บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany.
2. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
3. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA.
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland.
6. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
7. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
8. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น GenieII G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
9. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, Japan.
10. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Pico ของบริษัท Kendro, Germany.
11. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
    - หัวหมุนเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
    - หัวหมุนเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA22
12. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น WB 14 ของบริษัท Memmert, Germany.
13. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.
14. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA.
15. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.

16. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
17. กระดาษกรอง (filter paper) ของบริษัท Advantec, Japan.
18. ไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) ของบริษัท Amersham Biosciences, UK.
19. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.
20. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)
    - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan.
    - Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA.
21. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –70 ^{o}ซ รุ่น REVCO ULT 1786 ของบริษัท Forma Scientific , USA.
22. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –20 ^{o}ซ รุ่น MDF-U536D ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
23. เครื่อง Model 785 Vacuum Blotting ของบริษัท Bio- Rad, USA.
24. เครื่อง Hybridization oven ของบริษัท Thermo Electron, USA.

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
3. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUAI, Japan.
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E Merck, Germany.
5. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
7. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland.
8. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
9. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France.
10. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท E Merck, Germany.

11. น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของบริษัท E Merck, Germany.
12. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany.
13. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA.
14. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
15. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
16. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [($C_{16}H_{32}N(CH_3)_3$)Br] ของบริษัท TCI-EP, Japan.
17. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
18. เรสทริกชันเอนไซม์ทุกชนิดของบริษัท New England Biolab, UK.
19. 1 kb DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, UK.
20. 100 bp DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, UK.
21. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท New England Biolabs, UK.
22. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท New England Biolabs, UK.
23. ไลเกส (ligase) ของบริษัท New England Biolabs, UK.
24. อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ของบริษัท New England Biolabs, UK.
25. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA.
26. Proteinase K ของบริษัท Sigma, USA.
27. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) ของบริษัท Promega, USA.
28. IPTG (Isopropyl thio- β -D-galactoside) ของบริษัท Wako, Japan.
29. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.
30. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.
31. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของบริษัท Roche, Germany.
32. ชุดโคลนยีน BD GenomeWalker™ Universal Kit ของบริษัท BD Biosciences, USA.

<u>หมายเหตุ</u> สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย	จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
E. coli สายพันธุ์ DH5α	ϕ80d*lacZ*ΔM15, *endA*1, *recA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17, *relA*1, *supE*44, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*)U169	Hanahan, 1983
Rhizobium sp. สายพันธุ์ CU-A1	สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีน	ศรัลยา แพงไตร (2543)

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 พลาสมิด

พลาสมิด	จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
pGEM-T Easy	Ap^r, ∝lac/MCS	บริษัท Promega, USA
pBluescript KS(+/-)	Ap^r, ∝lac/MCS	บริษัท Stratagene, USA
pGEM-11Zf(+/-)	Ap^r, ∝lac/MCS	บริษัท Promega, USA
pGEM-7Zf(+/-)	Ap^r, ∝lac/MCS	บริษัท Promega, USA
pDE	Ap^r มีชิ้นส่วน *Eco*RI จากดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ขนาดประมาณ 5.9 kb ในพลาสมิด pBluescript KS(+/-)	ดวงกมล ธูปมงคล, 2546
pJ2	Ap^r มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ขนาดประมาณ 2.85 kb ในพลาสมิด pGEM-T Easy	สร้างในการทดลองนี้
pJ2.2	Ap^r มีชิ้นส่วน *Eco*RI จาก pJ2 ขนาดประมาณ 750 bp ในพลาสมิด pGEM-7Zf(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pJ2.3	Ap^r มีชิ้นส่วน *Bgl*II pJ2 ขนาดประมาณ 1.8 kb ในพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-)	สร้างในการทดลองนี้

ตารางที่ 3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (T_m)	เอกสารอ้างอิง
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (56^{o}ซ)	บริษัท Promega, USA
SP6	5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3' (50^{o}ซ)	บริษัท Promega, USA
JUB1	5'-TGCGCATCCAGACCGGTTCTGTCCACA-3' (86^{o}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
JUB2	5'-AGATGCGCATCTATTCGGAAGAAGCCT-3' (80^{o}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
AP1	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (64^{o}ซ)	บริษัท BD Biosciences, USA.
AP2	5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3' (60^{o}ซ)	บริษัท BD Biosciences, USA.
JANG-1	5'-CGCAGGCTCCTTATGGTG -3' (58^{o}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
JANG-2	5'-ATGCTTTCCAGATTCAC -3' (48^{o}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
JANG-4	5'-GAACCGAGGTCGTCCTG -3' (56^{o}ซ)	สร้างในการทดลองนี้

3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.1 เลี้ยง *Escherichia coli* ทุกสายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวก ก1) ในกรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวก ข2) ใช้ความเข้มข้น แอมพิซิลิน (Ap) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อต้องการทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 °ซ

3.5.2 เลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ในอาหารแข็ง เป็นเวลา 2-3 วัน หรือในอาหารเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

3.5.3 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *E. coli* ทุกสายพันธุ์ และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ นำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ในอัตราส่วน น้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3 : 7 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ –20 °ซ เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ –70 °ซ เป็นเวลา 1 ปี

3.6 เตรียมชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB*

3.6.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข14) ปริมาตร 576 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข5) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข23) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 100

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของโปรตีเนสเคใน 0.5% SDS) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข16) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข19) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย (ประมาณ 0.7-0.8 มิลลิลิตร) ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข18) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโปรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของไอโซโปรพานอลทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอใน บัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข24) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

3.6.1.1 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} ค่าที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260}x 50 x ค่าการเจือจาง

3.6.1.2 ตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Dra*I *Eco*RV *Pvu*II และ *Stu*I (BD Biosciences, USA) โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอ	1	ไมโครกรัม
10X บัฟเฟอร์	1/10	ของปริมาตรทั้งหมด
เรสทริกชันเอนไซม์	3-5	ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		ปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายตามต้องการ

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเบาๆด้วยเครื่องปั่นผสม 5-10 วินาที นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.6.1.3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ตามวิธีที่ระบุของชุดโคลนยีน BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD Biosciences, USA.) โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์มาสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตรเท่ากับปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอเริ่มต้นผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งสารละลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตรเท่ากับปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสด้านบนไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล โดยเติมโซเดียมอะซีเตทค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข22) ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ

สุดท้าย เติมไกลโคเจนความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเติมเอธานอลสัมบูรณ์ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 80% โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ระเหยเอธานอลให้แห้ง ละลายดีเอ็นเอกลับในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °ซ

3.6.2 ไลเกชัน (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อ (adaptor)

ไลเกทชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.6.1.3 เข้ากับชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อในชุดโคลนยีน BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD Biosciences, USA.) ด้วยไลเกส (ligase) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตรสุทธิ 4 ไมโครลิตร) ดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.6.1.3	2	ไมโครลิตร
ชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อ	0.95	ไมโครลิตร
10X ไลเกชันบัฟเฟอร์	0.8	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 หน่วยต่อไมโครลิตร	0.25	ไมโครลิตร

ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 16 °ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงจากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เติมบัฟเฟอร์ TE ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 40 ไมโครลิตร

3.6.3 ค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซม *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.6.3.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1

ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์โดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณปลาย 3' ของ *acnB* ให้ชื่อว่า JUB2 เพื่อใช้เป็น forward primer สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* ส่วน reverse primer ใช้ไพรเมอร์ AP1 จากชุดโคลน

ยีน BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD Biosciences, USA.) ใช้ส่วนผสมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ดังต่อไปนี้

- 10X BD Advantage 2 PCR buffer	5	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1X BD Advantage 2 PCR buffer)		
- สารละลาย JUB1 primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	1	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์)		
- สารละลาย AP2 primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	1	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์)		
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ของนิวคลีโอไทด์	1	ไมโครลิตร
แต่ละชนิด (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)		
- เอนไซม์ BD Advantage 2 polymerase Mix (50X)	1	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1X BD Advantage2 polymerase)		
ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.6.2	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	40	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

- 7 รอบ
  - อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 2 วินาที
  - อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 3 นาที
- 32 รอบ
  - อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 2 วินาที
  - อุณหภูมิ 69 °ซ เป็นเวลา 3 นาที

รอบสุดท้าย

- อุณหภูมิ 67 °ซ เป็นเวลา 4 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ซึ่งทำโดยเตรียม อะกาโรสเข้มข้น 1.0% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ 1XTAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายเอ็นเอกับสีติดตาม (ภาคผนวก ข20) ให้ความเข้มข้นของสีเป็น 1 เท่า หยอดดีเอ็นเอหรือหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder ลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ชุดทำอีเลคโทรโฟเรซิส Mupid-2 ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนเกือบสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข21) เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (Bio-Rad, USA.)

3.6.3.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 (Nested PCR)

ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์โดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณปลาย 3' ของ *acnB* ให้ชื่อว่า JUB1 ซึ่งไพรเมอร์ JUB1 นี้จะอยู่ถัดลงไปจากไพรเมอร์ JUB2 ไปทางปลายด้าน 3' ของยีน *acnB* ใช้ JUB1 เป็น forward primer สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* ส่วน reverse primer ใช้ไพรเมอร์ AP2 จากชุดโคลนยีน BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD Biosciences, USA.)

เจือจางผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 ประมาณ 50 เท่า โดยใช้น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จากนั้นนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 โดยสารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นตามที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังนี้

- 10X BD Advantage 2 PCR buffer	5 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 1X BD Advantage 2 PCR buffer)	
- สารละลาย JUB2 primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	1 ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์)	

- สารละลาย AP1 primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- เอนไซม์ BD Advantage 2 polymerase Mix (50X) (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X BD Advantage2 polymerase)	1	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.6.3.1 ที่ถูกเจือจางแล้ว	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	40	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

- 5 รอบ
  - อุณหภูมิ 94 ^{o}ซ เป็นเวลา 2 วินาที
  - อุณหภูมิ 70 ^{o}ซ เป็นเวลา 3 นาที
- 20 รอบ
  - อุณหภูมิ 94 ^{o}ซ เป็นเวลา 2 วินาที
  - อุณหภูมิ 60 ^{o}ซ เป็นเวลา 3 นาที

รอบสุดท้าย

- อุณหภูมิ 67 ^{o}ซ เป็นเวลา 4 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.3.1

3.7 โคลนชิ้นดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB*

3.7.1 สกัดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน

สกัดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ด้วยชุดสกัดพลาสมิดออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยตัดชิ้นอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจล (น้ำหนักอะกาโรสเจล 100 มิลลิกรัม มีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายจนหมด นำส่วนสารละลายสีเหลืองใส่ลงใน QIAquick spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนที่จะหมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ –20 ^{o}ซ

3.7.2 ไลเกชัน (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์

ไลเกทชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.7.1 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วยไลเกส (Promega, USA.) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.7.1 ประมาณ 50 นาโนกรัม	3 ไมโครลิตร
พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easyประมาณ 54 นาโนกรัม	1 ไมโครลิตร
2X ไลเกชันบัฟเฟอร์	5 ไมโครลิตร
T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 หน่วยต่อไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร

ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (อัตราส่วนระหว่างชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกและพลาสมิดเวกเตอร์สามารถแปรผันได้ตามความเหมาะสมของปริมาณดีเอ็นเอ)

3.7.3 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.7.2 เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5α และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ชิ้นส่วนที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* สอดแทรกอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

3.7.3.1 เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell)

เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ทำด้วยวิธี Calcium chloride (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* DH5α ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (ภาคผนวก ก3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 700 ไมโครลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน arm flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ จนกระทั่ง OD_{600} มีค่าเท่ากับ 0.3-0.5

เตรียมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ (เตรียมก่อนใช้และทุกขั้นตอนทำในอ่างน้ำแข็ง) โดยผสมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย $CaCl_2$ ที่ปลอดเชื้อและเย็นความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งให้ได้อุณหภูมิ 4 °ซ จากนั้นเติมสารละลาย $MgSO_4$ ที่ปลอดเชื้อและเย็นความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งจนกว่าจะใช้

เมื่อเซลล์เจริญจนถึงค่า OD_{600} ที่ต้องการ ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อปริมาตร 35 มิลลิลิตร ที่เย็นจำนวน 2 หลอด จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็วในการหมุนเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4 °ซ ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ที่เย็นปริมาตร 10.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอด กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ (ห้ามใช้

เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตกตะกอนเซลล์และสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30-45 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ที่เย็นปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์อีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 45 นาที หรือมากกว่า แล้วเติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อปริมาตร 875 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตรประมาณหลอดละ 100-300ไมโครลิตร เก็บคอมพีเทนต์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70 °ซ

3.7.3.2 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.7.2 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ดังนี้ นำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °ซ มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกทไว้จากข้อ 3.7.2 ทั้งหมดลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที โดย heat shock ที่อุณหภูมิ 42 °ซ เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว 2YT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

3.7.3.3 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

คัดเลือกโคโลนีของ *E. coli* DH5α ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีนที่ต้องการสอดแทรกอยู่ด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E. coli* DH5α ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วจากข้อ 3.7.3.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ซึ่งผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเกลี่ยบนผิวอาหารด้วย X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) (ภาคผนวก ข25) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside)

(ภาคผนวก ข26) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้าย 1 โมลาร์ ไว้แล้ว หลังจากเกลี่ยเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลาข้ามคืน

คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยคัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสกัด QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany.) (ภาคผนวก ข3) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* DH5α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครฟิวจ์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แขวนลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนที่จะหมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรองตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ –20 °ซ

เพื่อยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการอยู่จริง ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ JUB2 และ AP1 โดยใช้ส่วนผสม เป็นดังนี้

- 10X *Taq* DNA polymerase buffer 5 ไมโครลิตร

(ความเข้มข้นสุดท้าย 1X *Taq* DNA polymerase buffer)

- สารละลาย JUB2 primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	2.5 ไมโครลิตร
- สารละลาย AP1 primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	2.5 ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X *Taq* DNA polymerase)	0.5 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	37.5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 95 °ซ	เป็นเวลา 3 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 °ซ	เป็นเวลา 1 นาที	30 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 60 °ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา 3 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา 4 นาที	

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.3.1

3.8 ยืนยันความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน และระบุตำแหน่งการตัดเรสทริกชันเอนไซม์ต่าง ๆบนพลาสมิด pJ2

เพื่อยืนยันว่าชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pJ2 เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต่อจาก *acnB* จริง ทำการไฮบริไดเซชันพลาสมิด pJ2 โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม J2 ที่เตรียมได้จากชิ้นดีเอ็นเอของ pDE (ดวงกมล ธูปมงคล, 2546) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI และ *Hin*dIII

I23475043

โดยสกัด พลาสมิด pDE ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข3) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3.3 ตัดพลาสมิด pDE ประมาณ 10 ไมโครกรัม ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI และ *Hind*III (New England Biolab, UK.) อย่างสมบูรณ์ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังแสดงในข้อ 3.6.1.2 จากนั้นแยกพลาสมิดที่ตัดไว้ด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ด้วยอะกาโรสเข้มข้น 0.8% จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ชุด Mini Sub-Cell GT ใช้ความต่างศักย์ 75 โวลต์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.6.3.2

แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 486 เบส ออกจากอะกาโรสเจลด้วย ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัท (Qiagen, Germany.) ที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.1 ติดฉลากดีเอ็นเอติดตาม J2 โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข11) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้ ปริมาตร 16 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอ แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย DIG High Prime (หลอดหมายเลข 1) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมเบาๆให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำอุ่น 65 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอติดตามไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ

หาปริมาณดีเอ็นเอติดตาม J2 ที่ถูกติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) ด้วยการเจือจางดีเอ็นเอติดตามใน DNA dilution buffer (หลอดหมายเลข 3) ตามตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้ว

หลอดที่เจือจาง	ปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ ต่อ DNA dilution buffer (μl)
1. 1 : 100	1/99
2. หลอดที่ 1 เจือจาง 1 : 3.3	15/35
3. หลอดที่ 1 เจือจาง 1 : 10	5/45
4. หลอดที่ 2 เจือจาง 1 : 10	5/45
5. หลอดที่ 3 เจือจาง 1 : 10	5/45

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วหลอด 1-5 อย่างละ 1 ไมโครลิตร หยดลงบนไนลอนเมมเบรนที่ตัดไว้เป็นแถบยาวเล็กๆ (strip) ทำควบคู่กับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยการเจือจางแบบเดียวกับวิธีการข้างต้นแล้วหยดลงบนไนลอนเมมเบรนอีกแผ่นหนึ่ง ทิ้งไว้ให้แห้ง ตรึงดีเอ็นเอให้เกาะติดบนเมมเบรนด้วยการวาง เมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร แล้วนำไปจุ่มในสารละลายแต่ละชนิดตามลำดับขั้นตอนดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ขั้นตอนการหาปริมาณดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลาก

หลอดที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	Blocking solution	2
2	Antibody solution (1 : 5,000 ใน Blocking solution)	3
1	Blocking solution	1
3	Maleic acid buffer	1
4	Detection buffer	1
5	Color-substrate solution	5-30

บ่มแถบทดสอบดีเอ็นเอในหลอดที่ 5 ในที่มืดจนเกิดจุดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์สีม่วงน้ำเงิน เมื่อจุดสีบนแถบทดสอบขึ้นจนชัดเจนทุกจุดแล้วให้ล้างแถบทดสอบด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง เทียบสีที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยที่ดีเอ็นเอมาตรฐานมีความเข้มข้นดังนี้ 50, 15, 5, 1.5, 0.5 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

3.8.1 เตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสำหรับการไฮบริไดซ์

3.8.1.1 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3.3

3.8.1.2 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ตามวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 3.6.1.1

3.8.1.3 ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

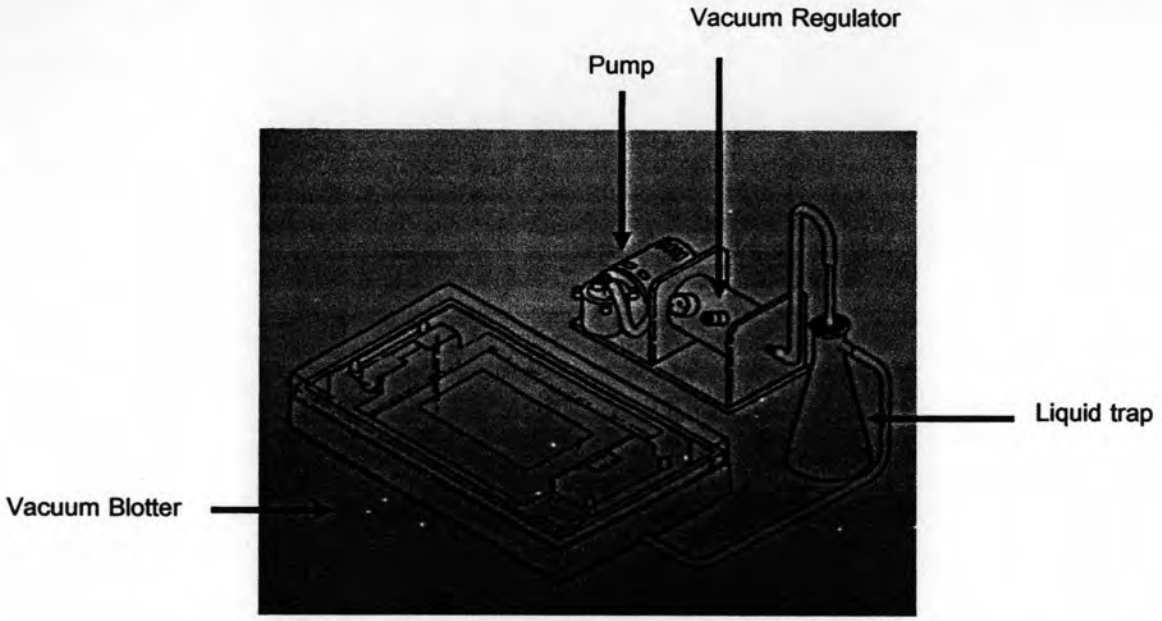
ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ประมาณ 10 ไมโครกรัม ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ (Promega, USA) อย่างสมบูรณ์ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังแสดงในข้อ 3.6.1.2 จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้ด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

3.8.1.4 ย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน (Southern blot)

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ตัดแล้วจากข้อ 3.8.1.3 มาทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder ใช้พลาสมิด pDE ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoR*I เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และใช้พลาสมิด pGEM-T Easy ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Nco*I เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) จากนั้นย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วถ่ายภาพเก็บไว้โดยใช้ไม้บรรทัดแนบด้านข้างอะกาโรสเจลเพื่อระบุระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ

การถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนใช้เครื่อง Vacuum Blotter ตามวิธีที่ระบุในบริษัทผู้ผลิต (Bio-Rad, USA.) โดยติดตั้งเครื่อง Vacuum Blotter กับ liquid Trap Vacuum Regulator และ pump ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ขั้นแรกตัดไนลอนเมมเบรนให้มีขนาดเท่ากับอะกาโรสเจลจำนวน 1 แผ่น จากนั้นนำมาทำให้อิ่มตัวด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อแล้ววางลงบนแผ่น Porous vacuum วางแผ่นพลาสติกใสที่เจาะช่องขนาดเท่ากับอะกาโรสเจลไว้บนไนลอนเมมเบรน ตามด้วย Window gasket อะกาโรสเจล และ Sealing frame ตามลำดับ เปิดปั๊มพ์สุญญากาศให้มีแรงดูดเท่ากับ 5 นิ้วต่อมิลลิเมตรปรอท การถ่ายดีเอ็นเอไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนเริ่มจาก เทสารละลาย 0.25 N HCl ลงบนแผ่นเจลเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เติม denaturation buffer (ภาคผนวก ข6) เป็นเวลา 30

นาที เติม Neutralization buffer (ภาคผนวก ข7) เป็นเวลา 10 นาที และเติม 20X SSC (ภาคผนวก ข8) เป็นเวลา 60 นาที ตามลำดับ แต่ละขั้นตอนจะต้องล้างด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อทุกครั้ง



รูปที่ 3.1 วิธีติดตั้งเครื่องในการทำ Vacuum Blot ประกอบด้วย Vacuum Blotter, Liquid trap, Vacuum Regulator และ Pump (Bio-Rad, USA.)

ภายหลังจากการถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน ปิดปั๊มพ์สุญญากาศ จากนั้นทำเครื่องหมายช่องวิ่งบนเจลลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนโดยใช้ปากกาลูกลื่น นำเจลออก แล้วใช้กรรไกรที่สะอาดตัดที่มุมด้านหนึ่ง เพื่อเป็นการระบุด้านของไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเออยู่ นำไนลอนเมมเบรนมาซับให้แห้ง และตรึงดีเอ็นเอให้ติดบนไนลอนเมมเบรนด้วยการนำไนลอนเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 3 นาทีเก็บไนลอนเมมเบรนไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

3.8.2 ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยดีเอ็นเอติดตาม J2

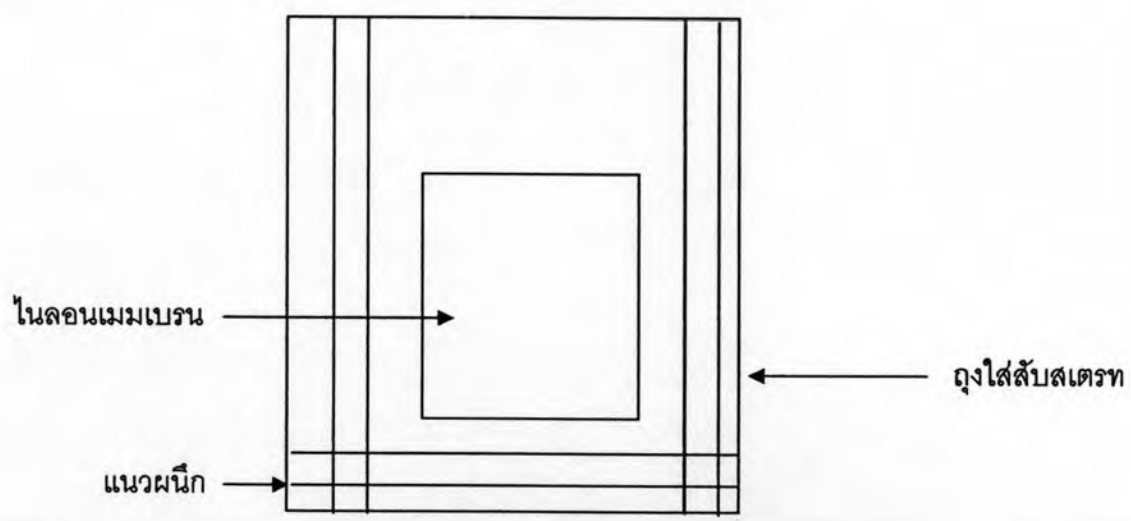
ทำพรีไฮบริไดเซชัน (prehybridization) โดยนำไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอมาใส่หลอดสำหรับไฮบริไดเซชัน เติมสารละลาย DIG Easy Hyb (ภาคผนวก ข11) ซึ่งอุ่นไว้ที่อุณหภูมิที่จะทำไฮบริไดเซชัน (อุณหภูมิ 42 ^{o}ซ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อ 100 ตารางเซนติเมตร นำไปบ่มที่ Hybridization oven ที่อุณหภูมิ 42 ^{o}ซ เป็นเวลา 30 นาที

เตรียมสารละลายดีเอ็นเอติดตาม สำหรับการไฮบริไดซ์ โดยเติมดีเอ็นเอติดตาม J2 ในสารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร (ให้มีความเข้มข้น 5-25 นาโนกรัมต่อสารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ที่บรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว (falcon tube) จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดเบาๆ แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อดีเนเจอร์สายดีเอ็นเอติดตาม ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิไฮบริไดซ์

เมื่อทำพรีไฮบริไดเซชันเสร็จแล้ว เทสารละลาย DIG Easy Hyb ทิ้ง เติมสารละลายดีเอ็นเอติดตาม J2 ที่เตรียมไว้ข้างต้นลงไป ไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 ^{o}ซ ด้วยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) สารละลายดีเอ็นเอติดตามที่ใช้แล้วกลับนำมาใช้ได้อีกหลายครั้งด้วยการเก็บรักษาในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่อุณหภูมิ –20 ^{o}ซ เมื่อนำมาใช้ในครั้งต่อไปให้เติมดีเอ็นเอติดตามเพิ่มอีก 2-3 ไมโครลิตร และก่อนใช้ต้องดีเนเจอร์ดีเอ็นเอติดตามที่อุณหภูมิ 68 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที (ระวังอย่าต้มจนเดือดเพราะสารละลาย DIG Easy Hyb จะเสียสภาพ)

เมื่อเสร็จสิ้นไฮบริไดเซชันแล้ว นำไนลอนเมมเบรนที่ได้มาล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออก ด้วยสารละลาย 2XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข9) ปริมาตร 30-50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมกับการเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นล้างอีก 2 ครั้งด้วย 0.5XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข10) ที่อุณหภูมิ 68 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ตรวจหาตำแหน่งดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไฮบริไดซ์ได้กับดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Enzyme immunoassay โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข11) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง) เริ่มจากนำไนลอนเมมเบรนที่ล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออกแล้วมาล้างด้วย maleic acid buffer (ภาคผนวก ข11) ในกล่องพลาสติกโดยใช้ปริมาตรท่วมไนลอนเมมเบรน เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเติม blocking

solution (ภาคผนวก ข11) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วเติม antibody solution (Anti-DIG-AP conjugate) ที่เตรียมโดยการเจือจาง Anti-DIG-AP conjugate (ภาคผนวก ข11) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใน blocking solution ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว) (เจือจาง 1 : 5,000) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วล้าง Anti-DIG-AP conjugate ส่วนเกินออกด้วย maleic acid buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เติม detection buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเตรียมสับสเตรท NBT/BCIP (ภาคผนวก ข11) โดยเจือจางสารละลายในหลอดที่ 5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใน detection buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่หุ้มให้มืด) ย้ายไนลอนเมมเบรนมาใส่ในถุงพลาสติกแล้วติดผนึกด้านข้าง จากนั้นเทสับสเตรทที่เตรียมไว้ลงในถุงไล่ฟองอากาศออกแล้วผนึกปิดถุง นำไปบ่มในที่มืด (ห้ามเขย่า) ตั้งทิ้งไว้จนกว่าจะเกิดแถบสีชัดเจน (ประมาณ 1 ชั่วโมง – 16 ชั่วโมง) เมื่อเสร็จสิ้นการบ่มกับสับสเตรทแล้วนำ เมมเบรนออกจากถุงพลาสติกมาล้างในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที ซับและตากให้แห้งจึงเก็บใส่ถุง



รูปที่ 3.2 ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับบ่มกับสับสเตรท

3.9 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ถัดลงมาจาก *acnB* จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

เมื่อคัดเลือกโคลนที่ต้องการได้แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่อยู่ถัด *acnB* ลงมา ซึ่งอยู่บนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบางส่วนที่อยู่ด้านปลาย 3' ของพลาสมิด pDE ที่ทราบข้อมูลแล้วก่อนหน้านี้ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบางส่วนได้มาจาก primer walking บางส่วนได้มาจากการสับโคลนและใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท 1st Base (มาเลเซีย) และสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์โดยหน่วยบริการชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) เมื่อได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกครบถ้วนแล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาแผนที่การตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์โดยละเอียด รวมทั้งหากรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ในการถอดรหัสของยีนเป็นเอนไซม์ที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยใช้การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และรวมไปถึงการหาความเหมือนและบริเวณที่คาดว่าจะเป็นกรอบอ่านรหัสเปิดโดยเทียบกับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.6