บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์:

1. เชื้อมาลาเรียชนิด P. falciparum

เชื้อมาลาเรียสำหรับใช้ในการวิจัยเป็นเชื้อที่ได้รับจากหน่วยวิจัยมาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 97 ไอโซเลต 3 สายพันธุ์ ในพื้นที่ต่อไปนี้

1. อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 17 ไอโซเลต 3 สายพันธุ์
2. อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 20 ไอโซเลต
3. อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด จำนวน 40 ไอโซเลต
4. อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี จำนวน 20 ไอโซเลต

2. อุปกรณ์

เครื่อง laminar flow

ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

เครื่องชั่งละเอียด

เครื่อง vortex mixer

เครื่องไมโครเซนติฟิวก์ (microcentrifuge)

เครื่อง UV transluminator (Fotodyne)

เครื่อง DNA Thermal cycler (Perkin elmer cetus)

Agarose gel electrophoresis chamber

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supper)

เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)

เครื่อง plastic sealer
เครื่องเขย่า (agitator)
หน้ากากกันแสง UV
กล้องโพลาลอยด์
กระติกน้ำแข็ง
นาฬิกาตั้งเวลา
ไมโครปิเปต (micropipette)
เครื่อง microwave
เครื่อง heater

3. เครื่องแก้วและภาชนะพลาสติก

พาสเจอร์ปิเปต
ปิเปตวัดปริมาตร
ปิเปตทิพ
ขวดแก้วสำหรับใส่สารเคมี
กระบอกตวง
บีกเกอร์
แท่งแก้วคนสาร
แผ่นกระจก
กล่องพลาสติก
แผ่นพลาสติกสำหรับช้อนเจล
ถุงพลาสติก
ถุงมือพลาสติก
ลูกยาง
ไมโครทิว (microtube)
ที่วางหลอดขนาดเล็ก (rack)
แผ่นพลาสติกอย่างบาง (saran wrap)

4. วัสดุอื่นๆ

กระดาษกรอง Whatman 3 MM

ไนลอนเมมเบรน(nylon membrane) (Genescreen)

กระดาษซับ

ฟิล์มโพลาลอยด์

กล่องใส่ฟิล์ม (cassette)

5. สารเคมี

Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)

Trisodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)

Sodium chloride (NaCl)

Tris (hydroxymethyl) methylamine ($NH_2C(CH_2OH)_3$)

Bovine serum albumin (BSA)

Sodium hydroxide (NaOH)

Hydrochloric acid (HCl)

Orthoboric acid power

Potassium chloride

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

Magnesium chloride -6- hydrate ($MgCl_2.6H_2O$)

Ficoll

Sucrose

Absolute ethanol

Sodium dodecyl sulphate (SDS)

Agarose

Bromophenol blue

Ethidium bromide

DNA marker (DNA molecular weight marker VI)

Kodak X-ray developer

Kodak X-ray fixer

I16751C5X

Double-distilled water

6. Commercial kit

ECL 3'- oligolabelling and detection system (Amersham)

- Fluorescein-11-dUTP
- Terminal transferase
- Cacodylate buffer
- Sterile water
- Control unlabelled probe
- Control target DNA
- Blocking agent
- Anti-fluorescein HRP conjugate
- Control Fluorescein-labelled DNA
- Hybridization buffer component
- Detection reagent 1
- Detection reagent 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่าง

เก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมจำนวน 97 ไอโซเลต 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้จาก 1. เลือดผู้ป่วยโดยตรง (fingerprick sample) 2. เลือดที่นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (culture material) และ 3. ตัวอย่างเลือดที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (sample frozen in liquid nitrogen)

2. การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่าง (DNA extraction) (Foley et al., 1992)

2.1 นำตัวอย่างเลือด 20-50 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครทิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 5 mM sodium phosphate pH 8.0 (5P8) จำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (vortex) นำไปปั่น (centrifuge) ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลานาน 10 นาที

2.2 ดูดส่วนใสข้างบน (supernatant) ทิ้งไป เติม 5P8 จำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำอีกข้อ 2.2 อีก 3-4 ครั้ง จนกระทั่งสารละลายข้างบนใส)

2.3 ดูดส่วนใสข้างบนทิ้งไปแล้วเติมน้ำกลั่น (sterile distilled water) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำหลอดไปต้มในน้ำเดือดทันทีเป็นเวลานาน 10 นาที

2.4 เมื่อครบเวลา นำหลอดไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลานาน 10 นาที ดูดส่วนใสข้างบนซึ่งเป็นส่วนที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) นำมาใส่ในหลอดไมโครทิวใหม่ เก็บที่อุณหภูมิ -20° C จนกว่าจะนำไปใช้

3. การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (DNA amplification)

เทคนิค nested PCR:

การเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ด้วยการใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ กับดีเอ็นเอทั้งหมดที่แยกสกัดได้ มักจะให้ผลิตผลที่ต้องการจำนวนน้อยจนไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซีส (agarose gel electrophoresis) ทั้งนี้เพราะดีเอ็นเอเป้าหมายมีจำนวนน้อยมากปะปนอยู่กับดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องจำนวนมาก ทำให้ไพรเมอร์แต่ละสายมีโอกาสจับ (anneal) กับตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สม (complementary) บนดีเอ็นเอเป้าหมายได้ยาก จึงเป็นผลให้ผลิตผลของดีเอ็นเอเป้าหมายเพิ่มขยายได้จำนวนน้อย และส่วนใหญ่จะมีผลิตผลที่ไม่ต้องการ (nonspecific product) ปนมาค่อนข้างมาก จึงมีการดัดแปลงเทคนิค PCR พื้นฐานให้สามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ผลิตผลที่ต้องการมากขึ้นโดยที่ลดจำนวนผลิตผลที่ไม่จำเพาะให้เหลือน้อยที่สุด ทำได้โดยเทคนิค nested PCR ซึ่งเป็นปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ ได้แก่ outer primer และ nested primer ในปฏิริยาช่วงแรกของ nested PCR จะใช้ outer primer ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่อยู่รอบนอกดีเอ็นเอเป้าหมายให้เกิดปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ ทำให้ได้ผลิตผลที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ภายใน ในปฏิกิริยาช่วงที่ 2 ของ nested PCR ทำโดยใช้ผลิตผลจากปฏิกิริยา PCR ช่วงแรกเป็นแม่พิมพ์ (template) และใช้ nested primer ซึ่งออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเพิ่มขยายให้ได้ผลิตผลของดีเอ็นเอเป้าหมายที่อยู่ถัดเข้ามาด้านในจาก outer primer ให้เกิดปฏิกิริยา 30 รอบ จะได้ผลิตผลของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีความบริสุทธิ์สูงและได้จำนวนขยายเพิ่มขึ้นมาก ซึ่งปัจจุบันเทคนิค nested PCR ได้รับความนิยมแพร่หลาย

PCR ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายในการทดลองนี้ประกอบ ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่เป็น conserved blocks ของ MSP-1 และ MSP-2 gene จำนวน 4 คู่ ดังนี้

ตารางที่ 2 PCR ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง (Ranford-Cartwright et al., 1991; Swewin et al., 1991)

gene name	oligo name	description	sequence 5'-3'	position
MSP-1	O1	5' outer	CACATGAAAGTTATCAAGAACTTGTC	sense(nt 62-88)
MSP-1	O2	3' outer	GTACGTCTAATTCATTTGCACG	antisense(nt 687-708)
MSP-1	N1	5' nested	GCAGTATTGACAGGTTATGG	sense(nt 112-131)
MSP-1	N2	3' nested	GATTGAAAGGTATTTGAC	antisense(nt 661-678)
MSP-2	S3	5' outer	GAAGGTAATTAAAACATTGTC	sense(nt 3-23)
MSP-2	S2	3' outer	GAGGGATGTTGCTGCTCCACAG	antisense(nt 789-810)
MSP-2	S1	5' nested	GAGTATAAGGAGAAGTATG	sense(nt 111-129)
MSP-2	S4	3' nested	CTAGAACCATGCATATGTCC	antisense(nt 709-728)

วิธีการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

1. เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ช่วงแรก (premix) ตามรายการต่อไปนี้ในหลอดไมโครทิว ผสมให้เข้ากัน

(สำหรับ 100 ไมโครลิตร premix)

10X PCR buffer	10	ไมโครลิตร
2% gelatin	1	ไมโครลิตร
100X dNTPs	1	ไมโครลิตร
100X oligo primer 1	1	ไมโครลิตร
100X oligo primer 2	1	ไมโครลิตร
sterile ddH_2O	86	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	100	ไมโครลิตร

2. แต่ละหลอดของ PCR ประกอบด้วย

premix	18	ไมโครลิตร
DNA template	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 unit/ul)	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

3. หยด mineral oil 1-2 หยด ปิดทับบนสารละลายเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ

4. นำหลอด PCR ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง DNA Thermal cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนดังนี้

MSP-1 (outer): denaturation	94° C	25 วินาที
annealing	50° C	35 วินาที
extension	68° C	2 นาที 30 วินาที

ทำซ้ำ 30 รอบ

MSP-2 (outer): denaturation	94° C	25 วินาที
annealing	42° C	1 นาที
extension	65° C	2 นาที

ทำซ้ำ 30 รอบ

5. เมื่อ PCR ช่วงแรกเสร็จแล้ว นำผลิตผล (PCR product) ที่ได้มาเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์สำหรับปฏิกิริยา PCR ช่วงที่ 2 โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (premix) ตามรายการต่อไปนี้ใส่ในหลอดไมโครทิว ผสมให้เข้ากัน

(สำหรับ 100 ไมโครลิตร premix)

10X PCR buffer	10	ไมโครลิตร
2% gelatin	1	ไมโครลิตร
100X dNTPs	1	ไมโครลิตร
100X oligo primer 1	1	ไมโครลิตร
100X oligo primer 2	1	ไมโครลิตร
sterile ddH_2O	86	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	100	ไมโครลิตร

6. แต่ละหลอดของ PCR ประกอบด้วย

premix	18	ไมโครลิตร
DNA template (ผลิตผล PCR จากปฏิกิริยาช่วงแรก)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 unit/ul)	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

7. หยด mineral oil 1-2 หยด ปิดทับบนสารละลายป้องกันการระเหยของน้ำ

8. นำหลอด PCR ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง DNA Thermal cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนดังนี้

MSP-1 (nested): denaturation 94° C 25 วินาที
annealing 50° C 35 วินาที
extension 68° C 2 นาที 30 วินาที
ทำซ้ำ 30 รอบ

MSP-2 (nested): denaturation 94° C 25 วินาที
annealing 50° C 1 นาที
extension 70° C 2 นาที
ทำซ้ำ 30 รอบ

9. เมื่อครบกำหนด นำหลอด PCR นั้นไปเก็บที่ -20° C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ผลิตผล (PCR product) ที่ได้ต่อไป

4. การตรวจวิเคราะห์ผลิตผลที่ได้โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซีส (Maniatis., 1982)

4.1 เตรียม 1.5% อะกาโรสเจล (agarose gel) โดยชั่งอะกาโรสหนัก 1.88 กรัม ผสมใน 1X TBE buffer 125 มิลลิลิตร นำไปใส่ในไมโครเวฟใช้ไฟระดับปานกลาง นานประมาณ 5 นาที จนกระทั่งได้สารละลายใส

4.2 ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องประมาณ 60-80°C เติมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) (0.5 µg/ml) ปริมาตร 6.25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยหมุน (swirl) เบาๆ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟองอากาศ

4.3 เทสารละลายอะกาโรสนี้ลงในแชมเบอร์ (agarose gel chamber) ที่ปรับระดับและวางหวี (comb) เตรียมไว้พร้อมล่วงหน้าแล้ว

4.4 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นประมาณอย่างน้อย 30 นาที จนกว่าอะกาโรสแข็งตัวดีแล้วจึงค่อยๆดึงหวีออก จากนั้นนำถาดอะกาโรสเจลนี้ไปวางในอิเลคโทรโฟรีซีสแชมเบอร์ (electrophoresis chamber) นำอิเลคโทรโฟรีซีสบัฟเฟอร์ (1X TBE) มาเทใส่ให้ได้ปริมาตรตามต้องการท่วมสูงกว่าผิวหน้าของอะกาโรสเจลประมาณ 5 มิลลิเมตร ตรวจดูทุกๆหลุม (well) ไล่ฟองอากาศที่อุดอยู่ภายในออกให้หมด

4.5 ปิเปต 5X loading buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับผลิตผล PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นดูดผลิตผล PCR นั้นใส่ลงในหลุมของเจลทำเหมือนกันทุกๆ ตัวอย่างจนครบ

4.6 เสียบขั้วไฟฟ้าของอิเลคโทรโฟรีซีสแชมเบอร์ต่อกับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) แล้วปรับให้มีความต่างศักย์ไฟฟ้าประมาณ 85 โวลต์ ใช้เวลาในการทำอิเลคโทรโฟรีซีสนานประมาณ 2 ชั่วโมง

4.7 เมื่อครบเวลา นำอะกาโรสเจลมาวางบนกล่อง UV (UV transilluminator) เพื่อตรวจดูแถบของผลิตล PCR โดยเปรียบเทียบขนาดความยาวกับแถบของดีเอ็นเอมาตราฐาน (standard DNA marker)

4.8 บันทึกผลที่ได้โดยการถ่ายภาพอะกาโรสเจลที่แสดงแถบดีเอ็นเอของผลิตผล PCR ด้วยกล้องโพลารอยด์ (Polaroid) ที่ใช้ฟิล์ม 667

5. การทำเซาต์เทิร์นบลอตทิง(southern blotting) (Southern.,1975)

5.1 แช่อะกาโรสเจลที่ได้จากข้อ 4.8 ใน 0.25 M HCl เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องพร้อมกับเขย่า

5.2 นำมาแช่ต่อใน denaturing buffer (0.2 M NaOH, 0.6 M NaCl) เป็นเวลา 30 นาที

5.3 และใน neutralizing buffer (1 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl) เป็นเวลานานครั้งละ 20 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง

5.4 นำแผ่นเจลมาวางบนกระดาษกรองเบอร์ 3 (Whatman 3 MM) ที่วางพาดอยู่บนแชมเบอร์ที่บรรจุ 20xSSC buffer

5.5 นำแผ่นไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) (Genescreen) ที่ชุ่ม 2xSSC มาวางทับบนแผ่นเจล ไล่ฟองอากาศระหว่างอะกาโรสเจลกับแผ่นไนลอนเมมเบรนออกให้หมด

5.6 นำแผ่นกระดาษกรอง Whatman 3 MM 2 แผ่นที่ตัดให้มีขนาดเท่ากับแผ่นไนลอนเมมเบรนมาทำให้เปียกใน 2XSSC แล้ววางทับลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน

5.7 หุ้มแชมเบอร์ด้วยพลาสติกใส (saran wrap) โดยเว้นส่วนที่เป็นแผ่นเจลไว้

5.8 นำกระดาษซับมาวางทับลงบนกระดาษกรอง สูงประมาณ 10 เซนติเมตร

5.9 วางแผ่นกระจกทับลงบนกระดาษซับแล้วทับด้วยน้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม ตั้งทิ้งไว้ค้างคืน

5.10 เมื่อครบเวลา นำแผ่นไนลอนเมมเบรนออกมาล้างด้วย 2XSSC

5.11 แช่แผ่นไนลอนเมมเบรนใน 0.4 N NaOH นาน 30 วินาที แล้วจึงนำมาแช่ใน neutralizing buffer นาน 30 วินาที

5.12 วางแผ่นไนลอนเมมเบรนบนกระจกที่สะอาด นำไปตรึง (fix) ด้วยแสงอุลตาไวโอเลต เป็นเวลา 1 นาที 40 วินาที

5.13 ซับแผ่นไนลอนเมมเบรนให้แห้งด้วยกระดาษกรอง เก็บใส่ซองที่ปิดสนิท เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำไปทำไฮบริไดเซชัน

6. การตรวจวิเคราะห์โดย ECL 3'-oligolabelling and detection system

6.1 การติดฉลาก oligonucleotide probe ด้วย fluorescien-11-dUTP (Amersham enhanced chemoluminascence (ECL) 3'-oligolabelling protocols)

ตัวติดตาม (oligonucleotide probe) ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MSP-1 และ MSP-2 ที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

ตารางที่ 3 ดีเอ็นเอติดตามที่ใช้ในการทดลอง (Snewin et al., 1991)

name	gene	length	sequence 5'-3'
K1	MSP-1	27	GCATCAGCTGGAGGGCTTGCACCAGAT
MAD20	MSP-1	22	ACAAGTGGAACAGCTGTTACAA
RO33	MSP-1	24	GTTGTTGCAAAGCCTGCAGGTGCT
IC1	MSP-2	21	GCAGAAGCATCTACCAGTACC
FC27	MSP-2	19	CACCTTCACCACCCATCAC

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ดังต่อไปนี้

	MSP-1			MSP-2	
	K1	MAD20	RO33	IC1	FC27
oligonucleotide	0.5	0.75	0.5	1.0	1.16
fluorescein-11-dUTP	5	5	5	5	5
10X cacodylate buffer	8	8	8	8	8
sterile water	58.5	58.25	58.5	58.0	58.84
terminal transferase	8	8	8	8	8
total	80	80	80	80	80

นำหลอดที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาไป incubate ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) ที่ 37° C เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด หุ้มหลอดด้วยกระดาษฟอยล์ (foil) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20° C จนกว่าจะนำมาใช้

6.2 prehybridization และ hybridization

1. นำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่ผ่านการเซาต์เทิร์นบลอตและตรึงด้วยแสงอุลตาไวโอเลตแล้ว มาทำให้เปียกใน 2XSSC

2. จากนั้นนำมา prehybridize ในไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 0.125 มิลลิลิตร/พื้นที่ตารางเซนติเมตรของไนลอนเมมเบรน โดยบรรจุในถุงพลาสติก (hybridization bag) แล้วนำไปวางในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ตามชนิดของตัวติดตาม (probe)ที่ใช้ เป็นเวลา 30 นาที โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการทำไฮบริไดเซชันของตัวติดตามแต่ละชนิดเป็นดังนี้

MSP-1: K1 = 74° C MAD20 = 56° C RO33 = 60° C

MSP-2: IC1 = 60° C FC27 = 56° C

3. เมื่อครบกำหนดเวลา ตัดปากถุงแล้วเติมตัวติดตามที่ฉลากแล้ว (labelled oligonucleotide probe)ลงไป ในอัตราส่วน 1 ไมโครลิตร/ปริมาณของไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์ (มิลลิลิตร) ปิดปากถุงให้สนิท แล้วนำไปวางในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

4. เมื่อครบเวลา นำแผ่นไนลอนเมมเบรนออกจากถุงมาล้างด้วย 1XSSC/0.1%SDS (2 ml / cm^2) ซึ่งบรรจุอยู่ในกล่องพลาสติกวางบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง

5. ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วย prewarmed 1XSSC / 0.1%SDS นำไปวางในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง

6. เมื่อเสร็จแล้ว ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วย buffer 1 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร 1 นาที ที่อุณหภูมิห้องพร้อมกับเขย่าเบาๆ แล้วนำไป incubate ใน buffer 1 + 0.5% blocking agent (0.25 ml/cm^2) เป็นเวลา 30 นาที

7. ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วย buffer 1 อีกครั้ง เป็นเวลา 1 นาที แล้ว incubate แผ่นไนลอนเมมเบรนใน buffer 2 + 0.5% BSA (0.25 ml / cm^2) ที่มี anti-fluorescein antibodies (1 ul / ml ของ buffer) เป็นเวลา 30 นาที

8. ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วย buffer 2 (2 ml / cm^2) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ครั้งละ 5 นาที ทำซ้ำ 4 ครั้ง

9. ผสม detection solution 1 และ 2 ในปริมาตรที่เท่ากัน ให้มีปริมาตรสุดท้าย (final volume) เท่ากับ 0.125 ml/cm^2 เทลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนที่วางด้านดีเอ็นเอขึ้นด้านบน incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที

10. หุ้มแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยพลาสติกใส ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ

11. วางแผ่นไนลอนเมมเบรนลงในกล่องใส่ฟิล์ม (film cassette) โดยหงายด้านที่มี ดีเอ็นเอขึ้นด้านบน ประกบแผ่นฟิล์ม (autoradiography film) บนแผ่นไนลอนเมมเบรนในห้องมืดเป็นเวลาประมาณ 5 นาที แล้วจึงทำการล้างฟิล์มและวิเคราะห์ผลต่อไป