บทที่ 3
วัสดุและวิธีการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

หนอนเยื่อไผ่ จากป่าไผ่ อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่

2. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง

2.1 กล่องพลาสติก พร้อมฝาปิดที่มีรู

2.2 เยื่อกระดาษชุบน้ำพอหมาด

2.3 ตู้เพาะเลี้ยงแมลง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3. สารที่ใช้กับสัตว์ทดลอง

3.1 อะซิโตน (acetone)

3.2 ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (S-methoprene), Zoecon , USA

4. อุปกรณ์ทั่วไป

4.1 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)

4.2 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)

4.3 เครื่องผสมเขย่า (vortex mixture)

4.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

4.5 DNA/PROTEIN/ENZYME Analyzer (Shimadzu, JAPAN)

4.6 ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-1601)

4.7 ชุดอุปกรณ์สำหรับการทำเจลอิเลกโตรโฟเรซิส (gel electrophoresis)

4.8 เครื่องชั่งน้ำหนัก แบบความละเอียด 2 ตำแหน่ง

4.9 ชุดเครื่องมือผ่าตัด ได้แก่ ถาดผ่าตัด กรรไกร ปากคีบขนาดเล็ก

4.10 ไมโครปิเปต

4.11 ปิเปตแก้ว

4.12 บีกเกอร์

4.13 หลอดทดลอง

4.14 หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 ml หลอด

4.15 เข็มปักแมลงเบอร์ 3 (insect pin No.3)

4.16 จานเพาะเลี้ยง (culture dish)

4.17 petri dish

4.18 ตะเกียงแอลกอฮอล์

4.19 ไข (paraffin)

4.20 ช้อนตักสาร

4.21 กระดาษกรอง

5. สารเคมีทั่วไปและบัฟเฟอร์

5.1 น้ำกลั่น, Milli Q water, DMPC-treated water

5.2 Grace's insect culture medium (Grace's medium) (Gibco, USA)

5.3 สารละลายริงเกอร์ (Ringer's solution)

5.4 ไดเอธิล อีเธอร์ (diethyl ether)

5.5 D-solution

5.6 70% และ 100 % เอธานอล (ethanol)

5.7 100% เมธานอล (methanol)

5.8 ไอโซโพรพานอล (isopropanol)

5.9 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethydium bromide)

5.10 water-saturated phenol

5.11 chloroform-isoamyl alcohol (CIA)

5.12 2M และ 3M โซเดียมอะซิเตท (NaOAc)

5.13 Agarose S

5.14 0.6x และ 10x TBE buffer

5.15 0.5x และ 10x TAE buffer

5.16 TE buffer

6. อุปกรณ์ที่ใช้หยดฮอร์โมนและเก็บฮีโมลิมพ์

6.1 กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe)

6.2 กรรไกรปลายแหลม

6.3 แผ่น parafilm

7. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจฮอร์โมนโดยวิธี Radioimmuno Assay (RIA)

7.1 เครื่องวัดรังสีเบต้า (β-scintillation counter) (Aroka, JAPAN)

7.2 centrifuge evaporator

7.3 ฮอร์โมนเอคไดโซนติดฉลาก (H^3-ecdysone) (New England Nuclear, USA)

7.4 ฮอร์โมนเอคไดโซนสำหรับทำ standard curve

7.5 แอนติบอดี (anti-ecdysone rabbit antiserum)

7.6 BSA (bovine serum albumin)

7.7 แอมโมเนียมซัลเฟต

7.8 Aquasal II (scintillator)

8. ไพรเมอร์ (primer) สำหรับการทำ PCR

8.1 degenerated primer (Amercham Phamacia Biotech, USA)

8.11 forward primer : 5′-GCYTGYGARATGGAYATSTAYATG-3′

8.12 reverse primer : 5′-TCCCARATYTCYTCGAGGAA-3′

8.2 primer for quantitative analysis (SIGMA Genosys, Japan)

8.2.1 forward primer : 5′-CTGAAGAAGTGTCTAGCGGTGG-3′

8.2.2 reverse primer : 5′-TTGTTGGCGAACAGAACGCTG-3′

8.3 primer for sequencing

8.3.1 universal forward primer : CgCCAgggTTTTCCCAgTCACgAC

8.3.2 universal reverse primer : TTTCACACAggAAACAgCTATgAC

9. เอนไซม์และ reagent

9.1 restriction enzyme : *Eco*RI, *Sma*I

9.2 KOD plus polymerase และ 10x buffer for KOD plus (TOYOBO, JAPAN)

9.3 Taq polymerase และ 10x buffer for Taq polymerase

9.4 DNase I และ DNase buffer

9.5 10μM TMN (Tris HCl-MgCl-NaCl)

9.6 2 mM และ 10 mMdNTPs

9.7 25 mM $MgSO_4$

9.8 Rever TraAce (MMLV reverse transcriptase RNase H-) และ 5xRT buffer (TOYOBO, JAPAN)

9.9 GENECLEAN II® kit (Bio 101, USA)

9.10 DNA ligation kit (TOYOBO, JAPAN)

9.11 FlexiPrep kit (Pharmacia Biotech, JAPAN)

10. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation และ transformation

10.1 temperature controller (Iwaki Glass, JAPAN)

10.2 handy aspirator

10.3 shaker incubator

10.4 pGEM®-72f(+) vector

10.5 competent cell (*E. coli* DH10B)

10.6 S.O.C medium

10.7 LB medium และ LB agar plate (Luria-Bertani medium)

10.8 แอมพิซิลิน (ampicillin)

10.9 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside)

10.10 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-iodyl-β-D-thiogalactoside)

11. อุปกรณ์และสารเคมีในการหาลำดับเบส

11.1 Gene Amp® PCR system 9700

11.2 DNA sequencer (Hitachi 5500M)

11.3 DNASIS (Hitachi software engineering, Tokyo)

11.4 Long Ranger™ gel solution for DNA sequencing (FMC Bio Products)

11.5 ยูเรีย (urea : nuclease and protease tested)

11.6 10% TEMED (N, N, N′, N′-Tetramethylethylenediamine)

11.7 Thermo Sequence Fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham Phamacia Biotech, USA)

11.8 Thermo Sequenase™ reaction buffer

12. สถานที่ทำการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

12.1 Endocrinology Research Laboratory ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

12.2 Radioisctope Center มหาวิทยาลัยคานาซาวา ประเทศญี่ปุ่น

12.3 Developmental Biology Laboratory ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยคานาซาวา ประเทศญี่ปุ่น

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

วิธีการวิจัย

<u>การทดลองที่ 1</u> การศึกษาผลของ JHA ต่อการกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

ทำได้โดยแบ่งหนอนเยื่อไผ่ออกเป็นสองกลุ่ม หนอนในกลุ่มที่ 1 เป็นหนอนที่ได้รับ JHA และเป็นตัวให้ต่อมโปรทอแรกซิก (donor larvae) กลุ่มที่ 2 เป็นหนอนที่ไม่ได้รับ JHA และได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก (recepient larvae) จากนั้นแบ่ง donor larvae ออกเป็น 5 กลุ่ม ใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มขนาดเล็ก หยด JHA ความเข้มข้นต่างๆที่ละลายในอะซิโตนแก่ donor larvae ดังนี้

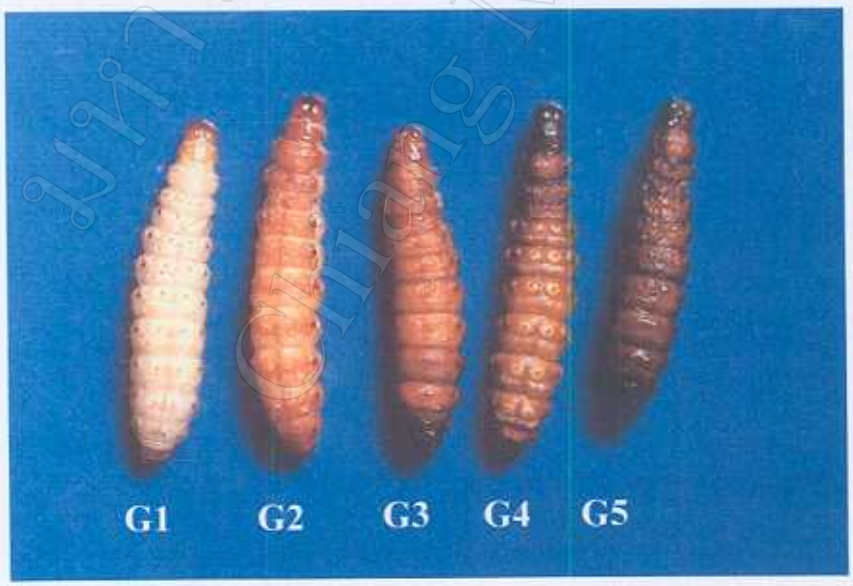
กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม หยดอะซิโตน	5	ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 2 หยด JHA	0.1	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 3 หยด JHA	0.25	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 4 หยด JHA	0.5	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 5 หยด JHA	1.0	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว

ทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกจาก donor larvae (ภาพ 10) ในวันที่ 1, 2 และ 3 ภายหลังการให้ JHA ไปยัง recepient larvae (ภาพ 11) สำหรับกลุ่มควบคุม ทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก ในวันที่ 3 หลังจากการให้อะซีโตน การหยดฮอร์โมนจะหยดฮอร์โมนลงด้านบน (dorsal) ของตัวหนอน โดยเริ่มหยดจากประมาณกึ่งกลางลำตัวเรื่อยไปยังด้านท้ายของลำตัว (ภาพ 8)

<u>การสังเกตและบันทึกผล</u> สังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่จะเกิดขึ้นใน recepient larvae โดยบันทึกผลทุกวัน เป็นเวลา 42 วัน ตามระดับการเปลี่ยนสี 5 ระดับ (ภาพ 9) ดังนี้

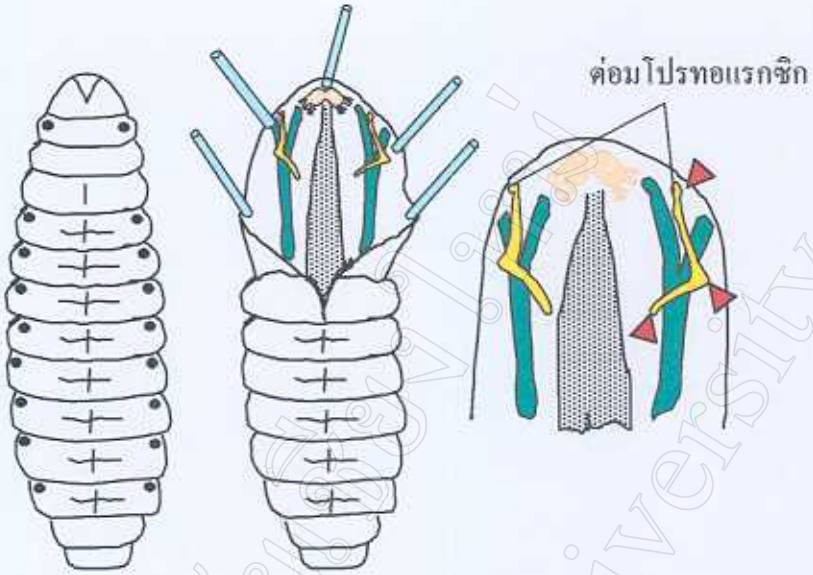
G 0	หมายถึง	ตัวหนอนหยุดการเคลื่อนไหว
G 1	หมายถึง	เริ่มเห็นจุดสีส้ม กระจายตามผิวลำตัว
G 2	หมายถึง	ผิวลำตัวเปลี่ยนเป็นสีส้มทั่วลำตัว
G 3	หมายถึง	ผิวลำตัวเปลี่ยนเป็นคิวติเคิลสีน้ำตาลของระยะดักแด้
G 4	หมายถึง	คิวติเคิลของดักแด้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม
G 5	หมายถึง	คิวติเคิลเปลี่ยนเป็นสีดำ

ภาพ 8 แสดงการหยดฮอร์โมนจูวีไนล์ลงบนตัวหนอนระยะไดอะพอส

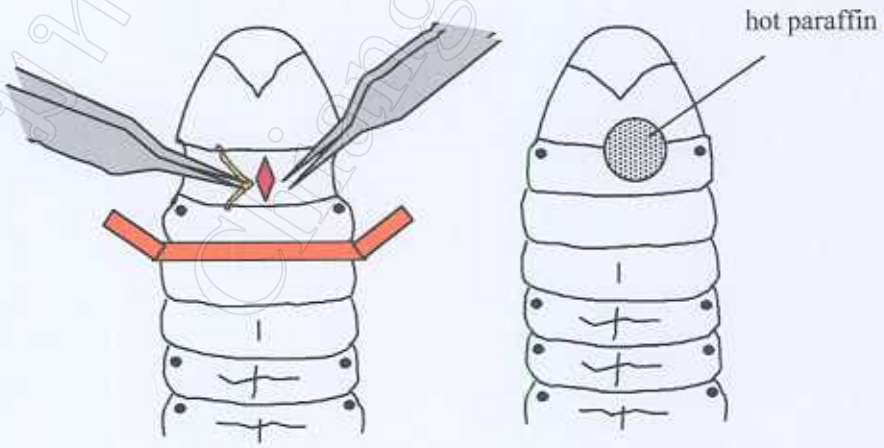


ภาพ 9 แสดงการเปลี่ยนแปลงตามระดับสีที่เกิดเมื่อหยดฮอร์โมนจูวีไนล์เป็น G1 G2 G3 G4 และ G5 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



ภาพ 10 แสดงการผ่าตัดต่อมโปรทอแรกซิกจาก donor larvae



ภาพ 11 แสดงการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกไปยัง recepient larvae

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

<u>การทดลองที่ 2</u> การศึกษาการตอบสนองของต่อมโปรทอแรกซิกต่อ JHA ในระหว่างระยะไดอะ-พอสของหนอนแต่ละเดือน

เริ่มจากเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายน โดยแบ่งหนอนในแต่ละเดือนออกเป็นสองกลุ่ม หนอนในกลุ่มที่ 1 เป็นหนอนที่ได้รับ JHA และเป็นตัวให้ต่อมโปรทอแรกซิก (donor larvae) กลุ่มที่ 2 เป็นหนอนที่ไม่ได้รับ JHA และได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก (recepient larvae) จากนั้นแบ่ง donor larvae ออกเป็น 6 กลุ่ม ใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มขนาดเล็ก หยด JHA ความเข้มข้นต่างๆที่ละลายในอะซิโตนแก่ donor larvae ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม หยดอะซิโตน	5	ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 2 หยด JHA	0.01	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 3 หยด JHA	0.04	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 4 หยด JHA	0.1	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 5 หยด JHA	0.4	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 6 หยด JHA	1.0	ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว

ทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกจาก donor larvae ในวันที่ 1 2 และ 3 ภายหลังการให้ JHA ไปยัง recepient larvae สำหรับกลุ่มควบคุม ทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก ในวันที่ 3 หลังจากการให้อะซีโตน สังเกตและบันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นใน recepient larvae เป็นเวลา 42 วันโดยอาศัยการเปลี่ยนสีผิวลำตัวทั้ง 5 ระดับ

<u>การทดลองที่ 3</u> การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมพ์และกิจกรรมการหลั่งฮอร์โมนของต่อมโปรทอแรกซิกของ recepient larvae

ทำได้โดยใช้หนอนเยื่อไผ่ในเดือนกันยายนเพราะเป็นหนอนที่เริ่มเข้าสู่ระยะไดอะพอส จากนั้นแบ่งหนอนออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 75 ตัว โดยหนอนในกลุ่มที่ 1 เป็นหนอนที่ได้รับ JHA และเป็นตัวให้ต่อมโปรทอแรกซิก (donor larvae) กลุ่มที่ 2 เป็นหนอนที่ไม่ได้รับ JHA และได้รับการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิก (recepient larvae) ให้ JHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว แก่ donor larvae แล้วทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกจาก donor larvae ไปยัง recepient larvae ภายหลังการให้ฮอร์โมน 3 วัน จากนั้นทำการเก็บฮีโมลิมพ์ของ recepient larvae ทุกๆ 2 วัน วันละ 5 ตัว เป็นเวลา 15 วัน เพื่อตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซน แล้วผ่าตัดเอาต่อมโปรทอแรกซิกของ recepient larvae มาทำการเพาะเลี้ยงใน Grace's medium ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนใน Grace's medium นั้น

วิธีการเก็บฮีโมลิมพ์

1. ใช้กรรไกรปลายแหลมขลิบตรงบริเวณ abdominal segment เพื่อให้ฮีโมลิมพ์ไหลออกมา แล้วหยดลงบนแผ่น parafilm

2. ใช้ไมโครปิเปตดูดฮีโมลิมพ์ 30 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube จากนั้นเติม 100% เมธานอล 120 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex 3 วินาที

3. นำสารจากข้อ 2ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

4. ดูด supernatant 110 ไมโครลิตรแล้วถ่ายลงหลอดใหม่

5. นำหลอดที่ได้ไปวางไว้ใน scintillator เพื่อทำให้แห้ง

6. หลังจากนั้นนำสารจากข้อ 5 ไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจหาระดับฮอร์โมนเอคไดโซน

การเก็บและเพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรกซิก

1. สลบหนอนด้วยอีเธอร์ จากนั้นใช้เข็มปักแมลงตรึงส่วนหัวและท้ายลำตัวของตัวหนอน

2. ใช้กรรไกรปลายแหลมผ่าตัดเปิดบริเวณกลางลำตัวของตัวหนอนแล้วผ่าตัดเปิดไปจนถึงกะโหลกหัวตรึงด้วยเข็มปักแมลง

3. ผ่าตัดเอาต่อมโปรทอแรกซิกทั้งสองต่อมออกมา แล้วทำการเพาะเลี้ยงใน Grace's medium 120 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

4. ใช้ไมโครปิเปตดูด Grace's insect culture medium 110 ไมโครลิตร ใส่ลงใน micro-centrifuge tube จากนั้นเติม100%เมธานอล120ไมโครลิตรแล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex 3 วินาที

5. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

6. ดูด supernatant 110 ไมโครลิตรแล้วถ่ายลงหลอดใหม่

7. นำหลอดที่ได้ไปวางไว้ใน scintillator เพื่อทำให้แห้ง

8. หลังจากนั้นนำสารจากข้อ 7ไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจหาระดับฮอร์โมนเอคไดโซน

การตรวจวัดระดับฮอร์โมนเอคไดโซนโดยวิธี Radioimmuno Assay

1. เตรียม standard ตามลำดับความเข้มข้นดังนี้ 400 200 100 50 25 12.5 6.25 3.125 1.5625 พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร

2. ใส่น้ำกลั่น 10 ไมโครลิตรลงในหลอดแก้ว หลังจากนั้นเติม standard หรือตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร

3. เติม H^3 - ecdysone 100 ไมโครลิตรและ anti ecdysone rabbit antiserum 100 ไมโครลิตร
4. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้วบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
5. เติม 100% แอมโมเนียมซัลเฟต (NH_4SO_4) 200 ไมโครลิตร
6. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้วบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. ดูดเอา supernatant ออก
8. เติม 50% แอมโมเนียมซัลเฟต 250 ไมโครลิตร
9. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
10. ดูดเอา supernatant ออก
11. เติมน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตรลงในหลอด
12. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
13. เติม 9 volume ของ Aqualsal II
14. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
15. นำเข้าเครื่องวัดรังสี β counter
16. นำผลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนโดยเปรียบเทียบกับstandard curve

<u>การทดลองที่ 4</u> การ clone เอคไดโซนรีเซบเตอร์ยีน (Ecdysone receptor gene : *EcR*) เพื่อศึกษาผลของ JHA ต่อการแสดงออกของ EcR mRNA ในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

ทำได้โดยหยด JHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว แก่หนอนในระยะไดอะพอส จากนั้นเมื่อหนอนเข้าสู่ระยะ G0 ทำการผ่าตัดเอาผิวหนังของหนอนใส่ลงในสารละลาย TRI zol แล้วทำการสกัด RNAจากผิวหนังออกมา เมื่อได้ RNA แล้ว ทำ DNase treatment และ reverse transcription เพื่อใช้เป็น template ในการทำ PCR (polymerase chain reaction) ต่อไป สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เป็น degenerated primer ที่ออกแบบโดยอาศัย conserved region ของ *EcR* ใน *M. sexta* แถบ band ที่เกิดจาก PCR นำมาทำ gene clean แล้วจึงนำไป insert ใน plasmid DNA โดยการทำ ligation จากนั้นนำ plasmid DNA ดังกล่าวไปทำการ transformation ใน *E. coli* ทำการตรวจหา plasmid DNA ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการ เมื่อตรวจพบแล้วทำการสกัด plasmid DNA เพื่อนำไปทำการหาลำดับเบสของ *EcR* จากนั้นจะทำการศึกษาการแสดงออกของ EcR mRNA ในต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนที่ได้รับและไม่ได้รับ JHA

การทดลองที่ 4.1 การหาลำดับเบสของ Ecdysone receptor gene

1. การเตรียม RNA จากผิวหนังของหนอนเยื่อไผ่โดยใช้สารละลาย TRI zol

    1.1 homogenize ผิวหนังของหนอนเยื่อไผ่ในสารละลาย TRI zol ให้ละเอียดที่สุด

    1.2 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15~30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที

    1.3 เติม 0.2 volume ของ CIA แล้วเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 15 วินาที

    1.4 ทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 นาที

    1.5 นำสารจากข้อ 1.4 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

    1.6 ดูด supernatant แล้วถ่ายในหลอดใหม่

    1.7 เติม isopropanol ในปริมาณที่เท่ากับ supernatant ในหลอดใหม่

    1.8 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

    1.9 นำสารจากข้อ 1.8 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

    1.10 remove isopropanol ออก จะได้ pellet RNA ที่ก้นหลอด

    1.11 ละลาย pellet RNA ใน D-solution 200 ไมโครลิตร

    1.12 เติม 2M NaOAc (pH 4.0) 20 ไมโครลิตร

    1.13 เติม phenol 200 ไมโครลิตร แล้วเติม CIA 60 ไมโครลิตร จากนั้นแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที

    1.14 นำสารจากข้อ 1.13 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที

    1.15 ดูด supernatant ออก แล้วถ่ายไปยังหลอดใหม่

    1.16 เติม isopropanol ในปริมาณที่เท่ากับ supernatant ในหลอดใหม่

    1.17 แช่สารจากข้อ 1.16 ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

2. การทำ DNase treatment

    2.1 นำสารจากข้อ 1.17 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูด isopropanol ออก แล้วเติม 75%เอธานอล 500 ไมโครลิตร

    2.2 นำสารจากข้อ 2.1 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูด isopropanol ออก

2.3 วางไว้ให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

2.4 ละลายใน DMPC-treated water ปริมาณ 35 ไมโครลิตร

2.5 เติม DNase buffer ปริมาณ 4 ไมโครลิตร

2.6 เติม DNase I ปริมาณ 1 ไมโครลิตร

2.7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

2.8 เติม DMPC-treated water ปริมาณ 160 ไมโครลิตร

2.9 เติม PCI ปริมาณ 200 ไมโครลิตร

2.10 แช่บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที

2.11 นำสารจากข้อ 2.10 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที แล้วดูด supernatant ออก แล้วถ่ายไปยังหลอดใหม่

2.12 ปรับปริมาณที่ได้ให้เป็น 200 ไมโครลิตร โดย DMPC-treated water

2.13 เติม CIA ปริมาณ 200 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

2.14 แช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที

2.15 นำสารจากข้อ 2.14 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูด supernatant ออก ถ่ายลงหลอดใหม่

2.16 เติม 0.1 volume ของ 3M NaOAc ลงใน supernatant

2.17 เติม 2.0 volume ของ 99.5% เอธานอล เขย่าให้เข่ากัน

2.18 เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำการสังเคราะห์ cDNA โดยการทำ reverse transcription ต่อไป

3. การสังเคราะห์ cDNA

3.1 นำสารจากข้อ 2.17 มาปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2 ดูดเอาเอธานอลออกแล้วล้างด้วย 75% เอธานอล ปริมาณ 500 ไมโครลิตร

3.3 นำสารจากข้อ 3.2 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.4 ดูดเอาเอธานอลออกแล้ววางผึ่งไว้ให้แห้ง เป็นเวลา 15 นาที

3.5 ละลายใน DMPC-treated waterปริมาณ 11ไมโครลิตรแล้วนำไปตรวจวัดหาค่าการดูดกลืนแสง (absorbancy) เพื่อคำนวณหาปริมาณ RNA ที่ได้

3.6 ใช้ 1 ไมโครกรัมจาก RNA ทั้งหมดที่ได้

3.7 เติม TMN ปริมาณ 2ไมโครลิตร แล้ว heat ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.8 เติม 5 x RT buffer ปริมาณ 4 ไมโครลิตร

3.9 เติม 10 mM dNTPs ปริมาณ 2 ไมโครลิตร

3.10 เติม Rever Tra Ace ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้ว heat ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆดังนี้

- อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
- อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.11 เติม TE ปริมาณ 80 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็น template สำหรับ PCR ต่อไป

4. การทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.1 ใช้ degenerated primers ในการ amplification ของ *EcR* โดยนำ cDNA ที่ได้มาทำ PCR ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

reaction volume

10x buffer	2	ไมโครลิตร
2mM dNTPs	2	ไมโครลิตร
25mM $MgSO_4$	1.2	ไมโครลิตร
10 picoM forward primer	2	ไมโครลิตร
10 picoM reverse primer	2	ไมโครลิตร
template	2	ไมโครลิตร
KOD plus polymerase	0.4	ไมโครลิตร
Milli Q water	8.4	ไมโครลิตร

PCR condition ที่ใช้ คือ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 48 องศาเซลเซียส 1 นาที, 68 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 40 รอบ

4.2 ทำ PCR 3 ครั้ง โดยใช้ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ในข้อ 4.1 เป็น template โดยอาศัย reaction volume เช่นเดียวกับข้อ 4.1

5. DNA purification โดยการทำ gene clean

5.1 ตัดแถบ band ที่ได้บน Agarose gel จากการทำ PCR ใส่ลงในหลอดแล้วชั่งน้ำหนักเจลที่ได้

5.2 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

5.3 เติม NaI ปริมาณ 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่วัดได้

5.4 ทำให้เจลละลายใน NaI โดยใช้ vortex

5.5 แช่ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ทุกๆ 1 นาทีจนเจลละลายจนหมด

5.6 เติม Glass milk ปริมาณ 5 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยพลิกไปมา

5.7 แช่บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที ผสมให้เข้ากันโดย vortex ทุกๆ 1 นาที

5.8 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที

5.9 ดูดเอา supernatant ออก

5.10 เติมสารละลาย New wash ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดย vortex

5.11 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที

5.12 ดูดเอา supernatant ออก

5.13 ทำเช่นเดียวกับ ข้อ 5.10-5.12 อีก 2 ครั้ง

5.14 แช่ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

5.15 เติม TE ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปต

5.16 แช่ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

5.17 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที

5.18 ดูด supernatant ออกแล้วถ่ายลงหลอดใหม่

5.19 เก็บสารจากข้อ 5.18 ไว้ที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทำ ligation ต่อไป

6. การทำ ligation

6.1 ใส่ plasmid DNA ที่ใช้เป็นเวกเตอร์คือ pGEM®-72f(+) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (100 นาโนกรัม) ลงในสารละลายที่ได้จากการทำ gene clean ของ PCR ครั้งที่ 3 ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร

6.2 เติม ligation enzyme ปริมาณ 6.9 ไมโครลิตร

6.3 บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

7. การทำ transformation

7.1 ทำให้ competent cell (*E. coli* DH10B) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ละลาย บนน้ำแข็ง

7.2 เติมสารละลายที่ได้จากการทำ ligation ลงใน competent cell

7.3 บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาที

7.4 แช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว แล้ว incubate เป็นเวลา 2-3 นาที

7.5 เติม SOC medium ปริมาณ 800 ไมโครลิตร

7.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

7.7 ดูดแยกสารละลายที่ได้จากข้อ 7.6 เป็นสองหลอด หลอดละ 200 และ 800 ไมโครลิตร

7.8 นำสารจากข้อ 7.7 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

7.9 ดูด supernatant ออก ให้เหลือหลอดละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ไมโครปิเปตละลายตะกอนของ plasmid DNA ที่ก้นหลอดทั้งสอง

7.10 ดูดเอาสารละลายของ plasmid DNA จากหลอดทั้งสอง หลอดละ 100 ไมโครลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยง(LB agar plate)ที่มี IPTG, X-gal และ ampicillin อย่างละ 15 ไมโครลิตร

7.11 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

8. การตรวจสอบ colony ที่ต้องการ

8.1 เลือกโคโลนีที่มีสีขาวใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium จำนวน 300 ไมโครลิตร

8.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

8.3 เติม PCI ปริมาณ 300 ไมโครลิตร เขย่าอย่างแรงจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีขุ่น

8.4 นำสารจากข้อ 8.3 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูด supernatant ออก ถ่ายไปยังหลอดใหม่

8.5 เติม 2M NaOH ปริมาณ 15% ของ supernatantที่ถ่ายออก

8.6 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

8.7 เติม 3M NaOAc ปริมาณ 10% ของสารละลายในข้อ 8.6

8.8 เติม 99.5% เอธานอล ปริมาณ 2 เท่าของ ปริมาตรสารละลายที่ได้จากข้อ 8.7

8.9 บ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

8.10 นำสารจากข้อ 8.9 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูด supernatant ออก

8.11 ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% เอธานอล ปริมาณ 700 ไมโครลิตร

8.12 นำสารจากข้อ 8.11 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูด supernatant ออก

8.13 ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

8.14 ละลายด้วย TE buffer 10 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex

8.15 แบ่งสารละลายจากข้อ 8.14 มา 5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 4 ไมโครลิตร และ loading buffer 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยปิเปตแล้ว load บน 1.2% Agarose S gel ใช้กระแสไฟฟ้า100 โวลต์ 200 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 35 นาที แช่ในเอธิเดียมโบรไมด์ เพื่อตรวจสอบหา positive band

9. การทำ purification โดยใช้ FlexiPrep Kit

9.1 เลือกโคโลนีที่ให้ positive band จากการตรวจสอบมาทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองขนาดกลางโดยใช้ LB medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

9.2 เมื่อครบเวลาการเพาะเลี้ยงให้ย้าย ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร

9.3 นำสารจากข้อ 9.2 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

9.4 เติม Solution I ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex

9.5 เติม Solution II ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จนสารละลายเป็นสีใส

9.6 เติม Solution III ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายมีลักษณะเหมือนวุ้น

9.7 นำสารจากข้อ 9.6 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

9.8 ดูด supernatant ออกแล้วถ่ายลงหลอดใหม่

9.9 เติม isopropanol ปริมาณ 7 เท่า ของ supernatant ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex

9.10 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

9.11 นำสารจากข้อ 9.10 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

9.12 ดูดเอา supernatant ออก

9.13 ล้างด้วย 70% เอธานอล ปริมาณ 200 ไมโครลิตร

9.14 นำสารจากข้อ 9.13 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

9.15 ดูดเอา supernatant ออก

9.16 วางผึ่งไว้ให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

9.17 เติม Sephaglas™ FP ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex เป็นเวลา 1 นาที

9.18 นำสารจากข้อ 9.17 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที

9.19 ดูดเอา supernatant ออก

9.20 ล้างด้วย wash buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex

9.21 นำสารจากข้อ 9.20 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที

9.22 ดูดเอา supernatant ออก

9.23 ล้างด้วย 70% เอธานอล ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex

9.24 นำสารที่จากข้อ 9.23 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที

9.25 ดูดเอา supernatant ออก

9.26 วางผึ่งไว้ให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

9.27 เติม TE buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex

9.28 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex ทุกๆ 2 นาที

9.29 นำสารจากข้อ 9.28 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

9.30 ดูด supernatant ออกแล้วถ่ายลงหลอดใหม่

9.31 เก็บสารจากข้อ 9.30 ไว้ที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

10. การหาลำดับเบส

10.1 การเตรียม PCR สำหรับการหาลำดับเบส

10.1.1 ทำได้โดย นำสารละลายที่ได้จากข้อ 9 มาทำ PCR โดยแบ่งออกเป็น 8 หลอด คือ

<u>หลอดที่ 1</u>	template	5	ไมโครลิตร
	universal forward primer	1	ไมโครลิตร
	A reagent	2	ไมโครลิตร
<u>หลอดที่ 2</u>	template	5	ไมโครลิตร
	universal forward primer	1	ไมโครลิตร
	G reagent	2	ไมโครลิตร
<u>หลอดที่ 3</u>	template	5	ไมโครลิตร
	universal forward primer	1	ไมโครลิตร
	C reagent	2	ไมโครลิตร
<u>หลอดที่ 4</u>	template	5	ไมโครลิตร
	universal forward primer	1	ไมโครลิตร
	T reagent	2	ไมโครลิตร

สำหรับหลอดที่ 5-8 ทำเช่นเดียวกับหลอดที่ 1-4 แต่เปลี่ยนจาก universal forward primer เป็นuniversal reverse primer

PCR condition ที่ใช้ คือ 94 องศาเซลเซียส 30วินาที, 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 25 รอบ

10.1.2 นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ทั้ง 8 หลอด หลอดละ 7 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาณ 3 ไมโครลิตร แล้วทำให้ความเข้มข้นมากขึ้นโดยนำไปใส่ไว้ใน aspirator เป็นระยะเวลา ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อเตรียมสำหรับการหาลำดับเบสในขั้นตอนต่อไป

10.2 การเตรียม sequencing gel

10.2.1 การเตรียมสารละลายสำหรับ sequencing gel เตรียมได้โดยผสมสารต่างๆ เข้าด้วย กัน คือ

50% long ranger gel solution	3.6	มิลลิลิตร
ยูเรีย	11	กรัม
Milli Q water	14	มิลลิลิตร

10.2.2 เขย่าสารให้เข้ากันเบาๆ

10.2.3 เมื่อยูเรียละลายหมดแล้วเติม 10X TBE สำหรับเครื่อง sequencer ของ Hitachi ปริมาณ 3.6 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอน

10.2.4 นำสารจากข้อ 20.2.3 เข้าเครื่อง vacuum เพื่อดูดเอาฟองอากาศออกจากสารละลาย เป็นเวลา 30 นาที

10.2.5 ระหว่างที่รอจนครบ 30 นาที นำแผ่นกระจกแก้วประกบเข้าด้วยกันโดยใช้แถบพลาสติก (spacer) เป็นตัวกำหนดความหนาของเจลที่จะใช้

10.2.6 เมื่อครบ 30 นาที นำเอาสารละลายจากข้อ 10.2.5 มาเติม 10% APS ปริมาณ 150 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาณ 15 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ

10.2.7 เทสารจากข้อ 10.2.6 ลงไปในแผ่นกระจกแก้วที่เตรียมไว้ โดยขณะเทสารละลายให้เอียงแผ่นกระจกแก้วนั้นเล็กน้อย

10.2.8 นำ comb พลาสติกสอดลงไปในตำแหน่งชั้นของเจลที่เตรียมไว้ (ภาพ 12)

10.2.9 ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ใช้ระยะเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วดึง comb พลาสติกออก แล้วต่อเข้ากับช่องของชุด sequencer ด้านบน (ภาพ 13)

10.2.10 ต่อชุด sequencer และ sequencing gel ที่เตรียมแล้วเข้าด้วยกัน (ภาพ 14) แล้วเติม 0.6X TBE ในช่องของชุด sequencer ทั้งบนและล่าง

10.2.11 ทำการ prerun เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

10.3 เมื่อครบ 1 ชั่วโมง แล้วใส่ comb กระดาษเพื่อทำเป็น lane สำหรับการ load ตัวอย่างลงไปอย่างรวดเร็วระหว่างช่องด้านบน กับ sequencing gel (ภาพ 15) แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดไล่ฟองอากาศที่เกิดขึ้นใน lane ให้หมด

10.4 ดูดสารจากข้อ 10.1.2 โดยไมโครปิเปต ใส่ลงในช่องของแผ่นเจล โดยใส่หนึ่งช่องต่อหนึ่งตัวอย่าง (ภาพ 16) เมื่อ load ตัวอย่างครบแล้วให้รีบดึง comb กระดาษออก จากนั้นหาลำดับของเบสในแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่อง DNA sequencer (ภาพ17) นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS(Hitachi software engineering, Tokyo)

การทดลองที่ 4.2 การศึกษาผลของ JHA ต่อการแสดงออกของ EcR mRNA ในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

1. ให้ JHA ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส จำนวน 30 ตัว ทำการเก็บต่อมโปรทอแรกซิกภายหลังการให้ฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 10 วัน

2. สกัด total RNAจากต่อมโปรทอแรกซิกโดยใช้สารละลาย TRI zol แล้ว นำ RNAที่ได้มาทำ DNase treatment, reversetranscription โดยอาศัยวิธีการเดียวกับการเตรียม DNA เพื่อนำมาหาลำดับเบส

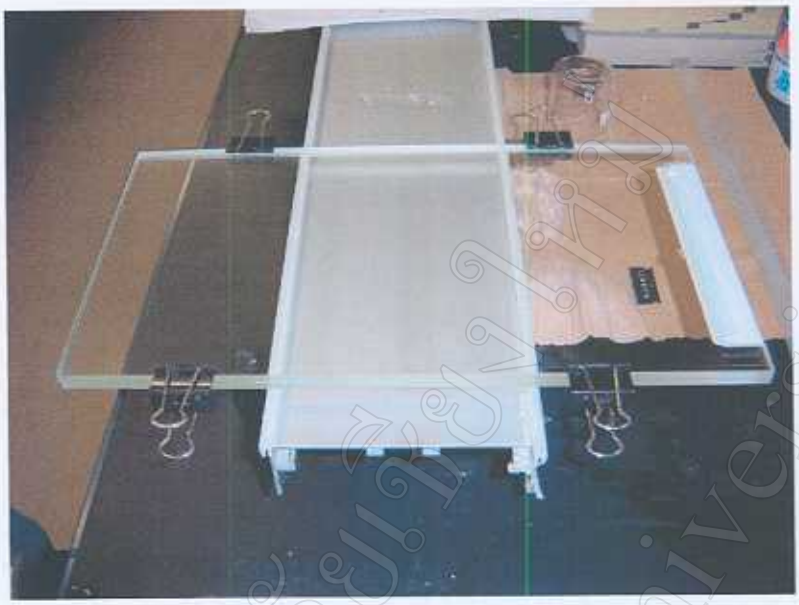
3. ทำ quantitative analysis โดย RT-PCR ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

10X buffer	1	ไมโครลิตร
2mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.1	ไมโครลิตร
Primer		
Forward primer	0.5	พิโคโมล
Reverse primer	0.5	พิโคโมล
Template	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น		

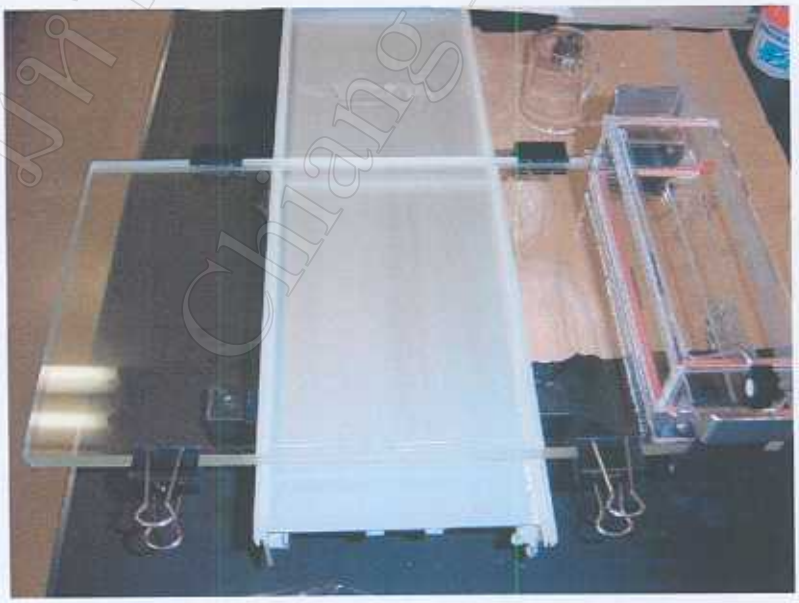
PCR condition ที่ใช้คือ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที, 52 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 45 รอบ ทำการเก็บตัวอย่างของ PCR ที่ 34, 36, 38, 40, 42 และ 44 รอบ

4. นำผลผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้ว load บน 1.2% Agarose S gel ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 200 มิลลิแอมแปร์ เป็นระยะเวลา 35 นาที

5. ย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นระยะเวลา 25 นาที ถ่ายรูปเจลที่ได้แล้วนำไปวิเคราะห์ความเข้มของแถบ band ที่เกิด โดย โปรแกรม NIH Image



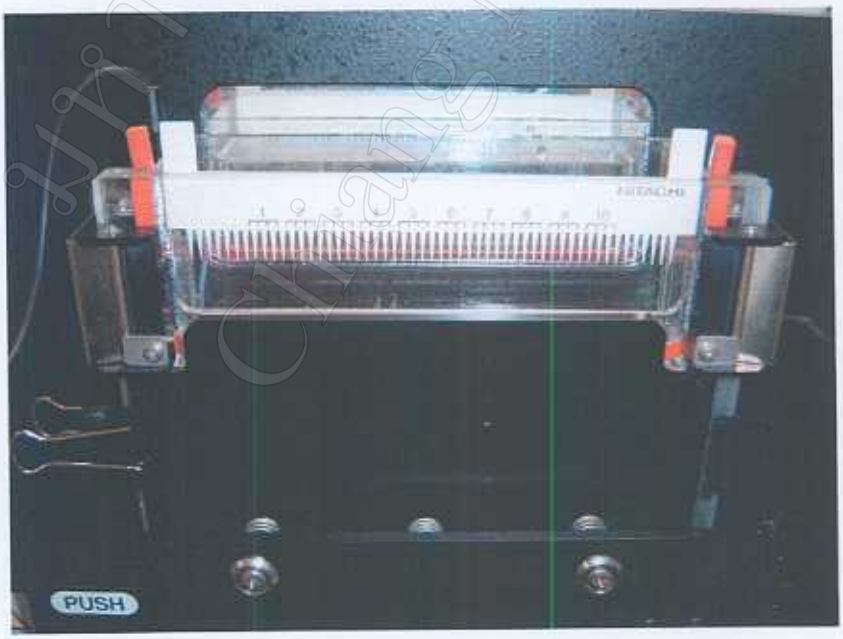
ภาพ 12 แสดงการจัด sequencing gel ประกอบด้วย แผ่นกระจก, spacer, comb พลาสติก และคลิบหนีบ



ภาพ 13 แสดง sequencing gel ที่ต่อกับช่องของชุด sequencer ด้านบน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

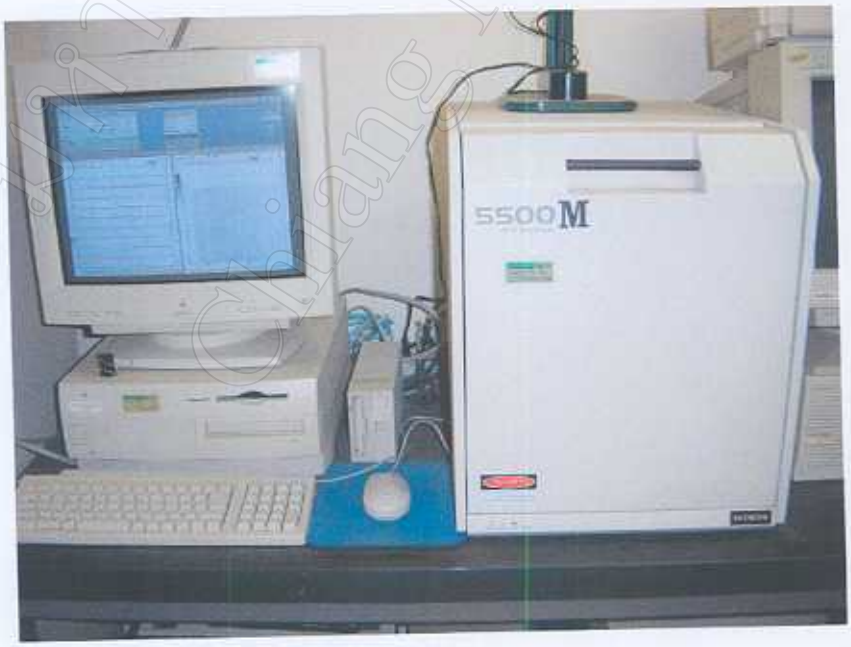
ภาพ 14 แสดงการต่อชุด sequencer และ sequencing gel เข้าด้วยกัน



ภาพ 15 แสดงตำแหน่งของ comb กระดายที่ต่อเข้ากับ ช่อง sequencer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพ 16 แสดงการ load ตัวอย่างเพื่อใช้ในการหาลำดับเบส



ภาพ 17 แสดงชุดอุปกรณ์ DNA sequencer (Hitachi 5500M)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University