บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การแยกแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์กำมะถันอนินทรีย์

นำตัวอย่างดินจำนวน 0.5 กรัม จากบริเวณทางระบายน้ำเหมืองแม่เมาะ จังหวัดลำปาง และจากบริเวณบ่อน้ำร้อนธรรมชาติแหล่งต่าง ๆ ทางภาคเหนือของประเทศไทย มาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเทลวสูตรพื้นฐาน (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มม. จำนวน 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าแบบรีซิโปรคอลที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อด้วยวิธีการกระจายเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสูตรเดิม (spread plate) บ่มที่อุณหภูมิและภาวะเดิมเป็นเวลา 7 วัน ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการขีดเชื้อ (streak plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตรเดิม บ่มที่อุณหภูมิและภาวะเดิมเป็นเวลา 2-3 วัน เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ.

3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการออกซิไดซ์กำมะถันอนินทรีย์

นำเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ตามข้อ 1 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเทลวสูตรวิเคราะห์ซัลเฟต (ภาคผนวก ก ข้อ 2) จำนวน 5 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดแก้วขนาด 16x150 มม. บนที่อุณหภูมิและภาวะเดิมเช่นเดียวกับข้อ 1 เป็นเวลานาน 7 วัน นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟตที่เกิดขึ้นด้วยวิธีวัดปริมาณตะกอนแบเรียมซัลเฟตที่เกิดขึ้นเมื่อเติมแบเรียมคลอไรด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงไปทำปฏิกิริยากับน้ำเลี้ยงเชื้อ จากค่าความขุ่นที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (Kargi และ Robinson, 1982) ใช้สารละลายโซเดียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ภาคผนวก ข ข้อ 1) เป็นสารมาตรฐานในการสร้างกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลเฟตและค่าความขุ่นของตะกอนแบเรียมซัลเฟตที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เพื่อใช้คำนวณหาความเข้มข้นของซัลเฟตที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทดสอบ

3.3 การสกัดดีเอ็นเอ

3.3.1 การสกัดแยกดีเอ็นเอชนิดปลายปิด (covalently closed circular form) จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยวิธีของ Kido และ Liu(1981)

ถ่ายโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการออกซิไดซ์กำมะถันอนินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร NBYE (ภาคผนวก ก ข้อ 5) จำนวน 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ข้ามคืน นำเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมได้จำนวน 0.47 มล. มาใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาดความจุ 1.5 มล. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ E (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ปริมาตร 0.15 มล. เขย่าให้เซลล์แบคทีเรียกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ เติมสารละลายไลซิง (Lysing solution) (ภาคผนวก ข ข้อ 3) ปริมาตร 0.3 มล. ผสมอย่างเบา ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ. ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำเป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข ข้อ 4) ปริมาตร 0.9 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตดเข้มข้น 3 โมลาร์ จำนวน 1ใน10 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส และเอธานอลสมบูรณ์ที่เย็นปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ. เป็นเวลา 15 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอด้วยสารละลายเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 1 มล. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนตะกอนไปทำให้แห้งในเครื่องอบไล่ความชื้นที่ต่อเชื่อมกับเครื่องปั๊มสูญญากาศ นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ TE ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 (ภาคผนวก ข ข้อ 5) เก็บดีเอ็นเอที่ได้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°ซ. แยกอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการย่อยสลายอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์อาร์เอ็นเอเอส (RNase)ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.3.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นพลาสมิดพาหะ

เลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* XL-1 Blue ที่มีพลาสมิด pBlue script SK บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มล. (ภาคผนวก ข ข้อ 10) โดยการขีดบนผิวหน้าอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมที่เติมยาปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิมจำนวน 5 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มม.บ่มบนเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ. ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจำนวน 1.5 มล. ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข ข้อ 6) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข ข้อ 7) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมอย่างเบา ๆ โดยวิธีเอียงหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

ดูดเอาส่วนน้ำใสมากำจัดโปรตีนออกโดยนำมาผสมกับสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข ข้อ 4) ในอัตราส่วน 1:1 นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำชั้นบนมาตกตะกอนเอาดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ล้างตะกอน ทำให้ตะกอนแห้ง กำจัดอาร์เอ็นเอ และเก็บดีเอ็นเอที่ได้เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.3.1

3.4 การหาขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

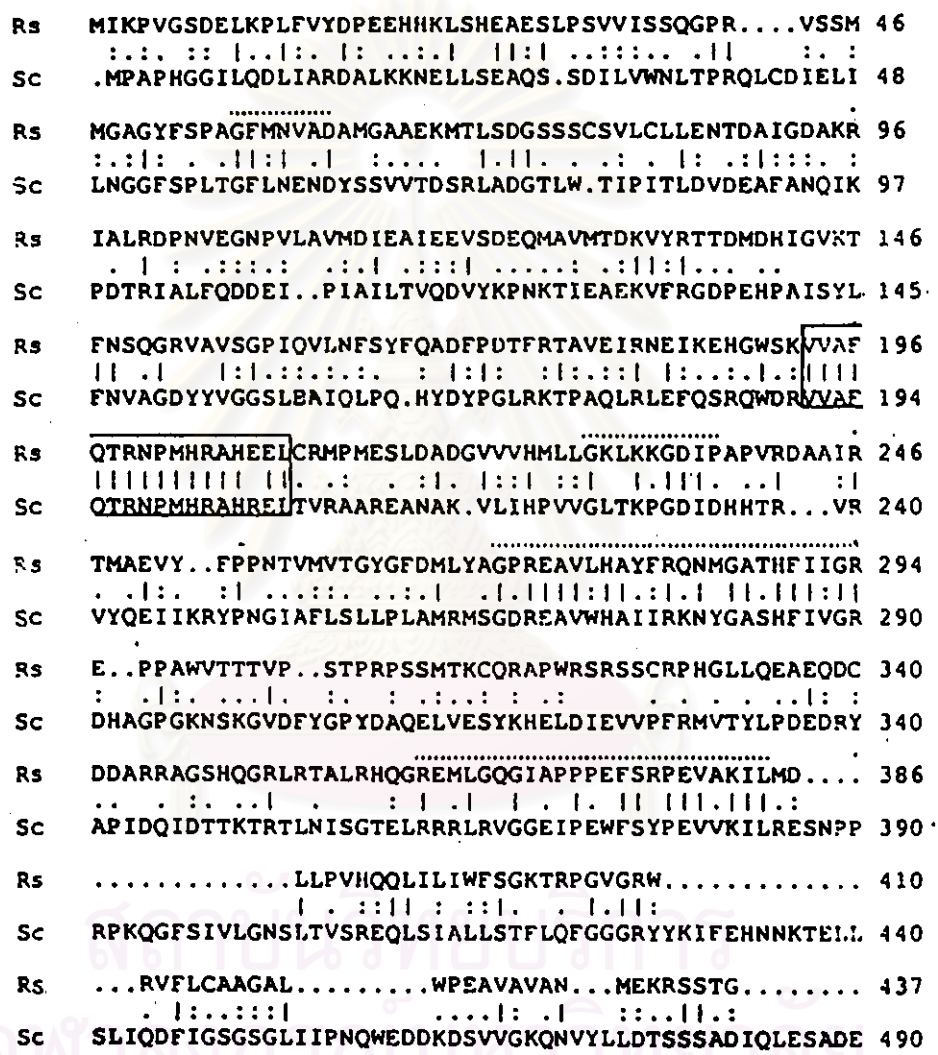
การหาขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลกโตรโฟริซิส เทอะกาโรสเข้มข้น 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์ TE ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 สภาพหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 45°ซ. ลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye) (ภาคผนวก ข ข้อ 13) ในอัตราส่วน 10:1 โดยปริมาตร หยดลงในหลุมซึ่งเกิดจากการดึงหวีออกจากเจลอะกาโรสที่แข็งตัวแล้ว หลุมละประมาณ 15 ไมโครลิตร ใช้แลมบ์ดาดีเอ็นเอซึ่งย่อยด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Hind* III เป็นชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบขนาด นำไปทำอิเลคโตรโฟริซิสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) ซึ่งบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 (ภาคผนวก ข ข้อ 9) โดยใช้ความต่างศักย์ 10 โวลต์/ซม. ของเจล จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาเกือบสุดขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์โดยแช่แผ่นเจลอะกาโรสที่ได้ ในสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัม/มล. ของสารละลายบัฟเฟอร์ TE ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 เป็นเวลา 15-30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร หาขนาดและความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบขนาดและความเข้มในการเรืองแสงที่ปรากฏกับของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน บันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายภาพด้วยฟิล์มขาวดำความไวแสง 400 ผ่านแผ่นกรองแสงสีแดง (red filter)

3.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA amplification)

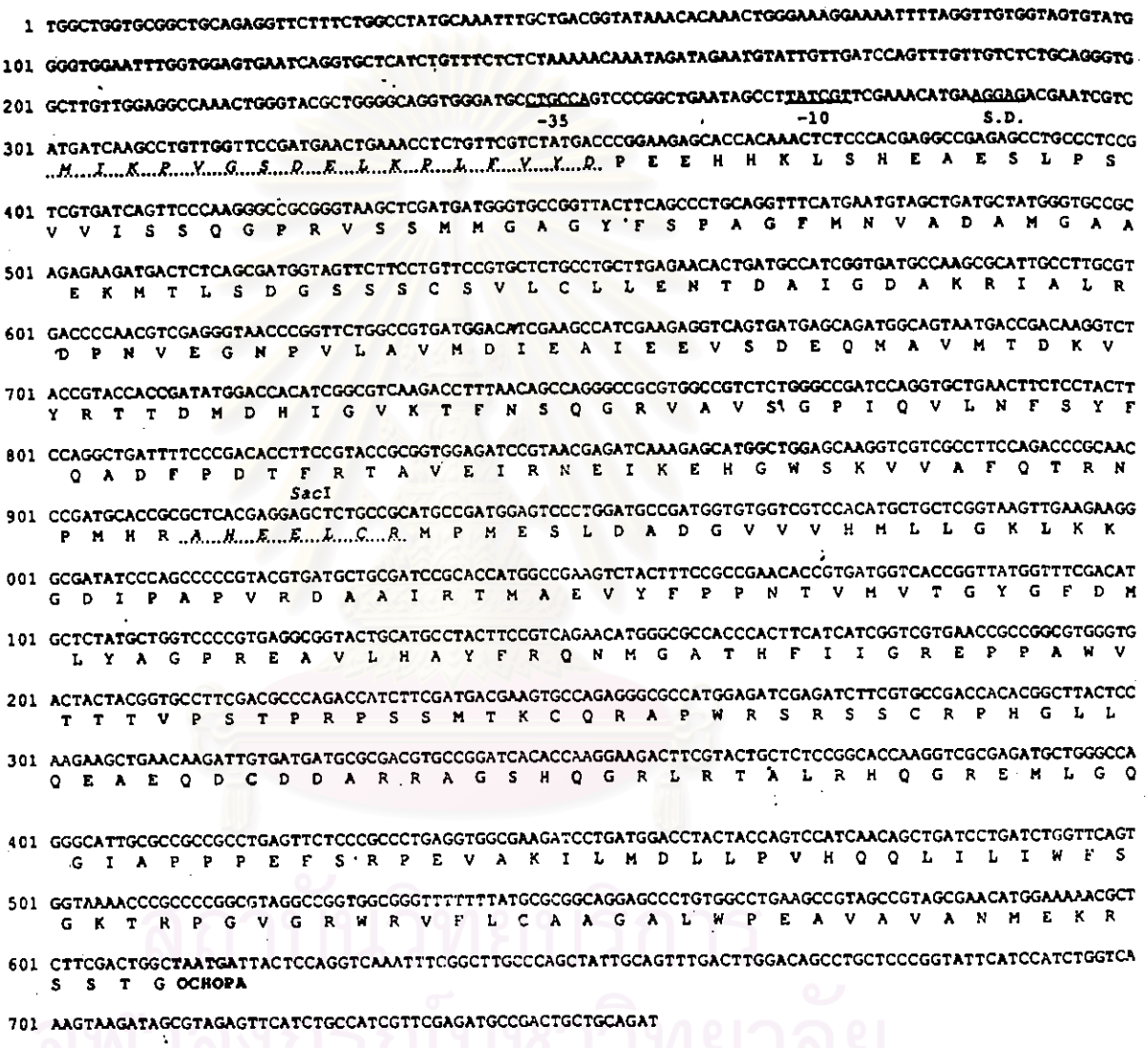
3.5.1 การออกแบบและการสังเคราะห์สายโอลิโกนิวคลีไทด์ตั้งต้น 2 สาย

ออกแบบสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้เป็นสายตั้งต้นในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ข้อมูลจากลำดับเบสบริเวณที่กรดอะมิโนบนสายพอลิเปปไทด์ของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลส ของแบคทีเรียที่อาศัยแบบภาวะที่ต้องพึ่งพาในทางเดินอาหารของ *R. pachyptila* และของ *S.cerevisiae* มีความคล้ายคลึงกันสูงมาก (Laue และ Nelson, 1994) ดังแสดงในรูปที่ 1 แล้วทำการสังเคราะห์สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น 2 สายจากบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 193 ถึง 209 และที่ตำแหน่ง 285 ถึง

294 แปลลำดับกรดอะมิโนกลับไปเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *sopT* ของแบคทีเรียที่อาศัยแบบภาวะที่ต้องพึ่งพาในทางเดินอาหารของ *R. pachyptila* (Laue และ Nelson, 1994) ดังแสดงในรูปที่ 2 และความชอบในการเลือกใช้รหัส (codon bias) ของแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถออกซิไดซ์กำมะถันอนินทรีย์



รูปที่ 1 แสดงลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์เอทีพีซัลฟูริเลสของแบคทีเรียที่อาศัยแบบภาวะที่ต้องพึ่งพาอยู่กับ *Riftia pachyptila* จากยีน *sopT* (Rs) และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งถอดรหัสมาจากยีน *MET 3* (Sc) บริเวณกรอบสี่เหลี่ยมเป็นบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันสูง



รูปที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *sopT* และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลส ของแบคทีเรียที่อาศัยแบบภาวะที่ต้องพึ่งพาในทางเดินอาหารของ *R. pachyptila*

3.5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอซึ่งเตรียมตามวิธีข้อ 3.3.1 ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ตามข้อ 3.2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ใช้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นตามข้อ 3.5.1 เป็นสารดีเอ็นเอตั้งต้น ใช้ชุดสำเร็จรูป Genetamp PCR Regent (Perkin Elmer, CT, USA) และเครื่องสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (DNA Thermal cycler, Perkin Elmer, C.T, USA) ส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบจำนวน 50 นาโนกรัม สายดีเอ็นเอตั้งต้นสายละ 0.5 โมลาร์ นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP เอนไซม์ *Tag* DNA polymerase สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR น้ำกลั่นปลอดเชื้อสำหรับปรับปริมาตรสุดท้ายตามที่กำหนด ปริมาณนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด ปริมาณหน่วยของเอนไซม์และความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด นำหลอดไมโครฟิวจ์ซึ่งบรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยาที่เตรียมได้ใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ กำหนดอุณหภูมิและเวลาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 3 ระดับหมุนเวียนของแต่ละรอบเป็นดังนี้ ดีเอ็นเอแม่แบบแยกออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denature) ที่อุณหภูมิ 95°ซ. เป็นเวลา 1 นาที ดีเอ็นเอตั้งต้นจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 55°ซ. เป็นเวลา 1 นาที เอนไซม์ *Tag* DNA polymerase สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการนำนิวคลีโอไทด์มาต่อที่ปลายของดีเอ็นเอตั้งต้น (extension) ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 1.5 นาที ทำหมุนเวียนเป็นวงจรซ้ำ 30 รอบ โดยรอบแรกของปฏิกิริยาเพิ่มระยะเวลาการทำให้ดีเอ็นเอแม่แบบแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็น 5 นาที และรอบสุดท้ายของปฏิกิริยาเพิ่มระยะเวลาให้เอนไซม์ *Tag* DNA polymerase สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่เป็น 7 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่หลอดไมโครฟิวจ์ซึ่งบรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยาไว้ที่ 4°ซ. วิเคราะห์ผลผลิต (PCR product) ที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส

3.6 การหาลำดับเบสโดยวิธี Thermal cycle sequencing

เชื่อมดีเอ็นเอซึ่งได้จากกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ต้องการทราบลำดับเบสเข้ากับพลาสมิดพาหะ pCR™ II (ภาคผนวก ค รูปที่ 17) ด้วยชุด TA cloning (Invitrogen Co., CA. USA) โดยอาศัยหลักการที่ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยการใช้เอนไซม์ *Taq* polymerase นั้น จะมีนิวคลีโอไทด์ที่มีเบส A ยื่นเลยออกมาทางด้านปลาย 3′ และในชุด TA cloning พลาสมิดพาหะ pCR™ II ที่ให้มานั้นจะมีลักษณะเป็นเส้นตรง มีนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสชนิด T ยื่นเลยออกมาทางด้านปลาย 3′ จึงสามารถเชื่อมต่อกันได้ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (ภาคผนวกที่ ค รูปที่ 18) อัตราส่วนของพลาสมิดพาหะ pCR™ II : ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทราบลำดับเบสที่ใช้เท่ากับ 1:3 ส่วนผสมของปฏิกิริยา (ligation reaction) ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พลาสมิดพาหะ ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทราบ

ลำดับเบส เอนไซม์ T4 DNA ligase ใช้ในปริมาณตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มที่อุณหภูมิ 14-15 ^{0}ซข้ามคืน ทรานฟอร์มเข้าสู่คอมพลีแทนท์เซลล์ *E.coli* ของชุด TA cloning ตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด กล่าวคือ เติม β-mercaptoethanol เข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 2 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครฟิวซ์ที่มีเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* ของ TA cloning จำนวน 50 ไมโครลิตรที่หลอมเหลวและแช่อยู่ในน้ำผสมน้ำแข็งผสมให้เข้ากัน ผสมเซลล์เจ้าบ้านข้างต้นจำนวน 10 ไมโครลิตร กับของผสมของปฏิกิริยาการสร้างพลาสมิดลูกผสม (ligation reaction) จำนวน 10 ไมโครลิตร แช่ในน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ย้ายมาบ่มที่อุณหภูมิ 42 ^{0} ซ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร SOC จำนวน 450 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แช่ในน้ำผสมน้ำแข็ง กระจายเซลล์จำนวน 25 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม. และทาผิวหน้าด้วยสารละลาย X-gal เข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 25 ไมโครลิตร ทรานฟอร์แมนท์ที่ต้องการคือโคโลนีสีขาว สกัดพลาสมิดจากโคโลนีสีขาวตามวิธีในข้อ 3.3.2 แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Eco*RI ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พลาสมิดที่สกัดได้จากโคโลนีสีขาว เอนไซม์เรสตริกชัน *Eco*RI ปริมาณที่ใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตเอนไซม์เรสตริกชัน กำหนด และกำจัด RNA ด้วยเอนไซม์ RNAase ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัม/20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วิเคราะห์หาชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิสตามวิธีในข้อ 3.4

สกัดพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทราบลำดับเบสตามวิธีในข้อ 3.3.2 โดยเริ่มต้นจากเชื้อจำนวน 1.5 มิลลิลิตร ละลายพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ TE จำนวน 50 ไมโครลิตร เติม RNAase เข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE จำนวน 450 ไมโครลิตร เติมสารละลาย polyethylene glycol 4,000 เข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 โมลาร์ จำนวน 6 เท่าของปริมาตร หรือประมาณ 300 ไมโครลิตร แช่ในน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 60 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 ^{0} ซ ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายเอทธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ทำให้ตะกอนแห้งในเครื่องอบไล่ความชื้นที่ต่อเชื่อมกับเครื่องปั๊มสูญญากาศ ละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 10 ไมโครลิตร วิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอสายคู่ที่ได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

นำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยชุด DyeDeoxy™ terminator cycle sequencing kit (Perkin Elemer, USA) ใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นชนิด M13 ซึ่งมีบริเวณแกะอยู่บนพลาสมิดพาหะ pCR™ II ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ ดีเอ็นเอตั้งต้น สารละลาย Terminator premix ปริมาณที่ใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมกำหนดภาวะในแต่ละรอบของปฏิกิริยาเป็นดังนี้ ดีเอ็นเอสองสายแยกจากกันที่อุณหภูมิ 96 ^{0}ซ

เป็นเวลา 30 วินาที ดีเอ็นเอตั้งต้นเกาะดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 50 ^{0}ซ เป็นเวลา 15 วินาที สังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อจากสายดีเอ็นเอตั้งต้นที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 25 รอบ หยุดปฏิกิริยาแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ เพื่อนำไปกำจัด DyeDeoxy terminator ที่มากเกินพอออกไป

วิธีการกำจัด DyeDeoxy terminator ที่มากเกินพอออกทำโดยเอาส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมข้างต้นจำนวน 20 ไมโครลิตรมาเติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย phenol:chloroform 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที นำส่วนน้ำชั้นบนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลาย phenol:chloroform ถ่ายส่วนน้ำชั้นบนใสในหลอดไมโครฟิวซ์ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ และเอทธานอลสัมบูรณ์ ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) เทส่วนน้ำทิ้ง ทำตะกอนให้แห้งในเครื่องอบไล่ความชื้นที่ต่อเชื่อมกับเครื่องปั๊มสูญญากาศ เติมสารละลาย loading sample 3 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 28) บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 90 ^{0}ซ เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งทันที

ประกบแผ่นกระจกสำหรับการทำอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิส 2 แผ่นเข้าด้วยกัน โดยมีแผ่น spacer วางอยู่ด้านข้างทั้ง 2 ด้าน หันเอากระจกด้านที่จะถูกสแกนด้วยแสงเลเซอร์ออกด้านนอก ติดเทปที่บริเวณด้านข้างทั้ง 2 ด้าน และด้านล่าง เพื่อกันไม่ให้สารละลายอะคริลาไมด์ไหลออกมาภายนอก ใช้เข็มฉีดยาขนาด 50 มิลลิลิตรที่มีสารละลายอะคริลาไมด์เข้มข้น 6 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข ข้อ 25)บรรจุอยู่ กรอกสารละลายอะคริลาไมด์ลงไปในช่องระหว่างแผ่นกระจกทั้งสอง ระดับของสารละลายอะคริลาไมด์ให้อยู่ที่ 5 เซนติเมตรต่ำจากขอบเว้าของกระจกแผ่นบน เสียบหวีขอบเรียบ (single wall comb) ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัว เมื่อเจลอะคริลาไมด์แข็งตัวแล้ว แกะแผ่นเทปทั้งสามด้านออก เอาหวีขอบเรียบออก ทำความสะอาดกระจกด้านนอกด้วยเอทธานอลสัมบูรณ์ ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำไปวางบนแท่นแล้วตรึงให้อยู่กับที่ที่เครื่องสำหรับหาลำดับเบส ABI DNA sequencing เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ที่อ่างด้านล่างและอ่างด้านบน ประกบแผ่นกันความร้อน กำจัดฟองอากาศที่ขอบเจลในอ่างสารละลายบัฟเฟอร์ด้านล่าง เสียบหวีฟันปลาที่ขอบเจลด้านบน หยอดตัวอย่างที่ต้องการหาลำดับเบสลงในช่องฟันปลา ต่อขั้วอิเลคโทรดทั้งสองข้าง ทำอิเลคโทรโฟริซิสที่ 2500 โวลต์ 40 มิลลิแอมแปร์ 30 วัตต์ 40 ^{0}ซ วิเคราะห์ผลด้วยคอมพิวเตอร์

3.7 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโดยการตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน

นำดีเอ็นเอที่ต้องการตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์เรสตริกชันชนิดนั้นๆ ที่ความเข้มข้นตามที่บริษัทผู้ผลิตเอนไซม์เรสตริกชันกำหนด เติมเอนไซม์เรสตริกชัน 3-5 หน่วยต่อดีเอ็นเอที่ต้องการตัด 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ตามที่กำหนดด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิตามที่บริษัทผู้ผลิตเอนไซม์เรสตริกชันกำหนดเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสแยกเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโดยการใช้ชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ (Prep-A-Gene)

3.7.1 การคัดเลือกหาชนิดของเอนไซม์เรสตริกชันที่เหมาะสมในการย่อยสลายโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้อย่างสมบูรณ์

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ตามข้อ 3.2 มาย่อยด้วยเอนไซม์เรสตริกชันชนิดต่าง ๆ คือ *EcoRI Pst* I และ *Bam* HI ที่ภาวะดังกล่าวข้างต้น ตรวจสอบผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ทำ Southern hybridization โดยการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นอะกาโรส สู่แผ่นเมมเบรนไนลอน (Neutral nylon membrane) ด้วยวิธี capillary tranfer ตรึงดีเอ็นเอลงบนแผ่นเมมเบรนไนลอนด้วยการอบที่ 80°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมงจากนั้นนำแผ่นเมมเบรนไนลอนที่มีดีเอ็นเอติดอยู่มาทำไฮบริไดซ์เซชันโดยใช้ดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.2 เป็นดีเอ็นเอติดตาม ใช้ชุดติดฉลากและตรวจสอบผล Rad-free kit (S & S) ชนิดของเอนไซม์เรสตริกชั่นที่เหมาะสมในการย่อยสลายโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สำหรับการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอเพื่อการสร้างชนาคารยีน โดยการย่อยสลายแบบสมบูรณ์นั้นผลการทำ Southern hybridization จะได้ดีเอ็นเอเพียง 1 แถบเท่านั้น

3.7.2 การเตรียมชิ้นโครโมโซมอลดีเอ็นเอเพื่อการสร้างชนาคารยีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ นำโคโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ตามข้อ 3.2 มาย่อยด้วยเอนไซม์เรสตริกชันชนิดที่ได้ตามข้อ 3.7.1 ที่ภาวะดังกล่าวข้างต้น ตรวจสอบผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส แยกเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ Prep-A-Gene

3.7.3 การเตรียมพลาสมิดพาหะ

นำพลาสมิด pBlue script SK มาย่อยด้วยเอนไซม์เรสตริชั่นชนิดเดียวกับที่เลือกใช้ในการตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอตามข้อ 3.7.1 ทำการย่อยแบบสมบูรณ์ที่ภาวะดังกล่าวข้างต้น ซึ่งจะทำให้ปลาย

ของชิ้นโครโมโซมอลดีเอ็นเอ สามารถเชื่อมต่อกับปลายของพลาสมิดพาหะ ตรวจสอบผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟริซิส จากนั้นนำมากำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ด้วยเอนไซม์ calf intestine alkaline phosphatase (CIP) ใช้ความเข้มข้น ส่วนผสมของปฏิกิริยาและภาวะการบ่มตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด แยกเอาชิ้นพลาสมิดพาหะที่ต้องการโดยใช้ชุดแยกดีเอ็นเอ

3.8 การแยกเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอชนิด Prep-A-Gene

นำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชั่นมาแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างกันออกจากกัน ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟริซิส ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ด้วยระยะเวลาอันรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้ดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากผลของแสงอัลตราไวโอเลต ตัดแผ่นเจลอะกาโรสบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการเพื่อแยกเอาชิ้นเจลอะกาโรสเฉพาะบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาแล้วนำมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดชิ้นละ 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 9,000 รอบ/นาที ให้เจลทั้งหมดมารวมกันอยู่ที่บริเวณก้นหลอด เพื่อหาปริมาตรโดยประมาณของเจลอะกาโรส เติมสารละลายบัฟเฟอร์บายดิง (binding buffer) ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรเจล บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 37-55°ซ. เป็นเวลา 2-3 นาที จนกระทั่งเจลอะกาโรสหลอมอย่างสมบูรณ์เติม Prep-A-Gene matrix ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ต่อปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที นำตะกอน Prep-A-Gene matrix ที่มีดีเอ็นเอเกาะอยู่มาล้างโดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์วอช (wash buffer) ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำตะกอน Prep-A-Gene matrix ที่มีดีเอ็นเอเกาะอยู่มาแยกเอาดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์อีลูชชัน (elution buffer) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อ Prep-A-gene matrix 5 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ปั่นแยกเอาตะกอน Prep-A-Gene matrix ออกจากดีเอ็นเอที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดแยกเอาส่วนน้ำใสชั้นบนที่มีดีเอ็นเอแขวนลอยอยู่ออกมาโดยระวังมิให้ Prep-A-Gene matrix ปนเปื้อนมาด้วยโดยสมบูรณ์ ซึ่งอาจทำโดยนำส่วนน้ำใสนี้มาปั่นเหวี่ยงซ้ำที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เพื่อตกตะกอน Prep-A-Gene matrix ที่อาจปนเปื้อนมาออกไปใส่ส่วนน้ำใสที่ปราศจาก Prep-A-Gene matrix ในหลอดไมโครฟิวจ์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ.เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.9 การกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายด้าน 5′ โดยเอนไซม์ Calf intestine alkaline phosphatase (CIP)

ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.7.2 เอนไซม์ CIP 0.01 หน่วยเอนไซม์ต่อปริมาณดีเอ็นเอ 1 พิโคโมล และสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ CIP ความเข้มข้นสุดท้ายตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มส่วนผสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 30 นาที แยกเอาดีเอ็นเอที่กำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้วด้วยชุดแยกยีน Prep-A-Gene อาจทำซ้ำได้อีกหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดหมู่ฟอสเฟต

3.10 การสร้างขนาดารยีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2

3.10.1 การสร้างดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant DNA)

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ GO2 ที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อ 3.7.1 และพลาสมิดพาหะ pBlue script SK ที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อ 3.7.2 ที่วัดด้วยเอนไซม์เรสตริกชัน *Eco*RI ในอัตราส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอ : พลาสมิดพาหะเท่ากับ 3:1 มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ในส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใช้ปริมาณเอนไซม์และความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มที่อุณหภูมิ 5-12°ซ. เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.10.2 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

3.10.2.1 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนซ์ (Competent cell)

เลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* JM109 บนอาหารแข็งสูตร LB ที่อุณหภูมิ 30°ซ. ข้ามคืน เขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร SOB (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ปริมาตร 20 มล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 100 มล. เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบรีซิโปรคอลซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 30°ซ. ความเร็ว 200 รอบ/นาที ข้ามคืนเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร SOB ปริมาตร 100 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. จำนวน 0.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบรีซิโปรคอลซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 30°ซ. ความเร็ว 200 รอบ/นาที จนกระทั่งค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรมีค่าระหว่าง 0.4 - 0.6 จากนั้นแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ที่ได้มากระจายในสารละลาย RFI (ภาคผนวก ข ข้อ 10) ปริมาตร 10 มล. อุณหภูมิ 4°ซ. โดยแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที กระจายเซลล์ที่ได้ในสารละลาย RF II (ภาคผนวก ข ข้อ 11) ปริมาตร 3 มล. ที่อุณหภูมิ 4°ซ.โดยแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที

แผนกวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบ่งสารแขวนลอยเซลล์คอมพลีเทนซ์ที่ได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ. หลอดละ 150 ไมโครลิตร เก็บเซลล์คอมพลีเทนซ์ที่ได้ที่อุณหภูมิ -70°ซ. ทันที

3.10.2.2 วิธีการทำทรานสฟอร์ม (Transformation)

เติมพลาสมิดลูกผสมจำนวน 100 นาโนกรัมในปริมาตรไม่เกิน 5 ไมโครลิตร ลงในสารแขวนลอยเซลล์คอมพลีแทนซ์จำนวน 150 ไมโครลิตรที่เตรียมได้จากข้อ 3.10.2.1 ผสมอย่างเบา ๆ ให้เข้ากัน แช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40°ซ. ทันที เป็นเวลา 90 วินาที นำกลับมาแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที เติมสารอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ผสมอย่างเบา ๆ ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 30 นาที เกลี่ยสารแขวนลอยเซลล์จำนวน 100 ไมโครลิตรบนผิวหน้าอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อขณะหลอมเหลว บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลาไม่เกิน 20 ชม. คัดเลือกหาเซลล์ทรานฟอร์แมนท์

3.11 วิธีการทำ Nucleic acid hybridization

การวิจัยนี้ตรวจหายีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลสโดยเทคนิคSouthern hybridization และตรวจหาโคโลนีที่มียีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เอทีพีซัลฟูรีเลส จากธนาคารยีนที่สร้างขึ้นตามวิธีในข้อ 3.10 โดยเทคนิค Colony hybridization และ dot-blot hybridization ใช้ดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.2 มาทำการติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี โดยใช้ชุดติดฉลากและตรวจสอบ Rad-free kit

3.11.1 วิธีการติดฉลากดีเอ็นเอด้วยสารปลอดรังสี

หลักการของวิธีการติดฉลากดีเอ็นเอด้วยสารปลอดรังสีโดยชุด Rad-free kit คือการใช้ Psoralen biotin ซึ่งเป็นสารประกอบที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 320-400 นาโนเมตรแล้ว จะสร้างพันธะโควาเลนท์กับเบสไทมิดีน (thymidine) แบบสุ่มวิธีการทำโดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการติดฉลากมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ TE ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มล. ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในอ่างที่ผสมน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 1 นาที เติม psoralen biotin 1.1 ไมโครลิตร ต่อดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง ย้ายส่วนผสมที่ได้มาใส่ลงในไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate) ที่แช่อยู่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร ฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร โดยให้แหล่งกำเนิดแสงอยู่ห่างจากสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการติดฉลากเป็นระยะทาง 2 ซม. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บสารละลายดีเอ็นเอจากหลุมไมโครไตเตอร์เพลทใส่ลงในหลอดไมโครฟิวส์ เติมแซททูเรทเต็ดบิวทานอล (αH_2O-Saturated n-butanol) ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตร

สารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 7,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดสารละลายบิวทานอลที่อยู่ชั้นบนทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง พยายามดูดบิวทานอลที่อยู่ชั้นบนออกให้หมด เก็บดีเอ็นเอที่ได้ทำการตกตะกอนแล้วนี้ที่อุณหภูมิ 4°ซ. การเก็บที่อุณหภูมิ -18°ซ. จะช่วยทำให้สามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานาน 6 เดือนถึง 1 ปี

3.11.2 วิธีการทำ Southern-blot

นำดีเอ็นเอที่ต้องการทำ Southern-blot hybridization มาทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส หลังการดูผลด้วยการย้อมสีเจลด้วยเอทิลเดียมโปรไมด์ และดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ด้วยเวลาอันรวดเร็วและบันทึกผลด้วยการถ่ายภาพแล้วนำเจลมาแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 10 นาที ล้างเจลโดยการแช่เจลในน้ำกลั่น เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที แช่เจลในสารละลาย denature/transter (ภาคผนวก ช ข้อ 21) เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้งโดยแช่เจลในสารละลาย denature/transter สารละลายใหม่และเขย่าเบา ๆ ต่ออีกเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอในเจลไปยังแผ่นเมมเบรนไนลอนชนิดไม่มีประจุ (Neutral nylon membrane) โดยวิธี capillary transter วิธีการทำโดยการวางกระดาษกรอง Whatman 3 MM บนกระจกโดยให้ปลายทั้งสองของกระดาษแช่อยู่ในภาชนะที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ denature/transter วางแผนเจลโดยให้ช่องที่เติมสารละลายดีเอ็นเอลงไปนั้นอยู่ด้านล่าง วางแผ่นเมมเบรนไนลอนขนาดเท่าแผ่นเจลที่แช่ในสารละลาย denature/transter ไว้เป็นเวลา 5 นาที ลงบนแผ่นเจล โดยไม่ให้มีฟองอากาศแทรกอยู่ระหว่างเจลและแผ่นเมมเบรนไนลอน วางแผ่นกระดาษกรอง Whatman 3 MM ขนาดเท่าแผ่นเจล 10 แผ่น บนแผ่นเมมเบรนไนลอนโดย 4 แผ่นแรกเป็นแผ่นกระดาษกรองที่แช่ในสารละลาย denature/transter ไว้เป็นเวลา 5 นาที วางแผ่นกระดาษซับน้ำขนาดเท่าแผ่นเจลทับกันหลาย ๆ แผ่นจนมีความหนาประมาณ 7-8 ซม. กดทับแผ่นกระดาษซับน้ำด้วยแผ่นเหล็กหนักประมาณ 1 กิโลกรัม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8-24 ชม. นำแผ่นเมมเบรนไนลอนมาแช่ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Cl pH 7.2 ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 โมลาร์ และสารละลาย NaCl ความเข้มข้นสุดท้าย 1 โมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที วางแผ่นเมมเบรนไนลอนบนแผ่นกระดาษกรอง Whatman 3MM ที่อุณหภูมิห้องจนแผ่นเมมเบรนไนลอนแห้ง แล้วจึงนำไปทำการตรึงดีเอ็นเอต่อไป ตรวจสอบประสิทธิภาพการย้ายดีเอ็นเอไปยังแผ่นเมมเบรนไนลอน โดยการย้อมสีเจลในสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ แล้วตรวจดูความเข้มของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.11.3 วิธีการทำ Colony

ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วย้ายโคโลนีเดี่ยวของทรานสฟอร์แมนท์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.10.2.2 โดยวิธีการลากเส้นสั้น ๆ ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและบนแผ่นเมมเบรนไนลอนที่วางอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ใช้คือสูตร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มล. อาหารเลี้ยงเชื้อ จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตรจะสามารถขีดเชื้อตามวิธีข้างต้นได้ ประมาณ 100 โคโลนี บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. ข้ามคืน ใช้คีมปลายแบน คีบแผ่นเมมเบรนไนลอนขึ้นจากจานเลี้ยงเชื้อวางลงบนแผ่นกระดาษกรอง Whatman 3MM ที่ชุ่มด้วยสารละลาย lysis/denature (ภาคผนวก ข ข้อ 21) ปล่อยให้สารละลาย lysis/denature ค่อย ๆ ซึมขึ้นมายังแผ่นเมมเบรนไนลอนเป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและเพื่อทำให้ดีเอ็นเอที่ถูกปล่อยออกมาอยู่ในสภาพเป็นเส้นเดียว ย้ายแผ่นเมมเบรนไนลอนไปวางบนกระดาษกรอง Whatman 3MM ที่แห้งเพื่อกำจัดสารละลาย lysis/denature ที่มากเกินไปออก แล้วย้ายแผ่นเมมเบรนไนลอนมาวางบนกระดาษกรอง Whatman 3 MM ที่ชุ่มด้วยสารละลาย neutralization (ภาคผนวก ข ข้อ 22) เป็นเวลา 5 นาที ย้ายแผ่นเมมเบรนไนลอนไปวางบนกระดาษกรอง Whatman 3MM ที่ชุ่มด้วยสารละลาย fixation/salt reduction (ภาคผนวก ข ข้อ 23) เป็นเวลา 5 นาที ย้ายแผ่นเมมเบรนไนลอนมาวางบนกระดาษกรอง Whatman 3MM ที่แห้ง ประกบด้วยแผ่นกระดาษกรองชนิดเดิมที่แห้งแล้ว วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแผ่นเมมเบรนไนลอนแห้งสนิท นำไปทำการตรึงดีเอ็นเอ นำแผ่นเมมเบรนไนลอนที่ตรึงดีเอ็นเอแล้วมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS ล้างเซลล์แบคทีเรียที่ติดอยู่บนแผ่นเมมเบรนไนลอนออกให้หมดโดยการเช็ดด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ ย้ายแผ่นเมมเบรนไนลอนมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS ที่เติม proteinase K ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 1 ชม. ล้างแผ่นเมมเบรนไนลอนด้วยการแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS ปริมาณมากเกินพอ เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนไนลอนไปทำไฮบริไดเซชัน หรือทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องโดยวางไว้บนกระดาษกรอง Whatman 3MM เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. เพื่อนำไปทำไฮบริไดเซชันต่อไป

3.11.4 วิธีการทำ Dot-blot

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมาทำให้ดีเอ็นเออยู่ในสภาพสายเดี่ยวโดยการเติมสารละลาย denature/transfer ปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วหยดสารละลายดีเอ็นเอลงบนแผ่นเมมเบรนไนลอน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้งสนิท แล้วนำไปทำการตรึงดีเอ็นเอต่อไป

3.11.5 การตรึงดีเอ็นเอไว้บนแผ่นเมมเบรนไนลอน

นำแผ่นเมมเบรนไนลอนแห้งที่มีดีเอ็นเอเกาะอยู่ มาทำการตรึงดีเอ็นเอโดยวางแผ่นเมมเบรนไนลอนไว้ระหว่างกระดาษกรอง Whatman 3MM 2 แผ่น ห่อทับด้วยกระดาษอลูมิเนียม อบที่อุณหภูมิ 80°ซ. เป็นเวลา 2 ชม. นำไปทำไฮบริไดเซชันในขั้นตอนต่อไป

3.11.6 วิธีการทำไฮบริไดเซชัน (Hybridization)

แช่แผ่นเมมเบรนไนลอนในสารละลาย 5XSSC (ภาคผนวก ช ข้อ 15) กำจัดสารละลาย 5 XSSC ที่มากเกินพอออก โดยการวางแผ่นเมมเบรนไนลอนบนกระดาษกรอง Whatman 3MM แช่แผ่นเมมเบรนไนลอนในสารละลาย prehybridization (ภาคผนวก ช ข้อ 16) ปริมาตร 10 มล. ต่อพื้นที่แผ่นเมมเบรนไนลอน 100 ตร.ซม. ซึ่งบรรจุอยู่ในถุงสำหรับทำไฮบริไดเซชัน ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิดปากถุงโดยเครื่องปิดปากถุงด้วยความร้อน บ่มที่อุณหภูมิ 42°ซ. บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลากแล้วมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แช่ในน้ำผสมน้ำแข็งทันที ผสมลงในสารละลาย hybridization ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอติดตาม 65 นาโนกรัม/มล. กรองผ่านกระดาษกรองชนิด cellulose acetate ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน ที่มี glass fiber prefilter วางซ้อนอยู่ด้านบน ใส่ลงในถุงสำหรับทำไฮบริไดเซชันในปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลาย prehybridization เดิมที่ใช้ผสมอยู่ ย้ายแผ่นเมมเบรนไนลอนมาใส่ลงในถุงสำหรับทำไฮบริไดเซชันซึ่งมีสารละลาย hybridization ที่มีดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลากแล้ว ปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดปากถุงด้วยไฟฟ้าโดยไม่ให้มีฟองอากาศอยู่ภายในบ่มที่อุณหภูมิและภาวะเดิม เป็นเวลา 16 ชม. นำไปทำการตรวจสอบสัญญาณการเกิดไฮบริดด้วยวิธีออโตเรดิโอกราฟฟีต่อไป

3.11.7 วิธีการตรวจสอบสัญญาณการเกิดไฮบริดด้วยวิธีออโตเรดิโอกราฟฟี

เนื่องจากเบสไทมิดีนบนสายดีเอ็นเอติดตามที่ใช้ถูกติดฉลาก คือมีสารประกอบ psoralen biotin เกาะอยู่ หลักการของวิธีการตรวจสอบสัญญาณการเกิดไฮบริดนี้คือการใช้ streptavidin ที่มีเอนไซม์ alkaline phosphatase คอนจูเกตอยู่มาเกาะแบบจำเพาะกับ biotin ของสารประกอบ psoralen biotin หลังจากนั้นตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นคือ 1,2-dioxetane ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีสมบัติเป็นสารเรืองแสง จึงสามารถตรวจหาสัญญาณได้โดยวิธีออโตเรดิโอกราฟฟี

3.12 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ G02 ทางอนุกรมวิธาน

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ G02 มาจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานในระดับจีนัส (genus) โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics) และการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical Characteristics) (Cowan, 1974)

3.12.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ G02 โดยวิธี streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient agar; ภาคผนวก ก ข้อ 6) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเดี่ยวที่ได้ นำโคโลนีเดี่ยวมาศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยวิธีการย้อมสีกรัม และวิธีการย้อมสีสปอร์

3.12.2 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ G02 ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังต่อไปนี้ อาหารแข็งนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 6), อาหารเหลวโอ-เอฟ เบซัล (OF Basal medium; ภาคผนวก ก ข้อ 7), อาหารเหลวฟีนอล เรด เบส (Phenol red broth base; ภาคผนวก ก ข้อ 8)

ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีดังต่อไปนี้ กิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (catalase test) กิจกรรมของเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test) ปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสของเซลล์เกิดขึ้นโดยกระบวนการออกซิเดชันหรือกระบวนการเฟอร์เมนเตชัน (OF test) ปฏิกิริยาการเจริญในอาหารเหลวฟีนอล เรด เบส ว่าผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้มีความเป็นกรดหรือมีความเป็นด่าง (Phenol red test)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย