บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

3.1 พันธุ์พืช

ในการทดลองครั้งนี้ใช้บัวชั้น 2 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 บัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก จำนวน 58 หัว

กลุ่มที่ 2 บัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก จำนวน 21 หัว

ปลูกบัวชั้นลงในถุงดำขนาด 6×12 นิ้ว ที่เรือนเพาะชำคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สุ่มเก็บตัวอย่างพืช ในระยะการเจริญเติบโต 4 ระยะ ได้แก่ ระยะใบอ่อน ระยะช่อดอกตูม ระยะช่อดอกบาน และระยะดอกจริงดอกแรกบาน (ภาพที่ 1-2) กลุ่มละ 12 ต้น ต้นละ 1 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างใบ ใบประดับส่วนล่าง และใบประดับส่วนบนของบัวชั้นจากแปลงมาแช่ในน้ำแข็งทันที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เพื่อนำไปสกัด RNA

ภาพที่ 1 บัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1ใน 3 ของช่อดอก
(1: ระยะใบอ่อน; 2: ระยะช่อดอกตูม; 3: ระยะช่อดอกบาน; 4: ระยะดอกจริงดอกแรกบาน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2 บัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก
(1: ระยะใบอ่อน; 2: ระยะช่อดอกตูม; 3: ระยะช่อดอกบาน; 4: ระยะดอกจริงดอกแรกบาน)

3.2 การสกัด RNA

นำตัวอย่างพืชแต่ละส่วนมาสกัด RNA โดยใช้ Trizol™ Reagent (Invitrogen, USA) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) ชั่งชิ้นส่วนพืชตัวอย่างละ 0.2 กรัม บดตัวอย่างในโกร่งที่แช่ใน -80 ^{O}C เติม Trizol™ Reagent 1,000 µl บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน เทสารละลายที่ได้ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
2) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{O}C เป็นเวลา 10 นาที
3) ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ วางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที เติม chloroform 200 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 5 ^{O}C เป็นเวลา 2-3 นาที
4) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{O}C เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 1 ใน 2 ของสารละลายที่ได้ กลับหลอดไปมาเบาๆ จากนั้นวางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที
5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{O}C เป็นเวลา 10 นาที
6) เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol ปริมาณ 1,000 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 rpm อุณหภูมิ 4 ^{O}C เป็นเวลา 5 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7) เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ตากตะกอน RNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

8) ละลายตะกอน RNA ด้วย RNase free water ปริมาณ 20 µl (หรือขึ้นอยู่กับปริมาณของตะกอน RNA)

9) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ RNA ด้วย agarose gel electrophoresis (1.2 %) ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต RNA ที่ได้เก็บไว้ที่ -80 ^{O}C

3.3 การทำ DNase digestion

นำ RNA ที่สกัดได้มากำจัด genomic DNA ที่มีการปนเปื้อนออกไป ส่วนผสมของปฏิกิริยามีรายละเอียดดังนี้

สารละลาย RNA	3	µl
10X DNase buffer	1.5	µl
25 mM $MgCl_2$	0.6	µl
0.1 M DTT	1.5	µl
RNase free H_2O	3.4	µl
DNase I (1U/µl)	5	µl
ปริมาตรรวม	15	µl

นำส่วนผสมที่ได้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เอนไซม์ DNase I ทำงาน จากนั้นนำมาเติม EDTA (25 mM) 1.5 µl และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 ^{O}C เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบคุณภาพของ RNA ที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis (1.2%) ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

3.4 การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (cDNA synthesis)

นำ RNA จากส่วนต่างๆ ของบัวชั้นที่ได้จากการทำ DNase digestion มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ชุดน้ำยา SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) โดยมีรายละเอียดดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1) เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา

สารละลาย RNA	3	µl
50 µM oligo $(dT)_{20}$	1	µl
10 µM dNTP mix	1	µl
DEPC-treated water	5	µl
ปริมาตรรวม	10	µl

2) นำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 ^{O}C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งนาน 1 นาที

3) เติมส่วนผสมของ cDNA Synthesis Mix ปริมาณ 10 µl ประกอบไปด้วย

10X RT buffer	2	µl
25 mM $MgCl_2$	4	µl
0.1 M DTT	2	µl
RNaseOUT^{TM} (40 U/µl)	1	µl
SuperScript^{TM} III RT (200 U/µl)	1	µl
ปริมาตรรวม	10	µl

4) นำส่วนผสมที่ได้ทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 ^{O}C เป็นเวลา 50 นาที

5) หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 85 ^{O}C เป็นเวลา 5 นาที

6) กำจัด RNA โดยเติม RNase H 1 µl จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เป็นเวลา 20 นาที เก็บ cDNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การตรวจสอบคุณภาพของ cDNA

การตรวจสอบคุณภาพ cDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR ใช้ไพรเมอร์ ndhB มีรายละเอียดดังนี้คือ

1) ส่วนผสมของปฏิกิริยา

10X buffer	2	µl
50 mM $MgCl_2$	0.6	µl
10 mM dNTP mix	0.4	µl
Taq DNA polymerase (5 U/µl)	0.4	µl
ndhB up	0.5	µl
ndhB down	0.5	µl
RNase-free H_2O	13.6	µl
สารละลาย cDNA	2	µl
ปริมาตรรวม	20	µl

nucleotide sequences	
ndhB up	ndhB down
5'-ATG GTTTCTCTTGGCTATATGG-3'	5'-GCATACGTTTCATGC TTGTTTGAG-3'

โปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

รอบที่ 1 denaturation	95 ^{O}C	4	นาที	
annealing	50 ^{O}C	30	วินาที	
รอบที่ 2 denaturation	95 ^{O}C	30	วินาที	จำนวน 35 รอบ
annealing	50 ^{O}C	60	วินาที	
extension	72 ^{O}C	70	วินาที	
รอบที่ 3 extension	72 ^{O}C	8	นาที	

2) ตรวจสอบผลของ PCR ที่ได้โดยใช้ agarose gel electrophoresis (1.8 %) ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 การคัดกรองคู่ไพรเมอร์

1) จากบัวชั้นทั้ง 2 กลุ่ม ที่ได้ใน 4 ระยะได้แก่ ระยะใบอ่อน ระยะช่อดอกตูม ระยะช่อดอกบาน และระยะดอกจริงดอกแรกบาน (ในช่อดอกแต่ละระยะจะใช้ส่วนของใบประดับส่วนล่างและใบประดับส่วนบน) รวม 14 ตัวอย่าง นำ cDNA ตัวอย่างละ 2 µl ผสมรวมกัน เพื่อนำมาคัดกรองคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ DDRT-PCR ประกอบด้วย forward primer 58 ชนิด (ตารางที่ 1) และ reverse primer 4 ชนิด คือ oligoVA (5'-TTT TTT TTT TTT VA-3') oligoVG (5'-TTT TTT TTT TTT VG-3') oligoVC (5'-TTT TTT TTT TTT VC-3') และ oligoVT (5'-TTT TTT TTT TTT VT-3')

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

primer		primer	
primer	nucleotide sequences	primer	nucleotide sequences
OPF01	5'-ACG GAT CCT G-3'	OPD10	5'-GGT CTA CAC C-3'
OPF02	5'-GAG CAT CCC T-3'	OPD11	5'-AGC GCC ATT G-3'
OPF03	5'-CCT GAT CAC C-3'	OPD12	5'-CAC CGT ATC C-3'
OPF04	5'-GGT GAT CAG G-3'	OPD13	5'-GGG GTG ACG A-3'
OPF05	5'-CCG AAT TCC C-3'	OPD14	5'-CTT CCC CAA G-3'
OPF06	5'-GGG AAT TCG G-3'	OPD15	5'-CAT CCG TGC T-3'
OPF07	5'-CCG ATA TCC C-3'	OPD16	5'-AGG GCG TAA G-3'
OPF08	5'-GGG ATA TCG G-3'	OPD17	5'-TTT CCC ACG G-3'
OPF09	5'-CCA AGC TTC C-3'	OPD18	5'-GAG AGC CAA C-3'
OPF10	5'-GGA AGC TTG G-3'	OPD19	5'-CTG GGG ACT T-3'
OPF11	5'-TTG GAT CCC C-3'	OPD20	5'-ACC CGG TCA C-3'
OPF12	5'-ACG GTA CCA G-3'	OPAB11	5'-GTG CGC AAT G-3'
OPF13	5'-GGC TGC AGA A-3'	OPAB12	5'-CCT GTA CCG A-3'
OPF14	5'-TGC TGC AGG T-3'	OPAB13	5'-CCT ACC GTG G-3'
OPF15	5'-CCA GTA CTC C-3'	OPAB14	5'-AAG TGC GAC C-3'
OPF16	5'-GGA GTA CTG G-3'	OPAB16	5'-CCC GGA TGG T-3'

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (ต่อ)

primer		primer	
primer	nucleotide sequences	primer	nucleotide sequences
OPF17	5’-AAC CCC GGA A-3’	OPAB17	5’-TCG CAT CCA G-3’
OPF18	5’-TTC CCG GGT T-3’	OPAB18	5’-CTG GCG TGT C-3’
OPF19	5’-CCT CTA GAC C-3’	OPAB19	5’-ACA CCG ATG G-3’
OPF20	5’-GGT CTA GAG G-3’	AP-A01	5’-TAC AAC GAG G-3’
OPD01	5’-ACC GCG AAG G-3’	AP-A02	5’-TGG ATT GGT C-3’
OPD02	5’-GGA CCC AAC C-3’	AP-A03	5’-CTT TCT ACC C-3’
OPD03	5’-GTC GCC GTC A-3’	AP-A04	5’-TTT TGG CTC C-3’
OPD04	5’-TCT GGT GAG G-3’	AP-A05	5’-GGA ACC AAT C-3’
OPD05	5’-TGA GCG GAC A-3’	AP-A06	5’-AAA CTC CGT C-3’
OPD06	5’-ACC TGA ACG G-3’	AP-A07	5’-TCG ATA CAG G-3’
OPD07	5’-TTG GCA CGG G-3’	AP-A08	5’-TGG TAA AGG A-3’
OPD08	5’-GTG TGC CCC A-3’	AP-A09	5’-TCG GTC ATA G-3’
OPD09	5’-CTC TGG AGA C-3’	AP-A10	5’-GGT ACT AAG G-3’

ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR

10X buffer	1.2	µl
50 mM $MgCl_2$	0.6	µl
10 mM dNTP mix	0.5	µl
Taq DNA polymerase (5 U/µl)	0.2	µl
Reverse primer (10 pmol)	1.5	µl
Forward primer (10 pmol)	0.5	µl
RNase-free H_2O	5.5	µl
สารละลาย first strand cDNA	2	µl
ปริมาตรรวม	12	µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

รอบที่ 1 denaturation	94 ^{O}C	3	นาที	
รอบที่ 2 denaturation	94 ^{O}C	30	วินาที	จำนวน 40 รอบ
annealing	42 ^{O}C	1	นาที	
extension	72 ^{O}C	1	นาที	
รอบที่ 3 extension	72 ^{O}C	8	นาที	

2) นำผลผลิต PCR ที่ได้ในรอบแรกเจือจางด้วย RNase-free H_2O ในอัตราส่วน 1:20 เพื่อใช้เป็น template ทำปฏิกิริยา PCR รอบที่สอง โดยมีส่วนผสมและโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยาเหมือนกับครั้งแรก

3) ตรวจสอบผลที่ได้โดยนำผลผลิต PCR ผสมกับ 6X loading buffer ในอัตราส่วน 5:1 นำไปแยกขนาดโดย polyacrylamide gel electrophoresis (6%) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมแผ่นเจลที่ได้ด้วย silver staining

4) คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบปรากฏบน polyacrylamide gel ที่มีลักษณะของแถบหลายแถบและมีความคมชัด เพื่อนำไปทำ DDRT-PCR ต่อไป

3.7 DDRT-PCR

นำตัวอย่างของ cDNA มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันด้วยเทคนิค DDRT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้มีทั้งหมด 6 ไพรเมอร์คือ OPD03 OPD07 OPD08 OPD20 OPF10 และ OPAB11 คู่กับ reverse primer (oligoVG และ oligoVA) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1) ส่วนผสมของปฏิกิริยา

10X buffer	1.2	µl
50 mM $MgCl_2$	0.6	µl
10 mM dNTP mix	0.5	µl
Taq DNA polymerase (5 U/µl)	0.2	µl
Reverse primer (10 pmol)	1.5	µl
Forward primer (10 pmol)	0.5	µl
RNase-free H_2O	5.5	µl
สารละลาย first strand cDNA	2	µl
ปริมาตรรวม	12	µl

โปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

รอบที่ 1 denaturation	94 ^{O}C	3	นาที	
รอบที่ 2 denaturation	94 ^{O}C	30	วินาที	จำนวน 40 รอบ
annealing	42 ^{O}C	1	นาที	
extension	72 ^{O}C	1	นาที	
รอบที่ 3 extension	72 ^{O}C	8	นาที	

2) นำผลผลิต PCR ที่ได้ในรอบแรกเจือจางด้วย RNase-free H_2O ในอัตราส่วน 1:20 เพื่อใช้เป็น template ทำปฏิกิริยา PCR รอบที่สอง โดยมีส่วนผสมและโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยาเหมือนกับครั้งแรก

3) ผลผลิต PCR ที่ได้นำมาผสมกับ 6X loading buffer ในอัตราส่วน 5:1 จากนั้นนำไปบ่มที่ 94 ^{O}C เป็นเวลา 3 นาที และแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นนำไปแยกขนาดโดย polyacrylamide gel electrophoresis (6%) ที่กำลังไฟฟ้า 50 W เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4) ย้อมแผ่นเจลที่ได้ด้วย silver staining โดยแช่เจลใน 10% acetic acid ปริมาตร 500 ml เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วย deionized water 2 ครั้ง และแช่ใน 1% nitric acid ปริมาตร 500 ml เป็นเวลา 10 นาที นำแผ่นเจลไปล้างด้วย deionized water 3 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปแช่ใน 0.1% silver nitrate เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย deionized water 1 ครั้ง แช่แผ่นเจลใน 3% sodium carbonate จนแถบของ DNA ปรากฏ หยุดปฏิกิริยาด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10 % acetic acid และล้างแผ่นเจลด้วย deionized water 3 ครั้งก่อนทำให้เจลแห้งด้วย gel dryer (Amersham Biosciences, USA)

5) วิเคราะห์ความแตกต่างของแถบ DNA ที่ปรากฏโดย วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker ที่ใช้ (marker 50 bp บริษัท Fermentas, Canada) นำระยะทางการเคลื่อนที่ที่ได้ไปเขียนกราฟ ให้แกน X เป็นระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบ DNA ส่วนแกน Y เป็นขนาดของแถบ DNA (คู่เบส) นำกราฟมาตรฐานไปหาความสัมพันธ์แบบล็อกการิทึม สมการที่ได้ใช้หาขนาดของแถบ DNA ในแต่ละตัวอย่างพืช

3.8 การเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR (reamplification of PCR fragment)

แถบ cDNA ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างพืชนำมาเพิ่มปริมาณ เพื่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแถบ cDNA มีรายละเอียดดังนี้คือ

1) ตัดแถบ cDNA แช่ลงใน TE buffer 15 µl
2) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วบดด้วยปลาย micro tip
3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 ^{O}C เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C ข้ามคืน
4) นำสารละลาย cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ และส่วนผสมเหมือนขั้นตอน DDRT-PCR (ข้อ 3.7)
5) ตรวจสอบขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้โดย polyacrylamide gel electrophoresis (6%) เปรียบเทียบกับขนาดของ cDNA ที่ได้จากข้อ 3.7

3.9 การวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอ

cDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสยังบริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย จากนั้นเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูล EMBL, GenBank, Swissport และ EST ด้วยโปรแกรม BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved