บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 ตัวอย่างเห็ดยานางิ ได้รับมาจาก 2 แหล่ง ดังนี้

3.1.1.1 เห็ดยานางิที่เพาะเลี้ยง

เห็ดยานางิสีน้ำตาล สายพันธุ์ยานางิ เบอร์ 1 จากกรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร ทำการเพาะเลี้ยงที่ 144 หมู่ 4 ตำบล ศรีมหาโพธิ์ อำเภอ นครชัยศรี จังหวัด นครปฐม 73120

3.1.1.2 เห็ดยานางิที่ได้จากตลาด

เห็ดยานางิสีน้ำตาล จากตลาดนัดจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและตลาดสดสามย่าน ทำการศึกษาในระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2549 – 31 มกราคม 2550

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

- จานเพาะเชื้อ
- หลอดทดลอง
- กระดาษชั่งสาร
- กระบอกตวง
- ห่วงเขี่ยเชื้อ
- ไมโครปิเปต
- tip
- ขวดรูปชมพู่
- บีกเกอร์
- กรวยกรอง
- กระดาษกรอง
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ถุงมือ
- แปลงล้างขวด
- แท่นวางหลอดทดลอง

- ตู้นึ่งความดัน
- แท่งแก้วคนสาร
- ก้านเกลี่ยเชื้อ (spreader)
- เทอร์โมมิเตอร์
- กาต้มน้ำ
- โกร่ง ก้านบด
- ใบมีด
- หลอด microcentrifuge
- ปากคีบ (forceps)
- หลอด PCR
- เครื่องชั่งไฟฟ้า (libror EL-120HA(SHIMADZU))
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Augusta safety cabinet (Lio Lab Co., Ltd.))
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) (BIO RAD Gene Cycler™)
- เครื่องปั่นตกตะกอน (MIKRO 12-24 Hettich Zentrifugen)
- เครื่องอิเล็กโทรฟอเรซิส (Mupid Advance Co., LTD)
- เครื่องทำดีเอ็นเอให้แห้ง (lyophilizer)
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- เครื่องฉาย UV (UV Electronic Dual Light™ Transillumination)
- microwave
- refrigerator

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- Phenol
- Phenol: Chloroform
- Chloroform: Isoamylalcoho
- RNase
- Rnase TE
- 3 M CH_3 COOK pH 4.8
- Ethidium bromide
- 0.5 M EDTA
- CTAB extraction buffer
- 10x TE
- 1% TAE Agarose gel (w/v)
- Lysozyme buffer
- RNA extraction buffer
- 3 M CH_3 COONa pH 5.2

- 10 M Ammonium Acetate
- Potassium acetate
- 10% SDS
- SOC medium
- Sodium acetate
- 50mM Glyceral Cacium
- 5 M NaCl
- 10x Loading buffer
- Licl 3 M
- 50x TAE
- 70% Ethanol
- SOB medium
- 1 M Glucose
- 50mM $CaCl_2$
- 1.0 M Tris
- 5 M Potassium acetate
- LB broth

3.2 การศึกษายีนไทโรซิเนสและการวิเคราะห์

กระบวนการศึกษายีนไทโรซิเนสและการวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาของเห็ดยานางิ ประกอบไปด้วย 6 ขั้นตอนดังนี้

3.2.1 การรวบรวมข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตออกแบบไพรเมอร์

รวบรวมข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการค้นหาข้อมูลลำดัลนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสจากสิ่งมีชีวิตจำพวกเห็ดราอย่างน้อย 10 ชนิด จากฐานข้อมูลดีเอ็นเอ (GenBank) (Benson *et al.*, 2004; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) จากนั้นนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์มาปรับให้อยู่ในรูปแบบเดียวกันโดยการจัดให้อยู่ในรูปของ FASTA format (www.cmbi.kun.nl/bioinf/tools/crab_fasta.html) วิเคราะห์ข้อมูลโดยการทำ sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W™ (Thompson *et al.*, 1994) เปรียบเทียบความเหมือน ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนส เลือกหาขอบเขตของนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์บริเวณ Cu A และ Cu B ที่มีความเหมาะสมจากข้อมูลนิวคลีโอไทด์เหล่านั้นมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ และนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงต่อยีนโดยการทำ local alignment search tool ด้วยโปรแกรม BLAST n (Altschul *et al.*, 1997; Tatusova and Madden, 1999) ข้อมูลไพรเมอร์ที่ได้ส่งไปสังเคราะห์ และนำไพรเมอร์ที่ได้ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่ได้กับดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี PCR พร้อมทั้งนำมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยการแยกด้วยสนามไฟฟ้าจากเทคนิคอิเล็คโทรฟอเรซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 1% agarose ใน 1x TAE buffer และย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 10 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร นาน 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตในเบื้องต้นและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้งหลังการโคลน (ดูรายละเอียดในตอนถัดไป) บันทึกผลการทดลอง

3.2.2 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

วิธีสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากเนื้อเยื่อของเห็ดยานางิอยู่บนพื้นฐานของการสกัดอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี Phenol extraction (Chomezynski and Sacchi, 1989) โดยใช้ตัวอย่างของดอกเห็ดขนาด 300 มิลลิกรัมใน extraction buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตรร่วมกับสารละลายฟีนอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (2:1) บดให้ละเอียด ดูดใส่หลอดหลอดเซ็นตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดหลอดเซ็นตริฟิวจ์ใหม่ เติมฟีนอลคลอโรฟอร์ม 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีประมาณ 2-3 ครั้งหรือจนกว่าส่วนใสจะใส เติมคลอโรฟอร์มไอโซเอมิล 250 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ส่วนใสที่ได้นำมาตกตะกอนด้วยโซเดียมอะซิเตด 1 ใน10 ของปริมาตร ส่วนใสร่วมกับ absolute alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ 2.5 เท่าของปริมาตร ส่วนใสตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนอาร์เอ็นเอที่ได้ทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตะกอนอาร์เอ็นเอไปทำตะกอนให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer แล้ว ละลายตะกอนด้วยน้ำ DEPC ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอโดยนำอาร์เอ็นเอที่ได้ปริมาตร 3 ไมโครลิตรไปแยกด้วยขนาดด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็คโทรฟอเรซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 1% agarose ในสารละลาย 1x TBE buffer ตรวจสอบด้วยการย้อมเจลในสารละลาย ethidium bromide 10 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร นาน 10 นาที ดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกผลการทดลอง หลังจากนั้นนำอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วตกตะกอนด้วยลิเธียมคลอไรด์ มีความเข้มข้น 3 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติมน้ำ DEPC ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเติมแอลกฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลาย ตกตะกอนที่ตู้ – 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำอาร์เอ็นรวมที่ตกตะกอนไว้มาปั่นให้ตกตะกอน พร้อมทั้งทำตะกอนให้แห้ง ละลายละกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ DEPC ปริมาตร 30 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำอาร์เอ็นเอปริมาตร 3 ไมโครลิตร มาตรวจสอบคุณภาพซ้ำด้วยแยกด้วยขนาดด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็คโทรฟอเรซิส อาร์เอ็นเอรวมส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ตู้ – 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานต่อไป บันทึกผลการทดลอง

3.2.3 ปฏิกิริยา RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ปริมาตร 1 ไมโครกรัม สังเคราะห์ cDNA สายแรกด้วยองค์ประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาตามด้วยเอนไซม์ MMLV reverse transcriptase และใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบไว้ในข้อ 3.2.1.1 พร้อมปฏิบัติตามคำแนะนำในคู่มือการใช้งาน Superscript II (Invitrogen, USA) และทำปฏิกิริยาที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ต่อด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ให้มีปริมาณมากโดยการจำลองดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้ cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ข้างต้นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา พร้อมปฏิบัติตามคำแนะนำในคู่มือ (Promega, USA) โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 45 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที และสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส นาน 3.30 นาที จำนวน 40 รอบ ซึ่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอเรส นำมาตรวจสอบคุณภาพโดยการแยกด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็คโทรฟอเรซิส โดยใช้ 1% agarose ใน 1x TAE buffer และย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 10 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร นาน 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาสกัดให้บริสุทธิ์ (elution) ด้วย HiYield™ Gel / PCR DNA Extraction Kit ด้วยวิธีปฏิบัติตามคำแนะนำในคู่มือ (Real Biotech Company, Taiwan) และนำดีเอ็นเอไปเก็บรักษาที่ตู้ –20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้งานต่อไป

3.2.4 การโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ การคัดเลือกโคลนและการตรวจสอบโคลนที่ได้

นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.2.1.4 มาเชื่อมต่อเข้าสู่พาหะ pCR IV™ ด้วยหลักการ TA-cloning (Invitrogen, USA) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ถ่ายเข้าสู่ *E coli* สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al*., 1982) จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียเหลว (LB broth) เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงแบคทีเรียแข็ง ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 300 ไมโครลิตรร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลต่อลิตรต่อลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่ขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำเข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียแต่ละโคโลนีมาขีดให้เป็นรอยในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียแข็งซ้ำอีกครั้ง หลังจากนั้น นำเชื้อในแต่ละเส้นมาตรวจสอบการปรากฏของดีเอ็นเอที่แทรกตัวอยู่ในพลาสมิดโดยการทำให้โคโลนีแตกออกเพื่อศึกษาขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอภายใน (ศจิษฐา ประเสริฐกุล, 2548) เลือกเชื้อของแบคทีเรียที่พบการแทรกตัวของดีเอ็นเออยู่ในพ

ลาสมิดบนจานเลี้ยงเชื้อ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียเหลว (LB broth) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 60 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พร้อมทั้งสกัดดีเอ็นเอจากพลาสมิดด้วยวิธี small scale (Sambrook *et al.*, 1982) โดยการนำเชื้อ *E coli* ที่เป็นดีเอ็นเอลูกผสมที่เจริญในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียเหลวจนครบจำนวนชั่วโมงแล้ว มาทำให้ตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เซลแตกโดยการเติมไลโซไซม์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน พร้อมทั้งเติม alkaline ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลอดผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 5 นาทีและเติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตด ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทำความสะอาดดีเอ็นเอด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม และตกตะกอนด้วยสารละลาย propanol เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอ ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ปั่นตกตะกอนที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตะกอนดีเอ็นเอไปเข้าเครื่อง Dry ดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่ได้นำมาแยกขนาดด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็คโทรฟอเรซิส พร้อมทั้งเปรียบเทียบขนาดของแบนด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ โดยใช้อะกาโรสเจล 1% TAE ในสารละลาย 1x TAE buffer ตรวจสอบดูแถบพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยการย้อมเจลในสารละลาย ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร นาน 10 นาที ดูแถบพลาสมิดดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พลาสมิคดีเอ็นเอที่ได้นำมาตรวจสอบดีเอ็นที่ปรากฏด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบค่ามาตรฐานด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยนำดีเอ็นเอที่ dilute 400 เท่า มาตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอโดยตรวจสอบสัดส่วนของปริมาณดีเอ็นเอ สัดส่วนของ OD 260 / OD 280 พร้อมปรับความเข้มข้นให้ได้เป็น 2.5 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตรพร้อมที่จะนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.2.5 <u>การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์</u>

พลาสมิดดีเอ็นเอของยีนไทโรซิเนสที่ได้จากการโคลน นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากการวิเคราะห์จะใช้วิธี dideoxy chain termination method และใช้ไพรเมอร์ M 13F และ M13R เป็นไพรเมอร์ทดสอบ (Sanger *et al.*, 1997) ในทางปฏิบัติดำเนินการผ่านกรรมวิธี custom analysis โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดนำมา alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W^{TM} (Thompson *et al.*, 1994) ร่วมกับไพเมอร์ของยีนไทโรซิเนสเพื่อหาชิ้นส่วนของยีนที่แท้จริงพร้อมทั้งตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนของยีนทิ้งไป หลังจากนั้นลำดับนิวคลี

โอไทด์ของชิ้นส่วนยีนที่ได้นำมาตรวจสอบความจำเพาะของยีนไทโรซิเนสด้วยโปรแกรม BLAST n (Altschul *et al.*, 1997; Tatusova and Madden, 1999)

3.3 ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนไทโรซิเนส

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสเน้นการศึกษาทางด้านการเปลี่ยนแปลงทางด้านคุณภาพและการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาโดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

3.3.1 ระดับการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลของดอกเห็ด

3.3.1.1 ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยง

เริ่มจากการศึกษาระยะเวลาในการเสื่อมสภาพของดอกเห็ดโดยการนำก้อนเห็ดที่มีเชื้อเจริญเต็มก้อนมาเก็บไว้ในโรงเรือนที่มีอุณหภูมิ 24-30 อาศาเซลเซียส ความชื้นประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ให้เจริญเติบโตจนกระทั่งดอกเห็ดเสื่อมสภาพ พร้อมทั้งกำหนดระยะเวลาในการศึกษาระดับการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลใน 2 บริเวณ ได้แก่บริเวณของครีบและวงแหวน ถ่ายรูปเทียบกับแถบสีจาก ตารางค่าสีมาตรฐาน PMS (Pantone maching system color chart) (http://www.mfauk.co.uk/images/colorchart .thm)

3.3.1.2 ดอกเห็ดที่ได้จากตลาด

เริ่มศึกษาจากตัวอย่างของดอกเห็ดจากตลาด แล้วนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 24-30 องศาเซลเซียส ความชื้นประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ โดยดอกเห็ดมีการเสื่อมสลายเช่นเดียวกับเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ถ่ายรูปเทียบกับแถบสีจากตารางค่าสีมาตรฐาน PMS (Pantone maching system color chart) ดังกล่าวข้างต้น พร้อมทั้งสกัดอาร์เอ็นเอรวม

3.3.2 สกัดอาร์เอ็นเอรวม

ดอกเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและได้จากตลาดนำมาจัดระยะตามผลที่ได้ในข้อ 3.3.1 สกัดอาร์เอ็นเอรวมทั้งในส่วนของครีบและวงแหวน ตามวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

3.3.3 <u>การตรวจสอบระดับปริมาณการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในรูปอาร์เอ็นเอ</u>

อาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงเองและดอกเห็ดที่ซื้อมาจากตลาดทั้งในส่วนของครีบและวงแหวน ในแต่ละระยะของการเปลี่ยนแปลงมาวัดค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบค่ามาตรฐานด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยการนำอาร์เอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 500 เท่า แล้วมาตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณอาร์เอ็นเอจากสัดส่วนของค่า OD 260/OD 280 บันทึกผลการทดลอง

3.3.4 <u>ปฏิกิริยา RT-PCR มี 2 ระบบดังนี้</u>

3.3.4.1 ปฏิกิริยา RT-PCR จากไพรเมอร์ที่ได้จากยีนไทโรซิเนส นำอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ในข้อที่ 3.2.2.2 ปริมาตร 1 ไมโครลิตรมาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ไพรเมอร์จากยีนไทโรซิเนสที่ออกแบบไว้ในข้อที่ 3.2.1.1 ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น บันทึกผลการทดลอง

3.3.4.2 ปฏิกิริยา RT-PCR จากไพรเมอร์ที่ได้จากยีน 12S rRNA นำอาร์เอ็นเอรวมจากตัวอย่างเดียวกันที่สกัดได้ในข้อที่ 3.3.2 ปริมาตร 1 ไมโครลิตรมาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ไพรเมอร์จากยีน 12S rRNA ซึ่งขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA ได้กล่าวมาแล้วขั้นต้น จากนั้นตามด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการจำลองดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR) โดยใช้ cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ข้างต้นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และปฏิบัติตามคำแนะนำในคู่มือ (Promega, USA) โดยใช้เงื่อนไขปฏิกิริยาอุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 52 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที จำนวน 40 รอบ ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอเรสมาตรวจสอบคุณภาพโดยการแยกด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเลคโทรฟอเรซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 1%TAE ใน 1x TAE buffer และย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 10 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร นาน 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.3.5 <u>การวัดระดับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์</u>

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อที่ 3.3.4.1 มาตรวจวัดด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ โดยการนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับโมเลกุลที่เป็น DNA binder ซึ่งก็คือโมเลกุลของ Hoechst 33258 ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร ผสมสารละลายทั้ง 2 ให้เข้ากัน โดยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ แล้วดูดสารละลายผสม 30 ไมโคลิตร นำไปหยดลงพื้นผิวของอิเลคโทรดหรือ Chip และนำไปตรวจวัดด้วย BDT chip tester และบันทึกข้อมูลที่ได้จากผลการวัดในรูปกราฟ บันทึกผลการทดลอง