บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุและสารเคมี

2.1.1 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	Merck
β-Carotene	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Merck
Calcium chloride	Merck
Chloroform	Labscan
Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether)N,N,N′,N′- tetraacetic acid (EGTA)	Merck
Glacial acetic acid	Merck
Glucose	Carlo Erba
Glycerol	Carlo Erba
Isoamyl alcohol	Carlo Erba
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Magnesium chloride	Merck
Methanol	BDH
Sodium acetate	Merck
Sodium chloride	Merck
Sodium dodecyl sulphate	Riedel-de-Haën
Sodium hydroxide	Merck
Sucrose	Carlo Erba
Triton X-100	USB

2.1.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Agarose	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich
AMV Reverse Transcriptase	Promega
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-GAL)	Promega
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich
*Eco*R I	Biolabs
Ethidium bromide	Sigma-Aldrich
Hexadecyl trimetyl ammonium bromide (CTAB)	Sigma-Aldrich
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	Promega
Lithium chloride	Sigma-Aldrich
Lysozyme	Sigma-Aldrich
Phenol, pH>8.0	USB
Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity	Invitrigen
Random primer	Promega
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Invitrigen
Taq DNA Polymerase	Promega
Tetracyclin	Sigma-Aldrich
Tris-base	Promega

2.1.3 ตัวอย่างพืช

ต้นและผลปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทเนอรา (ผลอ่อนสีน้ำตาลดำ) จากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร จังหวัดสุราษฎร์ธานี และสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตตรัง โดยทำการเก็บรักษาผลปาล์มน้ำมันที่อุณหภูมิ -80°C จนกระทั่งนำมาสกัดอาร์เอ็นเอ

2.1.4 แบคทีเรีย

Escherichia coli XL-1 Blue MRF′ (Stratagene) มีลักษณะ Genotype: Δ(*mcrA*) 183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*) 173, *end*A 1, *sup*E44, *thi*-1, *rec*A1*gyr*A96, *rel*A1, *lac* [F′*pro*AB *lacI*^{q}ZΔM15 Tn10 (Tet^{r})]

2.1.5 ดีเอ็นเอพาหะ (plasmid vector)

pGEM®-T Easy (Promega)

2.1.6 ไพร์เมอร์

ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับเบส 5′ ⟶ 3′
FDXS	TGGGATGTTGGTCATCAGTC
RDXS	ACTGC(A/G)TGTTGTTC(C/T)GCTAT
FDXR	GG(C/T)TC(C/T)ATTGG(A/C)ACTCAGAC
RDXR	AACCGCATATC(A/G)GGCCA(A/T)CC
Semi-FDXS2	TGGGATGTTGGTCATCAGTC
Semi-RDXS2	ACTGCGTGTTGTCTGCTAT
Semi-FDXR	GGCTCTATTGGAACTCAGAC
Semi-RDXR	AACCGCATACGGGCCAACC
F18S rRNA	CAAAGCAAGCCTACGCTCTG
R18S rRNA	CGCTCCACCAACTAAGAACG
GeneRacer™ 5′ Nested	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA
GeneRacer™ 3′ Nested	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG
3FDXS1	CTTTCTTCGCCGCTTTCCGACAAGGTGT
5RDXS1	CAACAGCCATCCCAAGGGCCGCCGAGAT

2.2 อุปกรณ์

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงอุตราไวโอเลต รุ่น UV-160A (Shimadzu)

เครื่องตรวจสอบ DNA โดยวิธี Agarose gel electrophoresis (Mupid และ Hoefer)

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler)

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Becthai)

เครื่องวัด pH รุ่น SA 230 (Orion Research)

เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น TJ-6RS (Beckman) และรุ่น 5804 (Eppendorf)

เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก รุ่น 16M Spectrafuge (Labnet)

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (BIO-RAD)

ตู้ปราศจากเชื้อ Laminar flow (GELAIRE)

เครื่อง ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer)

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (GALLENKAMP)

หม้อนึ่งความดันไอ (Hirayama)

ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37°C (Memmert)

micropipette ขนาด 0.1-2.5, 10, 20-200, 100-1000 µl (Eppendorf) และ 20 µl (Gilson)

เครื่องควบคุมอุณหภูมิ heat block (Violet Biosciences และ LAB-LINE)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (ENKAB)

หลอดสำหรับทำ PCR ขนาด 0.2, 0.5 มิลลิลิตร

เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ polymerase chain reaction (Hybaid และ Eppendorf)

ตู้เย็นแช่แข็งอุณหภูมิ -80°C (TEFCOLD)

ตู้เย็นแช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C (SANYO)

ตู้สำหรับเขี่ยเชื้อ (LIO-LAB)

Hot plate (GIBTHAI)

เครื่องอบแห้งควบคุมอุณหภูมิ (THELCO)

เครื่องทำกระแสวนหรือวอร์เทกซ์ (Becthai)

เครื่องทำน้ำแข็ง (Newton)

เครื่อง UV light transilluminator (UVP)

เครื่อง Gel Doc รุ่น BioDoc-It™ system

2.3 วิธีการ

2.3.1 การโคลนส่วนของยีน *dxs* และ *dxr* จากใบและผลปาล์มน้ำมัน

2.3.1.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากชั้นเนื้อของผลปาล์มน้ำมัน

(ดัดแปลงจาก Abdullah *et al.*, 1995)

นำชั้นเนื้อของผลปาล์มน้ำมัน ที่บดด้วยไนโตรเจนเหลว 5 กรัม เติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 ml ที่มีบัฟเฟอร์สำหรับสกัดอาร์เอ็นเอ 20 ml โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดมีส่วนประกอบดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของบัฟเฟอร์สำหรับสกัดอาร์เอ็นเอ

สารเคมี	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
1 M Tris-HCl, pH 7.6	2 ml	0.1 M
0.5 M EGTA, pH 7.6	2 ml	0.05 M
1 M NaCl	2 ml	0.1 M
10% SDS	2 ml	1 %
β-mercaptoethanol	70 µl	0.35 %
Phenol, pH>8	1 ml	5%
น้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase	10.93 ml	-
ปริมาตรรวม	20 ml	-

ผสมบัฟเฟอร์และผงปาล์มบดให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย phenol : chloroform อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร 20 ml เขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 5 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 20 นาที ที่ 4°C ดูดสารละลายส่วนบนออกไปโดยไม่ให้รบกวนตะกอน และนำสารละลายที่ได้มาสกัดซ้ำอีกสองครั้งด้วยสารละลาย phenol : chloroform อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร 20 ml หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำสารละลายใสส่วนบนมาสกัดด้วยสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 24 : 1 โดยปริมาตร จำนวน 20 ml นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm นาน 20 นาที ที่ 4°C แบ่งสารละลายใสส่วนบนมาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 ml หลอดละ 1 ml และตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ด้วย 330 µl ของ 8M LiCl ข้ามคืนที่ -20 °C หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4°C ล้างตะกอนด้วย 300 µl ของ 2M LiCl แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้นล้างตะกอนซ้ำสองครั้งด้วยการกวนตะกอนใน 1 ml ของ 70% ethanol แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนในแต่ละหลอดด้วยน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase ปริมาตร 50 µl ซึ่งเตรียมได้โดยการนำน้ำกลั่นมาเติม Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 0.1 % โดยปริมาตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 วัน นำสารละลายที่ได้ไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ

จากนั้นนำตะกอนที่ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase มารวมกัน แล้วสกัดด้วยสารละลาย 1 ml ของ phenol : chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 โดยปริมาตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แบ่งสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอด ไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 ml หลอดละ 1 ml และตกตะกอนด้วย 330 µl ของ 8M LiCl ที่ -20 °C อย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 °C ล้างตะกอนด้วยการกวนตะกอนใน 300 µl ของ 2M LiCl แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที 4 °C จากนั้นจึงล้างตะกอนอีกสองครั้งด้วย 70% ethanol 1 ml แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 °C ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase 300 µl ตกตะกอนอีกครั้งด้วย 30 µl ของ 3M sodium acetate (pH 5.2) และ absolute ethanol ที่เย็นจัดปริมาตร 750 µl ตกตะกอนที่ -20°C อย่างน้อย 2 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 °C ล้างตะกอนจำนวนสองครั้งด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 °C คว่ำหลอดบนกระดาษซับที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และดูดหยดของเหลวที่ติดข้างหลอดออกโดยใช้ปิเปต นำหลอดที่มีอาร์เอ็นเอไปอุ่นโดยใช้ heat box ที่อุณหภูมิ 50-60 °C นาน 10 นาที เพื่อให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase 50 µl ตรวจสอบหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอรวมจากอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) และการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% เก็บอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ไว้ที่ -80 °C

2.3.1.2 **การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบปาล์มน้ำมันโดยวิธีใช้** RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

นำใบปาล์มน้ำมันที่บดด้วยไนโตรเจนเหลว 0.1 กรัม เติมลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 ml ที่มี 450 µl บัฟเฟอร์ RLT ซึ่งมีส่วนประกอบเป็น guanidine

thiocyanate ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่ 56 °C เป็นเวลา 1-3 นาที ระหว่างการอุ่นกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายใสส่วนบนใส่ลงในคอลัมน์ QIAshredder spin หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm นาน 2 นาที เติม 95-100% ethanol ที่เย็นจัดจำนวน 0.5 เท่าของส่วนใสที่ได้ ผสมโดยใช้ปิเปตอย่างรวดเร็ว นำสารละลายปริมาตร 500 µl เติมลงในคอลัมน์ RNeasy mini หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที เติม 700 µl บัฟเฟอร์ RW1 ซึ่งมี ethanol เป็นส่วนประกอบลงในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นเติม 500 µl บัฟเฟอร์ RPE ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์สำหรับล้างคอลัมน์ (wash buffer) หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm นาน 2 นาที จำนวนสองครั้ง ทำการชะอาร์เอ็นเอออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30-50 µl หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที หาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรรวมถึงตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอรวมจากค่า A_{260}/A_{280} และการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% เก็บอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ไว้ที่ -80 °C

2.3.1.3 **การวิเคราะห์ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอรวม**

นำอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ไปทำการเจือจาง 30-50 เท่าและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยคำนวณจากอาร์เอ็นเอความเข้มข้น 40 ng/µl ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 (A_{260}=1) จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอได้ดังสมการ

ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ = (ค่า OD. 260 nm)(dilution factor)(40 ng/µl)

2.3.1.4 **การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอร**

ก. การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอรวมโดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสง

นำอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ มาตรวจสอบคุณภาพจากค่า A_{260}/A_{280} อาร์เอ็นเอรวมที่มีคุณภาพดีมีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-2.0 หากมีดีเอ็นเอ โปรตีน หรือสารละลายฟีนอลปะปน ค่า A_{260}/A_{280} จะได้น้อยกว่า 1.8

ข. การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอรวมโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำอาร์เอ็นเอรวมมาตรวจสอบคุณภาพ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% โดยชั่งอะกาโรส 1.5 กรัม เติม 100 ml ของ 1X TAE บัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วย Tris-

base 1 M, glacial acetic acid 0.57 ml และ 0.5 M EDTA 1 ml อุ่นให้ร้อนเขย่าเป็นครั้งคราว ให้อะกาโรสละลายจนหมด ทิ้งให้อุณหภูมิเย็นลงประมาณ 50-55°C แล้วจึงเทอะกาโรสลงในถาดเสียบหวีลงไปเพื่อทำให้เกิดร่องสำหรับหยอดตัวอย่าง ปล่อยให้แข็งตัวเป็นเจลที่อุณหภูมิห้อง ดึงหวีออกและนำเจลที่เตรียมไว้ใส่ในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยให้ 1X TAE บัฟเฟอร์สูงท่วมผิวเจล นำสารละลายอาร์เอ็นเอหรือสารละลายที่ได้จากการทำ PCR (PCR product) ผสมกับ loading buffer ซึ่งประกอบด้วย 0.25% bromphenol blue และ 4% sucrose ใส่ในช่องของเจลที่เตรียมไว้ ผ่านกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า ประมาณ 10 โวลต์ต่อเซนติเมตร ปล่อยให้ตัวอย่างเคลื่อนไปจนถึงปลายเจลโดยสังเกตจากสีน้ำเงินของ bromphenol blue ที่ผสมใน loading buffer นำเจลมาย้อมในเอธิเดียมโบร์ไมด์ความเข้มข้น 10 mg/ml เป็นเวลา 1-2 นาที ล้างเอธิเดียมโบร์ไมด์ด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจสอบอาร์เอ็นเอ หรือ PCR product โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

2.3.1.5 **การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค** Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

ก. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR **แบบขั้นตอนเดียว** (One step RT-PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว ได้ใช้ชุดสังเคราะห์ (OneStep RT-PCR Kit) ดังวิธีการจากบริษัท QIAGEN โดยมีส่วนผสมในการทำ RT-PCR ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว

สารเคมี	ปริมาตร
5x QIAGEN OneStep RT-PCR buffer	10 µl
10 mM dNTPs	2 µl
Forward primer (0.6 µmole)	1 µl
Reverse primer (0.6 µmole)	1 µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme mix	2 µl
อาร์เอ็นเอแม่แบบ (Template RNA) 1 pg-2 µg	X µl
น้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase	Y µl
ปริมาตรรวม	50 µl

X คือ ปริมาตรที่มีปริมาณรวมของอาร์เอ็นเอเป็น 1 pg-2 µg

Y คือ ปริมาตรของน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase ที่ทำให้ปริมาตรรวมเป็น 50 µl

ผสมสารดังกล่าวข้างต้นให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้ส่วนผสมรวมกันที่ก้นหลอด จากนั้นจึงใช้สภาวะในการทำ RT-PCR ด้วยเครื่อง PCR ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สภาวะการทำ RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Reverse transcription	50°C	30 นาที	1
2. Initial PCR activation step	95°C	15 นาที	1
3. Denaturation	94°C	1 นาที	40
4. Annealing	55°C	1 นาที	
5. Extension	72°C	1 นาที	
6. Final Extension	72°C	10 นาที	1

ข. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR แบบสองขั้นตอน
(Two steps RT-PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR แบบสองขั้นตอนใช้ชุดสังเคราะห์และวิธีการจากบริษัท Promega โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) **การสังเคราะห์** first strand complementary DNA (cDNA)

นำอาร์เอ็นเอรวมปริมาณ 2 µg ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 ml ที่มี 1 µg ของ randon primer (Promega) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที แช่เย็นในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติมสารเคมีดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอน

สารเคมี	ปริมาตร
AMV Reverse Transcriptase 5X reaction buffer	5 µl
10 mM dNTP mix	2.5 µl
RNase Ribonuclease inhibitor (40 unit)	5 µl
AMV Reverse Transcriptase (30 unit)	3 µl
น้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase	Y µl
ปริมาตรรวม	25 µl

Y คือ ปริมาตรของน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase ที่ทำให้ปริมาตรรวมเป็น 25 µl

ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต และนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้ส่วนผสมรวมกันที่ก้นหลอด หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที เก็บ first strand cDNA ไว้ที่ -20 °C

(2) **การสังเคราะห์** second strand complementary DNA

นำ first strand cDNA จากข้อ (1) มาเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการศึกษาโดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะ (specific primer) และสารเคมีดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการสังเคราะห์ second strand cDNA

สารเคมี	ปริมาตร
10 mM dNTP mix	2 µl
10X PCR buffer	2.5 µl
25 mM $MgCl_2$	2 µl
Forward primer (10 pmole)	2.5 µl
Reverse primer (10 pmole)	2.5 µl
cDNA แม่แบบ (Template cDNA) 87.5 ng	X µl
Taq DNA polymerase (5 unit/µl)	0.5 µl
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	Y µl
ปริมาตรรวม	25 µl

X คือ ปริมาตรที่มีปริมาณรวมของ cDNA เป็น 87.5 ng

Y คือ ปริมาตรของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ทำให้ปริมาตรรวมเป็น 25 µl

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันและนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้ส่วนผสมรวมกันที่ก้นหลอด จากนั้นจึงใช้สภาวะในการทำ PCR ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สภาวะการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอน

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Initial denaturation	95°C	5 นาที	1
2. Denaturation	95°C	1 นาที	35
3. Annealing	55°C	1 นาที	
4. Extension	72°C	1 นาที	
5. Final Extension	72°C	10 นาที	1

แบ่ง PCR product ที่ได้ มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 1.5 % เพื่อตรวจสอบขนาดของแถบ PCR product หากมี PCR product ขนาดที่ต้องการแต่มี PCR product ขนาดอื่นๆ ปนอยู่ด้วย ให้นำ PCR product ส่วนที่เหลือมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 1.0 % อีกครั้ง เพื่อตัดเจลที่มี PCR product ขนาดของแถบตามที่ต้องการออกมา จากนั้นจึงนำเจลที่ตัดได้มาสกัดแยกเอาส่วนของ PCR product ในเจลออกมา โดยใช้ชุดอุปกรณ์สกัดแยกของบริษัท QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit) แต่หากตรวจสอบ PCR product แล้วพบว่ามีขนาดแถบที่ต้องการเพียงแถบเดียวให้นำ PCR product ส่วนที่เหลือมาทำบริสุทธิ์โดยใช้ชุดอุปกรณ์ทำบริสุทธิ์จากบริษัท QIAGEN (QIAquick PCR Purification Kit) เพื่อแยกเอาส่วนของ primer, เอนไซม์ polymerase และส่วนของเกลือที่เหลือจากการทำ PCR ออกไป

2.3.1.6 การสกัด PCR product ออกจากเจลโดยวิธีใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

นำชิ้นเจลที่มี PCR product ขนาดที่ต้องการไปชั่งน้ำหนัก เติมบัฟเฟอร์ QG ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นบัฟเฟอร์ TAE (Tris-acetate/EDTA) หรือบัฟเฟอร์ TBE (Tris-borate/EDTA) ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อสกัดดีเอ็นเอออกมา นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ QIAquick spin และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เติมบัฟเฟอร์ QG อีกครั้งเพื่อกำจัดอะกาโรสที่เหลือในคอลัมน์ จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย 750 µl ของบัฟเฟอร์ PE ซึ่งมี ethanol เป็นส่วนประกอบ วางคอลัมน์ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทำการชะ PCR product ที่ดูดซับกับ silica-gel membrane ของคอลัมน์ออกมาโดยใช้ 30-50 µl Tris buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)

2.3.1.7 **การทำ** PCR product **ให้บริสุทธิ์โดยวิธีใช้** QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)

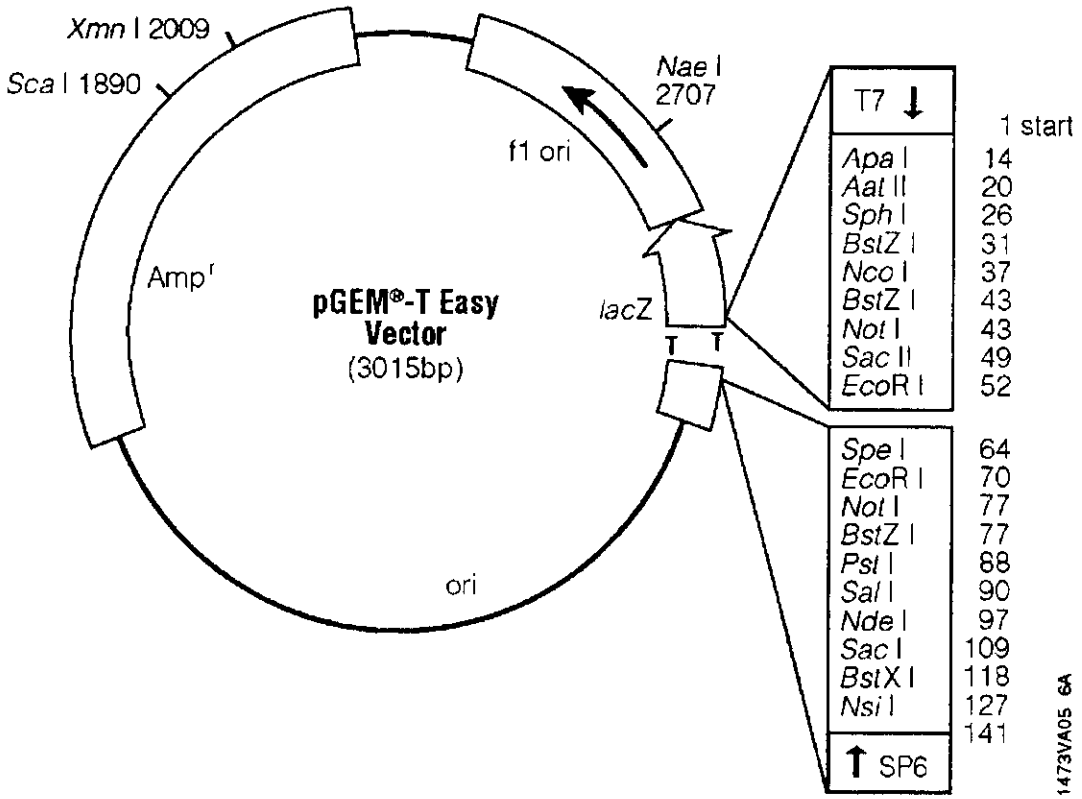
นำชิ้นเจลที่มี PCR product ขนาดที่ต้องการมาเติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 5 เท่าของน้ำหนักเจล และนำสารละลายที่ได้ใส่ในคอลัมน์ QIAquick spin หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที นำคอลัมน์ QIAquick spin ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml ชะ PCR product ที่ดูดซับกับ silica-gel membrane ของคอลัมน์ออกมาโดยใช้ 30-50 µl Tris buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)

2.3.1.8 **การเชื่อม** PCR product **กับดีเอ็นเอพาหะ**

นำ PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์หรือสกัดแยกออกจากเจลมาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะคือ pGEM®-T Easy (Promega) ดังรูปที่ 9 PCR product จะเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะตรงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นตำแหน่งในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I การเชื่อม PCR product ทำโดยใส่ดีเอ็นเอพาหะ 1 µl, PCR product 3 µl, 10X ligation buffer 5 µl และเอนไซม์ T4 DNA ligase 1 µl ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 0.5 ml ซึ่งวางอยู่บนน้ำแข็ง ผสมสารให้เข้ากันแล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วต่ำเพื่อให้สารผสมตกลงที่ก้นหลอด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือบ่มข้ามคืนที่ 4°C นำดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) ที่ได้จากการเชื่อมดีเอ็นเอพาหะกับ PCR product เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* XL1-Blue MRF' เพื่อเพิ่มจำนวน

2.3.1.9 **การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน** *E. coli* XL1-Blue MRF'

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* XL1-Blue MRF' บนจานอาหารวุ้น Luria Bertaini (LB agar) ที่เติมยาปฏิชีวนะ tetracyclin 12.5 µg/ml อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว Luria Bertaini (LB broth) หรือ SOB 100 ml เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm ที่ 37°C เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมงหรือจนมีความขุ่นเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้ค่า 0.5-0.6 ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 ml แช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนมาละลายด้วย 0.1 M $CaCl_2$ ที่เย็นจัดปริมาตร 5 ml วางไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย 0.1 M $CaCl_2$ ใน 15% glycerol ที่เย็นจัดปริมาตร 4 ml แบ่งลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดละ 200 µl เก็บไว้ที่ -80°C



รูปที่ 9 แผนที่ลักษณะดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy
(http://www.ymbc.ym.edu.tw/est/1473vaw4.gif)

2.3.1.10 **การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* XL1-Blue MRF'**
(ดัดแปลงจาก Sambrook *et al.*, 1989)

เมื่อต้องการนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* XL1-Blue MRF' ให้นำผลที่ได้จากการเชื่อม PCR product กับดีเอ็นเอพาหะจากข้อ 2.3.1.8 มาเติมในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มี *E. coli* XL1-Blue MRF' 200 µl แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบ 30 นาที ให้นำเซลล์มาบ่มไว้ที่ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที วางในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC ปริมาตร 800 µl บ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 1.5-2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ซึ่งมียาปฏิชีวนะ ampicillin 100 µg/ml และเคลือบผิวอาหารด้วย 100 µl ของ 100 mM IPTG และ 20 µl ของ 50 mg/ml X-Gal เป็นเวลา 30 นาที นำมาบ่มข้ามคืนที่ 37°C เลือกโคโลนีสีขาวและโคโลนีสีฟ้าซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม มาเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ml ซึ่งมี ampicillin 100 µg/ml โดย

เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm ที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสม

2.3.1.11 การสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสม

(ดัดแปลงจาก Holmes and Quigley, 1981)

นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง มาบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที และหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที หรือ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ปิเปตอาหารเหลวส่วนบนออกไป เติมสารละลาย STET buffer ซึ่งประกอบด้วย 8% Sucrose (w/v), 5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl และ 50 mM EDTA (pH 8.0) 200 µl ผสมโดยใช้วอร์เทกซ์ เติมสารละลาย Lysozyme ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 5 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30-45 วินาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ซึ่งตะกอนดังกล่าวสามารถเขี่ยออกไปได้โดยใช้ไม้จิ้มฟัน เติม 10 mg/ml RNase A ปริมาตร 1 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เติม 5% CTAB 20 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนใน 1.2 M NaCl 300 µl จากนั้นเติม chloroform 300 µl ผสมโดยวอร์เทกซ์ เป็นเวลา 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm 5 นาที แยกส่วนใสใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม isopropanol 220 µl เก็บไว้ที่ -20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือเก็บในไนโตรเจนเหลว 15 วินาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm 5 นาที เทสารละลายออกไปโดยไม่ให้รบกวนตะกอน ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 700 µl สองครั้ง เท 70% ethanol แล้วคว่ำหลอดบนกระดาษซับ และดึงหยดของเหลวที่ติดข้างหลอดโดยใช้ปิเปต ละลายพลาสมิดด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 30-50 µl นำพลาสมิดที่สกัดได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% เพื่อเลือกโคลนที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดที่ใช้เป็นตัวควบคุม

2.3.1.12 การตรวจสอบดีเอ็นลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I

นำดีเอ็นลูกผสมที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดที่ใช้เป็นตัวควบคุมมาตรวจสอบอีกครั้งโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I (BioLabs) ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น คาดว่าเป็นส่วนของยีนที่ต้องการศึกษาซึ่งเชื่อมอยู่กับดีเอ็นเอพาหะและสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 สารที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I

สารเคมี	ปริมาตร
1X NEBuffer *Eco*R I	5 µl
ดีเอ็นเอลูกผสม (1 µg)	X µl
เอนไซม์ *Eco*R I (20,000 unit/ml)	0.05 µl
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	Y µl
ปริมาตรรวม	50 µl

X คือ ปริมาตรที่มีปริมาณรวมของดีเอ็นเอลูกผสมเป็น 1 µg

Y คือ ปริมาตรของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ทำให้ปริมาตรรวมเป็น 50 µl

ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้สารผสมตกลงก้นหลอด นำสารผสมที่ได้มาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 1 ชั่งโมง สำหรับดีเอ็นเอลูกผสมที่มียีนที่ต้องการศึกษาเชื่อมอยู่ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I แล้วนำมาตรวจสอบผลด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% จะพบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับ PCR product ที่ใช้เชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะในขั้นตอน 2.3.1.8 นำดีเอ็นเอลูกผสมดังกล่าวมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

2.3.1.13 **การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ** (DNA sequencing)

นำดีเอ็นเอลูกผสมจากข้อ 2.3.1.12 มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยผสมสารดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 สารที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ

สารเคมี	ปริมาตร/ปฏิกิริยา
Big Dye Terminator ready reaction mix	2 µl
Big Dye sequencing buffer	1 µl
ดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant plasmid) 150-300 ng	X µl
ไพร์เมอร์ (T7 หรือ SP6)1.6 pmole	1 µl
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	Y µl
ปริมาตรรวม	10 µl

X คือ ปริมาตรที่มีปริมาณรวมของดีเอ็นเอลูกผสมเป็น 150-300 ng

Y คือ ปริมาตรของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ทำให้ปริมาตรรวมเป็น 10 µl

ผสมสารเคมีข้างต้นให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้สารผสมตกลงก้นหลอด จากนั้นนำมาทำ PCR โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Initial denaturation	96°C	1 นาที	1
2. Denaturation	96°C	10 วินาที	25
3. Annealing	50°C	5 วินาที	
4. Extension	60°C	4 นาที	
5. Final Extension	60°C	7 นาที	1

นำ PCR product ที่ได้ 10 µl มาเติมลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml ที่มี 125 mM EDTA 2.5 µl และ absolute ethanol 30 µl ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4°C ดูดสารละลายใสส่วนบนออกแล้วเติม 70% ethanol 30 µl แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C ดูดสารละลายใสส่วนบนออกให้หมดและทำให้แห้งโดยการใช้ heat box ที่ 90°C เป็นเวลา 1 นาที เก็บหลอดตัวอย่างในที่ทึบแสงที่ -20°C นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง Automated DNA Sequencer ที่ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.3.2 **การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 3′ และ 5′ ของยีน *dxs1* โดยวิธี** RLM-RACE (RNA ligase-mediated rapid amplification of 5′ and 3′ cDNA ends)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 5′ และ3′ ของยีน *dxs1* สรุปได้ดังรูปที่ 10 โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.3.2.1 **การกำจัดส่วน** 5′ phosphates **ของอาร์เอ็นเอ**

นำอาร์เอ็นเอรวมที่เตรียมได้จำนวน 1-5 µg มากำจัดส่วนของ 5′ phosphates โดยการเติม calf intestinal phosphatase (CIP) และสารอื่นๆดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 สารที่ใช้กำจัดส่วน 5′ phosphates ของอาร์เอ็นเอ

สารเคมี	ปริมาตร
อาร์เอ็นเอรวม (1-5 µg)	X µl
10X CIP buffer	1 µl
RNaseOut™ (40 unit/µl)	1 µl
CIP (10 unit/µl)	1 µl
น้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase	Y µl
ปริมาตรรวม	10 µl

X คือ ปริมาตรที่มีปริมาณของ RNA รวมเป็น 1-5 µg

Y คือ ปริมาตรของน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase ที่ทำให้ปริมาตรรวมเป็น 10 µl

ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้สารผสมตกลงก้นหลอด บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 50°C 1 ชั่วโมง แช่เย็นในน้ำแข็งจากนั้นนำสารละลายที่ได้มาตกตะกอนอาร์เอ็นเอ โดยการเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase 90 µl และ phenol : chloroform อัตราส่วน 1:1 100 µl ผสมสารด้วยวอร์เทกซ์ เป็นเวลา 30 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายใสส่วนบนมาเติม 10 mg/ml mussel glycogen 2 µl และ 3M sodium acetate (pH 5.2) 10 µl ผสมให้เข้ากัน เติม 95% ethanol 220 µl แช่สารละลายที่ได้ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm 20 นาที ที่ 4 °C ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 500 µl โดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm 2 นาที ที่ 4°C เทสารละลายใสส่วนบนออกไปโดยไม่ให้รบกวนตะกอน คว่ำหลอดบนกระดาษซับและดูดหยดของเหลวที่ติดข้างหลอดโดยใช้ปิเปต วางให้

แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase 7 µl แล้วนำอาร์เอ็นเอที่ได้ (dephosphorylated RNA) มากำจัดส่วน 5′ cap structure

2.3.2.2 **การกำจัดส่วน** 5′ cap structure **ของอาร์เอ็นเอ**

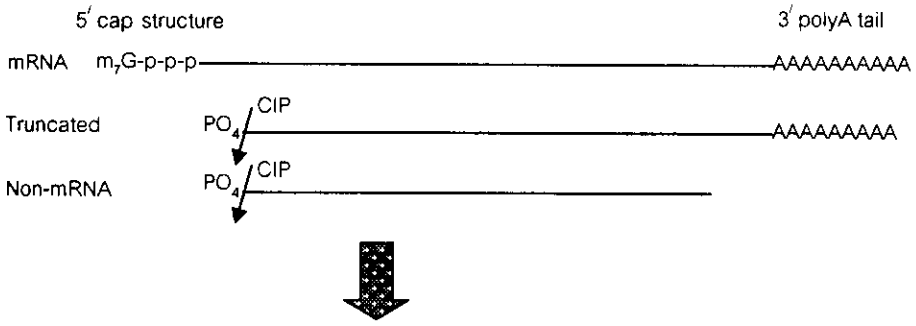
นำอาร์เอ็นเอ จากข้อ 2.3.2.1 มากำจัดส่วนของ 5′ cap structure โดยการเติม tobacco acid pyrophosphatase (TAP) และสารอื่นๆดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 สารที่ใช้กำจัดส่วน 5′ cap structure ของอาร์เอ็นเอ

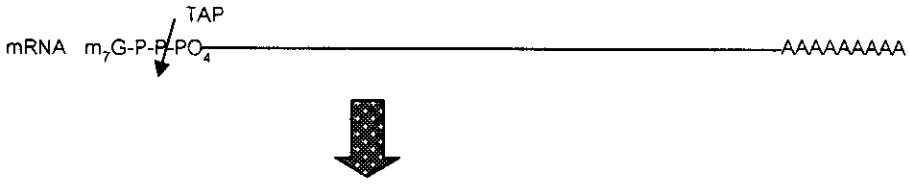
สารเคมี	ปริมาตร
Dephosphorylated RNA	7 µl
10X TAP buffer	1 µl
RNaseOutTM (40 unit/µl)	1 µl
TAP (0.5 unit/µl)	1 µl
ปริมาตรรวม	10 µl

ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้สารผสมตกลงก้นหลอด บ่มสารละลาย 1 ชั่วโมง ที่ 37°C วางหลอดในน้ำแข็ง นำสารละลายที่ได้มาตกตะกอนอาร์เอ็นเอ โดยการเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase 90 µl และ phenol : chloroform อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 µl ผสมสารด้วยวอร์เทกซ์ 30 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความ เร็ว 14,000 rpm 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายใสส่วนบนมาเติม 10 mg/ml mussel glycogen 2 µl และ 3 M sodium acetate (pH 5.2) 10 µl ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 95% ethanol 220 µl แช่สารละลายที่ได้ในน้ำแข็งแห้งเป็นเวลา 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm 20 นาที ที่ 4°C ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol 500 µl โดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm 2 นาที ที่ 4°C เทสารละลายใสส่วนบนออกไปโดยไม่ให้รบกวนตะกอน คว่ำหลอดบนกระดาษซับและดูดหยดของเหลวที่ติดข้างหลอดโดยใช้ปิเปต วางให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำตะกอนมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase 7 µl จากนั้นจึงนำอาร์เอ็นเอ (decapped RNA) ที่ได้มาเชื่อมกับ GeneRacer™ RNA oligo ทางปลาย 5′

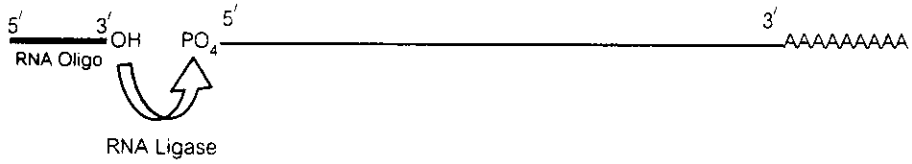
1. เติม CIP เพื่อกำจัด 5′ phosphate ของ rRNA, tRNA, DNA และ RNA ที่ไม่สมบูรณ์



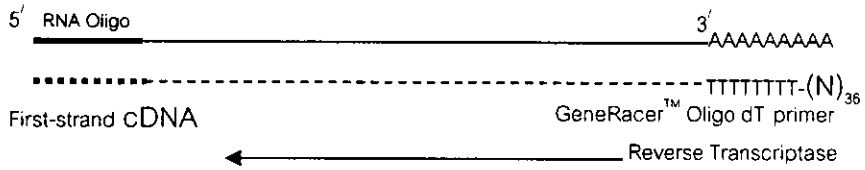
2. เติม TAP เพื่อกำจัด 5′ cap structure ของ mRNA ที่สมบูรณ์



3. เชื่อม GeneRacer™ RNA Oligo ทางปลาย 5′ของ mRNA ด้วยเอนไซม์ T4 RNA ligase



4. สังเคราะห์ first strand cDNA ด้วยเอนไซม์ SuperScript™ III Reverse Transcriptase โดยใช้ RNA จากข้อ 3 เป็นแม่แบบและ GeneRacer™ Oligo dT เป็น primer



5. เพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการศึกษาทางปลาย 5′ และ 3′ ด้วย primer ที่จำเพาะโดยใช้แม่แบบจากข้อ 4

รูปที่ 10 ขั้นตอนในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์โดยวิธี RLM-RACE (Invitrogen)

2.3.2.3 การเชื่อมปลาย 5′ ของอาร์เอ็นเอด้วย GeneRacer™ RNA oligo

นำอาร์เอ็นเอจากข้อ 2.3.2.2 มาเชื่อมทางปลาย 5′ ด้วย GeneRacer™ RNA oligo โดยดูดสารละลายอาร์เอ็นเอ 7 µl ลงในหลอด lyophilized GeneRacer™ RNA oligo ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต มาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้สารผสมตกลงก้นหลอด บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 65°C 5 นาทีเพื่อกำจัดโครงสร้างทุติยภูมิของอาร์เอ็นเอ (RNA secondary structure) แช่เย็นในน้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้มาเติมสารเคมีเพื่อเชื่อมปลาย 5′ ของอาร์เอ็นเอดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมปลาย 5′ ของอาร์เอ็นเอ

สารเคมี	ปริมาตร
Decapped RNA	7 µl
10X Ligase buffer	1 µl
10 mM ATP	1 µl
RNaseOut™ (40 unit/µl)	1 µl
T4 RNA ligase (5 unit/µl)	1 µl
ปริมาตรรวม	11 µl

ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้สารผสมตกลงก้นหลอด บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 37°C 1 ชั่วโมง วางหลอดในน้ำแข็ง นำสารละลายที่ได้มาตกตะกอนอาร์เอ็นเอ โดยการเติมน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase 90 µl และ phenol : chloroform อัตราส่วน 1:1 100 µl ผสมสารโดยใช้วอร์เทกซ์ 30 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายใสส่วนบนมาเติม 10 mg/ml mussel glycogen 2 µl และ 3M sodium acetate (pH 5.2) 10 µl ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 95% ethanol 220 µl แช่สารละลายที่ได้ในน้ำแข็งแห้ง 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm 20 นาที ที่ 4 °C ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol 500 µl โดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm 2 นาที ที่ 4°C เทสารละลายใสส่วนบนออกไปโดยไม่ให้รบกวนตะกอน คว่ำหลอดบนกระดาษซับและดึงหยดของเหลวที่ติดข้างหลอดโดยใช้ปิเปต วางให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนในน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase 10 µl นำอาร์เอ็นเอที่ได้ (ligated RNA) มาสร้าง first strand cDNA

2.3.2.4 **การสังเคราะห์** first strand cDNA

นำละลาย 10 µl จากข้อ 2.3.13.3 มาสร้าง first strand cDNA โดยเติม GeneRacer™ RNA oligo dT primer ปริมาตร 1 µl และ 10 mM dNTP mix 1 µl ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้สารผสมตกลงก้นหลอด บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 65°C 5 นาที เพื่อกำจัดโครงสร้างทุติยภูมิของอาร์เอ็นเอ แช่ในน้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาเติมสารเคมีเพื่อสังเคราะห์ first strand cDNA ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ first strand cDNA

สารเคมี	ปริมาตร
RNA ที่เติม GeneRacer™ RNA oligo dT และ 10 mM dNTP mix	12 µl
5X first strand buffer	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
RNaseOut™ (40 unit/µl)	1 µl
SuperScrip™ III Reverse Transcriptase (200 unit/µl)	1 µl
ปริมาตรรวม	20 µl

ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้ของเหลวตกลงก้นหลอด บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 42°C 50 นาที จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 70°C 15 นาที เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ SuperScrip™ III Reverse Transcriptase นำสารละลายที่ได้แช่ในน้ำแข็ง 2 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้สารผสมตกลงก้นหลอด เติม RNase H (2U) 1 µl บ่มสารละลาย 20 นาที ที่ 37°C นำสารละลายที่ได้ไปเพิ่มจำนวน cDNA โดยการทำ PCR หรือเก็บสารละลายไว้ที่ -20 °C

2.3.2.5 การเพิ่มจำนวน cDNA โดยการทำ PCR

นำ first strand cDNA จากข้อ 2.3.2.4 มาเพิ่มจำนวนยีน *dxs* ทางปลาย 3′ และ 5′ (3′ และ 5′ RACE) ด้วยการใช้ไพร์เมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ (Gene Specific Primer, GSP) กับ first strand cDNA ของยีน *dxs* ทางด้านปลาย 3′ และ 5′ โดยการทำ PCR ซึ่งมีส่วนผสมของสารเคมีดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ส่วนผสมของสารที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA โดยการทำ PCR

สารเคมี	5′ RACE PCR	3′ RACE PCR
GeneRacer™ 5′ หรือ 5′ Nested Primer, 10 µmole	3 µl	-
Reverse GSP, 10 µmole	1 µl	-
GeneRacer™ 3′ หรือ 3′ Nested Primer, 10 µmole	-	3 µl
Forward GSP, 10 µmole	-	1 µl
cDNA แม่แบบ (cDNA Template)	1 µl	1 µl
10X High Fidelity PCR buffer	5 µl	5 µl
10 mM dNTP mix solution	1 µl	1 µl
Platinum *Taq* DNA Polymerase (5 unit/µl)	0.5 µl	0.5 µl
$MgSO_4$ 50 mM	2 µl	2 µl
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	36.5 µl	36.5 µl
ปริมาตรรวม	50 µl	50 µl

ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้สารผสมตกลงก้นหลอด จากนั้นนำมาทำ PCR โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 18 แล้วนำสารละลายที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% จากนั้นนำ PCR product ขนาดที่ต้องการไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังวิธีการข้อ 2.3.1.6 - 2.3.1.13

ตารางที่ 18 สภาวะในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน cDNA ทางปลาย 3′ และ 5′

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Denaturation	94 °C	2 นาที	1
Denaturation	94 °C	30 วินาที	5
Annealing	72 °C	1 นาที/1 kb DNA	
Denaturation	94 °C	30 วินาที	5
Annealing	70 °C	1 นาที/1 kb DNA	
Denaturation	94 °C	30 วินาที	35
Annealing	60-68 °C	30 วินาที	
Extension	68-72 °C	1 นาที/1 kb DNA	
Final extension	68-72 °C	10 นาที	1

2.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

เมื่อได้ลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ DXS ในปาล์มน้ำมัน ใช้โปรแกรม ClustalX 1.81 ในการเรียงลำดับกรดอะมิโนให้อยู่ในแนวเส้นตรง (alignment) เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS ในแบคทีเรีย สาหร่าย และพืชชนิดอื่นที่มีการศึกษามาแล้วจากธนาคารยีน จำนวน 26 ชนิด ซึ่งมีชื่อและตัวย่อ ดังตารางที่ 19

การวิเคราะห์ตำแหน่งในการทำงานของเอนไซม์รวมถึงวิเคราะห์ว่ามีเปปไทด์ที่นำโปรตีนหรือไม่ ใช้โปรแกรม TargetP และ SignalP (Nielsen *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1999; www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) รวมทั้งโปรแกรม Predator (www.inra/servilete/web Predator)

การศึกษาความยาวของเปปไทด์ที่นำเอนไซม์ DXS จากไซโทพลาสมเข้าสู่คลอโรพลาสต์ใช้โปรแกรม ChloroP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 1999; http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/)

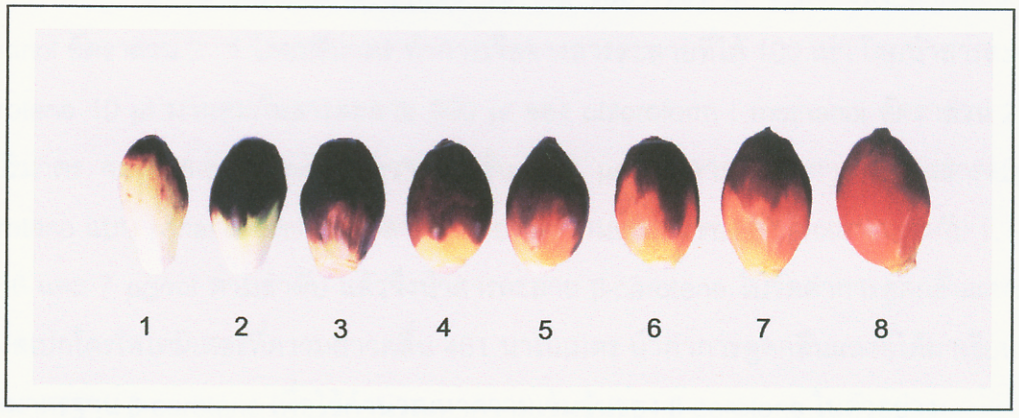
การเปรียบเทียบร้อยละความเหมือนและทำ phylogenetic tree ใช้โปรแกรม Progressive alignment (Feng and Doolittle, 1990)

ตารางที่ 19 ชนิด ชื่อย่อ และ accession number ของเอนไซม์ DXS ในแบคทีเรีย สาหร่าย และพืชที่ใช้ในการเปรียบเทียบข้อมูลต่างๆกับปาล์มน้ำมัน

ชนิดของสิ่งมีชีวิต (species)	ชื่อย่อ	accession number
Andrographis paniculata	ANDR	AY254390
Narcissus pseudonarcissus	NARC	CAC08458
Arabidopsis thaliana	ARAB	NP_193291
Artemisia annua	ARTE	AAD56390
Morinda citrifolia	MORI	AAL32062
Catharanthus roseus	CATH	CAA09804
Medicago truncatula(1)	MEDI	CAD22530
Medicago truncatula(2)	MED2	CAD22531
Oryza sativa	ORYZ	BAC84616
Stevia rebaudiana	STEV	CAD22155
Triticum aestivum	TRIT	BT009346
Tagetes erecta	TAGE	AAG10432
Capsicum annuum	CAPS	078328
Lycopersicon esculentum	LYCO	AAD38941
Elaeis guineensis	**PALM**	**AY583783**
Chlamydomonas reinhardtii	CHLA	T08140
Agrobacterium tumefaciens STR. C58	AGRO	NP353769
Brucella suis 1330	BRUC	NP697464
Chromobacterium violaceum ATCC 12472	CHRO	NP902362
Nitrosomonas europaea ATCC 19718	NITR	NP841218
Novosphingobium aromaticivorans	NOVO	ZP00096461
Rhodobacter capsulatus	RHOC	P26242
Rhodospirillum rubrum	RHOD	ZP0013656
Sinorhizobium meliloti	SINO	NP384986
Escherichia coli O157:H7	ESCH	NP286162
Mesorhizobium loti	MESO	NP107784

2.3.4 **การศึกษาการแสดงออกของยีน *dxs* และ *dxr* โดยวิธี** semiquantitative RT-PCR

นำชั้นเนื้อของผลปาล์มน้ำมันอายุ 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 และ 22 สัปดาห์หลังจากการผสมพันธุ์ มาสกัดอาร์เอ็นเอดังวิธีการข้อ 2.3.1.1 และทำการเพิ่มปริมาณยีน *dxs* (forward 5′-TGGGATGTTGGTCATCAGTC-3′, reverse 5′-ACTGCGTGTTGTTCTGCTAT-3′), ยีน *dxr* (forward 5′-GGCTCTATTGGAACTCAGAC-3′, reverse 5′-AACCGCATATCGGGCC AACC-3′) และตัวควบคุมคือยีน *18S rRNA* (forward 5′-CAAAGCAAGCCTACGCTCTG-3′, reverse 5′-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3′) ด้วยเทคนิค RT-PCR แบบสองขั้นตอนดังวิธีการข้อ 2.3.1.5 (ข.) โดยหาสภาวะที่เหมาะสม เช่น ปริมาณดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และจำนวนรอบในการทำ PCR ที่เหมาะสมก่อน รวมทั้งทำ RT-PCR ของยีน *18S rRNA* ควบคู่กับยีน *dxs* หรือยีน *dxr* ที่สภาวะเดียวกันทำอิเล็กโทรโฟรีซิสของ PCR product บนเจลอะกาโรส 1.5% ใน 0.5X TAE buffer จากนั้นนำ PCR product ของยีน *dxs* และยีน *dxr* รวมถึงยีน *18S rRNA* ที่ผ่านการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสมาวัดความเข้มของแถบ (band intensity) โดยใช้ Document gel รุ่น BioDoc-It™ system โปรแกรม Labworks 4.0 คำนวณค่าอัตราส่วนความเข้มแถบของยีน *dxs* หรือยีน *dxr* เทียบกับยีน *18S rRNA* (Relative intensity)



รูปที่ 11 ผลปาล์มน้ำมันระยะที่ 1-8 อายุ 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 และ 22 สัปดาห์หลังจากการผสมพันธุ์

2.3.5 **การหาปริมาณ β-carotene จากชั้นเนื้อของผลปาล์มน้ำมันบริเวณ**

(ดัดแปลงจาก Solovchenko *et al.*, 2001)

นำชั้นเนื้อของผลปาล์มน้ำมัน 200 mg จากผลปาล์มน้ำมันอายุ 8 และ 10 สัปดาห์หลังจากการผสมพันธุ์และ 100 mg จากผลปาล์มน้ำมันสุกอายุ 12, 14, 16, 18, 20 และ 22 สัปดาห์หลังจากการผสมพันธุ์ ที่แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวมาบดด้วยโกร่งจนเป็นผงละเอียด เติมสารละลาย chloroform:methanol อัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร 10 ml ผสมสารละลายและตัวอย่างให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายใสส่วนบนออกไปโดยไม่ให้รบกวนตะกอน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.2 เท่าของส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สารละลายที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงจะแยกชั้นได้ 2 ชั้น นำสารละลาย chloroform ที่อยู่ชั้นล่างมาหาปริมาณ β-carotene โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 461 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณ β-carotene โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน β-carotene (ดัดแปลงจาก Solovchenko *et al.*, 2001)

2.3.6 **การทำกราฟมาตรฐาน β-carotene**

ละลาย β-carotene จำนวน 10 mg ในสารละลาย 1 ml ของ chloroform : methanol อัตราส่วน 2 : 1 โดยปริมาตร ทำการเจือจางสารละลายที่ได้ 100 เท่า โดยนำสารละลาย β-carotene 10 µl มาผสมกับสารละลาย 990 µl ของ chloroform : methanol อัตราส่วน 2 : 1 โดยปริมาตร จะได้ β-carotene ที่มีความเข้มข้น 100 µg/ml จากนั้นทำการเจือจางสารละลาย β-carotene แบบ serial dilution ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของ β-carotene เท่ากับ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 µg/ml ตามลำดับ แล้วจึงนำสารละลาย β-carotene ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 461 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน β-carotene เพื่อใช้คำนวณหาความเข้มข้นของ β-carotene ในตัวอย่าง