หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือหลักที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Controlled Environmental Incubater Shaker) ทั้งแบบ rotary และ reciprocal ของ New Brunswick Scientific Co., U.S.A.

1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

1.2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) รุ่น J2-21 ของ Beckman, U.S.A.

1.2.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-Top Centrifuge) รุ่น H-103N ของ Kokusan, Japan

1.2.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของ Kubota, Japan

1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

1.3.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง visible รุ่น 340 ของ Sequoia-Turner, U.S.A.

1.3.2 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง UV รุ่น Spectronic 2000 ของ Bausch & Lomb, U.S.A.

1.4 ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (Agarose Gel Electrophoresis Equipment)

1.4.1 เครื่องกำเนิดไฟฟ้า รุ่น 2301 microdrive 1 ของ LKB , Sweden

1.4.2 เจลแชมเบอร์ (Gel Chamber) พร้อมอุปกรณ์เตรียมอะกาโรสเจล

1.5 เครื่องให้กำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Transilluminator) รุ่น 2011 MACROVUE ของ LKB , Sweden

1.6 อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

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

1.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath) ของ Memmert, German

1.8 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น UNILUX-12 ของ Kyowa, Japan

1.9 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Digital pH meter) รุ่น SP-5A ของ Suntex, Taiwan

1.10 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autocleave) ของ Hirayama Mfg.Corp., Japan

1.11 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) ของ Forma Scientific, U.S.A.

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

2. <u>สารเคมี</u>

2.1 เรสทริกชันเอนไซม์และเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดต่อยีน ของ BRL, U.S.A.

2.2 ไลโซไซม์ (lysozyme grade 1) , ไรโบนิวคลีเอส (RNase), โปรเนส (pronase) , สเปอร์มีนเตตราไฮโดรคลอไรด์ (spermine tetrahydrochloride) , TES [N-tris (Hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid] และสารเคมีอื่น ๆ ของ Sigma , U.S.A.

2.3 ไธโอสเตรพตอน (thiostrepton) ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr.S.J.Lucania แห่ง The Squibb Institute for Medical Research, E.R.Squibb and Sons Inc., Princeton , N.J., U.S.A.

3. เชื้อ *Streptomyces*

เชื้อ *Streptomyces* ที่ใช้สำหรับการทดลองนี้มี 3 สายพันธุ์คือ

1. *Streptomyces lividans* TK64 , S. *lividans* TK64/plJ702 และ S. *lividans* TK64/plJ699 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Prof. D.A.Hopwood แห่ง John Innes Institute, Norwich, UK.

2. *Streptomyces* sp. 190-1 ซึ่งมีแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (48)

3. *Streptomyces* sp. 42-9 ซึ่งมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนส (49)

4. การเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces*

4.1 การเลี้ยงในอาหารแข็ง

เตรียมอาหารแข็งสูตร MS (ภาคผนวก ก.1) ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างสปอร์ สำหรับเชื้อที่มีพลาสมิดพาหะเลี้ยงใน MS ที่เติมยาปฏิชีวนะไธโอสเตรพตอน (thiostrepton) 50 ไมโครกรัม/มล. (โดยเตรียมสารละลายตั้งต้นเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มล. ในสารละลาย DMSO) ภายหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

การเตรียมสปอร์แขวนลอย ทำโดยเพาะเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ที่ต้องการ โดยลาก (streak) สปอร์หรือไมซีเลียม ลงบนอาหารแข็งสูตร MS ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ 5-7 วัน จนสปอร์แก่เต็มที่ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5-10 มล. ลงในแต่ละจาน ใช้ลูป (loop) ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วขูดเบาๆ ให้สปอร์หลุด กรองสปอร์แขวนลอยโดยใช้ชุดกรอง (ภาคผนวก ง.1) นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อสองครั้ง แขวนลอยสปอร์ที่ได้ใน 20% กลีเซอรอลโดยให้ความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^{9}-10^{10} สปอร์/มล. เก็บในหลอดเล็กหลอดละ 0.5 มล. ที่อุณหภูมิ -20°ซ

016539

4.2 การเลี้ยงในอาหารเหลว

4.2.1 การเลี้ยงเพื่อเตรียมโปรโตพลาสต์หรือสกัดพลาสมิด

เตรียมอาหารเหลว YEME (ภาคผนวก ก.2) ในขวดแก้วรูปกรวย (Erlenmeyer flask) ที่มีลวดสปริงขดที่ก้นขวด (ภาคผนวก ง.2) หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเติมสปอร์ที่เตรียมจากข้อ 4.1 100 ไมโครลิตรต่ออาหารเหลว 50 มล. ในกรณีของการเตรียมเชื้อเพื่อสกัดพลาสมิด เติมไธโอสเตรพตอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 ไมโครกรัม/มล. นำไปเขย่าแบบ reciprocal ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที โดย S. *lividans* TK64 ซึ่งเป็นเชื้อมาตราฐานให้ใช้เวลาบ่ม 36-40 ชั่วโมงเพื่อเตรียมโปรโตพลาสต์ (13) ส่วนเวลาที่ใช้ในการบ่ม *Streptomyces* sp.190-1 และ *Streptomyces* sp.42-9 จะระบุไว้ในผลการทดลอง

สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดพลาสมิดบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มาก

4.2.2 การเลี้ยงเพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์

4.2.2.1 ไซแลเนส

เตรียม inoculum โดยใส่ 1 มล. ของสปอร์แขวนลอยเข้มข้น 10^6-10^7 สปอร์/มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก.3) 50 มล. ในขวดรูปกรวย เขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30°ซ เป็นเวลา 36-40 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 5 มล. ของ inoculum ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามสูตรของ Morosoli และคณะ (50) (ภาคผนวก ก.4) 50 มล. และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกากรำข้าวตามสูตรของกาญจนา (49) (ภาคผนวก ก.5) 50 มล. เขย่าเชื้อแบบ rotary ที่อุณหภูมิ 30°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3-11 วัน

4.2.2.2 กลูโคสไอโซเมอเรส

เขี่ยเชื้อที่จะนำมาตรวจสอบ 2 ลูปลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซโลส (ภาคผนวก ก.6) ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วในขวดรูปกรวยปริมาตร 50 มล. เขย่าแบบ rotary ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 3 วัน

5. <u>การสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces*</u>

5.1 <u>การสร้างโปรโตพลาสต์</u> ตามวิธีของ Hopwood และคณะ (13)

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* ตามข้อ 4.2.1 แล้วดูดอาหารเหลวที่มีไมซีเลียมปริมาตร 10 มล. มาบรรจุในหลอดแก้วฝาเกลียวปลอดเชื้อสำหรับปั่นเหวี่ยง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มล. เพื่อเจือจางความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.3 โมลาร์ซูโครส 5 มล. สองครั้ง จากนั้นเติม 6 มล.ของสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 1 มก./มล. ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ P (ภาคผนวก ข.1) ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยเยื่อกรอง Millipore บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ปิเปตขนาด 5 มล. ดูดขึ้นลงสามครั้งทุกๆ 10-15 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P 5 มล.เพื่อเจือจางไลโซไซม์ แล้วนำมากรองผ่านชุดกรองโปรโตพลาสต์ (ภาคผนวก ง.1) เพื่อกำจัดกากเซลและชิ้นส่วนของไมซีเลียมที่เหลือ นำส่วนน้ำใสที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างโปรโตพลาสต์ด้วย 10 มล.ของบัฟเฟอร์ P จากนั้นแขวนลอยโปรโตพลาสต์ใน 100 ไมโครลิตรของบัฟเฟอร์ P หาความเข้มข้นของโปรโตพลาสต์โดยการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ Hemacytometer

การเก็บโปรโตพลาสต์ทำโดยเก็บในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Micro centrifuge tube) โดยแช่ในภาชนะบรรจุน้ำแข็ง นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ ข้ามคืน แล้วนำออกจากน้ำแข็งเก็บที่ -70°ซ ต่อไปจนกว่าจะนำมาใช้ เมื่อจะนำมาใช้จะต้องทำให้โปรโตพลาสต์ที่แข็งอยู่ละลายอย่างรวดเร็วโดยจุ่มหลอดในอ่างน้ำอุ่น

5.2 การรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์

นำโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้จากข้อ 5.1 มาเจือจางเป็นอนุกรมในบัฟเฟอร์ P และ สารละลาย 0.01% Sodium Dodesyl Sulphate (SDS) ดูดโปรโตพลาสต์ที่ถูกเจือจางในแต่ละความเข้มข้นมา 100 ไมโครลิตร ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ R2YE (ภาคผนวก ก.7) ซึ่งผ่านการกำจัดความชื้นบางส่วนโดยการเปิดฝาจานบรรจุ R2YE ในตู้ laminar flow เป็นเวลา 1 1/2 ชั่วโมง) แล้วเกลี่ยให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 5-7 วัน นับโคโลนีที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P เปรียบเทียบกับที่เจือจางด้วย 0.01% SDS เพื่อคำนวนหาเปอร์เซนต์รีเจนเนอเรชัน

6. การสกัดโครโมโซมอลดีเอนเอและพลาสมิด

6.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอนเอ ตามวิธีของ Birch และ Cullum (51)

1. ขูดสปอร์จาก *Streptomyces* 2 ลูป มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดรูปกรวยพร้อมทั้งมีขดลวดสปริง โดยบ่มในเครื่องเขย่าแบบ reciprocal ควบคุมอุณหภูมิที่ 30°ซ ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน

2. นำมาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วย 10.3% ซูโครส สองครั้ง

3. เติมไลโซไซม์ (2 มก./มล.) ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายสำหรับไลโซไซม์ (ภาคผนวก ข.2) ปริมาตร 5 มล. บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. เติมโปรเนส (pronase เข้มข้น 10 มก./มล.) ปริมาตร 0.5 มล. เขย่าเบาๆให้เข้ากัน บ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมอีก 5 นาที

5. เติม 0.55 มล.ของสารละลาย SDS เข้มข้น 10% เขย่าผสมเบาๆและบ่มต่อจนกระทั่งสารละลายหนืด

6. เติม 5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ ผสมให้เข้ากัน

7. เติม 6 มล.สารละลายฟีนอลที่ปรับ pH ให้เป็นกลางในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข.3) นำไปเขย่าแบบ reciprocal ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นของสารละลาย ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 40 นาที

8. ดูดส่วนน้ำใสชั้นบนใส่ในขวดแก้วปากกว้างขนาดบรรจุ 50 มล. เติมไอโซโพรพานอล (isoprpanol) ปริมาตร 3 ใน 4 เท่าของปริมาตรของสารละลายทั้งหมด ผสมโดยเอียงขวดแก้วไปมาเบาๆ จะได้โครโมโซมอลดีเอนเอตกตะกอนเป็นสายใยอยู่ในสารละลาย

9. ใช้ปาสเจอร์ปิเปต (Pasture pipette) ที่หลอมปลายปิดสนิทพันสายใยของดีเอนเอขึ้นมาล้างด้วยเอธานอล 70% แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

10. แขวนลอยดีเอนเอที่ได้ในบัฟเฟอร์ TE pH 8.0 ปริมาตร 5 มล. และเติมไรโบนิวคลีเอส (RNase สารละลายตั้งต้นเข้มข้น 40 มก./มล.) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่าแบบ reciprocal ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง

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

12. นำสารละลายที่ได้ไปผ่านขั้นตอนข้อ 7-9 ซ้ำอีกครั้ง แล้วจึงนำดีเอนเอที่ได้มาแขวนลอยใน 0.5 มล.ของบัฟเฟอร์ TE

6.2 <u>การสกัดพลาสมิดดีเอนเอจาก *Streptomyces* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด</u> ตามวิธีของ Kieser (52)

1. เลี้ยง *Streptomyces* ที่มีพลาสมิดตามข้อ 4.2.1 แล้วนำมาปั่นแยกไมซีเลียมด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

2. ล้างไมซีเลียมด้วยซูโครส 10.3% สองครั้ง แบ่งเซลล์ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ (microfuge tube ขนาด 1.5 มล.) หลอดละ 100 ไมโครลิตร

3. ในแต่ละหลอดเติมไลโซไซม์ 2 มก./มล. ซึ่งผสมกับ RNase 50 มก./มล. ในสารละลายสำหรับไลโซไซม์ (ภาคผนวก ข.2) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที

4. เติม 250 ไมโครลิตรของสารละลาย 2% SDS ซึ่งละลายใน 0.3 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผสมให้เข้ากันโดยทันที นำไปบ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

5. เติม 100 ไมโครลิตร ฟีนอลคลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ค.1) ผสมให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่องปั่นผสมแบบวอร์เทกซ์ (vortex mixer) ประมาณ 10 วินาที จนเห็นสารละลายผสมกันเป็นสีขาวขุ่น

6. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกชั้นของฟีนอลออก ดูดสารละลายใสชั้นบนปริมาตรประมาณ 700 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ซึ่งบรรจุ 3 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตทอยู่ 70 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

7. เติมไอโซโพรพานอล 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที

8. นำส่วนของตะกอนมาละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE โดยรวมตะกอนที่ได้จาก 4-6 หลอดเข้าด้วยกันโดยใช้บัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตร

9. ตกตะกอนพลาสมิดด้วย 100 มิลลิโมลาร์ สเปอร์มีนเตตราไฮโดรคลอไรด์ (spermine tetrahydrochloride) 25 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที

10. นำส่วนตะกอนมาแขวนลอยใน 0.3 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตท 300 ไมโครลิตร ตกตะกอนด้วยเอธานอล 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ปั่นแยกตะกอนแล้วล้างด้วยเอธานอล 70% ก่อนจะนำมาแขวนลอยในบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร

6.3 การหาขนาดและความเข้มข้นของดีเอนเอ

นำดีเอนเอที่แขวนลอยในบัฟเฟอร์ TE มาตรวจสอบโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (Agarose Gel Electrophoresis) ซึ่งทำโดยเทอะกาโรสเจล 0.7% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ TB (ภาคผนวก ข.4) ลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวี (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอนเอกับสีติดตาม (tracking dye ภาคผนวก ค.2) ในอัตราส่วน 1:1 หยอดลงในหลุมบนอะกาโรสเจลหลุมละประมาณ 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) โดยให้ความต่างศักย์ 10 โวลต์/เซนติเมตรของความยาวเจล จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนมาเกือบถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง นำอะกาโรสเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 2.5 ไมโครกรัม/มล. ของบัฟเฟอร์ TB แช่ไว้ 15-30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอนเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพโดยใช้ฟิล์มขาวดำความไวแสง 400 ถ่ายผ่านแผ่นกรองแสงสีแดง

ดีเอนเอมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบขนาด และความเข้มข้นของดีเอนเอ คือแลมดาดีเอนเอที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III (λ Hind III)

การหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอนเอ สามารถใช้วิธีอัลตราไวโอเลตแอบซอร์บชันสเปกโตรสโคปี (ULtraviolet Absorbtion Spectroscopy) (53) โดยนำสารละลายดีเอนเอไปวัดการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260}/A_{280} ถ้าได้เท่ากับ 1.80 แสดงว่าดีเอนเอที่ได้บริสุทธิ์ ในกรณีที่สูงกว่าเกือบใกล้ 2.00 แสดงว่ามีอาร์เอนเอ (RNA) ปนอยู่มาก ในกรณีที่ต่ำกว่าแสดงว่าดีเอนเอนั้นไม่บริสุทธิ์มีโปรตีนหรือฟีนอลปนเปื้อนอยู่

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอนเอโดยเทียบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260} มีค่าเท่ากับ 1 เมื่อสารละลายดีเอนเอมีความเข้มข้นเป็น 50 ไมโครกรัม/มล.

7. การโคลนไซแลเนสยีน

7.1 ตัดโครโมโซมอลดีเอนเอแบบกึ่งสมบูรณ์

7.1.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสม ระหว่างดีเอนเอ และเอนไซม์ในการเตรียมชิ้นส่วนดีเอนเอขนาด 3-8 กิโลเบส

นำสารละลายโครโมโซมอลดีเอนเอ ที่เตรียมได้จากข้อ 6.1 มาทำการย่อยกึ่งสมบูรณ์ (partial digestion) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sau3A1 ซึ่งทำโดยเจือจางความเข้มข้นของดีเอนเอให้ได้ประมาณ 160 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ดูดสารละลายดีเอนเอมา 30 ไมโครลิตร เติมบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ Sau3A1 และน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วแบ่งบรรจุลงในหลอดไมโครฟิวจ์ 9 หลอด โดยหลอดที่ 1 บรรจุ 20 ไมโครลิตร ส่วนหลอดที่เหลือบรรจุ 10 ไมโครลิตรเติม Sau3A1 ลงในหลอดที่ 1 จำนวน 4 หน่วย (unit) ผสมให้เข้ากันแล้วถ่ายลงในหลอดที่ 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วถ่ายลงในหลอดถัดไปอีก 10 ไมโครลิตร ทำต่อเนื่องไปเช่นนี้จนครบถึงหลอดที่ 9 จากนั้นนำทั้ง 9 หลอดไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงผสมสีติดตามและนำไปทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส วิเคราะห์ผลแล้วเลือกอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของดีเอนเอและเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งย่อยดีเอนเอให้ชิ้นส่วนขนาด 3-8 กิโลเบสได้มากที่สุดเพื่อนำไปเตรียมในปริมาณมากต่อไป

7.1.2 การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอนเอที่เหมาะสมในปริมาณมาก

เพิ่มความเข้มข้นของดีเอนเอให้มากขึ้น โดยทำการย่อยด้วย Sau3A1 ตามสัดส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 7.1.1 ทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส แยกชิ้นส่วนดีเอนเอขนาด 3-8 กิโลเบส ออกจากเจลโดยการจับดีเอนเอด้วยแผ่น DEAE-cellulose (54)

เตรียมแผ่น DEAE-cellulose (ภาคผนวก ง.3) เสียบลงในเจลที่ตัดเป็นช่องใต้ขนาดดีเอนเอที่ต้องการ ทำอิเลคโตรโฟรีซีสต่อจนแถบดีเอนเอที่ต้องการเคลื่อนลงไปจับที่แผ่น DEAE-cellulose ติดตามโดยดูการเรืองแสงด้วยแสงอัลตราไวโอเลต นำแผ่น DEAE-cellulose มาล้างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อแช่เย็นที่ 4°ซ

แล้วตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆลงในหลอดทดลอง เติมบัฟเฟอร์ชะดีเอนเอ (DNA elution buffer ภาคผนวก ข.5) 0.3 มล. ต่อขนาดแผ่น DEAE-cellulose 50 ตารางมิลลิเมตร เขย่าให้กระดาษกระจายออก บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาปั่นผ่านหลอดไมโครฟิวจ์ที่เจาะรูที่ก้นและมีใยแก้วเคลือบซิลิโคน (silicone) ปิดอยู่ นำส่วนน้ำใสมาเติมบิวทานอล (butanol) 3 เท่าของปริมาตรเพื่อกำจัดเอธิเดียมโบรไมด์ออก (53) นำน้ำใสชั้นล่างมาเติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ และ tRNA 20 ไมโครกรัม/มล. แล้วตกตะกอนดีเอนเอด้วยเอธานอล 2 เท่าของปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 4°ซ อย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำมาปั่นล้างตะกอนดีเอนเอด้วยเอธานอล 70% ทำให้แห้งแล้วแขวนลอยในบัฟเฟอร์ TE ตรวจสอบดีเอนเอที่ได้โดยทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสเทียบกับ λ HindIII

7.2 ตัดพลาสมิดดีเอนเอ pIJ702 และ pIJ699

นำพลาสมิดที่เตรียมได้จากข้อ 6.2 มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ พลาสมิด pIJ702 ตัดด้วย BglII ส่วนพลาสมิด pIJ699 ตัดด้วย BglII และ BamHI โดยผสมในอัตราส่วนของดีเอนเอ 1 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 3 หน่วย บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เติม Bacterial Alkaline Phosphatase (BAP) 50 หน่วยต่อดีเอนเอ 1 ไมโครกรัม บ่มต่อที่ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที กำจัดเอนไซม์โดยการสกัดด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม

สำหรับพลาสมิด pIJ699 จะต้องทำการแยกชิ้นส่วนขนาด 5 กิโลเบสมาใช้ โดยใช้วิธีจับชิ้นส่วนพลาสมิดที่ต้องการด้วยแผ่น DEAE-cellulose ตามข้อ 7.1.2

7.3 เชื่อมชิ้นส่วนของโครโมโซมอลดีเอนเอและพลาสมิด (ligation)

ผสมชิ้นส่วนของโครโมโซมอลดีเอนเอและพลาสมิดในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 โดยใช้ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอ 5 ไมโครกรัม และพลาสมิด 1 ไมโครกรัม เติมบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ T_4 DNA ligase แล้วเติม ATP ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิโมลาร์ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ความเข้มข้นของดีเอนเอทั้งหมดในสารละลายเป็น 15 ไมโครกรัม/มล. เติม T_4 DNA ligase 0.05-0.1 หน่วย บ่มที่ 12-13°ซ

เป็นเวลา 12-13 ชั่วโมง กำจัดเอนไซม์โดยการสกัดด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม นำส่วนน้ำใส มาตกตะกอนด้วยเอธานอลที่มีโซเดียมคลอไรด์และ tRNA เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 7.1.2 ตรวจสอบการเชื่อมโดยทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

7.4 ทรานสฟอร์เมชัน

เติมพลาสมิดที่ต้องการจะทรานสฟอร์มลงในโปรโตพลาสต์ ที่เตรียมได้จากข้อ 5.1 ปริมาตร 1-1.5 ไมโครกรัมต่อโปรโตพลาสต์ 50-100 ไมโครลิตร (10^8-10^9 โปรโตพลาสต์/มล.) แช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 10 วินาที เติม 25% PEG 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 1 นาที เติมบัฟเฟอร์ P ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มล. นำไปเกลี่ยในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ R2YE จานละ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30°ซ โดยบ่ม *S. lividans* TK64 และ *Streptomyces* sp. 190-1 เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นราดผิวหน้าของจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วด้วย 1 มล. ของยาปฏิชีวนะไธโอเสตรพตอนเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มล. (เจือจางจากสารละลายตั้งต้นที่เตรียมไว้จากข้อ 4.1 ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เปิดฝาจานทิ้งให้ผิวหน้าแห้งใน laminar flow ประมาณ 15 นาที นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 5-7 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ

8. การคัดเลือกและตรวจสอบโคลน

8.1 คัดเลือกโคลนที่มีไซแลเนสแอคติวิตี

นำทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาทำ replica plating ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก.8) คัดเลือกเฉพาะโคลนที่ให้วงใส (clear zone) รอบโคโลนี

8.2 ตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส

นำเชื้อที่บ่มได้ที่แล้วจากข้อ 4.2.2.1 มาปั่นแยกเซลล์ทิ้งด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4°ซ

การตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนสทำตามวิธีของกาญจนา (49) ซึ่ง

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakajima และคณะ (55) ดังนี้ ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายไซแลนเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มล. ซึ่งละลายใน 0.1 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 0.3 มล., 0.1 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 2.4 มล. และส่วนน้ำใสที่แยกออกจากเซลล์ (crude enzyme) ที่ผ่านการเจือจางที่เหมาะสม 0.3 มล.โดยบ่มสับเสตรทกับบัฟเฟอร์ก่อนที่อุณหภูมิ 55°ซ เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมเอนไซม์ นำส่วนผสมทั้งหมดของปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ เป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างของส่วนผสมที่เวลา 0 และ 10 นาที ครั้งละ 1 มล. หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที แล้วนำไปหาน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีการของ Somogyi-Nelson (56,57) ดังนี้ เติมอัลคาไลน์-คอปเปอร์ รีเอเจนท์ (alkaline copper reagent ภาคผนวก ค.3) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำเย็นจัด แล้วเติมเนลสันรีเอเจนท์ (Nelson reagent ภาคผนวก ค.4) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มล. นำส่วนผสมนี้ไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

สร้างกราฟมาตราฐานโดยใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 20-200 ไมโครกรัม/มล.

1 หน่วยของไซแลเนส คือปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยไซแลนแล้วได้น้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ตรวจสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น

8.3 <u>ตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส</u>

นำเชื้อที่บ่มได้ที่แล้วจากข้อ 4.2.2.2 มาทำการตรึงเอนไซม์ไว้ภายในเซลล์ด้วยความร้อนตามวิธีของศิริลักษณ์ (58) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Takasaki และคณะ (59) โดยนำเซลล์ที่แช่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์ไปปั่นและล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง เก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

การวิเคราะห์กลูโคสไอโซเมอเรสแอคติวิตีทำโดยชั่งเซลล์ประมาณ 50 มิลลิกรัมน้ำหนักชื้น (wet weight) เติมส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย 0.5

โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 0.6 มล., 0.1 โมลาร์ มักเนเซียมซัลเฟต 0.1 มล., 0.001 โมลาร์ โคบอลท์คลอไรด์ 0.2 มล.,1.0 โมลาร์ กลูโคส 1.0 มล. เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 2.0 มล. นำไปบ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 80°ซ เก็บสารละลายตัวอย่างที่เวลา 0 และ 15 นาที นำมาทำให้เจือจาง 300 เท่าด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายนี้ 1 มล.ไปหาปริมาณของฟรุคโตสโดยวิธีการของ Marshall และ Kooi (60) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Dische และ Borenfreund (61) ดังนี้ เติม 1.5% ซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ (Cysteine-HCl) 0.2 มล. และ 70% กรดซัลฟูริกเกรดวิเคราะห์ (analytical grade ของ Mallinckrodt, U.S.A.) 0.6 มล. ที่แช่เย็น ผสมให้เข้ากันในอ่างน้ำเย็น เติม 0.12% อัลกออลิคคาร์บาโซล (alcoholic carbazole) 0.2 มล. ผสมให้เข้ากันทันที นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง ประมาณ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

สร้างกราฟมาตราฐานโดยใช้น้ำตาลฟรักโทสที่ความเข้มข้น 2-100 ไมโครกรัม/มล.

1 หน่วยของกลูโคสไอโซเมอเรสคือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะของวิธีการตรวจสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น โดยรายงานเป็น หน่วยของเอนไซม์/กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย