# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal Cycler) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.

ชุดเครื่องมือทำเจลอิเลคโตรโฟริซิส (Agarose gel electrophoresis equipment) ของบริษัท Mupid, Japan.

เครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเลต (UV Transilluminator) รุ่น 3-3602 ของบริษัท Fotodyne, USA.

อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ ประกอบด้วย

- กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์ ของบริษัท Polaroid, USA.
- แผ่นกรองแสงสีแดง
- ฟิล์มโพลารอยด์ขาว-ดำ (Polaroid film type 667) ความไวแสง 3000 (ISO 3000) ของบริษัท Polaroid, USA.

เครื่องเขย่า (Shaker) แบบรีซิโปรคอล (reciprocal) ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Ltd, USA.

ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น BE 500 ของบริษัท Memmert, Germany.

เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy Seiko, Japan.

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan pH2000 ของบริษัท Corning,USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge)

- ชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K ของบริษัท Kontron Instruments, Germany.
- ชนิดปั่นสารจำนวนน้อย (Micro centrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan

หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ผลิตด้วย Polypropylene Copolymer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ของบริษัท Nalgene, USA.

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-VIS recording spectrophotometer) รุ่น UV160A ของบริษัท Shimadzu Corporation, Japan.

คิวเวทท์ (Cuvette)

- ขนาดเล็กพิเศษ (Super-micro black cell) ปริมาตร 50-120 ไมโครลิตร ทางเดินแสง (path length) 2 มิลลิเมตร ของบริษัท Shimadzu Corporation, Japan.
- ขนาดเล็ก (Semi-micro cuvette) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ทางเดินแสง 1 เซนติเมตร ของบริษัท BioRad, USA.

กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) รุ่น CHK-H ของบริษัท Olympus optical Co.Ltd, Japan.

ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany.

ตู้เยือกแข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส (Freezer) รุ่น MDF-U332 ของบริษัท Sanyo, Japan.

เครื่องชั่งไฟฟ้า (Balance)

- ชนิดละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น L 2200p ของบริษัท Sartorius, Germany.
- ชนิดละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PB 3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.

ตู้อบแห้ง (Dryer) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert, Germany.

ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) รุ่น BV-124 ของบริษัท Dwyer Instruments, USA.

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W-760 ของบริษัท Memmert, Western Germany.

เครื่องผสมสาร (Mixer) รุ่น VSM-3 ของบริษัท Shelton Scientific, USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบต่ำ (Spin down) รุ่น 2816 ของบริษัท Waken, Japan.

เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicator) รุ่น Sonorex RK100 ของบริษัท Bandelin electronic, Germany.

เครื่องวัดความเข้มข้นของสารโดยใช้แสง (Spectrophotometer) รุ่น Novaspec ของบริษัท Pharmacia, England.

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker) รุ่น WB22 ของบริษัท Memmert, Germany.

**เอนไซม์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย**

แบคโต เปปโตน (Bacto-Peptone) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

สารสกัดจากเนื้อ (Beef Extract) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

กลูโคส (D (+) Glucose, $C_6H_{12}O_6$) จากบริษัท Merck, U.S.A.

ซูโครส (Sucrose, $C_{12}H_{22}O_{11}$) จากบริษัท Merck, U.S.A.

มอลโตส (Bacto®Maltose) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

แลคโตส (Bacto®Lactose) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

ดี-ฟรุกโตส (D-Fructose) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

แอล-อะราบิโนส (L-Arabinose) จากบริษัท Sigma, U.S.A.

อาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test medium) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP medium) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

อาหารเหลวฟีนอล เรด เบส (Phenol red broth base) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไธโอไกลโคเลต (Thioglycolate broth) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสตาร์ช (Starch agar) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสกิม มิลค์ (Skim milk agar) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไนเตรต (Nitrate broth) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริพเปิ้ล ชูการ์ ไอออน (Triple sugar Iron agar) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไลซีน ไอออน (Lysine Iron agar) จากบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate, $CH_3COONa$) จากบริษัท BDH Chemicals Ltd,England.

แอมโมเนียมคลอไรด์ (Ammonium chloride, $NH_4Cl$) จากบริษัท Ajax Chemicals, Australia.

แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulphate, $MgSO_4$) จากบริษัท Ajax Chemicals, Australia.

ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-Potassium hydrogen phosphate, $HK_2O_4P$) จากบริษัท Merck,Germany.

โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium phosphate, $KH_2PO_4$) จากบริษัท J. T. Baker, U.S.A.

อีดีทีเอ (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) จากบริษัท Bio-Rad laboratories, U.S.A.

แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride, $CaCl_2$) จากบริษัท Merck,Germany.

เฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric chloride, $FeCl_3$) จากบริษัท May&Baker Ltd, England.

โคบอลต์คลอไรด์ (Cobolt chloride, $CoCl_2$) จากบริษัท May&Baker Ltd, England.

แมงกานีสคลอไรด์ (Manganese chloride, $MnCl_2.4H_2O$) จากบริษัท May&Baker Ltd,England.

ซิงค์ซัลเฟต (Zinc sulfate, $ZnSO_4$) จากบริษัท Farmitalia Carlo Ersa, Italy.

โซเดียมโมลิบเดต (Sodium molybdate, $Na_2MoO_4$) จากบริษัท May&Baker Ltd, England.

คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper (II) sulfate, $CuO_4S$) จากบริษัท Merck, Germany.

โปแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide, KI) จากบริษัท LabGuard, U.S.A.

กลีเซอรอล (Glycerol, $CH_2OHCHOHCH_2OH$) จากบริษัท BDH Laboratory Supplies, England.

อะกาโรส เจล (Agarose gel) จากบริษัท FMC BioProducts, U.S.A.

เมธิลีนบลู (Methylene blue) จากบริษัท Fluka, Switzerland.

โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide, KOH) จากบริษัท Ajax Chemicals, Australia.

แอมโมเนียมออกซาเลต (Ammonium oxalate, $COONH_4.2H_2O$) Ajax Chemicals, Australia.

กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) จากบริษัท BDH Lab, England.

ทริสมาเบส (Trizma®Base) จากบริษัท Sigma, U.S.A.

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) จากบริษัท Sigma, U.S.A.

เอธิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) จากบริษัท Merck, U.S.A.

แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate, $NH_4SO_4$) จากบริษัท Merck, U.S.A.

กรดอะซิติก (Acetic acid) จากบริษัท Merck, U.S.A.

เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) จากบริษัท Fluka, Switzerland.

คูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี250 (Coomasie brillient blue G250) จากบริษัท Fluka, Switzerland.

กรดฟอสฟอริก (Orthophosphoric acid) จากบริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy.

แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) จากบริษัท Merck, Germany.

เบต้า-นิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ ฟอสเฟต (β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) จากบริษัท Sigma, U.S.A.

อะดีโนซีน-5-ไดฟอสเฟต (Adenosine-5-diphosphate) จากบริษัท Boehringer Mannheim, Germany.

โซเดียมฟอสเฟตกลาส (Sodium Phosphate glass) จากบริษัท Sigma, U.S.A.

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl) จากบริษัท Merck, Germany.

กรดมาเลอิก (Maleic acid) จากบริษัท Fluka, Switzerland.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) จากบริษัท LabGuard, Mexico.

โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin) จากบริษัท Sigma, U.S.A.

กรดบอริก (Boric acid, $H_3BO_3$) จากบริษัท J. T. Baker Inc, U.S.A.

2-เมอแคปโตเอธานอล (2-mercaptoethanol) จากบริษัท Sigma, U.S.A.

ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamyl alcohol) จากบริษัท Sigma, U.S.A.

โซเดียมซิเตรท ไดไฮเดรท (Sodium citrate dihydrate, $CH_2COONa.2H_2O$) จากบริษัท J. T. Baker Inc, U.S.A.

น้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease-free water) จากบริษัท Promega, U.S.A.

ชุดทดสอบฟอสเฟต Spectroquant® Phosphate Test, 1.14848.0001 จากบริษัท Merck, Germany.

ชุดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (PCR Core system) จากบริษัท Promega, U.S.A. ประกอบด้วย

- *Taq* DNA polymerase 5 หน่วย/ไมโครลิตร
- แมกนีเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์
- PCR นิวคลีโอไทด์ มิกซ์ 10 มิลลิโมลาร์
- สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา เข้มข้น 10 เท่า (10x reaction buffer)

ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล (Geneclean II kit) จากบริษัท Bio101, U.S.A.

ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ (DIG High Prime DNA labeling and Detection Starter kit I) จากบริษัท Roche, Germany.

โปรตีเนส เค (Proteinase K) จากบริษัท Life Teci-nologies, U.S.A.

ไลโซไซม์ (Lysozyme) จากบริษัท Sigma, U.S.A.

กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) จากบริษัท Biochemika, Switzerland.

เฮกโซไคเนส (Hexokinase) จากบริษัท Biochemika, Switzerland.

เอนไซม์เรสทริกชัน (Restriction enzyme) *Eco*RI จากบริษัท Promega, U.S.A.

ไรโบนิวคลีเอส เอ (Ribonuclease A) จากบริษัท Sigma, U.S.A.

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- 100 bp ดีเอ็นเอ แลดเดอร์ + 1.5 kb (100 bp DNA ladder + 1.5 Kbp) จากบริษัท Pacific sciences Ltd, Thailand.
- แลมดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Hin*dIII (λDNA/*Hin*dIII) จากบริษัท Takara, Japan.
- 1 kb ดีเอ็นเอ แลดเดอร์ (1kb DNA Ladder) จากบริษัท Promega, U.S.A

แผ่นไนลอน เมมเบรน (Nylon membrane) จากบริษัท Pail Bio support, U.S.A.

แผ่นกรองไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose filter membrane) ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร จากบริษัท Millipore, U.S.A.

**จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย**

*Streptomyces coelicolor* จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

*Propionibacteria* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ปริมาณสูง ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยครั้งนี้

*Corynebacterium* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ปริมาณสูง ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยครั้งนี้

*Renibacterium* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ปริมาณสูง ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยครั้งนี้

*Escherichia coli* JM109

## วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟต

3.1.1 การแยกแบคทีเรียที่สะสมโพลีฟอสเฟตจากตัวอย่างน้ำเสีย

เก็บตัวอย่างน้ำเสียชุมชนจากบ่อที่มีการให้อากาศ และบ่อพักที่ไม่มีการให้อากาศจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานบำบัดน้ำเสียสี่พระยา กรุงเทพมหานคร แล้วนำน้ำตัวอย่างดังกล่าวมาผ่านการสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) เพื่อทำให้ตะกอน (floc) แตกออกและแบคทีเรียกระจายตัวกันอย่างสม่ำเสมอ ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นเป็น $10^{-3}$, $10^{-4}$, $10^{-5}$ และ $10^{-6}$ จากนั้นกระจาย (spread) ตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรของแต่ละความเข้มข้น ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียชนิดแข็ง (waste water agar medium, ภาคผนวก ก. หมายเลข 1) โดยใช้แท่งแก้วงอ (spreader) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำโคโลนีเดี่ยวไปขีด (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียชนิดแข็งเพื่อ คัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เป็นโคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 5 วัน แล้วนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาย้อมดู โวลูทิน แกรนูล ด้วยสารละลายอัลคาไลน์ ลอฟเฟลอร์สเมธิลีนบลู (Alkaline Loeffler's Methylene Blue, ภาคผนวก ข. หมายเลข 1) แล้วคัดเลือกเฉพาะไอโซเลตที่มองเห็นโวลูทิน แกรนูล ติดสีน้ำเงินเข้มอยู่ภายในเซลล์เพื่อนำไปใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

3.1.2 การตรวจสอบความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์จากไอโซเลตที่คัดแยกได้จากกระบวนการข้างต้นดังข้อ 3.1.1

นำไอโซเลตที่คาดว่าน่าจะมีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.1.1 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดแข็งเอียง (synthetic waste water agar medium, ภาคผนวก ก. หมายเลข 2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำไอโซเลตดังกล่าวปริมาณ 1 ลูป (loop) ทดลอง มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลว (synthetic waste water medium, ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0.8% เพื่อเพิ่มการเจริญของเชื้อ ในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 32 ชั่วโมง จึงปั่นเซลล์ให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึง

ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลว ปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิมอีกครั้งเพื่อให้เซลล์ตกตะกอน เจือจางเซลล์ที่ได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลวเพื่อให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.5 แล้วจึงลงเชื้อที่ปรับให้ได้ความเข้มข้นดังกล่าวในหลอดทดลองซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด และนำทั้ง 2 ชุดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศโดยใช้หม้อที่ปราศจากออกซิเจน (anaerobic jar) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำชุดหนึ่งไปตรวจวัดความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ด้วยชุดทดสอบฟอสเฟต (Spectroquant® Phosphate Test) อีกชุดหนึ่งนำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปตรวจวัดความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ด้วยชุดทดสอบฟอสเฟตเช่นเดียวกัน โดยมีหลอดควบคุม (control) คืออาหารเลี้ยงเชื้อน้ำเสียสังเคราะห์ชนิดเหลว ซึ่งอาศัยหลักการวัดปริมาณออโธฟอสเฟตในสารละลาย โดยกรดซัลฟูริกจะทำให้ฟอสเฟตสามารถเกิดปฏิกิริยากับไอออนของโมลิบเดต (molybdate ion) ได้เป็นกรดโมลิบโดฟอสฟอริก (molybdophosphoric acid) แล้วกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) จะรีดิวซ์ให้เป็นฟอสโฟโมลิบดีนัมบลู (phosphomolybdenum blue) ที่วัดปริมาณได้ที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 710 นาโนเมตร

ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตชุดทดสอบฟอสเฟต โดยนำตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัด (เฉพาะส่วนน้ำใส โดยแยกเซลล์แบคทีเรียออกไปด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาเติมรีเอเจนต์ P-1A 5 หยด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร แล้วจึงเติมรีเอเจนต์ P-2A ปริมาณ 1 ช้อนตวง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารจนกระทั่งเกล็ดของสารรีเอเจนต์ละลายหมด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 710 นาโนเมตร จากการทดลองนี้จึงสามารถหาปริมาณของฟอสเฟตที่แบคทีเรียสะสมไว้ภายในเซลล์ได้ด้วยการเทียบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตเป็น 1, 2, 3, 4 และ 5 ไมโครกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค.)

3.2 <u>การจำแนกสกุลของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธาน</u>

นำไอโซเลตที่มีความสามารถในการสะสมโพลีฟอสเฟตไว้ภายในเซลล์ปริมาณมาก 3 อันดับ คือ (CUW-1, CUW-3, CUW-8) มาศึกษาลักษณะการเจริญ (cultural characteristics) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) และลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (physiological and biochemical characteristics) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆเพื่อเป็น

แนวทางในการจัดจำแนกอนุกรมวิธานอย่างคร่าวๆ โดยอ้างอิงจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Kandler, 1986)

3.2.1 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย

นำไอโซเลตที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเทรียนท์ (nutrient agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 4) มาศึกษารูปร่าง ขนาด สี ความโปร่งใสหรือความทึบแสงของโคโลนี และลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Cappuccino, 2000)

<u>การติดสีแกรม</u> นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเทรียนท์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ย้อมสีด้วยสารละลายแกรมคริสตอลไวโอเลต (Gram's crystal violet solution, ภาคผนวก ข หมายเลข 2) เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้งแล้วย้อมด้วยสารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution, ภาคผนวก ข หมายเลข 3) เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล และน้ำกลั่น แล้วย้อมด้วยสารละลายแกรมซาฟรานินโอ (Gram's safranin staining solution, ภาคผนวก ข. หมายเลข 4) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

<u>การย้อมสีเอนโดสปอร์</u> นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเทรียนท์เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หยดสารละลายมาลาไคท์กรีน (malachite green, ภาคผนวก ข. หมายเลข 5) ใช้ไฟลนพอให้เกิดเป็นไอ เป็นเวลา 1-2 นาที ระวังอย่าให้สีแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วล้างน้ำ ย้อมสีซาฟรานินโอ เป็นเวลา 1 นาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สปอร์จะติดสีเขียว เซลล์จะติดสีแดง

<u>การเคลื่อนที่</u> นำแบคทีเรียมาปลูกเชื้อแบบปักตรง (stab inoculation) ลงในอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test medium, ภาคผนวก ก. หมายเลข 5) บ่มเชื้อนาน 18-24 ชั่วโมง ถ้าเห็นการเจริญของเชื้อออกนอกรอยปักเชื้อหรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนแต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหลอดขุ่นกว่าเดิม แสดงว่าให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าเห็นการเจริญและขอบเขตของเชื้ออย่างชัดเจน แสดงว่าให้ผลเป็นลบ

3.2.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (นันทนา, 2537)

การสร้างแคตะเลส หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ที่มีความเข้มข้น 3% ลงบนโคโลนีของแบคทีเรีย ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้น แสดงว่าให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้น แสดงว่าให้ผลเป็นลบ

การทดสอบเมธิลเรด ปลูกเชื้อโคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP medium, ภาคผนวก ก. หมายเลข 6) เป็นเวลา 1-3 วัน เติมน้ำยาทดสอบคือ สารละลายเมธิลเรด 5 หยด ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง บันทึกผลเป็นบวก ถ้าเป็นสีเหลือง บันทึกผลเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ฟีนอล เรด เบส (phenol red broth base, ภาคผนวก ก. หมายเลข 7) สังเกตการสร้างกรด ถ้าแบคทีเรียใช้คาร์โบไฮเดรตได้จะสร้างกรดขึ้น ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นสีเหลือง บันทึกผลเป็นบวก ถ้าเชื้อสร้างแอมโมเนียจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง บันทึกผลเป็นลบ และสามารถดูการสร้างแก๊สได้ด้วยการใส่หลอดดักแก๊ส (Durham's tube)

การเจริญในภาวะไร้อากาศ ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไธโอไกลโคเลต (thioglycolate broth, ภาคผนวก ก. หมายเลข 8) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ้าเชื้อมีการเจริญ บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่มีการเจริญ บันทึกผลเป็นลบ

การทดสอบการย่อยแป้ง ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสตาร์ช (starch agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 9) เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจดูการย่อยแป้งโดยการราดด้วยสารละลายไอโอดีนให้ทั่วจานเพาะเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้ บันทึกผลบวก

การทดสอบการย่อยเคซีอีน ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสกิม มิลค์ (skim milk agar, ภาคผนวก ก. หมายเลข 10) เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจดูการย่อยเคซีอีน โดยถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยเคซีอีนได้บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบการย่อยเจลาติน ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเทรียนท์เจลาติน (nutrient gelatin medium, ภาคผนวก ก หมายเลข 11) เป็นเวลา 2 วัน ตรวจดูการย่อยเจลาติน โดยการราดด้วยสารละลายแอมโมเนียซัลเฟตอิ่มตัวให้ทั่วจากเพาะเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยเจลาตินได้ บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบการสร้างอินโดล ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอินโดล (indole broth, ภาคผนวก ก. หมายเลข 12) เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบสารอินโดลที่เกิดขึ้นโดยเติมสารละลายโคแวคส์ (Kovac's solution, ภาคผนวก ข. หมายเลข 6) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดสีแดงบนผิวหน้าอาหาร แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างอินโดลได้ บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเทรียนท์ (nutrient broth, ภาคผนวก ก. หมายเลข 13) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ถ้าเชื้อมีการเจริญ บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบไนเตรต ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไนเตรต (nitrate broth, ภาคผนวก ก. หมายเลข 14) บ่มเชื้อนาน 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาเติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ อัลฟา แนพธิลามีน (0.5% alpha-naphthylamine, ภาคผนวก ข. หมายเลข 7) และกรดซัลฟานิลิกเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (0.8% sulfanilic acid, ภาคผนวก ข. หมายเลข 8) อย่างละ 5 หยด ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นหรือไม่มีสีแดงเกิดขึ้นในตอนแรกและเมื่อเติมผงสังกะสีเข้าไปก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง บันทึกผลเป็นบวก แต่ถ้าเติมผงสังกะสีแล้วมีสีแดงเกิดขึ้น บันทึกผลเป็นลบ

3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของโพลีฟอสเฟตไคเนส (polyphosphate kinase, PPK) จากเชื้อ CUW1, CUW3, CUW8

3.3.1 การเตรียมเซลล์ของเชื้อตัวอย่าง CUW-1, CUW-3, CUW-8

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง 3 สายพันธุ์ในอาหารเหลวนิวเทรียนท์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บส่วนเซลล์มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 แล้วนำสารละลายเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรปลูกลงในน้ำเสียสังเคราะห์สูตรดัดแปลงที่มีฟอสเฟต

จำกัด (ภาคผนวก ก. หมายเลข 15) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดคือ ชุดที่ปราศจากออกซิเจนและชุดที่มีการให้อากาศ นำทั้ง 2 ชุดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศในหม้อที่ปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปเตรียมสารสกัดจากเซลล์ อีกชุดหนึ่งคือชุดที่มีการให้อากาศจะถูกนำไปบ่มต่อบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปเตรียมสารสกัดจากเซลล์เช่นเดียวกัน

3.3.2 การเตรียมสารสกัดจากเซลล์

นำชุดการทดลองทั้งสองชุดไปปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-อีดีทีเอ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.6 ((Tris-EDTA buffer, ภาคผนวก ข. หมายเลข 9) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (Bonting และคณะ, 1991) เติมเม็ดแก้ว (glass bead) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 มิลลิเมตรลงไปเพื่อทำให้เซลล์แตกจากการใช้เครื่องผสมสาร นาน 10 นาที (กณิกนันต์, 2543) ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส นำมาแยกกากเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนน้ำใสที่ได้คือ สารสกัดจากเซลล์

3.3.3 การหากิจกรรมของโพลีฟอสเฟตไคเนสจากสารสกัดจากเซลล์ของเชื้อตัวอย่าง CUW-1, CUW-3 และ CUW-8 (Van Groenstijin และคณะ, 1989)

จากหลักการที่โพลีฟอสเฟตไคเนสจะดึงหมู่ฟอสเฟตจากโพลีฟอสเฟตไปเติมในADP เกิดเป็น ATPซึ่งจะทำปฏิกิริยาเชื่อมโยงต่อไปตามสมการ 3.1 ถึง 3.3 เกิดเป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับเอ็นเอดีพีเกิดเป็น กลูโคเนต-6-ฟอสเฟต และ NADPHขึ้น ซึ่ง NADPH ที่เกิดขึ้นนี้จะอยู่ในรูปรีดิวซ์ สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และเป็นสัดส่วนกับปริมาณ ATP ที่เกิดขึ้น

$$(PolyP)_{n+1} + ADP \xrightarrow{PPK} (PolyP)_n + ATP \ldots..(3.1)$$

$$Glucose + ATP \xleftrightarrow{HK} Glucose\text{-}6\text{-}Phosphate + ADP \ldots(3.2)$$

$$Glucose\text{-}6\text{-}Phosphate + NADP \xleftrightarrow{G\text{-}6PDH} Gluconate\text{-}6\text{-}Phosphate + NADPH + H^{+} \ldots..(3.3)$$

<u>หมายเหตุ</u>

PPK หมายถึง โพลีฟอสเฟตไคเนส

HK หมายถึง เฮกโซไคเนส

G-6PDH หมายถึง กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส

นำสารสกัดจากเซลล์ที่สกัดได้จากข้อ 3.3.2 ปริมาตร 0.65 มิลลิลิตร มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ โดยมีส่วนผสมของสารทดสอบอื่นของปฏิกิริยา ดังนี้ (ภาคผนวก จ.)

- สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข. หมายเลข 10)
- แมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.008 โมลาร์
- กลูโคส เข้มข้น 0.2 โมลาร์
- NADP เข้มข้น 0.00065 โมลาร์
- ADP เข้มข้น 0.001 โมลาร์
- โพลีฟอสเฟต (n=35) เข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร
- เฮกโซไคเนส เข้มข้น 3.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร
- กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส เข้มข้น 1.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยการนำสารผสมปฏิกิริยาปริมาตร 145 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับสารสกัดจากเซลล์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร โดยตั้งโปรแกรมให้วัดคลื่นแสงทุกๆ 1 วินาทีเป็นเวลานาน 500 วินาที แล้วจึงใส่ ADP ปริมาตร 55 ไมโครลิตรที่เวลา 180 วินาทีเพื่อเป็นการเริ่มต้นของปฏิกิริยา

กำหนดให้ 1 หน่วย (unit) ของโพลีฟอสเฟตไคเนส คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแล้วเกิดเป็นเอ็นเอดีพีเอช 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

3.3.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford (Bradford, 1976)

ใส่สารสกัดจากเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย Bradford (ภาคผนวก ข. หมายเลข 11) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (ภาคผนวก ง.) ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4 <u>การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ออกจากเชื้อแบคทีเรีย</u> (ดัดแปลงจาก Sambrook และ Russell, 2001)

เลี้ยงเชื้อ 1 ลูปในอาหารเหลวนิวเทรียนท์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนเชื้อเข้าสู่ระยะกลางของการเจริญ (mid-log phase) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาทีที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเพื่อเก็บส่วนเซลล์ เติม lysis buffer 1 (ภาคผนวก ข. หมายเลข 12) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ ห้อง แล้วดูดส่วนน้ำใสทิ้ง ละลายส่วนตะกอนที่ได้ด้วย lysis buffer 2 (ภาคผนวก ข. หมายเลข 13) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนน้ำใสด้านบนมาเติมสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol) (ภาคผนวก ข. หมายเลข 14) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ผสมให้เข้ากันจนได้สารละลายขุ่น แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนน้ำใสไปเติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนเกิดตะกอนขาวของดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำตะกอนดีเอ็นเอดังกล่าวมาล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอธานอลที่แช่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเก็บตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ระเหยดีเอ็นเอที่ได้จนแห้งสนิท แล้วจึงแขวนลอยตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส เอ เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอแล้วจึงเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ ขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

3.5.1 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยการวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet absorption spectroscopy)

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.4 ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A260 และ A280) แล้วคำนวณค่า A260 ต่อ A280 ถ้าได้ค่าเท่ากับ 1.80 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นบริสุทธิ์ แต่ถ้าได้ค่าสูงจนใกล้ 2.00 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอ (RNA) ปนเปื้อนอยู่มากซึ่งกำจัดได้ด้วย และถ้าได้ค่าต่ำกว่าแสดงว่ามีการปนเปื้อนจากโปรตีนซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นได้ด้วยการสกัดด้วยสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ แล้วจึงตกตะกอนด้วยเอธานอลอีกครั้ง

สามารถคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้โดยเทียบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) ที่ A260 มีค่าเท่ากับ 1 เมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Ausubel, 1999)

3.5.2 วิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรส เจล อิเลคโตรโฟริซิส

หลอมอะกาโรส เจล (agarose gel) 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-อะซิเตท บัฟเฟอร์ เข้มข้น 1 เท่า (1xTAE buffer, ภาคผนวก ข. หมายเลข 15) แล้วเทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวี (comb) เสียบอยู่ ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวจึงดึงหวีออก นำเจลที่ได้มาวางในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) แล้วเทสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวลงไปให้ท่วมเจล ผสมสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.4 ให้เข้ากับสีติดตาม (tracking dye) ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 แล้วหยอดสารผสมดังกล่าวลงในหลุมอะกาโรส เจล และหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานคือ แลมดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Hin*dIII (λDNA/*Hin*dIII) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ (volt) เพื่อทำอิเลคโตรโฟริซิส รอจนกระทั่งสีติดตามเคลื่อนที่จนถึงเกือบสุดปลายขอบอีกด้านของเจล แล้วย้อมอะกาโรส เจลดังกล่าวด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงล้างสีส่วนเกินออกด้วยการแช่น้ำกลั่น เป็นเวลา 20 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร) แล้วจึงบันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพโดยใช้ฟิล์มโพลารอยด์ขาว-ดำ ความไวแสง 3000 โดยถ่ายผ่านแผ่นกรองแสง (filter) สีแดง

3.6 การออกแบบไพร์เมอร์ (primer) เพื่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (amplify) ยีนโพลีฟอสเฟตไคเนส (*ppk*)

3.6.1 นำข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) ที่แปลผล (translation) มาจากยีน *ppk* ของเชื้อต่างๆ ซึ่งได้จากฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information ในเครือข่าย http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ มาเทียบหาลำดับอนุรักษ์ (conserved sequence) ด้วยโปรแกรม ClustalX (Thompson และคณะ, 1994) เวอร์ชั่น (version) 1.7 ร่วมกับโปรแกรม GeneDoc เวอร์ชั่น 2.5.006 ในเครือข่าย www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml

3.6.2 เลือกส่วนที่มีบริเวณอนุรักษ์มากที่สุด 2 ช่วง เพื่อให้ได้ไพร์เมอร์ 2 ทิศทางแล้วจึงเปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโนอนุรักษ์ (conserved amino acid) ดังกล่าวให้กลับเป็นลำดับ นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) โดยใช้ตารางโคดอน (codon)

3.6.3 อาศัยวิธีการเลือกไพร์เมอร์ (primer) เพื่อใช้ทำ PCR ดังต่อไปนี้

- มีความจำเพาะกับลำดับที่ต้องการ (target sequence) และไม่สามารถจับกับบริเวณอื่นในลำดับหรือลำดับอื่น
- สามารถจับและทำให้เกิดความเสถียรกับลำดับที่ต้องการได้ในสภาวะที่เหมาะสมซึ่งขึ้นกับความเข้มข้นของไอออนและอุณหภูมิ
- ต้องไม่สามารถจับกับตนเอง (hairpin) หรือกับก๊อบปี้ (copy) อื่นของตนเอง (self dimer) และต้องไม่สามารถจับกับไพร์เมอร์อีกสายหนึ่งได้ (วัชรีและมนตรี, 2536)
- ควรมีขนาดความยาวประมาณ 18 ถึง 30 เบสแพร์
- ประกอบด้วยปริมาณของเบส G และ C ไม่เกินร้อยละ 45 ถึง 55
- ค่า melting temperature ($T_m$) ของแต่ละไพร์เมอร์ใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วง 55-75 องศาเซลเซียส
- หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มีโครงสร้างทุติยภูมิ โดยเฉพาะที่ปลาย 3' ของไพร์เมอร์
- ตรวจสอบการเรียงลำดับเบสของแต่ละไพร์เมอร์ไม่ให้มีความเป็นคู่สมกัน (complementary) เพื่อป้องกันการเกิด primer dimer (Sambrook และ Russell, 2001)

3.6.3 สังเคราะห์ไพร์เมอร์ที่ได้จากข้อ 3.6.2 ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

3.7 <u>การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *ppk* จากเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)</u> (Sambrook และ Russell, 2001)

เตรียมส่วนผสมของ PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้ คือ

- ดีเอ็นเอแม่แบบ (template) จำนวน 0.5 ไมโครกรัม
- แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)
- นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dTTP, dGTP และ dCTP (dNTP mix) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์
- ไพร์เมอร์ 2 สาย สายละ 1 ไมโครโมลาร์
- สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR ความเข้มข้น 10 เท่า
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อปราศจากนิวคลีเอส

ทำการหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสม โดยเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ในแต่ละปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 มิลลิโมลาร์

ใส่ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวทั้งหมดลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 200 ไมโครลิตรที่เตรียมพร้อมไว้แล้ว จากนั้นจึงนำหลอดไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอน ดังนี้

เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดเครื่องชั่วครู่ (pause) เพื่อทำ Hot-start PCR โดยการใส่ *Taq* DNA polymerase ลงไปในหลอดละ 1 หน่วย แล้วจึงให้เครื่องทำงานต่อไป โดยกำหนดให้แต่ละรอบของปฏิกิริยามีอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturation : 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

Annealing : ทำการหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยในแต่ละการทดลองจะคงสภาวะทุกอย่างไว้แล้วเปลี่ยนอุณหภูมิให้แตกต่างกันคือ 46, 48, 50, 52, 54 และ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

Extension : 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ หลังจากรอบสุดท้ายให้ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีแล้วจึงหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.8 การตรวจหาผลผลิตของสารพันธุกรรมที่ได้จากวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส

โดยใช้วิธีอะกาโรส เจล อิเลคโตรโฟริซิส เช่นเดียวกับข้อ 3.5.2 แต่เปลี่ยนเปอร์เซ็นต์ของอะกาโรส เจลเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-อะซิเตท เข้มข้น 1 เท่า ใส่ผลผลิตของแต่ละปฏิกิริยาเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานคือ 100 bp ดีเอ็นเอแลดเดอร์ + 1.5 kb โดยผสมกับสีติดตามในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 แล้วให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ รอจนกระทั่งสีติดตามเคลื่อนที่จนถึงเกือบสุดปลายขอบอีกด้านของเจล แล้วย้อมอะกาโรส เจลดังกล่าวด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงล้างสีส่วนเกินออกด้วยการแช่น้ำกลั่น เป็นเวลา 20 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเลตแล้วจึงบันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพโดยใช้ฟิล์มโพลารอยด์

3.9 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของสารพันธุกรรมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR

ใช้บริการของหน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โดยใช้ไพร์เมอร์ CUP10 เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ แล้วจึงนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank โดยอาศัยโปรแกรมที่เรียกว่า BlastN เวอร์ชั่น 2.2.1 แล้วจึงให้ชื่อผลิตภัณฑ์ที่ได้จากวิธี PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ CUP9 และ CUP10 นี้ว่า CAP1

3.10 การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่าง CUW-1, CUW-3, CUW-8 และ *E. coli* JM109 ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Eco*RI

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีในข้อ 3.4 มาคำนวณหาความบริสุทธิ์และความเข้มข้นดังข้อ 3.5 แล้วจึงใส่เอนไซม์เรสทริกชัน *Eco*RI, สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์เรสทริกชัน (RE buffer), อะซิไทเลท โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (acetylated BSA) และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยที่ปริมาณของสารดังกล่าวให้ใช้ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วทำอะกาโรส เจล อิเลคโตรโฟริซิส เช่นเดียวกับข้อ 3.5.2 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของอะกาโรส เจลเป็น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-อะซิเตทที่เข้มข้น 1 เท่า และใช้ 100 bp ดีเอ็นเอแลดเดอร์

+ 1.5 kb ร่วมกับ 1 kb ดีเอ็นเอแลดเดอร์ เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์

3.11 การทำ Dot blot และ Southern blot แบบ Capillary transfer ของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *EcoRI* (Sambrook และ Russell, 2001)

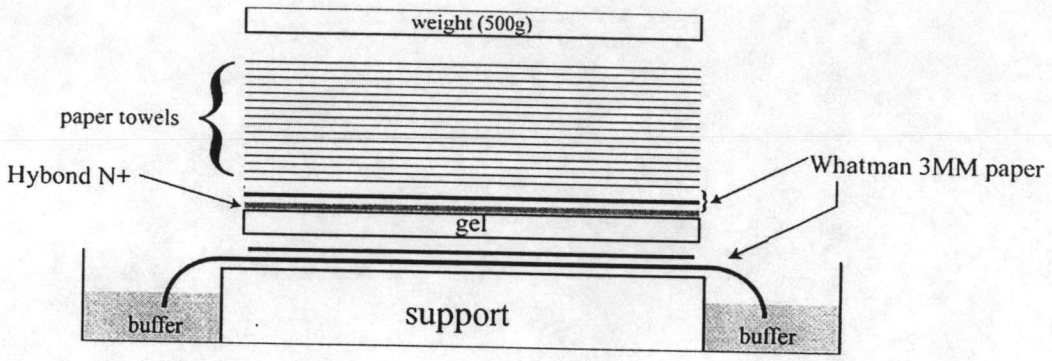
3.11.1 การทำ dot blot

ต้มจีโนมิกดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.10 ในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยการแช่น้ำแข็ง จากนั้นแช่แผ่นไนลอน เมมเบรนในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนแผ่นเมมเบรนดังกล่าวอิ่มตัว แล้วจึงผึ่งให้แห้งหมาดๆในอากาศ หยดจีโนมิกดีเอ็นเอลงบนแผ่นเมมเบรนแล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

3.11.2 การทำ Southern blot แบบ Capillary transfer เพื่อย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรส เจลไปยังแผ่นไนลอน เมมเบรน

นำแผ่นเจลที่ได้จากการทำอะกาโรส เจล อิเลคโตรโฟริซิส ในข้อ 3.10 มาใส่กล่องพลาสติกแล้วเทกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัลลงไปจนสารละลายท่วมเจล เขย่าเบาๆเป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วจึงเติมสารละลายบัฟเฟอร์ denaturation (ภาคผนวก ข. หมายเลข 16) ให้ท่วมเจล เขย่าเบาๆเป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง แล้วจึงล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เขย่าเบาๆ แล้วเทน้ำดังกล่าวทิ้ง ทำเช่นนี้อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นจึงใส่สารละลายบัฟเฟอร์ neutralization (ภาคผนวก ข. หมายเลข 17) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง เทสารละลายทิ้ง

เตรียมตัดแผ่นไนลอน เมมเบรนและกระดาษกรอง 2 แผ่นให้มีขนาดเท่ากับแผ่นเจล แล้วตัดกระดาษกรองอีกแผ่นให้ยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ความกว้างเท่าแผ่นเจล แช่ไนลอน เมมเบรนและกระดาษกรองที่เตรียมไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ทรานสเฟอร์ (transfer buffer, ภาคผนวก ข. หมายเลข 18) และตัดกระดาษเยื่อ (tissue paper) ให้มีขนาดเท่ากับแผ่นเจลโดยตัดให้มีความสูงประมาณ 5 เซนติเมตร จากนั้นจึงเติมบัฟเฟอร์ในกล่องพลาสติก แล้วนำกระดาษกรองแผ่นยาวที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ดังกล่าววางพาดบนแผ่นกระจกซึ่งเป็นสะพานให้บัฟเฟอร์เคลื่อนที่ผ่านขึ้นมาได้ ดังรูปที่ 3.1




**รูปที่** 3.1 ขั้นตอนการทำ Southern blot แบบ Capillary transfer

วางกระดาษกรองขนาดเท่ากับแผ่นเจลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ลงบนสะพานกระดาษกรอง จากนั้นจึงคว่ำแผ่นเจลแล้ววางแผ่นไนลอน เมมเบรนที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ลงบนเจลดังกล่าวโดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นในแต่ละชั้น วางกระดาษกรองขนาดเท่าแผ่นเจลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ทับด้านบนแผ่นไนลอน เมมเบรน แล้วสุดท้ายจึงวางกระดาษเยื่อทั้งหมดลงและทับด้วยน้ำหนัก 500 กรัม อาจทำการยึดชั้นต่างๆด้วยเทปกาวเพื่อให้เกิดความมั่นคงยิ่งขึ้น

ควรระวังไม่ให้กระดาษเยื่อสัมผัสกับอะกาโรส เจล และระวังให้บัฟเฟอร์ท่วมปลายสะพานทั้ง 2 ด้านเสมอ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วจึงยกชั้นที่อยู่ด้านบนแผ่นเมมเบรนออก ใช้กรรไกรที่สะอาดตัดมุมด้านซ้ายบนของแผ่นไนลอน เมมเบรนเพื่อเป็นการบ่งบอกด้านที่เป็นช่องวิ่ง (lane) สุดท้าย จากนั้นจึงแช่แผ่นเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอติดอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 2xSSC เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง นำแผ่นไนลอนเมมเบรนไปตรึงดีเอ็นเอให้ติดแน่นด้วยการอบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บรักษาแผ่นไนลอน เมมเบรนที่มีดีเอ็นเอติดอยู่ในถุงพลาสติก โดยเก็บไว้ในที่แห้ง

3.12 การไฮบริไดเซชัน (Hybridization) เพื่อติดตามยีน *ppk* ที่อยู่ในจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่างและ *E. coli* JM109

3.12.1 การเตรียม CAP1 เพื่อใช้เป็นตัวติดตาม (probe) ในการทำไฮบริไดเซชัน

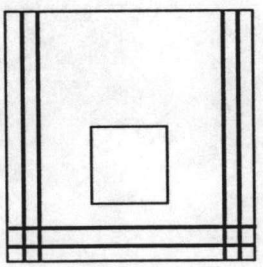
นำผลิตภัณฑ์ CAP1 ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ดังข้อ 3.7 ซึ่งละลายปนอยู่ในส่วนผสมต่างๆของปฏิกิริยา PCR มาแยกชิ้นดีเอ็นเอ CAP1 ออกมาด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล GeneClean II kit ตามวิธีที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต จนได้สารละลายดีเอ็นเอ CAP1 ที่บริสุทธิ์

3.12.2 การติดฉลากตัวติดตามยีน *ppk*

โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG high prime DNA labeling and detection starter kit I ติดฉลากสารละลายดีเอ็นเอ CAP1 ที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.12.1 ตามกรรมวิธีดังที่ผู้ผลิตได้แสดงไว้แล้ว จึงตั้งชื่อตัวติดตามที่ได้จากการติดฉลากนี้ว่าตัวติดตาม PE เพื่อใช้ในการไฮบริไดเซชันต่อไป

3.12.3 การไฮบริไดเซชันจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่างและ *E. coli* JM109 ด้วยตัวติดตาม PE

ทำพรีไฮบริไดเซชัน (prehybridization) โดยนำเอาแผ่นไนลอน เมมเบรนที่ได้จากข้อ 3.11.2 มาใส่ในถุงพลาสติกแล้วผนึกด้านข้างให้สนิทกันด้วยความร้อน ดังรูปที่ 3.2



**รูปที่** 3.2 ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกเพื่อการไฮบริไดเซชัน

เติมสารละลายบัฟเฟอร์ไฮบริไดเซชัน (hybridization buffer, ภาคผนวก ข. หมายเลข 19) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (เมื่อแผ่นไนลอน เมมเบรนมีขนาดไม่เกิน 100 ตารางเซ็นติเมตร) ซึ่งถูกทำให้มีอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสไว้แล้ว ลงไปในถุงที่มีแผ่นไนลอน เมมเบรนอยู่ ไล่ฟองอากาศที่เกิดขึ้นแล้วผนึกปลาย 2 ชั้นด้วยความร้อน บ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เขย่าเบาๆเป็นเวลา 30 นาที

เตรียมสารละลายของตัวติดตาม PE เพื่อใช้ในการไฮบริไดเซชันโดยนำตัวติดตาม PE ที่ได้จากการเตรียมไว้แล้วในข้อ 3.12.2 ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีแล้วทำให้เย็นในน้ำแข็ง จากนั้นจึงเติมลงไปลงในสารละลายบัฟเฟอร์ไฮบริไดเซชันปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ให้มีความเข้มข้น 5-25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว (falcon tube) ผสมให้เข้ากันดีด้วยการพลิกหลอดกลับไปมาโดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

เทสารละลายพรีไฮบริไดเซชันที่อยู่ในถุงพลาสติกทิ้ง ย้ายแผ่นไนลอน เมมเบรนไปยังถุงใหม่ ผนึกด้านข้างเช่นเดียวกับรูปที่ 3.2 ใส่สารละลายของตัวติดตาม PE ที่เตรียมไว้แล้วลงไป ไล่ฟองอากาศที่เกิดขึ้นแล้วจึงผนึกบ่ากถุงด้วยความร้อนจนปิดสนิท บ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (สารละลายของตัวติดตาม PE ที่ใช้แล้วสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เมื่อนำกลับมาใช้ให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีเสียก่อน)

เมื่อทำการไฮบริไดเซชันอย่างสมบูรณ์แล้วให้นำแผ่นไนลอน เมมเบรนดังกล่าวมาล้างตัวติดตาม PE ที่จับอย่างไม่จำเพาะกับจีโนมิกดีเอ็นเอหรือเมมเบรนออกไปด้วยสารละลาย 2xSSC ที่มี สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตอยู่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข. หมายเลข 20) ปริมาตรสารละลายท่วมแผ่นเมมเบรน เขย่าเบาๆเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง และนำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วยสารละลาย 0.5xSSC ที่มี สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตอยู่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข. หมายเลข 21) ซึ่งมีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตรสารละลายท่วมแผ่นเมมเบรน เขย่าเบาๆเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ทำซ้ำอีกครั้ง

3.12.4 การตรวจสอบตำแหน่งของตัวติดตาม PE บนแผ่นไนลอน เมมเบรนที่ผ่านกระบวนการไฮบริไดเซชันแล้ว (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง)

นำแผ่นไนลอน เมมเบรนที่ได้จากข้อ 3.12.3 มาล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ วัอชชิง (washing buffer, ภาคผนวก ข. หมายเลข 22) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาบ่มในสารละลายบล๊อกกิ้ง (blocking solution, ภาคผนวก ข. หมายเลข 23) เขย่าเบาๆ 30 นาที แล้วแช่ในสารละลายแอนตี้บอดี้ (antibody solution, ภาคผนวก ข. หมายเลข 25) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงล้างสารละลายแอนติบอดีที่มากเกินไปออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ วัอชชิง เขย่าเบาๆ 15 นาที ทำ 2 ครั้ง และแช่แผ่นไนลอน เมมเบรนในสารละลายบัฟเฟอร์ดีเท็กชัน (detection buffer, ภาคผนวก ข. หมายเลข 26) เป็นเวลา 5 นาทีด้วยการเขย่าเบาๆ จากนั้นจึงย้ายแผ่นไนลอนเมมเบรนดังกล่าวมาใส่ในถุงพลาสติกและผนึกด้านข้างดังรูปที่ 3.2 เทสารละลายซับสเตรตของสี (color substrate solution, ภาคผนวก ข. หมายเลข 27) แล้วจึงปิดผนึกถุงพลาสติกให้สนิท แล้วบ่มในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งจะเกิดแถบเป็นสีม่วงน้ำเงินที่แสดงตำแหน่งของยีน *ppk* สามารถหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีได้ด้วยการล้างแผ่นไนลอน เมมเบรนด้วย น้ำกลั่น 5 นาที ซับให้แห้งสนิทด้วยกระดาษกรอง เก็บรักษาไว้ในถุงพลาสติกที่แห้ง