บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นการวิจัยเชิงพรรณนาเพื่อศึกษาลักษณะความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *P. falciparum*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความผันแปรในส่วนกลางของยีนเอปิคอลเม็มเบรนแอนติเจนที่ 1 จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ที่มารับการตรวจรักษาในเขตอำเภอพบพระ และอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

<u>คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย</u>

ประชากรเป้าหมาย (target population) คือผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. falciparum* ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลอำเภอแม่สอด และ ศูนย์ควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลงที่ 4 อำเภอพบพระ จังหวัดตาก ระหว่างปี พ.ศ.2538 - 2540 และปี พ.ศ.2542

ประชากรตัวอย่าง (population sample) คือตัวอย่างเลือดที่เก็บมาจากประชากรเป้าหมาย

ผลบวก (positive) คือการนำตัวอย่างเลือดที่เก็บมาจากประชากรเป้าหมายมาทำฟิล์มเลือดชนิดหนา แล้วนำมาย้อมด้วยสี giemsa จากนั้นเมื่อนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายวัตถุ 100 เท่า แล้วพบเชื้อ *P. falciparum*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน AMA-1 ของเชื้อ *P. falciparum* จะเป็นพื้นฐานของการพัฒนาวัคซีนให้มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น นอกจากนั้นยังสามารถทราบแนวโน้มความแตกต่างประชากรของ *P. falciparum* ในเขตปรากฏโรคที่ต่างกันโดยอาศัยยีน AMA-1 เป็นตัวติดตาม (marker) ซึ่งผลการศึกษานี้อาศัยกลุ่มประชากรที่ต่างกัน กล่าวคือตัวอย่างเชื้อที่ได้จาก อำเภอแม่สอด มักเป็นเชื้อที่มาจากหลายแหล่งเนื่องจากการอพยพหรือการเดินทางของผู้ป่วยซึ่งเกิดขึ้นบ่อยจากการประกอบอาชีพ ในขณะที่ตัวอย่างเชื้อที่ได้จาก

อำเภอพบพระมักเป็นเชื้อที่ระบาดภายในท้องที่ ดังนั้นข้อมูลที่ได้จึงมีประโยชน์สำหรับการวางแผนในการติดตามควบคุมโรค รวมถึงการพัฒนาวัคซีน ได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไป

ขนาดของประชากรตัวอย่าง (sample size)

จากรายงานประจำปีของกองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อกระทรวงสาธารณสุขระหว่างปี พ.ศ.2538 - พ.ศ.2542 พบอุบัติการของการเกิดโรคมาลาเรียประมาณร้อยละ 5 ในเขตจังหวัดตาก จึงนำค่าดังกล่าวมาประกอบการคำนวนหาขนาดประชากรตัวอย่างโดยกำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นมีค่าร้อยละ 95

Z_α = Z 0.05/2

สูตร $N = Z_\alpha PQ/d^2$

N = ขนาดตัวอย่าง

d = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ กำหนดให้เป็น 0.05

P = อัตราการเกิดโรคมาลาเรียในเขตจังหวัดตาก

Q = 1-P

แทนค่า $N = (1.96)^2(0.05)(0.95)/(0.05)^2$

$= 73$

ดังนั้นขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่คำนวณได้เท่ากับ 73 ตัวอย่างเป็นอย่างน้อย สำหรับการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่างทั้งหมด 100 ตัวอย่าง

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

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)

ชุดอุปกรณ์สำหรับแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (Mupid-II)

ตู้เย็น 4 °C (Hitachi)

ตู้เย็น –20 °C (Puffer Hubbard)

ตู้เย็น –80 °C (Forma Scientific)

ตู้อบแห้ง (Memmert)

ไมโครปิเปตต์ (Adjustable micropipette) ขนาด 10 100 และ 1,000

ไมโครลิตร (Eppendorf)

หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง (Hirayama)

เครื่องอ่านผลแถบ DNA จากเจล (Bio Rad)

เครื่อง ABI 310 DNA sequencer

วัสดุ

กระจกสไลด์ (ขนาด 2.5 x 7.5 เซ็นติเมตร)

กระบอกฉีดน้ำ

กระบอกตวงขนาด 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

บีกเกอร์ขนาด 10 50 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

ปากคีบ (forceps)

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

พาราฟิลม์ (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)

Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4, May & Baker)

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma)

Purified water, Milli-Q grade

Ethidium bromide (Sigma)

Hydrochloric acid (HCl fuming 37%, Merck)

Potassium chloride (May & Baker)

Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2HPO_4, Ajax Chemical)

Sodium chloride (NaCl, Sigma)

Sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma)

Tris hydroxymethyl aminomethane (Merck)

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)

เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase (Pharmacia)

Oligonucleotide

ลำดับเบสจากบริเวณที่ 2 และ 3 ของยีนเอปิคอลเมมเบรนแอนติเจนที่1 ของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ FC27 (Peterson et al., 1989) ได้แก่

Oligonucleotide ที่เป็น PCR primers คู่นอกได้แก่

P1: 5'– TAGGAGAAGATGCTGAAGTAGCTGG –3' (ตำแหน่งที่ 392 ถึง 416)

P2: 5'– GAATTGAGTGCTTCGGATCAACCTA –3' (ตำแหน่งที่1027 ถึง1051)

Oligonucleotide ที่เป็น PCR primers คู่ในได้แก่

P3: 5'– GACTTCCATCAGGGAAATGTCCAGT –3' (ตำแหน่งที่ 428 ถึง 452)

P4: 5'– GATAACTGGGAAGAAGTTTGCCCTA –3' (ตำแหน่งที่ 886 ถึง 910)

การเก็บตัวอย่าง

โดยการเก็บตัวอย่างเลือด 3 มิลลิลิตร จากผู้ป่วยที่มารับการตรวจ ณ โรงพยาบาลอำเภอแม่สอด และอำเภอพบพระ จ.ตาก และทำการการซักประวัติเพื่อรวบรวมข้อมูลทางคลินิคของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ อายุ เชื้อชาติ ภูมิลำเนา และอาการป่วย หลังจากนั้นแบ่งเลือดที่เจาะจากหลอดเลือดดำดังกล่าวจำนวน 300 ไมโครลิตรเก็บในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง โดยใช้ EDTA แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ -20 °C เพื่อขั้นตอนในการเตรียม DNA ต่อไป ใช้เลือดส่วนที่เหลือจากการเจาะเลือดหยดลงบนแผ่นแก้วสำหรับทำฟิล์มเลือดชนิดหนาและชนิดบาง อย่าง 2 แผ่น นำไปย้อมสียิมซาความเข้มข้น 5% แล้วตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

การวัดอุณหภูมิร่างกาย

ทำการวัดอุณหภูมิร่างกายโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์สอดเข้าไปบริเวณใต้ลิ้นของผู้ป่วย จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 2 นาที จึงอ่านอุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์นั้น แล้วบันทึกค่าอุณหภูมิร่างกายโดยมีหน่วยเป็น°C

การวัดค่า hematocrit

บรรจุเลือดของผู้ป่วยลงใน hepainized capillary ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของความยาวของ hepainized capillary จากนั้นปิดปลายด้านหนึ่งด้วยดินน้ำมัน นำไปปั่นใน micro hematocrit centrifuge ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปอ่านค่า hematocrit และบันทึกผล

การย้อมสีแผ่นฟิลม์เลือดโดยวิธียิมซา

1. หยดเลือดลงบนกระจกสไลด์สะอาดประมาณ 1-2 หยด
2. ใช้ขอบกระจกสไลด์แผ่นที่สอง ซึ่งเรียบและสะอาด แตะที่หยดเลือดทำมุม 45 องศา กับ สไลด์แผ่นแรก แล้วค่อย ๆ เลื่อนสไลด์แผ่นที่สองออกไปด้านปลายสไลด์แผ่นแรกอย่างช้า ๆ และสม่ำเสมอ
3. ปล่อยให้ฟิลม์เลือดที่ได้ให้แห้งสนิท ภายใต้อุณหภูมิห้อง
4. นำฟิลม์เลือดที่แห้งสนิทแล้วไปจุ่มลงใน absolute methanol เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อรักษาสภาพเม็ดเลือดและเชื้อมาลาเรียที่อยู่ภายในเม็ดเลือด
5. นำขึ้นมาทิ้งไว้ให้แห้งสนิทภายใต้อุณหภูมิห้อง
6. หลังจากฟิลม์เลือดแห้งสนิทแล้ว เทสียิมซาความเข้มข้นร้อยละ 5 ลงไปบนสไลด์ให้ท่วมฟิลม์เลือด แล้วทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
7. ล้างสีบนสไลด์ออกด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปนับจำนวนเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

การนับจำนวนเชื้อ

นำฟิล์มเลือดที่ผ่านการย้อมสีแล้วมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายวัตถุ 100 เท่า แล้วนับจำนวนเชื้อไปพร้อม ๆ กับจำนวนเม็ดเลือดขาวที่พบ เมื่อนับเม็ดเลือดขาวจนครบ 200 เซลล์ และบันทึกจำนวนเชื้อที่นับได้ จากนั้นจึงนำค่าที่บันทึกไว้มาคำนวณหาความหนาแน่นของเชื้อต่อเลือด 1 ไมโครลิตร โดยใช้สูตร

$$\text{ความหนาแน่นของเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนเชื้อต่อเม็ดเลือดขาว 200 เซลล์ X 8,000}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับ (200 เซลล์)}}$$

หมายเหตุ 8,000 คือค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดเลือดขาวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร

การเตรียม DNA โดยใช้ Wizard™ PCR genomic DNA purification system

1. นำตัวอย่างเลือดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °C มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง หลังจากละลายแล้วเติม cell lysis solution ปริมาณ 600 ไมโครลิตร

2. เขย่าให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดทดลองไปมา แล้วตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 15 นาที หรือ จนสังเกตเห็นสารละลายเป็นสีแดงใส

3. นำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. ดูดสารละลายส่วนบนซึ่งมีฮีโมโกลบินทิ้งไป จนเหลือแต่ตะกอนอยู่ก้นหลอด

5. เติมสารละลาย PBS ปริมาณ 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 15 นาที ให้ตะกอนบริเวณก้นหลอดกระจายตัวออก เพื่อล้าง hemoglobin แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ภายใต้อุณหภูมิห้อง

6. ดูดสารละลายใสส่วนบนทิ้งไป แล้วเติม PBS solution เพื่อปั่นล้าง hemoglobin ออกให้หมด โดยทำตามขั้นตอนที่ 5-6 ซ้ำอีก 2-3 ครั้ง หรือจนกว่าสารละลายส่วนบนใส

7. หลังปั่นล้าง hemoglobin ครั้งสุดท้ายแล้ว ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เหลือตะกอนบริเวณก้นหลอด ซึ่งในตะกอนนี้มีนิวเคลียสของเชื้อมาลาเรียปะปนอยู่กับนิวเคลียสของเม็ดเลือดขาวของคน แล้วเติม nuclei lysis solution ปริมาณ 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียว

8. เติม protein precipitation solution ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอน DNA เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 1 นาที ก่อนนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากปั่นแล้วจะเห็นตะกอนที่ก้นหลอด แยกชั้นกับของเหลวส่วนบน

9. ดูดของเหลวส่วนบนใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย absolute ethanol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอน DNA นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

10. เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว นำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

11. เทสารละลายส่วนบนทิ้งโดยการคว่ำหลอดอย่างรวดเร็ว จะได้ตะกอนสีขาวอยู่บริเวณก้นหลอด ซึ่งเป็น DNA แล้วคว่ำหลอดทิ้งไว้บนกระดาษชำระที่แห้งและสะอาดประมาณ 10 นาที หรือจนกว่าสารละลายจะไหลออกจากหลอดจนหมด

12. เติมสารละลาย ethanol ความเข้มข้น 80% ปริมาณ 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C อีกครั้ง

13. เทสารละลายส่วนบนทิ้งโดยการคว่ำหลอดอย่างรวดเร็วแล้วคว่ำหลอดทิ้งไว้บนกระดาษชำระที่แห้งและสะอาดประมาณ 10 นาที หรือจนกว่าสารละลายจะไหลออกจากหลอดจนหมด

14. เติมสารละลาย elution buffer ปริมาณ 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C สำหรับใช้ในปฏิกิริยาในขั้นต่อไป

การเลือกตำแหน่งเพื่อสังเคราะห์ oligonucleotide สำหรับเป็น PCR primers

ในการศึกษาวิจัยนี้จะออกแบบ primers โดยอาศัยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์จากยีน AMA-1 ของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ FC27 (GenBank accession number M27133) เป็นต้นแบบ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษาจะอยู่ระหว่างตำแหน่งที่ที่ 451 ถึง 885 การศึกษาในครั้งนี้จะใช้ primers จำนวน 4 ตัว คือ P1 , P2 , P3 และ P4 ซึ่ง primer ทั้ง 4 ตัวนี้ จะมีจำนวน oligonucleotide จำนวน 25 mers ตามภาพที่ 7

การเพิ่มปริมาณ DNA (DNA amplification)

องค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกริยาเพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการศึกษา โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction) โดยกำหนดให้มีปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. DNA ต้นแบบปริมาตร 2 ไมโครลิตร

2. PCR primers คู่นอก (P1 และ P2) ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตรปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร

3. nucleotide substrate (dATP , dTTP , dCTP และ dGTP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร

4. 10X PCR reaction buffer ซึ่งประกอบด้วย Tris HCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมล KCl ความเข้มข้น 500 มิลลิโมล $MgCl_2$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาณ buffer ที่ใช้คือ 2 ไมโครลิตร

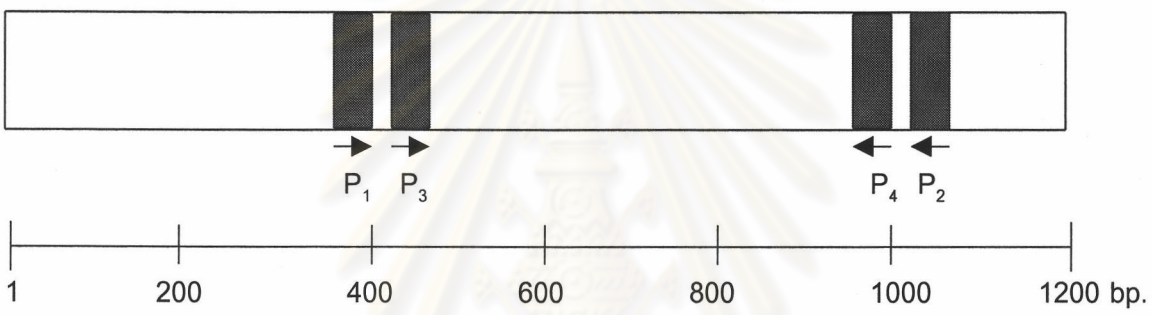
5. น้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว 14.5 ไมโครลิตร

6. เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.25 ยูนิต เพื่อเป็นตัวสนับสนุนปฏิกริยา

ส่วนประกอบทั้งหมดนี้เรียกว่า PCR reaction mixture แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้ DNA ต้นแบบแยกสาย (DNA denaturation) ที่อุณหภูมิ 95 oC เป็นเวลา 2 นาทีในรอบแรก และ 1 นาทีในรอบต่อ ๆ ไป

จากนั้นทำให้ primers จับคู่กับ DNA ต้นแบบ (primer template annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 60 oC เป็นเวลา 30 วินาที ต่อจากนั้นคือขั้นตอนการสร้างสาย DNA (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72 oC เป็นเวลา 1 นาที ปฏิกิริยาจะดำเนินไปจนครบ 35 รอบ และในรอบที่ 35 จะเพิ่มระยะเวลาในขั้นตอนการสร้างสาย DNA ออกไปอีก 7 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์

ภาพที่ 7 แสดงพื้นที่ที่มีสีทึบหมายถึง ตำแหน่งของ primers ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ P_1 P_2 P_3 และ P_4 ปลายลูกศรแสดงทิศทางของ primers ด้าน 3'



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส นำผลิตผลที่ได้มาใช้เป็น DNA ต้นแบบสำหรับการทำปฏิกริยาในรอบที่สอง องค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกริยาในรอบที่สองทั้งหมดมีปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. DNA ต้นแบบ 2 ไมโครลิตร
2. PCR คู่ใน (P3 และ P4) ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร
3. nucleotide substrate (dATP , dTTP , dCTP และ dGTP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
4. 10X PCR reaction buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร
5. น้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว 36.75 ไมโครลิตร
6. เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.5 ยูนิต เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

นำ PCR reaction mixture นี้ไปทำปฏิกิริยาโดยใช้เวลา อุณหภูมิ และขั้นตอนเช่นเดียวกันกับปฏิกิริยา PCR ในรอบแรก เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานี้จะได้ผลิตผลเป็น DNA ที่มีความยาว 430 คู่เบส แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ผลิตผลของปฏิกิริยาต่อไป

การวิเคราะห์ DNA จากผลิตผล PCR

การวิเคราะห์แถบ DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงและใช้กันอย่างแพร่หลาย ในการศึกษากรดนิวคลิอิกจำนวนเล็กน้อย โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีของกรดนิวคลิอิคที่หมู่ฟอสเฟต (PO_4) เป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง ทำให้มีประจุเป็นลบ ดังนั้นเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจึงเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ อะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นเตรียมอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรสเจล 1 กรัมแล้วนำไปละลายใน TAE buffer ซึ่งประกอบด้วย 40 mM Tris-acetate และ 1 mM EDTA, pH8แล้วเติมจนครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มแต่ระวังอย่าให้เดือดและเขย่าให้ผงเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิของเจลลดลงเหลือประมาณ 50-60 °C จึงนำไปเทลงแม่พิมพ์ของเจลขนาด 5.5X10.5 เซนติเมตร จากนั้นจึงใส่หวี (comb)เพื่อทำให้เกิดหลุมบนหน้าเจล ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวแล้วเติม TAE buffer ลงบนหน้าเจล เพื่อช่วยให้การดึงหวีออกทำได้ง่ายขึ้น ทำการดึงหวีออกโดยค่อย ๆ ดึงปลายทั้ง 2 ข้างออกพร้อม ๆ กันเพื่อป้องกันการฉีกขาดของหน้าเจลและหลุมเจล แล้วนำเจลไปใส่ใน electrophoresis chamber ซึ่งมี TAE buffer ท่วมสูงกว่าระดับหน้าเจลเล็กน้อย

นำ DNA ผลผลิตที่ต้องการวิเคราะห์จาก PCR ปริมาตร 3.5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye (ประกอบด้วย bromophenol blue ความเข้มข้น 0.25%, xylene cyanol FF ความเข้มข้น 0.25% และ สารละลาย Ficoll type 400 ความเข้มข้น 40% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) ปริมาตร 0.7ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วหยอดส่วนผสมนั้นลงในหลุมเจลแต่ละหลุม โดยใช้ *Hind* III ซึ่งเป็น DNA ที่ทราบขนาด (marker) เพื่อเปรียบเทียบขนาดของ DNA จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าเคลื่อนที่ผ่านเจลเพื่อให้ DNA วิ่งเข้าหาขั้วบวก โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที หรือจนกระทั่งแถบสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปได้ 2 ใน 3 ของความยาวเจลทั้งหมด แล้วจึงนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน TAE buffer เป็นเวลา 20 นาที นำไปดูการเรืองแสง UV ของแถบ DNA (UV transillumination) แล้วถ่ายภาพไว้เพื่อนำไปหาขนาดของผลิตของ PCR ที่เกิดขึ้นว่าตรงกับขนาดของ DNA ที่ต้องการศึกษาหรือไม่

การวิเคราะห์การเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์บน DNA

หลังจากได้ผลิตผลเป็น DNA ที่ต้องการศึกษาแล้ว นำ DNA มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยหลักการ dideoxy chain termination (Sanger et al, 1977)

<u>การเตรียม DNA โดยใช้ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit</u>

1. นำ GFX column ซึ่งเป็น glass fiber matrix อยู่ภายใน column ใส่ใน collection tube ความจุ 2 มิลลิลิตร แล้วเติม capture buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

2. ใช้ไมโครปิเปตต์ดูด DNA ผลิตผล ที่ได้จาก PCR ในรอบที่ 2 และผ่านการหาขนาดแล้ว ใส่ใน GFX column แล้วผสมให้เข้ากับ capture buffer โดยการใช้ไมโครปิเปตต์ดูดขึ้นลง 4-6 ครั้ง

3. นำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

4. เทสารละลายใน collection tube ทิ้งไป แล้วนำ GFX column ใส่กลับลงไปใน collection tube อีกครั้ง จากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

5. ย้าย GFX column ไปใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม elution buffer

6. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที เพื่อให้เกิด DNA elution อย่างสมบูรณ์ แล้วจึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

นำผลผลิตที่ได้ไปวิเคราะห์ DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) ครั้งด้วยขั้นตอนและวิธีเดิม แล้วนำไปติดฉลาก DNA ต่อไป

การติดฉลาก DNA โดยใช้ ABI PRISM™ dye terminator cycle sequencing ready reaction kit

เตรียมส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย dRhodamine dye terminator ready reaction ปริมาตร 8 ไมโครลิตร DNA ที่ต้องการติดฉลาก ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ primer สำหรับการ sequence (ในการทดลองนี้ใช้ primer P3) ความเข้มข้น 2 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำ reaction mixture นี้ไปทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนดังนี้

1. ทำให้ DNA แยกสาย โดยใช้อุณหภูมิ 96 °C เป็นเวลา 30 วินาที
2. จากนั้นทำให้ primer จับคู่กับ DNA โดยใช้อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 วินาที
3. เข้าสู่ขั้นตอนการสร้างสาย DNA โดยใช้อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 4 นาที รอจนปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 25 รอบ แล้วลดอุณหภูมิในขั้นตอนการสร้างสาย DNA ในรอบที่ 25 เป็น 4 °C เป็นเวลา 30 นาที

การตกตะกอน DNA สำหรับเข้าเครื่อง ABI 310 DNA sequencer

1. นำ DNA ที่ผ่านการติดฉลากแล้วมาตกตะกอนด้วยสารละลาย sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมล pH 4.6 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
2. เติม ethanol ความเข้มข้น 95% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง หลายๆครั้ง
3. นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลาประมาณ 10 นาที
4. นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15-30 นาที
5. ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไป เหลือแต่ตะกอน DNA อยู่ที่ก้นหลอด
6. เติม ethanol ความเข้มข้น 70% ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอน DNA
7. นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
8. ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ระวังอย่าให้สัมผัสตะกอน DNA ที่อยู่บริเวณก้นหลอด
9. ตั้งหลอดทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเพื่อให้ DNA แห้ง แล้วจึงเติม template suppression reagent ปริมาตร 25 ไมโครลิตรเพื่อละลายตะกอน DNA

10. นำ DNA ที่ผ่านการเติม template suppression reagent แล้วมาทำการแยกสายโดยใช้อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นรีบนำไปแช่น้ำแข็งทันที หลังจากทิ้งไว้สักครู่จึงใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายใน microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ลักษณะการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บน DNA ด้วยเครื่อง ABI 310 DNA sequencer

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลของลักษณะการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บน DNA ในแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI 310 DNA sequencer จะถูกรายงานออกมาในรูปแบบของ electropheogram ซึ่งจะถูกแปลผลเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ที่ต้องการศึกษา และเก็บรวบรวมไว้ใช้ในการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis)

1. นำข้อมูลของลักษณะการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บน DNA ที่ได้จากเครื่อง ABI 310 DNA sequencer มาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาความแตกต่างระหว่าง DNA ที่ได้จากตัวอย่างแต่ละราย จากนั้นจึงแบ่งออกเป็นกลุ่มตามความแตกต่างนั้น โดยตัวอย่างที่มีลักษณะการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์เหมือนกันจะถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน โดยอาศัยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

2. นำความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆในการศึกษานี้ และเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์อื่นๆที่ได้มีการศึกษาและรายงานไว้ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ว่ามีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมเพียงใด

3. นำข้อมูลที่ได้มาใช้ศึกษาอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่เป็น T-cell epitope ที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Lal et al, 1996)

4. เก็บรวบรวมข้อมูลเชิงคุณภาพเกี่ยวกับลักษณะทางกายภาพของกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา เช่น เพศ อายุ เชื้อชาติ และอาการทางคลีนิค เพื่อหาความสัมพันธ์กับรูปแบบของยีน AMA-1 จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์