บทที่ 2

เครื่องมือ วัสดุ-เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อเครื่องมือ	แบบ	บริษัท
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	PHM33 Autocal	Radiometer Denmark
เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated centrifuge)	J-21C	Backman Instrument inc, U.S.A.
เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงขนาดเล็ก (High speed microcentrifuge)	MC-15A	Tomy Seiko Japan
เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave)	HA-30	Memmert Gmbh Germany
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking water bath)	OIPF 623	News Brunswick Co, Inc. U.S.A.
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)	A466	Charlies Hearson & Co. Ltd., England

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเครื่องมือ	แบบ	บริษัท
เครื่องผสมสาร (vortex genic)	K-550G	Scientific Industries Inc., U.S.A.
เครื่องกำเนิดแสงอุลตร้าไวโอเล็ต (U.V. transilluminator)	2011 MAcrovue	San Gabrial, U.S.A.
ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette)	Pipetman P20 P100 และ P200	Gilson Medical
เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)	LC-3A	Shimadzu, Japan
เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)	Spectronic 20	MiltonRoy Company, U.S.A.

<u>วัสดุภัณฑ์</u>

ชื่อวัสดุ	แบบ	บริษัท
กระดาษกรอง	H.A. 0.45 μm	Millipore Corporation U.S.A.
ฟิลม์ถ่ายรูปขาวดำ	Kodax Tri-pan 400	Fastman Kodak company U.S.A.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>เคมีภัณฑ์</u>

ก.สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยเป็นเกรดสำหรับห้องปฏิบัติการ (Laboratory grade) ยกเว้น Acetonitrile, Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose, Maltohexaose, Maltoheptaose และ α, β, γ-CDs มาตรฐาน เป็นเกรด HPLC (HPLC grade)

ข. เอนไซม์

เรสทริกชันเอนไซม์ของบริษัท Biolabs U.S.A. และบริษัท Bethesda Research Laboratories (BRL) U.S.A.

T_4 DNA Ligase	บริษัท Biolabs U.S.A.
Lysozyme	บริษัท SERVA Feinbiochemica Gmbh&Co., Germany
α-amylase	บริษัท Sigma Chemical Company U.S.A.
β-amylase	บริษัท Sigma Chemical Company U.S.A

ค. ชุดการติดฉลากและการติดตามผล (DNA labelling and detection kit) ของบริษัท Boehringer Manuheim Gmbh Germany

<u>ดีเอ็นเอพาหะและดีเอ็นเอมาตรฐาน</u>

ดีเอ็นเอพาหะ pUC118 มีขนาด 3.2 กิโลเบส (Messing และคณะ, 1983) ดีเอ็นเอพาหะ pUC18 และ pUC19 (Maniatis และคณะ, 1982) ขนาด2.6 กิโลเบส มียีนต้านยาแอมพิซิลิน และยีน *lac Z'* ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็นชิ้นส่วนด้านปลายอะมิโนของเอนไซม์ β-galactosidase (ภาคผนวกที่ 1 และ 2)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน ใช้แลมป์ดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วย Hind III ได้ดีเอ็นเอ 8 ขนาดคือ 23.130 9.416 6.557 4.361 2.322 2.027 0.564 และ 0.125 กิโลเบส (Rodriguez และ Tait, 1983)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Escherichia coli สายพันธุ์ JM101 : *F′ tra D36 lac I^q Δ (lac Z) M15 pro AB/supE thi Δ (lac-pro AB)* (Messing และคณะ, 1981)

เครื่องแก้วและสารละลาย

เครื่องแก้วและสารละลายทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง เพื่อให้ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสต้องผ่านการอบที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การสกัดดีเอ็นเอพาหะ (ดัดแปลงจาก Maniatis และคณะ, 1982)

1. สกัดดีเอ็นเอพาหะปริมาณมาก

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีดีเอ็นเอพาหะในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB (Bacto tryptone 1%, yeast extract 0.5% และ NaCl 1%, pH7.4) 100 มิลลิลิตร ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 37 °ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4000 × g 10 นาที กระจายเซลล์ในสารละลาย Solution I (Tris-HCl 25 mM, Na_2EDTA 10 mM, กลูโคส 50 mM และ เอนไซม์ไลโซไซม์ 0.5%) จำนวน 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixter) นำไปแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที เติมสารละลาย Solution II (NaOH 200 mM และ SDS 1%) จำนวน 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆจนได้สารละลายใส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติมสารละลาย Solution III (NaoAc 3 mM pH 4.8) จำนวน 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆจนเกิดตะกอนอย่างสมบูรณ์ แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที

ปั่นแยกตะกอนออกที่ 4000 × g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมา สกัดโปรตีนออกโดยการเติมสารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม (1:1) 2 มิลลิลิตร ผสมโดยเครื่องผสม ปั่นที่ 4000 × g เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายชั้นบนมาสกัดโปรตีน

ออกอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำสารละลายชั้นบนมาสกัดฟีนอลออกโดยการเติมไดเอธิลอีเธอร์ 5 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งสารละลายแยกเป็น 2 ชั้นอย่างชัดเจน ปิเปตอีเธอร์ที่อยู่ชั้นบนทิ้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่ 37°ซ จนกระทั่งอีเธอร์ที่เหลือระเหยหมด เติมเอธานอลเย็น (-20°ซ) 95 % 2 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากัน เก็บที่ -20°ซ ข้ามคืน

ปั่นแยกตะกอนที่ 5000 × g 10 นาที ละลายตะกอนที่ได้ในบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 10 mM, Na_2EDTA 50 mM pH 8.0) ที่มีเอนไซม์ RNAse 0.1% จำนวน 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลาย NaOAc 3 M 100 ไมโครลิตร สกัดโปรตีนออกด้วยขั้นตอนที่กล่าวแล้วข้างต้น ตกตะกอนดีเอ็นเอพาหะที่ได้ด้วยเอธานอล 95 % เก็บที่ -20°ซ ข้ามคืน

ปั่นแยกตะกอนที่ 5000 × g 10 นาที เติมเอธานอลเย็น 70 % เพื่อล้างเกลือออก โดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาอย่างเบามือ ปั่นตกตะกอน แล้วละลายในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 200 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอพาหะที่ได้ที่ -20°ซ เมื่อต้องการเก็บระยะยาว และที่ 4°ซ เมื่อต้องการเก็บในระยะสั้น จะได้ดีเอ็นเอประมาณ 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

2. <u>การสกัดดีเอ็นเอพาหะปริมาณน้อย</u>

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 37°ซ ข้ามคืน ปั่นตกตะกอนเซลล์แล้วทำตามขั้นตอนของการสกัดปริมาณมาก โดยกระจายเซลล์ใน Solution I ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม Solution II ปริมาณ 400 ไมโครลิตร และเติม Solution III ปริมาณ 300 ไมโครลิตร หลังจากแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที ปั่นตกตะกอนแยกเอาส่วนน้ำใสมาสกัดโปรตีนออก และตกตะกอนดีเอ็นเอพาหะที่ได้ด้วยเอธานอลตามวิธีการสกัดดีเอ็นเอพาหะปริมาณมาก ละลายดีเอ็นเอพาหะที่ได้ด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บที่ -20°ซ หรือ 4°ซ ตามต้องการ จะได้ดีเอ็นเอประมาณ 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอพาหะ (ดัดแปลงจาก Aaij และ Borst,1972)

วิเคราะห์โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซีส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (ดีเอ็นเอของแลมป์ดาที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III อย่างสมบูรณ์) ใน submarine horizontal gel electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจล 0.7-1.0 % ในบัพเฟอร์ TBE (TrisHCl 89 mM, boric acid 89 mM และ Na_2EDTA 25 mM pH 8.3) กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เคลื่อนจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ภายใต้บัพเฟอร์ TBE จนกระทั่ง Tracking dye (glycerol 50 %, bromophenol blue 0.1% และ xylene cyanol FF 0.1%) ซึ่งใช้เป็นตัวติดตามเคลื่อนตัวถึงขอบล่างของเจล นำเจลขึ้นย้อมโดยแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรมาย 0.5% ประมาณ 10 นาที แล้วย้ายมาแช่ในน้ำกลั่นประมาณ 30 นาที ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV Transilluminator UVP วิเคราะห์ขนาดโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และวิเคราะห์ปริมาณโดยการเปรียบเทียบการเรืองแสงกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

การตัดดีเอ็นเอพาหะด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (ดัดแปลงจาก Fuchs และ Blakesley 1983)

เรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ จะมีสภาวะที่เหมาะสมในการตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์แตกต่างกัน ขึ้นกับองค์ประกอบที่สำคัญเช่น ความแรงของอิออนในบัพเฟอร์ อุณหภูมิเป็นต้น (ภาคผนวก 4) สำหรับในการตัดดีเอ็นเอพาหะปริมาณ 500 นาโนกรัม แต่ละครั้งใน reaction mixture จะประกอบด้วย บัพเฟอร์ที่เหมาะสมกับเรสทริกชันเอนไซม์ที่จะตัด (ความเข้มข้น 10 เท่า) จำนวน 2 ไมโครลิตร สารละลาย Bovine serum albumin 1 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตรจำนวน 2 ไมโครลิตร เรสทริกชันเอนไซม์ 5 หน่วย แล้วปรับปริมาตร ให้เป็น 20 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมข้ามคืน โดยส่วนมากมักจะบ่มที่ 37°ซ

การแยกชิ้นดีเอ็นเอพาหะออกจากเจล โดยใช้อะกาโรสที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ (Low melting)

หลังจากตัดดีเอ็นเอพาหะด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ นำมาแยกแถบดีเอ็นเอออก จากกันโดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซีสที่ 4°ซ โดยใช้อะกาโรสที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ 1.0% ภายหลังจากย้อมเจลโดยใช้เอธิเดียมโบรมาย และส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต จากนั้นเจาะชิ้นเจลเฉพาะตรงบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ลงใน Microfuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ 10 นาทีหรือจนกระทั่งเจลหลอมหมด เติมบัฟเฟอร์ TE ปริมาตรเท่ากับเจลที่หลอม แล้วเติม 3M NaoAc 0.1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด สกัดอะกาโรสเจลออกโดยการเติมสารละลายฟีนอล 3-4 หยด ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม ปั่นที่ 5000 × g 10 นาที แยกสารละลายชั้นบนมาสกัดด้วยฟีนอลอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำสารละลายชั้นบนมาสกัดโปรตีนออก โดยการเติมฟีนอล : คลอโรฟอร์ม (1 : 1) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรเดิม ผสมด้วยเครื่องผสม ปั่นที่ 5000 × g 10 นาที นำสารละลายชั้นบนมาสกัดฟีนอลออกโดยการเติมไดเอธิลอีเธอร์ ผสมด้วยเครื่องผสม รอจนสารละลายแยกชั้นอย่างชัดเจน ปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้ง นำไปบ่มที่ 37°ซ จนกระทั่งอีเธอร์ที่ค้างอยู่ระเหยหมด จึงนำมาเติมเอธานอลเย็น 95% 2 เท่าของปริมาตรเดิม เก็บที่ -20°ซ ข้ามคืน ปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที่ 5000 × g 10 นาที และล้างตะกอนด้วยเอธานอลเย็น70% นำตะกอนที่ได้มาละลายในบัฟเพอร์ TE จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอพาหะตามหัวข้อ 2.8

<u>การเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ</u> (ดัดแปลงจากศิริพร ,2532)

นำชิ้นดีเอ็นเอพาหะ pUC118 และชิ้นดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC5 (เดิมคือ pSV3) ซึ่งมียีน CGTaseอยู่ ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่ให้ปลายเหนียว (cohesive end) ที่สามารถสร้างเบสคู่สม (complementary) กันได้ หรือตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่ให้ปลายทู่ (blunt end) มาผสมกันในอัตราส่วนของโมลดีเอ็นเอพาหะต่อดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC5 เท่ากับ 1 : 4 ใน Reaction mixture 10 ไมโครลิตรซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl 50 mM Dithiothreitol 10 mM ATP 10 mM Bovine serum albumin 0.0025 % และ T4 - DNA

ligase 5 หน่วย บ่มที่อุณหภูมิ 15°ซ ข้ามคืน (มากกว่า 15 ชั่วโมง) ดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ (recombinant plasmid) จะนำเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือนโดยวิธีการทรานสฟอร์เมชัน (transformation) ต่อไป

การทำ Transformation

1. การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (ดัดแปลงจาก Mandel และ Higa, 1970)

เพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าเรือนคือ *E. coli* JM101 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB จำนวน 1 มิลลิลิตรที่ 37°ซ ข้ามคืนเพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น (starter) นำเซลล์ตั้งต้น 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ ประมาณ 3 ชั่วโมง ($O.D._{550}$ ประมาณ 0.5-0.6) ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4000 × g เป็นเวลา 10 นาที เติม $CaCl_2$ เย็น 0.01M ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเขย่าด้วยเครื่องผสม ปั่นเก็บเซลล์อีกครั้งแล้วเติม $CaCl_2$ เย็น 0.1M ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือที่ 4 °ซ ข้ามคืน แล้วจึงนำไปทำทรานสฟอร์เมชัน

2. การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ และการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (ดัดแปลงจาก Cohen และคณะ, 1972)

นำคอมพีเทนต์เซลล์จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมกับ ligation mixture (ตามข้อ 2.11) 10 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปบ่มที่ 42°ซ 5 นาที นำออกมาเติมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB จำนวน 100 ไมโครลิตรบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 10-15 นาที จึงนำไปกระจายบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร X-gal (5-bromo-4-chloro-3indolyl-β-D-galactoside) 0.002% และ IPTG (Isopropylthio-β-galactoside) 0.0025% แล้วบ่มที่ 37°ซ ข้ามคืน

การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (Transformant) ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสม ทำได้โดยอาศัยหลักการ Insertion inactivation ของเอนไซม์ β-galactosidase (Maniatis และ

คณะ, 1982) เมื่อเชื่อมต่อดีเอ็นเอ เข้าไปในตำแหน่งของ polylinker ในดีเอ็นเอพาหะ pUC 118 ซึ่งเป็นส่วนของ *Lac Z'* gene จะทำให้เกิดการถอดรหัสออกมาเป็น β-galactosidase ที่ไม่สมบูรณ์ และจะทำให้ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมไม่สามารถย่อย X-gal ได้ โคโลนีที่ได้จึงมีสีขาว แต่ถ้าหากทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ที่สมบูรณ์ ก็จะสามารถสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ได้และเกิดเป็นโคโลนีสีฟ้า ดังนั้นจึงสามารถคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมออกมาได้

<u>การศึกษาแผนที่เรสทริกชันของ pCSBC5</u>

ทำได้โดยตัดพลาสมิด pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ เช่น Kpn I Pst I Nde I ฯลฯ แล้วนำมาแยกแถบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซีส ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ต โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน

<u>การหาตำแหน่งของยีน CGTase บนพลาสมิด pCSBC5</u>

เป็นการ Subclone ชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 บางส่วน ลงในดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ทำได้โดยตัดชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์โดยได้ตัดออกมา 5 บริเวณด้วยกัน คือ 1) บริเวณ Hind III ถึง Pvu II 2) บริเวณ Hind III ถึง Hpa I 3) บริเวณ Sal I (AccI) ถึง Pvu II 4) บริเวณ Nde I ถึง Pst I และ 5) บริเวณ Pvu II ถึง EcoR I แยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโดยวิธีอิเลคโทรโฟริซีสที่ใช้อะกาโรสที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ ส่วนในการตัดดีเอ็นเอพาหะ pUC118 เพื่อใช้เชื่อมต่อกับดีเอ็นเอ insert จาก pCSBC5 แต่ละชิ้นนั้น ต้องตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่สามารถจะเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอได้ โดยตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Hind III กับ Sma I สำหรับเชื่อมต่อชิ้นที่ 1 และ 2 เนื่องจากปลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Pvu II และ Hpa I จะเป็นปลายทู่ (blunt end) จึงสามารถเชื่อมต่อกับปลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วย Sma I ได้เนื่องจากจะให้ปลายดีเอ็นเอที่เป็น

ปลายทู่เช่นเดียวกัน และได้ตัดดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sma I และ EcoR I สำหรับการเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอชิ้นที่ 5 จาก pCSBC5 ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ชิ้นที่ 3 เกิดจากการนำดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการ Subclone ของชิ้นที่ 1 แล้วนำมาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sal I แล้วทำให้เกิดการกลับมาเชื่อมต่อเป็นวงของปลายดีเอ็นเอในเส้นเดียวกัน (religation) และชิ้นที่ 4 เกิดจากการตัด pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ NdeI แล้วทำให้กลับมาเชื่อมต่อเป็นวงเช่นเดียวกัน การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (ligation) สามารถทำได้ตามวิธีการทดลองการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการ Subclone ชิ้นที่ 1 ถึง 5 มีชื่อว่า pCSBC9 10 11 12 และ 13 ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้มีชื่อว่า CSBC9 10 11 12 และ 13 ตามลำดับ นำทรานสฟอร์แมนท์ทั้ง 5 ตัวไปทดสอบแอคติวิตี เทียบกับทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 ถ้าทรานสฟอร์แมนท์ตัวใดที่มีแอคติวิตีใกล้เคียงกับ CSBC5 แสดงว่าทรานสฟอร์แมนท์นั้นมีดีเอ็นเอ insert ครอบคลุมยีน CGTase ทั้งยีน จึงสามารถหาตำแหน่งของยีน CGTase บน pCSBC5 ได้

<u>การตรวจสอบดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 โดยวิธี Southern blot hybridization</u>

หลักการโดยย่อของการทำ Southern blot hybridization คือการตัด pCSBC5 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I จากนั้นนำมาแยกแถบดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซีส ย้ายแถบดีเอ็นเอที่แยกได้จากอะกาโรสไปสู่แผ่นไนล่อนด้วยวิธี Southern blot (ดัดแปลงจาก Ishii ,1992) จากนั้นนำแผ่นไนล่อนไปทำไฮบริไดเซชัน โดยดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) คือดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC8 ซึ่งมียีน CGTase อยู่ การเตรียมดีเอ็นเอติดตามทำได้โดยตัดดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC8 (เดิมคือ pSV5) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Kpn I และ Pst I และแยกชิ้นดีเอ็นเอ insert โดยการทำเจลอิเลคโทรโฟริซีสโดยใช้อะกาโรสที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ ติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วยวิธี Random primer DNA labelling ด้วยสารปลอดรังสีคือ DIG หลังจากที่ไฮบริไดเซชันแล้ว นำแผ่นเมมเบรนมาวิเคราะห์สัญญาณการ

ไฮบริด โดยใช้สารที่มีสีเป็นสารตั้งต้น (ตามวิธีใน Genius system user's guider ของบริษัท Boehringer Manuheim Gmbh ,1992) คือ X-phosphate และ NBT ซึ่งบริเวณใดที่มีดีเอ็นเอติดตามไปจับอยู่ บริเวณนั้นก็จะให้สัญญาณออกมาเป็นสีม่วงน้ำเงิน

การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase

1. การตรวจสอบแอคติวิตีของการย่อยแป้ง (Dextrinizing activity) (ดัดแปลงจาก วรรณรัตน์, 2537)

เพาะเลี้ยงทรานสฟอร์แมนท์ UC118 (เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม) CSBC5 9 10 11 12 และ 13 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB ที่เสริมแป้ง (Potato soluble starch) 1% และ IPTG 0.0025% เขย่าที่ 37°ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์เก็บส่วนน้ำใส (supernate) เพื่อใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ นำมาทดสอบแอคติวิตีของการย่อยแป้ง โดยการนำส่วนสารละลาย 300 ไมโครลิตรผสมกับน้ำแป้ง 0.2% (Potato soluble starch ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 0.2 M pH6.0) จำนวน 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 40°ซ หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม HCl 0.2 N ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตรที่เวลาต่างๆกัน จากนั้นนำมาวัดน้ำแป้งที่เหลือในปฏิริยาโดยการเติมสารละลายไอโอดีน (KI 0.2% และ I_2 0.02%) 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน สารละลายจะฟอกจางสีน้ำเงินเป็นสีน้ำเงินอมม่วง เหลืองเข้มหรืออ่อนขึ้นกับปริมาณ CGTase จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

2. Cyclodextrin-trichloroethylene assay (CD-TCE assay)

ดัดแปลงจากวิธีของ Nomoto และคณะ (1984) เป็นการวัดปริมาณ CDs ที่มีอยู่ในสารละลายโดยตรง เตรียมสารละลายเอนไซม์ตามวิธีการทดลอง 2.16.1 นำสารละลายเอนไซม์ปริมาณ 1 มิลลิลิตรผสมกับน้ำแป้ง 2.0% (Potato soluble starch ในบัฟ

เฟอร์ฟอสเฟต 0.2 M pH6.0) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเติมสารละลาย trichloroethylene ผสมให้เข้ากันอย่างแรงด้วยเครื่องผสม (vortex mixture) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 12 ชั่วโมง สังเกตุตะกอน CD-TCE ที่เกิดขึ้นระหว่างชั้นของสารละลายกับชั้นของ trichloroethylene

3. การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเด็กทรินด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง เตรียมได้โดยนำสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร มาผสมกับน้ำแป้ง 2 % (Potato soluble starch ในบัพเฟอร์ฟอสเฟต 0.2 M pH6.0) 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 40°ซ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น กรองผ่านกระดาษกรอง millipore (0.45 μm) ก่อนนำไปวิเคราะห์

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ซึ่งได้แก่ glucose maltose maltotriose maltotetraose maltopentaoes maltohexaose maltoheptaose α-CD β-CD และ γ-CD ทำได้โดยละลายสารมาตรฐานในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือใช้ Supelco-NH_2 column ขนาด 4.6 มิลลิเมตร I.D. × 250 มิลลิเมตร ใช้สารละลาย Acetonitrile 75% เป็น mobile phase อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ RI เป็น detector ฉีดสารละลายมาตรฐานอย่างละ 20 ไมโครลิตร ส่วนสารละลายตัวอย่างฉีดตัวอย่างละ 40 ไมโครลิตร วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของไซโคลเดกซ์ทรินในสารละลายตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) กับสารละลายไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐาน

การตรวจสอบเอนไซม์ CGTase โดยวิธี Immunodiffusion (Jiraporn ,1994)

เป็นการทดสอบเอนไซม์ CGTase โดยอาศัยความจำเพาะของแอนติบอดี้ต่อ

แอนติเจน เตรียม Noble agar 1.0% ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 25 mM ที่มี NaCl 150 mM pH7.5 ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร เทลงใน petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิลิตร เจาะหลุมตรงกลาง 1 หลุมและล้อมรอบอีก 6 หลุม นำสารละลายเอนไซม์ที่ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี ultrafiltration ใส่ลงในหลุมที่เจาะทั้ง 6 หลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร และใส่แอนติบอดี้ของ CGTase (ซีรัมจากกระต่าย) ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์เดียวกัน 20 เท่า ปริมาตร 8 ไมโครลิตรในหลุมกลาง เก็บ dish ไว้ในตู้ (chamber) ที่มีความชื้นตลอดเวลาข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง นำ NaCl 0.85% เทลงใน dish ให้ท่วมวุ้น ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อล้างโปรตีนส่วนเกินออก ย้อม Ag-Ab complex ที่เกิดด้วยสี Coomassie blue (Coomassie blue R-250 0.2% ในสารละลายเมทธานอล 50% และกรดอะซีติก 7.5 %) เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินออกโดยแช่วุ้นในสารละลาย destaining (เมทานอล 25% และกรดอะซีติก 10%) 1-2 ชั่วโมงจึงเททิ้งแล้วเติมสารละลาย destaining ใหม่ ทำซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งส่วนพื้น (background) ใส ตะกอน Ag-Ab complex ที่เกิดจะย้อมติดสี Coomassie blue เป็นสีฟ้า วิเคราะห์ผลที่ได้เทียบกับสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่มาจาก *Bacillus* sp. A11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย