การผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสเพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสในกุ้ง

DNA polymerase enzyme production for viral detection in shrimp

นางสาววิสันต์ เชื้อวงค์
นางสาวสกุณา บุญโสม
นางสาวสรัญญา พันธุ์แก้ว

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2556

การผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสเพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสในกุ้ง

DNA polymerase enzyme production for viral detection in shrimp

นางสาววิสันต์ เชื้อวงค์
นางสาวสกุณา บุญโสม
นางสาวสรัญญา พันธุ์แก้ว

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2556

DNA POLYMERASE ENZYME PRODUCTION FOR VIRAL DETECTION IN SHRIMP

Wisan Chuavong

Sakuna Boonsom

Saranya Punkaew

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT 'S INSTITUTE OF TECHONOGY LADKRABANG

ACANDEMIC YEAR 2013

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสเพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสในกุ้ง

DNA polymerase enzyme production for viral detection in shrimp

ชื่อนักศึกษา นางสาววิสันต์ เชื้อวงค์
นางสาวสกุณา บุญโสม
นางสาวสรัญญา พันธุ์แก้ว

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังอนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิตสาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อมประจำปีการศึกษา2556

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ. ดร.สุวรรณี จรรยาพูน	
ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์	
ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ **การผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสเพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสในกุ้ง**

DNA polymerase enzyme production for viral detection in shrimp

ชื่อนักศึกษา นางสาววิสันต์ เชื้อวงค์
นางสาวสกุณา บุญโสม
นางสาวสรัญญา พันธุ์แก้ว

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

ดีเอ็นเอพอลีเมอร์เรสเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่และซ่อมแซมดีเอ็นเอแทคดีเอ็นเอพอลีเมอเรสเป็นดีเอ็นเอพอลีเมอร์เรสที่พบในเชื้อ *Thermus aquatics* และ ถูกนำไปใช้ในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (พีซีอาร์) ในงานวิจัยนี้ได้ผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลีเมอเรสจากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* โดยทำการทราสฟอร์มพลาสมิด pOpen*Taq* ที่มียีนดีเอ็นเอพอลิเมอเรสเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดจากนั้นจึงทราสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) เพื่อใช้ผลิตโปรตีนโดยใช้ isopropylthiogalactoside (IPTG) เป็นตัวเหนี่ยวนำทำการสกัดโปรตีนโดยการเติมไลโซไซม์เพื่อทำลายผนังเซลล์เติมแคลเซียมคลอไรด์และดีเอ็นเอสเพื่อกำจัดดีเอ็นเอจากนั้นหาขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGEโดยใช้ 8%Acrylamide gelพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 90 กิโลดาลตันของแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสนำโปรตีนทั้งหมดที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนโดยใช้ 30% แอมโมเนียมซัลเฟตและ ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนนำเอนไซม์ที่ได้ไปตรวจสอบแอคติวิตี้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์พบว่าที่ปริมาณโปรตีนสูงสุด(1.5ไมโครกรัม) สามารถเพิ่มปริมารดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบสได้แต่ยังไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ดังนั้นเราจึงใช้แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่ขายในเชิงพาณิชย์มาใช้ในการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจหาไวรัสในกุ้งและพบว่าด้วยเทคนิคนี้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ในกุ้งที่ติดเชื้อ

คำสำคัญ :แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส *Escherichia coli* BL21(DE3) พีซีอาร์ pOpen*Taq*

Title **DNA polymerase enzyme production for viral detection inshrimp.**

Students	WisanChuavong
	SakunaBoonsom
	SaranyaPunkaew
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Environmental Chemistry
Academic Year	2013
Advisor	Dr. TipachaiVatanavicharn

ABSTRACT

DNA polymerase is enzyme that aids in the creation of new DNA and DNA repair. *Taq* DNA polymerase is DNA polymerase found in bacteria *Thermus aquaticus* and applied in Polymerase chain reaction technique (PCR). In this research, DNA polymerase was produced using bacterial system.To produce pOpen*Taq* plasmid, DNA polymerase gene containing vector, the plasmid was transformed to *Escherichia coli*XL1-Blue, extracted and purified with DNA extraction kit. Then, the plasmid was transformed into *E.coli* strain BL21(DE3) for protein expression using isopropylthiogalactoside (IPTG) as an inducer. Total protein was extracted by the addition of lysozyme to break the cell wall. DNAse and $CaCl_2$were added to degrade contaminating DNA. To determine the protein size, polyacrylamide gel electrophoresis with 8% Acrylamide gel was used and protein band of 90 kilodalton was acquired. *Taq* DNA Polymerase was purified by precipitation with 30% Ammonium sulfate. Centrifugation was applied to precipitate *Taq* DNA Polymerase. Activity of the enzyme is determined by PCR (Polymerase chain reaction). With the highest concentration of the protein, the product can amplified 500 bp DNA fragment, but still not enough for commercial product. Therefore, we used commercial *Taq* DNA polymerase in the PCR to detect virus in shrimp and found that this technique can detect white spot virus in shrimp infection.

Keywords : *Taq* DNA polymerase, *Escherichia coli* BL21(DE3), PCR, pOpen*Taq*

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้ประสบความสำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากคณะผู้จัดทำได้รับความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังอาจารย์ที่ปรึกษาและกรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษ และเป็นผู้ให้ความรู้ให้คำแนะนำพร้อมเสนอแนะแนวทางการแก้ไขปัญหาที่พบขณะทำโครงงานพิเศษจนประสบความสำเร็จได้

ขอขอบพระคุณผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน และ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์อาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเป็นกรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ภาควิชาเคมี และภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความร่วมมืออำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณหน่วยวิจัยเคมีวิเคราะห์เชิงประยุกต์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศสาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำการทดลองจนทำโครงงานพิเศษจนประสบความสำเร็จได้

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว รวมทั้งเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดในการทำโครงงานพิเศษ

นางสาววิสันต์ เชื้อวงค์
นางสาวสกุณา บุญโสม
นางสาวสรัญญา พันธุ์แก้ว

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
สัญลักษณ์และคำย่อ	IX
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	
2.1.1 ดีเอ็นเอ (DNA)	4
2.1.2 ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase)	5
2.1.3 *Thermus aquaticus*	6
2.1.4 การโคลนยีน (Clonning)	7
2.1.5 การสังเคราะห์โปรตีน	9
2.1.6 บทบาทของโปรตีนควบคุม (Regulatory proteins)	11
2.1.7 การแยกขนาดโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE	13
2.1.8 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR)	16
2.1.9 White spot syndrome virus ;WSSV	19
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20

สารบัญ(ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 อุปกรณ์เครื่องมือและ สารเคมี	23
3.2 การแสดงออกของโปรตีน (Protein Expression)	26
3.3การสกัดโปรตีน (Protein Extraction)	27
3.4 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ (Protein Purification)	27
3.5 การทดสอบแอคติวิตี้ของแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสโดยใช้เทคนิค PCR	28
3.6 การตรวจหาเชื้อไวรัสWSSV ในกุ้งโดยใช้เทคนิค PCR	29
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	
4.1 การทรานสฟอร์มเมชั่นพลาสมิด pOpen*Taq*	31
4.2 การตรวจสอบขนาดพลาสมิด pOpen*Taq* ที่ได้จากการโคลนเข้าไปใน *Escherichia coli* XL 1-Blue	32
4.3 การตรวจสอบโปรตีนโดยการทำ Gel Electrophoresis	33
4.4 การทดสอบแอคติวิตี้ของแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส โดยใช้เทคนิค PCR	35
4.5 การตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้งโดยใช้แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส ด้วยเทคนิค PCR	36
4.6 การตรวจสอบขนาดพลาสมิด pOpen*Taq*และ pET -22b(+) Vector จากการโคลนเข้าไปใน *Escherichia coli* XL 1-Blue	37

สารบัญ(ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	38
ข้อเสนอแนะ	
เอกสารอ้างอิง	
ภาคผนวก ก สารละลาย	
ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	
ภาคผนวก ค Ladder	

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 3.1	การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทำ PCR ปริมาตร 50 μL	28
ตารางที่ 3.2	การตั้งอุณหภูมิสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR	28
ตารางที่ 3.3	การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทำ PCRในกุ้ง	29
ตารางที่ 3.4	แสดงการตั้งค่าอุณหภูมิสำหรับนำสารละลายเข้าเครื่อง PCR	30

สารบัญรูป

ภาพที่		หน้า
ภาพที่2.1	การแสดงออกของยีน (Gene expression)	4
ภาพที่2.2	แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (*Taq* DNA polymerase)	5
ภาพที่ 2.3	*Thermus aquaticus*และ บ่อน้ำพุร้อน	6
ภาพที่ 2.4	pOpen*Taq* Expression Vector	7
ภาพที่ 2.5	*Escherichia coli (E. coli)*	8
ภาพที่ 2.6	กระบวนการสังเคราะห์โปรตีน	9
ภาพที่ 2.7	กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนบน *lac* Operon	12
ภาพที่ 2.8	แสดงการเข้าจับของSDSกับโปรตีนซึ่งจะทำให้โปรตีนมีรูปร่างเป็นเส้นเหยียดและมีประจุลบ	13
ภาพที่ 2.9	แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แบบ discontinuous gel	15
ภาพที่ 2.10	ขั้นตอนการทำงานของ PCR	16
ภาพที่ 2.11	ขั้นตอนการเตรียมวุ้นเพื่อทำการแยกดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis	18
ภาพที่ 2.12	ตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อWhite spot virus และรูปร่างของWhite spot virus	19
ภาพที่ 4.1	โคโลนีของ BL21 (DE3) หลังจากการทรานสฟอร์เมชัน	31
ภาพที่ 4.2	โคโลนีของ XL-1Blue หลังจากการทรานสฟอร์เมชัน	31
ภาพที่ 4.3	การตรวจสอบขนาดพลาสมิด pOpen*Taq* ที่โคลนเข้าไป*ใน Escherichia coli* XL 1-Blueโดยการทำ 1.2% Agarose gel electrophoresis	32
ภาพที่ 4.4	การตรวจสอบโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE	34
ภาพที่ 4.5	การตรวจสอบโปรตีนที่ทำให้บริสุทธ์โดยการทำ SDS-PAGE	34
ภาพที่ 4.6	การทดสอบแอคติวิตี้ของแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสโดยใช้เทคนิค PCR วิเคราะห์ด้วย 1.2% Agarose gel electrophoresis	35
ภาพที่ 4.7	การตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้งโดยใช้แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสด้วยเทคนิค PCR	36
ภาพที่ 4.8	การตรวจสอบขนาดพลาสมิด pOpen*Taq*และ pET -22b(+) Vector วิเคราะห์ด้วย 1.2% Agarose gel electrophoresis	37

คำย่อและสัญลักษณ์

IPTG	isopropylthiogalactoside
LB Broth	Luria-Bertani Broth
PCR	Polymerase chain reaction
WSSV	White spot syndrome virus
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
OD	ค่าความทึบแสง(optical density)
µL	ไมโครลิตร
µm	ไมโครโมล
mL	มิลลิลิตร
bp	base pair
kb	kilobase pair
nm	นาโนเมตร
kDa	กิโลดาลตัน

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในการศึกษาเกี่ยวกับ *Escherichia coli* ตั้งต่ปี ค.ศ.1960-1970 ทำให้มีความเข้าใจดีเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติปัจจุบันเทคโนโลยี รีคอมบิแนนท์ (recombinant)ดีเอ็นเอถูกเผยออกอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับความสำเร็จในการวิเคราะห์ทางชีวะเคมีและพันธุกรรมก่อนที่จะมาถึงการโคลนนิ่งในระดับโมเลกุล การเปลี่ยนแปลงทางพันธุศาสตร์จากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ถูกใช้ในการผลิตโปรตีนปริมาณมากๆโดยการโคลนนิ่งใน *Escherichia coli* มีสองลักษณะที่ทำให้มันถูกเลือกนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนเนื่องจาก *Escherichia coli* ง่ายสังเกตต่อการเปลี่ยนแปลงและสามมารถเจริญเติบโตได้เร็วในอาหารที่ราคาไม่แพงด้วยลักษณะดังกล่าวนี้รวมถึงการผลิตโปรตีนร่วมกับยีนอื่นๆกว่า10ปีทำให้ *Escherichia coli* เป็นเซลล์ผู้รับที่สำคัญสำหรับการผลิตโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ (Frederick M. Ausble and Roger Brent . 1999)

ในการผลิตโปรตีนด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ต้องการเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสชนิดพิเศษที่สามารถทนความร้อนได้สูงนั่นคือแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (*Taq* DNA polymerase)โดยสกัดมาจากแบคทีเรีย*Thermus aquaticus*กลุ่มเทอร์โมแอซิโดไฟล์ (Thermoacidophile) คือ กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ชอบเจริญในที่มีอุณหภูมิและความเป็นกรดสูงสิ่งมีชีวิตในกลุ่มนี้จะใช้ซัลเฟอร์เป็นแหล่งพลังงานและใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนเช่น Sulfolobusacidocaldarius โดย *Thermus aquaticus* ถูกค้นพบครั้งแรกจากบ่อน้ำพุร้อน ณ อุทยานแห่งชาติ Yellow Stone ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งการค้นพบดังกล่าวเป็นการค้นพบที่น่าสนใจมากเนื่องจากอุณหภูมิของน้ำพุร้อนดังกล่าวจะอยู่ที่ประมาณ 70°C ณ อุณหภูมินี้สิ่งมีชีวิตอื่นจะตายหรือไม่สามารถเจริญอยู่ได้ แต่การที่ *T. aquaticus* สามารถเจริญและสืบพันธุ์อยู่ได้นั้นเนื่องมาจากการที่*T. aquaticus* มีเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) ที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงนั่นเองโดยการค้นพบเอนไซม์ดังกล่าวนับเป็นก้าวสำคัญของการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลเลยทีเดียว เพราะว่าเราสามารถสกัดแยกเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสจาก *T. aquaticus* หรือที่รู้จักกันในชื่อของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสซึ่งสามารถทนต่อความร้อนสูงมาใช้แทนเอนไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียทั่วๆไปซึ่งไม่ทนต่อความร้อนในเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวจะต้องใช้ความร้อนสูงกว่า 90°C ในการแยกสายของดีเอ็นเอ ดังนั้นการใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่สกัดได้จาก *T. aquaticus* ทำให้เราสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เป็นระบบอย่างต่อเนื่องโดยไม่ต้องมีการเติมเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส เข้าไปในปฏิกิริยาบ่อยๆเหมือนอย่างแต่ก่อน (พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล.อาร์คีจุลินทรีย์สายพันธุ์แกร่ง.1012)

ซึ่งในปัจจุบันได้มีการผลิตแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสออกมาในด้านการศึกษาและจำหน่ายทางเชิงพาณิชย์อย่างกว้างขวางอาทิ บริษัท Bio Labs (www.theetrad.com. 2556) บริษัท pacificscienc (www.pacificscience.co.th.2013) และบริษัท PCR Bio system (www.pcrbio.com. 2013) ที่มีการผลิตชุดน้ำยาแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส สำเร็จรูปออกมาวางจำหน่าย และยังมีบริษัทอื่นๆอีกมากมายที่เป็นผู้ผลิตหรือเป็นตัวแทนจำหน่ายสินค้าเพื่อให้เกิดความสะดวกต่อการแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสไปใช้

1.วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อผลิตดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสจาก *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)
2. ตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1.2 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ผลิตดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสจาก *Escherichia coli*
2. ทดสอบความสามารถของเอนไซม์ที่ผลิตด้วยเทคนิคพีซีอาร์
3. ทำการตรวจสอบหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง (WSSV) โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

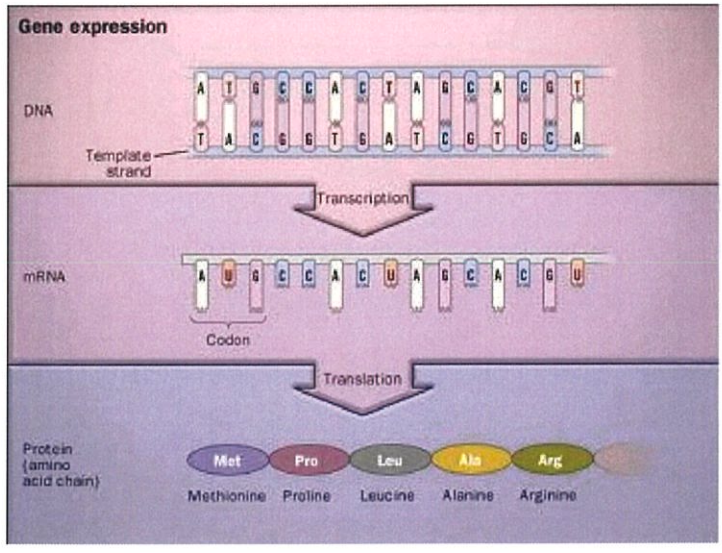
1. สามารถนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ในเชิงพาณิชย์และการเรียนการสอนได้
2. สามารถนำเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสไปประยุกต์ในงานสิ่งแวดล้อมได้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

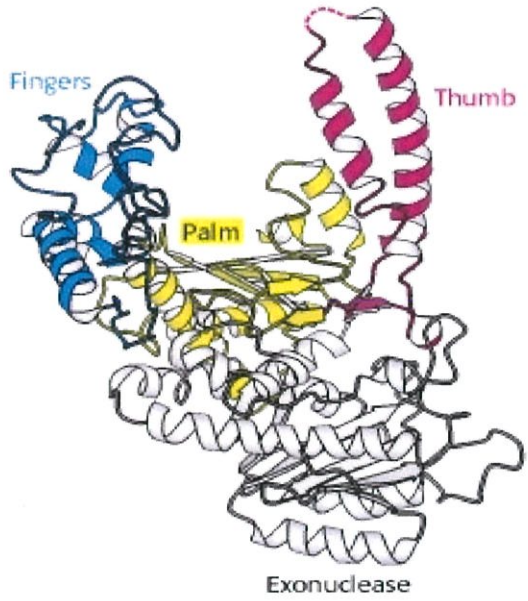
2.1.1 ดีเอ็นเอ (DNA)

ดีเอ็นเอภายในโครโมโซมเป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรม ไว้ด้วยการเรียงตัวด้วยเบสในนิวคลีโอไทด์ข้อมูลเหล่านี้มีอิทธิพลมากต่อการเจริญและการควบคุมลักษณะของมนุษย์และทำให้มนุษย์สามารถสืบถอดข้อมูลไปยังลูกหลานได้ด้วยการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) เป็นแบบกึ่งอนุรักษ์ (Semi-conservative) อยู่ในรูปของอาร์เอ็นเอด้วยกระบวนคัดลอกรหัสพันธุกรรม (transcription) และโปรตีนด้วยกระบวนการเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ได้แก่ ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสและ อาร์เอ็นเอพอลิเมอร์เรส การจำลองตัวของดีเอ็นและการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเป็นไปตามกระบวนการที่เรียกว่าCentral Dogma คือดีเอ็นเอสามารถจำลองตัวเองได้ด้วยกระบวนการจำลองตัวเอง (replication) ดีเอ็นเอสามารถถ่ายทอดข้อมูลออกมาแปลรหัส (translation) ตามลำดับโดยทิศทางของการถ่ายทอดข้อมูลจะไปในทิศทางเดียวกันคือ ดีเอ็นเอสู่อาร์เอ็นเอ สู่ โปรตีน



รูปที่ 2.1 การแสดงออกของยีน (Gene expression)

(ที่มา: http://www.barascientific.com)

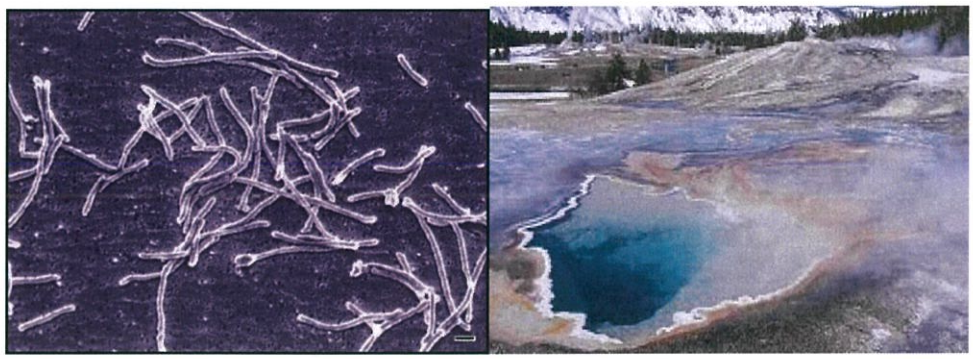


รูปที่ 2.2 แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (*Taq* DNA polymerase)
(ที่มา: http://www.ncbi.nlm.nih.gov 2545)

2.1.2 ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase)

ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยนำเอานิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ามาต่อที่ปลาย 3' (-OH) ของสายที่มีอยู่เดิมทำได้ดีเอ็นเอสามใหม่ยาวขึ้นในทิศทาง 5' ไป 3' ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสทำหน้าที่นำเอานิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟสตัวใหม่สร้างพันธะกับฟอสโฟไดเอสเทอร์กับปลาย3' (-OH) ของนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่เดิมทำให้นิวคลีโอไทด์ตัวใหม่เพิ่มสายดีเอ็นเอให้ยาวขึ้นกว่าเดิมจาก 5'-phosphate ไปยัง3' (-OH) เสมอโดยนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่ที่เข้ามาจะต้องมีเบสที่เข้าคู่กับสายดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) พลังงานที่ใช้ในการสร้างสายพอลิเมอร์นี้ จึงมาจากพันธะที่มีพลังงานสูงแอนไฮไดรด์ของนิวคลีโอไทล์ตัวใหม่ที่เข้ามานั่นเอง

2.1.3 *Thermus aquaticus*



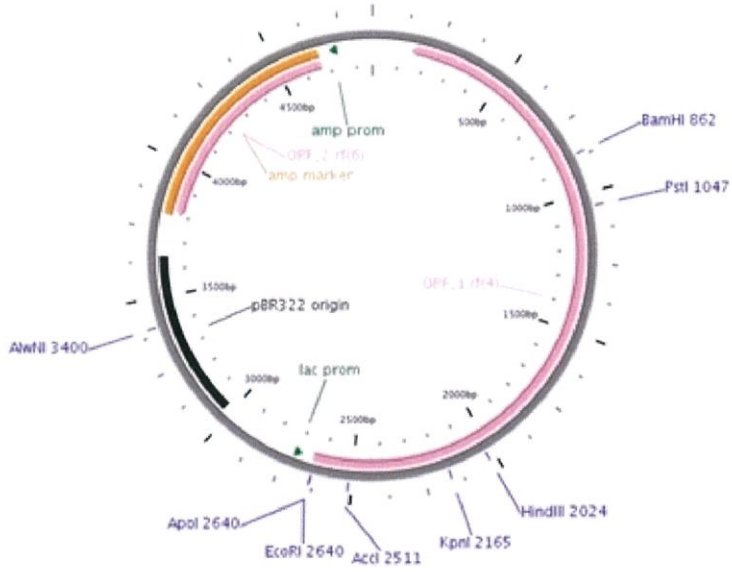
รูปที่ 2.3 *Thermus aquaticus*และ บ่อน้ำพุร้อน
(ที่มา : www.tistr.or.th/mircen/pdf/archaea.pdf)

Thermus aquaticus เป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มอาร์คีแบคทีเรีย สิ่งสำคัญที่ทำให้สิ่งมีชีวิตในกลุ่มอาร์คีกลายเป็นสิ่งมีชีวิตที่น่าสนใจมาจากการที่สิ่งมีชีวิตในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จัดเป็นสิ่งมีชีวิตพวกเอ็คซทรีมโมไฟล์ (Extremophile) คือสามารถเจริญและสืบพันธุ์ได้ในสภาวะวิกฤตที่สิ่งมีชีวิตอื่นไม่สามารถอาศัยอยู่ได้เช่นสภาวะที่มีอุณหภูมิและความเป็นกรดสูงสภาวะที่เค็มจัด *Thermus aquaticus* ถูกค้นพบครั้งแรกจากบ่อน้ำพุร้อน ณ อุทยานแห่งชาติ YellowStone ประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งการค้นพบดังกล่าวเป็นการค้นพบที่น่าสนใจมากเนื่องจากอุณหภูมิของน้ำพุร้อนดังกล่าวจะอยู่ที่ประมาณ 70°C ณ อุณหภูมินี้สิ่งมีชีวิตอื่นจะตายหรือไม่สามารถเจริญอยู่ได้แต่การที่ *T. aquaticus* สามารถเจริญและสืบพันธุ์อยู่ได้นั้นเนื่องมาจากการที่ *T. aquaticus* มีเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงนั่นเองโดยการค้นพบเอนไซม์ดังกล่าวนับเป็นก้าวสำคัญของการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลเลยทีเดียวเพราะว่าเราสามารถสกัดแยกเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสจาก *T. aquaticus* หรือที่รู้จักกันในชื่อของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสซึ่งสามารถทนต่อความร้อนสูงมาใช้แทนเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่สกัดได้จากแบคทีเรียทั่วๆไปซึ่งไม่ทนต่อความร้อนในเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ชอบเจริญในที่มีอุณหภูมิและความเป็นกรดสูงสิ่งมีชีวิตในกลุ่มนี้จะใช้ซัลเฟอร์เป็นแหล่งพลังงานและใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน

2.1.4 การโคลนยีน (cloning)

การโคลนยีน หมายถึง การแยกยีนใดยีนหนึ่งที่สนใจนำมาเพื่อเพิ่มปริมาณให้ได้มากเท่าที่ต้องการเพื่อใช้ในการศึกษา เช่น ศึกษาการควบคุมการแสดงออก หน้าที่ และความสำคัญของยีนนั้นในเซลล์ อาจถ่ายฝากยีนดังกล่าวลงในสิ่งมีชีวิตอื่นเพื่อผลิตสารหรือให้แสดงลักษณะบางประการ เมื่อเตรียมเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตที่สนใจนั้นแล้วไม่ว่าจะเป็นดีเอ็นเอจากจีโนมทั้งหมดหรือซีดีเอ็นเอ (cDNA) ที่สังเคราะห์มาจากเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ก็ต้องนำดีเอ็นเอดังกล่าวมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ก่อนโดยพิจารณาเลือกเวคเตอร์ตามความเหมาะสม

2.1.4.1 Expression Vector



รูปที่ 2.4 pOpen*Taq* Expression Vector
(ที่มา: http://www.openbiotech.com)

ดีเอ็นเอพาหะหมายถึง สิ่งที่นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์สามารถเตรียมได้จากพลาสมิด

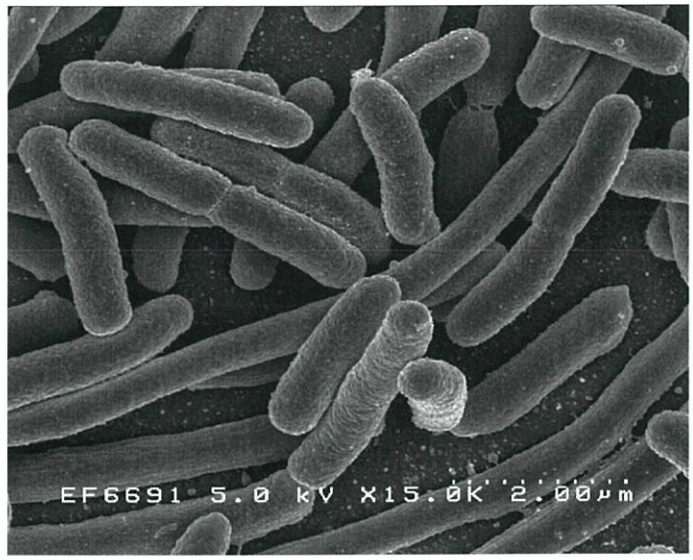
พลาสมิดหมายถึง Extrachromosomal double stranded DNA พบในแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นวงกลมสามารถเพิ่มจำนวนเองได้ (self replication)

Expression Vector จะนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ มีการเพิ่มจำนวนและการทำให้เกิดการแสดงออกของยีนได้ เวคเตอร์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันแล้วแต่จุดประสงค์ของการเอาไปใช้รวมถึงต้องคำนึงถึงองค์ประกอบต่างๆในเวคเตอร์

2.4.1.2 เซลล์ผู้รับ (cell host)

เซลล์ผู้รับเป็นเซลล์เจ้าบ้านประเภทโพรคาริโอตเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงและนำมาใช้ควรมีจีโนไทป์แตกต่างกันให้เลือกหลายสายพันธุ์และควรทราบลักษณะทางจีโนไทป์ของสายพันธุ์เหล่านั้นอย่างชัดเจนและควรมีความสามรถในการรับเอาพาหะเข้าไปภายในเซลล์ได้หลายชนิด สำหรับเซลล์ *Escherichia coli* มีลักษณะดังกล่าวจึงถูกนิยมนำมาใช้

ชนิดของเซลล์ผู้รับ : *Escherichia coli*



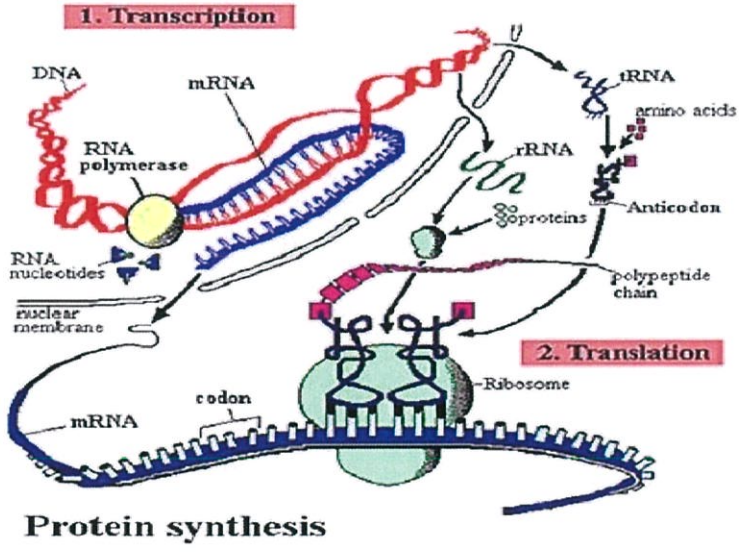
รูปที่ 2.5 *Escherichia coli* (*E. coli)*
(ที่มา: http: http://th.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)

E. coli เป็นแบคทีเรียมีเซลล์รูปท่อน แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ อาจเคลื่อนที่ได้หรือไม่เคลื่อนที่บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สร้างแคปซูลได้ให้โคโลนีเรียบไม่มีสีมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 mmในเวลา 18 ชั่วโมง แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารที่แสดงความแตกต่าง (differential media) เช่น Mac Conkey agar โคโลนีมีสีแดงชมพู ขนาดใหญ่ เนื่องจากเฟอร์เมนแลกโทส หรือเลี้ยงในอาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) และ Endo agar โคโลนีมีสีมันวาวคล้ายโลหะ มีบางสายพันธุ์ที่เฟอร์เมนต์แลกโทสได้ช้า เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45˚C) บางสายพันธุ์ทนความร้อน 60˚C15 นาที หรือ55 ˚C 60 นาที

เป็นเซลล์ที่นิยมนำมาใช้มากที่สุดในการผลิตโปรตีนที่ไม่ต้องการกระบวนการ Post-translational modification ของโปรตีนภายหลังเซลล์นี้มีข้อดีหลายอย่างคือเป็นเซลล์ที่ได้รับการศึกษาวิจัยมาเป็นอย่างดีจึงมีข้อมูลด้านพันธุกรรมและสรีรวิทยามากเพียงพอที่จะนำมาใช้ทาง genetic manipulation ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงให้ได้ผลผลิตมากเนื่องจากมีอัตราการเจริญสูงสามารถให้ความเข้มข้นของเซลล์ได้มากกว่า 50 g dryweight/Lสามารถกระตุ้นให้ยีนมีการแสดงออกในอัตราที่สูงเมื่อเลือกเวคเตอร์และโปรโมเตอร์ที่เหมะสมต้นทุนการผลิตต่ำ เนื่องจาก *E. coli* เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบธรรมดาราคาถูกรวมทั้งต้นทุนของ fermentation process ที่ต่ำ

อย่างไรก็ตามมีข้อเสียที่ต้องพิจารณาคือได้ recombinant protein น้อยอาจเนื่องจากถูกสลายด้วยเอนไซม์หรือเกิดการรวมตัวเป็น inclusion bodies ทำให้สูญเสียไปจำนวนหนึ่งจากความยุ่งยากในการแยกและการสกัดทำให้บริสุทธิ์ภายหลังแต่ปัจจุบันมีการแก้ไขด้วยการใช้ fusion partner

2.1.5 การสังเคราะห์โปรตีน



รูปที่ 2.6 กระบวนการสังเคราะห์โปรตีน
(ที่มา: www.barascientific.com)

โปรตีนเป็นสายของกรดอะมิโนมาต่อเรียงกันโดยมีลำดับของกรดอะมิโนที่คงที่สำหรับโปรตีนแต่ละชนิดการสร้างโปรตีนจึงจำเป็นต้องมีตัว ควบคุมลำดับของกรดอะมิโนสำหรับโปรตีนชนิดนั้นๆเพราะถ้าลำดับของกรดอะมิโนเปลี่ยนไปก็จะได้โปรตีนที่ผิดไปจากเดิม

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีโปรตีนอยู่นับพันชนิดโปรตีนทุกชนิดจะถูกสร้างขึ้นโดยคำสั่งจากยีน หรือ จากรหัสพันธุกรรมของดีเอ้นเอโดยที่แต่จะออกคำสั่งผ่านทางเอ็มอาร์เอ็นเอโดยการสร้างเอ็มอาร์เอ็นเอขึ้นมา หรือ กระบวนการคัดลอกรหัสพันธุกรรม (transcription) หลังจากนั้นเอ็มอาร์เอ็นเอจะออกจากนิวเคลียสไปยังไซโตพลาสมเชื่อมกับไรโบโซมและเริ่มต้นกระบวนการแปลรหัสพันธุกรรม (translation)

2.1.5.1 กระบวนการถอดรหัสของสัตว์ชั้นต่ำ

ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสของสัตว์ชั้นต่ำเช่นแบคทีเรียประกอบด้วย 6หน่วยย่อยคือαสองหน่วย $\beta\beta\omega$ และσ เรียกร่วมว่า holo enzyme สำหรับหน่วยซิกม่า (σ) นี้มีหลายรูปแบบ ทำให้DNA Polymerase แต่ละชนิดมีความจำเพาะในการเลือก promoter sequenceที่ต่างกันและสังเคราะห์อาร์เอ็นเอได้จำเพาะที่ต้องการเมื่อเริ่มการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอพอลิเมอร์เรสอาศัยหน่วยซิกมา (σ) ตรวจหาบริเวณ promoter region แล้วนำเอานิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตชนิดที่มีเบสเพียวรีน (pppG or pppA) เท่านั้นมาเป็นตัวเริ่มต้นของการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ เมื่อเริ่มสังเคราะห์อาร์เอ็นเอได้ประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ หน่วยซิกมาซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญเริ่มต้น (initiation factor) หลุดออกจากโมเลกุลของอาร์เอ็นเอพอลิเมอร์เรสเหลือแต่เฉพาะโครงสร้างแกนที่เรียกว่าcore enzyme ประกอบด้วยหน่วย $\alpha\alpha\beta\beta'\omega$ ทำหน้าที่สังเคราะห์สายอาร์เอ็นเอให้ยาวต่อไป อยู่ในรูป ดีเอ็นเอ-อาร์เอนเอไฮบริจด์เมื่อถึงจุดสิ้นสุดสังเคราะห์ (termination site) จะมีโปรตีนที่เรียกว่า โร (ρ)เป็นแฟกเตอร์ของการสิ้นสุด (termination factor) เข้ามาทำงานร่วมด้วยโดยทำให้สายอาร์เอ็นเอหลุดออกจากดีเอ็นเอ จากนั้นการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอก็สิ้นสุดลงด้วยเช่นกัน

2.1.5.2 กระบวนการแปลรหัส (Translation)

การแปลรหัสเป็นการสังเคราะห์โปรตีน (Protein Synthesis)โดยการนำกรดอะมิโนมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (Peptide bond) โดยลำดับกรดอะมิโนจะถูกกำหนดโดยลำดับเบสบนสายเอ็มอาร์เอ็นเอการแปลรหัสจะเริ่มจากปลาย 5′ของปลายเอ็มอาร์เอ็นเอไปยังปลาย 3′และโปรตีนจะถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยเริ่มจากปลายอะมิโน (N) ไปสิ้นสุดที่ปลายคาร์บอกซิล (C) เอ็มอาร์เอ็นเอของโปรคาริโอต1สายมักประกอบไปด้วย coding sequence สำหรับแปลรหัสเป็นโพลิเปปไทด์ได้หลายชนิดซึ่งเอ็มอาร์เอ็นเอแบบนี้เรียกว่า “polycistronic mRNA” ส่วนเอ็มอาร์เอ็นเอของยูคาริโอตจะประกอบไปด้วย coding sequence สำหรับแปลรหัสเป็นโพลีเปปไทด์ได้เพียงชนิดเดียวเอ็มอาร์เอ็นเอแบบนี้เรียกว่า “monocistronicmRNA”

การสังเคราะห์โปรตีนของทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอตจะเกิดขึ้นในไซโตพลาสซึมดังนั้นในโปรคาริโอตการสังเคราะห์โปรตีนสามารถเกิดขึ้นได้ในขณะที่การสังเคราะห์ เอ็มอาร์เอ็นเอกำลัง

ดำเนินอยู่เพราะเซลล์โปรคาริโอตไท่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสส่วนการสังเคราะห์โปรตีนของยูคาริโอตจะเกิดขึ้นหลังจากที่ mature เอ็มอาร์เอ็นเอถูกส่งผ่านเยื้อหุ้มนิวเคลียสออกไปยังไซโตพลาสซึมก่อน

2.1.6 บทบาทของโปรตีนควบคุม (Regulatory proteins)

โปรตีนควบคุมในที่นี่หมายถึงโปรตีนที่ควบคุมให้มีหรือไม่มีการแสดงออกของจีนหรือมีการแสดงออกมากหรือน้อย โปรตีนควบคุมมีหลายชนิดมีบทบาทในการเข้ามาจับกับสายดีเอ็นเอแล้วกระตุ้นให้มีการเกิดหรือยับยั้งกระบวนการถอดรหัส

2.1.6.1 การควบคุมการแสดงออกของยีนในสัตว์ชั้นต่ำ

โครงสร้างของดีเอ็นเอที่ควบคุมการถอดรหัสของโปรตีนชุดหนึ่งของโปรคาริโอต ที่เรียกว่า โอเพอรอน (Operon)ประกอบไปด้วยส่วนที่เรียกว่า regulatory gene (I gene) : promotor gene (P gene), operator gene (O gene) และ structural gen (S gene) อยู่ร่วมกันส่วน I,P และO gene

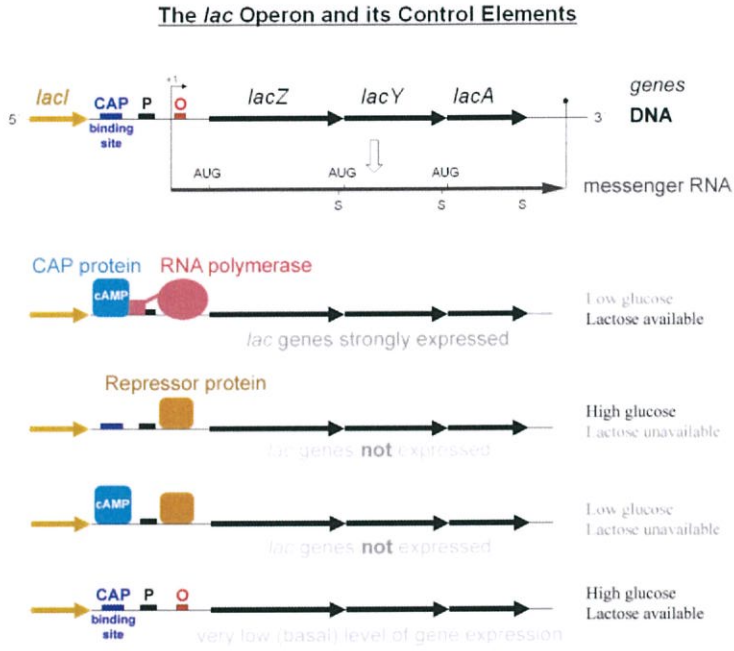
2.1.6.2 แล็กโอเพรอน (*lac* Operon)

แล็กโอเพรอนควบคุมให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ 3 ชนิดที่มีหน้าที่ร่วมกันเกี่ยวข้องกับการใช้แล็กโทสเอนไซม์ 3 ชนิดสามารถสังเคราะห์ขึ้นพร้อมกันจากเอ็มอาร์เอ็นเอ เดียวกันจึงจัดเป็น polycistonicm อาร์เอ็นเอ เอนไซม์เหล่านั้นคือ

- β-Galactosidase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายแล็กโทสให้กลายเป็นกาแล็กโทส และกลูโคสเพื่อให้เซลล์นำไปใช้ประโยชน์ต่อไป
- Permease ทำหน้าที่ในการนำกาแล็กโทสเข้าสู่เซลล์
- β-Galactosidasetransacetylase ทำหน้าที่ในการส่ง acetyl group จาก acetyl coA ให้แก่ β- Galactosidase

ส่วนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ทั้งสามนี้จะอยู่บริวณปลาย 5' –flanking region ของ coding strand (sense strand)ของสายดีเอ็นเอบริเวณทีติดกับ *lac Z* คือ *lac O* หรือ operator gene ยาวประมาณ 35bpจะอยู่ซ้อน(overlap)กับบริเวณที่เรียกว่า *lac P* หรือ gene ซึ่งเป็นบริเวณที่อาร์เอ็นเอพอลิเมอร์เรสเข้ามาจับเพื่อกระตุ้นกระบวนการถอดรหัส(transcription)ถัดจาก *lac p* จะเป็นส่วนที่เรียกว่า CRP site หมายถึง (CRPcAMP receptor protein ซึ่งบางทีเรียกว่า CAP หมายถึง catabolic gene activator protein) เป็นบริเวณที่ให้ cAMP-CRP complex (หรือเรียกว่า cAMP-CRP complex) มาจับถัดจากบริเวณ CRP site จะเป็นบริเวณที่เรียก *lac I* จัดเป็นจีนที่

ควบคุมกระบวนการถอดรหัสได้เรียกว่า regulatory gene มีหน้าที่ยับยั้งไม่ให้กระบวนการถอดรหัสเกิดขึ้น จึงเรียกตัวยับยั้ง (repressor) *lac I*



รูปที่ 2.7 กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนบน *lac* Operon

(ที่มา :http://th.wikipedia.org/wiki/Lac_operon)

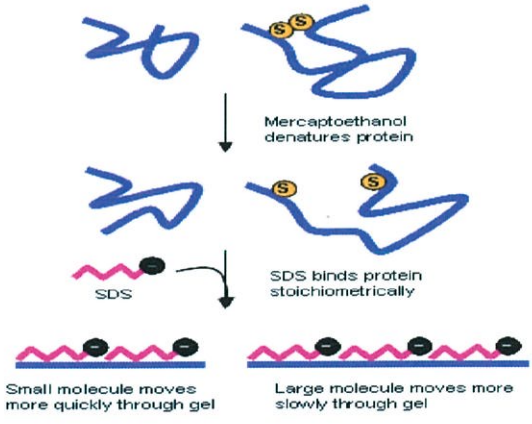
การควบคุมการทำงานของ *lac* Operon มีหลักการดังนี้ในสภาวะปกติที่ไม่มีอาหารแล็กโทส แบคทีเรียไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์เอนไซม์ β-Galactosidase แต่เมื่ออยู่ในสภาวะถูกกระตุ้นมีสารอาหารแล็กโทสเป็นตัวเหนี่ยวนำแบคทีเรียต้องการเอนไซม์ β-Galactosidase เพื่อมาสลายแล็กโทสให้กลายเป็นกลูโคสและกาแล็กโทส เอนไซม์สามารถถูกกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ขึ้นมากเมื่อมีตัวกระตุ้น เรียกว่า inducible enzyme ส่วนจีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์นี้ที่สามารถถูกกระตุ้นด้วยกระบวนการ transcription เกิดขึ้นได้เมื่อมีตัวกระตุ้นที่เรียกว่า inducible enzyme ในที่นี้คือ *lac Z, lac Y*และ *lac A*

ยังมีอีกหนึ่งตัวเหนี่ยวนำอื่นที่ไม่ใช้แล็กโทส แต่สามารถกระตุ้นให้มีกระบวนการถอดรหัสได้เช่นกัน สาร allolactose และ isopropylthiogalactoside ; IPTGโดย IPTG เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของ *lac* Operon ให้สร้างเอนไซม์แต่เอนไซม์ β-Galactosidase ที่ผลิตขึ้นไม่สามารถสลาย IPTG ได้จึงนิยมใช้ IPTG มากสำหรับงานวิจัยที่ศึกษาการทำงานของ *lac* Operon เพราะตัวกระตุ้น

จะไม่ถูกทำลายไปไม่เหมือนกับการใช้แล็กโทสเป็นตัวกระตุ้น ซึ่งสามารถสลายตัวไปเป็นกาแล็กโทสและกลูโคสเมื่อมีการสังเคราะห์ β-Galactosidase ได้

2.1.7 การแยกขนาดโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

หลักการของ SDS-PAGE คือ SDS ซึ่งเป็น detergent ที่มีประจุลบไปเกาะกับโปรตีนอย่างแน่นหนามากทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ นอกจากนี้ SDS ยังทำให้โปรตีนเสียสภาพ เปลี่ยนสภาพจากทรงกลม (globular) ไปอยู่ในสภาพที่เหยียดตรงโปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยหลายหน่วยเกาะกันอยู่ก็จะแยกออกเป็นแต่ละหน่วยย่อยดังนั้นการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีนทุกตัวในกรณีนี้จึงเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างในน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียวโดยจะเป็นการเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวกในอัตราส่วนผกผันกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งหมายความว่าจะสายมารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้จากระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้วนอกจากนี้การปรากฏของแถบโปรตีนเพียงแถบเดี่ยวใน SDS-PAGE ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีน

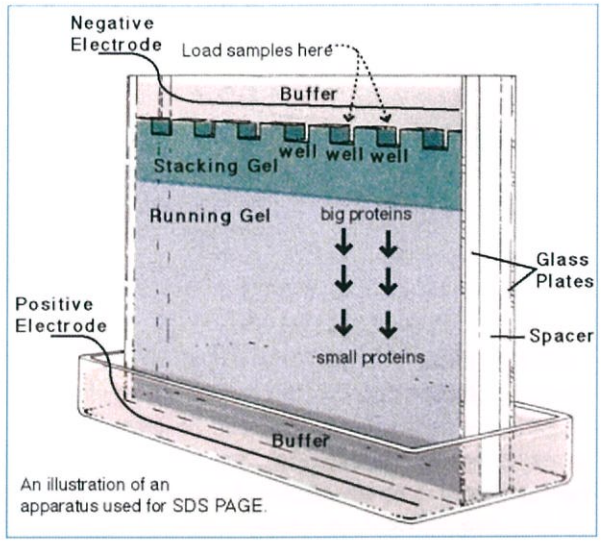


รูปที่ 2.8 แสดงการเข้าจับของSDSกับโปรตีนซึ่งจะทำให้โปรตีนมีรูปร่างเป็นเส้นเหยียดและมีประจุลบ (ที่มา: www.gibthai.com)

วิธีการทำ SDS-PAGE มีความแตกต่างกันบ้างในแต่ละวิธีเช่นวิธีของ Weber และ Osborne เป็นแบบ continuous polyacrylamide gel electrophoresis ใช้ phosphate buffer ของ Laemmli ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากและทำในรูปของ slab gel เป็นแบบ discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis ใช้ 0.5M Tris-HCl, pH6.8 สำหรับ concentrate stacking gel buffer, 1.5M Tris-HCl, pH 8.8 สำหรับ

concentrated resolving gel buffer หรือ concentrated separating gel buffer และ 0.025M Tris, 0.192M Glycine, 0.1% w/v SDS, pH8.3 สำหรับ electrode buffer วิธีของ discontinuous gel electrophoresis เป็นวิธีที่ gel buffer และ electrode buffer จะเกิดการรวมตัวกันและช่วยในการทำให้ตัวอย่างที่แยกในระหว่างการเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้ารวมตัวอัดแน่นและเข้มข้นนอกจากนี้ stacking gel ที่ %T ต่ำจะช่วยในการรวมตัวอัดแน่นกันของตัวอย่าง ส่วน separating gel สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงค่า %T ตามความต้องการขึ้นอยู่กับการแยกขนาดของโปรตีน และยังสามารถใช้แบบ gradient ได้จาก %T ต่ำ (ด้านบน) ไปสู่ %T สูง (ด้านล่าง) ของเจลได้เพื่อให้การแยกตัวอย่างที่มีความแตกต่างของขนาดได้ดียิ่งขึ้น

สำหรับการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE นั้นของผสมโปรตีนจะถูกทำให้เสียสภาพโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2 - 5 นาทีในสารละลายที่มี SDS มากเกินพอและมีสารประเภทไทออล (thiol) เป็นองค์ประกอบ เช่น 2-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) ในโปรตีน ภายใต้ภาวะดังกล่าวนี้โปรตีนส่วนใหญ่จะเกาะกับ SDS ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักที่คงที่ (1.4 กรัมของ SDS ต่อพอลิเพปไทด์ 1กรัม) จากนั้นนำของผสมโปรตีนแต่ละตัวอย่างใส่ลงบนเจลทรงกระบอกแต่ละแท่งหรือแต่ละช่องบนเจลแผ่นและนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งทั้งเจลและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแยกมี SDS เป็นองค์ประกอบอยู่ โปรตีนเทียบเคียงจะให้ผลในลักษณะเดียวกับเจลช่องอื่น ๆ โดยโปรตีนจะเคลื่อนที่ไปตามน้ำหนักโมเลกุลของตัวเอง ภายหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าตำแหน่งของแถบโปรตีนที่แยกออกจากกันจะปรากฏขึ้นเมื่อย้อมด้วยสี เช่น สีคูแมซีบลู (Coomassie Blue) หรือสีสารประกอบของเงิน (silver stain) การแยกด้วยวิธี SDS-PAGE SDS จะจับโปรตีนในอัตราส่วนโดยน้ำหนักหนักที่คงที่ตลอดทั้งเจล (กล่าวคือโปรตีนที่มีขนาดใหญ่มี SDS เกาะอยู่มาก) ทำให้โปรตีนทุกชนิดมีค่าความหนาแน่นของประจุต่อน้ำหนักโปรตีนเท่ากันการแยกโปรตีนด้วยวิธีนี้จึงอาศัยการแยกโดยขนาด



รูปที่ 2.9 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แบบ discontinuous gel

(ที่มา: www.gibthai.com)

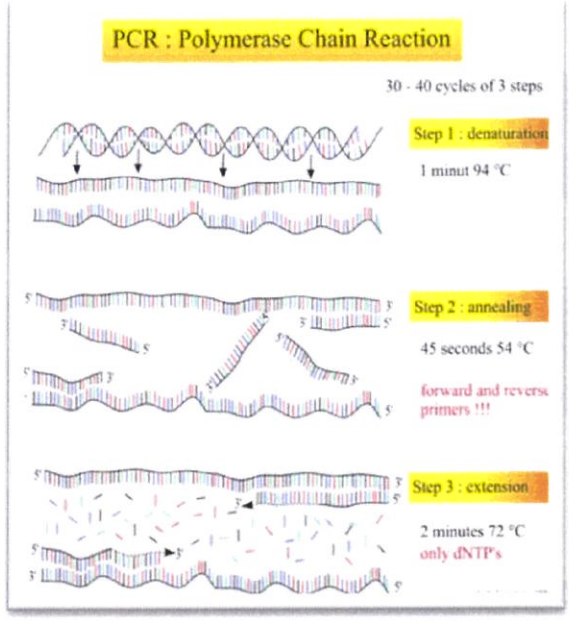
เพียงอย่างเดียวโดยไม่มีจำนวนประจุมาเกี่ยวข้องและเนื่องจากระยะทางที่เคลื่อนที่ไปของสายพอลิเพปไทด์บนเจลมีความสัมพันธ์โดยตรงกับขนาดของพอลิเพปไทด์เท่านั้นการแยกโปรตีนที่เราสนใจบนเจลนี้ทำได้โดยเทียบน้ำหนักโมเลกุลระหว่างโปรตีนตัวอย่างกับโปรตีนเทียบเคียงในกรณีที่เรามั่นใจว่า น้ำหนักของโปรตีนที่เราต้องการแตกต่างจากโปรตีนอื่นๆอย่างชัดเจน เราสามารถแยกโปรตีนบนเจลเพื่อนำไปศึกษาองค์ประกอบได้ (โดยที่ไม่ต้องเทียบกับโปรตีนเทียบเคียงที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว)

2.1.7.1 เนื้อเจล (gel matrice)

เจลที่นิยมใช้มี 2 ชนิดคือ Agarose และพอลิแอคริลาไมด์ (polyacrylamide) สำหรับ Agarose เป็นสารพอลิแซ็คคาไรด์ส่วนพอลิแอคริลาไมด์นั้นเป็นพอลิเมอร์ของแอคริลาไมด์โดยใช้ N,N'-methylene-bis-acrylamiden เป็นตัวเชื่อม (Crosslink) สายพอลิเมอร์การทำให้เกิดพอลิเมอร์นั้นโดยการเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)และ tetramethylethylenedimine (TEMED) สาร TEMED เป็นตัวทำให้เกิดอนุมูลอิสระจายไอออนเปอร์ซัลเฟต (persulfate) ซึ่งจะทำให้เกิดการเริ่มปฏิกิริยาการสร้างสายพอลิเมอร์ (polymerizartion) ของสารแอคริลาไมด์

ส่วนเจลพอลิแอคริลาไมด์จะถูกเตรียมและใช้ระหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่นในแนวตั้ง เนื่องจากขนาดของช่องในเนื้อเจลและความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดความสะดวกในการนำไปใช้จึงทำให้เจลพอลิแอคริลาไมด์เหมาะสำหรับการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ของโมเลกุลที่มีขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส

2.1.8 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)



รูปที่ 2.10 ขั้นตอนการทำงานของ PCR

(ที่มา: http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html)

Polymerase chain reaction (PCR)เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการหรือต้นแบบที่ปรากฏอยู่ในจีโนม(genome)โดยใช้วิธีการในหลอดทดลองซึ่งเป็นการเลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามธรรมชาติที่เกิดขึ้นเมื่อมีการแบ่งตัวของเซลล์ต่างกันที่เทคนิคการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยPCRนี้ทำในหลอดทดลองซึ่งสามารถกำหนดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้และสามารถสังเคราะห์ได้ในปริมาณมากเท่าที่ต้องการ

องค์ประกอบของปฏิกิริยาในเทคนิคPCR

1ดีเอ็นเอแม่แบบ(target DNA)เป็นดีเอ็นเอสายคู่และจะต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์(nucleotide)ที่ถูกต้อง

2ไพรเมอร์(primer) เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆส่วนใหญ่นิยม 20 ถึง 30 เบสและมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

3 ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสในเทคนิค PCR จะใช้แทคพอลิเมอร์เรสซึ่งสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 90°C เอนไซม์นี้แยกได้จากเชื้อ *Thermus aquaticus* ซึ่งเป็นพวกแบคทีเรียที่ทนความร้อนได้สูง (thermophilic bacterium)

4 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตประกอบด้วยดีออกซีอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (dATP) ดีออกซีกวาโนซีนไตรฟอสเฟต (dGTP) ดีออกซีไซติดีนไตรฟอสเฟต (dCTP)ดีออกซีไทมีดีนไตรฟอสเฟต (dTTP)

5 บัฟเฟอร์ประกอบด้วยโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) Tris-hydrochloric (Tris-HCl)

เจลาติน(Gelatin)

6 เกลือแมกนีเซียมคลอไรด์เป็นตัวควบคุมการเกิด primer-annealing และการเกิดปฏิกิริยาโดยรวม

2.1.8.1 ขั้นตอนการทำPCR

เทคนิคPCRเป็นการเลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีหลักการสำคัญอยู่ 3 ขั้นตอน

1 การทำให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ (denaturation)

เป็นการแยกสายดีเอ็นเอเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้ความร้อนทำลายพันธะไฮโดรเจนที่จับกันระหว่างคู่เบสแต่ละคู่นิยมใช้อุณหภูมิ 90°C-95°C เป็นเวลา 30-60 วินาที

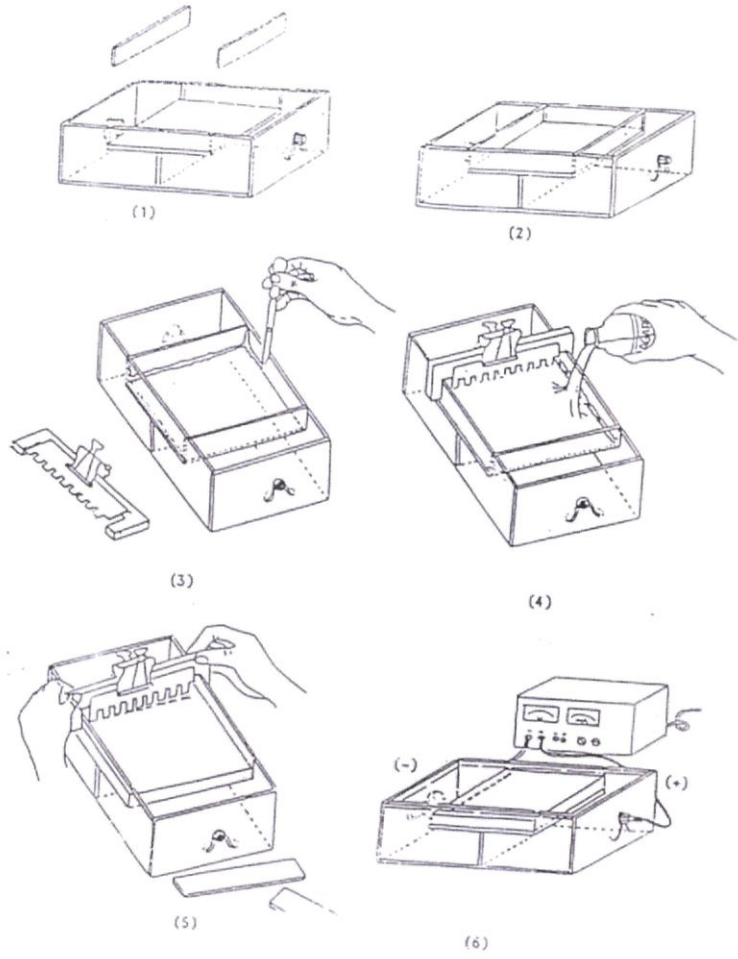
2 การกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ (annealing)

จะมีการเติมไพรเมอร์นิวคลีโอไทด์สั้นๆ 2 สายลงไปในปฏิกิริยาไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอแต่ละสายตามกฎการจับคู่ของเบสความยาวของไพรเมอร์ประมาณ 20-40 นิวคลีโอไทด์และมีลำดับเบสที่ที่เป็นคู่จำเพาะทั้งทางด้าน 5´(ด้านซ้าย) หรือ 3´(ด้านขวา)กับลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวนอุณหภูมิที่นิยมใช้คือช่วง 40°C-50°C เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที

3 การสังเคราะห์ส่วนของดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extention)

จะทำการสังเคราะห์ส่วนของดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ในทิศทางจาก5´⟶3´โดยใช้DNA สายเดี่ยวแต่ละสายเป็นแม่แบบนิยมทำที่อุณหภูมิ 70°-75°C เป็นเวลาประมาณ 1-2 นาที

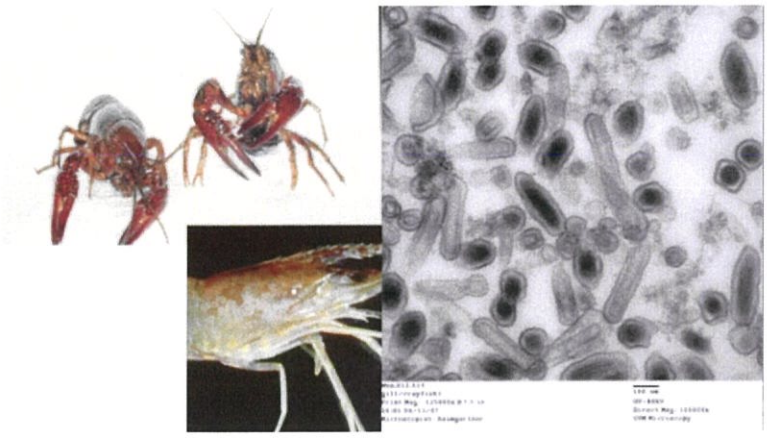
จะเห็นได้ว่าในแต่ละรอบของ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังกล่าวทุกๆรอบจะมีการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจเป็นสองเท่าซึ่งถ้าทำ 30 รอบจะมีการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจถึงพันล้านเท่าทำให้ได้ปริมาณมากเพียงพอที่จะนำมาใช้ในการศึกษาด้านต่างๆในระดับโมเลกุลต่อไป



รูปที่2.11 ขั้นตอนการเตรียมวุ้นเพื่อทำการแยกดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis

(ที่มา: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์)

2.1.9 White spot syndrome virus



รูปที่ 2.12 ตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อWhite spot virus และรูปร่างของWhite spot virus

(ที่มา: http://www.vetmed.lsu.edu)

โรคจุดขาว หรือเรียกว่า โรคตัวแดงดวงขาวในกุ้ง มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส (White spot syndrome virus, WSSV) โดยพบรอยโรค (lesion) เป็นจุดขาวหรือดวงขาวใต้เปลือกส่วนหัวและโคนหาง บางครั้งมีลักษณะตัวแดงร่วมด้วยและทำให้กุ้งตายได้เป็นโรคระบาดที่อยู่ในบัญชีโรคสัตว์น้ำขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศและอยู่ในกฎกระทรวงพ.ศ.2548ภายใต้พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ.2499 โรคนี้เกิดจากกุ้งติดเชื้อ WSSV ซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็น ดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) ขนาด 305 kbp อยู่ในวงศ์ Nimaviridae สกุล Whispovirusไวรัสมีรูปร่างเป็นแท่งจนถึงรูปไข่ ขนาด 80 - 120 x 250 - 380 นาโนเมตรมีผนังหุ้ม (envelope) มีรายงานการตรวจพบโรคนี้ในกุ้ง *Penaeus monodon* (กุ้งกุลาดำ), *Penaeus vannamei*(กุ้งขาว), *Penaeus japonicus* , *Penaeus chinensis*, *Penaeus indicus, Penaeus merguiensis*, *Penaeus setiferus, Penaeus stylirostris* จากการทดลองพบว่าเชื้อ WSSV สามารถทำให้กุ้ง *Penaeus articus*, *Penaeus duodarum*และ *Penaeus setiferus* ตายได้ การระบาดของโรคจุดขาวมีรายงานเป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2536 ในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง *Penaeus japonicus* แห่งหนึ่ง ที่ประเทศญี่ปุ่น สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบโรคจุดขาวครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2537 ที่ จ. ตรัง และเรียกไวรัสนี้ว่า systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

David และคณะ (1990) ศึกษาดีเอ็นเอโพลิเมอร์จาก*Thermus aquaticus* เป็นสารที่พบบ่อยในอณูชีววิทยาเพราะมีประโยชน์ในการขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอและลำดับเบสดีเอ็นเอการแยกเอนไซม์แทครีคอมบิแนนท์ที่ผลิตใน *E. coli*การทำให้บริสุทธิ์ต้องเวลา 8-10 ชั่วโมงโดยการรักษาความร้อนและการล้าง lysate ของ *E. coli* ตามด้วยการตกตะกอนของเอนไซม์ด้วย polyethyleneimine และสกัดเอนไซม์ด้วย Bio Rex 70 ion exchange ส่งผลให้ได้เอนไซม์จากการเตรียมเพียงครั้งเดียวปริมาณของแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสผลผลิตโปรตีน40-50มิลลิกรัมต่อลิตรของเซลล์ที่เลี้ยงการทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากๆความสำคัญต่อประสิทธิภาพการใช้ในงานวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR

Kallayaและคณะ (2006) ในประเทศไทยวิธีการทำ PCR แบบต่างๆจะถูกใช้โดยภาครัฐและเอกชนห้องปฏิบัติการที่ ให้บริการ สำหรับการตรวจหา White spot syndrome virus (WSSV) ที่ติดเชื้อในตัวอ่อนของกุ้ง ดังนั้นเราจึงเปรียบเทียบความว่องไวของการทำ PCR ในแบบต่างๆโดยทั่วไปในไทยใช้แทคแมน PCR แบบ real- time เป้าหมายเพื่อเป็นมาตรฐานและการทำให้สต๊อกดีเอ็นเอต้นแบบของ WSSV บริสุทธิ์ จากการวิเคราะห์พบว่าไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโต อย่างมีนัยสำคัญ โดยWSSVต่อดีเอ็นเออิสระของกุ้งในช่วง 0-300 นาโนกรัม ต่อ reation ของกุ้งที่ติดเชื้อการทำ PCR แบบ real-time สามารถตรวจสอบได้อย่างแน่นอนที่เจือจางประมาณ 5 copies/reationและ 1000 copies/reation ร่วมกับการทำวิธี one-step PCR และ single-tube nested PCR 50copies/reation ยิ่งไปกว่านั้นการทดสอบความว่องไวแบบอื่นๆเช่นa triple-blind ring testถูกนำมาใช้กับ 10 ชุดของสารสกัดดีเอ็นเอที่ติดเชื้อ WSSV ส่งไปให้ห้องปฏิบัติการเอกชน 12 แห่ง และประชาชนโดยไม่มีการระบุวิธี PCR ที่จะใช้ผลตอบกลับมาแปลเป็นความไวของการทดสอบจาก 97.3% และความจำเพาะ 100%รวมผลการยืนยันความถูกต้องของวิธีการ PCRในประเทศไทยสำหรับการตรวจหาตัวแดงดวงขาวสารสกัดดีเอ็นเอในกุ้งโดยไม่ใช้วิธี PCR ผลที่ได้กลับมารวมถึงความผิดพลาดในเชิงบวกและเชิงลบแปลเป็นความไวของการทดสอบจาก 97.3% และความจำเพาะ100%รวมผลการยืนยันความถูกต้องของวิธีการ PCRในประเทศไทยสำหรับการตรวจหาตัวแดงดวงขาวในสารสกัดดีเอ็นเอของกุ้ง

Jianlinและคณะ (2012) จากการศึกษาเมื่อเร็วๆนี้แลกโตสเพิ่งจะสามารถเหนี่ยวนำโดยอัตโนมัติใน *E. coli* ได้รับความสนใจมากเพราะว่าสามารถสร้างโปรตีนได้ในปริมาณมากโดยไม่ต้องไม่จำเป็นต้องตรวจสอบการเจริญเติบโตและเพิ่มตัวเหนี่ยวนำในเวลาที่เหมาะสมการรักษาระดับการผลิตที่มีโปรตีนสูงโดยการเหนี่ยวนำแบบอัตโนมัติพบว่าใน เชื้อ *E. coli* BL21โดยใช้ทั้ง T7 หรือโปรโมเตอร์แทคในการปรับปรุงอาหารเลี่ยงเชื้อ Luria Bertani (mlB) ใช้เปปโตนจากถั่วเหลือง

แทนทริปโตนในอาหารเลี่ยงเชื้อ Luria Bertani (mlB) จากการวิเคราะห์อาหารและจากการทดลอง พบว่าปริมาณกาแลกโตส 0.4mM ของเปปโตนจากถั่วเหลืองทำให้เกิดการเหนี่ยวนำโดยอัตโนมัติ ใน *E. coli* จากการเหนี่ยวนำด้วยกาแลกโตสสามารถทำให้อิ่มตัวได้ที่ความหนาแน่นสูงกว่าการเหนี่ยวนำด้วย IPTG กาแลกโตสไม่ได้ถูกนำไปใช้โดย *E. coli* สุดท้ายนี้แสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำสามารถนำมาใช้อย่างมีประสิทธิภาพในการหมักอาหารชุดสำหรับการผลิตโปรตีนของภาคอุตสาหกรรมส่วนหลักการเหนี่ยวนำอัตโนมัติด้วยกาแลกโตสควรนำไปใช้อย่างมากโดยผ่าน microplates สำหรับชุดคัดกรองการโคลนและการแสดงออกของโปรตีนใน *E. coli*

Kamiokaและคณะ (2013) เชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียผู้รับอเนกประสงค์เพราะมี ต้นทุนต่ำและเป็นที่นิยม สำหรับ การแสดง โปรตีนอย่างไรก็ตามการสกัดโปรตีนลูกผสมจาก *E. coli* ต้องทำให้ผนังเซลล์แตกซึ่งต้องใช้เวลาและความพยายามอย่างมากเราได้เสนอวิธีการทำให้เซลล์แตกโดยการค้นพบ VanX ซึ่งเป็น d-Ala-d-Ala ของเอนไซม์ Dipeptidase ใน vancomycin-resistant ซึ่งมีความทนต่อยีน VanA แสดงให้เห็นถึงการสลายเซลล์ที่แข็งแรงเมื่อแสดงออกใน *E. coli* ในเทคนิคนี้เป็นการแสดงออกของ VanX ร่วมกับโปรตีนเป้าหมายทำให้เกิดการสลายเซลล์และปล่อยโปรตีนออกมาวิธีนี้แสดงสำหรับโปรตีน2ชนิดที่แตกต่างกันได้แก่ green fluorescent protein variant (GFPuv) และ Gaussia luciferase เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายและการแสดงออกร่วมกับเวกเตอร์ การทำให้เซลล์แตกโดยการย่อยสลายของ VanX-mediated นั้นง่ายต่อการดำเนินการและจะเพิ่มประสิทธิภาพให้กับวิธีดั้งเดิม

Laurence และคณะ (2004) จากการศึกษาความไม่คงตัวของพลาสมิดเมื่อพลาสมิดแสดงความเป็นพิษสูงจะไปยับยั้งการทรานสฟอร์เมชันการศึกษาจาก *E. coli* สายพันธุ์BL21(DE3), C41(DE3)และ C43(DE3) ซึ่งสองสายพันธุ์หลังกลายพันธุ์แล้วจากการศึกษาการแสดงออกของโปรตินพบว่า*E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) การแสดงออกคือ 62% ซึ่งอีกสองสายพันธุ์แดงออกได้ดีกว่า

Abolfazlและคณะ (2011) จากการศึกษาการโคลนและการแสดงออกของ Subunit S1 จากสารพิษในเชื้อ *E. coli* ยีน S1 ถูกขยายและแทรกในเวกเตอร์3ชนิดได้แก่ pET-14b,pET-22b(+)และ pAED4 ความเป็นไปได้และระดับของการแสดงออกของโครงสร้างเหล่านี้ใน *E. coli* BL21(DE3)เป็นแบคทีเรียผู้รับและการแสดงออกสูงสุดปรากฏใน pET-22b(+) S1 หลังจากการเหนี่ยวนำ ด้วย IPTG0.2mlใน LB ที่มีแอมพิซิลลิน ที่ 30°Cเขย่า (250รอบต่อนาที) 6 ชั่วโมงรีคอมบิแนนโปรตีนS1 ถูกพบในโปรตีนสองชนิดที่แตกต่างกันแยกออกจากกันด้วยน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28และ 31kDa

Fatemeและคณะ (2012) การศึกษาในการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส จาก *E. coli* ได้แก่การโคลนโดยใช้ pET15b เป็นเวกเตอร์และใช้ *E. coli* BL21(DE3) เป็นแบคทีเรียผู้รับเหนี่ยวนำโดยการบ่มกับ IPTG ที่มีความเข้มข้นต่างกัน (OD_{660}= 0.4) ซึ่งช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดหลังจากเหนี่ยวนำด้วย IPTG 0.1mM 2 ชั่วโมงทำโปรตีนให้บริสุทธิ์และดูขนาดด้วยวิธี Western blotting นำเอนไซม์ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 2800 bp ด้วยเทคนิค PCR

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์เครื่องมือและ สารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปต HTL LAB SOLUTION รุ่น DISCOVERY COMFORT ประเทศ Poland
2. ทิปขนาดต่างๆ (Micropipette and Tips) GILSON รุ่น AUTOCLAVABLE TOWERPACK ประเทศ U.S.A.
3. ลูปเขี่ยเชื้อ (Loops Inoculate)
4. Quart Cuvette
5. หลอดไมโครเซนติฟิวขนาด 50mL
6. หลอดไมโครเซนติฟิว ขนาด 1.5mL
7. พาราฟิล์ม ตะเกียง ไฟแช็ค
8. ขวดรูปชมพู่ขนาด 500mL
9. หม้อและเตาไฟฟ้า
10. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
11. ถุง dialysis ขนาด 25Kb MW cutoff (Dialysis bag cutoff membrane in the 25Kb)
12. กรรไกรและด้าย
13. บีกเกอร์ขนาด 100mL และ 1000mL
14. ที่คีบเหล็ก
15. พลาสติกห่ออาหาร (Wrap)
16. หลอดไมโครเซนติฟิวขนาด 0.2mL
17. ชุดอุปกรณ์ทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส
18. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250mL และ กระบอกตวงขนาด 100mL

3.1.2 เครื่องมือ

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge)
2. เครื่องบ่มเชื้อและเขย่า (Incubator Shaker) WIS 30 DIHAN
3. เครื่องไมโครเซนติฟิวจ์ (Microcentifuge) Tomos laboratory products ประเทศ China
4. เครื่อง Spectrophotometer 269N273008 CALIBRATION LABORATORY
5. ตู้บ่มเชื้อ Plus II incubaterบริษัท Thai polymedic
6. ตู้เย็น
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
8. เครื่อง Gel electrophoresis
9. เครื่อง Gel documentation
10. เครื่องไมโครเวฟ (Microwave) GE87Q-S samsungประเทศไทย
11. อ่างน้ำร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Water bath)
12. เครื่อง PCR รุ่น T100 Thermal cycle บริษัท ธีระเทรดดิ้ง จำกัด ประเทศไทย

3.1.3 สารเคมี

1. พลาสมิด pOpen*Taq* 100ng
2. เชื้อ *Escherichia coli* BL21(DE3)และ XL-1Blue
3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB BrothMolecular biology grade U.S.A.
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar/Amp Molecular biology grade U.S.A.
5. ยาแอมพิซิลลิน (ampicillin) 50 mg/mL
6. ไอโซโพรพิลไทโอกาแลคไตไซด์ (isopropylthiogalactoside : IPTG) 1 M
7. น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave
8. สารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ (lysis buffer) 10x
9. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 630 mM
10. เอนไซม์ดีเอ็นเอเอส (DNAse) 3.35 mg/mL
11. เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme)

12. เอทานอล 99.5 % Analytical grade CARLO ERBA Italy
13. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium Sulfate) Analytical reagent UNIVER Australia
14. สารละลาย Storage Buffer pH 8.6
15. อะคริลาไมด์ (acrylamide mix) 45 % Molecular biology grade U.S.A.
16. สารละลายทริส (Tris) 1.5M pH8.8และ 1.0M pH6.8 Molecular biology grade Research arganicsthailand
17. โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate) 10 %
18. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) 10 % Analytical reagent UNIVER Australia
19. เตตระเมทิลเอทิลลีนไดเอมีน(tetramethylethylenediamine) Bioreagent grade sigma U.S.A.
20. ไกลซีน (Glycine)
21. สีย้อม Coomassie Brilliant Blue stain solution
22. ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) 500 bp
23. สารละลายรีแอคชั่นบัฟเฟอร์ (reaction buffer) 10x
24. ดีเอ็นทีพี (dNTP) 10 mM
25. แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส
26. ผงอะกาโรสเจล (agarose gel)
27. สารละลายทริสบอริกอีดีทีเอ (TBE) 1x
28. อิธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)
29. สารละลายพีซีอาร์รีแอคชั่นบัฟเฟอร์ (PCR reaction Buffer)1x
30. ดีเอ็นทีพีผสม (dNTP mix) 0.1 µm
31. อาร์บีซีแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (RBC *Taq* DNA polymerase)
32. เชื้อ White spot syndrome virus (WSSV)
33. แถบโปรตีนมาตรฐาน (Unstained Protein Ladder)
34. แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder)
35. Destain Solution
36. 5x Loading dye

3.2 การแสดงออกของโปรตีน (Protein Expression)

ทำการละลาย pOpen*Taq* 100ng ด้วยน้ำ50µLในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 µL เขย่าเบาๆนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องไมโครเซนติฟิวจ์ (Microcentifuge) จะได้ pOpen*Taq* 2 ng/µL ใส่หลอดเก็บไว้ในน้ำแข็งทำการทรานสฟอร์เมชั่นโดยปิเปตสารละลาย pOpen*Taq* 2µLใส่หลอดที่มีเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE 3) และ XL-1Blueอยู่ (หลอดเชื้อพร้อมใช้) ตีข้างหลอดเบาๆ บ่มน้ำแข็งประมาณ 30 นาที และบ่มใน Water bath 42 °C ประมาณ 30 นาที นำมาแช่ในน้ำแข็งทันที ใส่ LB broth 1ml นำไปบ่มใน incubator shaker ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นนำมา spread บนplate LB Agar ที่มี 100 mg/ml แอมพิซิลลินนำไปบ่มที่37 °C ข้ามคืนในตู้บ่มเชื้อเตรียม LB broth10 ml ที่มี 100 mg/ml Ampicillin ปริมาตร 10µL ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 15ml ผสมให้เข้ากัน แล้วใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการเผาไฟเขี่ยเชื้อที่ได้จากการทรานสฟอร์เมชั่นใส่แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C ข้ามคืนสิ่งที่ได้คือ Starter culture จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 150 ml ในฟลาสขนาด 500 ใส่ 50 mg/mL แอมพิซิลลินลงในฟลาส 150µLให้ความเข้มข้นเป็น 0.001M ผสมให้เข้ากันย้าย Start culture ใส่ในฟลาส 3mL แล้วนำไปบ่มพร้อมเขย่าที่ 37 °C 3-5 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง incubator shaker วัดค่า OD (optical density) ทุกๆชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 600 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้ได้ค่า OD ในช่วง 0.6-0.8 จากนั้นใส่ 1 M IPTG ปริมาตร 75µL ให้ความเข้มข้นเป็น 0.5mM ลงในฟลาสแล้วนำไปบ่มพร้อมเขย่าที่ 37°C 8-16 ชั่วโมงหลังทำการเหนี่ยวนำด้วย IPTG แล้ว เก็บตัวอย่างมา 1 mLใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 mLโดยทำการเก็บทั้งหมด 6 หลอด คือ เก็บตอนใส่ IPTG1 ชั่วโมงหลังใส่ IPTG 2 ชั่วโมงหลังใส่ IPTG 3 ชั่วโมงหลังใส่ IPTG 8 ชั่วโมงหลังใส่ IPTGและ 24 ชั่วโมงหลังใส่ IPTG เพื่อนำไปดูขนาดโปรตีนด้วยวิธี เจลอิเลคโตรโฟรีซีสทำการปั่นตกด้วยเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 10 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนใส่ 1x ไลซิสบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 µL ตีหลอดเบาๆให้ตะกอนละลายทำการ quick spin ใส่ loading dyne 5x ปริมาตร 25 µL ผสมให้เข้ากัน quick spin นำมาต้มน้ำ 100°C เป็นเวลา 10 นาที ประกอบชุดอุปกรณ์ทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (ใส่ถุงมือขณะทำ)เตรียม resolving gel : ใช้ gel Acrylamide 8% (w/v) ปริมาตร 10mLใช้ไมโครปิเปตดูด resolving gel ที่เตรียมไว้ลงในชุดรันเจลประมาณ 5-6mLรอเจลแข็งตัว ประมาณ 1ชั่วโมงเตรียม stacking gel :gel Acrylamide 3% (w/v) ปริมาตร 3mLใช้ไมโครปิเปตดูด stacking gel ลงในชุดรันเจลปัก Comb รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาทีเอา Comb ออกจากเจลล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเติม10xTris-Glycine Electrophoresisgel ลงในกล่องรันเจลด้านในและด้านนอกโหลดตัวอย่างโปรตีนที่ต้มแล้ว 20 µL แถบโปรตีนมาตรฐาน5µL ต่อชุดอุปกรณ์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส เข้ากับpower supply ปรับกระแสไฟฟ้าในช่วง resolving gel 150V และ stacking gel 80V รอประมาณ 2 ชั่วโมงเมื่อรันเจลเสร็จ

นำเจลมาย้อมด้วยสีย้อม Coomassie Brilliant Blue stain solution ล้างสีย้อมโดยการแช่ Destain solution ทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วนำแผ่นเจลที่ได้ไปสแกนเพื่อดูขนาดโปรตีนบนแผ่นเจลส่วน expression culture ที่เหลือใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 50 mL แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนนำตะกอนที่ได้ไปสกัดโปรตีน

3.3 การสกัดโปรตีน (Protein Extraction)

ใส่ 1x ไลซิสบัฟเฟอร์ pH 8 ปริมาตร 7.5 mL ให้ความเข้มข้นเป็น 0.05M ลงในหลอดตะกอนโปรตีนตีข้างหลอดเบาๆหลีกเลี่ยงฟองและ ใส่ไลโซไซม์ 150µL ให้ความเข้าข้นเป็น 0.001M กลิ้งหลอดไปมาเพื่อให้สารเข้ากันเก็บใส่ถุงซิปนำไปแช่แข็ง (freezer) ที่ -20 °C นำออกมาให้ความร้อนใน Water bath ที่ 37°C เพื่อให้ cell suspention ละลายใส่ $CaCl_2$ ปริมาณ 119.04 µL ให้ความเข้มข้นเป็น 0.001M กลิ้งหลอดไปมาเบาๆ ใส่ DNAs 2.24 µL ให้ความเข้มข้นเป็น 0.05mM ผสมให้เข้ากันเบาๆบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C 2 ชั่วโมงจะได้สารละลายโปรตีนที่มีลักษณะที่เหนียว (slurry)

3.4 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ (Protein Purification)

นำโปรตีนที่สกัดได้มาให้ความร้อน 75 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงรอให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 นาที (เก็บส่วนใส) ให้ความร้อน 85°C เป็นเวลา 1ชั่วโมง เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่หลงเหลืออยู่รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้องปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 นาที (เก็บส่วนใส) ใส่แอมโมเนียมซัลเฟต 9 g (w/v) กลิ้งหลอดไปมาช้าๆจนแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมดนำไปปั่นเหวี่ยงเวลา 30 นาที (เก็บตะกอน) แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส จะอยู่ในรูปของตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตใส่สารละลาย 1x ไลซิสบัฟเฟอร์แล้ว ตีข้างหลอดเบาๆจนตะกอนละลายเลี่ยงฟอง (ทำการตรวจสอบโปรตีนโดยการทำ Gel Electrophoresis) จากนั้นทำการ Dialyze แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสในสารละลาย Storage Buffer pH 8.6 โดยใช้ที่คีบเหล็กและ กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟแล้วรอจนเย็นคีบถุง dialysis แล้วตัดใช้ด้ายผูกปลายด้านหนึ่งไว้ให้แน่นใช้มือคลี่ปลายอีกด้านหนึ่งออกให้กว้างปิเปตแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส ที่ละลายอยู่ในไลซิสบัฟเฟอร์ใส่ในถุง dialysis ผูกปลายอีกด้านให้แน่นเช่นกัน นำถุง dialysis ที่มี แทคดีเอ็นเอพอลิเมอรร์เรส ใส่ใน Storage Buffer pH 8.6 ปิดด้วยพลาสติกแล้วเก็บที่ 4°C เปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกวัน (แช่ข้ามคืน 2 คืน) การเก็บ (สวมถุงมือ) หยิบ ถุง dialysis ที่บรรจุโปรตีนอยู่ออกมาด้วยความระมัดระวังจับที่ถุงแล้วใช้กรรไกรตัดปมเชือกออก (ระวังถุงdialysis รั่วหรือขาด) จากนั้นคลี่ปากถุง dialysis ออกแล้วใช้ไมโครปิเปต ขนาด 20-2000 µL ดูดสารละลายมาใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 mL (ไม่เก็บส่วนที่เป็นฟอง) จากนั้นพลิกหลอดไปมาเติมพีเอ็มเอสเอฟ

6 µL ให้ความเข้มข้นเป็น 500mM ทำการผสม (ระวังการเกิดฟอง) นำไปแช่แข็ง (freezer) โดยถุง Dialysis bag ที่ใช้แล้วสามารถนำมาใช้ใหม่ได้โดยการนำมาล้างน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและ เก็บในเอทานอล 20 % ที่ 4°C

3.5 การทดสอบแอคติวิตี้ของแทคดีเอ็นเอพอลิเมอรร์เรส โดยใช้เทคนิค (PCR)

ในการออกแบบไพรเมอร์จะใช้โปรแกรม SECentral

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทำ PCR ปริมาตร 50 µL

สารเคมี	ปริมาตร
น้ำ DI	41.25 µL
primer	1 µL
Template (500 bp)	2 µL
10x Reaction buffer	5 µL
10 mMdNTP	0.5 µL
แทคดีเอ็นเอพอลิเมออร์เรส	0.25 µL

จากตารางผสมทุกอย่างให้เข้ากันโดยการปิเปตขึ้นลง หลังจากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยตั้งอุณหภูมิตามตารางนี้

Sagment	**จำนวนรอบ**	**อุณหภูมิ**	**เวลา**
1	1	94°C	1 นาที
2	40	94°C	30 วินาที
		50°C	1 นาที
		72°C	1 นาที
3		72°C	7 นาที
		25°C	

หลังจากทำ PCR แล้ว นำ PCR Product ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose gel electrophoresisจะใช้ Aarose gel เข้มข้น 1.2% (w/v)ในสารละลาย 1x TBE (Agarose 0.48 g ,1x TMB 40 mL) จากนั้นให้ความร้อนนำเจลเทลงใน chamber รอจนเจลแข็งตัวดึง Comb ออก แล้วใส่ลงใน

เครื่อง gel electrophoresis เท 1xTBE ลงในเครื่องให้ท่วมเจล จากนั้นเตรียมตัวอย่างโดยปิเปตสารละลาย PCR product 5 µL ผสมกับ Loading dye1 µL แล้วดูดสารละลายไปใส่ไว้ในช่องของเจลทำการ run gel โดยใช้ความต่างศักย์ 100 volts จนกระทั่งสีของ Loading dye เคลื่อนที่มาอยู่บริเวณกึ่งกลางเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้าย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาดเป็นเวลา 5 นาทีดูเจลด้วยเครื่อง Gel documentation

3.6 การตรวจหาเชื้อไวรัส WSSV ในกุ้ง โดยใช้เทคนิค PCR

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทำ PCR

สาร	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X Reaction Buffer	1.25 µL	1X
10 mMdNTP mix	0.125 µL	0.1 µm
Template DNA	1 µL	n/a
RBC แทคดีเอ็นเอพอลิเมอรร์เรส	0.0625 µL	n/a
Primer	0.5 µL	1.25 units
น้ำกลั่น	เติมจนมีปริมาตรรวม 12.5µL	n/a

จากตารางผสมสารละลายทุกอย่างให้เข้ากันนำเชื้อ WSSV ที่ได้มาเจือจาง 10 เท่า เชื้อไวรัสที่ได้จากกุ้งที่ติดเชื้อ White spot syndrome virus (WSSV) ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อจากห้องปฏิบัติการชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำสารละลายที่ได้เข้าเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิตามตารางนี้

Sagment	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ	เวลา
1	1	94°C	1 นาที
2	40	94°C	30 วินาที
		58°C	1 นาที
		72°C	1 นาที
3		72°C	7 นาที
		25°C	

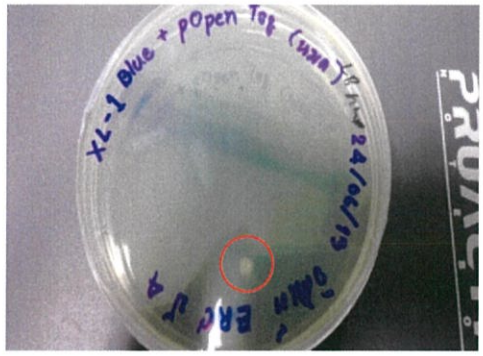
หลังจากทำ PCR แล้วนำ PCR Product ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทรานสฟอร์เมชั่นพลาสมิด pOpen*Taq*

จากการพลาสมิด pOpen*Taq* เข้าไปใน *Escherichia coli* XL 1-Blue และBL21(DE3) แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB/Agar ที่ใส่แอมพิซิลลินจากการวิเคราะห์ผลการทรานสฟอร์เมชั่นพลาสมิด pOpen*Taq* เข้าไปใน *Escherichia coli* XL 1-Blue และ BL21 (DE3) พบโคโลนีหนึ่งโคโลนีมีสีขาวขุ่น แสดงว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มีพลาสมิด pOpen*Taq* ที่เราต้องการผลเป็นดังภาพที่ 4.1และ 4.2

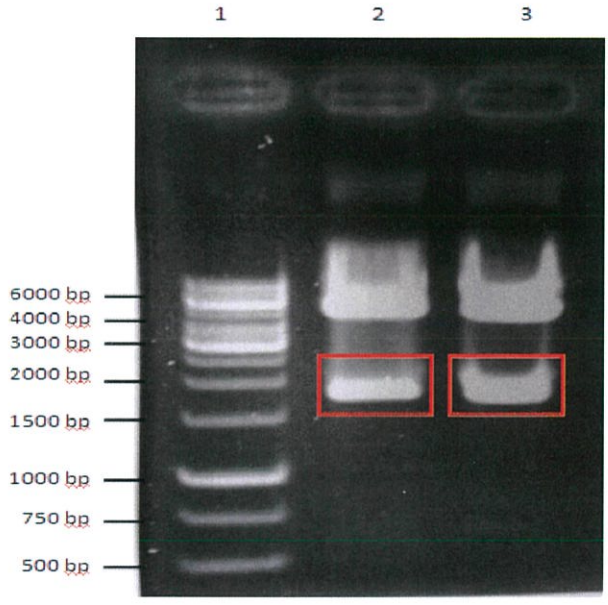


รูปที่ 4.1 โคโลนีของ *E. coli* XL-1Blue หลังจากการทรานสฟอร์เมชั่น

รูปที่ 4.2 โคโลนีของ *E. coli* BL21(DE3) หลังจากการทรานสฟอร์เมชั่น

4.2 การตรวจสอบขนาดพลาสมิด pOpen*Taq* ที่ได้จากการโคลนเข้าไปใน *Escherichia coli* XL 1-Blue

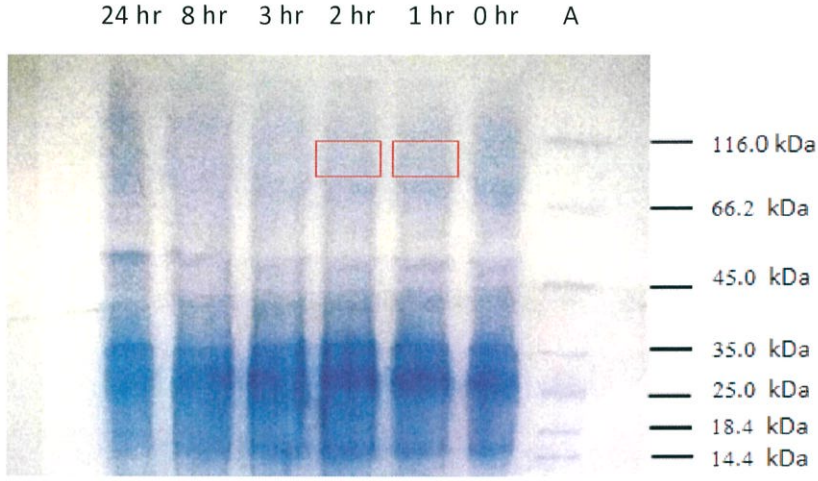
จากการโคลนพลาสมิด pOpen*Taq* เข้าไปใน *Escherichia coli* XL 1-Blue แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB/Agar ที่ใส่แอมพิซิลลินนำโคโลนีที่ได้มาสกัดเอาพลาสมิดและใช้ restriction enzyme EcoRI และ BamHI ในการตัดพลาดมิด นำพลาดมิดที่ตัดได้มาวิเคราะห์ด้วย 1.2% Agarosegel electrophoresis ทำการย้อมเจลด้วย ethidium bromide ดูเจลด้วยเครื่อง UV box จากการวิเคราะห์ผลของการทำ 1.2% Agarose gel electrophoresis ปรากฏ แถบพลาสมิด pOpen*Taq* ที่มีขนาดประมาณ 1778 bp เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานแสดงว่าในการทราสฟอร์เมชั่นพลาสมิดเข้าไปใน *Escherichia coli* XL 1-Blue มี พลาสมิด pOpen*Taq* เราต้องการอยู่ในเซลล์แบคทีเรียนั้นได้ผลดังภาพที่ 4.3



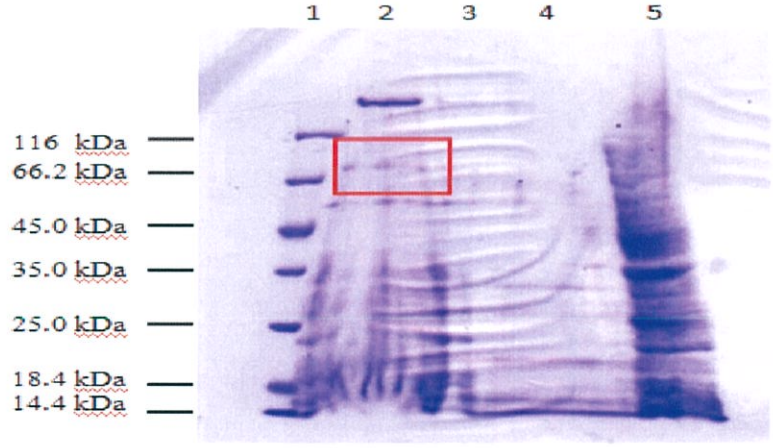
รูปที่ 4.3 การตรวจสอบขนาดพลาสมิด pOpen*Taq* ที่โคลนเข้าไปใน *Escherichia coli* XL 1-Blue โดยการทำ 1.2% Agarose gel electrophoresis: แถวที่ 1 คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน แถวที่ 2 และ 3 คือพลาสมิด pOpen*Taq* ในแถวที่ 2 และ 3 พบแถบของพลาสมิดpOpen*Taq* ที่ขนาด ประมาณ 1778 bp

4.3 การตรวจสอบขนาดโปรตีนโดยการทำSodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

จากการทำ SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบขนาดของโปรตีนที่ได้โดยการนำตัวอย่างโปรตีนที่ได้โหลดลงในช่องของ 8% gel acrylamide ช่องละ 20 μL ในช่องที่ 1-6 คือ 24 ชั่วโมงหลังใส่ IPTG 8 ชั่วโมงหลังใส่ IPTG 3 ชั่วโมงหลังใส่ IPTG 2 ชั่วโมงหลังใส่ IPTG 1ชั่วโมงหลังใส่IPTG และก่อนใส่ IPTG ตามลำดับ ช่องที่ 7 จะโหลด แถบโปรตีนมาตรฐาน 5μL เพื่อทำการเปรียบเทียบขนาดจากการผลการทดลองSDS-PAGE พบว่าที่ 1ชั่วโมงหลังใส่ IPTG และที่ 2ชั่วโมงหลังใส่ IPTG มีแถบของโปรตีนที่ใกล้เคียงกับขนาดโปรตีนที่เราต้องการคือ 90kDa เมื่อเทียบกับขนาดของแถบโปรตีนมาตรฐาน แสดงว่า ตัวอย่างโปรตีนที่เราทำการรันเจลมีโปรตีนอยู่ ผลที่ได้เป็นภาพที่ 4.4 จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยให้ความร้อน 75°C และ 85°C ปั่นเหวี่ยง (เก็บส่วนใส)ใส่แอมโมเนียมซัลเฟต 9g ละลายนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสใส่สารละลาย 1x ไลซิสบัฟเฟอร์ทำการตรวจสอบโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE อีกครั้งจากการผลการทดลองพบว่าที่ แถบที่ 2 ตะกอน 2ml มีแทบของโปรตีนปรากฏขึ้นบนเจลเมื่อเทียบกับขนาดของแถบโปรตีนมาตรฐาน พบว่าขนาดของโปรตีนที่ปรากฏมีขนาดใกล้เคียง 90kDa ซึ่งเป็นขนาดของโปรตีนที่เราต้องการผลที่ได้เป็นภาพที่ 4.5



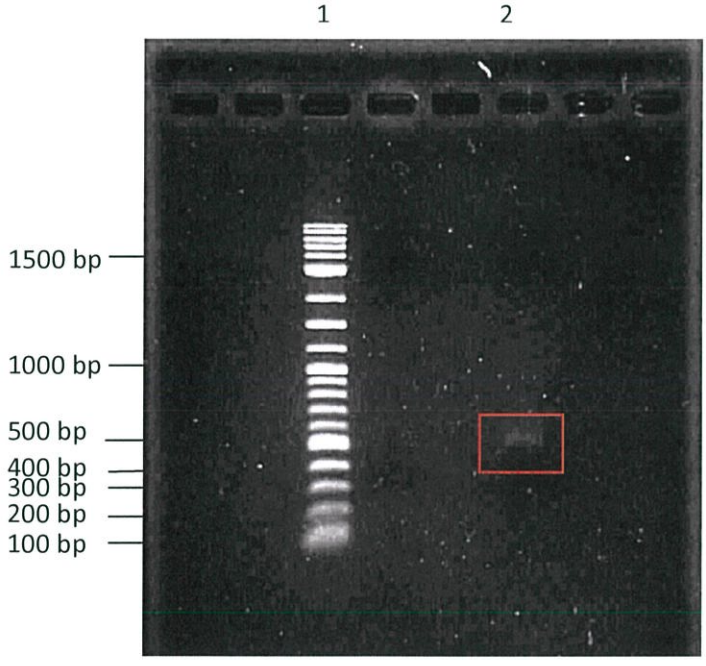
รูปที่ 4.4 การตรวจสอบโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE: แถว A คือแถบโปรตีนมาตรฐานจากภาพในแถวที่ 2 ชั่วโมงหลังใส่ IPTG และ 1 ชั่วโมงหลังใส่ IPTG จะพบแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส



รูปที่ 4.5 การตรวจสอบโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและนำมาตรวจสอบโดย SDS-PAGE : แถวที่ 1 คือแถบโปรตีนมาตรฐานแถวที่ 2 คือ ตะกอน 2ml แถวที่ 3 คือ ตะกอน 10 ml แถวที่ 4 คือ ไม่มีตะกอน แถบที่ 5 คือ หลังใส่ IPTG จากภาพในแถวที่ 2 จะพบแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส

4.4 การทดสอบแอคติวิตี้ของแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสโดยใช้เทคนิค PCR

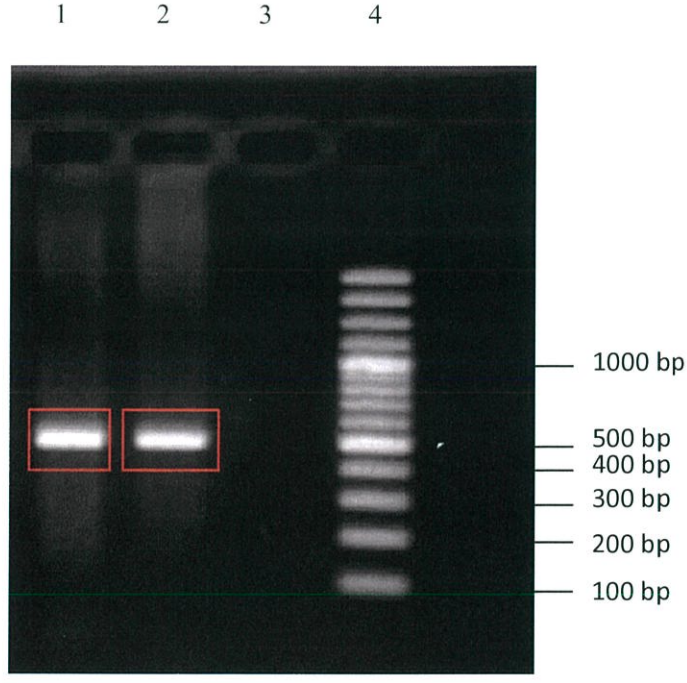
การทดสอบแอคติวิตี้ของแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่ผลิตขึ้นโดยการนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA Templat) ขนาน 500bpโดยใช้เทคนิค PCR และทำ 1.2% Agarose gel electrophoresis เพื่อดูขนาดดีเอ็นเอเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานจากผลการทดลองพบแถบของดีเอ็นเอแม่แบบขนาด 500bp เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน หลังจากการทำ 1.2% Agarose gel electrophoresis แสดงให้เห็นว่าแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสทีผลิตขึ้นจากการโคลน *Escherichia coli* XL 1-Blue สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 500bp ได้โดยเทคนิค PCR ผลการทดลองเป็นดังภาพที่ 4.6



รูปที่ 4.6 การทดสอบแอคติวิตี้ของแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสโดยใช้เทคนิค PCR จากการทำ 1.2% Agarose gel electrophoresis แถวที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน แถวที่ 2 คือ PCR product จากภาพในแถวที่ 2 พบแถบขึ้นที่ขนาด 500bp

4.5 การตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้ง โดยใช้แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสด้วยเทคนิค PCR

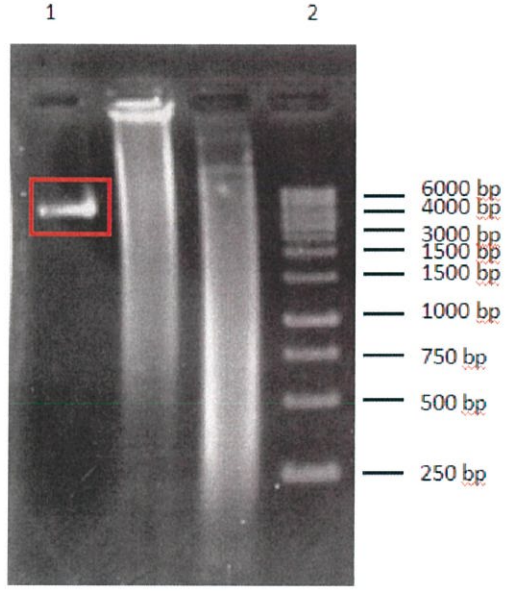
ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้งจะทำการตรวจหาเชื้อ White spot syndrome virus (WSSV) โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งในการตรวจหาเชื้อไวรัส WSSV ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อจากห้องปฏิบัติการชีวเคมีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยโดยการนำเชื้อตัวอย่าง WSSV มาเจือจาง10 เท่าโดยเราจะใช้แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสทางการค้าและ แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่ผลิตขึ้นมาตรวจหาด้วยเทคนิค PCRและนำมาวิเคราะห์ด้วย 1.5% Agarosegel electrophoresis พบแถบของ เชื้อ WSSVและเชื้อ WSSV ที่เจือจาง 10 เท่า แสดงว่าแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่เราผลิตขึ้นไม่สามารถนำมาตรวจสอบหาเชื้อ White spot syndrome virus (WSSV) ในกุ้งได้ผลที่ได้เป็นดังภาพที่ 4.7



รูปที่ 4.7 การตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้งโดยใช้แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสทางการค้าและแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่ผลิตขึ้น ด้วยเทคนิค PCR แถวที่ 1 คือเชื้อ WSSV ที่ใช้แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสทางการค้า แถวที่ 2 คือ เชื้อ WSSV ที่เจือจาง 10 เท่าและใช้แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสทางการค้าแถวที่ 3 คือเชื้อ WSSV ที่ใช้แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่ผลิตขึ้นและ แถวที่ 4 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐานจากภาพพบแถบของเชื้อ WSSV ที่ใช้แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสทางการค้า และเชื้อ WSSV ที่เจือจาง 10 เท่าใช้แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสทางการค้า

4.6การตรวจสอบขนาดพลาสมิด pOpen*Taq* และ pET -22b(+) Vector จากการโคลนเข้าไปใน *Escherichia coli* XL 1-Blue

จากการโคลนพลาสมิด pOpen*Taq* และ pET -22b(+) Vector เข้าไปใน *Escherichia coli* XL 1-Blue แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB/Agar ที่ใส่แอมพิซิลลินนำโคโลนีที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ restriction enzyme NdeI และ NotI ในการตัด pET -22b(+)Vector จากนั้นมาวิเคราะห์ด้วยการทำ 1.2% Agarose gel electrophoresis ทำการย้อมเจลด้วย ethidium bromide ดูเจลด้วยเครื่อง UV box จากการวิเคราะห์ผลของการทำ 1.2% Agarose gel electrophoresis ปรากฏแถบของดีเอ็นเอและเมื่อเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าไม่พบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดดีเอ็นเอที่เราต้องการแสดงว่าในการทรานสฟอร์เมชั่นพลาสมิด pOpen*Taq* และ pET -22b(+) Vector เข้าไปใน *Escherichia coli*XL 1-Blue ไม่มีพลาสมิดที่เราต้องการได้ผลดังภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 การตรวจสอบขนาดพลาสมิด pOpen*Taq* โดยการทำ 1.2% Agarose gel electrophoresis :แถวที่ 1 คือพลาสมิดpOpen*Taq* แถวที่ 2 คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าใน แถวที่ 1ไม่ปรากฏแถบของพลาสมิด pOpen*Taq*

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การผลิตเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (*Taq* DNA polymerase) จากการโคลนพลาสมิด pOpen*Taq* เข้าไปในแบคทีเรียโดยใช้เชื้อ *Escherichia coli*BL21(DE3)และXL-1Blue เป็นแบคทีเรียผู้รับพบโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งLB Agar/Amp การพบโคโลนีของเชื้อเป็นเพียงการคาดการณ์เบื้องต้นว่าน่าจะมีพลาสมิด pOpen*Taq* ในแบคทีเรียผู้รับเท่านั้นซึ่งบางครั้งโคโลนีของเชื้อที่พบอาจไม่ใช่เชื้อที่มีพลาสมิดที่เราต้องการเสมอไป เนื่องจากมีปัจจัยอื่นๆร่วมด้วยเช่น คุณภาพของพลาสมิดที่โคลนเข้าไปไม่ดีพอ การเตรียมพลาสมิดในขั้นต้นอาจมีความเจือจางเกินไป อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองซึ่งอาจรวมไปถึงอายุของเชื้อ *Escherichia coli* ที่ใช้แก่เกินไปทำให้ประสิทธิภาพการโคลนน้อยลงดังนั้นจึงตรวจสอบขนาดพลาสมิดใน *Escherichia coli* XL-1Blueปรากฏแถบพลาสมิดขนาดประมาณ1778 bp เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานสรุปได้ว่าพลาสมิดที่อยู่ในเชื้อ *Escherichia coli* คือพลาสมิด pOpen*Taq* ค่า ODที่ใช้ในการกระตุ้นด้วย IPTG คือ 0.8 วัดความยาวคลื่นที่ 600nm การดูขนาดโปรตีนที่ผลิตโดยการทำ SDS-PAGE ใช้ polyacrylamide gel 8% ก่อนและหลังการสกัดให้บริสุทธิ์พบแถบโปรตีนขนาด 90 kDa จางมากจากการวิเคราะห์สาเหตุที่อาจจะเป็นไปได้เช่นการใช้ expression culture ที่มีค่า OD เกิน 0.8 แล้วนำไปเหนี่ยวนำด้วย IPTG เชื้อที่นำมาใช้จึงแก่เกินไปที่จะนำมาผลิตโปรตีน หรือ พลาสมิด pOpen*Taq* ที่ใช้ในการโคลนประสิทธิภาพไม่ดีพอนอกจากนี้การให้กระแสไฟฟ้าในในช่วงแถบ stacking ของการรันเจลที่มากเกินไปทำให้โปรตีนทำให้โปรตีนที่โหลดไม่มีระยะเวลาในการอัดตัวก่อนแยกจึงทำให้เห็นแถบไม่ชัดเจนการทดสอบแอคติวิตี้ของแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่ผลิตขึ้นโดยใช้ในการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอขนาด 500bp ด้วยเทคนิค PCR พบแถบของดีเอ็นเอขนาด 500bp แต่แถบมีขึ้นไม่ค่อยชัดเจนและเมื่อนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้งพบว่าไม่สามารถใช้แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่ผลิตขึ้นตรวจหาเชื้อดังกล่าวได้เป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพของแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่ผลิตมีน้อยเมื่อวิเคราะห์สาเหตุที่น่าจะเป็นไปได้พบว่าเกิดจากคุณภาพของตัวพลาสมิดที่ไม่ดีพอในการผลิตหรือตัวแบคทีเรียผู้รับและ พลาสมิดไม่สามารถเข้ากันได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรตรวจสอบคุณภาพของแบคทีเรียผู้รับและ พลาสมิดที่จะใช้การโคลนควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ให้เหมาะสมและ ทดลองใช้วิธีการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธีอื่น
2. ทดลองโคลนยีนแทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส เข้าไปใน pET-22b(+)ซึ่งเป็นเวกเตอร์ตัวใหม่ที่จะใช้โคลนเข้าไปในแบคทีเรียผู้รับ

เอกสารอ้างอิง

กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย. (2556). **วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย**. (ออนไลน์) . แหล่งที่มา : www.kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/2391/6/223354_app1.pdf. วันที่สืบค้น 20 กันยายน 2556

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. (2556). **IPTG**. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : www.sc.mahidol.ac.th /scbc/webboard/view.php?ID=001477 วันที่สืบค้น 11 ตุลาคม 2556

ตรีทิพย์ รัตนวรชัย .2552. **อณูพันธุศาสตร์เบื้องต้น มหัศจรรย์องดีเอ็นเอ** . กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์ฟาลงกรณ์

ธนเศรษฐ์ เสนาวงศ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น .(2556). **การสังเคราะห์ดีเอ็นเอและการแสดงออกของยีน**.(ออนไลน์).แหล่งที่มา : www.champa.kku.ac.th/thanaset วันที่สืบค้น 20 ตุลาคม 2556

บริษัท พาราไซแอนติฟิค จำกัด. (2556). **จากดีเอ็นเอสู่โปรตีน.** (ออนไลน์). แหล่งที่มา : www.barascientific.com .วันที่สืบค้น 12 ตุลาคม 2556

บริษัท openbiotech. (2556). **pOpen*Taq* Expression Vector**. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : www.openbiotech.com/product_p/popentaq.htm. วันที่สืบค้น 9 กันยายน 2556

บริษัท กิบไทย จำกัด. (2556). **SDS- PAGE** . (ออนไลน์). แหล่งที่มา : www.gibthai.com /services/technical_detail.php?ID=. วันที่สืบค้น 20 ตุลาคม 2556

บริษัท thermoscientific (2556). **Ladder**. (ออนไลน์). แหล่งที่มา :www.thermoscientificbio.com.2010 . วันที่สืบค้น 6 ตุลาคม 2556

พรงาม ลิปตระกูล .2541. **ชีวเคมีของกรดนิวคลีอิก** . กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์ดาว

พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล . 2010 .**อาร์คีจุลินทรีย์สายพันธุ์แกร่ง** . ปทุมธานี. ศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศ

มณีวรรณ สุขสมทิพย์ .2553. **การโคลนยีนเบื้องต้น** . กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์ฟาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

มหาวิทยาลัยรามคำแหง. (2556). **การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับโคลน.** (ออนไลน์). แหล่งที่มา : www.e-book.ram.edu/e-book/b/BO453(H)/BO453-7 . วันที่สืบค้น 6 ตุลาคม 2556

วิกิมีเดียไทยแลด์. (2556). ***Escherichia coli* (*E. coli*)** . (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://th.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli. วันที่สืบค้น 1 ตุลาคม 2556

วิกิมีเดียไทยแลด์. (2556). ***lac* Operon**. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://th.wikipedia.org/wiki/Lac_operon , วันที่สืบค้น 1 ตุลาคม 2556

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ .2536. **เทคนิค PCR ในการวินิจฉัยโรคและแยกวิเคราะห์** : ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สถาบันชีววัตถุ . 2536. **การผลิตและควบคุมคุณภาพ Biotechnological Products** . กรุงเทพฯ

สุทธิเดช ปรีชารัมย์ .2556. **พันธุกรรมของแบคทีเรีย** . กรุงเทพฯ

สุรินทร์ ปียะโชคณากุล . 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ** . กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุรินทร์ ปียะโชคณากุล .2548. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น** . กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. 2555. **ปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม**.กรุงเทพฯ:สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Andy Vierstraete. (2556). **PCR**. (ออนไลน์). แหล่งที่มา :users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html วันที่สืบค้น 1 ตุลาคม 2556

Khafri, A. , Aqhaiypour, K., Peerayeh, S.N. andGhorbani, R.,(2011). **Cloning and Expression of S1 Subunit of Pertussis Toxin in *Escherichia coli*. Avicenna J Med Biotechnol.** 3(1):19-24

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

Engelke ,D. R .,Krikos ,A ., Bruck, M. E. and Ginsburg,D.(1990). **Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. Analytical Biochemistry**.V.191: 396-400

Moazen, F., Rastegari, A., Hoseini, S.M., Panjehpour, M., Miroliaei, M.andSadeghi, H.M.,(2012). **Optimization of *Taq* DNA polymerase enzyme expression in *Escherichia coli*. Adv Biomed Res**.V.1:82

Ausuble,F.M., Brent,R.,Moore,R.D., Seidman,J.G., Smith,T.A. andStruhl,K.(1999). **Short Protocols in Molecular Biology**. New York.Jonh Wiley & Sons,Inc :16-2

Walsh,G., (2002). **Biochemistry and Biotechnology** . New York. Jonh Wiley & Sons, Inc:501

National Center for Biotechnology Information. (2556). **DNA polymerase**. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term= DNA. วันที่สืบค้น **24 ตุลาคม 2556**

Green,M.,J. (2012). **Molecular Cloning A Laboratory Fourth Edition** ,New York. Spring harbbor Laboratory press: 1602, R., Sambrook 1613-1614

Xu, J. ,Akhilesh,B. , Pan, S. and Li,Z. J. (2012). **Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using *E. coli* BL21 strains. Protein Expression and Purification**.V. 83: 30-36

Sritunyalucksana ,K. , Srisala,J. , McColl ,K., Nielsen,Land Flegel . T.W. (2006).**Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeidshrimp. Aquaculture**.V. 255: 95-104

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

The Louisiana Animal Disease Diagnostic Laboratory. (2556). **WSSV**. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://www.vetmed.lsu.edu/news_&_events_archives_2007.วันที่สืบค้น 24 ตุลาคม 2556

Kamioka, T.,Sohya,S. ,Wu,N. ,Maki, T. ,Matsuda, T. ,Ikegami, T. ,Nakamura ,H. and Kuroda, Y. (**2013). Extraction of recombinant protein from Escherichia coli by using a novel cell autolysis activity of VanX. AnalyticalBiochemistry**.V. 439: 212-217

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารละลาย

สารละลาย IPTG 1x (0.1M)

1 M IPTG	100 µL
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	900µL

วิธีการเตรียม

ใส่ 1 M IPTG 100 µL และ น้ำกลั่น 900µL ในหลอดขนาด 1.5 mLเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

สารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ (lysis buffer) 10x ในปริมาตร 50 mL

Tris-base	0.8 g
KCl	1.875 g
EDTA	0.15 g

วิธีการเตรียม

ชั่งTris0.8 gKCl1.875 g และ EDTA0.15 g ละลายในน้ำ 30 mLปรับ pH ด้วย HClจน pH=8 และปรับปริมาตรเป็น 50 mL นำไป Autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาทีเก็บที่อุณหภูมิ -4°C หากนำออกมาใช้ให้ใส่ 1% triton x 100สาร

สารละลาย lysozyme 10 mL

Lysozyme	0.1 g
lysis Buffer 1x	10mL
Triton x 100	100µL

วิธีการเตรียม

ชั่ง lysozyme 0.1 g ละลายใน 10 mLlysis Buffer 1xที่ใส่ 100µL Triton x 100 แล้ว ผสมสารละลายให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

สารละลาย $CaCl_2$ 630mM

$CaCl_2$	0.7 g
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	900µL

วิธีการเตรียม

ชั่ง $CaCl_2$0.7 g ในน้ำ 10 mLจากนั้นนำไปAutoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายDNAseใน Storage Buffer 10 mL

Storage Buffer

-Tris-HCl 1 M (pH 7.5)	50 mL
-Glycerol 50% ปริมาตร	10 mL
- $CaCl_2$630 mM	10 mL
-DNAse	0.335 g

วิธีเตรียม

-ละลาย Tris 6.055 g ในน้ำ 20 mLปรับ pH = 7.5 ด้วย HClแล้วปรับปริมาตรเป็น 50 mLด้วยน้ำกลั่น

-ปิเปต5 mL Glycerol 100% ในน้ำ 5 mLทำการผสมให้เข้ากัน

-Tris-HCl pH 7.5 100 µl 50%Glycerol 10 mLและ 630 mM $CaCl_2$ 15.9 µl ใส่ในหลอดขนาด 1.5 mL ผสมให้เข้ากัน(เลี่ยงการเกิดฟอง)

-ละลาย DNAse 0.335 g ใส่หลอดขนาด 1.5 mLทำการละลายด้วย Storage buffer 800 µlจากนั้นดูดสารละลายจากหลอดที่มี DNAse มาใส่ในหลอดที่มี Storage buffer เหลืออยู่ แบ่งใส่หลอด จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20C

การรันเจล(run gel)

ส่วนประกอบ 8% gel Acrylamide (10 mL): Separate gels

Components	Volume of components required to cast gel of indicated volumeand concentration	
	5mL	10 mL
8% gel		
H_2O	2.3	4.6
Acrylamide mix (30%)	1.3	2.7
Tris(1..5M , pH 8.8)	1.3	2.5
SDS(10%)	0.05	0.1
Ammonium persulfate(10%)	0.05	0.1
TEMED	0.003	0.006

วิธีเตรียม

ปิเปตสารละลายตามตารางข้างต้น ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปเทลงในชุดรันเจล

ทำการเตรียม stacking gel :3% gel Acrylamide

Components	Volume of components required to cast gel of indicated volume and concentration	
	2mL	3 mL
3% gel		
H_2O	1.4	2.1
Acrylamide mix (30%)	0.33	0.5
Tris(1..0M , pH 6.8)	0.25	0.38
SDS(10%)	0.02	0.03
Ammonium persulfate(10%)	0.02	0.03
TEMED	0.002	0.003

วิธีเตรียม

ปิเปตสารละลายตามตารางข้างต้น ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปเทลงในชุดรันเจลต่อจาก Separate gels

การเตรียม Agarose gel (1.2%) (20 mL)

Agarose gel	0.24 g
1X TBE	10 mL

การเตรียม

ชั่ง Agarose gel0.24 g ละลายด้วย 1x TBE10 mL และน้ำกลั่น 10 mLจากนั้นนำไปให้ความร้อน รออุ่นแล้วนำมาเทใส่ชุดรันเจล

ส่วนประกอบ1.2% Agarose Gel

Agarose	0.48 g
1X TMB	40 mL

ชั่งผง Agarose 0.48 กรัม ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TBE 40 mLนำไปให้ความร้อนให้ละลายเทใส่ถาดเตรียมเจล

สารละลายบัฟเฟอร์electrophotoresis (Tris-borate buffer 10xTBE) สำหรับการทำ Agarose gel electrophotoresis

Tris-base	108 g
boric acid	55 g
0.5 MEDTA pH 8	40 mL
น้ำกลั่น	1 L

ชั่ง Tris-base 108g และ boric acid 55 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 800 mLเติม 0.5 M EDTA pH 8 จำนวน 40 mLและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

สารละลาย Tris-Glycine Electrophoresis Buffer (10x) 500 mL

Tris-base	7.57 g
Glycine	36.0 g
SDS	2.5 g
น้ำกลั่น	250mL

วิธีการเตรียม

ชั่ง Tris-base 7.57 g Glycine 36.0 gและ SDS 2.5 gละลายในน้ำกลั่น 500 mL

สารละลาย Destain Solution

Glacial aceticacid	10 mL
methanol(100%)	50 mL
น้ำกลั่น	40 mL

วิธีการเตรียม

ใส่ Glacial aceticacid10 mL methanol(100%) 50 mL น้ำกลั่น 40 mL ผสมให้เข้ากัน

สารละลาย Coomassie Brilliant Blue Stain Solution

ผง Coomassie Brilliant Blue	0.05 g
methanol(100%)	50 mL
Glacial aceticacid	10mL
น้ำกลั่น	40 mL

วิธีการเตรียม

ละลายผงCoomassie Brilliant Blue ใน methanol (100%) ให้ละลายก่อนจากนั้นเติมน้ำและ Glacial aceticacid และนำไปกรองแบบลดความดัน ขนาดกระดาษกรองที่ใช้ Whatman No.1

*methanol(100%)กับน้ำก่อนแล้วจึงใส่ Glacial aceticacid

สารละลาย Dialyze *Taq*Storange pH 8.6 (500 mL)

-Tris-HCl pH 8.6 และ 500 mMNaClปริมาตรรวม 800 mL

Tris-HCl	48.4 g
NaCl	23.36 g

ละลาย Tris-HClในน้ำประมาณ 700 mLปรับ pH=8.6 ด้วยHClจากนั้นเติม NaClลงไปและปรับปริมาตรเป็น 800 mL

-EDTA 0.1 M	25 mL

ชั่ง EDTA 0.7 g ละลายในน้ำกลั่น 25mLนำไป Autoclave

-DTT	1 M

ชั่ง DTT 0.3828 ละลายในน้ำ 2.4803 mLเก็บที่อุณหภูมิ -20C

-Glycerol	25%

วิธีการเตรียม

ใส่ Tris-HCl pH 8.6 และ 500 mMNaCl 50 mL EDTA 500 µl 1 M DTT 500 µl 25%Glycerol 125mL PMAF 500 µl ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -4C

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Luria Bertani Broth600 mL(25 g :1000 mL)

Luria Bertani Broth	15g
น้ำกลั่น	600 mL

วิธีการเตรียม

ชั่ง Luria BertaniBroth15 g ละลายในน้ำ 600 mLจากนั้นนำไป Autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Luria Bertani Agar 150 mL

Luria Bertani Broth	3.75g
น้ำกลั่น	150mL
1.5% Agar	2.25 g

วิธีการเตรียม

ชั่ง Luria BertaniBroth3.75 g Agar2.25 g ละลายในน้ำกลั่น 150 mLจากนั้นนำไป Autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Trypticase Soy Agar (30 g:1000 mL)

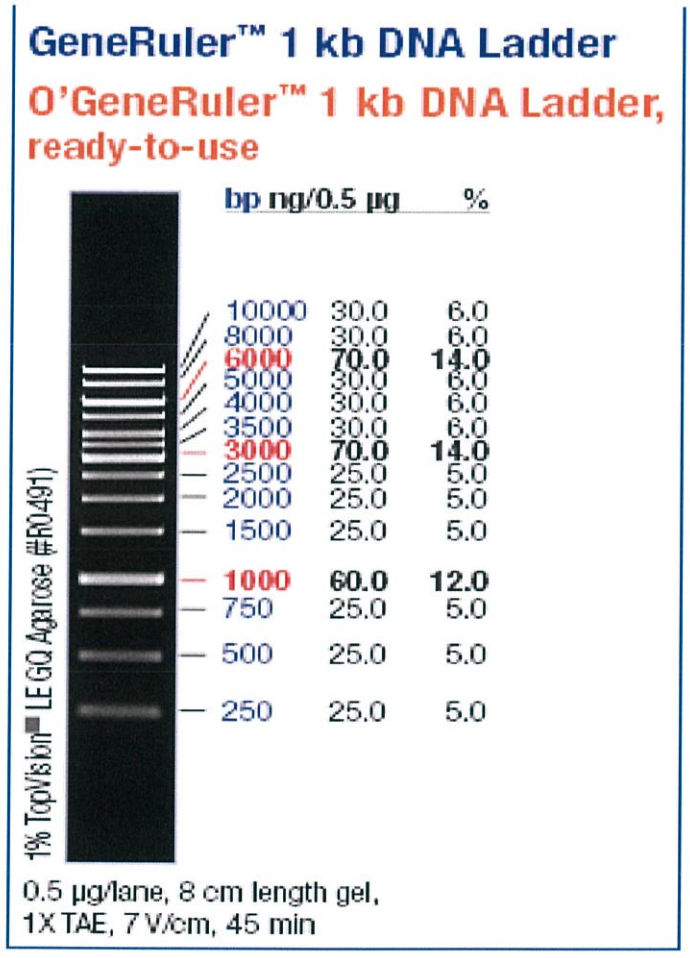
Trypticase Soy	3 g
1.5% Agar	1.5 g

วิธีการเตรียม

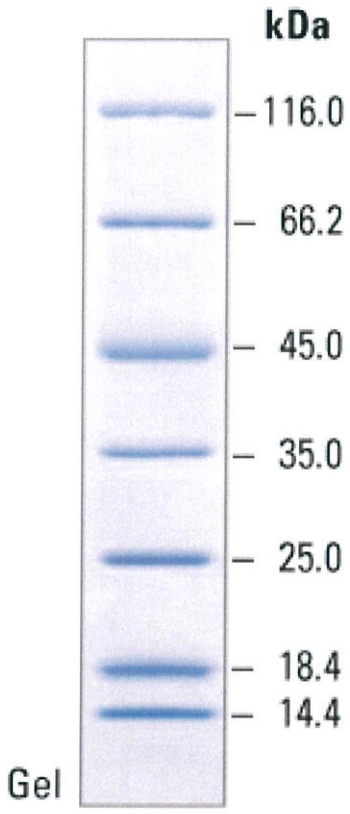
ชั่ง TS3 g Agar 1.5 g ละลายในน้ำกลั่น 150 mLจากนั้นนำไป Autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15

ภาคผนวก ค

Ladder



GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use 250 to 10,000 bp



SDS-PAGE band profile of the Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker. Image is a 12% Tris-glycine gel (SDS-PAGE) stained with coomassie blue gel stain.