

บทที่ 2

เครื่องมือ วัสดุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์

เครื่องมือ

1. ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) ขนาด 20, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
GILSON PIPETMAN[®] รุ่น P20, P100, P200 และ P1000 บริษัท Gilson Medical Electronics
(France) S.A., France
2. เครื่องเลี้ยงเซลล์แบบหมุน ROLLORDRUM[™] รุ่น TC-7 บริษัท New
Brunswick Scientific, USA
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (water bath shaker) GYROTOR[®]
Water Bath Shaker รุ่น G76 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
4. เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิ (dri - bath incubator) SYBRON THERMOLYNE
DRI-BATH รุ่น DB - 17610-26 บริษัท SYBRON Co., USA
5. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ชนิด BM 600 บริษัท memmert GmbH, W.
Germany
6. ตู้อบอุณหภูมิสูง (hot air oven) บริษัท memmert GmbH, W. Germany
7. เครื่องอิเล็กทรอนิกส์โทรทรานสปอร์เมชัน GENE PULSER[®] apparatus
รุ่น 1652077 บริษัท BIO-RAD Laboratories, CA
8. ตู้เย็น SHARP refrigerator-freezer รุ่น SJ-6Y บริษัท SHARP CO.,Ltd.,
Japan
9. ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -70°C biofreezer บริษัท REVCO Co.,Ltd., USA.
10. เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge)
รุ่น J-21C บริษัท Beckman Instrument Inc., USA
11. เครื่องปั่นแรงเหวี่ยง KOKUSAN H-103N SERIES บริษัท Kokusan
Enshinki Co., Ltd., Japan

12. เครื่องชั่งสาร ELECTRONIC BALANCE alsep EY-220A 220 g บริษัท A&D Co., Ltd., Japan และ BALANCE SARTORIUS 1507 5500 g, 4 pts. บริษัท Sartorius GMBH, Germany
13. เครื่องชั่งสารละเอียด BALANCE SARTORIUS 1702 200 g, 0.1mg บริษัท Sartorius GMBH, Germany
14. เครื่องชั่งสารแบบสองแขน HAVARD TRIP BALANCE 2 kg (5 lb) capacity บริษัท OHAUS, USA
15. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) ORION SA 720 บริษัท Orion Research Incorporated, USA
16. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ UV-visible recording spectrophotometer Du[®] SERIES 600 SPECTROPHOTOMETER บริษัท Beckman Instruments, Inc., CA
17. เตาให้ความร้อนและผสมสารด้วยแม่เหล็ก hot plate and magnetic stirrer Framo[®] - Gerratetechnik M 21/1, Germany และ IKAMAG[®] RH 436783 บริษัท JANKE & KUNKEL GMBH & Co., Germany
18. เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงขนาดเล็ก (high speed microcentrifuge) รุ่น MC-15A บริษัท TOMY Seiko, Japan และ เครื่องกำเนิดไฟฟ้า รุ่น STEPDOWN TRANSFORMER KD-600 600VA บริษัท Toyozumi Dengenkiki Co.,Ltd., Japan
19. เครื่องอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น HA-30 บริษัท Hirayama Manufacturing Coporation, Japan
20. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น VORTEX-GENIE[™] K 550-G และ G 560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA
21. เครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator) รุ่น TS-20 Chromato-vue[®] บริษัท Ultra Violet Products, Inc., USA
22. หลอดกำเนิดแสงอุลตราไวโอเล็ต (UV lamp) รุ่น Rad Free Long Wave Ultraviolet 365 nm บริษัท Schleicher & Schuell GmbH, Germany
23. เครื่องกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (light box) รุ่น 2859 SHANDON บริษัท Shandon Scientific Co. Ltd., England
24. เครื่องกำเนิดแสงสีแดง (adjustable savelight lamp) รุ่น 1521541 Kodak 6B บริษัท Eastman Kodak Company, USA

25. อุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เครื่องกำเนิดไฟฟ้า รุ่น EPS 322 หรือ EPS 5100
26. เครื่องทำความสะอาด Ultrasonic Cleaner B-32 บริษัท BRANDSON (a Smithkline company) Cleaning Equipment Company, USA และ Ultrasonicator ULTRASONS. บริษัท J.P. SELECTA, S.A., Espana
27. อุปกรณ์เฮลดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) รุ่น Mini-PROTEAN[®] II และ เครื่องกำเนิดไฟฟ้า รุ่น 1000/500 บริษัท BIO-RAD Laboratories, CA
28. หลอดไฮบริไดเซชัน HYBAID[™] HB-OV-BM บริษัท HYBAID Ltd., USA
29. ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับทำไฮบริไดเซชัน รุ่น Equipment Class I MINI 10 และ Shake 'n' shake บริษัท HYBAID Ltd., USA
30. กล่องสำหรับประกอบฟิล์ม (film cassette)
- ขนาด 8 x 10 นิ้ว (205 x 256 mm) บริษัท OKAMOTO Co.,Ltd., Japan และ บริษัท TOSHIBA Co.,Ltd., Japan
 - ขนาด 35 x 43 นิ้ว รุ่น PL (358 x 434 mm) บริษัท OKAMOTO Co.,Ltd., Japan และ รุ่น X-Omatic cassette Lanex[®] REGULAR screens บริษัท Eastman Kodak Company, USA
31. เครื่องตรวจนับสารกัมมันตภาพรังสี (detector) AC-DC ALARM RATEMETER SML-2 บริษัท Technical Associates, USA
32. เครื่องทำให้เซลล์แตก sonicator CELL DISRUPTOR W-375 บริษัท Heat Systems-Ultrasonics, Inc., USA
33. ตู้ laminar flow ISSCO LAMINAR FLOW บริษัท DWYER Instruments Inc., USA
34. เครื่องบ่มอุณหภูมิต่ำ BIOCHILLER[™]2000 รุ่น 8-3202 บริษัท FOTODYNE Inc., USA
35. เตาไมโครเวฟ TURBORA TRX.1500 Microwaveoven บริษัท TURBO International Co.,Ltd., Korea
36. เครื่องฉายแสงอุลตราไวโอเล็ต รุ่น GS GENE LINKER[®] UV CHAMBER บริษัท BIO-RAD Laboratories, CA

37. เครื่องถ่ายภาพโพลาลอยด์ ประกอบด้วย

- ImageStore 7500 WHITE/UV TMW-20 transilluminator GDS 7500 Darkroom และเครื่องกำเนิดไฟฟ้า PS 200 บริษัท Ultra Violet Products, USA
- color display monitor FA 3435 บริษัท Mitsubishi Electric Co., Japan
- video graphic printer UP860CE บริษัท SONY Co., Japan

38. เครื่องทำ Southern blotting รุ่น 785 VACUUM BLOTTER, VACUUM PUMP บริษัท BIO-RAD Laboratories, CA

วัสดุภัณฑ์

- กระดาษกรอง (filter paper) HA 0.45 μm บริษัท Millipore Corporation, USA
- กระดาษกรอง (filter paper) Whatman Membrane Filters Cellulose Nitrate (White Plain) 0.45 μm บริษัท Whatman International Ltd., England
- กระดาษกรอง (filter paper) Whatman No. 1, 42 (ashless) บริษัท Whatman International Ltd., England
- แผ่นไนลอนทรานสเฟอร์เมมเบรน MagnaCharge 0.45 μm บริษัท Micron Separations Inc., MA
- ฟิล์มถ่ายภาพขาว-ดำ Kodak TriX-pan 400 บริษัท Eastman Kodak Company, USA
- ฟิล์มเอกซเรย์ Kodak XAR film บริษัท Eastman Kodak Company, USA
- ฟิล์มเอกซเรย์ HyperfilmMP บริษัท Amersham International plc., England
- ถุงไดอะไลซิส (cellulose dialysis tubing) 6 mm (diameter) M.W. cut off 12,000 Da บริษัท SIGMA Chemical Company, USA
- คิวเวตสำหรับทำการทรานสเฟอร์ด้วยกระแสไฟฟ้า 0.2 cm electrode gap Gene Pulser[®] E. coli Pulser[™] Cuvette บริษัท BIO-RAD Laboratories, CA
- คอลัมน์สำหรับการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ (disposable column) อยู่ในชุด Bulk and RediPack GST purification modules บริษัท Pharmacia Biotech, Inc., USA
- คอลัมน์สำหรับการทำให้ดีเอ็นเอติดฉากบริสุทธิ์ NENSORB[™] 20 nucleic acid purification cartridge บริษัท Du Pont, USA

เคมีภัณฑ์

สารเคมี

สารเคมีเกรดห้องปฏิบัติการ (laboratory grade)

ยาปฏิชีวนะ kanamycin (kanamycin A) $C_{18}H_{36}N_4O_{11} H_2SO_4$ monosulfate จาก *Streptomyces kanamyceticus* 5 g บริษัท SIGMA Chemical Co., USA

glutathione sepharose 4B 10 ml บริษัท Pharmacia Biotech. Inc., USA

glutathione (γ -Glu-Cys-Gly; GSH) reduced form 25 g บริษัท SIGMA Chemical Co., USA

เอนไซม์

เรสทริคชันเอนไซม์ต่าง ๆ ของบริษัท Boehringer Mannheim GmbH, Germany, New England Biolabs, USA, GIBCO BRL Life Technologies, Inc., USA

T4 DNA ligase บริษัท New England Biolabs, USA

Lysozyme บริษัท SERVA Feinbiochemica GmbH & CO., Germany และ บริษัท SIGMA Chemical Co., USA

Ribonuclease A บริษัท SIGMA Chemical Co., USA

Thrombin (EC 3.4.24.5) from human plasma บริษัท SIGMA Chemical Co., USA

Thrombin Protease 500 unit บริษัท Pharmacia Biotech. Inc., USA

สารกัมมันตภาพรังสี

$[\alpha^{32}P]$ dATP สำหรับการติดฉลากดีเอ็นเอสายยาวด้วยวิธี Nick translation บริษัท Amersham International plc., England

ชุด Kits

GeneClean[®] II kit บริษัท BIO 101, Inc., CA

Nick translation kit บริษัท Amersham International plc., England

Bulk and RediPack GST purification modules บริษัท Pharmacia Biotech. Inc., USA

ดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอพาหะ

พลาสมิด pGEX-2T (Smith และคณะ, 1988) มีขนาดประมาณ 4.948 กิโลเบส แผนที่ยีนเรสทริกชันของพลาสมิดนี้แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 1

พลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม

พลาสมิด pNC3 (Wu, Z.R. และคณะ, 1991) มีขนาดประมาณ 5.354 กิโลเบส มียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์นิวคลีโอไทด์โปรตีน (*nprE* gene) และยีนต้านยาต้านมาัยซิน สกัดจาก *Bacillus subtilis* 1E61 มีจีโนไทป์เป็น : (pNC3) Km trpC2

แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 2

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองคือ ดีเอ็นเอของฟาจแลมบีดา (λ -DNA) ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* อย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคีน (λ /*HindIII*) ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 8 ขนาด ดังนี้ 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 0.564 และ 0.125 กิโลเบส ตามลำดับ ตรวจสอบโดยวิธี 1 % agarose gel electrophoresis (Rodrigues และ Tait, 1983) แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 3

ดีเอ็นเอของฟาจแลมบีดา (λ -DNA) ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BstEII* อย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 60 °ซ ข้ามคีน (λ /*BstEII*) ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 14 ขนาด ดังนี้ 8.454, 7.242, 6.369, 5.686, 4.822, 4.324, 3.675, 2.322, 1.929, 1.371, 1.264, 0.702, 0.224 และ 0.117 กิโลเบส ตามลำดับ ตรวจสอบโดยวิธี 1 % agarose gel electrophoresis (New England Biolabs, 1993) แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 3

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Bacillus subtilis TISTR25

เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินในประเทศไทยซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Science and Technological Research, TISTR) มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส

Escherichia coli HB101

มีจีโนไทป์เป็น

supE44 supF58 hsdS20 (r_gm_g) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2

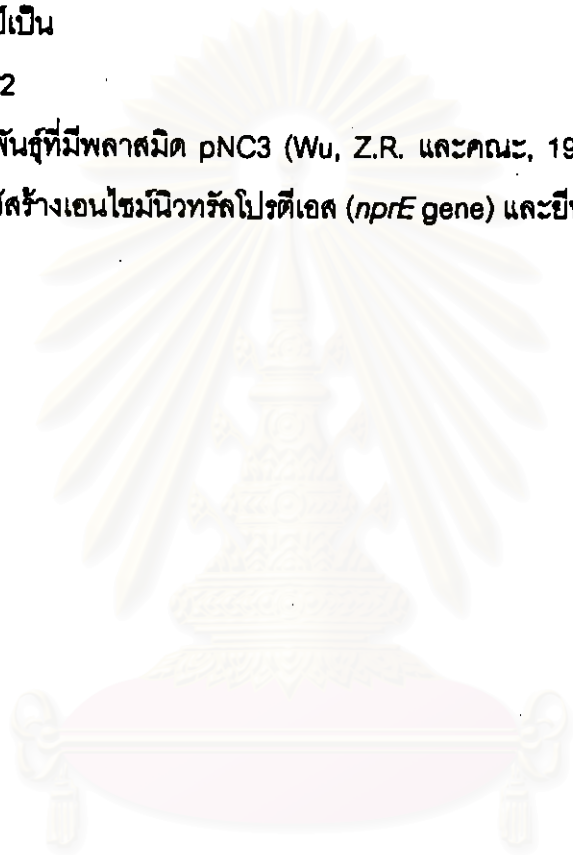
rpsL20 xyl-5 mtl-1 เป็นสายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตพลาสมิดสเกลใหญ่ ๆ เป็นลูกผสมระหว่าง *E.coli* K12 กับ *E.coli* B ซึ่งมีประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มสูง (Boyer and Roulland-Dussoix 1969; Bolivar and Backman 1979) ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

Bacillus subtilis 1E61

มีจีโนมเป็น

Km trpC2

เป็นสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pNC3 (Wu, Z.R. และคณะ, 1991) มีขนาดประมาณ 5.354 กิโลเบส มียีนที่ใช้สร้างเอนไซม์นิวคลีโอไทด์ (nprE gene) และยีนต้านยาต้านมะเร็ง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย