บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นการศึกษาการวิจัยเชิงพรรณนาเพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Cryptosporidium*

การให้คำนิยามในเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operational Definition)

ประชากรเป้าหมาย (target population) คือ ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส HIV ที่ตรวจพบการติดเชื้อ *Cryptosporidium* ร่วมด้วย ซึ่งมารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในช่วงปี ค.ศ.1966 ถึง ค.ศ. 2000

โรค cryptosporidiosis คือ ภาวะที่ผู้ป่วยติดเชื้อ *Cryptosporidium* ทำให้เกิดอาการท้องเสียถ่ายเหลวเป็นน้ำ หรือในบางครั้งอาจมีมูกปนมากับอุจจาระ และการตรวจพบ oocyst ที่มีลักษณะจำเพาะ

ประชากรตัวอย่าง (population sample) คือ ตัวอย่างอุจจาระที่เก็บจากประชากรเป้าหมาย

ผลบวก (positive) คือ การอ่านผลจากการย้อมสีอุจจาระ โดยวิธี modified kinyoun acid fast stain และนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายวัตถุ x100 เห็นลักษณะของ sporozoite ที่อยู่ภายใน oocyst ติดสีแดงในขณะที่พื้นจะเห็นเป็นสีเขียว

ขนาดของประชากร (sample size)

โดยการนำผลจากการศึกษานำร่องในการสำรวจอุบัติการของการติดเชื้อ *C. parvum* ในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส HIV พบว่ามีอุบัติการของการติดเชื้อร้อยละ 0.5 (Thamlikitkul V et al., 1987) และได้คำนวณขนาดตัวอย่างโดยใช้สูตร

$$n = Z_{\alpha}^{2} PQ/d^{2}$$ (ภิรมย์ และคณะ, 1999)

กำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ระดับร้อยละ 95

$$Z_{\alpha} = Z_{0.05/2} = 1.96 \text{ (two-tailed)}$$

โดย	n	=	ขนาดตัวอย่าง
	P	=	อัตราการติดเชื้อ *C. parvum* = 0.005
	Q	=	1-0.005
	d	=	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้กำหนดให้เป็น 0.03
แทนค่า	n	=	$(1.96)^2(0.005)(0.0995)/(0.03)^2$
	n	=	21.2355

ดังนั้นจากการคำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 22 ตัวอย่างเป็นอย่างน้อย สำหรับการศึกษานี้จะใช้กลุ่มตัวอย่างทั้งหมดเป็น 30 ตัวอย่าง

อุปกรณ์

Automatic thermal cycler (Perkin Elmer)

High speed refrigerated microcentrifuge (Tomy)

Magnetic stirrer (Thermolyne)

Vortex mixer (Scientific Industries)

กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)

เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียดอ่านได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Bosh)

เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (Cyberscan 500)

ชุดอุปกรณ์สำหรับแยกDNAด้วยกระแสไฟฟ้า (Mupid-II)

ตู้เย็น 4^{0}C (Hitachi)

ตู้เย็น –20^{0}C (Puffer Hubbard)

ตู้เย็น –80^{0}C (Forma Scientific)

ตู้อบแห้ง (Memmert)

ไมโครปิเปตต์ (Adjustable micropipette) ขนาด 10 ,100 และ 1000 ไมโครลิตร (Eppendorf)

หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง (Hirayama)

เครื่องอ่านผลแถบ DNA จากเจล (Bio Rad)

เครื่อง ABI 310 DNA Sequencer

เครื่องปั่นความเร็ว 2000 รอบต่อนาที

วัสดุ

กระจกสไลด์ (ขนาด 2.5 x 7.5 เซ็นติเมตร)

กระบอกฉีดน้ำ

กระบอกตวง ขนาด 10 50 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

กล่องโฟมใส่น้ำแข็ง

ขวดแก้วสำหรับใส่สารเคมีขนาดความจุ 100 และ 500 มิลลิลิตร

ถุงมือยาง (latex gloves)

ที่วางหลอดทดลองขนาด 0.1 และ 1.5 มิลลิลิตร (microtube rack)

เทอร์โมมิเตอร์

นาฬิกาจับเวลา

บิกเกอร์ขนาด 50 100 200 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

ปากคีบ (forcep)

ปิเปตต์ทิป (pipette tip) ขนาด 10 100 และ 1,000 ไมโครลิตร (Eppendorf)

พาราฟิล์ม (parafilm)

พาสเจอร์ปิเปตต์ (pasteur pipette)

หลอดทดลองขนาดเล็กชนิดมีฝาปิด (microtube) ขนาดความจุ 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (Elkay)

หลอดทดลองปลายแหลมความจุ 15 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารเคมีทั่วไป

Absolute ethanol (Merck)

Absolute methanol (Mallinkrot)

Acetic acid, glacial (Merck)

Agarose (Funakoshi)

Bromophenol blue (Sigma)

Cleaning solution (ICN Biomedicals)

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma)

Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4, May & Baker)

Purified water, Milli-Q grade

Ethidium Bromide (Sigma)

Ficoll, type 400 (Pharmacia)

Hydrochloric acid (HCl fuming 37%, Merck)

Potassium chloride (May & Baker)

Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4, Ajax Chemicals)

Sodium chloride (Sigma)

Sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma)

Tris hydroxymethyl aminomethane (Merck)

Xylene cyanol FF (Sigma)

2. สารเคมีที่เป็น Reagent Kit

Wizard™ PCR Genomic DNA Purification System (Promega)

GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (Pharmacia)

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer)

3. เอ็นไซม์

Taq DNA polymerase (Pharmacia)

4. Oligonucleotides

ลำดับเบสจากส่วนของ small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene ของเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ได้แก่

Oligonucleotide ที่เป็น PCR primers คู่นอกได้แก่

P1: 5' -CAGGGAGGTAGTGACAAGAA- 3'

P2: 5' -TCAGCCTTGCGACCATACTC- 3'

Oligonucleotide ที่เป็น PCR primers คู่ในได้แก่

P3: 5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG- 3'

P4: 5'-TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG- 3'

การเก็บตัวอย่าง

โดยการเก็บอุจจาระจากผู้ป่วยที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งทำการตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งตรวจพบ oocyst ของ *Cryptosporidium* ตัวอย่างอุจจาระทั้งหมดที่ได้นำมาแยก oocyst โดยใช้วิธี flotation และทำการเก็บไว้ที่ –20^{0}C ในกรณีที่ตัวอย่างอุจจาระที่ยังไม่ได้นำมาทำการแยก oocyst ทันที ให้นำมาเติมด้วย 10% formalin ลงไปประมาณ 1 เท่าของอุจจาระที่มี และนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างอุจจาระดังกล่าวก่อนที่จะนำมาแยก oocyst ให้นำตัวอย่างอุจจาระบางส่วนทำการย้อมสีโดยวิธี modified Kinyoun acid fast stain และทำการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พร้อมกับทำการวัดขนาดของ oocyst

วิธีการทดลอง

การแยก oocyst ของ *Cryptosporidium* ออกจากกากอุจจาระ

การแยก oocyst ออกจากกากอุจจาระนำตัวอย่างอุจจาระที่ได้จากการตรวจเชื้อ *Cryptosporidium* ณ ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำมากรองใส่หลอดทดลองปลายแหลม ขนาด 15 มิลลิลิตร ประมาณอุจจาระ 1-2 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย sucrose ความเข้มข้นร้อยละ 55 ประมาณ

5-10 เท่าของปริมาณอุจจาระและเติมน้ำ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000-1,500 รอบต่อนาที ใช้เวลา 15 นาที ดูดส่วนที่เป็น oocyst ซึ่งอยู่ตรงบริเวณรอยต่อของสารละลายน้ำตาล sucrose นำไปใส่ไว้ใน หลอดทดลองขนาดเล็กชนิดมีฝาปิดความจุ 1.5 มิลลิลิตรทำการปั่นล้างด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) และนำไปเก็บที่ -20^{0}C (Kim et al., 1992)

การเตรียม DNA

การสกัด DNA (DNA extraction) โดยนำ oocyst ที่ได้จากวิธี flotation มาสกัด DNA โดยใช้ Wizard^{TM} Genomic DNA Purification Kit (Promega)

1. นำ oocyst ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20^{0} C มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง เติม cell lysis solution 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำมาทำให้ oocyst แตก โดยการทำวิธี freeze–thaw คือ การใช้อุณหภูมิที่ 90^{0} C และอุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดย แช่ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ที่เติม absolute ethanol ลงไป โดยใช้เวลาในการทำซ้ำ 5-6 รอบ
2. เติม cell lysis solution 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันหรือใช้ vortex mixer เป็นเวลา 10 นาที
3. นำไปปั่นด้วย high speed refrigerated microcentrifuge ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
4. ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง เติม nuclei lysis solution 300 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง 5-6 ครั้ง จนของเหลวเป็นเนื้อเดียวกัน ได้ของเหลวค่อนข้างเหนียว
5. เติม protein precipitation 100 ไมโครลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากันนาน 10–20 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
6. ดูดของเหลวส่วนบนใส่ microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปตกตะกอน DNA โดยเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของของเหลวที่ได้ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80^{0}C นานประมาณครึ่งชั่วโมง
7. เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4^{0}C เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งจะได้ตะกอน DNA อยู่ที่ก้นหลอด
8. ล้างตะกอน DNA โดยเติม ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 80 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4^{0}C เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งตะกอน DNA จะอยู่ที่ก้นหลอด คว่ำหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องจน DNA แห้ง แล้วละลาย DNA โดยเติม TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และนำ DNA เก็บไว้ที่อุณภูมิ -20^{0}C สำหรับปฏิกิริยาในขั้นต่อไป

การเพิ่มปริมาณ DNA (DNA amplification)

องค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) ในปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. DNA ต้นแบบปริมาตร 2 ไมโครลิตร
2. PCR primers คู่นอก (P1 และ P2) ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร
3. nucleotide substrate (dATP dTTP dCTP และ dGTP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร
4. 10 x PCR reaction buffer ซึ่งประกอบด้วย 100 มิลลิโมล ของ Tris HCl 500 มิลลิโมลของ KCl 10 มิลลิโมลของ $MgCl_2$ และ gelatin ร้อยละ 0.01 (W/V) ปริมาณ buffer ที่ใช้คือ 2 ไมโครลิตร
5. น้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 14.5 ไมโครลิตร
6. เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.5 ยูนิต เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ส่วนประกอบที่ได้ทั้งหมดนี้ เรียกว่า PCR reaction mixture แล้วนำไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนที่ทำให้ DNA ต้นแบบแยกสาย (DNA denaturation) ที่อุณหภูมิ 95^0C เป็นเวลา 2 นาที ในรอบแรก จากนั้นทำให้ DNA แยกสายโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94^0C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นต่อไปทำให้ primer จับคู่กับ DNA ต้นแบบ (primer template annealing) โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 50^0C เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอนต่อไปคือการสร้างสาย DNA (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72^0C เป็นเวลา 1 นาที ปฏิกิริยาจะดำเนินไปจนครบ 35 รอบ โดยในรอบที่ 35 นี้ ในขั้นตอนในการสร้างสาย DNA จะเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72^0C นาน 7 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์

สำหรับ primer ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ P1 primer ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-CAGGGAGG TAGTGACAAGAA-3' ซึ่งตรงกับตำแหน่งเบสที่ 437 ถึง 456 ใน SSU rRNA gene ของ *C. parvum* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 434 ถึง 453 ของ *C. baileyi* หรือตำแหน่งเบสที่ 437 ถึง 456 ของ *C. muris* หรือตำแหน่งเบสที่ 447 ถึง 466 ของ *C. felis* หรือตำแหน่งเบสที่ 436 ถึง 455 ของ *C. meleagridis* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 436 ถึง 455 ของ *C. wrairi* และตรงกับตำแหน่งเบสที่ 437 ถึง 456 ของ *C. serpentis* สำหรับ P2 primer มีลำดับเบสดังนี้ 5'-TCAGCCTTGCGACCATACTC-3' ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1070 ถึง 1089 ของ *C. parvum* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1057 ถึง 1116 ของ *C. felis* หรือตำแหน่งเบสที่ 1065 ถึง 1084 ของ

C. meleagridis หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1066 ถึง 1085 ของ *C. wrairi* และตำแหน่งเบสที่ 1062 ถึง 1081 ของ *C. serpentis* การตรวจผลผลิตของปฏิกิริยาอาศัยขนาดความยาวของ DNA ซึ่งมีความยาวประมาณ 650 ถึง 670 คู่เบส และทำการตรวจวิเคราะห์ผลิตผลของปฏิกิริยาด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้า กระแสตรงที่ความต่างศักดิ์ 100 โวลต์ ใน agarose gel

ในการทำ PCR รอบสอง โดยแบ่งผลิตผลจากการทำ PCR ในรอบแรกเพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบ องค์ประกอบที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. DNA ต้นแบบปริมาตร 2 ไมโครลิตร
2. PCR primer คู่นอก (P3 และ P4) ความเข้มข้น 20 พิโคโมล ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร
3. nucleotide substrate (dATP dTTP dCTP และ dGTP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
4. 10 x PCR reaction buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร
5. น้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 36.75 ไมโครลิตร
6. เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.5 ยูนิต เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

นำ PCR reaction mixture นี้ไปทำปฏิกริยา PCR ขั้นตอน อุณหภูมิและเวลาเช่นเดียวกับการทำ PCR ในรอบแรก การเพิ่มปริมาณ DNAในรอบนี้ primer ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ P3 primer ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5' –ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG– 3' ซึ่งตรงกับตำแหน่งเบสที่ 525 ถึง 544 ใน SSU rRNA gene ของ *C. parvum* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 525 ถึง 544 ของ *C. felis* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 524 ถึง 543 ของ *C. meleagridis* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 525 ถึง 545 ของ *C. serpentis* หรือตำแหน่งเบสที่ 522 ถึง 541 ของ *C. baileyi* และตรงกับตำแหน่งเบสที่ 525 ถึง 544 ของ *C. wrairi* สำหรับ P4 primer มีลำดับเบสดังนี้ 5' –TAAGGT GCTGAAGGAGTAAGG– 3' ซึ่งตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1019 ถึง 1040 ใน SSU rRNA gene ของ *C. parvum* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1013 ถึง 1034 ของ *C. muris* หรือตำแหน่งเบสที่ 1046 ถึง 1067 ของ *C. felis* หรือตำแหน่งเบสที่ 1014 ถึง 1035 ของ *C. meleagridis* หรือตำแหน่งเบสที่ 1011 ถึง 1032 ของ *C. serpentis* หรือตำแหน่งเบสที่ 1006 ถึง 1027 ของ *C. baileyi* และตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1015 ถึง 1036 ของ *C. wrairi* ผลิตผลของปฏิกิริยาจะได้สาย DNA ที่มีความยาวประมาณ 480-500 คู่เบส ตรวจวิเคราะห์ผลิตผลของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับผลิตผลจากปฏิกิริยา PCR ในรอบแรก

การวิเคราะห์แถบ DNA

วิเคราะห์แถบ DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง และใช้กันอย่างแพร่หลาย ในการศึกษากรดนิวคลิอิกจำนวนเล็กน้อย โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีของกรดนิวคลิอิกที่มีโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต (PO_4^-) ทำให้ประจุเป็นลบ ดังนั้นเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจึงเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก โดยวิ่งผ่านตัวกลางคือ อะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (w/v) เตรียมโดยการชั่งอะกาโรส 1 กรัม ละลายใน TAE buffer 100 มิลลิลิตร นำไปอุ่นให้ร้อนจนเจลละลายหมดแต่ไม่ควรให้เดือดตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิประมาณ 50 ถึง 60^{0}C นำไปเทในถาดพลาสติกที่เตรียมไว้ขนาด 5.5 x 10.5 เซนติเมตร จากนั้นใส่หวี (comb) ลงไปในช่องที่เตรียมเพื่อทำร่องสำหรับหยอดผลผลิตจาก PCR ตั้งทิ้งไว้ 50 นาที ให้เจลแข็งตัว เท TAE buffer ลงไปให้ท่วมผิวหน้าเจล แล้วจึงค่อย ๆ ดึงหวีออกจากเจล จากนั้นนำถาดไปวางใน chamber (horizontal electrophoresis) ที่มี TAE buffer โดยให้ปริมาณของ TAE buffer ท่วมเจลประมาณ 1 เซนติเมตร

นำผลผลิตจาก PCR ที่ต้องการวิเคราะห์มาผสมกับ loading dye (ประกอบด้วย bromophenol blue ร้อยละ 0.25 xylene cyanol FF ร้อยละ 0.25 และ สารละลาย Ficoll type 400 ร้อยละ 40 (w/v)) ในอัตราส่วน 6:1 แล้วหยอดลงไปในหลุมบนเจล โดยใช้ DNA ที่ทราบขนาด (λ *Hind* Ⅲ และX 174 *Hind* Ⅲ) เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ศึกษา เปิด power supply ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านเจลจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 30 นาที หรือจนกระทั่งสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปได้ 2 ใน 3 ของเจล จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน TAE buffer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที ตรวจดูแถบ DNA จากการเรืองแสงภายใต้แสง UV

การวิเคราะห์การเรียงลำดับเบสของ DNA

การหาลำดับเบสของ DNA โดยวิธี automated DNA sequencing โดยอาศัยหลักการของ dideoxy chain termination คือการใช้สารเคมีปรับเปลี่ยนเบสของ DNA

การเตรียม DNA โดยใช้ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit

1. นำ GFX column ซึ่งเป็น glass fiber matrix อยู่ภายใน column ใส่ใน collection tube ขนาดความจุประมาณ 2 มิลลิลิตร เติม capture buffer 500 ไมโครลิตร
2. ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดผลผลิตจากการทำ PCR ในรอบที่ 2 ใส่ใน GFX column ผสมให้เข้ากันกับ capture buffer โดยใช้ไมโครปิเปตต์ดูดขึ้นและปล่อยลง 4-6 ครั้ง

3. นำไปปั่นด้วย high speed refrigerated microcentrifuge ด้วยความเร็ว 10,000 ถึง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

4. เทสารละลายที่มีอยู่ใน collection tube ทิ้ง นำ GFX column ใส่ใน collection tube อีกครั้งเติม wash buffer 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000-13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

5. นำ GFX column ใส่ใน microcentifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ซึ่งสามารถใช้ TE buffer (10 มิลลิโมล Tris HCL pH 8.0 และ 1 มิลลิโมล EDTA pH 8.0)

6. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000–13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

นำผลผลิตที่ได้วิเคราะห์ DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) โดยใช้ DNA ที่ทราบขนาด (λ *Hind* Ⅲ) เป็นตัวเปรียบเทียบปริมาณของDNA

การเตรียมตัวติดตามโดยใช้ ABI PRISM™ DyeTerminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

องค์ประกอบที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dRhodamine Dye Terminator Ready Reaction ปริมาตร 8 ไมโครลิตร DNA ที่ต้องการติดฉลาก ปริมาตร 10 ไมโครลิตร Primer สำหรับ sequence (P3 หรือ P4) ความเข้มข้น 2 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำ reaction mixture นี้ไปทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. ทำให้ DNA แยกสาย โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 96^{0}C เป็นเวลา 30 วินาที
2. ขั้นต่อไปทำให้ primer จับคู่กับ DNA โดยใช้อุณหภูมิที่ 50^{0}C เป็นเวลา 30 วินาที
3. ขั้นตอนการสร้างสาย DNA ใช้อุณหภูมิที่ 60^{0}C เป็นเวลา 4 นาที ปฏิกิริยาจะดำเนินไปจนครบ 25 รอบ และในรอบที่ 25 นี้ในขั้นตอนการสร้างสาย DNA จะทำการลดอุณหภูมิเป็น 4^{0}C เป็นเวลา 30 นาที

การตกตะกอน DNA สำหรับเข้าเครื่อง ABI 310 DNA Sequencer

1. นำผลิตผลของปฏิกิริยามาตกตะกอนกับสารละลายของ 3M sodium acetate, pH 4.6 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. ใช้ปิเปตต์ดูดผลิตผลของปฏิกิริยาทั้งหมดใส่ในสารละลายข้างต้น ผสมให้เข้ากัน และนำไปแช่ที่ตู้ -80^{0}C เป็นเวลา ประมาณ 10 นาที

I20507732

3. เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4^0C เป็นเวลา 15-30 นาที

4. นำปิเป็ตต์ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง จะได้ตะกอน DNA อยู่ที่ก้นหลอด

5. ล้างตะกอน DNA โดยเติม ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร

6. นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4^0C เป็นเวลา 5 นาที

7. เมื่อครบเวลาใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ระวังอย่าให้โดนตะกอน DNA ทางด้านล่าง

8. ตั้งหลอดทิ้งไว้จนกว่า DNA แห้ง ละลาย DNA โดยการเติม Template suppression reagent ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

9. นำ DNA ที่เติมสารละลาย Template suppression reagent นำมาทำให้ DNA ต้นแบบแยกสายที่อุณหภูมิ 95^0C เป็นเวลา 2 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้สักครู่ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายใส่ใน microcentifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร และนำไปเข้าเครื่อง ABI 310 DNA Sequencer

การวิเคราะห์ผลการตรวจฟิล์มสไลด์

การตรวจฟิล์มสไลด์ในรายที่พบเชื้อ *Cryptosporidium* ทำการบันทึกผลการตรวจขนาดของ oocyst และระดับความหนาแน่นของ oocyst สำหรับการประเมินความหนาแน่นของเชื้อ *Cryptosporidium* จากการตรวจนับปริมาณ oocyst ใน 20 วงกล้องที่กำลังขยายเลนส์ objective 100 เท่า ใน oil immersion สำหรับการวัดขนาดของ oocyst ทำการวัดขนาดทางด้านยาว และทางด้านกว้างของ oocyst จำนวนปริมาณ 30 oocyst พร้อมทั้งคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้าง (shape index) ที่กำลังขยายเลนส์ objective 100 เท่า ใน oil immersion (Sargent et al., 1998)

Oocyst ของเชื้อ *Cryptosporidium parvum* มีรูปร่างกลมหรือรี ผนังเรียบไม่มีสี มีรอยเส้นจางที่ขั้วบนเป็นเส้นทะแยงเฉียงลงมายาว 1/2 ถึง 1/3 ของ oocyst ภายในประกอบด้วย sporozoite มีรูปร่างคล้าย กล้วยหอมจำนวน 4 ตัว มีขนาดความยาวประมาณ 4.9 – 11.1 ไมโครเมตร ความกว้างประมาณ 1.0–1.2 ไมโครเมตร (Vandepitte et al., 1985) ทั้งหมดเรียงตัวขนานกันอยู่ด้านใดด้านหนึ่ง ภายใน oocyst มี residual body จำนวนตั้งแต่ 2 ถึงมากกว่า 40 (Upton & Current, 1985)

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

1. การวิเคราะห์ข้อมูลเป็นการเปรียบเทียบลำดับ DNA ของ SSU rRNA gene ของ *Cryptosporidium* จากแต่ละตัวอย่างโดยอาศัยโปรแกรมการวิเคราะห์ข้อมูลที่เหมาะสมเพื่อเปรียบเทียบกับลำดับ DNA ของเชื้อดังกล่าวที่ได้จากผู้ป่วยและจากสัตว์ชนิดต่างๆ ที่มีการศึกษาและรายงานไว้ก่อนหน้านี้ในต่างประเทศ ลำดับ DNA ที่เหมือนกันหรือมีความคล้ายคลึงกันสูงมากกว่าร้อยละ 99 บ่งชี้ว่าเป็น species เดียวกัน

2. เก็บรวบรวมข้อมูลลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพเช่น เพศ อายุ แหล่งที่อยู่ และอาการที่สำคัญ

3. เก็บรวบรวมข้อมูลจากผลการตรวจวัดขนาดของ oocyst ของเชื้อ *Cryptosporidium* โดยอาศัยการตรวจวินิจฉัยจากการย้อมสีพิเศษโดยวิธี modified Kinyoun acid-fast stain