บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 สร้างระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสของแก่นตะวันในหลอดทดลอง

3.1.1 นำหัวพันธุ์แก่นตะวันมาปลูกในเรือนปลูกพืชของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อใช้เปรียบเทียบการผลิต inulin และกิจกรรมของเอนไซม์และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin กับแคลลัสที่ได้จากการชักนำในหลอดทดลอง

3.1.2 เตรียมต้นอ่อนที่งอกจากหัว (sprouting tubers) เพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับชักนำแคลลัส โดยนำหัวพันธุ์แก่นตะวันที่มีตาจำนวน 2- 3 ตา ไปเพาะในถุงดำบรรจุดินปลูกพืช และรดน้ำทุกวัน เมื่อต้นอ่อนมีอายุประมาณ 2 สัปดาห์นำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการชักนำแคลลัส

3.1.3 ชักนำแคลลัสบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่มีการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด BA ร่วมกับการแปรผัน (vary) ชนิดของฮอร์โมนออกซิน 4 ชนิดคือ (NAA, IAA, IBA และ 2, 4- D) โดยใช้ไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและฮอร์โมนออกซิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเปรียบเทียบการชักนำแคลลัสจากชิ้นพืช (explants) 2 ชนิดคือ แผ่นใบ (leaf blade) และส่วนของข้อลำต้น (nodal stem) จาก sprouting tubers โดยตัดแยกแผ่นใบให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ส่วนลำต้นตัดให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นย้ายชิ้นพืชที่เตรียมได้ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรสำหรับชักนำแคสลัส โดยทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ แต่ละขวดเพาะเลี้ยงชิ้นพืชจำนวน 3 ชิ้น เพาะเลี้ยงอย่างน้อย 10 ขวด หลังจากนั้นนำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อวางบนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 30 วัน ทำการประเมินความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัสเบื้องต้นบนอาหารสูตรต่างๆ โดยบันทึกลักษณะสีและการเกาะตัวของแคลลัส และติดตามปริมาณแคลลัสที่ชักนำได้โดยหาน้ำหนักสด และวิเคราะห์การผลิตและชนิดของ inulin และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin

จากนั้นชักนำแคลลัสจากชิ้นพืชที่บนอาหารสูตรที่ให้ปริมาณ inulin สูงนาน 30 วัน และทำการถ่ายเลี้ยงลงอาหารใหม่ (สูตรเดียวกับที่ใช้ชักนำ) และเลี้ยงต่อนาน 45 และ 60 วัน โดยมีการติดตามปริมาณแคลลัสที่ชักนำได้โดยหาน้ำหนักสด และวิเคราะห์การผลิตและชนิดของ inulin และวิเคราะห์การแสดงออกของยีนและวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin

3.2 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ในแคลลัสที่ชักนำได้

3.2.1 สกัดโปรตีน (เอนไซม์หยาบ)

ชั่งน้ำหนักแคลลัสของแก่นตะวัน บดให้ละเอียดโดยขั้นตอนการสกัดทุกขั้นตอนต้องอยู่ในสภาวะอุณหภูมิต่ำ จากนั้นชั่งตัวอย่างพืชและเติม Extraction buffer (0.007 M potassium phosphate buffer pH 7 + 0.5% Triton X-100 + 0.5% cysteine) ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อ extraction buffer 1:1 ทิ้งไว้ข้ามคืน (16 ชั่วโมง) จากนั้นนำสารสกัดไปกรองผ่านผ้าขาวบางและนำของเหลวที่ได้จากการกรองไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จะได้เอนไซม์หยาบ (crude enzyme)

3.2.2 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์

หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยมีส่วนประกอบของปฏิกริยาดังนี้

1) 0.1 M phosphate buffer pH 4.5 + 0.02% sodiumazide,

2) 0.46 M sucrose และ

3) crude enzyme

ซึ่งแยกเป็น 3 reactions ดังนี้

Reaction 1 เอนไซม์ตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร+ 0.46 M Sucrose ผสมกับ 0.1 M phosphate buffer pH 5.4 + 0.02% sodiumazide 250 ไมโครลิตร

Reaction 2 เอนไซม์ตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร + 0.1 M phosphate buffer pH 5.4 + 0.02% sodiumazide 250 ไมโครลิตร

Reaction 3 H_2O 250 ไมโครลิตร + 0.46 M Sucrose 0.1 M phosphate buffer pH 5.4 + 0.02% sodiumazide 250 ไมโครลิตร

บ่มเอนไซม์กับสารตั้งต้นที่ 34°C เป็นเวลา 0 และ 24 hr หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มเป็นเวลา 5 min นำไปวิเคราะห์ reducing sugar นำไปวิเคราะห์ 1-kestose ที่เกิดขึ้นโดยวิธี HPLC วัด enzyme activity จากปริมาณ 1-kestose ที่เกิดขึ้น โดย

enzyme activity (Ut) 1 unit คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเกิด 1-kestose 1 ไมโครโมล ใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการวิเคราะห์

หาโปรตีนโดยใช้ Bradford dye reagent ที่เจือจางด้วยน้ำ DI 4 เท่า โดยผสมตัวอย่าง 10 µl + Bradford dye reagent 200 µl ผสมให้เข้ากันนาน 5 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 nm ด้วยเครื่อง microplate reader แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำไว้

3.3 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ในแคลลัสที่ชักนำได้

3.3.1 การสกัด RNA รวม (Total RNA)

นำตัวอย่างแคลลัสระยะต่างๆ ที่เก็บไว้มาสกัด RNA ด้วยสารละลาย TRI reagent ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1) Homogenization

ใส่สารละลาย TRI reagent 500 ไมโครลิตรลงในหลอดที่ใส่ตัวอย่างที่บดไว้แล้วด้วยไนโตเจนเหลว

2) Phase Separation

เก็บ homogenate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ใส่สารละลาย chloroform 200 ไมโครลิตรต่อสารละลาย TRI reagent 1000 ไมโครลิตร (ใส่ 100 ไมโครลิตร เนื่องจากใส่ TRI reagent 500 ไมโครลิตร) ปิดฝาเขย่าอย่างแรง 15 วินาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จะได้ส่วนบนที่เป็นสารละลาย aqueous phase ซึ่งเป็นส่วนที่มี RNA

3) RNA Precipitation

ถ่ายส่วนบนที่เป็น aqueous phase ใส่ในหลอดใหม่ ใส่สารละลาย isopropanol 500 ไมโครลิตรต่อสารละลาย TRI reagent 1000 ไมโครลิตร (ใส่ 250 ไมโครลิตร เนื่องจากใส่ TRI reagent 500 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 8 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

4) RNA Wash

ทิ้งสารละลายส่วนบน เก็บตะกอน RNA ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวัดปริมาณ RNA) ปั่นเหวี่ยง 7,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทเอาสารละลายเอทานอลออก แล้วทำให้ตะกอนแห้งด้วย vacuum pump จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำ Milli Q ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

3.3.2 การสังเคราะห์ 1st strand cDNA

1) เติมส่วนผสมดังต่อไปนี้ในหลอด sterile eppendorf

- Total RNA 1 ไมโครกรัม
- Oligo $(dT)_{18}$ 1 ไมโครกรัม (1 ไมโครลิตร)
- เติม Milli Q water ให้ครบ 11 ไมโครลิตร

2) นำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง

3) นำไปเติมสารละลายต่อไปนี้ตามลำดับ

- 5x Reaction buffer for M-MuL V RT 4 ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP mix 2 ไมโครลิตร
- Ribonuclease Inhibitor 20 ยูนิต (0.5 ไมโครลิตร)
- เติม Milli Q water ให้ครบ 19 ไมโครลิตร

4) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

5) เติม reverse transcriptase M-MuL V RT 200 ยูนิต (1 ไมโครลิตร)

6) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

7) หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วจุ่มลงในน้ำแข็ง

8) นำ 1^{st} strand cDNA ที่สังเคราะห์ได้ไปใช้เป็น template สำหรับวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี PCR ในขั้นตอนต่อไป

3.3.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *1-sst* และ *1-fft* ด้วยวิธี PCR

1) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *actin*

เตรียม reaction mixture ดังนี้ บัฟเฟอร์ (10X PCR buffer + KCl-$MgCl_2$) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) ที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร rice actin forward (5’ CGA GCT TCC TGA TGG ACA 3’) ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร rice actin reverse (5’ TGG GTC AGA CTC GTC GTA C 3’) ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (Fermentas, Germany) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เติมน้ำ Milli Q จนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป spin down แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System2400 (Perkin Elmer, USA)

โดยตั้งโปรแกรมในการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน actin ดังนี้

โปรมแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที	
โปรมแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	30 รอบ
(Annealing)	ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
โปรมแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส ∞	

2) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *1-sst*

เตรียม reaction mixture ดังนี้ บัฟเฟอร์ (10X PCR buffer + KCl-$MgCl_2$) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) ที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 1-sst forward (5’ ATG ATG

GCT TCA TCC ACC AC 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 1-sst reverse (5' CCA TCA AGG TTC GAA AGT CC 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (Fermentas, Germany) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เติมน้ำ Milli Q จนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป spin down แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System2400 (Perkin Elmer, USA)

โดยตั้งโปรแกรมในการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน ดังนี้

โปรมแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที	
โปรมแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	30 รอบ
(Annealing)	ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 2.10 นาที	
โปรมแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส ∞	

3) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *1-fft*

เตรียม reaction mixture ดังนี้ บัฟเฟอร์ (10X PCR buffer + KCl-$MgCl_2$) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) ที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 1-fft forward (5' ATG CAA ACC CCT GAA CCC 3')ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 1-fft reverse (5' GCC GGT AAT TAA AAA GGG TA 3')ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (Fermentas, Germany) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เติมน้ำMilli Q จนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป spin down แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System2400 (Perkin Elmer, USA)

โดยตั้งโปรแกรมในการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน ดังนี้

โปรมแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที	
โปรมแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	30 รอบ
(Annealing)	ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 2.00 นาที	
โปรมแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส ∞	

4) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธีอิเลคโตโฟรีซีส PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ตัวอย่างลงในหลุมของ agarose gel ที่เตรียมไว้ นำไป Run ใน 1x TAE buffer บนเครื่อง gel electrophoresis โดยตั้งค่าความต่างศักย์ 100 โวลท์ ระยะเวลา 35 นาที แล้วนำไปตรวจดูขนาดของแถบของดีเอ็นเอ เทียบกับ DNA marker ด้วยเครื่อง gel documentation

5) การถ่ายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบไปบนแผ่นไนลอน

นำแผ่นเจลที่ได้ล้างด้วยน้ำ Milli Q ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง แล้วนำแผ่นเจลแช่ในสารละลาย depurination solution (HCL ความเข้มข้น 0.125 โมลาร์) เขย่าเบาๆ นาน 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำ Milli Q ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง ทำให้ดีเอ็นเอเปลี่ยนสถาพโดยแช่ใน denaturing buffer (NaCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ + NaOH ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์) แล้วเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่าเพื่อทำให้ DNA เปลี่ยนสภาพ ประมาณ 30 นาที ในระหว่างรอให้เตรียมอุปกรณ์เพื่อทำการ blotting ดังแสดงในภาพที่ 4 ดังนี้ให้นำปลาย

สองด้านของกระดาษกรอง (3 MM filter paper) ที่จะใช้เป็นสะพาน (bridge) ในการส่งผ่าน DNA จุ่มลงใน 6X SSC (Tri- sodium citrate + NaCl, pH 7-8) ตัดแผ่น Hybond nylon membrane (Amersham,USA) ให้มีขนาดเท่ากับแผ่นเจลที่จะทำการ blot เมื่อครบเวลาให้นำแผ่นเจลวางบนแผ่นกรองที่ชุ่มด้วย 6X SSC (ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ) แล้ววางทับด้วย Hybond nylon membrane ที่ตัดไว้ทับลงบน agarose gel (ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ) ลอกพลาสติกออก วางกระดาษกรอง ทับลงไปประมาณ 4 แผ่น แล้ววางทิชชู บนกระดาษกรอง นำวัสดุที่มีน้ำหนักมาทับลงบนทิชชู และเปลี่ยนทิชชูบ่อยๆ ทิ้งไว้ข้ามคืน ทำเครื่องหมายที่แผ่น Hybond nylon membrane แล้วแยกออกจากแผ่นเจล นำแผ่นไนลอนไปล้างในน้ำ Milli Q ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการตรึงดีเอ็นเอให้อยู่บนแผ่นไนลอน โดยอบในตู้ hot air oven อุณหภูมิ 80°C นานประมาณ 2 ชั่วโมงนำไป hybridize กับ probe ที่เตรียมไว้ หรือ เก็บไว้ที่ 4°C จนกว่าจะใช้ hybridize

6) การสกัดพลาสมิด p-GemT ที่สอดแทรกด้วยยีน *1-sst* และยีน *1-fft* จากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อใช้เป็นยีนติดตาม (gene probe) ด้วย quick plasmid miniprep kit

- นำอาหารที่เลี้ยงเชื้อมาแยกให้ได้ตะกอนเซลล์ โดยแยกอาหารอย่างระมัดระวังออกจากตะกอนเซลล์
- ทำการแยกตะกอนเซลล์ไว้ใน Resuspension Buffer (R3) 250 ไมโครลิตรเติม Lysis Buffer (L7) 250 ไมโครลิตร ลงในเซลล์ ผสมโดยการกลับหลอดทดลอง 5 ครั้ง (ห้ามเขย่า) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- เติม Precipitation Buffer (N4) 350 ไมโครลิตร ผสมทันทีด้วยการกลับหลอดทดลองจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- ปั่นเหวี่ยงสารละลายผสมด้วยความเร็วประมาณ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ใช้หลอด microcentrifuge เก็บส่วนที่ใส
- นำ supernatant ใส่ใน Spin Column
- วาง Spin column ที่มี supernatant ใส่หลอด Wash ขนาด 2 มิลลิลิตร
- ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนที่ไหลผ่านจาก column แล้วนำ column ใส่หลอด Wash กลับตำแหน่งเดิม
- เติม Wash Buffer (W10) 500 ไมโครลิตร ที่มี ethanol ลงใน column ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนที่ไหลผ่านจาก column แล้วนำ column ใส่หลอด Wash กลับตำแหน่งเดิม
- เติม Wash Buffer (W9) 700 ไมโครลิตร ที่มี ethanol ลงใน column
- ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนที่ไหลผ่านจาก column แล้วนำ column ใส่หลอด Wash กลับตำแหน่งเดิม
- ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด Wash Buffer ที่หลงเหลืออยู่ ทิ้งส่วนที่ไหลผ่านจาก column แล้วนำ column ใส่หลอด Wash กลับตำแหน่งเดิม
- นำ Spin column วางในหลอด Recovery ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- เติม TE Buffer ที่ผ่านความร้อน 75 ไมโครลิตร ลงบนตรงกลางของ column
- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที
- ภายในหลอด Recovery มี plasmid DNA ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

7) การเตรียมยีนติดตาม (gene probe) ด้วยการติดฉลากด้วย Dig (Digoxigenin labeling)

ติดฉลากยีนติดตามด้วย DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (บริษัท Roche เยอรมัน) มีขั้นตอนดังนี้ นำยีนติดตามที่ได้จากเจลความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมใส่ใน eppendorf จากนั้นเติมน้ำ Milli Q ที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีปริมาตรรวม 16 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเปลี่ยนสภาพดีเอ็นเอ (denature DNA) โดยนำไปบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีแล้วทำให้เย็นลงทันทีในน้ำแข็ง จากนั้นจึงเติม DIG High Prime (50 ไมโครลิตร DIG High Prime, 5X Conc. Labeling mixture containing optical concentrations of random primers, nucleotides, DIG-dNTP (alkali-label), Klenow enzyme and buffer components) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หรือบ่มข้ามคืน และทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.2 โมลาร์ EDTA pH 8.0 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จะมีปริมาตรรวม 22 ไมโครลิตร

8) การ Hybridization

- การทำ prehybridization โดยนำแผ่นไนลอน เมมเบรนที่มี DNA ที่ต้องการตรวจสอบใส่ลงในถุงพลาสติก แล้วเติม preheat DIG Easy Hyb Granules 10 มิลลิลิตร ปิดผนึกถุง แล้วนำไปบ่มใน Hybridization oven ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

- การทำ Hybridization โดยเติม denature DIG – labeled DNA probe (นำ DIG-labeled DNA probe; ยีนติดตามผลที่ติดฉลากด้วย Dig ความเข้มข้นประมาณ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรไปต้มนาน 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที) ที่เตรียมไว้แล้วประมาณ 3.5 มิลลิลิตรต่อ 100 ตารางเมตรของแผ่นไนลอน ความเข้มข้นของ probe ประมาณ 51.136 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมลงในแผ่นไนลอนที่ผ่านการ pre- hybridization ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มข้ามคืนใน Hybridization oven ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

9) การตรวจสอบสัญญาณบนแผ่นไนลอน

- หลังจากทำ hybridization แล้วเทสารละลายทิ้งแล้วนำแผ่นไนลอนล้างใน 2X SSC, 0.1% SDS 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างซ้ำอีกด้วย 0.5X SSC , 0.1% SDS 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที บ่มใน Hybridization oven ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เทสารละลายทิ้ง

- นำแผ่นไนลอนที่ผ่านการล้างเติม washing buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20) ให้ท่วมแผ่นไนลอนเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เทสารละลายทิ้ง

- เติม Blocking solution (เจือจาง 10X Blocking solution ในอัตราส่วน 1:10 ด้วย Maleic acid buffer) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า 30 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วเติมสารละลาย Antibody solution (หมุนเหวี่ยง Anti-Digoxigenin-AP 5 นาที ที่ 10,000 รอบต่อนาที ดูดเอาสารละลายที่ผิว จากนั้นเจือจาง Anti-Digoxigenin-AP 1:5000 (150 mU/ml) ด้วย Blocking solution) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่านาน 30 นาที เทสารละลายทิ้ง

- ล้างแผ่นไนลอนใน washing buffer 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที เทสารละลายทิ้ง

- เติมสารละลาย Detection buffer (0.1 M Tris – HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5 (20^0C)) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า 2-5 นาที เทสารละลายทิ้ง

- จากนั้นนำแผ่นไนลอนใส่ในถุงพลาสติก แล้วเติม color substrate solution (เติม NBT/BCIP stock solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปใน Detection buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการปิดผนึกถุง แล้วนำไปบ่มในที่มืดโดยไม่มีการเขย่าจนกระทั่งเห็นแถบดีเอ็นเอ จากนั้นทำการ

หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 50 มิลลิลิตร ของ น้ำ milli Q หรือ TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) ทำการบันทึกภาพ

3.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกของ inulin ที่ได้จากแคลลัส

ศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติก (Probiotics) โดยการนำ inulin ที่ได้จากแคลลัส รากที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (วิการดา 2554) และหัวสดแก่นตะวันมาทดแทนแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อในจุลินทรีย์ *Bifidobacteria bifidum* เพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่เพิ่มขึ้น มีวิธีทดลองดังนี้

เตรียม inoculums เชื้อ *Bifidobacteria* โดยการเลี้ยงในอาหาร MRS medium ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 50 μl (10^{6} cell/ml) ลงในอาหาร MRS medium ปริมาตร 5 ml ที่มี inulin ที่ได้จากแคลลัสและหัวสดแก่นตะวันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะ anaerobic และทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 , 24 และ 48 ชั่วโมง โดยมีมีการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ คือ นับปริมาณเซลล์โดยทำ serial dilution plate count, คำนวณปริมาณเซลล์ที่ได้ในหน่วย CFU/ml, วัด pH โดยใช้ pH meter และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.5 การวิเคราะห์น้ำตาลโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3.5.1 นำแคลลัสของแก่นตะวันมาบด แล้วทำการสกัดด้วยน้ำในอัตราส่วน 2 : 1 (โดยน้ำหนัก) ใช้เวลาในการสกัด 10 นาที และทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้มารวมกัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอน จะได้สารสกัดตัวอย่าง

3.5.2 นำสารสกัดจากแคลลัสที่ต้องการวิเคราะห์มาเจือจางให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วกรองด้วย 0.22 µM nylon syringe filter จากนั้นนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ใช้ column ชนิดคาร์โบไฮเดรต (Phenomenex, Rezek RNM Carbohydrate Column 7.8 x 300 mm) สำหรับการแยกสาร โดยกำหนดสภาวะในการแยกคือ ชะด้วย mobile phase (deionized distilled water) ที่อัตราการไหล 0.4 ml/min และอุณหภูมิ 45°C ตรวจจับสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วย refractive index detector (RI) และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารที่ออกจากคอลัมน์โดยการเปรียบเทียบกับค่า retention time (RT) และค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน คือ inulin, nystose, 1-kestose, sucrose, glucose, fructose

3.6 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในแต่ละ treatment ของการทดลองทำอย่างน้อย 10 ขวดและใช้ชิ้นพืช 3 ชิ้นต่อขวด ทำการทดลองซ้ำ 2 ชุดการทดลอง และวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณการสะสม inulin เฉลี่ยใน *In vitro* tuber ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ ONE WAY ANOVA