

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ มีรายชื่อดังแสดงในตารางที่ 1 เชื้อทุกตัวเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมา streak บน nutrient agar (NA) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และเลือก single colony แล้วนำไปเพิ่มจำนวนใน NB 24 ชั่วโมง มาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเอาตะกอนเซลล์ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนการ stock เชื้อใช้ BHI broth และ RVS broth

ตารางที่ 4 ชนิดของเชื้อที่ใช้ในการตรวจสอบ

เชื้อที่ใช้ในการตรวจสอบ	
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Escherichia coli</i> 0157 H:7
<i>Salmonella typhi</i> B	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1466
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Salmonella paratyphi</i> B	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Escherichia coli</i> DMST 4212	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Vibrio cholerae</i>

โดยนำเชื้อชนิดต่างๆ มาทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงโดยใช้เครื่อง sonication แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford method เทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน จากนั้น นำโปรตีนของแต่ละเชื้อปริมาณเท่ากันจึงนำไปในการทดลองต่อไป

2. แอนติบอดี

แอนติบอดีที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มีทั้งหมด 2 ชนิด นำมาจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดขอนแก่น ได้แก่ Anti-Salmonella O polyvalent A-I และ Anti-Salmonella O group B

3. การเตรียมเชื้อให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากันก่อนนำไปทดสอบ

ก่อนที่จะพัฒนาให้เป็น strip จำเป็นต้องตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่มีต่อโปรตีนในเชื้อชนิดต่างๆ โดยนำเชื้อชนิดต่างๆ มาทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงโดยใช้เครื่อง sonication แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford เทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน จากนั้น นำโปรตีนปริมาณเท่ากันของแต่ละเชื้อมาแยกแถบโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยเตรียม separating gel ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง จากนั้นเตรียม stacking gel ทำการ load ตัวอย่าง ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 150 volt จนกระทั่ง dye front เคลื่อนไปสู่จุดเจล จากนั้นย้อมด้วย coomassie blue R250 นาน 30 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วย destaining solution ในแต่ละเชื้อชนิดต่างๆ ให้แถบโปรตีนมากมาย และปริมาณโปรตีนของแต่ละเชื้อ น่าจะมีปริมาณพอๆ กัน จากนั้น นำไปตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีชนิดต่างๆ ต่อเชื้อชนิดต่างๆ ต่อไป

4. การเตรียมเชื้อให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากันก่อนนำไปทดสอบด้วยแอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting

ในการตรวจสอบความเป็นไปได้ในการพัฒนา strip โดยใช้แอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting ก่อนที่จะพัฒนาเป็น strip โดยนำเชื้อชนิดต่างๆ มาทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford เทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน จากนั้น นำโปรตีนของแต่ละเชื้อปริมาณเท่ากันคือ 1 ไมโครกรัม มาหยดลงบนแผ่น nitrocellulose (NC) จากนั้นย้อมแผ่นด้วย coomassie blue R250 นาน 30 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วย destaining solution โดยใช้แอนติบอดีชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting ต่อไป

การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดี และความสามารถของแอนติบอดีที่จะนำไปพัฒนาเป็น Salmonella Strip ก่อนที่จะนำ แอนติบอดีที่ซื้อมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ไปพัฒนาเป็น Salmonella Strip เพื่อใช้ตรวจเชื้อ Salmonella จำเป็นต้องมีการตรวจสอบความจำเพาะของ Anti-Salmonella O polyvalent A-I, Anti-Salmonella O group B, แอนติบอดีที่ผลิตขึ้น และเชื้ออื่นๆ ด้วยวิธี western immunoblotting และ dot-blotting เสียก่อน

5. วิธีการใช้แอนติบอดีตรวจโปรตีนของเชื้อ *Salmonella*

5.1 เตรียมโปรตีนเพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูถีบจักร โดยทำการแยกโปรตีนของเชื้อ ด้วยวิธี SDS-PAGE ดังรายละเอียดต่อไปนี้

- เทสารละลายสำหรับเตรียม separating gel (9%T acrylamide/Bis, 0.375 M Tris HCl, pH 8.8, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 0.05% ammonium persulphate, 0.05% TEMED) ใส่ลงระหว่างแผ่นกระจกของชุดเตรียมเจล แล้วหยดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าของสารละลายผสม ปล่อยให้แห้งตัวอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิด polymerization อย่างสมบูรณ์

- เตรียม stacking gel (4%T acrylamide/Bis, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.06% ammonium persulphate, 0.31% TEMED) เทลงเหนือ separating gel ซึ่งเทหน้าออกแล้ว จากนั้นเสียบ comb ลงไป ปล่อยให้แห้งตัว

- ผสมตัวอย่างกับ solubilizing solution (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% glycerol, 1% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue) จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเดือดนาน 2 นาที แล้ว load ลงในหลุมเจล

- ต่อ electric chamber เข้ากับ power supply แยกโปรตีนโดยใช้ความต่างศักย์คงที่ 150 V ในสารละลาย electrode buffer (25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 0.1% SDS) จนกระทั่งแถบของ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปเกือบสุดของปลายแผ่นเจล

- แกะแผ่นเจลออกจากกระจก ตัดส่วนที่เป็น stacking gel ทิ้งไป

- ย้อมเจลด้วย staining solution (0.1% coomassie brilliant blue R-250 ใน 40% methanol, 10% acetic acid) นานแค่พอเห็นแถบโปรตีน

- ล้างด้วย destaining solution (40% methanol, 10% acetic acid) จนเห็นแถบโปรตีน

- ตัดเจลตรงตำแหน่งโปรตีนที่ต้องการใส่ microtube เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำเจลให้แห้งด้วย lyophilizer จนกระทั่งเจลแห้งกรอบนำเจลมาบดละเอียดในโกร่ง และเก็บใน desiccators

5.2 การผลิตแอนติบอดี

- เจาะเลือดหนูถีบจักรเพื่อเก็บเป็น pre-immunized serum โดยใช้ micropipette ขนาด 100 ไมโครลิตร ที่ rinse ด้วย 1 unit/ml heparin เพื่อช่วยป้องกันเลือดแข็งตัว

- นำเจลที่บดละเอียดแล้วมาทำให้พองตัวด้วย PBS buffer (135 mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 2.5 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4)

- สำหรับการฉีดหนูครั้งแรกจะ emulsify เจลที่พองตัวกับ complete Freund's adjuvant อัตราส่วน 1:1 ด้วย sonicator
- ฉีดหนูลึบจักรด้วย emulsion ของ antigen ที่เตรียมได้ใต้ผิวหนังบริเวณต้นคอ และแผ่นหลัง 3-4 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร
- กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีภายหลังการฉีดหนูครั้งแรก 2 สัปดาห์ ด้วยการนำเจลที่บดละเอียดมาเตรียม emulsion กับ incomplete Freund's adjuvant อัตราส่วน 1:1 เท่า
- หลังการฉีดหนู 3 วัน เก็บเลือดด้วย retro-orbital plexus bleeding technique แล้วเก็บเลือดไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง
- ปั่นเลือดด้วยความเร็ว 2700 g ที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บซีรัมไว้ที่ -65 องศาเซลเซียส

- นำซีรัมที่ได้ไปตรวจหาค่าไตเตอร์ด้วยวิธี Western immunoblotting และ Dot blotting หากค่าไตเตอร์ยังไม่สูงพอจะต้องทำการฉีดกระตุ้นซ้ำ โดยเว้นระยะการฉีดทุก 2 สัปดาห์

5.3 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี western immunoblotting

- ทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE
- ย้ายโปรตีนจากเจลลงบนแผ่น nitrocellulose โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 150 mA ต่อหนึ่งเจลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ใน blocking solution แล้ว incubate ข้ามคืนที่
- ตัดแผ่น nitrocellulose เฉพาะตรงตำแหน่งที่ load สารละลายโปรตีนมาตรฐานไปข้อมด้วย 0.1% amido black (ใน 45% methanol, 10% acetic acid) ส่วนที่เหลือนำไปแช่ในซีรัมที่เจือจางด้วย blocking solution อัตราส่วนต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ล้างแผ่น nitrocellulose ด้วย TBST 3 ครั้ง, ครั้งละ 5 นาที
- แช่ใน mouse IgG linked with alkaline phosphatase ที่เจือจางด้วย TBST อัตราส่วน 1:500 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และ TBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- แช่แผ่น nitrocellulose ใน substrate buffer pH 9.5 (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) 2 ครั้ง
- แช่ในสารละลาย AP conjugated substrate kit (Amersham^R) จนกระทั่งสังเกตเห็นแถบสีม่วงปรากฏขึ้น
- หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

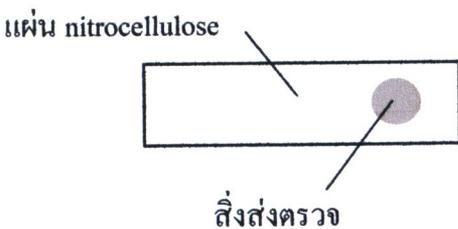


5.4 การตรวจการจับกันระหว่างเชื้อแบคทีเรีย ของแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี

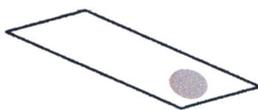
Dot blotting

- ทำการแยกหยดโปรตีนของแบคทีเรียลงบนแผ่น nitrocellulose ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- จากนั้น นำไปแช่ใน blocking solution แล้ว incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ตัดแผ่น nitrocellulose เฉพาะตรงตำแหน่งที่ load สารละลายโปรตีนมาตรฐานไปย้อมด้วย 0.1% amido black (ใน 45% methanol, 10% acetic acid) ส่วนที่เหลือนำไปแช่ในซีรัมที่เจือจางด้วย blocking solution อัตราส่วนต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ล้างแผ่น nitrocellulose ด้วย TBST 3 ครั้ง, ครั้งละ 5 นาที
- แช่ใน goat anti-mouse IgG antibody linked with alkaline phosphatase ที่เจือจางด้วย TBST อัตราส่วน 1:500 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และ TBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- แช่แผ่น nitrocellulose ใน substrate buffer pH 9.5 (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) 2 ครั้ง
- แช่ในสารละลาย AP conjugated substrate kit (Amersham®) จนกระทั่งสังเกตเห็นแถบสีม่วงปรากฏขึ้น
- หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

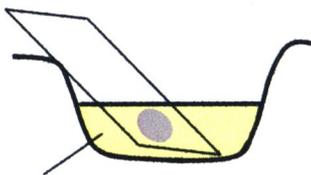
6. นำสิ่งส่งตรวจมาทดสอบกับ antibody



6.1 ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยคลื่นเสียงหรือในโฮโมจีไนเซอร์ แล้วหยดลงไปแผ่น nitrocellulose ซึ่งตัดเป็นเส้น strip

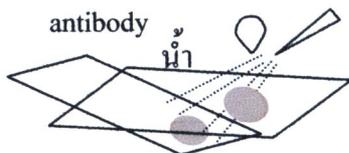


6.2 ทิ้งไว้สักครู่จนเกือบแห้ง เพื่อให้โปรตีนติดกับ strip



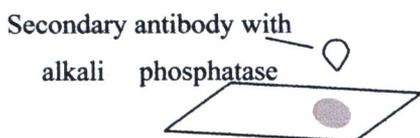
Skim milk solution

6.3 นำ strip ไป block ด้วยสารละลาย
blocking solution

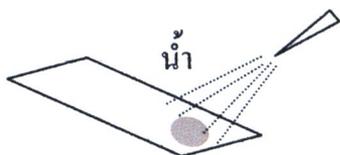


6.4 บน strip แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

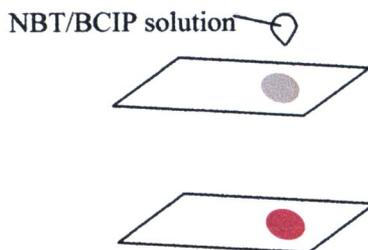
6.5 ฉีดล้าง strip ด้วยน้ำกลั่น

Secondary antibody with
alkali phosphatase

6.6 สารละลายแอนติบอดีตัวที่ 2 ที่มีเอนไซม์
ติดอยู่มาหยดลงบน strip แล้วทิ้งไว้
เป็นเวลา 10 นาที



6.7 ฉีดล้าง strip ด้วยน้ำกลั่น



NBT/BCIP solution

6.8 นำ strip ไปแช่ในสารละลาย substrate ของ
alkali phosphatase คือ NBT/BCIP เป็น
ระยะเวลาประมาณ 5 นาที จะปรากฏสี
น้ำตาลปนม่วงขึ้นมา

7. การตัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย

7.1 ทำการเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 18 สายพันธุ์ ในอาหาร Nutrient broth (NB) ปริมาตร 50 mL ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่ความเร็วรอบ 160 rpm

7.2 นำเชื้อแบคทีเรียมาปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 13,000 g เป็นเวลา 5 นาที

7.3 ล้างตะกอนเซลล์ด้วย TE buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,000 g เป็นเวลา 10 วินาที

7.4 นำตะกอนเซลล์มาเติม lysozyme ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 2X pronase buffer (20 mM Tris, 20 mM EDTA, 300 mM NaCl) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

7.5 เติม 2X lysis buffer (4 mg/ml pronase in 4 % SDS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7.6 เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าขึ้นลงเบา ๆ ปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 g เป็นเวลา 5 นาที (สกัด 2 ครั้ง)

7.7 ควบส่วน supernatant ไปยัง micro tube อันใหม่ เติม 0.1 M NaCl (final concentration) และ absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตร supernatant ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา ทิ้งให้ดีเอ็นเอตกตะกอนสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

7.8 ปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอ โดยการ centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,000g เป็นเวลา 10-15 นาที

7.9 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % alcohol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,000 g เป็นเวลา 5 นาที ควบเอาส่วน 70 % alcohol ทิ้งไป

7.10 ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (air dry) จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE:Rnase

7.11 ทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของโครโมโซมของเชื้อทั้ง 18 สายพันธุ์ บน agarose gel electrophoresis (0.8 เปอร์เซ็นต์) และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide

8. วิธีการใช้ DNA probe เพื่อตรวจจับ DNA ของเชื้อ *Salmonella*

8.1 ออกแบบ DNA probe ให้มีความจำเพาะสูงสุดกับ DNA ของเชื้อแต่ละชนิด โดยอาศัยข้อมูลจากฐานข้อมูลที่มีในต่างประเทศมาประกอบ

8.2 สังเคราะห์ DNA probe ให้มีความยาวราว 50 base pair และติด probe ไว้ด้วยสาร biotin

9. การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายโดยวิธี southern blot hybridization

9.1 นำแผ่น nitrocellulose ชนิด hybom ทำการหยด DNA ที่สกัดได้นำไปหยดจำนวน 1 ไมโครลิตร ทำให้แห้งด้วยความร้อนแห้ง ทำการ Fix ด้วยรังสี UV เป็นเวลา 2 นาที

9.2 นำแผ่น nitrocellulose ชนิด hybom ข้างต้น ไป Pre-hybridization (5X SSC, 0.1%N-lauroylsarcosine, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 2% blockion reagent) ในถุงพลาสติกทึบร้อน ดังนี้ เติม hybridization buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อแผ่นไนลอน 100 ตารางเซนติเมตร ปิดปากถุงให้สนิทด้วยเครื่องปิดปากถุง

9.3 นำไปบ่มพร้อมเขย่าเบาๆ ใน เครื่อง water bath shaker ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

9.4 ก่อนสิ้นสุดเวลาการ Pre-hybridization เตรียม Hybridization buffer (5X SSC, 0.1%N-lauroylsarcosine, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 2% blockion reagent, 50% formamide) นำ สารละลาย SalI probe ที่เตรียมไว้ 8 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ปิดฝานำไปต้มใน น้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นจัดโดยทันทีเป็นเวลา 10 นาที เติม Hybridization buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน เมื่อครบเวลา Pre-hybridization แล้วเททับ buffer ในถุงออก แล้วเติม Hybridization buffer ที่มี DNA probe ลงในถุงให้สนิทด้วยเครื่องปิดปากถุง

9.5 นำไปบ่มพร้อมเขย่าเบาๆ ใน เครื่อง water bath shaker ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

9.6 นำแผ่น nitrocellulose ลงแช่ในสารละลาย 1X maleic acid (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย NaOH) เป็นเวลา 5 นาที

9.7 ย้ายแผ่น nitrocellulose ลงแช่ในสารละลาย 1X blocking solution (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% skim milk) เขย่าเบาๆ บนเครื่อง Shaker เป็นเวลา 30 นาที

9.8 ย้ายแช่ใน 1X blocking solution ที่เติม streptavidin-alkaline phosphatase อัตราส่วน 1: 500 เท่า บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

9.9 ล้างด้วย 1X maleic acid with tween 20 (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween 20 ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย NaOH) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และ 1X maleic acid 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

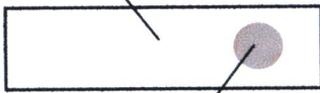
9.10 แช่แผ่น nitrocellulose ใน substrate buffer pH 9.5 (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) 2 ครั้ง

9.11 แช่ในสารละลาย AP conjugated substrate kit (Amersham®) จนกระทั่งสังเกตเห็น แถบสีม่วงปรากฏขึ้น

9.12 หยดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

10. นำสิ่งส่งตรวจมาทดสอบกับ DNA probe

แผ่น



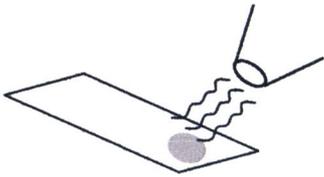
สิ่งส่งตรวจ

10.1 หยดหรือป้ายหรือแตะสิ่งส่งตรวจลงไปบนแผ่น nitrocellulose ซึ่งตัดเป็นเส้น strip

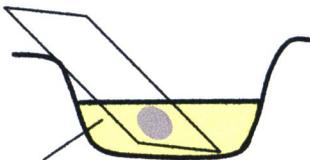
sodium



10.2 นำไปหยดด้วย sodium hydroxide เพื่อย่อยเซลล์และ denature DNA



10.3 ทำให้ DNA ติดอยู่กับ strip ด้วยความร้อนจาก air dryer



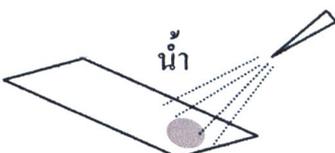
Denhardt solution

10.4 นำ strip ไป block ด้วยสารละลายเดนฮาร์ด

DNA probe



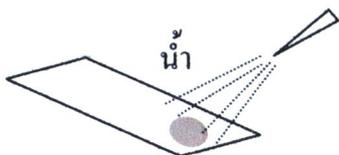
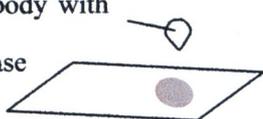
10.5 นำสารละลาย DNA probe มาหยดลงบน strip แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที



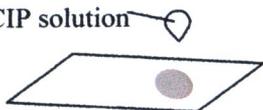
น้ำ

10.6 ฉีดล้าง strip ด้วยน้ำกลั่น

Secondary antibody with
alkali phosphatase



NBT/BCIP solution



10.7 นำสารละลาย streptavidin ที่มีเอนไซม์ alkali phosphatase ติดอยู่มาหยดลงบน strip แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

10.8 ฉีดล้าง strip ด้วยน้ำกลั่น

10.9 นำ strip ไปแช่ในสารละลาย substrate ของ alkali phosphatase คือ NBT/BCIP เป็นระยะเวลาประมาณ 5 นาที จะปรากฏสีน้ำตาลปนม่วงขึ้นมา