บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร บริษัท นิโปร (ประเทศไทย) จำกัด
2. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดความกว้างรู 0.2 ไมโครเมตร บริษัท Chrom Tech, USA
3. ชุดเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) บริษัท EYELA, Japan
4. ชุดเครื่องเจลอิเล็กโทรฟอเรซิส mini Gel migration trough รุ่น i-mupid บริษัท COSMO BIO, Japan
5. ชุดเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC)
   - เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น 6890N บริษัท Agilent Technologies, USA
   - คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิลเมทิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร
   - เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID)
   - เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) ขนาด 10 ไมโครลิตร
6. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific supply, Japan
7. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –70°ซ รุ่น ULT1786 บริษัท Forma Scientific, USA
8. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –20°ซ รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan
9. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE800, Germany
10. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ New Brunswick Scientific ของบริษัท Edison, NJ., USA
11. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
12. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
13. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) บริษัท Nalgene, USA

14. หัวกรองพลาสติกและกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร
15. หัวกรองสำเร็จรูป ขนาดความกว้างรู 0.22 ไมโครเมตร
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Japan
17. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 บริษัท Decan Ultrasonics, England
18. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท Newb Brunswick Scientific, USA
19. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (Digital DryBath) รุ่น D1100 บริษัท Labnet International, USA
20. เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต ของบริษัท Fotodyne Co., Inc., USA
21. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Swietzerland
22. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
23. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
24. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Mikro20 บริษัท Hettich zentrifugen, Germany
25. เครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
26. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
27. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
28. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 2, 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
29. Cromatofolios AL TLC 20x20 cm; silica gel 60 F_{254} บริษัท Merck, Germany

3.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดมอร์ฟอลิโนอีเทนซัลโฟนิค (2-[*N*-morpholino]ethanesulfonic acid, MES) บริษัท Sigma, USA
2. กรดอะซีติกเข้มข้น (CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
3. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
4. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Research organics, Inc., USA
5. กลูโคส (glucose) บริษัท Merck, Germany
6. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
7. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit บริษัท Qiagen, Germany
8. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล EASYTRAP^{TM}Ver.2 บริษัท TAKARA BIO INC, Japan
9. ชุดเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hin*dIII, *Kpn*I, *Pst*I, *Sph*I และ *Xba*I บริษัท Promega, USA
10. ชุดเอนไซม์ Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) บริษัท Promega, USA
11. ชุดเอนไซม์ T4-DNA ligase บริษัท Promega, USA
12. นอร์มัลเฮกเซน (C_6H_{14}) บริษัท Merck, Germany
13. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
14. ฟลูออแรนธีน (fluoranthene) บริษัท Kanto Chemical Co., INC, Japan
15. ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany
16. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) บริษัท Sigma, USA
17. รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl) บริษัท Sigma, USA
18. สารปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล (Chloramphenicol, Cm) ($Cl_2CHCONHCH(CH_2OH)CH(OH)C_6H_4NO_2$) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
19. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin, Ap) ($C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
20. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) บริษัท Fluka, Germany
21. อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUAI, Japan
22. อะซีแนพธีน (acenaphthene) บริษัท Wako, Japan
23. อะซีแนพธีนอล (acenaphthenol) บริษัท Sigma, USA
24. อะซีแนพธิลีน (acenaphthylene) บริษัท Kanto Chemical Co., INC, Japan

25. อินโด (indole) บริษัท Kanto Chemical Co., INC, Japan
26. เฟอร์รัสคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) บริษัท Merck, Germany
27. เอธิลอะซีเตต (C_2H_5) บริษัท Merck, Germany
28. เอทิลีนไดเอมีนเททราอะซิติกแอซิก (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$) บริษัท Sigma, USA
29. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
30. แนพธาลีน (naphthalene) บริษัท Kanto Chemical Co., INC, Japan
31. แบคโตอะการ์ (bacto agar) บริษัท Difco, USA.
32. แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) บริษัท Merck, Germany
33. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) บริษัท Merck, Germany
34. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Carlo ERBA, France
35. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) บริษัท Merck, Germany
36. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
37. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
38. โซเดียมอะซิเตต ($CH_3COONa.3H_2O$) บริษัท Merck, Germany
39. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) บริษัท Nacalai Tesque, Japan
40. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, German
41. โทลูอีน ($C_6H_5CH_3$) บริษัท JT. Batker, USA
42. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
43. โพแทสเซียมอะซิเตต (CH_3COOK) บริษัท Merck, Germany
44. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
45. ไดออกเซน (1,4-dioxan) ($C_4H_8O_2$) บริษัท Merck, Germany
46. ไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (dimethyl formamide, DMF)บริษัท BIOBASIC, INC. Japan
47. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) บริษัท Merck, Germany
48. ไทรเมธิวซิลิไทรฟลูออโรอะเซทาไมด์ (N -methyl-N-trimethylsilyltrifluoro acetamide, MSTFA) บริษัท Sigma, USA
49. ไพรีน (pyrene) บริษัท Sigma, USA
50. ไอโซโปรพานอล (isopropanol) บริษัท Merck, Germany

51. IPTG (Isopropyl thio- ß-D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC, Canada
52. Lambda *Hind*III บริษัท Bio-Rad, UK
53. Proteinase K บริษัท US.Biological, US
54. Ribonuclease A (Rnase A) บริษัท Promega, USA
55. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) บริษัท Sigma, USA
56. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactoside) บริษัท BIO BASIC, INC, Canada
57. 1 kilobase DNA ladder บริษัท Bio-Rad, UK
58. 100 base pair DNA ladder บริษัท Bio-Rad, UK

3.3 แบคทีเรีย พลาสมิดและไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 แสดงสมบัติของแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

ชนิด	ลักษณะสมบัติ	แหล่งที่มา
Sphingomonas sp. SP2	Ace^+, $Acele^-$, Ap^r	Saiphet และคณะ, 2006
Escherichia coli JM109	e14$^-$ (*mceA*) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* (r_k^- m_k^-) *supE44 relA1* Δ (*lac-proAB*) (F' *traD36 proAB* lac^{Iq} *ZΔM15*	Sambrook และคณะ, 1989

หมายเหตุ : Ace^+; สามารถเจริญโดยใช้อะซีแนพธีนเป็นแหล่งคาร์บอน, $Acele^-$; ไม่สามารถเจริญโดยใช้อะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอน, Ap^r; มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

ตารางที่ 3.2 แสดงสมบัติของพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อพลาสมิด	ลักษณะสมบัติ	แหล่งที่มา
pUC18	Cloning vector, Ap^r, *lacZ*, pMB9 replicon	Yanisch-Perron และคณะ, 1985
pSA3A4	pSTV28 with 1.5 kb *Kpn*I-*Bam*HI fragment carrying *ahdA3* and *ahdA4* from pUPA3A4 , Cm^r	Pingyakong และคณะ, 2004
pPC1	pUC18 with 4.7 kb *Eco*RI fragment from strain SP2 , Ap^r	สร้างในงานวิจัย
pPPA1A2	pUC18 with 2.7 kb *Pst*I fragment carrying *arhA1* and *arhA2* from pPC1, Ap^r	สร้างในงานวิจัย
pHP9	pUC18 with 0.9 kb *Hin*dIII-*Pst*I fragment from pPC1 , Ap^r	สร้างในงานวิจัย
pPE15	pUC18 with 1.5 kb *Pst*I-*Eco*RI fragment from pPC1 , Ap^r	สร้างในงานวิจัย
pPH16	pUC18 with 1.6 kb *Pst*I-*Hin*dIII fragment from pPC1 , Ap^r	สร้างในงานวิจัย
pEP4	pUC18 with 0.4 kb *Eco*RI-*Pst*I fragment from pPC1 , Ap^r	สร้างในงานวิจัย
pPEv10	pUC18 with 1.0 kb *Pst*I-*Eco*RV fragment from pPC1 , Ap^r	สร้างในงานวิจัย
pEvB5	pUC18 with 0.5 kb *Eco*RV-*Bgl*II fragment from pPC1 , Ap^r	สร้างในงานวิจัย

หมายเหตุ : Ap^r; มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน, Cm^r; มียีนต้านยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล

ตารางที่ 3.3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')
M13F	Forward: GTAAAACGACGGCCAGT
M13R	Reverse: GCGGATAACAATTTCACACAGG
PC1FF	Forward: GAAGCACGTCGAGCAAC
CF1FF	Forward: GGAAAGGGCGCTGTTGG
HP9FR	Forward: CACGATCTGCTTCACAG
PH16FF	Forward: GAGATCGCCCCTGGATC

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 แยกยีนอะซีแนพธีนออกซิจีเนสจาก *Sphingomonas* sp. SP2 และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4.1.1 การเตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอ (plasmid library) ของสายพันธุ์ SP2

3.4.1.1.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI โดยคัดเลือกชิ้นที่มีขนาดประมาณ 4-6 กิโลเบสเพื่อสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ (plasmid library) ของสายพันธุ์ SP2

3.4.1.1.1.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก) 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 30°ซ ข้ามคืน (16-18 ชม.) ถ่ายเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ลงหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ 4°ซ 5,000 รอบต่อนาที 5 นาที กระจายตะกอนเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) 517 ไมโครลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกับบัฟเฟอร์ เติมสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาและบ่มที่ 37°ซ 1 ชม. แล้วเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) เข้มข้น 10% (ภาคผนวก ข) 30 ไมโครลิตร และโปรตีนเนสเคเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลตร (ภาคผนวก ข) 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 °ซ 1 ชม. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) 120 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข) 220 ไมโครลิตร บ่มที่ 65°ซ 10 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 5 นาที นำสารละลายชั้นบนมาเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเดิม นำสารละลายชั้นบนมาเติมไอโซโพรพานอล 0.6 เท่าของปริมาตรสุดท้าย กลับหลอดให้เข้ากันจนปรากฏสายดีเอ็นเอนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% (ภาคผนวก ข) 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง เทส่วนใสทิ้งระเหยเอทานอลจนแห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 100 ไมโครลิตรและใส่อาร์เอ็นเอสเอ (RNase A) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ 1 ชม.

3.4.1.1.1.2 การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วย *Eco*RI แบบสมบูรณ์ (Sambrook และ Russell, 2001) โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ดังนี้

จีโนมิกดีเอ็นเอ (1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	40 ไมโครลิตร
10x บัฟเฟอร์	10 ไมโครลิตร
โปรตีน BSA	1 ไมโครลิตร
เอนไซม์ *Eco*RI (12 หน่วยต่อไมโครลิตร)	5 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	44 ไมโครลิตร

บ่มที่ 37°ซ 16-18 ชั่วโมง (ข้ามคืน)

3.4.1.1.1.3 กำจัดโปรตีนด้วยวิธีฟีนอล/คลอโรฟอร์ม โดยการเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์มปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรสุดท้ายของสารละลาย จากนั้นนำส่วนใสชั้นบนมาตก ตะกอนดีเอ็นเอด้วยวิธีการตกตะกอนโดยเอทานอล 99% เริ่มจากการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) 0.1 เท่าของปริมาตรสุดท้าย และเติมเอทานอล 99% 2 เท่าของปริมาตรสุดท้าย แช่ที่ -70°ซ 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4°ซ 15000 รอบต่อนาที 15 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระเหยเอทานอลจนแห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 30 ไมโครลิตร

3.4.1.1.1.4 จากนั้นตรวจความสมบูรณ์ในการตัดของดีเอ็นเอที่สกัดได้และคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดที่ต้องการ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9% (ภาคผนวก ข) เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสที่ได้ลงในแชมบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) เข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วมเหนืออะกาโรสเจล 2-3 มม. ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งแรกจะหยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผสมกับสีติดตามแล้ว 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำอิเล็กโทรฟอเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.4.1.1.1.5 การสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลด้วย EASYTRAP™ Ver.2 (บริษัท TAKARA BIO INC ประเทศญี่ปุ่น) โดยตัดส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4-6 กิโลเบสจากอะกาโรสเจล และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Glass powder for Recovery of DNA EASYTRAP™Ver.2 ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยนำเจลที่ตัดได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ ชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล เติม NaI 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่ 55°ซ จนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด เติม glass powder 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับ glass powder ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที 15 วินาที เทส่วนน้ำใสออก แล้วเติม washing buffer มากกว่า 50 เท่าของปริมาตร glass powder ที่เติมลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปตต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนน้ำใสออกจนหมด ตั้งทิ้งไว้จน washing bufer ระเหยแห้ง เติมบัฟเฟอร์ TE 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 55°ซ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที 15 วินาที ดูดส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเออยู่เก็บไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่

3.4.1.1.2 การเตรียมเวกเตอร์ pUC18 ที่ตัดด้วย *Eco*RI เพื่อใช้เป็นเวกเตอร์พาหะในการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ (plasmid library) ของสายพันธุ์ SP2

3.4.1.1.2.1 การตัดเวกเตอร์ pUC18 ด้วย *Eco*RI แบบสมบูรณ์ (Sambrook และ Russell, 2001) โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ดังแสดงในข้อ 3.4.1.1.1.2 จากนั้นกำจัดโปรตีนและตรวจความสมบูรณ์ในการตัดเวกเตอร์ pUC18 ด้วย *Eco*RI โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซิส ดังแสดงในข้อ 3.4.1.1.1.3 และ 3.4.1.1.1.4 ตามลำดับ และคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 2.68 กิโลเบส ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด EASYTRAP™Ver.2 ดังแสดงวิธีในข้อ 3.4.1.1.1.5

3.4.1.1.2.2 การกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ ด้วย calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) เริ่มจากละลายพลาสมิดจากข้อ 3.4.1.1.2.1 ด้วยบัฟเฟอร์ TE 172 ไมโครลิตร บ่มที่ 68°ซ 10 นาที แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติม 10X บัฟเฟอร์ CIAP 20 ไมโครลิตร และเติม CIAP (1 หน่วยต่อไมโครลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ 30 นาที เติม CIAP อีก 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ 30 นาที เติมสารละลายเอทิลีนไดเอมีนเททราอะซิติกแอซิด (EDTA) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) 4 ไมโครลิตร SDS เข้มข้น 10% 6 ไมโครลิตร และโปรตีเนสเค 3.02 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มที่ 37°ซ

60 นาที กำจัดโปรตีนด้วยวิธีฟีนอล/คลอโรฟอร์ม และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยวิธีการตกตะกอนโดยเอทานอล 99% ดังแสดงในข้อ 3.4.1.1.1.3 สุดท้ายละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 10 ไมโครลิตร

3.4.1.1.3 วัดปริมาณดีเอ็นเอทั้งส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4-6 กิโลเบส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และเวกเตอร์พาหะที่ผ่านการกำจัดหมู่ฟอสเฟสแล้ว โดยนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} โดยหากอัตราส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง แต่ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง และคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} X 50 X dilution factor

จากนั้นเชื่อมดีเอ็นเอสอดแทรก (จีโนมิกดีเอ็นเอขนาด 4-6 กิโลเบส) และเวกเตอร์พาหะด้วย T4-DNA ligase (3 หน่วยต่อไมโครลิตร) (Promega, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยคำนวณอัตราส่วนนาโนกรัมดีเอ็นเอสอดแทรกต่อนาโนกรัมเวกเตอร์พาหะ ดังนี้

$$\frac{\text{นาโนกรัมดีเอ็นเอสอดแทรก}}{\text{นาโนกรัมเวกเตอร์พาหะ}} = \frac{\text{ขนาดดีเอ็นเอสอดแทรก}}{\text{ขนาดเวกเตอร์พาหะ}} \times \frac{3}{1}$$

โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

เวกเตอร์ pUC18 ตัดด้วย *Eco*RI (ประมาณ 20 นาโนกรัม)	x	ไมโครลิตร
จีโนมิกดีเอ็นเอขนาด 4-6 กิโลเบส (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	y	ไมโครลิตร
10x ไลเกชันบัฟเฟอร์	1	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	8 – x – y	ไมโครลิตร

ทำไลเกชันที่ 4°ซ 16-18 ชั่วโมง (ข้ามคืน)

3.4.1.1.4 ทานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.4.1.1.3 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ที่มี pSA3A4 (พลาสมิดที่บรรจุยีน *ahdA3* และ *ahdA4* จาก *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ P2) และคัดเลือกเซลล์รีคอมบิแนนท์ที่มีชิ้นยีนที่ต้องการอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

3.4.1.1.4.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์โดยวิธี Calcium chloride (Sambrook และ Russell, 2001) ลงเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 บนอาหารแข็ง Ψb (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 37°ซ 16-18 ชั่วโมง แล้วเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Ψb 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ 37°ซ 4 ชั่วโมง จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.3-0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 5 มิลลิลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Ψb 100 มิลลิลิตรที่บรรจุใน arm flask นำไปเขย่าที่ 37°ซ จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.5 เมื่อเซลล์เจริญจนถึงค่า OD_{600} ที่ต้องการ ให้ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ปลอดเชื้อ แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 4°ซ 3,000 รอบต่อนาที 5 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4°ซ ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย TfbI (ภาคผนวก ข) ที่เย็น 40 มิลลิลิตร กระจายตะกอนเซลล์ให้เข้ากับสารละลาย TfbI (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4°ซ 3,000 รอบต่อนาที 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย TfbII (ภาคผนวก ข) ที่เย็น 4 มิลลิลิตร กระจายตะกอนเซลล์ให้เข้ากับสารละลาย TfbII แช่ในน้ำแข็ง 15 นาทีหรือมากกว่านั้น แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็น ปริมาตรหลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บคอมพีเทนต์เซลล์ไว้ที่ -70°ซ

3.4.1.1.4.2 ถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ที่เก็บไว้ที่ –70°ซ มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.4.1.1.3 และพลาสมิด pSA3A4 ชนิดละ 3 ไมโครลิตร ลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มในอ่างน้ำแข็ง 30 นาที ทำการ heat shock ที่ 42°ซ 90 วินาที แช่ในน้ำแข็งทันที 3 นาที เติมอาหารเหลว SOC (ภาคผนวก ก) 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดบรรจุเชื้อ และนำไปบ่มที่ 37°ซ 45 นาที

3.4.1.1.4.3 คัดเลือกเซลล์รีคอมบิแนนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้ว 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin, Ap) (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล (Chloramphenicol, Cm) (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal) เข้มข้น 2 % (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (ภาคผนวก ข) ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ นำไปบ่มที่ 37°ซ 16-18 ชั่วโมง

3.4.1.2 ค้นหายีนอะซีแนพธีนออกซิจีเนสจากห้องสมุดดีเอ็นเอของสายพันธุ์ SP2

3.4.1.2.1 คัดเลือกโคลนที่มียีนออกซิจีเนส จากห้องสมุดดีเอ็นเอของสายพันธุ์ SP2 โดยเขี่ยเซลล์รีคอมบิแนนท์ที่มียีนสอดแทรกลงบนอาหารแข็งที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน คลอแรมฟีนิคอล และ IPTG บ่มที่ 30°ซ 12 ชั่วโมง แล้ววางอินโดลบนฝาจานเลี้ยงเชื้อบ่มต่อที่ 30°ซ 24 ชั่วโมง ถ้าเซลล์รีคอมบิแนนท์มีส่วนของยีนที่สามารถผลิตออกซิจีเนส เซลล์สามารถผลิตเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนอินโดลให้เป็นอินดิโกที่ให้สีอินดิโก (Ensley และคณะ, 1983) ทำให้โคโลนีดังกล่าวเป็นสีอินดิโก

3.4.1.2.2 สกัดพลาสมิดที่มียีนออกซิจีเนสเป็นยีนสอดแทรกออกจากโคลนที่มียีนออกซิจีเนสและแยกพลาสมิดที่มียีนออกซิจีเนสออกจากพลาสมิด pSA3A4

3.4.1.2.2.1 การสกัดพลาสมิดจากโคลนที่มียีนออกซิจีเนส ด้วยวิธี alkaline extraction ของ Sambrook และ Russell, 2001 โดยเขี่ยโคโลนีเดียวที่ให้สีอินดิโกเมื่อทดสอบตามวิธีในข้อ 3.4.1.2.1 ลงในอาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลลิน และคลอแรมฟีนิคอล นำไปเขย่าที่ 30°ซ ข้ามคืน (16-18 ชม.) ถ่ายเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ลงหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ 4 °ซ 5,000 รอบต่อนาที 5 นาที เติมบัฟเฟอร์ TEG (ภาคผนวก ข) 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกับบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมสารละลายผสมของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอแมล

(ภาคผนวก ข) SDS 10% และน้ำปลอดเชื้อ อัตราส่วน 2:1:7 ตามลำดับ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาและแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที และเติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตตเข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) 150 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง 5-15 นาที จากนั้นเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 5 นาที นำสารละลายชั้นบนมาเติมไอโซโพรพานอล 450 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอนพลาสมิด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง เทส่วนใสทิ้ง ระเหยเอทานอลจนแห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 100 ไมโครลิตรและเติมอาร์เอ็นเอสเอเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ 1 ชม.

3.4.1.2.2.2 แยกพลาสมิดที่มียีนออกซิจีเนส (pPC1) ออกจากพลาสมิดผสมที่สกัดได้จากข้อ 3.4.1.2.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด เช่น *Bam*HI, *Xba*I หรือ *Kpn*I เป็นต้น โดยคาดว่าเอนไซม์ดังกล่าวจะไม่มีบริเวณตัดจำเพาะบนชิ้นสอดแทรกของพลาสมิดทั้ง 2 (ภาคผนวก ค) โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 30 ไมโครลิตร) ดังนี้

พลาสมิด (1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	10 ไมโครลิตร
10x บัฟเฟอร์	3 ไมโครลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะ (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	16 ไมโครลิตร

บ่มที่ 37°ซ 16-18 ชั่วโมง (ข้ามคืน)

จากนั้นกำจัดโปรตีนและตรวจความสมบูรณ์ในการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซิส ดังแสดงในข้อ 3.4.1.1.1.3 ถ้าพบ 2 แถบที่ขนาด 4.5 กิโลเบส (pSA3A4) และประมาณ 8 กิโลเบส ซึ่งคาดว่าคือพลาสมิดที่มียีนออกซิจีเนส คัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 8 กิโลเบส และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด EASYTRAP^{TM}Ver.2 ดังแสดงวิธีในข้อ 3.4.1.1.1.4 ละลายพลาสมิดในบัฟเฟอร์ TE 10 ไมโครลิตร ทำการเชื่อมพลาสมิดดังกล่าวด้วย T4-DNA ligase โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

พลาสมิดขนาด 8 กิโลเบส (300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	4	ไมโครลิตร
10x ไลเกชันบัฟเฟอร์	1	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	4	ไมโครลิตร

ทำไลเกชันที่ 4°ซ 6 ชั่วโมง

3.4.1.2.3 เพิ่มปริมาณพลาสมิดที่มียีนออกซิจีเนส (pPC1) โดยการถ่ายโอน พลาสมิดดังกล่าวเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี heat shock ดังแสดงในข้อ 3.4.1.1.4.2 และเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์บนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน นำไปบ่มที่ 37°ซ 16-18 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.4.1.2.2.1

3.4.1.3 โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์

หาแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pPC1 เพื่อเตรียมสร้างโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เรียงต่อกันจนครบทั้งชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (ประมาณ 5 กิโลเบส) โดยอาศัยเวกเตอร์ pUC18 เป็นเวกเตอร์พาหะในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอในแต่ละโคลน เพื่อนำมาต่อกันทำให้สามารถทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pPC1 ได้

3.4.1.3.1 การหาแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ของพลาสมิด pPC1 โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด เช่น *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, *Sph*I *Eco*RV หรือ *Bgl*II ซึ่งคาดว่าเอนไซม์ดังกล่าวจะมีบริเวณตัดจำเพาะบนชิ้นสอดแทรกของพลาสมิด โดยทำปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวหรือสองชนิด โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียว (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

พลาสมิด (1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	3	ไมโครลิตร
10x บัฟเฟอร์	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะ (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	5.5	ไมโครลิตร

บ่มที่ 37°ซ 1-2 ชั่วโมง

การตัดด้วยเอนไซม์สองชนิด ถ้าเอนไซม์ทั้ง 2 สามารถใช้บัฟเฟอร์ร่วมกันได้ก็สามารถตัดได้ตามส่วนผสม (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

พลาสมิด(1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	3	ไมโครลิตร
10x บัฟเฟอร์	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดที่ 1 (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดที่ 2 (10 หน่วยต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	5	ไมโครลิตร

บ่มที่ 37°ซ 1-2 ชั่วโมง

แต่ถ้าเอนไซม์ทั้ง 2 ไม่สามารถใช้บัฟเฟอร์ร่วมกันได้ ต้องตัดทีละเอนไซม์โดยตัดด้วยเอนไซม์แรกในส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 30 ไมโครลิตร) ตามข้อ 3.4.1.2.2.2 จากนั้นเหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดแรกโดยการเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์มปริมาตรเท่ากับปริมาตรสุดท้าย และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยวิธีการตกตะกอนโดยเอทานอล 99% ดังแสดงในข้อ 3.4.1.1.1.3 สุดท้ายละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 8.5 ไมโครลิตร แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดที่ 2 0.5 ไมโครลิตร และ 10x บัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ 1-2 ชั่วโมง และตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซิส ดังแสดงในข้อ 3.4.1.1.1.4

3.4.1.3.2 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรก ที่มีการหาแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะตามข้อ 3.4.1.3.1 โดยใช้เวกเตอร์ pUC18 เป็นเวกเตอร์พาหะ ทำการสร้างทั้งหมด 6 โคลน ซึ่งการตัดพลาสมิด pPC1 และเวกเตอร์ pUC18 ทำโดยปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวหรือสองชนิด ด้วยส่วนผสมของปฏิกิริยาการดังแสดงในข้อ 3.4.1.3.1 และเวกเตอร์ที่มีการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวต้องทำการกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ด้วย CIAP ดังแสดงวิธีในข้อ 3.4.1.1.2.2 และเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกกับเวกเตอร์พาหะที่เตรียมขึ้นด้วย T4-DNA ligase โดยวัดค่า A_{260} และ A_{280} เพื่อคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และคำนวณอัตราส่วนนาโนกรัมชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกต่อนาโนกรัมเวกเตอร์พาหะ และทำส่วนผสมของปฏิกิริยาดังข้อ 3.4.1.1.3 จากนั้นถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีข้อ 3.4.1.1.4.2 และคัดเลือกเซลล์รีคอมบิแนนท์ด้วยวิธี Blue/White selection ทำโดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิ

แนนท์พลาสมิดแล้ว 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-gal และ IPTG นำไปบ่มที่ 37°ซ 16-18 ชั่วโมง

3.4.1.3.3 การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 5 มิลลิลิตร ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน บ่มบนเครื่องเขย่าที่ 37°ซ 200 รอบต่อนาที 16-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ในหลอดไมโครฟิวจ์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที 5 นาที แขวนลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที เติมสารละลาย N3 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 13,000 รอบต่อนาที 10 นาที แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB 500 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB 30 ไมโครลิตรให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส และตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมด้วยส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังแสดงในข้อ 3.4.1.3.2 เก็บพลาสมิดที่ -20°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

3.4.1.3.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกทั้ง 7 โคลน ได้แก่ พลาสมิด pPC1, pHP9, pPE15, pPH16, pEP4, pPEv10 และ pEvB5 ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen INC ประเทศเกาหลี ซึ่งใช้พลาสมิดเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 10 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และไพรเมอร์ M13F (Forward: GTAAAACGACGGCCAGT) และ M13R (Reverse: GCGGATAACAATTTCACA CAGG) เข้มข้น 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร 10 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Automatic Sequencer รุ่น 3730XL

3.4.1.3.5 ออกแบบไพรเมอร์ เพื่อหาลำดับเบสระหว่างซิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในแต่ละโคลน โดยออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้จากข้อ 3.4.1.3.4 ซึ่งออกแบบทั้งหมด 4 ไพรเมอร์ ดังแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตารางที่ 3.3 การออกแบบใช้โปรแกรม primer3 online ในการหาบริเวณไพรเมอร์ที่เหมาะสมและตรวจสอบคุณสมบัติไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม fastPCR Microsoft version 4.0.27 ("PCR Team" University of Helsinki, Finland) ส่งสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Bio Basic Inc ประเทศแคนาดา ซึ่งผ่านทางบริษัท แปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด ประเทศไทย และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen Inc ประเทศเกาหลี ซึ่งใช้พลาสมิด pPC1 เข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 10 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

3.4.1.3.6 เชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้จากข้อ 3.4.1.3.4 และ 3.4.1.3.5 ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac software version 2.05 (Hitachi Software Engineering Co. Ltd.)

3.4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางชีวโมเลกุลของยีนออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2

หากรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) บนดีเอ็นเอสอดแทรกของ พลาสมิดที่มีขนาด 4.7 กิโลเบส โดยโปรแกรม pDRAW32 version 1.1.93 (AcaClone software) และนำมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลของยีนที่มีใน database GenBank DDBJ และ EMBL ซึ่งเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม BlastX และ BlastP เพื่อทำนายหน้าที่ของยีนและโปรตีนผลิตภัณฑ์ จากนั้นวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนสด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.83 และทำ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package เพื่อจัดกลุ่มออกซิจีเนสที่ผลิตจาก *Sphingomonas* sp. SP2

3.4.3 วิเคราะห์ความเหมือนทางสายพันธุ์ของสายพันธุ์ SP2 และ A4

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 (อรสุภาส์ สายเพชร, 2545) (ภาคผนวก ง) กับข้อมูลที่มีใน database GenBank DDBJ และ EMBL ซึ่งเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม BlastN เพื่อวิเคราะห์ความเหมือนทางสายพันธุ์ของ SP2 และ A4 จากนั้นจัดกลุ่มสายพันธุ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยใช้โปรแกรม ClustalX version 1.83 และทำ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package

3.4.4 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนอะซีแนพธีนออกซิจีเนสใน *E.coli*

3.4.4.1 สร้างพลาสมิดที่มียีนที่ผลิตออกซิจีเนส โดยแสดงออกได้ใน *E. coli*

3.4.4.1.1 เตรียมชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ที่มีบริเวณของยีนเทอร์มินัลออกซิจีเนส ซึ่งรวมทั้งหน่วยย่อยแอลฟาและบีตา โดยการตัดพลาสมิด pPC1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ดังส่วนผสมในข้อ 3.4.1.1.2.1 จากนั้นกำจัดโปรตีนและตรวจความสมบูรณ์ในการตัดด้วย *Pst*I โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซิส ดังแสดงในข้อ 3.4.1.1.1.3 และ 3.4.1.1.1.4 ตามลำดับ และคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 2.7 กิโลเบส มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด EASYTRAP^{TM}Ver.2 ดังแสดงวิธีในข้อ 3.4.1.1.1.5

3.4.4.1.2 เตรียมเวกเตอร์ pUC18 เพื่อใช้เป็นเวกเตอร์แสดงออก โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ดังส่วนผสมในข้อ 3.4.1.1.2.1 จากนั้นกำจัดโปรตีนและตรวจความสมบูรณ์ในการตัดด้วย *Pst*I โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซิส ดังแสดงในข้อ 3.4.1.1.1.3 และ 3.4.1.1.1.4 ตามลำดับ และคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 2.68 กิโลเบส มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด EASYTRAP^{TM}Ver.2 ดังแสดงวิธีในข้อ 3.4.1.1.1.5 และกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ด้วย CIAP ตามวิธีในข้อ 3.4.1.1.2.2

3.4.4.1.3 เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ที่มีบริเวณของยีนเทอร์มินัลออกซิจีเนสกับเวกเตอร์แสดงออกที่เตรียมขึ้นด้วย T4-DNA ligase โดยวัดค่า A_{260} และ A_{280} เพื่อคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และคำนวณอัตราส่วนนาโนกรัมชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกต่อนาโนกรัมเวกเตอร์แสดงออก และทำส่วนผสมของปฏิกิริยาดังข้อ 3.4.1.1.3 จากนั้นถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 3 มิลลิลิตร และ pSA3A4 3 มิลลิลิตร เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีข้อ 3.4.1.1.4.2

3.4.4.1.4 คัดเลือกเซลล์รีคอมบิแนนท์ด้วยวิธี Blue/White selection ทำโดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้ว 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินและคลอแรมฟีนิคอล นำไปบ่มที่ 37°ซ 16-18 ชั่วโมง จากนั้นสุ่มโคโลนีข้างต้นมาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่มีบริเวณของยีนเทอร์มินัลออกซิจีเนสที่มีทิศทางในการแสดงออกเหมาะสมกับเวกเตอร์แสดงออก โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 3.4.4.1.3 ลงบนอาหารแข็งที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน คลอแรมฟีนิคอล และ IPTG บ่มที่ 30°ซ 12 ชั่วโมง ทำการวางอินโดลบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 30°ซ 24 ชั่วโมง ถ้าเซลล์รีคอมบิแนนท์มีส่วนของยีนที่สามารถผลิตออกซิจีเนสสอดแทรกอยู่ในทิศทางที่เหมาะสม เซลล์สามารถผลิตเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนอินโดลให้เป็นอินดิโกที่ให้สีอินดิโก (Ensley และคณะ, 1983) ให้ชื่อพลาสมิดที่มีการแสดงออกของยีนเทอร์มินัลออกซิจีเนสว่า pPPA1A2

3.4.4.2 ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ ของ *E. coli* ที่มี recombinant oxygenase ที่สร้างขึ้น

ในการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุมและชุดทดลอง ซึ่งชุดควบคุมได้แก่ *E. coli.* สายพันธุ์ JM109 ที่มีพลาสมิด pUC18 และ pSA3A4 และชุดทดลอง ได้แก่ *E. coli.* สายพันธุ์ JM109 ที่มีพลาสมิด pPPA1A2 และ pSA3A4

3.4.4.2.1 การเตรียมหัวเชื้อของชุดควบคุมและชุดทดลอง เกลี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและคลอแรมฟีนิคอล บ่มที่ 37 °ซ 16-18 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อลงในอาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและคลอแรมฟีนิคอล บ่มบนเครื่องเขย่าที่ 37°ซ 200 รอบต่อนาที 12-14 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB 95 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและคลอแรมฟีนิคอล บ่มบนเครื่องเขย่าที่ 37°ซ ประมาณ 4 ชั่วโมง จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.6 แล้วเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครโมลาร์ บ่มต่อที่เครื่องเขย่าที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 4 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ปลอดเชื้อ ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 4°ซ 8000 รอบต่อนาที 10 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 4°ซ ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน (Carbon Free Mineral Medium, CFMM) (ภาคผนวก ก) 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม เก็บตะกอนเซลล์มาล้างซ้ำอีกครั้ง สุดท้ายละลายตะกอนด้วย CFMM ประมาณ 10 มิลลิลิตร (เจือจางจน OD_{550} เท่ากับ 10)

3.4.4.2.2 ทดสอบความสามารถในการย่อยซับสเตรต PAHs ชนิดต่างๆ โดยการนำหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.4.4.2.1 ทั้ง 2 ชุดการทดลองเติมลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบความสามารถในการย่อยได้แก่ อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแนพธาลีน (ภาคผนวก ข) จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มบนเครื่องเขย่าที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 20 ชั่วโมง

3.4.4.2.3 การสกัดสาร PAHs ออกจากอาหารเหลว เพื่อตรวจสอบซับสเตรตที่เหลือและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว ตามวิธีการของ Grifoll และคณะ (1992) เริ่มจากการนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาปรับค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.0-3.0 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 หยด จากนั้นเติมเอธิลอะซีเตต 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อ ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสมด้วยความเร็วสูง 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงให้แยกชั้น จากนั้นแยกส่วนเอธิลอะซีเตตชั้นบนเก็บไว้ สกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ด้วยเอธิลอะซีเตต 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีเดิม รวมส่วนเอธิลอะซีเตตที่ได้ เติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตเพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ จากนั้นแยกส่วนเอธิลอะซีเตตมาผ่านคอลัมน์แอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตเพื่อกำจัดน้ำอีกครั้ง แบ่งสารละลายที่กรองได้เป็น 2 ส่วนเท่ากัน เพื่อแยกวิเคราะห์สารประกอบ PAHs ด้วยเทคนิค TLC, GC-FID และ GC-MS จากนั้นนำทั้ง 2 ส่วนไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนจนสารแห้งเป็นผลึก

3.4.4.2.4 วิเคราะห์ซับสเตรตที่เหลือและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว

3.4.4.2.4.1 การวิเคราะห์ซับสเตรตที่เหลือ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว โดยเทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) นำส่วนที่ระเหยแห้งจากข้อ 3.4.4.2.3 ละลายด้วยเฮกเซน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารที่สกัดได้ทั้งหมดจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่าง 5-10 ไมโครลิตร จุดลงบนแผ่น TLC ขนาดกว้าง 8 × 8 ซม. โดยใช้ระบบตัวทำละลาย เป็นโทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซีติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาซับสเตรตที่เหลือและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร

3.4.4.2.4.2 การวิเคราะห์ซับสเตรตที่เหลือ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว โดยเทคนิค GC (Gas Chromatography) กรองสารละลายที่เจือจางจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากข้อ 3.4.4.2.4.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร ทำการวิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค Gas Chromatography โดยวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น 6890N (บริษัท Agilent Technologies, USA) คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วย เฟนิลเมทิลไซโลเซนเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID) วิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น 80 °ซ

อุณหภูมิขั้นที่ 1	25 °ซต่อนาที	จนอุณหภูมิ 160 °ซ	hold	3 นาที
อุณหภูมิขั้นที่ 2	3 °ซต่อนาที	จนอุณหภูมิ 220 °ซ	hold	2 นาที
อุณหภูมิขั้นที่ 3	40 °ซต่อนาที	จนอุณหภูมิ 300 °ซ	hold	7 นาที

โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราเร็ว 1.7 มิลลิลิตรต่อนาที

3.4.4.2.4.3 การวิเคราะห์ซับสเตรตที่เหลือ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว โดยเทคนิค GC-MS (Gas Chromatography - Mass spectrometry) นำส่วนที่ระเหยแห้งจากข้อ 3.4.4.2.3 ละลายด้วยเอธิลอะซีเตต 1 มิลลิลิตร ในการทดลองที่ใช้ซับสเตรตเป็นอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีน ส่วนซับสเตรตอีก 5 ชนิด ได้แก่ ฟีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนธีน ไพรีน และ แนพธาลีนละลายตะกอนด้วย ไทรเมธิวซิลิไทรฟลูออโรอะเซทาไมด์ (MSTFA) 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 70°ซ 20 นาที จากนั้นเจือจางสารที่สกัดได้ทั้งหมดจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร ทำการวิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค GC-MS โดยส่งวิเคราะห์ที่โครงการศูนย์วิจัยแห่งชาติด้านสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย โดยวิเคราะห์ด้วยชุดเครื่อง Gas Chromatography with Time of Fight Mass spectrometry ยี่ห้อ LECO รุ่น Pegasus III (บริษัทลีโก้อินสตูรเม้นต์ (ประเทศไทย) จำกัด) โดยใช้คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิลเมทิลไซโลเซนเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัดชนิด Mass spectrometry (MS) วิเคราะห์ภายใต้ภาวะดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น 80 °ซ

อุณหภูมิขั้นที่ 1	16 °ซต่อนาที	จนอุณหภูมิ 240 °ซ	hold	8 นาที

โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราเร็ว 2 มิลลิลิตรต่อนาที