บทที่ 3

วิธีทดลอง

การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอม *L. edodes*

1. อาหารแข็ง (PDA, Potato Dextrose Agar)

ในอาหาร 1 ลิตร พีเอช 5.0 ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	10	กรัม
Bacto-agar	15	กรัม

เตรียมโดยล้างและปอกเปลือกมันฝรั่งให้สะอาดหั่นเป็นรูปลูกบาศก์ขนาด 1 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักให้ได้ 200 กรัมต้มในน้ำกรองปริมาตร 1 ลิตรจับเวลาตั้งแต่น้ำเริ่มเดือดจนถึง 20 นาทีจึงหยุดต้ม ทิ้งไว้ให้เย็น กรองน้ำใสผ่านผ้าขาวบางหนา 4 ชั้น ปรับพีเอชเป็น 5.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 5 โมลาร์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร แบ่งใส่ขวดขวดละ 100 มิลลิลิตร ชั่งวุ้น (Bacto-agar) ใส่ขวดละ 1.5 กรัม ปิดฝา นึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121°ซ นาน 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50°ซ เทใส่จานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้วด้วยวิธีปลอดเชื้อ อาหาร 1 ขวดสามารถเทได้ 4-5 จาน รอจนอาหารแข็งจึงนำไปใช้หรือเก็บที่ 4°ซ

2. อาหารเหลว (PDB, Potato Dextrose Broth)

ในอาหาร 1 ลิตร พีเอช 5.0 ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	10	กรัม

เตรียมตามวิธีที่ใช้เตรียมอาหารแข็งจนถึงขั้นตอนการปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตรใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรขวดละ 100 มิลลิลิตร อุดปากขวดด้วยจุกสำลีหุ้มผ้าขาวบางปิดทับด้วยกระดาษนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121°ซ นาน 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เลี้ยงในอาหารสูตรอุดม LB พีเอช 7.4 (Luria และคณะ ,1960)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto-tryptone	10	กรัม
Bacto-yeast Extract	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม

เตรียมโดยชั่งสารต่างๆแล้วละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร แบ่งใส่ภาชนะตามที่ต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่ 121°ซ นาน 15 นาที ถ้าต้องการเตรียมเป็นอาหารแข็งให้แบ่งอาหารเหลวที่ปรับพีเอชและปรับปริมาตรแล้วใส่ขวดขวดละ 100 มิลลิลิตร ชั่งวุ้น (Bacto-agar) ใส่ขวดละ 1.5 กรัมปิดฝา นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121°ซ นาน 15นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50°ซ เทใส่จานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ด้วยวิธีปลอดเชื้อ

ดีเอ็นเอพาหะ

ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการทดลองนี้คือพลาสมิด pUC118 (Messing, 1983) เป็นอนุพันธุ์ของ pUC18 มีขนาด 3.158 kb มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน M13 ori และยีน *lacZ'* ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็นชิ้นส่วนด้านปลายอะมิโนของเอนไซม์ β-galactosidase (ภาคผนวกที่ 3)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ดีเอ็นเอของ λ-DNA Clindlts 857 Sam7 ถูกตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 8 ชิ้นมีขนาด 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 0.564 และ 0.125 กิโลเบส ตามลำดับ (Rodrigarz และ Tait, 1983)

ดีเอ็นเอของ λ-DNA Clindlts 857 Sam7 ถูกตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III และ *Eco*RI ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 13 ชิ้นมีขนาด 21.226, 5.148, 4.973, 4.268, 3.530, 2.027, 1.904, 1.584, 1.375, 0.947, 0.831, 0.564 และ 0.125 กิโลเบส ตามลำดับ (Promaga, 1991)

จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าเรือนในการทดลองได้แก่ *Escherichia coli* K12 สายพันธุ์ JM101: *supE*, *thi*, (*lac-pro*AB), [F', *tra*D36, *pro*AB, *lacI*^{q}ZM15] (Yanisch-Perron และคณะ, 1985) (ภาคผนวกที่ 3)

เส้นใยเห็ดหอม *Lentinula edodes*

เส้นใยเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) สายพันธุ์ MU2, MU4, MU5, MU12 และ สายพันธุ์ลูกผสมของ MU4 กับ MU12 ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในรูปของเส้นใยระยะที่ 2 (n+n) ใน Slant PDA (ตารางที่ 3 และ รูปที่1)

วิธีการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอม *Lentinula edodes*

เขี่ยเส้นใยเห็ดหอมจากหลอดตั้งต้นวางบนจานอาหารแข็งสูตร PDA ตรงกลางจานโดยวิธีปลอดเชื้อ เลี้ยงเส้นใยให้เจริญที่อุณหภูมิ 25^{o}ซ นาน 7-10 วัน เส้นใยจะเจริญแผ่ออกไปริมจานใช้เครื่องมือเจาะวุ้นเจาะอาหารที่มีเส้นใยเจริญอยู่ โดยเจาะบริเวณที่ห่างจากขอบนอกสุดของเส้นใยเข้ามาประมาณ 1 เซนติเมตร ใช้เข็มเขี่ยปลายงอย้ายชิ้นอาหารที่เจาะจากจานเลี้ยงไปลอยบนผิวหน้าอาหารเหลวสูตร PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ระวังอย่าให้ชิ้นเส้นใยจมลงในอาหารเหลว (ภาคผนวกที่ 2) ทำการเลี้ยงเส้นใยในที่มืดอุณหภูมิ 25^{o}ซ นานตามเวลาที่ต้องการ

วิธีติดตามการเจริญของเส้นใยเห็ดหอม *Lentinula edodes*

การติดตามการเจริญทำโดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งเส้นใยที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวทุกๆ 5 วัน ใช้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งเส้นใย 3 ขวดเป็นค่าในการบันทึก เวลาของการบันทึกผลได้จากเมื่อเลี้ยงเส้นใยบนอาหารเหลวนาน 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 วันตามลำดับ หาน้ำหนักแห้งโดยอบสิ่งที่ต้องการหาน้ำหนักที่ 65^{o}ซ นาน 3 วัน เอาออกจากตู้อบใส่เดซิเคเตอร์ไว้จนอุณหภูมิลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง นำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด

เมื่อเส้นใยเจริญบนอาหารเหลวได้อายุตามต้องการ ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แล้วนำเส้นใยมาวางบนกระดาษกรอง Whatman #4 ที่ทราบน้ำหนักแห้ง นำไปอบหาน้ำหนักแห้งเส้นใยและกระดาษกรอง หักน้ำหนักแห้งกระดาษกรองออกจะได้น้ำหนักแห้งของเส้นใยหาค่าเฉลี่ยของทั้ง 3 ขวด นำไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการเจริญ (วัน) กับน้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัม)

การสกัดดีเอ็นเอ

1. การสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมจากเส้นใยเห็ดหอม *L. edodes*

ดัดแปลงมาจากวิธีที่เสนอโดย Robert และ Yoder (1983) Klich และ Mullaney (1987)

1.1 การเก็บเส้นใยจากอาหารเหลว เมื่อเลี้ยงเส้นใยจนถึงระยะ late-log หรือระยะ early-stationary ใช้เวลาประมาณ 25 วัน เก็บเส้นใยโดยนำเส้นใยมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อและเย็น ในขณะที่ทำการล้างและรอรวบรวมเส้นใยภาชนะที่ใช้จะต้องแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา เส้นใย 1 ขวดล้างด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เส้นใยที่ล้างแล้วแช่น้ำแข็งไว้นำไปดึงน้ำออกด้วยเครื่องดูดจนเส้นใยหมาด รวบรวมเส้นใยให้ได้ประมาณ 50 กรัม ห่อด้วยอลูมิเนียมฟอล์ยเก็บไว้ในตู้แช่อุณหภูมิ -80°ซ จนกว่าจะใช้สกัดดีเอ็นเอ

1.2 การสกัดดีเอ็นเอ · ในการสกัดดีเอ็นเออุปกรณ์ทุกอย่างต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดเอนไซม์นิวคลีเอส บดเส้นใยที่แช่แข็งไว้ด้วยโกร่งแช่เย็นที่ -80°ซ จนละเอียดมีลักษณะคล้ายผงแป้ง ขณะบดให้แช่โกร่งในอ่างน้ำแข็งและเติมไนโตรเจนเหลวเป็นระยะๆ ระวังอย่าให้เส้นใยละลายขณะบด ตักเส้นใยจากโกร่งใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์สกัดเส้นใย (น้ำตาลซูโครส 15 เปอร์เซนต์, Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0, EDTA 0.2 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที) ที่เย็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน รอจนเส้นใยละลายหมด เติมสารละลาย SDS 25 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 14 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์โปรเนส (ละลายใน TEN บัฟเฟอร์ : Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.6, EDTA 1 มิลลิโมลาร์, โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที) เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าแรงๆให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่ 65°ซ นาน 30 นาที พลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆเป็นระยะๆ เติมสารละลายโปแทสเซียมอะซีเตท 5 โมลาร์ ปริมาตร 1 ใน 1.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย พลิกหลอดเบาๆให้เข้ากันแช่ในอ่างน้ำแข็ง 45 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 15,000xg ที่ 0°ซ 30 นาที กรองสารละลายดีเอ็นเอผ่านผ้าขาวบางหนา 6 ชั้น ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีไอโซโพรพานอลอยู่ 0.7 เท่าของปริมาตรสารละลาย พลิกหลอดให้เข้ากัน แช่เย็นที่ -20°ซ นาน 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 15,000xg ที่ 0°ซ นาน 30 นาที ทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งโดยคว่ำหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20-30 นาที ระวังอย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งมากเกินไป ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0, EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ย้ายสารละลายดีเอ็นเอลงในหลอดทดลองขนาด 13 มิลลิลิตรปั่นทิ้งตะกอนที่ความเร็ว 1,500xg นาน 30 นาที ถ่ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ จำนวน 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอ พลิกหลอดให้เข้ากันเบาๆ ใส่เอทธานอลแอบโซลูทจำนวน 2 เท่าของปริมาตรสารละลายกลับหลอดให้เข้ากัน จะสังเกตุเห็นสายดีเอ็นเอของโครโมโซม ตั้งหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอ

ตารางที่ 3 ลักษณะของสายพันธุ์เห็ดหอมที่ใช้ในการทดลอง

รหัส	แหล่งที่มา	คุณลักษณะ			
		การออกดอกในถุงขี้เลื่อย	ขนาดดอก	สีดอก	ลักษณะเด่น
MU2	ไต้หวัน	ออกสม่ำเสมอ	กลาง-ใหญ่	น้ำตาล	ดอกสวย ผลผลิตสูง
MU4	ญี่ปุ่น (พันธุ์ท่อนไม้)	ออกสม่ำเสมอ	กลาง	น้ำตาล	ดอกสวย ผลผลิตสูง
MU5	ญี่ปุ่น (ถุงก้อนเชื้อ)	ออกสม่ำเสมอ	กลาง	น้ำตาลเข้ม	ดอกสวย ผลผลิตสูง
MU12	พันธุ์พื้นเมืองของไทย (ท่อนไม้ก่อ)	ออกดอกน้อย	เล็ก ก้านยาว	สีซีด จาง	พันธุ์พื้นเมือง ทนร้อน
HY	ลูกผสมของ MU4xMU12	ออกสม่ำเสมอ	กลาง	น้ำตาลเทา	เส้นใยทนร้อน ดอกสวย ผลผลิตสูง

ที่มา : หน่วยวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก)

(ข)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 แสดงลักษณะดอกเห็ดหอม *Lentinula edodes* สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง 5 สายพันธุ์

ก) สายพันธุ์ MU2 ข) สายพันธุ์ MU4 ค) สายพันธุ์ MU5

ง) สายพันธุ์ MU12 จ) สายพันธุ์ลูกผสม MU4xMU12 (HY)

(ค)

(ง)

<u>รูปที่ 1(ต่อ)</u> แสดงลักษณะดอกเห็ดหอม *Lentinula edodes* สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง 5 สายพันธุ์

ก) สายพันธุ์ MU2 ข) สายพันธุ์ MU4 ค) สายพันธุ์ MU5

ง) สายพันธุ์ MU12 จ) สายพันธุ์ลูกผสม MUxMU12 (HY)

(จ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>รูปที่ 1(ต่อ)</u> แสดงลักษณะดอกเห็ดหอม *Lentinula edodes* สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง 5 สายพันธุ์

ก) สายพันธุ์ MU2 ข) สายพันธุ์ MU4 ค) สายพันธุ์ MU5

ง) สายพันธุ์ MU12 จ) สายพันธุ์ลูกผสม MUxMU12 (HY)

จัดตัวลงไปอยู่ก้นหลอด รินส่วนใสทิ้งโดยระวังอย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอไหลออกไป ล้างตะกอนด้วยเอทธานอล แอบโซลูท ค่อยๆรินส่วนใสทิ้งล้างตะกอนอีกครั้งด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซนต์ที่เย็น รินส่วนใสทิ้งทำให้ตะกอนดีเอ็นเอหมาดโดยการคว่ำหลอด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE-RNase (ละลายเอนไซม์ RNase ปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ TE) หลอดละ 3-4 มิลลิลิตร บ่มที่ 37°ซ นาน 30 นาที นำไปสกัดโปรตีนโดยใส่สารละลายฟีนอล (ฟีนอลที่อิ่มตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8.0) ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอ พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆนาน 15 นาที ปั่นที่ 1,500xg นาน 25 นาที ใช้พาสเจอร์ไปเปตต์ตัดปลายดูดสารละลายดีเอ็นเอที่อยู่ชั้นบนใส่หลอดใหม่ ระวังอย่าให้ตะกอนระหว่างชั้นของสารละลายติดมาด้วย ทำการสกัดด้วยสารละลายฟีนอลอีกครั้งหนึ่ง แล้วนำส่วนใสใส่หลอดใหม่ สกัดโปรตีนต่อโดยเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม (คลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ อัตราส่วน 24 ต่อ 1) ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอ พลิกหลอดไปมาเบาๆ นาน 15 นาที ปั่นที่ 1,500xg นาน 25 นาที ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่อยู่ชั้นบนใส่หลอดใหม่ ทำการสกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มอีก 3-4 ครั้งหรือจนกว่าจะไม่เห็นคราบสีขาวของโปรตีนอยู่ระหว่างชั้นของสารละลาย ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใส่สารละลายโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรสารละลาย พลิกหลอดให้เข้ากันใส่เอทธานอลแอบโซลูทปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย พลิกหลอดเบาๆจะสังเกตุเห็นสายของดีเอ็นเอ ค่อยๆรินส่วนใสทิ้ง (ระวังอย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอไหลไปด้วย) ล้างตะกอนด้วยเอทธานอลแอบโซลูทอีกครั้งหนึ่ง แล้วล้างด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซนต์ที่เย็น ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการคว่ำหลอด ละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ย้ายสารละลายดีเอ็นเอใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

2. <u>การสกัดดีเอ็นเอของพลาสมิดโดยวิธีอัลคาไลน์ (Alkaline Extraction)</u>

ดัดแปลงมาจากวิธีที่เสนอโดย Birnboim และ Doly (1979) ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งปริมาณมากและปริมาณน้อย

2.1 <u>การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณมาก</u> เลี้ยงเชื้อที่มีพลาสมิดที่ต้องการในอาหารเหลวสูตรอุดม LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ (ประมาณ 12-18 ชั่วโมง) ปั่นเก็บเซลล์ที่ 1,500xg นาน 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปั่นเก็บเซลล์แล้วนำมาเติมสารละลาย Solution I (น้ำตาลกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0, EDTA 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ก่อนใช้ใส่ไลโซไซม์ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในอ่างน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง ระหว่างนี้ให้เขย่าให้เข้ากันเป็นครั้งคราว เติมสารละลาย Solution II (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ และ SDS 1 เปอร์เซนต์) จำนวน 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยการพลิกหลอด จนได้สารละลายใสตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เติมสารละลาย Solution III (โซเดียมอะซี

เตท 3 โมลาร์ พีเอช 4.8 ฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร พลิกหลอดให้เข้ากันจนเกิดการตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ แช่หลอดในอ่างน้ำแข็งนานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ปั่นทิ้งตะกอนที่ 1,500xg 15 นาที ย้ายสารละลายใส่หลอดใหม่สกัดโปรตีนออก โดยการเติมสารละลายฟีนอลและคลอโรฟอร์มปริมาตรอย่างละ 1 เท่าของปริมาตรสารละลายเขย่าให้เข้ากัน ปั่นแยกชั้นที่ 1,500xg 15 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอชั้นบนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอลและคลอโรฟอร์มอีกครั้งหนึ่ง ดูดสารละลายดีเอ็นเอมาสกัดฟีนอลออกโดยเติมไดเอทธิลอีเธอร์ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย พลิกหลอดให้เข้ากันจนสารละลายชั้นล่างใส ถ้าสารละลายยังขุ่นเมื่อพลิกหลอดเป็นเวลานานแล้ว ให้ดูดสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วเติมไดเอทธิลอีเธอร์ใหม่ลงไป พลิกหลอดไปมาจนสารละลายชั้นล่างใสดูดสารละลายชั้นบนทิ้งกำจัดไดเอทธิลอีเธอร์ที่เหลืออยู่โดยการเป่าลมลงบนสารละลาย หรือตั้งทิ้งไว้ที่ 37°ซ นาน 15-30 นาที หรือจนไม่มีกลิ่นของไดเอทธิลอีเธอร์ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติมเอทธานอลแอบโซลูทที่เย็นปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย แช่ที่ -20°ซ อย่างน้อย 3 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนที่ 1,500xg นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้งทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งโดยการคว่ำหลอด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE-RNase จำนวน 1 มิลลิลิตร ย้ายสารละลายที่ได้ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ บ่มที่ 37°ซ นาน 30 นาที ใส่โซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์จำนวน 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรสารละลาย ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอลแอบโซลูทที่เย็นจำนวน 2 เท่าของสารละลาย แช่ที่ -20°ซ นานอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนที่ 7,000xg 5 นาที เทส่วนใสทิ้งทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

2.2 <u>การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณน้อย</u> เลี้ยงเชื้อที่มีพลาสมิดที่ต้องการในอาหารเหลวสูตรอุดม LB ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ (ประมาณ 12-18 ชั่วโมง) เทสารละลายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปั่นเก็บเซลล์ที่ 1,500xg นาน 5 นาที เติมสารละลาย Solution I ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแช่ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที เติมสารละลาย Solution II จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจนได้สารละลายใส เติมสารละลาย Solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร พลิกหลอดให้เข้ากันจนเกิดตะกอนอย่างสมบูรณ์ แช่หลอดในอ่างน้ำแข็ง 30 นาที ปั่นทิ้งตะกอนที่ 7,000xg นาน 10 นาที สกัดโปรตีนจากสารละลายโดยการเติมสารละลายฟีนอลและคลอโรฟอร์มปริมาตรอย่างละ 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย เขย่าให้เข้ากันปั่นแยกชั้นที่ 7,000xg นาน 5 นาที นำสารละลายชั้นบนมาสกัดฟีนอลออก โดยเติมไดเอทธิลอีเธอร์ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย กลับหลอดให้เข้ากันจนสารละลายชั้นล่างใสดูดสารละลายชั้นบนทิ้ง กำจัดไดเอทธิลอีเธอร์ที่เหลืออยู่โดยการเป่าลมลงบนสารละลายหรือตั้งทิ้งไว้ที่ 37°ซ นาน 15-30 นาที หรือจนไม่มีกลิ่นของไดเอทธิลอีเธอร์ เติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรสารละลาย ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอลแอบโซลูทที่เย็นจำนวน 2 เท่าของสารละลาย แช่ที่ -20°ซ นานอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนที่ 7,000xg 5 นาที เทส่วนใสทิ้งทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE-RNase ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ 30 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

การย่อยดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

1. สภาวะในการย่อยดีเอ็นเอ

สภาวะในการย่อยดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ได้ศึกษาโดย บริษัท New England Biolabs พบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการย่อยดีเอ็นเอ คือความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (Ausuble และคณะ, 1989)

1.1 การย่อยดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ทั่วไป สภาวะในการย่อยดีเอ็นเอประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10xRB (Tris-HCl 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 และแมกนีเซียมคลอไรด์ 1 มิลลิโมลาร์) 10 เปอร์เซนต์ BSA (สารละลาย BSA 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมต่อสารละลายปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร เลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์) ที่เหมาะสมต่อเอนไซม์แต่ละชนิดตามที่แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 4 สำหรับเอนไซม์ *Pvu*II และ *Sal*3AI จะเพิ่มโปแตสเซียมคลอไรด์ (สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 1 โมลาร์) ในปริมาณ 50 มิลลิโมลาร์เพื่อช่วยให้ทำงานดีขึ้น ผสมสารละลายต่างๆเข้าด้วยกัน เติมเอนไซม์ปริมาณ 5 หน่วยต่อสารละลายดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากันบ่มที่ 37°ซ (ประมาณ 12 ชั่วโมง)แล้ว หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย tracking dye (กลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์, บรอมฟีนอล บลู 0.1 เปอร์เซนต์ และไซลีนไซยานอล เอฟเอฟ 0.1 เปอร์เซนต์) ปริมาตร 4 ไมโครลิตรต่อสารละลายปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร นำไปแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส และบันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

1.2 การย่อยดีเอ็นเอเพื่อศึกษาปริมาณของเอนไซม์ สารละลายปฏิกิริยาทั้งหมดมีปริมาตร 40 ไมโครลิตร ใช้สารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในกรณีของปฏิกิริยาการย่อยด้วย *Bam*HI, *Eco*RI, *Hae*III, *Hind*III และ *Tag*I จะเท่ากับ 10 และ 20 หน่วยต่อหนึ่งปฏิกิริยา ส่วน *Alu*I จะใช้ 4 และ 8 หน่วย *Pvu*II ใช้ 3 และ 6 หน่วย และ *Sau*3AI จะใช้ 5 และ 10 หน่วย หยุดปฏิกิริยาการย่อยดีเอ็นเอโดยเติมสารละลาย tracking dye นำไปแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส และบันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

1.3 การย่อยดีเอ็นเอเพื่อศึกษาแถบดีเอ็นเอ สารละลายปฏิกิริยาทั้งหมดมีปริมาตร 40 ไมโครลิตร ใช้สารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ทำการย่อยอย่างสมบูรณ์โดยใช้ปริมาณเอนไซม์และสภาวะในการย่อยตามที่ศึกษาแล้ว หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย tracking dye ศึกษาแถบดีเอ็นเอโดยการแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีสและบันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

1.4 การย่อยดีเอ็นเอเพื่อศึกษาด้วยวิธีไฮบริไดเซชั่น สารละลายปฏิกิริยาทั้งหมดมีปริมาตรเท่ากับ 80-100 ไมโครลิตร ใช้สารละลายดีเอ็นเอ 4 ไมโครกรัมทำการย่อยอย่างสมบูรณ์ หยุดปฏิกิริยาแล้วนำสารละลายไปแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส บันทึกผลโดยการถ่ายภาพแล้ว จึงนำเจลไปทำการเตรียมดีเอ็นเอบนแผ่นไนล่อนเมมเบรนตามวิธี Southern-blot Transfer

อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีสและการบันทึกผลของแถบดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอทำโดยใช้ Submarine Horizontal Gel Electrophoresis

เตรียมอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์เมื่อศึกษาดีเอ็นเอของโครโมโซมที่สกัดจากเส้นใย, 1เปอร์เซนต์เมื่อศึกษาดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ และใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 1.5 เปอร์เซนต์สำหรับดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hae*III, *Sau*3AI, *Alu*I และ *Tag*I หลอมอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE (Tris-HCl 89 มิลลิโมลาร์, กรดบอริก 89 มิลลิโมลาร์, EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์ ปรับพีเอชเป็น 8.3) โดยใช้เจลขนาด 8.5x10x0.5 ซ.ม. สำหรับการศึกษาดีเอ็นเอของโครโมโซม, การย่อยดีเอ็นเอเพื่อศึกษาปริมาณเอนไซม์และการย่อยดีเอ็นเอเพื่อศึกษาแถบของดีเอ็นเอ ส่วนการย่อยดีเอ็นเอเพื่อศึกษาด้วยวิธีไฮบริไดเซชั่นจะใช้เจลขนาด 8.5x10x0.8 ซ.ม. เมื่อเจลแข็งตัวแล้วใส่สารละลายปฏิกิริยาลงในช่องด้านขั้วลบของเจล ทำอิเลคโตรโฟริซีสที่ 70 โวลต์ นาน 3-4 ชั่วโมงในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE โดยเคลื่อนกระแสจากขั้วลบไปขั้วบวก ติดตามการเคลื่อนที่ด้วยสารละลาย tracking dye เมื่อครบเวลาตามที่ต้องการ นำเจลไปแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (เอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นาน 10-20 นาที ก่อนส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตจากเครื่อง UV Transilluminator UVP เปรียบเทียบขนาดและปริมาณกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และบันทึกผลโดยการถ่ายภาพ .

การสกัดดีเอ็นเอที่ต้องการภายหลังการทำอิเลคโตรโฟรีซีส

นำแผ่นอะกาโรสเจลซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ที่ผ่านการทำอิเลคโตรโฟรีซีสมาตัดเนื้อเจลส่วนที่อยู่ใต้แถบดีเอ็นเอที่ต้องการออก โดยใช้ใบมีดแซะให้เป็นช่องกว้าง 0.3-0.5 ซม. และยาวตามความยาวของแถบดีเอ็นเอ นำไปวางบนชุดทำอิเลคโตรโฟรีซีส ตัดถุงไดอะไลซีสให้มีความยาวเท่ากับช่องที่เจาะไว้ ผ่าด้านข้างของถุงไดอะไลซีสตามความยาว ใส่ถุงลงในช่องของเจลที่เจาะไว้ในลักษณะหุ้มเนื้อเจลส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการในรูปตัวยู โดยก้นของตัวยูอยู่ติดกับขอบอีกด้านของเจลที่เจาะไว้ ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ TE ลงในช่องที่เจาะไว้ให้เต็ม เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ลงในชุดทำอิเลคโตรโฟรีซีสอย่าให้ท่วมแผ่นเจลทำอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ 100 โวลล์นาน 15 นาที หรือจนแน่ใจว่าแถบดีเอ็นเอที่ต้องการเคลื่อนออกจากเนื้อเจลจนหมดจึงหยุดการให้กระแสไฟฟ้า ค่อยๆเปิดถุงไดอะไลซีสส่วนบนออก ใช้ไมโครไปเปตต์ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ TE ที่มีดีเอ็นเอที่เคลื่อนออกจากเจลอยู่ ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์จนหมด แล้วเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรสารละลาย TE เติมสารละลายฟีนอล และคลอโรฟอร์มอย่างละ 1 ส่วน พลิกหลอดไปมานานประมาณ 5 นาที หรือผสมด้วยเครื่องผสมสารจนสารละลายทั่วถึงกัน นำไปปั่นแยกชั้นที่ 7,000xg 5 นาที ถ่ายสารละลายชั้นบนสู่หลอดใหม่ สกัดฟีนอลที่ตกค้างอยู่ออกโดยใส่ไดเอทิลอีเธอร์ในปริมาตรที่เท่ากันพลิกหลอดไปมาจนสารละลายชั้นล่างใส ดูดสารละลาย

ชั้นบนทิ้งให้หมดแล้วกำจัดไดเอธิลอีเธอร์ที่เหลืออยู่โดยระเหยที่ 37°ซ นาน 15-30 นาที หรือโดยการเป่าลมลงผิวหน้าของสารละลาย ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอลแอบโซลูทที่เย็นปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย ทิ้งให้ดีเอ็นเอตกตะกอนที่ -20°ซ นานประมาณ 12-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนที่ 7,000xg นาน 5 นาที เทส่วนน้ำทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซนต์ที่เย็นปั่นเก็บตะกอนอีกครั้งหนึ่ง เทส่วนน้ำทิ้งและทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการคว่ำหลอด ละลายตะกอนดีเอ็นเอในสารละลายบัฟเฟอร์ TE แล้วเก็บไว้ที่ -20°ซ

<u>การทำ Molecular Cloning ของดีเอ็นเอของโครโมโซมจากเส้นใยเห็ดหอม *Lentinula edodes* ในพลาสมิด pUC118</u>

1. <u>การเตรียมดีเอ็นเอของโครโมโซมจากเส้นใยสำหรับ Cloning</u>

ย่อยสารละลายดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ปริมาณ 5 ไมโครกรัมอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ปริมาณ 50 หน่วย ในสารละลายปฏิกิริยา 200 ไมโครลิตร หยุดปฏิกิริยาโดยการสกัดด้วยสารละลายฟีนอลและคลอโรฟอร์มอย่างละ 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ปั่นให้สารละลายแยกชั้นที่ความเร็ว 7,000xg นาน 5 นาที แยกสารละลายชั้นบนมาสกัดฟีนอลที่ปนอยู่ออกโดยเติมไดเอทธิลอีเธอร์จำนวน 1 มิลลิลิตร พลิกหลอดไปมาจนสารละลายดีเอ็นเอที่อยู่ชั้นล่างใส ดูดสารละลายชั้นบนทิ้งให้หมด กำจัดไดเอทธิลอีเธอร์ที่เหลือด้วยการเป่าลมบนสารละลาย หรือตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ 15-30 นาที เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรสารละลายผสมให้เข้ากัน เติมเอทธานอลแอบโซลูทปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายทั้งหมด ทิ้งให้ดีเอ็นเอตกตะกอนที่ -20°ซ นานประมาณ 12-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนที่ 7,000xg นาน 5 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซนต์ที่เย็น ปั่น 7,000xg 5 นาที ทำตะกอนให้แห้งโดยการคว่ำหลอดนาน 15-30 นาที กระจายตะกอนในสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเก็บที่ -20°ซ

2. <u>การเตรียมดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC118</u>

ย่อยดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC118 ปริมาณ 6 ไมโครกรัมอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI จำนวน 30 หน่วย ในสารละลายปฏิกิริยา 80 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ จำนวน 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรสารละลาย หยุดปฏิกิริยาโดยการสกัดด้วยสารละลายฟีนอลและคลอโรฟอร์มอย่างละ 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ปั่นให้สารละลายแยกชั้นที่ 7,000xg นาน 5 นาที แยกสารละลายชั้นบนมาสกัดฟีนอลที่ปนอยู่ออก โดยเติมไดเอทธิลอีเธอร์จำนวน 0.5 มิลลิลิตร พลิกหลอดไปมาจนสารละลายดีเอ็นเอที่อยู่ชั้นล่างใส ทิ้งสารละลายชั้นบน แล้วกำจัดไดเอทธิลอีเธอร์ที่เหลือด้วยการเป่าลมหรือตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ 30 นาที เติมเอทธานอลแอบโซลูทปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย ทิ้งให้ดีเอ็นเอตกตะกอนที่ -20°ซ นานประมาณ 12-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนที่ 7,000xg นาน 5 นาที ล้าง

ตะกอนด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซนต์ที่เย็น แล้วปั่นเก็บตะกอนอีกครั้งหนึ่ง ทำตะกอนให้แห้งโดยคว่ำหลอดนาน 15-30 นาที กระจายตะกอนในสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บที่-20°ซ

3. การเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ (Ligation)

นำดีเอ็นเอของโครโมโซมที่เตรียมได้จากการย่อยดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ด้วย *Eco*RI และดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC118 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI เช่นกัน มาทำการเชื่อมต่อกันในอัตราส่วน 5:1 ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Maniatis, 1982) ในสารละลายปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ dithiothreitol 10 มิลลิโมลาร์ ATP 1 มิลลิโมลาร์และ BSA 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมเอนไซม์ T-4 DNA ligase 5 หน่วย ผสมให้เข้ากันบ่มที่ 15°ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 15 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปทำทรานสฟอร์เมชัน

4. การทำทรานสฟอร์เมชัน (Transformation)

จากวิธีที่เสนอโดย Mandel และ Higa (1970) และ Cohen และคณะ (1972)

4.1 การเตรียมเซลล์เจ้าเรือน (Competent cell) เจริญเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM101 ในอาหารเหลวสูตรอุดม LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 37°ซ นาน 12-18 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น ดูดเซลล์ตั้งต้นปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงด้วยการเขย่าเร็วๆ ที่ 37°ซ นาน 2-3 ชั่วโมง (ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ A_{550} ประมาณ 0.5-0.6) แช่ขวดที่เลี้ยงเชื้อ ในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที ถ่ายใส่หลอดปั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ปั่นเก็บเซลล์ที่ 1,500xg นาน 10 นาที ล้างเซลล์หนึ่งครั้งด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ (นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที) ที่เย็นจำนวน 4 มิลลิลิตร ปั่นเก็บเซลล์อีกครั้งก่อนกระจายเซลล์ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ (นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที) ที่เย็นปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำไปทำทรานสฟอร์เมชัน

4.2 การทำทรานสฟอร์เมชัน ผสมเซลล์เจ้าเรือนที่เตรียมไว้ จำนวน 100 ไมโครลิตรกับสารละลายปฏิกิริยาการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ (Ligation mixture) จำนวน 10 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°ซ นาน 5 นาที เติมอาหารเหลวสูตรอุดม LB จำนวน 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ ทันทีนาน 10-15 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำเชื้อไปกระจายบนจานอาหารแข็งสูตรอุดม LB ที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลาย X-gal (X-gal ในไดเมทธิลฟอร์มาไมด์ 0.02 กรัมต่อมิลลิลิตร) สารละลาย IPTG (IPTG ในน้ำ 0.025 กรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ นาน 12-18 ชั่วโมง) แล้วทำการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม

5. การตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม

ดัดแปลงจาก Maniatis (1982)

จากหลักการเชื่อมต่อแบบ insertion inactivation เมื่อดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC118 ได้รับการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมเข้าไปในตำแหน่งของเอนไซม์ *Eco*RI ที่อยู่บนยีน *lac*Z' ทำให้ยีน *lac*Z' ไม่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นชิ้นส่วนด้านปลายอะมิโนของเอนไซม์ β-galactosidase ได้ จึงไม่สามารถย่อย X-gal ในอาหารได้ ทำให้โคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมไม่เป็นสีน้ำเงิน ซึ่งต่างกับทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอของพลาสมิดที่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมเชื่อมอยู่ จึงยังคงสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ชิ้นส่วนด้านปลายอะมิโนของเอนไซม์ β-galactosidase ได้ตามปกติ ทำให้สามารถย่อย X-gal ในอาหารได้โคโลนีที่เห็นจึงมีสีน้ำเงิน นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่ได้เปรียบเทียบกับจำนวนโคโลนีสีค่อนข้างขาวของทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม ทำการเก็บทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอสายผสม โดยเขี่ยโคโลนีสีค่อนข้างขาวลงบนจานอาหารแข็งสูตรอุดม LB ที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37°ซ นาน 12-18 ชั่วโมง เก็บที่ 4°ซ และทำการย้ายลงสู่จานอาหารใหม่ทุก 2-3 เดือน

การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม

นำทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีอัลคาไลน์ แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปทดสอบการไฮบริไดซ์เพื่อหาโคลนที่มี repetitive sequence กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ด้วยวิธี Dot-blot hybridization คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมที่ปรากฏจุดเข้มเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของโครโมโซม MU12 และดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC118 ในปริมาณที่เท่ากัน มาติดฉลากและใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม

การเตรียมดีเอ็นเอติดตาม (Probe preparetion)

จากวิธีที่เสนอโดย Boehringer (1993)

เป็นการติดฉลากดีเอ็นเอสายผสมจากทรานสฟอร์แมนท์ด้วยชุดติดฉลาก DIG-DNA Labelling and Detection Kit ของบริษัท Boehringer Mannheim Biochemica เป็นการติดฉลากดีเอ็นเอด้วยสาร Digoxigenin ซึ่งเป็นสาร steroid hapten อยู่ในรูปของ DIG-11-dUTP โดยวิธี Random Primed DNA Labelling

1. การติดฉลากดีเอ็นเอติดตาม

ใส่สารละลายดีเอ็นเอที่จะสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามปริมาณ 1 ไมโครกรัมรวมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ให้ความร้อนที่ 100°ซ 10 นาที แช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันที ขณะอยู่ในอ่างน้ำแข็งเติม Hexanucleotide Mixture และ dNTP Labelling Mixture อย่างละ 2 ไมโครลิตร แล้วใส่เอนไซม์ Klenow Fragment จำนวน 1 ไมโครลิตร (2 หน่วยต่อไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง (จำกัดเวลา) หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย EDTA 0.2 โมลาร์ พีเอช 8.0 จำนวน 2 ไมโครลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการใส่สารละลายลิเทียมคลอไรด์ 4 โมลาร์ ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันแล้วเติมเอทธานอลแอบโซลูทปริมาตร 2 เท่าของสารละลายทั้งหมด ผสมให้เข้ากันทิ้งให้ดีเอ็นเอตกตะกอนที่ -70°ซ นาน 30 นาที หรือที่ -20°ซ (ประมาณ 12 ชั่วโมง) ปั่นเก็บตะกอนที่ 7,000xg 10 นาที ล้างตะกอนด้วยสารละลายเอทธานอล 70 เปอร์เซนต์ที่เย็น ปั่นเก็บตะกอนอีกครั้งหนึ่ง ทำให้ตะกอนแห้งโดยการคว่ำหลอด 15-20 นาที กระจายตะกอนในสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บที่ -20°ซ

2. <u>การวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอติดตาม</u>

วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอติดตามโดยการทำ Dot-blot hybridization เปรียบเทียบความเข้มของสัญญาณที่ได้ กับสัญญาณของดีเอ็นเอควบคุมที่ติดฉลากแล้ว (Labelled Control DNA : digoxigenin labelled pBR328 ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ที่ค่าความเข้มข้น 5000, 1000, 100, 10 และ 1 พิโคกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ

<u>การเตรียมดีเอ็นเอบนแผ่นไนล่อนเมมเบรน</u>

ดัดแปลงจากวิธีที่ของ Southern (1975)

1. <u>Dot-blot Transfer</u>

นำดีเอ็นเอที่ต้องการมา 1 ไมโครกรัม ทำให้เป็นสายเดี่ยวโดยบ่มกับสารละลาย Denaturing Solution (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 โมลาร์, EDTA 100 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของสารละลาย ดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จุดลงบนแผ่นไนล่อนเมมเบรนพยายามให้จุดมีขนาดใกล้เคียงกัน ปล่อยให้แห้ง นำไปตรึงดีเอ็นเอด้วยการฉายแสงอุลตราไวโอเลตนานด้านละ 1.5 นาทีทั้งสองด้าน แล้วนำไปทำไฮบริไดเซชั่นกับ ดีเอ็นเอติดตาม

2. <u>Southern-blot Transfer</u>

ดัดแปลงจากวิธีของ Ishii (1992)

นำอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้มาเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10-12 นาทีในสารละลาย Depurination Solution (สารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.25 โมลาร์) ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วเขย่าในสารละลาย

Denaturing Solution (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์) เป็นเวลา 45 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนแช่แผ่นเจลในสารละลายบัฟเฟอร์ Transfer (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.25 โมลาร์, โซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์) นาน 15 นาที หลังจากนั้นทำการเคลื่อนย้าย ดีเอ็นเอจากเจลลงสู่แผ่นเมมเบรนตามหลักการ Capillary Transfer ดังแสดงในภาคผนวกที่ 5 ชั้นล่างสุดเป็นกระดาษกรอง 3 MM ที่วางบนกระจก โดยปลายทั้งสองข้างของกระดาษแช่อยู่ในภาชนะที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ Transfer ต่อจากชั้นล่างสุด เป็นกระดาษกรองขนาดเท่ากับแผ่นเจลจำนวน 4-5 แผ่น วางเจลที่เตรียมไว้ในลักษณะคว่ำหน้าลงบนกระดาษ วางแผ่นไนล่อนเมมเบรนที่มีขนาดเท่ากับเจลและชุ่มด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Transfer ลงบนเจล ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ แล้ววางกระดาษกรองขนาดเท่ากับเจลทับลงบนแผ่นเมมเบรน 6-8 แผ่น สุดท้ายวางตั้งของกระดาษซับที่ตัดขนาดเท่าแผ่นเจลทับลงด้านบน ให้มีความสูงของกระดาษซับประมาณ 3 นิ้ว กดทับด้านบนด้วยน้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม คลุมด้วยแผ่นพลาสติกห่ออาหารเพื่อกันน้ำระเหย ทิ้งไว้ 24-36 ชั่วโมง จึงนำแผ่นเมมเบรนออกมาล้างในสารละลาย 5xSSC (เจือจางจากสารละลายบัฟเฟอร์ 20xSSC : โซเดียมคลอไรด์ 3 โมลาร์ และไตรโซเดียมซิเตรท 0.3 โมลาร์ พีเอช 7.0) เป็นเวลา 1 นาที ผึ่งบนกระดาษกรองที่สะอาดให้แห้ง ตรึงดีเอ็นเอด้วยการฉายแสงอุลตราไวโอเลตทั้งสองด้านด้านละ 1.5 นาที แล้วนำไปทำไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม หรือถ้ายังไม่ใช้สามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง

การทำไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม (Hybridization)

ดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย Ishii (1992)

แช่แผ่นเมมเบรนที่ผ่านการตรึงแล้วในสารละลาย Standard Prehybridization Solution (สารละลายบัฟเฟอร์ 5xSSC, N-lauroyl sarcosine 0.1 เปอร์เซนต์, SDS 0.02 เปอร์เซนต์ และ Blocking Reagent 1 เปอร์เซนต์ เก็บที่ -20°ซ) ปริมาตรพอท่วมแผ่น บ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง เตรียมสารละลายดีเอ็นเอติดตามเพื่อการทำไฮบริไดเซชัน โดยเจือจางสารละลายดีเอ็นเอ ติดตามในสารละลาย Standard Prehybridization Solution ในความเข้มข้น 5-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ปริมาตรสารละลายเจือจางดีเอ็นเอติดตามที่ใช้ต่อเมมเบรนขนาด 9x10 ตารางเซนติเมตรเท่ากับ 3 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันดีแล้วให้ความร้อน 100°ซ ด้วยการแช่ในอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วรีบแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที นำเมมเบรนที่บ่มไว้ที่ 65°ซ ใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาดเทสารละลายเจือจางดีเอ็นเอติดตามที่แช่อ่างน้ำแข็งไว้ลงในถุง แล้วรีดปิดปากถุงให้สนิทระวังอย่าให้มีฟองอากาศ บ่มที่ 65°ซ นาน 12-18 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจหาสัญญาณของดีเอ็นเอติดตามต่อไป

การตรวจหาดีเอ็นเอติดตาม (Detection)

1. การตรวจหาสัญญาณด้วยการเกิดสี (Colorimetric Detection)

นำเมมเบรนที่ผ่านการทำไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามออกจากถุงเขย่าเบาๆ ในสารละลาย 2x Washing Solution (เจือจาง สารละลายบัฟเฟอร์ 20xSSC จนเป็น 2xSSC และ SDS 0.1 เปอร์เซนต์) 2 ครั้งครั้งละ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วเขย่าเบาๆในสารละลาย 0.5x Washing Solution (เจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ 20xSSC จนเป็น 0.5xSSC และ SDS 0.1 เปอร์เซนต์) อีก 2 ครั้งครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 65°ซ แช่เมมเบรนในสารละลาย บัฟเฟอร์ Genius 1 (โซเดียมคลอไรด์ 150 มิลลิโมลาร์ และ Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.4 ไมโครเมตร) เป็นเวลา 1 นาที เขย่าเบาๆในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 2 (Blocking Reagent 2 เปอร์เซนต์ในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 1) ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เปลี่ยนเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 2 ที่มี Anti-DIG-alkaline phosphatase เจือจางอยู่ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5,000 เขย่าเบาๆที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีแล้ว เปลี่ยนเป็นเขย่าในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 1 2 ครั้งครั้งละ 15 นาที แช่แผ่นเมมเบรนในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 3 (Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์และโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ปรับพีเอช เป็น 9.5 แล้วเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.4 ไมโครเมตร) นาน 2 นาที นำไปใส่ถุงพลาสติกที่สะอาดเติมสารละลายสีตั้งต้น (Color Substrate : NBT และ X-phosphate อย่างละ 45 ไมโครลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร รีดปิดปากถุงให้สนิทระวังอย่าให้มีฟอง บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ห้ามเขย่าถุงสังเกตสัญญานของดีเอ็นเอติดตาม โดยดูจากตะกอนสีที่ปรากฏเมื่อปล่อยให้เกิดตะกอนสีจนมีความเข้มตามที่ต้องการแล้ว หยุดปฏิกิริยาโดยล้างแผ่นเมมเบรนในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 1 นาน 5 นาที บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ เก็บรักษาแผ่นเมมเบรนในสารละลายบัฟเฟอร์ TE ไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

2. <u>การตรวจหาสัญญานด้วยสารเรืองแสง (Chemiluminescent Detection)</u>

ดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย Ishii (1992)

นำเมมเบรนที่ผ่านการทำไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามออกจากถุงเขย่าเบาๆ ในสารละลาย 2 x Washing Solution 2 ครั้งครั้งละ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วเขย่าเบาๆในสารละลาย 0.5x Washing Solution อีก 2 ครั้งครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 65°ซ แช่เมมเบรนในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 1 เป็นเวลา 1 นาที เขย่าเบาๆในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 2 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เปลี่ยนเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 2 ที่มี Anti-DIG-alkaline phosphatase เจือจางอยู่ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10,000 เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เปลี่ยนเป็นเขย่าในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 1 2 ครั้งครั้งละ 15 นาที แล้วแช่แผ่นเมมเบรนในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 3 นาน 2 นาที ขั้นตอนต่อจากนี้ไปต้องทำในห้องมืดที่ใช้แสงสีแดงเป็นแหล่งกำเนิดแสง ย้ายแผ่นเมมเบรนจากสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 3 ลงจุ่มในสารละลายสารเรืองแสง (Lumigen PPD ที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 3 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 100) ให้ทั่ว ยกแผ่นเมมเบรนขึ้นปล่อยให้สะเด็ดน้ำวางลงในถุงพลาสติกใสที่สะอาดรีดถุงให้แนบแผ่นเมมเบรนอย่าให้มีฟองอากาศ ปิดรอบถุงให้สนิทบ่มที่ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง ทำปฏิกิริยากับแผ่นฟิล์ม X-ray เป็นเวลา 15-60

นาที ล้างฟิล์มโดยจุ่มในสารละลาย Developer นานประมาณ 10-30 วินาที ล้างในน้ำสะอาดแล้วแช่ในสารละลาย Fixer นาน 1-2 นาที ล้างในน้ำไหล ตากแผ่นฟิล์มให้แห้งก่อนนำมาวิเคราะห์ผล

การล้างดีเอ็นเอติดตามเพื่อการทำไฮบริไดเซชั่นใหม่

1. การตรวจสัญญาณด้วยการเกิดสี

1.1 การล้างตะกอนสี นำแผ่นเมมเบรนที่บันทึกผลของสัญญาณสีด้วยการถ่ายรูปเรียบร้อยแล้วมาจุ่มใน DMF (N,N-dimethylformamide 100 เปอร์เซนต์) ที่อุ่นในอ่างแก้วจนมีอุณหภูมิ 50-60°ซ เขย่าแผ่นเมมเบรนเบาๆ จนตะกอนสีละลายหมด (DMF เป็นสารระเหยที่เป็นพิษต้องทำในตู้ควันระวังอย่าสูดดมหรือสัมผัสที่ผิว)

1.2 การล้างดีเอ็นเอติดตาม ล้างแผ่นเมมเบรนซึ่งล้างตะกอนสีออกแล้วในน้ำกลั่นหลายๆครั้งบ่มในสารละลาย Probe-stripping Solution (DMF 60 เปอร์เซนต์, Tris-HCl 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 และ SDS 1 เปอร์เซนต์) ที่อุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นให้ทั่วเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ 2xSSC ก่อนนำไปทำไฮบริไดเซชั่นกับตัวติดตามชนิดอื่นต่อไป

2. การตรวจสัญญาณด้วยสารเรืองแสง

ดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย Ishii (1992)

นำแผ่นเมมเบรนที่บันทึกผลด้วยการประกบฟิล์มแล้ว มาล้างสารเรืองแสงออกในน้ำกลั่นเขย่าเบาๆ ในสารละลาย Reprobe (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 มิลลิโมลาร์ และ SDS 0.1 เปอร์เซนต์) 4 ครั้งครั้งละ 15 นาที ที่ 37°ซ แล้วแช่ในสารละลาย 2xSSC ก่อนนำไปทำไฮบริไดเซชั่นกับตัวติดตามชนิดอื่นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย