บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1) เครื่องปั่นเหวี่ยง บริษัท Denville scientific, USA
2) เครื่องเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ (PCR thermal cycler) รุ่น T-Gradient thermoblock บริษัท Biometra, Germany
3) ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า บริษัท Gallenkamp, U.K.
4) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ รุ่น SS-245 บริษัท Tomy, Thailand
5) ชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า บริษัท Helixx Technology, Canada
6) เครื่องถ่ายภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต UV-Tranillumirator บริษัท Clare Chemical Research, USA
7) ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น HLF 1200E
8) เครื่องผสมสาร รุ่น REAX 2000 บริษัท Heidolph, Germany
9) เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้ารุ่น MD 625B-12 บริษัท Hoefer scientific instruments, USA
10) เครื่อง nanodrop 2000 Spectrophotometer บริษัท Thermo scientific, Thailand
11) อุปกรณ์ผ่าตัด ปากคีบ และที่บดตัวอย่าง
12) หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 0.2, 0.5, และ 1.5 มิลลิลิตร
13) ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) ขนาด 2, 20, 200, และ 1,000 ไมโครลิตร
14) ทิปและทิปกรอง ขนาด 10, 20, 200, และ 1,000 ไมโครลิตร
15) จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)

3.2 สารเคมี

1) ไพรเมอร์สังเคราะห์โดย บริษัท Biodesign, Thailand
2) Ethanol บริษัท Merck, Thailand
3) Tris Base บริษัท Promega, USA
4) Boric acid บริษัท Univar, U.K.
5) EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic acid) บริษัท Amresco, USA
6) DNase I บริษัท Roche, Thailand

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7) Ethidium Bromide บริษัท Invitrogen, USA

8) Seakem LE agarose บริษัท Cambrex bio science rockland, USA

9) LB Broth บริษัท Hardy Diagnostics, USA

10) Agar บริษัท Criterion, USA

11) X-gal บริษัท Amresco, USA

12) Amplicillin บริษัท T.P. Drug Laboratories, Thailand

13) 100 bp DNA Ladder Plus (0.5ug/ul) บริษัท Fermentas, USA

14) 6x loading dye บริษัท Fermentas, USA

15) Taq DNA polymerase บริษัท Vivantis, Malaysia

16) SuperScript III Reverase Transcriptase บริษัท Invitrogen, USA

17) เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR*I และ *Mse*I บริษัท New England Biolabs, U.K.

18) First strand cDNA Synthesis kit บริษัท Roche, Thailand

19) ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป บริษัท Qiagen, Germany

20) ชุด RNA Assay Kit บริษัท Invitrogen, USA

21) 17β-estradiol บริษัท Invitrogen, USA

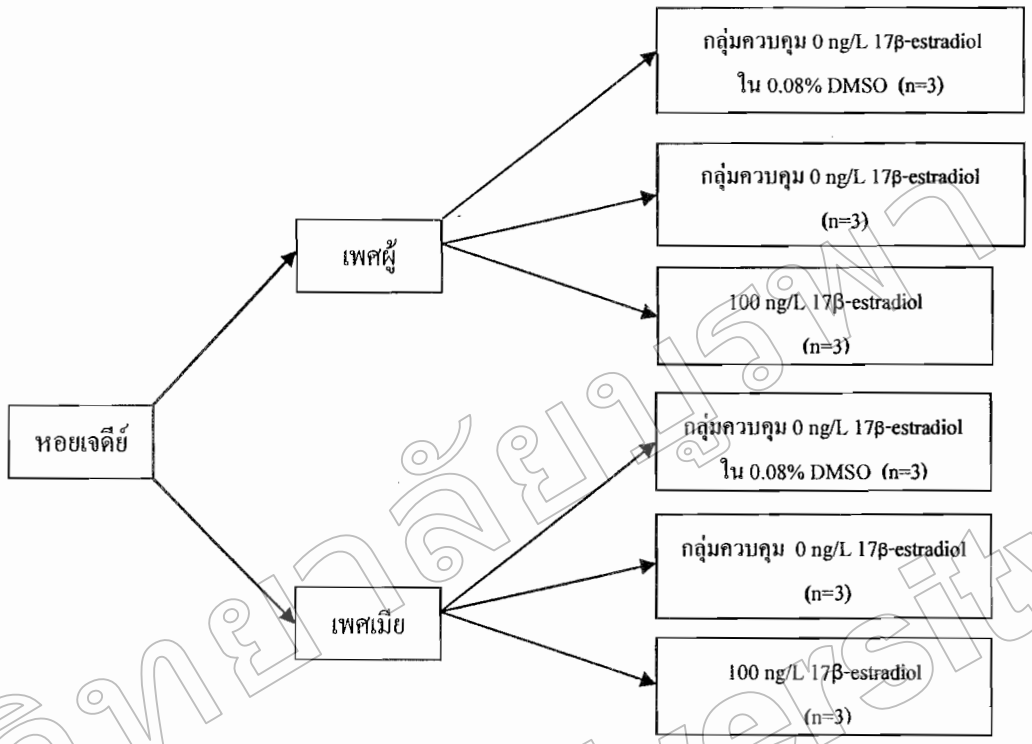
22) Trizol บริษัท Invitrogen, USA

ตอนที่ 1 การค้นหายีนบ่งชี้ทางชีวภาพในหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร 17β-estradiol

3.3 ตัวอย่างหอยเจดีย์ที่ใช้ในการค้นหายีนบ่งชี้ทางชีวภาพ

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างหอยเจดีย์ทั้งเพศผู้และเพศเมียตัวเต็มวัย (ความยาวของเปลือกประมาณ 2 เซนติเมตร) จากแหล่งธรรมชาติที่มีการกระจายอยู่ตามหาดโคลนบริเวณหาดเจ้าหลาว ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ทำความสะอาดหอยเจดีย์และนำไปเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจาก 17β-estradiol เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพ จากนั้นจึงนำหอยเจดีย์มาเลี้ยงไว้ในตู้เลี้ยงขนาด 20x20 x20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตู้ละ15 ตัวอย่าง โดยเพศผู้และเพศเมียทำการเลี้ยงแยกตู้กัน จากนั้นนำแต่ละเพศ (1 กลุ่ม/ตู้) มาทดสอบดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมเลี้ยงในน้ำทะเลที่มี 0.08% DMSO (ตัวทำละลายของ 17β-estradiol) กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุมเลี้ยงในน้ำทะเล กลุ่มที่ 3 ได้รับสาร 17β-estradiol ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/L โดยทั้งหมดทดสอบเป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นทำการแยกเนื้อเยื่อส่วนเท้าจากแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยแต่ละกลุ่มทดลองทำ 3 ซ้ำ (n=3) ในแต่ละซ้ำใช้ตัวอย่างหอยเจดีย์ 5 ตัว รวมกัน เพราะฉะนั้นใช้หอยเจดีย์ในแต่ละกลุ่มจำนวน 15 ตัว ดังแสดงในแผนภาพ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



3.4 การสกัดอาร์เอ็นเอ

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนเท้า โดยนำเนื้อเยื่อดังกล่าวของหอยเจดีย์ที่แช่ใน RNA later เพื่อรอปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ จากนั้นชั่งเนื้อเยื่อประมาณ 20-30 mg ทำการสกัดอาร์-เอ็นเอ โดยใช้น้ำยา Trizol หรือ ชุด RNeasy Mini Kit ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต ซึ่งมีวิธีโดยสรุปคือ เติมบัฟเฟอร์ RLT (guanidine thiocyanate) จำนวน 700 ไมโครลิตร และสารละลาย β-mercaptoethanol จำนวน 7 ไมโครลิตร แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียดโดยใช้แท่งบด ปิเปตส่วนของเหลวผสมจำนวน 700 ไมโครลิตร ใส่ใน QIAshredder spin column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดูดสารละลายที่ผ่าน column จำนวน 670 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ ทำการเติม 50% ethanol จำนวน 670 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต แล้วถ่ายสารละลายผสมจำนวน 700 ไมโครลิตร ใส่ลงใน RNeasy column ที่บรรจุใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทของเหลวใน collection tube ทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ RW1 (100% ethanol) จำนวน 700 ไมโครลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 วินาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ RPE (70% ethanol) จำนวน 500 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 วินาที เทของเหลวใน collection tube ทิ้ง เติมบัฟเฟอร์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

RPE อีกครั้งจำนวน 500 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเปลี่ยน collection tube ใหม่ อีกครั้งก่อนปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงย้าย RNeasy column ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการชะสารละลายอาร์เอ็นเอใน column ดังกล่าว จำนวน 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 เติมน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase-free water) จำนวน 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ครั้งที่ 2 เติมน้ำที่ปราศจาก RNase อีกครั้งจำนวน 20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่จำนวนรอบและเวลาเท่าเดิม นำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์มาเติม DNase I จำนวน 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop 2000/2000c spectrophotometer แล้วเก็บไว้ที่ -30°C เพื่อสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอต่อไป

3.5 การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอโดยการถอดรหัสย้อนกลับ (Reverse Transcription)

นำสารละลายอาร์เอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.4 มาทำการถอดรหัสย้อนกลับเพื่อให้ได้ซีดีเอ็นเอ การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอเป็นการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่แบบ การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอจะทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองผนังบางขนาด 0.2 ml ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้อาร์เอ็นเอเริ่มต้นเท่ากันทุกตัวอย่างที่ปริมาณ 500 นาโนกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 10X Reaction buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 50 mM $MgCl_2$, 20 mM DTT) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X ร่วมกับ $MgCl_2$ 5 mM, Random hexamer 4 ไมโครกรัม และ dNTPs จำนวน 1 mM, Ribonuclease Inhibitor จำนวน 20 U และ AMV-Reverse Transcriptase (Vivantis Technologies) จำนวน 20 U จากนั้นนำสารละลายผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 นาที และที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง PCR thermal cycler จากนั้นเก็บซีดีเอ็นเอที่ได้นี้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.6 การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP

นำซีดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ในข้อ 3.5 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I โดยใช้ซีดีเอ็นเอจำนวน 8 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย NEB buffer 4 จำนวน 2 ไมโครลิตร, BSA buffer จำนวน 0.2 ไมโครลิตร, nuclease free water จำนวน 7.8 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I อย่างละ 0.5 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหยุดปฏิกิริยา ที่ 65 °C เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อให้เอนไซม์เสียสภาพ และเก็บไว้ที่ -30 °C เพื่อเตรียมที่จะเชื่อมต่อกับ adapter ต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเชื่อมต่อ adapter ทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 10 mM *EcoR*I adapter 5′ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 10 mM *EcoR*I adapter 3′ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 100 mM *Mse*I adapter 5′ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 100 mM *Mse*I adapter 3′ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร T4 DNA Ligase จำนวน 0.3 ไมโครลิตร T4 DNA Ligase buffer จำนวน 1 ไมโครลิตร และ nuclease free water จำนวน 1.7 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 4 °C เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อเตรียมทำการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ต่อไป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลิตผล AFLP จะประกอบไปด้วยสองขั้นตอนคือ preselective amplification และ selective amplification

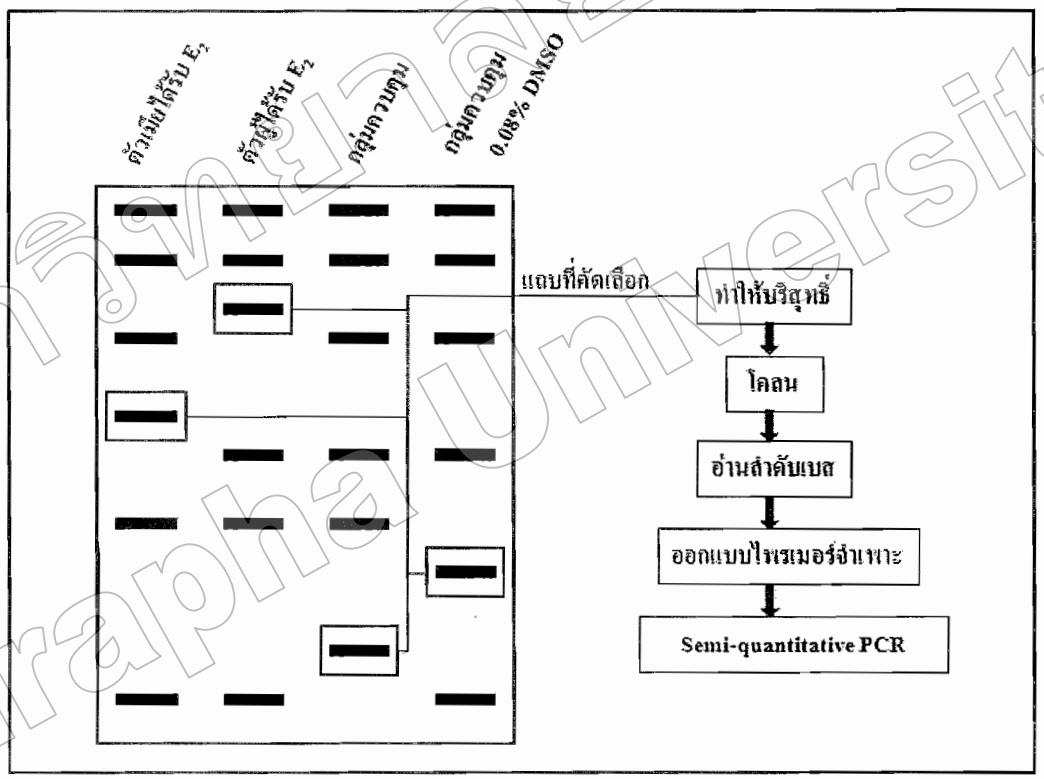
ขั้นแรก การทำ preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นแรก ทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา (10X buffer A, dNTP, 25 mM $MgCl_2$ และ Taq DNA polymerase) จำนวน 10 ไมโครลิตร cDNA ที่ต่อ adapter จำนวน 3 ไมโครลิตร 10 µM *EcoR*I_Pre-amp primer จำนวน 1 ไมโครลิตร 10 µM *Mse*I_Pre-amp primer จำนวน 1 ไมโครลิตร และ nuclease free water จำนวน 5 ไมโครลิตร โดยขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR จะเริ่มจาก predenature ที่ 94°C นาน 3 นาที denature ที่ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 54°C นาน 1 นาที extension ที่ 72°C นาน 1 นาที และ final extension ที่ 72°C นาน 5 นาที ทำปฏิกิริยารวม 20 รอบ

ขั้นที่สอง การทำ selective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นที่สอง ทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา (10X buffer A, dNTP, 25 mM $MgCl_2$ และ Taq DNA polymerase) จำนวน 10 ไมโครลิตร ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากขั้นตอน preselective amplification ที่ (เจือจาง 20 เท่า) จำนวน 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ 10 µM *EcoR*I_amp จำนวน 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ 10 µM *Mse*I_amp จำนวน 1 ไมโครลิตร และ nuclease free water จำนวน 3 ไมโครลิตร โดยขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR จะแบ่งออกเป็น 2 ช่วง ประกอบด้วย ช่วงที่ 1 เป็นการทำ Touch-down PCR (อุณหภูมิในขั้น annealing จะลดลงรอบละ 0.7°C / รอบ) จะเริ่มจาก predenature ที่ 94°C นาน 3 นาที denature ที่ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 65°C นาน 1 นาที โดย extension ที่ 72°C นาน 40 วินาที ทำปฏิกิริยารวม 11 รอบ จากนั้นจะเข้าสู่ช่วงที่ 2 โดยเริ่มจาก denature ที่ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 60°C นาน 1 นาที extension ที่ 72°C นาน 40 วินาที และ final extension ที่ 72°C นาน 3 นาที ทำปฏิกิริยารวม 25 รอบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.7 การวิเคราะห์ AFLP

แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้ปรากฏเป็นแถบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้ Seakem LE agarose ที่มีความเข้มข้น 3% ใน TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 2.30 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วย sybergreen หรือ Ethidium bromide นานประมาณ 15-20 นาที ถ่ายภาพเพื่อคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในตัวอย่างที่ได้รับสาร 17β-estradiol ทั้งเพศผู้ เพศเมีย และกลุ่มควบคุม จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอออกจากเจล ทำให้บริสุทธิ์แล้วทำการโคลน อ่านลำดับเบส จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank เพื่อบ่งชี้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นเป็นยีนหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดใด ขั้นตอนการวิเคราะห์ AFLP แสดงในภาพที่ 3-1



ภาพที่ 3-1 การคัดเลือกแถบดีเอ็นเอจำเพาะด้วยเทคนิค cDNA-AFLP ในเนื้อเยื่อส่วนเท้าของหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสาร E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/L เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.8 การทำแถบดีเอ็นเอที่คัดเลือกให้บริสุทธิ์

ตัดแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.7 (น้ำหนักไม่เกิน 300 มิลลิกรัม) มาใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วเติม DF buffer (Geneaid) จำนวน 500 ไมโครลิตรจากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 °C จนกว่าอะกาโรสเจลละลายหมด จากนั้นดูดสารละลายที่ละลายแล้วใส่ DF column จำนวน 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นเติม W1 buffer จำนวน 400 ไมโครลิตร ลงใน DF column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง เติม Wash buffer จำนวน 600ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นย้าย DF column ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ เติม nuclease free water จำนวน 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 g เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30°C เพื่อนำไปใช้งานต่อไป

3.9 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิดเวกเตอร์และการทรานสฟอร์ม

นำชิ้นดีเอ็นเอมาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM (ภาคผนวก ข) ในชุดสำเร็จของ pGEM®-T Easy Vector Kit ปริมาตรรวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยผลผลิตพีซีอาร์ จำนวน 3 ไมโครลิตร (ประมาณ 20 นาโนกรัม) 2x Rapid ligation buffer T4 DNA จำนวน 5 ไมโครลิตร pGEM®-T Easy Vector จำนวน 1 ไมโครลิตร (50 นาโนกรัม) และ T4 DNA Ligase จำนวน 1 ไมโครลิตร (3 U/ไมโครกรัม) ทำการผสมให้เข้ากันในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ผนังบาง ขนาด 0.6 มิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมนี้จำนวน 2 ไมโครลิตร เติมลงใน competent *E. coli* DH5 alpha ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมนี้ไปทำการทรานสฟอร์ม โดยการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 45 วินาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เมื่อครบเวลานำมาแช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว และทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำออกมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม SOC medium จำนวน 180 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้น ปิเปตทรานสฟอร์แมนท์จำนวน 100 ไมโครลิตร กระจายบนผิวหน้าอาหารแข็งผสมยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลินความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และ X-gal ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลังจากทำการกระจายเซลล์ให้ทั่วบนจานอาหารแข็งแล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมซึ่งโคโลนีจะมีสีขาว ทำการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.10 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมและการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

คัดเลือกโคโลนีสีขาวโดยแตะด้วยไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในสารผสมของปฏิกิริยา PCR แล้วทำ replica plate ให้เชื้อเจริญในอาหาร LB agar ส่วนปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ M13 F/R จากนั้นตรวจสอบผลผลิตด้วย agarose gel electrophoresis จะทราบว่าโคโลนีใดที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม จึงนำทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมในจานอาหาร replica plate โดยนำไปเจริญในอาหารเหลว LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-20 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ high speed plasmid mini kit (Geneaid, Taiwan) ตามคู่มือที่แนะนำจากผู้ผลิต จากนั้นตัดพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยทำปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิดลูกผสมจำนวน 8 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Eco*RI (10U/µl) จำนวน 1 ไมโครลิตร 10X *Eco*RI buffer จำนวน 2 ไมโครลิตร BSA buffer จำนวน 0.2 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรรวมให้ครบ 20 ไมโครลิตร ด้วย nuclease free water นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง และตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis

3.11 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายที่ตรวจสอบได้ในข้อ 3.9 ส่งอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท First Base Laboratories SdnBdh (Malaysia) จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตอื่นที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (blast) และลำดับกรดอะมิโน (blastx) ผ่านเครือข่ายอินเตอร์เน็ต (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi)

3.12 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ

เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ในชิ้นดีเอ็นเอจากการศึกษาในข้อ 3.11 ทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่มีความจำเพาะ นำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR (Canesi, Borghi, Fabbri, Ciacci, Lorusso, Gallo, & Vergani, 2007) ต่อไป โดยใช้โปรแกรม primer 3 ซึ่งคู่ไพรเมอร์ใหม่ที่ออกแบบมานี้คือ คือ 217L_transposase และ 217R_transposase

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.13 การยืนยันการใช้งานและการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางชีวภาพ

ผลที่ได้จากการคัดเลือกยีนหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีศักยภาพเป็นดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพนั้น ทำการทดสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์กับตัวอย่างหอยเจดีย์ในห้องทดลองที่ให้ได้รับสัมผัสสาร E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ng/L และกลุ่มควบคุม 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร E_2 และกลุ่มควบคุมที่มี 0.08% DMSO ในตอนต้นแล้ว เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวระหว่างกลุ่มทดลองด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR

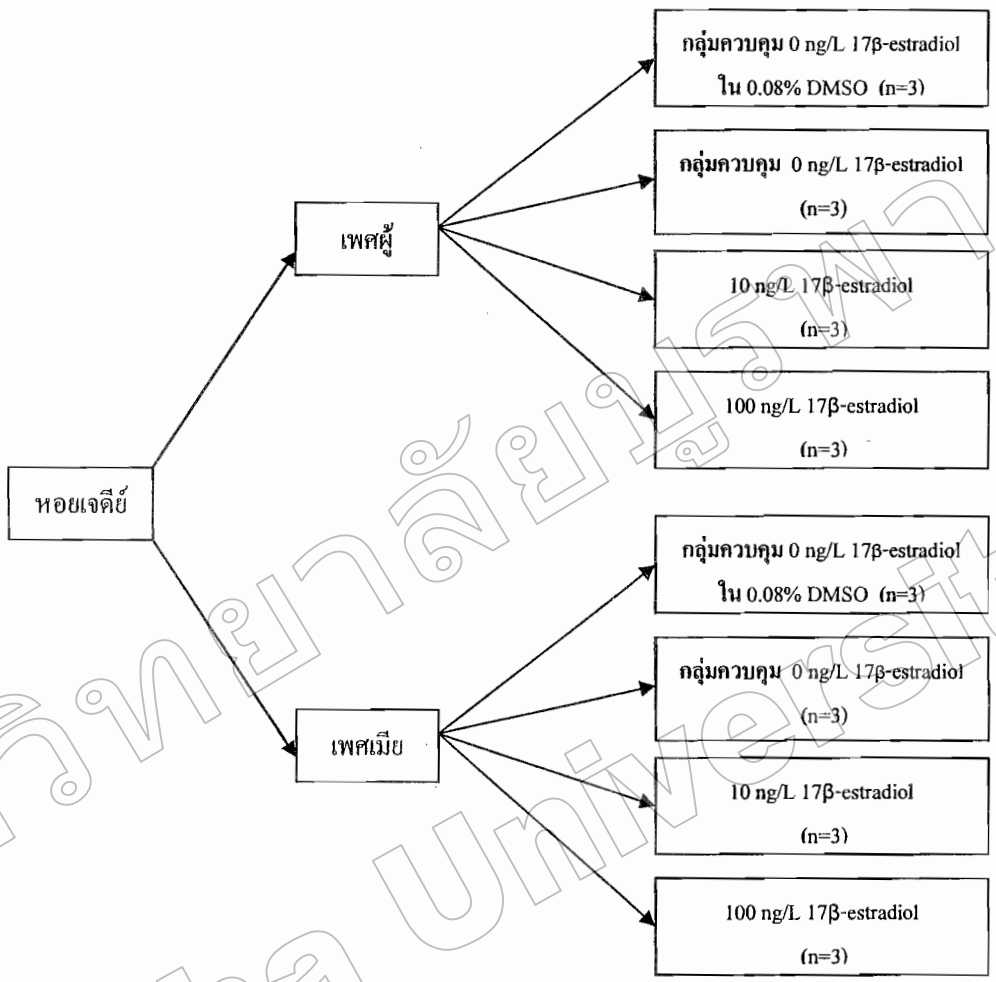
<u>ตอนที่ 2</u> การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอในหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร E_2

3.14 ตัวอย่างหอยเจดีย์ที่ใช้ในการศึกษา

3.14.1 ระดับการแสดงออกของยีนหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอในหอยเจดีย์ตัวเต็มวัย

นำตัวอย่างหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยทำการแยกเพศผู้และเพศเมีย (ความยาวของเปลือกประมาณ 2 เซนติเมตร) ที่ทำการปรับสภาพแล้วจำนวนกลุ่มละประมาณ 320 ตัวอย่าง นำมาเลี้ยงไว้ในตู้เลี้ยงขนาด 20x20x20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตู้ละ 40 ตัวอย่าง โดยแต่ละกลุ่มนำมาทดสอบดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมเลี้ยงในน้ำทะเลที่มี 0.08% DMSO (ตัวทำละลายของ 17β-estradiol) กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุมเลี้ยงในน้ำทะเล กลุ่มที่ 3 ได้รับสาร 17β-estradiol ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L กลุ่มที่ 4 ได้รับสาร 17β-estradiol ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/L และเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 7, 14 และ 30 วัน หอยเจดีย์แต่ละกลุ่มทดลองนำมาทำการแยกเนื้อเยื่อส่วนเท้าและเนื้อเยื่อสมองกลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ (n=3) ในแต่ละซ้ำใช้ตัวอย่างหอยเจดีย์ 5 ตัว รวมกัน ดังแสดงในแผนภาพ

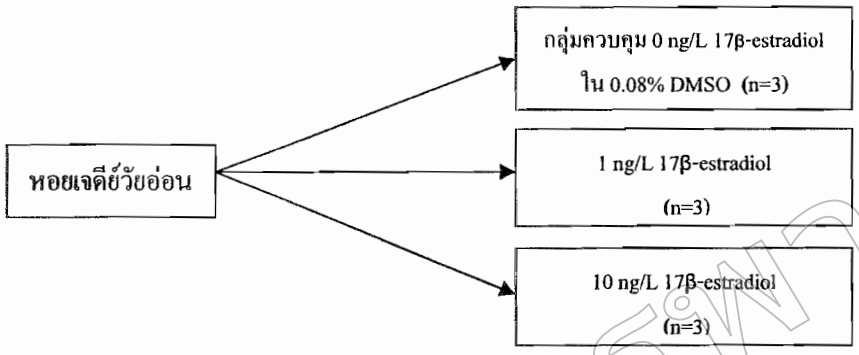
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



3.14.2 ระดับการแสดงออกของยีนหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอในหอยเจดีย์วัยอ่อน

นำตัวอย่างหอยเจดีย์วัยอ่อน (ความยาวของเปลือกประมาณ 0.7 เซนติเมตร) จากบริเวณหาดเจ้าหลาว ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ทำความสะอาดหอยเจดีย์และนำไปเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจาก 17β-estradiol เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพ นำหอยเจดีย์วัยอ่อนจำนวนกลุ่มละประมาณ 120 ตัวอย่าง นำมาเลี้ยงไว้ในตู้เลี้ยงขนาด 20x20x20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตู้ละ 40 ตัวอย่าง โดยแต่ละกลุ่มนำมาทดสอบดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมเลี้ยงในน้ำทะเลที่มี 0.08% DMSO (ตัวทำละลายของ 17β-estradiol) กลุ่มที่ 2 ได้รับสาร 17β-estradiol ที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/L กลุ่มที่ 3 ได้รับสาร 17β-estradiol ระดับความเข้มข้น 10 ng/L และเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 3, 7 และ 14 วัน หอยเจดีย์วัยอ่อนแต่ละกลุ่มทดลองนำมาทำการแยกเนื้อเยื่อส่วนเท้ากลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ (n=3) ในแต่ละซ้ำใช้ตัวอย่างหอยเจดีย์ 5 ตัว รวมกัน ดังแสดงในแผนภาพ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



3.15 การวัดระดับการแสดงออกของยีนหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ทำการเพิ่มปริมาณซีดีเอ็นเอที่ได้มาจากการทดสอบในหอยเจดีย์ทั้งตัวเต็มวัยและวัยอ่อน ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากข้อ 3.12 โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 2X GoTaq green mastermix (reaction buffer pH 8.5, 400 µM dNTP, 3 mM $MgCl_2$) จำนวน 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์จำเพาะจากข้อ 3.12 สายละ 0.5 ไมโครลิตร ซีดีเอ็นเอ จำนวน 3 ไมโครลิตร และ nuclease free water จำนวน 6 ไมโครลิตร จากนั้นเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ในขณะเดียวกัน cDNA ชุดเดียวกันที่ใช้เพิ่มปริมาณในขั้นต้นก็นำมาเพิ่มปริมาณยีนควบคุม 28S *rRNA* โดยมีองค์ประกอบ ขั้นตอนและสภาวะการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับยีนเป้าหมายแต่จะเปลี่ยนคู่ไพรเมอร์เป็น 28S Oce_L99 และ 28S Oce_R334

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR จะทำการวิเคราะห์ผลด้วย gel electrophoresis โดยนำผลผลิต RT-PCR จำนวน 20 ไมโครลิตร เคลื่อนที่ใน 1% SeaKem LE agarose ใน 0.5X TBE buffer ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 µg/ml นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5 นาที จึงส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation และวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA โดยใช้โปรแกรม Gene Tool ซึ่งระดับการแสดงออกของยีนคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Expression ratio} = \frac{\text{ความเข้มของแถบ DNA ยีนเป้าหมาย}}{\text{ความเข้มของแถบ DNA ยีนควบคุม}}$$

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University