บทที่ 2

วิธีการทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 เครื่องมือที่ใช้

เครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 20 บริษัท Bausch & Lomb

เครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 2000 บริษัท Bausch & Lomb

เครื่องบันทึกการดูดแสง Shimadzu UV-240

เครื่องวัดความขุ่น Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter บริษัท Arthur H. Thomas company

เครื่องปั่นแรงสูง Beckman Model J 21 C

เครื่องปั่นแรงสูงอุลตรา (Ultra Centrifuge) L 8-70 บริษัท Beckman

เครื่องปั่นแอพเพนดอฟ (Eppendrof Centrifuge) TOMY MC-15A

เครื่องปั่นความเร็วต่ำของ International Equipment

เครื่องเขย่าซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ (Shaking water bath, Aquatherm บริษัท New Brunswick Scientific

เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (Water bath) Model SCB IV Thermo Bath

เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Incubater) บริษัท Heraeus

เครื่องทำลายเซลล์ (French Pressure Cell Press) บริษัท American Instrument company

เครื่องป้อนพลังงาน (Power Supply)

อุปกรณ์อิเลคโตรโฟรีซีส

UV transilluminator บริษัท UVP

กล้องถ่ายรูป Pentax super A Soft case 32650

พร้อมฟิล์มขาวดำ Kodak Tri-X Pan

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1013228

ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipett) ของ Pipetman

ตู้แล่งอุลตราไวโอเลตสำหรับการกลายพันธุ์

2.1.2 เคมีภัณฑ์

ก. สารเคมี

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเกรดวิเคราะห์

ข. เอนไซม์

เอนไซม์เรสตริกชัน ของบริษัท Amersham

เอนไซม์ไลเกส ของบริษัท Amersham

เอนไซม์อื่น ๆ ของบริษัท Sigma

2.2 พลาสมิดดีเอนเอและดีเอนเอมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 พลาสมิดดีเอนเอ

พลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 (Yasuda และ Takagi, 1983) ขนาดประมาณ 9.5 Kb เป็น runaway replication plasmid มียีนต้าน Kanamycin

พลาสมิดดีเอนเอ pBR 322 (Maniatis และคณะ, 1982) ขนาดประมาณ 4.3 Kb มียีนต้าน Tetracycline และ Amplicillin

2.2.2 ดีเอนเอมาตรฐาน

ดีเอนเอของ λ Clindlts 857 Sam 7 ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย Hind III ได้ชิ้น DNA 8 ขนาดคือ 23.130, 9.416, 6.682, 4.361, 2.322, 2.027, 0.564 และ 0.125 Kb. ตามลำดับ (Rodriguez and Tait, 1983)

2.3 การเก็บรักษาดีเอนเอที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายและภาชนะที่ใช้เก็บ DNA ต้องปราศจาก DNase การเก็บรักษาดีเอนเอที่ใช้ในการทดลองนี้มี 2 วิธีคือ

2.3.1 การเก็บรักษาระยะสั้น ละลายดีเอนเอในบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ.

2.3.2 การเก็บรักษาระยะยาว เก็บตะกอนแห้งของดีเอนเอที่อุณหภูมิ -20°ซ. เมื่อต้องการใช้ นำดีเอนเอมาละลายในบัฟเฟอร์ TE

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง แสดงในตารางที่ 1

2.4.1 Escherichia coli ATCC 11105 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จาก American Type Culture Collection สามารถสร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้

2.4.2 Escherichia coli HB 101 และ C 600 เป็นสายพันธุ์ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าเรือนสำหรับการทรานสฟอร์มพลาสมิด

2.4.3 Escherichia coli Q_{69}, R_9 และ S_5 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างได้จากการวิจัยนี้

2.4.4 Serratia marcescens ATCC 27117 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จาก American Type Culture Collection ใช้ทดลองเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยอาศัยคุณสมบัติการสามารถถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วย 6-APA

2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.5.1 LB-medium (Luria-Bertani) (Luria และคณะ, 1960) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้ออุดม (rich medium) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tryptone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม
วิตามิน บี 1	5	มิลลิกรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ถ้าเป็นอาหารแข็งเติม Bacto-agar 15 กรัมต่อลิตร

2.5.2 By-medium (Mayer และคณะ, 1980) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้ออุดมในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef Extract	5	กรัม
Yeast Extract	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

จุลินทรีย์	สายพันธุ์	Relevant Phenotype	เอกสารอ้างอิง
Escherichia coli	ATCC 11105	Pen G^r, PAA^+, λ^-, P_1^-, $Tn\ 5^-$, $Tn\ 10^-$ (Wild Type)	ในการวิจัยนี้
	HB 101	F^-, had S 20 (r_B^-, m_B^-), rec A 13, ara-14, pro A 2, lac Y 1, gal K 2, rps L 20 (Sm_r), Xyl-5, mtl-1, Sup E 44, λ^-	Boyer และ Roulland-Dussoix, 1969; Bolivar และ Backman, 1979
	C 600	F^-, thi-1, thr-1, leu B 6, lac Y^+, ton A 21, Sup E 44, λ^-	Appleyard และคณะ, 1954
	Q_{69}	HB 101 (pJR 69)	ในการวิจัยนี้
	R_9	C 600 (pJR 69)	ในการวิจัยนี้
	S_5	HB 101 (pJR 69)	ในการวิจัยนี้
Serratia marcescens	ATCC 27117	Pen G^r, 6-APA	Mevootisom และคณะ, 1983

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล

2.5.3 Minimum medium (MM) (Self และคณะ, 1969) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	7	กรัม
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	3	กรัม
อัมโมเนียมซัลเฟต	1	กรัม
โซเดียมซีเตรท	1	กรัม
โมโนโซเดียมกลูตาเมท	1	กรัม
เฟอริกคลอไรด์	10	มิลลิกรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	200	มิลลิกรัม
วิตามิน บี 1	5	มิลลิกรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ถ้าเป็นอาหารแข็งเติม Bacto-agar 15 กรัมต่อลิตร

2.5.4 Nutrient soft agar (Oostendorp, 1972) ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 1 ลิตร ประกอบด้วย

Peptone	6	กรัม
Yeast Extract	2	กรัม

เติม Bacto-agar 6 กรัมต่อลิตร

2.5.5 SOB-medium (Hamahan และคณะ, 1983) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียม competent cell ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tryptone	20	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	มิลลิโมลาร์
โปแตสเซียม คลอไรด์	25	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียม คลอไรด์	10	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียม ซัลเฟตต์	10	มิลลิโมลาร์

วิตามิน บี 1	5	มิลลิกรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล

2.6 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.6.1 การเก็บรักษาระยะสั้น

ก. Slant LB-agar ใช้สำหรับการเก็บเชื้อทั่วไป บรรจุอยู่ในภาชนะที่เป็นขวด (vial) ซึ่งอุดด้วยพาราฟินเหลว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ.

ข. Plate LB-agar เสริม Kanamycin 50 µg/ml เป็นจานแม่ (Master plate) สำหรับแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pSY 343, เสริม Ampicillin 50 µg/ml เป็นจานแม่สำหรับแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pBR 322, เสริม PAA 0.1 เปอร์เซนต์ และ Penicillin G 100 µg/ml เป็นจานแม่สำหรับ E. coli ATCC 11105, เสริม Penicillin G 200 µg/ml เป็นจานแม่สำหรับ transformant และมิวแตนท์ที่ได้จากการทดลอง

2.6.2 การเก็บรักษาระยะยาว ใช้สำหรับเก็บเชื้อทุกชนิด โดยเจริญเชื้อในอาหารอุดม LB แล้วเก็บเชื้อโดยผสมกับกลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์ในขวด (vial) ซึ่งอุดด้วยพาราฟินเหลว เก็บไว้ที่ -20°ซ

2.7 การเตรียมสารละลาย

2.7.1 บัฟเฟอร์ TE (Maniatis และคณะ, 1982) ใช้สำหรับละลายดีเอนเอ ประกอบด้วย

Tris-HCl	10	มิลลิโมลาร์
Na_2EDTA	1	มิลลิโมลาร์

ปรับ pH ให้เป็น 8.0

2.7.2 สารละลายไอโอดีน (Sykes และ Nordstrom, 1972) ใช้สำหรับทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมส โดยวิธี Microiodometric test ประกอบด้วย

ไอโอดีน	0.1	โมลาร์
โปแตสเซียมไอโอไดด์	0.4	โมลาร์

2.7.3 สารละลายแป้ง-ไอโอดีน (Sykes และ Nordstrom, 1972) ใช้สำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส ประกอบด้วย

soluble starch 0.2 กรัม ละลายในโปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 จำนวน 100 มิลลิลิตร

ไอโอดีน 0.08 โมลาร์ ละลายในโปแตสเซียมไอโอไดด์ 3.2 โมลาร์ จำนวน 0.15 มิลลิลิตร

2.7.4 บัฟเฟอร์ SET (Rodriguez และ Tait, 1983) ใช้ในขั้นตอนการสกัดโครโมโซมของแบคทีเรีย ประกอบด้วย

ซูโครส	20	เปอร์เซนต์
Tris-HCl	50	มิลลิโมลาร์
Na_2EDTA	50	มิลลิโมลาร์

ปรับ pH ให้เป็น 7.6

2.7.5 บัฟเฟอร์ RNase (Rodriguez และ Tait, 1983) ใช้ในขั้นตอนการสกัดโครโมโซมของแบคทีเรีย ประกอบด้วย

โซเดียมอะซีเตท	0.1	โมลาร์
Na_2 EDTA	0.4	มิลลิโมลาร์
RNase	10	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 4.8

2.7.6 บัฟเฟอร์ TEN (Rodriguez และ Tait, 1983) ใช้ละลายโครโมโซมของแบคทีเรีย ประกอบด้วย

Tris-HCl	10	มิลลิโมลาร์
Na_2-EDTA	1	มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	10	มิลลิโมลาร์

ปรับ pH ให้เป็น 7.6

2.7.7 tracking dye (Maniatis และคณะ, 1982) ใช้สำหรับผสมกับดีเอนเอก่อนทำอิเลคโตรโฟรีซีส ประกอบด้วย

Bromphenol blue	0.1	เปอร์เซ็นต์
Ficoll	40	เปอร์เซ็นต์
Na_2 EDTA	5	มิลลิโมลาร์

2.7.8 บัฟเฟอร์ Tris-borate (Maniatis และคณะ, 1982) เป็น running buffer ของการทำอีเลคโตรโฟรีซีส ประกอบด้วย

Tris-HCl	89	มิลลิโมลาร์
Boric acid	89	มิลลิโมลาร์
Na_2 EDTA	2.5	มิลลิโมลาร์

ปรับ pH ให้เป็น 8.3

2.7.9 Elution buffer (Dretzen และคณะ, 1981) ใช้สำหรับชะดีเอนเอจาก DEAE-cellulose paper ประกอบด้วย

Tris-HCl	20	มิลลิโมลาร์
Na_2 EDTA	1	มิลลิโมลาร์
Arginine	50	มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	1.5	โมลาร์

ปรับ pH ให้เป็น 7.5

2.7.10 บัฟเฟอร์ TFB (Hamahan และคณะ, 1983) ใช้ในขั้นตอนของการเตรียม competent cell โดยวิธี DMSO-treated method ประกอบด้วย

Z-N-Morpholinoethane sulfonic acid	10	มิลลิโมลาร์
โปแตสเซียมคลอไรด์	100	มิลลิโมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์	45	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์	10	มิลลิโมลาร์
Hexamine Cobalt (III) chloride	3	มิลลิโมลาร์

ปรับ pH ให้เป็น 6.3

2.7.11 สารละลาย Lowry (Lowry และคณะ, 1951) ใช้สำหรับหาปริมาณโปรตีน ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ในโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จำนวน 100 มิลลิลิตร

คอปเปอร์ซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตต 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 มิลลิลิตร

2.8 การศึกษาการเจริญของเชื้อ

2.8.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีจากจานแม่ (master plate) ลงในอาหารอุดม ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองเอเสนเมเยอร์ ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มที่ 30°ซ. 15 ชั่วโมง นำเชื้อตั้งต้นมาล้างหนึ่งครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วกระจายเชื้อด้วยสารละลายเดียวกันในปริมาตรเดิม

2.8.2 การเลี้ยงเชื้อและวัดการเจริญของเชื้อ

ใส่เชื้อตั้งต้นลงในอาหารที่ต้องการด้วยอัตราส่วนระหว่างเชื้อต่ออาหารเท่ากับ 1:50 โดยอาหาร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ ชนิดมีแขนข้าง ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี บ่มเชื้อในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิตามต้องการ เขย่าด้วยความเร็ว 150-200 รอบต่อนาที เมื่อเชื้อเจริญถึงเวลาที่ต้องการ วัดการเจริญของเชื้อโดย :

ก. วัดความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่อง Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter มีหน่วยเป็น Klett unit

ข. นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยการเจือจางเชื้อด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วกระจายเชื้อบนอาหารแข็ง LB บ่มที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง จึงนับจำนวนโคโลนี

ค. หาน้ำหนักเปียกของเซลล์ โดยปั่นเซลล์ด้วยความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้าง 2 ครั้งด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วชั่งน้ำหนักเปียก

2.9 การตรวจสอบแอคติวิตีเบื้องต้นของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของโคโลนีในจานเพาะเชื้อโดยวิธี Microbiological test (Meevootisom และคณะ, 1983; Oostendrop และคณะ, 1972)

เจริญแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหารแข็ง LB ที่เสริมเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี grid หรือปั๊มแบบ (Replica plating) บ่มที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง เททับด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ของ Serratia marcescens ATCC 27117 ใน nutrient soft agar ที่เสริมด้วยเพนนิซิลินจี 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีที่ผลิต PA เนื่องจาก PA จะย่อยเพนนิซิลินจีให้เป็น 6-Amino penicillanic acid ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ S. marcescens ได้ เปรียบเทียบแอคติวิตีของ PA ได้ด้วยค่า Inhibition zone indices คืออัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสกับเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง

2.10 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส

2.10.1 วิธีของ Szewezuk (Szewezuk และคณะ, 1980)

ก. วิธีเตรียมเซลล์เพื่อวัดแอคติวิตี

ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 80 มิลลิโมลาร์ pH 7.8 กระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์เดิม ปริมาตรเท่าเดิม

ข. วิธีสังเคราะห์ PAAB (Szewezuk และคณะ, 1980)

การสังเคราะห์ PAAB ทำได้โดยผสม 4-aminobenzoic acid 6.85 กรัมใน 2 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 25 มิลลิลิตร และอะซีโตน จำนวน 25 มิลลิลิตร และอะซีโตน จำนวน 25 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เติม Phenyl acetyl chloride จำนวน 6.4 มิลลิลิตร ทีละหยดในขณะที่ควบคุมอุณหภูมิให้เป็น 0°ซ. และปรับ pH ให้มากกว่า 8 ตลอดเวลา

จากนั้นตกตะกอนโดยการเติม กรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มอลจำนวน 200 มิลลิลิตร แล้วกรองตะกอนเก็บไว้ นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนซ้ำอีก 2 ครั้ง อบตะกอนให้แห้งที่ 50°ซ.

นำตะกอนอบแห้งมาละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 นอร์มอลกับเอทานอล 20 เปอร์เซนต์ จำนวน 30 มิลลิลิตร แล้วตกตะกอนใหม่ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มอล จำนวน 50 มิลลิลิตร กรองตะกอนแล้ว ทำซ้ำเดิมอีก 2 ครั้ง อบตะกอนให้แห้งที่ 50°ซ.

นำไปหาจุดหลอมเหลว จะอยู่ในช่วง 256-259°ซ. มีน้ำหนักโมเลกุล 255

ค. วิธีวัดแอคติวิตีของ PA

ผสมเซลล์ 0.1 มิลลิลิตร กับ PAAB 2.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 80 มิลลิโมลาร์ pH 7.8 จำนวน 0.4 มิลลิลิตร บ่มที่ 46°ซ. 10 นาที เพื่อให้ PA ย่อย PAAB ได้เป็น p-Amino benzoic acid (PABA)

วัดปริมาณ PABA ด้วยปฏิกริยา Diazotization โดยการเติมสารละลายที่เตรียมใหม่ของโซเดียมไนตรัส 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในกรดอะซิติก 0.25 โมลาร์ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จะเกิดสารประกอบซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยา coupling ได้เมื่อเติมสารละลายที่เตรียมใหม่ของ 1-amino-8-hydroxy-naphthalene-3,6-disultonic acid (H-acid) 10 มิลลิโมลาร์ ในโซเดียมคาร์บอเนต 0.66 นอร์มอล จำนวน 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที จะเกิดสารประกอบสีแดง

ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 6500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสวัดการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ PABA

2.10.2 วิธีของ Balasingham (Balasingham, 1972)

ก. วิธีเตรียมเซลล์เพื่อวัดแอคติวิตี

ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ กระจายเซลล์ในสารละลายเดิม โดยให้มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 0.035 กรัม (น้ำหนักเปียก) ต่อ 1 มิลลิลิตร

ข. วิธีวัดแอคติวิตีของ PA

ผสมเซลล์ 1 มิลลิลิตรกับสารละลายเพนนิซิลินจี 25 มิลลิกรัม ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.5 จำนวน 4 มิลลิลิตร เขย่าที่ 37°ซ. เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ PA ย่อย PDAB ได้เป็น 6-APA

วัดปริมาณ 6-APA โดยการปิเปตสารละลายดังกล่าว 0.5 มิลลิลิตร ผสม

กับสารละลายซึ่งประกอบด้วย PDAB 0.5 เปอร์เซนต์ในเมทธานอล 0.5 มิลลิลิตร, กรดอะซิติก 20 เปอร์เซนต์ 2 มิลลิลิตร และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 โมลาร์ จำนวน 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จะเกิดสารประกอบสีเขียวอ่อน

ปั่นเซลล์ด้วยความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวัดการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ 6-APA

2.11 การตรวจสอบแอคติวิตีเบื้องต้นของเอนไซม์ บีตา-แลคตาเมสของโคโลนีในจานเพาะเชื้อโดยวิธี Microiodometric test (Sykes และ Nordstrom, 1972)

เจริญแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหารแข็ง LB ที่เสริมแป้ง (soluble starch) 1 เปอร์เซนต์ โดยวิธี grid หรือปั๊มแบบ (Replica plating) บ่มที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง เททับด้วยสารละลายไอโอดีน (ไอโอดีน 0.1 โมลาร์, โปแตสเซียมไอโอไดด์ 0.4 โมลาร์) และเพนนิซิลินจี 20 มิลลิกรัมในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 จำนวน 3 มิลลิลิตร 10 วินาที รินสารละลายส่วนเกินทิ้ง อาหารแข็งจะเป็นสีน้ำเงินเข้มของสารประกอบแป้ง-ไอโอดีน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จะพบการฟอกจางสีรอบ ๆ โคโลนีที่ผลิตเอนไซม์ บีตา-แลคตาเมสเนื่องจากเอนไซม์ บีตา-แอคตาเมสจะย่อยเพนนิซิลินจี เกิดเป็น penicilloic acid ซึ่งสามารถดึงไอโอดีนออกจากสารประกอบแป้ง-ไอโอดีนได้

2.12 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ บีตา-แลคตาเมส (Sykes และ Nordstrom, 1972)

2.12.1 วิธีเตรียมตัวอย่างสำหรับวัดแอคติวิตี

ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 แล้วกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์เดิม จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วย French pressure Cell แล้วปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที 40 นาที แยกเอาส่วนน้ำใส (crude enzyme) มาวัดแอคติวิตีของ บีตา-แลคตาเมส

2.12.2 วิธีวัดแอคติวิตีของ บีตา-แลคตาเมส

เมื่อเอนไซม์ บีตา-แลคตาเมสย่อยเพนนิซิลินจี จะเกิดเป็น penicilloic acid ซึ่งสามารถดึงไอโอดีนจากสารประกอบแป้ง-ไอโอดีน ที่มีสีน้ำเงินเข้มให้มีสีจางลง แต่เนื่องจากการจางลงของสีอาจเกิดจากเอนไซม์ และสับสเตรท (เพนนิซิลินจี) ได้ด้วย ดังนั้น

จึงต้องทำ Enzyme และ Substrate control เพื่อเป็น back ground ด้วยดังต่อไปนี้

ก. Enzyme control ผสมสารละลายแป้ง-ไอโอดีน (soluble starch 0.2 กรัมใน 100 มิลลิลิตรของโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 กับ 0.15 มิลลิลิตรของไอโอดีน 0.08 โมลาร์ ในโปแตสเซียมไอโอไดด์ 3.2 โมลาร์) 1 มิลลิลิตร กับ โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 1.9 มิลลิลิตร และ crude enzyme 0.1 มิลลิลิตร วัดการจางลงของสีที่สัมพันธ์กับเวลา ที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร อุณหภูมิ 30°ซ. ด้วยเครื่องบันทึกการดูดแสง Shimadzu UV-240

ข. Substrate control ผสมสารละลายแป้ง-ไอโอดีน 1 มิลลิลิตร กับ เพนนิซิลินจี 0.2 มิลลิโมลาร์ 1 มิลลิลิตร และโปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 1 มิลลิลิตร วัดการจางลงของสีที่สัมพันธ์กับเวลา เช่นเดียวกับข้อ ก.

ค. Test ผสมสารละลายแป้ง-ไอโอดีน 8 มิลลิลิตร กับเพนนิซิลินจี 0.2 มิลลิโมลาร์ 1 มิลลิลิตร กับโปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 0.9 มิลลิลิตร และ crude enzyme 0.1 มิลลิลิตร วัดการจางลงของสีที่สัมพันธ์กับเวลา เช่นเดียวกับ ข้อ ก แล้วคำนวนแอคติวิตีของเอนไซม์ ดังแสดงในภาคผนวกที่ 4

2.13 การสกัดพลาสมิดดีเอนเอ

เครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้ต้องผ่านการ Siliconized และรีเอเจนต์ทุกชนิดต้องสะอาด ปราศจากเอนไซม์ Nuclease ด้วย

การเจริญเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 (Copy number amplification) ทำโดยเจริญเชื้อในอาหารอุดม LB ที่ 30°ซ. จนกระทั่ง $O.D._{660}$ เท่ากับ 0.1 เปลี่ยนอุณหภูมิการเจริญไปที่ 37°ซ. ประมาณ 5 ชั่วโมง

2.13.1 การสกัดพลาสมิดดีเอนเอโดยวิธีสัด (Rapid Extraction) (Rodriguez และ Tait, 1985)

ปั่นเซลล์ 1 มิลลิลิตรใน microfuge tube ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 วินาที ด้วยเครื่องปั่นแอพเพนดอฟ TOMY MC-15 A

นำตะกอนมาเติม Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 8, Na_2 EDTA 50 มิลลิโมลาร์ และซูโครส 10 เปอร์เซนต์ที่มี lysozyme 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.5

มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จึงเติม Sodium dodecyl sulfate 20 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 ไมโครลิตร กลับหลอดขึ้นลง บ่มที่ 37°ซ. 10 นาที เพื่อทำให้ผนังเซลล์เป็นรูรั่ว และดีเอนเอออกมาเกิดการ denature ในสารละลายด่าง

เติมโปแตสเซียมอะซีเตท 5 โมลาร์ pH 4.8 จำนวน 50 ไมโครลิตร เพื่อ neutralized พลาสมิดจะเกิด renature ได้ง่ายเนื่องจากมีขนาดเล็ก เมื่อแช่ในอ่างน้ำแข็ง นาน 30 นาที โครโมโซมและโปรตีนจะตกตะกอน จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดมาปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 15 นาที นำส่วนน้ำใสมาสกัดโปรตีนออกโดยการเติม 10 phenol : 1 (24 $CHCl_3$: 1 isoamylalcohol) โดยปริมาตรจำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วบ่มที่ 37°ซ. 2 นาที แล้วเขย่าอีก ทำเช่นนี้ประมาณ 10 ครั้ง โดยการปั่นแยกชั้นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 10 วินาที นำสารละลายชั้นบนมาสกัด phenol ออก โดยการเติม เอทธิลอีเธอร์ 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าจนกระทั่งสารละลายชั้นล่างใส นำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 10 วินาที ปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้งไป

นำสารละลายชั้นล่างมาเติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมเอทธานอล 1 มิลลิลิตร ตั้งที่อุณหภูมิ -20°ซ. 2 ชั่วโมง ปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป ทำให้ตะกอนแห้งในเดซิเคเตอร์สูญญากาศ

กระจายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE ที่ผสม RNase 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ. 30 นาที จึงเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ.

2.13.2 <u>การสกัดพลาสมิดดีเอนเอปริมาณมาก</u> (Ronald, 1980)

ปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ในกรณีที่เซลล์เริ่มต้นเป็น 100 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ 1 ครั้งใน 25 มิลลิลิตรของ Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 และ Na_2 EDTA 1 มิลลิโมลาร์

กระจายเซลล์ใน 2 มิลลิลิตรของ Tris-HCl 0.05 โมลาร์ pH 8.5, Na_2 EDTA 0.05 โมลาร์ และซูโครส 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมี Lysozyme 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

เติม 2 มิลลิลิตรของ Triton X-100 0.1 เปอร์เซ็นต์, Tris-HCl 0.05 โมลาร์ pH 8.5 และ Na_2 EDTA 0.05 โมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที ย้ายไปบ่มที่ 37°ซ. 30 นาที

ปั่นด้วยความเร็ว 20,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 4°ซ. รินส่วนน้ำใส่ด้วยความระมัดระวัง เพื่อนำไปทำ Isopicnic Cesium chloride gradient centrifugation

ผสม cesium chloride 3.7 กรัม และ Ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.4 มิลลิลิตร กับส่วนน้ำใส่ที่ได้จากขั้นตอนที่แล้ว 4 มิลลิลิตร (ตรวจ refractive index ควรจะเป็น 1.390-1.396 หรือ density 1.59 กรัมต่อมิลลิลิตร) ใช้หลอด cellulose nitrate

ปั่นด้วยเครื่องปั่นแรงสูงอุลตร้า L8-70 ด้วยความเร็ว 35,000 รอบต่อนาที 48 ชั่วโมง 4°ซ. เมื่อนำหลอดเซ็นตริฟิวส์ดังกล่าวมาส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ชั่วงคลื่นยาว จะเห็นเป็นแถบ (band) วงแหวนของพลาสมิดลักษณะต่าง ๆ โดย supercoil form จะอยู่แถบล่างสุด (ρ=1.59 g/ml) และถัดขึ้นมาเป็น relaxed form (ρ = 1.55 g/ml) ใช้เข็มขนาด 21 x 1½ นิ้ว เจาะข้างหลอดเพื่อแยกพลาสมิดแต่ละแถบออกมา

สกัด ethidium bromide และ cesium chloride ออกจากสารละลายดังกล่าว โดยเติม 1 volume ของ isopropanol ซึ่งอิ่มตัวด้วยโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์, Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 และ Na_2 EDTA 1 มิลลิโมลาร์ เขย่า แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น นำสารละลายชั้นล่างมาสกัดซ้ำจนกระทั่งมองไม่เห็นสี

เติม 2 ปริมาตรของน้ำกลั่น และ 6 ปริมาตรของเอทธานอล แล้วตั้งที่อุณหภูมิ -20°ซ. 2 ชั่วโมง ปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ตะกอนแห้งในเดซิเคเตอร์สูญญากาศ

กระจายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE เก็บที่ 4°ซ.

2.14 การสกัดโครโมโซมของแบคทีเรีย (Rodriguez และ Tait, 1983)

เจริญเชื้อในอาหารอุดม LB ที่ 30°ซ. เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จะได้เซลล์ประมาณ 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์หนึ่งครั้งด้วยบัฟเฟอร์ SET (ซูโครส 20 เปอร์เซนต์, Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ และ Na_2 EDTA 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.6)

นำเซลล์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ. 5 นาที ทำให้ละลายลงที่อุณหภูมิ 37°ซ. กรณีที่เริ่มต้นจากเซลล์ 80 มิลลิลิตร กระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ SET 2 มิลลิลิตร แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง

เติม lysozyme 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และบัฟเฟอร์ RNase (RNase 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, โซเดียมอะซีเตท 0.1 โมลาร์ และ Na_2 EDTA 0.3 มิลลิโมลาร์ pH 4.8) จำนวน 0.2 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที

เติม sodium dodecyl sulfate 25 เปอร์เซนต์ จำนวน 0.05 มิลลิลิตร บ่มที่ 37°ซ. เขย่าเบา ๆ 6 ชั่วโมง

เติม pronase 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.3 มิลลิลิตร และ $CHCl_3$: n-amyl alcohol (24 : 1) จำนวน 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37°ซ. เขย่าเบา ๆ 16 ชั่วโมง

เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และ $CHCl_3$: n-amyl alcohol 2 เท่าของปริมาตร ปิดจุกหลอดแล้วกลับหลอดไปมาเบา ๆ 5 นาที ปั่นด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วนำสารละลายชั้นบนมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วย $CHCl_3$: n-amyl alcohol

นำสารละลายชั้นบนมาเติมโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ 0.2 มิลลิลิตร และเอทธานอลเย็น จำนวน 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด

ค่อย ๆ พันสายโครโมโซมด้วยแท่งแก้ว แล้วนำไปจุ่มในเอทธานอลเย็น เพื่อล้างดีเอนเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ ให้หลุดออกไป

ละลายตะกอนของโครโมโซมดังกล่าวในบัฟเฟอร์ TEN (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA 1 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.6) จำนวน 3 มิลลิลิตร ซึ่งมี $CHCl_3$ 0.1 มิลลิลิตร เก็บที่ 4°ซ.

2.15 การวัดปริมาณดีเอนเอ (Maniatis และคณะ, 1982)

วัดการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 2000 โดยที่ OD_{260} เท่ากับ 1 คือปริมาณดีเอนเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หรือวัดปริมาณดีเอนเออย่างคร่าว ๆ โดยเปรียบเทียบความเข้ม ของแถบที่ปรากฏบนอะกาโรส์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส์ กับดีเอนเอมาตรฐาน

2.16 เทคนิคทาง Molecular cloning

2.16.1 การย่อยดีเอนเอด้วยเอนไซม์ Restriction endonuclease

Hind III และ EcoR I ที่ใช้ในการทดลองเป็นของบริษัท Amersham โดยที่ส่ภาวะในการย่อยดีเอนเออย่างสมบูรณ์ เป็นดังนี้

ก. Hind III reaction mixture 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอนเอ 1 ไมโครกรัม, Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, โซเดียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ และ dithiothreitol 1 มิลลิโมลาร์ และ Hind III 3 หน่วย บ่มที่ 37^{o}ซ. 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกริยาโดยเติม tracking dye (bromphenol blue 0.1 เปอร์เซนต์, ficoll 40 เปอร์เซนต์ และ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์) จำนวน $\frac{1}{3}$ เท่าของปริมาตรรวม

ข. EcoR I reaction mixture 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอนเอ 1 ไมโครกรัม, Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, โซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ และ dithiothreitol 1 มิลลิโมลาร์ และ EcoR I 3 หน่วย บ่มที่ 37^{o}ซ. 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกริยาโดยเติม tracking dye จำนวน $\frac{1}{3}$ เท่าของปริมาตรรวม

2.16.2 อีเลคโตรโฟรีซีส์ (Maniatis และคณะ, 1982)

การวิเคราะห์ปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอนเอ ทำโดยใช้ submarine horizontal gel electrophoresis ของอะกาโรส์เจล 0.7 เปอร์เซนต์ ซึ่งเตรียมในบัฟเฟอร์ Tris-borate (Tris-HCl 89 มิลลิโมลาร์ pH 8.3, Boric acid 89 มิลลิโมลาร์ Na_2EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์) และใส่ดีเอนเอประมาณ 100-200 นาโนกรัมต่อ 1 ช่องของเจล ถ้าเจลมีขนาด 110 x 60 x 3 มิลลิเมตร ทำอีเลคโตรโฟรีซีส์ 50 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 20

นาที และถ้าเจลมีขนาด 100 x 80 x 8 มิลลิเมตร ทำอีเลคโตรโฟรีซีส 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมงในบัฟเฟอร์ Tris-borate โดยให้เคลื่อนจากขั้วลบไปขั้วบวก และใช้ tracking dye เป็นเครื่องหมาย

นำเจลมาย้อมโดยแช่ใน ethidium bromide เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที แล้วแช่ล้างในน้ำกลั่น 1 ชั่วโมง นำเจลมาส่องดูแถบดีเอนเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตจาก UV transilluminator UVP แล้วเปรียบเทียบขนาดและปริมาณกับแถบของดีเอนเอมาตรฐาน

2.16.3 การแยกและทำให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล

แยกยีนดีเอนเอโดยการ trapping onto DEAE - Cellulose paper (Dretzen และคณะ, 1981)

ทำอีเลคโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ในบัฟเฟอร์ Tris-borate จากนั้นดูดบัฟเฟอร์ออก ตัดเจลช่องที่ใช้เป็นเครื่องหมายนำไปย้อมใน ethidium bromide แล้วส่องดูระยะทางของแถบของดีเอนเอขนาดที่ต้องการภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

นำเจลไปใส่กลับเข้าที่เดิม ตัดเจลเหนือและใต้แถบดีเอนเอเล็กน้อย ลอดด้วยชิ้น DEAE - Cellulose paper (ซึ่งก่อนใช้ต้องนำไปแช่ในโซเดียมคลอไรด์ 2.5 โมลาร์ 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างในน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วเก็บใน Na_2EDTA 1 มิลลิโมลาร์ ที่ 4°ซ.) ทำอีเลคโตรโฟรีซีสต่อไป จนกว่าแถบของดีเอนเอขนาดที่ต้องการจะเคลื่อนมาอยู่ใน DEAE - Cellulose paper ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาทีถึง 1 ชั่วโมง

นำ DEAE - Cellulose paper ที่มีดีเอนเอมาจุ่มล้างในน้ำเย็น แล้วซับให้แห้งบนกระดาษกรอง แล้วนำไปแช่ใน elution buffer (Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, Na_2EDTA 1 มิลลิโมลาร์, Arginine 50 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์) จำนวน 500 ไมโครลิตรต่อ DEAE - cellulose paper 50 ตารางมิลลิเมตร ตัดและเขย่ากระดาษให้กระจายในบัฟเฟอร์ บ่มที่ 37°ซ. นาน 2 ชั่วโมง

ดูดส่วนผสมดังกล่าวใส่ใน eppendorf centrifuge tube ที่เจาะรู และใส่ siliconized glass wool ไว้ที่ก้นหลอด ซึ่งวางอยู่บนหลอดแก้วอีกทีหนึ่ง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

กระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ TFB (2-N-Morpholinoethane sulfonic acid 10 มิลลิโมลาร์ pH 6.3, โปแตสเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์, แมงกานีสคลอไรด์ 45 มิลลิโมลาร์, แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ และ Hexamine Cobalt (III) chloride 3 มิลลิโมลาร์) จำนวน $\frac{1}{3}$ เท่าของปริมาตรเดิม แช่ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที แล้วเขย่า 10 นาที ที่ 4°ซ. ปั่นเซลล์ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่ 4°ซ.

กระจายเซลล์อีกครั้งในบัฟเฟอร์ TFB ปริมาตร $\frac{1}{12.5}$ เท่าของปริมาตรเดิม แช่ในอ่างน้ำแข็ง เติม dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ความเข้มข้นเป็น 3.5 เปอร์เซนต์ แช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที เติม dithiothreitol ให้ความเข้มข้นเป็น 75 มิลลิโมลาร์ แช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที นำไปทำ transformation

ข. การ transformation (Rodriguez และ Tait, 1983)

ผสม competent cell 200 ไมโครลิตร กับดีเอนเอ 50-100 นาโนกรัม ในปริมาตรไม่เกิน 10 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที

นำไปให้ความร้อน 42°ซ. ทันที 2 นาที แล้วนำมาแช่ในอ่างน้ำแข็ง 1 นาที จึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB 800 ไมโครลิตร แล้วเขย่าที่ 30°ซ. นาน 1 ชั่วโมง หรือมากกว่า

กระจายเชื้อ 0.1 มิลลิลิตรบนอาหารแข็งที่เสริมยาปฏิชีวนะตามความเหมาะสม บ่มที่ 30°ซ. 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่สามารถเจริญได้ ต่อจำนวนดีเอนเอ 1 ไมโครกรัม เพื่อคำนวณเป็นประสิทธิภาพของการ transformation

2.17 การแยก Catabolite derepressed mutant

2.17.1 การกลายพันธุ์ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต

เจริญเชื้อในอาหารอุดม LB จนกระทั่งถึง logarithmic growth phase ล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ 2 ครั้ง กระจายเซลล์ในสารละลายเดิม

เจือจางเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ ให้ได้ประมาณ 1×10^8 เซลล์ต่อ 0.1 มิลลิลิตร กระจายเซลล์ 0.1 มิลลิลิตรบนอาหารแข็งสูตรอุดม LB เสริมกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ จากนั้นนำไปรับรังสี (expose) อุลตราไวโอเลต ซึ่งมีกำลัง

ล่องล่วาง 15 วัตต์ ในระยะห่าง 30 เซนติเมตร โดยใช้ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. ในที่มืด 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี และปั๊มแบบลงบนอาหารแข็งชนิดเดิม

ทดลอบเพื่อเลือกโคโลนีที่สามารถผลิต PA โดยวิธี Microbiological test

2.17.2 การกลายพันธุ์ด้วย NTG ดัดแปลงจากวิธีของ Mandel และ Chen (1965)

เจริญเชื้อในอาหารอุดม LB จนกระทั่งถึง logarithmic growth phase ล้างด้วยซิเตรทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.5 1 ครั้ง กระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์เดิมด้วยปริมาตรเท่าเดิม

เติม NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) ให้ความเข้มข้นเป็น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ 3 ครั้ง กระจายเซลล์มิวแตนท์ในอาหารอุดม LB จำนวน $\frac{1}{2}$ เท่าของปริมาตรเริ่มต้น

นำเซลล์มิวแตนท์ 0.5 มิลลิลิตรใส่ในอาหารอุดม LB 10 มิลลิลิตร เขย่าที่ 30°ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมกลูโคส์ให้มีความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซนต์ เขย่าที่ 37°ซ. 2 ชั่วโมง ย้ายไปเจริญที่ 30°ซ. 6 ชั่วโมง เติมเพนนิซิลินจีให้มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่า 20-50 นาที นำเซลล์มาแช่ในอ่างน้ำแข็ง ล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ 3 ครั้ง แล้วกระจายเซลล์ในสารละลายเดิม 1 มิลลิลิตร

กระจายเซลล์ 0.1 มิลลิลิตร บนอาหารแข็งสูตรอุดมที่เติมกลูโคส์ 0.2 เปอร์เซนต์ และเพนนิซิลินจี 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและปั๊มแบบลงบนอาหารแข็งชนิดเดิม

ทดลอบเพื่อเลือกโคโลนีที่สามารถผลิต PA โดยวิธี Microbiological test

2.18 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry และคณะ, 1951)

ล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ 2 ครั้ง แล้วกระจายในสารละลายเดิม ปริมาตรเท่าเดิม

ผสมเซลล์ที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร กับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ได้เป็น Hydrolysate ทำให้เย็นลง

ผสม Hydrolysate 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลาย Lowry (โซเดียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N จำนวน 100 ml กับคอปเปอร์ซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรต 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 มิลลิลิตร) จำนวน 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

เติมสารละลาย Folin Ciocalten (เจือจาง 1:2) จำนวน 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30^{o}ซ. นาน 30 นาที วัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนกรัม เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย