บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 สารเคมี

2.1.1.1 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	Merck
Acetic acid	Merck
Ammonium acetate	Merck
Acrylamide	Merck
Bisacrylamide(N,Nmethylenediacrylamide)	Merck
Bovine serum albumin	Merck
Calcium chloride	Merck
Coomassie Brilliant Blue R-250	Merck
Chloroform	Merck
Ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA)	Fluka
Glucose	Carrlo erba
Glycerol	Carrlo erba
Phenol reagent	Merck
Formaldehyde	Merck
Isoamyl alcohol	Difco
Isopropanol	Merck

2.1.1.2 สารเคมี เกรดอณูวิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Agarose	Sigma
Ampicillin	Sigma
Diethyl pyrocabonate(DEPC)	Sigma
Dithiothreitol	Sigma
100 bp DNA ladder	Promega
Guanidine isothiocyanate	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	Sigma
Ethidium bromide	Sigma
L-leucine	Sigma
^{14}C-leucine	NEN

2.1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.2.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย *E.coli* (Top10F′) (Invitrogen, The Netherlands) มีลักษณะ Genotype: F′(*pro* AB, *lacI*^{q},lacZΔM15,Tn10(Tet^{R})*mcr*A,Δ(mrr-hsdRMS-*mcr*BC),ϕ80*lac*ZΔM15,Δ*lac*X74,*deo*R,*rec*A1,araΔ139,Δ(ara-lue) 7697,galK,rpsL(Str^{R}),end A1,*nup*Gλ

แบคทีเรีย *E.coli* XL1-Blue (Invitrogen, The Netherlands) มีลักษณะ Genotype: *endA*1, *gyrA*96, *hsdR*17, *lac*$^{-}$, *recA*1, *relA*1, *supE*44, *thi*-1,[F'*lacI*^{q}Z ΔM15,*proAB*,Tn*10*]

2.1.3 อณูชีวโมเลกุล (Molecular molecule)

2.1.3.1 พลาสมิดเวคเตอร์

pGEM-T easy (Promega, Madison, USA)

2.1.3.2 Oligonucleotide primer (Clontech, USA)

2.1.3.2.1 primer เตรียม First-Strand cDNA

Smart III Oligonucleotide (5′-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTG GCCATTATGGCCGGG-3′)

CDS III/ 3' primer (5′-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)$_{30}$N$_{-1}$N-3′), N = A,G,C or T.,N$_{-1}$ = A,G or C

2.1.3.2.2 primer เตรียม cDNA โดยใช้ LD –PCR

5′PCR Primer (5′-AAGCAGTGGTATCAACGCAGACT-3′)

3′PCRPrimer (5′-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)$_{30}$ N$_{-1}$N-3′), N = A, G, C or T.,N$_{-1}$ = A, G or C

2.1.3.2.3 primer สำหรับเตรียม probe

G12 (5′GGTAATCGTGACCTCTAC3′)

OligodT (Promega, Madison, USA)

2.2 อุปกรณ์

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต รุ่น Ultraspec III (Pharmacia)

เครื่องสังเคราะห์ DNA Polymerase Chain Reaction (hybrid), (Gene Amp 2400)

เครื่องตรวจสอบ DNA Agarose gel electrophoresis (BIO-RAD)

กล้องถ่ายรูป Polaroid (Fotodyn)

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น Junior 2000 C (Precisa)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Satorius)

เครื่องวัด pH รุ่น CyberScan (Eutech Cybernetics)

เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น RC 5B (Sorvall)

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (BIO-RAD)

ตู้ปราศจากเชื้อ Laminar flow (Nuaire)

ตู้บ่มเชื้อ 37°C (memmert)

หม้อนึ่งความดัน (Hirayama)

เครื่องเขย่าความเร็วต่ำ (Stovall)

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Labline)

เครื่อง Semi-Dry electrophoretic Transfer cell (BIO-RAD)

เครื่องวัดปริมาณสารกัมมันตรังสีรุ่น LS 5000 TD (Beckman)

เครื่อง ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer)

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การโคลนฮอร์โมนที่ยับยั้งรังไข่กุ้งแชบ๊วย

2.3.1.1 การเตรียม cDNA library

2.3.1.1.1 การสกัด RNA (Promega, Madison, USA)

ตัวอย่างกุ้งแชบ๊วยที่มีชีวิตซื้อจากชาวประมงหมู่บ้านเก้าเส้ง อ.เมือง จ.สงขลา ซึ่งจับมาจากทะเลฝั่งอ่าวไทย ขนาดตัวประมาณ 20 กรัม จำนวน 20 ตัว เมื่อทำให้กุ้งสลบโดยการแช่ในน้ำแข็ง แล้วจึงตัดก้านตาลงบน plate ที่มี 0.8% NaCl ที่เย็นจัดซึ่งวางอยู่บนน้ำแข็ง ตัดส่วนลูกตาออก แล้วดึงส่วนเส้นประสาทที่ก้านตาออกมาแล้วบดในไนโตรเจนเหลว เมื่อละเอียดแล้วจึงใส่ Denaturing Solution (25 g guanidine-thiocyanate, 33 ml CSB buffer (42 mM sodium citrate, 0.83% N-lauryl-sarcosine, 0.2 mM β-mercaptoethanol) จำนวน 1.2 ml ต่อเนื้อเยื่อ 1 g จากนั้นใส่ 2 M Sodium acetate pH 4.0 จำนวน 0.1 เท่า ผสมให้เข้ากัน ใส่ Phenol:Chloroform:Isoamyl (25:24:1) จำนวนเท่าตัว ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 15 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แยกส่วนใสใส่ลงในหลอดซึ่งปราศจาก RNAase จากนั้นตกตะกอน RNA ด้วย Isopropanol เท่าตัว แช่ที่ –20°C อย่างน้อย 30 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ที่เย็นจัด จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที 4°C เท 70% ethanol ทิ้ง แล้วทำแห้งตะกอนเป็นเวลา 15-20 นาที แล้วจึงเติมน้ำกลั่น (RNAse free) จำนวน 50 µl

2.3.1.1.2 การเตรียม Complementary DNA (cDNA)

(Clontech, California, USA)

นำ RNA จำนวน 15.84 µg/µl มาทำ First-Strand cDNA โดยเติม Smart III Oligonucleotide 1 µl, CDS III/ 3' primer 1 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเบาๆ เป็นเวลา 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาทีจากนั้นเติม 5x first-strand buffer 2.0 µl, 20mM DTT 1.0 µl, 10mM dNTP mix 1.0 µl, MMLV reverse transcriptase (20 unit/µl) 1.0 µl ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงเบาๆเป็นเวลา 15 วินาที

จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง first-strand cDNA ที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20°C

นำ first-strand cDNA ที่ได้จำนวน 2 µl เติม deionized water 80 µl, 10x advantage 2 PCR buffer 10 µl, 50x dNTP mix 2 µl, 5′PCR primer 2 µl, CDSIII/3′PCR primer 2 µl, 50x advantage 2 polymerase mix 2 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงเบาๆเป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นทำ PCR ด้วยเครื่อง Gene Amp 2400 โดยบ่มที่ 95°C 5 นาที โดยใช้สภาวะในการทำ PCR ดังนี้

95°C	20 sec	1 cycles
95°C	5 sec	20 cycles
68°C	6 min	

2.3.1.1.3 การนำ cDNA เข้าสู่ phage (Clontech, California, USA)

นำ cDNA ที่เตรียมได้จำนวน 50 µl (2-3 µg) มาใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 0.5 ml (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) จากนั้นเติมเอนไซม์ proteinase K (20 µg/µl) จำนวน 2 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วต่ำเพื่อส่วนผสมทั้งหมดตกลงก้นหลอด นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น จำนวน 50 µl เติม phenol:chloroform:isoamyl จำนวน 100 µl ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1-2 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้น แยกส่วนบนออกมาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 0.5 ml ที่สะอาด เติม 3 M sodium acetate pH 4.8 จำนวน 10 µl, glycogen (20 µg/µl) จำนวน 1.3 µl และ 95% ethanol จำนวน 200 µl จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนบนออกจากตะกอนแล้วล้างตะกอนด้วย 80% ethanol แล้วทำแห้งตะกอนด้วยเครื่องดูดอากาศ ละลายตะกอนกลับด้วยน้ำจำนวน 79 µl

สารละลายหลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K จำนวน 79 µl จะนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sfi* I โดยเติม 10X *Sfi* I buffer จำนวน 10 µl, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sfi* I จำนวน 10 µl และ 100XBSA จำนวน 1 µl ผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันแล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติม 1% xylene cyanol dye จำนวน 2 µl เมื่อเขย่าให้เข้ากันแล้วจึงนำมาคัดเลือกขนาดของ cDNA โดยใช้ CHROMA SPIN 400 ซึ่งมีขนาด 1 ml อัตราการชะประมาณ 40 µl/นาที

ล้างคอลัมน์ด้วยคอลัมน์บัฟเฟอร์ (0.1mM EDTA, pH 8) จำนวน 700 µl ปล่อยให้บัฟเฟอร์ ไหลออก เมื่อบัฟเฟอร์หยุดการไหลจึงเติมสารละลาย cDNA ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Sfi* I จำนวน 100 µl จากนั้นปล่อยให้ตัวอย่างไหลเข้าไปในเนื้อเจล นำคอลัมน์บัฟเฟอร์จำนวน 100 µl มาล้างหลอดที่ใส่สารละลาย cDNA ข้างต้น แล้วเติมลงบนผิวเจล ปล่อยให้บัฟเฟอร์ไหลออกจากคอลัมน์ซึ่งจะเห็นสีอยู่ในคอลัมน์ จากนั้นเติมคอลัมน์บัฟเฟอร์ จำนวน 600 µl ลงในคอลัมน์ แล้วเริ่มเก็บหลอดแรกที่หยดลงมา โดยเก็บ 1 หยดต่อ 1 หลอด เก็บจำนวน 16 หลอด จากนั้นนำแต่ละหลอดที่เก็บได้จำนวน 5 µl เติมน้ำจำนวน 995 µl นำมาวัดความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ความยาวคลื่น 260 nm แล้วเลือกเอา 3 หลอด ที่มีปริมาณ DNA สูงที่สุดมารวมกัน แล้วตกตะกอน DNA โดยเติม 3 M sodium acetate pH 4.8 จำนวน 0.1 เท่า glycogen (20 µg/µl) จำนวน 1.3 µl และ 95% ethanol (-20°C) จำนวน 2.5 เท่า นำมาบ่มที่ –20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือ 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอน cDNA ตกที่ 15,000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้งแล้วทำให้ตะกอนแห้งเป็นเวลา 10 นาทีด้วยเครื่องดูดอากาศ เมื่อตะกอนแห้งแล้วเติม deionized water จำนวน 7 µl นำมาเชื่อมกับเวกเตอร์ λ TriplEX2 โดยการนำ cDNA จำนวน 1.5 µl, เวกเตอร์ λ TriplEX2 (500 ng/µl) จำนวน 1 µl, 10X ligation buffer จำนวน 0.5 µl, 10mM ATP จำนวน 0.5 µl T4 DNA ligase (30u/µl) จำนวน 0.5 µl ,deionized water จำนวน 1 µl ผสมสารดังกล่าวให้เข้ากัน นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเตรียมให้เป็น phage โดยใช้ Packagene Lambda DNA Packaging System (Promega, Madison,USA) ซึ่งเก็บไว้ที่ –70 °C

จำนวน 50 µl นำมาวางบนน้ำแข็งเพื่อให้ละลาย แล้วเติม cDNA ที่เชื่อมกับเวกเตอร์ λ TriplEX2 แล้วข้างต้นจำนวน 5 µl นำมาบ่มที่ 22°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเติม phage buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 10mM $MgSO_4$) จำนวน 445 µl และเติม chloroform จำนวน 25 µl ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดไปมา แล้วจึงปล่อยให้ chloroform ตกมาที่ก้นหลอด จากนั้นดูดส่วนบนเก็บไว้ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติม gelatin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในหลอดเป็น 0.01% จากนั้นเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในหลอดเป็น 7% v/v แบ่งใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 25 µl แล้วเก็บ phage library ที่ –70°C จนกว่าจะนำมาทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.3.1.1.4 การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* XL1-Blue

เขี่ยเซลล์ *E.coli* XL1-Blue จาก stock –70°C ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB/tet plates (ภาคผนวก ก) นำมาบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงบนอาหาร LB/$MgSO_4$/maltose (ภาคผนวก ก) จำนวน 15 ml นำมาเขย่าที่ความเร็ว 140 rpm ที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หรือได้ OD_{600} ประมาณ 2.0 จากนั้นนำเซลล์มาปั่นที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนบนทิ้ง แล้วละลายตะกอนกลับด้วย 10 mM $MgSO_4$ จำนวน 7.5 ml เซลล์ที่ได้จะนำไปใช้ในข้อ 2.3.1.1.5 ต่อไป และสามารถเก็บเซลล์ที่ 4°C ได้นาน 1 สัปดาห์

2.3.1.1.5 การหาปริมาณ phage บน LB plates

นำ phage library จาก –70°C มาเจือจางด้วย phage buffer ในอัตรา 1:100, 1:1,000, 1:10,000 จากนั้นเติม phage ที่เจือจางแล้วข้างต้น จำนวน 1 µl ลงในเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.1.4 จำนวน 200 µl นำมาบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 10-15 นาที ระหว่างนี้ หลอมละลาย LB/$MgSO_4$ top agar (ภาคผนวก ก) และบ่มไว้ที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 60°C จนกว่าจะนำมาใช้ และเมื่อบ่มเซลล์ครบเวลา 10-15 นาที แล้วจึงนำเซลล์มาเติมลงใน LB/$MgSO_4$ top agar ซึ่งเตรียมไว้ข้างต้น ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบนจานเพาะเชื้อ (ขนาด 90mm) ซึ่งมี LB/$MgSO_4$ จากนั้นขยับจานเพาะเชื้อไปมาเพื่อให้ top agar กระจายทั่วทั้งจานเพาะเชื้อ แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ

10 นาที จึงนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 6-18 ชั่วโมง แล้วจึงนับ plague ซึ่ง plague ที่นับได้จะนำมาคำนวณหาปริมาณของ phage ซึ่งมีหน่วยเป็น plague forming unit (pfu/ml) ซึ่งสามารถคำนวณได้ตามสูตร ดังนี้

$$\text{pfu/ml} = \frac{\text{จำนวนของ plaques ที่นับได้ X ค่าการเจือจาง X } 10^3 \mu\text{l/ml}}{\text{จำนวน µl ของ phage เจือจางที่ใช้}}$$

2.3.1.1.6 การเพิ่มปริมาณของ library

เมื่อคำนวณจำนวน pfu/ml ของ library ได้แล้วตามการทดลองข้อ 2.3.1.1.5 จะใช้ phage จาก library โดยปริมาณที่ใช้จะทำให้เกิด plagues จำนวน 6 -7X 10^4 plagues ต่อความกว้างของจานเพาะเชื้อ 150 mm (จานเพาะเชื้อขนาดอื่นจะลดปริมาณลงตามส่วน) การเพิ่มปริมาณของ library มีวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1.5 โดยเปลี่ยนจาก phage เจือจาง เป็น phage library ตามปริมาณที่คำนวณได้ข้างต้น หลังจากบ่มจานเพาะเชื้อ ประมาณ 6 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งเห็น plague เล็กๆ ติดๆกันจำนวนมากมาย จากนั้นเติม 1X Lambda dilution buffer (ภาคผนวก ก) จำนวน 12 ml (จานเพาะเชื้อขนาดอื่นจะลดปริมาณลงตามส่วน) แล้วบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเขย่าที่ความเร็วต่ำ ประมาณ 50 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน 1X Lambda dilution buffer จะมี phage จำนวนมากหลุดออกมา เก็บส่วนดังกล่าวในหลอด polypropylene ขนาด 50 ml ที่ฆ่าเชื้อแล้วเติม chloroform จำนวน 10 ml เขย่า (vortex) เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บส่วนบนในหลอดใหม่ นำมาหาปริมาณของ phage ที่เพิ่มจำนวนได้ ตามวิธีการในข้อ 2.3.1.1.5 phages ที่เหลือเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในหลอดเป็น 7% v/v แบ่งใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 1 ml เก็บที่ –70°C ได้นาน 1 ปี

2.3.1.2 การเตรียม ตัวตรวจจับ (Probe)

2.3.1.2.1 การเพิ่มจำนวนตัวตรวจจับโดย Polymerase Chain Reaction (PCR)

cDNA ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.1.2 นำมาทำ PCR โดยใช้ Primer G12 (5'GGTAATCGTGACCTCTAC3') ซึ่งเป็นส่วนที่มีเหมือนกันเสมอในโปรตีนกลุ่ม CHH/MIH/GIH family กับ Primer oligodT ซึ่งจับกับ poly A ทางด้านปลาย 3' โดยมีส่วนผสมในการทำ PCR ดังนี้

10Xbuffer	2.5 µl
25mM $MgCl_2$	2.5 µl
10mM dNTP	1 µl
primer (G12) 25 pmol	1 µl
primer (oligo dT)	1 µl
H_2O	15 µl
Taq DNA polymerase 1:20	1 µl
cDNA	1 µl

ผสมสารดังกล่าวข้างต้น ให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วต่ำ เพื่อให้สารตกลงก้นหลอด จากนั้นนำมาทำ PCR ด้วยเครื่อง PCR (HYBAID) โดยใช้สภาวะในการทำ PCR ดังนี้

ตารางที่ 2.1 สภาวะในการทำ PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Hot start	94 °C	3 นาที	1
2. Denaturation	94 °C	1 นาที	20
3. Annealing	55 °C	1 นาที	20
4. Extension	72 °C	2 นาที	20
5. Final Extension	72 °C	10 นาที	1

PCR product ที่ได้ แบ่งมาทำ electrophoresis บน 1.5 % agarose gel จำนวน 5 µl ที่เหลือ 20 µl นำมาตกตะกอนโดยการเติม 2 M sodium acetate pH 5.2 จำนวน 2 µl และ absolute ethanol จำนวน 2.5 เท่า บ่มที่ –70°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 15,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้น ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 % ethanol จำนวน 100 µl นำมาปั่นที่ 15,000 g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากเท 70% ethanol ทิ้ง แล้วทำตะกอนให้แห้งเป็นเวลาประมาณ10 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 10 µl เชื่อม DNA ที่ได้กับ เวกเตอร์ pGEM T easy โดยใช้เวกเตอร์ 0.5 µl, PCR product 7.5 µl, 10Xbuffer 1 µl, เอนไซม์ lygase 1 µl ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 0.5 µl ซึ่งวางอยู่บนน้ำแข็ง ผสมสารให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วต่ำเพื่อให้สารผสมตกลงที่ก้นหลอด แล้ววางบนน้ำแข็งเช่นเดิม นำมาบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง เวกเตอร์ที่เชื่อมต่อกับ DNA แล้วจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ *E.coli* (Top10F´) เพื่อเพิ่มจำนวน

2.3.1.2.2 การนำ พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ (Hanahan, 1983)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* (Top10F´) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria Bertaini) (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ลงในอาหารเหลว LB 100 ml เขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือจนมีความขุ่นเมื่อวัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 nm ได้ค่า 0.5-0.6 ถ่ายเชื้อลงในหลอดปั่นแล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 g นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำตะกอนมาละลายด้วย 0.1 M $CaCl_2$ (ที่เย็นจัด) ตั้งทิ้งไว้ในที่เย็น 30 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 4,000 g นาน 10 นาที ละลายตะกอนด้วย 0.1 M $CaCl_2$ (ที่เย็นจัด) จำนวน 2 ml แบ่งลงในหลอด microcentrifuge หลอดละ 200 µl เติม ligation reaction จำนวน 10 µl ลงในเซลล์ ทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ระหว่างนี้เปิดอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42° C เมื่อครบ 30 นาที นำเซลล์มาบ่มที่ 42°C เป็นเวลา 90 วินาทีแล้วแช่น้ำแข็งทันที บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (37°C) จำนวน 800 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมา

เกลี่ยบนอาหารแข็งซึ่งมียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 80 µg/ml และ X-gal:IPTG (40 µl ต่อ 4 µl) นำมาบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่เป็นสีขาว มาเลี้ยงในอาหารเหลวจำนวน 1 ml ซึ่งมีแอมพิซิลิน 80 µg /ml บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิด

2.3.1.2.3 การสกัด พลาสมิด (Birnboim และ Doly, 1979)

นำอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อครบ 16 ชั่วโมงแล้วมาบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้เซลล์ตก แล้วแยกอาหารเหลวออก เติมสารละลาย I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA) จำนวน 100 µl นำไปเขย่าให้ตะกอนละลายด้วยเครื่อง vortex mixer เติมสารละลาย II (0.2 N NaOH, 1% SDS) จำนวน 200 µl ผสมให้เข้ากันเบาๆแล้วบ่มในน้ำแข็งนาน 5 นาที เติมสารละลาย III (5 M potassum acetate จำนวน 60 ml , glacial actic acid จำนวน 11.8 ml, น้ำกลั่น จำนวน 28.5 ml) จำนวน 300 µl บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็ว 15,000 g เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสลงในหลอดใหม่ เติม isopropanol 0.6 เท่า ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อยครึ่งชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นที่ 15,000 g เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายออกโดยไม่ให้รบกวนตะกอน ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol จำนวน 100 µl ปั่นที่ความเร็ว 15,000 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วเท 70% ethanol ทิ้ง แล้วคว่ำหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าพลาสมิดจะแห้ง จากนั้นละลายพลาสมิดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 20 µl นำพลาสมิดแต่ละตัวที่สกัดได้มาทำ electrophoresis บน 1.5 % agarose gel เพื่อเลือกโคลนที่มีชิ้นขนาดประมาณ 300 bp ซึ่งเป็นขนาดที่คาดว่าจะเป็นส่วนของยีน GIH มาหาลำดับเบสต่อไป

2.3.1.2.4 การหาลำดับเบส

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนผสมในการทำ PCR เพื่อหาลำดับเบส

สารเคมี	ปริมาณ
Terminator Read Reaction Mix (Big Dye Terminator)	8 µl
Template 500 ng	1 µl
Primer (Sp6 or T3) 3.2 pmol	1 µl
Deionized water	10 µl
Total volume	20 µl

ผสมสารเคมีข้างต้นให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วต่ำเพื่อให้สารตกอยู่ก้นหลอด จากนั้นนำมาทำ PCR ด้วยเครื่อง Gene Amp PCR 2400 โดยใช้สภาวะในการทำ PCR ดังนี้

ตารางที่ 2.3 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อหาลำดับเบส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Denaturation	94°C	10 วินาที	25
2. Annealing	50°C	5 วินาที	25
3. Extension	60°C	4 นาที	25

จากนั้นทำความสะอาด PCR product ที่ได้ด้วยการตกตะกอนด้วย Isopropanol โดยเติม PCR product ที่ได้ ลงในหลอดที่มี 70 % Isopropanol จำนวน 80 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาปั่นที่ 15,000 g เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นค่อยๆดูดสารละลายออกให้หมด เติม 70 % Isopropanol จำนวน 250 µl เขย่า เบาๆจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วค่อยๆดูดสารละลายออกให้หมด ทำให้แห้ง เก็บไว้ใน –20°C จากนั้นเตรียมเจลโดยทำความสะอาด

กระจกโดยเช็ดด้วย Methanol แล้วประกอบแผ่นกระจก และเตรียม 4.8 % Acrylamide gel ซึ่งประกอบด้วย Acrylamide stock (19:1,BIO-RAD) จำนวน 4.8 ml Urea จำนวน 14.4 กรัม คนจนกระทั่ง Urea ละลาย อาจให้ความร้อนด้วยก็ได้ จากนั้นเติม 4 ml 10XTBE (5.4 g Tris, 2.8 g Boric Acid ,0.4 g Na_2EDTA ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml ด้วย deionized water pH จะอยู่ในช่วง 8.2 และ 8.3) ปรับปริมาตรให้ได้ 40 ml ด้วย deionized water แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง เติม 10% ammonium persulphate 200 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปลดความดันเพื่อดึงอากาศที่อยู่ในสารละลายออก ลดการเกิดฟองในแผ่นเจล จากนั้นเติม TEMED (N,N,N´,N´- tetramethylethylenediamine) 25 µl เขย่าให้เข้ากันเบาๆ อย่าให้เกิดฟอง เทสารละลายที่ได้ระหว่างแผ่นกระจกที่ประกอบไว้แล้ว สารละลายจะค่อยๆแทรกผ่านที่ว่างระหว่างกระจกจนทั่วต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมงก่อนใช้งาน ในระหว่างนี้นำ PCR product ที่ทำความสะอาดและแห้งแล้วมาผสมกับ loading buffer (Deionized formamide 5 ส่วน 25 mM EDTA pH 8 ซึ่งมี Blue dextran (50 mg/ml) 1 ส่วน) โดยเติม Loading buffer 4-6 µl แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วต่ำเพื่อให้สารตกอยู่ก้นหลอด นำมาต้มในน้ำอุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 นาที วางบนน้ำแข็งจนกระทั่งหยอดเจล ระหว่างนี้ นำแผ่นกระจกซึ่งมี acrylamide ที่แข็งตัวดีแล้วมาประกอบเข้ากับเครื่อง ABI PRISM 377 DNA Sequencer เท 1X TBE บัฟเฟอร์ แล้วหยอด ตัวอย่างหลุมละ 0.5-1 µl แล้วเดินเครื่องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง จึงอ่านผล

2.3.1.2.5 การติดฉลาก probe (AlkPhos direct labelling kit, Amersham Buckinghamshire, England)

พลาสมิดที่คัดเลือกได้จากการอ่านผล Sequence จะนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I โดยมีส่วนประกอบในปฏิกิริยาการย่อยดังนี้

ตารางที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบในปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ (µl)
1.DNA (0.4 µg/µl)	20
2. บัฟเฟอร์ *Eco*R I (10X)	5
3. เอนไซม์ *Eco*R I(1unit /µl)	1
4. น้ำกลั่น	24
ปริมาตรรวม	50
ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง	

จากนั้นเติม RNAse (5 mg/ml) 1 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำมาแยกโดยใช้ 1.5 % agarose gel electrophoresis โดยให้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 100 V ย้อมเจลใน EtBr นำแผ่นเจลมาส่องดูผ่านแสง UV จะเห็นแถบที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*R I แยกออกมา ตัดเจลบริเวณนั้นมาสกัดเอา DNA ออกมา เติม 3 M sodium acetate pH 5.2 จำนวน 0.1 เท่าของปริมาตร DNA แล้วเติม absolute ethanol 2.5 เท่า บ่มที่ –70° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นด้วยความเร็ว 15,000 g เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol จำนวน 100 µl นำมาปั่นที่ความเร็ว 15,000 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วคว่ำหลอดทิ้งไว้จน DNA แห้ง หรือทำให้ DNA แห้งด้วยเครื่องดูดอากาศ เป็นเวลา 10 นาที ละลาย DNA ด้วยน้ำกลั่น 30 µl แล้ววัดความเข้มข้นของ DNA โดยนำ DNA ที่ได้มา 1 µl ละลายในน้ำกลั่น 999 µl แล้ววัด OD_{260} นำมาคำนวณหาปริมาณ โดย 1 OD_{260} เท่ากับ DNA 50 µg จากนั้นเจือจาง DNA ให้มีความเข้มข้น 10 ng/µl จำนวน 10 µl นำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีแล้วแช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม reaction บัฟเฟอร์ (Amersham, Buckinghamshire, England) จำนวน 10 µl ลงในสารละลาย DNA เจือจางที่แช่ในน้ำแข็ง ผสมให้เข้ากันแล้วเติม labelling reagent (Amersham,

Buckinghamshire, England) จำนวน 2 µl ผสมให้เข้ากันแล้วเติม crosslinker solution (Amersham, Buckinghamshire, England) ที่เจือจาง (1:5) จำนวน 10 µl ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วต่ำเพื่อให้สารละลายตกอยู่ก้นหลอด นำมาบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที สามารถนำ probe มาใช้ได้ในทันที หรือสามารถเก็บไว้บนน้ำแข็งได้นาน 2 ชั่วโมง หรืออาจจะเก็บใน 50 % glycerol ที่ –15 ถึง – 30°C ได้นานถึง 6 เดือน

2.3.1.3 การค้นหา DNA เป้าหมายจาก phage library

จากการหาปริมาณ ข่อง phage ใน library ในข้อ 2.3.1.1.6 นำ มาเตรียม plaque ประมาณ 3000 plaques ต่อจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 mm โดยวิธีที่กล่าวแล้วใน 2.3.1.1.5 จากนั้นนำจานเพาะเชื้อดังกล่าวมาบ่มที่ 4°C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็นวงกลมขนาดเล็กกว่าจานเพาะเชื้อเล็กน้อย จากนั้นทำสัญลักษณ์ลงบนแผ่นเมมเบรน แล้วนำแผ่นเมมเบรนมาวางบนจานเพาะเชื้อที่เต็มไปด้วย plaque โดยวางด้านที่มีสัญลักษณ์ไว้ด้านบน จากนั้นทำสัญลักษณ์ที่จานเพาะเชื้อให้ตรงกับสัญลักษณ์บนเมมเบรน ใช้ปากคีบปลายแบน (forcep) คีบมุมของเมมเบรนแล้วดึงขึ้น จากนั้นวางเมมเบรน (โดยให้ด้านที่มี plaque อยู่ด้านบน) บนกระดาษ Whatman No.3 ที่ชุ่มด้วยสารละลาย denaturation (0.5 M NaOH,1.5 M NaCl) เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายมาวางบนกระดาษ whatman No.3 ที่ชุ่มด้วยสารละลาย neutralization (0.5 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 7.4) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้ายมาวางบนกระดาษ Whatman No.3 ที่ชุ่มด้วยสารละลาย 2X SSC เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำเมมเบรนมาทำ UV crosslink โดยใช้ Spectrolinker XL-1500 UV crosslinker (Spectronicscorporation, New York, USA.) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปทำ hybridization โดยใส่เมมเบรนลงในขวดแก้ว จากนั้นเติม hybridization บัฟเฟอร์ (hybridization บัฟเฟอร์ (Amersham, Buckinghamshire, England), 0.5 M NaCl, 4% blocking reagent) โดยใช้บัฟเฟอร์ 1.125-0.25 ml /cm^2 นำมา prehybridize ที่ 55°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม probe โดยใช้ probe

5-10 ng/ml จากนั้นอุ่นที่ 55°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วล้างเมมเบรนด้วย primary wash บัฟเฟอร์ (2 M Urea, 0.1% SDS, 0.2% Blocking reagent) จำนวน 1-2 ml/cm^2 โดยล้างจำนวน 2 ครั้งๆละ 15 นาทีที่ 55°C จากนั้นล้างด้วย secondary wash บัฟเฟอร์ (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$) จำนวน 1-2 ml/cm^2 โดยล้างจำนวน 2 ครั้งๆละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเมมเบรนมาวางบนแผ่นพลาสติก (wrap) โดยวางด้านที่มี plaque ไว้ด้านบน จากนั้นหยด CDP-Star detection reagent (Amersham, England) ให้กระจายทั่วแผ่นจากนั้นปิดด้วยแผ่นพลาสติก แล้วนำมาประกบกับแผ่น film X-ray บ่มไว้ในที่มืด ประมาณ 2 ชั่วโมง จึงล้าง film แล้วนำมาทาบกับ plate โดยวางให้ตรงในตำแหน่งที่ทำไว้ จากนั้นขุดวุ้นบริเวณที่ตรงกับจุดสีดำมาใส่ในอาหาร LB จำนวน 1 ml เติม chloroform 1 หยด วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 ชั่วโมง phage จะหลุดออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB จากนั้นนำ phage ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มาทำการค้นหา DNA เป้าหมายซ้ำอีกตามการทดลองข้อ 2.3.1.3 เพื่อให้ได้โคลนที่บริสุทธิ์ขึ้น

2.3.1.4 การเตรียม cDNA ขึ้นใหม่โดยวิธี GeneRacer ™ Kit (invitrogen, life technology, California, USA)

นำ mRNA ที่เตรียมได้จาก ภาคผนวก ข โดยทำให้เข้มข้น 250 ng จำนวน 7 µl เติม 10X buffer จำนวน 1 µl, RNAse Out (40 U/µl) จำนวน 1 µl และ TAP (0.5 U/µl จำนวน 1 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาปั่นด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้ของเหลวตกลงก้นหลอดวางหลอดในน้ำแข็งจากนั้นตกตะกอน RNA ละลายตะกอนด้วยน้ำที่ปราศจาก RNAse (น้ำ DEPC) จำนวน 7 µl แล้วดูดสารละลาย RNA ดังกล่าวลงในหลอด lyophilized Gene Racer RNA oligo (25 µg) ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ pipette ดูดขึ้นลงหลายๆครั้งแล้วนำมาปั่นด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้ของเหลวตกลงก้นหลอด บ่มที่ 65°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวางบนน้ำแข็งประมาณ 2 นาที แล้วนำมาปั่นด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้ของเหลวตกลงก้นหลอด เติม 10X ligase buffer จำนวน 1 µl, RNAse Out (40U/µl) จำนวน 1 µl, T4RNA ligase (50 U/µl) จำนวน 1 µl บ่มที่ 37°C เป็นเวลา

1 ชั่วโมง แล้วตกตะกอน RNA จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำจำนวน 10 µl เติม Gene Racer OligodT primer จำนวน 1 µl, dNTP Mix (อย่างละ 25 mM) จำนวน 1 µl บ่มที่ 65°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อกำจัด RNA secondary structure วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้สารละลายตกลงก้นหลอด เติม 10X RT buffer จำนวน 2 µl, AMV-RT (50 U/µl)จำนวน 1 µl, น้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 4 µl, RNAse Out (40 U/µl) จำนวน 1 µl ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 42°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นบ่มที่ 85°C เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ AMV-RT ปั่นที่ความเร็วต่ำนำมาใช้ทันทีหรือเก็บที่ -20°C จากนั้นเพิ่มจำนวน cDNA โดยทำ PCR ด้วยส่วนผสมดังนี้

Gene Racer 5′Primer 10 U	1.5 µl
Gene Racer 3′Primer 10 U	1.5 µl
RT template	1 µl
10X PCR buffer	2.5 µl
dNTP (10mM)	1 µl
Tag DNA polymerase	0.5 µl
$MgSO_4$	2 µl
H_2O	15 µl
รวม	20 µl

จากนั้นทำ PCR โดยใช้สภาวะดังนี้

ตารางที่ 2.5 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน cDNA ดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Denaturation	94°C	2 นาที	1
1. Denaturation	94 °C	30 วินาที	5
2. Annealing	72 °C	1 นาที	5
1. Denaturation	94 °C	30 วินาที	5
2. Annealing	70 °C	1 นาที	5
1. Denaturation	94 °C	30 วินาที	25
2. Annealing	60 °C	30 วินาที	25
3. Extension	72 °C	1 นาที	25
3. Extension	72 °C	10 นาที	1

นำ cDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดังกล่าวข้างต้นมาจำนวน 4 µl เติม salt solution (1.2 M NaCl, 0.06 M $MgCl_2$) และ TOPO vector จำนวน 1 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาบ่มที่ 22-23°C นาน 30 นาที แล้วแช่บนน้ำแข็ง จากนั้นแบ่งสารละลายมาจำนวน 2 µl ใส่ลงใน One Shot®Top 10 chemically competent *E.coli* ผสมเบาๆให้เข้ากัน แล้วนำมาวางบนน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นทำ heat-shock โดยนำมาบ่มที่ 42°C นาน 30 วินาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นเติม SOC medium (2% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 40 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM glucose) จำนวน 250 µl จากนั้นนำมาบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์ทั้งหมดมาเกลี่ยบน LB plate ซึ่งมี Kanamicin จำนวน 50 µg/ml บ่มที่ 37°C 16-18 ชั่วโมง แล้วนำมาทำ colony hybridization กับตัวตรวจจับและนำพลาสมิดมาสกัดเพื่อทำการ hybridize เพื่อค้นหายีนเป้าหมาย

2.3.2 การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อ vitellin เพื่อใช้สำหรับการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวภาพของ GIH

2.3.2.1 การเตรียม vitellin จากไข่กุ้ง

นำไข่กุ้งระยะ 3-4 จำนวน 5 g เติม PBS บัฟเฟอร์ (10 mM Na_2HPO_4, 1.4 mM KH_2PO_4, 2.6 mM KCl, 8% NaCl, 0.001% PMSF) ปริมาตร 20 ml บดด้วยเครื่อง hand homogenizer สารละลายที่ได้จะเป็นสีเขียวขุ่น นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นไขมันและตะกอนออก ปั่นซ้ำอีกครั้ง แล้วกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 และ 0.22 µm ตามลำดับ วัดปริมาณโปรตีนที่ได้ แล้วทำการเจือจาง นำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยเครื่อง FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) ซึ่งกำหนดความเข้มข้นไม่เกิน 10 mg/500 µl และใช้คอลัมน์ Superose 12 HR 10/30 ซึ่งสามารถแยกโปรตีนขนาด 1000-$2x10^6$ โปรตีน vitellin มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง $3x10^5$-$5x10^5$ (Lee and chang., 1997) โดยใช้ PBS บัฟเฟอร์เป็นตัวชะ ด้วยความเร็ว 0.5 ml ต่อนาที เริ่มเก็บตัวอย่างในนาทีที่ 10 หลังจากฉีดตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ ผ่าน UV Detector ซึ่งวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm เก็บตัวอย่างจำนวน 30 หลอดปริมาตร 1 ml ต่อหลอด ตัวอย่างแต่ละหลอดจะนำมาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry's นำ OD_{280} ที่ได้มาเขียนกราฟและนำมาเทียบกับปริมาณโปรตีนที่วัดได้ด้วยวิธีของ Lowry's จะทราบว่าโปรตีนที่ Fraction ใดมีปริมาณสูงสุดและเนื่องจากว่าในรังไข่จะผลิตโปรตีน vitellin เป็นโปรตีนหลัก ดังนั้นหลอดที่มีปริมาณโปรตีนสูงสุดจึงน่าจะเป็นโปรตีน vitellin และเนื่องจาก vitellin เป็น lipoglycoprotein เพื่อทดสอบว่า fraction ที่มีปริมาณโปรตีนสูงสุดเป็น vitellin จริง จึงนำโปรตีนดังกล่าวมาตรวจสอบลักษณะ vitellin โดยการทำ Native-PAGE แล้วย้อมโปรตีน ,ไขมัน และ น้ำตาล

2.3.2.2 การตรวจสอบลักษณะของ vitellin ของกุ้งแชบ๊วย

2.3.2.2.1 การแยกโปรตีน Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

เตรียม Acrylamide gel โดยมี separating gel 7% หรือ 10% ตามต้องการ วิธีการเตรียมแสดงในตารางที่ 2.6 และมีส่วน Stacking gel แสดงดังตาราง 2.7 ตัวอย่างไข่กุ้ง และ hepatopancreas ก่อนทำบริสุทธิ์โดยเตรียมดังหัวข้อ 2.3.2.1 และโปรตีน Fraction จากการทำบริสุทธิ์ของ vitellin จากไข่กุ้งดังข้อ 2.3.2.1 หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Lowry's (1951) แล้วนำสารตัวอย่างดังกล่าวมาแยกบน Native PAGE หรือ SDS-PAGE ตามต้องการที่ความต่างศักดิ์ คงที่ที่ 100 V หยุดการแยกเมื่อ สีของ loading บัฟเฟอร์ อยู่ห่างจากขอบเจลด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร นำเจลออกจากแผ่นกระจก นำมาย้อมโปรตีน, ไขมัน และ น้ำตาล (ภาคผนวก ก) หรือนำมาทำ immonobloting ต่อไป

ตารางที่ 2.6 ส่วนประกอบของ Separating gel สำหรับ Native-PAGE และ SDS-PAGE

ส่วนประกอบ 7%	Native-PAGE (ml)	SDS-PAGE (ml)
น้ำกลั่น	5.06	4.96
30% acrylamide mix	2.33	2.33
1.5 M Tris (pH8.8)	2.5	2.5
10%SDS	-	0.1
10% ammonium persulphate	0.1	0.1
TEMED	0.008	0.008
ปริมาตรรวม (ml)	10	10

ตารางที่ 2.7 ส่วนประกอบของ Stacking gel สำหรับ Native-PAGE และ SDS-PAGE

ส่วนประกอบ 5%	SDS (ml)	Native (ml)
น้ำกลั่น	4.1	4.16
30% acrylamide mix	1	1
1.5M Tris(pH8.8)	0.75	0.75
10% SDS	0.06	-
10% ammonium persulphate	0.06	0.06
TEMED	0.006	0.006
ปริมาตรรวม(ml)	6	6

2.3.2.3 การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อ vitellin จากกระต่าย

เตรียมแอนตีซีรัมที่จำเพาะต่อ vitellin ในกระต่ายขาว พันธุ์ New Zealand White เพศผู้ อายุ 3 เดือน โดยใช้สารสกัด vitellin (Fraction 6) ที่แยกจากไข่กุ้งโดย FPLC จำนวน 1 µg/µl จำนวน 1 ml ร่วมกับ Freud's Complete adjuvant ปริมาตรเท่าตัว ผสมให้เข้ากันจนมีลักษณะเป็น water in oil emulsion นำมาฉีดกระต่ายที่ใต้ผิวหนังบริเวณต้นคอ (Subcutaneous) จำนวน 10 จุดๆละ 100 µl หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ฉีดซ้ำในปริมาณเดิม หลังจากฉีดแอนติเจนครบ 2 สัปดาห์ จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 10 ml ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 1 เดือน โดยเจาะจากใบหู เลือดที่ได้นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ในตู้เย็น 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเลือดจะจับตัวเป็นก้อน นำเลือดที่ได้มาปั่นที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาน้ำเลือดเก็บที่ –20°C

2.3.2.1 การศึกษาความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อโปรตีน Vitellin

2.3.2.4.1 การทดสอบแอนติซีรัมที่ได้โดยการทำ ELISA

โปรตีนจากไข่กุ้งที่แยกได้จากการทำ FPLC นำมาเจือจางด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้น 2 µg/ml แล้วทำเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ นำมาใส่ใน 96 Well Microtiter Plate หลุมละ 50 µl บ่มที่ 4°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBS จำนวน 150 µl 2 ครั้ง ๆละ 15 นาที จากนั้นเติม botto (5% nonfat dry milk, 0.1% tritonX-100, PBS pH 7.4) ที่เจือจาง 1:10 บ่ม 30 นาที แล้วเทออก จากนั้นเติมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อ โปรตีน vitellin จากไข่กุ้งโดยเจือจาง 1:8 ใน PBS จำนวน 50 µl ต่อหลุม บ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือที่ 12-24°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้งๆละ 15 นาที เติม anti-rabbit IgG (Promega,Madison, USA) ที่เจือจางอัตรา 1 : 7500 ใน 5% botto จำนวน 50 µl ต่อ หลุม บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือที่ 4°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST (PBS, 0.05% Tween 20) 4 ครั้งๆละ 15 นาที ล้างด้วย 10mM Diethanolamine pH 9.5 ซึ่งมี 0.5mM $MgCl_2$ 1 ครั้ง เติม 1 mg/ml ของ PNPP (20 mg p-Nitro-phenyl phosphate ใน 20 ml ของ10mM Diethanolamine pH 9.5) จำนวน 50 µl ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-30 นาที ใส่ 0.1 M EDTA pH 9.5 จำนวน 50 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm ด้วยเครื่อง ELISA plate reader EIX 808 (Biotek Instument Inc.Wilrijk, Belgium.)

2.3.2.4.2 การทดสอบแอนติซีรัมต่อโปรตีน Vitellin โดยการทำ Immonoblotting

ทำ Native PAGE ตามวิธีในข้อ 2.3.2.2.1 สารตัวอย่างคือ สารสกัดโปรตีน vitellin ของไข่กุ้งแชบ๊วยจำนวน 5 µg สารสกัดโปรตีนจาก hepatopancreas ของกุ้งแชบ๊วยจำนวน 5 µg และโปรตีน vitellin (Fraction 6) ของกุ้งแชบ๊วยแยกโดย FPLC จำนวน 5 µg นำแผ่นเจลที่ผ่านการทำ electrophoresis แล้ว นำมาตัดส่วนที่เป็น stacking gel และส่วนอื่นที่ไม่มีแถบโปรตีนออก แช่แผ่นเจล ใน transfer บัฟเฟอร์ (25 mM Tris,192 mM glycine, 20% methanol) นาน 10 นาที จากนั้น transfer

โปรตีนในเจลด้วยเครื่อง Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD, USA) นำแผ่น ไนโตรเซลลูโลสที่ถ่ายโปรตีนเรียบร้อยแล้ว มาแช่ใน blocking solution (1% BSA ใน PBS) โดยเขย่าที่ 37°C นาน 10 นาที ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลส 3 ครั้งด้วย สารละลาย PBST (PBS ใน 0.05% Tween 20) แล้วนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาแช่พร้อมเขย่าในสารละลายแอนติซีรัมใน PBS ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 8 เป็นเวลา 30นาทีที่ 37 °C จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBST 3 ครั้งๆละ 10 นาที แช่ในสารละลาย Anti-Rabbit IgG (Fc) AP Conjugate (Promega, Madison, USA) ใน PBS ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 7500 เป็นเวลา 30 นาทีที่ 37°C จากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้งๆละ 10 นาที แล้วแช่ในสารละลาย Detection บัฟเฟอร์ (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM $MgCl_2$, pH 9.5) เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในสารละลาย Color–Substrate Solution (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM $MgCl_2$, pH 9.5, 0.37 mM NBT, 0.35 mM BCIP) จนเห็นแถบสีม่วงน้ำเงินชัดเจน สามารถหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีได้ด้วยการล้างน้ำกลั่น

2.3.3 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวภาพของโปรตีนที่แยกจากก้านตาต่อการสร้างโปรตีนไข่ (Quackeubush, 1992)

ตัดรังไข่ของกุ้งแชบ๊วยระยะที่ 2 ให้มีขนาดประมาณ 2-3 mm บน จานเพาะเชื้อซึ่งมี PBS pH 7.4 ที่เย็นจัดอยู่ นำชิ้นของรังไข่ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 ml ซึ่งมี อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (1 mM Hepes pH 8.2, 80 µg/ml, 9.9 g/l M199) จำนวน 1 ml เติม 0.5 µl ของ ^{14}C Leucine (0.05 µCi/4nmol) ใส่โปรตีนที่แยกจากก้านตาด้วยเครื่อง HPLC (ข้อมูลเตรียมวิทยานิพนธ์ของ วรวิทย์ ฉิมเพ็ชร) จำนวน 10 ก้านตาต่อหลอด และใช้โปรตีนจากก้านตาจำนวน 10 ก้านตา ซึ่งวิธีสกัดดัดแปลงตามวิธีของ Subramoniam และคณะ (1998) เป็น Positive Control และใช้ PBS เป็น Negative Control ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาบ่มและเขย่าที่ 28-30°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างชิ้นของรังไข่ด้วย PBS ที่มี 0.001% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) จำนวน 300 µl 2 ครั้ง แล้ว Homogenize ตะกอนใน 500 µl PBS ที่มี 0.001% PMSF แยกตัวอย่างจำนวน 100 µl เก็บที่ – 70°C เพื่อทำการทดลองในข้อ

2.3.3.3 นำตัวอย่างที่เหลือมาปั่นที่ความเร็ว 10,000 g ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสส่วนหนึ่งที่ –70°C เพื่อรอการวิเคราะห์โปรตีน อีกส่วนนำมาทำ ปริมาณการสร้างโปรตีน vitellin ต่อไป (ข้อ 2.3.3.2)

2.3.3.1 การเตรียมโปรตีน A จาก *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Harlow and Lane, 1988) เพื่อใช้ในข้อ 2.3.3.2

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar plate โดยบ่มที่ 37°C นาน 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth NB จำนวน 5 ml เขย่าที่ 37°C นาน 18 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB จำนวน 500 ml เขย่าที่ 37°C นาน 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์โดยนำมาปั่นที่ 7,000 g ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย 100 ml PBS จำนวน 2 ครั้ง ตะกอนเซลล์ที่ได้จะนำมาชั่งน้ำหนักแล้วละลายกลับด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10% จากนั้นเทใส่ใน flask แล้วนำมากวนด้วยเครื่องกวน (stirrer) แล้วค่อยๆเติม formaldehyde (37%) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.5 % จากนั้นกวนให้เข้ากัน ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบ 90 นาทีให้นำเซลล์มาปั่นที่ 7,000 g แล้วละลายตะกอนด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10% นำมาเขย่าที่ 80°C โดยเริ่มจับเวลาหลังจากสารละลายเซลล์มีอุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาวางบนน้ำแข็งแล้วล้างตะกอนด้วย PBS ละลายตะกอนกลับให้มีความเข้มข้นเป็น 10 % v/v ซึ่งสามารถเก็บไว้ที่ -70°C ได้เป็นเวลานาน 1 ปี

2.3.3.2 การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ (Quackenbush , 1992)

จากการทดลองที่ 2.3.3 รังไข่ที่บดละเอียดแล้วและแยกไว้ 100 µl นำมาตกตะกอนด้วย ammonium sulphate ที่อิ่มตัวปริมาตร 4 เท่านำมาปั่นที่ความเร็ว 14,000g นาน 10 นาที ตะกอนที่ได้ล้างด้วย PBS จำนวน 300 µl จากนั้นละลายตะกอนด้วย PBS จำนวน 150 µl แล้วแบ่งสารละลายออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกมีปริมาตร 50 µl นำมาหาปริมาณโปรตีน (Lowry *et al.*, 1951) อีกส่วนปริมาตร 100 µl ละลายใน 900 µl PBS แล้วเติมลงใน 10 ml Toluene-and Xylene-based

Scintillators จากนั้นวัดปริมาณ ^{14}C-Leucine โดยใช้เครื่อง Liquid Sintillation counter แสดงผลเป็น dpm/mg protein

2.3.3.3 การหาปริมาณ vitellin ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่โดยวิธี Immonoprecipitation (Harlow and Lane, 1988)

นำ supernatant ของ รังไข่ที่บดละเอียดแล้วในข้อ 2.3.3 จำนวน 500 µg เติมแอนติซีรัมต่อโปรตีน vitellin ซึ่งได้จากข้อ 2.3.2.3 จำนวน 50 µl บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม 10 % โปรตีน A ที่ได้จาก 2.3.3.1 จำนวน 50 µl บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นที่ 10,000 g ที่ 4°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 0.5 ml Lysis buffer (150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 50 mM Tris pH 8.0) จากนั้นตะกอนที่ได้จะเติมด้วย sample buffer (2% SDS, 100 mM DTT, 60 mM Tris pH 6.8) นำมาต้มที่ 85°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาปั่นที่ 10,000 g ที่ 4°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำส่วนใสมาเติมลงใน 950 ml PBS และ 10 ml toluene-and Xylene-based scintillators (toluene 1 l, tritonX-100 333 ml, PPO 4 g, POPOP 0.1 g) จากนั้นนำมาวัดปริมาณ ^{14}C-Leucine โดยใช้เครื่อง liquid scintillation counter แสดงผลเป็น dpm/mg protein