บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
β-Mercaptoethanol	Merck
Absolute ethanol	Carlo Erba
Acetic acid	Merck
Acrylamide	Fluka
Ammonium persulfate	Carlo Erba
Bisacrylamide (N,N'-methylene diacrylamide)	Sigma
Bovine serum albumin	Sigma
Bromophenol blue	Merck
Calcium chloride	Merck
Chloroform	Sigma
Coomassie Briullet Blue R-250	Merck
CTAB	Carlo Erba
EDTA (ethylenediamine tetraacetate)	Merck
Glycerol	BDH
Glycine	Merck
Hydrochloric acid	Merck
Isoamyl alcohol	Fluka
Lithium chloride	Merck
Magnesium chloride	Merck
Methyl alcohol	Merck

(ต่อ)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Phenol	Carlo Erba
Phenylmethylsulphonylfluoride Polyvinyl	Sigma
pyrolidone (PVP)	Sigma
Potassium acetate Sodium carbonate	Fluka
Sodium chloride	Labscan
Sodium citrate	Merck
Sodium dihydrogen phosphate	Fluka
Sodium hydroxide	Carlo Erba
Sodium phosphate	Fluka
Sodium potassium tartrate	Fluka
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Fluka
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Sigma
Triton X-100	Merck
Tween® 20	Merck

1.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Agarose	Promega
Ampicillin	Sigma
Ethidium bromide	Sigma
Isopropanol	Sigma
Ribonuclease A	Sigma
T4 DNA ligase	Promega
Taq DNA polymerase	Invitrogen
Taq DNA polymerase	QIAGEN

1.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลอง

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่งจดจำในการตัดจำเพาะ	อุณหภูมิที่เหมาะสมในทำงาน
*Bam*HI	G↓GATTC	37 องศาเซลเซียส
*Eco*RI	G↓AATTC	37 องศาเซลเซียส
*Pst*I	CTGCA↓G	37 องศาเซลเซียส
*Sal*I	G↓TCGAC	37 องศาเซลเซียส

2. ตัวอย่างพืช

2.1 ใบปาล์มน้ำมันจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร จังหวัดสุราษฎร์ธานี

ใบปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการทดลองด้วยเทคนิค EPIC-PCR ด้วยยีน Malate synthase

ลำดับที่	หมายเลข	เบอร์ต้น	แปลง	ลักษณะผล	หมายเหตุ
1.	105	383	905B	เทไนอรา	-
2.	105	384	905B	เทเนอรา	-
3.	105	80	905B	ดูรา	-
4.	105	346	905B	ดูรา	-
5.	105	14	905B	พิสิเฟอรา	-
6.	105	268	905B	พิสิเฟอรา	-
7.	109	298	905B	เทเนอรา	-
8.	109	297	905B	ดูรา	-
9.	109	167	905B	พิสิเฟอรา	-
10.	116	267	905	เทเนอรา	-
11.	116	336	905	ดูรา	-
12.	116	339	905	พิสิเฟอรา	-

ใบและผลปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการศึกษายีน *accD* ด้วย RT- PCR และ RACE

ลำดับที่	หมายเลข	เบอร์ต้น	แปลง	ลักษณะผล	Yield*
1.	25	1559	911	เทเนอรา	H
2.	25	172	911	ดูรา	L
3.	25	219	911	เทเนอรา	H
4.	25	1553	911	ดูรา	L
5.	5	1501	911	เทเนอรา	L
6.	5	1561	911	เทเนอรา	H

หมายเหตุ * ข้อมูลปริมาณน้ำมันปาล์มต่อน้ำหนักทะลายปาล์มที่มีการรวบรวมจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร จังหวัดสุราษฎร์ธานี

H = ปริมาณน้ำหนักน้ำมันปาล์มต่อน้ำหนักทะลายปาล์มสูง

L = ปริมาณน้ำหนักน้ำมันปาล์มต่อน้ำหนักทะลายปาล์มต่ำ

2.2 ใบปาล์มน้ำมันจาก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ม. สงขลานครินทร์

ลำดับ	ลักษณะการผสม	พันธุ์พ่อแม่	หมายเลขต้น
1.	Cross	D x T	10
2.	Self	D x D	14
3.	Self	D x D	17
4.	Self	D x D	19
5.	Cross	D x T	20

3. แบคทีเรีย

E. coli Top 10 F′ มีลักษณะ Genotype: F′ [*pro*AB, *lac* I^q, *lacZ*ΔM15, Tn10 (Tet^R) *mcr*A, Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), ϕ80*lacZ*ΔM15, Δ*lac*X74, *deo*R, *rea*A1, *ara*Δ139, Δ(*ara-leu*) 7697, *gal*U, *gal*K, *rps*L (Str^R), *end* A1, *nup*Gλ⁻] บริษัท Invitrogen ประเทศเนเธอร์แลนด์

4. ดีเอ็นเอพาหะ

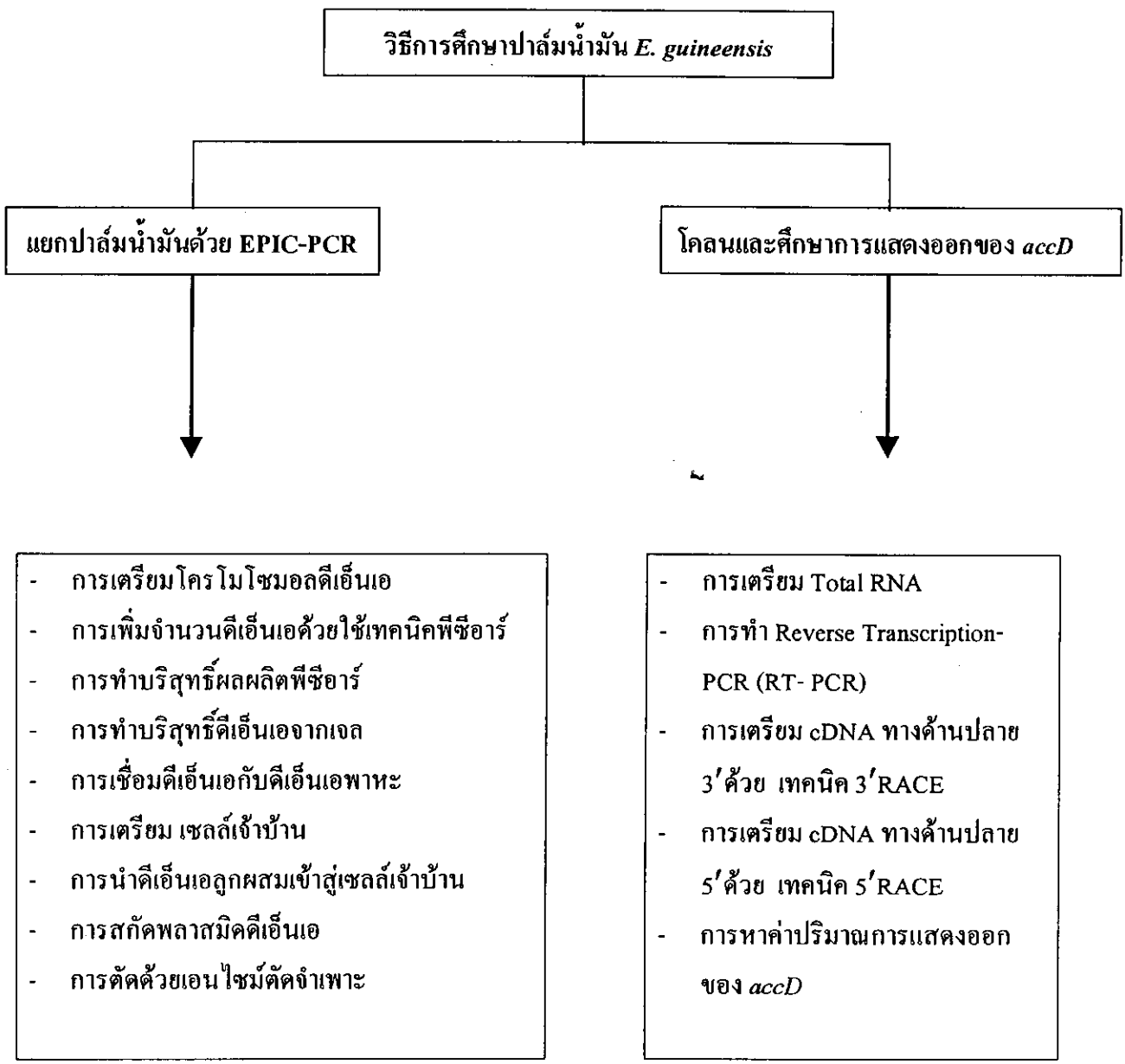
pGEM®-T Easy (Promega)

อุปกรณ์

1. เครื่อง Spectrophotometer รุ่น Ultrospec III (Pharmacia)
2. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่งรุ่น Junior 2000 C (Precisa)
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius)
4. เครื่อง หมุนเหวี่ยง รุ่น 5415C (eppendorf)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงรุ่น H-1200 B (KOKUSAN)
6. เครื่องหมุนเหวี่ยงที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น TLG 382K (Hermk)
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น 2K 15 (Sigma)
8. เครื่องวัด pH รุ่น Model 25 (Denver Instrument)
9. เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis (BIO-RAD)
10. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (BIO-RAD)
11. หลอดสำหรับทำพีซีอาร์ขนาด 0.2 และ 0.5 มิลลิลิตร
12. เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ Polymerase Chain Reaction (GeneAmp PCR System 2400)
13. เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ Polymerase Chain Reaction (braid)
14. เครื่องบันทึกแผนภาพดีเอ็นเอ รุ่น Gel Doc 1000 (BIO-RAD)
15. เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Labline)
16. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส (WTC binder)
17. ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส (Heraeus)
18. ตู้เย็นแช่แข็ง –70 องศาเซลเซียส (REVCO)
19. ตู้เย็นแช่เย็น –20 องศาเซลเซียส
20. หม้อนึ่งความดันรุ่น HVE-50 (HICLAVE™)
21. ตู้อบเครื่องแก้ว (Labline)
22. ตู้ปราศจากเชื้อ Larminar flow (NUAIRE)
23. เครื่องดูดความชื้นสูญญากาศ (B 169 vacuum dryer)

วิธีการ

ขั้นตอนการศึกษาวิจัย



ภาพที่ 2.1 แผนผังแสดงขั้นตอนวิธีการทดลองในการทำวิจัย

วิธีการทดลอง

1. การแยกปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC)-PCR

1.1 การเตรียมโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

1.1.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอโดยใช้ CTAB method (ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle, 1990)

บดใบปาล์มประมาณ 0.5-1.0 กรัม ในไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งบด ขูดผงที่บดละเอียดแล้วมาใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เติม CTAB buffer (ภาคผนวก) 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าเซลล์แตกจนหมด โดยสังเกตได้จากสารละลายมีสีเขียวเข้มและหนืด เขย่าเบาๆ เป็นครั้งคราว จากนั้นเติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 (v/v/v) 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้ทั่วถึง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วนใสไว้ในหลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1(v/v) 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ในหลอดใหม่ เติม isopropanol ที่เย็น ปริมาตร 1 เท่าของปริมาณส่วนใสที่ได้ ผสมเบาๆ ให้เข้ากันเพื่อตกตะกอน nucleic acid เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน เก็บตะกอน nucleic acid โดย หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสออกเบาๆ เหลือตะกอนสีขาวบริเวณก้นหลอด จากนั้นเติม 70 % เอธทานอล ลงไปล้างตะกอน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บตะกอนและทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติม RNase A ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจคุณภาพ ของดีเอ็นเอด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis ดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

1.1.2 สกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอโดยวิธีใช้ DNeasy Plant Mini Kit (วิธีการของบริษัท QIAGEN)

นำใบปาล์มที่บดด้วยไนโตรเจนเหลว 100 มิลลิกรัม เติมลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ AP1 (Lysis buffer) 400 ไมโครลิตร และ RNase A 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ระหว่างการอุ่นกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง เติม AP2 (Precipitation buffer) 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที ดูดส่วนใสลงในคอลัมน์ QIAshredder spin หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ย้ายสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลงมาไปยังหลอดใหม่

ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ AP3/E (Binding buffer) 1.5 เท่า ผสมให้เข้ากันแล้วดูดส่วนใสที่ได้ลงคอลัมน์ DNeasy นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ AW (Wash buffer) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส เติมบัฟเฟอร์ AW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาทีย้ายคอลัมน์ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการชะโครโมโซมอลดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นที่อุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส หมุนเหวียงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บส่วนใสนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอและตรวจคุณภาพของดีเอ็นเอด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis ดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

1.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนข้อ 1.1.1 หรือ ข้อ 1.1.2 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 10x buffer 5 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase 0.4 ไมโครลิตร, forward primer (2.5 ไมโครโมลาร์) 8 ไมโครลิตร, reward primer (2.5 ไมโครโมลาร์) 8 ไมโครลิตร, dNTPs mix (10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์) 4 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 21.6 ไมโครลิตร นำสารละลายไปทำพีซีอาร์โดยมีสภาวะคือ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที 1 รอบ และ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 50 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 4 องศาเซลเซียส 10 นาที 1รอบ นำตัวอย่างที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ ด้วย QIAquick PCR Purification Kit ตรวจสอบผลด้วย 1.8 % agarose gel electrophoresis

1.3 การทำบริสุทธิ์ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ด้วย QIAquick PCR Purification Kit (วิธีการของบริษัท QIAGEN)

เติม บัฟเฟอร์ PB (Binding buffer) ในปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรผลผลิตพีซีอาร์ ผสมให้เข้ากันดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ PE (Wash buffer) 750 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที ทิ้งส่วนใส หมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการชะ PCR product ด้วยน้ำ 30 ไมโครลิตรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บส่วนใส นำ PCR product ที่ได้มาตรวจคุณภาพด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis และเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

1.4 การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจลด้วย Purification of DNA using Concert^{TM} Gel Extraction Systems (วิธีการของบริษัท Life Technologeis)

นำชิ้นส่วนเจลที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจล แล้วเติมบัฟเฟอร์ L1 (Gel solubilization buffer) ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักเจล 30ไมโครกรัม บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส 15 นาที ระหว่างการอุ่นกลับหลอดทุก 3 นาที ดูดส่วนใสใส่ cartridge ที่สวมอยู่บน eppendroff หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที ทิ้งส่วนใส เติมบัฟเฟอร์ L2 (Wash buffer) 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที หมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ ชะดีเอ็นเอด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เก็บส่วนใสนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจคุณภาพ 1.0% agarose gel electrophoresis เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

1.5 การเชื่อมดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ

เชื่อมดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy ในอัตราส่วน 3:1 โดยผสมสารละลายดังต่อไปนี้ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร, 2X ligation buffer 5 ไมโครลิตร, pGEM®-T Easy (100 นาโนกรัม) 2 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอ (300 นาโนกรัม) 1 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 1 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 10 นาที

1.6 การเตรียม เซลล์เจ้าบ้าน (Competent cells) *E.coli* Top 10F′ (ดัดแปลงจากวิธี Hanahan, 1983)

นำโคโลนีเดี่ยวๆ ของเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* Top 10F′ จาก Stock มาเลี้ยงในอาหาร LB (Luria Bertaini) ที่มี tetracyclin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 25 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน ปริมาตร 225 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ติดตามปริมาณเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร รอจนได้ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) เท่ากับ 0.5-0.6 หยุดการเขย่าเลี้ยง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที ทิ้งส่วนใสเก็บเซลล์ (ตลอดการเตรียมต้องวางเชื้อบนน้ำแข็ง) ล้างและละลายตะกอนด้วย

0.1 M $CaCl_2$ ที่เย็น 3 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำตะกอนมารวมกัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสเก็บเซลล์ ละลายตะกอนด้วย 0.1 M $CaCl_2$ ที่เย็น 3.4 มิลลิลิตร แล้วเติมกลีเซอรอล 0.6 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15% (w/v) กลีเซอรอล) ผสมให้เข้ากันแบ่งเชื้อใส่หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร แล้วเก็บหลอดไว้ที่ –70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

1.7 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* Top 10F′ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Maniatis, *et al.*, 1982)

ผสมเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* Top 10F′ 200 ไมโครลิตร กับ ดีเอ็นเอลูกผสมปริมาตร 5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 25 นาโนกรัม) วางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที ทำ heat shock โดยนำสารละลายไปแช่ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที แล้วนำมาวางบนน้ำแข็งทันทีนาน 3-5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เลี้ยงบนอาหาร LB agar ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

1.8 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสม (ดัดแปลงจาก Holmes และ Quigley, 1981)

นำ *E. coli* Top 10F′ ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมมาสกัดพลาสมิดโดยดูดเชื้อมา 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที หลังจากนั้นจึงเทส่วนใสทิ้ง และเก็บเซลล์ไว้ และเติม STET buffer (8% sucrose; 5% tritonX-100; 50 mM EDTA, pH 8.0 และ 50 mM Tris, pH 8.0) 350 ไมโครลิตร นำไปเขย่าให้ตะกอนละลาย ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 45 วินาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อเขี่ยเอาตะกอนสีขาวของโปรตีนและโครโมโซมออก จากนั้นเติม isopropanol 350 ไมโครลิตร แช่ที่ –70 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนพลาสมิดด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 10 ล้างตะกอนด้วย 70 % เอทานอล 350ไมโครลิตรหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำตะกอนให้แห้งโดยใช้ vacuum dryer ละลายตะกอนในน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร กำจัด RNA ด้วย RNase A (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำพลาสมิดที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

คำนวณหาความเข้มข้นของพลาสมิด และตรวจคุณภาพของพลาสมิด ด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis พลาสมิดที่ได้เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

1.9 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction endonuclease)

เอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดจะมีบริเวณที่จดจำและจุดตัดในสายดีเอ็นเอสอง สายแตกต่างกันไปดังแสดงใน วัสดุข้อ 1.3 โดยมีองค์ประกอบที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาคือ ดีเอ็นเอ 1-2 ไมโครกรัม, เอนไซม์ตัดจำเพาะ (1-10 units) 1 ไมโครลิตร, 1X reaction buffer แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นหรือ TE (10 mM Tris-HCl pH 7.0 และ 1 mM EDTA pH 7.0) จนครบ 20 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมงตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis

2. ศึกษาการแสดงออกของยีนคาร์บอกซิลทรานซ์เฟอเรสในปาล์มน้ำมัน

2.1 การเตรียม Total RNA ด้วย RNeasy Plant Mini Kit (วิธีการของบริษัท QIAGEN)

นำเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันที่บดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ~100 มิลลิกรัม เติมลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ RLC 450 ไมโครลิตร และ β-Mercaptoethanol 4.5 ไมโครลิตร เขย่าอย่างแรง (vortex) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 1-3 นาที ดูดส่วนผสมไปยังคอลัมน์ QIAshredder spin แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 2 นาที ทิ้ง Spin Cup ดูดส่วนใสใส่ หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 96-100 % ethanol 225 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันดูดส่วนใส 650 ไมโครลิตรใส่คอลัมน์ RNeasy mini หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 20 วินาที ทิ้งส่วนใส เติมบัฟเฟอร์ RW1 700 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 20 วินาที ทิ้งส่วนใส ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร หลอดใหม่เติมบัฟเฟอร์ RPE1 500 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 20 วินาที ทิ้งส่วนใส แล้วเติมเติมบัฟเฟอร์ RPE1 500 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์อีกครั้ง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 2 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ RPE1 ออกให้หมด ย้ายคอลัมน์ไปยังหลอดขนาด1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ทำการชะอาร์เอ็นเอออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้น และตรวจคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis อาร์เอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

2.2 การทำ Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (วิธีการของบริษัทQIAGEN)

นำ Total RNA 1 ไมโครกรัมที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันมาทำ RT-PCR โดยเติม 5x buffer (Tris-Cl, KCl $(NH_4)_2SO_4$, 12.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$, DTT; pH 8.0)10 ไมโครลิตร, dNTPs mix (10 มิลลิโมลาร์ ของ dCTP, dGTP, dATP, dTTP) 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ 5′ (6 ไมโครโมลาร์) 5 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ 3′ (6 ไมโครโมลาร์) 5 ไมโครลิตร, เติม Onestep RT-PCR Enzyme mix (1.0 มิลลิโมลาร์ DTT, 0.1 มิลลิโมลาร์ EDTA, 0.5% (v/v) stabilizee; pH 9.0) 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (Nuclease free) จนครบ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มให้เกิดปฏิกิริยาในเครื่อง automated thermal cycler GeneAmp® PCR system model 2400 โดยมีสภาวะที่ดังต่อไปนี้ คือ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที 95 องศาเซลเซียส 15 นาที 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 48 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 4 องศาเซลเซียส 10 นาที 1รอบ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วย agarose gel electrophoresis

2.3 การเตรียม Full length cDNA ด้วย Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) (วิธีการของบริษัท Invitrogen)

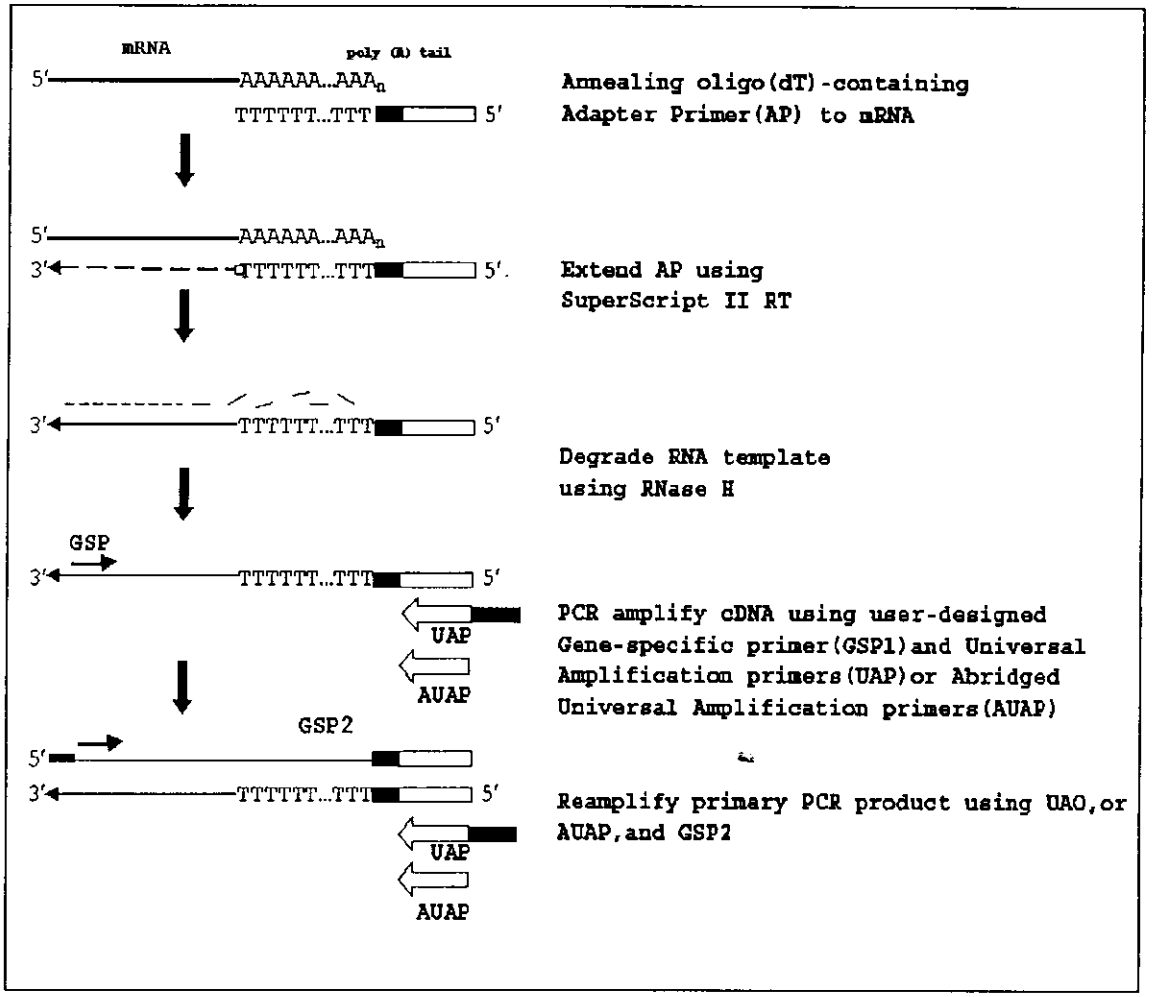
2.3.1 การลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3′ของ cDNA (ดังแสดงในภาพที่ 2.2)

2.3.1.1 การสังเคราะห์สาย cDNA เส้นแรกทางด้านปลาย 3′

นำ Total RNA 5 ไมโครกรัมที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันมาทำการสร้างสาย cDNA เส้นแรกทางด้านปลาย 3′ โดยเติมน้ำกลั่น (Nuclease free) ให้มีปริมาตรสุดท้าย 11 ไมโครลิตร เติมไพรเมอร์ AP (Adapter Primer) (10 ไมโครโมลาร์) 1ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว บ่มที่ 75 องศาเซลเซียส 10 นาที แช่น้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติม reaction buffer (10x PCR buffer (200 มิลลิโมลาร์ Tris HCl; pH 8.4, 500 มิลลิโมลาร์ KCl) 2 ไมโครลิตร, 25 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$2 ไมโครลิตร, dNTP mix (10 มิลลิโมลาร์ ของ dCTP, dGTP, dATP, dTTP) 1ไมโครลิตร และ 0.1 โมลาร์ DTT 2 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส 5 นาที่ เติม Superscript™ II Reverse transcriptase (200 U./μl) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมงหยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มที่ 75 องศาเซลเซียส 10 นาทีแช่น้ำแข็ง ย่อย RNA ต้นแบบโดยเติม RNaseH (2 U./μl) 1 ไมโครลิตรแล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

2.3.1.2 การเพิ่มจำนวนสาย cDNA ด้านปลาย 3′

ทำการเพิ่มจำนวนสาย cDNA ที่ได้จากขั้นตอนข้อ 2.3.1.1 โดยเติมสาย cDNA ที่ได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 10x buffer 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์) 3 ไมโครลิตร dNTPs mix (10 มิลลิโมลาร์) 1 ไมโครลิตรไพรเมอร์ GSP (Gene-Specific Primer) (10 ไมโครโมลาร์) 1 ไมโครลิตรไพรเมอร์ Abridged Universal Amplification Primer (AUAP) หรือ Universal Amplification Primer (UAP) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่น (Nuclease free) 36.5 ไมโครลิตรบ่มที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วเติม *Taq* DNA polymerase (5 U./μl) 0.5 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันบ่มให้เกิดปฏิกิริยาในเครื่อง automated thermal cycler GeneAmp® PCR system model 2400 โดยมีสภาวะที่ดังต่อไปนี้คือ คือ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 55 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 35 รอบ และ72 องศาเซลเซียส 10 นาที 4 องศาเซลเซียส 10 นาที 1รอบ จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการทำ nested PCR โดยใช้ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร (PCR product 1ไมโครลิตรต่อน้ำกลั่น 99 ไมโครลิตร) 10x buffer 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์) 3 ไมโครลิตร dNTPs mix 1 ไมโครลิตรไพรเมอร์ GSP 2 (10 ไมโครโมลาร์) 1 ไมโครลิตรไพรเมอร์ AUAP หรือ UAP 1 ไมโครลิตรน้ำกลั่น 33.5 ไมโครลิตร บ่มที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วเติม *Taq* DNA polymerase 0.5 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันบ่มให้เกิดปฏิกิริยาโดยมีสภาวะที่ดังต่อไปนี้คือ คือ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 55 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 35 รอบ และ72 องศาเซลเซียส 10 นาที 4 องศาเซลเซียส 10 นาที 1รอบ ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ 3′RACE products ตรวจสอบผลผลิต พีซีอาร์ด้วย agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 2.2 แผนผังสรุปขั้นตอนการเตรียมนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3′ของ cDNA

2.3.2 การลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5′ ของ cDNA (ดังแสดงในภาพที่ 2.3)

2.3.2.1 การสังเคราะห์สาย cDNA เส้นแรกทางด้านปลาย 5′

นำ Total RNA 5 ไมโครกรัม ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันมาทำการสร้างสาย cDNA เส้นแรกทางด้านปลาย 5′ เติมไพรเมอร์ GSP1 (2.5 ไมโครโมลาร์) 1 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น (Nuclease free) ให้มีปริมาตรสุดท้าย 15.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส 10 นาที แช่น้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติม บัฟเฟอร์ reaction (10x PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, 25 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 2.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP mix 1 ไมโครลิตร และ 0.1 โมลาร์ DTT 2.5 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส 5 นาที เติม Superscript™ II Reverse transcriptase 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง 70 องศาเซลเซียส 15 นาที 37 องศาเซลเซียส 5 นาทีเติม RNaseH 1 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที แช่น้ำแข็ง สาย cDNA ที่ได้สามารถเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.3.2.2 การทำบริสุทธิ์ cDNA เส้นแรกด้วย GlassMax DNA isolationspin cartridge

กำจัดนิวคลีโอไทด์ที่เหลือจากการสร้างสาย cDNA เส้นแรก (2.3.2.1) ไพรเมอร์ GSP1 โดยการสารละลายที่ได้จากขั้นตอนการสร้างสาย cDNA เส้นแรก 20 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับ binding solution (6 โมลาร์ NaI) 120 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาที ดูดสารละลายทั้งหมดไปยัง GlassMax spin cartridge หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 20 วินาที ทิ้งส่วนใสล้างคอลัมน์โดยเติม 1x wash buffer ที่เย็น 400 ไมโครลิตรแล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 20 วินาที ทิ้งส่วนใส จำนวน 3 ครั้ง ล้างคอลัมน์ด้วย 70% (v/v) เอทานอลที่เย็น 400 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 20 วินาที ทิ้งส่วนใส จำนวน 2 ครั้ง นำคอลัมน์มาหมุนเหวี่ยงซ้ำที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที เพื่อกำจัดเอทานอลออกให้หมด ชะ cDNA ออกมาด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 20 วินาที เก็บส่วนใสไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

2.3.2.3 การเติม TdT tail ที่ปลายสาย cDNA

ทำการเติม TdT tailing เพื่อเป็นตำแหน่งในการจับของไพรเมอร์ abridged anchor ทางด้านปลาย 3′ ของสาย cDNA ที่ได้โดยใช้สาย cDNA ที่ได้จากการทำขั้นตอน 2.3.2.2 10 ไมโครลิตร 5x tailing buffer (50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl; pH 8.4, 125 มิลลิโมลาร์KCl, 7.5

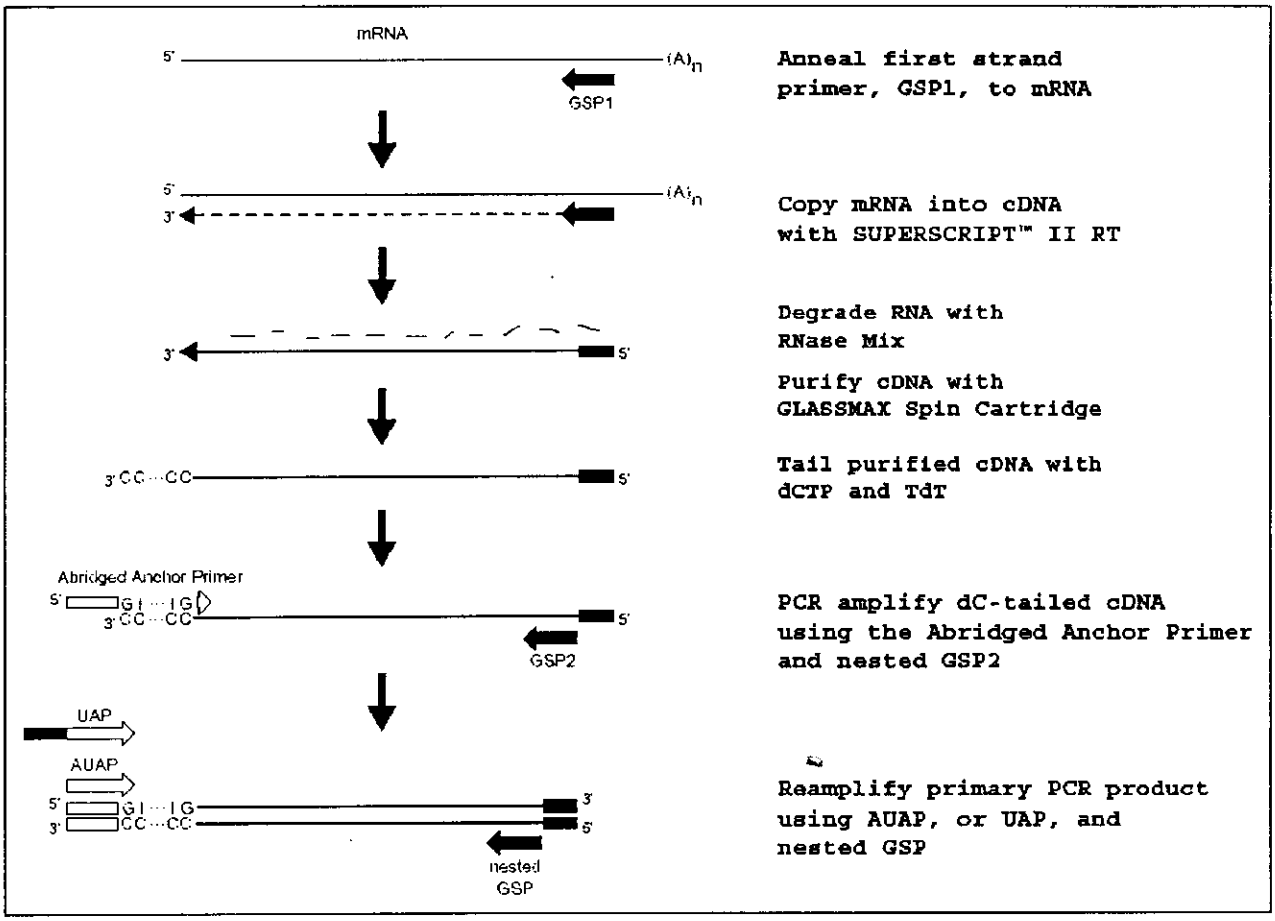
มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$) 5 ไมโครลิตร 2 มิลลิโมลาร์ dCTP 2.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่น (Nuclease free) 6.5 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงบ่มที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาทีแช่น้ำแข็ง 1 นาที ปั่นเหวี่ยงแล้วเติม TdT 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันปั่นเหวี่ยง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที ปั่นเหวี่ยงแช่น้ำแข็ง จะได้ dC-tailed cDNA สำหรับขั้นตอนต่อไป

2.3.2.4 การเพิ่มจำนวนของ dC-tailed cDNA

ทำการเพิ่มจำนวนสาย dC-tailed cDNA ที่ได้จากขั้นตอน 2.3.2.3 โดยเติมสาย dC-tailed cDNA 5 ไมโครลิตร 10x buffer 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์) 3 ไมโครลิตร dNTPs mix (10 มิลลิโมลาร์) 1 ไมโครลิตรไพรเมอร์ GSP 2 (10 ไมโครโมลาร์) 2 ไมโครลิตรไพรเมอร์ AAP (10 ไมโครโมลาร์) 2 ไมโครลิตรน้ำกลั่น 31.5 ไมโครลิตรบ่มที่ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที แล้วเติม *Taq* DNA polymerase 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มให้เกิดปฏิกิริยาในเครื่อง autamated thermal cycler GeneAmp® PCR system model 2400 โดยมีสภาวะที่ดังต่อไปนี้ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 50 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 35 รอบ และ72 องศาเซลเซียส 7 นาที 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บไว้ที่-20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

2.3.2.5 การเพิ่มจำนวนสาย cDNA ด้านปลาย 5′ ที่ต้องการ

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย Nested PCR โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.3.2.4 จำนวน 1 ไมโครลิตรมาผสมกับน้ำ 99 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันดูดมา 5 ไมโครลิตร แล้วเติม 10x buffer 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์) 3 ไมโครลิตร dNTPs mix (10 มิลลิโมลาร์) 1 ไมโครลิตรไพรเมอร์ GSP 3 (10 ไมโครโมลาร์) 1 ไมโครลิตรไพรเมอร์ AUAP หรือ UAP (10 ไมโครโมลาร์) 1 ไมโครลิตรน้ำกลั่น 33.5 ไมโครลิตร บ่มที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาทีแล้วเติม *Taq* DNA polymerase 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มให้เกิดปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ดังต่อไปนี้ คือ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 4 องศาเซลเซียส 10 นาที 1รอบ ตรวจสอบผลผลิตจาก 5′RACE ด้วย agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 2.3 แผนผังสรุปขั้นตอนการเตรียมนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5′ของ cDNA

2.4 การหาค่าปริมาณการแสดงออกของ *accD*

การหาค่าปริมาณการแสดงออกของ *accD* ในแต่ละตัวอย่างการทดลองได้ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อหาค่าปริมาณการแสดงออกของยีน *accD* และ *actin* (house keeping gene) ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับทำ RT-PCR ยีน *accD* และ *actin* แล้ววัดความเข้มของแถบผลผลิตจากการทำ RT-PCR ของทั้ง 2 ยีนด้วยโปรแกรม Scion image (ภาคผนวก) ตามขั้นตอนการใช้งานของโปรแกรม แล้วนำผลที่ได้จากการหาค่าปริมาณความเข้มของทั้งยีน *accD* และ *actin* มาเทียบอัตราส่วนได้เป็นค่าการแสดงออกของ *accD* หรือก็คือค่าปริมาณการแสดงออกของ accD/actin