บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

ไวรัส

ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD (จากสถาบันสุขภาพสัตว์, กรมปศุสัตว์, กรุงเทพฯ) นำมาทำการเพาะเลี้ยงและหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัสด้วยวิธี Immunoperoxidase test ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK-6

สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน Chinese strain (Fort Dodge Saude Animal Ltda., Brazil) LOM strain (Green Cross Veterinary Product co., ltd., Seoul) และ THIVERVAL strain (Sanofi Animal Health, Hungary)

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Swine kidney (SK-6) ได้จากหน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimum Essential Medium (MEM) ใน 5% fetal calf serum ชนิด BVD Antibody and Antigen – free ใน CO_2 incubator

ตัวอย่างจากสุกร

ตัวอย่างซีรั่ม และ tissue suspension ของสุกรป่วยที่มีอาการของการติดเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรจากบริเวณต่าง ๆ ของประเทศไทย ที่มีการบันทึกประวัติและอาการทางคลินิค

วิธีการ

การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรม

ทำการค้นหาลำดับ DNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรแต่ละสายพันธุ์ในส่วนของ gp55 จาก GeneBank นำมาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SeqPup version 0.6f (a biosequence editor & analysis application, Gilbert D.G. 1990-1995) ร่วมกับโปรแกรม GeneDoc version 2.5.000 (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility version 2.5, Karl Nicholas, 1999) เพื่อเรียงลำดับข้อมูลและเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับ DNA แต่ละสายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 3.1 ตารางกลุ่มสายพันธุ์ของไวรัสอหิวาต์สุกร และรหัสจาก GeneBank

กลุ่ม	Genbank accession number
1. สายพันธุ์วัคซีน	D49533 (GPE˜, Ishikawa et al., 1995)
	Z46258 (Chinese 08, Moormann,1996)
	U72048 (Chinese 06, Li unpublished)
	AF099102(CS34, Grebennikova, unpublished)
2. สายพันธุ์อ้างอิงต่างประเทศ	M31768 (Brescia, Moormann et al., 1990)
	D49532 (ALD, Ishikawa et al., 1995)
	AF092448 (Shimen, Huang unpublished)
	X87939 (Alfort/187, Ruggli et al., 1996)
	X96550 (CAP, Tratschin unpublished)
	U43924 (Taiwan, Chang,1996)
	U45478 (Glentorf, Muller unpublished)
3. สายพันธุ์ในประเทศไทย	AF134207 (BKK/50, Kitikoon, 1998)
	AF134208 (BKK/91, Kitikoon, 1998)
	AF134209 (BKK/88, Kitikoon, 1998)
	AF134210 (KPP/93, Kitikoon, 1998)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์หาบริเวณที่จำเพาะต่อ Restriction enzyme

นำลำดับเบสในส่วนของ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ต่าง ๆ แต่ละสายพันธุ์มาวิเคราะห์หาบริเวณที่จำเพาะต่อ restriction enzyme โดยใช้โปรแกรม Clone Manager version 4.01 (Scientific & Educational Software, 1995) แล้วทำการคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีรูปแบบในการตัดที่สามารถจำแนกกลุ่มของไวรัสอหิวาต์สุกรตามที่ต้องการ

การออกแบบ primer

ทำการคัดเลือกบริเวณที่ออกแบบ primer จากส่วนที่ครอบคลุมบริเวณที่วิเคราะห์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในส่วนของ gp55 ของไวรัสอหิวาต์สุกร โดยใช้โปรแกรม Oligos version 8.0 (Institue of Biotechnology, University of Helsinki, Finland, Ruslan Kalendar, 1999-2000) มาทำการวิเคราะห์การออกแบบ primer

การเพิ่มจำนวนไวรัสผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง

นำตัวอย่างซีรั่มหรือ tissue suspension ของสุกรป่วยจำนวน 100 ไมโครลิตร ไปทำการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK-6 โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มี 5% fetal calf serum ชนิด BVD Antibody and Antigen – free ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงแต่ละ passage เป็นเวลา 3 วัน ทำการเพาะเลี้ยงตัวอย่างละ 2 passages แล้วทำการเก็บแต่ละตัวอย่างโดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วนำเซลล์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70^{0}C และนำมาละลายอย่างรวดเร็วแล้วเก็บสารละลายส่วนที่เหลืออยู่ไปทำการทดลอง

การแยกสกัด RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกร

นำตัวอย่างจำนวน 250 ไมโครลิตร เติม RNA extraction buffer [monophasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate] (Trizol LS®, Gibco BRL, New York) จำนวน 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที แล้วเติม

chloroform จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที แล้วทำการปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4^0C นาน 15 นาที เพื่อทำการแยกโปรตีนออก โดยดูดส่วนใสด้านบนใส่ใน eppendorf ใหม่แล้วเติม isopropanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4^0C นาน 15 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol จำนวน 1000 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอน RNA อีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4^0C นาน 5 นาที ทำการเก็บตะกอน RNA โดยทำให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย 0.1% DEPC water จำนวน 20 ไมโครลิตร

การเพิ่มขยายจำนวนสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง

(Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR))

cDNA synthesis

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 75 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTPs, 5 nmol reverse primer, 40U RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Gibco BRL, New York) และ DEPC water ใน 20 ไมโครลิตร reaction volume แล้วนำ RNA ที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาเติมใน mixture นำไปอุ่นใน water bath อุณหภูมิ 37 ^{0}C นาน 2 นาที เติม 200U ของ M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL, New York) ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปใส่ water bath อีกครั้งที่อุณหภูมิ 42 ^{0}C นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่ 94 ^{0}C นาน 2 นาที

Primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน

Gp55.1	5' GCC GCC GAA TTC ATG CGG CTA GCC TGC AAG GAA GA 3'	(35 mers)
Gp55.2	5' GGC GGC GTC GAC TCA GGC GAG TTG TTC TGT TAY AAC TA 3'	(38 mers)
Gp55.3	5' ACA ACT CTG AGA ACA GCC GTG G 3'	(22 mers) (Kitikoon, 1998)
324	5' ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA 3'	(21 mers)
326	5' TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC 3'	(21 mers) (Vilcek and belak, 1998)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 50 pmol ของ forward และ reverse primer, 2.5U ของ Taq DNA Polymerase (Gibco BRL, New York), 10% cDNA และ DEPC water จนครบ 50 ไมโครลิตร นำหลอด microtubes ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง Programable DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer 9600; California) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนดังนี้

เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 ^{0}C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ
ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturation	95^{0}C	30 วินาที
Annealing	55^{0}C	30 วินาที
Extension	72^{0}C	1 นาที

ทำปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด 35 รอบ หลังจากรอบสุดท้าย ให้ตามด้วยอุณหภูมิ 72 ^{0}C นาน 5 นาที แล้วแช่หลอดไว้ที่ 4 ^{0}C

การตรวจหาผลผลิตของปฏิกิริยา (Product detection)

Agarose Gel Electrophoresis

เตรียม 1.5% agarose ใน 1X Tris-borate EDTA buffer (TBE buffer) ใส่ผลผลิตของแต่ละปฏิกิริยา และ DNA มาตรฐาน (Molecular weight marker 100 bp DNA ladder (Biolabs, New England) โดยผสมกับ tracking dye (0.025% Bromphenol blue, 40% Ficoll 400 และ 0.1% SDS) ในอัตราส่วน 1:2 แล้วทำการให้กระแสไฟฟ้าที่ 150 โวลต์ นาน 45 นาที ย้อมสีด้วย 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ethidium bromide ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น ตรวจดูผลด้วยแสง UV และทำการบันทึกภาพด้วย Photo Documentation System (Vilber Lourmat, France)

การหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ PCR

เตรียม cDNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ตามขั้นตอนข้างต้น แล้วนำมาทำ PCR โดยเติม $MgCl_2$ ในแต่ละปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ตามลำดับ

การหาความไวของเทคนิค RT-PCR

นำไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD ที่มีความเข้มข้น 10^5 $TCID_{50}$ ต่อ 50 ไมโครลิตร มาทำการเจือจางทีละ 10 เท่าไปจนถึง 1 $TCID_{50}$ ต่อ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำการสกัด RNA ของไวรัสอหิวาต์สุกรตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น โดยทำการเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง SK-6 และน้ำกลั่น

การตัดสาย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ *Ppu*MI

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย DNA ที่ได้จากการทำ PCR จำนวน 1 – 5 ไมโครกรัม, 50 mM Potassium acetate, 20 mM Tris-acetate (pH 7.4), 10 mM Magnesium acetate, 1 mM DTT, *Ppu*MI 2 U (BioLabs, New England) และน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C นาน 1-2 ชั่วโมง

เอนไซม์ *Xho*II

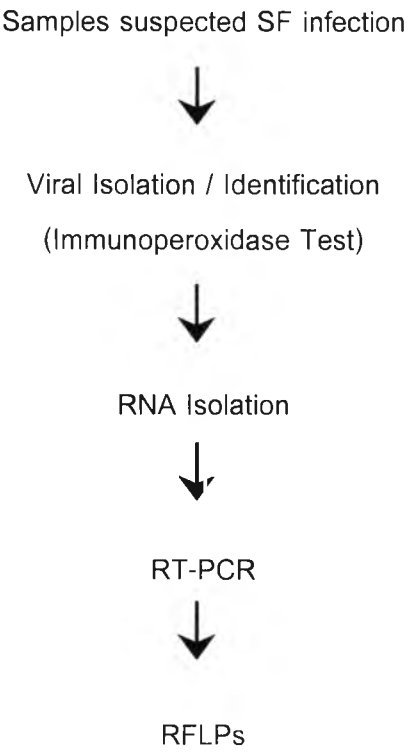
เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย DNA ที่ได้จากการทำ PCR จำนวน 1 – 5 ไมโครกรัม, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร BSA, 1 mM DTT, *Xho*II 5 U (Fermentas, USA) และน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C นาน 1-2 ชั่วโมง

ตรวจผลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

การตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Immunoperoxidase Test

เตรียมตัวอย่างไวรัสให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า ใน eppendorf จนตัวอย่างถูกเจือจางมากที่สุดที่ 10^{-5} เท่า แล้วใส่ตัวอย่างแต่ละค่าของการเจือจางลงในแต่ละหลุมของ 96-well microplate หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วเติมเซลล์เพาะเลี้ยง SK-6 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ใน 5% fetal calf serum 1 x 10^{6} เซลล์/มิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร ควบคุมการทดลองโดยใช้ไวรัสอหิวาต์สุกรสายพันธุ์ ALD และอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นตัวควบคุมบวกและลบตามลำดับ นำ microplate ดังกล่าวไปบ่มใน CO_2 incubator ที่ 37 ^{0}C นาน 72 ชั่วโมง

ทำการย้อมสีเซลล์เพื่อตรวจผลการทดลองโดยนำเพลทมาสะบัดน้ำเลี้ยงออกให้หมดแล้วตรึงเซลล์ด้วย 4% Formalin ใน PBS-0.5% Tween หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20-30 นาที สะบัด plate ให้น้ำออก แล้วล้างด้วย PBS-0.5% Tween 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 125 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม Monoclonal - Anti Swine Fever virus (สถาบันสุขภาพสัตว์, กรมปศุสัตว์, กรุงเทพฯ) อัตราส่วนที่เหมาะสมซึ่งเจือจางด้วย 1% BSA ใน PBS-0.5% Tween ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอบใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37^0C นาน 1 ชั่วโมง สะบัด plate ให้น้ำออก แล้วล้างด้วย PBS-0.5% Tween 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 125 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม Peroxidase-Conjugated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins (DAKO, Denmark) ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เจือจางด้วย 1% BSA ใน PBS-0.5% Tween ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอบใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37^0C นาน 1 ชั่วโมง นำ plate มาสะบัดให้น้ำออก แล้วล้างด้วย PBS-0.5% Tween 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 125 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม substrate ในอัตราส่วน ACE solution (3-amino acid-9-ethylcarbazole 80 มิลลิกรัม ใน Dimethyl formamide 20 มิลลิลิตร) : Acetate Buffer : H_2O_2 (30%) = 1 มิลลิลิตร: 19 มิลลิลิตร : 20 ไมโครลิตร ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปอบใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37^0C นาน 1 ชั่วโมง สะบัดน้ำทิ้งและล้าง plate ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง แล้วสะบัด plate ให้แห้ง จึงอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วทำการคำนวณหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Reed และ Muench (1983)



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำงานวิจัย