บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

1.1 หนอนเยื่อไผ่ จากป่าไผ่ อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่

2. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง

2.1 ตู้เพาะเลี้ยงแมลง ควบคุมอุณหภูมิ

2.2 กล่องพลาสติก พร้อมฝาปิดเจาะรู

2.3 กระดาษชำระชุบน้ำพอหมาด

2.4 กระดาษเลเบล

2.5 น้ำกลั่น

3. อุปกรณ์ทั่วไป

3.1 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)

3.2 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)

3.3 เครื่องผสมเขย่า (vortex mixture)

3.4 ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-1601) (Shimadzu, Japan)

3.5 เครื่องชั่งน้ำหนัก แบบความละเอียด 2 ตำแหน่ง

3.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

3.7 เครื่อง ultra-sonic bath

3.8 เครื่องวัดความเป็น กรด-ด่าง (pH meter)

3.9 ไมโครปิเปต (micropipette)

3.10 ชุดเครื่องมือผ่าตัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการให้ฮอร์โมน

4.1 ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (JHA, S-methoprene)

4.2 20-ไฮดรอกซีเอคไดโซน (20-hydroxyecdysone, 20E)

4.3 กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มหยดฮอร์โมนขนาดเล็ก (microsyringe)

4.4 อะซิโตน (acetone)

4.5 น้ำกลั่น

4.6 กระดาษชำระ

5. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างปุ่มปีก

5.1 ถาดผ่าตัดขนาดเล็ก

5.2 ปากคีบขนาดเล็ก

5.3 กรรไกรปลายแหลม

5.4 สำลี

5.5 เข็มปักแมลง เบอร์ 3

5.6 หลอดพลาสติกขนาดเล็ก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

5.7 เอทานอล 70%

5.8 สารละลายริงเกอร์ (Ringer's solution)

5.9 normal saline

6. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณโปรตีน

6.1 microcuvettes

6.2 กระดาษกรอง

6.3 หลอดพลาสติกขนาดเล็ก (microtube)

6.4 กรวยกรอง

6.5 ขวดรูปชมพู่ (flask)

6.6 น้ำกลั่น

6.7 bovine serum albumin (BSA)

6.8 Bio-Rad Protein Assay Kit

6.9 plastic homogenizer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงปุ่มปีกของแมลง

7.1 ตู้เพาะเลี้ยงแมลง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

7.2 บีกเกอร์

7.3 หลอดพลาสติกขนาดเล็ก (microcentrfuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

7.4 แผ่น parafilm

7.5 syringe filter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20ไมครอน

7.6 จานแก้ว

7.7 กระบอกฉีดยาขนาด 50 ml.

7.8 สารละลายริงเกอร์ (Ringer's solution)

7.9 Grace' s insect culture medium (Grace' s medium)

7.10 เอทานอล 70%

7.11 น้ำกลั่น

7.12 penicilin

7.13 sterptomycin

7.14 kanamycin

8. อุปกรณ์และสารเคมีในการสกัด RNA

8.1 ชุดอุปกรณ์สำหรับการทำเจลอิเลกโตรโฟเรซิส (gel electrophoresis)

8.2 คลอโรฟอร์ม (chloroform)

8.3 3 M โซเดียมอะซิเตต (NaOAc)

8.4 chloroform-isoamyl alcohol (CIA)

8.5 isopropanal

8.6 น้ำกลั่น (sterile water)

8.7 เอทานอล 75% และ 99.5%

8.8 TE buffer

8.9 TRI zol

8.10 DNase buffer

8.11 DNase I

8.12 DEPC-H_2O

8.13 TMN (poly-T)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8.14 5x Rx buffer

8.15 10M dNTPs

8.16 MMLV Reverse Transcriptase

8.17 TAE buffer

8.18 agarose S

8.19 DMPC-H_2O

8.20 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethydium bromide)

9. อุปกรณ์และสารเคมีในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

9.1 GeneAmp® PCR system 2400 (Perkin Elmer, USA)

9.2 UV Transilluminator

9.3 ไพรเมอร์ (primer) สำหรับการทำ PCR

9.3.1 สำหรับ *Omphisa fuscidentalis* Ecdysone Receptor (OfEcR) A (202bp)

9.3.1.1 forward primer (21base) (position; A 446-466)

5'- CTGAAGCACGAGGTGGCATAC –3'

9.3.1.2 reverse primer (20base) (position; A 627-646)

5'- CGTAGCTGCTCGATGACAGG –3'

9.3.2 สำหรับ *Omphisa fuscidentalis* Ecdysone Receptor (OfEcR) B1 (251bp)

9.3.2.1 forward primer (21base) (position; B1 380-400)

5'- GTCCAATAACGGTGGCTTTCA –3'

9.3.2.2 reverse primer (18base) (position ; B1 630-648)

5'- CGTGGGTGGCATCGGTAA –3'

9.3.3 สำหรับ *Omphisa fuscidentalis* Ribosomal Protein L (OfRpL) 3 (299bp)

9.3.3.1 forward primer (22base) (position; B1 7-28)

5'- TCTACCCCAAGAAGAGGTCTCG –3'

9.3.3.2 reverse primer (22base) (position; B1 284-305)

5'- ACGACAGTCCTCAGACATGTGC –3'

9.4 เอนไซม์ Taq polymerase (Invitrogen)

9.5 10x PCR buffer

9.6 2M dNTPs

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9.7 50mM $MgCl_2$

9.8 น้ำกลั่น

10. การวิเคราะห์ผล

10.1 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS (ANOVA)

10.2 การวิเคราะห์ความเข้มของ band จากผลผลิตของ PCR โดยใช้โปรแกรม NIH image

11. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการต่อมไร้ท่อวิทยา (Endocrinology) ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1. การศึกษาการเจริญเปลี่ยนแปลงของปุ่มปีกในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

ศึกษาการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของปุ่มปีกของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสโดยทำการเก็บตัวอย่างปุ่มปีกคู่หน้าและคู่หลังของหนอนเยื่อไผ่เดือนละ 10 ตัว ตั้งแต่เดือนกันยายน 2546 ถึงเดือนเมษายน 2547 มีวิธีการดังนี้

1.1 สลบหนอนด้วยอีเธอร์ จากนั้นใช้เข็มปักแมลงตรึงส่วนหัวและท้ายลำตัวของตัวหนอน

1.2 ใช้กรรไกรปลายแหลมผ่าตัดเปิดบริเวณท้ายลำตัวของตัวหนอนด้านหลังแล้วผ่าตัดเปิดไปจนถึงกะโหลกหัวตรึงด้วยเข็มปักแมลง

1.3 ผ่าตัดเก็บตัวอย่างปุ่มปีกทั้งคู่หน้าและคู่หลังของหนอนเยื่อไผ่ทั้ง 4 ปุ่มปีก

1.4 วัดขนาดความยาวและความกว้างของปุ่มปีก

1.5 นำปุ่มปีกทั้งหมดที่ได้ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เติม normal saline ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

1.6 นำปุ่มปีกไปทำให้เซลล์แตก (sonication) 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที

1.7 นำปุ่มปีกมาบดด้วย plastic homogenizer บนน้ำแข็ง

1.8 นำสารละลายที่ได้มาทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bio-rad protein assay

1.9 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

1.10 นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐานเพื่อหาระดับโปรตีนของปุ่มปีก

การทดลองที่ 2. การศึกษาผลของ JHA ต่อการเจริญเปลี่ยนแปลงของปุ่มปีกในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส ในสภาวะ in vivo

แบ่งหนอนเยื่อไผ่ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 50 ตัว

กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มควบคุม หยดอะซิโตน 5ไมโครลิตร/ ตัว

กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มทดลองหยด JHA 0.1 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร/ ตัว

กลุ่มที่ 3 คือกลุ่มทดลองหยด JHA 0.5 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร/ ตัว

กลุ่มที่ 4 คือกลุ่มทดลองหยด JHA 1.0 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร/ ตัว

ทำการเก็บตัวอย่างปุ่มปีกทั้งคู่หน้าและคู่หลังทุก 5 วัน จำนวน 5 ครั้ง เป็นเวลา 20 วัน นำปุ่มปีกมาตรวจวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อ 1.1-1.10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3. การศึกษาผลของ 20E ต่อการเจริญเปลี่ยนแปลงของปุ่มปีกในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส ในสภาวะ in vivo

แบ่งหนอนเยื่อไผ่ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 80 ตัว

กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มควบคุมฉีดน้ำกลั่น 5 ไมโครลิตร/ ตัว

กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มทดลองฉีด 20E 0.1 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร/ ตัว

กลุ่มที่ 3 คือกลุ่มทดลองฉีด 20E 0.5 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร/ ตัว

กลุ่มที่ 4 คือกลุ่มทดลองฉีด 20E 1.0 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร/ ตัว

ทำการเก็บตัวอย่างปุ่มปีกทั้งคู่หน้าและคู่หลังทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน นำปุ่มปีกมาตรวจวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อ 1.1-1.10

การทดลองที่ 4. การศึกษาผลของ 20E ต่อการเจริญเปลี่ยนแปลงของปุ่มปีกในหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส ในสภาวะ in vitro

4.1 ทำความสะอาดผิวลำตัวของหนอนเยื่อไผ่ในเอทานอล 70% ประมาณ 5 นาที

4.2 เก็บตัวอย่างปุ่มปีกทั้งคู่หน้าและคู่หลังของหนอนเยื่อไผ่ทั้ง 4 ปุ่มปีก

4.3 นำปุ่มปีกมาล้างด้วยสารละลายริงเกอร์ 2 ครั้ง

4.4 นำปุ่มปีกมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงของแมลง (Grace' s medium) ที่เติมฮอร์โมน 20E ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ

กลุ่มที่ 1 เพาะเลี้ยงปุ่มปีกในอาหารเพาะเลี้ยงแมลง ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 2 เพาะเลี้ยงปุ่มปีกในอาหารเพาะเลี้ยงแมลงที่เติม 20E 0.05 ไมโครกรัม/ 1 มิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 3 เพาะเลี้ยงปุ่มปีกในอาหารเพาะเลี้ยงแมลงที่เติม 20E 0.1 ไมโครกรัม/ 1 มิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 4 เพาะเลี้ยงปุ่มปีกในอาหารเพาะเลี้ยงแมลงที่เติม 20E 0.25 ไมโครกรัม/ 1 มิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 5 เพาะเลี้ยงปุ่มปีกในอาหารเพาะเลี้ยงแมลงที่เติม 20E 0.5 ไมโครกรัม/ 1 มิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

ทำการเก็บตัวอย่างปุ่มปีกทุก 2 วัน จำนวน 6 ครั้ง เป็นเวลา 10 วัน นำปุ่มปีกมาตรวจวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อ 1.5-1.10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 5. การศึกษาผลของ JHA ต่อการแสดงออกของ EcR mRNA ในปุ่มปีกของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

1. หยดฮอร์โมน JHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส จำนวน 225 ตัว ทำการเก็บตัวอย่างปุ่มปีกภายหลังการให้ฮอร์โมนทุกๆ 5 วัน เป็นเวลา 10 วัน
2. สกัด total RNA จากตัวอย่างปุ่มปีกโดยใช้สารละลาย TRI zol แล้ว นำ RNA ที่ได้มาทำ DNase treatment, PCI method และ Reverse transcription
   2.1 การเตรียม RNA จากตัวอย่างปุ่มปีกของหนอนเยื่อไผ่โดยใช้สารละลาย TRI zol
      2.1.1 homogenize ปุ่มปีกของหนอนเยื่อไผ่ในสารละลาย TRI zol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ให้ละเอียดที่สุด
      2.1.2 นำไปเขย่าโดย เครื่องผสมเขย่า เป็นเวลา 1 นาที
      2.1.3 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
      2.1.4 เติม 100 ไมโครลิตร ของ CIA เขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 15 วินาที
      2.1.5 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที
      2.1.6 นำสารจากข้อ 2.1.5 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
      2.1.7 ดูด supernatant แล้วถ่ายใส่หลอดใหม่
      2.1.8 เติม isopropanol ในปริมาณที่เท่ากับ supernatant
      2.1.9 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
      2.1.10 นำสารจากข้อ 2.1.9 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
      2.1.11 ใช้ปิเปตดูดเอา supernatant ออก จะได้ pellet RNA ที่ก้นหลอด
      2.1.12 เติม TRI zol 60 ไมโครลิตร
      2.1.13 เติม CIA 0.2 volume
      2.1.14 นำสารจากข้อ 2.1.13 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
      2.1.15 ดูด supernatant แล้วถ่ายในหลอดใหม่
      2.1.16 เติม isopropanol ในปริมาณที่เท่ากับ supernatant
      2.1.17 เขย่าไปมา ประมาณ 20 ครั้ง
      2.1.18 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.19 นำสารจากข้อ 2.1.18 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.1.20 ใช้ปิเปตดูดเอา supernatant ออก จะได้ pellet RNA ที่ก้นหลอด

2.1.21 ล้าง pellet ด้วยเอทานอล 75% ปริมาณ 300 ไมโครลิตร

2.1.22 นำสารจากข้อ 2.1.21 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.1.23 ใช้ปิเปตดูดเอา supernatant ออก

2.1.24 วางผึ่งไว้ให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

2.1.25 เติมน้ำกลั่นประมาณ 11 ไมโครลิตร ลงในหลอดผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตรวจวัดหาค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) เพื่อคำนวนหาปริมาณ RNA ที่ได้

2.1.26 เติม 3M NaOAc 0.1 volume ลงในหลอด

2.1.27 เติม เอทานอล 99.5% 0.2 volume ลงในหลอด แล้วเขย่าให้เข้ากัน

2.1.28 เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำ DNase treatment ต่อไป

2.2 การทำ DNase treatment

2.2.1 นำสารจากข้อ 2.1.28 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2.2 ใช้ปิเปตดูดเอา supernatant ออก จะได้ pellet RNA ที่ก้นหลอด

2.2.3 ล้างด้วย เอทานอล 75% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

2.2.4 นำสารจากข้อ 2.2.3 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.2.5 ใช้ปิเปตดูดเอา supernatant ออก

2.2.6 วางผึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

2.2.7 เติม DNase buffer 4 ไมโครลิตร

2.2.8 เติม DNase I 1 ไมโครลิตร

2.2.9 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

2.2.10 เติม DMPC-H_2O 160 ไมโครลิตร

2.2.11 เติม PCI 200 ไมโครลิตร

2.2.12 แช่ไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.13 นำสารจากข้อ 2.2.12 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที

2.2.14 ดูด supernatant แล้วถ่ายใส่หลอดใหม่

2.2.15 ปรับปริมาตรที่ได้ให้เป็น 200 ไมโครลิตร ด้วย DMPC-H_2O

2.2.16 เติม CIA 20 ไมโครลิตร

2.2.17 แช่ไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที

2.2.18 นำสารจากข้อ 2.2.17 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.2.19 ดูด supernatant แล้วถ่ายใส่หลอดใหม่

2.2.20 เติม 3M NaOAc 0.1 volume ลงในหลอด

2.2.21 เติม เอทานอล 99.5% 0.2 volume ลงในหลอด แล้วเขย่าให้เข้ากัน

2.2.22 เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำ PCI method ต่อไป

2.3 การสกัดโปรตีนและเศษเซลล์ออกจาก RNA ด้วยวิธี Phenol-Chloroform (PCI) method

2.3.1 นำสารจากข้อ 2.2.22 มา แล้วปรับปริมาตรที่ได้ให้เป็น 200 ไมโครลิตร โดยเติม DEPC-H_2O

2.3.2 เติม PCI ในปริมาณที่เท่ากับสารจากข้อ 2.3.1 แล้วเขย่าไปมา

2.3.3 แช่ไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที

2.3.4 นำสารจากข้อ 2.3.3 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3.5 ดูด supernatant แล้วถ่ายใส่หลอดใหม่

2.3.6 เติม PCI ในปริมาณที่เท่ากับสารจากข้อ 2.3.5 แล้วเขย่าไปมา

2.3.7 แช่ไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที

2.3.8 นำสารจากข้อ 2.3.7 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3.9 ดูด supernatant แล้วถ่ายใส่หลอดใหม่

2.3.10 เติม CIA ในปริมาณที่เท่ากับสารจากข้อ 2.3.9 แล้วเขย่าไปมา

2.3.11 แช่ไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที

2.3.12 นำสารจากข้อ 2.3.11 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.13 ดูด supernatant แล้วถ่ายใส่หลอดใหม่

2.3.14 เติม 3M NaOAc 0.1 volume ลงในหลอด

2.3.15 เติม เอทานอล 99.5% 0.2 volume ลงในหลอด แล้วเขย่าให้เข้ากัน

2.3.16 เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส หรือแช่ไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที

2.3.17 นำสารจากข้อ 2.3.16 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3.18 ใช้ปิเปตดูดเอา supernatant ออก จะได้ pellet RNA ที่ก้นหลอด

2.3.19 ล้างด้วย เอทานอล 75% ประมาณ 300 ไมโครลิตร

2.3.20 นำสารจากข้อ 2.3.19 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.3.21 ใช้ปิเปตดูดเอา supernatant ออก

2.3.22 วางผึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

2.3.23 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 11 ไมโครลิตร ลงในหลอดผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตรวจวัดหาค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) เพื่อคำนวนหาปริมาณ RNA ที่ได้

2.3.24 เติม 3M NaOAc 0.1 volume ลงในหลอด

2.3.25 เติม เอทานอล 99.5% 0.2 volume ลงในหลอด แล้วเขย่าให้เข้ากัน

2.3.26 เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำการสังเคราะห์ cDNA โดยการทำ reverse transcription ต่อไป

2.4 การทำ Reverse transcription

2.4.1 นำสารจากข้อ 2.3.26 มาละลายในน้ำแข็ง ประมาณ 5 นาที

2.4.2 นำสารจากข้อ 2.4.1 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.4.3 ใช้ปิเปตดูดเอา supernatant ออก โดยระวังไม่ให้ปลายปิเปตสัมผัสกับ pellet

2.4.4 ล้างด้วย เอทานอล 75% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

2.4.5 นำสารจากข้อ 2.4.4 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.4.6 ดูดเอาเอทานอลออกจนหมด

2.4.7 วางผึ่งไว้ให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.8 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 11 ไมโครลิตร ลงในหลอดผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตรวจวัดหาค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) เพื่อคำนวนหาปริมาณ RNA ที่ได้

2.4.9 ใช้ 0.4 ไมโครกรัมจาก RNA ที่ได้

2.4.10 ปรับปริมาตรที่ได้ให้เป็น 11 ไมโครลิตร โดยเติม DEPC-H_2O

2.4.11 เติม TMN ปริมาณ 2 ไมโครลิตร

2.4.12 บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.4.13 เติม 5x Rx buffer 4 ไมโครลิตร

2.4.14 เติม 10 mM dNTPs 2 ไมโครลิตร

2.4.15 เติม DEPC-H_2O 0.5 ไมโครลิตร

2.4.16 เติม MMLV Reverse Transcriptase 0.5 ไมโครลิตร

2.4.17 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้

- อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.18 เติม TE (pH 8.0) ปริมาณ 80 ไมโครลิตร

2.4.19 เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็น template สำหรับทำ PCR ต่อไป

3. การทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ดังนี้

10x PCR buffer	1.0	ไมโครลิตร
2 mM dNTPs	1.0	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.3	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.05	ไมโครลิตร
Primers		
Forward primer	0.2	ไมโครลิตร
Reverse primer	0.2	ไมโครลิตร
DNA Template	1.0	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	6.25	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1 PCR condition ของ *Omphisa fuscidentalis* Ribosomal Protein L (OfRpL) 3 คือ

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
จำนวน 25 รอบ

3.2 PCR condition ของ *Omphisa fuscidentalis* Ecdysone Receptor (OfEcR) B1 คือ

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
จำนวน 36 รอบ

3.3 PCR condition ของ *Omphisa fuscidentalis* Ecdysone Receptor (OfEcR) A คือ

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
จำนวน 40 รอบ

4. นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ปริมาณ 9 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้ว load บน 1.2% agarose S gel ใช้กระแสไฟฟ้า 180 โวลต์ 220 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 27 นาที
5. ย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นระยะเวลา 40 นาที ถ่ายรูปเจลที่ได้แล้วนำไปวิเคราะห์ความเข้มของ band ที่เกิด โดยใช้โปรแกรม NIH Image

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved