

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 หัวพันธุ์แก่นตะวัน

หัวพันธุ์แก่นตะวัน Hel 65 (ได้จาก Plant Gene Resource ประเทศแคนาดา; Pimsaen et al. 2010) ปลูกที่แปลงทดลองหมวดพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น สภาพดินเป็นดินชุดยโสธร เนื้อดินเป็นดินร่วนปนทราย คัดเลือกหัวพันธุ์ลักษณะสมบูรณ์ คือไม่มีเนื้อเชื้อซ้ำ หรือไม่มีลักษณะติดเชื้อโรค แخذหัวแก่นตะวันในน้ำประปา ล้างโดยวิธีใช้มือลูบดินออกให้สะอาด ไม่กระทบกระเทือนตาข้าง (lateral bud) และตัดไหล (stolon) ที่ทั้งหมดจนถึงฐานหัวพันธุ์ ทำการทดลองกระตุ้นตาข้างทันที ไม่ใช่หัวซึ่งเก็บแช่เย็นไว้

3.2 การแยกเก็บตาข้างในระยะต่างๆของหัวแก่นตะวัน

ตัดหัวแก่นตะวันแช่ในน้ำประปาเพื่อกระตุ้นการงอกของตาข้าง แยกเก็บตาข้างที่มีการเจริญต่างกัน 6 ระยะตามลักษณะฐานวิทยาทางเนื้อเยื่อเจริญในช่วงเวลา 6-72 ชั่วโมงขึ้นไปแล้วตัดตาข้างทั้ง 6 ระยะจากหัวแก่นตะวัน แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ที่ 4 องศาเซลเซียส เปลี่ยนล้างแอลกอฮอล์ 3 ครั้ง เก็บรักษาตัวอย่างในแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์ ใช้ตัวอย่างนี้ทั้งเพื่อสกัดโปรตีนและ RNA

3.3 การศึกษาดำแหน่งในเซลล์ของโปรตีนเลกติน 2

3.3.1 การสกัดโปรตีนรวม (total protein) นำตาข้างระยะการเจริญต่างๆ ที่เก็บรักษาไว้ในแอลกอฮอล์ น้ำหนัก 1 กรัม มาล้างน้ำกลั่นไล่แอลกอฮอล์ ใช้โกรงบดละเอียดเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลว สกัดโปรตีนทันทีที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.8 ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์และแคลเซียมคลอไรด์ 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ $11000\times g$ ที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งตะกอน เก็บส่วนน้ำใส (supernatant) เป็นสารละลายโปรตีนรวม วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีข้อ 3.3.3 และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสระหว่างทดลอง

3.3.2 การสกัดโปรตีนแยกส่วนเซลล์ (cell fractionated extraction) นำตาข้างระยะการเจริญที่มีโปรตีนเลกติน 2 คือตาข้างระยะที่ 1 ซึ่งเก็บรักษาไว้ในแอลกอฮอล์ น้ำหนัก 0.5 กรัม มาล้างน้ำกลั่นไล่แอลกอฮอล์ ใช้โกรงบดละเอียดเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลว สกัดโปรตีนทันทีตามวิธีของ Hood et al. (1988) ทุกขั้นตอนทำที่ 4 องศาเซลเซียส เริ่มต้นสกัดด้วยสารละลาย 0.1% โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulphite; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 4 มิลลิโมลาร์ ใช้ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กวนต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บั่นเหวี่ยง ($11000\times g$, 30 นาที) เก็บส่วนน้ำใสขั้นนี้ไว้เป็นตัวอย่างสารสกัด

โปรตีนในส่วนไซโตพลาสซึม (cytoplasmic protein) นำส่วนที่เป็นตะกอน (pellet) ไปสกัดด้วยสารละลาย 0.5% Nonidet P-40 ที่มีโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ 2 มิลลิโมลาร์ ใช้ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กวนต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยง (11000×g, 30 นาที) เก็บส่วนน้ำใสชั้นนี้ไว้เป็นตัวอย่างสารสกัดโปรตีนในส่วนเยื่อ (membrane protein) ล้างส่วนที่เป็นตะกอน 3 ครั้งด้วยโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนแต่ละครั้งที่ 11000×g เป็นเวลา 30 นาที) เพื่อกำจัด Nonidet P-40 นำตะกอนมาสกัดครั้งสุดท้ายด้วยแคลเซียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กวนต่อเนื่องเป็นเวลาข้ามคืน ปั่นเหวี่ยง (11000×g, 30 นาที) เก็บส่วนน้ำใสเป็นสารสกัดโปรตีนในส่วนผนังเซลล์ นำสารสกัดโปรตีนในส่วนเยื่อและสารสกัดโปรตีนในส่วนผนังเซลล์มาตกตะกอนโปรตีน ด้วยอะซิโตนปริมาตร 4 เท่าของปริมาตรสารสกัด (4 volumes) ความเข้มข้นของอะซิโตนที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน คือ 80% ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.8 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารสกัดโปรตีนแต่ละส่วน ตามวิธีข้อ 3.3.3 และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างทดลอง

3.3.3 การวิเคราะห์ค่าปริมาณโปรตีน ใช้วิธี Lowry et al. (1951) ผสมสารละลายตัวอย่างทดสอบ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper) 1 มิลลิลิตร* ให้เกิดปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วเติมน้ำยา Phenol (Folin-ciocalteu) reagent เจือจาง 2 เท่า ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ให้เกิดปฏิกิริยาต่อ 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรของสารละลายสีน้ำเงินม่วงที่เกิดขึ้น วิเคราะห์เทียบปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ที่สร้างจากโปรตีน bovine serum albumin (BSA) ช่วงความเข้มข้น 10- 100 ไมโครกรัม

*หมายเหตุ เตรียมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ จากสารละลาย 3 ชนิด ได้แก่ สาร A: คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1% สาร B: โซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรต ($\text{Na}_2\text{K}_2\text{tartrate}$) 1% สาร C: โซเดียมคาร์บอเนต 2% (ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์) ผสมใช้ด้วยอัตราส่วนโดยปริมาตร สาร A 1 ส่วน สาร B 1 ส่วน และสาร C 100 ส่วน

3.3.4 การวิเคราะห์ รูปแบบโปรตีน (protein profiling) วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE โดยวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้เจลพอลิอะคริลาไมด์ 15% (เตรียมจาก acrylamide และ bis-acrylamide ยี่ห้อ BioRad) ใช้อุปกรณ์ Mini-Protein III ยี่ห้อ BioRad

ผสมโปรตีนตัวอย่างใน 1×Laemmli loading buffer (Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.8 ที่มี SDS 1% β-mercaptoethanol 5% กลีเซอรอล 20% และโบรโมฟีโนลบลู 0.01%) ทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยแช่หลอดในอ่างน้ำเดือด 2 นาที แยกโปรตีนตัวอย่างควบคู่ไปกับโปรตีนมาตรฐานบอกขนาด (molecular weight protein markers) ใช้ค่าความต่างศักย์คงที่ 150 โวลต์ ระบบบัฟเฟอร์ Tris 24.77 มิลลิโมลาร์ที่มี glycine 191.82 มิลลิโมลาร์ แยกโปรตีนที่อุณหภูมิห้อง ระยะการแยกประมาณ 5 เซนติเมตร เมื่อสิ้นสุดการแยกนำแผ่นเจลมาย้อมดูรูปแบบโปรตีนด้วยสี coomassie brilliant blue R-250 (0.25% เตรียมใน

สารละลายผสมเมทิลแอลกอฮอล์ 40% และกรดอะซิติก 10%) ย้อมนาน 1 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินในเจลด้วยสารละลายผสมเมทิลแอลกอฮอล์ และกรดอะซิติก

3.4 การเตรียมอุปกรณ์ไม่ปนเปื้อนเอนไซม์ RNase

แช่อุปกรณ์ในภาชนะที่ใส่สารละลายสารไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต (diethylpyrocarbonate; DEPC) 0.1% (โดยปริมาตร) ที่เตรียมในน้ำกลั่น ให้สารละลาย DEPC สัมผัสอุปกรณ์อย่างทั่วถึงแล้วปิดภาชนะเพื่อป้องกัน DEPC ระเหย แช่อุปกรณ์ทิ้งไว้ในตู้ควั่นข้ามคืนเพื่อทำลาย RNase เมื่อครบเวลา ใส่อุปกรณ์ในถุงพลาสติก นำไปอบนึ่งด้วยไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องนึ่งแรงดันไอน้ำ (autoclave) เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลาย DEPC ที่ตกค้าง หลังจากนั้นนำอุปกรณ์เข้าตู้อบให้แห้งสนิทก่อนใช้ทำการทดลอง

3.5 การเตรียมสารละลายที่ไม่มี RNase ปนเปื้อน (RNase-free)

เติม DEPC ในน้ำกลั่นหรือสารละลายที่ต้องการเตรียมให้ไม่มี RNase ปนเปื้อน ความเข้มข้นสุดท้ายของ DEPC เป็น 0.1% (โดยปริมาตร) ปิดฝาภาชนะแล้วตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้น แล้วนำไปนำไปอบนึ่งด้วยไอน้ำที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลาย DEPC

3.6 การสกัด RNA รวม (total RNA)

วิธีการ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA รวมนี้ ทุกขั้นตอนต้องไม่มี RNase ปนเปื้อน ทดลองสกัด 2 วิธี

3.6.1 สกัด RNA ด้วย RNeasy Plant Mini Kit (ยี่ห้อ Qiagen) ซึ่งมีประสิทธิภาพของการสกัดได้เฉพาะ RNA ขนาดใหญ่กว่า 200 นิวคลีโอไทด์ (กำจัดทั้ง 5S rRNA 5.8S rRNA tRNA และ DNA)

นำตาของหัวแก๊นตะวันตกซึ่งถูกเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในโกร่ง เติมน้ำโตรเจนเหลวให้ท่วมเนื้อเยื่อ บดเนื้อเยื่อให้ละเอียดขณะที่ยังคงเป็นเนื้อเยื่อแข็งในน้ำโตรเจนเหลว ย้ายเนื้อเยื่อตามละเอียดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ซึ่งใส่ RLC lysis buffer (ส่วนประกอบของ RNeasy Plant Mini Kit) แช่เย็นรอไว้ก่อนแล้วทันที ใช้อัตราส่วน RLC buffer 450 ไมโครลิตร : เนื้อเยื่อตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม แล้วนำไปปั่นผสม (vortex) เป็นเวลาสั้นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายเซลล์ให้แตกได้สารสกัด

เปิดสารสกัดไม่ให้มีเศษเนื้อเยื่อปน ย้ายใส่หลอด QIAshredder spin column (ส่วนประกอบของ RNeasy Plant Mini Kit) ที่มีแผ่นกรองเป็นเยื่อซิลิกาดูดจับสารปนเปื้อนซึ่งไม่ต้องการนำไปปั่นเหวี่ยง (10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที) จากนั้นเปิดสารละลาย filtrate ที่ไหลผ่านแผ่นกรองใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำแอลกอฮอล์ลงผสมกับสารละลาย filtrate ปริมาตรของ

แอลกอฮอล์เป็นครั้งหนึ่ง (0.5 volume) ของสารละลาย ปิดสารละลายผสมใส่หลอด RNeasy spin column (ส่วนประกอบของ RNeasy Plant Mini Kit) ที่ประกอบอยู่บน collection tube ปั่นเหวี่ยงนาน 15 วินาทีที่ความเร็ว 10000 รอบ/นาที ดูดทิ้งส่วน filtrate เติม RPE washing buffer (ส่วนประกอบของ RNeasy Plant Mini Kit) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอด RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยง 15 วินาทีที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ดูดทิ้งส่วน filtrate ล้าง Rneasy spin column ด้วย RPE buffer (500 ไมโครลิตร) อีกครั้งหนึ่ง เซนตริฟิวชัน 2 นาที ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที แล้วทิ้ง filtrate ไปพร้อมกับ collection tube วาง RNeasy spin column (ซึ่งดูดจับ RNA ที่ต้องการไว้) บน collection tube หลอดใหม่ เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์กลั่นซ้ำ 2 ครั้ง ปริมาตร 40–50 ไมโครลิตรลงใน RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยง นาน 1 นาที ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เพื่อชะ RNA ออกจาก spin column เก็บ filtrate เป็นตัวอย่าง RNA

3..6.2 สกัด RNA ด้วย TRIzol Kit (ยี่ห้อ Invitrogen) นำตาของหัวแก้วแก้ววันซึ่งถูกเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสปริมาณ 100 มิลลิกรัม บดในโกร่งที่เติมนไตรเจนเหลว ย้ายเนื้อเยื่อตาบดละเอียดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม TRIzol reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เพื่อให้เซลล์แตกและเกิดการสกัดโปรตีนออกจากกรดนิวคลีอิก ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที (5 นาที, 4 องศาเซลเซียส) เก็บส่วนน้ำใสไม่ติดตะกอนมาเติมคลอโรฟอร์ม 200 ไมโคร-ลิตร เขย่าอย่างแรง 2-3 นาที เพื่อสกัดแยกโปรตีนปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบ/นาที (15 นาที, 4 องศาเซลเซียส) เก็บสารละลายน้ำชั้นบน (upper phase) มาเติมไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol) ปริมาตรเท่ากันเพื่อตกตะกอน RNA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอน RNA ดูดทิ้งส่วนน้ำใส ล้างตะกอน 2 ครั้งด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 70% ระเหยแห้งแอลกอฮอล์ละลายด้วยน้ำ RNase-free

3.7 การตรวจสอบ RNA รวม

3.7.1 วัดปริมาณ RNA โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร (A_{260}) แล้วคำนวณความเข้มข้นของ RNA จากสูตร (Sambrook 2001);

$$\text{ความเข้มข้นของ RNA} = 38 \text{ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร} \times A_{260} \times \text{จำนวนเท่าการเจือจาง}$$

3.7.2 วิเคราะห์สภาพสมบูรณ์ของ RNA ด้วย formaldehyde (FA) agarose gel electrophoresis (Sambrook 2001) เตรียมอุปกรณ์ทุกชิ้นให้ไม่มี RNase ปนเปื้อน โดยชะไล่ผิวอุปกรณ์ด้วย 0.5% SDS แล้วชะตามด้วยน้ำ RNase-free ชะล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ เพื่อช่วยให้แห้งง่าย เตรียม 1.2% เจลอะการโรส (agarose) ในบัฟเฟอร์ 1×MOPS 20 มิลลิลิตร หลอมให้ละลาย เมื่ออุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส จึงเติมสารฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde 37%; 12.3 โมลาร์) ปริมาตร 0.344 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันทันที แล้วเทลงในพิมพ์ (cast apparatus)

เตรียมตัวอย่าง RNA สำหรับวิเคราะห์ ดังนี้ ปิดสารสกัด RNA ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 2.3 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ผสมกับสารละลายต่อไปนี้ บัฟเฟอร์ 5×MOPS 1 ไมโครลิตร สารฟอร์มาลดีไฮด์ (37%) 1.75 ไมโครลิตร และสารฟอร์มาไมด์ (formamide 50%) 5 ไมโครลิตร

(ปริมาตรทั้งหมด 10.05 ไมโครลิตร) แช่ส่วนผสมใน water-bath ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลา ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำแข็งเย็นจัดเพื่อป้องกันการเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล RNA หรือระหว่างโมเลกุลให้ RNA อยู่ในสภาพโมเลกุลเดี่ยว ผสมสารละลาย RNA (10.05 ไมโครลิตร) กับ 6× loading dye ซึ่งเป็นสารละลายผสมที่มีโบรโมไฟโนลบลู 0.25% ไซลีนไซยานอล (xylene cyanol) 0.25% และซูโครส 40% ปริมาตรของ loading dye 2 ไมโครลิตร ทำการทดลองแบบเดียวกันกับ λ /HindIII marker DNA แล้วนำ RNA และ marker DNA ไปแยกในเจลอะการโรสที่เตรียมไว้ข้างต้น ใช้ไฟฟ้า 5 โวลต์/ระยะเจล 1 เซนติเมตร ระบบบัฟเฟอร์ MOPS จนแนวสีชนิดแรกซึ่งเป็นโบรโมไฟโนลบลูเกือบสุดขอบเจล หยุดกระแสไฟฟ้า ย้อมแถบ RNA ในเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรซึ่งเตรียมด้วย น้ำ RNase-free นาน 30 นาทีที่ อุณหภูมิห้อง ย้ายเจลล้างด้วยน้ำกลั่น RNase-free นาน 2 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำกลั่นแช่เจล วิเคราะห์และบันทึกภาพของแถบ ย้อมติดสีฟลูออเรสเซนซ์ช่วง UV ของเอทิเดียมโบรไมด์บนเจล โดยใช้โปรแกรม Quantity One ของเครื่อง Gel Doc (ยี่ห้อ BioRad)

3.7.3 วิเคราะห์สภาพสมบูรณ์ของ RNA ด้วย TBE agarose gel electrophoresis เตรียมอุปกรณ์ให้ไม่มี RNase ปนเปื้อนเช่นเดียวกับข้อ 3.7.2 เตรียม 1.5% เจลอะการโรส (agarose) ในบัฟเฟอร์ 1×TBE (Tris 0.89 โมลาร์ กรดบอริก 0.89 โมลาร์ EDTA 0.002 โมลาร์; Sambrook 2001)

เตรียมตัวอย่าง RNA สำหรับวิเคราะห์ ดังนี้ ปิเปตสารสกัด RNA ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 0-5 ไมโครลิตร ลงในหลอดผสมกับสารฟอร์มาไมด์ 6 ไมโครลิตร (ปริมาตรทั้งหมด 11 ไมโครลิตร) แช่ส่วนผสมใน water-bath ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำแข็งเย็นจัด เติม 6× loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทำการทดลองแบบเดียวกันกับ λ /HindIII marker DNA แล้วนำ RNA และ marker DNA ไปแยกในเจลอะการโรสที่เตรียมไว้ข้างต้น ใช้ไฟฟ้า 5 โวลต์/ระยะเจล 1 เซนติเมตร ระบบบัฟเฟอร์ 1×TBE จนแนวสีโบรโมไฟโนลบลูเกือบสุดขอบเจล หยุดกระแสไฟฟ้า ย้อมแถบ RNA ในเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ ตามวิธีข้อ 3.7.2 วิเคราะห์และบันทึกภาพของแถบย้อมติดสีเอทิเดียมโบรไมด์ โดยใช้โปรแกรม Quantity One ของเครื่อง Gel Doc (ยี่ห้อ BioRad)

3.8 การทำ RT-PCR สังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcript-tion (RT) และเพิ่มปริมาณ cDNA โดยวิธี PCR

3.8.1 ชนิดของไพรเมอร์ (primers)

3.8.1.1 ไพรเมอร์ของเลกติน 2 (lectin2) (สุพร นุชดำรงค์และคณะ 2555)

Forward primer F: ATGGCTGCCAGTGACATT

Reverse primer R1: TTAAGGAAC AACTACGCCAC

Reverse primer R2: CCTTTTGCGGAGAACAG

Reverse primer R3: GGGCGTCTACTGTAC

3.8.1.2 ไพรเมอร์ของ 18s RNA จากการออกแบบในรายงานนี้

Forward primer: ACAATACCGGGCTCAAACGA

Reverse primer: CAATTAAGGCCAGGAGCGTA

3.8.1.3 ไพรเมอร์ของ Cu,Zn-SOD จากการออกแบบในรายงานนี้

Forward primer: CCACAAATGGCTGCATGTCAAC

Reverse primer: CCACCCTTTCCAAGATCATC

3.8.1.4 ไพรเมอร์ของ ascorbate peroxidase (APX) ออกแบบในรายงานนี้

Forward primer: TGGTCACACTCTTGGAGCTG

Reverse primer: TCAACAAGAGGGCGGAATAC

3.8.2 การทำปฏิกิริยา RT ใช้ Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit ของ Roche Applied Science ปิเปตสารละลาย RNA รวม ซึ่งสกัดจากตาข้างแก่แต่ละระยะ ให้ได้ปริมาณ RNA รวม 1000 นาโนกรัม ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ เตรียมหลอดสำหรับทำ negative control โดยใช้ น้ำกลั่นแทนสารละลาย RNA

ในกรณีของ *lectin2* *Cu,Zn-SOD* และ *APX* เติม Oligo (dT)₁₈ primer ลงในหลอดปฏิกิริยาที่มี RNA และหลอด negative control หลอดละ 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 ไมโครโมลาร์) และเติมน้ำกลั่น PCR grade เพื่อปรับปริมาตรของปฏิกิริยาเป็น 11.4 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวางในอ่างน้ำแข็งเย็นจัดทันที ในขั้นนี้ได้ตัวอย่าง denatured RNA ซึ่งเป็นเส้นเดี่ยวสมบูรณ์ ไม่เกิดเกิดพันธะไฮโดรเจนในโมเลกุล สำหรับกรณีของ 18s RNA เปลี่ยนใช้ Random hexamer primer ของ cDNA Synthesis kit แทน Oligo (dT)₁₈ primer แล้วทำการทดลองแบบเดียวกัน

เตรียมสารละลาย master mix ตามตารางเป็นสารละลายสำหรับหลอดปฏิกิริยา RT 1 ปฏิกิริยา

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นใน ปฏิกิริยา RT
5x Transcriptor high fidelity reaction buffer	4	1x
dNTP mix	2	1 มิลลิโมลาร์
Protector RNase inhibitor	0.5	20 หน่วย
DTT	1	5 มิลลิโมลาร์
Transcriptor high fidelity reverse transcriptase	1.1	10 หน่วย
Total volume	8.6	

เติมสารละลาย master mix ปริมาตร 8.6 ไมโครลิตร ลงในหลอดปฏิกิริยาข้างต้นที่มี denatured RNA อยู่ในปริมาตร 11.4 ไมโครลิตร แห่หลอดในอ่างน้ำแข็ง ผสมสารละลายให้เข้ากัน (ปริมาตรของปฏิกิริยา RT คือ 20 μ l)

นำหลอดปฏิกิริยา RT ทั้งหมดเข้าเครื่อง Gene Amp PCR system 9700 ซึ่งตั้งโปรแกรมเพื่อทำปฏิกิริยา RT สังเคราะห์ cDNA ตามที่กำหนดในคู่มือของ Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (Roche Applied Science) ดังนี้

ขั้นที่ 1: 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อให้ เกิดปฏิกิริยา RT โดยเอนไซม์ reverse transcriptase

ขั้นที่ 2: 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์

ขั้นที่ 3: 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

เก็บตัวอย่าง cDNA จากปฏิกิริยาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.8.3 การทำปฏิกิริยา PCR ของ cDNA ปิเปิดตัวอย่าง cDNA ในปริมาตรที่ทำให้ได้ปริมาณ cDNA เทียบเท่ากับผลการทำ RT ของ RNA 100-200 นาโนกรัม (ตามที่ระบุในการทดลอง) ลงในหลอด PCR 200 ไมโครลิตร

เตรียมสารละลาย master mix ตามตารางเป็นสารละลายสำหรับทำ PCR 1 ปฏิกิริยาที่มี $MgCl_2$ ความเข้มข้นสุดท้าย 2 มิลลิโมลาร์ และปริมาตรของปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร

สารละลาย	ปริมาตร	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา PCR
Forward primer (10 ไมโครโมลาร์)	2 ไมโครลิตร	0.4 ไมโครโมลาร์
Reverse primer (10 ไมโครโมลาร์)	2 ไมโครลิตร	0.4 ไมโครโมลาร์
dNTP mix: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (10 มิลลิโมลาร์)	1 ไมโครลิตร	0.2 มิลลิโมลาร์
5x PCR buffer	10 ไมโครลิตร	1x
$MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์)	4 ไมโครลิตร	2 มิลลิโมลาร์
Taq DNA polymerase** (5 หน่วย/ไมโครลิตร)	0.5 ไมโครลิตร	2.5 หน่วย
Total volume	19.5 ไมโครลิตร	

ดูดสารละลาย master mix ใส่ลงในหลอดที่มี cDNA (100-200 นาโนกรัม) เตรียมไว้ แล้วเติมน้ำกลั่น DNase-free ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (ในบางการทดลองมีการเติมสารฟอว์มาไมด์) แล้วนำเข้าเครื่อง Gene Amp PCR system 9700 ซึ่งตั้งโปรแกรมเครื่องเพื่อทำ PCR

ดังนี้: 25 Cycles เมื่อใช้ cDNA 200 นาโนกรัม หรือ 30 Cycles เมื่อใช้ cDNA 100 นาโนกรัม โปรแกรม อุณหภูมิ

ขั้นที่ 1 Predenaturation: 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

* ในการทดลองที่ทำ Hotstart PCR จะเติม Taq DNA polymerase หลังจบขั้นที่ 1 นี้

ขั้นที่ 2 Denaturation: 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ขั้นที่ 3 Annealing**: ใช้เวลา 30 วินาที กำหนดอุณหภูมิใช้จากค่า Tm ของไพรเมอร์

ในการทดลองทำ Touchdown PCR มีการตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ annealing

ขั้นที่ 4 Extension: 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

ขั้นที่ 5 Complete extension: 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ขั้นที่ 6 Cooling: 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

เก็บผลิตภัณฑ์ PCR แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดย agarose gel electrophoresis (ความเข้มข้นของเจล 1.2 %) ในระบบ TAE buffer (Tris-acetate 0.04 โมลาร์ที่มี EDTA 0.002 โมลาร์) ของการวิเคราะห์ DNA (Sambrook 2001) โดยใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ผสมกับ 6× loading dye ปริมาตร 4 ไมโครลิตร) และใช้ DNA ladder 100 bp ปริมาณ 500 นาโนกรัม เป็น marker

ในการทดลองที่มีการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้น DNA ในผลิตภัณฑ์ PCR ใช้บริการของหน่วยวิเคราะห์ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น