หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มประชากรที่ศึกษา

1. กลุ่มผู้ป่วย จำนวน 50 คน เป็นผู้มารับการรักษาที่หน่วยระบบโรคข้อและรูมาติสซั่ม ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เป็นเพศหญิงทั้งหมด อายุระหว่าง 16-53 ปี อายุเฉลี่ย 31 ปี ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค systemic lupus erythematosus (SLE) ตามหลักเกณฑ์การพิจารณาของ American Rheumatism Association (ARA) 1982 (84) ในจำนวนผู้ป่วยทั้ง 50 คนนี้ ได้จำแนกเป็นกลุ่มย่อยดังนี้คือ

1.1 จำแนกตามสมรรถภาพการทำงานของไต เป็นกลุ่มที่มีอาการทางไตจำนวน 37 คน โดยผู้ป่วยที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีค่าproteinuriaมากกว่า 0.5 กรัม/วัน หรือค่าserum creatinineมากกว่า 1.5 มก.% หรือค่าcreatinine clearanceน้อยกว่า 60% ของคนปกติ

1.2 จำแนกตามช่วงอายุที่เริ่มแสดงอาการของโรค เป็น 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ผู้ป่วยที่เริ่มแสดงอาการของโรคเมื่อมีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 ปี

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ผู้ป่วยที่เริ่มแสดงอาการของโรคเมื่อมีอายุระหว่าง 21-30 ปี

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ผู้ป่วยที่เริ่มแสดงอาการของโรคเมื่อมีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 31 ปี

2. กลุ่มคนปกติ ที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบจำนวน 100 คน ประกอบด้วยแพทย์ นิสิตแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เป็นเพศชาย 68 คน เพศหญิง 32 คน อายุระหว่าง 20-59 ปี อายุเฉลี่ย 38 ปี

การเก็บสิ่งส่งตรวจ

1. HEPARINIZED BLOOD รายละ 25 มล. สำหรับคนปกติ และ 40 มล. สำหรับผู้ป่วย (heparin 20 ยูนิต ต่อเลือด 1 มล.) เพื่อทำ HLA typing

2. CLOTTED BLOOD รายละ 5 มล. ปั่นแยกซีรั่มที่อุณหภูมิ 4°ซ ภายใน 2 ชั่วโมง หลังเจาะเลือดและเก็บซีรั่มไว้ที่อุณหภูมิ 70°ซ เพื่อทำ C2 typing

HLA TYPING TRAY

เป็น Tray ที่บรรจุ typing sera ที่ใช้ในการตรวจหาชนิดของแอนติเจนของระบบ HLA แต่ละ tray ประกอบด้วยหลุม 60 หลุม แต่ละหลุมบรรจุ typing sera 1 μl การตรวจหาแอนติเจนแต่ละชนิดจะใช้ monospecific antibody อย่างน้อย 4 sera สำหรับแอนติเจนที่พบได้ทั่วไปในคนไทย (commom antigen)และอย่างน้อย 2 sera สำหรับแอนติเจนที่ไม่ค่อยพบในคนไทย (rare antigen) typing tray ที่ใช้ในครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 ชุด คือ

ชุดที่ 1 : เป็น typing tray สำหรับตรวจหาแอนติเจนของ HLA-A และ HLA-B ประกอบด้วย tray 2 tray มี typing sera ทั้งหมด 100 sera สามารถตรวจแอนติเจนของ HLA-A ได้ทั้งหมด 10 ชนิดคือ A1, A2, A3, A9, A10, A11, Aw19, A28, A23(9) A25(10) และตรวจหาแอนติเจนของ HLA-B ได้ทั้งหมด 15 ชนิดคือ B5, B7, B8, B12 B13, B15, B17, B18, Bw22, B27, B35, B40, Bw46, B51(5), และ Bw60(40)

ชุดที่ 2 : เป็น typing tray สำหรับตรวจหาแอนติเจนของHLA-DR ประกอบด้วย tray 1 tray มี typing sera ทั้งหมด 40 sera สามารถตรวจหาแอนติเจนของ HLA-DR ได้ทั้งหมด 8 ชนิด คือ DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, DR7, DR9, DRw10

แหล่งที่มาของ TYPING SERA

รวบรวมได้จากแหล่งใหญ่ ๆ 3 แหล่งด้วยกันคือ จากสตรีไทยที่ตั้งครรภ์(106) สั่งซื้อจากต่างประเทศ (Biotest, Hoechst - เยอรมันนี) และได้รับบริจาคจากฝรั่งเศส เดนมาร์คและออสเตรเลีย (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แหล่งที่มาของ typing sera

TYPING TRAY	จากสตรีไทยที่ตั้งครรภ์		สั่งซื้อจากต่างประเทศ		ได้รับบริจาคจากฝรั่งเศส เดนมาร์ค ออสเตรเลีย	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
ชุดที่ 1 : HLA-A,B (100 SERA)	74	74	24	24	2	2
ชุดที่ 2 : HLA-DR (40 SERA)	2	5	13	32.5	25	62.5

84% ของแอนติบอดีย์ที่ใช้ใน typing tray ชุดที่ 1 มีค่า r* มากกว่า 0.8 และมีเพียง 1% ที่มีค่า r น้อยกว่า 0.6 สำหรับใน typing tray ชุดที่ 2 แอนติบอดีย์ที่มีค่า r มากกว่า 0.8 มีเพียง 40% และ 38% มีค่า r น้อยกว่า 0.6

---

* r = correlation coefficient เป็นค่าที่แสดงถึงความจำเพาะของแอนติบอดีย์ มีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 แอนติบอดีย์ที่มีความจำเพาะสูงจะมีค่า $r>0.8$ ขึ้นไป ส่วนแอนติบอดีย์ที่มีความจำเพาะต่ำมีค่า $r<0.6$

การตรวจหา HLA PHENOTYPE

ตรวจหา HLA phenotype บนผิวเซลล์ลิมโฟซัยท์ โดยแยกลิมโฟซัยท์จาก heparinized blood ด้วยน้ำยา Ficoll-Paque โดยวิธี gradient centrifugation (107) แล้วแยกชนิดของเซลล์ออกเป็นทีและบี-ลิมโฟซัยท์ด้วยวิธี thrombin-nylon wool(108)จากนั้นทำการตรวจหาแอนติเจนของ HLA-class I (HLA-A และ HLA-B) บนที-ลิมโฟซัยท์ด้วยวิธี standard microlymphocytotoxicity test (NIH technique) (109) และตรวจหาแอนติเจนของ HLA-class II (HLA-DR) บนบี-ลิมโฟซัยท์ ด้วยวิธี modified microlymphocytotoxicity test (110)

ขั้นตอนการทำ

1. การเตรียมเซลล์ลิมโฟซัยท์

   - เจือจาง heparinized blood ด้วยน้ำยา Hanks' balanced salt solution (HBSS) ในอัตราส่วน 1:1
   - layer เลือดที่เจือจางแล้ว 25-30 มล. บนชั้นของน้ำยา Ficoll-Paque 15 มล.(อัตราส่วนของเลือด : น้ำยา = 3.0 ซม.: 2.4 ซม.โดยความสูง) ในหลอดปั่นขนาด 50 มล.
   - ปั่นแยกเซลล์ลิมโฟซัยท์ออกจากเลือดโดยใช้แรงเหวี่ยง 400 g.ที่อุณหภูมิ 18°ซ เป็นเวลา 40 นาที เซลล์ลิมโฟซัยท์จะลอยอยู่ระหว่างชั้นของพลาสมาและน้ำยา Ficoll-Paque
   - ใช้ plastic pipette ดูดชั้นของลิมโฟซัยท์ใส่ในหลอดปั่นขนาด 50 มล. ล้างเซลล์ด้วยน้ำยา HBSS ปริมาตร 50 มล. ปั่นล้างโดยใช้แรงเหวี่ยง 700g ที่อุณหภูมิ 18°ซ 10 นาที
   - resuspend ด้วยน้ำยา HBSS ปริมาตร 1 มล. ดูด cell suspension ถ่ายใส่หลอด Fisher

- ใส่thrombin (100 ยูนิต/มล.) 1 หยด(ประมาณ 1 µl)ลงในหลอดFisher ปิดจุกและเอียงหลอดไปมา(inversion)จนกระทั่งการตกตะกอนของเกร็ดเลือดเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์คือ เห็นตะกอนของเกร็ดเลือดรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนจับติดอยู่ข้างหลอด ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที
- ปั่นแยกเซลล์ลิมโฟซัยท์ออกจากตะกอนของเกร็ดเลือด โดยใช้เครื่องปั่นFisher (Model 59) ด้วยแรงปั่น 1,000g 3 วินาที ดูดส่วนน้ำใสใส่ในหลอดปั่นพลาสติกขนาด 10 มล.
- ปั่นล้างตะกอนของเกร็ดเลือด เพื่อดูดเก็บเซลล์ลิมโฟซัยท์ที่หลงเหลืออยู่ในส่วนน้ำใสอีก 2 ครั้ง
- เติมน้ำยา HBSS ลงไปในหลอดทดลองจนปริมาตรครบ 10 มล. ปั่นให้เซลล์ตกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง 700g ที่อุณหภูมิ 18°ซ 10 นาที
- resuspend เซลล์ด้วยน้ำยา 5% FBS-RPMI-1640 (น้ำยา RPMI-1640 + 5% fetal bovine serum) ปริมาตร 0.5 มล. รอผ่าน nylon wool column เพื่อแยกทีและบี-ลิมโฟซัยท์ออกจากกันต่อไป

2. การเตรียม NYLON WOOL COLUMN

ใช้หลอดกาแฟเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 ซม. ความยาว 14 ซม. เป็นcolumn โดยตัดปลายข้างหนึ่งเฉียงทำมุม 45 องศา ใช้arterial clampลนไฟให้ร้อนจัดแล้วหนีบปลายหลอดกาแฟด้านนี้ให้ปิดสนิท สำหรับ nylon wool ก่อนนำมาใช้ต้องยีเส้นใยให้สม่ำเสมอ โดยชั่ง nylon wool 100 มก. แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ยีแต่ละส่วนให้เป็นแผ่นบางๆ มีเส้นใยกระจายตัวสม่ำเสมอ วางทั้ง 3 แผ่นซ้อนทับกันแล้วยีอีกครั้งหนึ่งก่อนเก็บใส่ซองพลาสติก

วิธีเตรียม COLUMN เพื่อแยกชนิดทีและบี-ลิมโฟซัยท์

- แช่ nylon wool ใน petri dish ให้จมอยู่ในน้ำยา HBSS ตกแต่ง nylon wool อีกครั้งหนึ่งให้มีเส้นใยสม่ำเสมอ ม้วน nylon woolในลักษณะเดียวกับ

การม้วนพรมให้มีความยาวประมาณ 6 ซม.

- ตัดปลายแหลมของหลอดกาแฟให้เป็นรูเล็กๆ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มม. ใช้นิ้วชี้ปิดรูนี้ไว้แล้วใส่น้ำยา HBSS ให้เต็มหลอดกาแฟ
- จุ่มปลายเปิดด้านตรงข้ามลงใน petri dish ให้จมอยู่ใต้น้ำยา HBSS ค่อย ๆ สอด nylon wool เข้าไปในหลอดกาแฟ เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้วความยาว nylon wool ควรจะได้ประมาณ 6 ซม.
- ล้าง nylon wool column ด้วยน้ำยา HBSS 5 มล. ตามด้วยน้ำยา 5% FBS-RPMI-1640 3 มล. (ให้หลอดกาแฟอยู่ในแนวตั้ง) สุดท้ายให้เหลือ 5% FBS-RPMI-1640 อยู่เหนือ nylon wool 2 ซม.
- วาง nylon wool column ในแนวนอน ใช้ 5% FBS-RPMI-1640 ปิดปลายเปิดอีกด้านหนึ่งไว้
- อุ่น column ที่อุณหภูมิ 37°ซ 30 นาที ก่อนที่จะนำไปใช้ในการแยกเซลล์

3. <u>การแยกทีและบี-ลิมโฟซัยท์</u>

- นำ cell suspension 0.5 มล. (ที่เตรียมไว้ในข้อ 1) ผ่านเข้าไปใน column ที่อุ่นเรียบร้อยแล้ว โดยซับน้ำยาที่ปิดปาก column อยู่ออก จัดให้ column อยู่ในแนวดิ่ง ปล่อยให้น้ำยาที่อยู่เหนือ column ไหลออกมา แล้วรีบใส่ cell suspension 0.5 มล. เข้าแทนที่ทันที cell suspension จะซึมผ่านเข้าไปใน nylon wool
- วาง column ในแนวนอน ปิดปากหลอดด้วยน้ำยา 5% FBS-RPMI-1640 เพื่อป้องกันไม่ให้ nylon wool แห้ง
- อุ่น column ที่อุณหภูมิ 37°ซ 30 นาที
- เมื่อครบเวลา ซับน้ำยาที่ปิดปาก column ออก ตั้ง column ในแนวดิ่งแล้วใส่น้ำยา 5% FBS-RPMI-1640 (ที่อุณหภูมิ 37°ซ) ลงใน column 10 มล. ที-ลิมโฟซัยท์ซึ่งไม่เกาะติดกับ nylon wool จะไหลออกมาพร้อมกับน้ำยา เก็บไว้ในหลอดขนาด 10 มล.

- ล้าง column ด้วย 5% FBS-RPMI-1640 (อุณหภูมิ 37°ซ) จำนวน 30 มล. เพื่อให้แน่ใจว่าจะไม่มีที-ลิมโฟซัยท์หลงเหลืออยู่ใน column
- เก็บ บี-ลิมโฟซัยท์ที่ติดอยู่กับ nylon wool ด้วยหลอดก้นแหลมขนาด 10 มล. โดยเติม 5% FBS-RPMI-1640 (อุณหภูมิ 37°ซ) ลงใน column ครั้งละ 1-1.5 มล. พร้อมกับใช้นิ้วคลึงไปรอบ nylon wool column ให้ตลอดทั้ง column ทำเช่นนี้จนกระทั่งรองน้ำยาที่ไหลผ่าน column ออกมาได้ปริมาตรครบ 10 มล.
- นำหลอดที่เก็บ ทีและบี-ลิมโฟซัยท์ ไปปั่นโดยใช้แรงเหวี่ยง 700g 10 นาที แล้ว resuspend ด้วย 5% FBS-RPMI-1640
- ปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 3×10^6 เซลล์/มล. สำหรับ ที-ลิมโฟซัยท์ และ 3.5×10^6 เซลล์/มล. สำหรับบี-ลิมโฟซัยท์

4. <u>การตรวจสอบคุณภาพของเซลล์</u>

4.1 <u>การตรวจสอบ viability ของเซลล์</u>

ทีและบี-ลิมโฟซัยท์ ที่แยกได้ควรมีviabilityไม่ต่ำกว่า 90% ทดสอบได้โดยใช้ 0.4% trypan blue 50 µl ผสมกับ cell suspension 50 µl ทิ้งไว้ 5 นาที ถ้ามีเซลล์ตายจะเห็นติดสีน้ำเงินของ trypan blue ทั้งนี้เนื่องจากผนังเซลล์สูญเสียหน้าที่การทำงานยอมให้สีซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะไม่ติดสี เห็นลักษณะเซลล์วาวๆ ตรวจนับเปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตอยู่ได้ด้วย hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10x10

4.2 <u>การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของบี-ลิมโฟซัยท์</u>

บี-ลิมโฟซัยท์ที่แยกได้ในคนปกติควรมีความบริสุทธิ์ของเซลล์ไม่ต่ำกว่า 85% (111) ทำการตรวจสอบบี-ลิมโฟซัยท์โดยการย้อมดู surface immunoglobulin (sIg) ด้วยแอนติบอดีย์ต่อ sIg ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (anti-human Ig-FITC) และตรวจนับเซลล์ที่เรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์

วิธีการย้อม surface immunoglobulin

- อุ่น บี-ลิมโฟซัยท์จำนวนประมาณ 1 x 10^6 เซลล์ กับ 10% latex (เจือจางใน 5% FBS-RPMI-1640) 1 หยด ในหลอด Fisher ที่อุณหภูมิ 37°ซ 30 นาที
- ปั่น 2,000 g 1 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอนและดูดส่วนน้ำใสทิ้งไป
- ปั่นล้าง (2,000g 1 นาที) ด้วยน้ำยา HBSS อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อล้าง latex ส่วนเกินออก
- ใส่ anti-human Ig-FITC 50 µl (เจือจาง 1:4 ใน PBS อุณหภูมิ 4°ซ) ผสมให้เข้ากับตะกอนด้วย vortex mixer
- หุ้มหลอดFisher ด้วยกระดาษตะกั่ว (ป้องกันไม่ให้น้ำยาถูกแสง) แช่ในกระติกน้ำแข็ง 30 นาที
- ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วย PBS อุณหภูมิ 4°ซ(ปั่นล้าง 2,000g 1 นาที)
- ใส่ mounting media (50% glycerol) 1 หยด ผสมให้เข้ากับตะกอนด้วย vortex mixer
- หยด cell suspension หยดเล็ก ๆ ลงบนแผ่นสไลด์ ปิดทับด้วย cover glass ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาทับขอบ cover glass ทั้งสี่ด้าน นับเปอร์เซนต์เซลล์ที่เรืองแสงด้วยกล้องฟลูออเรสเซนส์

ลักษณะบี-ลิมโฟซัยท์ ที่เรืองแสงจะเห็นเป็น 2 ลักษณะคือ เรืองแสงอยู่รอบ ๆ ขอบเซลล์ (ring form) และเรืองแสงเป็นกระจุกที่ขั้วใดขั้วหนึ่งของเซลล์ (capping) ถ้าเป็น monocyte อาจจะเรืองแสงสีเขียวหรือไม่ก็ได้ แต่จะเห็นเม็ด latex อยู่ใน cytoplasm ส่วนเซลล์อื่น ๆ จะไม่เรืองแสงและไม่มีเม็ด latex อยู่ภายใน cytoplasm

5. MICROLYMPHOCYTOTOXICITY TEST

เป็นวิธีการตรวจหาแอนติเจนของ HLA-class I (HLA-A และ HLA-B) บนที-ลิมโฟซัยท์และแอนติเจนของ HLA-class II (HLA-DR) บนบี-ลิมโฟซัยท์

5.1 <u>หลักการ</u> : ถ้าบนผิวเซลล์ลิมโฟซัยท์ที่นำมาทดสอบมีแอนติเจนชนิดที่จำเพาะต่อแอนติบอดีย์ก็จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีย์ และมีการกระตุ้นคอมพลีเมนท์เป็นผลให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย สีสามารถซึมผ่านเข้าสู่ภายในcytoplasm เห็นเซลล์ที่ตายติดสีแดงของ Eosin-Y และเซลล์บวมขนาดโตกว่าเซลล์ปกติ 2-3 เท่า แต่ถ้าแอนติเจนที่อยู่บนผิวเซลล์ไม่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีย์ ก็จะไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น เซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่ มีลักษณะแวววาวและไม่ติดสี

5.2 <u>ขั้นตอนการทดสอบ</u>

- นำ typing tray ออกจากตู้แช่แข็งอุณหภูมิ-40°ซ มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (22° - 25°ซ) ประมาณ 10-15 นาที
- หยดลิมโฟซัยท์ที่ต้องการทดสอบลงในหลุมของtyping trayด้วยmicro-syringe (ขนาดความจุ 50 µl) หลุมละ 1 µl
- เคาะเบาๆบนฝาtray 3-4 ครั้ง เพื่อให้เซลล์และแอนติซีรั่มทำปฏิกิริยากันอย่างทั่วถึง
- วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีสำหรับการตรวจที-ลิมโฟซัยท์ และ 60นาทีสำหรับการตรวจบี-ลิมโฟซัยท์
- ใส่ rabbit complement ด้วย microsyringe (ขนาดความจุ 250 µl) หลุมละ 5 µl
- วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาทีสำหรับการตรวจที-ลิมโฟซัยท์ และ 120 นาทีสำหรับการตรวจบี-ลิมโฟซัยท์
- ใส่ 5% Eosin-Y หลุมละ 3 µl ด้วย jet pipette วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
- หยุดปฏิกิริยาโดยใส่ 40% neutral formalin หลุมละ 8 µl ด้วย jet pipette วางไว้ 10-15 นาที
- ปิดทับปากหลุมด้วยแผ่นพลาสติก (planing slide) วางไว้ 15 นาที จึงนำไปอ่านผล

5.3 หลักการแปลผล

ก. ต้องมีเซลล์ตายมากกว่า 45% จึงจะถือว่าเป็นปฏิกิริยาบวก ซึ่งแสดงว่ามีปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีย์

ข. การจะแปลผลว่าเป็นแอนติเจนชนิดใด จะต้องให้ปฏิกิริยาบวกอย่างน้อย 3 ใน 4 ของจำนวนแอนติบอดีย์ที่ใช้ในการตรวจแอนติเจนชนิดนั้น

การทำ TYPING COMPLEMENT C2

นำซีรั่มมาทำ isoelectric focusing (IEF) บน polyacrylamide gel(PAG) โปรตีนต่าง ๆ ในซีรั่มจะแยกจากกันตาม isoelectric point (pI) แถบตะกอนโปรตีนของคอมพลีเมนท์ C2 จะปรากฏอยู่ในช่วง pH 5.4-5.6 (112) แถบโปรตีนเหล่านี้จะถูกถ่ายไปยังแผ่น nitrocellulose และตรวจหาตำแหน่งโปรตีน C2 ได้โดยให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีย์ต่อ C2 แล้วตรวจปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วย peroxidase conjugated anti-Ig โดยมี 4-chloro -1-naphthol เป็น substrate

1. การเตรียม POLYACRYLAMIDE GEL (PAG)

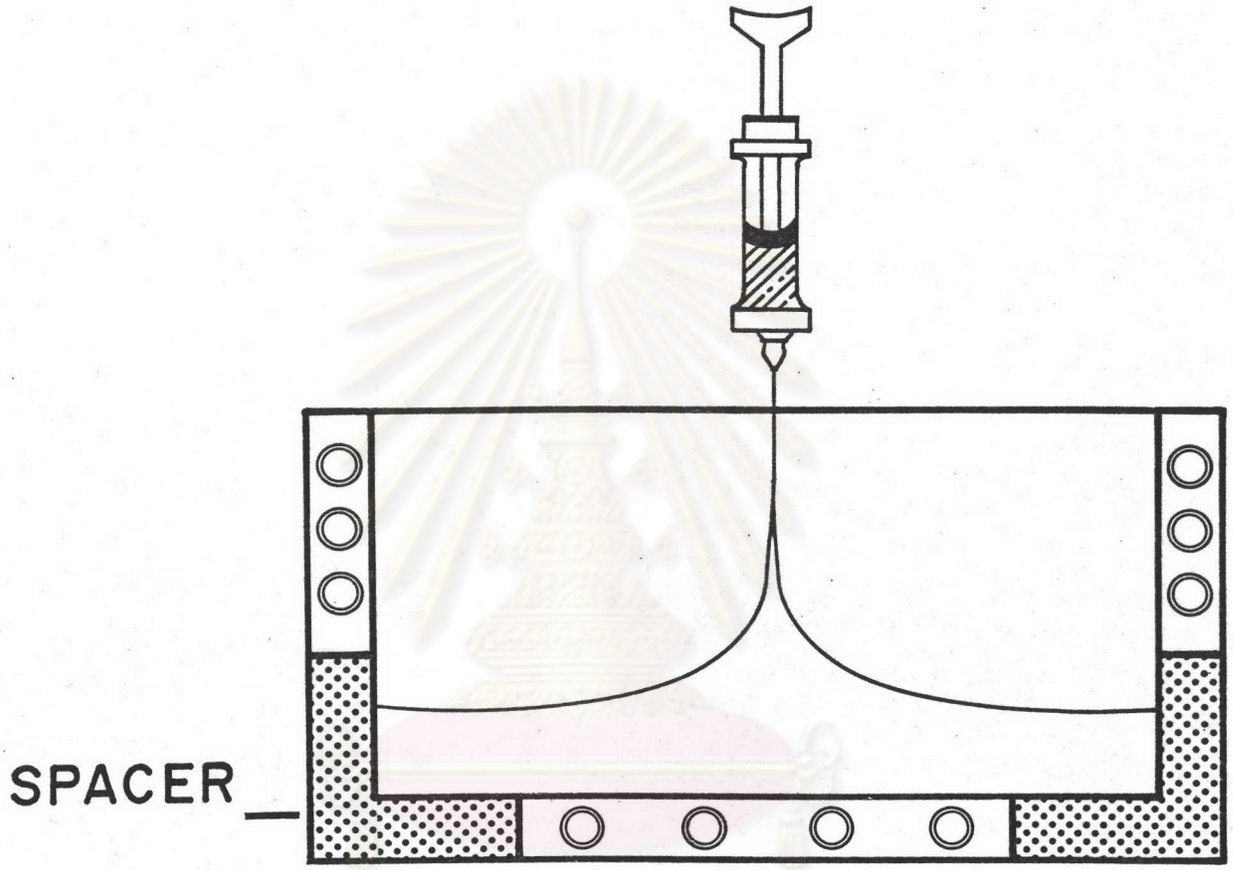
1.1 การเตรียมแผ่นกระจกสำหรับเทเจล

แผ่นกระจกที่ใช้ในการเทเจล ขนาดกว้าง 12.5 ซม., ยาว 25 ซม., หนา 0.2 ซม. ก่อนใช้ให้ทำความสะอาดดังนี้คือ

- แช่ใน 95% ethanol ประมาณ 15-20 นาที
- แช่ในน้ำยาล้างเครื่องแก้ว ประมาณ 30 นาที
- ล้างด้วยน้ำประปาและตามด้วยน้ำกลั่น
- อบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิไม่เกิน 65°ซ

ประกบกระจก 2 แผ่นเข้าด้วยกันโดยมี spacer รูปตัวยู (กว้าง1.25ซม. และหนา 0.05 ซม.) คั่นอยู่ระหว่างแผ่นกระจกทั้งสองแผ่น (รูปที่ 4) ทากาวรอบขอบกระจกทั้ง 3 ด้าน ที่มี spacer คั่นอยู่รอให้กาวแห้งแล้วปิดทับด้วย parafilm เพื่อป้องกันการรั่วของน้ำยา

PAG ขณะเทใส่ในแผ่นกระจก หนีบแผ่นกระจกทั้งสามด้านด้วยที่หนีบกระจก ตั้งบนโต๊ะปรับระดับเตรียมพร้อมที่จะใส่น้ำยา PAG



รูปที่ 4 แสดงวิธีการเทเจล และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียม polyacrylamide gel

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 <u>การเตรียม polyacrylamide gel solution</u> (113)

ผสม 29.1% Acrylamide 2.7 มล. กับ 0.9% Bisacrylamide 2.7 มล. ใส่Taurine 400 มก. Sucrose 2 กรัม แล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตร 16 มล. เขย่าจนละลายหมด นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°ซ ประมาณ 20 นาที แล้วเติม Ampholine pH 3.5 - 9.5 100 µl และ pH 5-7 900 µl แกว่งเบาๆ ให้ผสมกันจนทั่ว เมื่อพร้อมที่จะเทน้ำยาใส่แผ่นกระจกจึงใส่ Ammonium persulphate และ TEMED (น้ำยาทั้ง 2 ชนิดนี้จะเร่งให้มี

polymerization) ฉีดน้ำยาใส่แผ่นกระจก (ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1)ช้าๆ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จนกระทั่งน้ำยาอยู่ห่างจากขอบบนของกระจกประมาณ 2 มม. จึงฉีดน้ำกลั่นลงไปปิดทับน้ำยา จนกระทั่งระดับน้ำกลั่นเสมอกับขอบกระจกด้านบน วางทิ้งไว้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ประมาณ 5 ชั่วโมง ใช้กระดาษตะกั่วปิดขอบกระจกด้านบนป้องกันน้ำระเหย เก็บค้างคืนไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4°ซ) (114) หรืออย่างน้อย 1 ชั่วโมงก่อนใช้ (115)

2. ISOELECTRIC FOCUSING (IEF)

ประยุกต์วิธีของ Suzuki (113) และ Regueiroและคณะ (116) มีขั้นตอนในการทำดังนี้คือ

2.1 prefocusing

- เตรียมเครื่อง isoelectric focusing ให้มีอุณหภูมิ 4°ซ โดยต่อแผ่นทำความเย็น (cooling plate) ให้เข้ากับเครื่องปั๊มน้ำเย็น (cooling pump) ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 4°ซ
- นำแผ่น PAG ออกจากตู้เย็น เทน้ำที่อยู่ตอนบนออก ซับให้แห้ง งัดแผ่นกระจกแผ่นหนึ่งออกจะได้แผ่น PAG บางๆ ติดอยู่กับกระจกอีกแผ่นหนึ่ง
- ทำความสะอาดกระจกแผ่นที่รองรับ PAG โดยขูดกาวที่อยู่รอบ ๆ ออกให้หมด
- วางแผ่นPAGลงบนแผ่นทำความเย็น ระวังอย่าให้มีฟองอากาศแทรกกลาง โดยฉีดน้ำกลั่นลงบนขอบด้านหนึ่งของแผ่นทำความเย็น ให้มีความยาวเท่าแผ่นกระจก วางแผ่นกระจกลงตรงที่ฉีดน้ำ ค่อยๆเลื่อนแผ่นกระจกเข้าไปบน cooling plate น้ำจะค่อยๆ แพร่กระจายไปทั่วแผ่นกระจก ไล่ที่อากาศที่แทรกอยู่ออกไป
- วางกระดาษกรองWhatman 3MM* ที่ชุ่มด้วยน้ำยา 1M NaOH (catode

---

* ความยาวเท่ากับแผ่น PAG กว้าง 1 ซม. หนาเท่ากับ 5 แผ่นกระดาษ 3 MM.

solution) ที่ปลาย PAG ด้านขั้วลบ และวางกระดาษกรอง Whatman 3 MM ที่ชุ่มด้วยน้ำยา 1M H_3PO_4 (Anode solution) ที่ปลาย PAG ด้านขั้วบวก

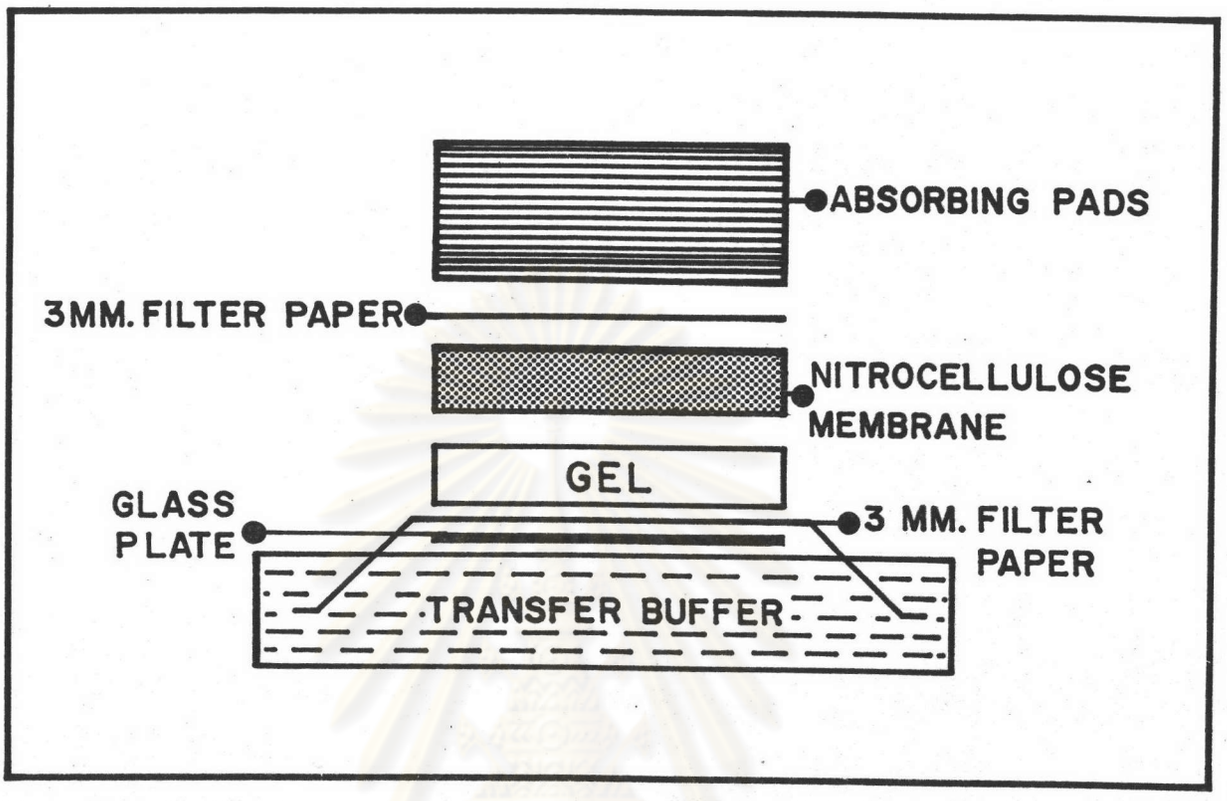
- วางelectrode holderลงทับกระดาษกรองให้cathode electrode อยู่ด้านขั้วลบ anode electrode อยู่ด้านขั้วบวก และelectrode ต้องอยู่กึ่งกลางของกระดาษกรอง
- ต่อสายelectrodeเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟ ตั้งกำลังไฟฟ้า 5 watt ความต่างศักย์ 400 volt และกระแสไฟฟ้า 30 milliampere เดินเครื่อง 1 ชั่วโมง

2.2 Sample application

- วางแผ่นกระดาษกรอง (whatman No.1) ขนาด 0.4 ซม. x 1 ซม. ซึ่งซับซีรั่มที่จะทำ typing จำนวน 10 µl วางลงบนเจลห่างจากขั้วบวก 2 ซม. และห่างจากขอบเจลด้านข้าง 2.0-2.5 ซม. ส่วนแผ่นซับซีรั่มแผ่นต่อๆไป ให้วางห่างกัน 0.5 ซม.
- เดินเครื่องต่ออีก 1 ชั่วโมง โดยตั้งกำลังไฟฟ้า ความต่างศักย์และกระแสไว้เท่าเดิม
- นำกระดาษกรองที่ซับซีรั่มออก เดินเครื่องต่อไปอีก 5 ชั่วโมง โดยเพิ่มความต่างศักย์เป็น 850 volt

3. BLOTTING

การย้ายแถบโปรตีนจาก PAG มาไว้บนแผ่น nitrocellulose ได้ประยุกต์ใช้วิธีของ Suzuki (113) และSouthern ซึ่งอาศัยหลักการของ convection (117,118) คือให้ transfer buffer ซึมผ่านเจลพาแถบโปรตีนต่าง ๆ ผ่านขึ้นไปยังแผ่น nitrocellulose



รูปที่ 5 แสดงวิธีการพาโปรตีนไปยังแผ่น nitrocellulose ด้วยหลักการ convection

<u>ขั้นตอนการทำ</u>

- วางแผ่นกระจกขนาดกว้าง 12.5 ซม.ยาว 25 ซม. พาดบนถาดที่ใส่tranfer buffer
- วางกระดาษกรอง Whatman 3 MM (19 x 22 ซม.) พาดบนแผ่นกระจกให้ปลายทั้งสองของกระดาษกรองจุ่มอยู่ใน buffer
- ใช้กระดาษกรอง 3 MM อีกแผ่นหนึ่ง (ขนาดกว้างยาวกว่าแผ่นPAG ด้านละ 1นิ้ว) จุ่มในtransfer buffer แล้วนำมาปิดทับลงบน PAG ที่ผ่านการทำ IEF แล้ว

PAG จะติดแน่นกับกระดาษกรอง นำมาวางลงบนกระดาษ 3 MMที่พาดอยู่บนแผ่นกระจก โดยให้ PAG หงายขึ้นข้างบน

- นำแผ่น nitrocellulose (NC) ขนาดเท่ากับ PAG วางปิดทับลงบน PAG ระวังอย่าให้มีฟองอากาศแทรก
- วางกระดาษชำระขนาดเล็กกว่าแผ่นNC ด้านละ 0.5 ซม.บนแผ่นกระดาษ 3 MM วางกระดาษชำระหลาย ๆ ชั้นให้มากพอที่จะซึมซับ tranfer buffer ที่จะซึมผ่านขึ้นมาตลอดคืน

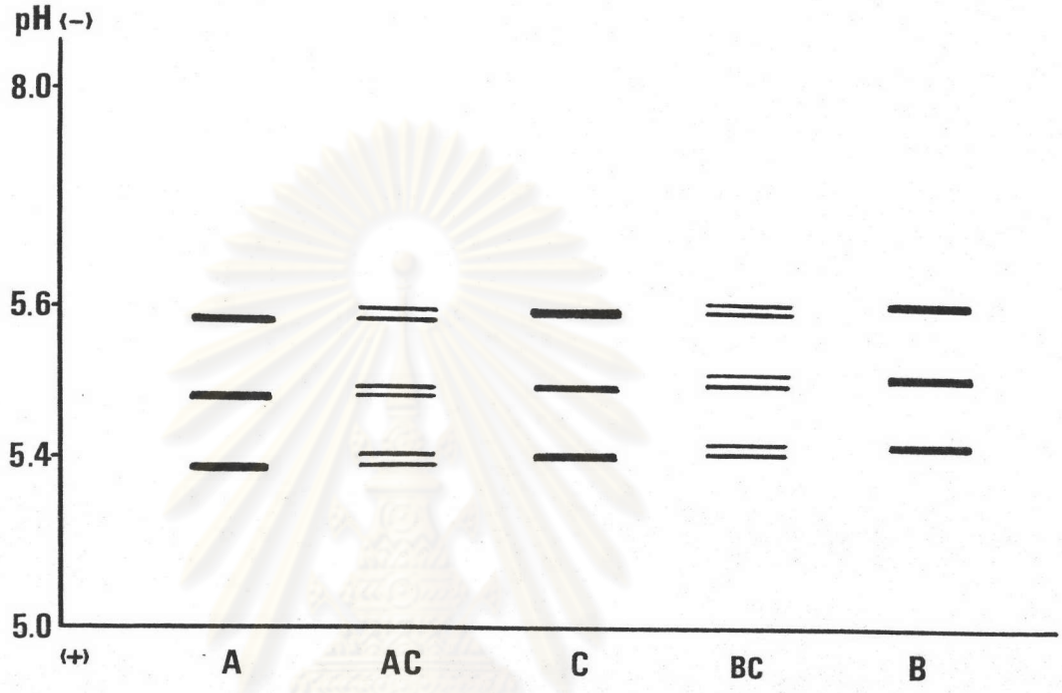
4. IMMUNOFIXATION & STAINING (117)

- นำ PAG ที่ผ่านการ blot มาแล้ว แช่ใน blocking solution(PBS/0.1% tween/0.1% gelatin) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ 2 ชั่วโมง
- นำมาทำปฏิกิริยากับ rabbit anti-human C2 (เจือจาง 1 : 300 ด้วย blocking solution) ปริมาตร 3 มล. ในถุงพลาสติก (ชนิดทนความร้อน) ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิดปากถุงให้สนิทวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง
- ล้าง 3 ครั้ง ในน้ำยา PBS/0.1% tween ครั้งละ 10 นาทีบนเครื่องเขย่า
- นำมาทำปฏิกิริยากับ goat anti-rabbit IgG (เจือจาง 1 : 1,000 ด้วย blocking solution) ปริมาตร 3 มล. ในถุงพลาสติก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง
- ล้าง 3 ครั้งด้วย PBS/0.1% tween ครั้งละ 10 นาทีบนเครื่องเขย่า
- แช่ใน substrate solution(4-chloro-1-naphthol)ปริมาตร 60 มล. บนเครื่องเขย่าจนกระทั่งเห็นติดสีน้ำเงินอย่างชัดเจน (ประมาณ 30-40 นาที) ขั้นตอนนี้ระวังอย่าให้ถูกแสงโดยห่อหุ้มภาชนะด้วยกระดาษตะกั่วหรือทำในที่มืด
- ล้างในน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้งโดยประกบด้วยกระดาษกรอง ระวังอย่าให้ถูกแสง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17290483

5. <u>การแปลผลC2 TYPING</u> (112,119)



รูปที่ 6 ลักษณะแถบคอมพลีเมนท์ C2A, C2AC, C2C, C2BC, และ C2B จากการทำ C2 typing ด้วยวิธี IEF และimmunoblotting

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แถบคอมพลีเมนท์ C2 จะปรากฏอยู่ระหว่างช่วง pH 5.4-5.6 มีทั้งหมด 4 แบบใหญ่ ๆ คือ

- C2C (C2 common) เป็นแบบที่พบได้มากที่สุด เห็นเป็นแถบโปรตีน 3 แถบ มีความหนาและติดสีเข้ม
- C2B (basic band) พบได้ค่อนข้างน้อย (rare type) แถบโปรตีนจะอยู่ค่อนไปทางขั้วลบ ถ้าเป็นแบบBC (heterozygous) จะเห็นเป็นแถบคู่

3 คู่ ในแต่ละคู่จะเห็นเส้นหนึ่งอยู่ในแนวเดียวกับ C2C และอีกเส้นหนึ่งอยู่ในแนว C2B แต่ละเส้นติดสีจางกว่าแบบ homozygous

- C2A(acidic band)พบได้น้อยมาก ลักษณะแถบโปรตีนทั้งแบบhomozygous (C2A) และแบบ heterozygous (C2AC) จะเหมือนกับแบบ C2B และ C2BC แต่อยู่ค่อนมาทางขั้วบวก
- C2D(C2 deficiency) แบบhomozygousจะมองไม่เห็นแถบโปรตีนเลย

<u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u> (120,121)

1. เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การพบแอนติเจนแต่ละชนิดของระบบMHCระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มคนปกติ

2. ทดสอบความสัมพันธ์ของแอนติเจนแต่ละชนิดกับโรคSLE โดยใช้การทดสอบไคสแควร์หรือ Fisher's exact probability test ในกรณีที่ expected number ในแต่ละช่องของตาราง 2x2 มีค่าน้อยกว่า 5

$$X^2(\text{Yates'}) = \frac{(\text{ad-bc} - k/2)^2 k}{\text{e x f x g x h}}$$

$$\text{Fisher's exact;P} = \frac{\text{e! f! g! h!}}{\text{a! b! c! d! k!}}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วิเคราะห์อัตราเสี่ยงของการเกิดโรค (Relative risk) โดยใช้ Odds ratio

$$\text{Relative risk (RR)} = \frac{ad}{bc}$$

ตาราง 2 x 2

	แอนติเจนของระบบ MHC		รวม
	+	-	
ผู้ป่วย SLE	a	b	h
คนปกติ	c	d	g
รวม	e	f	k

a = จำนวนผู้ป่วยที่มีแอนติเจนที่จะทำการวิเคราะห์

b = จำนวนผู้ป่วยที่ไม่มีแอนติเจนที่จะทำการวิเคราะห์

c = จำนวนคนปกติที่มีแอนติเจนที่จะทำการวิเคราะห์

d = จำนวนคนปกติที่ไม่มีแอนติเจนที่จะทำการวิเคราะห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย