บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 สารเคมี

2.1.1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	Merck
Acrylamide	Merck
Calcium chloride	J.T.Baker
Chloroform	Merck
Glycerol	Sigma
Magnesium chloride	Merck
Phenol Merck	
Potassium acetate	APS Ajax Finechem
Sodium chloride	Merck
Sodium dodecyl sulfate	APS Ajax Finechem
Sodium hydroxide	Merck
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Sigma

2.1.1.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Agarose	Merck
Ampicillin	Sigma
Anti-DIG-AP	Boeheringer Mannhem
Blocking reagent	Boeheringer Mannhem
Ethidium bromide	Sigma
Expression Module /Recombinant Phage Antibody System	Amersham Pharmacia-Biotech
GeneRacer™ Kit	Invitrigen
Isopropanol	Sigma
N-Lauroylsarcosine	Sigma
NBT/BCIP	Boeheringer Mannhem
Ribonuclesae A	Merck
T4 DNA ligase	Promega
TOPO TA Cloning®	Invitrogen
TRIzol Reagent	GIBCO BRL
100bp ladder	Promega
ZAP Express® cDNA Synthesis Kit and ZAP Express® cDNA Gigapack® III Gold Cloning Kit	Stratagene

2.1.2 ตัวอย่างสัตว์ทดลองและไวรัส

กุ้งกุลาดำที่มีน้ำหนักตัว 12-15 กรัม จำนวน 50 ตัว นำมาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงของเกษตรกรในจังหวัดสงขลาและหัวเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (systemic ectodermal and mesodermal baculovirus, SEMBV) นำมาจากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.1.3 แบคทีเรีย

E.coli Top 10F′ ลักษณะจีโนไทป์ : F′ *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ 80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *deo*R *ara*D139 Δ(*ara-leu*) 7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G บริษัท Invitrogen, California, USA

E.coli XL1-Blue MRF′ มีลักษณะจีโนไทป์ : Δ(*mcr*A)183 Δ(*mrc*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173 *end*A1 *sup*E44 *thi*-1 *rec*A1 *gyr*A96 *rel*A1 *lac* [F′ *pro*AB $lacI^q$ZΔM15 Tn10(Tet^r)] บริษัท Stratagene, California, USA

E.coli XLOLR มีลักษณะจีโนไทป์ : Δ(*mcr*A)183 Δ(*mrc*CB-*hsd*SMR-*mrr*) 173 *end*A1 *thi*-1 *rec*A1 *gyr*A96 *rel*A1 *lac* [F′ *pro*AB $lacI^q$ZΔM15 Tn10(Tet^r)] Su^- λ^r บริษัท Stratagene, California, USA

E.coli TG1 มีลักษณะจีโนไทป์ : K12 Δ(*lac-pro*), *sup*E, *thi*, *hsd*Δ5/F′ [*tra*D36, *pro*AB, $lacI^q$, *lac*ZΔM15] บริษัท Pharmacia, Buckinghamshire, UK

E.coli HB2151 มีลักษณะจีโนไทป์ : K12 Δ(*lac-pro*), *ara*, *nal*, *thi*/F′[*pro*AB, $lacI^q$, *lac*ZΔM15] บริษัท Pharmacia, Buckinghamshire, UK

2.1.4 ดีเอ็นเอพาหะ

- pCR®4-TOPO® บริษัท Invitrogen, California, USA
- pCANTAB 5E บริษัท Pharmacia, Buckinghamshire, UK
- pBK-CMV บริษัท Stratagene, California, USA

2.1.5 ดีเอ็นเอต้นแบบสายสั้นๆ (Oligonucleotide primer)

- T3 primer 5′-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3′
- T7 primer 5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′
- V1 primer 5′-CGGCCCAGCCGGCCACACTAGTGGA-3′
- RV2 primer 5′-GCGGCCGCCTCTAGAAGTACTCTCGA-3′
- S1 primer 5′-CAACGTGAAAAAATTATTCGC-3′
- S6 primer 5′-GTAAATGAATTTTCTGTATGAGG-3′
- GeneRacer™ RNA Oligo Sequence

  5′-CGACUGGAGCACGAGGACACU

  GACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3′
- GeneRacer™ Oligo dT Primer Sequence

  5′-GCTGTCAACGATACGCTACGTAA

  CGGCATGACAGTG$(T)_{18}$-3′

2.1.6 DNA adaptor

*Eco*R I adaptor : 5′-OH-AATTCGGCACGAGG-3′

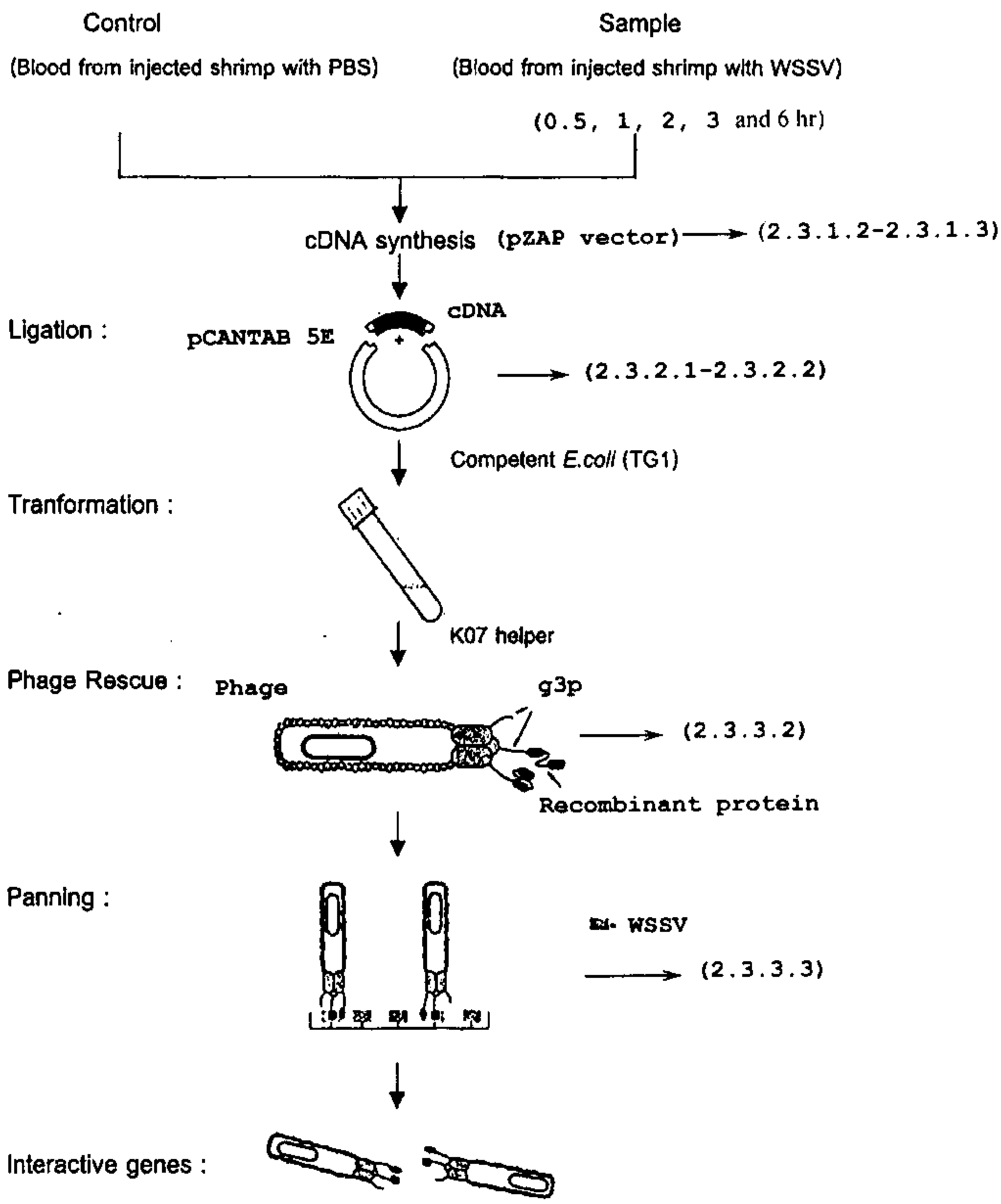
3′-GCCGTGCTCCp-5′

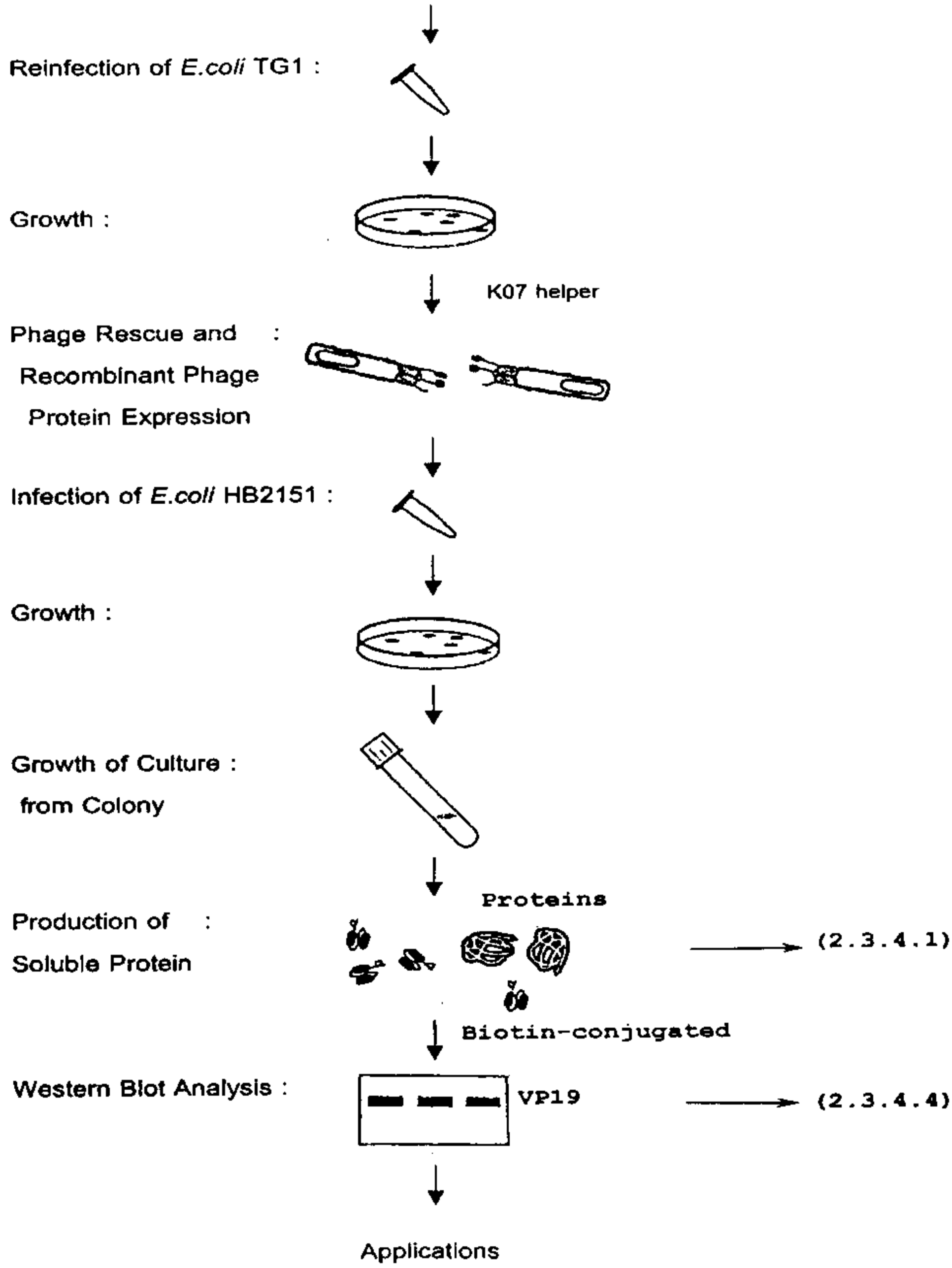
2.2 อุปกรณ์

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
เครื่องปั่นผสม (Mixer)
เครื่องกวนผสม (Stirrer)
เครื่อง Semi-Dry electrophoretic Transfer cell (BIO-RAD)
เครื่อง ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer)
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometor)
เครื่องตรวจสอบ DNA Agarose gel electrophoresis (BIO-RAD)
ตู้บ่มเชื้อ 30 และ 37 องศาเซลเซียส
ตู้แช่น้ำแข็ง - 70 องศาเซลเซียส
หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) (Hirayama)
ไมโครเวฟ (Microwave)
กล้องถ่ายรูป (Polaroid)
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น Junior 2000 C (Precisa)
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Satorius)
เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น RC 5B (Sorvall)
ตู้ปราศจากเชื้อ (Laminar flow)
เครื่องวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต รุ่น Ultraspec III (Pharmacia)
เครื่องวัด pH รุ่น CyberScan (Eutech Cybernetics)
เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (BIO-RAD)
เครื่องสังเคราะห์ DNA Polymerase Chain Reaction (hybrid), (Gene Amp 2400)

2.3 วิธีการทดลอง

แผนผังรวมของการศึกษาการค้นหายีนที่มีปฏิกิริยากับไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำของวิธีการทดลองตั้งแต่หัวข้อ 2.3.1-2.3.4.4 แสดงในรูปที่ 3





รูปที่ 3 แผนผังรวมของการศึกษาการค้นหายีนที่มีปฏิกิริยากับไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำของวิธีการทดลองตั้งแต่หัวข้อ 2.3.1-2.3.4.4

Figure 3 Flow chart of the protocol of the screening for the interactive genes of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) to White Spot Syndrome Virus since step 2.3.1-2.3.4.4

2.3.1 การเตรียม cDNA library จากเม็ดเลือดกุ้งปกติและกุ้งติดเชื้อ WSSV ใน pZAP (Stratagene, California, USA)

2.3.1.1 การเตรียม RNA (Promega, Madison, USA)

เลือกกุ้งกุลาดำที่มีชีวิต น้ำหนักตัว 12-15 กรัม จำนวน 50 ตัว เป็นกุ้งปกติที่ผ่านการตรวจสอบเชื้อ WSSV ด้วยวิธี PCR (Takahashi *et al.*, 1996) ไม่มีอาการของโรค ตัวใส เปลือกแข็งปกติ นำมาเลี้ยงในบ่อซิเมนต์ขนาด 2.5 ตัน ให้อากาศตลอดเวลา ปล่อยกุ้ง 50 ตัว/บ่อ ควบคุมความเค็มของน้ำให้คงที่ที่ 20 ส่วนในพันล้าน ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน 30 ส่วนในล้านส่วน เลี้ยงไว้ก่อนเริ่มการทดลอง 5-7 วัน แบ่งชุดการทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุมฉีดด้วย PBS (Phosphate Buffer Saline) ใช้เลือดจากกุ้งปกติ และกลุ่มที่ 2 ใช้เลือดกุ้งที่ติดเชื้อ ทำโดยการฉีดเชื้อ WSSV ที่เจือจาง 1:1000 เท่าโดยปริมาตรของเชื้อเริ่มต้น (การเตรียมเชื้อเริ่มต้นดังภาคผนวกที่ 10) ฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อตัวละ 0.1 มิลลิลิตร (ซึ่งเป็นระดับที่ทำให้กุ้งตายหมดภายใน 3 วัน) แล้วทำการเจาะเลือดกุ้งประมาณ 0.1-0.2 มิลลิลิตร/ตัว เก็บใน denaturing buffer (4 M guanidine isothiocyanate ใน CBS buffer ซึ่งประกอบด้วย 42 mM sodium citrate, 0.83 % N-lauryl sarcosine และ 0.2 mM β-mercaptoethanol) ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) วางบนน้ำแข็ง โดยเก็บตามช่วงเวลาต่างๆคือ 0.5, 1, 2, 3 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ นำเลือดที่อยู่ใน denaturing buffer เติม 2 M sodium acetate pH 4.0 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml แล้วเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol mixture 12 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งนาน 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C ดูดส่วนใสด้านบนเก็บไว้ แล้วตกตะกอน RNA โดยการเติม isopropanol ปริมาตรเท่าตัว บ่มที่อุณหภูมิ -20 °C นานอย่างน้อย 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 15 นาที ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol ที่เย็นปริมาตรเท่าตัว นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C นำตะกอนไปทำให้แห้งโดยใช้ vacuum dry นาน 15-20 นาที ละลายตะกอนโดยน้ำที่ปราศจาก RNase 500 มิลลิลิตร นำสารละลายตะกอนปริมาตร

500 มิลลิลิตร ไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 65°C นาน 10 นาที เติม biotinylated-oligo(dT) probe 3 ไมโครลิตร และ 20x SCC (7.5 M NaCl, 0.75 M sodium citrate, ปรับ pH 7.0) 13 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วเติม SA-PMPs (Streptavidin-Paramagnetic Particles) ซึ่งละลายใน 5x SCC ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วทำการจับ SA-PMPs โดยใช้ magnetic rack ค่อยๆเทส่วนใสออก ล้าง SA-PMPs ที่มีการจับกับ biotinylated-oligo(dT) ด้วย 0.1x SSC ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง จับอนุภาคส่วนที่เกาะกับ SA-PMPs ให้ตกมาอยู่ที่ก้นหลอด ดูดส่วนสารละลายที่ไม่มี SA-PMPs pellet ออก และทำการชะ mRNA โดยละลาย SA-PMPs pellet ด้วย RNase-free water ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วใช้แท่งแม่เหล็กจับส่วน SA-PMPs ไว้ ดูดส่วนสารละลายที่มี mRNA อยู่มาใส่ในหลอดใหม่ที่ไม่มี RNase วิเคราะห์ปริมาณ mRNA ที่ได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และนำไปใช้ในการเตรียม cDNA library ต่อไป

2.3.1.2 การเตรียม cDNA library ใน phage pZAP

ผสม 10x First-strand buffer 5 ไมโครลิตร, First-strand methyl nucleotide mixture 3 ไมโครลิตร, *Xho*I-linker primer (1.4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร และ RNase Block Ribonuclease Inhibitor (40 ยูนิต/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วเติม poly(A)-mRNA 37.5 ไมโครกรัมลงในหลอด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม MMLV-RT (Moloney murine leukomia virus reverse transcriptase) (50 ยูนิต/ไมโครลิตร) 1.5 ไมโครลิตรโดยปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง เพื่อทำการเปลี่ยน mRNA เป็น First-strand cDNA และนำ First-strand cDNA ที่ได้ 45 ไมโครลิตร มาเติม 10x Second-strand buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร, dNTP mixture 6 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 116 ไมโครลิตร, RNase H (1.5 ยูนิต/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร และ DNA polymerase I(9 ยูนิต/ไมโครลิตร) 11 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 16°C

นาน 2.5 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่บนน้ำแข็งทันที ทำ blunting โดยเติม blunting dNTP mix ปริมาตร 23 ไมโครลิตรและ *pfu* DNA polymerase (2.5 ยูนิต/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร ผสมและบ่มที่อุณหภูมิ 72°C นาน 30 นาที เติม phenol : chloroform (1:1) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนลงในหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 3 M sodium acetate 20 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 400 ไมโครลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ –20°C แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg นาน 60 นาที ที่ 4°C ล้างตะกอนโดยการเติม 70%(v/v) ethanol 500 ไมโครลิตร นำตะกอนดีเอ็นเอมาทำแห้งโดยใช้เครื่องดูดสูญญากาศ ละลายตะกอน cDNA ใน *Eco*R I Adaptors ปริมาตร 8 ไมโครลิตรและเติม 10x ligase buffer (500 mM Tris-HCl pH 7.5, 70 mM $MgCl_2$ และ 10 mM Dithiothreitol (DTT)) 1 ไมโครลิตร, 10 mM rATP 1 ไมโครลิตร และเอนไซม์ T4 DNA ligase (4 ยูนิต/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 8°C แล้วทำการเติม phosphate group ให้ปลาย *EcoR* I adaptor โดยเติม 10x ligase buffer 1 ไมโครลิตร, 10 mM rATP 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ T4 polynucleotide kinase (40 ยูนิต/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 6 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที แล้วแช่ใน water bath 70°C นาน 30 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ทำการตัดปลาย cDNA ด้วยเอนไซม์ *Xho* I โดยเติม *Xho*I buffer 28 ไมโครลิตร และ *Xho*I (40 ยูนิต/ไมโครลิตร) 3 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1.5 ชั่วโมง เติม 10x STE buffer (1 M NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 7.5, และ 100 mM EDTA) 5 ไมโครลิตร และ absolute ethanol เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ -20°C แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg นาน 60 นาที ที่ 4°C นำตะกอนดีเอ็นเอมาทำแห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย 1x STE buffer 10 ไมโครลิตรและเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อ 1 ไมโครลิตร นำมา 2.5 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองใหม่และ ZAP Express Vector (1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10x ligase

buffer 0.5 ไมโครลิตร, 10 mM rATP (pH 7.5) 0.5 ไมโครลิตรและเติม T4 DNA ligase (4 ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 12°C แล้วนำมา 4 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการ packaging โดยเติมลงในหลอดที่มี packaging extracts อยู่แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงโดยไม่ให้เกิดฟอง ปั่นหลอดนาน 2-3 วินาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22°C นาน 2 ชั่วโมง เติม 500 ไมโครลิตรของ SM buffer (0.1 M NaCl, 8.11 mM $MgSO_4.7H_2O$, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.01%(w/v) gelatin) เติม 20 ไมโครลิตรของ chloroform และผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนแล้วเก็บส่วนใสที่คาดว่ามี phage อยู่ ทำเจือจาง phage ใน SM buffer โดยทำเจือจางให้มีความเข้มข้น 1:10,000 1:100,000 และ 1:1,000,000 จากนั้นเติม 1 ไมโครลิตรของ phage แต่ละความเข้มข้นลงใน 200 ไมโครลิตรของเซลล์เจ้าบ้าน XL1-blue MRF′ (วิธีการเตรียมอยู่ในภาคผนวกที่ 2) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที แล้วเติม 3 มิลลิลิตร ของ LB-top agar ที่มี 10 mM $MgSO_4$ อุ่นอยู่ที่ 48°C เทสารละลายลงบน LB agar ที่มี 10 mM $MgSO_4$ และรอให้อาหารแข็งประมาณ 10 นาที จากนั้นคว่ำจานเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้น 6-8 ชั่วโมงจะเห็น plaques ซึ่งเป็นวงใสและทำการนับจำนวน plaque ที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อหาปริมาณ phage และทำการเพิ่มจำนวน phage โดยดูด bacteriophage ประมาณ 1×10^4 pfu ใน 600 ไมโครลิตรของ host cells (OD_{600} = 0.5) ใส่ลงในหลอดทดลอง ทำการเพิ่มจำนวนให้ได้ phage ประมาณ 1×10^7 pfu/ml โดยทำการเพิ่มจำนวน phage บนจานเพาะเชื้อขนาด 150 mm แล้วบ่มหลอดทดลองที่มี phage และ host cell ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที ผสม 6.5 มิลลิลิตรของ LB top agar ที่มี 10 mM $MgSO_4$ ที่หลอมเหลวและทำให้เย็นถึง 48°C นำแต่ละหลอดที่มีแบคทีเรียที่ติดเชื้อมาเทลงบน 150 mm LB-top agar ที่มี 10 mM $MgSO_4$ และเมื่อวุ้นแข็งตัวนำไปบ่มที่ 37°C นาน 6-8 ชั่วโมง เมื่อเกิด plaque เติม 8-10 มิลลิลิตร SM-buffer ลงบนหน้าวุ้นแล้วเก็บ plate ที่ 4°C นานข้าม-คืน ดูดของเหลวจากแต่ละ plate และนำมาเทรวมกันในภาชนะที่เป็น polypropylene ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติม 2 มิลลิลิตร

ของ SM buffer ใน plates อีกครั้งและเทรวมกัน เติม chloroform ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5%(v/v) ผสมกันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 500 xg นาน 10 นาที แยกส่วนใสที่มี amplified phage library เติม DMSO ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายคือ 7% แล้วเก็บ amplified phage library ที่ -80°C เพื่อใช้ในการเตรียม phage ที่สามารถแสดงออกเป็นโปรตีนที่ใช้ในการคัดเลือกกับไวรัส WSSV

2.3.1.3 การเปลี่ยน cDNA phage (pZAP) library เป็น cDNA plasmid (pZAP) library

เติม amplified phage ที่เตรียมได้จากการทดลองที่ 2.3.1.2 ที่มีจำนวนเท่ากับ 3.8×10^6 pfu, XL1-Blue MRF′ (วิธีการเตรียมอยู่ในภาคผนวกที่ 2) ที่มีจำนวน 3×10^7 cell และ Assist-helper phage จำนวนเท่ากับ 3×10^8 pfu ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37°C นาน 15 นาที แล้วเติม 20 มิลลิลิตร ของอาหารเหลว LB ที่มี 10 mM $MgSO_4$ บ่มที่ 37°C เขย่านาน 2.5-3 ชั่วโมง นำไปต้มที่อุณหภูมิ 65-70°C นาน 20 นาที ปั่นที่ความเร็ว 1,000 xg นาน 10 นาที แยกส่วนใสลงในหลอดทดลองใหม่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำ excised phagemids ไปเพิ่มจำนวนใน XLOLR cells โดยการเติม 1 ไมโครลิตรของส่วนใสกับ 200 ไมโครลิตรของ XLOLR cells ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรแล้วบ่มที่ 37°C นาน 15 นาที แล้วเติม 40 ไมโครลิตร ของ 5x LB ที่มี 10 mM $MgSO_4$ broth และบ่มที่ 37°C นาน 45 นาที จากนั้นดูด 100 ไมโครลิตร ของส่วนผสมเซลล์ที่ไม่เจือจางและเจือจาง (1:10 และ 1:100) ลงบน LB agar ที่มี Kanamycin และบ่มที่ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง นำ colony ทั้งหมดซึ่งโตบน LB agar ที่มี Kanamycin ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-24 ชั่วโมง ดูดสารละลายเซลล์มาสกัดพลาสมิดลูกผสม แล้วทำการตรวจสอบขนาดพลาสมิดลูกผสมโดยทำการแยกบน 1.2% gel electrophoresis พลาสมิดที่เตรียมได้จะนำไปใช้ในการทดลองที่ 2.3.2.1

2.3.2 การเตรียม Recombinant phage (pCANTAB 5E) display library

ทำการย้าย DNA ของ plasmid (pZAP) library เพื่อแสดงออกบนฟาจมิด pCANTAB 5E ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

2.3.2.1 การทำ PCR (Polymerase chain reaction) เพื่อสังเคราะห์ cDNA ที่มีเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็น *Sfi* I กับ *Not* I

นำ cDNA template ของกุ้งปกติและกุ้งติดเชื้อ WSSV ที่เตรียมได้จากการทดลองที่ 2.3.1.3 มาเติมสารประกอบในปฏิกิริยาที่ทำ PCR ตามตารางที่ 2.1 จากนั้นนำหลอดปฏิกิริยาไปบ่มในเครื่อง thermal cycler โดยมีขั้นตอนดังปฏิกิริยาตามตารางที่ 2.2 ทำการตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 1 สารประกอบในปฏิกิริยาที่ทำ PCR

Table 1 Composition of PCR reaction

สารประกอบในปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น	17.0
10x PCR buffer	2.5
10 mM dNTP	0.5
เอนไซม์ Tag polymerase	1.0
25 mM $MgCl_2$	2.5
V1 primer (3.5 pmole)	0.5
RV1primer (3.5 pmole)	0.5
ดีเอนเอ	0.5

ตารางที่ 2 สภาวะในการทำ PCR

Table 2 PCR condition

อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา	จำนวนรอบ (รอบ)
94	3 นาที	1
94	1 นาที	25
55	1 นาที	
72	2 นาที	
72	10 นาที	

2.3.2.2 การนำ PCR product ให้แสดงออกบน pCANTAB 5E

ย่อย PCR product ที่ได้จากข้อ 2.3.2.1 ของกุ้งปกติและกุ้งติดเชื้อ WSSV ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sfi* I และ *Not* I โดยเตรียมปฏิกิริยาในภาคผนวกที่ 5 นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับฟาจมิด pCANTAB 5E ซึ่งประกอบด้วย 10x ligation buffer ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอ (1ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) 7.0 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอพาหะ pCANTAB 5E 1.0 ไมโครลิตรและ T4 DNA ligase 1.0 ไมโครลิตร ผสมสารละลายเหล่านี้ให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงเบา ๆ บ่มไว้ในตู้เย็น 4°C ใช้เวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วใช้ 2.5 ไมโครลิตรของสารละลายเติมลงใน competent cell *E.coli* (TG1) (วิธีการการเตรียมในภาคผนวกที่ 3) 100 ไมโครลิตรที่เตรียมไว้เขย่าหลอดเบา ๆ ให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 45 นาที จากนั้นนำหลอดไปอุ่นที่อุณหภูมิ 42°C นาน 2 นาที ใน water bath นำหลอดมาแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดเหลว LBG (LB+20 mM Glucose) ลงในหลอด 900 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใช้ไมโครปิเปตดูด 200 ไมโครลิตรของแต่ละหลอดไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB agar ที่มี ampicillin อยู่ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง โดยเซลล์ลูกผสมที่ได้จะถูกนำมาใช้ในการเตรียม

phage ที่สามารถแสดงออกเป็นโปรตีนที่ใช้ในการคัดเลือกกับไวรัส WSSV ในข้อ 2.3.3.2 ต่อไป

2.3.3 การคัดเลือกฟาจลูกผสม pCANTAB 5E ของกุ้งปกติและกุ้งติดเชื้อ WSSV ที่สามารถจับกับ WSSV

2.3.3.1 การเตรียม WSSV inoculum (Hameed *et al.*, 2000)

ดูดเลือดกุ้งที่เป็นโรคโดยใช้ sterile syringe แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 xg ที่ 4°C นาน 20 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาทำการไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 xg ที่ 4°C นาน 30 นาที และนำส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.4 ไมโครเมตร และเก็บส่วนที่ผ่านการกรองที่ –20°C

2.3.3.2 การเตรียมฟาจลูกผสมที่ผลิตโปรตีนของ cDNA ของกุ้งปกติและกุ้งติดเชื้อ WSSV บนผนังเซลล์ของ pCANTAB 5E

นำเซลล์ TG1 ที่มีฟาจมิดลูกผสมอยู่ภายในที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วจึงนำ 500 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่านาน 1 ชั่วโมง เติม 25 ไมโครลิตรของ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ ampicillin แล้วเติม $4x10^{10}$ pfu ของ M13K07 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่านาน 1 ชั่วโมง จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ 1,000 xg นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วทำการละลายตะกอนอีกครั้งด้วย 5 มิลลิลิตรของอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่านาน 16-18 ชั่วโมง นำมาหมุนเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 1,000 xg นาน 20 นาที เก็บส่วนของเหลวที่มีฟาจลูกผสมอยู่ เติม 10 มิลลิลิตรของ PEG/NaCl (0.025 M polyethylene glycol-8000 และ 2.5 M NaCl) ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 30-60 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนใน 16 มิลลิลิตรของ LB- broth ซึ่งในสาระลายตะกอนคือฟาจลูกผสมที่มีโปรตีนของ cDNA ของกุ้งปกติและกุ้งติดเชื้อ WSSV แสดงออกอยู่บนผนังเซลล์

2.3.3.3 การทำการคัดเลือกฟาจลูกผสม pCANTAB 5E ที่สามารถจับกับ WSSV

เคลือบ 96 well plate ด้วยไวรัส WSSV (จากข้อ 2.3.3.1) (ปริมาณ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรใน PBS buffer) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วย PBS 100 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง แล้วเท blocking buffer (1XPBS ที่มี 10 % nonfat dry milk) ให้ทั่วทั้ง plate บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วย PBS 100 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม blocking buffer ที่ประกอบด้วย 0.01% sodium azide ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในของเหลวที่มีฟาจลูกผสม pCANTAB 5E อยู่ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10-15 นาที แล้วดูดสารละลายที่มีฟาจลูกผสม pCANTAB 5E 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 100 ไมโครลิตร จำนวน 20 ครั้ง และล้างด้วย PBS ที่มี 0.1% Tween 20 อีก 20 ครั้ง และทำการติดเชื้อฟาจที่จับกับ WSSV ในหลุมด้วย *E. coli* (TG1) โดยเติม log phase *E. coli* TG1 cells (OD_{600}= 0.3) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุม บ่มที่ 37°C ในเครื่องเขย่า 250 rpm นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบ 1 ชั่วโมง ดูดสารละลายมา 100 ไมโครลิตร แล้วนำมาทำเจือจางด้วย LB broth (1:10, 1:100 และ 1:1000) จากนั้นดูด 100 ไมโครลิตรของเซลล์ที่ไม่เจือจางและแต่ละความเข้มข้นลงเกลี่ยใน SOBAG plate (LB +20 mM Glucose + 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของ ampicillin) บ่มที่ 30°C นานข้ามคืน นำ colony ที่เจริญบนอาหาร SOBAG plate มาสกัดพลาสมิด (ตามวิธีการในภาคผนวกที่ 4) และศึกษาลำดับเบสของโคลนที่ได้ โดยใช้เครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer และทำการเปรียบเทียบผลที่ได้กับข้อมูลของธนาคารยีน

2.3.4 การทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีนที่ผลิตจากโคลนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3.3.3 กับโปรตีนของไวรัส WSSV

2.3.4.1 การผลิตโปรตีนที่ผลิตจากโคลนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3.3.3 ใน *E. coli* HB2151 cells

นำ 2 ไมโครลิตรของฟาจลูกผสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3.3.3 บ่มกับ 400 ไมโครลิตรของสารละลายเซลล์ HB2151 ซึ่งอยู่ใน log phase ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าเบา ๆ นาน 30 นาที แล้วดูด 200 ไมโครลิตร ไปทำ spread plate บนอาหารแข็ง LB ที่มี ampicillin อยู่ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 16-18 ชั่วโมง นำโคโลนีที่เจริญบน LB ที่มี ampicillin มา 1 โคโลนี แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว LBG บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่านาน 16-18 ชั่วโมง ดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 10 มิลลิลิตรของอาหารเหลว LBG ที่มี ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่านาน 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงอัตราเร็ว 1,500 xg นาน 20 นาที แล้วเก็บตะกอนเซลล์ หลังจากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย10 มิลลิลิตร ของอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin และเติม Isopropylthiogalactoside (IPTG) เพื่อชักนำให้แลคโอเปอรอนทำงานได้ดี โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นานอย่างน้อย 3 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 xg นาน 20 นาที จากนั้นแยกขนาดโปรตีนที่ต้องการซึ่งมีขนาดประมาณ 2,000-3,000 Da ด้วย spin column ที่มีแผ่นกรองขนาด molecular weight cut off เท่ากับ 5 kDa ซึ่งจะได้โปรตีนขนาดต่ำกว่า 5 kDa ซึ่งนำไปใช้จับโปรตีน WSSV โดยเก็บส่วนของเหลวไว้ที่อุณหภูมิ –20°C และตรวจสอบขนาดของโปรตีนโดยแยกโปรตีนที่ผลิตได้จากโคลนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3.3.3 เทียบกับโปรตีนที่ผลิตได้จากโคลนที่ไม่มีชิ้น insert บน 15% Tricine SDS-PAGE (วิธีการตามภาคผนวกที่ 7.2)

2.3.4.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีนของไวรัส (Hulten *et al.*, 2000)

ตัดเอาเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส ในส่วนเหงือก, ขาเดิน, ขาว่ายน้ำ และหัวใจของกุ้งจำนวน 10 ตัว นำมาบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยเติม TNE buffer (5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl และ 400 mM NaCl, pH 7.4) ปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุน-เหวี่ยงที่ความเร็ว 1,700 xg นาน 25 นาทีที่ 4°C ดูดสารละลายด้านบนมาทำการแยกไวรัสด้วยการทำ discontinuous sucrose density gradient centrifugation ที่ 80,000 xg นาน 1 ชั่วโมง โดยส่วนที่มีไวรัสจะอยู่ในช่วงระหว่างชั้นของ 20 และ

45% sucrose แยกส่วนที่มีไวรัสมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 45,000 xg นาน 1 ชั่วโมงที่ $4^{o}C$ แล้วละลายตะกอนไวรัสใน TN buffer (20 mM Tris-HCl และ 400 mM NaCl, pH 7.4) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำสารละลายไวรัสที่ได้มาทำให้เซลล์แตกโดยการทำ sonication เป็นเวลา 20 วินาที แล้วแช่บนน้ำแข็งทันที แยกขนาดโปรตีนของไวรัสบน 15% SDS-PAGE (วิธีการตามภาคผนวกที่ 7.1) แล้วตัดเจลส่วนที่ต้องการมาแยกโปรตีนออกจากเจลด้วยเครื่อง Gel Eluter (Hoefer) ซึ่งจะได้โปรตีนของไวรัสขนาด 19 KDa (VP19) และ 15 KDa (VP15)

2.3.4.3 การติดฉลากโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้จากข้อ 2.3.4.1 ด้วย Biotin-conjugated

โดยใช้ lyophilized protein ที่ผลิตได้จากข้อ 2.3.4.1 ที่มีปริมาณโปรตีน 1.2 มิลลิกรัม ซึ่งละลายอยู่ในน้ำกลั่นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำ dialysis ด้วยสารประกอบ 0.15 M KCl ใน 0.01 M PBK (6.67 mM K_2HPO_4 และ 3.33 mM, pH 7.5) ที่ $4^{o}C$ นาน 16-18 ชั่วโมง เติมสารละลาย (0.2 M $NaHCO_3$ ใน 0.15 M KCl, pH 8.8) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Biotin (12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M NH_4Cl ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำไปทำ dialysis ด้วยสารละลาย PBK นานอย่างน้อย 3 วัน

2.3.4.4 การทำ Western blotting

แยกโปรตีนของไวรัส VP19 และ VP15 บน 15% SDS-PAGE โดยใช้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 20 ไมโครกรัม ย้ายโปรตีนจากเจลไปสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยนำเจลมาแช่ใน transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine และ 20% methanol) นาน 10 นาที วางกระดาษกรองที่ชุ่มบัฟเฟอร์เดียวกับเจลลงบนแผ่นอิเล็กโทรดของเครื่อง Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, USA) แล้ววางทับด้วยแผ่นเมมเบรน แล้ววางแผ่นเจลโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นระหว่างแผ่นเจลและ

เมมเบรน วางทับด้วยกระดาษกรองด้านบน แล้วจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 10-15 โวลต์นาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่นเมมเบรนมาแช่ใน blocking solution (PBST + 5% skimmed milk) บ่มนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย PBST นาน 15 นาทีจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วยโปรตีนลูกผสมที่ติดฉลากจากข้อ 2.3.4.3 ที่ละลายอยู่ใน PBST ในอัตราส่วน 1:10 บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย PBST นาน 15 นาทีจำนวน 3 ครั้ง บ่มแผ่นเมม เบรนใน Streptavidin-Alkaline phosphatase conjugated ซึ่งละลายใน PBST ในอัตราส่วน 1:1,000 บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย PBST นาน 15 นาทีจำนวน 3 ครั้ง แช่เมมเบรนในสารละลาย detection buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl และ 0.05 M $MgCl_2$) นาน 2 นาที แช่ในสารละลาย color substrate (10x NBT/BCIP) วางในที่มืดจนกระทั่งเกิดสีม่วงขึ้น แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

2.3.5 การทำ Dot Blot hybridization (Boenringer Mannheim, MA, USA) เพื่อหาชิ้นยีนเต็มของยีนจากโคลนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3.3.3 ใน pCR®4 -TOPO® library

เนื่องจากชิ้นยีนจากโคลนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3.3.3 ใน pCANTAB 5E ที่ได้มีขนาดสั้น จึงได้มีการเตรียม cDNA library ขึ้นใหม่โดยใช้ GeneRacer™ Kit (Invitrogen, California, USA) โดยนำ mRNA ปริมาณ 250 นาโนกรัมใน 7 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย 10x TAP buffer 1 ไมโครลิตร, RNase Out™ (40 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร และ TAP (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาปั่นที่ความเร็วต่ำเพื่อให้ของเหลวตกลงที่ก้นหลอด บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่งโมง วางบนน้ำแข็ง ตกตะกอน RNA แล้วละลายตะกอนด้วย RNase-free water ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ดูดสารละลาย RNA ดังกล่าวใส่ในหลอดที่มี Lyophilized-GeneRacer RNA Oligo (0.25 ไมโครกรัม) ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่ความเร็วต่ำให้

สารละลายตกลงก้นหลอด บ่มที่ 65°C เป็นเวลา 15 นาทีแล้ววางบนน้ำแข็งประมาณ 2 นาที เติม 10x Ligase buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10 mM ATP 1 ไมโครลิตร, RNase Out (40 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตรและ T4 DNA ligase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วางบนน้ำแข็ง ตกตะกอน RNA แล้วละลายตะกอนให้มีปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติม GeneRacer Oligo dT primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตรและ dNTP mix (อย่างละ 25 mM) 1 ไมโครลิตร บ่มที่ 65°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัด RNA Secondary Structure วางบนน้ำแข็งนาน 2 นาที แล้วเติม 10x RT buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, AMV-RT (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร, sterile water 4 ไมโครลิตรและ RNase Out (40 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ 42°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บ่มที่ 85°C เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ AMV-RT เก็บที่ –20°C ทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี PCR ที่มีสารประกอบในการทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 2.3 และสภาวะในการทำ PCR ตามตารางที่ 2.4

ตารางที่ 3 สารประกอบในการทำปฏิกิริยา

Table 3 Composition of PCR reaction

สารประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
GeneRacer 5′ Primer (10 U)	1.5
GeneRacer 5′ Primer (10 U)	1.5
RT template	1.0
10x PCR buffer	2.5
dNTP (10 mM)	1.0
Tfl Tag polymerase	0.5
50 mM $MgSO_4$	2.0
Sterile water	15.0

ตารางที่ 4 สภาวะในการทำ PCR

Table 4 PCR condition

อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา	จำนวนรอบ (รอบ)
94	2 นาที	1
94	30 วินาที	5
72	1 นาที	
94	30 วินาที	
70	1 นาที	5
95	30 วินาที	
60	30 วินาที	25
72	1 นาที	
72	10 นาที	1

เติม fresh PCR product 4 ไมโครลิตร, salt solution (1.2 M NaCl, 0.06 M $MgCl_2$) 1 ไมโครลิตร และ Topo vector (pCR®4-TOPO®) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่ 22-23°C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารในปฏิกิริยามา 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการ Transformation เข้าสู่ Top 10 F′ competent cells ดังวิธีในข้อ 2.3.2.2 นำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี kanamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อนำไปสกัดพลาสมิดดังวิธีในภาคผนวกที่ 4 ใช้ไมโครปิเปตขนาด 1 ไมโครลิตรดูดพลาสมิดลูกผสมทั้ง 324 โคลนมาหยดบนแผ่นไนลอนเมมเบรนที่ตีตารางกำหนดหมายเลขไว้ แล้ววางบนกระดาษกรอง Whatman 3 MM ที่ชุ่มด้วยสารละลาย denaturing solution (0.5 M NaOH และ 1.5 M NaCl) นาน 15 นาที ย้ายเมมเบรนลงบนกระดาษกรองที่ชุ่ม neutralization solution (1.5 M NaCl และ 1.0 M Tris-HCl, pH 7.4) นาน 15 นาที ย้ายมาวางบนกระดาษกรองชุ่ม 2x SSC (0.3 M NaCl และ 0.03 M Na-citrate, pH 7.0) นาน 10

นาที นำแผ่นเมมเบรนไปฉายรังสี UV นาน 5 นาที นำเมมเบรนใส่ในหลอดแก้วสำหรับ hybridization ที่มี hybridization buffer (5x SSC, 1% blocking solution, 0.1% N-lauroyl sarcosine และ 0.02% SDS) แล้วนำไปอุ่นที่ 55°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วเทสารละลายออกและเติม hybridization buffer ที่มี DNA probe 10 นาโนกรัมที่เตรียมจากโคลนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3.3.3 และเตรียมดังภาคผนวกที่ 9) บ่มที่ 55°C นาน 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วยสารละลาย Washing 1 (2x SSC และ 0.1% SDS) นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้งที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลาย Washing 2 (0.1x SSC และ 0.1% SDS) นาน 15 นาที จำนวน 2 ครั้งที่อุณหภูมิ 68°C นำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วยสารละลายที่มี 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl ล้างนานประมาณ 2 นาที แช่แผ่นเมมเบรนใน 1% blocking buffer นาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แช่แผ่นเมมเบรนในสารละลาย Anti-DIG-AP conjugate 1:10,000 ใน blocking buffer (Anti-Digoxigenin-Alkaline Phosphatase-conjugate) นาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลายที่มี 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl และ 0.3% Tween 20 นาน 15 นาที 3 ครั้ง แช่เมมเบรนในสารละลาย detection buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl และ 0.05 M $MgCl_2$) นาน 2 นาที แล้วแช่ในสารละลาย color substrate (10x NBT/BCIP) วางในที่มืดจนกระทั่งเกิดสีม่วงขึ้น แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นโดย hybridization ที่อุณหภูมิ 75°C และหลังจากคัดเลือกโคลนที่ติดสีม่วงซึ่งมีส่วนของยีนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3.3.3 แล้วนำโคลนที่ได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoR* I โดยเติม buffer H ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, โคลนพลาสมิด (40 ไมโครกรัม) 5 ไมโครลิตร, *EcoR* I (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร) และน้ำกลั่น 12.5 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติม RNase (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose electrophoresis และศึกษาลำดับเบสของโคลนที่ได้ โดยใช้เครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer และทำการเปรียบเทียบผลที่ได้กับข้อมูลของธนาคารยีน