บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 เครื่องมือหลักที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) ทั้งแบบ rotary และ reciprocal ของ New Brunswick Scientific Co., U.S.A.

2.1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

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

2.1.2.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge)รุ่น H-103N ของ Kokusan,Japan

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

2.1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotorneter) รุ่น spectronic 21 ของ Bausch & Lomb, U.S.A.

2.1.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu Coporation

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

2.1.6 ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis equipment)

2.1.6.1 เครื่องกำเนิดไฟฟ้า รุ่น 2301 microdrive 1 ของ LKB, Sweden

2.1.6.2 เจลแชมเบอร์ (gel chamber) พร้อมอุปกรณ์เตรียมอะกาโรสเจล

2.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberbean 2000 ของบริษัท Cyberbean, Singapore

2.1.8 เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) รุ่น B-2200E1 บริษัท Bransonic, U.S.A.

2.1.9 อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

- กล้องถ่ายภาพ
- แผ่นกรองแสง (filter) สีแดง

- ฟิล์มขาว-ดำ ความไวแสง 400 (ASA 400)

2.1.10 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHK-H บริษัท Olympus optical CO., LTD, Japan

2.1.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของ Memmet, Germany

2.1.12 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ของ Memmet, Germany

2.1.13 ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น LV-124 บริษัท International Scientific Supply Co ., Ltd., Japan

2.1.14 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น FO535 ของ Sanyo Electric Co.,Ltd.,Japan

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

2.1.16 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Thai victory company Limited,Thialand

2.1.17 เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industies Inc., U.S.A.

2.2 สารเคมี

2.2.1 เรสตริกชันเอนไซม์และเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนยีนจาก Promega, U.S.A. และ NE Biolabs, U.S.A.

2.2.2 x-gal, IPTG และ Proteinase K จาก Promega, U.S.A. ไลโซไซม์ (lysozyme grade 1) , ไรโบนิวคลีเอส (Rnase) , สเปอร์มีนเตตราไฮโดรคลอไรด์ (spermine tetrahydro-chloride) ,TES [N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid] และสารเคมีอื่นๆ จาก Sigma, U.S.A.

2.2.3 ชุดแยกแถบดีเอ็นเออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit จาก QIAGEN, GmbH, Germany

2.2.4 ชุดสกัดแยกพลาสมิด QIA prep. Spin Plasmid Miniprep จาก QIAGEN, GmbH, Germany

2.3 จุลินทรีย์และพลาสมิด

- *E.coli* JM109 (*rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi* *hsd*R17 *Sup*E44 *rel*A1 Δ (*lac-pro*AB) [*F' tra*D36 *pro*AB$^+$ laclq lacZΔM15]) และ *E.coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pUC18
- *E.coli* GM242 ที่มี pIJ699
- *E.coli* DH5α (F$^-$ ϕ80d*lac* ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) J169*deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd* R17 (r_K^-,m_K^+) *pho* A *sup* E44λ$^-$ *thi*- 1 *gyr* A96 *rel* A1)
- *Streptomyces lividans* TK21 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Prof. D.A. Hopwood แห่ง John Innes Institute, Norwich, U.K.
- *Streptomyces* sp. PC22 ซึ่งมีแอคติวิตีของไซแลเนส
- *S.lividans* TK21 ที่มีพลาสมิด pIJ702 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr.M.J.Bibb แห่ง John Innes Institute, U.K.

2.4 การเลี้ยง *Streptomyces* (Hopwood *et al.*, 1985)

2.4.1 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งและการเตรียมสปอร์แขวนลอย

เตรียมอาหารแข็งสูตร MS (ภาคผนวก ก1) ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างสปอร์ สำหรับเชื้อที่มีพลาสมิดพาหะ pIJ702 เลี้ยงใน MS ที่เติมยาปฏิชีวนะไธโอสเตรพตอน 50 ไมโครกรัม/มล. (โดยเตรียมสารละลายตั้งต้นเข้มข้น 50 มก./มล. ในสารละลาย DMSO)

การเตรียมสปอร์แขวนลอย ทำโดยเพาะ *Streptomyces* สายพันธุ์ที่ต้องการ โดยลาก (streak) สปอร์หรือไมซีเลียมลงบนอาหารแข็งสูตร MS ในหลอดทดลองขนาดใหญ่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 5-7 วัน จนสปอร์แก่เต็มที่ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 มล. ลงในแต่ละหลอด ขูดเบาๆให้สปอร์หลุด กรองสปอร์แขวนลอยโดยใช้ชุดกรอง (ภาคผนวก ค1) นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มาปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อสองครั้ง แขวนลอยสปอร์ที่ได้ใน 20 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล โดยให้ความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^9-10^{10} สปอร์/มล. เก็บในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดละ 0.5 มล. ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.4.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

2.4.2.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมโปรโตพลาสท์ สกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ และสกัดพลาสมิด

เตรียมอาหารเหลว YEME (ภาคผนวก ก2) ในขวดรูปกรวยที่มีลวดสปริงขดที่ก้นขวด (ภาคผนวก ค2) หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเติมสปอร์ที่เตรียมจากข้อ 2.4.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหารเหลว 50 มล. ในกรณีของการเตรียมเชื้อเพื่อสกัดพลาสมิดเติม

ไธโอสเตรพตอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 ไมโครกรัม/มล. นำไปเขย่าแบบ reciprocal ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที ในกรณีที่เตรียมโปรโตพลาสท์จะใช้ *Streptomyces lividans* TK21 ที่มีอายุ 36-40 ชั่วโมง ส่วนสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอและพลาสมิด บ่มเชื้อเป็นเวลา 3-5 วันเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มาก

2.4.2.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส

เตรียมหัวเชื้อโดยเติมสปอร์แขวนลอยที่เตรียมจากข้อ 2.4.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก3) 50 มล. เขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36-40 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 5 มล.ของหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรของ สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) (ภาคผนวก ก4) ปริมาตร 50 มล. เขย่าเชื้อแบบ rotary ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 วัน

2.5 การสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces*

2.5.1 การสร้างโปรโตพลาสท์ตามวิธีของ Hopwood และคณะ (1985)

โดยเลี้ยง *Streptomyces* ตามข้อ 2.4.2.1 แล้วดูดอาหารเหลวที่มีไมซีเลียมปริมาตร 5 มล. มาบรรจุในหลอดฝาเกลียวปลอดเชื้อสำหรับปั่นเหวี่ยง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มล. เพื่อเจือจางความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส นำมาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นชนิดตั้งโต๊ะที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย 10.3% ซูโครส 5 มล. 2 ครั้ง จากนั้นเติม 6 มล.ของสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 1 มก./มล. ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ P (ภาคผนวก ข1) ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยเยื่อกรอง (milipore) บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ปิเปตขนาด 5 มล. ดูดขึ้นลงสามครั้งทุกๆ 10-15 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P 5 มล. เพื่อเจือจางไลโซไซม์ แล้วนำมากรองผ่านชุดกรองโปรโตพลาสท์ (ภาคผนวก ค1) เพื่อกำจัดกากเซลล์และชิ้นส่วนไมซีเลียมที่เหลือ นำส่วนน้ำใสที่ได้มาปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างโปรโตพลาสท์ด้วยบัฟเฟอร์ P 10 มล. จากนั้นแขวนลอยโปรโตพลาสท์ในบัฟเฟอร์ P 100 ไมโครลิตร หาความเข้มข้นของโปรโตพลาสท์โดยการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย haemacytometer

การเก็บโปรโตพลาสท์ทำโดยเก็บในหลอดไมโครฟิวจ์ (microfuge) โดยแช่ในภาชนะบรรจุน้ำแข็ง นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นจึงนำหลอดบรรจุโปรโตพลาสท์มาเก็บที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ เมื่อจะนำมาใช้ต้องหลอมละลายโปรโตพลาสท์ที่แข็งอยู่อย่างรวดเร็ว โดยจุ่มหลอดในอ่างน้ำอุ่น

2.5.2 การรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ตามวิธีของ Hopwood และคณะ (1985)

ทำโดยนำโปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.5.1 มาเจือจางเป็นอนุกรมในบัฟเฟอร์ P และสารละลาย 0.01% sodium dodecyl sulfate (SDS) ดูดโปรโตพลาสท์ที่ถูกเจือจางในแต่ละความเข้มข้นมา 100 ไมโครลิตร เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ R2YE (ภาคผนวก ก5) ซึ่งผ่านการกำจัดความชื้นบางส่วนโดยการเปิดฝาจานบรรจุ R2YE ในตู้เขี่ยเชื้อเป็นเวลา 30 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน นับโคโลนีที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P เปรียบเทียบกับที่เจือจางด้วย 0.01% SDS เพื่อคำนวณหาเปอร์เซนต์รีเจนเนอเรชัน

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

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

2.6 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Birch และ Cullum (1985)

ดูดสปอร์จาก *Streptomyces* 2 ลูป มาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YEME 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดรูปกรวยพร้อมทั้งมีขดลวดสปริง โดยบ่มในเครื่องเขย่าแบบ reciprocal ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน นำมาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วย 10.3%ซูโครส สองครั้ง เติมไลโซไซม์ (2 มก./มล.) ซึ่งละลายในสารละลายสำหรับไลโซไซม์ (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 5 มล. บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมโปรเนส (pronase เข้มข้น 10 มก./มล.) ปริมาตร 0.5 มล. เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน บ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมอีก 5 นาที เติม 0.55 มล. ของสารละลาย SDS เข้มข้น 10% เขย่าผสมเบาๆ และบ่มต่อจนกระทั่งสารละลายหนืด จากนั้นเติม 5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงเติม 6 มล. สารละลายฟีนอล ที่ปรับ pH ให้เป็นกลางในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข3) นำไปเขย่าแบบ reciprocal ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นของสารละลาย ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นาที เป็นเวลา 40 นาที ดูดส่วนน้ำใสชั้นบนใส่ในขวดแก้วปากกว้างขนาดบรรจุ 50 มล. เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 3 ใน 4 เท่าของปริมาตรของสารละลายทั้งหมด ผสมโดยเอียงขวดแก้วไปมาเบาๆ จะได้โครโมโซมอลดีเอนเอตกตะกอนเป็นสายอยู่ในสารละลาย ใช้ปาสเจอร์ปิเปต (pasture pipette) ที่หลอมปลายปิดสนิท พันสายดีเอนเอขึ้นมา ล้างด้วย 70% เอธานอล แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง แขวนลอยดีเอนเอที่ได้ในบัฟเฟอร์ TE pH 8.0 ปริมาตร 5 มล. และเติมไรโบนิวคลีเอส (Rnase สารละลายตั้งต้นเข้มข้น 40 มก./มล.) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่าแบบ reciprocal ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง เติม 10% SDS 0.5 มล. และ 5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ 0.55 มล. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ นำสารละลายที่ได้มาผ่านขั้นตอนสกัดด้วยฟีนอลจนถึงขั้นตอนตกตะกอนดีเอนเอด้วยไอโซโพรพานอล และล้างตะกอนด้วย 70% เอธานอล ซ้ำอีกครั้ง แล้วจึงนำดีเอ็นเอที่ได้มาแขวนลอยใน 0.5 มล. ของบัฟเฟอร์ TE วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ ขนาดและปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงและอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสในข้อ 2.10

2.7 การสกัดพลาสมิดจาก *Streptomyces* ตามวิธีของ Kieser (1984)

เลี้ยง *Streptomyces* ที่มีพลาสมิด pIJ702 แล้วนำมาปั่นแยกไมซีเลียมด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างไมซีเลียมด้วยซูโครส 10.3% สองครั้ง แบ่งเซลล์ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ หลอดละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายผสมของไลโซไซม์ 2 มก./มล. กับ Rnase 50 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งละลายในสารละลายสำหรับไลโซไซม์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด บ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม 2% SDS ซึ่งละลายใน 0.3 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที นำไปบ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข4) 100 ไมโครลิตร เพื่อสกัดโปรตีนออก ผสมให้เข้ากันทันทีด้วย vortex mixer ประมาณ 10 วินาที จนเห็นสารละลายผสมกันเป็นสีขาวขุ่น นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกชั้นของฟีนอลออก ดูดสารละลายใสชั้นบนปริมาตรประมาณ 700 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ ซึ่งบรรจุ 3 โมลาร์โซเดียมอะซิเตท 70 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมไอโซโพรพานอล 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ละลายตะกอนจาก 4-5 หลอดเข้าด้วยกันด้วย TE 500 ไมโครลิตร ตกตะกอนพลาสมิดด้วย 100 มิลลิโมลาร์ สเปอร์มีนเตตราไฮโดรคลอไรด์ (spermine

tetrahydrochloride) 25 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำส่วนตะกอนมาแขวนลอยใน 0.3 โมลาร์ โซเดียม อะซิเตท ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตกตะกอนโดยเติมเอธานอล 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ปั่นแยกตะกอนแล้วล้างด้วยเอธานอล 70% นำมาแขวนลอยในบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ ขนาดและปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงและอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสในข้อ 2.10

2.8 การเลี้ยง *E. coli*

2.8.1 การเลี้ยง *E. coli* เพื่อสกัดพลาสมิดตามวิธีของ Maniatis และคณะ (1982)

เตรียมหัวเชื้อโดยการเขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยว ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ปริมาตร 5 มล. เลี้ยงโดยการเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที ข้ามคืน สำหรับสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pIJ699 และ pUC18 จะเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 ไมโครกรัม/มล. (โดยเตรียมสารละลายตั้งต้นเข้มข้น 25 มก./มล.)เพาะเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนแล้ว 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 5 มล. ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม เลี้ยงโดยการเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที ประมาณ 12 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญถึงช่วง late log phase แยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์ที่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้สกัดพลาสมิด

2.8.2 การเลี้ยง *E. coli* เพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนส

เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 เพาะเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนแล้วปริมาตร 2.5 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี 0.2% xylan ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 ไมโครกรัม/มล. ปริมาตร 50 มล. เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าแบบ rotary ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 12-15 ชั่วโมง

2.8.3 การเลี้ยง *E. coli* เพื่อเตรียมท้าทรานสฟอร์เมชัน โดยวิธี electroporation (Maniatis *et al.*, 1982)

เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 โดยใช้โคโลนีเดี่ยวที่มีอายุประมาณ 12 ชั่วโมง เพาะเชื้อที่ได้ปริมาตร 2.5 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ปริมาตร 50 มล. วัดความขุ่นเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (โดยใช้ LB เป็นblank) เลี้ยงโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที จนกระทั่งเซลล์เจริญถึง log phase โดยติดตามค่าความขุ่นให้อยู่ในช่วง 0.45-0.55 ซึ่งโดยปกติจะใช้เวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง และที่ความขุ่นนี้จะมีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 3-5x10^6 เซลล์/มล. เก็บเซลล์โดยการปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มล. เขย่าจนเซลล์กระจายแล้วนำไปปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เติม 10%กลีเซอรอล ปริมาตร 5 มล. เขย่าจนเซลล์กระจาย ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นจำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ เติม 10%กลีเซอรอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าจนเซลล์กระจาย แบ่งเซลล์ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ (microfuge) ที่เย็น หลอดละ 40 ไมโครลิตร (มีเซลล์ประมาณ 4-6 x 10^9 เซลล์) หากต้องการเก็บเซลล์ไว้ใช้ต่อไป เก็บที่ –70 องศาเซลเซียส

2.9 การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* ตามวิธีของ Maniatis และคณะ (1982)

2.9.1 การสกัดพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสมปริมาณน้อย

นำเซลล์ที่เตรียมไว้จากข้อ 2.8.1 มาใส่สารละลาย I (ภาคผนวก ข 5) ที่เย็น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เซลล์กระจายอย่างทั่วถึง แช่ในอ่างน้ำแข็ง ใส่สารละลาย 1%SDS ใน 0.2 M NaOH 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข 5) ที่เย็น ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง 3-5 นาที นำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที ถ่ายส่วนใสลงในหลอดใหม่ ระวังไม่ให้มีตะกอนติดมา ถ้ามีตะกอนติดมาอาจนำไปปั่นซ้ำอีกครั้งก็ได้ เติมสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารละลายเดิม ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ เติมเอธานอล (ethanol) ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายเดิม นำไปแช่ที่ –20 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยการนำไปปั่น 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอธานอล และทำให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ความ

บริสุทธิ์ ขนาดและปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงและอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสในข้อ 2.10

2.9.2 การสกัดพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสมปริมาณมากด้วยชุดแยกพลาสมิด QIAGEN Plasmid Mini kit (ภาคผนวก ข 6)

ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยงเชื้อ *E.coli* ที่มีพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 หรือ 100 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะตามสูตรเดิมปริมาตร 2-5 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 8 ชั่วโมง ถ่ายเซลล์ที่ได้ปริมาตร 0.75 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะตามสูตรเดิมปริมาตร 25 มล. บ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ประมาณ 1-1.5 เก็บเซลล์โดยการปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P1 เพื่อกระจายเซลล์ แล้วจึงเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 4 มล. ลงไป กลับหลอดเบาๆ 5-6 ครั้ง วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ P3 ที่เย็น ปริมาตร 4 มล. กลับหลอดเบาๆทันที 5-6 ครั้ง บ่มไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 15-20 นาที นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใสมาปั่นซ้ำที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 15 นาที เตรียมคอลัมน์โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ QBT ปริมาตร 4 มล. ผ่านคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ QC 10 มล. ผ่านคอลัมน์ 2 ครั้ง นำส่วนน้ำใสทั้งหมดที่ได้หลังจากการปั่นมาเติมผ่านคอลัมน์ แล้วนำคอลัมน์ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ความจุ 10 มล. ชะดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ QE ปริมาตร 5 มล. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล ปริมาตร 3.5 มล. นำมาปั่นที่ความเร็ว 9,500 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นล้างดีเอ็นเอด้วย 70% เอธานอล 2 ครั้งที่สภาวะเดิม ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แขวนลอยดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 0.5 มล.

วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ ขนาดและปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงและอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสในข้อ 2.10 เก็บพลาสมิดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.10 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ ขนาดและปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

2.10.1 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ และปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยวิธีอัลตราไวโอเลตแอบซอร์บชันสเปกโตรสโคปี (Ultraviolet Absorbtion Spectroscopy)

โดยนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} / A_{280} ถ้าได้เท่ากับ 1.80 แสดงว่าดีเอ็นเอที่ได้บริสุทธิ์ ในกรณีที่สูงกว่าเกือบใกล้ 2.00 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอ (RNA) ปนอยู่มาก ในกรณีที่ต่ำกว่าแสดงว่าดีเอ็นเอนั้นไม่บริสุทธิ์มีโปรตีนหรือฟีนอลปนเปื้อนอยู่

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยเทียบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260} มีค่าเท่ากับ 1 เมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเป็น 50 ไมโครกรัม/มล.

2.10.2 วิเคราะห์ขนาดและปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

เตรียมอะกาโรสเจล 0.7% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ TA (ภาคผนวก ข7) ลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวี (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye ภาคผนวก ข8) ในอัตราส่วน 1:5 หยอดลงในหลุมบนอะกาโรสเจล หลุมละประมาณ 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำอิเลคโตรโฟรีซิสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) โดยใช้ความต่างศักย์ 10 โวลต์/ซม.ของเจล จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบรูเคลื่อนที่มาเกือบถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 2.5 ไมโครกรัม/มล. ในบัฟเฟอร์ TA แช่ไว้ 5-15 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานคือ แลมดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ *Hind*III (λDNA/*Hind*III) บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพโดยใช้ฟิลม์ขาวดำความไวแสง 400 ถ่ายผ่านแผ่นกรองแสง (filter) สีแดง

2.11 การโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22

2.11.1 ตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอแบบกึ่งสมบูรณ์

2.11.1.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสม ระหว่างดีเอ็นเอและเอนไซม์ ในการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2-6 กิโลเบส เมื่อใช้ pIJ699 หรือ pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ และขนาด 1-5 กิโลเบส เมื่อใช้ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะ

นำสารละลายโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 2.6 มาทำการย่อยกึ่งสมบูรณ์ (partial digestion) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sau*3A1 ซึ่งทำโดยการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ประมาณ 1000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดูดสารละลายดีเอ็นเอมา 10 ไมโครลิตร เติมบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ *Sau*3A1 11 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 110 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วแบ่งบรรจุลงในหลอดไมโครฟิวจ์ 8 หลอด โดยหลอดที่ 1 บรรจุ 20 ไมโครลิตร ส่วนหลอดที่เหลือบรรจุ 10 ไมโครลิตร เติม *Sau*3A1 ลงในหลอดที่ 1 จำนวน 5 หน่วย (unit) ผสมให้เข้ากันแล้วถ่ายลงในหลอดที่ 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วถ่ายลงในหลอดถัดไป (หลอดที่ 3) จำนวน 10 ไมโครลิตร ทำต่อเนื่องไปเช่นนี้จนครบถึงหลอดที่ 8 จากนั้นนำทั้ง 8 หลอดไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 โมลาร์ EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วจึงผสมสีติดตามปริมาตร 2 ไมโครลิตร และนำไปทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส วิเคราะห์ผล แล้วเลือกอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอและเอมไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งย่อยดีเอ็นเอให้ชิ้นส่วนขนาด 2-6 กิโลเบส และ 1-5 กิโลเบสได้มากที่สุด เพื่อนำไปเตรียมในปริมาณมากต่อไป

2.11.1.2 การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในปริมาณมาก

เพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้มากขึ้น โดยทำการย่อยด้วย *Sau*3A1 ตามสัดส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 2.11.1.1 ทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2-6 กิโลเบส และ 1-5 กิโลเบส ออกจากเจลโดยการใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit (ภาคผนวก ข 9) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

ตัดอะกาโรสเจลที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เหมาะสมโดยกำจัดเจลส่วนเกินให้มากที่สุด คำนวณความเข้มข้นดีเอ็นเอให้ได้ประมาณ 10 ไมโครกรัม ชั่งชิ้นเจลในหลอดไมโครฟิวจ์ (microfuge) เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล (โดย 100 มก. เท่ากับ 100 ไมโครลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กลับหลอดทุกๆ 2 นาที ระหว่างการบ่ม ถ้าเจลละลายอย่างสมบูรณ์ สารละลายจะเป็นสีเหลือง (ถ้าสารละลายเป็นสีส้มหรือม่วง ให้เติม 3 โมลาร์โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) pH 5.0 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สีของสารละลายก็จะกลายเป็นสีเหลือง) เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่าของ

น้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นใช้ QIAquick spin column จับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยดูดสารละลายลงใน QIAquick spin column นำมาปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำเช่นเดิมจนสารละลายที่เตรียมได้ผ่านคอลัมน์จนหมด เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน QIAquick spin column ปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำมาปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำ QIAquick spin column วางบนหลอดไมโครฟิวจ์ (microfuge) ชะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการที่ถูกจับอยู่ใน QIAquick spin column ด้วยบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที นำมาปั่นที่ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายที่ได้ในหลอดไมโครฟิวจ์ (microfuge) ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเลคโตรโฟรีซีสเทียบกับ λDNA/*Hind* III ถ้าปริมาณดีเอ็นเอถูกชะออกมาต่ำ ทำขั้นตอนชะด้วยบัฟเฟอร์ EB ซ้ำ อย่างน้อย 3 ครั้ง โดยชะซ้ำด้วยสารละลายที่ชะออกมาครั้งแรก

2.11.2 ตัดพลาสมิด pIJ699, pIJ702 และ pUC18

นำพลาสมิดพาหะที่เตรียมได้จากข้อ 2.7 และ 2.9 มาตัดด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ ดังนี้ ตัดพลาสมิด pIJ699, pIJ702 และ pUC18 ด้วย *Bgl*II/*Bam*HI, *Bgl*II และ *Bam*HI ตามลำดับ โดยผสมดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 4 หน่วย ในสารผสมให้เกิดปฏิกิริยาจำนวน 500 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่า จำนวน 50 ไมโครลิตร หลังปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อแล้ว จึงนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์มาทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอตามขนาดด้วยอิเลคโตรโฟริซิส จากนั้นจึงแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 2.11.1.2 สำหรับพลาสมิด pIJ699 จะแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5 กิโลเบส มาใช้

2.11.3 การกำจัดหมู่ฟอสเฟตของพลาสมิดพาหะ

นำพลาสมิดพาหะที่เตรียมได้จากข้อ 2.11.2 มากำจัดหมู่ฟอสเฟตด้วยเอนไซม์ Calf Intestina Alkaline Phosphatase (CIAP) ตามสัดส่วนที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต Promega, USA. คือ 1 ไมโครกรัมของดีเอ็นเอขนาด 1 กิโลเบส เท่ากับปริมาณดีเอ็นเอ 1.52 พิโครโมล และมีค่าเท่ากับความเข้มข้นปลายดีเอ็นเอ 3.03 พิโครโมล โดยจะใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.01 หน่วยต่อปริมาตรปลายดีเอ็นเอ(พิโครโมล) ในสารผสมให้เกิดปฏิกิริยาจำนวน 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่า จำนวน 5 ไมโครลิตร หลังปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อแล้ว โดย

พลาสมิด pIJ699 เติม CIAP	0.018	หน่วยต่อดีเอ็นเอ	1	ไมโครกรัม
พลาสมิด pIJ702 เติม CIAP	0.016	หน่วยต่อดีเอ็นเอ	1	ไมโครกรัม
และพลาสมิด pUC18 เติม CIAP	0.034	หน่วยต่อดีเอ็นเอ	1	ไมโครกรัม

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงบ่มที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการบ่มเช่นนี้ 2 รอบ สำหรับการเติม CIAP จะแบ่งเติมปริมาณเป็นครึ่งหนึ่งต่อ 1 รอบของการบ่ม หยุดปฏิกิริยาโดยเติม CIAP stop buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5, 200 mM NaCl และ 0.5 %SDS) จำนวน 300 ไมโครลิตร, Proteinase K 5 mg/ml จำนวน 6 ไมโครลิตร และ 100 mM $CaCl_2$ 17 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ขจัดเอนไซม์ออกโดยการเติมฟีนอลคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรเดิม ดูดสารละลายชั้นบนมาเติมแอมโมเนียมอะซิเตท pH 5.5 เข้มข้น 7.5 โมลาร์ ปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรทั้งหมด จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอลปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอธานอล ทำให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE ตรวจสอบการเชื่อมตัวเองของพลาสมิดพาหะที่กำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว ตามวิธีในข้อ 2.11.4 โดยไม่ต้องใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนไซแลเนส

2.11.4 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้มีชิ้นส่วนของยีนไซแลเนส

เชื่อม (ligate) ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ที่เตรียมได้ในข้อ 2.11.1.2 และพลาสมิดพาหะเข้าด้วยกัน ในอัตราส่วนพิโคโมลต่อพิโคโมลเท่ากับ 5 ต่อ 1 โดยใช้ชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอขนาด 2-6 กิโลเบส ปริมาณ 21.5 ไมโครกรัม กับพลาสมิดพาหะ pIJ699 ปริมาณ 3.3 ไมโครกรัม หรือพลาสมิดพาหะ pIJ702 ปริมาณ 3.7 ไมโครกรัม สำหรับชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอ็นเอขนาด 1-5 กิโลเบส ปริมาณ 11.5 ไมโครกรัม นำมาเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pUC18 ปริมาณ 1.78 ไมโครกรัม เติมบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ T_4 DNA ligase แล้วเติมสารละลาย ATP ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิโมลาร์ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อหรือ 10 mM Tris buffer, pH 8.0 ให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมดในสารละลายเป็น 20 ไมโครกรัมต่อมล. เติมเอนไซม์ T_4 DNA ligase 6 หน่วย บ่มที่ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-13 ชั่วโมง กำจัดเอนไซม์โดยการสกัดด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนด้วยเอธานอลที่มีโซเดียมคลอไรด์ เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 2.11.1.2 ตรวจสอบการเชื่อมโดยทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส เทียบกับ λDNA/*Hind*III

2.12 การทรานสฟอร์ม (transfomation) (Hopwood *et al.*, 1985)

2.12.1 เมื่อใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Streptomyces* ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะต้องเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pIJ699 หรือ pIJ702

เติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้จากข้อ 2.11.4 ลงใน 50-100 ไมโครลิตร ของโปรโตพลาสท์ (10^8-10^9 โปรโตพลาสท์/มล.) ที่เตรียมได้จากข้อ 2.5.1 โดยให้มีความเข้มข้นของพลาสมิด 1-1.5 ไมโครกรัมต่อโปรโตพลาสท์ 100 ไมโครลิตร แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 10 วินาที เติม 25%polyethylene glycol (PEG) (ภาคผนวก ข10) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง1 นาที เติมบัฟเฟอร์ P 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ R2YE จานละ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยบ่มเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ราดผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วด้วย 300 ไมโครกรัม/มล. ของยาปฏิชีวนะไธโอเสตรพตอน ปริมาตร 1 มล. เปิดฝาจานให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งในตู้เขี่ยเชื้อ ประมาณ 15 นาที นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 5-7 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ

2.12.2 เมื่อใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *E. coli* ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะต้องเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pUC18

เติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เย็นที่เตรียมได้จากการเชื่อมในข้อ 2.11.4 ความเข้มข้นประมาณ 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในเซลล์ที่เย็น 40 ไมโครลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 2.8.3 นำส่วนผสมตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 1 นาที แล้วใส่ลงใน electroporation cuvette ขนาด 0.2 เซ็นติเมตร ที่เย็น ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 1 นาที เช็ดให้แห้ง นำไปทรานสฟอร์มโดยวิธี electroporation โดยเครื่อง Gene Pulser Apparatus Puse Controller Capacitance Extender โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า (voltage) 2.5 kv, Capacitance 25 μF, Field Strength 12.5 kv/cm, Resistance 200 Ω (Pulse Controller), จะได้ Time Constance 4.6-4.9 msec เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เย็นลงไป 160 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LA ที่มี Xgal และ IPTG (ภาคผนวก ก3) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 มก./มล. จานละ 100 ไมโครลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นับจำนวนโคโลนีสีขาวที่เจริญ

2.13 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์

2.13.1 คัดเลือกโคลนที่มีไซแลเนสแอคติวิตี

2.13.1.1 เมื่อใช้เซลล์เจ้าบ้านเป็น *Streptomyces*

นำทรานสฟอร์แมนท์มาทำ replica plating ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส ที่มี 0.8% ไซแลนเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก6) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน คัดเลือกเฉพาะทรานสฟอร์แมนท์ที่ให้วงใส (clear zone) รอบโคโลนี นำไปตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส ตามวิธีในข้อ 2.13.2 ต่อไป

2.13.1.2 เมื่อใช้เซลล์เจ้าบ้านเป็น *E.coli*

นำทรานสฟอร์แมนท์มาทำ replica plating ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LA ที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 2 มล. บนฝาจานเลี้ยงเชื้อ คว่ำจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อได้รับไอคลอโรฟอร์ม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งคลอโรฟอร์มระเหยหมด นำมาราดทับด้วยไซแลน 0.8% ใน 0.8% วุ้น ปริมาตร 4 มล. (top agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วราดทับด้วยสีคองโกเรด (congo red 0.2%w/v) ทิ้งไว้ 30 นาที เทสีออก และล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ คัดเลือกเฉพาะโคลนที่ให้วงใส (clear zone) รอบโคโลนี นำไปตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส ตามวิธีในข้อ 2.13.2 ต่อไป

2.13.2 การตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส

นำทรานสฟอร์แมนท์ *Streptomyces* ที่คัดเลือกไปเลี้ยงในอาหารเหลวตามข้อ 2.4.2.2 แล้วปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์แอคติวิตีของไซแลเนส

สำหรับทรานสฟอร์แมนท์ที่เป็น *E.coli* เลี้ยงในอาหารเหลวตามข้อ 2.8.2 นำทั้งส่วนน้ำใสและเซลล์มาตรวจวัดแอคติวิตีของไซแลเนส ส่วนของเซลล์จะทำให้แตกก่อนด้วยอะลูมินา (alumina) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปปั่นแยกเศษเซลล์ทิ้ง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และใช้ส่วนน้ำใสมาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วย

การตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนสทำตามวิธีของสุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakajima และคณะ (1987) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังนี้

- สารละลายไซแลนเข้มข้น 10 มก./มล. ซึ่งละลายใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 0.3 มล.

- 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 2.4 มล.

- ส่วนน้ำใสที่จะตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ (crude enzyme) ที่ผ่านการเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 0.3 มล. โดยบ่มไซแลนกับบัฟเฟอร์ก่อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมเอนไซม์ นำส่วนผสมทั้งหมดของปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างของส่วนผสมที่เวลา 0 และ 10 นาที ครั้งละ 1 มล. หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที นำไปหาน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธีการของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952: Nelson, 1954) โดยเติมอัลคาไลน์ คอปเปอร์ รีเอเจนต์ (alkaline copper reagent ภาคผนวก ข11) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำเย็นจัด แล้วเติมเนลสันรีเอเจนท์ (Nelson reagent ภาคผนวก ข12) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มล. นำส่วนผสมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากนั้นจึงหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นโดยใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 20-200 ไมโครกรัม/มล.

1 หน่วยของไซแลเนสคือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยไซแลน แล้วได้น้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ตรวจสอบแอคติวิตีดังกล่าว

1.13.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

นำสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีปริมาณโปรตีนความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 1 มล. ผสมกับสารละลาย lowry C (ภาคผนวก ข13) 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลายผสมสารละลาย lowry D (ภาคผนวก ข13) 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (Bovine Serum Albumin) ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัม/มล.