

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. ชุดอุปกรณ์ทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ชนิดแนวนอน (บริษัท BIO-RAD)
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้า (electrical balance)
4. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
5. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
6. centrifuge tube ขนาด 1.5 ml และ 50 ml
7. เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)
8. อิเล็กโทรพอเรเตอร์ (electroporator) รุ่น Gene Pulser[®] II System บริษัท BIO-RAD
9. cuvettes ขนาด 0.1 cm
10. ตู้แช่แข็ง
11. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C
12. adjustable automatic pipette
13. yellow tip และ blue tip
14. ตะเกียงแอลกอฮอล์
15. เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น beakers, pipettes, flasks, cylinders, spreaders และ plates (เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 cm)
16. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ
17. spectrophotometer รุ่น 21 บริษัท Shimadzu
18. UV transilluminator บริษัท BIO-RAD
19. vortex

สารเคมี

1. tryptone
2. sodium chloride (NaCl)

3. yeast extract
4. ampicillin
5. HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid)
6. glycerol
7. agar
8. manganese chloride (MnCl_2)
9. rubidium chloride (Rb_2Cl)
10. calcium chloride (CaCl_2)
11. PIPES (Piperazine-N, N'-bis[2-ethanesulfonic acid])
12. MOPS. (3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid)
13. EDTA (Disodium ethylenediamine tetraacetate)
14. RNase
15. tris-borate buffer (TBE)
16. agarose
17. loading buffer (ภาคผนวก)
18. TE buffer (ภาคผนวก)
19. ethanol
20. ethidium bromide
21. potassium acetate
22. sodium hydroxide (NaOH)
23. sodium dodecyl sulfate (SDS)
24. isopropanol
25. tris- hydrochloride acid (Tris-HCl)

วิธีการวิจัย

1. แบคทีเรียที่ใช้ในการในการศึกษา

แบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

2. พลาสมิดที่ใช้ในการศึกษา

พลาสมิดที่บรรจุยีนที่ต้านทานต่อ ampicillin ได้แก่ pUC19, p35S-GFP และ pBI221 (ภาคผนวก: รูป 15, 16 และ 17) ซึ่งมีขนาดต่างกันคือ 2.7 kb, 4.5 kb และ 5.7 kb ตามลำดับ

3. การเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* เพื่อใช้ในการเตรียมเป็นเซลล์คอมพิเทนท์

3.1 เลือกหนึ่งโคโลนีแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่ขึ้นบนจานเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหารแข็งสูตร LB (ภาคผนวก) ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ จากนั้นถ่ายลงเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 50 ml ที่บรรจุอาหาร LB เหลวปริมาณ 10 ml นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน

3.2 ถ่ายเชื้อลงเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร LB (ภาคผนวก) ปริมาณ 100 ml (สัดส่วนของหัวเชื้อ 1 ส่วนต่ออาหาร 50 ส่วน) นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C จนวัดค่า O.D.₆₀₀ = 0.5-1.0 ด้วยเครื่อง spectrophotometer

4. การเตรียมพลาสมิด (Maniatis *et al.*, 1982)

4.1 เลือกหนึ่งโคโลนีจากเซลล์ที่ผ่านการทรานสฟอร์มเมชันด้วยพลาสมิดตามต้องการที่โตบนอาหารแข็งด้วยเข็มเขี่ย ถ่ายเชื้อลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 μ g/ml ในหลอดทดลอง ปริมาณ 2 ml/tube

4.2 นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นระยะเวลา 1 คืน

4.3 ถ่ายลงใน centrifuge tube ขนาด 1.5 ml ปริมาณ 1.5 ml

4.4 ปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 rpm ระยะเวลา 2 นาที

4.5 เทสารละลายใสส่วนบน (supernatant)ทิ้ง

4.6 เติมสารละลาย BP1 (50 mM Tris-HCl และ 10 mM EDTA) ปริมาณ 300 μ l

ละลายเซลล์ที่ตกตะกอนให้อยู่ในลักษณะของเซลล์แขวนลอยด้วยเครื่อง vortex

4.7 เติมสารละลาย BP2 (200 mM NaOH และ 1% SDS) ปริมาณ 300 μ l

4.8 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการพลิกกลับไปมา (inversion)

4.9 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

- 4.10 เติมนสารละลาย 3M Potassium acetate pH 5.0 ปริมาณ 300 μ l
- 4.11 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการพลิกกลับไปมา
- 4.12 นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 10 – 15 นาที
- 4.13 ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 rpm ระยะเวลา 10 นาที
- 4.14 แยกเอาสารละลายใสส่วนบนมาใส่ใน centrifuge tube ใหม่ ขนาด 1.5 ml
- 4.15 เติม isopropanol 700 μ l
- 4.16 แช่ในตู้แช่แข็งนาน 10 – 12 ชั่วโมง
- 4.17 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm ระยะเวลา 10 นาที
- 4.18 เทสารละลายใสส่วนบนทิ้ง
- 4.19 เติม 70 % ethanol 50 – 100 μ l
- 4.20 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm ระยะเวลา 3 นาที
- 4.21 เทสารละลายใสส่วนบนทิ้ง และ คว่ำ centrifuge tube จนแห้ง
- 4.22 เติมนสารละลาย TE bufer ปริมาณ 20 μ l
- 4.23 ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่า O.D.₂₆₀ ด้วย spectrophotometer หรืออาจเปรียบเทียบจากการเรืองแสงในวิธีเจลอเล็กโตรโฟรีซิส

5. การเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์ของแบคทีเรีย *E. coli* ในการวิจัย

5.1 การเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์เพื่อใช้ในการทรานสเฟอร์เมชันด้วยวิธี heat shock (Maniatis *et al.*, 1982)

- 5.1.1 นำเซลล์ *E. coli* ที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในข้อที่ 3.2 มาแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งนาน 15-20 นาที
- 5.1.2 ปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 4 นาที
- 5.1.3 เทสารละลายใสส่วนบนทิ้ง
- 5.1.4 เติมนสารละลาย TFB1(10 mM MOPS, 100 mM Rb₂Cl, 50 mM MnCl₂ และ 10 mM CaCl₂) ปริมาณ 100 ml
- 5.1.5 ละลายเซลล์ที่ตกตะกอนให้อยู่ในลักษณะของเซลล์แขวนลอยอย่างช้าๆ
- 5.1.6 ปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 3 นาที

5.1.7 เทสารละลายใส่ส่วนบนทิ้ง

5.1.8 เติมสารละลาย TFB 2 (10 mM PIPES, 10 mM Rb_2Cl , 75 mM CaCl_2 และ 10% glycerol) ปริมาณ 1 ml

5.1.9 ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.1.5

5.1.10 แบ่งเก็บเซลล์แขวนลอยในหลอด centrifuge tube ขนาด 1.5 ml ปริมาณ 100 μl /tube เก็บในที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันต่อไป

5.2 การเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์เพื่อนำไปใช้ในการทรานสเฟอร์เมชันด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Dower *et al.*, 1988)

5.2.1 นำเซลล์ *E. coli* ที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในข้อที่ 3.2 มาแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งนาน 15-20 นาที

5.2.2 ปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 4 นาที

5.2.3 เทสารละลายใส่ส่วนบนทิ้ง

5.2.4 เติมสารละลาย 10 mM HEPES ปริมาณ 100 ml

5.2.5 ละลายเซลล์ที่ตกตะกอนให้อยู่ในลักษณะของเซลล์แขวนลอยอย่างช้าๆ

5.2.6 ปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 4 นาที

5.2.7 เทสารละลายใส่ส่วนบนทิ้ง

5.2.8 เติมสารละลาย 10 mM HEPES ปริมาณ 25 ml

5.2.9 ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.2.5

5.2.10 ปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 4 นาที

5.2.11 เทสารละลายใส่ส่วนบนทิ้ง

5.2.12 เติมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 10 % ปริมาณ 1 ml

5.2.13 ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.2.5

5.2.14 แบ่งเก็บเซลล์แขวนลอยในหลอด centrifuge tube ขนาด 1.5 ml ปริมาณ 100 μl /tube

5.2.15 เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการทรานสเฟอร์เมชันต่อไป

6. กระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน

6.1 กระบวนการทรานสเฟอร์เมชันด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Dower *et al.*, 1988)

6.1.1 เงื่อนไขของเครื่องอิเล็กโทรพอเรเตอร์ คือ สนามไฟฟ้าที่ 12.5 kV/cm ความต้านทาน $200\ \Omega$ และ ค่าปริมาณกระแสไฟฟ้า $2.5\ \mu\text{F}$

6.1.2 ละลายเซลล์คอมพิเทนซ์และเติมพลาสมิดดีเอ็นเอทันที จากนั้นผสมเข้ากันแล้วแช่ในน้ำแข็ง นาน 15-20 นาที

6.1.3 ถ่ายส่วนผสมที่ได้ลงใน cuvettes จากนั้นเขย่า cuvettes ให้แห้งแล้วนำไปกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า

6.1.4 ดูดส่วนผสมจาก cuvette แล้วถ่ายลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลวสูตร LB ปริมาณ 1 ml

6.1.5 นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 150 rpm เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

6.1.6 เจือจางความเข้มข้นของเชื้อไว้เป็น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} ด้วยน้ำกลั่น

6.1.7 นำไป spread plates บนอาหารแข็งสูตร LB ที่มี ampicillin ความเข้มข้น $100\ \mu\text{g/ml}$ ปริมาณเชื้อ $50\ \mu\text{l}$ /จานเลี้ยงเชื้อขนาดเล็ก จำนวน 3 จานในแต่ละความเข้มข้นที่กำหนดไว้ นำไปเลี้ยงต่อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลา 1 คืน จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารดังรูป 6 บันทึกข้อมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

6.2 กระบวนการทรานสเฟอร์เมชันด้วยวิธี heat shock (Maniatis *et al.*, 1982)

6.2.1 ละลายเซลล์คอมพิเทนซ์และเติมพลาสมิดดีเอ็นเอทันที จากนั้นผสมให้เข้ากัน

6.2.2 แช่ส่วนผสมระหว่างเซลล์และพลาสมิดดีเอ็นเอในน้ำผสมน้ำแข็ง 30 นาที

6.2.3 กระตุ้นด้วยความร้อนโดยการแช่ส่วนผสมทั้งสองในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42°C 90 วินาที

6.2.4 แช่ต่อในน้ำผสมน้ำแข็ง 5 นาที

6.2.5 ถ่ายส่วนผสมทั้งสองลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลวสูตร LB ปริมาณ 1 ml

6.2.6 นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 150 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6.2.7 เจือจางความเข้มข้นของเชื้อไว้เป็น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} ด้วยน้ำกลั่น

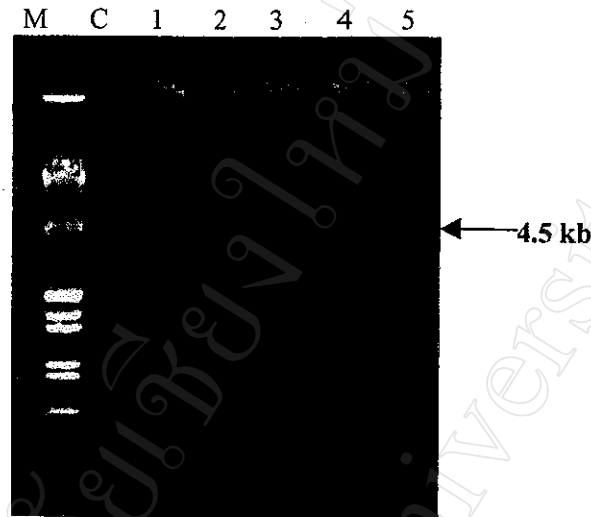
6.2.8 นำไป spread plates บนอาหารแข็งสูตร LB ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาณเชื้อ 50 µl/จานเลี้ยงเชื้อขนาดเล็ก จำนวน 3 จานในแต่ละความเข้มข้นที่กำหนดไว้ เลี้ยงต่อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C ระยะเวลา 1 คืน จากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารดังรูป 6 บันทึกข้อมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป



รูป 6 โคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml จากการทรานสฟอร์มชันโดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอ p35S-GFP ปริมาณ 500 ng โดยการเจือจางความเข้มข้นเป็น 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} ด้วยน้ำกลั่น ตามลำดับ

7. การตรวจสอบเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอ

ภายหลังจากการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml จึงสุ่มเลือกโคโลนีด้วยเข็มเข็มไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาณ 2 ml ที่ผสม ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยการสุ่มเลือกมาทั้งหมด 5 โคโลนี จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดตามวิธีการทดลอง 4 แล้วนำมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งเดียวบนพลาสมิดดังกล่าว ซึ่งสามารถตรวจสอบจากแผนที่พลาสมิดจากภาคผนวก นำมาตรวจสอบขนาด พลาสมิดด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังรูป 7



รูป 7 แสดงผลของการตรวจสอบพลาสมิดจีเอ็มเอ p35S-GFP ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ โดยวิธี เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (lane M = Lambda DNA/ *EcoR* I + *Hind* III marker, lane C = p35S-GFP/ *Pst* I, lane 1, 2, 3, 4 และ 5 คือพลาสมิดที่ได้จากการสุ่มเลือกโคโลนีหลังจากการทรานสฟอร์มเมชัน แล้วตัดด้วยเอ็นไซม์ *Pst*I)

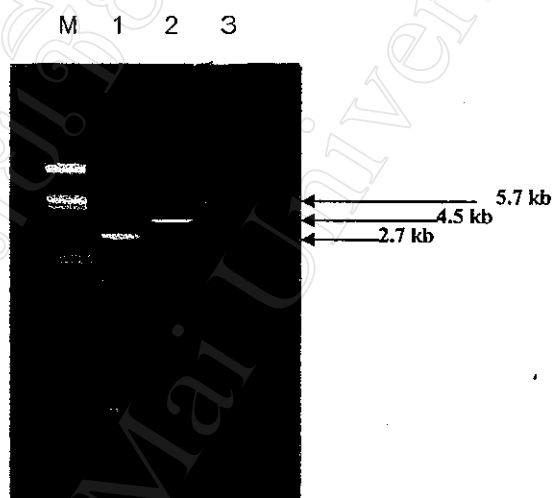
8. แผนการทดลอง

8.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *E. coli*

ในการศึกษาได้เลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลอง 3 แล้วเก็บตัวอย่างประมาณ 3 ml นำมาวัดค่า O.D.₆₀₀ ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยเก็บตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงภายหลังการเติมหัวเชื้อตามวิธีการทดลอง 3.2 ปริมาณ 2 ml ในอาหาร LB 100 ml จากนั้นนำตัวอย่างมาบันทึกค่า O.D. เจือจางตามวิธีการทดลองที่ 6.2.8 เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB จำนวน 3 ขั้ว นับจำนวนโคโลนีบนจานเลี้ยงเชื้อ หาค่าเฉลี่ยของตัวแทนจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวเมื่อเริ่มต้นทำการทดลอง ส่วนอาหารที่ลงหัวเชื้อให้เลี้ยงตามปัจจัยที่กำหนดไว้ในวิธีการทดลอง 3.2 หลังจากเริ่มทำการทดลอง แล้วเก็บตัวอย่างทุกๆ ชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง บันทึกค่า O.D.₆₀₀ และหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีเพื่อนำมาทำกราฟที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่า O.D. กับช่วงเวลาและการเจริญเติบโตของเซลล์ในแต่ละช่วงเวลา (growth curve)

8.2 การศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดที่มีขนาดต่างกัน

เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอ 3 ชนิด ได้แก่ pUC19 (2.7 kb), p35S-GFP (4.5 kb) และ pBI221 (5.7 kb) ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน พลาสมิดทั้ง 3 ชนิด ตรวจสอบขนาดโดยการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และตรวจสอบโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสดังรูป 8 พลาสมิดทั้ง 3 จะบรรจุยีนต้านทาน ampicillin (รูป 15, 16 และ 17) ดังนั้นสามารถตรวจสอบประสิทธิภาพจากจำนวนโคโลนีที่สามารถขึ้นบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มี ampicillin 100 µg/ml



รูป 8 แสดงการตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (lane M = Lambda DNA/ *EcoR* I + *Hind* III marker, lane 1 = pUC19/ *EcoR* I, lane 2 = p35S-GFP/ *EcoR* I และ lane 3 = pBI221/ *EcoR* I)

8.3 การศึกษาการส่งถ่ายพลาสมิดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

เลือกพลาสมิด p35S-GFP เป็นตัวแทนในการศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 10, 100 และ 500 ng ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน

8.4 การศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ที่ละลายในสาร

ละลายกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นต่างกัน

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด p35S-GFP ที่ปริมาณ 100 ng เข้าสู่เซลล์คอมพิเทนท์ที่เก็บในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10, 15 และ 20% ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน

8.5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย

เทคนิคอิเล็กโทรพอเรชันกับ heat shock

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ pUC19, p35S-GFP และ pBI221 ที่มีปริมาณความเข้มข้น 100 ng ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันกับวิธี heat shock

8.6 การศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดในช่วงเวลาที่เก็บรักษาเซลล์

คอมพิเทนท์ในสารละลายกลีเซอรอล

วัดประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด p35S-GFP ที่ปริมาณ 100 ng เข้าสู่เซลล์คอมพิเทนท์ที่เก็บอยู่ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10, 15 และ 20% เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C แล้วนำไปส่งถ่ายพลาสมิดด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ในช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ ตั้งแต่เริ่มต้นทำการทดลอง, เดือนที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ

9 การคิดประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอ

ประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอ

$$= \frac{A}{B} \times \frac{10^3 \text{ ng}}{1 \mu\text{g}} \times 20 \quad (\text{transformants}/\mu\text{g ของ DNA})$$

A = จำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มี ampicillin 100 µg/ml

B = ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ใช้ในการทรานสฟอร์มเมชัน