บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 พลาสมิด

3.3.1 ดีเอ็นเอพาหะ

ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการทดลองนี้คือพลาสมิด pUC18 (Yanisch-Perron และคณะ, 1985) มีขนาดประมาณ 2.686 กิโลเบส มียีนต้านยาแอมพิซิลลิน และยีน lacZ ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นชิ้นส่วนด้านปลายอะมิโนของเอนไซม์ β-galactosidase แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดนี้แสดงในภาคผนวกที่ 1

3.3.2 พลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม pNC3 และ pKWZ

พลาสมิด pNC3 (Wu, Z. R. และคณะ, 1991) มีขนาดประมาณ 5.354 กิโลเบส มียีนที่สร้างเอนไซม์ neutral protease (nprE gene) และยีนต้านยากานามัยซิน ดังแสดงในภาคผนวกที่ 2

พลาสมิด pKWZ (Park, S. S. และคณะ, 1989) มีขนาดประมาณ 7.0 กิโลเบส มียีนที่สร้างเอนไซม์ alkaline protease (aprE gene) และยีนต้านยากานามัยซิน ดังแสดงในภาคผนวกที่ 3

3.2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ดีเอ็นเอของฟาจแลมบ์ดา (λ-DNA) ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Hind*III (λ/*Hind*III) ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 8 ขนาด คือ 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 0.564 และ 0.125 กิโลเบส ตามลำดับ (Rodriguez และ Tait, 1983)

ดีเอ็นเอของ λ-DNA ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Bst*EII (λ/*Bst*EII) ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 14 ขนาด คือ 8.454, 7.242, 6.369, 5.686, 4.822, 4.324, 3.675, 2.323, 1.929, 1.371, 1.264, 0.702, 0.224 และ 0.117 กิโลเบส ตามลำดับ (New England Biolabs, 1993)

3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 *Bacillus subtilis* TISTR 25

เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินในประเทศไทยได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย TISTR (Thailand Institute of Scientific and Technological Research)

3.3.2 *Escherichia coli* JM109

F' traD36 lacI^q lacZΔM15 proA$^+$ proB$^+$ (mcrA)Δ(lac-proAB) thi gryA96 (Nal^r) *endA1 hsdR17* ($r^-_k m^+_k$) *relA1 supE44 recA1* เป็นเชื้อที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าเรือนสำหรับการทรานสฟอร์มพลาสมิด

3.4 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ระยะสั้นทำโดยเก็บในรูปจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-agar และทำการ subculture ทุก 1 เดือน หรืออาจเก็บไว้ในรูปของ Slant LB-agar และทำการ subculture ทุก 3 เดือน ส่วนการเก็บในระยะยาวนั้นทำโดยเจริญเชื้อจนถึง log phase (OD_{600} = 0.3-0.5) ในอาหารอุดม 1 มิลลิลิตร ผสมกับกลีเซอรอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ สามารถเก็บได้ประมาณ 1 ปี

3.5 เครื่องแก้วและสารละลาย

เครื่องแก้วและสารละลายทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง ทำให้สะอาดปราศจากนิวคลีเอสด้วยการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

3.6 การเตรียมสารละลาย

3.6.1 สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

อาหารเลี้ยงเชื้อ LB

เตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ LB จำนวน 100 มิลลิลิตร

Bacto-tryptone	1	กรัม
Bacto-yeast extract	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	1	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.5 โดยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เจือจาง นำไปออโตเคลบที่ 121°ซ, 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

<u>เตรียมวุ้นเลี้ยงเชื้อ LB</u>

ใส่วุ้น (agar) จำนวน 1.5 กรัม ลงในน้ำเลี้ยงเชื้อ LB จำนวน 100 มิลลิลิตร หลังออโตเคลบแล้ว ทิ้งให้เย็นจนอุณหภูมิประมาณ 50°ซ จึงเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลบแล้ว

<u>สารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์, pH 7.6</u>

ละลาย Tris base 1.21 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.6 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เจือจาง ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ

<u>สารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0</u>

ละลาย disodium ethylene diamine tetraacetate. $2H_2O$ (EDTA) จำนวน 1.861 กรัมในน้ำ 8 มิลลิลิตร คนให้ละลายมากที่สุดโดยใช้เครื่องกวนสาร ปรับ pH 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ

<u>สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์</u>

ละลายโซเดียมคลอไรด์ จำนวน 2.922 กรัม ลงในน้ำ 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ

<u>สารละลายซูโครส 25 เปอร์เซนต์</u>

ละลายซูโครส 12.5 กรัมในน้ำ 40 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ

<u>สารละลายบัฟเฟอร์ SET</u>

ผสมสารละลายต่อไปนี้เข้าด้วยกันในหลอดแก้วไร้เชื้อ ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ

สารละลายซูโครส 25 เปอร์เซนต์	40	มิลลิลิตร
สารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์, pH 7.6	2.5	มิลลิลิตร

สารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0 5 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมอะซีเตท 1 โมลาร์, pH 7.4

ละลาย sodium acetate. $3H_2O$ 1.36 กรัม ในน้ำ 8 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.4 โดยการเติมกรดอะซีติค ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร และทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ

สารละลายบัฟเฟอร์ RNase

ผสมสารละลายต่อไปนี้เข้าด้วยกันในหลอดแก้วไร้เชื้อ ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ

สารละลายโซเดียมอะซีเตท 1 โมลาร์, pH 7.4 1 มิลลิลิตร

สารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0 6 ไมโครลิตร

สารละลายบัฟเฟอร์ TEN

ผสมสารละลายต่อไปนี้เข้าด้วยกันในหลอดแก้วไร้เชื้อ ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ

สารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์,pH 7.6 0.1 มิลลิลิตร

สารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0 0.02 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ 0.02 มิลลิลิตร

Pancreatic ribonuclease A 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลาย Pancreatic ribonuclease A จำนวน 10 มิลลิกรัมในสารละลายบัฟเฟอร์ RNase จำนวน 1 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วไร้เชื้อ อุ่นที่ 80°ซ เป็นเวลา 10 นาที ก่อนใช้ทุกครั้ง เก็บสารละลายนี้ได้เป็นเวลานานที่ -20°ซ

สารละลายไลโซไซม์ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลายไลโซไซม์ 5 มิลลิกรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ TEN จำนวน 1 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วที่ไร้เชื้อ เก็บสารละลายนี้ได้เป็นเวลานานที่ -20°ซ

สารละลายโปรเนส 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลายโปรเนส 2 มิลลิกรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ TEN จำนวน 1 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วไร้เชื้อ อุ่นที่ 37°ซ เป็นเวลา 15 นาทีก่อนใช้ เก็บสารละลายนี้ได้เป็นเวลานานที่ -20°ซ

สารละลาย SDS 25 เปอร์เซนต์

ละลาย sodium dodecyl sulfate (sodium lauryl sulfate) 2.5 กรัม ในน้ำ 9 มิลลิลิตร อุ่นที่ 68°ซ เพื่อช่วยให้การละลายเร็วขึ้น ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ

สารละลายแอมโมเนียมอะซีเตท 7.5 M, pH 7.5

ละลายแอมโมเนียมอะซีเตท 5.78 กรัม ในน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วยกรดอะซีติค ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการกรอง

3.6.2 สารละลายสำหรับสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

สารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์, pH 8.0

ละลาย Tris base 1.21 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น ตั้งทิ้งให้สารละลายเย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ

สารละลายกลูโคส 100 มิลลิโมลาร์

ละลายกลูโคส 0.45 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ

สารละลาย Solution I

(กลูโคส 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, EDTA 10 มิลลิโมลาร์ และ ไลโซไซม์ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

สารละลายกลูโคส 100 มิลลิโมลาร์	5	มิลลิลิตร
สารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์, pH 8.0	0.25	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์ (ดูจากข้อ 3.6.1)	0.2	มิลลิลิตร
ไลโซไซม์	50	มิลลิกรัม

ผสมสารละลายต่อไปนี้เข้าด้วยกันในหลอดแก้วไร้เชื้อ ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ

สารละลาย Solution II

(โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ และ SDS 1 เปอร์เซนต์)

ผสมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์ (ดูการเตรียมจากข้อ 3.6.6) และ สารละลาย SDS 25 เปอร์เซนต์ (ดูการเตรียมจากข้อ 3.6.1) จำนวนอย่างละ 0.4 มิลลิลิตรเข้าด้วยกันในหลอดแก้วไร้เชื้อ ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ

สารละลาย Solution III

ละลาย sodium acetate.3 H_2O จำนวน 8.16 กรัมในน้ำ 16 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 4.8 ด้วยกรดอะซีติค ปรับปริมาตรให้เป็น 20 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ

สารละลายบัฟเฟอร์ TE

(Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์)

ผสมสารละลายต่อไปนี้เข้าด้วยกันในหลอดแก้วไร้เชื้อ ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ

สารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์, pH 8.0	0.1	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0	0.02	มิลลิลิตร

ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ละลายแอมพิซิลลิน 50 มิลลิกรัม ใน แอบโซลูทเอทธานอล จำนวน 1 มิลลิลิตร

3.6.3 สารละลายสำหรับการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

สารละลายบัฟเฟอร์ 1x และ 10x Tris-borate (1xTB และ 10xTB)

เตรียม 10xTB โดยละลาย Tris base 10.8 กรัม กรดบอริค 5.5 กรัม และ Na_2 EDTA 0.93 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 10xTB นี้ให้เป็น TB โดยเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ลงใน 10xTB จำนวน 100 มิลลิลิตร

0.7% และ 1.0% อะกาโรสเจล

ชั่งอะกาโรสเจล 0.7 หรือ 1.0 กรัม (ตามเปอร์เซนต์ที่ต้องการ) ใส่ลงใน 1xTB 100 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดพร้อมคนจนละลายหมด ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเย็นลงประมาณ 50°ซ ก่อนนำไปเทลงในเจลแชมเบอร์

สารละลาย Tracking dye (0.025% bromphenol blue, 40% Ficoll 400, 0.1% SDS

(บรอมฟีนอลบลู 0.025 เปอร์เซนต์, ไฟคอล 400 40 เปอร์เซนต์ และ SDS 0.1 เปอร์เซนต์)

ละลายบรอมฟีนอลบลู 2.5 มิลลิกรัม ไฟคอล 400 จำนวน 4 กรัมและ SDS 50 มิลลิกรัม ลงในน้ำกลั่นไร้เชื้อจำนวน 8 มิลลิลิตร หลังละลายหมดปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

สารละลายย้อม DNA (เอธิเดียมโบรไมด์ 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 2.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

3.6.4 สารละลายสำหรับการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 และ 0.01 โมลาร์

เตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ โดยละลาย $CaCl_2.2H_2O$ จำนวน 0.147 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ เตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ โดยเจือจางลง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่น

สารละลาย IPTG

ละลาย IPTG 0.025 กรัม ในน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ 1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายนี้ที่ -20°ซ

สารละลาย X-gal

ละลาย X-gal 0.02 กรัม ใน DMF (Dimethylformamide) 1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ -20°ซ

ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ดูวิธีการเตรียมจากข้อ 2.9.2

3.6.5 สารละลายสำหรับการหาโปรตีเอสแอคติวิตี

อาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium) สูตรที่ 1 (MG Halpern,1981)

yeast extract	20	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายให้เข้ากันแล้วนำไปปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 นำไปออโตเคลบ เติมสารละลายกลูโคสที่ออโตเคลบแล้วให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 เปอร์เซนต์

M9 medium + succinate

$Na_2HPO_4.7H_2O$	6	กรัม
KH_2PO_4	3	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	1	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปปรับ pH 7.4 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 900 มิลลิลิตร นำไปออโตเคลบ

เติมโซเดียมซัคซิเนต 0.1 กรัม/มิลลิลิตร ที่ออโตเคลบแยกต่างหากจำนวน 100 มิลลิลิตร

แมกเนเซียมซัลเฟต 1 โมลาร์ ที่ออโตเคลบแยกต่างหาก จำนวน 1 มิลลิลิตร และ แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ ที่ออโตเคลบแยกต่างหาก จำนวน 10 มิลลิลิตร

สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 โมลาร์ pH 7.0, 8.0 และ 9.0

ละลาย Tris (hydroxymethyl)-aminomethene 12.12 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 7.0, 8.0 และ 9.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 0.1 โมลาร์ pH 7.5 และ pH 8.0

ละลาย Na_2HPO_4 53.65 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร และ NaH_2PO_4 27.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เป็น stock solution ผสมสารละลายทั้งสองในอัตราส่วนดังต่อไปนี้

pH	NaH_2PO_4 (ml)	Na_2HPO_4 (ml)
7.5	80	420
8.0	26.5	473.5

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

สารละลายบัฟเฟอร์คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ pH 9.5, 10.0 และ 10.5

ละลาย Na_2CO_3 21.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร และ $NaHCO_3$ 16.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บเป็น stock solution ผสมสารละลายทั้งสองในอัตราส่วนดังต่อไปนี้

pH	Na_2CO_3 (ml)	$NaHCO_3$ (ml)
9.5	65	185
10.0	137	112.5
10.5	202.5	47.5

เติมน้ำกลั่น ปรับ pH ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลายบัฟเฟอร์คาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ pH 11.0

ชั่ง Na_2CO_3 10.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ด้วย 0.1 NaOH เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร

สารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์

ชั่ง casein hammersten 0.5 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ที่ใช้วัดแอคติวิตี จำนวน 100 มิลลิลิตร คนจนกระทั่งเคซีนละลายหมด เก็บรักษาในตู้เย็น

สารละลาย TCA 10 เปอร์เซนต์

ละลาย Trichloro acetic acid 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาในตู้เย็นก่อนนำมาใช้

3.6.6 สารละลายสำหรับการทำไฮบริไดซ์เซชั่น

สารละลาย EDTA 200 มิลลิโมลาร์, pH 8.0

เตรียมโดยเจือจางจาก stock สารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์ (จากข้อ 3.6.1) จำนวน 400 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ ปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร

สารละลายลิเทียมคลอไรด์ 4 โมลาร์

ชั่งลิเทียมคลอไรด์ 3.1138 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ

สารละลาย Dot-blot denature

(โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 โมลาร์ และสาร EDTA 100 มิลลิโมลาร์)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม และ EDTA 3.7224 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 4 โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 233.76 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย Southern-blot denature

(โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์)

เตรียมโดยเจือจางจาก stock สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 4 โมลาร์ จำนวน 37.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.25 โมลาร์

เตรียมโดยใช้กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 10.78 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร หรือใช้กรดไฮโดรคลอริค 37 เปอร์เซนต์ จำนวน 12.5 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

สารละลายบัฟเฟอร์ Transfer

(โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.25 โมลาร์และ โซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์)

เจือจางจาก stock โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์ จำนวน 50 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 4 โมลาร์ จำนวน 375 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายบัฟเฟอร์ 20xSSC

(โซเดียมคลอไรด์ 3 โมลาร์ และโซเดียมซิเตรต 0.3 โมลาร์, pH 7.0)

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 175.32 กรัม และโซเดียมซิเตรต 88.23 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 7.0 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลายบัฟเฟอร์ 5xSSC

เจือจางจาก stock 20xSSC จำนวน 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

สารละลาย standard prehybridization

ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ 5xSSC, blocking reagent 1 เปอร์เซนต์, SDS 0.02 เปอร์เซนต์ และ N-Lauroyl sarcosine 1 เปอร์เซนต์ เตรียมโดยชั่ง blocking reagent และ N-Lauroyl sarcosine อย่างละ 1 กรัม และ SDS 0.02 กรัม ละลายใน 5xSSC จำนวน 100 มิลลิลิตร

สารละลายบัฟเฟอร์ Genius I

ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 150 มิลลิโมลาร์ และ Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.8766 กรัมและ Tris-HCl 1.211 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH 7.5 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่าน 0.45 μm membrane

สารละลายบัฟเฟอร์ Genius II

เตรียมโดยละลาย blocking reagent 1 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius I จำนวน 100 มิลลิลิตร อุ่นพร้อมคนที่อุณหภูมิ 60° ซ จนละลายหมด เก็บที่ 4°ซ

สารละลายบัฟเฟอร์ Genius III

ประกอบด้วย Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์, โซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ pH 9.5 เตรียมโดยชั่ง Tris base 4.844 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 2.338 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH 9.5 เติม $MgCl_2.6H_2O$ 4.066 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 400 มิลลิลิตร

สารละลาย Reprobing

ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ และ SDS 0.1 เปอร์เซนต์ เตรียมโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์ จำนวน 8 มิลลิลิตร และ SDS 25 เปอร์เซนต์ จำนวน 0.8 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

3.7 การสกัดดีเอ็นเอ

3.7.1 การสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25

ดัดแปลงมาจากวิธีที่เสนอโดย Rodriguez และคณะ (1983)

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารอุดม LB จำนวน 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์หนึ่งครั้งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ SET

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

เติม ไลโซไซม์ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และอาร์เอ็นเอส จำนวน 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ โดยเขย่าเบาๆเป็นเวลา 30 นาที

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

เติมโปรเนส 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.3 มิลลิลิตร และ คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (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:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ นำสารละลายชั้นบนมาเติมโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และเอทธานอลเย็น จำนวน 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด แช่ที่อุณหภูมิ -20°ซ ข้ามคืน ค่อยๆพันสายโครโมโซมด้วยแท่งแก้ว แล้วนำไปจุ่มในเอทธานอลที่เย็น เพื่อล้างดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆให้หลุดออกไป

ละลายตะกอนของโครโมโซมดังกล่าว ในสารละลายบัฟเฟอร์ TEN จำนวน 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีคลอโรฟอร์ม 0.1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

3.7.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวิธีอัลคาไลน์ (Alkaline Extraction)

ดัดแปลงมาจากวิธีที่เสนอโดย (Maniatis,1982)

ในกรณีของการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณมาก เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารอุดม LB ที่เสริมยาปฏิชีวนะ 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน เพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น (starter) ดูดเซลล์ตั้งต้น จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะอัตราส่วนเดิม ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4,000xg เป็นเวลา 10 นาที

นำเซลล์มาเติมสารละลาย Solution I จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

เติมสารละลาย Solution II จำนวน 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆแล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 10 นาที

เติมสารละลาย Solution III จำนวน 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นตะกอน โดยกรองสารละลายผ่านผ้าขาวบางที่สะอาด 2 ชั้น นำสารละลายที่ได้มาเติมไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์เย็น จำนวน 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที ปั่นเก็บตะกอนด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนในสารละลายบัฟเฟอร์ TE จำนวน 10 มิลลิลิตร

เติม ซีเซียมคลอไรด์ 1 กรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมเอธิเดียมโบรไมด์ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดตะกอนโปรตีน ดูดสารละลายส่วนใสนำไปปั่นด้วยความเร็ว 55,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20°ซ ข้ามคืน จากนั้นลดความเร็วลงเหลือ 36,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้เกิดการแยกชั้นอย่างชัดเจนยิ่งขึ้น ค่อยๆดูดแถบชั้นของพลาสมิดออกมาโดยใช้เข็มฉีดยา

นำสารละลายที่ได้มาสกัดเอธิเดียมโบรไมด์ออก โดยเติมบิวธานอลที่ทำให้อิ่มตัวด้วยน้ำลงไปในปริมาตรที่เท่ากัน ปิดจุกหลอดแล้วกลับหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้นดูดสารละลายส่วนบนซึ่งมีเอธิเดียมโบรไมด์ทิ้งไป นำสารละลายส่วนล่างมาสกัดซ้ำอีกประมาณ 4 ครั้ง ด้วยบิวธานอลจนกว่าสีของเอธิเดียมโบรไมด์จะหมดไป ดูดสารละลายใสในถุงไดอะไลซีส (dialysis bag) แล้วนำไปทำไดอะไลส์ในสารละลายบัฟเฟอร์ TE เป็นเวลาข้ามคืน โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง เพื่อกำจัดซีเซียมคลอไรด์

ดูดสารละลายในถุงไดอะไลซีสออกมาสกัดด้วย ฟีนอล:คลอโรฟอร์ม(1:1) ในปริมาตรที่เท่ากับสารละลาย เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 4,000 xg เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายชั้นบนมาสกัดซ้ำอีกครั้งด้วย ฟีนอล:คลอโรฟอร์ม

นำสารละลายชั้นบนมาสกัดฟีนอลออก โดยการเติมไดเอธิลอีเธอร์ในปริมาตรที่เท่ากันเขย่าจนกระทั่งสารละลายชั้นล่างใส ปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้ง กำจัดไดเอธิลอีเธอร์ที่ยังเหลือในสารละลายโดยการเป่าลมลงบนสารละลายแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 15 นาที

เติมเอทธานอลเย็นจำนวน 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด แช่ที่อุณหภูมิ -20°ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป ปล่อยให้แห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ ละลายตะกอนในสารละลายบัฟเฟอร์ TE จำนวน 1 มิลลิลิตร

ในกรณีของการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณน้อย (Mini-preparation) จะใช้ปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยง 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

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

3.8 การย่อยดีเอ็นเอด้วย Restriction endonuclease

ได้มีการศึกษาพบว่า ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการย่อยดีเอ็นเอ คือความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (Ausuble และคณะ, 1989) ในงานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สำหรับเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดตามที่แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 4 ส่วนในกรณีที่ทำ double digestion จะเลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เอนไซม์ทั้งสองชนิดทำงานได้ดี ใน reaction mixture 20 ไมโครลิตร ใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม เรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดจะใช้ในปริมาณ 5 หน่วย บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาข้ามคืนหรืออย่างน้อย 2 ชั่วโมง ทำให้การย่อยดีเอ็นเอเกิดอย่างสมบูรณ์ แล้วหยุดปฏิกิริยา โดยการเติม tracking dye จำนวน 4 ไมโครลิตร

3.9 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

การวิเคราะห์ปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอทำโดยใช้ submarine horizontal gel electrophoresis ของอะกาโรสเจล 0.7-1.5 เปอร์เซนต์ ซึ่งเตรียมในบัฟเฟอร์ TB และใส่ดีเอ็นเอประมาณ 500 นาโนกรัมต่อหนึ่งช่องเจล ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส 80 โวลต์ นานประมาณ 3 ชั่วโมง ในบัฟเฟอร์ TB โดยเคลื่อนจากขั้วลบไปขั้วบวกและใช้ tracking dye เป็นตัวติดตาม นำเจลมาย้อมโดยแช่ในเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นประมาณ 1 ชั่วโมง นำเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตจาก UV transilluminator UVP แล้วเปรียบเทียบขนาดและปริมาณกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.10 การโคลนยีนโปรตีเอสในพลาสมิด pUC18

3.10.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2-7 กิโลเบส สำหรับการโคลน

นำโครโมโซมจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 มาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI แบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) ที่เวลาต่างๆกัน จากนั้นนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำเจลไปย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์แล้วส่องดูแถบชิ้นดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ตัดเจลที่มีขนาดตั้งแต่ 2 - 7 กิโลเบส มาแยกและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยวิธี electroelution โดยนำเจลที่ตัดออกมาใส่ถุงไดอะไลซีส (dialysis bag) เติมบัฟเฟอร์ TE ลงไปให้เต็มถุงแล้วนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสต่อประมาณ 30 นาที จากนั้นกลับขั้วไฟฟ้าทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจากขั้วบวก (+) ไปขั้วลบ (-) ต่ออีกประมาณ 5 นาที

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

เติมเอทธานอลเย็นจำนวน 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20°ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กระจายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

3.10.2 การเตรียมดีเอ็นเอพาหะ

นำพลาสมิด pUC18 มาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI โดยย่อยแบบสมบูรณ์แล้วนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตัดเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC18 โดยวิธี Electroelution จากนั้นนำมากำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ด้วยเอนไซม์ calf intestine phosphatase (CIP) โดยใช้ reaction mixture จำนวน 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัม, สังกะสีคลอไรด์ 1 มิลลิโมลาร์ และ CIP 1 หน่วย บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมโซเดียมอะซีเตท 3 โมลาร์ จำนวน 5 ไมโครลิตร แล้วนำมาสกัดด้วย ฟีนอล:คลอโรฟอร์ม (1:1) จำนวน 50 ไมโครลิตร โดยเขย่าให้เข้ากัน ปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำสารละลายชั้นบนมาสกัดซ้ำด้วย ฟีนอล:คลอโรฟอร์ม (1:1) อีกครั้ง

นำสารละลายชั้นบนมาสกัดเอาฟีนอลออก โดยการเติมไดเอธิลอีเธอร์ จำนวน 50 ไมโครลิตร แล้วเขย่าจนกระทั่งสารละลายชั้นล่างใส ปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้งกำจัดไดเอธิลอีเธอร์ที่ยังเหลืออยู่โดยตั้งทิ้งไว้ที่ 37°ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมเอทธานอลเย็นจำนวน 2 เท่าของปริมาณทั้งหมด แช่ที่

อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลาข้ามคืน ปั่นเก็บตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กระจายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

3.10.3 การสร้างดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant DNA)

นำดีเอ็นเอของโครโมโซมที่เตรียมได้ (ข้อ 3.10.1) และชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC18 (ข้อ 3.10.2) มาเชื่อมต่อกัน โดยใช้เอนไซม์เชื่อมต่อ T_4 DNA Ligase โดยผสมกันในอัตราส่วนของโมลดีเอ็นเอพาหะต่อโมลของดีเอ็นเอของโครโมโซมเท่ากับ 1:3 ใน Ligation mixture 20 ไมโครลิตร ใช้ T_4-DNA ligase 1 หน่วย และบัฟเฟอร์ Ligation 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 12-16°ซ เป็นเวลา 15-20 ชั่วโมง (จรัญญา เงินประเสริฐศิริ, 2528) แล้วนำไปทำทรานสฟอร์เมชัน (transformation) ต่อไป

3.10.4 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน

3.10.4.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (ดัดแปลงจาก Mandel และ Hiya, 1970)

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 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 โดยเขย่าอย่างเบาๆจนเซลล์กระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนทำการทรานสฟอร์ม

3.10.4.2 การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน (ดัดแปลงจาก Cohen และคณะ, 1972)

นำคอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียมได้จำนวน 100 ไมโครลิตรผสมกับดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมได้จากข้อ 3.10.3 จำนวน 10 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง ประมาณ 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 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน สังเกตสีและนับโคโลนีที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อ

3.10.5 การคัดเลือกหาดีเอ็นเอลูกผสมที่มียีนโปรตีเอส

ทำการตรวจหาเซลล์เจ้าเรือนที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมหรือทรานสฟอร์แมนท์ โดยคัดเลือกบนจานอาหารอุดม LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน, X-gal และ IPTG ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมจะให้โคโลนีสีขาว ส่วนทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอพาหะเดิมจะให้โคโลนีสีฟ้า เนื่องจากหลักการเชื่อมต่อเป็นแบบ insertion inactivation จากนั้นทำการคัดเลือกหาทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนโปรตีเอสโดยเลือกโคโลนีสีขาวดังกล่าวนำมาทำ replica plating บนจานอาหารที่มีนมพร่องไขมัน (skim milk 0.5 เปอร์เซนต์ และ Bactoagar 1.5 เปอร์เซนต์) ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1-2 วัน เนื่องจากเอนไซม์โปรตีเอสสามารถย่อยเคซีนซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำนมทำให้เกิดลักษณะวงใสรอบๆโคโลนี (clear zone) จึงทำการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ต้องการโดยเลือกเซลล์ที่ต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและให้วงใสรอบๆโคโลนี

3.10.6 การวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์

ดัดแปลงมาจากวิธีที่เสนอโดยเกษม (2536)

โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสในการไฮโดรไลส์เคซีนได้ไทโรซีนอิสระที่มีความสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

เพาะเลี้ยงทรานสฟอร์แมนท์ในอาหารสูตร M9 medium + succinate จำนวน 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (OD_{420} ประมาณ 0.3-0.5) ถ่ายเซลล์ตั้งต้นนี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 medium + succinate โดยคำนวณให้ได้ค่า OD สุดท้ายประมาณ 0.07-0.08 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดแอคติวิตีทุก 24 ชั่วโมง

ส่วนในการทดสอบการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 จะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเหมือนกันแต่เปลี่ยนอาหารเป็นอาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium) สูตรที่ 1

เนื่องจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 นี้สามารถผลิตได้ทั้ง alkaline protease และ neutral protease ดังนั้นในการตรวจสอบว่ายีนโปรตีเอสที่ได้นั้นเป็นชนิดใด จึงต้องทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสที่ค่า pH ต่างๆกัน โดยใช้บัฟเฟอร์ฟอสเฟต 0.1 โมลาร์ pH 7.5 และ 8.0, บัฟเฟอร์คาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ pH 9.5,10.0 และ 10.5 หรือบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 โมลาร์ pH 7.0-9.0 โดยสารละลายเคซีนที่ใช้นั้นจะเตรียมโดยละลายเคซีนในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในปฏิกิริยานั้น

นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นเก็บส่วนใสเพื่อใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ โดยปั่นที่ 3,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ผสมสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตรกับบัฟเฟอร์ 0.9 มิลลิลิตร เติมสารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ 1 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 45°ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่าง

น้ำแข็งเติมสารละลาย TCA 10 เปอร์เซนต์ที่เย็น จำนวน 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสมาวัด OD_{280} โดยทำ Blank และ Control นำไปวัดเปรียบเทียบกันด้วย ในการเตรียม Blank นั้นทำเหมือนกันแต่จะไม่ใส่สารละลายเอนไซม์ และใส่บัฟเฟอร์เพิ่มเป็น 1 มิลลิลิตร ส่วนใน Control นั้นจะเติมสารละลายเอนไซม์หลังจากที่เติมสารละลาย TCA 10 เปอร์เซนต์ นอกนั้นทำเหมือนกับในการทดลอง

นำค่า OD_{280} ที่ได้ มาคำนวณหาแอคติวิตีของโปรตีเอส โดยเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยเคซีนโดยเอนไซม์กับกราฟมาตรฐานของไทโรซีนที่ความเข้มข้น 0-140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไทโรซีนที่ใช้จะต้องละลายในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ใช้ในปฏิกิริยานั้น ทำการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสที่ pH ต่างๆ กำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์เท่ากับ ปริมาณของไทโรซีน 1 ไมโครโมลที่ได้จากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์ที่สภาวะของการวัดแอคติวิตี ภายในเวลา 1 นาที

3.11 <u>เทคนิคทาง Nucleic acid hybridization</u> (Boehringer, 1993)

นอกจากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์จากทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้แล้ว ยังมีอีกวิธีที่จะสามารถพิสูจน์ได้ว่ายีนโปรตีเอสที่ได้นั้นเป็นชนิดใด คือใช้เทคนิค hybridization โดยนำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้คัดเลือกมาทำ dot-blot hybridization และ Southern-blot hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามซึ่งมียีนที่สร้าง neutral protease ซึ่งได้จากพลาสมิด pNC3 ทำการย่อยด้วย *Eco*RI และ *Bgl*II และพลาสมิด pKWZ ซึ่งมียีนที่สร้าง alkaline protease จากนั้นนำมาเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตามทำการติดฉลากโดยใช้สารปลอดรังสี ซึ่งเทคนิคต่างๆที่ใช้คือ

3.11.1 <u>การติดฉลากดีเอ็นเอ</u>

ใช้วิธี Random Primed DNA Labelling และใช้ชุดการติดฉลากดีเอ็นเอ (DNA Labelling Kit) บริษัท Boehringer manniham โดยใช้สาร Digoxigenin ซึ่งเป็นสาร steriod hapten อยู่ในรูป DIG-11-dUTP เตรียมโดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการติดฉลากจำนวน 1 ไมโครกรัม ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีแล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งทันทีประมาณ 1 นาทีแล้วจึงนำมาเติม hexanucleotide จำนวน 2 ไมโครลิตร dNTP labelling mixture จำนวน 2 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Klenow fragment 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 ล้างด้วยเอทธานอลเย็น 70 เปอร์เซนต์ และละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 50 ไมโครลิตร

จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้รับการติดฉลากโดยการทำ dot-blot hybridization เปรียบเทียบความเข้มข้นของสัญญาณกับดีเอ็นเอที่ได้รับการติดฉลากมาตรฐาน (DNA control labeled: digoxigenin labeled pBR328 ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ความเข้มข้น 5000, 1000, 100, 1 และ 0.1 พิโครกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ ดีเอ็นเอที่ได้รับการติดฉลากนี้สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลานานที่ -20°ซ

3.11.2 Dot-blot hybridization

นำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้รับการคัดเลือกโคลนละ 1 ไมโครกรัม ทำให้เป็นสายเดี่ยวโดยบ่มกับสารละลาย denature ปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตรเดิมที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วจุดลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน (Nylon membrane positively charge) ทิ้งไว้จนแห้งสนิทดี จึงนำไปทำการตรึงดีเอ็นเอต่อไป

3.11.3 Southern-blot hybridization (ดัดแปลงจาก Ishii, 1992)

นำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้คัดเลือกไว้แล้ว มาทำการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 0.7-1.0 เปอร์เซนต์ ขนาดของเจล 8.5x10 ตารางเซนติเมตร ใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง ย้อมแถบดีเอ็นเอในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์นานประมาณ 30 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นประมาณ 30 นาที เขย่าแผ่นเจลอย่างเบาๆในกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่นก่อนเขย่าในสารละลาย denature เป็นเวลาประมาณ 45 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง แล้วนำแผ่นเจลแช่ในบัฟเฟอร์ transfer เป็นเวลา 15 นาทีหลังจากนั้นทำการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน โดยใช้หลักการ capillary transfer โดยชั้นล่างสุดเป็นกระดาษกรอง 3M ที่วางบนกระจก และมีปลายเชื่อมต่อลงในภาชนะที่บรรจุบัฟเฟอร์ 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

I16203793.

ทิ้งไว้ข้ามคืนจึงนำแผ่นไนลอนเมมเบรนออกมาล้างในบัฟเฟอร์ 5xSSC เป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งก่อนนำไปตรึงดีเอ็นเอต่อไป

3.11.4 การตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นไนลอนเมมเบรน

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

3.11.5 Prehybridization และ hybridization

นำแผ่นไนลอนเมมเบรนแช่ในสารละลาย standard prehybridization พอให้ท่วมแผ่น บ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 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 จึงนำไปวิเคราะห์สัญญาณการไฮบริดต่อไป

3.11.6 การวิเคราะห์สัญญาณการเกิดไฮบริด (Boehringer, 1993)

ในการวิเคราะห์สัญญาณการเกิดไฮบริดใช้หลักการทางอิมมูโนด้วยการใช้แอนติบอดีของ Digoxigenin ที่คอนจูเกตอยู่กับเอนไซม์ alkaline phosphatase หลังจากนั้นจึงตรวจสอบผลโดยการใช้สารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่ให้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถติดตามผลได้ซึ่งในการทดลองได้ใช้สารเรืองแสงเป็นสารตั้งต้น (Chemiluminescent Detection) โดยหลังจากขั้นตอน hybridization นำแผ่นไนลอนเมมเบรนออกจากถุง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 2xSSC ที่มี SDS อยู่ 0.1 เปอร์เซนต์ 2 ครั้งๆละ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 0.5xSSC ที่มี SDS 0.1 เปอร์เซนต์ 2 ครั้งๆละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 65°ซ จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ Genius I นาน 1 นาที แล้วนำแผ่นไนลอนเมมเบรนแช่ย่าเบาๆ ในบัฟเฟอร์ 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 ครั้งๆละ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และแช่ในบัฟเฟอร์ Genius III นาน 2 นาที จึงจุ่มลงในสารละลายเรืองแสง (Lumigen PPD เจือจางใน Genius III อัตราส่วน 1:200) ให้ทั่วแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วบรรจุลงในถุงพลาสติคใส ปิด

ปากถุงให้สนิทโดยไม่ให้มีฟองอากาศ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำมาทำปฏิกิริยากับฟิล์ม X-ray ในที่มืด เป็นเวลาประมาณ 30-60 นาที นอกจากจะใช้สารละลายเรืองแสง (Lumigen PPD) แล้ว อีกวิธีหนึ่งคือใช้ Lumi-Phos Chemiluminescent Substrate Sheet โดยนำแผ่น Lumi-Phos Sheet บรรจุลงในถุงพลาสติคใสซึ่งตัดด้านข้างออกหนึ่งด้านให้สามารถเปิด-ปิดได้ ใส่ในกล่องสำหรับประกบฟิล์ม (ทำในที่มืดและใช้แสงสีแดง) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาประมาณ 15 นาที จากนั้นเปิดถุงพลาสติคด้านข้างออกแล้วนำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่แช่ในบัฟเฟอร์ Genius III มาประกบลงบนแผ่น Lumi-Phos Sheet ปิดทับด้วยถุงพลาสติคเหมือนเดิม ใส่กล่องสำหรับประกบฟิล์มแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ต่ออีก 30 นาที จึงนำมาทำปฏิกิริยากับฟิล์ม X-ray ในที่มืด ประกบแผ่นฟิล์มลงบนแผ่นไนลอน-เมมเบรนโดยประกบทับบนถุงพลาสติค ใส่กล่องสำหรับประกบฟิล์ม เป็นเวลาประมาณ 20-60 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 ล้างดีเอ็นเอติดตามออกโดยเขย่าเบาๆในสารละลาย reprobe 4 ครั้งๆละ 15 นาทีที่อุณหภูมิ 37°ซ จากนั้นล้างในบัฟเฟอร์ 2xSSC พอให้ท่วมแผ่นไนลอนเมมเบรน เป็นเวลาประมาณ 1-2 นาที จึงนำแผ่นไนลอนเมมเบรนเข้าสู่ขั้นตอน prehybridization และ hybridization กับดีเอ็นเอติดตามชนิดอื่นๆต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย