บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 พืชทดลอง

ลำไยพันธุ์ดอ (*Dimocarpus longan* cv.Daw)

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนิน

สารเคมี	Cat. No.	บริษัท
1) Acetic acid AR grade	AR 1000	RCI Labscan
2) Ammonium acetate AR grade	A3440	Fisher Scientific
3) DEAE- sephadex A25	A25120	Sigma-Aldrich
4) Ethanol (C_2H_5OH)	100983	Merck
5) Horseradish peroxidase	0343	Amresco
6) Hydrogen peroxide(H_2O_2)	107209	Merck
7) Liquid nitrogen	-	-
8) Methanol (CH_3OH)	106009	Merck
9) Sodium hydroxide (NaOH)	106498	Merck
10) Orthophenylamine diamine (OPD)	P-1399	Zymed lab
11) Potassium chlorate ($KClO_3$)	-	-
12) Polyvinylpyrrolidone : PVP	P6755	Sigma-Aldrich
13) Sodium chloride (NaCl)	106404	Merck
14) *trans*-Zeatin (tZ)	Z0876	Sigma-Aldrich

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์การจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโตไคนิน

สารเคมี	Cat. No.	บริษัท
1) Ampicillin	319301	Invitrogen
2) Agar	-	Unionscience
3) Agarose	0710	AMRESCO
4) β-mercaptoethanol ($HSCH_2CH_2OH$)	444203	Merck
5) Calcium chloride ($CaCl_2$)	208291	Merck
6) Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, $19H_{42}NBr$)	219374	Merck
7) Chloroform ($CHCl_3$)	AR 1030A	RCI Labscan
8) DNaseI	EN0523	Fermentas
9) dNTP Mix	18427013	Invitrogen
10) Disodium salt (Dihydrate) (EDTA)	EB0185	Bio Basic Inc.
11) Dithiothreitol (DTT)	P2325	Invitrogen
12) DNA Maker-C (100 bp-1200 bp)	GM333	Bio Basic Inc
13) Dynabeads® mRNA Purification Kit	610.06	Dynal Biotech
14) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α	-	-
15) Ethidium bromide	GR041	Bio excellence
16) Formaldehyde (CH_2O)	K24213947731	BDH Lab
17) Isopropyl alcohol (C_3H_8O)	AR1162	RCI Labscan
18) Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	PC0708	Vivantis
19) Magnesium chloride ($MgCl_2$)	-	Invitrogen
20) PCR buffer	-	Invitrogen
21) pGEM®-T Easy Vector System I	A13160	Promega
22) PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit	K2100-10	Invitrogen
23) SuperScript ™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR	18080-051	Invitrogen

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมี	Cat. No.	บริษัท
24) *Taq* DNA polymerase	10342020	Invitrogen
25) Tris-base	0826	Amresco
26) Tryptone powder	G211	Bio Basic Inc
27) Ultra pure distilled water	10977015	Invitrogen
28) Yeast extract	G0961	Bio Basic Inc
29) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal)	PC0716	Vivantis

3.3 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.3.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนิน

อุปกรณ์ และเครื่องมือ	รุ่น	บริษัท
1) โกร่งบดตัวอย่าง	-	-
2) เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง	UNIVERSAL 32	Hettich Zentrifugen
3) เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์	Anthos 2010	Biochrom
4) ไมโคเพลทปลอดเชื้อชนิด 96 หลุม	32296	SPL Life Sciences
5) Freeze dryer	LY3FME	Snijders scientific
6) Glass sinter filter	G4	**Schott**
7) Rotary evaporator	CYC Z	Buchi
8) Sep-Pak-C_{18} cartridge	WAT091139	Water Corperation
9) Speed vacuum concentrator	RC 1010	Jouan
10)Ultrasonic bath	1320	D.S.C group

3.3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์การจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโตไคนิน

อุปกรณ์ และเครื่องมือ	รุ่น	บริษัท
1) โกร่งบดตัวอย่าง	-	-
2) เครื่องวอร์เทกซ์ (vortex mixer)	G-560E	Scientific Industries
3) เครื่องหมุนเหวี่ยง ขนาดเล็ก	GMC-260	Labtech
4) เครื่องชั่งแบบละเอียด	AB 204	Mettller-Toledo
5) จานเพาะเลี้ยง (plastic petri dish)	K 1004	Hycons

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์ และเครื่องมือ	รุ่น	บริษัท
6) ชุดอุปกรณ์อิเล็คโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ชนิดแนวนอน	Gel Mate 2000	Toyobo
7) Gel documentation	Gene Genius	Syngene
8) Hot air oven	ULE400	Memmert
9) PCR thermocycler	PTC-100^{TM}	MJ research
10) PCR tube	-	-
11) Pipette tips	E863	Labcon
12) Shaking incubator	DK-SI001	Daiki sciences
13) Spectrophotometer UV/Visible light	S22	BOECO
14) Gel Doc System	Gene Genius	Syngene

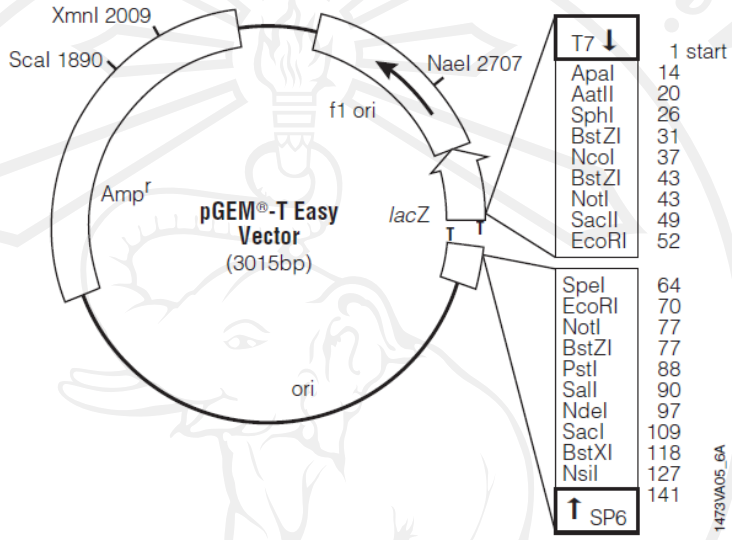
3.4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

วัตถุประสงค์การศึกษา	ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
ตรวจสอบ genomic DNA	At1g67110DEG forward primer	F1 5’ GAYRTNATHWCNMRNRCNSMVTT 3’ F2 5’ CCMKSHWNCMRRTWYYTHCC 3’ F3 5’ TTYTWYTTYRCHGGNMAHSASAC 3’ F4 5’ ACNWSNKCNVWNYTVCTBRYRTG 3’
	At1g67110DEG reverse primer	R1 5’ ACYTCNKYNCKNRSMYKBWCYTG 3’ R2 5’ AAYTYRTBBRCRTCBKBDCCCCA 3’ R3 5’ GCRWRVKHYTGBCCDAYRCA 3’ R4 5’ TAVBWNKSNGMNADNBHRAADSDRAA 3’
ตรวจสอบการแสดงออกของยีน	Alpha-tubulin forward primer	5’ CTCGGTTTCACTGTCTACCCGT 3’
	Alpha-tubulin reverse primer	5’ AAAGCACTGTTGGTGATTTCAGC 3’
	M13F-pUC (-40)	5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'
	M13R (-20)	5' GCGGATAACAATTTCACACAGG 3'

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 พลาสมิดสำหรับการโคลนยีน

พลาสมิด pGEM®-T Easy Vector (Promega, USA) ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ของเอนไซม์อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสไวรัสฝาจ T7 และไวรัสฝาจ SP6 ควบคุมการแสดงออกของยีน lacZ ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin DNA ที่สนใจจะแทรกที่ยีน lac Z (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แผนที่ของ pGEM®-T Easy Vector ขนาด 3015 bp (ที่มา http://www.promega.com)

3.6 แผนการดำเนินการทดลอง

3.6.1 ผลของสารโพแทสเซียมคลอเรตและอุณหภูมิต่ำต่อการออกดอกของลำไย

บันทึกข้อมูล จำนวนวันที่สังเกตเห็นตาดอก และเปอร์เซ็นต์ของยอดที่ออกดอก โดยการทำเครื่องหมายที่ยอดลำไย 1 ต้นต่อ 10 ยอด

3.6.2 ผลของสารโพแทสเซียมคลอเรต และอุณหภูมิต่ำต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนินในลำไย

1. เก็บตัวอย่าง ปลายยอด ใบ และปลายรากของพืชทดลองในวันที่ 0 5 10 15 20 25 และ 30 หลังกรรมวิธี

2. เตรียมเนื้อเยื่อพืชโดยเก็บในไนโตรเจนเหลวทันที และทำให้แห้งด้วย freeze dryer

3. สกัดฮอร์โมนจากเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เมทานอลเย็น และกรองตัวอย่างที่สกัดผ่าน grassinter-filter ลงในขวดก้นกลม และนำสารละลายไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator

4. ล้างตะกอนด้วย 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 และเก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. ทำให้สารละลายจากการสกัดตัวอย่างพืชบริสุทธิ์ โดยการผ่านคอลัมน์

6. ชะZ/ZR โดยใช้สารละลายเมทานอลใน 0.1 M acetic acid ที่ความเข้มข้น 30% methanol in 0.1 M acetic acid และ iP/iPA ด้วย 80% methanol in 0.1 M acetic acid ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำไปทำให้แห้งด้วย speed vacuum concentrator เพื่อรอการวิเคราะห์

3.6.3 การจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโตไคนินในลำไยภายหลังการชักนำให้ออกดอก

1. เก็บใส่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นนำตัวอย่างไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 ^{o}C เพื่อรอนำมาสกัด RNA โดยใช้วิธีของกฤษณา และคณะ (2553)

2. กำจัดจีโนมิกดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยชุด DNaseI (Fermentas Life Science, Canada)

3. ศึกษาการแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-PCR โดยใช้ SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen, USA)

4. ออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *CYP735A* โดยใช้ลำดับเบสที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูลของ NCBI และทดสอบดีเจเนอเรทไพรเมอร์

5. หาลำดับเบสของยีนที่สนใจ และทำการเชื่อมต่อยีนกับพลาสมิดเวคเตอร์โดย pGEM® -T Easy (Promega, Australia)

6. โคลน DNA สายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี transformation และสกัดพลาสมิด DNA โดยใช้ PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA)

7. การตรวจสอบชิ้น DNA ที่โคลนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ α-tubulin และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนโดยเทคนิคชีวสารสนเทศศาสตร์

การทดลองที่ 1 การศึกษาฮอร์โมนไซโตไคนินต่อการออกดอกของลำไย

1.1 พืชทดลอง

ต้นลำไยพันธุ์ดอที่มีความสมบูรณ์สม่ำเสมอกันอายุ 4 ปี จำนวน 21 ต้น ปลูกด้วยทรายในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว มีการแตกใบ 2 ชุดหลังการตัดแต่งกิ่ง และบำรุงต้นให้สมบูรณ์โดยให้สารละลายธาตุอาหารสูตรของ Hoagland and Arnon (1950) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และให้น้ำวันละ 2 เวลา คือ เช้า และเย็น วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มี 3 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 7 ซ้ำๆละ 1 ต้น ประกอบด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม (control) (ภาพที่ 9 ก)

ปลูกเลี้ยงที่อุณหภูมิกลางวัน 35 องศาเซลเซียส และกลางคืน 27 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาทดลอง และมีความชื้นสัมพัทธ์ตั้งแต่ 55.50-84.42 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 2 โพแทสเซียมคลอเรต ความเข้มข้น 400 ส่วนต่อล้าน (ภาพที่ 9 ก)

เมื่อใบอ่อนชุดที่ 2 มีอายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ ราด $KClO_3$ความเข้มข้น 400 ส่วนต่อล้าน 2 ครั้ง โดยผสมกับสารละลายธาตุอาหาร แต่ละครั้งห่างกัน 5 วัน โดยมีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศตั้งแต่ 55.50-84.42 เปอร์เซ็นต์ และปลูกเลี้ยงที่อุณหภูมิกลางวัน 35 องศาเซลเซียส และกลางคืน 27 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาทดลอง

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (อุณหภูมิกลางวัน 17 องศาเซลเซียส และกลางคืน 12 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 9 ข)

เมื่อใบอ่อนชุดที่ 2 มีอายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ ย้ายกระถางต้นลำไยมาปลูกเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ โดยมีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 57.02-81.98 เปอร์เซ็นต์ โดยวันแรกลดอุณหภูมิกลางวันลงที่ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นลดลงวันละ 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน เมื่อถึงวันที่ 6 คือวันที่ 0 ของการทดลองจะมีอุณหภูมิกลางวันที่ 17 องศาเซลเซียส โดยปรับระดับอุณหภูมิคงที่จนถึงวันที่ 20 ของการทดลอง จากนั้นปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในวันที่ 21 ของการทดลองเพิ่มขึ้นวันละ 1 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิประมาณ 27 องศาเซลเซียส จึงนำมาปลูกเลี้ยงต่อในสภาพปกติ คืออุณหภูมิกลางวัน 35 องศาเซลเซียส และกลางคืน 27 องศาเซลเซียส

เก็บตัวอย่าง ปลายยอด ใบ และปลายรากของพืชทดลองทุก 5 วัน จนสังเกตเห็นตาดอก และบันทึกข้อมูล ดังนี้

- จำนวนวันที่สังเกตเห็นตาดอก
- เปอร์เซ็นต์ของยอดที่ออกดอก
- วิเคราะห์ปริมาณไซโตไคนินโดยวิธี Competitive ELISA (ปริญญาภรณ์, 2552)

โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 5 10 15 20 25 และ 30 หลังกรรมวิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก

ข

ภาพที่ 7 ลักษณะต้นลำไยที่ปลูกเลี้ยง ((ก) สภาพโรงเรือนเพื่อชักนำการออกดอกโดยการใช้ $KClO_3$ และ (ข) การปลูกเลี้ยงใน growth chamber ภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำ (กลางวัน 17 องศาเซลเซียส และกลางคืน 12 องศาเซลเซียส))

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินโดยวิธี Competitive ELISA

.2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อพืช

เก็บตัวอย่างทั้งปลายยอด ใบ และปลายราก โดยเก็บใส่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที เพื่อหยุดกระบวนการเมแทบอลิซึม จากนั้นนำตัวอย่างไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำให้แห้งด้วย freeze dryer จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส รอการนำมาวิเคราะห์

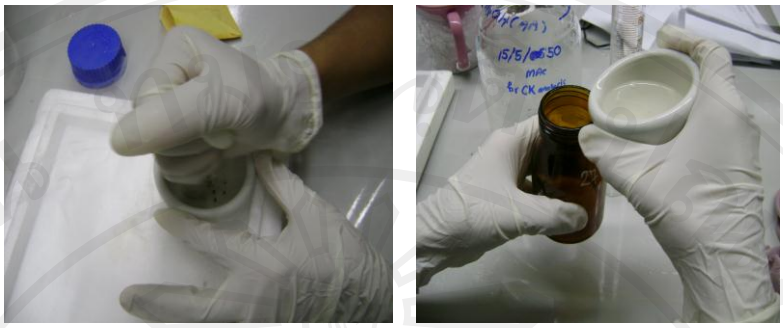
1.2.2 การสกัดฮอร์โมนจากเนื้อเยื่อพืช

1) การสกัดปลายยอด ใบ และปลายราก นำตัวอย่างที่เก็บไว้ ชั่งน้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม และบดตัวอย่างพืชให้ละเอียดด้วยโกร่ง โดยเติมไนโตรเจนเหลวขณะบดเพื่อรักษาสภาพความเย็น (ภาพที่ 10)

2) เติมเมทานอลเย็น (เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3) เก็บตัวอย่างใส่ขวดปิดฝาไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ก ข

ภาพที่ 8 การบด (ก) และการสกัด (ข) ตัวอย่างพืชเพื่อวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน (ปริญญาภรณ์, 2552)

1.2 การสกัดตัวอย่างพืช (Plant sample extraction)

1) กรองตัวอย่างที่สกัดแล้วผ่าน grassinter-filter ลงในขวดก้นกลม (rotary evaporator flask) และนำสารละลายไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator (<40°C)

2) ล้างตะกอนสารสกัดในขวดก้นกลมด้วย 0.01 M ammonium acetate 3 ครั้งๆ ละ 4 มิลลิลิตร โดยใช้ ultrasonic bath

3) เก็บสารละลาย ammonium acetate pH 7.5 ที่ได้ทั้ง 12 มิลลิลิตร รวมกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

1.3 การทำให้สารละลายจากการสกัดตัวอย่างพืชบริสุทธิ์ (Purification)

การเตรียมคอลัมน์ คอลัมน์ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ

1) หลอดบรรจุสารละลาย (reservoir) หลอดบรรจุ PVP (polyvinylpyrrolidone)

2) หลอดบรรจุ DEAE-sephadex (anion exchange)

3) Sep-Pak-C_{18} โดยระหว่างหลอดจะมีวาล์วบังคับการไหลของสารละลาย

เริ่มต้นโดยเติม PVP 12 มิลลิลิตร ในหลอดที่ 2 และ DEAE-sephadex 6 มิลลิลิตร ในหลอดที่ 3 ทิ้งไว้ 30 นาที นำหลอดที่ 1 2 และ3 มาต่อกัน (ยังไม่ใช้ Sep-Pak-C_{18} cartridge) จากนั้นเติม 0.1 M ammonium acetate pH 8.5 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 เปิดวาล์วให้สารละลายไหลผ่าน PVP ในหลอดที่ 2 และ DEAE-sephadex ในหลอดที่ 3 และปล่อยสารละลายทิ้งไปจนหมด ปิดวาล์ว (ระวังอย่าให้ PVP และ DEAE-sephadex แห้ง) จากนั้นเติม 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 เปิดวาล์ว ให้สารละลายไหลผ่าน PVP ในหลอดที่ 2 และ DEAE-sephadex ในหลอดที่ 3 และปล่อยสารละลายทิ้งไปจนหมด ปิดวาล์ว (ระวังอย่าให้ PVP และ DEAE-sephadex แห้ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 การปรับสภาพของ Sep-Pak-C_{18} cartridge ก่อนการใช้งาน

โดยผ่าน methanol (100%) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง หลังจากนั้นผ่าน 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

1.5 การทำให้สารละลายจากการสกัดตัวอย่างพืชบริสุทธิ์

1) นำสารสกัดตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ที่ -20 °C มาละลายให้เป็นของเหลว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 22000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที (ภาพที่ 9 (ค)) เทสารละลายส่วนใส (supernatant) ลงในขวดแก้วขนาด 30 มิลลิลิตร

2) นำ cytokinins Sep-Pak-C_{18} ที่เตรียมไว้ ต่อเข้าที่ปลายคอลัมน์ นำสารสกัดตัวอย่างที่ได้จากภาพที่ 9 (ค) เติมลงใน reservoir เปิดวาล์วให้สารสกัดตัวอย่างไหลลงผ่านคอลัมน์จนหมด ล้างขวดสารสกัดตัวอย่างด้วย 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซ้ำอีก 3 ครั้ง แล้วผ่านลงในคอลัมน์ปล่อยสารละลายไหลผ่านจนหมด (ระวังไม่ให้สารละลายในระบบแห้ง) ในขั้นตอนนี้ ส่วน cytokinins จะถูกจับอยู่ใน Sep-Pak-C_{18}

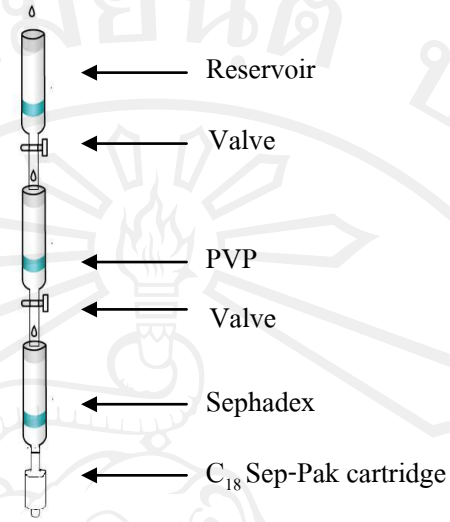
3) ถอด cytokinins Sep-Pak-C_{18} ออกจากคอลัมน์ (ภาพที่ 10) ชะฮอร์โมน *t*Z โดยใช้สารละลายเมทานอลใน 0.1 M acetic acid ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 30% methanol ใน 0.1 M acetic acid จะได้สารละลายฮอร์โมน *t*Z/ZR ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และชะฮอร์โมน iP/iPA ด้วย 80% methanol ใน 0.1 M acetic acid ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

4) นำไปทำให้แห้งด้วย speed vacuum concentrator เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินด้วยเทคนิค Competitive ELISA

ก. ข. ค.

ภาพที่ 9 การกรองสาร (ก) การระเหยแห้ง (ข) และการปั่นเหวี่ยงตัวอย่าง (ค) (ที่มา: ปริญญาภรณ์, 2552)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 10 ส่วนประกอบของคอลัมน์ที่ใช้ในการทำสารให้บริสุทธิ์ (purification) (ที่มา: พัชรินทร์, 2551)

1.6 การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินโดยวิธี Competitive ELISA

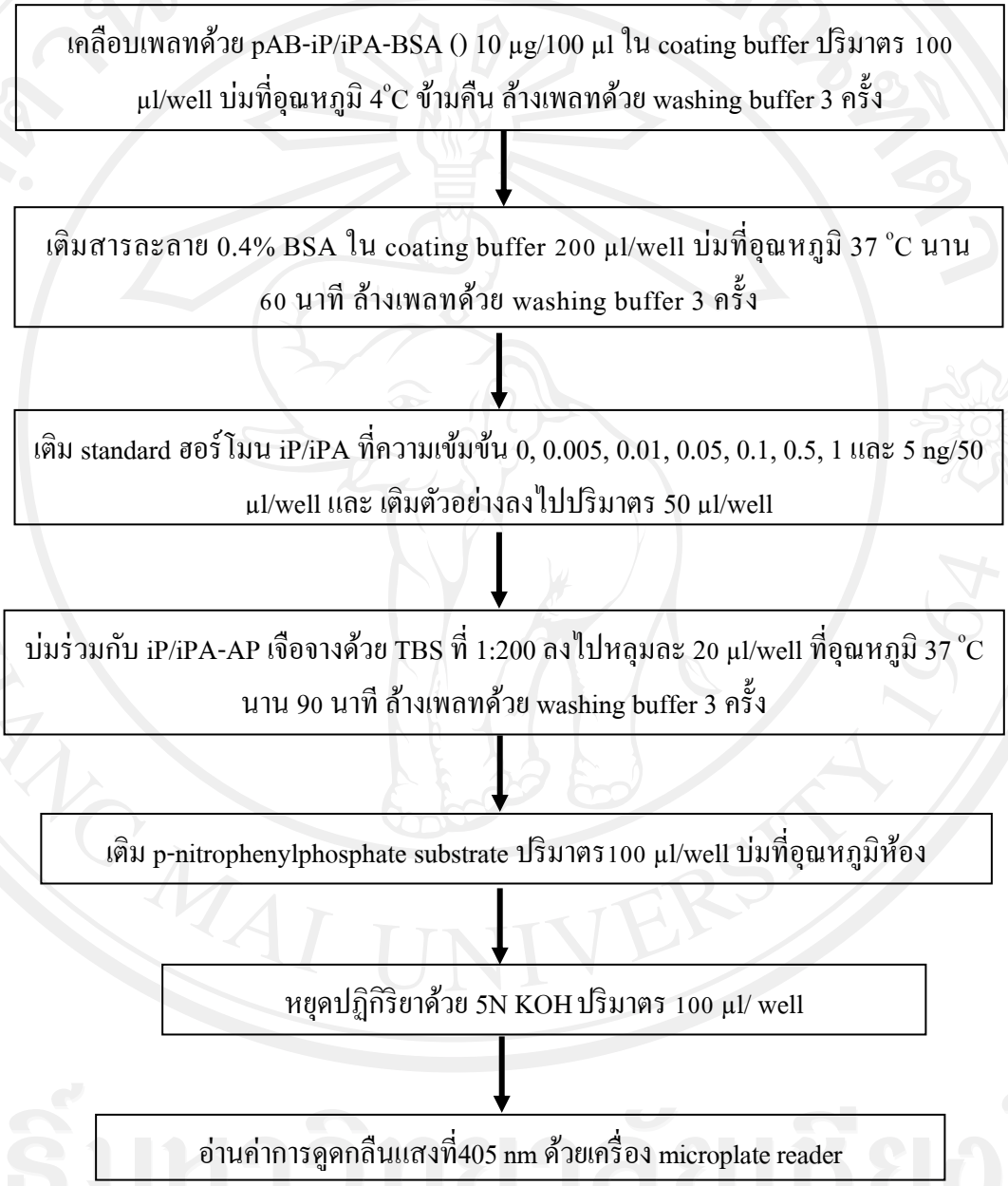
1.6.1 การหากราฟมาตรฐานของฮอร์โมน iP/iPA

จากไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เคลือบเพลทด้วย pAB-iPA อัตราเจือจาง 1:200 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมใน coating buffer บ่มทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลาย 0.4 % BSA ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นบ่มฮอร์โมน iP/iPA ความเข้มข้น 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 และ 0 นาโนกรัม/50 ไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง จากนั้นเติมเอนไซม์ iPA-AP อัตราเจือจาง 1:200 ลงไปหลุมละ 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลายทำให้เกิดสี p-nitrophenylphosphate solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บเพลทไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 20-30 นาที เมื่อเกิดสีแล้ว 5N KOH ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.6.2 การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด iP/iPA โดยวิธี Competitive ELISA

ตัวอย่างพืชทดลองที่ทำการสกัดฮอร์โมนแล้วนำไปทำให้แห้งด้วย speed vacuum concentrator แล้วละลายด้วย TBS จากนั้นตรวจวัดตามขั้นตอนดังนี้



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการวัดปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด iP/iPA โดยวิธี Competitive ELISA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.6.3 การหากราฟมาตรฐานของฮอร์โมน *t*Z/ZR

จากไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เคลือบเพลทด้วย pAB-ZR อัตราเจือจาง 1: 1000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมใน coating buffer บ่มทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลาย 0.4 % BSA ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นบ่มฮอร์โมน *t*Z/ZR ความเข้มข้น 5000 1000 100 50 10 5 และ 0 พิโคกรัม/ 50 ไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง แล้วเติมเอนไซม์ ZR-HRP อัตราเจือจาง 1:1000 ลงไปหลุมละ 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลายทำให้เกิดสี OPD solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บเพลทไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 20-30 นาที เมื่อเกิดสีแล้ว หยุดปฏิกิริยาด้วย 4N H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

1.6.4 การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด *t*Z/ZR โดยวิธี Competitive ELISA

ตัวอย่างพืชทดลองที่ทำการสกัดฮอร์โมนแล้วนำไปทำให้แห้งด้วย speed vacuum concentrator แล้วละลายด้วย PBS จากนั้นตรวจวัดตามขั้นตอนดังภาพที่ 12 ดังนี้

เคลือบเพลทด้วย pAB *t*Z/ZR-BSA 10 µg/100 µl ใน coating buffer ปริมาตร 100 µl/well บ่มที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง

↓

เติมสารละลาย 0.4% BSA ใน coating buffer 200 µl/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 60 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง

↓

เติม standard ฮอร์โมน *t*Z/ZR ที่ความเข้มข้น 5000 1000 100 50 10 5 และ 0 pg/50 µl/well และเติมตัวอย่างลงไปปริมาตร 50 µl/well

↓

บ่มร่วมกับ horseradish peroxidase เจือจางด้วย PBS ที่ 1:1000 ลงไปหลุมละ 20 µl/well ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 90 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง

↓

เติม OPD solution ปริมาตร100 µl/well บ่มที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 4N H_2SO_4 ปริมาตร 100 µl/ well และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm

ภาพที่ 12 ขั้นตอนการวัดปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด *t*Z/ZR โดยวิธี Competitive ELISA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโตไคนินชนิด *t*Z ในลำไยภายหลังการชักนำให้ออกดอก

2.1 พืชทดลอง

เก็บปลายยอด ใบ และปลายรากของพืชทดลองทุก 5 วันจนถึงวันที่สังเกตเห็นตาดอก (เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1) โดยทำการโดยเก็บใส่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นนำตัวอย่างไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำมาสกัดอาร์เอ็นเอ

2.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)

โดยวิธีสกัดของ กฤษณา และคณะ (2553) ตามขั้นตอนดังนี้

1) นำตัวอย่างพืช 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วนำใส่ลงใน microcentrifuge tube ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer (25mM EDTA, 100mM Tris HCl pH 8.0, 2M NaCl, 2% CTAB และ2% β-merceptoethanol) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 นาที

2) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และดูดเอาส่วนสารละลายด้านบนเก็บไว้

3) ใส่ 5M Sodium chloride เย็น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมคลอโรฟอร์มเย็น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆให้เข้ากัน

4) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา10 นาที และดูดเอาส่วนสารละลายด้านบนเก็บไว้

5) ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย isopropyl alcohol เย็น ปริมาตรต่อปริมาตร

6) บ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนสารละลายออก

7) ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol เย็น ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

8) เทเอาส่วนสารละลายออก ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

9) ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ultra pure water) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

10) นำไปตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วย 1.2 เปอร์เซ็นต์ฟอร์มัลดีไฮด์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 การกำจัดจีโนมิกดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน

นำสารละลายอาร์เอ็นเอไปกำจัดจีโนมิคดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยชุด DNaseI (Fermentas Life Science, Canada) ตามอัตราส่วนผสมของสารละลายดังตารางที่ 1

จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดในตารางที่ 1 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 25 mM EDTA 3 ไมโครลิตร และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสกัด mRNA โดยใช้ Dynalbeads® (Dynal Biotech, Norway) แล้วเก็บ mRNA ที่สกัดได้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาเป็นอาร์เอ็นเอแม่แบบในการสังเคราะห์เป็น complementary DNA (cDNA)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารผสมสำหรับกำจัดดีเอ็นเอ

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
สารละลายอาร์เอ็นเอ	10
10X DNase buffer	3
0.1 M DTT	3
DNase I (1U/ µl)	5

2.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-PCR

การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอคู่สม (cDNA) จากอาร์เอ็นเอโดยใช้ SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen, USA) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) สายแรก

นำอัตราส่วนของสารละลายทั้งหมดในตารางที่ 2 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมส่วนผสมของเอนไซม์ SuperScript ™ III reverse transcriptase (Invitrogen, USA) โดยแต่ละหลอดของปฏิกิริยา อัตราส่วนผสมของสารละลายดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารผสมสำหรับการสังเคราะห์ cDNA

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอแม่แบบ	5
dNTP Mix (10 mM)	1
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ultra pure water)	6
oligo dT_{12} (50 µM)	1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของสารผสมในการสังเคราะห์ cDNA

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5X RT buffer	4
0.1 M DTT	1
RNase Inhibitor (40 U/ µl)	1
SuperScript ™ III reverse transcriptase	1

จากนั้นไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ultra pure water) ปรับปริมาตรสุดท้ายจาก 20 ไมโครลิตร เป็น 150 ไมโครลิตร และเก็บ cDNAไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่อไป

2) การตรวจสอบผลการสังเคราะห์ cDNA

โดยใช้คู่ไพรเมอร์ α-tubulin ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกตลอดเวลา (housekeeping gene) นำมาทดสอบผลการทำ reverse transcription ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไย โดยแต่ละหลอดของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยสารละลายต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของสารผสมสำหรับการตรวจสอบผลของ cDNA

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ซีดีเอ็นเอแม่แบบ (cDNA template)	2
10x PCR buffer	2
dNTP Mix (2.5mM)	2
$MgCl_2$ (50mM)	0.6
Taq DNA polymerase (5U/ µl)	0.2
α-tubulin forward primer	1
α-tubulin reverse primer	1
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ultra pure water)	11.2
Total	**20**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

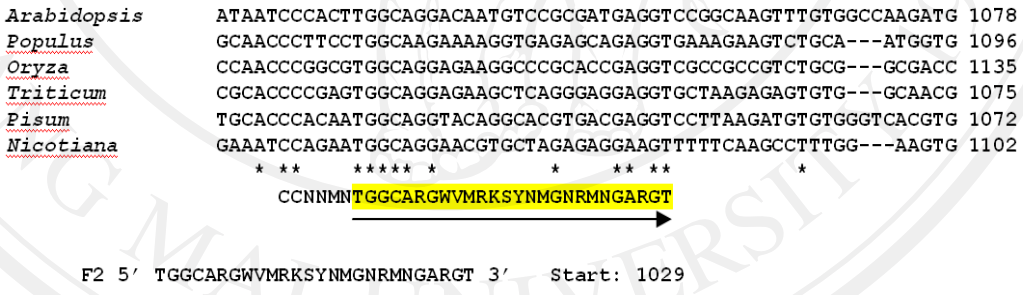
จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมของเครื่อง ดังนี้

Initial denaturation	94 °C	4	นาที	
Denaturation	94 °C	40	วินาที	40 รอบ
Annealing	55 °C	40	วินาที	
Extension	72 °C	1	นาที	
Final extension	72 °C	8	นาที	

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาตรวจสอบผลด้วย 1.2 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.5 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *CYP735A2*

1) สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYP735A2* ของพืชที่อยู่ในวงศ์ใกล้เคียงกับลำไย โดยใช้ลำดับเบสที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ที่เว็บไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov และ The Arabidopsis Information Resource (TAIR) ที่เว็บไซต์ http://www.arabidopsis.org (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYP735A2*

2) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYP735A2* ออกแบบ และสังเคราะห์ไพรเมอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.6 การทดสอบดีเจเนอเรทไพรเมอร์

นำ cDNA ของวันที่ 0-30 มารวมกันเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทดสอบดีเจเนอเรทไพรเมอร์ด้วยวิธี Nested PCR โดยมีส่วนประกอบของสารแต่ละชนิด ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารผสมการทดสอบดีเจเนอเรทไพรเมอร์รอบที่ 1

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอต้นแบบ	2
10x PCR buffer	2
dNTP Mix (2.5mM)	2
$MgCl_2$ (50mM)	0.6
Taq DNA polymerase (5U/ µl)	0.2
F1 primer (10pmol)	1
R2 primer (10pmol)	1
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ultra pure water)	11.2
Total	**20**

นำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมของเครื่อง thermal cycler ดังนี้

Initial denaturation	94 °C	4	นาที	
Denaturation	94 °C	30	วินาที	20 รอบ
Annealing	60.6 °C	1	นาที	
Extension	72 °C	1	นาที	
Final extension	72 °C	8	นาที	

นำผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ที่ใช้คู่ดีเจเนอเรทไพรเมอร์ F1R1 มาเป็นสารละลายต้นแบบเพื่อเพิ่มปริมาณ โดยมีส่วนประกอบของสารแต่ละชนิด ดังตารางที่ 6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของสารผสมการทดสอบดีเจเนอเรทไพรเมอร์รอบที่ 2

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
PCR productจากF1R1	2
10x PCR buffer	2
dNTP Mix (2.5mM)	2
$MgCl_2$ (50mM)	0.6
Taq DNA polymerase (5U/ µl)	0.2
F1 primer (10pmol)	1
R1 primer (10pmol)	1
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ultra pure water)	11.2
Total	**20**

นำไปทำ PCR โดยตั้งโปรแกรมของเครื่อง thermal cycler ดังนี้

Initial denaturation	94 °C	4	นาที	
Denaturation	94 °C	30	วินาที	40 รอบ
Annealing	59.8 °C	1	นาที	
Extension	72 °C	1	นาที	
Final extension	72 °C	8	นาที	

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบผลด้วย 1.2 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.7 การหาลำดับเบสของยีนที่สนใจ

1) การเชื่อมต่อ (ligation) ยีนกับพลาสมิดเวคเตอร์

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ที่ได้จากตารางที่ 6 ทำการเชื่อมกับเวคเตอร์ โดยใช้พลาสมิด pGEM®-T Easy (Promega, Australia) โดยเตรียม ligation reaction ดังตารางที่ 7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของสารผสมของการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่สนใจเข้ากับเวคเตอร์

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
PCR product	3
2x ligation buffer	5
pGEM® -T vector	1
T4 DNA ligase	1

ผสมสารละลายในตารางที่ 7 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วบ่มต่อข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2) การเตรียม competent *E. coli* strain DH5α

2.1) เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ลงบนอาหาร LB agar plate บ่มเชื้อข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.2) ถ่ายเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α จำนวนหนึ่งโคโลนีจากจานเพาะเชื้อ นำเลี้ยงต่อในอาหาร LB broth 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อข้ามคืน เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อให้มากขึ้น

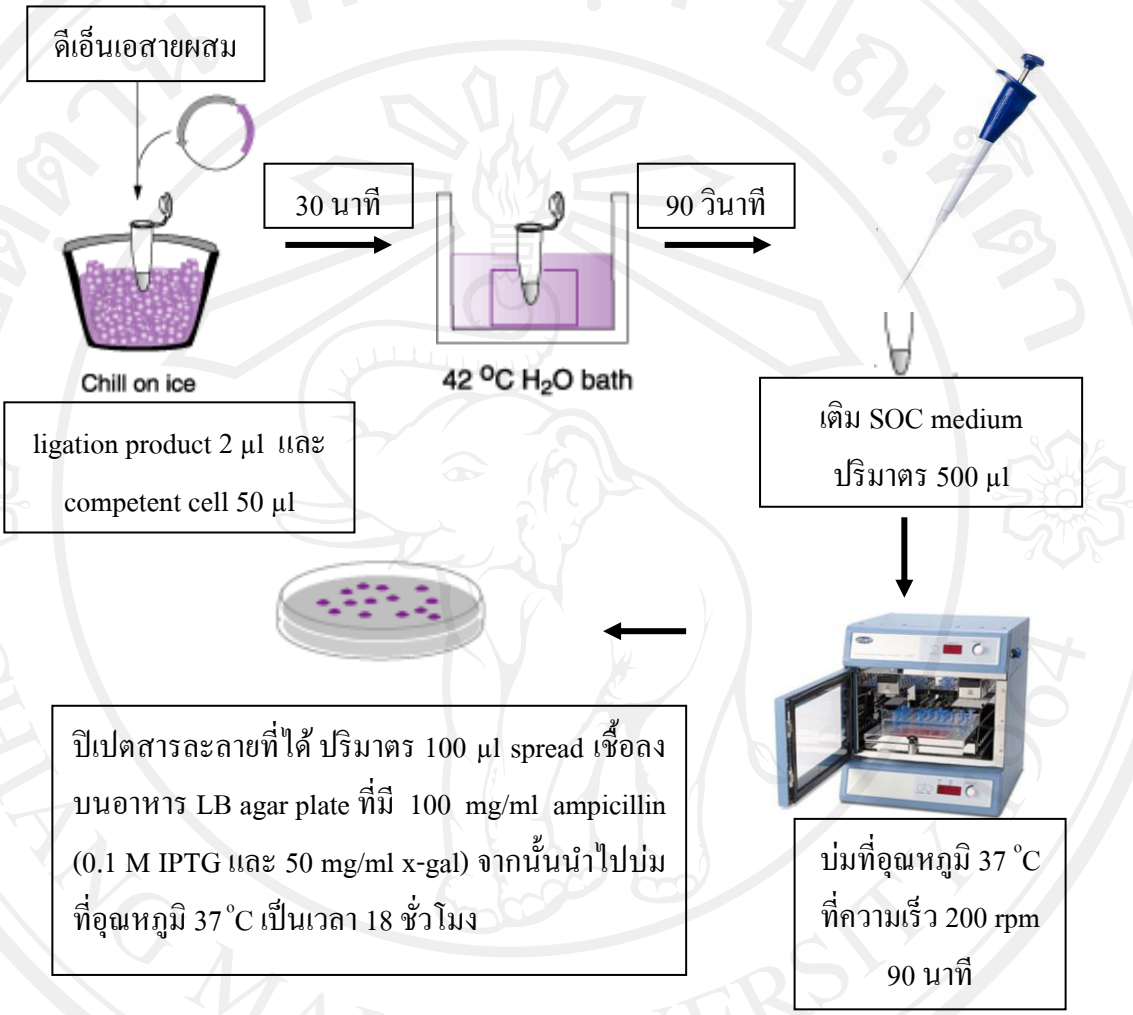
2.3) นำเชื้อปริมาตร 400 ไมโครลิตรเลี้ยงในอาหาร LB broth 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบ่งถ่ายเชื้อลงในหลอด centrifuge แล้วตกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทอาหารทิ้ง

2.4) ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 0.1M $CaCl_2$ ที่เย็น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้วตกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้ง

2.5) ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.1M $CaCl_2$ เย็นที่มี 20% glycerol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และแบ่ง 50 ไมโครลิตรเพื่อใช้ในการทรานฟอร์เมชั่น (transformation) หรือเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3) การโคลนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี transformation



ภาพที่ 14 ขั้นตอนการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli*

4) การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่โคลน

เลือกโคโลนีที่มีสีขาวที่เจริญอยู่ LB agar plates ที่มี ampicillin จุ่มลงใน microcentrifuge tube ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี ampicillin (50 µg/ml) โดยที่ส่วนผสมแบคทีเรียในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ถูกนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อใช้เป็นแม่แบบสำหรับตรวจหาโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีนที่เชื่อมต่อกับ pGEM®-T Easy Vector (Promega, Australia) ส่วนแบคทีเรียใน LB broth นำไปบ่มเชื้อข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เพื่อนำไปสกัดพลาสมิดต่อไป โดยมีส่วนประกอบของสารละลายแต่ละชนิด ดังตารางที่ 8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบของสารผสมของการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่โคลน

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดที่สกัดได้	2
10x PCR buffer	2
dNTP Mix (2.5mM)	2
$MgCl_2$ (50mM)	0.6
Taq DNA polymerase (5U/ µl)	0.2
M13 forward primer	1
M13 reverse primer	1
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ultra pure water)	11.2
Total	**20**

จากนั้นนำไปทำ PCR โดยตั้งโปรแกรมของเครื่อง thermal cycler ดังนี้

Initial denaturation	92 °C	5	นาที	
Denaturation	92 °C	45	วินาที	35 รอบ
Annealing	57 °C	45	วินาที	
Extension	68 °C	90	วินาที	
Final extension	68 °C	5	นาที	

ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย 1.2 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

5) การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มี pGEM® -T Easy Vector แทรกอยู่ ถูกนำไปเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนมากพอเพื่อใช้สำหรับสกัดพลาสมิด โดยใช้ PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1) นำเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลือทิ้ง

2) ละลายตะกอนเซลล์ด้วย resuspension buffer (R3) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร

3) เติมบัฟเฟอร์ lysis buffer (L7) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4) เติม precipitation buffer (N4) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา จนส่วนผสมมีลักษณะใส และเหนียวหนืด แล้วนำไปตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

5) ดูดสารละลายใสใส่บน spin column ที่มี wash tube เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับซิลิกาที่อยู่ในคอลัมน์

6) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน wash tube ทิ้ง

7) ล้างคอลัมน์โดยการเติม wash buffer (W10) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Wash tube ทิ้ง

8) เติม wash buffer (W9) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน wash tube ทิ้ง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที

9) เปลี่ยน wash tube เป็น 1.5 ml recovery tube ละลายตะกอนด้วยการเติม TE buffer (TE) ที่นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผ่านคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

10) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยใช้ spectrophotometer หรือ1.2 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

11) ส่งพลาสมิดที่ตรวจสอบพบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการคัดเลือกเพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสที่บริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย

2.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโดยเทคนิคชีวสารสนเทศศาสตร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยไพรเมอร์ M13 forward และ M13 reverse ซึ่งเป็น universal primer ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม DNAMAN แปลเป็นลำดับกรดอะมิโน แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากเวบไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov ด้วยชุดโปรแกรม BLAST ซึ่งเป็นการสืบค้นในฐานข้อมูลว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนรวมถึงลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลโดยโปรแกรม DNAMAN จากนั้นวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่ได้โดยทำ multiple alignment กับลำดับกรดอะมิโนของพืชที่ได้ โดยโปรแกรม Clustal จากเวบไซต์ http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw ของ European Bioinformatics Institue (EBI)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved