ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	BDH
Acrylamide	Fluka
Ammoniumpersulfate	Fluka
Acetic acid	J.T. Baker
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
Brilliant albulue R	Sigma
Bromophenol blue	Fluka
Calcium chloride dehydrate	Merck
Chloroform	LAB-SCAN
Dithiothreitol (DTT)	USB
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Merck
Folin ciocalteus 's reagent	CARLO ERBA
Folmaldehyde	Merck
Glucose	Fluka
Glycerol	Fisher
Glycine	BDH
HEPES	Sigma
Hydrocloric acid	Merck
Magnesium sulfate hydrate	CARLO ERBA
Magnesium chloride-hexahydrat reinst	Merck

สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Methanol	LAB-SCAN
N,N′-mehtylene-bis-acrylamide	Merck
N,N,N′,N′-Tetramethylethylene Diamine (TEMED)	Fluka
Nutrient Agar	Difco
Polygalacturonic acid	Sigma
Potassium acetate	Merck
Potassium chloride	Fluka
Potassium dihydrogenphosphate	Merck
Potassium sulphate	Merck
Sodium acetate	Merck
Sodium bicarbonate	BDH
Sodium chloride	LAB-SCAN
Sodium dihydrgen orthophosphate	BDH
Sodium hydrogen carbonate	BDH
Sodium hydroxide pellets	BDH
Sodium Lauryl sulphate	Aps Ajex Finechem
Sulfuric acid	LAB-SCAN
Triton X-100	USB
Tris base	Promega
Tryptone	Himedia
Yeast Extract	USB

1.2 **สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา** (Molecular biology grade)

สารเคมี	**บริษัทที่ผลิต**
Agarose	Promega
Ampicilin	Sigma
AMV Reverse Transcriptase	Promega
*Bam*HI	Promega
Deoxyribonucleotide Triphosphate (dNTP)	Promega
*Eco*RI	Promega
Ethidium bromide	Sigma
Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranositol(IPTG)	USB
Low Molecular Weight Caribration Kit	Amersham Biosciences
Lysozyme	Sigma
QIAprep® Miniprep Kit	QIAGEN
Random primer	Promega
Ribonuclease A	Sigma
Tag DNA polymerase	QIAGEN
TRIzol® reagent	Invitrogen
T4 DNA ligase	Promega
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system	Promega
100 bp DNA ladder	Promega

2. **แบคทีเรีย**

Escherichia coli สายพันธุ์ Top 10 F′ มีลักษณะ Genotype : F′{lacI^{q}*Tn*10(Tet^{R})} mcrAΔ (*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ 80*lacZ*ΔM15Δ *lacX74 deo*R *rec*A1 *ara*D139Δ (*ara-leu*) 7697 ga/U ga/K *rps*L(Str^{R}) *end*A1 *nup*G บริษัท Invitrogen ประเทศเนเธอร์แลนด์

Escherichia coli สายพันธุ์ BL21 มีลักษณะ Genotype : F-, *omp*T, *hsd*S_B,(r_B-, m_B-), *gal*, *dcm* บริษัท Invitrogen ประเทศเนเธอร์แลนด์

Escherichia coli สายพันธุ์ XL1-Blue มีลักษณะ Genotype : Δ(*mrc*A)183 Δ (*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173 *end*A1 *sup*E44 *thi*-1 *rec*A1 *gyr*A96 *rel*A1 *lac* [F′ proAB lacI^{q} ZΔM15 *Tn*10(Tet^{r})]

Escherichia coli สายพันธุ์ XLOLR มีลักษณะ Genotype : Δ(*mrc*A)183 Δ (*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173 *end*A1 *thi*-1 *rec*A1 *gyr*A96 *rel*A1 *lac* [F′ *pro*AB *lac*I^{q} ZΔM15 *Tn*10(Tet^{r})]Su^{-} λ^{r} บริษัท Stratagene ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. **ดีเอ็นเอพาหะ**

Zap Express® Vector บริษัท Stratagene

pGEM®-T Easy บริษัท Promega

pGEX-4T-1 บริษัท Amersham biosciences

4. **ดีเอ็นเอต้นแบบสายสั้น ๆ** (Oligonucleotide primer)

PL-R : 5′ACGAGTCCCATCAAAAAAACAATGG3′

PL-R nest : 5′CCCTGAAATGGTAATATCGGGCT3′

PL-F : 5′TGTGGGCGTTGCTTCAAGGA3′

PL-R2 : 5′GGACGGGGACAACACACACC3′

Pel F : 5′GGATCCATGGCTCAACATATTG3′

Pel R : 5′CCGAATTCCTATACTGTATCAGC3′

5. **ตัวอย่างยางพารา**

น้ำยางจากต้นยางพาราสายพันธุ์ RRIM 600 อายุประมาณ 7-10 ปี

อุปกรณ์

หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์สำหรับทำ PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

หลอดไมโครเซนตริฟิจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น 2200 C SCS (บริษัท Precisa)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204 (บริษัท Mettler Toledo)

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (บริษัท Labline)

เครื่องวัดพีเอชรุ่น Cyberscan 1000 (บริษัท Eutech Cybernectics)

เครื่องหมุนแรงเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น RC 5B (บริษัท Sorvall)

เครื่องหมุนแรงเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะรุ่น Biofuge pico (บริษัท Sorvall)

ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส (บริษัท Heraeus)

ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (บริษัท SANYO)

ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส (บริษัท SANYO)

หม้อนึ่งความดัน รุ่น HA-300 MII (บริษัท Hirayama)

ตู้อบเครื่องแก้ว (บริษัท Labline)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (บริษัท Bio Rad)

ตู้ปราศจากเชื้อ Laminar flow (บริษัท Neurair)

เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น TouchDown (บริษัท HYBRID)

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น 1000/500 (บริษัท Bio Red)

เครื่องดูดความชื้นระบบสุญญากาศ รุ่น B-169 (บริษัท Buchi)

เครื่องผลิตคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator)

เครื่อง Homogenizer รุ่น S-250 (บริษัท Ikeda Scientific)

ตู้ดูดควัน (บริษัท Major)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (บริษัท Mammert)

วิธีการ

1. การเตรียม mRNA จากน้ำยางพารา

1.1 **การเตรียมตัวอย่าง**

เก็บน้ำยางจากต้นยางพาราสายพันธุ์ RRIM 600 อายุประมาณ 7-10 ปี เก็บในขวดแก้วที่ปราศจากเอนไซม์ RNAse โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าใช้งานไว้

1.2 **การเตรียม total RNA** (ตามวิธีของบริษัท GIBCO BRL, Carlifornia, USA)

นำตัวอย่างน้ำยางพารา เติม 1 มิลลิลิตร TRIzol Reagent ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องบดด้วยมือ หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส แยกเอาส่วนใสด้านบนมาใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม chloroform 0.2 มิลลิลิตร ต่อ TRIzol Reagent ที่ใช้เริ่มต้น 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนมาตกตะกอน RNA ด้วย การเติม isopropyl alcohol เป็น 2 เท่าของสารละลาย RNA ที่สกัดได้ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จะได้ตะกอนใสติดอยู่ที่ก้นหลอดล้างตะกอนด้วย 75% ethanol ที่เย็นจัด 1 มิลลิลิตรแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนของเหลวออกจะได้ตะกอน RNA นำไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งระบบสุญญากาศ (vacuum) นำตะกอนที่ได้ไปละลายในน้ำปราศจาก RNase นำไปวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของ total RNA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตรและ เก็บสารละลาย RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้สำหรับเตรียม mRNA ต่อไป

1.3 **การเตรียม mRNA** (ตามวิธีของบริษัท Stratagene, Carlifornia, USA)

นำ total RNA 5 มิลลิกรัม ที่ได้จากข้อ 1.2 มาเตรียม mRNA โดยเติมสารละลาย elution buffer ปริมาตร10 มิลลิลิตร นำไปบ่มรวมกับ oligo(dT) cellulose (ความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มโดยการเขย่าเบาๆ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 700 รอบต่อนาที นาน 3 นาทีเพื่อตกตะกอน oligo(dT) cellulose ดูดส่วนใสทิ้ง เติมสารละลาย high-salt buffer 5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 700 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดส่วนใสทิ้งทำครั้งอีก 2 ครั้ง และละลาย oligo(dT) cellulose ด้วยสารละลาย low-salt buffer 5 มิลลิลิตร ดูดสารละลาย 2.5 มิลลิลิตรลง

คอลัมน์ แล้วใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ดันสารละลายออกจากคอลัมน์ oligo(dT) cellulose จะติดอยู่ที่คอลัมน์ ดูด oligo(dT) cellulose 2.5 มิลลิลิตร ที่เหลือลงคอลัมน์อีกครั้ง ชะ mRNA ออกด้วยสารละลาย elution buffer ที่มีอุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง วิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของ mRNA ที่ได้ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรและ เก็บสารละลาย RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2. **การเตรียม** cDNA library

2.1 **การสังเคราะห์** cDNA

ผสม 10x First-strand buffer 5 ไมโครลิตร First-strand methyl nucleotide mixture 3 ไมโครลิตร *Xho*I-linker primer (1.4µg/µl) 2 ไมโครลิตร และ RNase block ribonuclease inhibitor (40U/µl) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม mRNA จากข้อ1.3 ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม) ลงในหลอดผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Strata Script RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase) (50 U/µl) 1.5 ไมโครลิตร โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อเปลี่ยน mRNA เป็น First-strand cDNA

นำ First-strand cDNA ที่ได้ปริมาตร 45 ไมโครลิตร มาเติม 10x second-strand buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร dNTP mixture 6 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 114 ไมโครลิตร RNase H (1.5 U/µl) 2 ไมโครลิตร และ DNA polymerase I (9 U/µl) 11 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นาน 2.5 ชั่วโมงแล้วนำไปวางบนน้ำแข็งทันที

นำ Second-strand cDNA ที่ได้ มาทำ blunting โดยเติม blunting dNTP mix ปริมาตร 23 ไมโครลิตรและ *Pfu* DNA polymerase (2.5 U/µl) 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลาย phenol:chloroform อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ตกตะกอน cDNA โดยเติม 3 M sodium acetate 20 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ล้างตะกอนด้วยการเติม 70% (v/v) ethanol 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำตะกอนที่ได้ มาทำแห้งโดยใช้

เครื่องทำแห้งระบบสุญญากาศ(vacuum) ละลายตะกอน cDNA ที่ได้ ใน *Eco*RI adaptor 9 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 30 นาที เพื่อละลายตะกอน และเติม 10x ligase buffer (500 mM Tris-HCl pH 7.5, 70 mM $MgCl_2$ และ 10 mM Dithiothreitol (DTT)) 1 ไมโครลิตร 10 mM rATP 1 ไมโครลิตรและเอนไซม์ T4 DNA ligase (40 U/µl) 1 ไมโครลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ligase

เติม 10x ligase buffer 1 ไมโครลิตร 10 mM rATP 2 ไมโครลิตร และเอนไซม์ T_4 polynucleotide kinase (40 U/µl) 1 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 5 ไมโครลิตรลงใน สารละลายที่ได้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที และแช่ใน water bath 70 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที และนำมาเติม *Xho*I buffer 28 ไมโครลิตร และ *Xho*I (40 U/µl) 3 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1.5 ชั่วโมง เติม 10x STE buffer (1 M NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 7.5 และ 100 mM EDTA) 5 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 125 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาทีนำตะกอนมาทำแห้งแล้วละลายตะกอนด้วย 1x STE buffer 10 ไมโครลิตรและเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อ 1 ไมโครลิตร นำสารละลาย cDNA 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 100 ng/µl) ที่ได้ผสมกับ Zap Express vector (1 µg/µl), 10x ligase buffer 0.5 ไมโครลิตร, 10 mM rATP (pH7.5) 0.5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ T4 DNA ligase (4 U/µl) 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

2.2 **การทำ packaging (Gigapack ®III Gold Packaging Extract)**

ผสมดีเอ็นเอลูกผสม (0.01-1 ไมโครกรัม) ที่ได้จากข้อ 2.1 กับ packaging extract ผสมเข้ากันเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เติม SM buffer (NaCl, $MgSO_4$. $7H_2O$, 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 2% (w/v) gelatin) 500 ไมโครลิตรและ chloroform 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน ดูดสารละลายใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3 **การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน (XL1-Blue MRF')**

นำแบคทีเรีย XL1-Blue MRF' มา streak บนอาหาร Luria Bertiani (LB) ที่มี tetracyclin (15 µg/ml) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมงเพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ ถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในอาหาร LB 50

มิลลิลิตร ที่มี 10 mM $MgSO_4$ และ 0.2% (w/v) maltose บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 4-6 ชั่วโมง จนได้ OD_{600} ไม่เกิน 1.0 นำเชื้อที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10 mM $MgSO_4$ ให้ได้ OD_{600} เท่ากับ 0.5 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 **การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน**

สารละลาย phage ที่ได้จากข้อ 2.2 มาเจือจางด้วย SM buffer จากนั้นนำไปรวมกับเซลล์เจ้าบ้าน XL1-Blue MRF' ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีแล้วดูดสารละลายไปผสมกับอาหาร NZY top agar 3 มิลลิลิตร อุ่นอยู่ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เทสารละลายลงบน NZY agar plate รอจนกว่า top agar แข็งนำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสนาน 2-4 ชั่วโมง จนกระทั่งเกิด plaque แล้วจึงละลาย plaque ด้วย SM buffer ในปริมาตรที่เหมาะสม แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ดูดส่วนใสใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 2 มิลลิลิตร เก็บ cDNA phage library ที่ -70 องศาเซลเซียส

3. **การเปลี่ยน** cDNA phage library **เป็น** cDNA phagemid library (ตามวิธีการของบริษัท Stratagene, Carlifornia, USA)

3.1 **การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน** XI1-Blue MRF' **และ** XLOLR

นำแบคทีเรีย XL1-Blue MRF' และ XLOLR มา streak บนอาหาร LB ที่มี tetracyclin (15 µg/ml) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ของเชื้อแต่ละตัวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี10 mM $MgSO_4$ และ 0.2% (w/v) maltose 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10 mM $MgSO_4$ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของเชื้อแต่ละตัวให้ได้เท่ากับ 1.0 ด้วย 10 mM $MgSO_4$ แล้ววางบนน้ำแข็งจนกว่าใช้งาน

3.2 **การเปลี่ยน** cDNA phage library **เป็น** cDNA phagemid library

นำ cDNA phage library ที่ได้ และทำการเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนเท่ากับ 1X 10^7 pfu/ml ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมรวมกับเซลล์เจ้าบ้าน XL1-Blue MRF' ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ ExAssist helper phage (1X 10^6 pfu/µl) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอด microcenntrifuge ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที เติม

อาหารเหลว LB ที่มี 10 mM $MgSO_4$ และ 0.2% (w/v) maltose ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2.5-3 ชั่วโมง จากนั้นต้มที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดส่วนใส (excised phagemid) ใส่หลอดใหม่ นำ excised phagemid ไปเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้าน XLOLR ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

4. การค้นหายีนของน้ำยางพารา

4.1 การสกัดพลาสมิด

สุ่มเลือกโคลนจาก cDNA phagemid library ที่ได้จากข้อ 3.2 นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 15 µg/ml หลอดละ 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ละลายใน solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 10 mM EDTA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไป votex ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นเติม solution II (0.2 N NaOH, 1%SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง นาน 5 นาที แล้วเติม solution III (5 M potassium acetate, glacial acetic acid) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดส่วนใสขึ้นมาใส่หลอดใหม่แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายที่ได้ วางทิ้งไว้นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำตะกอนให้แห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งระบบสุญญากาศ (vacuum) ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น ตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้โดยใช้ 1.2 % agarose gel electrophoresis

4.2 การทำพลาสมิดให้บริสุทธิ์เพื่อการหาลำดับเบสของยีน (ตามวิธีการของบริษัท QIAGEN, Carlifornia, USA)

โดยใช้ QIA prep® Spin Miniprep Kit นำเชื้อที่ผ่านการตรวจสอบว่ามีดีเอ็นเอลูกผสมอยู่ในอาหารเหลว LB ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 15 µg/ml หลอดละ 5 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย P1 buffer 250 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย P2 buffer 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ

4-5 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย N3 buffer 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ 4-5 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสผ่านใน QIA pre column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย PB buffer 500 ไมโครลิตร เทส่วนใสทิ้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ล้างอีกครั้ง ด้วยสารละลาย PE buffer 50 ไมโครลิตร เทส่วนใสทิ้ง เหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาทีอีกครั้ง เพื่อกำจัด ethanol ออกให้หมด ย้ายคอลัมน์ลงหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชะคอลัมน์โดยใช้น้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอลูกผสมโดยใช้ 1.2 % agarose gel electrophoresis และนำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของพลาสมิด เก็บพลาสมิดที่ได้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

5. การเตรียม ยีนเส้นเต็ม (full length cDNA) ของยีน pectate lyase ด้วย Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) (ตามวิธีการของบริษัท INVITROGEN, Carlifornia, USA)

5.1 การกำจัดหมู่ฟอสเฟตและ Cap structure ของ mRNA

นำ total RNA 5 ไมโครกรัมที่สกัดได้จากน้ำยางพารามาทำการดึงหมู่ฟอสเฟตออกโดยเติมน้ำที่ปราศจาก RNase ให้มีปริมาตรสุดท้าย 7 ไมโครลิตร เติม 10x CIP buffer 1 ไมโครลิตร RNase Out (40 U/µl) 1 ไมโครลิตร และ CIP (10 U/µl) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ววางบนน้ำแข็งจากนั้นทำการตกตะกอนโดยเติมน้ำปราศจาก RNase 90 ไมโครลิตร และ phenol chloroform 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดส่วนใสด้านบนมาเติม mussel glycogen (10 µg/µl) 2 ไมโครลิตร, 3 M sodium acetate pH 5.2 10 ไมโครลิตร และ 95% (v/v) ethanol 220 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว บ่มที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ได้ตะกอนใสติดก้นหลอด ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol นำตะกอนไปทำให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำปราศจาก RNase 7 ไมโครลิตร นำมากำจัด Cap structure โดยเติม 10x TAP buffer 1 ไมโครลิตร, RNase Out (40 U/µl) 1 ไมโครลิตรและ TAP (0.5 U/µl) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาตกตะกอนอีกครั้งแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำปราศจาก RNase 7 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

5.2 การสังเคราะห์สาย cDNA เส้นแรกทางด้านปลาย 5′ ของยีน pectate lyase

นำ RNA ที่ได้จากขั้นตอน 5.1 มาทำการเติม GeneRacer™RNA oligo 2.5 ไมโครกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีและแช่ในน้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นเติมสารผสมบัฟเฟอร์ 10X ligase buffer 1 ไมโครลิตร, 10 mM ATP 1 ไมโครลิตร, RNase Out (40 U/µl) 1 ไมโครลิตร และ T_4 RNA ligase (5 U/µl) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นตกตะกอน RNA ด้วย phenol chloroform อีกครั้งหนึ่ง ละลายตะกอนที่ได้ด้วยน้ำปราศจาก RNase 10 ไมโครลิตร ทำการสังเคราะห์สาย cDNA เส้นแรกทางด้านปลาย 5′ โดยการเติม GeneRacer™oligo dT primer 1 ไมโครลิตร และ 10 mM dNTP 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แช่ในน้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นเติมสารผสมบัฟเฟอร์ (5X First strand buffer 4 ไมโครลิตร, 0.1 mM DTT 2 ไมโครลิตร, RNase Out (40 U/µl) 1 ไมโครลิตร และ SuperScript™ II RT (200 U/µl) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที ยับยั้งปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้ววางในน้ำแข็ง 2 นาที จากเติม RNaseH 1 ไมโครลิตร แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สาย cDNA ที่ได้สามารถเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ทำการเพิ่มจำนวนสาย GeneRacer™oligo cDNA ที่ได้ โดยการเติมสาย GeneRacer™oligo cDNA 1 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 5 ไมโครลิตร, 50 mM $MgSO_4$ 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP Mix 1 ไมโครลิตร, 10 µM Gene Racer 5′ primer 3 ไมโครลิตร, 10 µM PL-R primer 1 ไมโครลิตร, น้ำปราศจากไอออน (DI water) 36.5 ไมโครลิตร และ Taq DNA polymerase 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังนี้

บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 1 รอบ, อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 5 รอบ, อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 5 รอบ, อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 รอบและ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนโดยการทำ 1.2% agarose gel electrophoresis

นำสาย GeneRacer™oligo cDNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน 0.5 ไมโครลิตร (200 นาโนกรัม) 10X PCR buffer 5 ไมโครลิตร, 50 mM $MgSO_4$ 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP Mix 1

ไมโครลิตร, 10 µM 5′ Nested primer 1 ไมโครลิตร, 10 µM PL-R nest primer 1 ไมโครลิตร, น้ำปราศจากไอออน (DI water) 38.5 ไมโครลิตร และ Taq DNA polymerase 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังนี้

บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 1 รอบ, อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 30 รอบ และ อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ และตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนโดยการทำ 1.2% agarose gel electrophoresis

6. การทำ Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ของยีน Pectate lyase

นำ total RNA 4 ไมโครกรัม ที่สกัดจากน้ำยางของต้นยางพารามาทำ Reverse Transcription (RT) โดยใช้ Random primer 100 นาโนกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และบ่มบนน้ำแข็งอีก 5 นาที เติมสารสำหรับทำ RT ประกอบด้วย 0.6 mM dNTP, RT buffer, 0.2 U AMV และน้ำปราศจาก RNase ปริมาตรรวมเป็น 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย cDNA ที่ได้ 100 นาโนกรัม, 0.4 µM ของ Pel F :5′GGATCCATGGCTCAACATATTG3′และ Pel R: 5′CCGAATTCCTATACTGTAT-CAGC3′ ซึ่งออกแบบมาจาก full length cDNA ของยีน Pectate lyase และให้มีตำแหน่งตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Bam*HI ตามลำดับ, 0.2 mM ของแต่ละ dNTP, 10 mM Tris-HCl(pH 9), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM $MgCl_2$, และ 2.5 U Tag DNA polymerase โดยใช้สภาวะ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ, อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบและ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ และทำการตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนของยีนที่ได้โดยการทำ 1.2% agarose gel electrophoresis

7. การเตรียม ดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-Hb-Pel ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

นำยีน Hb-Pel ที่ได้จากการทำ PCR มาตกตะกอนด้วย 3 M sodium acetate pH 5.3 ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายทั้งหมด และ absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายทั้งหมด บ่มเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol หมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำให้ตะกอนแห้ง และละลายตะกอนด้วยน้ำปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปหาปริมาณดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตร ใช้ดีเอ็นเอ 300 นาโนกรัมเชื่อมกับเวคเตอร์ pGEM®-T Easy (Promega, USA) ปริมาณ 25 นาโนกรัม โดยใช้เอ็นไซม์ T_4 ligase 0.03 U ทำปฏิกิริยาใน 1X ligation buffer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยใช้แบคทีเรีย E. *coli* สายพันธุ์ Top10 F′ ในรูป competent cell โดยวิธี heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาทีแล้ววางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และเขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาเกลี่ย บนอาหารแข็ง LB ที่มี ampicilin 80 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวแบบสุ่มเลือกมาจำนวน 20 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่มี ที่มี ampicilin 80 µg/ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่งโมง นำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 4.1

นำดีเอ็นเอจากโคลนที่ตรวจสอบด้วยวิธี PCR แล้วมีชิ้นยีน Hb-Pel และพลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences, Sweden) ที่สกัดโดยวิธีการตามข้อ 4.1 มาย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI โดยใช้ดีเอ็นเอ 10 ไมโครกรัม, 1X buffer D และเอนไซม์ *Bam*HI 0.5 ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจสอบการย่อยของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI แล้ว ด้วย 3 M sodium acetate pH 5.3 ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายทั้งหมด และ absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายทั้งหมด บ่มเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol หมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำให้ตะกอนแห้ง และนำไปย่อยอีกครั้งด้วยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 0.5 U ใน 1X buffer H ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจสอบการย่อยของเอ็นไซม์ตัด

จำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis นำยีน Hb-Pel และ pGEX-4T-1 ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI และ *Eco*RI มาแยกบน 1.2% agarose gel electrophoresis และตัดเจลบริเวณที่มีแถบยีนอยู่ ทำการแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยการใช้ Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) โดยเติม Membrane Binding Solution 1 มิลลิลิตร ต่อเจล 1 มิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำเจลที่ละลายแล้วเติมลงใน SV mini column บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้าง SV mini column ด้วย Membrane Wash Solution ปริมาตร 500 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้าย SV mini column ไปยังหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้น้ำปราศจาก Nuclease ชะส่วนส่วนกลางของ SV mini column บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอของยีน Hb-Pel 300 นาโนกรัมเชื่อมเข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 ปริมาตร 100 นาโนกรัม โดยใช้เอนไซม์ T_4 ligase 0.03 U ทำปฏิกิริยาใน 1X ligation buffer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำดีเอ็นเอลูกผสมบ่มกับ E. *coli* สายพันธุ์ BL 21 ในรูป competent cell เป็นเวลา 30 นาที โดยวิธี heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาทีแล้ววางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และเขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่งโมง แล้วนำมาเกลี่ย บนอาหารแข็ง LB ที่มี ampicilin 100 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวแบบสุ่มเลือกมาจำนวน 20 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่มี ที่มี ampicilin 80 µg/ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่งโมง นำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 4.1 สารละลายดีเอ็นเอที่ได้นำมาตรวจสอบยีน Pectate lyase โดยทำ PCR

8. การเตรียมโปรตีน Pectate lyase จากดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-Hb-Pel ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

8.1 การกระตุ้นการสร้างโปรตีนในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

นำดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-Hb-Pel ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี ampicilin ความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรีย 10 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่ม

เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เมื่อเชื้อมีค่า OD_{600} ประมาณ 0.4-0.6 จึงกระตุ้นแบคทีเรียให้สร้างโปรตีนด้วยสารละลาย 0.1 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyronositol) มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แยกเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์ที่ได้บนน้ำแข็ง หลังจากนั้นสกัดโปรตีน โดยนำเซลล์แบคทีเรียละลายในสารละลาย lysis buffer (50 mM Na_2PO_4 pH 8.0, 300 mM NaCl และ 10 mM Tris-HCl pH 8.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 200-300 วัตต์ จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที โดยทำบนน้ำแข็งตลอดเวลา นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสและตะกอนเซลล์แยกออกจากกันที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส การหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Lowry และการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

8.2 การหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Lowry (Lowry และคณะ, 1951)

เตรียมสารละลาย BSA (Bovine Serum Albumin) ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้นเป็น 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเตรียมสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่จะวัดโดยทำการเจือจางเป็น 1:1000 จากโปรตีนเริ่มต้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย A ประกอบด้วย Copper tartrate carbonate solution (0.1% (w/v) $CuSO_4.5H_20$, 2% (w/v) $NaCO_3$, 1%(w/v) Sodium tartrate); 5%(w/v) SDS และ 0.8 M NaOH อัตราส่วน 1:2:1 ตามลำดับ หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย B ประกอบด้วย 2 N Folin ciocateus' reagent และน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:5 ตามลำดับ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรและเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานของ BSA

8.3 **การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบมีเอสดีเอส (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970)**

นำสารละลายโปรตีนตัวอย่างผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 10% (v/v) β-mercaptoethanol และ 0.1% (w/v) Bromophenol blue) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาทีแล้ววางบนน้ำแข็งทันที และเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล 12% ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 1 โดยเทส่วนผสมของชั้น separating gel ระหว่างแผ่นกระจกปริมาตร 3 ใน 4 ของความสูงของกระจก ใช้น้ำกลั่นเติมบนผิวหน้าเจลเพื่อปรับผิวหน้าเจลให้เรียบ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีเพื่อให้เกิดการโพลีเมอร์ไรซ์อย่างสมบูรณ์ เทน้ำกลั่นทิ้งและซับให้แห้ง เทส่วนผสมของชั้น stacking gel ลงจนเต็ม เสียบหวีลงในแผ่นกระจกให้ไม่มีฟองอากาศ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ดึงหวีออก นำเจลประกอบกับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส เติมสารละลายโปรตีนตัวอย่างลงในแต่ละช่องของเจล ใช้ Tris-glycine buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glycine และ 0.1% (w/v) SDS) สำหรับทำอิล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเจลไปย้อมด้วยสี Brilliant Coomassie Blue (0.25% (w/v) Brilliant Coomassie Blue R-250, 50% (v/v) methanol และ 7.5% (v/v) acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินออกด้วย destain 1 (50%(v/v) methanol และ 7% (v/v) acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ destain 2 (5% (v/v) methanol และ 7.5% (v/v) acetic acid) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของโพลิอะคริลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

ส่วนประกอบ	Separating gel 12% (ml)	Stacking gel 4%(ml)
30%Acrylamide-bisacrylamide	2.0	0.5
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.3	-
1.0 M Tris-HCl pH 6.8	-	0.38
10% SDS	0.05	0.03
10% APS	0.05	0.03
TEMED	0.002	0.003
Distill water	1.7	2.1
Total	5	3

9. **การศึกษาสมบัติของโปรตีนลูกผสม** GST-Hb-Pel (Glutathione-S-transferase-Pectate lyase)

9.1 **การเตรียมและการสร้าง** crude enzyme pectate lyase **จากดีเอ็นเอลูกผสม** pGEX-Hb-Pel **ในแบคทีเรีย** *E. coli* **สายพันธุ์** BL21

นำดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-Hb-Pel ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertiani (LB) ที่มี ampicilin ความเข้มข้น 100 µg/ml ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 8.1 หลังจากกระตุ้นแบคทีเรียให้สร้างโปรตีนด้วยสารละลาย 0.1 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyronositol) บ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แยกเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์ที่ได้บนน้ำแข็ง หลังจากนั้นสกัดโปรตีน โดยนำเซลล์แบคทีเรียละลายในสารละลาย lysis buffer (50 mM Na_2PO_4 pH 8.0, 300 mM NaCl และ 10 mM Tris-HCl pH 8.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารลาย lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 200-300 วัตต์ จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที โดยทำบนน้ำแข็งตลอดเวลา นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสและตะกอนเซลล์แยกออกจากกัน เก็บที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

9.2 **การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์**

9.2.1 **การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์**

นำโปรตีนส่วนใสที่ได้จากข้อ 9.1 ความเข้มข้น 1 mg/ µl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทดสอบหาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ Pectate lyase ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ โดยสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาปริมาตร 900 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 0.5% polygalacturonic acid , 120 mM Tris HCl pH 8.5 และ 0.3 mM $CaCl_2$ ผสมโปรตีนกับสารอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 232 นาโนเมตร หลังจากนั้นเปลี่ยนระดับพีเอชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ดังต่อไปนี้คือ citrate buffer (pH 3-4), acetate buffer (pH 4-6), phosphate buffer (pH 6-8) และ Tris-HCl buffer (pH 8-9) และ glycine buffer (pH 9-12)

9.2.2 **การศึกษาความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์**

เลือกระดับ pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 9.1 มาทำการทดสอบหาความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ที่ 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1 และ 2 mM $CaCl_2$

10. **การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค** Real time PCR

นำ total RNA 4 ไมโครกรัมที่สกัดจากน้ำยางของต้นยางพาราที่มีระยะการกรีดแตกต่างกัน คือ 1 วัน, 3 วัน, 1 สัปดาห์, 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์มาทำ Reverse Transcription (RT) โดยใช้ Random primer 100 นาโนกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และบ่มบนน้ำแข็งอีก 5 นาที เติมสารสำหรับทำ RT ประกอบด้วย 0.6 mM dNTP, RT buffer, 0.2 U AMV และน้ำปราศจาก RNase ปริมาตรรวมเป็น 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาทำ Real-Time PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย iQTMSYBR®Green Supermix (BIO-RAD, USA) 25 ไมโครลิตร, 20 pmol ของแต่ละ primer (PL-F2: 5′ ATGGCTCAACATATTGGCTTGC 3′, PL-R nest :5′CCCTGAAATGGTAATATCGGGCT3′), 300 นาโนกรัมของ cDNA และน้ำปราศจากไอออน (DI water) โดยใช้ยีน 18S rRNA QuantumRNA™ 18S Internal Standards (Ambion, USA) เป็น internal standard ด้วยเครื่อง real time COBAS Tag Man 48 (Roche, USA) และ fluorescence detection Mx3000P™ (Stratagene, La Jolla, CA) โดยใช้สภาวะ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ, อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 40 รอบ กราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่ใช้หาปริมาณยีน Hb-Pel และ 18S rRNA เตรียมจากการทำการเจือจางยีน Hb-Pel และ 18S rRNA ที่ทำบริสุทธิ์แล้วปริมาณยีนที่ใช้อยู่ในช่วง $1x10^3$ ถึง $1x10^7$ copies copy number ของแต่ละผลผลิต PCR คำนวณจากน้ำหนักมวลโมเลกุลเปลี่ยนเป็น copy number โดย Avogadro's number