บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

<u>อุปกรณ์ และเครื่องมือหลักที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) เขย่าแบบ reciprocal ของ New Brunswick Scientific Co., U.S.A.

2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

2.1. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของ Beckman, U.S.A.

2.2. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของ Kubota , Japan

3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) รุ่น UV 160 A ของ Shimudzu , Japan

4. เครื่องให้กำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-transilluminator) รุ่น FOTO/ PREP I ของ Fotodyne , U.S.A.

5. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (agarose gel elelectro-phoresis)

5.1. เครื่องกำเนิดไฟฟ้า รุ่น 2301 microdrive 1 ของ LKB , Sweden

5.2. เจลแชมเบอร์ (gel chamber) พร้อมอุปกรณ์เตรียมอะกาโรสเจล

6. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) รุ่น 240 ของ Corning , U.S.A.

7. เครื่องกำเนิดความถี่สูง (sonicator) รุ่น W-385 ของ Heat system ultra-sonic Inc. , U.S.A.

8. Microtips ของ Treff Lab , Switzerland

9. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

9.1. กล้องถ่ายภาพ Nikon รุ่น FM-2N

9.2. แผ่นกรองแสง (Filter) สีแดง

9.3. ฟิล์มขาวดำความไวแสง 400 (ASA 400)

10. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น BH-2 ของ Olympus , Japan

11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) รุ่น W- 760 ของบริษัท Kottermann , Germany

12. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124 ของบริษัท International Scientific Supply Co., Thailand

13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freeze) อุณหภูมิ -20°ซ รุ่นFO 535 ของ Sanyo Electric Co., Ltd. Japan

14. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -70°ซ ของ Forma Scientific , U.S.A.

15. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของ Kokusan Japan

16. ตู้อบสูญญากาศ (vacuum oven) Hotpack corp., U.S.A.

17. กล่องบรรจุฟิล์มเอกซเรย์ (X-ray film cassette) ของ Okamoto Manufacturing Co., Ltd., Japan

18. ฟิล์มเอกซเรย์ (Hyperfilm-ECL) ของ Amersham International plc., UK

19. ไนลอนเมมเบรน Hybond-N^+ ของ Amersham International plc., UK

20. โกร่งบดครบชุด

21. ถังเก็บไนโตรเจนหลว ขนาด 34 ลิตร

<u>สารเคมี</u>

1. ไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen) จากบริษัทไทยอินดัสเตรียลแก๊ส จำกัด

2. น้ำแข็งแห้ง (Dry ice) จากบริษัทลิควิด คาร์บอนิค ประเทศไทย จำกัด

3. ทริสมาเบส (Trizma base) , EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) , Mercaptoethanol , SDS (sodium dodecyl sulphate) , Phenol (AR grade) และสารเคมีอื่นๆ ของบริษัท Sigma , U.S.A.

4. อะกาโรสเจล (ID NA Agarose) ของ FMC Bio Products , U.S.A.

5. ชุดติดฉลากและตรวจหาดีเอ็นเอด้วยสารปลอดรังสี ECL direct nucleic acid labeling and detection system จาก Amersham International plc , UK

6. ชุดน้ำยาล้างฟิล์มเอกซเรย์ของ Kodak , U.S.A.

7. เอนไซม์โปรทีเนส เค (proteinase K) และเอนไซม์อาร์เอนเอส เอ (Rnase A) ของบริษัท Sigma , U.S.A.

8. เรสทริกชั่นเอนไซม์ (*Eco*R I , *Hin*d III , *Pst* I และ *Sma* I) และดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hin*d III) เป็นของ Bethesda Research laboratories , Inc. (BRL) , U.S.A.

<u>เชื้อจุลินทรีย์</u>

สายพันธุ์เห็ดที่ใช้ในการทดลองนี้ มี 6 สายพันธุ์ คือ

1. เห็ดฟาง (*Volvariella volvaceae*) V ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์แห่งประเทศไทย

2. เห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) ได้สายพันธุ์โดยการแยกเชื้อจากดอกเห็ดในห้องทดลองที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1. สายพันธุ์ T1 แยกเชื้อจากดอกเห็ดที่เก็บมาจากจังหวัดกาญจนบุรี ในปี 2529

2.2. สายพันธุ์ T3 แยกเชื้อจากดอกเห็ดที่เก็บจากเขตบางขุนเทียน จังหวัดกรุงเทพมหานคร ในปี 2534

3. สายพันธุ์เห็ดลูกผสม ที่เกิดจากการรวมเซลล์โปรโตพลาสต์ของเห็ดโคน และเห็ดฟาง

3.1. สายพันธุ์ $VT1_{(7)}$ (จากงานวิจัยของPichyangkura และคณะ, 1990)

3.2. สายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$ (จากงานวิจัยของPichyangkura และคณะ, 1990)

3.3. สายพันธุ์ VT3 (จากงานวิจัยของบุญลักษณ์, 2538 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งอยู่ระหว่างการเขียนวิทยานิพนธ์)

<u>การแยกเชื้อจากดอกเห็ด และทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ</u>

1. การแยกเชื้อจากดอกเห็ด

นำเห็ดมาเช็ดทำความสะอาดภายนอกด้วย 70% แอลกอฮอล์ ตัดเนื้อเยื่อภายในดอกเห็ด มาวางบนจานอาหารสูตรมาตรฐาน Potato Dextrose Agar =(PDA) ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูสายใยที่เจริญออกจากเนื้อเยื่อ แยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บในหลอดอาหารแข็ง

2. การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

ถ่ายเชื้อเห็ดลงในอาหารเหลว (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ปริมาตร 50 มล. ในขวดทดลองขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 14 วัน กรองเซลล์ผ่านผ้าขาวบางที่พับซ้อนกัน ประมาณ 3-4 ชั้น ล้างเซลล์สายใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่ -50°ซ ก่อนนำมาสกัดดีเอ็นเอ

<u>การทำให้เซลล์แตกและการสกัดดีเอ็นเอ</u>

1. การทำให้เซลล์แตก

นำเซลล์สดที่เก็บไว้ที่ -50 °ซ มาทำให้เซลล์แตกโดยเปรียบเทียบ 2 วิธีการคือการทำให้เซลล์แตกด้วยการใช้ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen -196 °ซ) ปริมาตรประมาณ 200 มล. ต่อเซลล์สด 5 กรัม อีกวิธีหนึ่งใช้น้ำแข็งแห้ง (dry ice อุณหภูมิ -79°ซ) 100 กรัม ต่อเซลล์สด 5 กรัม ทั้งสองวิธีนี้หลังใส่ไนโตรเจนเหลวและน้ำแข็งแห้งแล้ว จึงบดจนเป็นผงละเอียด โดยใช้เวลา ประมาณ 10 นาที

2. การสกัดดีเอ็นเอ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Biel และ Parrish (1986)

การสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์ ไม่ได้แยกไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอออกมา ดังนั้นจึงประกอบด้วยดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA) ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA , mt DNA) ดังรายงานวิจัยของ Garber และ Yoder (1983), Biel และ Parrish (1986) ซึ่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีดังนี้

ละลายผงเซลล์ที่เย็นจัด 1 กรัม ในบัฟเฟอร์สำหรับสกัด (extraction buffer ภาคผนวก ข หมายเลข1) 15 มล. เติม 1 มล. ของสารละลาย 20 % SDS และสารละลายโปรทีเนส เค (20 มก./มล.) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรทีเนส เค เป็น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ. เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 5 มล. ของสารละลายโปแตสเซียมอะซีเตท 5 โมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.5 โมลาร์ เขย่าเบาๆให้เข้ากันบ่มไว้ที่ 0°ซ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วนำมาปั่นแยกเอาตะกอนของกากเซลล์ทิ้งไปด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็นที่ 4°ซ ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เก็บส่วนน้ำใสมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล (isopropanal) 0.8 เท่าของปริมาตรของสารละลายทั้งหมด ผสมช้าๆ เบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา อย่างน้อย 30 นาที แล้วนำมาปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที ค่อยๆหลอดให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งบนกระดาษซับ ละลายดีเอ็นเอในสารละลาย TE buffer I pH 8.0 (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) นำสารละลายดีเอ็นเอมาเติม RNase A ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 นาโนกรัม/ ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง จึงนำมากำจัดโปรตีนออกด้วยสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1 ดังภาค

ผนวก ข หมายเลข 8) โดยเติมสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์มลงในหลอดในปริมาตรเท่าตัวของสารละลายดีเอ็นเอ ผสมโดยกลับหลอดขึ้น-ลงหลายครั้งอย่างเบาๆ แล้วจึงนำไปปั่นแยกชั้นของสารละลายด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์มเช่นนี้ 2 ครั้ง กำจัดฟีนอลที่อาจตกค้างในสารละลายดีเอ็นเอ ด้วยสารละลายอีเทอร์ที่อิ่มตัว (สารละลายดีเอ็นเอ : อีเทอร์อิ่มตัว ในปริมาณ 1:1) ปั่นแยกและระเหยสารละลายอีเทอร์ออกไป นำสารละลายดีเอ็นเอมาเติม 3 โมลาร์ ของสารละลายโซเดียมอะซิเตต pH 4.8 ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ และเติม 95 % เอทานอล 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ กลับหลอดเบาๆ จะเห็นสายของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ จึงนำมาปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 70 % เอทานอลที่เย็นจัด ทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งในภาชนะ desiccator ที่ดูดความชื้นออกด้วยแรงดึงดูดของน้ำ แล้วนำตะกอนดีเอ็นเอ มาละลายใน TE buffer II (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) สารละลายดีเอ็นเอที่ได้ นำมาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยวิธีของ Maniatis และคณะ (1982)

3. การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

โดยวิธีวัดการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ ตามวิธีการของ Maniatis และคณะ (1982) โดยการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer II แล้ววัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ จะมีค่า OD 260/280 ที่ 1.8 การหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอทำได้โดยการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอในช่วงแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 260 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 260 เท่ากับ 1 เทียบเท่ากับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

4. การหาขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซีส

เตรียมอะกาโรสเจล 0.7 % หรือ 1 % ใน TBE buffer (0.89 M Tris, 0.89 M boric acid, 0.025 M EDTA, pH 8.3) หลอมด้วยไมโครเวฟนาน 3-5 นาที (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) แล้วนำเจลที่อุ่นเทลงในแบบพิมพ์ (plate) ซึ่งมีหวี (comb) วางอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye ภาคผนวก ข หมายเลข 10) ในอัตราส่วน 4:1 หยอดลงในหลุมที่อะกาโรสเจล จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) โดยใช้ความต่างศักย์ 8 โวลต์/ซม. ของความยาวเจล จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 0.5 ไมโครกรัม/มล. ใน TBE buffer แช่เจลไว้ประมาณ 30 นาที แล้วแช่เจลในน้ำปลอดอิออน (deionized water) ประมาณ 45 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แลมดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III (λ/ *Hin*d III)

<u>การตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์</u>

การทดลองได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ (complete digestion) ด้วยการแปรปริมาณของเรสทริกชั่นเอนไซม์ และปริมาณของดีเอ็นเอ โดยแปรปริมาณของเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III เพียงชนิดเดียวในการตัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดฟาง นำภาวะที่เหมาะสมแล้วไปใช้ในการตัดดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ชนิดอื่นๆ

1. การแปรปริมาณเรสทริกชั่นเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอทั้งหมด

นำดีเอ็นเอประมาณ 1-1.2 ไมโครกรัม ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ผสมบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III และน้ำกลั่น (double distilled water) ปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ประมาณ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วเติม

เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 หน่วย ผสมให้เข้ากันโดยนำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) 7000 รอบ/นาที ประมาณ 30 วินาที บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ กลับหลอดเป็นครั้งคราว บ่มอย่างน้อย 3 ชั่วโมง เติม 95 % อัลกอฮอล์ ลงไป 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ อย่างน้อยเป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายใน TE buffer II เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ 4°ซ สำหรับทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีสต่อไป

2. การแปรปริมาณดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์

แปรปริมาณของดีเอ็นเอ 0.5, 1, 2, 3 และ 5 ไมโครกรัม แล้วนำมาตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III ด้วยอัตราส่วนที่ให้ผลของการตัดที่สมบูรณ์จากข้อ 6.1 ผสมบัฟเฟอร์และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นทำตามวิธีการดังข้อ 6.1

3. การแปรชนิดของเรสทริกชั่นเอนไซม์ในการตัดดีเอ็นทั้งหมด

แปรเรสทริกชั่นเอนไซม์ 4 ชนิดคือ *Hind* III , *Eco*R I, *Pst* I และ *Sma*I สำหรับตัดดีเอ็นเอทั้งหมดด้วยปริมาณดีเอ็นเอและเรสทริกชั่นเอนไซม์ที่เหมาะสมที่ได้ผลจากข้อ 6.1 และ 6.2 ผสมบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ค) และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 °ซ (ยกเว้นสำหรับเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Sma* I ที่ใช้อุณหภูมิ 25°ซ) จากนั้นทำตามวิธีการดังข้อ 6.1

<u>การวิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลของเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสม</u>

หลังแยกชิ้นดีเอ็นเอตามขนาดบนอะกาโรสเจลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเลก-โทรโฟรีซีส จึงบันทึกผลด้วยภาพ จากภาพถ่ายวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ปรากฏบนอะกาโรสเจล โดยเปรียบเทียบกับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/ *Hind* III)

โดยการสร้างกราฟมาตรฐานหาความสัมพันธ์ระหว่าง log 10 ของขนาดชิ้นดีเอ็นเอกับระยะทางการเคลื่อนที่

การตรวจสอบเห็ดลูกผสมโดยวิธี DNA-DNA Hybridization

วิเคราะห์ RFLP ของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ โดยใช้ rDNA ของ *Schizophyllum commune* เป็นโพรบ ทำโดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอของเห็ดกับโพรบ rDNA ติดฉลากโพรบโดยใช้ระบบ Enhanced Chemiluminescence (ECL) ของบริษัท Amersham , U.K. มีหลักการดังภาคผนวก ง ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้หลังจากตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ แล้วผ่านการแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีสจะนำมาไฮบริไดซ์ (hybridize) กับดีเอ็นเอโพรบ แล้วทำออโตเรดิโอกราฟฟี (Autoradiography) ตามเทคนิคการทำ Southern blotting โดยมีขั้นตอนดังนี้

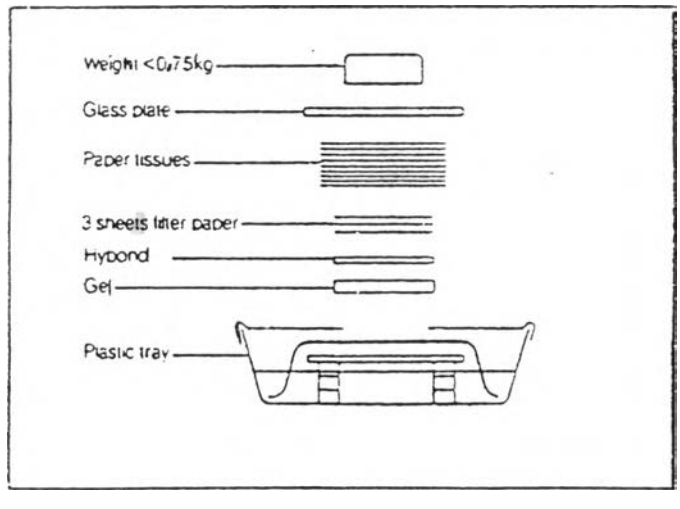
1. กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอบนแผ่นเจลหลังจากทำอิเลกโทรโฟรีซีส (Gel electrophoresis and processing)

ตัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, T3, V, $VT1_{(7)}$,$VT1_{(4y)}$ และ VT3 ในปริมาณ 2-10 ไมโครกรัม อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III แล้วนำมาทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกผลด้วยการถ่ายภาพ จากนั้นนำแผ่นเจลมาแช่ใน depurination solution (ภาคผนวก ข หมายเลข 16) 200 มล.ต่อขนาดเจล 10x10 ซม. เขย่าเบาๆให้แผ่นเจลเคลื่อนที่อย่างอิสระเป็นเวลา 15 นาที หรือจนกว่าสีของบรอมฟีนอลบลูบนแผ่นเจลจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกรองแล้วนำมาแช่ใน denaturation solution (ภาคผนวก ข หมายเลข 17) โดยใช้ปริมาตรเท่ากัน เป็นเวลา 15 นาที หรือสีของบรอมฟีนอลบลูกลับมาเป็นสีฟ้า ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกรองอีกครั้งหนึ่ง แช่แผ่นเจลในสาร Neutralization solution (ภาคผนวก ข หมายเลข 18) โดยใช้ปริมาตรเท่ากัน พร้อมเขย่าใช้เวลาประมาณ 30 นาที แผ่นเจลที่

ได้พร้อมที่จะนำไปทำ capillary blotting เพื่อเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจากเจลลงบนตัวกลางที่เหมาะสม ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ใช้เมมเบรน Hybond N+

2. การย้ายดีเอ็นเอจากเจลขึ้นสู่แผ่นเมมเบรน (Capillary blotting)

วางพาดกระดาษกรอง (Whatman -3MM) แผ่นยาวบนจานแก้วที่มีสารละลาย 20X SSC (ภาคผนวก ข หมายเลข 19) ในภาชนะพลาสติก ให้สารละลายซึมผ่านกระดาษกรองทั่วทั้งแผ่น แล้วใช้แท่งแก้วกลิ้งให้ทั่วเพื่อมิให้มีฟองอากาศ วางแผ่นเจลที่เตรียมไว้ในข้อ 1 บนกระดาษกรองแล้ววางแผ่นไนลอนเมมเบรน (Hybond N+) ที่มีขนาดพอดีกับแผ่นเจลประกบด้านบน ระวังไม่ให้มีฟองอากาศ จากนั้นตัดกระดาษกรอง 3 ชิ้นขนาดพอดีกับแผ่นเจลแล้วชุบสารละลาย 20X SSC มาวางทับบนแผ่นเมเบรน นำกระดาษซับมาพับซ้อนกันให้ได้ความสูงประมาณ 5 - 7 ซม. และวางก้อนน้ำหนักขนาด 0.75-1 กก. บนกระดาษซับ ตั้งทิ้งไว้หนึ่งคืน (ดังรูป)



รูปแสดงการทำ capillary blotting

3. การตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นเมมเบรน Hybond N+ (DNA fixation)

นำแผ่นเมมเบรนออกแล้ววางบนกระดาษกรอง โดยเอาด้านที่ประกบกับแผ่นเจลหงายขึ้นให้ด้านที่มีดีเอ็นเออยู่ด้านบน ทำเครื่องหมายบนแผ่นเมมเบรนด้วยดินสอดำ แล้วจึงนำแผ่นเมมเบรนไปอบในตู้อบสูญญากาศ อุณหภูมิ 80°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถเก็บรักษาแผ่นไนลอนเมมเบรนที่ตรึงดีเอ็นเอแล้ว โดยการห่อด้วยพลาสติกใส เก็บที่ 2-8°ซ หรือที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะสูญญากาศ

4. การติดฉลากบนโพรบ (Preparation of labelled probe)

ดีเอ็นเอติดตามที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ Ribosomal DNA (rDNA) มีขนาด 1.9 kb และมีลำดับเบสที่จำเพาะต่อเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Eco*R I และ *Xba* I เป็นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จาก ***Schizophyllum commune*** ซึ่งเป็นดีเอ็นเอของ rRNA ขนาด 5.8 S และ 18 S (Arima and Morinaga ,1993)

นำโพรบมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นลงทันทีโดยวางในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 5 วินาที เพื่อให้ของเหลวลงมาอยู่ก้นหลอด จากนั้นเติมรีเอเจนต์สำหรับติดฉลาก (DNA labelling reagent) ของบริษัท Amersham, U.K. ในปริมาตรที่เท่ากับสารละลายดีเอ็นเอ แล้วเติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ปริมาตรที่เท่ากับสารละลายดีเอ็นเอผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยง 5 วินาที แล้วบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 10 นาที ถ้ายังไม่ใช้ทันทีควรเก็บในสารละลายกลีเซอรอล 50 % อุณหภูมิ -20°ซ

5. Southern blot hybridization

เตรียมไฮบริไดเซชั่นบัฟเฟอร์ โดยผสมโซเดียมคลอไรด์ และ blocking agent (สารละลายสำเร็จรูปผลิตโดยบริษัท Amersham, U.K.) ด้วยเครื่องกวน (magnetic stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วอุ่นที่ 42 °ซ นำแผ่นเมมเบรนที่เตรียมได้จากข้อ 3 มาใส่ในถุงพลาสติก เติมไฮบริไดเซชั่นบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ 0.125 มล./ ตร.ซม. ของเมมเบรน รีดปิดปากถุงด้วยเครื่องรีดพลาสติก พยายามไม่ให้มีฟองอากาศ แล้วบ่มไว้ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 42°ซ ความเร็ว 100 รอบ/นาที เวลา 1 ชั่วโมง ขั้นตอน

นี้เป็นการทำ pre-hybridization จากนั้นเติมดีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากลงในถุงให้มีความเข้มข้นเป็น 10 นาโนกรัม/ มิลลิลิตรของไฮบริไดเซชั่นบัฟเฟอร์โดยระมัดระวังอย่าให้ดีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากถูกกับแผ่นเมมเบรนโดยตรง รีดปิดปากถุงให้สนิทโดยไม่ให้มีฟองอากาศ บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 42°ซ พร้อมทั้งเขย่า 100 รอบต่อนาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วย primary wash buffer สูตรที่ปราศจากยูเรีย (ภาคผนวก ข หมายเลข 20) ปริมาตร 2 มล./ ตร.ซม. ของแผ่นเมมเบรน บ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์นี้ 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วย secondary wash buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 21) ปริมาตรเท่ากับ primary wash buffer โดยบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ล้างซ้ำอีก 1 ครั้ง โดยแช่ใน secondary wash buffer ได้นาน 30 นาที ก่อนการทำออโตเรดิโอกราฟฟี (Autoradiography)

6. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์ได้บนฟิล์มเอกซเรย์ด้วยการทำออโตเรดิโอกราฟฟี (Detection and Autoradiography)

ผสมสารละลาย detection reagent 1 และ 2 เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1 ให้ได้ปริมาตร 0.125 มล./ตร.ซม. ของเมมเบรน ราด detection reagent ที่ผสมแล้วลงบนผิวหน้าของแผ่นเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอให้ทั่วแผ่น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ซับสารละลายส่วนเกินออก แล้วห่อแผ่นเมมเบรนด้วยพลาสติกใส อย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น แล้ววางแผ่นเมมเบรนโดยให้ด้านที่มีดีเอ็นเออยู่ข้างบนใน film cassette จากนั้นจึงนำฟิล์มเอกซเรย์วางทับบนเมมเบรนที่เตรียมไว้ ขั้นตอนนี้ทำในห้องมืด ภายใต้แสงสีแดง เสร็จแล้วจึงปิด cassette เมื่อครบเวลา 30 นาที นำฟิล์มเอกซเรย์มาล้างโดยแช่ในน้ำยาดีเวลลอปเปอร์ (developer solution) 3-5 นาที แช่ในน้ำ 1 นาที จากนั้นแช่ในน้ำยาฟิกเซอร์ (fixer solution) 10 นาที ล้างด้วยน้ำไหล 15 นาที ตากฟิล์มให้แห้ง และวิเคราะห์ผลโดยสังเกตสีดำบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ด้วยแสงสีขาว