บทที่ 4

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การเก็บ specimens

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการวิจัยนี้ เก็บจากผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ และ โรงพยาบาลภูมิพลอดุลยเดช พอ. โดยแบ่งผู้ป่วยเป็นกลุ่มต่าง ๆ ดังนี้

ผู้ป่วยมะเร็งนาโสฟาริงส์	40 ราย	(ชาย 27 ราย หญิง 13 ราย)
ผู้ป่วยลิมป์โฟมา	30 ราย	(ชาย 21 ราย หญิง 9 ราย)
ผู้ป่วยมะเร็งบริเวณลำคอและใบหน้า	50 ราย	(ชาย 30 ราย หญิง 20 ราย)
ผู้ป่วยมะเร็งปอด	40 ราย	(ชาย 30 ราย หญิง 10 ราย)
ผู้ป่วยมะเร็งตับ	40 ราย	(ชาย 32 ราย หญิง 8 ราย)
ผู้ป่วยมะเร็งบริเวณต่าง ๆ ของร่างกาย	50 ราย	(ชาย 33 ราย หญิง 17 ราย)
คนปกติ	50 ราย	(ชาย 35 ราย หญิง 15 ราย)

ผู้ป่วยในแต่ละกลุ่ม เป็นผู้ที่มีอายุระหว่าง 30-65 ปี ทำการเจาะเลือดจากผู้ป่วยก่อนการรักษา สำหรับผู้ป่วยมะเร็งนาโสฟาริงส์จะเก็บเลือดทั้งก่อนการรักษา และเก็บเลือดหลังจากได้รับการรักษา โดยทำการตรวจหาระดับแอนติบอดี้เป็นระยะ ๆ เท่าที่จะทำได้ สำหรับการวิจัยนี้สามารถติดตามหาระดับแอนติบอดี้หลังจากได้รับการรักษาในผู้ป่วย NPC ชาย 2 ราย หญิง 1 ราย

การเก็บเลือดได้ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณแขนประมาณ 5 ml ใส่ขวด sterile แล้วปั่นแยกซีรั่มเก็บไว้ใน sterile vials ที่ -20° ซ จนกว่าจะนำมาทำการตรวจหาแอนติบอดี้

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ B_{95-8} ซึ่งเป็น lymphoblastoid cell line ชนิดหนึ่งที่มี

เชื้อ EBV นำเซลล์นี้มาเลี้ยงใน media RPMI 1640 (Grand Island Biological company, N.Y. GIBCO) ซึ่งมี 8% heat inactivated fetal calf serum (GIBCO), penicillin 100 U/ml (Merk Sharp & Dohme Thailand Ltd) และ streptomycin 100 ug/ml (Merk Sharp & Dohme Thailand Ltd) หลังจากนั้น ปรับ pH ให้ได้ 7.4 โดยใช้ 7.5% $NaHCO_3$ หรือ 1M N-2-Hydroxy ethyl piperazine-N-2 ethane sulfonic acid (HEPES) (Flow laboratory , U.S.A.) และ subculture เซลล์ทุก ๆ 3-4 วัน

3. การเตรียม EBV associated antigens

ใช้เซลล์ B_{95-8} เป็น source ของ EBV associated antigens โดยนำ suspension ของเซลล์มาปั่นที่ 250xG 10 นาที เท supernatant ทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วย 0.85% sodium chloride solution (NaCl) 2 ครั้ง หลังจากเท supernatant ทิ้งแล้วนำเซลล์มาทำให้เป็น cell suspension ใน 1-2 หยด 0.85% NaCl solution แล้วนำเซลล์มา smear บน microscopic slide (Gold Seal, No. 3010, Clay-Adams) ที่ได้เขียน slide ให้เป็นวงด้วย Diamond pen, slide ละ 8 วง และ smear เซลล์ ในวงเหล่านี้ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้ว fix เซลล์ใน precooled acetone ที่ -20°ซ 10 นาที ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บ slide ไว้ที่ -20°ซ จนกว่าจะนำมาใช้ (ใช้ภายใน 1 อาทิตย์)

4. Fluorescein conjugated anti-human antibody

ใช้ goat anti-human Ig G (heavy chain specific) fluorescein conjugated (Hyland div. Travenol Laboratories inc., Costa Mesa Calif, U.S.A.) สำหรับการตรวจหาแอนติบอดี้ชนิด Ig G

ใช้ goat anti-human Ig A (heavy chain specific) fluorescein conjugated (Hyland div. Travenol Laboratories inc., Costa Mesa Calif, U.S.A.) สำหรับการตรวจหาแอนติบอดี้ชนิด Ig A

ละลาย conjugated antibodies ด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.6 แล้วแบ่งใส่ vial เล็ก ๆ vial ละ 0.1 ml เก็บที่ -20°ซ

เมื่อจะใช้นำ conjugated antibodies ใน vial นี้มาละลายแล้วนำมาทำให้เจือจางด้วย PBS pH 7.6 ในอัตราส่วน 1:20

5. <u>การหาระดับแอนติบอดี้ชนิด Ig G และ Ig A โดยวิธี indirect immuno-fluorescence technique</u>

นำซีรั่มที่จะตรวจหาระดับแอนติบอดี้ชนิด Ig G และ Ig A มาทำให้เจือจางด้วย PBS pH 7.6 โดยเจือจางตามต้องการ นำซีรั่มที่เจือจางเหล่านี้มาหยดบนเซลล์ที่ smear บน slide (slide ที่นำมาใช้ต้องนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเสียก่อน) incubate ที่ 37° ซ ใน moisture chamber 30 นาที สำหรับซีรั่มที่จะตรวจ Ig G และ incubate 1 ชม. สำหรับซีรั่มที่จะตรวจ Ig A ล้าง slide ด้วย PBS แล้วแช่ใน PBS ประมาณ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำมาย้อมด้วย goat anti-human Ig G (heavy chain specific) fluorescein conjugated เพื่อหาระดับแอนติบอดี้ชนิด Ig G และย้อมด้วย goat anti-human Ig A (heavy chain specific) fluorescein conjugated เพื่อหาระดับแอนติบอดี้ชนิด Ig A แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องใน moisture chamber 30 นาที ล้าง slide ด้วย PBS แล้วแช่ใน PBS ประมาณ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้ว mount slide ด้วย buffered glycerol (90% glycerol และ 10% PBS pH 7.6) แล้วทดสอบดูด้วย fluorescent microscope (TIYODA) ในการหาระดับแอนติบอดี้นี้ ก่อนที่จะตรวจหาระดับแอนติบอดี้จะทำ screening test ในซีรั่มผู้ป่วยทุกคน เพื่อดูว่าในซีรั่มเหล่านั้นมีแอนติบอดี้ชนิด Ig G และ Ig A หรือไม่ ถ้าพบว่ามีแอนติบอดี้ก็จะนำมาทำการตรวจหาระดับแอนติบอดี้นั้น (ในการย้อมเพื่อหาระดับแอนติบอดี้นี้ทุกครั้งจะทำการย้อม positive และ negative sera ควบคู่ไปด้วยเสมอ เพื่อใช้เป็น control โดยเตรียม serum control 1:10 และ 1:160 positive control)