บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือหลักที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubater shaker) เขย่าแบบ rotary และ reciprocal ของ New Brunswick Scientific Co., U.S.A.

1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

1.2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น(refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของ Beckman, U.S.A.

1.2.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น H-103N ของ Kokusan, Japan

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

1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) รุ่น UV 160 A ของ Shimudzu, Japan

1.4 เครื่องให้กำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-transilluminator) รุ่น FOTO/PREP I ของ Fotodyne , U.S.A.

1.5 ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส (agarose gel electrophoresis equipment)

1.5.1 เครื่องกำเนิดไฟฟ้า รุ่น 2301 microdrive 1 ของ LKB , Sweden

1.5.2 เจลแชมเบอร์ (gel chamber) พร้อมอุปกรณ์เตรียมอะกาโรสเจล

1.6 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) รุ่น 240 ของ Corning,U.S.A.

1.7 เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) รุ่น W-385 และ MICROTIP ของ Heat systems-ultrasonic Inc. , U.S.A.

1.8 อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

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

1.9 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHK ของ Olympus, Japan

1.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของ Memmert, Germany

1.11 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ของ Memmert, Germany

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

1.13 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ(deep freezer)อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของ Sanyo Electric Co.,Ltd., Japan

1.14 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ของ Forma Scientific, U.S.A.

1.15 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของ Kokusan , Japan

1.16 ตู้อบสูญญากาศ (vacuum oven) Hotpack corp.,U.S.A.

1.17 กล่องบรรจุฟิล์มเอกซเรย์ (X-ray film cassette) ของ Okamoto Manufacturing Co.,Ltd., Japan

1.18 ฟิล์มเอกซเรย์(Hyperfilm-ECL) ของ Amersham International plc., UK

1.19 เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S Sartorius, U.S.A.

1.20 ไนลอนเมมเบรน Hybond-N+ ของ Amersham International plc., UK

2. สารเคมี

2.1 เรสทริกชันเอนไซม์และเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนยีนเป็นของบริษัท New England Biolabs,Inc. และ BRL, U.S.A. บางส่วนได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. I.S. Hunter แห่ง University of Glasgow, U.K.

2.2 ไลโซไซม์ (lysozyme grade 1) , ไรโบนิวคลีเอส (RNase), สเปอร์มีนเตตราไฮโดรคลอไรด์ (spermine tetrahydro-chloride) , TES [N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid] , และสารเคมีอื่น ๆ เป็นของบริษัท Sigma,U.S.A.

2.3 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate) specially pure grade ของ BDH, England.

2.3 ชุดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจล GENECLEAN kit ของ BIO 101 U.S.A.

2.4 ชุดติดฉลากและตรวจหาดีเอ็นเอด้วยสารปลอดรังสี ECL direct nucleic acid labelling and detection system จาก Amersham International plc, UK

2.5 ชุดน้ำยาล้างฟิล์มเอกซเรย์ ของ Kodak, U.S.A.

3. เชื้อจุลินทรีย์และพลาสมิด

เชื้อ *Streptomyces* ที่ใช้สำหรับการทดลองนี้มี 4 สายพันธุ์คือ

1. *Streptomyces lividans* TK21 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Prof. D.A. Hopwood แห่ง John Innes Institute, Norwich, U.K.

2. *Streptomyces lividans* TK24 ที่มีพลาสมิด pIJ4090 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. M.J. Bibb แห่ง John Innes Institute , U.K.

3. *Streptomyces* sp. 190-1 ซึ่งมีแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (นฤมล ศุภจรรยา, 2526)

4. *Streptomyces* sp.Y1 เป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการ

5. *Escherichia coli* HB101 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUR289 (รัชนี ไสยประจง ,2537)

4. การเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces*

4.1 การเลี้ยงบนอาหารแข็งและการเตรียมสปอร์แขวนลอย

เตรียมอาหารแข็งสูตร MS (ภาคผนวก ก.1) ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างสปอร์ สำหรับเชื้อที่มีพลาสมิดพาหะ pIJ4090 เลี้ยงใน MS ที่เติมยาปฏิชีวนะไทโอสเตรพตอน 50 ไมโครกรัม/มล.(โดยเตรียมสารละลายตั้งต้นเข้มข้น 50 มก./มล. ในสารละลาย DMSO)

การเตรียมสปอร์แขวนลอย ทำโดยเพาะเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ที่ต้องการ โดยลาก (streak) สปอร์หรือไมซีเลียม ลงบนอาหารแข็งสูตร MS ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 5-7 วัน จนสปอร์แก่เต็มที่ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 มล. ลงในแต่ละจาน ใช้ลูป (loop) ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วขูดเบาๆ ให้สปอร์หลุด กรองสปอร์แขวนลอยโดยใช้ชุดกรอง (ภาคผนวก ค.1) นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มาปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อสองครั้ง แขวนลอยสปอร์ที่ได้ใน 20% กลีเซอรอล โดยให้ความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^{9}-10^{10} สปอร์/มล. เก็บในหลอดไมโครฟิวจ์ (microfuge) หลอดละ 0.5 มล. ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.2 การเลี้ยงในอาหารเหลว

4.2.1 การเลี้ยงเพื่อเตรียมโปรโตพลาสท์หรือสกัดพลาสมิด

เตรียมอาหารเหลว YEME (ภาคผนวก ก.2) ในขวดรูปกรวยที่มีลวดสปริงขดที่ก้นขวด (ภาคผนวก ค.2) หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเติมสปอร์ที่เตรียมจากข้อ 4.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหารเหลว 50 มล. ในกรณีของการเตรียมเชื้อเพื่อสกัดพลาสมิด เติมไทโอสเตรพตอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 ไมโครกรัม/มล. นำไปเขย่าแบบ reciprocal ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ในกรณีที่เตรียมโปรโตพลาสท์จะใช้ *Streptomyces lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp. Y1 ที่มีอายุ 40-45 ชั่วโมง สำหรับ *Streptomyces* sp. 190-1 จะใช้เชื้อที่มีอายุ 30 ชั่วโมง

สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดพลาสมิด บ่มเชื้อเป็นเวลา 3-5 วัน เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มาก

4.2.2 การเลี้ยงเพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

เขี่ยเชื้อที่จะนำมาตรวจสอบ 2 ลูปลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีไซโลส (ภาคผนวก ก.3) ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วในขวดรูปกรวยปริมาตร 20 มล. เขย่าแบบ reciprocal ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน

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

5.1 <u>การสร้างโปรโตพลาสท์</u> ตามวิธีของ Hopwood และคณะ (1985)

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* ตามข้อ 4.2.1 แล้วดูดอาหารเหลวที่มีไมซีเลียมปริมาตร 5 มล. มาบรรจุในหลอดแก้วฝาเกลียวปลอดเชื้อสำหรับปั่นเหวี่ยง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มล. เพื่อเจือจางความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส นำมาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นชนิดตั้งโต๊ะ ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.3 โมลาร์ซูโครส 5 มล. สองครั้ง จากนั้นเติม 4 มล.ของสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 1 มก./มล. ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ P (ภาคผนวก ข.1)ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยเยื่อกรอง (millipore) ขนาด 0.22 µm บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ปิเปตขนาด 5 มล. ดูดขึ้นลงสามครั้งทุกๆ 10-15 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P 5 มล. เพื่อเจือจางไลโซไซม์ แล้วนำมากรองผ่านชุดกรองโปรโตพลาสท์ (ภาคผนวก ค.1) เพื่อกำจัดกากเซลล์และชิ้นส่วนไมซีเลียมที่เหลือ นำส่วนน้ำใสที่ได้มาปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างโปรโตพลาสท์ด้วยบัฟเฟอร์ P 10 มล. จากนั้นแขวนลอยโปรโตพลาสท์ในบัฟเฟอร์ P 100 ไมโครลิตร หาความเข้มข้นของโปรโตพลาสท์โดยนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วย haemacytometer

การเก็บโปรโตพลาสท์ทำโดยเก็บในหลอดไมโครฟิวจ์ โดยแช่ในภาชนะบรรจุน้ำแข็ง นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นจึงนำหลอดบรรจุโปรโตพลาสท์มาเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสต่อไป จนกว่าจะนำมาใช้ เมื่อจะนำมาใช้ต้องทำให้โปรโตพลาสท์ที่แข็งอยู่ละลายอย่างรวดเร็ว โดยจุ่มหลอดในอ่างน้ำอุ่น

5.2 การรีเจนเนอเรตโปรโตพลาสท์

นำโปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้จากข้อ 5.1 มาเจือจางเป็นอนุกรมในบัฟเฟอร์ P และสารละลาย 0.01% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ดูดโปรโตพลาสท์ที่ถูกเจือจางในแต่ละความเข้มข้นมา 100 ไมโครลิตร เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ R2YE (ภาคผนวก ก.4) ซึ่งผ่านการกำจัดความชื้นบางส่วนโดยการเปิดฝาจานบรรจุ R2YE ในตู้ laminar flow เป็นเวลา 1 $^{1}/_{2}$ ชั่วโมง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน นับโคโลนีที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P เปรียบเทียบกับที่เจือจางด้วย 0.01% SDS เพื่อคำนวณหาเปอร์เซนต์รีเจนเนอเรชัน

เมื่อทำการเจือจางโปรโตพลาสท์ด้วย 0.01% SDS จะทำให้โปรโตพลาสท์ที่มีอยู่ทั้งหมดในสารละลายแตก ดังนั้นโคโลนีที่เจริญขึ้นมาจะเป็นการเจริญมาจากเซลล์ปกติ ส่วนโคโลนีที่เจริญมาจากการเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P จะมีทั้งเซลล์ปกติและโปรโตพลาสท์ ดังนั้นที่ความเข้มข้นเดียวกัน จำนวนความแตกต่างของโคโลนีที่เจริญจากการเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P (X) กับ 0.01% SDS (Y) ก็คือเซลล์ที่เจริญมาจากโปรโตพลาสท์ และถ้าเทียบให้จำนวนโปรโตพลาสท์ที่นับได้จากกล้องจุลทรรศน์ (ด้วย haemacytometer) (Z) เป็น 100% ก็จะสามารถคำนวณเปอร์เซนต์การรีเจนเนอเรชันของโปรโตพลาสท์ได้ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซนต์การรีเจนเนอเรชันของโปรโตพลาสท์} = \frac{(X-Y)\times 100}{Z}$$

6. การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอและพลาสมิด

6.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Birch และCullum(1985)

1. ขูดสปอร์จาก Streptomyces 2 ลูป มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 50 มล. (ภาคผนวก ก.5) ซึ่งบรรจุในขวดรูปกรวยพร้อมทั้งมีขดลวดสปริงโดยบ่มในเครื่องเขย่าแบบ reciprocal ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน

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

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

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

5. เติม 0.55 มล.ของสารละลาย SDS เข้มข้น 10% เขย่าผสมเบา ๆ และบ่มต่อจนกระทั่งสารละลายหนืด

6. เติม 5 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ ผสมให้เข้ากัน

7. เติม 6 มล.สารละลายฟีนอลที่ปรับ pH ให้เป็นกลางในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข.4) นำไปเขย่าแบบ reciprocal ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นของสารละลายด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 40 นาที

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

9. ใช้ปาสเจอร์ปิเปต (Pasture pipette) ที่หลอมปลายปิดสนิท พันสายใยของดีเอ็นเอขึ้นมาล้างด้วยเอทานอล 70% แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

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

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

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

6.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจาก *Streptomyces* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด

ตามวิธีของ Kieser (1984)

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

2. ล้างไมซีเลียมด้วยซูโครส 10.3 % สองครั้ง แบ่งเซลล์ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ หลอดละ 100 ไมโครลิตร

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

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

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

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

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

8. นำส่วนของตะกอนมาละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE โดยรวมตะกอนที่ได้จาก 4-6 หลอดเข้าด้วยกันโดยใช้บัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตร

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

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

7. <u>การหาขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส</u>

เตรียมอะกาโรสเจล 0.7% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ TA (ภาคผนวก ข.6) ลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวี (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัวผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye ภาคผนวก ข.7) ในอัตราส่วน 4:1 หยอดลงในหลุมบนอะกาโรสเจล หลุมละประมาณ 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟริซิสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) โดยใช้ความต่างศักย์ 10 โวลต์/ซม.ของเจล จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนมาเกือบถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 2.5 ไมโครกรัม/มล.ในบัฟเฟอร์ TA แช่ไว้ 15-30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ แลมดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII (λDNA/*Hin*dIII) บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพโดยใช้ฟิล์มขาวดำความไวแสง 400 ถ่ายผ่านแผ่นกรองแสง(filter) สีแดง

8. <u>การโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส</u>

8.1 <u>ตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอแบบกึ่งสมบูรณ์</u>

8.1.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสม ระหว่างดีเอ็นเอและเอนไซม์ในการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2-8 กิโลเบส

นำสารละลายโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 6.1 มาทำการย่อยกึ่งสมบูรณ์ (partial digestion) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Mbo*I ซึ่งทำโดยเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ประมาณ 160 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ดูดสารละลายดีเอ็นเอมา 40 ไมโครลิตร เติมบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ และน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งบรรจุลงในหลอดไมโครฟิวจ์ 9 หลอด โดยหลอดที่ 1 บรรจุ 20 ไมโครลิตร หลอดที่เหลือบรรจุ 10 ไมโครลิตร เติม *Mbo*I ลงในหลอดที่ 1 จำนวน 3 หน่วย (unit) ผสมให้เข้ากันแล้วถ่ายลงในหลอดที่ 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันถ่ายลงในหลอดถัดไปอีก 10 ไมโครลิตร ทำต่อเนื่องไปเช่นนี้จนครบถึงหลอดที่ 9 จากนั้นนำทั้ง 9 หลอดไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงผสมสีติดตามและนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส วิเคราะห์ผล เลือกอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอและเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งย่อยดีเอ็นเอให้ชิ้นส่วนขนาด 2-8 กิโลเบสได้มากที่สุด เพื่อนำไปเตรียมในปริมาณมากต่อไป

8.1.2 การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในปริมาณมาก

เพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้มากขึ้นทำการย่อยด้วย *Mbo*I ตามสัดส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 8.1.1 ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2-8 กิโลเบส ออกจากเจลโดยเคลื่อนแถบดีเอ็นเอเข้าไปในถุงไดอะไลซีส (ภาคผนวก ค.3) ตามวิธีของ Maniatis และคณะ (1982) โดยแบ่งครึ่งถุงไดอะไลซีสตามความยาว เสียบลงในเจลที่ตัดเป็นช่องใต้ขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการ ทำอิเล็กโทรโฟริซีสต่อจนแถบดีเอ็นเอที่ต้องการเคลื่อนลงไปติดกับถุงไดอะไลซีส ติดตามโดยดูการเรืองแสงด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ดูดสารละลายดีเอ็นเอใส่หลอดไมโครฟิวจ์ นำมาเติมบิวทานอล (butanol) 3 เท่าของปริมาตรเพื่อกำจัดเอทิเดียมโบรไมด์ออก นำน้ำใสชั้นล่างมาเติมโซเดียมคลอไรด์ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ และ tRNA 20ไมโครกรัม/มล. แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 2 เท่าของปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำมาปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ทำให้แห้งแล้วแขวนลอยในบัฟเฟอร์ TE ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสเทียบกับ λ DNA/*Hin*dIII

8.2 ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pIJ4090

นำพลาสมิดที่เตรียมได้จากข้อ 6.2 มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ พลาสมิด pIJ4090 ตัดด้วย *Bam*HI โดยผสมในอัตราส่วนของดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 3 หน่วย บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เติม Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) 1 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 100 พิโกโมล บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กำจัดเอนไซม์โดยการสกัดด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนด้วยเอทานอลที่มีโซเดียมคลอไรด์และ tRNA ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 8.1.2 ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสเทียบกับ λDNA/*Hin*dIII

8.3 เชื่อมชิ้นส่วนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอและพลาสมิด (ligation)

ผสมชิ้นส่วนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากข้อ 8.1.2 และพลาสมิดจากข้อ 8.2 ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 โดยใช้ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอ 3 พิโกโมล และพลาสมิด 1 พิโกโมล เติมบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ T_4 DNA ligase แล้วเติม ATP ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิโมลาร์ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมดในสารละลายเป็น 12-15 ไมโครกรัม/มล. เติม T_4 DNA ligase 0.05-0.1 หน่วย บ่มที่ 12-13 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-13 ชั่วโมง กำจัดเอนไซม์โดยการสกัดด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนด้วยเอทานอลที่มีโซเดียมคลอไรด์และ tRNA เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 8.1.2 ตรวจสอบการเชื่อมโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส

8.4 ทรานสฟอร์เมชัน

เติมพลาสมิดที่ต้องการจะทรานสฟอร์มลงในโปรโตพลาสท์ ที่เตรียมได้จากข้อ 5.1 ปริมาตร 1-1.5 ไมโครกรัมต่อโปรโตพลาสท์ 50-100 ไมโครลิตร(10^8-10^9 โปรโตพลาสท์/มล.) แช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 10 วินาที เติม 25% PEG 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 1 นาที เติมบัฟเฟอร์ P ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มล. นำไปเกลี่ยในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ R2YE จานละ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยบ่ม *Streptomyces lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp.190-1 เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นราดผิวหน้าของจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วด้วย 1 มล. ของยาปฏิชีวนะไทโอเสตรพตอน

เข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มล. (เจือจางจากสารละลายตั้งต้นที่เตรียมไว้จากข้อ 4.1 ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ) เปิดฝาจานทิ้งให้ผิวหน้าแห้งใน laminar flow ประมาณ 15 นาที นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 5-7 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ

9. <u>การคัดเลือกและตรวจสอบโคลน</u>

9.1 <u>คัดเลือกโคลนที่มีกลูโคสไอโซเมอเรสแอคติวิตีโดยวิธีโคโลนีไฮบริไดเซชัน</u>

9.1.1 การย้ายดีเอ็นเอลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน

1. ตัดแผ่นไนลอนเมมเบรน Hybond-N+ เป็นวงกลมขนาดพอดีกับด้านในของจานเพาะเชื้อ นำไปแช่น้ำให้อิ่มตัว ประกบด้วยกระดาษกรอง ห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

2. วางแผ่นเมมเบรนลงบนจานอาหารแข็ง R2YE เกลี่ยผิวหน้าอย่าให้มีฟองอากาศด้วยแท่งแก้วงอ

3. นำจานที่มีเชื้อสเตรพโตมัยซีส $50-10^{4}$ โคโลนี เรพลิกาลงบนจานเมมเบรน จากนั้นนำจานที่มีเมมเบรนไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-30 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ไมซีเลียมที่ยังอ่อน

4. นำแผ่นเมมเบรนออก ทำเครื่องหมายให้ตรงกับจานเพาะเชื้อ แล้ววางลงในถาดที่มีกระดาษกรองรองอยู่หงายด้านที่มีเชื้อขึ้น เติมสารละลายไลโซไซม์ (4 มก./มล.ใน TE บัฟเฟอร์) ให้ทั่ว บ่ม 30-45 นาที เพื่อให้เกิดโปรโตพลาสท์

5. ย้ายแผ่นเมมเบรนมาวางลงในถาดใหม่ที่มีกระดาษกรอง เติม 1% SDS ใน 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ทั่ว ทิ้งไว้ 20 นาที

6. ซับแผ่นเมมเบรนให้แห้งด้วยกระดาษกรอง Whatman 3MM เติมสารละลายนิวทรัลไลซ์ (neutralize solution) ซึ่งประกอบด้วย 1 โมลาร์ Tris.HCl (pH 7.5) 7 ส่วนและ 5 โมลาร์ NaCl 3 ส่วน (ภาคผนวก ข.10 และ ข.11 ตามลำดับ) ให้ทั่ว ทิ้งไว้ 5 นาที ทำขั้นนี้ 3 ครั้ง

7. จุ่มแผ่นเมมเบรนลงในเอทานอล 90% ชั่วขณะ ซับแห้งด้วยกระดาษกรอง นำแผ่นเมมเบรนไปอบในตู้อบสูญญากาศอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา $1^{1}/_{2}$ - 2 ชั่วโมง

9.1.2 การสร้างดีเอ็นเอติดตาม

ดีเอ็นเอติดตามเตรียมโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยได้รับความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง PCR จาก ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. 190-1 100 นาโนกรัม เป็นต้นแบบ โดยมี 24-mer นิวคลีโอไทด์ได้จากลำดับเบสของกรดอะมิโนด้าน N-terminal ของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. 190-1 100 พิโกโมล และ 23-mer นิวคลีโอไทด์ได้จาก conserved sequence ของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสในกลุ่ม Streptomycetes 100 พิโกโมล เป็นไพรเมอร์ (primer) เติม dNTP และ DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ และ 10 % ตามลำดับ เติมบัฟเฟอร์สำหรับ Taq polymerase ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพที่ 94 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที เติมเอนไซม์ Taq polymerase 1 หน่วย เริ่มกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 64 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 64 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 4 นาที 1รอบ นำดีเอ็นเอที่สร้างได้มาตรวจดูขนาดโดยวิธี นูซีฟ่อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสเทียบกับดีเอ็นเอของฟาจ ϕX174 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III (ϕX174/*Hae*III) และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยใช้ชุด GENECLEAN

9.1.3 การติดฉลากดีเอ็นเอติดตาม

เจือจางดีเอ็นเอติดตามให้ได้ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นลงทันทีโดยวางในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 5 วินาทีเพื่อให้ของเหลวลงมาอยู่ก้นหลอด จากนั้นเติมรีเอเจนต์สำหรับติดฉลาก (DNA labelling reagent) ในปริมาตรที่เท่ากับสารละลายดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ปริมาตรเท่ากับสารละลายดีเอ็นเอผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยง 5 วินาที แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

ถ้ายังไม่ใช้ทันที ควรเก็บในสารละลายกลีเซอรอล 50 % อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

9.1.4 การไฮบริไดเซชัน

1. เติมโซเดียมคลอไรด์และ blocking agent ลงในไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ 0.5% น้ำหนัก/ปริมาตร ตามลำดับ ผสมด้วยเครื่องกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา $^{1}/_{2}$-1 ชั่วโมงพร้อมทั้งเขย่าเป็นครั้งคราว

2. นำแผ่นเมมเบรนที่เตรียมจากข้อ 9.1.1 มาใส่ในถุงพลาสติก เติมไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์ 0.125 มล./ตร.ซม.ของเมมเบรน รีดด้วยเครื่องรีดพลาสติก นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง

3. เติมดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลาก 2 นาโนกรัม/มิลลิลิตรของบัฟเฟอร์ โดยระมัดระวังอย่าให้ดีเอ็นเอสัมผัสกับแผ่นเมมเบรนโดยตรง บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่า 60-100 รอบ/นาที

4. ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย primary wash buffer (ภาคผนวก ข.14) 2 มล./ตร.ซม. ถ้าใช้บัฟเฟอร์สูตรที่มียูเรีย ให้บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส สำหรับบัฟเฟอร์สูตรที่ไม่มียูเรียบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเมมเบรน 2 ครั้ง

5. จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนด้วย secondary wash buffer (ภาคผนวก ข.15) ปริมาตรเท่ากับ primary wash buffer โดยบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ล้างซ้ำอีกครั้ง

9.1.5 การตรวจหาโคลนและการทำออโตเรดิโกราฟ (ทำในห้องมืด)

1. ผสมสารละลาย detection reagent 1 และ 2 เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1 ให้ได้ปริมาตร 0.125 มล./ตร.ซม.ของเมมเบรน

2. เติม detection reagent ที่ผสมแล้วลงบนผิวหน้าของแผ่นเมมเบรนให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ซับสารละลายส่วนเกินออก ห่อแผ่นเมมเบรนด้วยพลาสติกห่อหุ้มอาหารอย่าให้มีฟองอากาศ วางลงใน X-ray film cassette

4. ปิดไฟ นำฟิลม์เอกซเรย์วางบนเมมเบรนจับเวลา 5-10 นาที

5. นำฟิลม์มาล้าง โดยแช่ใน น้ำยาดีเวลอปเปอร์ (developer solution) 3-5 นาที นำไปแช่น้ำ 1 นาที จากนั้นแช่ในน้ำยาฟิกเซอร์ (fixer solution) 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำไหล 15 นาที ผึ่งให้แห้ง

9.2 ตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส

เลี้ยง Streptomyces ตามข้อ 4.2.2 นำเซลล์ไปปั่นและล้างด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์สองครั้ง เก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

การวิเคราะห์กลูโคสไอโซเมอเรสแอคติวิตี ใส่เซลล์ลงใน 3 มล. ของ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทำให้แตกด้วย sonicator โดยใช้สภาวะที่ 50% duty cycle ต่อ 1 วินาที เป็นเวลา 6 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสไว้วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และหาปริมาณโปรตีนดังวิธีต่อไปนี้

นำส่วนใส 0.5 มล. มาเติมส่วนผสมของปฏิกิริยา ประกอบด้วย 0.5 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 0.6 มล., 0.1 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 มล., 0.001 โมลาร์ โคบอลท์คลอไรด์ 0.2 มล., 2.0 โมลาร์ กลูโคส 0.5 มล. เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 2.0 มล. นำไปบ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายตัวอย่างที่เวลา 0 10 20และ 30 นาที นำมาทำให้เจือจาง 300 เท่าด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายนี้ 0.5 มล.ไปหาปริมาณของฟรักโตสโดยวิธีการของ Marshall และ Kooi (1957) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Dische และ Borenfreund (1951) ดังนี้ เติม 70% กรดซัลฟูริกเกรดวิเคราะห์ (analytical grade ของ Mallinckrodt, U.S.A.) ที่แช่เย็น 3 มล. เติม 1.5% ซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ (Cysteine-HCl) 0.1 มล. และ 0.12% อัลกอออลิคคาร์บาโซล (alcoholic carbazole) 0.1 มล. ผสมให้เข้ากันทันทีในอ่างน้ำเย็น นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้น้ำตาลฟรักโทสที่ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัม/มล.

1 หน่วยของกลูโคสไอโซเมอเรส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะของวิธีการตรวจสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น โดยรายงานเป็น หน่วยของเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน

9.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry (1951)

นำสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ 1.0 มล.มาเติมสารละลาย Lowry C (ภาคผนวก ข.16) 5 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เมื่อครบเวลา เติมสารละลาย Lowry D 0.5 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้อีก 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับค่าของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่ใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

10. การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้มีชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส

10.1 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการเชื่อมด้วยปลายทู่

10.1.1 เตรียมดีเอ็นเอปลายทู่

นำยีนกลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จากการตัดพลาสมิด pUR289 (รัชนี ไสยประจง, 2537) *Sma*I กับ *Xba*I แล้วแยกชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสที่มีขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส โดยใช้ชุดแยกดีเอ็นเอ GENECLEAN kit (ภาคผนวก ข.9) ดังนี้

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดไว้แล้ว มาแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ และตรวจการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยใบมีดที่ผ่านการลนไฟแล้วและตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติม 6 โมลาร์ของสารละลายโซเดียมไอโอไดด์ 3 เท่าของปริมาตรเจล บ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 นาที เติม GLASSMILK ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ผสมให้เข้ากันทุกๆ 2 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วินาที ล้างตะกอนของ GLASSMILK ที่มีดีเอ็นเอเกาะอยู่ด้วยสารละลาย NEW ปริมาตร 250 ไมโครลิตร 3 ครั้ง จากนั้นชะดีเอ็นเอออกจาก GLASSMILK โดยละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE 10 ไมโครลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส 2 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วินาที ดูดสารละลายใสชั้นบนที่มีดีเอ็นเอแขวนลอยอยู่ใส่หลอดไมโครฟิวจ์

ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสเทียบกับ λDNA/*Hin*dIII ส่วนพลาสมิด pIJ4090 ตัดด้วย *Bam*HI ตามวิธีในข้อ 8.2 นำชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสที่แยกได้และพลาสมิด มาเติมบัฟเฟอร์สสำหรับเอนไซม์ Large fragment DNA polymerase เติม dNTP ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 33 ไมโครโมล เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอในสารละลายเป็น 50 ไมโครกรัม/มล. เติมเอนไซม์ Large fragment DNA polymerase 1 หน่วยต่อ 1 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม EDTA ให้มีความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ขจัดหมู่ฟอสเฟตและกำจัดเอนไซม์ตามข้อ 8.2

10.1.2 เชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ผสมชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสและพลาสมิดที่เตรียมได้จากข้อ 10.1.1 ในอัตราส่วน 3 นิโกโมลต่อ 1 นิโกโมล เติมบัฟเฟอร์สำหรับการเชื่อมดีเอ็นเอแบบปลายทู่ (ภาคผนวก ข.3) เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอในสารละลายเป็น 15-20 ไมโครกรัม/มล. เติมเอนไซม์ T_4 DNA ligase 5-10 หน่วย บ่มที่ 12-13 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง กำจัดเอนไซม์โดยการสกัดด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนด้วยเอทานอลที่มีโซเดียมคลอไรด์และ tRNA เช่นเดียวกับข้อ 8.1.2 ตรวจสอบการเชื่อมโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์ที่สร้างได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน แล้วสุ่มมาตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 8.4 และ 9.2 ตามลำดับ

10.2 <u>สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการเชื่อมด้วยปลายเหนียว</u>

นำยีนกลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จากการตัดพลาสมิด pUR289 ด้วย *Bam*HI กับ *Xba*I แยกชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสโดยใช้ชุด GENECLEAN ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 10.1.1 เชื่อมกับพลาสมิด pIJ4090 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI กับ *Xba*I ตามวิธีข้อ 8.3 จากนั้นทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านดังที่กล่าวไว้ในข้อ 8.4 แล้วสุ่มมาตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสตามวิธีในข้อ 9.2