บทที่ 3

วิธีทดลอง

3.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *Thiobacillus ferrooxidans*

3.1.1 การศึกษาสมบัติบางประการของลิกไนท์

ศึกษาสมบัติบางประการของลิกไนท์บดละเอียดจากขั้นตอนก่อนการนำส่งเข้าสู่เตาเผาของโรงไฟฟ้าแม่เมาะ (การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย อำเภอแม่เมาะ จังหวัดลำปาง) โดยวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง วิเคราะห์ปริมาณกำมะถันไพไรต์ กำมะถันซัลเฟต และกำมะถันอินทรีย์ที่ปนเปื้อน โดยฝ่ายวางแผนและบริหารเหมืองแม่เมาะ(ฝบม.) การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย เหมืองแม่เมาะ อ.แม่เมาะ จ.ลำปาง

3.1.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ระหว่าง *Thiobacillus ferrooxidans* Y4-3 และ *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC19859

นำโคโลนีเดี่ยวของ *T. ferrooxidans* Y4-3 หรือ *T. ferrooxidans* ATCC19859 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร TSM (ภาคผนวก ก ข้อ 1) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 วัน มาปลูกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K (ภาคผนวก ก ข้อ 2) 50 มล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อ *T. ferrooxidans* Y4-3 หรือ *T. ferrooxidans* ATCC19859 ปริมาตร 10% (มล./100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K 50 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่ภาวะเดิมต่ออีกเป็นเวลา 10 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น ถ่ายเชื้อเริ่มต้นที่ได้ 1% (มล./100มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว) ลงใน 10% (กรัม/100 มล.) ของผงลิกไนท์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟต 30 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 วัน การทดลองชุดควบคุมใช้ผงลิกไนท์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ที่ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟต ไม่ปลูกเชื้อ แต่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ปริมาตร 1% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว)

กรองผงลิกไนท์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2 ครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยแต่ละครั้งใช้กระดาษกรอง 2 ชั้น จนน้ำที่กรองได้ใส นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาปริมาณกำมะถัน

ซัลเฟตโดยวิธีตกตะกอนกำมะถันซัลเฟตด้วยแบเรียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ข ข้อ 1) หาประสิทธิภาพของการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์จากปริมาณกำมะถันซัลเฟตที่เกิดขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากกำมะถันไพไรต์ที่ปนเปื้อนอยู่ในลิกไนท์ถูกออกซิไดส์ไปเป็นกำมะถันซัลเฟต

3.1.3 การศึกษาผลของชนิดของสารใช้แขวนลอยผงลิกไนท์ต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 ใช้เชื้อ *T. ferrooxidans* Y4-3 แต่แขวนลอยผงลิกไนท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟต หรือแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่น การทดลองชุดควบคุมใช้ผงลิกไนท์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟต หรือผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น ไม่ปลูกเชื้อ แต่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ปริมาตร 1% (มล./100 มล. ผงลิกไนท์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K หรือในน้ำกลั่น)

หาประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ จากปริมาณกำมะถันซัลเฟตที่เกิดขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีเดียวกับข้อ 3.1.2 วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อก่อนและหลังการบ่มเชื้อเป็นเวลา 10 วัน

3.1.4 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.3 ใช้เชื้อ *T. ferrooxidans* Y4-3 แขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่น แต่แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 1.5, 2.0, 2.5 หรือ 3.0 การทดลองชุดควบคุมใช้ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่กำหนดของแต่ละการทดลอง ไม่ปลูกเชื้อ แต่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ปริมาตร 1% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างตามแต่ละการทดลอง)

หาประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ จากปริมาณกำมะถันซัลเฟตที่เกิดขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีข้อ 3.1.2

3.1.5 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.4 ใช้ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 2.0 แต่ใช้ *T. ferrooxidans* Y4-3 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K หรือเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟต แต่เติมผงลิกไนท์ 5% (กรัม/100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K) แทนเฟอรัสซัลเฟต เป็นเชื้อเริ่มต้น การทดลองชุดควบคุมใช้ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 2.0 ไม่ปลูกเชื้อ แต่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K หรืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ไม่เติมเฟอรัสซัลเฟต แต่เติมผงลิกไนท์ 5% (กรัม/100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K) ปริมาตร 1% (มล./100 มล. ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น)

หาประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ จากปริมาณกำมะถันซัลเฟตที่เกิดขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีเดียวกับข้อ 3.1.2

3.1.6 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้บ่มต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.5 ใช้ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 2.0 ใช้ *T. ferrooxidans* Y4-3 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K เป็นเชื้อเริ่มต้น แต่บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ, อุณหภูมิห้อง (30-32°ซ), 35°ซ และ 37°ซ การทดลองชุดควบคุมใช้ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 2.0 ไม่ปลูกเชื้อ แต่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ปริมาตร 1% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น) แปรผันอุณหภูมิที่บ่มตามแต่ละการทดลอง

หาประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ จากปริมาณกำมะถันซัลเฟตที่เกิดขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีเดียวกับข้อ 3.1.2

3.1.7 การศึกษาผลของปริมาณผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น (กรัม/100 มล.) ต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.6 ใช้ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 2.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ใช้ *T. ferrooxidans* Y4-3 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K เป็นเชื้อเริ่มต้น แต่แปรผันปริมาณผงลิกไนท์ซึ่งแขวนลอยในน้ำกลั่นเป็น 5, 10, 20 หรือ 30% (กรัม/100 มล.น้ำกลั่น) การทดลองชุดควบคุมใช้ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น ปริมาณผงลิกไนท์ที่ใช้แปรผันตามแต่ละการทดลอง ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง

เริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 2.0 ไม่ปลูกเชื้อ แต่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ปริมาตร 1% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น)

หาประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ จากปริมาณกำมะถันซัลเฟตที่เกิดขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีเดียวกับข้อ 3.1.2

3.1.8 การศึกษาผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.7 ใช้ผงลิกไนท์ 10% (กรัม/100 มล.น้ำกลั่น) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 2.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ใช้ *T. ferrooxidans* Y4-3 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K เป็นเชื้อเริ่มต้น แต่แปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เป็น 1, 5, 10, 15, 20% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น) การทดลองชุดควบคุมใช้ผงลิกไนท์ 10% (กรัม/100 มล.น้ำกลั่น) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 2.0 ไม่ปลูกเชื้อ แต่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K โดยแปรผันปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ที่เติมตามแต่ละการทดลอง

หาประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ จากปริมาณกำมะถันซัลเฟตที่เกิดขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีเดียวกับข้อ 3.1.2

3.1.9 การศึกษาผลของอายุของเชื้อเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.8 ใช้ผงลิกไนท์ 10% (กรัม/100 มล.น้ำกลั่น) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 2.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ใช้ *T. ferrooxidans* Y4-3 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K แต่แปรผันระยะเวลาการบ่มเชื้อเป็น 5, 7 หรือ 10 วัน เป็นเชื้อเริ่มต้น ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ 10% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น) การทดลองชุดควบคุมใช้ผงลิกไนท์ 10% (กรัม/100 มล.น้ำกลั่น) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 2.0 ไม่ปลูกเชื้อ แต่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ปริมาตร 10% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น)

หาประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ จากปริมาณกำมะถันซัลเฟตที่เกิดขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีเดียวกับข้อ 3.1.2

3.1.10 การศึกษาผลของระยะเวลาการบ่มต่อประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.9 ใช้ผงลิกไนท์ 10% (กรัม/100 มล.น้ำกลั่น) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 2.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ใช้ *T. ferrooxidans* Y4-3 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K เป็นเวลา 7 วัน เป็นเชื้อเริ่มต้น ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ 10% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น) แต่แปรผันระยะเวลาการบ่มเป็น 2, 4, 6, 8, 10 หรือ 12 วัน การทดลองชุดควบคุมใช้ผงลิกไนท์ 10% (กรัม/100 มล.น้ำกลั่น) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารแขวนลอยผงลิกไนท์ในน้ำกลั่นเป็น 2.0 ไม่ปลูกเชื้อ แต่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ปริมาตร 10% (มล./100 มล.ผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่น) แปรผันระยะเวลาการบ่มตามแต่ละการทดลอง

หาประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์ จากปริมาณกำมะถันซัลเฟตที่เกิดขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีเดียวกับข้อ 3.1.2

3.2 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสเอทีพีซัลฟูรีเลสและเอพีเอสรีดักเตส จาก *Allochromatium vinosum* strain D (DSMZ180)

3.2.1 การเตรียมพลาสมิดพาหะ

3.2.1.1 การสกัดพลาสมิด pTMZ48 จากเซลล์ *E. coli* (Sambrook และคณะ 1989)

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pTMZ48 ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มล. (ภาคผนวก ข ข้อ 2) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม 5 มล. ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองขนาด 16x150 มม. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ 1.5 มล. ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 4,000x*g* เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนน้ำใสออกให้หมด เติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข ข้อ 3.1) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข ข้อ 3.2) 200 ไมโครลิตร ผสมเบาๆโดยเอียงหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที และเติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข ข้อ 3.3) 150 ไมโครลิตร ผสมเบาๆโดยเอียงหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็งเป็น

เวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 15,000x*g* เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาส่วนน้ำใสมากำจัดโปรตีนโดยนำมาสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข ข้อ 4) ในอัตรส่วน 1:1 โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 13,500x*g* เป็นเวลา 5 นาที ดูดชั้นน้ำซึ่งอยู่ชั้นบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยเติมเอธานอลสัมบูรณ์อุณหภูมิ –20°ซ ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรน้ำที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ –20 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็ว 15,000x*g* เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลายเอธานอล 70% (ปริมาตร/ปริมาตร) 1 มล. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 2 นาที ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดน้ำในหลอดไมโครฟิวจ์ที่เหลืออยู่ออกจนหมด ทำตะกอนให้แห้งในเครื่องดูดความชื้นภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนที่ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ TE ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 (ภาคผนวก ข ข้อ 5) เก็บที่อุณหภูมิ –20°ซ กำจัดอาร์เอ็นเอโดยนำมาย่อยด้วยอาร์เอ็นเอส (RNase) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัม/มล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2.1.2 การตัดพลาสมิด pTMZ48 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

เติมพลาสมิด pTMZ48 (ผลจากข้อ 3.2.1.1) ลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยเรสทริกชัน *Xba*I สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเรสทริกชัน *Xba*I ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จำนวนหน่วยของเอนไซม์และความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2.1.3 การหาขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

เทอะกาโรสเจลเข้มข้น 1%(น้ำหนัก/ปริมาตร)ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข ข้อ 6) สภาพหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 45°ซ ลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวแล้วดึงหวีออกจะได้เจลที่มีลักษณะเป็นหลุม ผสมสารละลายดีเอ็นเอที่ได้หลังการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (ผลจากข้อ 3.2.1.2) กับสีติดตาม (tracking dye) (ภาคผนวก ข ข้อ 7) ในอัตราส่วน 10:1 โดยปริมาตร หยอดลงในหลุมของอะกาโรสเจลที่แข็งตัวแล้ว หลุมละประมาณ 15 ไมโครลิตร ใช้แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส เพื่อเปรียบเทียบความยาวของแถบดีเอ็นเอ นำไปทำอิเลคโตรโฟริซิสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) ซึ่งมีสารละลายบัฟเฟอร์ TAE บรรจุอยู่ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาสุดขอบเจลอีกด้าน ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์โดยแช่แผ่นอะกาโรสเจลที่ได้ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัม/มล. ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE เป็นเวลา 15 นาที นำแผ่นอะกาโรสเจลมาตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วย

แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร หาขนาดและความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบขนาดและความเข้มของการเรืองแสงที่ปรากฏกับของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน บันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพราลอยด์ขาวดำ ความไวแสง 3,000 ใช้แผ่นกรองแสงสีเหลือง หากต้องการแยกเอาแถบดีเอ็นเอที่ได้ออกจากอะกาโรสเจล แล้วนำไปเชื่อมต่อกับยีน (subclone) ในขั้นต่อไป ควรป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกทำลายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต โดยตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอบนแผ่นอะกาโรสเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในเวลาไม่เกิน 10 วินาที

3.2.1.4 การทำให้ดีเอ็นเอปลายเหนียวกลายเป็นดีเอ็นเอปลายทู่โดยเอนไซม์ Klenow large fragment

เอนไซม์ Klenow large fragment คือ เอนไซม์ DNA polymerase ของ *E. coli* ซึ่งไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 5'→3' exonuclease นำพลาสมิด pTMZ48 ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชัน *Xba*I (ผลจากข้อ 3.2.1.2) ซึ่งหยุดปฏิกิริยาของเรสทริกชัน *Xba*I โดยการสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลสัมบูรณ์ ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งและละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำมาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ Klenow large fragment 1 หน่วยเอนไซม์ต่อดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม นิวคลีโอไทด์ (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 25 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ Klenow large fragment ความเข้มข้นสุดท้ายตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที กำจัดเอนไซม์ Klenow large fragment ออกโดยนำมาสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลสัมบูรณ์ และทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง (ตามวิธีข้อ 3.2.1.1) ละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ –20°ซ

3.2.1.5 การกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายด้าน 5' โดยเอนไซม์ Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)

เติมพลาสมิด pTMZ48 ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชัน *Xba*I และทำให้เป็นปลายทู่ด้วยเอนไซม์ Klenow large fragment (ผลจากข้อ 3.2.1.4) ลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ CIAP 1 หน่วยเอนไซม์ต่อดีเอ็นเอ 20 พิโคโมล สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ CIAP ความเข้มข้นสุดท้ายใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที กำจัดเอนไซม์ CIAP ออก โดยการนำมาสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอลสัมบูรณ์

และทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งตามวิธีข้อ 3.2.1.1 อาจเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดหมู่ฟอสเฟตโดยการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ CIAP ซ้ำอีกครั้ง ละลายดีเอ็นเอที่ได้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ –20°ซ

3.2.2 การแยกยีนประมวลรหัสเอทีพีซัลฟูรีเลสและเอพีเอสรีดักเตสจากพลาสมิด pNTS50

พลาสมิด pNTS50 ขนาด 10.7 กิโลเบส เป็นพลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสเอทีพีซัลฟูรีเลส (ยีน *sat*) ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) เชื่อมต่อกับยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *apr*) ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) ขนาดรวม 8 กิโลเบส แทรกอยู่ใน พลาสมิด pUC18 ที่ตำแหน่งเรสทริกชัน *Eco*RI ในทิศทางที่ยีนทั้งสองสามารถแสดงออกได้ นำ พลาสมิด pNTS50 มาตัดด้วยเรสทริกชัน *Eco*RI (ตามวิธีข้อ 3.2.1.2) ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซิส (ตามวิธีข้อ 3.2.1.3) แยกเอาชิ้นดีเอ็นเอขนาด 8 กิโลเบส ซึ่งเป็นยีน *sat* เชื่อมต่อกับยีน *apr* ออกจาก อะกาโรสเจลด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ โดยตัดแผ่นอะกาโรสเจลเพื่อแยกเอาชิ้นวุ้นบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 8 กิโลเบส ออกมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณชิ้นละ 1 ลบ.มม. ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 15,000x*g* เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อหาปริมาตรของชิ้นวุ้น แยกดีเอ็นเอออกจากชิ้นวุ้นด้วยชุดแยกดีเอ็นเอ QIA purification kit (บริษัท QIAGEN, เยอรมันนี) แล้วนำมาทำให้เป็นปลายทู่ด้วยเอนไซม์ Klenow large fragment (ตามวิธีข้อ 3.2.1.4) กำจัดเอนไซม์ Klenow large fragment โดยการนำมาสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอลสัมบูรณ์ และทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง (ตามวิธีข้อ 3.2.1.1) ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ –20°ซ

3.2.3 การเชื่อมต่อยีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) กับพลาสมิดพาหะ pTMZ48

เติมพลาสมิดพาหะ pTMZ48 ซึ่งถูกตัดด้วยเรสทริกชัน *Xba*I ทำให้เป็นปลายทู่ และกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ออก (ผลจากข้อ 3.2.1) และเติมยีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) ซึ่งตัดออกมาจากพลาสมิด pNTS50 ด้วยเรสทริกชัน *Eco*RI และทำให้เป็นปลายทู่ (ผลจากข้อ 3.2.2) อัตราส่วนพลาสมิดพาหะ:ชิ้นยีน เท่ากับ 1:3 ลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วยเอนไซม์ T4 ligase สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ T4 ligase จำนวนหน่วยของเอนไซม์และความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตรของส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 16°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.3 การเพิ่มจำนวนและคัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

3.3.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell)

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5α ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร SOB (ภาคผนวก ก ข้อ 4) 20 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 100 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 0.5% (มล./100 มล.) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดเดิม 100 มล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ จนกระทั่งค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร มีค่าระหว่าง 0.4-0.6 แช่ฟลาสก์ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 2,000x*g* เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ที่ได้มากระจายในสารละลาย RF I (ภาคผนวก ข ข้อ 8.1) 10 มล. ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์อีกครั้งที่ภาวะเดิม กระจายเซลล์ที่ได้ในสารละลาย RF II (ภาคผนวก ข ข้อ 8.2) 3 มล. ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แบ่งเซลล์คอมพีเทนต์แขวนลอยที่ได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. ที่เย็น หลอดละ 150 ไมโครลิตร เก็บเซลล์คอมพีเทนต์แขวนลอยไว้ที่อุณหภูมิ –70°ซ

3.3.2 การทำทรานสฟอร์เมชัน (transformation)

เติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (ผลจากข้อ 3.2.3) 100 นาโนกรัม ซึ่งอยู่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาเชื่อมดีเอ็นเอปริมาตรไม่เกิน 10 ไมโครลิตร ลงในคอมพีเทนต์เซลล์แขวนลอยอุณหภูมิ 4°ซ 100 ไมโครลิตร บรรจุอยู่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. นำไปแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ห้ามเขย่า จากนั้นย้ายหลอดปฏิกิริยาไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42°ซ เป็นเวลา 90 วินาที แล้วย้ายกลับมาแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 2xYT (ภาคผนวก ก ข้อ 5) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที

3.3.3 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์โคโลนีที่มีพลาสมิดที่ต้องการ

เกลี่ยเซลล์แขวนลอย (ผลจากข้อ 3.3.2) 300 ไมโครลิตร บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็น

เวลาไม่เกิน 20 ชั่วโมง จะได้โคโลนีที่คาดว่าเป็นทรานสฟอร์แมนท์โคโลนีเจริญบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.3.1 การตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์โคโลนีว่ามียีน *sat* และยีน *apr*

ปลูกทรานสฟอร์แมนท์โคโลนี (ผลจากข้อ 3.3.3) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มล. 5 มล. ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองขนาด 16x150 มม. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิด (ตามวิธีข้อ 3.2.1.1) หาขนาดของพลาสมิดที่ได้เปรียบเทียบกับขนาดของพลาสมิด pTMZ48 โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส (ตามวิธีข้อ 3.2.1.3) รีคอมบิแนนท์พลาสมิดขนาดใหญ่กว่าพลาสมิด pTMZ48

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเรสทริกชัน *Sma*I (ตามวิธีข้อ 3.2.1.2) ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส (ตามวิธีข้อ 3.2.1.3)

3.3.3.2 การตรวจสอบทิศทางการจัดเรียงตัว (orientation) ของยีนในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ตรวจสอบทิศทางการจัดเรียงตัวของยีน *sat* และยีน *apr* ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยสกัดเอารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *sat* และยีน *apr* (ผลจากข้อ 3.3.3.1) มาตัดด้วยเรสทริกชัน *Pst*I (ตามวิธีข้อ 3.2.1.2) ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส (ตามวิธีข้อ 3.2.1.3)

3.4 การถ่ายโอนยีน *sat* และยีน *apr* เข้าสู่ *T. ferrooxidans* Y4-3

3.4.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ *T. ferrooxidans* Y4-3 สำหรับการถ่ายโอนยีนโดยวิธีอิเลคโตรพอเรชัน (Kusano และคณะ 1992)

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *T. ferrooxidans* Y4-3 ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร TSM ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 วัน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K 50 มล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายเชื้อที่ได้ 10% (มล./100 มล.) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิม 50 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่ภาวะ

เดิมเป็นเวลา 7 วัน ถ่ายเชื้อที่ได้ 20 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K 400 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 5,900x*g* เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ (ภาคผนวก ข ข้อ 9) 2 ครั้ง ล้างด้วยสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดด่างสูง (ภาคผนวก ข ข้อ 10) 2 ครั้ง และล้างครั้งสุดท้ายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเลคโตรพอเรชัน (ภาคผนวก ข ข้อ 11) กำจัดตะกอนเฟอริกซัลเฟต ออกจากตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 100x*g* เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งตะกอนสีเหลืองของเฟอริกซัลเฟต ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์อีกครั้งที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็ว 5,900x*g* เป็นเวลา 10 นาที แขวนลอยเซลล์ที่ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับ อิเลคโตรพอเรชัน 3.2 มล. แบ่งเซลล์แขวนลอยที่ได้ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. หลอดละ 400 ไมโครลิตร

3.4.2 การทำอิเลคโตรพอเรชัน (Kusano และคณะ 1992)

เติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมียีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงในสารแขวนลอยคอมพีเทนต์เซลล์ *T. ferrooxidans* Y4-3 400 ไมโครลิตร (ผลจากข้อ 3.5.1) ผสมให้เข้ากัน ย้ายไปใส่คิวเวตต์ (cuvette) ที่แช่เย็นไว้ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งด้วยไมโครปิเปตต์ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ระยะห่างระหว่างแผ่นอิเลคโทรด (electrode) ของ คิวเวตต์ที่ใช้เท่ากับ 0.2 ซม. แช่คิวเวตต์ในน้ำผสมน้ำแข็งต่ออีกเป็นเวลา 1 นาที นำไปทำอิเลคโตรพอ เรชัน ด้วยเครื่องอิเลคโตรพอเรชัน (Gene Pulser apparatus; BioRad, USA.) ภาวะที่ใช้คือ ค่า field strength 12.5 กิโลโวลต์/ซม. (kV/cm) ความต้านทานไฟฟ้า 400 โอห์ม หลังการทำอิเลคโตรพอเรชัน ย้ายส่วนผสมของปฏิกิริยาในคิวเวตต์ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ที่เย็น 5 มล. ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองขนาด 16x150 มม.ทันที โดยวิธีปราศจากเชื้อ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมสารละลายเมอคิวริคคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.02 ไมโครกรัม/มล. (ภาคผนวก ข ข้อ 12.1) เพื่อชักนำให้ชุดยีนต้านต่อสารปรอท (ยีน *mer*) แสดงออก บ่มที่ภาวะเดิมต่ออีกเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เกลี่ยสารแขวนลอยเซลล์ 200 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร TSM 25 มล. ที่เติมสารละลายเมอคิวริคคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.25 ไมโครกรัม/มล. (ภาคผนวก ข ข้อ 12.2) ซึ่งบรรจุในจานเพาะเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มม. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 วัน คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์โคโลนีจากความสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีเมอคิวริคคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.25 ไมโครกรัม/มล. การทดลองชุดควบคุมผลบวกใช้พลาสมิด pTMZ48 ซึ่งมีชุดยีนต้านต่อสารปรอทแทนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.5 การตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์โคโลนีว่ามียีน *sat* และยีน *apr* จาก *A. vinosum* strain D (DSMZ180) โดยวิธี PCR

นำโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ (ผลจากข้อ 3.4) มาตรวจหายีนประมวลรหัสเอทีพีซัลฟูรีเลส (ยีน *sat*) และเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *apr*) จาก *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) โดยปลูกทรานสฟอร์แมนท์โคโลนี (ผลจากข้อ 3.4.2) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K ซึ่งเติมสารละลายเมอคิวริคคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.075 ไมโครกรัม/มล. (ภาคผนวก ข ข้อ 12.3) 5 มล. บรรจุในหลอดทดลองขนาด 16x150 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายเชื้อที่ได้ 10% (มล./100 มล.) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดเดิม และเติมสารละลายเมอคิวริคคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเดิม 50 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่ภาวะเดิมต่ออีกเป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น ถ่ายเชื้อเริ่มต้นที่ได้ 10% (มล./100 มล.) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดเดิม และเติมสารละลายเมอคิวริคคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเดิม 250 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร จำนวน 2 ใบ บ่มที่ภาวะเดิมต่ออีกเป็นเวลา 7 วัน ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ นำเซลล์ไปสกัดดีเอ็นเอทั้งหมด เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี PCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ซึ่งออกแบบตามข้อมูลลำดับเบสของยีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180)

3.5.1 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากทรานสฟอร์แมนท์เซลล์ *T. ferrooxidans* Y4-3 (Martin และคณะ 1981, Shiratori และคณะ 1989, Peng และคณะ 1994, Brinkoff และ Muyzer 1997)

ปั่นเหวี่ยงเก็บทรานสฟอร์แมนท์เซลล์ *T. ferrooxidans* Y4-3 500 มล. ที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 5,900x*g* เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายเบซอลซอลท์มีเดียม (Basal salt medium) (ภาคผนวก ข ข้อ 13) และสารละลายบัฟเฟอร์เซ็ท (SET buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 14) กำจัดตะกอนเฟอริกซัลเฟตออก โดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 100x*g* เป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 5,900x*g* เป็นเวลา 10 นาที แขวนลอยเซลล์ที่ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์เซ็ท 5 มล. แบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. หลอดละ 500 ไมโครลิตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20°ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที ทำให้สารแขวนลอยเซลล์ละลายที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 5,900x*g* เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข ข้อ 3.1) ที่มีไลโซไซม์ความเข้มข้นสุดท้าย 20 มก./มล. 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodiumdodesyl sulfate, SDS) (ภาคผนวก ข ข้อ 15) ความเข้มข้นสุดท้าย 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เขย่าเบาๆให้เข้ากัน เติมสารละลายโปรติเนสเค (Proteinase K) (ภาคผนวก ข ข้อ 16) ความเข้มข้นสุด

ท้าย 0.2 มก./มล. เพื่อกำจัดโปรตีน บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 3 ชั่งโมง เขย่าเป็นครั้งคราว กำจัดโปรตีนซ้ำ โดยนำมาสกัดด้วยสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข ข้อ 4) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 13,500x*g* เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำชั้นบนมา ตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอโดยการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ข ข้อ 17) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 โมลาร์ เติมเอธานอลสัมบูรณ์ที่เย็นในอัตราส่วน 2 เท่าของปริมาตรน้ำที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ –20°ซ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 15,000x*g* เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลายเอธานอล 70% (ปริมาตร/ปริมาตร) 1 มล. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 2 นาที ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดน้ำที่เหลือในหลอดไมโครฟิวจ์ออกจนหมด ทำตะกอนให้แห้งในเครื่องดูดความชื้นภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนที่ได้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ –20°ซ กำจัดอาร์เอ็นเอโดยนำมาย่อยสลายด้วยอาร์เอ็นเอส (RNase) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัม/มล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.5.2 การเพิ่มปริมาณยีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* strain D (DSMZ 180) โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.5.2.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *sat* และยีน *apr*

ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* srtain D (DSMZ180) จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information เครือข่าย http://www.ncbi.nih.gov.

3.5.2.2 การสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

สังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ (ผลจากข้อ 3.5.2.1) โดยวิธี Solid Support - CPG (Controlled-pore-glass) ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

3.5.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

ใช้ดีเอ็นเอซึ่งสกัดได้จากทรานสฟอร์แมนท์เซลล์ *T. ferrooxidans* Y4-3 (ผลจากข้อ 3.5.1) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่สังเคราะห์ได้ (ผลจากข้อ 3.5.2.2) การทดลองชุดควบคุมใช้พลาสมิด pNTS50 ซึ่งมียีน *sat* และยีน *apr* ของ *A. vinosum* เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ใช้ชุดทำปฏิกิริยา PCR (PCR reagent kit ; Takara Shuzo, Japan) ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่แบบ 50 นาโนกรัม โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward primer) และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางกลับ (reverse primer) ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.2 ไมโครโมลาร์ นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.4 มิลลิโมลาร์ สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR ความเข้มข้นใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด แอลเอแทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (LA Taq DNA polymerase) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ยูนิต ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR แบบฮอทสตาร์ท (Hot start) โดยบรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยายกเว้นแอลเอแทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 200 ไมโครลิตร บ่มในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (DNA Thermal Cycle ; Perkin Elmer, CT, USA) เติมแอลเอแทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรสหลังจากเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็น 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แล้วจึงกำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในแต่ละรอบปฏิกิริยาเป็นดังนี้ อุณหภูมิ 94 °ซ เพื่อให้ดีเอ็นเอแม่แบบแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denaturation) 20 วินาที อุณหภูมิ 55 °ซ เพื่อให้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) โดยการจับคู่ของเบสคู่สม 20 วินาที อุณหภูมิ 72 °ซ เพื่อให้แอลเอแทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรสสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการนำนิวคลีโอไทด์มาต่อที่ปลายของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ (extension) ทิศทาง 5' ไปยัง 3' 1.30 นาที จำนวน 30 รอบปฏิกิริยา วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส หากดีเอ็นเอแม่แบบเป็นยีน *sat* และยีน *apr* จะได้ดีเอ็นเอขนาด 503 และ 546 เบส ตามลำดับ

3.6 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสในทรานสฟอร์แมนท์ *T. ferrooxidans* Y4-3 ที่มียีน *sat* และยีน *apr*

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *T. ferrooxidans* Y4-3 และทรานสฟอร์แมนท์ *T. ferrooxidans* Y4-3 ที่มียีน *sat* และยีน *apr* ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร TSM ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 วัน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9KS (ภาคผนวก ก ข้อ 6) 50 มล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายเชื้อที่ได้ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิม 200 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มล. จำนวน 2 ฟลาสก์ บ่มที่ภาวะ

เดิมเป็นเวลา 7 วัน เพิ่มจำนวนเชื้อเป็น 4 ลิตร โดยการถ่ายเชื้อที่ได้ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิม บ่มที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น ถ่ายเชื้อเริ่มต้นที่ได้ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิม 35 ลิตร บ่มที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 7 วัน ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 5,900x*g* เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ (ภาคผนวก ข ข้อ 9) 2 ครั้ง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ทริส-คลอไรด์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 (ภาคผนวก ข ข้อ 18) 2 ครั้ง กำจัดตะกอนซัลเฟอร์และตกตะกอนเฟอริกออกจากตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 100x*g* เป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์อีกครั้งที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็ว 5,900x*g* เป็นเวลา 10 นาที แขวนลอยเซลล์ที่ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-คลอไรด์ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาณ 10% (กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตร) ทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (ultrasonic disintegrator) โดยใช้คลื่นเสียงวัดได้ 4 Amplitude microns ครั้งละ 60 วินาที สลับกับหยุด 60 วินาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ โดยให้คลื่นเสียงจำนวน 30 ครั้ง หรือจนกว่าเซลล์จะแตก ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 20,600x*g* เป็นเวลา 30 นาที นำเฉพาะส่วนน้ำใสซึ่งเป็นส่วนของ crude extract มาหาปริมาตรทั้งหมด วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (ภาคผนวก ข ข้อ 19) และวิเคราะห์กิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลส (ภาคผนวก ข ข้อ 20)

3.7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์โดย *T. ferrooxidans* Y4-3 และ ทรานสฟอร์แมนท์ *T. ferrooxidans* Y4-3 ที่มียีน *sat* และยีน *apr*

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *T. ferrooxidans* Y4-3 หรือ ทรานสฟอร์แมนท์ *T. ferrooxidans* ที่มียีน *sat* และยีน *apr* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร TSM อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 10 วัน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K 50 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 10 วัน เพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยถ่ายเชื้อที่ได้ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K 50 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 7 วัน ปลูกเชื้อเริ่มต้นที่ได้ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในผงลิกไนท์แขวนลอยในน้ำกลั่นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 2.0 ปริมาณผงลิกไนท์ที่ใช้ 10% (กรัม/100 มล.) 30 มล. บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่ภาวะเดิม เป็นเวลา 8 วัน การทดลองชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันไม่ปลูกเชื้อแต่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร 9K 10% (ปริมาตร/ปริมาตร)

กำจัดผงลิกไนท์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการกรอง นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์หาปริมาณกำมะถันซัลเฟตโดยวิธีตกตะกอนด้วยแบเรียมคลอไรด์ (ตามวิธีข้อ 3.1.2) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการขจัดกำมะถันไพไรต์ออกจากลิกไนท์