

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัด RNA

4.1.1 ผลการสกัด RNA จากสมองสุนัข โดยวิธี AGPC (107) จำนวน 120 ตัวอย่างให้ค่า OD 260/OD 280 ประมาณ 1.3-2.0 ซึ่งคิดเป็น RNA ทั้งหมดประมาณ 100-200 ug โดยมีความเข้มข้นเป็น 1-2 ug/ul

4.1.2 ผลการสกัด RNA จาก TCM ที่เก็บจาก CVS-11 infected baby hamster kidney cells

พบว่าอัตราส่วนของ OD 260 / OD 280 อยู่ระหว่าง 1.8-2.0 คิดเป็น RNA ของ virus 0.16 ug/ul

4.1.3 ผลการสกัด RNA จากสมองร่วมกับ TCM

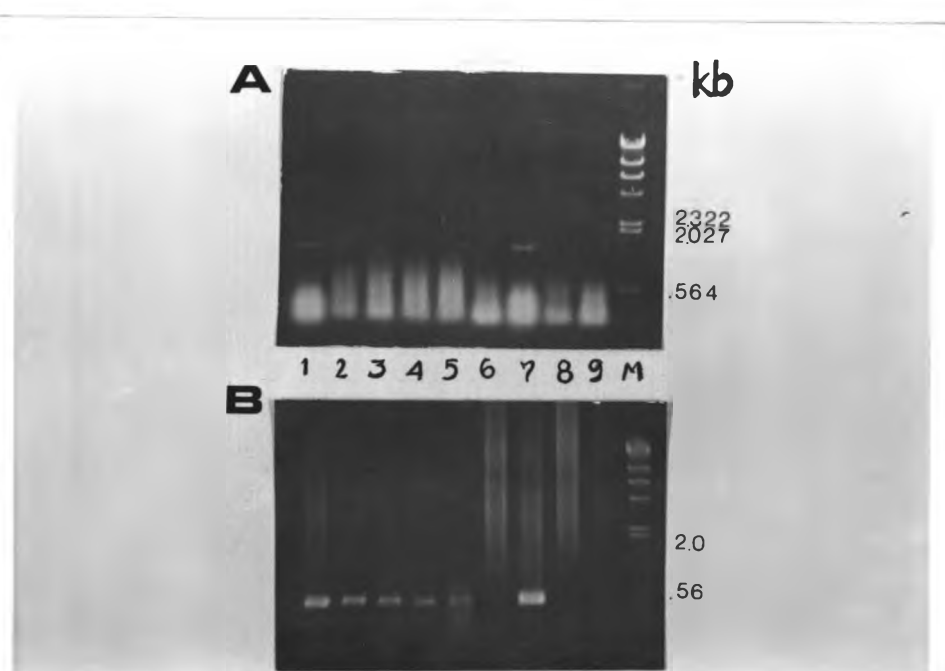
พบว่าอัตราส่วนของ OD 260/OD 280 เท่ากับ 1.6 คิดเป็น RNA รวม หรือ total RNA ประมาณ 1.3 ug/ul

4.2 ผลการหา sensitivity ของ RNA

4.2.1 ผลการหา sensitivity ของ total RNA จากเนื้อเยื่อสมองที่ติดเชื้อ

Total RNA ถูกปรับให้มีความเข้มข้น 1 ug/ul ดังนั้นปริมาณตั้งต้นของ total RNA คือ 5 ug และถูกเจือจางให้มีปริมาณเป็น 500, 50, 5, 0.5 ng ตามลำดับ เมื่อผ่านขั้นตอนการสร้าง cDNA, first step amplification และ second step amplification พบว่า การเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้ primer กุ่านั้นทำให้ DNA fragment ที่มีความเข้ม (intensity) สัมพันธ์กับความเข้มข้นของ RNA ดังรูปที่ 5 กล่าวคือ ความเข้มของ DNA fragment จะลดลงเมื่อ dilution เพิ่มขึ้น และ dilution สุดท้ายคือ 1×10^{-4} ที่ยังคงเห็น band ของ DNA ซึ่งคิดเป็น total RNA 0.5 ng

รูปที่ 5 แสดงปริมาณ total RNA ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจได้ด้วยวิธี nested PCR, first amplicon นั้นอยู่ใน panel A ตั้งแต่ lane 1-9, โดยที่ lane 6 และ 8 เป็น negative control, lane 7 เป็น positive control และ lane 9 เป็น DEPC·H₂O control ตามลำดับ สำหรับ nested amplicon อยู่ใน panel B ตั้งแต่ lane ที่ 1-9 โดยที่ lane 6 และ 8 เป็น negative control, lane 7 เป็น positive control, และ lane 9 เป็น DEPC·H₂O control ตามลำดับ



หมายเหตุ

lane 1 - lane 5 มีปริมาณ total RNA 5, 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005 ug ตามลำดับ

negative control บ่งชี้ถึง background RNA ที่ไม่มี templates

DEPC·H₂O control คือ negative control without nucleic acid ป้องกัน contamination ของ PCR mixture

M หรือ molecular weight marker คือ λ DNA/Hind III

4.2.2 ผลการหา sensitivity ของ virus specific RNA และ virus specific RNA ร่วมกับเนื้อสมองปกติ

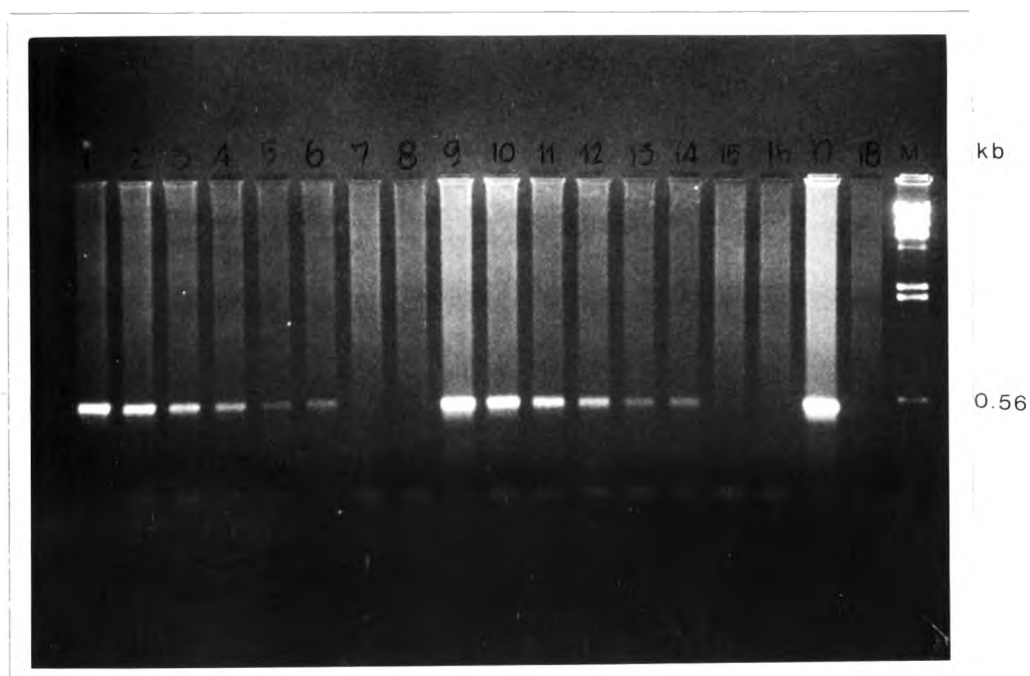
RNA ของไวรัส 0.8 ug หรือ 800 ng ที่สกัดได้จาก TCM ซึ่งเก็บจาก CVS-11 infected BHK-21 cells และ TCM ในปริมาณเท่ากันกับครั้งแรกพร้อมกับเนื้อสมองปกติ เมื่อนำไปเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 80, 0.8, 0.08, 0.008, 0.0008 ng ตามลำดับ แล้วผ่านขั้นตอนการสร้าง cDNA, first step amplification, nested amplification พบว่า RNA ของไวรัสแต่เพียงอย่างเดียว และ RNA ของไวรัสร่วมกับ RNA ของเนื้อสมองปกติ นั้น สามารถตรวจได้ที่มีความเข้มข้นเท่ากันคือ 8 pg ดังรูปที่ 6

4.3 ผลการทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิค nested PCR

จากการตรวจสอบ 500 ตัวอย่างด้วยวิธี nested PCR พบสมองที่ให้ผลบวก 224 ตัวอย่าง และสมองที่ให้ผลลบ 276 ตัวอย่าง โดยสมองที่เป็นบวกจะให้ DNA fragment ขนาด 524 bp ดังรูปที่ 7

สำหรับผลการตรวจด้วย FAT นั้นให้ผลบวก 223 ตัวอย่าง และให้ผลลบ 277 ตัวอย่าง โดยมี 1 ตัวอย่างที่ FAT ให้ผลลบแต่ nested PCR และ MIT ให้ผลบวก

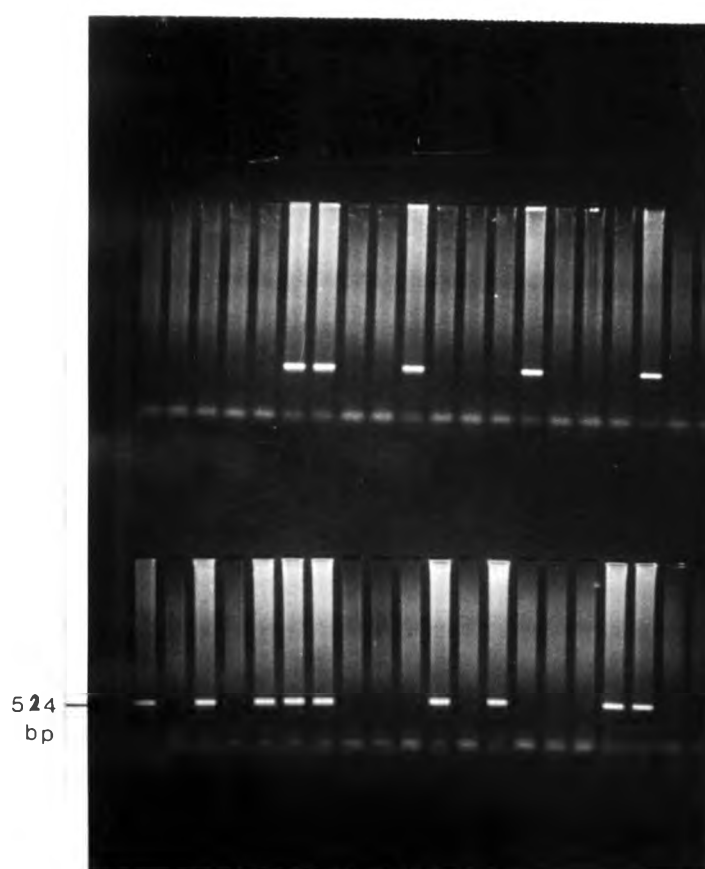
รูปที่ 6 แสดงปริมาณ virus specific RNA และ virus specific RNA รวมกับเนื้อสมองปกติที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจได้ด้วยวิธี nested PCR



lane 1-8 แสดง dilution ของ virus RNA รวมกับเนื้อสมองปกติโดยมีปริมาณ virus specific RNA 800, 80, 8, 0.8, 0.08, 0.008, 0.0008, 0.00008 ng ตามลำดับ lane 9-16 แสดง dilution ของ virus specific RNA ที่สกัดจาก TCM ซึ่งมีปริมาณ RNA 800, 80, 8, 0.8, 0.08, 0.008, 0.0008, 0.00008 ng ตามลำดับ

lane 17 คือ positive control, lane 18 คือ negative control ที่ไม่มีกรด nucleic (DEPC·H₂O control), M หรือ molecular weight marker คือ λ DNA/Hind III

รูปที่ 7 แสดงผลการตรวจด้วย nested PCR ซึ่งตัวอย่างที่เป็นบวกให้ DNA fragment ขนาด 524 bp



ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ MIT, FAT และ nested PCR จากสมอง 500 ตัวอย่าง

Test	MIT	FAT	Nested PCR
No. of samples			
positive samples	224	223	224
negative samples	276	277	276
Total	500	500	500

4.4 ผลการเปรียบเทียบ stability ของสิ่งส่งตรวจเมื่อนำมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธี nested PCR, FAT และ MIT

ผลการเปรียบเทียบ stability ของสิ่งส่งตรวจคือสมองสุนัข 20 ตัว ซึ่งเป็นสมองบวกและสมองลบด้วย FAT อย่างละ 10 ตัวอย่าง โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชม.

จากการทดลองพบว่า nested PCR สามารถตรวจสมองที่เป็นบวกได้ครบทั้ง 6 ช่วงเวลา ถึงแม้จะตั้งทิ้งไว้ที่ 72 ชม.ก็ตาม สำหรับ FAT นั้นสามารถตรวจสมองที่เป็นบวกได้ครบที่ 2, 6, 12, 24 ชม. แต่มี false negative ที่ 48 และ 72 ชม. กล่าวคือ ตรวจสมองบวกได้ 8 และ 3 ตัวอย่างตามลำดับ ส่วน MIT สามารถตรวจสมองที่เป็นบวกได้ครบที่ 2, 6, 12 ชม. แต่มี false negative กับสมองที่ตั้งทิ้งไว้ที่ 24, 48 และ 72 ชม. กล่าวคือ ตรวจสมองได้เพียง 7, 3 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ ดังแสดงตามตารางที่ 3 สำหรับสมองลบนั้นทั้ง 3 วิธีตรวจให้ผลลบเช่นเดียวกัน

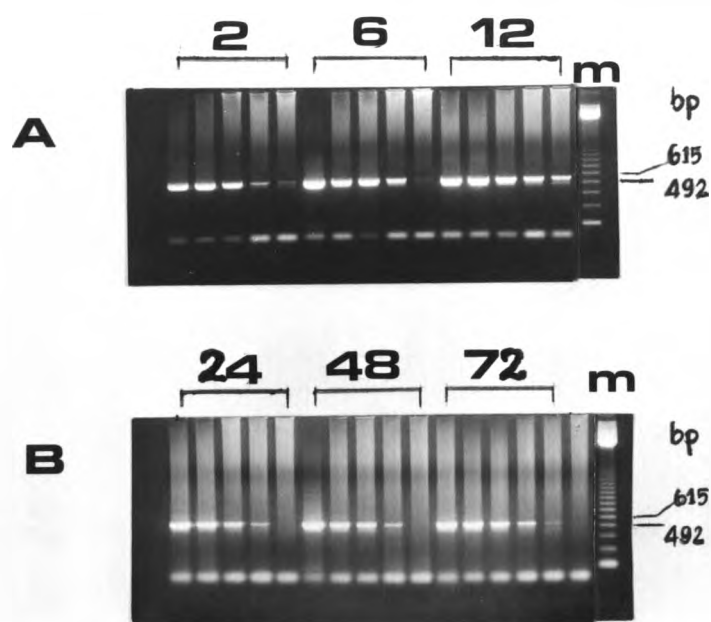
ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบของบวก 10 ตัวอย่าง ทั้ง 6 ช่วง
เวลา 2, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชม. ด้วยวิธี nested PCR, FAT
และ MIT

Times (hrs)	2			6			12			24			48			72		
Tests Samples	FAT	MIT	N PCR	FAT	MIT	N PCR	FAT	MIT	N PCR	FAT	MIT	N PCR	FAT	MIT	N PCR	FAT	MIT	N PCR
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
4	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
5	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
7	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Total positive tests	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7	10	8	3	10	3	2	10

หมายเหตุ

MIT เป็น - หมายถึง หนูไม่ตายภายใน 1 เดือน

4.5 ผลการหาปริมาณ RNA ที่น้อยที่สุดจากสมองสัตว์ที่ตั้งทิ้งไว้ที่เวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 2, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชม. ด้วยวิธี nested PCR



รูปที่ 8 แสดงการหาปริมาณ RNA ที่น้อยที่สุดจากสมองสุนัขที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องตั้งแต่เวลา 2, 6, 12 ชม. (panel A) และ 24, 48, 72 ชม. (panel B) m หรือ molecular weight marker คือ 123 bp DNA ladder