บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. <u>การเก็บ specimens</u>

ตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อที่ใช้ในการวิจัยนี้ เก็บจากผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งตับ 5 ราย (มะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ 3 ราย มะเร็งตับชนิดทุติยภูมิ 1 ราย มะเร็งท่อน้ำดีตับ 1 ราย) และจากผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคอื่น ๆ 13 ราย ซึ่งเป็นผู้ป่วยทางด้านนิติเวช 6 ราย โรคหัวใจ 2 ราย ความดันโลหิตสูง 1 ราย โรคกระเพาะ 1 ราย โรคตับแข็ง 2 ราย และพยาธิใบไม้ในตับ 1 ราย โดยเสียชีวิตไม่เกิน 16 ชั่วโมง จากโรงพยาบาลศิริราช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โรงพยาบาลขอนแก่น โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และโรงพยาบาลเลิดสิน

เก็บเลือดจากหัวใจประมาณ 10 มล ใส่ในหลอดทดลองที่มี ethylene diamine tetra acetate (EDTA) เขย่าให้เข้ากัน เก็บชิ้นเนื้อตับ โดยเลือกตัดในตำแหน่งที่แตกต่างกัน ทั้งลักษณะตับที่ปกติ และผิดปกติ ตัด 5 ตำแหน่งในแต่ละราย ให้แต่ละชิ้นมีขนาดประมาณ 2 ลบ ซม ใส่ในกล่องพลาสติกที่สะอาด และเก็บชิ้นเนื้อจากม้าม ตับอ่อน ไต ต่อมน้ำเหลืองในช่องท้องอย่างละชิ้น

เก็บชิ้นเนื้อเหล่านี้ในกระติกน้ำแข็ง หรือตู้เย็นธรรมดา นำไปศึกษาภายใน 1 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. <u>การเตรียม antibodies ต่อ antigens ของไวรัสตับอักเสบชนิดบี</u>

2.1 โดยการ immunize กระต่าย

2.1.1 ใช้ serum ที่ตรวจพบว่ามี HBsAg โดยวิธี CIEP ซึ่งในที่นี้จะเรียกว่า HBV associated circulating antigen (HBC Ag) ผสมกับสารละลายอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณเท่ากัน โดยค่อย ๆ เติม และคนเรื่อย ๆ แล้วเก็บ

ไว้ค้างคืนที่ 4° ซ หลังจากนั้นนำมาปั่นใน refrigerated centrifuge (Sorvall Dupont instrument RC 5) ที่ 1,000 x g เวลา 1 ชั่วโมง เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนใน 0.85% NaCl ให้ได้ปริมาณเท่าเดิม นำไป dialyse ใน 0.85% NaCl ที่ 4° ซ ค้างคืน และต้อง dialyse ซ้ำจนตรวจไม่พบ $SO_4^=$ จึงใช้ได้ แล้วนำไปตรวจหา HBsAg อีกครั้ง โดยวิธี immunodiffusion (ID) และ CIEP ก่อนที่จะนำไปฉีดเข้าสัตว์ทดลอง

2.1.2 นำเซลล์ที่ตรวจพบว่ามี HBsAg โดยวิธี IF ซึ่งในที่นี้จะเรียกว่า HBV associated antigens in liver cells (HBL Ag) มาบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันใน Hanks balanced salt solution (HBSS) โดยใช้เครื่อง Omnimixer (Ivan Sorvall Inc., Norwalk Connecticut, U.S.A.) ความเร็ว 6,400 รอบต่อนาทีโดยใช้ช่วงเวลา 3 นาที 3 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ แล้วนำมาปั่นใน refrigerated centrifuge ที่ 750 x g เวลา 30 นาที แบ่งสารละลายส่วนใสมาปั่นซ้ำอีกครั้ง ที่ 12,000 x g เวลา 1 ชั่วโมง แยกตะกอนออกมาละลายใน 0.85% NaCl ให้ได้ปริมาณเท่าเดิม ก่อนที่จะนำไปฉีดเข้าสัตว์ทดลอง

นำ antigens จากข้อ 2.1.1 และ 2.1.2 มาฉีดเข้าสัตว์ทดลองอย่างละตัว (ก่อนฉีด เจาะเลือด แยก serum ไว้ใช้เป็น negative control) ครั้งแรกใช้ antigen 0.5 มล ผสมกับ complete Freud's adjuvant (Difco Laboratories Detroit, Michigan, U.S.A.) ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ ฉีดซ้ำ โดยใช้ antigen ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant แล้วฉีดซ้ำทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน แล้วเจาะเลือดตรวจหลังจากการฉีดครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ แยก serum ตรวจหา antibody ต่อ antigen ของไวรัสตับอักเสบชนิดบี โดยวิธี ID

นำ antiserum ที่ได้จากการฉีด HBC Ag คือ anti-HBC และ antiserum ที่ได้จากการฉีด HBLAg คือ anti-HBL มา absorb ด้วย

serum และเซลล์ตับของคนปกติ (ไม่มี antigens ของไวรัสตับอักเสบชนิดบี) ที่ทำให้แห้ง (lyophilized serum or liver extracts) โดยเขย่าเข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ก่อนที่จะเก็บไว้ที่ 4° ซ ค้างคืน แล้วปั่นใน refrigerated centrifuge ที่ 1,000 x g เวลา 20 นาที แยก antisera เก็บไว้ antisera ที่ได้นี้ต้อง absorb จนไม่มีปฏิกิริยากับ serum หรือเซลล์ตับปกติ โดยทดสอบด้วยวิธี ID

ตรวจหา anti-HBs และ anti-HBc ใน antisera ทั้งสองชนิด โดยตรวจหา anti-HBs ด้วยวิธี CIEP และ passive haemagglutination (PHA) ปรากฏว่า anti-HBC มี anti-HBs titer 6×10^4 และ anti-HBL มี anti-HBs titer 32 anti-HBc ไม่สามารถตรวจพบใน antisera ทั้งสองชนิด โดยวิธี immune adherance haemagglutination

2.2 โดยใช้ sera คนที่มี antibodies ต่อ antigens ของไวรัสตับอักเสบชนิดบี

เก็บ sera จากผู้ที่ตรวจพบว่ามี anti-HBs, anti-HBe หรือ anti-HBc แล้วจัดแบ่งเป็น 4 พวก คือ ก) anti-HBs titer มากกว่า 10^6 (+HBsAg) ตรวจโดยวิธี CIEP และ PHA ข) anti-HBc titer มากกว่า 4×10^3 (+HBsAg) ตรวจโดยวิธี immune adherance haemagglutination ค) anti-HBc titer มากกว่า 1×10^3 + anti-HBe (+HBsAg) ตรวจโดยวิธี immune adherance haemagglutination และวิธี ID ตามลำดับ ง) control serum ซึ่งตรวจไม่พบทั้ง antigens และ antibodies ของไวรัสตับอักเสบชนิดบี

เก็บ antisera เหล่านี้ไว้ที่-20° ซ จนกว่าจะใช้

การตรวจหา titer ของ anti-HBs และ anti-HBc ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการของ Professor Kusuyu Nishioka, the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science โตเกียว ประเทศญี่ปุ่น

3. การตรวจหา antigens ในเซลล์

3.1 การเตรียมเซลล์

นำชิ้นเนื้อแต่ละชิ้นมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ขนาดพื้นที่หน้าตัดประมาณ 1 x 1.5 ตร ซม ป้ายบนแผ่นสไลด์ (Gold Seal microslide, Clay Adam, Co., Ltd.) ให้ได้เซลล์ชั้นเดียว โดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เลือกสไลด์ที่มีเซลล์ลักษณะชั้นเดียว และปริมาณเซลล์พอเหมาะ 3 แผ่น, ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำสไลด์ 2 แผ่นแช่ใน acetone ที่ -20° ซ 10 นาที ทิ้งไว้ให้แห้งอีกครั้ง ก่อนที่จะนำมาย้อม IF หรือหากไม่ย้อมทันที ต้องเก็บไว้ที่ -20° ซ ส่วนสไลด์อีกแผ่น fix ใน 10% formalin แล้วนำไปย้อมสี haematoxylin & eosin (H & E) เพื่อดูลักษณะเซลล์ และนำชิ้นเนื้อเดียวกันนี้ fix ใน 10% formalin แล้วทำ paraffin section แล้วย้อมดูลักษณะเซลล์เช่นเดียวกัน

3.2 การย้อม IF[125]

นำสไลด์ที่เตรียมไว้ วางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วหยด antisera ที่ทำให้เจือจาง 1:10 ด้วย Phosphate buffer saline solution (PBS) บนแผ่นสไลด์ โดยแบ่งสไลด์แผ่นแรกเป็น 5 ส่วน ส่วนที่ 1 และ 2 สำหรับ PBS และ serum คนปกติ เพื่อเป็น control ส่วนที่ 3, 4 และ 5 หยด anti-HBs, anti-HBc และ anti-HBc + anti-HBe ตามลำดับ ส่วนสไลด์แผ่นที่ 2 แบ่งเป็น 4 ส่วน ส่วนที่ 1 และ 2 สำหรับ control คือ PSB และ preimmunized serum ของกระต่าย ส่วนที่ 3 และ 4 หยด anti-HBC และ anti-HBL แล้วเก็บในภาชนะที่มีความชื้นที่ 37° ซ 30 นาที ล้างสไลด์ด้วย PBS และแช่ใน PBS อีก 10 นาที ล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วหยด fluorescein conjugated IgG fraction goat anti-rabbit IgG heavy chain (Cappel Laboratories Downing, PA, U.S.A.) และ fluorescein conjugated goat antiserum to human IgG heavy chain (Hyland Division Travenol, Inc., Costa Mesa California, U.S.A.) ซึ่งทำให้เจือจาง 1:20 ด้วย PBS pH 7.6 ลงบนสไลด์แผ่นแรก และแผ่นที่สอง ตามลำดับ เก็บในภาชนะที่มีความชื้นที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

แล้วล้างสไลด์เช่นเดียวกับครั้งแรก ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้ว mount ด้วย buffer glycerol (90% glycerol + 10% PBS pH 7.6) แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescent

4. <u>การตรวจหา antigens และ antibodies ใน plasma</u>

นำเลือดจากหัวใจที่ใส่ EDTA ไว้ ปั่นแยก plasma เก็บแช่แข็งที่ -20° ซ จนกว่าจะนำไปตรวจ

4.1 วิธี counter immunoelectrophoresis (CIEP) ตรวจหา HBsAg และ anti-HBs ใน plasma

ใช้ 1% agarose (BDH Chemicals Ltd. Poole, England) ใน Veronal buffer (pH 8.6) 8 มล เทลงบนแผ่นกระจกใสขนาด 8.3 x 10.3 ตร ซม ทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20-25 นาที แล้วเจาะช่องขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มม ห่างกันช่องละ 3 มม 3 แถว แล้วเติม anti-HBs ในช่องแถวซ้าย (ขั้วบวก) และเติม plasma ที่ต้องการตรวจในช่องกลาง ดังในรูปที่ 1, หน้า 17 แล้นนำไปวางใน electrophoresis chamber โดยใช้กระดาษกรองเป็นตัวเชื่อมระหว่าง agar กับ buffer ใน chamber ใช้กระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมแปร์ เวลา 90 นาที นำมาอ่านผล และอ่านซ้ำอีกครั้งหลังจากวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะที่มีความชื้นค้างคืน

006115

4.2 วิธี immunodiffusion (ID) ใช้ microtechnique ของ Ouchterlony[126]

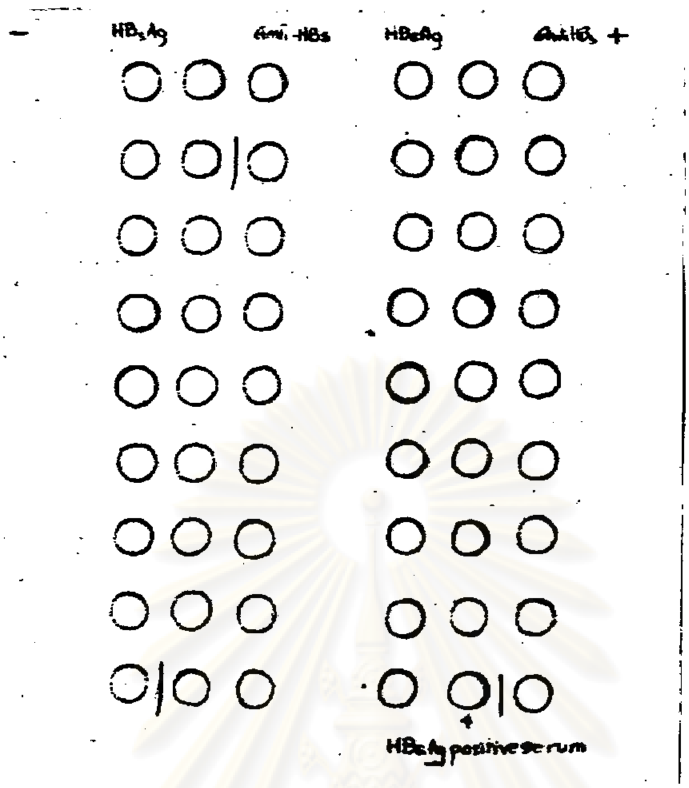
4.2.1 ตรวจหา antibody ต่อ antigen ของไวรัสตับอักเสบชนิดบีใน antisera จากกระต่าย โดยใช้ 1% agarose ใน Veronal buffer (pH 8.6) 3 มล เทลงบนแผ่นกระจกใสขนาด 2.3 x 7.6 ตร ซม วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20-25 นาที ในภาชนะที่มีความชื้น เจาะช่องขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม แล้วเจาะอีก 6 ช่องเป็นรูปหกเหลี่ยมโดยรอบ ห่างกันช่องละ 6 มม ดังรูปที่ 2, หน้า 17 ใช้ capillary pipette เติม antigen และ antibody ตามต้องการ วางไว้ในอุณหภูมิห้อง ในภาชนะที่มีความชื้น ค้างคืน อ่านผล

I18074285

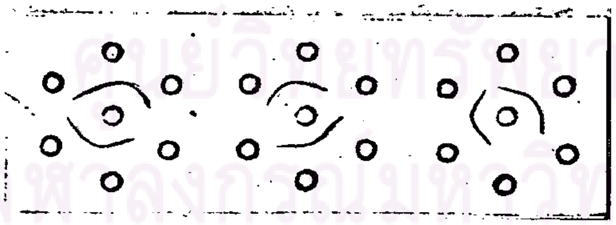
4.2.2 ตรวจหา HBeAg และ anti-HBe ใน plasma ที่พบ HBsAg โดยใช้ 0.9% agarose ใน Tris buffer (pH 7.6) 8 มล เทลงบนแผ่นกระจกใสขนาด 8.3 x 10.3 ตร ซม วางไว้ในอุณหภูมิห้อง 20-25 นาที ให้แข็งตัว แล้วเจาะช่องขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม ห่างกันช่องละ 2 มม และเจาะช่องรอบ ๆ สำหรับเติม buffer (รูปที่ 3, หน้า 18) ก่อนทำต้องนำ plasma ที่ตรวจพบ HBsAg มาทำให้เข้มข้นโดยใส่ lyphogel (Gelman Instrument Company Ann. Arbor. Michigan U.S.A.) ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชม แล้วนำไปเติมในช่องที่เจาะไว้ โดยเติมในช่องกลางระหว่าง positive antigen และ antibody แล้วเก็บในภาชนะที่มีความชื้นที่ 37^{o} ซ ค้างคืน

4.3 วิธี reverse passive haemaglutination (RPHA) โดยใช้ hepatitis B antigen kit ของ Wellcome Research Laboratories, Beckenham, England. BR 3 3BS

นำ plasma มา absorb โดยผสมเข้ากับ 20% control turkey red blood cells ในปริมาณเท่ากัน วางไว้ในอุณหภูมิห้อง 30 นาที ปั่น 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสมาทำให้เจือจางเป็น 1:8 กับ PBS buffer pH 7.2 ซึ่งมี serum ปกติของคน ม้า และไก่งวงผสมอยู่ โดยวิธี microtiter ใน microtiter plate จึงเติม test cells (turkey red blood cells coated with purified horse antibody to HBsAg) ปริมาณเท่ากัน เขย่า ปิด plate ด้วย parafilm วางไว้ในอุณหภูมิห้อง อ่านผลหลัง 30 นาที (รูปที่ 4, หน้า 18)

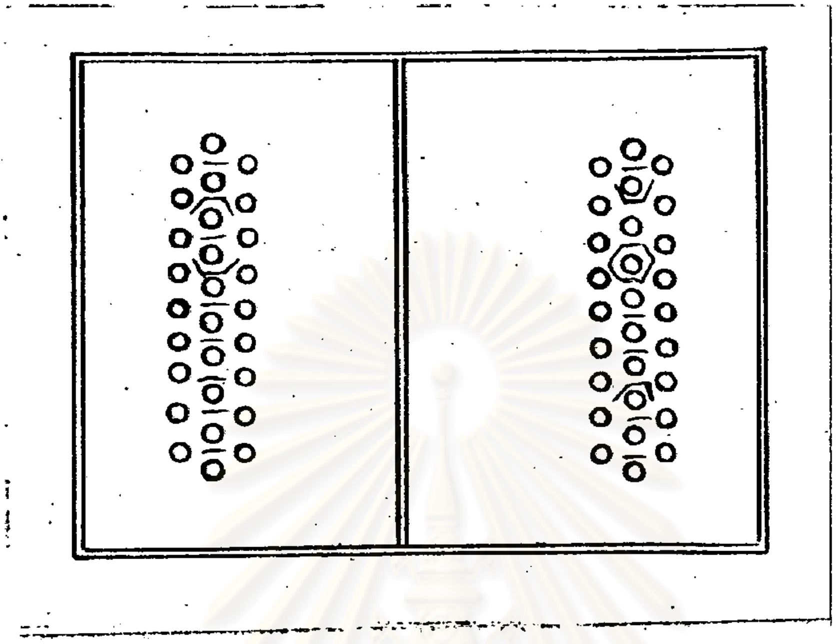


รูปที่ 1 ลักษณะ CIEP plate ซึ่งตรวจพบ HBsAg ในน้ำเหลืองในช่องที่สองของแถวแรก และตรวจพบ anti-HBs ในช่องสุดท้ายของแถวแรกด้วย

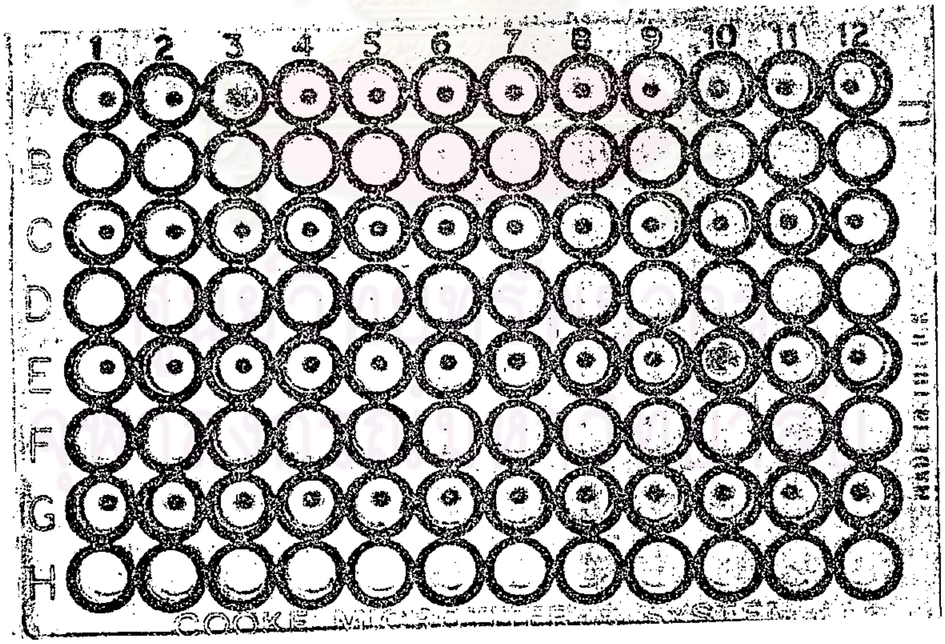


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 ลักษณะ ID plate ที่ใช้ในการตรวจ identity ของ antiserum



รูปที่ 3 ลักษณะ ID plate ที่ใช้ในการตรวจหา HBeAg และ anti-HBe



รูปที่ 4 ลักษณะ microtiter plate ที่ใช้ในการตรวจหา HBsAg โดยวิธี RPHA
ตัวอย่างน้ำเหลืองในช่องที่ 3 แถว A และช่องที่ 10 แถว E แสดงผล positive