

บทที่ 2
การทดลอง

2.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

2.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	Merck
Acrylamide	Sigma
Agarose	Gibco
Ampicillin	ANB Laboratories
Ammonium persulfate	Merck
Bacto agar	Difco
Bovine serum albumin (BSA)	Fluka
Calcium chloride	BDH
Carbolic acid (Phenol)	Gamma
Chloroform	Merck
Coomassie brilliant blue G-250	Fluka
Coomassie brilliant blue R-250	Fluka
Deoxycholic acid	Sigma
Disodium hydrogen phosphate	Fluka
Dithiothreitol	Sigma
λ DNA / Hind III	Gibco
Ethanol 95%	Ayudya
Ethanol absolute 99.8%	Merck
Ethidium bromide	Gibco

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Ethylenediaminetetraacetic acid (disodium salt , EDTA)	Merck
Glucose	Fluka
L-Glutamic acid (monosodium salt)	Fluka
Glycerol	
Glycine	Fluka
<i>Hind</i> III	Gibco
Hydrochloric acid	BDH
Isopropyl- β -D-thiogalactoside	Gibco
Isoamyl alcohol	Merck
Kanamycin	Thia Maiji
Magnesium chloride	Fluka
Magnesium sulfate	Fluka
Maganese chloride	M & B
2-Mercaptoethanol	BDH
Methanol	BDH
N,N'-Methylene-bis-acrylamide	Sigma
3-Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS)	Fluka
<i>Nco</i> I	Gibco
p-nitrophenyl laurate	Sigma
PCR Supermix	Gibco
Phosphoric acid 85 %	J.T. Baker

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Potassium acetate	BDH
2-propanol	GPR
Protein Molecular weight standard marker (14,300-200,000 Molecular Weight Range)	Gibco
Rapid gel extraction kit	Gibco
Rnase A	Gibco
Rubidium chloride	Fluka
Sodium acetate	Merck
Sodium chloride	Merck
Sodium dihydrogen phosphate	Fluka
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Merck
Sodium hydroxide	Eka chemical
T ₄ DNA ligase	Gibco
N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamine (TEMED)	BDH
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Riedel-De Haen
Triton X-100	Fluka
Tryptone	Difco
Tween 80	Fluka
Xylene cyanol	Sigma
Yeast extract	Difco

2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

ชื่อเครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Autoclave Model HL-42A-DY	Hirayama
Balance	OHAUS
Centrifuge Model 6060	Centuration Scientific
Constant Power supply Model 250	Life-Technologies Inc.
Electrophoresis set Model EC 330	E-C Apparatus corporation
Electrophoresis set Model EC 120	E-C Apparatus corporation
Hot plate & Stirrer Model PC-351	Corning
Incubator	Memert
Incubator shaker Model 3032	GFL
Laminar flow	Nuaire
Membrane (Ultrafiltration)	Spectrum
Microcentrifuge Model 7	Denver Instrument
pH Meter Model PHM 61	Radiometer
Pipette , Adjustable Micropipette	Biohit
Shaker bath	GFL
Thermal cycle	Perkin elmer
UV Transilluminator	UVP
UV/vis Spectrophotometer Model U-2000	Hitachi
Vortex Mixer	Lab-line

2.1.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

- แบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ *Bacillus stearothermophilus* (TP811) ได้จากการคัดเลือกจากน้ำตัวอย่างจากบ่อน้ำร้อนเทพพนม จังหวัดเชียงใหม่⁽⁹⁾
- แบคทีเรีย pUC-TP811 ได้จากการโคลนยีนไลเปสจากแบคทีเรีย TP811 เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pUC 19 ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH 5 α จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- แบคทีเรียดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 และแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ M15 [pREP4] จากบริษัท QIAGEN

2.2 วิธีการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้เริ่มจากการเพิ่มปริมาณยีนไลเปสจากแบคทีเรีย pUC-TP811 ที่ได้จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ด้วยวิธี PCR และทำการเชื่อมยีนไลเปสกับดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* สายพันธุ์ M15 [pREP4] เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนไลเปส ให้สามารถผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์มากขึ้น จากนั้นจึงศึกษาการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปสด้วย IPTG ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วจึงศึกษาคุณสมบัติบางประการของไลเปสออกเซลล์ ได้แก่ อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังศึกษาการเติมสารที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น Tween 80 และ Triton X-100 และเพิ่มแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง เช่น glutamic acid เพื่อเพิ่มการผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ให้มากขึ้น

2.2.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์

2.2.1.1 อาหารเหลว

อาหารเหลวใช้สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TP811 (TP811) จากน้ำและดินบริเวณบ่อน้ำร้อนเทพพนม ดัดแปลงจากสูตรอาหารของ Degryse⁽⁹⁾ สามารถเตรียมได้โดย

ส่วนประกอบ : ปริมาตร 100 มล.

*Base mixture 10 มล.

**0.2 M Phosphate buffer pH 7.2 10 มล.

Yeast extract	0.25	กรัม
Tryptone	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	80	มล.
น้ำมันมะกอก	0.5	มล.
*การเตรียม Base mixture		
Nitrotriacetic acid (Titriplex I)	1	กรัม
NaOH	0.2	กรัม
CaSO ₄ · 2H ₂ O	0.4	กรัม
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2.0	กรัม
0.01 M Ferric (III) citrate	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

หมายเหตุ 0.01 M Ferric (III) citrate เตรียมโดยละลาย 0.299 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. อุณหภูมิสูงจนละลายหมด เก็บในขวดสีชาและไว้ในที่เย็น

** การเตรียม 0.2 M Phosphate buffer pH 7.2

K₂HPO₄ (MW 174.18) 17.418 กรัม

Na₂HPO₄ (MW 156.01) 15.601 กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น 500 มล. ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วย 6 M NaOH เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร เก็บไว้ในที่เย็น

สำหรับอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ pUC-TP811, pQE 60 , *E.coli* M15[pREP4] และโคลนจากการทดลอง จะใช้อาหารเหลว LB สูตรอาหารประกอบด้วย

ส่วนประกอบ : ปริมาตร 100 มล.

Bacto-tryptone	1.0	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม

NaCl	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

นำอาหารที่เตรียมได้ไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่ความดัน 1 kg/cm³ อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที ตั้งไว้ให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

ในการเลี้ยงแบคทีเรีย pUC-TP811, pQE 60 , *E.coli* M15[pREP4] และโคลนจากการทดลอง จะต้องเติมยาปฏิชีวนะลงในอาหารเหลว LB ดังนี้

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ชนิดของยาปฏิชีวนะ	ปริมาณที่เติมลงไป (µl) ต่ออาหารเหลว LB 100 มล.	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)
pUC-TP811	Ampicillin	50	100
pQE 60	Ampicillin	50	100
<i>E.Coli</i> M15[pREP4]	Kanamycin	12.5	25
Cloned -TP811	Ampicillin	50	100
	Kanamycin	12.5	25

หมายเหตุ การเตรียม Stock solution ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและกานามัยซิน เข้มข้น 200 มก./มล. โดยละลายยาปฏิชีวนะ 1 กรัม ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 5 มล. จนละลายหมดแล้วเก็บในที่ 4 °C

2.2.1.2 อาหารวุ้น

อาหารวุ้นสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์เตรียมได้ตามสูตรอาหารเหลวในข้อ 2.2.1.1 แล้วเติม Bacto agar 2.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่ความดัน 1 kg/cm³ อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที ตั้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 40°C แล้วเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินหรือกานามัยซิน ตามชนิดของแบคทีเรียที่นำอาหารมาเลี้ยงลงไป แล้วเทลงใน Petri dish และขวด Slant ในตู้ปลอดเชื้อ ตั้งให้วุ้นแข็งตัว แล้วเก็บไว้ใช้สำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์ไว้ในระหว่างการวิจัย

2.2.2 วิธีศึกษาการเจริญและการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียทนความร้อน TP811 และ แบคทีเรีย pUC-TP811

เตรียม preculture ของเชื้อ TP811 และ pUC-TP811 โดยเชื้อจากอาหารรุ่น 1 loop ใส่ลงไปในอาหารเหลวปริมาณ 100 มล. นำไปบ่มที่ 65 °C (สำหรับเชื้อ TP811) และที่ 37 °C (สำหรับ pUC-TP811) พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจาก preculture นี้ 1 มล. ลงในอาหารเหลวใหม่ 99 มล. (หัวเชื้อ 1% v/v) เก็บน้ำเลี้ยง 5 มล. (เป็นเวลาเริ่มต้นในการศึกษา) ก่อนนำไปเลี้ยงที่ 65 °C และ 37 °C ตามชนิดของแบคทีเรียและเขย่าด้วยความเร็วเท่าเดิม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงทุก ๆ 6 ชั่วโมง นำไปวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร แล้วเซนติฟิวจ์แยกตะกอนเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บน้ำเลี้ยงใสส่วนบน เพื่อหาแอกติวิตีของไลเปส ดังข้อ 2.2.3 และปริมาณโปรตีน ดังข้อ 2.2.4 ตามลำดับ

2.2.3 การหาแอกติวิตีของไลเปส⁽¹⁸⁾

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งการสลายสับสเตรทสังเคราะห์ประเภท p-nitrophenyl ester ให้เป็น p-nitrophenol และกรดไขมันได้ จึงทำการวัดแอกติวิตีของไลเปสโดยติดตามปริมาณของ p-nitrophenol ที่เกิดขึ้น โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.2.3.1 วิธีเตรียมสาร

Reaction buffer , pH 8.0

ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl , 0.1%(w/v) Gum arabic และ 0.2% (w/v) Deoxycholic acid เตรียมโดยละลาย Tris (MW 121.14) 0.6057 กรัม Gum arabic 0.1 กรัม และ Deoxycholic acid (MW 432.60) 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 8.0 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล.

8 mM p-nitrophenyl laurate (C₁₂)

ละลาย p-nitrophenyl laurate (MW 321.4) 0.2571 กรัม ใน 2-propanol ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.

3 M HCl

เติมสารละลาย HCl เข้มข้น 37% 29.5 มล. ลงไปในน้ำกลั่นประมาณ 50 มล. เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 มล.

2 M NaOH

ละลาย NaOH (MW 40.0) 8.0 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.

2.2.3.2 วิธีหาแอกติวิตีของไลเปสโดยวิธีใช้สับสเตรทสังเคราะห์

ปิเปต Reaction buffer , pH 8.0 ปริมาตร 880 ไมโครลิตร และสารละลายไลเปส 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 1 นาที แล้วเติม 8 mM p-nitrophenyllaurate 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 2 นาที พร้อมเขย่า หยุดปฏิกิริยาด้วย 3 M HCl 0.5 มล. นำไปเซนติฟิวจ์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายใสส่วนบน 333 ไมโครลิตร มาใส่หลอดทดลองใหม่ เติม 2 M NaOH 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้อาหารเหลว 20 ไมโครลิตร เติมแทนสารละลายเอนไซม์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ทำปฏิกิริยา แล้วทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับเดิมซึ่งใช้เป็น blank

2.2.4 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford⁽¹²⁾**2.2.4.1 วิธีเตรียมสาร**

สีย้อม (0.01% w/v Coomassie brilliant blue G-250)

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 100 มก. ใน 99.8% เอทานอล 23.5 มล. คนจนกระทั่งสีย้อมละลายหมด แล้วจึงเติม 85% phosphoric acid 42.5 มล. ปรับปริมาตรเป็น 500 มล. ด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บใส่ขวดสีชาไว้ในที่ 4 °C

1 mg/ml BSA

ละลาย BSA 10 มก. ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล.

0.15 M NaCl

ละลาย NaCl (MW 58.44) 0.876 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล.

2.2.4.2 วิธีหาปริมาณโปรตีน

ก. วิธีทำกราฟมาตรฐานโปรตีน

ใส่สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA เข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 10,20,30,40 และ 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรในแต่ละหลอดให้ครบ 0.60 มล. ด้วยน้ำกลั่น และนำหลอดทดลองอีกหลอดหนึ่งมาใส่น้ำกลั่น 0.60 มล. เติม 0.15 M NaCl 0.1 มล. และสีย้อม 4.3 มล. ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ผสมสารด้วย Vortex mixer ตั้งไว้ 10 นาที นำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่มีน้ำกลั่น 0.60 มล. แทนสารละลายโปรตีนมาตรฐานเป็น blank นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีนในหน่วยไมโครกรัมต่อมล.

ข. วิธีหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

ทำการทดลองควบคู่พร้อมกับการทำกราฟมาตรฐานโดยใส่สารตัวอย่าง 0.50มล. ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรเป็น 0.60 มล. ด้วยน้ำกลั่น เติม 0.15 M NaCl 0.1 มล. และสีย้อม 4.3 มล. ผสมสารด้วย Vortex mixer ตั้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน

2.2.5 การเตรียมพลาสมิดปริมาณน้อย ๆ จากแบคทีเรีย โดยวิธี Alkaline lysis⁽²⁴⁾

วิธี alkaline lysis เป็นวิธีที่ใช้กันมากที่สุดในการเตรียมพลาสมิดปริมาณน้อย ๆ โดยใช้ SDS (Sodium dodecyl sulfate) เพื่อทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียและทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีน โดยใช้ NaOH ทำลายสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอทั้งพลาสมิดและโครโมโซม แต่เมื่อทำให้เป็นกลางด้วยโปแตสเซียมอะซิเตต เฉพาะพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นวงกลมขนาดเล็กจะ re-anneal เหมือนเดิม ส่วนโครโมโซมและโปรตีนจะตกตะกอนสามารถแยกออกได้โดยการเซนติฟิวจ ในการวิจัยนี้ต้องเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอจาก pUC-TP811 และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 เพื่อใช้ในการโคลนยีน มีขั้นตอนดังนี้

2.2.5.1 วิธีเตรียมสาร

สารละลาย 1 (ประกอบด้วย 50 mM glucose , 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 10 mM EDTA) โดยเตรียมจาก Stock solution ดังนี้

- 1 M glucose

ละลาย glucose (MW 198.07) 19.82 กรัม ในน้ำ deionized ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.

- 0.1 M Tris-HCl , pH 8.0

ละลาย Tris 1.2114 กรัม ในน้ำ deionized ปรับ pH เป็น 8.0 แล้วจึงปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.

- 0.1 M EDTA , pH 8.0

ละลาย EDTA (MW 372.24) 3.7224 กรัม ในน้ำ deionized ปรับ pH เป็น 8.0 แล้วจึงปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.

ให้นำสารละลายที่เตรียมได้ไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่ความดัน 1 kg/cm³ อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที และเก็บที่ 4 °C ก่อนนำไปใช้เตรียมสารละลาย 1 ได้จากการปิเปต 1 M glucose 0.5 มล. , 0.1 M Tris-HCl , pH 8.0 2.5 มล. และ 0.1 M EDTA , pH 8.0 1 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจนครบ 10 มล.

สารละลาย 2 (ประกอบด้วย 0.2 M NaOH , 1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) โดยเตรียมจาก Stock solution ดังนี้

- 1 M NaOH

ละลาย NaOH 4 กรัม ในน้ำ deionized แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.

- 10% (w/v) SDS

ละลาย SDS (MW 288.38) 10.0 กรัม ในน้ำ deionized แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. แล้วนำสารละลาย stock solution ที่เตรียมได้ไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่ความดัน 1 kg/cm³ อุณหภูมิ 121 °C นาน 20 นาที ก่อนนำไปใช้เตรียมสารละลาย 2 ได้จากการปิเปต 1 M NaOH 2 มล. และ 10% (w/v) SDS 1 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจนครบ 10 มล.

5 M potassium acetate solution , pH 5.8

ละลาย KOAC (MW 98.14) 49.07 กรัม ในน้ำ deionized ปรับ pH เป็น 4.8 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.

TE buffer , pH 7.6 (ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl และ 1 mM EDTA , pH 7.6 โดยเตรียมจาก Stock solution ดังนี้

- 0.1 M Tris-HCl pH 7.6

ละลาย Tris 1:2114 กรัม ในน้ำ deionized ปรับ pH เป็น 7.6 แล้วจึงปรับ ปริมาตรให้ครบ 100 มล.

- 0.1 M EDTA pH 7.6

ละลาย EDTA 3.7224 กรัม ในน้ำ deionized ปรับ pH เป็น 7.6 แล้วจึงปรับ ปริมาตรให้ครบ 100 มล.

ให้นำสารละลาย stock solution ที่เตรียมได้ไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัตโนมัติ ที่ ความดัน 1 kg/cm³ อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที TE buffer , pH 7.6 เตรียมได้จากปิเปต 0.1 M Tris-HCl , pH 7.6 10 มล. และ 0.1 M EDTA , pH 7.6 1 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจนครบ 100 มล.

2.2.5.2 วิธีเตรียมพลาสมิดปริมาณน้อย ๆ จากแบคทีเรียด้วยวิธี Alkaline lysis

หลังจากเลี้ยงแบคทีเรีย pUC-TP811 และ pQE 60 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บั่นเก็บ เซลล์ปริมาตร 1.5 มล. ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนสารละลายใสออก ด้วย pasteur pipet หรือหลอดดูดแล้วคว่ำหลอดบนกระดาษทิชชู แล้วกระจาย (resuspend) ตะกอนเซลล์แบคทีเรียใน 100 ไมโครลิตรของสารละลาย 1 ที่ทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 200 ไมโครลิตรของสารละลาย 2 ผสมโดยพลิกหลอดคว่ำหงายเบา ๆ 2-3 ครั้ง ทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม 150 ไมโครลิตรของ 5 M potassium acetate pH 4.8 ผสมให้เข้ากันโดย vortex ที่ ความเร็วสูงสุด 2 วินาที ทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที บั่นแยกเอาตะกอนของเศษเซลล์ที่แตกแล้ว และ โครโมโซมอดีเอ็นเอออก โดยการปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูด ส่วนใสซึ่งมีพลาสมิดดีเอ็นเอใสหลอดใหม่ เติม 0.8 มล. ของ 95% เอทานอล และทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 2 นาที เพื่อตกตะกอนกรดนิวคลีอิก แล้วนำไปปั่นนาน 3 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ดูดสารละลายส่วนบนออกให้หมด เหลือไว้แต่ตะกอน เติม 1 มล. ของ 70% เอทานอล โดยไม่ให้ตะกอนฟุ้งกระจายแล้วดูดเอทานอลออกให้หมด ตั้งหลอดไว้ที่ 37 °C เพื่อ

ให้ตะกอนแห้ง (ใช้เวลา 10-30 นาที) แล้วจึงละลายตะกอนใน 30 ไมโครลิตร ของ TE buffer pH 7.6

2.2.6 การกำจัดอาร์เอ็นเอออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอ⁽²⁴⁾

วิธีการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวิธี Alkaline lysis ดังข้างต้นนั้น จะมีอาร์เอ็นเอปะปนอยู่ ซึ่งอาร์เอ็นเอจะรบกวนการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ และการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้ ดังนั้นจึงต้องกำจัดอาร์เอ็นเอออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอเสียก่อน มีขั้นตอนดังนี้

2.2.6.1 วิธีเตรียมสาร

10 mg/ml RNase A

ละลาย RNase A 100 มก. ในสารละลายที่มี 10 mM Tris-HCl pH 7.6 และ 15 mM NaCl ปริมาตร 10 มล. (โดยเตรียม stock solution ของ 0.1 M Tris-HCl pH 7.6 โดยละลาย Tris 1.2114 กรัม ในน้ำ deionized ปรับ pH เป็น 7.6 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล. และ 0.1 M NaCl โดยละลาย NaCl 0.5844 กรัม ในน้ำ deionized แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล. แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ น้ำ ที่ความดัน 1 kg/cm³ อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วเปิด 0.1 M Tris-HCl pH 7.6 1 มล. และ 0.1 M NaCl 1.5 มล. แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มล. ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แบ่งเก็บเป็น aliquots (ประมาณ 100-500 ไมโครลิตร) เก็บที่ -20 °C

Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol 25:24:1

หอลอมละลาย Carboic acid หรือ Phenol ปริมาตร 100 มล. ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 °C เติม Hydroxyquinoline 0.1 กรัม และ 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 100 มล. กวนอย่างแรงด้วย stirrer นาน 10-15 นาที ปล่อยให้แยกชั้นแล้วดูด Aqueous phase ขึ้นบนออก สกัดซ้ำอีกครั้งด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 จนกระทั่ง pH ของสารละลายฟีนอล มากกว่า 7.8 (วัดด้วยกระดาษพีเอช) แล้วเติม β -Mercaptoethanol 0.2 มล. และ 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 เพื่อคลุมผิวของสารละลาย ควรเก็บสารละลายฟีนอลอิมิตัว เก็บในขวดสีชาที่ 4 °C ก่อนนำไปใช้ ให้ผสม Chloroform และ Isoamyl alcohol ด้วยอัตราส่วน 24 : 1 แล้วนำไปผสมกับสารละลายฟีนอลอิมิตัวปริมาตรที่เท่ากัน ถ้าต้องการเก็บไว้หลังผสมแล้วให้เติม 0.1 M Tris-HCl pH 8.0

เพื่อปิดผิวสารละลายเก็บในขวดสีชาที่ 4°C ใช้ได้ภายใน 1 เดือน สำหรับส่วนผสมระหว่าง Chloroform และ Isoamyl alcohol เก็บไว้ได้นาน

2.2.6.2 วิธีกำจัดอาร์เอ็นเอจากพลาสมิดดีเอ็นเอ

นำสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอที่ต้องการกำจัดอาร์เอ็นเอจากข้อ 2.2.5.2 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 95 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ deionized ที่ฆ่าเชื้อ เดิม 10 mg/ml RNase A 5 ไมโครลิตร แล้วนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เดิม Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 ลงไปปริมาตรเป็น 2 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดเบาๆ แล้วนำไปเซนต์ริฟด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใสด้านบนลงสู่หลอดใหม่ แล้วเติม Chloroform/Isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ลงไปปริมาตรเป็น 2 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอ ผสมกันโดยคว่ำหลอดเบา ๆ แล้วนำไปเซนต์ริฟด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วสกัดด้วย Chloroform/ Isoamyl alcohol อีกครั้ง แล้วดูดสารละลายดีเอ็นเอด้านบนลงหลอดใหม่ เดิม 2- propanol ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอ นำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 15-30 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปเซนต์ริฟด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสด้านบนออกให้หมด เหลือไว้แต่ตะกอน เดิม 70% เอทานอล ปริมาตร 800 ไมโครลิตร โดยไม่ให้ตะกอนฟุ้งกระจาย นำไปเซนต์ริฟด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอทานอลออกให้หมด ตั้งหลอดไว้ที่ 37 °C เพื่อให้ตะกอนแห้ง แล้วจึงละลายตะกอนด้วย TE buffer pH 7.6 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

2.2.7 การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอจากค่าการดูดกลืนแสง^(24,28)

2.2.7.1 วิธีเตรียมสาร

TE buffer , pH 7.6 (ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl และ 1mM EDTA)

ละลาย Tris 1.2114 กรัม และ EDTA 0.3722 กรัม ในน้ำ deionized ปรับ pH เป็น 7.6 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่ความดัน 1 kg/cm³ อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

2.2.7.2 วิธีวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอจากการดูดกลืนแสง

เจือจางสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการทราบปริมาณและคุณภาพ ด้วย TE buffer, pH 7.6 ให้ได้ปริมาตร 1 มล. แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) โดยใช้ TE buffer pH 7.6 เป็น blank คำนวณปริมาณของดีเอ็นเอ ได้โดย

การคำนวณหาปริมาณ

สำหรับดีเอ็นเอจะใช้ค่า A_{260} nm = 1 หมายถึงความเข้มข้นของดีเอ็นเอ = 50 $\mu\text{g/ml}$

สำหรับอาร์เอ็นเอจะใช้ค่า A_{260} nm = 1 หมายถึงความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ = 40 $\mu\text{g/ml}$

ดังนั้น เจือจางสารละลายดีเอ็นเอ = y เท่า

ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ A_{260} = x เท่า

เมื่อค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ A_{260} เท่ากับ 1 = 50 $\mu\text{g/ml}$

\therefore ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต้องการ = $\frac{x \times 50}{y}$ $\mu\text{g/ml}$

การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการหาอัตราส่วนของค่า A_{260}/A_{280}

ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอสายคู่ที่บริสุทธิ์

ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในการเตรียมดีเอ็นเอ นั้นมีอาร์เอ็นเอปะปนอยู่

ถ้าได้ค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปะปนอยู่

2.2.8 การทำ agarose gel electrophoresis ของดีเอ็นเอ^(21,24)

2.2.8.1 วิธีเตรียมสาร

50 X TAE buffer (2 M)

ละลาย Tris 242 กรัม ในน้ำ deionized เติม glacial acetic acid 57.1 มล. และ 0.5 M EDTA pH 8.0 100 มล. (โดยชั่ง EDTA 18.61 กรัม ละลายในน้ำ deionized ปรับ pH เป็น 8.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.) แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เมื่อต้องการใช้งานให้เจือจาง 50 X TAE buffer ลงเหลือ 1 X

Loading dye (ประกอบด้วย 0.25 % Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol และ 30% glycerol)

ละลาย Bromophenol blue 0.25 กรัม Xylene cyanol 0.25 กรัม และ glycerol 30 มล. ในน้ำ deionized ปรับปริมาตรจนครบ 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4°C โดยที่ Loading dye นี้มีความเข้มข้น 6 เท่าของที่ต้องการใช้ ดังนั้นปริมาณที่ใช้จะเป็น 1 ใน 6 ของปริมาตรรวมของสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย

2.5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidium bromide

ละลาย ethidium bromide 2.5 มก. ใน 1X TAE buffer ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.2.8.2 วิธีทำ agarose gel electrophoresis ของดีเอ็นเอ

ชั่ง agarose 0.8 กรัม ลงใน 1X TAE buffer ปริมาตร 100 มล. ต้มจนกระทั่ง agarose ละลายแล้วตั้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 60 °C นำไปเทลงบน gel chamber ที่มีช่องสำหรับหลอดสารตัวอย่าง (comb) เรียบร้อยแล้ว ตั้งไว้ประมาณ 20 นาที ให้เจลแข็งตัว แล้วจึงดึงส่วนที่จัดไว้และช่องที่หยอดสารออก แล้วเท 1X TAE buffer ลงใน gel chamber ให้ได้ระดับท่วมเจลเล็กน้อย และไล่ฟองอากาศที่อาจเกิดขึ้นในสารละลายบริเวณ gel chamber และช่องเติมสารตัวอย่าง นำเอาสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาผสมกับ loading dye ด้วยอัตราส่วน 3:1 (สารละลายดีเอ็นเอ : Loading dye) แล้วหยอดลงในช่องที่เตรียมไว้ ช่องซ้ายมือสุดเตรียมไว้ใส่ $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานทราบขนาดที่แน่นอน และใส่สารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างในช่องถัดไป แล้วต่อขั้วอิเล็กโทรดเข้ากับแหล่งจ่ายกระแสไฟ โดยให้กระแสวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก และแรงเคลื่อนประมาณ 10 volt/cm ของความยาวเจล ดังรูป 2.1 จนกระทั่งสีน้ำเงินของ bromophenol blue ใน loading dye เคลื่อนไป 2 ใน 3 ของความยาวเจล ปิดแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลออกจาก chamber และแช่ลงใน 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide ประมาณ 10-30 นาที (ใส่ถุงมือเพื่อป้องกันมิให้สัมผัส ethidium bromide โดยตรง) แล้ว destain ในน้ำกลั่น 30 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์การเรืองแสงด้วย UV box (ใส่แว่นตาเสมอเมื่อส่องดูเจลด้วยแสง UV) บันทึกผลแถบเรืองแสงที่ปรากฏโดยถ่ายรูปด้วยกล้องโพลาไรซ์ วัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ชิ้นส่วนของ DNA marker ในการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง \log_{10} ของจำนวน base pair กับระยะทางที่เคลื่อนที่จากนั้นจึงวิเคราะห์หาขนาดของแถบดีเอ็นเอตัวอย่าง



รูป 2.1 การติดตั้งเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเข้าสู่แผ่น agarose gel โดยกระแสไฟฟ้ามีทิศทางการไหลจากขั้วลบ(สายสีดำ) ไปยังขั้วบวก(สายสีแดง)

2.2.9 การหาลำดับเบสของยีนไลเปสของ *Bacillus stearothermophilus* TP811

การหาลำดับเบสของยีนไลเปสของ *Bacillus stearothermophilus* TP811 ในการวิจัยนี้ได้ส่งพลาสมิดดีเอ็นเอของ pUC-TP811 และโคลนของยีนไลเปสในงานวิจัยนี้ในดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ดีเอ็นเอพาหะ *E.coli* M15[REP4] (ที่ส่งไปภายหลัง) ไปหาลำดับเบส ณ Institute of Biological Chemistry, Academic Sinica เมืองไทเป ประเทศไต้หวัน โดยการสนับสนุนจากคุณ ศุภโชค สิ้นชัยกุล โดยใช้ชุดน้ำยาลำเร็จรูป ABIPRISM™ Dye Terminator Sequence Core และชุดน้ำยา AmpliTaq® DNA polymerase ของบริษัท Prekin – Elmer ใช้ในการหาลำดับเบสของยีนไลเปส และทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนไลเปสจาก pUC-TP811 กับยีนไลเปสจากฐานข้อมูลของ Gene Bank/EMBL/ DDBL ด้วยโปรแกรม BLAST

2.2.10 การเพิ่มปริมาณยีนไลเปสด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)⁽²⁴⁾

เดิม *Bacillus stearothermophilus* TP811 ได้ทำการโคลนยีนไลเปสเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pUC 19 โดยทีมงานของ ดร. วรชาติ สิริวารภรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เรียกชื่อใหม่ว่า pUC-TP811 โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* ตัดจีโนมดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TP811 และ *BamHI* ตัดดีเอ็นเอพาหะ pUC-19 แล้ว ทรานสฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH 5 α เมื่อต้องการนำชิ้นยีนไลเปสออกมาจากดีเอ็นเอพาหะ pUC 19 จึงไม่สามารถตัดด้วย *BamHI* ได้ เนื่องจากลำดับเบสบริเวณนั้นได้เปลี่ยนแปลง

ไปแล้ว และตำแหน่งที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบริเวณอื่น ไม่เหมาะสมกับดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ดังนั้นจึงใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) เพื่อนำชิ้นยีนไลเปสออกมาและเพิ่มปริมาณยีนไลเปสให้มากขึ้น โดยสร้างไพรเมอร์ (primer) 2 ชนิดที่สามารถจับกับชิ้นยีนไลเปสที่ต้องการได้ในทิศทางตรงข้ามกัน และมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Nco* I เพื่อใช้ในการเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 โดยลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เป็นดังนี้

Lipase Forward primer (22 นิวคลีโอไทด์)



Lipase Reverse primer (24 นิวคลีโอไทด์)



ซึ่งได้รับการช่วยเหลือจาก คุณศุภโชค สิ้นชัยกุล ในการสังเคราะห์ไพรเมอร์

การเพิ่มปริมาณยีนไลเปสด้วยวิธี PCR นี้จะใช้ PCR Supermix ซึ่งเป็นน้ำยาสำเร็จรูป ประกอบด้วย

22 mM Tris-HCl (pH 8.4)

55 mM KCl

1.65 mM MgCl_2

220 μM dGTP , dATP , dTTP , dCTP

22 U recombinant Taq DNA Polymerase

ในการทำ PCR ทุกครั้ง จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมี Positive และ Negative control ที่เหมาะสมทำร่วมไปกับตัวอย่างตรวจเสมอ เพื่อป้องกันการผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้

ก. Positive control

งานวิจัยนี้ใช้พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน pUC-P1 ซึ่งได้จากการโคลนยีนไลเปสขนาด 2.2 กิโลเบส จาก *Bacillus stearothermophilus* P1 (ซึ่งเป็นแบคทีเรียทนความร้อนจากน้ำและดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อนเทพพนม จ.เชียงใหม่) ลงในดีเอ็นเอพาหะ pUC 19 เข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* DH5 α โดย ดร.วรชาติ สิริวราภรณ์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็น Positive control เนื่อง

จากมีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกับ *Bacillus stearothermophilus* TP811 ถึง 93% โดยเติมสารละลายต่าง ๆ ปริมาตรรวม 50 μ l ดังนี้

สารละลาย	ปริมาตร (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
PCR supermix	45	-
Lipase Forward primer	0.5	0.25 μ M
Lipase Reverse Primer	0.5	0.25 μ M
Template pUC P1 DNA	1	(10^5 - 10^6 โมเลกุล)
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	3	-

ผสมให้เข้ากันโดยเคาะหลอดเบา ๆ 2-3 ครั้ง นำหลอดทดลองเข้าเครื่อง Thermal cycler ตั้งโปรแกรมดังนี้

Hold 80 °C 2 นาที

Denature 94 °C 30 วินาที

Annealing 55 °C 30 วินาที

Extension 72 °C 1 นาที

แล้วทำ Denature ถึง Extension ซ้ำจำนวน 30 รอบ แล้วเก็บไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะนำหลอดทดลองออกจากเครื่อง นำสารละลายดีเอ็นเอมาวิเคราะห์จำนวนแถบของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ต่อไป

ข. Negative control

Negative control มี 2 ชนิด คือ

- Well characterized Negative control เป็น control ที่มีดีเอ็นเอ ซึ่งทราบอย่างแน่นอนว่าไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ งานวิจัยนี้ใช้ดีเอ็นเอพาหะ pUC 19 เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ โดยเติมสารละลายต่าง ๆ ปริมาตรรวม 50 μ l ดังนี้

สารละลาย	ปริมาตร(μ l)
PCR Supermix	45
Lipase Forward primer	0.5
Lipase Reverse primer	0.5
Template pUC 19	1
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	3

ผสมให้เข้ากัน นำหลอดทดลองเข้าเครื่อง Thermal cycler ตั้งโปรแกรมเหมือนข้อ 2.2.10 ก. แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอไปวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

- Multiple reagent control เป็น control ที่มีส่วนประกอบทุกอย่างอยู่ครบถ้วน แต่จะไม่มีดีเอ็นเอแม่แบบอยู่ control นี้จะช่วยให้ทราบว่าน้ำยาและสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้อยู่ในสภาพที่ปราศจากการปนเปื้อน โดยเติมสารละลายปริมาตร 50 μ l ดังนี้

สารละลาย	ปริมาตร(μ l)
PCR Supermix	45
Lipase Forward primer	0.5
Lipase Reverse primer	0.5
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	4

ผสมให้เข้ากัน นำหลอดทดลองเข้าเครื่อง Thermal cycler ตั้งโปรแกรมเหมือนข้อ 2.2.10 ก. แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอไปวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ค. วิธีทำ PCR ของยีนไลเปสจากพลาสมิดดีเอ็นเอ pUC TP811

ใช้พลาสมิดดีเอ็นเอจาก pUC-TP811 ซึ่งมียีนไลเปสอยู่ เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณยีนไลเปส โดยเติมสารละลายต่าง ๆ ปริมาตรรวม 50 μ l ดังนี้

สารละลาย	ปริมาณ(μ l)
PCR Supermix	45
Lipase Forward primer	0.5
Lipase Reverse primer	0.5
Template pUC TP811	1
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	3

ผสมให้เข้ากัน นำหลอดทดลองเข้าเครื่อง Thermal cycler ตั้งโปรแกรมเหมือนข้อ 2.2.10 ก. แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอไปวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

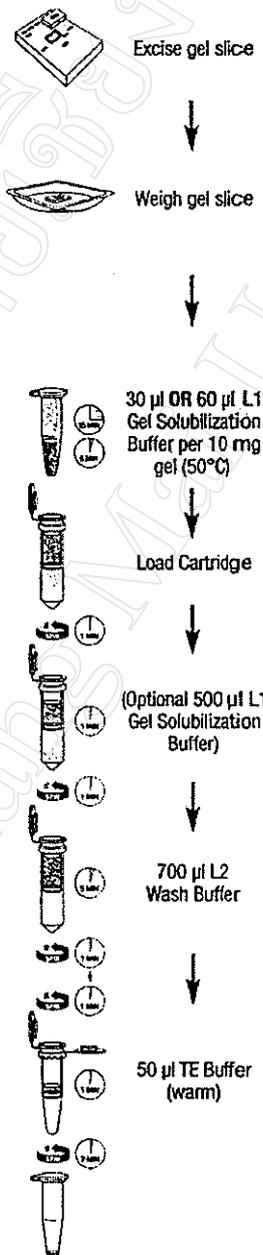
2.2.11 การทำยีนไลเปสจากวิธี PCR ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Rapid gel extraction

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีนไลเปสจาก pUC-TP811 ด้วยวิธี PCR แล้ว ต้องนำผลผลิตจาก PCR มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Rapid gel extraction วิธีนี้เป็นการสกัดดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก agarose gel ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ Rapid gel extraction Kit ซึ่งเป็นน้ำยาสำเร็จรูปประกอบด้วย 3 ส่วน ดังนี้

- Gel solubilization buffer ประกอบด้วย NaOAc และ TBE-Solubilizer
- Wash Buffer ประกอบด้วย NaCl , EDTA , Tris-HCl และ Ethanol 95%
- TE Buffer ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) และ 0.1 mM EDTA

นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากวิธี PCR มาทำ agarose gel electrophoresis เหมือนข้อ 2.2.8 แล้ว ใช้มีดสะอาดตัดลงบนเจลบริเวณที่ต้องการนำผลผลิตดีเอ็นเอจาก PCR ออกมา โดยตัดให้เหลือเนื้อเจลให้น้อยที่สุด นำเจลที่ตัดแล้วมาชั่งน้ำหนัก ควรมีน้ำหนักไม่เกิน 400 มก. นำเจลใส่ในหลอด polypropylene ขนาด 1.5 มล. เติม gel solubilization buffer 30 μ l ต่อ 10 มก. ของเจล นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 15 นาที โดยคว่ำหงายหลอดทดลองทุกๆ 3 นาที จนเจลถูกละลายหมด นำเจลที่ละลายแล้วใส่ลงใน spin cartridge ที่มี wash tube อยู่ด้านล่างนำไป เซนติฟิวจด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เจลจะลงไปอยู่ใน wash tube ด้านล่าง เหลือแต่ดีเอ็นเอบน spin cartridge นำ spin cartridge ใส่ลงใน wash tube หลอดใหม่ เติม gel solubilization buffer 500 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไป เซนติฟิวจด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที นำ spin cartridge ใส่ลงใน wash

tube หลอดใหม่ เติม wash buffer 700 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปเซนติฟิวจ์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที นำ spin cartridge ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. เติม TE buffer ที่อุ่นที่อุณหภูมิ 65 - 70°C ปริมาตร 50 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปเซนติฟิวจ์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์อยู่ในหลอดด้านล่าง เพื่อนำไปวิเคราะห์ และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป ดังรูป 2.2



รูป 2.2 โดอะแกรมการทำยีนไลเปสจากวิธี PCR ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Rapid gel extraction

2.2.12 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Nco*I^(23,24)

เมื่อได้ยีนไลเปสที่บริสุทธิ์ด้วยวิธี Rapid gel extraction และสกัดดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ด้วยวิธี Alkaline lysis แล้ว ต้องตัดดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hind* III และ *Nco*I ก่อนทำการเชื่อมยีนไลเปสกับดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 เข้าด้วยกัน โดยใส่สารละลายดีเอ็นเอ 0.2 – 2 µg ในหลอด microfuge ที่สะอาด (สำหรับ miniprep ใช้ 2-5 µl) ปรับปริมาตรให้เป็น 16 µl ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (สำหรับปริมาตรรวม 20 µl) เติม 10x buffer ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 µl (10x buffer สำหรับตัดดีเอ็นเอด้วย *Hind* III และ *Nco*I จะเลือกใช้บัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน คือ Buffer Reaction 2 ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์สำหรับ *Hind* III แต่ *Nco*I ก็สามารถทำงานได้ดี 100% เหมือนใน Buffer Reaction 3 ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์สำหรับ *Nco*I) เติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Nco*I ชนิดละ 1 µl (ใช้ประมาณ 2-4 Unit / 1 µl DNA) ผสมให้เข้ากันโดยเคาะหลอดเบา ๆ ถ้ามีสารละลายติดข้างหลอดให้เซนติฟิวจ์ 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 วินาที (โดยทั่วไปปริมาณของเอนไซม์ไม่ควรเกิน 1 ใน 10 ของปริมาตรรวม เนื่องจากเอนไซม์จะถูกเก็บในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol แต่ถ้ามีความเข้มข้น glycerol มากเกิน 10% เอนไซม์จะทำงานไม่ได้) นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 0.5-2 ชั่วโมง วิเคราะห์ดูจำนวนชิ้นและขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ต่อไป

2.2.13 การเชื่อมต่อยีนไลเปสกับดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ด้วย T_4 DNA Ligase^(24,27)

เมื่อทำการตัดยีนไลเปสและดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Nco*I แล้วจึงทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอทั้งสองเข้าด้วยกัน ด้วย T_4 DNA Ligase ในงานวิจัยนี้ใช้ T_4 DNA Ligase Kit ซึ่งเป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูป ประกอบด้วย 2 ส่วน ดังนี้

- T_4 DNA Ligase เป็นไลเกสที่สามารถเชื่อมดีเอ็นเอได้ทั้งปลายเหนียวและปลายหูก และซ่อมแซมดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่มีปลาย 3'- hydroxyl และ 5'- phosphate ได้ ซึ่งสกัดจากแบคทีเรีย *E.coli* lambda lysogen สายพันธุ์ NM 989

- 5X DNA Ligase buffer ประกอบด้วย

250 mM Tris-HCl (pH 7.6)

50 mM MgCl₂

5 mM ATP

5 mM DTT และ 25% (v/v) polyethylene glycol-8000

นำสารละลายดีเอ็นเอของยีนไลเปสเข้มข้น 45-180 fmol และสารละลายดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 15-60 fmol ซึ่งเป็นอัตราส่วน 3:1 (ดีเอ็นเอของยีนไลเปส : ดีเอ็นเอพาหะ pQE 60) ลงในหลอด microfuge ที่สะอาด เติม 5X Ligase Buffer 4 μ l และเอนไซม์ไลเกส 1 μ l (ใช้ประมาณ 1 U ต่อ 0.1-1.0 μ g DNA) เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจนปริมาณครบ 20 μ l ผสมให้เข้ากัน โดยเคาะหลอดเบา ๆ นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 14 °C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยา โดยเติม 250 mM EDTA (pH 8.0) ลงไป 1 μ l แล้วสกัดด้วยสารละลายผสม Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol 1 ครั้ง แล้วสกัดด้วยสารละลาย Chloroform/Isoamyl alcohol อีก 2 ครั้ง ขั้นตอนนี้ไม่ใช่ขั้นตอนซึ่งจำเป็นต้องทำ สามารถนำสารละลายหลังหยุดปฏิกิริยาแล้วไปใช้ในขบวนการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้เลยทันที

2.2.14 การเตรียม Competent cell ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15[pREP4]⁽²⁴⁾

การเชื่อมต่อยีนไลเปสและดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 เข้าด้วยกัน เรียกว่า ดีเอ็นเอสายผสม ก่อนนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านนั้น ต้องเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* M15 [pREP4] ให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอจากภายนอก (competent cell) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.2.14.1 วิธีเตรียมสาร

สารละลาย TFB I (ประกอบด้วย 30 mM Potassium acetate , 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂ , 50 mM MnCl₂ และ glycerol 15% (v/v))

ละลาย Potassium acetate 1.47 กรัม RbCl (MW 120.92) 6.05 กรัม , CaCl₂ (MW 110.99) 0.56 กรัม , MnCl₂ (MW 197.92) 4.95 กรัม และ glycerol 75 มล. ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 5.8 ด้วย 1 M KOH แล้วปรับปริมาตรจนครบ 500 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน 0.22 μ m filter ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บใส่ขวดที่ฆ่าเชื้อแล้วที่ 4°C

สารละลาย TFB II (ประกอบด้วย 10 mM MOPS , 75 mM CaCl₂ , 10 mM RbCl และ glycerol 15% (v/v))

ละลาย MOPS (MW 209.27) 0.21 กรัม CaCl₂ 0.83 กรัม RbCl 0.12 กรัม และ glycerol 15 มล. ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย 1M KOH แล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน 0.22 μ m filter ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บใส่ขวดที่ฆ่าเชื้อแล้วที่ 4°C

2.2.14.2 วิธีเตรียม Competent cell ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15 [pREP4]

เตรียม preculture ของแบคทีเรีย *E.coli* M15 [pREP4] โดยเชื้อที่มาจากอาหารก้อน 1 loop ใส่ลงในอาหารเหลว LB (ที่มีกาแนมัยซิน 25 µg/ml) ปริมาตร 100 มล. นำไปบ่มเลี้ยงที่ 37 °C พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจาก preculture นี้ 1 มล. ลงในอาหารเหลวใหม่ 99 มล. (หัวเชื้อ 1% v/v) นำไปบ่มเลี้ยงที่ 37°C และเขย่าด้วยความเร็วเท่าเดิม จนน้ำเลี้ยงมีความขุ่นของเซลล์ที่มีความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 (ใช้เวลาประมาณ 90-120 นาที) นำเซลล์ culture ที่ได้ไปแช่เย็นบนน้ำแข็ง 5 นาที นำ culture ปริมาตร 50 มล. ไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เกล็ดส่วนสารละลายใสด้านบนทิ้งอย่างระมัดระวัง กระจายเซลล์ด้วย TFB I (ที่แช่เย็น อุณหภูมิ 4 °C) ปริมาตร 30 มล. แล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 90 นาที นำมาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เกล็ดส่วนสารละลายใสด้านบนทิ้งไป กระจายเซลล์ด้วย TBF II ที่เย็นปริมาตร 4 มล. เก็บ competent cell ที่ได้ในหลอด microfuge ที่ฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 100-200 µl นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70 °C

2.2.15 การทรานสฟอร์มดิเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15 [pREP4]^(24,26)

เมื่อเตรียม competent cell ของ *E.coli* M15[pREP4] ให้อยู่ในสภาพที่รับดิเอ็นเอสายจากภายนอกเรียบร้อยแล้ว จึงทำการทรานสฟอร์มดิเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E.coli* M15[pREP4] โดยตรง มีขั้นตอนดังนี้

2.2.15.1 วิธีเตรียมสาร

Psi broth

ละลาย Tryptone 1 กรัม Yeast extract 0.5 กรัม NaCl 0.5 กรัม MgSO₄ (MW 246.48) 0.0985 กรัม และ KCl (MW 74.56) 0.74 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้ออัดไอน้ำที่ความดัน 1 kg/cm³ อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

2.2.15.2 วิธีการทรานสฟอร์มดิเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน

E.coli M15[pREP4]

นำดิเอ็นเอสายผสมที่เชื่อมต่อกันในข้อ 2.2.13 ปริมาตร 20 μ l ถ่ายลงในหลอด microfuge แซ่เย็น เติม competent cell ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15[pREP4] ในข้อ 2.2.14 ปริมาตร 200 μ l ผสมให้เข้ากันอย่างระมัดระวัง แซ่ลงบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 90 วินาที เติม Psi broth 500 μ l นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 60-90 นาที นำไปกระจาย (spread) บนอาหารร่วน LB ที่ผสมแอมพิซิลิน 100 μ g/ml และ กานามัยซิน 25 μ g/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วสูบลโคไลนบนอาหารร่วนเพื่อสกัดดิเอ็นเอแล้วตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้องในข้อ 2.2.16 ต่อไป

2.2.16 การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ด้วยวิธี Restriction Enzyme Analysis^(26,27)

เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารร่วน หลังการทรานสฟอร์มดิเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15[pREP4] นั้น อาจเป็นการเจริญของดิเอ็นเอพาหะ pQE 60 ที่ถูกทรานสฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้านเพียงอย่างเดียว หรือเป็นดิเอ็นเอสายผสมที่เป็นทรานสฟอร์มแมนท์ที่ต้องการ สามารถแยกความแตกต่างได้โดย ทำการสูบลโคไลนที่เจริญบนอาหารร่วนมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 1.5 มล. ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 μ g/ml และกานามัยซิน 25 μ g/ml นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสกัดพลาสมิดดิเอ็นเอออกจากโคไลนตัวอย่าง ดังวิธีข้อ 2.2.5 และ 2.2.6 เมื่อได้พลาสมิดดิเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วจึงนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ดังวิธีข้อ 2.2.12 แล้วการตรวจสอบแถบดิเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจดูขนาดของดิเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย *EcoR* I

ในกรณีที่ทรานสฟอร์มแมนท์เป็นดิเอ็นเอพาหะ pQE 60 เพียงอย่างเดียว จะได้ขนาดชิ้นดิเอ็นเอประมาณ 3.4 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าชิ้นดิเอ็นเอของทรานสฟอร์มแมนท์ที่เป็นดิเอ็นเอสายผสม จึงสามารถแยกความแตกต่างจากกันได้ นำดิเอ็นเอที่คาดว่าจะป็นดิเอ็นเอสายผสมไปตรวจสอบด้วยวิธี PCR อีกครั้งหนึ่ง

2.2.17 การทำ PCR เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้อง⁽²⁴⁾

เมื่อได้ดีเอ็นเอที่คาดว่าจะเป็นที่เอ็นเอสสายผสมที่ต้องการ จึงนำไปตรวจสอบหาชิ้นยีนไลเปสที่ต้องการด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด ได้แก่

- Lipase Forward primer
- Lipase Reverse primer
- Lipase pQE Forward primer
- Lipase pQE Reverse primer

โดยทำการสลับไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิดเพื่อการตรวจหายีนไลเปส ดังนี้

- ก. Lipase Forward primer กับ Lipase Reverse primer
- ข. Lipase Forward primer กับ Lipase pQE Reverse primer
- ค. Lipase Reverse primer กับ Lipase pQE Forward primer
- ง. Lipase pQE Forward primer กับ Lipase pQE Reverse primer

นำไพรเมอร์ข้อ ก-ง มาใช้ในการตรวจสอบชิ้นยีนไลเปสโดยวิธี PCR ดังวิธีข้อ

2.2.10 แล้วนำไปวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ต่อไป เมื่อได้ทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้องให้ชื่อโคลนที่ได้ว่า pQE-TP811

2.2.18 การศึกษาความเข้มข้นของ Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) ต่อการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปส ใน pQE-TP811⁽²⁵⁾

ทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีนไลเปสอยู่ในดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15[pREP4] เรียกว่า pQE-TP811 ดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 สามารถถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ต้องการหรือสร้างโปรตีนเพิ่มมากขึ้น ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปสให้มากขึ้น โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.2.18.1 วิธีเตรียมสาร

1 M IPTG

ละลาย IPTG (MW 238.31) 0.2383 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มล. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย 0.22 μm filter เก็บในหลอด microfuge ที่ฆ่าเชื้อแล้วอุณหภูมิ -20°C

2.2.18.2 วิธีศึกษาผลความเข้มข้นของ IPTG ต่อการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปส

เตรียม preculture ของเชื้อ pQE-TP811 โดยเชื้อจากอาหารรุ่น 1 loop ใส่ลงไปในอาหารเหลว LB ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ และกานามัยซิน 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ปริมาตร 100 มล. นำไปบ่มเลี้ยงที่ 37°C พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจาก preculture นี้ 1 มล. ลงในอาหารเหลวใหม่ 99 มล. (หัวเชื้อ 1% v/v) นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าด้วยความเร็วเท่าเดิม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยง 1 มล. ก่อนเติม IPTG 1 M ปริมาตร 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 และ 200 μl เพื่อให้ได้ความเข้มข้น IPTG สุดท้าย เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, และ 2.0 mM ตามลำดับ เก็บน้ำเลี้ยงปริมาตร 1.5 มล. ทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วเซนติฟิวจ์แยกตะกอนเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ตะกอนเซลล์เพื่อไปทำ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

2.2.19 การวิเคราะห์โปรตีนในเซลล์ด้วยวิธี SDS - Polyacrylamide gel electrophoresis^(9,25)

2.2.19.1 วิธีเตรียมสาร

Stock Acrylamide

ละลาย Acrylamide (MW 71.08) 29.2 กรัม และ bis-Acrylamide (MW 154.20) 0.80 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตรสารละลายให้ครบ 100 มล. แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

1.5 M Tris-HCl , pH 8.8 (สำหรับ Separating gel)

ละลาย Tris 18.171 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.8 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.

0.5 M Tris-HCl , pH 6.8 (สำหรับ Stacking gel)

ละลาย Tris 6.057 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.8 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.

10% (w/v) Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 มล.

0.5% (w/v) Bromophenol blue

ละลาย Bromophenol blue 0.05 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มล.

Stock Sample buffer (0.06 M Tris-HCl , pH 6.8 , 2% SDS , 10% glycerol และ 0.025% Bromophenol blue)

ผสมสารละลาย 0.5 M Tris-HCl , pH 6.8 1.2 มล. 10%(w/v) SDS 2.0 มล. glycerol 1.0 มล. และ 0.5%(w/v) Bromophenol blue 0.5 มล. เข้าด้วยกัน แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 10 มล. ก่อนนำไปใช้ให้เติม 2-Mercaptoethanol 50 μ l ต่อ stock sample buffer 0.95 มล.

10% (w/v) Ammonium persulfate (APS)

ละลาย Ammonium persulfate (MW 228.20) 1.0 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มล. แล้วใช้ทันที

Electrode buffer

ละลาย Tris 0.30 กรัม glycine (MW 75.07) 1.4 กรัม และ 10% (w/v) SDS 1 มล. ในน้ำกลั่น 100 มล.

สารละลาย Separating gel (12% gel)

ผสมสารละลาย 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 ปริมาตร 2.5 มล. Stock acrylamide 4.0 มล. น้ำกลั่น 3.35 มล. และสารละลาย 10% (w/v) SDS 0.1 มล. เข้าด้วยกัน เติมสารละลาย 10% (w/v) ammonium persulfate 50 μ l และ TEMED 5 μ l แล้วนำไปเตรียมเจลทันที

สารละลาย Stacking gel (4% gel)

ผสมสารละลาย 0.5 Tris-HCl pH 6.8 ปริมาตร 2.5 มล. Stock acrylamide 1.3 มล. น้ำกลั่น 6.1 มล. และสารละลาย 10%(w/v) SDS 0.1 มล. เข้าด้วยกัน เติมสารละลาย 10%

(w/v) ammonium persulfate 50 μ l และ TEMED 10 μ l แล้วนำไปเตรียมเจลทันที

1 mM Dithiothreitol (DTT)

ละลาย DTT (MW 154.25) 1.54 มก. ในน้ำกลั่น 10 มล.

สารละลายโปรตีนมาตรฐานเข้มข้น 1 มก./มล.

นำโปรตีนมาตรฐานสำเร็จรูป (MW 14,300-200,000) 0.5 มก. มาละลายใน 1 mM DTT ปริมาตร 500 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 2-5 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C

Staining solution

ละลาย Coomassie brilliant blue R-250 0.1 กรัม Methanol 40 มล. Acetic acid 10 มล. ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

สารตัวอย่างเพื่อทำอิมมูโนโพรบ

นำตะกอนเซลล์จากข้อ 2.2.18.2 มาเติม Sample buffer ปริมาตร 100 μ l ต้ม สารละลายที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปใส่ในช่องบนเจล

สารละลาย Destain

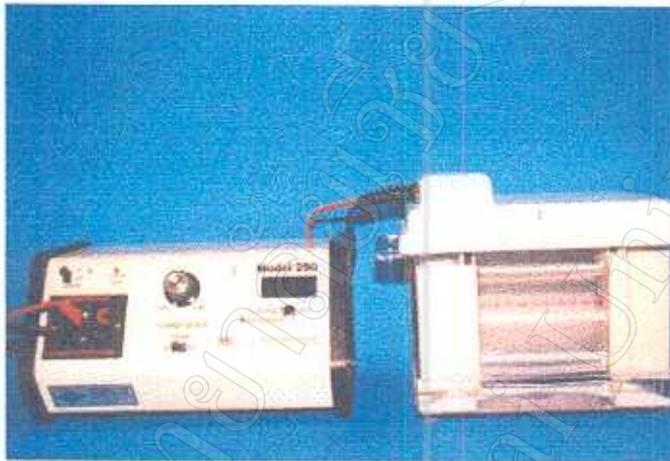
ผสม methanol 40 มล. และ acetic acid 10 มล. เข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นให้ ปริมาตรครบ 100 มล.

2.2.19.2 วิธีวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE

ก. วิธีทำ SDS-PAGE

ต่อชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ Slab gel ใน vertical slab gel unit Model E-C 120 โดยใช้ spacers เป็นตัวปรับความหนาของเจลตามต้องการ (0.75-1.0 มล.) ดังรูป 2.3 ใส่สารละลาย separating gel ลงไปในช่องว่างของกระจกทางด้านบน โดยให้สารละลายเจลอยู่ห่างขอบบนของกระจกประมาณ 2 ซม. แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปอย่างเบา ๆ บนหน้าเจลให้เต็มช่องว่าง เพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบ ตั้งไว้ประมาณ 45-60 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว เมื่อ separating gel แข็งตัวแล้วรินน้ำออกจากเจลให้หมด โดยคว่ำชุดเครื่องมือลงบนกระดาษซับน้ำจนหมด จากนั้นใส่สารละลาย stacking gel ลงไปให้เต็มช่องว่าง แล้วเสียบแผ่นหรือลงไปบน stacking gel ระมัดอย่าให้มีฟองอากาศ ตั้งไว้ประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว เมื่อ stacking gel จะเห็นช่องสำหรับใส่สาร

ที่ต้องการแยกบนเจล ใสสารที่ต้องการศึกษาลงในช่องจากซ้ายไปขวา โดยช่องที่ 1 ใสสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ในช่องถัดไป ผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่แผ่นเจลประมาณ 20 mA ดังรูป 2.3 เมื่อเห็นสีน้ำเงินของ bromophenol blue เคลื่อนที่ลงมาจนถึงปลายล่างของเจล ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง ให้หยุดผ่านกระแสไฟฟ้า นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาวางบนถาด เพื่อทำการย้อมสีโปรตีนในเจลต่อไป



รูป 2.3 การผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่แผ่นเจลในการทำ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

โดยมีทิศทางการไหลของกระแสจากขั้วลบ (สายสีดำ) ไปยังขั้วบวก (สายสีแดง)

ข. วิธีย้อมสีโปรตีนโดยวิธี Coomassie Brilliant Blue R-250

ค่อย ๆ นำแผ่นเจลมาใส่ในถาดที่มี Staining Solution ที่ใส่ไว้ประมาณ 30 นาที แล้วนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย Destain จนกระทั่งแผ่นเจลใสและเห็นแถบโปรตีนอย่างชัดเจน แล้วนำมาส่องดูแถบโปรตีนที่เข้มขึ้นเมื่อเติม IPTG เข้มข้นต่างๆกัน

2.2.20 การศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสนอกเซลล์จาก pQE-TP811⁽¹⁸⁾

นำสารละลาย Crude lipase ที่ได้จากการเลี้ยง pQE-TP811 ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเซนติฟิวจ์แยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อนำมาศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสดังนี้

2.2.20.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส

นำ Crude lipase มาศึกษาแอคติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 30,40,50, 55, 60, 65, 70, 80 และ 90 °C โดยใช้ Crude lipase 20 μ l ในสารละลาย Reaction buffer pH 8.0 ปริมาตร 880 μ l และสับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyllaurate 100 μ l ป่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 3M HCl 0.5 มล. เซนติฟิวจ์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำไปหาแอคติวิตีของไลเปสจาก p-nitrophenol ที่เกิดขึ้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ดังข้อ 2.2.3.2 และนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างแอคติวิตีของไลเปสและอุณหภูมิ

2.2.20.2 pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส

ก. วิธีเตรียมสาร

- 50 mM acetate buffer pH 4.0 , 5.0 , 6.0

บัฟเฟอร์ pH 4.0 เตรียมโดยชั่ง sodium acetate (MW 82.03) 0.151 กรัม glacial acetic acid 0.61 มล. ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ปรับ pH เป็น 4.0 ด้วย 6 M HCl ปรับปริมาตรเป็น 250 มล. ด้วยน้ำกลั่น

บัฟเฟอร์ pH 5.0 เตรียมโดยชั่ง sodium acetate 0.650 กรัม glacial acetic acid 0.26 มล. ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วย 6 M HCl ปรับปริมาตรเป็น 250 มล. ด้วยน้ำกลั่น

บัฟเฟอร์ pH 6.0 เตรียมโดยชั่ง sodium acetate 0.650 กรัม glacial acetic acid 0.04 มล. ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ปรับ pH เป็น 6.0 ด้วย 6 M HCl ปรับปริมาตรเป็น 250 มล. ด้วยน้ำกลั่น

- 50 mM phosphate buffer pH 6.0 , 7.0 , 7.5

บัฟเฟอร์ pH 6.0 เตรียมโดยชั่ง Na_2HPO_4 0.295 กรัม NaH_2PO_4 1.625 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ปรับ pH เป็น 6.0 ด้วย 6 M NaOH ปรับปริมาตรเป็น 250 มล. ด้วยน้ำกลั่น

บัฟเฟอร์ pH 7.0 เตรียมโดยชั่ง Na_2HPO_4 1.182 กรัม NaH_2PO_4 0.651 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 6 M NaOH ปรับปริมาตรเป็น 250 มล. ด้วยน้ำกลั่น

บัฟเฟอร์ pH 7.5 เตรียมโดยชั่ง Na_2HPO_4 1.532 กรัม NaH_2PO_4 0.266 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย 6 M NaOH ปรับปริมาตรเป็น 250 มล. ด้วยน้ำกลั่น

- 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 , 8.0 , 9.0

บัฟเฟอร์ pH 7.5 เตรียมโดยชั่ง Tris 1.541 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย 6 M HCl ปรับปริมาตรเป็น 250 มล.

บัฟเฟอร์ pH 8.0 เตรียมโดยชั่ง Tris 1.541 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย 6 M HCl ปรับปริมาตรเป็น 250 มล.

บัฟเฟอร์ pH 9.0 เตรียมโดยชั่ง Tris 1.541 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 9.0 ด้วย 6 M HCl ปรับปริมาตรเป็น 250 มล.

- 50 mM glycine-NaOH buffer pH 9.0 , 10.0 , 11.0

บัฟเฟอร์ pH 9.0 เตรียมโดยละลาย glycine 0.938 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 9.0 ด้วย 6 M NaOH ปรับปริมาตรให้ครบ 250 มล.

บัฟเฟอร์ pH 10.0 เตรียมโดยละลาย glycine 0.938 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 10.0 ด้วย 6 M NaOH ปรับปริมาตรให้ครบ 250 มล.

บัฟเฟอร์ pH 11.0 เตรียมโดยละลาย glycine 0.938 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 11.0 ด้วย 6 M NaOH ปรับปริมาตรให้ครบ 250 มล.

ข. การหาแอกติวิตีของไลเปสที่ pH ต่าง ๆ

นำ Crude lipase 20 μl ใส่ลงสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM ของบัฟเฟอร์ pH ชนิดต่าง ๆ ปริมาตร 880 μl ที่มี 0.2% Sodium Deoxycholate และ 0.1% Gum Arabic เติมสารละลาย p-Nitrophenyllaurate 100 μl บ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 2 นาที นำไปหาแอกติวิตีของไลเปสจาก p-Nitrophenol ที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ดังข้อ 2.2.3.2 และนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างแอกติวิตีของไลเปสและ pH

2.2.20.3 ความเสถียรของไลเปสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

แช่ Crude lipase 1 มล. ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 30 , 40 , 50 , 55 , 60 , 65, 70, 80 และ 90 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหาแอกติวิตีของไลเปสที่อุณหภูมิ 55°C pH 8.0 นำ

ไปหาแอกติวิตีของไลเปสจาก p-nitrophenol ที่เกิดขึ้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ดังข้อ 2.2.3.2 เขียนกราฟความสัมพันธ์ของไลเปสแอกติวิตีกับอุณหภูมิที่ใช้แช่บ่มไลเปส

2.2.21 การศึกษาการเพิ่มการส่งไลเปสออกเซลล์ของ pQE-TP811⁽²⁹⁻³¹⁾

แบคทีเรีย pQE –TP811 สามารถผลิตไลเปสออกนอกเซลล์ได้จำนวนหนึ่ง แต่ยังคงเหลือไลเปสภายในเซลล์อยู่ ดังนั้นจึงศึกษาการเพิ่มการส่งไลเปสออกเซลล์ โดยการเติมสารเคมีที่สามารถทำมีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ได้แก่ Tween 80 และ Triton X-100 และการเพิ่มแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง ได้แก่ glutamic acid

2.2.21.1 การศึกษาผลของ Tween 80 ความเข้มข้นต่างๆต่อการผลิตไลเปส

ก. วิธีเตรียมสาร

20 mM Tris-HCl และ 10 mM EDTA buffer, pH 8.5

ละลาย Tris 0.242 กรัม EDTA 0.372 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.5 แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 มล.

ข. วิธีศึกษาผลของ Tween 80 ความเข้มข้นต่างๆต่อการผลิตไลเปส

เตรียม preculture ของเชื้อ pQE-TP811 โดยถ่ายเชื้อจากจานอาหารรุ้น ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มล. นำไปบ่มเลี้ยงที่ 37 °C พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจาก preculture นี้ 1 มล. ลงในอาหารเหลว LB ที่ผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.25 , 0.50 , 0.75 , 1.0 , 1.25 , 1.5 , 2.0 , 4.0 , 6.0 , 8.0 และ 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 99 มล. และเติม IPTG เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยง 5 มล. (เป็นเวลาเริ่มต้นในการศึกษา) ก่อนนำไปเลี้ยงที่ 37 °C และเขย่าด้วยความเร็วเท่าเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงที่เวลา 24 ชั่วโมง ไปเซนติฟิวจ์แยกตะกอนเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง ปริมาตร 30 มล. ด้วยความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายใสด้านบนไปหาแอกติวิตีของไลเปส ดังข้อ 2.2.3.2 และปริมาณโปรตีน ดังข้อ 2.2.4.2 ส่วนตะกอนเซลล์นำมากระจายในสารละลายบัฟเฟอร์ 20 mM Tris-HCl , pH 8.5 และ 10 mM EDTA ปริมาตร 5 มล. ทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูง (Sonication) 5X เป็นเวลา 15 วินาที และพัก 15 วินาที จำนวน 5 ครั้ง นำไปเซนติฟิวจ์ด้วยความเร็ว 6,000 รอบ/นาที 20 นาที นำสารละลายใสด้านบนไปหาแอกติวิตีของไลเปส ดังข้อ 2.2.3.2 และ ปริมาณโปรตีน ดังข้อ 2.2.4.2 นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่าง

แอกติวิตี และปริมาณโปรตีนนอกและในเซลล์ กับความเข้มข้นของ Tween 80 ในอาหารเหลว LB เปรียบเทียบกับอาหารเหลว LB ปกติ

2.2.21.2 การศึกษาผลของ Triton X-100 ต่อการส่งไลเปสออกนอกเซลล์

ใช้อาหารเหลว LB ที่ผสม Triton X-100 เข้มข้น 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25, 1.75, 2.0, 2.25, 2.50, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 กรัม/ลิตร ปริมาตร 100 มล. และเติม IPTG เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อ pQE-TP811 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำดังข้อ 2.2.21.1 ข. นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างแอกติวิตีและปริมาณโปรตีนนอกและในเซลล์ กับความเข้มข้นของ Triton X-100 ในอาหารเหลว LB เปรียบเทียบกับอาหารเหลว LB ปกติ

2.2.21.3 การศึกษาการเติม glutamic acid เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง

ใช้อาหารเหลว LB ที่ผสม glutamic acid เข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 กรัม/ลิตร ปริมาตร 100 มล. และเติม IPTG เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อ pQE-TP811 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำดังข้อ 2.2.21.1 เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างแอกติวิตีและปริมาณโปรตีนนอกและในกับความเข้มข้นของ glutamic acid ในอาหารเหลว LB เปรียบเทียบกับอาหารเหลว LB ปกติ