บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์และ สารเคมี

1.1 เครื่องมือ/อุปกรณ์

1.1.1 เครื่องผลิตพลาสมาโดยการดิสชาร์จแบบเหนี่ยวนำด้วยคลื่นวิทยุ

- เครื่องผลิตพลาสมาโดยการดิสชาร์จแบบเหนี่ยวนำด้วยคลื่นวิทยุ ได้รับความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือจาก ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1.1.2 เครื่อง PCR (Thermal cycler)

1.1.3 เครื่อง Electrophoresis

1.1.4 เครื่อง UV

1.1.5 คิวเวต (cuvette)

1.1.6 เครื่อง electroporater

1.1.7 เครื่อง incubator

1.1.8 Holder

1.1.9 เครื่อง Microwave

1.1.10 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)

1.1.11 เครื่องเขย่า (shaker)

1.1.12 เครื่อง spectrophotometer

1.1.13 เครื่อง water bath

1.2 สารเคมี

1.2.1 Plasmid extraction buffer (ภาคผนวก)

1.2.2 ชุดสกัดพลาสมิด Mini kit

1.2.3 Chloroform

1.2.4 Iso-propanal (แช่ตู้เย็น)

1.2.5 Ethanol 70 % (แช่ตู้เย็น)

1.2.6 Master Mix (สำหรับ PCR)

1.2.7 Deionized water (dH_2O)

1.2.8 Agarose gel / Agar gel

1.2.9 TBE 1X buffer (ภาคผนวก)

1.2.10 DNA marker (ภาคผนวก)

1.2.11 Loading buffer (ภาคผนวก)

1.2.12 Ethidium Bromide (ภาคผนวก)

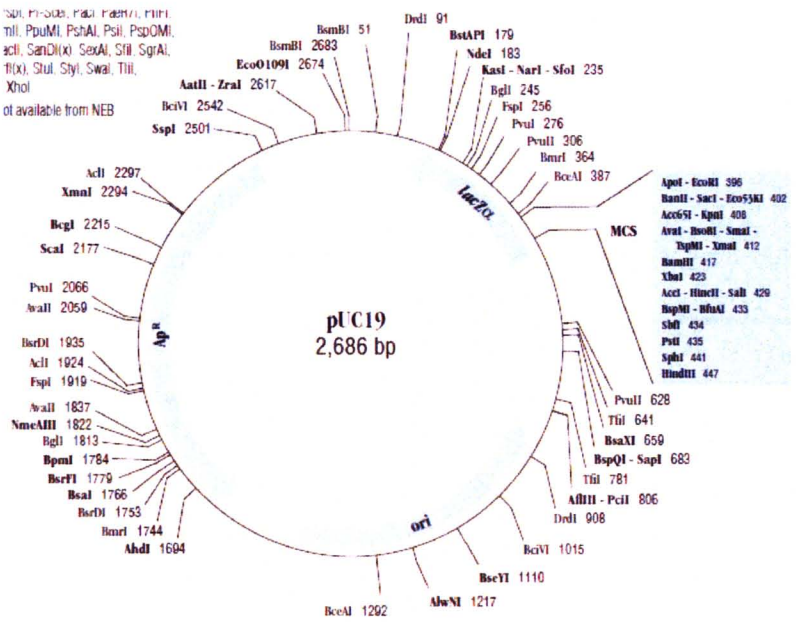
1.3 ตัวอย่างในการทดลอง

1.3.1 พลาสมิด pUC19

- จากบริษัท Clontech ซึ่งมีขนาด 2,686 bp โดยมียีน *Amp*^{r} เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อใช้ในการคัดเลือก และพลาสมิดดังกล่าวจะมี *LacZ* gene เป็นยีนรายงานผล ที่จะมีการแสดงออกของ β-galactosidase ซึ่งมีลักษณะฟีโนไทป์เป็นสีน้ำเงิน

1.3.2 ชิ้นส่วนของ *LacZ* gene

- ทำการตัดชิ้นส่วนของ *LacZ* gene จากพลาสมิด pUC19 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Restrition enzyme (*Nde*I / *Hind*III) ซึ่งจะได้ชิ้นส่วนของ *LacZ* gene โดยมีขนาดเท่ากับ 264 bp



ภาพ 7 พลาสมิด pUC19

2. วิธีการทดลอง

- แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

2.1 การใช้พลาสมิด pUC19 ไปเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยพลาสมา

2.1.1 การเตรียมพลาสมิด pUC19

เริ่มจากการลงเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pUC19 ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาประมาณ 16 – 18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการเขย่ามาสกัดพลาสมิดด้วยชุด kit (วิธีการตามข้อ 8) แล้ววัดความเข้มข้นของพลาสมิด ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นที่ 260 นาโนเมตร (ปริมาณที่ใช้ 3 ไมโครกรัม)

2.1.2 ทำการดูดสารละลายพลาสมิด pCU19 ลงใน holder ทั้ง 9 หลุมแล้วทำให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อประมาณ 30 นาที และนำเข้าสู่เครื่องพลาสมา โดยใช้สภาวะเงื่อนไขดังนี้

สภาวะเงื่อนไขที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยพลาสมา

- Gas = Nitrogen (N_2)
- Flow rate = 4.00 sccm
- RF power = 50 watt
- Frequency = 50 Hz
- Phuse leugth = 10 μs

ตาราง 1 แสดงสภาวะในการเหนี่ยวนำด้วยพลาสมาที่ใช้พลาสมิด pUC19

Dose (ion / cm^2)	Bias (kV)	Time (min)
$1x10^{15}$	2.5	6.30
$2x10^{15}$	2.5	19.08
$2x10^{15}$	3.5	17.16
$2x10^{15}$	5.0	26.14
$4x10^{15}$	2.5	38.17

2.1.3 ทำการละลายพลาสมิดที่อยู่บน holder ด้วยน้ำ dH_2O

2.1.4 ทำการส่งถ่ายพลาสมิดที่ผ่านการชักนำด้วยพลาสมาเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

2.1.5 นับจำนวนโคโลนีสีขาวและสีน้ำเงิน ทำการบันทึกเพื่อนำไปคำนวณความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์เพื่อใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่าง Dosage และ Bias

2.1.6 การคัดเลือกโคโลนีสีขาวด้วยเทคนิค Colonies PCR โดยวิธีการคือ

- ทำการ pick single colony นำไปเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเป็นระยะเวลา 1 – 2 ชั่วโมงในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ซึ่งจะใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR โดยตั้งโปรแกรมดังตาราง

ตาราง 2 แสดงการตั้งโปรแกรมการเกิดปฏิกิริยา

ขั้นตอน (Step)	อุณหภูมิ (Temperature : °C)	เวลา (Time)
- Warm up	94	2 นาที
- 3 Step cycling		
Denaturation	94	30 วินาที
Primer annealing	65	30 วินาที
Primer extention (35 cycle)	72	45 วินาที
- Final extention	72	5 นาที

- เตรียม Master Mix โดยสารละลายตามลำดับดังตาราง

ตาราง 3 Master Mix ของปฏิกิริยา PCR

องค์ประกอบ (Component)	ความเข้มข้นเริ่มต้น (Stock)	ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration)
Taq buffer	10X	1X
$MgCl_2$	25 มิลลิโมล	2.5 มิลลิโมล
dNTP (Mix)	10 มิลลิโมล	0.2 มิลลิโมล
Primers	100 ไมโครโมล	10 ไมโครโมล
Taq DNA polymerase	0.5 ยูนิต / ไมโครลิตร	0.4 ไมโครลิตร
dH_2O		
Total volume / rxn		19 ไมโครลิตร

ตาราง 4 แสดงรายชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค Colonies PCR

รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' ⟶ 3'
pUC19 Forward primer	GCT TGT CTG TAA GCG GAT GC
pUC19 Reverse primer	GCG GGC AGT GAG CGC AAC GC

- เติม DNA template ของแต่ละตัวอย่างจำนวน 1 ไมโครลิตร ต่อปฏิกิริยา แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (Shaker) 10 – 20 วินาที แล้วใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วต่ำ 4 – 5 วินาที

- นำไปใส่เครื่อง PCR แล้วกดเครื่องให้ทำงาน

2.1.7 นำ PCR product ไปตรวจสอบโดยเทคนิค Gel electrophoresis หรือเก็บไว้ในตู้ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปตรวจสอบ

2.1.8 นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่คัดเลือกด้วยเทคนิค Colonies PCR ไปลงในอาหาร LB 3 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาประมาณ 16 – 18 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยชุด kit โดยมีวิธีการดังนี้

- นำเชื้อที่ผ่านการเขย่าเทใส่ eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้ง

- เติม PD1 buffer (เพิ่ม RNase A) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex (อย่าเขย่าแรง) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

- เติม PD2 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน (อย่าใช้เครื่อง vortex) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

- เติม PD3 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน (อย่าใช้เครื่อง vortex) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 3 นาที

- เตรียม PD column ปริมาตรขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วดูดสารละลายส่วนใสจากขั้นตอนที่ 8.4 ลงใน PD column และ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 30 วินาที

- เติม W1 buffer ลงใน PD column ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเติม Wash Buffer (เพิ่ม ethanol) ปริมาตร

600 ไมโครลิตร ลงใน PD column และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 30 วินาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge อีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำให้แห้ง

- ย้าย PD column ที่แห้งแล้วใส่ลงใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่

- เติม Elution Buffer หรือ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ column แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที หรือจนกว่า Elution Buffer หรือ TE จะดูดซับหมด และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 2 นาที ซึ่งจะได้สารละลายชิ้นส่วนของ *LacZ gene*

2.1.9 ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) โดยส่งตัวอย่างพลาสมิดไปยัง First BASE Laboratories , Malaysia เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และใช้โปรแกรม CLUSTALW ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

2.2 การเหนี่ยวนำ *LacZ* gene ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยพลาสมา

2.2.1 การเตรียม *LacZ* gene

ทำการตัดชิ้นส่วนของ *LacZ* gene จากพลาสมิด pUC19 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restrition enzyme) คือ *Nde*I / *Hind*III แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนำไปตรวจสอบโดยทำ Gel electrophoresis ซึ่งจะได้ชิ้นส่วนของ *LacZ* gene ที่มีขนาดเท่ากับ 264 bp เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอ marker (Lambda / PstI) เมื่อส่องภายใต้เครื่อง UV แล้วทำการแยกชิ้นส่วนดังกล่าวออกจากเจล โดยมีวิธีการคือ

- ตัดแถบชิ้นส่วนของ *LacZ* gene ออกจากเจลใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- เติม TBE Conversion Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม Binding Buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงใน eppendorf tube ที่มีเจลอยู่ และนำไปบ่มด้วยเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีหรือจนกว่าเจลจะละลาย
- เติม silica powder suspension ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มด้วยเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยทำ 2 – 3 ครั้ง
- นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 5 วินาที และเทสารละลายส่วนใสทิ้ง ซึ่งจะเหลือแต่ตะกอนของ silica powder และเติม washing buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ละลายตะกอน silica powder กับ washing buffer ด้วยเครื่องเขย่า และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 5 วินาที และเทสารละลายส่วนใสทิ้ง โดยทำขั้นตอนนี้ 3 ครั้ง
- เมื่อเสร็จขั้นตอนสุดท้ายของวิธีที่ 1.4 แล้วผึ่งตะกอน silica powder ให้แห้งประมาณ 10 – 15 นาที
- เติม deionized water (dH_2O) หรือ TE และนำไปบ่มด้วยเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 30 วินาที และดูดสารละลายส่วนใส ใส่ eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.2.2 ทำการดูดสารละลายของ *LacZ* gene (ปริมาณที่ใช้ 2 ไมโครกรัม) ลงใน holder ทั้ง 9 หลุมและทำให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อประมาณ 30 นาที แล้วนำเข้าเครื่องพลาสมาตามเงื่อนไขดังนี้

สภาวะเงื่อนไขที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยพลาสมา

- Gas = Nitrogen (N_2)
- Flow rate = 4.00 sccm
- RF power = 50 watt
- Bias voltage = 2.5 kV
- Frequency = 50 Hz
- Phuse leugth = 10 μs

ตาราง 5 แสดงสภาวะในการเหนี่ยวนำชิ้นส่วนของ *LacZ* gene ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยพลาสมา

Dose (ion / cm^2)	Bias (kV)	เวลา (Time)
$5x10^{14}$	2.5	3.00 นาที
$1x10^{15}$	2.5	7.00 นาที
$2x10^{15}$	2.5	14.08 นาที
$2x10^{15}$	3.5	19.08 นาที
$2x10^{15}$	5.0	21.28 นาที

2.2.3 นำชิ้นส่วนของ *LacZ* gene ที่ผ่านการชักนำด้วยพลาสมาแล้ว ทำการละลายด้วยน้ำ dH_2O (20 ไมโครลิตร)

2.2.4 นำชิ้นส่วนของ *LacZ* gene ที่ผ่านการชักนำด้วยพลาสมา มาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ (vector) ด้วยปฏิริยา Ligation โดยบ่มในเครื่อง PCR ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และทำการส่งถ่ายดีเอ็นสายผสม (Recombinant DNA) เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

2.2.5 นับจำนวนโคโลนีสีขาวและสีน้ำเงิน ทำการบันทึกเพื่อนำไปคำนวณความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์เพื่อใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่าง Dose และ Bias

2.2.6 การคัดเลือกโคโลนีสีขาวด้วยเทคนิค Colonies PCR โดยวิธีการมีดังนี้

- ทำการ pick single colony นำไปเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเป็นระยะเวลา 1 – 2 ชั่วโมงในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ซึ่งจะใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR โดยตั้งโปรแกรมดังตาราง

ตาราง 6 แสดงการตั้งโปรแกรมการเกิดปฏิกิริยา

ขั้นตอน (Step)	อุณหภูมิ (Temperature : °C)	เวลา (Time)
- Warm up	94	2 นาที
- 3 Step cycling		
Denaturation	94	30 วินาที
Primer annealing	65	30 วินาที
Primer extention (35 cycle)	72	45 วินที
- Final extention	72	5 นาที

- เตรียม Master Mix โดยสารละลายตามลำดับดังตาราง

ตาราง 7 Master Mix ของปฏิกิริยา PCR

องค์ประกอบ (Component)	ความเข้มข้นเริ่มต้น (Stock)	ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration)
Taq buffer	10X	1X
$MgCl_2$	25 มิลลิโมล	2.5 มิลลิโมล
dNTP (Mix)	10 มิลลิโมล	0.2 มิลลิโมล
Primers	100 ไมโครโมล	10 ไมโครโมล
Taq DNA polymerase	0.5 ยูนิต / ไมโครลิตร	0.4 ไมโครลิตร
dH_2O		
Total volume / rxn		19 ไมโครลิตร

ตาราง 8 แสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค Colonies PCR

รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'→ 3'
Forward primer	GCT TGT CTG TAA GCG GAT GC
Reverse primer	GCG GGC AGT GAG CGC AAC GC

- เติม DNA template ของแต่ละตัวอย่างจำนวน 1 ไมโครลิตร ต่อปฏิกิริยา แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (Shaker) 10 – 20 วินาที แล้วใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วต่ำ 4 – 5 วินาที

- นำไปใส่เครื่อง PCR แล้วกดเครื่องให้ทำงาน

2.2.7 นำ PCR product ไปตรวจสอบโดยเทคนิค Gel electrophoresis หรือเก็บไว้ในตู้ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปตรวจสอบ

2.2.8 นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่คัดเลือกด้วยเทคนิค Colonies PCR ไปลงในอาหาร LB 3 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน เพื่อทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุด kit

2.2.9 ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) โดยส่งตัวอย่างพลาสมิดไปยัง First BASE Laboratories , Malaysia เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และใช้โปรแกรม CLUSTALW ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิธีการคำนวณความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ (Mutation frequency)

$$\text{Mutation frequency} = \frac{\text{No. of white colonies (mutant)}}{\text{Total No. of colonies (blue \& white)}} \times 100$$

วิธีคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความถี่ของรูปแบบการกลายพันธุ์

ซึ่งรูปแบบการกลายพันธุ์แบ่งเป็น 4 ประเภทคือ Transition , Transversion , Deletion และ Insertion โดยจำนวนที่เกิดขึ้น (Number of occurrence) ทำการนับทีละตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงในโคลนที่เป็น mutant เปรียบเทียบกับ control และบันทึกจำนวนตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด เพื่อใช้ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความถี่ของรูปแบบการกลายพันธุ์ (ดังสมการด้านล่าง)

$$\text{Frequency (\%)} = \frac{\text{Number of occurrence}}{\text{Total No. of occurrence}} \times 100$$