บทที่ 2

เครื่องมือ-เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือ

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) แบบ PHM 8? Autocal บริษัท Radiometer Copenhagen, Denmark

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated Centrifuge) แบบ J-21C บริษัท Beckman Instrument Inc., U.S.A.

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงขนาดเล็ก (High Speed Microcentrifuge) แบบ MC-15A บริษัท Tomy Seiko, Japan

เครื่องอบฆ่าเชื้อ(Autoclave) แบบHA-30 บริษัท Hirayama Manufacturing Coporation, Japan

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ(Incubator)แบบBM600 บริษัท Memmert GmbH, W. Germany

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking Water Bath) แบบ 01PF623 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A.

เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) แบบ A466 บริษัท Charlies Hearson & Co. Ltd., England

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography แบบ LC-3A บริษัท Shimadzu, Japan

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magmetic Stirrer) แบบ 0188 GMS, Scientific Instrument Development And service Center, Faculty of Science, Chulalongkorn University

เครื่องผสมสาร (Vortex Genic) แบบ K 550-G บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.

ปิเปตต์อัตโนมัติ (Autopipette) แบบ Pipetman P20, P100 และ P200 บริษัท Gilson Medical Electronics S.A., France

อุปกรณ์อิเลคโตรโฟรีซีส (Agarose Gel Electrophoresis) ประกอบด้วย Horizontal Electrophoresis Unit และ Power Supply แบบ EPS 3200 หรือ EPS 5100

อุปกรณ์อีเลคโตรโฟรีซีส (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ประกอบด้วย vertical Electrophoresis Unit และ Constant Power Supply แบบ 1000/500 บริษัท BIO-RAD, U.S.A.

2.2 วัสดุภัณฑ์

ถุงไดอะไลซีส (Cellulose Dialysis Tubing) 6 mm (dimeter) M.W. cut off 12,000 Dalton บริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A.

กระดาษกรอง (Filter Paper) แบบ HA 0.45 μm บริษัท Millipore Coporation, U.S.A.

2.3 เคมีภัณฑ์

2.3.1 สารเคมี

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเกรดห้องปฏิบัติการ (Labolatory grade) ยกเว้น Acetonitrile เป็นเกรด HPLC ส่วน Standard CDs, maltotriose maltotetraose, maltopentaose, maltohexose และ maltoheptaose เป็นเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

2.3.2 เอนไซม์

เรสติกชั่นเอนไซม์ของบริษัท Bethesda Research Laboratories, U.S.A., บริษัท Biolabs U.S.A. และบริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A.

เอนไซม์ T-4 DNA ligase ของบริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A.

2.4 พลาสมิดดีเอ็นเอและดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง

2.4.1 พลาสมิดดีเอ็นเอ

พลาสมิดดีเอ็นเอ pBR322 (Bolivar และคณะ, 1977; Sutcliffe, 1979) ขนาด 4.363 kb มียีนต้านยา tetracycline และ amplicillin

พลาสมิดดีเอ็นเอ pUC18 (Messing, 1983) ขนาด 2.686 kb มียีนต้าน amplicillin และ *lac* Z′ gene

พลาสมิดดีเอ็นเอ pSE411 (Dente และคณะ, 1983; Elledge และคณะ, 1989) เป็นอนุพันธ์ของ pUC18 ที่เพิ่ม M13 ori เข้าไปในตำแหน่งของ NarI และเพิ่ม *tac* promotor แทนที่ *lac* promotor

2.4.2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ดีเอ็นเอของ λ-DNA CIindIts 857 Sam 7 ถูกตัดอย่างสมบูรณ์ด้วย HindIII ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 8 ชิ้น มีขนาด 23.130, 9.4i6, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 0.564 และ 0.125 kb ตามลำดับ (Rodrigurz and Tait, 1983)

2.5 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง (ตารางที่ 11)

2.5.1 *Bacillus* A$_{1}$

เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

2.5.2 *Escherichia coli* K12 strain HB101, JM101 และ DH5α

เป็นสายพันธุ์ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าเรือนสำหรับการทรานสฟอร์มพลาสมิด

2.5.3 *Escherichia coli* strain SV1, SV2, SV3, SV4 และ SV5

เป็นสายพันธุ์ที่สร้างได้จากการวิจัยนี้

ตารางที่ 11 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	สายพันธุ์	Phenotype	เอกสารอ้างอิง
Bacillus A_{11}	-	-	Pongsawasdi และ Yahisawa, 1987
Escherichia coli	HB101	F^- *hsd* S20($r_B^- m_B^-$) *rec*A13 *leu*B6 *ara*-14 *pro*A2 *lac*Y1 *gal*K2 *rps*L20(str^r) *xyl*-5 *mlt*$^{-1}$ *sup*E44 λ^-	BoyerและRoulland-Dussoix, 1969; Bolivar และBackman, 1979
	JM101	F' *tra*D36*lac*I^q Δ(*lac*Z)M15 *pro*AB/supE thiΔ(lac-pro AB)	Messing และคณะ, 1981
	DH5α	F^- 80d*lac*ZΔM15 *end*A11 *rec*A1 *hsd*R17($r_k^- m_k^-$) *sup*E44 *thi*-1 λ^- *gyr*A96 *rel*A1 Δ(*lac*ZYA-*arq*F)U169	Raligh และคณะ, 1989
	SV1	HB101 (pSV1)	ใช้ในการวิจัยนี้
	SV2	JM101 (pSV2)	ใช้ในการวิจัยนี้
	SV3	JM101 (pSV3)	ใช้ในการวิจัยนี้
	SV4	JM101 (pSV4)	ใช้ในการวิจัยนี้
	SV5	HB101 (pSV5)	ใช้ในการวิจัยนี้

2.6 เครื่องแก้วและสารละลาย

เครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต้องผ่านการ siliconized และรีเอเจนต์ทุกชนิด ต้องสะอาดปราศจากเอนไซม์ Nuclease ด้วยการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.7 การสกัดดีเอ็นเอ

2.7.1 การสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซม จาก *Bacillus A*.

ดัดแปลงมาจากวิธีที่เสนอโดย Rodriguez และคณะ (1983)

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Alkaline medium (yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์, polypeptone 0.5 เปอร์เซนต์, K_2HPO_4 0.1 เปอร์เซนต์ pH 10) จำนวน 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์หนึ่งครั้ง ด้วยบัฟเฟอร์ SET (ซูโครส 20 เปอร์เซนต์, Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.6)

นำเซลล์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 65 °ซ กระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ SET 2 มิลลิลิตร แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง

เติม Lysozyme 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และ บัฟเฟอร์ RNase (RNase 10 มิลกรัมต่อมิลลิลิตร ในโซเดียมอะซีเตท 0.1 โมลาร์ และ Na_2EDTA 0.3 มิลลิโมลาร์ pH7.4) จำนวน 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 °ซ โดยเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที

เติม Sodium dodecyl sulfate 25 เปอร์เซนต์ จำนวน 0.05 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ โดยเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

เติม pronase 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.3 มิลลิลิตร และ $CHCl_3$: isoamyl alcohol (24:1) จำนวน 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ โดยเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และ $CHCl_3$: isoamyl alcohol (24:1) จำนวน 10 มิลลิลิตร ปิดจุกหลอดแล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ 5 นาที ปั่นที่ 4,000xg นาน 20 นาที แล้วแยกสารละลายชั้นบน มาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วย $CHCl_3$:isoamyl alcohol

นำสารละลายชั้นบนมาเติมโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์จำนวน 0.2 มิลลิลิตรและเอทธานอลเย็น จำนวน 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด แช่ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ค่อยๆพันสายโครโมโซม ด้วยแท่งแก้วแล้วนำไปจุ่มในเอทธานอลเย็น เพื่อล้าง DNA น้ำหนักโมเลกุลต่ำๆให้หลุดออกไป

ละลายตะกอนของโครโมโซมดังกล่าวในบัฟเฟอร์ TEN (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA 1 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ pH7.6) จำนวน 2 มิลลิตร ซึ่งมี $CHCl_3$ 0.1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

2.7.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวิธีอัลคาไลน์ (Alkaline Extraction)

ดัดแปลงมาจากวิธีที่เสนอโดย Birnboim และ Doly (1979) ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งปริมาณมากและปริมาณน้อย

ในกรณีของการสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอมาก เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารอุดม LB (Bactotrytone 1 เปอร์เซนต์, yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ และโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซนต์ pH 7.4) ที่เสริมแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์หนึ่งครั้งด้วยบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0)

นำเซลล์มาเติมสารละลาย Solution I (lysis buffer; Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์ Na_2EDTA 10 มิลลิโมลาร์, กลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ และlysozyme 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยในระยะนี้ก็เขย่าให้เข้ากันบ้างเป็นครั้งคราว

เติมสารละลาย Solution II (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ และ SDS 1 เปอร์เซนต์) จำนวน 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เติมสารละลาย Solution III (โซเดียมอะซีเตท 3 โมลาร์ pH 4.8) จำนวน 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 4,000xg เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายชั้นบน มาสกัดด้วย phenol:$CHCl_3$ (1:1) จำนวน 18 มิลลิลิตร โดยเขย่าให้เข้ากัน ปั่นที่ 4,000xg เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายชั้นบนมาสกัดซ้ำอีกครั้งด้วย phenol:$CHCl_3$

นำสารละลายชั้นบนมาสกัด phenol ออกโดยการเติมไดเอทธิลอีเธอร์ 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าจนกระทั่งสารละลายชั้นล่างใส ปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้ง กำจัดไดเอทธิลอีเธอร์ที่ยังเหลือในสารละลาย โดยการเป่าลมลงบนสารละลาย แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

เติมเอทธานอลเย็นจำนวน 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด แช่ที่ -20 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนที่ 4,000xg เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป ปล่อยให้แห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

กระจายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วผ่านสารละลายที่ได้ลงใน microfuge tube เติม RNase ในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เติมโซเดียมอะซีเตต 3 โมลาร์ จำนวน 1 ใน 10 ของปริมาตรทั้งหมด แล้วเติมเอทธานอลเย็นจำนวน 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องปั่นไมโครเซนตริฟิว TOMY MC-15 A กระจายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ ความเข้มข้นของพลาสมิคดีเอ็นเอจะมีประมาณ 250 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรสำหรับพลาสมิค pBR322 และจะมีความเข้มข้นประมาณ 1000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับพลาสมิค pUC18 และ pSE411 รวมทั้งอนุพันธ์

ในกรณีของการสกัดพลาสมิคดีเอ็นเอปริมาณน้อย (Mini-preparation) จะใช้ปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยง 1 มิลลิลิตร ส่วนวิธีการสกัดทุกขั้นตอนเหมือนการสกัดพลาสมิคดีเอ็นเอปริมาณมาก และใช้ Solution I: Solution II: Solution III ในอัตราส่วน 100 : 200 : 150 ไมโครลิตรตามลำดับ โดยไม่มีขั้นตอนการเติม RNase 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอลเย็นแล้วกระจายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE ที่ผสม RNase 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ โดยวิธีนี้ความเข้มข้นของพลาสมิคดีเอ็นเอ ประมาณ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับพลาสมิค pUC18 และ pSE411 รวมทั้งอนุพันธ์

การวัดปริมาณดีเอ็นเอจะวัดอย่างคร่าวๆ โดยการเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอ ที่ปรากฏบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.8 การย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ Restriction endonuclease

สภาวะในการย่อยดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ด้วย restriction endonuclease ได้ศึกษาโดยบริษัท New England Biolab พบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการย่อยดีเอ็นเอ คือความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (Ausuble และคณะ, 1989) ในงานวิจัยครั้งนี้ใช้

บัฟเฟอร์ในการย่อยดีเอ็นเอเพียงชนิดเดียวที่ประกอบด้วย Tris-HCl 5 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, แมกนีเซียมคลอไรด์ 1 มิลลิโมลาร์ และ BSA 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม ใน reaction mixture 20 ไมโครลิตร เลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สำหรับเรสติกชั่นเอนไซม์แต่ละชนิดตามที่แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 4 และในกรณีที่ทำ double digestion จะเลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เอนไซม์ทั้งสองชนิดทำงานได้ดี สำหรับ KpnI, HpaI และ ScaI ตามลำดับจะเพิ่มโปแตสเซียมคลอไรด์ในปริมาณ 50 มิลลิโมลาร์ เพื่อช่วยให้ทำงานได้ดีขึ้น

เรสติกชั่นเอนไซม์แต่ละชนิดจะใช้ในปริมาณ 5 หน่วย ต่อ reaction mixture ในกรณีการทำ double digestion ก็ใช้เอนไซม์อย่างละ 5 หน่วย ต่อ reaction mixture เช่นกัน

บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคืน แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม tracking dye (glycerol 50 เปอร์เซนต์, bromphenol blue 0.1 เปอร์เซนต์ และ Xylene cyanol FF 0.1 เปอร์เซนต์) จำนวน 5 ไมโครลิตร

2.9 <u>อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส</u>

การวิเคราะห์ปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ทำได้โดยใช้ submarine horizontal gel electrophoresis ของอะกาโรสเจล 0.7-1.5 เปอร์เซนต์ ซึ่งเตรียมในบัฟเฟอร์ TBE (Tris-HCl 89 มิลลิโมลาร์, boric acid 89 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์ pH 8.3) และใส่ดีเอ็นเอประมาณ 500 นาโนกรัมต่อหนึ่งช่องเจล โดยเจลมีขนาด 100 X 90 X 6 มิลลิเมตร ทำอิเลคโตรโฟรีซีส 80 โวลต์ นานประมาณ 3 ชั่วโมง ในบัฟเฟอร์ TBE โดยเคลื่อนจากขั้วลบไปขั้วบวก และใช้ tracking dye เป็นตัวติดตาม นำเจลมาย้อมโดยแช่ใน ethidium bromide เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นาน 30 นาที แล้วแช่น้ำกลั่นเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง นำเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตจาก UV transilluminator UVP แล้วเปรียบเทียบขนาดและปริมาณกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.10 การทำ molecular cloning ของ CGTase gene ในพลาสมิด pBR322

2.10.1 การเตรียมดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับ cloning จากโครโมโซมจาก *Bacillus* A_{11}

นำโครโมโซมจาก *Bacillus* A_{11} มาย่อยด้วยเรสติกชั่นเอนไซม์ Sau3AI แบบ partial digestion ที่เวลาต่างๆกัน จากนั้นนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส นำเจลไปย้อมใน ethidium bromide แล้วส่องดูแถบชิ้นดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ตัดเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอตามขนาดตั้งแต่ 2 kb ขึ้นไปมาแยกและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยวิธี electroelution โดยนำเจลที่ตัดออกมาใส่ถุงไดอะไลซีส (dialysis bag) เติมบัฟเฟอร์ TE จำนวน 0.45 มิลลิลิตร แล้วนำมาทำอิเลคโตรโฟรีซีสต่อประมาณ 30 นาที จากนั้นกลับขั้วไฟฟ้าทำอิเลคโตรโฟรีซีสจากขั้วบวก (+) ไปขั้วลบ (-) ต่ออีกประมาณ 5 นาที

ดูดสารละลายในถุงไดอะไลซีสใส่ใน microcentrifuge tube เติมโซเดียมอะซิเตด 3 โมลาร์ จำนวน 45 ไมโครลิตร แล้วสกัดด้วย phenol:$CHCl_3$ (1:1) แยกสารละลายชั้นบนมาสกัดเอา phenol ที่ปนอยู่ออก โดยการเติมไดเอธิลอีเธอร์จำนวน 0.5 มิลลิลิตรเขย่าจนกระทั่งสารละลายชั้นล่างใส ปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้ง กำจัดไดเอธิลอีเธอร์ที่ยังเหลือในสารละลาย โดยการเป่าลมลงบนสารละลาย และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

เติมเอธานอลเย็นจำนวน 2 เท่าของปริมาณทั้งหมด แช่ที่อุณหภูมิ -20 °ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องไมโครเซนตริฟิว TOMY MC-15 A กระจายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

2.10.2 วิธีเตรียม alkaline phosphatase-treated plasmid pBR322

นำพลาสมิด pBR322 มาย่อยด้วยเรสติกชั่นเอนไซม์ BamHI แล้วนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ตัดเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิด pBR322 มาแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล โดยวิธี Electroelution จากนั้นนำมากำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5′ ด้วยเอนไซม์ calf intestine phosphatase (CIP) โดยใน reaction mixture จำนวน 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัม, สังกะสีคลอไรด์ 1 มิลลิโมลาร์ และ CIP 1 หน่วย บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมโซเดียมอะซิเตด 3 โมลาร์ จำนวน 5 ไมโครลิตร แล้วนำมาสกัดด้วย phenol:$CHCl_3$ (1:1) จำนวน 100 ไมโครลิตร โดยเขย่าให้เข้ากัน ปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำสารละลายชั้นบนมาสกัดซ้ำ ด้วย phenol:$CHCl_3$ (1:1) อีกครั้ง

นำสารละลายชั้นบนมาสกัดเอา phenol ออก โดยการเติมไดเอธิลอีเธอร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วเขย่าจนกระทั่งสารละลายชั้นล่างใส ปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้ง กำจัดไดเอธิลอีเธอร์ที่ยังเหลืออยู่ แล้วเติมเอธานอลเย็นจำนวน 2 เท่าของปริมาณทั้งหมด แช่ที่อุณหภูมิ -20 °ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องไมโครเซนตริฟิว TOMY MC-15 A กระจายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

2.10.3 วิธีเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ (ligation)

นำชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *Bacillus* A_{11} (ข้อ 2.10.1) และชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิด pBR322 (ข้อ 2.10.2) มาผสมกันในอัตราส่วนของโมลดีเอ็นเอหาหะ ต่อโมล

ของดีเอ็นเอของโครโมโซมเท่ากับ 1:3 (ประมาณ 0.25:0.75 ไมโครกรัม ตามลำดับ ถ้าประมาณได้ว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนโดยเฉลี่ยมีขนาดเท่ากับดีเอ็นพาหะ) โดยใน reaction mixture จำนวน 10 ไมโครลิตร จะประกอบด้วย Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์, dithiothreitol 10 มิลลิโมลาร์, BSA 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ATP 1 มิลลิโมลาร์ และ T4-DNA ligase 1 หน่วย บ่มที่อุณหภูมิ 15 °ซ เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วนำไปทำทรานสฟอร์เมชั่น (transformation) ต่อไป

2.10.4 วิธีการทำทรานสฟอร์เมชั่น (transformation)

แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

2.10.4.1 การเตรียม competent cell

ดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย Mandel และ Higa (1970) โดยการใช้แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$ method) ปรับสภาพเซลล์เจ้าเรือน ซึ่งจะก่อให้เกิด permeability ที่ผนังเซลล์ ซึ่งเรียกว่า competent cell

เจริญเซลล์เจ้าเรือน *E. coli* strain HB101 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB, pH 7.4 จำนวน 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคืน เพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น (starter) ดูดเซลล์ตั้งต้น 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง (OD_{550} ประมาณ 0.5-0.6) นำขวดที่บรรจุเชื้อลงไปแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000Xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์หนึ่งครั้งด้วยแคลเซียมคลอไรด์เย็น 0.01 โมลาร์ ปั่นเก็บเซลล์อีกครั้งก่อนที่จะกระจายเซลล์ในแคลเซียมคลอไรด์เย็น 0.1 โมลาร์ จำนวน 0.6-0.7 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำทรานสฟอร์เมชั่น

2.10.4.2 การทำทรานสฟอร์เมชั่น

ผสม competent cell จำนวน 100 ไมโครลิตร กับดีเอ็นเอปริมาณ 50 นาโนกรัม จากข้อ 2.10.3 (ปริมาณ 5 ไมโครลิตร จาก ligation mixture) แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 42 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ทันที เป็นเวลา 10-15 นาที ในกรณีที่ทดสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินของทรานสฟอร์แมนท์ (tranformant) หรือบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในกรณีที่ทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ

กระจายเชื้อจำนวน 100 ไมโครลิตร บน LB-agar ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นก็ทำการเลือกเฟ้นหาทรานสฟอร์แมนท์ที่แสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ต่อไป

2.10.5 การจำแนกและคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับ CGTase gene

2.10.5.1 Replica plating

จากหลักการ insertion inactivation โดยเมื่อเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมเข้าไปในยีนที่ทำให้ดื้อยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน ที่ตำแหน่ง BamHI ของพลาสมิด pBR322 จะทำให้คุณสมบัติในการต้านยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลินเสียไป จึงสามารถคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยเขี่ยเชื้อที่ได้จากข้อ 2.10.4 แต่ละโคโลนีบนอาหารแข็ง LB-agar 2 จาน โดยในจานที่ 1 เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและเตตร้าซัยคลินในปริมาณ 50 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และในจานที่ 2 จะเสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น จานทั้งสองต้องทำเครื่องหมายให้ตรงกัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้เรียกว่า replica plating นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เจริญได้จากการทำทรานสฟอร์เมชั่น

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำมาเทียบกับจำนวนโคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เพื่อคำนวนหาเปอร์เซนต์ของการเกิดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (% insertion or % recombination) คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน แต่ไม่ต้านยาเตตร้าซัยคลิน ($Ap^r Tet^s$)

2.10.5.2 Starch Hydrolytic Activity (Amylolytic Activity)

เป็นการวัดการไฮโดรไลซ์พันธะ α-1, 4 glycosidic ของแป้งโดยเอนไซม์จะย่อยโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดเล็กลง ทำให้การเกิดสีกับสารละลายไอโอดีนเปลี่ยนไปคือเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเข้มเป็นไม่มีสี การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ไม่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ CGTase เนื่องจากเอนไซม์อื่นๆซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์พันธะ α-1, 4 glycosidic เช่น α-amylase ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

เชื้อเชื้อที่คัดเลือกจากข้อ 2.10.5.1 ซึ่งมีคุณสมบัติ $Ap^r Tet^s$ ลงบน LB-starch agar, pH 7.4 (Bactotryptone 1 เปอร์เซนต์, yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์, โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซนต์, Bacto agar 1.5 เปอร์เซนต์ และ soluble starch 1.5 เปอร์เซนต์) ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 60 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายไอโอดีน (ไอโอดีน 0.203 เปอร์เซนต์ และ โปแตสเซียมไอโอไดด์ 5.202 เปอร์เซนต์) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพิจารณาวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี

2.10.5.3 Phenol red inclution complex test (PICT)

ดัดแปลงจากวิธีของ Park และคณะ (1989)

นำโคโลนีที่ให้ผลบวก (positive test) ต่อการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนจากข้อ 2.10.5.2 มาทดสอบด้วย PICT ต่อ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Phenol red-methyl orange containing liquid medium (PM medium, pH 7.4) ซึ่งประกอบด้วย Bactotryptone 1 เปอร์เซนต์, yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์,

โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซนต์, soluble starch 1 เปอร์เซนต์, phenol red 0.02 เปอร์เซนต์ และ methyl orange 0.01 เปอร์เซนต์ และเสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ จำนวน 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง ผลการทดลองที่แสดงผลบวกคือ สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง ทั้งนี้เนื่องจากสาร CDs ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ CGTase จะจับกับ phenol red เกิดเป็น CD-phenol red complex ซึ่งไม่มีสี สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเกิดจากสีของ methyl orange ซึ่งมีขนาดไม่เหมาะที่จะจับกับ CDs นอกจากนี้ methyl orange ยังใช้เป็นตัวชี้ว่าการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ได้เกิดจากสภาวะที่เป็นกรดซึ่งเกิดจากการย่อยแป้งของแบคทีเรีย กล่าวคือถ้าเกิดสภาวะที่เป็นกรดขึ้นแม้ว่า phenol red จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่ methyl orange ก็จะเปลี่ยนสีเป็นสีแดงมาเสริม

2.10.5.4 Cyclodextrin-trichloroethylene assay (CD-TCE assay)

ดัดแปลงจากวิธีของ Nomoto และคณะ (1984) เป็นการวัดปริมาณของสาร CDs ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ CGTase จึงเป็นการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase โดยตรง และใช้วิธีนี้ในการเตรียมสาร CDs ด้วย

น่าโคโลนีที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน และ PICT จากข้อ 2.10.5.3 มาทดสอบ CD-TCE assay ต่อ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-starch broth, pH 7.4 (Bactotryptone 1 เปอร์เซนต์, yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์, โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซนต์, และ soluble starch 1เปอร์เซนต์) จำนวน 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นเก็บส่วนใส (S1) เพื่อใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ต่อไป

เจือจางสารละลายเอนไซม์ในอัตราส่วนต่างๆ (1:2, 1:4, 1:8,...) ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์, pH 6.0 แล้วผสมสารละลายเอนไซม์เจือจาง 1 มิลลิลิตร กับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์, pH 6.0 ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซนต์ ปริมาณ

5 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย trichloroethylene เขย่าอย่างแรงตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดประมาณ 12 ชั่วโมง บันทึกผลการเกิดตะกอน CD-TCE complex เป็นค่า dilution limit ($1:2^n$) นำตะกอนที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นปริมาตรเล็กน้อย ต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 °ซ แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง millipore (0.45 μm) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

กำหนดให้ dilution limit ($1:2^n$) คือ 1:2, 1:4, 1:8,...,$1:2^n$ เป็นค่าที่สารละลายเอนไซม์เจือจางมากที่สุดที่ยังสังเกตเห็นตะกอนที่เกิดขึ้นได้

2.11 <u>การโคลนยีนต่อเนื่อง (subcloning) ของ CGTase gene ในพลาสมิด pUC18</u>

ใช้หลักการ insertion inactivation ของเอนไซม์ β-galactosidase โดยเมื่อเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมเข้าไปใน *lac* Z′ gene ซึ่งถอดรหัสให้ส่วน α-peptide ทางปลาย N-terminal ของเอนไซม์ β-galactosidase ในตำแหน่ง restriction site BamHI บนพลาสมิด pUC18 ทำให้ไม่มีการสร้างส่วน α-peptide ที่จะรวมกับปลาย C-terminal ของเอนไซม์ β-galactosidase ที่สร้างจากเซลล์เจ้าเรือนทำให้ไม่มี active β-galactosidase มาย่อย X-gal ซึ่งเป็น substrate analogue ของ galactose ซึ่งถ้าถูกย่อยแล้วจะให้สีน้ำเงิน ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจึงมีโคโลนีสีขาว ขณะที่ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pUC18 จะให้โคโลนีสีน้ำเงิน

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างขึ้นใหม่ใน ข้อ 2.10 มาย่อยด้วยเรสติกชั่นเอนไซม์ Sau3AI แบบ partial digestion แล้วนำ digestion mixture มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส เลือกตัดอะกาโรสเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2-4 kb นำมาแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี electroelution เพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปทำ ligation ต่อไป

ภายหลังจากเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างขึ้นใหม่ประมาณ 150 นาโนกรัม กับพลาสมิด pUC18 ที่ถูกย่อยด้วย BamHI และถูกกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5′ ประมาณ 50 นาโนกรัม แล้วนำ ligation mixture มาทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* strain JM101 กระจายเชื้อบน LB-agar ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน, X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) และ IPTG (isopropylthio-β-galactoside) ในปริมาณ 50, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เจริญได้ (ทั้งโคโลนีสีขาวและโคโลนีสีน้ำเงิน) เทียบกับจำนวนโคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์ที่มีสีขาวเพื่อหาเปอร์เซนต์ของการเกิดรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีโคโลนีสีขาว

โคโลนีสีขาวจะถูกนำไปทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน, PICT และ CD-TCE assay (ข้อ 2.10.5.2, 2.10.5.3 และ 2.10.5.4) เพื่อคัดเลือกหาทรานสฟอร์แมนท์ที่แสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ตะกอนที่ได้จากวิธี CD-TCE assay จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ต่อไป

ในการศึกษาถึงอิทธิพลของ IPTG ที่มีต่อการแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ทำได้โดยนำทรานสฟอร์แมนท์ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase มาเจริญใน PM medium ที่ไม่เสริมและเสริม IPTG ในปริมาณ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกันระหว่างหลอดเลี้ยงเชื้อที่เสริมและไม่เสริม IPTG โดยพิจารณาว่าหลอดเลี้ยงเชื้อที่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีแดงเป็นสีเหลืองที่ชัดเจนกว่าแสดงว่ามีการแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase มากกว่า

2.12 การโคลนยีนต่อเนื่อง (subcloning) ของ CGTase gene ในพลาสมิด pSE411

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างขึ้นในข้อ 2.10 มาย่อยด้วยเรสติกชั่นเอนไซม์ PstI และ KpnI แล้วนำ digestion mixture มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส เลือกตัดอะกาโรสเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ inserted DNA fragment ในพลาสมิด pUC18 นำมาแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี electroelution เพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปทำ ligation ต่อไป

หลังจากเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 75 นาโนกรัม กับ พลาสมิด pSE411 ประมาณ 25 นาโนกรัม เข้าไปในตำแหน่ง PstI และ KpnI บนพลาสมิด pSE411 แล้วทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* strain HB101 กระจายเชื้อบน LB-agar ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่สามารถเจริญได้แบบสุ่ม มาทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ต่อไป

นำทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้มาทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน, PICT และ CD-TCE assay (ข้อ 2.10.5.2, 2.10.5.3 และ 2.10.5.4) เพื่อคัดเลือกหาทรานสฟอร์แมนท์ที่แสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase คะกอนที่ได้จากวิธี CD-TCE assay จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ต่อไป

2.13 ศึกษาบริเวณต่างๆที่เอนไซม์ CGTase กระจายอยู่ในเซลล์ของ *E. coli*

ดัดแปลงจากวิธีของ Nomoto และคณะ (1984) เป็นการวัดปริมาณของสาร CDs ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ CGTase จึงเป็นการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase โดยตรง และใช้วิธีนี้ในการเตรียมสาร CDs ด้วย

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-strach broth, pH 7.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นเก็บส่วนใส (S1) ที่ 4,000Xg เป็นเวลา 10 นาที ใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ (extracellular enzyme) จากนั้นนำเซลล์

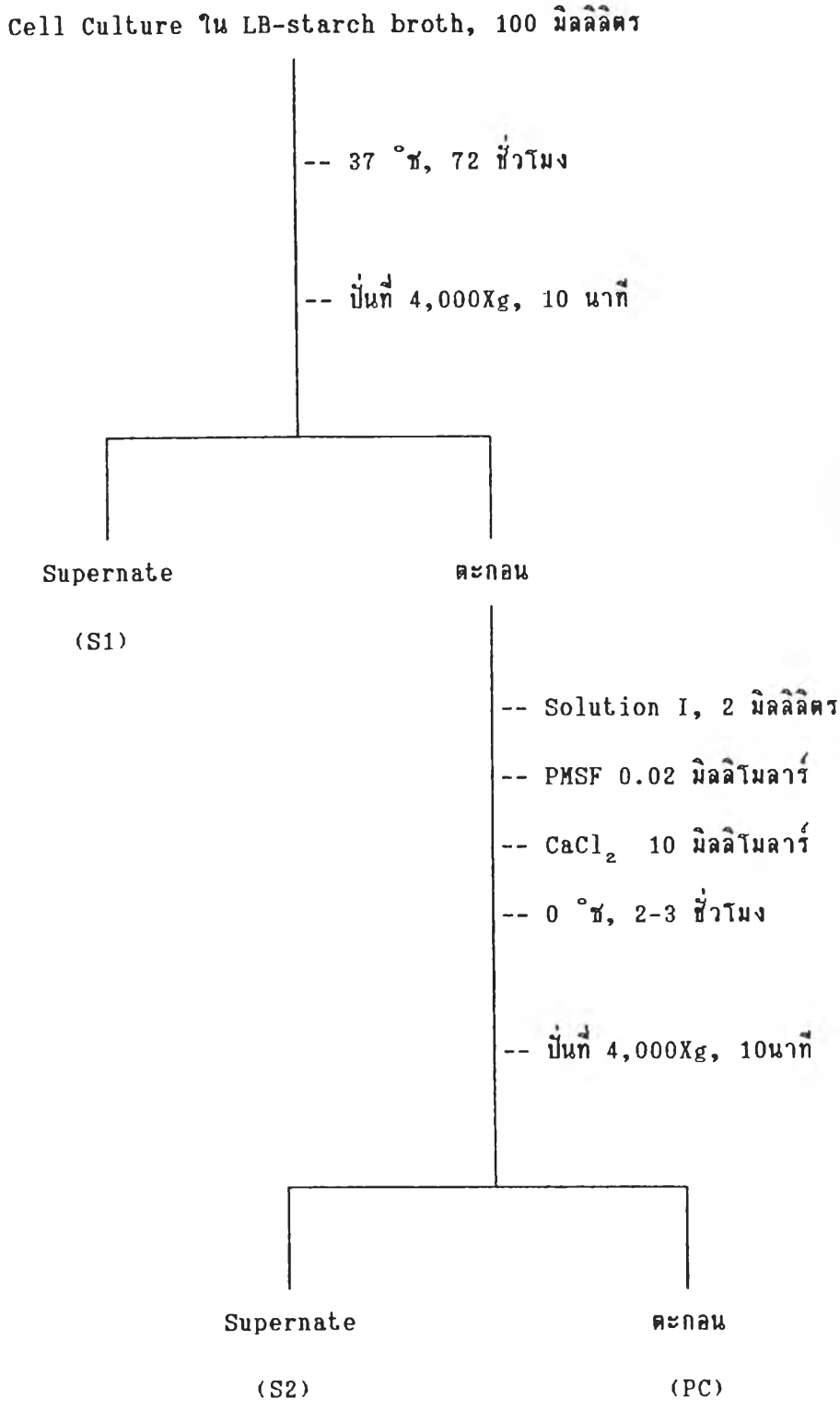
ที่ได้จากการปั่นมาบ่มกับ Solution I (Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, Na_2EDTA 10 มิลลิโมลาร์, กลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ และ lysozyme 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 0 °ซ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาปั่นอีกครั้งหนึ่งที่ 4,000Xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (S2 หรือ periplasmic enzyme) และ เซลล์ (PC) เพื่อใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ต่อไป แผนภูมิโดยสรุปในการเตรียมสารละลายเอนไซม์แสดงในรูปที่ 11

เจือจางสารละลายเอนไซม์จากส่วนน้ำเลี้ยง (S1), ส่วนของ supernate (S2) และ ทั้งเซลล์ (PC) ในอัตราส่วนต่างๆ (1:2, 1:4, 1:8,...) ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 แล้วผสมสารละลายเอนไซม์เจือจาง 0.5 มิลลิลิตร กับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 3 เปอร์เซนต์ ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วย HPLC

2.14 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2.14.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานที่ใช้ประกอบด้วย glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, α- , β- และ ช-CD ตามลำดับ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น



รูปที่ 11 แผนภูมิแสดงการเตรียมสารละลายเอนไซม์จากส่วนต่างๆของเซลล์

2.14.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.14.2.1 เตรียมจากตะกอนที่ได้จาก CD-TCE assay

นำตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย TCE มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตรเล็กน้อยแล้วต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 5-10 นาที จนตะกอนละลายหมด จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง millipore (0.45 µm) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

2.14.2.2 เตรียมจาก reaction mixture

นำ reaction mixture ที่เตรียมจากข้อ 2.13 มาต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง millipore (0.45 µm) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

2.14.3 สภาวะในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ ใช้ Supleco-NH_2 column ขนาด 4.6 มม. ID. X 250 มม. ใช้สารละลายผสม acetonitrile : water อัตราส่วน 75 : 25 (โดยปริมาตร) อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ RI เป็น detector ฉีดสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง ในปริมาตรอย่างละ 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC ส่วนในกรณีการทำ internal standard จะผสมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC จำนวน 40 ไมโครลิตร

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของไซโคลเดกซ์ทรินในสารละลายโดยเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α- , β- และ ɣ-CD มาตรฐาน ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนและฉีดเข้าเครื่องด้วยวิธีและสภาวะเดียวกัน

2.15 การศึกษาถึงความแตกต่างในการสร้างโปรตีนจากเซลล์เจ้าเรือน (*E. coli* strain HB101), ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพาสมิด pSE411 และ SV5 ด้วยเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแผ่น

2.15.1 การเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจล 10 เปอร์เซนต์

เตรียม separating gel โดยผสมสารละลายอะไครลาไมด์ : Bis (30:1) 10 มิลลิลิตร, สารละลายทรีส-เอสดีเอส pH 8.8 (Tris-HCl 1.5 โมลาร์ และ SDS 0.2 เปอร์เซนต์) 7.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 11.5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆให้เข้ากัน แล้วเติม TEMED 15 ไมโครลิตร และสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 เปอร์เซนต์ ที่เตรียมใหม่ๆ 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆให้เข้ากัน นำสารละลายเจลไปบรรจุลงในแบบเจล (ความหนาประมาณ 1 มิลลิลิตร) จนกระทั่งสารละลายสูงประมาณ 12 เซนติเมตร ค่อยๆเติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลอย่างรวดเร็วและเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที จะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจล และน้ำกลั่นอย่างชัดเจน

เตรียม stacking gel โดยผสมสารละลายอะโครลาไมด์ 1 มิลลิลิตร, ทรีสเอสดีเอส pH 6.8 (Tris-HCl 0.5 โมลาร์ และ SDS 0.2 เปอร์เซนต์) 2.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5.3 มิลลิลิตร ตามลำดับ เขย่าเบาๆให้เข้ากัน ก่อนเติม TEMED 5 ไมโครลิตร และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ๆ 0.7 มิลลิลิตร ตามลำดับ เขย่าเบาๆเทน้ำกลั่นออกจากผิวหน้า seperating gel ที่เตรียมไว้แล้วดังกล่าวข้างต้น ใส่หวี (comb) ในแบบเจลให้ห่างจากหน้า seperating gel ประมาณ 2.5-3 เซนติเมตร แล้วเท stacking gel อย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ให้เจลเกิดโพลีเมอไรซ์อย่างสมบูรณ์ ค่อยๆดึงหวีออกแล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.15.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างและเอนไซม์ CGTase ที่ต้องการวิเคราะห์

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* HB101 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ส่วนทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pSE411 และ pSV5 จะเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องไมโครเซนตริฟิว TOMY MC-15 A ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติมบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (Tris-HCl 125 มิลลิโมลาร์,SDS 2 เปอร์เซนต์, กลีเซอรอล 10 เปอร์เซนต์, 2-เมอแคปโตเอธานอล 5 เปอร์เซนต์ และ โบรโมฟีนอลบูล 0.001 เปอร์เซนต์) จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 5-10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปหยอดลงบนหลุมเจลที่เตรียมไว้ ในปริมาณ 10 ไมโครลิตร

สำหรับเอนไซม์ CGTase เป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus* A_{11} ที่แยกบริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนการดูดซับด้วยแป้ง ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80 เปอร์เซนต์ และแยกโดยคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส

ผสมเอนไซม์ CGTase ประมาณ 12 ไมโครกรัม กับบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 5-10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปหยอดลงบนหลุมเจลที่เตรียมไว้

2.15.3 การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

บรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่ทรีส-เอสดีเอสอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ (Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์, ไกลซีน 384 มิลลิโมลาร์ และ SDS 0.1 เปอร์เซนต์ pH 8.3) ลงในอ่างบัฟเฟอร์ชั้นบนและชั้นล่างให้ท่วมปลายทั้งสองข้างของแผ่นเจล หยอดสารละลายตัวอย่างและสารละลายเอนไซม์ CGTase (ข้อ 2.15.2) ลงบนหลุมเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 30 มิลลิแอมแปร์ ต่อแผ่นเจล ควบคุมกระแสไฟฟ้าให้คงที่ด้วย constant

power supply กำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งแถบสีตามรอยเคลื่อนที่อยู่ห่างจากขอบด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร

ถ่ายแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก แล้วนำไปแช่ในน้ำย้อมโปรตีน (Coomassie Brilliant Blue R 250 0.2 เปอร์เซนต์, เมทธานอล 50 เปอร์เซนต์ และ Glacial acetic acid 10 เปอร์เซนต์) เป็นเวลาอย่างน้อย 2-3 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นเจลมาล้างสีส่วนเกินออก ด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (เมทธานอล 7 เปอร์เซนต์ และ Glacial acetic 5 เปอร์เซนต์) หลายๆครั้ง จนกระทั่งแผ่นเจลใสและเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน ล้างแผ่นเจลอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น ก่อนใช้กระดาษแก้วใสหุ้มแผ่นเจล ไล่ฟองอากาศออก ทิ้งไว้ค้างคืนจนเจลแห้ง