# บทที่ 3
# วิธีการดำเนินการวิจัย

## 1. สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการวิจัย

### 1.1 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างใบอ่อนของเปล้าน้อย (*Croton stellatopilosus* Ohba) ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสมุนไพรพูดได้ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี กรุงเทพมหานคร

### 1.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 3.1

**ตารางที่ 3.1** แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

| สายพันธุ์ | ลักษณะทางจีโนไทป์ | บริษัท |
|---|---|---|
| *E. coli* DH5α | F-φ*80dlacZ*Δ*M15* Δ*(lacZYA-gF)U169 deoR recA1endA1hsdR17* (rK-,mK+) *phoA supE44*λ*- thi-1 gyrA96relA1* | Clontech |
| *E. coli* BL21 codon plus (DE3) RIPL | B F- *ompT hsdS(rB-mB-) dcm+ Tetr gal endA Hte[argU ileY leuW Camr]* | Stratagene |

## 2. สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

### 2.1 สารเคมี

TEMED (Tetramethylethylenediamine) (Bio-Rad)

30% acrylamide and bis-acrylamide solution (Bio-Rad)

BCIP-NBT (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt, Nitro- blue tetrazoliumchloride) (Amresco)

Tris-Base (Amresco)

Ethidium Bromide (Amresco)

Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Amresco)

Glycine (Amresco)

Triton X-100 (Sigma)

Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma)

Acetonitrile ($CH_3CN$) (Labscan)

Acetic acid ($CH_3COOH$) (Labscan)

Methanol ($CH_3OH$) (Labscan)

Isopropanol (Labscan)

Glycerol (Fischer Scientific)

Ammonium bicarbonate ($NH_4HCO_3$) (Fischer Scientific)

Sodium chloride (NaCl) (Merck)

**2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ**

Tryptone (Bacto)

Yeast extracts (Bacto)

Agar (Bacto)

**2.3 ตัวดูดซับ (Absorbent)**

MCI GEL® CHP20P (Mitsubishi)

S-agarose resin (Novagen)

PD10 Desalting column (Amersham)

**2.4 สารมาตรฐาน (Standard marker)**

1 kb ladder (Fermentas)

High range RNA ladder (Fermentas)

Standard protein marker (Precision Plus Protein Standards) (Bio-Rad)

Farnesol (FOH) (Sigma)

Geranylgeraniol (GGOH) (Sigma)

**2.5 เอนไซม์และแอนติบอดี**

DyNAzyme EXT DNA polymerase (Finnzymes)

M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas)

*Pfu* DNA Polymerase (Fermentas)

*Taq* DNA Polymerase (Fermentas)

T4 DNA ligase (Fermentas)

*BamH*I (Fermentas)

*Sal*I (Fermentas)

*Nde*I (Fermentas)

*EcoR*V (Fermentas)

S. tag monoclonal antibody (Novagen)

**2.6 ชุด Kit**

น้ำยาสกัด RNA (Trizol reagent) (Invitrogen)

ชุดสังเคราะห์ First strand cDNA (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit) (Fermentas)

ชุดเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) (Fermentas)

ชุดสกัด DNA ออกจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) (Qiagen)

**2.7 พลาสมิดเวคเตอร์**

pTZ57R/T vector (Fermentas)

pETDuet-1, coexpression vector (Novagen)

pET101/D/*PDPase* ได้จาก ดร.นาฏศจี นวลแก้ว (Nualkaew et al., 2004)

**2.8 เครื่องมือ**

Agarose gel electrophoresis (Mupid-2plus)

SDS-PAGE รุ่น Mini-protean tetra systems (Bio-Rad)

Thermal cycle รุ่น 2720 Thermal Cycler (Applied biosystems)

Heating box (Stuart Scientific)

Gel Documentation รุ่น Gel Doc (Syngene)

Benchtop Centrifuge รุ่น WiseSpin CF-10 (Labgenius)

Ultracentrifuge รุ่น Hybrid Speed Refrigerated Centrifuge Model 6200 (Kubota)

HPLC column (C18 reverse phase 4.0 mm x 250 mm, 5 μM) (Phenomenex)

HPLC รุ่น HP Agilent 1100 HPLC (Agilent)

Incubator shaker รุ่น UM-IS 120/R (UMAC Scientific)

pH meter รุ่น Seven Easy (Mettler Toledo

UV-spectrophotometer รุ่น UV-1700 Phamaspec (Shimadzu)

Sonicator รุ่น Soniprep150 (Henderson Biomedical company)

Electro-blotting รุ่น EBU-2000 (C.B.S. Scientific)

**2.9 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 3.2**

**ตารางที่ 3.2** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (สังเคราะห์จากบริษัท Proligo)

| ไพรเมอร์ | ทิศทาง (5' ⟶3') | Tm ($^0$C) |
|---|---|---|
| GGPPS FW | ATGAGTTCTGTGAATTTAGGTTCATGGGTTCATACTT | 61 |
| GGPPS RV | CATGAAGCTTAGTTTTGCCTGTATGCAATGTAATTAG | 61 |
| tGGPPS FW | CGCGGGATCCGGGTTTTGATTTCAAATCTTACATGGTTC | 56 |
| tGGPPS RV | CATGAAGCTTAGTTTTGCCTGTATGCAATGTAATTAG | 54 |
| tPDPase FW | CTGACATATGAAACGATATGCTGGGGAAGGACATG' | 58 |
| tPDPase RV | TACGGATATCCTTTTGGTCCCCTTTCAACGTC | 55 |
| pETUpstream primer | ATGCGTCCGGCGTAGA | 49 |
| DuetDOWN1 Primer | GATTATGCGGCCGTGTACAA | 52 |
| DuetUP2 Primer | TTGTACACGGCCGCATAATC | 52 |
| T7 terminator Primer | TATGCTAGTTATTGCTCAG | 45 |
| M13 forward primer | GTAAAACGACGGCCAGT | 47 |
| M13 reverse primer | GGAAACAGCTATGACCATG | 48 |

**หมายเหตุ** ตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้ (____) คือบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH*I, *Sal*I, *Nde*I และ *Eco*RV ตามลำดับ

**3. โปรแกรมชีวสารสนเทศน์ (bioinformatics)**

**3.1 Automated Codon Usage Analysis Software version 1.0 (ACUA) (Vetrivel et al., 2007)**

**3.2 Bioedit (Hall T. A., 1999)**

**3.3 CAP3 sequence assembly program (Huang and Madan. 1999)**

**3.4 RNA secondary structure prediction (http://www.genebee.msu.su)**

**4. ขั้นตอนและวิธีการทดลอง**

**4.1 การทำอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟริซิส (agarose gel electrophoresis)**

นำตัวอย่างสารละลาย DNA มาผสมกับสารละลาย loading buffer ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X และนำไปหยอดลงแผ่นอะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1% ที่ถูกติดตั้งในชุด electrophoresis tank โดยใช้สารละลายตัวกลาง 1X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน

40 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์นาน 15 นาที และตรวจสอบแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Syngene Gene Genias) โดยเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder

**4.2 การทำ SDS-PAGE**

นำตัวอย่างของโปรตีนมาผสมกับสารละลาย 5X sample buffer ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X ต้มที่อุณหภูมิ 100 $^{0}$C เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และนำตัวอย่างโปรตีนมาโหลดลงแผ่นเจลพอลิอะคริลาไมด์ถูกติดตั้งในชุด electrophoresis tank โดยผ่านสารละลายตัวกลาง 1X running buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นย้อมโปรตีนบนแผ่นเจลด้วย Coomassie blue stain solution นาน 1 ชั่วโมง และล้างออกด้วย Destain solution จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

**4.3 การถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย (Transformation)**

ทำการถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์ของ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี heat shock (Sambrook et al., 1989) โดยนำ competent cell ปริมาตร 100 µl ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 10 นาที จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายริคอมบิแนนท์พลาสมิดปริมาตร 20 µl นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที แล้วแช่ที่อุณหภูมิ 42 $^{0}$C เป็นเวลา 90 วินาที และทำให้เย็นตัวลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 3 นาที จึงเติมอาหารเหลว SOC medium ปริมาตร 1 mL และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{0}$C เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีเป้าหมายด้วยเทคนิค Blue-white screening (Sambrook et al., 1983) โดยนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของ ampicillin เข้มข้น 100 µg/mL, IPTG เข้มข้น 0.2 µg/mL และ X-gal เข้มข้น 0.2 µg/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{0}$C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยที่โคโลนีสีขาว (white colony) คือ โคโลนีที่มีการแทรกสอดของยีน *GGPPS* ในพลาสมิด pTZ57R/T vector

**4.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ**

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 mL ที่มีส่วนผสมของ ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/mL โดยนำมาเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37 $^{0}$C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 800 rpm เทส่วนน้ำใสทิ้งและนำส่วนของตะกอนเซลล์ (cell pellet) มาทำการสกัดพลาสมิดโดยชุด Kit ของบริษัท fermentas (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) จากนั้นตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นอะกาโรสเจลเท่ากับ 0.8 % ย้อมแถบ DNA ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 15 นาที และตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Syngene Gene Genias) โดยเปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder

**4.5 การสกัด Total RNA จากใบเปล้าน้อย**

นำใบอ่อนของเปล้าน้อยน้ำหนัก 1 g บดในโกร่งที่มีการเติมไนโตรเจนเหลวตลอดเวลาจนกระทั่งได้เป็นผงละเอียด ตักลงใส่หลอดทดลองปราศจากเชื้อ และเติมสารละลาย Trizol 10 mL ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 g อุณหภูมิ 4 $^{0}$C 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเติม chloroform 4 mL ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ดูดสารละลายใสที่อยู่ด้านบน (top phase) ลงในหลอดทดลองปราศจากเชื้อ และทำการตกตะกอน RNA ด้วย isopropanol 5 mL ผสมให้เข้ากันและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 g อุณหภูมิ 4 $^{0}$C 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอน RNA ด้วย 75 % ethanol 1 mL นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเทส่วนใสทิ้งละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มีส่วนผสมของ DEPC (DEPC treated water) ปริมาตร 100 µl จากนั้นจึงทำการตรวจสอบคุณภาพของ RNA ที่ได้โดยเทคนิคฟอร์มอลดีไฮด์เจลอิเล็คโตรโฟริซิส (formaldehyde gel electrophoresis) ที่ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลเท่ากับ 1 % ในสารละลายตัวกลาง 1X MOPS buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำแผ่นเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 15 นาที และตรวจดูแถบ RNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยเปรียบเทียบกับแถบ RNA มาตรฐาน *(*High range RNA Ladder*)* โดย RNA ที่มีคุณภาพดีควรประกอบด้วย 3 ส่วนคือ 18s rRNA, 28s rRNA และ small RNA โดยตรวจสอบคุณภาพ RNA ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของ RNA ที่ได้เทียบกับโปรตีน โดย RNA ที่มีคุณภาพสูงจะมีค่า $A_{260}/A_{280}$ เท่ากับ 1.8-2.1

**4.6 การทำ RT-PCR**

นำ Total RNA ที่ได้จากข้อ 3.2 ใช้เป็นต้นแบบในการทำ RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *GGPPS* โดยใช้ชุดสังเคราะห์ cDNA ของบริษัท Fermentas (RevertAid$^{TM}$ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit) ทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermal cycle โดยส่วนผสมของสารละลายที่ใช้มีดังนี้ (1.3 µg/µL) RNA 1 µl , 100 µM Oligo $(dT)_{18}$ primer 1 µl, DEPC treated water 10 µl ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 $^{0}$C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 5X reaction buffer 4 µl, 20 U/µl RiboLock Ribonuclease inhibitor 1 µl และ 10 mM dNTP mix 2 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{0}$C เป็นเวลา 5 นาที สุดท้ายเติมเอนไซม์ (200 U/µL) M-MuLV Reverse transcriptase 1 µl และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 $^{0}$C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 $^{0}$C เป็นเวลา 10 นาที นำ cDNA ใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *GGPPS* ในขั้นตอนต่อไป

**4.7 การทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *GGPPS***

นำ cDNA ที่ได้จากข้อ 4.6 ใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *GGPPS* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ GGPPS FW และ GGPPS RV ที่ถูกออกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GGPPS* จากเปล้าน้อย (Accession No. AB034249) โดยส่วนผสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้ 10X DyNAzyme buffer 5 µl, 25 mM dNTP 5 µl, 10 µM forward primer 5 µl, 10 µM reverse primer 5 µl, สารละลาย cDNA 1 µl, เอนไซม์ DyNAzyme EXT DNA polymerase 1µl ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 50 µl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง Thermal cycle โดยมีจำนวนรอบของการทำ PCR ดังนี้ predenature 95 °C 5 นาที, PCR cycle 30 รอบที่ประกอบด้วย 95 °C 30 วินาที, annealing 55 °C 30 วินาที และ extension 72 °C 1 นาที สุดท้ายที่ final extension 72 °C 10 นาที ตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่ได้ด้วยเจลอิเล็คโตรโฟริซิสโดยเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder (ข้อ 4.1) เมื่อได้แถบ DNA ที่มีขนาดตามต้องการนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit) (ข้อ 4.8) และเก็บผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกระทั่งใช้งาน

**4.8 การสกัดแยก DNA ออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์**

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสด้วย 1 % อะกาโรสเจลแล้วย้อมแถบเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder สกัด DNA ออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit ตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่ได้ด้วยเจลอิเล็คโตรโฟริซิสโดยเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder (ข้อ 4.1)

**4.9 การโคลนยีน *GGPPS* เข้าสู่พลาสมิด pTZ57R/T vector**

นำแถบ DNA ของยีน *GGPPS* ที่ได้จากข้อ 6.7 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R/T โดยมีส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ดังนี้ (5 U/µl) T4 DNA ligase 1 µl, 10X ligation buffer 1 µl, พลาสมิด pTZ57R/T 1 µl, ชิ้น DNAของยีน *GGPPS* 1 µl และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 10 µl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5α (ข้อ 4.3) จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีเป้าหมายด้วยเทคนิค Blue-white screening (Sambrook et al., 1983) โดยนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของ ampicillin เข้มข้น 100 µg/mL, IPTG ความเข้มข้น 0.2 µg/mL และ X-gal เข้มข้น 0.2 µg/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยที่โคโลนีสีขาว (white colony) คือโคโลนีเป้าหมายที่มีการแทรกสอดของยีน *GGPPS* ในพลาสมิด pTZ57R/T

**4.10 การตรวจสอบพลาสมิด pTZ57R/T vector ที่มีการแทรกสอดของยีน *GGPPS***

ทำการคัดเลือกโคโลนีเป้าหมาย (white colony) ที่ได้จากข้อ 4.9 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 mL ที่มีส่วนผสมของ ampicillin เข้มข้น 100 µg/mL เพื่อเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 4.4 นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบการแทรกสอดของยีน *GGPPS* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยมีส่วนผสมดังนี้ เอนไซม์ (10 U/µl) *Hind*III 0.5 µl, 10X Red buffer 2 µl, พลาสมิดดีเอ็นเอ 1 µl และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 20 µl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{0}$C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเจลอิเล็คโตรโฟริซิสโดยเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder (ข้อ 4.1) และทำการคัดเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีการแทรกสอดของยีน *GGPPS* ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ M13 forward และ M13 reverse primer ซึ่งพลาสมิด pTZ57R/T/*GGPPS* ที่มีลำดับเบสถูกต้องจะถูกนำมาใช้เป็น DNA ต้นแบบในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ truncate ของยีน *GGPPS* ในขั้นตอนต่อไป

**4.11 การทำ PCR เพิ่มปริมาณ Truncate ของยีน *GGPPS***

นำพลาสมิด pTZ57R/T/*GGPPS* ที่ได้จากข้อ 4.10 ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ truncate ของยีน *GGPPS* โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ tGGPPS forward และ tGGPPS reverse ซึ่งออกแบบขึ้นมาตามรายงานของ Sitthithaworn และคณะ (Sitthithaworn et al., 2001) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ดังนี้ เอนไซม์ (2.5 U/µL) *Pfu* DNA polymerase 1 µl, 10X *Pfu* DNA polymerase buffer 5 µl, 25 mM dNTPS 5 µl, 10 µM forward primer 5 µl, 10 µM reverse primer 5 µl, และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 50 µl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง thermal cycle โดยมีจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR (PCR cycle) ดังนี้ predenature 95 $^{0}$C 5 นาที, PCR cycle 30 รอบที่ประกอบด้วย 95 $^{0}$C 30 วินาที, annealing 55 $^{0}$C 30 วินาที และ extension 72 $^{0}$C 1 นาที สุดท้ายที่ final extension 72 $^{0}$C 10 นาที ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเจลอิเล็คโตรโฟริซิสโดยเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder เมื่อได้แถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit) (ข้อ 4.8) และเก็บรักษาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่อุณหภูมิ -20 $^{0}$C จนกระทั่งใช้งาน

**4.12 การตัดต่อ truncate ของยีน *GGPPS* เข้าสู่ pETDuet-1, vector**

นำ DNA ของยีน *GGPPS* ที่ได้จากข้อ 4.11 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH*I และ *Sal*I โดยมีส่วนผสมดังนี้ เอนไซม์ (5 U/µL) *BamH*I 3.5 µl, (5 U/µL) *Sal*I 3.5 µl, 10X Tango buffer 20 µl, ดีเอ็นเอเป้าหมาย 34 µl ปรับปริมาตรให้ได้ 100 µl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{0}$C นาน 2 ชั่วโมง และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกสกัด DNA ออกจากเจล (ข้อ 4.8) และนำ DNA ของยีน *GGPPS* ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pETDuet-1 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์

ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อโดยใช้เอนไซม์ (10 U/μL) T4 DNA ligase 1 μl, 10X ligation buffer 1 μl, pETDuet-1 vector 1 μl, แถบ DNA ของยีน *GGPPS* 1 μl และปรับปริมาตรให้ได้ 10 μl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 22 $^{0}$C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* DH5α (ข้อ 4.3) จากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของ ampicillin เข้มข้น 100 μg/mL โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{0}$C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

**4.13 การตรวจสอบการแทรกสอดของยีน *GGPPS* ในพลาสมิด pETDuet-1 vector**

ทำการคัดเลือกโคโลนี (Single colony) ที่ได้จากข้อ 4.12 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 mL ที่มีส่วนผสมของ ampicillin เข้มข้น 100 μg/mL เพื่อเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ (ข้อ4.4) ทำการตรวจสอบการแทรกสอดของของชิ้นยีน *GGPPS* ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยมีส่วนผสมดังนี้ดังนี้ เอนไซม์ *BamH*I และ *Sal*I (5 U/μL) อย่างละ 0.5 μl, 10X Tango buffer 2 μl, พลาสมิดดีเอ็นเอ 1 μl และปรับปริมาตรให้ได้ 10 μl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{0}$C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเจลอิเล็คโตรโฟริซิสโดยเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder (ข้อ 4.1) และคัดเลือกพลาสมิด pETDuet-1 ที่มีการแทรกสอดของยีน *GGPPS* ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ pETUpstream primer และDuetDOWN1 primer (ตารางที่ 3.2 )

**4.14 การแสดงออกของยีน *GGPPS* ใน *E. coli* BL21 (DE3) RIPL**

นำพลาสมิด pETDuet/*GGPPS* ที่ได้จากข้อ 4.13 ถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* BL21(DE3)RIPL โดยวิธีการ chemical heat shock (ข้อที่ 4.3) จากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของ ampicillin เข้มข้น 50 μg/mL และ chloramphenicol เข้มข้น 34 μg/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{0}$C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำโคโลนีเป้าหมายที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/*GGPPS* มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 mL ที่มีส่วนผสมของ ampicillin ความเข้มข้น 50 μg/mL และ chloramphenicol เข้มข้น 34 μg/mL นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37 $^{0}$C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงถ่ายโอน (subculture) ลงในอาหารเหลวชนิดเดียวกันจนกระทั่งมีอัตราการเจริญเติบโตที่ค่า $OD_{600}$ อยู่ระหว่าง 0.6-0.8 จึงทำการเติม IPTG ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 mM เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 16 $^{0}$C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บตะกอนเซลล์ (cell pellet) โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000 rpm นาน 5 นาที และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GGPPS* ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ข้อ 4.2 )

**4.15 การเตรียมยีน prenyl diphosphate phosphatase (*PDPase*)**

นำพลาสมิด pET101/D/TOPO ที่มีการแทรกสอดของยีน *PDPase* (pET101/TOPO/*PDPase*) ถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* DH5α (ข้อ 4.3) และนำโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 5 mL ที่มีสวนผสมของ ampicillin เข้มข้น 100 µg/mL เพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (ข้อที่ 4.4) เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ truncate ของยีน *PDPase*

**4.16 การทำ PCR เพิ่มปริมาณ truncate ของยีน *PDPase***

นำพลาสมิด pET101TOPO/*PDPase* จากข้อ 4.15 ใช้เป็น DNA ต้นแบบในการทำ PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ tPDPase forward และ tPDPase reverse (ตารางที่ 3.2) ซึ่งถูกออกแบบขึ้นมาเพื่อตัดส่วนเปปไทด์สัญญาณ (Nualkaew et al., 2004) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR มีดังนี้ เอนไซม์ (2.5 U/µL) *Pfu* DNA polymerase 1 µl, 10X *Pfu* DNA polymerase buffer 5 µl, 25 mM dNTP 5 µl, 10 µM forward primer 5 µl, 10 µM reverse primer 5 µl, pET101TOPO/*PDPase* 1 µl และปรับปริมาตรให้ได้ 50 µl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำปฏิกิริยาในเครื่อง thermal cycle โดยมีจำนวนรอบของการทำ PCR ดังนี้ predenature 95 $^{0}$C 5 นาที, PCR cycle 30 รอบที่ประกอบด้วย 95 $^{0}$C 30 วินาที, annealing 55 $^{0}$C 30 วินาที และ extension 72 $^{0}$C นาน 1 นาที สุดท้ายที่ final extension 72 $^{0}$C 10 นาที ชั่วโมง ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเจลอิเล็คโตรโฟริซิสโดยเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder (ข้อ 4.1) เมื่อได้แถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit) (ข้อ 4.8) และเก็บผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่อุณหภูมิ -20 $^{0}$C จนกระทั่งใช้งาน

**4.17 การตัดต่อยีน *PDPase* เข้าสู่พลาสมิด pTZ57R/T vector**

ทำปฏิกิริยาการเติมเบส Adenine (A) ที่ปลาย 3' ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.16 ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase โดยส่วนผสมที่ใช้มีดังนี้ 10X Taq DNA polymerase buffer 2 µl, 25 mM $MgCl_2$ 2 µl, 20 mM ATP 2 µl, DNA ของยีน *PDPase* 12 µl และเอนไซม์ (5 U/µL) *Taq* DNA polymerase 2 µlผสมให้เข้ากันและทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermal cycle ที่อุณหภูมิ 72 $^{0}$C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R/T vector โดยมีส่วนผสมดังนี้ เอนไซม์ (10 U/µL) T4 DNA ligase 1 µl, 10X ligation buffer 2 µl, pTZ57R/T 0.5 µl, แถบ DNA ของยีน *PDPase* 12.5 µl และปรับปริมาตรให้ได้ 20 µl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 22 $^{0}$C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5α (ข้อที่ 4.3) คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิด pTZ57R/*PDPase* ด้วยเทคนิค Blue-white screening (Sambrook et al., 1983) และมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 mL ที่มีส่วนผสมของ ampicillin เข้มข้น 100 µg/mL เพื่อเตรียมสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (ข้อ 4.4)

**4.18 การตรวจสอบพลาสมิด pTZ57R/T vector ที่มีการแทรกสอดของยีน *PDPase***

ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 4.17 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ปฏิกิริยาประกอบด้วย เอนไซม์ (5 U/μL) *Nde*I 0.5 μl, เอนไซม์ (5 U/μL) *Eco*RV 0.5 μl, สารละลาย 10X Tango buffer 2 μl และปรับปริมาตรให้ได้ 10 μl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{0}$C นาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเจลอิเล็คโตรโฟริซิสโดยเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder (ข้อ 4.1) และทำการคัดเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีการแทรกสอดของยีน *PDPase* ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ M13 forward และ M13 reverse primer (ตารางที่ 3.2)

**4.19 การตัดต่อ truncate ของยีน *PDPase* เข้าสู่ pETDuet-1 coexpression vector**

ตัดยีน *PDPase* ออกจากพลาสมิด pTZ57R/*PDPase* ด้วยเอนไซม์ *Nde*I และ *Eco*RV โดยมีส่วนผสมดังนี้ เอนไซม์ (5 U/μL) *Nde*I 1 μl, เอนไซม์ (5 U/μL) *Eco*RV 1 μl, 10X Tango buffer 2 μl, พลาสมิดดีเอ็นเอ 16 μl และปรับปริมาตรให้ได้ 40 μl ด้วยน้ำกลั่นจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{0}$C นาน 2 ชั่วโมง และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (ข้อ 4.8) และนำ DNA ของยีน *PDPase* มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pETDuet-1, vector ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน โดยมีส่วนผสมดังนี้ เอนไซม์ T4 DNA ligase (5 U/μl) 1 ไมโครลิตร, 10X Ligation buffer 2 μl, พลาสมิด pETDuet-1 vector 7.5 μl, DNA ของยีน *PDPase* 7.5 μl และปรับปริมาตรให้ได้ 20 μl ด้วยน้ำกลั่นจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 22 $^{0}$C 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5α (ข้อที่ 4.3) เลือกโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 mL ที่มีส่วนผสมของ ampicillin เข้มข้น 100 μg/mL สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด kit ของบริษัท fermentas (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit)

**4.20 การตรวจสอบการแทรกสอดของยีน *PDPase* ในพลาสมิด pETDuet-1, vector**

ทำการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากข้อ 4.19 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยมีส่วนผสมดังนี้ เอนไซม์ (5 U/μL) *Nde*I 0.5 μl, เอนไซม์ *Eco*RV 0.5 μl, 10X Tango buffer 2 ไมโครลิตร, พลาสมิดดีเอ็นเอ 1 μl และปรับปริมาตรให้ได้ 10 μl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{0}$C นาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเจลอิเล็คโตรโฟริซิสโดยเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder (ข้อ 4.1) และคัดเลือกพลาสมิด pETDuet-1 ที่มีการแทรกสอดของยีน *PDPase* ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ DuetUP2 Primer และ T7 Terminator Primer (ตารางที่ 3.2)

**4.21 การสร้างพลาสมิด pETDuet-1 vector ที่มีการแทรกสอดของยีน *GGPPS* และ *PDPase***

นำแถบ DNA ของยีน *GGPPS* ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *BamH*I และ *Sal*I (ข้อ 4.12) มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pETDuet/*PDPase* ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน โดยส่วนผสมของสารละลายที่ใช้มีดังนี้ เอนไซม์ (5 U/µl) T4 DNA ligase 1 µl, 10X Ligation buffer 1 µl, pETDuet/*PDPase* 1 µl, แถบ DNA ของยีน *GGPPS* 6 µl และปรับปริมาตรให้ได้ 10 µl ด้วยน้ำกลั่นจากเชื้อ ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 22 $^{0}$C 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5α (ข้อ 4.3) และทำการคัดเลือกโคโลนีเป้าหมายมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 mL ที่มีส่วนผสมของ ampicillin เข้มข้น 100 µg/mL เพื่อเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด Kit ของบริษัท fermentas (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit)

**4.22 การตรวจสอบการแทรกสอดของยีน *GGPPS* ในพลาสมิด pETDuet/*PDPase***

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 4.21 ตรวจสอบการแทรกสอดของยีน *GGPPS* และ *PDPase* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *BamH*I และ*EcoR*V โดยมีส่วนผสมดังนี้ เอนไซม์ (5 U/µL) *BamH*I 0.5 µl, เอนไซม์ (5 U/µL) *EcoR*V 0.5 µl, 10X Tango buffer 2 µl และปรับปริมาตรให้ได้ 10 µl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{0}$C นาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเจลอิเล็คโตรโฟริซิสโดยเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder (ข้อที่ 4.1) ยืนยันผลที่ได้อีกครั้งด้วยการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ DuetUP2 Primer และ T7 Terminator Primer

**4.23 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของเจอรานิลเจอรานิออลโดยดูความสามารถในการผลิต GGOH**

คัดเลือก *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับริคอมบิแนนท์พลาสมิด (pETDuet/*GGPPS/PDPase*, pETDuet/*GGPPS*, pETDuet/*PDPase* และ pETDuet-1 empty vector) มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 mL ที่มีส่วนผสมของ carbenicillin เข้มข้น 50 µg/mL และ chloramphenicol เข้มข้น 34 µg/mL นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37 $^{0}$C นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงถ่ายโอน (inoculate) ลงในอาหารเหลวชนิดเดียวกัน ปริมาตร 500 mL จนกระทั่งมีอัตราการเจริญเติบโตที่ค่า $OD_{600}$ เท่ากับ 0.6-0.8 จึงทำการเติม IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 16 $^{0}$C นาน 18 ชั่วโมง เก็บตะกอนเซลล์ (cell pellet) โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 10,000 g อุณหภูมิ 4 $^{0}$C เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย washing buffer (ที่

ประกอบด้วย 0.9% NaCl) พร้อมทั้งจดบันทึกน้ำหนักเซลล์เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่าชีวมวล (biomass) และนำตะกอนเซลล์ที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 $^{0}$C จนกระทั่งใช้งาน

**4.24 การเตรียมสารสกัดเซลล์ให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial purification)**

การเตรียมสารสกัดเซลล์ให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) เริ่มจากนำตะกอนเซลล์ที่ได้จากข้อ 6.23 มาผสมกับสารละลาย lysis buffer ปริมาตร 10 mL (ที่ประกอบด้วย 50 mM Tris HCl และ 0.2% Triton-X 100, pH 8) และนำไปใช้ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator ทั้งหมด 3 รอบๆ ละ 30 วินาที พัก 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10, 000 g เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายได้มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการแยกผ่านคอลัมน์ของ MCI gel ชะสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ด้วยการทำ gradient elution step ด้วยสารละลาย elution buffer (ที่ประกอบด้วย MeOH เข้มข้น 0, 10, 30, 50, 80 และ 100 % ในสารละลาย 25 mM $NH_4HCO_3$, pH 8) เก็บตัวอย่างของสารละลาย 100 % ของ MeOH และทำให้เข้มข้นด้วยการเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน และปรับปริมาตรด้วย absolute ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 $^{0}$C เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ GGOH ด้วยเทคนิค HPLC

**4.25 การวิเคราะห์ปริมาณ GGOH ด้วยเทคนิค HPLC (Zhang and Poulter. 1993)**

นำตัวอย่างของสารสกัดที่ได้จากข้อ 4.24 มาวิเคราะห์หาปริมาณ GGOH โดย คอลัมน์ HPLC ชนิด C18 reverse phase (4.0 mm x 250 mm, 5 µM: Phenomenex, Germany) สารละลายตัวพา (mobile phase) ที่ใช้ประกอบด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ A ประกอบด้วย 25 mM $NH_4HCO_3$ pH 8 และสารละลาย B ที่ประกอบด้วย acetonitrile ทำการชะสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ด้วยโปรแกรม gradient elution step โดยเพิ่มอัตราส่วนของสารละลายตัวพา (A : B) จาก 0 ถึง 100 % ภายในเวลา 40 นาทีและชะต่อไป (hold) เป็นเวลา 10 นาที ควบคุมอัตราการไหล (flow rate) ที่ความเร็ว 1 ml/min โดยตรวจวัด GGOH ที่ความยาวคลื่น 214 nm เทียบกับสารมาตรฐาน GGOH (Sigma) และ FOH (Sigma)

**4.26 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH**

การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของริคอมบิแนนท์ *E. coli* ใช้วิธีเดียวกับข้อ 4.4 โดยเก็บตัวอย่างเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ทุกๆ 2 ชั่วโมง มาวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยทำทั้งก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย

1 mM IPTG ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำมาสร้างกราฟการเจริญเติบโต (growth curve) เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น ขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอ, การแสดงออกของยีนเป้าหมาย และการผลิต GGOH

**4.27 การทำ feeding ของกลีเซอรอลในอาหารเหลว LB**

การทำ Feeding experiment เพื่อศึกษาผลของกลีเซอรอลที่มีต่อการเจริญเติบโต, การเปลี่ยนแปลงของค่าชีวมวล และการผลิต GGOH ซึ่งการศึกษาใช้วิธีการเดียวกับข้อ 4.23-4.26 แต่เปลี่ยนจากสูตรอาหารเหลวที่ใช้เป็น LB ที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอลเข้มข้น 2%

**4.28 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ S-tag purification kit**

นำตะกอนเซลล์ (cell pellet) ของ *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอน พลาสมิด pETDuet/*GGPPS* และ pETDuet/*GGPPS*/*PDPase* มาทำให้ฟุ้งในสารละลาย lysis buffer ที่ประกอบด้วย (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 0.2% Triton X-100) ปริมาตร 10 mL ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4 $^{0}$C เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) มาบ่มกับเรซิน S. agarose (Novagen) ปริมาตร 2 mL ที่อุณหภูมิ 22 $^{0}$C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดการจับตัวกันระหว่างเรซินกับ S-Agarose protein ที่เชื่อมต่อกับยีน *PDPase* จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 700 *g* นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างเรซินด้วยสารละลาย binding/washing buffer (ที่ประกอบด้วย 200 mM Tris-HCl และ 15 mM NaCl, pH 7.5) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 700 *g* นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและชะ (elute) โปรตีนเป้าหมายออกจากเรซินด้วยสารละลาย elution buffer (3M $MgCl_2$) ปริมาตร 3 mL โดยนำไปเขย่าที่ความเร็ว 60 rpm อุณหภูมิ 22 $^{0}$C เป็นเวลา 10 นาที และ นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 700 *g* นาน 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) มากำจัดเกลือด้วย PD10 desalting column (Amersham) และทำให้เข้มข้นด้วย Amicon (Millipore) จากนั้นนำสารสกัดโปรตีนเข้มข้นไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western blot โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ S-protein (S-tag monoclonal antibody) เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PDPase*

**4.29 การตรวจสอบการแสดงออกของริคอมบิแนนท์ *PDPase* ด้วยเทคนิค western blot**

นำตัวอย่างของโปรตีนที่ได้จากข้อ 4.28 มาแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ข้อ 4.2) จากนั้นจึงเคลื่อนย้ายโปรตีนเป้าหมายสู่แผ่นเมมเบรนชนิดไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose membrane) ด้วยเครื่อง electro blotting โดยใช้สารละลายตัวพา 1X transfer buffer

ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 $^{0}$C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วจึงนำแผ่นเมมเบรนที่ได้มาบ่มกับสารละลาย blocking solution (ที่ประกอบด้วย 1X TBST buffer และ 1% gelatin) เป็นเวลา 15 นาที และนำมาบ่ม S-tag antibody (dilution 1:5000) (Novagen, Inc) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลาย 1X TBST buffer จำนวน 4 รอบๆละ 2 นาที สุดท้ายจึงเติม BCIP และ NBT ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ alkaline phosphatase สังเกตการแถบสีม่วงที่เกิดขึ้น