สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Cross-sectional, descriptive research) ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) แล้ว

ประชากร

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ เป็นตัวอย่างอุจจาระจากประชากรเด็กไทยที่รับไว้ในโรงพยาบาลทั้งหมด 2 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร และโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ในช่วงเดือนมิถุนายน 2552-พฤษภาคม 2554 จากอาการอุจจาระร่วง ซึ่งได้รับการส่งตรวจจากงานบริการ และได้รับอนุญาตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลแล้ว รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 562 ตัวอย่าง แล้วคัดเลือกตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อไวรัสโรตามา 22 ตัวอย่าง เพื่อศึกษา complete genome

การคำนวณขนาดประชากร

คำนวณขนาดตัวอย่างโดยใช้อัตราการตรวจพบเชื้อไวรัสโรตาในอุจจาระของผู้ป่วยเด็กที่มาเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลด้วยอาการอุจจาระร่วง ดังแสดงในสูตรการคำนวณนี้

สูตรการคำนวณขนาดตัวอย่าง

$$n = \frac{Z^2PQ}{d^2}$$

โดย : Z ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% = 1.96

: อัตราการตรวจพบเชื้อ Rotavirus ในประเทศไทย (P) = 0.44

: Q = 1 – P = 0.56

: ค่าความคลาดเคลื่อน (d) = 15% ของอัตราการตรวจพบเชื้อ Rotavirus ในเด็กที่มาพักรักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาลด้วยอาการอุจจาระร่วง

แทนค่าลงในสูตร

$$n = \frac{(1.96)^2(0.44)(1-0.44)}{(0.15*0.44)^2} = 217 \text{ คน}$$

∴ ต้องทำการศึกษาตัวอย่างจากผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงในประเทศไทยจำนวนอย่างน้อย 217 ตัวอย่าง

แต่ในการวิจัยนี้สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมดเป็นจำนวน (มิถุนายน 2552-พฤษภาคม 2554)

- โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น จำนวน 521 ตัวอย่าง
- โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวน 41 ตัวอย่าง

รวมทั้งสิ้น 562 ตัวอย่าง

ตัวอย่างอุจจาระทั้งหมดละลายอยู่ในสารละลาย 0.1% Phosphate buffered saline (PBS) ซึ่งถูกนำมาปั่นแยก และเก็บรักษาสารละลายส่วนบนไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถูกนำมาใช้

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่าง

- 0.1% Phosphate Buffered Saline (PBS)

2. สารเคมีสำหรับสกัด Viral RNA

- Viral Nucleic Acid Extraction kit (RBC Bioscience, Cat no.YVN100)

3. สารเคมีสำหรับการตรวจสอบและเพิ่มจำนวนยีนด้วยวิธี one-step RT-PCR

- SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Cat no.11732-020)
- diethyl pyrocarbonate (DepC)
- 5 Prime PerfectTaq Plus MasterMix Kit
- Distill water (DW)

- Specific primers: forward primers และ reverse primers
- Magnesium chloride (MgCl)
- RNA template

4. สารเคมีสำหรับการทำ Agarose gel electrophoresis

- GeneRuler 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas, Cat no. SM0321)
- Agarose, Low EEO, Molecular Biology grade (Reserch Organics, Cat no. 1170A)
- 1× Tris borate buffer (1×TBE)
- Ethidium Bromide (SIGMA, Cat no.E-1510)

5. สารเคมีสำหรับทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

- HiYield™ Gel/ PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan)

6. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับงานวิจัย

- Automatic adjustable micropipette: P2 (0.1-2 µl), P10 (0.5-10 µl), P20 (5-20 µl), P100 (20-100 µl), P200 (20-200 µl), P1000 (100-1000 µl) (Eppendorf, Germany)
- Pipette tip: 10 µL, 200 µL and 1000 µL (AxyGen, USA)
- PCR tubes 0.2 ml (AxyGen, USA)
- Microtubes 1.5 ml (AxyGen, USA)
- Vortex mixer (Scientific industry, USA)
- Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)
- PCR Mastercycler personal (Hamburg, Germany)
- Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
- Water Purification equipment (Water pro Ps, USA)
- Power supply model 250 (Giboco BRL,USA)
- Parafilm (American Nation Can, USA)
- Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
- Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)

- Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich, USA)
- Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)
- Refrigerator 4°C (Misubishi, Japan)
- Freezer-20°C (Sanyo, Japan)
- Freezer–70°C (Forma Scientific, USA)
- Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)
- Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. **การเก็บตัวอย่าง**

- เก็บตัวอย่างที่เป็นอุจจาระ (stool) ลง 0.1% Phosphate Buffered Saline (PBS) 3 ml
- ผสมให้เข้ากันโดย vortex 15 วินาที จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการดูดเก็บ supernatant ลง microtube 1.5 ml ให้ได้ประมาณ 2 หลอด แล้วเก็บรักษาสภาพตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°C

2. **การสกัด** Viral RNA

ในการวิจัยนี้ได้ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Viral Nucleic Acid Extraction ของบริษัท RBC Bioscience ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

- นำสารละลายตัวอย่าง 200 µL
- เติม 400 µL ของ VB buffer แล้วนำไป Vortex
- Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- Transfer the lysate ลงใน spin column 2 mL
- เติม 500 µL ของ 95% ethanol แล้วนำไป Vortex
- Centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 60 วินาที
- ทิ้งส่วนของ filtrate
- เติม 400 µL ของ W1 buffer

- Centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 30 วินาที
- ทิ้งส่วนของ filtrate
- เติม 600 µL ของ Wash buffer (add ethanol)
- Centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 30 วินาที
- ทิ้งส่วนของ filtrate
- Centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 3 นาที
- เปลี่ยน collection tube
- เติม 50 µL RNAse-free water
- ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
- Centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 3 นาที

3. การศึกษาความซุกของเชื้อไวรัสโรตา

Positive control

ได้ตัวอย่างจากสารละลายอุจจาระของผู้ป่วย และได้รับการตรวจด้วยวิธี PCR พบเชื้อไวรัสโรตา

Negative control

ในการศึกษาครั้งนี้ คือ distilled water ที่มีปริมาตรเท่ากับสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

3.1. **ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสโรตาในส่วนของยีน VP7 และ VP4**

ด้วยวิธี One step Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ซึ่งสารเคมี และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ยีน VP7 และ VP4 ที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR ได้แสดงไว้ดังในตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2 แสดงส่วนผสม และปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน VP4 และ VP7 ของไวรัสโรตา

สารเคมี	ปริมาตร (µl/tube)
DEPC treated water	11.8
2x Reaction Mix buffer	10
Enzyme mix (SuperScript™ + *Taq*)	0.2
Forward primer (10 µM)	0.5
Reverse primer (10 µM)	0.5
RNA template	2
Total volume	25

ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ในส่วนของยีน VP7 และ VP4 สำหรับการทำ RT-PCR เพื่อตรวจหาการติดเชื้อไวรัสโรตา

Gene	Primer's Name	Type	Sequence (5'--->3')	Position
VP4	CON3_F	Forward	TGGCTTCGCTCATTTATAGA A	11–32
	CON2_R	Reverse	ATTTCGGACCATTTATAACC	887–868
VP7	BEG9_F	Forward	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28
	END9_R	Reverse	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1036-1062

- จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมด ใส่ลงในเครื่อง Eppendorf Mastercycler personal (Hamburg, Germany) ในสภาวะอุณหภูมิและเวลา ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ของไวรัสโรตาในส่วนของยีน VP4 และ VP7

PCR cycle	อุณหภูมิ (°C)		เวลา (นาที)	
	VP4 gene	VP7 gene		
Reverse transcription	50	50	30	
Pre-denaturation	95	95	2	
Denaturation	94	94	1	ทำซ้ำ 40 รอบ
Annealing	48	55	1	
Extension	72	72	1.30	
Final-extension	72	72	10	

3.2. **การหาลำดับนิวคลีโอไทด์**

- หาขนาด PCR Product ที่ต้องการด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 2% Agarose gel ในการแยกขนาดของ PCR Product ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใช้ 100 bp DNA Ladder เป็นตัวมาตรฐานเปรียบเทียบ เพื่อตรวจสอบขนาดของ cDNA ที่ต้องการ และย้อมดูแถบ cDNA ที่ต้องการด้วยสารละลาย Ethidium bromide นาน 15 นาที

- ตัด gel โดยเลือกตัดในตำแหน่งที่มีแถบ PCR Product ขนาดที่ต้องการ ดังนี้
  - VP4 gene ได้ PCR Product ขนาด 876 bp
  - VP7 gene ได้ PCR Product ขนาด 1062 bp

- สกัด PCR Product จาก gel ที่ตัดออกมาให้บริสุทธิ์ด้วย HiYieldTM Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit

- หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตรวจกับบริษัท First base laboratories SDN BHD (Malaysia)

3.3 **การจำแนกจีโนไทป์**

ใช้โปรแกรม Chromas Lite 2.0 อ่านผลที่ได้จากการส่งตรวจ เพื่อวิเคราะห์ Chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วทำการจำแนกจีโนไทป์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งตรวจ กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast

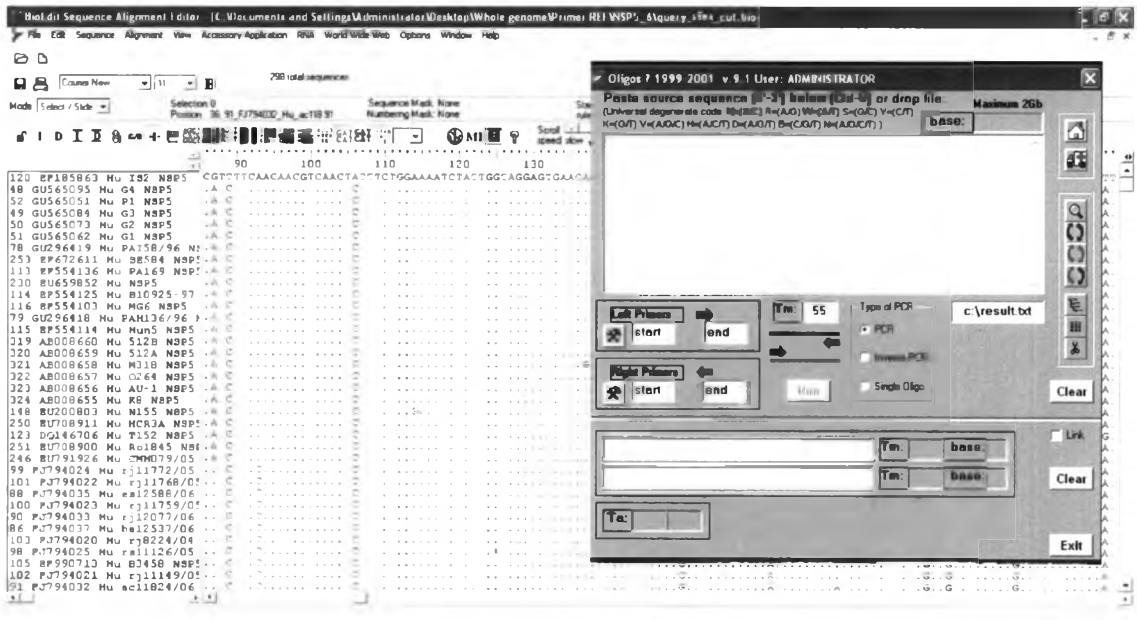
4. **ศึกษา** complete genome (11 **ยีน**)

4.1. **คัดเลือกตัวอย่าง** ที่ตรวจพบเชื้อไวรัสโรตา มาทำการศึกษา complete genome โดยได้คัดเลือกตัวอย่างจากทั้งปีที่ได้ทำการศึกษาคือ ตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2552 ถึง พฤษภาคม 2554 และจากตัวอย่างของปีก่อนหน้านี้ ที่ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์ในส่วนยีน VP7 และ VP4 ไว้แล้ว และเก็บรักษาสภาพไว้ที่ -70°C ที่ห้องปฏิบัติการศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก ทั้งที่เป็นสายพันธุ์ที่พบได้บ่อย และที่พบได้น้อยครั้งในประเทศไทย โดยในการวิจัยนี้ได้คัดเลือกมาทั้งหมด 22 ตัวอย่าง รวม 7 สายพันธุ์ ดังแสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา complete genome สำหรับการวิจัยนี้

จำนวน	รหัส	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	ปีที่เก็บตัวอย่าง	จีโนไทป์	
				G	P
1	CU331-NR/08	นครราชสีมา	2551	G12	P[6]
2	CU365-KK/08	ขอนแก่น	2551	G3	P[9]
3	CU110-BK/08	กรุงเทพมหานคร	2551	G2	P[4]
4	CU209-KK/08	ขอนแก่น	2551	G2	P[4]
5	CU436-KK/09	ขอนแก่น	2552	G2	P[4]
6	CU438-KK/09	ขอนแก่น	2552	G2	P[4]
7	CU473-BK/09	กรุงเทพมหานคร	2552	G2	P[4]
8	CU497-BK/09	กรุงเทพมหานคร	2552	G2	P[4]
9	CU328-NR/08	นครราชสีมา	2551	G9	P[8]
10	CU329-NR/08	นครราชสีมา	2551	G9	P[8]
11	CU460-KK/09	ขอนแก่น	2552	G12	P[8]
12	CU615-TK/09	ตาก	2552	G12	P[8]
13	CU616-TK/09	ตาก	2552	G12	P[8]
14	CU766-KK/10	ขอนแก่น	2553	G3	P[8]
15	CU747-KK/10	ขอนแก่น	2553	G3	P[8]
16	CU976-KK/11	ขอนแก่น	2554	G3	P[8]
17	CU938-BK/11	กรุงเทพมหานคร	2554	G3	P[8]
18	CU537-KK/09	ขอนแก่น	2009	G1	P[8]
19	CU769-KK/10	ขอนแก่น	2553	G1	P[8]
20	CU875-BK/10	กรุงเทพมหานคร	2553	G1	P[8]
21	CU956-KK/11	ขอนแก่น	2554	G1	P[8]
22	CU957-KK/11	ขอนแก่น	2554	G1	P[8]

4.2. **ออกแบบไพรเมอร์ทั้ง 11 ยีน** โดยนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลที่มีราใน Genbank โดยดำเนินการ ผ่านเว็บไซด์ของ NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) มาเป็นลำดับอ้างอิงสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ หลังจากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Software version 7.0 และ OLIGOS Version 9.1 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงโปรแกรมที่ใช้สำหรับการออกแบบไพรเมอร์

- ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสโรตา ได้แสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสโรตา

Gene	Size (bp)	Primer's Name	Type	Sequence (5'--->3')	Position
VP1	3,302	ROTA_VP1_F1	Forward	GGCTATTAAAGCTRTACAATGGG	1-23
		ROTA_VP1_R629	Reverse	ACTAAGTAGTAYGGYTTRTCYTTCAT	604-629
		ROTA_VP1_F433	Forward	TCATCAAATTTDAAYGCWGTHATGTT	433-458
		ROTA_VP1_R1304	Reverse	GCCATRTCATCCATNACRTGCAT	1282-1304
		ROTA_VP1_F1100	Forward	GGGAATATACHATGYTRATHAGAGA	1100-1124
		ROTA_VP1_R1747	Reverse	CTGGTATTTGAACRTAYGARTCCA	1724-1747
		ROTA_VP1_F1616	Forward	CATTTAGGAARGGDATAATHATGGG	1616-1640
		ROTA_VP1_R2255	Reverse	CCAGTAATTGCNACWGAHGTCAT	2233-2255
		ROTA_VP1_F2122	Forward	GGGCAGAGYACRCARTGGGA	2122-2101
		ROTA_VP1_R2843	Reverse	GGCTTATAAACTGARTAYTTHGATAT	2818-2843
		ROTA_VP1_F2696	Forward	CTATACARTAYCRAAARTTYATGCC	2696-2720
		ROTA_VP1_R3302	Reverse	GGTCACATCTAAGCRYTCTAATC	3280-3302
VP2	2,687	ROTA_VP2_F1	Forward	GGCTATTRAAGGYTCAATGGC	1-21
		ROTA_VP2_R662	Reverse	TTGAATTTTTRTTYTCDACNGCCAT	638-662
		ROTA_VP2_F471	Forward	AATTGCCTATHTATMGRGCDAATGG	471-495
		ROTA_VP2_R1187	Reverse	AAAACTGAGTYTCWGAYTGWATTGT	1162-1187
		ROTA_VP2_F1025	Forward	GAATCCYTVTGGGATACDATAAC	1025-1047
		ROTA_VP2_R1674	Reverse	ATAGATCTYTTATAATCDACDGGCAT	1649-1674
		ROTA_VP2_F1477	Forward	TCAAAATTTYCARGTNGCNAATTGG	1477-1501
		ROTA_VP2_R2327	Reverse	TTTGAGCATARTCDCCHGAYCTCAT	2302-2327
		ROTA_VP2_F2132	Forward	TTTAATTTRATABCRATGAAYATGGA	2132-2157
		ROTA_VP2_R2760	Reverse	GGTCATATYTCCAMARTGGGGTT	2736-2760
VP3	2,591	ROTA_VP3_F1	Forward	GGCTATTAAAGCARTAYYAGTAGTG	1-25
		ROTA_VP3_R599	Reverse	CRATTGGAAGAGATGTRGTCATTC	574-599
		ROTA_VP3_F478	Forward	ATGTCARAATGCAGCTACAGATGA	478-501
		ROTA_VP3_R1267	Reverse	TAAYTTCAGTAGTTGGRTGATGAAG	1243-1267
		ROTA_VP3_F972	Forward	GGATCCATTAGAYACTCYATATTC	972-995
		ROTA_VP3_R1808	Reverse	GAATATGATGTCGCAGACTCTG	1785-1808
		ROTA_VP3_F1553	Forward	GGTTCAAAAATATHTAYGAYTGGAC	1553-1577
		ROTA_VP3_R2137	Reverse	CATCAGCGTABGTTATRCTRTAHACT	2110-2137
		ROTA_VP3_F1922	Forward	ATTCATTTGATYTWAAAMGVTGGAT	1922-1946
		ROTA_VP3_R2593	Reverse	GGTCAYATCAYGACYAGTGTGTTA	2568-2593

I861518938

ตารางที่ 6 (ต่อ) แสดงไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสโรตา

Gene	Size (bp)	Primer's Name	Type	Sequence (5'--->3')	Position
VP4	2,361	ROTA_VP4_F1	Forward	AATGGCTTCRCTCATTTATAGAC	1-23
		ROTA_VP4_R715	Reverse	ATTYCTDGTATTYTGMATTGGTGG	690-715
		ROTA_VP4_F529	Forward	ARTATGGACRTTTCATGGTGAAAC	529-552
		ROTA_VP4_R1218	Reverse	CCAYTYATHAYWGGCCATKCACC	1194-1218
		ROTA_VP4_F1114	Forward	GGTRTAYGTYAGRTCRTTRGCAGC	1114-1137
		ROTA_VP4_R1714	Reverse	AGTYAWTTCHGARATYGAWGTRGCTA	1687-1714
		ROTA_VP4_F1455	Forward	ATTATCARACYCCAATYATGAATTCA	1455-1480
		ROTA_VP4_R2325	Reverse	TGYTCWATTCTATTYYTWATAATTGG	2298-2325
VP6	1,356	ROTA_VP6_F1	Forward	GGCTTTAAAACGAAGTCTTC	1-20
		ROTA_VP6_R925	Reverse	GTCATATTTGGTGGTCTCAT	904-925
		ROTA_VP6_F756	Forward	ACTACATGGTTCTTTAATCC	756-775
		ROTA_VP6_R1357	Reverse	GGTCACATCCTCTCACTA	1338-1357
VP7	1,062	BEG9_F	Forward	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28
		END9_R	Reverse	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1036-1062
NSP1	1,578	ROTA_NSP1_F1	Forward	GGCTTTTTTTATGAAAAGTCTTGTG	1-25
		ROTA_NSP1_R576	Reverse	CTAYTAAATTTRTAAATGARAATGGAGT	547-576
		ROTA_NSP1_F413	Forward	TAGAAAYGAATGTATRACACAGTGG	413-437
		ROTA_NSP1_R1304	Reverse	CACCAYTTRCARTTRTGYACYTCAG	1278-1304
		ROTA_NSP1_F971	Forward	AACCAAAYTATRTRACHTCRAATCATA	971-997
		ROTA_NSP1_R1616	Reverse	GGTCACATTTTATGCTGCCTAG	1593-1616
NSP2	1,059	ROTA_NSP2_F1	Forward	GGCTTTTAAAGCGTCTCAGTCGCCG	1-25
		ROTA_NSP2_R897	Reverse	AYVTCDAKWGYRTTDCCTTGYTTCAT	870-897
		ROTA_NSP2_F433	Forward	TNAAAKCHGTNYTDATAGCTATTGG	433-457
		ROTA_NSP2_R1059	Reverse	GGTCACATAAGCGCTTTCWATTCT	1034-1059
NSP3	1,078	ROTA_NSP3_F1	Forward	GGCWTTTAATGCTTTTCAGTGGTT	1-24
		ROTA_NSP3_R540	Reverse	TTCCAATCWATNGTRTCVAYTTCCAT	513-540
		ROTA_NSP3_F357	Forward	AAGGAATYRAYCARARRATGAGAGT	357-381
		ROTA_NSP3_R1118	Reverse	GGYCACATAACGCCCCTATAGC	1095-1118
NSP4	750	ROTA_NSP4_F1	Forward	GGCTTTTAAAAGTTCTGTTCCGAG	1-24
		ROTA_NSP4_R751	Reverse	GGTCACRYTAAGACCRTTCCTTCC	726-751
NSP5/6	667	ROTA_NSP6_F2	Forward	GCTTTWAAAGCGCTACAGTGATG	2-24
		ROTA_NSP6_R673	Reverse	GGTCACAAAACGGGAGTGGG	652-673

4.3. **ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสโรตา** ด้วยวิธี one step Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

- สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาสำหรับทำ RT-PCR ของแต่ละยีน แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนทั้ง 11 ยีนของไวรัสโรตา

สารเคมี	**ปริมาตร**(µl/tube)
DEPC treated water	11.8
2x Reaction Mix buffer	10
Enzyme mix (SuperScriptTM + Taq)	0.2
Forward primer (10 µM)	0.5
Reverse primer (10 µM)	0.5
Mg^{2+} (50 µM)	0-1
RNA template	2
Total volume	25

- จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมดใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Eppendorf Mastercycler personal) ในสภาวะอุณหภูมิ ดังตารางที่ 8-9

ตารางที่ 8 แสดงอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำ RT-PCR ของไวรัสโรตาในส่วนของยีน VP1, VP4, VP6 และ VP7

PCR cycle	**อุณหภูมิ** (°C)						**เวลา (นาที)**	
Gene	VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7		
Reverse transcription	50	50	50	50	50	50	30	
Pre-denaturation	95	95	95	95	95	95	5	
Denaturation	94	94	94	94	94	94	1	ทำซ้ำ
Annealing	54	52	54	55	47	48	1	40 รอบ
Extension	72	72	72	72	72	72	1.30	
Final-extension	72	72	72	72	72	72	10	

ตารางที่ 9 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ RT-PCR ของไวรัสโรตาในส่วนของยีน NSP1-NSP5/6

PCRcycle / Gene	อุณหภูมิ (°C)					เวลา (นาที)	
	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5/6		
Reverse transcription	50	50	50	50	50	30	
Pre-denaturation	95	95	95	95	95	5	
Denaturation	94	94	94	94	94	1	ทำซ้ำ
Annealing	55	54	58	62	55	1	40 รอบ
Extention	72	72	72	72	72	1.30	
Final-extention	72	72	72	72	72	10	

4.4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

- หาขนาด PCR Product ที่ต้องการด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 2% Agarose gel ในการแยกขนาดของ PCR Product ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใช้ 100 bp DNA Ladder เป็นตัวมาตรฐานเปรียบเทียบ เพื่อตรวจสอบขนาดของ cDNA ที่ต้องการ และย้อมดูแถบ cDNA ที่ต้องการด้วยสารละลาย Ethidium bromide นาน 15 นาที
- ตัด gel โดยเลือกตัดในตำแหน่งที่มีแถบ PCR Product ขนาดที่ต้องการ
- สกัด PCR Product จาก gel ที่ตัดออกมาให้บริสุทธิ์ด้วย HiYieldTM Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit
- หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตรวจกับบริษัท First base laboratories SDN BHD (Malaysia)

4.5. การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ที่ส่งตรวจ

ใช้โปรแกรม Chromas Lite 2.0 อ่านผลที่ได้จากการส่งตรวจ เพื่อวิเคราะห์ Chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วทำการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลที่มีรายงานใน GenBank ผ่านเว็บไซด์ของ NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) จากนั้นใช้โปรแกรม Seqman ประกอบสายลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีมากกว่า 1 สายเข้าด้วยกัน และสร้างรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสโรตาที่มีอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม Clustal X 1.8 และ MEGA 4.0

การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บรวบรวม และบันทึกข้อมูลลง Data sheet เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR และ genome sequencing ทั้งหมดนั้นใช้โปรแกรมในการออกแบบและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังต่อไปนี้

- Bioedit เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อการออกแบบไพรเมอร์ โดยการพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมจากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ต้นแบบ โดยใช้โปรแกรมรุ่น 7.0.4.1
- Oligos เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการกลับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (reverse complement) เพื่อเตรียม reverse primer และคำนวณค่า Tm ของไพรเมอร์ที่ออกแบบ พร้อมทั้งใช้ตรวจสอบโอกาสในการเกิด primer dimer ในเบื้องต้น

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการทำ DNA sequencing จะถูกตรวจสอบความถูกต้อง และแก้ไขโดยใช้โปรแกรม ดังต่อไปนี้

- Basic local alignment search tool (BLAST) ทำการเปรียบเทียบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยดำเนินการ ผ่านเว็บไซต์ของ NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)
- Chromas เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing โดยพิจารณาจากผลกราฟ chromatogram
- Molecular Evolution Genetics Analysis version 4.0 หรือ MEGA4 เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการสร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชุดข้อมูลที่ทำการตรวจวิเคราะห์

- ClustalW เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดข้อมูลที่คัดเลือก (multiple alignment) และเพื่อการสร้าง phylogenetic tree สามารถทำการวิเคราะห์ผ่านเว็บไซด์ DDBJ (http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html)
- DNASTAR's Seqman Genome Assembly เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการต่อข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 2 ข้อมูลเข้าด้วยกัน (nucleotide conting assembly) โดยการพิจารณาลำดับเบสและผล chromatogram ที่ได้ประกอบเพื่อวิเคราะห์ความน่าเชื่อถือของข้อมูลร่วมด้วย

การเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษา โดยใช้ Program Sequin version 7.25 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sequin) ไปยังฐานข้อมูล ธนาคารรหัส พันธุกรรม (GenBank) ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov