บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

3.1.1 การสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Bacillus* sp. A11

ดัดแปลงมาจากวิธีที่เสนอโดย Rodriguez และคณะ (1983)

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารอุดม LB (Bacto tryptone 1% yeast extract 0.5% และ NaCl 1% pH7.4) จำนวน 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์หนึ่งครั้งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ SET (ซูโครส 20 % Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA 50 มิลลิโมลาร์ pH7.6)

นำเซลล์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 65°ซ กระจายเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ SET 2 มิลลิลิตร แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง

เติม ไลโซไซม์ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และบัฟเฟอร์ RNase (RNase 10 มิลลิกัมต่อมิลลิลิตร ในโซเดียมอะซีเตท 0.1 โมลาร์ และ Na_2EDTA 0.3 มิลลิโมลาร์ pH 7.4) จำนวน 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ โดยเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที

เติมสารละลาย SDS 25 เปอร์เซนต์ จำนวน 0.05 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ โดยเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

เติม pronase 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.3 มิลลิลิตร และ คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (24:1) จำนวน 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ โดยเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และ คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) จำนวน 10 มิลลิลิตร ปิดจุกหลอดแล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ 5 นาที ปั่นที่ 4,000xg นาน 20 นาที แล้วแยกสารละลายชั้นบนมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วย คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์

นำสารละลายชั้นบนมาเติม โซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และเอทธานอลเย็น จำนวน 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด แช่ที่อุณหภูมิ -20°ซ ข้ามคืน ค่อยๆ พัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สายโครโมโซมด้วยแท่งแก้ว แล้วนำไปจุ่มในเอธานอลที่เย็น เพื่อล้างดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ ให้หลุดออกไป

ละลายตะกอนของโครโมโซมดังกล่าว ในสารละลายบัฟเฟอร์ TEN (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ Na_2EDTA 1 มิลลิโมลาร์ และ NaCl 10 มิลลิโมลาร์ pH7.6) จำนวน 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีคลอโรฟอร์ม 0.1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ

วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III) ซึ่งเป็นการวัดปริมาณดีเอ็นเออย่างคร่าวๆ หรืออาจทำโดยวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (เครื่อง Shimadzu UV-240 Spectrophotometer) เทียบจากค่า OD_{260} เท่ากับ 20 แสดงว่ามีดีเอ็นเอเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.1.2 <u>การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวิธีอัลคาไลน์ (Alkaline Extraction)</u>

ดัดแปลงมาจากวิธีที่เสนอโดย (Maniatis,1982)

ในกรณีของการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณมาก เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีดีเอ็นเอพาหะ ในอาหารอุดม LB ที่เสริมยาปฏิชีวนะ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000xg เป็นเวลา 10 นาที

นำเซลล์มาเติมสารละลาย Solution I (Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์ Na_2EDTA 10 มิลลิ-โมลาร์ และ ไลโซไซม์ 2 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร) จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที

เติมสารละลาย Solution II (โซเดียมไฮดรอกไซม์ 0.2 โมลาร์ และSDS 1 เปอร์เซนต์) จำนวน 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดให้ขึ้นลงอย่างเบาๆ จนสังเกตเห็นว่าสารละลายใส แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 30 นาที

เติมสารละลาย Solution III (โซเดียมอะซีเตท 3 โมลาร์ pH 4.8) จำนวน 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ จนเกิดตะกอนอย่างสมบูรณ์ แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 30 นาที นำไปปั่นแยกตะกอนออกที่ 4,000 X g เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นตะกอน นำสารละลายที่ได้มาสกัดโปรตีนออกโดยเติม สารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม (1 : 1) ในปริมาตรที่เท่ากับสารละลาย เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 4,000 X g เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายชั้นบนมาสกัดโปรตีนซ้ำอีกครั้งด้วย ฟีนอล:คลอโรฟอร์ม

จากนั้นนำสารละลายมาสกัดฟีนอลออก โดยการเติมไดเอธิลอีเธอร์ในปริมาตรที่เท่ากันเขย่าจนกระทั่งสารละลายชั้นล่างใส ปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้ง กำจัดไดเอธิลอีเธอร์ที่ยัง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เหลือในสารละลายโดยการเป่าลมลงบนสารละลายแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 15 นาที

เติมเอธานอลเย็นจำนวน 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด แช่ที่อุณหภูมิ -20°ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บตะกอนด้วยความเร็ว 5000 X g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป ปล่อยให้แห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ ละลายตะกอนในสารละลายบัฟเฟอร์ TE จำนวน 1 มิลลิลิตร

ในกรณีของการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณน้อย (Mini-preparation) จะเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* ที่มีดีเอ็นเอพาหะ ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร วิธีการสกัดคล้ายการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณมาก และใช้ Solution I: Solution II:Solution III ในอัตราส่วน 100: 200: 150 ไมโครลิตรตามลำดับ โดยหลังจากเติม Solution III และนำไปปั่นแล้วปิเปตสารละลายส่วนใสออกมา เติมไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ จำนวน 500 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที ปั่นเก็บตะกอนและละลายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 20 ไมโครลิตร

3.2 <u>การย่อยดีเอ็นเอด้วย Restriction endonuclease</u>

ได้มีการศึกษาพบว่า ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการย่อยดีเอ็นเอ คือความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (Ausuble และคณะ, 1989) ในงานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สำหรับเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดตามที่แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 4 ส่วนในกรณีที่ทำ double digestion จะเลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เอนไซม์ทั้งสองชนิดทำงานได้ดี ใน reaction mixture 20 ไมโครลิตร จะใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดที่จะตัด (ความเข้มข้น 10 เท่า) จำนวน 2 ไมโครลิตร สารละลาย Bovine serum albumin (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร) จำนวน 2 ไมโครลิตร และใช้เรสทริกชันเอนไซม์ในปริมาณ 5 หน่วย ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาข้ามคืน ทำให้การย่อยดีเอ็นเอเกิดอย่างสมบูรณ์ แล้วจึงนำไปทำการทดลองต่อไป

3.3 <u>อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส</u>

การวิเคราะห์ปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอทำโดยใช้ submarine horizontal gel electrophoresis ของอะกาโรสเจล 0.7-1.5 เปอร์เซนต์ ซึ่งเตรียมในบัฟเฟอร์ TBE (Tris-HCl 89 มิลลิโมลาร์ boric acid 89 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์ pH 8.3) และใส่ดีเอ็นเอประมาณ 500 นาโนกรัมต่อหนึ่งช่องเจล ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 80 โวลต์ ในบัฟเฟอร์ TBE นาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประมาณ 3 ชั่วโมง โดยเคลื่อนจากขั้วลบไปขั้วบวก และใช้ tracking dye (Glycerol 50 เปอร์เซนต์ Bromphenol blue 0.1 เปอร์เซนต์ และ Xylene cyanol FF 0.1 เปอร์เซนต์) จำนวน 5 ไมโครลิตร เป็นตัวติดตาม นำเจลมาย้อมโดยแช่ในเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นประมาณ 1 ชั่วโมง นำเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตจาก UV transilluminator UVP แล้วเปรียบเทียบขนาดและปริมาณกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.4 <u>การโคลนยีนต่อเนื่อง (subcloning) ของ CGTase gene จากพลาสมิด pCSBC8 ลงในพลาสมิด pUC118</u>

3.4.1 <u>การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCSBC8 สำหรับการโคลน</u>

นำพลาสมิด pCSBC8 มาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I / *Pvu*II (double digestion) โดยย่อยแบบสมบูรณ์ ที่ 37 °ซ ข้ามคืน จากนั้นนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส นำเจลไปย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์แล้วส่องดูแถบชิ้นดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ตัดเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.1 กิโลเบส มาแยกและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยวิธี electroelution โดยนำเจลที่ตัดออกมาใส่ถุงไดอะไลซีส (dialysis bag) เติมบัฟเฟอร์ TE ลงไปให้เต็มถุงแล้วนำมาทำอิเล็กโทรโฟริซิสต่อประมาณ 30 นาที จากนั้นกลับขั้วไฟฟ้าทำอิเล็กโทรโฟริซิสจากขั้วบวก(+) ไปขั้วลบ (-) ต่ออีกประมาณ 5 นาที

ดูดสารละลายในถุงไดอะไลซีสออกมา เติมโซเดียมอะซีเตท 3 โมลาร์ pH4.8 ปริมาณ 1/10 เท่าของปริมาตรเดิมแล้วสกัดด้วย ฟีนอล:คลอโรฟอร์ม (1:1) แยกสารละลายชั้นบนมาสกัดเอาฟีนอลที่ปนอยู่ออก โดยการเติมไดเอธิลอีเธอร์ในปริมาตรที่เท่ากัน เขย่าจนกระทั่งสารละลายข้างล่างใส ปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้งและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

เติมเอธานอลเย็นจำนวน 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 °ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% เอธานอล แล้วปั่นอีกครั้งหนึ่ง ก่อนจะกระจายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

3.4.2 <u>การเตรียมดีเอ็นเอพาหะ</u>

นำพลาสมิด pUC118 มาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I / *Sma*I โดยย่อยแบบสมบูรณ์ใน reaction mixture ที่ 37 °ซ ข้ามคืน หลังจากนั้นทำการสกัดส่วนของเรสทริกชัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอนไซม์ออก โดยการปรับปริมาตรของสารละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE ให้เป็น 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมอะซีเตท 3 โมลาร์ pH4.8 จำนวน 10 ไมโครลิตร แล้วนำมาสกัดด้วย ฟีนอล :คลอโรฟอร์ม (1:1) เท่ากับปริมาตรเดิม ผสมโดยเขย่าให้เข้ากัน ปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แยกสารละลายชั้นบนมาสกัดฟีนอลออก โดยการเติมไดเอธิลอีเธอร์ จำนวน 500 ไมโครลิตร แล้วเขย่าจนกระทั่งสารละลายชั้นล่างใส ปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้งกำจัดไดเอธิลอีเธอร์ที่ยังเหลืออยู่โดยตั้งทิ้งไว้ที่ 37°ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมเอธานอลเย็นจำนวน 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด แช่ที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลาข้ามคืน ปั่นเก็บตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% เอธานอล 1 ครั้ง หลังจากปั่นอีกครั้ง จึงกระจายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

3.4.3 การสร้างดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant DNA)

นำชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.1 กิโลเบสของพลาสมิด pCSBC8 ที่เตรียมได้ (ข้อ 3.4.1) และชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC118 (ข้อ 3.4.2) มาเชื่อมต่อกัน โดยใช้เอนไซม์เชื่อมต่อ T_4 DNA ligase โดยผสมกันในอัตราส่วนของโมลดีเอ็นเอพาหะต่อโมลของดีเอ็นเอ insert เท่ากับ 1:3 ใน ligation mixture 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ATP 1 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์ ligation (Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ และ dithiothreitol 10 มิลลิโมลาร์) และ T_4-DNA ligase 1 หน่วย บ่มที่อุณหภูมิ 16°ซ เป็นเวลา 15-20 ชั่วโมง (จรัญญา เงินประเสริฐศิริ, 2528) แล้วนำไปทำทรานสฟอร์เมชัน (transformation) ต่อไป

3.4.4 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน

3.4.4.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (ดัดแปลงจาก Mandel และ Hiya, 1970)

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM101 ในอาหารอุดม LB 1 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน เพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น (starter) ดูดเซลล์ตั้งต้น 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารอุดม LB 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าด้วยอัตราเร็ว 350-400 รอบต่อนาที ประมาณ 3 ชั่วโมง (OD_{550} ประมาณ 0.5-0.6) จากนั้นแช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 5 นาที ปั่นเก็บเซลล์ที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กระจายตะกอนเซลล์ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เย็น 10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 5 มิลลิลิตร ปั่นเก็บเซลล์อีกครั้งที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เย็น 100 มิลลิโมลาร์ จำนวน 500 ไมโครลิตร โดยเขย่าอย่างเบาๆ จนเซลล์กระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนทำการทรานสฟอร์ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.4.2 การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน (ดัดแปลงจาก Cohen และคณะ, 1972)

นำคอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียมได้จำนวน 100 ไมโครลิตรผสมกับดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3 จำนวน 10 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 30 นาที นำไปบ่มที่ 42°ซ ทันที เป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารอุดม LB จำนวน 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37°ซ ต่อเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำไปกระจายบนจานอาหารอุดม LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (Isopropylthio-β-galactoside) 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน สังเกตสีและนับโคโลนีที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อ

3.4.5 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์

ทำการตรวจหาเซลล์เจ้าเรือนที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมหรือทรานสฟอร์แมนท์ โดยคัดเลือกบนจานอาหารอุดม LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน X-gal และ IPTG ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมจะให้โคโลนีสีขาว ส่วนทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอพาหะเดิมจะให้โคโลนีสีฟ้า เนื่องจากหลักการเชื่อมต่อเป็นแบบ insertion inactivation ของเอนไซม์ β-galactosidase (Maniatis และคณะ,1982) เมื่อเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้าไปในตำแหน่งของ polylinker ในดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ซึ่งเป็นส่วนของ *Lac Z'* gene จะทำให้ไม่เกิดการถอดระหัสเป็นเอนไซม์ β-galactosidase และทำให้ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมไม่สามารถย่อย X-gal ได้ โคโลนีที่ได้จึงมีสีขาว แต่ถ้าหากทรานสฟอร์แมนท์ได้รับดีเอ็นเอพาหะ pUC118 ที่สมบูรณ์ก็จะสามารถสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ได้ และเกิดเป็นโคโลนีสีฟ้า ดังนั้นจึงสามารถคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมที่เราต้องการได้ จากนั้นทำการคัดเอาเฉพาะทรานสฟอร์แมนท์ ที่ให้โคโลนีสีขาวออกมาโดยวิธี replica plating บนจานอาหารอุดม LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน แล้วนำเชื้อที่คัดได้นี้มาทดสอบว่า มีชิ้นดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCSBC8 เชื่อมต่อหรือไม่ โดยนำมาสกัดเอาพลาสมิด และย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI / *Pst*I วิเคราะห์ผลโดยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสเปรียบเทียบกับพลาสมิด pUC118 ที่ย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI ทรานสฟอร์แมนท์ลูกผสม จะให้แถบดีเอ็นเอสองแถบ คือ แถบของพลาสมิด pUC118 ขนาด 3.2 กิโลเบส และชิ้นดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCSBC8 ขนาดประมาณ 3.0 กิโลเบส แล้วทำการทดสอบดีเอ็นเอลูกผสมว่าชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อนั้นเป็นชิ้นดีเอ็นเอจาก pCSBC8 จริง และเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pUC118 อย่างถูกต้อง โดยทำการย่อยดีเอ็นเอลูกผสมอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ที่เหมาะสม แล้วนำมาแยกแถบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ย้อม

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้กับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วนำดีเอ็นเอลูกผสมไปทำการหาลำดับเบสต่อไป

3.5 <u>การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing)</u>

3.5.1 <u>การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยว</u> (Single-stranded Template DNA)

ดัดแปลงมาจาก Tabor และ Richardson,1989)

เลี้ยงเชื้อทรานสฟอร์แมนท์ในอาหารอุดม LB 1 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ จนกระทั่งการเจริญถึงระยะ exponential (OD_{600}=0.3-0.6) นำเชื้อมา 15 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหารอุดม LB ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (เจือจาง 1:100) และเติม M13KO7 phage ลงไป 10 ไมโครลิตร (>5 X 10^{10} pfu/ml) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมกานามัยซินให้มีความเข้มข้น 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 14-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดใหม่แล้วเติม 40% PEG 6000 (polyethyleneglycol 6000) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตท pH 4.8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที นำมาปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสออกให้หมดหรือพยายามดูดออกให้มากที่สุด ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE จำนวน 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตท ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำมาสกัดด้วยฟีนอล:คลอโรฟอร์ม (1:1) เท่ากับปริมาตรเดิม เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเพื่อให้แยกชั้นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายชั้นบนมาสกัดฟีนอลออก โดยการเติมไดเอธิลอีเธอร์ จำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าจนกระทั่งสารละลายชั้นล่างใส ปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้งกำจัดไดเอธิลอีเธอร์ที่ยังเหลืออยู่โดยตั้งทิ้งไว้ที่ 37°ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมเอธานอลเย็นจำนวน 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด แช่ที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% เอธานอล 1 ครั้ง หลังจากปั่นอีกครั้งแล้วตากทิ้งไว้ให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 15-45 ไมโครลิตร สำหรับนำไปทำปฏิกิริยา sequencing ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.2 การทำปฏิกิริยา Sequencing (Amersham,1994)

การทำปฏิกิริยา sequencing เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายเดี่ยวนี้จะใช้วิธี chain termination sequencing ที่ปรับปรุงมาจากวิธีดั้งเดิมของ Sanger (1977) ใช้ชุดการทำปฏิกิริยา Sequencing (Sequenase ™ Version 2.0 DNA Sequencing Kit) ของบริษัท Amersham International plc. โดยการใช้ไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ เอนไซม์ T_7 DNA Polymerase และสารรังสี α-[S^{35}]-dATP ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนใหญ่ คือ Annealing ระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบกับดีเอ็นเอไพรเมอร์ (primer) Elongation เป็นช่วงที่ เอนไซม์ T_7 DNA Polymerase ทำการสร้างสายดีเอ็นเอ และ Termination เป็นช่วงที่ทำให้การสร้างสายดีเอ็นเอหยุดชะงักด้วยการใส่สารละลายที่มีไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ผสมอยู่ลงไป ซึ่งมีวิธีการทำดังนี้

ทำการ Anneal ดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวกับดีเอ็นเอไพร์เมอร์ในหลอดเซนตริฟิวส์ โดยใส่ดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวจำนวน 3 ไมโครกรัม เติมไพร์เมอร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 0.5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) เติม reaction buffer (Tris-HCl pH7.5 200 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียมคลอไรด์ 250 มิลลิโมลาร์) จำนวน 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อให้ได้เป็น 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ระหว่างนี้ เตรียมใส่ Termination mix ทั้ง 4 ชนิด (A mix ,G mix, C mix ,T mix) 2.5 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ใหม่ โดยใส่หลอดละชนิด แล้วนำมาอุ่นที่ 37°ซ เป็นเวลา 3-5 นาที

ทำ Elongation reaction ในหลอดที่ทำ Annealing โดยเติม 0.1 โมลาร์ DTT 1 ไมโครลิตร เติม Labeling Mix (เจือจาง 1:8 ด้วย Enzyme Dilution Buffer) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

ทำ Termination reaction โดยปิเปตสารละลายในหลอด Elongation reaction จำนวน 3.5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดที่มี Termination Mix แต่ละชนิด ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่ 37°ซ เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย Stop solution (95% Formamide EDTA 20 มิลลิโมลาร์ Bromophenol Blue 0.05 % Xylene Cyanol FF 0.05 %) จำนวน 4 ไมโครลิตร ลงในหลอดทั้ง 4

3.5.3 การเตรียม Sequencing Gel

Polyacrylamide gel ที่มียูเรียเป็นองค์ประกอบ จะถูกเทลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่นประกบกัน โดยมี spacer (แผ่นพลาสติกแถบยาวขนาดเท่าความยาวของกระจก) คั่นกลาง ที่ทำให้ติดกันด้วยแถบกาวพิเศษหรือใช้คลิบหนีบ แผ่นกระจกแผ่นหนึ่งเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าธรรมดา (back plate) ส่วนอีกแผ่นมีขนาดเล็กกว่า (notch plate) แผ่นเจลที่เตรียมนี้จะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บางมาก ประมาณ 0.4 มิลลิเมตร และมีความยาว 40 ซม. เริ่มต้นด้วยการล้างกระจกทั้ง 2 แผ่นด้วยน้ำสบู่และน้ำประปาจนสะอาดดีแล้วตั้งกระจกบนผ้าที่สะอาด ผึ่งให้แห้งดีแล้ว ทำการเคลือบกระจกเฉพาะ notch plate ด้วยซิลิโคน เพื่อป้องกันเจลติดกระจก ประกอบแผ่นกระจกทั้งสองเข้าด้วยกัน โดยมี spacer คั่นแผ่นกระจกทั้งสอง ให้เกิดช่องว่างเพื่อเทเจลได้ ใช้เทปกาวพิเศษพันรอบแผ่นกระจกที่ประกบกันทั้ง 3 ด้าน แล้วใช้คลิบหนีบให้แน่น วางแผ่นกระจกในแนวราบ เตรียม polyacrylamide gel ตามความเข้มข้นที่ต้องการ ดังแสดงในตารางที่ 9

<u>ตารางที่ 9</u> การเตรียม acrylamide gel ที่เปอร์เซนต์ความเข้มข้นต่างๆ (Amersham,1994)

Reagent		ความเข้มข้นของ acrylamide			
		4 %	5%	6 %	8 %
urea	(กรัม)	42	42	42	42
10 X TBE	(มิลลิลิตร)	10	10	10	10
acrylamide	(กรัม)	3.79	4.38	5.7	7.6
bis-acrylamide	(กรัม)	0.21	0. 167	0.3	0.4
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร					
10 % ammonium persulfate	(ไมโครลิตร)	200	200	200	200
TEMED	(ไมโครลิตร)	50	50	50	50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อพร้อมจะเทเจล เติม 10 % ammonium persulfate (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง) และ TEMED คนให้สารละลายผสมกัน เทเจลโดยจ่อปากบีกเกอร์เข้าที่มุมหนึ่งของ notch plate แล้วค่อยๆเทเจลลงระวังอย่าให้มีฟองอากาศ แล้วสอด comb ลงในสารละลายเจลที่อยู่ระหว่างกระจกให้ลึกประมาณ 0.5 ซม. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิด polymerization นาน 1-2 ชั่วโมง ดึง comb ออก ฉีดล้างผิวเจลด้านบนด้วย 1X TBE นำเจลไปประกอบเข้ากับเครื่อง sequencing electrophoresis chamber โดยเอาด้านของ notch plate เข้าหาอ่างบัฟเฟอร์ ปลายด้านล่างของแผ่นกระจกแกะเอาเทปกาวออก แล้วจุ่มลงในอ่างบัฟเฟอร์ล่าง เปิดเครื่องให้พลังไฟฟ้า (power

supply) โดยปรับวัตต์คงที่ (constant watts) ไปที่ 35 วัตต์ ทำการ Pre-run ประมาณครึ่งชั่วโมง ก่อนหยอดสารละลายตัวอย่าง นำสารละลายตัวอย่างไปอุ่นที่อุณหภูมิ 80-90 °ซ เป็นเวลา 3 นาที ฉีด 1X TBE ไล่ยูเรียที่ตกค้างอยู่ใน well ของเจล หยอดแต่ละ sequencing reaction ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ well ของเจล โดยเรียงลำดับ sequencing reaction ของแต่ละสารละลายตัวอย่างเป็น G A T และ C ตามลำดับ เพื่อสะดวกในการอ่านผล เปิดเครื่องให้พลังไฟฟ้าสำหรับเวลาที่ใช้นั้นขึ้นกับความยาวของกระจกและช่วงลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการอ่านผล เมื่อครบเวลาแล้ว นำแผ่นเจลออกจากเครื่อง แล้วแยกแผ่นกระจกทั้งสองออกจากกัน เจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นยาว (back plate) วางแผ่นกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ตัดให้มีขนาดใหญ่กว่าแผ่นเจลเล็กน้อย ลงบนเจล รีดทับเบาๆบนกระดาษ เพื่อให้เจลติดกับกระดาษตลอดทั้งแผ่น ยกเจลที่ติดกับกระดาษออกจากแผ่นกระจก ปิดทับด้วย Syran wrap นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องอบเจล ที่อุณหภูมิ 80 °ซ นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำเจลที่ได้ไปทำ autoradiography โดยประกบกับฟิลม์ X-ray ในกล่องประกบฟิลม์ เป็นเวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง

นำแผ่นฟิลม์มาล้าง โดยจุ่มลงในสารละลาย developer เป็นเวลาประมาณ 1 นาที ล้างในน้ำประมาณ 1 นาที และในสารละลาย fixer ประมาณ 3-5 นาที ล้างในน้ำอีกครั้ง ก่อนนำฟิลม์ไปผึ่งให้แห้งสนิท แล้วจึงนำมาแปลผลบนแผ่นฟิลม์ให้เป็นลำดับเบส จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม DNA strider 1.0 หาแผนที่เรสทริกชัน, ลำดับของกรดอะมิโน, ตำแหน่งของ promoter, start / stop codon, open reading frame และเปรียบเทียบความคล้ายคลึง (homology) กับเอนไซม์ CGTase ของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ

3.6 <u>การติดตามยีน CGTase ใน *Bacillus* sp. A11 โดยใช้ nucleic acid hybridization</u>

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำการสกัดดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. A11 ตามวิธีในหัวข้อ 3.1.1 แล้วนำมาย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI *Bam*HI *Pst*I ใน reaction mixture 30 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ แล้วนำไปทำ Southern-blot hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม 2 ชนิด ชนิดแรกนั้นเป็นยีน α-CGTase ที่มีขนาดประมาณ 2.5 กิโลเบส ซึ่งได้จากการย่อยพลาสมิด pDS10 ด้วยเอนไซม์ *Pvu*II/*Bam*HI ส่วนชนิดที่สอง เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 5.2 กิโลเบส ได้จากย่อยพลาสมิด pCSBC5 ด้วยเอนไซม์ *Pst*I จากนั้นนำมาเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตาม ทำการติดฉลากโดยใช้สารปลอดรังสี เทคนิคทาง nucleic acid hybridization ต่างๆที่ใช้มีดังนี้

3.7 nucleic acid hybridization (Boehringer, 1993)

3.7.1 การติดฉลากดีเอ็นเอ

ใช้วิธี Random Primed DNA Labeling และใช้ชุดการติดฉลากดีเอ็นเอ (DNA Labeling Kit) ของบริษัท Boehringer Manniham โดยใช้สาร digoxigenin ซึ่งเป็นสาร steriod hapten อยู่ในรูป DIG-11-dUTP เตรียมโดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการติดฉลาก จำนวน 1 ไมโครกรัม ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งทันทีประมาณ 1 นาที แล้วจึงนำมาเติม hexanucleotide จำนวน 2 ไมโครลิตร dNTP labeling mixture จำนวน 2 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Klenow fragment ของ DNA polymerase จำนวน 1 ไมโครลิตร (2 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อให้ได้จำนวน 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพอดี หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสาร Na_2EDTA 200 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 จำนวน 2 ไมโครลิตร และเติมสารละลายลิเทียมคลอไรด์ 4 โมลาร์ จำนวน 2.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ ข้ามคืน จึงปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 5000xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยเอธานอลเย็น 70 เปอร์เซนต์ และละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 50 ไมโครลิตร

จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้รับการติดฉลากโดยการทำ dot-blot hybridization เปรียบเทียบความเข้มข้นของสัญญาณกับดีเอ็นเอที่ได้รับการติดฉลากมาตรฐาน (DNA control labeled: digoxigenin labeled pBR328 ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ความเข้มข้น 5,000 1,000 100 1 และ 0.1 พิโครกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ ดีเอ็นเอที่ได้รับการติดฉลากนี้สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลานานที่ -20°ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

3.7.2 Dot-blot hybridization

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบมา 1 ไมโครกรัม ทำให้เป็นสายเดี่ยวโดยบ่มกับสารละลาย denature (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 โมลาร์ Na_2EDTA 100 มิลลิโมลาร์) ปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตรเดิมที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วจุดลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน (nylon membrane positively charge) ทิ้งไว้จนแห้งสนิทดี จึงนำไปทำการตรึงดีเอ็นเอต่อไป

3.7.3 Southern-blot hybridization (ดัดแปลงจาก Ishii, 1992)

นำดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบ มาทำการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 0.7-1.0 เปอร์เซนต์ ขนาดของเจล 8.5x10 ตาราง

เซนติเมตร ใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง ใน Tris-borate buffer pH8.3 ย้อมแถบดีเอ็นเอในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์นานประมาณ 30 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นประมาณ 30 นาที เขย่าแผ่นเจลอย่างเบาๆ ในกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่นก่อนเขย่าในสารละลาย denature (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียมคลอไรด์1.5 โมลาร์) เป็นเวลาประมาณ 45 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งแล้วนำแผ่นเจลแช่ในบัฟเฟอร์transfer (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 250 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์) เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอสู่แผ่นไนลอนเมมเบรนโดยใช้หลักการ capillary transfer โดยชั้นล่างสุดเป็นกระดาษกรอง 3M ที่วางบนกระจก และมีปลายเชื่อมต่อลงในภาชนะที่บรรจุ บัฟเฟอร์ transfer เอาไว้ หลังจากนั้นเป็นกระดาษกรอง 3M ที่มีขนาดเท่าแผ่นเจลจำนวน 2 แผ่น แล้วจึงเป็นแผ่นเจลที่วางคว่ำหน้าลง ชั้นบนของแผ่นเจลเป็นแผ่นไนลอนเมมเบรนที่แช่ในบัฟเฟอร์ transfer ก่อนประมาณ 1 นาที แล้วจึงเป็นชั้นของกระดาษกรอง 3M ประมาณ 3-4 แผ่น และชั้นบนสุดเป็นกระดาษซับน้ำที่มีความสูงประมาณ 7-8 เซนติเมตร กดทับด้วยน้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม แล้วคลุมด้วยถุงพลาสติค ทิ้งไว้ข้ามคืนจึงนำแผ่นไนลอนเมมเบรนออกมาล้างในบัฟเฟอร์ 5xSSC (โซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์ และ โซเดียมซิเตรด 0.07 โมลาร์ pH 7.0) เป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งก่อนนำไปตรึงดีเอ็นเอต่อไป

3.7.4 <u>การตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นไนลอนเมมเบรน</u>

นำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่แห้งแล้วมาตรึงดีเอ็นเอโดยการฉายแสงอุลตราไวโอเลตนาน ประมาณ 3-5 นาที หรือนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80°ซ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อตรึงดีเอ็นเอแล้ว แผ่นไนลอนเมมเบรนนี้สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง หรือนำไปทำการไฮบริไดซ์ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7.5 <u>Prehybridization และ hybridization</u>

นำแผ่นไนลอนเมมเบรนแช่ในสารละลาย standard prehybridization (บัฟเฟอร์ 5xSSC blocking reagent 1 เปอร์เซนต์ N-lauroyl sarcosine 1 เปอร์เซนต์ และ SDS 0.02 เปอร์เซนต์) พอให้ท่วมแผ่น บ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นในขั้นตอนการทำ hybridization นำสารละลาย standard prehybridization ที่มีดีเอ็นเอติดตามละลายอยู่ 5-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงบรรจุลงในถุงสะอาดที่มีแผ่นไนลอนเมมเบรนจากขั้นตอน prehybridization โดยใช้ปริมาณ 3 มิลลิลิตรต่อขนาดไนลอนเมมเบรน

8.5x10 ตารางเซนติเมตร รีบปิดปากถุงให้สนิทโดยไม่ให้มีฟองอากาศ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ ข้ามคืน จึงนำไปวิเคราะห์สัญญาณการเกิดไฮบริดต่อไป

3.7.6 การวิเคราะห์สัญญาณการเกิดไฮบริด (Boehringer, 1993)

ในการวิเคราะห์สัญญาณการเกิดไฮบริดใช้หลักการทางอิมมูโนด้วยการใช้แอนติบอดีต่อ digoxigenin ที่คอนจูเกตอยู่กับเอนไซม์ alkaline phosphatase หลังจากนั้นจึงตรวจสอบผลโดยการใช้สารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่ให้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถติดตามผลได้ ซึ่งในการทดลองได้ใช้สารเรืองแสงเป็นสารตั้งต้น (chemiluminescent detection) โดยหลังจากขั้นตอน hybridization นำแผ่นไนลอนเมมเบรนออกจากถุง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 2xSSC ที่มี SDS อยู่ 0.1 เปอร์เซนต์ 2 ครั้งๆ ละ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 0.5xSSC ที่มี SDS 0.1 เปอร์เซนต์ 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 65°ซ จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ Genius I นาน 1 นาที แล้วนำแผ่นไนลอนเมมเบรนเขย่าเบาๆ ในบัฟเพอร์ Genius II พอท่วมแผ่น เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นบัฟเฟอร์ Genius II ที่มี anti-DIG alkaline phosphatase เจือจางในอัตราส่วน 1:20,000 ใช้ปริมาณพอให้ท่วมแผ่น เขย่าเบาๆ ประมาณ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ Genius I 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และแช่ในบัฟเฟอร์ Genius III นาน 2 นาที จึงจุ่มลงในสารละลายเรืองแสง (lumigen PPD เจือจางใน Genius III อัตราส่วน 1:200) ให้ทั่วแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วบรรจุลงในถุงพลาสติคใส ปิดปากถุงให้สนิทโดยไม่ให้มีฟองอากาศ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำมาทำปฏิกิริยา กับฟิล์ม X-ray ในที่มืด เป็นเวลาประมาณ 30-60 นาที

นำแผ่นฟิล์มมาล้าง โดยจุ่มลงในสารละลาย developer เป็นเวลาประมาณ 1 นาที ในน้ำประมาณ 1 นาที และในสารละลาย fixer ประมาณ 3-5 นาที แล้วล้างในน้ำไหลประมาณ 1-2 นาที โดยทั้งหมดนี้ทำในห้องมืด และใช้แสงสีแดง จากนั้นจึงนำแผ่นฟิล์มตากให้แห้งสนิทจึงค่อยนำมาวิเคราะห์ผล แผ่นไนลอนเมมเบรนที่ตรวจสอบโดยวิธีนี้สามารถล้างดีเอ็นเอติดตามที่ไฮบริไดซ์อยู่กับ target DNA ออก แล้วใช้ดีเอ็นเอติดตามชนิดใหม่ไปไฮบริไดซ์กับ target DNA เดิมได้ โดยนำแผ่นออกจากถุง ล้างในน้ำกลั่นที่สะอาด ประมาณ 1-2 นาที ล้างดีเอ็นเอติดตามออกโดยเขย่าเบาๆ ในสารละลาย reprobe (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 มิลลิโมลาร์ และ SDS 0.1 เปอร์เซนต์) 4 ครั้งๆ ละ 15 นาทีที่อุณหภูมิ 37°ซ จากนั้นล้างในบัฟเฟอร์ 2xSSC พอให้ท่วมแผ่นไนลอนเมมเบรน เป็นเวลาประมาณ 1-2 นาที จึงนำแผ่นไนลอนเมมเบรนเข้าสู่ขั้นตอน prehybridization และ hybridization กับดีเอ็นเอติดตามชนิดอื่นๆ ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

i 17002400

3.8 <u>การโคลนยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ลงในพลาสมิด pUC18</u>

หลังจากที่ทำ Southern-blot hybridization ได้ตำแหน่งของสัญญาณไฮบริดที่เกิดขึ้นบนโครโมโซมของ *Bacillus* sp. A11 แล้ว จึงทำการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. A11 สำหรับการโคลน โดยตัดเจลบริเวณที่เกิดสัญญาณไฮบริดมาแยก และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยวิธีelectroelution ตามวิธีในข้อ 3.4.1 และนำพลาสมิด pUC18 มาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม ทำการสร้างดีเอ็นเอลูกผสมและคัดเลือกหาทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสม ตามวิธีในข้อ 3.4.3-3.4.5

3.9 <u>การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ โดยการทดสอบแอคติวิตีของการย่อยแป้ง (dextrinizing activity) ด้วยวิธี starch hydrolytic activity</u>

ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จากการโคลนในหัวข้อที่ 3.8 จะนำมาทดสอบแอคติวิตีของการย่อยแป้งของเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธี starch hydrolytic activity เพื่อคัดเลือกหาทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีน CGTase โดยการทำ replica plating บนจานอาหารอุดม LB-starch agar pH 7.4 (Bacto tryptone 1.0เปอร์เซนต์ yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ โซเดียมคลอไรด์ 1.0 เปอร์เซนต์ Bacto agar 1.5 เปอร์เซนต์ และ soluble starch 1.0 เปอร์เซนต์) ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG 0.0025 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วหยดสารละลายไอโอดีน (ไอโอดีน 0.203 เปอร์เซนต์ และโปรแตสเซียมไอโอไดด์ 5.202 เปอร์เซนต์) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 4-5 หยด คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและให้วงใสรอบๆ โคโลนี

3.10 <u>การคัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมโดยใช้ nucleic acid hybridization</u>

ทรานสฟอร์แมนท์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.8 นอกจากจะมาทำการคัดเลือกต่อด้วยการทดสอบแอคติวิตีของการย่อยแป้งแล้ว ยังนำทรานสฟอร์แมนท์เหล่านั้นมาสกัดเอาดีเอ็นเอลูกผสมตามวิธีในข้อ 3.1.2 เพื่อนำมาคัดเลือกหาดีเอ็นเอลูกผสมที่มียีน CGTase ด้วยวิธี dot-blot hybridization และ Southern-blot hybridization ตามวิธีในข้อ 3.7 อีกทางหนึ่งด้วย โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจาก pDS10 และ pCSBC5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.11 การศึกษาแผนที่เรสทริกชันของดีเอ็นเอลูกผสมที่ถูกคัดเลือก

เมื่อคัดเลือกได้ดีเอ็นเอลูกผสมที่ต้องการแล้ว ทำการย่อยดีเอ็นเอลูกผสมนั้น ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ แล้วนำมาแยกแถบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นำเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต แล้วเปรียบเทียบขนาดกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน เมื่อได้แผนที่เรสทริกชันของดีเอ็นเอลูกผสมแล้ว นำไปเปรียบเทียบกับแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pCSBC5 และของยีน CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย