157123

เอกสารประกอบคำสอนวิชา 104 854
เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล
(Techniques in Molecular Biology)

เรื่อง

การโคลนยีน
(Gene Cloning)

โดย
ผศ. ดร. หนูเดือน เมืองแสน
สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2553 (สงวนลิขสิทธิ์)

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำนำ

หนังสือบทปฏิบัติการนี้จัดทำขึ้นเพื่อเป็นส่วนหนึ่งในการสอนวิชา 104 854 เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล (Techniques in Molecular Biology) สำหรับนักศึกษาบัณฑิตศึกษาระดับปริญญาโทและเอก โดยมีเนื้อหาเน้นการจัดการกับดีเอ็นเอ การแยกดีเอ็นเอออกจากแบคทีเรีย การเชื่อมต่อยีน การส่งถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย การคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสม รวมทั้งมารยาทและข้อปฏิบัติในการทำงานในห้องปฏิบัติการ

ผู้เขียนเล็งเห็นว่าปัจจุบันเทคโนโลยีดีเอ็นเอได้เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวัน ไม่ว่าจะเป็นอาหาร วัคซีน ยา โปรตีนในทางการแพทย์ เช่น อินซูลิน ล้วนเป็นผลมาจากการตัดต่อยีน นักศึกษาควรมีความเข้าใจและเรียนรู้เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้อง งานหลายอย่างในทางชีววิทยาระดับโมเลกุลไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า เช่น การเชื่อมต่อดีเอ็นเอจากสองแหล่งในหลอดทดลอง การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ การทดลองเหล่านี้ต้องอาศัยจินตนาการเข้าช่วยแต่อาจเข้าใจได้ไม่หมดจึงจำเป็นต้องลองทำเอง พื้นฐานในการโคลนยีนยังคงอาศัยหลักการเหมือนเดิมมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1970 เพื่อความเข้าใจหลักการพื้นฐานในการตัดต่อยีน ผู้เขียนจึงนำเสนอปฏิบัติการที่มีความต่อเนื่อง เป็นขั้นตอนและให้นักศึกษาแก้ปัญหาด้วยตัวเองระหว่างที่ทำเพื่อความเข้าใจ

ผู้เขียนหวังว่าเอกสารประกอบการสอนเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักศึกษาและผู้สนใจ และนำไปใช้เป็นความรู้พื้นฐานในงานด้านชีววิทยาระดับสูงต่อไป

พลาสมิด pEGFP-N1 และ pAD1 ที่นำมาใช้ในการทำปฏิบัติการนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Sue Carson, North Carolina State University ซึ่งต้องขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

หนูเดือน เมืองแสน
มกราคม 2553

สารบัญ

บทปฏิบัติการที่ 1 บทนำ
บทปฏิบัติการที่ 2 เทคนิคพื้นฐานในการเตรียมอาหาร สารละลายบางชนิดและวัสดุอุปกรณ์
บทปฏิบัติการที่ 3 การสกัดและเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียปริมาณมาก
บทปฏิบัติการที่ 4 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ
บทปฏิบัติการที่ 5 การตัดดีเอ็นเอโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
บทปฏิบัติการที่ 6 การแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจล
บทปฏิบัติการที่ 7 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ
บทปฏิบัติการที่ 8 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้านและการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์
บทปฏิบัติการที่ 9 การเลือกเฟ้นเซลล์เจ้าบ้านที่มียีนที่ต้องการ
บทปฏิบัติการที่ 10 การตรวจหาโคลนที่ต้องการ โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)
ภาคผนวก

อักษรย่อที่ควรรู้ในทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

A260	การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
A280	การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
Amp	ยาปฏิชีวนะ ampicillin
bp	base pair
Carb	ยาปฏิชีวนะ carbenicillin
cfu	colony forming unit
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytidine triphosphate
dGTP	deoxyquanosine triphosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
DMSO	dimethylsulfoxide
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase A	deoxyribonuclease A
DTT	dithiothretol
EDTA	ethylenediamine tetraacetate
EtBr	ethidium bromide
g	gram
IPTG	Isopropyl- ß -D-thiogalactopyranoside
kb	kilobase (1 kb = 1000 bases)
LB	Lubia Bertani medium
M	Molar
µg	microgram (10^{-6} gram)
mg	milligram (10^{-3} gram)
µl	microliter (10^{-6} liter)
µM	micromolar (10^{-6} M)
ml	milliliter

mM	millimolar
ng	nanogram (10^{-9} gram)
OD600	optical idensity ที่ 600 นาโนเมตร
ORF	open reading frame
pg	picogram (10^{-12} gram)
pmol	picomol (10^{-12} M)
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
RNase A	ribonuclease A
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBE	Tris-Borate-EDTA buffer
TE	Tris-EDTA buffer
Tris	Tris (hydroxylmethyl) aminomethane
Tris-HCl	Tris-hydrochloride buffer
UV	ultraviolet
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactopyranoside

ข้อควรปฏิบัติทั่วๆ ไปในห้องปฏิบัติการทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล

กฎต้องห้าม

1. ไม่ดื่ม กิน สูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ
2. หลีกเลี่ยงการสวมรองเท้าเปิดส้น
3. สวมเสื้อกาวน์ในห้องปฏิบัติการแต่ไม่สวมนอกห้อง
4. ไม่ใช้ปากในการดูดปิเปต
5. รู้จักช่วยตัวเองและผู้อื่นกรณีฉุกเฉิน
6. อย่ากระทำการใดที่ไม่ปลอดภัย

กฎพื้นฐานในการเอาตัวรอดในห้องปฏิบัติการและทัศนคติ

1. ข้อร้องอย่างสุภาพ เมื่อต้องการความช่วยเหลือ ไม่ควรออกคำสั่ง
2. อย่าคิดว่าจะมีคนช่วย ควรพึ่งตัวเองให้มากที่สุด
3. จดบันทึกเท่าที่เป็นไปได้เมื่อมีใครอธิบายวิธีการบางอย่างแก่คุณ

กฎในการทำงานบนโต๊ะ

1. อย่าใช้สารเคมี บัฟเฟอร์ของผู้อื่นโดยไม่ได้รับอนุญาติ
2. ถ้าสารเคมีที่ใช้ประจำกำลังหมดหรือหมด ให้รายงานเจ้าหน้าที่หรืออาจารย์ผู้สอน
3. อย่าละเลยต่ออุปกรณ์ที่ชำรุดเสียหาย หรือเสียงที่ผิดปกติ ให้แจ้งเจ้าหน้าที่หรืออาจารย์ผู้สอน
4. จัดเก็บสารเคมีหรืออุปกรณ์ให้เรียบร้อย
5. ทำความสะอาดอุปกรณ์ และโต๊ะทันทีที่เสร็จการทดลอง
6. ขอความช่วยเหลือจากผู้อื่นให้น้อยที่สุด

การเขียนสมุดบันทึกงานวิจัย (Laboratory notebook)

สมุดบันทึกงานวิจัย (Laboratory notebook) คือ สมุดที่มีการบันทึกผล วิธีการทดลองและผลการทดลอง ข้อมูลดิบที่ได้ในสมุดบันทึกงานวิจัยมีความสำคัญมากต่อการนำเสนอผลงาน การตีพิมพ์วารสาร วางแผนการทดลอง ถ้าไม่มีสมุดบันทึกงานวิจัยก็เหมือนว่าไม่เคยทำงานในห้องวิจัย สมุดบันทึกงานวิจัยต้องมีความกระจ่างชัด เข้าใจง่าย เพราะหากการทดลองผิดพลาดไป สามารถตรวจสอบงานวิจัยเดิมจากสมุดบันทึกงานวิจัยและแก้ไขปัญหาได้ เช่น ใช้เซลล์ที่เก่ามากไปหรือเปล่า เตรียมบัฟเฟอร์ถูกต้องหรือไม่ เอนไซม์หยุดการทำงานเมื่อใด นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ท่านอื่นควรจะสามารถอ่านบันทึกงานวิจัยจากสิ่งที่ท่านเขียนได้ การเขียนบันทึกแบบลวกๆ อ่านได้หรือเข้าใจได้เฉพาะคนเขียนเท่านั้น ถือว่ามีพฤติกรรมน่าสงสัย นอกจากนี้สมุดบันทึกงานวิจัยยังนำมาใช้เป็นข้อมูลในการแสดงข้อเท็จจริงและแสดงถึงความเป็นนักวิทยาศาสตร์

ข้อแนะนำในการเขียนสมุดบันทึกงานวิจัย

ควรใช้สมุดที่มีปกสีน้ำตาล (Bound book) ขนาดใหญ่พอสมควร เช่น ขนาด 8½ " x 11" มีเลขหน้า มีหน้าสำรองข้อมูล ไม่ใช้ดินสอในการเขียน ให้ใช้ปากกาเท่านั้น ส่วนเนื้อหาในสมุดบันทึกงานวิจัยนั้นให้บันทึกทุกการทดลองโดยมีเนื้อหาดังต่อไปนี้

1. วันที่ที่เริ่มทำการทดลอง เขียน วัน เดือน ปี ให้ครบ
2. ชื่อเรื่องการทดลองสั้นๆ เฉพาะคำสำคัญ เช่น mini-preps of clone #1-10, Plasmid DNA isolation of pUR288
3. จุดประสงค์สั้นๆ
4. อธิบายการทดลอง ให้เขียนวิธีการทดลองลงในสมุดบันทึกงานวิจัยก่อนลงมือทำและทำการปรับปรุงแก้ไขขณะทำการทดลอง ถ้าวิธีการทดลองได้จากการถ่ายเอกสารมาให้นำแผ่นเอกสารนั้นมาปะติดลงในสมุด

ข้อสำคัญคือ อ้างแหล่งที่มาสำหรับวิธีการต่างๆ ว่ามาจากวารสารใด หนังสือเล่มใด และบันทึกสิ่งต่างๆ เช่น

   a. บันทึกการคำนวณต่างๆ เช่น การหาความเข้มข้น การเจือจาง น้ำหนักโมเลกุล และโมลาริตี
   b. บันทึกทุกสิ่งที่เกิดและไม่เกิดขึ้น ให้ระลึกเสมอว่าทุกอย่างคือ ข้อมูล มีตัวควบคุม กราฟมาตรฐาน (Standard graph) เวลาที่จุดศูนย์ (Zero time point)

c. ติดรูปภาพจากผลการทดลองที่ได้ในสมุด หรือเก็บในแฟ้มรูปภาพ เขียนบรรยายภาพให้เข้าใจ

d. สรุปผลการทดลองสั้น 1-2 บรรทัด

e. ให้เขียนโน้ต (Note) สิ่งที่ผิดสังเกต ความผิดพลาดหรือคำแนะนำ ไม่ว่าการทดลองนี้ประสบความสำเร็จหรือไม่

เนื่องจากไม่มีใครจำทุกสิ่งได้แต่อาจไม่จำอะไรเลย ดังนั้นให้บันทึกทุกอย่างเท่าที่เป็นไปได้ ทุกอย่างที่เกิดในการทำงานวิจัยมีความสำคัญหมด

ข้อมูลที่นักวิจัยส่วนใหญ่ละเลยแต่อาจจำเป็นต้องนำมาใช้ เช่น

-Serum lot number

-Antibiotic titer

-สมาชิกที่ทำงานร่วมด้วย

-รุ่นของเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว อุณหภูมิ

-เวลาในการบ่ม

-จำนวนครั้งในการชะล้าง

-ขนาดและชนิดของหลอด

-ชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

-pH บัฟเฟอร์

-การคำนวณต่างๆ

-จำนวนของเซลล์เริ่มต้น

-อายุของเซลล์

-ความเข้มข้นของอะกาโรส (Agarose) หรืออะคิลาไมด์ (Acrylamide)

-ระยะการเติบโตของแบคทีเรีย

-สภาพของเซลล์ เช่น เซลล์ที่เลี้ยงข้ามคืน เซลล์แขวนลอย

การดูแลรักษาสมุดบันทึกงานวิจัย

เนื่องจากไม่สามารถบันทึกทุกอย่างได้ทั้งหมด ควรมีการทำข้อมูลให้ทันสมัยและทบทวนเสมอ บันทึกทุกอย่างที่เป็นไปได้ขณะที่ทำการทดลอง แต่ถ้าทำไม่ได้ ให้บันทึกให้เร็วที่สุด ทบทวนตรวจสอบทุก

สัปดาห์ นำผลการทดลองแต่ละครั้งมารวบรวมให้เป็นหมวดหมู่ การเขียนตารางและกราฟทำให้ง่ายต่อการตีความ การวิจารณ์ เพราะถ้าท่านไม่รู้ข้อมูลของตัวเองการทดลองที่ทำไปก็ไม่มีประโยชน์ เขียนสรุปทุกสัปดาห์ที่มีการทดลอง เขียนคำแนะนำต่างๆ ที่ทำให้ท่านกลับมาตรวจสอบได้ บันทึกผลการทดลองให้เป็นระบบ มีชื่อเรื่อง วันเวลาในการทำการทดลอง ง่ายต่อการค้น เก็บสมุดบันทึกงานวิจัยไม่ต่ำกว่า 5 ปี ไม่ลบฆ่าข้อมูลดิบ และมีความซื่อสัตย์ต่อตัวเอง

บทที่ 1 บทนำ

จุดประสงค์ในหนังสือบทปฏิบัติการนี้คือ นักศึกษาจะได้เรียนรู้กระบวนการในการเชื่อมต่อยีนของโปรตีนเพิ่มเรืองแสงจากแมงกะพรุน (*Aequoria victoria* –enhanced green fluorescent protein-egfp) กับเวกเตอร์เพื่อสร้างดีเอ็นเอสายผสม (Recombinant DNA) (รูปที่ 1.1) การโคลนยีน (Gene cloning) เป็นเครื่องมือที่สำคัญในปัจจุบันเพื่อเข้าใจกระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต มีเทคนิคต่าง ๆ มากมายที่ถูกพัฒนาขึ้นโดยการใช้ *E. coli* เป็นแบบจำลอง (Model) ในการศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สังเคราะห์โปรตีน และเพื่อเข้าใจหน้าที่ของยีนมากขึ้น

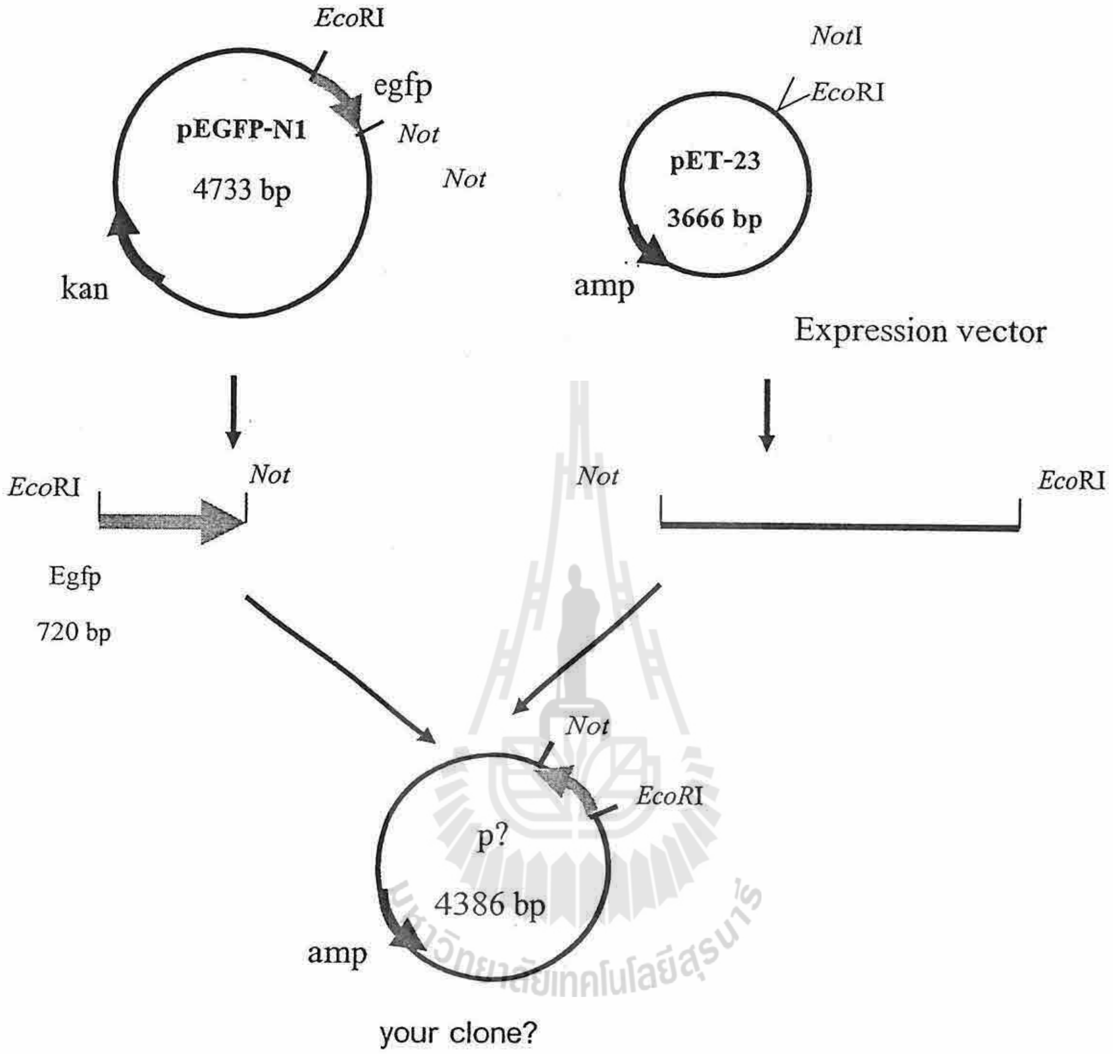
เป้าหมายในปฏิบัติการนี้คือ นักศึกษาจะโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนจาก *A. victoria* เข้ากับ Expression vector เพื่อผลิตดีเอ็นเอลูกผสม ยีน green fluorescent protein (gfp) กำหนดการสร้างโปรตีน GFP ที่พบในแมงกะพรุนชนิดหนึ่งที่ชื่อ *Aequoria victoria* ความแตกต่างระหว่างโปรตีน GFP และ EGFP คือ EGFP เปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์สว่างมากถึง 35 เท่าของโปรตีน GFP (ที่ 510 nm) เมื่อกระตุ้นด้วย ultraviolet (UV) หรือ แสงสีน้ำเงิน (blue light, 393 nm ด้วย minor peak at 470 nm) ดังนั้น EGFP จึงสว่างมากกว่า การเพิ่มความสว่างของโปรตีนเรืองแสง EGFP เกิดจากการทำมิวเทชัน (mutation) ของลำดับเบสที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนเล็กน้อยในส่วนโครโมฟอร์ของโปรตีน คือ เปลี่ยนจาก Ser65 -> Thr และ Phe64 -> Leu (Yang et al., 1996) ยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนเรืองแสง GFP และอนุพันธุ์ (egfp) ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในงานชีววิทยาระดับโมเลกุลในฐานะที่เป็นยีนเครื่องหมาย (reporter gene หรือ marker) ยีนเครื่องหมาย หมายถึง ยีนที่ถูกนำมาใช้ในการติดตามการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งต้องมีคุณสมบัติที่ง่ายต่อการติดตามการแสดงออกและควบคุม และสามารถนำมาใช้ในการศึกษากิจกรรมของโปรโมเตอร์ในสภาวะต่าง ๆ หรือในเนื้อเยื่อต่าง ๆ หรือระยะพัฒนาการที่ต่างกันได้ การสร้างดีเอ็นเอสายผสมทำโดยการตัดต่อยีนเครื่องหมายกับบริเวณโปรโมเตอร์ ทำการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านหรือสิ่งมีชีวิตที่ต้องการ

เพื่อที่จะโคลนยีน ขั้นตอนแรกคือ การหาเวกเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการโคลน แล้วแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (Foreign DNA หรือ Insert DNA) ซึ่งในกรณีนี้ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นก็มีการตัดเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมาย (Insert) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำดีเอ็นเอทั้งสองชนิดที่ได้มาเชื่อมต่อกันในหลอดทดลองโดยการทำงานของเอนไซม์ Ligase ดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อกันจะถูกขนส่งเข้าในเซลล์เจ้าบ้านซึ่งก็คือ แบคทีเรีย *E .coli* เพื่อเพิ่มจำนวน เรียกกระบวนการนี้ว่า Transformation จากนั้นปล่อยให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีสารปฏิชีวนะเพื่อให้พลาสมิดดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ขั้นตอนสุดท้ายก็คือการคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดบรรจุดีเอ็นเอลูกผสมที่เราต้องการ (รูปที่ 1.1)

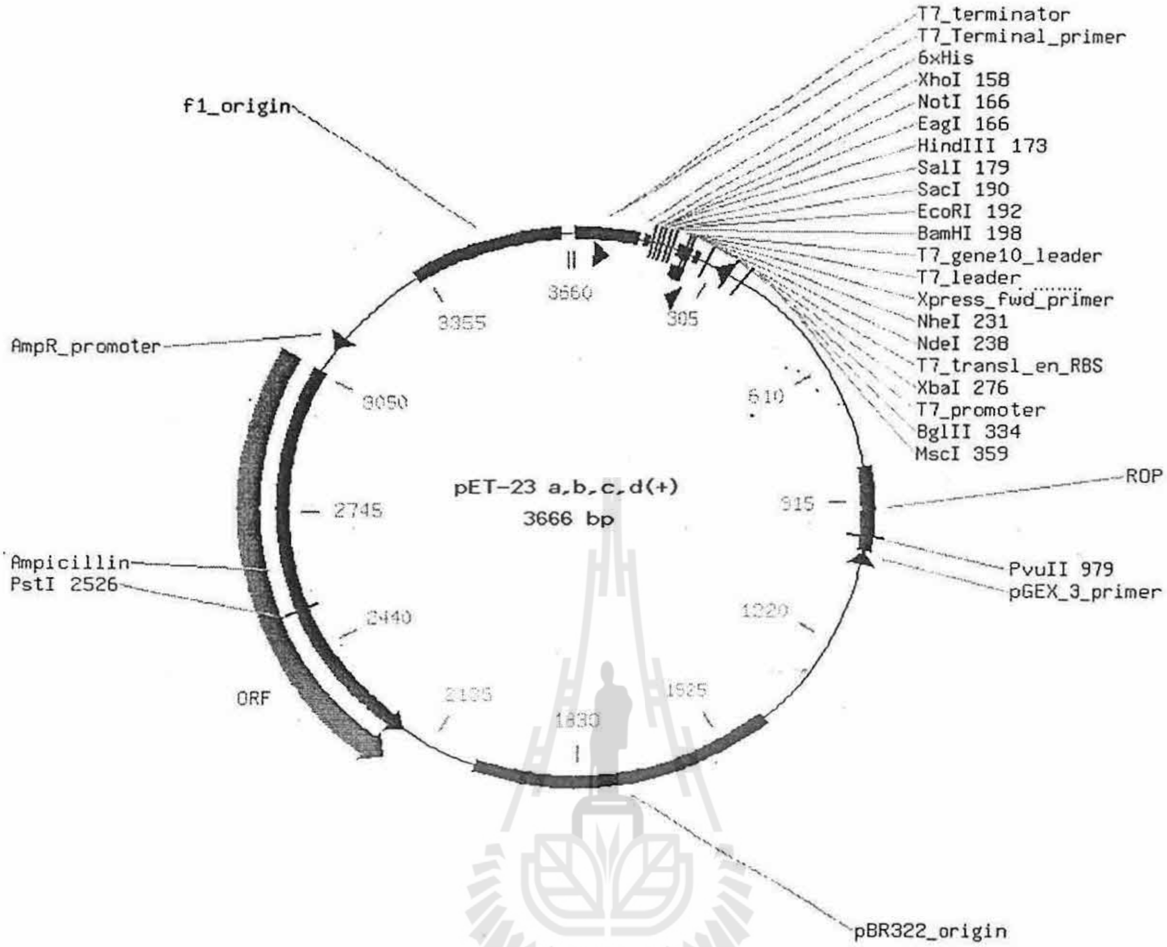
ในหนังสือบทปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะได้เรียนรู้กระบวนการในการจัดการกับดีเอ็นเอ ซึ่งได้แก่ การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ การตัดต่อยีน การคัดเลือกโคลน และการเก็บรักษาโคลนดีเอ็นเอที่ได้ พลาส

มิดหลัก ๆ ที่นักศึกษาต้องทำความเข้าใจในการทำบทปฏิบัติการครั้งนี้ คือ pEGFP-N1, pET-23 และ pAD1 โดยที่ pET-23 เป็น Expression vector (รูปที่ 1.2) ที่มีการถอดรหัสและการสร้างโปรตีนของยีนที่โคลนเข้าไปใน *E. coli* ตัวพลาสมิดเองมีตัวคัดเลือก (Selectable marker) จุดกำเนิดในการจำลองตัว (Origin of replication, ori), โปรโมเตอร์ (promoter) เทอร์มิเนเตอร์ (terminator) และบริเวณที่ดีเอ็นเอเป้าหมายนำมาเชื่อมต่อได้ (Cloning site) ยีนที่เป็นตัวช่วยในการคัดเลือก คือ ยีน Amp ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ β-lactamase มีหน้าที่ในการต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ส่วน ori มีความสำคัญในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในแบคทีเรีย และ Cloning site เป็นบริเวณที่ช่วยในการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเนื่องจากมีตำแหน่งในการจดจำและตัดโดยเอนไซม์ที่มีลักษณะเฉพาะ คือ มีเอนไซม์ *Xho*I, *Not*I, *Eag*I, *Hin*dIII, *Sal*I, *Sac*I, *Eco*RI และ *Bam*HI

pEGFP-N1 (Clontech, USA) เป็นพลาสมิดที่บรรจุยีน egfp ที่ได้จากการดัดแปลงยีน gfp ให้สามารถเพิ่มการเรืองแสงมากกว่าโปรตีน GFP ที่พบในธรรมชาติและเพิ่มการแสดงออกให้มากใน mammalian cells โดยมี excitation maximum = 488 nm; emission maximum =507 nm พลาสมิดนี้มียีนช่วยในการคัดเลือก คือ ยีน kan ช่วยให้แบคทีเรียที่มียีนนี้ต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ส่วน ori มีความสำคัญในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในแบคทีเรีย และ MCS (multicloning sites) เป็นบริเวณที่ช่วยในการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเนื่องจากมีตำแหน่งในการจดจำและตัดโดยเอนไซม์ที่มีลักษณะเฉพาะ คือ มีเอนไซม์ *Bgl*II, *Xho*I, *Hin*dIII, *Eco*RI, *Pst*I, *Sal*I, *Kpn*I, และ *Bam*HI


EcoRI
egfp
pEGFP-N1
4733 bp
Not
Not
kan
NotI
EcoRI
pET-23
3666 bp
amp
Expression vector
EcoRI
Not
Egfp
720 bp
Not
EcoRI
Not
EcoRI
p?
4386 bp
amp
your clone?

รูปที่ 1.1 การตัดต่อชิ้นส่วนยีน egfp จากพลาสมิด pEGFP-N1 เข้าสู่พลาสมิด pET-23


T7_terminator
T7_Terminal_primer
6xHis
XhoI 158
NotI 166
EagI 166
HindIII 173
SalI 179
SacI 190
EcoRI 192
BamHI 198
T7_gene10_leader
T7_leader
Xpress_fwd_primer
NheI 231
NdeI 238
T7_transl_en_RBS
XbaI 276
T7_promoter
BglII 334
MscI 359
ROP
PvuII 979
pGEX_3_primer
pBR322_origin
f1_origin
AmpR_promoter
Ampicillin
PstI 2526
ORF
pET-23 a,b,c,d(+)
3666 bp
3660
305
610
915
1220
1525
1830
2135
2440
2745
3050
3355

รูปที่ 1.2 แผนที่ของพลาสมิด pET-23

ความปลอดภัยในการทำงานด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล

อันตรายที่นักศึกษาจะต้องเจอระหว่างที่ทำการทดลองได้แก่ สารเคมีที่มีพิษและแสงอุลตราไวโอเลต (UV) นักศึกษาต้องใส่ใจและระมัดระวังเมื่อทำการสร้างดีเอ็นเอสายผสม ดังนั้นเมื่อความปลอดภัยในการทำงานต้องทำตามกฎและระเบียบอย่างเคร่งครัด

1. ไม่ดื่ม ไม่กิน ไม่สูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ และไม่เก็บอาหารในตู้เย็นหรือตู่แช่แข็ง
2. หลีกเลี่ยงการสวมรองเท้าเปิดส้น
3. สวมเสื้อกราว (lab coat) ถุงมือ และแว่นตานิรภัยทุกครั้งเมื่อต้องใช้ตู้ดูดควันหรือเมื่อทำงานกับสารเคมีอันตราย
4. สวมถุงมือเสมอเมื่อทำงานกับเอธิเดียมโบรไมด์ ฟีนอลและสารอันตราย และถอดถุงมือทิ้งก่อนออกจากห้องปฏิบัติการ และล้างภายนอกถุงมือเสมอเพื่อป้องกันการปนเปื้อนอุปกรณ์หรือประตู
5. ไม่ใช้ปากในการดูดปิเปต
6. หากผมยาวให้รวบผมให้เรียบร้อย
7. กำจัดจุลินทรีย์รวมทั้งหลอดทดลองที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อในที่ทิ้งเฉพาะ เพื่อทำการ autoclave หากเป็นของเหลวให้กำจัดด้วยคลอรอกซ์
8. กำจัดแก้วในที่ที่กำหนดให้ " glass box"
9. ทำความสะอาดโต๊ะปฏิบัติการและไม่วางสิ่งของรุงรัง
10. สวมแว่นตานิรภัยแบบ UV-protective shield เสมอเมื่อทำงานกับแสง UV แว่นตานิรภัยธรรมดาไม่สามารถกันแสง UV ได้
11. กำจัดสารเคมีอันตราย เช่น คลอโรฟอร์ม เมธานอล และ เอธิเดียมโบรไมด์ในที่กำหนดเฉพาะ ห้ามทิ้งลงในอ่างน้ำ หากไม่ทราบให้ถามอาจารย์ผู้รับผิดชอบ
12. หากมีการรั่วหรือหกหล่นของสารเคมี จุลินทรีย์ให้จัดการทันที
13. ล้างมือให้สะอาดเสมอก่อนออกจากห้องปฏิบัติการและจัดการวัสดุอุปกรณ์และวัสดุให้อยู่ในสภาพดี สะอาด เรียบร้อย ถอดปลั๊กไฟก่อนออกจากห้องเสมอ

หลักในการทำงานในห้องปฏิบัติการทั่วไป

1. สารเคมี (reagents)-ใช้ด้วยความประหยัดและระมัดระวังไม่ให้มีการปนเปื้อน หากหมดให้แจ้งเจ้าหน้าที่

2.เอนไซม์- มักมีราคาแพงและเสียสภาพได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นเก็บเอนไซม์บนน้ำแข็งและรีบเก็บกลับที่เดิม -20C ทันทีที่ใช้เสร็จ

3. ปิเปตทิบ- รับผิดชอบในการ autoclave เองและสวมถุงมือเมื่อหยิบจับปิเปตทิบ

4. อุปกรณ์- ควรมีความเข้าใจในการใช้งานวัสดุอุปกรณ์แต่ละชิ้นอย่างดี หากสงสัยให้ถามเจ้าหน้าที่อาจารย์ผู้รับผิดชอบ

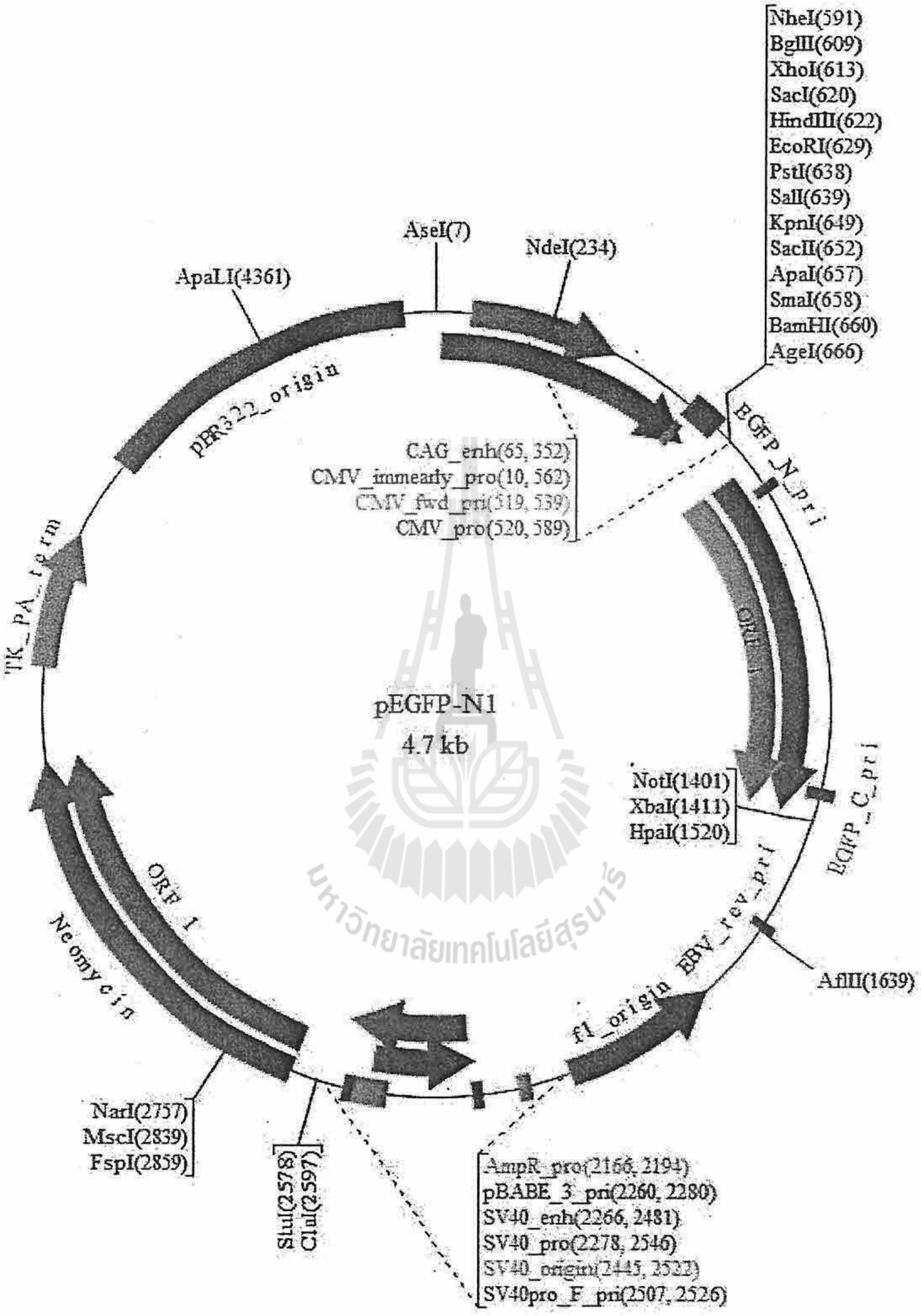
บรรณานุกรม

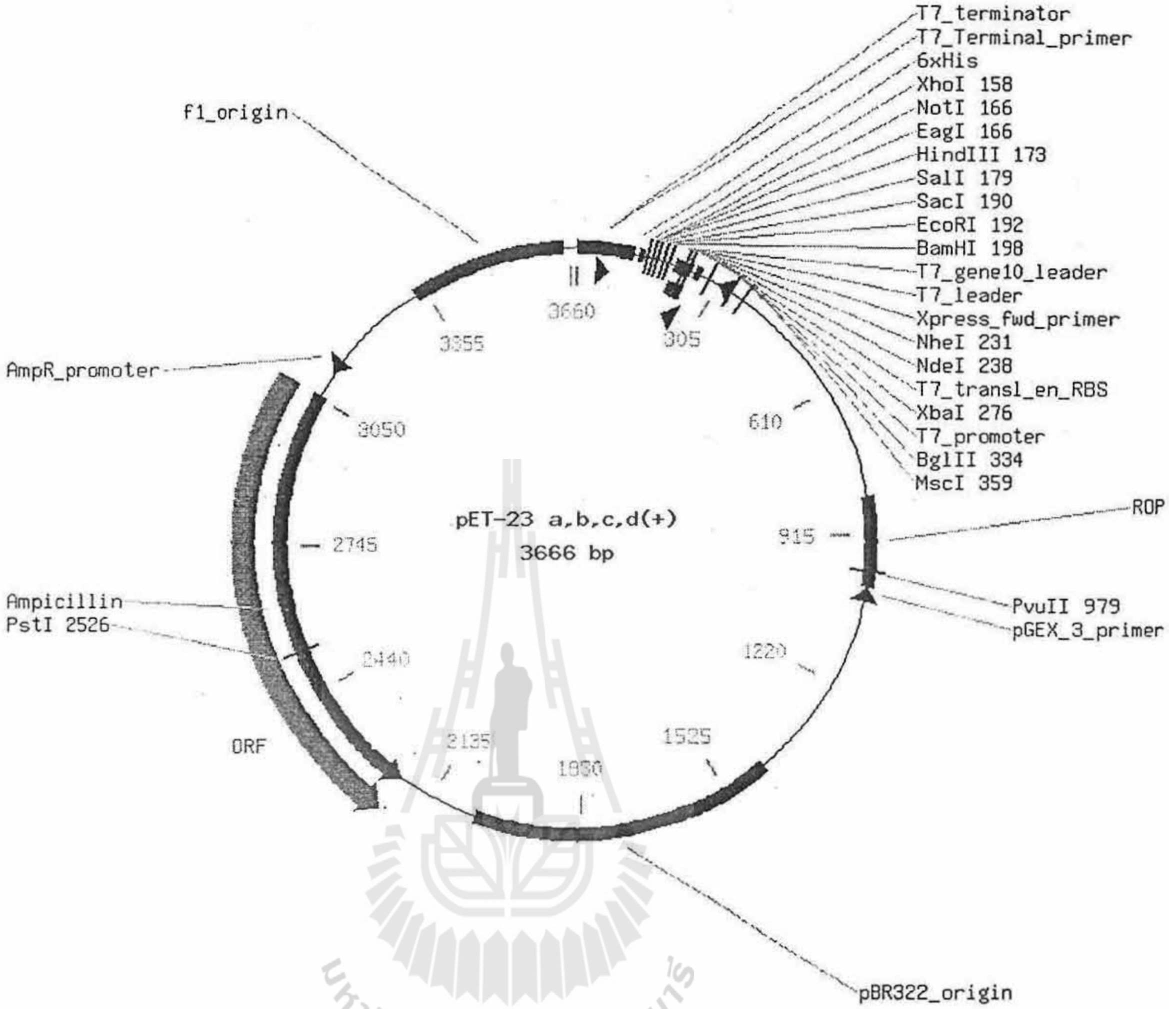
Carson, S. and Robertson, D. 2006. **Manipulation and Expression of Recombinant DNA, 2nd**. Academic Press San Diego, California. USA.

Griffiths, A. Gelbart, W.M., Miller, J.H. and Lewontin, R.C. 1999. **Modern Genetic Analysis**. W.H. Freeman and Company. New York. USA.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. E. 2000. **Molecular Cell Biology**. W.H. Freeman and Company New. York. USA.

Yang, T., Cheng, L., and Kain, SR. 1996. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. Nucl. Acids Res. 24(22), 4592-4596.


NheI(591)
BglII(609)
XhoI(613)
SacI(620)
HindIII(622)
EcoRI(629)
PstI(638)
SalI(639)
KpnI(649)
SacII(652)
ApaI(657)
SmaI(658)
BamHI(660)
AgeI(666)
AseI(7)
NdeI(234)
ApaLI(4361)
pBR322_origin
CAG_enh(65, 352)
CMV_immearly_pro(10, 562)
CMV_fwd_pri(319, 539)
CMV_pro(520, 589)
EGFP_N_pri
ORF 1
TK_PA_term
pEGFP-N1
4.7 kb
NotI(1401)
XbaI(1411)
HpaI(1520)
EGFP_C_pri
EBV_rev_pri
AflII(1639)
f1_origin
ORF 1
Neomycin
NarI(2757)
MscI(2839)
FspI(2859)
StuI(2578)
ClaI(2597)
AmpR_pro(2166, 2194)
pBABE_3_pri(2260, 2280)
SV40_enh(2266, 2481)
SV40_pro(2278, 2546)
SV40_origin(2445, 2522)
SV40pro_F_pri(2507, 2526)


T7_terminator
T7_Terminal_primer
6xHis
XhoI 158
NotI 166
EagI 166
HindIII 173
SalI 179
SacI 190
EcoRI 192
BamHI 198
T7_gene10_leader
T7_leader
Xpress_fwd_primer
NheI 231
NdeI 238
T7_transl_en_RBS
XbaI 276
T7_promoter
BglII 334
MscI 359
ROP
PvuII 979
pGEX_3_primer
pBR322_origin
f1_origin
AmpR_promoter
Ampicillin
PstI 2526
ORF
pET-23 a,b,c,d(+)
3666 bp
3660
305
610
915
1220
1525
1830
2135
2440
2745
3050
3355

บทปฏิบัติการที่ 2 เทคนิคพื้นฐานในการเตรียมอาหาร สารละลายบางชนิดและวัสดุอุปกรณ์

จุดประสงค์

1. เพื่อเรียนรู้การเตรียมอาหารและสารละลายบางชนิด
2. เพื่อเรียนรู้เทคนิคการทำให้ปลอดเชื้อ
3. เพื่อเตรียมวัสดุอุปกรณ์ให้ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และเอนไซม์นิวคลีเอส (Nuclease-free)

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

Clean petri plates
Glucose
NaOH 10 N
Sodium dodecyl sulfate (SDS)
Sodium acetate
Glacial acetic acid
Deionized water
70% alcohol
Ampicillin (100 mg/ml stock)
Kanamycin (100 mg/ml stock)
Tris-HCl
Boric acid
EDTA
Tryptone
NaCl
Yeast extract
Agar
Dimethylformamide (DMF)
60°C water bath

การทดลอง

A. การเตรียมอาหารและสารปฏิชีวนะ

Lubia-Bertani (LB) medium	**1 Liter**
Tryptone	10 g
NaCl	5 g
Yeast extract	10 g
Deionized water	1000 ml

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

Lubia-Bertani (LB) medium with agar	**1 Liter**
Tryptone	10 g
NaCl	5 g
Yeast extract	10 g
Deionized water	1000 ml
Agar	15 g (เติมหลังจากปรับ pH แล้ว)

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N และเติม agar 15 g ลงในขวด นำไปต้มให้วุ้นละลายจนใส เขย่าแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60°C ก่อนที่จะเทลงจานใน Larminar flow hood ปล่อยให้อาหารแข็งตัวซึ่งใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที เก็บจานอาหารที่อุณหภูมิ 4°C จนกระทั่งใช้

LB/Amp plates	**1 Liter**
Tryptone	10 g
NaCl	5 g
Yeast extract	10 g
Deionized water	1000 ml
Agar	15 g (เติมหลังจากปรับ pH แล้ว)

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นจนสัมผัสได้หรือนำไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 60°C จากนั้นเติม Ampicillin (100 mg/ml stock) หรือ Carbenicillin (100 mg/ml stock) จำนวน 0.5 ml ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 mg/L ยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดใช้แทนกันได้แต่ Carbenicillin มีความเสถียรมากกว่า เทอาหารเหลวลงบนจานใน Larminar flow hood ปล่อยให้อาหารแข็งตัวซึ่งใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที เก็บจานอาหารที่อุณหภูมิ 4°C จนกระทั่งใช้

Note: เพื่อความสะดวกในการจดจำชนิดของอาหาร ให้ใช้ปากกาเขียนถาวรขีดเส้นด้านข้างของจานอาหาร ดังนี้ ไม่มีขีดสำหรับจานอาหารที่ไม่มียาปฏิชีวนะ และสามขีดสำหรับจานอาหารที่มียาปฏิชีวนะ

LB/Kan plates 1 Liter

Tryptone	10 g
NaCl	5 g
Yeast extract	10 g
Deionized water	1000 ml
Agar	15 g (เติมหลังจากปรับ pH แล้ว)

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นจนสัมผัสได้หรือนำไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 60°C จากนั้นเติม Kanamycin (100 mg/ml stock) จำนวน 0.5 ml ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 mg/L

Ampicillin และ Kanamycin (100 mg/ml stock) ละลาย 1 g ใน Deionized water จำนวน 10 ml จากนั้นทำการกรองเพื่อกำจัดเชื้อ โดยใช้แผ่นกรองที่มีขนาดรู 0.20-0.24 µm ดูดสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วปริมาณ 1.0 ml ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

NaOH 1 Normal

ทำการเจือจาง จาก NaCl 10 N stock ทำในตู้ดูดควัน

B. การเตรียมสารละลายสำหรับการแยกพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณมาก (Preparation of solutions for Large-Scale plasmid DNA preps)

การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการแยกพลาสมิดดีเอ็นเอสำหรับบทปฏิบัติการที่ 3 ในการทำ large-scale alkaline lysis plasmid preps และการทำ alkaline mini-preps ในบทปฏิบัติการที่ 10 โปรดเก็บสารละลายไว้ใช้ตลอดบทปฏิบัติการจนกว่าการทดลองเสร็จสิ้น

Solution I

	Final concentration
Glucose (MW 181)	50 mM
1M Tris-HCl (pH 8.0)	25 mM
0.5M EDTA (pH 8.0)	10 mM
Deionized water	- ml

ให้เตรียม Solution I จำนวน 40 ml โดยใช้ขวดแก้วฝาเกลียวหรือฟลาสก์ขนาด 125 ml เขียนชื่อกลุ่ม ชื่อสารละลายว่า "Soln. I, alk lys" และทำการนึ่งฆ่าเชื้อ

Solution II

	Final concentration
10 N NaOH	0.2 N
⁎ Sodium dodecyl sulfate (SDS) ศศ ย pH 7 2	1%

เตรียม Solution II ใหม่ทุกครั้งที่ใช้ ใช้ SDS stock solution เข้มข้น 10% หรือ 20% โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ ให้คำนวณปริมาณของ NaOH และ SDS สำหรับ 40 ml ให้เตรียมวันที่จะใช้

Solution III สำหรับ 100 ml

	Final concentration
Potassium acetate, 5M	60 ml
Glacial acetic acid	11.5 ml
Deionized water	28.5 ml

ให้คำนวณปริมาณสารที่ต้องเตรียม สำหรับ 40 ml โดยใช้หลอด 50 ml-conical tube เก็บ solution III ไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ

TE

	Final concentration
1 M Tris (pH 8.0)	10 mM
0.5 M EDTA	0.1 mM
Deionized water	- ml

ให้เตรียมสารละลาย TE กลุ่มละ 10 ml ทำการกรองฆ่าเชื้อโดยใช้แผ่นกรองที่มีขนาดรู 0.20-0.24 micron เก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

5x TBE stock 1 Liter

Tris (MW =121.1)	54 g
Boric acid	27.5 g
EDTA	4.15 g (หรือ 20 ml of 0.5 M EDTA)
Deionized water	1000 ml

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง (สารละลาย TBE buffer ที่นำมาใช้ในการทำ Gel electrophoresis ไม่จำเป็นต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อให้ปลอดเอนไซม์นิวคลีเอส ยกเว้นต้องการแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจล)

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หลักการเตรียมสารละลายและบัฟเฟอร์

1.ต้องทำการนึ่งฆ่าเชื้อเสมอเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์และทำลายเอนไซม์นิวคลีเอส (Nuclease)

2.ใช้น้ำกลั่น (Double-distilled water) หรือ Deionized water ในการเตรียมสารละลาย

3.ให้เตรียมสารเท่าที่จำเป็น เพราะสารเคมีมีราคาแพงและอันตราย

C. การเตรียมวัสดุอุปกรณ์ให้ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และเอนไซม์นิวคลีเอส

นักศึกษาต้องเตรียมวัสดุอุปกรณ์บางอย่างด้วยตัวเองและต้องตรวจสอบเสมอว่าใกล้หมดหรือยัง

1. การเตรียมหลอด Microtube หรือ Eppendorf ให้นำหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 ml ที่สะอาดมาใส่ลงในบีกเกอร์ ขวดแก้วหรือถุงพลาสติก จำนวนตามต้องการ ปิดภาชนะด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอล์ย (option: ติด Autoclaving Tape) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการอบแห้ง
2. การเตรียม Pipette Tip เพื่อความสะดวกในการใช้ให้จัดเรียง Pipette Tip ลงในกล่องใส่ Pipette สวมถุงมือระหว่างที่ทำ เมื่อเสร็จแล้วให้ปิดฝา (option: ปิด Autoclaving Tape) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วอบให้แห้ง

Note: เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้นำหลอดไมโครทิวป์และกล่อง pipette tip ไปอบให้แห้งในตู้อบแห้งอุณหภูมิ 60 °C

บรรณานุกรม

Barker, K. 1998. **At the Bench: A Laboratory Navigator.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. USA.

Robertson, D., Shore, S. and Miller, D. 1997. **Manipulation and Expression of Recombinant DNA.** Academic Press San Diego, California. USA.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 2 nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York. USA.

บทปฏิบัติการที่ 3 การสกัดและเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียปริมาณมาก

(Isolation and Large scale preparation of bacterial plasmid DNA)

จุดประสงค์ 1. เพื่อแยกพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-23 และ pEGFP-N1 ออกจากแบคทีเรีย
2. เพื่อเรียนรู้การทำให้ดีเอ็นเอปราศจากการปนเปื้อนด้วยโปรตีน

บทนำ

แบคทีเรีย *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ดีมากในงานศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในฐานะที่เปรียบเสมือนโรงงานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอปริมาณมาก พลาสมิดดีเอ็นเอที่นำไปโคลนใน *E. coli* มีการเพิ่มจำนวนมากและคงลักษณะทางพันธุกรรมเดิม ในเซลล์แบคทีเรียเหล่านี้จะประกอบไปด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ โครโมโซม ดีเอ็นเอ โปรตีน เยื่อเซลล์และผนังเซลล์ หลักการสำคัญในการแยกพลาสมิดดีเอ็นเอคือต้องแยกพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากสิ่งอื่นๆ วิธีที่นิยมใช้กันแพร่หลายก็คือ Alkaline lysis ที่คิดค้นและพัฒนาโดย Birnboim and Dolly (1979) โดยใช้หลักการที่ว่าพลาสมิดดีเอ็นเอจะมีรูปร่างเป็นเกลียว (Supercoil) เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase ที่อยู่ในแบคทีเรียและมีขนาดเล็ก จึงทำให้แยกออกจากโครโมโซมดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดใหญ่ (ประมาณ 4000 kb) ขณะที่พลาสมิดดีเอ็นเอมีขนาดเล็กกว่า 10 kb ในวิธี Alkaline lysis ทั้งโครโมโซม ดีเอ็นเอและพลาสมิดดีเอ็นเอจะถูกทำให้เสียสภาพ (Denature) โดย NaOH ซึ่งไปทำลายพันธะไฮโดรเจน การผสมหรือปิเปตขึ้นลงทำให้โครโมโซมดีเอ็นเอหักเป็นชิ้นๆ ชิ้นละประมาณ 100 kb ในขณะที่พลาสมิดดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดเล็กและมีรูปร่างเป็นเกลียวยังคงสภาพเดิมเป็นส่วนใหญ่ ดีเอ็นเอส่วนที่เสียสภาพสามารถกลับสู่สภาพเดิมได้ในสภาวะที่มี pH เป็นกลาง หรือโดยการไม่เก็บในสารละลายที่เป็นด่างนานเกินไป (พลาสมิดดีเอ็นเอจำนวนหนึ่งยังคงมีรูปร่างเป็นเกลียวคู่พันกันอยู่ในระหว่างที่แช่ในสารละลายที่เป็นด่างและสามารถที่จะกลับสู่สภาพเดิมได้) ขณะเดียวกันโครโมโซมดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าไม่เป็นเกลียวและส่วนใหญ่จะขาดเป็นท่อนๆ ดังนั้นโครโมโซมดีเอ็นเอยังคงมีการเสียสภาพและในที่สุดจะตกตะกอนด้วย Potassium acetate และ Sodium dodecyl sulfate (SDS) ส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอและโมเลกุลของอาร์เอ็นเอยังคงล่องลอยในสารละลายซึ่งสามารถดูดเอาสารละลายส่วนนี้ไปใส่ในหลอดใหม่แล้วทำให้ตกตะกอนด้วย เอธานอลหรือ Polyethylene glycol (PEG) และกำจัดอาร์เอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ RNAse ก็จะได้พลาสมิด ดีเอ็นเอที่ต้องการแต่อาจยังไม่บริสุทธิ์มากนัก โดยอาจมีโปรตีนและชิ้นส่วนของโครโมโซมเล็กๆ เหลืออยู่ อย่างไรก็ตามพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้นี้สามารถนำมาใช้กับงานที่ต้องการความบริสุทธิ์น้อย เช่น Transformation การวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ แต่อาจไม่เหมาะกับการนำไปทำปฏิกิริยาPCR

การทำให้ดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นปราศจากการปนเปื้อนของโปรตีน อาร์เอ็นเอ และโครโมโซมดีเอ็นเอ ทำได้โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง (Ultracentrifugation) ด้วย Cesium chloride (CsCl) ปัจจุบันบริษัทการค้าต่างๆ ได้พัฒนาคอลัมน์ชนิด Chromatography column โดยใช้หลักการที่ว่าดีเอ็นเอสามารถจับกับเรซิน (Resin) ซึ่งโมเลกุลมีสภาวะเป็นประจุบวกภายใต้ความเข้มข้นของเกลือสูง จากนั้นมีการชะล้างเอาสิ่งปนเปื้อนหรือโมเลกุลที่ไม่สามารถจับกับเรซินออก ในขั้นตอนสุดท้ายก็จะชะล้างเอาพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากเรซินโดยใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำหรือใช้น้ำ วิธีการแบบนี้ประหยัดเวลากว่าการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงและสารที่ใช้ก็ไม่อันตรายเทียบกับ CsCl

ในการทดลองนี้นักศึกษาจะได้ทำการแยกพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากแบคทีเรียปริมาณมากและต้องทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์มากขึ้นซึ่งอาจทำได้โดยการใช้ Anion-exchange column หรือโดยการปั่นเหวี่ยงในสารละลาย Cesium gradient หรือการคัดเลือกโดยให้มีการตกตะกอนกับ Polyethylene glycol วิธีที่ง่ายที่สุดก็คือการใช้ Anion-exchange column (Qiagen หรือ Biorad) แล้วนำมาทำให้ดีเอ็นเบริสุทธิ์โดยใช้สารละลายฟีนอล

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

Solution I
Solution II (NaOH, 10% SDS) เตรียมใหม่เสมอ
Solution III
Isopropanol
70% ethanol
Buffer-saturated phenol pH 8.0 stored at 4 °C
Chloroform
TE buffer
LB liquid
Ampicillin (100 mg/ml stock)/ kanamycin (100 mg/ml stock)
Ice bucket
Table vortex
High speed centrifuge at 4 °C

การทดลอง

A. การแยกพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากแบคทีเรียปริมาณมาก

1. วันแรก เขี่ยโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่ต้องการลงในหลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 10 ml ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ LB จำนวน 2 ml และสารปฏิชีวนะ (ampicillin สำหรับ pET-23, kanamycin สำหรับ pEGFP-N1) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50 mg/L บ่มเชื้อในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 12-18 ชม.
2. วันที่สอง นำเชื้อที่เลี้ยงค้างคืนจำนวน 200 μl ไปเลี้ยงใหม่ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหาร LB/Amp (pET-23) หรือ LB/Kan (pEGFP-N1) จำนวน 100 ml (เจือจาง 1:500) บ่มเชื้อในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 120 rpm
3. วันที่สาม รินเชื้อจำนวน 50 ml ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงจำนวน 2 หลอดที่ทำการติดฉลากไว้ ทำให้หลอดมีน้ำหนักสมดุลกับหลอดตรงกันข้ามก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง ให้ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ในเครื่อง JA10 (Beckman, Palo Alto, CA) หรือเครื่องที่ใช้แทนกันได้

ขณะที่รอ ให้เอาสารละลาย Sol'n III แช่ในน้ำแข็งทิ้งไว้

4. ริน Supernate ทิ้งในภาชนะสำหรับทิ้งของเสียที่ติดฉลากว่า "LB waste" เติมคลอรอกซ์เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียทีหลัง
5. เติมสารละลาย Solution I จำนวน 5 ml (ต่อ 50 ml จากหลอดในข้อ 3) ลงไปบนตะกอนและปิดฝาเขย่าอย่างแรงโดยใช้เครื่องผสมสารเพื่อทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก

Solution I ประกอบด้วยกลูโคส Tris และ EDTA ทั้งกลูโคสและ Tris ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ให้กับเซลล์แบคทีเรียที่แตกและ EDTA จะจับกับ Mg^{2+} ป้องกันการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ ที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ส่วนใหญ่ต้องการ Mg^{2+} เป็น Cofactor

6. เติมสารละลาย Solution II จำนวน 10 ml ปิดฝา กลับหลอดไปมา 5 ครั้งเพื่อให้สารละลายเข้ากันและเก็บบนน้ำแข็ง 5-10 นาที

Solution II ต้องเตรียมใหม่หรือเตรียมไว้ไม่เกิน 1 สัปดาห์ก่อนใช้เพราะ NaOH จะดูด CO_2 *จากอากาศ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะรักษา pH ของ Solution II ให้คงที่ที่ 12.5 เพื่อที่จะทำให้โครโมโซมดีเอ็นเอเสียสภาพได้ดีที่สุด หลังจากเติม Solution II แล้วสารละลายที่ได้จะเริ่มขุ่นพร้อมกับมีการเสียสภาพของดีเอ็นเอ*

7. เติมสารละลาย Solution III จำนวน 5 ml ที่เย็น ปิดฝา กลับหลอดไปมา 5 ครั้งเพื่อให้สารละลายเข้ากันและเก็บบนน้ำแข็ง 10-15 นาที

หลังจากเติม Solution III แล้วจะมีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น พลาสมิดดีเอ็นเอจะกลับคืนสภาพ (Renaturation) และยังคงอยู่ในสภาพสารละลาย

8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

จะมองเห็นตะกอนสีขาวจำนวนมากเกาะตามผนังหลอดปั่นเหวี่ยงและตะกอนจำนวนน้อยเป็นแผ่นบางๆ กระจายอยู่ด้านบนของสารละลาย ตะกอนเหล่านี้คือ โครโมโซมดีเอ็นเอ SDS โปรตีนและเศษผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

9. ริน supernate ช้าๆ อย่างระมัดระวังผ่านแผ่นกรอง หรือหากจำเป็นให้ใช้กระดาษกรอง 3M เบอร์ 4 ลงไปในหลอดที่สะอาด ควรทำให้แผ่นกรองเปียกก่อนเพื่อช่วยป้องกันการสูญเสียดีเอ็นเอ
10. วัดปริมาณสารละลายคร่าวๆ แล้วเติมสารละลาย Isopropanol (RT) ปริมาตร 0.6-0.7 เท่าเพื่อทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอน ผสมโดยการกลับหลอดไปมา *(Isopropanol ทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอนอย่างต่อเนื่อง ขณะที่โปรตีนจะตกตะกอนช้าๆ)*
11. นำไปปั่นเหวี่ยงทันทีที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
12. ทิ้ง Supernate ลงอ่างน้ำแต่อย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุด ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย 70% Ethanol จำนวน 5 ml แต่ไม่ต้องทำให้ตะกอนดีเอ็นเอละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นดูดเอาเอธานอลออกให้หมด ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-10 นาที
13. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE จำนวน 200-300 µl กำจัดอาร์เอ็นเอโดยการเติม RNase (20 mg/ml stock) จำนวน 1-2 µl แล้วอาจทำการ Purification ต่อ

สารละลายดีเอ็นเอที่ได้อาจเหมาะสมสำหรับการแยกโดย Gel electrophoresis หรือการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แต่ถ้าเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ต่อ

B. Purification of Plasmid DNA

1B. Purification of Plasmid DNA using Phenol

มีการนำฟีนอลมาใช้มากในการทำให้ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอปราศจากการปนเปื้อนของโปรตีนเอนไซม์ต่างๆ ฟีนอลไม่ละลายในน้ำและจะแยกเป็นชั้นเมื่อนำมาผสมกับน้ำ เมื่อผสมสารละลายของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ โปรตีนจะอยู่ในส่วนของฟีนอล จึงทำให้แยกสารละลายดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอออกได้ แล้วนำสารละลายที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอธานอล

__คำเตือน__ สวมถุงมือและเสื้อกาวน์ เปิดใช้ฟีนอลในตู้ดูดควัน เพราะฟีนอลมีความเป็นพิษ ถ้าหากฟีนอลกระเด็นถูกร่างกายให้ล้างด้วยน้ำกอีกทันที

1. หลังจากที่ละลายดีเอ็นเอในสารละลาย TE ในปริมาตรที่แน่นอนแล้วให้เติม Buffer-saturated phenol:chloroform ปริมาตรเท่ากันลงไปในหลอดดีเอ็นเอ ผสมสารละลายในหลอดอย่างแรงโดยใช้เครื่องผสมสารประมาณ 20 วินาที
2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกชั้น
3. ใช้ปิเปตดูดสารละลายใสชั้นบนอย่างระมัดระวังไปใส่หลอดใหม่ อย่าทำให้รอยต่อระหว่างชั้นแตกเพราะมีโปรตีนอยู่
4. เติม Chloroform ปริมาตรเท่ากันใส่ลงในหลอดใหม่นี้ ผสมโดยใช้เครื่องผสมสารเป็นเวลา 20 วินาที
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกชั้น
6. ใช้ปิเปตดูดสารละลายใสชั้นบนอย่างระมัดระวังไปใส่หลอดใหม่ อย่าทำให้รอยต่อระหว่างชั้นแตกเพราะมีโปรตีนอยู่
7. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล โดยการเติม 1/10 เท่าปริมาตรของ 3 M Sodium acetate (pH 5.2) และ 2.5 เท่าปริมาตรของ cold 95% Ethanol กลับหลอดไปมาเพื่อผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 12-16 ชม หรือ ที่อุณหภูมิ -70°C เป็นเวลา 30 นาที
8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 15-30 นาที ที่อุณหภูมิ 4° C

9. เท Supernatant ทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย 70% Ethanol จำนวน 100-500 μl
10. ทำให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-10 นาที
11. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE (pH 8.0) จำนวน 100-200 μl เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4°C หรือที่อุณหภูมิ - 20°C
12. คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยใช้ Spectrophotometer หรือการทำ Gel electrophoresis (บทปฏิบัติการที่ 4)

2B. Purification of Plasmid DNA using Columns (Qiagen)

1. วันที่สาม รินเชื้อจำนวน 50 ml ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงจำนวน 2 หลอดที่ทำการติดฉลากไว้ ทำให้หลอดมีน้ำหนักสมดุลกับหลอดตรงกันข้ามก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง ให้ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ในเครื่อง JA10 (Beckman, Palo Alto, CA) หรือเครื่องที่ใช้แทนกันได้

ขณะที่รอ ให้เอาสารละลาย Sol'n III แช่ในน้ำแข็งทิ้งไว้

2. ริน Supernate ทิ้งในภาชนะสำหรับทิ้งของเสียที่ติดฉลากว่า "LB waste" เติมคลอรอกซ์ เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียทีหลัง
3. เติมสารละลาย P1 จำนวน 5 ml ลงไปบนตะกอนและปิดฝา ผสมสารละลายอย่างแรงโดยใช้เครื่องผสมสารเพื่อทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก
4. เติมสารละลาย P2 จำนวน 10 ml ปิดฝา กลับหลอดไปมา 5 ครั้งเพื่อให้สารละลายเข้ากันและเก็บบนน้ำแข็ง 5 นาที
5. เติมสารละลาย P3 จำนวน 5 ml ที่เย็น ปิดฝา กลับหลอดไปมา 5 ครั้งเพื่อให้สารละลายเข้ากันและเก็บบนน้ำแข็ง 15 นาที
6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
7. ริน Supernate ช้าๆ อย่างระมัดระวังผ่าน Qiafilter Cartridge (Qiagen, Lajolla, CA) โดยใช้ Ring stand หรือถังน้ำแข็งเพื่อยึด Cartridge ไว้ให้อยู่กับที่ ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เพื่อให้ตะกอนลอยตัวขึ้นมา
8. ติดตั้ง Qiagen column โดยใช้ Ring stand และใช้ 500-tip Column สำหรับเชื้อจำนวน 100 ml เติมสารละลาย QBT ลงไปใน Column จำนวน 10 ml ปล่อยให้สารละลาย QBT ไหลผ่าน Column ให้หมดโดยใช้แรงโน้มถ่วง

9. สอด Plunger ลงไปใน Qiafilter Cartridge และเก็บสารละลายไว้ แต่ทิ้งส่วนที่เป็น Cartridge ไป
10. เอาสารละลายที่ได้มาใส่ลงใน Qiagen Column ที่เตรียมไว้ในข้อ 10 ปล่อยให้สารละลายไหลผ่าน Column ให้หมดโดยใช้แรงโน้มถ่วง ของเหลวจะหยุดที่รอยต่อเหนือเรซินเพื่อเป็นการป้องกันเรซินจากการแห้งและสามารถพักไว้ได้ระยะหนึ่ง
11. ล้าง Column ด้วยบัฟเฟอร์ QC 2 ครั้ง ครั้งละ 30 ml
12. เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่ต้องการ ให้ใช้บัฟเฟอร์ QF จำนวน 15 ml เป็นตัวชะดีเอ็นเอออกจาก Column เก็บสารละลายดีเอ็นเอด้วยหลอดปั่นเหวี่ยงที่สะอาด
13. วัดปริมาณสารละลายคร่าว ๆ และเติม Isopropanol ปริมาตร 0.7 เท่า ที่อุณหภูมิห้องเพื่อทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอน ผสมโดยการกลับหลอดไปมา
14. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
15. ทิ้ง Supernate ลงอ่างน้ำ ล้างตะกอนดีเอ็นเอ 70% Ethanol จำนวน 5 ml แต่ไม่ต้องทำให้ตะกอนละลาย นำไปปั่นเหวี่ยง 5 นาที ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ดูดเอาเอธานอลออกและทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 5-10 นาที
16. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE จำนวน 100 µl ถ้าตะกอนมากและละลายยากสามารถเติม TE เพิ่ม ควรเก็บดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นมากกว่า 500 ng/µl
17. คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยใช้ Spectrophotometer หรือการทำ Gel electrophoresi (บทปฏิบัติการที่ 4)

ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์

....

....

....

บรรณานุกรม

Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** Nucleic Acids Res. 7:1513.

Robertson, D., Shore, S. and Miller, D. 1997. **Manipulation and Expression of Recombinant DNA**. Academic Press San Diego, California. USA.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 2 nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York. USA.

บทปฏิบัติการที่ 4 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ (Qualitative and quantitative determination of DNA)

จุดประสงค์
1. เพื่อสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอและคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้
2. เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรืออาร์เอ็นเอหรือไม่

บทนำ

Ultraviolet (UV) spectrophotometry ถูกนำมาใช้ในการหาความเข้มข้นของสารละลายกรดนิวคลีอิกและใช้บ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ เนื่องจากโปรตีนและกรดนิวคลีอิกดูดกลืนช่วงแสงที่มีความยาวคลื่นต่างกัน ทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอดูดกลืนแสง UV ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 260 nm จึงสามารถทำให้หาความเข้มข้นได้ต่ำสุดถึง 2 μg/ml สำหรับสารละลายดีเอ็นเอสายคู่บริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้น 50 μg/ml จะมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm เท่ากับ 1.0 ค่านี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยขึ้นกับเปอร์เซนต์ของ G + C content

การวัดค่าดูดกลืนแสงของกรดนิวคลีอิกที่ความยาวคลื่นอื่นนอกเหนือจาก 260 nm มีประโยชน์สำหรับการบ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของกรดนิวคลีอิก ซึ่งสามารถใช้ค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 320 nm และ 220 nm ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 320 nm ไม่ควรเกิน 5% ของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ถ้าค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 320 nm สูงมากแสดงว่ามีการปนเปื้อนของฝุ่นผงในสารละลายหรือ Cuvette สกปรก ทำให้ค่าที่ได้มีความคลาดเคลื่อน

โปรตีนดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 280 nm และค่าอัตราส่วน A260:A280 สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ว่าสารละลายดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของโปรตีนหรืออาร์เอ็นเอหรือไม่ ค่าอัตราส่วน A260:A280 ของสารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์ควรอยู่ระหว่าง 1.8-1.9 ถ้าค่าอัตราส่วนมากกว่า 1.9 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ปนเปื้อนด้วย RNA และถ้าค่าอัตราส่วนน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอปนเปื้อนด้วยโปรตีน การที่โปรตีนดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm เนื่องจากการมีกรดอะมิโนที่มีรูปร่างวงแหวน (Aromatic amino acids) ทำให้ค่าดูดกลืนแสงต่อน้ำหนักโมเลกุลมีความเปลี่ยนแปลงขึ้นกับการมีกรดอะมิโนพวก Tyrosine, Phenylalanine และ Tryptophane ซึ่งทำให้ค่าอัตราส่วน A260:A280 มีความแม่นยำลดลง ในกรณีนี้ค่าอัตราส่วน A234:A260 จะเป็นตัวบ่งชี้ได้ดีกว่า โดยถ้าค่าอัตราส่วนนี้สูงกว่า 0.5 แสดงว่ามีการปนเปื้อนด้วยโปรตีน

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

TE buffer

0.5 x TBE

Agarose gel

6x loading dye

EtBr 1 mg/ml

1 Kb DNA ladder

Calf-thymus DNA or Lambda DNA (100 ng/μl stock)

UV/Vis Spectrophotometer

Electrophoresis apparatus (Mini gel)

UV transiluminater/Gel Doc

50 ml-Conical tube (หลอดฝาเกลียว)

Microwave

Safety eye glasses or goggles

การทดลอง

A. การวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ UV Spectrophotometer

a. เปิดเครื่อง UV Spectrophotometer และปล่อยให้เครื่องอุ่นเป็นเวลา 5 นาที

b. ดูดสารละลายดีเอ็นเอจำนวน 1 μl (__) ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 ml

c. เติมสารละลาย TE จำนวน 99 (__) μl ลงไปในแต่ละหลอด มากหรือน้อยกว่านี้ขึ้นกับขนาดของ Cuvette

d. ใช้ Cuvette ที่ทำจาก Quartz (ราคาแพงและแตกหักง่าย โปรดใช้ด้วยความระมัดระวัง) 2 อัน อันหนึ่งสำหรับ TE และอีกอันสำหรับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการจะวัด วัดค่าดูดกลืนแสงของหลอดที่บรรจุ TE ที่ 260 nm แล้วทำให้ค่าเป็นศูนย์ (blank)

e. อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm สำหรับตัวอย่างแรก

f. ปรับค่าดูดกลืนแสงให้เป็นศูนย์อีกครั้งที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm โดยใช้ Cuvette ที่บรรจุ TE

g. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm สำหรับตัวอย่างที่สอง

h. หาค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงจากตัวอย่างทั้งสอง

การคำนวณหาความเข้มข้น โดยอาศัยค่าสังเกตที่ว่า หนึ่งยูนิตของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ของดีเอ็นเอสายคู่มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 µg/ml ให้ใช้สมการต่อไปนี้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

(A 260) x (50 µg/ml) x (Dilution factor) = DNA (µg/ml)

ตัวอย่าง เช่น 2 µl ของ DNA ใน 98 µl ของ TE ได้ค่า A260 = 0.200
ดังนั้น ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ = 0.200x 50 µg/ml x (100/2) = 500 µg/ml

หาปริมาณทั้งหมดของดีเอ็นเอในหน่วย µg โดยนำความเข้มข้นคูณด้วยปริมาณสารละลายดีเอ็นเอทั้งหมด บันทึกผลการทดลอง พร้อมคำนวณหาค่าอัตราส่วน A260:A280 ซึ่งควรมีค่าอัตราส่วน 1.7-1.8 ถ้าค่าอัตราส่วนมากกว่า 1.9 แสดงว่าดีเอ็นเอที่ได้อาจปนเปื้อนด้วย RNA และถ้าค่าอัตราส่วนน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าอาจปนเปื้อนด้วยโปรตีน ถ้าดีเอ็นเอมีความเข้มข้นมากเกินไปสามารถทำให้เจือจางได้ โดยการเพิ่ม TE แต่ถ้าเจือจางเกินไป (น้อยกว่า 100 ng/µl) สามารถนำมาตกตะกอนอีกครั้งโดยการเติม 1/10 เท่าปริมาตรของ 3M Sodium acetate และ 2.5 เท่าปริมาตรของ 95% cold ethanol แล้วบ่มที่อุณหภูมิ –20°C อย่างน้อย 1 ชม. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาทีความเร็วรอบ 14,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE ปริมาณที่ลดลง

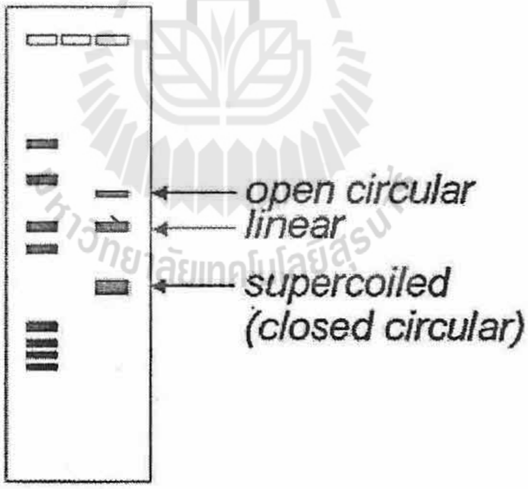
B. การวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยการวัดการเรืองแสงร่วมกับเอทิเดียมโบรไมด์

การทำ Gel electrophoresis มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันออกจากกันในสนามไฟฟ้า โดยใช้ตัวกลางคือ อะกาโรสหรือ Polyacrylamide จะใช้ตัวกลางชนิดใดนั้นขึ้นกับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการจะแยก เช่น ถ้าดีเอ็นเอมีขนาดเล็กกว่า 500 bp ควรใช้ Polyacrylamide แต่ถ้าหากมีขนาดใหญ่กว่า 500 bp ควรใช้อะกาโรส การใช้อะกาโรส มีความสะดวกและไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้ เมื่อนำอะกาโรสมาหลอมละลายโดยความร้อนและปล่อยให้เย็นลง อะกาโรสจะแข็งตัวทำให้เกิดรูพรุนที่ยอมให้ดีเอ็นเอผ่านเมื่อให้กระแสไฟฟ้าเข้าไป ขนาดของรูพรุนขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส ถ้าความเข้มข้นของอะกาโรสมากจะมีขนาดรูเล็กและถ้าความเข้มข้นน้อยรูก็มีขนาดใหญ่ ขนาดรูพรุนนี้มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ เช่น ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้าลงในเจลที่มีความเข้มข้นสูง ดังนั้นต้องเลือกความเข้มข้นของอะกาโรสให้เหมาะสมที่สามารถแยกดีเอ็นเอที่ต้องการจะวิเคราะห์ได้ ดังตารางที่ 4.1 นอกจากนี้ การเคลื่อนที่ของ

ดีเอ็นเอยังขึ้นกับรูปร่างของชิ้นดีเอ็นเอ พบว่าดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นเกลียว (Supercoiled DNA) เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นเส้นตรง (Linear DNA) และดีกว่าดีเอ็นเอที่เป็นวงกลม (Circular DNA) (รูปที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของอะกาโรสที่เหมาะสมในการแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆ

ปริมาณอะกาโรสในเจล (% w/v)	ช่วงขนาดดีเอ็นเอที่เหมาะสม (kb)
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.2	6-0.4
2.0	3-0.1



รูปที่ 4.1 การเคลื่อนที่ผ่านเจลขึ้นกับรูปร่างของพลาสมิดดีเอ็นเอ

(http://biochemistry.yonsei.ac.kr/biochem_molecular/gene_cloning_20.php)

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอผ่านอะกาโรสเจลขึ้นกับปัจจัยดังต่อไปนี้

-ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ (Molecular size) อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอเป็นสัดส่วนผกผันกับ $\log_{10}$ ของจำนวนคู่เบส นั่นคือโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่เคลื่อนที่ได้ช้ากว่า

DNA migration rate $=1/\log_{10}$ of number of base pair

-คุณภาพและชนิดของอะกาโรสเจล อะกาโรสที่มีขายทั่วไปมีสองชนิดคือ 1) ชนิดมาตรฐาน (High-melting –temperature) ใช้อุณหภูมิสูงในการละลายคือ 85-95°C และแข็งตัวที่อุณหภูมิ 35-42°C (Gelling temperature) อะกาโรสชนิดนี้แยกมาจาก Seaweed เหมาะในการแยกดีเอ็นเอขนาด 1-25 kb 2) Low melting/gelling temperature agarose ใช้อุณหภูมิในการละลายคือ 65-70°C และแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25°C เหมาะในการแยกกรดนิวคลีอิกออกจากเจล การเชื่อมต่อดีเอ็นเอในเจล (Gel Ligation) และ Random primed oligo-labeling

-ความเข้มข้นของเจล ดีเอ็นเอสายตรง (Linear DNA) มีอัตราการเคลื่อนที่ต่างกันในเจลที่มีความเข้มข้นต่างกัน โดยที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็วในเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ

-ส่วนประกอบและ Ionic strength ของบัฟเฟอร์ ในสภาวะที่ไม่มีไอออน จะไม่มีการชักนำให้เกิดสนามไฟฟ้า ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้าลง แต่ถ้ามี Ionic strength สูงก็จะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดสนามไฟฟ้ามาก ดังนั้นความร้อนจะเพิ่มขึ้นซึ่งอาจทำให้เจลละลายและดีเอ็นเอเสียสภาพ

-ความแรงของกระแสไฟฟ้า (Voltage used) การเพิ่ม Volt ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอลดลง โดยเฉพาะการแยกดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าที่มีความแรงสูงจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก โดยปกติจะใช้ 4-9 Volt/cm

-รูปร่างของดีเอ็นเอ (DNA conformation) ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างแบบเกลียว (supercoil) เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าแบบเส้นตรงและแบบ Open circular (รูปที่ 4.1) อย่างไรก็ตามการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอทั้งสามรูปยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ เช่น ความเข้มข้นของอะกาโรส Ionic strength ของบัฟเฟอร์

- การมี EtBr ในเจลและบัฟเฟอร์ EtBr เข้าไปแทรกระหว่างเบสของดีเอ็นเอ (Intercalate) ทำให้ดีเอ็นเอลดความเป็นประจุลบและดีเอ็นเอมีความยาวเพิ่ม นอกจากนี้ยังทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในเจลลดลง 15% EtBr จะแทรกตัวในโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นสายตรงดีกว่าดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นวงกลม ยิ่งมี EtBr เข้าไปแทรกตัวมากเท่าไรยิ่งทำให้ความหนาแน่นของดีเอ็นเอลดลง

Electrophoresis buffer

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำ Gel electrophoresis มีสามชนิด Tris-boric (TBE) Tris-acetate (TAE) Tris-phosphate (TPE) (ตารางที่ 4.2)

TAE มีราคาถูก มีค่าความจุต่ำสุด(Lowest buffering capacity) ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าบัฟเฟอร์ TBE และ TPE 10% เหมาะในการแยกดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีโครงสร้างซับซ้อนและพวก Supercoiled DNA เมื่อใช้แล้วจะนำกลับมาใช้อีกได้น้อยครั้งกว่าบัฟเฟอร์อื่น TPE และ TBE มีความจุสูง (High buffering capacity) เหมาะในการแยกดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและนำมาใช้ได้บ่อยครั้งกว่า

ตารางที่ 4.2 Electrophoresis buffer

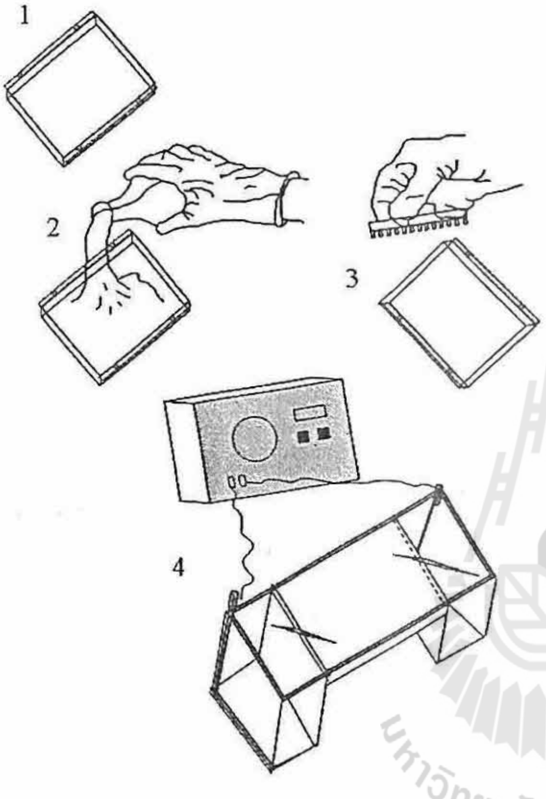
Buffer	**Working solution**	**Stock solution/Liter**
TAE	1x 40 mM Tris-acetate 1 mMEDTA	50x 242 g of Tris base 57.1 ml of glacial acetic acid 100 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)
TPE	1x 90 mM Tris-phosphate 2 mM EDTA	10x 108 g of Tris base 15.5 ml of phosphoric acid (85%, 1.679 g/ml) 40 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)
TBE	1x 45 mM Tris-borate 1 mM EDTA	5x 54 g of Tris base 27.5 g of boric acid 20 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)

สาธิตการเตรียมและการเทอะกาโรสเจลโดย TA (รูปที่ 4.2) แต่ละกลุ่มควรมีอุปกรณ์ดังนี้ Electrophoresis chamber, Gel casting tray, Gel comb และ Power supply วาง Gel casting tray ใน Electrophoresis chamber แล้ววาง Gel comb ให้ใกล้กับปลายข้างใดข้างหนึ่งของถาด (Casting tray) ที่จะเทเจล โดยปกติแล้วสำหรับ Minigel ต้องการอะกาโรสปริมาตร 25-30 ml ให้เตรียมบัฟเฟอร์ 0.5x TBE สำหรับแต่ละกลุ่มและใช้บัฟเฟอร์ 0.5x TBE ในการเตรียมอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ปริมาณ 100 ml ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 ml ใช้ไมโครเวฟเพื่อละลายอะกาโรส เปิดฝาขวดให้หลวมเพื่อให้ความดันอากาศได้ระเหยออกไปขณะให้ความร้อน และอะกาโรสละลายหมดจนเห็นสารละลายใส

ข้อควรระวัง ห้ามทิ้งขวดที่ใส่อะกาโรสโดยเด็ดขาด ขณะที่ทำการใช้ไมโครเวฟต้องมีการเขย่าขวดเป็นระยะระหว่างการให้ความร้อนและใช้ ถุงมือกันความร้อนจับขวดเสมอเพราะขวดร้อนมาก นอกจากนี้สามารถวาง Stirrer bar ในขวดเพื่อช่วยในการหลอมและป้องกันความร้อนเกิน

การเตรียมอะกาโรสเจล 0.8%

1. ชั่งอะกาโรสมา 0.8 g เทลงในขวดที่บรรจุสารละลาย 0.5x TBE จำนวน 100 ml
2. หลอมอะกาโรสให้ละลายด้วยไมโครเวฟ ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50°C หรือจนจับต้องได้
3. เทอะกาโรสที่ละลายแล้วลงในขวดขนาด 50-ml Conical tube จำนวน 25-30 ml
4. เติม EtBr ความเข้มข้น 1 mg/ml ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1-0.5 ug/ml ปิดฝาและผสมให้เข้ากัน
5. เทอะกาโรสลงบนถาดเจล การเทขณะที่อะกาโรสร้อน จะทำให้ Gel apparatus เสียหายได้และเกิดการรั่ว วาง gel comb ให้ใกล้ปลายข้างหนึ่งของ Gel casting tray
6. ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวนาน 20-30 นาที
7. ติดฉลากขวด 50-ml conical tube ว่า " for EtBr agarose" ซึ่งสามารถนำมาล้างและใช้ได้อีกหลายครั้ง



1.เตรียมถาดเจลที่แห้งและวางในถาดรอง

2.เทอะกาโรสเจล

3.วางหวีลงไปที่ปลายข้างหนึ่งของเจลและปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัว

4.นำถาดเจลวางในเครื่องแยก เทบัฟเฟอร์ให้ท่วม ใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอลงในช่องและทำการแยกดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า

รูปที่ 4.2 ขั้นตอนแสดงการเทอะกาโรสเจลและการทำ Gel electrophoresis

ข้อควรระวัง

ให้สวมถุงมือทุกครั้งที่มีการทำงานกับ EtBr และทิ้งวัสดุอุปกรณ์ที่ปนเปื้อนด้วย EtBr ในภาชนะที่จัดไว้ให้ ทิ้งเจลในภาชนะเฉพาะที่อยู่ใน Fume hood

Note: EtBr จะเคลื่อนที่ในทิศทางตรงข้ามกับการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ (จากขั้วสีดำไปยังขั้วสีแดง) เนื่องจากโมเลกุลของ EtBr มีการแทรกตัวกับดีเอ็นเอ ทำให้การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอช้าลง 15% ถ้าหากต้องการความถูกต้องของน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) ของดีเอ็นเอ สามารถย้อมเจลทีหลังเมื่อการแยกเสร็จสิ้น

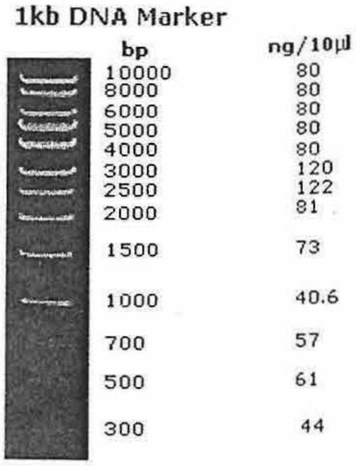
แล้วโดยวางเจลในบัพเฟอร์ 0.5x TBE ที่มี EtBr (0.5-1 μg/ml) 15 นาทีพร้อมกับเขย่าเบาๆ และล้างออกด้วยน้ำหรือบัฟเฟอร์

การหาปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Gel electrophoresis สำหรับพลาสมิด pET-23 และ pEGFP-N1

1. หลังจากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ให้เตรียมสารละลายดีเอ็นเอดังต่อไปนี้ ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

a. 1 Kb DNA ladder (100 ng/ul)	300 ng	__ μl
b. Your pET-23 หรือ pEGFP-N1	100 ng	__ μl
c. Your pET-23 หรือ pEGFP-N1	200 ng	__ μl

2. ให้เติม 6 x Loading dye ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1x สำหรับหลอด b-c โดยทำให้ปริมาตรสุดท้ายไม่เกิน 10 μl สำหรับ 8-well comb แยกดีเอ็นเอที่ความต่างศักย์ 100 Volts จับเวลาจนกว่า Bromophenol blue วิ่งได้ ¾ ของระยะทางของเจล ซึ่งจะใช้เวลา 20-30 นาที
3. ใช้ถุงมือค่อยๆ ดึงเอาเจลพร้อมถาดออกมาวางบน UV transiluminator แล้วเลื่อนถาดออก สวม UV –protective goggle (ไม่ใช่ Safety glasses) ตรวจดูเจลภายใต้แสง UV ถ่ายภาพและปิด UV transilluminator
4. ดีเอ็นเอที่ได้จะมี 1 แถบ ถ้าเป็นพลาสมิด pET-23 จะมีขนาดเท่ากับ 3.66 kb และมีขนาด 4.7 kb สำหรับพลาสมิด pEGFP-N ให้เทียบความเข้มแสงแถบดีเอ็นเอของ pET-23 หรือ pEGFP-N1 กับแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก 1 Kb DNA ladder ที่รู้ปริมาณแน่นอน (รูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.3) โดยที่ความเข้มแสงเท่ากันจะมีปริมาณดีเอ็นเอ (ไม่ใช่ความเข้มข้น) ใกล้เคียงกันมากที่สุด
5. คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหน่วย μg/ml และปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดในหน่วย μg
6. เปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่หาได้จากทั้งสองวิธี วิธีใดที่ให้ผลใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากกว่า เพราะเหตุใด


1kb DNA Marker
bp
ng/10µl
10000
80
8000
80
6000
80
5000
80
4000
80
3000
120
2500
122
2000
81
1500
73
1000
40.6
700
57
500
61
300
44

รูปที่ 4.3 1 kb DNA marker (http://www.antageneinc.com/images/1kb_DNA.gif)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณของดีเอ็นเอจาก 1 kb DNA Marker

DNA fragment (bp)	ng DNA/band ต่อ 1000 ng
10,000	**80**
80,000	**80**
6,000	**80**
5,000	**80**
3,000	**120**
2,500	**122**
2,000	**81**

ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์

....

....

....

....

....

บรรณานุกรม

Robertson, D., Shore, S. and Miller, D. 1997. **Manipulation and Expression of Recombinant DNA**. Academic Press San Diego, California. USA.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York. USA.

Winfrey, M.R., Rott, M.A. and Wortman, A.T. 1997. **Unraveling DNA: Molecular Biology for the Laboratory.** Prentice-Hall, Inc. New Jersey, USA.

http://www.promega.com

บทปฏิบัติการที่ 5 การตัดดีเอ็นเอโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme Digestion of DNA)

จุดประสงค์

1. เพื่อเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

บทนำ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction endonuclease หรือ Restriction enzymes) เป็นเอนไซม์ที่แยกมาจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ทำหน้าที่ในการจดจำลำดับเบสที่มีความจำเพาะและตัดที่พันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ที่อยู่ระหว่างนิวคลีโอไทด์ เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดที่ 2 (Type II) ได้ถูกนำมาใช้ในงานด้านชีววิทยาโมเลกุลมากที่สุดเนื่องจากโมเลกุลไม่ซับซ้อนประกอบด้วยโพลีเพพไทด์เพียงชนิดเดียว จดจำและตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเฉพาะ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดที่ 2 นี้จะจดจำลำดับเบสที่มีความยาว 4 6 หรือ 8 นิวคลีโอไทด์ที่มีการเรียงตัวแบบ Palindrome คือ การเรียงตัวของเบสที่เหมือนกันอยู่ตรงกันข้ามของสองสายและมีแกนสมมาตรอยู่กึ่งกลาง (Axis of symmetry) เช่น เอนไซม์ที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย *Eco*RI มีบริเวณจดจำ คือ GAATTC และสายที่เป็นคู่สมกันมีลำดับเบสที่เหมือนกันสำหรับสายที่สองในทิศทางตรงกันข้าม

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำให้ได้ปลายต่างกัน คือ ได้ปลายที่ยาวไม่เท่ากัน เรียกว่า ดีเอ็นเอปลายเหนียว (Cohesive end หรือ Sticky end) ที่มีปลายด้าน 5' ยาวกว่าด้าน 3' เรียกปลายที่ได้ว่า 5' protruding end แต่ถ้าได้ปลายด้าน 3' ยาวกว่าด้าน 5' เรียกว่า 3' protruding end เช่น *Eco*RI ให้ 5' protruding end ส่วน *Pst* I ให้ 3' protruding end

***Eco*RI**

5'-GAATTC-3'		5'-G	5'-AATTC-3'
3'-CAATTG-5'	⟶	3'-CTTAA-5'	G-3'

***Pst*I**

5'-CTGCAG-3'		5'-CTGCA	G-3'
3'-GACGTC-5'	⟶	3'-G	3'-ACGTC-5'

เอนไซม์บางชนิดจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งตรงกันทั้งสองสาย ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่ปลายทั้งสองยาวเท่ากัน เรียกว่า ปลายทู่ (Blunt end) เช่น *Eco*RV

$$\begin{matrix} \text{5'-GATATC-3'} & \longrightarrow & \text{5'-GAT} & \text{ATC-3'} \\ \text{3'-CTATAG-3'} & & \text{3'-CTA} & \text{TAG-3'} \end{matrix}$$

เอนไซม์บางชนิดมีบริเวณจดจำที่แตกต่างกันได้บ้าง เช่น *Xho*II มีบริเวณจดจำเป็น

$$\begin{matrix} \text{5'-Pu}\dot{\text{G}}\text{ATCPy-3'} & \longrightarrow & \text{5'-Pu} & \text{GATCPy-3'} \\ \text{3'-PyCTAGPu-3'} & & \text{3'-PyCTAG} & \text{Pu-5'} \end{matrix}$$

ปัจจุบัน เอนไซม์ตัดจำเพาะที่พบมีมากกว่า 400 ชนิดและหาซื้อได้จากหลายบริษัท การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยทั่วไปทำได้โดย เติมเอนไซม์ในสารละลายดีเอ็นเอที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์นั้น ซึ่งแต่ละบริษัทที่จำหน่ายจะให้มาด้วย ซึ่งในบัฟเฟอร์มีแมกนีเซียมไอออน โซเดียมคลอไรด์ มี pH อยู่ในช่วง 7.2-7.6 จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C บางเอนไซม์อาจใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกันไปซึ่งมักจะบอกไว้โดยบริษัทผู้ผลิต เช่น *Sma*I ต้องใช้อุณหภูมิต่ำและ *Taq*I ต้องใช้อุณหภูมิสูง ผู้ทดลองควรปฏิบัติตามคำแนะนำอย่างเคร่งคัด

องค์ประกอบในปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

-ดีเอ็นเอ
-บัฟเฟอร์
-เอนไซม์

บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแต่ละเอนไซม์ เมื่อครบเวลาต้องการหยุดปฏิกิริยา ทำได้โดย

1) ใช้อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 15 นาที เรียกว่า Heat inactivation
2) ใช้ EDTA ซึ่งเป็น Chelating agent โดยการเติม 200 mM Na_2EDTA pH 8.0 ลงไปประมาณ 1-2 μl

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

-ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่นำมาใช้ควรปลอดจากการปนเปื้อนจากขั้นตอนในการ Purification เช่น ฟีนอล EDTA, SDS เพราะสารเหล่านี้อาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

-บัฟเฟอร์ โดยปกติบริษัทผู้ผลิตจะให้มาด้วยซึ่งอยู่ในสภาวะความเข้มข้น 10x ดังนั้นต้องทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 1x

-อุณหภูมิ เอนไซม์ส่วนมากทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C แต่มีบางเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่ 42 °C หรือที่อุณหภูมิอื่น

-ส่วนประกอบอื่นๆ เช่น BSA, DTT

หากสภาวะไม่เหมาสมในการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์อาจทำงานได้ไม่ดีหรือตัดดีเอ็นที่ตำแหน่งอื่นที่ไม่ใช่ตำแหน่งที่จดจำ (Star activity) เช่น การมี Mn^{2+} การมี pH สูงกว่า 8.0 และการมีอัตราส่วนระหว่างเอ็นไซม์และดีเอ็นเอสูง (มากกว่า 100 units/ µg DNA)

ปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

กิจกรรมของเอนไซม์วัดในหน่วย Unit โดยที่ 1 Unit คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอจำนวน 1 µg ให้สมบูรณ์ในเวลาหนึ่งชั่งโมง ณ อุณหภูมิที่เหมาะสม ในทางปฏิบัติแล้วจะใช้เอนไซม์ปริมาณมากถึง 4-5 เท่า การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีหลายแบบ คือ

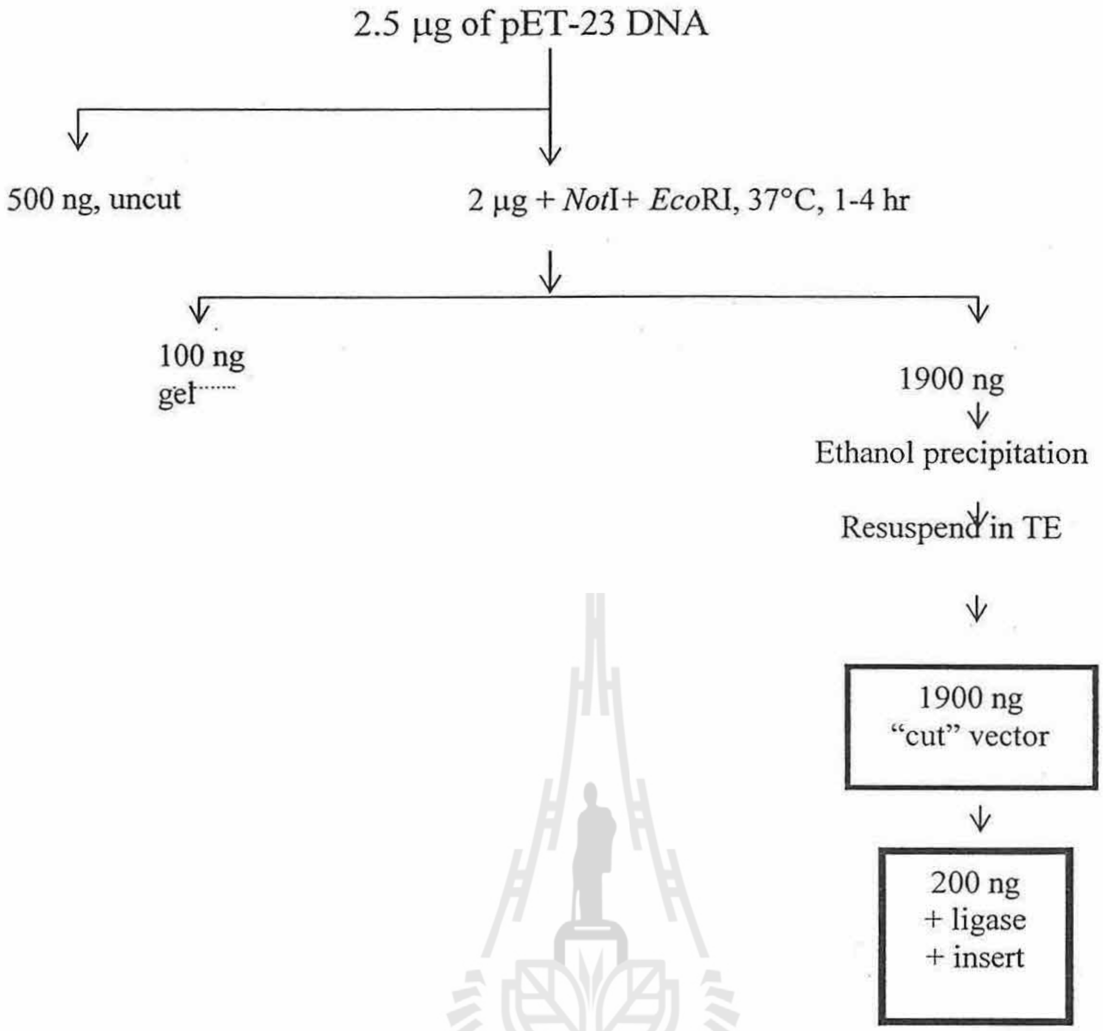
1. ตัดด้วยหนึ่งเอนไซม์ (Single digestion) การตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์หนึ่งชนิด ซึ่งทำได้ง่ายโดยใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่บริษัทผู้จำหน่ายให้มา

2. ตัดด้วยสองเอนไซม์ (Double digestion) ซึ่งทำได้โดย 1) เติมเอนไซม์ทั้งสองชนิดในหลอดเดียวกันและใช้บัฟเฟอร์ที่ทำให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดทำงานได้ดีที่สุด 2)หากไม่สามารถหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองได้ ให้ตัดด้วยเอนไซม์ทีละชนิด โดยเริ่มจากเอนไซม์ที่ทำงานในบัฟเฟอร์ที่ต้องการความเข้มข้นของเกลือต่ำแล้วเติมเอนไซม์ตัวที่สองลงในหลอดเดิมพร้อมกับปรับความเข้มข้นของเกลือให้เหมาะสม หรือ 3) ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัวแรกแล้วกำจัดเอนไซม์และบัฟเฟอร์ตัวแรกออกโดยการตกตะกอนด้วยเอธานอล จากนั้นทำการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดที่สองในบัฟเฟอร์ใหม่

2. ตัดด้วยหลายเอนไซม์ (Multiple digestion) ให้พิจารณาเหมือนการตัดด้วยสองเอนไซม์

การตัดดีเอ็นเอที่เป็นวงกลม (Covalently closed circular) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้หนึ่งตำแหน่ง นั่นคือ มีตำแหน่งจดจำหนึ่งที่ (One recognition site) ก็จะทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอวงกลมกลายเป็นเส้นตรงที่มีสองปลายเรียกเทคนิคนี้ว่า Linearlization ถ้านำเส้นตรงนี้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดดีเอ็นเอนี้ได้หนึ่งตำแหน่งอีก ผลก็จะทำให้เกิดดีเอ็นเอเส้นตรงสองสาย (Fragment) ที่มีปลายเกิดขึ้น 4 ปลาย ดังนั้น ถ้าดีเอ็นเอที่เป็นวงกลม มีตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ชนิดที่ใช้ n ตำแหน่ง ก็จะได้ดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง n เส้น มีจำนวน 2n ปลาย ถ้าเป็นดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง (Linear DNA) มีตำแหน่งการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดนี้ n ตำแหน่ง จะได้ดีเอ็นเอเส้นตรง n +1 ชิ้นมีจำนวน 2n+2 ปลาย

บทปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะทำการตัดเวกเตอร์ดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not*I และ *Eco*RI ขั้นตอนการเตรียมเวกเตอร์แสดงดังไดอะแกรมข้างล่าง (รูปที่ 5.1)


2.5 μg of pET-23 DNA
500 ng, uncut
2 μg + NotI+ EcoRI, 37°C, 1-4 hr
100 ng
gel.......
1900 ng
Ethanol precipitation
Resuspend in TE
1900 ng
"cut" vector
200 ng
+ ligase
+ insert

รูปที่ 5.1 ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนการเตรียมเวกเตอร์ดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำดีเอ็นเอสายผสม

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

Lambda *Hin*dIII marker 100 μg/ml

EtBr 1 mg/ml

Restriction enzymes: *Not*I, *Eco*RI และ buffer

5x TBE 1 Liter

10x loading dye

3M Sodium acetate pH 5.2 with glacial acetic acid

95% Ethanol

Glycogen 20 mg/ml หรือ tRNA 20 mg/ml

Water bath at 37°C and 65°C

การทดลอง

A. การเตรียม *Not*I + *Eco*RI-Cut vector

เอนไซม์ตัดจำเพาะจะจดจำและตัดลำดับเบสที่เฉพาะเจาะจงของดีเอ็นเอ เอนไซม์ *Not*I จดจำลำดับเบส GCGGCCGC และตัดภายใน เกิดปลาย 5' overhang ของ GGCC ของอีกสายที่เป็นคู่กัน ส่วนเอนไซม์ *Eco*RI จดจำลำดับเบส GAATTC และตัดภายใน เกิดปลาย 5' overhang ของ AATT หลังจากมีการตัดแบบสมบูรณ์ (ดีเอ็นเอถูกตัดหมด) ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ กิจกรรมของเอนไซม์ตัดจำเพาะถูกวัดโดยดูจากจำนวนของเอนไซม์ ในหน่วย Unit (U) ที่สามารถตัด 1 µg DNA (Lambda DNA) ให้สมบูรณ์ใน 1 ชม. ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม โดยปกติที่อุณหภูมิ 37°C เวลาสั่งซื้อเอนไซม์จะมีบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมติดมาด้วยที่ความเข้มข้น 10x กฎโดยทั่วไปก็คือว่า ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใดๆ ให้ใช้เอนไซม์ปริมาณ 4-5 เท่าและปริมาณเอนไซม์ไม่เกิน 10-20% ของปริมาตรสุดท้ายและเติมบัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1x

ตัวอย่างเช่น

การตัด 2 µg ของ pET-23 ที่มีความเข้มข้น 0.5 µg/µl ให้ใส่สารต่อไปนี้ตามลำดับ

DNA	4 µl
10x buffer	2 µl
Water	13 µl
Enzyme (10 U/µl)	1 µl
total volume	*20 µl*

ปฏิกิริยานี้อาจเปลี่ยนแปลงได้ โดยเติมน้ำ 3 µl และ 1 µl ของ 10x บัฟเฟอร์ เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 10 µl เอนไซม์บางชนิดจะตัดที่ตำแหน่งที่สองภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม ที่เรียกว่า Star activity ด้วยเหตุนี้ควรมีการทำให้เอนไซม์เจือจางอย่างน้อย 1: 10 และเติมเอนไซม์เป็นตัวสุดท้ายในบัฟเฟอร์ที่ได้มีการเจือจางแล้ว

วิธีการทดลอง

1. การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-23 ด้วยเอนไซม์ *Not*I + *Eco*RI ให้เก็บพลาสมิด pET-23 จำนวน 200 ng ติดฉลากและเก็บแยกไว้ต่างหาก และเริ่มปฏิกิริยาตามลำดับดังนี้

pET-23 DNA (2 µg) _____ µl

Sterile deionized water _____ µl

10x buffer (**) _____ µl

Enzyme (fivefold excess) _____ µl

Total volume *50 µl*

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชม. หรือมากกว่า ในตู้บ่มหรือ Heat block

หมายเหตุ การตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดพร้อมกันต้องใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ดูภาคผนวก

B. Gel electrophoresis of pET-23

ให้เตรียมอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8%

1. หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3-4 ชม. ให้หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1-2 µl ของ 200 mM Na_2EDTA pH 8.0 แล้วดูดเอาพลาสมิด pET-23/*Not*I+ *Eco*RI จำนวน 100 ng ใส่ลงในหลอดไมโครทิวป์ เติม 10x loading dye จำนวน 1-2 µl ผสมให้เข้ากัน
2. ให้เตรียมหลอดดังต่อไปนี้
   a. Lambda *Hind*III marker 300 ng __ µl
   b. pET-23, cut 100 ng __ µl + 1-2 µl dye
   c. pET-23, uncut 100 ng __ µl + 1-2 µl dye
3. ทำให้ปริมาตรสุดท้ายไม่เกิน 10 µl สำหรับ 8-well comb หรือ 5-8 µl สำหรับ 12-well comb นำไปแยกที่ความต่างศักย์ 100 Volts จับเวลาจนกว่า Bromophenol blue วิ่งได้ ¾ ของระยะทางของเจล ซึ่งจะใช้เวลา 20-30 นาที
4. ใช้ถุงมือค่อยๆ ดึงเอาเจลพร้อมถาดออกมาวางบน UV transiluminator แล้วเลื่อนถาดออก สวม UV –protective goggle (ไม่ใช่ Safety glasses) ตรวจดูเจลภายใต้แสง UV ถ่ายภาพและปิด UV transilluminator
5. ถ้าดีเอ็นเอมีการตัดโดยสมบูรณ์ (Complete digestion) ซึ่งหมายความว่าการที่มีการตัดดีเอ็นเอได้ครบทุกตำแหน่งที่เป็นตำแหน่งการตัดโดยเอนไซม์นั้นที่มีอยู่บนสายดีเอ็นเอ จะมี 1 แถบขนาดเท่ากับ 3.66 kb ถ้าตัดไม่สมบูรณ์ (Incomplete digestion) หมายความว่า ดีเอ็นเอสายนั้นถูกตัดไม่ครบทุกตำแหน่งที่จะสามารถตัดได้โดยเอนไซม์นั้นๆ แถบดีเอ็นเอที่ได้จะมีขนาด MW สูงกว่า (ดังรูปที่ 5.2) (ถ้าหากมีการตัดไม่สมบูรณ์เกิดขึ้นให้รายงานอาจารย์ซึ่งอาจให้บ่มนานขึ้น)

รูปที่ 5.2 เจลตัวอย่างของพลาสมิด pET-23 ช่องที่ 1 และ 6 คือ Lambda *Hin*dIII marker, ช่องที่ 2 คือ uncut pET-23, ช่องที่ 3 คือ pET-23,cut

ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์

……

……

……

……

……

บรรณานุกรม

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**.พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

Barker, K. 1998. **At the Bench: A Laboratory Navigator.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. USA.

Robertson, D., Shore, S. and Miller, D. 1997. **Manipulation and Expression of Recombinant DNA.** Academic Press San Diego, California. USA.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 2 nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York. USA.

ภาคผนวก

5x TBE 1 Liter

Tris base	54 g
Boric acid	27.5 g
EDTA 0.5 M	20 ml

10x loading dye เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

glycerol, 25%

EDTA, 0.1M

Bromophenol blue 0.25%

บทปฏิบัติการที่ 6 การแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจล (DNA isolation from gel)

จุดประสงค์

1. เพื่อแยก egfp fragment ก่อนจะนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET-23

บทนำ

การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจลจะเกี่ยวข้องกับการแยกดีเอ็นเอโดย Gel electrophoresis การตัดเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการและการแยกดีเอ็นเอออกจากเจล มีปัจจัยที่สำคัญที่สุดเพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการคือ คุณภาพของอะกาโรส เฉพาะอะกาโรสคุณภาพสูงเท่านั้น (High quality agarose) ที่ควรนำมาใช้ในการแยกชิ้นดีเอ็นเอ อะกาโรสที่มีขายตามบริษัทต่างๆ มีหลายเกรด มีทั้งแบบที่ไม่มีการปนเปื้อนของ Nuclease และตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ นอกจากนี้เมื่อต้องการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ ควรเลือกความเข้มข้นของอะกาโรสให้เหมาะสมและทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแยกจากดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการ การ Recovery ของดีเอ็นเอจะมีประสิทธิภาพดีถ้าดีเอ็นเอเริ่มต้นมีความเข้มข้นสูง นั่นก็คือมีปริมาณดีเอ็นเอ 200-500 ng เมื่อตัดแถบดีเอ็นเอออกจากเจลที่มี EtBr บน Transiluminator ควรใช้เวลาให้น้อยที่สุดเพื่อลดการสัมผัสกับแสง UV และเล็มเจลออกให้มากที่สุด มีหลายวิธีในการเอาดีเอ็นเอออกจากอะกาโรส ซึ่งแต่ละวิธีมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน ในบทปฏิบัติการนี้จะใช้วิธีการที่อธิบายโดยบริษัทผู้ผลิตซึ่งมีหลักการดังนี้ คือ การทำให้อะกาโรสละลายโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50-65°C จากนั้นปล่อยให้ดีเอ็นเอจับกับแผ่นเมมเบรนที่ทำจากซิลิกา (Silica membrane) ล้างเอาอะกาโรส และเกลือต่างๆ ออก แล้วทำการชะล้างดีเอ็นเอออกจากแผ่นเมมเบรน โดยใช้น้ำหรือบัฟเฟอร์ร่วมกับการปั่นเหวี่ยง

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เราต้องการนี้มีขนาด 770 bp และเป็นส่วนหนึ่งของยีน egfp ซึ่งก่อนหน้านี้ชิ้นส่วนของยีน egfp ถูกโคลนลงในเวกเตอร์ ได้พลาสมิดใหม่ที่มีชื่อว่า pEGFP-N1 ดังนั้นการให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 770 bp ที่ต้องการนี้ต้องนำพลาสมิด pEGFP-N1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not*I และ *Eco*RI พลาสมิด pET-23 มีตำแหน่งการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not*I และ *Eco*RI อย่างละหนึ่งตำแหน่ง การแยกชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี Gel electrophoresis ที่มีขนาด 770 bp ต้องใช้อะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.2% เพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีมวลโมเลกุลต่ำ หลังจากตัดแถบเจลที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการได้แล้วเราจะใช้ Gel /PCR Clean-up system จากบริษัท (BIORAD) เพื่อเอาดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากอะกาโรส แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของชิ้นดีเอ็นเอ 770-bp fragment นี้โดยวิธี Gel electrophoresis

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

Restriction enzymes and buffer: *Not*I, *Eco*RI

Agarose

5x TBE buffer

Gel/PCR Clean-up system ( )

Water bath at 50-65°C

Razor blade

Clean petri dishes

การทดลอง

A. Restriction digest ของ pEGFP-N1 ให้แต่ละกลุ่มเตรียมปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอจำนวนสองหลอดดังนี้

1. ทำการตัด pEGFP-N1 ด้วยเอนไซม์ *Not*I และ *Eco*RI

หลอดที่ 1 ทำ Double digestion โดยเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์แล้วเติมเอนไซม์ทั้งสองชนิดในหลอดเดียวกัน

pEGFP-N1 DNA (10 μg)	____ μl
Sterile water	____ μl
Not I	____ μl
*Eco*RI	____ μl
10x buffer	10 μl
Total	*50 μl*

แล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชม.

หลอดที่ 2 ทำการแยกตัดดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ทีละตัวเริ่มจากเอนไซม์ที่ทำงานในบัฟเฟอร์ที่ใช้ความเข้มข้นของเกลือต่ำกว่า แล้วเติมเอนไซม์ตัวที่สองที่ทำงานในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง

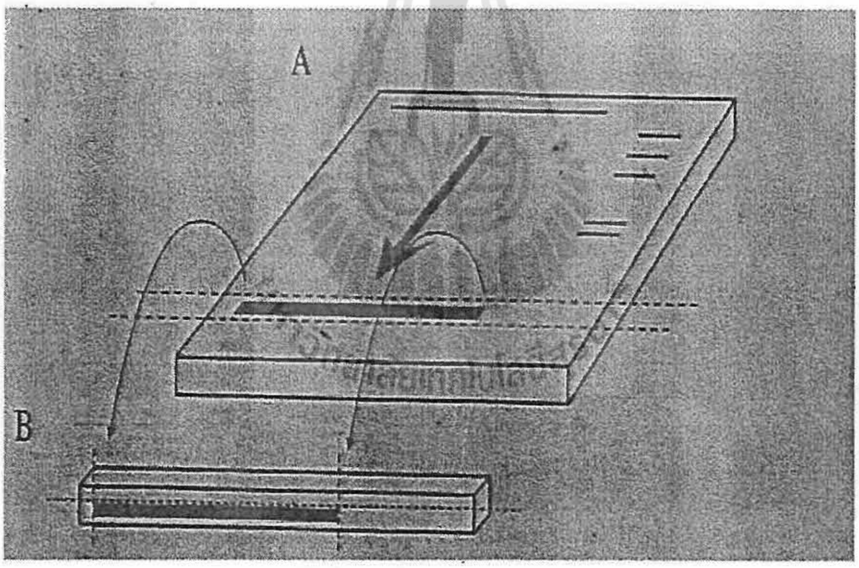
pEGFP-N1 DNA (10μg)	____ μl
Sterile water	____ μl
Enzyme 1	____ μl

10x buffer	10 µl
Total	*50 µl*

แล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชม. จากนั้นเติมเอนไซม์ *Enzyme II* จำนวน 5 U ผสมแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชม.

2. หลอมอะกาโรสให้ได้ความเข้มข้น 1.2% ใน 0.5x TBE
3. ใช้เทปใสมามัด 4 wells เข้าด้วยกันเพื่อให้ช่องเจลมีขนาดใหญ่ขึ้น
4. เทอะกาโรสลงบนถาด รอให้แข็งตัว แล้วปิเปตสารดังนี้
    - a. MW maker
    - b. pAD1/*Not*I+*Eco*RI (positive control)
    - c. Your pEGFP-N1/ *Not I+Eco*RI
5. แยกดีเอ็นเอที่ความต่างศักย์ 100 Volts เป็นเวลา 1 ชม. หรือจนกระทั่ง Bromophenol blue เคลื่อนถึงปลายสุด ตรวจสอบเจลด้วย UV transiluminator แล้วถ่ายภาพ (ดังภาพที่ 6.1)
6. เตรียม Heat block ที่อุณหภูมิ 55 °C
7. วางเจลลงบนจานพลาสติกเปล่าที่อยู่บน UV transiluminator สวม UV-protective goggle ใช้ มีดโกน (Razor blade) ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ เล็มเจลส่วนที่ไม่มีดีเอ็นเอออกให้เหลือน้อยที่สุด ระวังอย่าให้มีดโกนโดน UV transiluminator (รูปที่ 6.2)
8. เอาชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ใส่ลงในหลอดไมโครทิวป์ ชั่งน้ำหนักบันทึกผล

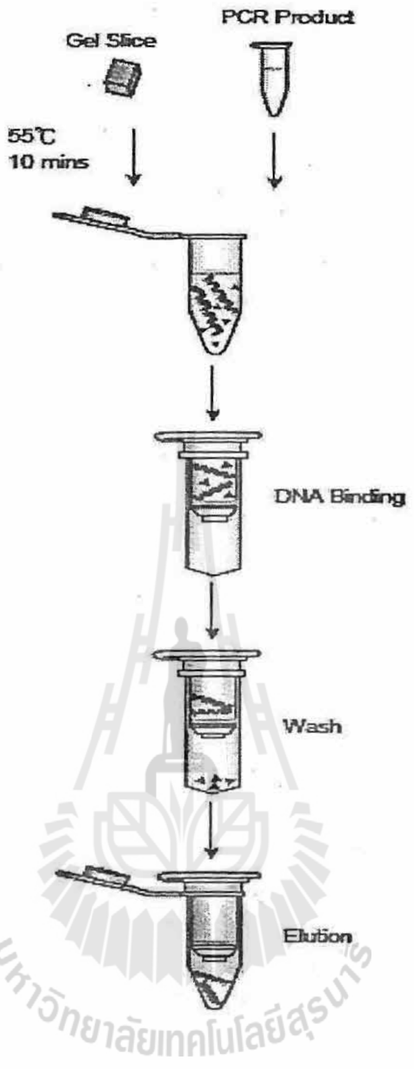
รูปที่ 6.1 เจลตัวอย่างของพลาสมิดดีเอ็นเอ pEGFP-N1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Not*I และ *Eco*RI ซึ่งอยู่ในช่องที่ 2, ส่วนช่องที่ 1 คือ molecular weight maker, ช่องที่ 3 คือ positive control (pAD1 ตัดด้วย *Not* I+*Eco*RI) ลูกศรชี้ตำแหน่งชิ้นส่วนของ egfp ขนาด 770 bp



รูปที่ 6.2 การตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจล (Robertson et al., 1997)

B. การแยกดีเอ็นเอจากเจลให้มีความบริสุทธิ์ (Gel/PCR Clean-up system, GENEAID) (ดังไดอะแกรมในรูปที่ 6.3)

1. เติมสารละลาย DE buffer จำนวน 500 µl ต่อเจลน้ำหนัก 300 mg ทำการผสมโดยใช้เครื่องผสมสาร (Vortex) และบ่มที่อุณหภูมิ 50-60 °C จนกระทั่งเจลละลายหมด โดยทำการกลับหลอดเป็นครั้งคราว
2. วาง DF column ลงในหลอด 2 ml Collection tube
3. ดูดสารละลายเจลจากข้อ 1 ปริมาณ 800 ul ลงในหลอด DF column
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที ทิ้ง Flow through แล้วนำ DF column ใส่ลงไปในหลอด Collection tube อันเดิม ถ้าสารละลายยังเหลือ ให้ทำซ้ำ
5. เติมสารละลาย Wash buffer (ที่เติมเอธานอลแล้ว) จำนวน 600 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที ทิ้ง flow through แล้วนำ DF column ไปใส่ลงในหลอด Collection tube อันเดิม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาทีเพื่อให้คอลัมน์แห้ง
6. ย้าย DF column ออกด้วยความระมัดระวัง แล้วใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml ที่สะอาด
7. เติมสารละลาย Elution buffer จำนวน 15-50 µl ลงในหลอด DF column และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
8. เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ และหาปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Gel electrophoresis บันทึกผลการทดลอง


Gel Slice
PCR Product
55℃
10 mins
DNA Binding
Wash
Elution

รูปที่ 6.3 ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนการแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล (www.geneaid.com)

C. การหาความเข้มข้นของชิ้นดีเอ็นเอ egfp 770 bp โดยวิธี Gel electrophoresis

1. หลอมอะกาโรสให้ได้ความเข้มข้น 1.2% ใน 0.5x TBE
2. เทอะกาโรสลงบนถาด รอให้แข็งตัว แล้วปิเปตสารดังนี้

a. Lambda DNA *Hin*dIII maker	
b. egfp770 bp (control)	50 ng
c. your efgp	1.0 μl
d. your egfp	2.0 μl

3. แยกดีเอ็นเอที่ความต่างศักย์ 100 Volts เป็นเวลา 1 ชม. หรือจนกระทั่ง Bromophenol blue เคลื่อนถึงปลายสุด ตรวจสอบเจลด้วย UV transiluminator แล้วถ่ายภาพ
4. คำนวณหาความเข้มข้นของ egfp ในหน่วย ng/μl โดยเทียบกับดีเอ็นเอ egfp (control)

D. การคำนวณหาประสิทธิภาพการ Recovery

1. ความเข้มข้นของ egfp = ng/μl

2. ปริมาณ egfp ทั้งหมดที่ได้ = ความเข้มข้น ng/μl x ปริมาตรดีเอ็นเอที่ละลายในสารละลาย TE (μl)
= ng

3. ชิ้นดีเอ็นเอ egfp 770 bp คิดเทียบกับพลามิดดีเอ็นเอ pEGFP-N1 เป็นเปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) = (770 bp/ 4700 bp) x 100% = 16.38 % ถ้าชิ้นดีเอ็นเอ egfp มีการ Recovery 100 % นั่นหมายความว่า ถ้ามี พลาสมิด pEGFP-N1 100 μg จะได้ egfp = 16.38 ng

ดังนั้นประสิทธิภาพในการ Recovery ของ egfp เป็นเปอร์เซนต์

= {ปริมาณ egfp (ng) x 100}/16.38 ng =_________%

ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์

1. ความเข้มข้นของชิ้นดีเอ็นเอ egfp 770 bp = ...ng/μl
2. คำนวณหาประสิทธิภาพในการ Recovery เป็นเปอร์เซนต์
3. การที่ดีเอ็นเอจับกับเรซินอาศัยหลักการใด และการชะเอาดีเอ็นเอออกจากเรซินอาศัยหลักการใด

บรรณานุกรม

Robertson, D., Shore, S. and Miller, D. 1997. **Manipulation and Expression of Recombinant DNA**. Academic Press San Diego, California. USA.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 2 nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York. USA.

Winfrey, M.R., Rott, M.A., and Wortman, A.T. 1997. **Unraveling DNA: Molecular Biology for the Laboratory**. Prenticc-Hall, Inc., New Jersey. USA.

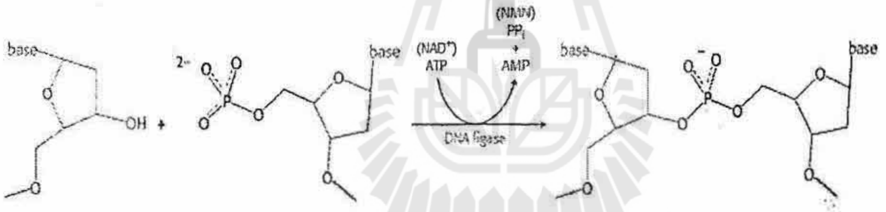
บทปฏิบัติการที่ 7 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ (DNA ligation)

จุดประสงค์

1. เพื่อเรียนรู้ขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ
2. เพื่อคำนวณหาอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเชื่อมต่อดีเอ็นเอระหว่างเวกเตอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย

บทนำ

DNA Ligation เป็นการเชื่อมต่อดีเอ็นเอสองโมเลกุลเข้าด้วยกันโดยเอนไซม์ DNA Ligase ตัวอย่างเช่น เชื่อมต่อดีเอ็นเอระหว่างเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมาย เอนไซม์ DNA Ligase จะสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ระหว่างหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ของดีเอ็นเอสายแรกและหมู่ไฮดรอกซิลที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอสายที่สอง (รูปที่ 7.1)



รูปที่ 7.1 กลไกการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่ฟอสเฟตโดยการทำงานของเอนไซม์ DNA Ligase (Berg et al., 2002)

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอมี 3 แบบ

1. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียวที่เกิดจากการถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันมาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ Ligase เช่น เมื่อใช้เอนไซม์ *Eco*RI ตัดทั้งเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมาย จะได้ปลายที่เป็นปลายเหนียวมีเบสคู่สมกัน นำมาเชื่อมต่อกันได้ง่าย เพื่อป้องกันชิ้นดีเอ็นเอนั้นๆ เชื่อมต่อกันเอง นิยมดึงเอาหมู่ฟอสเฟตที่อยู่ปลาย 5' ออกจากปลายของดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่เป็นเวกเตอร์ก่อนที่จะนำมาเชื่อมต่อกับ

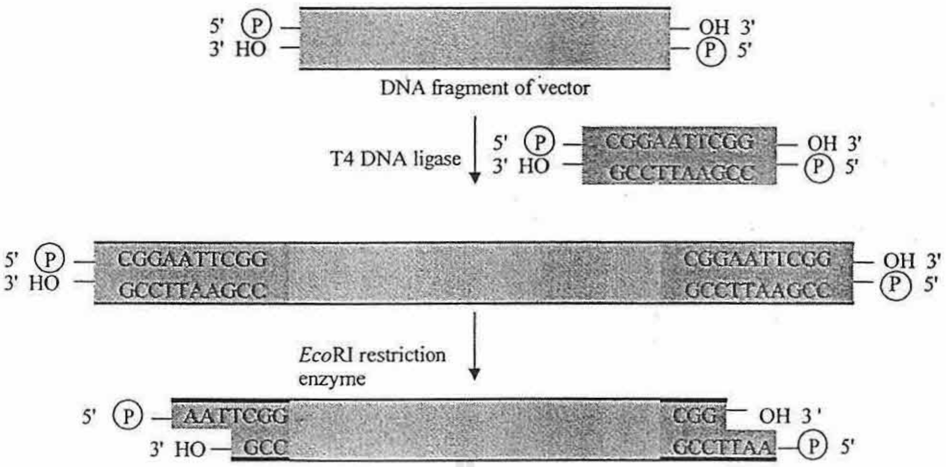
ดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการทำงานของเอนไซม์ Alkaline phosphatase เช่น Shrimp alkaline phosphatase (SAP)

2. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียวที่เกิดจากการถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างชนิดแต่มีปลายที่มีเบสคู่สมมาเชื่อมต่อกัน (Force cloning) เช่น เวกเตอร์ถูกตัดด้วย *Not*I เชื่อมกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ถูกตัดด้วย *Eco*RI ในกรณีนี้ไม่ต้องการกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ของเวกเตอร์ เมื่อนำเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมายมาเชื่อมต่อกันแล้วจะไม่สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์เดิมเพราะลำดับเบสบริเวณที่จดจำเปลี่ยนไป

3. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่ เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ให้ปลายทู่ (Blunt end ligation) เช่น เมื่อใช้เอนไซม์ *Eco*RV การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายทู่นี้มีประสิทธิภาพต่ำกว่าการเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียว และยังต้องใช้เอนไซม์ Ligase ที่มีความเข้มข้นมากกว่าและใช้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่นี้เกิดเมื่อมีตำแหน่งของเอนไซม์ไม่เหมาะสม แต่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้โดยการนำชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายทู่มาเชื่อมต่อกับ Linker ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นที่มีลำดับเบสถูกจดจำโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ให้ปลายเหนียว เช่น นำ Linker ที่มีลำดับเบสถูกจดจำโดยเอนไซม์ *Eco*RI มาต่อกับเวกเตอร์ แล้วนำเวกเตอร์ ใหม่ที่ได้มาตัดด้วย *Eco*RI (รูปที่ 7.3) จะได้ดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียวเกิดขึ้น

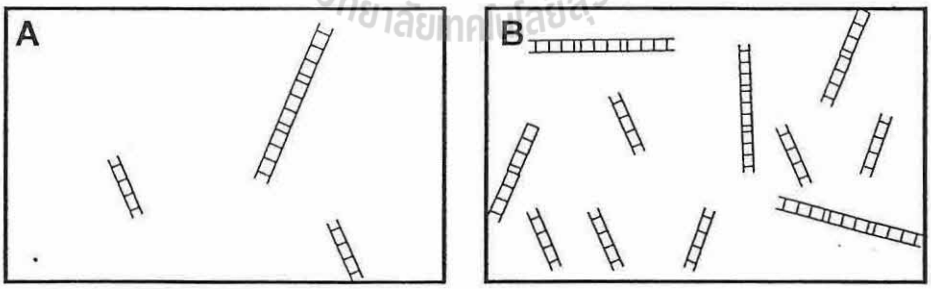
เอนไซม์ Ligase ที่มีจำหน่ายมีสองชนิดคือ T4 DNA ligase และ *E. coli* DNA ligase ซึ่งทำหน้าที่เหมือนกันแต่ T4 DNA ligase ต้องการ ATP เป็น Cofactor ขณะที่เอนไซม์ *E.coli* DNA ligase ต้องการ NAD เป็น Cofactor สำหรับการเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่นิยมใช้ T4 DNA ligase มากกว่า

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอระหว่างชิ้น egfp fragment (0.77 kb) กับเวกเตอร์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 5 เท่า (3.66 kb) หลักกลศาสตร์ในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอขึ้นกับจำนวนโมเลกุล ความยาวของชิ้นดีเอ็นเอและ ความ Rigidity ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ กฎโดยทั่วไป คือ ใช้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-100 ng/μl ซึ่งค่อนข้างได้ผลดีในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุล ดังนั้นดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลควรมีความเข้มข้นระหว่าง 0.1-1.0 μg/μl ก่อนที่จะนำมาทำการเจือจาง ถ้าดีเอ็นเอเจือจางเกินไปการ Recirculation จะเกิดขึ้นและถ้าดีเอ็นเอเข้มข้นเกินไปจะเกิด Contatemer


5'
Ⓟ
3' HO
OH 3'
Ⓟ 5'
DNA fragment of vector
T4 DNA ligase
CGGAATTCGG
GCCTTAAGCC
CGGAATTCGG
GCCTTAAGCC
*Eco*RI restriction enzyme
AATTCGG
GCC
CGG
GCCTTAA

รูปที่ 7.2 การทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายทู่เป็นปลายเหนียว โดยการนำ Linker มาเชื่อมต่อ (Adapted from Berg et al., 2002)

รูปที่ 7.3A แสดงภาพการเชื่อมต่อดีเอ็นเอของ pET-23 และ egfp ปลายของ egfp ใกล้กันเองมากกว่าแต่ไกลจากปลายของ pET-23 แต่เนื่องจาก egfp ไม่มี ori ที่ทำหน้าที่ใน *E. coli* หากมีการเชื่อมต่อชิ้นส่วนกันเองของ egfp ชิ้นส่วนที่ได้นี้จะหายไปไม่สามารถเพิ่มจำนวนใน *E. coli* รูปที่ 7.3B แสดงให้เห็นถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ส่งผลในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ การเติม Polyethylene glycol หรือ Ficol จะช่วยให้ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีขึ้นโดยเพิ่มประสิทธิภาพความเข้มข้นของปลาย



รูปที่ 7.3 Vector DNA และ Insert DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน A) ความเข้มข้นที่ต่ำเกินที่จะทำให้การ Ligation มีประสิทธิภาพ B) ความเข้มข้นที่เหมาะสำหรับการ Ligation

ปัจจัยที่มีผลต่อการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ คือ อัตราส่วนของปลายดีเอ็นเอของดีเอ็นเอเป้าหมายและเวกเตอร์ ควรอยู่ระหว่าง 1-3 จำนวนของปลายสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\frac{\text{DNA ends (pmol)}}{\text{Microgram double-stranded DNA}} = \frac{(2 \times 10^{6}) \times 1}{660 \times \text{number of bases} \times 2}$$

น้ำหนักโมเลกุลของ 1 bp = 660 Da และจากการคำนวณความถูกต้องจากหลักของ Avogado's number ทำให้ได้สมการข้างบน แล้วนำมาคูณด้วยสองเพราะชิ้นดีเอ็นเอมีสองปลาย ดังนั้น สำหรับ pET-23 ซึ่งมีขนาด 3666 bp ความเข้มข้นของปลาย = 0.22 pM/μg และความเข้มข้นของปลายสำหรับดีเอ็นเอเป้าหมาย (770 bp) = 1.08 pM/μg เพื่อให้อัตราส่วนของเวกเตอร์ใกล้เคียงกับดีเอ็นเอเป้าหมาย นั่นคือต้องใช้เวกเตอร์ดีเอ็นเอ 5 เท่าของดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อให้ได้ปลายจำนวนใกล้เคียงกัน อีกนัยหนึ่งคือ a single vector DNA มีมวล 5 เท่า ของ a single insert DNA

อย่างไรก็ตามสามารถใช้สมการข้างล่างในการคำนวณหาอัตราส่วนของปลายที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอระหว่างเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนี้

$$\text{ng of insert} = \frac{\text{ng of vector} \times \text{size of insert (kb)} \times \text{molar ratio}}{\text{size of vector (kb)}}$$

เมื่อ molar ratio คืออัตราส่วนปลายดีเอ็นเอระหว่างเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมาย

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

T4 DNA ligase

10x ligation buffer

pET-23, *NotI/EcoRI*-cut only

egfp

Sterile-deionized water

วิธีการทดลอง

A. ให้เจือจาง pET-23 ให้ได้ความเข้มข้น 200 ng/µl และใช้สูตรข้างบนในการคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:3 molar ratio

B. เตรียมปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ สำหรับการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียวสามารถบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชม. หรือวางบน Heat block ในตู้เย็นและปรับอุณหภูมิให้ได้ 12 –16 °C เป็นเวลา 12-16 ชม.

หลอดที่ 1 1:1 molar ratio

pET-23, NotI/*Eco*RI-cut 200 ng	1 µl
egfp	__ µl
sterile, deionized water	__ µl
10x ligase buffer	__ µl
ligase	__ µl
total volume	*10 ul*

หลอดที่ 2 1:3 molar ratio

pET-23, NotI/*Eco*RI-cut 200 ng	1 µl
egfp	__ µl
sterile, deionized water	__ µl
10x ligase buffer	__ µl
ligase	__ µl
total volume	*10 µl*

C. ทำ Gel electrophoresis ของ Ligation product เพื่อตรวจสอบว่าเวกเตอร์และดีเอ็นเอเป้าหมายมีการเชื่อมต่อกันหรือไม่ โดยการปิเปตสารดังต่อไปนี้แล้วนำไปแยกโดย Gel electrophoresis

lane 1 = pET-23, uncut	100 ng
lane 2 = pET-23, *NotI/Eco*RI cut	100 ng
lane 3 = 1:1 molar ratio pET-23, *NotI/Eco*RI + egfp	5 µl

lane 4 = 1:3 molar ratio pEt-23, *NotI/Eco*RI + egfp	5 µl
lane 5 = egfp	50 ng
lane 6 = molecular weight maker	300 ng

รูปที่ 7.4 ตัวอย่างเจลจากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA ligase ช่องที่ 1 คือ pET-23, uncut; ช่องที่ 2 คือ pET-23, *NotI/Eco*RI -cut , no ligase; ช่องที่ 3 คือ pET-23, *NotI/Eco*RI -cut, with ligase; ช่องที่ 4 คือ molecular weight makers

ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์

....

....

....

....

บรรณานุกรม

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**.พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

Berg, J.M., Tymoczko, J.L.and Stryer, L. 2002. **Biochemistry**. 5th Edition. New York: W. H. Freeman and Co.

Robertson, D., Shore, S. and Miller, D. 1997. **Manipulation and Expression of Recombinant DNA**. Academic Press San Diego, California. USA.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 2 nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York. USA.

บทปฏิบัติการที่ 8 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้านและการนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

(Competent cells preparation and transformation of *Eschericia coli* with plasmid DNA)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเรียนรู้การเตรียม Competent cells จากเซลล์ *E. coli* โดยวิธีการใช้สารเคมี
2. เพื่อเรียนรู้วิธีการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยวิธี Heat Shock

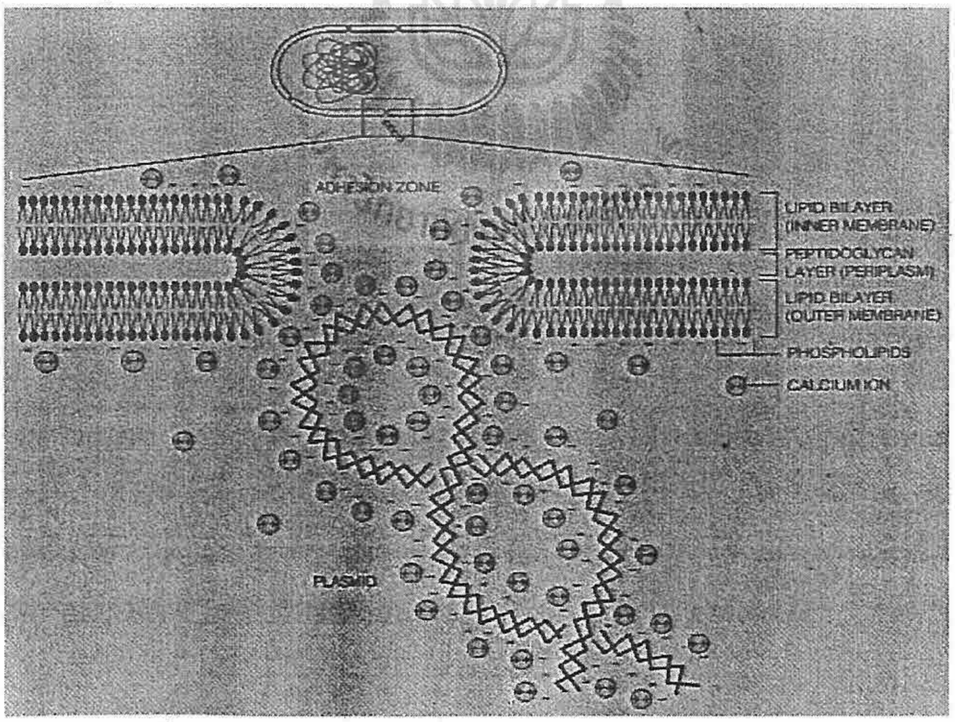
บทนำ

ในกระบวนการโคลนยีน (Gene cloning) หนึ่งในขั้นตอนที่สำคัญคือ การนำดีเอ็นเอสายผสม (Recombinant DNA) ที่ได้จากการตัดต่อยีนในหลอดทดลองเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Host) หรือที่เรียกว่า Transformation ซึ่งเซลล์มีการรับเอาดีเอ็นเอจากนอกเซลล์เข้าในเซลล์ แล้วมีการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่ต้องการ เซลล์ผู้รับดีเอ็นเอต้องนำมาทำให้เป็นเซลล์ที่มีความพร้อมในการรับ หรือที่เรียกว่า Competent cells ก่อน เซลล์ที่ใช้อาจเป็นเซลล์แบคทีเรีย เซลล์ยีสต์ เซลล์เชื้อรา เซลล์พืชหรือเซลล์สัตว์ ในงานด้าน Cloning นั้น นิยมใช้ เซลล์เจ้าบ้าน คือ *E. coli* K12 และอนุพันธุ์ของ K12 ที่มีการดัดแปลงให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมตามที่ต้องการ เช่น *E. coli* HB600, *E. coli* JM109, *E. coli* DH5 เป็นต้น โดยทั่วไปแล้วเซลล์เจ้าบ้านที่นำมาใช้ควรเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้างเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzymes) ใดๆ เลยเพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดกับพลาสมิดดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอสายผสมที่นำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน เซลล์เจ้าบ้านควรมีคุณสมบัติที่ไม่สามารถทำให้เกิด Homology based recombination ซึ่งเป็นการรวมตัวของดีเอ็นเอสายผสมกับดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้าน

การเตรียม Competent cells สามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่ใช้กันมานานคือการใช้สารเคมี จากการสังเกตที่ว่า Ca^{2+} และไอออนบวกอื่นๆ เช่น Mg^{2+}, Rb^{+}, Co^{2+}, K^{+} และ Dimethyl sulfoxide (DMSO) สามารถทำให้เซลล์ *E. coli* กลายเป็น Competent cells ได้ โดยที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ *E. coli* จะยอมให้ Cl^{-} ผ่านแต่ไม่ยอมให้ Ca^{+} ผ่าน ขณะที่ Cl^{-} เข้าสู่เซลล์ โมเลกุลของน้ำก็จะมีการรวมกับโมเลกุลที่มีประจุที่อยู่รอบนอกเซลล์ ส่งผลให้มีการไหลของน้ำเข้าสู่เซลล์ ทำให้เซลล์บวม ง่ายต่อการที่จะรับดีเอ็นเอจากภายนอก (รูปที่ 8.1) แต่อย่างไรก็ตาม กลไกพื้นฐานของ Transformation แบบนี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจในรายละเอียดมากนัก อีกวิธีคือ การทำ Electroporation เป็นการทำให้เซลล์กลายเป็น Competent cells โดยการให้กระแสไฟฟ้าสูงในช่วงเวลาสั้น ทำให้เกิดรูรั่วที่ผนังเซลล์ในหลอดที่บรรจุเซลล์ ดีเอ็นเอและพลาสมิดที่ผสมกันอยู่ ซึ่งพบว่าวิธีนี้มีประสิทธิภาพค่อนข้างสูง แต่จะต้องใช้ไฟฟ้าและเวลาที่เหมาะสม ถ้าใช้กระแสไฟฟ้าสูงหรือเวลานานเกินไป *E. coli* จะตายได้ ขนาดของดีเอ็นเอที่จะนำเข้าสู่เซลล์ไม่จำกัดเหมือนวิธี

Transformation แบบใช้สารเคมี การ Transformation โดยการใช้กระแสไฟฟ้า ให้ประสิทธิภาพสูงกว่าโดยทั่วไป 10-20 เท่าของวิธีสารเคมี (สูงถึง 10^{10} colonies/μg of pUC 18) แต่อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการ Transformation ขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ความเข้มของสนามไฟฟ้า ระยะเวลาของกระแสไฟฟ้า การเตรียมเซลล์เจ้าบ้านสำหรับ Electroporation คล้ายกับวิธีการใช้สารเคมี ยกเว้นแทนที่จะมีการละลายเซลล์ในสารละลายที่มีไอออน ก็ให้ละลายในน้ำสะอาด หรือ 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N, N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) เซลล์ที่เตรียมสำหรับ Electroporation ทำได้โดยเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียถึง Mid-log phase นำเซลล์ไปทำให้เย็น ปั่นเหวียง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มของเกลือเจือจางเพื่อลดปริมาณไอออนในสารละลายเซลล์ จากนั้นละลายเซลล์ใน 10% Glycerol ที่ความเข้มข้น 3 x 10^{10} cells/ml แล้วทำให้แข็งโดยใช้น้ำแข็งแห้ง (Dry ice) และเก็บที่ –70°C เซลล์ที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีนี้ต้องใช้กับ Electroporator เท่านั้น สับเปลี่ยนไปใช้กับวิธีใช้สารเคมีไม่ได้ เซลล์ทั้งสองชนิดที่ได้จากการใช้สารเคมีและเตรียมสำหรับ Electroporation สามารถเก็บที่ –70°C ใน 15% glycerol และเซลล์เหล่านี้สามารถนำมาละลายบนน้ำแข็งแล้วใช้ได้นานอย่างน้อย 6 เดือน

นอกจากมีการเตรียมเซลล์เจ้าบ้านได้เองแล้วยังสามารถซื้อจากบริษัทการค้า เช่น Gibco BRL, Bio-Rad ซึ่งมีคุณภาพดี (10^{8} colonies/μg of supercoiled plasmid DNA) และมีหลายสายพันธุ์ให้เลือก แต่ราคาค่อนข้างแพง ซึ่งอาจไม่จำเป็น ยกเว้นถ้าทำงานกับการโคลนเซลล์สัตว์ เซลล์พืช ซึ่งต้องการ Competent cells ที่มีคุณสมบัติสูงในการป้องกัน Rearrangement recombination Error!


ADHESION ZONE
LIPID BILAYER (INNER MEMBRANE)
PEPTIDOGLYCAN LAYER (PERIPLASM)
LIPID BILAYER (OUTER MEMBRANE)
PHOSPHOLIPIDS
CALCIUM ION
PLASMID

รูปที่ 8.1 กลไกการรับดีเอ็นเอภายนอกโดย Competent cells (Potrykus and Spangenberg, 1995)

การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยวิธี Heat Shock และ Electroshock

นำเซลล์ผู้รับที่อยู่ในสภาพที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอจากภายนอก (Competent cells) ที่ได้จากการใช้สารเคมี มาผสมรวมกับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 0°C ดีเอ็นเอจากพลาสมิดจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ทนต่อเอนไซม์ DNase ที่ผนังเซลล์ของ *E. coli* แล้วจึงทำให้ส่วนผสมของเซลล์และพลาสมิดนี้เปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (Heat Shock) โดยนำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 °C หรือ 42°C เป็นเวลาสั้นๆ สารประกอบเชิงซ้อนของดีเอ็นเอจะเข้าไปภายในเซลล์ ประสิทธิภาพการ Transformation โดยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่นรูปร่างและขนาดของพลาสมิด ระยะการเติบโตของเซลล์ และวิธีที่ทำให้เซลล์เป็น Competent cells เป็นต้น พลาสมิดที่มีรูปร่างเป็นวงแหวนปลายปิดและพันกันเป็นเกลียว (Supercoil) จะเข้าเซลล์ได้ดีกว่าพลาสมิดที่เป็นสายตรง (Linear) หรือวงกลมที่มีช่องเปิด (Opened circular) พลาสมิดขนาดเล็กเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าพลาสมิดขนาดใหญ่ และระยะที่ดีที่สุดในการนำเอา *E. coli* ทำเป็น Competent คือเซลล์ที่เจริญในระยะ Log phase

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการ Transformation

1.ความบริสุทธิ์ไร้การปนเปื้อนของสารเคมีที่ใช้ในบัฟเฟอร์ รวมทั้งคุณภาพของน้ำที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย

2.ระยะของการเติบโตของเซลล์

3.ความสะอาดของเครื่องแก้วและพลาสติก การมีผงซักฟอกหรือสบู่หลงเหลืออยู่ทำให้ลดประสิทธิภาพการ Transformation

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

E. coli XL2-blue หรือ DH5 บนอาหาร LB agar

หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 ml ปลอดเชื้อ

Supercoiled plasmid pUC18 10 ng/µl

LB/Amp plates	จำนวน 10 จานต่อกลุ่ม
TE	10 ml ปลอดเชื้อ
LB bloth	100 ml ปลอดเชื้อ
CaCl2 0.1M	150 ml ปลอดเชื้อ
CaCl2 0.1M+15% glycerol	50 ml ปลอดเชื้อ

การทดลอง

A. การเตรียม Competent cells โดยใช้สารเคมี (Preparation of chemically competent cells) ดัดแปลงจาก Cohen et al. (1972) และ Sambrook et al. (1989)

ข้อควรคำนึง จะไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะในขั้นตอนการทำ Competent cells เนื่องจากเซลล์ *E. coli* ที่ใช้ไม่มีพลาสมิด ให้ใช้เทคนิคปลอดเชื้อและแน่ใจว่าหลอดเซนติฟิวจ์ที่นำมาใช้ปลอดเชื้อ

1. เพาะเลี้ยง *E. coli* XL-Blue หรือ DH5 จากโคโลนีเดี่ยวบนจาน LB agar นำไปเลี้ยงใน LB broth 5 ml โดยใช้เครื่องบ่มแบบเขย่า โดยใช้ความเร็วรอบ 120 rpm ที่ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชม.
2. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 1 มา 0.4 ml (1:250 dilution) เติมลงในขวด Erlenmeyer flask ที่มี LB bloth อยู่ 100 ml นำไปเพาะเลี้ยงโดยใช้เครื่องบ่มแบบเขย่า ที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่ 37 °C เป็นเวลา 2.5-4 ชม. หรือจนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะ Mid-log phase (OD 600 = 0.3-0.5)
3. ใช้เทคนิคปลอดเชื้อและปิเปตขนาด 10 ml ที่ปลอดเชื้อดูดเซลล์เพื่อวัดค่า OD600 โดยใช้ Spectrophotometer (Spectronic-20 หรือเทียบเท่า)
4. นำเชื้อที่มีค่า OD600 ที่เหมาะสมแล้วมาแช่เย็นในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วแบ่งเซลล์ที่ได้ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ปลอดเชื้อขนาด 50 ml จำนวน 2 หลอด ชั่งหลอดทั้งสองให้สมดุล แช่ในน้ำแข็งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนี้ต่อไปต้องทำให้เซลล์เย็นตลอดเวลา โดยห้ามทำให้เซลล์อุ่นหรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
5. นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ต้องมั่นใจว่า เครื่องปั่นเหวี่ยงเย็นแน่นอน
6. เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งในภาชนะที่เตรียมไว้ให้ เก็บเซลล์ในอ่างน้ำแข็ง ดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวออกให้หมดด้วย Pasteur pipette หรือ 1-ml micropipettor ละลายตะกอนเบาๆ ด้วย 1/10 เท่าปริมาตรของ 100 mM $CaCl_2$ ที่แช่เย็น โดยการดูดขึ้นลงเบาๆ
7. นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 2,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที
8. เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งในภาชนะที่เตรียมไว้ให้ เก็บเซลล์ในอ่างน้ำแข็ง ดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวออกให้หมดด้วย Pasteur pipette หรือ 1-ml micropipettor ละลายตะกอนเบาๆ ด้วย 1/100 เท่าปริมาตรของ100 mM $CaCl_2$ ที่แช่เย็น โดยการดูดขึ้นลงเบาๆ แช่น้ำแข็งไว้
9. แช่หลอดไมโครทิวป์ในน้ำแข็ง

10. ดูดเซลล์ที่ได้ 100 µl อย่างรวดเร็วไปใส่หลอดไมโครทิวป์ที่แช่เย็น เซลล์เหล่านี้สามารถใช้ได้ทันที หรือ เติม 30% glycerol ที่ปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 15% แล้วเก็บ Freeze ที่อุณหภูมิ –70°C เพื่อใช้ในครั้งต่อไป แต่ไม่เกิน 6 เดือน

B. การส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี Heat Shock

1. ให้แต่ละกลุ่มเขียนชื่อรวมทั้งรายละเอียดคร่าวๆ ด้านบนของหลอดที่บรรจุ Competent cells ดังต่อไปนี้

a. TE		10 µl
b. Supercoiled pUC18	10 ng	1 µl
c. A 1:1 ratio of pET-23 to egfp		5 µl
d. A 1:3 ratio of pET-23 to egfp		5 µl

2. ใช้ Micropipettor รุ่น P20 ดูดดีเอ็นเอใส่ในหลอดตามที่เขียนชื่อไว้ ใช้นิ้วมือเคาะเบาๆ หรือเขย่าเบาๆ ให้ ดีเอ็นเอและ Competent cells กระจายทั่วกัน และแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที (ถ้าใช้เซลล์ที่เก็บไว้ –70°C ให้รอจนกว่าเซลล์จะละลายบนน้ำแข็ง ก่อนที่จะมีการเติมดีเอ็นเอ) เก็บ Ligation mixture ที่เหลือไว้เพื่อการวิเคราะห์โดยการทำ Gel electrophoresis

Note: ligation mixture ที่เหลือยังสามารถเก็บที่ -20°Cและนำมาใช้ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอ ได้อีกครั้ง

3. ทำ Heat shock โดยการนำหลอดลงไปแช่ในอ่างน้ำที่ได้ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 42°C นาน 2 นาที เมื่อครบเวลาแล้วให้รีบเอาหลอดออกแล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที
4. ใช้ Micropipettor รุ่น P1000 ดูดอาหารเหลว ไม่ว่าจะเป็น 2 xYT หรือ LB ปริมาณ 900 µl ลงไปในหลอดในข้อ 2 กลับหลอดไปมาเบาๆเพื่อผสม และบ่มหลอดในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 1 ชม. (ขั้นตอนนี้สำคัญเพราะเป็นการปล่อยให้ยีนที่ต้านยาปฏิชีวนะมีการแสดงออก)
5. ปั่นเหวี่ยงหลอดสั้นๆ 5 วินาทีเพื่อทำให้เซลล์แบคทีเรียตกตะกอน ดูดเอาของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมอาหารเหลว LB ลงไปใหม่จำนวน 100 µl
6. ใช้ Micropipettor รุ่น P200 ดูดเซลล์ 10 µl จากข้อ 5 หยดบนจานอาหารสำหรับการคัดเลือก LB/Amp และเขี่ยเชื้อให้เซลล์กระจายทั่วผิวหน้าของจานอาหาร โดยใช้ Glass hockey stick และให้

ดูดเซลล์จำนวน 90 µl จากหลอดเดิมลงบนจานอาหารอันใหม่และเขี่ยเชื้อให้เซลล์กระจายทั่วผิวหน้าของจานอาหาร บ่มจานเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 16-24 ชม.

7. นับจำนวนโคโลนีของ Transformants ที่เจริญบนอาหารคัดเลือก และหาค่า cfu
8. บันทึกผลการทดลองในตารางของรายงานผลการทดลองท้ายบท (ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนโดยทั่วไปสำหรับ Supercoiled pUC เท่ากับ 1-4 X 10^6 cfu/µg)
9. เก็บจานอาหารที่มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ 4°C เพื่อใช้ต่อในบทปฏิบัติการต่อไป

C. การทำ Replica plates

1. นำจานอาหาร LB/Amp จำนวนสองจาน หนึ่งจานสำหรับทำ Mini-preps อีกจานสำหรับทำ PCR วางจานอาหารทั้งสองบนรูปภาพที่ 27
2. นำจานอาหารที่มีโคโลนีของพลาสมิด pET-23 และจานอาหารที่มีโคโลนีของพลาสมิด pAD1 เพื่อเอาใช้เป็น Negative control และ Positive control ตามลำดับ จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อเอาโคโลนีเดี่ยวจากจานที่มีโคโลนีของพลาสมิด pET-23 แล้วลากให้ปลายของไม้จิ้มฟันแตะบนอาหารจานแรกโดยทำให้เป็นเครื่องหมายลบ "—" สำหรับ Negative control แล้วใช้ไม้จิ้มฟันอันเดิมไปแตะบนจานอาหารที่สองที่ตำแหน่งเดียวกัน ใช้ไม้จิ้มฟันอันใหม่ปลอดเชื้อทำในลักษณะเช่นเดียวกันแต่กับโคโลนีที่ได้จากพลาสมิด pAD1 โดยลากให้เป็นเครื่องหมายบวก "+" สำหรับ Positive control
3. ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้ออันใหม่สำหรับแต่ละโคโลนีของ Transformants ที่ได้จากการทำ Transformation (8B ข้อ 9)
4. แต่ละกลุ่มควรทำอย่างน้อย 20 โคโลนีหรือมากที่สุดเท่าที่ได้หากได้โคโลนีน้อยกว่า
5. นำจานอาหารไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชม. แล้วเก็บจานอาหารที่ได้จากการบ่มไว้ที่ 4°C โดยใช้แผ่นพาราฟินหุ้มรอบจานจนกว่าจะใช้ในบทปฏิบัติการต่อไป

รูปที่ 8.2 กริดสำหรับการทำ Replica plating

บันทึกผลการทดลอง

1. นับจำนวนโคโลนีของ Transformants ที่ได้จากจานเลี้ยงเชื้อต่างๆ
2. คำนวณหาค่า Transformation Efficiency ของ Competent cells ตามสมการข้างล่างนี้

$$\text{Transformation Efficiency} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่เจริญบน LB/Amp}}{\text{ปริมาณของพลาสมิดดีเอ็นเอ } (\mu g)}$$

Treatments	#colony	Transformation Efficiency
TE, 10 µl		
pUC18, 10 ng supercoil		
A 1:1 ratio of pET-23 to egfp		
A 1:3 ratio of pET-23 to egfp		

สรุปและวิจารณ์

....

....

....

....

....

คำถามท้ายบท

1. เหตุใดต้องมีการใช้ TE ในการทำ Transformation
2. เมื่อนำเอา Transformation mixture มาเกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดและทำไมจึงต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้น

บรรณานุกรม

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L. 1972. **Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA**. Proc. Natl. Acad. Sci., USA *69: 2110.*

Potrykus, I and Spangenberg, G. 1995. **Gene Transfer to Plants.** Spinger-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Robertson, D., Shore, S. and Miller, D. 1997. **Manipulation and Expression of Recombinant DNA.** Academic Press San Diego, California. USA.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 2 nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York. USA.

ภาคผนวก

2xYT (100 ml)

Tryptone	1.6 g
Yeast extract	0.1 g
NaCl	0.5 g
Deionized water	

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย NaOH เติม Deionized water ให้ได้ 100 ml ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่ 4°C

TE buffer

Tris (pH 8.0)	100 mM
EDTA	0.1 mM

Competent Cell Preparation using TSS and Transformation

TSS (Transformation and Storage Solution for chemical transformation)

85 % LB medium
10 % PEG (wt/vol, MW 6000-8000)
5 % DMSO (vol/vol)
50 mM $MgCl_2$ หรือ 0.1 g ($MgCl_2$.H20)

ปรับ pH ให้ได้ 6.5 แล้วเติมน้ำให้ครบ 10 ml ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อหรือการกรอง เก็บสารละลายที่ 4°C ไม่เกิน 2 สัปดาห์

วิธีการเตรียม competent cells

1. เพาะเลี้ยง *E. coli* JM109 หรือ DH5 จากโคโลนีเดี่ยวบนจาน LB agar นำไปเลี้ยงใน LB broth 5 ml โดยใช้เครื่องบ่มแบบเขย่า ความเร็วรอบ 120 rpm ที่ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชม.
2. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 1 มา 0.4 ml (1:250 dilution) เติมลงในขวด Erlenmeyer flask ที่มี LB bloth อยู่ 100 ml นำไปเพาะเลี้ยงโดยใช้เครื่องบ่มแบบเขย่า ความเร็วรอบ 120 rpm ที่ 37 °C เป็นเวลา 2.5-4 ชม. หรือจนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะ Mid-log phase (OD 600 = 0.3-0.5)

3. ใช้เทคนิคปลอดเชื้อและปิเปตขนาด 10 ml ที่ปลอดเชื้อดูดเซลล์เพื่อวัดค่า OD600 โดยใช้ Spectrophotometer (spectronic-20 หรือเทียบเท่า)
4. นำเชื้อที่มีค่า OD600 ที่เหมาะสมแล้วมาแช่เย็นในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วแบ่งเซลล์ที่ได้ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ปลอดเชื้อขนาด 50 ml จำนวน 2 หลอด ชั่งหลอดทั้งสองให้สมดุล แช่ในน้ำแข็งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนี้ต่อไปต้องทำให้เซลล์เย็นตลอดเวลา ห้ามทำให้เซลล์อุ่นหรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
5. นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ต้องมั่นใจว่า เครื่องปั่นเหวี่ยงเย็นแน่นอน
6. เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง และละลายเซลล์ในสารละลาย TSS ที่เย็น จำนวน 1 ml เซลล์ที่ได้นี้ คือ Competent cells ที่พร้อมสำหรับการ Transformation
7. ดูด 100 µl ของ competent cells ไปใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 ml ที่ผ่านการแช่เย็นบนน้ำแข็งถ้ายังไม่ใช้เซลล์ตอนนี้สามรถเก็บเซลล์ไว้ที่ 4 °C ได้ไม่เกิน 6 ชม. โดยไม่สูญเสียความสามารถในการ Transformation หรือเก็บที่ -70 °C ใช้ได้นาน 6 เดือน

(Competent cells ควรมีประสิทธิภาพ อย่างน้อยให้ $1x10^{6}$ transformants per /g of plasmid DNA)

Transforming the cells

1. เติมดีเอ็นเอ (น้อยกว่า 20 µl) ลงไปในหลอดที่บรรจุ 100 µl competent cells รอให้ละลายถ้านำมาจากช่องแช่แข็ง
2. บ่มหลอดบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว
3. นำหลอดไปทำการ Heat shock ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 2 นาที วางหลอดบนน้ำแข็งทันทีและแช่นาน 2 นาที
4. เติม 0.9 ml LB broth
5. นำหลอดไปบ่มที่เครื่องบ่มเขย่าอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที
6. ดูดสารละลายเซลล์ 100 µl ลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารปฏิชีวนะที่เหมาะสม และเกลี่ยให้เซลล์กระจาย
7. บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชม.

บทปฏิบัติการที่ 9 การเลือกเฟ้นเซลล์เจ้าบ้านที่มียีนที่ต้องการ (Selection and screening for desired transformants)

จุดประสงค์

1. เพื่อเรียนรู้เทคนิคการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากแบคทีเรียปริมาณน้อยและรวดเร็ว
2. สามารถตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอสายผสมที่มีภายในเซลล์เจ้าบ้านโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

บทนำ

การตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอสายผสมที่มีภายในเซลล์เจ้าบ้านสามารถทำได้หลายวิธีทั้งนี้ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของเวกเตอร์ ขนาดของเวกเตอร์และขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมาย หากใช้ pUC18 เป็นเวกเตอร์ในการโคลนยีน สามารถใช้การตรวจสอบยีนแบบ Blue/white screening โดยพบว่าโคลนที่มี ดีเอ็นเอเป้าหมายจะให้โคโลนีสีขาวเมื่อนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากการทำ Transformation มาเลี้ยงบนอาหารที่บรรจุสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินและ IPTG/X-gal และให้โคโลนีสีฟ้ากับโคลนที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถใช้การตรวจสอบนี้กับเวกเตอร์ pET-23 ที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งต้องใช้วิธีการอย่างอื่น นอกจากนี้ยังสามารถทำการตรวจสอบแบบรวดเร็วถ้าพลาสมิดที่นำมาใช้มีขนาดเล็กแต่นำมาเชื่อมกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีขนาดใหญ่ ทำให้พลาสมิดที่ได้ใหม่มีขนาดใหญ่กว่าเดิม เมื่อนำมาแยกโดย Gel electrophoresis ทำให้เห็นความแตกต่างของขนาดระหว่างพลาสมิดที่มีและไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งวิธีนี้ทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอออกจากแบคทีเรียแบบหยาบๆ (Laenmli mini-preps) ดีเอ็นเอที่ได้จะมีความบริสุทธิ์น้อยมาก แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้นี้มาแยกโดย Gel electrophoresis ในสภาวะที่ไม่มี EtBr เพราะต้องการความแม่นยำในเรื่องของขนาด นำเจลมาย้อมด้วย EtBr ทีหลังแล้วตรวจสอบบน UV transiluminator พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายจะมีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดที่ไม่มี นั่นก็คือวิ่งได้ช้ากว่า วิธีนี้สามารถนำมาตรวจสอบโคโลนีจำนวนมากในเวลารวดเร็ว แล้วจึงคัดเลือกโคลนที่คาดว่ามีดีเอ็นเอเป้าหมายมาตรวจสอบอีกครั้งโดยวิธีอื่นๆ เช่น แยกพลาสมิดให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นแล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

วิธีที่ให้ผลโดยมีประสิทธิภาพสูงและสามารถตรวจสอบโคโลนีจำนวนมากก็คือการทำ Colony hybridization หลักการทำคือ นำโคโลนีที่ได้จากการทำ Transfomation มาเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วย้ายโคโลนีเหล่านี้มาวางบนแผ่นเมมเบรน เช่น ไนลอนเมมเบรน (Nylon membrane) ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกแล้วทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพด้วยด่าง โดยดีเอ็นเอสายคู่จะกลายเป็นสายเดี่ยวแล้วเกาะกับแผ่นเมมเบรนได้ ตรึงดีเอ็นเอให้อยู่บนแผ่นเมมเบรนโดยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 80°C ภายใต้สูญญากาศนาน 2 ชม.หรือวางใน UV crosslinker เป็นเวลา 20 วินาที แล้วนำมา Hybridize กับ Probe

โดยใช้ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับส่วนหนึ่งส่วนใดของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ ซึ่ง Probe ที่ว่านี้ได้ทำการติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีหรือสารปลอดรังสี แล้วนำไปตรวจสอบหาตำแหน่งที่มีการจับตัวระหว่าง Probe กับดีเอ็นเอที่ต้องการ ถ้าติดฉลาก probe ด้วยสารกัมมันตภาพรังสีก็นำไปทำ Autoradiograph จะเกิดเป็นจุดสีดำตรงจุดที่มีการจับคู่หรือเกิด Hybridization นำฟิล์มกลับไปเทียบตำแหน่งกับจานเลี้ยงเชื้อเดิมและแยกโคโลนีที่อยู่บริเวณนั้นออกมา ถ้า Probe ที่ใช้ติดฉลากด้วยสารปลอดกัมมันตภาพรังสีหรือสารเคมีก็ตรวจสอบด้วยการทำให้เกิดสี (Colormetric) หรือทำปฏิกิริยาให้เกิดการเปล่งแสง (Chemiluminescent) แล้วตรวจสอบแสงที่เปล่งออกมาด้วยฟิล์มที่มีความไวต่อแสงดังกล่าว จะเกิดจุดสีดำบนแผ่นฟิล์มแบบเดียวกับการทำ Autoradiograph การทำ Colony hybridization ไม่จำเป็นที่โคลนดังกล่าวต้องมีการแสดงออก (รูปที่ 9.1) วิธีนี้จึงมีประสิทธิภาพสูง จากนั้นแยกโคโลนีที่ได้ผลบวกมาทำการวิเคราะห์ต่อ เช่น Restriction enzyme digestion หรือ PCR

ในการทำ Restriction enzyme digestion นั้นต้องการพลาสมิดดีเอ็นเอ ดังนั้นการแยกพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากเซลล์แบคทีเรียมีความสำคัญมากในงานด้านพันธุวิศวกรรมและการศึกษาด้านต่างๆในชีววิทยาระดับโมเลกุล การแยกพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากเซลล์แบคทีเรียปริมาณมาก (Large-scale plasmid purification) จากบทปฏิบัติการที่ 4 ได้ปริมาณดีเอ็นเอมากแต่ใช้เวลานานและจำเป็นต้องนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ต่อ เช่น โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายซีเซียมคลอไรด์ หรือใช้ Affinity column เพื่อให้ได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง อย่างไรก็ตามงานด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลบางอย่างไม่จำเป็นที่ต้องใช้พลาสมิดที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น การเลือกเฟ้นโคโลนีจำนวนมากเพื่อหาโคโลนีที่มียีนที่ต้องการ ซึ่งกรณีต้องการความรวดเร็วในการแยกพลาสมิดปริมาณน้อย ความบริสุทธิ์ไม่มาก ดีกว่าที่จะเสียเวลากับการเตรียมพลาสมิดที่มีความบริสุทธิ์สูง การแยกพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณน้อย (Rapid small-scale plasmid isolation) จึงได้รับการพัฒนาและใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากใช้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียปริมาณน้อยและต้องการพลาสมิดปริมาณน้อย จึงเรียกกระบวนการนี้ว่า mini-preps ซึ่งปกติจะได้พลาสมิดดีเอ็นเอระหว่าง 1-5 μg

วิธีที่นิยมมีสองวิธี คือ Alkaline lysis (Birnboim and Doly, 1979) และ Rapid boiling (Holmes and Quigley, 1981) ทั้งสองวิธีมีหลักการพื้นฐานคล้ายกันคือ ทำให้เศษเซลล์และโปรตีนตกตะกอน และแยกพลาสมิดดีเอ็นเอโดยอาศัยความแตกต่างทางด้านกายภาพในการแยก พลาสมิดออกจากโครโมโซมดีเอ็นเอ วิธีทั้งสองนี้ใช้เวลา 1-2 ชม. พลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีเหล่านี้มีความสะอาดมากพอสำหรับนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ การทำ Transformation และการ Sequencing

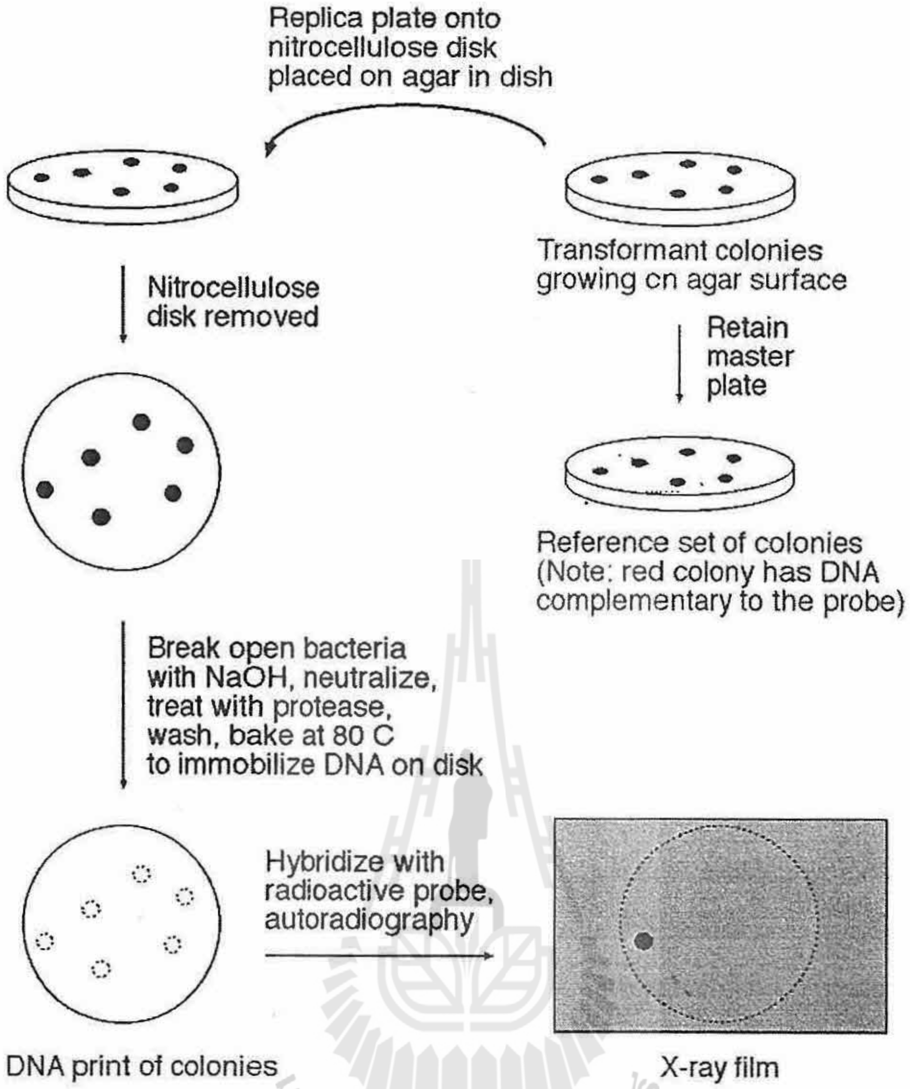
หลักการคือ นำเซลล์แบคทีเรียมาตกตะกอนในหลอดไมโครทิวป์ด้วยการปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำตะกอนของแบคทีเรียมาละลายในบัฟเฟอร์ สำหรับวิธี Alkaline lysis (คล้ายกับวิธีในบทปฏิบัติการที่ 3) นำเซลล์มาทำให้แตกด้วยสารละลายที่มี SDS และ NaOH เป็นส่วนผสม ทั้ง SDS และ NaOH จะทำให้ส่วนประกอบต่างๆ ในเซลล์เสียสภาพและในสภาวะที่มี pH สูงจะมีผลให้อาร์เอ็นเอถูกทำลายด้วย นอกจากนี้ยังทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพโดยทำให้โมเลกุลแยกเป็นสายเดี่ยวเพราะพันธะไฮโดรเจนถูก

ทำลาย เนื่องจากโครโมโซมดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่จึงง่ายต่อการแตกเป็นชิ้นๆ ขณะที่พลาสมิดดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดเล็กกว่ามากยังคงสภาพเหมือนเดิม และเมื่อทำให้สารละลายนี้มีสภาพเป็นกลางด้วย potassium acetate การสร้างพันธะไฮโดรเจนจะกลับคืน พลาสมิดดีเอ็นเอมีโอกาสกลับสู่สภาพเดิมได้เร็วกว่าในขณะที่โครโมโซมดีเอ็นเอจะตกตะกอนรวมกับ SDS และโปรตีน และสามารถแยกตะกอนนี้ออกโดยการปั่นเหวี่ยง ส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอยังคงละลายในสารละลาย จากนั้นนำสารละลายมาตกตะกอนอีกครั้งกับเอธานอลแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE

ส่วนวิธี Rapid boiling คล้ายกับวิธี Alkaline lysis โดยมีการแยกโปรตีนและโครโมโซมดีเอ็นเอออกจากพลาสมิดเช่นกัน แต่เซลล์ถูกทำให้แตกโดยการใช้ Lysozyme ความร้อนและ Non-ionic detergent (เช่น Triton X-100) การนำเซลล์แบคทีเรียมาทำให้เดือดในช่วงเวลาสั้นๆ ความร้อนจะทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ เกิดการรวมกลุ่มของโปรตีน แต่พลาสมิดซึ่งมีขนาดเล็กไม่ถูกกระทบมาก และเมื่อทำให้สารละลายเย็นลง พลาสมิดจะกลับสู่สภาพเดิม ส่วนโครโมโซมดีเอ็นเอกับโปรตีนจับกลุ่มร่วมกัน และนำมาแยกออกโดยการปั่นเหวี่ยง ส่วนพลาสมิดอยู่ในสารละลายและนำมาตกตะกอนกับเอธานอลและละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE

พลาสมิดที่ได้จากวิธี mini-preps จะมีอาร์เอ็นเอค่อนข้างมาก ซึ่งอาร์เอ็นเอไม่มีผลต่อการ Transformation แต่อาจบดบังชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 2 kb ที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอโดย Gel electrophoresis ดังนั้นควรกำจัดอาร์เอ็นเอออกจากพลาสมิดโดยใช้เอนไซม์ RNase

เนื่องจากความจำกัดเรื่องเวลาและงบประมาณ ในบทปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะได้ทำการแยกพลาสมิดดีเอ็นเอแบบ Leamni mini-preps, แบบ Alkaline lysis mini-preps และการตรวจสอบหาเซลล์เจ้าบ้านที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่ต้องการ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ


Replica plate onto nitrocellulose disk placed on agar in dish
Transformant colonies growing on agar surface
Nitrocellulose disk removed
Retain master plate
Reference set of colonies (Note: red colony has DNA complementary to the probe)
Break open bacteria with NaOH, neutralize, treat with protease, wash, bake at 80 C to immobilize DNA on disk
Hybridize with radioactive probe, autoradiography
DNA print of colonies
X-ray film

รูปที่ 9.1 Colony hybridization (http://oregonstate.edu/instruction/bb492/figletters/FigF9.html)

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

Cracking buffer

Solution I

Solution II

Solution III

Agarose gel

*Eco*RI and buffer (option: flanking enzymes)

*Not*I and buffer

10 x loading dye

DNA marker

Isopropanol

RNAse

TE buffer

การทดลอง

A. การตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอสายผสมที่มีภายในเซลล์เจ้าบ้านอย่างรวดเร็วแบบ Laenmli miniprep (Nature 227:680, 1970)

1. ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยโคโลนีของ Transformant ลงในหลอดเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ LB จำนวน 3 ml และผสมสารปฏิชีวนะ Ampicillin บ่มเชื้อในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 12-18 ชม. ให้เลือกมา กลุ่มละ 20 โคโลนี และให้มีโคโลนีของ pAD1 (Positive control) และโคโลนีของ pET-23 (Negative control) ด้วย
2. รินเชื้อจำนวน 1.0 ml ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml ที่ทำการติดฉลากไว้ ทำให้หลอดสมดุลกับอีกหลอดซึ่งต้องมีน้ำหนักที่เท่ากันก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง ให้ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. ริน Supernate ทิ้งในภาชนะสำหรับทิ้งของเสียที่ติดฉลากว่า "LB waste" เติมคลอรอกซ์ เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียทีหลัง ดูดของเหลวที่เหลือออกให้หมด
4. เติมสารละลาย Cracking buffer จำนวน 25 μl ลงไปบนตะกอน ปิดฝาทำให้เซลล์แตกโดยการใช้เครื่องผสมสาร (ทำใน Larminar flow hood) และสวมหน้ากากกันสารพิษ (Mask)

Note: β-mercapthoethanol มีกลิ่นรุนแรง ให้เตรียมสารใน Fume hood และสวม Mask

5. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องใน Larminar flow hood เป็นเวลา 20 นาที
6. ขณะที่รอให้เตรียมเจลความเข้มข้น 0.7% โดยไม่เติม EtBr ลงในเจล
7. ปั่นสารละลายเซลล์จากข้อ 5 ที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
8. ดูดสารละลายจากชั้นบนจำนวน 10 μl และนำไปแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสโดยไม่เติม EtBr.ในเจลและบัฟเฟอร์
9. ทำการย้อมเจลที่ได้ในบัฟเฟอร์ที่มี EtBr ความเข้มข้น 1.0 μg/ml เป็นเวลา 10 นาที
10. บันทึกผลโดยการถ่ายภาพและเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคโลนีของ Transformants กับขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอ pAD1 และ pET-23 พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายควรเคลื่อนที่ในเจลช้ากว่าพลาสมิดที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย

B. วิธีการทดลอง Alkaline Lysis miniprep

1. จากผลการทดลอง 10A ให้แต่ละกลุ่มเลือก Positive transformants มา 5 โคโลนีต่อกลุ่ม
2. รินเชื้อ 1.5 ml ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml ที่ทำการติดฉลากไว้ ทำให้หลอดสมดุลกับอีกหลอดซึ่งต้องมีน้ำหนักที่เท่ากันก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง ให้ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง *ขณะที่รอ ให้เอาสารละลาย Solution III แช่ในน้ำแข็งทิ้งไว้*
3. ริน Supernate ทิ้งในภาชนะสำหรับทิ้งของเสียที่ติดฉลากว่า “LB waste” เติมคลอรอกซ์เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียทีหลัง ดูดของเหลวที่เหลือออกให้หมด
4. เติมสารละลาย I จำนวน 200 μl ลงไปบนตะกอน และปิดฝา
5. เติมสารละลาย II จำนวน 200 μl ปิดฝา พลิกหลอดกลับไปกลับมา 5 ครั้งเพื่อให้สารละลายเข้ากันและเก็บบนน้ำแข็ง 5 นาทีแต่ไม่เกิน10 นาที
6. เติมสารละลาย III ที่เย็น จำนวน 200 μl ปิดฝา พลิกหลอดกลับไปกลับมา 5 ครั้งเพื่อให้สารละลายเข้ากันและเก็บบนน้ำแข็ง 15 นาที
7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °C
8. ดูดสารละลายใสเอาแต่ส่วนบนลงไปในหลอดใหม่ ส่วนตะกอนสีขาวให้ทิ้งไป
9. วัดปริมาณคร่าวๆ และเติม 0.7 เท่าด้วย Isopropanol (หรือ 2.5 เท่าปริมาตรของ 95% Ethanol) เพื่อทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอน ผสมโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมา เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ –20 °C อย่างน้อย 30 นาทีหรือข้ามคืน
10. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C
11. ทิ้ง Supernate ลงอ่าง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 100 ml ของ 70% ethanol แต่ไม่ต้องทำให้ตะกอนดีเอ็นเอละลาย ดูดเอาเอธานอลออก ทำให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที ละลายตะกอนด้วย TE จำนวน 20 μl เติม RNase (20 mg/ml stock) ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 μg/ml เพื่อกำจัด RNA
12. ทำการทดลอง 10C ต่อ หรือเก็บไว้ที่ –20°C

C. การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

1. เตรียมปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบว่าโคลนใดที่ได้จากการทำ Transformation มีดีเอ็นเอสายผสม โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จาก 10**B** มาทำการวิเคราะห์ต่อ เนื่องจากได้ใช้ ตำแหน่งของ *Not*I ในการโคลนชิ้นส่วนของ egfp ลงในเวกเตอร์ pET-23 ดังนั้นจะใช้เอนไซม์นี้ในการปลดปล่อยดีเอ็นเอเป้าหมาย ให้เตรียมปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับ 6 ปฏิกิริยา คือสำหรับ 5 Transformants และ 1 Positive control (pAD1)

การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับ miniprep DNA เป็นการสิ้นเปลืองมาก จึงควรมีการคำนึงถึงราคาของเอนไซม์และทำอย่างไรจะใช้อย่างประหยัดที่สุด (EcoRI ถูกกว่า XmaI ถึง 80 เท่า) ซึ่งทำได้โดยการทำ master mixes

การเตรียม Master mix

1. กำหนดปริมาณของสารเคมีที่จะใช้ (เอนไซม์ บัฟเฟอร์ น้ำ) สำหรับการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์สำหรับหนึ่งปฏิกิริยา ดังตารางที่ 6 แล้วคูณปริมาตรนี้ด้วยจำนวนของหลอดที่ต้องการและเพิ่มอีกหนึ่งเพื่อความถูกต้องในการดูดสาร รวมน้ำ บัฟเฟอร์ และเติมเอนไซม์เป็นตัวสุดท้ายในหนึ่งหลอด Master mix ผสมสารละลายในหลอดและเก็บบนน้ำแข็ง
2. ดูดสารละลายจาก Master mix มา 15 μl ลงในหลอดใหม่ ติดฉลากหลอดและเติม miniprep DNA (ที่ได้จาก 10B ข้อ 12) จำนวน 5 μl

ตารางที่ 9.1 ตัวอย่างการคำนวณสำหรับ Master mix

	Master mix for:		
Component	1 tube	13 tubes	7 tubes
Enzyme	0.5 μl	6.5 μl	
Buffer B	2 μl	26 μl	
DNA	5 μl*		
Deionized water	12.5 μl	162.5 μl	
Total Volume	20 μl	195 μl	

Miniprep DNA 5 μl มีดีเอ็นเอประมาณ 200-600 ng ดังนั้น 1 U ของเอนไซม์โดยทั่วไปจึงเพียงพอสำหรับ miniprep DNA ในหนึ่งปฏิกิริยา ให้บ่มหลอดอย่างน้อยเป็นเวลา 1 ช.ม. ที่อุณหภูมิ 37°C

3. ให้ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Eco*RI/*Not*I

Plasmid DNA	5 μl
Sterile deionized water	__ μl
10x buffer	2 μl
*Eco*RI	__ μl
Not I	__ μl
Total volume	20 μl

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชม.

4. ละลายอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8% และเทลงบนถาด ใช้หวีขนาด 8-well comb ทิ้งให้เจลแข็งตัว
5. เติม 10x loading dye ลงในหลอดที่ได้รับการตัดด้วยเอนไซม์ ผสมและนำไปแยกโดย Gel electrophoresis
6. ถ่ายภาพเจลและวิเคราะห์ผลว่าโคลนใดที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย และถ้ามี มีดีเอ็นเอเป้าหมายกี่ชิ้น

รูปที่ 9.2 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pAD1, pET23-egfp ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Lane 1 = 1-kb DNA ladder

Lane 2 = pAD1 cut with *Not*I+ *Eco*RI

Lane 3-7 = pET-23+egfp cut with *Not*I+ *Eco*RI

ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์

……

……

……

……………………………………………………………………

บรรณานุกรม

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**.พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. **A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA**. Nucleic Acids Res. 7:1513.

Holmes, D.S. and Quigley, M. 1981. **A Rapid Boiling Method for the Preparation of Bacterial Plasmids.** Anal. Biochem. 114:193.

Laemmli, U. K. 1970. **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** Nature. 227: 680.

Robertson, D., Shore, S. and Miller, D. 1997. **Manipulation and Expression of Recombinant DNA.** Academic Press San Diego, California. USA.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 2 nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York. USA.

Winfrey, M.R., Rott, M.A., and Wortman, A.T. 1997. **Unraveling DNA: Molecular Biology for the Laboratory.** Prenticc-Hall, Inc., New Jersey. USA.

http://oregonstate.edu/instruction/bb492/figletters/FigF9.html

ภาคผนวก

Laenmli mini cracking buffer	**10 ml**
0.0625 M Tris pH 6.8	0.62 ml of 1 M
2% SDS	1 ml (20%)
10% glycerol	1 ml (20%)
5% bata-mecaptonal EtOH	0.5 ml
0.1% Bromophenol blue	10 mg

เตรียมใน Fume hood สวมถุงมือและหน้ากากกันสารพิษ

บทปฏิบัติการที่ 10 การตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสมโดยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

จุดประสงค์

1. เพื่อเรียนรู้ขั้นตอนการทำ PCR
2. เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสมว่ามีทิศทางถูกต้องตาม ORF โดยเทคนิค PCR

บทนำ

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และสามารถนำมาใช้เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความรวดเร็วในการตรวจสอบว่า Transformant ที่ได้มีดีเอ็นเอเป้าหมายที่เราสนใจ หลักในการทำ PCR คือ ต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจก่อน อาจไม่จำเป็นต้องทราบทั้งหมด แล้วทำการสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้นๆ สองชนิด เรียกว่า ไพรเมอร์ (Primer) ซึ่งมีเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มปริมาณ โดยทั่วไปไพรเมอร์มีความยาวประมาณ 18-35 เบส แล้วนำไพรเมอร์ที่ได้ใส่รวมกับดีเอ็นเอซึ่งอาจเป็นพลาสมิดดีเอ็นเอ ชิ้นส่วนของยีน หรือโคโลนีของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดและนิวคลีโอไทด์ผสมเข้าด้วยกัน

ขั้นตอนในการทำ PCR มีสามขั้นตอน คือ Denaturing, Annealing และ Extending

Denaturing เป็นการใช้อุณหภูมิสูงในการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว จากนั้นทำให้อุณหภูมิลดลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งมีเบสคู่สมกับส่วนปลายของยีนที่ต้องการเข้ามาจับคู่ได้อย่างถูกต้อง เรียกขั้นตอนนี้ว่า Annealing จากนั้นทำการเปลี่ยนอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase ซึ่งจะนำนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบมาต่อให้ได้สายยาว เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เรียกขั้นตอนนี้ว่า Extending การเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR นี้พบว่าถ้าเริ่มจากยีน 1 โมเลกุล เมื่อผ่านรอบที่ 1 แล้วจะมี 2 โมเลกุล และปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จะ = 2^n เมื่อ n คือจำนวนรอบที่ทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปจะใช้ 30-40 รอบในปฏิกิริยาหนึ่งๆ นั่นก็คือจะมีโมเลกุลของดีเอ็นเอเป็นล้านๆ โมเลกุล ซึ่งในแต่ละรอบของ PCR ก็จะผ่านกระบวนการสามขั้นตอนนั่นเอง (รูปที่ 11.1)

ข้อจำกัดในการใช้เทคนิค PCR คือว่าลำดับเบสของยีนที่ต้องการนำมาเพิ่มจำนวนต้องรู้และถูกต้อง และสามารถที่จะเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่มีความยาวถึง 5 kb ได้ไม่ยากนักแต่ชิ้นดีเอ็นเอที่ยาวอย่างเช่น มีขนาด 40 kb อาจต้องทำการดัดแปลงปฏิกิริยาให้เอื้ออำนวย อย่างไรก็ตามชิ้นดีเอ็นเอที่มีความยาวมากกว่า 100 kb นั้นไม่สามารถใช้เทคนิคนี้ นอกจากนี้เอนไซม์ที่ใช้ในการทำ PCR ต้องทนต่อ

อุณหภูมิสูงและสามารถทำงานได้ในอุณหภูมิสูง ซึ่งเอนไซม์ DNA polymerase ที่แยกได้แบคทีเรียธรรมดาไม่สามารถทำได้ ต้องได้จากเอนไซม์จากแบคทีเรียที่เติบโตในน้ำพุร้อน Thermostable DNA polymerase of *T. aquaticus* อย่างไรก็ตาม เทคนิค PCRได้ถูกนำมาใช้มากมายในการวินิจฉัยความผิดปกติของยีน โดยเฉพาะยีนที่ก่อให้เกิดโรคร้ายแรงต่อมนุษย์ และเทคนิคนี้ใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อยมาก จึงนำมาใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยในทางการแพทย์ เช่น การตรวจสอบการเป็นพ่อแม่ ศึกษายีนมิวเทชัน

ในการทดลองนี้ไพรเมอร์ที่ใช้ถูกออกแบบให้มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอของพลาสมิด pET-23 ว่ามีดีเอ็นเอเป้าหมายหรือไม่

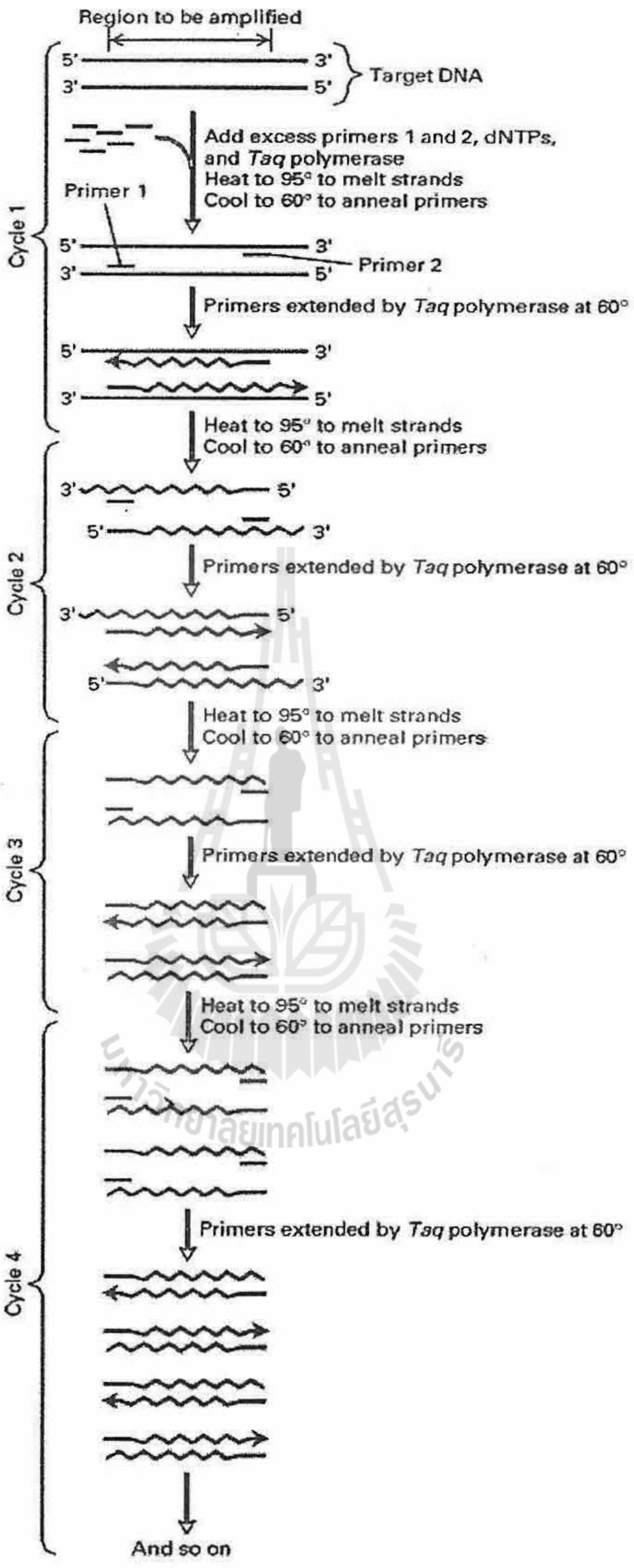
T7 terminal Primer 1 = 5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

T7 Xpress fwd Primer 2 = 5'-ACCATGCATGCTAGCCATA-3'

ไพรเมอร์ครอบคลุมทั้งดีเอ็นเอเป้าหมาย และเวกเตอร์ ให้คำนวณ Annealing temperature ของไพรเมอร์ โดยใช้สมการ Melting temperature (Tm, C) = 2(A+T) + 4 (G+C) นี้

Primer 1 =……………..

Primer 2 =……………


Region to be amplified
5'
3'
3'
5'
Target DNA
Add excess primers 1 and 2, dNTPs, and *Taq* polymerase
Heat to 95° to melt strands
Cool to 60° to anneal primers
Primer 1
Primer 2
Cycle 1
Primers extended by *Taq* polymerase at 60°
Heat to 95° to melt strands
Cool to 60° to anneal primers
Cycle 2
Primers extended by *Taq* polymerase at 60°
Heat to 95° to melt strands
Cool to 60° to anneal primers
Cycle 3
Primers extended by *Taq* polymerase at 60°
Heat to 95° to melt strands
Cool to 60° to anneal primers
Cycle 4
Primers extended by *Taq* polymerase at 60°
And so on

รูปที่ 10.1 Polymerase Chain Reaction (Lodish et al., 2000)

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

10 x loading dye

DNA marker

Primer

Tag DNA polymerase

10x PCR buffer

dNTPs

25 mM MgCl2

Colonies of recombinant DNA

Agarose gel 1.2%

การทดลอง

A. การเตรียม master mix

Stock	**Final concentration**
10x PCR buffer	1x
$MgCl_2$, 25 mM	1.75 mM
dATP, dCTP, dTTP, dGTP (100 mM each)	0.2 mM each
Primer 1 (17.5 ng/µl)	1.75 ng/µl
Primer 2 (17.5 ng/µl)	1.75 ng/µl
Tag DNA polymerase (10 U/µl)	0.075 U/µl

แต่ละกลุ่มจะได้รับ Master mix กลุ่มละหลอด

B. ขั้นตอนการทำ PCR

1. ให้ดูดสารละลาย Master mix จำนวน 25 µl ใส่ลงในหลอดขนาด 0.6-ml จำนวน 7 หลอด

2. ใช้ทิปสีเหลืองปลอดเชื้อ เขี่ยเชื้อมา 1 โคโลนีต่อหนึ่งหลอด (โคโลนีที่คาดว่าจะมีดีเอ็นเอเป้าหมาย) รวมทั้งโคโลนีของ pAD1 (Positive control) หมายเหตุ หาก PCR thermocycler ไม่มี heatpad เติม Mineral oil จำนวน 50-100 μl)

3. ทำการตั้งปฏิกิริยาดังนี้

Step 1: 95°C, 3 min

Step 2: 95 °C, 1 min

Step 3: 42 °C, 1 min 30 รอบ

Step 4: 72 °C, 1 min

Step 5: 72° C, 5 min to extend all unfinished products

ตรวจสอบผลโดยการทำ Gel electrophoresis ความเข้มข้นของเจล 1.2% ว่าโคลนใดที่มี egfp เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย และเปรียบเทียบผลที่ได้จากการทำ PCR กับการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากบทปฏิบัติการที่ 9

ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์

....

....

....

บรรณานุกรม

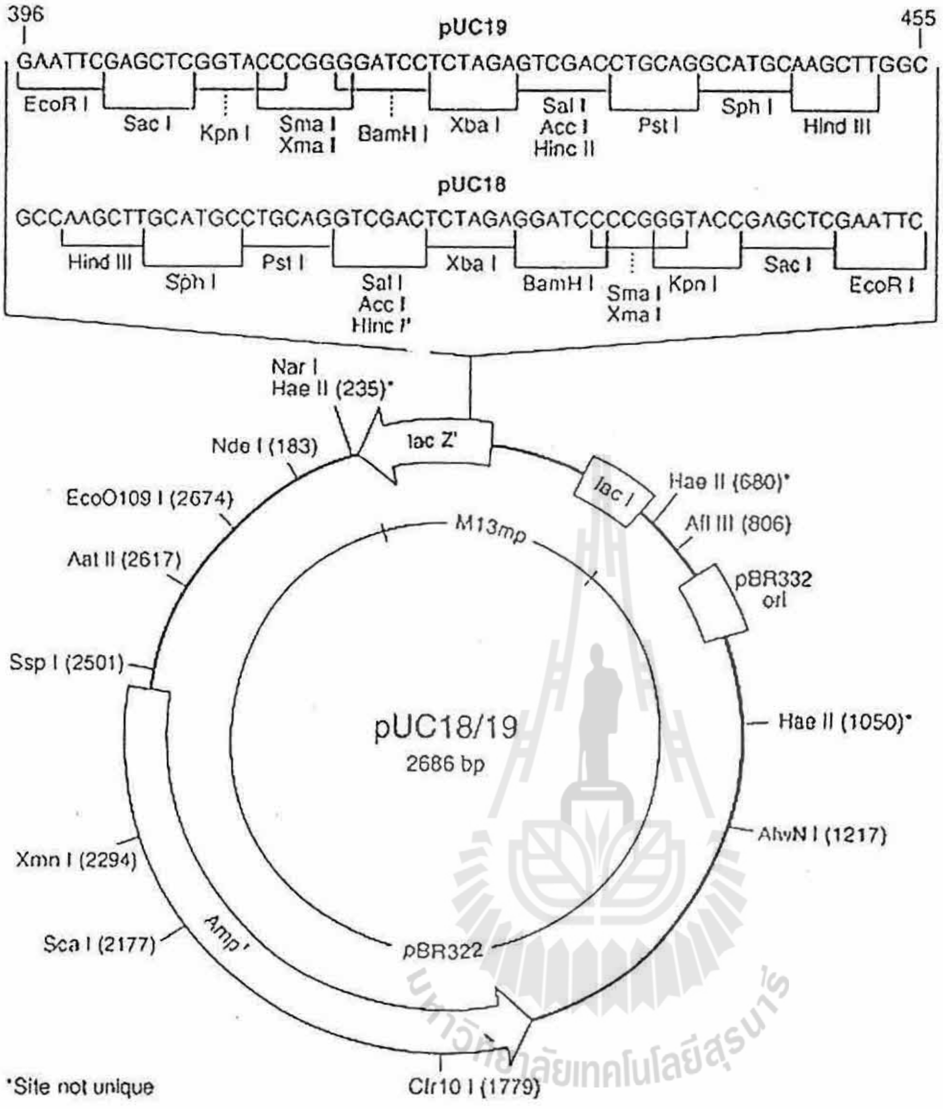
Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. E. 2000. **Molecular Cell Biology**. W.H. Freeman and Company New York. USA.

Robertson, D., Shore, S. and Miller, D. 1997. **Manipulation and Expression of Recombinant DNA**. Academic Press San Diego, California. USA.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 2 nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York. USA.

Winfrey, M.R., Rott, M.A., and Wortman, A.T. 1997. **Unraveling DNA: Molecular Biology for the Laboratory**. Prenticc-Hall, Inc., New Jersey. USA.

แผนที่ดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC 18 และ pUC19


396
455
pUC19
GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGC
EcoR I
Sac I
Kpn I
Sma I
Xma I
BamH I
Xba I
Sal I
Acc I
Hinc II
Pst I
Sph I
Hind III
pUC18
GCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTC
Hind III
Sph I
Pst I
Sal I
Acc I
Hinc II
Xba I
BamH I
Sma I
Xma I
Kpn I
Sac I
EcoR I
Nar I
Hae II (235)*
lac Z'
Nde I (183)
EcoO109 I (2674)
Aat II (2617)
Ssp I (2501)
Xmn I (2294)
Sca I (2177)
Amp r
pBR322
M13mp
Cfr10 I (1779)
lac I
Hae II (680)*
Afl III (806)
pBR332
ori
Hae II (1050)*
AlwN I (1217)
pUC18/19
2686 bp
*Site not unique

Copyright (c) 2003 Amersham Biosciences K.K. All Rights Reserved.

ที่มา http://www.jp-amershambioscience.com

This fragment, whose synthesis can be induced by IPTG, is capable of intra-allelic (a) complementation with a defective form of beta-galactosidase encoded by host (mutation *lacZ*DM15). In the presence of IPTG, bacteria synthesise both fragments of the enzyme and form blue colonies on media with X-gal. Insertion of DNA into the MCS located within the *lacZ* gene (codons 6-7 of *lacZ* are replaced by MCS) inactivates the N-terminal fragment of beta-galactosidase and abolishes alfa-complementation. Bacteria carrying recombinant plasmids therefore give rise to white colonies.

The map shows enzymes that cut pUC18/19 DNA once. Enzymes produced by Fermentas are shown in blue. The coordinates refer to the position of first nucleotide in each recognition sequence.

The exact position of genetic elements is shown on the map (termination codons included). The *bla* gene nucleotides 2486-2418 (complementary strand) code for a signal peptide. The LacZ polypeptide corresponding to wt beta-galactosidase and essential for blue/white screening ends at nt position 236 (compl. strand); another 30 codons in the same reading frame are derived from pBR322. The indicated *rep* region is sufficient to promote replication. DNA replication initiates at position 866 (+/- 1) and proceeds in indicated direction. Plasmids carrying the pMB1 and ColE1 replicons are incompatible, but they are fully compatible with those carrying the p15A replicon (pACYC177, pACYC184). pMB1-derived plasmids can be amplified using chloramphenicol.

1 kb DNA Ladder (http://www.promega.com)

1kb DNA Ladder:

Part No.	Size
G571A	500µl

Description: The 1kb DNA Ladder is ideal for determining the size of double-stranded DNA from 250-10,000 base pairs. The ladder consists of 13 double-stranded, blunt-end fragments with sizes of 250/253, 500, 750, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000, 4,000, 5,000, 6,000, 8,000 and 10,000 base pairs. The 1,000 and 3,000bp fragments have increased intensity relative to the other bands on ethidium bromide-stained agarose gels and serve as reference indicators. All other fragments appear with equal intensity on the gel. All fragments are dephosphorylated by CIAP treatment. However, they are not intended for use in quantitative analysis. Recommended loading volume is 5µl/lane.

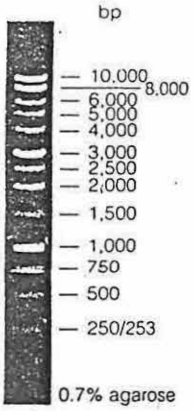
Storage Buffer: The 1kb DNA Ladder is supplied in 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA.

Concentration: The concentration of the 1kb DNA Ladder is 100µg/ml.

Storage Conditions: Store at –20°C. Avoid multiple freeze-thaw cycles and exposure to frequent temperature changes. See the expiration date on the product label.

Usage Note: Concentration gradients may form in frozen products and should be dispersed upon thawing. Mix well prior to use.

Blue/Orange 6X Loading Dye (G190A): The Blue/Orange 6X Loading Dye supplied with these markers has a composition of 15% Ficoll® 400, 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 0.4% orange G, 10mM Tris-HCl (pH 7.5) and 50mM EDTA. This dye is used for loading DNA samples into gel electrophoresis wells and tracking migration during electrophoresis. Recommended usage is one part loading dye for every five parts DNA solution. The xylene cyanol FF migrates at approximately 4kb, bromophenol blue at approximately 300bp and orange G at approximately 50bp in 0.5% to 1.4% agarose gels in 0.5X TBE (1).



0.7% agarose

Quality Control Assays

Accurate Sizing: Five microliters (500ng) of the 1kb DNA Ladder are mixed with 1µl of Blue/Orange 6X Loading Dye and subjected to electrophoresis in a single lane on a 1.2% agarose gel with TAE 1X buffer. The markers must show the expected pattern when compared with Lambda DNA/*Hind* III Markers (Cat.# G1711) and ΦX174 DNA/*Hae* III Markers (Cat.# G1761). **Note:** In a 2% gel, the 250bp fragment may appear as a doublet of 253 and 250bp, respectively.

Nuclease Assay: To test for nuclease contamination, 5µl of the 1kb DNA Ladder are incubated in restriction enzyme buffer overnight at 37°C. Following incubation, the ladder is subjected to electrophoresis and visualized on an ethidium bromide-stained agarose gel to verify the absence of visible degradation.

5′ End-Labeling: Five microliters of the 1kb DNA Ladder are added to a labeling reaction containing 1µl of T4 Polynucleotide Kinase 10X Buffer, 1µl of [γ-^{32}P]ATP (3,000Ci/mmol @ 10µCi/µl), 1µl of T4 Polynucleotide Kinase and 2µl of deionized water. This reaction is incubated at 37°C for 10 minutes, then stopped by the addition of 1µl of 0.5M EDTA. **Do not heat-inactivate the reaction. Do not heat the marker before loading.** After labeling, the 1kb DNA Ladder is separated on a 1.2% agarose gel. After the gel is processed, the labeled markers must be easily visible after overnight exposure to X-ray film without an intensifying screen, at room temperature.

Reference

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Lambda DNA/*Hin*dIII Markers (http://www.promega.com)

Lambda DNA/*Hind* III Markers:

Part No.	Size
G171A	100µg

Description: Lambda DNA/*Hind* III Markers are prepared by digesting Lambda DNA to completion with *Hind* III followed by heat-inactivation of the enzyme. The DNA fragments are then ethanol-precipitated and resuspended in storage buffer. The eight DNA fragments range in size from 125 to 23,130 base pairs.

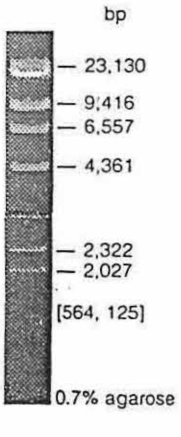
Concentration: 0.5mg/ml.

Storage Buffer: Lambda DNA/*Hind* III Markers are supplied in 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM NaCl and 1mM EDTA.

Storage Conditions: Store at –20°C. Avoid multiple freeze-thaw cycles and exposure to frequent temperature changes. See the expiration date on the product label.

Usage Notes:
1. Concentration gradients may form in frozen products and should be dispersed upon thawing. Mix well prior to use.
2. Due to the reannealing of cohesive ends, an extra band may appear above the 23,130bp fragment while the 4,361bp band disappears. To avoid this annealing, heat the Marker at 65°C for 10 minutes in the presence of 1X restriction enzyme buffer, and then immediately chill on ice for 5 minutes before loading onto a gel.

Blue/Orange 6X Loading Dye (G190A): The Blue/Orange 6X Loading Dye supplied with these Markers has a composition of 15% Ficoll® 400, 0.03% Bromophenol Blue, 0.03% Xylene Cyanol FF, 0.4% Orange G, 10mM Tris-HCl (pH 7.5) and 50mM EDTA. This dye is used for loading DNA samples into gel electrophoresis wells and tracking migration during electrophoresis. Recommended usage is one part loading dye for five parts DNA solution. The Xylene Cyanol FF migrates at approximately 4kb, Bromophenol Blue at approximately 300bp and Orange G at approximately 50bp in 0.5% to 1.4% agarose gels in 0.5X TBE buffer (1).



Quality Control Assays

Accurate Sizing: One microgram of the Lambda DNA/*Hind* III Marker is mixed with 1X restriction enzyme buffer and Blue/Orange 6X Loading Dye and subjected to electrophoresis in a single lane on a 0.7% agarose gel with TAE 1X buffer. The Lambda DNA/*Hind* III Marker must show the expected pattern when compared with a previous lot.

Nuclease Assay: To test for nuclease contamination, one microgram of the Lambda DNA/*Hind* III Marker is incubated in 50µl of 1X restriction enzyme buffer for 16 hours at 37°C. Following incubation, the Marker is subjected to electrophoresis and visualized on an ethidium bromide-stained agarose gel to confirm the absence of visible degradation.

Reference

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

*Eco*RV (http://www.promega.com)

Product		**Cat.#**	**Size**	**Conc.**	**Unit**
*Eco*R V	GPR	R6351	2,000u	10u/µl	
	GPR	R6355	10,000u	10u/µl	
*Eco*R V (HC)	GPR	R4354	10,000u	40–80u/µl	

For Laboratory Use.

Component Listing

Description

GAT▼ATC
CTA▲TAG

Features

- **Blue/White Cloning Qualified:** Promega's blue/white cloning assay provides a higher level of quality control for enzymes used in cloning applications.
- **Available at High Concentration:** Cat.# R4354 contains 10,000 units of *Eco*R V at a concentration of 40–80u/µl.

Protocol Restriction Enzyme Usage Information.

Storage Conditions Store at –20°C.

Storage Buffer 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mg/ml BSA, 50% glycerol.

Source *Escherichia coli* J62 pLG74.

Incubation Conditions Buffer D. 37°C.

Percent Activity in 4-CORE® Buffer System

A	B	C	**D**	**MULTI-CORE™**
10–25%	25–50%	50–75%	**100%**	**100%**

Frequency of Cutting

λ	Ad-2	ΦX174	pUC18	M13mp18	pBR322
21	9	0	0	0	1

*Hind*III (http://www.promega.com)

Product		Cat.#	Size	Conc.	Unit
Hind III	GPR	R6041	5,000u	10u/µl	
	GPR	R6045	15,000u	10u/µl	
Hind III (HC)	GPR	R4044	25,000u	40–80u/µl	
	GPR	R4047	50,000u	40–80u/µl	

For Laboratory Use.

Component Listing

Description

A▼AGCT T
T TCGA▲A

Features

- **Blue/White Cloning Qualified:** Promega's blue/white cloning assay provides a higher level of quality control for enzymes used in cloning applications.
- **Available at High Concentration:** Cat.# R4044 and R4047 contain 25,000 and 50,000 units of *Hind* III, respectively, at a concentration of 40–80u/µl.
- **Available in Custom and Bulk Configurations:** Learn more about our custom options for this product at: www.promega.com/myway/

Protocol	Restriction Enzyme Usage Information.
Storage Conditions	Store at –20°C.
Storage Buffer	10mM Tris-HCl (pH 7.4), 250mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mg/ml BSA, 50% glycerol.
Source	*Haemophilus influenzae* Rd.
Incubation Conditions	Buffer E. 37°C.

Percent Activity in 4-CORE® Buffer System

A	B	C	D	E	MULTI-CORE™
25–50%	100%	75–100%	10–25%	**100%**	**50–75%**

Frequency of Cutting

λ	Ad-2	ΦX174	pUC18	M13mp18	pBR322
7	12	0	1	1	1

Notes

Star activity may be observed in the presence of Mn^{2+}

*Xho*I (http://www.promega.com)

Product		Cat.#	Size	Conc.	Unit
Xho I	GPR	R6161	3,000u	10u/µl	
	GPR	R6165	10,000u	10u/µl	
Xho I (HC)	GPR	R4164	15,000u	40–80u/µl	

For Laboratory Use.

Component Listing

Description

C▼TCGA G
G AGCT▲C

Features

- **Blue/White Cloning Qualified:** Promega's blue/white cloning assay provides a higher level of quality control for enzymes used in cloning applications.
- **Genome-Qualified:** Promega's Genome-Qualified restriction enzymes are assayed to ensure optimal performance in genomic analysis applications.
- **Available at High Concentration:** Cat.# R4164 contains 15,000 units of *Xho* I at a concentration of 40–80u/µl.

Protocol Restriction Enzyme Usage Information.

Storage Conditions Store at –20°C.

Storage Buffer 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 300mM KCl, 0.01% Triton® X-100, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mg/ml BSA, 50% glycerol.

Source *Xanthomonas holcicola.*

Incubation Conditions Buffer D. 37°C.

Percent Activity in 4-CORE® Buffer System

A	B	C	**D**	MULTI-CORE™
25–50%	75–100%	75–100%	**100%**	10–25%

Frequency of Cutting

λ	Ad-2	ΦX174	pUC18	M13mp18	pBR322
1	6	1	0	0	0

Notes Ends generated with *Xho* I can be directly ligated to ends generated by *Sal* I. Neither recognition site is regenerated in the ligation product.

T4 DNA ligase (http://www.promega.com)

Product		Cat.#	Size	Conc.	Unit	Price
T4 DNA Ligase	GPR	M1801	100u (Weiss units)	1–3u/µl		Please Enquire
	GPR	M1804	500u (Weiss units)	1–3u/µl		Please Enquire
T4 DNA Ligase (HC)	GPR	M1794	500u (Weiss units)	10–20u/µl		Please Enquire
Available Separately						
T4 DNA Ligase Buffer Pack	GPR	C1263	1.5ml (3 × 500µl)			Please Enquire

For Laboratory Use. Units listed are Weiss units.

Component Listing

Description	T4 DNA Ligase catalyzes the joining of two strands of DNA between the 5´-phosphate and the 3´-hydroxyl groups of adjacent nucleotides in either a cohesive-ended or blunt-ended configuration (1). The enzyme has also been shown to catalyze the joining of RNA to either a DNA or RNA strand in a duplex molecule but will not join single-stranded nucleic acids (1).
Features	• **Available at High Concentration:** Cat.# M1794 contains 500 units of T4 DNA Ligase at 10–20u/µl. • **Flexible:** Use with 5´, 3´ or blunt-ended DNA inserts. • **Provided with 10X Reaction Buffer:** 300mM Tris-HCl (pH 7.8 at 25°C), 100mM $MgCl_2$, 100mM DTT and 10mM ATP. • **Blue/White Cloning Qualified:** Promega's blue/white cloning assay provides a higher level of quality control for enzymes used in cloning applications. • **Available in Custom and Bulk Configurations:** Learn more about our custom options for this product at: www.promega.com/myway/
Applications	• Joining double-stranded DNA molecules with cohesive or blunt ends.
Protocol	Promega Product Information #9PIM180.
Storage Conditions	Store at –20°C.
Storage Buffer	10mM Tris-HCl (pH 7.0 at 25°C), 50mM KCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA and 50% glycerol.
Unit Definition	0.01 Weiss unit of T4 DNA Ligase is the amount of enzyme required to catalyze the ligation of greater than 95% of 1µg of λ/*Hind* III fragments at 16°C in 20 minutes.
Quality Control Tests	Activity, SDS-PAGE/purity, DNase, endonuclease/nickase, RNase, blue/white cloning assay.
Source	Recombinant *E. coli* strain.
References	1. Engler, M.J. and Richardson, C.C. (1982) In: *The Enzymes*, Boyer, P.D., ed., Academic Press, New York, NY.

Shimp Alkaline Phosphatase (SAP) (http://www.promega.com)

Product		**Cat.#**	**Size**	**Unit**
Shrimp Alkaline Phosphatase	GPR	M8201	500u	

For Laboratory Use.

Component Listing

Description

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) catalyzes the dephosphorylation of 5´ phosphates from DNA and RNA. Unlike Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, SAP is completely and irreversibly inactivated by heating at 65°C for 15 minutes. Alkaline phosphatases are used to prevent recircularization and religation of linearized cloning vehicle DNA by removing phosphate groups from both 5´-termini and may also be used for the dephosphorylation of 5´ phosphorylated ends of DNA or RNA for subsequent labeling with [^{32}P]ATP and T4 Polynucleotide Kinase. SAP is active on 5´ overhangs, 5´ recessed and blunt ends (1).

Features

- **Convenient:** SAP is irreversibly inactivated by heating at 65°C for 15 minutes. This allows streamlining of the restriction enzyme digestion, dephosphorylation and ligation procedure by eliminating the need for clean-up after alkaline phosphatase treatment.
- **Flexible:** Active in most 1X restriction enzyme buffers.
- **Blue/White Cloning Qualified:** Promega's blue/white cloning assay provides a higher level of quality control for enzymes used in cloning applications.
- **Provided with 10X Reaction Buffer:** 0.5M Tris-HCl (pH 9.0), 100mM MgCl$_2$.

Applications

- Preventing religation of linearized cloning vehicle DNA by removing phosphate groups from both 5´ termini (1).
- Removing 5´ phosphate groups prior to end-labeling with T4 Polynucleotide Kinase (1).

Protocol Promega Product Information #9PIM820.

Storage Conditions Store at –20°C. See the expiration date on the label.

Storage Buffer 25mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C), 1mM MgCl$_2$, 0.1mM ZnCl$_2$ and 50% (v/v) glycerol.

Unit Definition One unit is defined as the amount of enzyme required to catalyze the hydrolysis of 1µmol 4-nitrophenyl phosphate per minute at 37°C in 1M diethanolamine, 10.9mM para-nitrophenyl phosphate, 0.5mM MgCl$_2$ (pH 9.8).

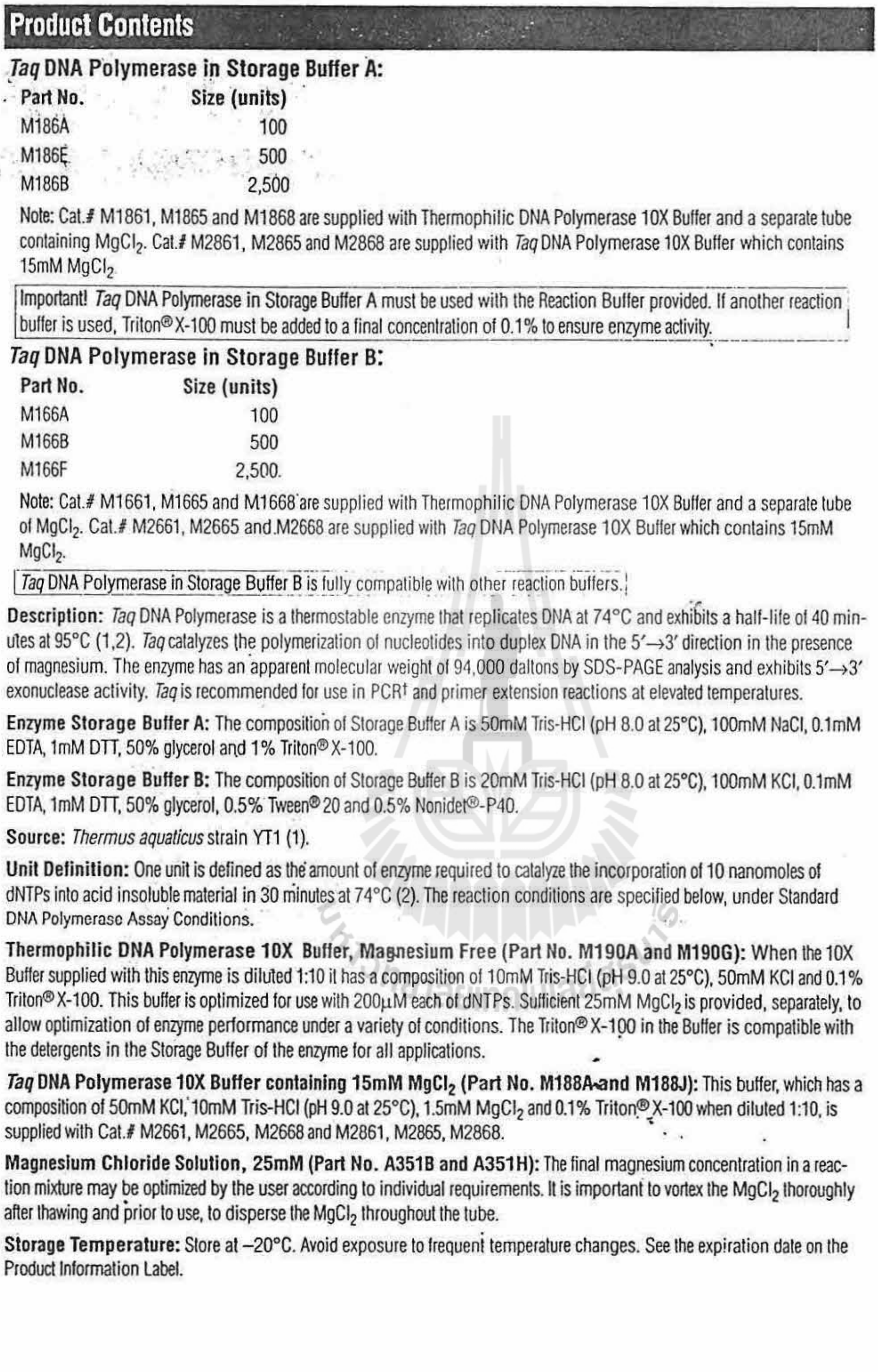
Quality Control Tests Activity, SDS-PAGE/purity, endonuclease/nickase, DNase, RNase, blue/white cloning assay.

Source *Pandalus borealis.*

References

1. Sambrook, J. *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Tag DNA polymerase (http://www.promega.com)



Product Contents

Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A:

Part No.	Size (units)
M186A	100
M186E	500
M186B	2,500

Note: Cat.# M1861, M1865 and M1868 are supplied with Thermophilic DNA Polymerase 10X Buffer and a separate tube containing $MgCl_2$. Cat.# M2861, M2865 and M2868 are supplied with *Taq* DNA Polymerase 10X Buffer which contains 15mM $MgCl_2$.

Important! *Taq* DNA Polymerase in Storage Buffer A must be used with the Reaction Buffer provided. If another reaction buffer is used, Triton® X-100 must be added to a final concentration of 0.1% to ensure enzyme activity.

Taq DNA Polymerase in Storage Buffer B:

Part No.	Size (units)
M166A	100
M166B	500
M166F	2,500.

Note: Cat.# M1661, M1665 and M1668 are supplied with Thermophilic DNA Polymerase 10X Buffer and a separate tube of $MgCl_2$. Cat.# M2661, M2665 and M2668 are supplied with *Taq* DNA Polymerase 10X Buffer which contains 15mM $MgCl_2$.

Taq DNA Polymerase in Storage Buffer B is fully compatible with other reaction buffers.

Description: *Taq* DNA Polymerase is a thermostable enzyme that replicates DNA at 74°C and exhibits a half-life of 40 minutes at 95°C (1,2). *Taq* catalyzes the polymerization of nucleotides into duplex DNA in the 5′→3′ direction in the presence of magnesium. The enzyme has an apparent molecular weight of 94,000 daltons by SDS-PAGE analysis and exhibits 5′→3′ exonuclease activity. *Taq* is recommended for use in PCR† and primer extension reactions at elevated temperatures.

Enzyme Storage Buffer A: The composition of Storage Buffer A is 50mM Tris-HCl (pH 8.0 at 25°C), 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% glycerol and 1% Triton® X-100.

Enzyme Storage Buffer B: The composition of Storage Buffer B is 20mM Tris-HCl (pH 8.0 at 25°C), 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% glycerol, 0.5% Tween® 20 and 0.5% Nonidet®-P40.

Source: *Thermus aquaticus* strain YT1 (1).

Unit Definition: One unit is defined as the amount of enzyme required to catalyze the incorporation of 10 nanomoles of dNTPs into acid insoluble material in 30 minutes at 74°C (2). The reaction conditions are specified below, under Standard DNA Polymerase Assay Conditions.

Thermophilic DNA Polymerase 10X Buffer, Magnesium Free (Part No. M190A and M190G): When the 10X Buffer supplied with this enzyme is diluted 1:10 it has a composition of 10mM Tris-HCl (pH 9.0 at 25°C), 50mM KCl and 0.1% Triton® X-100. This buffer is optimized for use with 200μM each of dNTPs. Sufficient 25mM $MgCl_2$ is provided, separately, to allow optimization of enzyme performance under a variety of conditions. The Triton® X-100 in the Buffer is compatible with the detergents in the Storage Buffer of the enzyme for all applications.

***Taq* DNA Polymerase 10X Buffer containing 15mM $MgCl_2$ (Part No. M188A and M188J):** This buffer, which has a composition of 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 9.0 at 25°C), 1.5mM $MgCl_2$ and 0.1% Triton® X-100 when diluted 1:10, is supplied with Cat.# M2661, M2665, M2668 and M2861, M2865, M2868.

Magnesium Chloride Solution, 25mM (Part No. A351B and A351H): The final magnesium concentration in a reaction mixture may be optimized by the user according to individual requirements. It is important to vortex the $MgCl_2$ thoroughly after thawing and prior to use, to disperse the $MgCl_2$ throughout the tube.

Storage Temperature: Store at –20°C. Avoid exposure to frequent temperature changes. See the expiration date on the Product Information Label.

Heat Inactivation of Restriction Endonucleases

Heat inactivation is a convenient method for stopping a restriction endonuclease reaction. Incubation at 65°C for 20 minutes inactivates the majority of restriction endonucleases that have an optimal incubation temperature of 37°C. Enzymes that cannot be inactivated at 65°C can often be inactivated by incubation at 80°C for 20 minutes. The table below indicates whether or not an enzyme can be heat inactivated and the temperature needed to do so.

Heat inactivation was performed as follows to approximate a typical experiment. A 50 µl reaction mixture containing the appropriate NEBuffer, 0.5 µg of calf thymus DNA, and 5 or 10 µl of restriction endonuclease (at selling concentration) was incubated at 37°C for 60 minutes and then at 65°C or 80°C for 20 minutes. 0.5 µg of substrate DNA (usually lambda) was added to the reaction mixture and incubated at the optimal reaction temperature of the enzyme for 60 minutes. Any digestion (complete or partial) of the substrate DNA after the second incubation, as seen by agarose gel electrophoresis, was interpreted as incomplete heat inactivation.

Enzyme	Heat Inactivation (temperature)
Aat II	Yes (65°C)
Acc I	Yes (80°C)
*Acc*65 I	Yes (65°C)
Aci I	Yes (65°C)
Acl I	No
Afl II	Yes (65°C)
Afl III	Yes (80°C)
Age I	Yes (65°C)
Ahd I	Yes (65°C)
Alu I	Yes (65°C)
Alw I	Yes (65°C)
*Alw*N I	Yes (65°C)
Apa I	Yes (65°C)
*Apa*L I	No
Apo I	Yes (80°C)
Asc I	Yes (65°C)
Ase I	Yes (65°C)
Ava I	Yes (80°C)
Ava II	Yes (65°C)
Avr II	No
*Bam*H I	Yes (80°C)
Ban I	Yes (65°C)
Ban II	Yes (65°C)
Bbs I	Yes (65°C)
Bbv I	Yes (65°C)
*Bbv*C I	Yes (80°C)
Bcg I	Yes (65°C)
*Bci*V I	Yes (65°C)
Bcl I	No
Bla I	Yes (80°C)
Bgl I	Yes (65°C)
Bgl II	No
Blp I	No
Bmr I	Yes (65°C)
Bpm I	Yes (65°C)
Bsa I	Yes (65°C)
*Bsa*A I	Yes (80°C)
*Bsa*B I	Yes (80°C)
*Bsa*H I	Yes (80°C)
*Bsa*J I	Yes (80°C)
*Bsa*W I	Yes (80°C)
*Bse*R I	Yes (65°C)
Bsg I	Yes (65°C)
*Bsi*E I	Yes (80°C)
*Bsi*HKA I	Yes (80°C)
*Bsi*W I	Yes (80°C)
Bsl I	Yes (80°C)
Bsm I	Yes (80°C)
*Bsm*A I	Yes (80°C)
*Bsm*B I	Yes (80°C)
*Bsm*F I	Yes (80°C)
*Bso*B I	No
*Bsp*1286 I	Yes (65°C)
*Bsp*D I	Yes (65°C)
*Bsp*E I	Yes (80°C)
*Bsp*H I	Yes (65°C)
*Bsp*M I	Yes (65°C)
Bsr I	Yes (80°C)
*Bsr*B I	Yes (80°C)
*Bsr*D I	Yes (80°C)
*Bsr*F I	No

Enzyme	Heat Inactivation (temperature)
*Bsr*G I	Yes (80°C)
*Bss*H II	Yes (80°C)
*Bss*K I	Yes (80°C)
*Bss*S I	Yes (80°C)
*Bst*AP I	Yes (80°C)
*Bst*B I	No
*Bst*E II	No
*Bst*F5 I	No
*Bst*N I	No
*Bst*U I	No
*Bst*X I	Yes (65°C)
*Bst*Y I	Yes (80°C)
*Bst*Z17 I	No
*Bsu*36 I	Yes (80°C)
*Cac*8 I	Yes (65°C)
Cla I	Yes (65°C)
Dde I	Yes (65°C)
Dpn I	Yes (80°C)
Dpn II	Yes (65°C)
Dra I	Yes (65°C)
Dra III	Yes (65°C)
Drd I	Yes (65°C)
Eae I	Yes (65°C)
Eag I	Yes (65°C)
Ear I	Yes (65°C)
*Eco*N I	Yes (65°C)
*Eco*O109 I	Yes (65°C)
*Eco*R I	Yes (65°C)
*Eco*R V	Yes (80°C)
Fau I	Yes (65°C)
*Fnu*4H I	Yes (65°C)
Fok I	Yes (65°C)
Fse I	Yes (65°C)
Fsp I	Yes (65°C)
Hae II	Yes (80°C)
Hae III	Yes (80°C)
Hga I	Yes (65°C)
Hha I	Yes (65°C)
Hinc II	Yes (65°C)
Hind III	Yes (65°C)
Hinf I	Yes (80°C)
*Hin*P1 I	Yes (65°C)
Hpa I	No
Hpa II	Yes (65°C)
Hph I	Yes (65°C)
Kas I	Yes (65°C)
Kpn I	No
Mbo I	Yes (65°C)
Mbo II	Yes (65°C)
Mfe I	Yes (65°C)
Mlu I	Yes (65°C)
Mnl I	Yes (65°C)
Msc I	Yes (65°C)
Mse I	Yes (65°C)
Msl I	Yes (65°C)
Msp I	Yes (65°C)
*MspA*1 I	Yes (65°C)
Mwo I	No
Nae I	Yes (65°C)
Nar I	Yes (65°C)
Nci I	Yes (65°C)

Enzyme	Heat Inactivation (temperature)
Nco I	Yes (65°C)
Nde I	Yes (65°C)
*Ngo*M IV	Yes (80°C)
Nhe I	Yes (65°C)
Nla III	Yes (65°C)
Nla IV	Yes (65°C)
Not I	Yes (65°C)
Nru I	Yes (65°C)
Nsi I	Yes (65°C)
Nsp I	Yes (65°C)
Pac I	Yes (65°C)
*Pae*R7 I	No
*Pfl*F I	Yes (80°C)
*Pfl*M I	Yes (65°C)
Ple I	Yes (65°C)
Pme I	Yes (65°C)
Pml I	Yes (65°C)
*Ppu*M I	No
*Psh*A I	Yes (65°C)
Pst I	Yes (80°C)
Pvu I	Yes (80°C)
Pvu II	No
Rsa I	Yes (65°C)
Rsr II	Yes (65°C)
Sac I	Yes (65°C)
Sac II	Yes (65°C)
Sal I	Yes (65°C)
Sap I	Yes (65°C)
*Sau*3A I	Yes (65°C)
*Sau*96 I	Yes (80°C)
Sbf I	No
Sca I	Yes (80°C)
*Scr*F I	Yes (65°C)
*Sex*A I	Yes (65°C)
*Sfa*N I	Yes (65°C)
Sfc I	Yes (65°C)
Sfi I	No
Sfo I	Yes (65°C)
*Sgr*A I	Yes (65°C)
Sma I	Yes (65°C)
Sml I	No
*Sna*B I	Yes (80°C)
Spe I	Yes (65°C)
Sph I	Yes (65°C)
Ssp I	Yes (65°C)
Stu I	Yes (65°C)
Sty I	Yes (65°C)
Swa I	Yes (65°C)
Taq I	Yes (80°C)
Tfi I	No
Tse I	No
*Tsp*45 I	No
*Tsp*509 I	No
*Tsp*R I	No
*Tth*111 I	No
Xba I	Yes (65°C)
Xcm I	Yes (65°C)
Xho I	Yes (65°C)
Xma I	Yes (65°C)
Xmn I	Yes (65°C)

Survival of Restriction Endonucleases in a Reaction

Restriction endonucleases vary with respect to their ability to maintain activity in a reaction over an extended period of time.

1.0, 0.50, 0.25, and 0.13 units of restriction endonuclease were added to 50 µl reaction mixtures containing 1 µg of unit-assay substrate DNA (defined for each enzyme in the Restriction Endonuclease section of this catalog). The reaction mixtures were incubated for 16 hours at 37°C (or as noted). The minimum number of units that resulted in complete digestion of 1 µg of substrate DNA in 16 hours was determined by agarose gel electrophoresis.

Enzymes that require less than 1 unit to digest 1 µg of DNA to completion in 16 hours can be used at lower concentrations for extended incubation periods.

DNA substrates are digested at varying rates, the actual number of units required for a complete digestion in 16 hours will change from substrate to substrate.

Enzyme	Units Required for Digestion (16 hrs)
Aat II	0.13
Acc I	0.13
*Acc*65 I	0.50
Aci I	1.00
Acl I	0.50
Afl II	0.13
Afl III	0.13
Age I	1.00
Ahd I	0.13
Alu I	0.25
Alw I	0.50
*Alw*N I	0.13
Apa I	0.13
*Apa*L I	1.00
Apo I	0.13
Asc I	0.13
Ase I	0.13
Ava I	0.25
Ava II	0.25
Avr II	0.13
*Bam*H I	0.50
Ban I	0.13
Ban II	0.50
Bbs I	0.25
Bbv I	1.00
*Bbv*C I	0.13
Bcg I	0.50
*Bci*V I	1.00
Bcl I @50°C	0.50
Bfa I	0.50
Bgl I	0.13
Bgl II	0.25
Blp I	0.50
Bmr I	1.00
Bpm I	1.00
Bsa I @50°C	1.00
*Bsa*A I	1.00
*Bsa*B I @60°C	0.13
*Bsa*H I	0.13
*Bsa*J I @60°C	0.13
*Bsa*W I @60°C	0.13
*Bse*R I	1.00
Bsg I	0.50
*Bsi*E I @60°C	0.25
*Bsi*HKA I @65°C	1.00
*Bsi*W I @55°C	0.50
Bsl I @55°C	0.13
Bsm I @65°C	0.50
*Bsm*A I @55°C	0.25
*Bsm*B I @55°C	0.50
*Bsm*F I	0.13
*Bso*B I @65°C	0.13
*Bsp*1286 I	0.50
*Bsp*D I	0.25
*Bsp*E I	0.13
*Bsp*H I	0.13
*Bsp*M I	0.25
Bsr I @65°C	0.25
*Bsr*B I	0.13
*Bsr*D I	0.50
*Bsr*F I	0.13

Enzyme	Units Required for Digestion (16 hrs)
*Bsr*G I	0.13
*Bss*H II @50°C	0.50
*Bss*K I @60°C	0.25
*Bss*S I	0.25
*Bst*AP I	0.50
*Bst*B I @65°C	0.13
*Bst*E II @60°C	1.00
*Bst*F5 I	0.25
*Bst*N I @60°C	1.00
*Bst*U I @60°C	0.13
*Bst*X I @55°C	0.25
*Bst*Y I @60°C	0.13
*Bst*Z17 I	1.00
*Bsu*36 I	0.13
*Cac*8 I	0.25
Cla I	0.50
Dde I	0.13
Dpn I	0.13
Dpn II	0.13
Dra I	0.25
Dra III	0.25
Drd I	0.13
Eae I	0.13
Eag I	0.50
Ear I	0.13
*Eco*N I	0.13
*Eco*O109 I	0.13
*Eco*R I	0.13
*Eco*R V	0.50
Fau I	0.50
*Fnu*4H I	0.25
Fok I	1.00
Fse I	1.00
Fsp I	0.13
Hae II	1.00
Hae III	0.13
Hga I	1.00
Hha I	0.25
Hinc II	0.13
*Hin*d III	0.13
*Hin*f I	0.13
*Hin*P1 I	0.13
Hpa I	0.25
Hpa II	0.25
Hph I	0.25
Kas I	1.00
Kpn I	0.25
Mbo I	0.50
Mbo II	1.00
Mfe I	0.25
Mlu I	0.13
Mnl I	0.25
Msc I	0.50
Mse I	0.13
Msl I	1.00
Msp I	0.50
*Msp*A1 I	0.25
Mwo I @60°C	0.13
Nae I	0.50
Nar I	1.00
Nci I	0.50

Enzyme	Units Required for Digestion (16 hrs)
Nco I	0.25
Nde I	0.13
*Ngo*M IV	0.13
Nhe I	0.25
Nla III	0.50
Nla IV	0.50
Not I	0.25
Nru I	0.13
Nsi I	0.50
Nsp I	0.25
Pac I	0.13
*Pae*R7 I	0.13
*Pfl*F I	0.13
*Pfl*M I	1.00
Ple I	1.00
Pme I	1.00
Pml I	0.50
*Ppu*M I	0.13
*Psh*A I	1.00
Pst I	0.50
Pvu I	1.00
Pvu II	0.13
Rsa I	0.13
Rsr II	0.25
Sac I	0.13
Sac II	0.13
Sal I	0.13
Sap I	1.00
*Sau*3A I	0.50
*Sau*96 I	0.25
Sbf I	0.25
Sca I	0.25
*Scr*F I	0.25
*Sex*A I	0.25
*Sfa*N I	0.50
Sfc I	1.00
Sfi I @50°C	0.25
Sfo I	0.50
*Sgr*A I	1.00
Sma I @25°C	0.13
Sml I	0.25
*Sna*B I	0.50
Spe I	0.50
Sph I	0.13
Ssp I	0.25
Stu I	0.25
Sty I	0.25
Swa I	0.25
Taq I @65°C	0.50
Tfi I @65°C	0.25
Tse I	0.25
*Tsp*45 I @65°C	0.50
*Tsp*509 I @65°C	0.13
*Tsp*R I @65°C	0.13
*Tth*111 I @65°C	0.25
Xba I	0.13
Xcm I	0.13
Xho I	0.13
Xma I	0.50
Xmn I	0.25

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี