บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

รูปแบบการศึกษาเป็นแบบการวิจัยและพัฒนา (Research and development diagnosis test) การวิจัยในครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee)

ประชากรศึกษา

- ใช้ตัวอย่าง Nasopharyngeal suction จากผู้ป่วยที่ส่งมารับบริการตรวจหาเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในช่วงปี พ.ศ. 2548 - 2549 โดยตัวอย่างดังกล่าวได้ส่งตรวจเพื่อรับบริการตรวจวินิจฉัยไวรัสในระบบทางเดินหายใจและวินิจฉัยว่าติดเชื้อ
  - Influenza A virus สายพันธุ์ H1N1 จำนวน 8 ตัวอย่าง
  - Influenza A virus สายพันธุ์ H3N2 จำนวน 11 ตัวอย่าง
  - Influenza B virus จำนวน 1 ตัวอย่าง
  - Respiratory Syncytial Virus (RSV) จำนวน 1 ตัวอย่าง
  - Human parainfluenza virus (HPIVs) จำนวน 1 ตัวอย่าง
  - Human metapneumovirus (hMPV) จำนวน 1 ตัวอย่าง
  - Adenovirus จำนวน 1 ตัวอย่าง
  - Human bocavirus (HBoV) จำนวน 1 ตัวอย่าง
  - และจากผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จำนวน 4 ตัวอย่าง
- cDNA ของ influenza A virus สายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ จำนวน 16 ตัวอย่าง จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบ โดยเก็บส่วนที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C ที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบ การศึกษานี้เป็นการศึกษาพัฒนาการตรวจ ตัวอย่างที่ใช้จะขออนุญาตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาล
- แบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*

การเก็บตัวอย่าง

วิธีเก็บและส่งตัวอย่างเพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยสงสัยไข้หวัดนกและไข้หวัดใหญ่

ตัวอย่างเพื่อการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) ควรเก็บตัวอย่างให้เร็วที่สุด เมื่อพบผู้ป่วยในระยะแรกที่เริ่มปรากฏอาการของโรค (อย่างช้าภายใน 3-5 วัน) การเก็บใช้วิธีไร้เชื้อ (aseptic technique) Nasopharyngeal suction เก็บโดยใช้สายพลาสติกที่ต่อกับเครื่องดูดสอดใส่เข้าในช่องจมูก ดูดสารคัดหลั่งจากทางเดินหายใจประมาณ 2-3 มล. ใส่ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ กรณีดูดเสมหะได้น้อย ใช้ Viral Transport Media ล้างเซลล์ที่ค้างสายลงในหลอด การเก็บจาก Nasopharyngeal aspirate ให้ค่า Yield ในการตรวจชันสูตรสูงที่สุด

เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ
    - 1.1 Aluminum foil (Rainbow metal company, USA)
    - 1.2 Barrier Tip: 200 µl (BioScience, USA)
    - 1.3 Beaker: 5 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml (Pyrex, England)
    - 1.4 Combs (Bio-RAD, USA)
    - 1.5 Cylinder: 25 ml (Pyrex, England)
    - 1.6 Flat-bottom ELISA plate (Costar, USA)
    - 1.7 Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (BioScience, USA)
    - 1.8 Parafilm (Penchiney plastic packaging, USA)
    - 1.9 Petri dish
    - 1.10 Pipette rack (Eppendorf, Germany)
    - 1.11 Pipette Tips: 10 µl, 200 µl, 1000 µl (BioScience, USA)
    - 1.12 Polypropylene conical tube: 15 ml, 50 ml (Elkay, USA)
    - 1.13 Reagent bottle: 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran, Germany)
    - 1.14 Sterile pasture pipette (Samco Scientific Corporation, USA)
    - 1.15 Stirring magnetic bar (V&P scientific, USA)
    - 1.16 Thermometer (Precision, Germany)

2. อุปกรณ์

2.1 ABIPRISM™ 310 Genetic (Perkin-Elmer, USA)

2.2 Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)

2.3 Automatic adjustable micropipette: P2.5 (0.1-2.5 µl), P10 (0.5-10 µl), P200 (20-200 µl) (Eppendorf, Germany), P20 (2-20 µl) (Socorex, Switzerland), P1000 (0.1-1 ml) (Gilson, France)

2.4 Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)

2.5 Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)

2.6 Chemical safety carbinet (Toxicap, France)

2.7 Class II microbiological safety carbinet (Envair, England)

2.8 Cuvett: 10 µl (Eppendorf, Germany)

2.9 Deep Freezer -20°C (Sanyo, Japan)

2.10 Deep Freezer -70°C (Forma Scientific, USA)

2.11 Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)

2.12 Incubator with orbital shaker (Stuart Scientific, UK)

2.13 Microcentrifuge 0.2 ml (Butterfly,Taiwan)

2.14 Microcentrifuge 1.5 ml (Denver, USA)

2.15 Mitsubishi Video copy processor (Bio-RAD, USA)

2.16 Multi-block heater (Lab-Line Instrument, USA)

2.17 PCR HEPA+ carbinet (LIO LAB, Thailand)

2.18 PCR safety carbinet (LIO LAB, Thailand)

2.19 pH meter (Eutech Cybernatics, Singapore)

2.20 Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)

2.21 Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich, USA)

2.22 Refrigerator 4°C (Mitsubishi, Japan)

2.23 Spectrophotometer (Eppendorf, Germany)

2.24 Stirring hot plate (Bamstead/Thermolene, USA)

2.25 Thermal cycler (Eppendorf, MasterCycler gradient, Germany)

2.26 UV transilluminator (Fotodyne, USA)

2.27 Vortex mixer (Scientific Industries, USA)

2.28 Water purification equipment (Yamato Scientific, Japan)

2.29 Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป

1.1 Agarose molecular grade (Promega, USA)

1.2 Diethyl pyrocarbonate (DEPC)(Sigma, Singapore)

1.3 Ethidium bromide (Sigma, Singapore)

1.4 Sucrose (USB, Hongkong)

1.5 GeneRuler™100bp DNA ladder Plus(Biolab, USA)

1.6 Boric acid (USB, Hong kong)

1.7 Tris (USB, Hong Kong)

1.8 Hydrochloric acid (Sigma, Singapore)

2. สารเคมีสำหรับการสกัด RNA

2.1 Guadinine thiocyanate (GTC) (Sigma, Singapore)

2.2 2mercaptoethanol(Sigma, Singapore)

2.3 Sodium acetate (Sigma, Singapore)

2.4 Phenol (Pierce, USA)

2.5 Chloroform (Sigma, Singapore)

2.6 Isoamyl alcohol (Sigma, Singapore)

2.7 Glycogen (USB, Ohio)

2.8 Isopropanal (Sigma, Singapore)

2.9 Absolute ethanol (Sigma, Singapore)

3. สารเคมีสำหรับการทำ Reverse transcription

3.1 M-MLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Canada)

4. สารเคมีสำหรับการทำ PCR

4.1 *i-Taq*™ DNA Polymerase (iNtRON, Gyeonggi-do, Korea)

5. สารเคมีสำหรับการทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

5.1 PERFECT Gel Cleanup (Eppendorf, Hamburg, Germany)

5.2 Isopropanal (Sigma, Singapore)

5.3 Absolute ethanol (Sigma, Singapore)

6. สารเคมีสำหรับการทำโคลนนิ่ง

6.1 Amplicillin (Phamacia, Hong kong)

6.2 isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside: IPTG (Bio Basic, Germany)

6.3 Magnesium sulfate (Sigma, Singapore)

6.4 Magnesium chloride (Sigma, Singapore)

6.5 pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA)

6.6 Tryptone (Giboco BRL, USA)

6.7 Yeast extract (Giboco BRL, USA)

6.8 5-bromo-4-chloro-3-inodlyl-β-D-galactopyranoside:X-gal (Bio Basic, Germany)

6.9 pGEM-T Easy Vector System I (Promega, USA)

6.10 Glucose (Giboco BRL, USA)

7. สารเคมีสำหรับก เรสกัดพลาสมิด

7.1 Eppendorf® FastPlasmid™ Mini Kit (Eppendorf, Germany)

8. สารเคมีสำหรับการทำ DNA Sequencing

8.1 BigDye terminator v.3.1 cycle sequencing RR-100 (Perkin-Elmer)

8.2 BigDye terminator v.3.1 cycle 5x buffer (Perkin-Elmer, USA)

8.3 Template suspension reagent (TSR) (Perkin-Elmer, USA)

วิธีการดำเนินการวิจัย

Positive control

ในการศึกษาครั้งนี้ คือพลาสมิด จากการ cloning ชิ้นส่วนของยีน M GAPDH H1 H3 H5 ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ cDNA ของเชื้อไวรัสจากผู้ป่วยที่ตรวจพบว่าติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 และสัตว์ที่ติดเชื้อไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1

Negative control

ในการศึกษาครั้งนี้ คือ

- Distilled water ที่มีปริมาตรเท่ากับ DNA ที่ใช้ในการทดลอง

- cDNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิดเอ สายพันธุ์ H2 H4 H6-H15, cDNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิดบี DNA/RNA ของเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ Respiratory Syncytial Virus (RSV), Human parainfluenza viruses (HPIVs), Human metapneumovirus (hMPV), Adenovirus, Bocavirus และ cDNA ที่ได้จากผู้ป่วยที่ตรวจไม่เชื้อไวรัสดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น
- เชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ *Haemophilus influenzae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus*

Internal control

ใช้ยีน GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) เป็นยีนที่อยู่ในกระบวนการไกลโคไลสิส ซึ่งมีการแสดงออกในทุกเซลล์ของมนุษย์ เพื่อเป็นการยืนยันว่าสามารถสกัด RNA จากตัวอย่างจากผู้ป่วยได้จริง เนื่องจากในการเก็บตัวอย่างจะมีเซลล์ของผู้ป่วยอยู่ใน Nasopharyngeal suction เพื่อยืนยันและป้องกันผล false negative จากการที่สกัด RNA ของไวรัสไม่ได้

การออกแบบไพรเมอร์

ทำการดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิดเอ ยีน M H1 H3 H5 แบบเต็มยีนที่แยกได้จากคนในทุกประเทศทั่วโลก ประมาณ 50-100 ลำดับเบส ที่รายงานอยู่ใน Influenza Virus Resource ระหว่างปี พ.ศ.2542-2549 จากเวปไซด์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากนั้นใช้โปรแกรม Clustal X ในการเปรียบเทียบหาส่วนเหมือนของลำดับเบส (conserve region) เพื่อเลือกใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

จากจุดประสงค์การทดลองที่จะทำการแบ่งเป็น 2 ระบบ ได้แก่ multiplex M GAPDH และ multiplex H1 H3 H5 ดังนั้น การเลือกไพรเมอร์ที่ใช้ในระบบเดียวกัน จะต้องมี PCR product ต่างกันอย่างน้อย 50 bp ขึ้นไป เพื่อการวิเคราะห์ผลได้อย่างชัดเจน เมื่อทำ agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 1 แสดงขนาด PCR product ของไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้ในการทำ multiplex PCR

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์(5'-3')	(position)	Tm	Product size (bp)
H3F3	ATGGAAGCATTCCCAATGACAA	(933-954)	62	717
H3R3	CATGATATGGCAAAGGAAATCCA	(1628-1650)	64	
H1F2	TTCTGTWATTGARAARATGAACAC	(1224-1247)	63	461
H1R2	CTGATTGCCCCCAGRGAGAC	(1666-1685)	65	
H5F3	ACTCCAATGGGGGCGATAAAC	(914-934)	64	352
H5R2	CAACGGCCTCAAACTGAGTGT	(1265-1245)	64	
MF3	TGATCTTCTTGAAAATTTGCAG	(718-739)	58	276
MR2	TGTTGACAAAATGACCATCG	(993-974)	56	
GAPDHF	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG	(85-104)	64	107
GAPDHR	TCAATGAAGGGGTCATTGATGG	(191-170)	64	

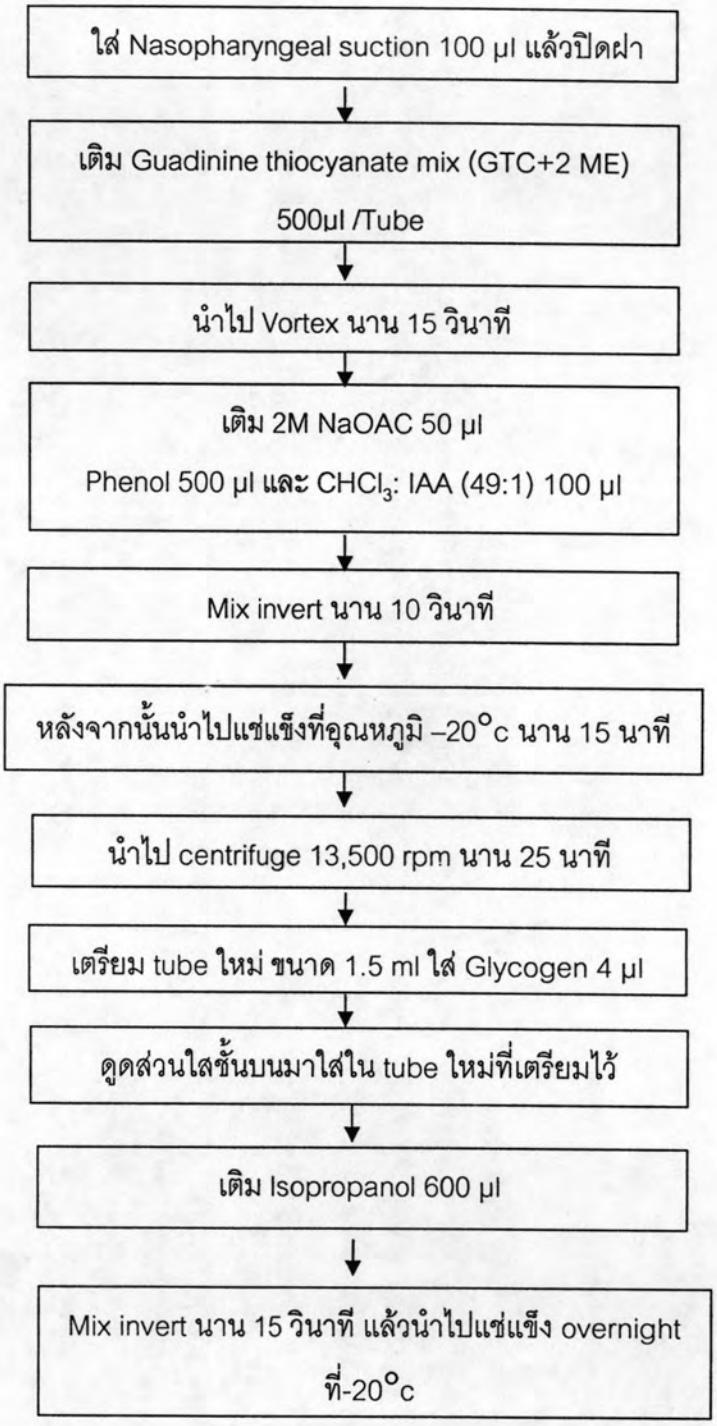
หลังจากเลือกลำดับเบสของไพรเมอร์ ได้แล้ว ตรวจสอบคุณสมบัติของ ไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม FastPCR เวอร์ชั่น 4.0.27 (โดย Ruslan Kalendar ปรับปรุงให้ทันสมัยเมื่อ 26 สิงหาคม 2549) เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ CG อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR และตรวจสอบว่ามีการจับคู่กันเองระหว่าง ไพรเมอร์ที่ใช้ใน multiplex PCR เดียวกันหรือไม่

จากนั้นนำมาตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ โดยการใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.gov/Blast เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของไพรเมอร์กับลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตอื่นทั้งหมดในฐานข้อมูลของธนาคารรหัสพันธุกรรม GenBank ว่าไม่มีส่วนของ ไพรเมอร์ ที่เหมือนกับยีนของสิ่งมีชีวิตอื่น โดยเฉพาะส่วนของไพรเมอร์ด้านปลาย 3' ที่อาจทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเออย่างไม่จำเพาะ

นำไพรเมอร์ที่ได้มาทดสอบในการทำ PCR จริงเพื่อยืนยันว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณ cDNA ได้จริง

แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัด RNA

วันที่ 1



วันที่ 2

นำ RNA ที่สกัดได้มาทำ reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ cDNA ใช้ในการทำ PCR ต่อไป

ขั้นตอนการทำ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

การทำ Reverse transcription

นำ RNA มา Incubate ที่ 65°c เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ RNA คลายตัวเป็นเส้นตรง ไม่อยู่ใน secondary structure หลังจากนั้นนำไปแช่ใน ice box เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ RNA คงสภาพเป็นเส้นตรง จากนั้นใช้ M-MLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Canada) ในการทำ reverse transcription ที่เตรียมไว้ดังตารางที่ 2 โดยในปริมาตรทั้งหมด 25 µl ประกอบด้วย RNA ที่สกัดได้ 12 µl ในความเข้มข้นที่แตกต่างกันใน M-MLV 5x Buffer(250mM Tris-HCl; pH 8.3 ที่อุณหภูมิ 25°C, 375mM KCl, 15mM $MgCl_2$, 50mM DTT) และ 2mM dNTP

40 units rRNAsin® Ribonuclease Inhibitor, 200 units Enzyme M-MLV RT, ไพรเมอร์: influenza cDNA 0.5µM และไพรเมอร์ GAPDHF85 0.5µM ผสมให้เข้ากันและนำไป Incubate ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำ cDNA ที่ได้มาใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR และเก็บส่วนที่เหลือที่อุณหภูมิ -20

ตารางที่ 2 ปริมาณไพรเมอร์ และสารต่างๆที่ใช้ในการทำ reverse transcription

สารที่ใช้ในการทำ RT–PCR	ปริมาณสารที่ใส่ในแต่ละหลอด(µl)
M-MLV 5x Buffer	5.0
10mM dNTP	5.0
ไพรเมอร์:influenza cDNA(25µM)+GAPDHF85(25µM)	0.5+0.5
rRNAsin® Ribonuclease (40u/µl)	1.0
Enzyme M-MLV (200u/µl)	1.0
Extracted RNA	12
Total Volume	25

การทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

จากนั้นนำ cDNA มาทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนของไวรัสและยีนของคน โดยในปริมาตรสุดท้าย 20 µl ประกอบด้วย cDNA 0.5-1 µl ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ใน PCR buffer ความเข้มข้น 1X PCR buffer ประกอบด้วย 10mM Tris-HCl(pH8.3), 50mM KCl, 2mM $MgCl_2$ และ 1 units *i-Taq*™ DNA Polymerase 1mM dNTPs(0.25mM each) ไพรเมอร์ 0.5 µM และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 µl

ตารางที่ 3 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน cDNA

สารเคมี	PCR/1 reaction (µl)
cDNA Template	1
Forward ไพรเมอร์(25µM)	0.4
Reverse ไพรเมอร์(25µM)	0.4
i-Taq™ DNA Polymerase(5U/ µl) (iNtRON, Gyeonggi-do, Korea)	0.2
10x PCR buffer	2
dNTP Mixture(2.5mM each)	2
Distilled water	13.4
Total volume	20

เมื่อใส่ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ตามตารางที่ 3 และผสมให้เข้ากันแล้ว จากนั้นนำหลอด PCR ที่ใส่สารละลายดังกล่าวใส่ในเครื่อง Eppendorf Mastercycler personal (Hamburg, Germany) โดยมีโปรแกรมตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR

อุณหภูมิ (^{o}c)	เวลา(นาที.วินาที)	จำนวนรอบ
94 (Pre-denaturation)	3.0	1
94 (Denaturation)	0.3	40
58 (Annealing)	0.3	
72 (Extension)	1.0	
72 (Post- extension)	10.0	1
25	15	1

เมื่อ PCR เสร็จสมบูรณ์ นำ PCR product ปริมาณ 10 µl ผสมกับ loading buffer ปริมาตร 2 µl แล้วนำไปแยกขนาดด้วย 2% (w/v) agarose gel ใน 1X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer ใช้กระแสไฟความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที โดยใช้ 100 bp ladder เป็น DNA marker เพื่อใช้เปรียบเทียบกับขนาดของ PCR product จากนั้นย้อมเจลด้วย ethidium

bromide (10 µg/ml) ประมาณ 15 นาที นำเจลไปตรวจหาแถบของ DNA ภายใต้แสง UV แล้วบันทึกภาพ

การทำ Positive control

การทำโคลนนิ่ง และการเตรียมพลาสมิดเพื่อการทำ positive control

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ดังตารางที่ 5 ซึ่งเป็นส่วนที่ครอบคลุม บริเวณลำดับเบสที่ไพรเมอร์ในระบบ multiplex PCR จะเข้าจับเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ หลังจากตรวจสอบขนาดของ PCR product ที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis แล้ว ทำการตัดชิ้นส่วนของเจลที่มี DNA ที่ต้องการ แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Perfectprep® Gel Cleanup kit (Eppendorf, Germany) นำ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมต่อเข้ากับ พลาสมิด pGEM-T ตามวิธีของ pGEM-T Easy Vector System I(Promega, USA) โดยมีขั้นตอนดังนี้

ตารางที่ 5 ไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็น positive control

ยีน	ไพรเมอร์	ขนาด(ตำแหน่งของลำดับเบส)
M	MF5'/MR3'	1027 (1-1027)
GAPDH	GF85/GR191	107 (85-191)
H1	H1F266/H1R3	1407 (266-1672)
H3	HAF2/HAR2	1762 (10-1771)
H5	H5F3/H5R4	850 (880-1694)

การทำ ligation

ใส่สารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation และ purified PCR product ของทั้ง 5 ยีน คือ H1 H3 H5 M และ GAPDH แล้วนำไปบ่ม ที่ 4°C ข้ามคืน

ตารางที่ 6 สารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation

สารเคมี	ligation/1 reaction (µl)
2X Rapid Ligation Buffer	5
pGEM-T Easy Vector (50ng/µl)	1
PCR product	X*
T4 DNA Ligase(3 Weiss units/µl)	1
deionized water ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น	10

* แล้วแต่ปริมาณของ Purified DNA ที่ได้ (ประมาณ 3 µl)

นำพลาสมิดสายผสมถ่ายเข้าสู่ Competent cell (*Escherichia coli* JM109) โดยนำ Competent cell ที่เก็บไว้ที่ -70°C มาปล่อยให้ละลายใน ice box ใส่ ligation mixture 2 µl ผสมกับ competent cell ปริมาตร 50 µl ดีดหลอดให้เข้ากันเบาๆ นำไปแช่ในน้ำแข็ง 20 นาที จากนั้นนำมาบ่มใน water bath ที่ 42°C เป็นเวลา 50 วินาที เมื่อครบกำหนดนำมาแช่ใน ice box เป็นเวลา 2 นาที เติม SOC ปริมาตร 950 µl เพื่อฟื้นฟูสภาพเซลล์ นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง และแกว่งที่ความเร็ว 200 rpm เมื่อครบเวลานำเอาหลอดออกจากตู้บ่ม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลาประมาณ 5 นาที แล้วดูด SOC ทิ้งประมาณ 850 µl เพื่อให้เหลือเซลล์ประมาณ 100 µl ผสมเซลล์โดยการดีดหลอดด้วยนิ้วเบาๆให้เซลล์ไม่เกาะกันเป็นก้อนและละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates จำนวน 2 plate ในปริมาณเซลล์ที่แตกต่างกัน เพื่อให้สามารถแยกโคโลนีเดี่ยวได้ นำ plate ไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง

เมื่อทำการเลือก blue-white colony โดยเลือก white colony มาเขี่ยบน LB broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มี Ampicillin (0.2 mg) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง ทำการสกัดแบบ Miniprep โดยใช้แต่ละ culture ปริมาตร 2 มิลลิลิตรด้วย FastPlasmid Mini 100 preparation kit (Eppendorf, Germany) ตามที่แนะนำจากผู้ผลิต

แล้วทำการวัดปริมาณพลาสมิดโดยใช้ spectrophotometer และคำนวณปริมาณพลาสมิดที่ได้ เพื่อนำไปตรวจสอบ sensitivity ต่อไป และทำการตรวจสอบด้วยวิธี PCR ด้วย M13 ไพรเมอร์ ว่าได้ขนาดของ PCR product ถูกต้องกับขนาดของยีนที่แทรก (insert) เข้าไปในพลาสมิดหรือไม่ พร้อมตรวจสอบว่า PCR product ที่ได้เป็นส่วนของยีนที่ถูกต้องโดยการทำ DNA Sequencing โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในระบบ multiplex PCR สำหรับการทำ DNA Sequencing

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

เพื่อตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยวิธี DNA sequencing ใช้ BigDye Terminator Version 3.0 (PE Biosystem , C4) จากนั้นอ่านผลด้วย ABIPRISM ™ 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer Cetus, Branchburg, New Jersy) นำ DNA sequence ที่อ่านได้ เข้า program BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อดูว่าลำดับเบสที่ได้มีความใกล้เคียงกับเชื้อสายพันธุ์ใด และเพื่อยืนยันว่าเป็นยีนเดียวกันกับที่ทำการแทรกเข้าไปในพลาสมิด

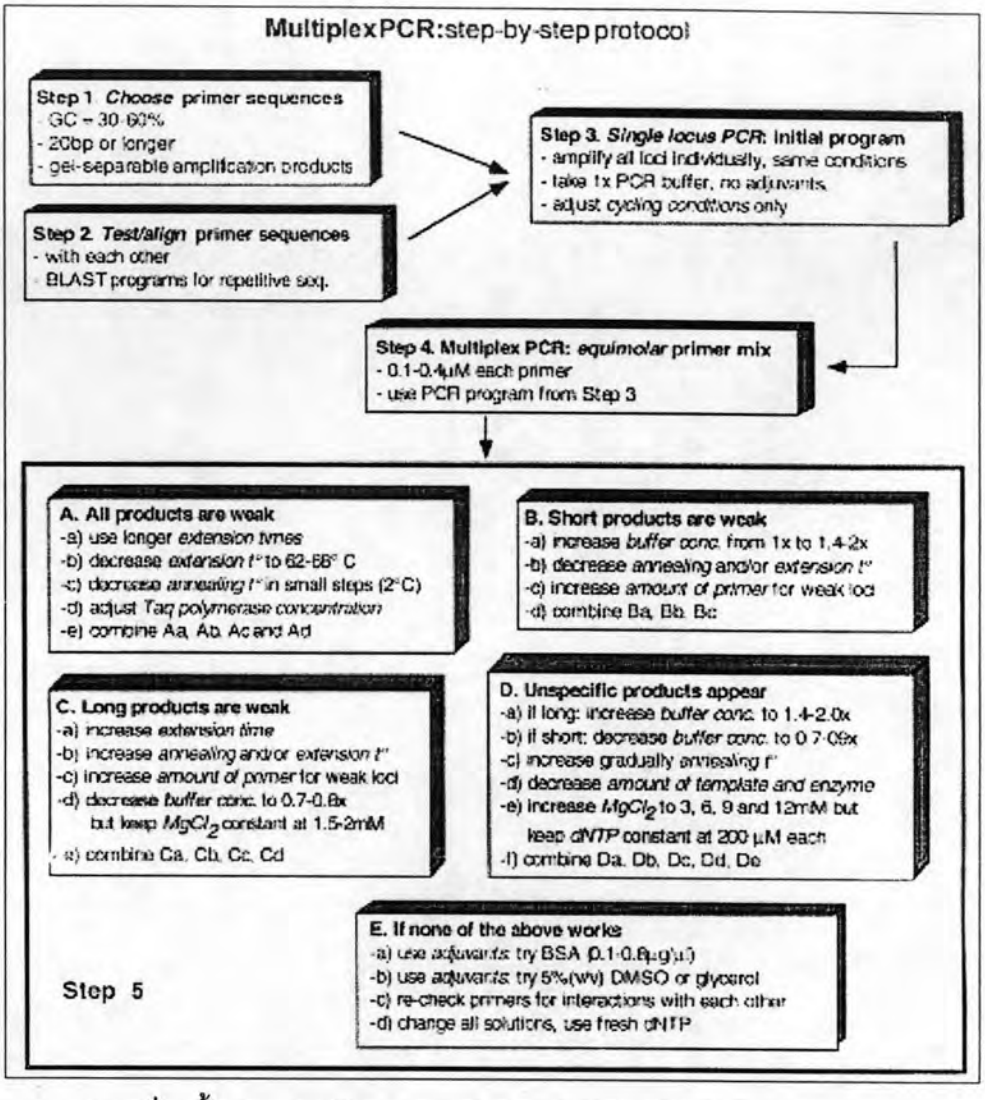
ทำการอ่านผลการถอดรหัสพันธุกรรมที่ได้โดยใช้โปรแกรม Chromas Lite 2.0 เพื่อวิเคราะห์ chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการวิเคราะห์ผลต่อไป

โดยใช้โปรแกรม

- Chromas เป็นโปรแกรมที่ใช้ดูและแก้ไขกราฟโครมาโตแกรมที่ได้จากการทำการถอดรหัสพันธุกรรม
- BLAST จาก www.ncbi.nlm.gov/Blast เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดกับลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตอื่นทั้งหมดในฐานข้อมูลของธนาคารรหัสพันธุกรรม GenBank ว่าผลการถอดรหัสพันธุกรรมเป็นลำดับเบสของยีนที่ทำการใส่เข้าไปหรือไม่
- Clustal X เพื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบส ที่ได้จากการถอดรหัสพันธุกรรมกับลำดับเบสที่ต้องการ
- BioEdit ใช้เปิดแฟ้มที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจากโปรแกรม

การพัฒนาระบบ multiplex PCR

เมื่อได้ positive control จากการโคลนนิ่งแล้ว จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ multiplex PCR โดยการนำไพรเมอร์มาทำ PCR ไหลอดเดียวกัน แบ่งเป็น 2 ระบบ ได้แก่ multiplex M GAPDH มีขนาด PCR product 214 และ 107 bp และ multiplex H1 H3 H5 มีขนาด PCR product 362 112 และ 191 bp ตามลำดับ โดยมีแนวทางในการพัฒนาระบบ multiplex PCR ดังภาพที่ 3 และทำการเลือกสภาวะที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ปริมาณมาก โดยดูจากความเข้มของ PCR product เมื่อทำ agarose gel electrophoresis แล้วสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเออย่างชัดเจนทุกยีน



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการพัฒนาระบบ multiplex PCR (35)

การทดสอบความไว (Sensitivity)

1. นำพลาสมิด ที่สกัดได้จากการ cloning มาทำการวัดปริมาณด้วยเครื่อง Spectrophotometer
2. นำค่า OD ที่ได้ มาคำณวนหาปริมาณพลาสมิด เป็น copies/µl ตามสูตรดังนี้

$$\text{Copies number (copies/µl)} = \frac{\text{X g/µl DNA} \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{Recombinant plasmid length (bp)} \times 660}$$

X = ปริมาณพลาสมิดที่อ่านได้จากการวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer (g/µl)

3. ทำการ dilute พลาสมิดให้มีความเข้มข้นปัน 10^9 copies/µl ตามสูตรดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 = ความเข้มข้นของพลาสมิดเริ่มต้น (µg/µl)

V_1 = ปริมาตรของพลาสมิดเริ่มต้น (µl)

C_2 = ความเข้มข้นของพลาสมิดที่ต้องการ (µg/µl)

V_2 = ปริมาตรของพลาสมิดที่ต้องการ (µl)

4. จากนั้นทำ serial dilution จากปริมาณพลาสมิด 10^9 copies/µl จนถึง 10^0copies/µl
5. นำพลาสมิด ทุกๆ ความเข้มข้นตั้งแต่10^9 copies/µl จนถึง 10^0copies/µl มาทำ multiplex PCR โดยใส่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ multiplex PCR ปริมาณ 1 µl ดังนั้น ในแต่ละปฏิกิริยาจะมีปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น เท่ากับความเข้มข้นของแต่ละพลาสมิด แล้วทำการเปรียบเทียบว่าความเข้มข้นของพลาสมิดที่น้อยที่สุดที่ PCR สามารถเพิ่มจำนวนได้มีค่าเท่าใด

การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

หลังจากได้ระบบ multiplex PCR ที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทุกยีนได้อย่างดีแล้ว จากนั้นจึงนำมาทดสอบว่ามีความจำเพาะกับยีนที่ต้องการเท่านั้น โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. สกัด DNA/RNA ของเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ influenza A virus สายพันธุ์ H2, H4, H6-H16, Respiratory Syncytial Virus (RSV), Human parainfluenza viruses (HPIVs), Human metapneumovirus (hMPV) และเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ *Haemophilus influenzae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus*
2. นำ RNA มาทำ reverse transcription ด้วยไพรเมอร์ influenza cDNA และไพรเมอร์ GAPDHF85

3. นำ cDNA และ DNA ที่ได้มาทำ monoplex PCR ด้วยไพรเมอร์ GAPDH เพื่อคัดกรองว่ามี cDNA และ DNA อยู่จริง เพื่อยืนยันผล false negative ว่าหากได้ผล negative นั้นไม่ได้เกิดจากการที่ไม่มีหรือมีปริมาณ cDNA และ DNA น้อยเกินไป เนื่องจากโดยปกติแล้วในสิ่งส่งตรวจจะมีปริมาณ cDNA ที่ได้จากยีน GAPDH น้อยกว่าปริมาณของ cDNA และ DNA ของไวรัส

4. นำ cDNA และ DNA ที่ได้มาทดสอบด้วย multiplex PCR ทั้ง 2 ระบบต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1. ทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของระบบ Multiplex RT-PCR ที่จะเลือกใช้ โดยดูจากการเปรียบเทียบความเข้มแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากการทำ agarose gel electrophoresis โดยทำการเลือกระบบที่ได้ PCR product ที่มีความเข้มมากที่สุดทุกยีน

2. ทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของระบบ Multiplex RT-PCR ที่เลือก ว่ามี specificity โดยทดสอบระบบ Multiplex RT-PCR ด้วยเชื้อไวรัสและแบคทีเรียชนิดอื่นที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจอื่นๆ ว่ามีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนที่ไม่ได้จำเพาะกับไพรเมอร์หรือไม่ ถ้ามีก็จะต้องทำการปรับระบบที่ใช้ หรือทำการเปลี่ยนไปใช้ไพรเมอร์คู่อื่นแทน

3. ทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของระบบ Multiplex RT-PCR ที่เลือก ว่ามี sensitivity เท่าไร