# บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

## 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany.
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) ของบริษัท Memmert, Germany.
4. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
9. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
12. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –70 $^{o}$ซ ของบริษัท Forma Scientific , USA.
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –20 $^{o}$ซ ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
14. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)
    - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan.
    - Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA.

15. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.
16. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น Mylab$^{TH}$ Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
17. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
18. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
19. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA.
20. ไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) ของบริษัท Pall Bio Support, USA.
21. กระดาษกรอง (filter paper) ของบริษัท Advantec, Japan.
22. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
23. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    - กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์ ของบริษัท Polariod, USA.
    - แผ่นกรองแสงสีแดง
    - ฟิล์มโพลารอยด์ขาวดำ ความไวแสง 3000 (ISO 3000)

## 3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
3. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUAI, Japan.
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E Merck, Germany.
5. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \bullet 2H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
7. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemical, AUS.
8. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial $CH_3COOH$) ของบริษัท E Merck, Germany.
9. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France.
10. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท E Merck, Germany.
11. น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของบริษัท E Merck, Germany.
12. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany.

13. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA.
14. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$•2H2O) ของบริษัท Sigma, USA.
15. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
16. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [($C_{16}H_{32}N(CH_3)_3$)Br] ของบริษัท TCI-EP, Japan.
17. สารปฏิชีวนะ กานามัยซิน (kanamycin) แอมพิซิลลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
18. เรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI, *Bam*HI, *Pst*I, *Sal*I, *Hin*dIII, *Bgl*II, *Xho*I และ *Xba*I ของบริษัท Promega, USA.
19. lambda DNA/*Hin*dIII marker ของบริษัท Promega, USA.
20. 1 kb DNA ladder ของบริษัท Promega, USA.
21. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, USA.
22. KOD DNA polymerase ของบริษัท TOYOBO, Japan.
23. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท Promega, USA.
24. เอนไซม์ไลเกส (ligase) ของบริษัท Promega, USA.
25. เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ของบริษัท Promega, USA.
26. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA.
27. Proteinase K ของบริษัท Sigma, USA.
28. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ของบริษัท Promega, USA.
29. IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) ของบริษัท Wako, Japan.
30. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.
31. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล Geneclean II Kit ของบริษัท BIO101, USA.
32. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของบริษัท Roche, Germany.

<u>หมายเหตุ</u> สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

### 3.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

**ตารางที่ 3.1 แบคทีเรีย**

| แบคทีเรีย | จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์ | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|
| *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 | *EndA*1, *recA*1, *gyrA*96, *thi*, *hsdR*17, *relA*1, *supE*44, Δ(*lac-proAB*), [*F'*, *traD*36, *proAB*, *lacI*$^{q}$ZΔ M15] | Yanisch-Perron และคณะ, 1985 |
| *E. coli* สายพันธุ์ DH5α | ϕ80d*lacZ*ΔM15, *endA*1, *recA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17, *relA*1, *supE*44, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*) U169 | Hanahan, 1983 |
| *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 | สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีน | ศรัลยา แพงไตร, 2543 |
| *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ A53 D1 E11 G12 G531 H1 J1 | สายพันธุ์กลายจากสายพันธุ์ CU-A1 ที่มีทรานสโปซอน Tn*5* ซึ่งไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีน | ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์, 2544 |

## 3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

**ตารางที่ 3.2 พลาสมิด**

| พลาสมิด | จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์ | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|
| pSUP2021 | Tn*5*($Km^r$), $Cm^r$, $Tra^-$, $Mob^+$, pBR325 replicon | Simon และคณะ, 1983 |
| pBluescript KS(+/-) | $Ap^r$, ∝lac/MCS | บริษัท Stratagene, USA |
| pGEM-7Zf(+/-) | $Ap^r$, ∝lac/MCS | บริษัท Promega, USA |
| pGEM-3Zf(+/-) | $Ap^r$, ∝lac/MCS | บริษัท Promega, USA |
| pTEM | $Ap^r$, $Km^r$ มีชิ้นส่วน *Eco*RI จากดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย E11 ขนาดประมาณ 9.2 kb ในพลาสมิด pBluescript KS(+/-) | สร้างในการทดลองนี้ |
| pTEB | $Ap^r$ มีชิ้นส่วน *Bam*HI-*Eco*RI จาก pTEM ขนาดประมาณ 3.9 kb ในพลาสมิด pGEM-7Zf(+/-) | สร้างในการทดลองนี้ |
| pWT | $Ap^r$ มีชิ้นส่วน *Bam*HI-*Hin*dIII จากดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ขนาด 4.5 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) | สร้างในการทดลองนี้ |
| pES | $Ap^r$ มีชิ้นส่วน *Eco*RI-*Sal*I จาก pWT ขนาดประมาณ 1.8 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) | สร้างในการทดลองนี้ |
| pWR | $Ap^r$ มีชิ้นส่วน *Eco*RI-*Hin*dIII จาก pWT ขนาดประมาณ 0.7 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) | สร้างในการทดลองนี้ |
| pSW | $Ap^r$ มีชิ้นส่วน *Sal*I-*Eco*RI จาก pWT ขนาดประมาณ 1.5 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) | สร้างในการทดลองนี้ |

**ตารางที่ 3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์**

| โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ ($T_m$) | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|
| TN5-OE | 5'-GGTTCCGTTCAGGACGCTAC-3' (64°ซ) | สร้างในการทดลองนี้ |
| W1 | 5'-GTCGGCGCACGACCTCAT-3' (60°ซ) | สร้างในการทดลองนี้ |
| W2 | 5'-AGCACTCCGACCGGGTGA-3' (60°ซ) | สร้างในการทดลองนี้ |
| RV1 | 5'-GAACCAGGACGCCATCCA-3' (58°ซ) | สร้างในการทดลองนี้ |
| RV2 | 5'-ACAATGATCCGGACGAG-3' (52°ซ) | สร้างในการทดลองนี้ |
| RV3 | 5'-ACACGGCACGTCGCATC-3' (56°ซ) | สร้างในการทดลองนี้ |
| RV4 | 5'-GACTGAAGGAACTGATC-3' (50°ซ) | สร้างในการทดลองนี้ |
| T7 | 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (56°ซ) | บริษัท Promega, USA |
| SP6 | 5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3' (50°ซ) | บริษัท Promega, USA |
| NCO | 5'-GCCGACATCCATGGGAT-3' (54°ซ) | สร้างในการทดลองนี้ |
| FW1 | 5'-AATCTCTTCCCGCCAGA-3' (52°ซ) | สร้างในการทดลองนี้ |
| FW2 | 5'-GATCCAATGAACGCGAT-3' (50°ซ) | สร้างในการทดลองนี้ |
| FW3 | 5'-GTGGTCCTTGAACTTGA-3' (50°ซ) | สร้างในการทดลองนี้ |
| PHNF | 5'-TGGATGGCGTCCTGGTTC-3' (58°ซ) | สร้างในการทดลองนี้ |
| PHNR | 5'-CTGACGTTTATTCGTGAAC-3' (54°ซ) | สร้างในการทดลองนี้ |

## 3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.1 เลี้ยง *Escherichia coli* ทุกสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวก ก1) ในกรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวก ข2) ใช้ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ กานามัยซิน (Km) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมพิซิลลิน (Am) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 $^{o}$ซ

3.5.2 เลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{o}$ซ ทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว เป็นเวลา 2-3 วัน และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สำหรับสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. เลี้ยงเช่นเดียวกันแต่มีการเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.3 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *E. coli* ทุกสายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลายต่างๆของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ นำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3 : 7 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ –20 $^{o}$ซ เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ –70 $^{o}$ซ เป็นเวลา 1 ปี

## 3.6 ค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลายต่างๆของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีชิ้นทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

3.6.1 เตรียมดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe)

3.6.1.1 สกัดพลาสมิด pSUP2021

สกัดพลาสมิด pSUP2021 ซึ่งมีทรานสโปซอน Tn*5* จาก *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข3) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ ด้วย

ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครฟิวจ์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แขวนลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ –20 $^{o}$ซ

3.6.1.2 เตรียมชิ้นส่วนของทรานสโปซอน Tn*5*

ตัดพลาสมิด pSUP2021 ประมาณ 10 ไมโครกรัม ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII (Promega, USA) อย่างสมบูรณ์ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| ดีเอ็นเอ | 0.5-10 | ไมโครกรัม |
| 10X บัฟเฟอร์ | 1/10 | ของปริมาตรทั้งหมด |
| เรสทริกชันเอนไซม์ | 3-5 | ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ |
| น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ | | ปรับปริมาตรตามต้องการ |

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

จากนั้นทำการแยกพลาสมิดที่ตัดไว้ด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ซึ่งทำโดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 0.7% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจล

ที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ 1XTAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (ภาคผนวก ข22) ให้ความเข้มข้นของสีเป็น 1 เท่า โดยอาจจะปรับปริมาตรด้วยน้ำในกรณีใช้ปริมาตรของดีเอ็นเอน้อย หยอดสารผสมลงในช่องวิ่งและหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน λDNA/*Hin*dIII จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ดังนี้ ชุดทำอีเลคโทรโฟเรซิส Mini Sub-Cell GT ใช้ความต่างศักย์ 75 โวลต์ หรือชุดทำอีเลคโทรโฟเรซิส Mupid-2 ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข23) เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.4 กิโลเบส ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของทรานสโปซอน Tn*5* ออกจากอะกาโรสเจลด้วย Geneclean II Kit (BIO101, USA) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ตัดอะกาโรสเจลตรงบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยใส่ไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติมสารละลายโซเดียมไอโอไดด์ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 45-55 $^{o}$ซ เป็นเวลา 5 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด เติมสารแขวนลอยที่เข้ากันของ glass milk ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายดีเอ็นเอเข้ากันกับ glass milk แล้วทำการบ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างบ่มให้กลับหลอดเบาๆเพื่อป้องกัน glass milk ตกตะกอนทุก 1-2 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลาย new wash ปริมาตร 500-700 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งที่ล้างให้กระจายตะกอนออกให้หมดแล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ระเหยแห้งตะกอนแล้วชะดีเอ็นเอออกจากตะกอน glass milk ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยกระจายตะกอนออกให้เข้ากันดีในน้ำ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ถ่ายส่วนน้ำใสที่มีชิ้นดีเอ็นเอละลายอยู่ไปยังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เก็บรักษาชิ้นดีเอ็นเอไว้ที่ -20 $^{o}$ซ

3.6.1.3 ติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย Digoxigenin-dUTP ด้วยวิธี Random labeling

ติดฉลากดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5* โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข12)

ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.1.2 ปริมาตร 16 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอ แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย DIG High Prime (หลอดหมายเลข 1) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมเบาๆให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำอุ่น 65 $^{o}$ซ เป็นเวลา 10 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอติดตามไว้ที่อุณหภูมิ -20 $^{o}$ซ

ประมาณปริมาณดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5* ที่ถูกติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) ด้วยการเจือจางดีเอ็นเอติดตามใน DNA dilution buffer (หลอดหมายเลข 3) ตามตารางที่ 3.4

**ตารางที่ 3.4 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้ว**

| หลอดที่ทำการเจือจาง | ปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ ต่อ DNA dilution buffer (μl) |
|---|---|
| 1. 1 : 100 | 1/99 |
| 2. หลอดที่ 1 เจือจาง 1 : 3.3 | 15/35 |
| 3. หลอดที่ 1 เจือจาง 1 : 10 | 5/45 |
| 4. หลอดที่ 2 เจือจาง 1 : 10 | 5/45 |
| 5. หลอดที่ 3 เจือจาง 1 : 10 | 5/45 |

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วหลอด 1-5 อย่างละ 1 ไมโครลิตร หยดลงบนไนลอนเมมเบรนที่ตัดไว้เป็นแถบยาวเล็กๆ (strip) ทำควบคู่กับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยการเจือจางแบบเดียวกับวิธีการข้างต้นแล้วหยดลงบนไนลอนเมมเบรนอีกแผ่นหนึ่ง ทิ้งไว้ให้แห้ง ทำการตรึงดีเอ็นเอให้เกาะติดบนเมมเบรนด้วยการวางเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร แล้วนำไปจุ่มในสารละลายแต่ละชนิดตามลำดับขั้นตอนดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.5

**ตารางที่ 3.5 ขั้นตอนการหาปริมาณดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลาก**

| หลอดที่ | สารละลาย | เวลา (นาที) |
|---|---|---|
| 1 | Blocking solution | 2 |
| 2 | Antibody solution (1 : 5,000 ใน Blocking solution) | 3 |
| 1 | Blocking solution | 1 |
| 3 | Maleic acid buffer | 1 |
| 4 | Detection buffer | 1 |
| 5 | Color-substrate solution | 5-30 |

บ่มแถบทดสอบดีเอ็นเอในหลอดที่ 5 ในที่มืดจนเกิดจุดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์สีม่วงน้ำเงิน เมื่อจุดสีบนแถบทดสอบขึ้นจนชัดเจนทุกจุดแล้วให้ทำการล้างแถบทดสอบด้วยน้ำกลั่นทิ้งไว้ให้แห้ง เทียบสีที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยที่ดีเอ็นเอมาตรฐานมีความเข้มข้นดังนี้ 50, 15, 5, 1.5, 0.5 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

3.6.2 เตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลายต่างๆ สำหรับการไฮบริไดซ์

3.6.2.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลายต่างๆ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลายต่างๆ ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข15) ปริมาตร 576 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข5) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข25) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของโปรตีเนสเคใน 0.5% SDS) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข17) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 $^{o}$ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข20) ด้วยอัตราส่วนปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย (ประมาณ 0.7-0.8 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข19) ด้วยอัตราส่วนปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโปรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใสกลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของไอโซโปรพานอลทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข26) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บที่อุณหภูมิ 4 $^{o}$ซ

3.6.2.2 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ($A_{260}$ และ $A_{280}$) คำนวณค่า $A_{260}$ ต่อ $A_{280}$ ค่าที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $A_{260}$x 50 x dilution factor

3.6.2.3 ตัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายชนิดต่างๆและสายพันธุ์ดั้งเดิมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI

ตัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายชนิดต่างๆและสายพันธุ์ดั้งเดิมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ประมาณ 10 ไมโครกรัม ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI (Promega, USA) อย่างสมบูรณ์ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| ดีเอ็นเอ | 0.5-10 | ไมโครกรัม |
| 10X บัฟเฟอร์ | 1/10 | ของปริมาตรทั้งหมด |
| เรสทริกชันเอนไซม์ | 3-5 | ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ |
| น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ | | ปรับปริมาตรตามต้องการ |

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

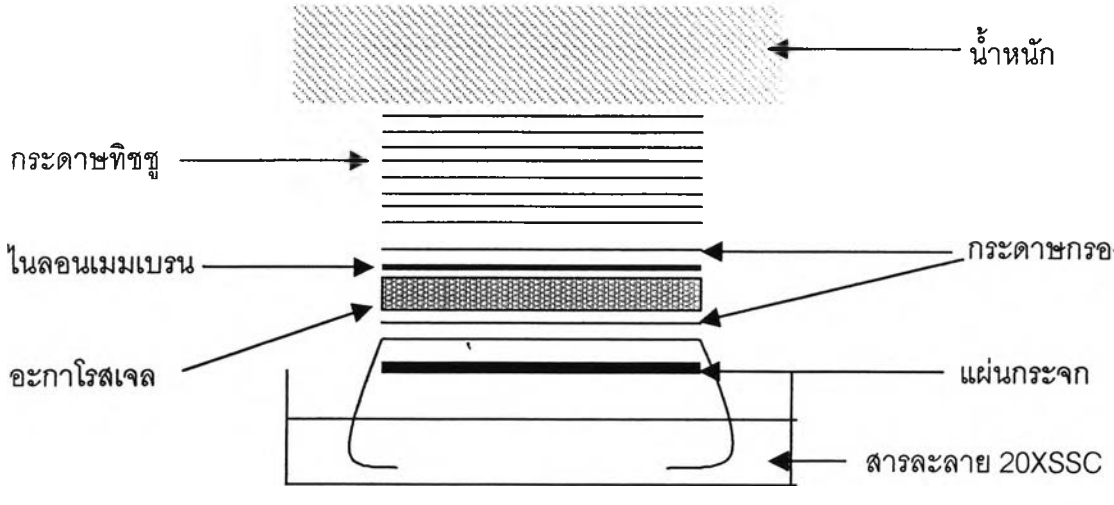
จากนั้นทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้ด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

3.6.2.4 ย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน (Southern blot)

นำดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายชนิดต่างๆ ที่ตัดแล้วจากข้อ 3.6.2.3 มาทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน λDNA/*Hin*dIII ใช้ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) และใช้พลาสมิด pSUP2021 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) จากนั้นทำการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วถ่ายภาพเก็บไว้โดยใช้ไม้บรรทัดแนบด้านข้างอะกาโรสเจลเพื่อระบุระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ

ทำการเตรียมอะกาโรสเจลเพื่อทำการถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน เริ่มจากการล้างชิ้นอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล ในกล่องพลาสติก โดยให้สารละลายท่วมอะกาโรสเจลเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม denaturation buffer (ภาคผนวก ข6) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร หรือเติมให้ท่วมอะกาโรสเจล เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ล้างด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นเติม neutralization buffer (ภาคผนวก ข7) เป็นเวลา 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

การถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยวิธี Capillary transfer (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยการวัดขนาดของชิ้นอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้ กำหนดขนาด A คือขนาดเท่ากับขนาดของแผ่นอะกาโรสเจล ขนาด B คือขนาดความกว้างเท่ากับด้านกว้างของอะกาโรสเจลแต่ความยาวจะยาวกว่าด้านยาวของอะกาโรสเจล ตัดไนลอนเมมเบรนให้มีขนาด A จำนวน 1 แผ่น ตัดกระดาษกรองให้มีขนาด A จำนวน 2 แผ่น และขนาด B จำนวน 1 แผ่น ตัดกระดาษทิชชูให้มีขนาด A เพื่อใช้เป็น paper towel สูงประมาณ 5 เซนติเมตร การจัดวางชั้นต่างๆของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.1 โดยเริ่มจากการเติม 20XSSC (ภาคผนวก ข8) ซึ่งเป็น transfer buffer ลงในกล่องพลาสติกปริมาตรพอประมาณ นำกระดาษกรองขนาด B ที่อิ่มตัวด้วย 20XSSC วางพาดบนแผ่นกระจกโดยให้ปลายทั้งสองข้างของกระดาษกรองแช่ในบัฟเฟอร์เพื่อเป็นสะพานให้ 20XSSC เคลื่อนที่ขึ้นมา จากนั้นวางกระดาษกรองขนาด A ที่อิ่มตัวด้วย 20XSSC ซ้อนขึ้นด้านบน แล้วนำอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้วางลงด้านบนในลักษณะที่คว่ำหน้าเจลลงด้านล่าง วางไนลอนเมมเบรนที่อิ่มตัวด้วย 20XSSC ลงบนเจล ต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นในแต่ละชั้น จากนั้นจึงวางกระดาษกรองขนาด A แล้ววางชั้นของกระดาษทิชชูและน้ำหนักกดด้านบน ตามลำดับ ทำการยึดชั้นต่างๆให้มั่นคงด้วยกระดาษกาว และระวังไม่ให้ชั้นทิชชูแตะโดนอะกาโรสเจลหรือกระดาษกรองด้านล่าง ตั้งทิ้งไว้ให้บัฟเฟอร์เคลื่อนที่ขึ้นมาเป็นเวลาข้ามคืน



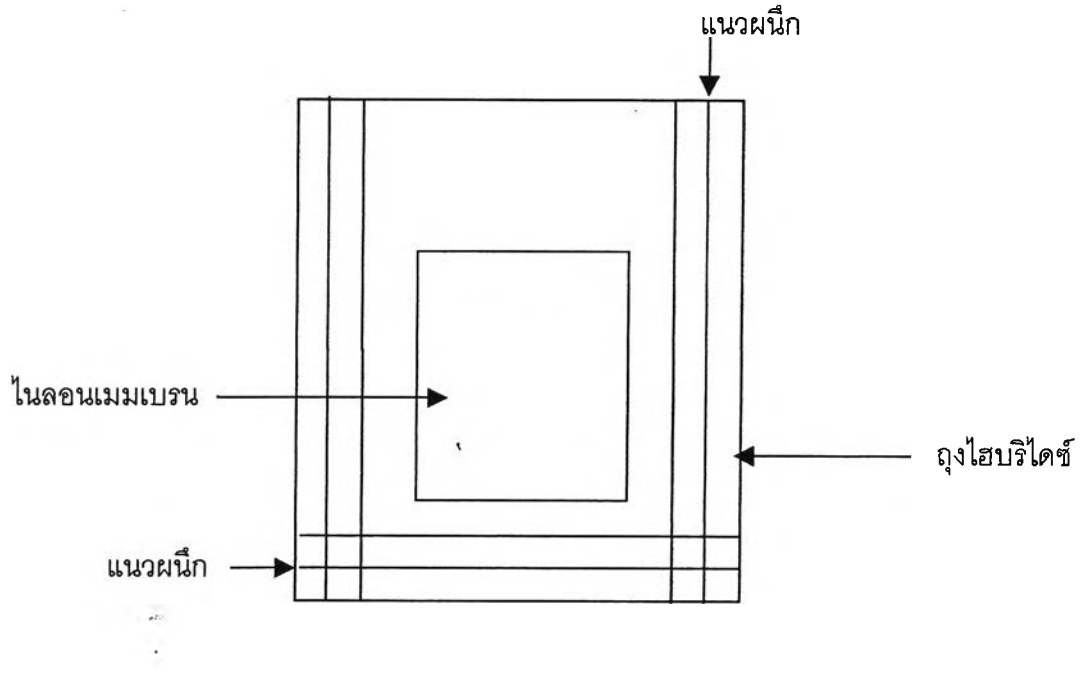

**รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงการจัดวางชั้นต่างๆของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน โดยวิธี Capillary transfer**

I 20646781

ภายหลังจากการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน ยกชั้นที่อยู่เหนือไนลอนเมมเบรนออก แล้วใช้กรรไกรที่สะอาดตัดที่มุมด้านหนึ่งเพื่อเป็นการบ่งบอกถึงด้านของไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเออยู่ นำไนลอนเมมเบรนมาใส่ในกล่องล้างด้วย 2XSSC (ภาคผนวก ข9) โดยการเขย่าเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปซับให้แห้งและทำการตรึงดีเอ็นเอให้ติดบนไนลอนเมมเบรนด้วยการนำไนลอนเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 3 นาที เก็บไนลอนเมมเบรนไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

3.6.3 ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5*

ทำพรีไฮบริไดเซชัน (prehybridization) โดยนำไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอมาใส่ถุงพลาสติกสำหรับไฮบริไดเซชันและผนึกด้านข้างให้สนิทด้วยเครื่องผนึกที่ใช้ความร้อนดังรูปที่ 3.2 เติมสารละลาย DIG Easy Hyb (ภาคผนวก ข12) ซึ่งทำการอุ่นไว้ที่อุณหภูมิที่จะทำไฮบริไดเซชัน (อุณหภูมิ 42 $^{o}$ซ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อ 100 ตารางเซนติเมตร ไล่ฟองอากาศออกให้หมด จากนั้นผนึกปิดให้สนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 $^{o}$ซ เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที




**รูปที่ 3.2 ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับทำไฮบริไดเซชัน**

เตรียมสารละลายดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5* สำหรับการไฮบริไดซ์ โดยเติมดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5* ในสารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร (ให้มีความ

เข้มข้น 5-25 นาโนกรัมต่อสารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ที่บรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว (falcon tube) จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดเบาๆ แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อดีเนเจอร์สายดีเอ็นเอติดตาม ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิไฮบริไดซ์

เมื่อทำพรีไฮบริไดเซชันเสร็จแล้วตัดถุงพลาสติกออก เทสารละลาย DIG Easy Hyb ทิ้ง แล้วย้ายเมมเบรนมาที่ถุงพลาสติกใบใหม่ จากนั้นทำการผนึกด้านข้างถุงเหมือนเดิม เทสารละลายดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 ที่เตรียมไว้ข้างต้นลงไป ไล่ฟองอากาศออกให้หมด แล้วปิดผนึกด้านบน 2 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 $^{o}$ซ ด้วยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) (สารละลายดีเอ็นเอติดตามที่ใช้แล้วกลับนำมาใช้ได้อีกหลายครั้งด้วยการเก็บรักษาในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่อุณหภูมิ –20 $^{o}$ซ เมื่อนำมาใช้ในครั้งต่อไปให้เติมดีเอ็นเอติดตามเพิ่มอีก 2-3 ไมโครลิตร และก่อนใช้ต้องทำการดีเนเจอร์ดีเอ็นเอติดตามที่อุณหภูมิ 68 $^{o}$ซ เป็นเวลา 10 นาที ระวังอย่านำไปต้มจนเดือดเพราะสารละลาย DIG Easy Hyb จะเสียสภาพ)

เมื่อเสร็จสิ้นไฮบริไดเซชันแล้ว นำไนลอนเมมเบรนที่ได้มาล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออกโดยการนำมาใส่ในกล่องพลาสติกแล้วล้างดีเอ็นเอติดตามที่จับกับไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย 2XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข10) ปริมาตร 30-50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมกับการเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นล้างอีก 2 ครั้งด้วย 0.5XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข11) ที่อุณหภูมิ 68 $^{o}$ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

ตรวจหาตำแหน่งดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ไฮบริไดซ์ได้กับดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 ด้วยวิธี Enzyme immunoassay โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข12) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง), เริ่มจากนำไนลอนเมมเบรนที่ล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออกแล้วมาล้างด้วย maleic acid buffer (ภาคผนวก ข12) ในกล่องพลาสติกโดยใช้ปริมาตรท่วมไนลอนเมมเบรน เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเติม blocking solution (ภาคผนวก ข12) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วเติม antibody solution (Anti-DIG-AP conjugate) ที่เตรียมโดยการเจือจาง Anti-DIG-AP conjugate (ภาคผนวก ข12) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใน blocking solution ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว) (เจือจาง 1 : 5,000) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วล้าง Anti-DIG-AP conjugate ส่วนเกินออกด้วย maleic acid buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เติม detection buffer ปริมาตร 20

มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเตรียมสับสเตรท NBT/BCIP (ภาคผนวก ข12) โดยเจือจางสารละลายในหลอดที่ 5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใน detection buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่หุ้มให้มืด) ย้ายไนลอนเมมเบรนมาใส่ในถุงพลาสติกแล้วติดผนึกด้านข้างเช่นเดียวกับขั้นไฮบริไดซ์ จากนั้นเทสับสเตรทที่เตรียมไว้ลงในถุง ไล่ฟองอากาศออกแล้วผนึกปิดถุง นำไปบ่มในที่มืด (ห้ามเขย่า) ตั้งทิ้งไว้จนกว่าจะเกิดแถบสีชัดเจน (ประมาณ 1 ชั่วโมง – 16 ชั่วโมง) เมื่อเสร็จสิ้นการบ่มกับสับสเตรทแล้วนำเมมเบรนออกจากถุงพลาสติกมาล้างในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที ซับและตากให้แห้งจึงเก็บใส่ถุง

## 3.7 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. ที่มีทรานสโปซอน Tn*5* สอดแทรกอยู่

### 3.7.1 สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5*

ตัดดีเอ็นเอสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่เตรียมไว้อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI ตามวิธีในข้อ 3.6.2.3 นำดีเอ็นเอที่ตัดได้ไปทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตัดอะกาโรสเจลให้คลุมตรงบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5* โดยเทียบผลจากการไฮบริไดซ์ในข้อ 3.6.3 จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วย Geneclean II Kit (BIO101, USA) ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2

### 3.7.2 สกัดและทำพลาสมิดเวกเตอร์ให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน

สกัดพลาสมิด pBluescript KS(+/-) (Stratagene) จาก *E. coli* DH5α ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตัดพลาสมิดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI แล้วนำพลาสมิดที่ตัดแล้วมาสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม โดยเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตรเท่ากับปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอเริ่มต้น ผสมจนกระทั่งสารละลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ตกตะกอนพลาสมิดด้วยเอธานอล โดยเติมโซเดียมอะซีเตทค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข24) ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเติม absolute ethanol ปริมาตร

2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตกตะกอนที่อุณหภูมิ –20 $^{o}$ซ เป็นเวลา 60 นาที หรือ ที่อุณหภูมิ –70 $^{o}$ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 $^{o}$ซ เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70% โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 $^{o}$ซ เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง ละลายพลาสมิดที่ได้ใน Tris-HCl ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 ด้วยปริมาตรที่เหมาะสม (น้อยกว่าปริมาตรเริ่มต้นก่อนที่จะทำการสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม)

3.7.3 การกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์

กำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์เพื่อป้องกันการเชื่อมกันเองของปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกตัดให้เป็นปลายเปิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แล้ว โดยใช้ Alkaline phosphatase (Promega, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยเริ่มจากการเจือจาง Alkaline phosphatase จากหลอดตั้งต้นความเข้มข้น 1 หน่วยต่อไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร ด้วยการใช้ส่วนผสมของการเจือจางดังนี้

| | |
|---|---|
| Alkaline phosphatase 1 หน่วยต่อไมโครลิตร | 1 ไมโครลิตร |
| 10X บัฟเฟอร์ | 10 ไมโครลิตร |
| น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ | 89 ไมโครลิตร |
| ปริมาตรสุทธิ | 100 ไมโครลิตร |

ผสมให้เข้ากัน (ควรทำการเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้งหรือเก็บรักษาไว้ใช้ได้ที่อุณหภูมิ –20 $^{o}$ซ ไม่เกิน 1 สัปดาห์))

จากนั้นเพิ่มปริมาตรของสารละลายพลาสมิดเวกเตอร์จากข้อ 3.7.2 ให้มีปริมาตร 40 ไมโครลิตร ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด แล้วทำส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

| | |
|---|---|
| พลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript KS(+/-)/*Eco*RI 1-5 ไมโครกรัม | 40 ไมโครลิตร |
| 10X บัฟเฟอร์ | 5 ไมโครลิตร |
| Alkaline phosphatase 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร | 5 ไมโครลิตร |
| ปริมาตรสุทธิ | 50 ไมโครลิตร |

บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม Alkaline phosphatase ที่เจือจางแล้วความเข้มข้น 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาตรเท่าเดิมลงไปอีกครั้ง แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ ต่อไปอีกเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนี้ทำการสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม และตกตะกอนด้วยเอธานอลตามขั้นตอนดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.2 สุดท้ายละลายพลาสมิดเวกเตอร์ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อในปริมาตรที่เหมาะสม (ปริมาตรน้อยที่สุดที่จะละลายดีเอ็นเอได้และน้อยกว่าปริมาตรเริ่มต้น)

3.7.4 ทำการไลเกท (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์

ไลเกทชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.7.1 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript KS(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI ในข้อ 3.7.3 ด้วยไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา10 ไมโครลิตร ดังนี้

| | |
|---|---|
| ชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.7.1 ประมาณ 300 นาโนกรัม | 3 ไมโครลิตร |
| พลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript KS(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ประมาณ 50-200 นาโนกรัม | 1 ไมโครลิตร |
| 10X ไลเกชันบัฟเฟอร์ | 1 ไมโครลิตร |
| T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 หน่วยต่อไมโครลิตร | 1 ไมโครลิตร |
| น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ | 5 ไมโครลิตร |

ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 16 $^{o}$ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (อัตราส่วนระหว่างชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกและพลาสมิดเวกเตอร์สามารถจะแปรผันได้ตามความเหมาะสมของปริมาณดีเอ็นเอ)

3.7.5 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.7.4 เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5α และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

3.7.5.1 ทำคอมพีเทนท์เซลล์ (competent cell)

คอมพีเทนท์เซลล์ทำด้วยวิธี Calcium chloride (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* DH5α ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (ภาคผนวก ก3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) เพื่อใช้เป็น

หัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 700 ไมโครลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน arm flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ จนกระทั่ง $OD_{600}$ มีค่าเท่ากับ 0.3-0.5

ระหว่างช่วงที่รอการเจริญของเชื้อให้ทำการเตรียมสารละลาย $MgSO_4$/ $CaCl_2$ (เตรียมก่อนใช้และทุกขั้นตอนทำในอ่างน้ำแข็ง) ดังนี้ ผสมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย $CaCl_2$ ที่ปลอดเชื้อและเย็นความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติกฝาเกรียว ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งให้ได้อุณหภูมิ 4 $^{o}$ซ จากนั้นเติมสารละลาย $MgSO_4$ ที่ปลอดเชื้อและเย็นความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งก่อนจะใช้

เมื่อได้ค่า $OD_{600}$ ตามที่ต้องการแล้วให้ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อปริมาตร 35 มิลลิลิตร ที่เย็น จำนวน 2 หลอด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 $^{o}$ซ ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4 $^{o}$ซ ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย $MgSO_4$/ $CaCl_2$ ที่เย็นปริมาตร 10.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอด กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย $MgSO_4$/ $CaCl_2$ (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตกตะกอนเซลล์และสารละลาย $MgSO_4$/ $CaCl_2$ ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30-45 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 $^{o}$ซ ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย $MgSO_4$/ $CaCl_2$ ที่เย็นปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอดอีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย $MgSO_4$/ $CaCl_2$ แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 45 นาที หรือมากกว่า แล้วเติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อปริมาตร 875 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลอดและผสมให้เข้ากันเบาๆ,สุดท้ายทำการแบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตรประมาณหลอดละ 100-300 ไมโครลิตร แล้วเก็บคอมพีเทนท์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70 $^{o}$ซ

3.7.5.2 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.7.4 เข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) โดยทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4 $^{o}$ซ ยกเว้นช่วงทำ heat shock ดังนี้ นำคอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* DH5α ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 $^{o}$ซ มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ เพื่อป้องกันเซลล์ตาย เมื่อเซลล์ละลายแล้วให้ใส่รีคอมบิ

แนนท์พลาสมิดที่ไลเกทไว้จากข้อ 3.7.4 ทั้งหมดลงในคอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* DH5α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 $^{o}$ซ เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว 2YT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

3.7.5.3 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

คัดเลือกโคลนหรือโคโลนีของ *E. coli* DH5α ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีทรานสโปซอน Tn*5* สอดแทรกอยู่ ทำโดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E. coli* DH5α ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วจากข้อ 3.7.5.2 มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งให้เหลือปริมาตรตามต้องการเพื่อทำเซลล์ให้เข้มข้นและกระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหลือให้เข้ากัน จากนั้นนำสารแขวนลอยของเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ซึ่งผสมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (เพื่อคัดเลือกยีนเครื่องหมายบน Tn*5*) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ เป็นเวลาข้ามคืน

3.7.6 สับโคลน (subclone) ชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ในข้อ 3.7.5.3

การสับโคลนทำเพื่อตัดแบ่งครึ่งทรานสโปซอน Tn*5* ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อให้เหมาะต่อการนำไปหาลำดับเบส เริ่มจากการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดออกจากเชื้อ *E. coli* DH5α ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ได้กล่าวข้างต้น จากนั้นทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 2 ชนิด ร่วมกัน (double digest) ได้แก่ เรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI แล้วนำไปทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟริซีสและทำการสกัดชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส ออกจากเจลด้วย Geneclean II Kit (BIO101, USA) ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น จากนั้นทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ดังกล่าวกับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-7Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI แล้วทำการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α

ทำการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเกลี่ยบนผิวอาหารด้วย X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข27) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข 28) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร (ทำการเตรียมเกลี่ยสารดังกล่าวก่อนใช้ทุกครั้ง) เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในที่มืดและตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 30 นาที – 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารเคมีที่ผสมใน X-gal ระเหยออก เพื่อจะไม่เป็นอันตรายต่อเชื้อ แล้วจึงทำการเกลี่ยเชื้อที่ทำการทรานสฟอร์มแล้วทับลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{O}$ซ เป็นเวลาข้ามคืน และทำการคัดเลือกโคลนโดยการคัดเลือกที่โคโลนีสีขาว จากนั้นทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ แล้วทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสเพื่อพิสูจน์ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการอีกครั้งหนึ่ง

### 3.8 ค้นหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลายต่างๆของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและอยู่ข้างเคียงทรานสโปซอน Tn*5* ด้วยเทคนิค Inverse Polymerase Chain Reaction (Inverse PCR)

3.8.1 เตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ (template) ในการทำ Inverse PCR

3.8.1.1 สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5* ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลายต่างๆ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลายต่างๆที่มีทรานสโปซอน Tn*5* สอดแทรกอยู่ ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.2.1 และตัดดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI อย่างสมบูรณ์ตามข้อ 3.6.2.3 นำดีเอ็นเอที่ตัดได้ไปทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตัดอะกาโรสเจลให้คลุมตรงบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็เอติดตามทรานสโปซอน Tn*5* โดยเทียบดูกับผลจากการไฮบริไดซ์ในข้อ 3.6.3 จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วย Geneclean II Kit (BIO101, USA) ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในในข้อ 3.6.1.2 โดยสุดท้ายละลายดีเอ็นเอในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตรน้อยที่สุดที่จะละลายดีเอ็นเอได้ นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง $A_{260}$ และ $A_{280}$ คำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอตามสูตรในข้อ 3.6.2.2

3.8.1.2 ทำการเชื่อมดีเอ็นเอภายในสายเดียวกัน (intramolecular joining) และทำชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ในข้อ 3.8.1.1 มาเชื่อมปลายภายในสายเดียวกันโดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

| | |
|---|---|
| ชิ้นดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร | 10 ไมโครลิตร |
| 10X ไลเกชันบัฟเฟอร์ | 2 ไมโครลิตร |
| T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 หน่วยต่อไมโครลิตร | 2 ไมโครลิตร |
| น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปรับปริมาตรให้ครบ | 20 ไมโครลิตร |

ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 16 $^{O}$ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

เมื่อทำการเชื่อมดีเอ็นเอแม่แบบภายในสายเดียวกันแล้วให้ทำลายเอนไซม์ไลเกสด้วยความร้อน (heat inactivation) ที่อุณหภูมิ 65-70 $^{O}$ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอลตามวิธีในข้อ 3.7.2 สุดท้ายละลายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตรน้อยที่สุดที่จะละลายดีเอ็นเอได้

3.8.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

การทำ Inverse PCR ในงานวิจัยนี้ใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ออกแบบตามวิธีของ Rich และ Willis (1990) โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาของสารแต่ละตัวเป็นดังนี้ สารละลาย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (ของแต่ละตัว) (Promega, USA) (ภาคผนวก ข29) สารละลาย TN5-OE primer ที่จำเพาะกับบริเวณปลายทั้ง 2 ด้านของทรานสโปซอน Tn*5* ปริมาณ 50 พิโคโมล 1X *Taq* DNA polymerase buffer *Taq* DNA polymerase (Promega, USA) ปริมาณ 2.5 หน่วย ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้ในข้อ 3.8.1 ปริมาณ 1 พิโคกรัม -1 ไมโครกรัม

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| hot start | ที่อุณหภูมิ 95 °ซ | เป็นเวลา 3 นาที | |
| denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 °ซ | เป็นเวลา 1 นาที | 35 รอบ |
| annealing | ที่อุณหภูมิ 55 °ซ | เป็นเวลา 2 นาที | |
| extention | ที่อุณหภูมิ 72 °ซ | เป็นเวลา 4 นาที | |
| final extention | ที่อุณหภูมิ 72 °ซ | เป็นเวลา 5 นาที | |

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

**3.9 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนข้างเคียงทรานสโปซอนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของทรานสโปซอน**

3.9.1 ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของปลายทรานสโปซอน Tn*5*

ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ โดยอาศัยลำดับเบสของปลายชิ้นทรานสโปซอนทั้งสองด้านที่หาได้จาก GenBank (Accession No.U00004) โดยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์มีทิศทาง 5' → 3' ออกจากชิ้นทรานสโปซอน สังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์โดยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเออัตโนมัติโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ตั้งชื่อโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์นี้ว่า TN5-OE มีลำดับเบสดังนี้ 5'-GGTTCCGTTCAGGACGCTAC-3'

3.9.2 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่อยู่ติดกับทรานสโปซอนและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GenBank

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่อยู่ติดกับทรานสโปซอนทำโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวคือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดในข้อ 3.7.6 ที่สกัดจาก *E. coli*

DH5α ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่อยู่ติดกับทรานสโปซอนที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.1 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่จะเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วจึงนำข้อมูลส่วนที่เป็นลำดับกรดอะมิโนที่ได้เข้าไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เป็นลำดับกรดอะมิโนของยีนที่มีอยู่ใน GenBank

**3.10 ค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของสายพันธุ์ดั้งเดิม *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนอยู่ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)**

3.10.1 ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn*5*

ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์โดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่อยู่ติดกับทรานสโปซอน Tn*5* ที่หาได้จากข้อ 3.9 ซึ่งคาดว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวน่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน จากนั้นทำการออกแบบทั้ง forward primer และ reverse primer ตั้งชื่อว่า PHNF และ PHNR ตามลำดับ ซึ่งมีลำดับเบสในทิศทาง 5'→ 3' ดังนี้คือ 5'-TGGATGGCGTCCTGGTTC-3' และ 5'-CTGACGTTTATTCGTGAAC-3' ตามลำดับ

3.10.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

$MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ 3 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1.5 มิลลิโมลาร์)
10X *Taq* DNA polymerase buffer 5 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1X *Taq* DNA polymerase buffer)
สารละลาย PHNF primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ 2.5 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)
สารละลาย PHNR primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ 2.5 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)
สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ของแต่ละตัว) 1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)
เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร 0.5 ไมโครลิตร
(ปริมาณสุดท้าย 2.5 หน่วย)
ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.7.6 ความเข้มข้น 10 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 34.5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| hot start | ที่อุณหภูมิ 95 $^{o}$ซ | เป็นเวลา 3 นาที | |
| denaturation | ที่อุณหภูมิ 95 $^{o}$ซ | เป็นเวลา 1 นาที | 30 รอบ |
| annealing | ที่อุณหภูมิ 53 $^{o}$ซ | เป็นเวลา 1 นาที | |
| extention | ที่อุณหภูมิ 72 $^{o}$ซ | เป็นเวลา 1 นาที | |
| final extention | ที่อุณหภูมิ 72 $^{o}$ซ | เป็นเวลา 5 นาที | |

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

3.10.3 เตรียมดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.10.2 มาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามด้วยการทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสแยกชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการออกจากดีเอ็นเออื่นๆ และทำการสกัดแยกเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวออกจากอะกาโรสเจล จากนั้นทำการติดฉลากด้วย DIG โดยใช้ชุดสำเร็จตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1

3.10.4 เตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สำหรับการไฮบริไดซ์

ทำการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆที่เหมาะสม จากนั้นทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสแล้วทำการเคลื่อนย้ายดีเอ็เอจากอะกาโรสเจลไปสู่ไนลอนเมมเบรนตามขั้นตอนและวิธีการดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.6.2

3.10.5 ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

นำไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอจากข้อ 3.10.4 มาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนซึ่งได้เตรียมไว้ในข้อ 3.10.3 ตามขั้นตอนและวิธีการดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.6.3 โดยมีดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรสในข้อ 3.10.2 เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และพลาสมิด pGEM-7Zf(+/-) เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control)

## 3.11 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

### 3.11.1 ไลเกทชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเข้ายังพลาสมิดเวกเตอร์และทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* JM109

เตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI-*Hin*dIII และเกิดสัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดเหมาะสมที่จะทำการโคลน เตรียมพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI-*Hin*dIII ไปทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสและทำการสกัดแยกพลาสมิดเวกเตอร์เฉพาะชิ้นใหญ่ออกจากอะกาโรสเจลเพื่อนำมาใช้ในการโคลน จากนั้นทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ที่เตรียมไว้และทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* JM109 ที่เตรียมไว้ตามขั้นตอนและวิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.5

### 3.11.2 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนด้วยวิธี Blue/White selection ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.6 โดยคัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยขั้นตอนลงเชื้อก่อนสกัดพลาสมิดจะทำการผสมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB จำนวน 10 โคลนต่อ 1 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$ซ เป็นเวลาข้ามคืน แล้วนำมาสกัดด้วยวิธี Alkaline lysis (Sambrook และ Russell, 2001) ดังขั้นตอนต่อไปนี้ ถ่ายเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้งให้หมด นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข21) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข21) ที่เตรียมใหม่ๆปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข21) ที่เย็น ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 3-5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนมาประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วเติมเอธานอล 95 % ปริมาตร 2 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ –20 $^{o}$ซ ประมาณครึ่งชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของเอธานอล 95 % ทิ้ง ปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัด ปริมาตรประมาณ 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิทแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บที่อุณหภูมิ –20 $^{0}$ซ

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้มาทำการคัดเลือกด้วยวิธี Dot blot hybridization (Sambrook และ Russell, 2001) โดยตีตารางลงบนไนลอนเมมเบรนและระบุตำแหน่งโคลนให้ชัดเจน ระหว่างนั้นแช่ไนลอนเมมเบรนในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเพื่อไล่ฟองอากาศออก ต้มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที นำเมมเบรนออกจากน้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เมมเบรนแห้งหมาด จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวมาหยดลงบนแต่ละช่องที่ระบุตำแหน่งไว้ครั้งละ 1 ไมโครลิตร รอให้แห้งแล้วหยดซ้ำจนครบ 3-5 ไมโครลิตร โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.10.2 เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) เมื่อหยดตัวอย่างครบและแห้งแล้วไปทำการตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับเมมเบรนด้วยการนำเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 3 นาที แล้วนำไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากข้อ 3.10.3 ด้วยวิธีการและขั้นตอนตามที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.6.3 เมื่อคัดเลือกกลุ่มโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการได้แล้วก็นำกลุ่มโคลนมาสกัดแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของแต่ละโคลนแล้วนำไปตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่จดจำบริเวณที่โคลน (cloning site) เพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกออกจากพลาสมิดเวกเตอร์ จากนั้นนำไปทำ Southern hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากข้อ 3.10.3 ตามวิธีการและขั้นตอนที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.6.3

เมื่อคัดเลือกโคลนที่ต้องการได้แล้วทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ตามวิธีการและขั้นตอนที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.9 โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบางส่วนที่อยู่ข้างเคียงทรานสโปซอน Tn*5* ที่ทราบข้อมูลแล้วก่อนหน้านี้ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบางส่วนได้มาจาก primer walking บางส่วนได้มาจากการสับโคลนและใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก เมื่อได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกครบถ้วนแล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาแผนที่การตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์โดยละเอียด รวมทั้งหากรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ในการถอด

รหัสของยีนเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยใช้การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และรวมไปถึงการหาความเหมือนและบริเวณที่คาดว่าจะเป็นกรอบอ่านรหัสเปิดโดยเทียบกับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.1