บทที่ 3

วัสดุและวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 สัตว์ทดลอง

หนอนเยื่อไผ่ จากป่าไผ่ อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง

1) กล่องพลาสติกพร้อมฝาปิดที่เจาะรู
2) เยื่อกระดาษชุบน้ำพอหมาด
3) ตู้เพาะเลี้ยงแมลง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.1.3 อุปกรณ์และสารเคมีในการให้ฮอร์โมน

1) อะซิโตน (acetone)
2) ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (S-methoprene), Zoecou, USA

3.1.4 อุปกรณ์ทั่วไป

1) กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)
2) เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)
3) กล้องจุลทรรศน์แสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence microscope)
4) กล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา (light microscope)
5) ชุดอุปกรณ์สำหรับการทำเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (gel electrophoresis)
6) เครื่องชั่งน้ำหนักแบบความละเอียด 2 ตำแหน่ง
7) ชุดเครื่องมือผ่าตัด ได้แก่ ถาดผ่าตัด กรรไกร คีมคีบขนาดเล็ก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8) พลาสติกโฮโมจีไนเซอร์ (plastic homogenizer)

9) บีกเกอร์

10) เข็มปักแมลงเบอร์ 3 (insect pin No.3)

11) ช้อนตักสาร

12) กระดาษกรอง

13) ไมโครปิเปต (micropipette)

14) หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

15) เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลจากเจล (Biodoc-it ® imaging system)

16) เครื่องผสมเขย่า (vortex mixture)

17) เครื่องเขย่าผสมสารชนิดหมุน (rotator mixer)

18) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

19) ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-1601)

20) ปิเปตแก้ว

21) หลอดทดลอง

3.1.5 สารเคมีทั่วไป

1) น้ำกลั่น, Milli Q Water

2) สารละลายริงเกอร์ (Ringer's solution)

3) DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole), Sigma,USA

4) PBS (phosphate buffer saline)

5) 4% Formaline

6) 75% และ 99.5% ethanol

7) เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethtidium bromide)

8) 0.5X TAE buffer

9) Agarose S

10) DEPC-H_2O

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.6 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA

1) HMW buffer

2) RNase A

3) Proteinase K

4) Chloroform-isoamyl alcohol (CIA)

5) Phenol

6) 3M Sodium acetate (NaoAc) pH 6.0

7) TE buffer

8) Phenol chloroform isoamyl alcohol (PCI)

3.1.7 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA

1) Chloroform

2) 2M (pH 4.0) และ 3M (pH 5.2) NaOAc

3) D-solution

4) 2-mercaptoethanol

5) isopropanol

6) phenol

7) DNase I

8) 25 mM EDTA

9) 10X reaction buffer

10) 5X reaction buffer

11) 10M dNTPs

12) MMLV Reverse transcriptase

3.1.8 สารเคมีในการทำ polymerase chain reaction (PCR)

1) T100™ Thermal Cycler from BIO-RAD

2) ไพรเมอร์ (primer) สำหรับทำ PCR

สำหรับ *Of Broad-Complex* (*OfBR-C*) ขนาด 513 คู่เบส (bp)

forward primer (18 base) : 5'-TTTGTGGACGTTACCCTG-3'

reverse primer (18 base) : 5'-ATTGTTGTCATGACGCGG-3'

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับ *Of Ribosomal Protein L 3* (*OfRpL3*) ขนาด 299 คู่เบส (bp)
ซึ่งจะใช้เป็น internal standard เนื่องจากระดับการแสดงออกของ *OfRpL3* mRNA
ในเนื้อเยื่อของหนอนเยื่อไผ่จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระยะต่างๆ ของตัวหนอน

forward primer (22 base) : 5'-TCTACCCCAAGAAGAGGTCTCG-3'

reverse primer (22 base) : 5'-ACGACAGTCCTCAGACATGTGC-3'

3) Taq polymerase

4) 10X PCR buffer

5) 2M dNTPs

6) 25 mM $Mgcl_2$

3.1.9 สารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation และ transformation

1) Water bath

2) Shaking incubator

3) pTZ57R/T vector

4) Competent cell (*E. coli* DH5α)

5) S.O.C medium

6) LB medium และ LB agar plate

7) Aampicillin

8) IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside)

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

3.1.10 โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

1) โปรแกรม SPSS (one-way ANOVA) สำหรับวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

2) โปรแกรม NIH Image สำหรับวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA หรือแถบ RNA
ในการทำ semi-qualitative PCR

3.1.11 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

ห้องปฏิบัติการวิจัยต่อมไร้ท่อวิทยา (Endocrinology research laboratory)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

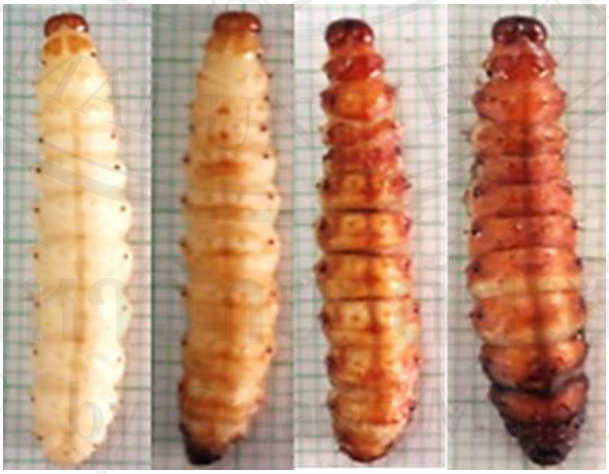
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ในต่อมสร้างไหมส่วนต้นของหนอนเยื่อไผ่ในระยะไดอะพอส

ในการศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์นั้น วิธีการที่ง่ายที่สุดคือติดตามการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของต่อมโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ นำหนอนเยื่อไผ่มาแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง (กลุ่มละ 200 ตัว) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม หยดอะซิโตนเพียงอย่างเดียว 5 ไมโครลิตรต่อตัว
กลุ่มที่ 2 หยดฮอร์โมน JHA ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรของอะซิโตนต่อตัว
กลุ่มที่ 3 หยดฮอร์โมน JHA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรของอะซิโตนต่อตัว
กลุ่มที่ 4 หยดฮอร์โมน JHA ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรของอะซิโตนต่อตัว

เมื่อแบ่งหนอนได้เป็นกลุ่มต่างๆ แล้ว ใช้ไมโครปิเปตหยดฮอร์โมน JHA ความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายในอะซิโตนให้กับหนอนเยื่อไผ่ โดยหยดบริเวณด้านบนของปล้องกลางลำตัวจนถึงปล้องสุดท้ายของหนอนเยื่อไผ่ เมื่อหยดฮอร์โมนแล้วเริ่มเก็บตัวอย่างต่อมสร้างไหมส่วนต้น นับเป็นวันแรก (day 0; D0) จากนั้นเก็บตัวอย่างต่อมสร้างไหมส่วนต้นของหนอนเยื่อไผ่ในแต่ละกลุ่มการทดลองทุกๆ 2 วันเป็นระยะเวลา 12 วัน (day 2; D2-day 12; D12) จนกระทั่งหนอนเยื่อไผ่เปลี่ยนแปลงเป็นดักแด้ การเกิดดักแด้ที่ถูกชักนำโดยฮอร์โมนนี้ จะทำให้ตัวหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาภายนอกของลำตัว ที่สามารถสังเกตได้ง่าย ตามระดับการเปลี่ยนแปลงของสีคิวติเคิลที่ระดับ G0-G3 (ภาพที่ 3.1) ดังนี้



ภาพที่ 3.1 แสดงการเปลี่ยนสีของลำตัว 3 ระดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในส่วนทบทวนเอกสาร ในการศึกษาการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ สามารถศึกษาได้โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของต่อมและการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของต่อมสร้างไหมส่วนต้นหลังจากที่ได้รับฮอร์โมนจูวีไนล์ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรของอะซิโตน เก็บข้อมูลโดยบันทึกการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์และให้ค่าการเปลี่ยนแปลงที่พบเป็นระดับคะแนน โดยกลุ่มทดลองที่ให้ฮอร์โมน JHA จะเก็บตัวอย่างต่อมสร้างไหมส่วนต้นในทุกๆ 2 วัน วันละ 4 ต่อมหลังจากให้ฮอร์โมนจนหนอนมีการเปลี่ยนแปลงเป็นดักแด้ ซึ่งสามารถสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสี คิวติเคิล ตัวอย่างต่อมสร้างไหมส่วนต้นจะถูกนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของต่อมและนิวเคลียส โดยมีวิธีการดังนี้

3.2.1 สลบหนอนเยื่อไผ่ จากนั้นทำการผ่าตัดหนอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

3.2.2 ทำการเก็บตัวอย่างต่อมสร้างไหมส่วนต้น

3.2.3 ล้างเนื้อเยื่อด้วย Phosphate buffer saline จำนวน 3 ครั้ง

3.2.4 จากนั้นแช่ต่อมในสารละลาย 4% Formaline เพื่อรักษาสภาพเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

3.2.5 ล้างต่อมด้วย Phosphate buffer saline จำนวน 3 ครั้ง

3.2.6 นำต่อมมาย้อมด้วยสี DAPI ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ Phosphate buffer saline

3.2.7 จากนั้นล้างเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็วด้วย Phosphate buffer saline เป็นจำนวน 3 ครั้ง

3.2.8 ตรวจดูการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของต่อมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดาและดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงฟลูออเรสเซนต์ นำผลที่ได้มาให้คะแนนการตายและบันทึกจำนวนต่อมที่เกิดการอัดแน่นของนิวเคลียสและการแตกหักของนิวเคลียสเพื่อนำไปหาเปอร์เซ็นต์การตายต่อไป

3.3 การตรวจวัดการแตกหักของ DNA

เนื่องจากการแตกหักของ DNA เป็นลักษณะสำคัญที่ช่วยยืนยันการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ การทดลองนี้จึงต้องการศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการชักนำให้เกิดการแตกหักของ DNA โดยนำต่อมสร้างไหมส่วนต้นของหนอนที่ได้รับฮอร์โมนจูวีไนล์ความเข้มข้นต่างๆ มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform extraction จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรไปทำอิเลคโทรโฟเรซิสและตรวจหาลักษณะการแตกหักของสายดีเอ็นเอ (DNA laddering pattern) บน 2% agarose S gel ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.1 บดต่อมสร้างไหมส่วนต้นให้ละเอียดในหลอดพลาสติกโดยใช้พลาสติกโฮโมจีไนเซอร์ทำในน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อไว้

3.3.2 เติม HMW buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

3.3.3 เติม RNase A ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร

3.3.4 บ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.3.5 เติม Proteinase K ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 4 ไมโครลิตร

3.3.6 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

3.3.7 เติม 1 volume ของ Phenol chloroform isoamyl alcohol แล้วเขย่าให้เข้ากัน

3.3.8 นำไปหมุนด้วยเครื่องเขย่าผสมสารชนิดหมุนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที

3.3.9 จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.3.10 ดูดสารละลายชั้นบน (supernatant) ออก แล้วถ่ายไปยังหลอดใหม่

3.3.11 เติม Chloroform-isoamyl alcohol ในปริมาตรที่เท่ากับสารละลายชั้นบนในหลอดใหม่

3.3.12 นำไปหมุนด้วยเครื่องหมุนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3.3.13 จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที

3.3.14 ดูดสารละลายชั้นบนออก แล้วถ่ายไปยังหลอดใหม่

3.3.15 เติม 0.1 volume ของ 3M NaoAc pH 6.0 ลงในสารละลายที่ได้จากข้อ 3.3.14

3.3.16 เติม 2.0 volume ของ 99.5% ethanol เขย่าให้เข้ากัน

3.3.17 เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง

3.3.18 นำสารจากข้อ 3.3.17 มาปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.19 ดูดเอา ethanol ออก แล้วล้างด้วย 75% ethanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.3.20 นำสารจากข้อ 3.3.19 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอา 75% ethanol ออก

3.3.21 วางไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

3.3.22 ละลายใน TE buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจวัดหาค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณหาปริมาตร DNA ที่ได้

3.3.23 นำดีเอ็นเอที่ได้ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไป load บน 2% agarose S gel ใช้กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์และ 18 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 25 นาที

3.3.24 ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นระยะเวลา 25 นาที และถ่ายรูปเจลเพื่อดูลักษณะดีเอ็นเอได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การหาลำดับเบสและการทำให้ยีน *BR-C* บริสุทธิ์

ทำการออกแบบ degenerated primer โดยเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *BR-C* ในแมลง 2 ชนิด คือ หนอนไหม (*B. mori*) และหนอนใบยาสูบ (*M. sexta*) จากนั้นใช้ primer ที่ออกแบบได้มาเพิ่มจำนวนยีนโดยวิธี polymerase chain reaction โดยใช้ตัวอย่าง cDNA จากเนื้อเยื่ออิพิเดอร์มิสของหนอนเยื่อไผ่ในระยะ G2 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วนำ PCR product ที่ได้ไป load บน 2% agarose S gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์และ 180 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 25 นาที แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นระยะเวลา 25 นาที เมื่อพบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ต้องการแล้วจึงตัดแถบ band ที่ได้ใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำ DNA purification โดยใช้ผลิตภัณฑ์ FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit ของบริษัท Favorgen และทำตามขั้นตอนคำแนะนำของชุดสกัด มีรายละเอียดดังนี้

3.4.1 นำหลอดพลาสติกที่มีชิ้นส่วนของเจลอยู่มาชั่งน้ำหนักให้ได้ไม่เกิน 300 มิลลิกรัม

3.4.2 เติม FADF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

3.4.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมเขย่าทุกๆ 2-3 นาทีจนเจลละลายหมด

3.4.4 ทำให้เย็นโดยวางไว้ที่อุณหภูมิห้องและนำ FADF column ไปวางบน collection tube

3.4.5 ดูดสารละลายตัวอย่างมาปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ลงไปบน FADF column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

3.4.6 เทสารละลายด้านล่างใน collection tube ทิ้งไป

3.4.7 ทำซ้ำข้อ 3.4.5-3.4.6 อีก 1 ครั้ง

3.4.8 เติม Wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน FADF column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

3.4.9 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

3.4.10 ย้าย FADF column ไปวางบนหลอดหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่

3.4.11 เติม Elution buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงบนเยื่อเมมเบรนของ FADF column แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที

3.4.12 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วเก็บตัวอย่างของ DNA purification ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การเชื่อมต่อยีน *BR-C* กับ cloning vector (ligation)

เมื่อได้ตัวอย่างของ DNA purification แล้วจะนำยีน *BR-C* มาเชื่อมต่อเข้ากับ vector ที่ชื่อ pTZ57R/T ผสมสารต่างๆ ลงในหลอดไมโคเซ็นตริฟิวก์ปลอดเชื้อขนาด 0.2 มิลลิลิตร ตามคำแนะนำของผู้ผลิตชุด InsTAclone PCR Cloning Kit (ThermoScientific, USA) ดังนี้

สาร	ปริมาตร	
Vector pTZ57R/T, (0.17 pmol ends)	1	ไมโครลิตร
10X Ligation buffer	1	ไมโครลิตร
PCR product (0.52 pmol ends)	1	ไมโครลิตร
Nuclease-free water	6	ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	ไมโครลิตร

3.5.1 ผสมสารให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3-5 วินาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.2 ดูดสารละลาย ligation ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี Chemical Transformation

3.6 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pTZ57R/T-*BR-C*) เข้าสู่ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี Chemical Transformation

3.6.1 นำเซลล์คอมพีเทนต์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาละลายในน้ำแข็ง

3.6.2 เติมสารละลายที่ได้จากการทำ ligation ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในเซลล์คอมพีเทนต์ที่มีปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วยการดีดหลอด แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

3.6.3 นำหลอดออกจากน้ำแข็งแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที

3.6.4 เติม SOC medium ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทันที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.5 ดูดเอาสารละลายเซลล์จากข้อ 4 มา spread ลงบนอาหารแข็ง (LB agar plate) ที่มี IPTG X-gal และ ampicillin อย่างละ 25 ไมโครลิตร

3.6.6 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.6.7 คัดเลือกโคโลนี (colony) ที่เจริญขึ้นมาตรวจหารีคอมบิแนนท์พลาสมิดต่อไป

3.7 การคัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนของยีน *BR-C* และการตรวจหารีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.7.1 ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวโดยใช้ไม้จิ้มฟันแตะที่โคโลนีของแบคทีเรียที่เลือกไว้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LA medium จำนวน 1,000 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มโดยเขย่าอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

3.7.2 เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีใสมาเป็นขุ่นแล้ว จะนำมาตรวจหาดีเอ็นเอสอดแทรกด้วยวิธี PCR โดยผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดพีซีอาร์ ดังนี้

สาร	ปริมาตร	
10X PCR buffer	1	ไมโครลิตร
2 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	1	ไมโครลิตร
Forward primer M13	0.2	ไมโครลิตร
Reverse primer M13	0.2	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.05	ไมโครลิตร
DEPC-H_2O	5.55	ไมโครลิตร
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ขุ่น	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	ไมโครลิตร

3.7.3 นำหลอดพีซีอาร์ในข้อ 2 ไปผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3-5 วินาที

3.7.4 นำหลอดพีซีอาร์ใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (T100™ Thermal Cycler from BIO-RAD) ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ดังนี้

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
จำนวน 20 รอบ

3.7.5 ตรวจวิเคราะห์ผล PCR product โดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

3.8 การตรวจสอบความถูกต้องของยีน *BR-C* ในพลาสมิด

3.8.1 ดูดสารละลายขุ่นที่ได้จากการคัดเลือกโคโลนีที่มียีน *BR-C* อยู่จำนวน 8 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LA medium จำนวน 8,000 ไมโครลิตร

3.8.2 นำไปบ่มโดยการเขย่าอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นทำไปสกัด plasmid DNA โดยใช้ชุด GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoScientific, USA)

3.9 การหาลำดับเบสของยีน *BR-C*

นำพลาสมิด pTZ57R/T-*BR-C* ที่สกัดได้มาหาลำดับเบสยีน *BR-C* โดยเตรียมพลาสมิดที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 200 ng/ml แล้วส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท FirstBase ประเทศมาเลเซีย แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลดีเอ็นเอจากฐานข้อมูลใน NCBI (National Center for Biotechnology information) แล้วทำการออกแบบ specific primer เพื่อใช้ในขั้นตอนการศึกษาการแสดงออกของ *BR-C* mRNA ในต่อมสร้างไหมส่วนต้นของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสต่อไป

3.10 การศึกษาการแสดงออกของ *BR-C* mRNA ของหนอนเยื่อไผ่ในธรรมชาติและผลของฮอร์โมน JHA ต่อการแสดงออกของ *BR-C* mRNA ในต่อมสร้างไหมส่วนต้นของหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส

ในการศึกษาการแสดงออกของ *BR-C* mRNA ของหนอนเยื่อไผ่ในธรรมชาติและหนอนที่ได้รับฮอร์โมน JHA สามารถทำได้โดยการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อต่อมสร้างไหมส่วนต้นมาสกัด RNA โดยมีขั้นตอนวิธีการสกัด ดังต่อไปนี้

3.10.1 เก็บตัวอย่างต่อมสร้างไหมส่วนต้นจากหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส ตั้งแต่เดือนตุลาคมจนถึงเดือนกุมภาพันธ์เพื่อนำมาใช้ในการเตรียม cDNA

3.10.2 เก็บตัวอย่างต่อมสร้างไหมส่วนต้นจากหนอนที่ได้รับฮอร์โมนจูวีไนล์ความเข้มข้นต่างๆ (รายละเอียดดังข้อ 3.2) เพื่อนำมาใช้ในการเตรียม cDNA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.10.3 นำตัวอย่างต่อมสร้างไหมที่ได้มาทำการสกัด RNA โดยเริ่มจากการบดตัวอย่างต่อมสร้างไหมส่วนต้นในสารละลาย D-solution ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ที่เติม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3.6 ไมโครลิตร ให้ละเอียดที่สุดโดยใช้พลาสติกโฮโมจีไนเซอร์

3.10.4 เติม 0.1 volume ของ 2M NaOAc pH 5.2

3.10.5 เติม 1 volume ของ Phenol

3.10.6 เติม 0.2 volume ของ Chloroform

3.10.7 นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที

3.10.8 นำสารละลายจากข้อ 5 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.10.9 ดูดสารละลายชั้นบนออกแล้วถ่ายไปยังหลอดใหม่

3.10.10 เติม Isopropanol ในปริมาณที่เท่ากับสารละลายชั้นบนในหลอดใหม่

3.10.11 จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง

3.10.12 นำสารจากข้อ 3.9.11 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.10.13 ดูดสารละลายชั้นบนออกให้เหลือแต่ตะกอน แล้วล้างด้วย 75% ethanol

3.10.14 นำสารจากข้อ 3.9.13 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.10.15 ดูดเอา 75% ethanol ออกแล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที

3.10.16 ละลายตะกอนใน DEPC-H_2O ปริมาตร 11 ไมโครลิตร

3.11 การทำ DNase treatment

3.11.1 เติม DEPC-H_2O ปริมาตร 6 ไมโครลิตร เข้าไปในตัวอย่างที่ได้จากการสกัด RNA ครั้งแรก

3.11.2 เติม 10X reaction buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

3.11.3 เติม DNase I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

3.11.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.11.5 เติม 25 mM EDTA ปริมาตร 1ไมโครลิตร

3.11.6 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

3.11.7 เติม 3M NaOAc pH 5.2 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

3.11.8 เติม 99.5% ethanol ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.11.9 นำสารจากข้อ 8 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำการสังเคราะห์ cDNA โดยการทำ reverse transcription ต่อไป

3.12 การสังเคราะห์ cDNA

3.12.1 นำสารละลายที่ได้จากการทำ DNase treatment มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.12.2 ดูดเอา ethanol ออกแล้วเติม 75% ethanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.12.3 ดูดเอา ethanol ออกแล้ววางผึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

3.12.4 ละลายตะกอนที่ได้ใน DEPC-H_2O ปริมาตร 11 ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจวัดหาค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณหาปริมาณ RNA ที่ได้

3.12.5 ใช้ 1 ไมโครกรัม จาก RNA ทั้งหมดที่ได้

3.12.6 ใส่ template RNA ตามปริมาตรที่คำนวณได้ (ไมโครลิตร)

3.12.7 เติม primer oligo dT (0.5 ug/ul) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

3.12.8 เติม DEPC-H_2O ให้ปริมาตรรวมทั้งหมดได้ 13.5 ไมโครลิตร

3.12.9 นำไปไปผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3-5 วินาที

3.12.10 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วใส่ในน้ำแข็งทันที

3.12.11 เติม 5X RT buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร

3.12.12 เติม 10 mM dNTPs ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

3.12.13 เติม MMLV RT ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ดังนี้

อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.12.14 เติม TE ปริมาตร 80 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำ PCR ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.13 การทำ Polymerase chain reaction

3.13.1 เตรียมหลอดพลาสติกขนาด 20 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการทำ PCR

3.13.2 เติมสารต่างๆ ลงในหลอด ดังตาราง (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้สำหรับการทำ PCR

สารต่างๆ	ปริมาณสารสำหรับทำ PCR ของยีน *OfRpL3* (µl)	ปริมาณสารสำหรับทำ PCR ของยีน *OfBR-C* (µl)
10X PCR buffer	1	1
2 mM dNTPs	1	1
25 mM $MgCl_2$	1	1
Forward primer	0.2	0.5
Reverse primer	0.2	0.5
Taq polymerase	0.05	0.05
DEPC-H_2O	5.55	3.95
Template DNA	1	2
ปริมาตรรวม	10	10

3.13.3 เมื่อเตรียมสารละลายสำหรับทำ PCR เรียบร้อยแล้ว นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (T100™Thermal Cycler from BIO-RAD) โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ ดังตาราง (ตารางที่ 3.2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.2 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้สำหรับการทำ PCR

ยีน *OfRpL3*		ยีน *OfBR-C*	
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
94	5	94	5
94	0.30	94	0.30
58	0.30	52	0.30
72	0.30	72	0.30
72	2	72	2
4	∞	4	∞

3.13.4 นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้ว load ลงบน 2% agarose S gel ใช้กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์ 180 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 25 นาที

3.13.5 ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 25 นาที ถ่ายรูปเจลที่ได้โดยใช้ BioDoc-It™ Imaging Systen แล้วนำไปวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยใช้โปรแกรม NIH Image

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved