บทที่ 2

วัสดุ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์

2.1.1 เครื่องมือที่ใช้

เครื่องวัดการดูดแสง บริษัท Bausch & Lomb model Spectronic 20

เครื่องวัดการดูดแสง บริษัท Bausch & Lomb model Spectronic 2000

เครื่องวัดความขุ่น Klett-Summerson photoelectric Colorimeter

เครื่องปั่นความเร็วต่ำ บริษัท MSE model Minor 35

เครื่องปั่นแรงสูง บริษัท Beckman model J21C

เครื่องปั่นแรงสูงอุลตรา (Ultra-Centrifuge) บริษัท Beckman model L8-70

เครื่องปั่นแรงสูงระดับจุลภาค (Microcentrifuge) บริษัท Tomy model MC-15A

เครื่องควบคุมอุณหภูมิแห้ง บริษัท Sybron thermolyne model BD 17610-26

เครื่องควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ บริษัท Thermo bath model SCB IV

ตู้บ่มเชื้อ (Incubater) บริษัท Heraeus model B5050 E

เครื่องเขย่าซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ บริษัท Heto Birkerod model 02PT623

เครื่องป้อนพลังงาน (Power supply) ทำขึ้นเองในประเทศไทย

อุปกรณ์อิเลกโตรโฟรีซีล ทำขึ้นเองในประเทศไทย

UV transilluminator บริษัท UVP model TS-20

กล้องถ่ายรูป Pentax Super a soft case 32650 พร้อมฟิล์มขาวดำ Kodak tri-X pan

ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette) บริษัท Pipetman พร้อมทิป (Tip)

2.1.2 เคมีภัณฑ์

ก. สารเคมี

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเกรดวิเคราะห์ทั้งสิ้น

ข. เอนไซม์เรสตริกชั่น จากบริษัท Amersham และบริษัท BRL

ค. เอนไซม์ไลเกส จากบริษัท BRL

ง. เอนไซม์ S_1 nuclease จากบริษัท BRL

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 1 แบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	ชื่อสายพันธุ์	Relevant Phenotype	เอกสารอ้างอิง
Escherichia coli	ATCC 11105	Pen G^r, PAA^+, λ^-, P_1^- Tn 5^-, Tn 10^-(wild type)	American type Culture collection
	BD 817	F^-, hsdR 514 (R^-,M^+) Sup E 44, Sup F, LacY 1 lacIZY1, gal K2 gal T22, met B1 trp R55, rps L rel A, nod B, rec A ung	Steme Rogers
	HB 101	F^-, had S 20(r_B^-, m_B^-) recA13, ara14,pvoA2 lacY1,galK12,rpsL20 (Sm_r) ,xyl-5, mtl-1 Sup E 44,	Boyer และ Roulland Dussoix, 1969, Bolivar และ Backman, 1979
	Q69	HB 101 มีพลาสมิด PJR_{69}	น.ส.จรัญญา เจินประเสริฐศิริ . 1985
	S5	HB 101 มีพลาสมิด PJR_{69}	
	VU1/9	BD 817 มีพลาสมิด pCR_{28}	ในการวิจัยนี้
	W21	BD 817 มีพลาสมิด pCR_{29}	
	X25	BD 817 มีพลาสมิด pCR_{29}	
	Y324	BD 817 มีพลาสมิด pCR_{29}	
Serratia marcescens	ATCC 27117	Pen G^r, 6-APA	Meevootisom และคณะ, 1983

2.3 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

ก. จาน LB agar เขี่ยแบคทีเรีย 1 โคโลนี เกลี่ยบนจานอาหาร LB agar บ่มที่ 30°ซ ประมาณ 24-30 ชม. หรือจนแบคทีเรียเจริญเต็มที่ แล้วนำไปเก็บที่ 4°ซ สำหรับสายพันธุ์ใดที่มีความสามารถต้านยาปฏิชีวนะใด ๆ จะเสริมยาปฏิชีวนะนั้น ๆ ใน LB agar ด้วย อายุการเก็บโดยวิธีนี้ประมาณ 1 เดือน

ข. Slant LB agar เขี่ยแบคทีเรีย 1 โคโลนี เกลี่ยบน Slant LB agar ซึ่งบรรจุในหลอดจิ๋ว (vial) ฝาเกลียว หลังจากปิดฝาแล้วพันพาราฟิล์ม เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จะเก็บได้นานประมาณ 3 เดือน

ค. Stap LB agar เขี่ยแบคทีเรีย 1 โคโลนี จิ้มลงใน LB agar หลังจากปิดฝาหลอดจิ๋วแล้วพันพาราฟิล์ม เก็บที่อุณหภูมิห้อง การเก็บวิธีนี้เป็นการเก็บแบบ anaerobic อายุการเก็บ ประมาณ 3 เดือน

ง. เก็บใน 50% glycerol เจริญแบคทีเรียในอาหารอุดม LB แล้วผสมด้วย glycerol 100% 1 ปริมาตร เก็บที่ -70°ซ เมื่อจะนำออกมาเจริญอีกครั้ง จะต้องคงอุณหภูมิของหลอดจิ๋วที่มีแบคทีเรียให้ต่ำกว่า 0°ซ เสมอ นำลูป (Loop) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แตะศัลเจอร์ที่เก็บไว้มาเกลี่ยบนจานอาหาร LB agar อายุการเก็บรักษาประมาณ 2-3 ปี

2.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

ก. อาหารอุดม LB (Luria-Bertani) (Luria และคณะ, 1960) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tryptone	10	gm
Yeast extract	5	gm
NaCl	5	gm
Vitamin B_1	5	mg

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย 5 N NaOH ถ้าเป็นอาหารแข็ง เสริม Bacto agar 15 กรัม

ข. Nutrient soft agar ละลาย Nutrient medium จากบริษัท Difco จำนวน 8 กรัม ละลายน้ำ 1 ลิตร แล้วเติม Bacto agar 6 กรัม

ค. Davis minimum medium (Maniatis และคณะ,1982)

K_2HPO_4	7.0	gm
KH_2PO_4	2.0	gm
$Na_3C_6H_5O_7 2H_2O$	0.5	gm
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	gm
$(NH_4)_2SO_4$	1.0	gm
$FeSO_4$	10	mg
Vitamin B_1	5	mg

ภายหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) แล้วเติมน้ำตาล และอาหารเสริมที่ต้องการ

ง. SOB medium (Hamahan และคณะ, 1963) เป็นอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย สำหรับเตรียม competent cell เพื่อเทคนิค ทรานส์ฟอรเมชั่นในสารละลาย 1 ลิตรจะประกอบด้วย

Tryptone	20	gm
Yeast extract	5	gm
NaCl	10	mM
KCl	25	mM
$MgCl_2$	10	mM
$MgSO_4$	10	mM
Vitamin B_1	5	mg

ปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย 5 N NaOH

จ. Super broth ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

Tryptone	32	gm
Yeast extract	20	gm
NaCl	5	gm

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย 5 N. NaOH

2.5 การเลี้ยงและการติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

ก. การเจริญในอาหารแข็งในจานเพาะ ทำโดยการเขี่ยแบคทีเรียหนึ่งโคโลนี เกลี่ยบนอาหารแข็ง LB หรือ LB เสริมยาปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชม. แล้วสังเกตลักษณะโคโลนีเดี่ยวที่เจริญขึ้นมา

ข. การเจริญในอาหารเหลว เขี่ยแบคทีเรียหนึ่งโคโลนีไปกระจายในอาหารเหลว เขย่า 100-120 รอบต่อนาที ที่ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น ใช้เชื้อตั้งต้น 0.1 มล.มากระจายในอาหารเหลว 10 มล.ที่บรรจุในขวดเอเลนเมเยอร์ที่มีแขนข้างขนาด 125 มล. เขย่า 100-125 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30°ซ นำไปวัดความขุ่นโดยใช้เครื่องวัดความขุ่น Klett colorimeter ตามเวลาที่ต้องการ

ค. การเพิ่มจำนวนชุดของพลาสมิดดีเอนเอ ทำได้โดย นำเซลล์เจ้าเรือนที่มีพลาสมิดที่ต้องการขยายจำนวนชุด เจริญใน LB ด้วยสภาวะตามที่ระบุไว้ในข้อข. จนกระทั่งได้ความขุ่นประมาณ 45 KU หรือตามที่ต้องการ แล้วเปลี่ยนไปเขย่าที่ 37°ซ ทันทีตามเวลาที่ต้องการ การเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30°ซ เป็น 37°ซ นี้จะเพิ่มจำนวนชุดของพลาสมิดดีเอนเอ และ ณ อุณหภูมิ 37°ซ นี้ จะหยุดการถอดรหัสของยีนเพนนิซิลิน เอซิเลส ดังนั้นในกรณีที่ต้องการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส จะนำกลับมาเขย่าที่ 30°ซ อีกครั้งหนึ่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง(Maniatis และคณะ, 1982)

2.6.1 เอนไซม์เรสตริกชั่น

ตารางที่ 2 สมบัติของเอนไซม์เรสตริกชั่นและสภาวะในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อเอนไซม์	ชนิดของบัฟเฟอร์ (1)	อุณหภูมิที่บ่ม °ซ	Recognition sequence	Compartible Cohesive ends
Bam HI	medium	37	G↓GATCC	BelI,BglII,MboI Sau 3A,Xho II
Bgl II	low	37	A↓GATCT	Bam HI,BelI,MboI Sau 3A, Xho II
EcoR I	high	37	G↓AATTC	
Hind III	medium	37-55	A↓AGCTT	
Kpn I	low	34	GGTAC↓C	Bam HI,BclI,BglII Xho II
Sal I	high	37	G↓TCGAC	Aca I, xho I
Sma I	(*)	37	CCC↓GGG	blunt

(1) รายละเอียดระบุไว้ในตารางที่ 3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 บัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ เรสตริกชั่น (Maniatis และคณะ, 1983)

ชนิดบัฟเฟอร์	Tris-HCl pH7.8 มิลลิโมลาร์	$MgCl_2$ มิลลิโมลาร์	NaCl มิลลิโมลาร์	DTT มิลลิโมลาร์
low salt	10	10	0	1
medium salt	10	10	50	1
hight salt	10	10	100	1

* หมายเหตุ บัฟเฟอร์เฉพาะสำหรับเอนไซม์ Sma I ประกอบด้วย

KCl	20 mM
Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
$MgCl_2$	10 mM
DTT	1 mM

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6.2 เอนไซม์ S_1 nuclease (Maniatis และคณะ, 1982)

เป็นเอนไซม์ที่อาจย่อยดีเอนเอสายเดี่ยวและสายคู่ก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของเอนไซม์ S_1 nuclease ที่ใช้ทำปฏิกิริยา

บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมคือ

CH_3COONa pH 4.5	50 mM
NaCl	0.15 M
$ZnSO_4$	0.5 mM

ให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่ 25°ซ 30 นาที แล้วหยุดด้วย EDTA ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 mM

2.6.3 เอนไซม์ T4 DNA Ligase (Maniatis และคณะ, 1982)

บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมคือ	20 mM
Tris-HCl pH 7.6	20 mM
$MgCl_2$	10 mM
DTT	10 mM
ATP	0.6 mM

ให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่ 4°ซ เป็นเวลา 24 ชม. หยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปทำการเลือกจาง

2.7 ดีเอนเอที่ใช้ในการทดลอง

2.7.1 ดีเอนเอมาตรฐาน เป็นดีเอนเอผสมซึ่งมีขนาด 23.130, 9.416, 6.682, 4.361, 2.322, 2.027, 0.564 และ 0.125 กิโลเบส ตามลำดับ ดีเอนเอผสมนี้ได้มาจากการย่อยโครโมโซม ของ Bacteriophage λ Clindlts 857 Sam 7 ด้วย Hind III อย่างสมบูรณ์ โดยปกติจะใช้ ดีเอนเอผสมนี้ทดลองควบคู่กับดีเอนเอตัวอย่างในการทดลองอะกาโรสอิเลกโตรโฟริซิส

2.7.2 พลาสมิดดีเอนเอ

ก. พลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 (Yasuda และ Takagi, 1983) ขนาดประมาณ 9.5 กิโลเบส มียีนต้านยา kanamycin และอาจเพิ่มจำนวน copy ถ้าเพิ่มอุณหภูมิการเจริญของเซลล์เจ้าเรือน จาก 30°ซ เป็น 37°ซ

ข. พลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} สกัดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ E.coli Q69 และ S5 ตามลำดับ

ค. พลาสมิดดีเอนเอ pCR_{28} สกัดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ E.coli VU 1/9 และ pCR_{29} จาก W21, X25 และ Y324 ตามลำดับ

2.8 การเก็บรักษาดีเอนเอ

2.8.1 เก็บในบัฟเฟอร์ TE

กระจายดีเอนเอในบัฟเฟอร์ TE ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เก็บที่ 4°ซ ในหลอดจิ๋วจุกเกลียวขนาดความจุ 4 มล. สามารถเก็บไว้ได้นานเป็นเดือน แต่ข้อเสียคือดีเอนเอที่เก็บอาจเกิดแตกหัก ณ บางจุดบนสายดีเอนเอ (nick point) ซึ่งอาจทำให้รูปร่างของดีเอนเอเปลี่ยนแปลง ก่อความไม่เหมาะสมกับการทดลองบางชนิด เช่น ทำให้ประสิทธิภาพของการ transform ต่ำลงมาก เป็นต้น

2.8.2 เก็บในรูปของตะกอนดีเอนเอ

เติม NaCl ลงไปในสารละลายดีเอนเอที่กระจายอยู่ในบัฟเฟอร์ TE จนความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 M ค่อย ๆ เติมเอธานอลสัมบูรณ์ 2 ปริมาตร นำไปตั้งไว้ที่ -20°ซ นาน 2 ชม. นำมาปั่นด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งใน desicator เก็บที่ -20°ซ ได้นานเป็นปี

2.9 การเตรียมสารละลาย

2.9.1 สารละลายเพื่อการสกัดดีเอนเอมาตรฐานจาก λ CI 857S7 (Rodriques และ Tait, 1983)

ก. บัฟเฟอร์ SM ใช้ในขั้นตอนสกัด λ CI857S7 ออกจากแบคทีเรียและสกัดดีเอนเอจาก λ CI857S7 ประกอบด้วย

Tris-HCl pH 7.5	20	mM
NaCl	100	mM
$MgSO_4$	1	mM
gelatin	0.01%	

ข. บัฟเฟอร์ TEN ใช้ในขั้นตอนละลายดีเอนเอ จาก ภ CI857S7 ประกอบด้วย

Tris-HCl pH 7.6	10	mM
EDTA	1	mM
NaCl	10	mM

2.9.2 สารละลายเพื่อการสกัดพลาสมิดดีเอนเอ (Maniatis และคณะ, 1982)

ก. บัฟเฟอร์สำหรับทำลายเซลล์ ประกอบด้วย

Tris-HCl	25	mM
EDTA	10	mM
glucose	50	mM
Lysozyme	5	mg/ml

ข. บัฟเฟอร์ TE สำหรับละลายพลาสมิดดีเอนเอ ประกอบด้วย

Tris-HCl pH 7.6	10	mM
Na_2EDTA	1	mM

ปรับ pH ให้เป็น 7.6

2.9.3 สารละลายอื่น ๆ

ก. บัฟเฟอร์ Tris-borate (Maniatis และคณะ, 1982) เป็น running buffer ของการทำอิเลกโตรโฟรีซีส ประกอบด้วย

Tris-HCl	89	mM
Boric acid	89	mM
Na_2EDTA	2.5	mM

ปรับ pH เป็น 8.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข. Tracking dye (Maniatis และคณะ, 1982) ใช้ผสมดีเอ็นเอในการทำการทดลองอะกาโรส์อิเลกโตรโฟรีซิส์ ประกอบด้วย

Bromphenol blue	0.1%
Ficoll	40%
Na_2EDTA	5 mM

ค. บัฟเฟอร์ชะดีเอ็นเอจากกระดาษ DEAE-cellulose (Eluting buffer) (Dretzen และคณะ, 1982) ประกอบด้วย

Tris-HCl	20 mM
Na_2EDTA	1 mM
NaCl	1.5 mM

ง. บัฟเฟอร์ TBF (Hamahan และคณะ, 1983) ใช้ในการเตรียม Competent cell ในการทำทรานส์ฟอร์เมชันด้วยวิธี DMSO-treated ประกอบด้วย

2-N-Morpholinoethane sulfonic acid	10 mM
KCl	100 mM
$MnCl_2$	45 mM
$CaCl_2$	10 mM
Hexamine Cobalt (III) Chloride	3 mM

ปรับ pH เป็น 6.3

จ. สารละลายไอโอดีน (Sykes และ Nordstrom, 1972) ใช้ทดสอบเอนไซม์ปีตาแลคตาเบส์โดยวิธี Microiodometric test ประกอบด้วย

Iodine	100 mM
KI	400 mM

ฉ. สารละลาย Lowry (Lowry และคณะ, 1951) ใช้สำหรับหาปริมาณโปรตีน ประกอบด้วย

$NaCO_3$ 2% ใน NaOH 0.1 N จำนวน 100 ml

$CuSO_4$ 1% และ Sodium potassium tartrate 1%

จำนวน 2 ml

ช. บัฟเฟอร์ฟอสเฟต 80 mM pH 7.8 ใช้กระจายเซลล์ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลส ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

KH_2PO_4	2.18	gm.
K_2HPO_4	11.25	gm.

2.10 <u>การสกัดและทำดีเอนเอจาก Bacteriophage λ CI857 S7 ให้บริสุทธิ์</u>

Bacteriophage λ CI857 S7 ที่จะนำมาสกัดนี้อยู่ในรูปของ Lysogenic ในเจ้าเรือน E. coli C600 และจะถูกชักนำให้เป็นอนุภาค phage ได้ด้วยการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ 43°ซ

ในการเลี้ยงจะเตรียมเชื้อตั้งต้นโดยเขี่ย E. coli C600 ที่มี λCI857 S7 1 โคโลนีลงกระจายในอาหารอุดม LB เขย่า 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 18 ชม. จากนั้น นำเชื้อตั้งต้นมากระจายในอาหารอุดม LB โดยให้ปริมาตรของเชื้อตั้งต้นเป็น 1 ใน 10 ของปริมาตรทั้งหมด นำไปเขย่า 100 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 30 นาที ต่อไปเปลี่ยนอุณหภูมิการเลี้ยงอย่างฉับพลันเป็น 43°ซ เขย่าต่ออีก 30 นาที แล้วจึงลดอุณหภูมิลงเป็น 37°ซ เขย่าต่ออีก 5 ชม. นำมาปั่น 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที ตะกอนเซลล์ที่ได้กระจายในบัฟเฟอร์ SM แล้วทำลายเซลล์เจ้าเรือนด้วยคลอโรฟอรมครึ่งปริมาตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ 15 นาที ทำลายดีเอนเอและอาร์เอนเอของเซลล์เจ้าเรือนด้วยเอนไซม์ DNase และ RNase ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที จึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°ซ นาน 30 นาที นำส่วนน้ำใสซึ่งเป็นส่วนที่มีอนุภาคของ λ CI857 S7 นี้มาเติมเกลือ NaCl ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1M พร้อมกันนั้นก็เติมเกลือ PEG MW. 6000 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% น้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าให้ละลายเป็นเนื้อเดียว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 0°ซ 1 ชม. แล้วจึงนำไปปั่นแยกตะกอนอนุภาค λ CI857 S7 มากระจายในบัฟเฟอร์ SM ทำให้อนุภาคแตกโดยใช้ 10% SDS และสกัดโปรตีนออกโดย phenol/chloroform 2 ครั้ง นำไปปั่นแยกตะกอนโปรตีนออก แล้วตกตะกอนส่วนน้ำใสซึ่งเป็นส่วนที่มีดีเอนเอของ λ CI857 S7 ด้วยเอธานอลบริสุทธิ์ 2 ครั้ง ตั้งที่ -20°ซ 2 ชม. ปั่นแยกตะกอนด้วยความเร็ว 15,000รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้มาทำให้แห้ง แล้วละลายในบัฟเฟอร์ TE ดีเอนเอของ λ CI857 S7

ที่บริสุทธิ์จะนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เรสตริกชั่น Hind III อย่างสมบูรณ์ได้ดีเอนเอ 8 ชิ้น ขนาด 23.130, 9.416, 6.682, 4.361, 2.322, 2.027, 0.564 และ 0.125 กิโลเบส ซึ่งจะได้เป็นดีเอนเอมาตรฐาน เปรียบเทียบกับดีเอนเอตัวอย่างในการทดลอง

2.11 การสกัดพลาสมิดดีเอนเอ

ปั่นเซลล์ 200 มล. ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที กระจายตะกอนที่ได้ในสารละลาย 10 มล.ของ Tris-HCl 25 mM pH 8.0 ซึ่งมี glucose 50 mM, EDTA 10 mM และ lysozyme 5 mg/ml อยู่ด้วย เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม 20 มล.ของ 1% SDS ละลายใน NaOH 2 N. ผสมให้เข้ากันโดยการเอียงหลอดหลาย ๆ ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 0 °ซ เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 15 มล.ของ CH_3COONa 3 M pH 4.8 ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 0 °ซ นาน 10 นาที ปั่นแยกโครโมโซมดีเอนเอและเศษเซลล์ออก ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใสซึ่งเป็นส่วนที่มีพลาสมิดดีเอนเอมาตกตะกอนด้วย 2 ปริมาตรของเอธานอลบริสุทธิ์ ตั้งที่ -20 °ซ 2 ชม. นำตะกอนมาทำให้แห้ง นำตะกอนที่แห้งแล้วมาละลายตะกอนใน 1.5 มล.ของ Tris-HCl 50 mM pH 8.0, CH_3COONa 0.1 M แล้วตกตะกอนซ้ำอีกครั้งด้วยเอธานอล 2 ปริมาตร จะได้ตะกอนพลาสมิดดีเอนเอที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ สำหรับการทดลองบางอย่างต้องใช้พลาสมิดดีเอนเอที่บริสุทธิ์มากขึ้นจะต้องนำตะกอนที่ได้มาสกัดโปรตีนออกด้วย phenol และ phenol/chloroform อย่างละ 1 ครั้ง ปั่นนำส่วนน้ำใสมาสกัดด้วยอีเธอร์ 2 ครั้ง ระเหยให้อีเธอร์หนีออกไปโดยการตั้งไว้ในตู้ดูดควัน (hood) เป็นเวลา 10 นาที ส่วนน้ำใสจะมีพลาสมิดดีเอนเออยู่ เติม NaCl ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 M แล้วตกตะกอนพลาสมิดดีเอนเอด้วย 2 ปริมาตรของเอธานอลบริสุทธิ์ ปั่นแยกตะกอนที่ได้ ทำตะกอนให้แห้ง กระจายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE ที่ผสม RNase 2 µg/ml บ่มที่ 37 °ซ นาน 30 นาทีจึงนำไปเก็บที่ 4 °ซ

2.12 การวัดปริมาณดีเอนเอ

ในกรณีที่ปริมาณของดีเอนเอมีมากจะใช้วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอนเอตัวอย่างที่ความยาวคลื่นนี้เท่ากับ 1 หมายถึงปริมาณของดีเอนเอตัวอย่างมีเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมล. ทั้งนี้จะต้องวัดอัตราส่วนของ

การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เพื่อวัดปริมาณโปรตีนที่ปนมากับดีเอนเอ อัตราส่วนต้องน้อยกว่า 1 จึงจะถือว่าดีเอนเอนั้นบริสุทธิ์ และค่าของปริมาณดีเอนเอที่วัดได้จากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรนั้นใช้ได้ค่อนข้างแม่นยำ

สำหรับในกรณีที่ปริมาณของดีเอนเอตัวอย่างมีน้อย จะใช้วิธีเปรียบเทียบความเข้มและขนาดของแถบดีเอนเอตัวอย่างกับดีเอนเอที่ทราบปริมาณ ในเจลอะกาโรส อิเลคโตรโฟริซิสก็ได้

2.13 <u>การทำดีเอนเอให้บริสุทธิ์โดยใช้กระดาษ DEAE-cellulose บนแผ่นอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟริซิส</u> (Maniatis และคณะ, 1982)

ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

ก. การเตรียมกระดาษDEAE-cellulose ตัดกระดาษให้มีขนาด 5 X 1 ซม. ขณะตัดต้องใส่ถุงมือ เพื่อป้องกันเอนไซม์ DNase ที่จะมาปะปนกับกระดาษ

แช่กระดาษใน NaCl 2.5 M เป็นเวลา 2 ชม. ล้างน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง เพื่อกำจัด NaCl ต่อไปนำกระดาษที่ล้างไว้ไปแช่ในสารละลาย EDTA 1 mM เก็บไว้ที่ 4 °ซ

ข. การเตรียมอะกาโรสเจล ชั่งวุ้นอะกาโรส 7 กรัมในบัฟเฟอร์ TB 100 มล. นำไปต้มจนกระทั่งได้สารละลายปรากฏเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้จนได้ 55 °ซ จึงนำไปเทใส่แม่พิมพ์ (box gel) ทิ้งให้แข็งจนเป็นเจลที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชม.

ค. การทำดีเอนเอให้บริสุทธิ์จากวัสดุที่เตรียมในข้อ ก. และ ข. นำดีเอนเอตัวอย่างซึ่งผสม tracking dye เรียบร้อยแล้วมาหยอดบนราวหลุมของอะกาโรสเจลจากข้อ ข. (โดยมีดีเอนเอมาตรฐานอยู่ด้วย) ทำอิเลคโตรโฟริซิสด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 โวลต์จนกระทั่ง tracking dye เคลื่อนที่ลงมาอยู่ระหว่าง 3 ใน 4 ส่วนของความยาวของแผ่นเจล หยุดการทำอิเลคโตรโฟริซิส ดูดบัฟเฟอร์ TB ออกบางส่วน แล้วจึงตัดอะกาโรสเจลข้องตัวอย่างออกมาย้อมด้วย $EtBr_2$ (Ethedium bromide) นำเจลไปส่องดูการเคลื่อนที่ของแถบดีเอนเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ทำเครื่องหมาย ของแถบดีเอนเอไว้

ขั้นต่อไปนำขั้นอะกาโรสเจลที่ทำเครื่องหมายกลับไปเชื่อมกับขั้นเดิม จากนั้นนำมีดชุบเอธานอลเผาไฟ ทำการกรีดแผ่นอะกาโรสเจลโดยให้ด้านจากแถบดีเอนเอ ที่ทำ

เครื่องหมายไว้ประมาณ 1 ซม. ล่อดกระดาษ DEAE-cellulose ที่เตรียมไว้ใส่ในช่องที่กรีดไว้

เติมบัฟเฟอร์ TB ให้ระดับสูงพอดีผิวเจล (ไม่ท่วมเจล) ทำอิเลคโตรโฟรีซิสต่อประมาณ 1 ชม. นำกระดาษ DEAE-cellulose ออกมาจุ่มในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว อุณหภูมิ 4°ซ จากนั้นกระดาษจะถูกใส่ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการ siliconize แล้ว กระจายชิ้นกระดาษให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วเติมบัฟเฟอร์สำหรับชะดีเอนเอ (eluting buffer) โดยใช้ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อกระดาษ 50 ตารางมิลลิเมตร บ่มที่ 37°ซ 2 ชม.

ขจัดกระดาษออกจากส่วนน้ำใส่โดยเซนตริฟิวจ์ ผ่านไมโครทิวบ์ที่เจาะรู และมีใยแก้วปิดอยู่ จะได้ส่วนน้ำใส่ที่มีดีเอนเอ แล้วนำไปตกตะกอนด้วยเอธานอลที่เย็น ตั้งทิ้งไว้ที่ -20°ซ อย่างน้อย 2 ชม.

2.14 <u>การตรวจขนาดของพลาสมิดดีเอนเอโดยการทำให้แบคทีเรียแตก ขณะอิเลคโตรโฟรีซิส</u> (Williamson, 1981)

อาศัยหลักการที่ทำให้เซลล์แตก ขณะที่ทำอิเลคโตรโฟรีซิสโดยใช้ SDS เมื่อเซลล์แตกแล้ว พลาสมิดดีเอนเอ และโครโมโซม จะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ตามขนาดของโมเลกุล

กระจายแบคทีเรียในสารละลาย 10% sucrose, 10 mM EDTA 25 mM Tris pH 8.0 เสริม RNase 0.1 µg/ml หยอดลงในหลุมบนแผ่นวุ้นอะกาโรส หยอดสารละลายของ 5% sucrose, 8% SDS ลงในหลุมเหนือหลุมที่หยอดเซลล์ประมาณ 0.2 ซม. ทำอิเลคโตร-โฟรีซิสให้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 15 โวลต์ 1 ชม. จากนั้นจึงเปลี่ยนแรงเคลื่อนไฟฟ้าเป็น 80 โวลต์ ต่อไปอีก 3-4 ชม. นำแผ่นวุ้นไปย้อมใน $EtBr_2$ แล้วจึงนำไปดูแถบของดีเอนเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

2.15 <u>การหาแผนผังเรสตริกชั่นของพลาสมิดดีเอนเอ</u>

หลักการก็คือ จะย่อยพลาสมิดดีเอนเอ ด้วยเอนไซม์เรสตริกชั่นเพียงหนึ่งตัว จากนั้นก็จะย่อยใหม่ด้วยเอนไซม์เรสตริกชั่นสองตัว ถ้าจับคู่เอนไซม์เรสตริกชั่นที่เหมาะสม ก็สามารถจะหาแผนผังเรสตริกชั่นได้

ทุกครั้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เรสตริกชั่นชนิดหนึ่งชนิดใด ก็จะนำอะกาโรสเจลไปบันทึกความเข้มและขนาดของพลาสมิดดีเอนเอเอาไว้ จากบันทึกเหล่านี้ จะสามารถอนุมานแผนผังเรสตริกชั่นได้

สิ่งที่ต้องระวังก็คือ จะต้องออกแบบชนิดของบัฟเฟอร์ และสภาวะให้เอนไซม์เรสตริก-ชั่นทำงานได้ดี และสมบูรณ์ที่สุด ซึ่งสภาวะเหล่านี้จะแตกต่างไป เป็นเงื่อนไขที่ระบุไว้ในผลการทดลองแล้ว

2.16 การสร้าง Deletion mutant

ใช้หลักการที่ว่า ถ้าหากแปรความเข้มข้นของ S_1 nuclease ให้แตกต่างกัน S_1 nuclease จะสามารถย่อยดีเอนเอสายเดี่ยวได้ ด้วยเหตุนี้จึงนำพลาสมิดดีเอนเอมา nick ด้วยเอนไซม์ เรสตริกชั่น ก่อนจะย่อยด้วย S_1 nuclease นำพลาสมิดดีเอนเอภายหลังการย่อย S_1 nuclease มาต่อเข้าเป็นวงกลมด้วยเอนไซม์ไลเกส จากนั้นเคลื่อนเข้าสู่เซลล์ตัวรับ โดยวิธีนี้ก็จะแยกทรานสฟอร์เมนที่เป็น Deletion mutant ซึ่งมีคุณสมบัติที่ต้านทานเพนนิซิลินสีได้

ในการทดลองแบ่งวิธีการออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ

2.16.1 การ nick และย่อยด้วย S_1 nuclease

พลาสมิดดีเอนเอ pJR_{69} nickด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ EcoRI ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม บ่ม 37° ซ 1 ชม. ตรวจสอบดูว่า พลาสมิดดีเอนเอถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิส ตกตะกอนพลาสมิดดีเอนเอด้วยเอธานอลที่เย็น

ตะกอนพลาสมิดดีเอนเอกระจายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้ความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอนเอเป็น 80 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร นำมา 45 ไมโครลิตร เติม 10 เท่าของบัฟเฟอร์สำหรับ S_1 nuclease 5 ไมโครลิตรนำไปบ่ม 37°ซ 1 นาที จึงย้ายไปบ่มที่ 25°ซ 3 นาที แบ่งสารละลายพลาสมิดดีเอนเอออกเป็น 5 หลอดเท่า ๆ กัน เติมเอนไซม์ S_1 nuclease ให้เป็น 0, 1, 4, 10 และ 50 ยูนิตตามลำดับ บ่มที่ 25°ซ 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย EDTA นำไปตรวจสอบพลาสมิดดีเอนเอที่ได้โดยการทำอะกาโรสอิเลคโตรโฟริซิส

2.16.2 การเชื่อมชิ้นพลาสมิดดีเอนเอด้วยเอนไซม์ T_4 DNA Ligase

(Maniatis และคณะ, 1982)

พลาสมิดดีเอนเอที่ผ่านการย่อยด้วย S_1 nuclease กระจายในน้ำกลั่น 8 ไมโครลิตร ความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอนเอประมาณ 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เติม

บัฟเฟอร์เอนไซม์ T_4 Ligase ความเข้มข้น 10 เท่า 1 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ T_4 Ligase 35 ยูนิต (1 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่ 4°ซ เป็นเวลา 24 ชม. นำพลาสมิดดีเอนเอที่ผ่านการเชื่อมนี้ไปตรวจสอบโดยวิธี อะกาโรสเจลอิเลกโตรโฟรีซีส

2.16.3 การเตรียม competent cell และการทำทรานสฟอรเมชั่น

แบคทีเรียเจ้าเรือนที่จะรับพลาสมิดดีเอนเอ (competent cell) จะต้องผ่านการเตรียมผนังเซลล์เพื่อพร้อมจะรับพลาสมิดดีเอนเอ มี 2 วิธีคือ

ก. DMSO-treated method (Hamahan และคณะ, 1983) เจริญแบคทีเรียเจ้าเรือนในอาหารเหลว SOB เขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ จนกระทั่ง OD_{550} เท่ากับ 0.50 นำขวดที่บรรจุเชื้อแช่น้ำแข็ง 15 นาที ปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4°ซ นำเซลล์มากระจายในบัฟเฟอร์ TBF ในปริมาตร $\frac{1}{3}$ เท่าของปริมาตรเดิม แช่น้ำแข็ง 15 นาที แล้วเขย่าที่ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที ปั่นเซลล์ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีที่ 4°ซ นาน 10 นาที นำเซลล์ที่ได้มากระจายในบัฟเฟอร์ TFB อีกครั้งในปริมาตร $\frac{1}{12.5}$ ของปริมาตรตั้งต้น นำไปแช่น้ำแข็ง เติม dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 3.5% แช่น้ำแข็งต่ออีก 5 นาที เติม Dithiothreitol (DTT) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 75 mM แช่น้ำแข็ง 5 นาที แล้วใช้สำหรับทำทรานสฟอรเมชั่น

ข. $CaCl_2$-treated method (Ronald, 1980) เจริญสายพันธุ์ที่เป็นเซลล์เจ้าเรือนในอาหารอุดม LB ที่อุณหภูมิ 37°ซ จนกระทั่ง OD_{660} เท่ากับ 0.2 นำขวดที่บรรจุเชื้อไปแกว่งในน้ำเย็น 5 นาที แล้วปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีเป็น 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ จากนั้นนำเซลล์มากระจายใน $CaCl_2$ 0.1 M ปริมาตรเท่าเดิม นำไปแช่อ่างน้ำแข็ง 20 นาที ปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีที่ 4°ซ เซลล์ที่ได้กระจายเบา ๆ ใน $CaCl_2$ 0.1 M ปริมาตร $\frac{1}{20}$ ของปริมาตรเริ่มต้น แช่ในอ่างน้ำแข็ง 10 ชม. นำไปทำทรานสฟอรเมชั่นต่อไป

การทำทรานสฟอรเมชั่น (Rodriguez และ Tait, 1983)

นำ competent cell 200 ไมโครลิตร มาผสมกับพลาสมิดดีเอนเอ 50-100 นาโนกรัม ปริมาตรไม่เกิน 10 ไมโครลิตร แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นให้ความร้อนเป็นอุณหภูมิ 42°ซ อย่างฉับพลัน 2 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งอีกครั้งนาน

1 นาที จึงเติมอาหารเหลว SOB 800 ไมโครลิตร เขย่า 100-125 รอบต่อนาที นาน 1 ชม. หรือมากกว่า

กระจายเชื้อที่ได้บนอาหารแข็ง LB ที่เสริมยาปฏิชีวนะ บ่มที่ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชม. นับจำนวนทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้ทั้งหมดเทียบกับปริมาณพลาสมิดดีเอนเอที่ใช้ไป ได้เป็นค่าของประสิทธิภาพในการทำทรานส์ฟอร์เมชัน (Efficiency of transformation)

2.17 <u>การเลือกสายพันธุ์ที่ขยายจำนวนของพลาสมิดโดยวิธี sibling</u>

ใช้สายพันธุ์ที่ต้องการขยายชุดของพลาสมิดดีเอนเอจำนวน 6-8 โคโลนี มากระจายในอาหารอุดม LB เสริมด้วย $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% เขย่า 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ จนกระทั่งความขุ่น 45 KU เพิ่มอุณหภูมิการเลี้ยงเป็น 37°ซ เขย่าต่ออีก 3 ชม. จากนั้นลดอุณหภูมิลงเป็น 30°ซ เขย่า 90 นาที เติมเพนนิซิลินจี 5 มก.ต่อ มล. เขย่าที่ 30°ซ 30 นาที นำไปปั่น 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารอุดม LB 3 ครั้ง นำเซลล์มากระจายในอาหารอุดม LB เสริมด้วย $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% ปริมาตรเท่าเดิม เขย่าที่ 30°ซ 2 ชม. (จากขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นถือเป็นการ sibling 1 ครั้ง ดังนั้นถ้าต้องการทำ sibling มากกว่า 1 ครั้ง ก็สามารถเวียนไปทำขั้นตอนเดิมอีกได้)

นำเซลล์ที่ได้มากระจายบนอาหารแข็ง LB เสริมด้วย $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% และ เพนนิซิลินจี บ่มที่ 30°ซ นาน 24 ชม. แยกโคโลนีที่เจริญได้ไปทดสอบความสามารถในการขยายจำนวนชุดของพลาสมิดดีเอนเอต่อไป

2.18 <u>การตรวจสอบแอคติวิตีเบื้องต้น ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของโคโลนีในจานเพาะเชื้อโดยวิธี Microbiological test</u> (Meevootisom และคณะ, 1983)

กรีดโคโลนีตัวอย่างบนอาหารอุดม LB เสริมด้วย $MgCl_2$ 1 mM และ PAA 0.02% และเพนนิซิลินจี บ่มที่ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชม.

ผสม <u>Serratia marcescens</u> ATCC 27117 ที่เจริญในอาหาร LB ที่ 30°ซ 24 ชม. มาแล้ว รวมกับ Nutrient soft agar ที่เสริมด้วยเพนนิซิลินจี 10 มก.ต่อมล. ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ <u>s. marcescens</u> เป็น 10% นำส่วนผสมนี้ 5 มล. ราดบนอาหารแข็ง

I10299191

ที่มีโคโลนี ตัวอย่างเจริญอยู่ นำไปบ่ม 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตวงใสรอบโคโลนีตัวอย่าง ซึ่งแสดงถึงสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส

2.19 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลส

วิธีของ Szewezuk (Szewezuk และคณะ, 1980)

เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะการสร้างเอนไซม์ 1 มล. ปั่น 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำตะกอนที่ได้ล้างด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 80 mM pH 7.8 2 ครั้ง แล้วกระจายในบัฟเฟอร์เดิม นำ 1 มล. ของเซลล์มาเติม 0.4 มล. ของ PAAB 2.5 mM บ่มที่อุณหภูมิ 46 °ซ นาน 10 นาที ขั้นนี้ PAAB จะถูกเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลสย่อยได้สารประกอบใหม่ชื่อ *p*-amino benzoic acid (PABA)

เติมสารละลายของ $NaNO_2$ 10 mM ใน CH_3COOH 0.25 M บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที PABA ที่เกิดขึ้นจะถูกทำปฏิกิริยา Diazotization และจะเกิดปฏิกิริยา coupling ทำให้เกิดสารประกอบสีม่วงแดงเข้ม เมื่อเติมสารละลายของ 1-amino-8-hydroxy-naphthalene-3, 6-disultonic acid (H-acid) 20 mM ใน Na_2CO_3 0.66 N จำนวน 1.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปปั่น 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนน้ำสีม่วงแดงเข้มไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะได้เป็นค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลสจากเซลล์ตัวอย่าง (เอนไซม์ 1 ยูนิต คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 nmole PABA/min.)

2.20 การตรวจสอบแอคติวิตีเบื้องต้นของเอนไซม์ บีตา-แลคตาเมส ของโคโลนีในจานเพาะเชื้อโดยวิธี Microiodometric test (Sykes และ Nordstrom, 1972)

เจริญสายพันธุ์ของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ที่เสริมแป้ง (Soluble starch) 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีกรีดหรือปั๊มแบบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 22 ชม. แล้วเททับด้วยสารละลายไอโอดีน และเพนนิซิลินจี 20 มก. ในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 0.1 M pH. 7.0 จำนวน 3 มล. เป็นเวลา 10 นาที รินสารละลายส่วนเกินทิ้ง อาหารแข็งจะเป็นสีน้ำเงินเข้ม ของสารประกอบ แป้ง-ไอโอดีน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จะพบการฟอกสีจางรอบ ๆ โคโลนีที่ผลิตเอนไซม์บีตา-แลกตาเมส ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบ penicilloic acid ที่เกิดขึ้นจาก

ปฏิกิริยาการย่อยสลาย เพนนิซิลินจี ด้วยเอนไซม์บีตาแลคตาเมส จะดึงไอโอดีนออกจากสาร ประกอบแป้ง-ไอโอดีน ทำให้เห็นเป็นวงใสรอบโคโลนีดังกล่าว

2.21 <u>การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry</u> (Lowry และคณะ, 1951)

ล้างเซลล์ด้วย NaCl 0.85% 2 ครั้ง นำเซลล์มากระจายในสารละลายเดิม ปริมาตรเท่าเดิม นำ 0.1 มล.มาเติม NaOH 1 N. ปริมาตร 1 มล. แช่ในน้ำเดือด 5 นาที จะได้ไฮโดรไลเซท นำไฮโดรไลเซท 0.1 มล. มาเติมสารละลาย Lowry (Na_2CO_3 2% ใน NaOH 1 N. จำนวน 100 มล. กับ $CuSO_4$ 1% และ Sodium potassium tartrate 1% จำนวน 2 มล.) 3 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที หลังจากนั้น เติมสารละลาย Folin ciocalten ที่เจือจาง 1:2 0.3 มล. บ่ม 30°ซ. 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin

2.22 <u>การ Starvation</u>

หลังจากเจริญเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวครบ 15 ชม. ปั่นนำตะกอนเซลล์มากระจายใน starving buffer ซึ่งประกอบด้วย Phosphate buffer 80 mM pH 7.8, $MgCl_2$ 1 mM, PAA 0.02% และเพนนิซิลินจี 100 ไมโครกรัม ต่อมล.นำไปหมุนใน rotary shaker ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชม. จากนั้นนำเซลล์มาปั่นแล้วล้างตะกอน 2 ครั้ง ด้วยบัฟเฟอร์เดิมแต่ไม่ใส่เพนนิซิลินจี เซลล์ที่ได้นำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ตามวิธีการทดลองข้อ 2.19 ต่อไป