บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือหลักที่ใช้ในการทดลอง

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

1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

1.2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมความเย็น (refrigerated centri fuge) รุ่น J2-21 ของ Beckman, U.S.A.

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

1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) รุ่น UV 160A ของ Shimadzu ,Japan

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

1.5 ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส (agarose gel electro phoresis)

1.5.1 เครื่องกำเนิดไฟฟ้ารุ่น 2301 microdrive 1 ของ LKB, Sweden

1.5.2 เจลแชมเบอร์ (gel chamber) พร้อมอุปกรณ์เตรียมอะกาโรส เจลของ Mupid,Japan

1.6 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) รุ่น 240 ของ Corning ,U.S.A.

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

1.8 เครื่องชั่งละเอียด รุ่น L2200P และ A200S ของ Sartorius,U.S.A.

1.9 อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

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

1.10 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHK ของ Olympus, Taiwan

1.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของ Memmert, Germany

1.12 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ของ Memmert, Germany

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

1.14 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -20°ซ รุ่น F0535 ของ Sanyo Electric Co.,Ltd., Japan

1.15 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -70°ซ ของ Forma Scientific, U.S.A.

1.16 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของ Kokusan , Japan

1.17 micropipette ขนาด 1000, 100 และ 20 ไมโครลิตร ของ Gilson, France และ ขนาด 10 และ 50 ไมโครลิตร ของ Nichiryo,Japan

1.18 Tip ขนาด 0-250 ไมโครลิตร และขนาด 0-1000 ไมโครลิตร ของ Treff, Switzerland

1.19 เครื่องผสมสาร (VORTEX GENIE) รุ่น K-550-GE ของ Scientific industries, U.S.A.

2. <u>สารเคมี</u>

2.1 เรสทริกชันเอนไซม์และเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนยีน

-*Bam*HI,*Hin*dIII,Sau3AI,*Mbo*I,*Eco*RI,*Xba*I,Sma I,*Pst*I,*Kpn*I

-T4 DNA ligase

-Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)

-ไลโซไซม์ (lysozyme grade 1)

-โปรเนส (Pronase)

-ไรโบนิวคลีเอส (RNase)

จาก BRL, U.S.A. และ Sigma, U.S.A. และบางส่วนได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. Iain S. Hunter แห่ง University of Glasgow, U.K. และ Dr. Hidayuki Suzuki แห่ง University of Kyoto, Japan.

2.2 ชุดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจล GENECLEAN kit จาก BIO 101, U.S.A.

2.3 ชุดติดฉลากดีเอ็นเอและตรวจสอบ ECL direct nucleic acid labelling and detection systems จาก Amersham, U.K.

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base จาก Difco, U.S.A.

2.5 สารเคมีอื่นๆ จาก Sigma, U.S.A.

3. เชื้อจุลินทรีย์และพลาสมิด

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

-*E. coli* HB101 (F⁻ *hsd*20(r_B^- m_B^-) *sup*E44 *ara*14 *gal*K2 *lac*Y1 *pro*A2 *rps*L20 (Str^r) *xyl*5 *leu mtl*1 (*rec*13 *mcr*B *mrr*) และ *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pUC18 และ pUC19

-*Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1 ซึ่งคัดเลือกได้จากดินในประเทศไทย และให้แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส คัดเลือกและศึกษาโดย Supajunya และ Pinphanichakarn (1984)

-*E. coli* SH50 (*xyl*$^+$) สายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr.Hidayuki Suzuki แห่ง University of Kyoto,Japan.

3.2 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

สำหรับ *E .coli* HB101 การเก็บในระยะสั้นจะเก็บบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งลาดเอียง (slant agar) สูตร LB (ภาคผนวก ก1) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล. ที่อุณหภูมิห้อง การเก็บรักษาในระยะยาวจะเก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ที่มี 15% v/v ของกลีเซอรอล (glycerol) สำหรับเชื้อที่มีพลาสมิดพาหะ

pUC18 หรือ pUC19 จะเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 ไมโครกรัม/มล. เก็บที่อุณหภูมิ -70°ซ

สำหรับ *Streptomyces* sp.190-1 นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งลาดเอียงสูตร MS (ภาคผนวก ก2) ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์เต็มที่ เก็บเชื้อที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บได้ประมาณ 1 เดือน สำหรับการเก็บในระยะยาวจะเก็บในรูปสปอร์แขวนลอยใน 20% v/v กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -70°ซ

4. <u>การเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. 190-1</u>

4.1 การเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. 190-1 เพื่อสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

4.1.1 ขูดสปอร์จาก *Streptomyces* sp.190-1 จำนวน 2 ลูป มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก1) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดรูปกรวยพร้อมทั้งมีขดลวดสปริง โดยบ่มในเครื่องเขย่าแบบ reciprocal ที่อุณหภูมิ 30°ซ ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน

4.1.2 นำมาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที 10 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วย 10.3 % ซูโครส 2 ครั้ง

4.1.3 นำเซลล์ไปสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอทันที กรณีที่ไม่สามารถแยกดีเอ็นเอได้ในทันที ให้เก็บเซลล์ที่ -20°ซ

4.2 การเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp.190-1 เพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ กลูโคสไอโซเมอเรส

4.2.1 เขี่ยเชื้อที่จะนำมาตรวจสอบ 2 ลูปลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซโลส (ภาคผนวก ก3) ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วในขวดรูปกรวยปริมาตร 50 มล. เขย่าแบบ rotary ที่ อุณหภูมิ 30°ซ ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน

4.2.2 นำมาปั่นแยกเซลล์ออก ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที 10 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง เก็บเซลล์ไว้ที่ -20° ซ จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

5. การเลี้ยงเชื้อ *E. coli* HB101

5.1 การเลี้ยงเชื้อ *E. coli* HB101 เพื่อสกัดพลาสมิด

5.1.1 เตรียม inoculum โดยการเขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยว ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ปริมาตร 5 มล. เลี้ยงโดยการเขย่าที่ 37°ซ ความเร็ว 200 รอบ/นาที ข้ามคืน

สำหรับสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pUC18 หรือ pUC19 จะเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 ไมโครกรัม/มล. (โดยเตรียมสารละลายตั้งต้นเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มล.)

5.1.2 เพาะเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืน 5 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 95 มล. ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม เลี้ยงโดยการเขย่าที่ 37°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ประมาณ 12 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญถึงช่วง late log phase

5.1.3 แยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นที่ 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°ซ

5.1.4 เก็บเซลล์ที่ -20°ซ เพื่อนำไปใช้สกัดพลาสมิดตามวิธีที่จะได้กล่าวถึงในข้อ 7

5.2 การเลี้ยงเชื้อ *E. coli* HB101 เพื่อเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell)

5.2.1 เตรียม inoculum เช่นเดียวกับข้อ 5.1.1 โดยใช้โคโลนีเดี่ยวที่มีอายุประมาณ 12 ชั่วโมง

5.2.2 เพาะเชื้อจากข้อ 5.2.1 ปริมาตร 1 มล.ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ปริมาตร 100 มล. วัดความขุ่นเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (โดยใช้ LB เป็น blank) เลี้ยงโดยการเขย่าที่ 37°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที จนกระทั่งเซลล์เจริญถึง log phase โดยติดตามค่าความขุ่นให้อยู่ในช่วง 0.4-0.5 ซึ่งโดยปกติจะใช้เวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง และที่ค่าความขุ่นนี้จะมีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วง $3\text{-}5\times10^{8}$ เซลล์/มล. นำเซลล์ไปเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ ตามวิธีที่ได้จะกล่าวในข้อ 8.1

5.3 การเลี้ยงเชื้อ *E. coli* เพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

5.3.1 เตรียม inoculum เช่นเดียวกับข้อ 5.1.1

5.3.2 เพาะเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนจากข้อ 5.3.1 2 มล.ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 100 มล. ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 25 ไมโครกรัม/ มล. และเติม 0.2 % ของแหล่งคาร์บอน (กลูโคส หรือ ไซโลส) เลี้ยงโดยการเขย่าที่ 37°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที จนกระทั่งเชื้อเจริญถึงช่วง late log phase

ในกรณีที่ต้องเติม IPTG (iscpropylthio-β-D-galactoside) เป็นตัวเหนี่ยวนำ จะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน จนกระทั่งถึงช่วง mid log phase ซึ่งมีค่า OD_{650} เท่ากับ 0.4 จึงเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ และเลี้ยงต่อไปจนถึงช่วง late log phase ซึ่งมีค่า OD_{650} เท่ากับ 0.5-0.6

5.3.3 ปั่นเก็บเซลล์ ที่ความเร็ว 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง

5.3.4 นำเซลล์ไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสตามวิธีการในข้อ 18 หรือเก็บที่ -20°ซ ในกรณีที่ไม่สามารถวัดแอคติวิตีได้ในทันที

6. <u>การสกัดโครโมโซมออลีเอ็นเอ *Streptomyces* sp.190-1</u>

ตามวิธีของ Birch และ Cullum (1985)

6.1 นำเซลล์ที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 เติมไลโซไซม์ (2 มก./มล.)ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายสำหรับไลโซไซม์ (ภาคผนวก ข1) ปริมาตร 5 มล.บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6.2 เติมโปรเนส (pronase เข้มข้น 10 มก./มล.) ปริมาตร 0.5 มล. เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน บ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมอีก 5 นาที

6.3 เติม 0.55 มล. ของสารละลาย SDS เข้มข้น 10% เขย่าผสมเบา ๆ และบ่มต่อจนกระทั่งสารละลายหนืด

6.4 เติม 5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ ผสมให้เข้ากัน

6.5 เติม 6 มล. สารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข3) นำไปเขย่าแบบ reciprocal ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นของสารละลาย ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 40 นาที

6.6 ดูดส่วนน้ำใสชั้นบนใส่ในขวดแก้วปากกว้างขนาดบรรจุ 50 มล. เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 3 ใน 4 เท่าของปริมาตรของสารละลายทั้งหมด ผสมโดยเอียงขวดแก้วไปมาเบาๆ จะได้โครโมโซมอลดีเอ็นเอตกตะกอนเป็นสายใยอยู่ในสารละลาย

6.7 ใช้ปาสเจอร์ปิเปต (Pasture pipette) ที่หลอมปลายปิดสนิทพันสายใยของดีเอ็นเอขึ้นมาล้างด้วยเอทานอล 70% แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

6.8 แขวนลอยดีเอ็นเอที่ได้ในบัฟเฟอร์ TE pH 8.0 (ภาคผนวก ข3)ปริมาตร 5 มล.และเติมไรโบนิวคลีเอส (RNase สารละลายตั้งต้นเข้มข้น 40 มก./มล.)ปริมาตร 5 ไมโครลิตรจากนั้นนำไปเขย่าแบบ reciprocal ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง

6.9 เติม 10% SDS 0.5 มล. และ 5 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 0.55 มล. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์

6.10 นำสารละลายที่ได้ไปผ่านขั้นตอนข้อ 6.5-6.7 ซ้ำอีกครั้ง แล้วจึงนำดีเอ็นเอที่ได้มาแขวนลอยใน 0.5 มล.ของบัฟเฟอร์ TE

7. <u>การสกัดพลาสมิดโดยวิธี Alkaline extraction</u>

ตามวิธีของ Birnboim และ Doly (1979) และ ศิรินร (2531)

7.1 นำเซลล์ที่เตรียมได้จากข้อ 5.1 เติมไลโซไซม์ (2 มก./มล.) ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายสำหรับไลโซไซม์ (ภาคผนวก ข1) ปริมาตร 2 มล. เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง5 นาที

7.2 เติมสารละลายไลซิส (Lysis solution ภาคผนวก ข2) ลงไป 4 มล. ผสมกันโดยการเอียงหลอดไปมา หลายๆครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที

7.3 เติม 3 โมลาร์ของโซเดียมอะซิเทต pH 4.8 (ภาคผนวก ข4) ที่เย็นลงไป 3 มล. ปิดปากหลอดผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลงหลายๆ ครั้งตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที

7.4 ปั่นแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอ และเศษเซลล์ ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4°ซ

7.5 ดูดส่วนน้ำใส (ถ้าส่วนน้ำใสมีลักษณะขุ่นให้นำไปปั่นต่อ) มากำจัดโปรตีนด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข7) จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 95% เอทานอล ที่เย็นลงไป 2 เท่าของปริมาณส่วนน้ำใส ตั้งทิ้งไว้ที่-20°ซ 30 นาที

7.6 ปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 3 มล.

7.7 ปรับสารละลายดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เป็น 0.1 โมลาร์ โดยเติม 5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ข5) แบ่งสารละลายดีเอ็นเอใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ ขนาด 1.5 มล. หลอดละ 0.5 มล.

7.9 นำมาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 95% เอทานอล ที่เย็นลงไป 2 เท่าของปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอที่มีอยู่ ทิ้งไว้ที่ -20°ซ 30 นาที

7.10 ปั่นเก็บตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอ ในเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง

7.11 ละลายตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE เก็บสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอที่ 4°ซ

8. <u>การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ (competent cell) ของเชื้อ *E. coli* HB101</u>

8.1 การเตรียมโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

ตามวิธีของ Maniatis และคณะ (1982)

8.1.1 เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ค่าความขุ่นตามที่ต้องการจากข้อ 5.2 แล้วนำขวดรูปกรวยที่เลี้ยงเชื้อมาแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที

8.1.2 เก็บเซลล์โดยการปั่นที่ 6,000 รอบ/นาที ที่ 4°ซ เป็นเวลา 20 นาที (โดยจะต้องแช่เย็นหลอดปั่นเซลล์ไว้ก่อน) เทส่วนน้ำใสทิ้ง และแช่เซลล์ในน้ำแข็ง

8.1.3 ค่อยๆ เติมสารละลายผสมของ 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.0 และ 50 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ที่เย็น ปริมาตร 30 มล. ลงไปเขย่าจนเซลล์กระจาย แช่ไว้ในน้ำแข็งอีก 10 นาที

8.1.4 นำไปปั่นแยกคอมพีเทนต์เซลล์ ที่ 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4°ซ

8.1.5 เติม 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.0 และ 50 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ที่เย็นลงไป 4 มล. เขย่าจนเซลล์กระจาย ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 50 นาที (อาจเพิ่มเวลาเป็น 12-24 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์เมชันสูงขึ้น 4-6 เท่า)

8.1.6 แบ่งคอมพีเทนต์เซลล์ใส่หลอดไมโครฟิวจ์ที่แช่เย็นแล้ว 16 หลอด หลอดละ 200 ไมโครลิตร (มีเซลล์ประมาณ $1.5x10^{7}$ เซลล์)

หากต้องการเก็บ คอมพีเทนต์เซลล์ไว้ใช้ต่อไปก่อนจะแบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ ให้เติมกลีเซอรอล (glycerol) ปลอดเชื้อลงไป 15% v/v เก็บที่ -70°ซ

8.2 **การเตรียมโดยใช้รูบิเดียมคลอไรด์ ($RbCl_2$)** ตามวิธีของ Hanahan, 1985

8.2.1 เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร SOB (ภาคผนวก ก5) ปริมาตร 30 มล. เลี้ยงโดยการเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน

8.2.2 เพาะเชื้อจากข้อ 8.2.1 จำนวน 8 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร SOB ปริมาตร 200 มล. เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ จนกระทั่งวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.3

8.2.3 แบ่งใส่หลอดเซนต์ติฟิวจ์หลอดละ 50 มล. เป็นจำนวน 4 หลอด นำมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาปั่นเก็บเซลล์ที่ 5000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ 5 นาที

8.2.4 ตะกอนเซลล์ที่ได้ นำมาเติมบัฟเฟอร์สำหรับทรานสฟอร์เมชัน 1 (ภาคผนวก ข19) ปริมาตร 16 มล. เขย่าจนเซลล์กระจาย แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที

8.2.5 ปั่นเก็บเซลล์ที่ 5000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 5 นาที

8.2.6 ตะกอนเซลล์ที่ได้นำมา เติมบัฟเฟอร์สำหรับทรานสฟอร์เมชัน 2 (ภาคผนวก ข20) ปริมาตร 4 มล. เขย่าจนเซลล์กระจาย เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนจะนำไปใช้ หรือแบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บที่ -70°ซ

9. การหาขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่แขวนลอยในบัฟเฟอร์ TE มาตรวจสอบโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส (Agarose Gel Electrophoresis) ซึ่งทำโดยเทอะกาโรสเจล 0.7% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข.6) ลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวี (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye ภาคผนวก ข8) ในอัตราส่วน 1:1 หยอดลงในหลุมบนอะกาโรสเจลหลุมละประมาณ 6 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟริซีสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) โดยให้ความต่างศักย์ 10 โวลต์/ซม.ของความยาวเจล จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนมาเกือบถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่งนำอะกาโรสเจลไปย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 2.5 ไมโครกรัม/มล.ของบัฟเฟอร์ TB แช่ไว้ 15-30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพโดยใช้ฟิล์มขาวดำความไวแสง 400 ถ่ายผ่านแผ่นกรองแสงสีแดง

ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบขนาด และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ คือแลมดาดีเอ็นเอ (λ DNA) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII

การหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ทำได้โดยวิธีอัลตราไวโอเลตแอบซอร์บชันสเปกโตรสโคปี (Ultraviolet Absorbtion Spectroscopy) (Maniatis,1982) โดยนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260}/A_{280} ถ้าได้เท่ากับ 1.80 แสดงว่าดีเอ็นเอที่ได้บริสุทธิ์ ในกรณีที่สูงกว่าเกือบใกล้ 2.00 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอ (RNA) ปนอยู่มาก ในกรณีที่ต่ำกว่าแสดงว่าดีเอ็นเอนั้นไม่บริสุทธิ์มีโปรตีนหรือ ฟีนอลปนเปื้อนอยู่

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยเทียบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260} มีค่าเท่ากับ 1 เมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเป็น 50 ไมโครกรัม/มล.

10. การตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอแบบกึ่งสมบูรณ์

การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างโครโมโซมอลดีเอ็นเอ และเอนไซม์ในการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2-8 กิโลเบส

นำสารละลายโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ที่เตรียมได้จากข้อ 6 มาทำการย่อยแบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sau3AI หรือ *Mbo*I ซึ่งทำโดยเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ประมาณ 150 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ดูดสารละลายดีเอ็นเอมา 40 ไมโครลิตร เติมบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ และน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วแบ่งบรรจุลงในหลอดไมโครฟิวจ์ 9 หลอด โดยหลอดที่ 1 บรรจุ 20 ไมโครลิตร ส่วนหลอดที่เหลือบรรจุ 10 ไมโครลิตร เติม Sau3AI หรือ *Mbo*I ลงในหลอดที่ 1 จำนวน 3 หน่วย ผสมให้เข้ากัน แล้วถ่ายลงในหลอดที่ 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วถ่ายลงในหลอดถัดไปอีก 10 ไมโครลิตร ทำต่อเนื่องไปเช่นนี้จนครบถึงหลอดที่ 9 จากนั้นนำทั้ง 9 หลอดไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงผสมสีติดตามและนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส วิเคราะห์ผลแล้วเลือกอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของดีเอนเอและเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งย่อยดีเอ็นเอให้ชิ้นส่วนขนาด 2-8 กิโลเบสได้มากที่สุด เพื่อนำไปเตรียมชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอในปริมาณมาก โดยเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้มากขึ้น ทำการย่อยด้วยเอนไซม์ Sau3AI หรือ *Mbo*I ตามอัตราส่วนที่ได้ นำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้วิธีเคลื่อนแถบดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลในถุงไดอะไลซีสโดยใช้กระแสไฟฟ้า ตามวิธีใน Maniatis และ คณะ (1982) ต่อไป

11. <u>การเตรียมชิ้นส่วนของพลาสมิดพาหะ</u>

พลาสมิดพาหะที่ใช้ในการสร้างรีคอมบิแนนต์พลาสมิดได้แก่ pUC18 และ pUC19

นำพลาสมิดพาหะมาตัดแบบสมบูรณ์ (complete digestion) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI โดยผสมพลาสมิดพาหะ 1 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 3 หน่วย เติมบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ *Bam*HI ที่มีความเข้มข้น 10 เท่า ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 เท่า และเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37° ซ ข้ามคืน กำจัดเอนไซม์ออกโดยการสกัดด้วยฟีนอลที่อิ่มตัวในบัฟเฟอร์ TE ในปริมาตรที่เท่ากัน นำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วตกตะกอนด้วย 95% เอทานอลปริมาตร 2 เท่าของปริมาตร

ดีเอ็นเอ และเติม 5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ ตั้งทิ้งไว้ที่ -20° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ทำให้แห้งแล้ว ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE แล้วนำไปแยกชิ้นส่วนพลาสมิดพาหะที่ต้องการ โดยใช้ชุดแยกดีเอ็นเอ GENECLEAN Kit (ภาคผนวก ข9) ต่อไป

12. <u>การใช้ชุดแยกดีเอ็นเอ GENECLEAN II kit</u>

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดไว้แล้ว มาแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ และตรวจการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยใบมีดที่ผ่านการลนไฟแล้วและตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติม 6 โมลาร์ของสารละลายโซเดียมไอโอไดด์ 3 เท่าของปริมาตรเจล บ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45-55 °ซ เป็นเวลา 2 นาที เติม GLASSMILK ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ผสมให้เข้ากันทุกๆ 2 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 5 วินาที ล้างตะกอนของ GLASSMILK ที่มีดีเอ็นเอเกาะอยู่ ด้วยสารละลาย NEW ปริมาตร 250 ไมโครลิตร 3 ครั้ง จากนั้นชะดีเอ็นเอออกจาก GLASSMILK โดยกระจาย GLASSMILK ในบัฟเฟอร์ TE 10 ไมโครลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45-55°ซ 2 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วินาที ดูดสารละลายใสชั้นบนที่มีดีเอ็นเอแขวนลอยอยู่ใส่หลอดไมโครฟิวจ์ ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสเทียบกับ λ DNA/*Hin*dIII

13. <u>การกำจัดหมู่ฟอสเฟตด้วยเอนไซม์ Calf Intestine Alkaline Phosphatase(CIAP)</u>

นำพลาสมิดพาหะจากข้อ 12 มากำจัดหมู่ฟอสเฟต โดยเติม CIAP 0.01 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 1 พิโกโมล (picomole) บ่มที่ 65°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงขจัดเอนไซม์ออกโดยการเติมฟีนอลที่อิ่มตัวในบัฟเฟอร์ TE ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 95% เอทานอล โดยมีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 11 เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ 1 ชั่วโมง

แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 รอบ/นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอลทำให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE ตรวจสอบการเชื่อมตัวเองของพลาสมิดพาหะที่ กำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว ตามวิธีในข้อ 14 โดยไม่ต้องใส่ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอในขั้นตอนการเชื่อม (ligation)

14. <u>การสร้างรีคอมบิแนนต์พลาสมิดให้มีชิ้นส่วนของยีนกลูโคสไอโซเมอเรส</u>

เชื่อมชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 10 และพลาสมิดพาหะที่เตรียมได้จากข้อ 13 เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 3 นิโกโมล ต่อ 1 นิโกโมล ตามลำดับ โดยให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอทั้งหมดอยู่ระหว่าง 12-15 ไมโครกรัม/มล. นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55°ซ เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งสักครู่ ใส่บัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ T4 DNA ligase แล้วเติมสารละลาย ATP ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิโมลาร์ ใส่เอนไซม์ T4 DNA ligase 4 หน่วย ต่อ ดีเอ็นเอ 1 นิโกโมล บ่มที่ 12-13 °ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กำจัดเอนไซม์โดยการสกัดด้วยฟีนอลที่อิ่มตัวในบัฟเฟอร์ TE นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนด้วย 95% เอทานอล ที่มีโซเดียมคลอไรด์ เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 11 ตรวจสอบการเชื่อมโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส เทียบกับ λ DNA/*Hin*dIII

15. <u>การทรานสฟอร์ม (transformation)</u>

ทำตามวิธีของ Maniatis และคณะ (1982)

15.1 เติมรีคอมบิแนนต์พลาสมิด ที่เตรียมได้จากการเชื่อมใน ข้อ 14 ความเข้มข้นประมาณ 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในคอมพีเทนต์เซลล์ 200 ไมโครลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 8

15.2 แช่ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42 ° ซ ทันที เป็นเวลา 45 วินาที

15.3 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB หรือ SOC (ภาคผนวก ก6) ลงไป 0.9 มล. แล้วนำไปเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

15.4 นำ 100 ไมโครลิตรไปเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey Agar base (ภาคผนวก ก4) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล. และ 1% ไซโลส บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลาไม่เกิน 20 ชั่วโมง

15.5 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ตามวิธีในข้อ 16

16. <u>การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์</u>

การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ ที่รับเอาริคอมบิแนนต์พลาสมิดเข้าไปอาศัยสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินของพลาสมิดพาหะ และการใช้น้ำตาลไซโลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มี 1% ไซโลส และ 50 ไมโครกรัม/มล. ยาปฏิชีวนะของแอมพิซิลลิน โคโลนีที่รับเอาคอมบิแนนต์พลาสมิดที่มียีนกลูโคสไอโซเมอเรส จะสามารถใช้น้ำตาลไซโลสและให้โคโลนีสีแดง ในขณะที่โคโลนีที่รับริคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ไม่มียีนกลูโคสไอโซเมอเรส ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ จะให้โคโลนีสีขาว ดังรายงานของ Rosenfeld และคณะ (1984) และ Ueng และคณะ (1985)

17. <u>การตรวจสอบทรานสฟอร์แมนต์ที่คัดเลือกได้</u>

ทรานสฟอร์แมนต์ที่คัดเลือกได้ นำมาสกัดพลาสมิดโดยวิธีที่ใช้เซลล์ปริมาณน้อย คือวิธี Alkaline lysis (Birnboim และ Doly 1979) เพื่อเปรียบเทียบขนาดกับพลาสมิดพาหะ pUC18 หรือ pUC19

17.1 เขี่ยเชื้อทรานสฟอร์แมนต์จากโคโลนีเดี่ยว ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 5 มล. ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มล. เลี้ยงโดยการเขย่าที่ 37°ซ ความเร็ว 200 รอบ/นาที ข้ามคืน

17.2 นำเชื้อปริมาตร 1.5 มล.ใส่ในหลอดไมโครติฟิวจ์ขนาด 1.5 มล.นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที

17.3 เทส่วนน้ำใสทิ้ง เซลล์ที่ได้นำมาละลายในสารละลายไลโซไซม์ ปริมาตร 0.1 มล. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

17.4 เติมสารละลายไลซิส 0.2 มล. ผสมโดยการกลับหลอดไปมา 10 วินาที แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที

17.5 เติม 3 โมลาร์ของโซเดียมอะซิเทต pH 4.8 ที่เย็นลงไป 0.15 มล. ผสมให้เข้ากันเบาๆ 10 วินาที ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที

17.6 ปั่นแยกเศษเซลล์และดีเอ็นเอของโครโมรโซมอล ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที

17.7 ใช้ micropipette ดูดส่วนน้ำใสออกใส่หลอดใหม่ เติมฟีนอลคลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข7) ในปริมาตรที่เท่ากัน ผสมโดย vortex mixer 10 วินาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่

17.8 นำมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 95% เอทานอล ที่เย็นปริมาตร 2 เท่าของสารละลายตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ปั่นเก็บตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ทำให้ตะกอนแห้ง

17.9 ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสตามวิธีในข้อ 9 เปรียบเทียบกับพลาสมิดพาหะ pUC18

18. <u>การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส</u>

18.1 นำเซลล์ *Streptomyces* และ *E. coli* ที่เตรียมได้จากข้อ 4.2 และ 5.3 ตามลำดับ มาแขวนลอยใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 โดยใช้ปริมาตร 6 มล. สำหรับ *Streptomyces* และ 3 มล. สำหรับ *E. coli*

18.2 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาทำให้แตก โดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ที่ 50% duty cycle และ 1 sec cycle time เป็นเวลา 3 นาที สำหรับ *E. coli* และ 6 นาที สำหรับ *Streptomyces*

18.3 นำมาปั่นแยกเศษเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที สำหรับ *E. coli* 10,000 รอบ/นาที สำหรับ *Streptomyces* ส่วนน้ำใสที่ได้ (crude enzyme) นำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการดังต่อไปนี้ และ ปริมาณโปรตีนตามข้อ 19

18.4 นำส่วนน้ำใสมา 0.5 มล. เติมส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย 0.6 มล. ของ 0.5 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, 0.1 มล.ของ 0.1โมลาร์ มักเน

เซียมซัลเฟต , 0.2 มล. ของ 0.001 โมลาร์ โคบอลท์คลอไรด์ , 0.5 มล. ของ 2.0 โมลาร์ กลูโคส และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 2.0 มล.

18.5 นำไปบ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 80° ซ เก็บสารละลายตัวอย่างที่เวลา 0,10,20 และ 30 นาที นำมาทำให้เจือจาง 300 เท่าด้วยน้ำกลั่น

18.6 นำ 0.5 มล. ของสารละลายในข้อ 18.5 ไปหาปริมาณฟรักโตสโดยวิธีของ Dische และ Borenfreund (1951) ซึ่งดัดแปลงโดย Marshall และ Kooi (1957) ดังนี้ เติม 70% กรดซัลฟูริกเกรดวิเคราะห์ (analytical grade ของ Mallinckrodt, U.S.A.) และ 1.5% ซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ (Cysteine-HCl) 0.1 มล. และตามด้วย 0.12% อัลกอฮอลิคคาร์บาโซล (alcoholic carbazole) 0.1 มล. ผสมให้เข้ากันทันที นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง ประมาณ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

18.7 สร้างกราฟมาตราฐานของน้ำตาลฟรักโทสที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัม/มล.

1 หน่วย (unit) ของกลูโคสไอโซเมอเรส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะของวิธีการตรวจสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น

19. <u>การวัดปริมาณโปรตีน</u> ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

นำสารละลายตัวอย่างที่จะทดสอบ 1 มล. มาเติมสารละลาย Lowry C (ภาคผนวก ข10) 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข10) 0.5 มล. ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร สำหรับกราฟมาตรฐานของโปรตีนใช้ BSA (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัม/มล.

20. <u>การหาแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนต์พลาสมิดจากโคลน 289</u>

(Restriction map)

นำริคอมบิแนนต์พลาสมิดจากโคลน 289 หรือ pUR289 มาหาแผนที่ยีนโดยการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แบบสมบูรณ์หลายๆชนิดเช่น *Hin*dIII, *Eco*RI, *Bam*HI, *Kpn*I, *Sma*I, *Xba*I และ *Pst*I โดยจะแยกการตัดออกเป็น 3 อย่าง คือตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียว (Single digestion) ตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด (Double digestion) และ ตัดด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด (Triple digestion) ตามวิธีการในข้อ 11 จากนั้นนำรีคอมบิแนนต์พลาสมิด ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แล้วมาทำอิเล็กโทรโฟริซิส เพื่อดูลักษณะแถบดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด ตามวิธีการในข้อ 9 บันทึกภาพเพื่อนำไปวิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

21. <u>การโคลนย่อยของยีนที่ได้จาก pUR289</u> (Subcloning)

นำรีคอมบิแนนต์พลาสมิดจาก pUR289 มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 11 โดยชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์จะระบุในผลการทดลอง แยก DNA insert ออกมาและทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด GENECLEAN kit ตามวิธีการในข้อ 13 นำชิ้นส่วนที่ต้องการมาเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pUC18 หรือ pUC19 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกันตามวิธีการในข้อ 14 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* HB101 ตามวิธีการในข้อ 15 วิเคราะห์ผลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้น 1% และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล.

22. <u>การเตรียมดีเอ็นเอติดตาม</u> (DNA Probe)

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามเตรียมได้จากพลาสมิด pUR289 ที่ได้จากโคลน 289 ที่คัดเลือกได้ นำมาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I *Eco*RI และ *Xba*I ร่วมกันแบบสะบูรณ์ตามวิธีในข้อ 11 แยกชิ้นส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส โดยใช้ชุด GENECLEAN Kit ตามวิธีในข้อ 13 นำชิ้นส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอมาติดฉลากโดยใช้ชุดติดฉลาก ECL Kit ของ Amersham, U.K. (ภาคผนวก ข11) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ตัวติดฉลากไม่ใช่สารกัมมันตรังสี (Non Radioactive Labelling) ดังนี้

22.1 ดีเอ็นเอที่จะนำมาติดฉลากควรมีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที นำมาแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำมาปั่นให้สารละลายตกมาอยู่ที่ก้นหลอด 5 วินาที

22.2 เติมสารสำหรับติดฉลากดีเอ็นเอ (DNA labelling reagent) ในปริมาตรที่เท่ากันกับปริมาตรดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer

22.3 เติมสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ ในปริมาตรที่เท่ากันกับปริมาตรดีเอ็นเอตั้งต้นผสมให้เข้ากัน 1 วินาที โดยใช้ vortex mixer

22.4 ปั่นให้สารละลายมาอยู่ก้นหลอด บ่มที 37°ซ เป็นเวลา 10 วินาที ในกรณีที่ไม่นำไปใช้ในทันทีให้แช่น้ำแข็งประมาณ 10-15 นาที และเติมกลีเซอรอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 % ก่อนนำไปเก็บที่ -20°ซ

23. <u>การทำ Southern blot</u>

23.1 การเตรียมอะกาโรสเจลสำหรับทำ Southern blot

23.1.1 เตรียมอะกาโรสเจลเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 9 โดยเติมเอทิเดียมโบรไมด์ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 ไมโครกรัม/มล. ดีเอ็นเอที่จะนำมาทำ Southern blot ต้องถูกตัดโดยสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมแล้วผสมดีเอ็นเอกับสีติดตามในอัตราส่วน 1:1 โดยมี λ DNA/*Hin*dIII เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

23.1.2 นำไปทำอิเล็กโทรโฟริซีส โดยให้ความต่างศักย์ 70 โวลต์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเจลไปตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพไว้

23.1.3 นำเจลใส่ในกล่องพลาสติก เติมสารละลาย depurination (ภาคผนวก ข12)ปริมาตร 400 มล. สำหรับเจลขนาด 20 ซม.x 20 ซม. จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 15 นาที หรือจนกระทั่งสีของบรอมฟีนอลบลูเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เทสารละลายทิ้ง ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น

23.1.4 เติมสารละลาย denaturation (ภาคผนวก ข13) ปริมาตร 400 มล. เขย่า 15 นาที เมื่อบรอมฟีนอลบลูเปลี่ยนจากสีเหลืองกลับมาเป็นสีฟ้า เทสารละลายทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

23.1.5 เติมสารละลาย neutralization (ภาคผนวก ข14)ปริมาตร 400 มล. เขย่า15 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปทำ capillary blotting เพื่อเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจากเจลลงบนตัวกลางที่เหมาะสม เช่น nitrocellulose membrane เป็นต้น

23.2 การทำ capillary blotting

23.2.1 เตรียมอุปกรณ์สำหรับทำ capillary blotting (ภาคผนวก ค) ใช้กล่องพลาสติกที่สะอาด เติมสารละลาย 20x SSC(ภาคผนวก ข15) และใช้กระดาษกรอง Whatman 3 MM 3 แผ่น เป็นตัวกลางในการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอ

23.2.2 วางแผ่นเจลบนกระดาษกรอง Whatman 3 MM ที่อิ่มตัวด้วยสารละลาย 20x SSC ระมัดระวังไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น

23.2.3 ตัดแผ่นเมมเบรน hybond-N^+ ให้มีขนาดเท่ากับแผ่นเจลวางบนเจลโดยไม่ให้มีฟองอากาศ ใช้ถุงมือเพื่อป้องกันการปนเปื้อนบนแผ่นเมมเบรน

23.2.4 วางกระดาษกรอง Whatman 3 MM 3 แผ่น ที่อิ่มตัวด้วยสารละลาย 20x SSC ลงบนแผ่นเมมเบรนโดยไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น

23.2.5 วางกระดาษทิชชูทับบนกระดาษกรอง ให้มีความสูง 5-7 ซม. จากนั้นใช้แผ่นกระจกวางทับอีกที และใช้อุปกรณ์ที่มีน้ำหนักประมาณ 750 กรัม วางทับบนแผ่นกระจก ทิ้งข้ามคืน

23.3 การตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นเมมเบรน hybond N^+ (DNA Fixation)

23.3.1 นำแผ่นเมมเบรนออกจากเจลวางบนกระดาษกรอง Whatman 3 MM โดยให้ด้านที่มีดีเอ็นเออยู่ด้านบน ทำเครื่องหมายบนแผ่นเมมเบรน

23.3.2 นำแผ่นเมมเบรนมาทำการตรึงดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีการ Alkali fixation โดยวางแผ่นเมมเบรนให้ด้านที่มีดีเอ็นเออยู่ด้านบนลงบนกระดาษกรองที่อิ่มตัวด้วย 0.4 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลา 2-30 นาที แล้วล้างด้วย 5XSSC

23.3.3 นำแผ่นเมมเบรน มาทำให้แห้งในอากาศ โดยวางบนกระดาษกรอง Whatman 3 MM เมื่อแห้งแล้วนำไปทำไฮบริไดเซชัน (Hybridization) ต่อไป ในกรณีที่ไม่สามารถนำไปทำได้ในทันทีให้เก็บที่ 4° ซ

23.4 การทำไฮบริไดเซชัน (Hybridization)

สารละลายต่างๆที่ใช้ในขั้นตอนนี้เป็นสารละลายสำเร็จรูปที่ผลิตโดย บริษัท Amersham, U.K.

23.4.1 เตรียมบัฟเฟอร์ไฮบริไดเซชัน โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ เกรดวิเคราะห์ (NaCl analytical grade) ในความเข้มข้นที่เหมาะสม และเติม 5% w/v blocking agentในบัฟเฟอร์ไฮบริไดเซชัน นำไปกวนโดยใช้ magnetic stirrerเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

23.4.2 นำไปอุ่นที่ 42° ซ 1 ชั่วโมง กวนเป็นครั้งคราว เมื่อละลายหมดแล้วแบ่งใส่ขวดพลาสติกที่ปลอดเชื้อ เก็บที่ -20° ซ

23.4.3 นำแผ่นเมมเบรนมาทำ pre-hybridization ในถุงพลาสติกโดยเติม บัฟเฟอร์สำหรับไฮบริไดเซชัน โดยใช้อัตราส่วน 0.125 มล./ตาราง ซม. ของแผ่นเมมเบรน ปิดถุงพลาสติกให้สนิทโดยระมัดระวังไม่ให้มีฟองอากาศ นำไปเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 42°ซ 1 ชั่วโมง

23.4.4 เติมดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลากจากข้อ 20 ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มล. ของบัฟเฟอร์ไฮบริไดเซชัน ลงในถุงพลาสติกโดยไม่ให้ถูกแผ่นเมมเบรนโดยตรง ปิดถุงพลาสติกให้สนิทโดยไม่ให้มีฟองอากาศ นำไปเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 42°ซ ข้ามคืน

23.4.5 นำแผ่นเมมเบรนออกจากถุงพลาสติกใส่ในกล่องพลาสติกที่สะอาดล้างด้วยบัฟเฟอร์ primary wash (ภาคผนวก ข16)นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 42°ซ 20 นาที 2 ครั้งในกรณีที่ใช้บัฟเฟอร์ primary wash สูตรที่ไม่เติมยูเรีย (urea)ให้นำไปเขย่าที่ 55°ซ 10 นาที 2 ครั้ง

23.4.6 เมื่อครบเวลาเทบัฟเฟอร์ทิ้ง นำแผ่นเมมเบรนไปใส่กล่องใหม่ล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ secondary wash (ภาคผนวก ข17) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที 2 ครั้ง เมื่อครบเวลานำแผ่นเมมเบรนไปตรวจสอบบนฟิล์มเอกซเรย์(X-ray film)

23.5 การตรวจสอบบนฟิล์มเอกซเรย์ (Autoradiograph)

23.5.1 นำแผ่นเมมเบรนมาวางบนกระดาษกรอง Whatman 3 MM ซับบัฟเฟอร์ส่วนเกินออก 1 นาที จากนั้นนำไปวางบนแผ่นพลาสติกโดยให้ด้านที่มีดีเอ็นเออยู่ด้านบน ราดด้วย detection reagent โดยใช้อัตราส่วน 0.125 มล./ตร.ซม. ให้ทั่วแผ่นเมมเบรนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที

23.5.2 ซับบัฟเฟอร์ส่วนเกินออกโดยวางลงบนกระดาษกรอง Whatman 3 MM จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาหุ้มด้วยแผ่นพลาสติกโดยไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น

23.5.3 วางแผ่นเมมเบรนโดยให้ด้านที่มีดีเอ็นเออยู่ด้านบน ใน film cassette และวางฟิล์มเอกซเรย์ทับบนแผ่นเมมเบรน ปิด cassette เพื่อให้สัญญาณเกิดขึ้นบนฟิล์มเอกซเรย์ ในเวลาที่เหมาะสม ขั้นตอนนี้ทำในห้องมืด ภายใต้แสงสีแดง

23.5.4 เมื่อครบเวลา นำฟิล์มเอกซเรย์มาล้าง โดยล้างในน้ำยา developer (ภาคผนวก ข18) 5 นาที ล้างในน้ำ 1 นาที จากนั้นนำมาล้างในน้ำยา fixer 10 นาที และล้างภายใต้น้ำไหล 15 นาที ตากฟิล์มให้แห้ง และวิเคราะห์ผลโดยสังเกตสีดำบนฟิล์มเอกซเรย์