หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเลี้ยงเชื้อ P. falciparum ในหลอดทดลอง

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ชั่ง RPMI 1640 หนัก 10.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 3 ครั้ง ประมาณ 900 ml. เติม hepes buffer 5.94 กรัม garamycin 1 ml. (40 mg.) ปรับปริมาตรทั้งหมดให้เท่ากับ 960 ml. ทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่องกรองมิลลิพอร์ใช้เมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน แบ่งใส่ขวดแก้วที่อบฆ่าเชื้อแล้วขวดละ 100 ml. เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ก่อนนำมาใช้ต้องเติม 5% สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) ที่ปลอดเชื้อ 4.2 ml. ซีรัม 10.4 ml. ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกว่า "อาหารเลี้ยงเชื้อ" ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่เฉพาะ 5% $NaHCO_3$ เรียก "อาหารเลี้ยงเชื้อไร้ซีรัม"

อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ml. ประกอบด้วย $NaHCO_3$ 2 mg. ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ml. 25 มิลลิโมล Hepes buffer และ 10 ถึง 20 เปอร์เซนต์ซีรัม

1.2 การเตรียมซีรัม เตรียมจากเลือดคนซึ่งปล่อยให้แข็งตัว ดูดเฉพาะชั้นบนนำไปปั่นแยกเม็ดเลือดแดงออกจากซีรัมด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดซีรัมใส ๆ ข้างบนใส่ในหลอดที่อบฆ่าเชื้อแล้วหลอดละประมาณ 10.4 ml. นำไปอุ่นในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 55-56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บซีรัมที่เตรียมได้ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเก็บได้นานประมาณ 3 เดือน หรือถ้าเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

1.3 การเตรียมเลือดที่ไม่มีเชื้อเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง เม็ดเลือดแดงที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงจะได้มาจากผู้บริจาค ซึ่งเก็บในถุงพลาสติกที่ปลอดเชื้อ บรรจุสารละลาย citrate phosphate dextrose (CPD) ป้องกันการแข็งตัว โดยนำเลือดหมู่ O ที่มีอายุนับจากการเจาะไม่เกิน 4 สัปดาห์ ปริมาตร 10 ml. มาปั่นโดยใช้ความเร็ว 1,500 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเอาส่วนพลาสมาและบัฟฟีโคต (buffy coat) ออกให้หมด แล้วล้างเม็ดเลือดแดงที่เหลืออยู่ด้วยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อไร้ซีรัมลงไปประมาณ 2 เท่าของปริมาตรเม็ดเลือดแดงใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันดีแล้วนำไปปั่นอีกด้วยเวลาและความเร็วเท่าเดิม ดูดส่วนใสชั้นบนออก แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ครั้งสุดท้ายเติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปปริมาตรเท่ากับเม็ดเลือดแดงที่เหลืออยู่ ผสมให้เข้ากันดีนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 สัปดาห์

1.4 การเตรียมเลือดที่มีเชื้อเมื่อเริ่มต้นทำการเพาะเลี้ยง เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อจะได้มาจากจานเพาะเลี้ยงซึ่งกำลังเลี้ยงอยู่และได้จากที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว ถ้าเป็นเชื้อที่ได้มาจากจานเพาะเลี้ยง จะเริ่มต้นด้วยการถ่ายเชื้อลงสู่หลอดสำหรับปั่นขนาด 15 ml. นำไปปั่นที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนบนให้เหลือปริมาตรเท่ากับเม็ดเลือดแดง แล้วทำสไลด์แบบฟิล์มบางเพื่อนับจำนวนของเชื้อในเม็ดเลือดแดง 10,000 เม็ด แต่ละ ml. ของเม็ดเลือดแดงต้องเติมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5.4 ml. เพื่อให้ความเข้มข้นเป็น 8% แล้วถ่ายลงบนจานเพาะขนาด 60x10 mm. โดยใช้พลาสเจอร์ปิเปต นำจานเพาะไปใส่ในเดสซิเคเตอร์ ซึ่งมีเทียนไขวางอยู่ จุดเทียนแล้วปิดฝาเดสซิเคเตอร์ ส่วน stop cock ที่อยู่ด้านบนจะปิดเมื่อเทียนใกล้ดับ จากนั้นนำเดสซิเคเตอร์ไปวางในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเดสซิเคเตอร์จะมีบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ 3% ออกซิเจน 17% เนื่องจากการจุดเทียน

สำหรับเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพัลซิปารัมที่ได้จากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวจะอธิบายในข้อ 1.7.2

1.5 การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใช้พลาสเจอร์-ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ชั้นบนออกให้มากที่สุด โดยระวังไม่ดูดเม็ดเลือดออกมาด้วย เติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ลงไปอีก 1.5 ml. สำหรับจานเพาะเลี้ยงขนาด 35x10 mm. และ 5 ml. สำหรับจานเพาะเลี้ยงขนาด 60x10 mm. เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันดี

สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อพัลซิปารัมติดต่อกันเป็นเวลานาน มีข้อปฏิบัติดังนี้

(1) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง และในกรณีที่มีจำนวนเชื้อสูงกว่า 3% จะต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงทุก 12 ชั่วโมง

(2) เติมเลือดใหม่เมื่อครบกำหนด 4 วัน หลังจากการเติมเลือดครั้งสุดท้าย หรือเมื่อต้องการลดจำนวนเชื้อลง

(3) ทุก 24 ชั่วโมงดูดเลือดจากจานเพาะเลี้ยงแต่ละจานมาทำฟิล์มเลือดชนิดบางบนกระจกสไลด์ย้อมด้วยสียิมซา ตรวจดูลักษณะรูปร่างของเชื้อ นับจำนวน แล้วบันทึกผลไว้

ถึงแม้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อจะผสมยาปฏิชีวนะ garamycin เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และเชื้อรา แต่การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกครั้งต้องทำอย่างระมัดระวัง ถ้ามีการปนเปื้อนเกิดขึ้นต้องรีบทำลายทิ้งทันที

1.6 การเตรียมเชื้อให้เป็นระยะเดียวกันในการเพาะเลี้ยง (synchronous culture) เชื้อพัลซิปารัมที่เลี้ยงในจานเพาะมักจะไม่เป็นระยะเดียวกัน แต่ในการทดลองเราต้องการเชื้อในระยะไซซอนท์ ซึ่งเป็นระยะที่มีการสังเคราะห์ดีเอนเอสูงสุด ดังนั้นจึงจำเป็นต้อง

ทำเชื้อให้อยู่ในระยะเดียวกันตามวิธีการดังต่อไปนี้

(1) ถ่ายเชื้อจากจานเพาะลงสู่หลอดสำหรับปั่น นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดชั้นใส ๆ ส่วนบนทิ้งไป

(2) เติมสารละลาย 5% sorbitol ลงไป 5 เท่า ผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

(3) นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นเม็ดเลือดแดงทดลองย้ายหลอดไปทำการเพาะเลี้ยงตามวิธีข้อ 1.4 ต่อไป

เมื่อเลี้ยงไปได้ 48 ชั่วโมง จึงทำข้อ (1) ถึง (3) ซ้ำอีกครั้ง เชื้อในจานเพาะจะปรากฏเป็นระยะเดียวกันเมื่อเลี้ยงไปได้ 48 ชั่วโมงหลังจากใส่ sorbitol ครั้งที่สอง

1.7 การเก็บรักษาเชื้อมาลาเรีย ในไนโตรเจนเหลว

1.7.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการเก็บรักษา (cryoprotectant solution) สารละลายประกอบด้วย

glycerol	28 %
sorbitol	3 %
NaCl	0.65 %

เตรียมโดยผสม glycerol 99% ปริมาตร 70 ml. ลงในสารละลาย NaCl 0.9% และ sorbitol 4.2% ปริมาตร 180 ml. ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วย millipore 0.45 μ

วิธีการเก็บรักษาเชื้อมาลาเรีย

ถ่ายเชื้อจากจานเพาะลงสู่หลอดสำหรับปั่น นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที ดูดชั้นใส ๆ ส่วนบนทิ้ง ใส่สาร cryoprotectant ลงไป 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่ ampule ละ 0.5 ml. รีบนำไปเก็บในถังที่มีไนโตรเจนเหลวทันที

1.7.2 การนำเชื้อที่เก็บรักษามาเลี้ยงในจานเพาะ (recultivation of malaria parasite) นำ ampule ขึ้นจากถังไนโตรเจนเหลวนำไปแกว่งในบีกเกอร์ที่มีน้ำอุณหภูมิ 40 ถึง 45 องศาเซลเซียส เมื่อเลือดหลอมตัวรีบถ่ายลงในหลอดสำหรับปั่น นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง จะได้เม็ดเลือดแดงส่วนล่างประมาณ 0.2 ml. เติมสารละลาย 3.5% NaCl ลงไป 1 เท่าครึ่ง ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นอีกครั้ง ดูดส่วนบนทิ้ง เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไร้ซีรัมลงไป 2 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็วเท่าเดิม ดูดส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ และ

เม็ดเลือดแดงที่ล้างใหม่ ๆ แล้วถ่ายลงจานเพาะเลี้ยงตามวิธีในข้อ 1.4

1.8 การเตรียมเชื้อ P. falciparum เพื่อใช้ในการทดลอง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในจานเพาะจนได้จำนวนเชื้อมากกว่า 10% และเป็นระยะไชซอนท์ แล้วถ่ายลงสู่หลอดสำหรับปั่น นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนทิ้ง เติมสารละลาย PBS (phosphate buffer saline) ลงไป 2 เท่า ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ความเร็วเดิม ดูดส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วเก็บเม็ดเลือดลงใส่หลอดสเตอไรด์ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เก็บรวมกันให้ได้ตัวอย่างละ 5 ml. เพื่อใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

1.9 การนับจำนวนเชื้อ

วิธีการทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบาง

หยดเลือดลงบนแผ่นสไลด์ที่แห้ง และสะอาดที่ปลายด้านหนึ่งใช้ขอบสไลด์อีกแผ่นหนึ่งแตะหยดเลือดทำมุมประมาณ 45 องศา เลื่อนขอบสไลด์ที่ทำมุมอยู่ออกไปทางปลายโดยเร็ว และสม่ำเสมอ อย่าให้หยุดชะงัก เลือดจะแผ่เป็นแผ่นฟิล์มบางบนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท นำไปจุ่มใน absolute methanol ครึ่งนาที ทิ้งให้แห้งสนิทแล้วจึงย้อมด้วยสียิมซา

การเตรียมสียิมซา

ส่วนประกอบ	geimsa powder	0.6	g.
	glycerol	50	ml.
	absolute methanol	50	ml.

วิธีการเตรียม

1. บดสียิมซากับ glycerol ทีละน้อยให้ละเอียดในโกร่ง จนเข้ากันและเป็นเนื้อเดียวกัน ทำเช่นนี้จนผงสีหมด
2. ล้างสีที่ติดโกร่งด้วย glycerol แล้วเทรวมใส่ขวดแก้ว
3. นำสีไปอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 55 ถึง 60 องศาเซลเซียส นาน 6 ถึง 8 ชั่วโมง คอยเขย่าขวดให้สีอุ่นทั่วกัน ทุกครึ่งชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
4. เติม absolute methanol แล้วเขย่าให้เข้ากัน
5. ปิดปากขวดแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์
6. กรองสารละลายของสีในขวดสีน้ำตาล แล้วเก็บไว้ใช้ต่อไป

วิธีการย้อม

ผสมสียิมซาโดยใช้ phosphate buffer ที่มีความเป็นกรดเป็นด่าง 7.0 ซึ่งเตรียมจาก 0.67 M. ของสารละลาย $NaHPO_4$ 3 ส่วน ผสมกับ 0.67 M. ของสารละลาย KH_2PO_4 2 ส่วน จำนวน 10 ml. ต่อสียิมซา 1 ml. ผสมทันทีก่อนใช้ แล้วหยดสีลงบนสไลด์ให้ท่วมบริ

เวณที่จะย้อม ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จึงล้างออกด้วยน้ำ ผึ่งให้แห้ง แล้วเก็บไว้นับจำนวนเชื้อต่อไป

การนับจำนวนเชื้อ

ใช้กล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 10x40 เลื่อนหาบริเวณที่ปริมาณเม็ดเลือดแดงบนแผ่นฟิล์มเลือดกระจายสม่ำเสมอ และเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ซึ่งมักจะพบบริเวณปลายฟิล์มเลือด เปลี่ยนกำลังขยายเป็น 10x100 นับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่พบในวงกล้อง 3 วงกล้อง คำนวณหาจำนวนวงกล้องที่จะพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ แล้วนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อฟัลซิปารัมต่อเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ โดยนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อที่พบในวงกล้องเท่ากับจำนวนวงกล้องที่คำนวณได้ แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ ตัวอย่างเช่น นับจำนวนเม็ดเลือดแดงในวงกล้อง 3 วงกล้องได้เท่ากับ 855 เซลล์จำนวนวงกล้องที่จะพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ เท่ากับ 10,000x3/855 เท่ากับ 35 วงกล้อง ดังนั้นจะต้องนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อที่พบใน 35 วงกล้อง สมมุติว่า นับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อเท่ากับ 260 เซลล์ ต่อเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ ดังนั้นคิดเป็น 2.6 เปอร์เซนต์

2. การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum

ดูดเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ P. falciparum ที่มีปริมาณการติดเชื้อมากกว่า 10 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.5 ml. ใส่หลอดสำหรับปั่นขนาด 15 ml. เติม 1% acetic acid ที่แช่จนเย็นจัด ปริมาตร 4 ml. ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,340 xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วดูดชั้นบนทิ้ง ละลายส่วนที่ตกอยู่ก้นหลอดด้วย 1% triton x-100 ปริมาตร 4 ml. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นอีกครั้ง ล้างส่วนที่ตกอยู่ก้นหลอดด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 5 ml. นำไปปั่นอีกครั้ง ล้างส่วนที่ตกอยู่ก้นหลอดด้วย 10 mM. tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl ปริมาตร 5 ml. รวบรวมเชื้อที่ได้จำนวนประมาณ $1-5x10^7$ เซลล์ เปลี่ยนมาใส่ในหลอดขนาด 50 ml. ย่อยโปรตีนด้วยการเติม proteinase K เข้มข้น 20 mg/ml ลงไป 200 µl. เติมสารละลาย 10 mM tris-HCl ความเป็นกรดเป็นด่าง 8.0, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl ปริมาตร 4 ml. และ 10% SDS อีก 1.6 ml. นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง แยกสารละลายที่ถูกย่อยออกด้วยการเติม phenol ลงไป 2 เท่าของปริมาตร และเติม chloroform อีก 2 เท่า ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลงเบา ๆ นำไปปั่นแยกชั้นที่ 650 xg นาน 5 นาที แล้วดูดสารละลายชั้นล่างทิ้งไป ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง เติม diethyl ether ลงไป 2 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว และเวลาเท่าเดิม ดูดสารละลายชั้นบนทิ้งไป แล้วทำซ้ำอีก 4 ครั้ง ระเหยกลิ่น ether ออกให้หมดโดยการนำหลอดไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส เปิดฝาหลอด

และเขย่าเบา ๆ จนหมดกลิ่น ether ย่อยอาร์เอ็นเอ ด้วยการเติม polyribonuclease A เข้มข้น 10 mg/ml ลงไปให้ได้ความเข้มข้น 100 µg ต่อสารละลาย 1 ml. นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง สกัดด้วย phenol และ chloroform อีก 3 ครั้ง และสกัดด้วย diethyl ether อีก 5 ครั้ง ตกตะกอนดีเอนเอออกจากสารละลายโดยการเติม absolute ethanol ลงไป 2 เท่าของปริมาตร และเติม 1 M NaCl ลงไป 1/10 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส 1-12 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 4,340 xg นาน 20 นาที ล้างตะกอนดีเอนเอด้วย 70% ethanol นำไปปั่นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม ค่ำหลอดทิ้งไว้จนแห้ง ละลายดีเอนเอด้วย TE buffer ในปริมาตรที่เหมาะสมกับจำนวนดีเอนเอที่สกัดได้ นำไปวัดหาค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (OD_{260}) เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอนเอ โดยเทียบจาก 20 OD_{260} จะมีดีเอนเอเข้มข้น 1 mg. ต่อสารละลาย 1 ml.

3. การสกัดพลาสมิดจาก E. coli

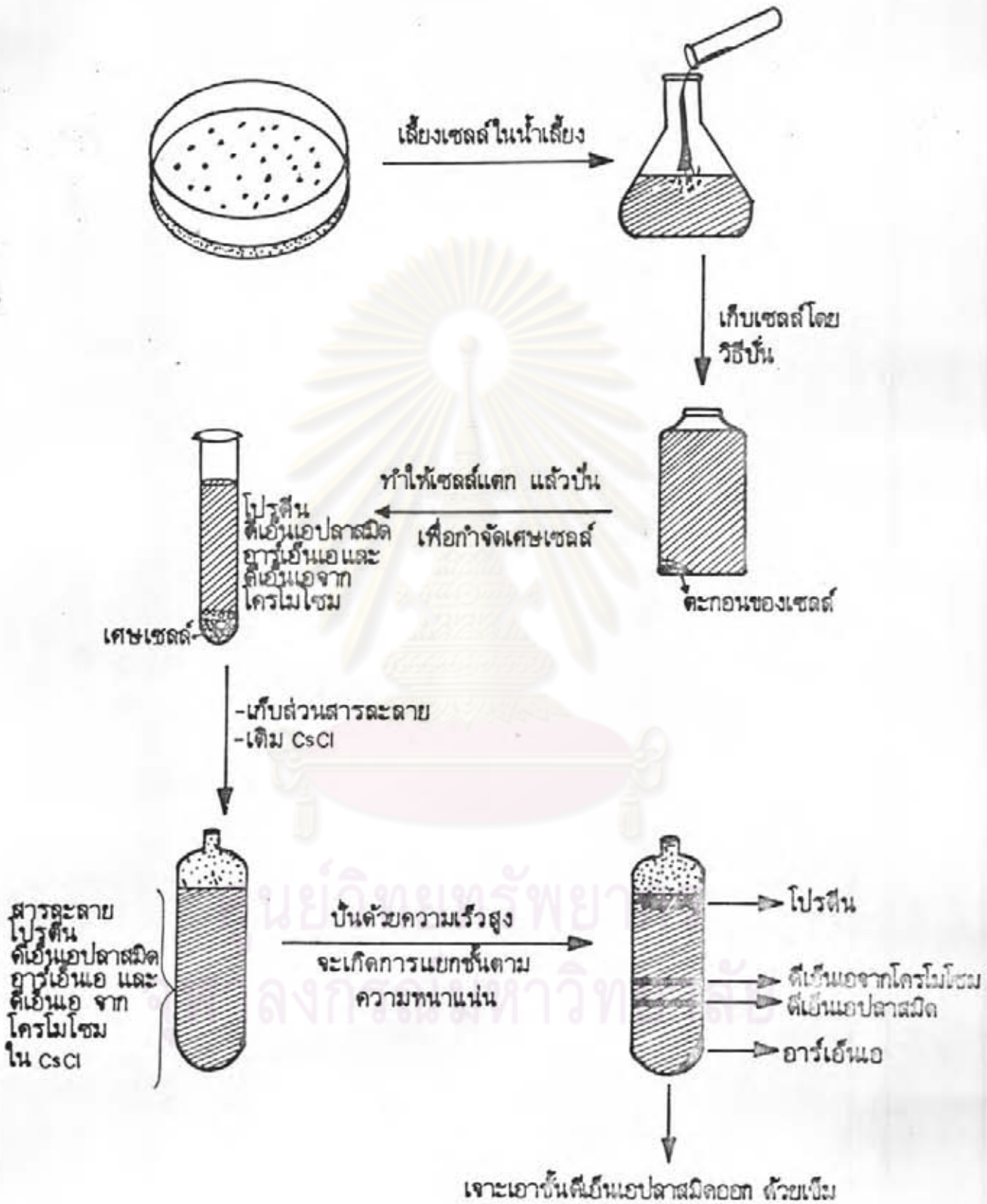
เลี้ยงเซลล์ E. coli สายพันธุ์ C 600 ซึ่งมี recombinant plasmid (pBR_{322}) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) ซึ่งใน 1 ลิตร จะประกอบด้วย Bacto tryptone 10 g. Yeast extract 5 g. และ NaCl อีก 5 g. ที่ใส่ tetracycline 20 µg/ml ปริมาตร 5 ml. นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ตลอดคืน ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มา 0.5 ml. ใส่ลงใน flask ขนาด 25 ml. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ 50 ml. ใส่ tetracycline 20 µg/ml นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า flask ตลอดเวลา E. coli จะเจริญเข้าสู่ระยะ log phase วัดค่า OD ที่ 260 นาโนเมตร ทุก ๆ 3-4 ชั่วโมง เมื่อค่า OD_{260} เท่ากับ 0.6 เติม chloramphenicol ลงไป 170 µg/ml เพื่อขยายพลาสมิดแล้ว incubate ต่อไปอีก 5-17 ชั่วโมง เก็บ E. coli โดยการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อลงสู่หลอดปั่นขนาด 50 ml. นำไปปั่นที่ 4,340 xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนบนทิ้งไป เติมสารละลาย lysozyme ลงไป 2 ml. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที เพื่อทำลายผนังเซลล์ เติมสารละลาย 1% SDS, 0.2 N NaOH ที่เตรียมใหม่ ๆ ลงไป 4 ml. เพื่อช่วยในการแตกเซลล์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ทำสารละลายให้เป็นกลางโดยการเติม 3 M. NaOAc ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.8 ลงไป 3 ml. ทิ้งไว้บนน้ำแข็งอีก 1 ชั่วโมง สารละลายนี้จะทำให้ chromosomal DNA ของ E. coli ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ตกตะกอนออกมาเนื่องจากถูกทำให้ denature ด้วยด่าง แล้วถูก renature ด้วย 3 M NaOAc จึงเรียงตัวเป็นตาข่าย ซึ่งไม่สามารถละลายได้ในสารละลายนี้ สารละลาย 3 M NaOAc ยังสามารถตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

และยังตกตะกอนโปรตีนออกมาในรูป protein-SDS complex นำสารละลายไปปั่นที่ 12,100 xg เก็บส่วนสารละลายด้านบน ซึ่งมี plasmid DNA และ อาร์เอ็นเอ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำละลายอยู่ ตกตะกอน plasmid DNA โดยการเติม absolute ethanol ลงไป 2 เท่าของปริมาตร นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 12,100 xg นาน 30 นาที ดูดส่วนบนทิ้งไป ละลาย plasmid DNA ด้วย 50 mM. tris-HCl pH 8.0, 0.1 M. NaOAc ปริมาตร 2 ml. ตกตะกอนใหม่อีกครั้ง แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ละลาย plasmid DNA ที่ได้ด้วย TE buffer ด้วยปริมาตรที่เหมาะสม แล้วนำไปวัดหาความเข้มข้นที่ OD_{260} เช่นเดียวกับการสกัดดีเอนเอของ P. falciparum

4. การสกัด plasmid DNA โดยวิธี cesium chloride gradient

ละลาย plasmid DNA จำนวน 1 mg. ใน TE buffer ปริมาตร 6.5 ml. ในหลอดปั่นขนาด 12 ml. ชั่ง CsCl จำนวน 6.5 g. ใส่ลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลงจนกระทั่ง CsCl ละลายหมด ใส่สารละลายอีธีเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 10 mg./ml. ลงไป 0.8 ml. ต่อสารละลาย 10 ml. นำไปปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็ว 45,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำหลอดไปส่องด้วยแสง UV จะปรากฏแถบสว่างบาง ๆ 2 แถบ ตรงกลางหลอด เจาะเอาแถบล่างซึ่งเป็น circular plasmid DNA ออกมาใส่หลอดที่สเตอไรด์ (ดูรูปที่ 6 ประกอบ) เติม isoamyl alcohol ลงไป 2 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกชั้นที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายชั้นล่างทิ้งไป ทำซ้ำจนกระทั่งสารละลายใส เติม chloroform ลงไป 2 เท่าของปริมาตร ปั่นที่ความเร็วและเวลาเดิม ดูดสารละลายชั้นล่างทิ้ง ทำซ้ำอีก 3 ครั้ง เติม diethyl ether ลงไป 2 เท่าของปริมาตร นำไปปั่นแยกชั้นแล้วดูดส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วระเหยกลิ่น ether ออกให้หมด ตกตะกอน plasmid DNA โดยการเติม absolute ethanol ลงไป 2 เท่าของปริมาตร นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ค้างคืน ถ่ายสารละลายลงหลอด microtube ขนาด 1.5 [illegible] ดูดส่วนบนทิ้งไป ทิ้งให้แห้ง ละลาย plasmid DNA ด้วย TE buffer แล้วนำไปวัดหาความเข้มข้นที่ OD_{260}

5. การตัดดีเอนเอด้วยเอ็นไซม์ตัดเฉพาะ (restriction endonuclease digestion) วิธีการนี้ใช้สำหรับดีเอนเอจำนวน 3 µg. ในสารละลายปฏิกิริยาปริมาตร 30 µl. ซึ่งมีวิธีการทำดังนี้



รูปที่ 6 แสดงการปั่นแยกชั้นของ plasmid DNA โดยวิธี CsCl gradient

ใส่น้ำกลั่นสเตอไรด์ลงใน microtube ขนาด 0.5 ml. เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 30 µl. เติม 3 µl. ของ 10x buffer (ได้มาพร้อมกับเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ) ที่เหมาะสมตามชนิดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ เติมดีเอนเอที่ต้องการตัดด้วยเอ็นไซม์ดังกล่าวลงไป 3 µg. เติม เอ็นไซม์ตัดจำเพาะลงไป 10 หน่วย (unit) ผสมให้เข้ากันโดยปั่นด้วย microcentrifuge นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ shaker bath เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย loading dye ปริมาตร 10 µl. แล้วผสมให้เข้ากันเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

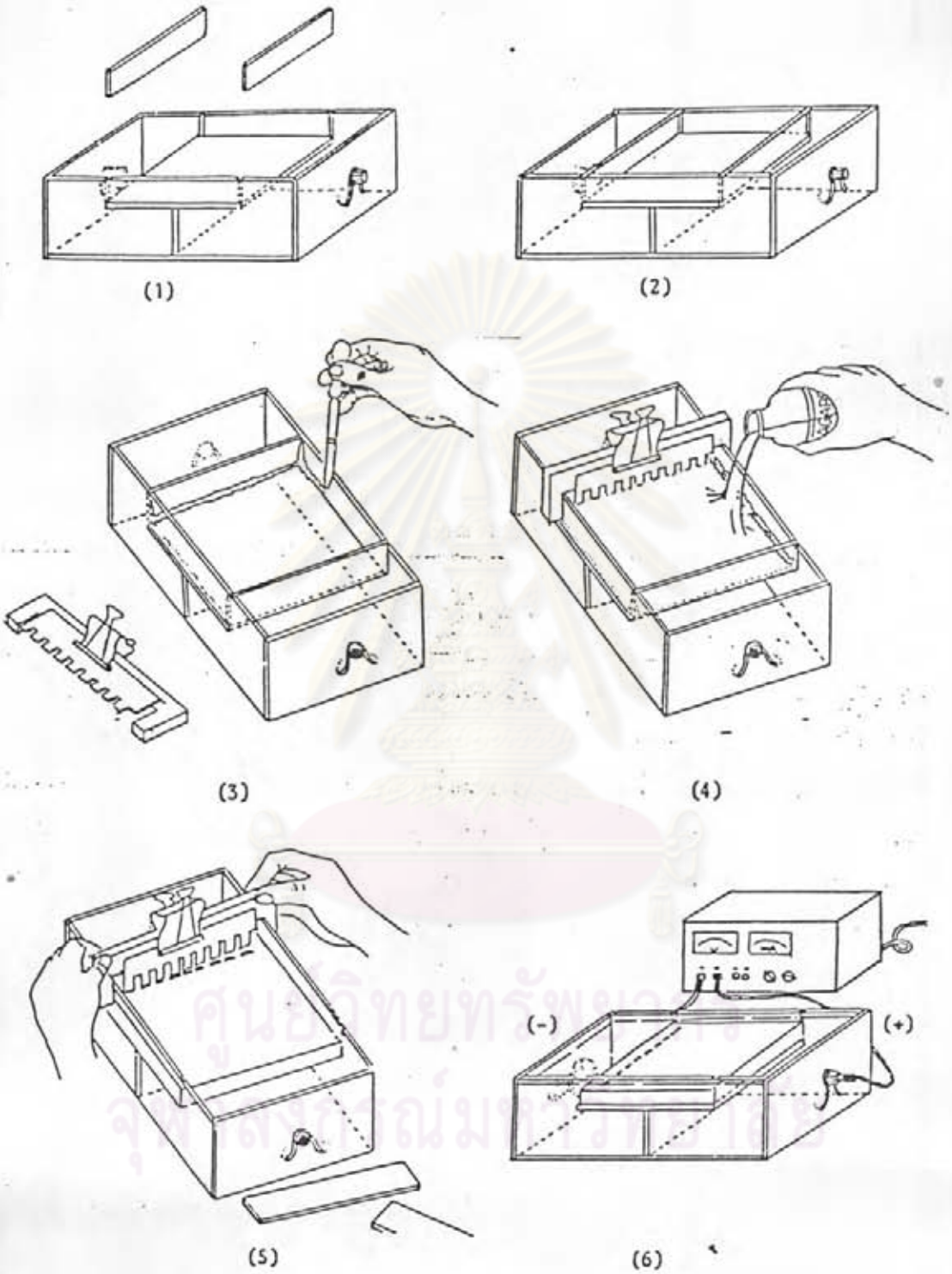
6. การวิเคราะห์ดีเอนเอโดยวิธีอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

จัด gel chamber ดังขั้นตอนตามรูปที่ 7 ชั่งอากาโรส 3.5 g. ละลายใน TBE buffer 500 ml. นำไปต้มจนเดือด นำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยการ autoclave แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส นำไปเทลงบน gel chamber ที่จัดไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ให้เจลแข็งตัว แล้วจิงดึงเอาส่วนที่จัดไว้ออก จากนั้นเท TBE buffer ลงไป 2 ข้างของขั้วจนกระทั่งท่วมเจล นำดีเอนเอที่จะวิเคราะห์มาผสมกับ loading dye ด้วยอัตราส่วน 3:1 (DNA:dye) แล้วหยอดลงในช่องที่เตรียมไว้บนอากาโรส ต่อขั้ว electrode เข้ากับ power supply โดยให้กระแสวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก และแรงเคลื่อนประมาณ 10 V./cm. ของความยาว เจล จะใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่ง loading dye เคลื่อนไปเกือบถึงปลายสุดอีกข้างของเจล หรือถ้าต้องการใช้แรงเคลื่อนต่ำ ๆ จะใช้เวลานาน เช่น 20 V. จะใช้เวลาถึง 16 ชั่วโมง ปิด power supply ช้อนเจลออกจาก chamber แช่เจลลงใน staining solution ประมาณ 30-60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ใส่ถุงมือป้องกันการสัมผัสกับ ethidium bromide) destain ในน้ำกลั่นที่สเตอไรด์แล้วประมาณ 30-60 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์การเรืองแสงที่ห้องมืด โดยใช้ UV box ควรใส่หน้ากากกันแสง UV

7. การถ่ายดีเอนเอโดยวิธี southern bloting

การ denature ดีเอนเอ

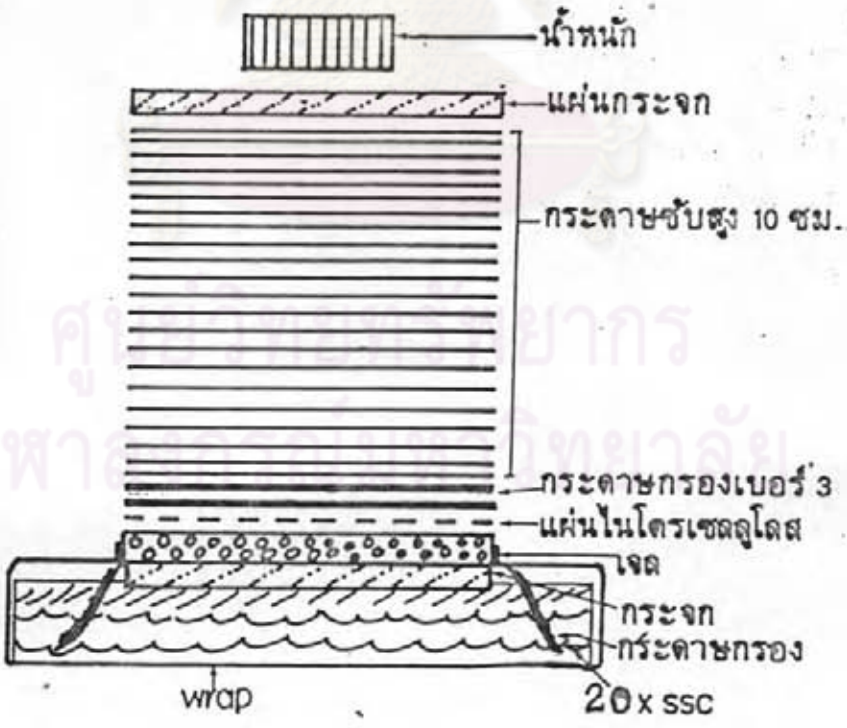
วางแผ่นเจลลงในกล่องพลาสติกที่ปู glad wrap เรียบร้อยแล้ว เทสารละลาย 0.25 M. HCl ลงไปให้ท่วมแผ่นเจล นำไปตั้งบนเครื่องเขย่า ทิ้งไว้ 20 นาที แล้วดูดสารละลายเก่าทิ้งไป ทำซ้ำอีกครั้ง ล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที เทสารละลาย 0.5 M. NaOH, 1.5 M. NaCl ลงไปให้ท่วมแผ่นเจล ทิ้งไว้ 25 นาที ดูดสารละลายทิ้ง แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง เทสารละลาย 1 M. tris-HCl pH 8.0, 1.5 M. NaCl ลงไปให้ท่วม เจล ทิ้งไว้ 25 นาที จึงดูดสารละลายทิ้งไป ทำซ้ำอีกครั้ง



รูปที่ 7 แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับทำ agarose gel electrophoresis

การ bloting ทำดังต่อไปนี้ (รูปที่ 8)

เติมสารละลาย 20 x SSC ลงใน bloting chamber ทั้ง 2 ข้าง วาง กระดาษกรองเบอร์ 3 ขนาด 14x23 cm. วางพาดบน bloting chamber เพื่อให้เป็นสะพานซับสารละลาย พยายามไล่ฟองอากาศออกให้หมด วางแผ่นเจลลงบนกระดาษ ไล่ฟองอากาศออกให้หมด นำแผ่น nitrocellulose ตัดขนาดเท่ากับเจล แช่ในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อให้เปียกชุ่มทั่วทั้งแผ่นก่อนนำไปแช่ในสารละลาย 20 x SSC นานประมาณ 3 นาที จากนั้นนำมาวางบนแผ่นเจล ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิดส่วนของกระดาษในส่วนที่ไม่มีเจลด้วย glad wrap เพื่อป้องกันการดูดซับสารละลายของกระดาษโดยไม่ผ่านเจล วางกระดาษกรองเบอร์ 3 ขนาดเท่าเจล 3 แผ่น บนแผ่น nitrocellulose วางกระดาษซับทับลงไปให้สูงขึ้นมาประมาณ 4-5 cm. แล้วทับด้วยกระจก จากนั้นวางน้ำหนักประมาณ 500 g. แล้วคลุมด้วย glad wrap ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 36 ชั่วโมง นำแผ่น nitrocellulose ออกมาล้างด้วยสารละลาย 2 x SSC นาน 5 นาที 2 ครั้ง ซับให้แห้งแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำแผ่น nitrocellulose ไปเก็บในถุงพลาสติกที่ปิดสนิท แล้วนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำออกไปใช้ นำ เจล ที่ผ่านการ blot แล้วไปย้อมด้วย ethidium bromide อีกครั้ง นำไปส่องบน UV box เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการ blot อีกครั้งหนึ่ง



รูปที่ 8 แสดงการทำ sounthern bloting

8. การทำ Nick translation

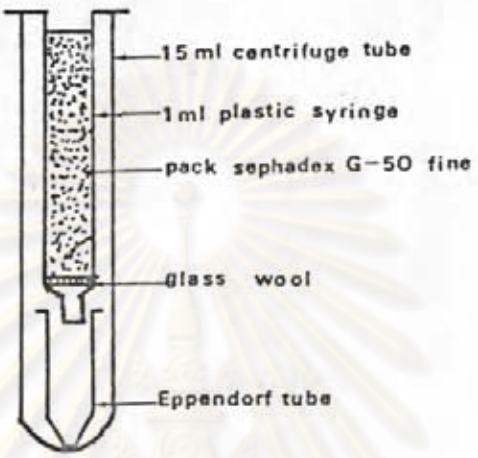
เตรียม microtube ขนาด 1.5 ml. ที่ปลอดเชื้อ แช่ในน้ำแข็ง เติมสารละลายต่อไปนี้ลงใน microtube ที่เตรียมไว้

solution A	5 µl
DNA probe	x µl (1 µg)
α ^{32}P dATP	5 µl
distilled H_2O	y µl (solution E)
ปรับปริมาตรให้ได้	45 µl

ผสมให้เข้ากันด้วยการปั่นด้วย microcentrifuge ที่ 15,000 xg นาน 5 นาที ใส่ solution C ลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่ 15 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม solution D 5 µl ตรวจสอบปฏิกิริยา incorporation โดยหยด 1 µl ของปฏิกิริยาในข้อ 6 บนกระดาษ GF/A ที่ชุ่มด้วย 10% TCA แล้วล้างกระดาษด้วย 5% TCA 3 ครั้ง ครั้งละ 5 ml. ตามด้วย 95% ethanol อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 5 ml. นำกระดาษ GF/A ที่แห้งแล้วไปแช่ในน้ำกลั่น 10 ml. แล้วนำไปนับค่า CPM ด้วยเครื่อง scintillation counter นำสารละลายที่เหลือมาผ่าน sephadex G-50 fine column เก็บสารละลายดีเอนเอที่ได้ใน mocrotube ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งควรจะได้ค่า specific activity ประมาณ 10^7-10^8 CPM/µg ดีเอนเอ

การเตรียม sephadex G-50 column

แช่ sephadex G-50 ในสารละลาย TE อย่างน้อย 1 คืน ใส่ glass wool ลงในกระบอกเข็มฉีดยา แล้วดูดสารละลาย sephadex ใส่ให้เต็ม นำกระบอกเข็มฉีดยาสอดเข้าไปในหลอดปั่น ขนาด 15 ml. พร้อมกับมีหลอด microtube ครอบ (ดังรูปที่ 9) นำไปปั่นที่ 2000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้ระดับของ sephadex ลดลงจนถึง 0.8-0.9 ml. เปลี่ยน microtube ใหม่ แล้วเติมดีเอนเอตรวจสอบที่ผ่านการ nick translation แล้วลงบนผิว sephadex นำไปปั่นอีกครั้งหนึ่ง ด้วยความเร็วเท่าเดิม เก็บดีเอ็นเอตรวจสอบที่ได้ แล้วล้าง column อีกครั้งด้วย TE buffer ปริมาตรเท่ากับสารละลายดีเอ็นเอครั้งแรกที่ load เก็บดีเอนเอตรวจสอบมารวมกับส่วน ^{32}P dATP ที่เหลืออยู่จะติดค้างอยู่ใน sephadex นำดีเอนเอตรวจสอบที่ได้ไปตรวจสอบ specific activity อีกครั้งก่อนนำไปใช้งาน



รูปที่ 9 แสดงการทำ sephadex G-50 fine column

9. การทำไฮบริไดเซชัน

นำแผ่น nitrocellulose ใส่ถุงพลาสติกชนิดหนา เติม PHB โดยใช้ปริมาตร 200 µl./cm.^{2} เติม salmon sperm DNA ลงไป 100 µl./ml. ไล่ฟองอากาศออกให้หมด แล้วปิดปากถุงให้สนิท นำไปวางระหว่างแผ่นกระจกแล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ตัดมุมด้านหนึ่งของถุงพลาสติกออกแล้วไล่ PHB ออกจากถุงให้มากที่สุด เติม HB ลงไปโดยพยายามใช้ปริมาตรให้น้อยที่สุด คือประมาณ 3-4 ml. ซึ่งประกอบด้วยดีเอนเอตรวจสอบ ซึ่งถูกติดฉลากด้วย α ^{32}P dATP ซึ่งมีค่า specific activity ประมาณ $2\text{-}5\times10^7$ CPM/µg. ใส่ดีเอนเอตรวจสอบลงไป 1×10^6 CPM/ml. ใส่ salmon sperm DNA ในปริมาณ 100 µg./ml. ไล่ฟองอากาศออกให้หมด แล้วปิดปากถุงให้สนิทอีกครั้ง นำไป incubate ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตัดมุมถุงพลาสติกอีกด้านหนึ่ง แล้วไล่ HB และดีเอนเอตรวจสอบที่เหลือจากการไฮบริไดเซชันออกให้มากที่สุด ตัดขอบถุงออก 3 ด้าน นำ nitrocellulose ออกใส่กล่องพลาสติกที่ปูด้วย glad wrap เทสารละลาย 3 x SSC,

0.1% SDS ลงไป เขย่าเบา ๆ แล้วเททิ้ง ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง แล้วเทสารละลายเดิมลงไปใหม่ ปริมาตร 200 ml. นำไปตั้งบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง แล้วเปลี่ยนเป็นสารละลาย 0.1xSSC, 0.1% SDS ปริมาตร 200 ml. ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ซับแผ่น notrocellulose ให้แห้งด้วยกระดาษเบอร์ 3 แล้วใส่ในถุงพลาสติกชนิดบาง ปิดปากถุงให้สนิท นำไปทำ autoradiograph

การทำ autoradiograph

นำแผ่น nitrocellulose ไปประกบด้วยฟิล์ม x-ray ใส่ลงใน x-ray cassette นำไปเก็บที่ตู้แช่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-7 วัน นำ x-ray cassette ออกมาจากตู้แช่ ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นขึ้นประมาณ 30 นาที นำ x-ray cassette เข้าไปล้างฟิล์มในห้องมืด แช่แผ่นฟิล์มลงในน้ำยา developer ประมาณ 3-5 นาที จะปรากฏแถบของดีเอนเอ แล้วนำฟิล์มขึ้น ล้างด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย แช่ฟิล์มลงในน้ำยา fixer จนกระทั่งเห็นแถบดีเอนเออย่างชัดเจน จึงนำขึ้นมาล้างด้วยน้ำกลั่น 30 นาที ผึ่งให้แห้งสนิท

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย