกอบไปด้วย

5X SuperscriptIII	4	µl
0.1M DTT	2	µl
RNase Inhibitor	1	µl
SuperscriptIII reverse transcriptase	1	µl
ปริมาตรรวม	8	µl

4) นำส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 15 นาที และเติม RNase free water ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 เพื่อใช้เป็น cDNA แม่แบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5) cDNA ที่ได้ถูกนำไปตรวจสอบคุณภาพด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ β-actin ตามวิธีการในข้อ 3.8 (ภาพ 8)



ภาพ 8 แสดงผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของ genomic DNA ใน cDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR β-actin PCR หมายเลข 1-6 คือ ตัวอย่าง cDNA ที่ไม่มี genomic DNA ปนเปื้อน และหมายเลข 7 คือตัวอย่าง genomic DNA

3.9.2 การคัดกรองยีนที่แสดงออกแตกต่างกันโดยใช้เทคนิค DDRT-PCR

1) ตัวอย่าง cDNA จากข้อ 3.9.1 ถูกเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ $dT_{12}VG$ กับไพร์เมอร์ จำนวน 12 คู่ (ดังตาราง 2) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

ตัวอย่าง first strand cDNA	2.0	µl
10X buffer (Invitrogen)	2.0	µl
oligo $T_{12}VG$ (10 pmol)	1.5	µl
arbitrary primer (10 pmol)	0.5	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1.2	µl
dNTP (10 pmol)	0.5	µl
dH_2O	4.2	µl
Taq DNA polymerase (Invitrogen) (5U/µl)	0.1	µl
ปริมาตรรวม	15.0	µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา PCR มีรายละเอียดดังนี้

รอบที่	1	denaturation:	94^{O}C	3	นาที	
รอบที่	2	denaturation:	94^{O}C	30	วินาที	
		annealing:	42^{O}C	1	นาที	จำนวน 50 รอบ
		extension:	72^{O}C	1	นาที	
รอบที่	3	extension:	72^{O}C	5	นาที	

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ของ DDRT-PCR ที่ใช้

Primer	**nucleotide sequences**		**nucleotide sequences**	
ZP1	Forward	5’-TACAACGAGG-3’	Reverse	5’-TTTTTTTTTTTTVG-3’
ZP2	Forward	5’-CTTTCTACCC-3’	Reverse	5’-TTTTTTTTTTTTVG-3’
ZP3	Forward	5’-TTTTGGCTCC-3’	Reverse	5’-TTTTTTTTTTTTVG-3’
ZP4	Forward	5’-GGAACCAATC-3’	Reverse	5’-TTTTTTTTTTTTVG-3’
ZP5	Forward	5’-AAACTCCGTC-3’	Reverse	5’-TTTTTTTTTTTTVG-3’
ZP6	Forward	5’-TCGATACAGG-3’	Reverse	5’-TTTTTTTTTTTTVG-3’
ZP13	Forward	5’-GTTTTCGCAG-3’	Reverse	5’-TTTTTTTTTTTTVG-3’
ZP15	Forward	5’-GATCCAGTAC-3’	Reverse	5’-TTTTTTTTTTTTVG-3’
ZP16	Forward	5’-GATCACGTAC-3’	Reverse	5’-TTTTTTTTTTTTVG-3’
ZP17	Forward	5’-GATCTGACAC-3’	Reverse	5’-TTTTTTTTTTTTVG-3’
ZP18	Forward	5’-GATCTCAGAC-3’	Reverse	5’-TTTTTTTTTTTTVG-3’
ZP24	Forward	5’-GATCTAGGTC-3’	Reverse	5’-TTTTTTTTTTTTVG-3’

ที่มา : Bauer et al. (1993)

2) ผลผลิต PCR ที่ได้ถูกเติมสารละลาย loading buffer จำนวน 6 µl และนำไป denaturation ที่ 94^{O}C เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในน้ำแข็ง ก่อนนำไปแยกขนาดชิ้นส่วน DNA บน polyacrilamide gel electrophoresis (6%) ที่กำลังไฟ 50 W เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3) แผ่นเจลถูกนำไปย้อมด้วย silver staining โดยแช่เจลในสารละลายกรดอะซิตริกที่ความเข้มข้น 10% จำนวน 300 ml นาน 10 นาที และแช่ในกรดไนตริกที่มีความเข้มข้น 1% จำนวน 300 ml นาน 10 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วย deionized water จำนวน 3 ครั้ง ก่อนแช่ด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตที่ความเข้มข้น 0.1% จำนวน 300 ml ซึ่งถูกผสมด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ (37%) จำนวน 450 µl นาน 30 นาที หลังจากนั้นล้างสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ด้วย deionized water จำนวน 2 ครั้งและล้างด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 3% (ที่มีฟอร์มัลดีไฮด์ 260 µl) ที่เจือจางด้วย deionized water ในอัตราส่วน 1:2 จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นแช่แผ่นเจลในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตจนกระทั่งแถบ DNA ปรากฏ และหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดอะซิตริก (10%) ล้างแผ่นเจลด้วย deionized water จำนวน 3 ครั้ง ก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง gel dryer

3.10 Reamplification

แถบ DNA ที่ปรากฏแตกต่างกันระหว่างลูกสุกรที่ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* ถูกนำมาเพิ่มปริมาณ DNA เพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแถบ cDNA มีรายละเอียดดังนี้

1) ตัดแถบ cDNA และนำไปแช่ใน 1X TE buffer จำนวน 20 µl
2) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นโฮโมจิไนซ์ด้วยปลาย tip
3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 15 นาที ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน
4) นำสารละลาย DNA ที่ได้ มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพร์เมอร์และส่วนผสมเช่นเดียวกับขั้นตอนการคัดกรองยีน ในข้อ 3.9.2
5) นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดบน polyacrylamide gel electrophoresis (6%) โดยเปรียบเทียบกับผลผลิต PCR ที่ได้จากข้อ 3.9.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.11 การสกัด DNA fragment จาก agarose gel โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit

ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในข้อ 3.10 ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) ก่อนนำไปเชื่อมกับ vector โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) ผลผลิต PCR ถูกนำไปแยกขนาดบน Agarose gel electrophoresis (0.8%) และตัดแถบ cDNA ออกจากเจล
2) ชั่งน้ำหนักเจลและเติมบัฟเฟอร์ QG ลงไป 3 เท่าของน้ำหนักเจล
3) เขย่าให้เจลละลายโดยใช้ vortex นานประมาณ 5 นาที
4) ปิเปตสารละลาย gel ลงในชุด QIAquick spin column
5) นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที เพื่อกำจัดสารละลายที่ผ่าน column ออก
6) เติม PE buffer จำนวน 0.75 ml ลงใน column นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาทีและเทสารละลายที่ผ่าน column ออก หลังจากนั้นนำ column นี้ไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที เพื่อทำให้ column แห้ง
7) นำ QIAquick spin column ไปใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
8) เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 15 µl ลงในคอลัมน์และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที จากนั้นทำการปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที และเติมบัฟเฟอร์ EB อีก 10 µl และปั่นซ้ำที่ความเร็วและเวลาเช่นเดิม

3.12 การโคลนแถบ cDNA

1) นำแถบ cDNA ที่บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGEM®-T vector (Promega) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

สารละลาย DNA	1.5	µl
2X ligation buffer	2.5	µl
pGEM®-T vector	0.5	µl
T4 DNA ligase	0.5	µl
ปริมาตรรวม	5.0	µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) บ่มส่วนผสมใน ข้อ 1 ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน

3) นำส่วนผสมที่ได้ไปทำทรานสฟอร์เมชั่น (transformation) โดยใช้ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH 5α เป็น host ด้วยวิธี Heat shock เริ่มจากการผสมผลผลิตของปฏิกิริยา Ligation จำนวน 5 µl เข้ากับ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH 5α จำนวน 50 µl และนำไปแช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที นำส่วนผสมดังกล่าว ไปแช่ในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 42 °C นาน 90 วินาที และแช่ในน้ำแข็งต่ออีก 2 นาที หลังจากนั้นเติม LB-broth จำนวน 650 µl และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37 °C นาน 90 นาที นำสารละลายแบคทีเรีย จำนวน 300 µl ไปเทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-agar ที่มี selective ได้แก่ ampicillin, X-gal และ IPTG หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน

4) คัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวจำนวน 3 โคลนและโคโลนีที่มีน้ำเงิน จำนวน 1 โคลน โดย picked แบคทีเรียลงใน 1X PCR buffer จำนวน 30 µl และ LB broth ประกอบด้วย amplicillin (10 mg/ml) จำนวน 700 µl โดยที่สารละลายแบคทีเรียใน 1X PCR buffer ถูกนำไปต้มที่ 95 °C นาน 15 นาที เพื่อใช้เป็น template สำหรับตรวจหาโคลนที่มีชิ้นส่วนของ cDNA ถูกเชื่อมต่อกับ vector ส่วนสารละลายแบคทีเรียใน LB-broth นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม Glycerol:LB-broth (1:1) ปริมาตร 450 µl เก็บที่ –80 °C เพื่อรอนำไปสกัด Plasmid DNA ต่อไป

5) ปฏิกิริยา PCR ถูกใช้ตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นส่วน cDNA ซึ่งถูกเชื่อมเข้ากับ vector โดยใช้ไพร์เมอร์ M13 (Forward:5'-TTGTAAAACGACGGCCAGT-3' และ Reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

สารละลาย DNA	10.00	µl
10X Taq buffer	1.00	µl
M13 Forward primer (10 pmol)	0.40	µl
M13 Reverse primer (10 pmol)	0.40	µl
dNTP (2.5 mM each)	0.50	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1.20	µl
dH_2O	6.45	µl
Taq DNA polymerase (5U/µl)	0.05	µl
ปริมาตรรวม	20.00	µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โปรแกรมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย

รอบที่ 1	denaturation:	94^{O}C	3	นาที	
รอบที่ 2	denaturation:	94^{O}C	30	วินาที	} จำนวน 35 รอบ
	annealing:	58^{O}C	30	วินาที	
	extension:	72^{O}C	1	นาที	
รอบที่ 3	extension:	72^{O}C	5	นาที	

6) นำผลผลิต PCR ไปตรวจสอบใน Agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 0.8%

3.13 การสกัด Plasmid DNA

สำหรับโคลนที่ได้รับการยืนยันความถูกต้อง Plasmid ถูกสกัดจาก เซลล์ DH 5α *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงไว้ โดยใช้ QIAprep® Miniprep Kit ตามขั้นตอนดังนี้

1) เซลล์แบคทีเรีย จำนวน 3 ml ถูกนำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm นาน 10 นาที และเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง
2) ละลายตะกอนแบคทีเรียใน resuspension solution จำนวน 200 µl ผสมให้เข้ากัน
3) เติม lysis solution จำนวน 200 µl เพื่อทำให้ผนังเซลล์แตก พลิกหลอดกลับไปมา 8 – 10 ครั้ง และรอให้ส่วนผสมใสและเหนียวหนืด
4) บ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที และเติม neutralization buffer จำนวน 350 µl ลงไปในส่วนผสมและเขย่าให้เข้ากันอย่างช้า ๆ จนกว่าสารละลายกลายเป็นสีขุ่นและตกตะกอนเป็นปุยก้อนสีขาว
5) ปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใส ใส่ในชุด QIAprep® miniprep binding column และปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที เทสารละลายที่ผ่าน column ทิ้ง
6) เติม wash solution จำนวน 700 µl ลงใน column และปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที เทสารละลายที่ผ่าน column ทิ้ง
7) ปั่นชุด GenElute miniprep binding column เวลา 2 นาที เพื่อให้ column แห้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

8) ย้าย column ใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่ เติมด้วย elution solution จำนวน 25-30 µl ปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที
9) ตรวจสอบคุณภาพ DNA โดยใช้ spectrophotometer และ agarose gel electrophoresis

3.14 Sequence Analysis

Plasmid ของโคลน cDNA ที่ถูกต้อง ถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมโดยใช้ GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit for Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

สารละลาย Plamid DNA	3.0	µl
DTCS	4.0	µl
Primer SP6 (5 pmol)	1.0	µl
dH_2O	2.0	µl
ปริมาตรรวม	10.0	µl

โปรแกรมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย

รอบที่ 1	denaturation:	$94^{O}C$	3	นาที	
รอบที่ 2	denaturation:	$94^{O}C$	30	วินาที	จำนวน 35 รอบ
	annealing:	$58^{O}C$	30	วินาที	
	extension:	$72^{O}C$	1	นาที	
รอบที่ 3	extension:	$72^{O}C$	5	นาที	

ผลผลิต PCR ถูกนำไปตกตะกอนด้วยเอธานอล ก่อนนำเอาเข้าเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) หรือ ABI PRISM 3100 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1) ผลผลิต PCR ถูกเติม stop solution จำนวน 5 µl ซึ่งประกอบไปด้วย 3M sodium acetate (pH5.2) ปริมาตร 2 µl, 100 mM Na_2- EDTA (pH8.0) จำนวน 2 µl และ glycogen 1 µl ผสมให้เข้ากัน
2) ล้างผลผลิต PCR ด้วยเอธานอล (95%) จำนวน 50 µl จำนวน 2 ครั้ง โดยปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{O}C นาน 2 นาที
3) ตากตะกอน DNA ให้แห้งและเจือจางด้วย sample loading solution (SLS) จำนวน 20 µl ก่อนนำเข้าเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.15 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.15.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการยึดเกาะ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการยึดเกาะระหว่าง brush border กับ เชื้อ *E. coli* ในกลุ่มที่ต้านทานและอ่อนแอ ด้วยวิธี two sample T-test โดยใช้โปรแกรม SPSS version 9.0

3.15.2 การเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม

ข้อมูลลำดับพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ถูกนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับพันธุกรรมที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST (Altschul *et al*. 1997) โดยพิจารณาความคล้ายคลึง (identity) ของลำดับพันธุกรรมที่ได้กับฐานข้อมูล จากค่า E-value ซึ่งต้องมีค่าน้อยกว่า 1e-10 และ/หรือมี overlapping region มากกว่า 100 bp ที่มีค่า identity มากกว่า 80% จึงจะถือว่ามีความคล้ายคลึงกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved