

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid (glacial)	Merck
Acrylamide	Sigma
Ammonium persulfate	Merck
Ampicillin	ANB Laboratories
Agarose	Gibco
Azocasein	Sigma
Bacto agar	Difco
<i>Bam</i> HI	Gibco
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Bromophenol blue	Fluka
Calcium sulphate dihydrate	Merck
Calcium chloride dihydrate	BDH
Carbolic acid (Phenol)	Gamma
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dipotassium hydrogen phosphate	Merck
λ DNA / <i>Hind</i> III Fragment	Gibco
<i>Eco</i> RI	Gibco
Ethanol 99.8%	Merck
Ethanol 95%	
Ethidium Bromide	Gibco

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	BDH
Ferric(III) citrate	Merck
Glucose	Fluka
Glycerol	
Glycine	BDH
<i>Hind</i> III	Gibco
Hydrochloric acid	Merck
8-Hydroxyquinoline	BDH
Isoamyl alcohol	Merck
Isopropanol	BDH
Magnesium chloride	BDH
Magnesium sulfate	BDH
2-Mercaptoethanol	BDH
Methanol 99.8%	BDH
N,N'-Methylene-bis-acrylamide	Sigma
Nitrilotriacetic acid(Titriplex I)	Sigma
Phosphoric acid 85%	Carlo Erba
Potassium chloride	Carlo Erba
Potassium dihydrogen phosphate	Merck
Proteinase K	Gibco
Protein molecular weight standards	Gibco
RNase A	Amresco
<i>Sau</i> 3AI	Gibco
Skim milk	Difco
Sodium acetate	Merck
Sodium chloride	Merck
Sodium hydroxide	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylenediamine (TEMED)	Sigma

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
T4 DNA ligase	Gibco
Trichloroacetic acid	Fluka
Triton X-100	Fluka
Tris (hydroxy methyl) aminomethane	Fluka
Tryptone	Difco
Yeast Extract	Difco

2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

ชื่ออุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Autoclave model HL-42A-DY	Hirayama
Centrifuge model 6060	Centurion Scientific
Centrifuge model J2-MC	Beckman
Concert rapid gel extraction system	Gibco
Electrophoretic gel system	EC-midicell primo
Hotplate stirrer	Nuova II
Incubator shaker model 3032	GFL
Microcentrifuge model 7	Denver instrument
Micropipette	Biohit
Minivertical gel system	EC-apparatus corporation
pH meter 28	Radiometer Copenhagen
Power supply 250	BRL
Shaker bath	GFL
UV 2000 spectrophotometer	Hitachi
UV transilluminator	UVP
Vivaspin	Vivascience

2.1.3 จุลินทรีย์

1. *Bacillus stearothermophilus* TLS33
2. *Escherichia coli* DH5 α
3. *Escherichia coli* DH5 α with pUC19

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย

2.2.1.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* TLS33^(14,15)

ก. สูตรอาหารแข็งประกอบด้วย (Skim milk agar plate)

0.25% (w/v) Skim milk , 0.1% (w/v) Yeast extract และ 1.5% Bacto Agar ใน 80% (v/v) base mixture pH 7.2 ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

base mixture ประกอบด้วย

Titriplex I	1.0	กรัม
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0.4	กรัม
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.0	กรัม
NaOH	0.2	กรัม
0.01 M ferric (III) citrate	5.0	มล.
H ₂ O	990.0	มล.

ปรับพีเอชให้เป็น 7.2 ด้วย 6 M NaOH เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 มล.

ทำการฆ่าเชื้ออาหารที่เตรียมได้โดยใช้ autoclave ที่ความดัน 1.0 kg/cm³ อุณหภูมิ 121 °ซ 20 นาที แล้วเทลงใน plate ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ข. สูตรอาหารเหลวประกอบด้วย

0.25% (w/v) Skim milk และ 0.1% (w/v) Yeast extract ใน 80% (v/v) base mixture pH 7.2 ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ทำการฆ่าเชื้ออาหารที่เตรียมได้โดยใช้ autoclave

2.2.1.2 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5 α ⁽¹⁷⁾

ก. สูตรอาหารแข็งประกอบด้วย (Luria-Bertaini medium, LB medium)

1 % Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0.5% NaCl และ 1.5% Bacto Agar ในน้ำกลั่น

ทำการฆ่าเชื้ออาหารที่เตรียมได้โดยใช้ autoclave แล้วเทลงใน plate ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ข. สูตรอาหารเหลวประกอบด้วย

1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract และ 0.5% NaCl ในน้ำกลั่น

ทำการฆ่าเชื้ออาหารที่เตรียมได้โดยใช้ autoclave

2.2.1.3 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5 α with pUC19⁽¹⁷⁾

เตรียมอาหารแข็งและอาหารเหลวเหมือนกับอาหารที่ใช้เลี้ยง *Escherichia coli* DH5 α (Luria-Bertaini medium) แต่จะเติม Ampicillin ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มล. โดยจะเติมหลังจากอาหารที่เตรียมได้เย็นลงแล้วภายหลังจากทำการฆ่าเชื้อด้วย autoclave

2.2.1.4 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียที่ได้รับการโคลนยีนโปรตีนเอส

เตรียมอาหารแข็ง (Skim milk agar plate) และอาหารเหลวเหมือนกับอาหารที่ใช้เลี้ยง *Bacillus stearothermophilus* TLS33 แต่จะเติม Ampicillin ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มล. โดยจะเติมหลังจากอาหารที่เตรียมได้เย็นลงแล้วภายหลังจากทำการฆ่าเชื้อด้วย autoclave

2.2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

2.2.2.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* TLS33

เตรียม preculture ในอาหารเหลว โดยใช้ loop เขี่ยเชื้อ จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 0.25% (w/v) Skim milk และ 0.1% (w/v) yeast extract ใน 80% (v/v) base mixture ปริมาตร 100 มล. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 65 °C ใน shaking incubator เขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชม. แล้วนำไปเลี้ยง culture โดยใช้ preculture ปริมาตร 1 มล. ใน culture medium ที่ประกอบด้วย 0.25% (w/v) Skim milk และ 0.1% (w/v) yeast extract ใน 80% (v/v) base mixture ปริมาตร 100 มล. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 65 °C ใน shaking incubator เขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 48 ชม. นำน้ำเลี้ยงที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ออกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C

2.2.2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5 α with pUC19

เตรียม preculture ในอาหารเหลว โดยใช้ loop เชี่ยเชื้อ จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงในอาหารเหลว LB medium ปริมาตร 100 มล. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 ° ซ ใน shaking incubator เขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 18 ชม. แล้วนำไปเลี้ยง culture โดยใช้ preculture ปริมาตร 1 มล. ใน LB medium ปริมาตร 100 มล. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 ° ซ ใน shaking incubator เขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชม. นำน้ำเลี้ยงที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ออกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 ° ซ

2.2.3 การโคลนยีนโปรตีนเอส

2.2.3.1 การสกัดจีโนมคิตีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* TLS33⁽¹⁷⁾

สารเคมี

- ก. TE buffer pH 7.4 (10mM Tris HCl pH 7.4, 0.1mM EDTA pH 8.0) ผสม 0.1M Tris-HCl pH 7.4 10 มล. กับ 0.1M EDTA pH 8.0 1 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionize เป็น 100 มล. นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave)
- ข. 10% w/v SDS
ซึ่ง Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 กรัม ละลายในน้ำ deionize ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 100 มล.
- ค. 20 มก./มล Proteinase K
ซึ่ง Proteinase K 20 มก. ละลายด้วยน้ำ deionize 1 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ
- ง. 24 :1 Chloroform/ Isoamyl alcohol
ผสม Chloroform กับ Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน Chloroform 24 ส่วน ต่อ Isoamyl alcohol 1 ส่วน เก็บไว้ในขวดสีชา
- จ. 25:24:1 Phenol/ Chloroform/ Isoamyl alcohol (Buffer phenol)
ผสมสารละลาย Saturated phenol 1 ส่วน ต่อสารละลาย 24 :1 Chloroform/ Isoamyl alcohol 1 ส่วน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 ° ซ
Saturated phenol เตรียมได้จาก

เติม 0.5 กรัม 8-hydroxyquinoline ใน สารละลาย phenol 500 มล. และเติม 50 mM Tris base 500 มล. ลงไป นำไปกวนเบาๆ ให้เข้ากันประมาณ 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม 50 mM Tris-HCl pH 8.0 500 มล. ลงไปกวนเบา ๆ แล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้นแล้วดูดสารละลาย

ส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำจนกว่าสารละลาย Phenol มี pH ประมาณ 8.0 โดยใช้กระดาษ pH ในการตรวจสอบ นำสารละลาย Saturated phenol ที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °ซ โดยเก็บไว้ใช้ได้ประมาณ 2 เดือน

จ. 70% Ethanol

ผสม Absolute Ethanol 70 มล. ด้วยน้ำ deionize ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปรับ ปริมาตรเป็น 100 มล.

ข. 3 M Sodium acetate pH 5.2

ชั่ง Sodium acetate 24.6 กรัมละลายด้วยน้ำ deionize แล้วปรับ pH เป็น 5.2 ด้วย Acetic acid ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave

ค. 10 มก./มล. RNase A

ชั่ง RNase A 10 มก. ละลายด้วย Tris-HCl pH 7.5 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ (ก่อนนำไปใช้ต้องนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °ซ นาน 15 นาที)

ณ. Isopropanol

วิธีทดลอง

ทำการเลี้ยง *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ในอาหารเลี้ยงปริมาณ 100 มล. ที่อุณหภูมิ 65 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำ culture ที่ได้ใส่ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มล. ปั่นเก็บเซลล์ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ที่ 6,000 rpm 10 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งไปเหลือแต่เซลล์ ทำการกระจายเซลล์ในสารละลาย TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 9.5 มล. เติม 10% SDS 0.5 มล. และ 20 มก./มล. Proteinase K ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มล.) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 1 ชม. (หรือจนกว่าสารละลายจะมีลักษณะใสและหนืด) โดยใช้ flip-flop shaker ช่วยเขย่าเบา ๆ เติมสารละลาย buffer phenol ปริมาณ 2 เท่าตัว ผสมให้เข้ากันโดยการปิดฝาหลอดแล้วพลิกไปมาเบา ๆ หลาย ๆ ครั้งแล้วนำไป centrifuge 10 นาที ดูดส่วนใสขึ้นบนมาสกัดซ้ำด้วย buffer phenol อีก 2 ครั้งหรือจนกว่าจะไม่เห็นตะกอนขาวระหว่างชั้น phenol ที่อยู่ชั้นล่างกับสารละลายชั้นบน นำสารละลายใสขึ้นบนมาสกัดด้วย 24:1 chloroform/isoamyl alcohol ปริมาณเท่าตัวอีก 2 ครั้ง ดูดสารละลายใสขึ้นบนใสในหลอดใหม่ แล้วเติม RNase A ลงไปในสารละลายให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 1 ชม. สกัดสารละลายด้วย buffer phenol 3 ครั้งและ 24:1 chloroform/isoamyl alcohol 2 ครั้ง

นำสารละลายที่ได้มาเติมด้วย 3M Sodium acetate pH 5.2 ปริมาณ 1/10 ของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันแล้วเติม Isopropanol ปริมาณเท่าตัวลงไปผสมให้เข้ากันเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาทีแล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็วสูงสุดนาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70% Ethanol 2 ครั้ง ทำให้แห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 7.4 แบ่งสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปหาปริมาณและความบริสุทธิ์ ส่วนที่เหลือนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อเก็บไว้ใช้งานในลำดับต่อไป

ข้อควรระวัง ในขั้นตอนการสกัดโปรตีนด้วยฟีนอลควรค่อย ๆ พลิกหลอดไปมาเบา ๆ

หมายเหตุ ก. ปริมาณดีเอ็นเอหาได้จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260นาโนเมตร โดยดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล. จะมีค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ($A_{260\text{nm}}$) เท่ากับ 1.0⁽²²⁾

ข. ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอหาได้จากการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรเทียบกับที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280})⁽²²⁾ ถ้าค่าที่ได้อยู่ในช่วง 1.8 - 2.0 ถือว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์พอที่จะนำไปใช้ในงานด้านพันธุวิศวกรรมได้

2.2.3.2 การสกัดดีเอ็นเอพลาหะ pUC19 จากแบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5 α สารเคมี⁽²²⁾

ก. GTE solution (50 mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0)

ในการเตรียมสารละลาย GTE จะเตรียมสารแยกกันเวลาใช้จึงจะนำมาผสมกัน

ก.1 1 M glucose ชั่งกลูโคส 19.817 กรัมละลายในน้ำ deionize ปริมาตรเป็น 100 มล. แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่าน membrane ที่มีรูขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ก.2 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 ชั่ง Tris (Hydroxymethyl) aminomethane 1.2114 กรัม ละลายในน้ำ deionize ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล. นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave

ก.3 0.1 M EDTA ชั่ง Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 3.7224 กรัม ละลายในน้ำ deionize ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล. นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave

GTE เตรียมได้จาก ผสม 1M glucose 0.5 มล. , 0.1M Tris-HCl pH 8.0 2.5 มล. และ 0.1 M EDTA pH 8.0 1 มล. เข้่าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionize ที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็น 10 มล. เก็บไว้ที่ 4 °ซ

ข. Lysis solution (0.2N NaOH, 1% SDS)

Lysis solution จะเตรียมเมื่อเวลาต้องการใช้โดยไม่มีการเตรียมเก็บไว้ โดยจะเตรียมแยกกันเวลาใช้จึงนำผสมกัน

ข.1 1N NaOH ซึ่ง Sodium hydroxide 4 กรัม ละลายในน้ำ deionize แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.นำไปฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

ข.2 10% SDS ซึ่ง Sodium dodecyl sulfate 10 กรัม ละลายน้ำ deionize แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

นำ 1N NaOH มา 2 มล. ผสมกับ 10% SDS แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionize แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

ค. 3M Sodium acetate pH 5.2

ง. TE buffer pH 7.4

จ. 70% Ethanol

ฉ. Isopropanol

ช. 10 มก./มล. RNase A

ซ. Buffer phenol

ณ. 24:1 Chloroform/Isoamyl alcohol

วิธีทดลอง

ทำการเลี้ยง *Escherichia coli* DH5 α with pUC19 ในอาหารเลี้ยงปริมาตร 100 มล. ที่อุณหภูมิ 37^oซ เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 24 ชม. นำ culture ที่ได้ใส่หลอด centrifuge ปริมาตร 50 มล.แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 rpm 10 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง แล้วทำการกระจายเซลล์ด้วย GTE ปริมาตร 1 มล.ดูดสารละลายใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 500 ไมโครลิตร เติม lysis solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปเขย่าให้เข้ากันเบา ๆ ด้วย flip-flop shaker จนกว่าสารละลายจะใสและเหนียว นำสารละลายที่ได้แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วเติม 3M Sodium acetate pH 5.2 ลงไป 375 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันนำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที นำสารละลายเซลล์ที่ได้ centrifuge ด้วยความเร็ว 10,000 rpm 10 นาทีแล้วดูดสารละลายใส่ใน microcentrifuge tube หลอดละ 500

ไมโครลิตร เติม Isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลอดเขย่าผสมกันเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 rpm 5 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้งแล้วนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้แห้ง โดยคว่ำหลอดไว้บนกระดาษทิชชูจนตะกอนแห้ง เติม 70% Ethanol ลงไป 500 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 rpm 2 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง นำตะกอนดีเอ็นเอไปทำให้แห้งแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer pH 7.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 10 มก./มล. RNase A ลงไป 10 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชม. นำสารละลายที่ได้ไปสกัดด้วย buffer phenol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 rpm 5 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนมาสกัดด้วย 24:1 chloroform/isoamyl alcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 rpm 3 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่แล้วเติม 3M Sodium acetate pH 5.2 ลงไป 1/10 ของปริมาตรสารละลายใส ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติม isopropanol ปริมาณ 1 เท่าลงไป เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำสารละลายที่ได้ปั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm 5 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้งแล้วทำตะกอนให้แห้งจากนั้นเติม 70% Ethanol ลงไป 500 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 rpm 2 นาที เทสารละลายทิ้งไป นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้แห้ง แล้วเติม TE buffer pH 7.4 ลงไป 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ส่วนหนึ่งไปหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ส่วนที่เหลือนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อไว้ใช้งานในลำดับต่อไป

2.2.3.3 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ก. การตัดจีโนมดีเอ็นเอด้วยวิธี Partial digestion ⁽⁴⁹⁾

ก.1 การตัดดีเอ็นเอแบบจำกัดเวลาแต่ไม่จำกัดปริมาณเอนไซม์

ใส่จีโนมดีเอ็นเอของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 10 ไมโครกรัม ลงในหลอด microcentrifuge เติม 10X Sau 3AI buffer 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionize เป็น 100 ไมโครลิตร ดูดสารละลายที่ได้ใส่หลอด microcentrifuge หลอดที่ 1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หลอดที่ 2-9 หลอดละ 10 ไมโครลิตร เติม Sau 3AI ความเข้มข้น 1 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1 ผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายในหลอดที่ 1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายในหลอดที่ 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 3 ทำซ้ำขั้นตอนแบบเดิมจนถึงหลอดที่ 8 ทำการดูดสารละลายในหลอดที่ 8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรทิ้งไป ส่วนหลอดที่ 9 เก็บไว้ทำ control นำสาร

ละลายทั้ง 9 หลอด ไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °ซ 1 ชม. แล้วทำการเติม 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ลงในทุกหลอด (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 mM) เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ นำสารละลายทั้ง 9 หลอด ไปทำ Agarose gel electrophoresis เทียบกับ λ DNA marker

ก.2 การตัดดีเอ็นเอแบบจำกัดปริมาณเอนไซม์แต่ไม่จำกัดเวลา

ใส่จีโนมดีเอ็นเอ ของ *Bacillus stearothermophilus* TLS33 6 ไมโครกรัม ลงในหลอด microcentrifuge เติม 10X *Sau* 3AI buffer 6 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionize เป็น 54 ไมโครลิตร เติม *Sau* 3AI ความเข้มข้น 0.025 ยูนิท/ไมโครลิตร ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มี 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร เพื่อทำเป็น control นำสารละลายที่เหลือไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °ซ ทำการดูดสารละลายในหลอดที่เวลา 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที ครั้งละ 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มี 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ที่เตรียมไว้เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปทำ Agarose gel electrophoresis เทียบกับ λ DNA marker

ข. การตัดดีเอ็นเอพาหะด้วยวิธี Complete digestion^(17.49)

ใส่ดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ลงในหลอด microcentrifuge จำนวน 5 หลอด หลอดละ 1 ไมโครลิตร เติม 10X *Bam* HI buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดแล้วเติมน้ำ deionize ลงในหลอดที่ 1- 5 ตามลำดับดังนี้ 8, 7, 6, 5 และ 4 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ *Bam* HI ความเข้มข้น 1 ยูนิท/ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 2-5 ปริมาตร 1, 2, 3 และ 4 ไมโครลิตร ตามลำดับ นำสารละลายทั้ง 5 หลอด ไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °ซ 1 ชม. แล้วเติม 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ลงในทุกหลอด นำสารละลายทั้ง 5 หลอด ไปทำ Agarose gel electrophoresis เทียบกับ λ DNA marker

หมายเหตุ ก. ความเข้มข้นของเอนไซม์ *Sau* 3AI ที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอแบบจำกัดปริมาณเอนไซม์แต่ไม่จำกัดเวลาในการทดลอง ก.2 ได้มาผลจากการทดลอง ก.1

ข. หลังจากทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์แล้ว ดีเอ็นเอที่ได้จะถูกนำไปทำความสะอาดโดยการสกัดด้วย buffer phenol แล้วทำการตกตะกอนดีเอ็นเอและล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol จากนั้นจะละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer เพื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ในงานขั้นต่อไป

2.2.3.4 การทำ Agarose gel electrophoresis⁽¹⁷⁾

วิธีเตรียมสาร

ก. 50X Tris- acetate (TAE) Buffer (Concentrate stock solution)

ชั่ง Tris (Hydroxymethyl) aminomethane 249 กรัม ผสมกับ glacial acetic acid 57.1 มล. และ 0.5 M EDTA pH 8.0 100 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร (เวลาใช้จะทำให้เจือจางลง 50 เท่า)

ข. Loading buffer (6X Buffer)

ผสม Bromophenol blue 0.025 กรัม และ Glycerol 3 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^oC (ปริมาณที่ใช้จะเป็น 1/6 ของปริมาตรรวมของสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย)

ค. Ethidium Bromide (ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม/มล.)

Ethidium Bromide (Stock solution ความเข้มข้น 10 มก./มล.) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วย 1X TAE Buffer

(Ethidium Bromide ที่ใช้แช่เจลแล้วสามารถนำกลับมาใช้แช่เจลใหม่ได้อีก เวลาใช้ไม่ควรให้ Ethidium Bromide สัมผัสถูกผิวหนัง)

วิธีทดลอง

ทำการเตรียม 0.8% เจล โดยชั่งผง agarose 0.8 กรัม ละลายใน 1X TAE Buffer ปริมาตร 100 มล. นำไปต้มให้เดือดแล้วนำมาเทลงในถาดของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสขณะอุ่น โดยให้เจลมีความหนาประมาณ 0.8 ซม. นำหัวเสียบ (comb) มาเสียบไว้ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวแล้วดึงหัวเสียบออก นำไปวางบน chamber ของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส เเท 1X TAE Buffer ลงไปให้ท่วมเจล

ผสม loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอ และสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด แล้วนำไปหยอดลงในช่องของ agarose gel ทำการปล่อยกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้า 45 โวลท์ เมื่อเห็นสีของ Bromophenol blue เคลื่อนที่ไปประมาณ 2/3 ของความยาวเจล จึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า แช่เจลที่ได้ใน Ethidium Bromide 10 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำ 2-3 ครั้ง ๆ ละ 10-15 นาที นำแผ่นเจลที่ได้มาส่องดูด้วย UV transilluminator ทำการวัดระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่นำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์กับ ค่า Log DNA fragment size เพื่อใช้ในการหาขนาดดีเอ็นเอ

2.2.3.5 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

สารเคมี

- ก. จีโนมิคดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI (ความเข้มข้น 0.025 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)
จีโนมิคดีเอ็นเอถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI ความเข้มข้น 0.025 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ นาน 75 นาที
- ข. ดีเอ็นเอพาหะที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI (ความเข้มข้น 0.025 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอพาหะถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI ความเข้มข้น 2 ยูนิท/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ นาน 1 ชม.
- ค. T4 DNA Ligase
- ง. 5X Ligase Reaction Buffer

วิธีทดลอง

เติมองค์ประกอบต่าง ๆ ดังต่อไปนี้เข้าด้วยกันในหลอด microcentrifuge

5X Ligase Reaction Buffer	4	μl
ดีเอ็นเอพาหะที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI	1	μl
จีโนมิคดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ <i>Sau</i> 3AI	3	μl
T4 DNA Ligase (0.1U/μl)	1	μl
น้ำ deionize ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	11	μl

นำสารละลายดีเอ็นเอผสมไปปั่นที่อุณหภูมิ 23-26 °C นาน 3 ชม. หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยการเติม 50 mM EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำการ transform ในลำดับต่อไป

2.2.3.6 การเตรียม Competent cell ด้วยวิธี Calcium chloride method⁽²²⁾

นำ preculture ของ *Escherichia coli* DH5α ปริมาตร 0.5 มล. ใส่ใน culture ที่เป็น LB medium ปริมาตร 50 มล. แล้วทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-4 ชม. หรือจนกว่าวัดความขุ่นของเซลล์ที่ OD₅₅₀ ได้ 0.3 - 0.4 (log phase) จากนั้นนำ culture ที่ได้ แช่ในน้ำแข็ง นาน 5-10 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง ทำการกระจายเซลล์ที่ได้ด้วย 0.1 M CaCl₂ ที่เย็น ปริมาตร 25 มล.

แล้วนำสารละลายเซลล์แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 4^oC นาน 10 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง ทำการกระจายเซลล์ที่ได้ด้วย 0.1 M CaCl₂ ที่เย็น ปริมาตร 2 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^oC ได้นานประมาณ 1 อาทิตย์

2.2.3.7 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยวิธี Transformation^(17,26)

สารเคมี

- ก. Competent cell
- ข. SOC medium
(SOC medium ประกอบด้วย 2% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ และ 20 mM glucose)
- ค. Skim milk agar plate ที่มี Ampicillin ผสมอยู่

วิธีทดลอง

เติมดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากการทดลอง 2.2.3.4 ลงในหลอด microcentrifuge ที่มี competent cell ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารเบา ๆ แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที ทำการ heat shock เซลล์ที่ได้ โดยนำไปแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42^oC นาน 90 วินาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 2 นาที เติม SOC medium ปริมาตร 0.8 มล. ลงไป นำเซลล์ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37^oC นาน 1 ชม. เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm จากนั้นทำการ spread เซลล์ลงใน Skim milk agar plate ที่มี Ampicillin ผสมอยู่ โดยใช้ปริมาตร 100-200 ไมโครลิตร ต่อ Skim milk agar plate 1 แผ่น นำ Skim milk agar plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^oC เพื่อทำการคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับการโคลนยีนโปรตีน โดยดูจากการขึ้นได้และการเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนี

หมายเหตุ ในการเตรียม SOC medium จะทำการเตรียม MgSO₄ และ Glucose แยกไป sterile ต่างหาก แล้วค่อยนำมาผสมในภายหลัง (MgSO₄ และ Glucose ทำการ sterile โดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีรูขนาด 0.22 ไมโครเมตร)

2.2.3.8 การหาแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรตีนเอสโดย วิธี Azocasein hydrolysis^(14,15)

สารเคมี

- ก. 0.02 M Tris-HCl buffer pH 7.0 ที่มี 5 mM CaCl₂

ซึ่ง Tris 1.2114 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย 1 M HCl ให้พีเอชเท่ากับ 7.0
เติม $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.3675 กรัม ลงไปในสารละลายบัฟเฟอร์ ปรับปริมาตรให้ได้ 500
มล.

ข. 0.2% (w/v) azocasein ใน 0.02 M Tris-HCl buffer pH 7.0

ซึ่ง azocasein 0.02 กรัม ละลายใน 0.02 M Tris-HCl buffer pH 7.0 ที่มี 5 mM
 CaCl_2 ปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

ค. 10% Trichloroacetic acid (TCA)

ซึ่ง TCA 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

ง. 0.5 M NaOH

ซึ่ง NaOH 2.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

จ. สารละลายเอนไซม์

วิธีทดลอง

ใส่ 0.2% (w/v) azocasein 1 มล. ลงในหลอดทดลอง และนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65°C 5
นาที เติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 มล. (ถ้ามีแอกทิวิตีมากควรทำให้สารละลายเจือจางก่อนเพราะ
azocasein substrate อาจจะไม่เพียงพอในการ hydrolysis ของเอนไซม์) นำไป incubate ที่
อุณหภูมิ 65°C 1 ชม. เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 10% TCA 2 มล.
แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C 2 ชม. (หลอดที่เป็น blank จะเติมสารละลายเอนไซม์หลังหยุด
ปฏิกิริยาด้วย 10% TCA) ทำการปั่นแยกตะกอนสารละลายที่ได้ด้วยความเร็ว 10,000 rpm 10
นาที นำสารละลายใสเหนือตะกอนมาเติมด้วย 0.5 M NaOH ในอัตราส่วน 1:1 นำไปวัดค่าการดูด
กลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร **หนึ่งหน่วยโปรตีน** หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์
ที่ไม่ตกตะกอนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 ต่อหนึ่งชั่วโมง

หมายเหตุ ในการหาแอกทิวิตีใช้เอนไซม์ 0.5 มล. และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 1 ชม.
แอกทิวิตีของเอนไซม์จะมีค่าเท่ากับ $A \times (1/0.5)$ โดยที่ A คือค่าการดูดกลืนแสงที่
ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

2.2.3.9 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการโคลนยีน^(14,15)

ก. การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก Cloned TLS33

เตรียม preculture ในอาหารเหลว โดยใช้ loop เชื้อเชื้อ Cloned TLS33 จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มล. ที่ประกอบด้วย 0.25% (w/v) Skim milk, 0.1% (w/v) yeast extract ใน 80% (v/v) base mixture และ Ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มล. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ ใน shaking incubator เขย่าที่ 200rpm เป็นเวลา 18 ชม. แล้วนำไปเลี้ยง culture โดยใช้ preculture ปริมาตร 1 มล. ใน culture medium ปริมาตร 100 มล. ที่ประกอบด้วย 0.25% (w/v) Skim milk, 0.1% (w/v) yeast extract ใน 80% (v/v) base mixture และ Ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มล. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ ใน shaking incubator เขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 52 ชม. ทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชม. เพื่อติดตามผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยนำมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และนำน้ำเลี้ยงที่ได้มาปั่นแยก crude enzyme ออกมาหาแอกทิวิตีโดยวิธี Azocasein hydrolysis

ข. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาแอกทิวิตีโดยวิธี Azocasein hydrolysis เพียงแต่นำเอนไซม์ที่ได้จาก Cloned TLS33 ไป incubation ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เริ่มตั้งแต่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 และ 90⁰ซ ตามลำดับ และทำการศึกษาเปรียบเทียบไปพร้อมกับโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33

ค. การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาแอกทิวิตีโดยวิธี Azocasein hydrolysis แต่ใช้ 0.2 (w/v) azocasein ละลายในบัฟเฟอร์ที่พีเอช ต่าง ๆ ตั้งแต่ พีเอช 4 – 10 ดังแสดงตารางที่ 2.1 และทำการศึกษาเปรียบเทียบไปพร้อมกับโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33

ตารางที่ 2.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.02 M ที่มี 5 mM CaCl₂ ที่ พีเอช ต่าง ๆ ปริมาตร 1 ลิตร

PH	pKa	สารและปริมาณ
4	4.76	Sodium acetate 0.2429 กรัม + acetic acid 1.03 มล. + Calcium chloride 0.735 กรัม
5	4.76	Sodium acetate 1.0413 กรัม + acetic acid 0.44 มล. + Calcium chloride 0.735 กรัม
6	7.21	Dipotassiumhydrogen phosphate 0.2023 กรัม + potassiumdihydrogenphosphate 2.5637 กรัม + Calcium chloride 0.735 กรัม ปรับ pH ด้วย 1M HCl
7	8.08	Tris(Hydroxymethyl) aminomethane 2.4228 กรัม + Calcium chloride 0.735 กรัม ปรับ pH ด้วย 1M HCl
8	8.08	Tris(Hydroxymethyl) aminomethane 2.4228 กรัม + Calcium chloride 0.735 กรัม ปรับ pH ด้วย 1M HCl
9	8.08	Tris(Hydroxymethyl) aminomethane 2.4228 กรัม + Calcium chloride 0.735 กรัม ปรับ pH ด้วย 1M HCl
10	9.78	Glycine 1.5014 กรัม + Calcium chloride 0.735 กรัม ปรับ pH ด้วย 1M NaOH

ง. การศึกษาความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาแอกติวิตีโดยวิธี Azocasein hydrolysis แต่แช่เอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหาแอกติวิตี โดยเริ่มที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 และ 90⁰ซ ตามลำดับ และทำการศึกษาเปรียบเทียบไปพร้อมกับโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33

จ. การศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสภายในและภายนอกเซลล์

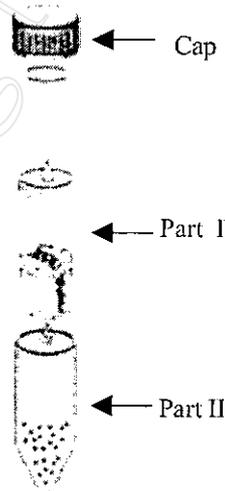
เลี้ยง culture ของ Cloned TLS33 โดยใช้ preculture ปริมาตร 1 มล. ใน culture medium ปริมาตร 100 มล. ที่ประกอบด้วย 0.25% (w/v) Skim milk, 0.1% (w/v) yeast extract

ใน 80% (v/v) base mixture และ Ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มล. ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ ใน shaking incubator เหย้าที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชม. นำน้ำเลี้ยงมาปั่นแยก crude enzyme ออกมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อนำมาใช้หาแอกทิวิตีของโปรตีนนอกเซลล์ ส่วนตะกอนเซลล์ที่ได้นำมากระจายเซลล์ด้วย 20 mM Tris-HCl pH 7.0 ปริมาตร 20 มล. แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sonicator จากนั้นปั่นแยกกากเซลล์ออกไป เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้หาแอกทิวิตีของโปรตีนในเซลล์ ทำการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรตีนด้วยวิธี Azocasein hydrolysis โดยหาแอกทิวิตีของโปรตีนที่ อุณหภูมิ 50 °ซ

- หมายเหตุ
- *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ทำการหาแอกทิวิตีภายในและภายนอกเซลล์ด้วยวิธีเดียวกัน แต่จะหาแอกทิวิตีที่อุณหภูมิ 65 °ซ
 - แอกทิวิตีของเอนไซม์โปรตีนในเซลล์จะมีค่าเท่ากับ Bx(20/100) ยูนิท/มล. โดยที่ B คือ แอกทิวิตีของโปรตีนที่หาได้จากวิธี Azocasein hydrolysis

2.2.3.10 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนที่ได้จากการโคลนยีน

ก. การทำให้สารละลายโปรตีนเข้มข้นขึ้น



รูปที่ 2.1 ชุดอุปกรณ์ Vivaspin

การทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นจะใช้ชุด Vivaspin 20 ของบริษัท Vivascience (รูปที่ 2.1) ซึ่งมี Molecular weight cut off 10,000 โดยทำการเติมสารละลายโปรตีนปริมาตร 20 มล. ลงใน

ส่วนที่ 1 ซึ่งต่ออยู่กับส่วนที่ 2 ปิดฝาหลอดแล้วนำไป centrifuge ที่ 5,000 rpm 10 นาที เติสารละลายที่ลงมาอยู่ในส่วนที่ 2 ทิ้งไป ทำการ centrifuge ซ้ำอีกจนกว่าสารละลายในส่วนที่ 1 มีปริมาตรลดลงน้อยกว่า 0.5 มล. โดยดูได้จากขีดบอกระดับที่อยู่ข้างหลอด ดูดสารละลายโปรตีนที่เหลืออยู่ในส่วนที่ 1 เก็บไว้เพื่อใช้หาปริมาณโปรตีน

ข. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding assay ^(14,27)

การเตรียมสาร

- ข.1 โปรตีนมาตรฐาน BSA (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 1 มก./มล.
ซึ่ง BSA 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มล.
- ข.2 Dye reagent (Coomassie brilliant blue G-250) ความเข้มข้น 0.1 มก./มล.
ซึ่ง Coomassie brilliant blue G-250 0.010 กรัม ละลายด้วย 99.8% เอทานอล 4.7 มล. และเติม 85% กรดฟอสฟอริก 8.5 มล. คนให้เข้ากันแล้วใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปรับปริมาตร นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 และเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ
- ข.3 0.15 M NaCl
ซึ่ง NaCl 0.8775 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล.

วิธีทดลอง

เตรียมสารดังตารางที่ 2.1 โดยกำหนดให้หลอดที่ 1 เป็น blank หลอดที่ 2-6 ใส่โปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 1 มก./มล. และหลอดที่ 7 ใส่สารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน ส่วน dye reagent ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. จะเติมเป็นลำดับสุดท้าย จากนั้นเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำข้อมูลการดูดกลืนแสงของหลอดที่ 1-6 ไปเขียนกราฟโปรตีนมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอด ส่วนหลอดที่ 7 นำไปเทียบหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

ตาราง ที่ 2.2 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding assay

สาร (ml)	หลอดที่						
	1	2	3	4	5	6	7
BSA (1มก./มล.)	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	-
สารตัวอย่าง	-	-	-	-	-	-	0.50
น้ำกลั่น	0.60	0.59	0.58	0.57	0.56	0.55	0.10
0.15 M NaCl	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
dye reagent	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30
ปริมาณโปรตีนมาตรฐาน (ไมโครกรัม)	0	10	20	30	40	50	-

ค. การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีเอสโดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)⁽¹⁷⁾

วิธีเตรียมสาร

ค.1 Stock acrylamide

ประกอบด้วย 30 % (w/v) acrylamide และ 0.8% (w/v) bis- acrylamide เตรียมโดย ชั่ง acrylamide 30 กรัม และ bis- acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับ ปริมาตรให้ครบ 100 มล. นำไปกรองผ่านกระดาษกรองแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่ อุณหภูมิ 4^oซ

ค.2 Separating gel buffer : 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

ชั่ง Tris (Hydroxymethyl) aminomethane 18.1710 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับ พีเอชเป็น 8.8 ด้วย 6M HCl และปรับปริมาตรจนครบ 100 มล.

ค.3 Stacking gel buffer :0.5 M Tris-HCl pH 6.8

ชั่ง Tris (Hydroxymethyl) aminomethane 6.0570 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับ พีเอชเป็น 6.8 ด้วย 6M HCl และปรับปริมาตรจนครบ 100 มล.

ค.4 Electrode buffer

ชั่ง Tris (Hydroxymethyl) aminomethane 3.0 กรัม , Glycine 14.4 กรัม และ 10%SDS 10 มล. ละลายในน้ำกลั่นปรับพีเอชเป็น 8.3 และปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

ค.5 10% Ammonium persulfate

ชั่ง Ammonium persulfate 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มล. (เตรียมใหม่ทุกครั้ง
เตรียมเจล)

ค.6 Tetramethyl ethylenediamine (TEMED)

ค.7. 10% (w/v) SDS

ชั่ง Sodium dodecyl sulfate 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล.

ค.8 Staining solution

ชั่ง coomassie brilliant blue R250 0.5 กรัม ละลายใน Methanol 200 มล. เติม
Acetic acid 50 มล. และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มล. นำไปกรองแล้ว
เก็บไว้ในขวดสีชา

ค.9 Destaining solution

ผสม Methanol 400 มล. กับ Acetic acid 100 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ
1 ลิตร

ค.10. Sample buffer

เตรียมโดยผสมสารต่าง ๆ ในอัตราส่วนดังนี้

น้ำ	4.8	มล.
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.2	มล.
10% SDS	2.0	มล.
Glycerol	1.0	มล.
0.5% Bromophenol Blue (w/v)	0.5	มล.

SDS reducing buffer เตรียมโดยใส่ 50 ไมโครลิตร ของ 2-mercaptoethanol
ใน 0.95 มล. ของ sample buffer ก่อนที่จะใช้

ค.11 ชุดโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล

ค.12 สารละลายเอนไซม์โปรติเอสเข้มข้น

สารละลายเอนไซม์โปรติเอสเข้มข้นได้จากการทำให้เอนไซม์โปรติเอสเข้มข้นขึ้นโดย
ใช้ชุดอุปกรณ์ Vivaspin และทำการหาปริมาณโปรตีนที่ได้โดยวิธี Dye binding
assay

วิธีเตรียมเจล

ก. Separating gel (10% acrylamide) ปริมาตร 10 มล. ประกอบด้วย

Stock acrylamide	3.3	มล.
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5	มล.
น้ำกลั่น	4.05	มล.
10% Ammonium persulfate	50	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร
10% SDS	0.1	มล.

ข. Stacking gel (4% acrylamide) ปริมาตร 10 มล. ประกอบด้วย

Stock acrylamide	1.3	มล.
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	2.5	มล.
น้ำกลั่น	6.05	มล.
10% Ammonium persulfate	50	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร
10% SDS	0.1	มล.

วิธีทดลอง

เท็ดชุดเครื่องมือ electrophoresis ด้วย ethanol แล้วประกอบชุดแผ่นกระจก Slab gel เข้าด้วยกัน ผสมสารละลายของ Separating gel ตามข้อ ก. แล้วใช้ไปเปิดดูดูไปใส่ลงในแผ่นกระจก Slab gel ตรงช่องว่างระหว่างกระจกจนมีความสูงจากขอบล่างประมาณ 6 ซม. เติมน้ำกลั่นลงไปบนหน้าเจลเพื่อให้หน้าเจลเรียบ ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชันประมาณ 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง จนได้เจลที่แข็งตัวสมบูรณ์ แล้วจึงเทน้ำออกจากหน้าเจลและใช้กระดาษทิชชูช่วยซับน้ำออกให้หมด ผสมสารละลายของ Stacking gel ตามข้อ ข. แล้วใช้ไปเปิดดูดูไปใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกต่อจากส่วน Separating gel และเสียบแผ่นหวีตามทันที เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับหยดสารละลายตัวอย่าง ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที ประกอบชุดอิเล็กโตรไฟรีซิส เข้าด้วยกัน เติมน้ำ electrophoresis buffer ลงไป chamber บนและล่างให้เต็ม และค่อย ๆ ดึงแผ่นหวีออก

เตรียมสารละลายเอนไซม์และสารละลายโปรตีนมาตรฐานโดยการผสมสารละลายกับ SDS-reducing buffer ในอัตราส่วน 1:1 ต้มสารละลายที่ 90°C เป็นเวลา 4 นาที ใส่สารละลายเอนไซม์ และสารละลายโปรตีนมาตรฐานลงไปบนเจลในแต่ละช่อง ต่อด้วยไฟฟ้าลบและบวกเข้ากับ power supply โดยใช้กระแสไฟฟ้า 18 มิลลิแอมป์ รอจนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของ

bromophenol blue เคลื่อนที่ไปจนถึงปลายด้านล่างของ separating gel หยุดผ่านกระแสไฟฟ้า และถอดชุดเครื่องมือและแผ่นเจลออก ล้างด้วยน้ำกลั่นและแช่ลงใน staining solution 30 นาที แล้วทำการล้างสีย้อมออกด้วย destaining solution หลาย ๆ ครั้งจนมองเห็นแถบโปรตีนวัดระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่เทียบกับความยาวเจลที่ bromophenol blue เคลื่อนที่ นำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า Relative mobility (Rm) แล้วเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Rm กับ log MW เพื่อใช้หาขนาดโปรตีน

ง. การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนเอสโดยวิธี Zymography ชนิด SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)⁽⁴⁸⁾

วิธีเตรียมสาร

ง.1 Stock acrylamide

ประกอบด้วย 30 % (w/v) acrylamide และ 0.8% (w/v) bis- acrylamide เตรียมโดยชั่ง acrylamide 30 กรัม และ bis- acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. นำไปกรองผ่านกระดาษกรองแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C

ง.2 Separating gel buffer : 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

ชั่ง Tris (Hydroxymethyl) aminomethane 18.1710 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับพีเอชเป็น 8.8 ด้วย 6M HCl และปรับปริมาตรจนครบ 100 มล.

ง.3 Stacking gel buffer :0.5 M Tris-HCl pH 6.8

ชั่ง Tris (Hydroxymethyl) aminomethane 6.0570 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วย 6M HCl และปรับปริมาตรจนครบ 100 มล.

ง.4 Electrode buffer

ชั่ง Tris (Hydroxymethyl) aminomethane 3.0 กรัม, Glycine 14.4 กรัม และ 10%SDS 10 มล. ละลายในน้ำกลั่นปรับพีเอชเป็น 8.3 และปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

ง.5 10% Ammonium persulfate

ชั่ง Ammonium persulfate 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มล. (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้เตรียมเจล)

ง.6 Tetramethyl ethylenediamine (TEMED)

ง.7 10% (w/v) SDS

ซึ่ง Sodium dodecyl sulfate 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล.

ง.8 Staining solution

ซึ่ง coomassie brilliant blue R250 0.5 กรัม ละลายใน Methanol 200 มล. เติมน้ำ Acetic acid 50 มล. และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มล. นำไปกรองแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

ง.9 Destaining solution

ผสม Methanol 400 มล. กับ Acetic acid 100 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

ง.10 Sample buffer

เตรียมโดยผสมสารต่าง ๆ ในอัตราส่วนดังนี้

น้ำ	4.8	มล.
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.2	มล.
10% SDS	2.0	มล.
Glycerol	1.0	มล.
0.5% Bromophenol Blue (w/v)	0.5	มล.

SDS reducing buffer เตรียมโดยใส่ 50 ไมโครลิตร ของ 2-mercaptoethanol ใน 0.95 มล. ของ sample buffer ก่อนที่จะใช้

ง.11 20 mM Tris-HCl pH 7.0

ซึ่ง Tris (Hydroxymethyl) aminomethane 1.2114 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับพีเอช เป็น 7.0 ด้วย 1M HCl และปรับปริมาตรจนครบ 500 มล.

ง.12 1% Triton X-100

ผสม 10 มล. Triton X-100 กับ 20 mM Tris-HCl pH 7.0 ปริมาตร 990 มล.

ง.13 ชุดโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล

ง.14 สารละลายเอนไซม์โปรตีนเอสที่ทราบปริมาณแอกทิวิตี

วิธีเตรียมเจล

ก. Separating gel (10% acrylamide) ปริมาตร 10 มล. ประกอบด้วย

Stock acrylamide	3.3	มล.
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5	มล.

น้ำกลั่น	4.05	มล.
10% Ammonium persulfate	50	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร
10% SDS	0.1	มล.
Skim milk	0.05	กรัม
ข. Stacking gel (4% acrylamide) ปริมาตร 10 มล. ประกอบด้วย		
Stock acrylamide	1.3	มล.
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	2.5	มล.
น้ำกลั่น	6.05	มล.
10% Ammonium persulfate	50	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร
10% SDS	0.1	มล.

วิธีทดลอง

เช็ดชุดเครื่องมือ electrophoresis ด้วย ethanol แล้วประกอบชุดแผ่นกระจก Slab gel เข้าด้วยกัน ผสมสารละลายของ Separating gel ตามข้อ ก. แล้วใช้ไปเปิดดูตโปใส่ลงในแผ่นกระจก Slab gel ตรงช่องว่างระหว่างกระจกจนมีความสูงจากขอบล่างประมาณ 6 ซม. เติมน้ำกลั่นลงไปบนหน้าเจลเพื่อให้หน้าเจลเรียบ ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชันประมาณ 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง จนได้เจลที่แข็งตัวสมบูรณ์ แล้วจึงเทน้ำออกจากหน้าเจลและใช้กระดาษทิชชูช่วยซับน้ำออกให้หมด ผสมสารละลายของ Stacking gel ตามข้อ ข. แล้วใช้ไปเปิดดูตโปใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกต่อจากส่วน Separating gel และเสียบแผ่นหวีตามทันที เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับหยดสารละลายตัวอย่าง ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที ประกอบชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสเข้าด้วยกัน เติมน้ำ electrophoresis buffer ลงไป chamber บนและล่างให้เต็ม และค่อย ๆ ดึงแผ่นหวีออก

เตรียมสารละลายเอนไซม์และสารละลายโปรตีนมาตรฐานโดยการผสมสารละลายกับ SDS-reducing buffer ในอัตราส่วน 1:1 ต้มสารละลายที่ 90°C เป็นเวลา 4 นาที (สารละลายโปรตีนมาตรฐานเตรียมโดยวิธีเดียวกัน) ใส่สารละลายเอนไซม์ และสารละลายโปรตีนมาตรฐานลงไปบนเจลในแต่ละช่อง ต่อขั้วไฟฟ้าลบและบวกเข้ากับ power supply โดยใช้กระแสไฟฟ้า 18 มิลลิแอมป์ รอจนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปจนถึงปลายด้านล่างของ separating gel หยุดผ่านกระแสไฟฟ้าและถอดชุดเครื่องมือและแผ่นเจลออก

ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นและแช่ลงใน 1% Triton X-100 นาน 1 ชม. แล้วนำไปแช่ใน 20 mM Tris-HCl pH 7.0 2 ครั้ง ๆ ละ 10-15 นาที นำแผ่นเจลที่ได้ไป incubate ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 15 นาที (ขณะ incubate แช่เจลใน 20 mM Tris-HCl pH 7.0 พอประมาณ ระวังอย่าให้เจลแห้ง) จากนั้นนำเจลแช่ใน staining solution 30 นาที แล้วทำการล้างสีย้อมออกด้วย destaining solution หลาย ๆ ครั้งจนมองเห็นแถบโปรตีนวัดระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่เทียบกับความยาวเจลที่ bromophenol blue เคลื่อนที่ นำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า Relative mobility (Rm)

จ. การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนเอสโดยวิธี Zymography ชนิด Native polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE)

วิธีเตรียมสาร

วิธีเตรียมสารจะเหมือนกับวิธีการเตรียมของ Zymography ชนิด SDS-PAGE จะต่างกัน คือ sample buffer จะไม่ใส่ SDS และ 2-mercaptoethanol และใส่น้ำแทน 10% SDS ในสูตรที่ใช้เตรียมเจลและ electrode buffer

วิธีทดลอง

วิธีการทดลองเหมือนกับวิธีการทดลองของ Zymography ชนิด SDS-PAGE จะต่างกัน คือ ในการเตรียมสารตัวอย่างไม่ต้องนำไปต้มเหมือนกับ Zymography ชนิด SDS-PAGE

2.2.3.11 การศึกษาขนาดยีนโปรตีนเอสที่โคลนได้

สารเคมี

ก. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI

ข. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III

ค. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI

ง. 10X *Bam* HI buffer

จ. 10X *Hind* III buffer

ฉ. 10X *Eco* RI buffer

ช. ดีเอ็นเอสายผสมจาก Cloned TLS33

ดีเอ็นเอสายผสมจาก Cloned TLS33 สกัดได้โดยวิธีเดียวกันกับการสกัดดีเอ็นเอ
พาหะในหัวข้อที่ 2.2.3.2

ซ. 0.5 M EDTA pH 8.0

วิธีทดลอง

ใส่ดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จาก Cloned TLS33 ลงในหลอด microcentrifuge 3 หลอด ๆ ละ 1 ไมโครกรัม เติม 10X *Bam* HI buffer ,10X *Hind* III buffer และ 10X *Eco* RI buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ปรับปริมาตรสารละลายในแต่ละหลอดด้วยน้ำ deionize เป็น 8 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ *Bam* HI , *Hind* III และ *Eco* RI ความเข้มข้น 1 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ แล้วนำสารละลายที่ได้ไปป้อนที่อุณหภูมิ 37⁰ซ 1 ชม. แล้วเติม 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด นำสารละลายที่ได้ไปทำ Agarose gel electrophoresis เทียบกับ λ DNA marker และดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Cloned TLS33

2.2.3.12 การเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จากการโคลนยีนโดยใช้โปรแกรม BLAST

(31,50)

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีนกับข้อมูลลำดับเบสของ GenBank ทำได้โดยเข้าไปที่ website " <http://www.blast.genome.ad.jp> " แล้วเลือกโปรแกรม BLASTN ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้เปรียบเทียบลำดับเบส จากนั้นทำการใส่ลำดับเบสของยีนดีเอ็นเอที่ต้องการเปรียบเทียบลงไปโดยกำหนดให้เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของ GenBank แล้วรอผลการเปรียบเทียบซึ่งจะส่งมาให้ทาง E-mail address ของผู้ต้องการทำการเปรียบเทียบ

2.2.4 การทำ Subcloning

2.2.4.1 การสกัดยีนโปรตีนเอสจากดีเอ็นเอสายผสม

ก. การตัดยีนโปรตีนเอสจากดีเอ็นเอสายผสม

สารเคมี

ก.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III

ก.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI

ก.3 10X *Hind* III buffer

เนื่องจาก *Eco* RI สามารถใช้ buffer ของ *Hind* III ได้โดยที่ไม่ทำให้ประสิทธิภาพของ เอนไซม์ลดลง จึงเลือกใช้ 10X *Hind* III buffer ในการเร่งปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอ

ก.4 ดีเอ็นเอสายผสมจาก Cloned TLS33

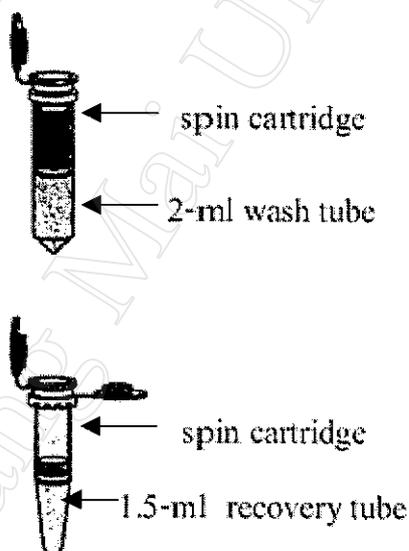
ดีเอ็นเอสายผสมจาก Cloned TLS33 สกัดได้โดยวิธีเดียวกันกับการสกัดดีเอ็นเอ พาะในหัวข้อที่ 2.2.3.2

ก.5 0.5 M EDTA pH 8.0

วิธีทดลอง

ใส่ดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จาก Cloned TLS33 ลงในหลอด microcentrifuge ประมาณ 2 ไมโครกรัม เติม 10X *Hind* III buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงในหลอดแล้วปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำ deionize เป็น 12 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ *Hind* III ความเข้มข้น 1 ยูนิต/ไมโครลิตร 4 ไมโครลิตร และ เอนไซม์ *Eco* RI ความเข้มข้น 1 ยูนิต/ไมโครลิตร 4 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37⁰ซ 1 ชม. เติม 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร ลงในหลอดเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำสารละลายไปทำ Agarose gel electrophoresis เทียบกับ λ DNA marker

ข. การศึกษาการสกัดยีนโปรตีนจาก Agarose gel



รูปที่ 2.2 ชุดอุปกรณ์ Concert rapid gel extraction

ทำการสกัดยีนโปรตีนจากเจลโดยใช้ชุดอุปกรณ์ Concert rapid gel extraction ของบริษัท GIBCO BRL (รูปที่ 2.2) ตัด agarose gel ตรงตำแหน่งของยีนโปรตีนแล้วนำไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มล. ปริมาณ 400 มก. เติม 1.2 มล. Gel solubilization buffer (L1) ลงในหลอดแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50⁰ซ นาน 15 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด นำส่วน spin cartridge สวมลงใน 2-ml wash tube เติมเจลที่ละลายแล้วลงในส่วน spin cartridge นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm 1 นาที เสร็จแล้วนำสารละลายที่อยู่ใน 2-ml wash tube ที่ทิ้ง แล้วเติมสาร

ละลาย L1 ปริมาตร 0.5 มล. ลงในส่วน spin cartridge ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm 1 นาที เทสารละลายที่อยู่ใน 2-ml wash tube ทิ้ง แล้วเติม Wash buffer ปริมาตร 0.7 มล. ลงในส่วน spin cartridge ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm 1 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายที่อยู่ใน wash tube ทิ้ง แล้วนำไป centrifuge จากนั้นนำส่วน spin cartridge ไปใส่ใน 1.5-ml recovery tube เติม TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในส่วน spin cartridge ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm 2 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่อยู่ก้นหลอดไปใช้งานในลำดับต่อไป

2.2.4.2 การตัดยีนโปรตีนที่ได้จากการโคลนยีนด้วยวิธี Partial digestion สารเคมี

- ก. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau* 3AI
- ข. 10X *Sau* 3AI buffer
- ค. ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการทดลอง 2.2.4.1 ข
- ง. 0.5 M EDTA pH 8.0

วิธีทดลอง

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลอง 2.2.4.1 ข 5 ไมโครกรัม ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มล. เติม 10X *Sau* 3AI buffer 5 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionize เป็น 45 ไมโครลิตร จากนั้นเติม *Sau* 3AI ความเข้มข้น 0.025 ยูนิท/ไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปในหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปใส่ในหลอดที่มี 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร เพื่อทำเป็น control นำสารละลายที่เหลือไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ทำการดูดสารละลายในหลอดที่เวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ครั้งละ 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มี 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ที่เตรียมไว้เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปทำ Agarose gel electrophoresis เทียบกับ λ DNA marker

2.2.4.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอจาก Cloned TLS33 ที่ทำการตัดด้วยวิธี Partial digestion กับดีเอ็นเอพาหะ pUC19

ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.2.3.5 โดยใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองที่ 2.2.4.1 ข ทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI ความเข้มข้น 0.025 ยูนิท/ไมโครลิตร ใช้เวลาในการตัด

1 ชม. เชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI

2.2.4.4 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ทำการทดลองเหมือนการทดลองที่ 2.2.3.7 โดยใช้ดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากการทดลองที่ 2.2.4.3 และใช้เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH5 α ที่เตรียมเป็น competent เซลล์ด้วยวิธีการทดลองที่ 2.2.3.6

2.2.4.5 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning^(14,15)

ก. การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

เตรียม preculture ในอาหารเหลว โดยใช้ loop เชี่ยเชื้อ Subclone I และ Subclone II จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มล. ที่ประกอบด้วย 0.25% (w/v) Skim milk, 0.1% (w/v) yeast extract ใน 80% (v/v) base mixture และ Ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มล. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ ใน shaking incubator เขย่าที่ 200rpm เป็นเวลา 18 ชม. แล้วนำไปเลี้ยง culture โดยใช้ preculture ปริมาตร 1 มล. ใน culture medium ปริมาตร 100 มล. ที่ประกอบด้วย 0.25% (w/v) Skim milk, 0.1% (w/v) yeast extract ใน 80% (v/v) base mixture และ Ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มล. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ ใน shaking incubator เขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 36 ชม. ทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชม. นำน้ำเลี้ยงที่ได้มาปั่นแยก crude enzyme ออกมาหาแอกทิวิตีโดยวิธี Azocasein hydrolysis

หมายเหตุ การหาแอกทิวิตีของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการ Subcloning โดยวิธี Azocasein hydrolysis ทำการหาแอกทิวิตีโดยใช้เอนไซม์ 0.1 มล. Incubate ที่อุณหภูมิ 50⁰ซ 30 นาที แอกทิวิตีของเอนไซม์จะมีค่าเท่ากับ $A \times (1/0.1) \times (1/0.5)$ โดยที่ A คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

ข. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาแอกทิวิตีโดยวิธี Azocasein hydrolysis เพียงแต่นำเอนไซม์ที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II ไป incubation ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เริ่มตั้งแต่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80 และ 90⁰ซ ตามลำดับ และทำการศึกษาเปรียบเทียบไปพร้อมกับโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33

ค. การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำ Subcloning

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาแอกติวิตีโดยวิธี Azocasein hydrolysis แต่ใช้ 0.2 (w/v) azocasein ละลายในบัฟเฟอร์ที่พีเอช ต่าง ๆ ตั้งแต่ พีเอช 4 – 10 เหมือนการทดลองที่ 2.2.3.9 ค และทำการศึกษาเปรียบเทียบไปพร้อมกับโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33

ง. การศึกษาความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการ Subcloning

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาแอกติวิตีโดยวิธี Azocasein hydrolysis แต่แช่เอนไซม์ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนแล้วนำมาหาแอกติวิตี โดยเริ่มที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 55 60, 65, 70, 80 และ 90⁰ ซ ตามลำดับ และทำการศึกษาเปรียบเทียบไปพร้อมกับโปรติเอสที่ได้ จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 และ Cloned TLS33

จ. การศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสภายในและภายนอกเซลล์ที่ได้จากการทำ Subcloning

ทำการทดลองเหมือนการทดลองที่ 2.2.3.9 จ การหาแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสจาก Subclone I และ Subclone II จะทำการหาโดยให้เอนไซม์ 0.1 มล. incubate ที่อุณหภูมิ 50⁰ซ 30 นาที

2.2.4.6 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการ Subcloning

ก. การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.2.3.10 ก โดยใช้โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II ในการหาขนาดมวลโมเลกุล

ข. การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Zymography

ข.1 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Zymography ชนิด SDS- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.2.3.10 ข.1 โดยใช้โปรตีนที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II ในการหาขนาดมวลโมเลกุล

ข.2 การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนโดยวิธี Zymography ชนิด Native polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE)

ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.2.3.10 ข.2 โดยใช้โปรตีนที่ได้จาก Subclone I และ Subclone II ในการหาขนาดมวลโมเลกุล

2.2.4.7 การศึกษาขนาดยีนโปรตีนที่ได้จาก Subclone I

ใส่ดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จาก Subclone I ลงในหลอด microcentrifuge 1 ไมโครกรัม เติม 10X *Hind* III buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในหลอดแล้วปรับปริมาตรสารละลายที่ได้ด้วยน้ำ deionize เป็น 8 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ *Hind* III ความเข้มข้น 1 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดแล้วนำสารละลายที่ได้ไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C 1 ชม. แล้วเติม 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ไปทำ Agarose gel electrophoresis เทียบกับ λ DNA marker และดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จาก Subclone I

หมายเหตุ เนื่องจากไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอสายผสมจาก Subclone II จึงไม่ได้ทำการหาขนาดยีนโปรตีนของ Subclone II

2.2.4.8 การเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จาก Subcloning โดยใช้โปรแกรม BLAST

การเปรียบเทียบลำดับเบสของซีดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนนิ่งกับข้อมูลลำดับเบสของ GenBank ทำได้โดยเข้าไปที่ website " <http://www.blast.genome.ad.jp>. " แล้วเลือกโปรแกรม BLASTN ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้เปรียบเทียบลำดับเบส จากนั้นทำการใส่ลำดับเบสของซีดีเอ็นเอที่ต้องการเปรียบเทียบลงไปโดยกำหนดให้เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของ GenBank แล้วรอผลการเปรียบเทียบที่จะส่งมาให้ทาง E-mail address ของผู้ต้องการทำการเปรียบเทียบ