การหาลำดับ cDNA ปลาย 3′ ของยีน hydrogenase A ในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. Cu2551

3′ cDNA end determination of gene hydrogenase A from Green Alga, *Tetraspora* sp. CU2551

ครองขวัญ เกตุสุวรรณ์
ปริชญา เกลี้ยงเกลา
หทัยรัตน์ ป้อมทรัพย์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การหาลำดับ cDNA ปลาย 3′ ของยีน hydrogenase A ในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

3′ cDNA end determination of gene hydrogenase A from Green Alga, *Tetraspora* sp. CU2551

T149471

ครองขวัญ เกตุสุวรรณ์
ปริชญา เกลี้ยงเกลา
หทัยรัตน์ ป้อมทรัพย์

b 12884200
i
สบหมู 149471
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 8 มิ.ย. 2561

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3′ cDNA end determination of gene hydrogenase A from Green Alga, *Tetraspora* sp. CU2551

KRONGKWAN KETSUWAN
PARICHAYA KLIANGKLAO
HATHAIRAT POMSUB

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (ENVIRONMENTAL CHEMISTRY)
DEPARTMENT OF CHEMISTRY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การหาลำดับ cDNA ปลาย 3´ ของยีน hydrognase A ในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 3´ cDNA end determination of hydrogenase A gene from Green Alga, *Tetraspora* sp. CU2551
ชื่อนักศึกษา	นางสาวครองขวัญ เกตุสุวรรณ์ รหัสนักศึกษา 56050672 นางสาวปริชญา เกลี้ยงเกลา รหัสนักศึกษา 56050722 นางสาวหทัยรัตน์ ป้อมทรัพย์ รหัสนักศึกษา 56050790
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการ	
ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การหาลำดับ cDNA ปลาย 3´ ของยีน hydrognase A ในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

ชื่อนักศึกษา นางสาวครองขวัญ เกตุสุวรรณ์ รหัสนักศึกษา 56050672
นางสาวปริชญา เกลี้ยงเกลา รหัสนักศึกษา 56050722
นางสาวหทัยรัตน์ ป้อมทรัพย์ รหัสนักศึกษา 56050790

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา เคมี
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2559
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันก๊าซไฮโรเจนเป็นพลังงานทางเลือกที่สะอาดและกำลังได้รับการพัฒนาเพื่อนำไปใช้กับการขนส่ง และการผลิตไฟฟ้า ก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตได้หลายวิธี โดยวิธีหนึ่งที่ใช้ในปัจจุบันคือผลิตโดยสาหร่ายสีเขียว การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวจะต้องอาศัยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งแปลรหัสจากยีน Hydrogenase A (*hydA*) เป็นตัวทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา โดยการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hydA* จากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ได้พบก่อนหน้านี้แล้วบางส่วน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิค 3´ Rapid Amplification of cDNA End (3´RACE) เพื่อหาส่วนที่ยังขาดของปลาย 3´ ของยีน *hydA* เริ่มด้วยการสร้าง First-stranded cDNA ด้วย oligo-dT primer โดยใช้ mRNA ต้นแบบที่สกัดได้จากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ที่อยู่ในสภาวะที่มีการแสดงออกของยีน *hydA* สูงที่สุด นำไพร์เมอร์ที่ออกแบบจำเพาะเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ผลจากการแยกดีเอ็นเอด้วยเจลอะกาโรสพบว่า ยังไม่พบแถบดีเอ็นเอ จึงนำผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้ไปทำ Nested-PCR เพื่อเพิ่มความจำเพาะ และเพิ่มปริมาณ DNA ให้ได้มากขึ้น ผลที่ได้พบว่าพบแถบ DNA ขนาด 250 คู่เบส จึงนำไปสกัดแล้วโคลนด้วยชุดโคลน TA-cloing Kit (RBC) จากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดแล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเมื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นของเวกเตอร์ออก ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหลือไม่พบ Poly A Tail หรือ Oligo dT ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ cDNA ที่ควรพบ นอกจากนี้ยังไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้อีกด้วย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าชิ้น DNA ที่ได้มานั้นไม่ใช่ส่วนด้านปลาย 3´ ของยีน *hydA* ในสาหร่าย ซึ่งอาจเป็นได้ว่าไพร์เมอร์ที่ออกแบบยังไม่มีความจำเพาะมากพอ หรือสภาพวะที่ใช้ในการทำ PCR หรือ Nested PCR ยังไม่เหมาะสมต่อการจับอย่างจำเพาะของไพร์เมอร์

คำสำคัญ : ลำดับนิวคลีโอไทด์, Rapid Amplification of cDNA End (RACE), Hydrogenase A (*hydA*), Primer, mRNA, PCR, DNA Cloning

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	3´ cDNA end determination of gene hydrogenase A from Green Alga, *Tetraspora* sp. CU2551
Students	Miss Krongkwan Ketsuwan Student ID 56050672
	Miss Parichaya Kliangklao Student ID 56050722
	Miss Hathairat Pomsub Student ID 56050790
Degree	Bachelor of Science (ENVIRONMENTAL CHEMISTRY)
Department	Chemistry
Faculty	Science
University	KingMongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Dr. Tipachai Vatanavicharn

Abstract

Currently, hydrogen gas an alternatively clean energy are being developed for use in transport and electricity production. Hydrogen can be produced in several ways. In present, hydrogen is produced by blue-green algae. Hydrogen production in green algae require hydrogenase enzyme, which translated from Hydrogenase A (hydA) gene, to act as a catalyst. This study focused on nucleotide sequencing of *hyd*A genes from *Tetraspora* sp. CU2551 that was partially identified. In this work, 3' Rapid Amplification of cDNA End (3'RACE) were used to reveal the 3'-end of the *hyd*A gene. First-stranded cDNA was synthesized with oligo-dT primer and the mRNA template extracted from algae Tetraspora sp. CU2551 in the presence of the highest expression of *hyd*A gene. *Hyd*A gene specific primers were used for DNA amplification using PCR technique. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. The result showed that none of DNA band was detected. Nested-PCR that used the PCR product as a template and another gene specific primer was applied to increase specificity and DNA band intensity. The result showed that the size of 225 bp DNA was identify. The DNA band was extracted from agarose gel and cloned with TA-cloing kit (RBC). The recombinant plasmid was extracted and nucleotide sequenced. The 225-bp DNA sequence without vector sequence was analyzed. The result showed that the DNA sequence was not contained poly A tail sequence or oligo dT sequence that should be found as a part of the cDNA or oligo-dT primer. The partial sequence that previously reported was not identify as well. Therefore, it was concluded that the DNA fragment is not a part of the 3' end of hydA genes in this alga which may be because the primers were not specific or PCR or nested-PCR conditions were not optimized for the primers.

Keywords : DNA sequence, Rapid Amplification of cDNA End (RACE), Hydrogenase A (*hyd*A), Primer, mRNA, Polymerase Chain Reaction (PCR), DNA Cloning

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สามารถสำเร็จตามวัตถุประสงค์ไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ที่กรุณาให้ความรู้แก่คณะผู้จัดทำและแนะแนวทางการปฏิบัติงาน ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงานนี้ทำให้โครงงานมีความสมบรูณ์ยิ่งขึ้น ทางคณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการสอบและ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการสอบโครงงานพิเศษนี้ที่กรุณาให้คำปรึกษา รวมทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆทำให้โครงงานพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่รวมทั้งให้ความรู้และความช่วยเหลือในการปฏิบัติงาน

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและพี่ปริญญาโทที่คอยช่วยเหลือและให้คำแนะนำในด้านต่างๆ รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ในการปฏิบัติงาน

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดาของคณะผู้จัดทำที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำโครงงานพิเศษนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ครองขวัญ เกตุสุวรรณ์
ปริชญา เกลี้ยงเกลา
หทัยรัตน์ ป้อมทรัพย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
สัญลักษณ์	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขต	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 พลังงานไฮโดรเจน	3
2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว	3
2.3 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว	4
2.4 สารพันธุกรรม	5
2.5 ทิศทางการส่งผ่านข้อมูลพันธุกรรม	5
2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)	7
2.7 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	8
2.8 การโคลนยีน	10
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	16
3.1 สาหร่าย	16
3.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย	16
3.3 สารเคมี	16
3.4 ชุดทดสอบ (Kit)	17
3.5 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR	18
3.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	18
3.7 ขั้นตอนการวิจัย	19
3.7.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย	19
3.7.2 การสกัด RNA ด้วย TRIzol® Reagent	19
3.7.3 การย่อย DNA ที่ปนเปื้อนมาจากการสกัด RNA ด้วย DNase	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.7.4 การทำ PCR RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 20
3.7.5 การทำให้ DNA บริสุทธิ์ 24
3.7.6 การเพิ่มจำนวน DNA จาก PCR Product (PCR Reamplification) 24
3.7.7 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (PCR Clean-up) 25
3.7.8 การเพิ่มจำนวน DNA จาก PCR Product (PCR Reamplification) 25
3.7.9 การทำให้ DNA บริสุทธิ์ 26
3.7.10 การโคลนผลิตภัณฑ์ PCR 26
3.7.11 การคัดเลือกและตรวจสอบโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าได้รับพลาสมิด DNA และการสกัดพลาสมิด 27

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 29
4.1 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ RNA 29
4.2 แสดงผลการตรวจสอบ PCR 30
4.2.1 ผลการตรวจสอบ PCR รอบแรก 30
4.2.2 ผลการตรวจสอบ PCR Nested (PCR Gradient) 31
4.2.3 ผลการตรวจสอบ PCR Nested (DNase Treatment) 32
4.2.4 ผลการตรวจสอบ PCR Reamplification 33
4.2.5 ผลการตรวจสอบ PCR Clean Up 34
4.2.6 ผลการตรวจสอบ PCR รวมหลุม 35
4.2.7 ผลการตรวจสอบ Colony PCR 35
4.3 แสดงผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 36
4.3.1 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR Nested 36
4.3.2 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของการโคลน 38

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 41
เอกสารอ้างอิง 42
ภาคผนวก 44
ภาคผนวก ก 45
ภาคผนวก ข 48
ภาคผนวก ค 51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์	18
3.2	ส่วนประกอบและปริมาตรที่ใช้ในการสกัด cDNA	21
3.3	ส่วนประกอบและปริมาตรที่ใช้ในการทำ PCR รอบแรก	21
3.4	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR	22
3.5	ส่วนประกอบและปริมาณที่ใช้ในการทำ PCR Nested	22
3.6	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR	23
3.7	ส่วนประกอบและปริมาตรที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR Nested	23
3.8	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR	24
3.9	ส่วนประกอบและปริมาตรที่ใช้ในเทคนิค PCR Reamplification	25
3.10	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR Reamplification	25
3.11	ส่วนประกอบและปริมาตรที่ใช้ในเทคนิคการโคลน	26
3.12	ส่วนประกอบและปริมาตรที่ใช้ในการทำ PCR	27
4.1	ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA ที่สกัดได้	29
ก-1	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (TAP)	45
ก-2	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (TAP-S)	46
ข-1	แสดงความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ RNA	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	การสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์แสง	4
2.2	ความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดลักษณะของสิ่งมีชีวิต (Central Dogma)	5
2.3	แสดงการถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมของโปรตีน	6
2.4	การถ่ายทอดรหัสจาก DNA ในยูแคริโอต	7
2.5	ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction	8
2.6	ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา 3´ RACE	9
2.7	ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา 5´ RACE	10
2.8	การโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรีย	11
2.9	พลาสมิดที่มีเครื่องหมายในการคัดเลือกและยีนรายงานผล	12
2.10	ขั้นตอนการสร้าง DNA รีคอมบิแนนท์	12
2.11	ฟีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ได้รับและไม่ได้รับ DNA รีคอมบิแนนท์	13
4.1	PCR รอบแรก	30
4.2	PCR Nested	31
4.3	PCR Nested ที่อุณหภูมิ 58.2 °C และชุดควบคุม	32
4.4	PCR Reamplification	33
4.5	PCR จากผลิตภัณฑ์ PCR Nested ที่ขนาด 600 bp	34
4.6	PCR จากผลิตภัณฑ์ PCR Clean up ที่ขนาด 250 bp	34
4.7	PCR Reamplification ที่ขนาด 250 bp	35
4.8	Colony PCR ทั้งหมด 5 โคโลนี	36
4.9	แผนภาพยืนยันการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hyd*A ในขนาด 200 bp	37
4.10	แผนภาพยืนยันการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hyd*A ในขนาด 600 bp	37
4.11	แผนภาพยืนยันการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hyd*A จากการสกัดพลาสมิดขนาด 250 bp	38
4.12	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blast	40
4.13	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blast	40
ค-1	แสดงตำแหน่งการออกแบบของไพร์เมอร์ Specific Primer (F_1) และ Specific Primer (F_2)	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัญลักษณ์

สัญลักษณ์	คำอธิบาย
MJ/kg	เมกะจูลต่อกิโลกรัม
$\mu E/m^2/s$	ไมโครโฟตรอนต่อตารางเมตรต่อวินาที
µmol/mg Chl a/h	ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลเอต่อชั่วโมง
µl/mg Chl a/h	ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลเอต่อชั่วโมง
°C	องศาเซลเซียส
nm	นาโนเมตร
ng/ml	นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
µl	ไมโครลิตร
ml	มิลลิลิตร
bp	เบสแพร์
kb	กิโลเบสแพร์
rpm	รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากปัจจุบันพลังงานเป็นสิ่งที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์เป็นอย่างมาก ฉะนั้นความมั่นคงทางพลังงานจึงถือว่าเป็นเรื่องที่ต้องให้ความสำคัญ เพราะในอนาคตนั้นไม่มีใครทราบได้อย่างแน่ชัดว่าพลังงานที่ใช้กันอยู่ในทุกวันนั้นจะหมดลงไปเมื่อไร การมองหาพลังงานทางเลือกเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนพลังงานหลักซึ่งส่วนใหญ่คือน้ำมัน ถ่านหินและก๊าซธรรมชาติซึ่งมีวันหมดลงจึงเป็นการเตรียมพร้อมและป้องกันการขาดแคลนพลังงานในอนาคต โดยพลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจเพราะพลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่ให้ความร้อนสูง โดยสามารถให้ความร้อนสูงถึง 142 MJ/kg(ชัชวาลย์ ชัยชนะ,2547;ภานุทัศน์ อินใจมา,2550) เมื่อทำการเผาไหม้ด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อนหากเผาไหม้ในอากาศจะเกิดเป็นออกไซด์ของไนโตรเจนซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าพลังงานอื่นๆกระบวนการผลิตไฮโดรเจนนั้นมีได้หลายวิธีเช่น วิธีสตีมรีฟอร์มมิ่ง (Steam Reforming) วิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Water Electrolysis) เป็นต้น ซึ่งวิธีสตีมรีฟอร์มมิงเป็นวิธีการที่ยังต้องใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งมีอยู่ในปริมาณจำกัด ส่วนการผลิตไฮโดรเจนจากการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยไฟฟ้าต้องใช้ความดันสูง ซึ่งมีค่าใช้จ่ายและต้องใช้พลังงานที่มากกว่าพลังงานที่ได้จากการแยก ด้วยเหตุนี้ทั่วโลกจึงหันมาให้ความสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตแทนหรือที่เรียกว่า "ไบโอไฮโดรเจน"(Biohydrogen) สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียว ไซยาโนแบคทีเรีย แต่ข้อได้เปรียบที่สาหร่ายมีมากกว่าแบคทีเรียคือการนำเอาพลังงานแสงที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดนำมาผลิตไฮโดรเจนโดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง

Tetraspora sp. CU2551 (*Tetraspora* sp.) จัดเป็นสาหร่ายสีเขียวที่พบได้ในประเทศไทย ดังนั้นจึงสามารถทนความร้อนและความเข้มแสงสูงได้ มีความสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดี ภายใต้ความเข้มแสง 48-92 $\mu E/m^2/s$ ที่อุณหภูมิ 36 °C จะสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนในอัตรา 17.3-61.7 μmol/mg Chl a/h หรือ 423-1511 μl/mg Chl a/h ซึ่งเป็นอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงมากเมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่น หากเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้(Kari. *et al.*2008; Chochois. *et al.* 2010) สาหร่ายที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากที่สุดคือ สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) โดยให้ค่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจนไว้เพียง 71 μl/mg Chl a/h เท่านั้น(เชิดศักดิ์, 2551) ดังนั้นสาหร่าย *Tetraspora* sp. จึงเป็นตัวอย่างที่น่าสนใจสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยสิ่งมีชีวิต *Tetraspora* sp. จึงเป็นสาหร่ายที่เรานำมาทำการศึกษา

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบในสาหร่ายสีเขียวเป็นเอนไซม์ที่ประกอบไปด้วยโมเลกุลของเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์หรือที่เรียกว่า Iron-hydrogenases หรือ Fe-hydrogenase เป็นโคแฟกเตอร์ (Schnackenberg. *et al.*, 1993) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสนี้มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นไฮโดรเจนทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซไฮโดรเจน ด้วยเหตุนี้การเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานหรือการพัฒนาเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงเป็นเรื่องที่น่าให้ความสนใจการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์มีอยู่หลายวิธี หนึ่งในนั้นคือ วิธีการตัดต่อพันธุกรรมซึ่งต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence) ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือ การหาลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิวคลีโอไทด์จากลำดับที่ทราบแล้วบางส่วนด้วยวิธีการทำ Rapid Amplification of cDNA End (RACE) ซึ่งชิ้นส่วนของดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA) เลือกทำการศึกษาจากส่วน messenger RNA (mRNA) ของยีน Hydrogenase A (*hyd*A) ในสาหร่าย *Tetraspora* sp. วิธีการทำ RACE นั้นจะเริ่มจากเบสที่ทราบตำแหน่งปลาย 5′ ของ RNA ไปยังปลาย 3′ ก่อนเรียกเทคนิคนี้ว่าการทำ 3′ RACE ซึ่งเป็นหนึ่งในวิธีการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

ด้วยเทคนิคที่กล่าวมาข้างต้นทำให้ทราบลำดับ mRNA ของปลาย 3′ ทั้งหมดสามารถนำไปต่อยอดทางด้านพันธุ์ศาสตร์ได้ เช่น การออกแบบให้ยีนไฮโดรจีเนสแสดงลักษณะได้อย่างหลากหลาย หรือการโคลนที่สามารถเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนที่มากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3′ ของยีน Hydrogenase A (*hyd*A) ในสาหร่าย *Tetraspora* sp. ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA End (RACE)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. สกัด mRNA จากสาหร่าย *Tetraspora* sp. ด้วย TRIzol® Reagent
2. ทำ 3′ RACE (Rapid Amplification of cDNA End) และเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ทางปลาย 3′ ของยีน Hydrogenase A (*hyd*A)
3. หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ 3′ RACE

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Hydrogenase A (*hyd*A) จากสาหร่าย *Tetraspora* sp.
2. เป็นความรู้เบื้องต้นสำหรับงานในส่วนของพันธุกรรมของสาหร่าย *Tetraspora* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลังงานไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความสำคัญในการเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญในอนาคต ไฮโดรเจน (อังกฤษ: Hydrogen; ละติน: Hydrogenium) เป็นธาตุลำดับแรกในตารางธาตุ มีสัญลักษณ์ธาตุคือ H และมีเลขอะตอมเท่ากับ 1 ที่อุณหภูมิห้องและในสภาวะความดันบรรยากาศมาตรฐาน ไฮโดรเจนมีสถานะเป็นก๊าซที่มี 2 อะตอมและมีอิเล็กตรอนชั้นนอกสุดหรือเวเลนซ์อิเล็กตรอนตัวเดียว ไฮโดรเจนสามารถพบในองค์ประกอบของน้ำ ในสารประกอบอินทรีย์ทุกตัวและในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ไฮโดรเจนสามารถทำปฏิกิริยาได้กับคาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน เป็นต้น นอกจากนี้ไฮโดรเจนจึงจัดเป็นธาตุที่เบาที่สุด โดยเบากว่าอากาศถึง 14 เท่า สามารถลอยกระจายไปในอากาศได้อย่างรวดเร็วและไม่ตกค้างบนพื้นดินเป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่ายและให้พลังงานเชื้อเพลิงที่มีประสิทธิภาพสูง โดยไฮโดรเจนให้พลังงานต่อหน่วยได้สูงสุดในบรรดาเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ และมีค่าพลังงานเชื้อเพลิงสูงกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงถึง 3 เท่า ไฮโดรเจนสามารถติดไฟได้แต่ไม่ได้ช่วยให้ติดไฟ โดยจะต้องอาศัยออกซิเจนในการเผาไหม้ไฮโดรเจนที่มีจุดติดไฟที่ 570 °C และมีจุดเดือดต่ำมากที่ -253 °C ไฮโดรเจนถือว่าเป็นอันตรายน้อยกว่าเชื้อเพลิงชนิดอื่น(ศิริจันทร์ และมานิจ, 2008)

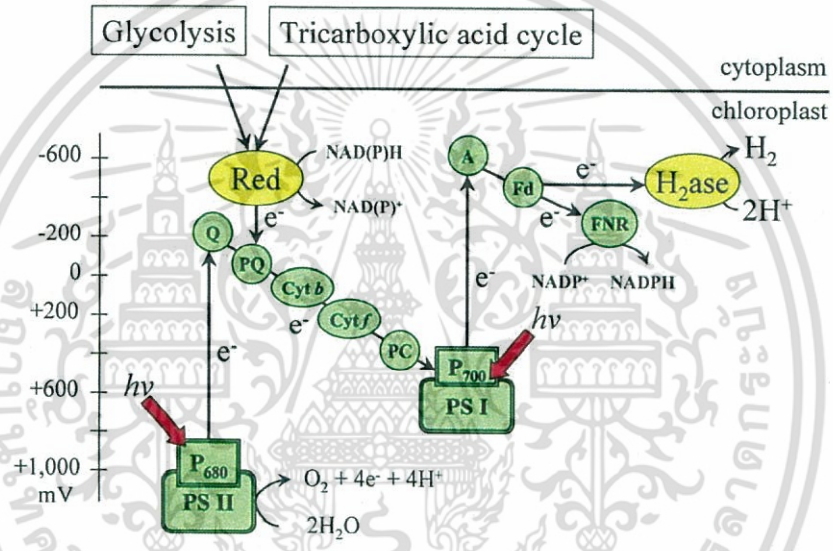
ไฮโดรเจนเป็นพลังงานสะอาด เมื่อทำการเผาไหม้ไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน เมื่อเผาไหม้ไฮโดรเจนในอากาศจะผลิตออกไซด์ของไนโตรเจน โดยไม่ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจก นอกจากนี้ก๊าซไฮโดรเจนยังมีค่าออกเทนสูงถึง 120 โดยเชื้อเพลิงที่มีค่าออกเทนสูงจะทำให้เกิดการเผาไหม้เชื้อเพลิงที่สมบูรณ์ ทำให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อเทียบกับพลังงานอื่นๆ ไฮโดรเจนจึงเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่มิตรต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้พลังงานไฮโดรเจนยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทดแทนกับการที่ต้องใช้พลังงานดั้งเดิม เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงกับครัวเรือน เครื่องยนต์ เครื่องกังหันและเครื่องไอพ่น เป็นต้น(Bak.*et al.*, 2002)

2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศโดยใช้เพียงแสงและน้ำในการผลิตไฮโดรเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna Complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิดทั้งแคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสงแล้วส่งพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction Center) ซึ่งอยู่ภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์เอ เมื่อโมเลกุลคลอโรฟิลล์เอได้รับพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมอิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์เอจะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้นและพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนนี้ให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เมื่อมีพลังงานในรูปของแสงมาตกกระทบในบริเวณระบบแสงสอง (PSII) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงคลื่น 680 nm ระบบแสงสองจะถูกกระตุ้นให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ควิโนนซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Q : Primary Electron Acceptor Of PSII) อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (PQ : Plastoquinone) ต่อมาเมื่อน้ำมีการแตกตัวออกหรือเรียกว่า Water Splitting ได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอนและอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สองไปแทนที่อิเล็กตรอนที่คลอโรฟิลล์ที่สูญเสียไปในระบบ จากนั้นอิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนนจะถูกส่งต่อไปยังไซโตโครมบี (Cytochrome b) ไซโตโครมเอฟ (Cytochorme f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) และเข้าไปยังระบบแสงหนึ่ง (PSI) ระบบแสงหนึ่งจะประกอบด้วยหน่วยแสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 nm เมื่อระบบแสงหนึ่งถูกกระตุ้นจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (A : Primary Electron Acceptor Of PSI) และเมื่อมีโฟตรอนหรือแสงมากระตุ้นคลอโรฟิลล์ภายในระบบแสงหนึ่ง (PSI) คลอโรฟิลล์จะปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่เฟอร์รีดอกซิน (Fd : Ferredoxin) แล้วเมื่ออิเล็กตรอนออกจากเฟอร์รีดอกซินจะไปรวมกับโปรตรอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนขึ้น(Melis, 2002) (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 การสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์แสง
ที่มา : http://www.plantphysiol.org/content/127/3/740/F2.expansion

2.3 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว

การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Gaffron ในปี ค.ศ. 1939 จากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจน จากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นไฮโดรเจนและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเป็นโปรตอน ดังสมการที่ 2.1

$$2H^+ + 2e^- \xleftarrow{\text{Hydrogenase}} H_2 \qquad \text{สมการที่ 2.1}$$

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถแบ่งตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้เป็น 3 ชนิด(Schulz *.et al.*, 1996) ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

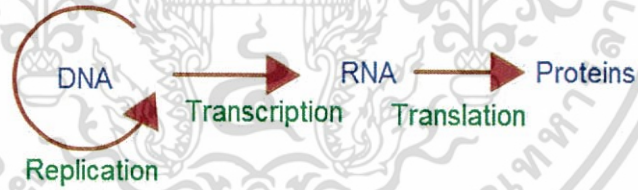
1. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (NiFe-hydrogenase)
2. ไฮโดรเจนที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์เท่านั้น (Fe-hydrogenase)
3. ไฮโดรจีเนสที่ไม่พบโลหะใดเป็นองค์ประกอบในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (Metal-free hydrogenase)

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวเป็นเอนไซม์ชนิดที่บริเวณกระตุ้นประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็กเท่านั้น (Fe-hydrogenase) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย

2.4 สารพันธุกรรม

ในสิ่งมีชีวิต DNA มีหน้าที่เก็บข้อมูลพันธุกรรมในรูปของลำดับเบสบนโมเลกุลสายยาวของ DNA ซึ่งจะจำลองตัวเอง (DNA Replication) เพื่อถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมจากสิ่งมีชีวิตรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง อีกหน้าที่หนึ่งคือ การแสดงออกของยีนจากข้อมูลพันธุกรรมบน DNA จะถูกทอดรหัส (Transcription) มาอยู่ในรูปโมเลกุล RNA ซึ่งเป็นโมเลกุลตัวกลางระหว่าง DNA และโปรตีน จากนั้นโมเลกุล RNA จะถูกแปรรหัส (Translation) เป็นลำดับของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ซึ่งเป็นสิ่งที่กำหนดคุณลักษณะเฉพาะตัวของโปรตีนแต่ละชนิดและสุดท้ายโปรตีนทั้งหลายก็ไปกำหนดฟีโนไทป์ในสิ่งมีชีวิต ดังรูปที่ 2.2 (กิตติพัฒน์, 2557)

Complementary DNA (cDNA) คือ DNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้ mRNA เป็นต้นแบบโดยอาศัยเอนไซม์ Reverse Transcriptase และ DNA Polymerase



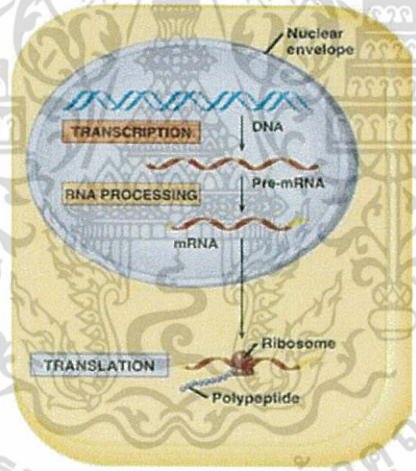
รูปที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดลักษณะของสิ่งมีชีวิต (Central Dogma)
ที่มา : http://biology.tutorvista.com/cell/central-dogma.html

2.5 ทิศทางการส่งผ่านข้อมูลพันธุกรรม

ข้อมูลพันธุกรรมใน DNA จะต้องมีการถ่ายทอดจากคนรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งโดย DNA มีการจำลองตัวแบบกึ่งอนุรักษ์ได้ DNA สายใหม่ที่เหมือนเดิมผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์ ขณะเดียวกันภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ข้อมูลพันธุกรรมใน DNA จะทำหน้าที่ควบคุมลักษณะโดยส่งข้อมูลผ่าน RNA ไปควบคุมโปรตีน (ดังรูปที่ 2.3) ขั้นแรกยีนจะทำหน้าที่ถ่ายทอดรหัสให้กับ RNA เรียกว่ากระบวนการถ่ายทอดรหัส (Transcription) ในขั้นตอนนี้ DNA ช่วงที่เป็นยีนจะคลายเกลียวออกโดยเอนไซม์ RNA Polymerase จับกับลำดับของนิวคลีโอไทด์บนสาย DNA ที่เรียกว่า โปรโมเตอร์ (Promotor) แล้วใช้สายหนึ่งเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ mRNA หนึ่งสายที่เป็นคู่สมสำหรับขั้นตอน

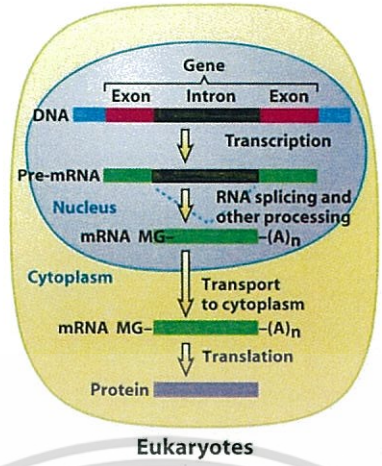
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มความยาวของสาย RNA (Elongation) เอนไซม์ RNA Polymerase จะเคลื่อนที่ไปบน DNA ต้นแบบเพื่อสร้างสายของ RNA โดยเชื่อมด้วยไรโบนิวคลีโอไทด์ (Ribonucleotide) ที่เข้าคู่กัน (A, G, C และ U) เช่น ถ้าลำดับของนิวคลีโอไทด์ DNA ต้นแบบเป็น AAA ลำดับนิวคลีโอไทด์ในสาย RNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาจะเป็น UUU โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ใน mRNA จะทำหน้าที่เป็นรหัสพันธุกรรม (Genetic Code) กำหนดลำดับอะมิโนในสายโพลีแปปไทด์หนึ่งรหัสพันธุกรรมเรียก โคดอน (Codon) ประกอบด้วย 3 นิวคลีโอไทด์เรียงต่อกันเป็นตัวกำหนดกรดอะมิโนหนึ่งชนิดในยูแคริโอตผลลัพธ์การถ่ายทอดรหัสจาก DNA จะได้ Pre-mRNA ก่อนที่จะมีการตัดแต่ง RNA เนื่องจากยีนส่วนมากของยูแคริโอตชั้นสูงและบางส่วนในยูแคริโอตชั้นต่ำจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ไม่ใช่รหัสพันธุกรรมเรียกว่า อินทรอน (Intron) แทรกอยู่ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่เป็นรหัสพันธุกรรมที่เรียกว่า เอ็กซอน (Exons) ซึ่งในส่วนอินทรอนนี้จะถูกถ่ายทอดไปใน Pre-mRNA ด้วยจึงจะต้องมีปฏิกิริยาตัดแต่ง (Splicing Reaction) ตัดอินทรอนออก โดยอณูขนาดใหญ่ที่เรียก Spilceosome (ดังรูปที่ 2.4) ซึ่ง Spilceosome ประกอบด้วย snRNA (Small Nuclear RNAs) และโปรตีน ซึ่งมีลักษณะเหมือนไรโบโซมขนาดเล็กแต่ไม่เคยออกจากนิวเคลียส เมื่อผ่านกระบวนการทั้งหมดแล้วจะได้ Mature mRNA ซึ่งจะเคลื่อนที่เข้าสู่ไซโทพลาซึมเพื่อเข้าสู่กระบวนการแปลรหัสเป็นโปรตีน (Translation) ต่อไป ดังนั้นในยูแคริโอตสาย mRNA จะสั้นกว่าสาย DNA ต้นแบบ



รูปที่ 2.3 แสดงการถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมของโปรตีน
ที่มา : Becker *et al.*, 2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 การถ่ายทอดรหัสจาก DNA ในยูแคริโอตได้ผลลัพธ์เป็น Pre-mRNA ที่ถูกตัดแต่งเอาส่วนอินทรอนออก เติม 7-Methylguanosine (MG) ที่ปลาย 5´ และเติม Poly A Tails ที่ปลาย 3´

ที่มา : http://slideplayer.com/slide/10605379/

2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

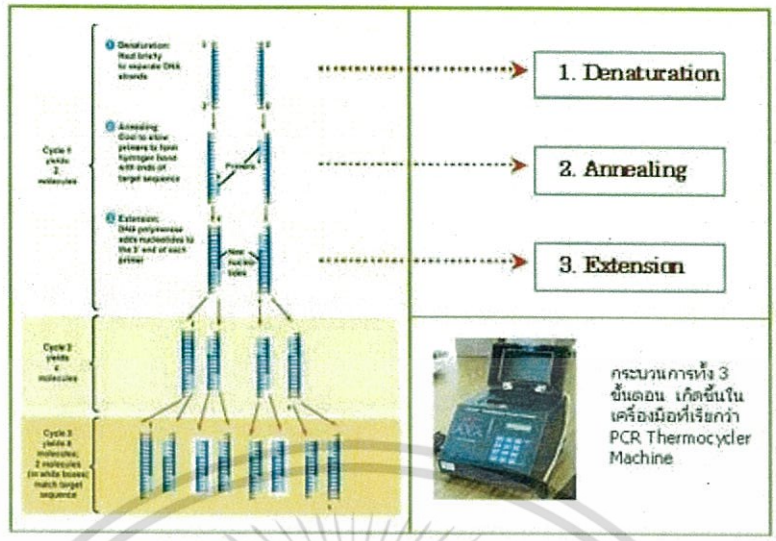
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) หรือ PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณ Template DNA โดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA Polymerase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายรอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (รูปที่ 2.5)

1. ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอสายคู่ (Double Stranded DNA) ของแม่พิมพ์ที่ต้องการศึกษา ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (Single Stranded DNA) โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C

2. ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 °C เพื่อให้ไพร์เมอร์สามารถจับกันอย่างจำเพาะที่ Template DNA สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม

3. ขั้นตอน Primer Extension เป็นขั้นตอนการสร้าง DNA สายใหม่ต่อจากไพร์เมอร์ในทิศทางจาก 5´ ไป 3´ อุณหภูมิในขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 °C (วีระพงศ์, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction

ที่มา : https://sites.google.com/site/biology2012science/what-is-dna/thekhnikh-pcr-ni-kar-pheim-canwn-dna

ส่วนประกอบของ PCR

- Template DNA คือ DNA สายคู่ (Double Stranded DNA) ที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน
- ไพร์เมอร์เป็น DNA สายสั้นๆที่มีลำดับเบสคู่สม (Complementary Sequence) กับ DNA Template และใช้เป็น DNA ตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ DNA สายใหม่
- DNA Polymerase คือ เอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาเพื่อการต่อสายของ DNA

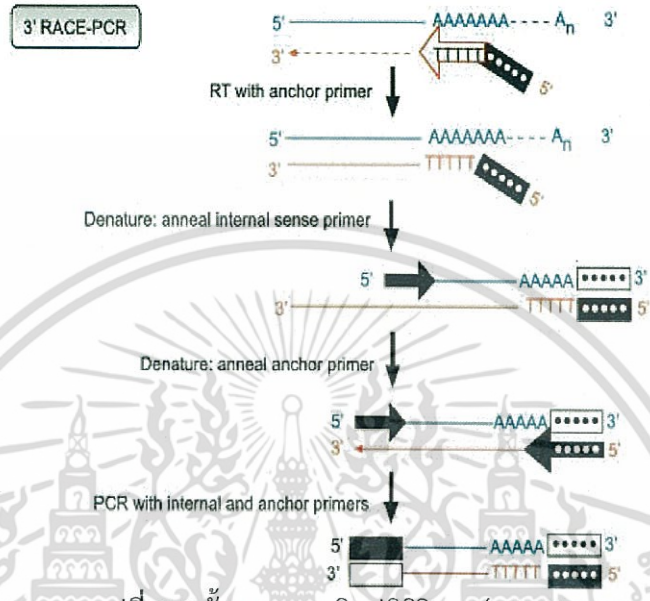
2.7 Rapid Amplification Of cDNA Ends (RACE)

RACE เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA จาก mRNA ส่วนหนึ่งจากบริเวณภายในโมเลกุลที่ทราบลำดับเบสถึงปลาย 3´ หรือปลาย 5´ ของ mRNA ข้างใดข้างหนึ่งวิธีดังกล่าวนี้ เรียกว่า One-Sided PCR หรือ Anchored PCR 3´ และ 5´ RACE เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับยีนที่ทราบลำดับเบสช่วงสั้นๆ ที่อยู่ในส่วนกลางของโมเลกุลของ mRNA ชนิดหนึ่ง กระบวนการดังกล่าวนี้ช่วยให้สามารถเพิ่มปริมาณส่วนของ Complementary DNA (cDNA) ที่ไม่ทราบลำดับเบสตั้งแต่ช่วงกลางที่มีไพร์เมอร์ที่จำเพาะสำหรับยีนนั้น (Gene Specific Primer) ถึงปลาย 5´ หรือปลาย 3´ โดยต้องทราบลำดับเบสในช่วงกลางของยีนนั้นเป็นช่วงสั้นๆ เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะ (GSP) ดังกล่าวทั้ง 2 วิธีเริ่มจากสังเคราะห์ cDNA สายแรกจาก mRNA โดยใช้เอนไซม์ Reverse Transcriptase (RT) แล้วจึงเพิ่มปริมาณ cDNA สายนี้โดยการทำ RACE ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณและโคลน mRNA ที่มีปริมาณน้อยๆ ผลผลิตที่ได้สามารถนำไปหาลำดับเบสโดยตรงใช้เป็นโพรบหรือนำมารวมกันเพื่อทำให้เกิด cDNA ที่สมบูรณ์ก็ได้

3´ RACE (รูปที่ 2.3) เริ่มจากสังเคราะห์ cDNA สายแรกโดยใช้ Reverse Transcriptase (RT) มีเบส T สายสั้นๆต่ออยู่กับ Anchor Base เป็นไพร์เมอร์ (Anchor Base คือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยมีลำดับเบสที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2-3 ชนิดเพื่อใช้ในการต่อชิ้น DNA ที่ได้กับเวคเตอร์ในภายหลังหรือเรียกว่า Anchor Primer) เมื่อได้ cDNA สายแรกแล้วจึงย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาย Template RNA ออกไปได้โดยใช้เอนไซม์ RNase H แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA สายเดี่ยวที่ได้โดยวิธี PCR ใช้ไพร์เมอร์ 2 ชนิด คือ Anchor Primer กับไพร์เมอร์ที่จำเพาะสำหรับบริเวณส่วนกลางของยีน (Internal Sense Primer) ผลผลิตที่ได้คือบริเวณปลาย 3´ ของยีนที่ต้องการ

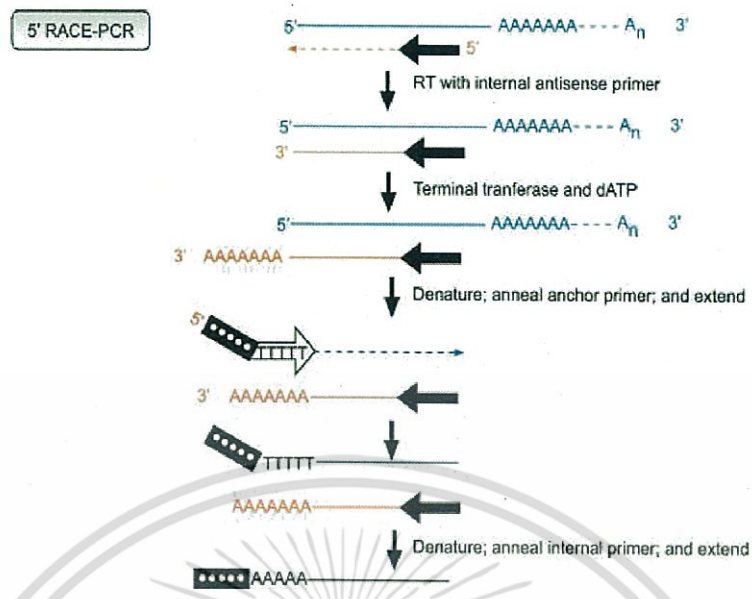


รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา 3´ RACE

ที่มา : http://find.jorum.ac.uk/resources/12070

5´ RACE (รูปที่ 2.4) เริ่มโดยสังเคราะห์ cDNA สายแรกด้วยเอนไซม์ Reverse Transcriptase โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะ (Internal Antisense Primer) เติมเบส A เข้าที่ปลาย 3´ โดยใช้เอนไซม์ Terminal Transferase (TdT) ย่อย RNA ออกโดยใช้เอนไซม์ RNase H แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA ที่ได้นี้โดยเทคนิค PCR ใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะร่วมกับ Anchor Primer (ไพร์เมอร์ที่มีส่วนบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2-3 ชนิดต่ออยู่กับเบส T สายสั้นๆ) จะได้ชิ้น DNA จากบริเวณปลาย 5´ ของยีนถึงส่วนของไพร์เมอร์ที่ใช้(สุรินทร์, 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



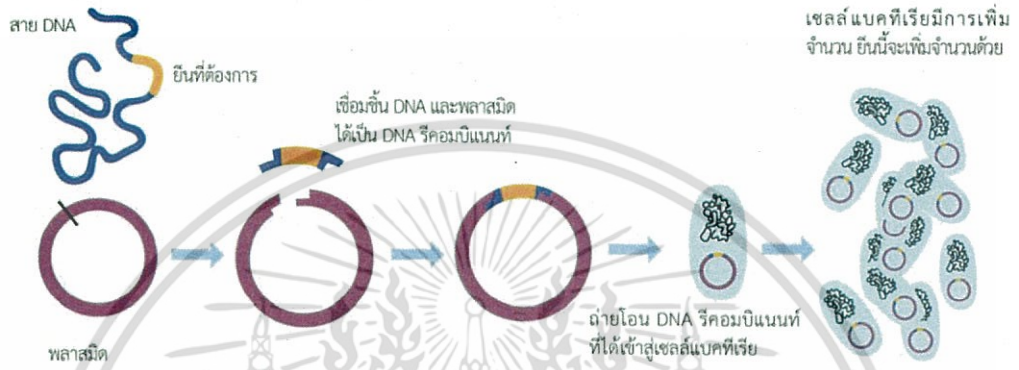
รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา 5´ RACE
ที่มา : http://find.jorum.ac.uk/resources/12070

2.8 การโคลนยีน (Gene Cloning)

การโคลนยีนเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของยีนหรือ DNA จำเพาะที่สนใจ โดยอาศัยการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่มียีนหรือ DNA ที่สนใจนั้นๆ ในทางปฏิบัติการโคลนยีนต้องดำเนินการหลายขั้นตอนโดยใช้เทคนิคและความรู้ทางชีวเคมี ในแต่ละขั้นตอนจะต้องเตรียมองค์ประกอบต่างๆให้พร้อม เมื่อต้องการโคลนยีนหรือ DNA ที่สนใจจะต้องทำการตัดโมเลกุล DNA ซึ่งมีขนาดใหญ่ให้เป็นชิ้นที่มีขนาดตามที่ต้องการ เครื่องมือที่ใช้ทำการตัดนั้นจะทำให้เกิด DNA ขนาดแตกต่างกันซึ่งไม่สามารถแยกออกจากกันได้โดยตรง แต่จะใช้แบคทีเรียซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวเพื่อทำการแยก DNA ชนิดต่างๆที่เกิดจากการตัดดังกล่าว แบคทีเรียจำนวนล้านๆเซลล์จะถูกนำมาผสมกับชิ้น DNA ที่ได้จากการตัดแล้วใช้วิธีการที่ทำให้ DNA สามารถผ่านเข้าไปอยู่ภายในเซลล์ นอกจากนั้นต้องทำการปรับสภาวะเพื่อให้แบคทีเรียเซลล์หนึ่งสามารถรับเอา DNA ชนิดเดียวเข้าไปภายในเซลล์เท่านั้น เมื่อนำเอาแบคทีเรียไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งจะทำให้เกิดการเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ต่อ จากนั้นทำการเลือกเฉพาะกลุ่มเซลล์ที่มียีนหรือ DNA ที่สนใจเท่านั้น แล้วนำเอาแบคทีเรียดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนหลายๆครั้ง เพื่อให้ได้เซลล์จำนวนมากพอที่จะนำมาสกัดแยกเอายีนหรือ DNA ที่สนใจออกมาทำการศึกษาต่อไป การโคลนยีนจึงต้องใช้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสันดาปโมเลกุลของ DNA หรือ RNA โดยเอนไซม์เหล่านี้ได้จากการสกัดแยกจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ในปัจจุบันสามารถหาซื้อได้จากผู้แทนจำหน่าย สำหรับวัตถุประสงค์ของการโคลนยีนนั้นมีหลายประการรวมถึงเพื่อให้ง่ายต่อการนำไปใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนและการควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาหรือเพื่อพิสูจน์หาโปรตีนที่สร้างโดยยีนหรือศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของยีนเพื่อให้ได้ผลผลิตโปรตีนในปริมาณมากๆ นอกจากนั้นยังนำโปรตีนที่สร้างได้จากยีนไปศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าวหรือเพื่อพิสูจน์หาองค์ประกอบในเซลล์ที่มีปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ที่จำเพาะหรือส่วนที่จำเพาะในโมเลกุลของโปรตีน(มณีวรรณ,2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

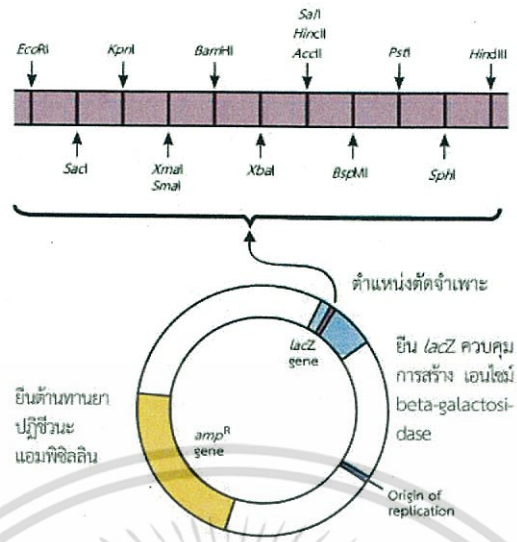
การโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรียเริ่มจากการตัดต่อยีนหรือ DNA ที่ต้องการศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำมาเชื่อมต่อกับ DNA พาหะหรือเวกเตอร์ (Vector) เช่น พลาสมิด ได้เป็น DNA รีคอมบิแนนท์ (Recombinant DNA) แล้วถ่ายโอน DNA รีคอมบิแนนท์ที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Host Cell) เช่น แบคทีเรีย เมื่อเซลล์เจ้าบ้านมีการเพิ่มจำนวนยีนหรือ DNA นี้จะเพิ่มจำนวนตามเซลล์เจ้าบ้านด้วยเซลล์เจ้าบ้านที่มี DNA รีคอมบิแนนท์เหมือนๆกันที่เรียกว่า โคลน (Clone) ดังรูปที่ 2.8



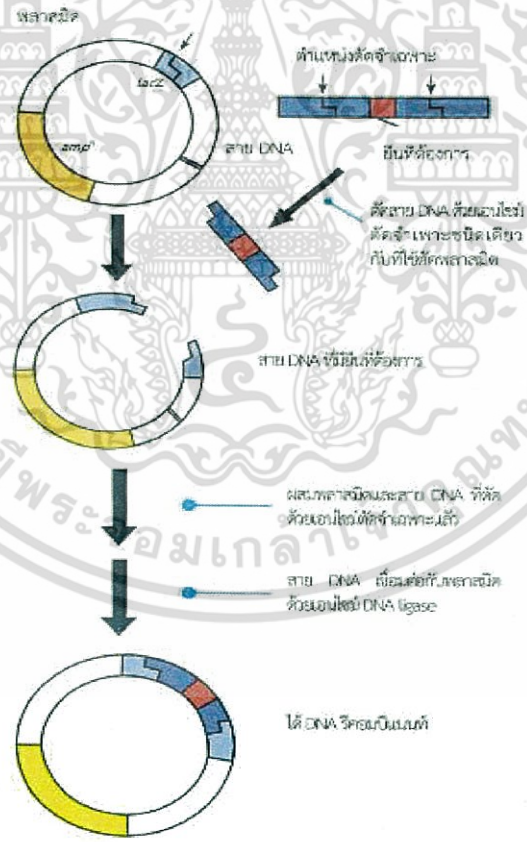
รูปที่ 2.8 การโคลนยีนโดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรีย
ที่มา : http://biology.ipst.ac.th/?p=3084

ในปัจจุบันมีการสร้างพลาสมิดที่มีส่วนของยีนที่ต้านยาปฏิชีวนะ เช่น Ampicillin (amp^R) เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (Selectable Marker) เซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด ซึ่งเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ยาปฏิชีวนะ Ampicillin อย่างไรก็ตามเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดทุกชนิดสามารถเจริญได้แม้ว่าพลาสมิดที่อยู่ในเซลล์นั้นไม่มีชิ้น DNA ที่ต้องการแทรกอยู่ก็ตามจึงไม่สามารถบอกได้ว่าการโคลนชิ้นใดมี DNA หรือยีนที่ต้องการ ดังนั้นในการสร้างพลาสมิดจึงใส่ยีน *lacZ* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Beta-galactoseidase เพื่อใช้เป็นยีนรายงานผล (Reporter Gene) ว่าพลาสมิดใดในเซลล์แบคทีเรียนั้นมีชิ้น DNA ที่ต้องการแทรกอยู่หรือไม่ ซึ่งเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับ DNA รีคอมบิแนนท์มีลักษณะที่ต่างไปจากเดิม นอกจากนี้ในยีน *lacZ* มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆที่สามารถใส่ชิ้น DNA ที่ต้องการแทรกเข้าไปเพื่อให้สะดวกในการโคลนยีน ดังรูปที่ 2.9 และ 2.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



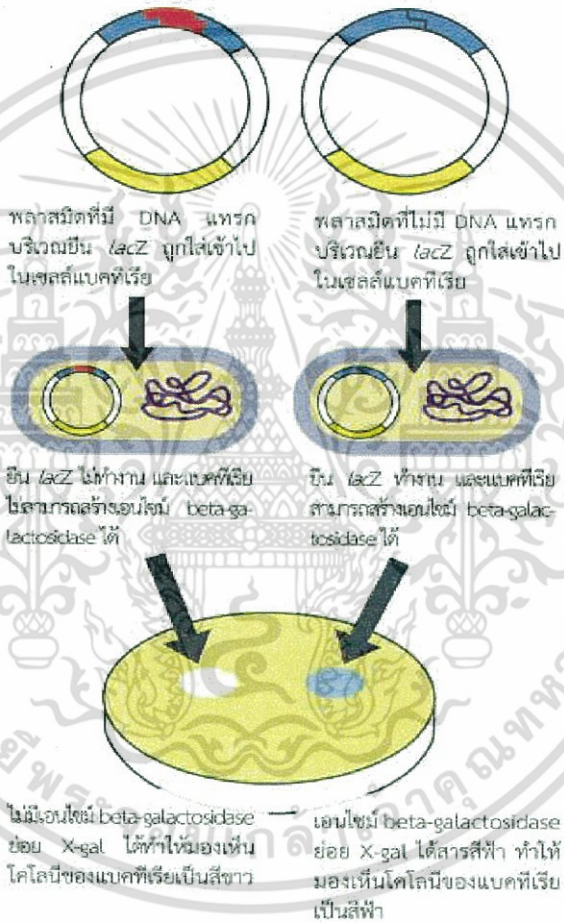
รูปที่ 2.9 พลาสมิดที่มีเครื่องหมายในการคัดเลือกและยีนรายงานผล
ที่มา : http://biology.ipst.ac.th/?p=3084



รูปที่ 2.10 ขั้นตอนการสร้าง DNA รีคอมบิแนนท์
ที่มา : http://biology.ipst.ac.th/?p=3084

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแทรกเข้าไปในพลาสมิดได้ตรงตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจะทำให้ยีน *lacZ* ไม่ทำงาน ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ Beta-galactoseidase ได้เมื่อนำพลาสมิดใส่เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านแล้วเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ยาปฏิชีวนะ Ampicillin และ IPTG ซึ่งเป็นสารเหนี่ยวนำการสร้าง Beta-galactoseidase พร้อมกับใส่สาร X-gal เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์นี้ เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเท่านั้นที่เจริญได้และเพิ่มจำนวนขึ้นจนมาเห็นเป็นโคโลนีและสีของโคโลนีแบคทีเรียบอกได้ว่าแบคทีเรียโคลนนั้นสร้าง Beta-galactoseidase ได้หรือไม่ และเป็นตัวรายงานผลว่าแบคทีเรียโคลนนั้นได้รับ DNA รีคอมบิแนนท์หรือมี DNA ที่ต้องการแทรกอยู่ในพลาสมิดหรือไม่ ดังรูปที่ 2.11(สุนัดดา, 2558)



รูปที่ 2.11 ฟีโนไทป์ของแบคทีเรียที่ได้รับและไม่ได้รับ DNA รีคอทบิแนนท์
ที่มา : http://biology.ipst.ac.th/?p=3084

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Corina Maeder.*et al.*(2016) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแยก DNA ออกจากเซลล์คุณภาพที่ดีของ DNA เป็นสิ่งที่ต้องการในการทดลองไม่ว่าจะเป็นเทคนิคทางชีวเคมีหรือทางอณูชีววิทยา ในการแยก DNA ออกจากเซลล์มีรูปแบบวิธีมาตรฐานในการที่ทำการย่อยเซลล์และแยกกรดนิวคลีอิกออกจากโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตและใช้วิธีรวมตัวกันทั้งทางเคมีและกายภาพ หลังจากนั้นจะใช้วิธีมาตรฐานทางเคมีเป็นหลักในการแยก DNA ออกจาก Saccharomyces Cerevisiae และทำการปรับคุณภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยการเติม RNase ประการที่หนึ่งเพื่อเป็นการย่อย RNA และสองจะช่วยทำให้ลดการเกิดแถบ DNA ที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Gel Electrophoresis เช่น เมื่อเติม RNase ช่วยลดการเกิดแถบ DNA ที่ไม่ได้พบในการตกตะกอนของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ซึ่งมีหลากหลายวิธีในการจะพยามที่กำจัด RNA ที่หลงเหลืออยู่ เช่น วิธีทางเอมไซม์ วิธีทางเคมี หรือวิธีทางกายภาพรวมทั้งการเอมไซม์ที่หลากหลาย, การตกตะกอนด้วยด้วยแอลกอฮอล์, การย่อยด้วยสภาวะเบสและวิธี Chromatographic การทดลองนี้ส่งผลในการพัฒนาวิธีใหม่ในการแยก DNA ของ *S. cerevisiae* วิธีนี้จะเป็นประโยชน์ในการเลือกส่วนตะกอนในสัดส่วนของ Potassium Acetate ต่อ Isopropanol ที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ DNA ที่มีคุณภาพที่ปราศจากการปนเปื้อนของ RNAs

Maneeruttanarungroj*.et al.*(2012) ศึกษาความสัมพันธ์ของ Sulfate Permease *(sul*P) และ Hydrogenase (*hyd*A) ในสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ยีน *sul*P ที่แปลรหัสให้โปรตีนทำหน้าที่ขนส่งซัลเฟตเข้าสู่คลอโรพลาสต์และยีน *hyd*A ที่แปลรหัสให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสร้างก๊าซไฮโดรเจนได้ถูกค้นพบในสาหร่ายชนิดนี้ยีน *sul*P มี Open Reading Frame (ORF) ขนาด 1,014 เบส โดยที่มีขนาดของ 5´ UTR และ 3´ UTR เป็น 285 และ 225 เบสตามลำดับโปรตีนที่แปลรหัสจาก *sul*P ของ *Tetraspora* sp. ได้ถูกทำนายว่ามี Chloroplast Transit Peptide ทางด้านปลาย N ส่งผลให้โปรตีนนี้มีความใกล้เคียงกับโปรตีนที่แปลรหัสจาก *sul*P ของสาหร่าย *C. reinhardtii* โดยยืนยันจากการทำ Phylogenetic Tree นอกจากนี้แล้ว พบว่ายีน *hyd*A ของสาหร่าย *Tetraspora* sp. มีขนาด 878 เบสซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีนประกอบด้วย 292 กรดอะมิโนโปรตีนที่แปลรหัสจาก *hyd*A มีความใกล้เคียงกับโปรตีนที่แปลรหัสจาก *hyd*A ของสาหร่าย *Chlorella fusca* ระดับการแสดงออกของยีนทั้ง *sul*P และ *hyd*A ของ *Tetraspora* sp. เพิ่มขึ้น 2.3 เท่าหลังจากอยู่ในภาวะขาดแหล่งซัลเฟอร์ ในขณะที่การเติมแหล่งซัลเฟอร์กลับคืนจะทำให้การแสดงออกของสองยีนนี้ลดลง ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและกิจกรรมของระบบแสงที่สอง (PSII) ลดลงเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะขาดแหล่งซัลเฟอร์ ทั้งสองกิจกรรมนี้จะถูกฟื้นฟูคืนเมื่อเพิ่มแหล่งซัลเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองให้เห็นถึงความสำคัญของซัลเฟอร์ต่อการควบคุมวิถีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่าย *Tetraspora* sp.

Maneeruttanarungroj*.et al.*(2010) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 โดยทดสอบการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อของสาหร่าย 7 ชนิด ได้แก่ N-free, BG11, BG110, N8, TAP, AA และ Zarrouk พบว่าสาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร TAP เมื่อเซลล์ถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 36 °C ภายใต้ความเข้มแสง 48-92 $\mu E/m^2/s$ พบว่าเจริญเติบโตเร็วขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้น การผลิตไฮโดรเจนมากขึ้นเมื่อเพิ่มค่า pH จาก 5.75 เป็น 9.30 ที่ pH 5.25 พบว่าไม่มีการตรวจพบไฮโดรเจนและใน TAP ที่มีตัวรีดิวซ์ 0.5mM β–mercaptoethanol ทำให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังนั้นในสภาวะที่เหมาะสมพบว่าสาหร่าย *Tetraspora* sp. สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตรา 17.3 – 61.7 μmol/mg Chl a/h ซึ่งเป็นอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงมากเมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่น

Kari Skjånes*.et al.*(2008) ได้ศึกษาสาหร่ายสีเขียว 21 สายพันธุ์จากน้ำเค็ม น้ำจืดและที่พบตามธรรมชาติ มี 7 สายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกมาโดยวัดจากความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน นอกจากนี้สาหร่ายสายพันธุ์ *Chlamydomonas reinhardtii, C. noctigama* (น้ำจืด) และ *C. Euryale* (น้ำกร่อย) สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่น่าสนใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายใต้สภาวะที่ขาดซัลเฟอร์ สายพันธุ์เหล่านี้สามารถใช้อะซิเตทเป็นสารตั้งต้นในการเจริญเติบโตในที่มีแสง การทดลองในสภาวะขาดซัลเฟอร์มีการเพาะเลี้ยงแบบ Photoheterotrophic จุดประสงค์ในการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพและแสดงค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง วัสดุทั่วไปที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เช่น วัสดุยาง พลาสติกและโลหะผสมเหล็ก มีผลกระทบต่อการอยู่รอดของสาหร่ายในสภาวะที่ขาดซัลเฟอร์

ชนนิษฐ์ และคณะ(2556) ศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพที่จะสามารถสกัดแยก RNA ที่มีคุณภาพสูงออกมาจากใบพลู ใบชะพลูและใบดีปลี จากการเปรียบเทียบวิธีสกัด RNA โดยใช้ RNease Plant Mini Kit (QIAGEN), TRIzol® Reagent (Life Technologies) และ Easy RED Total RNA Extraction (iNtRON Biotechnology) พบว่าการใช้ชุด RNeasy Plant เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุด สามารถสกัด RNA ได้คุณภาพสูงปริมาณสม่ำเสมอจากทั้งสามวิธีที่ทดสอบ เมื่อนำ RNA ไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-qPCR พบว่า RNA นี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มทรานสคริปต์ของ Action และ Sesquiterpene Synthase ได้ชุดสกัด RNA RNeasy Plant จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่าย

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองนี้คือ สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. และไพร์เมอร์ 18s rRNA ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ภาควิชาเคมี สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 อาหารเลี้ยงสาหร่าย

1. อาหาร Tris Acetate Phosphate Medium (TAP) : ภาคผนวก ก
2. อาหาร Sulfur-free TAP Medium (TAP-S) : ภาคผนวก ก

3.3 สารเคมี

1. Boric Acid (H_2BO_3) (Analytical Grade, Merck, Germany)
2. Acetic Acid (CH_3COOH) (Analytical Grade, Merck, Germany)
3. Copper (II) Sulfate Pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$) (Analytical Grade, CarlovErba, Italy)
4. Copper (II) Chloride ($CuCl_2$) (Analytical Grade, Univar, Australia)
5. Calcium Chloride ($CaCl_2$) (Analytical Grade, Analar®, England)
6. Cobalt (II) Chloride ($CoCl_2$) (Analytical Grade, Fluka, Switzerland)
7. Zinc Sulfate ($ZnSO_4$) (Analytical Grade, Fluka, Switzerland)
8. Zinc Chloride ($ZnCl_2$) (Analytical Grade, Univar, Australia)
9. Dipotassium Phosphate (K_2HPO_4) (Analytical Grade, Univar, Australia)
10. Disodium Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (Na_2EDTA) (Analytical Grade, Promega, USA)
11. Tris (Analytical Grade, Scharlau, Spain)
12. Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4) (Analytical Grade, CarlovErba, Italy)
13. Iron (II) Sulfate Heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$) (Analytical Grade, CarlovErba, Italy)
14. Magnesium Chloride ($MgCl_2$) (Analytical Grade, Univar, Australia)
15. Magnesium Sulfate ($MgSO_4$) (Analytical Grade, CarlovErba, Italy)
16. Manganese (II) Chloride ($MnCl_2$) (Analytical Grade, Univar, Australia)
17. Ammonium Cholride (NH_4Cl) (Analytical Grade, Univar, Australia)
18. Ammonium Heptamolybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) (Analytical Grade, Univar, Australia)
19. Iron (II) Chloride ($FeCl_2$) (Analytical Grade, Univar, Australia)
20. Liquid Nitrogen

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

21. Trizol® Buffer
22. Chloroform
23. Isopropanol (C_3H_8O)
24. 70% Ethanol (C_2H_6O)
25. 10X Running Buffer
26. DNase Free RNase
27. Agarose
28. Tris-borate EDTA Buffer (TBE Buffer)
29. Eco Dye
30. 100 bp+3 K DNA Ladder
31. 6X Loading Dye

3.4 ชุดทดสอบ (Kit)

1. ชุดสังเคราะห์ cDNA (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ประกอบด้วย
   - 10mM Deoxynucleotide Mixture (dNTP Mix)
   - Nuclease-free Water
   - 100μM OligodT-Anchore Primer
   - 5X Reaction Buffer
   - RevertAid M-MuLVRT (200 U/μl)
   - Rnase Inhibitor (20 U/μl)
2. ชุดการทำ PCR (RBC Taq DNA Polymerase Kit) (RBC Bioscience Corp, Taiwan) ประกอบด้วย
   - 10mM Deoxynucleotide Mixture (dNTP Mix)
   - 10X Reaction Buffer
   - RBC Taq DNA Polymerase (5 U/μl)
3. ชุดการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit) (Favorgen Biotech, Taiwan) ประกอบด้วย
   - Collection Tube
   - Elution Buffer
   - FADF Buffer
   - FADF Tube
   - Wash Buffer
4. ชุดการทำโคลนยีน (RBC TA Cloning Vector Kit) (RBC Bioscience Corp, Taiwan) ประกอบด้วย
   - Ligation Buffer A
   - Ligation Buffer B
   - RBC TA Cloning Vector

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

149471

- T4 DNA Ligase

5. ชุดสกัด Plasmid (FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit) (Favorgen Biotech, Taiwan) ประกอบด้วย

- Collection Tube
- Elution Buffer
- FAPD1 Buffer
- FAPD2 Buffer
- FAPD3 Buffer
- FAPD Tube
- W1 Buffer
- Wash Buffer

3.5 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR

สำหรับไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ต้องมีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบแล้วบางส่วน จึงต้องทำการออกแบบไพร์เมอร์มีลำดับและชื่อไพร์เมอร์ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์

ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5´⟶ 3´)
OligodT-Anchore Primer (R_1)	gac cac gcg tat cga tgt cga ctt ttt ttt ttt ttt ttv
Specific Primer (F_1)	agg tgg tca gcc tcg cag tag tag caa
PCR Anchor Primer (R_2)	gac cac gcg tat cga tgt cga c
Specific Primer (Nested Primer, F_2)	acg cca gca agc tat gta cc

3.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. จานเพาะเชื้อ
2. Loop
3. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
4. คิวเวตแบบควอตซ์
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
6. ไมโครปิเปต ขนาด 1, 10, 20, 200 และ 1,000 µl
7. Tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 µl
8. หลอด Centrifuge ขนาด 15 และ 50 ml
9. หลอด PCR ขนาด 100 µl
10. หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
11. โกร่ง แบบกระเบื้อง
12. ถุงมือยางไนไทรต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. ช้อนตักสาร
14. Spreader แบบสามเหลี่ยม
15. Parafilm
16. เครื่อง Spectrophotometer (MAPADA รุ่น UV-1200)
17. เครื่อง Quick Spin (Mc รุ่น PC-200)
18. เครื่อง Vortex (Scientific Industries รุ่น Vortex-2 GENIE)
19. เครื่อง Autoclave (JS Researchlnc. รุ่น JSAC-60)
20. เครื่อง Incubator Shaker
21. เครื่อง Thermal Cycler (Bio-RAD รุ่น T100^{TM} Thermal Cycler)
22. เครื่องCentrifuge (Refrigerated Bench-top Centrifuge Model Universal รุ่น HET-1 1406)
23. เครื่อง Electrophoresis (BIOBASE รุ่น ET-H2)
24. เครื่อง UV Transilluminator (ULTRA LUM)
25. ตู้ Laminar Flow (JS Researchlnc. รุ่น jscb-1200sb)
26. เครื่อง Heat Block (Benchmark)
27. Microwave (SHARP รุ่น R-220)
28. เครื่องชั่ง (Mettler Toledo รุ่น ML204)

3.7 ขั้นตอนการวิจัย

3.7.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

นำสาหร่าย *Tetraspora* sp. ที่ขึ้นเป็นโคโลนีจากอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงต่อใน Flask ขนาด 100 ml ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 ml นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 36 °C ความเข้มแสง 40 μE/m^2/s เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 nm และทำการเจือจางเพื่อให้มีค่า A 730 เท่ากับ 0.01 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 36 °C ความเข้มแสง 40 μE/m^2/s เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการล้างเซลล์ด้วย TAP-S แล้วเพาะเซลล์ในอาหารเหลว TAP-S ปริมาตร 50 ml เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัด RNA

3.7.2 การสกัด RNA ด้วย TRIzol® Reagent

เก็บสาหร่ายโดยการเซนติฟิว 4,500 rpm จากนั้นนำสาหร่ายใส่ในโกร่งเติม Liquid Nitrogen บดจนละเอียดเป็นผงลงในหลอด Microcentrifuge เติม Trizol® Buffer 400 μl และเติม Chloroform 100 μl ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol 500 μl ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอน RNA แล้วล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 1 ml นำไปปั่นที่ 7,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายออก ตากตะกอนให้แห้งและละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำปราศจากนิวคลีเอสปริมาตร 15 μl จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ RNA ที่สกัดได้ไปทำการย่อย DNA ที่ปนเปื้อนมาจากการสกัด RNA ด้วย DNase (RNase Free DNase Treatment)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับในกรณีที่ไม่ได้ทำการการย่อย DNA ที่ปนเปื้อนมาจากการสกัด RNA ด้วย DNase (Non-RNase Free DNase Treatment) นำผลิตภัณฑ์ RNA ที่สกัดได้มาทำการสกัดอีกรอบ โดยใช้ Trizol® Buffer 400 µl และเติม Chloroform 100 µl ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol 500 µl ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอน RNA แล้วล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 1 ml นำไปปั่นที่ 7,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ตากตะกอนให้แห้งและละลายตะกอน RNA น้ำปราศจากนิวคลีเอสปริมาตร 15 µl

3.7.3 การย่อย DNA ที่ปนเปื้อนมาจากการสกัด RNA ด้วย DNase (RNase Free DNase Treatment)

DNA ที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลายที่สกัด RNA อาจทำให้ผลการทดลองเกิดความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR อาจเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ปนเปื้อน ไม่ใช่เป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณของ RNA ที่ผ่านการเปลี่ยนให้เป็น DNA (cDNA) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการย่อย DNA ที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNase ปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการย่อย 30 µl ประกอบด้วย RNA ที่สกัดได้จากข้อ 3.7.2 ปริมาตร 3.98 µl 10X Running Buffer 3 µl เอนไซม์ DNase 2 µl และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 30 µl ด้วยน้ำปราศจากนิวคลีเอส นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปสกัดอีกครั้ง โดยการเติม Trizol® Buffer 400 µl และเติม Chloroform 100 µl ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol 500 µl ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 15 นาที นำไปปั่นที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอน RNA แล้วล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 1 ml นำไปปั่นที่ 7,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ตากตะกอนให้แห้งละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำปราศจากนิวคลีเอสปริมาตร 15 µl นำไปตรวจสอบคุณภาพและหาปริมาณ RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้น้ำกลั่นเป็นค่ามาตรฐาน (Blank) จากนั้นนำ RNA ที่สกัดมาเจือจาง 20 เท่า โดยการนำ RNA ที่สกัดมาปริมาตร 3 µl เติมน้ำปราศจากนิวคลีเอสปริมาตร 57 µl มาวัดที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm ใช้คำนวณหาปริมาณ RNA เพื่อใช้ในการทำเทคนิค PCR แสดงวิธีคำนวณในภาคผนวก ข

3.7.4 การทำ PCR RACE (Rapid Amplification Of cDNA End)

3.7.4.1 การสังเคราะห์ cDNA จาก RNA โดย RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

ปิเปตส่วนประกอบในปริมาตรดังตารางที่ 3.2 ใส่ในหลอด Microcentrifuge ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบและปริมาตรที่ใช้ในการสกัด cDNA

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
5X Reaction Buffer	4.00
10mM Deoxynucleotide Mixture (dNTP Mix)	2.00
OligodT-Anchore Primer (R_1)	1.00
Template RNA	11.00
Rnase Inhibitor (20 U/µl)	1.00
RevertAid M-MuLVRT (200 U/µl)	1.00
Total	20.00

หมายเหตุ การปิเปตสารใส่ในหลอด Microcentrifuge จะต้องอยู่ในน้ำแข็ง (ต้องกระทำขณะที่เย็น) จากนั้นปรับด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 20 µl นำไปบ่มในเครื่อง Thermal Cycler ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำออกมาทำการผสมให้เข้ากัน

3.7.4.2 การทำ PCR รอบแรก โดย RBC Taq DNA Polymerase Kit

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ cDNA จากข้อ 3.7.4.1 มาเจือจาง 5 เท่า โดยนำ cDNA ปริมาตร 2 µl เติมน้ำกลั่นปริมาตร 8 µl จากนั้นปิเปตส่วนประกอบในปริมาตรดังตารางที่ 3.3 ใส่ในหลอด Microcentrifuge ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบและปริมาตรที่ใช้ในการทำ PCR รอบแรก สำหรับ 1 ตัวอย่าง

ส่วนประกอบ	ปริมาตร(µl)
cDNA Dilute 2X	2.000
Primer F_1	0.250
Primer R_2	0.250
10X Reaction Buffer	1.250
RBC Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.0625
10mM dNTP Mix	0.125
Water	8.5625
Total	12.50

หมายเหตุ การปิเปตสารใส่ในหลอด Microcentrifuge จะต้องอยู่ในน้ำแข็ง (ต้องกระทำขณะที่เย็น)

จากนั้นผสมให้สารทั้งหมดเข้ากันและนำไปบ่มในเครื่อง Thermal cycler เริ่มทำการตั้งค่าเครื่องตามตารางที่ 3.4 ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
1	Initial denaturation	94	2 นาที	1
2	Denaturation Annealing (PCR Gradient) Elongation	94 65, 66.2, 67.4, 68 72	30 วินาที 30 วินาที 40 วินาที	10
3	Denaturation Annealing (PCR Gradient) Elongation	94 60, 61.2, 62.4, 63 72	30 วินาที 30 วินาที 40 วินาที	25
4	Final Elongation	72	5 นาที	1

3.7.4.3 การทำ PCR เพื่อเพิ่มความจำเพาะ (PCR Nested)

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากทำ PCR รอบแรกจากข้อ 3.7.4.2 มาเจือจาง 20 เท่า โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากทำ PCR รอบแรก ปริมาตร 0.5 µl เติมน้ำกลั่นปริมาตร 9.5 µl จากนั้นปิเปตส่วนประกอบในปริมาตรดังตารางที่ 3.5 ใส่ในหลอด ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว

ตารางที่ 3.5 สารเคมีและปริมาณที่ใช้ในการทำ PCR Nested สำหรับ 1 ตัวอย่าง

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
cDNA Dilute 2X	2.000
Primer F_1	0.250
Primer R_2	0.250
10X Reaction Buffer	1.250
RBC Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.0625
10mM dNTP Mix	0.125
Water	8.5625
Total	12.50

จากนั้นผสมให้สารทั้งหมดเข้ากันและนำไปบ่มในเครื่อง Thermal Cycler เริ่มทำการตั้งค่าเครื่องตามตารางที่ 3.6 ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.6 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
1	Initial Denaturation	94	3 นาที	1
2	Denaturation Annealing (PCR Gradient) Elongation	94 57.0, 58.2, 59.4, 60 72	30 วินาที 30 วินาที 30 วินาที	35
3	Final Elongation	72	5 นาที	1

เมื่อครบกำหนดระยะเวลาและจำนวนรอบตามตารางที่ 3.6 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากทำ PCR รอบแรกและ PCR Nested อย่างละ 5 µl เพื่อใช้สำหรับการรันเจล

3.7.4.4 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR รอบแรกและ PCR Nested มาทำการตรวจสอบการแสดงออกโดยใช้เทคนิค 1.2% Agarose Gel Electrophoresis เตรียมโดยการชั่ง Agarose 0.48 g เติม 0.5X TBE Buffer 40 ml ทำการละลายโดยใช้ Microwave จนวุ้นละลายหมดเติม Eco Dye 2 ml แล้ววางทิ้งไว้ให้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60 °C แล้วจึงทำการเทลงบนถาดเจลที่มีหวีเพื่อทำให้เกิดหลุมสำหรับการหยอด DNA เมื่อเจลแข็งตัวนำไปใส่ลงใน Chamber ที่มี 0.5X TBE Buffer และต่อเข้ากับตัวจ่ายกระแสไฟฟ้า จากนั้นผสมผลิตภัณฑ์ปริมาตร 5 µl กับ 6X Loading Dye ปริมาตร 1 µl จากนั้นหยอดลงไปในหลุมและทำการจ่ายกระแสไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปส่องดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.7.4.5 การเพิ่มปริมาตร PCR Nested เพื่อที่จะนำไปทำให้ DNA บริสุทธิ์โดยชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากทำ PCR รอบแรกจากข้อ 3.7.4.2 ที่ถูกเจือจางแล้ว 20 เท่า ปิเปตส่วนประกอบในปริมาตรดังตารางที่ 3.7 ใส่ในหลอด โดยเพิ่มปริมาตรรวมเป็น 100 µl

ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบและปริมาณที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR Nested สำหรับ 1 ตัวอย่าง

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
Template DNA Dilute 20X	2.00
Primer F_2	1.00
Primer R_2	1.00
10X Reaction Buffer	5.00
RBC Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.25
10mM dNTP Mix	0.50
Water	40.25
Total	50.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมให้สารทั้งหมดเข้ากันและนำไปบ่มในเครื่อง Thermal Cycler เริ่มทำการตั้งค่าเครื่องตามตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
1	Intitial Denaturation	94	2 นาที	1
2	Denaturation Annealing Elongation	94 58.2 72	30 วินาที 30 วินาที 30 วินาที	35
3	Final Elongation	72	5 นาที	1

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR Nested มาทำการตรวจสอบการแสดงออกโดยใช้เทคนิค 1.2% Agarose Gel Electrophoresis ผสมผลิตภัณฑ์ปริมาตร 100 µl กับ 6X Loading Dye ปริมาตร 20 µl จากนั้นหยอดลงไปในหลุมและทำการจ่ายกระแสไฟฟ้า 100 V นาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปส่องดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.7.5 การทำให้ DNA บริสุทธิ์โดยชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit

ตัดแผ่นอะกาโรสเจลในแถบที่เข้มใส่ในหลอดเติม FADF Buffer 500 µl จากนั้นผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C 15 นาที นำออกมาเขย่าทุก 5 นาที เพื่อให้เจลละลายหมด และนำมากรองผ่าน FADF Column พร้อมกับปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทำการล้างแผ่นกรองด้วย Washing Buffer ปริมาตร 750 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ทำการเทสารละลายทิ้งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีก 3 นาที เพื่อให้แผ่นกรองแห้งสนิท เมื่อครบเวลาเปลี่ยนจาก Collection Tube เป็นหลอด Microcentrifuge เติม Elution Buffer 40 µl ตรงกลางแผ่นกรองและตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -20 °C โดยนำสารละลายบางส่วนมาทำการเจือจาง 20 เท่า เพื่อที่จะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm เพื่อทำการคำนวณหาปริมาณ DNA ที่ได้ จากนั้นทำการตรวจสอบโดย Agarose Gel Electrophoresis ข้อ 3.7.4.4 เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นขนาด DNA ที่ต้องการ

3.7.6 การเพิ่มจำนวน DNA จาก PCR Product (PCR Reamplification)

การทำ PCR Reamplification คือ วิธีการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ PCR Product มาใช้เป็น Template โดยนำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.7.5 มาเจือจาง 20 เท่า โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำให้ DNA บริสุทธิ์ปริมาตร 0.5 µl เติมน้ำกลั่นปริมาตร 9.5 µl จากนั้นปิเปตส่วนประกอบในปริมาตรดังตารางที่ 3.9 ใส่ในหลอด Microcentrifuge โดยเพิ่มปริมาตรรวมเป็น 100 µl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.9 ส่วนประกอบและปริมาตรที่ใช้ในเทคนิค PCR Reamplification สำหรับ 1 ตัวอย่าง

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
Template DNA Dilute 20X	2.00
Primer F_2	1.00
Primer R_2	1.00
10X Reaction Buffer	5.00
RBC Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.25
10mM dNTP Mix	0.50
Water	40.25
Total	50.00

จากนั้นผสมให้สารทั้งหมดเข้ากันและนำไปบ่มในเครื่อง Thermal Cycler เริ่มทำการตั้งค่าเครื่องตามตารางที่ 3.10 ดังนี้

ตารางที่ 3.10 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR Reamplification

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
1	Intitial denaturation	94	2 นาที	1
2	Denaturation Annealing Elongation	94 58.2 72	30 วินาที 30 วินาที 30 วินาที	35
3	Final elongation	72	5 นาที	1

3.7.7 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (PCR Clean-up) โดยชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit

นำตัวอย่างข้อ 3.7.6 มา 95 µl ใส่ FADF Buffer 5 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง (475 µl) ลงในหลอดแล้วทำการผสมสารด้วยเครื่อง Vortex แล้วนำมากรองผ่าน Collection Tube พร้อมกับปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการล้างแผ่นกรองด้วย Washing Buffer ปริมาตร 750 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทำการเทสารละลายทิ้งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีก 3 นาที เพื่อให้แผ่นกรองแห้งสนิท เมื่อครบเวลาเปลี่ยนจาก FADF Column เป็นหลอด Microcentrifuge แล้วเติม ddH_2O 40 µl ตรงกลางแผ่นกรองและตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -20 °C

3.7.8 การเพิ่มจำนวน DNA จาก PCR Product (PCR Reamplification)

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.7.7 มาเจือจาง 20 เท่า โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำให้ DNA บริสุทธิ์ปริมาตร 0.5 µl เติมน้ำกลั่นปริมาตร 9.5 µl จากนั้นปิเปตส่วนประกอบในปริมาตรดังตารางที่ 3.9 ใส่ในหลอด Microcentrifuge โดยเพิ่มปริมาตรรวมเป็น 100 µl ผสมให้สารทั้งหมดเข้ากันและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปบ่มในเครื่อง Thermal Cycler เริ่มทำการตั้งค่าเครื่องตามตารางที่ 3.10 จากนั้นทำการตรวจสอบโดย Agarose Gel Electrophoresis ข้อ 3.7.4.4

3.7.9 การทำให้ DNA บริสุทธิ์โดยชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit

ตัดแผ่นอะกาโรสเจลในแถบที่เห็นชัดใส่ในหลอด Microcentrifuge แล้วใส่ FADF Buffer 500 µl ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 15 นาที เขย่าทุก 5 นาที เพื่อให้เจลละลายหมดและนำมากรองผ่าน FADF Column พร้อมกับปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทำการล้างแผ่นกรองด้วย Washing Buffer ปริมาตร 750 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ทำการเทสารละลายทิ้งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีก 3 นาที เพื่อให้แผ่นกรองแห้งสนิท เมื่อครบเวลาเปลี่ยนจาก Collection Tube เป็นหลอด Microcentrifuge แล้วเติม Elution Buffer 40 µl ตรงกลางแผ่นกรองและตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -20 °C โดยนำสารละลายบางส่วนมาทำการเจือจาง 20 เท่า เพื่อที่จะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm เพื่อทำการคำนวณหาปริมาณ DNA ที่ได้ จากนั้นทำการตรวจสอบโดย Agarose Gel Electrophoresis ข้อ 3.7.3.4 เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นขนาด DNA ที่ต้องการ

3.7.10 การโคลนผลิตภัณฑ์ PCR โดยชุด RBC TA Cloning Vector Kit

นำผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จากข้อ 3.6.9 มาทำการโคลนเข้าพลาสมิดด้วยชุด RBC TA Cloning Vector Kit

3.7.10.1การเชื่อมต่อชิ้นส่วน DNA กับพลาสมิดพาหะ (Ligation)

ปิเปตสารปริมาตรดังตารางที่ 3.11 ใส่ในหลอด PCR แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.11 ส่วนประกอบและปริมาตรที่ใช้ในเทคนิคการโคลน

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
Ligation Buffer A	1.00
Ligation Buffer B	1.00
RBC TA Cloning Vector	2.00
PCR Product	2.00
T4 DNA Ligase	1.00
Water	3.00
Total	10.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.10.2 เตรียม Competent Cell จาก XL1-Blue

โดยนำเชื้อ XL1-Blue มา 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหาร LB 5 ml บ่มด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดเชื้อลงในอาหารเลี้ยง LB 5 ml ในอัตราส่วน 1:50 แล้วนำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 36 °C จนได้ค่า OD_{600} 0.4-0.6 จึงนำไปแช่ในน้ำแข็งปิเปตสารละลาย 1 ml ใส่ในหลอด Microcentrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วย 0.1M $CaCl_2$ 600 µl แช่ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งละลายตะกอนด้วย 0.1M $CaCl_2$ 100 µl แล้วแช่ในน้ำแข็ง

3.7.10.3 การนำพลาสมิด DNA สายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยกระบวนการ Transformation

นำ Ligation ที่เตรียมจากข้อ 3.4.7.1 มา 5 µl ลงในหลอด Microcentrifuge ที่มี Competent 100 µl แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นใส่อาหาร LB 1 ml นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 36 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใสทิ้ง 900 µl ละลายตะกอนให้เข้ากันกับสารละลายที่เหลืออยู่ จากนั้นปิเปตสารละลายที่เหลือทั้งหมดมา Spread ลงในอาหาร LB ที่มี Ampicillin, IPTG และ X-gal จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 36 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.7.11 การคัดเลือกและตรวจสอบโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าได้รับพลาสมิด DNA และการสกัดพลาสมิดด้วยชุด FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit

คัดเลือกโคโลนีสีขาวโดยใช้ Tip เขี่ยโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 3 ml ที่เติมสาร Ampicillin 3 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 36 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

จากนั้นตรวจสอบพลาสมิดโดยใช้เทคนิค PCR โดยนำสารละลายที่บ่มจนครบเวลาตามที่กำหนดมา 100 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใสทิ้งละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 50 µl เพื่อนำมาเป็น Template และเตรียมสารปริมาตรดังตารางที่ 3.12 นำไปบ่มในเครื่อง Thermal Cycler ทำการตั้งค่าเครื่องตามตารางที่ 3.10

ตารางที่ 3.12 ส่วนประกอบและปริมาตรที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับ 1 ตัวอย่าง

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
Template	2.00
Primer F_1	0.25
Primer R_2	0.25
10X Reaction Buffer	1.25
RBC Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.0625
10mM dNTP Mix	0.125
Water	8.5625
Total	12.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำการตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA โดยเทคนิค Electrophoresis เมื่อทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์เรียบร้อยแล้วนำสารละลายที่ในแถบที่เห็นชัดมาทำการสกัดด้วยชุด FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit โดยปิเปตสารละลายครั้งละ 1 ml ลงในหลอด Microcentrifuge ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งจนกว่าสารละลายข้างต้นจะหมด ละลายตะกอนด้วย FAPD1 Buffer 200 µl เติม FAPD2 Buffer 200 µl ทำการพลิกหลอดอย่างช้าๆ 10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที ได้สารละลายใส (ห้ามทิ้งไว้เกิน 5 นาที) แล้วเติม FAPD 3 Buffer 300 µl ทำการพลิกหลอดช้าๆ 10 ครั้ง สารละลายจะแยกชั้น จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใสลงใน FAPD Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายทิ้งเติม W1 Buffer 400 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง เติม Wash Buffer 600 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ทำการเปลี่ยน Collection Tube เป็นหลอด Microcentrifuge เติม Elution Buffer 50 µl ตรงกลางแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C โดยแบ่งสารละลายมาเจือจาง 20 เท่า เพื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm จากนั้นทำการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ในโครงงานพิเศษนี้ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ปลาย 3´ ของยีน *hyd*A ในสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 โดยเริ่มต้นทำการเลี้ยงสาหร่าย *Tetraspora* sp. ในอาหารสูตร TAP เป็นเวลา 1 วัน แล้วทำการเปลี่ยนอาหารเป็น TAP-S เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้มาสกัด RNA ด้วย TRIzol® Reagent และทำการย่อย DNA ที่ปนเปื้อนมาจากการสกัด RNA ด้วย DNase จากนั้นสังเคราะห์ cDNA เพื่อนำไปทำเทคนิค PCR RACE โดยใช้ไพร์เมอร์ Specific Primer (F_1), PCR Anchor Primer (R_2) และ Specific Primer (Nested Primer, F_2) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการโคลนโดยใช้ชุด RBC TA Cloning Kit ซึ่งมีเวกเตอร์เป็น TA Cloning Vector และทำการ Transform เข้าสู่เซลล์ของ *E.coil* สายพันธุ์ XL1-Blue สุดท้ายทำการสกัดพลาสมิดเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hyd*A ในส่วนของปลาย 3´

4.1 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ RNA ที่ได้จากการสกัด RNA ด้วย TRIzol® Reagent

จากการทดลองการสกัด RNA ด้วย TRIzol® Reagent นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 260 และ 280 nm ซึ่ง Non DNase Treatment คือ ตัวอย่างที่ไม่ได้ทำการย่อย DNA ที่ปนเปื้อนมาจากการสกัด RNA ด้วย DNase และ DNase Treatment คือ ตัวอย่างที่ทำการย่อย DNA ที่ปนเปื้อนมาจากการสกัด RNA ด้วย DNase นำผลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA ได้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA ที่สกัดได้จากสาหร่าย *Tetraspora* sp.

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ RNA (ng/ml)	ความบริสุทธิ์ของ RNA (A260/280)
Non DNase Treatment	712.0	1.6574
DNase Treatment	55.2	1.8649

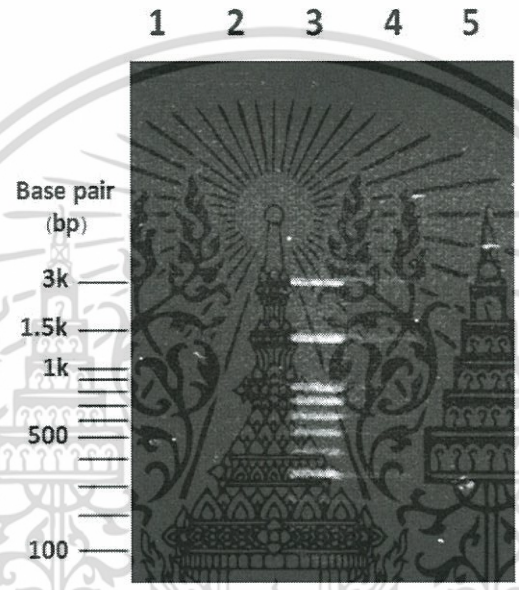
ซึ่งความบริสุทธิ์ของ RNA จะมีค่าประมาณ 2.0 แต่ตัวอย่างมีค่าความบริสุทธิ์น้อยกว่า 2.0 (Oxford Gene Technology The Molecular Genetics Company™, 2016) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ RNA ที่สกัดได้นั้นมีการปนเปื้อนของโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 แสดงผลการตรวจสอบ PCR ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis

4.2.1 ผลการตรวจสอบ PCR รอบแรก

ผลการคำนวณความบริสุทธิ์ของ RNA จากตารางที่ 4.1 ได้นำตัวอย่าง DNase Treatment และ Non DNase Treatment มาสังเคราะห์ cDNA โดยเทคนิค PCR RACE ซึ่ง PCR รอบแรกไพร์เมอร์ที่ใช้ คือ Specific Primer (F_1) และ PCR Anchor Primer (R_2) ผลที่ได้จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR รอบแรกด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 PCR รอบแรกของ RNase Free DNase Treatment (DNase) และ NonRNase Free DNase Treatment (Non-DNase)

เลนที่ 1 Blank DNase

เลนที่ 2 DNase

เลนที่ 3 100 bp+3 K DNA Ladder

เลนที่ 4 Blank Non-DNase

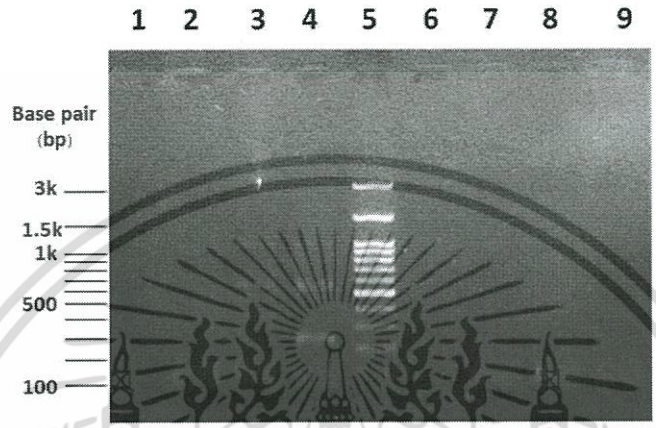
เลนที่ 5 Non-DNase

ผลที่ได้จากการทดลองพบแถบของ DNA มาตรฐาน ไม่พบแถบผลิตภัณฑ์ PCR รอบแรกของ DNase และ Non-DNase ทั้งนี้อาจเป็นเพราะผลิตภัณฑ์ PCR มีปริมาณน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR Nested จากการทำ PCR Gradient

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR รอบแรกมาทำ PCR Nested โดยใช้ Specific Primer (Nested primer, F_2) และ PCR Anchor Primer (R_2) เพื่อเพิ่มความจำเพาะให้กับผลิตภัณฑ์ เมื่อได้ผลิตภัณฑ์จาก PCR Nested ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย 1.2% Agarose Gel Electrophoresis ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 PCR Nested ของ RNase Free DNase Treatment (DNase) และ NonRNase Free DNase Treatment (Non-DNase) จากการทำ PCR Gradient ที่อุณหภูมิ 57-60 °C

เลนที่ 1 Blank DNase ที่อุณหภูมิ 57.0 °C

เลนที่ 2 DNase ที่อุณหภูมิ 60.0 °C

เลนที่ 3 DNase ที่อุณหภูมิ 59.4 °C

เลนที่ 4 DNase ที่อุณหภูมิ 58.2 °C

เลนที่ 5 100 bp+3 K DNA Ladder

เลนที่ 6 Blank Non-DNase ที่อุณหภูมิ 57.0 °C

เลนที่ 7 Non-DNase ที่อุณหภูมิ 60.0 °C

เลนที่ 8 Non-DNase ที่อุณหภูมิ 59.4 °C

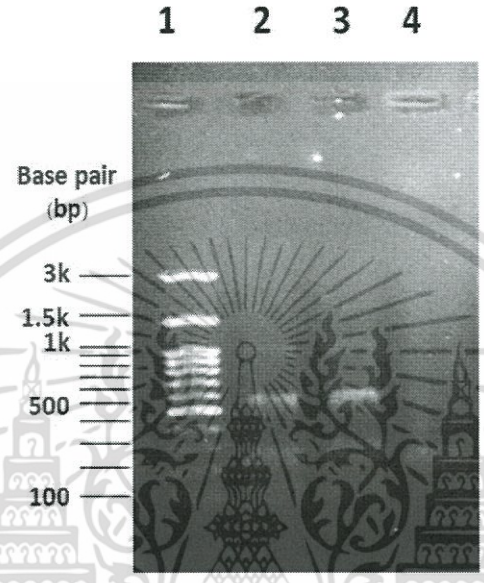
เลนที่ 9 Non-DNase ที่อุณหภูมิ 58.2 °C

ผลการทดลองการทำ PCR Nested ระหว่างผลิตภัณฑ์ PCR ของตัวอย่าง DNase และ Non-DNase พบว่า DNase ให้แถบที่เข้มกว่าเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก DNase นั้นผ่านการทำการย่อย DNA ที่ปนเปื้อนมาจากการสกัด RNA ด้วย DNase ทำให้มีความบริสุทธิ์ของ RNA มากกว่า Non-DNase การทำ PCR Gradient เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์พบว่าที่อุณหภูมิ 58.2 °C เหมาะสมสำหรับการทำ PCR Nested ทั้งนี้ความเข้มของแถบขึ้นกับปริมาณและความสมบูรณ์ของผลิตภัณฑ์ PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ผลการตรวจสอบ PCR Nested ของ RNase Free DNase Treatment (DNase)

เมื่อทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมจากการทำ PCR Gradient นำผลิตภัณฑ์จาก PCR รอบแรกมาทำ PCR Nested ที่อุณหภูมิ 58.2 °C และตรวจสอบคุณภาพ cDNA ที่ได้โดยใช้ชุดควบคุมเป็น cDNA ที่มี 18s rRNA เป็น Forward Primer แทน Specific Primer (F_1) เพื่อทดสอบว่าผลิตภัณฑ์ cDNA ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับ cDNA ในงานหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *Hyd*A ก่อนหน้านี้



รูปที่ 4.3 PCR Nested ของ RNase Free DNase Treatment (DNase) ที่อุณหภูมิ 58.2 °C และชุดควบคุม

เลนที่ 1 100 bp+3 K DNA Ladder

เลนที่ 2 และ 3 DNase ที่อุณหภูมิ 58.2 °C

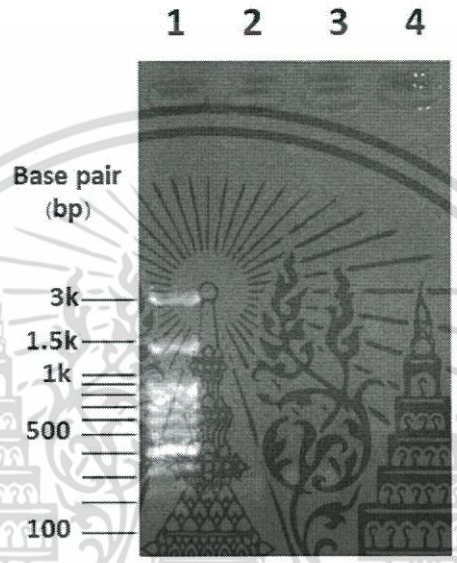
เลนที่ 4 cDNA ที่มีไพร์เมอร์เป็น 18s rRNA ที่อุณหภูมิ 58.2 °C

จากรูปที่ 4.3 ผลการทดลองการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR Nested ที่อุณหภูมิ 58.2 °C พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของสารละลาย DNase ทั้งเลนที่ 2 และ 3 ให้แถบเข้มที่ 250 และ 600 bp ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ cDNA ของชุดควบคุมให้แถบเข้มที่ 200 bp แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ cDNA ที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *Hyd*A ในงานก่อนหน้านี้เมื่อทราบขนาดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการแล้วทำการเพิ่มปริมาณของผลิตภัณฑ์เพื่อตัดเจลในแถบเข้มที่ขนาด 250 และ 600 bp นำไปทำให้ DNA บริสุทธิ์โดยชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 ผลการตรวจสอบ PCR Reamplification

การทำ PCR Reamplification โดยใช้ PCR Product มาเป็น Template ได้จากผลิตภัณฑ์ PCR Nested ในแถบเข้มที่ขนาด 250 และ 600 bp ตามลำดับ ที่ผ่านการทำให้ DNA บริสุทธิ์โดยชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit จากนั้นนำไปบ่มในเครื่อง Thermal Cycler เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ผลที่ได้จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR Reamplification ด้วย 1.2% Agarose Gel Electrophoresis ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 PCR Reamplification

เลนที่ 1 100 bp+3 K DNA Ladder

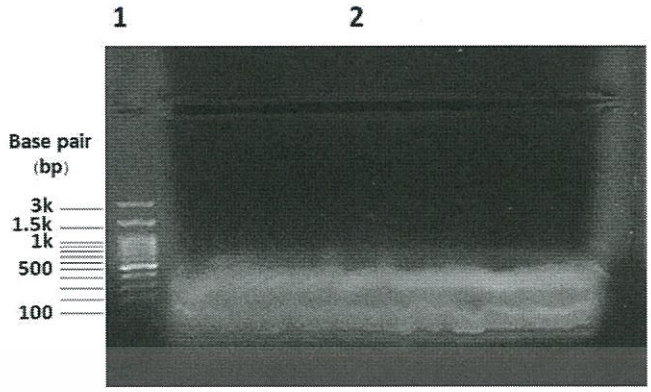
เลนที่ 2 และ 3 PCR Reamplification ขนาด 250 bp

เลนที่ 4 PCR Reamplification ขนาด 600 bp

ผลการทดลองการตรวจสอบ PCR Reamplification โดยใช้ผลิตภัณฑ์ PCR Nested ในแถบเข้มที่ขนาด 250 และ 600 bp ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 58.2 °C พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR Nested ที่ขนาด 250 bp ให้ผลในแถบเข้มที่ขนาด 250 bp และมีแถบขนาดอื่นที่ไม่ใช่ขนาด 250 bp จึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำ PCR Clean-up โดยชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ให้แก่ผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์ PCR Nested ที่ขนาด 600 bp ให้ผลเข้มที่ขนาด 600 bp และขนาดที่เล็กกว่า 600 bp ดังนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ไปทำ PCR อีกรอบเพื่อเพิ่มปริมาณ DNA และใช้ชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit อีกครั้งเพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์ ผลจากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย 1.2% Agarose Gel Electrophoresis ไม่สำเร็จตามความคาดหวัง ดังรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 PCR ขนาด 600 bp

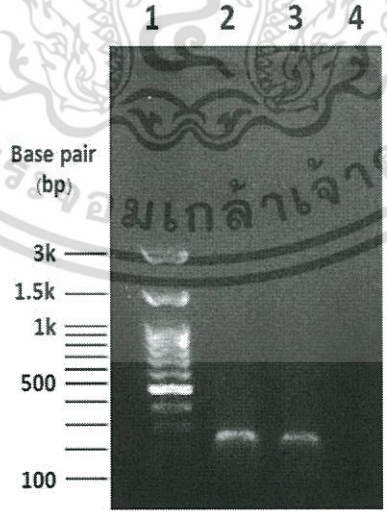
เลนที่ 1 100 bp+3 K DNA Ladder

เลนที่ 2 PCR ขนาด 600 bp

จากการทำ PCR รวมหลุมพบว่าไม่เกิดแถบในขนาด 600 bp ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากขั้นตอนการเตรียมเจลเพราะเทปกาวที่ใช้ติดหวีนั้นทำให้เกิดการปนเปื้อน

4.2.5 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR Clean up

หลังจากการทำ PCR Reamplification นำผลิตภัณฑ์ขนาด 250 bp ที่ได้มาทำ PCR Clean-up โดยชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ให้แก่ผลิตภัณฑ์จากนั้นทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย 1.2% Agarose Gel Electrophoresis ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 PCR Clean up ขนาด 250 bp

เลนที่ 1 100 bp+3 K DNA Ladder

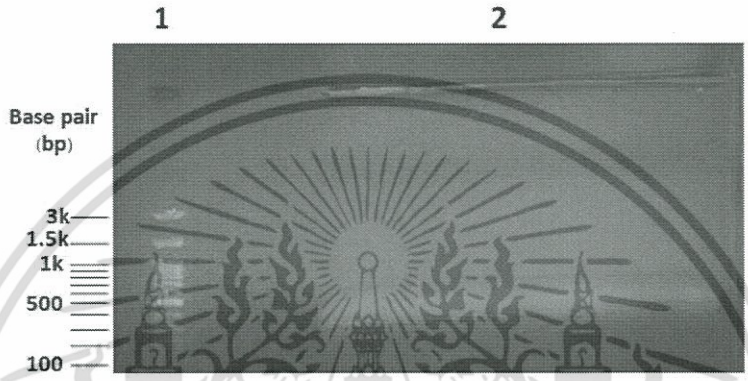
เลนที่ 2 และ 3 PCR ขนาด 250 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นปรากฏแถบในขนาดที่ต้องการจากนั้นนำมาทำ PCR Reamplification เพื่อเพิ่ม Poly A Tails ที่ปลาย 3´ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ได้ถูกเก็บเป็นเวลานานส่วนของ Poly A Tails จะสลายจึงต้องทำ PCR ก่อนที่จะนำมาทำการโคลน

4.2.6 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR รวมหลุมหลังจากการทำ PCR Reamplification

หลังจากทำ PCR Reamplification ที่ขนาด 250 bp นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มารันเจลรวมหลุมดังรูปที่ 4.7 เพื่อที่จะทำให้ DNA บริสุทธิ์โดยชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit ก่อนการทำโคลนโดยชุด RBC TA Cloning Vector Kit



รูปที่ 4.7 PCR Reamplification ที่ขนาด 250 bp

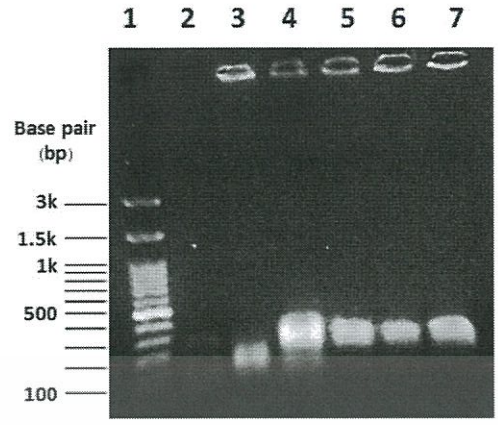
เลนที่ 1 100 bp+3 K DNA Ladder

เลนที่ 2 PCR Reamplification ขนาด 250 bp

4.2.7 ผลการตรวจสอบ Colony PCR

หลังจากการทำให้ DNA บริสุทธิ์โดยชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ Ligation Reaction มา Transform เข้า *E.coli* สายพันธุ์ XL1-Blue เพื่อนำไปเลี้ยงในอาหาร LB ที่มี Ampicillin, IPTG และ X-gal เมื่อขึ้นเป็นโคโลนีแล้วทำการเลือกโคโลนีสีขาวเพื่อนำไปตรวจสอบโดยการทำ Colony PCR ดังรูปที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 Colony PCR ทั้งหมด 5 โคโลนี

เลนที่ 1 100 bp+3 K DNA Ladder

เลนที่ 2 Blank

เลนที่ 3-7 Colony PCR

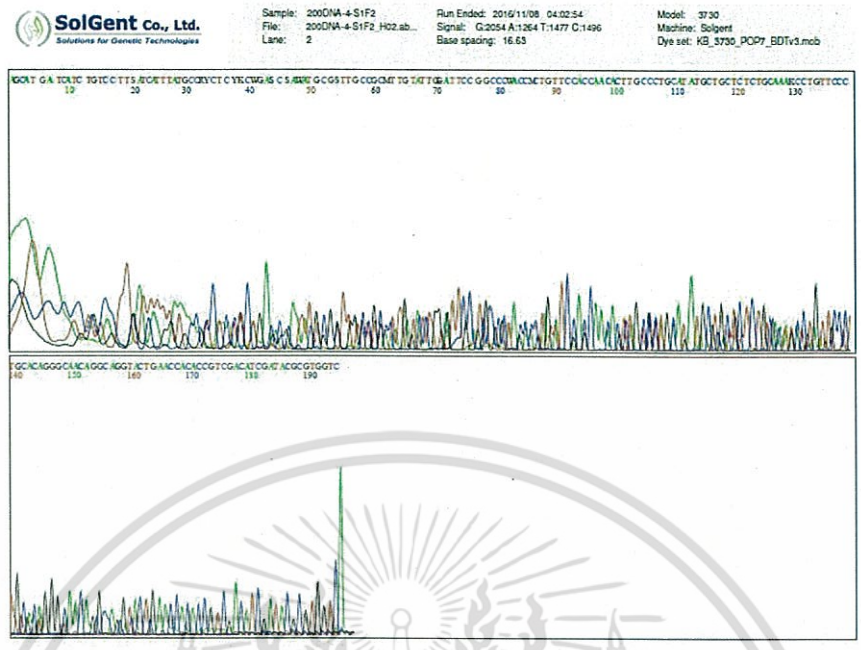
ผลการทดลองทำ Colony PCR พบว่าโคโลนีที่เลือกมานั้นมีการแสดงออกของยีนทั้ง 5 โคโลนี แต่ในเลนที่ 3 พบว่าแถบแบนนั้นมีขนาดต่ำกว่า 250 bp จึงไม่นำมาสกัดพลาสมิด จากนั้นเลือกผลิตภัณฑ์โคโลนีในเลนที่ 4 และ 6 มาทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุด FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit เพื่อทำการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4.3 แสดงผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

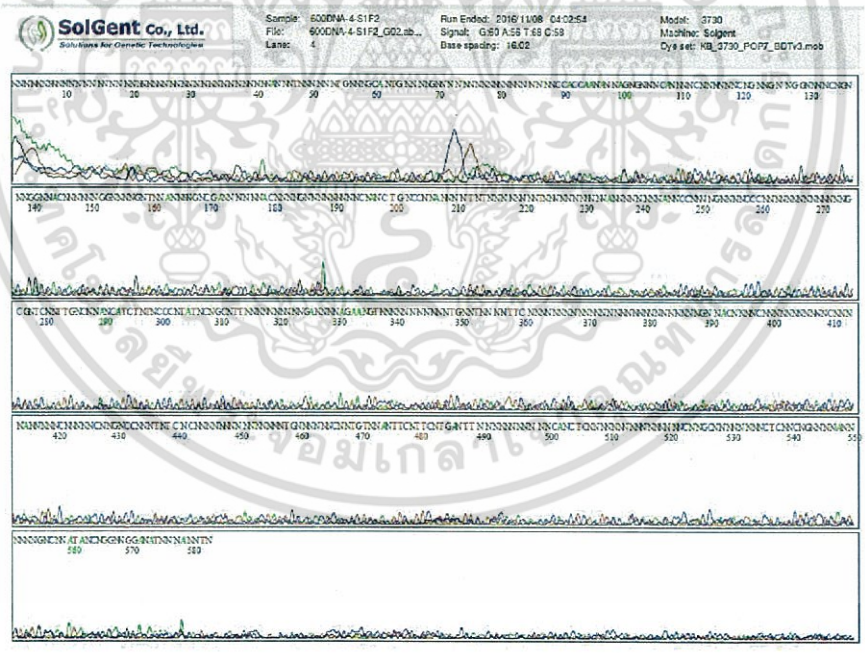
4.3.1 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR Nested

จากการทดลองหลังจากทำ PCR Nested นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ขนาด 200 และ 600 bp ที่ผ่านการทำให้ DNA บริสุทธิ์โดยชุด FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ผลที่ได้คือ พีคซ้อนทับกันและบางส่วนไม่สามารถแปลผลเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ ทั้งนี้เป็นเพราะผลิตภัณฑ์ DNA ทั้งสองขนาดอาจมีการปนเปื้อนหรือมี DNA Template มากกว่า 1 เส้น ดังรูปที่ 4.9 และ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แผนภาพยืนยันการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hyd*A ในขนาด 200 bp



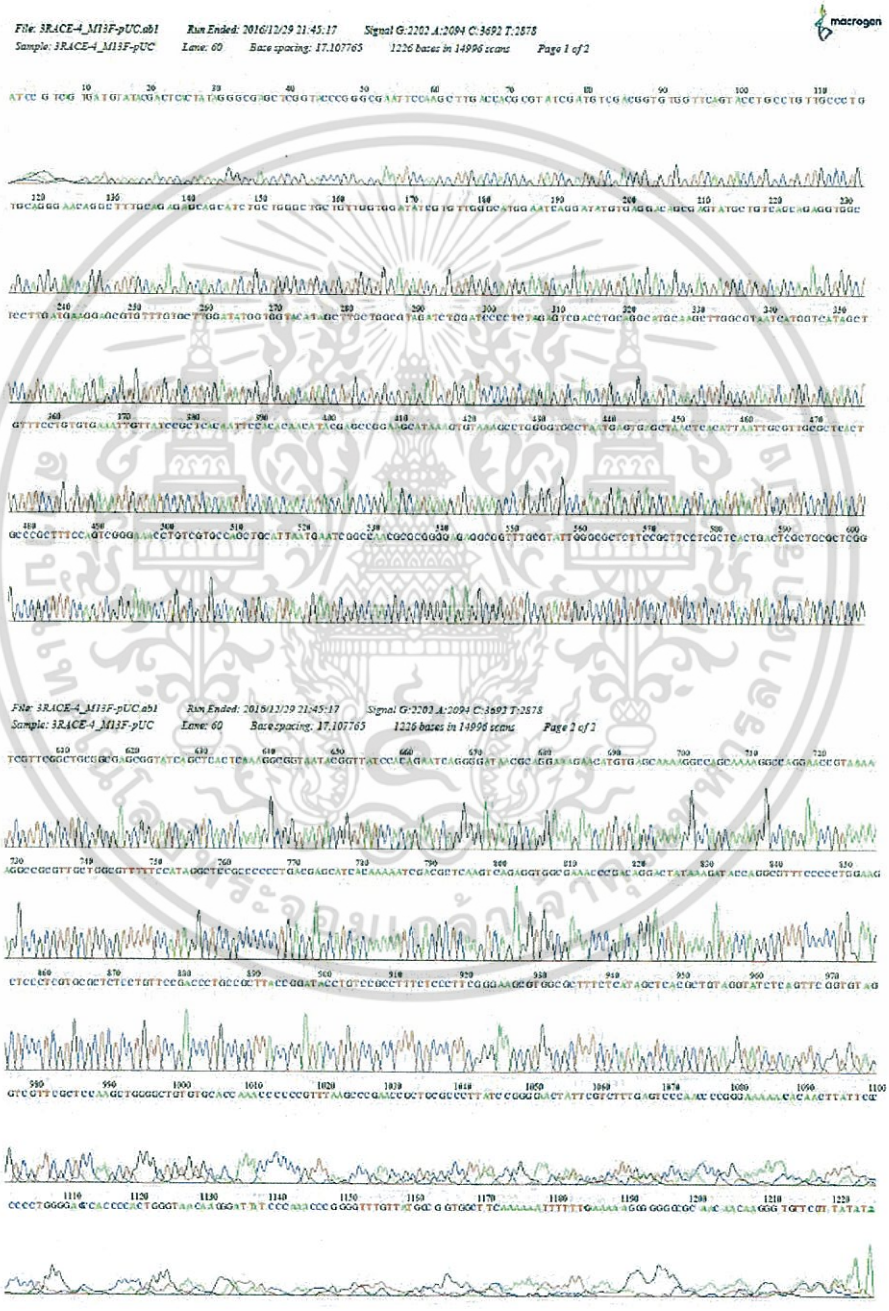
รูปที่ 4.10 แผนภาพยืนยันการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hyd*A ในขนาด 600 bp

หลังจากวิเคราะห์ผลข้างต้นแล้วว่าผลที่ได้นั้นไม่สามารถบอกถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ จึงทำการแก้ไขวิธีการทดลองโดยการทำ PCR Nested ใหม่เพื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการโคลน แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปของพลาสมิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของวิธีการโคลน

หลังจากการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ครั้งแรกไม่สำเร็จแล้ว ได้ทำ PCR Nested ใหม่เพื่อที่จะทำการโคลน โดยเวกเตอร์ที่ใช้คือ TA Cloning Vector จากนั้นทำ Colony PCR เพื่อตรวจสอบว่ายีนที่ต้องการเข้าแทรกในพลาสมิด จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุด FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit เพื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 แผนภาพยืนยันการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในที่มาจากการสกัดพลาสมิดขนาด 250 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากแผนภาพยืนยันการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าพีคที่ได้นั้นไม่มีการซ้อนทับกันและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ คือ

>161229-024_E15_3RACE-4_M13F-pUC.ab1 1226
ATCCGTCAGTGATGTATACGACTCACTATAGGGCGAGCTCGGTACCCGGGCGAATTC
R →
CAAGCTT*GACCACGCGTATCGATGTCGAC*GGTGTGGTTCAGTACCTGCCTGTTGCCC

TGTGCAGGGAACAGGCTTTGCAGAGAGCAGCATCTGCTGGGCTGCTGTTGGTGGATA

TCGTGTTGGGCATGGAATCAGGATATGTGAGGACAGCGAGTATGCTGTCAGCAGAGG
← F
TGGCTCCTTGATGAAGGAGCGTGTTTGTGCTTGGATATGGT*GGTACATAGCTTGCTG*

GCGTAGATCTGGATCCCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATC

ATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACAT

ACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCAC

ATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCT

GCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTC

CGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC

AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAA

GAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCT

GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAG

TCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAG

CTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTT

TCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTC

GGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGGCTGTGTGCACCAAACCCCCCGTTTAAGCC

CGAACCGCTGCGCCCTTATCCGGGGAACTATTCGTCTTTGAGTCCCAACCCCGGGAA

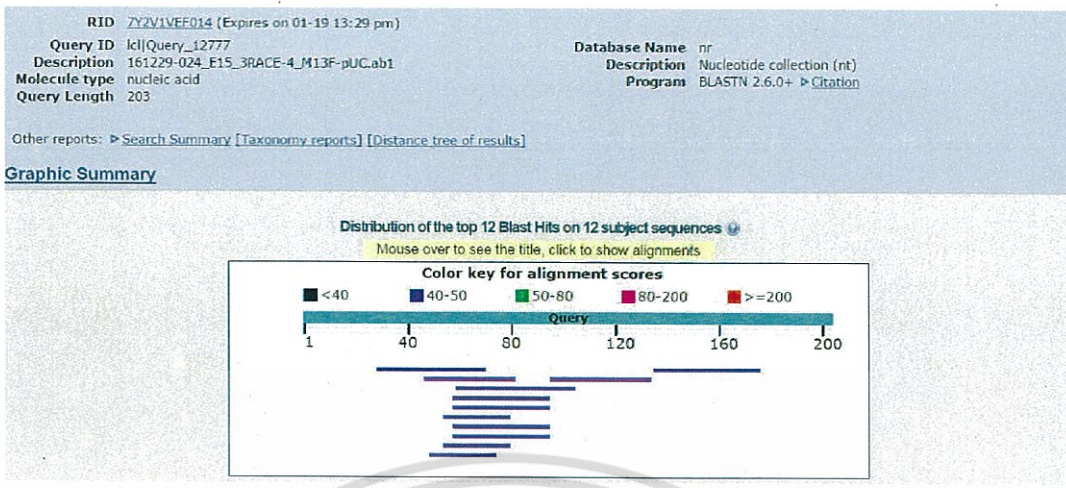
AAAACACAACTTATTCGCCCCCTGGGGAGCCACCCCACTGGGTAACAAGGGATTATC

CCAAACCCGGGGTTTGTTATGGCGGTGGCTTCAAAAAATTTTTTGAAAAAGGGGGGG

CGCAACAACAAGGGTGTTCCTTTATATAA

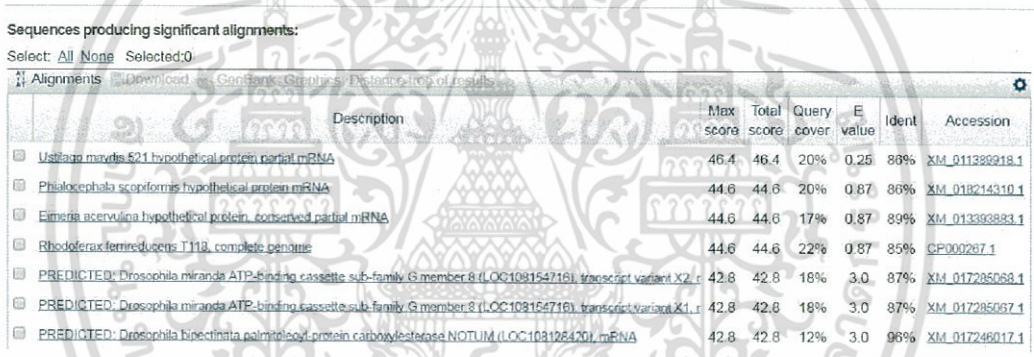
จากผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สามารถหาตำแหน่งของ Reverse Primer และ Forward Primer แต่ไม่พบ Poly A Tails และไม่พบส่วนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนยีน *hyd*A ในฐานข้อมูล NCBI จึงสรุปได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไม่ใช่ของยีน *hydA* จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blast พบว่ามีความคล้าย *Ustilagomaydis 521* hypoghetical protein mRNA แต่ค่า E-value สูงเกินทำให้ไม่สามารถเชื่อถือได้ สรุปได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น Unknown ดังรูปที่ 4.12 และ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blast

ที่มา : https://blast.ncbi.nlm.nij.gov/Blast.cgi



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Ustilago maydis 521 hypothetical protein partial mRNA	46.4	46.4	20%	0.25	86%	XM_011389918.1
Phialocephala scopiformis hypothetical protein mRNA	44.6	44.6	20%	0.87	86%	XM_018214310.1
Eimeria acervulina hypothetical protein, conserved partial mRNA	44.6	44.6	17%	0.87	89%	XM_013393883.1
Rhodoferax ferrireducens T118, complete genome	44.6	44.6	22%	0.87	85%	CP000267.1
PREDICTED: Drosophila miranda ATP-binding cassette sub-family G member 8 (LOC108154716), transcript variant X2, r	42.8	42.8	18%	3.0	87%	XM_017285068.1
PREDICTED: Drosophila miranda ATP-binding cassette sub-family G member 8 (LOC108154716), transcript variant X1, r	42.8	42.8	18%	3.0	87%	XM_017285067.1
PREDICTED: Drosophila bipectinata palmitoyl-protein carboxylesterase NOTUM (LOC108126420), mRNA	42.8	42.8	12%	3.0	96%	XM_017246017.1

รูปที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blast

ที่มา : https://blast.ncbi.nlm.nij.gov/Blast.cgi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า RNA ของยีน *hyd*A ได้ถูกสกัดจากสาหร่าย *Tetraspora sp.* CU2551 ได้สำเร็จและสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ในการทำ PCR Nested ได้ทำ PCR Gradient โดยใช้อุณหภูมิ Annealing (T_A) ทั้งหมด 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 57.0, 58.2, 59.4 และ 60.0 °C ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 58.2 °C ซึ่งทำการตรวจดูผลโดยใช้ 1.2% Agarose Gel Electrophoresis และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีการโคลนชิ้นส่วน DNA เข้าสู่พลาสมิด จากนั้น Transform พลาสมิดเข้าสู่ *E.coil* สายพันธุ์ XL1-Blue ซึ่งสามารถทำได้อย่างสำเร็จ ซึ่งผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ปลาย 3´ ของยีน Hydrogenase A (*hyd*A) ในสาหร่าย *Tetraspora* sp. ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA End (RACE) ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ไม่พบ Poly A Tails และไม่พบส่วนที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hyd*A ในฐานข้อมูล NCBI ผลแสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไม่ใช่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hyd*A จากนั้นใช้โปรแกรม Blast พบว่ามีความคล้ายกับ *Ustilago maydis 521* hypoghetical protein mRNA ค่า E-value 0.25 ค่า Max scroe 46.4 และมีค่า Query cover 20% แต่ค่า E-value นั้นไม่เป็นที่ยอมรับดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จึงเป็น Unknown

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทำโครงงานพิเศษซึ่งเป็นการศึกษาวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3´ ของยีน Hydrogenase A *(hyd*A) ในสาหร่าย *Tetraspora sp.* CU2551 ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA End (RACE) สรุปข้อเสนอแนะเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปได้ดังนี้

1. การทำการทดลองควรทำอย่างต่อเนื่อง ไม่ควรเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ DNA ไว้นานและในการทำงานเกี่ยวกับ RNA หรือ DNA ควรทำอย่างระมัดระวังไม่ให้เกิดการปนเปื้อน

2. ควรทำการรันผล RNA ด้วย 1.2% Agarose Gel Electrophoresis หลังจากการสกัดทันทีเพื่อตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ RNA ได้ชัดเจน การรันผล RNA ควรทำไปพร้อมกับการสังเคราะห์ cDNA

3. ควรทำการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ทันทีเพื่อลดขั้นตอนการเพิ่ม Poly A Tails ที่ปลาย 3´ ก่อนส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่ควรส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปผลิตภัณฑ์ PCR

4. ในการทำการทดลองครั้งต่อไปหากมีแบนเข้มขึ้นที่ขนาด 600 bp ควรนำมาพิจารณาส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์

5. ในขั้นตอนของการเตรียมจานเพาะเชื้อควรทิ้งเวลา Spread อาหาร LB ที่มี Ampicillin, IPTG และ X-gal ลงจานเพาะเชื้อให้แห้ง โดยทำการตากจานเพาะเชื้อในตู้ปลอดเชื้อเพื่อให้จานเพาะเชื้อแห้งจึงทำการ Spread ตัวอย่างลงไปจานเพาะเชื้อ

6. การคัดเลือกโคโลนีมาทำ Colony PCR ควรมีจำนวนตัวอย่างมากกว่านี้ เพื่อเพิ่มโอกาสในการพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง

7. เมื่อเลือกโคโลนีที่ต้องการแล้วควรนำไป Steak บนจานเพาะเชื้อที่ถูกแบ่งไว้เป็นช่องซึ่งเรียกว่า Master Plate เพื่อสามารถใช้โคโลนีที่ต้องการเพื่อนำไปใช้ในการทำการทดลองครั้งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Blanca V Rodriguez, Eric T Malczewskyj, Joshua M Cabiya, L Kevin Lewis, Corina Maeder. 2016. "Identification of RNase-resistant RNAs in Saccharomyces cerevisiae extracts : Separation from chromosomal DNA by selective precipitation." Int. J. Analytical Biochemistry 492 : 69-75

Oxford Gene Technology The Molecular Genetics Company™. 2016. RNA ratio. [Online]. Available : https://www.ogt.com/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality

Cherdsak Maneeruttanarungroj, Peter Lindblad and Aran Incharoensakdi. 2012. "Sulfate permease (SulP) and hydrogenase (HydA) in the green alga Tetraspora sp. CU2551: Dependence of gene expressionon sulfur status in the medium." Int.J. Hydrogen Energy. 37 : 15105-15116.

Cherdsak Maneeruttanarungroj, Peter Lindblad and Aran Incharoensakdi. 2010. "A newly isolated green alga Tetraspora sp. CU 2551, from Thailand with efficient hydrogen production." Int.J. Hydrogen Energy. 35 : 13193-13199.

Vincent Chochois, Laure Constans, David Dauville´e, Audrey Beyly, Me´lanie Solive´re`s, Steven Ball, Gilles Peltier and Laurent Cournac. 2010. "Relationships between PSII-independent hydrogen bioproduction and starch metabolism as evidenced from isolation of starch catabolism mutants in the green alga Chlamydomonas reinhardtii." Int.J. Hydrogen Energy. 35 : 10731-10740

Maness, P.C., Yu, J., Eckert, C. and Ghirardi, M.L. 2009. "Photobiological hydrogen productionprospects and challenge: Efforts to scale up the capacity of green algae and cyanobacteria to use sunlight to convert water into hydrogen gas for energy use." Microbe. 6(4) : 275-280.

Kari Skjanesa, Gjert Knutsena, Torsten Kallqvistb and Peter Lindbladc. 2008. "H_2 production from marine and freshwater species of green algae during sulfur deprivation and considerations for bioreactor design." Int.J. Hydrogen Energy. 33 : 511-521

Bak, T.,Nowothy, J., Rekas, M. and Sorrell, C.C. 2002. "Photo-electrochemical hydrogen generation from water using solar energy.Materials-related aspects." Int. J. Hydrogen Energy. 27 : 991-1022.

Melis, A. 2002. "Green alga hydrogen production : progress, challenges and prospects." Int. J. Hydrogen Energy. 27 : 1217-1228.

Schulz. R. "Hydrogenases and hydrogen production in eukaryotic organisms and Cyanobacteria." J. Mar. Biotechnol. 4(1996) : 16-22.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schnackenberg. J., Schulz. R. and Senger.H. "Characterization and purification of a hydrogenase from the eukaryotic green alga *Scenedesmus obliquus*." J. FEBS Letters. 1(1993) : 21-24.

ชนนิษฏ์ชูพยัคฆ์, กำไรวรนุช, รัตติกานต์บัวเรืองและอนุพันธ์กงบังเกิด. 2559. **การเปรียบเทียบการ สกัดอาร์เอ็นเอสามวิธีเพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-qPCR จากพืชวงศ์พริกไทย**. [online]. Available : http://scijournal.kku.ac.th/files/Vol_41_No_4_P_.pdf

ศิริจันทร์ ทองประเสริฐ และ มานิจ ทองประเสริฐ. 2559. **ไฮโดรเจน: เชื้อเพลิงสำหรับอนาคต.** [Online]. Available : http://www.navy222.com/th/index.php?option=com_smf&Ipemie=o&topic=14691.0.

อโณทัย โภคาธิกรณ์. 2559. **Polymerase Chain Reaction.** [Online]. Available : https://www.gotoknow.org/posts/94753

สุนัดดา โยมญาติ. 2558. **สื่อการสอนเรื่อง การโคลนยีน โดยอาศัยพลาสมิดของแบคทีเรีย.** [Online]. Available : http://biology.ipst.ac.th/?p=3084

กิตติพัฒน์อุโฆษกิจ. 2557. **พันธุศาสตร์.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

สุรัตน์ติพร รัตนะ. 2554. "การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *SCENEDESMUS* SP. KMITL-01 HYDROGEN PRODUCTION BY UINCELLULAR GREEN ALGA *SCENEDESMUS* SP. KMITL-01." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

มณีวรรณ สุขสมทิพย์. 2553. **การโคลนยีนเบื้องต้น (Introductory Gene Cloning).** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาณุทัศน์ อินใจมา. 2550. ก๊าซไฮโดรเจน แหล่งพลังงานทดแทนที่ไม่มีวันสูญสิ้น. วารสารโลกพลังงาน. ปีที่ 10 ฉบับที่ 34 หน้า 43-45. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. 2548. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชัชวาลย์ ชัยชนะ. 2547. ทรัพยากรธรรมชาติแหล่งพลังงานทดแทน.วารสารโลกพลังงาน. ปีที่ 7 ฉบับที่ 24 หน้า 29-34. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วีระพงษ์ ลุลิตานนท์. 2545. **การออกแบบ PCR Primers.** [Online]. Available : http://microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku_microbio/17/%A1%D2%C3%CD%CD%A1%E1%BA%BA_PCR_Primers_June_08.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris Acetate Phosphate Medium (TAP) และ Sulfur-free TAP Medium (TAP-S)

ตารางที่ ก-1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (TAP)

ลำดับที่	สารเคมี	น้ำหนัก (g)	ปริมาตรที่เตรียม (ml)	ปริมาตรที่ใช้เตรียม TAP 1 L (ml)
1.	Tris	24.20	100	10
2.	แคลเซียมคลอไรด์ไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	0.50	250	25
	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	1.00		
	แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	3.75		
3.	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.88	10	1
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.44		
4.	กรดบอริก (H_3BO_3)	0.1140	10	1
	คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.0160		
	โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$)	0.0160		
	ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดตร ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.2200		
	ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)	0.5000		
	ฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดตร ($FeSO_4.7H_2O$)	0.0500		
	แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	0.0500		
	แอมโมเนียมเฮปตะมิลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$)	0.0077		
5.	กรดอะซีติก (CH_3COOH)	-	-	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (TAP-S)

ลำดับที่	สารเคมี	น้ำหนัก (g)	ปริมาตรที่เตรียม (ml)	ปริมาตรที่ใช้เตรียม TAP 1 L (ml)
1.	ทริส (Tris)	24.20	100	10
2.	แคลเซียมคลอไรด์ไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	0.50 0.80 3.75	250	25
3.	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.88 1.44	10	1
4.	กรดบอริก (H_2BO_3) คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ ($CuCl_2$) โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$) ซิงค์ (II) คลอไรด์ ($ZnCl_2$) ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA) ไอร์ออน (II) คลอไรด์ ($FeCl_2$) แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) แอมโมเนียมเฮปตะมิลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$)	0.1140 0.0338 0.0160 0.1800 0.5000 0.0420 0.0500 0.0077	10	1
5.	กรดอะซีติก (CH_3COOH)	-	-	1

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria Bertani Broth (LB)

เตรียม LB ปริมาตรทั้งหมด 500 ml โดยทำการชั่ง PEP TONE 5 g, Yest Extract 2.5 g และ 0.17M NaCl 21.25 ml เติมน้ำกลั่น 500 ml นำสารละลายไปปั่นกวนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งสารละลายเป็น 2 ขวด ขวดที่ 1 ปริมาตร 400 ml เป็นอาหารเหลวและขวดที่ 2 ปริมาตร 100 ml เตรียมเป็นอาหารวุ้นนำสารละลายขวดที่ 2 ปริมาตร 100ml มาเติมผง Agar 1.5 g ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 ขวด ไปทำการฆ่าเชื้อ นำสารละลายขวดที่ 2 มาเติม Ampicillin 50 µg/ml แล้วเทสารละลายลงในจานเพาะเชื้อ ทำภายในตู้ปลอดเชื้อรอจนอาหารแห้ง จากนั้นทำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

3. การเตรียม 100mM IPTG

เตรียมโดยปิเปต 1M IPTG 10 µlเติมน้ำกลั่น 90 µl ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml

4. การเตรียม X-gal 50 mg/ml

ชั่ง X-gal 17 mg เติม Dimethylformamide 340 µl ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การเตรียม 10X TBE Electrophoresis Buffer

ชั่ง Tris Base 108 g, Boric Acid 55 g และ EDTA 9.3 g เติมน้ำกลั่น 800 ml จากนั้นนำสารละลายไปปั่นกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 ml

6. การเตรียม 0.5X TBE Electrophoresis Buffer

นำ 10X TBE ปริมาตร 50 ml เติมน้ำกลั่น 950 ml ลงในขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สูตรการคำนวณที่ใช้ในการทดลอง

1. สูตรการเตรียมอาหารเหลวที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S) คิดเปรียบเทียบโมลเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสาร

<u>ตัวอย่าง</u> ต้องเปลี่ยนจาก $MgSO_4$ 1 g ไปเป็น $MgCl_2$ จะต้องใช้ปริมาณ $MgCl_2$ เท่าใด

$$MgSO_4 \rightarrow MgCl_2$$

ดังนั้น $$MolMgSO_4 = MolMgCl_2$$

$$\frac{g}{m} = \frac{g}{m}$$

$$\frac{1}{120.3} = \frac{g}{95.3}$$

$$g = \frac{1 \times 95.3}{120.3}$$

$$g = 0.79 \ , \approx 0.80 \ g$$

จึงเตรียมอาหารด้วย $MgCl_2$ 800 mg

2. สูตรคำนวณการเจือจางของสารสำหรับการเตรียม Starter

$Mol = C \times V$; C = ค่าการดูดกลืนแสง

V = ปริมาตรสารในหลอด Centrifuge

$$Mol = 0.745 \times 45$$

$$= 33.525 \text{ mol}$$

นำไปปั่นเหวี่ยง เทน้ำออกให้เหลือน้ำอยู่ 10 ml แล้วผสมให้เข้ากัน ได้ความเข้มข้นใหม่ของสาร

$$= \frac{33.525 \text{ mol}}{10 \text{ ml}}$$

$$= 3.3525 \text{ mol/ml}$$

ทำการเจือจาง 100 เท่า เพื่อให้มีความเข้มข้นเข้าใกล้ 0.01 มากที่สุด ต้องการเตรียมให้มีปริมาตร 50 ml

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_1V_1 = \frac{C_1 \times 50}{100}$$

ดังนั้น ปิเปตสารปริมาตร 500 µl แล้วปรับปริมาตรรวมเป็น 50 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สูตรการคำนวณหาปริมาตร RNA ต่อ ปริมาณ DNase 2 µl

จากสูตร 5 µg RNA : 1 µl DNase

ต้องการใช้ DNase 2 µl
จะได้ 10 µg RNA : 2 µl DNase

คำนวณความเข้มข้นของ RNA จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm จากทฤษฎีถ้าการดูดกลืนแสง (A) มีค่าเท่ากับ 1 เนื้อสารนั้นจะมี RNA 40 ng/µl

A_1 = 40 ng/µl

$A_{0.314}$ = 40×0.314 ng/µl

= 12.56 ng/µl

ทำการเจือจาง 200 เท่าก่อนการวัดค่าดูดกลืนแสง

เนื้อสารมี RNA = 12.56×200

= 2,512 ng/µl

จาก 10 µg = 2 µl DNase ; (10 µg = 10,000 ng)

จะได้ว่า 2,512 ng = 1 µl

ต้องการ 10,000 ng = 3.98 µl

ดังนั้น ปิเปต RNA ตัวอย่างมา 3.98 µl ต่อ DNase 2 µl

4. สูตรหาความเข้มข้นของRNA จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260nm.

$C_{RNA} = A_{260} \times 40 \times$ จำนวนเท่าเจือจาง

5. การหาความบริสุทธิ์ของ RNA

$$\text{ความบริสุทธิ์ของ RNA} = \frac{\lambda_{260}}{\lambda_{280}}$$

ตารางที่ ข-1 แสดงความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ RNA

ซ้ำ \ Condition	λ_{260}	λ_{280}	$\lambda_{260}/\lambda_{280}$	C_{RNA}
RNA -DNase Treatment เจือจาง 50X	0.069	0.037	1.8649	138
RNA Non-DNase Treatment เจือจาง 20X	0.890	0.537	1.6574	1,780

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. สูตรการหาอุณหภูมิ Annealing

$$T_A = T_M - 5$$

7. สูตรการหาอุณหภูมิเพื่อทำ Gradient PCR

$$T_G = T_A \pm 1$$

8. สูตรความเข้มข้น DNA จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง

$$C_{DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{จำนวนเท่าเจือจาง}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การออกแบบไพร์เมอร์

เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่จะโคลนเข้ากับระบบแสดงออกจึงต้องอาศัยการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ที่ต้องการผ่านวิธี PCR อย่างไรก็ตามการทำเทคนิค PCR นั้นจำเป็นต้องออกแบบไพร์เมอร์เพื่อเพิ่มความจำเพาะและประสิทธิภาพในการทำ PCR โดย Forward Primer$_1$ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 27 bp และ Forward Primer$_2$ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 20 bp โดยหลักการสำคัญสำหรับออกแบบไพร์เมอร์คือ

1. ควรเลือกบริเวณอนุรักษ์ (Conserved Region) และมีปริมาณ GC อยู่ในช่วง 50-60%

2. มีค่า Melting Temperature (Tm) อยู่ในช่วงระหว่าง 55-80 °C ซึ่งไพร์เมอร์ที่มีค่า Tm อยู่ในช่วงนี้จะสามารถจับกับ DNA Template ได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่ง Tm สามารถคำนวณได้จาก Tm = 2°C × (A+T) + 4°C × (G+C)

3. ความยาวของไพร์เมอร์ควรอยู่ระหว่าง 18-28 bp

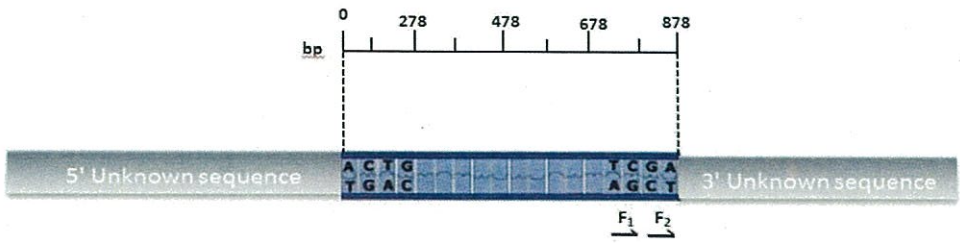
```
LOCUS KT984857 878 bp    mRNA    linear   PLN 20-APR-2016
DEFINITION  Tetraspora sp. CU2551 hydrogenase A mRNA, partial cds.

ORIGIN
1 ttgcccatgt tcaccagctg ctgccctggg tgggttgcta tggtggaaaa gagcaacccg

61 gagctcatcc catatctttc atcttgcaag tcaccccaaa tgatgctggg tgccgtaatc

121 aaaaactact ttgcacagca ggttggagtg caggccagtg acattgtcaa tgtgtctgtg

181 atgccctgtg tccgtaagca gggtgaagca gaccgtgagt ggttcaacac aacaggcctt

241 gcacgtgatg ttgatcatgt gatgactaca gctgaggtcg gcaaggtttt ccttgagcgt

301 ggcatcaagc tcaatgaact gccagagagc aacttcgaca accctgttgg tgagggtaca

361 ggtggagccg tgctgtttgg taccactgga ggtgtcatgg aggcagcact gcgaactgtc

421 tatgagctgg tcacacagaa gcccatgggc cgcatcgact ttgcagaggt gcgtgggttg

481 gatggtatca aggaggctac cctgaacctc aagcctggtg aaaacagtcc attcaaggca

541 tttgctggac ccgatggcga aggcatcacg ctgaacatcg cagtggccaa tggtttgggc

601 aatgctaaga agctgatcaa gagcttgtca gagggcaagg ccaagtatga cttcatcgaa

                                  F1 →
661 gttatggcct gcccaggagg atgcatcggt ggaggtggtc agcctcgcag tagtgacaag

          F2 →
721 cagatcttgc agaaacgcca gcaagctatg taccagctgg acgagcgcat gaccctgcgt

781 cgcagtcatg agaatccctt catacaggcc ctgtacaaca acttcttaga ggcacccaat

841 agccacaagg cgcacgacct gctgcacacc cactacgt
```

Forward Primer 1 : 5′ agg tgg tca gcc tcg cag tag tag caa 3′

Forward Primer 2 : 5′ acg cca gca agc tat gta cc 3′

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งตำแหน่งที่ทำการออกแบบไพร์เมอร์แสดงดังรูปที่ ค-1



รูปที่ ค-1 แสดงตำแหน่งการออกแบบของไพร์เมอร์ Specific Primer (F_1) และ Specific Primer (F_2)

<u>หมายเหตุ</u> F_1 คือ Specific Primer ตัวที่หนึ่งออกแบบที่ตำแหน่ง 693 bp มีความยาว 27 bp

F_2 คือ Specific Primer ตัวที่สองออกแบบที่ตำแหน่ง 735 bp มีความยาว 20 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง