บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงพรรณนาเพื่อศึกษาความหลากหลายของโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์ชนิดที่ 1 ในบริเวณที่ 2 ของเชื้อ *P. falciparum*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาความหลากหลายของยีนที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์ชนิดที่ 1 ของ *P. falciparum* (PfMSP1) ในบริเวณที่ 2 ในระดับนิวคลีโอไทด์จากประชากรมาลาเรียที่ได้จากจังหวัดตากในระหว่างปี พ.ศ. 2538 ถึง พ.ศ. 2542

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (target population) คือ ผู้ป่วยมาลาเรียที่มารับบริการตรวจรักษา ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลง จังหวัดตาก

ประชากรตัวอย่าง (population sample) คือ กลุ่มตัวอย่างเลือด (whole blood) ที่เก็บมาจากประชากรเป้าหมาย

การตรวจฟิล์มเลือดหนา (thick blood film) คือ การตรวจวินิจฉัยด้วยการย้อมสีเลือดบนกระจกสไลด์ การวินิจฉัย *P. falciparum* จะพบเฉพาะระยะวงแหวนหรือระยะแกมมีโตไซต์หรือทั้งสองระยะร่วมกัน ส่วนในระยะอื่นมีโอกาสพบน้อยมาก

การตรวจฟิล์มเลือดบาง (thin blood film) คือ การตรวจวินิจฉัยการย้อมสีเลือดบนกระจกสไลด์ แล้วตรึงสภาพด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ก่อนย้อมสี การวินิจฉัยเชื้อ *P. falciparum* โดยตรวจพบระยะวงแหวนหรือระยะแกมมีโตไซต์ โดยในเม็ดเลือดแดง 1 ตัวอาจพบระยะวงแหวนมากกว่า 1 หรือพบระยะวงแหวนที่มีโครมาติน 2 จุด (double chromatin) ตลอดจนการพบระยะที่มีเชื้อชิดขอบเม็ดเลือดแดง (marginal form)

ขนาดของกลุ่มประชากร

ขนาดของกลุ่มตัวอย่างคำนวณจากอุบัติการของการเกิดโรคมาลาเรีย จากรายงานประจำปีของกองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข ระหว่างปี พ.ศ. 2538 ถึง พ.ศ. 2542 พบอุบัติการของการเกิดโรคมาลาเรียในจังหวัดตาก ประมาณร้อยละ 5

กำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

$$Z_{\alpha} = Z_{0.05/2} = 1.96 \quad \text{(two tail)}$$

สูตร

$$n = \frac{Z_{\alpha}^{2}\, pq}{d^{2}}$$

เมื่อ n = ขนาดตัวอย่าง

p = อัตราการเกิดโรคมาลาเรีย = 0.05

q = (1 - p) = 1 – 0.05

d = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้กำหนดให้เป็น 0.05

แทนค่า

$$n = \frac{(1.96)^{2}(0.05)(0.95)}{(0.05)^{2}}$$

$$= 73$$

จากการคำนวณขนาดตัวอย่างที่ต้องใช้อย่างน้อยคือ 73 ตัวอย่าง แต่สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ใช้จำนวนตัวอย่างมากกว่า 150 ตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์

เครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ (automatic thermal cycler, Perkin Elmer)

เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิและเวลาได้ (high speed refrigerated microcentrifuge, Tomy)

Magnetic stirrer (Thermolyne)

Vortex mixer (Scientific Industries)

กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)

เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียดอ่านได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Bosh)

เครื่องวัดความเป็นกรดและด่าง (Cyberscan 500)

ชุดอุปกรณ์สำหรับแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Mupid-II)

ตู้เย็น 4°C (Hitachi)

ตู้เย็น -20°C (Puffer Hubbard)

ตู้เย็น -80°C (Forma Scientific)

ตู้อบแห้ง (Memmert)

ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติ (Automatic adjustable micropipette) ขนาด 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร (Eppendorf)

หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง (Hirayama)

เครื่องอ่านผลแถบสารพันธุกรรมจากเจล (Bio Rad)

เครื่องวิเคราะห์รหัสพันธุกรรม ABI 310 DNA Sequencer

วัสดุ

กระจกสไลด์ (ขนาด 2.5 x 75 เซนติเมตร)

กระบอกฉีดน้ำ

กระบอกตวง ขนาด 10 50 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

กล่องโฟมใส่น้ำแข็ง

ขวดแล้วสำหรับใส่สารเคมี

ถุงมือยาง (latex gloves)

ที่วางหลอดทดลองขนาด 0.1 และ 1.5 มิลลิลิตร (microtube rack)

เทอร์โมมิเตอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นาฬิกาจับเวลา

บีกเกอร์ขนาด 50 100 200 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

ปากคีบ (forcep)

ปิเปตต์ทิบ (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)

สารเคมี

1. สารเคมีทั่วไป

Absolute ethanol (Merck)

Absolute methanol (Mallinkrot)

Acetic acid (100%, Merck)

Agarose (Funakoshi)

Bromophenol blue (Sigma)

Cleaning solution (ICN Biomedicals)

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma)

Disodium hydrogen phosphate ($Na_2 HPO_4$, May & Baker)

Double distilled water

Ethidium bromide (Sigma)

Ficoll, type 400 (Pharmacia)

Hydrochloric acid (HCl fuming 37% Merck)

Potassium chloride (May & Baker)

Potassium di-hydrogen orthophosphate (KH_2PO_4, Ajax Chemicals)

Sodium chloride (Sigma)

Sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma)

Sodium hydoxide (Merck)

Tris hydroxymetyl amino methane (Merck)

2. สารเคมีที่เป็น Reagent Kit

Wizard™ PCR DNA and Gel Band 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

NP1 : 5'-CACAATGTGTAACACATGAAAGTTATC-3' (27 เบส)

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 110 ถึง 136 ของสายพันธุ์ MAD20 ของยีน PfMSP1)

NP2 : 5'-GATCCACTTGAATTAGAATATTATTTAAGA-3' (30 เบส)

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1,273 ถึง 1,302 ของสายพันธุ์ MAD20 ของยีน PfMSP1)

P1 : 5'-AAACTAGAAGCTTTAGAAGATG-3' (22 เบส)

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 151 ถึง 172 ของสายพันธุ์ MAD20 ของยีน PfMSP1)

P2 : 5'-TGATTGGTTAAATCAAAGAGTT-3' (22 เบส)

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 593 ถึง 614 ของสายพันธุ์ MAD20 ของยีน PfMSP1)

5. ดีเอ็นเอมาตรฐาน

λ/*Hind* III Markers (0.5 μg/ml) (Promega)

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมาลาเรียที่มาตรวจ ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลงที่ 4 จังหวัดตาก ในปี พ.ศ. 2538 ถึง พ.ศ. 2542 โดยใช้เลือดที่เจาะจากหลอดเลือดดำที่แขน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เก็บในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวคือ ethylene diamine tetracetic acid (EDTA) นำตัวอย่างเลือดดังกล่าวเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ –20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งนำแต่ละตัวอย่างมาทำการตรวจวินิจฉัยโดยการย้อมฟิล์มเลือดชนิดหนาและชนิดบางด้วยสียิมซ่าแล้วตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อตรวจแยกชนิด ปริมาณเชื้อมาลาเรียและทำการเก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐานทางคลีนิกได้แก่ เพศ อายุ เชื้อชาติ ภูมิลำเนาและอาการแสดงของโรค

การนับจำนวนเชื้อ

วิธีการทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดหนา (thick blood film)

หยดเลือดลงบนส่วนกลางของแผ่นกระจกสไลด์ที่แห้งและสะอาด ประมาณ 2-3 หยด ใช้ขอบมุมกระจกสไลด์แผ่นใหม่ที่สะอาด เกลี่ยเลือดเป็นวงกลมให้เลือดกระจายออกเป็นแผ่นบางและสม่ำเสมอ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5–2.0 เซนติเมตร ซึ่งจะต้องไม่ให้หนาหรือบางจนเกินไป แผ่นฟิล์มเลือดที่เตรียมเสร็จแล้ว ทิ้งไว้จนแห้งสนิท แล้วจึงย้อมด้วยสียิมซาความเข้มข้นร้อยละ 5

วิธีการนับจำนวนเชื้อ

ใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย objective lens 40X เลื่อนหาเม็ดเลือดขาวในบริเวณที่มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ แล้วเปลี่ยนกำลังขยาย objective lens เป็น 100X นับจำนวนเชื้อมาลาเรียต่อเม็ดเลือดขาว 200 ตัว แล้วสามารถคำนวณหาเชื้อต่อเลือด 1 มิลลิลิตร โดยค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 8,000 เซลล์/เลือด 1 ไมโครลิตร

วิธีการประเมินจากฟิล์มเลือดชนิดหนา

$$\text{ความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย} = \frac{\text{จำนวนเชื้อที่นับได้ x ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวในเลือด 1 ไมโครลิตร}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้}}$$

ตัวอย่างเช่น นับจำนวนเชื้อมาลาเรียในแต่ละวงกล้องพบจำนวนเชื้อมาลาเรีย 100 ตัวต่อเม็ดเลือดขาว 200 ตัว ถ้าประมาณว่าเลือด 1 ไมโครลิตร มีเม็ดเลือดขาวเฉลี่ยประมาณ 8,000 ตัว ดังนั้นความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในเลือด 1 ไมโครลิตร มีจำนวนประมาณ 4,000 ตัว

วิธีการย้อมสีแผ่นฟิล์มเลือดอย่างบาง (thin blood film)

หยดเลือดบนแผ่นกระจกสไลด์สะอาดประมาณ 1-2 หยดเล็ก ใช้ขอบกระจกสไลด์อีกแผ่นหนึ่งแตะเลือดทำมุมประมาณ 45 องศา เลื่อนขอบกระจกสไลด์ที่แตะเลือดออกไปทางปลายอย่างรวดเร็วและสม่ำเสมออย่าให้หยุดชะงัก ปล่อยให้เลือดที่แผ่เป็นแผ่นบางบนกระจกสไลด์ให้แห้ง

นำไปจุ่มใน absolute methanol 30 วินาที เพื่อรักษาเม็ดเลือดแดงและเชื้อให้คงสภาพไม่หลุดออก ขณะทำการย้อม นำขึ้นมาเก็บไว้จนแห้งสนิท แล้วจึงย้อมด้วยสียิมซาความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยหยดสีลงบนแผ่นสไลด์จนท่วมบริเวณที่จะย้อมทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งและเก็บไว้นับจำนวนเชื้อต่อไป

วิธีการนับจำนวนเชื้อ

ใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย objective lens 40X เลื่อนหาบริเวณที่เม็ดเลือดแดงมีการกระจายตัวสม่ำเสมอและเรียงตัวกันเป็นชั้นเดียว มักจะพบในบริเวณใกล้กับส่วนปลายของฟิล์มเลือด เปลี่ยนกำลังขยาย objective lens 100X นับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่พบใน 3 วงกล้อง และนำไปคำนวณหาจำนวนวงกล้องที่จะพบเม็ดเลือดแดง 10,000 เซลล์ แล้วนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียทั้งหมด จากจำนวนวงกล้องทั้งหมดที่ได้จากการคำนวณ

$$\text{ความหนาแน่นของเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ} \times \text{จำนวนเม็ดเลือดแดงในเลือด 1 ไมโครลิตร}}{\text{ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงต่อ 1 วงกล้อง} \times \text{จำนวนกล้อง}}$$

(ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 5×10^6 ตัว / ไมโครลิตร)

การสกัดดีเอ็นเอ

ในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดผู้ป่วยมาลาเรียที่มารับบริการตรวจจากหน่วยควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลงที่ 4 อ.พบพระ จ.ตาก โดยใช้ชุดอุปกรณ์และน้ำยาเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ Wizard™ Genomic DNA Purification System (Promega) Kit มีขั้นตอนนี้

1. นำตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมาลาเรีย ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20°C ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลายเป็นของเหลว ใช้ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติดูดเลือดขึ้นแล้วปล่อยลงอย่างช้า ๆ ให้เลือดผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดเลือดปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร สำหรับนำมาสกัดดีเอ็นเอ
2. เติมสารละลาย cell lysis solution ปริมาตร 900 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากันหรือใช้ vortex mixer ที่ความเร็วต่ำสุด เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก

3. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที
4. ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง หลังจากนั้นเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 5 นาที ให้ตะกอนที่เป็นก้อนกระจายตัวออกเพื่อล้าง haemoglobin ออกไป นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ตกตะกอน
5. ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติม PBS เพื่อทำการปั่นล้าง hemoglobin โดยปฏิบัติตามขั้นตอนที่ 4 และ 5 ทำซ้ำอีก 2-3 ครั้ง หรือจนเห็นว่าหลังจากการปั่นตกตะกอนครั้งสุดท้ายแล้วสารละลายส่วนบนใส
6. หลังจากที่ทำการปั่นล้าง haemoglobin ครั้งสุดท้ายแล้วดูดสารละลายส่วนบนออก เหลือตะกอนที่ก้นหลอดไว้ ซึ่งเป็นตะกอนของนิวเคลียสของเชื้อมาลาเรียและเม็ดเลือดขาวของคนแล้วเติม nuclei lysis solution 300 ไมโครลิตร เขย่าผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายที่ค่อนข้างเหนียว
7. เติม protein precipitation 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากปั่นเสร็จแล้วจะสังเกตเห็นตะกอนที่ก้นหลอดแยกชั้นกับสารละลายส่วนบน
8. ดูดสารละลายส่วนบนเก็บไว้ใน microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติมสารละลาย absolute ethanol 800 ไมโครลิตร หรือปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง
9. หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทสารละลายส่วนบนทิ้งจะเหลือตะกอนดีเอ็นเออยู่ที่ก้นหลอด
10. ล้างตะกอน ดีเอ็นเอ โดยเติม ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 80 ที่อยู่ในความเย็น ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง ตะกอนดีเอ็นเอจะอยู่ที่ก้นหลอด คว่ำหลอดไว้บนกระดาษที่สะอาด ที่อุณหภูมิห้องจนดีเอ็นเอแห้ง ต่อจากนั้นละลายดีเอ็นเอ โดยเติม TE Buffer จำนวน 30 ไมโครลิตร เพื่อใช้สำหรับเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Amplification)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้ปฏิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยอาศัย primers ที่ต่างกัน 2 คู่ ด้วยวิธี nested PCR

<u>การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรก</u>

1. ในการทำ PCR รอบแรกมีองค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด (PCR reaction mixture) ในปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 0.5 ไมโครลิตร ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้
น้ำ	13.5 ไมโครลิตร
10X PCR reaction buffer	2 ไมโครลิตร
nucleotide substrate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ประกอบด้วย dATP, dTTP, dCTP และ dGTP	0.4 ไมโครลิตร
primer: NP1 (ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
primer: NP2 (ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอต้นแบบ	2 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.1 units

2. ผสม PCR reaction mixture ให้เข้ากัน โดยใช้นิ้วเคาะที่ก้นหลอดทดลอง แล้วนำไปปั่นให้สารละลายข้างหลอดรวมกันที่ก้นหลอดทดลอง

3. นำ PCR reaction mixture เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.1 ขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอแยกสาย (DNA denaturation)
ใช้อุณหภูมิที่ 94°C เป็นเวลา 1 นาที

3.2 ขั้นตอนที่ทำให้ primer จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (primer-template annealing)
ใช้อุณหภูมิที่ 60°C เป็นเวลา 1 นาที

3.3 ขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอ (extension)
ใช้อุณหภูมิที่ 72°C เป็นเวลา 1 นาที

โดยทำปฏิกิริยาทั้งหมดซ้ำกันจนครบ 35 รอบ โดยในรอบที่ 35 ซึ่งเป็นรอบสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ แล้วนำมาตรวจสอบผลิตผล (PCR product) ของปฏิกิริยา PCR โดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบสอง (nested PCR)

1. ในการทำ PCR รอบสอง ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมดในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้
น้ำ	36.5 ไมโครลิตร
10X PCR rcaaction buffer	5 ไมโครลิตร
nucleotide substrate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ประกอบด้วย dATP, dTTP, dCTP และ dGTP	1 ไมโครลิตร
primer : P1 (ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	2.5 ไมโครลิตร
primer : P2 (ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	2.5 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอต้นแบบ (จาก PCR products ในรอบแรก)	2 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.1 units

2. ผสม PCR reaction mixture ให้เข้ากัน โดยใช้นิ้วเคาะที่ก้นหลอดทดลอง แล้วนำไปปั่นให้สารละลายข้างหลอดรวมกันที่ก้นหลอดทดลอง

3. นำ PCR reaction mixture เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.1 ขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอแยกสาย
ใช้อุณหภูมิที่ 94°C เป็นเวลา 1 นาที

3.2 ขั้นตอนที่ทำให้ primer จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ
ใช้อุณหภูมิที่ 50°C เป็นเวลา 30 วินาที

3.3 ขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอ
ใช้อุณหภูมิที่ 72°C เป็นเวลา 1 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำปฏิกิริยาซ้ำกันจนครบ 35 รอบ เมื่อครบรอบสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำ PCR products ที่ได้นำไปตรวจสอบผลิตผล โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับรอบแรก

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้กรดนิวคลีอิกในปริมาณเล็กน้อย นำมาศึกษาโครงสร้าง ขนาดและปริมาณของกรดนิวคลีอิกที่มีความยาวเหมาะสม โดยอาศัยคุณสมบัติโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกมีองค์ประกอบของหมู่ฟอสเฟต (PO_4^-) ซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมีเป็นประจุลบ ดังนั้นเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะมีการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก โดยอาศัยเจลเป็นตัวกลางในการแยกขนาดดีเอ็นเอขณะที่เคลื่อนที่ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

<u>ขั้นตอนการตรวจสอบผลิตผล</u>

1. เตรียมอะกาโรสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยชั่งอะกาโรส 1 กรัม ทำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 100 มิลลิลิตรโดยเติม TAE บัฟเฟอร์ แล้วนำไปให้ความร้อน จนส่วนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ให้ความร้อนลดลงมีอุณหภูมิประมาณ 50 °C ถึง 60 °C

2. นำส่วนผสมนี้เทลงบนแม่พิมพ์สำหรับเตรียมเจล (gel chamber) ขนาด 5.5 x 10.5 เซนติเมตร จากนั้นใส่หวีเจล (comb) ลงไปในช่องที่สำหรับใส่หวี เพื่อทำหลุม (well) สำหรับวิเคราะห์ PCR products ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จนเจลแข็งตัว เติม TAE buffer โดยให้ปริมาตรของบัฟเฟอร์ท่วมเจลเล็กน้อย เพื่อช่วยให้ดึง comb ออกจากเจลได้ง่ายขึ้นและเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดหลุมในเจลแตกหรือการฉีกขาดของเจล แล้วค่อย ๆ ดึง comb ออก จากนั้นนำไปใส่ใน electrophoresis chamber ที่เติม TAE ไว้ให้ปริมาตรที่ท่วมผิวหน้าของเจล ประมาณ 1 เซนติเมตร

3. นำ PCR products ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 6 : 1 (DNA : dye) ใช้ไมโครปิเปตต์หยอดแต่ละตัวอย่างลงในหลุมเจล โดยเรียงตามลำดับและบันทึกข้อมูล ใช้ λ/*Hin*d III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาด เพื่อเปรียบเทียบขนาดโดยประมาณของดีเอ็นเอที่ศึกษา เปิด power supply ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านเจลจากขั้วลบเข้าหาขั้วบวกใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า100 โวลต์ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 20 นาที หรือจนกระทั่งสีของ loading dye เคลื่อนที่ไปได้ 2 ใน 3 ส่วนของเจล

4. นำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide (EtBr) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน TAE buffer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที

5. นำไปวิเคราะห์โดยตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จากแหล่งกำเนิดแสงและถ่ายภาพไว้เพื่อนำมาวัดขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยตรง เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

ข้อควรระวัง ควรใส่ถุงมือเพื่อป้องกันการสัมผัส EtBr

การวิเคราะห์การเรียงลำดับเบสของดีเอ็นเอ

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยอาศัยหลักการของ dideoxy chain termination (Sanger et al., 1977)

1. ขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ โดยใช้ GFX™ PCR DNA and Gel Purification kit
    1. เตรียมชุด Purification kit สำหรับดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วย GFX column ซึ่งมี glass fiber matrix อยู่ใน column collection tube แล้วเติมสารละลาย capture buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
    2. ใช้ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติดูด PCR product ในปฏิกิริยารอบที่ 2 ใส่ลงใน GFX column ในข้อที่ (1) แล้วใช้ไมโครปิเปตต์อัตโนมัตินี้ดูดขึ้นและปล่อยลงประมาณ 4-6 ครั้ง ระวังอย่าให้ปลาย tip แทง glass fiber
    3. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ความเร็วประมาณ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 1 นาที หลังจากนั้นสารละลายจะลงมาอยู่ที่ก้นหลอด
    4. เก็บ GFX column ไว้ นำสารละลายที่อยู่ใน collection tube เททิ้งให้หมด แล้วนำ GFX column นี้ใส่ลงไปใน collection tube เดิมอีกครั้ง หลังจากนั้นเติมสารละลาย wash buffer ประมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็วประมาณ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องและใช้เวลาประมาณ 1 นาที
    5. นำ GFX column มาใส่ microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย elution buffer (10 mM. Tris-HCl pH 8.0) หรือน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร

25 ไมโครลิตร ลงในบริเวณ glass fiber matrix แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1 นาที

6. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ประมาณ 1 นาที
7. นำ PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์มาตรวจสอบวิเคราะห์แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้ Lambda/*Hind* III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาดเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่ศึกษา นำผลิตผลที่มีขนาดถูกต้องมาเตรียม labeling reaction ในขั้นตอนต่อไป

2. ขั้นตอนการเตรียมตัวติดตาม (labeling reaction)

เตรียม reaction mixture ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

ส่วนประกอบ	ปริมาตร
dRhodamine Termination Cycle Sequencing Ready Reaction	4 ไมโครลิตร
Sequencing primer : P2 (ความเข้มข้น 2 pmol/µl)	1 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์	5 ไมโครลิตร

ใช้นิ้วเคาะที่ก้นหลอดผสมให้เข้ากันแล้วนำไปทำปฏิกิริยาโดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1 ขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอแยกสาย
ใช้อุณหภูมิที่ 96°C เป็นเวลา 30 วินาที

2.2 ขั้นตอนที่ทำให้ primer จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ
ใช้อุณหภูมิที่ 50°C เป็นเวลา 30 วินาที

2.3 ขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอ
ใช้อุณหภูมิที่ 60°C เป็นเวลา 4 นาที

ทำปฏิกิริยาซ้ำกันจนครบ 25 รอบ เมื่อครบรอบสุดท้ายแล้วตามด้วยอุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที

3. ขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่อง ABI 310 DNA sequencer

    1. นำผลิตผลจากขั้นตอน labeling reaction มาตกตะกอนโดยเติมสารละลาย 3M sodium acetate, pH 4.6 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ใน microcentifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
    2. ใช้ปิเปตต์ดูดผลิตผลของปฏิกิริยาทั้งหมดใส่ในสารละลายข้างต้น ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ –80^{0}C เป็นเวลา 10 นาที
    3. เมื่อครบเวลา นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4^{0}C เป็นเวลา 15 - 30 นาที แล้วใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งจะได้ตะกอนของดีเอ็นเอที่ก้นหลอด
    4. ล้างตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติม ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4^{0}C เป็นเวลา 1 นาที
    5. ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งให้เหลือปริมาณน้อยที่สุด ระวังอย่าดูดถึงก้นหลอดเพราะจะทำให้ดีเอ็นเอหลุดขึ้นมากับสารละลาย
    6. นำหลอดทดลองจากข้อ 5 เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C จนดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย Template Suppression Reagent (TSR) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
    7. นำดีเอ็นเอมาจากข้อ 6 มาทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกสายที่อุณหภูมิ 95^{0}C เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที แล้วดูดสารละลายใส่ใน microcentifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท
    8. นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่อง ABI 310 DNA sequencer

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ ได้แก่ เพศ เชื้อชาติ แหล่งที่อยู่ ประวัติการเจ็บป่วยและอาการแสดงที่สำคัญของโรคมาลาเรีย สำหรับข้อมูลที่เป็นข้อมูลเชิงปริมาณ ได้แก่ อายุ อุณหภูมิร่างกาย จำนวนครั้งที่เจ็บป่วยด้วยโรคมาลาเรีย วิเคราะห์ข้อมูลในรูปของความถี่ ร้อยละ ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด ค่าเฉลี่ยและค่าความสัมพันธ์
2. นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ เปรียบเทียบลักษณะความแตกต่างที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่างทั้งในระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน จัดกลุ่มที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกัน
3. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจากการศึกษานี้เปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกัน ของ *P. falciparum* ที่เคยมีการศึกษามาก่อน โดยนำข้อมูลจากฐานข้อมูล DNA ของ National Center for Biotecnology Information ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. คำนวณหาค่าที่สำคัญที่ใช้สำหรับการวิจัยทางด้านชีวโมเลกุลและอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย