บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

2.1.1 อุปกรณ์

ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) model 3173 บริษัท Forma Scientific, U.S.A.

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath) model 01-PF-623 บริษัท Heto,Japan

เครื่องเขย่า (Vortex) Vortex-Genin model K-550-GE บริษัท Scientific Inidustries, U.S.A.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Eppendroff centrifuge) model Tomy Mc-15-A. U.S.A.

เครื่องปั่นความเร็วสูง (Beckman refrigerated centrifuge) model J21-c บริษัท Beckman Instrument Inc. Fullerton, California, U.S.A.

เครื่องปั่นความเร็วสูง (Ultra centrifuge centrifuge) model Rp-42, RPS 27-2 MFG No 55P-72 บริษัท Hitachi Koki, Japan

เครื่องปั่นความเร็วสูง (Refrigerated centrifuge) model RS-20 IV บริษัท Tomy Srijo, Japan

เครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะ (Top bench centrifuge) model 35 ของ Me, England

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectronic 20) บริษัท Basch & Lomb, U.S.A.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophometer UV visible recording) model UV-240 บริษัท Shimadzu, Japan

ตู้เก็บตัวอย่างอุณหภูมิต่ำ (-20 องศาเซลเซียส) รุ่น F0535 บริษัท Sanyo Electric Co., Ltd., Japan

ตู้แช่แข็ง (Freezer -70 องศาเซลเซียส) ของ Forma Scientific, U.S.A.

เครื่องมือและอุปกรณ์โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโพรีซีส

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) model,2301 บริษัท Maruzen Biochemical Co., Japan

เจลแชมเบอร์ สำหรับ First และ Second electrophoresis พร้อมสายไฟ

ไมโครปิเปต (pipetman) และ tip ของ Gilson, Medical electronics, France

ชุดอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเซลและตรวจสอบเชื้อไวรัส ประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงเซลแบบ 24 หลุม ขวดเพาะเลี้ยงเซลขนาด 25 มล. จานหลุมทดสอบขนาดเล็กชนิดก้นมน (microplate U-type), Komagome pipette สำหรับกระจายเซล และกล้อง Inverted Microscope, Japan

แผ่นกระจกคู่ ขนาด กว้างxยาว 20x24 ซม. หนา 2 มม. สำหรับ First dimension

แผ่นกระจกคู่ ขนาด กว้างxยาว 24x29 ซม. หนา 2 มม. สำหรับ Second dimension

คลิบหนีบ eppendorf tube, Syringe และ needle

เครื่องกวนพร้อมแท่งคน (Magnetic bar)

แผ่นฟิล์มเอกซ์เรย์

โพลิเอทธิลีน

กล้องถ่ายรูปโพลารอยด์

ถาดอลูมิเนียมใส่น้ำยาล้างแผ่นฟิล์ม

ห้องมืด (Dark room) สำหรับล้างฟิล์ม

กล่องกำเนิดแสง (Light box)

กระดาษลอกลาย ดินสอ steadler 6B

แผ่นฟิล์มฟิงเกอร์พรินติง ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธ์อ้างอิง

2.1.2 <u>กาซ</u>

คาร์บอนไดออกไซด์ บริษัท ลิควิด คาร์บอนิค ประเทศไทย จำกัด

2.1.3 <u>เคมีภัณฑ์</u>

2.1.3.1 ส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้แยกเชื้อไข้หวัดใหญ่ตัวอย่าง

ก. Bovine Serum Albumin (BSA), crystallized and lyophilized, จากบริษัท Sigma, St. Louis, U.S.A.

ข. Gentamycin

ค. Fungizone

ง. Fetal bovine serum

จ. Beef extract

ฉ. Trypsin (Difco)

2.1.3.2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลเพาะเชื้อ

ก. 10x Gibco MEM medium

ข. Folic acid

ค. TC Vitamin

ง. Biotin

จ. Bovine albumin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.3.3 น้ำยาสำหรับทดสอบฮิมแอคกลูตินิน อินฮิบิชัน

ก. เชื้อไข้หวัดใหญ่อ้างอิง

A/Yamagata/32/89 (H1N1)

A/Taiwan/1/86 (H1N1)

A/Hokkaido/20/89 (H3N2)

A/Sichuan/2/87 (H3N2)

A/Shanghi/11/87 (H3N2)

B/Victoria/2/87

B/Yamagata/16/88

ข. Receptor destroying enzyme

ค. เลือดไก่ อายุการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.3.4 ชุดน้ำยาสำเร็จรูปทดสอบนิวรามินิเดสอินฮิบิชัน สั่งซื้อจากบริษัท Pharmacia

2.1.3.5 ส่วนประกอบของสารใช้ติดฉลาก (Labelling) อาร์เอนเอไวรัส

ก. สารรังสี (α^{32}-P) ATP บริษัทวิทยาคม รหัสมีกัมมันตภาพรังสี 250 ยูซีไอ

ข. เอนไซม์ Polynucleotide kinase รหัส 174645 200 ยูนิต สั่งซื้อจาก บริษัทชัชรีย์

ค. เอนไซม์ RNase T1 บริษัท Sankyo 500 ยูนิต/มล.

ง. Digestion buffer (Tris HCI 20 mM, EDTA 2 mM)

จ. Kinasing buffer (Tris HCI 10 mM, $Mg(OAC)_2$ 10 mM, DTT 1 mM)

ฉ. Stop buffer (Yeast RNA 20 mg, O.M $AcoHN_4$ 10 ml)

ช. Running Mixture (Bromphenol blue, Xylene cyanal, glycerol)

2.1.3.6 สารเคมีอื่น ๆ

ก. Tris (hydroxymethyl amino methane บริษัท Sigma

ข. Bis (N,N-Methylene-bis-Acrylamide) M 7256 บริษัท Sigma

ค. TEMED (N,N,N,N-tetramethylenediamine T 9281 บริษัท Sigma

ง. Acrylamide (A 3553) บริษัท Sigma

จ. Urea สำหรับเตรียมเจลใช้ 500 กรัม (U 5378) บริษัท Sigma Urea สำหรับเตรียมบัฟเฟอร์ใช้ 1 กิโลกรัม บริษัท Merck)

ฉ. เอนไซม์ Protenase K (100 มก/20 มล.) รหัส T 8133 บริษัท Sigma

หมายเหตุ สารเคมีข้างต้นบางส่วนได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.เค เนรีรเมและ ดร.รยชิรอกะ แห่งกองวิจัยไวรัส กรมวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี ส่วนสารเคมีอื่นนอกเหนือจากนี้เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Difco Laboratories, Detroit.U.S.A. ได้แก่

ช. Sodium hydrogencarbonate

ซ. Potassiun dihydrogencarbonate

ฌ. Sucrose

ญ. Sodium chloride

ฎ. Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ฏ. Magnesium chloride

ฐ. Lithium chloride

ฑ. Chloroform in isoamyl alcohol

ฒ. Distilled phenol saturated with double distilled water

ณ. Absolute ethanol

ด. Citric acid

ต. Ascorbic acid

ถ. Hydrogen peroxide

ท. Ferric sulphate

ธ. Ammonium persulphate

น. Boric acid

2.1.3.7 ชุดน้ำยาล้างฟิลม์ X-ray ประกอบด้วยสารละลาย Fixer และ สารละลาย developer เป็นผลิตภัณฑ์ของ Kodak

2.2 เซลเพาะเลี้ยง

2.2.1 <u>เซลจากไตสุนัข</u> diploid cell line จาก Madin-Darby Canine Kidney หรือ MDCK cell ได้รับการอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยไวรัส กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (National Institute of Health) จ.นนทบุรี และจากภาควิชาจุลชีววิทยา รพ.ศิริราช

2.2.2 <u>ถุงอัลแลนโตอิค</u> ในไข่ไก่ฟักอายุ 10-11 วัน บ่มในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.3 การเตรียมเซลเพาะเลี้ยง (33,34)

2.3.1 <u>การเก็บรักษาเซลเพาะเลี้ยง</u>

ล้าง MDCK cell culture ที่มีอายุ 3 วัน ด้วยฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาไลน์ (PBS) ทำทริปซิไนส์เซลล์ด้วยสารละลาย 0.25% trypsin-EDTA เมื่อเซลล์หลุดจากขวดเติมอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร 1X MEM (35) ลงไป

10-15 มล. นำไปปั่นกับเซลด้วยความเร็ว 1,500-2,000 rpm 5 นาที เก็บตะกอนเซลออกมาเติมสูตรอาหารเดิมลงไปอีก 3 มล. กระจายตะกอนเซล แล้วนำมานับแล้วปรับให้มีจำนวนเซลไม่ต่ำกว่า $1x10^5$-$1x10^6$ เซลล์/มล. โดยเติมสารละลายอาหารให้ได้สัดส่วนกัน (ใน 1X MEM จะมี DMSO 10% และ FBS 20%) จากนั้นแบ่งเก็บในหลอด หลอดละ 1 มล. ที่ -70 องศาเซลเซียส

2.3.2 <u>การนำเซลที่เก็บแช่แข็งมาใช้</u>

นำเซลที่ -70 องศาเซลเซียสออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย ดูดขึ้นใส่หลอดปั่นโดยเติมสารละลายอาหาร 1X MEM ลงไป 10-15 มล. นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500-2,000 rpm 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเทส่วนน้ำทิ้ง เติมสารละลายอาหารลงไปใหม่ 5 มล. (สูตร 1X MEM ที่มี 10% FBS) กระจายตะกอนเซลและถ่ายลงขวดขนาดเล็ก (ขนาด 25 มล.) ขวดละ 5 มล. บ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณกาซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 35.5 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนเฉพาะอาหารในวันรุ่งขึ้น

2.3.3 <u>การพาสเซสเซลล์</u>

ล้างเซลในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 มล. ด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาไลน์ 3 มล.ทริปซีไนส์ด้วยสารละลาย 0.25%trysin-EDTA 1 มล.(36) นำไปบ่มไว้ที่ตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที เซลจะเริ่มลอกหลุดจากผิวขวดเพาะ นำออกมาเติมสารละลายอาหาร 1X MEM ที่มี 10% FBS 25 มล. และแบ่งใส่จานเพาะเซล 24 หลุมโดยให้มีปริมาตรหลุมละ 1 มล.

2.4 การเพาะเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

ดูดสารละลายอาหารจากจานเพาะ 24 หลุม โดยใช้ ซัคชัน ปั๊ม (suction pump) ต่อกับปิเปตร์ทิ้ง เติมสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาไลน์หลุมละ 1 มล. เพื่อทำความสะอาดผิวเซล ดูดทิ้งและเติมสารละลายจากตัวอย่าง throat swab จำนวน 2 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง 0.1 และ 0.2 มล. ต่อหลุม

ตามลำดับ บ่มที่ตู้อบอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 30 นาทีก่อนนำออกมาเติมสารละลายอาหารสูตร 2X MEM (35) หลุมละ 1 มล. หลังจากนั้นนำไปอินคิวเบตต่อ และติดตามการเกิด Cytophatic effect (37) และทำการทดสอบปฏิกริยาฮีมแอคกลูตินินทุกวัน

หมายเหตุ ผลบวก หมายถึง การเกิดการจับตัวระหว่างเชื้อไวรัสกับรีเซพเตอร์ (receptor) บนผิวเม็ดเลือดแดง (38) ทำให้เซลเม็ดเลือดแดงเข้ามาเกาะกลุ่มเป็นเม็ดเล็กๆ (granule) กระจายอยู่ที่ก้นหลุมฟอร์มเป็น shield

ผลลบ หมายถึง การไม่พบว่ามีเชื้อไวรัส หรือการที่เชื้อไวรัสนั้นไม่สามารถagglutinate เม็ดเลือดแดง ทำให้เซลเม็ดเลือดแดงตกตะกอนที่ก้นหลุมฟอร์มเป็น button

2.4.1 <u>การตรวจหาระดับหรือกำลังความเข้มข้นของไวรัส ที่ทำปฏิกริยาฮีมแอคกลูตินิน (HA titer) (34)</u>

เจือจางไวรัสจาก specimen หลุมที่ให้ผลบวกในการทดสอบปฏิกิริยาฮีมแอคกลูตินิน ให้มี dilution ต่างๆ กันเช่นเป็นแบบ 2 เท่า serial dilution (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128...etc) โดยดูด specimen มาหลุมละ 50 ไมโครลิตร เจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาไลน์ พีเอส 7.2 ทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร หยด 0.05% เลือดไก่แดงหลุมละ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง อ่านผลเมื่อครบ 30 นาที

<u>หมายเหตุ</u>

1. อาจใช้ 10 fold dilution ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความแรงของไวรัสที่ให้ผลบวกในปฏิกิริยาฮีมแอคกลูตินิน

2. เมื่อเริ่มมี HA titer จะต้องเช็คระดับ titer ทุกวันว่าขึ้นสูงสุดเท่าใด

2.4.2 การตรวจพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงจากการติดเชื้อไวรัส

สังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องอินเวอร์ตเทด ไมโครสโคป (inverted microscope) กำลังขยายต่ำภายใน 3 ถึง 4 วันหลังการเพาะเชื้อ เริ่มจากการเพิ่มขึ้นของจุดเล็ก ๆ จำนวนมากภายในเซลล์ เซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นและค่อนข้างกลม ผนังเซลล์เริ่มบางลงและถูกทำลาย การเรียงตัวกระจายอยู่เป็นกลุ่ม ๆ อย่างหลวม ๆ ไม่หนาแน่นเหมือนเซลล์ปกติ เนื่องจากเซลล์แตกและหลุดลอกออก

2.5 การจำแนกชนิดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยวิธีทาง Serology (39)

2.5.1 การจำแนกชนิด (type) และชนิดย่อย (Subtype) ของไวรัสโดยการทดสอบปฏิกิริยาฮีมแอคกลูตินิน อินฮิบิชัน (40)

ทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกับไวรัสชนิดที่ ให้ฮีมแอคกลูตินินที่มีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยเจือจางซีรัม ที่ตรวจหาแอนติบอดีแล้ว เติม specimen ที่มีไวรัสที่มีขนาดเข้มข้นที่พอเหมาะ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือในตู้เย็น 1 ชั่วโมง ต่อมาหยด 0.05% สารละลายเม็ดเลือดแดงไก่ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น อ่านผลเมื่อครบ 30 นาที ถ้าแอนติเจนบนผิวของอนุภาคไวรัส correspond กับชนิดของซีรัมที่ใช้ทดสอบ จะยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง เห็นเม็ดเลือดแดงตกตะกอนเป็นจุดแดงใหญ่ที่ก้นหลอด และ titer ของแอนติบอดี หมายถึงระดับเจือจางสูงสุดของซีรัมที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้สมบูรณ์

2.5.2 การจำแนกชนิดของนิวรามินิเดส แอนติเจนของไวรัส โดยการทดสอบปฏิกริยานิวรามินิเดส อินฮิบิชัน โดยอาศัยปฏิกิริยาการยับยั้งของเอนไซม์ นิวรามินิเดสที่มีต่อฟิทูอิน และปลดปล่อย N-acetyl neuraminic

acid ออกมาซึ่งจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับเพอริโอเดต ได้กรดเบต้า-ฟอมิลไพรูวิคซึ่งไม่มีสี จะถูกเปลี่ยนเป็นสารที่มีสี โดยเติมกรดไทโอบาบิทูริด และสกัดแยกออกด้วยแอซิดบิวทานอล และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 549 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงนี้จะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของนิวรามินิเดสแอคทิวิตี (41)

2.6 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (42, 43)

2.6.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

จากผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ มีอาการนำของโรคไข้หวัดใหญ่ โดยไม่จำกัดเพศและอายุที่เข้ามารับการรักษายังศูนย์ให้บริการสาธารณสุขประชานิเวศน์ เขต 17 ศูนย์ให้บริการสาธารณสุขวงศ์สว่าง เขต 19 สำนักอนามัยกรุงเทพมหานคร และที่โรงพยาบาลเด็ก ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2532 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ.2533 ทั้งสิ้นเป็นจำนวน 711 คน

2.6.2 แยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

จาก throat swab ในอาหาร 3% beef extract ที่เติม gentamycin 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาปั่นแยกโดยใช้ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสซึ่งมีไวรัสอยู่เพาะเชื้อลงใน Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cell culture บ่มเซลที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในตู้ควบคุมปริมาณความชื้นสัมพันธ์ที่ 80% และคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

2.7 การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสที่แยกได้และการทำให้บริสุทธิ์ (44)

2.7.1 การเพิ่มจำนวนไวรัส

ฉีดน้ำจากเซลเพาะเลี้ยง (cell culture fluid) ซึ่งมีไวรัสเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วันหรือเลี้ยงในเซลเพาะเลี้ยง MDCK ที่มีอายุ

3 วันบ่มในตู้อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บเกี่ยว harvest เพื่อเป็นการเตรียมสภาพของไวรัสไม่ให้สูญเสียคุณสมบัติการติดเชื้อ และเพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนไวรัสให้มีปริมาณมากพอที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ (2)

2.7.2 การทำไวรัสให้บริสุทธิ์

นำ infected culture fluid ที่ได้มาปั่นแยก cell debris ออกจากไวรัสด้วยความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใสมาปั่นอีกครั้งในเครื่องเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบสูง 30,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 60 นาที เก็บตะกอนนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ค้างคืน ก่อนจะนำมาแขวนลอยในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และนำมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยการปั่นใน sucrose density gradient ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20%-50% ความเร็ว 25,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 90 นาที ทำซ้ำสองครั้ง ดูดแถบของไวรัสละลายในบัฟเฟอร์แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบสูง 30,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 90 นาที เก็บตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค้างคืน ตรวจสอบไตเตอร์ปฏิกริยาฮีมแอดกลูติเนชันของไวรัสที่ทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการละลายตะกอนในบัฟเฟอร์ให้ได้ปริมาตรหลอดละ 3 มล. ไวรัสที่ถูกเตรียมไว้ในลักษณะนี้สามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 2 ปีที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (34)

2.8 การสกัดแยกอาร์เอ็นเอ (45)

ละลายไวรัสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ในสารละลาย STE ให้มีปริมาตรรวมเป็น 4 มล. เติมสารละลาย RSB สารละลาย 10% SDS และเอนไซม์ Protenase K อย่างละ 0.5 มล.อินคิวเบต 15 นาทีที่อุณหภูมิ 56° ซ.เพื่อให้เอนไซม์เข้าไปทำลายชั้น Matrix protein ของอนุภาคไวรัสได้อย่างสมบูรณ์ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ลิเทียมคลอไรด์ 0.4 มล. และสารละลายฟินอลที่อิ่มตัว 4 มล. ปิดจุกหลอดด้วยจุกยางและพันทับด้วยเทปพลาสติก ใช้มือพลิกกลับไปมาตลอดเวลา 7 นาทีขณะบ่มที่อุณหภูมิ 56° ซ. นำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และเติมสารละลายคลอโรฟอร์มในไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ 4 มล. สาร

ละลายในหลอดจะแยกเป็นสองชั้นอย่างชัดเจนระหว่างชั้นฟินอลและชั้นน้ำซึ่งมีอาร์เอนเอละลายอยู่ จากนั้นเขย่าด้วยมือต่ออีก 15 นาที ก่อนจะนำไปเซนติฟิวจ์ที่ความเร็วรอง 2,600 rpm 5 นาที ถ่ายชั้นน้ำใสใส่หลอดใหม่และเติม 95% เอทธานอลเย็นเป็นปริมาตร 2.5 เท่านำไปอินคิวเบตค้างคืนที่อุณหภูมิ -20° ซ. เพื่อตกตะกอนเอร์เอนเอปั่นตกตะกอนอาร์เอนเอด้วยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm นาน 30 นาทีทิ้งส่วนน้ำ และทำแห้งตะกอนอาร์เอนเอที่ติดอยู่ที่ก้นหลอด ด้วยการอบที่อุณหภูมิ 37° ซ.จนแห้งสนิทจึงนำตะกอนในหลอดมาเติมสารละลาย EDTA บัฟเฟอร์ 0.3 มล.เพื่อละลายตะกอนและนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 56° ซ. 2-3 นาทีโดยแกว่งไปมา จากนั้นทิปดูดสารละลาย EDTA บัฟเฟอร์ 0.1 มล.ผสมกับสารละลายในหลอดให้เข้ากันก่อนเติม 95% เอทธานอล 1 มล.และถ่ายใส่หลอดเอฟเพนดอท เก็บค้างคืนที่อุณหภูมิ -20° ซ. และนำออกมาปั่นครั้งสุดท้ายด้วยความเร็ว 13,000 rpm 10 นาที ทิ้งส่วนน้ำและละลายตะกอนที่ก้นหลอดด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง ปริมาตร 30 ไมโครลิตร แบ่งสารละลาย 10 ไมโครลิตรมาเช็คความเข้มข้นของอาร์เอนเอ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและคำนวนหาปริมาตรอาร์เอนเอ โดยกำหนดให้ 1 OD 260 = RNA 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร อาร์เอนเอที่สกัดได้ด้วยวิธีนี้ควรมีความเข้มข้นประมาณ 2-3 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (45)

2.9 การย่อยตัด และการติดฉลากรีอลิกนิวคลีโอไทด์ (26)

นำอาร์เอนเอ จากข้อ 2.8 ปริมาตร 20 ไมโครลิตรในน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง เติมเอทธานอลที่เย็น 50 ไมโครลิตร เก็บที่ -70 องศาเซลเซียสค้างคืน ก่อนจะนำมาปั่นแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำโดยคว่ำหลอดแอบเพนดอทบนกระดาษซับ ละลายตะกอนในหลอดด้วยไดเจสชันบัฟเฟอร์ 9 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ RNase T1 1 ไมโครลิตร อินคิวเบตที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที เติมสารละลาย Kinasing buffer 34 ไมโครลิตร เอนไซม์โพลีนิวคลีโอไทด์ไคเนส 1 ไมโครลิตร และ

สารเรดิโอแอคทีฟ (γ-^{32}P) อาร์เอ็นเอ 5 ไมโครลิตรนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อให้การทำงานของเอนไซม์เป็นไปได้โดยสมบูรณ์ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย Stop mixture และตกตะกอนโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ไม่ต้องการโดยเติมสารละลายฟีนอล 100 ไมโครลิตร และนำมาปั่นด้วยความเร็วรอบสูง 10,000 rpm 10 นาที ส่วนน้ำใสซึ่งมีอาร์เอ็นเอที่ติดฉลากลงในหลอด eppendort ใหม่เติมเอทธานอลเย็น 300 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ก่อนนำมาปั่นแยกเอาตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm 10 นาที ละลายตะกอนที่ติดฉลากด้วยสารละลาย running mixture 15 ไมโครลิตร อุ่นที่ 50 องศาเซลเซียส 3 นาที ก่อนนำไปหยอด (load) เจลอิเลคโตรโฟรีซีส

2.10 การรันโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีสสองทิศทาง (26)

2.10.1 อิเลคโตรโฟรีซีสทิศทางแรก (FIRST DIMENSION ELECTROPHORESIS)

เจลประกอบด้วย 10% โพลิอะคริลาไมด์ (acrylamide: bis ratio 10:1.5) 6 โมลาร์ยูเรียพีเอช 3.5 อิเลคโทรดบัฟเฟอร์ใช้กรดซิตริค 25 มิลลิโมลาร์ ปรับให้เป็นพีเอช 3.5 ด้วย 10 N NaOH อัตราส่วนของส่วนผสมและปริมาตรแสดงในตารางที่ 3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 สารละลายที่ใช้ในการทำโพลิอะคริละไมด์ เจล อิเลคโตรโฟริซิส ทิศทางแรก

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ต่อหนึ่งเจล
อะคริละไมด์ : บิส (40 : 1.5%)	50 มล.
ยูเรีย (บริษัทซิกมา)	72 ก.
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อสองครั้ง (DDW)	90 มล.
โมลาร์ กรดซิตริค	5.0 มล.
เฟอริก ซัลเฟต เฮนตะไฮเดรต (25 มก./มล.)	0.8 มล.
10% กรดแอสคอบิค (0.1 ก./มล.)	0.8 มล.
30% ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์	80 ไมโครลิตร
สารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์	25 มิลลิโมลาร์ กรดซิตริคปรับพีเอชให้ได้ 3.5 ด้วย 10 นอมอล โซเดียมไฮดรอกไซด์
สารตัวอย่าง	20 ไมโครลิตร ของอาร์เอนเอตัวอย่างผสมด้วย 40 ไมโครลิตรของสารละลาย 9 โมลาร์ ยูเรีย (บริษัทเมิร์กซ์) ก็มี 50% กลีเซลรอลอิ่มตัว และสีติดตามบรอมฟีนอลบลูและไซลีนไซยานอล 0.3%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

i17869198

เติมเฟอร์ริกซัลเฟตคะตาเลสเร่งปฏิกริยาโพลิเมอร์ไลเซชัน ของเจลในแผ่นกระจกคู่ (glass plate) ขนาดกว้าง x ยาว 20 x 40 เซนติเมตร หนา 2 มิลลิเมตร รอจนเจลแข็งหรือประมาณ 30 นาที ดึงหวีออก เติมอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ให้ท่วมหน้าเจล ใช้ไมโครไซริงค์หยอดเชื้อตัวอย่างที่ติดฉลากซึ่งผสมสีติดตามการเคลื่อนที่ (dye marker) บรอมฟีนอล บลู (bromphenol blue) และไซลีนไซยานอล (xylene cyanol) สภาวะการทำอยู่ที่อุณหภูมิ 4° ซ ในห้องเย็น ควบคุมความต่างศักดิ์ไว้ที่ 600 โวลต์ กระแสไฟ 15 มิลลิแอมแปร์ การรันสิ้นสุดเมื่อบรอมฟีนอล บลู (bromphend blue) เคลื่อนที่วัดจากจุดเริ่มต้นลงมา 20 เซนติเมตร หรือวัดจากก้นเจลขึ้นไป 8 เซนติเมตร หลังจากนั้นถอดแผ่นกระจกด้านหน้าออก และตัดเจลตามแนวการเคลื่อนที่ของโอลิโก นิวคลีโอไทด์ ให้มีความกว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 12 เซนติเมตร จากบรอมฟีนอล บลู มาทางจุดเริ่มต้น และ 8 เซนติเมตร จากแนวเส้นที่ทำเครื่องหมายมาทางด้านล่าง นำชิ้นเจลไปแช่ในอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ 500 มล.ของอิเลคโตรโฟริซีสทิศทางที่สอง (1 โมลาร์ ทรีส บอเรต บัฟเฟอร์ พีเอช 8.0) นาน 30 นาที เพื่อชะยูเรียออก เนื่องจากจะไปยับยั้งการเกิดโพลิเมอร์ไรซ์ระหว่างรอยต่อของเจลทิศทางแรก และเจลทิศทางที่สอง จากนั้นวางเจลทิศทางแรกบนเพลทใหม่ แล้วนำมารันต่อในระบบของการทำอิเลคโตรโฟริซิสทิศทางที่สอง (46)

2.10.2 <u>อิเลคโตรโฟริซิส ทิศทางที่สอง (SECOND DIMENSION ELECTROPHORESIS) (26)</u>

เจลประกอบด้วย 21.8% โพลีอะคริลาไมด์ (acrylamide: bis ratio 40 : 1.3%) ใน 1 โมลาร์ ทรีส บอเรต อีดีทีเอ พีเอช 8.0 เติม 10% แอมโมเนียเปอร์ซัลเฟตคะตะเลส เพื่อเร่งปฏิกริยาโพลิเมอร์ไลเซชัน เติมเจลระบบที่สอง เข้าเชื่อมกับชิ้นของเจลระบบแรกที่วางอยู่ในแผ่นกระจกคู่ ขนาดกว้างxยาว 24x29 เซนติเมตร หนา 2 มิลลิเมตร เอียงแชมเบอร์ไปมา เพื่อให้เจลทั้งสองเชื่อมต่อกันสนิท ไม่มีอากาศแทรกอยู่ ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็ง สภาวะการรันทำที่อุณหภูมิห้อง ควบคุมที่ปริมาณกระแสไฟฟ้าต่อเพลทเป็น 10 มิลลิ-

แอมแปร์ การรันจะสิ้นสุดเมื่อบรอมฟีนอลเคลื่อนที่ วัดจากจุดเริ่มต้นลงมา 20 เซนติเมตร หรือประมาณ 16 ชั่วโมง อัตราส่วนของส่วนผสม และปริมาตร แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สารละลายที่ใช้ในการทำโพลิอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟริซิส ทิศทางที่สอง

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ต่อเจล (มล.)		
	1 เพลท	2 เพลท	3 เพลท
อะคริลาไมด์ : บิส (40:1.3%)	54.7	109.4	164.1
1 โมลาร์ ทรีส บอเรต อีดีทีเอ พีเอช 8.0	4.0	8.0	12.0
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อสองครั้ง	41.0	82.0	123.0
ทีเมด (TEMED)	60 ul		
10% แอมโมเนียม เพอร์ซัลเฟต	0.6 ul		
สารละลายอิเลคโทรด บัฟเฟอร์	50 มิลลิโมลาร์ ทรีส บอเรต พีเอช 8.0		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.11 ออโตเรดิโอกราฟี และการแปลผล (26)

หลังจากสิ้นสุดการทำในอิเลคโตรโฟริซิส ทิศทางที่สองแล้ว ถอดเจลออกจากเพลท ห่อเจลด้วยโพลีเอทธิลีน วางแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ซึ่งอยู่ในถุงดำประกบเข้ากับแผ่นเจลให้ขอบของทั้งสองพอดีกัน ใช้แผ่นกระจกทับไว้ด้านบนในห้องเย็นค้างคืน นำแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ที่ได้มาล้างในห้องมืด โดยแช่แผ่นฟิล์มในสารละลายดีวีลอปเปอร์ (Developer) นาน 5-6 นาที ยกขึ้นและแช่ต่อในสารละลายฟิกเซอร์ (Fixer) นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปาจนหมดน้ำยา นำขึ้นส่องดูความคมชัดของจุด (spot) สีดำของรอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลาก ถ้าจุดสีดำจางมาก การฉายแสง (expose) อาจนานถึง 3 วัน ใช้คลิบหนีบที่ปลายแผ่นฟิล์ม ทำเครื่องหมายชื่อเชื้อตัวอย่าง นำไปแขวนให้แห้งในลามินาโฟล์

การแปลผลโดยเปรียบเทียบพิมพ์นิ้วมือของตัวอย่างเชื้อไวรัสกับสายพันธุ์อ้างอิง โดยนับจำนวนจุดที่มีการเปลี่ยนแปลง เพื่อหาค่าต่ำสุดในการเปลี่ยนแปลงของเบส (minium number of base change) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัสตัวอย่างกับสายพันธุ์อ้างอิงที่ใช้ในการเปรียบเทียบจากสูตร

ค่าต่ำสุดในการเปลี่ยนแปลงของเบส

= จุดที่เพิ่ม x 1.5 + ค่าสัมบูรณ์ของผลต่างระหว่างจุดที่เพิ่มและจุดที่หาย โดยวางแผ่นเอกซ์เรย์ฟิล์มของแต่ละตัวอย่างบนไลท์ บอกซ์ (light box) ใช้ดินสอหกบีกือปปี้จุดบนกระดาษลอกลาย ซึ่งวางทาบไว้เหนือแผ่นเอกซ์เรย์ฟิล์มของสายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐานโดยลากแนวเส้นเพื่อทำเครื่องหมายใต้แถบที่ห่างจากจุดเริ่มต้น สังเกตการกระจายตัวของจุดภายใต้เส้นที่ทำเครื่องหมายไว้นี้ ทำเส้นประล้อมรอบจุดที่ไม่ตรงกับที่พบในสายพันธุ์อ้างอิง นับจำนวนจุดที่หายหรือเพิ่มขึ้นเพื่อคำนวณโดยใช้สูตรข้างต้น