ภาคผนวก
การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับโคลน

การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับโคลน

การโคลนหรือเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้นขั้นแรกต้องเตรียมดีเอ็นเอก่อน ที่ได้มาจากแหล่งที่ต้องการ จึงนำมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายผสมแล้วจึงนำไปถ่ายฝากลงในเซลล์ผู้รับ ซึ่งที่มาของดีเอ็นเอมี 3 แหล่ง คือ

1. ดีเอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต เป็นดีเอ็นเอทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น เรียกว่า Genomic DNA

2. ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นจากเอ็มอาร์เอ็นเอ เรียกว่า Complementary DNA หรือ cDNA โดยสร้างอาร์เอ็นเอในอวัยวะหนึ่งในช่วงหนึ่งของชีวิต

3. ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี หรือใช้เอ็นไซม์ หรือใช้ร่วมกันทั้งวิธีทางเคมีและใช้เอ็นไซม์

การเตรียมดีเอ็นเอจากเซลล์ เตรียมได้จากหลายแหล่งอาจมาจากพืชหรือสัตว์ชั้นสูง ถ้าต้องการดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่แล้วต้องนำไปโคลน หรือนำไปวิเคราะห์โดยวิธี Southern blot นั้นคือเตรียมดีเอ็นเอให้ได้ขนาดไม่ต่ำกว่า 100-200 กิโลเบส (kb) แล้วนำไปแยกด้วยวิธี อิเล็คโทรโฟริซิส ในอะกาโรสเจล

ดีเอ็นเอจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเตรียมได้จากตับ ม้าม หรือ ไต ซึ่งโดยทั่วไปนิยมเตรียมจากม้ามเพราะได้ดีเอ็นเอ บริสุทธิ์ในปริมาณมาก โดยเตรียมจากเนื้อเยื่อสดทันทีหรือตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ลงในไนโตรเจนเหลว จึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 ^{o}C การเก็บเนื้อเยื่อโดยวิธีนี้เก็บได้นานกว่า 1 ปี นอกจากนี้อาจเตรียมดีเอ็นเอจากเลือด หรือ จากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงก็ได้

การเตรียมดีเอ็นเอจากพืช เตรียมได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ใบ กิ่ง ใบเลี้ยง ต้นอ่อน และกลุ่มเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำส่วนของพืชมาบดในไนโตรเจนเหลว แล้วใส่บัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยสารดีเทอร์เจนต์ เช่น SDS และจึงเติม

สารโปแตสเซียมอะซิเตท ที่มีสมบัติเป็นกรด เพื่อให้ส่วนต่างๆของพืชตกตะกอน แล้วจึงนำส่วนของเหลวด้านบนมากรอง แล้วจึงตกตะกอนโดยใช้แอลกอฮอล์ เมื่อได้ดีเอ็นเอแล้วนำไปตรวจสอบขนาดโดยอิเล็คโทรโฟริซิสและหาปริมาณดีเอ็นเอ โดยวัดจากค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

การเตรียมดีเอ็นเอจาก mRNA

การเตรียมดีเอ็นเอโดยวิธีนี้ได้มาจาก mRNA ซึ่งเป็นผลผลิตของยีนบางยีนที่มีการแสงออกในบางช่วงเวลา และในอวัยวะหนึ่งเท่านั้น ดีเอ็นเอที่ได้จากการลอกรหัสมาจาก mRNA จะเป็นส่วนของยีนที่ไม่มีอินทรอน เพราะmRNA ที่อยู่ในไซโตรพลาสซึมได้ผ่านการตัดแต่งเอาอินทรอน ออกเรียบร้อยแล้ว ดีเอ็นเอที่ได้จากการลอกรหัสมาจาก mRNAนี้เรียกว่า Complementary DNA หรือ cDNA ต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิด ขั้นแรกต้องศึกษาว่ายีนที่สนใจนั้นแสดงออกในอวัยวะใด และในช่วงเวลาใด แล้วจึงแยกสกัด mRNA จากเซลล์ดังกล่าวมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เริ่มต้นโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยเบสT หลายๆ เบสเป็นไพรเมอร์ เข้าไปเกาะที่ปลาย 3’ ของ mRNA ด้วยพันธะไฮโดเจนระหว่างเบส T และ A จึงสังเคราะห์ cDNA สายแรกในทิศทาง 5’ ไป 3’ โดยใช้เอนไซม์reverse transcriptase

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธีทางเคมี

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในปัจจุบัน สร้างได้ถึง 50 นิวคลีโอไทด์ ถ้าทราบลำดับกรดอะมิโนของยีนดังกล่าวจะสังเคราะห์เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวสั้นๆ ที่ต่อเนื่องทั้งสองสาย และมีลำดับเบสที่ซ้อนกันในสายที่มีเบสเป็นคู่สมนั้น แล้วจึงเชื่อมต่อโอลิโกนิวคลีโอไทด์เหล่านี้โดยใช้เอ็นไซม์ DNA ligase

การสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์มีหลายวิธีแต่วิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางและมีการผลิตเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอแบบอัตโนมัติ ในทางการค้ามี 2 วิธี คือ วิธี Phosphate triester และวิธี Phosphite triester ทั้งสองวิธีมีหลักการคล้ายกันคือ ต่อนิวคลีโอไทด์เข้าไปในสายที่ละหนึ่งโมเลกุล โดยขั้นตอนแรกต้องป้องกันไม่ให้หมู่ที่เข้าทำปฏิกริยาได้ง่าย นั่นคือ ต้องป้องกันหมู่อะมิโน ของเบส A C และ G ไม่ให้เกิดปฏิกริยาได้ โดยเติมหมู่ benzoyl เข้าที่เบส A และ C และเติมหมู่ isobutyryl เข้าที่เบส G เมื่อสิ้นสุดการสังเคราะห์แล้ว หมู่ที่ป้องกันเบสกำจัดออกได้โดยใช้ด่างอ่อนและหมู่ dimethoxytrityl กำจัดออกได้โดยย่อยด้วยกรดอย่างอ่อน

เวคเตอร์

หลักการโคลนยีน คือการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการให้ได้ปริมาณมากเพื่อต้องการศึกษาหรือวิเคราะห์ต่อไป แต่ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการนั้นไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตัวเองในเซลล์ผู้รับ จึงต้องนำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวมาต่อเข้ากับดีเอ็นเออื่น ที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับคือดีเอ็นเอที่เป็นพาหะหรือเวคเตอร์นั่นเอง

พลาสมิด(Plasmid)

พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมพบในแบคทีเรียหลายชนิดมีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่มีขนาดตั้งแต่ 1,000 คู่เบสจนถึงมากกว่า 200,000 คู่เบส พลาสมิดมีสมบัติเป็นหน่วยที่จำลองตัวได้ และเกิดความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ การแยกพลาสมิดออกมาจากเซลล์เดิมก่อนแล้วส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ใหม่โดยทำให้เซลล์ผู้รับเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ (Competent cell)และรับดีเอ็นเอจากภายนอกโดยกระบวนการ transformation ตัวอย่างพลาสมิดที่ใช้เป็นเวคเตอร์ได้แก่ pBR322 และ pUC18, pUC19

ฝาจแลมบ์ดา(Lambda phage)

เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ขนาด 48,500 คู่เบสมีการดำรงชีวิตได้ 2 แบบ คือ

1. Lytic pathway โดยดีเอ็นเอของไวรัสที่เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย แล้วทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกแล้วปล่อยอนุภาคไวรัสออกมา

2.Lysogenic pathway โดยดีเอ็นเอของไวรัสซึ่งจับตัวกันเป็นวงแหนวจะไปเกาะกับโครโมโซมของแบคทีเรียแล้วแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอทำให้จีโนมของฝาจแทรกตัวเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรีย เมื่อมีการจำลองโครโมโซมของแบคทีเรีย ฝาจก็จะจำลองโมเลกุลแล้วส่งต่อไปยังเซลล์ลูกด้วย

ตัวอย่างของฝาจแลมบ์ดา ได้แก่ λgt10 , λgt11,λ2001 และ M13

คอสมิด(Cosmid)

คอสมิดมีส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองตัวเองในแบคทีเรีย มียีนเครื่องหมายสำหรับคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับเวคเตอร์นี้และมี cos site ของฝาจแลมบ์ดา เพื่อช่วยให้สามารถบรรจุดีเอ็นเอลงในโปรตีนห่อหุ้มของฝาจแลมบ์ดาได้ ได้แก่ คอสมิด pJB8

การโคลนยีน

การสร้างดีเอ็นเอ library ดีเอ็นเอที่แยกได้ทั้งหมดจากเซลล์นำมาต่อกับเวคเตอร์และถ่ายลงในเซลล์ผู้รับก็จะได้ประชากรของเซลล์ หรือของฝาจที่มีชิ้นดีเอ็นเอต่างๆ ที่มา

จากสิ่งมีชีวิตที่แยกสกัดดีเอ็นเอมาได้ทั้งหมดเรียกว่า Genomic library ส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นจาก mRNA เมื่อนำมาต่อกับเวคเตอร์และถ่ายฝาจลงสู่เซลล์แล้วจะได้ cDNA library ขนาดของ library จีโนมของคนมีขนาดประมาณ 3×10^{6} kb

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวคเตอร์มี 3 วิธี คือ

1.เชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียวที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Cohensive end ligation)

2.เชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่(Blunt end ligation)

3.การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่มีปลายเป็นเบสคู่สมที่เกิดจากการต่อเบสชนิดเดียวกันเข้าไปที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่ง โดยเอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase

การตรวจหาโคลนที่ต้องการ สามารถทำได้ดังขั้นตอนดังต่อไปนี้

ผลที่ได้จากการตัดต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวคเตอร์แล้วนำเข้าสู่เซลล์ผู้รับคือ ประชากรของเซลล์ หรือ ประชากรของฝาจที่มีชิ้นดีเอ็นเอต่างๆกัน เป็น library หรือ gene bank วิธีการตรวจหาโคลนที่ต้องการของเซลล์ทั้งหมดนั้นทำได้หลายวิธีคือ

คัดเลือกจากฟีโนไทป์ (Phenotypic selection)

ถ้ายีนที่สอดใส่เข้าไปในเวคเตอร์แสดงออกได้ในเซลล์ผู้รับนั้น และลักษณะที่ปรากฏแตกต่างไปจากลักษณะของเซลล์ผู้รับเดิม ก็สามารถคัดเลือกโดยวิธีนี้ได้ ทั้งนี้ในการโคลนยีนต้องเลือกใช้เวคเตอร์ที่เอื้ออำนวยให้ยีนสามารถแสดงออกได้ในเซลล์ผู้รับเช่น expression vector

ตรวจหาโดยวิธีอิมมูโนเคมี (immunochemical screening)

ทำได้เมื่อโคลนที่ต้องการแสดงออกได้โดยผลิตโพลีเพพไทด์ หรือโปรตีนที่ถูกต้องคล้ายกับวิธีแรก แต่โปรตีนดังกล่าวไม่แสดงฟีโนไทป์ที่เด่นชัดไม่สามารถจะคัดเลือกโดยตรงได้ แต่ต้องมีแอนติบอดี ต่อโปรตีนนี้เตรียมพร้อมอยู่ก่อน แล้วตรวจสอบโปรตีนที่เซลล์ผลิตขึ้นโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนที่ต้องการนั้น

การตรวจหาโดยวิธีการ Nucleic acid hybridization

การคัดเลือกโคลนโดยวิธีนี้ใช้เมื่อโคลนที่ต้องการไม่แสดงลักษณะใดๆ อาจจะผลิตโพลีเพพไทด์จำเพาะได้หรือไม่ก็ตามและอยู่ในเวคเตอร์ใดก็ได้ โดยใช้ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับส่วนหนึ่งส่วนใดของชิ้นดีเอ็นเอแยกนั้นเป็นตัวตรวจสอบ เรียกดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบนี้ว่า Probe

การประยุกต์ใช้

1.พันธุวิศวกรรมทางการศึกษาวิจัย เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมสามารถนำมาใช้อธิบายกลไกต่างๆในเซลล์ เช่น การแสดงออกของยีน ปฏิกริยาร่วมระหว่างโปรตีน และลำดับเบสจำเพาะของดีเอ็นเอ การทำงานของยีนและเอนไซม์บางชนิดในเซลล์ พัฒนาการและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต

2.พันธุวิศวกรรมทางอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม การโคลนยีนนั้นวัตถุประสงค์อย่างหนึ่งคือ พยายามให้ยีนนั้นแสดงออก หรือ สร้างผลผลิตได้ในเซลล์ผู้รับ ผลผลิตยีนดังกล่าวนี้ได้แก่ อุตสาหกรรมยา การผลิตวัคซีน ผลิตสารที่เป็นส่วนผสมในอาหาร ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ส่วนที่เกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อม เช่น การสร้างแบคทีเรียที่ย่อยสลายหางนมและของเสียบางชนิด

3.พันธุวิศวกรรมทางการเกษตร เข้ามามีบทบาทต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ เช่น การเพิ่มผลผลิตน้ำนม การสร้างยีนต้านทานโรคพืช และสัตว์ การสร้างพืชต้านทานแมลง เป็นต้น

4.พันธุวิศวกรรมทางการแพทย์ เช่น การทำยีนบำบัดในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็ง การวินิจฉัยโรคโดยใช้เทคนิค PCR การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA figerprint)

ปฏิบัติการที่ 1
การเพลทห้องสมุดซีดีเอ็นเอ
(Plating λgt 11 cDNA library)

ปฏิบัติการนี้จะได้ทราบวิธีการเพาะเลี้ยง λgt 11 ในเซลล์ให้อาศัย (E.coli strain Y 1090) และการไตเตรทจำนวนอนุภาค λgt 11 ที่มีอยู่ในห้องสมุดซีดีเอ็นเอ

วัสดุและอุปกรณ์

1. ห้องสมุดซีดีเอ็นเอในเวคเตอร์ λgt 11เป็นห้องสมุดซีดีเอ็นเอ ซึ่งสังเคราะห์จาก mRNA ที่สกัดจากละอองเรณูของข้าว
2. เชื้อ *E.coli* Y1090
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar+amplicillin (100μg/ml)
5. top agarose
6. 1 M $MgSO_4$
7. amplicillin (100μg/ml)
8. 20% maltose
9. SM buffer
10. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 ml และ 15ml
11. automatic pipettesและ pipette tips
12. ตู้ถ่ายเชื้อแบบไบโอฮาซาด
13. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
14. ตู้เลี้ยงเชื้อ
15. อ่างน้ำอุ่น
16. เตาไมโครเวฟ

<u>วิธีทำ</u>

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การสตีคเชื้อ *E.coli* Y1090

ทำการสตรีคเชื้อ *E.coli* Y1090 ซึ่งเป็นเซลล์ให้อาศัยสำหรับฝาจ λgt 11 จาก glycerol stock บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar+amplicillin (100μg/ml) เลี้ยงเชื้อในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลาหนึ่งคืน (16-18 ชั่วโมง)

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> การเตรียมเซลล์ให้อาศัย *E.coli* Y1090

1. ย้ายเชื้อ *E.coli* Y1090 หนึ่งโคโลนีจากจานวุ้นไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium ที่มี amplicillin (100μg/ml), $MgSO_4$ mM และ 0.4%maltose (เตรียมโดยใส่ amplicillin (100μg/ml) จำนวน 10 μl, 1 M $MgSO_4$ จำนวน 100 μl, 20%moltose จำนวน 200 μl ลงใน LB medium จำนวน 10 ml) เขย่าข้ามคืนที่ 37 ° C

2. วันรุ่งขึ้นย้าย overnight culture จำนวน 1ml ไปใส่ใน LB medium ที่มีสารชื่อ amplicillin (100μg/ml), $MgSO_4$ mM และ 0.4%maltose จำนวน 10 ml เขย่าที่อุณหภูมิ 37 ° Cเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงจนกระทั่งได้ค่า OD_{600} ประมาณ 0.6-0.8

2. แช่เซลล์ในกระบะน้ำแข็ง เป็นเวลาประมาณ 15 นาที

3. นำเซลล์ไปทำให้ตกตะกอนโดยปั่นเหวี่ยงใน refrigerated centrifugeที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไป แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10 mM $MgSO_4$ (เย็นจัด) จำนวน 3 ml แช่เซลล์ในน้ำแข็งจนกว่าจะถึงเวลาใช้

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> การทำ dilution series ของ cDNA library

ต้องทำ cDNA library ให้เจือจางแล้วจึงนำมาผสมกับเชื้อ *E.coli* Y1090 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในจานวุ้น

1. แบ่ง λgt 11 cDNA library จาก stock จำนวน 5 μl
2. เติม SM buffer ลงไป 95 μl (dilution ที่ 1)
3. แบ่ง dilution ที่ 1 มา 5 μl ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อีกหลอดหนึ่งแล้วเติม SM buffer ลงไป 95 μl (dilution ที่ 2)
4. ทำซ้ำข้อ 2 และ 3 จนถึง dilution ที่ 5

<u>ขั้นตอนที่ 4</u> การเพลท λgt 11 cDNA library

1. นำหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 ml มา 6 หลอด
2. หลอดที่ 1 ใส่ SM buffer ลงไป 50 μl
3. ใส่ diluted λgt 11 cDNA library dilution 1 ถึง dilution 5 ละ 50 μl ใส่ลงไปในหลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 6 ตามลำดับ
4. ใส่เซลล์ *E.coli* Y1090 ที่เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 2 ลงไปในหลอดที่ 1 ถึง หลอดที่ 6 หลอดละ 150 μl
5. นำหลอดเซนตริฟิวจ์ทั้ง 6 หลอดไปแช่ในอ่างน้ำอุ่น 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ฝาจ λgt 11 absorb กับ host cell
6. เติม top agarose เหลว (3.5 ml) อุณหภูมิประมาณ 45-50 $^{\circ}$ C ลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์ เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงบนจานวุ้น (LB+amplicillin) (ขั้นตอนนี้ต้องทำอย่างรวดเร็ว ต้องเท top agarose และเกลี่ย top agarose ให้ทั่วพื้นผิววุ้น ก่อนที่ top agarose จะแข็งตัว ดังนั้นจึงต้องนำจานวุ้นที่จะใช้ไปทำให้อุ่นก่อนโดยนำไปใส่ในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อล่วงหน้า 37°C ประมาณ 2-3 ชั่วโมงก่อน ที่จะทำขั้นตอนนี้)
7. นำจานวุ้นทั้ง 6 ใบ ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
8. วันรุ่งขึ้นนับจำนวนพลากใส (plaques) ที่เกิดจากการเจริญเติบโตแบบ lytic cycle ของ λgt 11 แล้วคำนวณหาจำนวน λgt 11 ที่มีอยู่ใน stock cDNA library มีหน่วยเป็น pfu/ml (plaque forming units/ml)

ปฏิบัติการที่ 2
การเพิ่มจำนวนแบคทิริโอฝาจแลมด้า
(Preparation of higher Phage lysate)

จากปฏิบัติการที่ได้เพลท cDNA libraly เรียบร้อยแล้วจะได้พลาก (plagues) จำนวนมากบนจานวุ้น พลากแต่ละพลากจะมีฝาจ λgt11 อยู่เป็นจำนวน 10^5 – 10^6 อนุภาคขึ้นอยู่กับขนาดและความสมบูรณ์ พลากแต่ละพลากคือโคลนของλ gt11 ซึ่งมีจีโนมเป็นดีเอนเอสายผสม (recombinant DNA) ระหว่าง DNA ของ λgt11 กับ cDNA

ของข้าว ในบทปฏิบัติการนี้จะให้สุ่มเอาพลากมาเพียงสองพลากแล้วนำมาเพิ่มจำนวนให้ได้จำนวนมากพอที่จะสกัดเอาดีเอนเอมาทำการศึกษาต่อไป

วัสดุและอุปกรณ์

1. จานวุ้นที่มี cDNA library จากปฏิบัติการที่ 2 เลือกเอาจานที่มีจำนวนพลากไม่มากเกินไปไม่น้อยเกินไปและพลากห่างกันพอสมควร
2. เชื้อ *E.coli.*Y1090 ซึ่งเป็นเซลล์ให้อาศัย (host cell)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar+ampicilin
5. ampicilin 100 mg/ml
6. 20% maltose
7. 1M $MgSO_4$
8. 1M $CaCl_2$
9. SM buffer
10. Top agarose
11. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
12. หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 และ 50 ml
13. automatic pipettes และ pipett tips
14. Paster pipetts
15. ตู้ถ่ายเชื้อแบบไบโอฮาซาด
16. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
17. ตู้เลี้ยงเชื้อ
18. อ่างน้ำอุ่น
19. เตาไมโครเวฟ

<u>วิธีทำ</u> –การเพิ่มจำนวนแบคทิริโอฟาจจากพลากมี 2 วิธี นักศึกษาจะเลือกทำวิธีใดก็ได้ ในเบื้องต้นแนะนำให้ใช้วิธีที่ 2 เพราะใช้เวลาน้อยกว่าและสิ้นเปลืองน้อยกว่า

<u>วิธีที่1</u>-วิธีเพลทไลเสด (Plat lysate method)

1. ใช้ปลายพลาสเจอร์ปิเปตที่ไร้เชื้อเจาะลงไปบนวุ้นที่มีพลาก (plaqe) ที่ต้องการจะนำไปเพิ่มจำนวนอยู่แล้วนำวุ้นที่มีพลากอยู่นั้นไปใส่ใน phage dilution buffer หรือ SM buffer จำนวน 1 ml ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

2. เติม Chloroform ลงไป 1 หยดเขย่าแล้วทิ้งไว้ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืนเพื่อให้ฝาจเคลื่อนที่ออกจากวุ้น

3. ปิเปต phage stock จากข้อ 2 ให้ได้จำนวนประมาณ 10^5 pfu (plague forming unit) นำมาผสม กับ *E.coli* host cells จำนวน 0.15 ml ในหลอดไร้เชื้อขนาด 15 ml (เตรียม host cells ตามขั้นตอนที่2, บทที่ 2) การที่จะทราบว่าควรจะใช้ phage stock ปริมาณเท่าใดนั้นต้องทำการไตเตรทเสียก่อนตามวิธีในบทปฏิบัติการที่2

4. นำส่วนผสมจากข้อ 3 ไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อให้ฝาจและเซลล์ absorb กับผนังเซลล์ให้อาศัย

5. เติม top agarose ที่ เหลวและอุ่น(45 °C) ลงไปในส่วนผสมของฝาจและเซลล์ให้อาศัยผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบนจานที่มีวุ้นเลี้ยงเชื้อ LB+ampicilin ที่แข็งตัวอยู่

6. นำจานวุ้นไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมงในขั้นตอนนี้บนพื้นผิวของจานเพาะเชื้อควรมีลักษณะใสเกือบทั้งหมด เนื่องจากฝาจมีการเจริญมากจนทำให้เซลล์ให้อาศัยแตก (lyse) เกือบทั้งหมด

7. เติม SM buffer ลงไปบนจานเพาะเชื้อจำนวน 4 ml ปิดฝา ปิดช่องระหว่างฝากับตัวจานด้วยพาราฟิล์ม วางจานเพาะเชื้อนี้ไว้ที่ 4 °C เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง ถ้าเป็นไปได้ควรเขย่าเบา ๆ เป็นระยะ ๆ หรือวางจานบนเครื่องเขย่าซึ่งวางไว้ในตู้เย็น

8. เท SM buffer จากข้อ 7 ลงในหลอดไร้เชื้อ เติม SM buffer อีก 1 ml ลงบนจานวุ้นเพื่อล้างฝาจที่ยังหลงเหลืออยู่แล้วเท SM buffer นี้ลงไปรวมกับ SM buffer จากข้อ 7

9. เติม chloroform ลงไป 0.1 ml ลงไปผสมโดยการ vortex เล็กน้อย นำไปเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เศษเซลล์แบคทีเรียตกตะกอน

10. ย้าย supernatant ไปใส่ในหลอดอีกหลอดหนึ่ง เติม chloroform ลงไป 2-3 หยด

11. plaqe stock ที่ได้นี้จะมีจำนวนฝาจมากประมาณ 10^{10}-10^{11} pfu/mlซึ่งสามารถเก็บไว้ได้ที่ 4 °C เป็นเวลาหลายเดือน

<u>วิธีทำ 2</u> วิธีอาหารเหลวจำนวนน้อย (Small scale liquid culture)

1. ใช้ปลายของพลาสเจอร์ปิเปต ที่ไร้เชื้อเจาะลงไปบนวุ้นที่มีพลาก (Plaque) ที่ต้องการเพิ่มจำนวนอยู่ แล้วนำวุ้นที่มีพลากอยู่นั้นไปใส่ลงในเซลล์ให้อาศัย จำนวน 0.2 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที (เตรียมเซลล์ให้อาศัยตามขั้นตอนที่ 2 บทที่ 2)

2. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB+100 μg/ml ampicilin ซึ่งมี $CaCl_2$ เข้มข้น 5 mM จำนวน 5 ml ในหลอดขนาด 50 ml

3. นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ 37 °C เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง (ควรเพาะเลี้ยงเฉพาะเซลล์ให้อาศัยอย่างเดียวในหลอดอีกหลอดหนึ่ง เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟาจอยู่ด้วยจะใสเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีฝาจ)

4. เติม chloroform ลงไป2-3 หยดแล้วเขย่าต่ออีก 10 นาที

5. นำไปเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์แบคทีเรีย

6. ย้าย supernatant ไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม cloroform ลงไป 2-3 หยด สามารถเก็บ phage stock นี้ไว้ที่ 4 °C ได้หลายเดือน

7. สำหรับวิธีที่ 2 สามารถ scale up ได้ โดยเพิ่มจำนวนพลากเป็น 3-4 พราก (จาก clone เดียวกัน) ต่อ culture 10 ml และเพิ่มปริมาณเซลล์ให้อาศัยเป็น 0.5 ml

ปฏิบัติการที่ 3
การแยกดีเอ็นเอของแบคทีริโอฝาจแลมด้า
(Isolation of bacteriophage lambda DNA)

ในปฏิบัติการที่ 2 นักศึกษาได้เตรียม phage lysate จากโคลนของ λgt 11 ที่นักศึกษาคัดเลือกมาจำนวน 2 โคลน ในปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะได้สกัดแยกเอาดีเอ็นเอออกมาจากแบคทิริโอฝาจ λgt 11 ซึ่งมีหลายวิธีในที่นี้จะแนะนำวิธีที่ไม่ต้องใช้วัสดุราคาแพงมากนักเพียง 2 วิธี สำหรับวิธีอื่นๆ นักศึกษาสามารถค้นคว้าเพิ่มเติมได้จากเอกสารอ้างอิง

วัสดุและอุปกรณ์

1. Buffer L1 (ประกอบด้วย 20 mg/ml Rnase A, 6 mg/ml Dnase,0.2 mg/ml bovine serum albumin,10 mM EDTA,100 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl)
2. สารละลาย 20 % PEG 8,000, 2 M NaCl
3. DE 52 ion exchange cellulose in LB medium

4. 3 M Potassium acetate pH 4.8
5. proteinase K 0.1 mg/ml
6. 10% SDS
7. 5% CTAB, 0.5 M NaCl
8. isopropanol
9. absolute ethanol
10. 70 % ethanol
11. 1.2 M NaCl
12. TE buffer
13. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
14. หลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 ml
15. automatic pipettor และ pipet tips
16. อ่างน้ำอุ่น
17. Deep freezer (-70 °C)
18. เครื่อง refrigerated centrifuge
19. เครื่อง microcentrifuge

วิธีทำ

<u>วิธีที่ 1</u>-DE 52 method

1. นำ phage lysate จำนวน 15 ml ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 ml แล้วเติม Buffer L1ลงไป 50 μl นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. เติมสารละลาย 20 % PEG 8,000, 2 M NaCl ที่เย็นจัด 5 ml ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วแช่ไว้ในน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง
3. นำไปเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C
4. เท supernatant ทิ้งไปแล้วคว่ำหลอดบนกระดาษทิชชู ทิ้งไว้ครู่หนึ่ง เพื่อให้ของเหลวที่เหลือไหลลงมาให้หมด
5. ละลายตะกอนฝาจแลมด้าด้วย LB-broth จำนวน 1,200 μl ย้ายไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ 2 หลอดๆ ละ 600 μl

6. เติม DE 52 ion exchange cellulose ซึ่งแขวนลอยอยู่ใน LB-broth ลงไปหลอดละ 600 μl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดไปมา 20-30 ครั้ง
7. เหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้าย supernatant ไปใส่หลอดใหม่ แล้วเติม DE 52 ลงไปอีก 600 μl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอด
8. เหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง แล้วย้าย supernatant ไปใส่หลอดใหม่
9. เติมสารละลาย proteinase K เข้มข้น 0.1 mg/ml ลงไป 10 μl ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 10 % SDS ลงไป 50 μl ผสมให้เข้ากัน
10. เติมสารละลาย 3% potassium acetate ลงไป 130 μl นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 70°C 10 นาที แล้วย้ายไปแช่ในน้ำแข็งอีก 10 นาที
11. นำไปเหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์ เป็นเวลา 10 นาที
12. ย้าย supernatant ไปใส่หลอดใหม่แล้วเติม isopropanol ปริมาตรเท่ากันลงไป นำไปแช่ในตู้แช่แข็ง (-70°C) เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงเป็นเวลา 15 นาที
13. เท supernatant ทิ้งไป ผึ่งตะกอนให้แห้งเล็กน้อย แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE จำนวน 30 μl

การเตรียมสารละลาย

1. Buffer L1

เอนไซม์ Rnase A	20 mg
เอนไซม์ Dnase I	6 mg
1 Mtris-HCl (pH 7.5)	0.1 ml
0.5 M Na_2EDTA	20 μl
5 M NaCl	60 μl

ในปริมาตรทั้งหมด 1 ml เก็บในตู้แช่แข็ง(-20°C)

2. 20% PEG 8000, 2 M NaCl

PEG 8000	20 กรัม
NaCl	11.96 กรัม

ละลายใน SM buffer จนได้ปริมาตรทั้งหมด 100 ml ฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

3. DE52 in LB-medium

ชั่ง DE52 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ ค่อยๆ เติม 0.05 N HCl ลงไปพร้อมกับค่อยๆ คนเติม HClทั้งหมดเป็นปริมาตรประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตร DE52 แล้วค่อยๆ เติม NaOH เข้มข้น (5N) ลงไปจนกระทั่ง pH ของส่วนผสมมีค่าใกล้เคียง pH ของ LB medium คือประมาณ 7.0 ตั้งทิ้งไว้ให้ DE52 ตกตะกอนแล้วจึงเทส่วนลอยทิ้งไป แล้วล้าง DE52 หลายๆ ครั้งด้วย LB จำนวนมากจนกระทั่ง pH ของ LB มีค่า 7.0 จากนั้นจึงละลาย DE52 ด้วย LB ให้ส่วนผสมมีปริมาณ DE52 75% LB 25% เติม sodium azide ลงไปให้มีความเข้มข้น 0.1% เก็บส่วนผสมนี้ไว้ที่ 4°C

4. proteinase K

proteinase K 1 mg

ละลายใน TE buffer10 ml เก็บไว้ -20°C

5. 10% SDS

Sodium dodecyl sulfate 10 กรัม

ละลายน้ำจนได้ปริมาตร 100ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ไม่ต้องออโตเคลฟ SDS)

6. 3 M Potassium acetate

ชั่ง Potassium acetate 29.5 กรัม ละลายน้ำให้ได้ปริมาตร 100 ml ปรับ pH ให้เป็น 4.8 แล้วฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

7. 5% CTAB in 0.5 M NaCl

CTAB 5 กรัม

NaCl 2.92 กรัม

ละลายน้ำให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 100 ml ฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

8. 1.2 M NaCl

NaCl 7.03 กรัม

ละลายน้ำจนได้ปริมาตร 100 ml ฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

9. TE buffer

Tris-base **0.121 กรัม**

Na_2EDTA 0.037 กรัม

ละลายน้ำ 80 ml ปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วย HCl แล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 100ml ฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

ปฏิบัติการที่ 4
การย่อยดีเอ็นเอของแบคทิริโอฝาจแลมด้าด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
(Restrictuion digestion of bacteriophage lambda DNA)

จากบทปฏิบัติการที่ 3 ได้แยกดีเอ็นเอจากแบคทิริโอฝาจแลมด้าจีที 11 โดยใช้ phage lysate จำนวน 15 ml ขั้นสุดท้ายได้ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer จำนวน 30 μl ปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะนำดีเอ็นเอดังกล่าวซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) มาย่อยด้วยเอนไซม์ Eco RI เพื่อแยกชิ้น cDNA ออกมาจากดีเอ็นเอของแลมด้าจีที 11

1. ดีเอ็นเอของแบคทิริโอฝาจแลมด้าจีที 11
2. เอนไซม์ Eco RI
3. 10 x Eco RI buffer
4. sterile distilled water
5. 10 x gel loading buffer
6. 5 x TBE buffer
7. Ethidium bromide 10 mg/ml
8. Agarose (elctophoresis grade)
9. อ่างน้ำอุ่น
10. electophoresis chamber
11. power supply
12. UV Transilluminator

วิธีทำ

1 นำดีเอ็นเอของแบคทิริโอฝาจแลมด้าจีที 11 มา 16 μl ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

2 เติม 10 x Eco RI buffer ลงไป 6 μl

3 เติม sterile distilled water ลงไป 7 μl

4 เติมเอนไซม์ Eco RI ลงไป 3 μl

5 นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 1.5-2 ชั่วโมง

6 เติม 10 x gel loading buffer ลงไป 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปแยกในอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟลิซิส โดยหยอด DNA ทั้งหมดลงใน 1 หลุมของอะกาโรสเจล

7 ในหลุมอีกหลุมหนึ่งข้างๆ ให้หยอดดีเอ็นเอที่ไม่ถูกย่อยด้วย Eco RI ลงไปด้วยเพื่อเปรียบเทียบโดยนำดีเอ็นเอมาประมาณ 5 ไมโครลิตร เติมน้ำลงไป 4 ไมโครลิตร และ 10 x gel loading buffer 1 ไมโตรลิตร

8 เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 50-60 โวลท์ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสี bromophenol blue เคลื่อนที่ไปได้ประมาณ 80 % ของความยาวของอะกาโรสเจล

9 ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำเจลไปวางบน UV Transilluminator และบันทึกภาพไว้ (ถ้าโคลนที่นักศึกษาคัดเลือกมาเป็น recombinant แลมด้าจีที 11 จะพบแถบดีเอ็นเออย่างน้อย 2 แถบ แถบที่มีขนาดใหญ่ประมาณ 48 kbp คือดีเอ็นเอของเวคเตอร์ λgt 11 ส่วนแถบที่มีขนาดเล็กกว่าเป็นซีดีเอ็นเอของข้าวที่ถูกตัดออกมาด้วยเอนไซม์ Eco RI)

ปฏิบัติการที่ 5
อะกาโรสเจลอิเล็กโทโฟริซิสของดีเอนเอ
(Agarose Gel Electrophoresis of DNA)

อิเล็กโทรโฟริซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาดและโครงรูปของโมเลกุลของสาร การแยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส มักทำให้ตัวกลางที่เป็นสารโมเลกุลใหญ่พวกโพลีเมอร์ สำหรับดีเอ็นเอนิยมแยกโดยใช้อะกาโรส หรือโพลีอะคริลาไมด์เป็นตัวกลาง การแยกดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเป็นตัวกลางเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม เพราะเป็นเทคนิคที่ใช้แยก บ่งชี้และทำชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ซึ่งทำให้สะดวกและรวดเร็ว เนื่องจากการเตรียมอะกาโรสเจลทำได้สะดวกกว่าการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล การตรวจหาแถบของดีเอ็นเอที่แยกออกจากกันสามารถทำได้โดยการย้อมอะกาโรสเอธิเทียมโบรไมด์ แล้วตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอธิเดียมไบรไมด์กับดีเอ็นเอ ซึ่งจะเรืองแสง(fluorescence) เมื่อส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต แถบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำเพียง 10 นาโนกรัม สามารถถูกตรวจพบได้โดยวิธีนี้ การแยกดีเอ็นเอโดยโพลีอะคริลาไมด์ยุ่งยากกว่า แต่มีอำนาจการแยก (resolving power) สูงกว่าอะกาโรสเจลมากโดยสามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียงคู่เบสเดียวออกจากกันได้ จึงใช้ได้ดีในเทคนิคการหาลำดับเบส (DNA sequencing)

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

อะกาโรสเป็นสารโพลีเมอร์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล ถ้ากำหนดให้โครงรูปของดีเอ็นเอเป็นแบบเส้นตรง ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของโมเลกุลกับระยะทางที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถแสดงได้ในรูปของกราฟดังภาพที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่าสำหรับแต่ละความเข้มข้นของอะกาโรสเจลจะมีช่วงที่การเคลื่อนที่กับ log ของขนาดโมเลกุลมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรวจ ซึ่งช่วงขนาดของดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระยะทางนั้นได้รวบรวมไว้ตารางที่ 1

ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของดีเอ็นเอกับการเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ

ในปัจจุบันมีการใช้อะกาโรสในงานอิเล็กโทรโฟริซิสเพิ่มมากขึ้นทั่วโลก ผู้ผลิตหลายบริษัทจึงทำการผลิตอะกาโรสชนิดพิเศษสำหรับใช้ในงานอิเล็กโทโฟริซิส โดยเฉพาะซึ่งเป็นอะกาโรสที่บริสุทธิ์ปราศจากสารเจือปนซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไปหลังจากแยกดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล และปราศจากการปนเปื้อนจากนิวคลีเอสซึ่งทำลายกรดนิวคลีอิก

ในการเตรียมเจลจะนำอะกาโรสมาหลอมในบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ประมาณ 8 แล้วเทลงในถาดรองเจล เมื่ออะกาโรสแข็งตัวแล้วจึงทำการหยดดีเอ็นเอลงในหลุมแล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่เจล ดีเอ็นเอ ซึ่งมีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วบวก อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆต่อไปนี้

1. **ขนาดของดีเอ็นเอ**

อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะแปรผกผันกับ $\log_{10}$ ของจำนวนคู่เบส ดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าเพราะมีแรงเสียดทานมากกว่า และโมเลกุลจะเคลื่อนผ่านรูของเจลยากกว่า

2. **ความเข้มข้นของอะกาโรส**

ขณะที่ให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านรูภายในเจล ถ้ารูมีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะสูงกว่าเจลที่มีรูขนาดเล็ก ขนาดของรูภายในเจลจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส อะกาโรสยิ่งมีความเข้มข้นมากรูภายในจะมีขนาดเล็กลง การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรส จะมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรส ตามสมการ

$\log u = \log u_0 - K_r T$

u = ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจล

u_0 = ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในสภาพที่ไม่มีในอะกาโรสเจล

K_r = สัมประสิทธิ์ความหน่วง(retardation coefficient)

ตารางที่ 1 ช่วงขนาดดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระยะทางที่เคลื่อนที่ไปในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล (%)	ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด(กิโลเบส)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

3. โครงรูปของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แต่อยู่ในโครงรูปที่ต่างกันจะเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลในอัตราที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล ความแรงของกระแสไฟฟ้าและความแรงอิออนของบัพเฟอร์ โดยทั่วๆ ไป สำหรับพลาสมิดดีเอ็นเอ โครงรูปแบบซูเปอรเฮลิคัล(superhelical) จะเคลื่อนที่เร็วกว่าแยบบเส้นตรง(linear) ส่วนแบบวงกลมนิก(nicked circular) จะเคลื่อนที่ช้าที่สุด

4. องค์ประกอบของบัพเฟอร์

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและความแรงอิออนของบัพเฟอร์ บัพเฟอร์ที่นิยมใช้สำหรับอิเลกโทรโฟริซิสของดีเอ็นเอมี 4 ชนิด ดังสรุปไว้ใน ตารางที่ 2นิยมเตรียมบัพเฟอร์เข้มข้นเก็บไว้ เช่น 10X buffer หมายความว่าเป็นบัพเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ใช้จริง TAE, TPE และ TBE ใช้กับดีเอ็นเอสายคู่ ส่วนบัพเฟอร์ด่าง(alkaline buffer) ใช้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยว

ตารางที่ 2 แสดงบัพเฟอร์ที่นิยมใช้ในเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของดีเอ็นเอ

บัพเฟอร์	ความเข้มข้นที่ใช้ในอิเล็กโทรโฟริซิส (working solution)	บัพเฟอร์เข้มข้น/1000 ml (stock solution)
Tris-acetate (TAE)	1X:0.04 M Tris-acetate 0.001 M EDTA	10X:48.4 g Tris base 11.4 ml glacial aceticacid 20 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Tris-phosphate (TPE)	1X:0.09 M Tris-phosphate 0.002 M EDTA	10X:108 g Tris base 15.5 ml 85% phosphoric acid 40 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Tris-borate (TBE)	0.5X:0.045 M Tris-borate 0.002 M EDTA	5X:54 g Tris base 27.5 ml boric acid 20 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Alkaline Butter	1X:50mM NaOH 1 mM EDTA	10X:5 ml 10 N NaoH 2 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

วัสดุและอุปกรณ์

1. agarose (electrophoresis grade)
2. 5x TBE buffer
3. Ethidium bromide 10 mg/ml
4. 10 x gel loading buffer

5. elctrophoresis chamber(mini gel)
6. power supply
7. UV transilluminator
8. Polaroid Camera

<u>วิธีทำ</u>

1. เตรียมถาดรองเจล (gel mould) วางบนพื้นเรียบ
2. ชั่ง agarose จำนวนที่ต้องการลงในฟลาสก์ เติม electrophoresis buffer (1 X TBE) ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการโดยทั่ว ๆ ไป mini-gel มักใช้ปริมาณ agarose 35-40 ml ถ้าต้องการเตรียม 0.8 % agarose gel ใช้ agarose 0.32 กรัมต่อบัพเฟอร์ 40 ml
3. ทำให้ agarose ละลายโดยแช่ฟลาสก์ในน้ำเดือด หรือในเตาไมโครเวฟนำออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็นลงถึงประมาณ 60 ^{o}C เติม ethidium bromide (10 mg/ml) ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 μg/ml (2 ไมโครลิตรต่อ 40 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยการหมุนฟลาสก์เบาๆ
4. เท agarose ลงในถาดรองเจลที่เตรียมไว้ พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศวาง comb ลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดรองเจล ให้ซี่ของ comb อยู่ห่างจากปลายของเจลประมาณ 1 ซม. รอให้เจลแข็งตัว
5. หลังจากเจลแข็งตัว นำถาดไปวางใน electrophoresis tank เท buffer (1X TBE) ลงไปจนท่วมเจลให้บัพเฟอร์ท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 1-2 มม. ค่อยๆดึง comb ออก
6. ผสม DNA sample กับ gel-loading buffer แล้วหยอดตัวอย่างลงในช่องโดยใช้ disposable micropipette (gel-loading buffer คือบัพเฟอร์ที่มีสีย้อม 2 ชนิด คือ bromphenol blue กับ xylene cyanol, brompheol blue จะเคลื่อนที่ในอัตราเร็วพอๆกับดีเอ็นเอซึ่งยาวประมาณ 300 คู่เบสและเคลื่อนที่เร็วกว่า xylene cyanol ประมาณ 2.2 เท่า xylene cyanol เคลื่อนที่ในอัตราเร็วพอๆกับดีเอ็นเอคู่ซึ่งยาวประมาณ 4 kb นอกจากนี้ยังมี glycerol หรือ sucrose ผสมอยู่ เพื่อถ่วงให้ดีเอ็นเอตกลงสู่ก้นหลุม มักจะเตรียม gel - loading buffer ที่เข้มข้นกว่าที่ใช้จริง 10 เท่า ดังนั้น ถ้ามีดีเอ็นเอตัวอย่างอยู่ 10 ไมโครลิตร ใช้ gel - loading buffer 1 ไมโครลิตร ในการทำอิเล็กโทรโฟริซิสทุกครั้งต้องมีดีเอ็นเอมาตรฐานที่รู้ขนาดแน่นอนเป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งมักจะหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานนี้ลงในหลุมซ้ายมือสุด ดีเอ็นเอมาตรฐานที่นิยมใช้คือ แลมด้าดีเอ็นเอ ตัดด้วยเอนไซม์ Hind III หรือ Eco RI หรือทั้งสอง

7. เมื่อหยอดตัวอย่างเรียบร้อยทุกหลุมแล้ว ปิดฝา electrophoresis chamber แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ power supply ตั้ง voltage สูงประมาณ 1-5 โวลท์/ซม. ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จาก cathode (ขั้วสีดำ)ไปยัง anode(ขั้วสีแดง) อย่าตั้ง voltage ให้สูงเกินไป จะทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งจะทำลายดีเอ็นเอ โดยทั่วๆ ไปสำหรับ mini-gel ใช้ 50-60 โวลท์ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อ bromphenol blue เคลื่อนไปได้ประมาณ 80 % ของความยาวเจล หยุดกระแสไฟฟ้า นำเจลออกมาแล้วนำไปวางบน UV Transilluminator เพื่อตรวจดูผลการแยก บันทึกภาพด้วยกล้องโพลารอยด์

การเตรียมสารละลาย

1. 5x TBE (0.045 M Tris-borate,0.001 M EDTAO

   54 กรัม Tris base

   27.5 กรัม Boric acid

   20 ml 0.5 M EDTA(pH8.0)

   ละลายน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

2. 1 x TBE

   5 x TBE 1 ส่วน:น้ำ 4 ส่วน

3. 10 mg/ml ethidium bromide

   ชั่ง ethidium bromide 100 มิลิกรัม ละลายในน้ำ 10 มิลลิลิตร โดยการกวนบน magnetic stirrer

   1-2 ชั่วโมง เก็บไว้ในขวดหุ้มอะลูมิเนียมฟอยล์ (ethidium bromide อาจเป็น strong mutagen สวมถุงมือตลอดเวลาที่เกี่ยวข้องกับสารนี้)

4. 10 x gel-loading buffer

   0.4 % bromophenol blue

   0.4 % xylene cyanol

   50 % glycerol in water

ปฏิบัติการที่ 6
การแยกแถบดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล
(Recovery of DNA from agarose gel)

ในปฏิบัติการบทที่ 4 นักศึกษาได้ย่อย recombinant λgt 11 DNA ด้วยเอนไซม์ Eco RI และแยกด้วยอิเล็กโทรโฟริซิส ในปฏิบัติการนี้ นักศึกษาจะแยกแถบ cDNA ออกมาจากวุ้นอะกาโรสมีหลายวิธี ตามที่บรรยายในบทนี้ แต่จะให้นักศึกษาทำเพียงวิธีเดียวคือวิธี Prep-A-Gene DNA purification system (Bio-RAD)

วัสดุและอุปกรณ์

1. แถบดีเอ็นเอในวุ้นอะกาโรสจากบทปฏิบัติการที่ 4
2. สารละลาย 0.3 M Na acetate, 1 mM EDTA
3. 3 M Na acetate pH 5.2
4. low melting temperature agarose
5. TE buffer
6. Phenol : chloroform : isoamyl alcohol
7. Absolute ethanol
8. Prep-A-Gene Matrix DNA Purification Kit (Nio-Rad)
9. NA 45 nitrocellulose membrane
10. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
11. automatic pipettor และ pipet tips
12. เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์
13. อ่างน้ำอุ่น
14. ไนโตรเจนเหลว

<u>**วิธีทำ**</u> (Prep-A-Gene DNA purification system (Bio-RAD)

1. ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกมานำชิ้นวุ้นไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์นำไปปั่นเหวี่ยงให้ชิ้นวุ้นตกลงที่ก้นหลอด คาดคะเนปริมาตรของวุ้นว่าเป็นเท่าใด

2. เติม binding buffer ลงไปจำนวน 3 เท่าของปริมาตรวุ้น แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37-55 $^{\circ}$C ประมาณ 10-20 นาที จนกระทั่งวุ้นละลายหมด
3. เติม prep-A-Gene matrix ลงไป (5 μl ต่อ 1 μg DNA) ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 10 นาที DNA จะได้ตัวกับ matrix
4. นำไปปั่นเหวี่ยง 30 วินาที ให้ matrix ตกตะกอนดูด supernatant ทิ้งไปแล้วล้าง matrix ด้วย washing buffer ปริมาตร 25 เท่าของปริมาตร matrix ที่ใช้ในข้อ 3.
5. ล้าง matrix ด้วย washing buffer ทั้งหมด 3 ครั้ง ในการล้างครั้งสุดท้ายดูด washing buffer ทิ้งให้หมด
6. ชะ DNA ที่เกาะอยู่กับ matrix ออกโดยเติม elution buffer ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของ matrix ที่ใช้ในข้อ 3 แล้วแช่ในอ่างน้ำอุ่น (37-50°C) เป็นเวลา 5 นาที
7. นำไปปั่นเหวี่ยง 1-2 นาที ให้ matrix ตกตะกอน ย้าย supernatant ซึ่งมีดีเอ็นเออยู่ไปใส่หลอดใหม่ นำดีเอ็นเอไปใช้ต่อได้ทันทีโดยไม่ต้องทำ ethanol precipitation

ปฏิบัติการที่ 7
การโคลนดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ pGEM3Z
(Cloning in pGEM3Z plasmid vector)

ในบทปฏิบัติการที่ 4 และ 6 ที่ผ่านมาได้เตรียม DNA จากโคลนของ λgt 11 ย่อย DNA ด้วยเอ็นไซม์ Eco RI และได้แยกชิ้น cDNA ออกมาจากอะกาโรสเจลแล้ว ในปฏิบัติการนี้จะโคลน cDNA นั้นเข้าสู่ vector ชนิดใหม่คือ plasmid ชนิด pGEM3Z (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Promega) ซึ่งเป็นพลาสมิดที่นิยมใช้กันมากชนิดหนึ่ง

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. cDNA ที่ต้องการโคลน (จากปฏิบัติการที่ 6)
2. pGEM3Z DNA
3. glycerol stock ของเซลล์ E. coli strain JM 109
4. agarose
5. 5xTBE buffer

6. ethidium bromide 10 mg/ml
7. เอนไซม์ Eco RI
8. Eco RI 10 x buffer
9. เอนไซม์ T4 DNA ligase
10. DNA ligase 10x buffer
11. LB-medium
12. LB-agar plate และ LB-ampicillin agar plate
13. 50 mM CaCl2
14. selection plates (LB agar + 100 μg/ml ampicillin + 0.1 mM IPTG + 50μ g/ml X-gal)
15. petri dishes
16. หลอดไร้เชื้อขนาด 50 ml
17. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
18. autometic pipettors และ pipet tips
19. อ่างน้ำอุ่น
20. ตู้ถ่ายเชื้อแบบไบโอฮาซาด
21. กะบะน้ำแข็ง
22. ตู้เพาะเชื้อ

วิธีทำการทดลอง

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> Determination of the amount of cDNA insert

โดยจะต้องทราบโดยประมาณว่า cDNA ที่ dilute ออกจาก agarose gel นั้นมีปริมาณเท่าใด โดยการ run agarose gel ของตัวอย่าง cDNA เทียบกับ standard DNA ที่ทราบปริมาณ เช่น λDNA (บริษัท Gibco BRL) โดยนำ λDNA (10 ng/μl) จำนวน 2 μl, 4 μl, 6 μl load ลงในหลุมที่ 1, 2, 3 ของ 1% agarose gel ตามลำดับแล้วหยอดตัวอย่าง cDNA ที่เตรียมได้ลงในหลุมที่เหลือ (แบ่ง cDNA มาประมาณ 2-5 ไมโครลิตร) run electrophoresis ตามปกติ นำ gel ไปวางบน UV transilluminator จะสามารถทราบ

ปริมาณ cDNA โดยประมาณได้ โดยเปรียบเทียบกับความสว่างของแถบ cDNA กับความสว่างของ λDNA

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> Digestion of pGEM vector with Eco RI

Set up Eco RI digestion ของ pGEM DNA ดังนี้

PGEM DNA	1 μl (ความเข้มข้น 0.5 μg/μl)
10 x Eco RI buffer	1 μl
Enzyme Eco RI	1 μl
Sterile distilled water	7.5 μl
Total volume	10 μl(pGEM DNA เข้มข้น 50 ng/μl)

Incubate ที่ 37 °C 1-2 ชั่วโมง

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> Ligation of pGEM DNA to cDNA

3.1 การหา vector : insert ratio ที่เหมาะสม

โดยทั่ว ๆ ไป มักใช้ 1 : 1 หรือ 1 : 3 molar ratio ของ vector : insert ใช้สูตรต่อไปนี้ ในการเปลี่ยน molar ratio เป็น mass ratio

$$\frac{\text{Ng of vector x kb size of insert}}{\text{Kb size of vector}} \times \text{molar ratio of insert / vector}$$

$$= \text{ng of insert}$$

3.2 Set up ligation of reaction

pGEM 3Z DNA จากขั้นตอนที่ 2	100 ng (1 μl)
cDNA insert	…. Ng (ตามที่คำนวณได้จาก ขั้นตอนที่ 3.1)
T4 DNA ligase enzyme	1 unit (1μl)
Ligase 10 x buffer	1 μl
เติม nuclease-free water จนครบ	10 μl

Incubate ที่ 22 °C 3 ชั่วโมง หรือ 4 °C 16 ชั่วโมง (ข้ามคืน)

โดยจะต้อง set up ligation reaction อีกหลอดหนึ่งเป็นหลอดควบคุม ซึ่งไม่ใส่ cDNA insert โดยใส่น้ำแทนให้มีปริมาตรทั้งหมด 10 μl

<u>ขั้นตอนที่ 4</u> Transfornation of pGEM DNA into host cells

4.1 Preparation of competent host cells (E. coli strain JM 109)

1. streak plate ของ E. coli JM 109 บน LB plate
2. Incubate single colony ใน 5 ml ของ LB medium เขย่าข้ามคืนที่ 37 °C
3. วันรุ่งขึ้น inoculate 1 ml ของ overnight culture ลงใน 100 ml ของ fresh LB medium เขย่าที่ 37 °C จนกระทั่งได้ค่า OD_{600} ประมาณ 0.4-0.6 ใช้เวลาประมาณ 4-5 ชั่วโมง
4. แช่เซลล์ในกะบะน้ำแข็งแล้วนำไป centrifuge ที่ 3,500 x g เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 °C
5. resuspend เซลล์ด้วย 0.4 volume ของ ice-cold 50 mM $CaCl_2$
6. แช่เซลล์ไว้ในกะบะน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
7. centrifuge ที่ 3,500 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °C
8. resuspend เซลล์ด้วย 1/25 original volume ของ ice-cold 50 mM CaCl2 (culture 100 ml ใช้ CaCl2 4 ml) ต้องทำอย่างเบามือที่สุดเพราะเซลล์จะแตกได้ง่าย
9. แช่กะบะน้ำแข็งไว้อีกอย่างน้อย 60 นาที แล้วจึงแบ่งใส่หลอด ๆ ละ 200 μl แล้วนำไปใช้ทำ transformaion ได้เลย ถ้ายังไม่พร้อมที่จะทำ transformation ต้องการเก็บเซลล์ไว้ให้เติม sterile glycerol ลงไป หลอดละ 40 μl แล้วเก็บไว้ที่ –70 °C freezer ได้ประมาณ 2-3 เดือน

4.2 Transformation of JM 109 competent cells

1. เติม pGEM DNA จำนวน 1 μl (จากขั้นตอนที่ 3.2) ลงใน 200 μl ของ E.coli JM 109 competent cells (จาก step 5.1) ผสมให้เข้ากัน
2. เติม pGEM DNA จำนวน 5 μl (จากขั้นตอนที่ 3.2) ลงใน 200 μl ของ E.coli JM 109 competent cells อีกหลอดหนึ่ง
3. แช่หลอดทั้งสองในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
4. ย้ายหลอดมาแช่ใน water bath (42°C) เป็นเวลา 2 นาที (heat shock)

5. ย้ายกลับไปแช่น้ำแข็งอีก 2 นาที
6. เติม LB medium ลงไป หลอดละ 0.5 ml นำไปแช่อ่างน้ำอุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 1-1.5 ชั่วโมง
7. plate 100 μl ของ transformation mixture ลงใน selection plates (selection plate คือ LB medium + 100 μg/ml ampicillin + 0.1 mM IPTG + 50 μg/ml X-gal)
8. Incubate plate ข้ามคืนที่ 37°C
9. ตรวจสอบและนับจำนวน recombinant colonies (สีขาว) non-recombinant colonies (สีน้ำเงิน)
10. ทำขั้นตอนที่ 1-9 กับ ligation reaction ชุดควบคุมด้วย

<u>การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย</u>

1. LB medium

   ดูท้ายบทปฏิบัติการที่ 1

2. LB agar plate

   Bacto-tryptone 10 กรัม

   Bacto-yeast extract 5 กรัม

   NaCl 5 กรัม

   Bacto-agar 15 กรัม

   ละลายน้ำจนได้ปริมาณทั้งหมด 1000 ml ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 1N NaOH ฆ่าเชื้อโดยการออโตเครฟ รอจนเย็นลง (อุณหภูมิประมาณ 50 °C) เทลงในจานเพาะเชื้อแล้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 82 มม. จานละประมาณ 25 ml ทิ้งไว้ให้แข็งแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

3. IPTG / X-gal selection plates

   เตรียม LB agar ปริมาตร 1000 ml ตามข้อ 2 ก่อนเทลงในจานเพาะเชื้อเติมสารละลายต่อไปนี้

ampicillin (100 mg/ml)	จำนวน 1 ml
IPTG (0.1 M)	จำนวน 1 ml
X-gal (50 mg/ml)	จำนวน 1 ml

ปฏิบัติการที่ 8
การแยกพลาสมิดดีเอ็นเอ
(Isolation of plasmid DNA)

วัสดุและอุปกรณ์

1. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* JM 109 ที่ transform ด้วยพลาสมิด pGEM 3Z (จากปฏิบัติการที่ 7)
2. LB medium
3. ampicillin 100 mg/ml
4. miniprep lysis buffer
5. 1 N NaOH
6. 10% SDS
7. 3 M Potassium acetate pH 4.8
8. phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)
9. chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1)
10. 3 M Na acetate pH 5.2
11. Ethanol (Absolute)
12. Rnase A 10 mg/ml
13. STE buffer
14. 10 M Ammonium acetate
15. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
16. automatic pipettor และ pipet tips
17. อ่างน้ำอุ่น
18. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

<u>วิธีทำ</u> **Plasmid Miniprep (Serghini' s method)**

1. เขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวสีขาว 3 โคโลนีและโคโลนีสีน้ำเงิน 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium + 100 μl/ml ampicillin จำนวน 10 ml

2. นำเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืน จำนวน 1.5 ml ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 2 นาที (เก็บเชื้อที่เหลือไว้ที่ 4°C)
3. ดูด supernatant ทิ้งไป
4. ละลายตะกอนเซลล์ด้วย STE buffer 100 μl
5. เติม phenol : chloroform : isoammyl alcohol (25 : 24 : 1) จำนวน 100 μl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer
6. นำไปปั่นเหวี่ยง 5 นาที ย้าย supernatant ไปใส่ในหลอดใหม่แล้วเติม 10 M ammonium acetate ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 M
7. เติมเอธานอลที่เย็นจัด 2 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากันแล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที
8. นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลานาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ผึ่งให้ตะกอนแห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 14 μl
9. เติม Rnase A (10 mg/ml) จำนวน 2 μl นำไปแช่อ่างน้ำอุ่นที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัด RNA
10. เก็บพลาสมิดดีเอ็นเอไว้ในตู้แช่แข็ง -20°C

<u>การเตรียมสารละลาย</u>

1. miniprep lysis buffer

ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCL pH 8.0

10 mM	Na_2EDTA
50 mM	glucose
2 mg/ml	lysozyme

2. สารละลาย 0.2 N NaOH, 1% SDS (เตรียมก่อนการทดลอง)

1 N NaOH	1	มิลลิลิตร
10% SDS	0.5	มิลลิลิตร
sterile H_2O	3.5	มิลลิลิตร
รวม	5	มิลลิลิตร

3. สารละลาย Rnase A ที่ปราศจากการปนเปื้อนของ Dnase

ละลาย Rnase A 10 มิลลิกรัม ในสารละลาย 10 mM Tris pH 7.5, 15 mM NaCl จำนวน 1 ml นำไปต้มเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลาย Dnase แล้วปล่อยให้เย็นลงอย่างช้าๆ แบ่งสารละลายออกเป็นส่วนเล็กๆ หลายๆ หลอดเก็บไว้ที่ -20°C

4. 3 M K acetate, pH 4.8 ละลาย K acetate. $3H_2O$ จำนวน 8.16 กรัมในน้ำ 16 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 4.8 ด้วย glcial acetic acid ปรับปริมาตรให้เป็น 20 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

5. TE buffer (10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA)

ผสมสารละลาย	1 M Tris-HCL, pH 8.0	0.1 มิลลิลิตร
	0.5 M EDTA, pH 8.0	20 ไมโครลิตร
	เติม sterile H_2O ให้ได้ปริมาตร	10 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

6. STE buffer

1 M Tris-HCL pH 7.5	1 ml
0.5 M Na_2EDTA	0.2 ml
5 M NaCl	2 ml

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

ตัวอย่างผลการทดลอง

Vector	Tube	Plate (μl)	Blue colony	White colony	% Recombinant
PGEM DNA Eco RI-cut religated	1	100	-	-	0
PGEM DNA Eco RI-cut A7 cDNA	2	50	112	11	12.3
PGEM DNA Eco RI-cut A7 cDNA	2	100	300	20	6.25
PGEM DNA Eco RI-cut A7 cDNA	2	150	463	37	7.4

PGEM DNA EcoRI-cut λ2 cDNA	3	50	?	53	-
PGEM DNA EcoRI-cut λ2 cDNA	3	100	800	100	?
PGEM DNA EcoRI-cut λ2 cDNA	3	150	-	113	?
PGEM DNA	4	50	-	-	?

ปฏิบัติการที่ 9
การแยกสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืช
(Isolation of DNA from plant tissues)

การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนจำเป็นต้องมีการแยกดีเอ็นเอออกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การแยกดีเอ็นเอออกจากเนื้อเยื่อพืชมีหลายวิธี มีหลักการโดยทั่วไปโดยทำให้เซลล์แตกโดยการบด ทำลายเมมเบรนที่ห่อหุ้มนิวเคลียสด้วยดีเทอร์เจนท์ ทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดย phenol extraction และ ethanol precipitation กำจัดอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ Rnase

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. เนื้อเยื่อพืชซึ่งควรเป็นเนื้อเยื่อสดและเป็นส่วนที่มีอายุน้อยเช่น ต้นอ่อน ใบอ่อน
2. extraction buffer
3. 20% SDS
4. β-mer captoethanol
5. isopropanol
6. TE buffer เอนไซม์ RnaseA (10 mg/ml)
7. Phenol : chloroform : isoamyl alcohol
8. chloroform : isoamyl alcohol
9. absolute alcohol

10. 70% ethanol
11. 7.5 M ammonium acetate
12. refigurated high-speed centrifuge
13. microcentrifuge
14. หลอดเซนตริฟิวจ์
15. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
16. โกร่ง
17. กะบะน้ำแข็ง
18. อ่างน้ำอุ่น

<u>วิธีการ</u> ดัดแปลงจาก Graham et. al., 1994.

1. บดเนื้อพืชหนัก 1 กรัมในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลวบดจนเป็นเนื้อละเอียด
2. ย้ายเนื้อเยื่อไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วเติม extraction buffer ลงไป 1 ml ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดแล้วนำไปแช่อ่างน้ำอุ่นที่ 55 ^{o}C เป็นเวลา 20 นาที
3. นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์เป็นเวลา 5 นาที
4. ย้าย supernatant ไปใส่หลอดใหม่เติม chloroform : isoamyl alcohol (41 : 1) ปริมาตรเท่ากัน
5. ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาเป็นเวลา 2 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาที
6. ย้าย supernatant ไปใส่หลอดใหม่แล้วเติม 7.5 M ammonium acetate ลงไปในปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรเดิมแล้วเติม absolute ethanol (เย็นจัด) ลงไป 2 เท่าของปริมาตรเดิม แช่ไว้ในตู้แช่แข็ง (-20 C) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที
8. เท supernatant ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ผึ่งตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนด้วย TE buffer 50 μl

<u>การเตรียมสารละลาย</u>

1. extraction buffer (วิธีที่ 1)

    9.1 g sorbitol

1.21 g Tris-base

0.94 g Na_2 EDTA

ในปริมาตรทั้งหมด 100 ml ปรับ pH เป็น 7.5 ฆ่าเชื้อโดยการออโตเครฟ

2. 20% SDS ละลาย SDS 20 กรัม ในน้ำให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 200 ml (ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ไม่ต้องออโตเครฟสารละลาย SDS เข้มข้น
3. 5 M potassium acetate
4. extraction buffer (วิธีที่ 2)

(2% CTAB , 100 mM Tris-HCl , 1.4 M NaCl , 20 mM EDTA)

CTAB	2 กรัม
1 M Tris-HCl pH 8.0	10 ml
NaCl	8.18 กรัม
0.5 M EDTA	4 ml

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ฆ่าเชื้อโดยออโตเครฟ

5. 7.5 M ammonium acetate
6. Phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 :24 :1)

- ทำ phenol ให้เป็นของเหลวโดยนำขวด phenol ไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่ 65 ^{o}C แล้วเติม 8-hydroxyquinoline ลงไป 0.1 กรัมต่อ phenol 100 มิลลิลิตร
- เติม 1M Tris-HCl pH 8.0 ลงไป 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ชั้น phenol และชั้นน้ำ aqueous phase แยกออกจากกัน
- ตรวจ pH ของชั้นน้ำ (ชั้นบน) ดูว่ามากกว่า 7.5 หรือไม่ ถายังต่ำกว่า 7.6 ให้ดูดเอาชั้นน้ำทิ้งแล้วเติม 1 M Tris-HCl pH 8.0 ลงไปอีก
- ทำซ้ำจนกว่า pH ของชั้นน้ำมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 7.5
- เก็บ phenol เหลวไว้ในขวดสีน้ำตาลที่ 4 C โดยมี TE อยู่ชั้นบน
- เมื่อต้องการใช้ผสม phenol กับ chloroform : isoamyl alcohol (24 :1) ในสัดส่วน 1 :1

7. Chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ผสม chloroform 240 ml กับ isoamyl alcohol 10 ml เก็บในขวดสีชา หรือขวดแก้วหุ้มอลูมิเนียมฟอยล์ที่อุณหภูมิห้อง

ปฏิบัติการที่ 10

การหาปริมาณดีเอ็นเอ และปริมาณอาร์เอ็นเอ

(Quantitative of DNA and RNA)

การหาปริมาณดีเอ็นเอ และปริมาณอาร์เอ็นเอ เป็นเทคนิคที่จำเป็นมาก เพราะเมื่อสกัด ดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตได้แล้ว จำเป็นที่จะต้องทราบความเข้มข้นในตัวอย่างนั้น เพื่อที่จะทราบว่าควรจะปิเปต สารละลายกรดนิวคลีอิกปริมาตรเท่าใดไปใช้ในขั้นตอนต่อไป วิธีการที่นิยมใช้มากที่สุดมี 2 วิธี คือ

1. **วิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี** ซึ่งใช้ในกรณีที่มีปริมาณของกรด นิวคลีอิกมากพอสมควร และเป็นตัวอย่างกรดนิวคลีอิกที่มีสารปนเปื้อนเช่น โปรตีน ฟีนอล หรืออะกาโรส อยู่ในปริมาณที่ต่ำ
2. **วิธีย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์** นิยมใช้ในกรณีที่มีปริมาณของกรดนิวคลีอิกน้อย (> 250 ng/ml) และมีสารปนเปื้อนอยู่ค่อนข้างมาก

วิธีการศึกษา

การหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี

1. แบ่งสารละลายดีเอ็นเอ ที่ต้องการหาค่าความเข้มข้น มา 5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมน้ำกลั่นลงไป 995 มิลลิตร แล้วนำไปหาค่า absorbance ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank
2. นำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวนหาความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิก ดังนี้

   ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (μg/ml) = A_{260} x 50 μg/ml x dilution factor

   การคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย DNA

   ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (μg/ml) = A_{260} x 50 μg/ml x dilution factor

   = 0.57 x 50 x 200

   = 570 μg/ml

   = 0.57 μg/ml

   เมื่อค่า absorbanceที่ความยาวคลื่นแสง 260 = 0.57

   dilution factor = 200

จากการสกัด DNA จากใบพืชแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรและที่ 280 นาโนเมตร DNA ที่สกัดได้จากใบฟ้าทะลายโจร

ทำให้อยู่ในรูปหน่วย ug/ul = 0.57/1000 ug/ul

แสดงว่าใน 10 ul ของ DNA solution มีดีเอ็นเอ = 10x 0.57/1000 = 0.0057 ug

100ul มี DNA = 100 x 0.0057/10 = 0.057 ug

ในใบพืช 4 กรัม มี DNA = 0.057 ug

ถ้าใบพืช 1 กรัม มี DNA = 0.057/4 = 0.0143 ug/g

****