ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum essential medium (MEM) pH 7.4

1.1. เตรียม MEM 1 ซอง ซึ่งประกอบด้วย Earle's salts และ L-glutamine น้ำหนักสุทธิ 9.5 กรัม เติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันด้วยเครื่อง stirrer แบบไม่ใช้ความร้อน

1.2. เติม Sodium bicarbonate 850 มิลลิกรัม สารละลายที่ได้จะเปลี่ยนเป็นสีแดงส้ม

1.3. นำไปวัดและปรับ pH ให้ได้ 7.4 (±0.1)

1.4. ปรับปริมาตรให้ครบ 980 มิลลิลตร

1.5. กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 และ 0.2 µm

1.6. เติม L-glutamine และ Sodium pyruvate อย่างละ 10 มิลลิลิตรต่อ MEM 1 ลิตร เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม growth medium (10% Fetal bovine serum: FBS) 100 มิลลิลิตร

2.1. MEM	90	มิลลิลิตร
2.2. FBS	10	มิลลิลิตร

3. การเตรียม maintenance medium (5% FBS) 100 มิลลิลิตร

3.1. MEM	95	มิลลิลิตร
3.2. FBS	5	มิลลิลิตร

4. การเตรียม 5x Trypsin-EDTA 100 มิลลิลิตร

4.1. เตรียม Solution A 50 มิลลิลิตร

Trypsin	1.25	กรัม
1x PBS	50	กรัม

4.2. เตรียม Solution B 50 มิลลิลิตร

EDTA	0.1	กรัม
1x PBS	50	มิลลิลิตร

นำ Solution A และ B มาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง stirrer จนละลาย กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.2 µm เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. การเตรียม stock 10x Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

5.1. ชั่งสารเคมี

NaCl	80	กรัม
$NaHPO_4$	11.5	กรัม
KH_2PO_4	2	กรัม

KCl	2	กรัม

5.2. เติมน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันด้วยเครื่อง stirrer

5.3. นำไปวัดและปรับ pH ให้ได้ 7.4 (±0.1)

5.4. ปรับปริมาตรให้ครับ 1,000 มิลลิลิตร นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

6. การเตรียม 1xPBS, pH 7.4

6.1. ดูดสารละลายจาก stock 10x PBS มา 100 มิลลิลิตร

6.2. เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันด้วยเครื่อง stirrer

6.3. นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

หรือ

NaCl	8	กรัม
$NaHPO_4$	1.15	กรัม
$KH2PO_4$	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันด้วยเครื่อง stirrer นำไปวัดและปรับ pH ให้ได้ 7.4 (±0.1) ปรับปริมาตรให้ครับ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

7. การเตรียม 0.1 M $CaCl_2$, pH 7.4

7.1. ชั่ง $CaCl_2$	1.12	กรัม
7.2. เติมน้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. การเตรียม 0.1 M $MgCl_2$, pH 7.4

8.1. ชั่ง $MgCl_2$	0.94	กรัม
8.2. เติมน้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. การเตรียม 0.5%Tween-20 PBS(TPBS), 1,000 มิลลิลิตร

9.1. 1x PBS	995	มิลลิลิตร

9.2. Twenn-20 5 มิลลิลิตร

9.3. กวนให้เข้ากันด้วยเครื่อง stirrer เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

10. การเตรียม stock 5% Bovine serum Albumin (BSA)(w/v) ใน 0.5% TPBS 10 มิลลิลิตร

10.1. ชั่ง BSA 0.5 กรัม

10.2. เติม 0.5% TPBS 10 มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันเก็บที่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

11. การเตรียม 1% BSA ใน 0.5% TPBS 10 มิลลิลิตร

11.1. 5%BSA 2 มิลลิลิตร

11.2. 0.5% TPBS 8 มิลลิลิตร

กวนให้เข้ากันเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

12. การเตรียม 4% formaldehyde, 100 มิลลิลิตร

12.1. 30.8% formaldehyde 12.98 มิลลิลิตร

12.2. 0.5% TPBS 87.02 มิลลิลิตร

13. การเตรียมสีย้อม AEC (AEC Chromogen Kit) 4 มิลลิลิตร Stock No. AEC101

13.1. Acetate buffer 100 ไมโครลิตร

13.2. H_2O_2 50 ไมโครลิตร

13.3. AEC 50 ไมโครลิตร

13.4. น้ำกลั่น 3,800 ไมโครลิตร

14. การเตรียม LB-agar

14.1. Yeast extract 10 กรัม

14.2. Tryptone 10 กรัม

14.3. Sodium chloride 5 กรัม

14.4. Agar 15 กรัม

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

15. การเตรียม LB-broth

15.1. Yeast extract 10 กรัม

15.2. Tryptone 10 กรัม

15.3. Sodium chloride 5 กรัม

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

16. การเตรียม stock 10x TBE buffer pH 8.3, 1,000 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย 89 mMTris-HCL, 2.5 mM Na_2 EDTA, 89 mM Boric Acid, pH 8.3)

16.1. Tris 107.7 กรัม

16.2. Na_2 EDTA 9.3 กรัม

16.3. Boric acid 55 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.3 จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

17. การเตรียม 1%agarose gel

17.1.	Agarose	1	กรัม
17.2.	1x TBE buffer	100	กรัม

18. การเตรียม 0.5 M EDTA, pH 8 10 มิลลิลิตร

18.1.	ชั่ง EDTA	1.86	กรัม
18.2.	เติมน้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8 (เติม NaOH ชนิดเกล็ดเพื่อให้ EDTA ละลาย) แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร

19. การเตรียม 10%SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 10 มิลลิลิตร

19.1.	ชั่ง SDS	1	กรัม
19.2.	เติมน้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

นำไป vortex ให้ SDS กระจายแล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียสให้ละลาย

20. การเตรียม 2 M NaOH 10 มิลลิลิตร (Mr = 39.997/L)

20.1.	ชั่ง NaOH	0.79	กรัม
20.2.	เติมน้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

21. การเตรียม 1 M Glucose 5 มิลลิลิตร (Mr = 180.16/L)

21.1.	ชั่ง	0.9	กรัม
21.2.	เติมน้ำกลั่นให้ครบ	5	มิลลิลิตร

22. การเตรียม 1M Tris-base, pH 8 10 มิลลิลิตร

22.1.	ชั่ง Tris-base	1.21	กรัม
22.2.	เติมน้ำกลั่น	7	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8 แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร

23. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการสกัด DNA ด้วยวิธี Alkaline lysis

23.1. การเตรียมสารละลาย LSG I (lysozyme solution) 100 มิลลิลิตร

10 mM EDTA, pH 8	(2 ml จาก stock solution 0.5 M)
20 mM Tris-base, pH 8	(1 ml จาก stock solution 1 M)
50 mM Glucose	(5 ml จาก stock solution 1 M)

เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองด้วย filter ขนาด 0.2 µm เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

23.2. การเตรียมสารละลาย LSG II (lysis solution) * 2 มิลลิลิตร

0.2 M NaOH	(0.2 ml จาก stock solution 2M)
1% SDS	(0.2 ml จาก stock solution 10%)

เติมน้ำกลั่น 1.6 มิลลิลิตร (*เตรียมใช้สด)

23.3. การเตรียมสารละลาย LSG III (neutralization solution) (Sodium Acetate), pH 4.8 50 มิลลิลิตร

ชั่ง Sodium Acetate	12.3	กรัม
เติมน้ำกลั่น	30	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 4.8 ด้วย acetic acid แล้วเติมน้ำให้ครบ 50 มิลลิลิตร กรองด้วย filter ขนาด 0.2 µm เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

24. การเตรียม TE buffer, pH 8 50 มิลลิลิตร

24.1. 10 mM Tris-base, pH 8 (0.5 ml จาก stock solution 1 M)

24.2. 1 mM EDTA, pH 8 (0.1 ml จาก stock solution 0.5 M)

ภาคผนวก ข

วิธีการทดลอง

วิธีการทดลอง

1. วิธีการนับเซลล์ด้วยเทคนิค Direct microscopic count ด้วยสไลด์ Haemacytometer counting chamber

1.1. นำเซลล์ที่ทำการ subculture ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที

1.2. เทน้ำเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

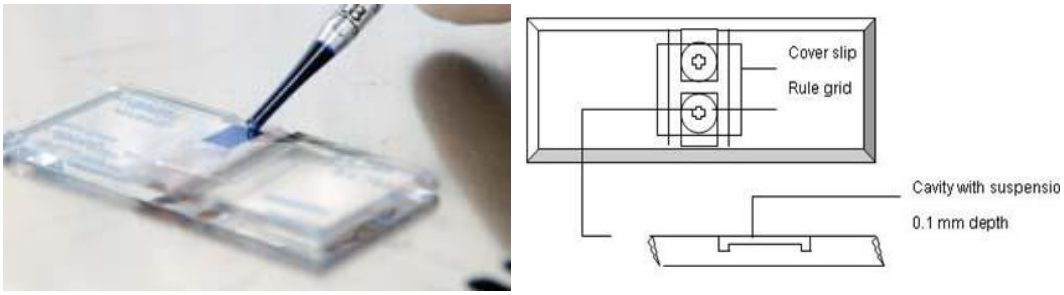
1.3. กระจายเซลล์แล้วดูดใส่ใน microtube ปริมาตร 20 ไมโครลิตรและเติมสี trypan blue ในสัดส่วน 1:1 (20 ไมโครลิตร) หรือ 1:10 ถ้ามีเซลล์จำนวนมาก

1.4. ใช้ pipette tip ดูดสารละลายเติมลงใน haemacytometer counting chamber (ภาพภาคผนวกที่ 1)

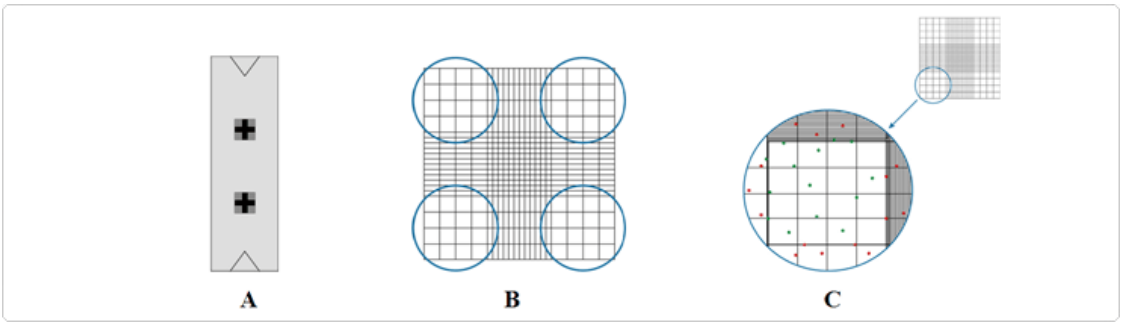
1.5. นับเซลล์ที่มียังชีวิต คือ เซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยนับตามช่องที่แสดงในภาพภาคผนวกที่ 2

1.6. นำจำนวนเซลล์ที่นับได้ไปคำนวณในสูตรต่อไปนี้

จำนวนเซลล์ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร = จำนวนเซลล์ที่นับได้ x dilution x 10,000 (ปริมาตรของ Haemacytometer counting chamber)



ภาพภาคผนวกที่ 1 Haemacytometer counting chamber



ภาพภาคผนวกที่ 2 การนับจำนวนเซลล์ตามช่องของ Haemacytometer counting chamber

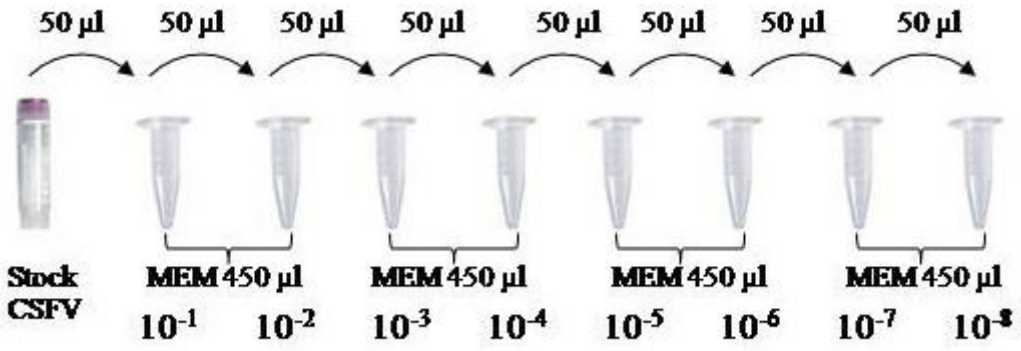
2. การตรวจหาปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ CSFV (virus titration)

2.1. เจือจางเชื้อ CSFV แบบ 10-fold serial dilution ที่ 10^{-1} ถึง 10^{-8} (ภาพภาคผนวกที่ 3)

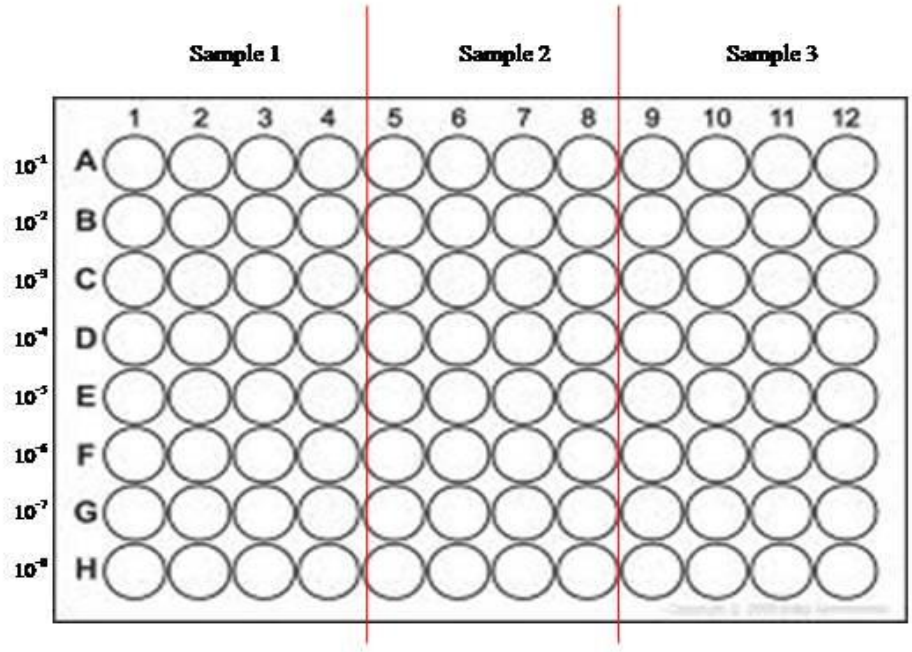
2.2. Subculture เซลล์ SK-6 ลงในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม (20,000 เซลล์ต่อหลุม) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อหลุม

2.3. เติมลงไวรัสเจือจางลงในเซลล์ SK-6 ที่ subculture โดยใช้ dilution ละ 4 หลุม ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อหลุม (ภาพภาคผนวกที่ 4)

2.4. นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์นาน 48 ชั่วโมง



ภาพภาคผนวกที่ 3 เจือจางเชื้อ CSFV แบบ 10-fold serial dilution



ภาพภาคผนวกที่ 4 ไมโครเพลทแบบ 96 หลุม

3. การย้อมสี Immunoperoxidase (AEC substrate)

3.1. เมื่อบ่มเซลล์ครบ 48 ชั่วโมง ดูดหรือเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง

3.2. นำไมโครเพลทมา fix เซลล์ด้วย 4 % formaldehyde เตรียมด้วย 0.5 % TPBS หลุมละ 50ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20-30 นาที

3.3. นำไมโครเพลทมาล้างด้วย 0.5 % TPBS จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งควรแช่ทิ้งไว้ 1 นาที

3.4. เติม primary antibody คือ Porcine anti-SFV serum (HC301) (ได้รับความอนุเคราะห์จากสุจิรา ปาจริยานนท์) โดยเจือจางในสัดส่วนที่เหมาะสม คือ 1:16 เตรียมด้วย 0.5 % TPBS+1%BSA หลุมละ 50 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

3.5. นำไมโครเพลทมาล้างด้วย 0.5 % TPBS จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งควรแช่ทิ้งไว้ 1 นาที

3.6. เติม secondary antibody (conjugate) คือ Goat-Anti Mouse peroxidase (KPL) (ได้รับความอนุเคราะห์จากสุจิรา ปาจริยานนท์) โดยเจือจางในสัดส่วนที่เหมาะสม คือ 1:200 เตรียมด้วย 0.5 % TPBS+1%BSA หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

3.7. นำไมโครเพลทมาล้างด้วย 0.5 % TPBS จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งควรแช่ทิ้งไว้ 1 นาที

3.8. นำไมโครเพลทมาย้อมด้วย AEC substrate โดยหยดสีให้ท่วมเซลล์ (หลุมละ 30-50 ไมโครลิตร) แช่ทิ้งไว้ไม่ให้โดนแสงนาน 20-30 นาที

3.9. นำไมโครเพลทไปล้างด้วยน้ำ นำไปอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับและบันทึกผลโดยเซลล์ที่มีเชื้อไวรัสจะติดสีน้ำตาลแดง นำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของไวรัสด้วยวิธี Reed and Muench (1938) ต่อไป

4. การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkaline lysis (Birnboim and Doly, 1979 อ้างถึงใน สิรินดา, 2541)

4.1. นำเอาเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนใน LB-broth ข้ามคืนมาใส่ลงใน microtube 1 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปปั่นหวี่ยงใน microcentrifuge ที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที

4.2. เทเอาน้ำเลี้ยงเชื้อออกให้หมดเหลือแต่ตะกอนเซลล์ที่ตกลงรวมกันอยู่ก้นหลอด

4.3. นำเซลล์ที่ได้มาเติม 100 ไมโครลิตรของสารละลาย LSG I (lysozyme solution) เขย่าและผสมให้เซลล์และ lysozyme solution เข้ากันให้ดีด้วย vortex mixer

4.4. เติมผง lysozyme ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

4.5. เติม 200 ไมโครลิตรของสารละลาย LSG II (lysis solution) เขย่าแบบแผ่วเบาด้วยนิ้วมือและข้างๆหลอดแล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

4.6. เติม 150 ไมโครลิตรของสารละลาย LSG II (neutralization solution) เขย่าให้เข้ากันเบาๆ (ขณะนี้ควรเห็นตะกอนสีขาวๆเกิดขึ้นแล้ว) แช่ในน้ำแข็งอีกเป็นเวลา 10 นาที

4.7. นำไปปั่นเหวี่ยงใน microcentrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

4.8. ถ่ายแยกเอาแต่ส่วนใสข้างบนหลอดลงไปในหลอด microtube หลอดใหม่ส่วนตะกอนสีขาวที่ก้นหลอดเดิมนั้นทิ้งไป

4.9. ประมาณปริมาตรส่วนใสที่ได้ แล้วเติม absolute ethanol ที่แช่เย็นเอาไว้ก่อนแล้วที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นปริมาณ 2 เท่าของปริมาตรของส่วนใส

4.10. เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียสประมาณ 1 ชั่วโมง-ข้ามคืน เพื่อให้พลาสมิดดีเอ็นเอตกตะกอนลงมา

4.11. นำไปปั่นเหวี่ยงใน microcentrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10-20 นาที

4.12. นำเอาตะกอนมาล้างด้วย 70% ethanol ที่เย็นแล้วปั่นเหวี่ยงใน microcentrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

4.13. เทเอา 70% ethanol ทิ้งไปแล้วนำเอาตะกอนมาทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศหรือบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

4.14. นำเอาตะกอนที่ทำให้แห้งมาทำให้ละลายใหม่โดยใช้สารละลาย TE buffer pH 8 ในปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร

5. **วิธีการคำนวณหาความเข้มข้นของไวรัส (virus titration)โดยวิธี Reed and Muench (1938)**

หลักการของการหาปริมาณความเข้มข้นของไวรัส เป็นการหาความรุนแรงหรือความเข้มข้นของไวรัสโดยการเตรียมไวรัสซึ่งเจือจางเป็น 10 เท่า (serial 10 fold dilution) แต่ละความเจือจางจะถูกฉีดลงในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไวต่อไวรัสและสังเกตการเพิ่มจำนวนของไวรัส ซึ่ง end point ของการไตเตรทคือความเจือจางสูงสุดที่พบไวรัสเพิ่มจำนวนได้ 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงที่ฉีดไวรัสลงไป end point นี้เรียกว่า $TCID_{50}$ (Tissue Culture Infective Dose 50%) (อารินี, 2551) ทำได้โดยการคำนวณหาค่า proportionate distance (PD) โดยใช้สูตรในการคำนวณดังต่อไปนี้

$$\text{Proportionate distance (PD)} = (A-50) / (A-B)$$

จากนั้นนำค่า PD ไปแทนค่าในสูตรเพื่อหาค่า $TCID_{50}$ (tissue culture infective dose 50%)

$$\log TCID_{50} = (\log C) - (PD \times \log X)$$

เมื่อ A = % response สะสมค่าแรกที่มากกว่า 50%

B = % response สะสมค่าแรกที่น้อยกว่า 50%

C = dilution ของไวรัสที่ให้ค่า A

X = ลำดับการเจือจางไวรัส (dilution factor)

6. การคำนวณหาค่าไดเตอร์ของซีรัม (อารินี, 2551)

หลักการ คือ แอนติบอดีจำเพาะจะยับยั้งคุณสมบัติทางชีววิทยาของไวรัส ทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ไม่สามารถก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆบนโฮสต์ได้ ทำได้โดยการคำนวณหาค่า proportionate distance (PD) โดยใช้สูตรในการคำนวณดังต่อไปนี้

Proportionate distance (PD) = (A-50) / (A-B)

จากนั้นนำค่า PD ไปแทนค่าในสูตร

Log of 50% protection = (logC) - (PD x log X)

เมื่อ A = % protection สะสมค่าแรกที่มากกว่า 50%

B = % protection สะสมค่าแรกที่น้อยกว่า 50%

C = dilution ของซีรัมที่ให้ค่า A

X = ลำดับการเจือจางซีรัม (dilution factor)

ค่า Log of 50% protection ที่ได้คือ ระดับความเจือจางของซีรัมที่สามารถยับยั้งไวรัสมาตรฐานในปริมาตรเท่ากันได้ครึ่งหนึ่ง ซึ่งก็คือระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีจำเพาะในซีรัมนั่นเอง