บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 อุปกรณ์

3.1.1.1 กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มเจาะเลือด

3.1.1.2 Filter ขนาด 0.45 ไมครอน

3.1.1.3 Microcentrifuge tube

3.1.1.4 Pasteur pipette

3.1.1.5 96 well Microtiter plate U shape

3.1.1.6 หลอดฝาเกลียว (Test tube)

3.1.17 ก้านสำลี

3.1.1.8 ขวดแก้วรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)

3.1.1.9 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

3.1.1.10 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)

3.1.1.11 กระดาษวัด pH

3.1.1.12 PCR tube 0.2 ml

3.1.1.13 Cuvette

3.1.1.14 แผ่นสไลด์

3.1.1.15 แผ่นกระดานพลาสติก

3.1.1.16 ขวด Duran

3.1.1.17 Multi channel pipette

3.1.1.18 กรวยกรอง

3.1.1.19 กระบอกตวง (Cylinder)

3.1.1.20 ทิป (Tip)

3.1.1.22 ถุงมือยาง

3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.2.1 ไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge) (Eppendorf, Germany)

3.1.2.2 ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (SANYO, U.S.A)

3.1.2.3 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator)(DAIKISCIENCES, Korea)

3.1.2.4 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, UK.)

3.1.2.5 Thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, U.S.A)

3.1.2.6 เครื่องผสมสาร (vortex)

3.1.2.7 Horizontal gel electrophoresis apparatus (Bio-Rad Laboratories, U.S.A)

3.1.2.8 Gel documentation (UVItec, UK.)

3.1.2.9 High speed refrigerated centrifuge

3.1.2.10 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

3.1.2.11 ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (SANYO, U.S.A.)

3.1.2.12 ELISA reader (Biotek Instruments, U.S.A.)

3.1.2.13 Spectrophotometer (SUNNY, China)

3.1.2.14 Real – time PCR detector (BIORAD Laboratory, U.S.A)

3.1.2.15 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) (HIRAYAMA, Japan)

3.1.2.16 เครื่องชั่ง (analytical balance) (Sartorius, Germany)

3.1.2.17 Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad Laboratories, U.S.A)

3.1.2.18 PLM-91 Heater Block Temperature Control (PLm Industry, Thailand)

3.1.3 สารเคมี

3.1.3.1 Mycoplasma broth base (Becton, Dickinson and Company, U.S.A)

3.1.3.2 Dextrose (OXOID, England)

3.1.3.3 L- Cystein Hydrochloride anhydrous (SIGMA, U.S.A)

3.1.3.4 Thallium (I) Acetate (SIGMA, U.S.A)

3.1.3.5 Phenol Red (SIGMA, U.S.A)

3.1.3.6 β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide, Reduce Disodium Salt Hydrate (β-NADH) (SIGMA, U.S.A)

3.1.3.7 Penicillin G Potassium salt (SIGMA, U.S.A)

3.1.3.8 Swine serum (Invitrogen, U.S.A)

3.1.3.9 Agar (bacteriological grade) (OXOID, England)

3.1.3.10 Fluid Thioglycolate medium (OXOID, England)

3.1.3.11 ชุดย้อมสี Gram's stain (CLINAG, Thailand)

3.1.3.12 ชุดย้อมสี Giemsa stain (MERCK, Germany)

3.1.3.13 Reagent kit for protein assay (Quick start™ Bradford, Bio-Rad

Laboratories, U.S.A.)

3.1.3.14 Crystal violet (MERCK, Germany)

3.1.3.15 MG antigen commercial kit (Intervet Shering-Plough Animal Health, Holland)

3.1.3.16 DNA Extraction kit (DNA Technology Laboratory, BIOTEC, Thailand)

3.1.3.17 Primer MG pvpA1F/R (SIGMA-ALDRISH, Singapore)

3.1.3.18 Primer mgc2 F/R (SIGMA-ALDRISH, Singapore)

3.1.3.19 Primer MS ((SIGMA-ALDRISH, Singapore)

3.1.3.20 dNTPs (Bioline, UK.)

3.1.3.21 Taq polymerase (Fermentas, U.S.A)

3.1.3.22 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen, U.S.A)

3.1.3.23 Agarose gel for electrophoresis (AMRESCO, U.S.A)

3.1.3.24 Ethidium Bromide (AMRESCO, U.S.A)

3.1.3.25 iQ SYBR® Green supermix (Bio-Rad Laboratories, U.S.A)

3.1.3.26 Wizard® SV gel and PCR Clean - Up System (Promega corporation, U.S.A)

3.1.3.27 Restriction enzyme *Acc*I (Fermentas, U.S.A.)

3.1.3.28 Restriction enzyme *Scr*FI (Fermentas, U.S.A.)

3.1.3.29 Tris base (AMRESCO, U.S.A.)

3.1.3.30 Boric acid (AMRESCO, U.S.A.)

3.1.3.31 Ethylene diamine tetra acitic acid (EDTA Di-sodium salt) (APS Ajax Finechem, Australia

3.1.3.32 NaOH (MERCK, Germany)

3.1.3.33 MG ELISA commercial kit (Synbiotics Corporation, U.S.A.)

3.1.3.34 MS Positive serum (ELISA commercial kit) (Synbiotics Corporation, U.S.A.)

3.1.3.35 IBV Positive serum (ELISA commercial kit) (Synbiotics Corporation, U.S.A.)

3.1.3.36 IBD Positive serum (ELISA commercial kit) (Synbiotics Corporation, U.S.A.)

3.1.3.37 Reo Positive serum (ELISA commercial kit) (Synbiotics Corporation, U.S.A.)

3.1.3.38 ILTV Positive serum (ELISA commercial kit) (Synbiotics Corporation, U.S.A.)

3.1.3.39 PM Positive serum (ELISA commercial kit) (Synbiotics Corporation, U.S.A.)

3.1.3.40 Bovine Serum Albumin (SIGMA, U.S.A)

3.1.3.41 Coat anti -Chicken IgG (H+L) horseradish peroxidase (Synbiotics Corporation, Canada)

3.1.3.42 ABTS-Hydrogen Peroxide (ELISA commercial kit) (Synbiotics Corporation, U.S.A)

3.1.3.43 High binding capacity ELISA plate (SPL life science, Korea)

3.1.3.44 Tween-20 (BDH, England)

3.1.3.45 Phosphoric acid (J.T. Baker, U.S.A.)

3.1.3.46 Carbonate – Bicarbonate Buffer (SIGMA, U.S.A.)

3.1.3.47 NaCl (APS Ajax finechem, Australia)

3.1.3.48 KCl (APS Ajax finechem, Australia)

3.1.3.49 Na_2HPO_4 (AP S Ajax finechem, Australia)

3.1.3.50 KH_2PO_4 (APS Ajax finechem, Australia)

3.1.3.51 Coomassie® Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

3.1.3.52 Deionized distilled water

3.1.3.53 2-Mercaptoehanol (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

3.1.3.54 Acrylamide bis (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

3.1.3.55 TEMED (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

3.1.3.56 Acetic acid (MERCK, Germany)

3.1.3.57 Hydrochloric acid (J.T. Baker, U.S.A.)

3.1.3.58 Ethanol (Union chemical and equipment, Thailand)

3.1.3.59 Glycine (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

3.1.3.60 Sodium Dodecyl sulfate (SDS) (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

3.1.3.61 Bromphenol Blue (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

3.1.3.62 Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare Bio-Science, Sweden)

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างโดยการรวบรวมซีรัมจากฟาร์ม

3.2.1.1 รวบรวมซีรัมไก่ ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ MG ด้วยวิธี SPA ที่ผลิตเชิงพาณิชย์ จำนวน 10 ฝูง ฝูงละ 15 ตัวอย่าง

3.2.1.2 รวบรวมซีรัมจากไก่เนื้อ ที่ไม่ทำวัคซีน MG จำนวน 10 ฝูง ฝูงละ 15 ตัวอย่าง

3.2.1.3 เตรียมซีรัม ควบคุมผลบวก โดยการเจาะเลือดไก่ที่ให้วัคซีน MG-F strain เชื้อเป็น และปั่นแยกซีรั่มไว้ นำซีรัมไปทดสอบ SPA กับ MG antigen ที่ผลิตเชิงพาณิชย์ (Intervet Shering-Plough Animal Health, Netherlands) ใช้ซีรัมที่เกิดการตกตะกอนกับ MG antigen ที่ผลิตเชิงพาณิชย์ เป็นซีรัมควบคุมผลบวก

3.2.1.4 เตรียมซีรัมควบคุมผลลบ โดยการเจาะเลือดไก่ ที่ไม่ให้วัคซีน MG และปั่นแยกซีรัมไว้ นำซีรัมไปทดสอบ SPA กับ MG antigen ที่ผลิตเชิงพาณิชย์ ใช้ซีรัมที่ไม่เกิดการตกตะกอนกับ MG antigen ที่ผลิตเชิงพาณิชย์ เป็นซีรัมควบคุมผลลบ

3.2.2 การแยกเชื้อ MG สายพันธุ์ท้องถิ่น

3.2.2.1 สุ่มเก็บตัวอย่าง swab หลอดลม จากไก่เนื้อในฟาร์มที่มีอาการของโรค CRD (Chronic Respiratory Disease) และไม่ได้ทำวัคซีน MG จำนวน 4 ฟาร์ม ฟาร์มละ 5 โรงเรือน โรงเรือนละ 15 ตัว รวมทั้งสิ้น 300 ตัวอย่าง จุ่ม swab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycoplasma broth (Frey's medium) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 3 ml แล้วทิ้งไม้พันสำลี และนำไปบ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีเหลือง ใช้ปิเปตต์ถ่ายเชื้อลงใน Mycoplasma agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 วัน ส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลมมีจุดนูนตรงกลางเหมือนไข่ดาว มาพิสูจน์เชื้อ MG ด้วยวิธี PCR โดยการใช้

primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ MG และตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ MS ด้วยวิธี PCR โดยการใช้ Primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ MS

ยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ MG ที่แยกได้ ว่าเป็นสายพันธุ์ในท้องถิ่น โดยการเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ MG สายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกได้ สายพันธุ์ F สายพันธุ์ 6/85 สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ ts -11 ด้วยวิธี PCR-RFLP

3.2.2.2 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* โดยวิธี PCR

สกัด DNA จาก MG สายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกได้ สายพันธุ์ S6 สายพันธุ์ F สายพันธุ์ 6/85 และ สายพันธุ์ ts -11 ด้วยชุดสกัด DNA Trap II (DNA Technology Laboratory, BIOTEC, Thailand)

เตรียมสารเคมีเพื่อทำปฏิกิริยา PCR (ต่อหนึ่งสายพันธุ์) ในหลอด 0.2 ml tube ดังตารางที่ 3 โดยใช้ Primer ที่จำเพาะต่อบริเวณ Phase variable protein (PvpA) (Liu et al., 2001)

Primer pvpA1F: 5'gCC AMT CCA ACT CAA CAA gCT gA 3'

Primer pvpA2R: 5'ggA CgT SgT CCT ggC Tgg TTA gC3'

ตารางที่ 3. ส่วนประกอบสารเคมีในปฏิกิริยา PCR

สารเคมี	**ความเข้มข้นสุดท้าย**	**ปริมาตร (ul)**
Nucleus free water	-	11.15
10X PCR buffer (Fermentas , U.S.A)	1X	2.00
25mM MgCl2 (Fermentas , U.S.A)	1.5mM	1.20
10mM dNTPs (Fermentas , U.S.A)	0.2	0.40
20 uM Primer pvpA1F(SIGMA-ALDRISH, Singapore)	1.0	1.00
20 uM Primer pvpA2R(SIGMA-ALDRISH, Singapore)	1.0	1.00
5U/ul recombinant Taq polymerase (Fermentas , U.S.A)	1.25U	0.25
DNA Template	-	3.00
ปริมาตรสุดท้าย		20.00

นำหลอดทดลองที่เตรียมไว้ เข้าเครื่อง Thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ดังนี้

94 องศาเซลเซียส	3.00 นาที	
94 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	40 รอบ
55 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	
72 องศาเซลเซียส	1.00 นาที	
72 องศาเซลเซียส	10.00 นาที	
4 องศาเซลเซียส	α	

แยกขนาด PCR product ด้วย gel electrophoresis ด้วย 1.0% agarose gel in 0.5X TBE buffer กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ระยะเวลา 40 นาที แช่ agarose gel ในสารละลาย ethidium bromide 20 นาที อ่านผล และบันทึกภาพภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation (UVItec,UK)

วิเคราะห์ผล

3.2.2.3 การทำปฏิกิริยา RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

เทคนิค RFLP เป็นวิธีที่สามารถใช้ในการจัดจำแนกความแตกต่างของ *M. gallisepticum* สายพันธุ์ต่างๆได้โดยการพิจารณาจากขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Acc*I (Fermentas, U.S.A.) มีบริเวณตัดจำเพาะดังนี้

5'...G T↓C A T
                G A C...3'

3'...C A G C T G...5'
      T A↑

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *ScrF*I (Fermentas, U.S.A.) มีบริเวณตัดจำเพาะดังนี้

5'...C C↓N G G ...3'

3'...G G N↑C C ...5'

ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Acc*I (Fermentas, U.S.A)

1.) นำ PCR product จากข้อ 3.2.2.2 ทำการ purified โดยใช้สารเคมีและวิธีการตามชุดทดสอบ Wizard® SV gel and PCR Clean - Up System (Promega corporation, U.S.A)

2.) นำ PCR product ที่ผ่านการ purified ทำปฏิกิริยา RFLP กับเอนไซม์ตัดจำเพาะ AccI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาดังตารางที่ 4.

ตารางที่ 4. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา RFLP

สารเคมี	**ความเข้มข้น**	**ปริมาตร** (µl)
Nucleus free water	-	13.0
10X buffer B	1X	2.0
AccI Restriction Enzyme	10U	1.0
PCR product	-	4.0
Final volume		20.0

ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ScrF*I (Fermentas, U.S.A)

1.) นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่ผ่านการ purified ทำปฏิกิริยา RFLP กับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ScrF*I ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมีส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Acc*I

2.) ตรวจสอบผล RFLP ผ่าน 3.0% agarose ใน 0.5X TBE กระแสไฟ 100 โวลต์ เวลา 40 นาที แช่ gel ในสารละลาย ethidium bromide เวลา 20 นาที แล้วอ่านผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation (UVItec, UK.)

3.2.3. การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ MG

นำเชื้อ MG ทั้ง 3 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์ F และสายพันธุ์ S6) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Frey's medium ปริมาตร 3 ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ถ่ายเชื้อ MG แต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 1 ml จาก Frey' medium 3 ml ที่บ่มแล้วลงใน Frey's medium 9 ml หลอดใหม่ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ถ่ายเชื้อ MG แต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 10 ml จาก Frey' medium 10 ml ที่บ่มแล้วลงใน Frey's medium 90 ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส แบบเขย่า เก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycoplasma agar (ภาคผนวก ก) และวัด pH ที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120 ชั่วโมง

3.2.4. การเตรียมแอนติเจน

การเตรียมแอนติเจนสายพันธุ์ท้องถิ่น

คัดเลือกโคโลนีของเชื้อ MG ที่จำแนกเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่น มาเพิ่มปริมาณเชื้อโดยถ่ายเชื้อลงใน Mycoplasma broth base บ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 -3 วัน จนอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีเหลือง นำเชื้อใน Mycoplasma broth (Frey's medium) ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่อง super speed centrifuge ความเร็ว 14,000 ×g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทส่วนใสหลังการปั่นเหวี่ยงทิ้ง และผสมตะกอนเชื้อใน 0.85% NaCl แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 ×g เวลา 30 นาที จำนวน 2 รอบ

เตรียมแอนติเจน โดยละลายตะกอนที่ได้ด้วย 0.85% NaCl (อัตราส่วน 0.85% NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร/อาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น 1 ลิตร) นำสารละลายแอนติเจน วัดความเข้มข้นโปรตีนโดยใช้วิธีของ Bradford ใช้ชุดวัดโปรตีน Quick start™ (Bio-Rad Laboratories, U.S.A)

การเตรียมแอนติเจนสายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ F

เลี้ยงเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* สายพันธุ์ S6 (Charles River Laboratories, U.S.A) และสายพันธุ์ F ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycoplasma broth (Frey's medium) บ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 -3 วัน จนอาหารเลี้ยงเชื้อ เปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีเหลือง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง และเตรียมแอนติเจนเช่นเดียวกับการเตรียมแอนติเจนสายพันธุ์ในท้องถิ่น

การตรวจสอบคุณภาพของแอนติเจน (วาสนา และคณะ, 2537)

Contamination test โดยการทำ direct smear แอนติเจนบนสไลด์ 2 แผ่น แล้วย้อมสี Gram's stain และ Giemsa stain อย่างละ 1 แผ่น ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 × 100 อย่างน้อย 20 field ต้องไม่พบแบคทีเรียอื่นปนเปื้อน

Sterility test ใส่แอนติเจน 0.1 ml ลงใน Fluid Thioglycolate medium (ภาคผนวก ก) 10 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลา 3-5 วัน เพื่อทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

Character test ผสมแอนติเจนความเข้มข้น 100 μg/ml กับสี crystal violet ความเข้มข้น 1% ให้เข้ากัน เปรียบเทียบลักษณะของแอนติเจนที่เตรียมได้ กับแอนติเจนที่ผลิตเชิงพาณิชย์ในด้านความขุ่น สี ความเป็นเนื้อเดียวกัน การเกิด autoagglutination โดยแอนติเจนที่เตรียมได้ไม่ควรเกิด autoagglutination ควรมีลักษณะใส และมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

Specificity test นำแอนติเจนที่ผสมสีแล้ว ทดสอบกับซีรัมควบคุมผลบวก MG และ MS ซึ่งมาพร้อมชุดทดสอบ ELISA (Synbiotics Corporation, U.S.A.) ที่ผลิตเชิงพาณิชย์ด้วยวิธี SPA ซึ่งแอนติเจนที่เตรียมได้ต้องให้ผลการทดสอบเป็นดังนี้ คือ ให้ผลบวกต่อซีรัมควบคุมผลบวก MG และให้ผลลบต่อซีรัมควบคุมผลบวก MS

Potency test ผสม crystal violet (SIGMA, U.S.A) ความเข้มข้น 1% และแอนติเจนทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ปรับปริมาณโปรตีนให้ได้ 100 μg/ml อัตราส่วน 1:100 ทดสอบ SPA กับซีรัมควบคุม

ผลบวก และซีรัมควบคุมผลลบที่รวบรวมไว้ในข้อ 3.2.1.3 และ 3.2.1.4 อย่างละ 10 ตัวอย่าง ซึ่งแอนติเจนที่เตรียมไว้ต้องให้ผลบวกกับซีรั่มควบคุมผลบวก ทั้ง 10 ตัวอย่าง และให้ผลลบต่อซีรัมควบคุมผลลบ ทั้ง 10 ตัวอย่าง

3.2.5. การทดสอบด้วยวิธี SPA

3.2.5.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับทดสอบ SPA

แบ่งแอนติเจนจากข้อ 3 เป็น 3 ชุด ชุดที่ 1 คือ แอนติเจนสายพันธุ์ท้องถิ่น ชุดที่ 2 คือแอนติเจนสายพันธุ์ S6 ชุดที่ 3 คือ สายพันธุ์ F แล้วนำแอนติเจนแต่ละชุดไปเตรียมแต่ละชุดให้มีความเข้มข้น 100 µg/ml กับสี Crystal violet (SIGMA, U.S.A) ความเข้มข้น 1% ให้เข้ากัน

3.2.5.2 การทดสอบ SPA

นำตัวอย่างซีรัมในฟาร์ม ที่รวบรวมไว้ในข้อ 3.2.1.1 และ 3.2.1.2. ชุดเดียวกันมาทดสอบกับแอนติเจน 4 ชุด ดังนี้

- ทดสอบด้วยแอนติเจนสายพันธุ์ในท้องถิ่น
- ทดสอบด้วยแอนติเจนสายพันธุ์ S6
- ทดสอบด้วยแอนติเจนสายพันธุ์ F
- ทดสอบด้วยแอนติเจนที่ผลิตเชิงพาณิชย์

เปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างการใช้แอนติเจนสายพันธุ์ท้องถิ่น และที่ผลิตเชิงพาณิชย์

เปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างการใช้แอนติเจนสายพันธุ์ S6 และที่ผลิตเชิงพาณิชย์

เปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างการใช้แอนติเจนสายพันธุ์ F และที่ผลิตเชิงพาณิชย์

เปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างการใช้แอนติเจนสายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ F

สรุป และวิเคราะห์ผลการทดสอบ

3.2.6. **การทดสอบด้วยวิธี** ELISA (indirect method) (Anonymous, 2005b; C)

การเตรียมเพลท ELISA

เตรียมสารเคมี สำหรับทดสอบ วิธี ELISA ดังนี้ (ภาคผนวก ข)

- 0.05 M Carbonates-bicarbonate (pH 9.6)

- 0.1 M PBS (pH 7.5)

-Blocking Solution (BSA 1%)

- Washing buffer (pH 9.6)

- Distilled Water 1000 ml

- Stop solution

- 1% Sodium Lauryl sulphate ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$

แบ่งแอนติเจนเป็น 3 ชุด ชุดที่ 1 คือแอนติเจนสายพันธุ์ท้องถิ่น ชุดที่ 2 คือแอนติเจนสายพันธุ์ S6 และชุดที่ 3 คือแอนติเจนสายพันธุ์ F แล้วนำแอนติเจนแต่ละชุดไปเตรียมเพลท ELISA ตามขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมแอนติเจนใน 0.05 M carbonates-bicarbonate ให้ได้ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 µg/ml

2. เติมแอนติเจนใน ข้อ 1 ปริมาตร 100 µl/หลุม ลงใน High binding capacity ELISA plate บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 18-20 ชั่วโมง (หรือจนกระทั่งใช้งาน)

3. ล้างเพลท ด้วย washing buffer 300 µl/หลุม ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ทำซ้ำรวม 3 ครั้ง เติม Blocking Solution (BSA,SIGMA, U.S.A) ลงในเพลท ปริมาตร 300 µl ต่อหลุม และทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

3.2.6.1 การทดสอบ Checkerboard Titration (การหาความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมในการเคลือบเพลท ELISA)

ซีรัมควบคุมผลบวก (Synbiotics Corporation, U.S.A.)

ซีรัมควบคุมผลลบ (Synbiotics Corporation, U.S.A.)

เจือจางซีรัมควบคุมผลบวก ซีรัมควบคุมผลลบ อัตราส่วน 1:1000 นำเพลทที่เตรียมไว้ทั้ง 3 เพลท มาล้างด้วย washing buffer ปริมาตร 300 µl/หลุม ทิ้งไว้ 3 นาที ทำซ้ำรวม 3 ครั้ง เติมซีรัมที่เจือจางไว้ปริมาตร 100 µl/หลุม ทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 300 µl/well ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ทำซ้ำรวม 3 ครั้ง เติม conjugate (Goat anti-Chicken IgG (H+L) horseradish peroxidase, Synbiotics corporation, U.S.A.) ที่ความเจือจาง 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 ปริมาตร 100 µl /หลุม ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 300 µl/well ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ทำซ้ำรวม 3 ครั้ง เติม substrate (ABTS-Hydrogen peroxidase, Synbiotics corporation, U.S.A.) 100 µl ต่อหลุม ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติม stop solution (ภาคผนวก ข) เพื่อหยุดปฏิกิริยา ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม นำเพลทไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ด้วยเครื่อง ELISA Reader (Biotek Instruments, U.S.A.) filter 405 nm และนำค่า O.D. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอนติเจน และซีรัม แล้วเลือกความเข้มข้นของแอนติเจนที่ทำให้ซีรัมความเข้มข้นต่างๆ แยกกันได้อย่างชัดเจน และเหมาะสมเพื่อนำมาใช้เคลือบเพลท ELISA ในการทดลองต่อไป

3.2.6.2 การทดสอบความสามารถในการตรวจซ้ำได้ (Reproducibility test)

เคลือบเพลท ELISA ด้วยแอนติเจนความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาทดสอบกับตัวอย่างซีรัมควบคุมผลบวกที่เจือจางในระดับ 1: 50, 1: 100, 1: 200, 1: 400 และ 1: 800 จำนวน 3 ครั้ง แล้ววิเคราะห์ผล

3.2.6.3 การทดสอบความจำเพาะของวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้นเอง

นำเพลท ELISA ที่เตรียมเองทั้ง 3 สายพันธุ์มาทดสอบกับซีรัมควบคุมผลลบ ซีรัมควบคุมผลบวกของเชื้อ IBV, IBDV, REO, ILTV, PM, MS ซึ่งมาพร้อมชุดทดสอบ ELISA ที่ผลิตเชิงพาณิชย์ (Synbiotics corporation, U.S.A.)

3.2.6.4 การทดสอบ ELISA

นำซีรัมที่เก็บรวบรวมไว้ข้อ 3.2.1.1 และ 3.2.1.2 มาทดสอบ ELISA ดังนี้

- ทดสอบ ELISA ด้วยเพลทที่เคลือบเพลทด้วยแอนติเจนสายพันธุ์ท้องถิ่น
- ทดสอบ ELISA ด้วยเพลทที่เคลือบด้วยแอนติเจนสายพันธุ์ S6
- ทดสอบ ELISA ด้วยเพลท ELISA ที่ผลิตเชิงพาณิชย์ (Synbiotics corporation, U.S.A.)

เปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างการใช้ ELISAสายพันธุ์ท้องถิ่น และที่ผลิตเชิงพาณิชย์

เปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างการใช้ ELISAสายพันธุ์ S6 และที่ผลิตเชิงพาณิชย์

เปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างการใช้ ELISA สายพันธุ์ F และที่ผลิตเชิงพาณิชย์

เปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างการใช้ ELISA สายพันธุ์ท้องถิ่น สายพันธุ์ S6 และสายพันธุ์ F

สรุป และวิเคราะห์ผลการทดสอบ

3.2.7. **การทำ** Quantitative Real - time PCR

ใช้เชื้อ MG สายพันธุ์ S6 ทดลองทำปฏิกิริยา Real - time PCR โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีน mgc2 ที่ encode บริเวณ cytadhesin protein (Hnatow et al., 1998)

ตารางที่ 5. แสดงลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Real time PCR (Grodio et al., 2008)

Primer	Sequence	Target gene	Product size (bp)
mgc2-F	5' ggT CCT AAT CCC CAA CAA AgA AT 3'	mgc2	303
mgc2-R	5' CTT ggT Tgg TTC ATA TTA ggC ATT T 3'		

7.1 นำเชื้อ MG สายพันธุ์ S6 จากการศึกษาอัตราการเจริญที่ทราบปริมาณเชื้อตั้งต้นมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด DNA Trap II (DNA Technology Laboratory, BIOTEC, Thailand) นำดีเอ็นเอที่ได้วัด OD.ที่ความยาวคลื่น 260 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer (SUNNY, China) แล้วคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น เจือจางดีเอ็นเอ 10 เท่า แล้วนำดีเอ็นเอแต่ละความเจือจางทดลองทำปฏิกิริยา Real - time PCR

ตารางที่ 6. ส่วนประกอบสารเคมีในปฏิกิริยา Real time PCR

สารเคมี	**ความเข้มข้นสุดท้าย**	**ปริมาตร (ul)**
- Nucleus free water	-	8
- iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)	-	12.5
- 2 μM Primer mgc2-F	100 nM	1.25
- 2 μM Primer mgc2-R	100 nM	1.25
- DNA Template	-	2
ปริมาตรสุดท้าย		25.00

7.2 นำหลอดทดลองที่เตรียมไว้ เข้าเครื่อง Real - time PCR detector (Chromo4: Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	20	วินาที	
95 องศาเซลเซียส	3	วินาที	} 55 รอบ
60 องศาเซลเซียส	30	วินาที	

Melting curve 60-95 องศาเซลเซียส

3.2.8 **การวิเคราะห์โปรตีนของเชื้อ** MG **โดยวิธี** Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนของแอนติเจน MG ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) ดังนี้

3.2.8.1 นำโปรตีนที่ได้จากข้อ 4 และสารละลายโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง (Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weigh, GE Healthcare Bio-Science, Sweden) มาทำ SDS-PAGE ดังนี้ ประกบแผ่นแก้วขนาด 8.3x10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3x10.2 เซนติเมตร เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง ประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล MiniPROTEAN II (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)

3.2.8.2 เทสารละลายผสมของ separating gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เติม TEMED 5 ไมโครลิตร และ Ammonium persulfate 10 % (ภาคผนวก ข) 50 µl ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกัน แล้วรีบเทสารผสม ลงในช่องระหว่างแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตรทันทีเนื่องจาก TEMED และAmmonium persulfate ทำให้เจลแข็งตัวเร็ว หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ประมาณ 15 นาที ซับน้ำออก เทสารละลายผสม stacking gel ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

3.2.8.3 เติม TEMED 5 ไมโครลิตร และ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ 25 ไมโครลิตร ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกันแล้วรีบเทสารผสม ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือ วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัวจึงดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก) นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส เติมอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิสจนเต็ม

3.2.8.4 นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 5 ไมโครกรัมและผสมกับ 2X Laemmli buffer (ภาคผนวก ข) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยอดตัวอย่าง 45 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง และหยอดโปรตีนมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง แล้วทำอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ 200 โวลท์ เป็นเวลา 45 นาที ซึ่งสีของ Bromphenol blue เคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำแผ่นเจลออกจากแผ่นแก้ว

3.2.8.5 ย้อมสีโปรตีนด้วยสี Coomassie blue โดยนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี staining solution (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยสารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก ข) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน โดยในระหว่างการย้อมและการล้างสีมีการเขย่าเบาๆ ตลอดเวลาด้วย เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนของแอนติเจน โดยเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน