บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเครื่องแก้วและอุปกรณ์

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ทุกชิ้นที่ใช้ในการทดลอง จะต้องผ่านการทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง มี 3 ชนิด คือ

1. *Bacillus subtilis* TISTR25
2. *Escherichia coli* HB101
3. *Bacillus subtilis* 1E61

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ระยะสั้นทำโดยการเก็บในรูปอาหารแข็งในจานเลี้ยงเชื้อ (agar plate) ที่อุณหภูมิ 4°ซ แล้วทำการเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ ทุก ๆ 1 เดือน แบ่งเป็น

- agar plate ที่มีนมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *Bacillus subtilis* TISTR25
- LB-agar plate สำหรับ *Escherichia coli* HB101 ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน
- LB-agar plate ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและ IPTG สำหรับทรานสฟอร์แมนท์
- LB-agar plate ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน สำหรับ *Bacillus subtilis* 1E61

หรืออาจเก็บในรูปอาหารแข็งในหลอดทดลอง (agar slant) ที่อุณหภูมิ 4°ซ แล้วทำการเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ ทุก ๆ 3 เดือน

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ระยะยาวสามารถเก็บไว้ได้นานถึง 2 ปี ในอาหารแข็งแบบ stab culture หรือ ในอาหารเหลวที่มีกลีเซอรอล ดังนี้

อาหารแข็งแบบ stab culture

เตรียมอาหารแข็งปริมาตร 2 ใน 3 ของหลอดแก้วขนาด 2-3 มล. มีฝาเกลียวปิด ทำให้ปลอดเชื้อโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

นาน 20 นาที เมื่ออาหารแข็งตัวใช้เข็ม (needle) เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อจุลินทรีย์มาแทงลงในอาหารแข็งที่แข็งแล้วจนถึงก้นขวด หลังจากบ่มเชื้อข้ามคืนจึงเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

อาหารเหลวที่มีกลีเซอรอล

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจนถึงระยะการเจริญในช่วงลอกาลิทึม (OD_{600}ประมาณ 0.3-0.5) แบ่งเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้มา 0.85 มล. ผสมกับกลีเซอรอลที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแล้ว 0.15 มล. ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -70 °ซ

3. การโคลนยีนโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ด้วยระบบ GST Gene Fusion

3.1 การสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 (ศิริพร สิทธิประณีต, 2532) ดัดแปลงมาจากวิธีที่เสนอโดย Rodrigues และคณะ (1983) ดังนี้

วันที่ 1 เขี่ยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25 จากอาหารแข็งมาเลี้ยงในอาหาร LB (1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl) 1.5 มล. pH 7.4 ด้วยเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืนเพื่อเป็นหัวเชื้อ

วันที่ 2 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหาร LB 100 มล. แล้วเลี้ยงต่อด้วยเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืนเช่นกัน

วันที่ 3 ปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 5,000xg (8,000 รอบต่อนาที) 10 นาที ที่ 4°ซ ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ล้างเซลล์ด้วย SET Buffer ประมาณ 5 มล. เซนตริฟิวจ์อีกครั้งเพื่อเก็บเซลล์ แล้วทำลายผนังเซลล์ด้วยวิธี freeze และ thaw ด้วยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ นาน 10 นาทีแล้วแช่ที่อุณหภูมิ 65°ซ ทันที หลังจากนั้นเติมสารละลายไลโซไซม์ (Lysozyme 5 มก./มล. ใน TEN buffer) จำนวน 200 ไมโครลิตร สารละลายอาร์เอ็นเอส (Pancreatic Ribonuclease A 10 มก./มล. ใน RNase buffer) เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ จำนวน 100 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย SDS 25 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 ไมโครลิตร เขย่าต่อนาน 3-6 ชั่วโมง ทำให้โปรตีนบนเยื่อเซลล์เกิดเสียสภาพ แล้วเติมสารละลายโปรเนส (Pronase 10 มก./มล. ใน TEN buffer) จำนวน 300 ไมโครลิตร เพื่อย่อยโปรตีนอื่น ๆ ที่ติดมาด้วย และเติมสารละลายคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24:1 จำนวน 1.5 มล. แล้วเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 10-16 ชั่วโมงเพื่อสกัดเอาเฉพาะดีเอ็นเอที่ต้องการ สามารถเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มล. เพื่อลดความหนืดและช่วยให้ดีเอ็นเอค่อย ๆ ละลายออกมา และเติมคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24:1 จำนวน 10 มล. อีกครั้งปิดจุกหลอดแล้วกลับหลอดขึ้นลงเบา ๆ 5 นาที เซนตริฟิวจ์ 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีแล้วแยกสารละลายชั้นบนมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ดูดสารละลายชั้นบนด้วย Pasteur pipette ปลายตัด นำมาเติมโซเดียมคลอไรด์ (5 M

NaCl) ประมาณ 1.5 มล. เพื่อให้มีความเข้มข้นเป็น 0.2-0.5 โมลาร์ และเติมเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ แช่เย็นจำนวน 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด แช่ที่ -20°ซ ข้ามคืนเพื่อดึงโมเลกุลของน้ำออกจากดีเอ็นเอที่ต้องการ

วันที่ 4 ค่อย ๆ พันสายโครโมโซมขึ้นมาด้วยแท่งแก้ว แล้วจุ่มสายโครโมโซมที่ได้ใน เอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ ให้หลุดออกไปแล้วปล่อยให้แห้ง ละลายสายโครโมโซมดังกล่าวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ประมาณ 2 มล. (ขึ้นอยู่กับปริมาณของดีเอ็นเอ) เก็บรักษาไว้ได้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

3.2 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (agarose gel electrophoresis)

ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อหาปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่าง โดยเตรียมความเข้มข้นอะกาโรสเจล 0.7% แบบ submarine ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE (89 mM Tris-HCl, 89 mM boric acid, 2.5 mM EDTA, pH 8.3) ผสมดีเอ็นเอตัวอย่างกับสี tracking dye แล้วใส่ลงในช่องบนเจล ให้กระแสไฟฟ้า 80 โวลท์ นาน 3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสีเคลื่อนที่ลงไปถึงปลายอีกด้านหนึ่งของเจล นำเจลมาย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (2.5 ไมโครลิตร/มล.) นาน 5-10 นาที แล้วส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UVP) จะปรากฏแถบของดีเอ็นเอ สามารถทราบความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยประมาณด้วยการเปรียบเทียบความเข้มข้นหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐานของฟาจแลมบ์ดา (λ-DNA) ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Hind*III ถ่ายรูปเจล ผ่านฟิลเตอร์สีแดงด้วยฟิล์มถ่ายรูปขาว-ดำ Kodak Tri-X pan400

3.3 การย่อยดีเอ็นเอแบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion)

ย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI จำนวน 1 ยูนิตต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ (New England Biolabs) ที่เวลาต่าง ๆ กันคือ 1, 3, 5 และ 10 นาที โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 2 ไมโครกรัม สำหรับ 4 ปฏิกิริยา ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 10X ของเอนไซม์ *Sau*3AI (100 mM NaCl, 10 mM bis-Tris-propane-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DDT, pH 7.0 ที่ 25°C) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 80 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดส่วนผสมออกมาครั้งละ 20 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีสี tracking dye อยู่แล้ว 4 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ตรวจสอบการย่อยโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เลือกเวลาที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเอเป็นแถบสม่ำเสมอครอบคลุมขนาด 1-7 กิโลเบส สามารถแยกดีเอ็นออกจากเจลได้ 3 วิธี

วิธีที่ 1 การแยกดีเอ็นเอจากเจลด้วยกระแสไฟฟ้า (Electro-elution)

โดยตัดชิ้นเจลที่มีดีเอ็นเอในขนาดที่ต้องการใส่ในถุงไดอะไลซิส เติม TE บัฟเฟอร์พอประมาณ ปิดปากถุงให้สนิท แล้วนำไปวางในแชมเบอร์สำหรับทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสผ่านกระแส

ไฟฟ้า 80 โวลท์ ประมาณ 30 นาที แล้วกลับถุงให้อยู่ในทิศทางตรงกันข้าม แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าต่ออีก 2-3 นาที ดีเอ็นเอที่ต้องการจะหลุดออกจากเจลไปละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ จึงดูดบัฟเฟอร์นั้นไปทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยฟีนอลด้วยการเติมฟีนอลปริมาตร 1 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) แล้วปั่นเหวี่ยงแยกชั้นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบนมาสกัดด้วยฟีนอลซ้ำอีกครั้ง แล้วสกัดต่อด้วยฟีนอลต่อคลอโรฟอร์มอัตราส่วน 1:1 (1 เท่าของปริมาตร) เช่นกัน 1 ครั้ง ดูดสารละลายชั้นบนมาเติมสารละลายไดเอธิลอีเธอร์ ปริมาตร 1 เท่า เมื่อแยกชั้นสารละลายชั้นบนออก เก็บสารละลายชั้นล่างไประเหยอีเธอร์ที่เหลืออยู่ที่ 37°ซ ประมาณ 15 นาที เติมแอลกอฮอล์เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ขั้นตอนสุดท้ายละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE

วิธีที่ 2 การใช้เจลละลายที่อุณหภูมิต่ำ (Low melting agarose gel electrophoresis)

โดยใช้เจลที่สามารถละลายได้ที่อุณหภูมิต่ำในการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ต้องทำในห้องเย็นและผ่านกระแสไฟฟ้าเพียง 50 โวลท์ แล้วตัดชิ้นเจลที่มีดีเอ็นเอในขนาดที่ต้องการใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วย spatular ให้ได้ปริมาตร 0.75 มล. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 0.75 มล. (1 เท่าของปริมาตร) นำไปแช่ที่เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิ 65°ซ จนกระทั่งเจลละลายจนหมด เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ จำนวน 1 ใน 10 ของปริมาตร (หรือ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ จำนวน 1 ใน 25 ของปริมาตร) สกัดด้วยฟีนอลเช่นเดียวกับวิธีที่ 1

วิธีที่ 3 การใช้ Geneclean Kit

ตัดชิ้นเจลที่มีดีเอ็นเอในขนาดที่ต้องการใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วย spatular ให้ได้ปริมาตร 0.5 มล. เติม NaI 1.5 มล. (3 เท่าของปริมาตรเจล) นำไปแช่ที่เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิ 45-55°ซ นาน 5 นาที ต้องผสมเบา ๆ ทุก 1-2 นาที แล้วเติมสารละลาย Glassmilk (5 ไมโครลิตร ต่อ ดีเอ็นเอ 5 ไมโครกรัม ถ้าดีเอ็นเอมากกว่า 5 ไมโครกรัม เติมอีก 1 ไมโครลิตร ต่อ 0.5 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ) วางบนน้ำแข็ง 5 นาที ต้องผสมให้เข้ากันทุก ๆ 1-2 นาที เพราะตกตะกอนได้ง่าย เมื่อได้เวลาจึงปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที ทิ้งส่วนน้ำ แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลาย NEW 200-700 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ละลายตะกอนในสารละลาย NEW ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที ทิ้งส่วนน้ำอีกครั้ง แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ละลายที่ 45-55°ซ นาน 2-3 นาที ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที เก็บส่วนสาร

ละลายบัฟเฟอร์ TE วิธีการนี้สะดวกและใช้เวลาน้อย เพราะไม่ต้องการขั้นตอนการสกัดด้วยฟีนอลเหมือน 2 วิธีแรก

3.4 การทรานสฟอร์มพาหะดีเอ็นเอ pGEX-2T เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 ด้วยวิธีการเตรียมคอมพิเทนท์เซลล์โดยแคลเซียมคลอไรด์

วันที่ 1 เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* HB101 จากอาหารแข็ง มาเลี้ยงในอาหาร LB จำนวน 1.5 มล. เป็นหัวเชื้อ ด้วยเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน

วันที่ 2 ถ่ายหัวเชื้อประมาณ 0.1 มล. ลงในอาหาร LB จำนวน 10 มล. แล้วเลี้ยงต่อด้วยเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°ซ จนกระทั่งการเจริญอยู่ในช่วงการเจริญแบบลอกาลิทึม ประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำมาแช่น้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดการเจริญ ปั่นเก็บเซลล์ 5,000xg (8,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°ซ ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ล้างเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 2-3 มล. ปั่นเก็บเซลล์อีกครั้ง ละลายเซลล์ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 0.5 มล. แช่บนน้ำแข็งนานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จึงใช้เป็นคอมพิเทนต์เซลล์ได้ สามารถเก็บไว้ได้เพียง 1 วัน ที่ 4°ซ

ในการทรานสฟอร์มใช้คอมพิเทนต์เซลล์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายของพลาสมิด pGEX-2T เข้มข้น 250 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จำนวน 1 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 0.5 ไมโครลิตร แช่น้ำแข็งนาน 30 นาที ทำให้ช็อคด้วยความร้อนด้วยเครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิ 42°ซ ทันทีนาน 5 นาทีเพื่อรับพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ เติมอาหาร LB จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปกระจาย (spread) บนจานอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล. และ IPTG ความเข้มข้น 0.025 มก./มล. จานละ 50, 100 และ 150 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน นำเชื้อที่เจริญมาเขี่ย (streak) ลงบนจานอาหารแข็งจานใหม่ เพื่อให้แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ

3.5 การสกัดพาหะดีเอ็นเอ pGEX-2T เพื่อนำไปใช้โดยวิธี minipreparation

วันที่ 1 เขี่ยเชื้อที่มี พลาสมิด pGEX-2T จากอาหารแข็งมาเลี้ยงในอาหาร LB (1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl) จำนวน 1.5 มล. ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ด้วยเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน

วันที่ 2 ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. แล้วปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ทิ้งส่วนน้ำไป เติม *Solution I* (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 5 mg/ml Lysozyme) จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จนกระทั่งเป็นสีนมขุ่น แช่บนน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้วเติม *Solution II* (1 % SDS, 0.2 N NaOH) จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมโดยการหมุนหลอดเบา ๆ จนกระทั่งใส ทิ้งไว้บนน้ำแข็งต่ออีก

30 นาที จากนั้นเติม *Solution III* (3 M sodium acetate, pH 4.8) จำนวน 150 ไมโครลิตร จะได้เป็นตะกอนคล้ายไข่ขาว ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้บนน้ำแข็งอีก 15 นาที ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วเก็บส่วนน้ำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอล ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 100% ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และเทเอธานอล ทิ้งไป ล้างตะกอนต่อด้วยเอธานอล 70% แล้วปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ ประมาณ 10-15 นาที แล้วละลายดีเอ็นเอที่ได้ในบัฟเฟอร์ TE ต่อ อาร์เอ็นเอส (1:1000) เพื่อทำลายอาร์เอ็นเอ

3.6 การย่อยพาหะดีเอ็นเอ pGEX-2T อย่างสมบูรณ์ (complete digestion)

ย่อยพลาสมิด pGEX-2T อย่างสมบูรณ์ (complete digestion) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (New England Biolabs) โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัม สำหรับ 1 ปฏิกิริยา ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 10X ของเอนไซม์ *Bam*HI (50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DDT, pH 7.9 ที่ 25^{o}ซ) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ สารละลาย BSA (1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าว 1 ยูนิตต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ ปรับปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ ข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาด้วยสี tracking dye ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำไปตรวจสอบการย่อยโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ควรทำการทดลองครั้งละหลาย ๆ ปฏิกิริยาจะได้นำส่วนที่เหลือจากการตรวจสอบไปใช้ต่อไป) นำส่วนที่เหลือโดยที่ไม่ต้องเติมสีมาทำการสกัดด้วยฟีนอลเพื่อแยกดีเอ็นเอพาหะออกจากส่วนผสมอื่น ๆ แล้วสามารถเก็บรักษาไว้ที่ -20^{o}ซ ก่อนนำมาใช้ หรืออาจทำ dephosphorylation เพื่อป้องกันการกลับมาเป็นวงของพลาสมิด

3.7 การทำ dephosphorylation พลาสมิด pGEX-2T ที่ตัดด้วย *Bam*HI

จากขั้นตอนที่ 3.6 ต่อจากการตัดพลาสมิดที่ต้องการครบตามเวลาที่กำหนด (ไม่ต้องหยุดปฏิกิริยาด้วยสี) ตกตะกอนด้วย 100% เอธานอล ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างด้วย 70% เอธานอล ปล่อยตะกอนให้แห้งที่ 37^{o}ซ ประมาณ 15 นาที ละลายดีเอ็นเอในสารละลาย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ 10X CIP (0.5 M Tris-HCl, pH 9.0, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM $ZnCl_2$, 10 mM spermidine) จำนวน 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 33 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ calf intestine alkaline phosphatase (0.2 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (Phamacia) จำนวน 1 ไมโครลิตร บ่มที่เครื่องปมควบคุมอุณหภูมิ 37^{o}ซ ประมาณ 30 นาที แล้วเติมเอนไซม์ดังกล่าวเพิ่มอีกจำนวน 1 ไมโครลิตร บ่มต่ออีก 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 40 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ 10X STE (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 M NaCl, 10 mM EDTA) จำนวน 10 ไมโครลิตร และสารละลาย 10% SDS จำนวน 5 ไมโครลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 68^{o}ซ เป็น

เวลา 15 นาที ทำการสกัดด้วยวิธีฟีนอลและ คลอโรฟอร์ม และสุดท้ายละลายดีเอ็นเอในสารละลายบัฟเฟอร์ TE

3.8 การเชื่อมดีเอ็นเอ (Ligation)

นำดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *Bacillus subtilis* TISTR25 ขนาดประมาณ 1-7 กิโลเบส ปริมาณ 0.3 ไมโครกรัม (300 นาโนกรัม) มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEX-2T ซึ่งถูกย่อยด้วย *Bam*HI ปริมาณ 0.1 ไมโครกรัม (100 นาโนกรัม) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (New England Biolabs) โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ 1X T4 DNA ligase buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DDT, 1 mM ATP, 50 µg/ml BSA, pH 7.8 ที่ 25°ซ) จำนวน 4 ไมโครลิตร สารละลาย 10 mM ATP จำนวน 4 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 16°ซ เป็นเวลา 4-16 ชั่วโมง (Sambrook et al., 1989) แล้วนำไปทำการทรานสฟอร์เมชันต่อไป

3.9 เตรียมเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 ให้อยู่ในรูปคอมพิเทนต์เซลล์

สามารถเตรียมคอมพิเทนท์เซลล์โดยใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ด้วยวิธีเดียวกันกับหัวข้อ 3.4 ที่ทำการทรานสฟอร์มพาหะดีเอ็นเอ pGEX-2T เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 แต่สำหรับการทรานสฟอร์มด้วยกระแสไฟฟ้า (electroporation) มีวิธีการเตรียมคอมพิเทนท์ที่ต่างกัน โดยเลี้ยง *E. coli* HB101 ในอาหาร L-Broth (1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl) ปริมาตร 100 มล. (จากหัวเชื้อ 1 มล. ที่เลี้ยงมา 1 คืน) ที่อุณหภูมิ 37°ซ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ โดยเลี้ยงเชื้อให้มีค่าความขุ่น (OD_{550}) ประมาณ 0.5-0.8 (early log phase) แช่บนน้ำแข็งนาน 15-30 นาที ปั่นล้าง 2 ครั้งโดยการเซนตริฟิวจ์ในโรเตอร์ที่แช่เย็น (Beckman J2-21, USA) ที่ความเร็ว 4,000xg เป็นเวลา 15 นาที และกระจายเซลล์ในน้ำกลั่นแช่เย็นปริมาตร 50 มล. ทั้ง 2 ครั้ง จากนั้นทำการปั่นล้างด้วยกลีเซอรอล 10% ปลอดเชื้อและเย็นอีก 2 ครั้ง ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 200-300 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีเซลล์อย่างน้อย $3x10^{10}$ เซลล์/มล. ทำให้ผนังเซลล์มีรูพรุนพร้อมจะรับดีเอ็นเอลูกผสม สามารถแบ่งเก็บเป็นส่วน ๆ ละ 40 ไมโครลิตร ที่ -70°ซ ได้นานถึง 6 เดือน

3.10 การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 ด้วยวิธี electroporation (Dower et al., 1988)

ทำการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 ด้วยวิธีให้กระแสไฟฟ้า เริ่มจากการแช่คิวเวตและแท่นวางคิวเวตในน้ำแข็ง นำคอมพิเทนท์เซลล์มาวางให้ละลายช้า ๆ บนน้ำแข็ง ตั้งกระแสไฟฟ้าของเครื่อง Gene pulser (BIO-RAD Laboratories) 2.5 กิโลโวลท์ เติมดีเอ็นเอ 1-5 ไมโครลิตร (ประมาณ 10 นาโนกรัม) ลงในคอมพิเทนท์เซลล์ 40 ไมโครลิตร ผสม

ให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 1 นาที ใช้ Pasteur pipette ดูดมาใส่ในคิวเวต พยายามให้ลงไปรวมกันที่ก้นคิวเวต ผ่านกระแสไฟฟ้านาน 4-5 msec (กด 2 ปุ่มพร้อมกันจนได้ยินเสียงสัญญาณ) เติมอาหาร LB ลงไปในคิวเวต ผสมเบา ๆ แล้วดูดลงในหลอดสำหรับเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงต่ออีก 1 ชั่วโมง ที่ 37°ซ โดยเครื่องบ่มแบบเขย่า นำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB (จานละ 50, 100 และ 100 ไมโครลิตร) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและ IPTG ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 °ซ เลือกโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อนำมาทำการย้าย (replica plating) ด้วยไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อ ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนมพร่องไขมัน (skim milk plate) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วตรวจหาเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมหรือทรานสฟอร์แมนท์ซึ่งมียีนโปรตีเอสอยู่ภายในเซลล์ โดยคัดเลือกจากโคโลนีที่ให้วงใสรอบ ๆ โคโลนีที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนมพร่องไขมัน เนื่องจากโปรตีเอสสามารถย่อยโปรตีนเคซีนในน้ำนมทำให้เกิดลักษณะวงใส ๆ รอบโคโลนี (clear zone) (ดลนภา ตนุนาถ, 2538)

4. ตรวจวัดแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์ ซึ่งอยู่ในรูป fusion protein

เนื่องจากเชื้อ *B. subtilis* TISTR25 สามารถสังเคราะห์ได้ทั้งแอลคาไลน์และนิวทรัลโปรตีเอส ดังนั้นในการตรวจวัดแอคติวิตีจึงต้องศึกษาที่ค่า pH ต่าง ๆ กันทั้งที่เป็นเบสและกลางในการทดลองศึกษาด้วยบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่างกันทั้งสิ้น 8 ค่า ดังนี้ 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5 และ 11.0 เก็บตัวอย่างมาศึกษาทุก ๆ 12 ชั่วโมง ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงทั้งสิ้น 72 ชั่วโมง

4.1 โดยวัดแอคติวิตีในการไฮโดรไลส์เคซีนได้ไทโรซีนอิสระที่มีความสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) (เกษม พงษ์มณี, 2536)

เพาะเลี้ยงทรานสฟอร์แมนท์ในอาหารสูตร Basal medium ที่มีซักซิเนต (succinate) เป็นสารต้นตอคาร์บอน pH 7.4 ใช้เป็นหัวเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 16 ชั่วโมง (OD_{420} ประมาณ 0.3-0.5) แล้วถ่ายลงในอาหารขวดใหม่ โดยคำนวณให้ได้ค่า OD_{420} สุดท้าย 0.07-0.08 เลี้ยงเชื้อโดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดค่า OD_{420} และค่าแอคติวิตีทุก 2 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ เป็นเวลาทั้งสิ้น 72 ชั่วโมง (12, 24, 48, 72 ชั่วโมง) ในการวัดแอคติวิตีต้องนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator นาน 12 วินาทีในน้ำแข็งแล้วปั่นเก็บส่วนใสเพื่อใช้เป็นสารละลายเอนไซม์หลอดทดลองละ 100 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ 900 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองมีทั้งบัฟเฟอร์ฟอสเฟต, pH 7.5 และ 8.0, บัฟเฟอร์คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต, pH 9.5, 10.0 และ 10.5 , บัฟเฟอร์ Tris-HCl, pH 7.0 และ 9.0 และบัฟเฟอร์คาร์บอเนต, pH 11.0 (เกษม พงษ์มณี, 2536) เติมสารละลายเคซีนที่เตรียมในบัฟเฟอร์เดียวกันปริมาตร 1 มล. บ่ม

ที่อุณหภูมิ 45°ซ นาน 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ในอ่างน้ำแข็งแล้วเติมสารละลายไทรคลอโรอะซิติกแอซิด 10% ที่เย็น 2 มล. รวมปริมาตรทั้งสิ้น 4 มล. ปั่นตกตะกอนเก็บส่วนใสมาวัดค่า A_{280} โดยทำแบลงค์ (blank) และคอนโทรล (control) นำไปวัดเปรียบเทียบกันด้วย ในการเตรียม blank นั้นทำเหมือนกันโดยจะไม่ใส่สารละลายเอนไซม์แต่ใส่บัฟเฟอร์แทน ส่วนใน control นั้นจะเติมสารละลายเอนไซม์หลังจากที่เติมสารละลายไทรคลอโรอะซิติกแอซิด 10% นอกเหนือจากนั้นเป็นสารละลายตัวอย่างทำเหมือนกับในการทดลอง นำค่า A_{280} ที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของโปรตีเอส โดยเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยเคซีนโดยเอนไซม์กับกราฟมาตรฐานของไทโรซีนที่ความเข้มข้น 0-140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ 6) โดยไทโรซีนจะต้องเตรียมด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ใช้ในปฏิกิริยานั้น ทำการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ค่า pH ต่าง ๆ และที่เวลาต่าง ๆ

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณของไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ที่ได้จากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์ที่สภาวะของการวัดแอคติวิตีภายในเวลา 1 นาที

สูตรการคำนวณ

$$\text{activity (units/ml)} = \frac{\text{absorbance} \times \text{total vol.(ml)} \times \text{dilution}}{\text{slope (ml/}\mu\text{g)} \times \text{sample vol.(ml)} \times \text{incubation time (min)}}$$

$$\text{total activity (units)} = \text{activity (units/ml)} \times \text{culture vol.(ml)}$$

4.2 **หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ของเบรดฟอร์ด** (Bradford Assay) (Harris and Angal, 1989) เปรียบเทียบด้วยกราฟมาตรฐานของ BSA ที่เข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ 7)

การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธีการวิเคราะห์ของเบรดฟอร์ด มีขั้นตอนดังนี้

1. ปิเปตสารละลายโปรตีนที่ต้องการทราบปริมาณโปรตีนลงในหลอดทดลอง (ปริมาตรสูงสุด 100 ไมโครลิตร)

2. ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ไมโครลิตร

3. เติมสารละลาย Bradford working buffer ปริมาตร 1 มล. ลงในหลอดทดลองแล้วผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A_{595}) หลังจากนั้น 2 นาที แต่ไม่ควรทิ้งไว้นานเกิน 1 ชั่วโมง

นำค่า A_{595} มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA ที่เข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3 การคำนวณหาค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์

นำค่าแอคติวิตีในการไฮโดรไลส์เคซีนได้ไทโรซีนอิสระที่มีความสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) และปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ของแบรดฟอร์ดมาคำนวณหาค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์

สูตรการคำนวณ

$$\text{specific activity (units/mg protein)} = \frac{\text{total activity (units)}}{\text{total protein (mg)}}$$

5. การศึกษาการยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสโดย PMSF (phenyl methanesulphonyl fluoride) และ EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)

ศึกษาการยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสโดยสารเคมี 2 ชนิด คือ PMSF และ EDTA เนื่องจากเคยมีการศึกษา และพบว่าสารทั้งสองชนิดนี้มีผลต่อความสามารถในการทำงานของโปรตีเอส

5.1 การยับยั้งการทำงานโดย PMSF (phenyl methanesulfonyl fluoride)

นำส่วนใสที่ใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ (จากการทำให้เซลล์แตก) จากหัวข้อ 4.1 มาจำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ปริมาตร 700 ไมโครลิตร (บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1) เติมสารละลายเคซีนที่เตรียมในบัฟเฟอร์เดียวกันปริมาตร 1 มล. แล้วเติมสารละลาย PMSF ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยการเติมสารละลาย PMSF เข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 40 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลอง โดยทำ blank และ control ที่มี PMSF เช่นกัน นำค่า A_{280} ที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของโปรตีเอส ทำการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ค่า pH ต่าง ๆ แสดงผลโดยกราฟ

5.2 การยับยั้งการทำงานโดย EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)

นำส่วนใสที่ใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ (จากการทำให้เซลล์แตก) จากหัวข้อ 4.1 มาจำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ปริมาตร 700 ไมโครลิตร (บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1) เติมสารละลายเคซีนที่เตรียมในบัฟเฟอร์เดียวกันปริมาตร 1 มล. แล้วเติมสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 200 ไมโครลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 mM EDTA บ่มที่อุณหภูมิ 45°ซ นาน 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ในอ่างน้ำแข็งแล้วเติมสารละลายไทรคลอโรอะซิติกแอซิด 10% ที่เย็นปริมาตร 2 มล. รวมปริมาตรทั้งสิ้น 4 มล. ปั่นตก

ตะกอนเก็บส่วนใสมาวัดค่า A_{280} โดยทำ blank และ control ที่มี EDTA เช่นกัน นำค่า A_{280} ที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของโปรตีเอส ทำการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ค่า pH ต่าง ๆ แสดงผลโดยกราฟ

6. ตรวจสอบชนิดของยีนโปรตีเอสที่ได้ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

6.1 การเตรียมตรึงดีเอ็นเอเป้าหมายกับเมมเบรนสำหรับโคโลนีไฮบริไดเซชัน ดัดแปลงจากวิธีของ Maniatis และคณะ (1982)

1. ใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 หรือ แผ่นไนลอนเมมเบรน ตัดขนาดเท่ากับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. ทำสัญลักษณ์บนแผ่นเมมเบรนด้วยดินสอ หรือตัดมุมเพื่อแสดงทิศทาง

3. วางแผ่นเมมเบรนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่บนผิวหน้า (ซึ่งผ่านการถ่ายเชื้อทรานสฟอร์แมนท์มาจิ้มลงบนอาหารด้วยไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อ และเลี้ยงข้ามคืน) โดยที่ให้สัญลักษณ์ที่เขียนไว้ด้วยดินสออยู่ด้านบน

4. ใช้ปากคีบดึงแผ่นเมมเบรนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จะได้โคโลนีเชื้อติดขึ้นมา

5. เทสารละลายต่อไปนี้ลงในการดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 ให้ดูดซับสารละลายเอาไว้พอชุ่ม (กระดาษกรอง 1 แผ่น ต่อ สารละลาย 1 ชนิด) แล้ววางแผ่นเมมเบรนบนกระดาษกรองดังกล่าวให้โคโลนีของเชื้อหงายขึ้น

denaturing solution เป็นเวลาอย่างน้อย 7 นาที

neutralizing solution เป็นเวลาอย่างน้อย 3 นาที

neutralizing solution เป็นเวลาอย่างน้อย 3 นาที

6. ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย 2X SSC เป็นเวลา 0.5 - 1 นาที

7. ปล่อยให้แห้ง ประมาณ 15 - 30 นาที

8. นำแผ่นเมมเบรนไปตรึงดีเอ็นเอด้วยเครื่องฉายแสง UV (BIO-RAD Laboratories) หรืออบในตู้อบอุณหภูมิ 80°ซ นาน 1.5 - 2 ชั่วโมง

9. จานเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นจานอ้างอิง (master plates) นำไปบ่มต่ออีก 1 คืน แล้วจึงสามารถเก็บได้ที่ 4°ซ

6.2 การติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี (labelling) การติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี [α ^{32}P] dATP (Amersham) กับดีเอ็นเอติดตามที่มียีนนิวทรัลโปรตีเอส

การติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี [α ^{32}P] dATP (Amersham) กับดีเอ็นเอติดตามซึ่งยีนนิวทรัล โปรตีเอส คือ ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส ที่ได้จากการย่อยพลาสมิด pNC3

(Wu, Z.R. และคณะ, 1991) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Bgl* เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ นิวทรัลโปรตีเอส (*nprE* gene) เริ่มต้นจากการสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* 1E61 ที่สามารถเจริญในภาวะที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ด้วยการสกัดแบบแอลคาไลน์ นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Bgl*I ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส นำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวซึ่งเป็นดีเอ็นเอติดตามสายยาวมาติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสีด้วยวิธี Nick translation ใช้ชุดการทดลอง Nick translation kit (Amersham) เสนอโดย Rigby และคณะ (1977) อาศัยเอนไซม์ 2 ประเภท คือ DNase I และ DNA polymerase I โดยที่ DNase I จะย่อยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ทำให้ดีเอ็นเอติดตามเกิดรอยขาด (Nick) จากนั้น DNA polymerase I จะทำหน้าที่ดึงนิวคลิโอไทด์ออกแล้วเติม dATP ที่มีสารกัมมันตภาพรังสี [α ^{32}P] ลงไปแทนที่ ทำให้สายดีเอ็นเอติดตามนี้มีสารกัมมันตภาพรังสีติดอยู่ด้วย

ขั้นตอนในการติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสีกับดีเอ็นเอ มีขั้นตอนดังนี้

1. เจือจางดีเอ็นเอที่ต้องการติดฉลากให้มีความเข้มข้น 2-50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ หรือสารละลายบัฟเฟอร์ TE
2. ผสมสารละลาย dCTP , dGTP และ dTTP อย่างละ 4 ไมโครลิตร ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 0.5 ไมโครลิตร นำไปใช้ในการทำปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร (ในกรณีที่ต้องการติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสีด้วย [α ^{32}P] dATP)
3. เตรียมส่วนผสมดังนี้

DNA	1-25	ไมโครลิตร
nucleotide buffer	10	ไมโครลิตร
[α ^{32}P] dATP 3,000 Ci/mmol(33 pmol)	5	ไมโครลิตร
สารละลายเอนไซม์	5	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

4. ผสมด้วยการดูดขึ้นลงเบา ๆ แล้วปิดฝาหลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยง 1-2 วินาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ให้ส่วนผสมลงไปอยู่ที่ก้นหลอด
5. บ่มที่อุณหภูมิ 15^{o}ซ เป็นเวลา 60 นาที (30 นาที - 3 ชั่วโมง)
6. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย EDTA 0.2 M, pH 8.0 (สามารถเจือจางได้จากสารละลาย 1 M EDTA) จำนวน 5 ไมโครลิตร ต้มดีเอ็นเอติดตามนี้ ที่ 95-100^{o}ซ เป็นเวลา 60 นาที

7. ทำให้ดีเอ็นเอติดฉลากนี้บริสุทธิ์โดยผ่านลงในคอลัมน์ NENSORB™ (Dupont) ซึ่ง equilibrate ด้วย 100 % เมธานอล ปริมาตร 2 มล. ให้มีอัตราการไหล 0.5 หยดต่อวินาที ใช้หลอดฉีดยาฉีดรีเอเจนท์ A ปริมาตร 2 มล. ปล่อยให้ไหลออกจนเกือบหมดแล้วจึงเติมดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้วลงในคอลัมน์ ฉีดรีเอเจนท์ A ปริมาตร 3 มล. ตามไปในคอลัมน์ และน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 3 มล. จนเกือบหมดแล้วชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย 20 % N-propanol จำนวน 1 มล. เก็บใส่ในหลอด ๆ ละ 8 หยด ประมาณ 8-9 หลอด ใช้เครื่องตรวจนับเช็คแต่ละหลอดแล้วเลือกหลอดที่มีสารกัมมัตภาพรังสีสูงที่สุด มาทำการไฮบริไดซ์กับยีนโปรตีเอสที่โคลนได้

6.3 การไฮบริไดซ์ดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสีเพื่อจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย

เพื่อตรวจสอบว่ายีนโปรตีเอสที่มีอยู่ในดีเอ็นเอลูกผสมจากทรานสฟอร์แมนท์ที่สามารถผลิตโปรตีเอสนั้นเป็นยีนนิวทรัลโปรตีเอส การไฮบริไดซ์กับชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิด pNC3 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI และ *BglI* ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามของยีนนิวทรัลโปรตีเอสบนเมมเบรน จากข้อ 4.2 นำ pNC3 ที่ติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสีเรียบร้อยแล้ว มาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอบนเมมเบรน เริ่มจากการบรรจุแผ่นเมมเบรนในหลอดสำหรับไฮบริไดซ์ (HYBAID) เติมสารละลาย prehybridization (working solution) ปริมาตร 7 มล. (ต่อเมมเบรน 3 แผ่น) บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับทำไฮบริไดเซชัน (HYBAID) ที่ 52^{o}ซ เป็นเวลา มากกว่า 6 ชั่วโมง แล้วเทสารละลายออก เติมสารละลาย hybridization (working solution) ที่มี salmon sperm DNA 10 มก./มล. (ถูกทำลายสภาพโดยการต้มที่ 95 - 100^{o}ซ นาน 10 นาที) จำนวน 35 ไมโครลิตร และเติมยีนนิวทรัลโปรตีเอสที่ติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสีแล้วจำนวน 70 ไมโครลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 52^{o}ซ มากกว่า 20 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเทสารละลายทิ้งในที่ทิ้งสารกัมมันตภาพรังสีเหลว

6.3.1 การล้างแผ่นเมมเบรน (washing)

เติมสารละลาย washing solution (6X SSC, 0.5% SDS) ประมาณ 20 มล. เพื่อล้างเมมเบรนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที 3 ครั้ง นำแผ่นเมมเบรนออกมาจากหลอดไฮบริไดซ์ ล้างผ่าน 6X SSC, 0.5% SDS อีก 1-2 นาที จับโดยปากคีบ ล้างด้วย 6X SSC, 0.5% SDS อุณหภูมิ 55^{o}ซ นาน 1.5 นาที และ ล้างผ่าน 2X SSC เป็นลำดับสุดท้าย จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนไปผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรอง Whatman 3 MM หลาย ๆ ชั้น ประมาณ 30 นาที นำแผ่นเมมเบรนที่แห้งไปจัดเรียงบนกระดาษกรองขนาดเท่ากับกล่องสำหรับประกบฟิล์ม โดยให้ด้านที่มีดีเอ็นเอหงายขึ้น ห่อด้วยพลาสติก Saran wrap แล้วนำไปทำออโตเรดิโอกราฟ (autoradiograph) ในห้อง

มืด วิเคราะห์สัญญาณการไฮบริไดซ์ที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นฟิล์มและถ่ายรูปโดยใช้เครื่องกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนต์ (light box)

6.3.2 การทำ autoradiography

ประกบฟิล์มเอ็กซเรย์กับแผ่นเมมเบรนที่ห่อด้วยพลาสติกแล้ว เก็บที่ -71°ซ เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นฟิล์มมาล้างตามขั้นตอนดังนี้

1. X-ray developer นาน 10 นาที
2. น้ำ นาน 1 นาที
3. fixer นาน 10-20 นาที
4. ผ่านน้ำไหล

จากนั้นจึงปล่อยให้แผ่นฟิล์มแห้ง แปรผลสัญญาณไฮบริไดซ์ที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม โดยที่ทรานสฟอร์แมนท์โคโลนีที่มียีนโปรตีเอสอยู่จะเกิดเป็นจุดสีดำตรงตำแหน่งของโคโลนีนั้นบนจานเลี้ยงเชื้อ

7. การทำให้โปรตีเอสบริสุทธิ์ โดยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (Smith, 1993)

7.1 เตรียม glutathione sepharose 4B

เขย่าขวด 75% slurry glutathione sepharose 4B 10 มล. เบา ๆ ให้ละลาย แล้วปิเปตมาจำนวน 1.33 มล. ลงในหลอดทดลอง เซนตริฟิวจ์ 500xg นาน 5 นาที และทิ้งส่วนน้ำใส (supernatant) จากนั้นล้างเจลด้วย 1xPBS ที่แช่เย็น 4 °ซ ปริมาตร 10 มล. ผสมกลับไปกลับมา เซนตริฟิวจ์และทิ้งส่วนใสอีกครั้ง เติม 1xPBS ปริมาตร 1 มล. จะได้ 50% slurry glutathione sepharose 4B สามารถเก็บได้นาน 1 เดือน

7.2 เตรียมเพาะเลี้ยงเชื้อ

โดยเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและมี IPTG จำนวน 100 มล. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการเขย่า จากนั้นเทเชื้อลงในอาหารแบบเดียวกันปริมาตร 1,000 มล. แล้วเลี้ยงต่ออีก 1 ชั่วโมง เติม IPTG แล้วเลี้ยงต่อ 2-5 ชั่วโมง เซนตริฟิวจ์เก็บเซลล์ ด้วยความเร็วรอบ 5000xg (8,000 รอบต่อนาที) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ละลายเซลล์ใน 1xPBS ปริมาตร 50 มล. นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator ในน้ำแข็ง 1-3 นาที จากนั้นเติม 20% Triton X-100 ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1% เซนตริฟิวจ์ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 °ซ

I17584490

7.3 การทำให้บริสุทธิ์

นำของเหลวที่แตกออกมาจากเซลล์ (crude lysate) ที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องทำให้เซลล์แตก จำนวนทั้งสิ้น 50 มล. มาเข้าสู่กระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านลงในคอลัมน์สำหรับแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีที่มีเจล 50% slurry glutathione sepharose 4B อยู่ภายใน 1 มล. (= 0.5 bed volume) บ่มไว้ที่ 4 ^{o}ซ เป็นเวลา 5-30 นาที ผสมให้เข้ากันโดยกลับคอลัมน์ไปมาเบา ๆ สิ่งที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์อันดับแรก คือโปรตีนอื่น ๆ ที่เซลล์สังเคราะห์ขึ้น โดย fusion protein ที่ประกอบด้วยโปรตีเอสเชื่อมอยู่กับ GST จะถูกจับไว้ภายในคอลัมน์ จากนั้นชะเจลด้วยบัฟเฟอร์ glutathione elution buffer ปริมาตร 0.5 มล. (เท่ากับ bed volume) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-5 นาที จะได้ fusion protein ส่วนเจลที่ใช้ในคอลัมน์สามารถนำกลับมาใช้ได้อีกโดยต้องต้ม 5 นาทีใน 1xPBS ที่มี 1% SDS

7.4 การแยกด้วยทรอมบิน

การแยกโปรตีเอสที่ต้องการออกจาก GST ด้วยการย่อยด้วยทรอมบิน นำ fusion protein ที่ได้มาผ่านลงคอลัมน์อีกครั้งจากนั้นจึงชะด้วย 1xPBS ที่มีทรอมบินจำนวน 50 cleavage unit (50 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20-37^{o}ซ นาน 2-16 ชั่วโมง เพื่อแยกโปรตีเอสให้ขาดออกจาก GST และหลุดออกจากคอลัมน์ ได้เป็นโปรตีเอสอิสระ

8. การเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสที่อยู่ในรูป fusion protein กับโปรตีเอสอิสระที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี

8.1 ตรวจวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี โดยนำของเหลวที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์มาทำการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอส โดยวัดแอคติวิตีในการไฮโดรไลส์เคซีนเช่นเดียวกัน (เกษม พงษ์มณี, 2536)

8.2 หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดของโปรตีเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ของเบรดฟอร์ด

8.3 เปรียบเทียบกับโปรตีเอสที่อยู่ในรูป fusion protein แล้วหาค่าจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ (purification fold)

$$\text{Puriffication fold} = \frac{\text{Specific activity of free protease}}{\text{Specific activity of fusion protease}}$$

9. การตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ดัดแปลงจากวิธีของ Harris และ Angal (1989)

ทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของ fusion protein และ โปรตีเอสอิสระที่ได้จากการผ่านลงในคอลัมน์ในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการใช้อุปกรณ์เอสดีเอส-โพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส Mini-PROTEAN® II (BIO-RAD Laboratories) ย้อมด้วยสี coomassie blue เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานต่าง ๆ ได้แก่ β-galactosidase (น้ำหนักโมเลกุล 116,400), glutamate dehydrogenase (น้ำหนักโมเลกุล 55,600), chymotrypsinogen (น้ำหนักโมเลกุล 27,000) และ trypsin inhibitor (น้ำหนักโมเลกุล 20,100)

ขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE มีดังต่อไปนี้

1. ผสมตัวอย่างโปรตีน 20 ไมโครลิตร กับ สารละลายบัฟเฟอร์ 5X sample buffer 5 ไมโครลิตร ในหลอดเซนตริฟิวจ์
2. ต้มที่ 100°ซ นาน 2-10 นาที
3. ปั่นเหวี่ยงสารละลายโปรตีน ประมาณ 1 วินาที
4. ใส่สารละลายตัวอย่างลงไปในช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง

ให้กระแสไฟฟ้า 220 โวลท์จากเครื่องกำเนิดไฟฟ้า จนกระทั่งสีเคลื่อนที่ลงไปถึงปลายเจล จึงนำเจลไปย้อมด้วยสี coomassie blue R-250 นาน 5-10 นาที แล้วทำการ destaining จนกระทั่งสีที่เกินมาหมดไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย