บทที่ 4

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P.vivax*

ตัวอย่างเชื้อ *P.vivax* ได้จากผู้ป่วยมาลาเรียที่มาตรวจรักษาที่ศูนย์มาลาเรีย อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ที่ศูนย์มาลาเรีย อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด และแผนกผู้ป่วยนอก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในปี พ.ศ. 2534 และ 2536 จำนวน 15 ตัวอย่าง โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่แขนของผู้ป่วยประมาณ 1 ml ใส่ในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดโดยใช้ EDTA ซึ่งแต่ละตัวอย่างทำการตรวจวินิจฉัย โดยการย้อมฟิล์มเลือดอย่างบางด้วยสียิมซา (giemsa) และเก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐานทางคลินิค ได้แก่ เพศ อายุ เชื้อชาติ และภูมิลำเนา

การนับจำนวนเชื้อ

วิธีการทำแผ่นฟิล์มเลือดอย่างบาง (thin blood film)

หยดเลือดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่แห้งและสะอาดประมาณ 1 หยดเล็กๆ ใช้ขอบกระจกสไลด์อีกแผ่นหนึ่งแตะหยดเลือดทำมุมประมาณ 45 องศา เลื่อนขอบกระจกสไลด์ที่ทำมุมอยู่ออกไปทางปลายโดยเร็วและสม่ำเสมอ อย่าให้หยุดชะงัก เลือดจะแผ่เป็นแผ่นฟิล์มบางบนแผ่นกระจกทิ้งไว้ให้แห้งสนิทนำไปจุ่มใน absolute methanol ครึ่งนาที ทิ้งไว้ให้แห้งสนิทแล้วจึงย้อมด้วยสีโดยผสมสียิมซาเข้มข้นที่เตรียมไว้ล่วงหน้า 1 ml กับ PBS ที่มีค่า pH 7.0 จำนวน 10 ml ผสมให้เข้ากันแล้วหยดสีลงบนแผ่นฟิล์มเลือดบนกระจกสไลด์จนท่วมบริเวณที่จะย้อม ทิ้งไว้ 10 นาที จึงล้างสีออกด้วยน้ำประปา ผึ่งให้แห้ง แล้วเก็บไว้นับจำนวนเชื้อต่อไป

การนับจำนวนเชื้อ

ใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย objective lens 40X เลื่อนหาบริเวณเม็ดเลือดแดงบนแผ่นฟิล์มเลือดที่กระจายสม่ำเสมอและเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ซึ่งมักจะพบบริเวณปลายฟิล์มเลือด เปลี่ยนกำลังขยาย objective lens เป็น 100X นับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่พบในวงกล้อง 3 วงกล้อง คำนวณหาจำนวนวงกล้องที่จะพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ แล้วนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียต่อเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ โดยนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียที่พบในวงกล้องเท่ากับจำนวนวงกล้องที่คำนวณได้แล้วคำนวณเป็นค่าร้อยละ ตัวอย่างเช่น นับจำนวนเม็ดเลือดแดงในวงกล้อง 3 วงกล้องได้เท่ากับ 990 เซลล์ จำนวนวงกล้องที่จะพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์เท่ากับ 10,000 X 3/990 เท่ากับ 30 วงกล้อง ดังนั้นจะต้องนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อที่พบใน 30 วงกล้อง สมมุติว่านับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อเท่ากับ 50 เซลล์ต่อเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ คิดเป็นอัตราการติดเชื้อในเลือดของผู้ป่วยรายนี้เท่ากับร้อยละ 0.50

การแยกเซลล์ออกจากพลาสมา

นำตัวอย่างเลือดที่ได้มาเติมสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.8 ที่เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 °C ลงไป 2 เท่าผสมให้เข้ากันเพื่อล้างพลาสมาออกแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที ใช้พาสเจอร์ปิเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำการปั่นล้างซ้ำด้วย PBS อีก 2 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายดูดส่วนที่เป็นสารละลายออกให้มากที่สุด ส่วนของเม็ดเลือดรวมทั้งเม็ดเลือดขาวจะอยู่ในส่วนที่ตกตะกอน

การสกัด ดีเอ็นเอ ของเชื้อ *P.vivax*

นำตะกอนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อ *P.vivax* มาเติมสารละลาย PBS ที่มี saponin อยู่ร้อยละ 0.05 ประมาณ 500 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 5 นาที หรือจนสังเกตเห็นว่าเม็ดเลือดแดงแตกหมด สังเกตุโดยสีของสารละลายจะเป็นสีแดงใส นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 ° ใช้เวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนที่มีฮีโมโกลบินทิ้งไป จะได้ตะกอนอยู่ก้นหลอดเติมสารละลาย PBS ที่เย็น อุณหภูมิ 4 °C เพื่อล้างตะกอนดังกล่าวอีก 2 ครั้งหรือจนสารละลายส่วนบนใส ละลายส่วนที่ตกตะกอนอยู่ด้วย lysis บัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วย SDS ร้อยละ 0.5, 0.01M EDTA pH 8.0, proteinase K 4 mg โดยมีปริมาตร 500 µl นำไป ใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 4 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอ ออกจากโปรตีนและเศษของเซลล์ที่ถูกย่อยสลายด้วย phenol/chloroform extraction โดยเติม saturated phenol ลงไปปริมาตรเท่าตัว ปิดฝาหลอดให้แน่นเขย่าอย่างแรงประมาณ 5 นาที นำไปปั่นเพื่อให้สารละลายแยกชั้นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีดูดสารละลายส่วนบนลงในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลาย phenol:chloroform:isoamyl alcohol ในสัดส่วน 25:24:1 ทำการเขย่าอย่างแรงและปั่นเพื่อให้สารละลายแยกชั้นโดยให้สภาวะเดิมอีก 2 ครั้ง ครั้งสุดท้ายภายหลังจากดูดสารละลายส่วนบนลงในหลอดทดลองใหม่แล้วเติม chloroform ลงไปในปริมาตรเท่าตัวเขย่าอย่างแรง 5 นาทีแล้วปั่นด้วยความเร็วเท่าเดิม ดูดสารละลายส่วนบนซึ่งมีดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรีย และดีเอ็นเอของเม็ดเลือดขาวของคนปนกันอยู่ ใส่ในหลอดทดลองที่สะอาด (Tanabe et al., 1987)

การตกตะกอน ดีเอ็นเอ

เติมสารละลาย 3M sodium acetate pH 5.2 และ absolute ethanol ลงในสารละลายที่มีดีเอ็นเอในปริมาตร 1 ใน 10 เท่า และ 2 เท่าของสารละลายที่มีดีเอ็นเอตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีนาน 20 นาที เทสารละลายทิ้ง จะได้ตะกอนสีขาวสะอาด ซึ่งมีดีเอ็นเออยู่บริเวณก้นหลอด ทำการล้างเกลือที่ปะปนกับตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol ร้อยละ 70 ประมาณ 500 µl นำไปปั่นอีกครั้งด้วยความเร็วเท่าเดิมเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง จะได้ตะกอนของดีเอ็นเอเกาะแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ทิ้งไว้จนแห้งโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือในตู้เย็น 4 °C ซึ่งจะรักษาสภาพที่ดีของดีเอ็นเอ (Sambrook et al., 1989)

การเลือกตำแหน่งเพื่อสังเคราะห์ oligonucleotides สำหรับเป็น PCR primers

การออกแบบ primer โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ merozoite surface protein 1 หรือ Pv200 ของ *P. vivax* Belem strain (del Portillo et al., 1991) และ Sal-1 strain (Gibson et al., 1992) เป็นต้นแบบ โดยลำดับที่ศึกษาอยู่ในช่วง block 4 ถึง block 6 หรือที่ตำแหน่ง 1617 ถึง 2568 ของ Belem strain และตำแหน่งที่ 1813 ถึง 2826 ของ Sal-1 strain การศึกษาครั้งนี้ใช้ PCR primers คือ Pv1 และ Pv2 โดย Pv1 ประกอบด้วย oligonucleotide 29 mers มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-GAA ATT TAT GAT CAA GCC CAG GAA ATC CG-3' ตรงกับตำแหน่งที่ 1813 ถึง 1841 ของ Sal-1 strain ซึ่งตรงกับตำแหน่งที่ 1617 ถึง 1645 ของ Belem strain เบสที่ขีดเส้นใต้เป็นการทำ mismatch เพื่อให้เกิด artificial restriction site

สำหรับ *Bcl* I ส่วน Pv2 ประกอบด้วย oligonucleotide 30 mers มีลำดับเบสดังนี้ 5'-GTT TCC AGG AAA GCT TTA ATC TTC TTG TCC-3' ตรงกับตำแหน่งที่ 2797 ถึง 2826 ของ Sal-1 strain ซึ่งตรงกับตำแหน่งที่ 2539 ถึง 2568 ของ Belem strain เบสที่ขีดเส้นใต้เป็นการทำ mismatch เพื่อให้เกิด artificial restriction site สำหรับ *Hind* III

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดไว้และทำแห้งจากข้อ 5 มาละลายน้ำบริสุทธิ์ 20 µl เพื่อเป็น template สำหรับ PCR (Saiki et al., 1988) องค์ประกอบที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ 100 µl ประกอบด้วยดีเอ็นเอของ *P. vivax* 10 µl Pv1 และ Pv2 อย่างละ 20 pM, nucleotide substrate (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) อย่างละ 10 mM, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 mM, 10X PCR reaction buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ และ gelatin ร้อยละ 0.01(w/v)) 10 µl, น้ำกลั่น 50 µl และมี *Taq* polymerase 2.5 units เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นำ PCR reaction mixture เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ (PCR thermal cycler) ซึ่งประกอบด้วยขั้นทำให้ดีเอ็นเอแยกสาย (DNA denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนทำให้ primer จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (template DNA)(primer-template annealing) ที่ 55 °C เป็นเวลา 2 นาที และขั้นตอนที่ดีเอ็นเอยืดสาย (primer extension) ที่ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที โดยปฏิกิริยาทั้งหมดทำซ้ำกันจนครบ 35 รอบ โดยในรอบที่ 35 ในขั้นตอนที่ดีเอ็นเอยืดสายจะเพิ่มเวลาเป็น 7 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาโดยสมบูรณ์

การตรวจผลิตผล PCR โดย agarose gel electrophoresis

เตรียมอะกาโรสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยชั่งอะกาโรส 1 g ละลายใน TAE บัฟเฟอร์ 100 ml โดยนำไปต้มจนเดือด เขย่าให้อะกาโรสเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 50 ถึง 60 °C นำไปเทลงบน gel chamber ที่จัดไว้ แล้วใส่ comb ทิ้งไว้จนแข็งตัว เติม TAE ลงไปบนหน้าเจลพอท่วมเพื่อช่วยให้ดึง comb ออกได้ง่ายขึ้นและเป็นการป้องกันไม่ให้หลุม (well) ในเจลแตก ค่อย ๆ ดึง comb ออกโดยดึงปลายทั้ง 2 ข้างออกพร้อม ๆ กัน ระวังอย่าให้มีการฉีกขาดของเจลแล้วนำไปใส่ใน eletrophoresis chamber ซึ่งมี TAE อยู่ในปริมาณที่ท่วมหน้าเจลนำ PCR product 5 µl ผสมกับ loading dye 1 µl ใช้ไมโครปิเปตต์หยอดแต่ละตัวอย่างลงในหลุมเจลโดยเรียงลำดับและจดบันทึกไว้ ใช้ λ/*Hin*d III เป็นดีเอ็นบอกขนาด (marker) เพื่อเปรียบเทียบขนาดโดยประมาณของผลิตผล PCR ปิดฝา electrophoresis chamber ต่อขั้วอิเล็กโทรดเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้าที่มีแรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงสุด 250 V จัดให้ดีเอ็นเอวิ่งเข้าหาขั้วบวกใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 V เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 µg/µl เป็นเวลา 15 นาที นำไปดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตจากแหล่งกำเนิดแสง(UV transilluminator) และถ่ายภาพไว้เพื่อวัดขนาดของแถบดีเอ็นเอต่อไป โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอบอกขนาด (λ/*Hin*d III/*Eco*R I) (Sambrook et al., 1989)

การวิเคราะห์ผลิตผล PCR โดย Southern blot hybridization ด้วย ECL-3-oligolabelling และ detection system

ภายหลังจากการตรวจสอบผลิตผล PCR โดย agarose gel electrophoresis ย้ายเจลนี้สู่ภาชนะที่มี 0.25N HCl พอท่วมเจลนาน 15 นาที เพื่อเป็นการทำให้ดีเอ็นเอเป็นสายสั้นลง เทสารละลายกรดนี้ออก ล้างเจล

ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เติม 0.5 N NaOH พอท่วมเจลนาน 30 นาที เพื่อเป็นการทำให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว เทสารละลายนี้ออกเติม 10XSSC ลงไปให้ท่วมเจลนาน 5 นาที

1 การขนถ่ายดีเอ็นเอ

นำไนล่อนเมมเบรน (nylon membrane) และกระดาษกรองขนาดเท่าแผ่นเจลจุ่มในน้ำให้เปียกแล้วแช่ใน 10XSSC จัดอุปกรณ์การขนถ่ายโดยวางแผ่นกระดาษกรอง 2 แผ่น ลงไปตรงกลางของแผ่นพลาสติกที่ช่องตรงกลาง (window gasket) วางแผ่นไนล่อนเมมเบรนทับบนกระดาษกรองซึ่งอยู่ในตำแหน่งช่องตรงกลางของแผ่นพลาสติก นำแผ่นเจลวางทับบนแผ่นไนล่อนเมมเบรน เติม 10XSSC พอท่วมเจล เปิดเครื่องดูดสุญญากาศค่อย ๆ หมุนให้ความดันเท่ากับ 5 นิ้วของปรอท เมื่อครบ 90 นาที ปิดเครื่องดูดสุญญากาศนำไนล่อนเมมเบรนไปแช่ใน 2XSSC นาน 5 นาที ใช้ปากคีบจับแผ่นไนล่อนเมมเบรนวางลงบนกระดาษกรอง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หุ้มแผ่นไนล่อนเมมเบรนด้วยแผ่นพลาสติกใส ทำให้ดีเอ็นเอเป็นสายสั้นลงและยึดติดแน่นกับแผ่นไนลอนเม็มเบรน (cross linking) โดยผ่านแสงอุลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 nm นาน 2 นาที นำไปเก็บไว้ที่ 4 °C เพื่อรอขั้นตอนต่อไป (Sambrook et al., 1989)

2 การติดฉลากบน oligonucleotide โดยวิธี enhanced chemiluminescence (ECL), Amersham

เตรียม reaction mixture ที่มีส่วนประกอบดังนี้

น้ำกลั่นบริสุทธิ์	117	µl
oligonucleotide (SQ_2)(100 pmole)	1	µl
cacodylate บัฟเฟอร์	16	µl
fluorescein-11-dUTP	10	µl
Terminal transferase	16	µl
ปริมาตรรวม	160	µl

ผสมให้เข้ากันนำไปอุ่นที่ 37 °C นาน 90 นาที เก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อรอ hybridize ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 การทำ hybridization

เท hybridization บัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วย blocking agentร้อยละ 0.5, hybridization buffer component ร้อยละ 0.1, 5XSSC และ SDS ร้อยละ 0.02 จำนวน 20 ml ลงใน กล่องพลาสติก อุ่นที่อุณหภูมิ 50 °C ผสมให้เข้ากันโดยใช้ตู้เขย่า วางแผ่นไนล่อนเมมเบรนลงไปเปิดให้เครื่องทำงานต่อจนครบ 30 นาที เติม oligonucleotide ที่ติดฉลากแล้วลงไปในสารละลาย โดยให้มีความเข้มข้น 5 ถึง 10 ng/ml เขย่าต่อจนครบ 1 ชั่วโมงในตู้เขย่า หลังจากนั้นล้างแผ่นไนล่อนเมมเบรนด้วยสารละลายซึ่งประกอบด้วย 5 X SSC และ SDS ร้อยละ 1 นาน 5 นาที 2 ครั้ง ล้างต่อด้วยบัฟเฟอร์ 1 ซึ่งประกอบด้วย 0.15 M NaCl และ 0.1 M Tris, pH 7.5 เป็นเวลา 1 นาที และ blocking solution ประกอบด้วย blocking agent ร้อยละ 0.5 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 เขย่าต่อที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1 อีกครั้งประมาณ 1 นาที แล้วจึงนำแผ่นไนล่อนเมมเบรนไปใส่ในสารละลาย antibody-conjugate ที่เจือจางซึ่งมีส่วนประกอบคือ antifluorescein HRP conjugate 1 ส่วน ใน 1,000 ส่วน ของ bovine serum albumin (fraction V) ในบัฟเฟอร์ 2 ซึ่งประกอบด้วย 0.4 M NaCl และ 0.1 M Tris, pH 7.5 เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วล้างแผ่นไนล่อนเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ 2 นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จนครบ 4 ครั้ง

4 การตรวจสอบสัญญาณ (detection)

ผสมสารละลาย detection 1 และสารละลาย detection 2 ในสัดส่วน เท่า ๆ กันโดยใช้ปริมาตร 0.1 ml/cm^3 ของแผ่นไนล่อนเมมเบรนในกล่องพลาสติก นำไนล่อนเมมเบรนจากบัฟเฟอร์ 2 วางลงไป ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที หุ้มแผ่นเมมเบรนด้วยแผ่นพลาสติกใส แล้ววางใน X-ray cassette โดยให้ด้านที่มีดีเอ็นเออยู่ด้านบน ประกบด้วยแผ่นฟิล์ม X-ray ในที่มืด นาน 5 นาที ล้างแผ่นฟิล์มด้วยน้ำยา developer และ fixer ตามลำดับ ล้างแผ่นฟิล์มด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

การเชื่อมผลิตผล PCR กับ pUC119

1 ใช้เอ็นไซม์ตัดเฉพาะภายใน (endonucleases) เพื่อทำให้เกิดปลายเหนียว (cohesive termini)

นำผลิตผล PCR ทั้งหมดที่เหลือมาตกตะกอนโดย ethanol precipitation แล้วทำให้แห้ง reaction mixture สำหรับการย่อยดังนี้

ดีเอ็นเอละลายน้ำบริสุทธิ์	89	µl
10X บัฟเฟอร์	10	µl
เอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน	1	µl
รวมปริมาตร	100	µl

ย่อยปลาย 5' ของผลิตผล PCR ด้วย *Bcl* I ใช้บัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCl 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, NaCl 5 mM และ DTT 0.1 mM pH 7.9 ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 4 ถึง 6 ชั่วโมง ตกตะกอนดีเอ็นเอ ทำให้แห้งแล้วทำการย่อยปลายด้าน 3' ด้วย *Hind* III ใช้บัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCl 0.6 mM, $MgCl_2$ 0.6 mM, NaCl 5 mM และ DTT 0.1 mM pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ถึง 6 ชั่วโมง ตกตะกอนดีเอ็นเอแล้วทำให้แห้งอีกครั้ง

ในส่วนของ pUC119 ทำการย่อยส่วน polycloning sites ด้วย *BamH* I โดยใช้บัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCl 0.6 mM, $MgCl_2$ 0.6 mM, NaCl 10 mM และ DTT 0.1 mM pH 7.5 และ *Hind* III ใช้บัฟเฟอร์ดังกล่าวข้างต้น ย่อยที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ถึง 6 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนด้วยวิธี ethanol precipitation ทำให้แห้ง (Sambrook et al., 1989)

2 แยกส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการและทำให้บริสุทธิ์

นำผลิตผล PCR และ pUC119 ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายในจากข้อ 10.1 ละลายใน TE บัฟเฟอร์ 10 µl เติม loading dye 2 µl นำไปแยกแถบดีเอ็นเอโดยทำอิเล็คโตรโฟลิซีส (electrophoresis) ใช้ low melting agarose ร้อยละ 1 หลังจากย้อมด้วย ethidium bromide นำไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดูด้วยเครื่องกำเนิดแสง (UV transilluminator) เพื่อตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการโดยใช้ใบมีดโกนตัดให้มีปริมาตรของเจลน้อยที่สุดใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml

เติมสารละลาย NaI ประมาณ 750 µl เพื่อละลายเจลนำไปหลอมที่อุณหภูมิ 50 ถึง 60 °C 1 ชั่วโมงหรือจนเจลละลายหมด เติม glass milk 10 µl เขย่าให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำแข็ง คว่ำหลอดทดลองทุก ๆ 5 นาที เพื่อให้ glass milk กระจายตัวในสารละลายเพื่อให้ดีเอ็นเอจับได้ทั่วถึง ทิ้งไว้จนครบ 30 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C 1 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำการล้างเจลที่ปะปนติดกับ glass milk โดยเติม New Wash (Bio 101) ที่เย็นจัด (โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C) ประมาณ 750 µl ใช้ไมโครปิเปตต์ขนาด 1,000 µl ดูดสารผสมดังกล่าวขึ้นลงอย่างแรงประมาณ 5 นาที นำไปปั่นที่ 4 °C ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วเทสารละลายส่วนบนทิ้ง จะได้ glass milk ที่มีดีเอ็นเอเกาะอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง เติม TE บัฟเฟอร์ 100 µl เขย่าให้เข้ากัน นำไปใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °C 15 นาที ปั่นให้ glass milk ตกตะกอนด้วยความเร็วและเวลาเท่าเดิม ดูดสารละลายส่วนบนที่มีดีเอ็นเอใส่ในหลอดทดลอง 1.5 ml ตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี ethanol precipitation ทิ้งให้แห้ง (Sambrook et al., 1989)

3 การเชื่อม PCR product กับ pUC119

ละลายผลิตผล PCR และ pUC119 ที่เตรียมจากข้อ 9.2 ด้วย TE บัฟเฟอร์ หลอดละ 10 µl เตรียม ligation mixture โดยเติมสารต่าง ๆ ดังนี้

PCR product/ *Bcl* I & *Hind* III digest	6	µl
pUC119/ *BamH* I & *Hind* III digest	2	µl
10x ligation บัฟเฟอร์	1.5	µl

(ประกอบด้วย 300mM Tris-HCl, pH 7.8, 100mM $MgCl_2$, 100mM DTT และ 5mM dATP)

น้ำบริสุทธิ์	4.5	µl
T4 DNA ligase	1	µl
ปริมาตรรวม	15	µl

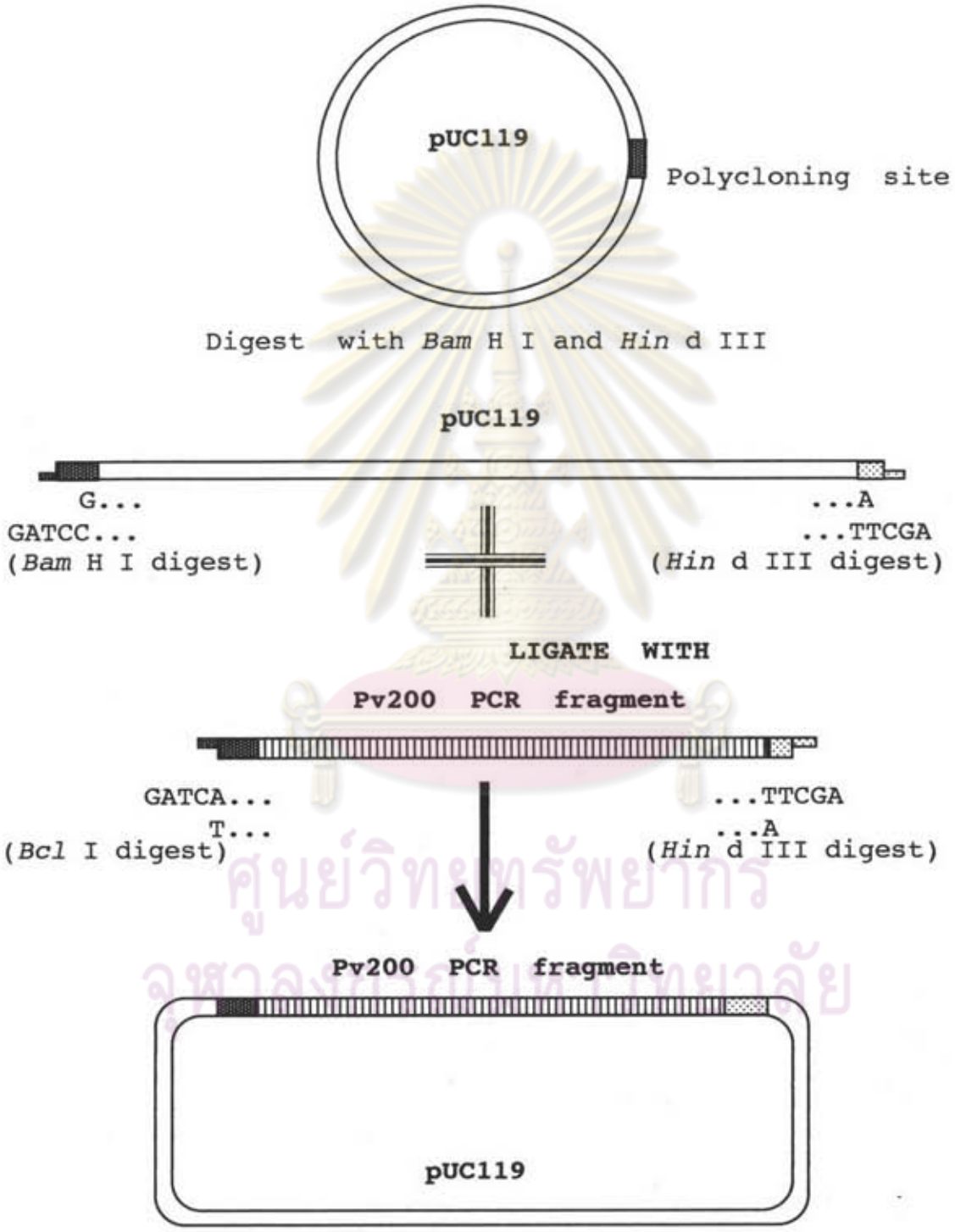
ภายหลังจากผสมให้เข้ากันนำไปใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 15 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน

แผนภาพแสดงการเชื่อมระหว่างดีเอ็นเอ Pv200 จากผลิตผล PCR และ pUC119 โดยอาศัยปลายที่สามารถเชื่อมต่อกันได้แสดงในรูปที่ 3

การเตรียม *Escherichia coli* strain JM 109 competent cell

นำ *E.coli* strain JM109 จาก stock มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด Luria Bertani (LB broth) 3 ml นำไปใส่ในตู้เขย่าเชื้อ (shaker incubator) อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน เขย่าด้วยความเร็วสูงประมาณ 170 รอบต่อนาที หลังจากนั้นดูด *E.coli* ที่เจริญเต็มที่ จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวดังกล่าว ประมาณ 300 ถึง 500 µl ใส่ลงในขวดเลี้ยงเชื้อ (culture flask) ขนาด 500 ml ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอยู่ประมาณ 100 ml นำไปใส่ในตู้เขย่าเชื้อ ที่สภาวะเดิมใช้เวลาประมาณ 3 ถึง 4 ชั่วโมง หรือนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี *E.coli* เจริญอยู่ วัดค่า O.D. ที่ 600 nm โดยมีค่าที่เหมาะสมประมาณ 0.1 ถึง 0.2 ซึ่งมีจำนวนเซลไม่เกิน 10^8 เซลล์ซึ่งจะเป็นระยะที่ *E.coli* เจริญในช่วง logarithmic ทำการขนถ่ายเชื้อสู่หลอดทดลองขนาด 50 ml ที่มีฝาปิด แช่ในน้ำแข็งจนเย็นประมาณ 10 ถึง 15 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษซับที่สะอาดประมาณ 1 นาที เติม 0.1 M $CaCl_2$ อุณหภูมิ 4 °C 10 ml ลงในหลอดทดลองที่มีตะกอนของ *E.coli* อยู่ด้วยปิดฝาหลอดผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งประมาณ 6 ชั่วโมงหรือข้ามคืนแล้วนำไปปั่นให้ *E.coli* ตกตะกอนที่สภาวะเดิม เทสารละลายส่วนบนทิ้งจะได้ตะกอน *E.coli*

Figure 3 Diagram showing ligation of Pv200 PCR fragment with pUC119.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่ก้นหลอด เติมสารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ ที่เย็น อุณหภูมิ 4 °C, 2 ml เขย่าให้กระจายตัวในสารละลายแช่ในน้ำแข็ง แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดละประมาณ 200 µl ซึ่งแช่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา (Sambrook et al., 1989)

การนำดีเอ็นเอเข้าสู่ *E.coli* (transformation)

นำ ligation mixture จากข้อ 9 มาเติมลงในหลอดทดลองที่มี competent *E.coli* อยู่เขย่าเบาๆ นำไปแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่องให้ความร้อน (heat block) ที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 42 °C นาน 90 วินาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งอีกครั้งประมาณ 2 นาที แล้วถ่ายส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอยู่ 1.5 ml นำไปเขย่าอย่างแรงด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ในตู้เขย่าเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Sambrook et al., 1989)

การแยกโคโลนีของ *E.coli* ที่มี phagemid ดีเอ็นเอ กับโคโลนีที่มี phagemid อย่างเดียว

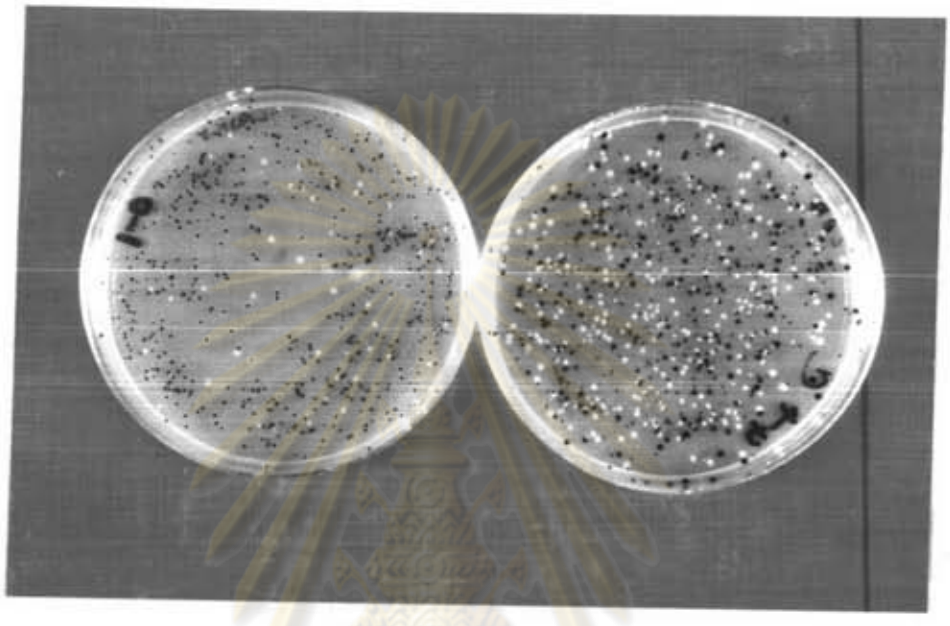
ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) แบ่งตัวอย่างที่ได้ในข้อ 11 มา 1 ml แล้วเจือจางตามลำดับ (serial dilution) เป็น 1:10, 1:100, 1:1,000 และ 1: 10,000 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเป็นตัวทำให้เจือจาง ใช้ตัวอย่างจากการทำเจือจางตามลำดับดังกล่าว 200 µl หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (LB agar) ที่มีเอมพิซิลิน 100 µg/ml IPTG 2 µmole/ml และ X-gal 0.04 µg/ml ใช้แท่งแก้วที่สะอาดกระจายตัวอย่างให้สม่ำเสมอทั่วจานเลี้ยงเชื้อ โดยหมุนจานเลี้ยงเชื้อในขณะที่ไถแท่งแก้วปลายป้านไปมาตลอดเวลาจนแห้ง นำไปใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 37 °C โดยคว่ำจานเลี้ยงเชื้อเพื่อไม่ให้ไอน้ำที่เกาะบนฝาจับตัวกันและหล่นลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้

ข้ามคืน วันรุ่งขึ้นเลือกจานเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีของ *E. coli* ขึ้นกระจายสม่ำเสมอมาเลือกโคโลนีที่ต้องการโดยโคโลนีที่เป็นสีขาวเกิดจาก insertional inactivation ของยีนที่สร้างเอ็นไซม์ β-galactosidase (lacZ) ในส่วน polycloning sites ในขณะที่สีน้ำเงินจะเป็นโคโลนีที่มี phagemid อย่างเดียว (Sambrook et al., 1989) ดังแสดงในรูปที่ 4

การตรวจสอบยืนยันโคโลนีของ *E.coli* สีขาวมีส่วนของยีน Pv200 แทรกอยู่

เลือกโคโลนีสีขาวที่อยู่เดี่ยว ๆ ใช้หมึกวงเป็นเครื่องหมายและเขียนหมายเลขไว้ที่ด้านนอกของจานเลี้ยงเชื้อ เลือกประมาณ 10 โคโลนีต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จิ้มบางส่วนของโคโลนีใส่ลงในหลอดเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ml ที่มีเอมพิซิลิน 100 µg/ml ทำเครื่องหมายให้ตรงแต่ละหลอด นำไปใส่ในตู้เขย่าเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าข้ามคืนด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที วันรุ่งขึ้น *E. coli* จะเจริญเต็มที่จนอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น ใช้พาสเจอร์ปิเปตขนถ่ายสู่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่มีฝาปิด นำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที *E.coli* จะตกตะกอนแน่นบริเวณก้นหลอด เทสารละลายข้างบนทิ้ง เติมสารละลาย GTE ซึ่งประกอบด้วย glucose 50 mM, Tris-HCl pH 8.0 25 mM และ 10 mM EDTA pH 8.0 ลงไป 500 µl เขย่าอย่างแรงเพื่อให้ *E. coli* กระจายตัวในสารละลาย นำไปปั่นอีกครั้งที่สภาวะเดิมและเทสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วเติมสารละลาย GTE 50 µl เขย่าอย่างแรงเพื่อให้ *E. coli* กระจายในสารละลาย เติม GTE ที่มี lysozyme 200 µg/ml ในปริมาณ 50 µl ดีดก้นหลอดเบา ๆ ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมสารละลาย 0.2N NaOH/SDS ร้อยละ 1 จำนวน 200 µl ดีดก้นหลอดเบา ๆ ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วเติม 3M sodium acetate pH 5.2 ปริมาณ 150 µl คว่ำหลอดไปมาให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำแข็ง 20 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว

Figure 4 Photograph showing blue and white colonies of *Escherichai coli* on LB agar plate containing ampicillin, IPTG and X-gal.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนที่มีดีเอ็นเออยู่ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ใหม่ ทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากโปรตีนและสิ่งเจือปนโดย phenol/chloroform extraction ดังวิธีในขั้นตอนที่ 4 หลังจากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอโดยวิธี ethanol precipitation ทำให้แห้ง เติม TE บัฟเฟอร์ 35 µl ทิ้งไว้จนดีเอ็นเอละลายดีแล้วแบ่งดีเอ็นเอใน TE บัฟเฟอร์ 5 µl มาทำการย่อยด้วย *Hind* III ในสภาวะทำนองเดียวกับขั้นตอนที่ 9.1 แล้ววิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง โดย agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอบอกขนาด λ/*Hind* III ตัวอย่างที่มี phagemid ดีเอ็นเอจะมีความยาวเท่ากับ pUC119 รวมกับผลิตผล PCR ซึ่งมีขนาดประมาณ 4.2 kb (Sambrook et al., 1989)

การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ (template) สำหรับการหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

ใช้ phagemid จากข้อ 12 เติมเอ็นไซม์ RNase 10 units หรือ 1 µl อุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเติม 2N NaCl/ polyethylene glycol ร้อยละ 20 จำนวน 30 µl เขย่าให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำแข็ง 1 ชั่วโมงแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างเกลือที่ปะปนอยู่กับตะกอนข้างล่างหลอดด้วย ethanol ร้อยละ 70 ที่เย็น 500 µl นำไปปั่นด้วยความเร็วเท่าเดิมเป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งจะได้ดีเอ็นเอที่ปราศจากอาร์เอนเอที่ก้นหลอด ทิ้งให้แห้งแล้วเติม TE บัฟเฟอร์ 16 µl สารละลาย 0.2mM EDTA, pH 8.0 จำนวน 2 µl และ 2N NaOH 2 µl ทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม 3M sodium acetate, pH 5.2 จำนวน 8 µl และ absolute ethanol 100 µl นำไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 °C 1 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างเกลือที่อาจปะปนอยู่ด้วย ethanol ร้อยละ

70 จำนวน 500 µl เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำให้แห้ง จะได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA) ที่ก้นหลอด (Chen et al., 1985)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี dideoxy chain termination สำหรับ ดีเอ็นเอ sequencing

1 ขั้นตอน annealing

นำดีเอ็นเอแม่แบบ (templete DNA) ที่ได้จากข้อ 13 ละลายในน้ำ 7 µl เติม Sequenase บัฟเฟอร์ (5X) 2 µl ประกอบด้วย 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$, 250 mM NaCl และ sequencing primer ความเข้มข้น 0.5 pmole/µl ปริมาณ 1 ถึง 2 µl ในการศึกษานี้ใช้ sequencing primers สำหรับแต่ละตัวอย่างดังนี้

(1) Forward primer : 5'-GTTTTTCCCAGTCACGAC-3'

(2) SQ1 primer : 5'-GGAAATTGACAAGTTGAAGG-3'
(ตรงกับ nucleotide ที่ 2058 ถึง 2077 ของ Sal-1 strain)

(3) SQ2 primer : 5'-CTTACGCATGTCACAAGCAC-3'
(complementary strand ตรงกับ nucleotide ที่ 2537 ถึง 2556 ของ Sal-1 strain)

(4) Reverse primer : 5'-CAGGAAACAGCTATATGAC-3'

ทำการผสม anneaing mixture ดังกล่าวให้เข้ากันนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 2 นาที ทำให้เย็นลงอย่างช้า ๆ ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยใช้เวลาประมาณ 15 ถึง 30 นาที เก็บไว้ในน้ำแข็งเพื่อขั้นตอนต่อไป

2 เตรียม labeling reaction

ประกอบด้วย

annealed DNA mixture (จากข้อ 14.1)	10	µl
0.1 M DTT	1	µl
labeling mix	2	µl

(1.25 µM dGTP, 1.25 µM dCTP และ 1.25 µM dTTP)

^{35}S α dATP	0.1	µl
Sequenase version 2.0	2	µl

(modified T7 DNA polymerase)

(เจือจางโดยใช้ enzyme dilution บัฟเฟอร์ 8 ส่วน ประกอบด้วย 10 mM Tris HCL pH 7.5, 5 mM DTT และ bovine serum albumin 0.5 mg/ml ผสมกับ Sequenase version 2.0 จำนวน 1 ส่วน)

เมื่อผสมให้เข้ากันดีแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ถึง 5 นาที

3 การดำเนินปฏิกิริยา extension และ termination

แบ่งออกเป็น 4 ส่วน ส่วนละ 3.5 µl นำไปเติมในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml 4 หลอดที่มี 80 µM dATP, 80 µM dGTP, 80 µM dCTP, 80 µM dTTP และ 50 mM NaCl โดยแต่ละหลอดมีองค์ประกอบของ dideoxynucleotide ต่างกันดังนี้

หลอดที่ 1 ddG termination mix ประกอบด้วย 8 µM ddGTP

หลอดที่ 2 ddA termination mix ประกอบด้วย 8 µM ddATP

หลอดที่ 3 ddT termination mix ประกอบด้วย 8 µM ddTTP

หลอดที่ 4 ddC termination mix ประกอบด้วย 8 µM ddCTP

ทำปฏิกิริยา extension/termination โดยอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที เติม stop solution 4 µl ซึ่งประกอบด้วย formamide ร้อยละ 95, 25 mM EDTA, bromophenol blue ร้อยละ 0.05 และ xylene cyanole FF ร้อยละ 0.05 เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนี้สามารถนำไปวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C (Sanger et al., 1977)

Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

1 ล้างแผ่นกระจกขนาด 20 X 60 cm ให้สะอาดเคลือบกระจกด้านหนึ่งด้วย silicone (Sigmacote) ปิดขอบกระจกด้วยเทปพลาสติก

2 เตรียม TBE gel mix ร้อยละ 0.5 ซึ่งประกอบด้วย acrylamide ร้อยละ 40 จำนวน 30 ml, 10XTBE 10 ml และยูเรียบริสุทธิ์ (ultrapure urea) 92 g ปรับปริมาตรเป็น 200 ml ด้วยน้ำบริสุทธิ์ กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman 3MM สารละลายดังกล่าวสามารถเก็บไว้ได้ประมาณ 1 เดือนที่อุณหภูมิ 4 °C

3 เตรียม denaturing polyacrylamide gel ร้อยละ 6 โดยผสม TBE gel mix ร้อยละ 0.5 จำนวน 100 ml กับ ammonium persulfate (250 mg/ml) 210 µl และ TEMED (N,N,N,N-tetramethylenediamine) 210 µl ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว เทใส่ในช่องระหว่างแผ่นกระจกจนเต็มระวังอย่าให้มีฟองอากาศ นำแผ่น comb ด้านเรียบใส่ลงขอบบนของเจลลึกประมาณ 0.5 mm ทิ้งไว้ประมาณ 1 ถึง 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องเจลจะเกิด polymerization จนสมบูรณ์จึงแกะเทปพลาสติกที่ขอบกระจกออกนำไปติดตั้งกับ electrophoresis apparatus เติม 1XTBE บัฟเฟอร์ลงในบัฟเฟอร์ chamber ทั้งด้านบนและด้านล่างจึงกลับด้านของ comb ให้ปลายแหลมแตะขอบบนของเจล ต่อขั้วอิเล็คโทรดกับเครื่องกำเนิดไฟฟ้าชนิดแรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงสุด 3000 V ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 25 mA เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้การเหนี่ยวนำกระแสไฟฟ้าในแผ่น เจล สม่ำเสมอกัน ปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าชั่วคราว ใช้ปิเปตต์ขนาด 100 ml ดูดไล่ยูเรียที่อยู่ในหลุมด้านบนนำ sequencing reaction 3 µl ใส่ลงในแต่ละช่องโดยใช้ sequencing pipette ขนาด 3 µl สำหรับตัวอย่างหนึ่ง ๆ จัดให้ลำดับของ sequencing reaction อยู่ชิดกันเรียงลำดับจากซ้ายไปขวาของแต่ละแถวเป็น G, A, T, C พร้อมกับจดบันทึกไว้ เปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 25 mA ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง (Sambrook et al., 1989)

การบันทึกสัญญาณกัมมันตรังสีบนแผ่นฟิล์ม (autoradiography)

ปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าเมื่อแถบสีน้ำเงินถึงขอบล่างของเจลนำกระจกออกจาก sequencing apparatus แกะกระจกออกจากกันโดยให้เจลติดที่แผ่นใดแผ่นหนึ่งทำให้เจลคงสภาพโดยแช่ในสารละลาย methanol ร้อยละ 10 ผสมกับกรด acetic ร้อยละ 10 ประมาณ 15 นาทีนำกระดาษกรอง Whatman 3MM วางบนแผ่นเจลเพื่อลอกออกจากแผ่นกระจก ใช้แผ่นพลาสติก (Saran wrap) คลุมลงบนเจล ทำให้เจลแห้งโดยใช้ gel dryer ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที เจลจะแห้งติดกับแผ่นกระดาษกรอง นำไปประกบกับแผ่นฟิล์ม X-ray ใน cassette เป็นเวลา 16 ถึง 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง การล้างฟิล์มทำในห้องมืดที่มี safety light โดยแช่แผ่นฟิล์มลงใน developer 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยกรด acetic ร้อยละ 3 เป็นเวลา 2 นาที และทำให้ฟิล์มคงสภาพด้วย fixer 5 นาที ล้างน้ำประปาให้สะอาด ทำให้แห้ง แถบสีดำของดีเอ็นเอจะปรากฏบนแผ่นฟิล์มเรียงตามลำดับของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างดังกล่าวข้างต้น ตัวอย่างวิธีการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในภาพที่ 5 (Sambrook et al., 1989)

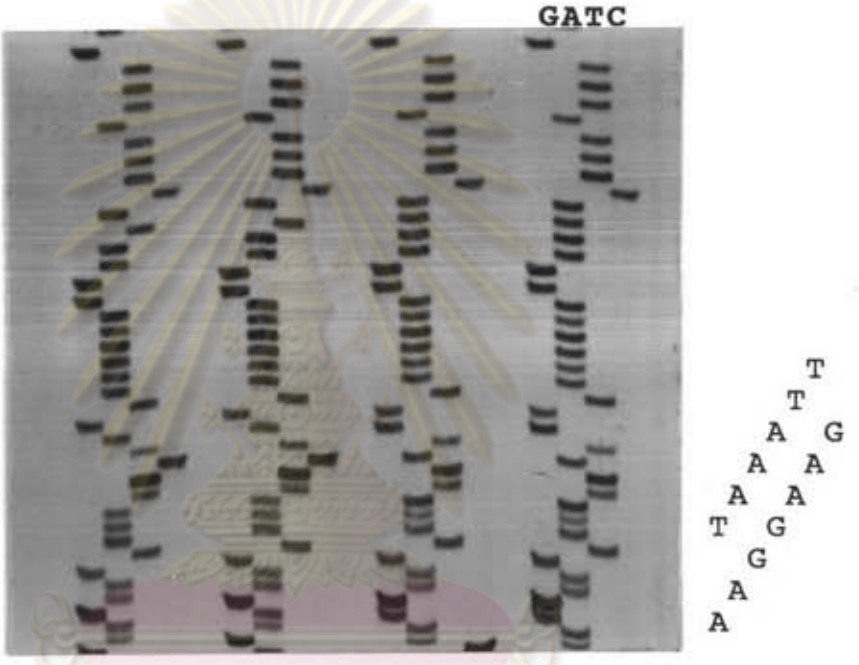
การบันทึกผลในแต่ละตัวอย่างนั้นจะต้องทำการตรวจสอบยืนยันข้อมูลที่ได้โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำอย่างน้อยจาก 2 recombinant subclones ในเชื้อมาลาเรียไอโซเลตเดียวกัน

การทำ direct sequencing โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

สำหรับในกรณีที่เกิดปัญหาการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์หรือไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้โดยวิธี dideoxy chain termination ในบางตัวอย่าง เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มีความแตกต่างจากกลุ่มตัวอย่างอื่น ๆ ที่ได้ทำมา การทำ direct sequencing จะเป็นการช่วยตรวจสอบข้อมูลที่ได้ให้ถูกต้องยิ่งขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure 5 Autoradiogragh of DNA sequencing by the dideoxy chain-termination technique (Sanger et al., 1977). Sequences are sequentially read from bottom to top according to the bands in each lane.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การดำเนินปฏิกิริยา direct incorporation และ extension/ termination โดยขั้นตอนที่แนะนำในคู่มือ fmol™ Sequencing System (TM024), Promega ดังนี้

1.เตรียมหลอดทดลองที่มีฝาปิดขนาด 0.5 ml เติม termination mixture (dNTP/ddNTP) หลอดละ 2 µl เก็บไว้ในน้ำแข็งเพื่อรอขั้นตอนต่อไป

2.เตรียมส่วนประกอบของ sequencing reaction ในหลอดทดลองที่มีฝาปิดขนาด 1.5 ml สำหรับแต่ละชุดของการทำ sequencing ประกอบด้วย

ดีเอ็นเอแม่แบบ	500	fmole
(ผลิตผล PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย GeneClean II)		
Primer	3	pmole
α-S^{35} dATP (10µCi/ml)	2.5	µl
5 X Sequencing บัฟเฟอร์	5	µl
(ประกอบด้วย 50 mM Tris, pH 9.0 และ 10 mM $MgCl_2$)		
เติมน้ำบริสุทธิ์ให้ได้ปริมาตรสุทธิ	16	µl

3.เติม Sequencing grade *Taq* DNA polymerase (5 units/µl) 1 µl ลงใน primer/template mix (ข้อ 2) ผสมให้เข้ากัน

4.แบ่งสารละลายจากข้อ 3 ลงในหลอดที่มี dNTP/ddNTP หลอดละ 4 µl ผสมให้เข้ากัน เติม mineral oil หลอดละ 20 µl

5.นำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ โดยเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 2 นาที ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสซึ่งประกอบด้วย ขั้นทำให้ดีเอ็นเอแยกสาย ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนทำให้ primer จับกับ ดีเอ็นเอแม่แบบที่ 42 °C เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอนที่ดีเอ็นเอยืดสาย ที่ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที โดยปฏิกิริยาทั้งหมดทำซ้ำกันจนครบ 30 รอบ หลังจากนั้นเติม stop solution หลอดละ 3 µl เพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากัน สำหรับในขั้นตอนต่อไปดำเนินเช่นเดียวข้อ 16 ถึง 17