บทที่ 2
วิธีการทดลอง

ในบทนี้จะกล่าวถึงรายละเอียดของขั้นตอนการทดลองในการสกัดพลาสมิดโดยวิธี Rapid alkaline lysis การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) และวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

การเตรียมพลาสมิด (Plasmid) โดยวิธี Rapid alkaline lysis (Birnboim, 1983) และการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิด โดยวิธี อะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel Electrophoresis) (Sambrook et al., 1989)

1. การเตรียมพลาสมิดโดยวิธี Rapid alkaline lysis (Birnboim, 1983)

กระจายเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดด้วยสารละลาย 1 (Solution I) (ภาคผนวก ค) หลังจากนั้นเติมสารละลาย 2 (Solution II) (ภาคผนวก ค) ลงไปเพื่อทำให้เซลล์แตกในภาวะที่เป็นด่าง ทำให้โครโมโซมและโปรตีนรวมทั้งพลาสมิดเสียสภาพ แต่เนื่องจากพลาสมิดมีขนาดเล็กจึงยังคงเป็นวงกลม (Circular plasmid) หลังจากนั้นเติมสารละลาย 3 (Solution III) (ภาคผนวก ค) ซึ่งเป็นตัวปรับpHให้เป็นกลาง พลาสมิดก็จะสามารถกลับสู่สภาพเดิม ส่วนโครโมโซมยังคงเสียสภาพและรวมตัวกับโปรตีนเป็นตะกอนสีขาว หลังจากนั้นก็นำมาสกัดโปรตีนที่ปนเปื้อนในสารละลาย โดยใช้ สารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม (phenol : chloroform) แล้วตามด้วยการตกตะกอนพลาสมิดโดยใช้เอธานอล 100% (Absolute alcohol) แล้วล้างตะกอนโดยใช้เอธานอล 70% (ภาคผนวก ค) ตากตะกอนให้แห้งแล้วละลายพลาสมิดในสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ค) พร้อมนำไปวิเคราะห์หาปริมาณพลาสมิดโดยใช้วิธีอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

วิธีการสกัดพลาสมิด

1. เลี้ยงเซลล์ *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pUC18 หรือ pBR322 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB(L broth)(ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ผสมแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 25 μg/ml

(ภาคผนวก ข) เป็นเวลาข้ามคืน

2. แบ่งเชื้อใส่หลอด Microcentrifuge tube หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร แล้วปั่นเก็บเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้ง

3. นำเซลล์ในแต่ละหลอดมากระจายในสารละลาย 1 (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 100 µl แล้วเขย่าให้เข้ากันแล้วแช่ไว้ในที่เย็น

4. เติมสารละลาย 2 (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 200 µl เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ พลิกคว่ำหงายหลอด 2-3 ครั้ง แช่ในน้ำแข็ง

5. เติมสารละลาย 3 (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 150 µl เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 3 - 5 นาที (ต้องทำอย่างรวดเร็ว)

6. นำไปปั่นแยกตะกอน ที่ความเร็วรอบ 13000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสใส่หลอด Microcentrifuge tube หลอดใหม่ ส่วนของตะกอนทิ้งไป

7. เติมสารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม (Phenol : chloroform) (ภาคผนวก ค) ในอัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตรเท่ากันกับส่วนสารละลายใสแล้วเขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. ดูดสารละลายชั้นบนออกไปใส่หลอด Microcentrifuge tube หลอดใหม่ โดยพยายามหลีกเลี่ยงตะกอนที่อยู่ระหว่างชั้น

9. เติมเอธานอลความเข้มข้น 100% (Absolute ethanol) ที่อุณหภูมิห้องปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่มีพลาสมิดอยู่ลงไปเพื่อตกตะกอนพลาสมิด เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที

10. ปั่นเก็บพลาสมิด ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอธานอลทิ้งไป ตั้งทิ้งไว้ให้เอธานอลแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 30 นาที

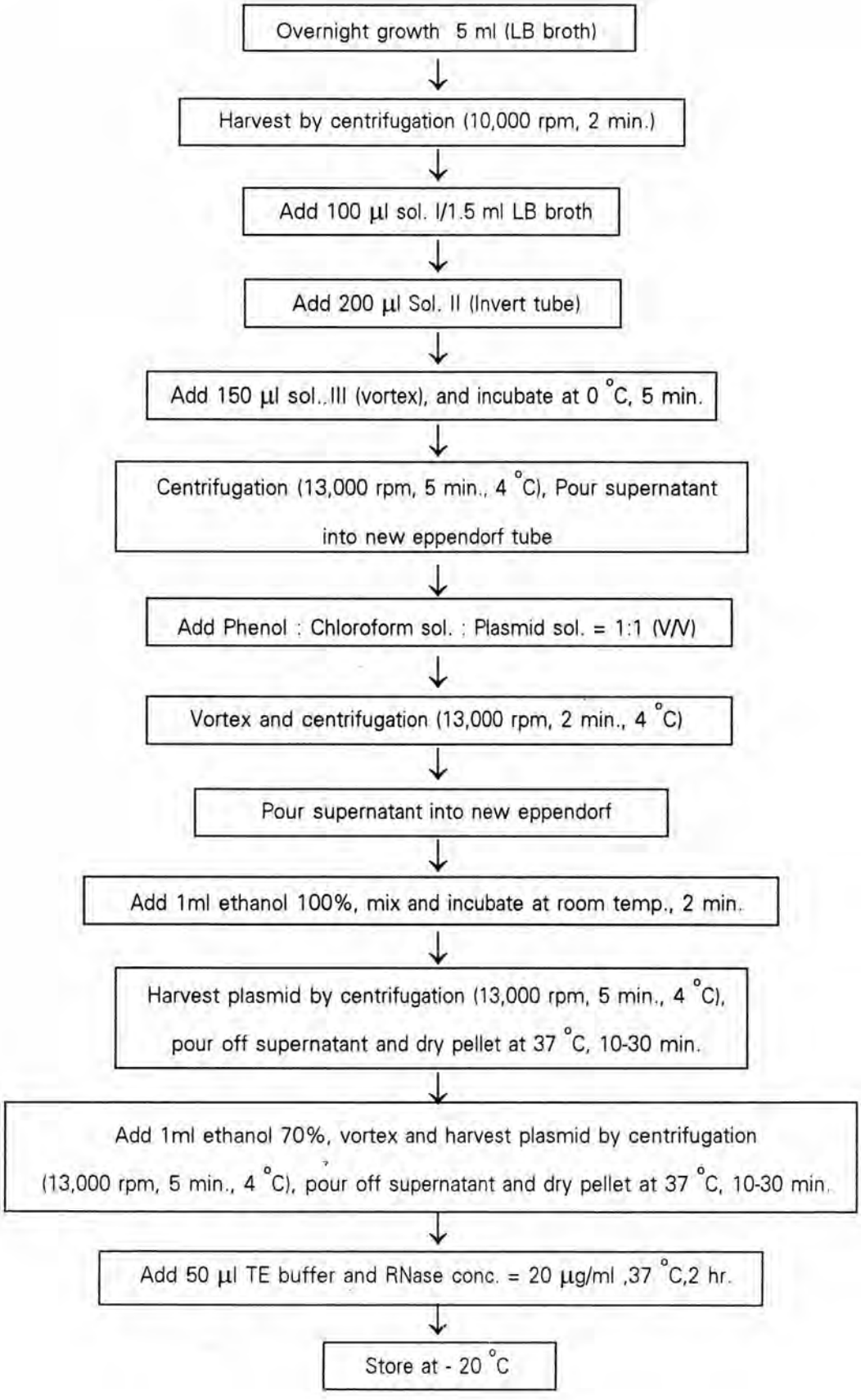
11. ล้างตะกอนพลาสมิดด้วยเอธานอล ความเข้มข้น 70%(Ethanol 70%) (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นเก็บตะกอนพลาสมิดที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทเอธานอลทิ้งไป ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (10 - 30 นาที) เพื่อให้ตะกอนพลาสมิดแห้ง

12. เติมสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 50 µl แล้วเติม RNase (ภาคผนวก ค) ให้ได้ความเข้มข้น 20 µg/ml แล้วเขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

13. เก็บพลาสมิดที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสการเตรียมพลาสมิดวิธีนี้จะได้พลาสมิด 3-5 μg/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ขั้นตอนการสกัดพลาสมิดโดยวิธี Rapid alkaline lysis แสดงดังรูปที่ 2.1

รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการสกัดพลาสมิดโดยวิธี Rapid alkaline lysis



2. การวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดโดยใช้ อะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) (Sambrook et al., 1989)

การวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดโดยวิธีนี้ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและไม่เสียเวลามาก ใช้หลักการที่ว่าพลาสมิด หรือดีเอ็นเอมีประจุลบเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะวิ่งเข้าหาขั้วบวก พลาสมิดแต่ละชนิดจะเดินทางในสนามไฟฟ้าด้วยความเร็วต่าง ๆ กันขึ้นกับ

- ขนาดของพลาสมิด พลาสมิดขนาดใหญ่จะเดินทางได้ช้ากว่าพลาสมิดขนาดเล็ก
- รูปร่างพลาสมิด รูปร่างเป็นวงกลม จะเดินทางได้เร็วกว่าเป็นเส้นตรง

หลังจากนั้นนำมาหาตำแหน่งพลาสมิดบนเจลได้โดยย้อมเอธิลเดียมโบรไมด์ ซึ่งจะแทรกสอดระหว่างเกลียวคู่พลาสมิด และเรืองแสงที่ช่วงคลื่นอุลตราไวโอเลต (λ = 295 nm) ทำการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิด โดยเทียบความเข้มการเรืองแสงของพลาสมิดกับแถบความเข้มเรืองแสงมาตรฐานของ λ DNA/Hind III

วิธีการ

1. หลอมอะกาโรสความเข้ม 0.7% ใน สารละลาย TB buffer (ภาคผนวก ค) แล้วตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นประมาณ 60 องศาเซลเซียสนำไปเทลงบน Gel chamber แล้วใส่หวีเสียบเพื่อทำหลุมสำหรับใส่ดีเอ็นเอ
2. ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วดึงหวีออกนำพลาสมิดที่จะวิเคราะห์มาผสมกับ Tracking dye ด้วยอัตราส่วน 3 : 1 (พลาสมิด : Tracking dye) แล้วหยดลงในช่องที่อยู่บนแผ่นอะกาโรส
3. ต่อขั้วอิเล็กโทรด ให้สนามไฟฟ้าโดยให้พลาสมิดเริ่มต้นทางขั้วลบไปขั้วบวก เพราะว่าพลาสมิดจะวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ ใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง หรือให้สีติดตามเคลื่อนที่เกือบถึงปลายของเจล
4. ปิด power supply แล้วนำเจลไปแช่ในสารละลายเอธิลเดียมโบรไมด์ (2.5 µg/ml) (ภาคผนวก ค) ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 30 นาที
5. นำเจลที่ย้อมแล้ว มาส่องดูการเรืองแสงของชั้นพลาสมิด ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต
6. คำนวณค่าปริมาณพลาสมิด โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์($CaCl_2$ method)(Sambrook et al., 1989)

การใช้แคลเซียมคลอไรด์ก็เพื่อทำให้ผนังเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้านเกิดการซึมผ่าน (permeability) ได้ดีขึ้นเรียกเซลล์นี้ว่า Competent cell เมื่อใส่พลาสมิดและทำการกระตุ้นด้วยความร้อนก็ทำให้เกิดการทรานสฟอร์เมชัน

วิธีการ

1. การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (Competent cell) (Sambrook et al., 1989)

1.1 เขี่ยเชื้อ *E. coli* HB101 จากหลอดลากลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar (ภาคผนวก ข) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน

1.2 นำโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* HB101 จากจานอาหารมาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (LB Broth) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงโดยเขย่า 300 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (15-17 ชั่วโมง)

1.3 นำเชื้อจากที่เลี้ยงข้ามคืนปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 60 มิลลิลิตร เลี้ยงที่ภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 - 5 ชั่วโมง ซึ่งจะถึงระยะทวีคูณ (log phase) โดยนำไปวัดค่า Optical density ที่ 550 นาโนเมตร (nm) ให้ได้เท่ากับ 0.4 - 0.5 (ซึ่งจะได้ความหนาแน่น ประมาณ 10^8 cell/ml)

1.4 แช่เชื้อในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที

1.5 เก็บเซลล์โดยการปั่นที่ความเร็วรอบ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในหลอดปั่นที่แช่เย็น เทส่วนอาหารทิ้งไป แช่เซลล์ในน้ำแข็ง

1.6 เติมสารละลาย 10 mM Tris-HCl, pH8.0, 50mM $CaCl_2$ (ภาคผนวก ค) ที่เย็นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เขย่าจนเซลล์แขวนลอยสม่ำเสมอ ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที

1.7 ปั่นเก็บ Competent cell ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.8 เติมสารละลาย 10 mM Tris-HCl, pH8.0, 50 mM $CaCl_2$ ที่เย็นปริมาตร 4 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เขย่าจนเซลล์กระจายหมด ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที (เพิ่มเวลาเป็น 12 - 24 ชั่วโมง ทำให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงขึ้น 4 - 6 เท่า)

1.9 แบ่งใส่หลอด Microcentrifuge tube หลอดละ 200 µl

2. การทรานสฟอร์เมชัน โดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ (Sambrook et al., 1989)

2.1 นำ Competent cell จากข้อ 1.9 ปริมาตร 200 µl มาผสมกับพลาสมิด ปริมาณระหว่าง 0-100 ng เขย่าให้เข้ากัน

2.2 ตั้งไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที

2.3 บ่มที่อุณหภูมิเท่ากับ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 หรือ 120 วินาที

2.4 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB หรือ SOC (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 800 µl เลี้ยงที่ภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ ความเร็วรอบ 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

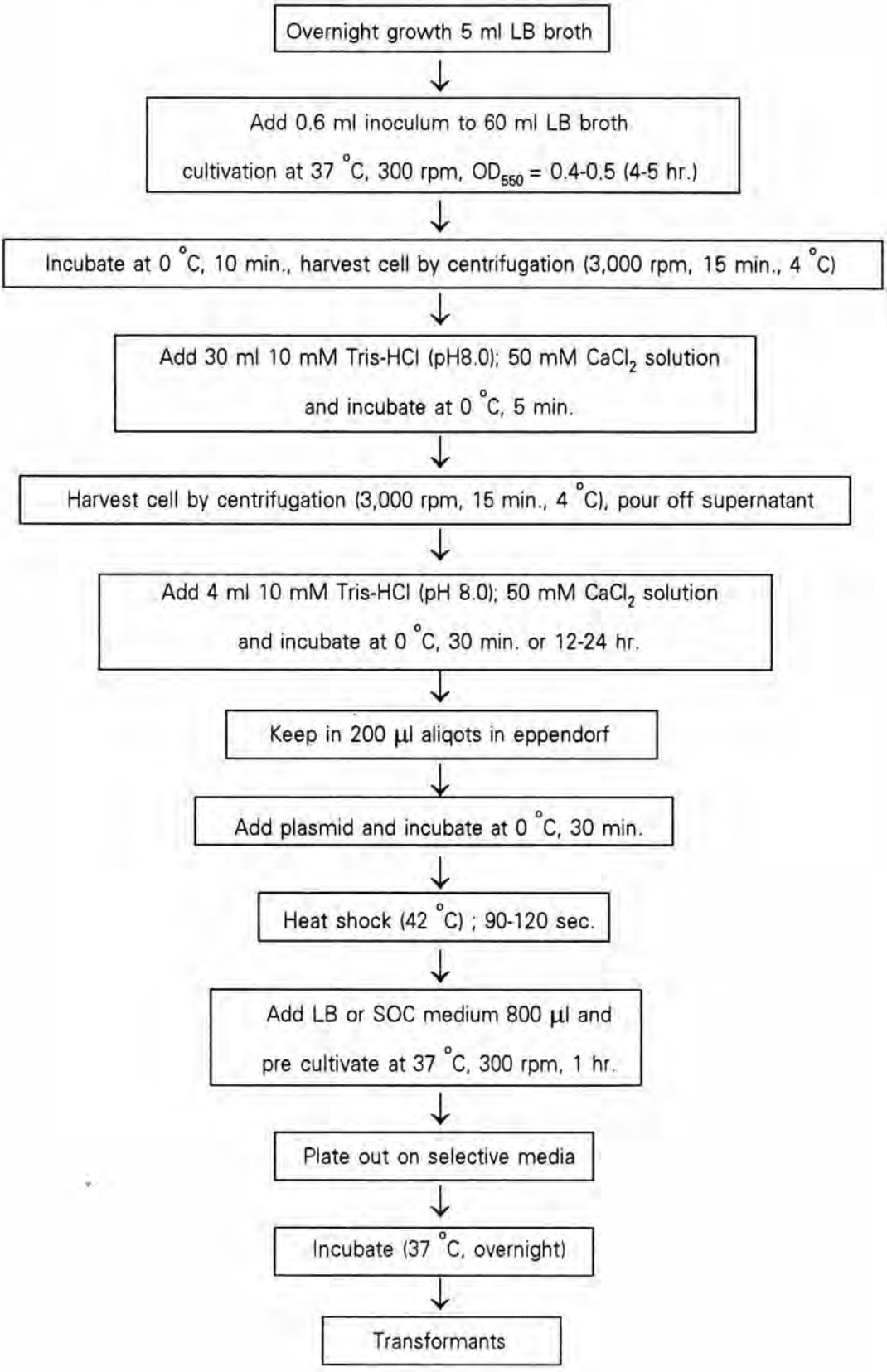
2.5 กระจายเชื้อหลังจากผ่านการเพาะเลี้ยง (cultivation) ลงบนจานอาหารคัดเลือก LB Agar ผสมยาแอมพิซิลิน (50 µg/ml) (ภาคผนวก ข) จานละ 100 µl

2.6 บ่มไว้ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2.7 นับโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานอาหาร LB Agar ที่ผสมยาแอมพิซิลลิน แล้วนำไปคำนวณประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน

ขั้นตอนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ แสดงดังรูปที่ 2.2

รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)



การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation) (Dower et al., 1988)

ขั้นตอนการทำอิเล็กโทรพอเรชันมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

วิธีการ

1. การเตรียมเซลล์ที่ใช้ในกระบวนการอิเล็กโทรพอเรชัน (Dower et al., 1988)

1.1 เขี่ยเชื้อ *E. coli* HB101 จากหลอดลากลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

1.2 นำโคโลนีเดี่ยว ของ *E. coli* HB101 จากจานอาหารมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงโดยเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ความเร็วรอบ 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 - 17 ชั่วโมง

1.3 นำเชื้อจากที่เลี้ยงข้ามคืนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ภาวะความเร็วรอบ 300 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 - 10 ชั่วโมง หรือได้ OD_{550} = 0.8 - 1.0

1.4 แช่เชื้อในน้ำแข็ง 10 นาที

1.5 ปั่นเก็บเซลล์โดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส , เป็นเวลา 5 นาที

1.6 ปั่นล้างเซลล์ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% (Glycerol 10%) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

1.7 กระจายเซลล์ในสารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 200 µl แล้วแบ่งเป็นส่วน ๆ ปริมาตรละ 50 µl ต่อ 1 หลอด Microcentrifuge tube แล้วเก็บไว้ในอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2. การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Dower et al., 1988)

2.1นำเซลล์จากข้อ1.7ผสมกับพลาสมิดและสารละลายอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation solution) (ภาคผนวก ง)

2.2 แช่น้ำแข็ง 1 นาที

2.3 ถ่ายสารละลายผสมจากข้อ 2.2 ลงสู่ห้องบรรจุเซลล์ (Chamber) แล้วปล่อยสนามไฟฟ้าความเข้มต่าง ๆ ที่ปรากฏในผลการทดลอง

2.4 ดูดเซลล์ออกจากห้องบรรจุเซลล์ แล้วใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SOC medium (ภาคผนวก ข)ปริมาตร 500 µl

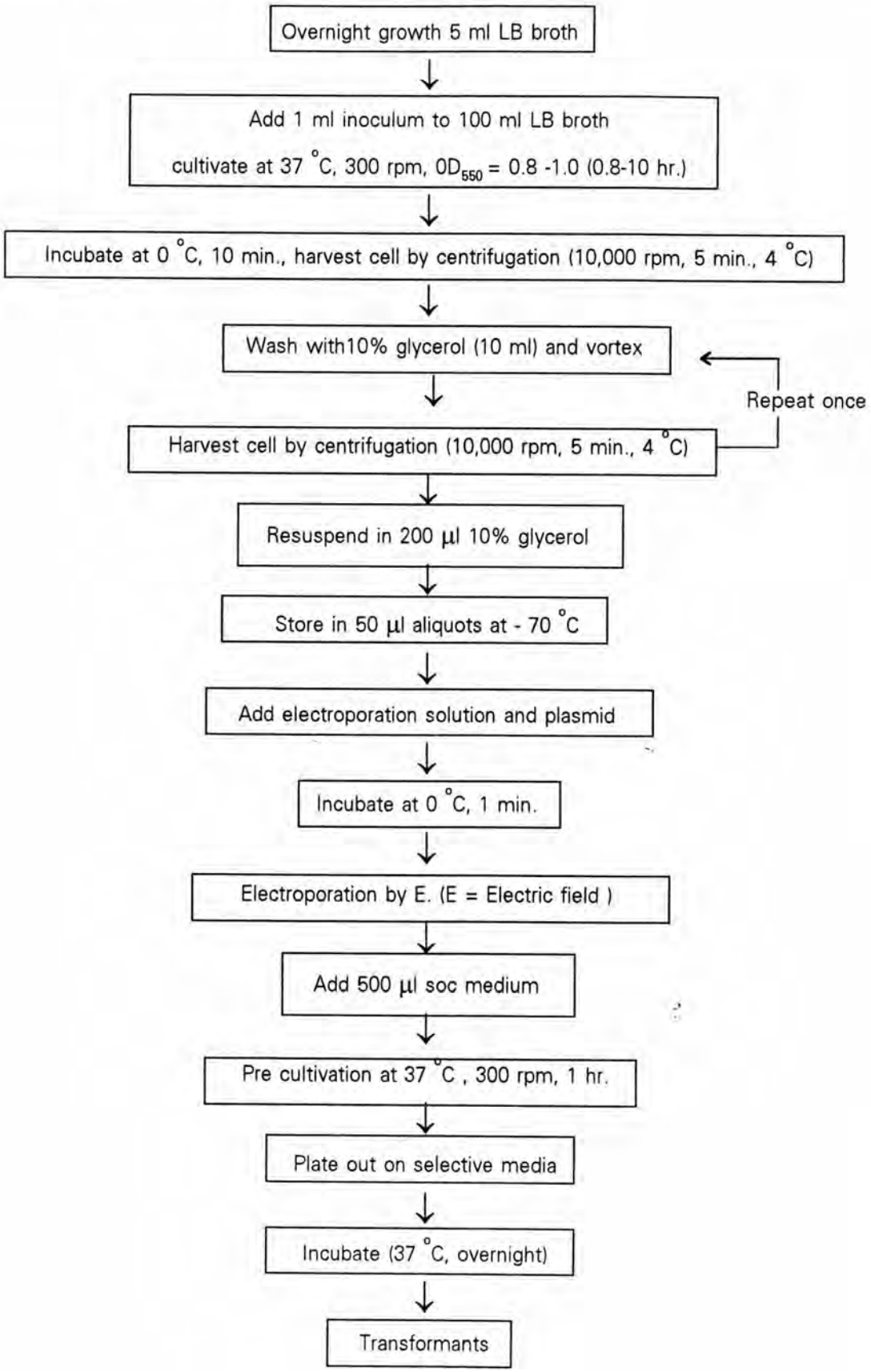
2.5 เลี้ยงเซลล์ที่ภาวะ ความเร็วรอบ 300 รอบ/นาที, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.6 กระจายเซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงลงในจานอาหารคัดเลือก LB Agar ที่ผสมยาแอมพิซิลลิน (50 µg/ml) จานละ 100 µl แล้วบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

2.7 นับโคโลนี ที่เกิดขึ้นแล้วคำนวณ ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน

ขั้นตอนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน แสดงดังรูปที่ 2.3

รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน



การคำนวณประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน (Transformation efficiency)

การคำนวณประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันในงานวิจัยนี้มี 2 แบบ ดังหัวข้อต่อไปนี้

1. การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีแคลเซียมคลอไรด์

สมมติ เกิด x โคโลนีบนจานอาหารคัดเลือก โดยใช้ปริมาณพลาสมิด Y ng ในการทรานสฟอร์เมชัน

เทียบได้ว่า สารละลายอาหาร 100 µl มี x โคโลนี

ถ้า สารละลาย 1000 µl มี $\frac{X\ (1000)}{100}$ = 10 (X) โคโลนี

∴ ปริมาณพลาสมิด Y ng ได้ทรานสฟอร์แมนท์ 10 (x) โคโลนี

ถ้า ปริมาณพลาสมิด 1000 ng ได้ทรานสฟอร์แมนท์ $\frac{10{,}000\ (x)}{Y}$ t/µg DNA

∴ ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชัน เท่ากับ $\frac{10{,}000\ (x)}{Y}$ t/µg DNA

2. การทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation)

สมมติ เกิดโคโลนี x โคโลนี ในจานอาหารคัดเลือก โดยใช้ปริมาณพลาสมิด = Y ng ในการทรานสฟอร์เมชัน

เทียบได้ว่า สารละลายอาหาร 100 µl มี x โคโลนี

500 µl มี $\frac{x\ (500)}{100}$ = 5 (x) โคโลนี

∴ ปริมาณพลาสมิด Y ng ได้ทรานสฟอร์แมนท์ 5 (x) โคโลนี

ถ้า ปริมาณพลาสมิด 1000 ng ได้ทรานสฟอร์แมนท์ $\frac{5000\ (x)}{Y}$ t/µg DNA

∴ ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ $\frac{5000\ (x)}{Y}$ t/µg DNA