

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุ อุปกรณ์

ชื่อวัสดุ	ชื่อผู้ผลิต
Autoclave (Model MC-30L)	ALP CO.Ltd, Japan
Centrifuge	LABQUIP, England
Centrifuge, Hitachi CR 22G II	Hitachi, Japan
Electronic balance (Mettler Toledo)	Science Promotion, Thailand
Freezer -70°C	Harris Manufacturing, USA
Gel dryer (SLAB, Model SE1160)	Hoefer Scientific Instruments, USA
Gene Amp [®] PCR system, 9700	Gene System, Thailand
Heat block	Major-Science, Malaysia
Incubator (HOTPACK, Model 3526D2)	Hotpack Crop., USA
96-well NUNC-Immuno Plate	NUNC, Denmark
Magnetic stirrer (Model MS115)	HL Instrument, Thailand
Micropipette	LIO LAB, Thailand
Microplate Reader (Benchmark)	Bio-Rad, USA
Microwave	National, Japan
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, USA
Nitrocellulose membrane (0.45 μm)	Bio-Rad, USA
Nano Blot	Pharmacia Biotech, Sweden
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
Power supply (PowerPac basic)	Bio-Rad, USA
pH meter (Model pH 34)	Beckman, USA
Shaker (ORBIT LS)	LIO LAB, Thailand

UV/VIS Spectrophotometer	Jasco, USA
Vortex	EYELA, Japan
Whatman No. 1 filter paper	Whatman, USA
3.1.2 สารเคมี	
ชื่อสารเคมี	ชื่อบริษัทผู้ผลิต
Acetic acid glacial, AR	Carlo Erba, France
Acrylamide, Electrophoresis grade	Bio-Rad, USA
Agarose	Pronadisa, Spain
Alkaline phosphatase from calf intestine	AppliChem, Germany
Amido Black	Merck, Germany
Ammonium persulphate, AR	Carlo Erba, France
AP conjugated substrate kit	Bio-Rad, USA
Boric acid	Ajax Finechem, Australia
Bovine serum albumin	Merck, Germany
Bromophenol blue	Sigma, USA
Calcium carbonate	Fluka, Switzerland
Complete Freund's adjuvant	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka, Switzerland
Disodium hydrogen phosphate	Carlo Erba, France
Diethyl ether	BDH, UK
Ethyl alcohol absolute, AR	RCI Labscan limited, Thailand
Ethidium bromide	Sigma, USA
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Fluka, Switzerland
Glutaraldehyde	Fluka, Switzerland
Go Taq® Green Master Mix	Promega, USA
Hydrochloric acid	Carlo Erba, France
Illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini	GE Healthcare, Sweden
Spin Kit	
Incomplete Freund's adjuvant	Sigma, USA

Low Molecular Weight Calibration Kit	Amersham Biosciences, UK
Lambda Hind III	Vivantis, Malaysia
Magnesium chloride-6-hydrate	Riedel-de Haën, Germany
Maleic acid	SEARLE company, England
Methyl alcohol	Carlo Erba, France
β -mercaptoethanol	Sigma, USA
p-Nitrophenyl phosphate	Amersham, Canada
N, N'-methylene-bis-acrylamide	Bio-Rad, USA
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)	Fluka, Switzerland
Potassium chloride	Carlo Erba, France
Potassium dihydrogen phosphate	Fluka, Switzerland
Proteinase K	Sigma, USA
Protein G sepharose beads	GE Healthcare, Sweden
RNase A	GE Healthcare, Sweden
Skim milk	Scharlau, Spain
Sodium chloride	APS Ajax Finechem, Australia
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Bio-Rad, USA
Sodium hydroxide	Carlo Erba, France
STR primer	Ward Medic, Thailand
Sucrose	Carlo Erba, France
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris-base)	Arcos, Belgium
Tween 20	Fluka, Switzerland
Urea	Ajax Finechem, Australia
VC 100bp Plus DNA Ladder	Vivantis, Malaysia
Xylene cyanol FF	Fluka, Switzerland

3.2 การเตรียมตัวอย่าง

3.2.1 เลือดคนและเลือดสัตว์ชนิดต่างๆ

เลือดคนได้รับจากอาสาสมัคร เลือดสัตว์กระต่าย, สุนัข, หนู, ไก่, เป็ด, นก, แพะ, วัว, แกะ, กบ, หมู, ปลาไหล, ปลานิล, ปลาทับทิม และปลาดุก ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ส่วนเลือดแมวได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตัวอย่างเลือดทั้งหมดแบ่งเก็บในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่มี 200 mM EDTA ปริมาตร 50 μ l ส่วนตัวอย่างเลือดที่เหลือจะเก็บโดยไม่เติม EDTA ในหลอด Microcentrifuge จากนั้นตัวอย่างเลือดทั้งหมดจะนำไปเก็บที่ -80°C

3.2.2 เลือดคน เส้นผม และน้ำลาย

ตัวอย่างเลือดคน เส้นผม และน้ำลายที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มาจากอาสาสมัคร 5 คนที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกัน การเก็บตัวอย่างเลือดจะใช้นักเทคนิคการแพทย์เป็นผู้เก็บตัวอย่าง ตัวอย่างเลือดที่ได้จะเก็บในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml มี 200 mM EDTA ส่วนตัวอย่างน้ำลายเก็บในหลอด Microcentrifuge 1.5 ml และเก็บที่ -70°C และตัวอย่างเส้นผมเก็บเส้นผมพร้อมทั้งรากผมเก็บในช่องเก็บตัวอย่างเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

(1) การเตรียมกราฟมาตรฐาน

นำหลอดทดลองมา 6 หลอด ใส่สารละลาย BSA 2 mg/ml ลงในหลอดที่ 2-6 เท่ากับ 1, 2, 3, 4, 5 μ l ตามลำดับ ในแต่ละหลอดที่เติม Coomassie reagent หลอดละ 1 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm โดยเครื่อง Spectrophotometer โดยใช้หลอดที่ 1 ซึ่งเตรียมเหมือนหลอดที่ 2-6 แต่ต่างกันตรงที่ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 μ l แทนสารละลาย BSA เป็น blank

(2) การหาปริมาณโปรตีน

เตรียมโปรตีนตัวอย่างปริมาตร 1 μ l ลงในหลอดทดลองที่เติม Coomassie reagent ลงไป 1 ml เขย่าหลอดให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm

3.3.2 การเตรียม Anti-human IgG

(1) การทำบริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG)

การทำบริสุทธิ์ IgG จากซีรัมจะใช้ Protein G Sepharose beads เป็นตัวจับ (Affinity binding) ซึ่งจะจำเพาะกับ Fc region ของ IgG วิธีการทำบริสุทธิ์จะเริ่มจากการนำ Protein G Sepharose beads ปริมาตร 250 μ l มาล้างด้วย 0.1% Triton X ปริมาตร 500 μ l 3 ครั้ง จากนั้นนำ ซีรัมคนปริมาตร 250 μ l มาผสมเข้ากับ Protein G Sepharose beads แล้วตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C โดยกวนให้เข้ากันทุกๆ 10 นาที จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำ Protein G Sepharose beads มาล้างด้วย 0.1% Triton X ปริมาตร 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที 3 ครั้ง เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนต่อด้วย PBS buffer ปริมาตร 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที 3 ครั้ง เทส่วนใสทิ้งจากนั้นเติม Tris-glycine, pH 3.0 ปริมาตร 500 μ l ลงไป ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนนี้จะทำให้ IgG แยกออกจาก Bead เก็บส่วนใสด้านบนที่มี IgG ใส่ลงใน Microcentrifuge แล้วเติม Tris-HCl, pH 9.0 ปริมาตร 50 μ l ผสมให้เข้ากัน เพื่อให้ IgG มีค่า pH เป็นกลาง จากนั้นแบ่งส่วนใสที่มี IgG ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE สำหรับส่วนใสที่เหลือจะเก็บที่ -20°C เพื่อใช้สำหรับการสร้างแอนติบอดีในหนูทดลองต่อไป ส่วน Protein G Sepharose beads จะถูกนำมาล้างด้วย Tris-glycine, pH 3.0 ปริมาตร 500 μ l 6 ครั้ง แล้วล้างต่ออีก 3 ครั้งด้วย PBS buffer ปริมาตรครั้ง ละ 500 μ l ก่อนนำไปเก็บที่ 4°C เพื่อนำมาใช้ในครั้งต่อไป

(2) การวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของ IgG โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

การเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์

- ประกอบกระจกของเครื่อง Mini-PROTEAN Tetra Cell
- เท 13% Separating polyacrylamide gel ลงไปในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกให้ได้ความสูงประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของแผ่นกระจก
- ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นปิดทับผิวหน้าของเจล เพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบและป้องกันไม่ให้อากาศลงไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา Polymerization ของเจล
- ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง โดยสังเกตจากรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำกลั่นที่ปรากฏขึ้นอย่างชัดเจน
- เทน้ำกลั่นออกโดยใช้กระดาษทิชชูช่วยซับ
- เติม 4% Stacking gel ลงไปจนเต็มแผ่นกระจก
- ใส่หัวเสียบ (Comb) ลงไป

- ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ ประมาณ 30 นาที
- ค้าง Comb ออก เพื่อให้เกิดเป็นช่องสำหรับใส่สาร (Well)
- ประกอบแผ่นเจลที่เตรียมไว้เข้ากับอุปกรณ์ของเครื่อง แล้ววางลงใน

Chamber

- เติม Electrode buffer ลงไปจนท่วมเจล

การไหลคตัวอย่างและการ Run gel

- นำส่วนใสที่มี IgG ที่เตรียมได้จากข้อ (1) ปริมาตร 10 μ l มาใส่ในหลอด Microcentrifuge จากนั้นเติม Solubilizing buffer ปริมาตร 10 μ l แล้วผสมให้เข้ากัน

- ปิเปตสารผสมปริมาตร 10 μ l ลงในช่องใส่สารตัวอย่าง (Well) ของเจล
- ปิเปต Low Molecular Weight ปริมาตร 2 μ l ใส่ลงในช่องใส่สารตัวอย่าง ช่องแรก เพื่อใช้เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีน

- ต่อขั้ว Electrode ของ Chamber เข้ากับ Power supply โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ 150 V จนกระทั่งแถบสีน้ำเงินของ Bromophenol blue เคลื่อนที่ลงมาจนถึงส่วนปลายสุดของ เจล

- นำเจลไปย้อมเพื่อดูแถบโปรตีน

การย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue

- นำเจลมาแช่ในสารละลาย Staining เป็นเวลา 1 คืน บนเครื่องโยก (Shaker)
- จากนั้นนำเจลมาแช่ในสารละลาย Destaining จนกระทั่งเห็นแถบของ

Protein marker

(3) การเตรียม Anti-human IgG ในหนูทดลอง

- เตรียมหนูทดลอง จำนวน 4 ตัว
- เก็บเลือดหนูทดลองก่อนนำหนูไปกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี

(Pre-immunized serum) โดยวิธีการเจาะเลือดหนูจะใช้เทคนิค Retro-orbital plexus bleeding

- เตรียม IgG ที่จะใช้ไปกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนู โดยนำ IgG บริสุทธิ์จากข้อ (1) ความเข้มข้น 10 μ g มาผสมกับ PBS buffer, pH 7.4 ปริมาตรรวมเท่ากับปริมาตรของ Complete Freund's adjuvant จากนั้นเติม Complete Freund's adjuvant ปริมาตร 100 μ l นำไปผสมให้เข้ากัน จนกระทั่งได้สารละลาย Emulsion สีขาวขุ่น

- นำสารละลาย Emulsion ปริมาตรทั้งหมดที่เตรียม 200 μ l ไปฉีดหนูทดลอง โดยใช้วิธีฉีดแบบเข้ากล้ามเนื้อ (Intramuscular injection) ตรงบริเวณหลังของหนูทดลอง

3-4 ตำแหน่ง หลังฉีด 3 วัน เก็บเลือดจากหนูมาวิเคราะห์หาปริมาณ Anti-human IgG (โดยเลือดที่เก็บส่วนนี้ คือ เลือดที่ได้หลังจากการกระตุ้นครั้งที่ 1)

- หลังจากฉีดหนูครั้งแรก 2 สัปดาห์ จะกระตุ้นหนูซ้ำด้วยสารละลาย Emulsion ปริมาตรทั้งหมดที่เตรียม 200 μ l เหมือนข้างบน ต่างกันตรงที่ใช้ Freund's incomplete adjuvant แทน แล้วทิ้งไว้ 3 วัน จึงเก็บเลือดมาวิเคราะห์หาปริมาณ Anti-human IgG (เลือดที่เก็บส่วนนี้ คือ เลือดที่ได้หลังจากการกระตุ้นครั้งที่ 2)

- เลือดที่ได้จะเก็บไว้ใน Microcentrifuge แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

- นำเลือดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ส่วนของซีรัมแยกออกจากส่วนของเม็ดเลือดมากที่สุด

- เก็บซีรัมที่อยู่ตรงส่วนใสด้านบนในหลอด Microcentrifuge และเก็บไว้ที่ -70°C

- แบ่งซีรัมหนูไปหาค่าไตเตอร์ด้วยวิธี ELISA และ Western immunoblotting (ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี คือ ค่าความเจือจางสูงสุดที่ยังเห็นปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดี) ซึ่งหากค่าไตเตอร์ยังไม่สูงพอ แสดงว่าปริมาณ Anti-human IgG ที่สร้างขึ้นยังมีน้อย จะต้องทำการฉีดกระตุ้นซ้ำ โดยเว้นระยะการฉีดทุก 2 สัปดาห์

(4) การตรวจหา Anti-human IgG ในซีรัมของหนูด้วยเทคนิค ELISA

- เตรียมแอนติเจน (ซีรัมคน) ความเข้มข้น 20 μ g/ μ l ใน Carbonate buffer, pH 9.5

- ปิเปิดแอนติเจนปริมาตร 50 μ l ใส่ลงในหลุม (Well) ของ Microtiter plate จำนวน 54 หลุม

- นำ Microtiter plate ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน

- เทของเหลวที่อยู่ในหลุมทิ้ง

- ล้างหลุมด้วยสารละลาย TBST buffer ปริมาตร 500 μ l 3 ครั้ง

- เติม Blocking solution ลงไปหลุมละ 100 μ l

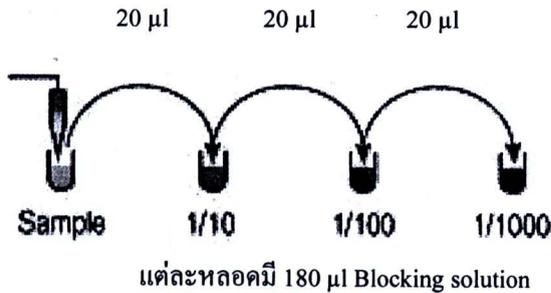
- นำ Microtiter plate ไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- เทของเหลวในหลุมทิ้ง

- ล้างหลุมด้วย TBST buffer ปริมาตร 500 μ l 3 ครั้ง

- เจือจางซีรัมของหนูที่ได้จากข้อ (3) ซึ่งเป็นส่วนที่มีแอนติบอดี โดยเจือจางทีละ 10 เท่า (10 Fold dilution) ซึ่งจะใช้วิธีการเจือจางเป็นลำดับเท่า (Serial dilution) โดยนำซีรัมของ

หนูมา 20 μ l ใส่ลงในหลอดที่มี 180 μ l Blocking solution ผสมให้เข้ากัน จะได้ความเข้มข้นเจือจาง 1:10 เท่า จากนั้นปิเปตมาซีรัมเจือจาง 1:10 เท่า มา 20 μ l แล้วเติม 180 μ l Blocking solution ผสมให้เข้ากัน จะได้ความเข้มข้นเจือจาง 1:100 เท่า สำหรับหลอดอื่นๆ ก็ทำแบบเดียวกัน (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 วิธีการเจือจางซีรัมหนูเป็นลำดับเท่า (Serial dilution) (วิธีการเจือจางซีรัมหนูเป็นลำดับเท่า, ม.ป.ป.)

- ปิเปตซีรัมของหนูที่เจือจางไว้แต่ละค่าลงในหลุมของ Microtiter plate (1 Dilution/well) โดยเติมหลุมละ 50 μ l
- นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- เทของเหลวที่อยู่ในหลุมทิ้ง
- ล้างหลุมด้วย TBST buffer ปริมาตร 500 μ l 3 ครั้ง
- เติมสารละลาย Goat anti-mouse IgG linked with alkaline phosphatase ที่เจือจางใน TBST buffer อัตราส่วน 1:500 ลงไปในแต่ละหลุมๆ ละ 50 μ l
- นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ล้างหลุมด้วยสารละลาย TBST buffer ปริมาตร 500 μ l 3 ครั้ง
- เทของเหลวในหลุมทิ้ง
- ล้างหลุมด้วยสารละลาย TBS buffer ปริมาตร 500 μ l 3 ครั้ง
- เทของเหลวในหลุมทิ้ง
- เติมสารละลาย 1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate ใน Substrate buffer, pH 9.5 ลงไปหลุมละ 100 μ l
- สังเกตการณ้เกิดสี
- นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm ในเครื่อง Microplate reader

(5) การวิเคราะห์หาไตเตอร์ของ Anti-human IgG ด้วยเทคนิค Western

immunoblotting

ดังต่อไปนี้

ทำการแยกซีรัมของคนด้วย SDS-PAGE เหมือนข้อ (2) จากนั้น ทำการทดลอง

การเตรียมแผ่น Nitrocellulose

- ตัดแผ่น Nitrocellulose ประมาณ 6x9 cm หรือให้มีขนาดเท่ากับแผ่นเจล
- นำแผ่น Nitrocellulose แช่ในน้ำกลั่น

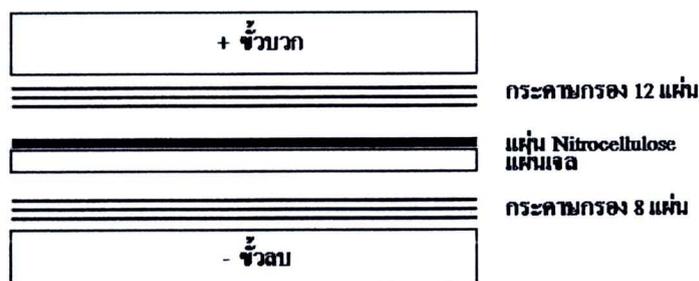
การเตรียมกระดาษกรอง

- ตัดกระดาษกรอง ประมาณ 6x9 cm หรือให้มีขนาดเท่ากับแผ่นเจล
- นำกระดาษกรอง 8 แผ่น และ 12 แผ่น แช่ใน Transfer buffer (Towbin)

การย้ายโปรตีนจากเจลไปบนแผ่น Nitrocellulose โดยใช้กระแสไฟฟ้า

- ประกบแผ่น Nitrocellulose กับแผ่นเจล เข้าด้วยกัน โดยมีชั้นของกระดาษ

กรองทำหน้าที่เป็นตัวยึด (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 การประกอบอุปกรณ์สำหรับย้ายโปรตีนจากเจลไปบนแผ่น Nitrocellulose ด้วยกระแสไฟฟ้า

- ต่อ Electrode เข้ากับ Power supply ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 130 mA ต่อหนึ่งเจล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- ค่อยๆ แยกแผ่น Nitrocellulose ออกจากเจล จากนั้นใช้กรรไกรที่สะอาด ตัดตามแนวการเคลื่อนที่ของโปรตีนเฉพาะ Lane ที่มีโปรตีนมาตรฐาน แล้วนำส่วนที่ตัดได้ไปแช่ในสารละลาย 0.1% amido black บนเครื่องโยก สำหรับแผ่น Nitrocellulose ที่เหลือจะนำไปวิเคราะห์หาไตเตอร์

การวิเคราะห์หาไตเตอร์ของ Anti-human IgG ในซีรัมหนู

- เตรียมแผ่น Parafilm บนกระจก
- ปิเปตซีรัมของหนูที่เจือจางในสารละลาย Blocking solution ในแต่ละความเข้มข้น ได้แก่ $1:10$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$ และ $1:10^5$ ตามลำดับ ไปใส่บนแผ่น Parafilm
- นำแผ่น Nitrocellulose ไปบ่มกับซีรัมของหนูที่อยู่บนแผ่น Parafilm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- นำแผ่น Nitrocellulose ที่มีโปรตีนจากซีรัมคนไปแช่ในสารละลาย Blocking solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- นำแผ่น Nitrocellulose มาล้างด้วย TBST buffer 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- แช่แผ่น Nitrocellulose ในสารละลายเจือจาง 1:500 ของ Goat anti-mouse IgG linked with alkaline phosphatase ใน TBST buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- ล้างแผ่น Nitrocellulose ด้วย TBST buffer และ TBS buffer อย่างละ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- นำแผ่น Nitrocellulose ไปแช่ใน Substrate buffer pH 9.5 2 ครั้งๆ ละ 30 วินาที
- แช่แผ่น Nitrocellulose ในสารละลาย AP conjugated substrate kit (Amersham®) จนกระทั่งสังเกตเห็นแถบโปรตีนปรากฏขึ้น แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

3.3.3 การทำบริสุทธิ์ Anti-human IgG

ก่อนติดฉลาก Anti-human IgG กับเอนไซม์ Alkaline phosphatase ต้องทำบริสุทธิ์ Anti-human IgG (จากซีรัมหนู) ก่อน ซึ่งทำเหมือนกับข้อ 3.3.2 ขั้นตอน (1) ที่ใช้ Protein G Sepharose beads

3.3.4 การติดฉลาก Anti-human IgG กับเอนไซม์ Alkaline phosphatase

นำ Anti-human IgG ที่ทำบริสุทธิ์แล้วจากข้อ 3.3.3 ปริมาณ 0.05 mg ใสลงไปใน HEPES buffer ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับปริมาตรต้องการเตรียม แล้วเติม 1.5 mg Alkaline phosphatase ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Glutaraldehyde ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% (v/v) แล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปเก็บที่ 4°C

3.3.5 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) และความไว (Sensitivity) ของ Anti-human IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase โดยใช้เทคนิค Dot blotting

- นำเลือดคน, ปลาทับทิม, ปลานิล, แพะ, แกะ, วัว, กระจ่าง, กบ, หมู, ไก่, เป็ด, ห่าน, สุนัข, นก, ปลาไหล, ปลาดุก และแมว เตรียมเลือดชนิดต่างๆ ให้มีปริมาณโปรตีน 0.64 μg จากนั้นเจือจางให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 0.32, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 และ 0.005 μg ตามลำดับ
- หยดเลือดที่มีปริมาณต่างๆ กัน ลงบนแผ่น Nitrocellulose ขนาด 1x7 cm โดยเว้นระยะห่างจุดละ 0.8 mm
- ทิ้งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง
- นำแผ่น Nitrocellulose ไปแช่ใน Blocking solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องโยก
- นำแผ่น Nitrocellulose ไปแช่ในสารละลายเจือจาง 1:10 ของ Anti-human IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase (จากข้อ 3.3.4) กับ TBST buffer อัตราส่วน 1:10 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ล้างแผ่น Nitrocellulose ด้วย TBST buffer และ TBS buffer อย่างละ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- นำแผ่น Nitrocellulose ไปแช่ใน Substrate buffer pH 9.5 2 ครั้งๆ ละ 30 วินาที
- แช่แผ่น Nitrocellulose ในสารละลาย AP conjugated substrate kit (Amersham®) จนกระทั่งสังเกตเห็นแถบโปรตีนปรากฏขึ้น แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

3.3.6 การสกัดดีเอ็นเอ

(1) เลือด

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดจะใช้ Illutra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit ดังนี้

- ปิเปิดตัวอย่างเลือดปริมาตร 10 μl ใส่ใน Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
- เติมสารละลาย PBS buffer ปริมาตร 50 μl ลงไป ผสมให้เข้ากัน
- เติม 50 μl Lysis buffer type 1 และ 10 μl Proteinase K
- ผสมให้เข้ากันโดยการ Vortex เป็นเวลา 15 นาที
- บ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g เป็นเวลา 10 วินาที
- เติม 10 μl RNaseA ลงไป ผสมให้เข้ากัน
- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

- เติม Lysis buffer type 4 ปริมาตร 500 μ l ลงไป ผสมให้เข้ากันโดยนำไป Vortex เป็นเวลา 15 วินาที

- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- ปิเปตสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน Mini column
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที ที่งสารละลายที่ออกจาก

Column

- เติม Lysis buffer type 4 ปริมาตร 500 μ l ลงใน Mini column
- จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000g เป็นเวลา 1 นาที ที่งสารละลายที่ออก

จาก Column

- เติม 500 μ l Wash buffer type 6 ลงใน column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 3 นาที ที่งสารละลายที่ออกจาก Column

- ย้าย Mini column ไปใส่ใน DNase-free microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- เติม 30 μ l Pre-warmed (70°C) Elution buffer type 5 ลงไปใน Mini

column แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที

- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที ส่วนใสที่ออกมาจากคอลัมน์คือสารละลายดีเอ็นเอ ซึ่งจะเก็บไว้ที่ -20°C

(2) เส้นผม

- นำตัวอย่างเส้นผมที่มีรากผมใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- เติม PBS buffer ปริมาตร 1 ml
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 16,000 g เป็นเวลา 2 นาที
- ดูดส่วน Supernatant ออก แล้วเติม 50 μ l PBS buffer ผสมให้เข้ากัน
- เติม 50 μ l Lysis buffer type 1 และ 10 μ l Proteinase K แล้วผสมให้เข้ากัน

โดยการ Vortex เป็นเวลา 15 วินาที

- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g เป็นเวลา 10 วินาที
- เติม 10 μ l RNase A ผสมให้เข้ากัน
- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
- เติม 500 μ l Lysis buffer type 4 แล้วผสมโดยการ Vortex เป็นเวลา

15 วินาที

- นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

- คูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน Mini column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ออกจาก Column
- เติม 500 μ l Lysis buffer type 4 แล้วผสมโดยการ Vortex เป็นเวลา 15 วินาที
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000g เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ออกจาก Column
- เติม 500 μ l Wash buffer type 6 ลงไปใน Mini column
- นำ Mini column ไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 3 นาที เพื่อกำจัดสารละลายในคอลัมน์
- ย้าย Mini column ไปใส่ใน DNase-free microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml จากนั้นเติม 30 μ l Pre-warmed (70°C) Elution buffer type 5 ลงไปในคอลัมน์
- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที และเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ออกมาจากคอลัมน์ไว้ที่ -20°C

(3) น้ำลาย

- นำตัวอย่างน้ำลาย 2 μ l มาใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- เติมสารละลาย 50 μ l PBS buffer
- เติม 50 μ l Lysis buffer type 1 และ 10 μ l Proteinase K แล้วผสมให้เข้ากันโดยการ Vortex เป็นเวลา 15 นาที
- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g เป็นเวลา 10 วินาที
- เติม 10 μ l RNase A ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
- เติม 500 μ l Lysis buffer type 4 แล้ว Vortex เป็นเวลา 15 วินาที
- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- คูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน Mini column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ออกจาก Column
- เติม 500 μ l Lysis buffer type 4
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000g เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ออกจาก Column

- เติม 500 μ l Wash buffer type 6 ลงไปในคอลัมน์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 3 นาที เพื่อกำจัดสารละลายในคอลัมน์
- ย้าย Mini column ไปใส่ใน DNase-free microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml จากนั้นเติม 30 μ l Pre-warmed (70°C) Elution buffer type 5 ลงไปในคอลัมน์
- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที และเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ออกมาจากคอลัมน์ไว้ที่ -20°C

3.3.7 การวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

- ชั่ง Agarose 0.16 g ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 150 ml
- เติม TAE buffer ปริมาตร 20 ml
- นำ Agarose ไปทำให้ละลายด้วย Microwave
- เทสารละลายทั้งหมดลงในถาด (Tray) แล้ววางหวี (Comb) ทิ้งเจลไว้ให้แข็งตัว ประมาณ 45 นาที
- ดึง Comb ออก แล้วนำเจลไปวางในเครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอ เท TAE buffer ลงใน Chamber จนท่วมเจล
- ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 μ l ผสมกับ Loading dye 2 μ l
- ปิเปตสารละลายผสมลงในช่องใส่สารตัวอย่าง โดยใส่ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda HindIII) ปริมาตร 3 μ l ลงในช่องใส่สารตัวอย่างช่องแรก
- ต่อขั้ว Electrode ของ Chamber เข้ากับ Power supply โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ 75 V เป็นเวลา 40 นาที
- นำเจลที่ได้ไปย้อมสีด้วย Ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที
- นำแผ่นเจลไปวางบนเครื่อง UV transilluminator เพื่อดูแถบดีเอ็นเอ จากนั้นบันทึกภาพ

3.3.8 การหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง STR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การทดลองนี้จะใช้เทคนิค PCR วิเคราะห์หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวน 10 ตำแหน่ง ได้แก่ D8S1179, D5S818, D7S820, TPOX, D3S1358, D13S317, vWA, TH01, CSF1PO และ D16S539 โดยใช้ Simplex PCR ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งดังนี้ แซ่หลอดสำหรับทำ PCR ขนาด 200 μ l ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในน้ำแข็ง จากนั้นเตรียมสารละลายปริมาตรรวม 15 μ l สำหรับแต่ละปฏิกิริยา โดยเติมส่วนประกอบดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของสารผสมสำหรับทำ PCR ของ STR แต่ละตำแหน่ง

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
ดีเอ็นเอตัวอย่าง	3.0	1 ng
Go Taq® Green Master Mix	7.5	1X
STR primer (Forward)	0.6	0.4 μ mol
STR primer (Reverse)	0.6	0.4 μ mol
Deionised water	3.3	

* ลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ทำ PCR แต่ละตำแหน่งดูในภาคผนวก ง

ผสมส่วนประกอบให้เข้ากันโดยเคาะเบาๆ ที่ก้นหลอด จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 15,000 rpm เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ของเหลวรวมที่ก้นหลอด จากนั้นนำหลอดไปใส่ในเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมของเครื่อง สำหรับการทำ PCR ตำแหน่ง D8S1179, D5S818, D7S820, TPOX, D3S1358, D13S317, TH01, CSF1PO และ D16S539 ดังนี้

Initial denaturation	94°C	5 นาที	} 40 Cycles
Denaturation	94°C	1 นาที	
Annealing	58°C	1 นาที	
Extension	72°C	1 นาที	
Final extension	72°C	5 นาที	

สำหรับการทำ PCR ที่ตำแหน่ง vWA จะตั้งโปรแกรมของเครื่องดังนี้

Initial denaturation	94°C	5 นาที	} 40 Cycles
Denaturation	94°C	1 นาที	
Annealing	50°C	1 นาที	
Extension	72°C	1 นาที	
Final extension	72°C	5 นาที	

เมื่อสิ้นสุดการทำ PCR จะวิเคราะห์ผลผลิตของ PCR (PCR product) โดยเทคนิค

SDS-PAGE

3.3.9 การวิเคราะห์ขนาดของ STR 10 ตำแหน่ง โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

- เตรียมเจลพอลิอะคริลามิไนด์เหมือนข้อ 3.3.2 (2) แต่ใช้ 8% Polyacrylamide gel
- หลังจากใส่อุปกรณ์ลงใน Chamber และ TBE buffer แล้วจะทำการ Pre-run

โดยใช้กระแสไฟฟ้า 120V เป็นเวลา 30 นาที

- เตรียมผลผลิต PCR (จากข้อ 3.3.7) โดยผลผลิต PCR 15 µl แล้วเติม 5 µl

Denate dye ผสมให้เข้ากัน

- ปิเปตสารละลายผสม 10 µl แล้วไหลตกลงในช่องใส่สารตัวอย่าง
- ต่อขั้ว Electrode ของ Chamber เข้ากับ Power supply โดยใช้ด้วยกระแส

ศักย์ไฟฟ้าคงที่ 120V จนกระทั่งสีของตัวอย่างเคลื่อนที่ที่สุดแผ่นเจล

- นำเจลที่ได้ไปย้อมสีด้วย Ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาทีนำแผ่นเจลไปวาง

บนเครื่อง UV transilluminator เพื่อดูแถบดีเอ็นเอ จากนั้นบันทึกภาพ

3.3.10 การหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างผู้ต้องสงสัยและตัวอย่างเลือด เส้นผม และ น้ำลายจากสถานที่เกิดเหตุโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง STR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการวิเคราะห์ขนาดของ STR 10 ตำแหน่ง โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

การทดลองนี้จะใช้เทคนิค PCR วิเคราะห์หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างผู้ต้องสงสัยและตัวอย่างเลือด เส้นผม และน้ำลายจากสถานที่เกิดเหตุจำนวน 10 ตำแหน่ง ได้แก่ D8S1179, D5S818, D7S820, TPOX, D3S1358, D13S317, vWA, TH01, CSF1PO และ D16S539 เพื่อเป็นการยืนยันการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลว่าสามารถนำวิธีการนี้สามารถนำไปตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้ โดยสมมุติให้ตัวอย่างจากอาสาสมัครทั้ง 5 คน เป็นผู้ต้องสงสัย และตัวอย่างเลือด เส้นผม และน้ำลายที่ได้จากสถานที่เกิดเหตุ ซึ่งขั้นตอนการวิเคราะห์เหมือนกับ 3.7.7 และ 3.3.8