บทที่ 3

การทำ RT-PCR

3.1 หลักการทั่วไปของกระบวนการ RT-PCR

วิธี PCR เป็นวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมประเภท DNA (deoxyribonucleic acid) ภายหลังจากทำการเพิ่ม (amplification) จำนวนสารพันธุกรรมแล้ว จึงเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมปริมาณน้อย ๆ ได้ เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะในการตรวจสูง และมีการนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรีย, ไวรัส, เชื้อรา, และปรสิตทั้งประเภทโปรโตซัว และหนอนพยาธิ สำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีนั้น ต้องใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เพื่อเปลี่ยน RNA (ribonucleic acid) เป็น DNA ก่อน เนื่องจากเชื้อไวรัสเดงกีเป็นเชื้อไวรัสประเภท RNA จึงเรียกวิธีการนี้ว่า reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

สำหรับวิธี RT-PCR ที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นวิธี nested RT-PCR คือมีการทำ PCR 2 ครั้ง แต่ละครั้งของ PCR ใช้ primer ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ภายหลังจากได้ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ครั้งแรกแล้ว มีการทำ PCR ครั้งที่สองโดยการใช้ primer อีกคู่หนึ่งที่แตกต่างจาก primer คู่แรก ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR ครั้งที่สองมีขนาดเล็กกว่ารอบแรก วิธีการ nested RT-PCR นี้จะเพิ่มความจำเพาะของการตรวจ PCR มากขึ้น

3.2 ขั้นตอนการทำ RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี

ในบทความนี้จะกล่าวถึงขั้นตอนของการทำ RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกีโดยคร่าวเฉพาะที่ใช้ในงานวิจัยนี้เท่านั้น ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. **การเตรียมและการเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจ**

สิ่งส่งตรวจที่ได้คือ น้ำลายและเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (ซึ่งละลายอยู่ในสารละลาย buffer) จะถูกนำมาปั่น (centrifuge) แล้วเก็บตะกอนที่ได้จากการปั่น (pellet) ไว้ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ยังไม่ได้นำมาสกัดสารพันธุกรรม ซึ่งสามารถเก็บสิ่งส่งตรวจดังกล่าวได้เป็นเวลานานมากกว่า 1 ปี

2. **การสกัดสารพันธุกรรม RNA ของไวรัส**

สิ่งส่งตรวจที่ถูกเก็บไว้จะถูกนำมาสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกี โดยใช้น้ำยา

และ ชุดอุปกรณ์ของบริษัท QIAGEN ชื่อการค้า "QIAmp® Viral RNA Mini Kit" ซึ่งจะได้สาร พันธุกรรมประเภท RNA ซึ่งจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสในกรณีที่ยังไม่นำไปตรวจด้วยวิธี RT-PCR

3. **การเตรียม** cDNA (complimentary DNA)

เป็นกระบวนการที่ทำให้ RNA ที่สกัดได้เปลี่ยนเป็น DNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เรียกกระบวนการนี้ว่า "reverse transcription" ขั้นตอนนี้ใช้น้ำยาและชุดอุปกรณ์ของบริษัท Promega ชื่อการค้า "ImProm-II RT"

4. การทำ PCR ครั้งที่ 1

นำ cDNA ที่ได้ปริมาณ 2.5 ไมโครลิตรไปผ่านกระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA ครั้งที่ 1 คือ primary DNA amplification 40 รอบ (denaturing 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, annealing 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, extending 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที) โดยใช้ primer ชื่อ Den outer1 และ Den outer2 ตัวละ 0.75 ไมโครลิตร

ลำดับเบสของ DNA primer Den outer1 คือ 5'-CCATggAAgCTgTACgC-3' และของ Dengue outer2 คือ 5'-gARACAgCAggATCTCTggTCT-3'

5. **การทำ PCR ครั้งที่** 2

นำ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ครั้งแรกมาขยายปริมาณโดยการทำ PCR ครั้งที่ 2 คือ secondary DNA amplification 25 รอบ (denaturing 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, annealing 58 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, extending 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที) โดยใช้ primer ชื่อ Den inner1 และ Den inner2 ตัวละ 0.75 ไมโครลิตร

ลำดับเบสของ DNA primer Den inner1 คือ 5'-ggTTAgAggAgACCCCTCCC-3' และของ Dengue inner2 คือ 5'-gggggTCTCCTMTAACCTCTAKTCCTT-3'

6. **การอ่านผลการตรวจ**

นำ DNA ที่ผ่านการขยายโดยกระบวนการ RT-PCR แล้วไปตรวจสอบ โดยใช้ DNA ที่ได้ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตรไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) บน agarose gel ที่ผสมกับ TBE buffer และ marker แล้วนำไปย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งเป็นสารเรืองแสง ก่อนนำไปตรวจดูและถ่ายรูปแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต