หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) แบบ SP-5A ของ Suntex, Taiwan

1.2 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น UNILUX-12 ของ Kyowa, Japan

1.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator) รุ่น Psychrotherm NBS Shaker แบบ reciprocal ของ New Brunswick Scientific Co., U.S.A.

1.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง UV รุ่น Spectronic 2000 ของ Bausch and Lomb, U.S.A.

1.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของ Memmert, German

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

1.7 เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) รุ่น 2301 microdrive 1 ของ LKB, Sweden

1.8 เจลแชมเบอร์ (gel chamber)

1.9 เครื่องให้กำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-transilluminator) รุ่น 2011 MACROVUE ของ LKB, Sweden

1.10 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของ Hirayama Mfg. Corp., Japan

1.11 เตาไมโครเวฟ (microwave oven) รุ่น Er-562 ของ TOSHIBA, Japan

1.12 กล้องถ่ายรูปและฟิล์ม (Tri-X pan 400, Kodak)

2. เคมีภัณฑ์

ไลโซไซม์ (lysozyme ; grade 1) โปรเนส (pronase) SDS (sodium dodecyl sulfate) (specially pure grade) ฟีนอล (phenol) (AR grade) ทริสมา เบส (trizma base) อะกาโรส (agarose)(type I-A) และ สารเคมีอื่น ๆ ของ Sigma, U.S.A.

เรสทริกชันเอนไซม์ (BamHI Bg1II EcoRI HindIII PstI Sau3AI and XbaI) ของ Bethesda Research Laboratories, Inc. (BRL), U.S.A.

3. เชื้อจุลินทรีย์

Streptomyces spp. ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่

3.1 Streptomyces sp. 42-9 หรือ S. griseoruber

3.2 Streptomyces sp. 190-1 หรือ S. cyaneus

3.3 S. glaucescens

3.4 S. coelicolor A3 (2)

3.5 S. lividans 1326

3.6 Streptomyces sp. 20306

3.7 Streptomyces sp. 41-10

3.8 Streptomyces sp. 111-04

3.9 Streptomyces sp. 8.3.7

3.10 Streptomyces sp. 11-4

3.11 Streptomyces sp. 50-13

3.12 Streptomyces sp. 1-13

3.13 Streptomyces sp. 43-5

3.14 Streptomyces sp. 50-5

3.15 Streptomyces sp. 10

หมายเหตุ

1. การจำแนกชนิดของ Streptomyces ในข้อ 3.1 และ 3.2 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor S.T. Williams แห่งมหาวิทยาลัย Liverpool, U.K.

2. เชื้อหมายเลข 3.3 - 3.5 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Professor D.A. Hopwood แห่ง John Innes Institute , Norwich , U.K.

4. การเลี้ยงเชื้อ

4.1 การเตรียมสปอร์ของ Streptomyces spp.

ลาก (streak) เชื้อบนอาหารแข็งเอียง MS (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ ประมาณ 1 สัปดาห์ จนได้สปอร์แก่เต็มที่ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5-10 มล. แล้วใช้ลูป (loop) ปลอดเชื้อขูดสปอร์ให้แขวนลอยในน้ำ แบ่งสปอร์ที่แขวนลอยในน้ำที่มีความหนาแน่น 10^{10} - 10^{11} สปอร์ต่อมิลลิลิตรลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ประมาณ 0.5 มล. ต่อหลอดและเก็บที่ -70°ซ สำหรับนำมาเตรียมสายใย (mycelium) ของเชื้อต่อไป

4.2 การเตรียมสายใยของ Streptomyces spp.

นำ 0.1 มล. ของสปอร์แขวนลอยดังกล่าวมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (Luria Broth) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งมีลวดสปริงขดที่ก้นขวด เขย่าตลอดเวลาแบบ reciprocal ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 °ซ ประมาณ 3 วัน หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกสายใยด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

5. การสกัดโครโมโซมอลดีเอนเอ

นำสายใยของ Streptomyces ชนิดต่าง ๆ ที่แยกได้มาสกัดดีเอนเอของโครโมโซมโดยดัดแปลงจากวิธีของ Birch และ Cullum (34) นำสายใยมาล้างด้วยซูโครส 10.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วเติมไลโซไซม์ (2 มก./มล.) ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายสำหรับเตรียมไลโซไซม์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ปริมาตร 5 มล. แล้วบ่มที่ 37°ซ ประมาณ 1 ชั่วโมง เติมโปรเนส (10 มก./มล.) ปริมาตร 0.5 มล. เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันและบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย SDS (10%) ปริมาตร 0.55 มล. เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันและบ่มต่อเป็นเวลา 5 นาทีจนกระทั่งสารละลายหนืด หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายฟีนอล (ภาคผนวก ค หมายเลข1) 6 มล. เขย่าแบบ reciprocal ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที และเติมคลอโรฟอร์ม(chloroform) ปริมาตร 6 มล. เขย่าด้วยวิธีการและระยะเวลาเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น แล้วจึงนำไปปั่นแยกชั้นของสารละลายด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 40 นาที แยกสารละลายชั้นบนลงในขวดแก้วปากกว้างขนาดบรรจุ 100 มล. เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 3 ใน 4 เท่าของปริมาตรของสารละลายทั้งหมด เขย่าช้า ๆ เบา ๆ ให้เข้ากันจนกระทั่งโครโมโซมอลดีเอนเอตกตะกอนเป็นสายใยลงมา ใช้ปาสเจอร์ปิเปต (pasture pipette) ที่หลอมปลายปิดสนิทคล้ายตะขอเกี่ยว พันสายใยของโครโมโซมอลดีเอนเอขึ้นมาแล้วล้างด้วยเอธานอล 70% ทิ้งไว้ให้แห้ง หลังจากนั้นแขวนลอยดีเอนเอที่ได้ในหลอดทดลอง

017845

ฝาเกลียวปิดที่มีบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) pH 8.0 ปริมาตร 5 มล. เติมสารละลายไรโบนิวคลีเอส (40มก./มล.) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปเจือจางแบบ reciprocal ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืนแล้ว นำมาเติม SDS (10%) ปริมาตร 0.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ 5 นาที แล้วเติมโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ ทำภาวะสกัดซ้ำด้วยฟีนอลดังวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น นำชั้นน้ำมาตกตะกอนดีเอนเอโดยเติมเอธานอล 2 ปริมาตร ล้างตะกอนดีเอนเอด้วย 70% เอธานอล ทำให้แห้งแล้วจึงนำโครโมโซมอลดีเอนเอที่ได้มาแขวนลอยในบัฟเฟอร์ TE

6. <u>การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของโครโมโซมอลดีเอนเอ</u>

นำโครโมโซมอลดีเอนเอที่ได้มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ โดยการเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ TE ในอัตราส่วน 1 : 50 (โครโมโซมอลดีเอนเอ:บัฟเฟอร์ TE) ปริมาตรรวม 500 ไมโครลิตร แล้ววัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรนิก 2000 (Spectronic 2000) ดีเอนเอบริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนของ OD_{260}/OD_{280} เป็น 1.8 ถ้าต่ำกว่านี้แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปนเปื้อนอยู่ (35)

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอนเอทำได้โดยการวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ 260 นาโนเมตร โดยค่า OD_{260} เท่ากับ 1 เทียบเท่ากับความเข้มข้นของโครโมโซมอลดีเอนเอ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (35)

7. <u>การตัดโครโมโซมอลดีเอนเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์</u>

นำโครโมโซมอลดีเอนเอประมาณ 1.2 ไมโครกรัมใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเรสทริกชันเอนไซม์และน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร และเติมเรสทริกชันเอนไซม์ที่ความเข้มข้นซึ่ง

จะระบุไว้ในผลการทดลอง แล้วผสมให้เข้ากันโดยนำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) 7,000 รอบ/นาที ประมาณ 1 นาที บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ อย่างน้อย 6 ชั่วโมง เติมสีติดตามอัตราส่วน 1:1 (สีติดตาม : ปริมาตรรวม) แล้วนำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กอีกครั้ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8°ซ สำหรับทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีสต่อไป

8. การวิเคราะห์ดีเอนเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส

นำดีเอนเอที่แขวนลอยในบัฟเฟอร์ TE มาตรวจสอบโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส ซึ่งทำโดยเทอะกาโรสเจล 0.7% ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TB (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัวผสมสารละลายดีเอนเอกับสีติดตาม (tracking dye ภาคผนวก ค หมายเลข 2) ในอัตราส่วน 1:1 หยอดลงในหลุมบนอะกาโรสเจลหลุมละประมาณ 5 ไมโครลิตร แล้วทำอิเลคโทรโฟรีซีสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) โดยให้ความต่างศักย์ซึ่งจะระบุไว้ในผลการทดลอง จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนมาเกือบถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง นำอะกาโรสเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidiumbromide) (2.5ไมโครกรัม / มล.ของบัฟเฟอร์ TB) แช่ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปลอดไอออนเป็นเวลา 15 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเลต บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพโดยใช้ฟิล์มขาวดำความไวแสง 400 ผ่านแผ่นกรองแสงสีแดง

9. การวิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอของ Streptomyces ที่ปรากฏเด่นชัดภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส

การวิเคราะห์ขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส ทำโดยใช้ λ ดีเอนเอที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ HindIII เป็นขนาดดีเอนเอ

มาตรฐาน โดยสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง $\log_{10}$ ของขนาดโมเลกุลของดีเอนเอและระยะทางที่เคลื่อนที่