บทที่ 3
วัสดุและวิธีการ

1. การคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อนำมาศึกษา

นำ *P. pseudomallei* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ระหว่างปี พศ.2528-2532 และเชื้อ *P. pseudomallei* NCTC 4845 และ NCTC 4731 ดังตารางที่ 1 มาทดสอบหา hemolytic activity โดยวิธี cellophane plate technique (20) โดยเลี้ยง transformants 1 โคโลนี ใน tryptone-glucose broth ปริมาตร 5 มล. ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อ 60 µL ไป spread บน tryptone-glucose agar ซึ่งมีแผ่น cellophane (Flexel) ปิดอยู่ด้านบน incubate ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นล้างเชื้อที่เจริญอยู่ด้านบนแผ่น cellophane ด้วย 0.85% NaCl 3 มล. ปั่นตกตะกอนเชื้อด้วยความเร็ว 4000xg 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสไปทดสอบหา hemolysin activity โดยเจือจางส่วนน้ำใสแบบ two-fold dilution ด้วย 0.85% NaCl ไปเรื่อย ๆ ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 0.5 มล. เติม 0.5 มล. ของ 1% human group O red blood cell ที่ปั่นล้าง 3 ครั้งหลังนำไป incubate ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 2 ชม. แล้วจึงนำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 6000xg เป็นเวลา 15 นาที แล้วอ่านผล complete hemolysis คือมองไม่เห็นเม็ดเลือดแดงตกตะกอนคำนวนหา hemolysin unit คือ ปริมาณ hemolysin ในหลอด dilution สูงสุดที่สลายเม็ดเลือดแดงสมบูรณ์ (100% hemolysis) ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 2 ชม. แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ hemolytic activity สูงสุดมาเป็นเชื้อต้นแบบในการศึกษา hemolysin

2. การโคลนยีนจากโครโมโซม (genomic DNA cloning) ของ *P. Pseudomallei*

2.1 การสกัด chromosomal DNA ของเชื้อ *P. pseudomallei* โดย large-scale preparation method using Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) (47)

เลี้ยงเชื้อ *P. pseudomallei* ใน Luria-Bertani broth (LB broth) จำนวน 100 มล.ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. ใน shaking incubator (Memmort type 80, Germany) โดยเขย่าด้วยความเร็ว 700xg ปั่นตกตะกอนเชื้อด้วยความเร็ว 4000xg 10 นาที นำตะกอนเชื้อที่ได้มาละลายด้วย 9.5 มล. Tris-EDTA buffer (10mM Tris.HCl(pH7.6),1mM EDTA pH8.0) (TE) เติม Lysis buffer (10% SDS,20 mg/ml protinase K 50 µL) นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เมื่อครบ 1 ชม.เติม 5M NaCl 1.8 มล. และ

ตารางที่ 1 แสดงแหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas pseudomallei*

หมายเลข	รหัส	แหล่งที่มา	สถานที่และปีที่ตรวจเชื้อได้
1	C1/85	human,blood	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, 2528
2	C1/86	human,blood	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, 2529
3	C2/30	ไม่มีข้อมูล	
4	C2188	human,blood	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, 2531
5	C3/87	ไม่มีข้อมูล	
6	C3/88	human,blood	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, 2531
7	C4/86	human,pus	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, 2529
8	C4/88	synovialfluid	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, 2531
9	C6/88	human,blood	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, 2531
10	E1/88	human,pus	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, 2531
11	K1/88	human,pus	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, 2531
12	S2/87	ไม่มีข้อมูล	
13	S6/87	human,sputum	โรงพยาบาลสงขลานครินทร์,2530
14	NCTC 4731	human	-
15	NCTC 4845	monkey	-

และ CTAB/NaCl (10% Cetyltrimethyl ammonium bromide , 0.7 M NaCl) แล้วนำไปแช่ที่ 65°ซ เป็นเวลา 2 ชม. จากนั้นทำการสกัดแยกด้วย phenol 1 ครั้ง และสกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) อีก 2 ครั้ง ตกตะกอน chromosomal DNA ด้วย isopropanol ล้างตะกอน chromosomal DNA ด้วย 70% alcohol 1 ครั้ง จากนั้นนำตะกอน chromosomal DNA ที่ได้ไปทำให้แห้งในตู้สุญญากาศ ละลาย chromosomal DNA ด้วย TE buffer 4 มล. นำสารละลายไปหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์โดยวัดค่า optical density (O.D.) ที่ 260 nm และ 280 nm คำนวนหาความเข้มข้นโดยเทียบจากสารละลายที่มีค่า O.D. 260 = 1 มีค่าความเข้มข้นของ DNA =50 µg/ml ความบริสุทธิ์ของ DNA พิจารณาจากอัตราส่วนของ O.D. 260 ต่อ OD 280 จะต้องมีค่าระหว่าง 1.6-1.8 (55)

2.2 <u>การตัด chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei*</u>

ใช้ restriction endonuclease เช่น EcoRI,BamHI,SalI,KpnI ตัด chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* แบบ partial digestion โดย restriction endonuclease เหล่านี้มีจุดที่ตัดอยู่ใน polylinker ของ pUC18 การตัดทำในปริมาตรปฏิกิริยาทั้งหมด 400 mL มี DNA 20 µg ใส่เอนไซม์ด้วยสัดส่วน 1 µg DNA/unit incubate ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 5 นาที หลังหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อน 75 °ซ 15 นาที แล้วจึงนำไปสกัดด้วย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) 1 ครั้ง ตกตะกอนด้วย absolute ethanol ปริมาตร 3 เท่า ล้างตะกอนด้วย 70% alcohol ทำให้แห้งแล้วละลายด้วย TE buffer 60 µL จะได้ chromosomal DNA fragments มีความเข้มข้น 0.33 µg/ml

2.3 <u>การตัด pUC18 DNA</u>

2.3.1 <u>การตัด pUC18 แบบ complete digestion</u>

นำ pUC18 DNA ที่แยกให้บริสุทธิ์ด้วย cesium chloride-ethidium bromide gradients ซึ่งมีการแยกเตรียมไว้แล้วในห้องปฏิบัติการ มาตัดด้วย PstI โดยใช้ปริมาณ DNA ต่อเอ็นไซม์เท่ากับ 1 µg/unit ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชม ใช้ DNA 20 ug ในปริมาตรปฏิกิริยาทั้งหมด 400 µL หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อน 75 °ซ เป็นเวลา 15 นาที สกัดด้วย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) 1 ครั้ง นำไปตกตะกอน plasmid DNA ด้วย absolute ethanol ปริมาตร 3 เท่า ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% alcohol ทำให้แห้งแล้วละลายตะกอน plasmid DNA ด้วย TE buffer 5 µL

2.3.2 การ dephosphorylate pUC18 DNA

ผสม pUC18 ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.1 จำนวน 5 µL กับ 10xCIP buffer (Calf intestinal alkaline phosphatase bufferx10, 0.5 M Tris.HCl pH9.0, 10 mM $MgCl_2$, 1mM $ZnCl_2$, 10mM spermidine) เติม Alkaline phosphatase จาก unweaned Calf intestinal mucosa (CIP) จำนวน 2 unit ปรับปริมาตรให้เป็น 50 µL ด้วย sterile distilled water จากนั้นนำไป incubate ที่ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 10 µL STE (100 mM Tris HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 10 mM EDTA) แล้วไป incubate ต่อที่อุณหภูมิ 68°ซ เป็นเวลา 15 นาที ทำการสกัดเอนไซม์ออกด้วย phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) จากนั้นทำให้แห้งและละลายด้วย TE buffer หาความเข้มข้นของ DNA โดยเปรียบเทียบการเรืองแสงเมื่อย้อมด้วย ethidium bromide กับ DNA มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (λ /HindIII) หลังการทำ agarose gel electrophoresis

2.4 การ transform recombinant plasmids เข้าสู่ *E. coli*

2.4.1 การเตรียม recombinant DNA

นำชิ้น DNA ที่ได้จากการตัด chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* ด้วย PstI และ dephosphorylated pUC18 ที่ตัดด้วย PstI 20 ng/ml และ 50 ng/ml ตามลำดับมาเชื่อมต่อกันโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase 4 unit T4 Ligation buffer 16 µL โดยใช้ปริมาตรรวมเป็น 80 µL นำไป incubate ที่ 12°ซ เป็นเวลา 16 ชม. หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M EDTA 2 µL สกัดเอาเอนไซม์ออกด้วย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) แล้วตกตะกอนด้วย absolute ethanol ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% alcohol 1 ครั้ง จากนั้นทำให้แห้งแล้วละลายด้วย TE buffer 20 µL

2.4.2 การเตรียม Competant cells (47)

เลี้ยง *E. coli* JM109 [*rec A1 sup E 44 end A1 hsd R17 gyr A96 rel A1 thi* (*lac-pro AB*)] ใน LB broth 50 มล. ที่อุณหภูมิ 37 °ซ จนได้ค่า O.D. 590 เป็น 0.3-0.4 แบ่งเซลทั้งหมดแยกเป็นหลอด หลอดละ 25 มล. แช่ในน้ำแข็ง 10 min แล้วปั่นแยกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 1600xg เป็นเวลา 7 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ ละลายเซลล์ใน ice-cold $CaCl_2$ Solution (60mM $CaCl_2$,15% glycerol, 10 mM piperazine-N,N´bis [2-ethanesulfonic acid] (PIPES) 10 มล. จากนั้นนำไปปั่นเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 1100xg เป็นเวลา 5 นาที และละลายเซลที่ได้ด้วย ice-cold $CaCl_2$ 2 มล. เก็บไว้ใช้ในการทำ transformation โดยแบ่งใส่หลอด eppendorf หลอดละ 100 µL เก็บที่อุณหภูมิ -70 °ซ

2.4.3 การนำ plasmid เข้าสู่ *E. coli* JM 109 (Transformation)

นำเอา Ligation mixture จากข้อ 2.4.1 จำนวน 10 µL มาผสมกับ Competent cell ซึ่งได้จาก 2.4.2 จำนวน 100 µl แล้วแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที Heat shock ด้วยอุณหภูมิ 42 °ซ เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเติม LB broth 0.5 มล. incubateใน waterbath ที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชม. แล้วจึงนำ suspension 0.1 mL ไปเพาะบน LB agar ซึ่งมี ampicillin 50 µg/mL และ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 0.1 mg/ml คัดเลือก transformants ที่มีเป็นโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. การคัดเลือก *E. coli* transformants ที่มี hemolysin activity

นำ transformants ที่คัดเลือกจากข้อ 2.4.3 มาทดสอบหา hemolytic activity โดยวิธี cellophane plate technique ของ Liu และคณะ (20) เช่นเดียวกับในหัวข้อที่ 1

4. การพิสูจน์ว่า hemolysin-expressing *E. coli* มี *P. pseudomallei* DNA inserts

4.1 หาขนาดของ DNA inserts จาก recombinant plasmids

4.1.1 การสกัด recombinant plasmids จาก hemolysin-expressing E.coli โดยวิธี alkaline lysis (47)

เลี้ยง transformants ที่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงใน ปริมาตร 5 มล. LB broth ซึ่งมี ampicillin ผสมอยู่ 50 µg/mL ที่อุณหภูมิ 37°ซ ใน shaking incubator (Memmert type 80,Germany) หลังจาก 24 ชม. โดยเขย่า 700 g ปั่นเก็บตะกอนเซลล์แล้วนำมาละลายใน glucose-TE buffer (0.025 M Tris-HCL, 0.01 M EDTA) จำนวน 100 µL จากนั้นเติม NaOH /SDS Solution (0.2 N NaOH,1%SDS) จำนวน 200 µL ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม 5 m Potassium acetate, pH 4.8 150 µL แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งต่อ 5 นาที ทำให้เซลล์แตกโดยเขย่าด้วย vortex ปั่นเก็บน้ำใสมาตกตะกอน recombinant plasmid ด้วย 0.9 มล. ของ absolute ethanol ล้างตะกอน 2 ครั้งด้วย 70% alcohol นำตะกอน recombinant plasmid ไปทำให้แห้งในตู้สูญญากาศ ละลาย recombinant ด้วย TE buffer 20 µL

4.1.2 เตรียม DNA inserts จาก recombinant plasmids

นำ recombinant plasmids มาตัดด้วยเอนไซม์ PstI แบบ complete digestion ใช้ DNA ต่อเอนไซม์ 1 µg/ unit ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชม. แล้วนำไปตรวจสอบหา inserted DNA fragments โดยแยกด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใช้ pUC18 ที่อยู่ในรูป linear form เป็นตัวเปรียบเทียบ

4.2 การทำ Southern blot hybridization

4.2.1 เตรียม DNA inserts จาก recombinant plasmids เช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 นำไปแยกด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

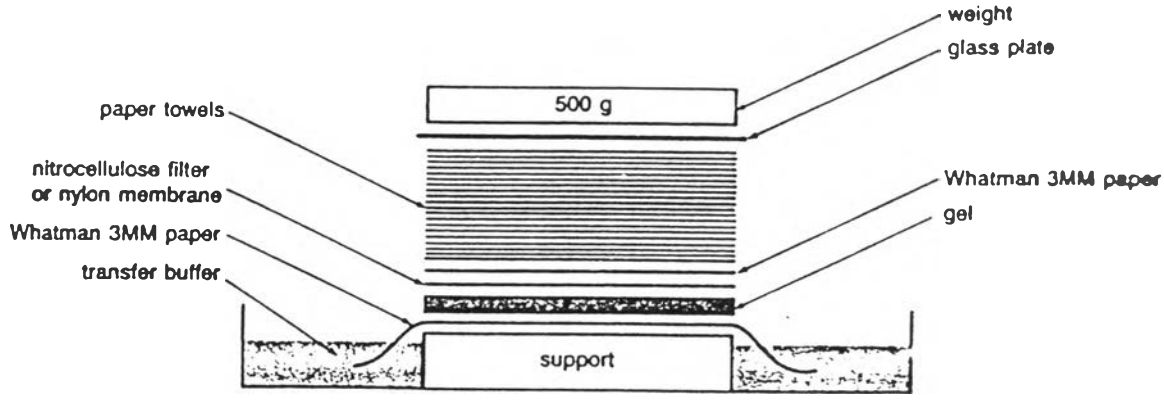
4.2.2 การทำ Southern blot transfer (47)

ตัด chromosomal DNA ด้วย PstI แบบ complete digestion แยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าใน 0.85% agarose gel เสร็จแล้วมาแช่ใน depurinate solution (0.25 M HCl) ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตร gel เป็นเวลา 20 นาที แล้วแช่ด้วย denature solution (1.5 M NaCl,0.5 M NaOH) สองเท่าของปริมาตร gel 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที และสุดท้ายด้วย neutralize solution (1.0 M Tris pH 7.5, 1.5 M NaOH) สองเท่าของปริมาตร gel เป็นเวลา 30 นาที

เตรียม Photo Gene™ Nylon membrane (BRL,U.S.A.,cat No 8193SA) โดยนำไปแช่ด้วย 10xssc (1.5 M NaCl,0.15 M Na3 citrate pH 7.0) 5 นาที นำมาวางดังรูปที่ 1 เริ่มจากวางแผ่น wick ที่ชุ่มด้วย 10xssc แล้วค่อย gel ลงบน wick โดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศ นำ nylon membrane วางทับบน gel จากนั้นจึงวางกระดาษ whatman 3 MM และ paper towel ตามลำดับ โดยให้ paper towel มีความหนา 10 ซม. ทิ้งไว้ข้ามคืน เมื่อครบเวลาแช่ nylon membrane ด้วย 5xssc (0.75 NaCl, 0.075 M Na3 citrate pH 7.0) เป็นเวลา 5 นาที นำไปอบในตู้สูญญากาศ อุณหภูมิ 80°ซ เป็นเวลา 2 ชม.

4.2.3 การ Elute DNA ออกจาก agarose gel โดยวิธีของ Jingdong และคณะ (48)

ทับ Durapore membrane disc filter เป็นรูปกรวย โดยทำให้เปียกหมาด ๆ ด้วย 200 µL ของ elution buffer (0.1%SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) ใส่ลงในหลอด eppendorf ที่ก้นเจาะรู แล้วนำมาซ้อนบนหลอดที่ไม่เจาะรูให้แน่น จากนั้นตัด agarose gel ตรงที่มีแถบของ inserted DNA fragment ที่ต้องการออกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปวางบน membrane ที่เป็นรูปกรวย ปั่นแยก DNA ด้วยความเร็วสูง 15000xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายที่อยู่ในหลอดล่าง มาทำ phenol extraction 1 ครั้ง เติม 5 M NaCl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 M NaCl จากนั้นตกตะกอน DNA ด้วย absolute ethanol แล้วละลายด้วย TE buffer นำ inserted DNA fragments ที่ได้ไปหาค่าความเข้มข้น โดยเปรียบเทียบการเรืองแสงเมื่อย้อมด้วย ethidium bromide หลังแยกด้วย agarose gel electrophoresis ด้วยกระแสไฟฟ้าเทียบกับ λ HindIII-cut DNA ที่รู้ความเข้มข้นเป็น DNA มาตรฐาน



รูปที่ 1 แสดง Southern blot transfer

018796

4.2.4 การติดฉลาก DNA ด้วยสารรังสีโดย Random Primer DNA Labelling System

ละลาย inserted DNA fragment จำนวน 25 ng ใน distilled water 5-20 µL นำไป denature ด้วยความร้อน 100 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วแช่ในน้ำแข็งทันที ใส่ส่วนผสมของ dATP,dGTP,dTTP อย่างละ 2 mL จาก stock ที่มีค่าความเข้มข้น 0.5 mM ลงใน random primer buffer 15 µL(0.67 M HEPES,0.17 M Tris-HCL,17 mM $MgCl_2$,33 mM 2-mercaptoethanol,1.33 mg/mL BSA, 18 OD 260 Units/mL,oligodeoxyribonucleotide primer hexamer fraction pH 6.8) และ [α-^{32}P]dCTP 5 µL (10 mCi/mL) เติม distilled water จนได้ปริมาตรของส่วนผสมเท่ากับ 49 µL จากนั้นเติม Klenow fragment 1 µL (30 units/mL) นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 1 ชม. เมื่อครบเวลาแบ่งสารละลายมาอย่างละ 2 µLเพื่อไปหาค่า total radioactivity และ incorporated radioactivity โดยวิธี trichloroacetic acid precipitation (ภาคผนวก ค) เมื่อได้ค่า incorporated radioactivity ที่ต้องการแล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติม stop buffer 5 µL (0.2 M Na_2EDTA,pH7.5) กำจัด free [α-^{32}P] dCTP ด้วย Gene Clean II kit (BIO 101, BRL, Inc, Cat NO 3106) หลังจากกำจัดแล้วเติม 50% Formamide ถ้ายังไม่ได้ใช้ทันทีเก็บไว้ที่ -70 °ซ

4.2.5 ไฮบริไดเซชั่นและการล้าง DNA ติดตาม (Hybridization and Washing)(55)

นำแผ่น nylon membrane ที่มี DNA ตรึงไว้มาใส่ใน prehybridization solution ด้วยอัตราส่วน 250 ml/Cm^2 แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 42 °ซ เป็นเวลา 2 ชม. จากนั้นให้เตรียม denatured DNA probe โดยนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ในน้ำแข็ง เมื่อครบเวลาให้ถ่ายสารละลาย prehybridization solution ออกจากถุงและเติม hybridization solution 100 mL/cm^2 ที่ผสมกับ DNA probe นำไป incubate ต่อที่อุณหภูมิ 42 °ซ ข้ามคืน เมื่อครบเวลานำ nylon membrane ไปล้างด้วย washing solution คือ 2xssc,0.1% SDS ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ครั้งละ 15 นาที 4 ครั้ง และตามด้วย 1xssc,0.1% SDS ที่อุณหภูมิ 55 °ซ ครั้งละ 30 นาที 2 ครั้ง วางแผ่น nylon membrane บนกระดาษกรอง เพื่อซับน้ำให้แห้ง ใส่ในถุงพลาสติกแล้วนำไปประกบฟิล์ม X-ray ที่ -70 °ซ จากนั้นนำแผ่นฟิล์มไปล้างด้วยน้ำยา developer และ fixer ตามลำดับ