รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยรับคาถิเษกสมโภช

เรื่อง

การผลิต λgt 11 DNA และ In vitro packaging mixes
เพื่อใช้ในงานทันธุวิศวกรรม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

นภา ศิวรังสรรค์

2536

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การผลิต λgt 11 DNA และ In vitro packaging mixes เพื่อใช้ในงานพันธุวิศวกรรม

โดย

นภา ศิวรังสรรค์

ธันวาคม 2536

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ ที่ได้ช่วยเหลือเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการทำการวิจัย ตลอดจนสารเคมีบางส่วนเพื่อทำให้งานวิจัยเริ่มต้นได้และจบลงอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้งานวิจัยจะปราศจากผู้ช่วยวิจัยที่มีฝีมือก็คงจะไม่มีวันได้ผลสำเร็จ จึงขอขอบพระคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านดังรายนามดังนี้ คือ น.ส. จันทร์ทิพย์ เหล่าฤทธิรัตน์ และ น.ส. ดวงพร สีหนันทวงศ์ ท้ายนี้ขอระลึกถึงท่านคณะกรรมการพิจารณาเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชประจำปีงบประมาณ 2536 ทุกท่านที่ให้โอกาสได้ทำงานวิจัยชิ้นนี้เพื่อประโยชน์ในการทำพันธุวิศวกรรมให้เจริญก้าวหน้าในจุฬาฯ ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สพ
574.192
ส167ก
2536
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 2469
วันที่.....เดือน 14 ก.ค. 2541 พ.ศ.....

ชื่อโครงการวิจัย : การผลิต λgt 11 DNA และ *In vitro* packaging mixes เพื่อใช้ในงานพันธุวิศวกรรม

ชื่อผู้วิจัย : น.ส. นภา ศิวรังสรรค์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ : ธันวาคม 2536

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะผลิต λgt 11 DNA จากเชื้อ *E. coli* BNN 97 โดยการเหนี่ยวนำให้เชื้อเกิด lysis ที่อุณหภูมิ 45°c จากนั้นนำ Bacteriophage λgt 11 มาบุกรุกเซลล์ให้อาศัย *E. coli* Y 1088 จะสามารถขยายจำนวน Bacteriophage ให้มากขึ้นก่อนที่จะทำการแยก λgt 11 DNA แบบเสกลเล็ก (Requena 1993) และแบบขยายส่วน (Maniatis 1982) ปริมาณ λgt 11 DNA ที่แยกได้จากแต่ละวิธีขึ้นอยู่กับจำนวน pfu ของ λgt 11 ที่ใช้ในการบุกรุกเซลล์ให้อาศัย ผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ λgt 11 จำนวน 5×10^5 pfu บุกรุกเซลล์ให้อาศัย จะสามารถแยก λgt 11 DNA แบบเสกลเล็กได้ทั้งหมดเท่ากับ 7.93 มิลลิกรัม และเมื่อใช้ λgt 11 จำนวน 10^6 pfu บุกรุกเซลล์ให้อาศัย จะสามารถแยก λgt 11 DNA แบบขยายส่วนได้ทั้งหมดเท่ากับ 0.25 มิลลิกรัม อย่างไรก็ตาม λgt 11 DNA ที่เตรียมแบบเสกลเล็กยังปนเปื้อนด้วย chromosomal DNA ของเซลล์ให้อาศัย นอกจากนี้งานวิจัยยังมีความประสงค์ที่จะผลิต *In vitro* packaging mixes จากเชื้อ *E. coli* BHB 2688 และ *E. coli* BHB 2690 ตามวิธีของ Maniatis (1982) เพื่อนำมาเตรียม Freeze thaw lysate และ Sonic extract ตามลำดับ เมื่อนำ *In vitro* packaging mixes มาทดสอบประสิทธิภาพของการ packaging กับ λgt 11 DNA ที่แยกได้ ผลการทดลองพบว่าได้จำนวน Bacteriophage 1.48×10^{11} pfu/μg DNA

Project Title : λgt 11 DNA and *In vitro* packaging mixes Productions for using in genetic engineering work

Name of the Investigators : Miss Napa Siwarungson

Year : December 1993

Abstract

The objective of this work was to produce λgt 11 DNA from *E. coli* BNN97 by inducing cell lysis at 45°c. The number of λgt 11 was amplified by infecting *E. coli* Y 1088 host cells. The λgt 11 DNA was isolated from the infected host cells by both small scale method (Requena 1993) and large scale method (Maniatis 1982). The amount of isolated λgt 11 DNA from each method depended on the plaque forming units of λgt 11 which was used to infect host cells. The total amount of λgt 11 DNA isolated from 5×10^5 pfu of λgt 11 infected host cells on small scale method was 7.93 mg. And the total amount of λgt 11 DNA isolated from 10^4 pfu of λgt 11 infected host cells on large scale method was 0.25 mg. However, λgt 11 DNA prepared by small scale method contained host chromosomal DNA. The other objective of this work was to produce *in vitro* packaging mixes from *E. coli* BHB 2688 and *E. coli* BHB 2690 by the method of Maniatis (1982) for the preparation of freeze thaw lysate and sonic extract, respectively. The packaging efficiency of the prepared *in vitro* packaging mixes was tested with the isolated λgt 11 DNA. The number of bacteriophage of 1.48×10^{11} pfu/μg DNA was obtained from this system.

สารบัญ

บทนำ 1

วิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 14

สารเคมี 15

เชื้อแบคทีเรียและ Bacteriophage 16

การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย 19

การทดสอบ Bacteriophage λgt 11 lysogen 19

การเตรียม Bacteriophage λgt 11 stock solution 19

การทำ Titering ของ Bacteriophage λgt 11 stock solution 20

การแยก λgt 11 DNA แบบเสกลเล็ก 21

การเตรียม λgt 11 DNA แบบขยายส่วน 22

การเตรียม Freeze thaw lysate จากเชื้อ E. coli BHB 2688 25

การเตรียม Sonic extract จากเชื้อ E. coli BHB 2690 26

การทดสอบประสิทธิภาพของ In vitro packaging mixes 27

ผลการวิจัย

Titering ของ Bacteriophage λgt 11 stock 29

การแยก λgt 11 DNA แบบเสกลเล็กจาก Bacteriophage λgt 11 ที่เก็บเป็นระยะเวลายาวนาน 32

การเตรียม λgt 11 DNA ในระดับขยายส่วน 32

การเตรียม Freeze thaw lysate 37

การเตรียม Sonic extract 38

การหาประสิทธิภาพของ In vitro packaging mixes 39

การอภิปรายผล 40

ข้อสรุป 41

เอกสารอ้างอิง 42

ภาคผนวก 44

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ 1	ชื่อตาราง	หน้า
1	แสดงการหาประสิทธิภาพของ In vitro packaging mixes	39

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่	ชื่อเรื่อง	หน้า
1	ยีนของเฟจแลมดา	5
2	การสร้างและการควบคุมตัวกดดันของเฟจแลมดา	7
3	การประกอบอนุภาคของ phage λ	10
4	แสดงแผนผัง gene และ restriction map บน λgt 11 DNA	18
5	แสดง plaques บน plate ที่ dilute 10^{-4} และ 10^{-5} เท่า	30
6	แสดง plaques บน plate ที่ dilute 10^{-6} และ 10^{-7} เท่า	31
7	แสดงการแยก DNA บน 0.7% agarose gel	32
8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{600} กับเวลาที่เขย่าเชื้อ E. coli Y 1088 เพื่อเตรียม phage infected culture	33
9.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{600} กับเวลาที่เขย่าเชื้อ E. coli Y 1088 ในระดับขยายส่วน	34
10.	แสดง phage band ที่ได้จากการปั่น ultracentrifuge	35
11.	แสดงการแยก DNA บน 0.7% agarose gel	36
12.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{600} กับเวลาที่เขย่าเชื้อ E. coli BHB 2688	37
13.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{600} กับเวลาที่เขย่าเชื้อ E. coli BHB 2690	38

รายการสัญลักษณ์

ชื่อ	สัญลักษณ์
Lambda	λ
มิลลิลิตร	ml
ไมโครกรัม	μg
plaque forming unit	pfu
องศาเซลเซียส	$^{\circ}$c
ไมโครลิตร	μl
revolution per minute	rpm
Sodium dodesyl sulfate	SDS
Ethylene diamine tetraacetic acid	EDTA
Polyethylene glycol	PEG
Deoxyribonuclease I	DNase I
Ribonuclease A	RNase A
Adenosine triphosphate	ATP
กิโลเบส	kb
ปอนด์	lb
ตารางนิ้ว	in^2
Tris-EDTA	TE
Sodium acetate	NaOAc
Ethylene diamine tetraacetate disodium salt	Na_2EDTA
β-galactosidase gene	lac Z
Luria-Bertani	LB
Deoxyribonucleic acid	DNA

บทนำ

พันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) เป็นเทคนิคที่กำลังมีความสำคัญต่อการพัฒนาทางด้านการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรม การตัดต่อยีนที่ทำกันอย่างแพร่หลายต้องอาศัย DNA พาหะ (vector DNA) เพื่อช่วยในการถ่ายทอดยีนจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งไปยังสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ปัจจุบัน DNA พาหะมีอยู่หลายชนิด คือ พลาสมิด (Plasmid), Bacteriophage DNA และคอสมิด (Cosmid) เป็นต้น โดยทั่วไปพลาสมิดและ Bacteriophage DNA มักถูกใช้เป็น DNA พาหะสำหรับการทำโคลนยีน (gene cloning) เป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้เพราะคอสมิดมักจะมีปัญหาของ recombination และ deletion ของชิ้น DNA ที่ใส่เข้าไป และให้ผลิตผลของ recombinant DNA ต่ำ ส่วนพลาสมิดนั้นใช้ในการใส่ชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาดเล็กเท่านั้น จึงไม่เหมาะสมที่จะใส่ชิ้น DNA ที่มีขนาดใหญ่ได้ ดังนั้น Bacteriophage DNA จึงเป็น cloning vector ที่มีประสิทธิภาพในการพาชิ้น DNA ที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 kb ขึ้นไป และสามารถใช้ Bacteriophage DNA ในการสร้างทั้ง cDNA และ genomic libraries ได้ด้วย

การประยุกต์ใช้ bacteriophage DNA vector ในทางพันธุวิศวกรรมนั้นต้องอาศัยความเข้าใจพื้นฐานทางชีววิทยาของ bacteriophage ในการเพิ่มจำนวนและพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของการควบคุมวงจรชีวิต จึงจะสามารถนำไปสู่การใช้ bacteriophage DNA เป็น cloning vector ได้ Bacteriophage DNA ที่ใช้เป็น DNA พาหะในการ clone มีอยู่ 2 พวกใหญ่ ๆ คือ Bacteriophage ที่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA เกลียวคู่ ได้แก่ Bacteriophage lambda (λ) และ Bacteriophage ที่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายเดี่ยว ได้แก่ Bacteriophage M13 การใช้งาน Bacteriophage λ และ M13 จะแตกต่างกันโดยที่ Bacteriophage λ จะใช้ในการ clone DNA ชิ้นใหญ่ที่มีขนาดมากกว่า 10 kb และเป็น expression vector ได้ ในขณะที่ M13 มักนิยมใช้ในการ clone DNA ที่มีขนาดเล็กไม่เกิด 2 kb, ทำ DNA sequencing และ site-directed mutagenesis (1)

Bacteriophage λ ประกอบด้วย DNA เกลียวคู่ปลายเปิด (linear DNA Double helix) ที่มีขนาด 48.5 kb ที่มีปลาย 5 ยื่นยาวเป็นสายเดี่ยวที่มีขนาด 12 bp ทั้งสองปลาย ปลายที่ยื่นยาวนี้เรียกว่า "cos site" (cohesive end site) จะมีลักษณะ

เป็นปลายเหนียว (cohesive end) ที่ปลายทั้งสองซึ่งมีการจับเบสคู่สมกันพอดี (complementary base pair) เมื่อ Bacteriophage λ บุกรุกเซลล์ให้อาศัย ปลาย 5′ ที่ยื่นยาวทางขวามือ (cos R) จะถูกส่งเข้าไปในเซลล์ให้อาศัยก่อน ติดตามมาด้วย genome ทั้งหมด cos site ที่อยู่ที่ปลายทั้งสองจะถูกเชื่อมโดย E.coli DNA ligase เพื่อสร้างเป็น DNA เกลียวคู่รูปวงแหวน ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็น supercoil structure โดย E.coli DNA gyrase เมื่อ lambda genome เริ่มการลอกแบบ DNA จะได้ gemome หลาย ๆ ชุด องค์ประกอบโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการรวมตัวกันเป็น phage particle จะถูกสร้างขึ้นโดยการร่วมกันแสดงออกของ phage genes phage DNA ถูกบรรจุไว้ใน protein coat และ phage particle ถูกปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมภายหลังจากเกิด lysis ของเซลล์ การพัฒนาของ lambda เพื่อเพิ่มจำนวน phage เรียกว่า "lytic cycle" ในทางตรงกันข้าม phage genome อาจเข้าสู่ระยะพัก (dormant stage) ที่เรียกว่า "Prophage" โดยการแทรก phage genome เข้าไปใน bacterial genome โดยขบวนการที่เรียกว่า "Site-specific recombination" หลังจากนั้น phage genome เกิดการลอกแบบไปพร้อม ๆ กับ bacterial genome ขั้นตอนนี้เรียกว่า "Lysogeny" การเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมและสภาพภายในเซลล์อาจกระตุ้น prophage ให้เปลี่ยนเป็น lytic cycle ได้ (1) ดังนั้นวงจรชีวิตของ Bacteriophage λ สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ วงจรชีวิตแบบไลโซจินิก (lysogenic cycle) และวงจรชีวิตแบบไลติก (lytic cycle) วงจรชีวิตของ Bacteriophage λ ทั้งสองนี้เกิดจากการมีสมดุลที่ละเอียดอ่อนของการแสดงออกของยีนของ Bacteriophage λ

1. วงจรชีวิตแบบไลโซจินิก (lysogenic cycle) จะเกิดขึ้นเมื่อวงจรชีวิตแบบไลติก (lytic cycle) ถูกยับยั้ง โดยมีการยับยั้งการถอดรหัสของ phage DNA โดยโปรตีนที่เป็นผลิตภัณฑ์ของยีน cI ของ phage lambda เป็นเหตุให้โปรตีนที่จำเป็นต่าง ๆ ในวงจรชีวิตแบบไลติกสร้างขึ้นไม่ได้ การลอกแบบของ phage DNA จะเกิดควบคู่ไปกับการลอกแบบของ DNA ของเซลล์ให้อาศัย วงจรชีวิตแบบไลโซจินิกนี้สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่วงจรชีวิตแบบไลติกได้โดยการใช้วิธีทางกายภาพหรือใช้สารเคมี (2)

2. วงจรชีวิตแบบไลติก (lytic cycle) phage DNA จะเริ่มถอดรหัส (transcription) ให้ RNA สื่อสาร (messenger RNA) ซึ่งจะแปลรหัส (translation) ให้โปรตีนหลายชนิดที่จำเป็นในการถ่ายแบบของ phage DNA เป็นผลให้ได้ DNA ของ phage

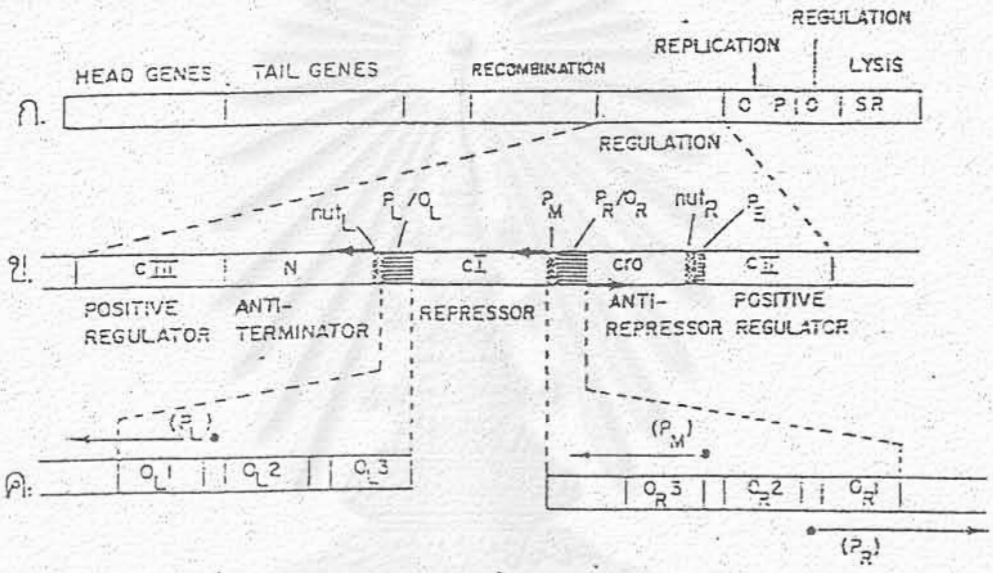
จำนวนมากมาย ต่อมาจะมีการถอดรหัสของ DNA เหล่านี้และในระยะหลังจะเป็นการสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้างเพื่อใช้ในการประกอบเป็นอนุภาคของ phage (phage particle) และประกอบตัว (package) ได้เป็น phage รุ่นลูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเมื่อเซลล์ให้อาศัยแตก phage ที่ถูกปลดปล่อยออกมานี้จะบุกรุกเซลล์ให้อาศัยอื่น ๆ ต่อไป (2)

โครงสร้างของยีนบน phage DNA ประกอบด้วยยีนต่าง ๆ ดังนี้ คือ head genes 10 genes, Tail genes 11 genes, Recombination genes 7 genes, Regulation genes, Replication genes (O และ P), gene Q และ lysis genes 2 genes (รูปที่ 1 ก) ผลิตภัณฑ์ของ gene Q ทำหน้าที่เป็น antiterminator สำหรับการถอดรหัสของ Head genes, Tail genes และ lysis genes (S และ R) ส่วน Regulation genes ที่อยู่ตรงกลางทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของวงจรชีวิตของ phage lambda ประกอบด้วย gene cI ที่ทำหน้าที่สร้างตัวกดดัน (repressor) ซึ่งมีบริเวณ promoter ของมันเองเรียกว่า P_M (รูปที่ 1 ข) ทั้งสองด้านของ gene cI มีบริเวณ promoter และบริเวณ operator ด้านซ้ายและด้านขวา เรียกว่า P_L/O_L และ P_R/O_R ตามลำดับ, gene N ทำหน้าที่ผลิต antiterminator ภายใต้การควบคุมของบริเวณ P_L/O_L gene cII, cIII จะผลิต positive regulator คนละชนิด และ gene Cro ทำหน้าที่ผลิต antirepressor ภายใต้การควบคุมของบริเวณ P_R/O_R นอกจากนี้ยังมีบริเวณ nut_L และ nut_R ซึ่งเป็นที่จับของผลิตภัณฑ์ของ gene N จึงเรียกว่า N utilization site ทางซ้ายและทางขวาตามลำดับทำหน้าที่เป็น antiterminator ของการถอดรหัส (transcription) เมื่อขยายบริเวณ P_L/O_L จะประกอบด้วยบริเวณ O ถึง 3 ช่วง คือ O_L1, O_{L2} และ O_L3 (รูปที่ 1 ค) โดยมี P_L เป็นที่ให้ RNA polymerase จับโดยอยู่ที่บริเวณ O_L1 สาย DNA ที่ใช้สร้าง RNA จะเป็นสายบน ส่วนบริเวณ P_R/O_R นั้นจะประกอบด้วยบริเวณ O ถึง 3 ช่วง คือ O_R1, O_R2 และ O_R3 (รูปที่ 1 ค) โดยมี P_R เป็นที่ให้ RNA polymerase จับโดยอยู่ที่บริเวณ O_R1 และมี P_M อยู่ที่บริเวณ O_R3 การสร้าง RNA จาก P_R จะใช้ DNA สายล่าง ส่วนการสร้าง RNA จาก P_M จะใช้ DNA สายบน (3)

ในวงจรชีวิตแบบไลโซจินิก (lysogenic cycle) เมื่อ gene cI สามารถสังเคราะห์ตัวกดดัน (repressor) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย (รูปที่ 2 ก) ตัวกดดันนี้จะจับที่ O_L และ O_R ได้ทุกตำแหน่งโดยจะจับกับ O_R1 ได้ดีกว่า O_R2 และ O_R3 ตามลำดับ เมื่อระดับ

ของตัวกดดันมีอยู่ต่ำนั้น ตัวกดดันจะจับที่ O_R1 และ O_R2 แล้วยับยั้งการแสดงออกของยีน Cro ส่วนบริเวณ O_R3 ยังว่าง ทำให้บริเวณ P_M มี RNA polymerase มาจับ สภาวะเช่นนี้ทำให้มีการสังเคราะห์ตัวกดดันต่อไป (รูปที่ 2 ก) จนกระทั่งระดับตัวกดดันเพิ่มมากขึ้นทำให้ตัวกดดันไปจับที่บริเวณ O_R3 ด้วย (รูปที่ 2 ข) ทำให้ RNA polymerase ไม่สามารถใช้ P_M ในการสังเคราะห์ตัวกดดันต่อไป ทำให้ phage คงอยู่ในสภาวะไลโซจินิกได้โดยบังคับไม่ให้ยีนต่าง ๆ แสดงออก (3)

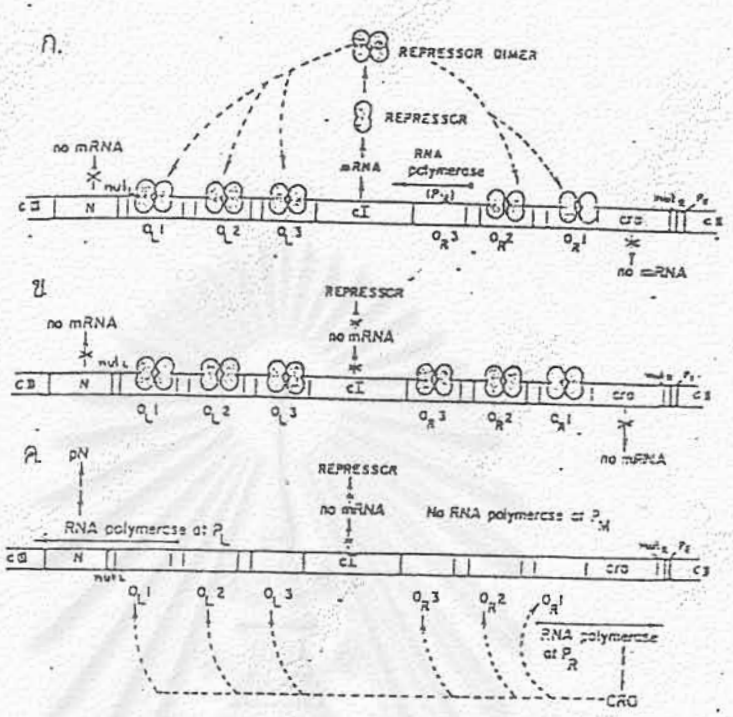
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 ยีนของเฟจแลมดา (ก) แสดงยีนควบคุม ยีนโครงสร้าง สำหรับโปรตีนส่วนหัวและหาง ยีนสำหรับการลอกดีเอ็นเอ ยีนรีคอมบิแนนท์ และยีนสำหรับการสลายเซลล์เจ้าบ้าน (ข) แสดงรายละเอียดของยีนควบคุม ลูกศรแสดงทิศทางการสร้างอาร์เอ็นเอ (ค) แสดงรายละเอียดของบริเวณบังคับทั้งสอง ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วน

ในวงจรชีวิตแบบไลติกเกิดขึ้นเมื่อระดับของตัวกดดันถูกทำลายจนระดับลดต่ำลงทำให้บริเวณ O_R2 และ O_R1 ว่าง RNA polymerase ก็จะไม่สามารถใช้ P_M ในการสังเคราะห์ตัวกดดันเพิ่มขึ้นได้ (รูปที่ 2 ค) ดังนั้น RNA polymerase จะใช้ P_L ที่บริเวณ O_L1 และ P_R ที่บริเวณ O_R1 สร้าง RNA เพื่อผลิตโปรตีน N (pN) ซึ่งเป็น antiterminator และโปรตีน CRO ซึ่งเป็น antirepressor ขึ้นมา โปรตีน N ที่เกิดขึ้นจะช่วยให้ RNA polymerase เคลื่อนผ่านบริเวณ nut_L และ nut_R (รูปที่ 2 ค) มีผลให้สร้าง RNA จาก gene อื่น ๆ ทั้งสองข้าง เมื่อเป็นเช่นนี้ phage จะเปลี่ยนวงจรชีวิตจากไลโซจินิกเป็นไลติก คือ มีโปรตีนส่วนหัว (Head proteins), โปรตีนส่วนหาง (Tail proteins) และเอนไซม์ในการสลายแบคทีเรียให้อาศัย เมื่อ phage เริ่มวงจรชีวิตแบบไลติกแล้วจะไม่สามารถกลับสู่วงจรชีวิตแบบไลโซจินิกอีกต่อไป ส่วนโปรตีน CRO ที่สร้างขึ้นมานั้นจะเริ่มไปจับที่บริเวณ O_R3 ก่อนเพื่อป้องกันไม่ให้ RNA polymerase มาใช้ P_M ในการสร้างตัวกดดัน (repressor) นอกจากนี้ถ้าโปรตีน CRO มีระดับมากพอจะไปจับที่ O_L1, O_L2 และ O_L3 เพื่อหยุดการสร้างโปรตีน N และอาจจะจับกับ O_R2 และ O_R1 เพื่อหยุดการสังเคราะห์โปรตีน CRO อีกด้วย (รูปที่ 2 ค) (3)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 การสร้างและการควบคุมตัวกดดันของเฟจแลมดา (ก) ยีน cI จะสร้างตัวกดดันจับบริเวณบังคับการด้านซ้ายไม่ให้มีการแสดงออกของยีน N และจับบริเวณบังคับการด้านขวาที่ O_R1 และ O_R2 ยับยั้งการแสดงออกของยีน Cro ส่วนที่ O_R3 P_M ทำหน้าที่จับกับ RNA polymerase เพื่อสร้างอาร์เอ็นเอจาก cI (ข) เมื่อมีตัวกดดันมากขึ้น จะจับที่บริเวณ O_R3 ด้วย ทำให้ RNA polymerase ไม่สามารถจับที่ O_R3 ได้ จึงหยุดการสร้างตัวกดดันจากยีน cI (ค) เมื่อระดับตัวกดดันลดลงจนกระทั่งหลุดจาก O_R2 และ O_R1 RNA polymerase มีโอกาสจับที่ O_R1 ซึ่งเป็นบริเวณ P_R จะสร้างโปรตีน Cro ขณะเดียวกันสามารถสร้างโปรตีน pN ได้ Cro จะไปจับที่ O_R3 ไม่สร้างตัวกดดันและที่บริเวณบังคับการอื่น ๆ หยุดสร้าง pN และ Cro ด้วย ทำให้มี pN จำกัดแต่เพียงพอที่จะต่อต้านการหยุด RNA polymerase จะผ่านจุด nut สร้างอาร์เอ็นเอจากยีนอื่น ๆ ทำให้เข้าสู่สภาวะไลติก

Bacteriophage lambda vectors ที่ใช้ในการทำ cloning นั้น การเลือก vector ขึ้นอยู่กับ (i) ขนาดของชิ้น DNA ที่ใส่ (ii) restriction enzymes ที่ใช้ (iii) การแสดงออกของชิ้น DNA ที่ใส่ และ (iv) วิธีการตรวจหาเพื่อใช้ในการคัดเลือก clones ที่ต้องการ ดังนั้นการจำแนก Bacteriophage lambda vectors จึงแบ่งออกอย่างกว้าง ๆ เป็น 2 ชนิด คือ

1. Replacement vectors จะมีการขจัด central fragment หรือ stuffer fragment ตรงที่เป็นที่อยู่ของ Recombination gene ออกไป แล้วแทนที่ด้วยชิ้น DNA แปลกปลอมที่มีขนาดเหมาะสมที่จะใส่เข้าไปในส่วนหัวของ phage โดยมากชิ้น DNA แปลกปลอมที่มีขนาดยาวกว่า 24 kb สามารถ clone เข้าไปแทนที่ stuffer fragment ได้ หลังจากที่เชื่อม DNA แปลกปลอมเข้ากับ L-arm และ R-arm แล้วจะเป็นประโยชน์ในการสร้าง genomic libraries ของ Eukaryote ชั้นสูง ตัวอย่าง replacement vectors ที่นิยมมาก คือ charon และ EMBL เป็นต้น

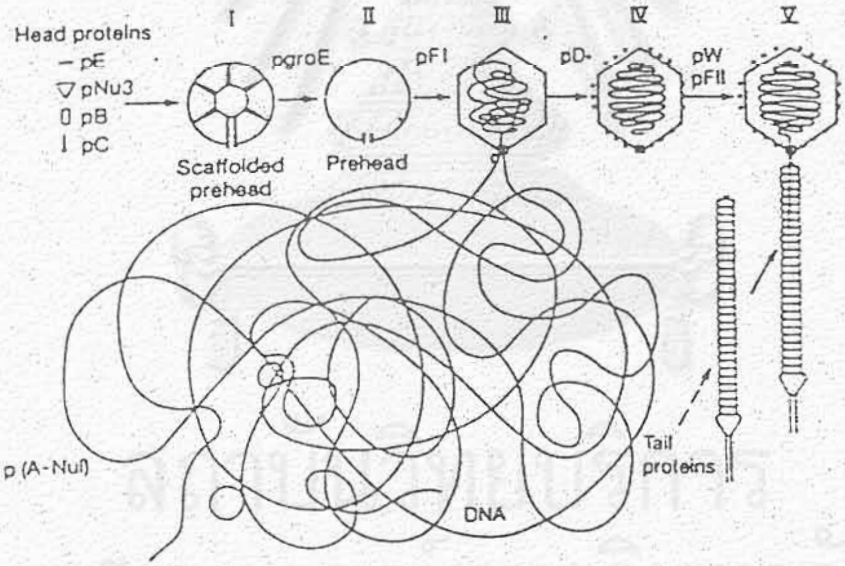
2. Insertion vectors จะอาศัยความสามารถสูงสุดของการใส่ phage DNA ขนาด 53 kb เข้าไปในส่วนหัวของ phage ทำให้สามารถใส่ชิ้น DNA แปลกปลอมที่มีขนาด 10 kb เข้าไปโดยไม่มีการขจัด stuffer fragment ออกไป การใส่ชิ้น DNA แปลกปลอมใน vectors เหล่านี้ทำให้เกิด Insertional inactivation ที่สามารถแยก recombinant clones ออกจาก nonrecombinant clones ได้ ดังนั้น Insertion vectors จึงเป็นประโยชน์ในการ clones ชิ้น DNA เล็ก ๆ เช่น cDNA (complementary DNA) ตัวอย่างของ Insertion vectors ชนิดนี้ คือ Lambda gt 10 และ Lambda gt 11 เป็นต้น (1)

Lambda gt 11 (λ gt 11) เป็น Insertion vector ที่มีส่วนของ E. coli ß-galactosidase gene อยู่ตรงกลางของ genome การสร้าง λ gt 11 เกิดจากการ cross λgt 7-lac5 ที่ประกอบด้วย ß-galactosidase gene กับ λgt 4 ที่มี cI857, S100 และ nin5 mutations (2) cI857 mutation เป็นการกลายพันธุ์ที่ gene cI ทำให้ไวต่ออุณหภูมิสูง โดยที่จะเกิด prophage เมื่อเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำ 32-34°c แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 42°c repressor จะถูกทำลาย ทำให้การดำรงชีวิตของ phage เปลี่ยนมาเป็นแบบ lytic เกิดเป็น plagues ขึ้น s100 mutation ช่วยให้ได้ biological containment ที่ดีกว่า ส่วน nin5 mutation จะช่วยให้เกิดการถอดรหัสโดยไม่ขึ้นกับ

ผลิตภัณฑ์ของ gene N นอกจากนี้ λgt 11 DNA ยังมี EcoRI site อันเดียวที่ปลาย 3′ ของ β-galactosidase gene ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับใส่ชิ้น DNA แปลกปลอมที่มีขนาดยาวมากกว่า 9.2 kb (1) เมื่อมีการใส่ชิ้น DNA แปลกปลอมเข้าไปใน β-galactosidase gene จะเกิด Insertional inactivation ของ β-galactosidase gene แล้วทำให้ตรวจหา plaque สีขาว และสีน้ำเงินบน X-Gal plates plaque สีขาวจะเป็น recombinant clones และ plaque สีฟ้าจะเป็น nonrecombinant clones เนื่องจากชิ้น DNA แปลกปลอมที่ใส่ใน λgt 11 DNA ตรง EcoRI site จะถูกแสดงออกเป็น β-galactosidase fusion product ทำให้สามารถตรวจหาโดยใช้ antibody probes (5) ดังนั้น λgt 11 DNA จึงเป็น expression system ที่ดีสำหรับ cloning และ expression ของ gene การสร้าง cDNA และ genomic libraries ทำโดยการใส่ชิ้น DNA เข้าไปใน EcoRI site ภายใน gene lac Z และตรวจ libraries โดยการมองหา plaques สีขาวเทียบกับสีน้ำเงินบน X-Gal plate จากนั้นแยก gene โดยอาศัย in situ hybridization (6) เมื่อใส่ cDNA เข้าไปที่ EcoRI site ของ lac Z gene จะทำให้มีการแสดงออกของ cDNA เป็น β-galactosidase fusion proteins ที่สามารถตรวจหาด้วย antibody probes (5) การสร้าง β-galactosidase fusion proteins ในแบคทีเรียให้อาศัยที่ไม่เกิดการทำลายโปรตีนที่สร้างขึ้น เรียกว่า "lon mutant" จะช่วยให้การตรวจหา β-galactosidase fusion proteins มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ในระยะต่อมาได้มีการ amplify DNA ที่ใส่ใน λgt 11 DNA โดยตรงจาก plaques ด้วยการใช้ polymerase chain reaction (PCR) (7) และใช้ oligonucleotide primers ที่เป็น λgt 11 DNA sequences ที่อยู่ใกล้ EcoRI cloning site (8) นอกจากนี้ยังได้มีการ sequence ของ DNA ที่ใส่ใน λgt 11 DNA โดยใช้ λgt 11 DNA templates โดยตรงทำให้ไม่ต้อง subclone ก่อนที่จะนำมาทำ dideoxynucleotide sequencing ของ clones (9)

การประกอบเป็นอนุภาคไวรัส (Packaging) ต้องการส่วนหัวและส่วนหางมาประกบกันเป็น phage particle ที่สมบูรณ์ ส่วนหัวประกอบด้วยโปรตีนที่สร้างมาจาก gene ดังนี้ คือ E, Nu3, B และ C เรียกว่า pE, pNu3, pB และ pC มารวมกันอยู่เป็นโครงสร้างที่เรียกว่า "Scaffolded prehead" โดยอาศัยโปรตีน gro E ที่สร้างโดยเซลล์ให้อาศัยจะทำการย่อยบางส่วนออกทำให้ได้โครงสร้างส่วนหัวที่พร้อมสำหรับบรรจุ DNA เข้าไปเรียกว่า "Prehead"

แล้ว pNu1 และ pA ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างจาก gene Nu1 และ A จะไปเกาะกับ DNA สายยาวที่บริเวณใกล้กับ cos L และนำ DNA มาที่ส่วน Prehead ต่อมา pF1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างจาก gene F1 จะทำให้ DNA บรรจุลงไปในส่วน Prehead ทำให้ขนาดใหญ่ขึ้น 20% และรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป เมื่อบรรจุ DNA เต็มแล้ว โปรตีน pD ซึ่งสร้างมาจาก gene D จะมาเกาะที่ภายนอกทำให้ขนาดของส่วนหัวไม่เปลี่ยนแปลงอีกต่อไป เมื่อ DNA ที่บรรจุในส่วนหัวจนเต็มนั้น ส่วนของ cos L และ cos R จะมาอยู่ใกล้กันบริเวณทางเข้าแล้วจึงถูกตัดให้ขาดโดยโปรตีน pA หรือ Terminase ทำให้ได้ปลาย 5´ ที่เป็นสายเดี่ยวยาว 12 เบส ส่วนหัวที่เต็มด้วย DNA แล้วนี้จะไปต่อกับส่วนหางโดยมีโปรตีน pW และ pF II มาช่วยได้อนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ phage particle จะหลุดออกจากเซลล์ให้อาศัยโดยอาศัยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ lysis คือ โปรตีนจาก gene R และ S (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การประกอบอนุภาคของ phage

In vitro packaging ของ Bacteriophage λ DNA เป็นวิธีการประกอบกันเป็นอนุภาคของ phage ในหลอดทดลองโดยการใช้ส่วนผสมของ extracts ที่เตรียมจากแบคทีเรียที่บุกรุกด้วย bacteriophage λ mutants ที่มีการกลายพันธุ์ gene ที่ต้องการสำหรับการประกอบเป็นอนุภาคของ phage ดังต่อไปนี้

1. gene E ที่เกิดการกลายพันธุ์ทำให้มีการสะสมองค์ประกอบทั้งหมดของส่วนหัวของ phage คือ โปรตีน pE ที่เป็นองค์ประกอบหลักของส่วนหัวของ phage และจำเป็นในตอนต้นของการประกอบเป็นอนุภาคของ phage

2. gene D ที่เกิดการกลายพันธุ์ทำให้มีการสะสม prehead ที่ไม่มีการบรรจุ λ DNA เข้าไป คือ โปรตีน pD ที่ตั้งอยู่ด้านนอกของส่วนหัวของ phage และเกี่ยวข้องในการบรรจุ λDNA เข้าไปในส่วนหัวจนกระทั่งได้ส่วนหัวที่สมบูรณ์

3. gene A ที่เกิดการกลายพันธุ์ทำให้มีการสะสม prehead ที่ว่างเปล่า คือ โปรตีน pA ที่เกี่ยวข้องกับการบรรจุ λ DNA เข้าไปในส่วนหัวและตัด DNA ที่ cos site ทั้งสองเพื่อให้สามารถบรรจุ λ DNA เข้าไปในส่วนหัว

ดังนั้น extracts ที่เข้าคู่กันจะต้องเตรียมจากเซลล์ที่บุกรุกด้วย λA^- และ λE^- หรือ λD^- และ λE^- เป็นต้น extracts ที่เตรียมจากเซลล์ที่บุกรุกด้วย λA^- mutant สามารถทดแทน โดยการเติมโปรตีน A จาก wild type λ เป็นต้น โดยปกติ extracts เตรียมจากเซลล์ที่ประกอบด้วย bacteriophage λ lysogens ที่มี nonsense (amber) mutation ใน gene A, D หรือ E แล้ว ยังมีการกลายพันธุ์ gene อื่น ๆ ด้วย ได้แก่ gene

1. cI 857 จะทำให้ λ repressor ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ การกลายพันธุ์ที่ gene นี้ทำให้ λ DNA อยู่ในสภาวะไลโซจินิกเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่ 32°c ถ้ากระตุ้นเซลล์แบคทีเรียที่อุณหภูมิ 42-45°c จะทำให้ repressor ที่สร้างจาก gene cI ไม่ทำงาน แบคทีเรียจึงอยู่ในสภาพไลติก

2. Sam 7 เกิด nonsense (amber) mutation ใน bacteriophage S gene ซึ่งต้องการสำหรับการ lysis ของเซลล์ การกลายพันธุ์นี้ทำให้มีการสะสมส่วนหัวไว้ภายในแบคทีเรียเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ภายหลังจากกระตุ้น cI 857 lysogen

3. b 2 หรือ b 1007 เป็นการทำ deletion ใน bacteriophage λ DNA โดยการขจัด λ DNA attachment site (att) การกลายพันธุ์นี้จะช่วยลดการ packaging ของ λ DNA ที่อยู่ภายใน extracts ที่เตรียมมาจาก lysogen ที่กระตุ้น

4. red 3 (ใน λ) และ rec A (ใน E. coli) การกลายพันธุ์ที่ทั้งสองนี้จะทำให้ไม่เกิด generalized recombination system ของ bacteriophage λ และเซลล์ให้อาศัย ดังนั้นการเกิด recombination ระหว่าง λ DNA ที่อยู่ใน extract และ recombinant DNA ที่เติมเข้าไปจะมีน้อยที่สุด

การเตรียม Packaging extracts โดยปกติเตรียมโดยการเลี้ยง E. coli lysogen ที่ 30-32°c จนกระทั่งถึงระยะแบ่งตัวทวีคูณ จากนั้นกระตุ้นให้เกิด lysis โดยการทำให้ repressor protein ที่สร้างจาก gene cI ไม่ทำงานที่อุณหภูมิ 45°c แล้วเลี้ยงเชื้อให้เจริญต่ออีก 2-3 ชั่วโมง ที่ 38°c เพื่อทำให้องค์ประกอบในการ packaging สะสมแล้วจึงค่อยเตรียม extracts การเตรียม Packaging extracts เพื่อช่วยในการบรรจุ λ DNA ไว้ในอนุภาคของ phage จะมีประสิทธิภาพสูงถึง 10^7-10^8 pfu/ug ของ λ DNA ที่ใส่ นอกจากนี้ยังให้ background ต่ำ และมีขนาดที่พอเหมาะด้วย E. coli lysogen 2 ชนิด คือ BHB 2688 และ BHB 2690 ถูกใช้ในการเตรียม Freeze thaw lysate และ Sonic extract ตามลำดับ ตามวิธีการที่ได้อธิบายแล้ว ภายหลังจากที่ได้มีการ package recombinant DNA เข้าไปในส่วนหัวและเชื่อมกับส่วนหางแล้วจะได้อนุภาคของ phage ที่ต้านทานต่อการย่อยด้วย DNase ทำให้สามารถเก็บรักษา phage particle ไว้เป็น cDNA หรือ genomic libraries โดยมากมักจะมีการเติม chloroform ลงใน In vitro packaging เพื่อป้องกันการเจริญของ E. coli แต่ phage particle ยังคงเสถียรใน chloroform (10, 11, 12)

ปัจจุบัน λ gt 11 DNA มีราคาแพง แนวความคิดที่จะจัดทำ DNA พาหะนี้ขึ้นใช้ในจุฬาฯ ได้เกิดขึ้น เนื่องจากเห็นว่าจะช่วยแบ่งเบาภาระค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อจากต่างประเทศลง และเพื่อให้แน่ใจว่าได้ In vitro packaging mixes ที่อยู่ในสภาพที่ใช้ได้จริง จึงได้มีการนำเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการผลิต phage λ gt 11, แบคทีเรียให้อาศัยที่เฉพาะสำหรับ phage λ gt 11 และแบคทีเรียที่ช่วยในการผลิต In vitro packaging mixes จากการฝึกอบรม ณ ประเทศอังกฤษซึ่งตั้งใจที่จะนำมาผลิตเพื่อใช้ประโยชน์ในงานด้านพันธุวิศวกรรมของประเทศไทย การจัดเตรียม λ gt 11 DNA เพื่อใช้เป็น standard DNA marker, cDNA cloning, expression vector และยังสามารถเตรียม In vitro packaging

ได้ด้วยโดยเริ่มต้นจากเชื้อแบคทีเรีย E. coli BNN 97 ซึ่งเป็น lysogen ที่ประกอบด้วย λgt 11 DNA อยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียให้อาศัย คือ E. coli Y 1088 เป็น amplification host, E. coli Y 1089 เป็น lysogenic host และ E. coli Y 1090 เป็น lytic host เป็นต้น ซึ่งจะช่วยในการผลิต λ gt 11 DNA, amplification libraries, เตรียม recombinant fusion protein และ screen λgt 11 libraries ด้วย antibody probes ในขั้นสุดท้ายของการผลิต In vitro packaging mixes ต้องอาศัยเชื้อแบคทีเรีย E. coli ที่ประกอบด้วย λ lysogen BHB 2688 และ BHB 2690 เพื่อผลิต Freeze thaw lysate และ Sonic extract ซึ่งจะเอื้อประโยชน์ให้สร้าง cDNA หรือ genomic libraries ใน λ gt 11 DNA ได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ คือ เพื่อผลิต λgt 11 DNA และ In vitro packaging mixes เพื่อใช้ในงานพันธุวิศวกรรม ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้คือ จะช่วยสนับสนุนโครงการสร้าง cDNA และ genomic libraries ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดไว้ใน λgt 11 DNA เพื่อจัดทำการสะสมพันธุกรรมไว้ สำหรับการทำพันธุวิศวกรรมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์

Sonicator

Autoclave

Freezer -70°c

Shaking water bath

Refrigerated centrifuge

Ultracentrifuge

Incubator

Microfuge centrifuge

Liquid nitrogen tank

Spectronic

Power supply

Gel chamber ขนาด 4"x6"

Balance

pH meter

Microwave oven

Refrigerator

Top bench centrifuge

Glassware

Centrifuge tube

Disposable syringe

Needle

Closures

Micropipette tip

Toothpick

Film TriX-pan 400

สารเคมี

Bactoagar

Tryptone

Yeast-extract

Agarose

Phenol

EcoRI

BamHI

HindIII

λ DNA

Sucrose

DNase I

RNase A

CsCl

Proteinase K

Spermidine

Sarkosyl

ATP

SDS

Magnesium chloride

Magnesium sulfate

β-mercaptoethanol

Hydrochloric acid

Polyethylene glycol 6000

Tris

Sodium chloride

Sodium acetate

Ethylenediamine tetraacetate disodium salt

Chloroform

absolute ethanol

Isopropanol

95% ethanol

2. เชื้อแบคทีเรียและ Bacteriophage

ก. E. coli BNN97 เป็น lysogen ที่ประกอบด้วย Bacteriophage λ gt 11 และใช้สำหรับการเตรียม λgt 11 DNA แบบขยายส่วน genotype ของ E. coli BNN97 เป็น hsd R^- hsd M^+ sup E thr leu thi lac Y1 ton A 21

ข. E. coli Y1088 เป็นแบคทีเรียให้อาศัยสำหรับ plate out และ amplification ของ library เพราะไม่สามารถเกิด host-controlled restriction modification enzyme activity แบคทีเรียนี้สร้าง lac repressor มายับยั้งการสร้าง polypeptides ในรูปของ β-galactosidase fusion protein ดังนั้นจึงไม่เกิดการล่าเอียงในกรณีที่มี recombinant ที่โตช้าในระหว่าง amplification ของ library genotype ของ E. coli Y1088 เป็น Δ lac_{U169} sup E sup F hsd R^- hsd M^+ met B trp R ton A 21 str A mcr A pro C :: Tn 5/pMC 9

ค. E. coli Y1090 เป็นแบคทีเรียให้อาศัยที่ใช้ในการ plate out λgt 11 libraries สำหรับการคัดเลือกด้วย antibody probes เพราะแบคทีเรียนี้ประกอบด้วย (1) lac repressor สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน lac Z ถ้าเติมตัวเหนี่ยวนำ IPTG (Isopropylthiogalactoside) จะทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน lac Z โดย lac repressor (2) ไม่มี lon protease ทำให้เพิ่มความเสถียรของ recombinant fusion protein เพราะไม่ถูกย่อยด้วย lon protease (3) sup F สามารถยับยั้ง phage mutation ที่ทำให้ไม่เกิด lysis genotype ของ E. coli Y1090 เป็น Δ lac_{U169} pro A^+ Δ(lon) ara D139 str A sup F mcr A trp C 22 :: Tn 10/pMC9

ง. E. coli Y1089 เป็นแบคทีเรียที่ใช้บุกรุก λgt11 recombinant lysogen ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการเตรียม recombinant fusion

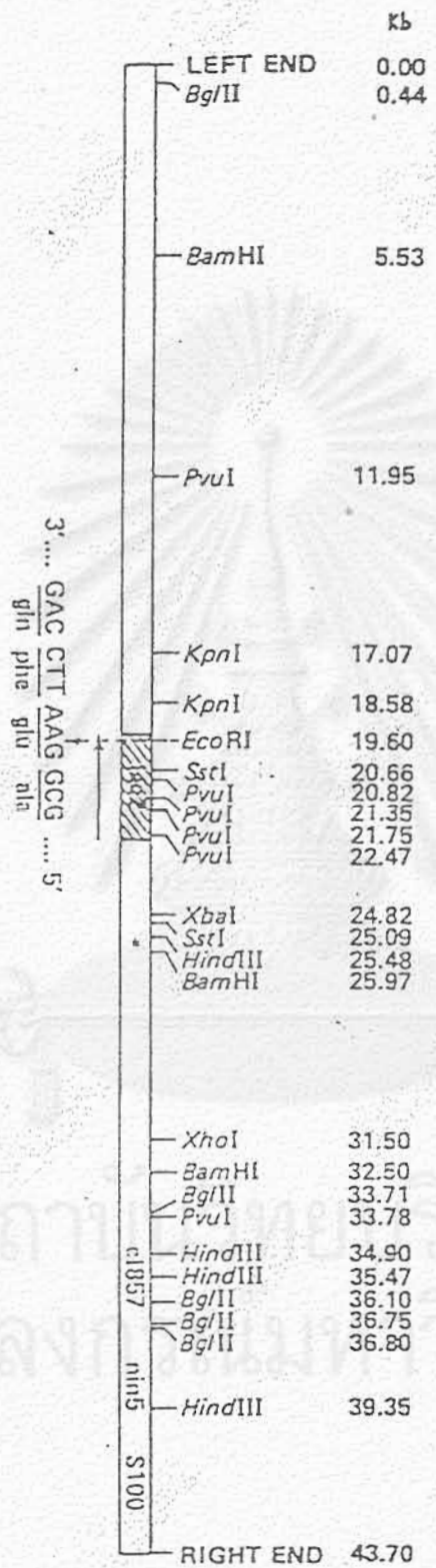
protein จำนวนมากที่เกิดจากชิ้น DNA ที่ clone เข้าไป เพราะแบคทีเรียนี้ประกอบด้วย (1) lac repressor (2) ไม่มี lon protease (3) เกิด mutation ที่ Hfl A 150 (High frequency lysogen) ซึ่งกระตุ้นการเกิดเป็น phage lysogeny อย่างมาก genotype ของ E. coli Y1089 เป็น Δ lac_{U169} pro A^{+} Δ(lon) ara D139 str A hfl A 150 chr :: Tn 10/pMC9

จ. E. coli BHB2688 เป็นแบคทีเรีย lysogen ที่ใช้เตรียม Freeze thaw lysate genotype ของ E. coli BHB2688 เป็น [N205 rec A^{-} (λ imm 434 cIts b2 red 3 Eam 4 Sam 7)/λ]

ฉ. E. coli BHB2690 เป็นแบคทีเรียlysogen ที่ใช้เตรียม Sonic extract genotype ของ E. coli BHB2690 เป็น [N205 rec A^{-} (λ imm 434 cIts b2 red 3 Dam 15 Sam 7)/λ]

ช. λgt 11 เป็น Bacteriophage ที่มี genotype เป็น lac 5 cI857 nin5 S100 และมีแผนผังยีนตามรูปที่ 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 แสดงแผนผัง gene และ restriction map บน λgt 11 DNA (1)

ดพ
574.192
ท167ก
2536
เลขหมู่
เลขทะเบียน 2469
วันที่ เดือน 14 ก.ค. 2541 พ.ศ.

3. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

3.1 การเก็บรักษาเชื้อในระยะสั้น

โคโลนีของแบคทีเรียถูกเก็บรักษาบนพื้นที่ผิวของอาหารแบบแข็ง (LB agar) โดยมีแผ่นพาราฟิล์มพันรอบ plate และเก็บคว่ำ plate ที่ 4°c เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์

3.2 การเก็บรักษาเชื้อในระยะยาว

เชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีถูกเขี่ยมาใส่ใน 5-10 ml ของ LB แล้วหมุนตลอดคืน จากนั้นเติม sterile glycerol ลงไปจนมีความเข้มข้นสุดท้าย 50% ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เก็บไว้ที่ -20°c และ-70°c.

4. การทดสอบ Bacteriophage λ gt 11 lysogen

4.1 streak E. coli BNN97 บน LB-agar plate เป็นจำนวน 1 plate แล้วนำไปบ่มที่ 32°c ข้ามคืน

4.2 เลือกขนาดของโคโลนีปานกลางที่ขึ้นบน plate ที่บ่มที่ 32°c มาทำ replica plate โดยใช้ประมาณ 25 โคโลนี จากนั้นนำ plate หนึ่งไปบ่มที่ 32°c และอีก plate หนึ่งไปบ่มที่ 42°c ข้ามคืน

4.3 โคโลนีที่เจริญที่ 32°c แต่ไม่เจริญที่ 42°c จะถูกนำมาใช้ในการทำการทดลองเตรียม Bacteriophage λ gt 11 stock solution

5. การเตรียม Bacteriophage λ gt 11 stock solution

5.1 นำเชื้อแบคทีเรีย E. coli BNN97 ที่ได้ตรวจสอบ temperature sensitivity ดังข้อ 4 แล้วมาเป็น starter ของการเตรียม Bacteriophage λ gt 11

5.2 เขี่ย 1 โคโลนีของ E. coli BNN97 ใส่ใน LB ปริมาตร 1 ml แล้วหมุนตลอดคืนที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเป็น starter culture

5.3 ใส่ starter culture ปริมาตร 1 ml ลงใน LB ปริมาตร 100 ml และเขย่าที่ 32°c จนกระทั่ง OD_{600} = 0.6

5.4 นำ culture ไปกระตุ้นที่ 45°c อย่างรวดเร็วเท่าที่จะทำได้และเขย่าต่ออีก 15 นาที

5.5 นำ culture ไปเขย่าที่ 37°c เป็นเวลาอีก 3 ชั่วโมง

5.6 ปั่นที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°c เพื่อเก็บเซลล์ จากนั้นเก็บ supernate ไว้เป็น Bacteriophage λ gt 11 stock solution ที่ -20°c

6. การทำ Titering ของ Bacteriophage λgt 11 stock solution

6.1 เชื้อ E. coli Y1088 1 โคโลนีใส่ใน LB ปริมาตร 5 ml หมุนข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง

6.2 ปั่นที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

6.3 กระจายตะกอนใน 0.01 M $MgSO_4$ ปริมาตร 2 ml

6.4 เก็บสารละลายเซลล์ไว้ที่ 4°c จนกว่าจะใช้ (สามารถเก็บไว้ได้ 1 สัปดาห์)

6.5 เจือจาง Bacteriophage λgt 11 stock solution ด้วยสารละลาย SM medium จนเป็น 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, และ 10^{-7} เท่า

6.6 ปิเปตสารละลาย Bacteriophage λgt 11 จากแต่ละ dilution ปริมาตร 0.1 ml ผสมรวมกับสารละลายเซลล์ในข้อ 6.4 ปริมาตร 0.1 ml

6.7 บ่มที่ 37°c เป็นเวลา 20 นาที

6.8 เติม 0.7% soft agar ที่อุ่นที่ 55°c ปริมาตร 3 ml แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex ที่หมายเลข 3

6.9 เทลงบน LB-agar plate แล้วเอียงให้ soft agar กระจายทั่วทั้ง plate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°c เป็นเวลาข้ามคืน

6.10 นับจำนวน plaques ที่เกิดในแต่ละ dilution และคำนวณหาจำนวน pfu (plaque forming unit)/μl ของ Bacteriophage λgt 11 stock solution

7. การเก็บ Bacteriophage λgt 11 solution เป็นระยะเวลานาน

7.1 เขี่ยเชื้อ E. coli Y1088 จำนวน 1 โคโลนีใส่ใน LB ปริมาตร 5 ml แล้วหมุนตลอดคืนที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเป็น starter culture

7.2 ปั่นที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

7.3 กระจายตะกอนใน 0.1 M $MgSO_4$ ปริมาตร 2 ml

7.4 ใส่ Bacteriophage λgt 11 stock solution จำนวน 10^5 pfu ในสารละลาย SM medium ปริมาตร 1 ml

7.5 เติมสารละลายเซลล์จากข้อ 7.3 ปริมาตร 10 μl ลงไป ผสมให้เข้ากัน

7.6 บ่มที่ 37°c เป็นเวลา 15 นาที

7.7 เทใส่ใน LB ปริมาตร 10 ml ที่มี 10 mM $MgSO_4$

7.8 บ่มที่ 37°c โดยการเขย่าอย่างแรง 350 rpm เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง

7.9 ปิเปตสารละลายจากข้อ 7.8 ปริมาตร 100 μl ใส่ในหลอด eppendorf ปริมาตร 1.5 ml ที่บรรจุ glycerol ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 15 μl แล้วผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่ -20°c จำนวน pfu ในแต่ละหลอด = 10^5 pfu

8. การแยก λgt 11 DNA แบบเสกลเล็ก (13)

8.1 นำสารละลาย Bacteriophage λgt 11 ที่เก็บเป็นระยะเวลายาวนานที่ -20°c มาตั้งทิ้งไว้ให้หลอมเหลวที่อุณหภูมิห้อง

8.2 ปิเปตสารละลาย Bacteriophage λgt 11 ปริมาตร 0.5 ml คิดเป็น 5×10^5 pfu ใส่ใน LB ปริมาตร 50 ml ที่มี 10 mM $MgSO_4$

8.3 บ่มที่ 37°c โดยการเขย่า 250 rpm เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จนเห็น lysis ชัดเจน

8.4 ปั่น 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°c

8.5 นำส่วนใสมาเติม Polyethylene glycol (PEG) 6000 และ NaCl จนมีความเข้มข้นสุดท้าย 10% (W/V) และ 1M ตามลำดับ

8.6 กวนอย่างเบา ๆ ด้วย magnetic stirrer ที่ 4°c ข้ามคืน

8.7 ปั่น 10,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4°c

8.8 กระจายตะกอนในสารละลาย SM medium ปริมาตร 3 ml

8.9 เติม DNase I และ RNase A จนมีความเข้มข้นสุดท้าย 1 μg/ml และ 10 μg/ml ตามลำดับ

8.10 บ่มที่ 37°c เป็นเวลา 30 นาที

8.11 เติม SDS, EDTA และ Pronase จนมีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1% (W/V), 10 mM และ 0.1 mg/ml ตามลำดับ

8.12 บ่มที่ 65°c เป็นเวลา 30 นาที

8.13 สกัดสารละลายด้วย phenol : chloroform : isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25 : 24 : 1

8.14 ใช้ pasteur pipette ที่ดัดปลายแหลมทิ้งดูดส่วนบนของ aqueous phase ใส่ใน corex tube ขนาด 15 ml

8.15 เติม 3M NaOAc pH 4.8 จนมีความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 M

8.16 เติม absolute ethanol จำนวน 2 ปริมาตรของสารละลายในข้อ 8.15

8.17 เก็บที่ -20°c ข้ามคืน

8.18 ปั่น 10,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4°c

8.19 นำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่ 37°c ข้ามคืน เพื่อขจัด ethanol ออกให้หมด

8.20 ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 1 ml และเขย่าอย่างเบา ๆ

8.21 วัด Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 nm. โดยใช้ TE buffer เป็น blank

8.22 คำนวณความเข้มข้นของ λgt 11 DNA โดยใช้ค่า A_{260} = 20 คิดเป็นความเข้มข้น 1 mg/ml

8.23 นำ λgt 11 DNA ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยการย่อยด้วย Hind III และตรวจการแยกชิ้น DNA บน 0.7% agarose gel electrophoresis โดยใช้สารละลาย Tris-borate buffer pH 8.3 เป็น electrophoresis buffer และมี bromphenol blue เป็น tracking dye ความต่างศักย์ที่ใช้ในการแยกคือ 80 โวลต์

8.24 ภายหลังจากย้อมสี agarose gel ด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที และ destain ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที จึงค่อยนำ agarose gel ไปถ่ายรูปภายใต้แสง UV ในห้องมืด ฟิล์มที่ใช้บันทึกภาพเป็นฟิล์ม Kodak TriX-pan 400 โดยเปิดหน้ากล้องหมายเลข 8, มี filter สีแดงช่วยทำให้แถบ DNA ที่เรืองแสงสีแดงส้มเข้มขึ้น และตั้ง shutter speed เป็น blank เมื่อกด shutter ให้กดแช่ไว้โดยนับจาก 1 ถึง 20 แล้วปล่อย shutter จากนั้นนำฟิล์มไปล้างและอัดขยายภาพ

9. <u>การเตรียม λgt 11 DNA แบบขยายส่วน</u>

9.1 เขี่ย <u>E. coli</u> Y 1088 จำนวน 1 โคโลนี ใส่ใน LB ปริมาตร 5 ml และหมุนข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง

9.2 ปั่น 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

9.3 กระจายตะกอนใน 0.01 M $MgSO_4$ ปริมาตร 2 ml

9.4 เก็บสารละลายเซลล์ที่ 4°c ได้เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

9.5 เจือจาง Bacteriophage λgt 11 ที่มีค่า 10^8 pfu/μl ให้เป็น 10^{-2} เท่าด้วยสารละลาย SM medium ปริมาตร 1 ml คิดเป็นปริมาณ λgt 11 = 10^4 pfu

9.6 เติมสารละลายเซลล์จากข้อ 9.4 ปริมาตร 1 ml

9.7 บ่มที่ 37°c เป็นเวลา 20 นาที

9.8 เทลงใน LB ปริมาตร 50 ml

9.9 เขย่าที่ 37°c และวัด Absorbance ที่ความยาวคลื่น 600 nm. ทุก ๆ 30 นาที

9.10 เมื่อค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 600 nm. ค่อย ๆ ลดลง ให้เก็บสารละลายที่ 4°c เรียกสารละลายนี้ว่า "Phage infected culture"

9.11 เติมสารละลายเซลล์จากข้อ 9.4 ปริมาตร 1 ml ลงใน LB ปริมาตร 100 ml และเขย่าที่ 37°c ข้ามคืน

9.12 เตรียม LB ปริมาตร 250 ml ที่มี 10 mM $MgSO_4$ ทั้งหมด 4 flasks

9.13 เติมสารละลายเซลล์จากข้อ 9.11 ปริมาตร 20 ml ลงในแต่ละ flask ที่เตรียมไว้ในข้อ 9.12

9.14 เขย่าที่ 37°c และวัด Absorbance ที่ความยาวคลื่น 600 nm. ทุก ๆ 30 นาที และวาดกราฟ OD_{600} กับเวลา

9.15 เมื่อ OD_{600} มีค่า 0.2-0.3 จึงค่อยเติม phage infected culture ปริมาตร 10 ml

9.16 วัด Absorbance ที่ความยาวคลื่น 600 nm. จนกระทั่ง OD_{600} ค่อย ๆ ลดลง

9.17 เติม NaCl 14.8 กรัม ลงในแต่ละ flask เพื่อหยุด phage infection และเขย่าที่ 37°c ด้วยความเร็ว 120 rpm เป็นเวลา 15 นาที

9.18 เติม chloroform ปริมาตร 2.5 ml

9.19 เขย่าที่ 37°c ด้วยความเร็ว 120 rpm เป็นเวลา 10 นาที

9.20 เติม DNase I, RNase A จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20 $\mu g/ml$

9.21 เขย่าที่ 37°c ด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

9.22 ปั่น 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°c

9.23 เท supernatant ผ่านผ้าขาวบางซ้อน 4 ชั้น

9.24 เติม PEG 6000 ลงใน supernatant จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10%(W/V)

9.25 ใช้ magnetic bar กวนจน PEG 6000 ละลายหมด

9.26 เก็บสารละลายที่ 4°c, ข้ามคืน

9.27 กวนสารละลายอีก 30 นาที ก่อนนำไปปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°c

9.28 ละลายตะกอนด้วย SM medium ปริมาตร 10 ml

9.29 เติม CsCl 7.5 กรัมลงไปในสารละลาย

9.30 เทใส่หลอด polyallomer tube ปริมาตร 13.5 ml

9.31 ปั่น 55,000 rpm เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ที่ 25°c

9.32 เมื่อสิ้นสุดการปั่น ใช้ slow accelerate ที่ 36,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที จึงค่อยปิดเครื่อง

9.33 เจาะ band ทางด้านข้างโดยใช้เข็มขนาด 18 G 1 1/2 ที่ต่อกับกระบอกเข็มฉีดยาขนาด 10 ml

9.34 dialyse phage band ด้วย buffer ที่ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง โดยเปลี่ยน buffer 2-3 ครั้ง เพื่อขจัด CsCl

9.35 เทสารละลาย phage ใส่หลอดทดลอง

9.36 เติม EDTA, Pronase, และ SDS จนมีความเข้มข้น 20 mM, 200 μg/ml และ 1%(W/V) ตามลำดับ

9.37 บ่มที่ 65°c เป็นเวลา 30 นาที

9.38 สกัด phage DNA ด้วย phenol/$CHCl_3$/isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25 : 24 : 1 พร้อมกับเขย่าเบา ๆ

9.39 ใช้ pasteur pipette ที่หักปลายแหลมออกเพื่อใช้ดูดชั้นบนของ aqueous phase ใส่ใน corex tube ปริมาตร 15 ml

9.40 เติม 3 M NaOAc pH 4.8 จนมีความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 M

9.41 เติม absolute ethanol จำนวน 2 ปริมาตรของสารละลายในข้อ 9.40

9.42 เก็บไว้ที่ -20°c, ข้ามคืน

9.43 ปั่น 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°c

9.44 นำตะกอน DNA ไปอบแห้งที่ 37°c, ข้ามคืน

9.45 ละลาย DNA ในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 1 ml

9.46 วัด Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยใช้สารละลาย TE buffer เป็น blank

9.47 คำนวณความเข้มข้นของ DNA โดยใช้ค่า OD_{260} เท่ากับ 20 คิดเป็นความเข้มข้น 1 mg/ml

9.48 นำ DNA ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยการย่อยด้วย Hind III และตรวจดูขนาดชิ้น DNA บน 0.7% agarose gel electrophoresis ที่มี electrophoresis buffer เป็น Tris-borate buffer pH 8.3 และมี bromphenol blue เป็น tracking dye ความต่างศักย์ที่ใช้ คือ 80 โวลต์

9.49 ภายหลังจากย้อมสีด้วย ethidium bromide และ destain ด้วยน้ำกลั่นแล้ว จึงตรวจดูแถบ DNA บน agarose gel ด้วยการส่องด้วยแสง UV บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพด้วยฟิล์ม Kodak TriX-pan 400 โดยการใช้ฟิลเตอร์สีแดงส้ม เปิดหน้ากล้องเลข 8 และ shutter speed ตั้งที่ blank เมื่อกด shutter ให้กดค้างโดยนับ 1 ถึง 20 จึงปล่อย shutter จากนั้นนำไปล้างฟิล์มและอัดขยายภาพ

10. <u>การเตรียม Freeze thaw lysate จากเชื้อ E. coli BHB 2688</u>

10.1 เขี่ยเชื้อ E. coli BHB 2688 มาตรวจ Temperature sensitivity ที่ 32°c และ 42°c บน LB-agar replica plate

10.2 โคโลนีที่เจริญที่ 32°c แต่ไม่เจริญที่ 42°c จะถูกนำมาใช้เป็นเชื้อตั้งต้น

10.3 เขี่ย 1 โคโลนีจากข้อ 10.2 มาใส่ใน LB ปริมาตร 100 ml และเขย่าที่ 32°c ข้ามคืน

10.4 นำสารละลายจากข้อ 10.3 ปริมาตร 20 ml ใส่ใน LB ปริมาตร 500 ml โดยมี OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และเขย่าอย่างรุนแรงที่ 32°c จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.2-0.3

10.5 นำ flask ไปเขย่าที่ 45°c เป็นเวลา 15 นาทีอย่างรวดเร็ว

10.6 บ่มที่ 38°c และเขย่าอย่างรุนแรงเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง

10.7 แบ่งสารละลายปริมาตร 0.5 ml ทุก ๆ 20 นาที มาเติม chloroform 2-3 หยด เพื่อทดสอบ lysis ตัวอย่างจะต้องใสภายใน 2-3 นาที

10.8 ปั่น 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°c เพื่อเก็บเซลล์

10.9 เก็บตะกอนเซลล์บนน้ำแข็ง แล้วกระจายตะกอนใน 10% sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 7.5 ที่เย็นจัด ปริมาตร 3 ml แล้วแบ่งใส่หลอด eppendorf หลอดละ 0.5 ml

10.10 เติม lysozyme 10 mg/ml ใน 0.25 M Tris-HCl pH 7.5 ปริมาตร 6 μl ลงในสารละลายที่เป็นแป้งเปียก 0.5 ml ที่แช่เย็นจัดใน eppendorf tube

10.11 ผสมสารละลายอย่างรวดเร็วและแช่ใน liquid nitrogen ทันที

10.12 หลังจากที่หลอมบนน้ำแข็งจนกระทั่งสารละลายแป้งเปียกมองดูกึ่งเหลวและเหนียว จึงเติม Q1 buffer ที่เตรียมใหม่ ๆ ซึ่งประกอบด้วย 10 mM β-mercaptoethanol, 6 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM Spermidine, 18 mM $MgCl_2$ และ 15 mM ATP ปริมาตร 150 μl ลงในแต่ละหลอด

10.13 รวบรวม lysate อย่างเบา ๆ ใส่ในหลอด centrifuge และปั่นที่ 18,000 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 4°c

10.14 ปิเปต supernate ปริมาตร 25 μl ใส่ใน eppendorf tube ที่แช่แข็งอย่างรวดเร็วใน liquid nitrogen

10.15 เก็บ Freeze thaw lysate ไว้ที่ -70°c

11. <u>การเตรียม Sonic extract จากเชื้อ E. coli BHB2690</u>

11.1 เขี่ยเชื้อ E. coli BHB 2690 มาตรวจ Temperature sensitivity ที่ 32°c และ 42°c บน LB-agar replica plate

11.2 โคโลนีที่เจริญที่ 32°c แต่ไม่เจริญที่ 42°c จะถูกนำมาใช้เป็นเชื้อตั้งต้น

11.3 เขี่ย 1 โคโลนีจากข้อ 11.2 มาใส่ใน LB ปริมาตร 100 ml และเขย่าที่ 32°c ข้ามคืน

11.4 นำสารละลายเซลล์จากข้อ 11.3 ปริมาตร 20 ml ใส่ใน LB ปริมาตร 500 ml โดยมี OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และเขย่าอย่างรุนแรงที่ 32°c จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.2-0.3

11.5 นำ flask ไปเขย่าที่ 45°c เป็นเวลา 15 นาที อย่างรวดเร็ว

11.6 บ่มที่ 38°c และเขย่าอย่างรุนแรงเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง

11.7 แบ่งสารละลายปริมาณ 0.5 ml ทุก ๆ 20 นาที มาเติม chloroform 2-3 หยด เพื่อทดสอบ lysis ตัวอย่างต้องใสภายใน 2-3 นาที

11.8 ปั่น 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°c เพื่อเก็บเซลล์

11.9 เก็บตะกอนเซลล์บนน้ำแข็งและกระจายตะกอนด้วย Buffer A ที่เตรียมใหม่ ๆ ซึ่งประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM β-mercaptoethanol และ 1 mM EDTA ปริมาตร 3 ml

11.10 เทสารละลายใส่ใน corex tube ปริมาตร 15 ml วางหลอดในน้ำแข็งที่มีเกลือบรรจุในบีกเกอร์ แล้ว sonicate ใน sonicator ที่มี microtip ให้พลังสูงสุดภายใน 5 วินาทีจะเกิดแตกออก และหยุด 20 วินาทีจนกระทั่งสารละลายใส จะไม่มีฟองเกิดขึ้นเป็นเวลา 12 นาที

11.11 ปั่น 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°c

11.12 เท supernate ลงในหลอดที่แช่ใน liquid nitrogen แล้วเติม 0.6 ml ของ Q1 buffer ที่เตรียมใหม่ ๆ ซึ่งประกอบด้วย 10 mM β-mercaptoethanol, 6 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM spermidine, 18 mM $MgCl_2$ และ 15 mM ATP

11.13 ปิเปตสารละลาย 20 μl ใส่ใน eppendorf tube ที่แช่เย็นจัดที่ -70°c

11.14 เก็บ Sonic extract ไว้ที่ -70°c

12. <u>การทดสอบประสิทธิภาพของ In vitro packaging mixes</u>

12.1 นำ packaging mixes ทั้งสองคือ Freeze thaw lysate และ Sonic extract จาก -70°c มาวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้หลอมเหลว

12.2 ผสมสารละลายตามลำดับดังต่อไปนี้ใน Eppendorf tube 4 หลอด

สารละลาย	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	หลอดที่ 4
Sonic extract (μl)	5	5	5	5
TE buffer (μl)	1	-	-	-
7.9 μg/μl λgt 11 DNA (μl)	-	1	-	-
0.79 μg/μl λgt 11 DNA (μl)	-	-	1	-
0.079 μg/μl λgt 11 DNA (μl)	-	-	-	1
Freeze thaw lysate (μl)	25	25	25	25

12.3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

12.4 เติม SM medium ปริมาตร 200 μl ลงในแต่ละหลอด

12.5 ทำ dilution สารละลายในหลอดที่ 2, 3 และ 4 ด้วย SM medium เป็น 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} dilution ส่วนหลอดที่ 1 ไม่ต้องทำ dilution

12.6 เลี้ยงแบคทีเรีย E. coli Y1088 1 โคโลนีใน LB ปริมาตร 5 ml ข้ามคืนแล้วนำมาปั่นที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที

12.7 เท supernate ทิ้ง แล้วกระจายตะกอนเซลล์ใน 0.01 M $MgSO_4$ ปริมาตร 2 ml สามารถเก็บสารละลายนี้ที่ 4°c เป็นเวลา 1 สัปดาห์

12.8 ใช้ 10 μl ของสารละลาย Bacteriophage ที่ dilute หรือของสารละลายในหลอดที่ 1 ผสมกับ 100 μl ของสารละลายแบคทีเรีย E. coli Y1088 แล้วเขย่า

12.9 บ่มที่ 37°c เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เกิด absorb phage particle บนแบคทีเรีย

12.10 เติม 0.7% LB-soft agar ที่อุ่นที่ 55°c ปริมาตร 3 ml แล้วผสมและเททันทีลงบน LB-agar plate จากนั้นกระจาย soft agar ให้ทั่วทั้ง plate โดยเอียง plate

12.11 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนกระทั่ง soft agar แข็ง

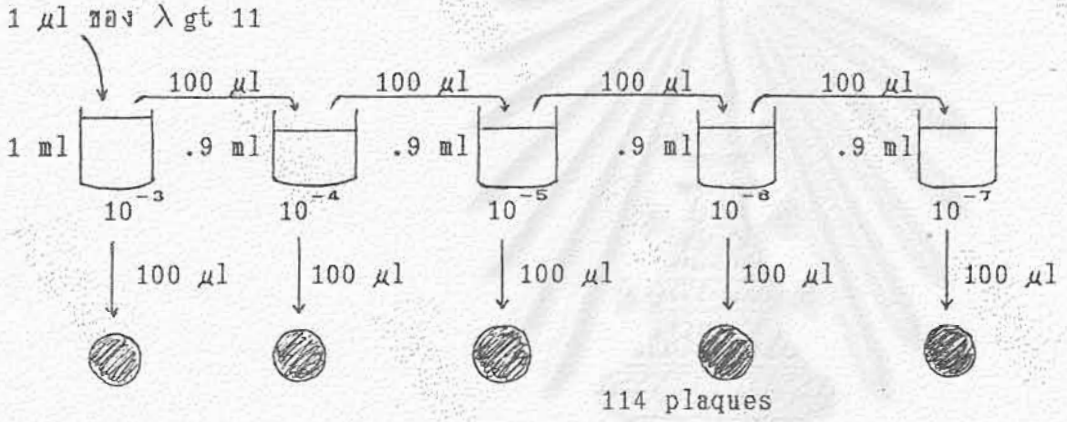
12.12 นำ plate มาวางคว่ำที่ 37°c, ข้ามคืน

12.13 นับจำนวน plaques ที่ปรากฏในแต่ละ plate แล้วคำนวณประสิทธิภาพของ In vitro packaging mixes เป็น plaques forming unit (pfu)/μg DNA

ผลการวิจัย

1. Titering of Bacteriophage λ gt 11 stock

เมื่อนำ Bacteriophage λ gt 11 stock มาทำ dilution ตั้งแต่ 10^{-3}-10^{-7} เท่า และเติมเชื้อ E. coli Y1080 เพื่อ amplified Bacteriophage λgt 11 stock ได้ผลตามรูปที่ 5 และ 6 ตามลำดับ เมื่อตรวจนับ plaque forming unit (pfu) ที่ dilution 10^{-6} เท่า พบว่ามี 114 plaques ดังนั้น วิธีการคำนวณหา pfu ของ Bacteriophage λ gt 11 DNA ของ stock solution ได้แสดงไว้ดังต่อไปนี้



เมื่อตรวจนับ pfu ที่ dilution 10^{-6} เท่า พบว่ามี 114 pfu

จาก 100 μl ของ dilution 10^{-6} จะมี phage = 114 pfu

. . 1 ml ของ dilution 10^{-6} จะมี phage = $\frac{114 \times 1000}{100}$ pfu/100 μl ของ dilution 10^{-5}

= 1.14×10^{3} pfu/100 μl ของ dilution 10^{-5}

. . 1 ml ของ dilution 10^{-5} จะมี phage = $\frac{1.14 \times 10^{3} \times 1000}{100}$ pfu/100 μl ของ dilution 10^{-4}

= 1.14×10^{4} pfu/100 μl ของ dilution 10^{-4}

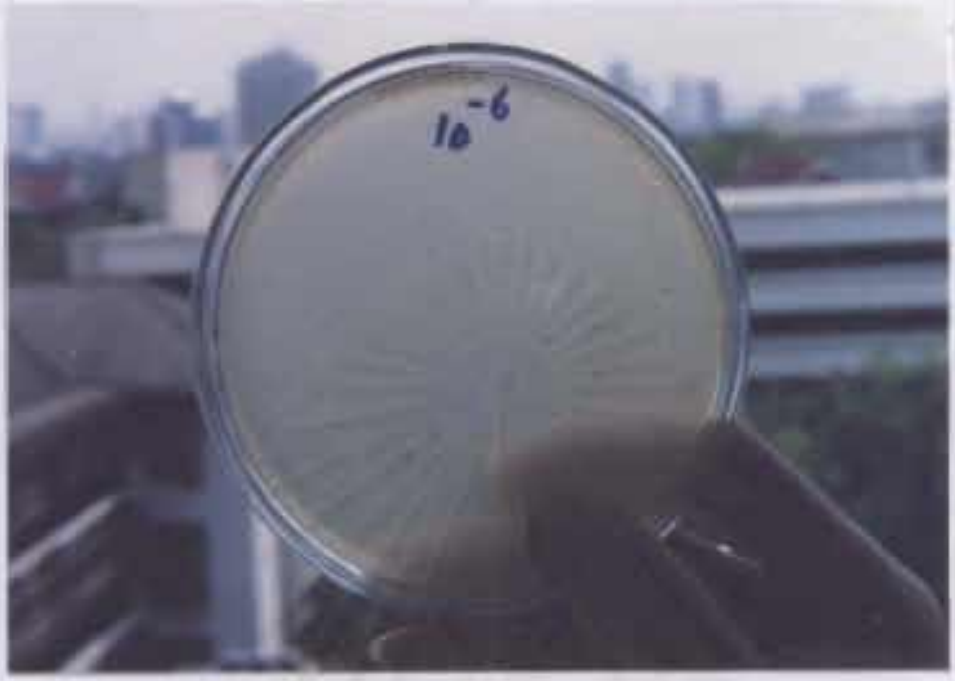
. . 1 ml ของ dilution 10^{-4} จะมี phage = $\frac{1.14 \times 10^{4} \times 1000}{100}$ pfu/100 μl ของ dilution 10^{-3}

= 1.14×10^{5} pfu/100 μl ของ dilution 10^{-3}

. . 1 ml ของ dilution 10^{-3} จะมี phage = $\frac{1.14 \times 10^{5} \times 1000}{100}$ pfu/μl ของ stock

= 1.14×10^{6} pfu/μl ของ stock

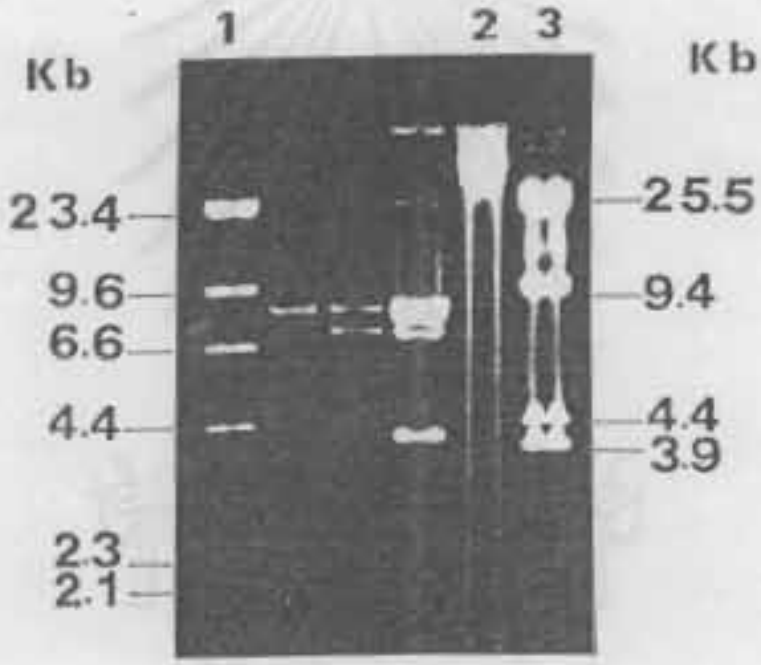
รูปที่ 5 แสดง plaques ใน plate ที่ dilute 10^{-x} และ 10^{-x} เท่า



รูปที่ 6 แสดง plaques บน plate ที่ dilute 10^{-6} และ 10^{-7} เท่า

2. การแยก λgt 11 DNA แบบเศษเล็กจาก Bacteriophage λgt 11 ที่เก็บเป็นระยะเวลายาวนาน

เมื่อนำ Bacteriophage λgt 11 ที่เก็บเป็นระยะเวลายาวนานมาแยก λgt 11 DNA พบว่า สามารถแยก λgt 11 DNA ได้เข้มข้น 7.93 mg/ml โดยมีปริมาณทั้งหมด 7.93 มก. แต่มีการปนเปื้อนของ chromosomal DNA อยู่บ้างเป็นรอยทางยาว เมื่อทำการย่อย λgt 11 DNA ด้วย Hind III ได้ชิ้น DNA 4 ชิ้น (รูปที่ 7) ซึ่งตรงตาม Restriction map ของ λgt 11 DNA ในรูปที่ 4

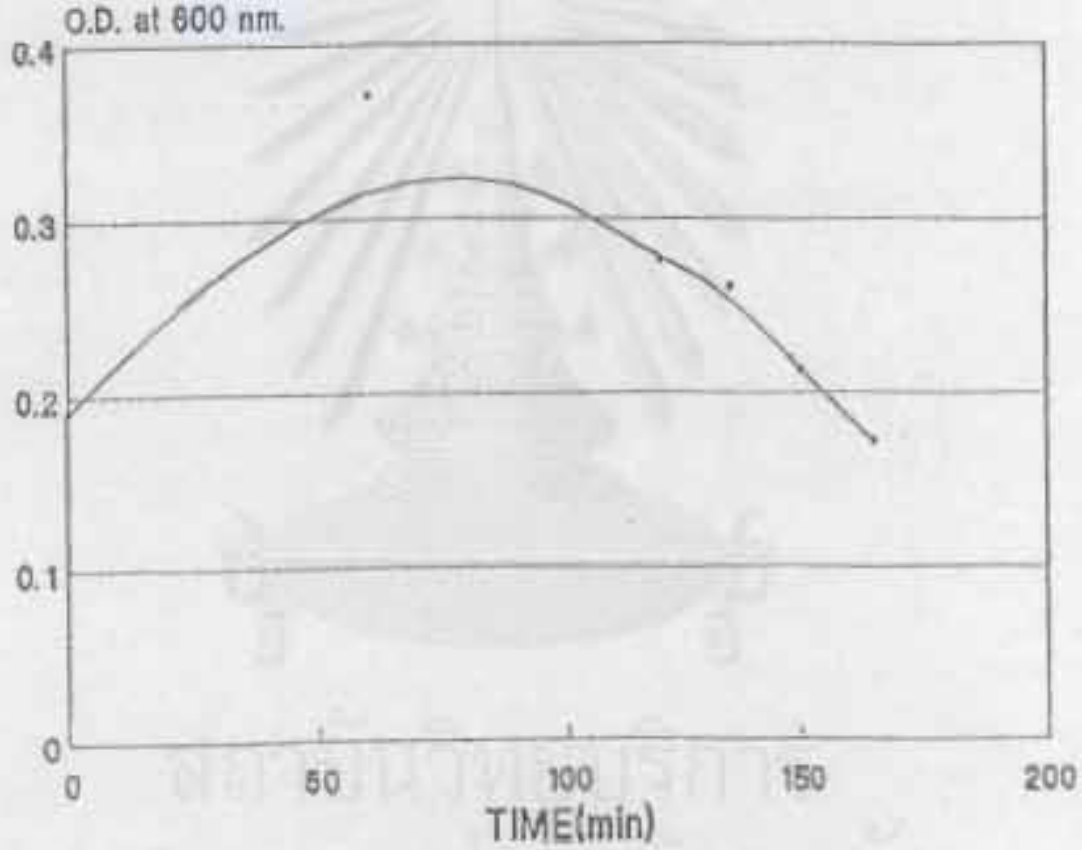


รูปที่ 7 แสดงการแยก DNA บน 0.7% agarose gel
ช่องที่ 1 เป็น λ DNA/Hind III standard marker
ช่องที่ 2 เป็น λgt 11 DNA ที่แยกจากวิธีการนี้
ช่องที่ 3 เป็น λgt 11 DNA/Hind III ได้ชิ้น DNA จำนวน 4 ชิ้น ที่มีขนาด 25.5, 9.4, 4.4 และ 3.9 kb ตามลำดับ

3. การเตรียม λgt 11 DNA ในระดับขยายส่วน

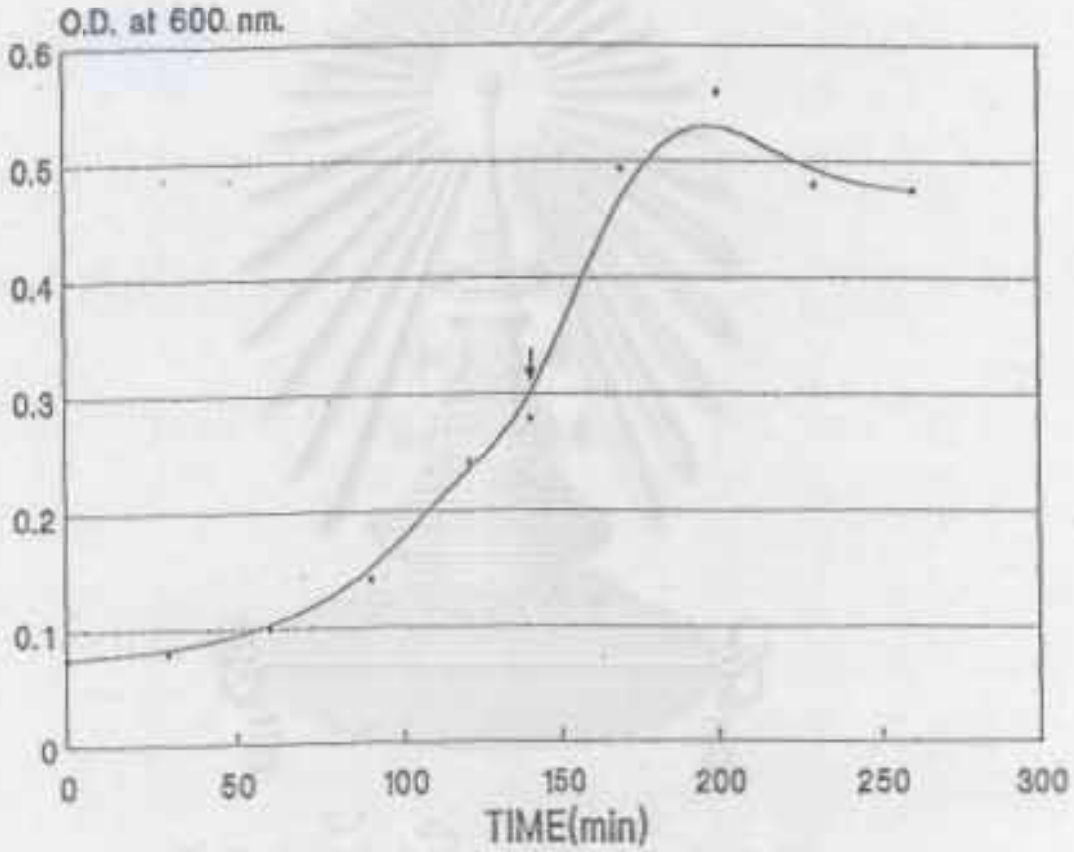
ในการเพิ่มจำนวน phage ด้วยการเตรียม phage infected culture ก่อนที่จะใส่ลงไปใน culture จำนวนมากช่วยให้การเตรียม λgt 11 DNA ประสบผลสำเร็จ

การคิดหาปรากฏการณ์ lysis ของ phage infected culture ซึ่งสามารถวัดได้จาก OD_{600} เมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 8) OD_{600} จะเริ่มลดลงแสดงว่า phage ทำให้เกิด lysis ของเซลล์แบคทีเรีย



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{600} กับเวลาที่เชื้อ E. coli Y1088 เพิ่มจำนวน Phage infected culture ใสหัว phage เจือจาง 10^{-8} เท่า ปริมาตร 1 ml ผสมกับเชื้อ E. coli Y1088 ที่เลี้ยงข้ามคืนปริมาตร 2 ml

เมื่อติดตามปรากฏการณ์ lysis ใน flask ที่มี LB ปริมาตร 250 ml ทั้งหมด 4 flasks พบว่า OD_{600} เริ่มลดลงเช่นกันภายหลังจากเติม phage infected culture ปริมาตร 10 ml ลงไป (รูปที่ 9)

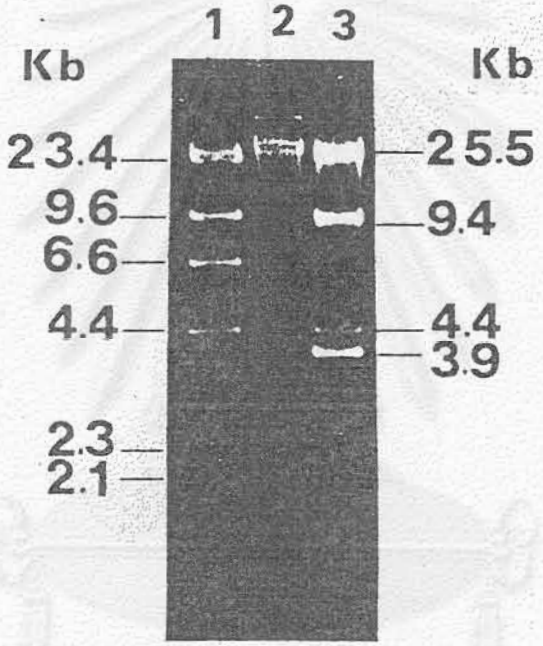


รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{600} กับเวลาที่เลี้ยงเชื้อ E. coli Y1088 ในระดับขยายส่วน โดยใช้เชื้อ E. coli Y1088 ที่เลี้ยงข้ามคืนปริมาตร 20 ml เติมลงไปใน LB ปริมาตร 250 ml และเขย่าที่ 37°c เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงใส่ phage infected culture ปริมาตร 10 ml ลงไปและเขย่าที่ 37°c จนกระทั่ง OD_{600} เริ่มลดลง ตำแหน่งลูกศรชี้ในกราฟแสดงเวลาที่เติม phage infected culture ลงไป

สิ้นสุดขั้นตอนการแยก λ gt 11 DNA แบบหยาบส่วน พบว่ามี phage band สีขาว ตกตะกอนหลอด centrifuge (รูปที่ 10) เมื่อทำการสกัด λ gt 11 DNA จาก phage band ที่ได้มีปริมาณ 0.25 mg/ml จากนั้นวิเคราะห์ λ gt 11 DNA ที่ได้บน 0.7% agarose gel electrophoresis (รูปที่ 7) จะพบว่าชิ้น DNA ของ λ gt 11 มีขนาดใหญ่กว่า 23.4 kb และมี chromosomal DNA ปนเปื้อนเล็กน้อยตรงหลุมที่ใส่ตัวอย่าง

รูปที่ 10 แสดง phage band ที่ได้จากการปั่น ultracentrifuge

ในการย่อย λgt 11 DNA ที่เตรียมแบบแยกส่วนด้วย Hind III ได้ขนาดชิ้น DNA 25.5, 9.4, 4.4 และ 3.9 kb ตามลำดับ (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 แสดงการแยก DNA บน 0.7% agarose gel electrophoresis

ช่องที่ 1 เป็น λ DNA/Hind III standard marker

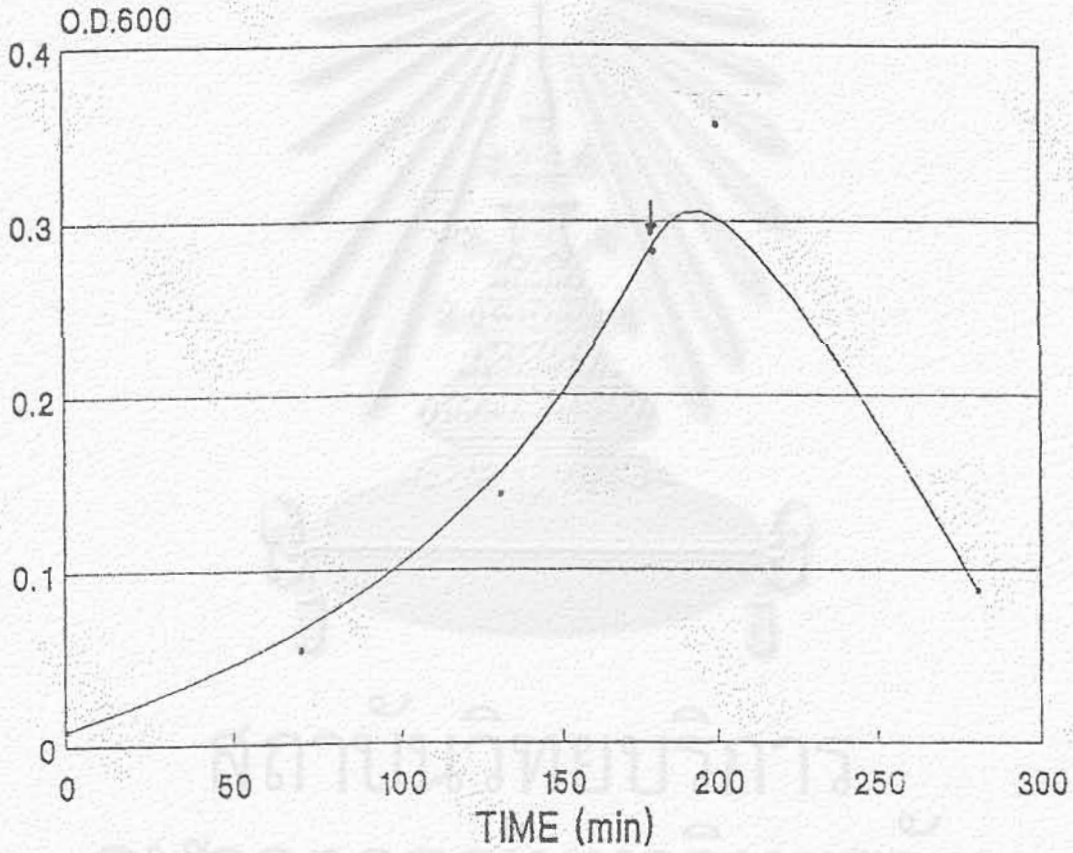
ช่องที่ 2 เป็น λgt 11 DNA ที่แยกได้จากการปั่น ultracentrifuge

ช่องที่ 3 เป็น λgt 11 DNA/Hind III

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเตรียม Freeze thaw lysate

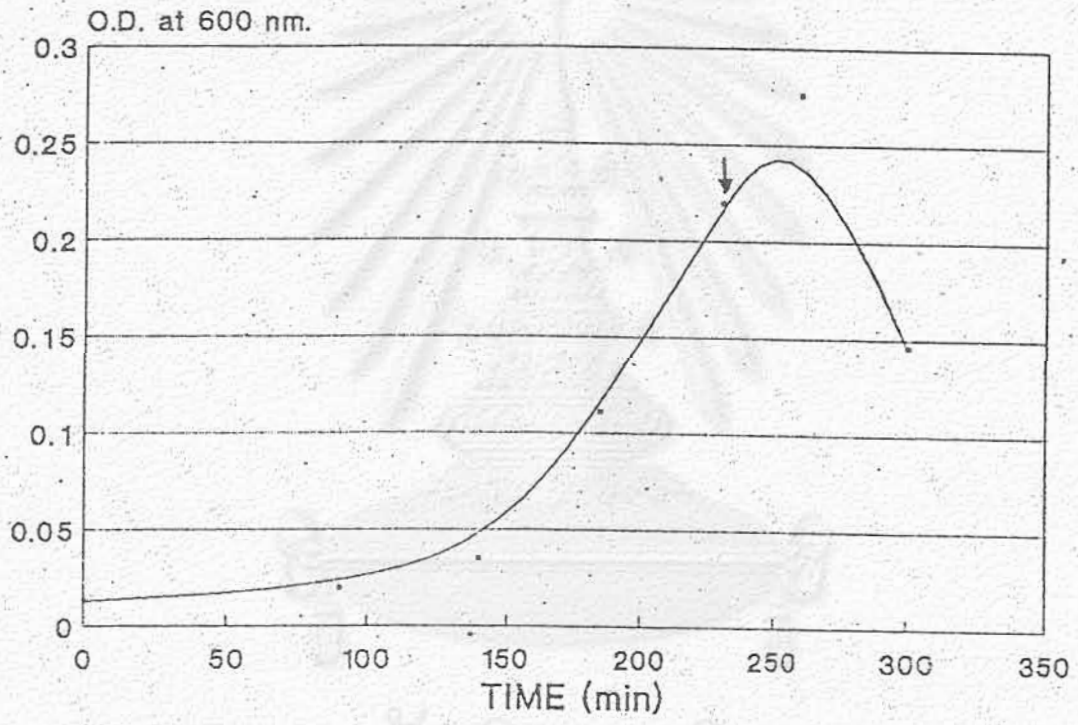
เมื่อนำเชื้อ E. coli BHB2688 มาเลี้ยงที่ 32°c โดยติดตามการเจริญด้วยการวัด OD_{600} ในขณะที่เวลาเชย่าเชื้อเพิ่มขึ้น (รูปที่ 12) เมื่อเหนี่ยวนำที่ 45°c และติดตาม OD_{600} จะพบว่า OD_{600} เริ่มลดลง



รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{600} กับเวลาที่เชย่าเชื้อ E.coli BHB2688 ตำแหน่งลูกศรที่ชี้ในกราฟแสดงถึงการเหนี่ยวนำที่ 45°c.

5. การเตรียม Sonic extract

เมื่อนำเชื้อ E. coli BHB2690 มาเลี้ยงที่ 32°c โดยติดตามการเจริญด้วยการวัด OD_{600} ในขณะที่เวลาเขย่าเชื้อเพิ่มขึ้น (รูปที่ 13) เมื่อเหนี่ยวนำที่ 45°c และติดตาม OD_{600} จะพบว่า OD_{600} เริ่มลดลง



รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{600} กับเวลาที่เขย่าเชื้อ E. coli BHB2690 ตำแหน่งลูกศรที่ชี้ในกราฟแสดงถึงการเหนี่ยวนำที่ 45°c.

6. การหาประสิทธิภาพของ In vitro packaging mixes

ตารางที่ 1 แสดงการหาประสิทธิภาพของ In vitro packaging mixes

หลอดที่	ปริมาณของ λgt 11 DNA(μg)	dilution	จำนวน plaques	pfu/μg DNA
1	-	-	5	-
2	7.9	10^{-7}	1020	1.29×10^{9}
3	0.79	10^{-7}	952	11.99×10^{9}
4	0.079	10^{-7}	1072	135.06×10^{9}

ค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพของ In vitro packaging mixes $= \frac{1.29 \times 10^{9} + 11.99 \times 10^{9} + 135.06 \times 10^{9}}{3}$

$= 148.34 \times 10^{9}$ pfu/μg DNA

$= 1.48 \times 10^{11}$ pfu/μg DNA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายผล

เมื่อเปรียบเทียบการแยก λgt 11 DNA แบบเสกลเล็ก (13) และแบบเสกลใหญ่ (12) พบว่า การแยกแบบเสกลเล็กให้ผลเป็นที่น่าพอใจ เพราะวิธีการที่แยกใช้เวลาสั้นและประหยัดเวลา พร้อมทั้งได้ผลผลิตมากพอที่จะใช้ในงานพันธุวิศวกรรมต่อไป ลักษณะของ DNA ที่แยกได้จากแบบเสกลเล็กมีการปนเปื้อนของ chromosomal DNA อยู่บ้าง ทำให้ปริมาณ DNA ทั้งหมดที่แยกได้ 7.93 มิลลิกรัมเป็นผลรวมของ λgt 11 DNA ที่แยกได้ และ chromosomal DNA ที่ปนเปื้อนมา ส่วนการแยก λgt 11 DNA แบบขยายส่วนนั้นต้องใช้เวลานานและได้ผลผลิตน้อยกว่าการแยกแบบเสกลเล็กเมื่อใช้จำนวน pfu ของ λgt 11 เท่ากันในการบุกรุกเซลล์ให้อาศัย คือ 10^5 pfu จะได้ปริมาณ DNA ทั้งหมดเท่ากับ 2.5 มิลลิกรัม เพราะการขยายส่วนปริมาตรทำให้ต้องประสบกับการสูญเสียของ phage บางส่วนในระหว่างการปั่นหลาย ๆ ครั้ง แต่การแยกแบบเสกลเล็กใช้ปริมาตรน้อยจึงลดการสูญเสียลง นอกจากนี้ ปริมาณ λgt 11 DNA ที่แยกได้จากแบบขยายส่วนจะเป็น λgt 11 DNA เท่านั้น ไม่มีการปนเปื้อนของ chromosomal DNA เลย จากการพิจารณาถึงปริมาณ DNA ทั้งหมดที่แยกได้โดยวิธีแบบเสกลเล็กเทียบกับที่รายงานโดย Requena (13) พบว่าปริมาณ DNA ทั้งหมดที่เราแยกได้สูงกว่าที่ Requena รายงานไว้ประมาณ 7 เท่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง คือ สภาพ host cells ในขณะที่ infect มีมากน้อยต่างกัน และจำนวน λgt 11 ที่เตรียมเป็น stock นั้นได้เตรียมขึ้นใช้ทันที ทำให้ประสิทธิภาพการบุกรุกของ λgt 11 สูงกว่ามากในการทดลองที่ใช้นี้ ส่วนการเตรียมแบบขยายส่วนโดย Maniatis (12) นั้นไม่ได้รายงานถึงปริมาณ DNA ทั้งหมดที่เตรียมไว้จึงไม่สามารถเปรียบเทียบกับวิธีที่การทดลองนี้เตรียมได้ อย่างไรก็ตามการเตรียมแบบขยายส่วนก็ขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เหมือนกับการแยกแบบเสกลเล็ก นอกจากนี้วิธีการและการทำต้องพยายามลดการสูญเสียลงเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น

ส่วนการเตรียม In vitro packaging mixes โดยวิธีของ Maniatis (12) พบว่าให้ประสิทธิภาพที่สูงกว่าที่รายงานไว้โดย Maniatis ทั้งนี้เป็นผลมาจาก background สูงอันเนื่องมาจากการเตรียม Sonic extract และ Freeze thaw lysate หรืออาจจะการทำ dilution และนับ plaques ทั้งหมดมีความคลาดเคลื่อนบ้างเล็กน้อย อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพที่ได้สูงเพียงพอที่จะใช้ในการเตรียม phage particle เพื่อเก็บเป็น cDNA library หรือ genomic library ต่อไปได้

ข้อสรุป

1. การแยก λgt 11 DNA แบบเสกลเล็กได้ปริมาณ = 7.93 มิลลิกรัม
   เมื่อใช้ λgt 11 จำนวน $5x10^5$ pfu บุกรุกเซลล์ให้อาศัย
2. การแยก λgt 11 DNA แบบขยายส่วนได้ปริมาณ = 0.25 มิลลิกรัม
   เมื่อใช้ λgt 11 จำนวน $5x10^4$ pfu บุกรุกเซลล์ให้อาศัย
3. ประสิทธิภาพของ In vitro packaging mixes = $1.48x10^{11}$ pfu/μg DNA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนอ้างอิง

1. Chauthaiwale, V.M., Therwath, A. and Deshpande, V.V. (1992). Bacteriophage Lambda as a Cloning Vector. Microbiological Reviews 56 : 577-591.

2. ศิริพร สิทธิประณีต (2531). พันธุวิศวกรรม : ปฏิบัติการเบื้องต้น : 1-38, โรงพิมพ์ ส.วิชาญการพิมพ์

3. มนตรี จุฬาวัฒนทล, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, มรว.ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, ประหยัด โกมารทัต, ประพนธ์ วิไลรัตน์, สกล พันธุ์ยิ้ม, ภิญโญ พานิชพันธ์ (2530). ชีวเคมี : 362-368, โรงพิมพ์ ห้างหุ้นส่วนจำกัด ศ.ส.

4. Young, R.A. and Davis, R.W. (1983).Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 1194-1198.

5. Young, R.A. and Davis, R.W. (1983). Yeast RNA Polymerase II Genes : Isolation with Antibody Probes. Science 222 : 778-782.

6. Benton, W.D. and Davis, R.W. (1977). Screening λgt Recombinant Clones by Hybridization to Single Plaques in situ. Science 196 : 180-182.

7. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Hiquchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science 239 : 487-491.

8. Dorfman, D.M., Zon, L.I. and Orkin, S.H. (1989). Rapid Amplification of λgt 11 Bacteriophage Library Inserts from Plaques Using the Polymerase Chain Reaction (PCR). Biotechniques 7 : 569-570.

9. Steffens, D.L. and Gross, R.W. (1989). Sequencing of Cloned DNA Using Bacteriophage λgt 11 Templates. Biotechniques 7 : 674-680.

10. Enquist, L. and Sternberg, N. (1979). In vitro Packaging of λ Dam Vectors and Their Use in Cloning DNA Fragments. Method in Enzymology 68 : 281-298.

11. Hohn, B. (1979). In vitro Packaging of λ and Cosmid DNA. Method in Enzymology 68 : 299-309.

12. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning : A Laboratory Manual : 256-268, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

13. Requena, J.M. Soto, M. and Alonso, C. (1993). Bacteriophage : long-term stored stocks ready for lysis. Trends in Genetics 9 : 4.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 LB และ LB agar plate

LB ปริมาตร 100 ml ประกอบด้วย

Bacto-tryptone	1 กรัม
Yeast extract	0.5 กรัม
NaCl	1 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.5 โดยสารละลาย NaOH ที่เจือจาง นำไป autoclave ที่ 121°c, เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 lb/in^2 ในกรณีที่ต้องการเตรียม LB agar plate ให้ใส่ Bactoagar จำนวน 1.5 กรัม ลงใน LB ปริมาตร 100 ml หลัง autoclave แล้ว ทิ้งไว้ใน incubator 50°c แล้วจึงเทลงใน petri dish ที่ผ่านการ autoclave แล้ว หลังจาก Bactoagar แข็งตัวแล้วเก็บไว้ที่ 4°c จนกว่าจะใช้

1.2 0.01 M $MgSO_4$

ละลาย $MgSO_4 .7 H_2O$ 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 ml นำไป autoclave

1.3 1 M Tris-HCl, pH 7.5

ละลาย Tris 1.21 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 8 ml เติม conc. HCl ปริมาตร 0.6 ml ลงไป ตั้งทิ้งให้สารละลายเย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย HCl หรือ NaOH ที่เจือจาง ปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml แล้วนำไป autoclave

1.4 SM medium (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M NaCl, 8 mM $MgSO_4$)

ละลาย NaCl 5.8 กรัม และ $MgSO_4 .7 H_2O$ 2.2 กรัม ใน 1 M Tris-HCl pH 7.5 ปริมาตร 50 ml แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไป autoclave

1.5 0.7% soft agar

ละลาย Bactoagar 0.7 กรัม ใน LB ปริมาตร 100 ml นำไป autoclave

1.6 5 M NaCl

ละลาย NaCl 2.922 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml นำไป autoclave

1.7 0.15 M NaCl

ปิเปต 5 M NaCl ปริมาตร 0.3 ml ใส่ในน้ำกลั่นที่ autoclave แล้ว ปริมาตร 10 ml

1.8 DNase I 1 mg/ml

ละลาย DNase I 1 mg ใน 0.15 M NaCl ปริมาตร 1 ml และเติม glycerol ที่ autoclave แล้วปริมาตร 1 ml แล้วเก็บที่ -20°c

1.9 0.5 M EDTA pH 8.0

ละลาย ethylene diamine tetraacetate disodium salt จำนวน 1.861 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 8 ml คนให้ละลายมากที่สุดโดยใช้ magnetic bar ปรับให้เป็น pH 8.0 โดยใส่ NaOH ประมาณ 0.2 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml นำไป autoclave

1.10 1 M NaOAc pH 7.4

ละลาย sodium acetate .3 H_2O จำนวน 1.36 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 8 ml ปรับ pH ให้เป็น 7.4 โดยเติม glacial acetic acid แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml แล้วนำไป autoclave

1.11 RNase buffer (0.1 M NaOAc pH 7.4, 0.3 mM EDTA)

ผสมสารละลายต่อไปนี้เข้าด้วยกันในหลอดแก้วที่ autoclave แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml โดยการเติมน้ำกลั่นที่ autoclave

1 M NaOAc pH 7.4	1 ml
0.5 M EDTA pH 8.0	6 μl

1.12 RNase A 10 mg/ml

ละลาย RNase A จำนวน 10 มิลลิกรัม ใน RNase buffer ปริมาตร 1 ml ในหลอดแก้วที่ autoclave นำไปอุ่นที่ 80°c เป็นเวลา 10 นาที ก่อนใช้ทุกครั้ง เก็บสารละลายนี้เป็นเวลานานที่ -20°c

1.13 25% SDS

ละลาย sodium dodecyl sulfate จำนวน 2.5 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 9 ml อุ่นที่ 68°c เพื่อช่วยให้การละลายเร็วขึ้น ปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml

1.14 TEN buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl) ผสมสารละลายต่อไปนี้ในหลอดแก้วที่ autoclave แล้ว ปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml โดยการเติมน้ำกลั่นที่ autoclave แล้ว

1 M Tris-HCl	pH 7.5	0.1 ml
0.5 M EDTA	pH 8.0	0.02 ml
5 M NaCl		0.02 ml

1.15 Pronase 2 mg/ml

ละลาย Pronase 2 mg ใน TEN buffer ปริมาตร 1 ml ในหลอดแก้วที่ autoclave แล้ว อุ่นที่ 37°c เป็นเวลา 15 นาทีก่อนใช้ เก็บสารละลายไว้ที่ -20°c

1.16 phenol : chloroform : isoamyl alcohol 25:24:1

ตวง phenol ปริมาตร 25 ml และตวง chloroform ปริมาตร 24 ml จากนั้นเติม isoamyl alcohol ปริมาตร 1 ml เก็บในขวดสีชา

1.17 3 M NaOAc pH 4.8

ละลาย NaOAc .3 H_2O จำนวน 8.16 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 16 ml ปรับ pH ให้เป็น 4.8 ด้วย glacial acetic acid แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 20 ml ด้วยน้ำกลั่น นำไป autoclave

1.18 1 M Tris-HCl pH 8.0

ละลาย Tris 1.21 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 8 ml เติม conc. HCl ปริมาตร 0.4 ml ลงไป ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายเย็นลงถึงอุณหภูมิห้องปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย HCl หรือ NaOH ที่เจือจาง ปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml แล้วนำไป autoclave

1.19 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)

เตรียมโดยผสมสารละลายต่อไปนี้ในหลอดแก้วที่ autoclave แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml

1 M Tris-HCl pH 8.0	0.1 ml
0.5 M EDTA pH 8.0	0.02 ml

1.20 10 X Tris-borate buffer (0.89 M Tris, 0.89 M boric acid, 0.025 M EDTA pH 8.3)

ละลาย Tris 10.8 กรัม, boric acid 5.5 กรัม และ Na_2 EDTA 0.93 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 ml ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

1.21 1 X Tris-borate buffer

ตวง 10 X TB buffer ปริมาตร 100 ml ใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 ml

1.22 0.7% agarose

ใส่ agarose 0.7 กรัมลงใน 1 X TB ปริมาตร 100 ml ต้มพร้อมกับคนจนละลายหมด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50°c ก่อนนำไปเทลงใน chamber

1.23 Tracking dye (0.025% bromphenol blue, 40% Ficoll 400, 0.1% SDS)

ละลาย bromphenol blue 2.5 มิลลิกรัม, Ficoll 400 จำนวน 4 กรัม, และ SDS 50 มิลลิกรัม ลงในน้ำกลั่นที่ autoclave ปริมาตร 8 ml หลังจากสารละลายหมดปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml

1.24 2.5 μg/ml ethidium bromide

ละลาย ethidium bromide 2.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บไว้ในกล่องพลาสติกทึบแสง

1.25 dialyse buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$)

ผสมสารละลายต่อไปนี้ในกระบอกตวงปริมาตร 1 ลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

1 M Tris-HCl pH 7.5	10 ml
5 M NaCl	20 ml
1 M $MgSO_4$	10 ml

1.26 1 M $MgSO_4$

ละลาย $MgSO_4 .7 H_2O$ 25 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml นำไป autoclave

1.27 LB + 10 mM $MgSO_4$

ปิเปต 1 M $MgSO_4$ ที่ autoclave ปริมาตร 2.5 ml ใส่ใน LB ที่ autoclave แล้วปริมาตร 250 ml

1.28 25% sucrose

ละลาย sucrose 12.5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 40 ml ปรับปริมาตรให้เป็น 50 ml นำไป autoclave

1.29 10% sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 7.5

ผสมสารละลายดังต่อไปนี้ในขวดที่ autoclave ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่นที่ autoclave

25% sucrose	40 ml
1 M Tris-HCl pH 7.5	5 ml

1.30 lysozyme 10 mg/ml ใน 0.25 M Tris-HCl pH 7.5

เตรียมสารละลาย 0.25 M Tris-HCl pH 7.5 ด้วยการปิเปต 1 M Tris-HCl pH 7.5 ปริมาตร 0.25 ml และเติมน้ำกลั่นที่ autoclave ปริมาตร 0.75 ml จากนั้นชั่ง lysozyme จำนวน 10 มิลลิกรัม ใส่ลงใน 0.25 M Tris-HCl pH 7.5 ปริมาตร 1 ml

1.31 1 M $MgCl_2$

ละลาย $MgCl_2 .6 H_2O$ จำนวน 2.033 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 8 ml ปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml นำไป autoclave

1.32 Q 1 buffer (10 mM β-mercaptoethanol, 6 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM Spermidine, 18 mM $MgCl_2$ และ 15 mM ATP)

ผสมสารละลายดังต่อไปนี้ในกระบอกตวงที่ autoclave ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่นที่ autoclave เก็บไว้ในขวดที่ autoclave ควรเตรียมในวันที่ทำการทดลอง

β-mercaptoethanol	0.08 ml
1 M Tris-HCl pH 7.5	0.6 ml
Spermidine	1.53 กรัม
1 M $MgCl_2$	1.8 ml
ATP	0.83 กรัม

1.33 Buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM β-mercaptoethanol และ 1 mM EDTA) ผสมสารละลายดังต่อไปนี้ใน กระบอกตวงที่ autoclave ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่นที่ autoclave เก็บไว้ในขวดที่ autoclave ควรเตรียมในวันที่ทำการทดลอง

1 M Tris-HCl pH 8.0	2	ml
1 M $MgCl_2$	0.3	ml
β-mercaptoethanol	0.08	ml
5 M EDTA pH 8.0	0.02	ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย