บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo, Japan.
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany.
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น WB 14 ของบริษัท Memmert, Germany.
4. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Vortex Genie II G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE600 ของบริษัท Memmert, Germany.
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Pico ของบริษัท Kendro, Germany.
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
9. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. H1 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA.
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น ION-check10 ของบริษัท Radiometer, France.
12. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –70 $^{\circ}$ซ รุ่น REVCO ULT 1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA.
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –20 $^{\circ}$ซ รุ่น MDF-U536D ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
14. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)
    - Personal gel-electrophoresis apparatus รุ่น GelMate® 2000 ของบริษัท

TOYOBO, 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 MylabTH Thermo-Block SL TDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
17. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต 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)
24. ชุดคอมพิวเตอร์สำหรับถ่ายภาพ รุ่น UNIVERSAL HOOD ใช้โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.

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 Merck, Germany.
5. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
7. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland.

8. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท Merck, Germany.

9. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France.

10. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Merk, Germany.

11. น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของบริษัท 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), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \bullet 2H_2O$) 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. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.

18. เรสทริกชันเอนไซม์ทุกชนิดของบริษัท Promega, USA.

19. 1 kb DNA ladder ของบริษัท NewEngland Biolabs, USA.

20. 100 bp DNA ladder ของบริษัท NewEngland Biolabs, USA.

21. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, USA.

22. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท Promega, USA.

23. T4 DNA ligase ของบริษัท NewEngland Biolabs, USA.

24. อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ของบริษัท Promega, USA.

25. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA.

26. Proteinase K ของบริษัท Qiagen, Germany.

27. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ของบริษัท Promega, USA.

28. IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) ของบริษัท Wako, Japan.

29. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.

30. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick® Gel Extraction Kit ของบริษัท QIAGEN, USA.

31. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของบริษัท Roche, Germany.

32. ถุงไดแอลิซิส Cellu • Sep T3 ของบริษัท Membrane Filtration Products, USA.

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

3.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย	จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
E. coli สายพันธุ์ DH5α	φ80d*lacZ*△M15, *endA*1, *recA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17, *relA*1, *supE*44, *deoR*, △(*lacZYA-argF*) U169	Hanahan, 1983
Pseudomonas sp. A41	สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิพิด (rhamnolipid)	อารีย์ กิ่งฉิน, 2542

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 พลาสมิด

พลาสมิด	จีโนไทป์/ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
pBluescript KS(+/-) (2961 bp)	Ap^r, αlac/MCS	บริษัท Stratagene, USA
pGEM-3Zf(+/-) (3199 bp)	Ap^r, αlac/MCS	บริษัท Stratagene, USA
pBR123 (4500 bp)	Ap^r, มีชิ้นส่วน *Bam*HI-*Xho*I จากดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาดประมาณ 1.5 kb ในพลาสมิด pBluescript KS(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pBR530 (3500 bp)	Ap^r, มีชิ้นส่วน *Bam*HI-*Xho*I จากดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาดประมาณ 0.5 kb ในพลาสมิด pBluescript KS(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pBBG8 (4000 bp)	Ap^r, pBR123 ที่ตัดชิ้นส่วน *Bam*HI-*Bgl*II ขนาดประมาณ 0.5 kb ออก	สร้างในการทดลองนี้
pBP1 (4400 bp)	Ap^r, มีชิ้นส่วน *Bam*HI-*Pst*I จากดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาดประมาณ 1.2 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-)	สร้างในการทดลองนี้

ตารางที่ 3.2 พลาสมิด (ต่อ)

พลาสมิด	จีโนไทป์/ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
pBR157 (4000 bp)	Ap^r, มีชิ้นส่วน *Xho*I-*Bgl*II จากดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาดประมาณ 1 kb ใน พลาสมิด pBluescript KS(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pGA396 (4700 bp)	Ap^r, มีชิ้นส่วน *Eco*RI-*Pst*I จากดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาดประมาณ 1.5 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pN9 (4000 bp)	Ap^r, มีชิ้นส่วน *Eco*RI-*Bam*HI จาก pGA396 ขนาดประมาณ 0.9 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pKB261 (5000 bp)	Ap^r, มีชิ้นส่วน *Bam*HI จากดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ขนาดประมาณ 2.0 kb ในพลาสมิด pBluescript KS(+/-)	สร้างในการทดลองนี้

ตารางที่ 3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (T_m)	เอกสารอ้างอิง
T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (64°ซ)	บริษัท Promega, USA
T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3' (56°ซ)	บริษัท Promega, USA
SP6	5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3' (50°ซ)	บริษัท Promega, USA
M13 Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (52°ซ)	บริษัท Promega, USA
RA-F	5'-ATGCGGCGCGAAAGTCT-3' (54°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
RA-R	5'-GGTTGCTTCAGCAGGTG-3' (54°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
RR-F	5'-ATGAGGAATGACGGAGG-3' (52°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
RR-R	5'-GGCAGCCAGCGTCTTGT-3' (56°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
N912r	5'-GAGACCAGGTGATTGAC-3' (52°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
1BF	5'-CGACGAACTGACCTAC-3' (50°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
2BR	5'-CCTATGACAACGTTCG-3' (48°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
27f	5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (48°ซ)	Widada และคณะ (2002)
350f	5'-TACGGGAGGCAGCAG-3' (50°ซ)	Mueller และคณะ (1997)
1240r	5'-CCATTGTAGCACGTGT-3' (48°ซ)	Achenbach และคณะ (2001)
1492r	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (62°ซ)	Widada และคณะ (2002)

3. 5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.1) ทุกสายพันธุ์ *Escherichia coli* เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวก ก1) ในกรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Am) (ภาคผนวก ข2) ใช้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°ซ

3.5.2) เลี้ยง *Pseudomonas* sp. A41 เพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับ *Escherichia coli* แต่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ

3.5.3) เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *Escherichia coli* และ *Pseudomonas* sp. A41 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ นำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3 : 7 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 1 ปี

3.6 การพิสูจน์ลักษณะ *Pseudomonas* sp. A41 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

3.6.1) การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp A41 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

3.6.1.1) การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็ว 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 ของโปรตีนเนสเคใน 0.5% SDS) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข17) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข20) ด้วยอัตราส่วนปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข19) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของไอโซโพรพานอลทิ้งแล้วล้าง

ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข26) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

3.6.1.2) การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

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

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

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

3.6.2) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนี้ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์คือ forward primer 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ reverse primer 1492r (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') นอกจากนี้ในตารางที่ 3.4 จะแสดงส่วนผสมสารในปฏิกิริยา ความเข้มข้นสุดท้ายและปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาของสารแต่ละตัวสำหรับการเพิ่มจำนวน 16S ribosomal DNA ของ *Pseudomonas* sp. A41

ตารางที่ 3.4 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน 16S ribosomal DNA **ของ** *Pseudomonas* sp. A41

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
$MgCl_2$	25 mM	3	1.5 mM
Taq DNA polymerase buffer	10 X	5	1 X
ไพร์เมอร์ 27f	50 μM	1	1.0 μM
ไพร์เมอร์ 1492r	50 μM	1	1.0 μM
dNTP	2 mM (ของแต่ละตัว)	5	200 μM (ของแต่ละตัว)
Taq DNA polymerase	1 U/ μl	1.5	1.5 U
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 pg -1 μg/μl	1	1 pg -1 μg
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		32.5	
ปริมาตรสุทธิ		50	

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ	46°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
final extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 7 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ทำโดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ 1XTAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ

สีติดตาม (ภาคผนวก ข22) ให้ความเข้มข้นของสีเป็น 1 เท่า โดยอาจจะปรับปริมาตรด้วยน้ำในกรณีใช้ปริมาตรของดีเอ็นเอน้อย หยอดสารผสมลงในช่องวิ่งและหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ดังนี้ ชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส GelMate 2000 ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข23) เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.6.3) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.6.2) มาแยกชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซิส จากนั้นสกัดชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 bp ออกจากอะกาโรสด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ตัดอะกาโรสเจลตรงบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยใส่ไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตรเป็น 3 เท่าของปริมาตรชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 10 นาที หรือกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมดได้เป็นสารละลายใสสีเหลือง นำสารละลายดังกล่าวใส่ใน QIAquick spin column นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้องเทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ PE ที่เหลือติดคอลัมน์ออกให้หมด ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใสเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °ซ

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทำโดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โดยใช้ไพร์เมอร์

ดังนี้คือ forward primer 27f, forward primer 350f, reverse primer 1240r และ reverse primer 1492r นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN

3.7 **การเพิ่มจำนวน *rhlA* หรือ *rhlR* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส**

3.7.1) **การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อ *rhlA* หรือ *rhlR***

ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้งแบบ forward primer และ reverse primer คือ RA-F และ RA-R หรือ RR-F และ RR-R สำหรับการเพิ่มจำนวน *rhlA* หรือ *rhlR* ตามลำดับ โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของ *rhlA* หรือ *rhlR* จาก *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover และ คณะ, 2000) และ *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (Ochsner และคณะ , 1994a, b) สังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์โดยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเออัตโนมัติโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

3.7.2) **การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ** (template) **ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส**

การสกัด การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และการหาความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) ซึ่งอธิบายไว้ในข้อ 3.6.1) โดยสุดท้ายให้ละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข26) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

3.7.3) **ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส** (Polymerase Chain Reaction, PCR)

การทำ PCR ในงานวิจัยนี้ใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้ในข้อ 3.7.1 โดยความเข้มข้นสุดท้ายและปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาของสารแต่ละตัวแสดงในตารางที่ 3.5 หรือ 3.6 สำหรับการเพิ่มจำนวน *rhA* หรือ *rhlR* ตามลำดับดังนี้

ตารางที่ 3.5 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน *rhlA*

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
$MgCl_2$	25 mM	3	1.5 mM
Taq DNA polymerase buffer	10 X	5	1 X
ไพร์เมอร์ RA-F	50 μM	1	1.0 μM
ไพร์เมอร์ RA-R	50 μM	1	1.0 μM
dNTP	2 mM (ของแต่ละตัว)	5	200 μM (ของแต่ละตัว)
Taq DNA polymerase	1 U/ μl	1.5	1.5 U
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 pg -1 μg/μl	1	1 pg -1 μg
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		32.5	
ปริมาตรสุทธิ		50	

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ	54°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 7 นาที	

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

ตารางที่ 3.6 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน *rhlR*

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
$MgCl_2$	25 mM	2	1.0 mM
Taq DNA polymerase buffer	10 X	5	1 X
ไพร์เมอร์ RR-F	50 µM	1	1.0 µM
ไพร์เมอร์ RR-R	50 µM	1	1.0 µM
dNTP	2 mM (ของแต่ละตัว)	5	200 µM (ของแต่ละตัว)
Taq DNA polymerase	1 U/ µl	1.5	1.5 U
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 pg -1 µg	1	1 pg -1 µg
น้ำปลอดประจุ		33.5	
ปริมาตรสุทธิ		50	

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ	95°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ	52°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ	72°ซ	เป็นเวลา 7 นาที	

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

3.7.4) **การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส**

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในข้อ 3.7.3) ทั้งที่ได้จากการเพิ่มจำนวน *rhlA* และ *rhlR* มาตรวจสอบชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 หรือ 700 bp ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก *rhlA* หรือ *rhlR* ตามลำดับออกจากอะกาโรสด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังที่อธิบายแล้วในข้อ 3.6.3)

หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9

3.8 **การค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของ** *Pseudomonas* sp. A41 **ที่มี** *rhlA* **หรือ** *rhlR* **ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน** (hybridization)

3.8.1) **การเตรียมดีเอ็นเอติดตาม** (DNA probe)

3.8.1.1) การเตรียมผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ *rhlA* หรือ *rhlR*

จากการทำ PCR เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนที่มาจาก *rhlA* หรือ *rhlR* ต้องใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ตามข้อ 3.7.3) จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอในผลิตภัณฑ์ที่ได้ดังกล่าว ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสและสกัดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 800 หรือ 700 bp สำหรับ *rhlA* หรือ *rhlR* ตามลำดับ ออกจากอะกาโรสเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตที่อธิบายไว้ในข้อ 3.6.3)

3.8.1.2) การติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย Digoxigenin-dUTP ด้วยวิธี Random labeling

ติดฉลากดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข12) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.8.1.1) ปริมาตร 16 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอแล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย DIG High Prime (หลอดหมายเลข 1) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำอุ่น 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอติดตามไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ

ประมาณปริมาณดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* ที่ถูกติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) ด้วยการเจือจางดีเอ็นเอติดตามใน DNA dilution buffer (หลอดหมายเลข 3) ตามตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 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

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วหลอดที่ 1-5 อย่างละ 1 ไมโครลิตร หยดลงบนไนลอนเมมเบรนที่ตัดไว้เป็นแถบยาวเล็กๆ (strip) ทำควบคู่กับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยการเจือจางแบบเดียวกันกับวิธีการข้างต้น แล้วหยดลงบนไนลอนเมมเบรนอีกแผ่นหนึ่งทิ้งไว้ให้แห้ง ทำการตรึงดีเอ็นเอให้เกาะติดบนเมมเบรนด้วยการวางเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอให้สัมผัสแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร แล้วนำไปจุ่มในสารละลายแต่ละชนิดตามลำดับขั้นตอนดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 ขั้นตอนการหาปริมาณดีเอ็นเอติดตามที่ถูกติดฉลาก

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

3.8.2) **การเตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ** *Pseudomonas* sp. A41 **สำหรับการไฮบริไดซ์**

การเตรียมไนลอนเมมเบรนสำหรับการไฮบริไดซ์เพื่อติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* บนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 มีขั้นตอนเหมือนกันดังนี้

3.8.2.1) การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41

สกัดและหาความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) ดังอธิบายในข้อที่ 3.6.1)

3.8.2.2) การตัดดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

ตัดดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ประมาณ 10 ไมโครกรัม ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ (Promega, USA) อย่างสมบูรณ์ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

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

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง

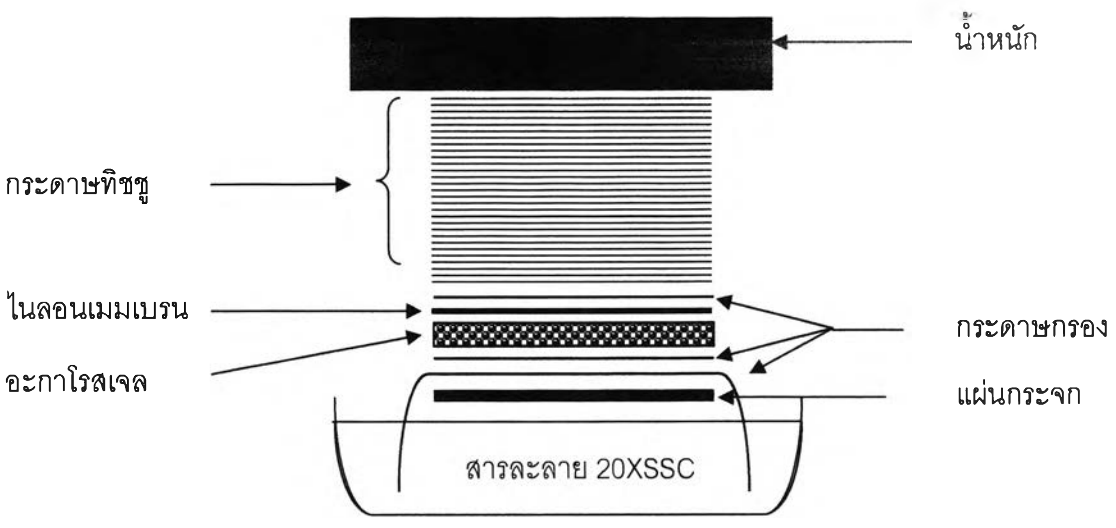
จากนั้นทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

3.8.2.3) การย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน (Southern blot)

นำดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ตัดแล้วจากข้อ 3.8.2.2) มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรสของ *rhlA* หรือ *rhlR* เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) จากนั้นทำการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วถ่ายภาพเก็บไว้โดยใช้ไม้บรรทัดแนบด้านข้างอะกาโรสเจลเพื่อระบุระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ

เตรียมอะกาโรสเจลเพื่อทำการถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน เริ่มจากล้างชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ในกล่องพลาสติกโดยให้สารละลายท่วมอะกาโรสเจลเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม denaturation buffer (ภาคผนวก ข6) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร หรือเติมให้ท่วมอะกาโรสเจลเขย่าเบาๆ 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) ทำโดยการวัดขนาดของชิ้นอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้กำหนดขนาด 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 การจัดวางชั้นต่างๆ ของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.1 โดยเริ่มจากการเติม 20 X SSC (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 แล้ววางชั้นของกระดาษทิชชูและน้ำหนักกดด้านบนตามลำดับ ทำการยึดชั้นต่างๆ ให้มั่นคงด้วยกระดาษกาว และระวังไม่ให้ชั้นทิชชูแตะโดนอะกาโรสเจลหรือกระดาษกรองด้านล่าง ตั้งทิ้งไว้ให้บัฟเฟอร์เคลื่อนที่ขึ้นมาเป็นเวลาข้ามคืน

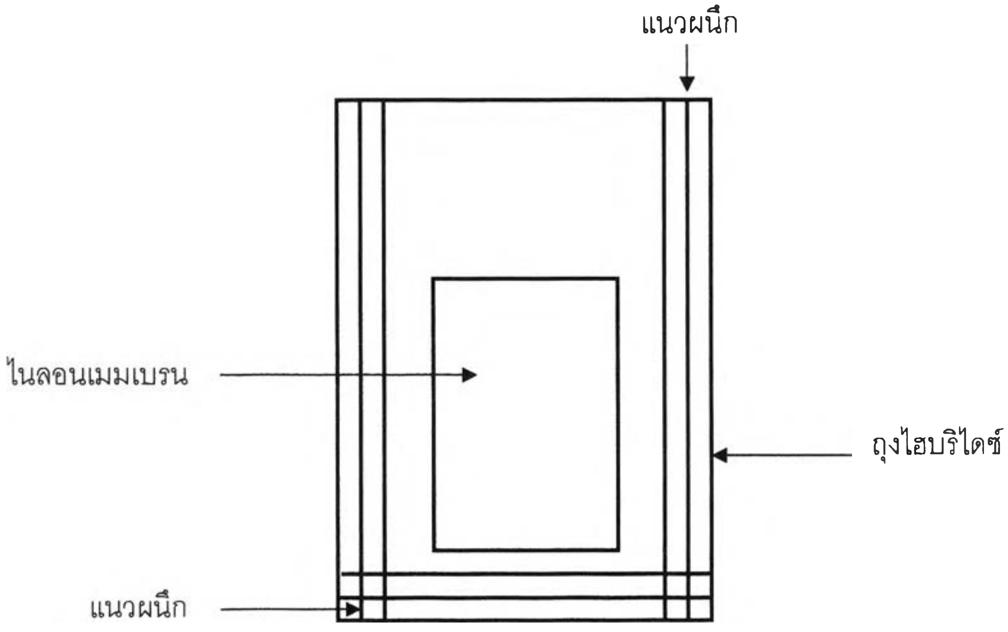


รูปที่ 3.1 **แผนภาพแสดงการจัดวางชั้นต่างๆ ของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน โดยวิธี** Capillary transfer

ภายหลังจากการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน ยกชั้นกระดาษที่อยู่เหนือไนลอนเมมเบรนออก แล้วใช้กรรไกรที่สะอาดตัดที่มุมด้านหนึ่งเพื่อเป็นการระบุด้านของไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเออยู่ นำไนลอนเมมเบรนมาใส่กล่องล้างด้วย 2XSSC (ภาคผนวก ข9) โดยการเขย่าเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปซับให้แห้งและทำการตรึงดีเอ็นเอให้ติดบนไนลอนเมมเบรนด้วยการนำไนลอนเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 3 นาที เก็บไนลอนเมมเบรนไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

3.8.3) **ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของ** *Pseudomonas* sp. A41 **ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** *rhlA* **หรือ** *rhlR*

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



รูปที่ 3.2 **ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับทำไฮบริไดเซชัน**

เตรียมสารละลายดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* สำหรับการไฮบริไดซ์โดยนำดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมลงในสารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร (ให้มีความเข้มข้น 5-25 นาโนกรัมต่อสารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ที่บรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว (falcon tube) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 68°ซ เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปไฮบริไดซ์

เมื่อทำพรีไฮบริไดเซชันเสร็จแล้วตัดถุงพลาสติกออก เทสารละลาย DIG Easy Hyb ทิ้งแล้วย้ายเมมเบรนมาที่ถุงพลาสติกใบใหม่ จากนั้นทำการผนึกด้านข้างถุงเหมือนเดิม เทสารละลายดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* ที่เตรียมไว้ข้างต้นลงไป ไล่ฟองอากาศออกให้หมดแล้วปิดผนึกด้านบน 2 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°ซ ด้วยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) (สารละลายดีเอ็นเอติดตามที่ใช้แล้วกลับนำมาใช้ได้อีกหลายครั้งด้วยการเก็บรักษาในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่อุณหภูมิ -20°ซ เมื่อนำมาใช้ในครั้งต่อไปให้เติมดีเอ็นเอติดตามเพิ่มอีก 2-3 ไมโครลิตร และก่อนใช้ต้องทำการแยกสายดีเอ็นเอติดตามที่อุณหภูมิ 68°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°ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

ตรวจหาตำแหน่งดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่ไฮบริไดซ์ได้กับดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* 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 เขย่าเบาๆเป็นเวลา 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 เทบัฟเฟอร์ทิ้งแล้วล้าง 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 จากนั้นเตรียมซับสเตรท NBT/BCIP (ภาคผนวก ข12) โดยเจือจางสารละลายในหลอดที่ 5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใน detection buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่หุ้มให้มืด) ย้ายไนลอนเมมเบรนมาใส่ถุงพลาสติกแล้วผนึกด้านข้างเช่นเดียวกับขั้นไฮบริไดซ์ จากนั้นเทซับสเตรทที่เตรียมไว้ลงในถุง ไล่ฟองอากาศออกแล้วผนึกปิดถุง นำไปบ่มในที่มืด (ห้ามเขย่า) ตั้งทิ้งไว้จนกว่าจะเกิดแถบสีชัดเจน (ประมาณ 1 ชั่วโมง – 16 ชั่วโมง) เมื่อเสร็จสิ้นการบ่มกับซับสเตรทแล้วนำเมมเบรนออกจากถุงพลาสติกมาล้างในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที ซับและตากให้แห้งจึงเก็บใส่ถุง

3.9 **การโคลนชิ้นดีเอ็นเอของ** *Pseudomonas* sp. A41 **ที่มี** ***rhlA*** **หรือ** ***rhlR***

3.9.1) **การสกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม** ***rhlA*** **หรือ** ***rhlR***

ตัดดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* sp. A41 ที่เตรียมไว้อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I/*Eco*RI และ *Bam*HI สำหรับการโคลน *rhlA* หรือตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI/*Xho*I สำหรับการโคลน *rhlR* ตามวิธีในข้อ 3.8.2.2) นำดีเอ็นเอที่ตัดได้ไปทำอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซิส ตัดอะกาโรสเจลให้ครอบคลุมตรงบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* โดยเทียบผลจากการไฮบริไดเซชั่นในข้อ 3.8.3) จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี Electroelution โดยล้างถุงไดแอลิซิสที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ข30) ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปิดปลายด้านหนึ่งของถุงโดยใช้ตัวหนีบ (clamp) นำอะกาโรสเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแยกใส่ลงในถุงไดแอลิซิส เติมบัฟเฟอร์ 1XTAE ที่ปลอดเชื้อปริมาตรไม่เกิน 400 ไมโครลิตร ไล่ฟองอากาศออกจากถุงให้หมดแล้วปิดปลายอีกด้านที่เหลือ จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสชิ้นเจลในบัฟเฟอร์ 1XTAE ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอหลุดออกจากเจลมาอยู่ที่สารละลาย จากนั้นกลับขั้วไฟฟ้าและทำอิเล็กโทรโฟเรซิสซ้ำใช้ความต่างศักย์ 200 โวลต์ เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอที่ติดอยู่กับถุงไดแอลิซิสหลุดออกมาอยู่ในสารละลาย นำสารละลายที่ได้ใส่หลอดไมโครฟิวจ์แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อ

กำจัดเศษอะกาโรสเจลที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ถ่ายสารละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ 1XTAE สู่หลอด ไมโครฟิวจ์ใหม่ สกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ปริมาตรเท่ากับปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอเริ่มต้น ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งสารละลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ตกตะกอนพลาสมิดด้วยเอธานอล โดยเติมโซเดียมอะซีเตทค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข24) ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงเติมเอธานอลสัมบูรณ์ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้ว นำไปตกตะกอนที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 60 นาที หรือที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70% โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งทำซ้ำ 2 ครั้ง ระเหยเอธานอลให้แห้ง ละลายดีเอ็นเอกลับในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ

3.9.2) การเตรียมพลาสมิดเวกเตอร์สำหรับการโคลน

3.9.2.1) การสกัด การตัด และการทำพลาสมิดเวกเตอร์ให้บริสุทธิ์

สกัดพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) หรือ พลาสมิด pBluescript KS(+/-) (Stratagene) จาก *E. coli* DH5α ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข3) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* DH5α ที่ได้รับพลาสมิดดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครฟิวจ์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 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 นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ

ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20°ซ

ตัดพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-)ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I/*Eco*RI สำหรับการโคลน *rhlA* หรือตัดพลาสมิด pBluescript KS(+/-) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI/*Xho*I สำหรับการโคลน *rhlR* ตามวิธีในข้อ 3.8.2.2) แล้วนำพลาสมิดที่ตัดได้ไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตัดอะกาโรสเจลให้คลุมตรงบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอ จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี Electroelution ตามวิธีการและขั้นตอนที่กล่าวในข้อ 3.9.1) ละลายพลาสมิดที่ได้ในน้ำปลอดประจุด้วยปริมาตรที่เหมาะสม

ส่วนพลาสมิด pBluescript KS(+/-) ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI ต้องเตรียมพลาสมิดดังกล่าวใน Tris-HCl ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 ก่อนจึงนำไปกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์เพื่อป้องกันการเชื่อมกันเองของปลายสายเวกเตอร์ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ นำพลาสมิดที่ตัดอย่างสมบูรณ์ดังกล่าวมาสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ตกตะกอนพลาสมิดแล้วละลายพลาสมิดที่ได้ใน Tris-HCl ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 ด้วยปริมาตรที่เหมาะสม (น้อยกว่าปริมาตรเริ่มต้นก่อนที่จะทำการสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์)

3.9.2.2) การกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์

กำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์เพื่อป้องกันการเชื่อมกันเองของปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกตัดให้เป็นปลายเปิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แล้ว โดยใช้แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (Promega, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยเริ่มจากการเจือจางแอลคาไลน์ฟอสฟาเทสจากหลอด

ตั้งต้นความเข้มข้น 1 หน่วยต่อไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร ด้วยการใช้ส่วนผสมของการเจือจางดังนี้

แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส 1 หน่วยต่อไมโครลิตร	1	ไมโครลิตร
10Xบัฟเฟอร์	10	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	89	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	100	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน (ควรทำการเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้งหรือเก็บรักษาไว้ใช้ได้ที่อุณหภูมิ -20°ซ ไม่เกิน 1 สัปดาห์)

จากนั้นเพิ่มปริมาตรของสารละลายพลาสมิดเวกเตอร์จากข้อ 3.9.2.1) (เฉพาะพลาสมิดเวกเตอร์ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI) ให้มีปริมาตร 40 ไมโครลิตร ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด แล้วทำส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

พลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript KS(+/-)/ *Bam*HI 1-5 ไมโครกรัม	40	ไมโครลิตร
10Xบัฟเฟอร์	5	ไมโครลิตร
แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร	5	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมแอลคาไลน์ฟอสฟาเทสที่เจือจางแล้วความเข้มข้น 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาตรเท่าเดิมลงไปอีกครั้ง แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ต่อไปอีกเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนี้ทำการสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และตกตะกอนด้วยเอธานอลตามขั้นตอนดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.9.1) สุดท้ายละลายพลาสมิดเวกเตอร์ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อในปริมาตรที่เหมาะสม (ปริมาตรน้อยที่สุดที่จะละลายดีเอ็นเอได้และน้อยกว่าปริมาตรเริ่มต้น)

3.9.3) ไลเกชัน (ligation) **ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์**

ไลเกทชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.9.1) เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกันในข้อ 3.9.2) ด้วยไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.8.1) ประมาณ 300 นาโนกรัม	3 ไมโครลิตร
พลาสมิดเวกเตอร์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันประมาณ 50-200 นาโนกรัม	1 ไมโครลิตร
10Xไลเกชันบัฟเฟอร์	1 ไมโครลิตร
T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 หน่วยต่อไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	4 ไมโครลิตร

ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 16°ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (อัตราส่วนระหว่างชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกและพลาสมิดเวกเตอร์สามารถจะแปรผันได้ตามความเหมาะสมของปริมาณดีเอ็นเอ)

3.9.4) การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.8.3 เข้าสู่ ***Escherichia coli*** **DH5α และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มี** ***rhlA*** **หรือ** ***rhlR***

3.9.4.1) เตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ (competent cell)

คอมพีเทนท์เซลล์ทำด้วยวิธี Calcium chloride (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* DH5α ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (ภาคผนวก ก3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 700 ไมโครลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน arm flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ จนกระทั่ง OD_{600} มีค่าเท่ากับ 0.3-0.5

เตรียมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ (เตรียมก่อนใช้และทุกขั้นตอนทำในอ่างน้ำแข็ง) โดยผสมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย $CaCl_2$ ที่ปลอดเชื้อและเย็นความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ใน

อ่างน้ำแข็งให้ได้อุณหภูมิ 4°ซ จากนั้นเติมสารละลาย $MgSO_4$ ที่ปลอดเชื้อและเย็นความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งจนกว่าจะใช้

เมื่อเซลล์เจริญจนถึงค่า OD_{600} ที่ต้องการถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อปริมาตร 35 มิลลิลิตร ที่เย็นจำนวน 2 หลอด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4°ซ ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ที่เย็นปริมาตร 10.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอด กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์และสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30-45 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 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 ผสมให้เข้ากันเบาๆ แบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตรประมาณหลอดละ 100-300 ไมโครลิตร เก็บคอมพีเทนท์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ

3.9.4.2) ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.9.3) เข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ดังนี้ นำคอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* DH5α ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกทไว้จากข้อ 3.9.3) ทั้งหมดลงในคอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* DH5α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42°ซ เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว 2YT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

3.9.4.3)การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

คัดเลือกโคโลนีของ *E. coli* DH5α ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี *rhlA* หรือ *rhlR* ด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E. coli* DH5α ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วจากข้อ 3.9.4.2) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ซึ่งผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเกลี่ยบนผิวอาหารด้วย X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข27) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) ความเข้มข้นสุดท้าย 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข28) ปริมาตร 7 ไมโครลิตรไว้แล้ว หลังจากเกลี่ยเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาข้ามคืน

คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีน *rhlA* หรือ *rhlR* โดยคัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB จำนวน 10 โคลนต่อ 1 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาข้ามคืน แล้วนำมาสกัดด้วยวิธี Alkaline lysis (Sambrook และ Russell, 2001) ดังขั้นตอนต่อไปนี้ ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งให้หมด นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข21) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข21) ที่เตรียมใหม่ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอด 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข21) ที่เย็น ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอด 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 3-5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนมาประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตรเท่ากับปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอเริ่มต้น ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งสารละลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ตกตะกอนพลาสมิดด้วยเอธานอลสัมบูรณ์ ปริมาตร 2 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมา ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตกตะกอนที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 60 นาที หรือที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของเอธานอลสัมบูรณ์ทิ้ง ปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัด ปริมาตรประมาณ 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง

โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยแห้งสนิทแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปลอดเชื้อปลอดประจุ 50 ไมโครลิตร และเติม RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ที่อุณหภูมิ -20°ซ

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้มาทำการคัดเลือกด้วยวิธี Dot blot hybridization (Sambrook และ Russell, 2001) โดยตีตารางลงบนไนลอนเมมเบรนและระบุตำแหน่งโคลนให้ชัดเจน ระหว่างนั้นแช่ไนลอนเมมเบรนในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเพื่อไล่ฟองอากาศออก ต้มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที นำเมมเบรนออกจากน้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เมมเบรนแห้งหมาด จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวมาหยดลงบนแต่ละช่องที่ระบุตำแหน่งไว้ครั้งละ 1 ไมโครลิตร รอให้แห้งแล้วหยดซ้ำจนครบ 3-5 ไมโครลิตร โดยใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรสของ *rhlA* หรือ *rhlR* เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และพลาสมิดเวกเตอร์ที่ใช้ในการโคลน เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) เมื่อหยดตัวอย่างครบและแห้งแล้วนำเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 3 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับเมมเบรนแล้วนำไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม *rhlA* หรือ *rhlR* จากข้อ 3.8.1) ด้วยวิธีการและขั้นตอนที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.8.3) เมื่อได้กลุ่มโคลนที่ให้ผลบวกกับดีเอ็นเอติดตามแล้วนำกลุ่มโคลนมาสกัดแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของแต่ละโคลนแล้วนำไปทำ Dot blot hybridization ซ้ำอีกครั้ง เพื่อหาโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ต้องการ จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์ที่ให้ผลบวกกับดีเอ็นเอติดตามไปตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่จดจำบริเวณที่โคลน (cloning site) และเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิดเพื่อนำข้อมูลไปสร้างแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.9 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rhlA* หรือ *rhlR* จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GenBank

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rhlA* หรือ *rhlR* ส่วนหนึ่งได้มาจากการสับโคลนและใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์คือไพร์เมอร์ T3 T7 SP6 และ M13 Forward ในการหาลำดับนิวคลีไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอด ส่วนที่เหลือได้จากการทำ primer working ไพร์เมอร์ที่ใช้คือ RR-F N912r 1BF และ 2BR ไพร์เมอร์ที่ใช้ดังกล่าวสังเคราะห์โดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวคือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดในข้อ 3.9.4.3) ที่สกัดจาก *E. coli* DH5α ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้ดังกล่าวส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แรมโนลิพิดที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.9 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่จะเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วจึงนำข้อมูลส่วนที่เป็นลำดับกรดอะมิโนที่ได้เข้าไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เป็นลำดับกรดอะมิโนของยีนที่มีอยู่ใน GenBank