บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

Acrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)

Agarose (Gibco/BRL, USA)

Ammonium peroxydisulfate (USB corporation, USA)

Bisacrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)

Boric acid (Merck, Germany)

Chloroform (Lab Scan, Ireland)

dNTPs (Invitrogen, USA)

Dithiothreitol (Invitrogen, USA)

Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (Fisher Scientific, USA)

Ethanol (Merck, USA)

Ethidium bromide (Bio Basic Inc, Canada)

Isopropanol (Merck, Germany)

Oligonucleotide primer (Bio Basic Inc, Canada)

Silver nitrate (Merck, Germany)

Silver chloride (Merck, Germany)

Sodium carbonate (Merck, Germany)

Sodium hydroxide (Merck, Germany)

Tetramethylethylenediamine (USB corporation, USA)

Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA)

Tris (USB corporation, USA)

3.2 ชุดน้ำยาสำเร็จรูป

Trizol™ reagent (Invitrogen, USA)

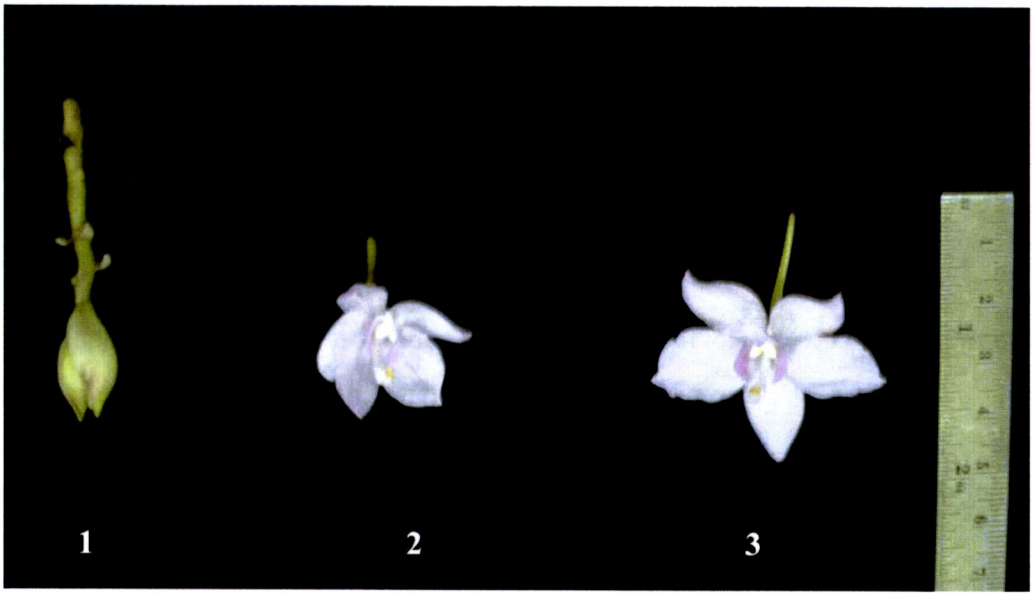
SuperScript ™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen, USA)

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) Electrophoresis for agarose gel, Gel-Mate 2000 (Toyobo, Japan)
2) Electrophoresis, vertical apparatus, Hoefer SQ3 (Amersham pharmacia biotech,USA)
3) Power supply, Model E833 (Consort, Belgium)
4) Gel documentation (Model Gene Genius & Gene Tools, USA)
5) Gel dryer, Model GD2000 (Amersham Bioscience, USA)
6) Hot Air Oven, Model ULE400 (Memmert, Germany)
7) PCR Thermocycle, PTC-100™ (MJ research, USA)
8) Spectrophotometer UV/visible light (UV-VIS Biowave s2100, Germany)
9) ThermoShaker, Model DKSI001a (Daiki, Korea)
10) Magnetic Stirrer, Model HS115 (HL Instument, Thailand)
11) Microcentrifuge tube 1.5 ml (Sorenson, Bioscience. Inc., USA)
12) PCR tube (Sorenson, Bioscience. Inc., USA)
13) pH meter (Model CG 842, Inc., USA)
14) Pipette, 0.2 µl (CappAero, Denmark)
15) Pipette, 20, 200, 1000 µl (Gilson, France)
16) Refrigerated Bench Top Centrifuge, Model Universal 32 R (Hettich, Germany)
17) Vortex mixer, Genie II Model G560E (Scientific Industries, USA)

3.3 พืชทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้กล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก 3 species รวม 5 สี ได้แก่ *Spathoglottis affinis* สีเหลือง, *S. plicata* สีม่วง สีชมพู และ สีขาว และ *S. petri* สีบานเย็น ปลูกเลี้ยงที่โรงเรือนเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ ณ ศูนย์วิจัย สาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ สุ่มเก็บตัวอย่างจากกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากแต่ละสี กลุ่มสีละ 3 ต้น โดยเก็บกลีบเลี้ยงและกลีบดอกในระยะต่างๆ แบ่งเป็น 3 ระยะ คือ ระยะดอกตูม (ระยะที่ 1) ดอกแรกแย้ม (ระยะที่ 2) และดอกบาน (ระยะที่ 3)



ภาพที่ 3 ระยะการเก็บตัวอย่างพืช 1 = ระยะดอกตูม 2 = ระยะดอกแรกแย้ม 3 = ระยะดอกบาน

3.4 การสกัดอาร์เอ็นเอ

นำตัวอย่างพืชมาสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Trizol™ Reagent บริษัท Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างกลีบเลี้ยงและกลีบดอกประมาณ 0.5 กรัม ใส่ในโกร่งแช่เย็นและเติม Trizol™ reagent ปริมาตร 1,000 µl บดให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน และเทใส่ eppendorf tube
2. นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที
3. ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที
4. เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา และบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 นาที
5. นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที
6. ดูดสารละลายใสส่วนบน ใส่ในหลอดใหม่
7. เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 ใน 2 ส่วนของสารละลายที่ได้จากข้อ 6 ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
8. นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที และเทสารละลายส่วนใสออก
9. ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอ ด้วยเอธานอล 75% ปริมาตร 1 ml โดยปั่นที่ความเร็ว 7,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที

10. ตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง และละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ ด้วย DEPC-treated water ปริมาตร 15 µl (หรือขึ้นอยู่กับขนาดตะกอนของอาร์เอ็นเอ)
11. เก็บอาร์เอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

3.5 DNase digestion

เพื่อกำจัด genomic DNA ที่ปนเปื้อน นำอาร์เอ็นเอมาย่อยด้วยเอนไซม์ DNase I ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามส่วนผสมของปฏิกิริยามีรายละเอียดดังนี้

สารละลายอาร์เอ็นเอ	6.0	µl
10X DNase buffer	3.0	µl
dH_2O	6.8	µl
25 mM $MgCl_2$	1.2	µl
0.1 M DTT	3.0	µl
DNase I (1U/µl)	10.0	µl
ปริมาตรรวม	30.0	µl

แล้วจึงนำออกมาเติม 25 mM EDTA 3 µl และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที

3.6 การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (cDNA synthesis)

สังเคราะห์ซีดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยกระบวนการ reverse transcription โดยใช้ชุด SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR ของบริษัท Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา

1. ส่วนผสมของปฏิกิริยา

สารละลายอาร์เอ็นเอ	5.0	µl
oligo dT_{12} (50 µM)	1.0	µl
dNTP Mix (2.5 mM)	1.0	µl
dH_2O	3.0	µl
ปริมาตรรวม	10.0	µl

2. นำส่วนผสมดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวางบนน้ำแข็ง

3. เติมส่วนผสมของเอนไซม์ SuperScript ™ III reverse transcriptase (Invitrogen, USA) 10 µl ที่ประกอบด้วย

10 x RT buffer	2.0	µl
25 mM $MgCl_2$	4.0	µl
0.1 M DTT	2.0	µl
RNase Inhibitor (40 U/ µl)	1.0	µl
SuperScript ™ III reverse transcriptase	1.0	µl
ปริมาตรรวม	10.0	µl

นำส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 50 นาที

4. หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 85 °C นาน 5 นาที ทำให้เย็นบนน้ำแข็ง
5. เติมเอนไซม์ RNase H 1 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 นาที
6. เก็บซีดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.7 การตรวจสอบผลการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพของซีดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ ndhB ซึ่งออกแบบเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในคลอโรพลาสต์ (Maier *et al.*, 1992) นำมาทดสอบผลการทำ reverse transcription ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากกลีบดอกของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก

1. ส่วนผสมของปฏิกิริยา

10x PCR buffer	2.0	µl
$MgCl_2$ (25mM)	0.6	µl
dNTP Mix (10mM)	0.4	µl
Taq DNA polymerase (5U/ µl)	0.4	µl
ndhB forward primer	0.5	µl
ndhB reverse primer	0.5	µl
dH_2O	13.6	µl
cDNA template	2.0	µl
ปริมาตรรวม	20.0	µl

โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์มีรายละเอียดดังนี้

รอบที่ 1	denaturation	95 °C	4	นาที	
	annealing	50 °C	30	วินาที	
รอบที่ 2	denaturation	95 °C	30	วินาที	} 35 รอบ
	annealing	50 °C	1	นาที	
	extension	72 °C	70	วินาที	
รอบที่ 3	extension	72 °C	8	นาที	

2. ตรวจสอบผลของ PCR บน 1% agarose gel electrophoresis ที่ 100 V 20 นาที

3.8 การคัดกรองไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากโดยใช้ซีดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชทั้ง 5 กลุ่มสี ใน 3 ระยะ ได้แก่ ระยะดอกตูม ดอกตูมก่อนบาน และดอกบาน รวมกันเพื่อนำมาคัดกรองไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดสุ่ม 58 ชนิด (ตารางที่ 1) ร่วมกับ Oligo $T_{12}VG$ (5'-TTTTTTTTTTTTVG-3') บริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ครั้ง

1. ครั้งที่ 1 มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

ตัวอย่าง first strand cDNA	2.0	µl
10 x PCR buffer	1.2	µl
Oligo $T_{12}VG$ (10 pmol)	1.5	µl
ไพรเมอร์ชนิดสุ่ม (10 pmol)	0.5	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	0.6	µl
dNTP (10 mM)	0.5	µl
dH_2O	5.5	µl
Taq DNA polymerase (5U/ µl)	0.2	µl
ปริมาตรรวม	12	µl

โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์มีรายละเอียดดังนี้

denaturation	94°C	3	นาที	
denaturation	94°C	30	วินาที	40 รอบ
annealing	42 °C	1	นาที	
extension	72°C	1	นาที	
extension	72°C	8	นาที	

2. นำผลผลิตพีซีอาร์ครั้งที่ 1 ไปเจือจางกับน้ำในอัตราส่วน 1:20 เพื่อการเพิ่มปริมาณครั้งที่ 2 โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาและเงื่อนไขเหมือนพีซีอาร์ 1
3. ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณครั้งที่ 2 เติมสารละลาย loading buffer 6 µl และนำไป บ่มที่ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที และนำไปแช่น้ำแข็ง ก่อนนำไปแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบน 6% polyacrylamide gel ที่กำลังไฟ 50 W เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3.9 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver stain

1. แช่เจลในสารละลายกรดอะซิติก (10 %) 300 ml นาน 10 นาที
2. แช่ในกรดไนตริก (1%) 300 ml นาน 10 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วย deionized water 3 ครั้ง
3. แช่ในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (0.1%) 500 ml ฟอร์มัลดีไฮด์ (37%) 750 µl นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย deionized water 2 ครั้ง
4. เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (3%) 600 ml ที่มีฟอร์มัลดีไฮด์ (37%) 900 µl โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 300 ml ส่วนหนึ่งใช้ล้างเจลรอบแรก ส่วนที่ 2 นำไปเจือจางในอัตราส่วน 1:2 โดยการเติมน้ำอีก 600 ml เพื่อแช่เจล จนกระทั่งแถบดีเอ็นเอปรากฏ
5. หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดอะซิติก (10%) ล้างแผ่นเจลด้วย deionized water 3 ครั้งทำให้แห้งด้วยเครื่อง gel dryer

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ชนิดสุ่มสำหรับการทำดีดีอาร์ที-พีซีอาร์

Primer	Nucleotide sequence	Primer	Nucleotide sequence
OPD01	5'-ACCGCGAAGG-3'	OPD02	5'-GGACCCAAC-3'
OPD03	5'-GTCGCCGTCA-3'	OPD04	5'-TCTGGTGAGG-3'
OPD05	5'-TGAGCGGACA-3'	OPD06	5'-ACCTGAACGG-3'
OPD07	5'-TTGGCACGGG-3'	OPD08	5'-GTGTGCCCCA-3'
OPD09	5'-CTCTGGAGAC-3'	OPD10	5'-GGTCTACACC-3'
OPD11	5'-AGCGCCATTG-3'	OPD12	5'-CACCGTATCC-3'
OPD13	5'-GGGGTGACGA-3'	OPD14	5'-CTTCCCCAAG-3'
OPD15	5'-CATCCGTGCT-3'	OPD16	5'-AGGGCGTAAG-3'
OPD17	5'-TTTCCCACGG-3'	OPD18	5'-GAGAGCCAAC-3'
OPD19	5'-CTGGGGACTT-3'	OPD20	5'-ACCCGGTCAC-3'
OPF01	5'-ACGGATCCTG-3'	OPF02	5'-GAGCATCCCT-3'
OPF03	5'-CCTGATCACC-3'	OPF04	5'-GGTGATCAGG-3'
OPF05	5'-CCGAATTCCC-3'	OPF06	5'-GGGAATTCGG-3'
OPF07	5'-CCGATATCCC-3'	OPF08	5'-GGGATATCGG-3'
OPF09	5'-CCAAGCTTCC-3'	OPF10	5'-GGAAGCTTGG-3'
OPF11	5'-TTGGTACCCC-3'	OPF12	5'-ACGGTACCAG-3'
OPF13	5'-GGCTGCAGAA-3'	OPF14	5'-TGCTGCAGGT-3'
OPF15	5'-CCAGTACTCC-3'	OPF16	5'-GGAGTACTGG-3'
OPF17	5'-AACCCCGGAA-3'	OPF18	5'-TTCCCGGGTT-3'
OPF19	5'-CCTCTAGACC-3'	OPF20	5'-CCTCTAGACC-3'
AP-A01	5'-TACAACGAGG-3'	AP-A02	5'-TGGATTGGTC-3'
AP-A03	5'-CTTTCTACCC-3'	AP-A04	5'-TTTTGGCTCC-3'
AP-A05	5'-GGAACCAATC-3'	AP-A06	5'-AAACTCCGTC-3'
AP-A07	5'-TCGATACAGG-3'	AP-A08	5'-TGGTAAAGGG-3'
AP-A09	5'-TCGGTCATAG-3'	AP-A10	5'-GGTACTAGG-3'

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Primer	Nucleotide sequence	Primer	Nucleotide sequence
OPAB11	5'-GTGCGCAATG-3'	OPAB12	5'-CCTGTACCGA-3'
OPAB13	5'-CCTACCGTGG-3'	OPAB14	5'-AAGTGCGACC-3'
OPAB16	5'-CCCGGATGGT-3'	OPAB17	5'-TCGCATCCAG-3'
OPAB18	5'-CTGGCGTGTC-3'	OPAB19	5'-ACACCGATGG-3'

3.10 การอ่านข้อมูลของแถบดีเอ็นเอ

การอ่านข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยบันทึกค่าความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ (polymorphism) แบบ binary data คือถ้าช่องใดปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ตรวจสอบให้กำหนดค่าเป็น 1 (presence) แต่ถ้าช่องใดไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ตรวจสอบให้กำหนดค่าเป็น 0 (absence)

3.11 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์

1. นำไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิด ที่ได้จากการคัดเลือก ได้แก่ OPD16 OPF14 และ OPAB19 มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาและเงื่อนไขเช่นเดียวกับข้อ 3.8 ในตัวอย่างพืชแต่ละชนิดทั้ง 5 กลุ่มสี และระยะต่างๆ ทั้ง 3 ระยะ
2. เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง เพื่อคัดเลือกไปเพิ่มปริมาณเพื่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.12 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแถบคัดเลือกและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแตกต่างกันระหว่างกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก 5 กลุ่มสีถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ดังนี้

1. ตัดแถบซีดีเอ็นเอ และนำไปแช่ใน 1 x TE buffer 20 µl
2. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยปลาย tip
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 15 นาที ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน
4. นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์และส่วนผสมเช่นเดียวกับขั้นตอนการคัดกรองไพรเมอร์ในข้อ 3.8

5. นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดบน 6% polyacrylamide gel โดยเปรียบเทียบขนาดกับผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้จากข้อ 3.11
6. เมื่อได้แถบซีดีเอ็นเอที่ต้องการมีเพียงแถบเดียว ชัดเจนและมีขนาดตรงกับแถบที่ต้องการแล้วจึงส่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ให้บริษัท 1st BASE ประเทศมาเลเซีย เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.13 การเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม

ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ถูกนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับพันธุกรรมในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov)