บทที่ 3

ระเบียบวิจัย

แผนการทดลองแบ่งออกเป็น 7 ข้อ ดังนี้

3.1 เชื้อ *Trypanosoma evansi* ที่ใช้ในการทดลอง

3.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อในหนูทดลอง (mice)

3.3 การแยกเชื้อด้วยวิธี Anion-exchange chromatography (Lanham and Godfrey, 1976)

3.4 การสกัด DNA

3.5 การหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ

3.6 การหาความแตกต่างของ minisatellite DNA ด้วยวิธี PCR

3.7 การทำให้เชื้อ isolate VPh03 บริสุทธิ์ขึ้น

3.1 เชื้อ *Trypanosoma evansi* ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อ *T. evansi* ที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 5 isolates (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ประวัติของเชื้อ *T. evansi* ที่ใช้ในการทดลอง

Isolate	แหล่งที่มา	host	วันที่เก็บ	สถานที่เก็บเชื้อปัจจุบัน
NpI 8/2	ผ่านการโคลนจาก Vriej University of Brussels ประเทศ Belgium	สุกร	พฤศจิกายน พ.ศ. 2528	หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
VPs	จังหวัดนครปฐม	สุกร	ไม่ทราบแน่ชัด	หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
VPh03	ม้าชื่อ พระเดช จากหน่วยม้าทรงประจำพระองค์ฯ กรุงเทพมหานคร	ม้า	16 ตุลาคม พ.ศ. 2546	หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
VPd03G	กรุงเทพมหานคร	สุนัข	24 กันยายน พ.ศ. 2546	หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
VPd03R	กรุงเทพมหานคร	สุนัข	24 กันยายน พ.ศ. 2546	หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 **การเพิ่มจำนวนเชื้อในหนูทดลอง** (mice)

นำเชื้อ *T. evansi* ที่เก็บไว้ในตู้เยือกแข็งที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส มาทำให้ละลายบนถาดน้ำแข็งจนถึงอุณหภูมิห้อง และฉีดเข้าหนูทดลองสะอาด (mice) ทางช่องท้องปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อหนู 1 ตัว หลังจากนั้นตรวจเลือดจากปลายหางหนูและนับจำนวนเชื้อทุกวันด้วยวิธี Rapid Matching Methods (Herberts and Lumsden, 1976) เมื่อเชื้อในกระแสเลือดมีปริมาณ 10^8-10^9 trypanosomes / เลือด 1 มิลลิลิตร จึงทำการเก็บเลือดจากหัวใจหนู โดยใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง นำเลือดไปทำการทดลองต่อไป และเลือดส่วนที่เหลือจะทำการเก็บใน 20% glycerol PSG (phosphate saline glucose) ในอัตราส่วนดังนี้ เลือดที่มีเชื้อ 100 ไมโครลิตร ต่อ 20% glycerol PSG 200 ไมโครลิตร และเก็บในอุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

3.3 **การแยกเชื้อด้วยวิธี** Anion-exchange chromatography **โดยวิธีของ** Lanham and Godfrey (1976)

เตรียม PSG buffer โดยนำ stock PS buffer ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 5:5 และเติม glucose ให้ได้เป็น 1% glucose จากนั้นชั่ง DE52 DEAE cellulose (Whatman®, USA) มา 1.2 กรัม ละลายใน PSG buffer ที่เตรียมไว้ 10 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็นค่า pH 8.0 ด้วย 0.1 M NaOH วางทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นเทส่วนใสทิ้งไป และเติม PSG buffer จนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นเตรียม column โดยใช้ pasture pipette หยด DE52 DEAE cellulose ที่ผสมกับ PSG buffer ลงใน syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร ที่ใช้สำลีอุดปลายท่อไว้ รอให้ตกตะกอนลงมาจนผิวหน้าของตะกอนเรียบ จึงหยดเลือดหนูที่มีเชื้อ *T. evansi* ที่ผสมกับ PSG buffer (อัตราส่วน 1:1) ปริมาณ 400 ไมโครลิตร และหยด PSG buffer ลงใน column จนกว่าเชื้อจะถูก elute ลงมาหมด โดยใช้หลอด plastic centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตรรองรับ buffer ที่ elute ลงมา นำเอา buffer ที่ถูก elute ลงมาไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 5,000 รอบ/นาที (rpm, round per minute) เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เชื้อตกตะกอนลงมา เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนมาละลายใน PSG buffer ใหม่จนได้ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เพื่อนำไปสกัด DNA ต่อไป

3.4 **การสกัด** DNA

วิธีการสกัด DNA ดัดแปลงมาจากวิธีของ Zhao และคณะ (2001) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ นำเชื้อ *T. evansi* ที่ได้จากการแยกเชื้อด้วยวิธี Anion-exchanged chromatography (Lanham and Godfrey, 1976) ตามวิธีข้อ 3.3 มา 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม lysis buffer (660 mM EDTA และ 1.3% *N*-Lauroylsarcosine) 60 ไมโครลิตร และ proteinase K (2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 3 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากัน นำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ

65 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม CTAB buffer (cetryltrimethylammonium bromide) 350 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดูดเก็บส่วนที่เป็นของเหลวใสหลอดใหม่ จากนั้นเติม phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1) 400 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และดูดเก็บสารละลายส่วนบนใสหลอดใหม่ จากนั้นทำการตกตะกอน DNA โดยเติม 4M NaCl 40 ไมโครลิตร และ absolute ethanol ที่เย็นจัด 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 30 นาทีหรือข้ามคืน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที นาน 30 นาที เหลือส่วนที่เป็นตะกอนอยู่ก้นหลอด เติม 70% ethanol 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที นาน 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง เหลือส่วนที่เป็นตะกอนอยู่ก้นหลอด และเติม 70% ethanol 1 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นวางทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้ง และละลายตะกอน DNA ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 200 ไมโครลิตร และเก็บสารละลาย DNA ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.5 การหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ

3.5.1 การเพิ่มสารพันธุกรรมบริเวณ small subunit rRNA gene ด้วยวิธี PCR

การออกแบบ primer ครอบคลุมทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ดังนี้ ตำแหน่งที่ 1 คือตั้งแต่ลำดับเบสที่ 2181-2251 ของ 18s rRNA gene ตำแหน่งที่ 2 คือส่วนที่เป็น ITS1 region ทั้งหมดตั้งแต่ลำดับเบสที่ 1-337 และตำแหน่งที่ 3 คือตั้งแต่ลำดับเบสที่ 1-100 ของ 5.8 s rRNA gene โดยออกแบบจากข้อมูล DNA sequence ของ *T. evansi* จาก GenBank (accession number U75507) จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีความยาวประมาณ 510 คู่เบส ดังรูปที่ 3.1

นำ DNA ของเชื้อแต่ละ isolate ที่สกัดได้จากข้อ 3.4 (การสกัด DNA) ปริมาณ 5 ไมโครลิตรมาทำปฏิกิริยา PCR โดย 1 ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1xbuffer $MgCl_2$ 1.5 mM dNTP mix (Eppendorf, Germany) 0.2 mM forward primer (5' GAT ATT GCT TCA ATA GAG GAA 3') 0.2 µM reverse primer (5' AAA GAT TGG GCA ATG AAA TGA 3') 0.2 µM และ Platinum®*Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, USA) 5 unit และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์จนได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาทั้งหมดไปเข้าเครื่อง thermal cycler (PCR Sprint, ThermoHybaid) ซึ่งตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้ initial PCR activation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย denaturation step 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing step 41 องศาเซลเซียส 30 วินาที extension step 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที ทั้งหมด 35 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

3.5.2 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ผสมผลิตภัณฑ์ PCR 10 ไมโครลิตร กับ loading dye 2 ไมโครลิตร และใช้ marker เป็น 100 base pair DNA ladder (SibEnzyme, USA) 2 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุม (well) ของ 2% agarose gel ที่แช่อยู่ใน chamber ที่มี 1xTAE ใช้กระแสไฟฟ้า 400 แอมแปร์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที เสร็จแล้วนำ gel มาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ภายใต้แสง UV (ultraviolet) และถ่ายรูปเก็บไว้

3.5.3 การทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์

การทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAquick® PCR purification kit (QIAGEN®, USA) ทำตามขั้นตอนดังนี้ โดยเติม PB buffer เป็นปริมาณ 5 เท่าของผลิตภัณฑ์ PCR (ผลิตภัณฑ์ PCR 40 ไมโครลิตร ดังนั้นเติม PB buffer 200 ไมโครลิตร) จากนั้นย้ายสารละลายใส่ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม PE 750 ไมโครลิตร ลงใน column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เทสารละลายทิ้ง ย้าย column มาใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ และเติม EB 40 ไมโครลิตร (ตามปริมาตรของผลิตภัณฑ์ PCR เดิม) ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบ/นาที จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ 40 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.5.4 การโคลน (clone) ผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด (plasmid)

3.5.4.1 การ ligate ผลิตภัณฑ์ PCR

ทำการ ligate ผลิตภัณฑ์ PCR สู่ pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, USA) โดยปฏิกิริยา ligation ประกอบด้วย 1xRapid ligation buffer, T4 DNA Ligase 5 ไมโครลิตร pGEM®-T Easy Vector 50 นาโนกรัม ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ 3 ไมโครลิตร และ T4 DNA Ligese 3 Weiss units ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

3.5.4.2 ขั้นตอน Transformation

เตรียม Bacto® LB agar ที่ผสม Ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับทำ transformation โดยนำ IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside) 0.1 M ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และ X-gal (5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-β-D-Galactopyranoside) 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตรทำให้กระจายตัวบน Bacto® LB agar และทิ้งไว้ 30 นาทีให้แห้ง ก่อนนำไปใช้

นำ *ECOS* 101 1-minute competent cells (*ECOS*™, Taiwan) 100 ไมโครลิตร มาทำให้ละลายในน้ำแข็ง เติมปฏิกิริยา ligation 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที นำเซลล์ที่ได้ทำให้กระจายตัวบน Bacto® LB agar ที่เตรียมไว้แล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.4.3 การสกัดพลาสมิดจาก *Escherichia coli*

เลือกโคโลนีสีขาวที่ขึ้นบน Bacto® LB agar ไปเพาะเลี้ยงต่อใน Bacto® LB agar ที่ผสม Ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงต่อใน Bacto® LB broth ที่ผสม Ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำ Bacto® LB broth ที่มี *E. coli* มาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด QIAprep® Miniprep Kit (QIAGEN®, USA) โดยนำ Bacto® LB broth ที่มี *E. coli* ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนที่ได้มาเติม buffer P1 250 ไมโครลิตร และ buffer P2 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง เติม buffer N3 350 ไมโครลิตร และกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสใส่ลงใน column และนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม buffer PB 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม buffer PE 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาทีอีกครั้ง จากนั้นย้าย column ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ เติม buffer EB 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้พลาสมิดปริมาณ 50 ไมโครลิตร เก็บพลาสมิดที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.5.4.4 การตรวจสอบ recombinant พลาสมิด

นำพลาสมิดที่สกัดได้มา 5 ไมโครลิตร มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *Eco*R I ปฏิกิริยาประกอบด้วย 1Xbuffer H และเอนไซม์ *Eco*R I (Promega,

USA) 5 unit และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์จนได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

จากนั้นนำปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาตรวจสอบขนาดของ DNA ที่ตัดได้ด้วยวิธี agarose electrophoresis โดยนำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร มาผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร ใช้ marker ขนาด 1 kb DNA ladder (SibEnzyme, USA) ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุมของ 1% agarose gel ที่แช่อยู่ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 400 แอมแปร์ 100 โวลต์ 45 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจสอบผลการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะภายใต้แสง UV และถ่ายรูปเก็บไว้

3.5.4.5 การส่งตรวจหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene

เมื่อตรวจสอบแล้วว่า recombinant พลาสมิด มี DNA ที่ต้องการ insert อยู่ จึงทำการส่งตรวจหาลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพ (Bioservice Unit, BSU) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

3.5.4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส

เมื่อได้ข้อมูลลำดับเบสของเชื้อแต่ละ isolate มาแล้วจะนำมาทำการ alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw) และนำมาศึกษา phylogenetic relationship โดยใช้โปรแกรม MEGA3 ด้วยวิธี Neighbor-Joining กำหนด bootstrap 1,000 replicates

3.6 การหาความแตกต่างของ minisatellite DNA ด้วยวิธี PCR

ปฏิกิริยา PCR ที่ทำการทดลองได้ทดลองใช้ primer 2 คู่ ได้แก่ NV4 และ NV5 และ 122-2 และ 122-3 เพื่อทดสอบหา primer คู่ที่แสดงความแตกต่างของ minisatellite DNA ได้

Primer NV5 (5' GAT TGG GTA ACG CCT TCC ACT 3') เป็น forward primer และ NV4 (5' TAA CCA TGA AAC ATG GGC CAT 3') เป็น reverse primer โดย primer คู่นี้มีลักษณะเป็น inverted primers เพื่อให้ได้ PCR product ในส่วนที่อยู่ระหว่าง minisatellite และ primer อีกหนึ่งคู่คือ primer 122-3 (5' GCG CCT 3') เป็น forward primer และ 122-2 (5' TAA CAC ACC A 3') เป็น reverse primer โดย primer ทั้ง 2 คู่ ที่กล่าวมาข้างต้น (NV4, NV5 และ 122-2, 122-3) ออกแบบมาจาก DNA ตรวจสอบ (DNA probe) pTec.21 ที่มีขนาด 122 คู่เบส

ของ *T. evansi* ที่รายงานไว้โดย Viseshakul (1989) และได้แสดงการเข้าเกาะของ primer บน DNA template ดังรูปที่ 3.2

3.6.1 ปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer NV4 และ NV5

นำสารละลาย DNA ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆที่ได้จากการสกัด DNA (ข้อ 3.4) มา 2.5 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา PCR ซึ่ง 1 ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1X buffer $MgCl_2$ 1 mM dNTP mix 0.2 mM primer NV4 และ NV5 อย่างละ 0.4 µM และ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA) 2.5 unit และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์จนได้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดเข้าเครื่อง thermal cycler ซึ่งตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้ initial PCR activation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย denaturation step 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing step 45 องศาเซลเซียส 45 วินาที extension step 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ทั้งหมด 35 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

3.6.2 ปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer 122-2 และ 122-3

นำสารละลาย DNA ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆที่ได้จากการสกัด DNA (ข้อ 3.4) มา2.5 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา PCR ซึ่ง 1 ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1X buffer $MgCl_2$ 2 mM dNTP mix 0.2 mM primer 122-2 และ 122-3 อย่างละ 1 µM และ *Taq* DNA polymerase 2.5 unit และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์จนได้ 25 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา PCR เข้าเครื่อง thermal cycler ซึ่งตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิไว้ดังนี้ initial PCR activation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย denaturation step 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที annealing step 37 องศาเซลเซียส 30 วินาที extension step 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ทั้งหมด 30 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

3.6.3 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

นำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose ผสม ethidium bromide 2 ไมโครกรัม ที่แช่อยู่ใน 1X TAE ใช้ marker เป็น 100 base pair DNA ladder 2 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร และผลิตภัณฑ์ PCR 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร โดยใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 70 นาที หลังจากนั้นนำ gel ที่ได้มาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ภายใต้แสง UV และถ่ายรูปเก็บไว้

3.6.4 **การคำนวณค่า** Similarity coefficient **โดยวิธีของ** Nei and Li (1979)

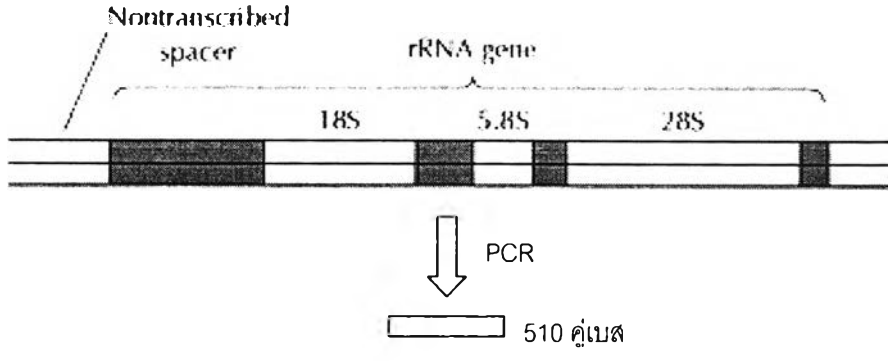
นำรูป gel ที่ได้มานับจำนวนแถบของชิ้นส่วนของ DNA แต่ละ isolate มาคำนวณค่า similarity coefficient (Nei and Li, 1979) ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$F = 2n_{xy} / (n_x+n_y)$$

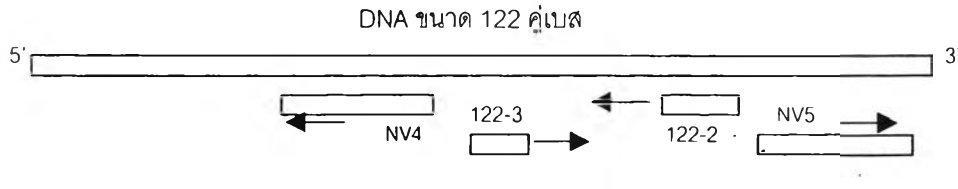
n_xหรือ n_y คือ จำนวนแถบของชิ้นส่วนของ DNA ของ isolate x หรือy

n_{xy} คือ จำนวนแถบของชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดเท่ากันทั้ง isolate x และ y

นำค่า similarity coefficient ที่คำนวณได้ มาวิเคราะห์ความเหมือนและความแตกต่างกันระหว่างแต่ละ isolate



รูปที่ 3.1 การเพิ่มสารพันธุกรรมบริเวณ small subunit rRNA gene (ดัดแปลงจาก Cooper, 2000): ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 510 คู่เบส ซึ่งครอบคลุมส่วนปลายของ 18S rRNA gene ITS1 และส่วนต้นของ 5.8S rRNA gene



รูปที่ 3.2 ตำแหน่งของ primer ที่เข้าเกาะบริเวณ minisatellite pTec21 ที่มีขนาด 122 คู่เบส (Viseshakul, 1989

3.7 การทำให้เชื้อ isolate VPh03 บริสุทธิ์ขึ้น

การทำให้เชื้อ isolate VPh03 บริสุทธิ์ขึ้น ทำโดยการฉีดเลือดที่คาดว่ามีเชื้อ 1 trypanosome เข้าสู่หนูทดลองสะอาดที่ถูกกดภูมิคุ้มกันไว้แล้ว โดยเมื่อตรวจพบเชื้อในหนูทดลองแล้วก็จะทำการเก็บเลือดและผ่านเชื้อด้วยวิธีเดียวกันต่อไป ซึ่งการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นนี้จะทำการผ่านเชื้อทั้งหมด 3 ครั้ง (รูปที่ 3.1) เลือดจากหนูที่มีเชื้อถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 นำมาเจือจางด้วย PBS (phosphate buffer saline) จนได้เชื้อ 1 trypanosome หรือที่เรียกว่า limiting dilution และฉีดเข้าหนูทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกันในการผ่านเชื้อ เลือดส่วนที่ 2 นำมาทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Anion-exchange chromatography และ สกัด DNA (ตามข้อ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ) และเลือดส่วนที่ 3 แบ่งเก็บใน 20% glycerol PSG เก็บที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

การเตรียมหนูทดลองสะอาดก่อนโคลนเชื้อ โดยนำหนูทดลองมาชั่งน้ำหนัก นำน้ำหนักหนูมาคำนวณปริมาณยา cyclophosphamide (Sigma, USA) ที่ใช้ฉีดต่อหนู 1 ตัว เพื่อใช้กดภูมิคุ้มกัน ซึ่งใช้ยาในปริมาณ 200 มิลลิกรัม / น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และต้องทำการฉีดยาก่อนการฉีดเชื้อเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง (Smith et al., 1982)

การทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นจะทำการผ่านเชื้อ 3 ครั้ง (รูปที่ 3.1) การผ่านเชื้อครั้งที่1 ทำโดยนำเอาเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส มาทำให้ละลายและฉีดเข้าหนูทดลองสะอาดทางช่องท้อง ตรวจเลือดจากปลายหางหนูและประมาณจำนวนเชื้อด้วยวิธี Rapid Matching Method จนเชื้อมีปริมาณ 10^9 trypanosomes / เลือด 1 มิลลิลิตร จึงเจาะเลือดจากหัวใจ และเจือจางเลือดที่มีเชื้อด้วย PBS จนเชื้อมีปริมาณ 1 trypanosome แล้วฉีดเข้าหนูทดลองสะอาดที่ถูกฉีดกดภูมิคุ้มกันไว้แล้วเป็นจำนวน 10 ตัว ตรวจเลือดหนูจากปลายหางทุก 2 วัน เมื่อพบว่าเชื้อมีปริมาณ 10^9 trypanosomes / เลือด 1 มิลลิลิตร จึงทำการเก็บเลือดจากหัวใจ

เลือดหนูที่มีเชื้อจากการผ่านเชื้อครั้งที่ 1 ถูกนำมาผ่านเชื้อครั้งที่ 2 โดยนำเลือดมาเจือจางด้วย PBS จนเชื้อมีปริมาณ 1 trypanosome แล้วฉีดเข้าหนูทดลองสะอาดที่ถูกฉีดกดภูมิคุ้มกันไว้แล้วเป็นจำนวน 3 ตัว ตรวจเลือดหนูจากปลายหางทุก 2 วัน เมื่อพบว่าเชื้อมีปริมาณ 10^9 trypanosomes / เลือด 1 มิลลิลิตร จึงทำการเก็บเลือดจากหัวใจ

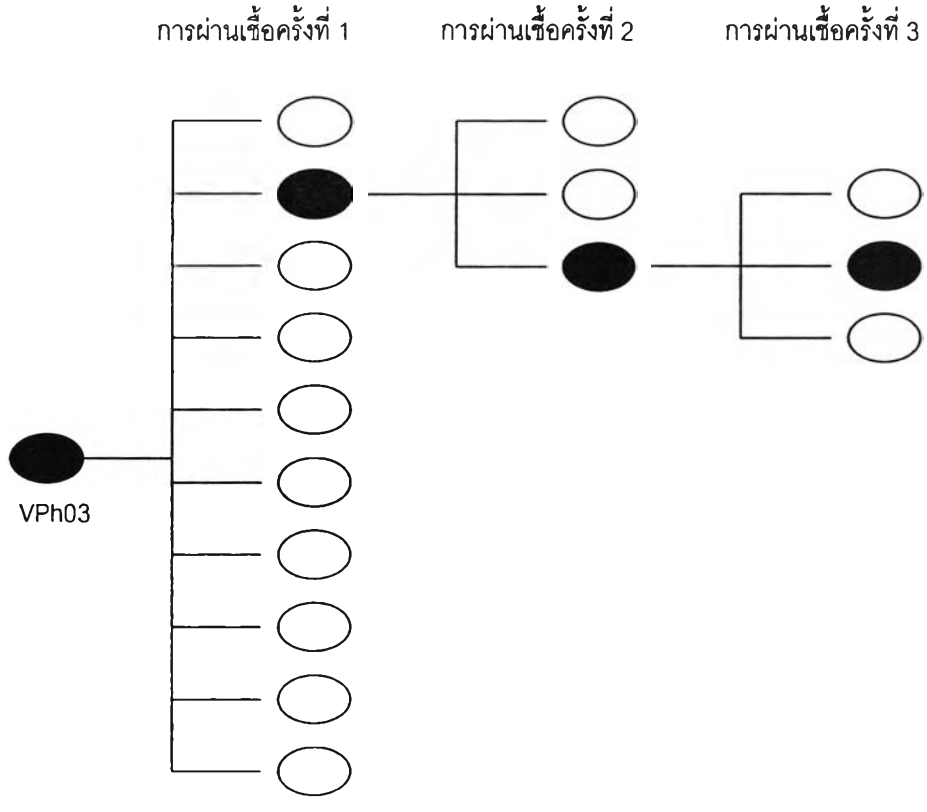
เลือดหนูที่มีเชื้อจากการผ่านเชื้อครั้งที่ 2 ถูกนำมาผ่านเชื้อครั้งที่ 3 โดยนำเลือดมาเจือจางด้วย PBS จนเชื้อมีปริมาณ 1 trypanosome แล้วฉีดเข้าหนูทดลองสะอาดที่ถูกฉีดกดภูมิคุ้มกันไว้แล้วเป็นจำนวน 3 ตัว ตรวจเลือดหนูจากปลายหางทุก 2 วัน เมื่อพบว่าเชื้อมีปริมาณ 10^9 trypanosomes / เลือด 1 มิลลิลิตร จึงทำการเก็บเลือดจากหัวใจ

การทดลองในกลุ่มควบคุม โดยฉีดเชื้อที่คาดว่ามีปริมาณเชื้อ 1 trypanosome ในหนูทดลอง 5 ตัวที่ไม่ได้ทำการฉีดยากดภูมิคุ้มกันไว้ก่อน ทำการตรวจเลือดจากปลายหางหนูทุก 2 วัน เป็นเวลา 20 วัน เมื่อพบว่าเชื้อมีปริมาณ 10^9 trypanosomes / เลือด 1 มิลลิลิตร จึงทำการเก็บ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลือดจากหัวใจ เลือดจากหนูที่มีเชื้อถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ เลือดส่วนที่ 1 นำมาสกัด DNA (ตามข้อ 3.4) และเลือดส่วนที่ 2 แบ่งเก็บใน 20% glycerol PSG เก็บที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

สารละลาย DNA ของเชื้อที่ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นนี้จะนำมาหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ตามวิธีข้อ 3.6 เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้ระหว่างเชื้อที่ไม่ผ่าน (isolate VPh03) และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ และหาความแตกต่างของ minisatellite DNA ด้วยวิธี PCR ตามวิธีข้อ 3.7 เพื่อเปรียบเทียบ DNA fingerprinting profile ว่ามีความแตกต่างระหว่างเชื้อที่ไม่ผ่าน (isolate VPh03) และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นหรือไม่



รูปที่ 3.3 การทำให้เชื้อ isolate VPh03 บริสุทธิ์ขึ้น : ◯ คือหนูทดลองที่ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือด และ ● คือหนูทดลองที่ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือด จากนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ตำแหน่ง 18S rRNA gene, ITS1 และ 5.8S rRNA gene และถูกนำเข้าสู่พลาสมิด ทำการคัดเลือกพลาสมิดมา 3 พลาสมิด เพื่อตรวจหาลำดับเบสต่อไป