บทที่ 3
วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและตัวอย่างส่งตรวจ (sample)

ผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งปากมดลูก และมีพยาธิสภาพในระยะลุกลามจาก ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งพิจารณาตัดสินโดยนายแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ

การหาขนาดข้อมูลตัวอย่าง (sample size) (66)

$$n = Z^2PQ/X^2$$

เมื่อ Z= 1.96

P= จำนวนประชากรที่คิดว่าจะให้ผลบวก

Q= 1-P

X= clinical error

(โดยคิดค่านัยสำคัญทางสถิติ p= 0.05)

แทนค่าข้อมูลได้ดังนี้คือ

1. จากสถิติที่มีผู้ได้ทำการทดลองในประเทศไทย (67) พบว่าผู้ป่วย CIN ที่ตรวจพบ HPV มีจำนวน 4/10 ราย คิดเป็นร้อยละ 40 และ ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งระยะลุกลามตรวจพบ HPV จำนวน 30/40 ราย คิดเป็นร้อยละ 66.67

2. จากสถิติที่มีผู้ทำไว้ในต่างประเทศ (37,38,68,69) พบว่าผู้ป่วย CIN ที่ตรวจพบ HPV มีประมาณร้อยละ 80 และ ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งระยะลุกลามตรวจพบ HPV ประมาณร้อยละ 80

ดังนั้นเมื่อแทนค่าลงในสูตรโดยให้ค่า clinical error เป็น 10% จะได้ขนาดของข้อมูลตัวอย่าง 2 กรณีคือ ในประเทศ ต้องอย่างน้อย 92 ราย ส่วนในต่างประเทศ ต้องอย่างน้อย 61 ราย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้กลุ่มตัวอย่าง 100 ราย

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจได้มาจาก การตัดชิ้นเนื้อบริเวณตำแหน่งที่แสดงพยาธิสภาพ โดยเจ้าหน้าที่ของ หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชา สูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จะนำชิ้นเนื้อแช่ในน้ำยาฟอร์มาลินแล้วฝังเก็บลงในพาราฟิน ทำให้เป็นก้อนแข็งโดยใช้ความเย็น (formalin-fixed, paraffin embedded specimen) เก็บที่อุณหภูมิห้อง เมื่อจะนำมาทำการศึกษาจึงจะนำมาตัดเป็นแผ่นบางๆ โดยใช้เครื่องมือตัดแบบละเอียด (microtome)

2. <u>การสกัดแยก DNA จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ</u>

การสกัดแยก HPV DNA จากชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ถูกฝังอยู่ในพาราฟินทำตามวิธีของ Wu, A.M. และคณะ (70) โดยทำการตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างให้มีความบางประมาณ 20 um (โดยเจ้าหน้าที่ของภาควิชา สูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์)จำนวน 30 ชิ้นต่อราย ใส่ลงในหลอด polypropylene microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติม xylene ลงไป 1.4 ml เขย่าเบาๆ 5 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วรอบสูง (microcentrifuge) 2 นาที ดูดแยกเอา xylene ออก ทำซ้ำเช่นเดียวกันแบบนี้อีก 3 ครั้ง แล้วจึงล้างตะกอนด้วย absolute ethanol 2 ครั้ง ล้างตะกอนอีกครั้งด้วย TE buffer (0.1 M EDTA, 0.05 M Tris-HCl, pH8) ปั่นตกตะกอน และ ละลายใน 400 ul ของ lysis buffer (0.1 M EDTA, 0.5 M Tris-HCl, pH 8) โดยเติมสารละลาย SDS (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5%) และ proteinase K (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 mg/ml) แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชม. เมื่อครบเวลานำมาสกัด DNA โดยเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่มีอยู่ เขย่าแรงๆ และปั่นแยกน้ำใสส่วนบนออกที่ความเร็ว 10,000 rpm ทำซ้ำเช่นนี้อีกหนึ่งครั้ง นำส่วนใสด้านบนมาเติม Na acetate ให้ได้ความเข้มข้น 0.3 M จากนั้นตกตะกอน DNA ด้วย cold absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส 1 ชม. ปั่นตกตะกอนและล้างตะกอน DNA ด้วย cold 70% ethanol 2 ครั้ง นำตะกอนไปทำให้แห้งแล้วละลายตะกอนด้วย 100 ul TE buffer เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม DNA มาตรฐาน

3.1 Purified plasmid HPV DNA ประกอบด้วย HPV-6, 11, 16, 18 และ 33 เป็นตัวควบคุมบวก ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.วีระพงษ์ ลุลิตานนท์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ plasmid pBR 322 เป็นตัวควบคุมลบ

3.2 HeLa-DNA HeLa cell เป็น continuous cell line ที่ได้มาจากเซลล์มะเร็งของสตรีที่เป็นมะเร็งปากมดลูก (71) มีคุณสมบัติคือ มีสารพันธุกรรมของ HPV-18 สอดแทรกอยู่ (72) โดยประมาณ 10-30 copies ต่อหนึ่งเซลล์ ทำการเตรียม HPV-18 DNA จากเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa โดยนำมาสกัดแยก DNA ตามวิธีการของ Ausubel, F.M. และคณะ (73) โดยเริ่มจากการเลี้ยง Hela cell ใน 1xMEM (minimum essential medium) ที่มี 10% fetal bovine serum และ ยาปฏิชีวนะได้แก่ penicillin 100 unit/ml และ streptomycin 100 ug/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ เทอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วย cold phosphate buffered saline, pH 7.5 (PBS) 1 ครั้ง แล้วขูดเอาเซลล์ในขวดออก นำมาล้างด้วย cold PBS อีก 2 ครั้ง ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 800 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทำการสกัด DNA จากเซลล์โดยเติม digestion buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 25 mM EDTA, pH 8, 0.5% SDS) ให้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 cells/ml เติม proteinase K ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ug/ml แช่ใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชม. แล้วนำมาสกัดแยก DNA โดยใช้วิธี phenol chloroform extraction ตกตะกอน DNA ด้วย Na acetate และ cold absolute ethanol (รายละเอียดเหมือนข้อ 2) ละลายตะกอนใน 100 ul TE buffer เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.3 Human DNA เตรียมจากเม็ดโลหิตขาวของคนปกติ ตามวิธีการของ Sambrook, J. และคณะ (74) โดยเจาะเลือด 10 ml ใช้ 0.5% EDTA (pH 7.4) เป็น anticoagulant นำมาปั่นที่ความเร็ว 2,500 rpm 20 นาที แยกเอาชั้น buffy coat ออกมาเติม red cell lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl) 10 ml เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 rpm, 10 นาที แยกส่วนใสด้านบนทิ้งไป และทำซ้ำจนกว่า เม็ดเลือดแดงจะแตกหมด แล้วแยกชั้นตะกอน (pellet) นับเม็ดเลือดขาวได้จำนวน 10^8 เซลล์ นำมาละลายใน digestion buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA, pH 7.6, 50 mM NaCl) 3 ml เติม SDS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.25% เติม proteinase K ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ug/ml นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชม. แล้วนำมาสกัดแยก DNA โดยใช้วิธี phenol chloroform extraction ตกตะกอน DNA ด้วย Na acetate และ cold absolute ethanol (รายละเอียดเหมือนข้อ 2) ละลายตะกอนใน 100 ul TE buffer เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4. การหาปริมาณ DNA

โดยใช้ ultraviolet spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm (75) นำตัวอย่างที่จะทำการตรวจหามาละลายในน้ำกลั่นแล้วนำมาวัดค่า optical density (OD) ค่า OD ที่ 260 nm เท่ากับ 1 แสดงว่ามีความเข้มข้นของ DNA สายคู่ (double stranded DNA) เท่ากับ 50 ug/ml ความบริสุทธิ์ของกรดนิวคลีอิกที่เตรียมได้อ่านจากค่าอัตราส่วนของ OD_{260} ต่อ OD_{280} ควรมีค่ามากกว่า 1.8

5. คุณสมบัติของ oligonucleotides

oligonucleotide ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มาจากการสังเคราะห์โดยเครื่องสังเคราะห์ (oligo synthesizer) แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ (ดังตารางที่ 4) ได้แก่

ตารางที่ 4: คุณสมบัติของ oligonucleotide primers และ probes

Name	Sequence (5'-3')	Target	Purpose
MY11	GCC CAG GGA CAT AAC AAT GG	L1	HPV-primer
MY09	CGT CCA AGG GGA AAC TGA TC	L1	"
GH20	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	B-globin	B-globin primer
PC04	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	B-globin	"
GP01	CTG TTG TTG ATA CTA CAC GCA GTA C	HPV	Generic probe
GP02	CTG TGG TAG ATA CCA CTC GCA GTA C	HPV	"
MY12	CAT CCG TAA CTA CAT CTT CCA	HPV-6	Specific probe
MY13	TCT GTG TCT AAA TCT GCT ACA	HPV-11	"
MY14	CAT ACA CCT CCA GCA CCT AA	HPV-16	"
WD74	GGA TGC TGC ACC GGC TGA	HPV-18	"
MY16	CAC ACA AGT AAC TAG TGA CAG	HPV-33	"

5.1 Oligonucleotide primers เพื่อใช้ในการเพิ่มขยายปริมาณ DNA โดยวิธี PCR

5.1.1 Generic L1 primers (L1 primers) เป็น nucleotide สายสั้นๆ ที่มีความจำเพาะกับช่วงสายพันธุกรรมของยีน L1: L1 consensus primer (HPLC purification: APPLIGENE, Inc., Plesanton, CA, USA) ได้แก่ MY11, MY09 ขนาดของ L1 PCR product มีขนาด 450 bp โดยประมาณ

5.1.2 Beta(B)-globin primers เพื่อใช้ในการเพิ่มขยายปริมาณ DNA ช่วงสายพันธุกรรมของยีน beta globin ในเซลล์ของคน โดยวิธี PCR (HPLC purification: APPLIGENE, Inc., Plesanton, CA, USA) ได้แก่ GH20 และ PC04 ขนาดของ B-globin product มีขนาด 268 bp.

5.2 Oligonucleotide probes เพื่อใช้ในงาน hybridization

5.2.1 Generic oligonucleotide probe (GP) ได้แก่ GP01 และ GP02 ได้ถูกออกแบบมาให้มีความจำเพาะกับ HPV-DNA บริเวณ L1-region ที่เกิดจากการ amplify โดยใช้ L1 primer MY11 และ MY09 มีความจำเพาะต่อ HPV อย่างน้อย 25 types (76)

5.2.2 Type specific oligonucleotide probe (TS) คือ MY12, MY13, MY14, WD74, และ MY16 ซึ่งถูกออกแบบมาให้มีความจำเพาะต่อ HPV-6, 11, 16, 18 และ 33 ตามลำดับ (76)

6. การขยายเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR

จากการดัดแปลงวิธีการจาก Bauer, H.M. และคณะ (72) และ Ting, Y. และคณะ (76) เตรียมส่วนประกอบทั้งหมดใน 1 หลอดทดลองคือ 1xPCR buffer

(50 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8.5), 4 mM $MgCl_2$, 200 uM dNTPs, L1 primers 50 pmole (MY11 และ MY09 อย่างละ 25 pmole), B-globin primers 5 pmole (GH20 และ PC04 อย่างละ 2.5 pmole), Taq polymerase 1.25 unit และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ รวมกับ DNA ตัวอย่างที่สกัดได้ 1 ul แล้วจะต้องได้ปริมาตรสุดท้าย 50 ul (ทั้งนี้ยกเว้นบางกรณีที่ได้ระบุไว้) ผสมส่วนประกอบทั้งหมด (ยกเว้น DNA ตัวอย่าง) แล้วเติม mineral oil 30 ul ปิดทับผิวหน้า แล้วจึงเติม DNA ตัวอย่างท้ายสุด เหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge 10 วินาที เพื่อให้สารละลายตกอยู่ใต้ผิว mineral oil นำหลอดทดลองเข้าเครื่อง PCR โดยกำหนดสภาวะการทำงานคือ denature 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, annealing 50 องศาองศาเซลเซียส 1 นาที, extention 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 40 รอบ และ หลังจากรอบสุดท้ายแล้ว ให้อยู่ที่ 72 องศาเซลเซียส อีก 10 นาทีแล้วจึงแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ amplified product ที่ได้มาทำการตรวจสอบต่อไป

การป้องกันความผิดพลาดในการทำ PCR (PCR carry over) ในงานวิจัยนี้ได้แบ่งพื้นที่ในการทำงานคือ พื้นที่เตรียม specimen และพื้นที่ทำ PCR ซึ่งแยกออกจากกันเพื่อป้องกันสิ่งปนเปื้อนเข้าไปรบกวนการทำปฏิกิริยา PCR พื้นที่ที่ทำ PCR มีการฉายแสง UV ก่อนและหลังการทำ PCR อย่างน้อย 15 นาทีทุกครั้งเพื่อทำลายชิ้นส่วน DNA ที่อาจหลงเหลืออยู่ การใช้ pipet tip สำหรับ PCR จะใช้เป็น filter tip และ สวมถุงมือขณะทำ PCR ทุกครั้ง ในการทดลองแต่ละครั้งจะมีตัวควบคุมผลบวก (1 ug HeLa DNA), ตัวควบคุมผลลบ (1 ug human DNA), และ น้ำกลั่น

7. <u>การวิเคราะห์หา Amplified product จาก PCR โดยวิธี gel electrophoresis (GE)</u>

เป็นการตรวจวิเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ที่ถูกเพิ่มจำนวนขึ้นจากขบวนการ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยนำ 10 ul ของ amplified DNA มาแยกผ่านตัวกลางคือ 1.2% agarose ใน 0.5x TBE buffer (ภาคผนวก ข) ภายใต้สนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 90 โวลท์ นาน 1 ชม. และมี ethidium bromide 0.5 ug/ml

เพื่อเป็นตัวย้อม DNA จากนั้นนำมาดูภายใต้แสง ultraviolet ผ่าน UV transilluminator แล้วถ่ายรูปโดยตรงจาก gel โดยใช้กล้อง polaroid กับ ฟิลม์ polaroid (no. 667) ขนาดของ DNA ที่สังเกตได้เปรียบเทียบกับ molecular marker ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ 0x174 RF DNA/HaeIII และ pBR322/HinfI เป็นตัวเปรียบเทียบ

8. การทำ Hybridization

ในการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะตรวจหาความจำเพาะของสารพันธุกรรม DNA ที่ผ่านขบวนการเพิ่มขยายโดยวิธี PCR ว่าเป็น HPV-DNA หรือไม่ จึงใช้ตัวตรวจจับ 2 ชนิด คือ ตัวตรวจจับแบบทั่วไป GP และ TS (รายละเอียดดังข้อ 5 และ ตารางที่ 4)

8.1 การเตรียม DNA และ ตรึงบนแผ่น membrane

8.1.1 การทำ dot hybridization (DH) ในการวิจัยนี้เลือกใช้วิธีนี้เป็นหลักเพราะสะดวก รวดเร็ว และ ให้ผลดีโดยเฉพาะในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก ตัวอย่าง DNA ที่จะทำการทดสอบจะอยู่ในตำแหน่งจำเพาะโดยการหยด (dot) เป็นจุดบนแผ่น membrane ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. การเตรียมแผ่น membrane โดยนำแผ่น membrane (Hybond^{TM}N+, Amersham, co.) มาตัดให้ได้ขนาดที่ต้องการนำมาแช่น้ำกลั่นแล้วแช่ใน 10X SSPE (1.5 M NaCl, 0.1 M $NaH_2PO_4.H_2O$, 10 mM EDTA, pH 7.4) เป็นเวลา 15 นาที นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสให้แผ่น membrane แห้งสนิท

2. การสกัดแยกน้ำมัน (mineral oil) ออกจาก amplified DNA โดยใช้ Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาณเท่ากับ amplified DNA เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า (vortex) 2 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงโดยใช้ microcentrifuge 5 นาที ดูดเอาส่วนใสด้านบน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

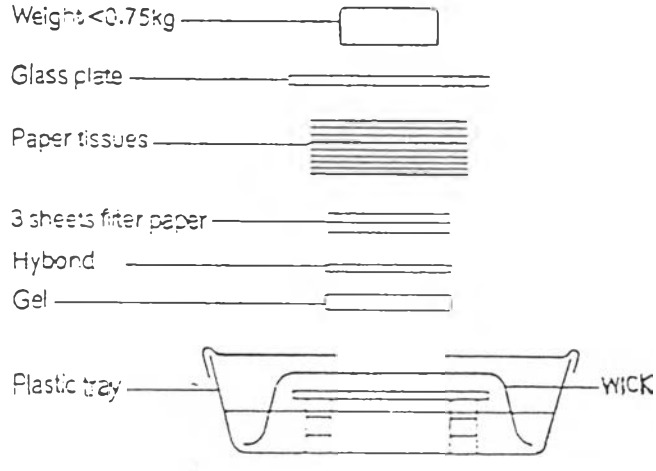
3. การตรึง DNA บนแผ่น membrane โดยหยดตัวอย่าง DNA ที่ผ่านขบวนการ PCR และ สกัดเอา mineral oil ออกแล้ว และ DNA ควบคุมบวกและลบ ปริมาณ 1 ug ลงบน membrane แช่ membrane ใน 0.4 M NaOH นาน 5 นาทีแล้ว นำมาแช่ใน 10X SSPE (1.5 M NaCl, 0.1 M $NaH_2PO_4.H_2O$, 10 mM EDTA, pH 7.4) 10 นาที นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม. เพื่อให้ DNA ตัวอย่างติดบนแผ่น membrane (77)

8.1.2 <u>วิธี Southern hybridization</u> วิธีการนี้สารพันธุกรรม DNA ที่จะทำการตรวจจะถูกแยกผ่านตัวกลางภายใต้สนามไฟฟ้าก่อน แล้วจึงผ่านขบวนการตรึงบนแผ่น membrane

1. การเตรียม DNA โดยใช้ amplified DNA ที่ผ่านขบวนการ PCR แล้วนำไปแยกใน 1.5% agarose gel ภายใต้สนามไฟฟ้า

2. การเตรียมแผ่น membrane โดยนำเอาแผ่น nylon hybond^{TM}N+ membrane (Amersham, co.) ไปแช่ใน 10X SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M Na Citrate, pH 7) เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำมาวางทับบน gel

3. การถ่าย (transfer) DNA จาก gel ไปบนแผ่น membrane โดยนำแผ่น gel จากข้อ 1 มาแช่ใน depurinate solution (0.25 M HCl) ปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาตร gel นาน 20 นาที แล้วแช่ใน denature solution (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) ด้วยปริมาตร 2 เท่าของ gel 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที และสุดท้ายแช่ใน neutralize solution (0.1 M Tris, pH 7.5 1.5M NaOH) ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตร gel เป็นเวลา 30 นาที เริ่มจากวางแผ่นกระดาษกรอง whatman 3MM ที่ชุ่มด้วย 10X SSC โดยเอาด้านหน้า gel ลงติดกับ wick (รูปที่ 3) ระวังไม่ให้มีฟองอากาศ แล้วนำแผ่น membrane วางทับบน gel จากนั้นจึงวางกระดาษกรอง whatman 3MM และชั้นกระดาษซับ (paper towel) ตามลำดับ โดยให้ชั้นกระดาษซับมีความหนาประมาณ 10 เซนติเมตร วางน้ำหนักทับด้านบนประมาณ 0.5 กิโลกรัม ทิ้งไว้ข้ามคืนประมาณ 16-18 ชม. เมื่อครบเวลานำแผ่น membrane ออกมาแช่ใน 5X SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M Na Citrate, pH 7) นาน 5 นาที นำมาซับให้พอแห้ง แล้วอบในตู้สูญญากาศ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชม.



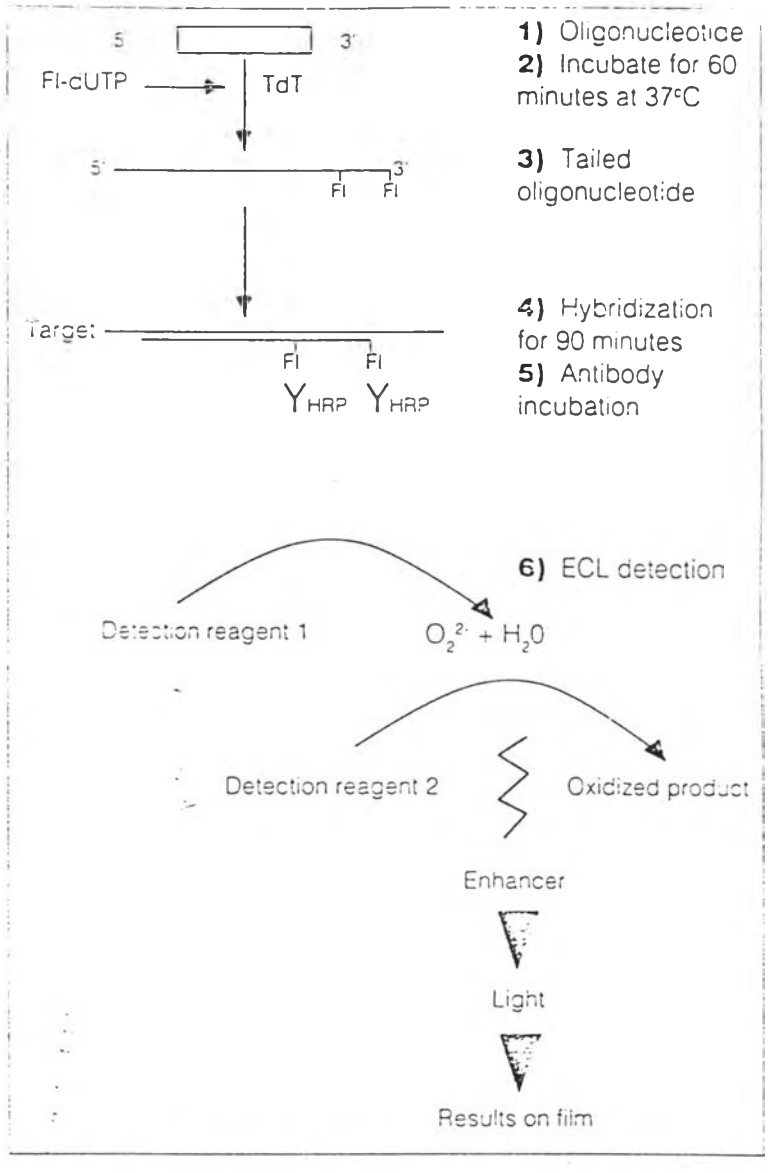
รูปที่ 3: แสดงตำแหน่งการวางวัสดุต่างๆในการทำ Southern hybridization

8.2 การ ติดฉลาก probe (probe labelling) ด้วยสารปลอดกัมมันตภาพรังสี [Non-isotope kit: Enhance chemiluminescence (ECL) 3' oligolabelling, Amersham, co.] ตามเอกสารที่แนบมากับน้ำยาสำเร็จรูป (รูปที่ 4) โดยเตรียม probe 10 pmole ประกอบด้วย fluorescein-11-dUTP 1 ul, cacodylate buffer 1.6 ul, terminal transferase 1.6 ul และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ รวมปริมาตรทั้งหมดต่อ 1 หลอด ให้ได้ 16 ul แช่ไว้ใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชม. แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส การตรวจสอบการติดฉลากทำได้โดย dot เปรียบเทียบกับ unlabelled probe, 1/16 fluorescein-11-dUTP, น้ำกลั่น บนกระดาษกรอง DE-81 ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วแช่ลงใน 2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 Na Citrate, pH 7) ที่มี 0.1% SDS ที่ 60 องศาเซลเซียส 15 นาที เขย่าบนเครื่องเขย่าเบาๆ นำมาแช่ในน้ำกลั่น 30 นาที ล้างด้วย absolute ethanol ซับให้แห้งบน กระดาษกรอง whatman 3 MM แล้วนำไปตรวจสอบการเรืองแสง fluorescein บน UV transiluminator ความยาวคลื่น 365 nm

8.3 การตรวจวิเคราะห์ DNA บนแผ่น membrane

8.3.1 Pre-hybridization แช่ membrane ลงใน 2XSSC (0.3 M NaCl, 0.03 Na Citrate, pH 7), 5 นาที แล้วใส่แผ่น membrane ลงในถุง (hybridization bag) คำนวณปริมาตรของ hybridization buffer (ภาคผนวก ข) โดยใช้ hybridization buffer 0.25 ml ต่อ 1 cm^2 ของแผ่น membrane ปิดปากถุงให้สนิทด้วยเครื่องปิดผนึกไฟฟ้า แช่ไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิเหมาะสม (ตารางที่ 5) นาน 30 นาที

8.3.2 Hybridization เปิดปากถุงแล้วใส่ probe ที่ติดฉลากแล้วลงไปให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม (ตารางที่ 5) ปิดปากถุงให้สนิท และ ระวัง ต้องไล่ฟองอากาศออกให้หมด แช่ใน water bath ต่อไปที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 1.30 ชม.



รูปที่ 4: หลักการของ 3'-end labelling enhance chemiluminescense.

ตารางที่ 5: สภาวะที่เหมาะสมของการทำ Hybridization ของแต่ละ probe

Type Specificity	Probe	Tm (°C)	Conc.^{n} (pmole)	Pre and hybridization condition(°C)	Washing (°C)
HPV-DNA	GP01	48.2	0.25	42	45
	GP02		0.25		
TS- 6	MY12	46.9	5	37	37
TS-11	MY13	42.4	0.5	37	37
TS-16	MY14	47.5	5	42	55
TS-18	WD74	56.5	5	42	50
TS-33	MY16	39.2	0.5	37	37

8.3.3 Washing นำแผ่น membrane ออกจากถุงแช่ลงใน 5X SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M Na Citrate, pH 7) ที่มี 0.1% SDS เขย่าบนเครื่องเขย่าเบาๆ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำ 2 ครั้ง แล้วแช่ลงใน 1X SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M Na Citrate, pH 7) ที่มี 0.1% SDS ในอุณหภูมิที่ระบุตามตารางที่ 5 ครั้งละ 15 นาที 2 ครั้ง

8.3.4 Blocking แช่แผ่น membrane ลงใน bufferI (ภาคผนวก ข) 1 นาที แช่ลงใน Blocking solution (ภาคผนวก ข) 30 นาที แล้วกลับมาแช่ใน buffer I อีก 1 นาที ใส่ membrane ลงในถุงซึ่งมี 0.5% BSA ใน buffer II (ภาคผนวก ข) ปริมาตรเท่ากับ 0.25 ml ต่อ 1 cm^2 ของแผ่น membrane เติม anti-fluorescein horseradish peroxidase conjugate ให้ปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1:1,000 ปิดปากถุงให้สนิท เขย่าบนเครื่องเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ครบเวลา นำแผ่น membrane ออกมาล้างโดยแช่ใน buffer II (ภาคผนวก ข) เขย่าบนเครื่องเขย่าเบาๆ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

8.3.5 Detection ผสม detection solution I และ II (น้ำยาสำเร็จรูปมาพร้อมกับชุด ECL) โดยให้มีปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 0.25 ml ต่อ 1 cm^2 ของแผ่น membrane แล้วนำแผ่น membrane แช่ใน detection solution เป็นเวลา 1 นาที ซับด้วยกระดาษซับพอหมาดแล้วนำมาห่อด้วย plastic wrap รีดฟองอากาศให้หมด บรรจุใน cassette แล้วนำไปตรวจจับการเรืองแสง fluorescein บนแผ่นฟิล์ม (Hyperfilm^{TM}: Amersham, co.)

8.3.6 การล้างแผ่นฟิลม์ ทำการล้างฟิลม์ในห้องมืด โดยเตรียมน้ำยาล้างฟิลม์คือ developer (Agfa, Belgium) (ภาคผนวก ข), fixer (Kodak, U.S.A.) (ภาคผนวก ข) และ น้ำเปล่า เมื่อครบเวลาในการวางฟิลม์ นำแผ่นฟิลม์ออกมาแช่ใน developer ประมาณ 1 นาที แล้วแช่ใน fixer อีกประมาณ 2 นาที สุดท้ายล้างด้วยน้ำเปล่า นำออกจากห้องมืด รอให้แผ่นฟิลม์แห้ง