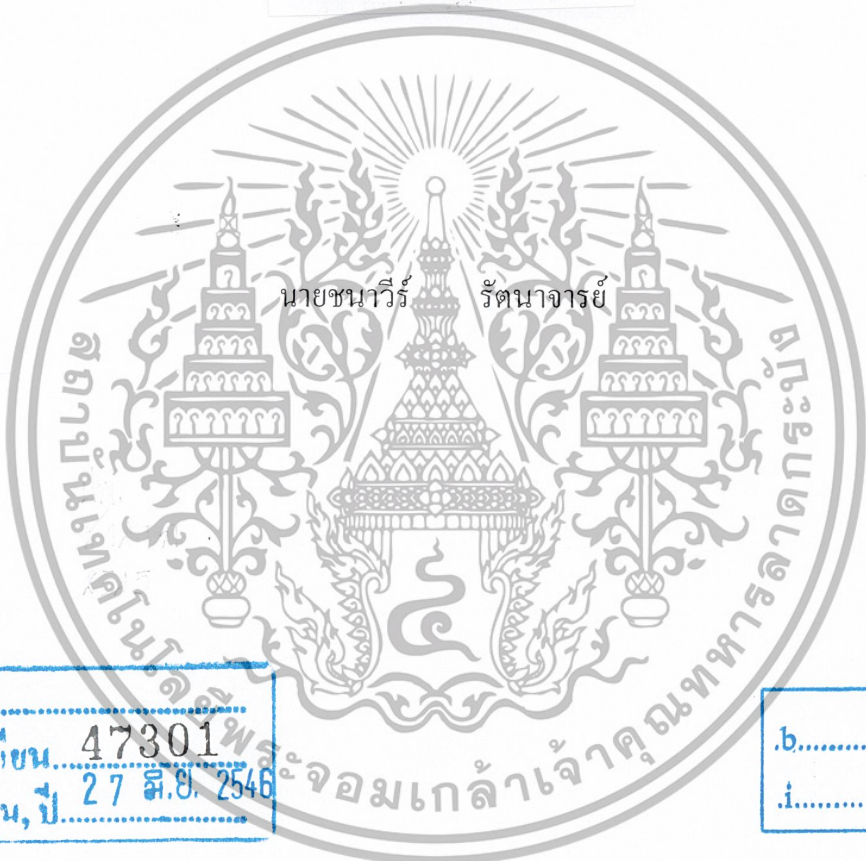


# สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การกลายพันธุ์ของยีน *hupL* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*



เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 47301  
วัน, เดือน, ปี..... 27 ส.ย. 2546

.b.....  
.i.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต  
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์  
คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mutation of *hupL* gene in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*



A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of  
Bachelor of Science  
Department of Applied Biology  
Faculty of Science  
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang  
Academic year 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง การกลายพันธุ์ของยีน *hupL* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน  
*Anabaena siamensis*

นักศึกษา นายชนาวีร์ รัตนอาจารย์ รหัสประจำตัว 42050149

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.สร้อยญา พันธุ์พลักษณ์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร-บัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ	ดร.สร้อยญา พันธุ์พลักษณ์	
กรรมการ	ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล	

  
 (รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	การกลายพันธุ์ของยีน <i>hupL</i> ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน <i>Anabaena siamensis</i>
นักศึกษา	นายชนาวีร์ รัตนจารย์ รหัสประจำตัว 42050149
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย

### บทคัดย่อ

ในปัจจุบัน การใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องด้วยพลังงานเหล่านี้เป็นพลังงานธรรมชาติที่มีอยู่อย่างจำกัด หน่วยงานต่างๆ ทั่วโลกจึงได้มีความพยายามในการศึกษาและค้นหาพลังงานทางเลือกใหม่ ไบโอดีเซลที่ผลิตจากการใช้พลังงานแสงอาทิตย์ และเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย จัดเป็นแหล่งพลังงานที่น่าสนใจมากที่สุดแห่งหนึ่ง โดยเมื่อเผาผลาญไฮโดรเจนจะไม่ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ในโครงการพิเศษนี้ ได้ทำการสร้างพลาสมิดลูกผสมที่ได้ชิ้นส่วนของยีนด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินเข้าไปในบริเวณยีน *hupL* โดยเริ่มจาก สกัดพลาสมิด pUTA และ pMV261 โดยการใช้ค้ำ นำพลาสมิด pUTA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsaBI* จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ตัดได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIAquick gel extraction ส่วนพลาสมิด pMV261 นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* จะได้ชิ้นส่วนยีนด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินขนาด 1,352 คู่เบส จากนั้นแยกชิ้นส่วนที่มียีนด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ T4 DNA polymerase เพื่อสร้างปลายที่ หลังจากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsaBI* ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ก่อนการทำทรานสฟอร์มไปยั้ง *E. coli* เมื่อนำมาทดสอบบนอาหารเลี้ยง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน พบว่ามี 4 โคลนที่เจริญ นำโคลนทั้ง 4 มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการใช้ค้ำ พบว่าพลาสมิดที่ได้มีลักษณะไม่แตกต่างกัน จึงเลือกพลาสมิด pSP4.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *PstI* จากการตัดพลาสมิด pSP4.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* พบว่าพลาสมิดที่ได้มีขนาดประมาณ 5,500 คู่เบสซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวังไว้คือ 5,710 คู่เบส นอกจากนี้เมื่อตัดพลาสมิด pSP4.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบแถบ 3 แถบที่มีขนาดประมาณ 300, 2,300 และ 3,000 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวังคือ 308, 2,387 และ 3,015 คู่เบส จากผลที่กล่าวมาข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า พลาสมิด pSP4.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินอยู่ภายในบริเวณยีน *hupL*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Special Project Title** Mutation of *hupL* gene in the nitrogen-fixing cyanobacterium  
*Anabaena siamensis*

**Name** Mr. Chanavee Ratanajaraya

**Department** Applied Biology

**Program** Biotechnology

**Academic year** 2002

**Special Project Advisor** Dr. Saranya Phunpruch

### ABSTRACT

Nowadays the use of energy has been increased rapidly. Due to the limited natural energy resource, many organisms worldwide have attempted to search and find out the new alternative energy source. Biohydrogen produced by using solar energy and the enzyme hydrogenase in cyanobacteria is one of the most interesting sources of energy without significant impacts on the global environment. In this project, the recombinant plasmid in which *hupL* region was inserted with the kanamycin-resistance cassette was constructed. Plasmid DNAs pUTA and pMV261 were isolated by alkaline lysis method. Plasmid pUTA was cut by restriction endonuclease *Bsa*BI and subsequently purified by using QIAquick gel extraction. Plasmid pMV261 was cut by restriction endonucleases *Hind*III 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 *E. coli*. 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 was the new recombinant plasmid in which the *hupL* region was inserted to the kanamycin-resistance cassette.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย คณะกรรมการโครงการพิเศษ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ และผศ.ดวงใจ โอชัยกุล ตลอดจนอาจารย์ท่านอื่นที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ และประสบการณ์ที่เป็นประโยชน์แก่ผู้จัดทำ ด้วยเหตุนี้ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

นอกจากนี้ ผู้จัดทำขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่คอยอำนวยความสะดวกและคอยเอื้อเฟื้อ ให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ระหว่างการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณ พี่วิภาวี แบบประเสริฐ พี่ชมภรณ์ ธงเพ็ง และพี่เชษฐ รัตนจารย์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ เพื่อให้เกิดความถูกต้องในการปฏิบัติงาน ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมดไว้ ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในทุกๆ ด้านจนโครงการพิเศษนี้สมบูรณ์ได้ด้วยดี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ .....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน.....	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....	4
2.1 ไชยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) (ลัดดา, 2542).....	4
2.2 <i>Anabaena siamensis</i> .....	5
2.3 การตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) (มนตรี, 2542).....	6
2.4 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส.....	7
2.5 ยีนที่ทำหน้าที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ฮัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ( <i>hupL</i> ).....	8
2.6 การกลายพันธุ์.....	8
2.7 ตัวพาหะในการพาดิเอ็นเอที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (สุรินทร์, 2543).....	9
2.8 การนำดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย <i>E. coli</i> .....	10
2.9 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (สุรินทร์, 2543).....	11
2.10 เอนไซม์ T4 DNA polymerase (สุรินทร์, 2543).....	12
2.11 การเชื่อมต่อดิเอ็นเอ (วัฒนาถัย และสรวง, 2536).....	13
2.12 เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (พรงาม, 2541).....	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	17
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	17
3.2 พลาสมิด.....	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3	อุปกรณ์ .....	17
3.4	สารเคมี.....	18
3.5	เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และเอนไซม์อื่นๆ ที่ใช้ในโครงการพิเศษ .....	19
3.6	ดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker) .....	19
3.7	วิธีการทดลอง.....	19
บทที่ 4	ผลการทดลองและอภิปรายผล .....	26
4.1	การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 และ pUTA โดยการใช้ต่าง .....	26
4.2	การตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i> และ <i>SpeI</i> และ พลาสมิด pUTA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BsaBI</i> .....	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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i> และ <i>SpeI</i> .....	21
ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา T4 DNA polymerase .....	22
ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BsaBI</i> .....	23
ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation .....	24
ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> .....	25
ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>PstI</i> .....	25



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่ 1	ลักษณะรูปร่างของ <i>Anabaena siamensis</i> .....	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 <i>EcoRI</i> .....	15
รูปที่ 7	การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดโดยการใช้ด่าง .....	26
รูปที่ 8	การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ .....	28
รูปที่ 9	พลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลังการทำให้บริสุทธิ์ .....	29
รูปที่ 10	พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม .....	31
รูปที่ 11	การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในอะกาโรส เจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ก) และอะกาโรสเจล 2.0 เปอร์เซ็นต์ (ข).....	32
รูปที่ 12	พลาสมิด pMV261 .....	38
รูปที่ 13	พลาสมิด pGEM-T Easy .....	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ

ในโลกปัจจุบัน การใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้นทุกวัน ซึ่งพลังงานส่วนใหญ่เป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป ไม่ว่าจะเป็นพลังงานจากถ่านหินหรือก๊าซธรรมชาติ หน่วยงานของรัฐและเอกชน จึงได้มีความสนใจในการค้นคว้าวิจัยเพื่อหาพลังงานทดแทนพลังงานที่ใกล้จะหมดไปในเวลาอันใกล้นี้ ไม่ว่าจะเป็นพลังงานน้ำ พลังงานลม พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานนิวเคลียร์ รวมถึงพลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน

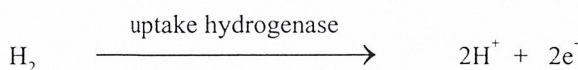
ก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากปฏิกิริยาทางเคมี แต่เนื่องจากการผลิตด้วยวิธีทางเคมีนี้เสียค่าใช้จ่ายสูง และมีความเสี่ยงต่อการระเบิด นักวิจัยจึงได้หันมาสนใจผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นจากแบคทีเรียหรือไซยาโนแบคทีเรีย โดยเรียกพลังงานไฮโดรเจนที่ได้จากสิ่งมีชีวิตว่า “ไบโอไฮโดรเจน” เนื่องด้วยการผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรีย จำเป็นต้องมีการให้ธาตุอาหารแก่แบคทีเรีย และต้องควบคุมสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (Thomas *et al.*, 2001) จึงได้มีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศเพื่อนำไปผลิตเป็นสารประกอบอินทรีย์จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยไม่จำเป็นต้องได้สารประกอบอินทรีย์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศจะผลิตไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจน โดยไนโตรเจนจะถูกรีดิวซ์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส และพร้อมกันนั้นจะรีดิวซ์โปรตอนเป็นไฮโดรเจน ไฮโดรเจนที่ได้จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอนโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

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

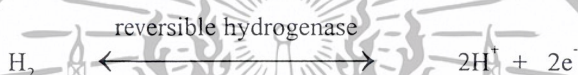
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกได้ 2 ชนิดตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

1. “Unidirectional” หรือ “Uptake” hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนดังสมการ



2. “Bidirectional” หรือ “Reversible” hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจนดังสมการ



เอนไซม์รีเวอร์ซิเบิลไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) พบได้ในไซยาโนแบคทีเรียทั่วไป แต่เอนไซม์อัปเดตไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase) พบได้ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนทุกชนิดและในไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่ตรึงไนโตรเจนบางชนิด เอนไซม์อัปเดตไฮโดรจีเนสถอดและแปลรหัสมาจากยีน 2 ชนิด คือยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัปเดตไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยเล็ก (*hupS*) และยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัปเดตไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) ด้วยเหตุนี้เราจึงได้มีแนวคิดในการเปลี่ยนแปลงยีนบริเวณ *hupL* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* สายพันธุ์ของประเทศไทยที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูง เพื่อให้สามารถสะสมผลิตภัณฑ์คือ แอมโมเนียและไฮโดรเจน สำหรับกลายเป็นปุ๋ยที่ได้อาจใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนให้แก่พืช และมีการสะสมไฮโดรเจนซึ่งถือว่าเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญมากขึ้น

## 1.2 วัตถุประสงค์

ศึกษาการสร้างพลาสมิดลูกผสมที่ใส่ชิ้นส่วนของยีนด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ลงในบริเวณยีน *hupL* ของพลาสมิด pUTA เพื่อนำไปสร้างไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* สายพันธุ์กลายต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการสร้างพลาสมิดลูกผสม โดยการใส่ชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ได้จากพลาสมิด pMV261 ลงในบริเวณยีน *hupL* ของพลาสมิด pUTA หลังจากนั้นทำการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่ได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

### 1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

- 1.4.1 สกัดพลาสมิด pUTA ที่มียีน *hupL* และพลาสมิด pMV261 ที่มีชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน
- 1.4.2 ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsaBI* ตัดบริเวณยีน *hupL* ของพลาสมิด pUTA และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *SpeI* ตัดพลาสมิด pMV261 ให้ได้ชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน
- 1.4.3 แยกชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน และพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsaBI* พร้อมทั้งทำให้บริสุทธิ์
- 1.4.4 ทำปฏิกิริยารังปลายูให้แก่นชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินด้วยเอนไซม์ T4 DNA polymerase
- 1.4.5 เชื่อมพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsaBI* กับชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีปลายยูด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase
- 1.4.6 ทรานสฟอร์มพลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมในแบคทีเรีย *E. coli* DH5 $\alpha$  แล้วจึงคัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน
- 1.4.7 สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากทรานสฟอร์มแมนท์ และตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน จากการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *PstI*

### 1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้พลาสมิดลูกผสมที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินอยู่ในบริเวณยีน *hupL*

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและหลักการ

#### 2.1 ไชยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) (ลัดดา, 2542)

ไชยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโพรคาริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย คุณสมบัติที่สำคัญของไชยาโนแบคทีเรียคือ มีรงควัตถุที่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน ซึ่งคุณสมบัตินี้ไม่พบในแบคทีเรียทั่วไป

ไชยาโนแบคทีเรียมีลักษณะที่สำคัญ 5 ประการ คือ

- 2.1.1 มีสารสีสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic pigments) ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แครโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน
- 2.1.2 ผนังเซลล์ของไชยาโนแบคทีเรีย แบ่งออกเป็น 2 ชั้น มีองค์ประกอบสำคัญคล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (gram negative) ที่เรียกว่ามิวโคเปปไทด์ (mucopeptide) ส่วนรอบนอกผนังเซลล์มักจะเป็นเมือกใสๆ ที่เรียกว่าชีท (sheath) หุ้มอยู่โดยรอบ ชีทนี้มีความหนาบางต่างกัน อาจมีสีหรือไม่มีสี หรือแบ่งออกเป็นชั้นๆ
- 2.1.3 ไชยาโนแบคทีเรียทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลา มีลักษณะการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement)
- 2.1.4 ผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นสารประเภทแป้งชนิดหนึ่งคือ แป้งไชยาโนไฟเซอิน (cyanophycean starch) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป โดยเรียกว่า ไชยาโนไฟซินแกรนูล (cyanophycin granule) แป้งไชยาโนไฟเซอินนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่นคือ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดงแทนที่จะได้สีน้ำเงิน
- 2.1.5 จัดเป็นโพรคาริโอต (prokaryote) แตกต่างจากพืชชั้นสูงจำพวกยูคาริโอต (eukaryote) คือสารสีไม่ได้อยู่ในพลาสติดแต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 *Anabaena siamensis*

*Anabaena* จัดเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นทริยโคมชนิดเดี่ยวๆ มีซีทหุ้ม เส้นสายตรงหรือม้วนเป็นวง บางครั้งอาจพบในลักษณะบิดเป็นเกลียว ในบางสายพันธุ์เซลล์มีรูปร่างแบบดั่งเบียร์ กลม หรือรูปสี่เหลี่ยม มีเฮเทอโรซิสต์อยู่ระหว่างเซลล์ บางครั้งอาจพบเฮเทอโรซิสต์อยู่ที่ปลายเซลล์

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

Division Cyanophyta

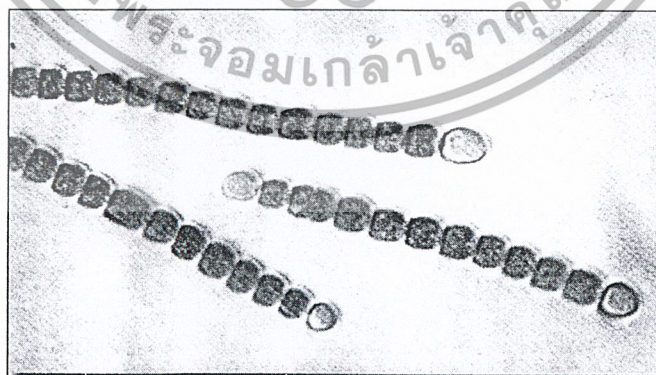
Class Cyanophyceae

Order Nostocales

Family Nostocaceae

Genus *Anabaena*

Specie *Anabaena siamensis*

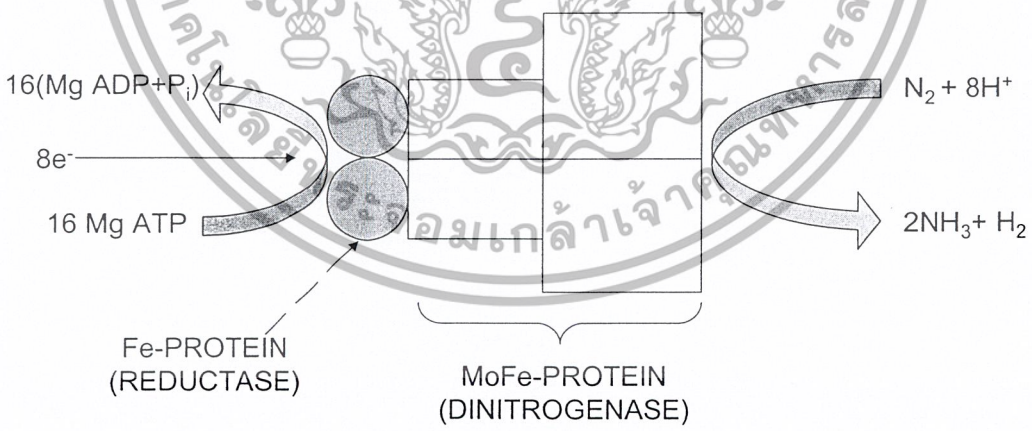


รูปที่ 1 ลักษณะรูปร่างของ *Anabaena siamensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3 การตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) (มนตรี, 2542)

แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศได้จะมีทั้งชนิดที่อยู่อย่างอิสระ และชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกัน (symbiosis) นอกจากแบคทีเรียแล้ว ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดก็สามารถตรึงไนโตรเจนได้เช่นกัน ในการตรึงไนโตรเจน เอนไซม์ nitrogenase complex (รูปที่2) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ โดยประกอบด้วยสองส่วน ส่วนแรกคือเอนไซม์รีดักเทส (reductase) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ (Fe-protein) ประกอบด้วยสองหน่วยย่อย ส่วนที่สองเป็นเอนไซม์ไดไนโตรจีเนส (dinitrogenase) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีทั้งธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมเป็นองค์ประกอบ (MoFe-protein) จึงสามารถเรียกเอนไซม์ชนิดนี้อีกชื่อหนึ่งว่าเอนไซม์โมลิบดีนัมไนโตรจีเนส โดยประกอบด้วยสี่หน่วยย่อย เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสส่วนแรกประกอบด้วยสองหน่วยย่อยที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนและสลาย ATP เพื่อผลักดันอิเล็กตรอนให้แก่ส่วนที่สอง ส่วนที่สองประกอบด้วยสองหน่วยย่อย ซึ่งจะทำหน้าที่รีดิวซ์ไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย แอมโมเนียที่สังเคราะห์ได้จะเข้าสู่ขบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโนและกรดนิวคลีอิกเป็นส่วนใหญ่ แหล่งของอิเล็กตรอนที่ใช้อาจได้มาจากเฟอร์รีดอกซินในรูปรีดิวซ์ หรือเฟลโวโปรตีนในรูปรีดิวซ์ ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ nitrogenase complex สามารถรีดิวซ์ไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียแล้ว ยังรีดิวซ์โปรตอนให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนอีกด้วย (รูปที่2) ไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นนี้จะถูกเปลี่ยนเป็นโปรตอนอีกครั้งด้วยเอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส

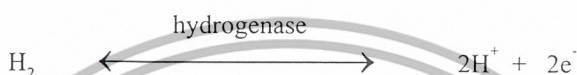


รูปที่ 2 องค์ประกอบและการทำงานของ Nitrogenase complex  
ที่มา มนตรี (2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

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



เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกได้ 2 ชนิดตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

- 2.4.1 “Unidirectional” หรือ “Uptake” hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน เป็นเอนไซม์ที่ได้จากการถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hup* (*hup* มาจาก hydrogen uptake) ซึ่งประกอบด้วยยีน 2 ชนิดที่ทำงานร่วมกัน คือยีน *hupL* และ ยีน *hupS*
- 2.4.2 “Bidirectional” หรือ “Reversible” hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน เป็นเอนไซม์ที่ได้จากการถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hox* (*hox* มาจาก hydrogen oxidation) ซึ่งประกอบด้วยยีนหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสที่พบในไซยาโนแบคทีเรียจะพบเฉพาะในบริเวณเฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน แต่อาจพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ไม่ตรึงไนโตรเจนบางชนิดเช่นกัน (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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 ยีนที่ทำหน้าที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัทเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*)

ยีนอัทเทคไฮโดรจีเนสประกอบด้วยยีน 2 ชนิดที่ถอดและแปลรหัสร่วมกัน คือ ยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัทเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยเล็ก (*hupS*) และยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัทเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) Carrasco และคณะ (1995) ได้แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์อัทเทคไฮโดรจีเนสเป็นครั้งแรกและอธิบายการจัดเรียงดีเอ็นเอของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัทเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) ในระยะที่เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์ PCC7210 นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับยีนอัทเทคไฮโดรจีเนสในแบคทีเรีย *Rhodobacter capsulatus* โดยพบว่าการทำงานของเอนไซม์อัทเทคไฮโดรจีเนส จะมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์โมลิบดีนัมไนโตรจีเนส ที่เป็นส่วนสำคัญในกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Elsen *et al.*, 2000) ใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 ได้มีการศึกษาถึงผลของนิคเกิล ไฮโดรเจนและไนโตรเจนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (Oxelfelt *et al.*, 1995) และต่อมาได้มีรายงานการตีพิมพ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโครงสร้างของอัทเทคไฮโดรจีเนสใน *Nostoc* สายพันธุ์ดังกล่าว (Oxelfelt *et al.*, 1998)

## 2.6 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลักษณะพันธุกรรมที่เกิดขึ้น โดยลักษณะที่เปลี่ยนแปลงนี้สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นถัดไป การกลายพันธุ์ทางด้านเทคนิคของพันธุวิศวกรรมสามารถทำได้ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

- 2.6.1 การลบออก (deletion) เป็นการนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนที่สนใจ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ตำแหน่งที่บริเวณระหว่างยีนที่สนใจ แล้วทำการสอดแทรกชิ้นเครื่องหมายเข้าแทนที่ ลักษณะของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้รับยีนเครื่องหมายจะแสดงออกตามคุณสมบัติของยีนเครื่องหมายนั้นๆ
- 2.6.2 การสอดแทรก (insertion) เป็นการนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนที่สนใจ มาตัดยีนที่สนใจนั้นออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ตำแหน่ง แล้วทำการสอดแทรกชิ้นเครื่องหมายเข้า ณ บริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้รับยีนเครื่องหมายจะแสดงออก ตามคุณสมบัติของยีนเครื่องหมายนั้นๆ

## 2.7 ตัวพาหะในการพาดิเอ็นเอที่สนใจเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (สุรินทร์, 2543)

ดิเอ็นเอพาหะ (vector) ที่ใช้ในงานพันธุกรรมต้องมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนได้เองในเซลล์เจ้าบ้าน โดยไม่ขึ้นกับเซลล์เจ้าบ้าน ตัวพาหะเหล่านี้ได้แก่ พลาสมิด (plasmid) ฟาจ (phage) และคอสมิด (cosmid) การเลือกใช้ตัวพาหะชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของนิวคลีโอไทด์ในดิเอ็นเอที่สนใจ กล่าวคือดิเอ็นเอที่สนใจมีขนาดประมาณ 5, 22 และ 40 กิโลเบส จะนิยมใช้พลาสมิด ฟาจ และคอสมิดเป็นตัวพาดิเอ็นเอชนิดนั้นๆ ตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อรักษาสภาพของดิเอ็นเอที่สนใจเมื่อทำการเชื่อมต่อดิเอ็นเอที่สนใจกับตัวพาหะที่ใช้

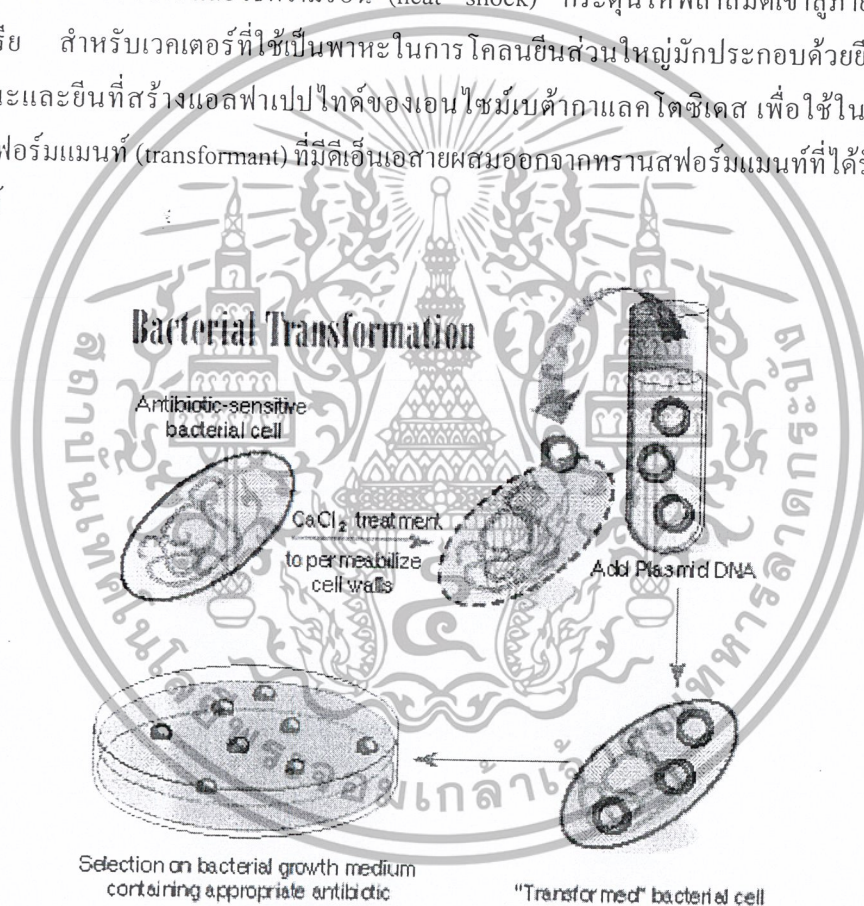
พลาสมิดเป็นดิเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรียหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ พันเกลียวซ้อนเกลียว (supercoil) มีขนาดตั้งแต่ 1 พันคู่เบสจนถึงมากกว่า 200,000 คู่เบสหรือประมาณ 0.2-4 เมอร์เซ็นต์ของโครโมโซม พลาสมิดจะมีชิ้นซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์หรือสารที่มีประโยชน์ต่อแบคทีเรียในบางสถานะ ทำให้แบคทีเรียที่เป็นเจ้าของพลาสมิดมีคุณสมบัติพิเศษบางประการ อย่างไรก็ตาม พลาสมิดไม่ใช่สิ่งจำเป็นในเซลล์แบคทีเรียยกเว้นในบางสถานะเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจจะพบหรือไม่พบพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรียหนึ่งๆ โดยธรรมชาติ การถ่ายทอดพลาสมิดจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งที่ไม่มีพลาสมิดนั้น จะเกิดขึ้นโดยกระบวนการที่คล้ายกับการคอนจูเกชัน (conjugation) นั่นเอง พลาสมิดบางชนิดมีความสามารถในการส่งถ่ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้เรียกว่า conjugative หรือ self transmissible plasmid เนื่องจากในพลาสมิดมียีนที่ควบคุมการส่งถ่ายนั้นพลาสมิดชนิดนั้นคือยีน *tra* (transfer) อยู่ พลาสมิดบางชนิดไม่มียีน *tra* อยู่ในส่วนใดส่วนหนึ่งทำให้ไม่สามารถส่งพลาสมิดจากเซลล์เดิมไปสู่เซลล์ใหม่ได้จัดเป็น non conjugative plasmid คือขาดคุณสมบัติการเป็น self transmissible พลาสมิดกลุ่มหลังนี้จะส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ใหม่ โดยทำให้เซลล์ผู้รับเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ (competent cell) และสามารถรับเอาดิเอ็นเอจากภายนอกเข้าไปได้โดยกระบวนการทรานสฟอร์มเมชัน (transformation) การเลือกพลาสมิดที่เหมาะสมกับดิเอ็นเอที่สนใจ ควรจะคำนึงถึงหลักการ 2 ประการดังนี้

- 2.7.1 พลาสมิดสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการตัดดิเอ็นเอที่สนใจ จึงสามารถสร้างเป็นดิเอ็นเอลูกผสมได้
- 2.7.2 พิจารณาคุณสมบัติในการดีออกของพลาสมิด โดยเฉพาะยีนที่แสดงคุณสมบัตินี้สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันกับที่ตัดดิเอ็นเอที่สนใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 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 สำหรับเวกเตอร์ที่ใช้เป็นพาหะในการโคลนยีนส่วนใหญ่มักประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะและยีนที่สร้างแอลฟาเปปไทด์ของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เพื่อใช้ในการแยกทรานสฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่มีดีเอ็นเอสายผสมออกจากทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับเฉพาะเวกเตอร์



รูปที่ 3 การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.9 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (สุรินทร์, 2543)

ในการโคลนยีนนั้นต้องอาศัยเอนไซม์สำหรับตัดและเชื่อมต่อดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังต้องการเอนไซม์สำหรับปฏิกิริยาเฉพาะอีกหลายชนิด โดยเอนไซม์ที่สามารถจดจำและตัดดีเอ็นเอได้ เรียกว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

โดยทั่วไป แบคทีเรียจำนวนมากมีระบบป้องกันตัวเองจากการบุกรุกของดีเอ็นเอแปลกปลอมโดยจะตัดดีเอ็นเอที่แปลกปลอมนั้นออกเป็นชิ้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ในขณะที่ดีเอ็นเอของตัวเซลล์เองจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมธิลที่เบสจำเพาะนั้นก่อน จึงไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ ระบบที่กล่าวมานี้รวมเรียกว่า restriction modification ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ควบคู่กัน เอนไซม์ในระบบแบ่งเป็น 3 แบบ ตามลักษณะการทำงาน องค์ประกอบร่วมที่ใช้ และวิธีการตัดดีเอ็นเอ

แบบที่ 1 (type I) เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 3 ชนิด สามารถตัดดีเอ็นเอและเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมธิลเข้าไปที่เบสบางเบสได้ ในขณะที่เดียวกัน เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำที่จำเพาะ แต่จะตัดสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่ไม่จำเพาะห่างออกไป 400 ถึง 7,000 คู่เบส การตัดดีเอ็นเอต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน ( $Mg^{2+}$ ) อะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (ATP) และ S-adenosylmethionine (SAM)

แบบที่ 2 (type II) เป็นเอนไซม์ที่ใช้มากในการตัดต่อยีน เนื่องจากโมเลกุลไม่ซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์เพียงชนิดเดียว การตัดดีเอ็นเอจะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำหรือที่จุดใกล้เคียงกับบริเวณจดจำ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน และนอกจากเอนไซม์ที่ใช้แล้ว ในปฏิกิริยายังต้องการแมกนีเซียมไอออนอีกด้วย เอนไซม์แบบที่ 2 มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงอย่างเดียว การเติมหมู่เมธิลให้กับเบสอาศัยเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง

แบบที่ 3 (type III) ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 2 ชนิด เอนไซม์แบบนี้มีคุณสมบัติในการตัดจำเพาะและเติมหมู่เมธิลในขณะเดียวกัน การตัดดีเอ็นเอจะเกิดห่างจากบริเวณจดจำประมาณ 25 ถึง 27 คู่เบส ในปฏิกิริยาต้องมีแมกนีเซียมไอออนและ ATP แต่ไม่จำเป็นต้องมี S-adenosylmethionine แต่ถ้ามี S-adenosylmethionine จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และเอนไซม์จะสามารถเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

*EcoRI* มาจาก *Escherichia coli* RY13 แยกได้เป็นชนิดแรก

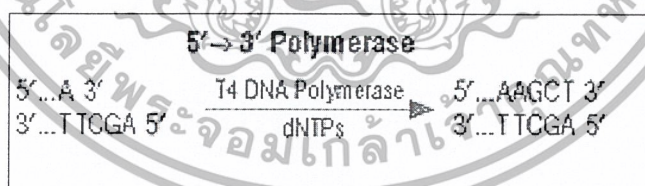
*HindIII* มาจาก *Haemophilus influenzae* แยกได้เป็นชนิดที่ 3

*HaeIII* มาจาก *Haemophilus aegyptius* แยกได้เป็นชนิดที่ 3

*PstI* มาจาก *Providencia stuartii* แยกได้เป็นชนิดแรก

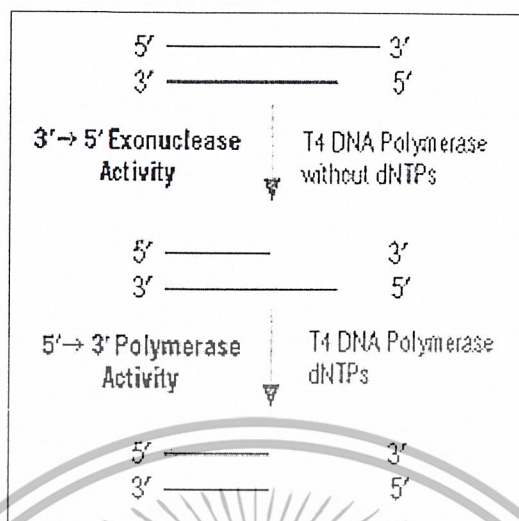
## 2.10 เอนไซม์ T4 DNA polymerase (ลูรินทร์, 2543)

เอนไซม์นี้มีคุณสมบัติ  $5' \rightarrow 3'$  polymerase และ  $3' \rightarrow 5'$  exonuclease และยังสามารถเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย  $3'$  ในกรณีที่มีปลาย  $3'$  ยาวกว่า  $5'$  เนื่องจากเอนไซม์นี้มีประสิทธิภาพของ  $3' \rightarrow 5'$  exonuclease ซึ่งใช้ในการควบคุมปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหรือตัดดีเอ็นเอที่ปลาย  $3'$  นั้นขึ้นกับคือออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (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>



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

## 2.11 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (วิธานลัย และสรวง, 2536)

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ระหว่างหมู่ฟอสเฟตบนปลาย 5' กับหมู่ไฮดรอกซิลบนปลาย 3' ปฏิกิริยาการสร้างพันธะดังกล่าวต้องอาศัยเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ไลเกส (ligase) เป็นตัวเร่งและพบว่ามีปัจจัยสำคัญ 2 ประการ ซึ่งมีผลต่อการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ คือ  $i$  และ  $j$  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  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทฤษฎีแล้ว สามารถใช้ค่า  $i$  และ  $j$  เข้าช่วยในการคาดคะเนถึงผลที่ควรจะได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอในแต่ละปฏิกิริยา กล่าวคือ

เมื่อ  $i = j$  ( $j/i = 1$ ) เป็นภาวะซึ่งมีโอกาสที่ปลายทั้งสองของโมเลกุลเดียวกัน จะมาเชื่อมต่อกันเองเป็น โมเลกุลวงกลมมีสูงเท่าๆ กับโอกาสที่มีโมเลกุลดีเอ็นเอทั้งหลายในปฏิกิริยาจะมาเชื่อมกันเป็นสายตรง

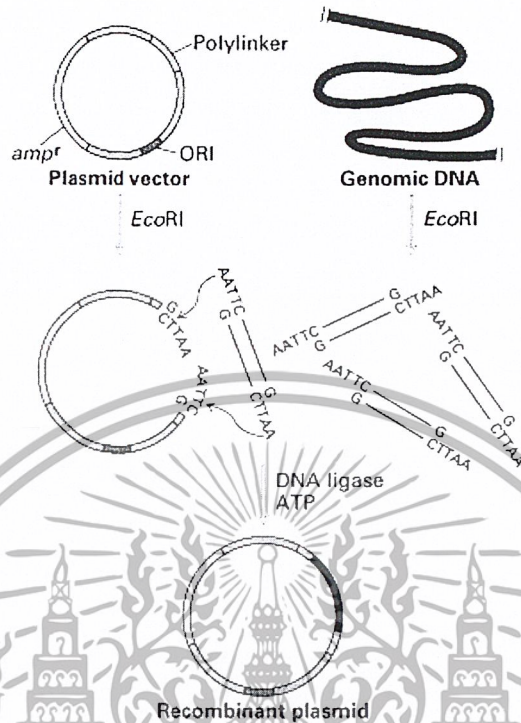
เมื่อ  $i > j$  ( $j/i > 1$ ) เป็นภาวะซึ่ง โอกาสที่ปลายทั้งสองของ โมเลกุลเดียวกัน จะมาเชื่อมต่อกันเองมีมากกว่า

เมื่อ  $i < j$  ( $j/i < 1$ ) เป็นภาวะซึ่ง โอกาสที่ปลายของ โมเลกุลทั้งหลายในปฏิกิริยา จะมาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรงมีมากกว่า

ในการสร้างดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) ซึ่งเป็นการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมาย จะต้องคำนึงถึงค่า  $i$  และ  $j$  ของทั้งเวกเตอร์และดีเอ็นเอนั้นๆ โดยทั่วไปค่า  $i$  ต้องสูงกว่าค่า  $j$  ราว 2 หรือ 3 เท่า และความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายต้องมากกว่าความเข้มข้นของเวกเตอร์ประมาณ 2 เท่า จึงจะทำให้ได้ดีเอ็นเอสายผสมที่คาดหวังไว้ อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติ การคำนวณค่า  $i$  และ  $j$  ไม่ใช่เรื่องง่ายเสมอไป เพราะบ่อยครั้งที่ดีเอ็นเอเป้าหมายมีอยู่น้อยเกินกว่าจะวัดปริมาณได้แน่นอน นอกจากนี้ เป็นไปได้ว่าในการเตรียมดีเอ็นเอเพื่อมาเชื่อมต่อ อาจทำให้ปลายบางปลายของดีเอ็นเอนั้นชำรุดไม่สมบูรณ์พอที่จะเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถวัดปริมาณความเข้มข้นของปลายดีเอ็นเอได้อย่างถูกต้อง

ฉะนั้นสำหรับการเชื่อมต่อต่างๆ ไป จึงมักกะเนให้ความเข้มข้นของเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมายมีอัตราส่วนน้อยกว่า หรือเท่ากับ 1 หรืออีกนัยหนึ่งก็คือ ใช้เวกเตอร์ในปริมาณเท่ากับหรือน้อยกว่าดีเอ็นเอเป้าหมายดังรูปที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(b) Insertion of *Eco*RI restriction fragments

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

## 2.12 เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (พรงาม, 2541)

อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันทั่วไปในการวิเคราะห์กรดนิวคลีอิก ซึ่งทำให้ทราบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่กำลังวิเคราะห์ หลักการของอิเล็กโตรโฟรีซิส คือการแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอตามขนาดและรูปร่าง โดยใช้กระแสไฟฟ้า ดีเอ็นเอมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต ทำให้มีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า ก็จะถูกแรงคลื่นไฟฟ้าผลักให้เคลื่อนที่จากขั้วลบ ไปสู่ขั้วบวก แผ่นเจลที่ใช้ในการแยกดีเอ็นเอมี 2 ชนิด คือ อะกาโรส (agarose) และพอลิอะครีลาไมด์ (polyacrylamide) การเลือกใช้เจลชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการแยก การตรวจสอบสายของดีเอ็นเอที่มีขนาด 200 คู่เบสถึง 30 กิโลเบส หรือมวลโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตันขึ้นไป ควรใช้อะกาโรสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เช่น อะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้แยกกรดนิวคลีอิกที่มีมวลโมเลกุลสูงจนถึง 50,000 กิโลดาลตัน สำหรับพอลิอะครีลาไมด์เจลจะใช้สำหรับแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่ำกว่า 500 คู่เบส ดีเอ็นเอที่ใช้วิเคราะห์ควรมีปริมาณ 0.1 ถึง 1 ไมโครกรัม การใช้อะกาโรสเจลมักทำในแนวราบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(horizontal gel electrophoresis) ในขณะที่พอลิอะคริลาไมด์เจลจะต้องทำในแนวตั้ง (vertical gel electrophoresis) ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอ คือ ขนาด รูปร่าง ดีเอ็นเอ และความเข้มข้นของเจลที่ใช้ กล่าวคือถ้าชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะผ่านตัวกลางหรือเจลได้ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก เป็นผลทำให้ดีเอ็นเอขนาดเล็กเคลื่อนที่ไปได้ไกล ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างขดเป็นวงเกลียว (supercoiled DNA) มักจะเคลื่อนผ่านเจลได้ดีกว่าดีเอ็นเอที่มีรูปร่างอื่น รองลงมาคือดีเอ็นเอคลายเป็นเส้น และดีเอ็นเอคลายเป็นวง เจลที่มีความเข้มข้นสูงๆ จะมีช่องว่างภายในเนื้อเจลน้อย ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนผ่านได้ช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำๆ หลังจากที่แยกดีเอ็นเอออกมาเป็นแถบบนอะกาโรสเจล โดยใช้เทคนิคของอิลีคโตรโฟเรซิสแล้ว ดีเอ็นเอสายคู่จะถูกย้อมด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) โครงสร้างของเอทิดียมโบรไมด์ เป็นอะโรมาติกแคโทไอออน ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ โดยเข้าไปแทรกตัวระหว่างคู่เบสที่ซ้อนกันแล้วจะให้ฟลูออเรสเซนส์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต การย้อมเจลด้วยเอทิดียมโบรไมด์ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ สำหรับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวสามารถให้ฟลูออเรสเซนส์เมื่อย้อมด้วยเอทิดียมโบรไมด์เช่นกัน แต่จะมีความไวน้อยกว่าดีเอ็นเอเกลียวคู่ นอกจากนี้ยังมีสีย้อมดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ เช่น อะคริดีนออเรนจ์ (acridine orange) หรือ โพรฟลาวิน (proflavin) และในปัจจุบัน ได้มีการใช้สีย้อมที่มีความเป็นอันตรายน้อยกว่าสีย้อมในอดีตได้แก่ เจลสตาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### บทที่ 3

## วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

- 3.1.1 *E. coli* DH5 $\alpha$  (*supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*)

#### 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-Labortechnik 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)

- 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 ชุดวิเคราะห์และถ่ายรูโปะกาโรสเจล (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 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 3.4.4 โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2
- 3.4.5 ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซอามิลแอลกอฮอล์ (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 สีข้อมติเอ็นเอ (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<sub>2</sub> buffer) (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, CaCl<sub>2</sub> 50 มิลลิโมลาร์)
- 3.4.15 ยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.16 คือออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 2 มิลลิโมลาร์

### 3.5 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และเอนไซม์อื่นๆ ที่ใช้ในโครงการพิเศษ

- 3.5.1 *EcoRI* 15 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Amersham)
- 3.5.2 *SpeI* 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Amersham)
- 3.5.3 *BsaBI* 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Amersham)
- 3.5.4 *HindIII* 15 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Amersham)
- 3.5.5 *PstI* 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 ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (Promega)
- 3.6.2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (Promega)

### 3.7 วิธีการทดลอง

- 3.7.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5 $\alpha$

นำ *E. coli* DH5 $\alpha$  1 โคลนินมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก 4) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน ในกรณีที่ชื้อยาปฏิชีวนะ กานามัยซิน จะเติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

- 3.7.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ด่าง (lysis by alkaline)

เพาะเลี้ยง *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอดังข้อที่ 3.7.1 ทำการเก็บเซลล์โดย ปิเปตเชื้อ 1.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 นาที ที่ส่วนของเหลวแล้วเติมเชื้อที่เหลือและนำไปปั่น เหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเซลล์ที่ผ่านการเก็บเซลล์มากระจายในสารละลาย solution I (ภาคผนวก 5) 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย solution II (ภาคผนวก 5) 200 ไมโครลิตร ทำการพลิกหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ จากนั้นเติมสารละลายสารละลาย solution III (ภาคผนวก 5) 150 ไมโครลิตร ทำการพลิกหลอดไปมา 10 วินาที วางทิ้งไว้บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 3-5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที ทำการย้ายส่วนใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด 2 เท่า วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วทำการล้างดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที कुछส่วนใส่ทิ้ง แล้วคว่ำหลอดให้ดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 7.5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

### 3.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 0.8 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA (TBE buffer) 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้น นำไปให้ความร้อนเพื่อให้อะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันในตู้ไมโครเวฟ (microwave) แล้วปล่อยให้อะกาโรสมีอุณหภูมิลดลง จากนั้นเติมเจลาสตาร์ ในอัตราส่วน 1 ต่ออะกาโรส 10,000 ส่วน และเทใส่แม่พิมพ์ตั้งไว้จนแผ่นเจลแข็ง หลังจากนั้น นำแผ่นเจลที่ได้ใส่ในอ่าง (chamber) ที่มีบัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA ทำการวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอโดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye ภาคผนวก 3) หลังจากนั้นหยอดลงในช่อง (well) ของแผ่นเจลที่เตรียมไว้ โดยทำการเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเพื่อดูแถบดีเอ็นเอ ถ่ายรูปแผ่นเจลและคำนวณหาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐาน

### 3.7.4 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Spe*I

นำพลาสมิด pMV261 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Spe*I โดยมีส่วนประกอบในการตัดดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Spe*I

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	50
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Spe</i> I (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	5
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	5
10 เท่าบัฟเฟอร์ M	10
น้ำกลั่นมาเชื้อ	30
ปริมาตรสุทธิ	100

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ภายหลังจากตัด ปลายของชิ้นส่วน ยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่ได้จะมีลักษณะเป็นปลายเหนียว จากนั้นทำการเติมฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 100 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตต 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 ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที คัดส่วนใสทิ้ง แล้วคว่ำหลอดให้ดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 7.5 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

### 3.7.5 การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้บริสุทธิ์

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 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 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 โดยบีบที่บัฟเฟอร์ 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)
ชิ้นส่วนยีนต้านยาปฏิชีวนะkanamycin (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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	10
10 เท่าบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ <i>Bsa</i> BI	3
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bsa</i> BI (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	3
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	4
ปริมาตรสุทธิ	20

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน โดยภายหลังการตัดพลาสมิด pUTA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI จะได้พลาสมิดที่มีปลายทู่ จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIAquick gel extraction (หัวข้อ 3.7.5)

### 3.7.8 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (ligation)

นำชิ้นส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Spe*I และทำปฏิกิริยาให้พลาสมิดมีปลายทู่กับ T4 DNA polymerase ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมสายดีเอ็นเอ แสดงไว้ในตารางที่ 3.4

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ligation

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดคิเอ็นเอ pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bsa</i> BI (20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2
ชิ้นส่วนยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่ได้จากพลาสมิดคิเอ็นเอ pMV261 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Spe</i> I และทำปฏิกิริยากับ T4 DNA polymerase (25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	4
10 เท่าบัฟเฟอร์ ligation	1
T4 DNA ligase (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
น้ำกลั่นมาเชื้อ	2
ปริมาตรสุทธิ	10

### 3.7.9 การเตรียม competent cell ของ *E. coli* DH5 $\alpha$

เพาะเลี้ยง *E. coli* DH5 $\alpha$  ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว 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 ที่ไว้บนน้ำแข็ง 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 การนำรีคอมบีแนนต์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (transformation)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการพลิกหลอดไปมาทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปิด 300 ไมโครลิตรมาทำเทคนิค spread plate ลงบนจานอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน บ่มข้ามคืน ทำ 3 ซ้ำ โดยเทียบกับตัวควบคุม

### 3.7.11 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอในลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *PstI*

คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน 1 โคโลนี มาทำการเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.7.1 จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยการใช้ดังตามวิธีในข้อ 3.7.2 นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เทียบกับการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดดังตารางที่ 3.5 และตารางที่ 3.6 ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	8
10 เท่าบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ <i>EcoRI</i>	2
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	2
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	8
ปริมาตรสุทธิ	20

ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	8
10 เท่าบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ <i>PstI</i>	2
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>PstI</i> (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	2
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	8
ปริมาตรสุทธิ	20

ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผล

#### 4.1 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 และ pUTA โดยการใช้ต่าง

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 และพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA ตามวิธีในข้อ 3.7.1 จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการใช้ต่าง (หัวข้อ 3.7.2) แล้วนำพลาสมิดที่ได้มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (หัวข้อ 3.7.3) โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาหยอดลงในช่องของอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดโดยการใช้ต่าง

- |   |   |
|---|---|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐานแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III |
| 1 | พลาสมิด pUTA  |
| 2 | พลาสมิด pMV261  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้คาง พบว่าพลาสมิด pUTA (ช่องที่ 1 รูปที่ 7) และพลาสมิด pMV261 (ช่องที่ 2 รูปที่ 7) มีขนาดและปริมาณใกล้เคียงกันโดยเมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่า พลาสมิดที่ได้ทั้งสองชนิดมีปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

#### 4.2 การตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *SpeI* และ พลาสมิด pUTA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsaBI*

นำพลาสมิด pMV261 ปริมาณ 5 ไมโครกรัมมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* ปริมาณ 50 ยูนิตและเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ปริมาณ 75 ยูนิต (หัวข้อ 3.7.4) พร้อมกันนี้ได้นำพลาสมิด pUTA ปริมาณ 2 ไมโครกรัมมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsaBI* ปริมาณ 30 ยูนิต (หัวข้อ 3.7.7) หลังจากนั้นนำพลาสมิดทั้งสองชนิดที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาทำการตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (หัวข้อ 3.7.3) โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาหยอดลงในช่องของอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 8

จากการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าในช่องที่มีพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsaBI* ปรากฏแถบเข้มบนแผ่นอะกาโรสเจล 1 แถบ (ช่องที่ 2 รูปที่ 8) มีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับแถบพลาสมิด pUTA ที่ยังไม่ผ่านการตัด (ช่องที่ 1 รูปที่ 8) จากการเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่าขนาดของพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีขนาดประมาณ 4,200 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวัง จากผลที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การตัดพลาสมิด pUTA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และขนาดพลาสมิด pUTA ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsaBI* มีขนาด 4,337 คู่เบสและมีลักษณะเป็นปลายทู่ สำหรับการตรวจสอบพลาสมิด pMV261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *SpeI* ปรากฏแถบเข้มบนแผ่นอะกาโรสเจล 2 แถบ (ช่องที่ 4 รูปที่ 8) คือขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส และขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวัง จากผลที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และขนาดพลาสมิด pUTA ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *SpeI* มีขนาด 3,154 คู่เบส และขนาด 1,352 คู่เบส โดยชิ้นส่วน

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



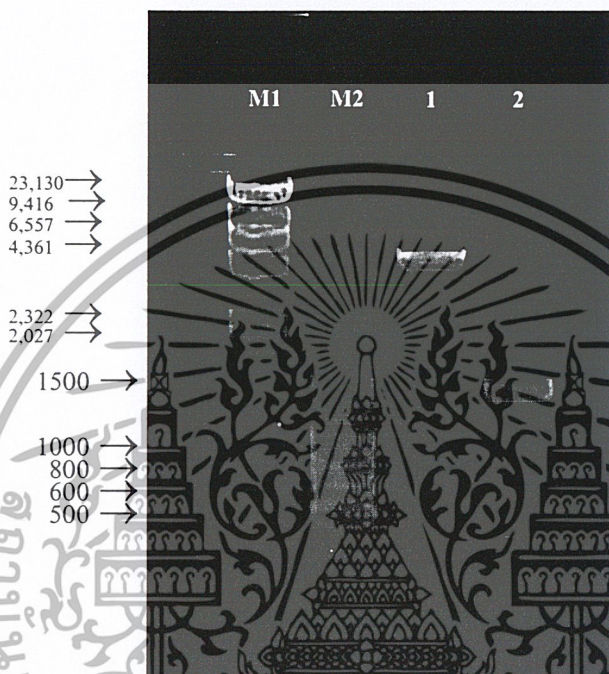
รูปที่ 8 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐานแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III
- 1 พลาสมิด pUTA
- 2 พลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI
- 3 พลาสมิด pMV261
- 4 พลาสมิด pMV261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Spe*I

#### 4.3 การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้บริสุทธิ์

นำพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดสารต่างๆ ที่รบกวนในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอ และนำพลาสมิด pMV261 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Spe*I มาทำการแยกชิ้นส่วนยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน โดยนำพลาสมิดทั้งสองมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ตัดเจลบริเวณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่

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



รูปที่ 9 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์  
 M1 ดีเอ็นเอมาตรฐานแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III  
 M2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp  
 1 พลาสมิด pUTA หลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์  
 2 ชิ้นส่วนยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin resistance cassette) หลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 การสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

##### 4.4.1 การเปลี่ยนสายดีเอ็นเอปลายเหนียวให้เป็นปลายทู่โดย T4 DNA polymerase

เป็นการนำชิ้นส่วนยีนด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีลักษณะของปลายเป็นปลายเหนียวที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทำให้เป็นปลายทู่ โดยใช้ชิ้นส่วนยีนด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ปริมาณ 150 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยากับ T4 DNA polymerase ปริมาณ 3 ยูนิต (หัวข้อ 3.7.6) ผลลัพธ์ที่ได้ควรมีลักษณะของปลายสายเป็นปลายทู่ เพื่อให้สามารถเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI ได้

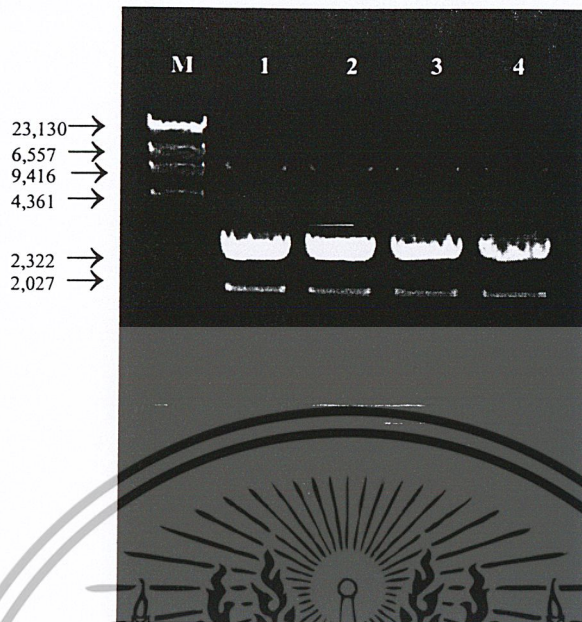
##### 4.4.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนยีนด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่ผ่านการทำปฏิกิริยา T4 DNA polymerase ปริมาณ 40 นาโนกรัม มาเชื่อมกับพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI ปริมาณ 40 นาโนกรัม ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ปริมาณ 3 ยูนิต (หัวข้อ 3.7.8) ผลลัพธ์ที่ได้ควรเป็นพลาสมิดที่มีลักษณะเป็นวงกลมที่มีชิ้นส่วนยีนด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน อยู่ในพลาสมิด pUTA เดิม

##### 4.4.3 การนำรีคอมบีแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

จากการนำผลลัพธ์ที่ได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ มาทำการถ่ายโอนไปยังภายในเซลล์ของ *E. coli* DH5 $\alpha$  (หัวข้อ 3.7.10) และตรวจสอบ *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม โดยทำการคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ผลที่ได้เกิดโคโลนีบนอาหาร 4 โคโลนี จากนั้นนำทรานสฟอร์มเม้นท์ที่ได้มาทำการเลี้ยงเชื้อ (หัวข้อ 3.7.1) สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการใช้ค่าง (หัวข้อ 3.7.2) โดยเรียกชื่อว่า pSP4.1, pSP4.2, pSP4.3 และ pSP4.4 แล้วนำผลลัพธ์ที่ได้มาทำการตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (หัวข้อ 3.7.3) โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาหยอดลงในช่องของอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

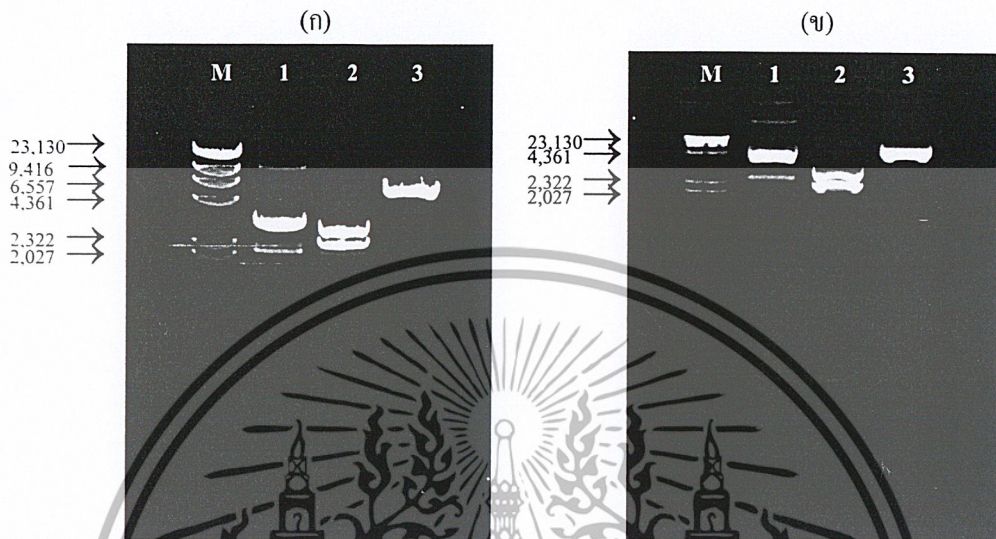
M	ดีเอ็นเอมาตรฐานแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i>
1	พลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.1
2	พลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.2
3	พลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.3
4	พลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.4

จากการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้การไล้ต่าง พบว่าพลาสมิด pSP4.1 (ช่องที่ 1 รูปที่ 10), pSP4.2 (ช่องที่ 2 รูปที่ 10), pSP4.3 (ช่องที่ 3 รูปที่ 10) และ pSP4.4 (ช่องที่ 4 รูปที่ 10) มีขนาดและปริมาณใกล้เคียงกัน โดยเมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า ผลลัพธ์ที่ได้มีปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากนั้นเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.1 ทำการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

#### 4.5 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิด pSP4.1 (หัวข้อ 4.4) ปริมาณ 800 นาโนกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* ปริมาณ 20 ยูนิต และ *EcoRI* ปริมาณ 30 ยูนิต (หัวข้อ 3.7.11) หลังจากนั้น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (หัวข้อ 3.5.3) โดยนำพลาสมิดดี-

เอ็นเอที่ได้มาหยอดลงในช่องของอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ก) และอะกาโรสเจล 2.0 เปอร์เซ็นต์ (ข)

- M ดีเอ็นเอมาตรฐานแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*  
 1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.1  
 2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*  
 3 พลาสมิดดีเอ็นเอ pSP4.1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI*

จากการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่า ในช่องที่มีพลาสมิด pSP4.1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ปรากฏแถบเข้ม 2 แถบบนแผ่นอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 11 ก ช่องที่ 2) และพบแถบ 3 แถบบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 11 ข ช่องที่ 2) จากการเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่า ขนาดของพลาสมิด pSP4.1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีขนาดประมาณ 300, 2,300 และ 3,000 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวังคือ 308, 2,387 และ 3,015 คู่เบส สำหรับพลาสมิด pSP4.1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* ปรากฏแถบเข้ม 1 แถบบนแผ่นอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 11 ก ช่องที่ 3) และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 11 ข ช่องที่ 3) จากการเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่าขนาดของพลาสมิด pSP4.1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีขนาดประมาณ 5,500 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของพลา-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลูกผสมที่คัด 5,710 คู่เบส จากการตัดพลาสมิด pSP4.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิด แสดงให้เห็นว่า พลาสมิด pSP4.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน อยู่ภายในบริเวณยีน *hupL*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ pMV261 และ pUTA แล้ว นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิดโดยใช้คาง พบว่าพลาสมิด pUTA และ pMV261 มีปริมาณเท่ากันคือ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากนั้น นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยภายหลังการตัดพลาสมิด pUTA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 4,200 คู่เบส และภายหลังการตัดพลาสมิด pMV261 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Spe*I จะพบแถบ 2 แถบคือ ชิ้นส่วนของพลาสมิด pMV261 ที่ไม่มีชิ้นด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินซึ่งมีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบสและชิ้นส่วนชิ้นด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินซึ่งมีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส จากนั้นนำส่วนของพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI และชิ้นส่วนชิ้นด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินมาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุดปฏิบัติการสำเร็จ QIAquick gel extraction แล้วนำชิ้นส่วนชิ้นด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ T4 DNA polymerase ให้เป็นปลายทู่ ทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*BI ซึ่งจะทำให้ได้พลาสมิดลูกผสม จากนั้นทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมไปยัง *E. coli* DH5 $\alpha$  ตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม โดยนำมาคัลเจอร์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน โดยพบ 4 โคลนินที่เจริญได้บนอาหาร จากนั้นนำทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้คาง พบว่าพลาสมิดทั้ง 4 ชนิดมีขนาดเหมือนกัน เลือกพลาสมิด pSP4.1 มาทำการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Pst*I พลาสมิด pSP4.1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จะพบแถบ 3 แถบ ที่มีขนาดใกล้เคียงกับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่คาดหวังคือ 308, 2,387 และ 3,015 คู่เบส สำหรับพลาสมิด pSP4.1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I จะพบแถบ 1 แถบ ที่มีขนาดใกล้เคียงกับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่คาดหวังคือ 5,710 คู่เบส จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าพลาสมิด pSP4.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนชิ้นด้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินอยู่ในบริเวณยีน *hupL*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

พลาสมิดลูกผสมที่ได้ในโครงการพิเศษนี้สามารถนำไปศึกษาและค้นคว้าวิจัย โดยการนำพลาสมิดลูกผสมนี้เข้าสู่เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* เพื่อสร้างสายพันธุ์กลายและศึกษาลักษณะของสายพันธุ์กลายที่ได้ต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- พรงาม ลิ้มตระกูล (2541). ชีวเคมีของกรดนิวคลีอิก. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 37 น.
- มนตรี จุฬาวัฒนทล (2542). การสังเคราะห์แสงและการตรึงไนโตรเจน. ชีวเคมี. 511-523. มนตรี จุฬาวัฒนทล และประหยัด โกมารทัต. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- ลัดดา วงศ์รัตน์ (2542). แพลงก์ตอนพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 22 น.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภักดิ์ (2536). หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัย เทคโนโลยีชีวภาพ, เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม เล่ม 1-2. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2543). พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 42 น.
- Appel, J., and Schultz, R. (1996) Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* 1298:141-147.
- Boison, G., Schmitz, O., Mikheeva, L., Shestakov, S., and Bothe, H. (1996) Cloning, molecular analysis and insertional mutagenesis of the bidirectional hydrogenase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett.* 394:153-158.
- Carrasco, C.D., Buettner, J.A., and Golden, J.W. (1995) Programmed DNA rearrangement of cyanobacterial *hupL* gene in heterocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:791-795.
- Elsen, S., Dischert, W., Colbeau, A., and Bauer, C.E. (2000) Expression of hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system. *Journal of Bacteriology* : 2831-2837.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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<sub>2</sub>-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 Lindblad, 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-containing 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  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก 1

พลาสมิด pMV261



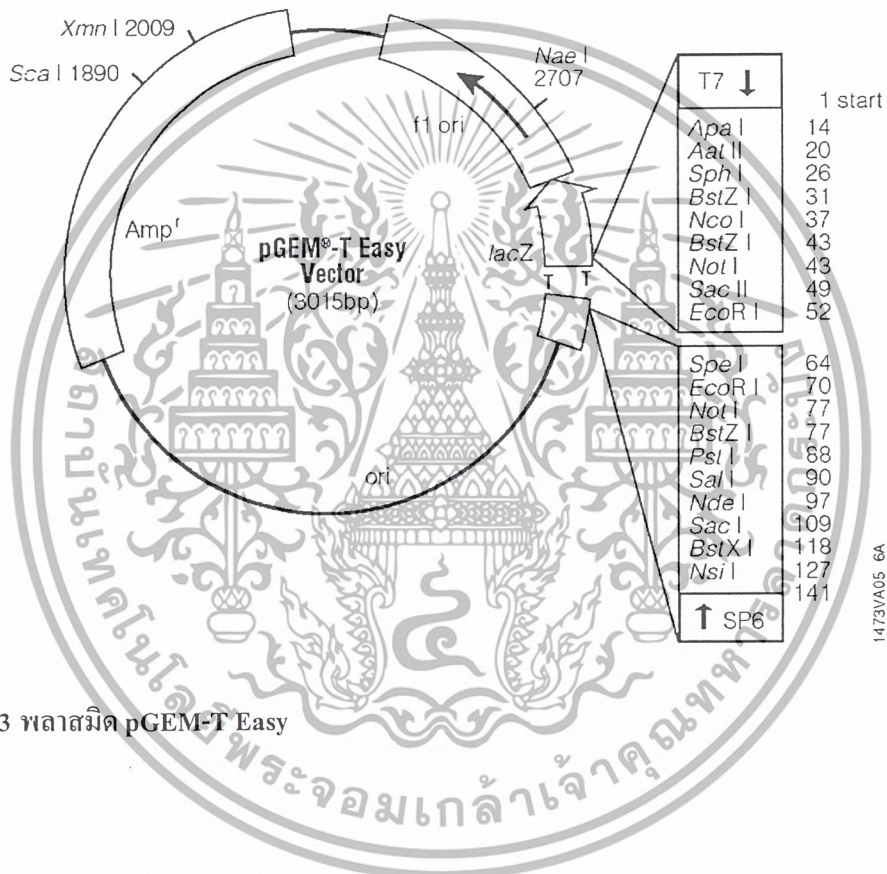
รูปที่ 12 พลาสมิด pMV261

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก 2

### พลาสมิด pUTA

เป็นพลาสมิดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณชมาภรณ์ ชงเพ็ง โดยพลาสมิดนี้เกิดจากการนำชิ้นส่วนของยีน *hupL* สอดแทรกเข้าไปในพลาสมิด pGEM-T Easy ที่ตำแหน่งปลาย T ซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 พลาสมิด pGEM-T Easy

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้.

### ภาคผนวก 3

ส่วนประกอบสีข้อมติเอ็นเอ (Tracking dye)

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

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 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 เพื่อป้องกันการเสียดสภาพของยาปฏิชีวนะ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก 5

สารละลายที่ใช้สกัดพลาสมิกดีเอ็นเอ โดยการใช้ต่าง

### ส่วนประกอบของ solution I

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

### ส่วนประกอบของ solution II

โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.2	นอร์มอล
โซเดียมไดออกซิซัลเฟต	10	เปอร์เซ็นต์

### ส่วนประกอบของ solution III

โพแทสเซียมอะซิเตต	5	โมลาร์
กรดกราเซียลอะซิติก	11.5	เปอร์เซ็นต์
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเต็ม		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้