บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเพาะฟักไข่เต่าตนุแบบควบคุมอุณหภูมิ

นำไข่เต่าตนุจากรังที่พบในธรรมชาติเรียงลงในกล่องโฟมขนาด 25 x 40 x 30 เซนติเมตร ที่มีทรายอยู่ก้นกล่องหนาประมาณ 7 เซนติเมตรโดยวางไข่เฉพาะบริเวณกลางกล่อง เรียงไข่ซ้อนกัน 3 ชั้น ชั้นละ 5-6 ฟอง จนครบ 15 ฟอง จำนวน 2 กล่อง ใช้ทรายกลบไข่ให้มีความหนาของทรายขึ้นมาจากไข่ชั้นบนสุดอย่างน้อย 3-4 เซนติเมตร ทั้งนี้ระดับบนสุดของทรายต้องต่ำกว่าขอบกล่องประมาณ 7 เซนติเมตร เพื่อกันลูกเต่าปีนออกจากกล่อง ทรายที่ใช้บ่มต้องมีความชื้นพอเหมาะไม่แห้งหรือแฉะเกินไป นำกล่องโฟมที่มีไข่เต่าตนุกล่องที่หนึ่งไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 35°C อีกหนึ่งกล่องนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 27°C เป็นเวลา 45-60 วัน วัดอุณหภูมิของทรายในกล่องโดยฝังเทอร์โมมิเตอร์ไว้ในทรายอ่านค่าแล้วบันทึกอุณหภูมิที่ได้จริง ตรวจดูความชื้นของทรายทุกวันและปรับความชื้นโดยการน้ำพรมหลังจากลูกเต่าตนุฟักเป็นตัวและแผลที่เกิดจากการหลุดลอกของสายสะดือแห้งแล้วจึงย้ายไป เลี้ยงในน้ำทะเลที่เตรียมไว้ การอนุบาลลูกเต่าตนุเป็นเวลา 3-4 เดือน แล้วจึงทำการเจาะเลือด (รายละเอียดใน 3.2.1) ก่อนปล่อยกลับสู่ทะเล

3.2 สถานที่เก็บตัวอย่างเลือดหรือเนื้อเยื่อของเต่าตนุ

เก็บตัวอย่างเลือดหรือเนื้อเยื่อของเต่าตนุจากแหล่งต่างๆ ดังนี้ 1) สถานีอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลเกาะมันใน อ.แกลง จ.ระยอง 2) หน่วยอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลและกระทะเล ฐานทัพเรือสัตหีบ 3) หน่วยอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลและกระทะเล กองเรือภาคที่ 3 จ.พังงา 4) สวนสาธารณะเกาะลอย อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี 5) สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง อ. บ้านแหลม จ. เพชรบุรี 6) สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง อ.แหลมผักเบี้ย จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ 7) ศูนย์ชีววิทยาทางทะเล จ.ภูเก็ต เพื่อนำมาใช้ในการทดลองทำได้ 2 วิธี ดังนี้ คือ

3.2.1 วิธีการเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณลำคอทางด้านหลังของเต่าตนุตัวเต็มวัยที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 50-70 กิโลกรัม จำนวน 5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 18 หรือจากลูกเต่าตนุอายุ 3-4 เดือนที่มีน้ำหนักเกิน 100 กรัมขึ้นไปจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 25 เก็บตัวอย่างเลือดที่ได้ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย acid citrate dextrose เพื่อป้องกันการแตกของเม็ดเลือดและการแข็งตัวของเลือด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนนำไปสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอ

3.2.2 วิธีการเก็บตัวอย่างจากเนื้อเยื่อ

เก็บลูกเต่าตนุที่มีอายุตั้งแต่แรกเกิดถึง 6 เดือน ที่ได้รับการอนุบาลจากหน่วยงานดังกล่าวข้างต้นหลังจากลูกเต่าตายทันทีโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C หรือ -80 °C ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง ตัวอย่างเต่าตนุเหล่านี้จะถูกนำมาผ่าเพื่อเก็บอวัยวะภายใน เช่น ตับและหัวใจใช้สำหรับสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอและตัดโกแนดเก็บไว้ใช้ตรวจหาเพศของเต่าตนุโดยการศึกษาความแตกต่างของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง (histology)

3.3 การสกัดโครโซมัลดีเอ็นเอของเต่าตนุ (ดัดแปลงจาก Maniatis, 1989)

ในกรณีที่สกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อทำได้โดยตัดเนื้อเยื่อตับหรือหัวใจเป็นชิ้นเล็กๆ บดเนื้อเยื่อให้ละเอียดขณะที่ทำให้แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดยาที่เย็นจัด สำหรับตัวอย่างเลือดปั่นแยกส่วนพลาสมา (plasma) ออกทิ้งด้วยความเร็ว 3,000 xg เป็นเวลา 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนเม็ดเลือดมาทำการสกัดโครโมโซมโดยเติม extraction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M EDTA, 0.5%SDS และ 20 mg/ml RNase) 5 มิลลิลิตร สำหรับเลือดที่ได้จากลูกเต่าและ 10 - 15 มิลลิลิตร สำหรับเลือดที่ได้จากเต่าตนุตัวเต็มวัยหรือเนื้อเยื่อ เขย่าเบาๆ ให้เซลล์เนื้อเยื่อหรือเซลล์เม็ดเลือดกระจายตัวและแตกออก นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ RNAase ย่อย RNA เติมโปรติเอสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อย่อยโปรตีนต่างๆ ที่อยู่ในสารละลาย จากนั้นนำมาสกัดโปรตีนออก 2 ครั้ง ด้วยสารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl , 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นแยกส่วนน้ำและฟีนอลด้วยความเร็ว 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 27°C ใช้ปิเปตปากตัดดูดสารละลายส่วนบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเกลือแอมโมเนียมอะซิเทต (ammonium acetate) เข้มข้น 10 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 เท่า และแอบโซลูทเอทานอล ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนบน พันสายดีเอ็นเอด้วยแท่งแก้วที่แห้งและสะอาด ล้างดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70%, 80% และ 90% ตามลำดับ รอให้สารละลายเอทานอลระเหยหมดแล้วจึงนำดีเอ็นเอมาละลายใน TE buffer ตรวจวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอโดยการคำนวณหาอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{260} :OD_{280}) และวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยทำอะกาโรสเจล-อิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.7% ความยาว 5 เซนติเมตร ความต่างศักย์ไฟฟ้า คงที่ 100 โวลต์ ย้อมเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 นาที แช่เจลในน้ำกลั่นเพื่อล้างเอทิเดียมโบรไมด์ส่วน

เกินออก นำเจลไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อตรวจดูแถบของโครโมโซมัลดีเอ็นเอที่สกัดได้ วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยการวัดค่า OD_{260} แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงนั้นมาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอตามสมการ

$$[\text{ดีเอ็นเอ}] = \frac{OD_{260} \times \text{ปริมาตรสารทั้งหมดที่วัด}}{\text{ปริมาตรดีเอ็นเอที่ใช้} \times 20} \quad \text{มิลลิกรัม/มิลลิลิตร}$$

โดย 1 OD_{260} มีความเข้มข้นดีเอ็นเอ = 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4°C จนถึงเวลาทดลอง

3.4 การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.4.1 การเตรียมสไลด์ถาวร

ตัดโกแนดของลูกเต่าตนุขนาด 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ดองในน้ำยาบูแอองส์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีเหลืองของน้ำยาบูแอองส์ออกด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% จนเนื้อเยื่อซีดจาง ทำการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยแช่ในสารละลายเอทานอลตามลำดับความเข้มข้นดังนี้ 90% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 95% เป็นเวลา 1 คืน โดยเปลี่ยนสารละลายเอทานอล 2 ครั้ง ย้ายชิ้นเนื้อเยื่อมาแช่ในนอร์มอลบิวทานอล (n-butanol) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงแช่ในไซลีน (xylene) 2 ครั้ง ครั้งละครึ่งชั่วโมงจากนั้นจึงทำการฝังเนื้อเยื่อในแวก (wax) โดยทำดังนี้ แช่เนื้อเยื่อในสารละลายผสมระหว่างไซลีนและพาราพลาสต์ (xylene:paraplaste) อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 30 นาที ย้ายเนื้อเยื่อมาแช่ในพาราพลาสต์เหลว 2 ครั้ง ครั้งละ 60 นาที นำเนื้อเยื่อมาฝัง (embed) ในแม่พิมพ์ที่มีพาราพลาสต์เหลวบรรจุอยู่ ปล่อยให้พาราพลาสต์เย็นและแข็งตัว นำชิ้นเนื้อเยื่อไปตัด (section) ด้วยเครื่องไมโครโตม (microtome) ให้มีความหนาเท่ากับ 5 ไมครอน ติดชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดได้กระจกสไลด์ แล้วนำสไลด์เนื้อเยื่อไปทำการย้อมสีต่อไป

3.4.2 การย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี haematoxylin และ eosin

นำแผ่นสไลด์ที่มีชิ้นเนื้อเยื่อตรึงอยู่มาละลายพาราพลาสต์ออกโดยการแช่ในไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วนำแผ่นสไลด์ผ่านลงในสารละลายชนิดต่างๆ ตามลำดับ ดังนี้ นอร์มอล-บิวทานอล สารละลายเอทานอลเข้มข้น 95%, 90%, 70%, 50% และน้ำกลั่น ทุกขั้นตอนใช้เวลา 3 นาที ทำการย้อมเนื้อเยื่อโดยจุ่มแผ่นสไลด์ลงในสี haematoxylin เป็นเวลา 15 วินาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นจากนั้นแช่สไลด์ลงในสารละลาย differentiate เป็นเวลา 30-60 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง แล้วจึงนำไปแช่น้ำประปาเป็นเวลา 15 นาที จนเห็นนิวเคลียสเป็นสีม่วงเข้ม นำสไลด์มาผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์เนื้อเยื่อก่อนจะนำไปย้อมด้วยสี eosin โดยแช่สไลด์ในสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% และ 90% นานขั้นตอนละ 1 นาที ตามลำดับ จากนั้นแช่ในสี eosin เป็นเวลา 45 วินาที ดึงน้ำออกอีกครั้งโดยแช่ในสารละลายเอทานอลเข้มข้น 95% เป็นเวลา 1 นาที และนอร์มอลบิวทานอล 1 นาที ตามลำดับ จากนั้นแช่ไว้ในไซลีน 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมสีแล้วมาปิดทับด้วย cover slip โดยใช้น้ำยาคานาดาบอลซัม (Canada balsam) รอให้สไลด์แห้งแล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง

3.4.3 การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อของโกแนดลูกเต่าตนุภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง

ตรวจสอบลักษณะความแตกต่างกันของเนื้อเยื่อโกแนดของลูกเต่าตนุเพศผู้และเพศเมียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) กำลังขยาย 100, 200 และ 400 เท่า ตามลำดับ สังเกตลักษณะเซลล์และการเรียงตัวของเซลล์เพื่อประกอบเป็นเนื้อเยื่อของโกแนดและนำมาศึกษาลักษณะเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อโกแนดของลูกเต่าหญ้าตามรายงานของ Merchant-Larios และ Villalpando (1990)

3.5 การทำเซาท์เทิร์นบลอทไฮบริไดเซชัน (Southern-blot hybridization) เพื่อตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้ระบุเพศ

3.5.1 การย่อยโครโมโซมัลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme reaction)

นำตัวอย่างโครโมโซมัลดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดของเต่านุ่มที่ทราบเพศแล้วจำนวน 8 ตัว มาย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด (*Bam*H I, *Bgl* II, *Bst*N I, *Eco*R I, *Hae* III, *Hin*d III, *Hin*f I, *Nde* I, *Pst* I, *Pvu* II และ *Sau*3A I) โดยผสมสารต่างๆ ในปฏิกิริยาให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 30 ไมโครลิตร ดังนี้ โครโมโซมัลดีเอ็นเอของเต่าตนุ 20 ไมโครลิตร (ประมาณ 2ไมโครกรัม) 10X บัฟเฟอร์ของเอนไซม์แต่ละชนิด 3 ไมโครลิตร เอนไซม์ 1 ไมโครลิตร (1-2 ยูนิต) 10 mM BSA 3 ไมโครลิตร (เติมเฉพาะบางเอนไซม์ที่ระบุไว้ตามคำแนะนำของบริษัทที่ผลิตเอนไซม์) เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีปริมาตรรวมเป็น 30 ไมโครลิตร ผสมสารในปฏิกิริยาให้เข้ากัน นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C (ยกเว้น *Bst*N I บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังการย่อยเสร็จสิ้นแล้วแบ่งสารละลายจำนวน 5 ไมโครลิตร มาตรวจการย่อยโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.7% ความยาว 5 เซนติเมตร ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ตรวจดูลักษณะของโครโมโซมัลดีเอ็นเอที่ย่อยได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตหลังย้อมเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ โครโมโซมัลดีเอ็นเอที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์จะเก็บไว้ที่ 4°C ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป สำหรับดีเอ็นเอที่ย่อยไม่สมบูรณ์นำมาย่อยซ้ำโดยเพิ่มเอนไซม์ประมาณ 1-2 ยูนิต แล้วบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง

3.5.2 การแยกชิ้นดีเอ็นเอหลังย่อยด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำโครโมโซมัลดีเอ็นเอของเต่าตนุที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์แต่ละชนิด 25 ไมโครลิตร (2 ไมโครกรัม) มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.7% ความยาว 5 เซนติเมตร ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 20 โวลต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยใช้ λ/*Hin*d III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งในภาวะนี้จะทำให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4 กิโลเบส ขึ้นไปยังคงอยู่บนเจล ตัดส่วนของเจลที่มี λ/*Hin*d III มาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์เพื่อนำไปใช้คำนวณหาระยะการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ นำเจลส่วนที่เหลือซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอเต่าตนุที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดไปทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอขึ้นสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน

3.5.3 การถ่ายโอนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยจากอะกาโรสขึ้นสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน

ทำการถ่ายโอนชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้วิธีของ Southern (1975) โดยนำเจลที่ต้องการถ่ายโอนชิ้นดีเอ็นเอมาแช่ใน denaturing buffer (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) 300 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว (denatured DNA) ย้ายชิ้นเจลมาล้างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2-3 ครั้ง ก่อนนำมาแช่ในสารละลาย neutralizing เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพ pH ของเจลให้เป็นกลาง ในขณะที่เตรียมเจลทำการเตรียมแผ่นไนลอนเมมเบรนขนาดเท่ากับชิ้นเจลโดยแช่ใน 10X SSC (20XSSC stock มี 3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0) ก่อนการใช้อย่างน้อย 15 นาที เตรียมสะพานบัฟเฟอร์โดยเทบัฟเฟอร์ 10X SSC ลงในถาดก้นแบนใช้แผ่นกระจกพื้นเรียบวางพาดขอบถาดปูทับด้วยกระดาษกรอง Whatman 3MM ที่ชุ่มด้วยบัฟเฟอร์ลงบนแผ่นกระจกให้แนบสนิทไม่มีฟองอากาศโดยปลายกระดาษกรอง Whatman 3MM จุ่มลงในบัฟเฟอร์ที่อยู่ในถาดจากนั้นนำเจลที่เตรียมไว้วางลงตรงกลางแผ่นกระดาษกรอง Whatman 3MM วางทับด้วยแผ่นไนลอนเมมเบรนที่เตรียมไว้ตามด้วยกระดาษกรอง Whatman 3MM ขนาดเท่าชิ้นเจลที่ชุ่มด้วย 10X SSC จำนวน 3 แผ่น วางทับด้วยกระดาษซับขนาดเท่าชิ้นเจล

3MM ขนาดเท่าชิ้นเจลที่ชุ่มด้วย 10X SSC จำนวน 3 แผ่น วางทับด้วยกระดาษซับขนาดเท่าชิ้นเจล จำนวน 100 แผ่น และก้อนน้ำหนักหนักประมาณ 500 กรัม 1 ก้อน ใช้แผ่นพลาสติกบางๆ (wrap) คลุมทับส่วนของกระดาษกรองนอกบริเวณที่กระดาษซับดูดบัฟเฟอร์ผ่านทางเจล ตั้งทิ้งไว้ 16-24 ชั่วโมง คอยเติม 10X SSC ในถาดให้มีปริมาณเพียงพอ เมื่อเสร็จสิ้นการถ่ายโอนใช้คีมคีบแผ่นไนลอนเมมเบรนมาแช่ใน 2X SSC เป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นแช่ในสารละลาย 0.4 M NaOH เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้บนแผ่นไนลอนเมมเบรนแล้วแช่ในสารละลาย 0.2 M Tris-HCl, pH 7.5 2X SSC เป็นเวลา 2-3 นาที เพื่อปรับสภาพแผ่นไนลอนเมมเบรนให้เป็นกลาง คีบแผ่นไนลอนเมมเบรนขึ้นมาตากให้แห้งบนกระดาษกรอง Whatman 3MM เก็บแผ่นไนลอน-เมมเบรนไว้ในโถอบไล่ความชื้น (desiccator)

3.5.4 การเตรียมดีเอ็นเอติดตาม

สังเคราะห์ดีเอ็นเอติดตามให้มีลำดับเบสคือ GATA repeats จำนวน 21 เบส ซึ่งเป็นลำดับที่จำลองมาจากลักษณะเฉพาะของ Bkm sequence ในส่วน conserved sequence ซึ่งเป็น sex-specific sequence ในงูสามเหลี่ยม *Bungarus fasciatus* โดยให้ปลาย 5' เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (5'-OH) ละลายดีเอ็นเอติดตามด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร คำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้สารละลายดีเอ็นเอติดตาม 40 ไมโครลิตร เจือจางเป็น 1 มิลลิลิตร วัดค่า OD_{260} นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นได้ดังสมการ

$$[DNA] = \frac{(\text{ค่า } OD_{260} \times \frac{\text{ปริมาตรสารทั้งหมดที่วัด}}{\text{ปริมาตรดีเอ็นเอที่ใช้}} \times \text{factor } OD_{260})}{\text{มวลโมเลกุล}} \quad \text{ไมโครกรัม/มิลลิลิตร}$$

โดย 1 OD_{260} มีความเข้มข้นดีเอ็นเอ = 31 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เจือจางดีเอ็นเอติดตามให้มีความเข้มข้นประมาณ 2-3.5 พิโครโมลต่อไมโครลิตร จากนั้นติดฉลากที่ปลาย 5' ของดีเอ็นเอติดตามด้วยสารรังสี (γ-^{32}P)ATP (specific activity 6000 Ci/mmol) โดยใช้ T_4 polynucleotide kinase ผสมสารต่างๆ ลงในไมโครทิวป์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ดังนี้ 10X kinase buffer (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 5 mM KCl, 2 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 µM ATP, 50% glycerol) 1 ไมโครลิตร สารละลายดีเอ็นเอติดตาม 3 ไมโครลิตร (ประมาณ 5-10 พิโครโมล) T_4 polynucleotide kinase 1 ไมโครลิตร (10 ยูนิต) และ (γ-^{32}P) ATP 5 ไมโครลิตร (ประมาณ 8 พิโครโมล) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยย้ายไมโครทิวป์มาไว้ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที นำดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลากแล้วมาแยกออกให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ NENSORB™20 ที่เตรียมให้อยู่ในสภาพเหมาะสมโดยชะคอลัมน์ด้วย 2 มิลลิลิตร แอบโซลูทเมทานอล (absolute methanol) ติดตามด้วยรีเอเจนต์เอ (10 mM triethylamide, 1 mM EDTA, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.7) 2 มิลลิลิตร โดยให้มีอัตราการไหลของสารผ่านคอลัมน์เท่ากับ 0.5 หยดต่อนาที เติมดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลากไว้แล้วลงในคอลัมน์จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยรีเอเจนต์เอและน้ำกลั่นปลอดเชื้ออย่างละ 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ ชะดีเอ็นเอตัวติดตามออกมาด้วยสารละลายเมทานอลเข้มข้น 50% 1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้จากการชะลงในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 8 หยด วัดความแรงของรังสีในแต่ละหลอดด้วยเครื่องตรวจวัดรังสี เลือกดีเอ็นเอติดตามหลอดที่มีความเข้มของสารกัมมันตภาพรังสีสูงที่สุดมาใช้ในการทดลอง

3.5.5 การไฮบริไดซ์

นำแผ่นเมมเบรนที่ต้องการไฮบริไดซ์มาทำพรีไฮบริไดซ์โดยใส่เมมเบรนในกระบอกไฮบริไดซ์แล้วเติม working solution (5X Denhardt, 5X SSC, 1% SDS) 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55°C ซึ่งเป็นค่า Tm-8°C ที่คำนวณมาจาก GC content ของดีเอ็นเอติดตาม

(Tm=4(G+C)+2(A+T)) เป็นเวลานานกว่า 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นเท working solution ในกระบอกออกแล้วเติม working solution 5 มิลลิลิตร ดีเอ็นเอของปลาแซลมอลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ถูกต้มที่ 90 °C เป็นเวลา 10 นาที 25 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลากแล้ว 50 ไมโครลิตร เข้าไปแทนที่ ปิดฝากระบอกไฮบริไดซ์ให้สนิทนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลานานกว่า 20 ชั่วโมง นำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วย washing solution (6X SSC, 0.5% SDS) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งที่ 4 ล้างที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 90 วินาที ติดตามด้วยการล้างในสารละลาย 2XSSC 1 ครั้ง วางแผ่นเมมเบรน ที่ล้างเสร็จแล้วลงบนกระดาษ Whatman 3MM รอให้แผ่นเมมเบรนแห้งก่อนนำไปทำออโตเรดิโอกราฟ

3.5.6 การทำออโตเรดิโอกราฟ

นำเมมเบรนที่ผ่านการไฮบริไดซ์แล้วมาติดบนกระดาษกรอง Whatman 3MM ขนาดเท่ากับพื้นที่ด้านในของกล่องประกบฟิล์ม (cassette) โดยให้ด้านที่มีดีเอ็นเอหงายขึ้นคลุมทับด้วยแผ่นพลาสติกบางๆ วางไว้ในกล่องประกบฟิล์มแล้วนำไปประกบด้วย X-ray ฟิล์มในห้องมืดโดยวางแผ่นฟิล์มทาบลงบนแผ่นเมมเบรนปิดกล่องให้สนิทไม่ให้แสงผ่าน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 3-7 วัน นำฟิล์มออกมาล้างในห้องมืดโดยเปิดกล่องดึงเฉพาะฟิล์มออกมาแช่ในสารละลาย developer เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เกิดแถบสีดำขึ้นบนแผ่นฟิล์มแล้วล้างแผ่นฟิล์มใน น้ำกลั่น 1 ครั้ง ก่อนแช่ในสารละลาย fixer ประมาณ 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ developer ล้างฟิล์มอีกครั้งด้วยน้ำประปา หลังจากแผ่นฟิล์มแห้งแล้วจึงตรวจดูความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอบนแผ่นฟิล์ม

3.6 การทำ PCR เพื่อหาชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศ

3.6.1 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ

นำโครโมโซมัลดีเอ็นเอเต่าตนุที่สกัดได้จากข้อ 3.3 มาเจือจางด้วย TE buffer ให้มีความเข้มข้นประมาณ 100 - 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตรวจปริมาณดีเอ็นเอโดยเทียบความเข้มของการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอของ λ/*Hin*d III marker หลังทำอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

3.6.2 การเตรียมดีเอ็นเอไพรเมอร์

นำดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองคือชิ้นดีเอ็นเอ GATA repeat จำนวน 21 เบส มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 3 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

3.6.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศในเต่าตนุโดยการทำ PCR

นำโครโมโซมัลดีเอ็นเอของเต่าตนุที่ทราบเพศแล้วจำนวน 8 ตัว มาทำการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอแล้วให้ความแตกต่างระหว่างเพศโดยผสมสารต่างๆ ในปฏิกิริยาให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl) 2.5 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ 2.5 ไมโครลิตร 10 mM dNTP 2 ไมโครลิตร 3 μM ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 4 ไมโครลิตร 100 - 500 ng/μl ดีเอ็นเอตัวอย่าง 1.0 - 2.0 ไมโครลิตร 5 U/μl *Taq* polymerase 0.125 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีปริมาตรรวมเป็น 25 ไมโครลิตร ทดลองหาภาวะในการทำ PCR (reaction condition) โดยใช้อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที เพื่อเริ่มทำให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยวให้สมบูรณ์แล้วเข้ารอบการทำ PCR โดยเริ่มด้วยการทำให้ดีเอ็นเอเต่าตนุแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) ที่อุณหภูมิ 92 °C เป็นเวลา 90 วินาที สำหรับภาวะในการทำให้ดีเอ็นเอไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอ

ของเต่าตนุ (annealing) ทดลองใช้ 6 ภาวะ คือ 1) ที่อุณหภูมิ 53 °C 2) ที่อุณหภูมิ 51 °C 3) ที่อุณหภูมิ 49 °C 4) ที่อุณหภูมิ 47 °C 5) ที่อุณหภูมิ 45 °C และ 6) ที่อุณหภูมิ 43 °C เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นเข้าสู่ภาวะการต่อสายดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำ 37 รอบ ทำการต่อสายดีเอ็นเอครั้งสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที เพื่อต่อปลายสายดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ให้สมบูรณ์ นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.6% ความยาว 12.5 เซนติเมตร ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง

3.7 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศของเต่าตนุ

3.7.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศของเต่าตนุ

นำตัวอย่างโครโมโซมัลดีเอ็นเอของเต่าตนุมาทำ PCR โดยใช้ภาวะเดียวกันกับภาวะที่ได้ชิ้นดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์เฉพาะในเต่าตนุเพศใดเพศหนึ่ง นำดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์มาแยกโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ low-melting agar เข้มข้น 1.25% ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 6-7 ชั่วโมง ตัดชิ้นอะกาโรสเจลตรงตำแหน่งที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแยกเก็บใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์นำชิ้นอะกาโรสมาชั่งน้ำหนักแล้วเติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 2-3 เท่าของชิ้นอะกาโรส จากนั้นนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 65 °C จนกระทั่งชิ้นอะกาโรสละลายหมด ทำการสกัดโปรตีนต่างๆ ออกด้วยสารละลายฟีนอล pH 7.5 1 ครั้ง สารละลายผสมฟีนอล:คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1:1 1 ครั้ง แล้วจึงสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 1 ครั้ง จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมโซเดียมคลอไรด์ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2 N และเติมแอบโซลูทเอทานอล ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอแล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 15 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลาย เอทานอลเข้มข้น 70%

ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้ง ดูดสารละลายทิ้งตากตะกอนให้แห้งหมาดๆ นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาละลายใน TE buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตรวจปริมาณดีเอ็นเอโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับ λ/*Hin*d III marker เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.7.2 การเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการปริมาณ 100 นาโนกรัม มาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ (vector DNA) pGEM-T Easy (Promaga) (ภาคผนวกที่ 3) โดยผสมสารต่างๆ ดังนี้ 10X T_4 DNA ligase buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 4 U/µl T_4 DNA ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 50 ng/µl ดีเอ็นเอพาหะปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 50 - 100 ng/µl ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการปริมาตร 5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรครบ 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 16 - 24 ชั่วโมง ทำ positive control เทียบโดยเติมดีเอ็นเอควบคุมเข้มข้น 4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตรแทนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจประสิทธิภาพการเชื่อมด้วยการทำอะกาโรส - เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.7.3 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์

เขี่ยเชื้อ *E. coli* JM 109 โคโลนีเดี่ยวจากจานเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar (1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract , 1% NaCl, pH 7.5) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงโดยเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ที่ความเร็ว 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน เทเชื้อจาก อาหารเลี้ยงเชื้อ LB 1 มิลลิลิตร ลงในขวดเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ L-broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ความเร็ว 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อจะมีค่า OD_{600} = 0.5-0.8 นำเชื้อมาแช่ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อ นำอาหารเลี้ยงเชื้อ L-broth มาปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 4,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร 1 ครั้ง และ

ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 1 ครั้ง นำตะกอนเซลล์มาล้างในสารละลายกลีเซอรอลเข้มข้น 10% จำนวน 2 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ละลายตะกอนเซลล์ในสารละลายกลีเซอรอลเข้มข้น 10% ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร แล้วจึงแบ่งตะกอนเซลล์เก็บในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 500 ไมโครลิตร หลอดละ 40 ไมโครลิตร เก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนถึงเวลาใช้

3.7.4 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยการใช้กระแสไฟฟ้า (Dower *et. al.*, 1982)

นำดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) ที่ได้จากข้อ3.7.2 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) *E. coli* JM 109 ซึ่งถูกเตรียมให้อยู่ในสภาพคอมพีเทนต์เซลล์จากข้อ 3.7.3 โดยเปิดเครื่อง Gene pulser (BIO-RAD Laboratories) ตั้งกระแสไฟฟ้าไว้ที่ 2.5 กิโลโวลต์ ก่อนการใช้งานเป็นเวลา 10-15 นาที นำคิวเวตแท่งวางคิวเวตและคอมพีเทนท์เซลล์แช่ไว้ในน้ำแข็งเพื่อให้เครื่องมือเย็นและคอมพีเทนท์เซลล์ค่อยๆ ละลายอย่างช้าๆ เมื่อทุกอย่างพร้อมจึงเติมดีเอ็นเอลูกผสมปริมาตร 1-5 ไมโครลิตร (มีดีเอ็นเอประมาณ 10 นาโนกรัม) ลงในคอมพีเทนท์เซลล์ 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อขึ้นมาใส่ในคิวเวตทำให้เซลล์ลงไปอยู่ก้นคิวเวตแล้ววางคิวเวตบนแท่นวาง เลื่อนแท่นวางเข้าไปให้คิวเวตตรงกับขั้วไฟฟ้า กดปุ่มเพื่อให้กระแสไฟผ่านเป็นเวลา 4-5 วินาที ซึ่งเมื่อกระแสไฟผ่านเสร็จสมบูรณ์เครื่องส่งเสียงสัญญาณเตือน ให้ถอนมือจากปุ่มและเลื่อนแท่นวางคิวเวตออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในคิวเวต ถ่ายเอาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียกระจายอยู่ขึ้นมาใส่หลอดเลี้ยงเชื้อ นำเชื้อไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็วต่ำๆ เป็นเวลา 90 นาที คัดเชื้อบน X-gal plate ซึ่งเป็นอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน IPTG และ X-gal เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน คัดเชื้อที่มีโคโลนีสีขาวมาทำ replica plating โดยย้ายเชื้อมาลงบน X-gal plate 2-3 ซ้ำ เพื่อเก็บไว้ใช้ (stock) เก็บไว้ที่ 4 °C หลังจากเลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 คืน

3.7.5 การคัดเชื้อที่มีดีเอ็นเอลูกผสม

นำเชื้อที่ให้โคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี minipreparation (Dillon, Nasim and Neatmenn, 1985) โดยเทเชื้อใส่ไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 5,000 xg เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเหลว LB ทิ้งแล้วเติม solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 5 mg/ml Lysozyme) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายเซลล์ด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม solution II (1 % SDS, 0.2 N NaOH) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ จนได้สารละลายใสตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายโซเดียมอะซิเทต pH 4.8 เข้มข้น 3 M ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้สารเข้ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอซึ่งจะมองเห็นเป็นสีขาวขุ่น ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 15 นาที เพื่อให้สารทำปฏิกิริยากันได้อย่างสมบูรณ์ ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำมาสกัดโปรตีนออกด้วยฟีนอล 1 ครั้ง สกัดด้วยสารละลายผสมฟีนอลต่อคลอโรฟอร์มอัตราส่วน 1:1 1 ครั้ง นำส่วนน้ำชั้นบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอบโซลูทเอทานอลแช่ที่ -80 °C เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเก็บตะกอนที่ความเร็ว 10,000 xg เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% ตากตะกอนให้แห้งหมาดๆ ละลายตะกอนในสารละลาย TE : RNAase อัตราส่วน 1000 : 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตรวจดีเอ็นเอลูกผสมโดยการย่อยดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I ซึ่งจะตัดส่วนของดีเอ็นเอลูกผสม 2 ตำแหน่ง โดยแยกเอาชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ออก ตรวจขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยทำอะกาโรสเจล - อิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับ λ/*Hin*d III marker

I17986552