บทที่2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 เครื่องมือหลักที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) แบบ reciprocal ของบริษัท New Brunswick Scientific Co, U.S.A.

2.1.2 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath shaker) แบบ reciprocal รุ่น 1068 ของบริษัท Grosellschaft fur labortechnik (GEL), Germany

2.1.3 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany

2.1.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Memmert, Germany

2.1.5 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kokusan, Japan

2.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น cyberscan2000 ของบริษัท Eutech Cybernetics, Singapore

2.1.7 เครื่องชั่งรุ่น A200S ของบริษัท Forma Scientific, U.S.A.; รุ่น PB3002 ของบริษัท METTLER TOLEDO, Swizerland

2.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

2.1.8.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan

2.1.8.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น 1120 ของบริษัท Kubota, Japan

2.1.9 ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow ของบริษัท Lab Service, Thailand

2.1.10 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electric Co., Ltd., Japan

2.1.11 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส ของ Forma Scientific, U.S.A.

2.1.12 ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

2.1.12.1 เครื่องกำเนิดไฟฟ้ารุ่น 2301 microdrive 1 ของบริษัท LKB, Sweden

2.1.12.2 เจลแชมเบอร์ (gel chamber) พร้อมอุปกรณ์เตรียมอะกาโรสเจล ของ Mupid, Japan

2.1.13 เครื่องผสมสาร (vortex genie) รุ่น K-550-GE ของ Scientific Industries, U.S.A.

2.1.14 เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator) รุ่น 3-3602 ของบริษัท Fotodyne, U.S.A.

2.1.15 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง visible (spectrophotometer) รุ่น spectronic 21 ของ Bausch and Lomb, U.S.A.

2.1.16 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง UV (UV/VIS spectrophotometer) รุ่น UV 160 A ของบริษัท Shimadzu., Japan

2.1.17 เครื่อง Gene Pulser II Electroporation System ของ Bio-Rad Laboratories, Canada

2.1.18 อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

กล้องถ่ายภาพรุ่น FM-2 ของบริษัท Nikon, Japan

แผ่นกรองแสงสีแดง (filter)

ฟิล์มขาว-ดำ ความไวแสง 400 (Tmax400)

2.2 เคมีภัณฑ์

2.2.1 สารเคมี

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (Analytical grade)

2.2.2 เอนไซม์

เรสทริกชันเอนไซม์และเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนยีนของบริษัท Promega Co., U.S.A. และ BRL, Inc., U.S.A.

เอนไซม์ T4 DNA ligase ของบริษัท New England Biolabs, Inc., U.S.A.

เอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme) ของบริษัท Sigma, U.S.A.

เอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase) โปรเนส (Pronase) และ โปรตีเนส เค (Proteinase K) ของบริษัท Sigma, U.S.A.

2.2.3 4-methylumbelliferyl-7-β-D-xyloside (MUX) ของบริษัท Sigma, U.S.A.

2.2.4 พารา-ไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside) ของบริษัท Sigma, U.S.A.

2.2.5 ไซแลน (xylan from birchwood) ของบริษัท Sigma, U.S.A.

2.2.6 อะลูมินา (alumina) ของบริษัท Sigma, U.S.A.

2.2.7 ชุดแยกพลาสมิดปริมาณน้อย (QIAprep Spin Plasmid Kit) ของบริษัท QIAGEN GmbH, Germany

2.2.8 ชุดแยกพลาสมิดปริมาณมาก (QIAGEN Plasmid Midi Kit) ของบริษัท QIAGEN GmbH, Germany

2.2.9 ชุดแยกแถบดีเอ็นเอจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) ของบริษัท QIAGEN GmbH, Germany

2.3 เชื้อจุลินทรีย์และพลาสมิด

2.3.1 เชื้อจุลินทรีย์

2.3.1.1 *Streptomyces* sp. CH7 ซึ่งคัดเลือกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย และมีแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-ไซโลสิเดสสูง คัดเลือกและศึกษาโดย สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539)

2.3.1.2 *Escherichia coli* DH5α

2.3.2 พลาสมิด

2.3.2.1 pUC18

2.3.2.2 pUC19

รายละเอียดพลาสมิดทั้ง 2 แสดงในภาคผนวก ง.

2.4 การเตรียมและเก็บรักษาสปอร์จาก *Streptomyces* sp. CH7

ขีด (streak) สปอร์หรือไมซีเลียมของเชื้อลงบนอาหารแข็งสูตร MS (ภาคผนวก ก.) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 7 วัน หรือจนกระทั่งสปอร์เปลี่ยนเป็นสีเทาเข้ม เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3-5 มิลลิลิตร ใช้ลูป (loop) ขูดเบาๆให้สปอร์หลุด กรองสปอร์ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำกลั่นด้วยชุดกรอง (ภาคผนวก ค.) นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง แขวนลอยสปอร์ที่ได้ใน 20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของกลีเซอรอลในน้ำกลั่น โดยให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสปอร์แขวนลอยเป็น 10^8-10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.5 การเลี้ยงและการเก็บรักษาเซลล์ *Streptomyces* sp. CH7

นำสปอร์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 2.4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปกรวยที่มีขดลวดสปริง (ภาคผนวก ก.) บ่มในเครื่องเขย่าแบบ reciprocal ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 2 วัน ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง และปั่นล้างด้วยสารละลายซูโครสเข้มข้น 10.3 เปอร์เซนต์ 2 ครั้ง แบ่งเก็บเซลล์ที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด เก็บรักษาเซลล์ไว้ที่ตู้แช่เข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.6 การเตรียม *E. coli* DH5α เพื่อใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการทรานสฟอร์มโดยวิธีอิเลคโทรพอเรชัน (Bio-Rad Laboratories, 1993)

ขีดแยกเชื้อ *E. coli* DH5α ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB (ภาคผนวก ก.) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ถ่ายโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB (ภาคผนวก ก.) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ข้ามคืน ถ่ายเซลล์ที่เตรียมได้ 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่สภาวะเดิม จนกระทั่งสามารถวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ OD_{600} ได้ประมาณ 0.5 ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ปั่นล้างที่สภาวะเดิมด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร 1 ครั้ง และกลีเซอรอลเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ตามลำดับ เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมกลีเซอรอลเข้มข้นเท่าเดิมปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์กระจาย แบ่งเก็บเซลล์ใส่หลอดไมโครฟิวจ์ความจุ 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 40 ไมโครลิตร นำไปทำอิเลคโทรพอเรชันทันทีหรือเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

2.7 การสกัดดีเอ็นเอ

2.7.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *Streptomyces* sp. CH7 ตามวิธีของ Birch และ Cullum (1985)

เตรียมสารละลายไลโซไซม์ 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข.) ที่มีไลโซไซม์ผสมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงในเซลล์ 1 หลอดที่เตรียมได้จากข้อ 2.5 บ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ปิเปตดูดสารละลายขึ้นลงเบาๆ ระหว่างการบ่ม 4-5 ครั้ง ที่เวลา 15 นาที และ 30 นาที แล้วบ่มต่อจนกระทั่งครบ 1 ชั่วโมง เติมสารละลายโปรเนส (ภาคผนวก ข.) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดเบาๆ บ่มต่อที่สภาวะเดิมอีก 5 นาที เติมสารละลาย SDS เข้มข้น 10% ปริมาตร 0.55 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดเบาๆ บ่มต่อที่สภาวะเดิมจนกระทั่งสารละลายในหลอดใสและหนืด เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดเบาๆ เติมสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์มที่อิ่มตัวในบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข.) กลับหลอดเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที ดูดส่วนน้ำใสชั้นบนใส่หลอดแก้วฝาเกลียว เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 3 ใน 4 เท่าของปริมาตรสารละลายทั้งหมด ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดเบาๆ จนได้ตะกอนเป็นสายใยของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ใช้พาสเจอร์ปิเปต (pasture pipette) ที่หลอมปลายปิดสนิทเกี่ยวสายใยดีเอ็นเอขึ้นมาล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แขวนลอยดีเอ็นเอที่ได้ในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอาร์เอ็นเอส เข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มโดยเขย่าเบาๆในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เติมสารละลาย SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 0.55 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปผ่านขั้นตอนเติมสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม จนถึงขั้นตอนตกตะกอนดีเอ็นเอและทำให้แห้งอีกครั้ง นำดีเอ็นเอที่ได้มาแขวนลอยในบัฟเฟอร์ TE แล้วเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.7.2 การสกัดพลาสมิดหรือรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจาก *E. coli* DH5α

2.7.2.1 การสกัดพลาสมิดหรือรีคอมบิแนนท์พลาสมิดปริมาณน้อย (Maniatis et al., 1982)

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิดพาหะ pUC18 , pUC19 หรือ พลาสมิดลูกผสม บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก.) โดยขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะตามสูตรเดิม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน ถ่ายเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข.) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายตัวสม่ำเสมอ เติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข.) ที่เตรียมใหม่ 200 ไมโครลิตร กลับหลอดเบาๆ 2-3 ครั้ง ตั้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข.) ที่เย็น 150 ไมโครลิตร กลับหลอดเบาๆ 2-3 ครั้ง ตั้งบ่มในอ่างน้ำแข็ง 3-5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสมาประมาณ 400 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับ 95 เปอร์เซนต์ เอทานอล ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ได้ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณครึ่งชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ปั่นล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 500 ไมโครลิตร 2 ครั้งที่สภาวะเดิม เทส่วนน้ำใสทิ้ง วางไว้ให้แห้ง แขวนลอยตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE เก็บสารละลายดีเอ็นเอในตู้แช่เข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.7.2.2 การสกัดพลาสมิดหรือรีคอมบิแนนท์พลาสมิดปริมาณมากด้วยชุดแยกพลาสมิด QIAGEN Plasmid Midi Kit

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดหรือรีคอมบิแนนท์พลาสมิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะตามสูตรเดิมปริมาตร 2-5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 8 ชั่วโมง ถ่ายเซลล์ที่ได้ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ลงในอาหาร

เลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะตามสูตรเดิมปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ OD_{600} ได้ประมาณ 1-1.5 ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ละลายเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร กลับหลอดเบาๆ 5-6 ครั้ง วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ P3 ที่เย็น 4 มิลลิลิตร กลับหลอดเบาๆทันที 5-6 ครั้ง บ่มไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 15-20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วมากกว่าหรือเท่ากับ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใสมาปั่นเหวี่ยงซ้ำที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 15 นาที เตรียมคอลัมน์โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ QBT ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ QC 10 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ 2 ครั้ง นำส่วนน้ำใสทั้งหมดที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงมาเติมให้ผ่านคอลัมน์ นำคอลัมน์มาวางใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ความจุ 10 มิลลิลิตร ชะพลาสมิดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ QF ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตกตะกอนพลาสมิดด้วยไอโซโพรพานอลปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 9,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ปั่นล้างพลาสมิดด้วย 70 เปอร์เซนต์ เอธานอล 2 ครั้งที่สภาวะเดิม ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แขวนลอยพลาสมิดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

ตรวจสอบผลและวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส เก็บพลาสมิดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.8 การหาความเข้มข้นและขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส

เทสารละลายอะกาโรสเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสภาพหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ดึงหวีออก นำเจลมาวางในกล่องสำหรับทำอิเลคโทรโฟรีซิส เทบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข.) ลงไปให้ท่วมเจล นำดีเอ็นเอที่แขวนลอยอยู่ในบัฟเฟอร์ TE มาผสมกับสีติดตาม (ภาคผนวก ข.) ในอัตราส่วน 4:1 โดยปริมาตร หยดสารผสมที่ได้ลงในหลุมเจล หยดแลมบ์ดาดีเอ็นเอซึ่งถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII และรู้ความเข้มข้นแน่นอนลงในหลุมเจลเพื่อใช้เป็นชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่นำมาทดสอบ ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เพื่อทำอิเลคโทรโฟรีซิสจนกระทั่งสีติดตามเคลื่อนที่มาเกือบสุดขอบอีกด้านของเจล ย้อมสีดีเอ็นเอโดยแช่แผ่นเจล

ที่ผ่านการทำอิเลคโทรโฟรีซิสลงในสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข.) เป็นเวลาประมาณ 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ นำแผ่นเจลมาวางบนเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต เปิดเครื่องให้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตรส่องผ่าน เปรียบเทียบขนาดและความเข้มของการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอที่นำมาทดสอบกับแถบปีดาดีเอ็นเอเพื่อหาขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพผ่านแผ่นกรองสีแดง (red filter) โดยใช้ฟิล์มขาว-ดำ และความไวแสง 400

การหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอปริมาณมากสามารถทำได้อีกวิธีหนึ่งคือใช้วิธีอัลตราไวโอเลตแอบซอร์บชันสเปกโตรสโคปี (Ultraviolet Absorbtion Spectroscopy) โดยนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260}/A_{280} โดยถ้าได้ค่าเท่ากับ 1.80 แสดงว่าดีเอ็นเอที่ได้บริสุทธิ์ ในกรณีที่ได้ค่าสูงกว่า 1.80 และเกือบใกล้ 2.00 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอ (RNA) ปนอยู่มาก ในกรณีที่ค่าต่ำกว่า 1.80 แสดงว่าดีเอ็นเอนั้นไม่บริสุทธิ์ มีโปรตีนหรือฟีนอลปนเปื้อนอยู่ (Maniatis et al., 1982)

การคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอทำโดยเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260} มีค่าเท่ากับ 1 เมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Maniatis et al., 1982)

2.9 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

2.9.1 การเตรียมชิ้นโครโมโซมอลดีเอ็นเอโดยการย่อยแบบกึ่งสมบูรณ์

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 2.7.1 เข้มข้น 5 ไมโครกรัม ในปริมาตรไม่เกิน 100 ไมโครลิตรมาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเรสทริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI ปริมาตรตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด เติมบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 110 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอดที่ 1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และแบ่งใส่หลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 8 หลอดละ 10 ไมโครลิตร เติมเรสทริกชันเอนไซม์ *Sau*3AI ความเข้มข้น 4 หน่วย ลงในหลอดที่ 1 ผสมอย่างรวดเร็ว ดูดสารในหลอดที่ 1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมลงในหลอดที่ 2 อย่างรวดเร็ว แล้วดูดสารในหลอดที่ 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมลงในหลอดที่ 3 และทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆ จนถึง

หลอดที่ 8 นำหลอดทั้งหมดไปบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผสมสีติดตาม แล้วนำไปทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิสเปรียบเทียบกับแลมบ์ดา ดีเอ็นเอ เลือกอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอและเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการย่อยดีเอ็นเอให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการมากที่สุดเพื่อนำไปเตรียมในปริมาณมากต่อไป

การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในปริมาณมากทำโดยเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอและปริมาณเอนไซม์ในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้ทดสอบไว้ข้างต้น ทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส ย้อมด้วยสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์และนำไปตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ตัดเฉพาะแถบที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการมาชะออกด้วยวิธีไดอะไลซิสในถุงไดอะไลซ์ ดูดสารละลายที่ได้มาสกัดเอทิเดียมโบรไมด์ออกโดยเติมบิวทานอล (butanol) ลงไปปริมาตร 2 เท่า กลับหลอดเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายใสส่วนล่างมาสกัดด้วยบิวทานอลซ้ำอีก 2-3 ครั้ง ตรวจดูผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจนกระทั่งไม่พบการเรืองแสงสีส้มของเอทิเดียมโบรไมด์ เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 โมลาร์ ตกตะกอนด้วย 95 เปอร์เซนต์ เอทานอล และปั่นล้างด้วย 70 เปอร์เซนต์ เอทานอล วางไว้ให้แห้ง แขวนลอยดีเอ็นเอที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE และนำไปทำให้บริสุทธิ์ซ้ำอีกครั้งด้วยชุด QIAprep Spin Plasmid Kit ตามวิธีที่กล่าวในข้อ 2.9.3.1

2.9.2 การเตรียมพลาสมิดพาหะ

นำพลาสมิดพาหะ pUC18 หรือ pUC19 มาตัดแบบสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาและสภาวะการบ่มตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด ตรวจสอบการย่อยด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส นำพลาสมิดที่ได้จากการตัดมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit ตามวิธีที่กล่าวในข้อ 2.9.3.2 แล้วกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ด้วยเอนไซม์ Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) จากบริษัท Promega Co., U.S.A. โดยนำชิ้นพลาสมิดพาหะที่ได้มา 6 ไมโครกรัม ในปริมาตรประมาณ 40 ไมโครลิตร ผสมกับ 3 ไมโครลิตร ของสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับ CIAP ที่เข้มข้น 0.10 หน่วยต่อปลายฟอสเฟตทั้ง 2 ข้างของดีเอ็นเอที่เข้มข้น 1 พิโกโมล ปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปรับอุณหภูมิเป็น 56 องศาเซลเซียส แล้วบ่มต่อ 20 นาที นำมาวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย CIAP ที่ความเข้มข้นเดิมอีก 3 ไมโครลิตร บ่มที่สภาวะ

และอุณหภูมิเดิมอีกครั้ง เติมสารละลายสำหรับหยุดปฏิกิริยาของ CIAP (ภาคผนวก ข.) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปั่นผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายโปรตีเนส เค (Proteinase K) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 6 ไมโครลิตร และเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข.) ปริมาตรเท่าตัว นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสชั้นบนมาใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เติมสารละลายโซเดียมอะซีเตทเข้มข้น 3 โมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 โมลาร์ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล และปั่นล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 2 ครั้ง นำไปวางไว้ให้แห้ง ละลายพลาสมิดที่เตรียมได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ตรวจสอบผลและคำนวนความเข้มข้นโดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส

2.9.3 การแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ

2.9.3.1 การแยกเอาชิ้นโครโมโซมอลดีเอ็นเอด้วยชุด QIAprep Spin Plasmid Kit

ตกตะกอนดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์โดยคำนวณความเข้มข้นดีเอ็นเอให้ได้ประมาณ 10 ไมโครกรัม ปั่นล้างด้วย 70 เปอร์เซนต์ เอทานอล 2 ครั้ง วางทิ้งไว้ให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติมไอโซโพรพานอล 150 ไมโครลิตร กลับหลอดเบาๆ ดูดหรือเทสารละลายทั้งหมดลงในคอลัมน์ที่รองรับด้วยหลอดขนาดความจุ 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วประมาณ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา1 นาที ทิ้งส่วนน้ำในหลอดที่รองรับ ล้างคอลัมน์ด้วยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-5 นาที ปั่นที่ความเร็วประมาณ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนน้ำในหลอดที่รองรับ นำไปปั่นที่สภาวะเดิมอีกครั้ง นำเฉพาะคอลัมน์มาใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ความจุ 1.5 มิลลิลิตร ชะดีเอ็นเอให้ผ่านคอลัมน์ลงไปในหลอดไมโครฟิวจ์ โดยใส่สารละลาย TE 50 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที นำไปปั่นที่ความเร็วประมาณ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบและวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยการทำอิเลคโทรโฟรีซิส เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

ในกรณีที่ได้ดีเอ็นเอปริมาณน้อยให้ทำซ้ำโดยดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากหลอดไมโครฟิวจ์มาผ่านคอลัมน์ อีก 2 ครั้ง

2.9.3.2 การแยกเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ความเข้มข้นประมาณ 10 ไมโครกรัม มาทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ตัดเจลอะกาโรสเฉพาะแถบที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการมาชั่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยชั่งน้ำหนักเจลไม่เกิน 400 มิลลิกรัมต่อหลอด เติมสารละลาย QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล (น้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัมเท่ากับเจลปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ปั่นผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยปั่นผสมระหว่างการบ่มทุก 2-3 นาที หลังจากเจลละลายสมบูรณ์จึงเติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล กลับหลอดเบาๆ ดูดหรือเทสารละลายจากหลอดไมโครฟิวจ์ปริมาตรไม่เกิน 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ที่รองรับด้วยหลอดขนาดความจุ 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดที่รองรับทิ้ง ในกรณีที่สารละลายมีปริมาตรเกิน 750 ไมโครลิตร ให้ทำซ้ำในขั้นดูดสารละลายใส่คอลัมน์ จนกระทั่งสารละลายทั้งหมดผ่านคอลัมน์ หลังจากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร และทำขั้นต่อไปเช่นเดียวกับในข้อ 2.9.3.I จนกระทั่งถึงขั้นสุดท้าย

2.10 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

นำชิ้นโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากการเตรียมในข้อ 2.9.1 และชิ้นพลาสมิดพาหะที่ได้จากการเตรียมในข้อ 2.9.2 มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T_4 DNA ligase ใช้อัตราส่วนของพิโกโมลชิ้นพลาสมิดพาหะต่อชิ้นโครโมโซมอลดีเอ็นเอเท่ากับ 1:5 โดยความเข้มข้นรวมของดีเอ็นเอทั้งหมดประมาณ 1.5-1.6 ไมโครกรัม เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ T_4 DNA ligase ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด เติมสารละลาย ATP เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200 มิลลิโมลาร์ เติมเอนไซม์ T_4 DNA ligase ให้ได้ความเข้มข้น 6 หน่วย ปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ให้ได้

ความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอทั้งหมดเท่ากับ 19-21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 12-15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เติมทีอาร์เอ็นเอ (tRNA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 3 โมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 โมลาร์ ตกตะกอนด้วย 95 เปอร์เซนต์ เอธานอล ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง ปั่นล้างด้วย 70 เปอร์เซนต์ เอธานอล 2 ครั้ง เทส่วนน้ำใสทิ้ง วางไว้ให้แห้ง แขวนลอยตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

2.11 การนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยวิธีอิเลคโทรพอเรชันและการคัดเลือกโคลนที่ได้รับยีนบีตา-ไซโลสิเดส

ตั้งค่าเครื่องอิเลคโทรพอเรชัน (Gene Pulser II Electroporation System ของ Bio-Rad Laboratories, Canada) ให้มีค่าความต้านทานไฟฟ้าเท่ากับ 200 โอห์ม ค่าความจุไฟฟ้าเท่ากับ 25 ไมโครฟารัด และค่าความต่างศักย์เท่ากับ 2.5 กิโลวัตต์ เติมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เตรียมได้จากวิธีในข้อ 8 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในเซลล์เจ้าบ้านที่เตรียมได้จากวิธีในข้อ 2.6 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมเบาๆให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง ถ่ายส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดสำหรับทำอิเลคโทรพอเรชันที่มีความกว้างภายในเท่ากับ 0.2 เซนติเมตร ที่แช่เย็นไว้ วางหลอดลงในช่องบนแท่นสำหรับวางหลอด ดันหลอดเข้าไปสัมผัสกับแผ่นประจุขั้วบวกและขั้วลบให้ครบวงจร กดปุ่มทำอิเลคโทรพอเรชัน แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ที่เย็น ทันที ดูดผสมให้เข้ากันเบาๆ รีบถ่ายส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดไมโครฟิวจ์ความจุ 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50-60 นาที นำส่วนผสมทั้งหมดมาทาบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่มีไซเลนผสมอยู่ 0.2 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินผสมอยู่ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี IPTG, X-gal และมี 4-เมทิลอัมเบลลิเฟอริล-7-บีดา-ดี-ไซโลไซด์ (4-methylumbelliferyl-7-β-D-xyloside;MUX) (ภาคผนวก ข.) ราดอยู่บนผิวหน้า นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1- 2 วัน สังเกตและคัดเลือกโคลนภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร โคโลนีที่ได้รับยีนบีตา-ไซโลสิเดส จะปรากฏการเรืองแสงสีฟ้าทั้งภายในและรอบนอกโคโลนี

2.12 การตรวจสอบโคลนโดยวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสเปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. CH7 และ *E. coli* ที่มีพลาสมิดพาหะ

2.12.1 การเลี้ยงเซลล์เพื่อวิเคราะห์แอคติวิตี

2.12.1.1 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. CH7

ดูดสปอร์ *Streptomyces* sp. CH7 ที่เตรียมได้จากข้อ 2.4 มา 1 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ที่ผสมไซแลน 0.2 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน ถ่ายเซลล์ที่ได้ทั้งหมดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมปริมาตร 50 มิลลิลิตร และนำไปบ่มต่อที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 15 ชั่วโมง

2.12.1.2 การเลี้ยง *E. coli* ที่มีพลาสมิดพาหะหรือโคลน

ถ่ายโคโลนีเดี่ยวของเซลล์แบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ผสมไซแลน 0.2 เปอร์เซนต์ และมียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินผสมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่สภาวะเดียวกันกับข้อ 2.12.1.1

2.12.2 การเตรียมบีตา-ไซโลสิเดส

นำเซลล์ที่ได้ในข้อ 2.12.1 มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำเซลล์มาปั่นล้างด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 (ภาคผนวก ข.) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำเซลล์ทั้งหมดมาบดผสมกับอะลูมินาในอัตราส่วน 1:1 เติมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นและค่าความเป็นกรดด่างเท่าเดิม ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เพื่อเป็นตัวทำละลาย ปั่นเหวี่ยงแยกชั้นสารละลายที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสไว้สำหรับวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสและปริมาณโปรตีน

2.12.3 การวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส

ดัดแปลงจากวิธีการของ Nakanishi และคณะ (1987) โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม

ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และพารา-ไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำส่วนผสมนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-50ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1 หน่วยของบีตา-ไซโลสิเดสเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพารา-ไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ แล้วได้พารา-ไนโตรฟีนอลเกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

2.12.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยเตรียมสารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีนความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย C (ภาคผนวก ข.) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายผสม D (ภาคผนวก ข.) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ปั่นผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย