บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

ปูทดลองซึ่งอยู่ในวงศ์ Grapsidae 5 ชนิด ได้แก่

ปูแป้น	*Varuna literata*	น้ำหนักประมาณ 4.35 – 8.00 กรัม	จำนวน 30 ตัว
ปูแสม	*Sesarma mederi*	น้ำหนักประมาณ 13.10 – 55.00 กรัม	จำนวน 30 ตัว
ปูซองจาก	*Sesarma polita*	น้ำหนักประมาณ 9.43 – 46.59 กรัม	จำนวน 30 ตัว
ปูแสม	*Sesarma moeschii*	น้ำหนักประมาณ 5.31 - 8.50 กรัม	จำนวน 30 ตัว
ปูแสม	*Sesarma bocourti*	น้ำหนักประมาณ 1.57 – 8.40 กรัม	จำนวน 30 ตัว

เก็บรวบรวมจากบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง ณ อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1อุปกรณ์สำหรับ immunohistochemistry

1.กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยา

2.อ่างเลี้ยงปูพร้อมอุปกรณ์การเลี้ยง

3.เครื่องมือผ่าตัด

4. ถุงมือยาง (latex examination gloves)

5.ตู้อบ (hot air oven , Memmert)

6.ตู้ดูดควัน (chemical fume hood , Newlab252N)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.ตู้เย็น , ตู้แช่แข็ง (freezer , Whirlpool)

8.จานแก้ว (petri dish)

9.ขวดรูปกรวยมีแขน (suction flask)

10.เครื่องดูดอากาศ (suction pump) พร้อมอุปกรณ์

11.สไลด์ (slide) พร้อมกระจกปิดสไลด์ (cover slide)

12.โถแก้วสำหรับย้อมสไลด์ (couplin jar)

13.ตะกร้าสำหรับย้อมสไลด์ (slide basket)

14.ไมโครปิเปตพร้อมทิป (micropipette and tip)

15.ขวดแก้วปากตรง (vial tube)

16.แท่นอุ่นสไลด์ (hot plate, Medax)

17.เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (Rotary microtome,LEICA RM 2135)

18.ตะเกียงแอลกอฮอล์

19.กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (light microscope)

20.กล้องพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 อุปกรณ์สำหรับ RT-PCR

1.เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge, รุ่น Genofuge 16 M,Techne)

2.หลอด high pure spin filter

3.หลอด high pure collection

4.หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

5.หลอด thin wall สำหรับ PCR

6.เครื่อง elctrophoresis apparatus และ อุปกรณ์ (Power Pac 300 ,BIORAD)

7.เครื่อง ultraviotel transillumitor (Spectroline)

8.เครื่อง microwave oven (Turbora)

9.เครื่องเขย่าผสมสาร shaker (VRN – 360 , KK)

10.เครื่อง thermal cycler (appendoff)

11.กล้อง polaroid (Gelcam) พร้อมฟิล์ม

12.เครื่องชั่งสาร

13.โกร่งเคลือบสำหรับบดเนื้อเยื่อผ่านการฆ่าเชื้อ

3.2.2 สารเคมีสำหรับ immunohistochemistry

1.เอทิลแอลกอฮอลล์ (Ethyl alcohol) 70%	BDH
2.เอทิลแอลกอฮอลล์ (Ethyl alcohol) 80%	BDH
3. เอทิลแอลกอฮอลล์ (Ethyl alcohol) 90%	BDH
4. เอทิลแอลกอฮอลล์ (Ethyl alcohol) 95%	BDH
5. N-butyl alcohol	Univar
6. ไซลีน (Xylene)	Carlo Erba
7.Formaldehyde	Carlo Erba

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8.สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) 0.15 M pH 7.2 (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)

9. สารละลาย P_1^+ (calf bovine serum:PBS dilution 1:10)

(วิธีเตรียมดูภาคผนวก)

10. ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ Sigma

(Diaminobenzidine tetrahydrochloride ,DAB)

11. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide ,H_2O_2) 30 % Sigma

12. อิโอซิน (Eosin Y) 0.02% ใน เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % Harleco

(วิธีเตรียมดูภาคผนวก)

13.ฮีมาทอกไซลีน (Hematoxylin) (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)

14. พาราพลาส พลัส พาราฟิน (Paraplast plus paraffin) Sherwood

15. สารละลายเคลือบสไลด์ (Gelatin coat slide solution) Difco

(วิธีเตรียมดูภาคผนวก)

16.Davidson ' s fixative (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)

17.โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide , NaOH) Riedel – de Haen

18.กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid , HCl) Merck

19.Permount Fisther Scientific

20.น้ำกลั่น

21.แอนติเจนเชื้อไวรัสหัวเหลือง (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

22.แอนติบอดีสำหรับตรวจไวรัสหัวเหลือง

แอนติบอดีตัวแรก (first antibody) ได้แก่

โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B จำเพาะต่อ envelope protein ของไวรัสหัวเหลือง ขนาด135 กิโลดาลตัน

โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D จำเพาะต่อ capsid protein ของไวรัสหัวเหลือง ขนาด67 กิโลดาลตัน

โมโนโคลนอลแอนติบอดี V19 จำเพาะต่อ matrix protein ของไวรัสหัวเหลือง ขนาด22 กิโลดาลตัน

22. แอนติบอดีตัวที่สอง (second antibody) ได้แก่

Goat antimouse IgG heavy and light chain horseradish

peroxidase conjugate (GAM-HRP) Sigma

3.2.2 สารเคมีสำหรับวิธี RT-PCR

รายการที่ 1 – 5 นำมาจากชุดทดลอง high pure viral nucleic acid kit

Cat no.1858874 ของบริษัท Roche Molecular Biochemicals

1.working solution (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)

2.protinase K

3.inhibitor removal buffer

4.washing buffer

5.elution buffer

(สารประกอบดูภาคผนวก)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการที่ 6 – 7 นำมาจากชุดทดลอง บริษัท Invitrogen

6. 2 x RT – Buffer

7. เอนไซม์ RT/Taq Polymerase

8. primer 10F และ primer 144R

9. lysis buffer (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)

10.TBE buffer (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)

11.เจล Agarose	gibco
12.Blue/Orange 6x Loading dye	promeca
13.DNA marker	Hi – Lo
14.ethedium bromide ((วิธีเตรียมดูภาคผนวก)	Bio – Rad
15.isopropanol	

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงปู (wild – captured crabs specimens)

2. การพิสูจน์ทราบชนิดของปู (species identification)

3. การเตรียมเชื้อไวรัสหัวเหลือง (preparation of yellow – head virus)

4. การทดลองทำให้ติดเชื้อไวรัส (experimental viral infection)

5. การตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี immunohistochemistry (yellow – head virus detection by immunohistochemistry)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี one step RT – PCR (yellow – head virus detection by one step RT – PCR)

3.3.1 การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงปู

เก็บตัวอย่างปูชนิดต่างๆ จากบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำใน อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัด สมุทรปราการ ทำการแยกชนิด และเลี้ยงไว้ในอ่างขนาด 40 x 49 x 31 เซนติเมตร บรรจุน้ำเค็มที่มีความเค็ม 5 ppt โดยเอียงภาชนะเป็นมุมประมาณ 30 องศากับพื้นราบ ทั้งหมดเลี้ยงในอุณหภูมิและแสงธรรมชาติ

3.3.2 การพิสูจน์ทราบชนิด

นำปูชนิดต่าง ๆ เก็บเป็นตัวอย่าง ชนิดละ 3 ตัว ดองในสารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์แยกชนิด จำแนกรายละเอียดสถานที่และวันที่เก็บ เพื่อนำไปเปรียบเทียบลักษณะตามอนุกรมวิธาน จากคู่มือเฉพาะและผู้เชี่ยวชาญ

3.3.3 การเตรียมเชื้อไวรัสหัวเหลือง

เชื้อหัวเหลืองเตรียมได้จากการนำ haemolymph ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ติดเชื้อหัวเหลืองอย่างรุนแรง ผ่านการปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของ haemocyte ออก เจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1:500 นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วจึงนำไปใช้

3.3.4 การทดลองทำให้ติดเชื้อไวรัส

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ได้แก่

1. การตรวจการติดเชื้อหัวเหลืองตามธรรมชาติ

สุ่มตัวอย่างปูชนิดต่างๆ ชนิดละ 10 ตัว ในวันเดียวกับที่เก็บตัวอย่างจากบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง เพื่อทำการตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ติดมาตามธรรมชาติ

2. การทดลองเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อด้วยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

สุ่มตัวอย่างปูชนิดต่างๆ ชนิดละ 10 ตัว ในวันเดียวกับที่เก็บตัวอย่างจากบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่เจือจางใน 2x PBS 1:500 จำนวน 50 ไมโครลิตร บริเวณโคนขาปู จากนั้นทำการเลี้ยงแยกชนิดโดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์วันละ 2 เวลา เช้า-เย็น เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงเก็บมาตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

3. การทดลองเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อด้วยการกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

สุ่มตัวอย่างปูชนิดต่างๆ ชนิดละ 10 ตัว หลังจากเก็บตัวอย่างจากบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง ทำการเลี้ยงแยกชนิดโดยให้อาหารเนื้อกุ้งกุลาดำสดที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองขั้นรุนแรงเพียงอย่างเดียว วันละ 2 เวลา เช้า-เย็น เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงเก็บมาตรวจการติดเชื้อไวรัสเหลือง

3.3.5 การตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วย immunohistochemistry

วิธีการทำดัดแปลงมาจากวิธีของ Paisarn Sithigorngul et al. (2000)

1. การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology (ดูภาพประกอบ 3.1)

1.1 นำตัวอย่างปูที่เก็บจากการทดลองข้างต้นตามกำหนดวัน นำมาทำให้สลบด้วยน้ำใส่น้ำแข็งที่เย็นจัด ฉีดน้ำยา Davidson's fixative ให้คงรูป แล้วเปิดกระดองดึงอวัยะภายในส่วนต่างๆที่สำคัญแช่เก็บในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 นำมาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อล้างให้น้ำยาออก

1.3 ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ กัน

- แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- นำออกไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- นำออกไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- นำออกไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ที่ผสมกับนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- นำออกไปแช่กับนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- นำออกไปแช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ที่ผสมกับไซลีน ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.4 ขั้นตอนนำสารใหม่เข้ามาแทนที่ (clearing)

- นำออกไปแช่ไซลีน จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง

1.5 ขั้นตอนการแช่ให้แข็งตัว (impregnation) ในพาราพลาสต์

- นำออกไปแช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราพลาสต์หลอมเหลวปริมาณ 1:1 เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- แช่ในพาราพลาสต์หลอมเหลว จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 45 นาที

1.6 ขั้นตอนการฝังพาราพลาสต์ (embedding)

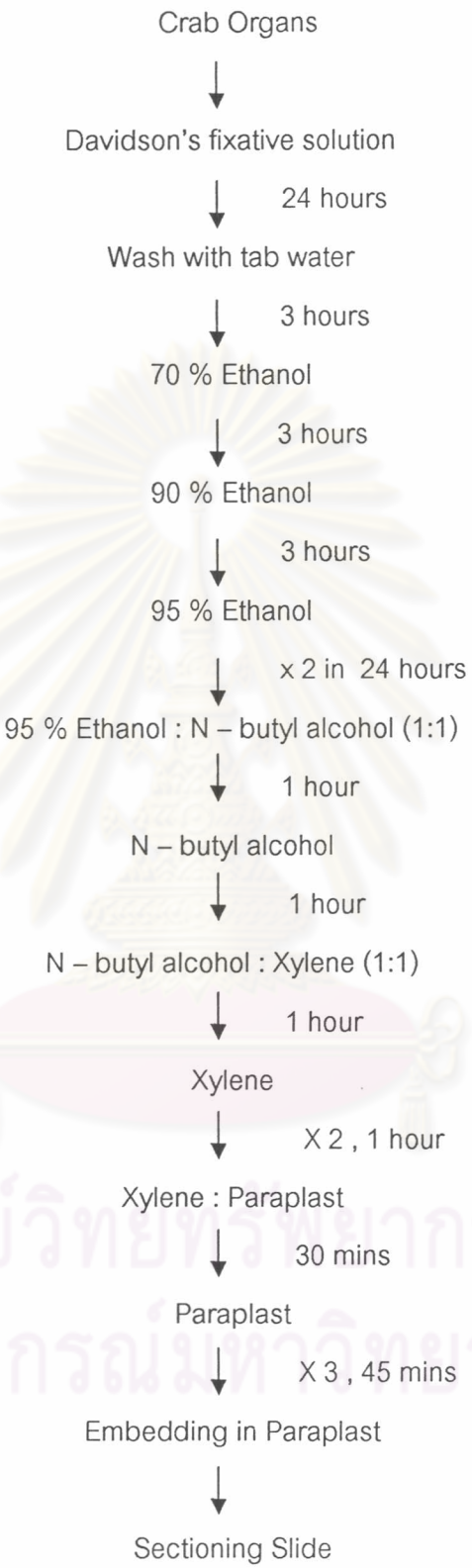
- นำอวัยวะในแต่ละส่วนของปูแต่ละตัว จัดเรียงในก้นพิมพ์สี่เหลี่ยม จัดให้อวัยวะอยู่ตรงกลาง จากนั้นเทพาราพลาสต์หลอมเหลวลงไปให้เต็มพิมพ์ ปิด

ด้วยกรอบพลาสติกด้านบนที่ต้องนำไปใช้ในการตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตม รอจนแข็งตัวจึงแกะพิมพ์ออก

1.7 ขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อ (sectioning)

- ตัดเนื้อเยื่อจากอวัยวะที่ฝังในพาราพลาสต์ด้วยเครื่องไมโครโตมแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) ให้แต่ละชิ้นมีความหนา 0.8 ไมครอนเรียงต่อกัน
- นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นสะอาดลงบนสไลด์ 1 แผ่น ให้พอดีกับขนาดเนื้อเยื่อ 3 ชิ้น จากนั้นนำเนื้อเยื่อลงวางบนหยดน้ำ แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 50 องศาเซลเซียสเพื่อให้เนื้อเยื่อแผ่ขยายจนตึงเรียบ จากนั้นดูดน้ำออกซับให้แห้ง จะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงบนสไลด์ แล้วนำไปอบในตู้อบ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพประกอบ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology

(Paisarn Sithigoerngul et al., 2000)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. กระบวนการย้อมโดยวิธี Indirect peroxidase immunohistochemistry

(ดูภาพประกอบ 3.3)

2.1 ขั้นตอนการเอาพาราพลาสต์ออก (deparaffination)

- นำสไลด์ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น วางบนตะกร้า (slide basket) แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 ,5 และ 5 นาที ตามลำดับ

2.2 ขั้นตอนการดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (hydration) ด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ ต่าง ๆ กัน

- แช่ในไซลีนที่ผสมนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในสารละลายฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที
- ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

2.3 ขั้นตอนการใส่แอนติบอดีที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

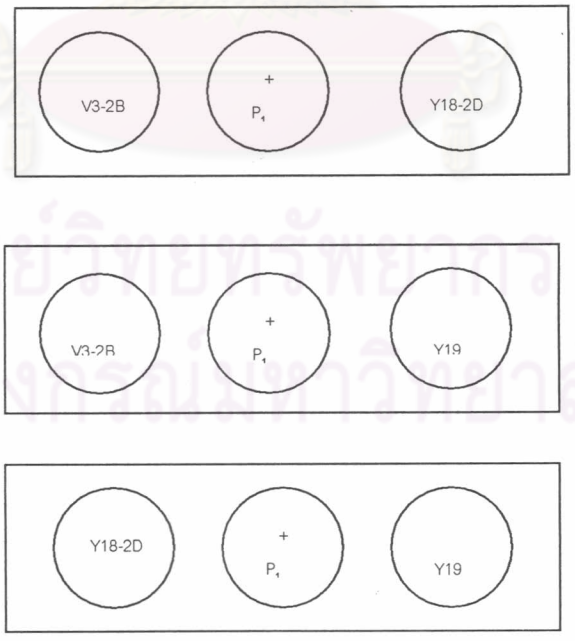
- นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยให้ปั๊มสูญญากาศ (vacuum pump)

- หยดสารละลาย P_1^+ คลุมแต่ละเนื้อเยื่อด้วยไมโครปิเปต บ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันการจับกันของโปรตีนแบบไม่จำเพาะ โดยวางสไลด์ในกล่องที่ปิดฝาภายในบุด้วยกระดาษทิชชูที่เปียกชื้นเพื่อรักษาความชื้นตลอดเวลา

- ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเนื้อเยื่อออก ยกเว้นเนื้อเยื่อที่ 2 ให้เป็นเนื้อเยื่อควบคุม

- หยดแอนติบอดีที่ 1 ให้คลุมแต่ละเนื้อเยื่อที่ 1 และ3 โดยแอนติบอดีที่ใช้มี 3 ชนิด ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B , โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D และ โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19

โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสามชนิดเจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ ปริมาณ 1:5 ซึ่งในการหยดโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะทำให้แสดงผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดได้ 2 ซ้ำ ใน 1 ชุด ดังภาพประกอบ 3.2



ภาพประกอบ 3.2 แสดงการหยดแอนติบอดีที่ 1 ในการตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลือง

- เก็บในกล่องป้องกันความชื้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

2.4 ขั้นตอนการใส่แอนติบอดีที่ 2

- ล้างแอนติบอดีที่ 1 ออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว
- แช่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที
- นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยใช้ปั๊มสูญญากาศ (vacuum pump)
- หยดแอนติบอดีที่ 2 ได้แก่ Goat antimouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจางในสารละลาย P_1^+ ปริมาณ 1:1000 ในทุกเนื้อเยื่อ
- เก็บในกล่องป้องกันความชื้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.5 ขั้นตอนการใส่ซับสเตรต

- ล้างแอนติบอดีที่ 2 ออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว
- แช่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที
- นำเนื้อเยื่อแต่ละสไลด์มาทำปฏิกิริยากับ 3,3' ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (DAB) 0.03 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ15 มิลลิกรัม และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ10 ไมโครลิตร ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ถึงขั้นนี้เมื่อสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่ให้ผลบวกจะสามารถเห็นเป็นสีน้ำตาล
- ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2.6 ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกไซลีน (hematoxylin)

โดยนำเนื้อเยื่อ 3 แผ่นแรก หรือ 1 ชุด มาย้อมสีฮีมาทอกไซลีน แต่ในอีก 1 ชุดย้อมสีอิโอซินเพียงอย่างเดียวทำได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนนี้

- นำเนื้อเยื่อย้อมสีฮีมาทอกไซลีน เป็นเวลา 10 นาที
- แช่เนื้อเยื่อในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างสีส่วนเกินออกอย่างรวดเร็ว
- แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 นาที
- แช่เนื้อเยื่อในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ให้เนื้อเยื่อที่ได้เป็นสีน้ำเงินจาง
- แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 นาที

2.7 ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ กัน

- แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที
- ย้อมสีทับ (counterstain) ในเนื้อเยื่อปูด้วยสีอิโอซิน 0.02 เปอร์เซ็นต์ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์
- แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 5 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ที่ผสมกับไซลีน ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในไซลีน จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

3. ขั้นตอนการทำเป็นสไลด์ถาวร

ทำโดยการผนึกสไลด์ (mount) โดยหยดเปอร์เม้าท์ (permount) ประมาณ 3 หยด บนสไลด์ นำกระจกสไลด์มาปิดโดยแตะขอบด้านหนึ่งเอียงทำมุม 45 องศาแล้วค่อยๆวางลง โดยไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น

จากนั้นจึงนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตจากการติดสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในบริเวณต่างๆของเนื้อเยื่อปู

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Sectioning Slide

↓

Xylene

↓ 10 mins and x 2 , 5 mins

N – butyl alcohol : Xylene (1:1)

↓ 5 mins

N – butyl alcohol

↓ 5 mins

95 % Ethanol

↓ 5 mins

90 % Ethanol

↓ 5 mins

80 % Ethanol

↓ 5 mins

70 % Ethanol

↓ 5 mins

Wash with Distrilled water

↓ 5 mins

10 % Formalin

↓ 10 mins

Wash with PBS

↓ X 3 , 15 mins

Block with p_1^+

↓ 30 mins

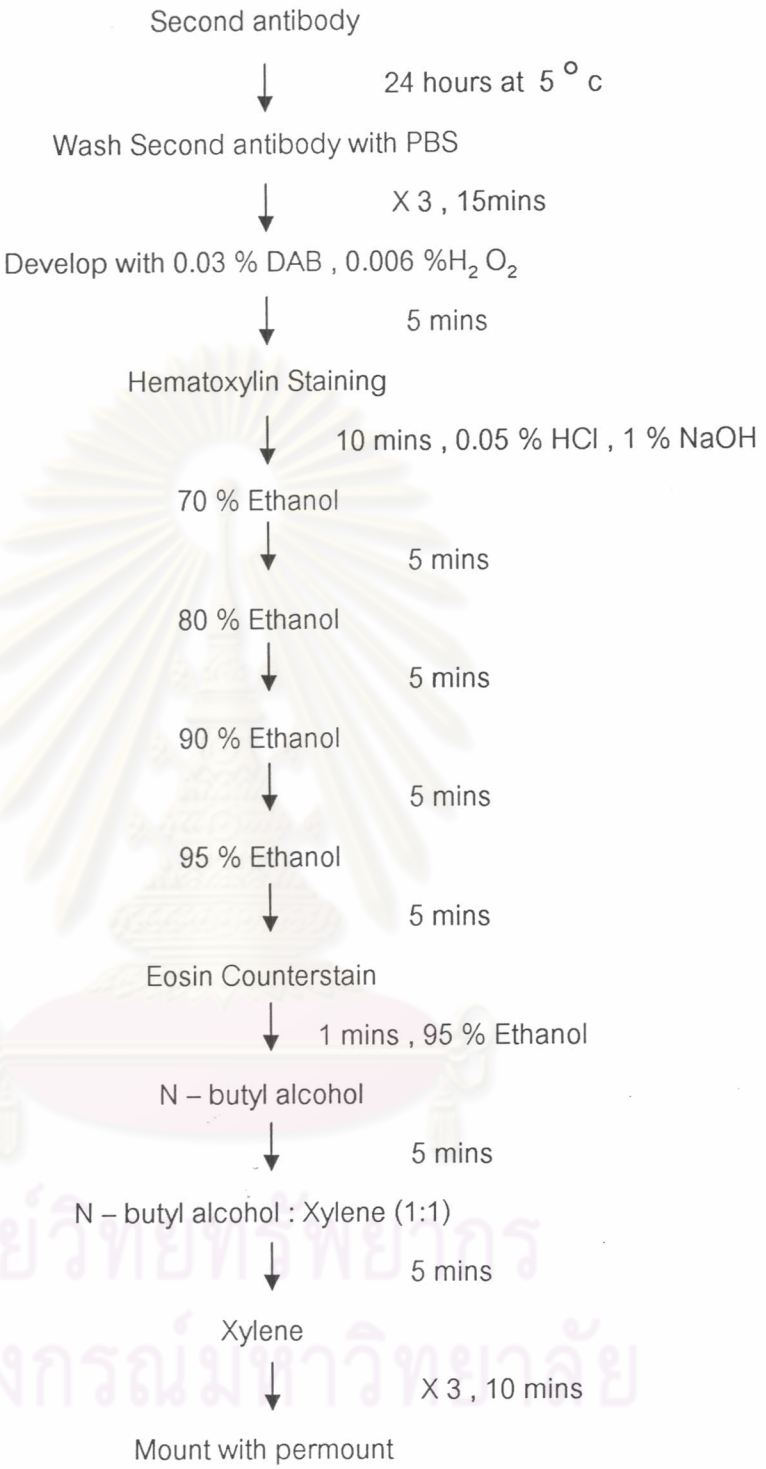
First antibody

↓ 24 hours at 5 ^{o} c

Wash First antibody with PBS

↓ X 3 , 15 mins

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพประกอบ 3.3 ขั้นตอนการทำ immunohistochemistry และสไลด์ถาวร

(Paisarn Sithigorngul et al., 2000)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.6 การตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี one step RT – PCR

การทดลอง RT-PCR นี้ ได้ใช้ปู 2 กลุ่มการทดลอง คือ ปูกลุ่มที่จับจากธรรมชาติ และปูกลุ่มที่ฉีดเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อด้วยไวรัสหัวเหลือง และในแต่ละกลุ่มมีปู 4 ชนิด คือ *Sesarma mederi* , *Sesarma polita* , *Sesarma moeschii* และ *Sesarma bocourti* โดยขั้นตอนการสกัด RNA จากตัวอย่าง นำวิธีการทดลองมาจาก ชุดทดลอง high pure viral nucleic acid kit Cat no.1858874 ของบริษัท Roche Molecular Biochemicals และขั้นตอน one step RT-PCR และ gel agarose electrophoresis ดัดแปลงมาจาก Chainarong Wongteerasupaya et el. (1997)

1. ขั้นตอนการสกัด RNA จากตัวอย่าง (ดูภาพประกอบ 3.4)

1.1 นำอวัยวะของตัวอย่างปูแต่ละตัว ที่แบ่งจากการทำการทดลองวิธีอินไดเรคอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส บดรวมกันแยกชนิดด้วย lysis buffer ประมาณ 40 มิลลิลิตร ในโกร่งเคลือบที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำใส่หลอด ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 3000 x rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงดูด Supernatant มาแต่ละชนิดปริมาณ 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge ผสมกับ working solution ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และ protinase K ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.2 เติม isopropanol ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

1.3 ประกอบหลอด high pure spin filter และ หลอด high pure collection เข้าด้วยกัน จากนั้นเติมตัวอย่างทั้งหมดที่บ่มแล้วแยกลงในหลอดด้านบน ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 8000 x rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงกำจัดส่วนของเหลวของหลอด high pure collection

1.4 ประกอบหลอด high pure collection ชิ้นใหม่กับหลอด high pure spin filter เข้าด้วยกัน จากนั้นเติม inhibitor removal buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร บนส่วนผสม นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 8000 x rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงกำจัดส่วนของเหลวของหลอด high pure collection

1.5 ล้างส่วนผสมในหลอด high pure spin filter โดยเติม wash buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 8000 x rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงกำจัดส่วนของเหลวในหลอด high pure collection จากนั้นทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้งหนึ่ง

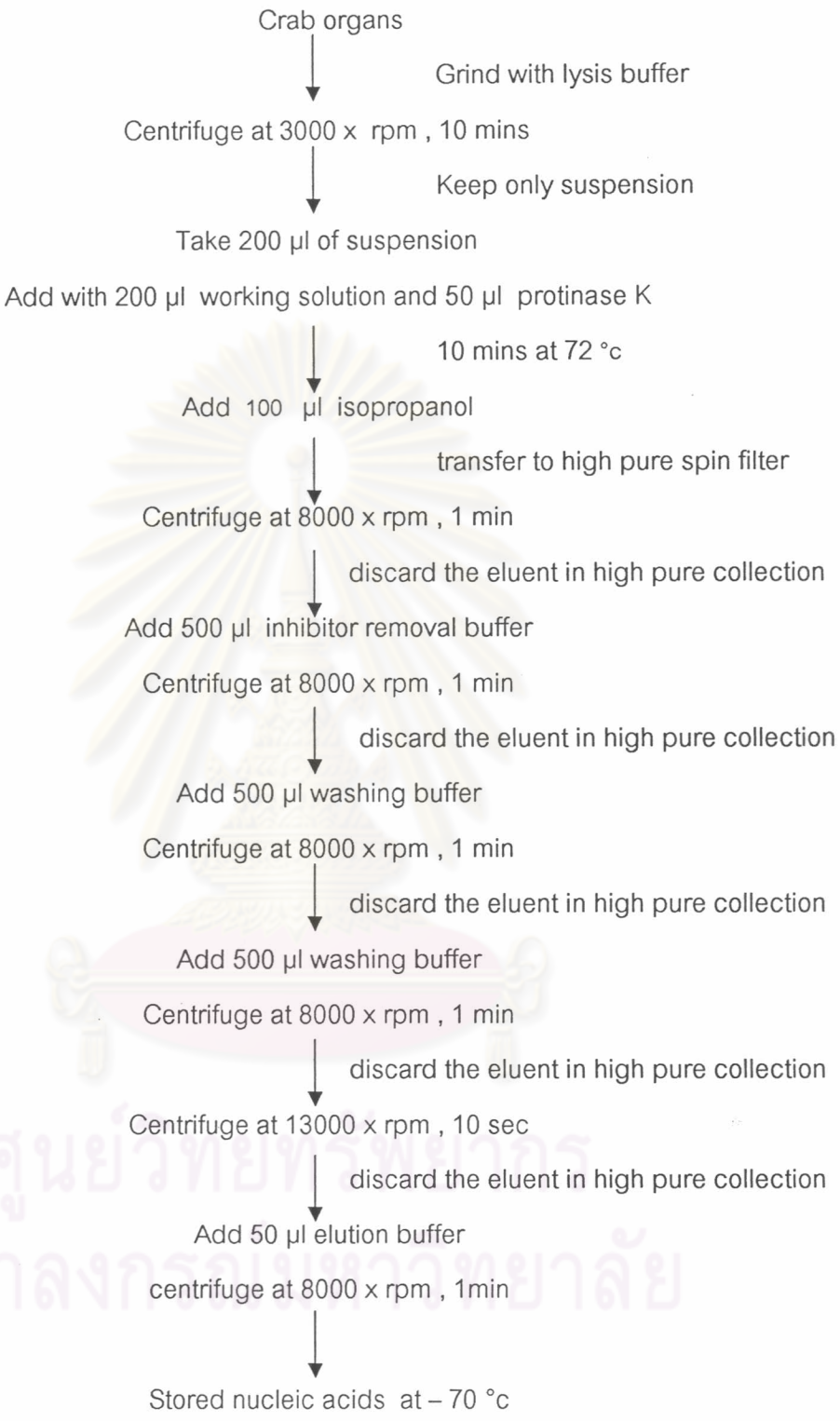
1.6 นำหลอด high pure spin filter ที่ได้จากการล้าง 2 ครั้งด้วยสารละลาย wash buffer ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 13000 x rpm เป็นเวลา 10 วินาที แล้วจึงกำจัดในส่วนของเหลวของหลอด high pure collection

1.7 ประกอบหลอด high pure spin filter กับหลอด microcentrifuge เข้าด้วยกัน จากนั้นเติม elution buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 8000 x rpm เป็นเวลา 1 นาที

1.8 เก็บกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียส

<u>หมายเหตุ</u> การทดลอง ได้ทำควบคู่ด้วยตัวควบคุมผลบวก ดังนั้นจึงนำส่วนของ haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองทำในทุกขั้นตอนในการทำ RT – PCR ส่วนในตัวควบคุมผลลบใช้น้ำกลั่นทำตั้งแต่ขั้นตอน one step RT – PCR

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพประกอบ 3.4 ขั้นตอนการสกัด RNA จากตัวอย่าง

(high pure viral nucleic acid kit, 2001)

2. ขั้นตอนการทำ one step RT – PCR

(ดูภาพประกอบ 3.6)

2.1 ผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT – PCR รวมทั้ง ตัวอย่างปูแยกชนิด ในแต่ละหลอดของหลอด thin wall ที่มีปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

RT - PCR buffer	25	ไมโครลิตร
Primer 10F	1	ไมโครลิตร
Primer 144R	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ RT/Taq Polymerase	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	17	ไมโครลิตร
RNA Template (ตัวอย่างปู)	5	ไมโครลิตร

2.2 นำหลอดเข้าเครื่อง thermal cycler ปรับอุณหภูมิและเวลา ได้ดังตาราง 3.1

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (°c)	เวลา (นาที : วินาที)	อุณหภูมิ (°c)	เวลา (นาที : วินาที)	อุณหภูมิ (°c)	เวลา (นาที : วินาที)	จำนวนรอบ
1	42	15:00					1
2	95	5:00					1
3	4	5:00					1
4	94	00:30	58	00:30	72	00:30	35
5	72	10:00					1
6	4	-					1

ตาราง 3.1 แสดง อุณหภูมิ ระยะเวลาและจำนวนรอบ ในแต่ละขั้นตอนการทำงาน RT-PCR

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตาราง 3.1

ขั้นตอนที่ 1 – 3 มีผลทำให้ RNA เปลี่ยนไปเป็น complementary DNA

ขั้นตอนที่ 4 เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 35 รอบปฏิกิริยา

ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นขั้นตอนที่ DNA ถูกทำให้แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว 2 สาย (denaturation step)

ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นขั้นตอนที่ primer ทั้ง 2 สามารถเข้าจับที่ตำแหน่งเฉพาะของ DNA สายเดี่ยวทั้ง 2 สาย (annealing step)

ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นขั้นตอนที่ Taq polymerase ทำงานโดยเร่งปฏิกิริยาการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3 ของ primer ทำให้ DNA เป็นสายยาว เกิดการจำลองที่สมบูรณ์ (elongation step)

ขั้นตอนที่ 5 – 6 เป็นการหยุดปฏิกิริยา และเก็บรักษา DNA

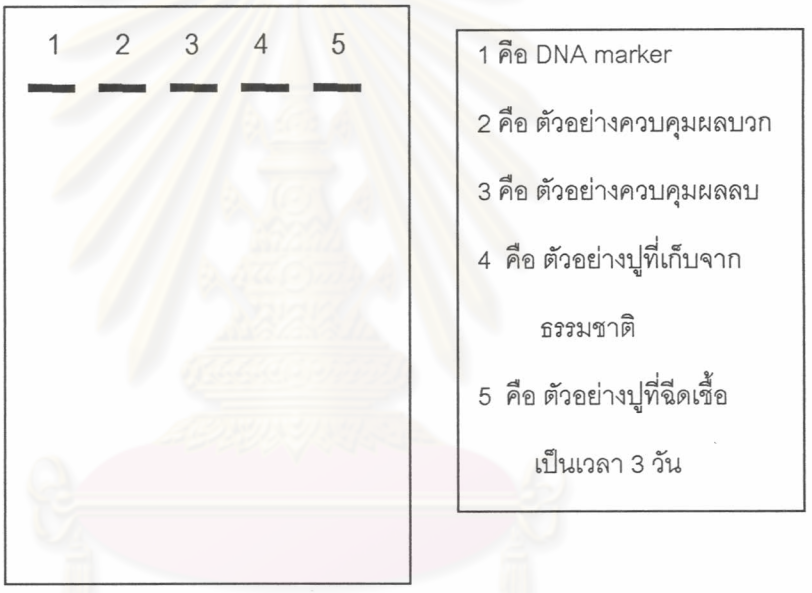
3.แสดงผลโดยวิธี gel agarose electrophoresis

3.1 เตรียมเจลที่จะใช้แสดงผลโดย ชั่งผงเจล agarose ปริมาณ 1.2 กรัม ละลายด้วย TBE buffer ปริมาตร 60 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องไมโครเวฟปรับความร้อนปานกลางนานประมาณ 2 นาที จนเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน รอให้เย็นจนอุณหภูมิประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงไปในบลอคเจลพร้อมเสียบแผ่นอุปกรณ์พลาสติก (comb)ให้เจลเกิดเป็นร่องได้ทั้งหมด 8 ร่อง ทิ้งไว้ให้แข็งตัว

3.2 นำสี Blue/Orange 6x Loading dye ดูดได้ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เติมในหลอด microcentrifuge เตรียมไว้ให้ครบจำนวนตัวอย่างที่จะหยอดแสดงผลในเจล

3.3 ดูดตัวอย่างที่ได้หลังจากการทำ one step RT – PCR ซึ่งได้แก่ ตัวอย่างปูแต่ละชนิด , ตัวควบคุมที่ให้ผลบวก และตัวควบคุมผลลบ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด Blue/Orange 6x Loading dye ที่เตรียมไว้

3.4 นำเจลที่แข็งตัวแล้วจัดลงไปในเครื่องแสดงผลที่มีสารละลาย TBE buffer รองรับอยู่ในปริมาตรที่พอประมาณท่วมเจล ทำการเติมสารต่าง ๆ ลงในไปร่องเจลโดยดูดปริมาตรตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ซึ่งได้แก่ DNA marker , ตัวควบคุมที่ให้ผลบวก , ตัวควบคุมที่ให้ผลลบ และตัวอย่างปูแต่ละชนิด ดังภาพประกอบ 3.5



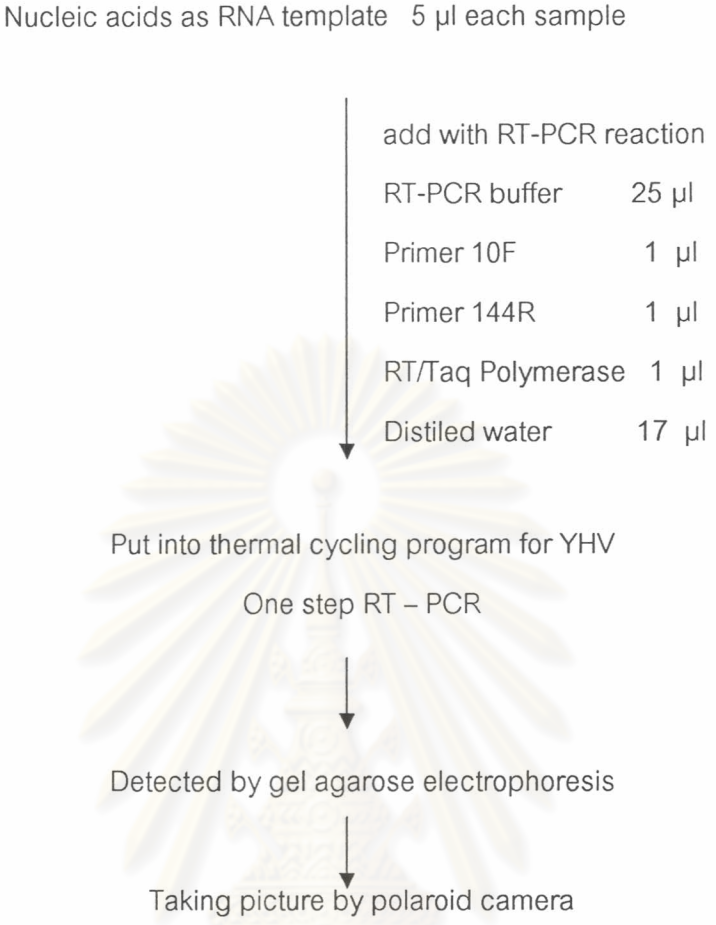
ภาพประกอบ 3.5 แสดงตำแหน่งการแสดงผลของ gel electrophoresis

3.5 เมื่อเติมสารทุกอย่างพร้อมแล้ว เปิดเครื่องให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่ง ให้เกิดแถบที่สังเกตได้จากสีที่ย้อมในแต่ละร่องเจลอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมคือเกือบจะถึงด้านล่างของเจล จึงปิดเครื่องให้กระแสไฟฟ้า

3.6 นำเจลตักขึ้นย้อมด้วยสี ethedium bromide เวลา 10 - 20นาที และล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น เวลา 20 นาที แล้วจึงนำไปวางบนเครื่อง ultraviolet

transillumitor เพื่อดูผลที่ได้ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นจึงถ่ายรูปด้วยกล้อง polaroid

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพประกอบ 3.6 ขั้นตอน one step RT-PCR และ gel agarose electrophoresis

(Chainarong Wongteerasupaya et al., 1997)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย