

วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจทาง Serology

ไวรัสตับอักเสบ บี HBsAg, anti-HBs, anti-HBc ไวรัสตับอักเสบ เอ anti-HAV IgG และไวรัสตับอักเสบ ซี anti-HCV โดยวิธี Enzyme Linked Immunoassay (EIA) โดยใช้ commercial available kit โดยการตรวจโดยวิธีมาตรฐาน และมีการประเมินความเที่ยงตรงตามมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจทาง Molecular biology

- ตรวจสอบลำดับเบสของยีน preS1, preS2 และ S ในไวรัสตับอักเสบ บี ดูการกลายพันธุ์ และ genotype
- ตรวจสอบลำดับเบสของยีน core และ NS5 ในไวรัสตับอักเสบ ซี เพื่อแยกกลุ่ม genotype

ดังมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

-ไวรัสตับอักเสบ เอ

การตรวจทาง Serology

ไวรัสตับอักเสบ เอ anti-HAV IgG โดยวิธี Enzyme Linked Immunoassay (EIA) โดยใช้ commercial available kit โดยการตรวจโดยวิธีมาตรฐาน และมีการประเมินความเที่ยงตรงตามมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ

EIA (Enzyme Immuno Assay)

การวิเคราะห์ อยู่บนหลักการของ enzyme linkage โดยใช้หลักการ sandwich คือ incubate serum, plasma ใน solid phase ที่มี antigen หรือ antibody เกาะอยู่จากนั้นใส่ enzyme conjugate peroxidase ที่มี antibody หรือ antigen link อยู่ซึ่ง conjugate นี้จะเข้าไปจับกับ antigen หรือ antibody ที่เกาะอยู่ที่ solid phase

จากนั้นจะทำการ develop สีโดยการใส่ substrate คือ O-Phenylenediamine เพื่อทำปฏิกิริยาให้เกิดสี จากนั้นจะหาไปวัดความเข้มของสีที่ optimal density (OD) ที่กำหนดค่า OD นี้จะแปรตามปริมาณของ antibody หรือ antigen ในสิ่งตรวจ

ลักษณะการตรวจ EIA แบบที่ 2 คือ เป็น competitive enzyme link Assay โดยการใส่สิ่งตรวจเช่น serum หรือ plasma ลงไปพร้อมกับ antigen หรือ antibody เพื่อแย่งกันจับ antigen หรือ antibody บน solid phase จากนั้นก็ดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกับ EIA แบบที่ 1

- ไวรัสตับอักเสบบี

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. Control

1.1 Positive control

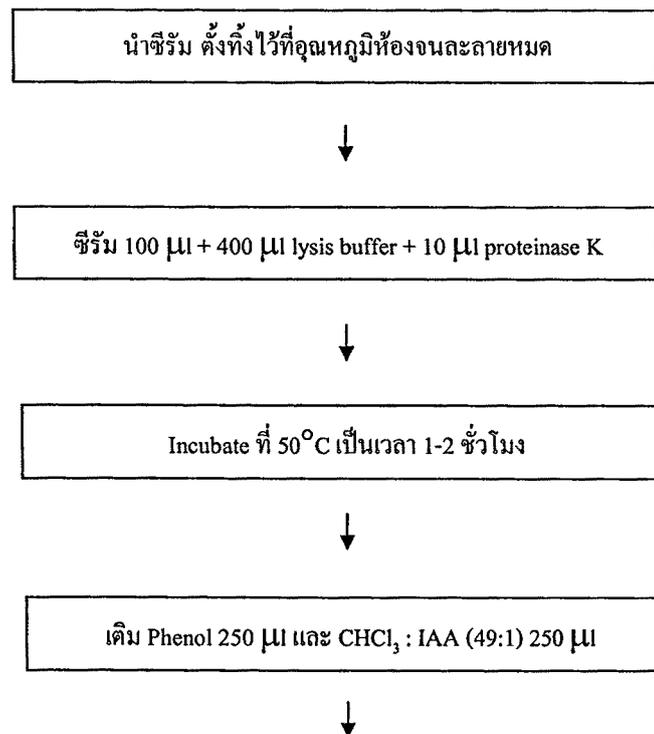
ได้ตัวอย่างจากผู้บริจาคโลหิตที่สภากาชาดไทย และตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี ด้วยวิธี PCR

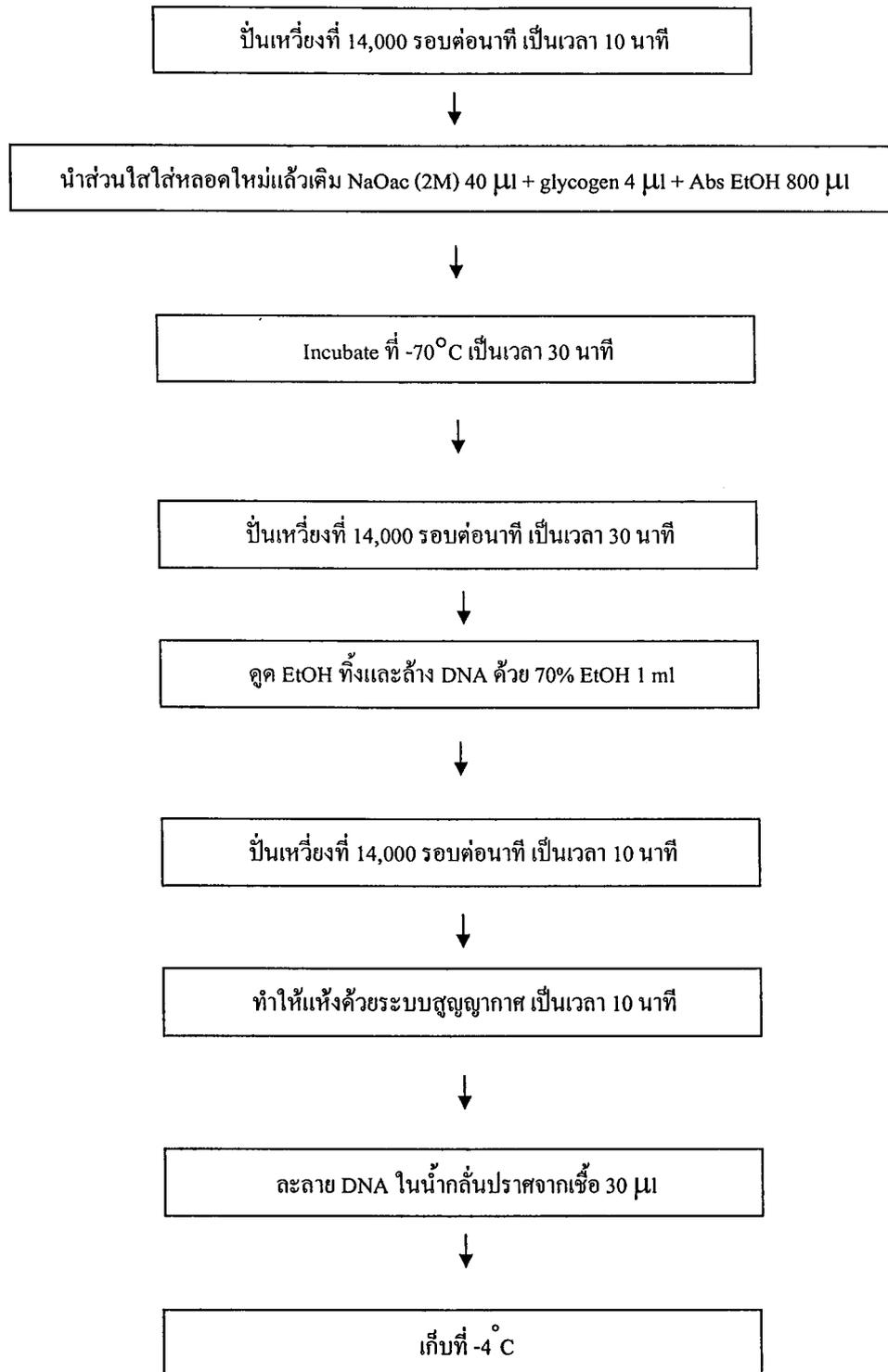
1.2 Negative control

เนื่องจาก HBV เป็น DNA ไวรัส เพราะฉะนั้น Negative control ในการศึกษาครั้งนี้ คือ น้ำที่ปราศจากเอ็นไซม์ย่อย DNA (DNase) คือ Distilled water ที่มีปริมาตรเท่ากับ DNA ที่ใช้ในการทดลอง

2. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

ใช้ซีรัมปริมาณ 100 μ l ในการสกัด DNA ด้วยวิธี phenol/chloroform ดังแสดงในแผนภูมิด้านล่าง





3. เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1, PreS2 และ S gene จนถึงบริเวณ “a” determinant

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ “a” determinant โดยวิธี PCR ใช้ primer ที่ ครอบคลุมบริเวณของ Pre-S1 และ “a” determinant

ทำการเตรียมส่วนผสมของสารเรียงตามลำดับลงใน microtube ดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของ primer ที่ใช้

Primers	ลำดับเบส	ตำแหน่ง	T _m (°C)
Pre-S1 F (forward primer)	5' TCACCATATTCTTGGGAACAAGA 3'	2,817-2,839*	64
R4 (reverse primer)	5' ATGGCACTAGTAAACTGAGCC 3'	689-668*	62

*เปรียบเทียบกับตำแหน่งบนลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ HBV accession number AB115417

ตารางที่ 2 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ HBV

สารละลาย	ปริมาตร (volume/tube)
Distilled water	12 µl
Eppendorf MasterMix (Hamburg, Germany)	10 µl
Pre-S1 F primer (10 pmol)	0.5 µl
R4 primer (10 pmol)	0.5 µl
DNA Template	2 µl
Total volume	25 µl



จากนั้นนำ microtube ที่ใส่สารละลาย ทั้งหมดใส่ในเครื่อง Eppendorf Mastercycler personal (Hamburg, Germany) โดยมีอุณหภูมิและเวลาดังตารางที่ 3 แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ “a” determinant

ตารางที่ 3 แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ “a” determinant

PCR Cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Pre-denaturation	94	1 นาที
	55	1 นาที
	72	1 นาที
Denaturation	94	30 วินาที
	55	30 วินาที
	72	1 นาที 30 วินาที
	ทำซ้ำ 35 รอบ	ทำซ้ำ 35 รอบ
Post extension	72	7 นาที

ตรวจสอบผลผลิตจากการทำ PCR โดยการนำผลผลิตที่ได้ทั้งหมดผสมกับ loading dye แล้วใส่ลงใน หลุมของ 2% agarose gel electrophoresis ที่ได้ทำการเตรียม gel แบบแผ่นนอนราบเรียบร้อยแล้ว จากนั้นใช้ กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใช้ marker 100 bp เป็นตัวมาตรฐานเปรียบเทียบ นำ gel ที่ได้มาแช่ในสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที และนำมาเข้าเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Gel Doc) เก็บ DNA ใน gel นำไปทำการ purification เพื่อเตรียมหาลำดับเบส

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่..... 6 ก.ย. 2553
เลขทะเบียน..... 229467
เลขเรียกหนังสือ.....

- ไวรัสตับอักเสบ ซี

วิธีการดำเนินการวิจัย

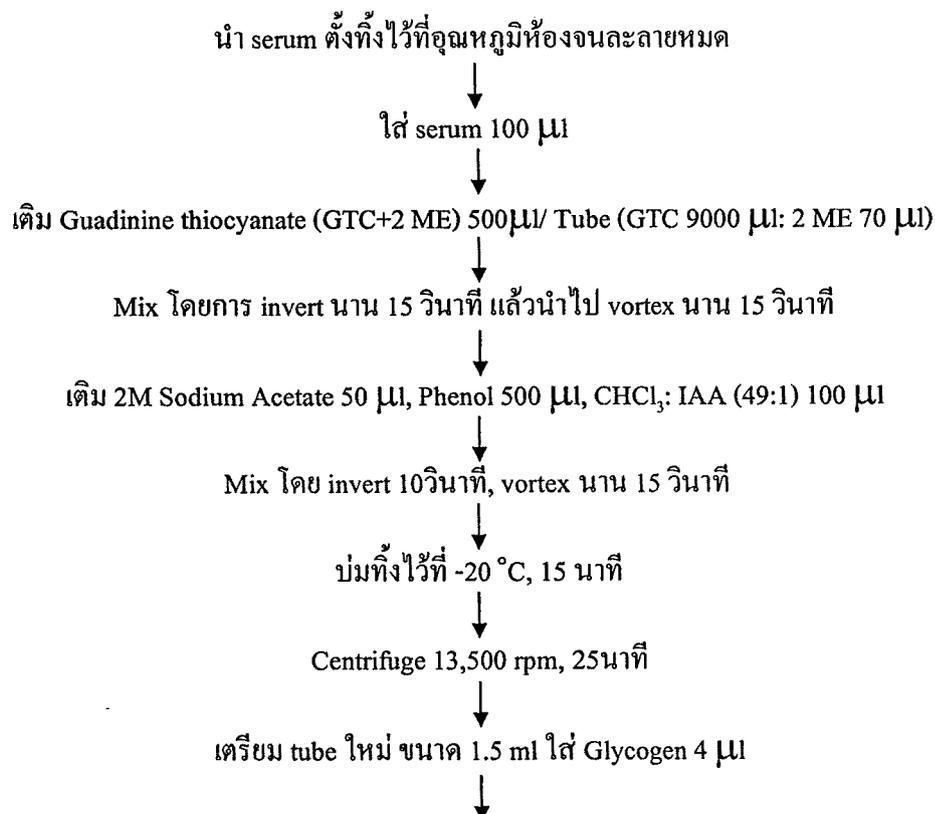
Positive control

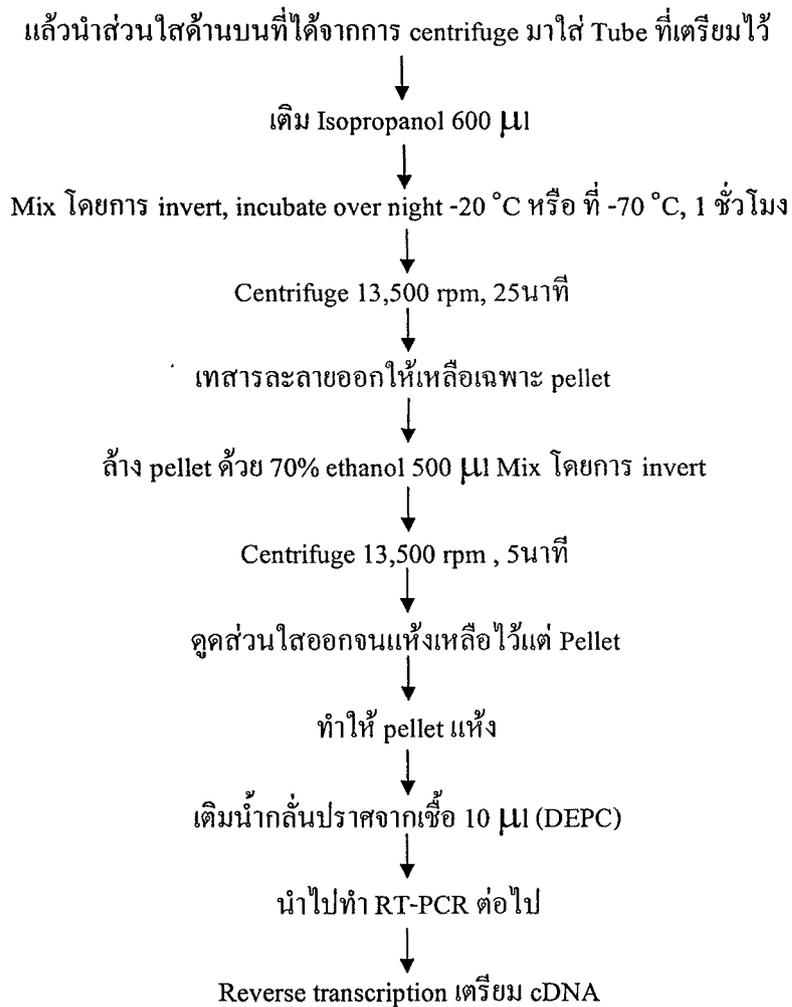
ได้ตัวอย่างจากซีรัมผู้ป่วยโรคโลหิต ซึ่งให้ผลตรวจ anti-HCV positive และตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบ ซี ด้วยวิธี PCR

Negative control

ในการศึกษาครั้งนี้ คือ distilled water ที่มีปริมาตรเท่ากับ DNA ที่ใช้ในการทดลอง ผู้วิจัยคัดเลือกตัวอย่างที่จะนำมาศึกษา โดยคัดเลือกตัวอย่างซีรัมเฉพาะผู้ที่ให้ผลบวกต่อแอนติบอดีของเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี (anti-HCV) โดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยใช้สารเคมี Murex HCV Kit (Abbott Laboratory, North Chicago, IL) ซึ่งเป็น recombinant HCV protein : CORE, NS3, NS4 และ NS5 protein และในรายที่ตรวจพบ anti HCV จะทำการสกัด RNA ต่อไป

การสกัด RNA ด้วยวิธี Guanidine extraction

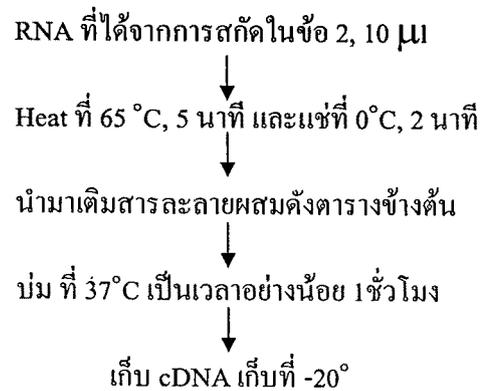




ตารางที่ 4 Primer และสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ reverse transcription ของไวรัส HCV

สารเคมี	ปริมาตร (ul)
H ₂ O	5.8
buffer (ของ Enzyme MMLV)	5.8
Enzyme MMLV	1.0
Specific primer หรือ random primer	1.0 หรือ 0.5
RNase inhibitor	0.5

วิธีการ



PCR amplification

เพิ่มจำนวน DNA ของ HCV ในบริเวณของ CORE และ NS5B ขึ้น

ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบส ของ primer ที่ใช้ในการทำ PCR

Region	Primer (nucleotide position)	Sequence	Product size(bp)
CORE	954F (291-314)	ACT GCC TGA TAG GGT GCT TGC GAG	405
	953F (324-347)	AGG TCT CGT AGA CCG TGC ATC ATG	
	410R (735-754)	ATG TAC CCC ATG AGG TCG GC	
	951R (708-729)	CAC TGT RAG GGT ATC GAT GAC	
NS5B	NS5B_F1 (8011-8032)	CAA TWS MMA CBA CCA TCA TGG C	660
	NS5B_F2 (8171-8193)	GAT GGG HHS BKC MTA YGG ATT CC	
	NS5B_R1 (8818-8838)	CCA GGA RTT RAC TGG AGT GTG	

ตารางที่ 6 สารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ Core และ NS5 ยีน

สารเคมี	1 st PCR	2 nd PCR
Distilled water	11.25	11.25
Eppendorf Mastermix (Humburg, Germany)	11.25	11.25
Forward primer (25M/uL)	0.375	0.375
Reverse primer (25M/uL)	0.375	0.375
DNA template	2.5	0.25

ตารางที่ 7 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วน NS5 และ CORE ยีน ทั้ง 1st PCR และ 2nd PCR

PCR cycle	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	
Pre-denaturation	95	3	
Denaturation	95	1	} ทำซ้ำ 35 รอบ
Annealing	49	1	
Extension	72	1.30	
Post-extension	72	7	