หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องปั่นแยกปริมาตรน้อย (High speed microcentrifuge) รุ่น 202 M ของบริษัท Sigma, USA

เครื่องปั่นแยกความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (High speed refrigerated centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota, Japan หรือรุ่น B-22M ของบริษัท IEC, USA

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (UV Spectrophotometer) รุ่น UV-3100 ของบริษัท Shimadzu, Japan หรือรุ่น Spectronic 3000 Array ของบริษัท Milton Roy,USA

เครื่องวัดค่าความเข้ม (densitometer) ของบริษัท LKB, Bromma, Sweden

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 420 A ของบริษัท ORION, USA

เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) รุ่น 2301 Macrodrive 1 ของบริษัท LKB , Bromma, Sweden

เจลแชมเบอร์รุ่น 2013 Miniphor ของบริษัท LKB, Bromma, Sweden หรือรุ่น Sub-Cell Submarine ของบริษัท Bio-Rad, USA

แหล่งกำเนิดแสงอุลตราไวโอเลต (UV transilluminator) ของบริษัท LKB, Bromma , Sweden

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น SA0178 ของบริษัท LAB-LINE,USA

ตู้อบสูญญากาศ(vacuum)รุ่น 0052 ของบริษัท HETOSICC, Denmark

กล้องถ่ายรูป และฟิลม์ Tri-X pan

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เอนไซม์ตัดจำเพาะ(restriction enzymes)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	**หมายเลขแคตตาล็อค**	**แหล่งที่ผลิต**
*Bam*H I	15201-023	BRL Life Technologies, USA
Bgl I	15219-017	BRL Life Technologies, USA
*Eco*R I	15215-015	BRL Life Technologies, USA
Pst I	15202-013	BRL Life Technologies, USA

2. ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ดีเอ็นเอมาตรฐาน	หมายเลขแคตตาล็อค	แหล่งที่ผลิต
λ/Hind III	15612-013	BRL Life Technologies, USA
100 bp DNA Ladder	15628-019	BRL Life Technologies, USA

3. เคมีภัณฑ์

ชื่อสารเคมี	หมายเลขแคตตาล็อค	แหล่งที่ผลิต
กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)	10117	BDH Chemicals Ltd. England
คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$)	2445	E.Merck, Germany
ซิลิโคน	35130	Serva Feinbiochemica GmbH& Co., Germany
ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	0335	Amresco, USA
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	6404	E.Merck, Germany
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ($C_{12}H_{25}O_4SNa$)	L4390	Sigma Chemical Co., USA
โบรโมฟีนอลบลู ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)	607	E.Merck, Germany
บอริกแอซิด (H_3BO_3)	B7901	Sigma ChemicalCo,USA

ชื่อสารเคมี	หมายเลขแคตตาล็อค	แหล่งที่ผลิต
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	4936	E. Merck, USA
ไตตรอนเอ็ก-100 ($C_{34}H_{62}O_{12}$)	P0069440	Amresco, USA
ทรีส-เบส ($C_4H_{11}NO_3$)	T1503	Sigma Chemical Co., USA
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$)	10149	BDH Chemicals Ltd. England
ฟีนอล (Phenol)	0945	Amresco, USA
ไรโบนิวคลีเอส (RNase A)	R4875	Sigma Chemical Co., USA
อะกาโรสเจล		
- I.D.Na^{TM}	50172	FMC Bioproducts,USA
- NuSieve^{R} 3:1	50092	FMC Bioproducts,USA
- Ultrapure	5510UA	BRL Life Technologies, USA
ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ ($C_5H_{12}O$)	979	E.Merck, Germany
เอทธีลีนไดเอมีนเตตราอะเซติก (EDTA)	0105	Amresco, USA
เอธิเดียมโบรไมด์ ($C_{21}H_{20}N_3{+}.Br{-}$)	21238	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Germany
แอบโซลุทเอธทานอล (C_2H_5OH)	983	E.Merck, Germany
Ficoll-paque	17084003	Pharmacia LKB,Sweden

สัตว์ทดลอง

กระบือปลักเพศเมียอายุ 3-8 ปีมีลูกมาแล้ว 1-2 ตัวจำนวน 4 ตัวได้แก่เบอร์ 301, 302, 305 และ ด ยกเว้นกระบือปลักเบอร์ 309 ที่มีอายุ 17 เดือนและยังเป็นกระบือ สาว กระบือปลักทั้ง 5 ตัวเป็นสัตว์ทดลองที่ ศ. มณีวรรณ กมลพัฒนะได้ซื้อด้วยเงินทุนส่วนตัวและเลี้ยงที่บริเวณอ่างเก็บน้ำบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรีและใช้กระบือปลักจากโรงงานฆ่าสัตว์อายุ 4 - 10 ปีจำนวน 3 ตัว

กระบือมูราห์เพศเมียอายุ 4-12 ปีมีลูกมาแล้ว 1-10 ตัวจำนวน 6 ตัวที่ซื้อมาจากสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์หนองกวาง จังหวัดราชบุรี

การเตรียมตัวอย่างเลือด

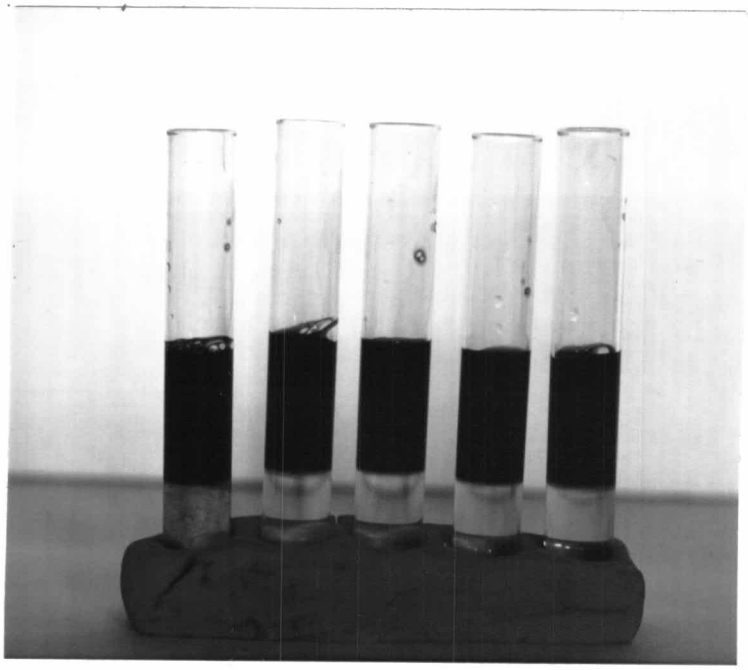
ทำการเจาะเลือดกระบือปลักและกระบือมูราห์ โดยใช้อีดีทีเอ (EDTA) เป็นสารกันเลือดแข็ง ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะใช้สารละลายอีดีทีเอ (0.5 โมลาร์, pH 8.0) 1 มล.ต่อ เลือด 100 มล. และนำเลือดมาเก็บแช่ที่อุณหภูมิ 4^{o} ซ หรือเก็บแช่แข็งที่ -20^{o} ซ จนกว่าจะนำมาทำการแยกเม็ดเลือดขาว

การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว

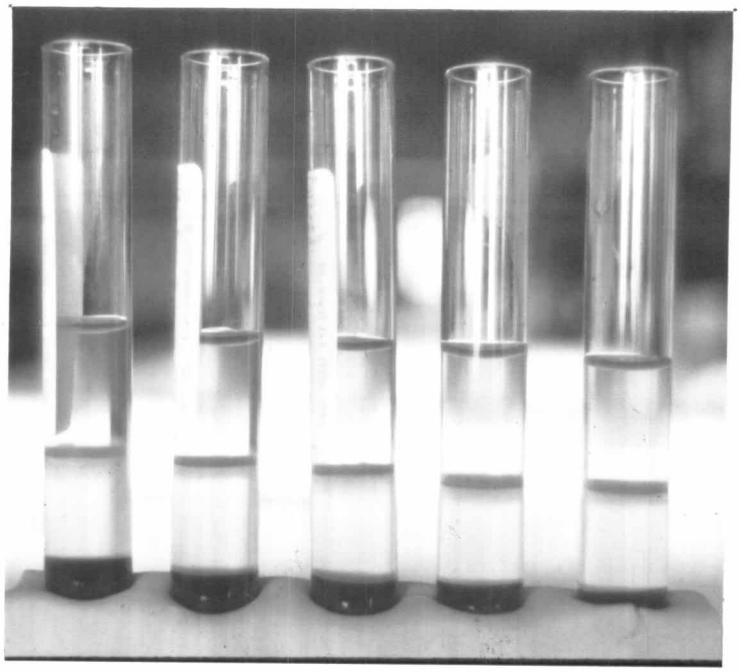
วิธีการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากเซลล์เม็ดเลือดจะใช้ Ficoll-paque มา ช่วย เพื่อให้ได้เซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีคุณภาพ Ficoll-paque เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย Ficoll 400 ซึ่งเป็นสารประกอบ พอลิเมอร์ของซูโครสมีน้ำหนักโมเลกุลสูงประมาณ 400,000 รวมกับสารโซเดียมไดอะไตรโซเอต (sodium diatrizoate) และสารแคลเซียมไดโซเดียมอีดีทีเอ (calcium disodium EDTA) และมีความหนา

แน่น 1.077 ± 0.001 กรัม/มล.หลักการในการแยกก็คือ เมื่อทำการปั่นแยกเซลล์เซลล์เม็ดเลือดแดงจะรวมตัวกันและเคลื่อนที่ผ่าน Ficoll-paque ตกลงสู่ก้นหลอดขณะที่เซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งมีความหนาแน่นไม่มากพอที่จะเคลื่อนที่ผ่าน Ficoll-paque จึงรวมกันอยู่เป็นชั้นระหว่างรอยต่อของชั้น Ficoll-paque กับพลาสมา

ในการทดลองจะปิเปตเลือดปริมาตร 2 มล.ลงในหลอดพลาสติกหรือหลอดแก้วที่เคลือบด้วยซิลิโคนผสมกับ 2 มล. ของ Balanced salt solution (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันปิเปต 3 มล. ของ Ficoll - paque ลงในหลอดแก้วที่เคลือบด้วยซิลิโคนค่อย ๆปิเปตเลือดที่เจือจางแล้ว (4 มล.) แล้วค่อย ๆปล่อยลงบนชั้นของ Ficoll-paque (3 มล.) อย่างช้า ๆทำเป็นชั้นดังรูปที่ 5 แล้วนำไปปั่นโดยใช้ความเร็ว 400 x g เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องเมื่อปั่นครบเวลาจะได้ส่วนต่าง ๆของเลือดแบ่งแยกกันเป็นชั้นดังในรูปที่ 6



รูปที่ 5 แสดงการเตรียมตัวอย่างเลือดที่ต้องการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยการใช้ Ficoll - paque



รูปที่ 6 แสดงส่วนต่าง ๆของเลือดที่แยกออกจากกันด้วย Ficoll-paque ภายหลังการปั่นที่ความเร็ว 400 x g เป็นเวลา 30 นาที

ดูดส่วนพลาสมาและเกล็ดเลือดทิ้งไป เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวไว้โดยเก็บไว้ในหลอดพลาสติก และเก็บแช่ที่อุณหภูมิ 4^{o} ซ หรือเก็บแช่แข็งจนกว่าจะนำมาทำการแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

การสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

นำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้มาสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Brown และคณะ (1989) และวิธีของ Koehler และคณะ (1988) ซึ่งในการทดลองนี้ได้ดัดแปลงวิธีการแยกสกัดดีเอ็นเอเป็น 2 วิธีดังแสดงในแผนผังที่ 2 และมีรายละเอียดตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

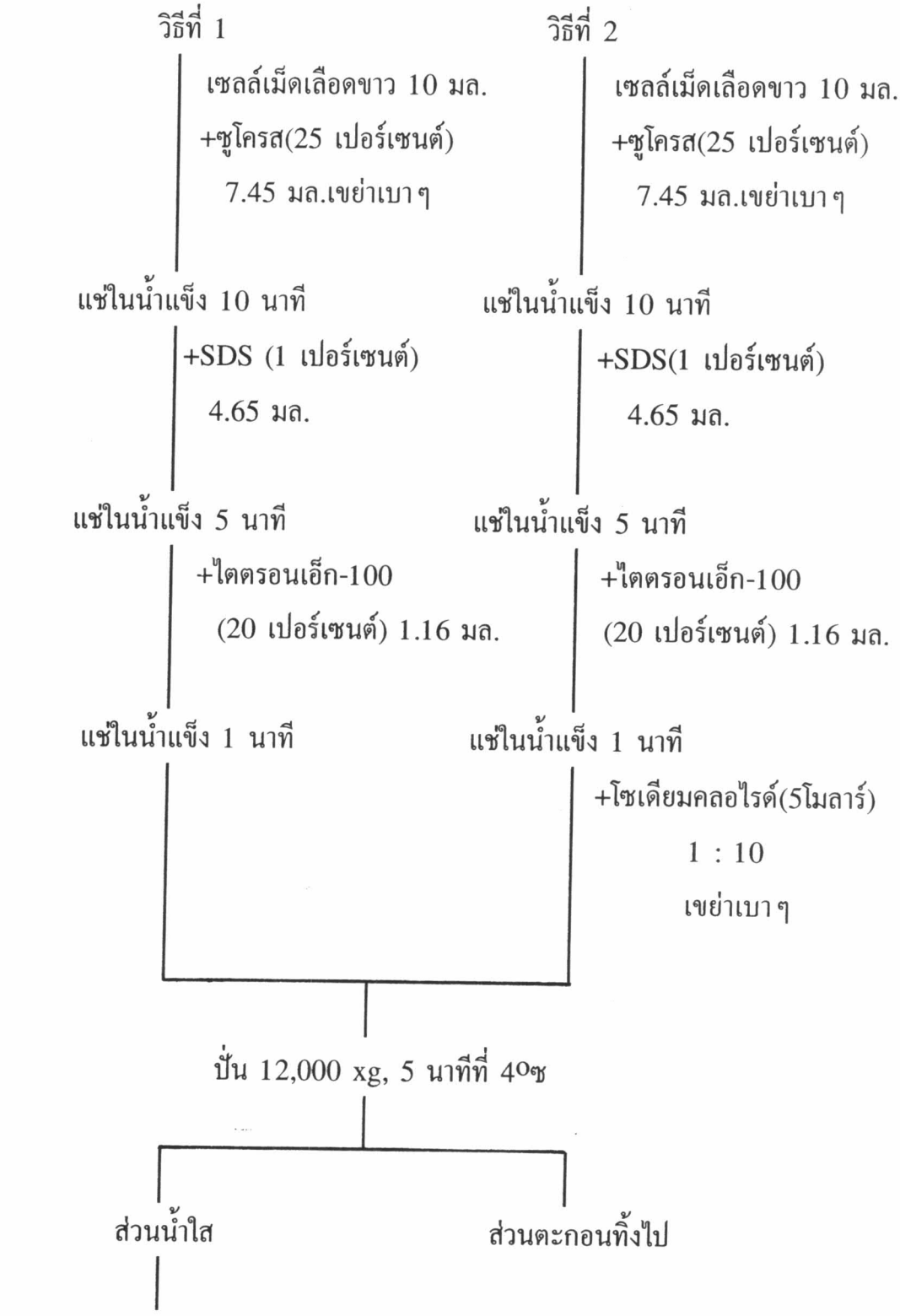
วิธีที่ 1

นำเซลล์เม็ดเลือดขาวมา10 มล.เติมสารละลายซูโครส (25 เปอร์เซนต์) 7.45 มล. (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 7 เปอร์เซนต์) เขย่าเบา ๆผสมให้เข้ากันแช่ในน้ำแข็งประมาณ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย SDS (1 เปอร์เซนต์) 4.65 มล.(ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2 เปอร์เซนต์) เขย่าเบา ๆโดยการกลับหลอดไปมาผสมให้เข้ากันให้ดี จะได้สารละลายใสที่มีความหนืดแช่ในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายไตตรอนเอ็ก-100 (20 เปอร์เซนต์) 1.16 มล.(ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 เปอร์เซนต์) เขย่าเบา ๆผสมให้เข้ากันทันทีแช่ในน้ำแข็งประมาณ 1 นาที แล้วนำไปปั่นในเครื่องปั่นเซนตริฟิวส์ เพื่อแยกดีเอ็นเอของโครโมโซมและเศษเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 x g เป็นเวลานาน 5 นาทีที่ 4^{o} ซ เมื่อครบเวลาในการปั่นแล้วใช้ปิเปตต์ดูดส่วนน้ำใส (supernatant) เก็บแยกไว้ในหลอดทดลองอันใหม่เพื่อนำไปสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซ เอมิลแอลกอฮอล์

วิธีที่ 2

ทำวิธีการทดลองเช่นเดียวกับวิธีที่ 1 ต่างกันที่ก่อนที่จะนำสารละลายทั้งหมดไปปั่นแยกที่ 12,000 x g จะนำมาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์(5 โมลาร์) ในอัตราส่วน 1:10 ผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำไปปั่นแยกดีเอ็นเอของโครโมโซมและเศษเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 5 นาทีที่ 4^{o} ซ เมื่อครบเวลาในการปั่นแล้วใช้ปิเปตต์ดูดส่วนน้ำใส (supernatant) เก็บแยกไว้ในหลอดทดลองอันใหม่เพื่อนำไปสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ด้วยสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

วิธีการสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ



แผนผังที่ 2

2. การสกัดดีเอ็นเอด้วยฟีนอล

นำส่วนน้ำใสที่แยกเก็บไว้มาเติมสารละลายฟีนอลอิ่มตัว (ภาคผนวก ข)ด้วยปริมาตรที่เท่ากับสารละลายดีเอ็นเอเขย่าเบา ๆผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาหลายครั้งประมาณ 5 นาที แล้วนำไปปั่นแยกชั้นน้ำและฟีนอลด้วยความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลานาน 10 นาที ดูดแยกสารละลายใสชั้นบนที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่ เติมสารละลายฟีนอลอิ่มตัว/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) ลงไปด้วยปริมาตรที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากันเบา ๆโดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นแยกชั้นเช่นเดิม ดูดแยกสารละลายใสชั้นบน นำไปทำการสกัดซ้ำด้วยปริมาตรที่เท่ากันของคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ล (24:1) อีก 2 ครั้งทำการแยกสารละลายโดยวิธีการปั่นเช่นเดิม ดูดแยกสารละลายใสชั้นบนครั้งสุดท้ายไว้ในหลอดทดลองอันใหม่ แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (5 โมลาร์)โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของโซเดียมคลอไรด์เป็น 0.1 โมลาร์ เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมแอบโซลุทเอธทานอลที่เย็นปริมาตรเป็น 2.5 เท่าของปริมาตรเดิมลงไปเขย่าให้เข้ากันนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20° ซ ค้างคืนหรือที่ -70° ซ ประมาณหนึ่งชม. ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลานาน 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทธานอล 70 เปอร์เซนต์ ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งหรือใช้ตู้อบสูญญากาศ ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มล. เติมสารละลายไรโบนิวคลีเอส (40 มก./มล.) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปเขย่าตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาหนึ่งคืน เติมสารละลาย SDS (5 เปอร์เซนต์) ปริมาตร 0.5 มล. แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (5 โมลาร์) ปริมาตร 0.55 มล. ทำการสกัดแยกดีเอ็นเอซ้ำด้วยสารละลายฟีนอลอิ่มตัว /คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ทำการปั่นแยกชั้นด้วยความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดแยกสารละลายใสชั้นบนเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (5 โมลาร์) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ โซเดียมคลอไรด์เป็น 0.1 โมลาร์ นำมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอลตามวิธีที่กล่าวข้างต้นล้างดีเอ็นเอด้วยเอทธานอล

ปล่อยให้แห้งหรือใช้ตู้อบสูญญากาศนำไปละลายด้วย บัฟเฟอร์ T (ภาคผนวก ก) โดยใช้ปริมาตรที่น้อยที่สุด

การตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

นำไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ TE แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ 260 และ 280 นาโนเมตรซึ่งถ้าดีเอ็นเอบริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนของ OD_{260}/OD_{280} มีค่าระหว่าง 1.65-1.85 กรณีที่อัตราส่วนที่ได้มีค่าต่ำกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนอื่นหรือฟีนอลปนเปื้อนอยู่ต้องนำไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอล หรือถ้าอัตราส่วนที่ได้มีค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่ายังมีอาร์เอ็นเอปะปนอยู่ต้องย่อยสลายอาร์เอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

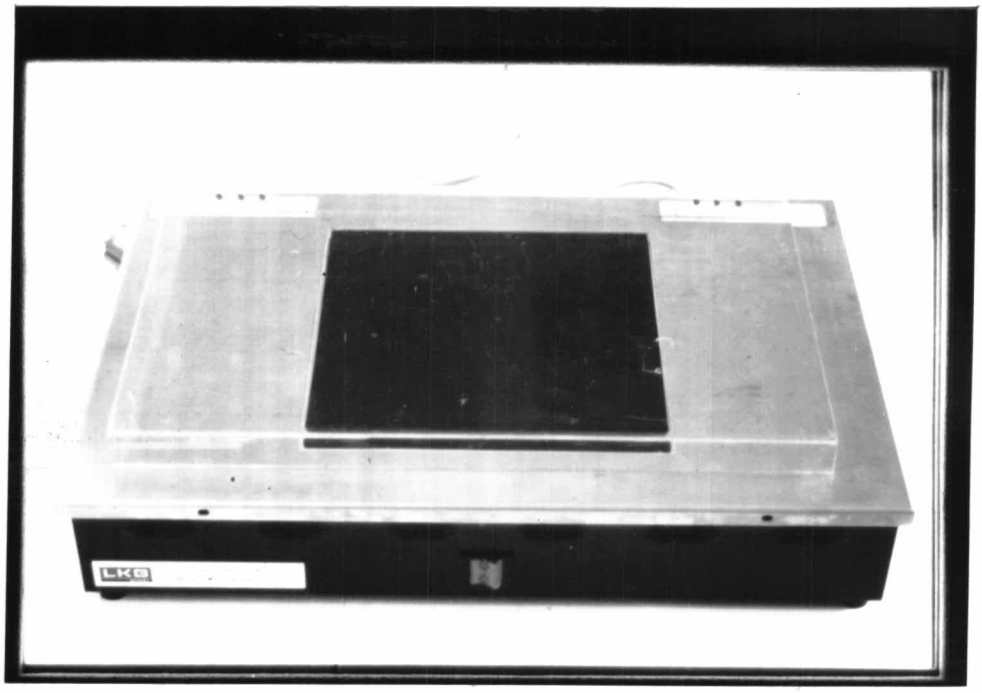
การวิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ 260 นาโนเมตรโดยค่า OD_{260} เท่ากับ 1 เทียบเท่ากับความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัม/มล. (Hopwood et al., 1985)

การวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

นำไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ความสมบูรณโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เทอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TB (ภาคผนวก ก) ลงในแบบพิมพ์ขนาด 7x10 ซม. ที่มีหวีเสียบอยู่ (รูปที่ 7) ปล่อยทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

รูปที่ 7 แสดงการเตรียมอะกาโรสเจล

เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วจึงดึงหวีออกแล้ว หยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกับสีติดตาม (tracking dye) ในอัตราส่วน 1:1 ลงในแต่ละหลุมของอะกาโรสเจลหลุมละประมาณ 10 ไมโครลิตรแล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซีสโดยให้ความต่างศักย์คงที่ที่สัดส่วน 8 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม.เป็นเวลานาน 1 ชม. 30 นาทีจากนั้นนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (2.5 ไมโครกรัมต่อ มล.ในบัฟเฟอร์ TB) แช่ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชม.แล้วล้างออกโดยการแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเจลที่ย้อมแล้วมาตรวจดูการเรืองแสง (Fluorescence) ของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเลตจากเครื่อง UV transilluminator (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 แสดงเครื่อง UV transilluminator

การตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

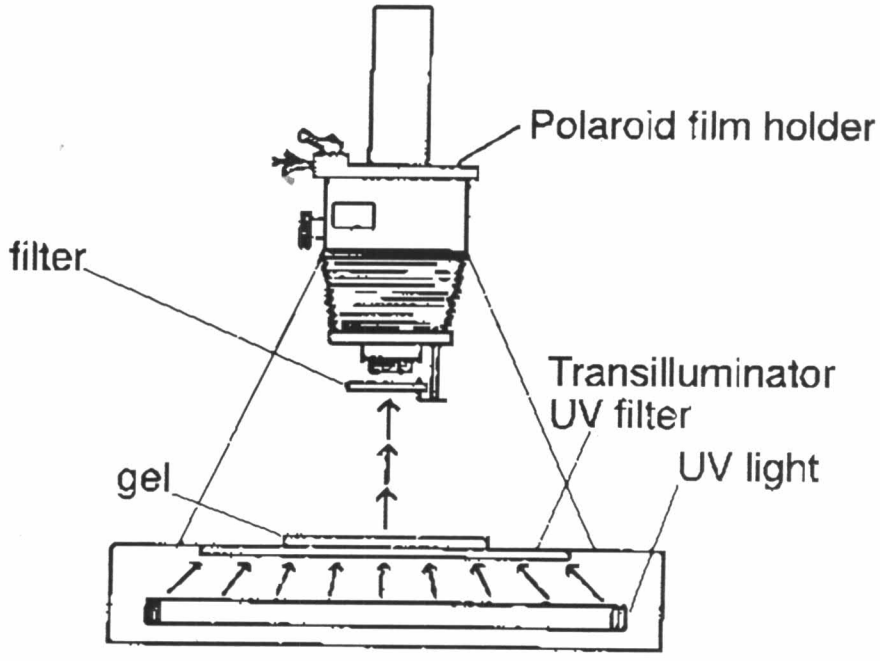
นำไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่แยกได้มาประมาณ 1 ไมโครกรัมทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I, *Bgl* I, *Eco*R I และ *Pst* I ที่มีความเข้มข้นดังที่จะระบุไว้ในผลการทดลอง ภายใต้ภาวะและบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดที่ใช้จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 20 ไมโครลิตรด้วยบัฟเฟอร์ T (ภาคผนวก ก) ดังตัวอย่างที่ แสดงไว้ในตารางที่ 1 ผสมให้เข้ากันโดยนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นขนาดเล็ก (microcentrifuge) 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 1 นาทีนำไปบ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37^{o} ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 15 ชม. แล้วนำมาเติมสีติดตามด้วยอัตราส่วน 5:1 (ปริมาตรทั้งหมด : สีติดตาม) และนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นขนาดเล็ก 6,000 รอบต่อนาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^{o} ซ จนกว่าจะนำมาทำการวิเคราะห์โดยการ อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

ตารางที่ 1 แสดงวิธีการเตรียมสารละลายต่าง ๆที่ใช้ในหลอดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

ชนิดของสาร	ปริมาตรที่ใช้(ไมโครลิตร)
ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ(กระบือปลัก/กระบือมูราห์)	2.84
10X high ionic strength buffer	2.00
*Bam*H I 6 หน่วย	2.00
น้ำกลั่นไร้เชื้อ	13.16

การวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

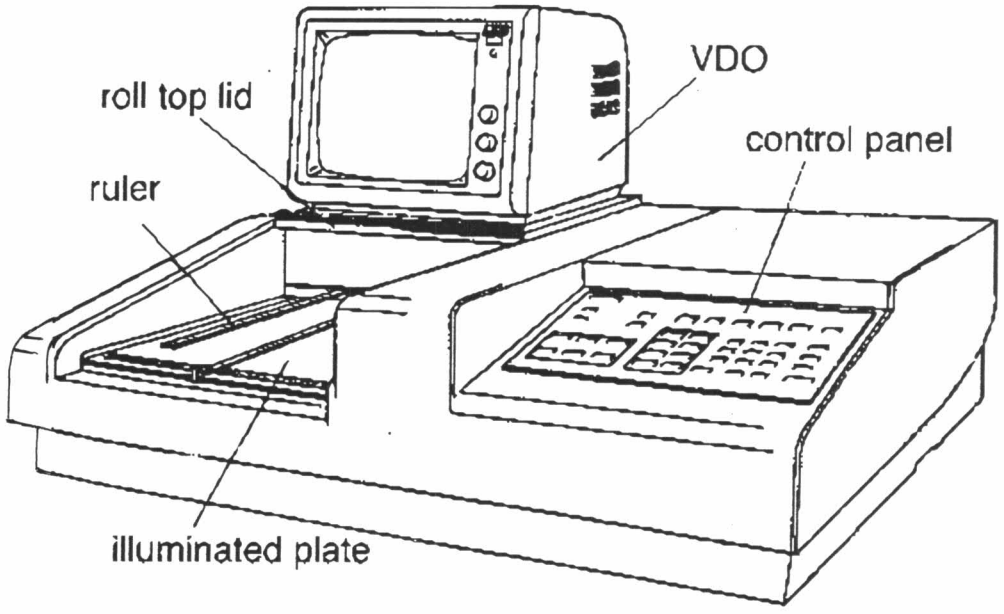
นำอะกาโรสเจลมา 1.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลอมในบัฟเฟอร์ TB และเทลงในแบบพิมพ์ขนาด 9 X 15 ซม. ที่มีหวีเสียบอยู่ เมื่อเจลแข็งตัวแล้วจึงดึงหวีที่เสียบอยู่ออกนำตัวอย่างสารละลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่เตรียมได้มาหยอดลงในหลุมโดยแต่ละหลุมจะมีปริมาณดีเอ็นเอหลุมละประมาณ 1 ไมโครกรัม จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ด้วยความต่างศักย์คงที่และภายในระยะเวลาตามที่ได้ระบุไว้ในผลการทดลอง หรือจนกระทั่งสีติดตามเคลื่อนเกือบถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่งหยุดกระแสไฟฟ้าแล้ว นำเจลไปแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (2.5 ไมโครกรัมต่อมล.ของบัฟเฟอร์ TB) แช่ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชม. จึงล้างด้วยน้ำกลั่นโดยแช่ทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นนำเจลที่ย้อมแล้วมาส่องดูการเรืองแสงของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเลต บันทึกผลโดยการถ่ายภาพด้วยฟิลม์ขาวดำไวแสง ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงวิธีการถ่ายภาพเจลจากเครื่อง UV transilluminator

การวิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

นำฟิลม์ที่ได้จากการถ่ายภาพขาวดำมาวัดตำแหน่งของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยการวัดความเข้มสีของแถบดีเอ็นเอ โดยอาศัยเครื่องวัดค่าความเข้ม (densitometer) ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงเครื่องวัดค่าความเข้ม (densitometer)

เครื่องวัดค่าความเข้มนี้จะประกอบด้วย แหล่งกำเนิดของแสงเลเซอร์เป็นหลอด Helium-Neon จะให้ลำแสงโมโนโครเมติกที่มีความยาวคลื่น 633 นาโนเมตร และโฟกัสลำแสงนี้ไปบนสารตัวอย่างเช่น แผ่นเจล หรือแผ่นฟิลม์เป็นต้น แล้วระบบเครื่องตรวจวัด (detector) และส่วนขยายสัญญาณ (amplifier) ก็จะเปลี่ยน photo current เป็นสัญญาณมิลลิโวลท์ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อเป็นสัญญาณดิจิตอล เข้าสู่ระบบคอมพิวเตอร์และถูกแปลเป็นค่าความเข้มของสารตัวอย่าง จากนั้นนำค่าความเข้มที่ได้มาคำนวณหาค่า Disc similarity coefficients(SD) โดยเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์กระบือปลักและกระบือมูราห์ ตามวิธีของ Sneath และ Sokal (1973) ดังสูตร

SD =สองเท่าของจำนวนแถบที่เหมือนกัน/จำนวนแถบทั้งหมด

I 16131411

การหาขนาดโมเลกุลของแถบดีเอ็นเอ

นำเจลที่ได้มาวัดระยะทางของแถบดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ และคำนวณหาขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งเขียนขึ้น จากค่าระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอมาตรฐานเฟจแลมป์ดา (λ/ *Hin*d III) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III และค่าลอการิทึมของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0 และ 0.6 กิโลเบส