

574.1925
57315

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง
การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ Taq DNA polymerase สำหรับ
งานวิจัยในภาค

ผู้ดำเนินการวิจัย
อาจารย์สิรินันท์ นิลรวงกูร

-2 ส.ค. 2544

หน่วยงานที่รับผิดชอบ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

แหล่งสนับสนุนเงินทำงานวิจัย
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2541

147488

บทคัดย่อ

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase มีความสำคัญในการทำ polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งปัจจุบันได้กลายเป็นเทคนิคพื้นฐานในงาน Molecular Biology ทางภาควิชาชีวเคมี มีงานวิจัยหลายชิ้นที่ต้องใช้เทคนิค PCR และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ต้องสั่งซื้อจากบริษัทเอกชนซึ่งมีราคาแพง งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โดยวิธี freeze-thaw และ Anion exchange chromatography ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สามารถใช้ในการวิจัยได้ดีพอสมควร

สารบัญ

	หน้า
1. บทนำ	1
2. วัตถุประสงค์	1
3. อุปกรณ์และระเบียบวิธีการวิจัย	1
3.1 อุปกรณ์	1
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย	2
3.2.1 การเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> เพื่อให้ผลิตเอนไซม์	2
3.2.2 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์	2
3.2.3 การตรวจสอบโปรตีน	3
3.2.4 การหาความเข้มข้นของเอนไซม์	3
4. ผลการทดลอง	4
5. อภิปรายผล	9
6. เอกสารอ้างอิง	11

1. บทนำ

เอนไซม์ Taq DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอให้เป็นเส้นยาว เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนสูง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อน

เอนไซม์ Taq DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำคัญในการทำ polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งในปัจจุบันได้กลายเป็นเทคนิคพื้นฐานในงานวิจัยและการวินิจฉัยโรค ยีนของเอนไซม์นี้ได้ถูก clone มาใส่ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* และสามารถเพิ่มปริมาณของยีน ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน และสกัดเอนไซม์ออกมาได้

งานวิจัยในภาควิชาชีวเคมีมีส่วนใหญ่นั้นเกี่ยวข้องกับการทำ PCR ซึ่งในการทำ PCR นั้นต้องอาศัยเอนไซม์ Taq DNA polymerase จำนวนมาก และต้องสั่งซื้อจากบริษัทเอกชน ซึ่งมีราคาแพงมาก ดังนั้นถ้าเราสามารถผลิตเอนไซม์ได้เองจะเป็นการลดค่าใช้จ่ายได้มาก

2. วัตถุประสงค์

2.1 หาวิธีสกัดเอนไซม์ Taq DNA polymerase จากแบคทีเรียที่มีพลาสมิด

2.2 ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

3. อุปกรณ์และระเบียบและวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิดที่มียีนของเอนไซม์ Taq polymerase

3.1.2 สารเคมี

Bactotryptone, yeast extract, NaCl, Ampicillin, Tris-base, Sucrose, Triton x-100, glycerol, ethylenediamine (EDTA), isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), acrylamide, Serva Blue G, ammonium persulphate, N,N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), DEAE 52, ethidium bromide, agarose gel, borate, Coomassie blue R-250, methanol

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

3.2.1 การเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดที่มียีนของเอนไซม์ Taq polymerase และการกระตุ้นให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ Taq polymerase

นำเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดที่มียีนของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่เก็บที่ -80°C มา streak บนวุ้นของ Luria-Bertani medium ที่มี Ampicillin 100 mg/ml ทิ้งไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำ colony ของแบคทีเรียที่โตแล้ว 1 colony เลี้ยงใน Luria-Bertani medium ที่มี Ampicillin 100 mg/ml เขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำ 1% inoculum ของเชื้อที่โตมาเลี้ยงต่อใน Luria-Bertani medium 500 มล. ที่มี Ampicillin 100 mg/ml เขย่าที่ 37°C เป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง หรือจนกว่าค่า Absorbance ที่ 600 นาโนเมตร มีค่า 0.3-0.7 แล้วใส่ IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นเขย่าต่อที่ 37°C จนครบ 24 ชั่วโมง

นำเชื้อที่ได้มาปั่นตกตะกอนที่ 5000 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนของเซลล์ที่ได้มาละลายใน STET buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี 8% sucrose, 50 mM EDTA, 0.1% Triton X-100) หลังจากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยการนำหลอดไปตั้งทิ้งไว้ที่ -80°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาแช่ที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำหลอดไปตั้งทิ้งไว้ที่ -80°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาแช่ที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 30 นาที อีกครั้งหนึ่ง

นำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ซึ่งมีเอนไซม์ Taq polymerase มา dialyse ด้วย 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 และใช้เป็น crude enzyme

3.2.2 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ Taq DNA polymerase โดยใช้ Ion-exchange chromatography

ใช้ DEAE-52 pack ลงใน column ขนาดความสูง 30 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร (column volume = 94 ml) โดยใช้ 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 เป็นบัฟเฟอร์เริ่มต้น ปรับ flow rate ให้ได้ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที และเก็บ fraction ละ 1.5 มิลลิลิตร

ล้าง column ด้วย 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้น load sample ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปใน column แล้วเริ่ม gradient ของ NaCl ที่ 200 มิลลิโมลาร์ใน 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วชะเอนไซม์ออกจาก column ด้วย 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี NaCl 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

นำแต่ละ fraction ไปวัด Absorbance ที่ 280 นาโนเมตร แล้ว pool ส่วนที่เป็น peak มา dialyse ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ของ Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1%

Triton x-100 และ 50% glycerol เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้น เติม 1 mM DTT และ 0.5 mM PMSF แล้วเก็บที่ -20°C

3.2.3 การตรวจสอบโปรตีนโดย SDS-PAGE

ใช้วิธีของ Laemmli (7) โดยใช้ separating gel 10% และ stacking gel 4% ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie blue R 250 0.1% ละลายใน 40% methanol และ 10% acetic acid และ ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 40% methanol และ 10% acetic acid

3.2.4 การหาความเข้มข้นและประเมินประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่เตรียมได้

ประมาณความเข้มข้นของเอนไซม์โดยนำไปทำ PCR DNA ที่ใช้คือ ยีนของ 16s RNA จาก *Paragonimus heterotremus* ใน 1 ปฏิกริยาที่มีปริมาตรรวมสุดท้าย 25 μL ประกอบด้วย 100 μM dNTPs, 1X PCR buffer, 1.5 M MgCl_2 และ 1 μM universal primer A และ B ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 2 kb

ขั้นตอนการทำ PCR ประกอบด้วย ขั้นตอน denaturation ที่ 95°C 1 นาที annealing ที่ 35°C 1 นาที และ extension ที่ 72°C 1 นาที ทำซ้ำ 3 ขั้นตอนเป็นจำนวน 30 รอบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องใต้แสงอุลตราไวโอเลต บันทึกผลการทดลองที่ได้บนเครื่องประมวลผลภาพจากเจล

ประมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เตรียมได้เทียบกับเอนไซม์ที่สั่งซื้อมา (Gibco) โดยเทียบจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใต้แสงอุลตราไวโอเลต บันทึกผลการทดลองที่ได้บนเครื่องประมวลผลภาพจากเจล

Triton x-100 และ 50% glycerol เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้น เติม 1 mM DTT และ 0.5 mM PMSF แล้วเก็บที่ -20°C

3.2.3 การตรวจสอบโปรตีนโดย SDS-PAGE

ใช้วิธีของ Laemmli (7) โดยใช้ separating gel 10% และ stacking gel 4% ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie blue R 250 0.1% ละลายใน 40% methanol และ 10% acetic acid และ ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 40% methanol และ 10% acetic acid

3.2.4 การหาความเข้มข้นและประเมินประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่เตรียมได้

ประมาณความเข้มข้นของเอนไซม์โดยนำไปทำ PCR DNA ที่ใช้คือ ยีนของ 16s RNA จาก *Paragonimus heterotremus* ใน 1 ปฏิกริยาที่มีปริมาตรรวมสุดท้าย 25 μL ประกอบด้วย 100 μM dNTPs, 1X PCR buffer, 1.5 M MgCl_2 และ 1 μM universal primer A และ B ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 2 kb

ขั้นตอนการทำ PCR ประกอบด้วย ขั้นตอน denaturation ที่ 95°C 1 นาที annealing ที่ 35°C 1 นาที และ extension ที่ 72°C 1 นาที ทำซ้ำ 3 ขั้นตอนเป็นจำนวน 30 รอบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องใต้แสงอุลตราไวโอเลต บันทึกผลการทดลองที่ได้บนเครื่องประมวลผลภาพจากเจล

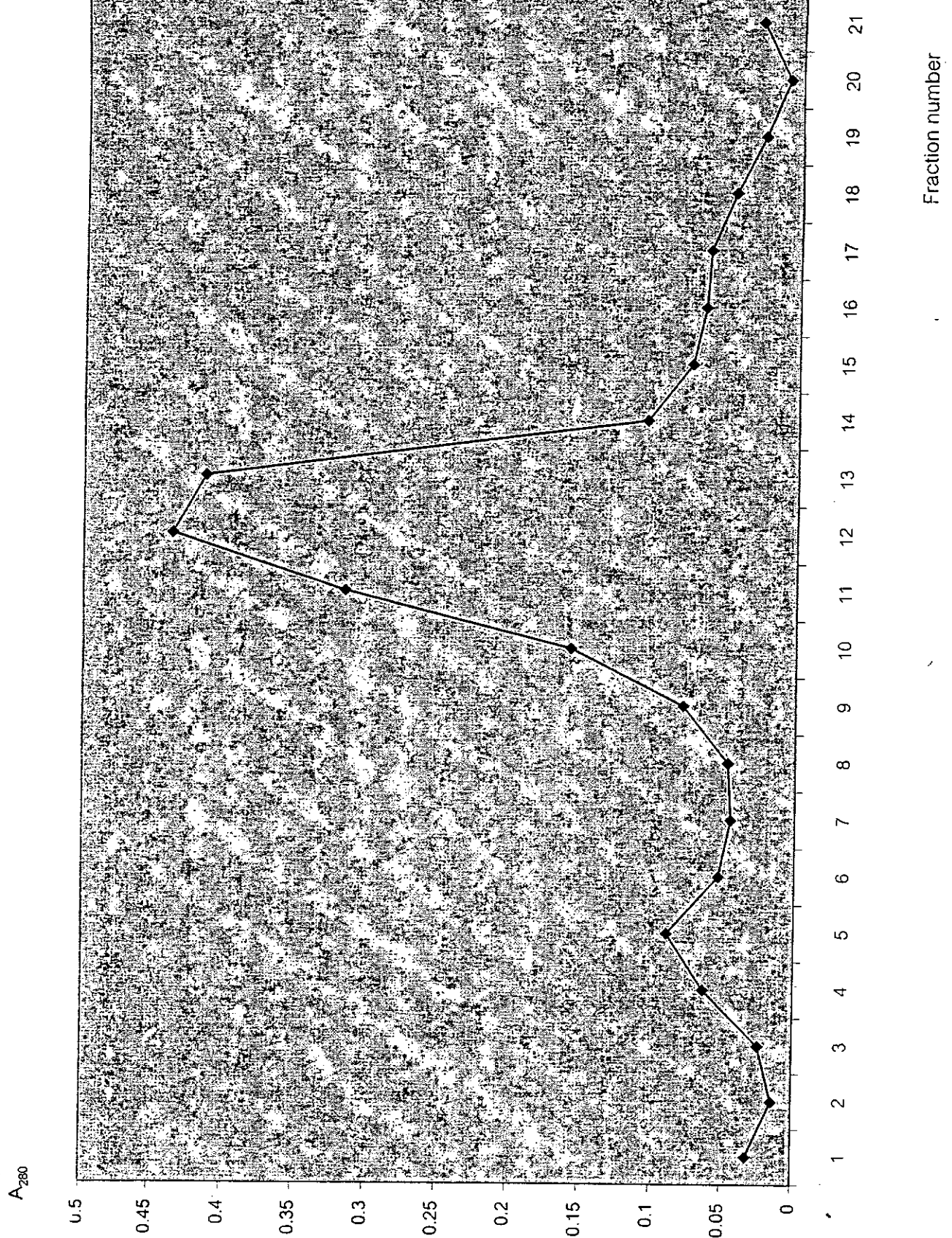
ประมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เตรียมได้เทียบกับเอนไซม์ที่สั่งซื้อมา (Gibco) โดยเทียบจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใต้แสงอุลตราไวโอเลต บันทึกผลการทดลองที่ได้บนเครื่องประมวลผลภาพจากเจล

4. ผลการทดลอง

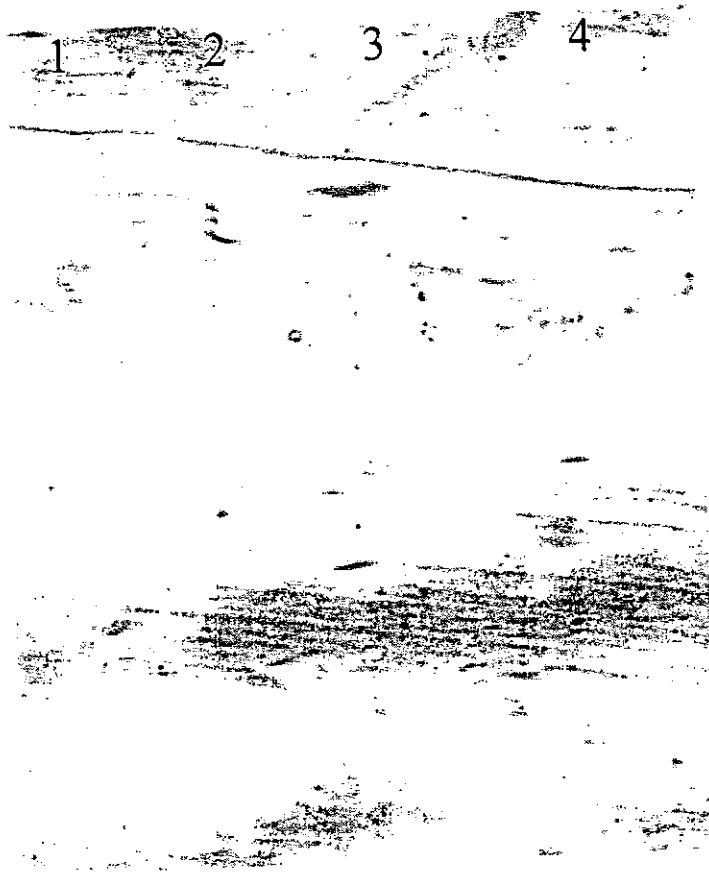
แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ออกมาในเซลล์ จึงต้องทำให้เซลล์แตกออกโดยใช้วิธี freeze-thaw โดยนำแบคทีเรียที่ได้มาแช่แข็งที่ -80°C แล้วนำไปแช่ที่ 75°C วิธีการนี้จะทำให้เซลล์แตกและปล่อยสิ่งที่อยู่ภายในเซลล์ออกมารวมถึงเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และโปรตีนอื่นด้วย ดังนั้นการที่นำไปแช่ที่ 75°C ยังเป็นการทำให้โปรตีนอื่นนอกเหนือจาก *Taq* DNA polymerase เสียสภาพธรรมชาติแล้วตกตะกอนลงมา ส่วนเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ทนต่อความร้อนดังนั้นจึงไม่เสียสภาพธรรมชาติภายใต้อุณหภูมิสูง จึงทำให้สามารถแยกออกมาจากโปรตีนอื่นได้ (3)

เมื่อปั่นตกตะกอนแล้วนำ crude enzyme ที่ได้ไป apply ใน column DEAE-52 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะถูกชะออกมาด้วยความเข้มข้นของ NaCl ที่ 200-350 มิลลิโมลาร์ column ที่ใช้มีปริมาตรประมาณ 90 มิลลิลิตร ล้าง column ด้วย 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 300 มิลลิลิตร หลังจาก apply เอนไซม์แล้ว ใส่บัฟเฟอร์ 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี NaCl 200 มิลลิโมลาร์ จำนวน 300 มิลลิลิตร เพื่อให้เอนไซม์ติดกับ resin ใน column จากนั้นจึงชะเอนไซม์ออกด้วย 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี NaCl 350 มิลลิโมลาร์ จำนวน 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำแต่ละ fraction ไปวัด Absorbance ที่ 280 นาโนเมตร พบโปรตีนในช่วงปริมาตรที่ 80-120 มิลลิลิตร จากรูปที่ 1 จะเห็นว่ามี peak โปรตีนอยู่ 2 peak นำปริมาตรที่ 82-92 (pool 1) มารวมกัน และปริมาตรที่ 94-110 (pool 2) มารวมกัน นำไป dialyse ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100 และ 50% glycerol หลังจากนั้นนำไป concentrate ด้วย Centricon ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 2) จากรูปที่ 2 จะเห็นว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่สั่งซื้อมา ส่วน pool 1 ไม่สามารถตรวจสอบโปรตีนได้

เมื่อนำเอนไซม์ที่เตรียมได้ไปทำ PCR เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่สั่งซื้อมา พบว่าในปริมาตรที่เท่ากันเอนไซม์ที่เตรียมได้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้น้อยกว่า เมื่อเทียบความเข้มข้นของ PCR product เมื่อย้อมด้วย ethidium bromide สามารถประมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เตรียมเองโดยเทียบกับเอนไซม์ของ Gibco ได้ประมาณ 1 U/0.5 μL (2 U/ μL) เอนไซม์ที่นำมาทำ PCR มีทั้งหมด 1 มิลลิลิตร ดังนั้นในการเตรียมเอนไซม์ครั้งนี้ ได้เอนไซม์ทั้งหมด 1,000 U

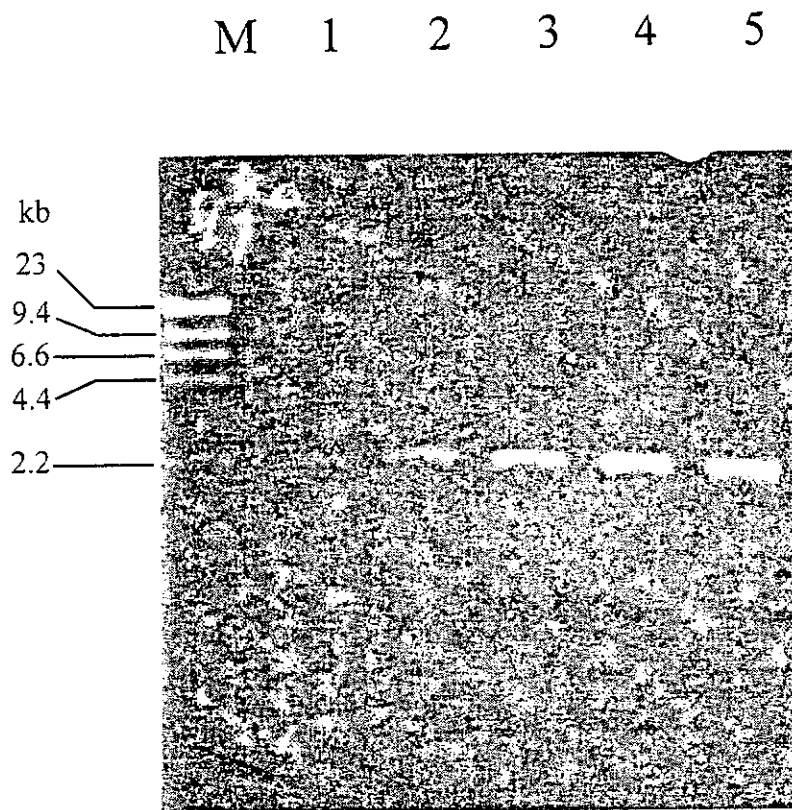


รูปที่ 1 DEAE52 column profile ของ crude enzyme ใช้ single step gradient 100-500 mM ของ NaCl ใน 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ได้ทำการ pool peak ทั้ง 2 โดย peak แรก pool ตั้งแต่หลอดหมายเลข 2-7 (pool 1) ส่วน peak ที่ 2 pool ตั้งแต่หลอดที่ 8-15 (pool 2)



รูปที่ 2 SDS-PAGE : 7.5% separating gel, 3.5% stacking gel

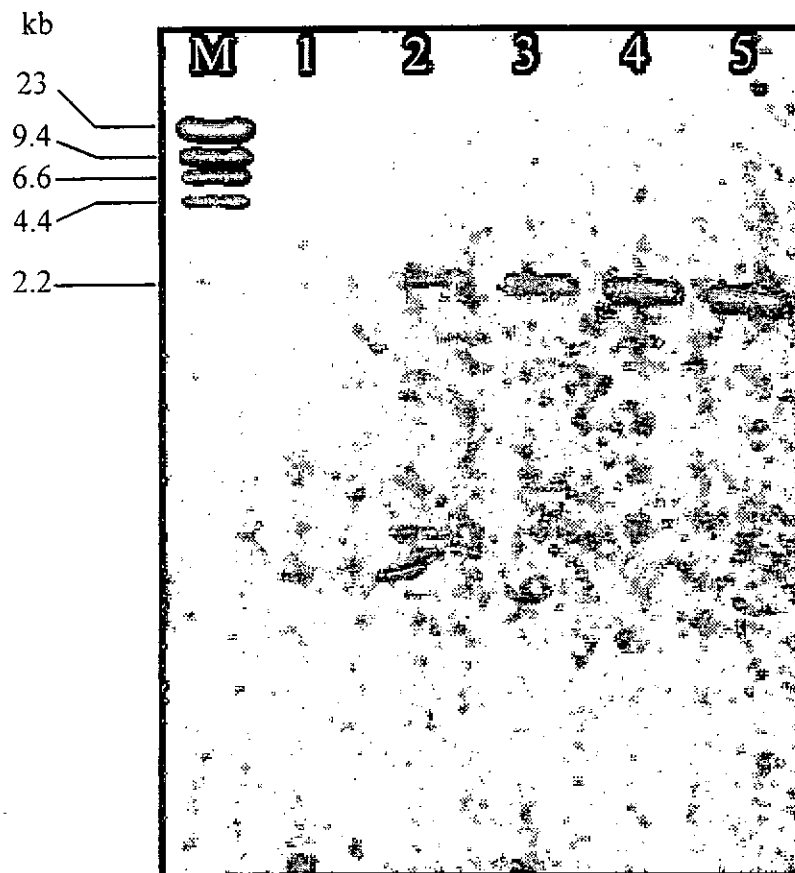
Lane 1	=	pool 1
Lane 2	=	crude enzyme
Lane 3	=	Taq DNA polymerase ที่เตรียมเอง
Lane 4	=	Taq DNA polymerase ของ Gibco



รูปที่ 3 PCR product ที่ได้โดยใช้ Taq DNA polymerase ของ Gibco

Lane 1	=	λ /HindIII marker
Lane 2	=	Taq DNA polymerase 0.1 μ L (0.5 U)
Lane 3	=	Taq DNA polymerase 0.2 μ L (1.0 U)
Lane 4	=	Taq DNA polymerase 0.4 μ L (2.0 U)
Lane 5	=	Taq DNA polymerase 0.6 μ L (3.0 U)
Lane 6	=	Taq DNA polymerase 0.8 μ L (4.0 U)

197488



รูปที่ 4 PCR product ที่ได้จาก Taq DNA polymerase ที่เตรียมเอง

Lane 1	=	λ /HindIII marker
Lane 2	=	Taq DNA polymerase 0.1 μ L
Lane 3	=	Taq DNA polymerase 0.2 μ L
Lane 4	=	Taq DNA polymerase 0.4 μ L
Lane 5	=	Taq DNA polymerase 0.6 μ L
Lane 6	=	Taq DNA polymerase 0.8 μ L

อภิปรายผล

จากผลของ DEAE52 column chromatography เมื่อวัด Absorbance ที่ 280 นาโนเมตร พบว่ามี 2 peak ของโปรตีนเมื่อทำการ pool แต่ละ peak เข้าด้วยกัน และนำไปตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE พบว่า pool 2 คือเอนไซม์ Taq DNA polymerase ทั้งนี้ดูจากตำแหน่งของ band ของโปรตีนที่ตรงกับเอนไซม์ Taq DNA polymerase ของ Gibco ส่วน pool 1 ไม่สามารถตรวจสอบโปรตีนได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะมีขนาดโมเลกุลใหญ่หรือเล็กกว่าเอนไซม์ Taq DNA polymerase ทำให้ไม่สามารถวิ่งเข้ามาในเจล หรือวิ่งตกเจลไปแล้วก็ได้ หรืออาจมีปริมาณโปรตีนน้อยเกินไปไม่สามารถตรวจสอบด้วย Coomassie blue ได้

เมื่อดู band ของ crude enzyme เทียบกับเอนไซม์ของ Gibco และเอนไซม์ที่เตรียมเอง พบว่ามีขนาดเท่ากันและยังไม่พบ band ของโปรตีนอื่นร่วมด้วย ซึ่งแปลได้ว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจหมายความว่าวิธีการเตรียม crude enzyme อย่างเดียวโดยที่ยังไม่ผ่าน column chromatography ก็สามารถทำบริสุทธิ์เอนไซม์ได้ ทั้งนี้เนื่องจากวิธีที่ใช้เตรียม crude enzyme โดยใช้อุณหภูมิสูงทำให้โปรตีนอื่นเสียสภาพได้ แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้จาก SDS-PAGE ค่อนข้างไม่ชัดเจนทั้งนี้เนื่องมาจากข้อจำกัดทางด้านเครื่องมือ ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ นอกจากนี้จากข้อจำกัดด้านสารเคมีทำให้ไม่สามารถหาความเข้มข้นของโปรตีนได้ และการหาความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นแค่การประเมิน ดังนั้นจึงไม่สามารถหา specific activity ของเอนไซม์ได้

เมื่อดูผลการทดลองจาก SDS-PAGE แล้ว จากรูปที่ 2 จะพบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่สั่งซื้อมา เนื่องจากไม่พบ band ของโปรตีนอื่นอยู่ร่วมกับเอนไซม์ เมื่อนำเอนไซม์ที่เตรียมได้ไปใช้ใน PCR และเปรียบเทียบผลที่ได้จากรูปที่ 3 และรูปที่ 4 สามารถประมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เตรียมได้ว่ามีความเข้มข้นเท่ากับ 2 U/ μ L แต่การใช้เอนไซม์ที่เตรียมเองในการทำ PCR ให้ผลที่ไม่แน่นอน บางครั้งได้ PCR product แต่บางครั้งก็ไม่ได้ ซึ่งครั้งที่ไม่ได้ PCR product ก็ไม่มีแม้แต่ primer dimer ซึ่งแปลว่าเอนไซม์ไม่ทำงาน ทั้งที่ใช้ condition ในการทำ PCR เหมือนกัน

สรุปว่าเอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่เตรียมเองมีความสามารถเพียงพอในการทำ PCR ถึงแม้ว่าผลที่ได้จะไม่แน่นอน แต่เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อเอนไซม์จากบริษัทเอกชน เอนไซม์ที่เตรียมเองสามารถใช้ใน preliminary study ในการทำ PCR ได้ เช่น ใช้ในตอนหา condition ในการทำ PCR (ความเข้มข้นของ $MgCl_2$, dNTPs, primer denaturation temperature และ annealing temperature) ถ้าต้องการเตรียมเอนไซม์ให้ได้ปริมาณมากกว่านี้ต้องใช้ column ที่ใหญ่กว่านี้ ซึ่ง column ที่ใช้อยู่มีความสูง 30

เซนติเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ทำให้ load เอนไซม์ได้น้อย นอกจากนี้ระบบที่ใช้เป็นระบบที่ไม่ sterile อย่างสมบูรณ์ ถึงแม้ว่าจะมีการ autoclave สารทุกอย่าง รวมถึงเครื่องมือที่ใช้ แต่เอนไซม์ที่เตรียมก็อาจเกิด contamination ได้จากขั้นตอนการเก็บ fraction ของเอนไซม์จาก column chromatography และตอนที่นำเอนไซม์ไปวัด absorbance

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับความสนับสนุนด้านการเงินจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนด้านสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยจากภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ รวมทั้งคำแนะนำจาก รศ.ดร.โกสุม จันทศิริ ผศ.ดร.ยุวดี วัฒนโกคาสิน ผศ.ดร.ชัยณรงค์ วงศ์ธีระทรัพย์ ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ และอ.จันทร์ทรา ตันนัthyทรวงศ์ ยีน 16s RNA ของ *Paragonimus heterotremus* จากอาซัวดามิ ภาคพิธ เจริญ และ *E. coli* ที่มียีน Taq DNA polymerase จาก ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

1. Leelayuwat C., Srisuk T., Paechaiyaphum R., Limpai boon T., Romphruk A., Romphruk A. Production and evaluation of *Taq* DNA polymerase. *J. Med.Assoc.Thai.* 1997;80:S129-137
2. Desai UJ. and Pfaffle PK. Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Biotechniques.* 1995;19:780-784
3. Grimm E. and Arbuthnot P. Rapid purification of *Taq* DNA polymerase by freezing and high temperature thawing of bacterial expression cultures. *Nucleic acids Res.* 1995;23(21):4518-4519
4. Engelke DR., Krikos A. and Ginsburg D. Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal.Biochem.* 1990;191:396-400
5. Pluthero F. Rapid purification of high-activity *Taq* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 1993;21:4850-4851
6. คู่มือปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม 1 : การขยายยีนและการตัดต่อยีนจากโครโมโซม โดย โครงการอนุพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สุมาลี ตั้งประดับกุล บรรณาธิการ
7. Laemmli, UK. *Nature.* 1970;227,680