บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 อุปกรณ์การทดลอง

ตารางที่ 1 รายชื่ออุปกรณ์ รุ่น/ยี่ห้อ และบริษัทผลิตอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ชื่อเครื่องมืออุปกรณ์	รุ่น/ยี่ห้อ	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)	UM-65L VA	United Mechanical, Thailand
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerate Centrifuge)	1 K 15	Sigma, Germany
ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าและควบคุมอุณหภูมิได้ (Controller Incubator shaker)	Ace-80	TAIYO, Japan
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบ UV-visible Spectophotometer	2011 MACROVUE	LKB Bromma, Sweden
ชุด Electrophoresis	GelMate 2000	TOYOBO, Japan
Freezer -20°C, Refrigerator	SF-C69	SANYO, Thailand
เครื่องอบแห้งด้วยอากาศ (Hot air oven)	WTCbinder FD240	TuttLingen, Germany
เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (PCR set)	ICyler Thermal Cycler	BIO-RAD, USA
เครื่อง Laminar air Flow	BS 5726 NSF 49	Clean Air, USA

เครื่องมืออุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.1.2 วัสดุการทดลอง

3.1.2.1 พืชทดลอง

เซลล์แคลลัสต้นไข่เน่า (*Vitex grabata*) ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงสว่าง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

3.1.2.2 แบคทีเรีย *Escherichia coli*

E. coli สายพันธุ์ DH5α ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Renkichi Takata จากมหาวิทยาลัยเอฮิเมะ ประเทศญี่ปุ่น แบคทีเรีย *E. coli* DH5α นี้ใช้สำหรับเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (Host cell) ในการโคลนยีนซึ่งบนโครโมโซมจะมี lacZΔM13 เป็นดีเอ็นเอโมเลกุลเครื่องหมาย (DNA molecular marker) สำหรับใช้ในการคัดเลือกโคลนหรือ transformant ที่มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการ (Target DNA) สอดแทรกอยู่ ทั้งนี้โดยอาศัยลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์ของโคโลนีระหว่างสีฟ้าและสีขาว บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่สาร X-gal ซึ่งเรียกวิธีการคัดเลือกแบบนี้ว่า Blue/White selection

3.1.2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารสูตร Murashige and Skoog (½ MS medium) (1962): เติมฮอร์โมนพืช BAP, 2,4-D องค์ประกอบของสูตรอาหาร MS แสดงในภาคผนวก ข

3.1.2.4 อาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

อาหารสูตร LB ซึ่งองค์ประกอบของอาหาร แสดงในภาคผนวก ข

3.1.2.5 ดีเอ็นเอพาหะ (DNA vector)

ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการทดลองคือ pGEM T-easy vector (QIAGEN, Germany) โดยใช้เป็นพาหะสำหรับการโคลนยีน (Cloning vector) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายภายในเซลล์เจ้าบ้าน (*E. coli*) ซึ่งมียีนที่ให้ลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicillin) และยังมีส่วนของยีน β-galactosidase (*lacZ*) อยู่บนโมเลกุลของดีเอ็นเอพาหะด้วย

3.1.2.6 ดีเอ็นเอโมเลกุลเครื่องหมายมาตรฐาน (Standard DNA molecular weight marker)

Lambda DNA/*Hin*dIII Marker (Fermentas, USA) ใช้เป็นดีเอ็นเอโมเลกุลเครื่องหมายมาตรฐานที่ทราบขนาด ใช้สำหรับตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ซึ่งประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragments) ขนาดต่างๆ กัน ดังนี้คือ 23.1, 9.4, 6.7, 4.4, 2.3, 2.0 และ 0.6 กิโลเบส

3.1.2.7 เอนไซม์

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction endonuclease enzyme) ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Bam*HI, *Eco*RI, *Xba*I, *Hin*dIII และ *Pst*I นอกจากเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วยังมีเอนไซม์สำหรับใช้ในการโคลนยีนชนิดอื่นๆ อีกเช่น Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) และ T4 DNA ligase จากบริษัท New England BioLabs (BioLab, USA)

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่า

ในการทดลองครั้งนี้ใช้เซลล์แคลลัสจากต้นไข่เน่า ซึ่งได้รับการพัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยแคลลัสเหล่านั้น เจริญอยู่บนอาหาร ½ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D และ BAP ในปริมาณ 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงสว่าง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายลงสู่อาหารใหม่ทุกๆ 10 วัน

3.2.2 การศึกษารูปแบบการเจริญของแคลลัสพืชไข่เน่า

ชั่งเซลล์แคลลัสด้วยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic technique) มา 0.5 กรัมน้ำหนักสด แล้วถ่ายลงสู่อาหารใหม่ (1/2 MS) จากนั้นนำเซลล์แคลลัสไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่กล่าวแล้วข้างต้นในข้อ 3.2.1 ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์แคลลัสทุกๆ 2 วัน เพื่อนำไปวัดค่าการเจริญโดยวิธีการชูดเซลล์แคลลัสออกมาจากขวดอาหารใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (ประมาณ 4 ชั่วโมง) และนำเซลล์ที่ได้ไปชั่งหาน้ำหนักแห้งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ทำการทดลองทั้งสิ้น 3 ซ้ำ

3.2.3 การแยกและศึกษาคุณลักษณะบางประการของ cytochrome P450 gene ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ Ecdysone 20-monooxygenase จากเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยง

3.2.3.1 การแยกสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่า

แยกสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่าโดยใช้ชุดแยกสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNA Plant mini kit (QIAGEN, Germany) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ชั่งเซลล์สดของแคลลัสต้นไข่เน่าใส่จานเพาะเลี้ยง ในปริมาณ 100 มิลลิกรัม
2. นำเซลล์ที่ชั่งน้ำหนักมาบดในโกร่งและเติมไนโตรเจนเหลว จากนั้นค่อยเทผงเซลล์ที่ได้ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร รอจนกระทั่งไนโตรเจนเหลวระเหยออกไปหมด
3. เติมบัฟเฟอร์ AP1 ลงไปในปริมาตร 400 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม RNase ลงไปในปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำหลอดไป vortex แล้วบ่มใน heat box ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที โดยการเขย่าเป็นระยะๆ

4. เติมบัฟเฟอร์ AP2 ลงไปในปริมาตร 430 ไมโครลิตร ผสมให้สารเข้ากันอย่างดี และนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

5. นำหลอดปฏิกิริยาไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

6. ดูดสารละลายส่วนใส (supernatant) ใส่ใน column (สีม่วงที่ให้มากับชุด kit) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

7. หลังจากนั้นดูดสารละลายส่วนใสที่ได้มาใส่ใน microcentrifuge tube ในปริมาตร 450 µl

8. เติมบัฟเฟอร์ AP3/E ลงไปในปริมาตร 675 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ปิเปตดูดสารละลายขึ้น-ลงอย่างเบาๆ แล้วย้ายสารละลายที่ได้มาใส่ใน column (สีขาวที่ให้มากับชุด kit)

9. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ในขั้นตอนนี้ดีเอ็นเอจะติดอยู่ที่ membrane และเทสารละลายส่วนใสทิ้ง

10. นำ column ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

11. จากนั้นนำเฉพาะส่วนที่เป็น spin column ไปใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง (collection tube) อันใหม่

12. เติมบัฟเฟอร์ AW ที่ผสมเอทานอลแล้ว ลงไปในปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

13. เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ AW ที่ผสมเอทานอลแล้ว ลงไปในปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

14. นำส่วน spin column ไปวางบน microcentrifuge tube ที่ใช้ในการเก็บรวบรวมสารละลายดีเอ็นเอ

15. เติมบัฟเฟอร์ AE ลงไปในปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยเติมลงบนผิวหน้าของ Spin column แล้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

16. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

17. นำส่วน spin column ที่มี membrane ติดอยู่ทิ้งไป เก็บเฉพาะสารละลายที่รวบรวมได้ในหลอด microcentrifuge tube ไปใช้สำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.3.2 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจตาม (DNA Probe) สำหรับใช้ตรวจติดตามการสังเคราะห์ cytochrome P450 gene

(1) การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ (Specific primer)

ทำการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะจากลำดับดีเอ็นเอในส่วนอนุรักษ์ (Conserved region) ของ cytochrome P450 gene ที่ควบคุมการสังเคราะห?สารเอคไดโซน ที่มีรายงานในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตในกลุ่มแมลงและพืช โดยใช้ฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของกลุ่มสิ่งมีชีวิตด้วยการทำ multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW (http://dot.imgen.bcm.tmc. edu:9331/multi-align/Optios/clustalw.html) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์จากส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะมากที่สุด และทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์โดยบริษัท QIAGEN ประเทศเยอรมันนี

(2) การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของ cytochrome P450 gene โดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

นำไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้จากข้อ 1 ไปใช้ในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของ cytochrome P450 gene ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ genomic DNA ที่แยกสกัดได้จากแคลลัสต้นไข่เน่า เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา (Reaction mixture) ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย genomic DNA จากพืช 50 นาโนกรัม, dNTP (dATP / dGTP / d CTP และ dCTP) ชนิดละ 0.2 มิลลิโมลาร์, 10 x PCR buffer 5 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 ไมโครโมลาร์, *Taq* polymerase 1 ยูนิต, ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นกำจัดไอออนให้เป็น 50 ไมโครลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermal cycler (Icycler Thermal Cycler, BIO-RAD, USA) โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้

Cycle 1: 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ

Cycle 2: จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วยขั้นตอนย่อยดังนี้

Step 1: 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Step 2: 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

Step 3: 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

Cycle 3: 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ที่มี ethidium bromide เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE แล้วนำไปตรวจดูพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Image Analyzer (Phamacia biotech, USA)

การทำ PCR ทุกครั้งจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการ (negative control) โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบ

(3) การแยกสกัดและทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาในข้อ 2 ไปทำการแยกขนาดด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ผ่าน 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40-60 นาที บันทึกภาพแถบ PCR ที่ปรากฏในแผ่นเจลด้วยเครื่อง Image Analyzer (Phamacia, USA) จากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องผ่านภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (UV light) และใช้ใบมีดใหม่ที่ปลอดเชื้อตัดชิ้นเจลในตำแหน่งที่มีชิ้นดีเอ็นเป้าหมายหรือผลิตภัณฑ์ PCR อยู่ เก็บชิ้นดีเอ็นเอในหลอดปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปแยกสกัด DNA ด้วยชุดแยกสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extration Kit, QIAGEN, Germany)

(4) การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ การส่งถ่ายยีนและการคัดเลือกเซลล์ที่ต้องการ

(1) การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ

ทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย (ผลิตภัณฑ์ PCR) เข้ากับพลาสมิด pGEM T-easy โดยใช้ชุดเชื่อมต่อสำเร็จรูป Rapid ligation and transformation kit (Fermentas, USA) โดยหลอดปฏิกิริยาในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอประกอบด้วย

pGEM T-easy vector	1 µl
PCR product	3 µl
2x Buffer	5 µl
T_4 DNA ligase	1 µl

จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน และตรวจสอบสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ

(2) การเตรียมเซลล์เจ้าบ้านสำหรับส่งถ่ายยีน

เตรียมเซลล์ *E. coli* สำหรับใช้ในการส่งถ่ายยีน ตามวิธีการในชุดโคลนยีนสำเร็จรูป Rapid ligation and transformation kit (Fermentas, USA) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหาร C-medium ที่มีปริมาตร 2 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นมา 500 µl นำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร C-medium ปริมาตร 1.5 ml แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

(3) การส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและการคัดเลือกเซลล์ที่ต้องการ

ส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ที่เตรียมได้ข้างต้น โดยใช้ชุดโคลนยีนสำเร็จรูป Rapid ligation and transformation kit (Fermentas, USA) โดยการ Pre-warm จานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี Ampicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นผสมสารละลาย T-solution A และ T-solution B ในปริมาตรที่เท่ากัน และ

นำเชื้อที่บ่มไว้มา 1.5 ml ใส่ลงในหลอด microcentrifuge แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งไป และเติมสารละลาย T-solution ที่เตรียมไว้แล้วลงไปในปริมาตร 150 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที และนำไป centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย T-solution อีก 100 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำสารประกอบดังกล่าวมาแบ่งใส่หลอด microcentrifuge อย่างละ 5 µl แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายพลาสมิดลูกผสมที่เตรียมได้มา 50 µl ใส่ลงไปในเซลล์ที่เตรียมได้ จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที และนำไป spread ลงบนอาหาร LB Amp agar plate ที่ pre-warmed แล้ว และเติม X-Gal ความเข้มข้น 20 µg/ml ปริมาตร 12.5 µl และ IPTG ปริมาตร 80 µl ต่อจานเพาะเลี้ยง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-22 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคลนที่ต้องการ โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไปของเซลล์เจ้าบ้านภายหลังได้รับชิ้นดีเอ็นเอเข้าไป ซึ่งในการทดลองนี้ใช้วิธีการคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค blue/white selection โดยเลือกโคลนที่มีสีขาวไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไปด้วยวิธี Rapid alkaline method เพื่อนำไปตรวจสอบขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอ ในขณะเดียวกันก็ทำการทดลองเพื่อยืนยันผลที่ได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบได้ แล้วจึงเลือกโคลนที่ผ่านการทดสอบและคาดว่าได้รับเอาดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าไปภายในเซลล์ มาเพาะเลี้ยงและแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในระดับ large scale เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Dideoxy termination ตามวิธีการมาตรฐานของ Sambrook and Russell (2001) ต่อไป

3.2.3.3 การตรวจติดตามการสังเคราะห์ cytochrome P450 gene ในเซลล์พืชด้วยเทคนิค Southern hybridization (Sambrook and Russell, 2001)

(1) การตัด Genomic DNA และแยกขนาดด้วยเทคนิค Electrophoresis

ตัด genomic DNA ที่แยกสกัดได้จากพืชด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยการนำหลอดปฏิกิริยาไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอล และละลายดีเอ็นเอกลับด้วยสารละลาย TE (pH 8.0) และนำไปแยกขนาดโดยการทำ electrophoresis ผ่าน 0.7 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำ (<1 โวลต์ต่อเซนติเมตร) เพื่อให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่อย่างช้าๆ หลังจากทำ electrophoresis เสร็จแล้ว นำแผ่นเจลไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และบันทึกภาพเจลก่อนนำไปทำการถ่ายดีเอ็นเอลงสู่แผ่นเมมเบรนต่อไป

(2) การเตรียมเจลที่มีดีเอ็นเอสำหรับถ่ายลงสู่แผ่นเมมเบรน

ภายหลังจากการทำ electrophoresis ให้นำแผ่นเจลไปตัดส่วนที่ไม่ต้องการออกและวัดขนาดของแผ่นเจล จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลาย HCl ความเข้มข้น 0.25 นอร์มอล เขย่าเบา ๆ จนกระทั่งสีของ front dye เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 15 นาที (ขั้นตอนนี้ทำเพื่อกำจัดหมู่พิวรีน

ออก) จากนั้นย้ายแผ่นเจลไปแช่ในสารละลาย alkaline transfer buffer (สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.4 นอร์มอล และสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์) เขย่าเบา ๆ จนกระทั่งสีของ front dye เปลี่ยนจากสีเหลืองกลับเป็นสีน้ำเงิน ใช้เวลาประมาณ 30 นาที และขั้นตอนสุดท้าย ย้ายแผ่นเจลไปแช่ใน neutralization buffer (สารละลาย Tris-HCl pH 7.5 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์) เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 30-60 นาที เพื่อปรับสภาวะให้เป็นกลางเหมาะสำหรับการย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปสู่แผ่นไนลอนเมมเบรนในขั้นตอนต่อไป ซึ่งทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง

(3) การเตรียมแผ่นไนลอนเมมเบรนชนิดที่มีประจุบวก

ใช้ใบมีดใหม่ตัดแผ่นไนลอนเมมเบรนให้ใหญ่กว่าแผ่นเจล ประมาณ 1 มิลลิเมตรในทุก ๆ ด้าน และตัดกระดาษกรอง Whatman 3MM ให้มีขนาดเท่ากับแผ่นไนลอนเมมเบรน แช่แผ่นไนลอนเมมเบรนในน้ำกำจัดไอออนจนกระทั่งเปียกชุ่มทั่วทั้งแผ่น (15 นาที) และใช้ใบมีดตัดมุมของแผ่นไนลอนเมมเบรนเพื่อทำเครื่องหมายสำหรับใช้ตรวจสอบการถ่ายดีเอ็นเอลงสู่แผ่นไนลอนเมมเบรนในภายหลัง

(4) การย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลลงสู่แผ่นไนลอนเมมเบรนชนิดที่มีประจุบวก

ทำการย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลลงสู่แผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยวิธี Capillary transfer โดยทำการประกอบชุดย้ายดีเอ็นเอ ขั้นตอนแรกนำกระดาษกรอง Whatman 3MM วางลงบนแผ่นกระจก โดยให้ส่วนปลายของกระดาษกรองทั้งสองข้างจุ่มลงไปใน alkaline transfer buffer (10x SSC) จากนั้นวางแผ่นเจลลงบนกระดาษกรอง ตามด้วยแผ่นไนลอนเมมเบรน โดยพยายามไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นระหว่างแผ่นเจลกับแผ่นไนลอนเมมเบรน จากนั้นนำกระดาษกรอง Whatman 3MM 3 ชั้น มาวางทับแผ่นไนลอนเมมเบรน และนำชั้นกระดาษทิชชูหนา ๆ ประมาณ 20-30 เซนติเมตร มาวางทับด้านบนเพื่อเป็นตัวดูดซับและวางตุ้มน้ำหนัก (ประมาณ 400 กรัม) ทับด้านบนอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการเคลื่อนย้ายของดีเอ็นเอไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

(5) การตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นไนลอนเมมเบรนชนิดที่มีประจุบวก

นำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ (4) ไปแช่ใน Neutralization buffer (สารละลาย Tris-HCl pH 7.2 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือนำไปทำ crosslink ภายใต้แสง UV เป็นเวลา 5 นาที

(6) การทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่น (Hybridization reaction)

ก่อนที่จะทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นระหว่างดีเอ็นเอที่ถูกตรึงอยู่บนแผ่นไนลอนเมมเบรนกับดีเอ็นเอตรวจตาม จะต้องติดฉลากดีเอ็นเอตรวจตามก่อนด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase โดยใช้ชุด Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection system (Amersham pharmacia biotech, UK) ชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เตรียมเป็นดีเอ็นเอตรวจตามคือ ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR หลังจากนั้นจึงทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นโดยการเติมสารละลายดีเอ็นเอตรวจตามลงไปในสารละลาย hybridization buffer ที่ใช้แช่แผ่นไนลอนเมมเบรน และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วย

สารละลาย washing buffer ตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในชุดติดฉลากสำเร็จรูป และตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาด้วยการประกบแผ่นไนลอนเมมเบรนกับ แผ่นฟิล์ม (Autoradiography film; Hyperfilm™ ECL บริษัท Amersham, UK) ในห้องมืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(7) การแยกสกัดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นกับดีเอ็นเอตรวจตามและการโคลนยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยเทคนิค Electroporation

แยกสกัดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นกับดีเอ็นเอตรวจตาม และทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดแยกสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Germany) จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่พลาสมิด pUC19 และนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH 5α ด้วยวิธี electroporation ร่วมกับการใช้ชุดโคลนสำเร็จรูป (Rapid DNA Ligation & Transfermation Kit, Fermentas, USA)

(8) การคัดเลือกโคลนที่ต้องการด้วยวิธี Colony hybridization (ดัดแปลงวิธีการของ Sambrook and Russell, 2001)

หากจำนวนของ transformant ที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน มีจำนวนประมาณ 100-200 โคโลนี สามารถที่จะนำแผ่นไนลอนเมมเบรนไปวางทับบนผิววุ้นในจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อได้เลย แต่ถ้า transformant มีจำนวนมากกว่า 200 โคโลนี ให้ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยโคโลนีแบคทีเรียมาแตะบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินอย่างน้อย 2 จาน (เรียกเทคนิคนี้ว่าการทำ Replica plating) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เก็บจานแรกไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น Master plate ส่วนจานที่สองนำไปใช้เป็นจานทดสอบ โดยทำการประกบแผ่นไนลอนเมมเบรนโดยการวางแผ่นไนลอนเมมเบรนลงบนผิววุ้นในจานทดสอบที่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญอยู่ ทิ้งให้แผ่นไนลอนเมมเบรนดูดซับน้ำจนเปียกทั่วทั้งแผ่นใช้เวลาประมาณ 1 นาที ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทำเครื่องหมายบนแผ่นไนลอนเมมเบรนให้ตรงกับตำแหน่งที่กำหนดบนจานเพาะเชื้อ จากนั้นย้ายแผ่นไนลอนเมมเบรน (ด้านที่มีโคโลนีติดหงายขึ้น) ไปวางบนกระดาษกรอง Whatman 3 MM ซึ่งเปียกชุ่มด้วยสารละลาย Denaturing solution (สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ และสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์) ปล่อยให้สารละลายซึมขึ้นสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงย้ายแผ่นไนลอนเมมเบรนไปวางบนกระดาษกรอง Whatman 3 MM ที่แห้ง เพื่อดูดซับสารละลายส่วนเกินออก (ทำซ้ำ 1 ครั้ง) จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนไปวางบนกระดาษกรอง Whatman 3 MM ซึ่งเปียกชุ่มด้วยสารละลาย Neutralizing solution (สารละลาย Tris-HCl pH 7.5 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์) ปล่อยให้สารละลายซึมขึ้นสู่แผ่นไนลอนเมมเบรนเป็นเวลา 10 นาที ย้ายแผ่นไนลอนเมมเบรนไปวางบนกระดาษกรอง Whatman 3 MM และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นไนลอนเมมเบรนโดยการทำ crosslink ภายใต้แสง UV เป็นเวลา 5 นาที ภายหลังการตรึงดีเอ็นเอแล้ว ควรล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย washing buffer (3 x SSC ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ SDS เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อขจัดดีเอ็นเอที่เกาะอยู่กับแผ่นไนลอนเมมเบรน

อย่างไม่จำเพาะออกไป จากนั้นจึงนำแผ่นไนลอนเมมเบรนไปทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นกับดีเอ็นเอตรวจตามที่มีความจำเพาะต่อ cytochrome P450 gene และทำการคัดเลือกโคลนที่ต้องการโดยดูจากแถบปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นที่เกิดขึ้นภายหลังจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค autoradiography จากนั้นนำโคลนที่คัดเลือกได้ไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอสำหรับใช้ในการศึกษาคุณลักษณะบางประการของยีนในขั้นตอนต่อไป

3.2.3.4 การศึกษาคุณลักษณะบางประการของ cytochrome P450 gene ที่แยกได้จากต้นไข่เน่า

ศึกษาคุณลักษณะบางประการของ cytochrome P450 gene ที่แยกได้จากต้นไข่เน่าโดยวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี dideoxy chain termination จากนั้นใช้ฐานข้อมูลของ NCBI GenBank (htpp://www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อหาลำดับกรดอะมิโน และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ cytochrome P450 gene ที่แยกได้จากต้นไข่เน่ากับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ รวมทั้งหาส่วนของ domain ต่างๆ ที่อาจปรากฏอยู่บนลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับกรดอะมิโน

3.2.4 การศึกษาการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ในระยะต่างๆ ของการเจริญของเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่าด้วยเทคนิค RT-PCR

3.2.4.1 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอในระยะต่าง ๆ ของการเจริญของเซลล์แคลลัส

แยกสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่าที่เจริญในระยะต่างๆ ดังต่อไปนี้คือ lag phase, log phase, deceleration phase และ stationary phase โดยใช้ชุดแยกสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (QIAGEN RNase Plant Mini Kit, QIAGEN, Germany) ก่อนที่จะนำไปสารละลายอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้ไปใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป ให้นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอไปทำการปรับความเข้มข้นให้เท่ากันด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

3.2.4.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของ cytochrome P450 gene ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, Germany) และใช้อาร์เอ็นเอที่แยกสกัดจากระยะการเจริญในช่วงต่างๆ สารละลายปฏิกิริยาสำหรับการทำ RT-PCR ประกอบไปด้วย 1x QIAGEN OneStep RT-PCR buffer, dNTP ชนิดละ 0.4 มิลลิโมลลาร์ ไพรเมอร์ ชนิดละ 0.4 ไมโครโมลาร์ QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix 2 ไมโครลิตร template RNA 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรรวมของสารละลายเป็น 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจาก RNase (RNase-free water) สำหรับอุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ประกอบด้วย ขั้นตอนการทำ Reverse transcription ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที Initial PCR activation step ที่อุณหภูมิ

95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการทำ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาคือ 35 รอบ ทำการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ครั้งละ 8 ไมโครลิตรในรอบที่ 20, 23, 26, 29, 32 และ 35 ตามลำดับ และนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค electrophoresis ผ่าน 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ผลที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค electrophoresis จะแสดงถึงระดับการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ในระดับ transcription ในแต่ละระยะการเจริญของเซลล์แคลลัสพืช