

ภาคผนวก ก

1. วิธีการเตรียมแบคทีเรียให้อยู่ในสภาพพร้อมรับ DNA จากภายนอก (competent cell)

- 1.1. นำ frozen stock ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการใช้ในการทำ cloning กับเวกเตอร์ (pGEM-T vector) ของบริษัท Promega มา streak บนอาหารแข็งสูตร LB ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง
- 1.2. เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร SOB (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มี 2 M $MgCl_2$ (0.5 มิลลิลิตร ต่อ SOB 100 มิลลิลิตร) เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง
- 1.3. ปิเปตเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลวสูตร SOB 250 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร SOB ใหม่อีกครั้งที่ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มี 2 M $MgCl_2$ (0.5 มิลลิลิตร ต่อ SOB 100 มิลลิลิตร) เพื่อให้เซลล์ของเชื้อมีความเป็น competent เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.50 ชั่วโมง
- 1.4. วัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.7
- 1.5. นำเชื้อที่เลี้ยงมาใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ ขนาด 50 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที
- 1.6. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 2500 RCF ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- 1.7. เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB 1.25 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที
- 1.8. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 2500 RCF ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 1.9. เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอน ด้วยสารละลาย TB 1 มิลลิลิตร และ DMSO 70 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที
- 1.10. เก็บสารละลาย 100 ไมโครลิตร ต่อ 1 หลอดไมโครเซนตริฟิวส์
- 1.11. แช่ในไนโตรเจนเหลว เพื่อเก็บ competent cell

1.12 เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาความเป็น competent cell

2. การนำโคลนที่สนใจ (DNA plasmid) เข้าสู่แบคทีเรีย (competent cell) โดยวิธี transformation

- 2.1 นำ competent cell 100 ไมโครลิตร และ DNA plasmid 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที
- 2.2 แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (heat shock) แช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 3 นาที
- 2.3 เติมหอาหารเหลวสูตร SOC 800 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
- 2.4 ปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ตกตะกอน ปิดเปิดสัดส่วนใส่ทิ้งประมาณ 750 ไมโครลิตร
- 2.5 นำสารละลายที่เหลือมา spread บนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีสาร X-gal 40 ไมโครลิตร กับ IPTG 4 ไมโครลิตร
- 2.6 บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3. สกัด DNA plasmid ด้วยวิธี small-scale preparation of plasmid DNA lysis by alkaline lysis

- 3.1 เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 15 มิลลิลิตร
- 3.2 บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 3.3 ปิดอาหารเหลวสูตร LB ที่มีเชื้อแบคทีเรีย 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์
- 3.4 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 3.5 เเทส่วนใส่ทิ้ง เติมห solution I (ภาคผนวก ข) 100 ไมโครลิตร
- 3.6 ละลายตะกอน ด้วยการ vortex

- 3.7 เติม solution II (ภาคผนวก ข) 200 ไมโครลิตร invert ประมาณ 4-5 ครั้ง แช่บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที
- 3.8 เติม solution III (ภาคผนวก ข) 150 ไมโครลิตร invert ประมาณ 4-5 ครั้ง แช่บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที
- 3.9 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 3.10 ปิเปตส่วนใส ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ เติม 95% ethanol ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใสที่ปิเปตได้
- 3.11 แช่ตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 3.12 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 3.13 เติม 70% ethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- 3.14 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 3.15 เท 70% ethanol ออกให้หมด
- 3.16 ปลอຍให้แห้งเติม TE buffer 50 ไมโครลิตร

