บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมไวรัส

การเพิ่มจำนวนไวรัส โดยการฉีดไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 (H5N1) เข้าช่องอัลลันโตอิก (allantoic cavity) ของไข่ไก่ฟักอายุ 9-11 วัน ซึ่งปลอดจากภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา (SAN; Specific Antibody Negative) จากนั้นเก็บอัลลันโตอิกฟลูอิด (allantoic fluid) จากไข่ไก่ฟักและทำการแยกเอาส่วนที่เป็นเศษเนื้อเยื่อและเม็ดเลือดแดงออกจากของเหลวโดยวิธีปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน (centrifuge) ที่ระดับ 1000xg เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำอัลลันโตอิกฟลูอิด ไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการแยกไวรัสให้บริสุทธิ์

2. การฉดฤทธิ์ของเชื้อไวรัส (virus inactivation) (King, 1991)

เตรียม binary ethylenimine (BEI) ความเข้มข้น 0.1 M โดยใช้ 2-bromo-ethylamine HBr (BEA) 0.041 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.175 N ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่ปิดฝาสนิท นำสารละลายดังกล่าวตั้งไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 – 60 นาที ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายจาก pH ~12 ลดลงเป็น pH~ 8.5 จึงจะสามารถนำไปใช้ในการทำลายฤทธิ์ของไวรัส

นำสารละลาย BEI ความเข้มข้น0.1 M เจือจางด้วยอัลลันโตอิก ฟลูอิด ในอัตราส่วน 1:10 และอัตราส่วน 1:100 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย BEI เป็น 0.01 M และ 0.001 M ตามลำดับ นำอัลลันโตอิก ฟลูอิด จากไข่ไก่ฟักที่เจือจางด้วยสารละลาย BEI ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการแยกเก็บอัลลันโตอิก ฟลูอิด จากไข่ไก่ฟักเมื่อเวลาผ่านไป 0, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ เพื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นกรด-ด่าง hemagglutination titer และทดสอบความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity test)

ตัวอย่างอัลลันโตอิก ฟลูอิด ที่แยกเก็บในแต่ละช่วงเวลาต้องทำการหยุดปฏิกิริยาของสารละลาย BEI ด้วยสารละลายโซเดียม ไธโอซัลเฟต (sterilized sodium thiosulfate) ความเข้มข้น 1 M ที่ระดับความเข้มข้น 10 เท่า ของความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย BEI

2.1 การทดสอบความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity test)

นำตัวอย่างอัลลันโตอิก ฟลูอิด ที่เจือจางด้วยสารละลาย BEI ความเข้มข้น 0.01 M และ 0.001 M ในแต่ละช่วงเวลาฉีดเข้าช่องอัลลันโตอิกของไข่ไก่ฟัก โดยทำการฉีดในปริมาตร 100 ไมโครลิตร/ฟอง เป็นจำนวน 5 ฟอง/ช่วงเวลา/ความเข้มข้นของสารละลาย BEI จากนั้นสังเกตการ

ตายของตัวอ่อนในไข่ไก่ฟัก เป็นเวลา 24 - 72 ชั่วโมง เก็บอัลลันโตอิก ฟลูอิดของไข่ไก่ฟักที่ตายและรอดชีวิต เพื่อนำไปตรวจหาไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ด้วยวิธี hemagglutination test ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ นำไปทดสอบต่อด้วยวิธี hemagglutination inhibition (HI) test ในกรณีที่ให้ผลบวกต่อ HI test แสดงว่าไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา ไม่ถูกลดฤทธิ์โดยสารละลาย BEI ส่วนกรณีที่ตัวอย่างให้ผลลบต่อ hemagglutination activity แสดงว่าสารละลาย BEI สามารถลดฤทธิ์ของเชื้อไวรัสได้

2.1.1 Hemagglutination; HA test

การทดสอบด้วยวิธีการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง โดยใช้ microplate ชนิดก้นหลุมแบบตัววี (v-shape) ขนาด 96 หลุม และใช้เม็ดเลือดแดงไก่ที่ระดับความเข้มข้น 1% อ้างอิงตาม O.I.E. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (2000) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

- เติมสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงใน microplate 1 แถว (12 หลุม) สำหรับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 1 ตัวอย่าง
- เติมตัวอย่างไวรัสที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 หลังจากนั้นทำการเจือจาง 2 เท่า (2-fold dilution) โดยเริ่มตั้งแต่หลุมที่ 1 ไปจนถึงหลุมที่ 11 ซึ่งจะได้สารละลายของไวรัสที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1:2 ไปจนถึง 1:2,048 ตามลำดับ สำหรับหลุ่มที่ 12 ใช้เป็นหลุมควบคุมจะไม่มีไวรัส
- เติมสารละลาย PBS ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงใน microplate ทั้ง12 หลุม
- เติมเม็ดเลือดแดงไก่ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงใน microplate ทั้ง 12 หลุม
- เขย่าให้เม็ดเลือดแดงกระจายทั่วทั้งหลุม หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 45 นาที จึงทำการอ่านผลการทดสอบ

2.1.2 Hemagglutination Inhibition; HI test

การทดสอบด้วยวิธีการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง โดยใช้ microplate ชนิดก้นหลุมแบบตัววี ขนาด 96 หลุม และใช้เม็ดเลือดแดงไก่ที่ระดับความเข้มข้น 1% อ้างอิงตาม O.I.E. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (2000) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

- เติมสารละลาย PBS ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงใน microplate 1 แถว (12 หลุม) สำหรับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 1 ตัวอย่าง
- เติมตัวอย่างไวรัสที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 หลังจากนั้นทำการเจือจาง 2 เท่า (2-fold dilution) โดยเริ่มตั้งแต่หลุมที่ 1 ไปจนถึงหลุมที่ 10 ซึ่งจะได้สารละลายของไวรัสที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1:2 ไปจนถึง 1:1,024 ตามลำดับ

ในส่วนของหลุมที่ 11 จะใช้เป็นหลุมควบคุมสำหรับซีรัมไม่มีการเติมไวรัส หลุมที่ 12 ไม่มีการเติมทั้งซีรัมและเชื้อไวรัส

- เติมซีรัมที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา ที่เจือจางในสารละลาย PBS อัตราส่วน 1:5 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ตั้งแต่หลุมที่ 1 ไปจนถึงหลุมที่ 11 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เพื่อให้ไวรัสทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี
- เติมเม็ดเลือดแดงไก่ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงใน microplate ทั้ง 12 หลุม
- เขย่าให้เม็ดเลือดแดงกระจายทั่วทั้งหลุม หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 45 นาที จึงทำการอ่านผลการทดสอบ

3. การเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์

3.1 การเตรียมสารละลายซูโครส (sucrose gradient solutions)

เตรียมสารละลายความเข้มข้นต่างๆ จากสารละลายตั้งต้น (stock solution) เพื่อใช้ในการเจือจางให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นตามต้องการ สารละลายตั้งต้นของน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 66% w/w เตรียมจากน้ำตาลซูโครส 1,710 กรัม ใน HNE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ความเข้มข้นในระดับต่างๆ ของน้ำตาลซูโครส (sucrose gradient) สามารถเตรียมได้โดยใช้กระบวนการ laying process วิธี linear gradient (Griffith, 1986)

3.2 การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ (virus purification)

นำของเหลวจากไข่ไก่ฟักซึ่งผ่านกระบวนการลดความสามารถในการก่อโรคของไวรัส (inactivation) โดยใช้ BEI solution ปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงแรงสูง (ultracentrifuge) ที่ระดับ 75,000xg (Beckman, SW41Ti) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จะได้ตะกอนของไวรัสที่ก้นหลอดทดลองและทำการแยกส่วนของเหลวที่อยู่ชั้นบนออกไป นำตะกอนของไวรัสที่ได้มาละลายในสารละลาย HNE buffer และนำไปปั่นใน 10-60% (w/v) sucrose gradient ที่ 100,000xg (Beckman, SW41Ti) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แยกส่วนที่เป็นแถบของไวรัสเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อรอดำเนินการเตรียมไวโรโซม

4. การเตรียมไวโรโซม

การเตรียม virosomes โดยใช้ octaethyleneglycol mono (n-dodecyl) ether ($C_{12}E_8$) (Bron et al., 1993)

นำไวรัสบริสุทธิ์ที่มีปริมาณของโปรตีนทั้งหมดจำนวน 1 มิลลิกรัม (Metsikko et al., 1986) เจือจางใน HNE buffer จากนั้นจึงปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงแรงสูง ที่ระดับ 50,000xg (Beckman, SW41Ti) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการแยกส่วนที่อยู่เหนือ

ตะกอนออกไป นำตะกอนของไวรัสที่ล้นหลอดทดลองมาเติมด้วยสารละลาย octaethyleneglycol mono (n-dodecyl) ether ($C_{12}E_8$) ความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 0.7 มล. ผสมให้รวมตัวกันโดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ในระหว่างการผสมควรหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดฟอง เมื่อได้ของผสมที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วตั้งพักไว้ในภาชนะที่บรรจุด้วยน้ำแข็ง นาน 15 นาที เพื่อให้สารละลาย octaethyleneglycol mono (n-dodecyl) ether ทำปฏิกิริยากับไขมันในเปลือกหุ้มไวรัส หลังจากนั้นทำการแยกส่วนที่เป็นโปรตีนนิวคลิโอแคปซิด (nucleocapsid proteins) ออกจากสารละลาย โดยการปั่นเหวี่ยงที่ระดับ 85,000xg (Beckman, SW41Ti) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

หลังจากการแยกเอาส่วนโปรตีนนิวคลิโอแคปซิดออก ทำการล้างสารละลาย octaethylene glycol mono (n-dodecyl) ether โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดส่วนที่อยู่เหนือตะกอนใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุด้วย BioBead SM2 จำนวน 180 มก. เขย่าที่ความเร็ว 1,400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าวเติม BioBead SM2 จำนวน 90 มก. เขย่าต่อเนื่องที่ความเร็ว 1,800 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จะได้ของผสมที่มีลักษณะขุ่น ซึ่งบ่งชี้ว่าเกิดการสร้างไวโรโซม หลังจากนั้นนำของผสมดังกล่าวไปปั่นใน 10-40% discontinuous sucrose gradient ที่ระดับ 130,000xg (Beckman, TLS-55 SW) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จะได้แถบของไวโรโซมระหว่างชั้นของน้ำตาลซูโครส

5. การทดสอบคุณลักษณะทางกายภาพของไวโรโซม (physiological characterization of virosome)

เนื่องจากไวโรโซมเป็นอนุภาคที่เกิดขึ้นจากการจัดเรียงแอนติเจนโปรตีน ที่ปรากฏอยู่บนโครงสร้างของเปลือกหุ้มไวรัส (viral envelopes) เกิดเป็นโครงสร้างใหม่ของไวรัสที่มีรูปร่างและส่วนประกอบบนเปลือกหุ้มใกล้เคียงกับไวรัสต้นแบบ คุณสมบัติพื้นฐานของไวโรโซมสามารถตรวจสอบได้หลายวิธีขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการใช้ประโยชน์จากไวโรโซม ได้แก่

5.1 การศึกษารูปร่างของไวโรโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (morphological study; electron microscope)

ทำการตรวจสอบลักษณะโครงสร้าง รูปร่างและขนาดของอนุภาคเอเวียนอินฟลูเอ็นซาของไวโรโซมและไวรัสเอเวียนอินฟลูเอ็นซาที่ผ่านกระบวนการลดฤทธิ์ของเชื้อไวรัส ด้วย negative-staining transmissible electron microscopy (TEM) ณ ห้องปฏิบัติการจุลทรรศน์อิเลกตรอน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีขั้นตอนดังนี้

เตรียมสารละลายที่เจือจางด้วยตัวอย่างที่ต้องการตรวจในอัตรา 1: 40 หยดสารละลายที่เจือจางลงบนกริดทองแดง (copper grid) ขนาด 300 mesh ซึ่งเคลือบด้วย Formvar ทิ้งไว้ประมาณ 2

นาที หลังจากนั้นซับสารละลายส่วนเกินออก โดยใช้กระดาษกรอง (torn filter paper) จากนั้นย้อม negative stain ด้วยสี Uranyl acetate ซับสีส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรองและทิ้งให้กริดแห้งในอากาศ นาน 1-2 นาที

นำกริดที่เตรียมตัวอย่างเสร็จเรียบร้อยไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องผ่าน (transmissible electron microscopy, TEM; JEM-2010) โดยใช้ความต่างศักย์ของแหล่งกำเนิดลำแสงอิเลคตรอนที่ระดับ 80 kV

5.2 การศึกษาโปรตีนองค์ประกอบของไวรัส ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

5.2.1 การเตรียม Separation gel (12.0% gel)

ผสมสารละลาย 30% Acrylamide/bis, 1.5 M Tris-HCl , pH 8.8, Distilled water และ 10 % SDS solution ในปริมาตร 4,000 2,500 3,344 และ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับเข้าด้วยกัน ดูดอากาศซึ่งอาจแทรกอยู่ในสารละลายออก หลังจากนั้นค่อยๆผสม 10% Ammonium persulfate และ TEMED ปริมาตร 50 และ 6 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในสารละลายที่ดูดอากาศออก ใช้ปิเปตดูดสารละลายเจลใส่ลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ จากนั้นค่อยๆ หยอดสารละลาย isobutanol ให้คลุมผิวหน้าของเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 45 นาที หลังจากนั้นค่อยๆล้างส่วนบนของ separation gel ด้วยน้ำกลั่นหลายๆรอบ และซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง

5.2.2 การเตรียม Stacking gel (4% gel)

ผสมสารละลาย 30% Acrylamide/bis, 0.5 M Tris-HCl , pH 6.8, Distilled water และ 10% SDS solution ในปริมาตร 650, 1,250, 3,020 และ 50 ไมโครลิตร ตามลำดับเข้าด้วยกัน ดูดอากาศซึ่งอาจแทรกอยู่ในสารละลายออก หลังจากนั้นค่อยๆผสม 10% Ammonium persulfate และ TEMED ปริมาตร 25 และ 5 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในสารละลายที่ดูดอากาศออก ใช้ปิเปตดูดสารละลายเจลใส่ลงบน Separation gel สอด comb ที่มีขนาดเหมาะสมไว้บน stacking gel ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นค่อยๆล้างส่วนบนของ stacking gel ด้วยน้ำกลั่นหลายๆรอบ และซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง

5.2.3 การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อทำอิเลคโตรโฟรีซิส (sample preparation)

เจือจางตัวอย่างที่ต้องการทดสอบให้มีปริมาณโปรตีน 10 ไมโครกรัม ต่อ ช่อง (well) ผสมตัวอย่างกับ sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8; 10% glycerol; 2% w/v SDS; 1% beta-mercaptoethanol; 0.025% bromophenol blue) ในอัตราส่วน 2:1 (v/v) และนำสารละลายตัวอย่างที่

เจือจางแล้วไปต้มในเครื่องทำความร้อน (heat block) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เพื่อแยกตะกอนออก แล้วจึงนำสารละลายตัวอย่างไปหยอดลงในช่องว่าง (well) บนชั้นของ stacking gel ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร/ช่อง (well)

5.2.4 การทำอิเลคโตรโฟรีซิส (sample loading and running)

เตรียมชุดอิเลคโตรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมบัฟเฟอร์ลงในช่องว่างของชุดอิเลคโตรโฟรีซิสทั้งด้านในและด้านนอก หลังจากที่เจลแข็งตัวให้ดึง comb ออกจากชั้นของ stacking gel ซึ่งจะปรากฏเป็นช่องว่าง (well) สำหรับใส่สารบนเจล จากนั้นเติมสารละลายเจือจางไวรัสบริสุทธิ์ สารละลายเจือจางของนิวคลิโอแคปซิดโปรตีนและไวโรโซม ที่ต้องการแยกส่วนประกอบโปรตีนและโปรตีนมาตรฐานลงในช่องบน stacking gel แต่ละช่อง โดยใช้ไมโครปิเปตค่อยๆหยอดผ่านบัฟเฟอร์ลงไปในช่องที่เตรียมไว้

ทำการต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับชุดอิเลคโตรโฟรีซิส แล้วจึงเปิดสวิทซ์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 90 โวลต์ นานประมาณ 1 ชั่วโมง หรือเมื่อพบว่าสีของ bromo-phenol blue เคลื่อนที่มาถึงส่วนปลายของเจลจึงปิดสวิทซ์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า และนำแผ่นกระจกออกจาก chamber และนำแผ่นเจลออกมาย้อมด้วย Coomassie blue staining เพื่อตรวจหาตำแหน่งและขนาดของโปรตีน

5.2.5 การย้อมสีโปรตีนในเจล (Coomassie blue staining)

เตรียม Coomassie staining solution (0.1 % (w/v) Coomassie brilliant blue R-250, 40% Methanol, 10% (v/v) Acetic acid) นำแผ่นเจลที่ผ่านการทำอิเลคโตรโฟรีซิส วางในถาดที่มี staining solution ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นจึงทำการล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วย Destain solution (40 % Methanol, 10 % Acitic acid) จนกว่าจะปรากฏแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน

5.3 การตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค Western immunoblotting

5.3.1 การถ่ายโอนโปรตีน (Transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gel to membrane)

หลังจากการแยกโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electro-phoresis (SDS-PAGE) นำแผ่นเจลที่ได้ไปถ่ายโอน (transfer) โปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membranes; Bio-Rads, USA) ในสารละลายบัฟเฟอร์ (25mM Tris, pH 8.3, 192 mM glycine, 20% Methyl alcohol และ 0.1% SDS) โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์

นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากที่ทำการถ่ายโอนโปรตีนเสร็จสิ้น แยกเอาส่วนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสออกมา โดยต้องระวังไม่ให้แห้ง

5.3.2 การขัดขวางการจับกันของโปรตีนที่ไม่มีความจำเพาะ (Blocking of nonspecific protein binding site)

นำแผ่นไนโตรเซลลูโลส แช่ไว้ในบลอกกิง บัฟเฟอร์ (TBS-3% nonfat milk) เพื่อขัดขวางและป้องกันการจับกันระหว่างโปรตีนที่ไม่ต้องการบนเยื่อไนโตรเซลลูโลส (non-specific protein binding site) นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน (overnight) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยระหว่างการแช่ให้ทำการเขย่าสารละลายในแนวระนาบอย่างสม่ำเสมอ

5.3.3 Antibody binding

นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ผ่านขั้นตอนการขัดขวางการจับกันระหว่างโปรตีนที่ไม่ต้องการบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลายที่เจือจางด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสเอเวียนอินฟลูเอนซา (primary antibody) (ได้รับการอนุเคราะห์จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ) ความเข้มข้น 1:1,000 นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างการแช่ให้ทำการเขย่าสารละลายในแนวระนาบอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นล้างแอนติบอดีส่วนเกินบนแผ่นเยื่อไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย TBS-0.1% Tween20 จำนวน 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

5.3.4 การตรวจหาโปรตีน (Detection)

เจือจางแอนติบอดีทุติยภูมิ (goat anti-chicken immunoglobulin G (IgG)) ซึ่งติดด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) (KPL, USA) ในสารละลาย blocking ในอัตราส่วน 1:2,500 (v/v) นำแผ่นเยื่อไนโตรเซลลูโลสแช่ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (ใช้สารละลายที่เจือจางแล้วในอัตรา ส่วน 0.125 มิลลิลิตร/ตารางเซนติเมตรของแผ่นเยื่อไนโตรเซลลูโลส) ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย TBS-0.1% Tween20 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วยสารละลาย TBS จำนวน 2 ครั้ง โดยครั้งละ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

หลังจากนั้นนำไปบ่มกับสาร 3,3'–diaminobenzidine carbonyl chloride ความเข้มข้น 0.6 % ใน Tris-HCl (pH 7.6) ซึ่งมีส่วนประกอบของ hydrogen peroxide (H_2O_2) ความเข้มข้น 0.03% เป็นเวลา 10-30 นาที หรือจนกระทั่งเกิดการเปลี่ยนแปลงสี แล้วจึงนำไปบันทึกภาพ

6. การทดสอบคุณลักษณะทางด้านชีวภาพของไวโรโซม โดยการทดสอบคุณสมบัติในการจับกลุ่มตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดง (hemaggluitnation activity test)

การทดสอบด้วยวิธีการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง โดยใช้ microplate ชนิดก้นหลุมแบบตัววี (v-shape) ขนาด 96 หลุม และใช้เม็ดเลือดแดงไก่ที่ระดับความเข้มข้น 1% อ้างอิงตาม O.I.E. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (2000) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

- เติมสารละลาย PBS ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงใน microplate 1 แถว (12 หลุม) สำหรับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 1 ตัวอย่าง
- เติมตัวอย่างไวรัสที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 หลังจากนั้นทำการเจือจาง 2 เท่า (2-fold dilution) โดยเริ่มตั้งแต่หลุมที่ 1 ไปจนถึงหลุมที่ 11 ซึ่งจะได้สารละลายของไวรัสที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1:2 ไปจนถึง 1:2,048 ตามลำดับ หลุมที่ 12 ใช้เป็นหลุมควบคุมจะไม่มีไวรัส
- เติมสารละลาย PBS ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงใน microplate ทั้ง 12 หลุม
- เติมเม็ดเลือดแดงไก่ที่ระดับความเข้มข้น 1 % ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงใน micro-plate ทั้ง 12 หลุม
- เขย่าให้เม็ดเลือดแดงกระจายทั่วทั้งหลุม หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 45 นาที จึงทำการอ่านผลการทดสอบ