วิธีการทดลอง

<u>1.การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมด</u> (Total DNA)

1.บดใบปาล์มในไนโตรเจนเหลว(liquid nitrogen) ด้วยโกร่งบดยา (motar) จนละเอียด

2.ใส่ Extraction buffer(0.1M Tris-HCl,0.05M EDTA, 1%SDS pH8.0) 25 มิลลิลิตร

3.นำใบปาล์มที่บดละเอียดแล้วใส่ในหลอดปั่น(centrifuge tube)ขนาด 50 มิลลิลิตร

4.ใส่ Phenol 10 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ นำไปปั่นด้วยความเร็ว 4500xg 15 นาที 4°ซ จะเห็นชั้นของ Phenol และ สารละลายแยกจากกัน

5.ดูดเอาชั้นสารละลายมาสกัดด้วย Phenol อีกครั้งนำไปปั่นเหมือนข้อ 4

6.ดูดชั้นสารละลายใส่หลอดปั่นแล้วเติม Phenol 10 มิลลิลิตร และ Sevag (chloroform:isoamyl alcohol) 5 มิลลิลตร เขย่าเบาๆ นำไปปั่น

7.นำชั้นสารละลายไปใส่อีเทอร์ 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ นำไปปั่นและดูดชั้นอีเทอร์ทิ้ง

8.นำหลอดที่ได้มาวางในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 50-60°ซ 10-15 นาที เพื่อไล่อีเทอร์

9.ใส่ PVP ประมาณ 1 กรัม เขย่า ทิ้งไว้ 2-3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่น

10.นำชั้นสารละลายมาตกตะกอนด้วย 0.5M NaCl,10%PEG เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ 1 คืน

11.นำไปปั่นด้วยความเร็ว 4500xg 20 นาที ได้ตะกอนดีเอ็นเอ

12.ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE (0.01M Tris-HCl,0.001M EDTA pH7.4) 1 มิลลิลิตร และ run gel electrophoresis

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

2.การสกัดดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์

2.1วิธีของ Richard Kolodner และ K.K.Tewari

1.โฮโมจิไนซ์ใบปาล์ม 50 กรัมใน homogenize buffer(50mM Tris-HCl pH8.0,0.35M Sorbitol,5mM EDTA,0.1%BSA,5mM 2-ME) 150 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องบด

2.กรองด้วยผ้าก๊อซ 4 ชั้น นำไปปั่นด้วยความเร็ว 100xg 10 นาที 4°ซ เพื่อกำจัด debris cell ทิ้ง

3.นำส่วนใส(supernatant)มาปั่นด้วยความเร็ว 1500xg 10 นาที 4°ซ จะได้ตะกอน

4.นำตะกอนมาละลายใน homogenize buffer 80 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็ว 1500xg 10 นาที 4°ซ ได้ตะกอน

5.นำตะกอนมาเติมเอนไซม์ deoxyribonuclease (0.01M $MgCl_2$ และDNase I 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 0.5 มิลลิลิตร จากstock และบัฟเฟอร์G (0.3M Sucrose,50mM Tris-HCl pH7.5) 4.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

6.ล้างตะกอนด้วย wash buffer (50mM Tris-HCl pH8.0,0.35 Sorbitol,25mM EDTA) 125 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็ว 1500xg 10 นาที 4°ซ ได้ตะกอน

7.นำตะกอนมาละลายใน wash buffer 50 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็ว 1500xg 10 นาที 4°ซ ทำ 2 ครั้ง

8.เติม lysis buffer (100mM Tris-HCl pH8.0,50mM EDTA,1oomM NaCl,1%SDS) 2.5 มิลลิลิตร และย่อยโดยใช้ Proteinase K ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่ 37°ซ 2-3 ชั่วโมง

9.สกัดคลอโรฟิลล์โดยใช้ Phenol 5 มิลลิลิตร และ Sevag 5 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็ว 1500xg 5 นาที 4°ซ ดูดส่วนใสมาสกัดซ้ำอีกครั้ง

10.ตกตะกอนด้วย NaCl ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 M และ absolute ethanol 2-2.5 เท่า ของปริมาตรเดิม เก็บไว้ที่ -20°ซ อย่างน้อย 1 ชั่วโมง

11.ปั่นด้วยความเร็ว 4500xg 20 นาที 4°ซ ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE (0.01M Tris-HCl,0.001M EDTA pH7.4) 1 มิลลิลิตร

12.run gel electrophoresis

2.2 วิธีของ J.D.Palmer

1.นำใบปาล์ม 100 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ล้างด้วยน้ำประปา และน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2.นำใบปาล์มไปโฮโมจิไนซ์ โดยใส่ homogenize buffer (0.35M Sorbitol,50mM Tris-HCl pH8.0,5mM EDTA,20% PEG6000,0.1% BSA,0.1% 2-ME) 600 มิลลิลิตร ลงในเครื่องบดปั่นด้วยความเร็วสูงสุด ใช้เวลาน้อยกว่า 1 นาที

3.กรองด้วยผ้าก๊อซ 4 ชั้น ปั่นด้วยความเร็ว 100xg 10 นาที 4°ซ เพื่อกำจัด debris cell

4.นำส่วนใสมาปั่นด้วยความเร็ว 1500xg 15 นาที 4°ซ ได้ตะกอน

5.นำตะกอนมา resuspend ด้วย wash buffer (0.35M Sorbitol,50mM Tris-HCl pH8.0,25mM EDTA,20% PEG6000) 6 มิลลิลิตร

6.นำสารละลายที่ได้ไป layer บน sucrose step gradient 35%,50%

7.นำไปปั่นด้วยความเร็ว 4500xg 30-60 นาที 4°ซ คลอโรพลาสต์จะอยู่ระหว่างชั้น sucrose 35%และ50% ดูดออกมาโดยใช้ปิเปตปากกว้าง

8.ล้างคลอโรพลาสต์ด้วย wash buffer 3-10 เท่าของปริมาตรเดิม ปั่นด้วยความเร็ว 1000-1500xg 10-15 นาที 4°ซ ทำ 2 ครั้ง

9.นำตะกอนมาresuspend ใน wash buffer 2 มิลลิลิตร และเติม lysis buffer (5% Sodium sarcosinate,50mM Tris-HCl pH8.0,25mM EDTA) 1/5 เท่าของปริมาตรเดิม กับ Proteinase K 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลตร

10.ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ 1 ชั่วโมง

11.สกัดด้วย Phenol-Sevag ทำ 2 ครั้ง

12.ตกตะกอนด้วยเอธานอล และNaCl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ 1 ชั่วโมง หรือ 1 คืน

13.ปั่นด้วยความเร็ว 4500xg 20 นาที 4°ซ ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์TE (0.01M Tris-HCl,0.001M EDTA pH7.4) 1 มิลลิลิตร

14.run gel electrophoresis

2.3 วิธีของ Takashige Ishii

1.นำใบปาล์ม 100 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ

2.ทำให้เซลล์แตกโดยบดในไนโตรเจนเหลว

3.โฮโมจิไนซ์ในบัฟเฟอร์ A (0.44M Mannitol,50mM Tris-HCl pH8.0,3mM EDTA) 400 มิลลิตร ด้วยเครื่องบด โดยบด 6 วินาที 3 ครั้ง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 150xg 5 นาที 4°ซ

4.นำส่วนใสมาปั่นด้วยความเร็ว 1900xg 10 นาที 4°ซ ได้ตะกอน

5.นำตะกอนมา resuspend ในบัฟเฟอร์ A โดยเขย่าเบาๆ

6.นำสารละลายที่ได้ layer บน sucrose step gradient 30%และ60%

7.นำไปปั่นด้วยความเร็ว 4500xg 60 นาที 4°ซ คลอโรพลาสต์จะอยู่ระหว่างชั้น sucrose 30% และ 60% ดูดออกมาโดยใช้ปิเปตปากกว้าง

8.ล้างคลอโรพลาสต์ด้วยบัฟเฟอร์ A 3-10เท่าของปริมาตรเดิม ปั่นด้วยความเร็ว 1000-1500xg 10-15 นาที 4°ซ ทำ 2 ครั้ง

9.นำตะกอนมา resuspend ใน บัฟเฟอร์ A 2 มิลลิลตร และเติม lysis buffer(5% Sodium sarcosinate,50mM Tris-HCl pH8.0,25mM EDTA) 1/5เท่าของปริมาตรเดิม กับ Proteinase K 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ 1 ชั่วโมง

10.สกัดด้วย Phenol-Sevag ทำ 2 ครั้ง

11.ตกตะกอนด้วยเอธานอล และNaCl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ 1 ชั่วโมง หรือ 1 คืน

12.ปั่นด้วยความเร็ว 4500xg 20 นาที 4°ซ ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE (0.01M Tris-HCl,0.001M EDTA pH7.4)

13.run low melting gel electrophoresis

14.ตัดแถบของดีเอ็นเอที่ได้จาก ข้อ 13 มาละลายในบัฟเฟอร์ TE 7เท่าของปริมาตรเดิม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 65°ซ 15 นาที

15.สกัดด้วย Phenol 3 มิลลิลิตร 4°ซ เขย่าเบาๆ ปั่นด้วยความเร็ว 1500xg 10นาที 4°ซ จะเห็นชั้นของบัฟเฟอร์ TE ที่มีดีเอ็นเออยู่แยกจากชั้น Phenol โดยมี agarose อยู่ระหว่างชั้น

16.ดูดชั้นบัฟเฟอร์ TE มาสกัดด้วย Phenol-Sevag 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ปั่นด้วยความเร็ว 1500xg 10 นาที 4°ซ

17.ดูดชั้นดีเอ็นเอมาสกัดด้วย Sevag 5 มิลลิลิตร อีกครั้งหนึ่ง ปั่นด้วยความเร็ว 1500xg 10 นาที 4°ซ

18.ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล และ 0.1M NaCl ทิ้งไว้ 1 คืน

19. ปั่นด้วยความเร็ว 4500xg 20 นาที 4°ซ ล้างตะกอนด้วย 70% เอธานอล

20. ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE 10 ไมโครลิตร ทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III

21. run gel electrophoresis

3.การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการทดลองข้างต้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ วิธีนี้ใช้สำหรับตัดดีเอ็นเอ 0.2-1 ไมโครกรัม ในสารละลายปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ซึ่งกระทำโดยการเรียงตามขั้นตอนดังนี้

1.ใส่น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส(nuclease) ลงในหลอดปั่นขนาดเล็กเพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร

2.เติม 2 ไมโครลิตร ของ 10เท่าบัฟเฟอร์ (10x buffer) ที่เหมาะสม (low,medium,high หรือspecific salt)

3.เติมดีเอ็นที่ต้องการตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าว

4.เติม 1-2 ยูนิต(units)ของเอนไซม์โดยใช้ปริมาตรไม่เกิน 4 ไมโครลิตร เพื่อมิให้ความเข้มข้นของ Glycerol เกิน 10%

5.เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่น

6.ตั้งทิ้งไว้ที่ 37°ซ 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 ไมโครลิตร 250mM EDTA pH8.0 นำไป run gel electrophoresis

4.การทำ gel electrophoresis

1.ชั่งอากาโรส 0.7 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ TBE(0.089M Tris-HCl, 0.089M Boric acid,0.002M EDTA) 100 มิลลิลิตรต้มจนกระทั่งอากาโรส ละลาย แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 60°ซ นำไปเทลงบน gel chamber ที่มีช่องสำหรับหยอดดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้ว

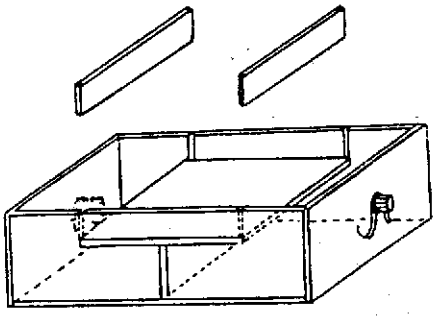
2.ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ให้เจลแข็งตัว แล้วจึงเอาส่วนที่จัดไว้และช่องที่หยอดดีเอ็นเอออก จากนั้นเทบัฟเฟอร์ TBE ลงทั้ง 2 ข้างของขั้ว จนกระทั่งท่วม

3.นำเอาดีเอ็นเอที่จะวิเคราะห์มาผสมกับ loading dye ด้วยอัตราส่วน 3:1 (ดีเอ็นเอ:loading dye) แล้วหยอดลงในช่องที่เตรียมไว้บนอากาโรส

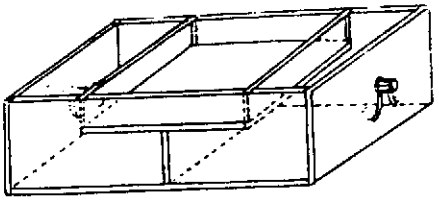
4.ต่อขั้วอิเลคโทรดเข้ากับเครื่องแปลงไฟฟ้ากระแสตรงโดยให้กระแสวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก และแรงเคลื่อนประมาณ 100 โวลต์จะใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่ง loading dye เคลื่อนไปเกือบถึงปลายสุดอีกข้างของเจล

5.ปิดเครื่องแปลงไฟฟ้ากระแสตรง แล้วค่อยๆนำเจลออกจาก chamber แช่เจลลงใน staining solution(EtBr) ประมาณ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

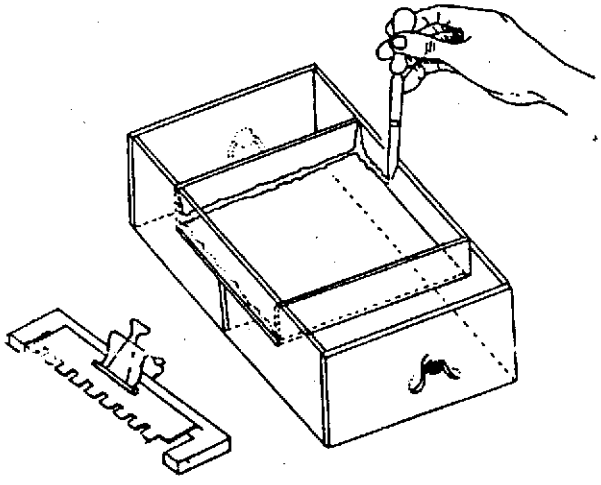
6.destain ในน้ำกลั่น 30-60 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์การเรืองแสงด้วย UV box



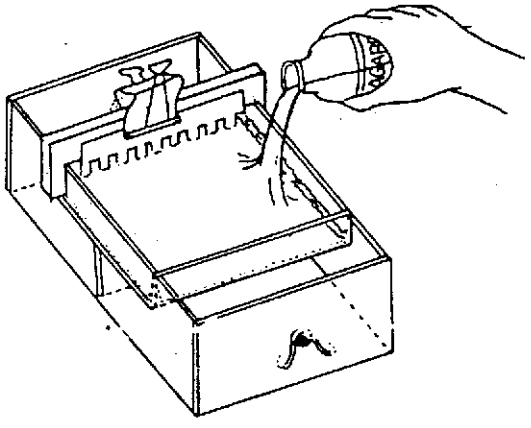
(1)



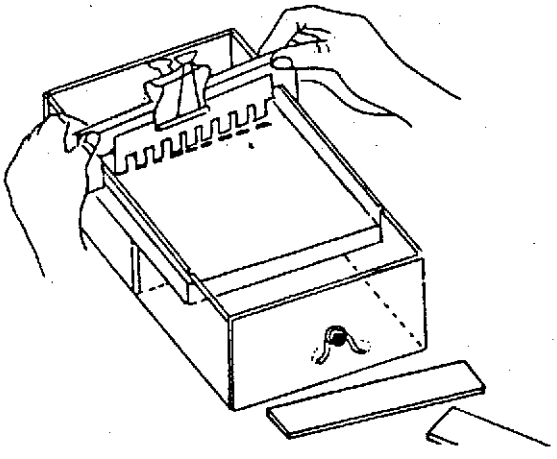
(2)



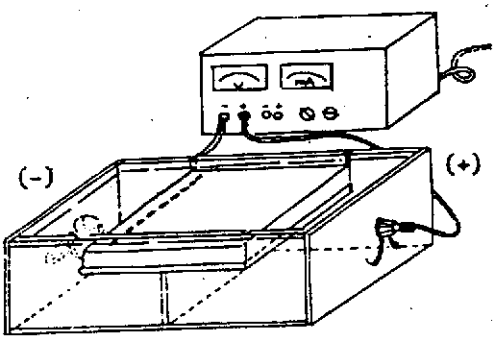
(3)



(4)



(5)



(6)

รูปที่ 5 แสดงการทำเจลอิเลคโตรโฟริซิส

5.การแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยเจลชนิด low melting

1.ชั่งเจล low melting 0.7 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ TBE 100 มิลลิลิตร ต้มจนเจลละลายหมด

2.เทลงใน chamber ทิ้งไว้ให้แข็งตัวในตู้เย็น

3.load ดีเอ็นเอในช่องที่เตรียมไว้แล้ว run gel electrophoresis

4.นำเจลไปดูด้วยแสง UV ตัดแถบของดีเอ็นเอออกมาละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 5 เท่า ที่ 65°ซ เป็นเวลา 15 นาที

5.สกัดด้วย Phenol และปั่นด้วยความเร็ว 1500xg 10 นาที 4°ซ

6.ดูดส่วนบนซึ่งประกอบด้วยบัฟเฟอร์ TE และดีเอ็นเอมาสกัดด้วย Phenol-Sevag และสกัดด้วย Sevag อีกครั้ง

7.ตกตะกอนด้วยเอธานอล และ0.1M NaCl ทิ้งไว้ข้ามคืน

8.นำไปปั่น และล้างตะกอนที่ได้ด้วย เอธานอล 70% เพื่อล้าง NaCl

9.ปั่นอีกครั้งและละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE 10 ไมโครลิตร แล้วใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ตัดดีเอ็นเอ

10.run gel electrophoresis