รายงานโครงงานวิจัย

งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2546

การตัดส่วนของยีน *hup* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน

Deletion of *hup* gene in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* for increasing the nitrogen fixation efficiency

ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QR
99.63
ส3495

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน 58927

วัน,เดือน,ปี 17 ก.พ. 2549

b.11419725

i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

In cyanobacteria, hydrogenase enzyme can be classified into 2 classes. Reversible hydrogenase encoded by *hox* gene catalyzes the production and degradation of molecular hydrogen. Uptake hydrogenase encoded by *hup* gene catalyzes the degradation of molecular hydrogen which is a by-product of nitrogen fixation. In general, *hup* gene can be found in only nitrogen-fixing cyanobacteria. When function of *hup* gene is deleted, the nitrogen fixation efficiency is increased. In this project, the recombinant plasmid DNA in which *hupL* region (*hup* gene large subunit) was inserted with the kanamycin-resistance cassette was constructed. Plasmid DNAs pUTA and pMV261 were isolated by alkaline lysis method. Plasmid pUTA containing *hupL* gene fragment was cut by restriction endonuclease *Bsa*BI and subsequently purified by using QIAquick gel extraction. Plasmid pMV261 containing the kanamycin-resistance cassette was cut by restriction endonucleases *Hin*dIII and *Spe*I. A 1,352 bp of the kanamycin-resistance cassette was isolated, purified and finally reacted with T4 DNA polymerase to create blunt ends. This cassette was ligated by T4 DNA ligase to plasmid pUTA cut by *Bsa*BI before transformation to competent cell *E. coli* DH5α. Four transformants were obtained on kanamycin containing LB agar. Their plasmid DNAs were isolated. No differences of 4 plasmid DNAs were found. Plasmid pSP4.1 was selected and cut by either restriction endonucleases *Eco*RI or *Pst*I. It was found that the size of plasmid pSP4.1 cut by *Pst*I was approximately 5,500 bp which was similar to expected size 5,691 bp. In addition, plasmid pSP4.1 cut by *Eco*RI showed 3 bands of about 300, 2,300 and 3,000 bp that were equivalent to the expected sizes 308, 2,387 and 3,015 bp. It can be summarized that plasmid pSP4.1 is the new recombinant plasmid in which the *hup* region was inserted to the kanamycin-resistance cassette and able to introduce to nitrogen fixing cyanobacterial cell *Anabaena siamensis* for increasing the nitrogen fixation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการตัดส่วนของยีน *hup* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนนี้ ดำเนินงานไปได้ด้วยดีโดยได้รับความสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2546 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ นอกจากนี้ ยังขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการให้ความสะดวกในการทำวิจัย สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณนายชนาวีร์ รัตนาจารย์ และนางสาวชมาภรณ์ ธงเพ็ง ที่ช่วยเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี ตลอดจนช่วยเหลือในทุกๆ ด้านจนโครงการวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ค
กิตติกรรมประกาศ.....ง
สารบัญ.....จ
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ซ
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย.....1
1.2 วัตถุประสงค์.....2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....2
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน.....2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....4
2.1 ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria).....4
2.2 *Anabaena siamensis*.....5
2.3 การตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation).....6
2.4 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส.....7
2.5 ยีนที่ทำหน้าที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hup*).....8
2.6 การกลายพันธุ์.....8
2.7 ตัวพาหะในการพาดีเอ็นเอที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน.....9
2.8 การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli*.....10
2.9 เอนไซม์ตัดจำเพาะ.....11
2.10 เอนไซม์ T4 DNA polymerase.....12
2.11 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ.....13
2.12 เทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส.....15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....17
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....17
3.2 พลาสมิด.....17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์ 17
3.4 สารเคมี 18
3.5 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และเอนไซม์อื่นๆ ที่ใช้ในโครงการวิจัย 19
3.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker) 19
3.7 วิธีการทดลอง 19
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 26
4.1 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 และ pUTA โดยการใช้ด่าง 26
4.2 การตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Spe*I และ พลาสมิด pUTA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI 27
4.3 การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้บริสุทธิ์ 28
4.4 การสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม 30
4.5 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 31
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 34
5.1 สรุปผลการทดลอง 34
5.2 ข้อเสนอแนะ 35
เอกสารอ้างอิง 36
ภาคผนวก 1 38
ภาคผนวก 2 39
ภาคผนวก 3 40
ภาคผนวก 4 41
ภาคผนวก 5 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Spe*I 21
ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา T4 DNA polymerase 22
ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI 23
ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation 24
ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 25
ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ 1 ลักษณะรูปร่างของ *Anabaena siamensis* 5
รูปที่ 2 องค์ประกอบและการทำงานของ Nitrogenase complex 6
รูปที่ 3 การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย 10
รูปที่ 4 การทำงานของเอนไซม์ T4 DNA polymerase ที่มี dNTPs ในปฏิกิริยา 12
รูปที่ 5 การทำงานของเอนไซม์ T4 DNA polymerase ที่ไม่มี dNTPs ในปฏิกิริยา 13
รูปที่ 6 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอด้วย DNA ligase ตำแหน่งที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 15
รูปที่ 7 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดโดยการใช้ด่าง 26
รูปที่ 8 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 28
รูปที่ 9 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 29
รูปที่ 10 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม 31
รูปที่ 11 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ก) และอะกาโรสเจล 2.0 เปอร์เซ็นต์ (ข) 32
รูปที่ 12 พลาสมิด pMV261 38
รูปที่ 13 พลาสมิด pGEM-T Easy 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการวิจัยออกมาประยุกต์และสามารถเป็นแนงทางในการพัฒนาปุ๋ยชีวภาพ เพื่อให้สามารถผลิตข้าวและผลิตผลทางการเกษตรที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น แทนการใช้สารเคมี

1.2 วัตถุประสงค์

ศึกษาการสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ใส่ชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ลงในบริเวณยีน *hup* ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA เพื่อนำไปสร้างไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* สายพันธุ์กลายต่อไป

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โดยการใส่ชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่ได้จากพลาสมิด pMV261 ลงในบริเวณยีน *hup* ของพลาสมิด pUTA หลังจากนั้นทำการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1.4.1 สกัดพลาสมิด pUTA ที่มียีน *hup* และพลาสมิด pMV261 ที่มีชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน

1.4.2 ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI ตัดบริเวณยีน *hup* ของพลาสมิด pUTA และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Spe*I ตัดพลาสมิด pMV261 ให้ได้ชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน

1.4.3 แยกชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน และพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI พร้อมทั้งทำให้บริสุทธิ์

1.4.4 ทำปฏิกิริยาสร้างปลายทู่ให้แก่ชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินด้วยเอนไซม์ T4 DNA polymerase

1.4.5 เชื่อมพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI กับชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีปลายทู่ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase

1.4.6 ทรานสฟอร์มพลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมในแบคทีเรีย *E. coli* DH5α แล้วจึงคัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.7 สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากทรานสฟอร์มแมนท์ และตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน จากการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Pst*I

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินอยู่ในบริเวณยีน *hup*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย คุณสมบัติที่สำคัญของไซยาโนแบคทีเรีย คือ มีรงควัตถุที่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน ซึ่งคุณสมบัตินี้ไม่พบในแบคทีเรียทั่วไป

ไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะที่สำคัญ 5 ประการ (ลัดดา, 2542) คือ

2.1.1 มีสารสีสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic pigments) ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน

2.1.2 ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย แบ่งออกเป็น 2 ชั้น มีองค์ประกอบสำคัญคล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (gram negative) ที่เรียกว่ามิวโคเปปไทด์ (mucopeptide) ส่วนรอบนอกผนังเซลล์มักจะเป็นเมือกใสๆ ที่เรียกว่า ชีท (sheath) หุ้มอยู่โดยรอบ ชีทนี้มีความหนาบางต่างกัน อาจมีสีหรือไม่มีสี หรือแบ่งออกเป็นชั้นๆ

2.1.3 ไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลา มีลักษณะการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement)

2.1.4 ผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นสารประเภทแป้งชนิดหนึ่งคือ แป้งไซยาโนไฟเซียน (cyanophycean starch) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปโดยเรียกว่า ไซยาโนไฟซินแกรนูล (cyanophycin granule) แป้งไซยาโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่นคือ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดงแทนที่จะได้สีน้ำเงิน

2.1.5 จัดเป็นโปรคาริโอต (prokaryote) แตกต่างจากพืชชั้นสูงจำพวกยูคาริโอต (eukaryote) คือ สารสีไม่ได้อยู่ในพลาสติดแต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 *Anabaena siamensis*

Anabaena จัดเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นทรัยโคมชนิดเดี่ยวๆ มีชีทหุ้ม เส้นสายตรงหรือม้วนเป็นวง บางครั้งอาจพบในลักษณะบิดเป็นเกลียว ในบางสายพันธุ์ เซลล์มีรูปร่างแบบถังเบียร์ กลม หรือรูปสี่เหลี่ยม มีเฮเทอโรซิสต์อยู่ระหว่างเซลล์ บางครั้งอาจพบเฮเทอโรซิสต์อยู่ที่ปลายเซลล์

Anabaena siamensis (รูปที่ 1) เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากนาข้าวในประเทศไทย มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูง ลักษณะทั่วไปจะเป็นทรัยโครมชนิดเดี่ยว มีทั้งที่เป็นเส้นสายตรง หรือที่ม้วนเป็นวง มีบริเวณของเฮเทอโรซิสต์ทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจน บางครั้งอาจพบเฮเทอโรซิสต์มากกว่า 1 ตำแหน่ง *A. siamensis* จัดอยู่ใน

Division Cyanophyta

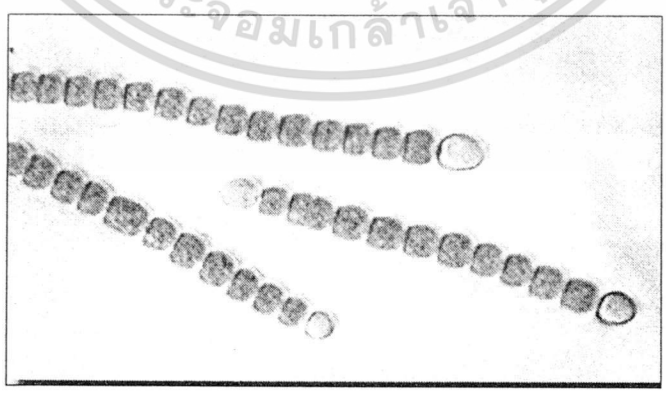
Class Cyanophyceae

Order Nostocales

Family Nostocaceae

Genus Anabaena

Specie *Anabaena siamensis*



รูปที่ 1 ลักษณะรูปร่างของ *Anabaena siamensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase : acceptor oxidoreductase, EC 1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99) เป็นเอนไซม์ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและสลายไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจน ปฏิกิริยาที่ผันกลับของเอนไซม์แสดงดังสมการ

$$H_2 \xleftarrow{\text{hydrogenase}} 2H^+ + 2e^-$$

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกได้ 2 ชนิดตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

2.4.1 "Unidirectional" หรือ "Uptake" hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน เป็นเอนไซม์ที่ได้จากการถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hup* (*hup* มาจาก hydrogen uptake) ซึ่งประกอบด้วยยีน 2 ชนิดที่ทำงานร่วมกัน คือยีน *hup* และ ยีน *hupS*

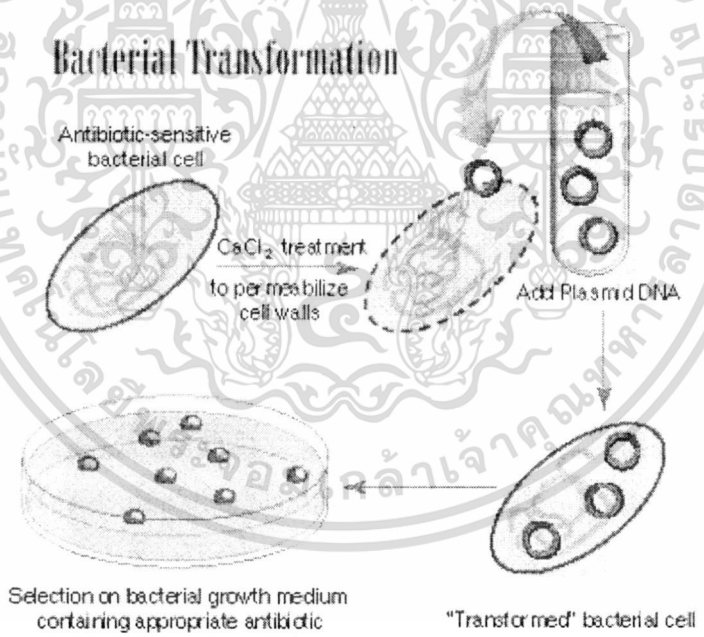
2.4.2 "Bidirectional" หรือ "Reversible" hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน และปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน เป็นเอนไซม์ที่ได้จากการถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hox* (*hox* มาจาก hydrogen oxidation) ซึ่งประกอบด้วยยีนหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสที่พบในไซยาโนแบคทีเรีย จะพบเฉพาะในบริเวณเฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน แต่อาจพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ไม่ตรึงไนโตรเจนบางชนิดเช่นกัน (Peschek, 1997 a;b) เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสจะพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียทั่วไป ปัจจุบันมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน *Anacystis nidulans* (Schmitz *et al.*, 1995; Boison *et al.*, 1996) และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC6803 (Appel and Schulz, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* (transformation) เป็นการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าไปสู่เซลล์ของแบคทีเรียที่เป็น competent cell (เซลล์ที่สามารถรับและนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้) และเป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับใช้ในงานทางด้านพันธุวิศวกรรม เช่น การโคลนยีน การสร้างพลาสมิดใหม่ ฯลฯ การเตรียม competent cell อาจมีวิธีการแตกต่างกันได้ แต่สำหรับการทรานสฟอร์ม competent cell ด้วยพลาสมิดนั้นจะมีลักษณะที่เหมือนกันคือ ใช้แคทไอออนมาทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียมีช่องว่าง และใช้ความร้อน (heat shock) กระตุ้นให้พลาสมิดเข้าสู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย สำหรับเวคเตอร์ที่ใช้เป็นพาหะในการโคลนยีนส่วนใหญ่มักประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะและยีนที่สร้างแอลฟาเปปไทด์ของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เพื่อใช้ในการแยกทรานสฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่มีดีเอ็นเอสายผสมออกจากทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับเฉพาะเวคเตอร์



รูปที่ 3 การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

ที่มา http://www.accessexcellence.org/AB/WYW/cohen/transformation.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์แบบที่ 1 และแบบที่ 3 จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดไม่แน่นอน และในปฏิกิริยายังมีการแข่งขันระหว่างการตัดดีเอ็นเอและการเติมหมู่เมธิล ด้วยเหตุนี้เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาการโคลนยีนจึงเป็นเอนไซม์แบบที่ 2 เอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 2 นี้แยกได้จากแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่

*Eco*RI มาจาก *Escherichia coli* RY13 แยกได้เป็นชนิดแรก

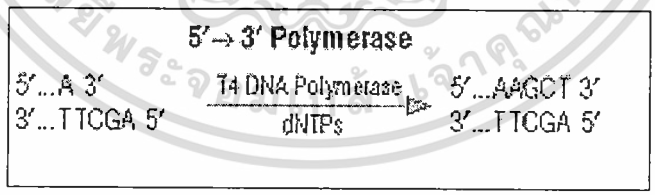
*Hin*dIII มาจาก *Haemophilus influenzae* แยกได้เป็นชนิดที่ 3

*Hae*III มาจาก *Haemophilus aegyptius* แยกได้เป็นชนิดที่ 3

*Pst*I มาจาก *Providencia stuartii* แยกได้เป็นชนิดแรก

2.10 เอนไซม์ T4 DNA polymerase

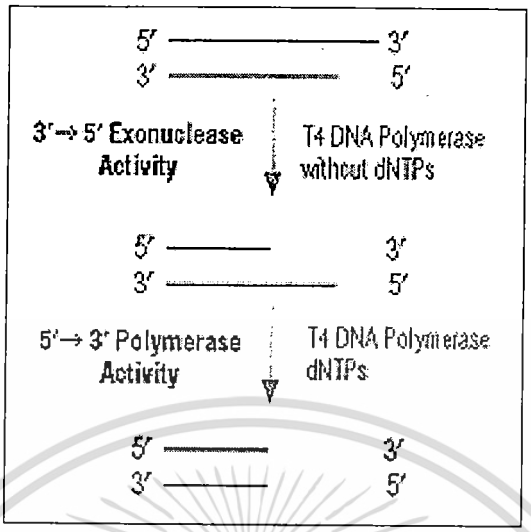
เอนไซม์นี้มีคุณสมบัติ 5'⟶3' polymerase และ 3'⟶5' exonuclease และยังใช้เปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ในกรณีที่ปลาย 3' ยาวกว่า 5' เนื่องจากเอนไซม์นี้มีประสิทธิภาพของ 3' ⟶ 5' exonuclease สูง การควบคุมปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหรือตัดดีเอ็นเอที่ปลาย 3' นั้นขึ้นกับดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ถ้ามี dNTPs ในปฏิกิริยา การตัดดีเอ็นเอ จะถูกยับยั้งโดยกิจกรรมของเอนไซม์ polymerase (รูปที่ 4) แต่ถ้าไม่มี dNTPs ในปฏิกิริยา เอนไซม์ exonuclease จะทำงานโดยตัดนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ออก (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 การทำงานของเอนไซม์ T4 DNA polymerase ที่มี dNTPs ในปฏิกิริยา

ที่มา http://www.promega.com/pnotes/54/5105f/1244ma09.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 การทำงานของเอนไซม์ T4 DNA polymerase ที่ไม่มี dNTPs ในปฏิกิริยา
ที่มา **http://www.promega.com/pnotes/54/5105f/1244ma09.gif**

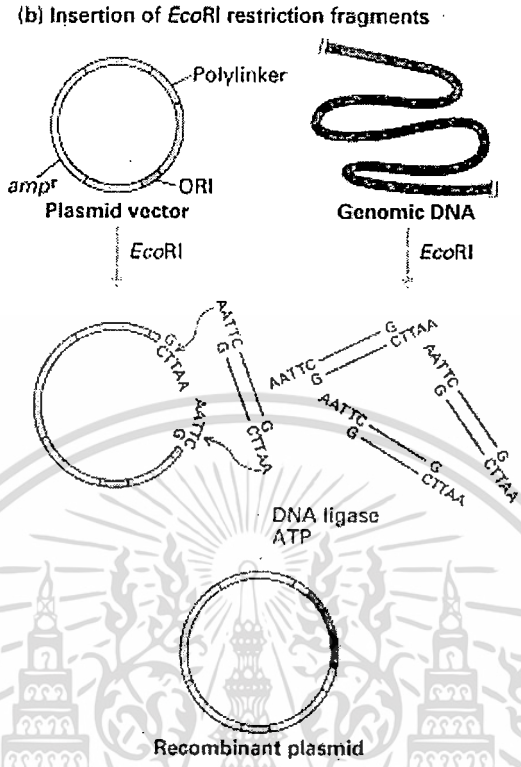
2.11 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ เกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ระหว่างหมู่ฟอสเฟตบนปลาย 5' กับหมู่ไฮดรอกซิลบนปลาย 3' ปฏิกิริยาการสร้างพันธะดังกล่าวต้องอาศัยเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ไลเกส (ligase) เป็นตัวเร่ง และพบว่ามีปัจจัยสำคัญ 2 ประการ ซึ่งมีผลต่อการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ คือ i และ j (วัฒนาลัยและสรวง, 2536) โดย

i คือ ค่าความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอทั้งหมด โดยหมายความถึงทั้งปลาย 5' และปลาย 3' ของดีเอ็นเอทุกโมเลกุลในปฏิกิริยา

และ j คือ ค่าความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอปลายหนึ่งๆ (5' หรือ 3') เฉพาะที่อยู่ใกล้กับปลายตรงข้าม (3' หรือ 5') ของโมเลกุลเดียวกัน ค่า j จึงเป็นสัดส่วนผกผันกับความยาวของโมเลกุลดีเอ็นเอ โมเลกุลดีเอ็นเอยาวมากขึ้นเท่าใดก็ทำให้ปลายทั้งสองมีโอกาสเข้าใกล้กันน้อยลงเท่านั้น นอกจากนี้ค่า j ยังเป็นค่าคงที่เฉพาะสำหรับโมเลกุลหนึ่งๆ และไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอในปฏิกิริยานั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอด้วย DNA ligase ตำแหน่งที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI
ที่มา http://homepages.strath.ac.uk/~dfs99109/BB310/Lod7-8bEcoRIsubcloning.JPG

2.12 เทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส

อิเล็คโตรโฟเรซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันทั่วไปในการวิเคราะห์กรดนิวคลีอิค ซึ่งทำให้ทราบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่กำลังวิเคราะห์ หลักการของอิเล็คโตรโฟเรซิส คือการแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอตามขนาดและรูปร่าง โดยใช้กระแสไฟฟ้า ดีเอ็นเอมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต ทำให้มีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า ก็จะถูกแรงคลื่นไฟฟ้าผลักให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก แผ่นเจลที่ใช้ในการแยกดีเอ็นเอมี 2 ชนิด คือ อะกาโรส (agarose) และพอลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) การเลือกใช้เจลชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการแยก การตรวจสอบสายของดีเอ็นเอที่มีขนาด 200 คู่เบสถึง 30 กิโลเบส หรือมวลโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตันขึ้นไป ควรใช้อะกาโรสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เช่น อะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้แยกกรดนิวคลีอิคที่มีมวลโมเลกุลสูงจนถึง 50,000 กิโล-ดาลตัน สำหรับพอลีอะคริลาไมด์เจลจะใช้สำหรับแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่ำกว่า 500 คู่เบส ดีเอ็นเอที่ใช้วิเคราะห์ควรมีปริมาณ 0.1 ถึง 1 ไมโครกรัม การใช้อะกาโรสเจลมักทำในแนวราบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *E. coli* DH5α (*supE*44 △*lac*U169 (ϕ80*lacZ*△M15) *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1)

3.2 พลาสมิด

3.2.1 pMV261 (ภาคผนวก 1)

3.2.2 pUTA (ภาคผนวก 2)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Tomy รุ่น autoclaves-325 ประเทศญี่ปุ่น

3.3.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) บริษัท Hermle-Labortech รุ่น Z383K ประเทศเยอรมนี

3.3.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) บริษัท Labnet รุ่น spectrafuge ประเทศเยอรมนี

3.3.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) บริษัท International Scientific Supply รุ่น HS123 ประเทศไทย

3.3.5 เครื่องผสมสาร (vortex) บริษัท Scientific Industries รุ่น Genie 2 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.6 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (incubater shaker) บริษัท New Brunswick Scientific รุ่น Innova 4,000 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.7 ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (incubater) บริษัท Scientific promotion รุ่น Binder control ประเทศญี่ปุ่น

3.3.8 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis equipments) บริษัท Pharmacia Biotech รุ่น GNA 100 ประเทศสวีเดน

3.3.9 เครื่องแก้ว (glasswares)

58927

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.10 เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลองขนาดเล็ก (Thermo-block) บริษัท Biosan รุ่น TDB-120 Thermostat ประเทศเยอรมนี

3.3.11 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) บริษัท Denver Instrument รุ่น 215 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.12 แหล่งกำเนิดไฟฟ้า (Power supply) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech รุ่น EPS 301 ประเทศสวีเดน

3.3.13 ชุดวิเคราะห์และถ่ายรูปอะกาโรสเจล (Documentation gel analysis) บริษัท Syngene รุ่น BTS-20.M ประเทศเยอรมนี

3.4 สารเคมี

3.4.1 บัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 7.5 (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์)

3.4.2 ฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ Tris- EDTA (TE-buffer saturated phenol)

3.4.3 โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.4.4 โซเดียมอะซีเตต (Sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2

3.4.5 ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Phenol-chloroform-isoamylalcohol) 25 ต่อ 24 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)

3.4.6 EDTA 0.5 โมลาร์

3.4.7 เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด

3.4.8 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด

3.4.9 อะกาโรส (Agarose)

3.4.10 บัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA 10 เท่า (Tris-HCl 0.89 โมลาร์, Boric acid 0.89 โมลาร์, EDTA 0.02 โมลาร์)

3.4.11 สีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye) (ภาคผนวก3)

3.4.12 เจลสตาร์ (Gel star) nucleic acid gel stain บริษัท BMA Biowhittaker Molecular Applications ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4.13 กลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ (86 % glycerol)

3.4.14 บัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$ buffer) (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, $CaCl_2$ 50 มิลลิโมลาร์)

3.4.15 ยาปฏิชีวนะคานามัยซิน (kanamycin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.16 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 2 มิลลิโมลาร์

3.5 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และเอนไซม์อื่นๆ ที่ใช้ในโครงการวิจัย

3.5.1 *Eco*RI 15 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Amersham)

3.5.2 *Spe*I 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Amersham)

3.5.3 *Bsa*BI 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Amersham)

3.5.4 *Hin*dIII 15 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Amersham)

3.5.5 *Pst*I 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Amersham)

3.5.6 T4 DNA ligase 3 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Amersham)

3.5.7 T4 DNA polymerase 3 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Amersham)

3.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker)

3.6.1 ดีเอ็นเอมาตรฐานแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (Promega)

3.6.2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (Promega)

3.7 วิธีการทดลอง

3.7.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5α

นำ *E. coli* DH5α 1 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก 4) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน ในกรณีที่ใช้ยาปฏิชีวนะกานามัยซิน จะเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.7.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการใช้ด่าง (lysis by alkaline)

เพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอดังข้อที่ 3.7.1 ทำการเก็บเซลล์โดยปิเปตเชื้อ 1.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 นาที ทิ้งส่วนของเหลวแล้วเติมเชื้อที่เหลือและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Spe*I

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	50
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Spe*I (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	5
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	5
10 เท่าบัฟเฟอร์ M	10
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	30
ปริมาตรสุทธิ	100

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ภายหลังการตัด ปลายของชิ้นส่วนยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่ได้จะมีลักษณะเป็นปลายเหนียว จากนั้นทำการเติมฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 100 ไมโครลิตร โซเดียมอะซีเตต 3 โมลาร์ ปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมทั้งหมด และเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรรวมทั้งหมด หลังจากนั้น นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นนำไปล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัดปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วคว่ำหลอดให้ดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 7.5 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

3.7.5 การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้บริสุทธิ์

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส ทำการตัดเจลบริเวณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยมีดที่สะอาด นำชิ้นส่วนของเจลที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIAquick gel extraction โดยนำหลอดทดลองที่มีเจลส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการมาเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยผสมให้เข้ากันทุก 2-3 นาทีจนครบเวลา 10 นาที จากนั้นทำการย้ายดีเอ็นเอที่อยู่ในบัฟเฟอร์ QG ลงใน QIAquick spin column ที่อยู่บน collection tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ใน collection tube แล้วนำ spin column วางบน collection tube เดิม จากนั้นทำการล้างดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ใน collection tube แล้วนำ spin column วางบน collection tube เดิม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาทีซ้ำอีกครั้ง ย้าย spin column ลงในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชะดีเอ็นเอให้หลุดจาก spin column โดยปิเปตบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน spin column วางทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ

3.7.6 การทำปฏิกิริยา T4 DNA polymerase

การทำปฏิกิริยา T4 DNA polymerase เป็นการทำปฏิกิริยาให้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอปลายเหนียวให้เป็นปลายทู่ โดยมีส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา T4 DNA polymerase

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ชิ้นส่วนยีนต้านยาปฏิชีวนะคานามัยซิน (20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	15
10 เท่า BSA	2.5
T4 DNA polymerase (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
2 มิลลิโมลาร์ dNTPs	2.5
10 เท่าบัฟเฟอร์ของ T4 DNA polymerase	2.5
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1.5
ปริมาตรสุทธิ	25

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 11 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการเติม EDTA 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา

3.7.7 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI

นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI โดยมีส่วนประกอบในการตัดดังแสดงในตารางที่ 3.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI (20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2
ชิ้นส่วนยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่ได้จาก พลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Spe*I และทำปฏิกิริยากับ T4 DNA polymerase (25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	4
10 เท่าบัฟเฟอร์ ligation	1
T4 DNA ligase (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	2
ปริมาตรสุทธิ	10

3.7.9 การเตรียม competent cell ของ *E. coli* DH5α

เพาะเลี้ยง *E. coli* DH5α ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อใส่ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์มากระจายในบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 15 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์มากระจายในบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิลิตร และกลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร แบ่งเก็บในหลอดทดลองขนาดเล็กหลอดละ 500 ไมโครลิตร นำไปใช้ทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ -70 องศาเซลเซียส

3.7.10 การนำรีคอมบีแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (transformation)

นำพลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (หัวข้อ 3.7.8) ทรานสฟอร์มใน competent cell โดยใช้พลาสมิด pBluescript และน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นตัวควบคุม ปิเปต competent cell 100 ไมโครลิตร และพลาสมิดลงในหลอดทดลองที่เย็น แล้วนำมาวางบนน้ำแข็ง 30 นาที หลังจากนั้นนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 90 วินาที วางบนน้ำแข็ง 3 นาที จากนั้นนำมาเติม

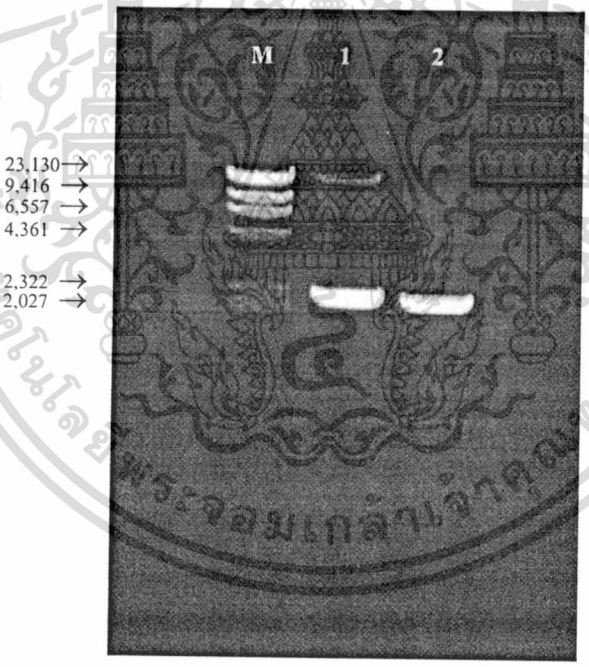
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 และ pUTA โดยการใช้ด่าง

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 และพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA ตามวิธีในข้อ 3.7.1 จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการใช้ด่าง (หัวข้อ 3.7.2) แล้วนำพลาสมิดที่ได้มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส (หัวข้อ 3.7.3) โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาหยอดลงในช่องของอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดโดยการใช้ด่าง

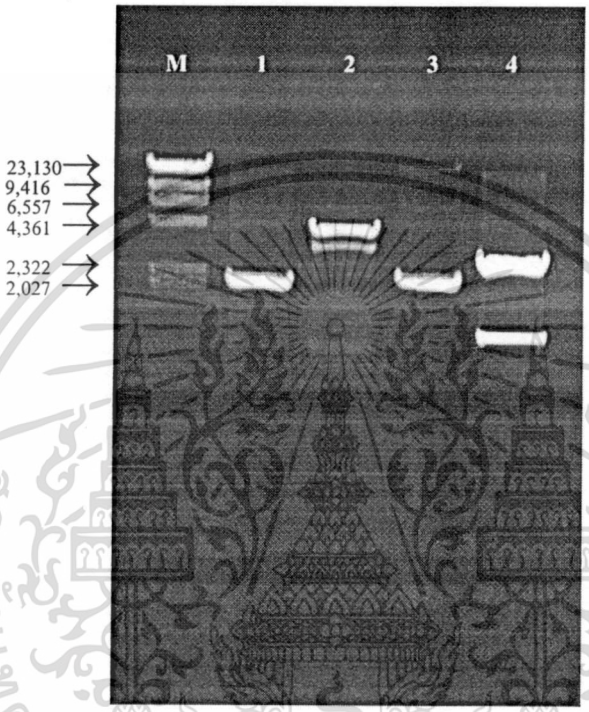
M ดีเอ็นเอมาตรฐานแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 พลาสมิด pUTA

2 พลาสมิด pMV261

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด 1,352 คู่เบสเป็นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีลักษณะปลายเหนียว จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้จากการตัดพลาสมิด pUTA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI และส่วนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่ได้จากการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Spe*I มาทำการแยกให้บริสุทธิ์



รูปที่ 8 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

M ดีเอ็นเอมาตรฐานแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 พลาสมิด pUTA

2 พลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI

3 พลาสมิด pMV261

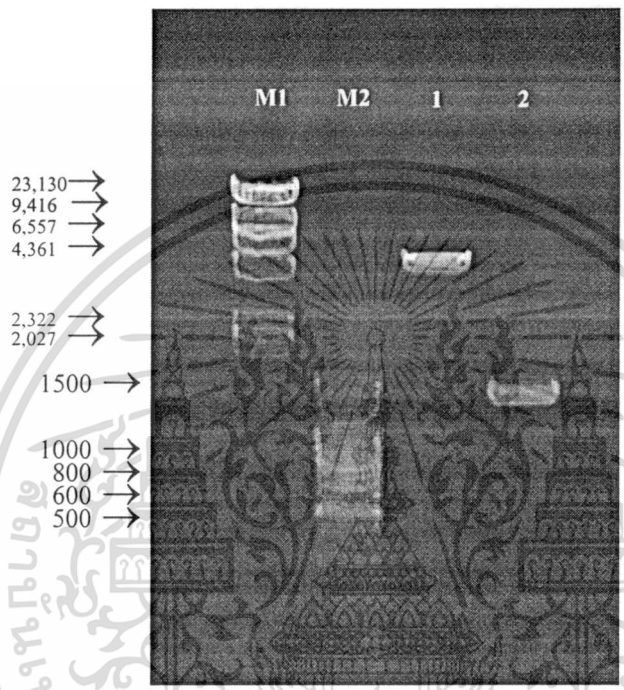
4 พลาสมิด pMV261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Spe*I

4.3 การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้บริสุทธิ์

นำพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดสารต่างๆ ที่รบกวนในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอ และนำพลาสมิด pMV261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Spe*I มาทำการแยกชิ้นส่วนยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน โดยนำพลาสมิดทั้งสองมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส ตัดเจลบริเวณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการด้วยมีดที่สะอาด นำชิ้นส่วนของเจลที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIAquick gel extraction (หัวข้อ 3.7.5) แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาหยอดลงในช่องของอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์

M1 ดีเอ็นเอมาตรฐานแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

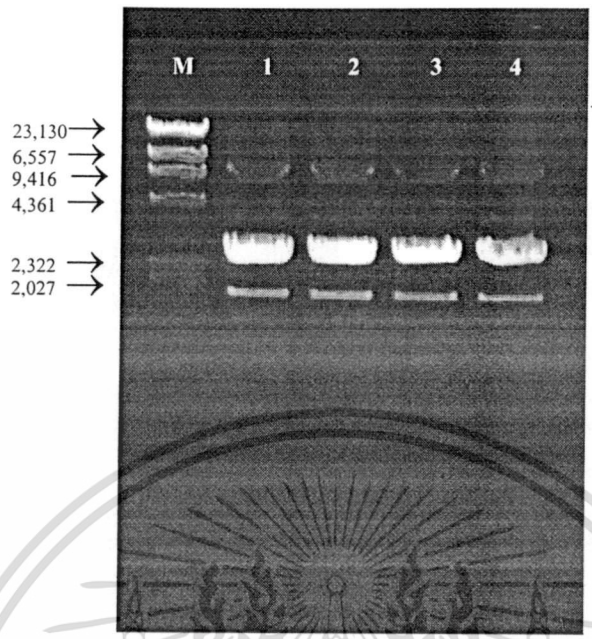
M2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp

1 พลาสมิด pUTA หลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์

2 ชิ้นส่วนยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin resistance cassette) หลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์

จากการทำพลาสมิดดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIAquick gel extraction พบว่าพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI ขนาดประมาณ 4,200 คู่เบสมีปริมาณ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับชิ้นส่วนยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่ได้จากการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Spe*I ขนาดประมาณ 1,300 คู่เบสที่มีปริมาณ 25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ทั้งสองไปสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

M ดีเอ็นเอมาตรฐานแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.1

2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.2

3 พลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.3

4 พลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.4

จากการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดโดยการใช้ด่าง พบว่าพลาสมิด pSP4.1 (ช่องที่ 1 รูปที่ 10), pSP4.2 (ช่องที่ 2 รูปที่ 10), pSP4.3 (ช่องที่ 3 รูปที่ 10) และpSP4.4 (ช่องที่ 4 รูปที่ 10) มีขนาดและปริมาณใกล้เคียงกัน โดยเมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากนั้นเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.1 ทำการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

4.5 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิด pSP4.1 (หัวข้อ 4.4) ปริมาณ 800 นาโนกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I ปริมาณ 20 ยูนิต และ *Eco*RI ปริมาณ 30 ยูนิต (หัวข้อ 3.7.11) หลังจากนั้น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส (หัวข้อ 3.5.3) โดยนำพลาสมิดดี-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิดลูกผสมที่คาด 5,710 คู่เบส จากการตัดพลาสมิด pSP4.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิด แสดงให้เห็นว่า พลาสมิด pSP4.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน อยู่ภายในบริเวณยีน *hup*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ในโครงการวิจัยนี้สามารถนำไปศึกษาและค้นคว้าวิจัยโดยการนำพลาสมิดลูกผสมนี้เข้าสู่เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* เพื่อสร้างสายพันธุ์กลายและศึกษาลักษณะของสายพันธุ์กลายที่ได้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oxelfelt, F., Tamagnini, P., Salema, R., and Lindblad, P. (1995) Hydrogen uptake in *Nostoc sp.* Strain PCC 73102 : Effects of nickel, hydrogen, carbon and nitrogen. Plant Physiol. Biochem. 33:617-623.

Oxelfelt, F., Tamagnini, P., and Lindblad, P. (1998) Hydrogen uptake in *Nostoc sp.* strain PCC 73102. Cloning and characterization of a *hupSL* homologue. Arch. Microbiol. 169:267-274.

Peschek, G.A. (1979a) Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. H_2-dependent photoreduction and related reactions. Biochim. Biophys. Acta 548:187-202.

Peschek, G.A. (1979b) Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. The oxyhydrogen reaction. Biochim. Biophys. Acta 548:203-221.

Schmitz, O., Boison, G., Hilscher, R., Hundeshagen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F., and Bothe, H. (1995) Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. Eur. J. Biochem. 233:266-276.

Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wunschiers, R., and Lindbland. P. (2002) Hydrogenase and hydrogen metabolism of cyanobacteria. Microbiology and molecular biology. 66:1-20.

Milne, T.A., Elam, C.C., and Evans, R.J. (2001) Hydrogen from biomass state of the art and research challenges. A report for the international energy agency agreement on the production and utilization of hydrogen task 16, hydrogen from carbon-containang material. USA

http://www.eere.energy.gov/consumerinfo/refbriefs/a109.html

http://www.promega.com/pnotes/54/5105f/1244ma09.gif

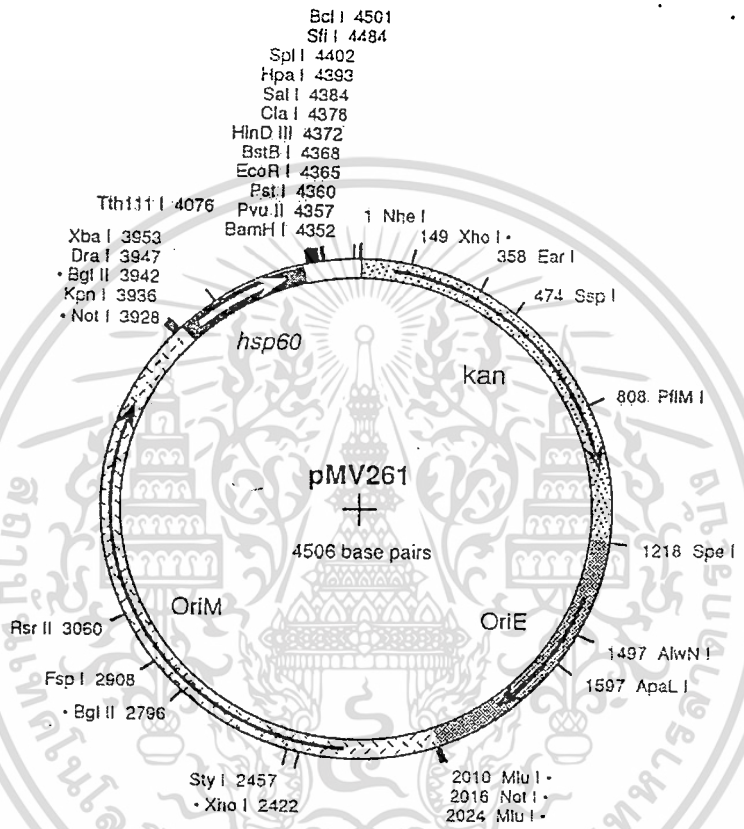
http://www.accessexcellence.org/AB/WYW/cohen/transformation.gif

http://homepages.strath.ac.uk/~dfs99109/BB310/Lod7-8bEcoRIsubcloning.JPG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 1

พลาสมิด pMV261



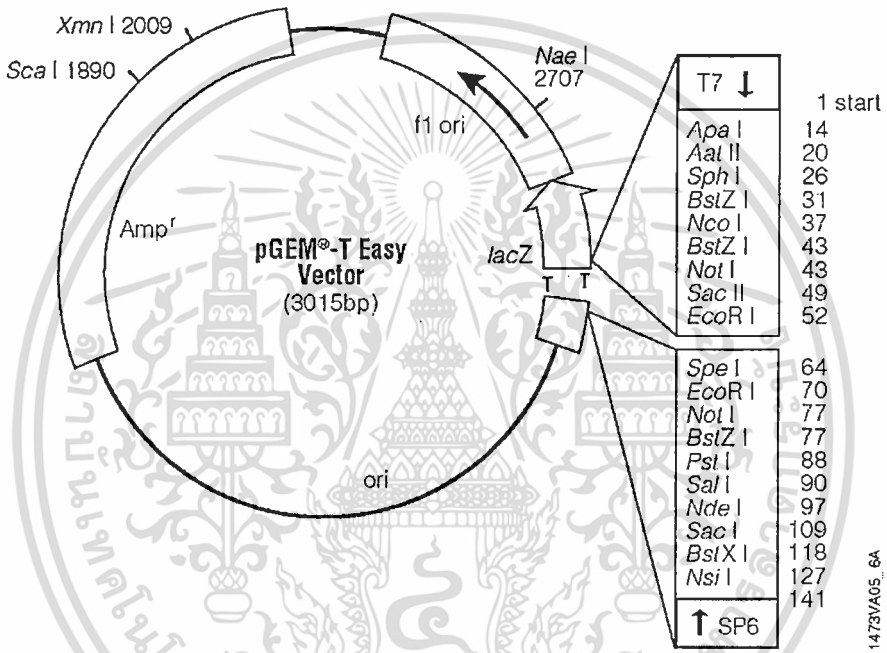
รูปที่ 12 พลาสมิด pMV261

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 2

พลาสมิด pUTA

เป็นพลาสมิดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณชมาภรณ์ ธงเพ็ง โดยพลาสมิดนี้เกิดจากการนำชิ้นส่วนของยีน *hup* สอดแทรกเข้าไปในพลาสมิด pGEM-T Easy ที่ตำแหน่งปลาย T ซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 พลาสมิด pGEM-T Easy

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 3

ส่วนประกอบสีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye)

ซูโครส หรือ กลีเซอรอล	40	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
โบรโมฟีนอลบลู	0.25	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
Tris-boric-EDTA	1	เท่า

ชั่งซูโครสหรือกลีเซอรอล 4 กรัม และโบรโมฟีนอลบลู 0.25 กรัม ละลายใน Tris-boric-EDTA 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 4

ส่วนประกอบอาหารเหลว LB

ทริปโทน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร และปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้เป็น 7.4 หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร สำหรับอาหารแข็งเติมวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร การเติมยาปฏิชีวนะ จะทำการเติมหลังจากที่อาหารผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เรียบร้อยแล้ว รอให้อาหารมีอุณหภูมิไม่สูงเกินไป เพื่อป้องกันการเสียสภาพของยาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 5

สารละลายที่ใช้สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการใช้ด่าง

ส่วนประกอบของ solution I

กลูโคส	50	มิลลิโมลาร์
Tris-HCl (pH8.0)	25	มิลลิโมลาร์
EDTA	10	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบของ solution II

โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.2	นอร์มาล
โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต	10	เปอร์เซ็นต์

ส่วนประกอบของ solution III

โพแทสเซียมอะซีเตต	5	โมลาร์
กรดกราเซียลอะซีติก	11.5	เปอร์เซ็นต์

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้