บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ *Malassezia furfur* CBS 1878^{T} (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands) และ *Escherichia coli* DH5α ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Susumu Kajiwara แห่งมหาวิทยาลัย Tokyo Institute of Technology ประเทศญี่ปุ่น

อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

1) YPD-Tween agar
2) YPD-Tween broth
3) IM agar
4) IM broth
5) LB agar
6) LB broth

สารเคมี

1) Yeast extract
2) Bacto peptone
3) D-glucose
4) Tween 60
5) Ethanol
6) NaCl

7) Tryptone
8) Glycine
9) $MgSo_4 \cdot 7H_2O$
10) KH_2PO_4
11) Agar
12) Ampicillin
13) Glass beads (450-600 µm, Sigma, USA)
14) Tris-HCl pH 8.0
15) Ethylenediaminetetraacetic acid
16) Phenol
17) Chloroform
18) Agarose
19) 2X Taq Master Mix (Vivantis, Malaysia)
20) 50X TAE buffer (Vivantis, Malaysia)
21) UltraPower™ DNA stain (Syngene)
22) ViSafe red Gel Stain (Vivantis, Malaysia)
23) 6X Loading dye (Vivantis, Malaysia)
24) VC DNA Ladder (Vivantis, Malaysia)
25) GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
26) TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc., USA)
27) ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Toyobo, Japan)
28) T4 DNA ligase (Vivantis, Malaysia)
29) pTG19-T cloning vector (Vivantis, Malaysia)
30) *Bam*HI (Vivantis, Malaysia)
31) *Hind*III (Vivantis, Malaysia)
32) Deionized water

เครื่องมือและอุปกรณ์

1) Incubator
2) Shaking incubator
3) Inoculating loop
4) Autoclave
5) Digital balance
6) Laminar air flow hood
7) Vortex
8) Centrifuge
9) Microcentrifuge
10) Water bath
11) Digital heat block
12) Spatula
13) Flask
14) Beaker
15) Cylinder
16) Alcohol burner
17) Vial tubes
18) Micropipettes and tips
19) Eppendorf tube
20) Electrophoresis chamber (Biometra, Germany)
21) Power supply device
22) Gel documentation system (Biorad, USA)
23) Microwave machine
24) Refrigerator
25) Deep freezer (-80°C)
26) Spectrophotometer (Biorad, USA)
27) Microplate Reader (BioTek, Germany)
28) PCR Thermal Cycler (Biometra, Germany)
29) Computer

ไพรเมอร์

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบ cDNA

Primers	Sequences (5’ to 3’)	Tm (°C)	Annealing temperature (°C)
βtub-F2	AGGGGCTTCCAGATCACTCACT	59	55
βtub-R2	GTCCTGGATAAAGAAGAGCACATT	54	55

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์สำหรับ cDNA-RAPD

Primers	Sequences (5’ to 3’)	Tm (°C)	Annealing temperature (°C)
OPT-01	GGGCCACTCA	39	44
OPT-02	GGAGAGACTC	28.9	37
OPT-03	TCCACTCCTG	32.2	37
OPT-04	CACAGAGGGA	32.2	37
OPT-05	GGGTTTGGCA	35.8	40
OPT-06	CAAGGGCAGA	34.1	40
OPT-07	GGCAGGCTGT	40.3	44
OPT-08	AACGGCGACA	39	44
OPT-09	CACCCCTGAG	35.1	40
OPT-10	CCTTCGGAAG	31.4	37
OPT-11	TTCCCCGCGA	42.6	44
OPT-12	GGGTGTGTAG	30.5	37
OPT-13	AGGACTGCCA	36	40
OPT-14	AATGCCGCAG	37.1	40
OPT-15	GGATGCCACT	34.2	40
OPT-16	GGTGAACGCT	35.7	40
OPT-17	CCAACGTCGT	35.9	40
OPT-18	GATGCCAGAC	32.1	37
OPT-19	GTCCGTATGG	31	37
OPT-20	GACCAATGCC	33.1	37

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การ pre-culture เชื้อ *M. furfur*

นำเชื้อ *M. furfur* ประมาณ 1 loop ลงในอาหาร YPD-Tween broth ปริมาตร 3 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นระยะเวลา 2 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโต จากนั้นนำเชื้อไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 12000 rpm ระยะเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส (supernatant) เติมน้ำกลั่น 1 ml เพื่อล้างอาหารเดิมออก ทำซ้ำ 2 รอบ แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 600 nm

2. การเลี้ยงเชื้อ *M. furfur* เพื่อให้เจริญเป็นยีสต์และสายรา

นำเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1. ลงในฟลาสก์ที่มีอาหาร IM broth และ YPD-Tween broth สำหรับกระตุ้นให้เชื้อเจริญเป็นสายราและยีสต์ ตามลำดับ ปรับค่า OD เริ่มต้นที่ 0.05 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นระยะเวลา 6 วัน ตรวจสอบการสร้างสายราด้วยการดูภาพจากใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 630X

3. การสกัด total RNA และ reverse transcription

ในสกัด total RNA เริ่มจากการเก็บเซลล์จากแต่ละชุดการทดลอง นำเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และนำเซลล์ที่ได้ไปผสมกับน้ำยา TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc., USA) และปั่นให้เซลล์แตกด้วย acid free glass beads (Sigma, USA) โดยทำตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ หลังจากนั้นนำ total RNA ที่ได้เป็นแม่พิมพ์เพื่อสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ต่อ ด้วยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ของชุด Kit ของ ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Toyobo, Japan) โดยทำตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ เก็บรักษา cDNA ที่สังเคราะห์ได้ที่ -20°C เพื่อนำไปใช้เป็นแม่พิมพ์สำหรับการทำ cDNA-RAPD ต่อไป

4. การตรวจสอบ cDNA

ในการตรวจสอบปริมาณของ cDNA ที่สังเคราะห์จาก RNA ที่สกัดได้ของแต่ละชุดการทดลอง ใช้วิธีการตรวจสอบจาก housekeeping gene ใช้ beta-tubulin ของ *M. furfur* CBS 1878^{T} (GenBank, accession number KC573799) เป็น reference gene ใช้ไพรเมอร์ βtub-F2 และ βtub-R2 ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีน beta-tubulin ของ *M. furfur* ผสม reaction reagent

เข้าด้วยกันตามตารางที่ 3.3 นำไปเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ด้วยเครื่อง thermal cycler ตั้งโปรแกรมเครื่องตามตารางที่ 3.4

ตรวจสอบชิ้นส่วน DNA ที่ได้จาก PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ตัวอย่างจาก RT-PCR ปริมาตร 5 µl ผสมกับ loading dye 1 µl และ UltraPower™ DNA stain 1 µl หยดลงในช่องของ 1% agarose gel แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ electrophoresis chamber ใช้ความต่างศักย์ที่ 70 V ใน 1X TAE buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำ agarose gel ไปตรวจผลภายใต้แสง UV โดยบันทึกผลด้วยเครื่อง Gel documentation

ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบ cDNA

สารเคมี	ปริมาตร (µl)
Taq Master mixed (2x)	5
βtub-F2 primer (10 µM)	1
βtub-R2 primer (10 µM)	1
cDNA (1/20x)	1
น้ำกลั่น	2
รวม	10

ตารางที่ 3.4 ขั้นตอน PCR เพื่อตรวจสอบ cDNA

Step	Temperature (°C)	Time	Cycles
Initial denaturation	95	2 min	1
Denaturation	95	30 sec	
Annealing	55	30 sec	30
Extension	72	1 min	
Final extension	72	5 min	1
Cooling	16	10 min	1

5. การทำ cDNA-RAPD

นำ cDNA ที่ได้จากการ reverse transcription ในข้อ 4. มาทำ cDNA-RAPD โดยใช้ random primer ชนิดต่าง ๆ จำนวน 20 ไพรเมอร์ (ตาราง 3.2) ผสม reaction reagent เข้าด้วยกัน

ตามตารางที่ 3.5 นำไปเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้เทคนิค PCR ด้วยเครื่อง thermal cycler ตั้งโปรแกรมเครื่องตามตารางที่ 3.6

ตรวจสอบชิ้นส่วน DNA ที่ได้จาก PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ตัวอย่างจาก RT-PCR ปริมาตร 20 µl ผสมกับ loading dye 6 µl และ UltraPower™ DNA stain 3 µl หยดลงในช่องของ 1% agarose gel แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ electrophoresis chamber ใช้ความต่างศักย์ที่ 70 V ใน 1X TAE buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำ agarose gel ไปตรวจผลภายใต้แสง UV โดยบันทึกผลด้วยเครื่อง Gel documentation

ตารางที่ 3.5 ส่วนผสมในการทำ cDNA-RAPD

สารเคมี	ปริมาตร (µl)
Taq Master mixed (2x)	15
Random primer (10 µM) (ตารางที่ 3.2)	3
cDNA (1/20x)	1
น้ำกลั่น	11
รวม	30

ตารางที่ 3.6 ขั้นตอน PCR สำหรับ cDNA-RAPD

Step	Temperature (°C)	Time	Cycles
Initial denaturation	95	2 min	1
Denaturation	95	30 sec	45
Annealing	ตามตารางที่ 3.2	30 sec	
Extension	72	1 min	
Final extension	72	5 min	1
Cooling	16	10 min	1

6. การสกัดชิ้นส่วน DNA จาก agarose gel

นำ agarose gel ที่ได้จากขั้นตอนที่ 5. มาตัดแถบ DNA ที่ต้องการใส่ลงไปใน microcentrifuge tube หลังจากนั้นนำเจลที่ได้มาสกัด DNA ด้วยชุด kit ของ GF-1 ambiclean Kit (PCR & Gel) (Vivantis, Malaysia) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ

7. การโคลนชิ้นส่วน DNA

นำ DNA ที่สกัดได้จากข้อ 6. เชื่อมเข้ากับ cloning vector (pTG19-T) (Vivantis, Malaysia) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase (Vivantis, Malaysia) โดยใช้ส่วนผสมดังตารางที่ 3.7 บ่มที่อุณหภูมิ 16 °C ระยะเวลา 12 ชั่วโมง

นำ recombinant DNA ที่ได้ ปริมาตร 10 µl มาผสมกับ competent cell (*E. coli* DH5α) ปริมาตร 100 µl แล้วนำไปทำ transformation ด้วย heat shock method นำเชื้อ *E. coli* DH5α ที่ทำ transformation แล้วในอาหาร LB agar ที่มี ampicillin (100 µg/ml) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ระยะเวลา 16 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.7 ส่วนผสมในการโคลนชิ้นส่วน DNA

สารเคมี	ปริมาตร (µl)
DNA fragment	6
10X buffer ligase	1
T4 DNA ligase	1
pTG19-T vector	2
รวม	10

8. DNA sequencing

จิ้ม colony ที่ปรากฏบนอาหาร LB agar ที่มี ampicillin จากขั้นตอนที่ 7 ด้วยไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อ นำไปเลี้ยงใน LB broth ปริมาตร 2 ml ที่มี ampicillin (100 µg/ml) บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ระยะเวลา 16 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 150 rpm หลังจากนั้นจึงนำมาสกัด plasmid ด้วย GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, USA) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ

ส่ง plasmid DNA ที่ได้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st BASE (Malaysia) หลังจากได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) แล้ว นำข้อมูลไปวิเคราะห์ค้นหาความเหมือนหรือความแตกต่าง (identity and similarity) ของ sequence ที่ต้องการเทียบกับ sequence ที่มีอยู่ใน database ด้วยโปรแกรม blastn และ blastx (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)