บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อ *Pythium insidiosum* ที่แยกได้จากผู้ป่วย Pythiosis 9 สายพันธุ์ (ได้ผ่านการพิสูจน์โดยการศึกษาลักษณะมหสัณฐาน, จุลสัณฐาน และ การกระตุ้นการสร้าง zoospore และการทำ western blot) และเชื้อ *Pythium* spp.ที่แยกจากสิ่งแวดล้อม 1 สายพันธุ์ และ เชื้อก่อโรคพืชอีก 1 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับเชื้ออ้างอิงได้รับการอนุเคราะห์ DNA (M17) จาก Associate Professor Dr. Leonel Mendoza, Michigan State University, Lansing, ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 1 รายชื่อเชื้อ *Pythium* ในการศึกษา

ลำดับ	รายชื่อเชื้อ	ที่มา
1	PyCU1	ผู้ป่วย Pythiosis /โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2	PyCU2	ผู้ป่วย Pythiosis /โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
3	PyCU3	ผู้ป่วย Pythiosis /โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
4	PyCU4	ผู้ป่วย Pythiosis จาก รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช ม. มหิดล
5	PyCU5	ผู้ป่วย Pythiosis /โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
6	PyCU6	ผู้ป่วย Pythiosis /โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
7	PyCU7	ผู้ป่วย Pythiosis /โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
8	PyCU8	*Pythium* spp. มาจากเขื่อนป่าสัก จ.ลพบุรี
9	MMC44P21-1	ผู้ป่วย Pythiosis จาก ศ.ดร.นงนุช วณิตย์ธนาคม ม. เชียงใหม่
10	MMC45P21-2	ผู้ป่วย Pythiosis จาก ศ.ดร.นงนุช วณิตย์ธนาคม ม. เชียงใหม่
11	*Pythium graminicola*	เป็นเชื้อที่ก่อโรคพืชในสิ่งแวดล้อม

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 ลักษณะทางมหสัณฐานและจุลสัณฐาน

สังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Pythium* ที่เลี้ยงในอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน และ เขี่ยเส้นใย *Pythium* ด้วย needle ลงบนแผ่นสไลด์แก้ว slide หยดน้ำยา LCB (Lacto-phenol-cotton blue) ปิด cover slide และ ศึกษาลักษณะจุลสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 400X

3.2.2 การกระตุ้นการสร้าง zoospore (ดัดแปลงวิธีการจาก Mendoza, 1993 (32))

เขี่ยเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่มีอายุ 2 วันลงในน้ำดอกหญ้า (วิธีการเตรียมดูในภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน ถ่ายเส้นใยลงในสายละลาย Induction medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในที่มืด นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นให้ความร้อนด้วยแสงไฟภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยศึกษาลักษณะ sporangium และ zoospores ด้วยกำลังขยาย 40X, 100X และ 400X

3.2.3 การสกัดสารพันธุกรรม(DNA)

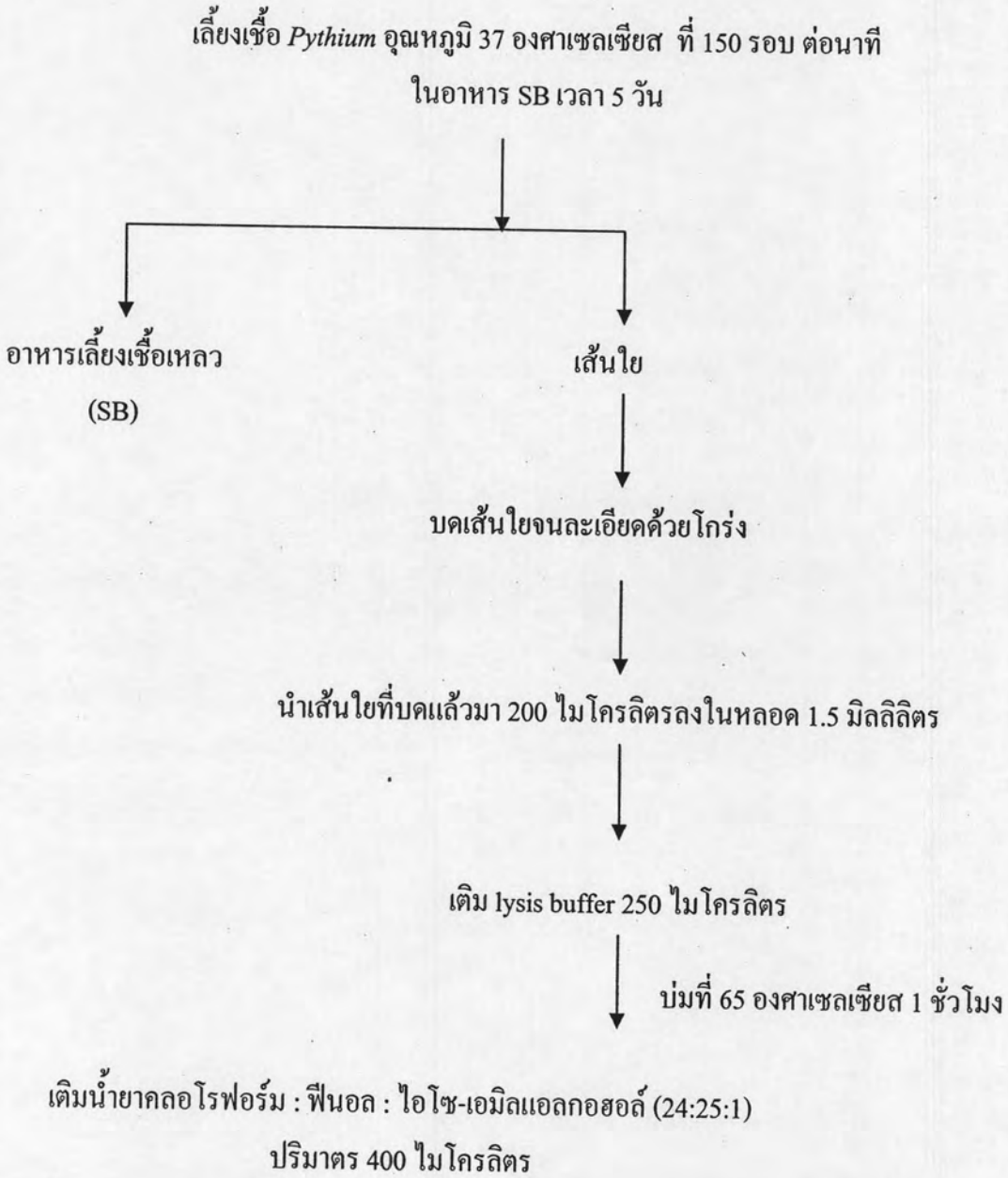
เตรียมเชื้อตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose broth (SB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน (49) จากนั้นทำการสกัดDNAโดยดัดแปลงวิธีการจาก Moller , 1992 (13)

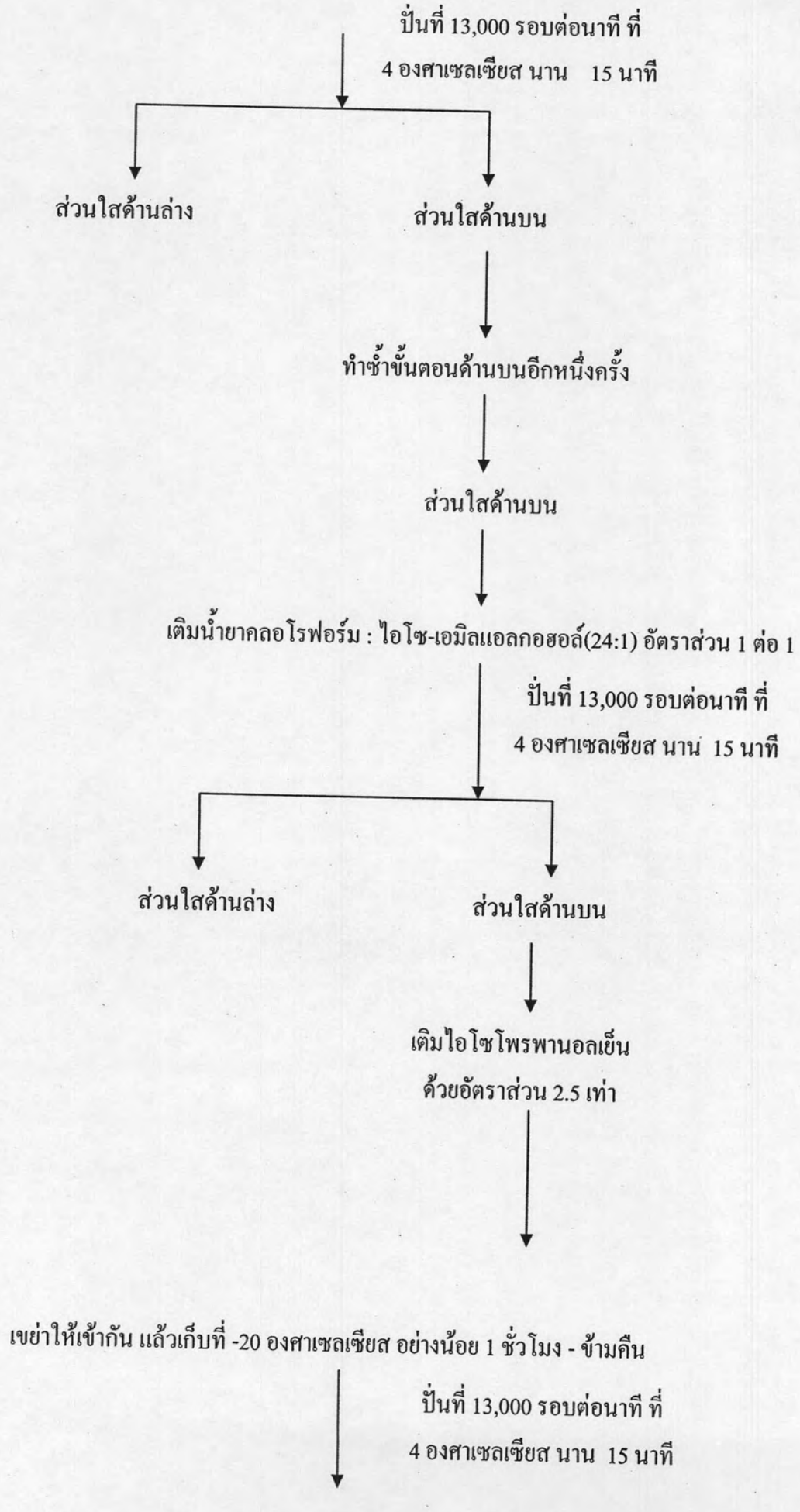
1. แยกส่วนของเส้นใยออก และทำให้เซลล์แตกในโกร่งที่สะอาด
2. แบ่งเชื้อประมาณ 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองเล็กขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. เติม lysis buffer ปริมาณ 250 ไมโครลิตรลงในหลอด เขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน และบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง
4. สกัดDNAโดยเติมน้ำยาคลอโรฟอร์ม : ฟีนอล : ไอโซ-เอมิลแอลกอฮอล์(24:25:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปั่นแยกส่วนใส โดยใช้เครื่องปั่น (Kubota, Japan) ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
5. แยก DNA ที่อยู่ในส่วนใส ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมน้ำยาคลอโรฟอร์ม : ฟีนอล : ไอโซ-เอมิลแอลกอฮอล์ ด้วยปริมาณที่เท่ากัน เขย่าให้เข้ากัน และ ปั่นแยกส่วนใสเช่นเดียวกับข้างต้นในข้อที่ 4
6. แยกส่วนใสในชั้นบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมน้ำยาคลอโรฟอร์ม : ไอโซ-เอมิลแอลกอออล์ (24:1) อัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน ปั่นแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
7. แยกส่วนใสในชั้นบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมน้ำยาไอโซโพรพานอลเย็นด้วยอัตราส่วน 2.5 เท่าของสารส่วนใส เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ -

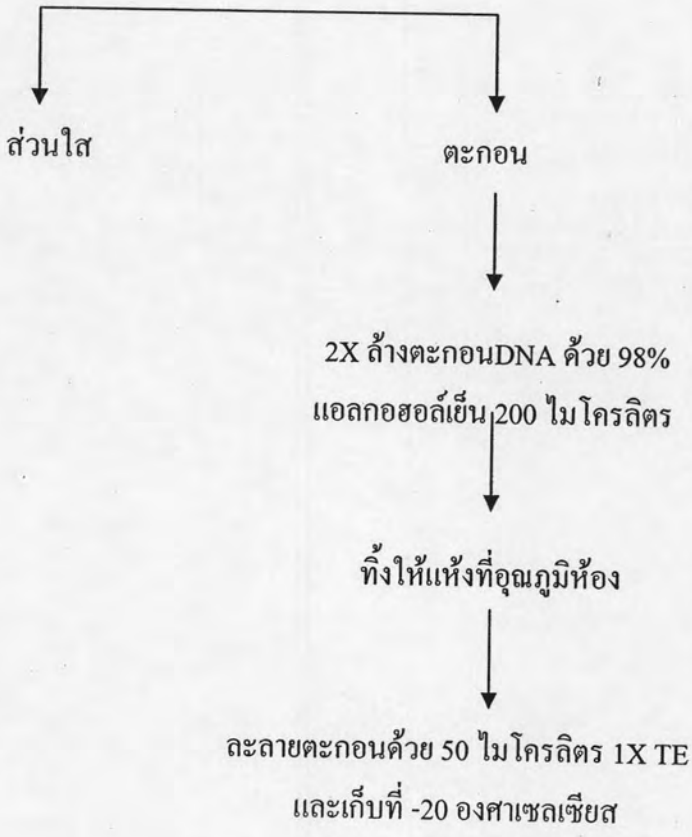
20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกตะกอนDNAด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

8. ล้างตะกอนของDNAที่แยกได้ 2 ครั้งด้วย 98% แอลกอฮอล์เย็นปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งให้ตะกอนแห้งที่อุณภูมิห้อง
9. ละลายตะกอนDNAด้วยสารละลาย 1X TE ปริมาณ 50 ไมโครลิตร และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

ขั้นตอนการสกัดDNA สรุปดังแผนผังดังนี้




ปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่
4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
ส่วนใสด้านล่าง
ส่วนใสด้านบน
ทำซ้ำขั้นตอนด้านบนอีกหนึ่งครั้ง
ส่วนใสด้านบน
เติมน้ำยาคลอโรฟอร์ม : ไอโซ-เอมิลแอลกอฮอล์(24:1) อัตราส่วน 1 ต่อ 1
ปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่
4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
ส่วนใสด้านล่าง
ส่วนใสด้านบน
เติมไอโซโพรพานอลเย็น
ด้วยอัตราส่วน 2.5 เท่า
เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมง - ข้ามคืน
ปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่
4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที



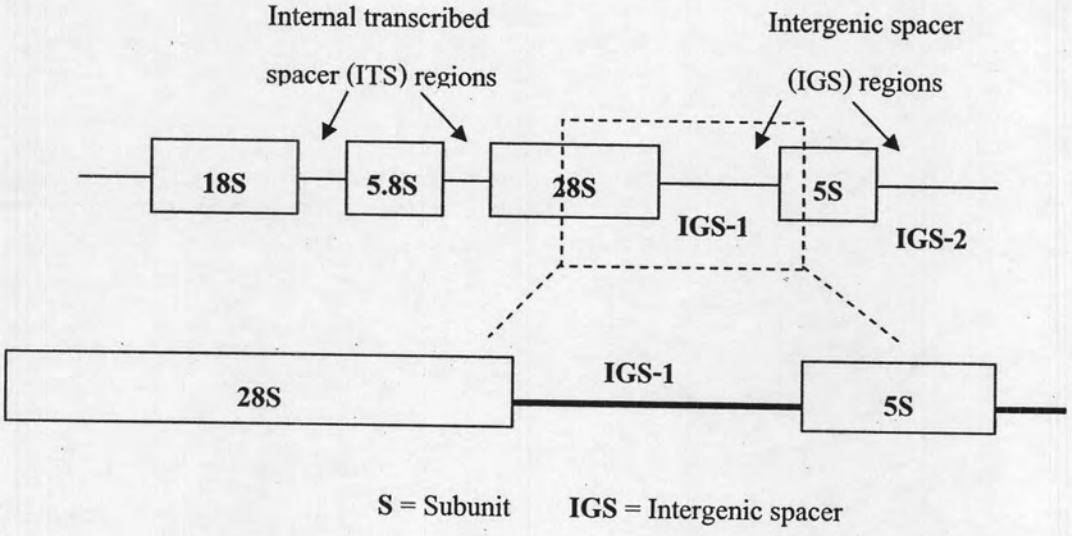
3.2.4 การออกแบบสังเคราะห์ primer ช่วง Intergenic spacer 1 (IGS-1) ของเชื้อ *Pythium*

การศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *Pythium* ในที่นี้ใช้ IGS-1 rRNA (ribosomal RNA) เป็นเป้าหมาย IGS-1 อยู่ระหว่าง 28S (large subunit) และ 5S (small subunit) (รูปที่ 20) การออกแบบ primers ในการทดลองนี้ เป็นการออกแบบเอง ครอบคลุมบริเวณ 28S ถึง 5S โดยอาศัยการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนอนุรักษ์ (conserved sequence region) และอาศัยการ blast และ alignment เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์อื่นๆ ความยาว primers ที่ออกแบบแล้วมีความยาวประมาณ 19-22 เบส

primers คู่ที่ 1 ครอบคลุมตั้งแต่ 28S – 5S ดังนี้

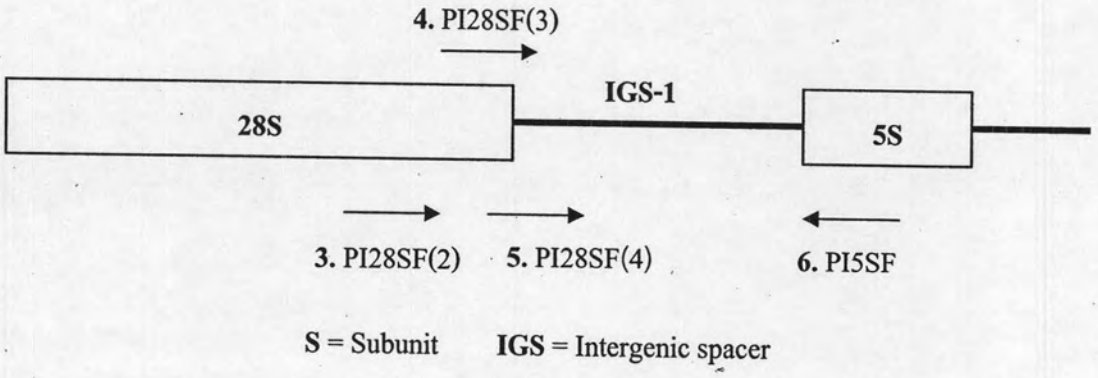
Forward primer คือ PI28SF

Reverse primer คือ PI5SF



รูปที่ 20 แสดงแผนผัง rRNA gene 1 unit

จากนั้นศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างต่อเนื่องโดยใช้ forward primer PI28SF ด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ประมาณ 6 ช่วง ดังนี้ (รูปที่21)



รูปที่ 21 แสดงตำแหน่ง primer 6 primers ในการออกแบบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน IGS-1

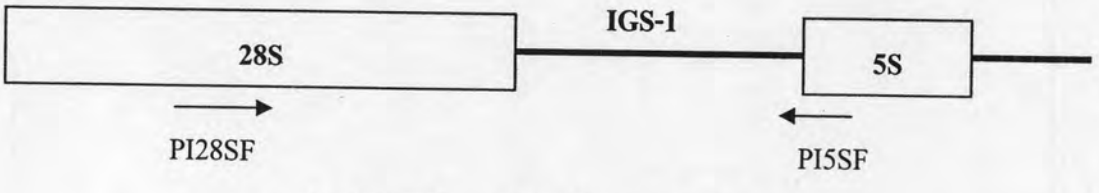
ใช้ forward primer 1 : PI28SF ในการทำ sequencing ได้ความยาวประมาณ 500-600 คู่เบส

1. ออกแบบ forward primer 2 ประมาณตำแหน่งที่ 400-500 คู่เบส จากผลการหาลำดับเบสที่ได้ในข้อ 1 เป็น forward primer 2 คือ PI28SF(1)
2. ใช้ forward primer PI28SF(1) ในการทำ sequencing ได้ความยาวประมาณ 500-600 คู่เบส
3. ออกแบบ forward primer 3 ประมาณตำแหน่งที่ 400-500 คู่เบส จากผลการหาลำดับเบสที่ได้ในข้อ 3 เป็น forward primer 3 คือ PI28SF(2)
4. ใช้ forward primer PI28SF(2) ในการทำ sequencing ได้ความยาวประมาณ 500-600 คู่เบส
5. ออกแบบ forward primer 4 ประมาณตำแหน่งที่ 400-500 คู่เบส จากผลการหาลำดับเบสที่ได้ในข้อ 5 เป็น forward primer 4 คือ PI28SF(3)
6. ใช้ forward primer PI28SF(3) ในการทำ sequencing ได้ความยาวประมาณ 500-600 คู่เบส
7. ออกแบบ forward primer 5 ประมาณตำแหน่งที่ 400-500 คู่เบส จากผลการหาลำดับเบสที่ได้ในข้อ 7 เป็น forward primer 5 คือ PI28SF(4)
8. ใช้ PI5SF เป็น reverse primer 6ในการทำ sequencing ได้ความยาวประมาณ 500-600 คู่เบส

3.2.5 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

3.2.5.1 การเตรียม template ด้วย PCR

ปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการทำ PCR บริเวณ 28S ถึง 5S rRNA อาศัย primers คู่ที่ 1 คือ forward primer PI28SF และ reverse primer PI5SF



S = Subunit **IGS** = Intergenic spacer

รูปที่ 22 แสดงตำแหน่ง primers คู่แรก PI28SF และ PI5SF ในการทำ PCR

- ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย :

- DNA	0.1-10	ng
- dNTPs	0.1	mM
- $MgCl_2$	4.0	mM
- primers	10	pM

- Taq DNA polymerase 5 U/ul (Amplitaq, USA)
- 1xPCR buffer (20 mMTris-HCl (pH8.4), mMKCl 50)
- Distilled water

โดยใช้ PCR ในสภาวะดังนี้

1. denature	94 ^{o}C	2	นาที	
2. denature	94 ^{o}C	40	วินาที	ทั้งหมด 45 รอบ
annealing	55 ^{o}C	30	วินาที	
elongation	72^{o}C	3	นาที	
3. final extension	72^{o}C	10	นาที	

- นำ PCR product ที่ได้มาทำ electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ใน 1.0X TBE ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ต นาน 50 นาที ย้อมด้วย ethidium bromide (USB,USA) ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และตรวจสอบภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

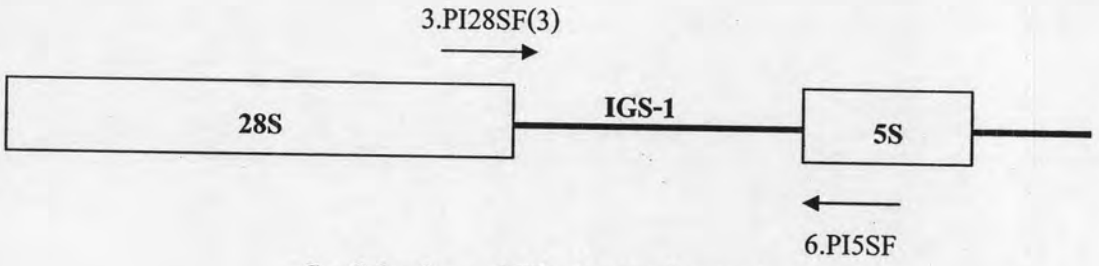
3.2.5.2 การ clone gene

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ forward primer 4 : PI28SF(3) ในการ sequencing พบว่ามีการซ้อนกันของหลาย peak ในลำดับเบสด้านปลาย 3' จึงไม่สามารถอ่านผลลำดับเบสได้ เนื่องจาก primer PI28SF(3) ที่ออกแบบนั้นไม่เหมาะสมกับการอ่านลำดับเบสช่วงนี้ จึงเปลี่ยนวิธีเป็นการ clone gene เพื่อแก้ไขปัญหานี้ออกไป

3.2.5.2.1 การเตรียม PCR product เพื่อทำการ insert gene

โดยทำ PCR ใช้ forward primer 4 : PI28SF(3) และ reverse primer 6 :PI5SF ในการทำ PCR สภาวะการของ PCR เช่นเดียวกับการเตรียม template ในข้อ 3.2.4 ความยาวโดยเฉลี่ยของ inserted gene นี้ประมาณ 2 ,000 คู่เบส (รูปที่ 23)

I 23193384



รูปที่ 23 แสดงตำแหน่ง primers PI28SF(3) และ PI5SF ในการทำ PCR เพื่อ insert ในการ clone gene

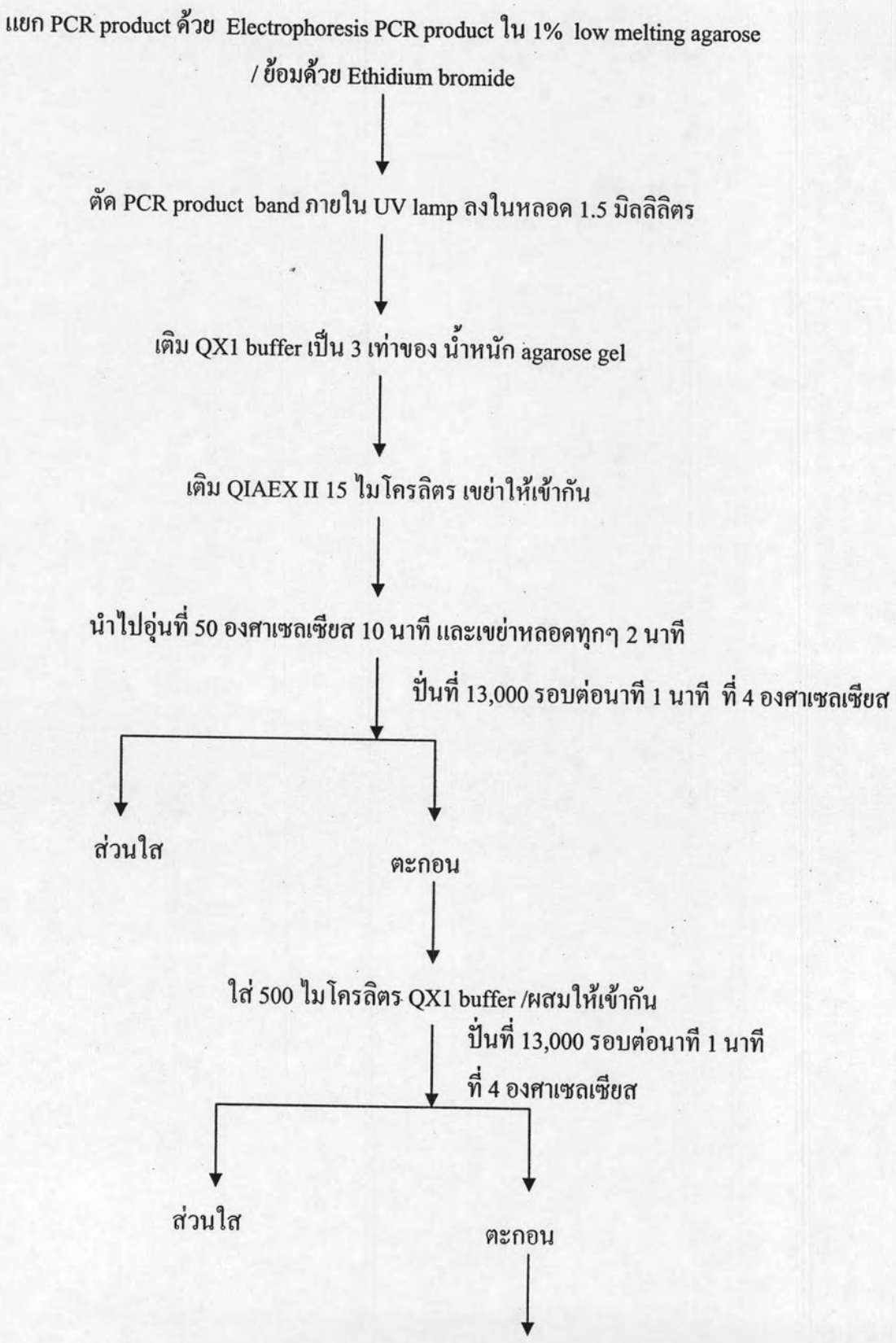
3.2.5.2.2 การสกัด PCR product

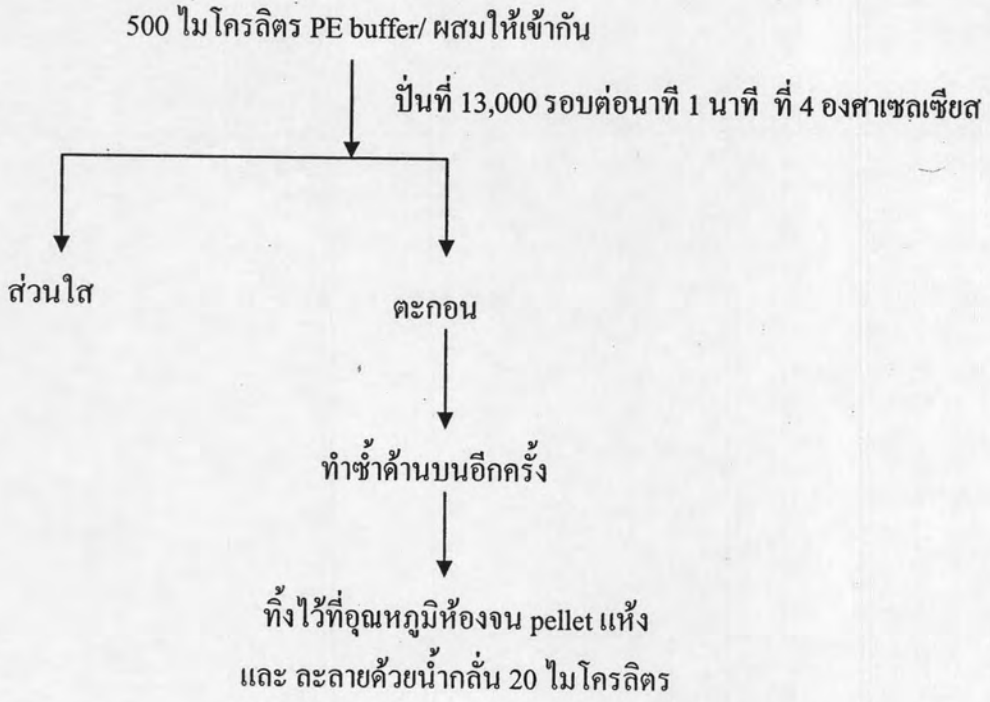
ใช้วิธีการสกัดตามวิธีการในคู่มือของ QIAEX II Agarose Gel Extraction (QIAGEN, USA) ดังนี้

1. แยก PCR product ด้วยการทำ eletrophoresis ที่กระแสไฟ 100 โวล์ต นาน 50 นาที ใน 1% low melting agarose (USB, USA) และ ย้อมด้วย ethidium bromide
2. ตัด band ที่ได้ ภายใต้แสง UV lamp และ ถ่ายเจลลงในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร และนำไปชั่ง
3. เติม QX1 buffer ต่อ agarose gel ที่ชั่งมาได้ด้วยปริมาตร 3 เท่าของเจล
4. เติม QIAEX II ปริมาตร 15 ไมโครลิตร/ เขย่าให้เข้ากัน และ นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10นาที และเขย่าหลอดทุกๆ 2นาที เพื่อให้ agarose ละลาย และนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และดูดส่วนใสทิ้งด้วยปิเปต
5. เติม QX1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยด้วยปิเปต นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ ดูดส่วนใสทิ้งด้วยปิเปต
6. ล้าง pellet ที่ได้ด้วย PE buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยด้วยปิเปต นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และดูดส่วนใสทิ้งด้วยปิเปตทำซ้ำอีกครั้ง

7. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจน pellet แห้ง จึงละลาย pellet ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ขั้นตอนการสกัด PCR product โดยวิธี gel extraction สรุปดังแผนผังดังนี้





3.2.5.2.3 การ ligation ตามวิธีในคู่มือของ InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentus, USA)

จาก PCR product ที่สกัดได้ข้างต้นนำมา ligate กับ plasmid vector

สูตรการทำ ligation (ปริมาตร 30 ไมโครลิตร) มีดังนี้

PCR product	4	ไมโครลิตร
pTZ57R/T (vector plasmid)	3	ไมโครลิตร
10X Ligation buffer	3	ไมโครลิตร
PEG-4000	3	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase enzyme	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	16	ไมโครลิตร

1. เตรียมสารทั้งหมดในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร /บ่มไว้ที่ 22 องศาเซลเซียสข้ามคืน
2. เติม 3 M NaOAc pH 5.3 + 98% ethanol ที่เย็น ปริมาตร 75 ไมโครลิตร
3. นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

4. ตกตะกอน plasmids โดยนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ปิเปตดูดสารละลายใสออกอย่างระมัดระวังจนเหลือประมาณ 20 ไมโครลิตร (ระวังปิเปตสัมผัส plasmid ที่ตกตะกอนที่ก้นหลอดระหว่างการดูด)
5. เติม 98% ethanol ที่เย็น ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายใสอย่างระมัดระวัง จนเหลือปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ระวังอย่าให้โดนส่วน plasmid ที่ตกตะกอนที่ก้นหลอด) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
6. ดูดส่วนใสออกจนหมด และตากหลอดที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง ซึ่งจะเห็นคราบตะกอน plasmid ที่ก้นหลอด และละลาย plasmids ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 6 ไมโครลิตร

3.2.5.2.4 การเตรียม transform cell (*E.coli* DH5α)

1. เขี่ย single colony *E.coli* DH5α จาก LB (Luria-Bertani) agar ลงใน LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร / เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน
2. เท ทั้งหมด ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มี LB broth ปริมาตร 250 มิลลิลิตร /เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 - 3.5 ชั่วโมง
3. นำเชื้อ *E.coli* DH5α ที่เจริญใน LB broth ใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด/ ปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที / เทน้ำ media ออก ซึ่งจะเหลือแต่ตะกอนเซลล์
4. ล้างเซลล์ *E.coli* DH5α ด้วยการเติม 10% glycerol (Fisher, ประเทศอังกฤษ) ลงในหลอดจนถึงระดับขีด 50 มิลลิลิตร / เขย่าให้ตะกอนเซลล์เข้ากับ glycerol นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที / เทน้ำ glycerol ออก / ทำการล้างเซลล์ด้วย 10% glycerol ซ้ำอีก 3 ครั้ง
5. ดูด *E.coli* DH5α ที่ล้างได้ ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และแช่ไว้บนน้ำแข็ง

3.2.5.2.5 ขั้นตอนการ clone gene ด้วยวิธี Electro-transformation และการเตรียมการ

นำ *E.coli* DH5α จาก – 70 องศาเซลเซียส บนน้ำแข็ง / เตรียมcuvette ขนาด 0.1 เซนติเมตร ที่ใช้ในการ Electro-transformation แช่ในน้ำแข็ง / เตรียมเครื่อง *E. coli* Pulser (Bio-RAD, USA) ใช้ไฟขนาด 1.8 KV สำหรับ cuvette ขนาด 0.1 เซนติเมตร และ แช่ slider stick ที่เป็น adapter ไว้ใส่ cuvette ในน้ำแข็ง

1. ดูด plasmids ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ที่ละลายด้วยน้ำกลั่น + *E.coli* DH5α ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงใน cuvette ที่พักไว้บนน้ำแข็ง นำ cuvette ใส่ adapter ในช่องสำหรับ shock cell
2. กดปุ่ม Pulse จนเกิดเสียง เป็นเวลาประมาณ 3 วินาที นำ cuvette ออกจาก adapter และ ใส่ LB broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทันที ใน cuvette โดยใช้ปิเปต ดูดขึ้นลงให้เข้ากัน ระวังอย่าให้มีฟอง
3. ดูด *E.coli* DH5α ที่ผ่านการ Electro-transformation ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
4. ดูดเชื้อมา 500 ไมโครลิตร มาทำ spread plate บน LB+ampicillin agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

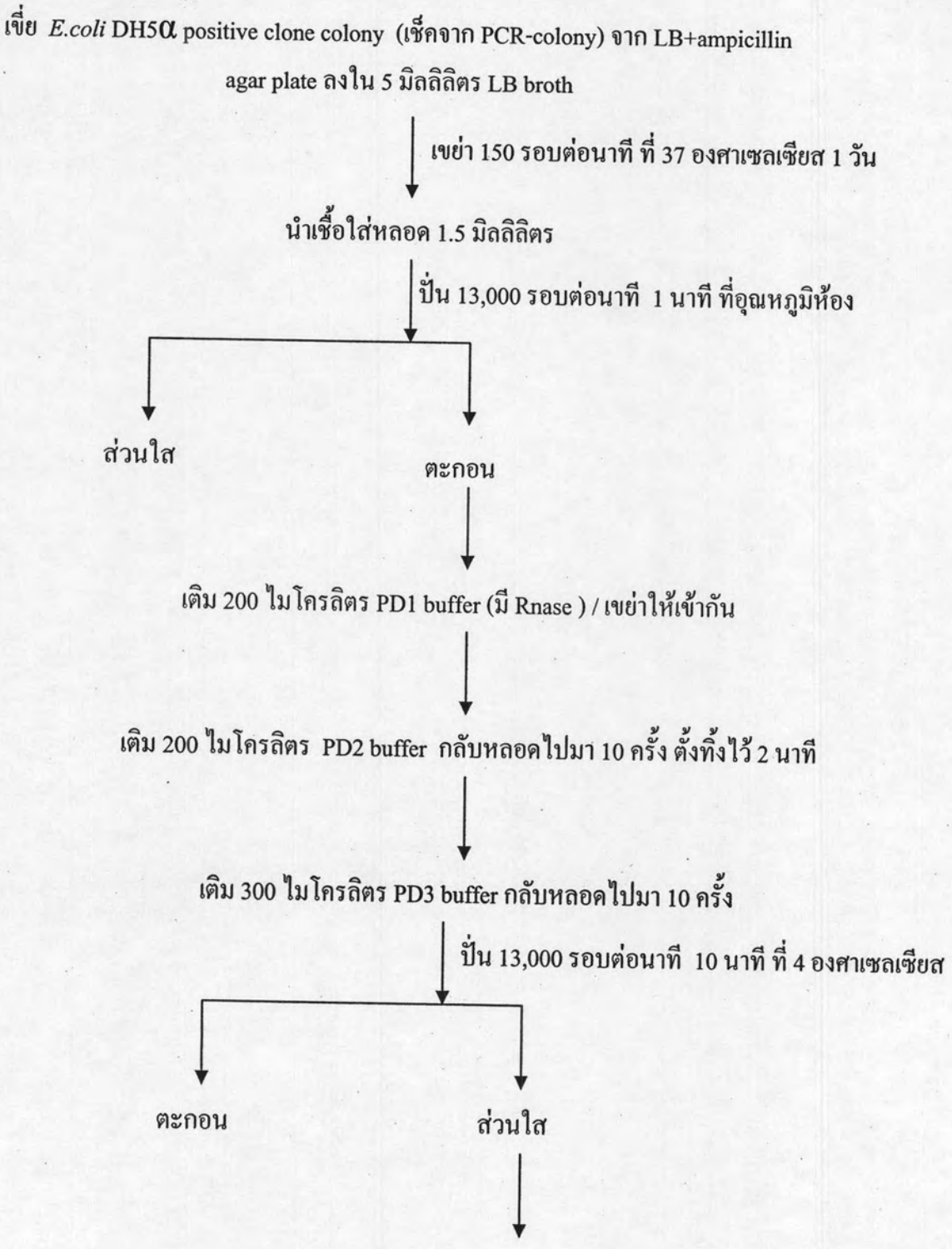
3.2.5.2.6 การคัดเลือก clone ที่มี IGS- 1 gene (Selection of IGS-1 inserted clone)

สุ่มเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB+ampicillin agar plate และตรวจสอบโคโลนีดังกล่าวว่ามีส่วนของ inserted DNA หรือไม่ ด้วยการทำ PCR โดยการใช้โคโลนีเป็น template สำหรับ primers ที่ใช้ ได้แก่ forward primer 4 : PI28SF(3) และ reverse primer 6 : PI5SF ปฏิกิริยา PCR เดียวกับการทำ PCR templete ในข้อ 3.3.4

3.2.5.2.7 การสกัด Plasmids ด้วยวิธีตามคู่มือของ High-Speed Plasmid Mini kit (RBC, Taiwan)

1. ใช้ loop เขี่ย *E.coli* DH5α positive clone colony (ตรวจสอบจาก PCR-colony) จากอาหารเลี้ยงเชื้อ LB+ampicillin agar plate ลงใน LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน
2. เทใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เซลล์อัดตัวกัน เทน้ำ media ทิ้ง
3. เติม PD1 buffer (มี Rnase) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยปิเปต
4. เติม PD2 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ กลับหลอดไปมา 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที จะเห็นสารละลายเป็นสีใส
5. เติม PD3 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 10 ครั้งให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
6. ดูดส่วนใส ใส่ PD column ปั่นที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส่ที่อยู่ใต้หลอดของ PD column ไป แล้วใส่หลอดกลับที่เดิม
7. เติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใน PD column ปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส่ที่อยู่ใต้หลอดของ PD column ไป แล้วใส่หลอดกลับที่เดิม
8. เติม Wash buffer (มี 98%ethanol ผสม) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใน PD column ปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส่ที่อยู่ใต้หลอด แล้วนำหลอดกลับไปใส่ที่เดิม
9. ปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อให้ column แห้ง ทิ้งหลอดที่อยู่ใต้หลอดของ PD column และเปลี่ยนเป็นหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร มาใส่แทน
10. เติม Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรงกลางของ membrane PD column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที และ นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการสกัด plasmid สรุปดังแผนผังดังนี้



ใส่ PD column

↓ ปั่น 8,000 รอบต่อนาที 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

ทิ้งส่วนใสที่อยู่ใต้หลอดของ PD column ไป แล้วนำหลอดใส่กลับที่เดิม

↓

เติม 400 ไมโครลิตร W1 buffer ใน PD column / ทิ้งส่วนใสที่อยู่ใต้หลอดของ PD column ไป แล้วนำหลอดใส่กลับที่เดิม

↓ ปั่น 8,000 รอบต่อนาที 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

ทิ้งส่วนใสที่อยู่ใต้หลอดของ PD column ไป แล้วนำหลอดใส่กลับที่เดิม

↓

เติม 600 ไมโครลิตร Wash buffer (มี 98%ethanol ผสม) ใน PD column

↓ ปั่น 8,000 รอบต่อนาที 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

ทิ้งส่วนใสที่อยู่ใต้หลอดของ PD column ไป แล้วนำหลอดใส่กลับที่เดิม

↓ ปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที 2นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

เปลี่ยนหลอดที่อยู่ใต้หลอดของ PD column เป็นหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

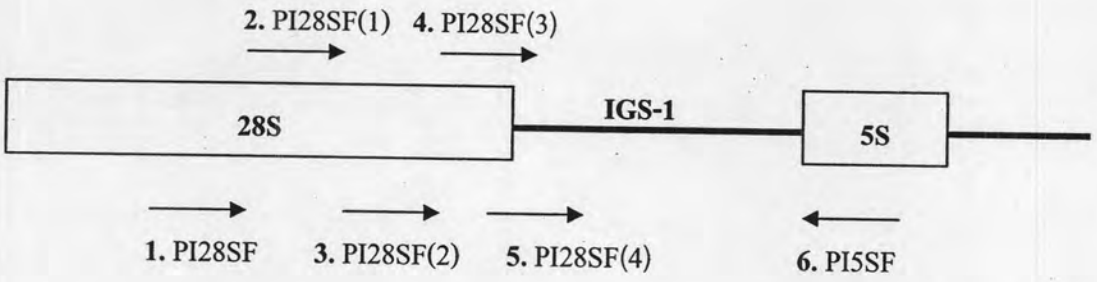
↓

เติม 50 ไมโครลิตร Elution Buffer ตรงกลางของ membrane PD column /ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที

↓ ปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที 2นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

เก็บส่วนใสในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2.6 การหาลำดับเบส (DNA sequencing)



S = Subunit

รูปที่ 24 แสดงผังสรุปตำแหน่ง primers 6 primers ที่ใช้ในการหาลำดับเบส

ใช้ pimers 6 primers ในการหาลำดับเบส (รูปที่ 21) โดย

เริ่มจากการเตรียม template PCR ในการหาลำดับเบส โดยใช้ forward primer1: PI28SF และ reverse primer6 : PI5SF และนำ template PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบสโดยใช้ primer PI28SF(1), PI28SF(2) และ PI28SF(3) ส่วน primer PI28SF(4) และ PI5SF นั้นจะใช้ plasmid ที่มี inserted IGS-1 gene เป็น template ในการหาลำดับเบส ซึ่งเป็นส่วนที่ได้จากการทำ PCR ของ genomic DNA ด้วย primer PI28SF(3) และ PI5SF

3.2.6.1 การ Purify PCR product ใช้ชุด QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, USA)

1. เติม PB buffer ปริมาตร 5 เท่า ต่อ ปริมาณ PCR product และ เขย่าให้เข้ากัน ดูดทั้งหมดใส่ใน QIAquick spin column ปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ในหลอดข้างล่าง column ไป และนำหลอดใส่กลับที่เดิม
2. เติม PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใน column และปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ในหลอดข้างล่าง column ไป และนำหลอดใส่กลับที่เดิม

3. ปั่นให้ column แห้งที่ ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นทิ้งหลอดที่อยู่ด้านล่างcolumn ไป นำหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรมาใส่แทน
4. เติม EB buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตรงกลาง membrane ของ column ตั้งทิ้งนาน 5 นาที และนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ขั้นตอนการ purify PCR product สรุปดังแผนผังดังนี้

ใส่ 5 เท่าของ PB buffer ต่อปริมาตร 1 เท่า PCR product /เขย่าให้เข้ากัน

↓

ใส่ใน QIAquick spin column

↓ ปั่น 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 1 นาที

ทิ้งส่วนใสที่อยู่ในหลอดข้างล่าง column ไป และใส่กลับที่เดิม

↓ ปั่น 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 1 นาที

ใส่ 750 ไมโครลิตร PE buffer ใน column

↓

ทิ้งส่วนใสที่อยู่ในหลอดข้างล่าง column ไป และใส่กลับที่เดิม

↓

ปั่นให้ column แห้งที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 1 นาที
จากนั้นเปลี่ยนเป็นหลอด 1.5 มิลลิลิตรมาใส่ด้านล่างแทน

↓

ใส่ EB buffer 30 ไมโครลิตร ตรงกลาง membrane ของ column ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

↓ ปั่น 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 1 นาที

เก็บส่วนใสในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2.6.2 การหาลำดับเบส

เป็นการติดฉลากสี fluorescence กับ dideoxynucleotide (ddNTP) เพื่อให้แย่งจับกับ deoxynucleotide (dNTP) ในขั้นตอน polymerization ของกระบวนการ PCR โดยใช้ชุด Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA) และนำ ผลิตผลที่ได้มาแยกใน polyacrylamine gel และแปลผลลำดับเบสออกมาเป็นสีของเบสที่แตกต่างกันด้วยแสง laser ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) (48)

3.2.6.3 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส

นำผลของลำดับเบสที่ได้ทั้งหมดมาศึกษาวิเคราะห์ความเหมือน(homology) ความต่างโดยทำการ Alignment ด้วยโปรแกรม CLC bio Workbench (V.3.2.2) , Bioedit และ ClustalX (V.1.81) และสำหรับการทำ Phylogenetic tree ใช้โปรแกรม MEGA (V.3.1) โดยใช้วิธี Neighbor-joining กำหนดค่า Boostrap = 1,000 replicate