บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มคนปกติที่ให้ผลการตรวจ HBs Ag เป็นลบโดยวิธี ELISA จำนวน 50 ราย โดยสุ่มมาจากนิสิตแพทย์ ชั้นปีที่ 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. กลุ่มบุคคลที่ให้ผลการตรวจ HBs Ag เป็นบวก ($HBs\ Ag^+$) จำนวน 50 ราย โดยเก็บจากซีรั่มซึ่งเจาะสิงส่งตรวจที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย

3. กลุ่มบุคคลที่มารับการตรวจรักษาที่แผนกคลินิคไวรัสตับอักเสบ บี สถานเสาวภา สภากาชาดไทย แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ

3.1 กลุ่ม HBs Ag-negative ex-chronic carrier เป็นกลุ่มที่ให้ผลการตรวจ HBs Ag เป็นบวก, anti - HBc เป็นบวก และ anti - HBs เป็นลบติดต่อกันมากกว่าหนึ่งปี ต่อมาเมื่อพบว่า ผลการตรวจ HBs Ag เป็นลบ และ anti-HBs ยังคงเป็นลบ จึงได้รับการฉีดวัคซีนไวรัส ตับอักเสบ บี (HEVAC-B, Pasteur ประเทศฝรั่งเศส) สามครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 เดือน โดยครั้งแรกฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ครั้งที่สอง และ ครั้งที่สามฉีดเข้าใต้กล้ามเนื้อแขน แต่ยังคงพบว่าร่างกายไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อไวรัสตับอักเสบ บี โดยยังให้ผลการตรวจ anti - HBs เป็นลบ จำนวน 12 ราย

3.2 กลุ่มบุคคลปกติ ที่ให้ผลการตรวจ HBs Ag, anti-HBc และ anti-HBs เป็นลบ และเมื่อได้รับการฉีดวัคซีนไวรัสตับอักเสบ บี (Plasma derived vaccine,ประเทศเกาหลี) สามครั้ง ที่ 0, 1, 6 เดือน โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง แล้วพบว่าร่างกายยังไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ โดยให้ผลการตรวจ anti - HBs เป็นลบจำนวน 9 ราย

วิธีการเก็บตัวอย่าง

เจาะเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 5 มล. ใส่ในหลอดแก้วที่ปราศจากเชื้อ นำเลือดไปปั่นแยกซีรั่มที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที 10 นาที นำซีรั่มที่แยกได้เก็บใส่หลอดที่ปราศจากเชื้อ นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70° ซ. เพื่อรอการสกัดแยก DNA

วิธีการตรวจทางน้ำเหลือง (Serological test)

การตรวจหา HBs Ag, anti - HBc และ anti - HBs ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ของบริษัท Roche (Basel, Switzerland)

การสกัด DNA

การสกัด DNA จากซีรั่มใช้วิธี proteinase K phenol chloroform extraction ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Shih และคณะ(68) โดยสกัดจากซีรั่ม 100 ul ด้วย lysis buffer (0.5 % sodium dodecyl sulfate , 100 ug/ml proteinase K , 5 mM EDTA, 10 mM Tris HCl , pH 8.0) นำไปแช่ที่อุณภูมิ 65 °ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดแยกด้วย phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1) 2 ครั้ง และสกัดด้วย chloroform : isoamylalcohol (24 : 1) อีก 1 ครั้ง ตกตะกอน DNA ด้วย absolute ethylalcohol ที่ -70° ซ. เป็นเวลา 30 นาที ปั่นแยกตะกอน DNA ที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที 10 นาที ล้างตะกอน DNA ที่ได้ด้วย 70% alcohol

1 ครั้ง จากนั้นนำตะกอน DNA ที่ได้ไปทำให้แห้งในตู้สูญญากาศ ละลายตะกอน DNA ด้วย 50 ul TE buffer (10 mM Tris HCl ; pH 8.0, 0.1 mM EDTA) นำไปเก็บไว้ที่ -20°ซ. หรือในปฏิกิริยา PCR ทันที

Oligonucleotide primers

Oligonucleotide primers ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้พิจารณาจากส่วน core gene ของไวรัสตับอักเสบ บี ซึ่งเป็นส่วนที่มีลำดับ nucleotide เหมือนกันในทุกสายพันธ์ คือ adr, adw และ ayw (69) ซึ่งสังเคราะห์โดยบริษัท Synthetic genetic, U.S.A. นอกจากนี้ยังพบว่า core gene ของไวรัสชนิดนี้เป็นส่วนที่ถูกอนุรักษ์ (conserved region)

1. Oligonucleotide primer คู่นอก

Oligonucleotide primer คู่นอก ประกอบด้วย primer 1766 และ primer 2287 (R) Primer 1766 มีตำแหน่งลำดับ nucleotide ที่ 1766 ถึง 1788 ของ HBV DNA ประกอบด้วย 23 nucleotides มี GC content ร้อยละ 52

Primer 1766 5′- CTT TGT ACT AGG AGG CTG TAG GC - 3′

Primer 2287 (R) มีตำแหน่งลำดับ nucleotide ที่ 2267 ถึง 2287 ของ reverse (R) strand DNA ประกอบด้วย 21 nucleotides มี GC content ร้อยละ 57

Primers 2287 (R) 5′-GGA GGA GTG CGA ATC CAC ACT - 3′

2. Oligonucleotide primer คู่ใน (Nested - Primer)

Oligonucleotide primer คู่ในประกอบด้วย primer 1891 และ primer 2156 (R) Primer 1891 มีลำดับ nucleotide เริ่มจากตำแหน่งที่ 1891 ถึง 1912 ของ HBV DNA ประกอบด้วย 22 nucleotides มี GC content ร้อยละ 55

Primer 1891 5´- GCT TTG GGG CAT GGA CAT TGA C - 3´

Primer 2156 (R) มีลำดับ nucleotide เริ่มจากตำแหน่งที่ 2135 ถึง 2156 ของ reverse (R) strand DNA ประกอบด้วย 22 nucleotides มี GC content ร้อยละ 50

Primer 2156 (R) 5´- CTA CTA ATT CCC ATG CTG G - 3´

Amplification of HBV DNA

1. Two - step nested PCR

1.1 First step PCR

เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ได้จากการสกัดจากสิ่งส่งตรวจโดยเติม DNA ที่ผ่านการสกัดเรียบร้อย 10 ul ลงใน reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย Taq DNA polymerase 1.25 units , 100 uM dNTPs , 10 mM Tris HCl [pH 8.3] 50 mM KCl , 0.01 % (wt/vol) gelatin และ 1.5 mM $MgCl_2$, โดยใช้ primer 1766 และ primer 2287 (R) อย่างละ 25 pmole โดยให้มีปริมาตรสุดท้าย 50 ul เขย่าสารให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า และเติม mineral oil ปริมาณ 50 ul เพื่อป้องกันการระเหยของสาร จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเครื่อง DNA thermal cycler โดย

ทำให้ร้อนก่อนที่ 94° ซ.เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงทำการเพิ่มปริมาณ DNA อีก 30 รอบ ซึ่งแต่ละรอบของการเพิ่มจำนวน DNA ประกอบด้วย denaturation ที่ 94° ซ.30 วินาที, annealing ที่ 55° ซ. 30 วินาที และ extension ที่ 72° ซ.1 นาที เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 30 จะทำการ extension ที่ 72° ซ. อีกเป็นเวลา 5 นาที โดยในการทำ PCR แต่ละครั้ง จะทำ positive control และ negative control ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง DNA product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยใช้ primer 1766 และ 2287 (R) มีขนาด 521 base pairs

1.2 Second step PCR หรือ Nested PCR

เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ได้จาก first step PCR โดยใส่ DNA product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในขั้นตอนแรกปริมาณ 1 ul ลงใน reaction mixture ซึ่งมีส่วนผสมเหมือนกันกับ reaction mixture ใน first step PCR โดยใช้ primer 1891 และ 2156 (R) อย่างละ 25 pmole โดยให้มีปริมาตรสุดท้าย 50 ul จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณ DNA thermal cycler เหมือนกันกับขั้นตอนใน first step PCR DNA product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยใช้ primer คู่นี้มีขนาดเท่ากับ 265 base pairs

2. One - step nested PCR

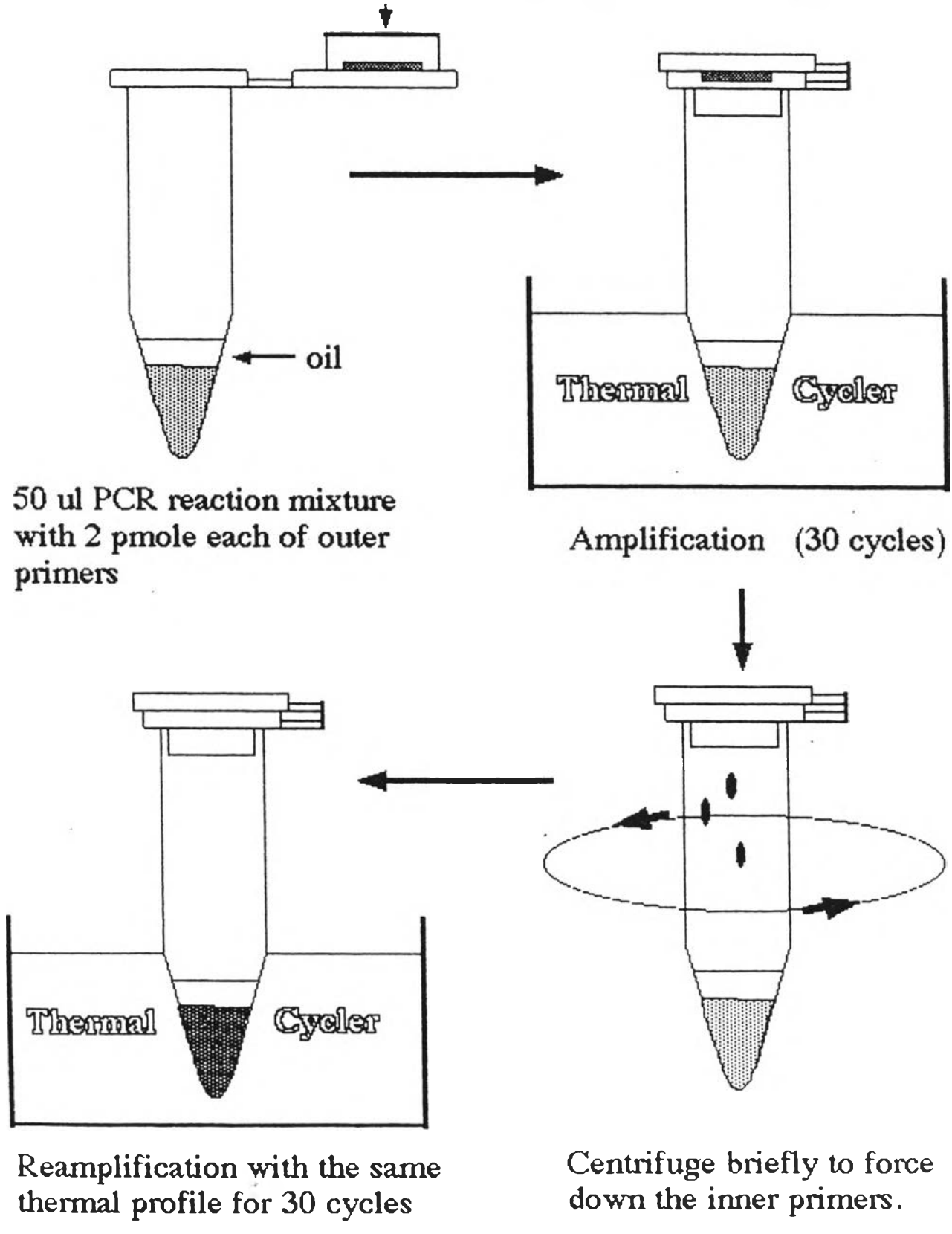
ใส่ DNA ที่ได้จากการสกัด 10 ul ลงใ น reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย primer 1766 และ 2287 (R) อย่างละ 2 pmole , Taq DNA polymerase 1.25 units , 100 uM dNTPs, 10 mM Tris HCl [pH 8.3], 50 mM KCl 0.01 % (wt/vol) gelatin และ 1.5 mM $MgCl_2$ โดยให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 ul เขย่าสารให้เข้ากัน เติม 50 ul mineral oil เพื่อป้องกันการระเหยของสาร เตรียม nested reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย primer 1891 และ 2156 (R) อย่างละ 25 pmole, 10 mM Tris HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 0.01 % (wt/vol) gelatin และ 1.5 mM $MgCl_2$ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นดูด 10 ul ของ nested reaction mixture

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใส่ลงบนฝาด้านในของหลอดที่ใส่ first step reaction mixture ไว้เรียบร้อย จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเครื่อง DNA thermal cycler โดยทำให้ร้อนก่อนที่ 94° ซ. 3 นาที แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณ DNA อีก 30 รอบ ซึ่งแต่ละรอบของการเพิ่มจำนวน DNA เหมือนกันกับการทำ Two - step nested PCR เมื่อครบ 30 รอบ จึงนำหลอดทดลองมาปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที 30 วินาที จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวน DNA อีกครั้งด้วยเครื่อง DNA thermal cycler 30 รอบ ซึ่งแต่ละรอบของการเพิ่มจำนวนเหมือนกันกับการเพิ่มจำนวนในครั้งแรก (รูปที่ 3.1)

Agarose gel electrophoresis

ผสม PCR product 10 ul กับ 10 X gel loading buffer type II 2 ul จากนั้นหยอดลงในช่องของ 1.2 % agarose gel แล้วนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ ที่ 90 โวลต์ ใน 1X TAE buffer ที่มี ethidium bromide 50 ug/ml ผสมอยู่ จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ขนาดของ DNA product นั้นทราบได้โดยเทียบกับ standard molecular weight marker 174 / Hae III และ DNA /Hind III



One-step Nested Polymerase Chain Reacti

รูปที่ 3.1 แสดงวิธีการทำ One - step nested PCR