

เครื่องมือ วัสดุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์

2.1 เครื่องมือ

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) แบบ PHM 83 Autocal บริษัท Radiometer
Copenhagen, Denmark

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated Centrifuge) แบบ J-21C
บริษัท Beckman Instrument Inc., U.S.A.

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงขนาดเล็ก (High Speed Microcentrifuge) แบบ MC-15A
บริษัท Tomy Seiko, Japan

เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) แบบ HA-30 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation,
Japan

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) แบบ BM-600 บริษัท Memmert GmbH, W. Germany
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking Water Bath) แบบ 01PF623 บริษัท New
Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) แบบ A466 บริษัท Charles Hearson & Co. Ltd.,
England

เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) แบบ 0188GMS, Scientific Instrument
Development And Service Center, Faculty of Science, Chulalongkorn University

เครื่องผสมสาร (Vortex Genic) แบบ K 550-G บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.

เครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเลต (UV Transilluminator) แบบ 2011 Macrovue บริษัท
San Gabriel California, U.S.A

เครื่องกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Light Box) แบบ 2859 SHANDON บริษัท Shandon
Scientific Co. Ltd., London, England

เครื่องกำเนิดแสงสีแดง (Adjustable Savelight lamp) แบบ 1521541 Kodak 6B บริษัท Eastman Kodak Company, U.S.A.

ปิเปตต์อัตโนมัติ (Autopipette) แบบ Pipetman P20, P100 และ P200 บริษัท Gilson Medical Electronics S.A., France

อุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis) ประกอบด้วย horizontal electrophoresis unit และ power supply แบบ EPS 322 หรือ EPS 5100

อุปกรณ์แยกลำดับเบสอิเล็กโทรโฟรีซิส (Sequencing Electrophoresis Chamber) ประกอบด้วย Vertical electrophoresis unit และ power supply แบบ LKB 2103

เครื่องอบแห้งเจล (Gel dryer) แบบ 583 บริษัท Bio-RAD Laboratories, USA

กล่องสำหรับประกอบฟิล์ม (Film Cassette) ขนาด 8"x10" และขนาด 14"x17" บริษัท Okamoto, Japan

2.2 วัสดุภัณฑ์

กระดาษกรอง (Filter Paper) แบบ HA 0.45 μm . บริษัท Millipore Corporation, U.S.A.

กระดาษกรอง (Filter Paper) แบบ Whatman 3MM บริษัท Whatman International Ltd., England

แผ่นไนลอนเมมเบรนแบบชนิดประจุบวก บริษัท Boehringer Mannheim GmbH, Germany

กระจก 1 คู่ ขนาด 40X21 ซม.

spacer และ comb สำหรับการเตรียม sequencing gel

ฟิล์มถ่ายภาพขาว-ดำ แบบ Kodak TriX-pan 400, ฟิล์ม X-ray แบบ Xk5 บริษัท Eastman Kodak Company, U.S.A.

ถุงไดอะไลซิส (Cellulose Dialysis Tubing) 6 mm. (diameter) M.W. cut off 12,000 Dalton บริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A.

2.3 เคมีภัณฑ์

2.3.1 สารเคมี

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเกรดห้องปฏิบัติการ (Laboratory grade)

2.3.2 เอนไซม์

เรสทริคชันเอนไซม์ทุกชนิดเป็นของบริษัท Bethesda Research Laboratories, U.S.A., และ บริษัท Biolabs, U.S.A.

เอนไซม์ T4-DNA Ligase บริษัท Bethesda Research Laboratories, U.S.A.

Lysozyme บริษัท SERVA Feinbiochemica Gmbh & Co., Germany

Ribonuclease A บริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A.

Proteinase K บริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A.

2.3.3 ชุดการแยกลำดับนิวคลีโอไทด์

Sequenase™ Version 2.0 DNA Sequencing Kit ของ บริษัท Amersham International plc, England ประกอบด้วย

Universal Primer (-40) 5'-GTTTCCAGTCACGAC-3'

Annealing Buffer

Labelling Mix

Enzyme Dilution Buffer

T7 DNA Polymerase

Stop Solution

Terminator Mix (A mix ,G mix ,C mix ,Tmix)

REDIVUE [α -S³⁵]-dATP

2.3.4 ชุดการติดฉลากและการติดตามผล

DIG-DNA Labelling and Detection Kit บริษัท Boehringer Mannheim GmbH, Germany ประกอบด้วย

Unlabelled control DNA

Labelled control DNA

DNA dilution buffer

Hexanucleotide mixture (10x)

dNTP labelling mixture (10x)

Klenow enzyme, labelling grade

Anti-DIG-alkaline phosphatase

NBT
X phosphatase solution
และ Blocking reagent.
Lumigen PPD บริษัท Boehringer Mannheim GmbH, Germany

2.4 พลาสมิด

2.4.1 ดีเอ็นเอพาหะ

ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการทดลองนี้คือ พลาสมิด pUC18 (Maniatis และคณะ,1982) มีขนาดประมาณ 2.6 กิโลเบส พลาสมิด pUC118 (Messing และคณะ,1983) มีขนาดประมาณ 3.2 กิโลเบส มียีนต้านยาแอมพิซิลลิน และยีน *lacZ* ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นชิ้นส่วนด้านปลายอะมีโนของเอนไซม์ β -galactosidase แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดทั้งสองนี้แสดงในภาคผนวกที่ 1 และ 2

2.4.2 พลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม pDS10 และ pCSBC5

พลาสมิด pDS10 (Takanoและคณะ,1986) มีขนาดประมาณ 6.4 กิโลเบส มียีนที่สร้างเอนไซม์ α -CGTase และยีนต้านยาทานามัยซิน ดังแสดงในภาคผนวกที่ 3

พลาสมิด pCSBC5 (สุรศักดิ์,1993) มีขนาดประมาณ 7.9 กิโลเบส มียีนที่สร้างเอนไซม์ CGTase ได้ผลิตภัณฑ์ชนิด γ -CDs และมียีนต้านยาแอมพิซิลลิน ดังแสดงในรูปที่ 3

2.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ดีเอ็นเอของฟาจแลมปีดา (λ -DNA) ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *HindIII* (λ /*HindIII*) ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 8 ขนาด คือ 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 0.564 และ 0.125 กิโลเบส ตามลำดับ (Rodriguez และ Tait, 1983)

2.6 แบคเทอริโอฟาจ (Bacteriophage)

M13 KO7 Helper phage (Tabor and Richardson,1989) ช่วยในการเตรียมดีเอ็นเอสายเดี่ยว (Single-Stranded DNA) ของดีเอ็นเอลูกผสม pCSBC15

2.7 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

2.7.1 *Bacillus* sp. A11

เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987)

2.7.2 *Escherichia coli* JM101

F' traD36 lacI^o lacZΔM15 proAB/supE thi Δ(lac-proAB) เป็นเชื้อที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าเรือนสำหรับการทรานสฟอร์มพลาสมิด

2.8 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ระยะสั้นทำโดยเก็บในรูปจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-agar และทำการ subculture ทุก 1 เดือน หรืออาจเก็บไว้ในรูปของ slant LB-agar และทำการ subculture ทุก 3 เดือน ส่วนการเก็บในระยะยาวนั้นทำโดยเจริญเชื้อจนถึง log phase ($OD_{600} = 0.3-0.5$) ในอาหารอุดม 1 มิลลิลิตร ผสมกับกลีเซอรอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°C สามารถเก็บได้ประมาณ 1 ปี

2.9 เครื่องแก้วและสารละลาย

เครื่องแก้วและสารละลายทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง ทำให้สะอาดปราศจากนิวคลีเอสด้วยการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

3.0 โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ผล

โปรแกรมการวิเคราะห์ผลการหาลำดับเบสที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ โปรแกรม DNA Strider 1.0 ออกแบบและเขียนโดย Christian Marck แห่ง Departement de Biologie Institut de Recherche Fondermentale Commissariat a l'Energie Atomique ประเทศฝรั่งเศส