บทที่ 2

วัสดุและอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ตัวอย่างเลือดและจุลินทรีย์

ใช้ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครซึ่งมีสุขภาพสมบูรณ์ ไม่มีประวัติในครอบครัวว่ามีผู้ป่วยเป็นโรคธาลัสซีเมีย

ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ HB101 ซึ่งมีพลาสมิดที่มียีน δ

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเลือดคนปกติ และการสกัดโครโมโซมจาก buffy coat

สารเคมี

Heparin

KRP buffer

Absolute ethanol

70% ethanol

Chloroform:isoamyl (24:1)

วิธีทดลอง

1. เจาะเลือดคนปกติ 10-20 ml บรรจุเลือดในหลอดสะอาดที่มี anticoagulant ซึ่งอาจเป็นหรือ haphalin
2. ปั่นหลอดบรรจุเลือดด้วยความเร็ว 3,000 rpm. ที่ 4°C นาน 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นเซลล์ ออกจากพลาสมา
3. ดูดเฉพาะ buffy coat เก็บไว้ในหลอดพลาสติกขนาด 12 ml
4. ล้างเซลล์ใน buffy coat ด้วย 10 ml. KRP buffer
5. ปั่นที่ 6,000-7,000 rpm 4°C 25 นาที
6. เติม lysis buffer 2 ml. ใช้ pasture pipette ดูดเป่าถ่ายไปใส่หลอดที่ใหญ่ขึ้นแล้วเติม lysis buffer อีกจนครบ 6 ml.
7. บ่มที่ 37°C 4 ชม.
8. เติม 5 x ANE 1.2 ml.
9. สกัดด้วย phenol 3 ml และ Chloroform-isoamyl 3 ml. อย่างละสองครั้ง

10.เก็บเฉพาะส่วนใส (ใช้ pipette tip ปากกว้าง)

11.เติม 4 M. NaCl 0.6 ml. เติม Cold Absolute Ethanol 12 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่ -70°C 15 นาที

12.ปั่นที่ 1,000 rpm. 10 นาที เก็บตะกอนโครโมโซม

13.ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol

14.ทำให้ตะกอนแห้งด้วยความดัน

15.ละลายตะกอนด้วย TE ในปริมาตรที่เหมาะสม

2. การตัดโครโมโซมด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

สารเคมี

น้ำกลั่น

เอนไซม์ *Eco*R I

10 x *Eco*R I buffer

Spermidine 0.25 mg/ml

วิธีทดลอง

ผสมสารเคมีและโครโมโซมที่เตรียมได้ในสัดส่วนดังต่อไปนี้

โครโมโซม	5-10	ไมโครลิตร(ใช้ดีเอ็นเอประมาณ 1 μg)
10 x buffer	10	ไมโครลิตร
เอนไซม์	1	ไมโครลิตร(1-5 unit)
spermidine	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	78-83	ไมโครลิตร

บ่มที่ 37°C นาน 1-2 ชม. แล้วตรวจสอบว่าโครโมโซมถูกย่อยอย่างสมบูรณ์หรือไม่ด้วย agarose gel electrophoresis

3. การสกัดพลาสมิดออกจากแบคทีเรียโดยวิธี Rapid Alkaline Extraction

สารเคมี

อาหารเหลว LB (tryptone 10 กรัม, yeast extract 5 กรัม, NaCl 5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย lysis (50 mM glucose; 25mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH8.0 ก่อนใช้ให้เติมเอนไซม์ lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

สารละลายบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0)

<u>สารละลาย NaOH/SDS</u> (0.2 N NaOH, 1%sodium dodecyl sulphate; ผสมก่อนใช้ ไม่สามารถ เก็บไว้ได้นาน)

<u>สารละลาย 3 M potassium acetate pH 4.8</u> (potassium acetate 296 กรัม ละลายใน glacial acetic acid ประมาณ 115 มิลลิลิตร หรือให้ได้ pH 4.8 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วย น้ำกลั่น)

<u>Phenol/chloroform/isoamyl alcohol</u> ด้วยอัตราส่วน 25:24:1 ตามลำดับ

<u>Absolute ethanol</u> ที่แช่เย็น

<u>70% ethanol</u> ที่แช่เย็น

สารละลายทุกตัว (ยกเว้น Phenol และ ethanol) ให้นึ่งฆ่าเชื้อเพื่อทำลายเอนไซม์ nuclease ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที ก่อนนำมาใช้

วิธีการทดลอง

1. เลี้ยงแบคทีเรียใน LB 5 มิลลิลิตร นาน 14-16 ชั่วโมง
2. เทแบคเรียใส่ลงในหลอด microcentrifuge ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 12,000-15,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเทอาหารทิ้ง (ต้องนำไปฆ่าเชื้อทิ้งก่อน เททิ้งในอ่างน้ำทิ้ง)
3. เติมสารละลาย lysis ปริมาตร 88 ไมโครลิตร ผสมให้เซลล์ละลายด้วยการใช้นิ้วดีดเบาๆ นำไปบ่มที่ 37°ซ นาน 10 นาที
4. เติมสารละลาย NaOH/SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้นิ้วดีดเบาๆ นำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที
5. เติมสารละลาย potassium acetate ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เซลล์ละลายด้วยการใช้นิ้วดีดเบาๆ นำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งนาน 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000-15000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทเก็บส่วนใสไว้ในหลอดใหม่
6. นำสารละลายพลาสมิดมาสกัดโปรตีนทิ้งด้วยการเติม phenol/chloroform/isoamyl alcohol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000-15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทเก็บส่วนสารละลายพลาสมิดไว้ในหลอดใหม่
7. เติม absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปแช่ที่ -70°ซ นาน 10 นาที หรือ -20°ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000-15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เท absolute ethanol ทิ้ง แล้วล้างตะกอนพลาสมิดด้วย 70% ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดิม
8. ทำให้ตะกอนพลาสมิดแห้งด้วย ชุดทำสุญญากาศ

9. ละลายตะกอนพลาสมิดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 40-50 ไมโครลิตร
10. อาจนำสารละลายพลาสมิดไปทำลายอาร์เอ็นเอที่ปนมาด้วยเอนไซม์ RNase หรือเก็บพลาสมิดไว้เพื่อตรวจสอบคุณภาพด้วยการทำ electrophoresis ที่ 4 °ซ

4. การตัด Plasmid DNA ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

สารเคมี:

น้ำกลั่น (Sterile)

เอนไซม์ *Hinf* I

10 x *Hinf* I buffer

วิธีทดลอง

ผสมสารเคมีและดีเอ็นเอที่เตรียมได้จาก 2ในสัดส่วนดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอ	5-10	ไมโครลิตร(ใช้ดีเอ็นเอประมาณ 1 μg)
10 x buffer	10	ไมโครลิตร
เอนไซม์	1	ไมโครลิตร(1-5 unit)
น้ำกลั่น	78-83	ไมโครลิตร

บ่มที่ 37°C นาน 1-2 ชม. แล้วตรวจสอบว่าดีเอ็นเอถูกย่อยอย่างสมบูรณ์หรือไม่ด้วย agarose gel electrophoresis

5. การวิเคราะห์ DNA โดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

สารเคมีและอุปกรณ์

Agarose gel (ดูตารางที่ 1 ประกอบการเลือกใช้ ซึ่งขึ้นกับขนาดของดีเอ็นเอนั้นๆ)

สารละลายบัฟเฟอร์ TAE (0.04M Tris-acetate, 0.002M EDTA)

สารละลาย Ethidium bromide (0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

10x บัฟเฟอร์ loading (20% Ficoll 400, 0.1 M EDTA, pH8.0, 1.0% SDS, 0.25% Bromphenol blue, 0.25% Xylene cyanol)

ชุด Horizontal gel electrophoresis

เครื่องกำเนิดไฟฟ้ากรพแสตรง (DC power supply)

วิธีทดลอง

1. ชั่ง agarose ให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยอาศัยตารางที่ 1 เพื่อการพิจารณาแยกขนาดของดีเอ็นเอให้มีประสิทธิภาพสูงที่สุด
2. นำ agarose มาทำให้หลอมเป็นเจลในเตาไมโครเวฟ หรือต้ม จนแน่ใจว่า agarose หลอมหมด แล้วจึงปล่อยทิ้งไว้ให้พออุ่น
3. ประกอบอุปกรณ์ chamber สำหรับทำ electrophoresis ตามแต่ละชนิดของผู้ผลิต สิ่งที่สำคัญคือต้องจัดวาง comb ให้อยู่ในแนวดิ่งกับพื้นของ chamber โดยเว้นช่องว่างระหว่างปลายของ comb กับพื้นให้มีความสูงไม่น้อยกว่า 1-2 มิลลิเมตร
4. เทเจลลงในแบบพิมพ์ที่มีที่กั้นเพื่อไม่ให้เจลรั่ว (ขึ้นกับชนิดของ chamber) ปล่อยให้เจลแข็งนานประมาณครึ่งชั่วโมง จากนั้นถอดอุปกรณ์การกั้นขอบของ chamber และ comb ออกให้นุ่มนวลที่สุดเพื่อมิให้ผนังของหลุมแตกได้ นำเจลไปวางใน chamber
5. เทสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ลงใน chamber จนมีระดับสูงกว่าผิวหน้าเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร จากนั้นให้ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 10xloading buffer ด้วยอัตราส่วน 10:1 แล้วใส่สารละลายดีเอ็นเอที่ได้ลงในหลุม (wells) ควรใส่ดีเอ็นเอมาตรฐานทุกครั้งเพื่อเป็นตัวบ่งบอกขนาดของดีเอ็นเอตัวอย่าง โดยสามารถเลือกชนิดของดีเอ็นเอมาตรฐานได้หลายชนิด
6. ปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าสู่ chamber ให้มีความต่างศักย์อยู่ระหว่าง 1 ถึง 10 โวลท์ต่อความยาวของเจล โดยให้ขั้วลบอยู่ด้านหลุมของสารละลายดีเอ็นเอ
7. ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเมื่อสีน้ำเงินของ Bromophenol blue วิ่งเข้าใกล้สุดปลายทางของเจล นำเจลออกมาจาก chamber แล้วแช่ไว้ในสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 5 นาที ล้าง ethidium bromide ที่เกาะตามผิวเจลออกด้วยการแช่เจลในน้ำกลั่นนานประมาณ 5-10 นาที แล้วจึงนำเจลไปดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ต

ตารางที่ 1 แสดงความเข้มข้นของเจล agarose ที่เหมาะสมสำหรับขนาดดีเอ็นเอต่างๆ

%Agarose	ขนาดดีเอ็นเอที่เหมาะกับการแยก (kb)
0.5	30 ถึง 1
0.7	12 ถึง 0.8
1.0	10 ถึง 0.5
1.2	7 ถึง 0.4
1.5	3 ถึง 0.2

6. การสกัดดีเอ็นเอออกจาก Agarose Gel

สารเคมี

NaI stock solution

glass milk

TE buffer

Washing solution

วิธีทดลอง

1. ประมาณน้ำหนักของ agarose ถ้าน้อยกว่า 0.4 g. (1 g. = 1 ml) ใส่ใน microcentrifuge ไม่จำเป็นต้องบด gel แต่ถ้าชิ้นใหญ่ให้ตัดชิ้นขนาดหนา 2 mm. เพื่อให้ ละลายง่าย
2. เติม 2.5 -3 Volume ของ NaI Stock Solution (2-3 เท่าของน้ำหนักเจล เช่นถ้าเจลหนัก 0.1 กรัม ให้เติมสารละลาย NaI 0.3 ml) อุ่นที่ 55°C นานอย่างน้อย 2นาที เจลควรจะละลายหมดได้ภายใน5 นาที ถ้าไม่หมดให้อุ่นต่อจนกว่าจะละลายหมด แต่**ข้อควรระวังคือ**อย่าอุ่นไว้นานเกินไป
3. เติม glass milk (glass milk มีประจุ + ส่วน DNA ประกอบด้วยหมู่ ฟอสเฟต ซึ่งมีประจุ- จะรวมกันได้ดี) โดยให้มีสัดส่วนของ glass milk ต่อดีเอ็นเอคือ ใช้ glass milk 5 µl ต่อดีเอ็นเอ 5 µg ผสม และเขย่าทุกๆ 1-2 นาทีเป็นเวลา 2-5 นาที
4. ปั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm 5 วินาที ดูดส่วนใสออก
5. ล้างตะกอน 3 ครั้งด้วย washing solution
6. ละลายดีเอ็นเอออกจากตะกอนด้วย TE Buffer 30-50 µl. บ่มที่ 45 - 55C นาน 2-3 นาที
7. Centrifuge 10,000 rpm, 3 นาที เก็บส่วนใสซึ่งจะมีดีเอ็นเอที่ต้องการ

7. การทำ Southern Blotting

สารเคมีและวัสดุ

0.2 N HCl

Denaturation solution (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)

Neutralization solution (3 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 8)

20xSSC (3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate, ปรับให้ได้ pH 7)

2x, SSC

0.1 % SDS

กระดาษ 3 MM Whatman และ กระดาษทิชชู

<u>แผ่นไนโตรเซลลูโลสหรือไนลอน</u>

<u>กล่องพลาสติกหรือถุงพลาสติก</u>

วิธีทดลอง

1. แยกดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis (ดูบทที่ 5)
2. ตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วย ethedium bromide และถ่ายรูปเก็บไว้
3. ล้างเจลให้สะอาดด้วยน้ำ
4. แช่เจลในสารละลาย 0.2 N HCl เขย่าเบาๆ 10 นาที (การแช่ในกรดจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย้ายดีเอ็นเอขนาดใหญ่ ขั้นตอนนี้อาจงดได้หากดีเอ็นเอที่ต้องการย้ายมีขนาดเล็กกว่า 10 kb)
5. เทกรดออก ล้างเจลด้วยน้ำ 2-3 ครั้ง
6. แช่ใน denaturation solution เขย่าเบาๆ 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง
7. แช่ใน neutralization solution เขย่าๆเบาๆ 30 นาที
8. วัดขนาดเจล แล้วตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสให้ได้ขนาดเล็กว่าเจลเล็กน้อย (ประมาณ 3 มิลลิเมตรจากปลายทุกด้าน) แช่แผ่นที่ตัดในน้ำ 1 นาที และแช่ต่อใน 20xSSC 5-10 นาที
9. ตัดกระดาษ Whatman 3 MM 3-5 แผ่นให้มีขนาดเล็กกว่าแผ่นไนโตรเซลลูโลส (7 มิลลิเมตร จากปลายทุกด้าน)
10. ทำที่รองรับเจลด้วยกระดาษ Whatman 3 MM ให้มีความกว้างมากกว่าขนาดเจลเล็กน้อยและยาว 30-40 เซนติเมตร กระดาษนี้ถูกทำให้ชุ่มด้วย 20xSSC แล้ววางทับบนแผ่นกระจกหรือแผ่นพลาสติกซึ่งออกแบบให้ลอยอยู่เหนือภาชนะบรรจุสารละลาย 20xSSC ปลายสองด้านของกระดาษ 3 MM ต้องสัมผัสกับสารละลาย 20xSSC
11. วางเจลบนที่รองรับในข้อ 10
12. วางแผ่น 3 MM ในข้อ 9 ซึ่งชุ่มด้วยสารละลาย 20xSSC ทับบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส
13. วางกระดาษทิชชูทับบนแผ่น 3 MM ให้สูงขึ้นมา 3 เซนติเมตร
14. วางของหนักทับบนกระดาษทิชชู
15. ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ดีเอ็นเอจะถูก transfer
16. เมื่อครบเวลา ให้ใช้ forcep ค่อยๆคีบไนโตรเซลลูโลสออกมาล้างเบา ๆ ด้วย 2xSSC วางบนกระดาษ 3 MM ปล่อยให้แห้ง แล้วเปลี่ยนไปวางบนกระดาษ 3 MM แผ่นใหม่และนำไปอบที่ 80°ซ นาน 2 ชั่วโมง
17. แผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ผ่านการอบแล้ว สามารถนำไปทำ hybridization ต่อได้ทันทีหรืออาจเก็บไว้ในที่แห้งได้นานเป็นปีโดยก่อนนำไปใช้ควรอบอีกครั้งที่ 80°ซ นาน 2 ชั่วโมง

8. การติดฉลาก DNA ด้วย Biotinylated Nucleotide โดยวิธี Nick Translation

สารเคมี

Solution A (0.2 mM. ของ dNTPS ใน 500 mM. Tris-HCl pH 7.8, 50 mM. Mg Cl_2, 100 mM. 2-mercaptoethanol และ 100 g/ml. BSA)

Solution B (0.4 units/µl BRL DNA Polymerase I, 40 pg/µl DNA Pol I/DNAse I (Nick Translation Grade), 50 mM. Tris-HCl pH 7.5, 5 mM. Mg-acetate, 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 50% glycerol และ 100 µg/ml. nuclease-free BSA)

Solution C (เป็น Stop buffer ประกอบด้วย 300 mM. Na_2 EDTA pH 8.0)

Distilled H_2O

วิธีทดลอง

1. ผสมสารละลายต่อไปนี้ลงใน microcentrifuge tube

Solution A	5	ไมโครลิตร
DNA	x	ไมโครลิตรหรือ 1 ไมโครกรัม Sample DNA
0.4 mM. Biotin-7-dATP	2.5	ไมโครลิตร
H_2O	y	ไมโครลิตร(จนได้ปริมาตรรวมเป็น 45 µl)

2. เติม 5 µl Solution B (DNA Polymerase I และ DNA Pol I/DNAse I) ผสมให้เข้ากัน
3. บ่มที่ 15°C นาน 90 นาที
4. เติม Solution C (Stop Buffer) 5 µl และ 1.25 µl ของ 5% SDS

9. การทำ Biotinylated DNA ให้บริสุทธิ์ด้วย Gel Filtration

Biotin-labeled DNA ถูกแยกจาก unincorparation nucleotides โดยผ่านบน Chromatography แบบ Gel filtration บน Sephadex G-50 ซึ่งถูกทำให้สมดุลย์ด้วย 1 x SSC (0.15 M. Sodium Chloride, 0.015 M Sodium Citrate, pH 7.0) และ1% SDS

10. การตรวจสอบผลด้วย Blugene TW Nonradioactive NA Detection System

อุปกรณ์และสารเคมี

Streptavidin-alkaline phosphatase (SA-AP)

3M. NaCl, 1 mM. $MgCl_2$, 0.1 mM. $ZnCl_2$, 30 mM. tri-ethanolamine (pH 7.6)

Nitroblue tetrazolium (NBT) ความเข้มข้น 75 mg/ml. ใน 70% dimethylfarmamide

5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) ความเข้มข้น 50 mg/ml. ใน dimethyl formamide

buffer 1 (0.1 M. Tris-Hcl/0.15 M. NaCl pH 7.5)

buffer 2 (3% BSA ใน buffer 1)

buffer 3 (0.1 M. Tris pH 9.5)

วิธีทดลอง

1. ทำแผ่นไนโตรเซลลูโลสให้อิ่มตัวด้วย buffer 1
2. แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสใน buffer 2 นาน 10 นาที
3. แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสใน buffer 2 ที่มี SA-AP (SA-AP 280 µl ต่อ 5 ml ของ buffer 2 นาน 30 นาที
4. ล้างด้วย buffer 1 นาน 10 นาที 3 หน
5. เปลี่ยนไปแช่ต่อในสารละลาย buffer 3 นาน 1 นาที
6. ผสมสารละลาย NBT 33 µl และ BCIP 25 µl ลงใน 7.5 ml ของ buffer 3 แล้วแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลายที่ได้นี้ในที่มืดนาน 30 นาที

11. การติดฉลากดีเอ็นเอด้วย DIG (digoxigenin) หรือ DIG-labeling

DIG หรือ digoxigenin คือสารสเตียรอยด์ขนาดเล็ก สามารถทำให้เกิดพันธะกับ dUTP ได้เป็น DIG-11-dUTP แล้วนำมาติดฉลากบนดีเอ็นเอตรวจจับโดยอาศัยปฏิกิริยา random primed labeling คือ ให้ดีเอ็นเอ primer ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น ไปจับคู่กับสายดีเอ็นเอตรวจจับที่ตำแหน่งต่างๆ อย่างไม่เฉพาะเจาะจง เมื่อเติม DIG-11-dUTP, dATP, dGTP, dCTP และ Klewnow enzyme เอนไซม์จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ด้วยการเติมเบสต่อจากดีเอ็นเอ primer โดยมีดีเอ็นเอสายเดิมเป็น template ทำให้ DIG-11-dUTP เข้าไปอยู่ในสายตามตำแหน่งของเบส T ในที่สุดจะได้ดีเอ็นเอที่มี DIG อยู่มากมาย ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการติดฉลากแต่ละครั้งคือ10 นาโนกรัม - 3 ไมโครกรัม ดีเอ็นเอสายตรง (linear DNA) ถูกนำมาติดฉลากได้ดีกว่าดีเอ็นเอสายกลม (circular DNA) นำดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้วนี้ไปใช้ในกระบวนการ hybridization ซึ่งดีเอ็นเอตรวจจับจะจับกับดีเอ็นเอที่ได้คู่สมบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส แล้วจึงตรวจสอบผลของการ hybridize ได้โดยบ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสกับสารละลาย Anti-DIG-AP ซึ่งเป็นแอนติบอดี้ที่ปลายข้างหนึ่งเชื่อมกับเอนไซม์ alkaline phosphatase เมื่อแอนติบอดี้จับกับ DIG บนสายดีเอ็นเอ แล้วจึงเติมสับสเตรทที่ประกอบด้วย NBT (Nitroblue tetrazolium) และ X-phosphate หรือ BCIP

(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) เอนไซม์ alkaline phosphatase จะทำหน้าที่เปลี่ยนสับสเตรทให้เป็นตะกอนสีม่วงตกอยู่บริเวณที่มีดีเอ็นเอตรวจจับติดอยู่ จึงทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอเป็นสีม่วง

สารเคมี

Hexanucleotide mixture

dNTP labeling mixture(1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 0.65mM dTTP และ 0.35 mM DIG-dUTP pH 7.5)

Klewnow enzyme

0.2 M EDTA (เจือจางจากสารละลายตั้งต้น 0.5 M EDTA)

4 M LiCl (ละลาย LiCl 1.69 กรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร)

Absolute ethanol

70% ethanol

วิธีทดลอง

1. ต้มดีเอ็นเอที่ต้องการติดฉลากในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที
2. ผสมสารละลายดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอตรวจจับ (DNA probe)	5	ไมโครลิตร
hexanucleotide mixture	2	ไมโครลิตร
dNTP labeling mixture	2	ไมโครลิตร
H_2O	10	ไมโครลิตร
Klenow enzyme	1	ไมโครลิตร

3. บ่มที่ 37°ซ นานไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง
4. เติม 0.2 M EDTA 2 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา
5. เติม LiCl 2.5 ไมโครลิตร, Absolute ethanol 75 ไมโครลิตร แช่ที่ -20°ซ นาน 2 ชั่วโมง
6. ปั่นที่ 12,000xg ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol
7. ละลายตะกอนในน้ำ 20-50 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

12. Hybridization

ดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากแล้วและถูกทำให้เสียสภาพ (denature) ด้วยความร้อนจะจับกับดีเอ็นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีเบสคู่สมได้ โดยเลือกอุณหภูมิการทำปฏิกิริยาที่ต่ำกว่า melting temperaure ซึ่งส่วนมากได้แก่ที่ 68°ซ หรืออาจเติม formamide เพื่อลด melting temperature

และ hybridized ที่อุณหภูมิ 42°ซ หรือ 37°ซ แทน ก่อนการ hybridization ควรแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลาย prehybridization เพื่อให้ blocking reagent เคลือบบนไนโตรเซลลูโลส เพื่อป้องกันการจับของดีเอ็นเอตรวจจับอย่างไม่เฉพาะเจาะจง

สารเคมี

20xSSC (3 M NaCl, 300 mM sodium citrate; pH 7.0)

5xSSC (750 mM NaCl, 75 mM sodium citrate; pH 7.0)

Prehybridization solution [5XSSC, 1%(w/v) blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02 % SDS]

Hybridization solution [มีส่วนผสมเช่นเดียวกับ prehybridization solution แต่เติมดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากและผ่านการ denature ด้วยความร้อนแล้ว]

Washing 1 (2XSSC, 0.1%SDS)

Washing 2 (0.1XSSC, 0.1%SDS)

วิธีทดลอง

1. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีดีเอ็นเอติดอยู่มาแช่ในสารละลาย prehybridization solution โดยมีสัดส่วนของสารละลายต่อขนาดไนโตรเซลลูโลส คือ 20 มิลลิลิตรต่อ 100 ตารางเซนติเมตร
2. บ่มที่ 68°ซ นาน 1 ชั่วโมง. (หรืออาจนานกว่าก็ได้)
3. เมื่อครบเวลา เท prehybridization solution ออก แล้วใส่ hybridization solution ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรต่อไนโตรเซลลูโลสขนาด 100 ตารางเซนตริเมตร
4. ต้มดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากแล้ว (labeled DNA probe) ที่ 95°ซ นาน 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที
5. ใส่ดีเอ็นเอตรวจจับในข้อ 4 ลงไปใน hybridization solution 5 ไมโครลิตร
6. บ่มที่ 68°ซ นาน 6-12 ชั่วโมง
7. เมื่อครบเวลา นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาล้างด้วย Washing solution 1 ที่อุณหภูมิห้อง สองครั้งๆ ละ 5 นาทีและ Washing solution 2 ที่ 68°ซ สองครั้ง ๆ ละ 15 นาที
8. ปล่อยให้แผ่นไนโตรเซลลูโลสแห้งที่อุณหภูมิห้อง และสามารถนำไปตรวจสอบผลการ hybridized ได้ทันที หรือเก็บไว้ในที่แห้งได้นาน 1 สัปดาห์

13. การตรวจสอบผลของ Hybridization ด้วยแอนติบอดี้ต่อ DIG

สารเคมี

บัฟเฟอร์ 1 (0.1 M Tris-HCl pH 7.5; 0.15 M NaCl)

<u>บัฟเฟอร์ 2</u> (Blocking reagent 1%(w/v) ในสารละลาย buffer 1)

<u>บัฟเฟอร์ 3</u> (0.1 M Tris-HCl pH 9.5; 0.1 M NaCl; 0.05 M $MgCl_2$)

<u>บัฟเฟอร์ 4</u> (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0)

<u>Color solution</u> (ผสม NBT 45 ไมโครลิตรและ X-phosphate solution 35 ไมโครลิตรใน 10 มิลลิลิตร ของ buffer 3)

วิธีทดลอง

1. ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสในบัฟเฟอร์ 1 (ปริมาตรพอท่วม)นาน 1 นาที
2. แช่ในบัฟเฟอร์ 2 นาน 30 นาที แล้วเทสารละลายออก
3. เตรียมสารละลายแอนตี้บอดี้โดยเจือจาง Anti-DIG-AP ในสัดส่วน 1:2,500 หรือ 1:5,000 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 2
4. บ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลายแอนตี้บอดี้นาน 30 นาที
5. ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1 สองครั้ง ๆ ละ 15 นาที
6. ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 3 นาน 2 นาที
7. แช่ใน color solution (2-10 มิลลิลิตร) วางไว้ในที่มืด ห้ามเขย่า จะเกิดปฏิกิริยาเห็นสีภายใน 2-3 นาที ถ้ายังไม่เห็น อาจทิ้งไว้นาน 24 ชม.
8. หยุดปฏิกิริยาโดยล้างในบัฟเฟอร์ 4 สามารถเก็บแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่เห็นผลแล้วนี้ในบัฟเฟอร์ 4 ได้เป็นระยะเวลานาน