บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือหลักที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubater shaker) ทั้งแบบ rotary และ reciprocal ของ New Brunswick Scientific Co., U.S.A.

1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

1.2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น(refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของ Beckman, U.S.A.

1.2.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น H-103N ของ Kokusan, Japan

1.2.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของ Kubota, Japan

1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น 340 ของ Sequoia-Turner, U.S.A.

1.4 เครื่องให้กำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-transilluminator) รุ่น FOTO/PREP I ของ Fotodyne , U.S.A.

1.5 ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis equipment)

1.5.1 เครื่องกำเนิดไฟฟ้า รุ่น 2301 microdrive 1 ของ LKB , Sweden

1.5.2 เจลแชมเบอร์(gel chamber)พร้อมอุปกรณ์เตรียมอะกาโรสเจล

1.5.3 เจลแชมเบอร์ พร้อมอุปกรณ์เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล ของ Pharmacia Fine Chemicals, Sweden

1.6 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) รุ่น SP-5A ของ Suntex, Taiwan

1.7 เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง(sonicator)รุ่น W-385 และ MICROTIP ของ Heat systems-ultrasonic Inc. , U.S.A.

1.8 อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

- กล้องถ่ายภาพ
- แผ่นกรองแสง (filter) สีแดง
- ฟิล์มขาว-ดำ ความไวแสง 400 (ASA 400)

1.9 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น UNILUX-12 ของ Kyowa, Japan

1.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของ Memmert, Germany

1.11 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ของ Memmert, Germany

1.12 ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow ของ ISSCO รุ่น BV-124 บ.อินเตอร์เนชันแนล ไซแอนติฟิค ซัพพลาย จำกัด กรุงเทพฯ

1.13 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ(deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของ Sanyo Electric Co.,Ltd., Japan

1.14 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ของ Forma Scientific, U.S.A.

1.15 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของ Kokusan , Japan

2. <u>สารเคมี</u>

2.1 เรสตริกชันเอนไซม์และเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนยีนจาก BRL, U.S.A. และบางส่วนได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. I.S.Hunter แห่ง University of Glasgow, U.K.

2.2 ไลโซไซม์ (lysozyme grade 1) , ไรโบนิวคลีเอส (RNase), สเปอร์มีนเตตราไฮโดรคลอไรด์ (spermine tetrahydro-chloride) , TES [N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid] , แคทีคอล (catechol), x-gal, IPTG และสารเคมีอื่น ๆ จาก Sigma,U.S.A.

2.3 ชุดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจล GENECLEAN II kit จาก BIO 101 U.S.A.

3. เชื้อจุลินทรีย์และพลาสมิด

- *E. coli* JM109 (recA1 *endA1 gyrA96 thi hsdR17 SupE44 relA1* Δ(*lac-proAB*)[*F' traD36 proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZ*ΔM15]) และ *E. coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pUC19

- *E. coli* DS941(*recF143 proA7 str31 thr1 leu6 tsx33 mtl2 his4 argE3 lacY*$^+$ *lacZ*ΔM15 *lacI*^{q} *galK2 ara14 SupE44 xyl5*) และ *E. coli* DS941 ที่มีพลาสมิด pT7-7 หรือ pGP1-2 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. I.S.Hunter แห่ง University of Glasgow, U.K.

- *Streptomyces lividans* TK64 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Prof. D.A. Hopwood แห่ง John Innes Institute, Norwich, U.K.

- *Streptomyces* sp. 42-9 ซึ่งมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนส (12)

- S. *lividans* 1326 ที่มีพลาสมิด pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 หรือ pIJ4083/4 (29)

- S. *lividans* TK24 ที่มีพลาสมิด pIJ4090 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr.M.J. Bibb แห่ง John Innes Institute , U.K.

- S. *lividans* TK64 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C (13)

4. การเลี้ยงเชื้อ *E. coli*

4.1 การเลี้ยง *E. coli* เพื่อสกัดพลาสมิด (25)

4.1.1 เตรียม inoculum โดยการเขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยว ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก1) เลี้ยงโดยการเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที ข้ามคืน

สำหรับสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pUC19 หรือ pT7-7 จะเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครกรัม/มล. (โดยเตรียมสารละลายตั้งต้นเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มล.)

ส่วนสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pGP1-2 จะเติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล. (โดยเตรียมสารละลายตั้งต้นเข้มข้น 25 มก./มล.)

สายพันธุ์ที่มีทั้งพลาสมิด pT7-7 และ pGP1-2 จะใส่ทั้งแอมพิซิลลินและกานามัยซิน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยที่แต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครกรัม/มล.

4.1.2 เพาะเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนแล้ว 3 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 95 มล. ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม เลี้ยงโดยการเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ประมาณ 12 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญถึงช่วง late log phase

4.1.3 แยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นที่ 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

4.1.4 เก็บเซลล์ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้สกัดพลาสมิด

4.2 <u>การเลี้ยง *E. coli* เพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนส</u>

4.2.1 เตรียม inoculum เช่นเดียวกับข้อ 4.1.1

4.2.2 เพาะเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนแล้วปริมาตร 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Morosoli และคณะ (35) (ภาคผนวก ก2) ปริมาตร 50 มล. เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าแบบ rotary ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

สำหรับเชื้อที่มีทั้งพลาสมิด pT7-7 และ pGP1-2 จะนำไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนโดยการนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนสตามวิธีในข้อ 17

4.3 <u>การเลี้ยงเชื้อ *E. coli* เพื่อเตรียม competent cell (26)</u>

4.3.1 เตรียม inoculum เช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 โดยใช้โคโลนีเดี่ยวที่มีอายุประมาณ 12 ชั่วโมง

4.3.2 เพาะเชื้อจากข้อ 4.3.1 ปริมาตร 1 มล.ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ปริมาตร 100 มล. วัดความขุ่นเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (โดยใช้ LB เป็น blank) เลี้ยงโดยการเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที จนกระทั่งเซลล์เจริญถึง log phase โดยติดตามค่าความขุ่นให้อยู่ในช่วง 0.4-0.5 ซึ่งโดยปกติจะใช้เวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง และที่ค่าความขุ่นนี้จะมีจำนวนเซลล์อยู่ 3-5x10^8 เซลล์/มล.

5. การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli* (26)

5.1 เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ค่าความขุ่นตามที่ต้องการจากข้อ 4.3.2 แล้ว นำฟลาสก์ที่เลี้ยงเชื้อมาแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที

5.2 เก็บเซลล์โดยการปั่นที่ 6,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (โดยจะต้องแช่เย็นหลอดปั่นเซลล์ไว้ก่อน)

5.3 เทส่วนน้ำใสทิ้ง และแช่เซลล์ในน้ำแข็ง

5.4 ค่อยๆ เติมสารละลายผสมของ 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.0 และ 50 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ที่เย็น ปริมาตร 30 มล. ลงไป เขย่าจนเซลล์กระจาย แช่ไว้ในน้ำแข็งอีก 10 นาที

5.5 นำไปปั่นแยก competent cell ที่ 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

5.6 เติม 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl และ 50 มิลลิโมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ที่เย็นลงไป 4 มล. เขย่าจนเซลล์กระจาย ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที (อาจเพิ่มเวลาเป็น 12-24 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์เมชันสูงขึ้น 4-6 เท่า)

5.7 แบ่ง competent cell ใส่หลอดไมโครฟิวจ์ (microfuge) ที่แช่เย็นแล้ว 16 หลอด หลอดละ 200 ไมโครลิตร (มีเซลล์ประมาณ 1.5×10^7 เซลล์)

หากต้องการเก็บ competent cell ไว้ใช้ต่อไป ก่อนจะแบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ให้เติมกลีเซอรอล (glycerol) ปลอดเชื้อลงไป 15%ปริมาตร/ปริมาตร เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส (36)

6. การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* ตามวิธีของ Birnboim และ Doly (37) ที่ปรับปรุงโดย วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด (38)

6.1 นำเซลล์ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.1.4 มาใส่สารละลายไลโซไซม์ 4 มล. (ภาคผนวก ข1) ที่มีไลโซไซม์เข้มข้น 2 มก./ม.ล. ผสมให้เซลล์กระจายอย่างทั่วถึง แช่ในอ่างน้ำแข็ง 20 นาที

6.2 ใส่สารละลาย 1% SDS ใน 0.2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 มล. ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง 10 นาที

6.3 เติมสารละลาย 3 โมลาร์โปตัสเซียมอะซีเตท pH 5.2 (ภาคผนวก ข2) ที่เย็น ปริมาตร 6 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง 10 นาที

6.4 นำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที

6.5 ถ่ายส่วนใสลงในหลอดใหม่ ระวังไม่ให้มีตะกอนติดมา ถ้ามีตะกอนติดมาอาจนำไปปั่นซ้ำอีกครั้งก็ได้

6.6 เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรสารละลายเดิม นำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที

6.7 ตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยการนำไปปั่น 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

6.8 ละลายตะกอนที่ได้ด้วยบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข3) ปริมาตร 10 มล.

6.9 เติม 7.5 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซีเตท ที่เย็น 5 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอที่ 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6.10 ถ่ายสารละลายใสลงหลอดใหม่ เติมสารละลายเอนไซม์อาร์เอ็นเอสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครกรัม/มล. (โดยเตรียมสารละลายตั้งต้นเข้มข้น 50 มก./มล.) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

6.11 เติมสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม 7.5 มล. (ภาคผนวก ข4) ผสมโดยใช้เครื่องปั่นผสมแบบ vortex

6.13 ปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6.14 ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่เติมเอธานอล 30 มล. นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที

6.15 นำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอธานอล และทำให้แห้ง

6.16 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

6.17 วิเคราะห์คุณภาพและประมาณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ในข้อ 10

7. การเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* (39)

7.1 การเลี้ยงบนอาหารแข็งและการเตรียมสปอร์แขวนลอย

เตรียมอาหารแข็งสูตร MS (ภาคผนวก ก3) ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างสปอร์ สำหรับเชื้อที่มีพลาสมิดพาหะ pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 pIJ4083/4 pIJ4090 หรือ pPT6C เลี้ยงใน MS ที่เติมยาปฏิชีวนะไธโอสเตรพตอน 50 ไมโครกรัม/มล. (โดยเตรียมสารละลายตั้งต้นเข้มข้น 50 มก./มล. ในสารละลาย DMSO)

การเตรียมสปอร์แขวนลอย ทำโดยเพาะเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ที่ต้องการ โดยลาก (streak) สปอร์หรือไมซีเลียม ลงบนอาหารแข็งสูตร MS ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 5-7 วัน จนสปอร์แก่เต็มที่ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 มล. ลงในแต่ละจาน ใช้ลูป (loop) ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วขูดเบาๆ ให้สปอร์หลุด กรองสปอร์แขวนลอยโดยใช้ชุดกรอง (ภาคผนวก ค1) นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มาปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อสองครั้ง แขวนลอยสปอร์ที่ได้ใน 20% กลีเซอรอล โดยให้ความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^{9}-10^{10} สปอร์/มล. เก็บในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดละ 0.5 มล. ที่ -20 องศาเซลเซียส

7.2 การเลี้ยงในอาหารเหลว

7.2.1 การเลี้ยงเพื่อเตรียมโปรโตพลาสท์หรือสกัดพลาสมิด

เตรียมอาหารเหลว YEME (ภาคผนวก ก4) ในฟลาสก์ที่มีลวดสปริงขดที่ก้นขวด (ภาคผนวก ค2) หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเติมสปอร์ที่เตรียมจากข้อ 7.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหารเหลว 50 มล. ในกรณีของการเตรียมเชื้อเพื่อสกัดพลาสมิด เติมไธโอสเตรพตอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 ไมโครกรัม/มล. นำไปเขย่าแบบ reciprocal ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ในกรณีที่เตรียมโปรโตพลาสท์ จะใช้ *Streptomyces lividans* TK64 ที่มีอายุ 36-40 ชั่วโมง ส่วนสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดพลาสมิด บ่มเชื้อเป็นเวลา 3-5 วัน เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มาก

7.2.2 การเลี้ยงเพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนส

เตรียม inoculum โดยเติมสปอร์แขวนลอยที่เตรียมจากข้อ 7.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก1) 50 มล. เขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36-40 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 5 มล. ของ inoculum ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามสูตรของ Morosoli และคณะ (35) (ภาคผนวก ก2) 50 มล. เขย่าเชื้อแบบ rotary ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 9 วัน

8. การสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces*

8.1 การสร้างโปรโตพลาสท์ ตามวิธีของ Hopwood และคณะ (39)

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* ตามข้อ 7.2.1 แล้วดูดอาหารเหลวที่มีไมซีเลียมปริมาตร 5 มล. มาบรรจุในหลอดแก้วฝาเกลียวปลอดเชื้อสำหรับปั่นเหวี่ยง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มล. เพื่อเจือจางความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส นำมาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นชนิดตั้งโต๊ะ ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.3 โมลาร์ซูโครส 5 มล. สองครั้ง จากนั้นเติม 6 มล.ของสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 1 มก./มล. ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ P (ภาคผนวก ข5) ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยเยื่อกรอง (millipore) บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ปิเปตขนาด 5 มล. ดูดขึ้นลงสามครั้งทุกๆ 10-15 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P 5 มล. เพื่อเจือจางไลโซไซม์ แล้วนำมากรองผ่านชุดกรองโปรโตพลาสท์ (ภาคผนวก ค1) เพื่อกำจัดกากเซลล์และชิ้นส่วนไมซีเลียมที่เหลือ นำส่วนน้ำใสที่ได้มาปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างโปรโตพลาสท์ด้วยบัฟเฟอร์ P 10 มล. จากนั้นแขวนลอยโปรโตพลาสท์ในบัฟเฟอร์ P 100 ไมโครลิตร หาความเข้มข้นของโปรโตพลาสท์โดยนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วย haemacytometer

การเก็บโปรโตพลาสท์ทำโดยเก็บในหลอดไมโครฟิวจ์ (microfuge) โดยแช่ในภาชนะบรรจุน้ำแข็ง นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นจึงนำหลอดบรรจุโปรโตพลาสท์มาเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสต่อไป จนกว่าจะนำมาใช้ เมื่อจะนำมาใช้ต้องทำให้โปรโตพลาสท์ที่แข็งอยู่ละลายอย่างรวดเร็ว โดยจุ่มหลอดในอ่างน้ำอุ่น

8.2 การรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ (39)

นำโปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้จากข้อ 8.1 มาเจือจางเป็นอนุกรมในบัฟเฟอร์ P และ สารละลาย 0.01% sodium dodecyl sulphate (SDS) ดูดโปรโตพลาสท์ที่ถูกเจือจางในแต่ละความเข้มข้นมา 100 ไมโครลิตร เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ R2YE (ภาคผนวก ก5) ซึ่งผ่านการกำจัดความชื้นบางส่วนโดยการเปิดฝาจานบรรจุ R2YE ในตู้ laminar flow เป็นเวลา 1 $^{1}/_{2}$ ชั่วโมง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน นับโคโลนีที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P เปรียบเทียบกับที่เจือจางด้วย 0.01% SDS เพื่อคำนวณหาเปอร์เซนต์รีเจนเนอเรชัน

เมื่อทำการเจือจางโปรโตพลาสท์ด้วย 0.01%SDS จะทำให้โปรโตพลาสท์ที่มีอยู่ทั้งหมดในสารละลายแตก ดังนั้นโคโลนีที่เจริญขึ้นมาจะเป็นการเจริญมาจากเซลล์ปกติ ส่วนโคโลนีที่เจริญมาจากการเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P จะมีทั้งเซลล์ปกติและโปรโตพลาสท์ ดังนั้นที่ความเข้มข้นเดียวกัน จำนวนความแตกต่างของโคโลนีที่เจริญจากการเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P (X) กับ 0.01%SDS (Y) ก็คือเซลล์ที่เจริญมาจากโปรโตพลาสท์ และถ้าเทียบให้จำนวนโปรโตพลาสท์ที่นับได้จากกล้องจุลทรรศน์ (ด้วย haemacytometer) (Z) เป็น 100% ก็จะสามารถคำนวณเปอร์เซนต์การรีเจนเนอเรชันของโปรโตพลาสท์ได้ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซนต์การรีเจนเนอเรชันของโปรโตพลาสท์} = \frac{(X-Y)\times 100}{Z}$$

9. ตรวจสอบประสิทธิภาพของโปรโมเตอร์ในพลาสมิดพาหะ pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 และ pIJ4083/4 (33,34)

ตรวจสอบประสิทธิภาพของโปรโมเตอร์ในพลาสมิดพาหะเหล่านี้ โดยการเลี้ยง S. *lividans* TK64 ที่มีพลาสมิดนี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ R2YE (ภาคผนวก ก5) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วฉีดพ่นด้วยสารละลาย 0.5 โมลาร์แคทีคอล และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้สีเหลืองของโคโลนีเข้มที่สุดเพื่อใช้เป็นพลาสมิดพาหะต่อไป

10. <u>การสกัดพลาสมิดจาก *Streptomyces*</u> ตามวิธีของ Kieser (40)

10.1 เลี้ยง *Streptomyces* ที่มีพลาสมิดตามข้อ 7.2.1 แล้วนำมาปั่นแยกไมซีเลียมด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

10.2 ล้างไมซีเลียมด้วยซูโครส 10.3% สองครั้ง แบ่งเซลล์ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ หลอดละ 100 ไมโครลิตร

10.3 เติมสารละลายผสมของไลโซไซม์ 2 มก./มล.กับRNase 50 มก./มล. ซึ่งละลายในสารละลายสำหรับไลโซไซม์ (ภาคผนวก ข1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด บ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

10.4 เติม 2% SDS ซึ่งละลายใน 0.3 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที นำไปบ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

10.5 เติมสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข4) 100 ไมโครลิตร เพื่อสกัดโปรตีนออก ผสมให้เข้ากันทันทีด้วย vortex mixer ประมาณ 10 วินาที จนเห็นสารละลายผสมกันเป็นสีขาวขุ่น

10.6 นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกชั้นของฟีนอลออก ดูดสารละลายใสชั้นบนปริมาตรประมาณ 700 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ซึ่งบรรจุ 3 โมลาร์โซเดียมอะซีเตท 70 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

10.7 เติมไอโซโพรพานอล 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที

10.8 ละลายตะกอนจาก 4-6 หลอดเข้าด้วยกัน ด้วย TE 500 ไมโครลิตร

10.9 ตกตะกอนพลาสมิดด้วย 100 มิลลิโมลาร์สเปอร์มีนเตตราไฮโดรคลอไรด์ (spermine tetrahydrochloride) 25 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที

10.10 นำส่วนตะกอนมาแขวนลอยใน 0.3 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตท ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตกตะกอนด้วยเอธานอล 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ปั่นแยกตะกอนแล้วล้างด้วยเอธานอล 70% นำมาแขวนลอยในบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11. การหาขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

เตรียมอะกาโรสเจล 0.7% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ TA หรือ TB (ภาคผนวก ข6 และ ข7 ตามลำดับ) ลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวี (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye ภาคผนวก ข8) ในอัตราส่วน 1:1 หยอดลงในหลุมบนอะกาโรสเจล หลุมละประมาณ 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลแชมเบอร์(gel chamber) โดยใช้ความต่างศักย์ 10 โวลต์/ซม. ของเจล จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนมาเกือบถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 2.5 ไมโครกรัม/มล. ในบัฟเฟอร์ TB แช่ไว้ 15-30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ แลมดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII (λDNA/*Hin*dIII) บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพโดยใช้ฟิล์มขาวดำความไวแสง 400 ถ่ายผ่านแผ่นกรองแสง (filter) สีแดง

12. การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน (xylanase gene fragment) ของ *Streptomyces* sp. 42-9

สกัดพลาสมิด pPT6C ซึ่งมีไซแลเนสยีนของ *Streptomyces* sp.42-9 (13) แล้วนำมาตัดแบบสมบูรณ์ (complete digestion) ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII หรือ *Xba*I ดังนี้

ผสมพลาสมิดดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 3 หน่วย (unit) บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กำจัดเอนไซม์ออกโดยการสกัดด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์มในปริมาตรที่เท่ากัน จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที นำสารละลายใสชั้นบนใส่ในหลอดใหม่ แล้วตกตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอธานอลปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรดีเอ็นเอ และเติม 1 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอธานอล ทำให้แห้งแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE แล้วแยกชิ้นส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดแยกดีเอ็นเอ GENECLEAN II kit (ภาคผนวก ข9) ดังนี้

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดไว้แล้ว มาแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยใบมีดที่ผ่านการลนไฟแล้วและตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในหลอดพลาสติก เติม 6 โมลาร์ของสารละลายโซเดียมไอโอไดด์ 3 เท่าของปริมาตรเจล บ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เติม GLASSMILK ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ผสมให้เข้ากันทุกๆ 2 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วินาที ล้างตะกอนของ GLASSMILK ที่มีดีเอ็นเอเกาะอยู่ ด้วยสารละลาย NEW ปริมาตร 250 ไมโครลิตร 3 ครั้ง จากนั้นชะดีเอ็นเอออกจาก GLASSMILK โดยละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE 10 ไมโครลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส 2 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วินาที ดูดสารละลายใสชั้นบนที่มีดีเอ็นเอแขวนลอยอยู่ใส่หลอดไมโครฟิวจ์ ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิสเทียบกับ λDNA/*Hin*dIII

13. <u>การเตรียมชิ้นส่วนของพลาสมิดพาหะ</u>

พลาสมิดพาหะที่ใช้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดได้แก่ pUC19 pT7-7 pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 pIJ4083/4 และ pIJ4090

สำหรับ pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 และ pIJ4083/4 จะใช้สายพันธุ์ที่มีโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งได้จากการตรวจสอบตามวิธีในข้อ 9

13.1 นำพลาสมิดพาหะมาตัดแบบสมบูรณ์ ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII หรือ *Xba*I ตามวิธีในข้อ 12 แล้วละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE

13.2 กำจัดหมู่ฟอสเฟตด้วยเอนไซม์ Bacterial Alkaline Phosphatase (BAP) โดยการเติม BAP 70 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 1 ไพโคโมล (picomole) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ขจัดเอนไซม์ออกโดยการเติมฟีนอลคลอโรฟอร์มตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล โดยมีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 12 เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 รอบ/นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70%เอธานอล ทำให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE ตรวจสอบการเชื่อมตัวเองของพลาสมิดพาหะที่กำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว ตามวิธีในข้อ 14 โดยไม่ต้องใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีน

14. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้มีชิ้นส่วนของไซแลเนสยีน

เชื่อม (ligate) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีไซแลเนสยีนที่เตรียมได้จากข้อ 12 และพลาสมิดพาหะที่เตรียมได้จากข้อ 13.2 เข้าด้วยกัน ในอัตราส่วน 3 ไพโคโมลต่อ 1 ไพโคโมล ตามลำดับ นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งสักครู่ ใส่บัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ T_4 DNA ligase แล้วเติมสารละลาย ATP ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิโมลาร์ ใส่เอนไซม์ T_4 DNA ligase 4 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 1 ไพโคโมล บ่มที่ 12-13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กำจัดเอนไซม์โดยการสกัดด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนด้วยเอธานอลที่มีโซเดียมคลอไรด์ เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 12 ตรวจสอบการเชื่อมโดยทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส เทียบกับ λDNA/*Hin*dIII

15. การทรานสฟอร์เมชัน (transformation) (39)

15.1 เมื่อใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *E. coli* ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะต้องเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pUC19 หรือ pT7-7

15.1.1 เติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ที่เตรียมได้จากการเชื่อมในข้อ 14 ความเข้มข้นประมาณ 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงใน competent cell 200 ไมโครลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 5.7

สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pT7-7 ต้องใส่พลาสมิด pGP1-2 เข้มข้น 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ด้วย

15.1.2 แช่ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ทันที เป็นเวลา 5 นาที

15.1.3 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ลงไป 1 มล. แล้วนำไปเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

15.1.4 นำไปเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LA (ภาคผนวก ก1) ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม จานละ 100 ไมโครลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 20 ชั่วโมง

15.1.5 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์

15.2 เมื่อใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces* ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะต้องเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pIJ4083/1 pIJ4083/2 pIJ4083/3 pIJ4083/4 หรือ pIJ4090

15.2.1 เติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้จากข้อ 14 ลงในโปรโตพลาสท์ ที่เตรียมได้จากข้อ 8.1 โดยให้มีความเข้มข้นของพลาสมิด 200-500 นาโนกรัมต่อโปรโตพลาสท์ 50-100 ไมโครลิตร (10^{8}-10^{9} โปรโตพลาสท์/มล.) แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 10 วินาที

15.2.2 เติม 25%polyethylene glycol (PEG)(ภาคผนวก ข10) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 1 นาที

15.2.3 เติมบัฟเฟอร์ P 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ R2YE จานละ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยบ่มเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

15.2.4 ราดผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วด้วย 300 ไมโครกรัม/มล. ของยาปฏิชีวนะไธโอเสตรพตอน (เจือจางจากสารละลายตั้งต้นที่เตรียมจากข้อ 7.1 ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ) ปริมาตร 1 มล. เปิดฝาจานให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งใน laminar flow ประมาณ 30 นาที นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 5-7 วัน

15.2.5 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์

16. การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์

นำทรานสฟอร์แมนท์จาก 15.1.5 และ 15.2.5 มาทำ replica plating ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก6) คัดเลือกเฉพาะทรานสฟอร์แมนท์ที่ให้วงใส (clear zone)รอบโคโลนี เพื่อนำไปตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส ตามวิธีในข้อ 7.2.2 ต่อไป

สำหรับทรานสฟอร์แมนท์ที่เป็น *E. coli* จะนำทุกตัว ไปทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยเลี้ยงเชื้อตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 4.2

17. การตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส

นำทรานสฟอร์แมนท์ที่เลี้ยงได้จากข้อ 4.2.2 และ 7.2.2 มาปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

สำหรับทรานสฟอร์แมนท์ที่เป็น *E. coli* จะนำทั้งส่วนน้ำใสและเซลล์มาตรวจวัดแอคติวิตีของไซแลเนส ส่วนของเซลล์จะทำให้แตกก่อนด้วย sonicator โดยใช้สภาวะที่ 50% duty cycle ต่อ 1 วินาที เป็นเวลา 6 นาที แล้วนำไปปั่นแยกเศษเซลล์ทิ้ง ใช้ส่วนใสมาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วย

ทรานสฟอร์แมนท์ที่เป็น *Streptomyces* จะใช้เฉพาะส่วนน้ำใสมาตรวจสอบ

การตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนสทำตามวิธีของกาญจนา วรวิทย์วัฒนะ (12) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakajima และคณะ (4) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังนี้

- สารละลายไซแลนเข้มข้น 10 มก./มล. ซึ่งละลายใน 0.1 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 0.3 มล.
- 0.1 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 2.4 มล.
- ส่วนน้ำใสที่จะตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ (crude enzyme) ที่ผ่านการเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 0.3 มล.

โดยบ่มไซแลนกับบัฟเฟอร์ก่อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมเอนไซม์ นำส่วนผสมทั้งหมดของปฏิกิริยา ไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างของส่วนผสมที่เวลา 0 และ 10 นาที ครั้งละ 1 มล. หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที นำไปหาน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีการของ Somogyi-Nelson (41,42) โดยเติมอัลคาไลน์ คอปเปอร์ รีเอเจนท์ (alkaline copper reagent ภาคผนวก ข11) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำเย็นจัด แล้วเติมเนลสัน รีเอเจนท์ (Nelson reagent ภาคผนวก ข12) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มล. นำส่วนผสมนี้ไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 20-200 ไมโครกรัม/มล.

1 หน่วยของไซแลเนส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยไซแลน แล้วได้น้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ตรวจสอบแอคติวิตีดังกล่าว

18. การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนโดยการทำ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส (sodium dodecly sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)) ตามวิธีของ Laemmli (43)

SDS-PAGEเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงและนิยมใช้ในการแยกโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากกัน โดยอาศัยขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลเป็นสำคัญ ซึ่งนอกจากจะใช้ในการแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันออกจากกันแล้ว ยังสามารถใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานหลายๆ ชนิดที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้วได้ (44)

18.1 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล

นำแผ่น spacer 3 แผ่น มาทา grease ทั้งสองด้านแล้ววางคั่นระหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่น ขนาด 13.5x15.5 เซนติเมตร ที่ด้านริมทั้งสองด้านและด้านล่างของแผ่นกระจกทั้งสอง แล้ววางแผ่นกระจกไว้ในแนวตั้ง จากนั้นเทสารละลายผสมของ separating gel (ภาคผนวก ข14) ลงในแผ่นแก้ว หยดน้ำลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 3 มิลลิเมตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเจลแข็งตัวสมบูรณ์ แล้วจึงเทน้ำออก วาง slot former ลงระหว่างแผ่นกระจกทั้งสอง เทสารละลายผสมของ stacking gel (ภาคผนวก ข15) ลงไปเมื่อเจลแข็งตัวแล้ว ค่อยๆนำ spacer ที่ด้านล่าง และ slot former ออก แล้ววางแผ่นกระจกลงใน แชมเบอร์ และเติมบัฟเฟอร์สำหรับทำ SDS-PAGE (ภาคผนวก ข16) ลงไปให้ท่วมแผ่นกระจก (43)

18.2 การเตรียมโปรตีนและการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส

นำน้ำเลี้ยงเชื้อ หรือ สารสกัดแยกจากเซลล์จากข้อ 17 ไปลดปริมาตรเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน โดยใช้ตู้อบสูญญากาศ (vacuum oven) แล้วนำไปตรวจปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (45) ดังนี้

นำสารละลายตัวอย่างที่จะทดสอบ 1 มล. มาเติมสารละลาย Lowry C (ภาคผนวก ข17) ลงไป 5 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข17) ปริมาตร 0.5 มล. ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัม/มล.

ใช้สารละลายโปรตีนแต่ละตัวอย่างเข้มข้น 400 ไมโครกรัม ผสมกับบัฟเฟอร์ที่มีสีติดตาม (ภาคผนวก ข18) นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 2 นาที แล้วหยอดลงในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำอิเลคโตรโฟรีซิสโดยควบคุมให้กระแสคงที่ ที่ 35 มิลลิแอมแปร์ ใน stacking gel และ 20 มิลลิแอมแปร์ ใน separating gel จนกระทั่งสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนลงมาจนถึงปลายสุดของเจล

ย้อมแผ่นเจลในน้ำยาย้อมโปรตีน (ภาคผนวก ข19) ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออกโดยการแช่ในสารละลายสำหรับล้างสี (ภาคผนวก ข20) จนกระทั่งเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน บันทึกผลโดยการถ่ายถาพ

18.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

คำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility : R_m) ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนแต่ละตัวอย่าง ดังนี้

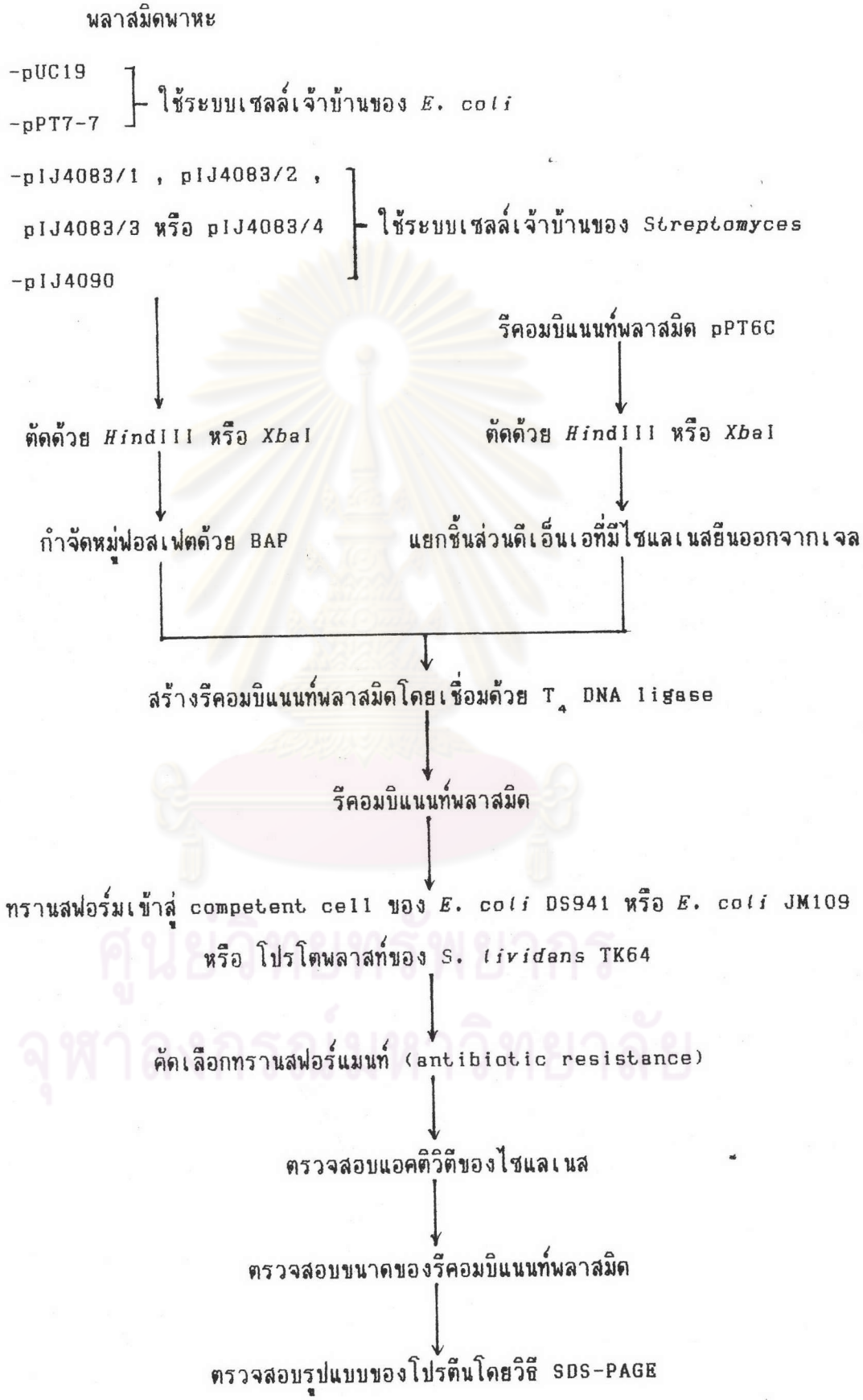
$$R_m = \frac{\text{ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่สีเคลื่อนที่}}$$

หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ระหว่างการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ กับ ค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งได้แก่

Phosphorylase b	น้ำหนักโมเลกุล	94,000 ดาลตัน
Albumin	น้ำหนักโมเลกุล	67,000 ดาลตัน
Ovalbumin	น้ำหนักโมเลกุล	43,000 ดาลตัน
Carbonic Anhydrase	น้ำหนักโมเลกุล	30,000 ดาลตัน
Trypsin Inhibitor	น้ำหนักโมเลกุล	20,000 ดาลตัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย



I16206047