บทที่ 3

วิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย

ตัวอย่างเชื้อ *P. falciparum* ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นเชื้อที่เก็บจากผู้ป่วยเป็นไข้มาลาเรียที่มารับการรักษา ณ มาลาเรียคลินิค ของจังหวัด ตาก ตราด จันทบุรี ชลบุรี สงขลาและเชื้อจากผู้ป่วยโรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน ในช่วงปี พ.ศ. 2523-2536 จำนวน 124 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196°C (ภายหลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมาระยะเวลาหนึ่ง) ที่ WHO Collaborating Centre on the Biological Characterization of Malaria Parasites ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. อุปกรณ์

1. Magnet (Promega)
2. micropipette
3. DNA thermal cycle (TC-I; Perkin Elmer Cetus)
4. DNA sequencing machine (SA,S2; BRL) และ power supply (EC600; E-C Apparatus Corporation)
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (PHM 83 Autocal pH meter; Radiometer)
6. เครื่องเซนติฟิวจ์ (Biofuge 13 และ Biofuge 22 R; Heraeus sepatech)
7. mixer (G-560E; Scientific Industries)
8. magnetic stirrer (pyro-magnestir No.1267; Lab-line instruments,Inc.)
9. microwave (R-4A52, Carousel; Sharp)
10. เครื่องชั่งแบบละเอียด (BP310S; Sartorius)

11. กล้องโพลารอยด์ (5-533; Foto Dyne Incoperated)
12. เครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเลต (3-3102; Foto Dyne Incoperated)
13. ชุดอิเล็คโตรโฟรีซีส ประกอบด้วย เจลแชมเบอร์ (WIDE MINI C; Bio Rad) และเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (200/2.0; Bio Rad)
14. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C (UE 650; Kelvinator)
15. ฟิล์ม X-ray (AGFA)
16. กระดาษกรอง chromatography paper (3MM Chr; Whatman)
17. ฟิล์มโพลารอยด์ (NO. 667; Fabriqu' au Royaume-Uni par Polaloid,Ltd.)
18. Rotamix Heto (RK 20-1; Berman & Beving Lab)
19. light box
20. fume hood (5000E; Astecair)
21. หน้ากากกันแสงอัลตราไวโอเลต (Foto Dyne Incoperated)
22. เครื่อง gel dryer (SE1160; Hoefer Scientic instruments)
23. เครื่องแก้วและภาชนะพลาสติก
24. gel sealing tape 1.5"x72 YD (BRL)
25. blue tip (Treff Lab)
26. yellow tip (Treff Lab)
27. micro tip (Socorex)
28. micro tube 1.5 ml และ 0.5 ml

3. สารเคมี

1. Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (Dynal)
2. potassium dihydrogen phosphate (MERCK)
3. saponin (SIGMA)
4. sodium dodecyl sulfate (BRL)
5. water saturated phenol (AMRESCO)
6. chloroform (MERCK)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. isoamyl alcohol (SIGMA)
8. absolute ethanol (MERCK)
9. 100 mM dNTP (Boehringer Mannheim)
10. *Taq* DNA Polymerase (Perkin Elmer)
11. magnesium chloride (BDH)
12. mineral oil (SIGMA)
13. ortho-boric acid powder (BDH)
14. sodium chloride (BDH)
15. agarose; ultra pure (BRL)
16. disodium ethylenediamine tetraacetic acid (SIGMA)
17. ethidium bromide (SIGMA)
18. tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Fluka)
19. 1 Kb ladder DNA marker (BRL)
20. Dynabeads M-280-Streptavidin (Dynal)
21. sodium hydroxide (MERCK)
22. Sequencing Kit (Sequenase Version 2.0 DNA; USB)
23. 1,000 Ci/mmol [^{35}S] dATP (Amersham)
24. acrylamide (Bio Rad)
25. N,N'-methylene-bis acrylamide (Bio Rad)
26. ammonium persulfate (SIGMA)
27. N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (SIGMA)
28. urea (AMRESCO)
29. methanol (MERCK)
30. acetic acid (MERCK)
31. sigmacote (SIGMA)
32. developer for X-ray film (AGFA)
33. fixer for X-ray film (AGFA)

<u>วิธีดำเนินการวิจัย</u>

เนื่องจากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเชื้อมาลาเรียที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในจานทดลองระยะเวลาหนึ่ง ดังนั้นตัวอย่างที่ใช้จึงประกอบด้วย เม็ดเลือดแดงและสาร cryoprotectant ในปริมาณ 1:1 (ปริมาณรวมอย่างน้อย 0.5 ml) ดังนั้นเมื่อกล่าวถึงปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยนี้ให้คำนึงอยู่เสมอว่ามิใช่ปริมาณของเม็ดเลือดแดงอย่างเดียว

1. การสกัดดีเอ็นเอ

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียซึ่งแยก โดยวิธี Immunomagnetic separation (IMS) (Seesod *et al*, 1993)

บ่มโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ merozoite surface protein 1 (MSP1) ของ *P.falciparum* กับ magnetic beads ซึ่งเคลือบด้วย (couple) แอนติบอดีต่ออิมมิวโนกลอบบิลลินจี (Dynabeads M-280 Sheep anti-rabbit Immunoglobulin G) นำไปเขย่าด้วย เครื่อง Rotamix เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เพื่อให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเคลือบอยู่บน magnetic beads หลังจากนั้นใส่สารละลายข้างต้นลงในเครื่อง Magnet (Promega) ซึ่งจะทำให้ magnetic bead-antibody complex จะติดอยู่กับผนังหลอดไมโครทิวบ์ เมื่อดูดส่วนใสทิ้งไปจะเหลือแต่ magnetic bead ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีเคลือบอยู่ ซึ่งสามารถนำมาใช้แยกเชื้อมาลาเรียได้โดยการนำตัวอย่างเลือด 5 µl (ประมาณ 5% parasitemia) ใส่ใน PBS buffer 100 µl แล้วเติมลงในหลอดไมโครทิวบ์ ที่มี magnetic beads-antibody complex (ปริมาณ 20 µl/ 4 µl antibody) บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เพื่อให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีบนผิวของ magnetic beads จับกับเชื้อมาลาเรียนำหลอดไมโครทิวบ์ใส่ลงใน Magnet ดูดส่วนใสทิ้งไปจะได้เชื้อมาลาเรียจับอยู่กับ magnetic beads เติมน้ำกลั่น 18 µl แล้วนำไปต้มที่ 100°C เป็นเวลา 10 นาที ดีเอ็นเอของเชื้อฟัลซิพารัมก็จะแยกอยู่ในส่วนของเหลวตามต้องการ

1.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี Phenol chloroform extraction (Snounou *et al.*, 1993)

เติมสารละลาย PBS ที่มี saponin อยู่ร้อยละ 0.5 ปริมาณ 500 µl ลงในตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมปริมาณ 400 µl ผสมให้เข้ากัน จนกระทั่งเห็นสารละลายเป็นสีแดงใส หลัง

จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 *g* เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°C ดูดสารละลายสีแดงใสทิ้งไป เก็บตะกอนที่ก้นหลอดไว้แล้วล้างตะกอนดังกล่าวด้วย PBS เย็น ปริมาณ 400 µl (phosphate buffer saline; 10 mM phasphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl) (อุณหภูมิ 4 °C) 2 ครั้ง หลังจากนั้นละลายตะกอนด้วย lysis buffer ปริมาณ 400 µl (2% SDS, 80 mM EDTA, 40 mM Tris·Cl pH 8.0 และ Pronase 2 mg/ml) นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน

ทำการสกัดดีเอ็นเอ ออกจากโปรตีน และเศษของเซลล์ที่ถูกย่อยสลายด้วยฟีนอลที่อิ่มตัวด้วย Tris·Cl ปริมาตรเท่าตัวอย่างดีเอ็นเอ เขย่าอย่างแรงประมาณ 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 *g* เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แยกสารละลายส่วนบนมาสกัดด้วยสารละลาย phenol/chloroform-isoamylalcohol (phenol : chloroform : isoamyl alcohol 25:24:1) ปริมาตรเท่าตัวอย่าง ทำการเขย่าอย่างแรง และ ปั่นที่ความเร็ว 13,000 *g* เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกชั้นสารละลายส่วนบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติมสารละลาย 3M sodium acetate pH 5.2 ลงไป 1 ใน 10 ของปริมาตรสารละลายที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากัน เติม absolute ethanol ที่อุณหภูมิ -20°C ลงไป 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย บ่มดีเอ็นเอข้ามคืนที่อุณหภูมิ -20°C เก็บตะกอนดีเอ็นเอโดยการปั่นด้วยความเร็ว 15,000 *g* เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ล้างตะกอนด้วย 80% ethanol ทิ้งให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA) หรือ ddH_2O

2. การเพิ่มปริมาณของ Pf155/RESA fragmant โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction) (Saiki *et al.*, 1988)

เพิ่มปริมาณของ Pf155/RESA ขนาดประมาณ 349 bp จากนิวคลีโอไทด์ที่ 2625 ถึง 2973 (ดังรูปที่ 3-1) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสที่มีดีเอ็นเอของเชื้อฟัลซิพารัมเป็นต้นแบบ โดยใช้ primer 1 (5' CAC AGC TTT AAA TGC CGC TGA AC 3') และ primer 2 (5' ATC ATG TTC TAC ATT TTC TTC AGC 3') เป็น PCR primer (Seesod *et al.*,1993) ภายในปฏิกิริยาประกอบด้วย

Tris·Cl, pH 8.3	10 mM
$MgCl_2$	1.5 mM

KCl	50 mM
Tween 20	0.1%
dNTPs	0.2 mM
primer	0.2 μM
Taq DNA polymerase	1 unit

ปรับปริมาตรด้วย น้ำกลั่น (ddH_2O) ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 50 μl

ภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเป็นดังนี้

รอบที่	อุณหภูมิ(°C)	ระยะเวลา(นาที)
1	95	10
2-35	96	0.5
	60	1
	72	2

เมื่อ PCR ช่วงแรกเสร็จแล้ว นำผลิตผล (PCR product) ที่ได้มาเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์สำหรับ ปฏิกิริยา PCR ช่วงที่ 2 เพื่อเตรียมปริมาณดีเอ็นเอของ Pf155/RESA ขนาดประมาณ 246 bp จาก นิวคลีโอไทด์ที่ 2648 ถึง 2872 (รูปที่ 3-1) โดยใช้ ไพร์เมอร์ 3 (5' biotin - AAT TGT TGT CAG ATA ATT CAG TAG ATG -3') และไพร์เมอร์ 4 (5' *AAT TGT TAT CCG CTC ACA ATT* GTT GTA CAT GTT CTG GTA CAT TTT C-3') เป็น PCR primer (Seesod *et al., 1*993) ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสประกอบด้วย

Tris·Cl, pH 8.3	10 mM
$MgCl_2$	1.5 mM
KCl	50 mM
Tween 20	0.1%
dNTPs	0.2 mM
primer	0.2 μM
Taq DNA polymerase	1 unit

ปรับปริมาตรด้วย น้ำกลั่น (ddH_2O) ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 50 μl

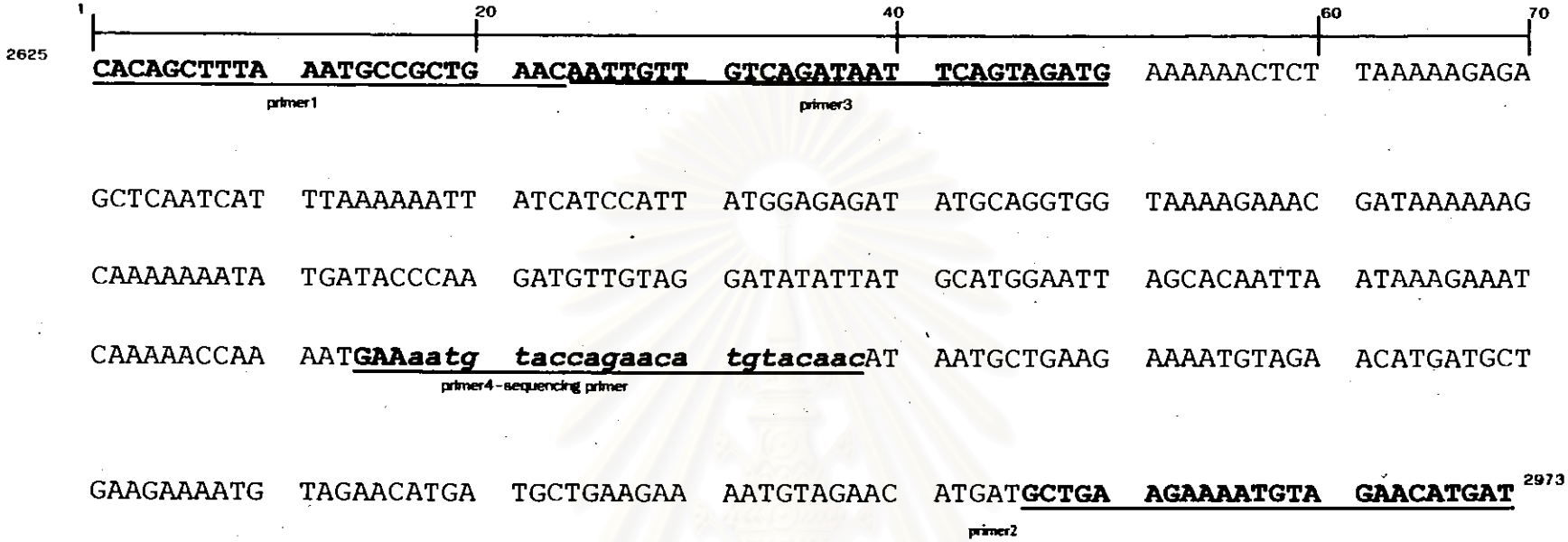
ภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Seesod *et al.*, 1993) เป็นดังนี้

รอบ	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา(นาที)
1-35	96	0.5
	60	1
	72	2

วิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสด้วยอิเลคโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรส 1 เปอร์เซนต์ ใน TBE buffer (0.1 M Tris·Cl, 0.1 M Boric acid , 2 mM EDTA pH 8.0) เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสกับดีเอ็นเอมาตรฐานของ 1 KB ladder

3. การทำดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับหาลำดับเบส โดยวิธี solid phase sequencing (Hultman *et al.*,1989)

ล้าง streptavidin beads 30 µl (Dynabeads M-280-Streptavidin,Dynal) ด้วย 1 M NaCl/TE 50 µl 3 ครั้ง เติม PCR product ลงไป 50 µl เขย่าด้วย vortex เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ biotin ที่ติดอยู่กับ primer 3 ไปติดอยู่กับ streptavidin beads แยกส่วนใสออกจาก beadsโดย Magnet เก็บส่วนใสนี้ไว้เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการจับดีเอ็นเอของ beads (ด้วยการเปรียบเทียบกับผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ใน 1%agarose gel electrophoresis) จากนั้นล้าง beads ด้วย TE buffer 50 µl ใส่ 0.1M NaOH 10 µl เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้งเติม 0.15 M NaOH 50 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างด้วย TE buffer 50 µl 3 ครั้ง จึงใส่ ddH_2O 7 µl แล้วนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับหาลำดับเบส หรือเก็บไว้ใน ตู้เย็น -20°C เพื่อใช้ในการหาลำดับเบสในภายหลัง รูปที่ 3-2



รูปที่ 3-1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีลจีน Pf155/RESA ตำแหน่งของ PCR primer (ตัวพิมพ์เข้มและขีดเส้นใต้) และ sequencing primer (ตัวพิมพ์เอน)

primer1 ตำแหน่ง 2625-2647 (5' CAC AGC TTT AAA TGC CGC TGA AC 3')

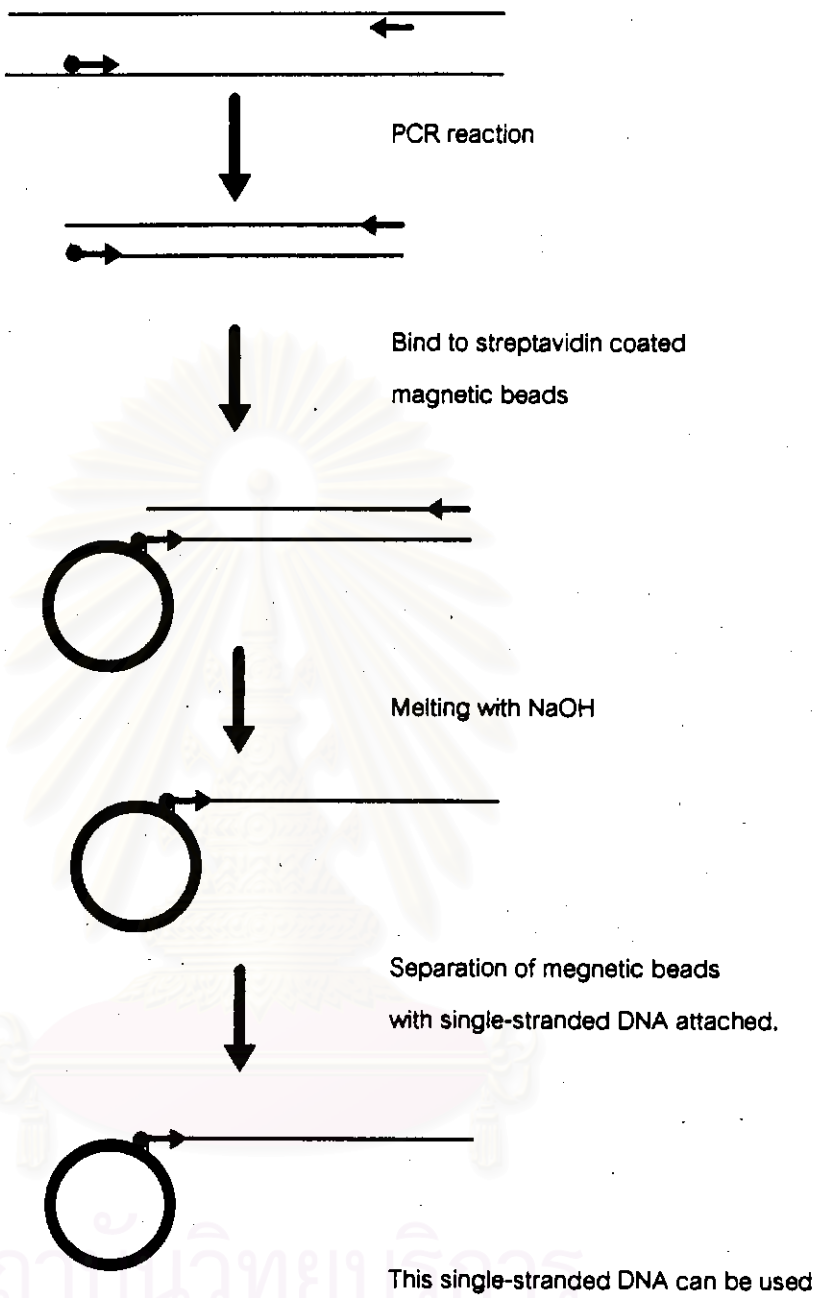
primer2 ตำแหน่ง 2950-2973 (5' ATC ATG TTC TAC ATT TTC TTC AGC 3') reverse primer

primer3 ตำแหน่ง 2648-2674 (5' biotin - AAT TGT TGT CAG ATA ATT CAG TAG ATG -3')

primer4 ตำแหน่ง 2848-2872 มีลำดับเบสที่ไม่ homologous อยู่ด้าน 5' จำนวน 21 mer (5' *AAT TGT TAT CCG CTC ACA ATT* GTT GTA CAT GTT CTG GTA CAT TTT C-3') reverse primer

sequencing primer ตำแหน่ง 2851-2872 (5'GTT GTA CAT GTT CTG GTA CAT T 3') reverse primer

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3-2 การแยกผลผลิต PCR ให้เป็นสายเดี่ยว (ดัดแปลงจาก Hultman, *et al.*, 1989)

← หมายถึง PCR primer

● หมายถึง biotin

4. การหาลำดับเบส (Sanger *et al.*, 1977)

นำ DNA template ที่ได้มาหาลำดับเบส ด้วยวิธี dideoxy-chain termination technique โดยใช้ Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit (USB) โดยมีรายละเอียดดังนี้

4.1 ขั้นตอน การจับเบสคู่สมระหว่างดีเอ็นเอกับ primer (annealing)

เตรียม annealing mixture ดังนี้

ดีเอ็นเอแม่แบบ (จากขั้นตอน solid phase sequencing)	7 µl
Sequencing buffer	2 µl
(220 mM Tris·Cl pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$ และ 250 mM NaCl)	
Sequencing primer (5 pmole/µl)	1 µl
(5'GTT GTA CAT GTT CTG GTA CAT T 3')	

ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 2 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ใช้เวลา 15-30 นาที จึงเก็บไว้ในน้ำแข็ง เพื่อขั้นตอนต่อไป

4.2 ขั้นตอน labeling

annealed DNA mixture (จากขั้นตอนที่ 4.1)	10 µl
0.1 M DTT (dithiothreitol solution)	1 µl
labeling mix (1.5 µM dGTP, 1.5 µM dCTP, 1.5 µM dTTP)	2 µl
[^{35}S]dATP (1 µCi/ml)	1 µl
Sequenase Version 2.0	2 µl

(เจือจางโดยผสม Sequense 1 µl และ enzyme dilution buffer (10 mM Tris·Cl, pH7.5, 5 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA) 8 µl เข้าด้วยกัน

ผสมสารข้างต้นตามลำดับ ให้เข้ากันดี แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-5 นาที

4.3 ขั้นตอนปฏิกิริยา termination

เตรียมหลอดทดลอง 4 หลอด แต่ละหลอดเติม 2.5 µl ของ dideoxynucleotide termination mixture ต่างๆดังนี้

หลอดที่ 1 ddG termination mix ประกอบด้วย 80 µM dGTP, 80µM dATP, 80 µM ,dCTP 80 µM dTTP, 8 µM ddGTP และ 50 mM NaCl

I 17176013

หลอดที่ 2 ddA termination mix ประกอบด้วย 80 μM dGTP, 80μM dATP, 80 μM dCTP, 80 μM dTTP,8 μM ddATP และ 50 mM NaCl

หลอดที่ 3 ddT termination mix ประกอบด้วย 80 μM dGTP ,80μM dATP ,80 μM ,dCTP 80 μM dTTP, 8μM ddTTP และ 50 mM NaCl

หลอดที่ 4 ddC termination mix ประกอบด้วย 80 μM dGTP ,80μM dATP ,80 μM dCTP ,80 μM dTTP, 8 μM ddCTP และ 50 mM NaCl

นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C อย่างน้อย 1 นาที แล้วเริ่มขั้นตอน termination โดยเติมสารจากปฏิกิริยา labeling จำนวน 3.5 μl เติมลงในหลอดที่มี termination mixture แต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม stop solution 4 μl (95% Formamide , 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% Xylene Cyanol FF) แยกแถบดีเอ็นเอโดย denaturating polyacrylamide gel electrophorysis

5. Denaturating gel electrophoresis

เตรียม 6% acrylamide gel ใน 10% TBE (1 M Tris·Cl, 1 M Boric acid , 20 mM EDTA pH 8.0) ที่มี 7 M urea เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะเกิด polymerization ด้วยปฏิกิริยาระหว่าง ammonium persulfate และ TEMED จากนั้นเปิดกระแสไฟฟ้า 60 วัตต์ ความต่างศักย์ 1600 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเหนี่ยวนำกระแสไฟฟ้าให้เกิดในแผ่นเจลอย่างสม่ำเสมอ

ต้ม sequencing reaction ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว หลังจากนั้นใส่ sequencing reaction จำนวน 3 μl ลงไปตามช่องที่กำหนดไว้ (G A T C) เปิดเครื่องกระแสไฟฟ้าใช้กระแส 60 วัตต์ ความต่างศักย์ 1600 โวลต์ เป็นเวลา 1ชั่วโมง หรือจนกว่าแถบสีน้ำเงินของ bromophenol blue ลงมาชิดขอบล่างของเจล จึงปิดกระแสไฟฟ้า

6. Autoradiography

ทำให้เจลคงสภาพแช่ลงใน fixative solution (10% methanol, 10% acetic acid) ประมาณ 10 นาที แล้วทาบกระดาษกรอง Whatman 3 MM ลงบนเจล แล้วลอกเจลขึ้นมาพร้อมกระดาษกรอง และคลุมแผ่นเจลที่ติดอยู่บนกระดาษกรองแล้วด้วยแผ่นพลาสติก (saran wrap) จากนั้นทำให้เจลแห้งด้วยเครื่อง gel dryer ที่อุณหภูมิ 80°C ภายใต้สูญญากาศ เป็นเวลาประมาณ 2

ชั่วโมง เมื่อเจลแห้งติดกับกระดาษกรองแล้วนำไปประกบกับกับแผ่นฟิล์ม X-ray ใน cassette เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำฟิล์มไปล้างด้วยน้ำยาล้างฟิล์ม (AGFA)

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบสายลำดับเบสของ Pf155/RESA กับสายลำดับเบสที่ตีพิมพ์ไว้แล้ว (A°slund *et al.*, 1990; Seesod *et al.*, 1996) เพื่อวิเคราะห์หาความถี่ของรูปแบบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย