บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย

1. ตัวอย่างดีเอ็นเอของมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* จำนวน 1 สายพันธุ์ (clone) และ 15 ไอโซเลต (isolate) ที่ทราบ MSP1 allele โดยวิธี Southern blot hybridization หรือ DNA sequencing ซึ่งถูกเก็บไว้ในสภาพที่แห้ง ที่อุณหภูมิ -20°C (ได้รับจาก ผศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* แหล่งที่มา และปีที่ทำการเก็บเชื้อ ที่ทราบ MSP1 allele จำนวน 1 สายพันธุ์ และ 15 ไอโซเลต

ไอโซเลต/สายพันธุ์	แหล่งที่มาของเชื้อ	ปีที่ทำการเก็บเชื้อ
806	อ.แม่สอด จ.ตาก	2531
807	อ.แม่สอด จ.ตาก	2531
815	อ.แม่สอด จ.ตาก	2531
822	อ.แม่สอด จ.ตาก	2531
827	อ.แม่สอด จ.ตาก	2531
834	อ.แม่สอด จ.ตาก	2531
836	อ.แม่สอด จ.ตาก	2531
837	อ.แม่สอด จ.ตาก	2531
838	อ.แม่สอด จ.ตาก	2531
841	อ.แม่สอด จ.ตาก	2531
842	อ.แม่สอด จ.ตาก	2531

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลต/สายพันธุ์	แหล่งที่มาของเชื้อ	ปีที่ทำการเก็บเชื้อ
843	อ.แม่สอด จ.ตาก	2531
946	อ.แม่สอด จ.ตาก	2532
947	อ.แม่สอด จ.ตาก	2532
K1	จ.กาญจนบุรี	2521
T9/94	อ.แม่สอด จ.ตาก	2521

2. เชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จำนวน 4 สายพันธุ์ และ 10 ไอโซเลต ที่ไม่ทราบ MSP1 allele ที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ และถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (ได้รับจากศูนย์วิจัยมาลาเรีย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* แหล่งที่มา และปีที่ทำการเก็บเชื้อที่ไม่ทราบ MSP1 allele จำนวน 4 สายพันธุ์ และ 10 ไอโซเลต

ไอโซเลต/สายพันธุ์	แหล่งที่มาของเชื้อ	ปีที่ทำการเก็บเชื้อ
TD 500	อ.บ่อไร่ จ.ตาก	2537
TD 503	อ.บ่อไร่ จ.ตาก	2537
K31	จ.กาญจนบุรี	?
K31 CB1	เป็นสายพันธุ์ของ K31	?
K31 CB2	เป็นสายพันธุ์ของ K31	?
K31 CB3	เป็นสายพันธุ์ของ K31	?
TM142 R	คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล	?

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลต/สายพันธุ์	แหล่งที่มาของเชื้อ	ปีที่ทำการเก็บเชื้อ
TM142 RCB2	เป็นสายพันธุ์ของ TM142 R	?
TP4	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	2537
TP20	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	2537
TP21	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	2537
TP26	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	2537
TP34	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	2537
TP40	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	2537

หมายเหตุ ? = ไม่มีข้อมูล

อุปกรณ์

Automatic thermal cycler (Techne)

Blue-light sensitive autoradiography film

Heat block (Techne)

High speed refrigerated micro centrifuge (Tomy)

Kodak X-ray cassette (Kodak)

Magnetic stirrer (Thermolyne)

Power supply (Scientific company)

Rotator (Yankee)

Shaker incubator (Taitec)

Submarine electrophoresis chamber (Bio Rad)

Vacuum blotter unit (Bio Rad)

Vacuum pump (Bio Rad)

Vapor trap (Bio Rad)

Vacuum regulator (Bio Rad)

Vortex mixer (Scientific Industries)

กล่องไฟสำหรับอ่านฟิล์ม

กล้องจุลทรรศน์

กล้องโพลารอยด์พร้อมอุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ

เครื่องชั่งละเอียดอ่านได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Bosch)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

ชุดอุปกรณ์สำหรับแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า

ตู้ปลอดเชื้อ (biological safety cabinets, Nuaire)

ตู้เย็น 4°C (Hitachi)

ตู้เย็น -20°C (Puffer Hubbard)

ตู้เย็น -80°C (Forma Scientific)

ตู้อบแห้ง (hot air oven, Memmert)

ถาดล้างฟิลม์ (ขนาด 27x32 cm)

ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติ (automatic adjustable micropipette) ขนาด 1-10 µl, 10-100 µl และ 100-1000 µl (Eppendorf)

หน้ากากกันแสงอุลตร้าไวโอเลต (UV-absorbing face shield, Spectroline)

หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง (autoclave, Becthai)

แหล่งกำเนิดแสงอุลตร้าไวโอเลตความยาวคลื่น 312 nm (UV transilluminator, Spectroline)

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath, Memmert)

วัสดุ

กระจกสไลด์ (glass slide) (ขนาด 2.5x7.5 cm)

กระดาษกรองเบอร์ 3 (Whatman)

กระบอกฉีดน้ำ

กระบอกตวง ขนาด 10 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml และ 1,000 ml

กล่องพลาสติก ขนาด 7.3x13.2 cm, No. 648 (Nam Ngai Hong)

กล่องโฟมสำหรับใส่น้ำแข็ง

ขวดแก้วสำหรับใส่สารเคมี

ขวดปรับปริมาตร (Volummetric flask)

ถุงมือยาง (latex gloves)

ที่วางหลอดทดลองสำหรับหลอดขนาด 0.5 ml และ 1.5 ml (micro tube rack)

แท่งแก้วสำหรับคน

เทอร์โมมิเตอร์

นาฬิกาจับเวลา

บีกเกอร์ขนาด 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml และ 4,000 ml

ปากคีบ (forcep)

ปิเปตต์ทิป (pipette tip) ขนาด 10 µl (Eppendorf), 100 µl และ 1,000 µl (Elkay)

ปิเปตต์วัดปริมาตร ขนาด 1 ml, 5 ml, 10 ml และ 100 ml

แผ่นไนล่อนสำหรับขนถ่ายดีเอ็นเอ (nucleic acid transfer membranes Hybond-N^+ 0.45 mm, Amersham)

แผ่นพลาสติกอย่างบาง (plastic wrap)

พาราฟิล์ม (parafilm)

พาสเจอร์ปิเปตต์ (pasteur pipette)

ฟิล์มโพลารอยด์ เบอร์ 667 (polaroid film)

ฟิล์มเอ็กซเรย์ (Kodak)

ลูกยาง

สายยาง

สำลี

หลอดทดลองขนาดเล็กชนิดมีฝาปิด (microtube) ขนาดความจุ 0.5 ml และ 1.5 ml (Elkay)

สารเคมี

1. สารเคมีทั่วไป

Absolute ethanol (Merck)

Absolute methanol

Acetic acid (100%, Merck)

Agarose (Promega)

Agarose, low gelling temperature (FMC Bio product)

Bromophenol blue

Chloroform (Sigma)

Cleaning solution (ICN Biomedicals)

Developer for X-ray film (Kodak)

Disodium ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Sigma)

Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4, May & Baker LTD.)

Double distilled water

Ethidium Bromide (Sigma)

Ficoll, type 400 (Phamacia)

Fixer for X-ray film (Kodak)

Giemsa stain

Hydrochloric acid (HCL fuming 37%, Merck)

Isoamyl alcohol

Mineral oil

Phenol, saturated (pH 4.5, Amresco)

Potassium chloride (May & Baker LTD.)

Potassium di-hydrogen orthophosphate (KH_2PO_4, Ajax Chemicals)

Sodium acetate

Sodium chloride (Sigma)

Sodium citrate (Merck)

Sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma)

Sodium hydroxide (NaOH 98%, EKA Nobel)

Saponin

Tris hydroxymethyl amino methane (Merck)

Xylene cyanol FF

2. สารเคมีที่เป็น Reagent kit

ECL 3'-oligolabelling and detection systems (RPN 2131, Amersham)

ECL^{tm} random prime labelling and detection systems (RPN 3030, Amersham)

PCR kit (Perkin Elmer Cetus)

3. เอ็นไซม์

*Alu*I (Promega)

*Dra*I (Promega)

*Hae*III (New England Biolab)

*Hind*III (Promega)

Lysozyme

Proteinase K (Boehringer Mannheim)

*Pst*I (Promega)

Taq polymerase

4. ดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวติดตามสำหรับ Southern blot hybridization

Oligonucleotide probes

Block 2

K2 5'-AGT GGT ACA AGT GGT CCA AGT-3' (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 217 ถึง 237)

M2 5'-TCA GTT GCT TCA GGT GGT TCA-3' (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 412 ถึง 432)

R2 5'-GTT GTT GCA AAG CCT GCA GAT-3' (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 517 ถึง 537)

Block 4

K4 5'-AGA ATT GGC CGG TGG GGG ATT-3' (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 952 ถึง 972)

M4 5'-CAG TAG TGG GGT TTT CGG CAT-3' (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1100 ถึง 1120)

Block 16

K16 5'-GGA ATT GCT GAT TTA TCA ACA-3' (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 4414 ถึง 4434)

Fragment probes

Block 6

K216 (Tanabe et al., 1989)

M534 (Tanabe et al., 1989)

Block 16

M16 (Jongwutiwes et al., 1991)

ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่แบบสำหรับ Polymerase chain reaction

Block 1 - Block 5

P1 5'-CAC AAT GTG TAA CAC ATG AAA GTT ATC-3' (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 185 ถึง 211, 50 ถึง 76 และ 386 ถึง 412 บน MAD20, K1 และ RO33 type ตามลำดับ)

P2 5'-TCT TAA ATA GTA TTC GAA TTC AAG TGG ATC-3' (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1234 ถึง 1263, 1084 ถึง 1113 และ 1141 ถึง 1440 บน MAD20, K1 และ RO33 type ตามลำดับ)

Block 5 - Block 13

P3 5'-GTT TAT TTA CGG ATC CAC TTG-3' (นิวคลีโอไทด์

ตำแหน่งที่ 1223 ถึง 1243 และ 1073 ถึง 1093 บน MAD20 และ K1 type ตามลำดับ)

P4 5'-GGC ATA ATT ATC TTC TGT TTG AAT TG-3' (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 3554 ถึง 3579 และ 3299 ถึง 3324 บน MAD20 และ K1 type ตามลำดับ)

Block 12 - Block 17

P5 5'-CTC CAT TAA AAA CTT TAA GTG-3' (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 3527 ถึง 3547 และ 3272 ถึง 3292 บน MAD20 และ K1 type ตามลำดับ)

P6 5'-GTA ACA TAT TTT AAC TCC TAC-3' (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 5247 ถึง 5267 และ 4902 ถึง 4922 บน MAD20 และ K1 type ตามลำดับ)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

∅X174/*Hae*III Markers (0.5 µg/ml) (Gibco BRL)

Lambda *Eco*RI / *Hind*III Markers (0.5 µg/ml) (Promega)

Lambda *Hind*III Markers (0.5 µg/ml) (Promega)

วิธีการทดลอง

การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* (Tanabe et al.,1989)

1. นำตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อมาลาเรีย ซึ่งถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C มาทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.8 ที่เย็น (อุณหภูมิประมาณ 4 ^{o}C) ลงไป 2 เท่า ผสมให้เข้ากันเพื่อล้างพลาสมาออก แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

2. ใช้พาสเจอร์ปิเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนส่วนล่างซ้ำด้วย PBS อีก 2 ครั้งจะได้ตะกอนของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ก้นหลอด

3. เติมสารละลาย 0.05% saponin ใน PBS ปริมาตร 500 µl ลงไปผสมกับตะกอนให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C จนเม็ดเลือดแดงแตก โดยจะสังเกตเห็นสีของสารละลายเป็นสีแดงใส

I16588903

4. นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C นาน 10 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนที่มีฮีโมโกลบินทิ้งไป ล้างตะกอนที่ได้ด้วยสารละลาย PBS ที่เย็นปริมาตร 500 µl (อุณหภูมิประมาณ 4 ^{o}C) ซ้ำอีก 2 ครั้งหรือจนสารละลายส่วนบนใส

5. นำตะกอนส่วนล่างที่ได้มาเติมสารละลาย lysis buffer 500 µl (ประกอบด้วย ร้อยละ 0.5 sodium lauryl sulfate (SDS), 0.01M EDTA pH 8.0 และ proteinase K 4 mg) นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C นาน 4 ชั่วโมง

6. นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี phenol-chloroform extraction โดยเติม saturated phenol ลงไป 500 µl (1 เท่าของปริมาตรเดิม) เขย่าให้เข้ากันอย่างแรงด้วย vortex mixer นาน 5 นาที แล้วจึงนำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายสองส่วนแยกชั้นกัน

7. ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดทดลองใหม่แล้วเติมสารละลาย phenol: chloroform: isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25: 24: 1) ลงไปปริมาตร 500 µl (1 เท่าของปริมาตรเดิม) เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนลงในหลอดทดลองใหม่ ทำซ้ำเช่นเดียวกันนี้อีกครั้ง

8. เติม chloroform ลงในสารละลายส่วนบนที่ได้ครั้งสุดท้ายในหลอดทดลองใหม่ปริมาตร 500 µl เขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture นาน 5 นาทีแล้วปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

9. ดูดสารละลายส่วนบนที่ได้ใส่ในหลอดทดลองใหม่ จากนั้นนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลาย 3 M sodium acetate pH 5.2 ลงไปปริมาตร 50 µl (ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของสารละลายที่มีอยู่) และ absolute ethanol ปริมาตร 1,000 µl (ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย) ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บที่ อุณหภูมิ -80 ^{o}C นาน 1 ชั่วโมง

10. เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสข้างบนทิ้ง จะได้ตะกอนสีขาวของดีเอ็นเอติดอยู่ที่ก้นหลอด

11. ล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 70% ethyl alcohol ปริมาตร 500 µl แล้วนำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เทส่วนใสข้างบนทิ้ง ตะกอนดีเอ็นเอจะอยู่ที่ก้นหลอด คว่ำหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องจนดีเอ็นเอแห้ง นำดีเอ็นเอไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ

-20 ^{o}C เพื่อใช้เป็น template สำหรับทำ PCR ต่อไป

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) (Saiki et al., 1988)

1. นำดีเอ็นเอที่สกัดไว้ในสภาพแห้งมาละลายใน sterile double distilled water (sterile ddw) ปริมาตร 20 µl เพื่อใช้เป็น template สำหรับทำ PCR

2. เตรียม Reaction mix ในหลอดทดลองขนาดเล็กความจุ 0.5 ml ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้	ความเข้มข้นที่ได้
Sterile ddw	* µl	-
10X PCR reaction buffer	10 µl	1 X
dATP	2 µl	200 µM
dCTP	2 µl	200 µM
dGTP	2 µl	200 µM
dTTP	2 µl	200 µM
Primer 1	2.5 µl	0.5 µM
Primer 2	2.5 µl	0.5 µM
Taq DNA Polymerase	0.5 µl	2.5 Units / 100 µl
25 mM $MgCl_2$ Solution	8 µl	2 mM
DNA template	1-5 µl	< 1 µg / 100 µl

* ปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 100 µl

3. ทำส่วนผสมในหลอดให้เข้ากันโดยใช้นิ้วเคาะที่ก้นหลอด นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ให้สารละลายข้างหลอดลงมารวมกันบริเวณก้นหลอด (spin down)

4. เติม mineral oil ปริมาตรประมาณ 10-20 µl ลงบนสารละลายที่ผสมแล้วเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ

5. นำ PCR reaction mixture ที่ได้นี้ไปเข้าเครื่อง automatic thermal cycler โดยกำหนดขั้นตอนดังนี้

5.1 Primer คู่ที่ 1 คือ P1 และ P2 มีขั้นตอนดังนี้

Denaturation 94 ^{o}C 1 นาที

Annealing 60 ^{o}C 1 นาที

Extension 72 ^{o}C 1 นาที

ทำซ้ำ 30 รอบ

เมื่อครบรอบสุดท้ายเพิ่มเวลา extension ที่อุณหภูมิ 72 ^{o}C นาน 7 นาที จากนั้นแช่หลอดไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C หรือนำไปวิเคราะห์ผลิตผล (PCR products) ที่ได้ต่อไป

5.2 Primer คู่ที่ 2 คือ P3 และ P4 มีขั้นตอนดังนี้

Denaturation 94 ^{o}C 1 นาที

Annealing 48 ^{o}C 2 นาที

Extension 72 ^{o}C 3 นาที

ทำซ้ำ 30 รอบ

เมื่อครบรอบสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72 ^{o}C นาน 7 นาที จากนั้นแช่หลอดไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C หรือนำไปวิเคราะห์ผลิตผล (PCR products) ที่ได้ต่อไป

5.3 Primer คู่ที่ 3 คือ P5 และ P6 มีขั้นตอนดังนี้

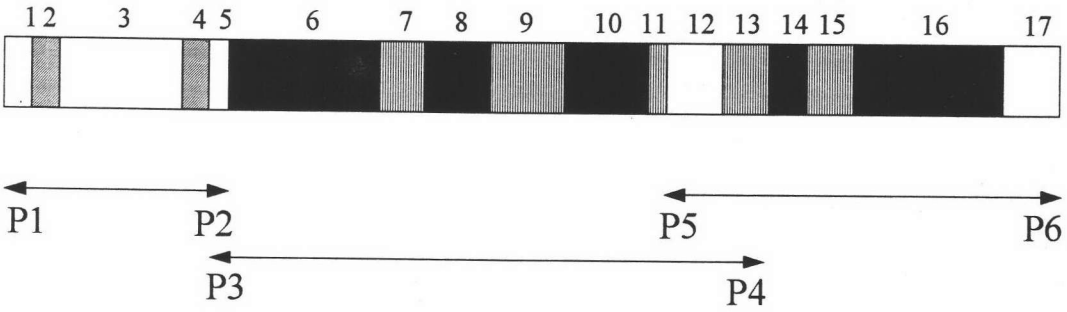
Denaturation 94 ^{o}C 1 นาที

Annealing 50 ^{o}C 1 นาที

Extension 72 ^{o}C 1 นาที

ทำซ้ำ 30 รอบ

เมื่อครบรอบสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72 ^{o}C นาน 7 นาที จากนั้นแช่หลอดไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C หรือนำไปวิเคราะห์ผลิตผล (PCR Products) ที่ได้ต่อไป



รูปที่ 6 ตำแหน่งของ PCR primers P1, P2, P3, P4, P5 และ P6 บนยีน MSP1
(ดูตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ หน้า 34 และ 35)

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis

การเตรียมอะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 1% หรือ 1.7% โดยชั่งอะกาโรส 1 กรัม หรือ 1.7 กรัม ละลายใน TAE buffer 100 ml ตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิประมาณ 50-60 ^{o}C นำไปเทลงบนถาดพลาสติกที่เตรียมไว้ ขนาด 5.5x10.5 cm ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีให้เจลแข็ง เท TAE buffer ลงไปให้ท่วมผิวหน้าของเจล แล้วจึงค่อยๆ ดึงหวี (comb) ออกจากเจลยกถาดพลาสติกนี้ไปวางใน chamber ที่มี TAE buffer โดยให้ปริมาตรของบัฟเฟอร์ท่วมเจลสูงขึ้นมาประมาณ 1-3 ml นำดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์มาผสมกับ loading dye (ประกอบด้วย bromophenol blue, xylene cyanol FF และ ficoll) ให้มีปริมาตร 10-20 µl ในอัตราส่วน 5 : 1 (DNA : dye) แล้วหยอดลงในหลุมบนเจลโดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda/*Hind*III, Lambda/*Eco*RI/*Hind*III หรือ ∅X174/*Hae*III เป็น ตัวเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอที่ศึกษา เปิด power supply ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านเจลจากขั้วลบไปขั้วบวกโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 หรือ 100 โวลต์ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 60 และ 30 นาทีตามลำดับ หรือจนกระทั่งสีของ bromphenol blue เคลื่อนไปได้ 2 ใน 3 ของเจล จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย EtBr (1 µg/ml) ใน TAE buffer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นประมาณ 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอจากการเรืองแสงภายใต้แสง UV ในห้องมืด ถ่ายภาพบันทึกไว้ด้วยกล้องโพลารอยด์ เพื่อนำมาวิเคราะห์ผลต่อไป

ข้อควรระวัง ควรใส่ถุงมือป้องกันการสัมผัสกับ EtBr และใส่หน้ากากกันแสง UV

การวิเคราะห์ผลผลิตของ PCR (PCR Product) ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน (Restriction endonuclease)

1. เตรียมส่วนประกอบในการย่อยผลิตผลของ PCR ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายในดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้
ผลิตผล PCR	5-10 µl
10X buffer	2 µl (1ใน10 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด)
เอ็นไซม์	1 µl
Sterile ddw	* µl

* ปรับปริมาตรทั้งหมดให้เท่ากับ 20 µl

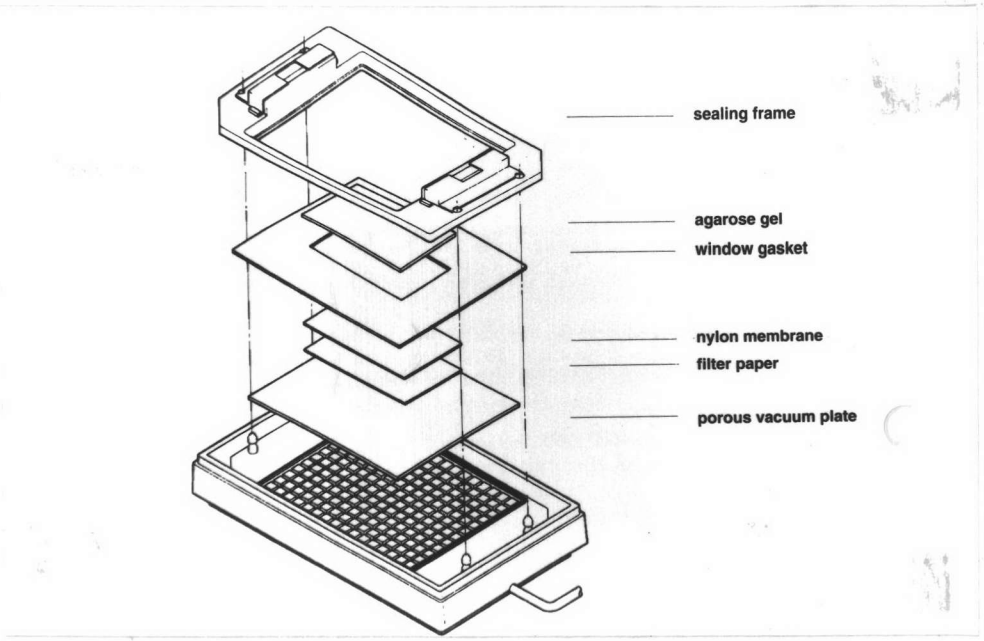
ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นให้สารละลายที่ติดข้างหลอดทดลองลงด้านล่างของหลอด (spin down) ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

2. หุ้มฝาหลอดด้วยพาราฟิล์มเพื่อกันการระเหยของน้ำนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. จากนั้นนำไปผสมกับ loading dye เพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วจึงนำมาวิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์ PCR product โดยวิธี Southern blot hybridization ด้วย ECL-3-oligolabelling and detection systems สำหรับ probes จาก blocks 2, 4 และ 6

1. นำผลิตผล PCR บนอะกาโรสเจลมาขนถ่ายลงบนแผ่น nylon membrane ด้วย vacuum blotter โดยนำเจลมาแช่ใน 0.25 N HCL ในกล่องพลาสติกโดยให้สารละลายท่วมเจล เพื่อทำให้ดีเอ็นเอมีขนาดสั้นลง เขย่าเบาๆ ตลอดเวลานาน 15 นาที จากนั้นเทสารละลายออกให้หมด ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วเติม 0.5N NaOH ลงไปให้ท่วมเจล เพื่อทำให้ดีเอ็นเอแยกสลาย (denature) เขย่าเบาๆ ตลอดเวลานาน 30 นาที เตรียม vacuum blotter (ดังรูปที่ 7) ตัด nylon membrane และกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ให้มีขนาด 6.2x11 cm (ขนาดใหญ่กว่าเจลประมาณ 0.5 cm ในแต่ละด้าน) แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่นให้เปียกชุ่ม จากนั้นจึงไปแช่ใน 10X SSC จนเปียกชุ่ม ใช้ปากคีบชนิดไม่มีเขี้ยวคีบแผ่นกระดาษกรองวางลงบน porous vacuum plate ซ้อนกัน 2 แผ่น แล้วจึงวางทับด้วย nylon membrane โดยให้



รูปที่ 7 ส่วนประกอบของ vacuum blotter

อยู่ในตำแหน่งที่ตรงกับช่องของ window gasket จากนั้นวางแผ่น window gasket ทับลงไปบนแผ่น nylon membrane นำเจลที่ denature แล้วมาวางทับบน window gasket ระวังอย่าให้มีฟองอากาศระหว่างเจลและ nylon membrane วางแผ่นพลาสติก ลงไปเพื่อยึด blotter ให้แน่นเปิดเครื่องดูดสูญญากาศโดยค่อยๆ ปรับให้มีความดันเท่ากับ 5 นิ้วของปรอท จากนั้นจึงเติม 10X SSC ลงไปให้ท่วมเจล ตั้งทิ้งไว้ 90 นาที เมื่อครบเวลาปิดเครื่องดูดสูญญากาศ แล้วนำเจลไปย้อมด้วย EtBr เพื่อตรวจดูว่ายังมีดีเอ็นเอเหลืออยู่บนเจลหรือไม่ จากนั้นนำ nylon membrane ไปแช่ในสารละลาย 2X SSC นาน 5 นาที แล้วนำแผ่น nylon membrane มาวางลงบนกระดาษกรองทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำไปหุ้มด้วยแผ่นพลาสติกใสอย่างบาง (saran wrap) แล้วทำ cross linking เพื่อให้ดีเอ็นเอจับแน่นอยู่บน nylon membrane โดยให้แสง UV ความยาวคลื่น 312 nm ผ่านนาน 2 นาที นำแผ่น nylon membrane ไปเก็บไว้ที่ 4 ^{o}C ในกล่องพลาสติกเพื่อทำ hybridize ต่อไป

2. การติดฉลากบน oligonucleotide โดยวิธี enhanced chemiluminescence (ECL) (ตามวิธีการใน ECL 3-oligolabelling and detection system : AMERSHAM)

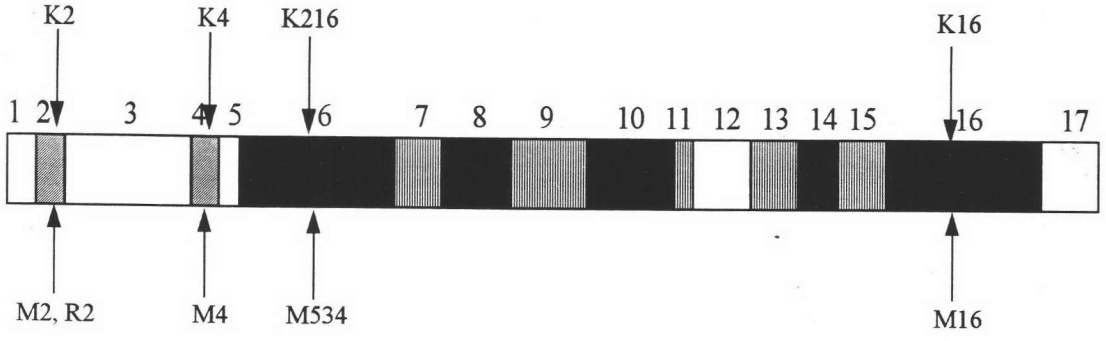
เตรียม reaction mixture ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ประกอบด้วย

Sterile ddw	117 µl
oligonucleotide (100 pmoles)	1 µl
cacodylate buffer	16 µl
fluorescein-11-dUTP	10 µl
terminal transferase	16 µl
ปริมาตรรวมทั้งหมด	160 µl

ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่ 37 ^{o}C นาน 90 นาทีแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C เพื่อนำไปทำ hybridize ต่อไป

3. การทำ hybridization

เท hybridization buffer (ประกอบด้วย 0.5% blocking agent, 0.1% hybridization buffer component, 5X SSC, 0.02% SDS) ปริมาตร 20 ml (ปริมาตร 0.25 ml/cm^2 ของ membrane) ลงในกล่องพลาสติกใส อุ่นที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C (โดยกำหนดอุณหภูมิจากค่า melting temperature (Tm) ของ oligonucleotide ลบ 5 ถึง 10 ^{o}C สำหรับค่า Tm ของ oligonucleotide ที่มีความยาวประมาณ 20-30 bases มีค่าเท่ากับ Tm = 4 x (G+C) + 2 x



รูปที่ 8 ตำแหน่งของ **Probes** ที่ใช้ใน **block 2, 4, 6,** และ **16** ของอัลลีล K1, MAD20 และ RO33 ใน **Southern blot hybridization**
(ดูตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ หน้า 33 และ 34)

(A+T)) เขย่าช้าๆ โดยใช้ incubator shaker วาง nylon membrane ที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ลงไปโดยให้ hybridization buffer ท่วมแผ่น nylon membrane เขย่าใน incubator shaker ที่ 50 ^{o}C เพื่อ prehybridize นาน 30 นาที จากนั้นเติม oligonucleotide ที่ติดฉลากแล้ว (จากข้อ 2) ลงไปในสารละลาย โดยให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5-10 ng/ml ทำการ hybridize ที่ 50 ^{o}C ใน incubator shaker นาน 1-2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่น nylon membrane มาล้างในสารละลาย 5X SSC, 0.1% SDS (ปริมาตร 2 ml/cm^2 ของ membrane) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที 2 ครั้ง และนำไปล้างใน 1X SSC, 0.1% SDS เขย่าใน incubator shaker 15 นาที ที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C อีก 2 ครั้ง แล้วจึงนำ nylon membrane ล้างด้วย buffer 1 (ประกอบด้วย 0.15 M NaCl, 0.1M Trisbase, pH 7.5) ปริมาตร 2 ml/cm^2 ของ membrane นาน 1 นาที แล้วนำไปเติม blocking solution (0.5% blocking agent ใน buffer 1 ปริมาตร 0.25 ml/cm^2 ของ membrane) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างด้วย buffer 1 นาน 1 นาที นำ nylon membrane ไปใส่ในสารละลาย antibody conjugate ที่เจือจาง (ประกอบด้วย antifluorescein HRP conjugate 1 ส่วนใน 1000 ส่วนของ 0.5% bovine serum albumin (fraction V) ใน buffer 2 (0.4M NaCl, 0.1M tris base, pH 7.5) ปริมาตร 0.25 ml/cm^2 ของ membrane เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำ nylon membrane ไปล้างใน buffer 2 (ปริมาตร 2 ml/cm^2 ของ membrane) เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ทำซ้ำจนครบ 4 ครั้ง

4. การตรวจสอบ (detection)

ผสม detection solution 1 และ detection solution 2 (Cat. No RPN 2105, AMERSHAM) ในสัดส่วนเท่าๆ กัน (ปริมาตร 0.1 ml/cm^2 ของ membrane) ในกล่องพลาสติกใส นำ nylon membrane จาก buffer 2 วางลงไปเขย่าให้ membrane เปียกจนทั่ว นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ปากคีบ คีบ nylon membrane มาหุ้มด้วย plastic wrap ระวังอย่าให้มีฟองอากาศนำไปวางใน X-ray film cassette โดยหงายด้านที่มีดีเอ็นเอขึ้นปิดไฟแล้วนำแผ่นฟิล์มมาวางทับบน nylon membrane ปิด cassette ใช้เวลาในการ expose นาน 5 นาที จากนั้นนำแผ่นฟิลม์มาล้างโดยแช่ใน developer solution ประมาณ 3-5 นาที จะปรากฏแถบดีเอ็นเอสีดำบนแผ่นฟิลม์เอ็กซเรย์ หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่ใน 30% acetic acid ประมาณ 30 วินาที และ ทำให้คงสภาพใน fixer solution จนเห็นแถบของดีเอ็นเอชัดเจน นำไปล้างในน้ำประปาแล้วทิ้งให้แห้ง เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

5. การกำจัด probe (Deprobing blots)

หลังจากการ detection เก็บ nylon membrane ที่หุ้มด้วย plastic wrap ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C หรือนำมากำจัด probe ทันที โดยล้าง nylon membrane ใน 5X SSC 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำ membrane ไปแช่ในสารละลาย 0.1X SSC และ 0.1% SDS (ปริมาตร 2 ml/cm^2 ของ membrane) เขย่าใน incubator shaker ที่ 65 ^{o}C นาน 60 นาที แล้วนำมาล้างด้วย 5X SSC (ปริมาตร 2 ml/cm^2 ของ membrane) 5 นาที หุ้ม nylon membrane ที่เปียกด้วย plastic wrap เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 ^{o}C เพื่อนำไป hybridize กับ probe ตัวใหม่ต่อไป

การวิเคราะห์ PCR product โดยวิธี hybridization ด้วย ECL^{TM} random prime labelling and detection systems สำหรับ block 16

1. การเตรียมตัวติดตาม (probe)

นำ labelling components จากตู้แช่ -20 ^{o}C มาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เจือจางดีเอ็นเอที่จะติดฉลาก (label) ให้มีความเข้มข้น 2-25 ng/ml ด้วย sterile double distilled water ให้มีปริมาตรอย่างน้อย 20 µl นำไป denature โดยต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาทีแล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เตรียม labelling components ประกอบด้วย nucleotide mix 10 µl, primers 5 µl, denatured DNA ที่เตรียมไว้ (50 ng) และ enzyme solution (Klenow 4 units / l) 1 µl ปรับปริมาตรรวมทั้งหมดสุดท้ายให้เป็น 50 µl ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นให้สารละลายข้างหลอดลงไปรวมที่ก้นหลอด (spin down) จากนั้นนำไปอุ่นที่ 37 ^{o}C จนกระทั่งครบ 1 ชั่วโมงหรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เก็บ probe ที่ถูกติดฉลากแล้วไว้ที่ -20 ^{o}C (หรือเติม 20 mM EDTA) เพื่อนำไป hybridization ต่อไป

2. การทำ hybridization

เตรียม hybridization buffer ประกอบด้วย 5X SSC, 0.5% blocking agent, 0.1% SDS, 100 mg/ml denatured sheared heterogous DNA ทำให้ละลายที่ 55-60 ^{o}C ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติม dextran sulfateคนให้ละลายโดยใช้ magnetic stirrer (ใช้เวลาประมาณ 15-30 นาที) ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml นำไปเก็บที่ -20 ^{o}C นำ hybridization buffer ไปต้มที่

อุณหภูมิ 95-100 ^{o}C นาน 5 นาที เพื่อตัด heterologous DNA ก่อนทำ prehybridize แล้วนำ nylon membrane ที่มีดีเอ็นเออยู่มาใส่ใน hybridization buffer ปริมาตร 0.25 ml/cm^2 ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C เขย่าใน incubator shaker นานอย่างน้อย 30 นาที นำดีเอ็นเอที่ตัวติดตามที่เตรียมไว้ (DNA probe) ปริมาตร 20 µl มา denature โดยต้มในน้ำเดือด 5 นาทีแล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เมื่อครบ 30 นาทีเติม denatured probe ลงไปใน prehybridize solution ระวังอย่าให้ถูก membrane เขย่าเบาๆใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C ข้ามคืน จากนั้นนำ membrane ไปล้างใน washing solution (1X SSC และ 0.1% SDS, ปริมาตร 2-5 ml/cm^2 ของ membrane) ซึ่งอุ่นอยู่ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C เขย่าเบาๆ 15 นาที แล้วนำไปล้างในสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.5X SSC และ 0.1% SDS ที่อุณหภูมิเดิม เขย่าเบาๆ นาน 15 นาที

3. การ blocking และ antibody incubation

ล้าง nylon membrane ใน antibody wash buffer ปริมาตร excess (2ml/cm^3) ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปแช่ในสารละลาย 0.5% blocking agent ใน antibody wash buffer (ปริมาตร 0.5 ml/m^2) เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาทีจากนั้นล้าง nylon membrane ด้วย antibody wash buffer อีกครั้ง แล้วนำ nylon membrane ไปแช่ใน antibody wash buffer ที่เจือจาง (ประกอบด้วย antifluorescein HRP 1 ใน 1000 เท่าของ 0.5% BSA ที่เตรียมใหม่ๆ ปริมาตร 0.25 ml/cm^2 ของ membrane) เขย่าตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้องจนครบ 1 ชั่วโมง กำจัด unbond conjugate โดยนำ nylon membme มาล้างใน 0.1 (V/V) Tween-20 ใน antibody wash buffer ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที 2 ครั้ง และ 5 นาที อีก 2 ครั้ง โดยเขย่าตลอดเวลา

4. signal generation และ detection

ผสมสารละลาย detection 1 และ detection 2 ปริมาตรเท่าๆ กัน (0.125 ml/cm^2) ในกล่องพลาสติกใส นำ nylon membrane มา แช่ใน detection solution นาน 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปหุ้มด้วย plastic wrap ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ นำไปวางใน X-ray film cassette อย่างรวดเร็วโดยให้วางด้านที่มีดีเอ็นเอไว้ด้านบน นำแผ่นฟิล์มมาประกบ (ทำในห้องมืด) expose 5 นาที จากนั้นนำฟิล์มไปล้างเพื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏต่อไป

5. การกำจัด probe (Deprobing blots)

นำ nylon membrane ที่ทำการตรวจสอบ (detection) แล้วมาล้างด้วย 5X SSC นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปใส่ใน 0.1% (w/v) SDS (ปริมาตร 5 ml/cm^2 ของ membrane) ที่ต้มจนเดือด ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปล้างด้วย 5X SSC 5 นาที แล้วเก็บ nylon membrane นี้ไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 ^{o}C ใน plastic wrap เพื่อนำไป hybridize ด้วย probe ตัวอื่นต่อไป (การกำจัด probe นี้ไม่จำเป็นต้องทำทันทีหลังจากการตรวจสอบ (detection) โดยที่ nylon membrane สามารถเก็บไว้ใน plastic wrap ที่อุณหภูมิ 2-8 ^{o}C แต่ควรระวังอย่าให้ membrane แห้ง)

การประเมินค่าหาจำนวนเชื้อที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตผลของ PCR จากอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟรีซิส โดยวิธี limiting dilution

นำตัวอย่างเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ T9/94 (M1-1) b3 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการมาทำฟิล์มเลือดอย่างบางเพื่อตรวจนับหาเปอร์เซนต์ parasitemia แล้วจึงนำไปหาเปอร์เซนต์ hematocrit จากนั้นนำตัวอย่างเลือดนี้ปริมาตร 15 µl ไปทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็น template สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ PCR primer P1 และ P2 เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของจีน MSP1 ในบริเวณ block 1 ถึง block 5 และทำการตรวจสอบผลิตผล PCR โดยวิธีอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟรีซีส นำผลิตผล PCR ที่ได้นี้มาเจือจางใน sterile ddw แบบ serial dilution โดยแบ่งทำ 2 ชุดในอัตราส่วน 1:5 และ 1:10 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ถูกเจือจางนี้ไปตรวจสอบผลแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟรีซีส แล้วนำเจลที่มีแถบดีเอ็นเอนี้ไปวิเคราะห์ผลด้วย Southern blot hybridization กับ oligonucleotide ที่จำเพาะกับบริเวณที่เป็น conserved sequence ใน block 3 ของจีน MSP1 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

5' - TTA ATT GAT GGA TAT GAA G - 3' (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 616 ถึง 634, 472 ถึง 490 และ 799 ถึง 817 บน MAD20, K1 และ RO33 type ตามลำดับ)

บันทึกผลที่ได้เพื่อนำไปคำณวนหาจำนวนเชื้อที่สามารถตรวจพบได้ที่ระดับความเจือจางต่างๆ