

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ มีขั้นตอนในการดำเนินงาน ดังนี้

1. ทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เบื้องต้นของเชื้อเซอร์โคไวรัส เพื่อออกแบบและพัฒนาไพรเมอร์ (primer) ในการเพิ่มจำนวน DNA ของออร์ฟทู (ORF2) ของเซอร์โคไวรัส ด้วยวิธี isothermal amplification และตรวจหา DNA ดังกล่าวด้วยวิธีไบโอฟลูออเรสเซนซ์เน้นการจับตัวของโมเลกุลกับ DNA binder โดยตรงกับ DNA products โดยใช้ตัวอย่าง DNA ที่แยกได้จากซีรัมและ/หรือตัวอย่างชิ้นเนื้อที่มีรอยโรค และเปรียบเทียบกับลำดับเบสของออร์ฟทูของเชื้อเซอร์โคไวรัสอ้างอิง โดยทำการศึกษาที่คณะสัตวแพทยศาสตร์และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อเซอร์โคไวรัสจากตัวอย่างซีรัมและ/หรือตัวอย่างชิ้นเนื้อที่มีรอยโรคที่พบในสุกรป่วยที่สงสัยในเบื้องต้นว่าติดเชื้อเซอร์โคไวรัสจากฟาร์มสุกรในเขตภาคกลางของประเทศไทย จำนวน 20 ฟาร์ม และทดสอบตรวจหา DNA ของเชื้อเซอร์โคไวรัส
3. พัฒนารูปแบบปฏิกิริยาสังเคราะห์เพิ่มปริมาณ DNA เพื่อเป็นสัญญาณ (signal) ในการตรวจสอบ และทำการออกแบบรูปแบบของปฏิกิริยาที่สอดคล้องกับการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายจากตัวอย่าง DNA โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะอย่างน้อยระบบละ 4 คู่ไพรเมอร์ จัดวางไพรเมอร์และทดสอบปฏิกิริยาในรูปและความไวของปฏิกิริยา ความเฉพาะเจาะจง ความสามารถในการทำซ้ำ ส่วนหนึ่งของไพรเมอร์นำมาใช้เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR เพื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาโคลนเข้าสู่พลาสมิดและใช้เปรียบเทียบรูปแบบการเพิ่มปริมาณ DNA
4. พัฒนาระบบการตรวจสอบบนพื้นฐานของการการเรืองแสง เนื่องจากการจับตัวระหว่าง DNA กับไบนเดอร์ (binder) ศึกษาตรวจสอบและคัดเลือกระบบเปรียบเทียบระหว่างระบบที่ใช้ ด้วยหลักการเปลี่ยนแปลงระบบพลังงาน ในรูปการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยโมเลกุลสีที่เป็นไบนเดอร์ โดยการจำลองการตรวจสอบเพื่อคัดเลือกรูปแบบการตรวจสอบที่เหมาะสม

วิธีการและรายละเอียดในการดำเนินการ

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อเซอร์โคไวรัส ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อเซอร์โคไวรัสจากฟาร์มและจากห้องปฏิบัติการในรูปของซีรัม (serum) หรือดีเอ็นเอ โดยทำการเก็บส่วนหนึ่งเพื่อใช้เป็นตัวอย่างหลักและอีกส่วนหนึ่งเพื่อศึกษารูปแบบทางพันธุกรรมเปรียบเทียบและประเมินผลการทดสอบ โดยการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างด้วย QIAmp DNA mini kit (Qiagen, USA) หรือ RBC Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC, USA) ด้วยวิธีที่ระบุในคู่มือการใช้งานชุดน้ำยา โดยใช้ serum ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเป็นตัวอย่างเริ่มต้น ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้น ถูกนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป
2. การศึกษารูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล Genbank ได้แก่ accession number FJ905468 EU450636 EU450617 HM009338 JF317583 HQ591373

HM641752 GU938303 AB462390 เป็นต้น และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีการพื้นฐาน model local multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W (Higgins, 1994) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ORF2 โดยเน้นบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแปรผัน (variation) และบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการอนุรักษ์ (conserved) และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Similarity) เพื่อเป็นพื้นฐานอ้างอิงในการออกแบบชุดไพรเมอร์ (primer) ต่อไป

3. ทำการคัดเลือกบริเวณจำเพาะ เพื่อให้เป็นมาร์คเกอร์ (marker) ในการพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะ และการออกแบบชุดไพรเมอร์นั้น ทำการคัดเลือกบริเวณภายในส่วนของ ORF2 บนพื้นฐานของสมดุระหว่างบริเวณนิวคลีโอไทด์แปรผันกับบริเวณนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ โดยหลีกเลี่ยงบริเวณแปรผันสูง (hypervariable domain) และคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคอนเซินซัส (consensus sequence) จัดทำข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบ FASTA format จากนั้นนำข้อมูลไปออกแบบชุดไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อบริเวณเป้าหมายของยีน ทั้ง 6 บริเวณ ด้วยโปรแกรม Primer Explorer V4 (Fujitsu Co., Japan) ทำการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบ ด้วยการทำ Basic local alignment search ด้วยโปรแกรม Blastn (Altschul et al., 1990) ทำการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบ จากค่า E (expected value) ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน และค่าคะแนนรวมที่ปรากฏโดยเปรียบเทียบกับคู่เทียบ ร่วมกับผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้องหลังการตรวจสอบด้วยโปรแกรม Blastn วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูลในรูปความจำเพาะ และทำการคัดเลือกไพรเมอร์จากการเปรียบเทียบ Tm ร่วมกันกับการคำนวณ Tm รวมของแม่แบบที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา

4. ทำการโคลนบริเวณของยีน ORF2 เพื่อพัฒนาเป็นดีเอ็นเอควบคุมบวก โดยการนำไพรเมอร์ที่บริเวณด้านนอกปลาย 5' และ 3' สุดของชุดไพรเมอร์ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้องค์ประกอบของปฏิกิริยาตามที่แสดงในคู่มือการใช้งานของชุด Go Taq Green Master Mix (Promega, USA) โดยใช้ปริมาณคู่ไพรเมอร์ 5 พิโคโมลต่อปฏิกิริยาและปริมาณดีเอ็นเอ 50-100 นาโนกรัม ทำการบ่มปฏิกิริยาให้ดีเอ็นเอเสียสภาพที่อุณหภูมิ 93 °C 1 นาที annealing อุณหภูมิ 45 °C 1 นาที และทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ หรือ extention ที่อุณหภูมิ 72 °C 2 นาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นบ่มปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 10 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการแยกด้วยสนามไฟฟ้า ใน TAE เจลที่มีวุ้นอะกาโรสอยู่ 1-1.5 % ในชั้นต้นดำเนินการปรับภาวะของปฏิกิริยา และดำเนินการเพิ่มปริมาณจนได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอเพียงชนิดเดียว ภายหลังตรวจสอบด้วยเทคนิคการแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า ดำเนินการโคลนชิ้นส่วนของยีนเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pGEM โดยวิธี TA cloning (Promega, USA) และถ่ายยีนเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี heat shock transformation (Sambrook et al., 1989) ตรวจสอบและคัดเลือกโคลนที่ได้และยืนยันการแทรกตัวของยีนจากความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ ampicillin ทำการคัดเลือกพลาสมิดจากการตรวจสอบการปรากฏของยีนโดยวิธี PCR และยืนยันความถูกต้องโดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี dideoxy termination ภายหลังการคัดเลือกโคลนแล้ว นำโคลนที่ได้มาเพิ่มปริมาณพลาสมิด และเตรียมพลาสมิดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี CsCl centrifugation (Sambrook et al., 1989) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการทดลองต่อไป

5. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ เซอร์โคไวรัสบนพื้นฐานของไบโอเซ็นเซอร์ ประกอบด้วย การพัฒนา 2 ส่วนได้แก่

5.1 การพัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณสัญญาณดีเอ็นเอของยีน ORF2 โดยดำเนินการพัฒนารูปแบบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม บนพื้นฐานหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการชักนำแบบ loop ที่อุณหภูมิระนาบเดียว (Loop Mediated Isothermal DNA Amplification; LAMP) (Notomi *et al.*, 2000) โดยทำปฏิกิริยาในสารละลาย ที่ประกอบด้วย 40 mM Tris pH 8.8 20 mM KCl 16mM MgSO₄ 20 mM (NH₄)₂SO₄ 0.2% Tween 20 1.6 M Betaine 2.8 mM dNTP และ 8 U. *Bst* DNA polymerase ทำการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 63⁰C 40 นาที ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบด้วยไพรเมอร์ผสม เข้มข้น 10 pmole each ของไพรเมอร์ด้านนอก (Outer primer) และ 40 pmole each ของไพรเมอร์ด้านใน (Inner primer) บ่มปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Accu Block™ (Labnet, USA) โดยไม่มีการหยุดปฏิกิริยาที่ 90⁰C และทำการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการแยกด้วยสนามไฟฟ้า ใน TAE เจลที่มีวุ้นอะกาโรสอยู่ 2.5 % ตรวจสอบระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียวจากผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอรูปขั้นบันได (ladder) ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมีขนาดเท่ากับผลคูณของขนาดดีเอ็นเอเป้าหมาย

ทำการทดสอบสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา โดยปรับอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยา และทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวมาข้างต้น ในช่วง 60-65⁰C เลือกความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ ตรวจสอบผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการแยกด้วยสนามไฟฟ้า ใน TAE เจลที่มีวุ้นอะกาโรสอยู่ 2.5 % แล้วย้อมดูแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ทำการเลือกความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ และศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยาโดยทดสอบร่วมกับสารพันธุกรรมของไวรัสที่ก่อโรคติดเชื้ออื่นๆ ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร ได้แก่ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) สายพันธุ์ China และ สายพันธุ์ EU เชื้อ Porcine Parvo Virus (PPV) เชื้อ Classical Swine Fever (CSF) เชื้อ Porcine Epidemic Diarrhea (PED) และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงสุกร ได้แก่สารพันธุกรรมของเชื้อ Newcastle Disease Virus (NDV) ในไก่ เชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) เชื้อ Infectious Hypodermal and Haematopoietic Virus (IHHNV) เชื้อ Yellow Head Virus (YHV) เชื้อ Taura Syndrome Virus (TSV) ในกุ้ง และเชื้อ Human Influenza Virus (H1N1) เป็นต้น และดำเนินการตรวจสอบยืนยันโดยเปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยวิธี PCR มาตรฐาน ที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Ouardani *et al.*, 1999)

ทำการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาโดยใช้ plasmid DNA ที่ทราบจำนวนก๊อปปี้ นำมาเจือจางเป็นระดับโดยความเข้มข้นต่างกันระดับละ 10 เท่า จากความเข้มข้นสูงสุด 10⁷ ก๊อปปี้ ถึง 1 ก๊อปปี้ตามลำดับ (Anonymous, 2003) มาเป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบระหว่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ ORF2 PCV2 S4 และ ORF2 PCV2 S4AS (Ouardani *et al.*, 1999)

สำหรับการทดสอบภาคสนามกับตัวอย่างที่ได้รวบรวมมาจากฟาร์มสุกรเป้าหมายและจากห้องปฏิบัติการหลัก จำนวน 147 ตัวอย่าง ดำเนินการตรวจสอบเปรียบเทียบโดยใช้สารพันธุกรรมจากตัวอย่าง

ร่วมกับเทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้น และดำเนินการตรวจสอบเปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยวิธี PCR ที่ใช้เป็นมาตรฐานที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Ouadani et.al., 1999) นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบ 2 ระดับ ได้แก่ ความไวของปฏิกิริยา ซึ่งคำนวณจาก จำนวนตัวอย่างที่ได้ผลบวกหารด้วยจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและตัวอย่างที่ให้ผลลบผิดพลาด (false negative) รวมกัน ตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา โดยคำนวณจากตัวอย่างที่ได้ผลลบหารด้วยจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบและตัวอย่างที่ให้ผลบวกผิดพลาด (false positive) รวมกัน

5.2 การพัฒนาระบบการตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอ ดำเนินการด้วย 2 วิธีการย่อยได้แก่ การชักนำให้เกิดสัญญาณดีเอ็นเอด้วยโมเลกุล DNA binder และการชักนำให้เกิดสัญญาณดีเอ็นเอโดยการใช้การถ่ายทอดพลังงานภายในโครงสร้างของโมเลกุล อาศัย analog DNA เป็น โพรบ (probe)

5.2.1 การชักนำให้เกิดสัญญาณดีเอ็นเอด้วยโมเลกุล DNA binder ดำเนินการตรวจสอบความเข้มข้นและสัญญาณดีเอ็นเอ เมื่อใช้ DNA binder ในรูปสารละลาย minor groove binder ที่จับตัวกับโครงสร้าง minor groove ภายในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็น double strand โดยเริ่มจากนำโมเลกุล DNA binder SYBR Green I (Sigma Aldrich, USA) มาแปรผันความเข้มข้น จากหัวเชื้อเข้มข้นในรูปความเข้มข้น 1 ต่อ 20000 ต้นแบบเจือจางสู่ความเข้มข้นต่ำลง ประเมินรูปแบบการเรืองแสงเมื่อหยดดีเอ็นเอแม่แบบจากปฏิกิริยา LAMP ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอควบคุมบวก 1 ไมโครลิตร เป็นมาตรฐานและตรวจสอบสัญญาณในรูปความเข้มของแสงที่เกิดขึ้นจากการเรือง และการรบกวนสัญญาณในรูปของ background นำเงื่อนไขที่ได้ไปตรวจสอบร่วมกับผลการทดลองในข้อ 5.1 เปรียบเทียบผลที่ได้กับผลการแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้าควบคุมกับการตรวจสอบสัญญาณการเรืองแสง

5.2.2 การใช้โมเลกุลเรืองแสงที่ติดฉลากที่ปลาย 5' และ 3' ของโมเลกุล การตรวจสอบสัญญาณดีเอ็นเอ ดำเนินการโดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมาทดสอบด้วยโมเลกุลของโพรบ (probe) ที่มีโครงสร้างประกอบด้วย analog DNA ทดแทน oligonucleotide analog DNA ที่ใช้เป็นโมเลกุลในกลุ่ม aminoethylglycyl peptide nucleic acid ที่ติดฉลากบริเวณ 5' ด้วย fluorophore FAM (Nielson and Haaima, 1997) เป็น probe และ oligonucleotide คู่สมขนาด 10 nucleotide ที่ติดฉลากปลาย 3' ด้วยโครงสร้างโมเลกุล BHQ-1 ซึ่งใช้เป็นโมเลกุลแข่งขันและเป็นตัวรับพลังงาน เป็น quencher ทำการนำดีเอ็นเอแม่แบบในระบบที่ใช้เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายมาทำปฏิกิริยา hybridization กับ probe โดยแปรผันปริมาณของ probe และ quencher เมื่อระดับปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้จากการเพิ่มปริมาณเป้าหมายดีเอ็นเอคงที่ ที่ 1 ไมโครลิตร โดยดำเนินปฏิกิริยา hybridization ด้วยสารละลาย 10 mM PBS (phosphate buffer saline) pH 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง ทดสอบสัญญาณดีเอ็นเอโดยการบันทึกการเรืองแสงของปฏิกิริยา เปรียบเทียบผลที่ได้กับผลของการแยกผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้าและการตรวจสอบสัญญาณการเรืองแสงด้วยโมเลกุล DNA binder