บทที่ 2

เครื่องมือ วัสดุ-เคมีภัณฑ์ และ วิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อเครื่องมือ	แบบ	บริษัท
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	PHM83 Autocal	Radiometer Copenhegen, Denmark
เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated-Centrifuge)	J-21C	Beckman Instrument Inc., U.S.A.
เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงขนาดเล็ก (High Speed Micro-centrifuge)	MC-15A	Tomy-Seiko, Japan
เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave)	HA-30	Hirayama Manufacturing Coporation, Japan
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)	BM-600	Memmert GmbH, Germany
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking water bath)	OIPF 623	New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A.

ชื่อเครื่องมือ	แบบ	บริษัท
เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	A466	Chalies Hearson & Co. Ltd., England
เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)	K-550G	Scientific Industries Inc., U.S.A.
เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transluminator)	2011 Macrovue	San Gabriel California, U.S.A.
เครื่องกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนต์ (Light box)	2859 SHANDON	Shandon Scientific Co. Ltd., London England
เครื่องกำเนิดแสงสีแดง (Adjustable savelight-lamp)	1521541 KODAK 6B	Eastman Kodak Company, U.S.A.
ปิเปตต์อัตโนมัติ (Autopipette)	Pipetman P20 P100, P200	Gilson Medical - Electronics S.A., France

2.2 วัสดุภัณฑ์

ชื่อวัสดุภัณฑ์	แบบ	บริษัท
กระดาษกรอง	HA 0.45 μm	Millipore Coporation, U.S.A.
กระดาษกรอง	Whatman 3mm Chr	Whatman International Ltd., England
แผ่นไนลอนเมมเบรน	ชนิดประจุบวก	Boehringer Mannheim GmbH, Germany
ฟิล์มถ่ายรูปขาวดำ	Kodak Tri x-pan400	Eastman Kodak Company, U.S.A.
ฟิล์ม x-ray	Xk-5	Eastman Kodak Company, U.S.A.

2.3 เคมีภัณฑ์

ก. สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยเป็นเกรดห้องปฏิบัติการ (Labolatory grade)

ข. เอนไซม์

เรสทริกชันเอนไซม์

*Alu*I, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hae*III, *Hind*III, *Sca*I, *Xba*I บริษัท Bethesda Research Laboratories, U.S.A.

*Nde*I, *Pvu*II บริษัท Biolabs, U.S.A.

T_4 DNA ligase บริษัท Biolabs, U.S.A.

Lysozyme บริษัท SERVA Feinbiochemica GmbH & Co., Germany.

Ribonuclease A บริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A.

Proteinase K บริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A.

ค. ชุดการติดฉลากและการติดตามผล (DNA Labelling and Detection Kit) บริษัท Boehringer Mannheim GmbH, Germany. ประกอบด้วย

Unlabelled control DNA

Labelled control DNA

DNA dillution buffer

Hexanucleotide mixture (10x)

dNTP Labelling mixture (10x)

Klenow enzyme, Labelling grade

anti-DIG-alkaline phosphatase

NBT

x phosphate solution

และ Blocking reagent

2.4 ดีเอ็นเอพาหะ

ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการทดลองนี้คือพลาสมิด pBR322 (Bolivar และคณะ, 1977) ซึ่งมีขนาด 4.363 กิโลเบส มีจีนต้านยาแอมพิซิลลินและเททร้าซัยคลิน (ภาคผนวกที่ 1) และพลาสมิด pUC18 (Maniatis และคณะ, 1982) ซึ่งมีขนาดประมาณ 2.686 กิโลเบส มีจีนต้านยาแอมพิซิลลิน และจีน *lacZ* ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นชิ้นส่วนด้านปลายอะมิโนของเอนไซม์ β-galactosidase (ภาคผนวกที่ 2)

2.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองสำหรับเทียบขนาดคือ แลมบ์ดาดีเอ็นเอ (DNA) ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 7 ขนาด คือ 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027 และ 0.689 กิโลเบส

ตามลำดับ (Rodriguez และ Tait, 1983)

2.6 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α : F^- 80d *lac*Z ΔM15 *end*A11 *rec*A1 *nsd*R17 (r_k^- m_k^-) *sup* E44 *thi*-1 r^- *gyr*A96 *rel*A1 Δ (*lac*ZYA-*arg*F) U169 (Raligh และคณะ, 1969)

2.7 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ จะแบ่งเป็นการเก็บในระยะสั้นและระยะยาว โดยการเก็บในระยะสั้นจะเก็บไว้ในรูปของ Slant LB-agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการ subculture ทุก 3 เดือน หรืออาจเก็บในรูปจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการ subculture ทุก 1 เดือน

สำหรับการเก็บในระยะยาวจะเตรียมโดย นำเชื้อที่ต้องการเก็บเจริญจนถึงระยะล็อก (OD_{600} = 0.3-0.5) ในอาหารอุดม LB 1 มิลลิลิตร ผสมกับกลีเซอรอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ จะสามารถเก็บรักษาได้ประมาณ 1 ปี

2.8 ตัวอย่างผึ้งโพรง (*Apis cerana*)

ตัวอย่างผึ้งโพรงที่ใช้สำหรับการเตรียมดีเอ็นเอติดตาม ได้รับจากหน่วยวิจัยชีววิทยาผึ้ง ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้ผึ้งในระยะดักแด้ ที่มีอายุประมาณ 11-13 วัน หลังจากเก็บตัวอย่างแล้ว ทำการสกัดส่วนของดีเอ็นเอทันทีในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะเป็นวิธีที่ทำให้ได้เฉพาะส่วนของโครโมโซมัลดีเอ็นเอเท่านั้น

สำหรับตัวอย่างที่ใช้เพื่อ การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประเทศไทย ได้ร่วมมือกับหน่วยวิจัยชีววิทยาผึ้ง ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สุ่มเก็บตัวอย่างของผึ้งโพรงตามสถานที่ต่างๆ ในประเทศ (ขอบเขตแสดงดังภาคผนวกที่ 3) แบ่งเป็น ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคใต้ และเกาะสมุย (รายชื่อสถานที่เก็บตัวอย่างแสดงใน

ภาคผนวกที่ 4) โดยใช้ผึ้งในระยะดักแด้ ที่มีอายุประมาณ 11-13 วัน นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีที่สามารถทำได้ขณะอยู่นอกห้องปฏิบัติการ ซึ่งวิธีนี้จะใช้สกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์

2.9 เครื่องแก้วและสารละลาย

เครื่องแก้วและสารละลายทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง ทำให้สะอาดปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส โดยการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

2.10 เทคนิคทาง Molecular cloning

ในการเตรียมดีเอ็นเอติดตาม เพื่อใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ได้เลือกใช้วิธีการเตรียมจากส่วน repetitive sequences ของผึ้งโพรงเอง ซึ่งทำโดยวิธีการโคลน (Cloning) เชื่อมต่อชิ้นส่วนของผึ้งโพรงที่ได้รับการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม โดยเลือกใช้เรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI กับดีเอ็นเอพาหะที่เลือกคือ พลาสมิด pUC18 ที่ได้รับการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกัน โดยการเชื่อมต่อของดีเอ็นเออาศัยหลักการ insertion inactivation เชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ตำแหน่งของจีน *lac*Z บนพลาสมิด pUC18 แล้วนำเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือนที่เลือกใช้คือ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีทรานสฟอร์เมชัน (transformation) หลังจากนั้นทำการคัดเลือกหาโคลนที่มีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสม แล้วจึงทำการคัดเลือกหาโคลนที่มีชิ้นส่วนของ repetitive sequences ต่อด้วยวิธีการทาง nucleic acid hybridization ซึ่งจะกล่าวถึงต่อไปในหัวข้อ 2.11 สำหรับรายละเอียดในวิธีการทาง molecular cloning มีดังนี้

2.10.1 การสกัดดีเอ็นเอจากผึ้งโพรง (*Apis cerana*)

การสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองมี 2 วิธีคือ ก) การสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรงซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Hall (1986) และ ข) การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ (total DNA) ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Devis และคณะ (1986) สำหรับใช้ในการเตรียม

ดีเอ็นเอตัวอย่าง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ก) การสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรง

การสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรง ทำโดยการบดตัดแต้ของผึ้งโพรงให้ละเอียดในบัฟเฟอร์ Hom I (Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ pH 7.4, น้ำตาลซูโครส 250 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA 1 มิลลิโมลาร์, แคลเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ และ แมกนีเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์) จำนวน 700 ไมโครลิตร ปั่นเก็บเซลล์ผึ้งที่ 5000xg เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนตะกอนซึ่งเป็นเซลล์บดต่อให้ละเอียดในบัฟเฟอร์ Hom II (Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ pH7.4, น้ำตาลซูโครส 250 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA 1 มิลลิโมลาร์, แคลเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ และ Triton x-100 0.1เปอร์เซ็นต์) จำนวน 1 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 8000xg นาน 10 นาที เก็บตะกอนซึ่งเป็นส่วนนิวเคลียสเติมบัฟเฟอร์ lysis (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, Na_2EDTA 10 มิลลิโมลาร์, โซเดียมอะซีเทต 500 มิลลิโมลาร์ และ SDS 1 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 400 ไมโครลิตร และสารละลาย proteinase K เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตรผสมเข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 42 °ซ ข้ามคืน แล้วจึงปั่นแยกส่วนน้ำใสที่ 5000xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นสกัดโปรตีนออกโดยเติมสารละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) เท่ากับปริมาตรเดิมผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ แล้วปั่นแยกชั้นของสารละลายความเร็ว 4000xg เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายชั้นบนเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) เท่ากับปริมาตรเดิมผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ ปั่นแยกชั้นสารละลายที่ 4000xg เป็นเวลา 5 นาที ทำจนไม่มีคราบโปรตีนระหว่างชั้นสารละลาย จึงแยกสารละลายชั้นบนเติมเอทานอลเย็น 95 เปอร์เซ็นต์ 2 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมโดยการกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที หรืออาจเก็บในระยะยาว เมื่อต้องการดีเอ็นเอจึงนำมาปั่นที่ 4000xg เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนตะกอนดีเอ็นเอล้างด้วยเอทานอลเย็น 70 เปอร์เซ็นต์ ปั่นที่ 4000xg เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทเอทานอลทิ้ง และคว่ำหลอดจนตะกอนดีเอ็นเอแห้งหรือหมาดๆ จึงละลายในบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0) จำนวน 20-30 ไมโครลิตร สารละลายดีเอ็นเอนี้สามารถเก็บที่ 4 °ซ

สำหรับระยะสั้นได้เป็นเวลาประมาณ 1-2 เดือน

ข) การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์

การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ ทำโดยการนำผึ้งโพรงระยะดักแด้บดให้ละเอียดใน บัฟเฟอร์ Extraction (Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ pH 9.0, โซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิ-โมลาร์, น้ำตาลซูโครส 200 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0) จำนวน 400 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย SDS ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 40 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 30-60 นาที หลังจากนั้นสารละลายผึ้งนี้สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 สัปดาห์ เมื่อกลับเข้าสู่ห้องปฏิบัติการจึงเติมสารละลาย RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายโปแตสเซียมอะซีเทตให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ บ่มต่อในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30-45 นาที นำมาปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่ 8000xg เวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสสกัดโปรตีนออก โดยการเติมสารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) เท่ากับปริมาตรเดิม แล้วผสมโดยการกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ ทำเช่นเดียวกับข้อ ก) จนกระทั่งไม่มีคราบโปรตีน นำสารละลายส่วนบนเติมสารละลายอัมโมเนียมอะซีเทต 7.5 โมลาร์ จำนวนครึ่งหนึ่งของปริมาตรเดิม ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติมเอทานอลเย็น 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ แล้วแช่ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แยกตะกอนดีเอ็นเอโดยการปั่นที่ 4000xg เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างเกลือออกด้วยเอทานอลเย็น 70 เปอร์เซ็นต์ รอจนตะกอนดีเอ็นเอแห้งหรือหมาดๆ ละลายใน บัฟเฟอร์ TE จำนวน 20-30 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

2.10.2 <u>การสกัดดีเอ็นเอที่ใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะ</u> (ดัดแปลงจาก Birnboim และ Doly, 1979) มีวิธีเตรียม 2 วิธีคือ การสกัดในปริมาณมากและปริมาณน้อย

2.10.2.1 <u>การสกัดปริมาณมาก</u>

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pUC18 ในอาหารอุดม LB (Bactotryptone 1 เปอร์เซ็นต์, Yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียม-

คลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ pH 7.4) จำนวน 100 มิลลิลิตร ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคืน ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4000xg เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ TE จากนั้นกระจายตะกอนเซลล์ในสารละลาย Solution I (Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA 10 มิลลิโมลาร์, กลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ และเอนไซม์ไลโซไซม์ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 2 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30-60 นาที เติมสารละลาย Solution II (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 มิลลิโมลาร์ และ SDS 1 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ จนสังเกตุเห็นว่าสารละลายใส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จึงเติมสารละลาย Solution III (โซเดียมอะซีเทต 3 โมลาร์, pH 4.8) จำนวน 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ จนเกิดตะกอนอย่างสมบูรณ์แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

ปั่นแยกตะกอนออกที่ 4000xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสสกัดโปรตีนออกโดยเติมสารละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม (1: 1) เท่ากับปริมาตรเดิมผสมด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ปั่นที่ 4000xg เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายชั้นบนสกัดโปรตีนเช่นเดิม จากนั้นสกัดฟีนอลออกโดยการเติมไดเอทิลอีเทอร์เท่ากับปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากันดีจนใสและแยกเป็น 2 ชั้นจึงดูดไดเอทิลอีเทอร์ที่อยู่ชั้นบนทิ้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 15-20 นาที เพื่อให้ไดเอทิลอีเทอร์ที่อาจหลงเหลืออยู่ระเหยจนหมด จากนั้นจึงเติมเอทานอลเย็น 95 เปอร์เซ็นต์ 2 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากันดีเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ ข้ามคืน

แยกส่วนตะกอนดีเอ็นเอที่ได้โดยการปั่นที่ 5000xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 1 มิลลิลิตร ที่มี RNase ละลายอยู่ 100 ไมโครกรัมแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงเติมสารละลายโซเดียมอะซีเทตความเข้มข้น 3 โมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร สกัดโปรตีนออกเช่นเดิมด้วยสารละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม และสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเย็น 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ ข้ามคืน ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ล้างเกลือด้วยเอทานอลเย็น 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วละลายในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ เมื่อต้องการเก็บระยะยาวและที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในระยะสั้นประมาณ 1-2 เดือน

2.10.2.2 การสกัดปริมาณน้อย

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารอุดม LB จำนวน 10 มิลลิลิตร ที่เสริมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคืน นำมาปั่นเก็บเซลล์ที่ 4000xg เป็นเวลา 10 นาที กระจายตะกอนเซลล์ในสารละลาย Solution I จำนวน 200 ไมโครลิตร แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งเวลา 30 นาที เติมสารละลาย Solution II จำนวน 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยกลับหลอดขึ้นลงจนสารละลายใส ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย Solution III จำนวน 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ จนเกิดตะกอนอย่างสมบูรณ์ แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นแยกตะกอนออกที่ 4000xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสสกัดโปรตีนออกด้วยสารละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม (1: 1) เช่นเดียวกับการสกัดปริมาณมากในข้อ 2.10.2.1 แล้วสกัดฟีนอลออกด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเย็น 95 เปอร์เซ็นต์และล้างเกลือออกด้วยเอทานอลเย็น 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 30 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ ในการเก็บระยะยาว และที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในการเก็บระยะสั้นประมาณ 1-2 เดือน

2.10.3 การวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอ ได้ดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย Aaij และ Borst (1972) โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (ดีเอ็นเอของแลมบ์ดาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III; λ/*Hind*III) ใน submarine horizontal gel electrophoresis อะกาโรส 0.7-1.0 เปอร์เซนต์ ขนาดเจล 85x100x5 มิลลิเมตร กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เคลื่อนจากขั้วลบไปขั้วบวก ในบัฟเฟอร์ TBE (Tris-HCl 89 มิลลิโมลาร์, boric acid 89 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์ pH 8.3) ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมงและใช้ tracking dye (กลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์, บรอมฟีนอลบลู 0.1 เปอร์เซนต์ และ xylene cyanol FF 0.1 เปอร์เซนต์) เป็นตัวติดตาม ย้อมเจลที่ได้ในสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นนาน 30 นาที ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง UV transilluminator UVP เปรียบเทียบการเรืองแสงกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

2.10.4 <u>การย่อยดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์</u> (ดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย Fuchs และ Blakesley ,1983)

โดยปกติเรสทริกชันเอนไซม์ จะมีสภาวะที่เหมาะสม ในการย่อยดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์แตกต่างกันขึ้นกับองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ ความแรงของอิออนของบัฟเฟอร์ อุณหภูมิ เป็นต้น (ภาคผนวกที่ 5) สำหรับใน reaction mixture 20 ไมโครลิตร จะมีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 0.5-1ไมโครกรัม, เรสทริกชันเอนไซม์ปริมาณ 5 หน่วย, สารละลาย Bovine serum albumin 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ บัฟเฟอร์ในการย่อยดีเอ็นเอที่ประกอบด้วย Tris-HCl 5 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, แมกนีเซียมคลอไรด์ 1 มิลลิโมลาร์ และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่จะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ ทำการบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิด โดยส่วนใหญ่ใช้อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคืน แล้วแบ่งมาทดสอบการย่อยของดีเอ็นเอว่าสมบูรณ์หรือไม่ โดยการเพิ่มปริมาณเอนไซม์และเพิ่มเวลา แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอที่ไม่ถูกย่อย, ดีเอ็นเอที่ได้รับการย่อยทั้งไม่เพิ่มและเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และ ดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ในครั้งต่อไป เมื่อพบว่ามีการย่อยอย่างสมบูรณ์แล้ว จึงหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม Tracking dye จำนวน 4 ไมโครลิตร หรือนำไปทำการทดลองต่อไป

2.10.5 <u>การสร้างดีเอ็นเอลูกผสม</u>

ในการเตรียมดีเอ็นเอลูกผสมเพื่อให้ได้ส่วน repetitive sequences ของผึ้งโพรง ในขั้นตอนแรก ทำการย่อยดีเอ็นเอพาหะและดีเอ็นเอจากผึ้งโพรง ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกัน โดยเลือกใช้เรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI หลังจากทดสอบว่ามีการย่อยอย่างสมบูรณ์แล้ว จึงค่อยนำมาเชื่อมต่อกันโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ T_4 DNA Ligase ซึ่งรายละเอียดในการสร้างดีเอ็นเอลูกผสมทำโดย

นำพลาสมิด pUC18 และโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรง ชนิดละ 1 ไมโครกรัมย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI อย่างสมบูรณ์ใน Reaction mixture ชนิดละ 40 ไมโครลิตร ที่ 37 °ซ ข้ามคืน หลังจากนั้นจึงทำการสกัดส่วนของเรสทริกชันเอนไซม์ออก โดยเพิ่มปริมาตร

ของสารละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE จำนวน 60 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมอะซีเทต 3 โมลาร์ จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติมสารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม (1:1) เท่ากับปริมาตรเดิม ผสมโดยเครื่องผสมสาร ปั่นที่ 4000xgเป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายชั้นบนเติมไดเอทิลอีเทอร์เท่ากับปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากันแล้วดูดไดเอทิลอีเทอร์ทิ้ง ตั้งสารละลายชั้นล่างทิ้งไว้ที่ 37 °ซ จนไม่มีไดเอทิลอีเทอร์ตกค้าง จึงเติมเอทานอลเย็น 95 เปอร์เซนต์ 2 เท่าของปริมาตรเดิมผสมให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ ข้ามคืน จึงปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 5000xg เป็นเวลา 10 นาที และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเย็น 70 เปอร์เซนต์ รอจนตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 20 ไมโครลิตร

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ทั้ง 2 ส่วนนี้ มาเชื่อมต่อกัน โดยผสมดีเอ็นเอที่ย่อยได้ด้วยอัตราส่วนโครโมโซมัลดีเอ็นเอจากฝิ้ง ต่อพลาสมิด pUC18 เป็น 5:1 (ดัดแปลงจาก Maniatis, 1982) ใน Ligation mixture 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ATP 1 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์ Ligation (Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ และ Dithiothreitol 10 มิลลิโมลาร์) และ เอนไซม์ T_4 DNA Ligase จำนวน 5 หน่วย โดยขั้นแรกจะนำเฉพาะดีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิดผสมกันบ่มที่อุณหภูมิ 56 °ซ เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที จึงเติมองค์ประกอบอื่นที่เหลือจนครบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 12-15 °ซ นาน 15 ชั่วโมง ดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมได้นี้จะนำเข้าเซลล์เจ้าเรือนต่อไปโดยการทรานสฟอร์ม

2.10.6 <u>การทรานสฟอร์ม</u>

ดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมได้ จะทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน โดยเลือกใช้ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ซึ่งในขั้นตอนแรกได้ทำการเตรียมให้เป็นคอมพีเทนต์เซลล์ 2 วิธี เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม ระหว่างการใช้แคลเซียมคลอไรด์และรูบิเดียมคลอไรด์ โดยใช้พลาสมิด pBR322 เมื่อได้วิธีที่เหมาะสม จึงทำการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมได้ต่อไป

2.10.6.1 <u>การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์</u> มี 2 วิธีคือ

ก) การใช้แคลเซียมคลอไรด์ (ดัดแปลงจาก Mandel และ Hiya,

1970)

เตรียมโดยเจริญเชื้อตั้งต้นของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ในอาหารอุดม LB 1 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคืน แล้วนำเชื้อตั้งต้นนี้จำนวน 100 ไมโครลิตร เติมลงในอาหารอุดม LB 10 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ประมาณ 3-4 ชั่วโมง (OD_{550} ประมาณ 0.5-0.6) หลังจากนั้นนำขวดเชื้อนี้แช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 5 นาที จึงปั่นเก็บเซลล์ที่ 4000xg เป็นเวลา 10 นาที กระจายตะกอนเซลล์ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เย็น 10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นเก็บเซลล์อีกครั้งที่ 4000xg เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เย็น 100 มิลลิโมลาร์ จำนวน 500 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆจนเซลล์กระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนทำการทรานสฟอร์ม

ข) การใช้รูบิเดียมคลอไรด์ (ดัดแปลงจาก Hanahan, 1983)

เตรียมโดยเจริญเชื้อตั้งต้นของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ในอาหารอุดม LB 1 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคืน แล้วนำเชื้อตั้งต้นจำนวน 100 ไมโครลิตร เติมลงในอาหารอุดม LB 10 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ประมาณ 3-4 ชั่วโมง (OD_{550} ประมาณ 0.5-0.6) หลังจากนั้นนำขวดเชื้อนี้แช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 5 นาที ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4000xg เป็นเวลา 10 นาที กระจายตะกอนเซลล์ในสารละลาย Tfb I (โปแตสเซียมอะซิเทต 30 มิลลิโมลาร์, รูบิเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์, แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์, แมงกานีสคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ และกลีเซอรอล 15 เปอร์เซนต์) จำนวน 4 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 5 นาที ปั่นเก็บเซลล์ที่ 4000xg เป็นเวลา 10 นาที แยกตะกอนเซลล์เติมสารละลาย Tfb II (MOPS 10 มิลลิโมลาร์, แคลเซียมคลอไรด์ 75 มิลลิโมลาร์, รูบิเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ และกลีเซอรอล 15 เปอร์เซนต์) จำนวน 400 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ จนเซลล์กระจายเป็นเนื้อเดียวกัน แช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 15 นาที ก่อนทำการทรานสฟอร์ม

2.10.6.2 <u>การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน</u> (ดัดแปลงจาก Cohen และคณะ, 1972)

นำคอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียมได้ จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมกับดีเอ็นเอลูกผสมที่

เตรียมได้จากข้อ 2.10.5 จำนวน 5 ไมโครลิตร จาก Ligation mixture 20 ไมโครลิตร (ประมาณ 60 นาโนกรัม) แช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 30 นาที จึงนำไปบ่มที่ 42 °ซ ทันทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมอาหารอุดม LB จำนวน 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 °ซ ต่อเป็นเวลา 15 นาที จึงนำไปกระจายบนจานอาหารอุดม LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, X-gal 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคืน สังเกตโคโลนีที่ปรากฏ

สำหรับประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์ม ศึกษาโดยทำจานอาหารควบคุมซึ่งจะกระจายคอมพีเทนต์เซลล์ที่เจือจางด้วยอัตราส่วน $1:10^5$ และ $1:10^6$ จำนวน 100 ไมโครลิตร ต่อจานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคืน จึงบันทึกผลจำนวนโคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์ที่ปรากฏ และทำจานอาหารทดสอบโดยใช้พลาสมิด pBR322 ปริมาณ 1, 5, 20 และ 100 นาโนกรัม เป็นดีเอ็นเอทดสอบ ทรานสฟอร์มเข้าในคอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียมขึ้น แล้วเจือจางในอัตราส่วน 1:10 กระจายเชื้อจำนวน 100 ไมโครลิตร ลงบนจานอาหารอุดมLB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคืน บันทึกผลจำนวนโคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์ที่ปรากฏ และบันทึกประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม เป็นจำนวนทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอพาหะ

2.10.7 <u>การคัดเลือกและทดสอบดีเอ็นเอลูกผสม</u> (ดัดแปลงจาก Maniatis, 1982)

ภายหลังการทำทรานสฟอร์ม ติดตามคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมได้โดยการคัดเลือกบนจานอาหารอุดม LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน, X-gal และ IPTG สำหรับทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมจะให้โคโลนีสีขาว ส่วนทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอพาหะเดิมจะให้โคโลนีสีฟ้า เนื่องจากหลักการเชื่อมต่อเป็นแบบ insertion inactivation ทำการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมโดยวิธี replica plating บนจานอาหารอุดม LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ข้ามคืน จากนั้นนำเชื้อที่คัดได้นี้มาทดสอบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอจากโครโมโซมของผึ้งโพรงเชื่อมต่อหรือไม่ โดยนำมาสกัดพลาสมิดและย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI วิเคราะห์ผลโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับพลาสมิด pUC18 ที่ย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI เช่นกัน ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอ

ลูกผสมจะให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ พลาสมิด pUC18 ขนาด 2.686 กิโลเบส และ ชิ้นดีเอ็นเอจากโครโมโซมผึ้ง ดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้รับการทดสอบแล้ว จะถูกนำไปคัดเลือกหาโคลนที่มี repetitive sequences โดยวิธีการ dot-blot hybridization โคลนที่มีสัญญาณการเกิดไฮบริดเข้มจะถูกคัดเลือก เพื่อเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตาม โดยการแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจากโครโมโซมผึ้งที่ถูกเชื่อมต่อออกจากดีเอ็นเอพาหะ แล้วนำมาติดฉลากเพื่อทดสอบการเป็นดีเอ็นเอติดตามต่อไป

2.11 <u>เทคนิคทาง Nucleic acid hybridization</u> (Boehringer, 1993)

นำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้รับการคัดเลือกมาทำ dot-blot hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามเป็นดีเอ็นเอจากโครโมโซมผึ้งที่ได้รับการติดฉลาก เพื่อหาโคลนที่มี repetitive sequences โคลนที่มีสัญญาณการเกิดไฮบริดเข้ม จะถูกนำมาเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตามทำการติดฉลากโดยใช้สารปลอดรังสี หลังจากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการเป็นดีเอ็นเอติดตาม โดยวิธีการ Southern-blot hybridization ซึ่งจะใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงที่สุ่มเก็บจากภาคต่างๆ ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมขึ้น แล้วจึงวิเคราะห์สัญญาณการไฮบริดที่เกิดขึ้น ซึ่งเทคนิคต่างๆที่ใช้คือ

2.11.1 <u>การติดฉลากดีเอ็นเอ</u>

การติดฉลากในการวิจัยนี้เลือกใช้วิธี Random Primed DNA Labelling และใช้ชุดการติดฉลากดีเอ็นเอ (DNA Labelling Kit) บริษัท Borinhger manniham GmbH โดยใช้สาร Digoxigenin ซึ่งเป็นสาร steroid hapten อยู่ในรูป DIG-11-dUTP เตรียมโดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการติดฉลากจำนวน 1 ไมโครกรัม ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งทันทีประมาณ 1 นาทีแล้วจึงนำมาเติม hexanucleotide จำนวน 2ไมโครลิตร dNTP labelling mixture จำนวน 2 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Klenow fragment จำนวน 1 ไมโครลิตร (2 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อให้ได้จำนวน 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพอดี หยุดปฏิกิริยาโดย

การเติมสารละลาย Na_2EDTA 200 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 จำนวน 2 ไมโครลิตร และเติมสารละลายลิเธียมคลอไรด์ 4 โมลาร์ จำนวน 2.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จึงเติมเอทานอลเย็น 95 เปอร์เซ็นต์ 2 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ ข้ามคืน จึงปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 5000xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างเกลือด้วยเอทานอลเย็น 70 เปอร์เซนต์ และละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 50 ไมโครลิตร

ดีเอ็นเอที่ได้รับการติดฉลากนี้ นำมาวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธีการทำ dot-blot hybridization เปรียบเทียบความเข้มของสัญญาณ กับดีเอ็นเอที่ได้รับการติดฉลากมาตรฐาน (DNA control labelled: digoxigenin labelled pBR328 ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ความเข้มข้น 5000, 1000, 100, 1 และ 0.1 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ดีเอ็นเอที่ได้รับการติดฉลากนี้สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลานานที่ -20 °ซ

2.11.2 Dot blot hybridization

นำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้รับการคัดเลือกโคลนละ 1 ไมโครกรัม ทำให้เป็นสายเดี่ยวโดยบ่มกับสารละลาย denature (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 โมลาร์ Na_2EDTA 100 มิลลิโมลาร์) ปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตรเดิม ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วจุดลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน (Nylon membrane positively charged) ทิ้งไว้จนแห้งสนิทดี จึงนำไปทำการตรึงดีเอ็นเอต่อไป

2.11.3 Southern-blot hybridization (ดัดแปลงจาก Ishii, 1992)

นำตัวอย่างของดีเอ็นเอจากผึ้งโพรง ที่สุ่มเก็บจากภาคต่างๆ ในประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคใต้ และ เกาะสมุย ภาคละ 1 ตัว ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอตัวละประมาณ 3.5 ไมโครกรัม ย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI และ *Hae*III ใน reaction mixture 40 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ

ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 0.7-1.0 เปอร์เซ็นต์ ขนาดของเจล 8.5x10 ตารางเซนติเมตร ในหนึ่งแผ่นเจลจะเป็นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ชนิดเดียวกัน จาก 5 ภาคๆ ละ 1 ตัว เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งเป็น (*HindIII*) กระแสไฟฟ้าที่ใช้ 80 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง ย้อมแถบดีเอ็นเอในสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์นานประมาณ 30 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นประมาณ 30 นาที

หลังจากนั้นนำแผ่นเจลเขย่าเบาๆ ในกรดไฮโดรคลอลิกเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ นานประมาณ 10 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่นก่อนเขย่าในสารละลาย denature (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์) เป็นเวลาประมาณ 45 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง แล้วนำแผ่นเจลแช่ในบัฟเฟอร์ transfer (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 250 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์) เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลงสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน โดยใช้หลักการ capillary transfer ดังแสดงในภาพภาคผนวกที่ 6 โดยชั้นล่างสุดเป็นกระดาษกรอง 3M ที่วางบนกระจก และมีปลายเชื่อมต่อลงในภาชนะที่บรรจุบัฟเฟอร์ transfer เอาไว้ หลังจากนั้นเป็นกระดาษกรอง 3M ที่มีขนาดเท่าแผ่นเจลจำนวน 2 แผ่น แล้วจึงเป็นแผ่นเจลที่วางคว่ำหน้าลง ชั้นบนของแผ่นเจลเป็นแผ่นไนลอนเมมเบรนที่แช่ในบัฟเฟอร์ transfer ก่อนประมาณ 1 นาที แล้วจึงเป็นชั้นของกระดาษกรอง 3M ประมาณ 3-4 แผ่น และชั้นบนสุดเป็นกระดาษซับน้ำ ที่มีความสูงประมาณ 7-8 เซนติเมตร กดทับด้วยน้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม แล้วคลุมด้วยพลาสติกทิ้งไว้ข้ามคืน จึงนำแผ่นไนลอนเมมเบรนออกมาล้างในบัฟเฟอร์ 5xSSC เป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งก่อนนำไปตรึงดีเอ็นเอต่อไป

2.11.4 <u>การตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นไนลอนเมมเบรน</u>

แผ่นไนลอนเมมเบรนที่แห้งแล้ว นำมาตรึงดีเอ็นเอ โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนานประมาณ 3-5 นาที หรือนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อตรึงดีเอ็นเอแล้วแผ่นไนลอนเมมเบรนนี้สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง หรือนำไปทำการไฮบริไดซ์ต่อไป

2.11.5 <u>Prehybridization และ Hybridization</u>

ก่อนการทำ hybridization นำแผ่นไนลอนเมมเบรนแช่ในสารละลาย standard

prehybridization (บัฟเฟอร์ 5xSSC, blocking reagent 1 เปอร์เซ็นต์, N-Lauroyl sarcosine 1 เปอร์เซนต์ และ SDS 0.02 เปอร์เซนต์) พอให้ท่วมแผ่น บ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นในขั้นตอนการทำ hybridization นำสารละลาย standard prehybridization ที่มีดีเอ็นเอติดตามละลายอยู่ 5-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงบรรจุลงในถุงสะอาดที่มีแผ่นไนลอนเมมเบรนจากขั้นตอน prehybridization โดยใช้ปริมาณ 3 มิลลิลิตรต่อขนาดไนลอนเมมเบรน 8.5x10 ตารางเซนติเมตร รีดปิดปากถุงให้สนิทโดยไม่ให้มีฟองอากาศ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ ข้ามคืนจึงนำไปวิเคราะห์สัญญาณการไฮบริดต่อไป

2.11.6 <u>การวิเคราะห์สัญญาณการไฮบริด</u> (Boehringer, 1993)

ในการวิเคราะห์สัญญาณการไฮบริด ได้ใช้หลักการทางอิมมูโน ด้วยการใช้แอนติบอดีของ Digoxigenin ที่คอนจูเกตอยู่กับเอนไซม์ alkaline phosphatase หลังจากนั้นจึงตรวจสอบผล โดยการใช้สารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่ให้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถติดตามผลได้ ซึ่งในการทดลองได้ใช้สารเรืองแสงเป็นสารตั้งต้น (Chemiluminescent Detection) โดยหลังจากขั้นตอน hybridization นำแผ่นไนลอนเมมเบรนออกจากถุง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 2xSSC ที่มี SDS อยู่ 0.1 เปอร์เซนต์ 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 0.5xSSC ที่มี SDS 0.1 เปอร์เซนต์ 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 65 °ซ จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ Genius I นาน 1 นาที แล้วนำแผ่นไนลอนเมมเบรนเขย่าเบาๆ ในบัฟเฟอร์ Genius II พอท่วมแผ่น เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นบัฟเฟอร์ Genius II ที่มี anti-DIG alkaline phosphatase เจือจาง ในอัตราส่วน 1:20,000 ใช้ปริมาณพอให้ท่วมแผ่นเขย่าเบาๆ ประมาณ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ Genius I 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องและแช่ในบัฟเฟอร์ Genius III นาน 2 นาที จึงจุ่มลงในสารละลายสารเรืองแสง (LumigenPPD เจือจางใน Genius III อัตราส่วน 1:200) ให้ทั่วแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วบรรจุลงในถุงพลาสติกใส ปิดปากถุงให้สนิทโดยไม่ให้มีฟองอากาศ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำมาทำปฏิกิริยากับฟิล์ม X-ray

ในที่มืด เป็นเวลาประมาณ 30-60 นาที

หลังจากนั้นนำแผ่นฟิล์มล้าง โดยจุ่มในสารละลาย developer เป็นเวลาประมาณ 1 นาที ในน้ำประมาณ 1 นาที และ สารละลาย fixer ประมาณ 3-5 นาที แล้วล้างในน้ำไหลประมาณ 1-2 นาที โดยทั้งหมดนี้ทำในห้องมืด และใช้แสงสีแดง จากนั้นจึงนำแผ่นฟิล์มตากให้แห้งสนิทจึงค่อยนำมาวิเคราะห์ผล

แผ่นไนลอนเมมเบรนที่ตรวจสอบโดยวิธีนี้ สามารถล้างดีเอ็นเอติดตามที่ไฮบริไดซ์อยู่กับ target DNA ออก แล้วใช้ดีเอ็นเอติดตามชนิดใหม่ไปไฮบริไดซ์กับ target DNA เดิมได้ โดยนำแผ่นออกจากถุง แล้วล้างในน้ำกลั่นที่สะอาด เป็นเวลาประมาณ 1-2 นาที แล้วล้างดีเอ็นเอติดตามออกโดยเขย่าเบาๆ ในสารละลาย reprobe (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 มิลลิโมลาร์ และ SDS 0.1 เปอร์เซนต์) 4 ครั้งๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ จากนั้นล้างในบัฟเฟอร์ 2xSSC พอให้ท่วมแผ่นไนลอนเมมเบรน เป็นเวลาประมาณ 1-2 นาที จึงนำแผ่นไนลอนเมมเบรนเข้าสู่ขั้นตอน prehybridization และ hybridization เพื่อไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิดอื่นๆ ต่อไป