บทที่ 4

วิธีดำเนินการศึกษา

ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษาได้จากชน 2 กลุ่ม โดยการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำรายละ 5 มล. ใส่ในขวดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัว ชน 2 กลุ่มนั้นคือ

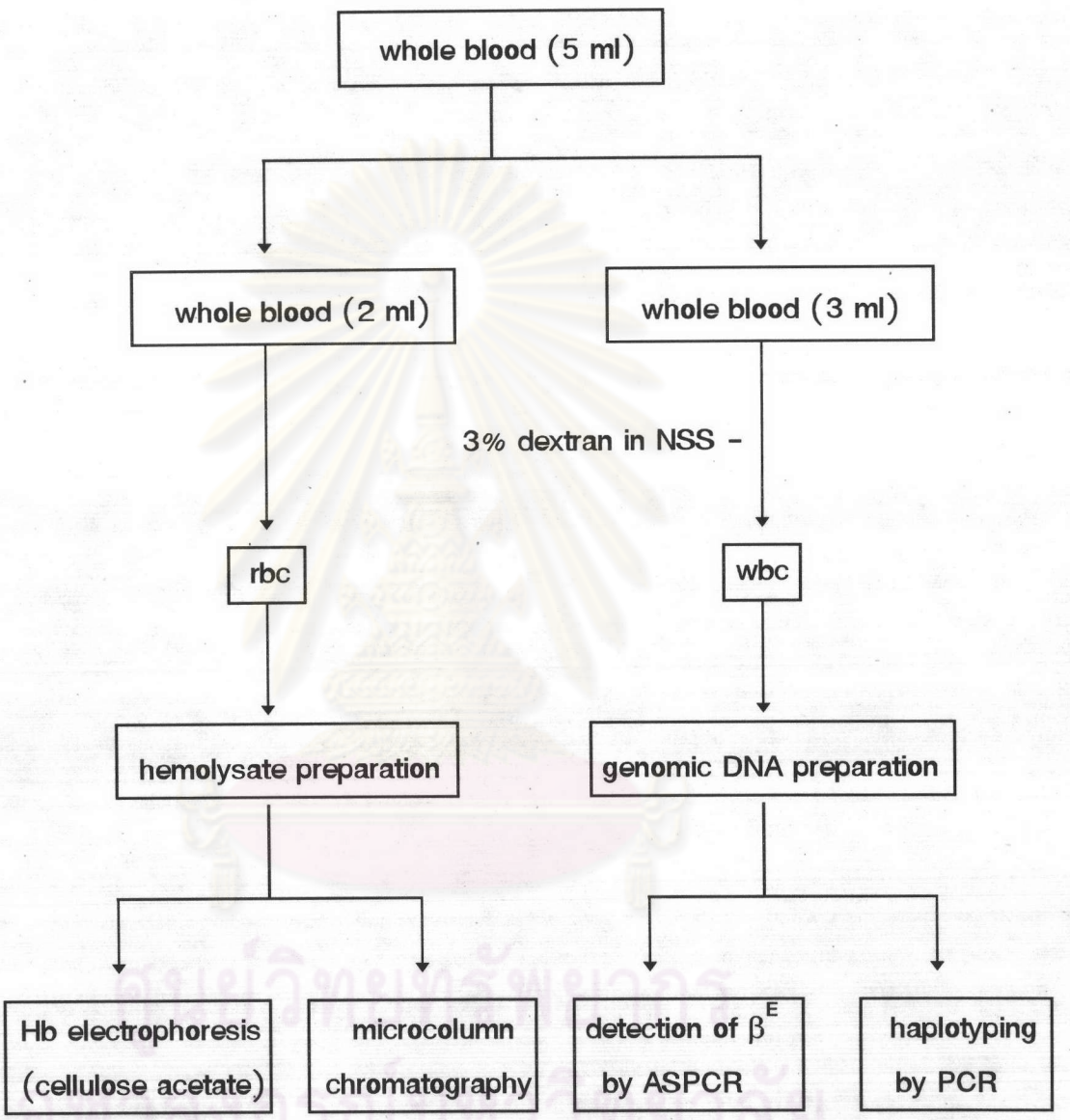
- ชนเผ่าซาไกในเขตอำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง จำนวน 20 ราย
- ชาวชองที่อาศัยในเขตตำบลคลองพลู อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี จำนวน 76 ราย

นำเลือดที่ได้มาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการโดยแบ่งตัวอย่างเลือดป็น 2 ส่วน คือ 2 มล. กับ 3 มล. นำไปศึกษาดังนี้

ขั้นตอนการศึกษา

1. ตัวอย่างเลือดปริมาตร 2 มล. นำไปเตรียมเป็นน้ำละลายฮีโมโกลบิน (hemolysate preparation) เพื่อ
   1.1 ตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธีเซลลูโลสอะซีเตทอิเลคโตรโฟเรซีส
   1.2 ตรวจวัดปริมาณ HbA_2 และ HbE โดยวิธีไมโครคอลัมน์ โครมาโตกราฟี
2. ตัวอย่างเลือดที่เหลืออีก 3 มล.นำไปเตรียมเป็นจีโนมิค ดีเอ็นเอ (genomic DNA preparation) เพื่อ
   2.1 ตรวจยีน HbE โดยวิธีเอเอสพีซีอาร์
   2.2 ศึกษา DNA restriction polymorphism หรือ ลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน (β-globin gene haplotypes)โดยวิธีพีซีอาร์

ขั้นตอนการศึกษาโดยสังเขป แสดงไว้ในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาทั้งหมด

จากตัวอย่างเลือด 2 มล.ของชนเผ่าซาไกและชาวชองทั้งหมดมาเตรียมเป็นน้ำละลายฮีโมโกลบิน

การเตรียมน้ำละลายฮีโมโกลบิน ทำตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. นำตัวอย่างเลือดที่ใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัวมา 2 มล. ใส่ในหลอดแก้ว แล้วนำไปปั่นแยกเอาส่วนที่เป็นพลาสมาทิ้งไป
2. ล้างเม็ดเลือดแดงที่ได้ด้วย 0.85% NaCl โดยใช้ปริมาตรของน้ำเกลือมากกว่าเม็ดเลือดแดงประมาณ 10 เท่า ล้าง 3 ครั้ง หรือจนกว่าไม่มีพลาสมาปน
3. เติมน้ำกลั่นโดยใช้ปริมาตร 1.5 เท่า ของปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่ได้ หลังจากปั่นแยกเอาส่วนที่เป็นน้ำเกลือทิ้งไปแล้ว
4. ผสมเลือดกับน้ำกลั่นอย่างแรงด้วย vertex mixer เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก
5. เติม CCl_4 ในปริมาตรครึ่งหนึ่งของน้ำละลายฮีโมโกลบินที่ได้ในข้อ 4 เขย่าอย่างแรงด้วย vertex mixer
6. นำไปปั่นที่ 2,000 rpm 15 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำละลายฮีโมโกลบินซึ่งอยู่ชั้นบน

หลังจากได้น้ำละลายฮีโมโกลบินแล้ว นำไปตรวจหาชนิดฮีโมโกลบินโดยวิธีเซลลูโลส อะซีเตท อิเลคโตรโฟเรซีส และตรวจวัดปริมาณ HbA_2 และ HbE โดยการทำไมโครคอลัมน์ โครมาโตกราฟี

การตรวจหาชนิดฮีโมโกลบินโดยวิธีเซลลูโลส อะซีเตท อิเลคโตรโฟเรซีส

ทำตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. แช่แผ่นเซลลูโลสอะซีเตท ขนาด 5.7 ซม. x 14.4 ซม. ในบัฟเฟอร์นานอย่างน้อย 5 นาทีก่อนใช้
2. ซับบัฟเฟอร์ที่มากเกินพอออกด้วยกระดาษกรอง

3. หยดน้ำละลายฮีโมโกลบินลงบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตท ด้วยอุปกรณ์สำหรับหยดน้ำละลายฮีโมโกลบิน (sample applicator) ให้ห่างจากปลายด้านหนึ่ง ประมาณ 2 นิ้ว
4. ขึงแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทในกล่องใส่บัฟเฟอร์ตัวนำไฟฟ้า โดยให้ปลายทั้ง 2 ข้างจุ่มอยู่ในบัฟเฟอร์ และปลายด้านที่มีน้ำละลายฮีโมโกลบินอยู่ทางด้านขั้วลบ
5. ปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าไป โดยให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 250-350 โวลต์ ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 20-35 นาที หรือจนกว่าแถบฮีโมโกลบินแยกกันชัดเจน
6. นำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตท ที่แยกชนิดฮีโมโกลบินเสร็จแล้ว มาย้อมด้วยสี poceau S โดยแช่ในกล่องย้อมสี นาน 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว นำมาล้างใน 5% acetic acid จนสะอาด แล้วผึ่งให้แห้ง
7. ถ้าต้องการเก็บแผ่นเซลลูโลสอะซีเตท ไว้นาน ๆ นำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทที่ล้างด้วย 5% acetic acid จนสะอาดแล้ว นำมากำจัดน้ำออกโดยแช่ใน absolute methanol นาน 2 นาที ทำให้ใสโดยแช่ใน clearing solution นาน 5 นาที อบให้แห้งที่ 50-60 °C แล้วเก็บไว้

การตรวจวัดปริมาณ HbA_2 และ HbE โดยการทำไมโครคอลัมน์ โครมาโตกราฟี

ทำตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. เตรียมคอลัมน์โดย

- นำ Pasteur pipette ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม. ยาว 9 นิ้ว ซึ่งมีสำลีอุดที่ส่วนคอด ไปตั้งบนที่ตั้งในแนวดิ่ง
- เติม DEAE-cellulose ที่เตรียมใส่ใน Pasteur pipette จนได้ความสูงของ DEAE-cellulose อัดแน่น สูงประมาณ 3 ซม.
- คอลัมน์ที่เตรียมได้หากไม่ใช้ทันทีต้องเก็บไว้ที่ 4 °C โดย DEAE-cellulose ต้องชุ่มด้วยบัฟเฟอร์เอ และปิดคอลัมน์ให้สนิท จนกว่าจะนำมาใช้

2. ปล่อยให้บัฟเฟอร์เอที่อยู่ด้านบนคอลัมน์แห้ง แล้วเติมน้ำละลายฮีโมโกลบินลงบน DEAE-cellulose โดยใช้หลอดปั่นฮีมาโตคริต 1-2 หยด รอจนน้ำละลายฮีโมโกลบิน ซึมเข้าไป DEAE-cellulose หมด
3. เติมบัฟเฟอร์บีลงบนคอลัมน์ ซึ่งมีกระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 10 มล. ยึดติดที่ส่วนปลายสำหรับเป็นแหล่งเก็บบัฟเฟอร์ที่เติม เมื่อแถบของ HbA_2 และ HbE เคลื่อนลงมาประมาณครึ่งความสูงของคอลัมน์ นำหลอดปั่นที่มีขีดบอกปริมาตรขนาด 15 มล. รองรับสารละลายที่ผ่านออกมาจนกระทั่งเก็บแถบของ HbA_2 และ HbE ได้หมดบันทึกปริมาตรของสารละลายที่เก็บได้ (volume A_2)
4. ดูดบัฟเฟอร์บีที่เหลือออกจากคอลัมน์ เติมบัฟเฟอร์ซี เพื่อพาฮีโมโกลบินที่เหลืออยู่ออกให้หมดซึ่งโดยส่วนใหญ่เป็น HbA นำกระบอกตวงขนาด 25 มล. รองรับ สารละลายที่ผ่านออกมาจนกระทั่งเห็นคอลัมน์ขาวที่สุด เจือจางสารละลายที่รองรับได้ ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ประมาณ 25 มล. บันทึกปริมาตรของสารละลายนี้ไว้ (volume A)
5. นำสารละลายที่เก็บได้ในข้อ 3 และ ข้อ 4 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD.) ที่ 415 นาโนเมตร เทียบกับน้ำกลั่น นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในข้อ 3 (OD. A_2) และสารละลายในข้อ 4 (OD. A) ไปคำนวณหาปริมาณ HbA_2 หรือ HbE โดยใช้ สูตรดังนี้

$$\% \ HbA_2 \text{ หรือ } HbE = \frac{OD.\ A_2 \times volume\ A_2 \times 100}{(OD.\ A_2 \times volume\ A_2) + (OD.\ A \times volume\ A)}$$

ค่าปกติ

ผู้ใหญ่ HbA = 1.71 - 3.54 % ในคนปกติ

HbA = 3.9 - 7.5 % ใน β-thalassemia trait

HbE = 24.32 - 31.48 % ใน HbE trait

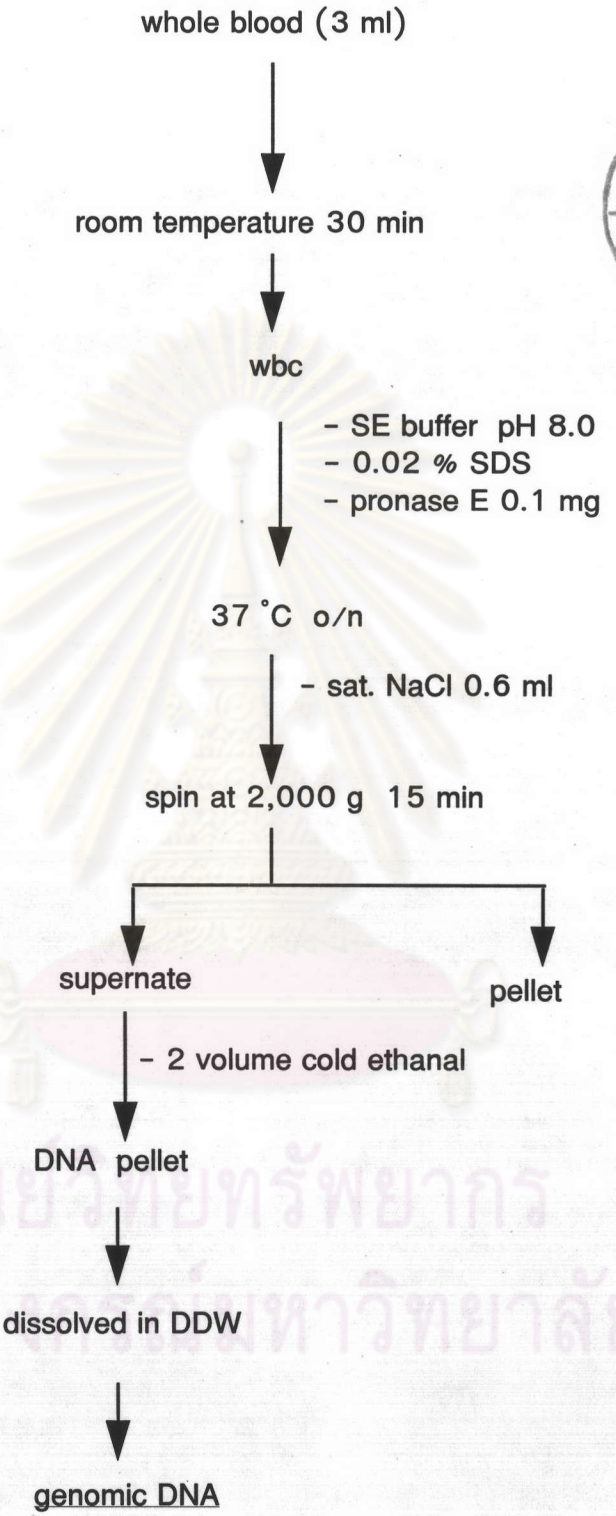
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำเลือด 3 มล. ของชนเผ่าซาไกและชาวซองทั้งหมดมาเตรียมเป็นจีโนมิค ดีเอ็นเอ

การเตรียมจีโนมิค ดีเอ็นเอ

ทำตามขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างเลือดที่ใช้ 2 % EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัวมา 3 มล. เติม 3 % dextran ใน NSS 3 มล. (อัตราส่วน 1:1) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที หรือจนเห็นเม็ดเลือดแดงตกตะกอนแยกชั้นอยู่ด้านล่าง
2. แยกน้ำส่วนบน นำไปปั่นที่ 3,000 rpm 10 นาที เพื่อแยกเม็ดเลือดขาว ดูดน้ำใส ส่วนบนทิ้งไป จะได้เม็ดเลือดขาวอัดแน่นอยู่ก้นหลอด
3. ล้างเม็ดเลือดขาวที่ได้ด้วย lysis buffer ประมาณ 5 มล. 2 ครั้ง แล้วนำไปปั่นที่ 3,000 rpm 10 นาที จะได้เม็ดเลือดขาวอัดแน่นที่สะอาด
4. เติม SE buffer 3 มล. 20% SDS 0.15 มล. 10 มก./มล. pronase E 15 *ml* ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่ 37 °C ใน water bath ข้ามคืน หรือจนกว่าจะมีการย่อยเม็ดเลือดขาวอย่างสมบูรณ์
5. เติม saturated sodium chloride (6 MNaCl) 0.84 มล. เพื่อตกตะกอนโปรตีน ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ 3,000 rpm 15นาที ดูดเอาน้ำใสส่วนบนแยกใส่อีกหลอดหนึ่ง
6. เติม 2 ปริมาตรของ cold absolute ethanol แล้วเขย่าเบาๆ จนเห็นดีเอ็นเอจับเป็นเส้นสีขาวดูด absolute ethanol ทิ้งไปแล้วล้างดีเอ็นเอด้วย 70% cold ethanol ออก
7. นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้แห้งโดยใช้ suction หรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะแห้ง
8. ละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 0.5-1 มล.เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C แสดงเป็นแผนภูมิได้ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการเตรียมจีโนมิค ดีเอ็นเอ

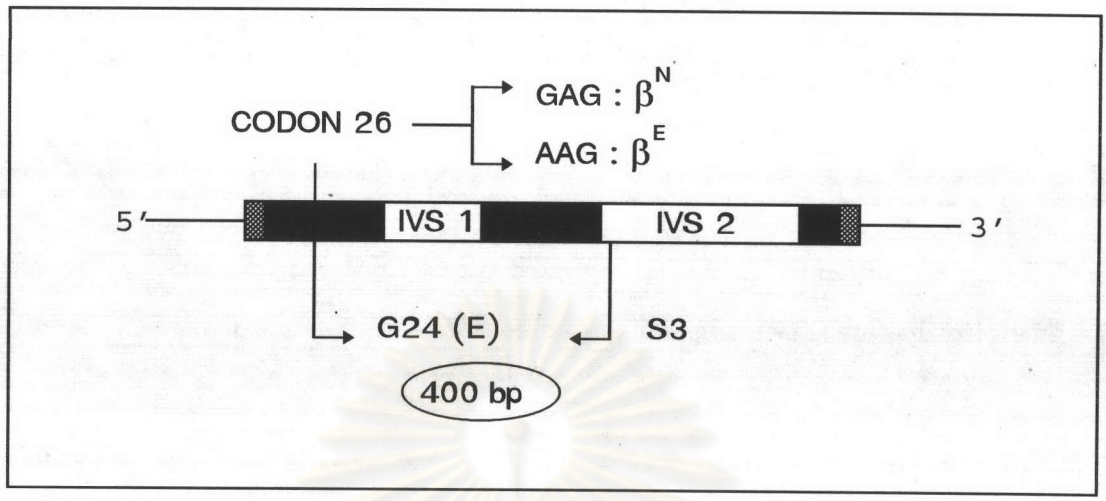
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลังจากได้จีโนมิค ดีเอ็นเอแล้วนำมาตรวจหายีน HbE โดยวิธี ASPCR และศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตา-โกลบินโดยวิธี PCR

การตรวจสอบยีน HbE โดยวิธีอัลลีลสเปซิฟิกโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น
(Allele Specific Polymerase Chain Reaction ; ASPCR)

เพื่อเป็นการยืนยันว่าตัวอย่างที่เลือกมาวิเคราะห์ดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิสมนั้นมียีน HbE จริงหรือไม่ จึงได้ทำการตรวจสอบด้วยวิธี ASPCR (Fucharoen และคณะ, 1994) โดยทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนบีตา-โกลบิน ขนาด 400 คู่เบส ซึ่งอาศัยไพรเมอร์ G24 ที่จำเพาะต่อยีนบีตาอีโกลบิน ร่วมกับไพรเมอร์ S3 ซึ่งจะเพิ่มชิ้นส่วนยีนบีตา-โกลบิน โดยมีไพรเมอร์ γ4 และ γ5 ที่ใช้เพิ่มจำนวนยีนแกมม่า-โกลบินขนาด 540 คู่เบส เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ของการทำพีซีอาร์ ไดอะแกรมของยีนบีตา-โกลบิน และตำแหน่งของไพรเมอร์ แสดงไว้ในรูปที่ 4.3 ส่วนรายละเอียดเกี่ยวกับไพรเมอร์ที่ใช้ แสดงไว้ในตารางที่ 4.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.3 โครงสร้างของยีนบีตา-โกลบินแสดงตำแหน่งโคดอนที่ 26 ซึ่งเป็น GAG สำหรับยีนบีตา-โกลบินปกติ (β^N) และเป็น AAG สำหรับยีนบีตาอี (β^E), G24 เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนบีตาอีซึ่งเมื่อนำไปใช้ร่วมกับไพรเมอร์ S3 ในปฏิกริยาพีซีอาร์จะสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 400 bp

ตารางที่ 4.1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ ที่ใช้ในการทำ ASPCR

ชนิดของไพรเมอร์	ลำดับเบส จาก 5′--->3′
G24	CGTGGATGAAGTTGGTGGTA
S3	TCCCATAGACTCACCCTGAA
γ4	GGCCTAAAACCACAGAGAGT
γ5	CCAGAAGCGAGTGTGTGGAA

การตรวจสอบยีน HbE โดยวิธี ASPCR มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียมหลอดไมโครทิวป์ขนาด 0.5 มล. และเติมสารต่าง ๆต่อไปนี้

extracted DNA	1	ml	(1 mg)
10X *Taq* buffer + 3 mM $MgCl_2$	5	ml	
dNTPs mixture	2	ml	
S3 primer	15	pmole	
γ4 primer	10	pmole	
γ5 primer	10	pmole	
Taq polymerase	0.5	Unit	
sterile distilled H_2O to 50 ml			

2. เริ่มทำพีซีอาร์ โดยใช้เครื่อง DNA Thermal cycler 480 โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาตามลำดับดังต่อไปนี้

   96 °C : 3 นาที สำหรับครั้งแรก และตามด้วย 30 รอบของ

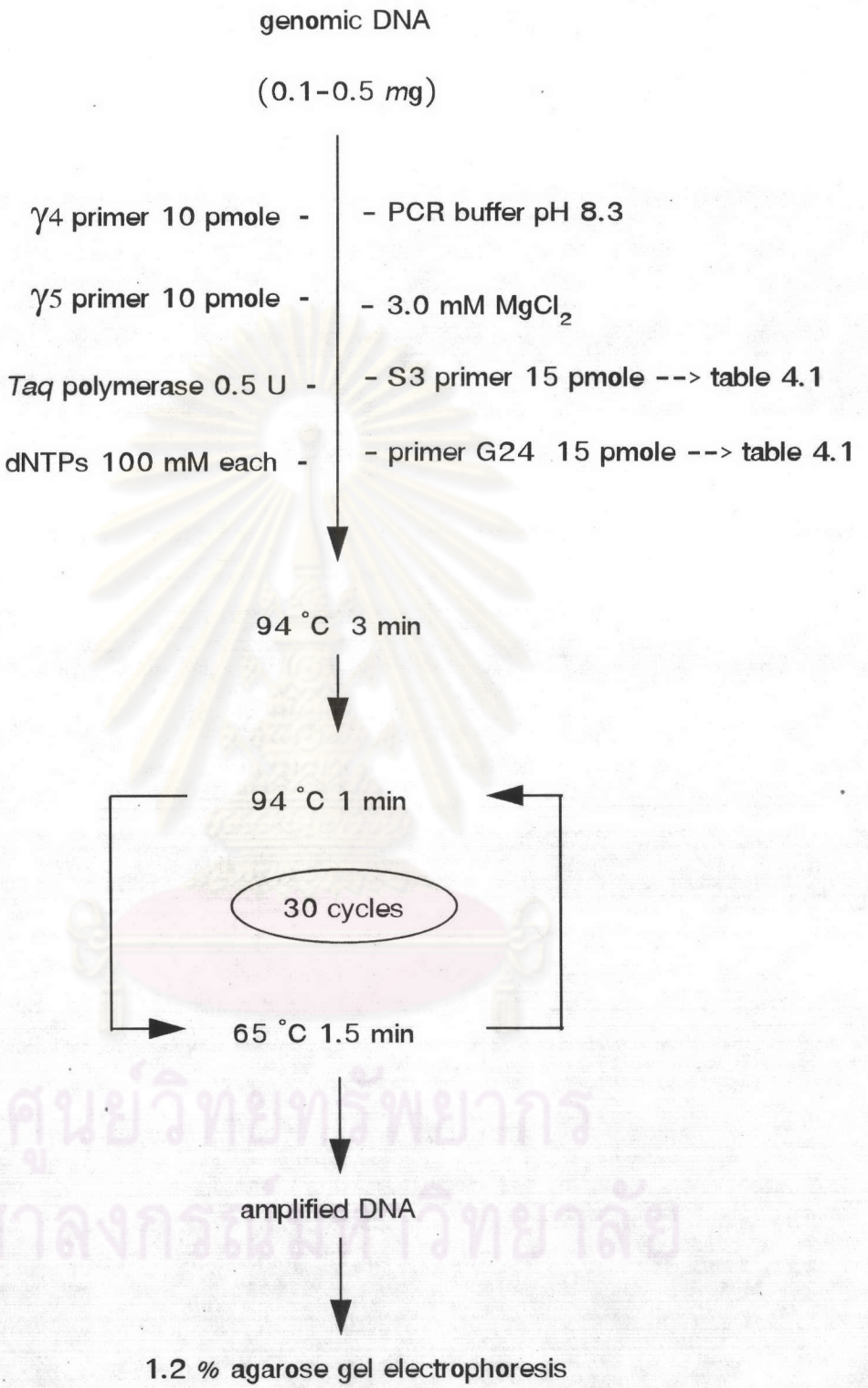
   94 °C : 1 นาที

   65 °C : 1.5 นาที

3. เก็บดีเอ็นเอ ที่เพิ่มจำนวนได้ไว้ที่ 4 °C

4. ตรวจดูดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นมาได้ โดยการทำ agarose gel electrophoresis (1.2 %) เทียบกับตัวเทียบขนาด (DNA size marker)

ขั้นตอนทั้งหมดแสดงเป็นแผนภูมิได้ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทำ ASPCR

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จีโนมิค ดีเอ็นเออีกส่วนหนึ่งนำมาศึกษาต่อดังนี้

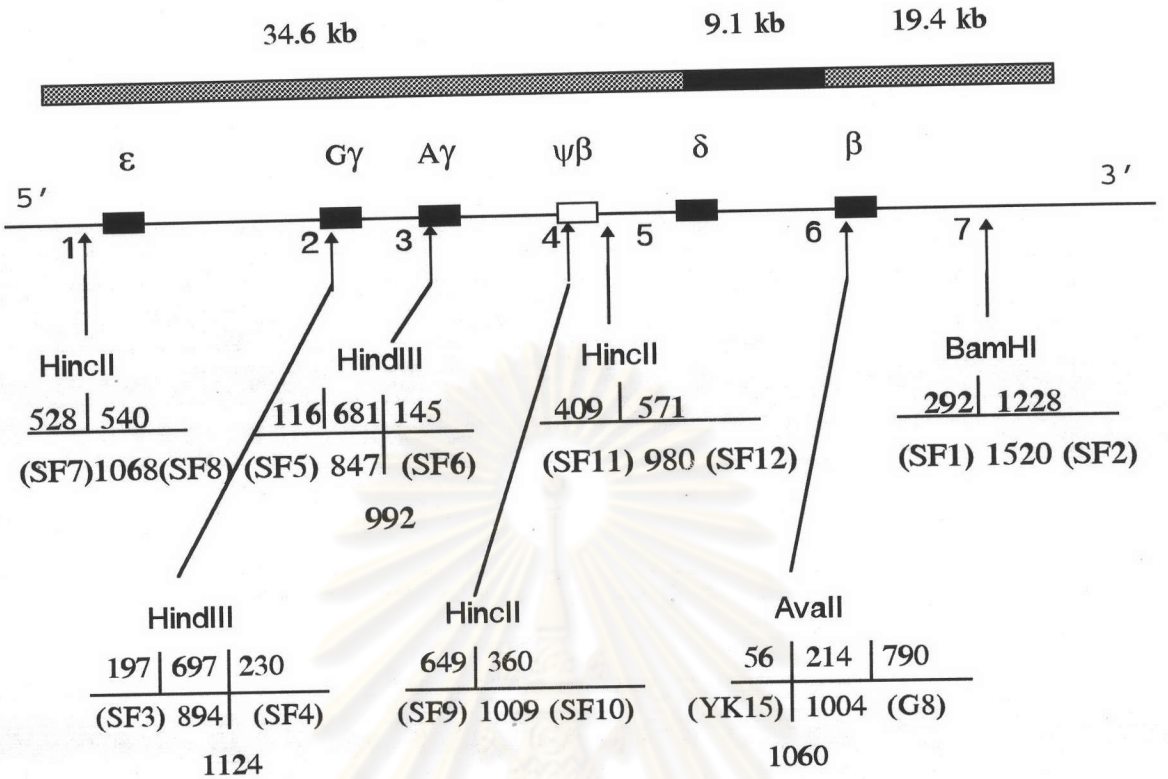
ศึกษา DNA polymorphism หรือ ลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตา-โกลบินโดยวิธีพีซีอาร์

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตำแหน่ง (polymorphic restriction site) ภายในกลุ่มยีนบีตา-โกลบินจำนวน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 1, 5′ε-Hinc II ; 2, Gγ-Hind III ; 3, Aγ-Hind III ; 4, ψβ-Hinc II ; 5, 3′ψβ-Hinc II ; 6, β-Ava II และ 7, 3′β-Bam HI (Fukumaki และ Fucharoen, 1991) ดูรายละเอียดในรูปที่ 4.5

มีขั้นตอนในการศึกษาคือ

1. เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยอาศัยไพรเมอร์ที่เหมาะสม
2. แล้วนำมาวิเคราะห์ DNA restriction polymorphism ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเหล่านั้น โดยดูจากการตัดได้ (presence, +) หรือตัดไม่ได้ (absence, -) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนโครโมโซมที่มียีน HbE (ยีนมิวแตนท์) หรือยีนที่มียีน HbA (ยีนปกติ)
3. หลังจากนั้นตรวจดูผลด้วยการทำเจล อิเลคโตรโฟเรซีส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 แสดงตำแหน่งของ DNA restriction polymorphism ภายในกลุ่มยีนบีตา-โกลบินที่ใช้ในการศึกษามี 7 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 1, 5′ ε-Hinc II ; 2, Gγ-Hind III ; 3, Aγ-Hind III ; 4, ψβ-Hinc II ; 5, 3′ψβ-Hinc II ; 6, β-Ava II และ 7, 3′β-Bam HI ทุกตำแหน่งตรวจได้ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยอาศัยไพรเมอร์ และเอนไซม์ที่ระบุไว้ (Fukumaki และ Fucharoen, 1991) ตัวอย่างเช่น ตำแหน่งที่ 1, 5′ε-Hinc II หมายถึงบริเวณ 5′ ถึง ε-globin gene ซึ่งจะถูกเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนขึ้นมาด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ SF7 และ SF8 ให้ชิ้นส่วนขนาด 1068 bp เมื่อตัดได้ (+,presence) ด้วยเอนไซม์ HincII จะให้ชิ้นส่วนขนาด 540 bp และ 528 bp ถ้าเอนไซม์ HincII ตัดไม่ได้ (-,absence) จะให้ชิ้นส่วนขนาด 1068 bp เท่าเดิม เป็นต้น ส่วนรายละเอียดของไพรเมอร์แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 ส่วนที่แรเงาทึบด้านบนเป็น hot spot region

ตารางที่ 4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ และตำแหน่งของยีนภายในกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน ที่ใช้ในการศึกษา DNA polymorphisms หรือ β-globin gene haplotypes

ไพรเมอร์	ลำดับเบสจาก 5′--->3′	โพลีมอร์ฟิก ไซท์	ยีน
[1]SF 7	GGCACATGGATCGAATTGAA	Hind III	5′ε
[2]SF 8	ACCATGATGCCAGGCCTGAG		
[1]SF 3	GTTTGTGTGTGTGTGAGAGC	Hind III	Gγ
[2]SF 4	TCTTTAGGCATGCGTCAACA		
[1]SF 5	TTAACGTCTTCAGCCTACAA	Hind III	Aγ
[2]SF 6	CAATCTGCACACTTGAGGGGC		
[1]SF 9	GGGAACAGAAGTTGAGATAG	Hinc II	ψβ
[2]SF 10	CTCTTTTCTTGCAGGATTGC		
[1]SF 11	GCTCCATGAACAAACATTCC	Hinc II	3′ψβ
[2]SF 12	AAGGAGCACCCACTAGCTCA		
[1]YK 15	TCTCTCTGCCTATTGGTCTA	Ava II	β
[2]G 8	GCTTGGACTCAGAATAATCC		
[1]SF 1	GCCCACATCACCAAGGCAAT	Bam HI	3′β
[2]SF 2	GCTCTACGGATGTGTGAGAT		

1 = upstream primers

2 = downstream primers

จากจีโนมิคดีเอ็นเอนำมาศึกษาต่อดังนี้

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายในกลุ่มยีนบีตา-โกลบินด้วยวิธีพีซีอาร์

ขั้นตอนต่าง ๆ แสดงเป็นแผนภูมิได้ดังรูปที่ 4.6

1.1 เตรียมหลอดไมโครทิวป์ขนาด 0.5 มล. และเติมสารต่าง ๆต่อไปนี้

extracted DNA	1	ml
10X *Taq* buffer	5	ml
dNTPs mixture	2	ml
50 % glycerol	2	ml
upstream primers	15	pmole*
downstream primers	15	pmole*
Taq polymerase	0.5	Unit

sterile distilled H_2O to 50 ml

* รายละเอียดของไพรเมอร์ แสดงไว้ในตารางที่ 4.2

1.2 เริ่มทำพีซีอาร์โดยใช้เครื่อง DNA Thermocycler 480 โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาตามลำดับดังนี้

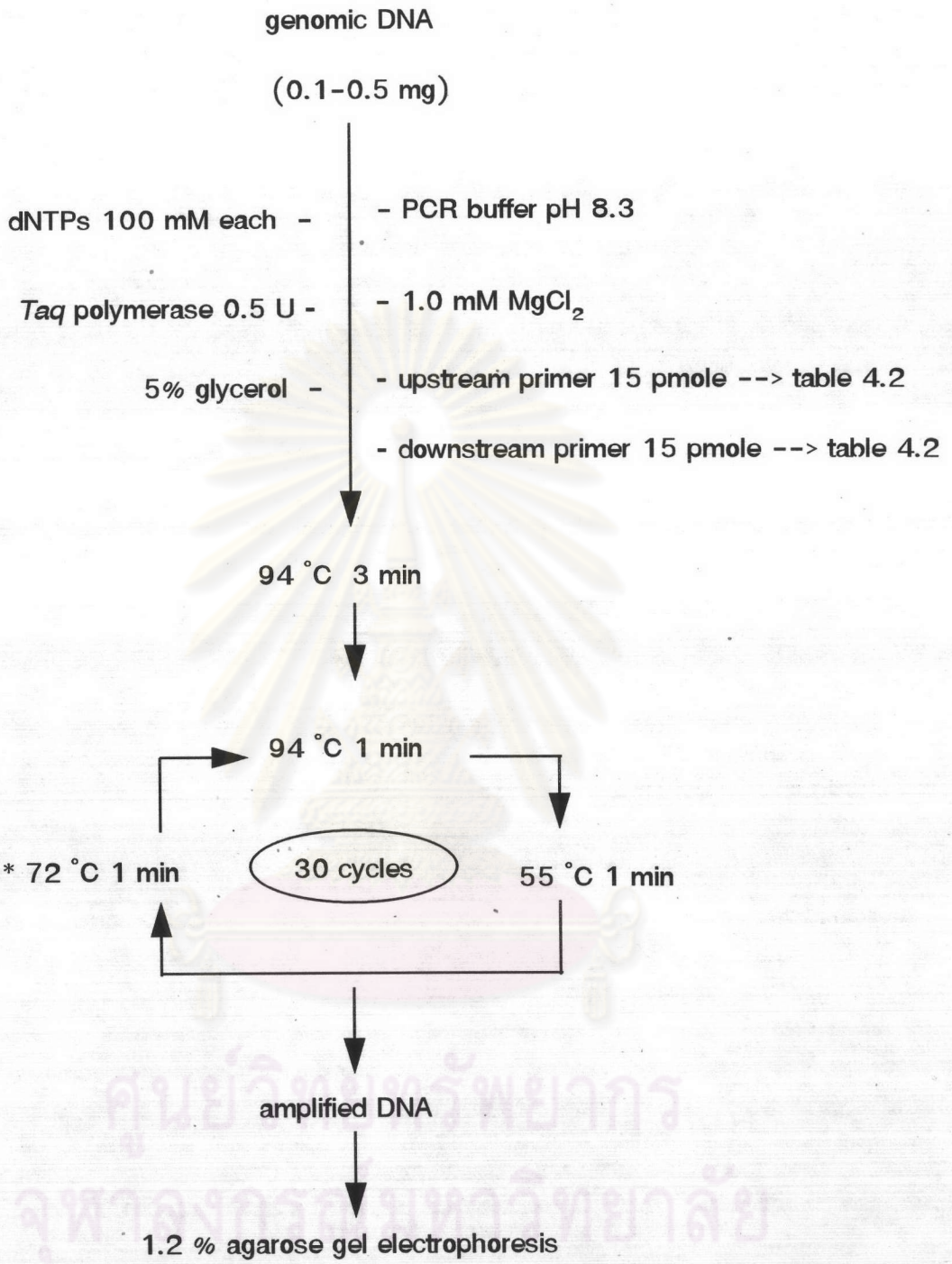
94 °C : 3 นาที สำหรับครั้งแรก และตามด้วย 30 รอบของ

94 °C : 1 นาที

55 °C : 1 นาที

72 °C : 1 นาที (ยกเว้น ตำแหน่งที่ 7,3′β-Bam HI ใช้เวลา 1.30 นาที)

1.3 นำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มา 5 ml ผสมกับ loading dye 1 ml ไปตรวจดูโดยการทำ agarose gel electrophoresis (1.2 %) เทียบกับตัวเทียบขนาด และ ย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ได้เป็นผลสำเร็จจะปรากฏเป็นแถบของดีเอ็นเอ ที่มีขนาดต่าง ๆ ตามชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ให้เห็น



* ยกเว้นตำแหน่งที่ 7 ,3′β-Bam HI ใช้เวลา 1.30 นาที

รูปที่ 4.6 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทำพีซีอาร์ ภายในกลุ่มยีนบีตา-โกลบิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วนำมาศึกษาต่อดังนี้

วิเคราะห์ดีเอ็นเอ ที่เพิ่มจำนวนได้ โดยวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme analysis of amplified DNA) ทำตามขั้นตอนดังนี้

2.1 เตรียมหลอดไมโครทิวป์ขนาด 0.5 มล. และเติมสารต่าง ๆดังต่อไปนี้

amplified DNA	5-8	ml
10X restriction enzyme buffer	1	ml*
specific restriction enzyme	0.5	ml*
distilled H_2O to	8-10	ml

* รายละเอียดของเรสตริกชั่นเอนไซม์ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แสดงไว้ในตารางที่ 4.3

2.2 เขย่าให้ผสมเข้ากันเบาๆ ด้วย vertex แล้วอุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.3 เติม 2 ml ของ loading dye ลงในหลอดไมโครทิวป์

2.4 นำไปทำอิเลคโทรโฟเรซีสบนแผ่น agarose minigel (1.2 %)

2.5 ย้อมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดได้ หรือตัดไม่ได้นั้นด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ได้ตัด (uncut)

ตารางที่ 4.3 แสดง specific restriction enzyme และbuffer ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนขึ้นมาได้โดยวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดเพาะ

restriction enzymes	buffer
Hinc II	B-buffer
Hind III	B-buffer
Ava II	Ava II buffer
Bam HI	E-buffer

จากนั้นตรวจดูผลโดยการทำ agarose gel electrophoresis

การทำ agarose gel electrophoresis

3.1 เตรียม 1.2 % agarose gel โดยละลาย agarose 1 กรัม ใน 1X E buffer 100 มล. นำไปต้มเพื่อเปลี่ยนสภาพเป็นเจล (ต้มประมาณ 5 นาที)

3.2 เมื่อได้เจลใสที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน รอจนกว่าเจลเริ่มเย็นลงแล้วเทใส่ถาดพลาสติก หรือแผ่นกระจกที่เตรียมไว้โดยมีหวีเสียบ (comb) วางอยู่บนในแนวดิ่ง

3.3 ตั้งถาดเจลทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนเจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 8-10 นาที ดึงหวีเสียบออกจากเจล จะได้ร่องสำหรับใส่ตัวอย่าง นำเจลที่ได้วางไว้ใน chamber ที่มี E-buffer อยู่ในชุด mini-gel electrophoresis

3.4 เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการแยกด้วยอิเลคโตรโฟเรซีส โดยผสมดีเอ็นเอ กับ 6X-gel loading dye ในอัตราส่วน 5:1 (ดีเอ็นเอ 5 ml ต่อ 6X gel-loading dye 1 ml) นำส่วนผสมดังกล่าวใส่ลงไปในร่องที่เตรียมไว้

3.5 เปิดเครื่อง mini-gel electrophoresis ให้แถบสีวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก โดยให้แถบสีวิ่งไปประมาณ 2 ใน 3 ของแผ่นเจล

3.6 นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 mg/ml) ประมาณ 10 นาที

3.7 อ่านผลที่ได้โดยใช้แสง UV

หน่วยวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย