บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 14323 และ *E. coli* ซึ่งมี IS*6110* อยู่บนพลาสมิด pCD73 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.นพ.ประสิทธิ์ ผลิตผล การพิมพ์ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล

2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทที่ผลิต
Löwenstein-Jensen medium	Difco
Tryptone	Difco
Yeast extract	Merck

2.1.3 สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute alcohol	Merck
Agarose gel	Sigma
Ammonium acetate	BDH
Anti digoxiginin-AP, Fab fragments	Boehringer Mannheim
Blocking reagent	Boehringer Mannheim
Boric acid	Merck
5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (X phosphate)	Boehringer Mannheim
Carbol fuchsin	BDH
Chloroform	Merck
CTAB(N-cetyl-N,N,N,-trimethyl ammonium bromide)	Merck
Dig DNA labeling mixture	Boehringer Mannheim
Ethidium bromide	Sigma
Ethylenediaminetetraacetate (EDTA)	Sigma

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Formamide	Boehringer Mannheim
Glacial acetic acid	Merck
Glycerol	Merck
Hexanucleotide mix	Boehringer Mannheim
Hydrochloric acid	Merck
Isoamyl alcohol	Merck
Isopropanol	Merck
Klenow enzyme	Boehringer Mannheim
Litium chloride	BDH
Magnesium chloride	BDH
Methylene blue	Merck
Methanol	Merck
Nitroblue tetrazolium chloride (NBT) solution	Boehringer Mannheim
N-lauroyl sarcosine	Sigma
Oxalic acid	Merck
Phenol	Merck
Potassium acetate	Fluka
Sodium chloride	Merck
Sodium citrate	Merck
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Sigma
Sodium hydroxide	BDH
Tri-sodium citrate	BDH
Tris (hydroxy methylaminomethane)	Sigma

2.1.4 เอนไซม์

	บริษัทที่ผลิต
*Bam*H I	Bio labs
Klenow enzyme	Boehringer Mannheim

เอนไซม์	บริษัทที่ผลิต
Lysozyme	Boehringer Mannheim
Proteinase K	Sigma
Pst I	GIBCO BRL
Restriction endonuclease *Pvu* II	Boehringer Mannheim
Ribonuclease A	Sigma
Sal I	Bio lab

2.1.5 Molecular weight marker	บริษัทผู้ผลิต
Lamda *Hin*d III	Promega
PhiX 174 *Hae* III	Bio labs
Lamda Pst I	Gibco BRL

2.1.6 วัสดุอื่นๆ	บริษัทที่ผลิต
กระดาษ Whatman 3 MM	Whatman
ไนลอนเมมเบรน (nylon membrane, positive charged)	Boehringer Mannheim

2.2 อุปกรณ์

- ปิเปตอัตโนมัติ (automatic pipette)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ (autoclave) Tomy Seiko Co.Ltd., Japan
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator), Heraeus GmbH, Germany
- ตู้บ่มเชื้อชนิดมีเครื่องเขย่าและควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator) Labline instrument Inc., USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (micro-highspeed centrifuge) Eppendorf, Brinkman Instruments Inc., USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมความเย็น (refrigerated centrifuge) RC 2-B, Ivan Sorvall Inc., USA
- เครื่องผสมสาร (vortex mixer) Lab-line Instruments Inc., USA

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) UV-1601, SHIMADZU cooperation, Japan
- เครื่องแยกสารละลายโดยใช้ไฟฟ้าเพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอ (horizontal gel electrophoresis) GNA-100, Pharmacia, Sweden
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) LKB, Phamarcia , Sweden
- เครื่องดูแถบ ดี เอ็น เอ ภายใต้แสงอัลต้าไวโอเล็ต (UV light transilluminator) San Gabriel Inc., USA
- ตู้ปลอดเชื้อ (bio-safety flow cabinet) class II, Forma Scientific Inc.,USA
- ตู้อบชนิด Hybridization incubator Model 400, Robbin Science Cooperation, USA
- กล้องถ่ายรูปโพลารอยด์ (polaroid camera) DS34, Spectonics Coorperation, USA

2.3 วิธีการ

2.3.1 เรือนจำที่ทำการศึกษา

ในการศึกษานี้ได้เลือกเรือนจำจากภาคใต้ 4 แห่งคือ เรือนจำกลางจังหวัดสงขลา เรือนจำจังหวัดสงขลา ทัณฑสถานหญิงจังหวัดสงขลา และเรือนจำกลางจังหวัดนครศรีธรรมราช

เรือนจำกลางสงขลา เป็นเรือนจำที่ขังผู้ต้องหาที่ได้พิจารณาโทษแล้ว แต่ไม่เกิน 30 ปี มีการแยกผู้ต้องขังตามคดีที่ต้องโทษ แยกเป็นแดนต่างๆ เช่นแดนคดีอุกฉกรรจ์ แดนยาเสพติด เป็นต้น เรือนจำจังหวัดสงขลา เป็นเรือนจำที่ขังผู้ต้องหาที่อยู่ระหว่างการพิพากษาคดี รวมทั้งพิพากษาโทษจากศาลจังหวัดสงขลา และพิพากษาคดีแล้วแต่ต้องโทษไม่นาน ทัณฑสถานหญิงสงขลา สำหรับผู้ต้องหาหญิงทั้งหมดที่ต้องโทษ ส่วนเรือนจำกลางนครศรีธรรมราช ไม่ได้แยกผู้ต้องขังตามลักษณะการต้องโทษ เรือนนอนของผู้ต้องขังโดยทั่วไปพบว่า มีเรือนนอนขนาดใหญ่ พื้นที่ประมาณ 8 เมตร x 16 เมตร จุผู้ต้องขังประมาณ 100 - 130 คน ส่วนเรือนนอนขนาดเล็ก พื้นที่ประมาณ 8 เมตร x 8 เมตร จุผู้ต้องขังประมาณ 60 - 70 คน เรือนนอนบางแห่ง จะแบ่งเป็นห้อง มีพื้นที่ประมาณ 2.5 เมตร x 7 เมตร บางแห่งใช้เป็นห้องแยกโทษ จุผู้ต้องขังประมาณ 6-20 คน กิจกรรมโดยทั่วไปในเรือนจำ ตอนเช้ามีการออกกำลังกาย รับประทานอาหารร่วมกัน การฝึกวิชาชีพต่างๆ เป็นต้น

2.3.2 การเก็บตัวอย่าง

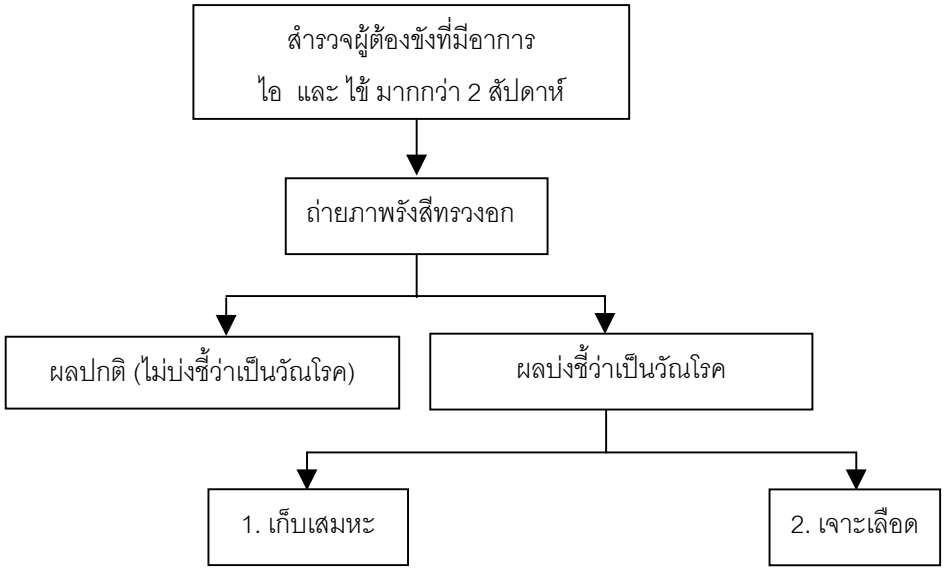
สำรวจผู้ต้องขังที่มีอาการไอ และ ไข้ มากกว่า 2 สัปดาห์ (ครอฟตัน และ คณะ,2537) ภาพประกอบ 2.1 แสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างในเรือนจำโดยพยาบาลประจำเรือนจำแต่ละแห่ง

เรือนจำกลางจังหวัดสงขลาสำรวจช่วงเดือนกันยายน 2540 เรือนจำจังหวัดสงขลา และทัณฑสถานหญิงจังหวัดสงขลาสำรวจช่วงเดือนตุลาคม 2540 เรือนจำกลางจังหวัดนครศรีธรรมราช สำรวจช่วงเดือนมีนาคม 2541 จากนั้นทำการ ถ่ายภาพรังสีทรวงอก (chest X-ray: CXR) แบบฟิล์มขนาดเล็ก (mini chest X-ray) โดยรถถ่ายภาพรังสีทรวงอกเคลื่อนที่ จากโรงพยาบาลราษฎร์ยินดี อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา อ่านผลโดยรังสีแพทย์ แล้วเก็บเสมหะ จากผู้ต้องขังรายที่ผลภาพถ่ายรังสีทรวงอกสงสัยเป็นวัณโรค หลังตื่นนอนเช้า 3 วันติดต่อกัน โดยเก็บในภาชนะที่สะอาดและปราศจากเชื้อ ตรวจร่างกายผู้ต้องขัง โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ขจรศักดิ์ ศิลปโภชากุล ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และพยาบาลประจำเรือนจำช่วยบันทึกข้อมูล (ภาคผนวก ง) เช่น อายุ ระยะเวลาที่ต้องขัง ภูมิลำเนา อาชีพ รวมทั้งประวัติเกี่ยวกับการเป็นวัณโรค เช่น เคยเป็นวัณโรคหรือไม่ ถ้าเคยเป็นเป็นที่ใด เคยรักษาหรือไม่ ถ้าเคยรักษา รักษาที่สถานพยาบาลใด กินยาต้านวัณโรคมาแล้วนานเท่าไร ต้องโทษคดีอะไร เคยฉีดยาเข้าเส้นหรือไม่ ต้องขังมานานเท่าไร ต้องอยู่ในห้องขังอีกนานเท่าไร รวมเวลาที่ต้องโทษ ครอบครัวมีใครเคยเป็นวัณโรค ถ้ามีเกี่ยวข้องเป็นอะไรกัน และในการต้องโทษ พักห้องพักร่วมกับใครในกลุ่มที่ต้องเก็บเสมหะนี้

2.3.3 การบ่งชี้วัณโรค

นำตัวอย่างเสมหะที่เก็บจากผู้ต้องขังทุกราย ย้อมสีทนกรด (Acid fastness Baclli : AFB) ด้วยวิธี Kinyoun โดยป้ายเสมหะบนสไลด์แก้ว แล้วนำสไลด์ผ่านเปลวไฟประมาณ 2-3 ครั้งเพื่อตรึงเชื้อ ย้อมด้วยน้ำยา Kinyoun carbon fuchsin (ภาคผนวก ข.1) แล้วนำมาอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ รายงานผลด้วยวิธีของ CDC (Center for Disease Control, US public health service) (ภาคผนวก ค)

ตัวอย่างเสมหะทุกตัวอย่าง นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคโดยใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (steriled swab) ป้ายเสมหะ ควรเลือกบริเวณที่ข้นๆ หรือมีเลือดปน แช่ไม้พันสำลีใน 5% oxalic acid 10 มิลลิลิตร นาน 25 นาที เมื่อครบเวลาย้ายไม้พันสำลีแช่ลงใน 5% sodium citrate 10 มิลลิลิตร นาน 10 นาที ครบเวลา นำไม้พันสำลีไปป้ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Löwenstein - Jensen (L-J) นำไปบ่มที่ 35 - 37 องศาเซลเซียส การอ่านผล คอยตรวจดูการเจริญเติบโตของเชื้อครั้งแรก 5 - 7 วัน ต่อมาอ่านทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ถ้าเพาะเชื้อขึ้น นำไปพิสูจน์ชนิดของเชื้อ โดยดู สี ลักษณะรูปแบบของเชื้อ และทดสอบทางชีวเคมีเพื่อแยกชนิดของเชื้อวัณโรค โดยได้รับความอนุเคราะห์การทดสอบ จากสมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ กรุงเทพฯ



ภาพประกอบ 2.1 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างในเรือนจำ

2.3.4 การทดสอบเชื้อต่อยาต้านวัณโรค

เชื้อที่ได้รับการบ่งชี้ว่าเป็น *M. tuberculosis* นำมาทดสอบกับยาต้านวัณโรค isoniazid streptomycin kanamycin ethambutol rifampicin และ pyrazinamide โดยได้รับความอนุเคราะห์การทดสอบเชื้อต่อยาต้านวัณโรค จากสมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ กรุงเทพฯ ในการทดสอบนี้ใช้วิธี resistance ratio short test (Canetti *et al*., 1963)

2.3.5 การตรวจการติดเชื้อเอชไอวี

เจาะเลือดเพื่อตรวจ เอชไอวี แอนติบอดี จากผู้ต้องขังรายที่ต้องเก็บเสมหะ เฉพาะที่ยินยอมให้เจาะเลือดเท่านั้น โดยได้ลงชื่อยินยอมให้เจาะเลือดเพื่อตรวจเอชไอวี แอนติบอดี และตรวจรักษาวัณโรค การตรวจ เอชไอวี แอนติบอดี (anti-HIV I) วิธี Gel Particle Agglutination (GPA) ด้วยชุดตรวจการติดเชื้อเอชไอวี ซีโรเดีย® -เอชไอวี ชนิดตรวจกรองแอนติบอดีต่อเอชไอวี ผลิตโดยบริษัทฟูจิเรบิโอ จำกัด ประเทศญี่ปุ่น รายที่ให้ผลบวก จะทำการตรวจซ้ำเพื่อหา เอชไอวี แอนติบอดี (anti-HIV I/II) วิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ด้วยชุดตรวจการติดเชื้อเอชไอวีเพื่อวินิจฉัยโรคชนิดตรวจกรอง เอ็นซิกโนสท์® แอนติ-เอชไอวี ½พลัส ผลิตโดยบริษัท เดด แบริ่ง ในตรวจเอชไอวี แอนติบอดี ทำตามวิธีมาตรฐาน (Standard Operation Procedure (SOP)) ของหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2540

2.3.6 เชื้อควบคุม

เก็บเชื้อวัณโรค จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ซึ่งเพาะเลี้ยงจากตัวอย่างตรวจของผู้ป่วย เพื่อเป็นกลุ่มเปรียบเทียบกับตัวอย่างของผู้ต้องขัง และใช้เชื้อวัณโรค จากกองวัณโรค กรมควบคุมโรคติดต่อ กรุงเทพฯ เป็นกลุ่มตัวอย่างจากภาคใต้ที่ดื้อต่อยาหลายขนาน

2.3.7 การทดสอบลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) โดยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

2.3.7.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *M. tuberculosis*

เชื้อที่เพาะขึ้นจากตัวอย่างเสมหะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Löwenstein -Jensen นำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Soolingen และ คณะ (1991b) โดยขูดเชื้อประมาณเท่าหัวไม้ขีด ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ที่มี 500 ไมโครลิตรของบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข. 2.21) ผสมให้เข้ากันนำไปต้มที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นเติม lysozyme จำนวน 50 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข. 2.6.1) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วเติม SDS 70 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข. 2.15) และ proteinase K 6 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข. 2.6.2) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม 5 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข. 2.9) ผสมให้เข้ากันดี สารละลายจะมีลักษณะสีขาวขุ่นข้นคล้ายนม แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที สกัดดีเอ็นเอด้วย chloroform/isoamyl alcohol (ภาคผนวก ข. 2.8) ในจำนวนที่เท่ากับสารละลายทั้งหมดที่มีในหลอด microcentrifuge (ประมาณ 0.7-0.8 ml) โดยผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) ประมาณ 10 วินาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g 5 นาที ดูดสารละลายที่ได้ซึ่งอยู่ชั้นบน ถ่ายสู่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม isopropanol 0.6 เท่าของปริมาณเดิม เพื่อตกตะกอน ดีเอ็นเอ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วปั่นด้วยความเร็ว 12,000 g 15 นาที จากนั้นล้างดีเอ็นเอด้วย 70% แอลกอฮอล์ 5 นาที เพื่อเอา CTAB ที่เหลืออยู่ออก ปั่นล้าง 2 ครั้ง เท 70% แอลกอฮอล์ทิ้ง ได้ดีเอ็นเอที่ก้นหลอด ตั้งให้แห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย TE สามารถเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทำการทดสอบ

2.3.7.2 การเตรียมตัวตรวจจับ IS*6110* (IS*6110* probe)

นำ *E. coli* ที่มี IS*6110* บนพลาสมิด pDC73 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Terrific Broth 250 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก1) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 10-15 ชั่วโมง แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการปั่นในเครื่องปั่น (Sorvall centrifuge, หัวปั่น GSA) ด้วยความเร็ว 2,500 g เป็นเวลานาน 5-10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติม solution 1 (ภาคผนวก ข 2.16) 8 ml ทำให้เซลล์

กระจายในสารละลายแล้วแช่ในน้ำแข็ง 20 นาที แล้วเติม solution 2 (ภาคผนวก ข 2.17) 16 ml ผสมให้เข้ากันดี จะได้สารละลายที่มีความหนืด เนื่องจากดีเอ็นเอหลุดออกมาจากเซลล์ แช่ในน้ำแข็ง 10 นาที จากนั้นเติม solution 3 (ภาคผนวก ข 2.18) 12 ml เพื่อตกตะกอนโปรตีน แล้วผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นในเครื่องปั่นด้วยความเร็ว 7,500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที ถ่ายส่วนใสลงในหลอดใหม่ขนาด 50 ml ระวังไม่ให้ตะกอนติดมา แล้วเติมไอโซโปรปานอล 0.6 เท่าของปริมาณเดิม (21.6 มิลลิลิตร) เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ปั่นที่ 7,500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 -10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตะกอนในหลอดคือส่วนผสมของดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ละลายตะกอนใน TE 10 ml จากนั้นเติม 7.5 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตท 0.5 เท่าของปริมาณเดิม (5 ml) ผสมให้เข้ากันปั่น 7,500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ดีเอ็นเออยู่ในส่วนใส อาร์เอ็นเอเกือบทั้งหมดจะตกตะกอนอยู่ก้นหลอด แล้วถ่ายส่วนใสลงในหลอดใหม่เติม RNase A ให้ได้ความเข้มข้น 50 -100 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 20 นาที เติมสารละลายฟีนอลอิ่มตัว 7.5 ml และคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 :1) 7.5 ml นำไปปั่น 2,500 g 5 นาที ดีเอ็นเอจะอยู่ในชั้นบน ถ่ายลงสู่หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ (24 :1) 15 ml ผสมให้เข้ากันปั่นอีก 5 นาที ถ่ายสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ เติม 2 ส่วนของเอทธานอลสมบูรณ์ เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที หรืออาจทิ้งไว้ค้างคืน ปั่นเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ (8,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที) เทส่วนใสทิ้งล้างดีเอ็นเอด้วยเอทธานอล 70% จากนั้นทำให้แห้งแล้วละลายใน TE 1-2 ml ทำอิเล็กโทรโฟลีซิสเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพลาสมิด

นำพลาสมิด pDC73 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Sal* I โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 1 ยูนิต ต่อ 1 ไมโครกรัมของ พลาสมิดบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำอีเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้วุ้นที่มีความเข้มข้น 0.7% จากนั้นตัดวุ้นตรงตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ ซึ่งมีลำดับเบสประมาณ 400 bp. จะได้ IS*6110* จากนั้นสกัด IS*6110* จากวุ้นโดยบีบเนื้อวุ้น จะได้สารละลายของดีเอ็นเอตรวจจับ IS*6110* นำไปวัดหาปริมาณความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (1 O.D. เท่ากับดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัม) แล้วแบ่งเก็บใส่ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

2.3.7.3 การติดสลากตัวตรวจจับ IS*6110*

ทำการติดสลากดีเอ็นเอแบบสุ่ม (random primed labeling) ด้วย digoxigenin (DIG) dUTP โดยนำดีเอ็นเอตรวจจับ IS*6110* ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที ผสมสารละลายดังนี้ ปริมาณ ดีเอ็นเอตรวจจับ IS*6110* ที่ต้องการติดสลาก 1 ไมโครกรัม เติม

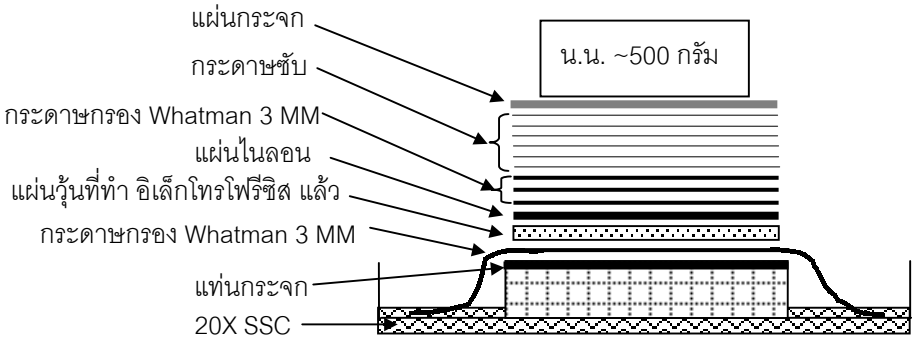
hexanucleotide mixture 2 ไมโครลิตร dNTP labeling mixture 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 19 ไมโครลิตร แล้วเติมเอนไซม์ klenow 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม 0.2 โมลาร์ EDTA 2 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วเติม ลิเทียมคลอไรด์ ($LiCl_2$) 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทธานอลสมบูรณ์ 75 ไมโครลิตร ที่ –20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 g 5 นาที ล้างดีเอ็นเอด้วย 70% เอทธานอล แล้วทำให้แห้ง จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ต่อไป

2.7.3.4 การย่อยดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรค

นำดีเอ็นเอ เติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pvu*II โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 10 ยูนิต/ไมโครลิตร 1 ไมโครลิตรต่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 2 ไมโครกรัม อบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำไปทำอีเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นวุ้น 1% ใน Tris-borate Buffer (TBE) ผ่านกระแสไฟฟ้าไปในวุ้นประมาณ 100 โวลท์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นประมาณ 25 โวลท์ ข้ามคืน

2.3.7.5 การถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยวิธี Southern Blotting และ การทำHybridization

แช่แผ่นวุ้นใน 0.2 N กรดไฮโดรคลอริก เขย่าเบา ๆ 10 นาที ล้างแผ่นวุ้นด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วแช่ใน denaturation solution (ภาคผนวก ข 2.10) เขย่าเบา ๆ 30-60 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วเติม neutralization solution (ภาคผนวก ข 2.12) เขย่าเบา ๆ 30-60 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้ววางบนแผ่นกระจกที่มีกระดาษกรอง Whatman 3 MM วางเป็นสะพานโดยมีปลายทั้งสองข้างจุ่มอยู่ในสารละลาย SSC ความเข้มข้น 20 เท่า (20X SSC) (ภาคผนวก 2.19) นำแผ่นไนลอนที่มีขนาดเล็กกว่าแผ่นวุ้นเล็กน้อย แช่ในน้ำกลั่น 1 นาที แล้วแช่ใน 20X SCC 5-10 นาที วางทับบนแผ่นวุ้น วางกระดาษกรอง Whatman 3 MM ทับบนแผ่นไนลอน 3-5 แผ่น จากนั้นวางกระดาษซับทับบนกระดาษกรอง Whatman 3 MM ให้มีความสูงประมาณ 5 เซนติเมตรวางแผ่นกระจกทับ จากนั้นวางของหนักประมาณ 1 กิโลกรัม ทับบนกระจก ตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมงหรือข้ามคืน ดีเอ็นเอจะถูกถ่ายลงแผ่นไนลอน ภาพประกอบ 2.2 จากนั้นนำแผ่นไนลอนมาล้างด้วย SSC ความเข้มข้น 2 เท่า (2X SSC) ทิ้งให้แห้ง แล้วนำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แผ่นที่ผ่านการอบแล้วสามารถนำไปทำ hybridization ต่อได้ทันทีหรืออาจเก็บไว้ในที่แห้งได้นานเป็นปี (ก่อนนำไปใช้ควรอบอีกครั้ง)



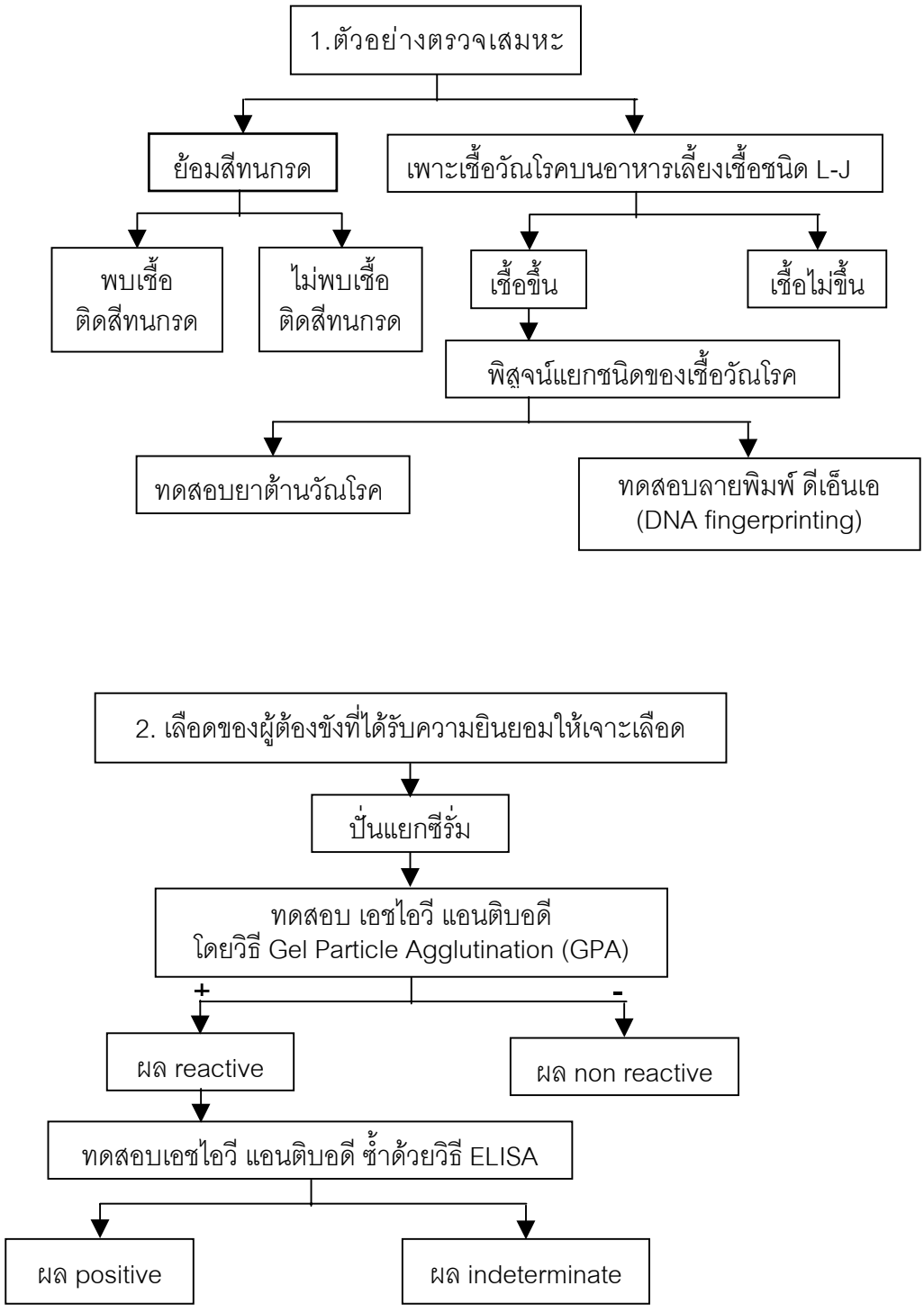
ภาพประกอบ 2.2 การถ่ายโอนดีเอ็นเอ (Southern blot) แบบ capillary จากวุ้นไปสู่แผ่นไนลอน

การทำ hybridization เติมสารละลาย prehybridization (ภาคผนวก ข 2.13)ลงในขวดที่มีแผ่นไนลอน (ให้ส่วนของสารละลายต่อขนาดพื้นที่ของแผ่นไนลอน 20 มิลลิลิตรต่อ 100 ตารางเซนติเมตร) นำขวดไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแทนที่สารละลาย prehybridization ด้วย hybridization solution (ภาคผนวก ข 2.11) ที่มี IS*6110* ติดฉลากด้วย DIG (ในสัดส่วน 2.5 มิลลิลิตรต่อแผ่นไนลอน 100 ตารางเซนติเมตร) นำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 6-12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาล้างด้วย 0.1% SDS ใน 2X SSC ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วล้างด้วย 0.1% SDS ใน 0.1 X SSC ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ปล่อยให้แผ่นไนลอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง นำไปตรวจสอบผลการ hybridized ได้ทันทีหรือเก็บไว้ในที่แห้งได้นาน 1 สัปดาห์

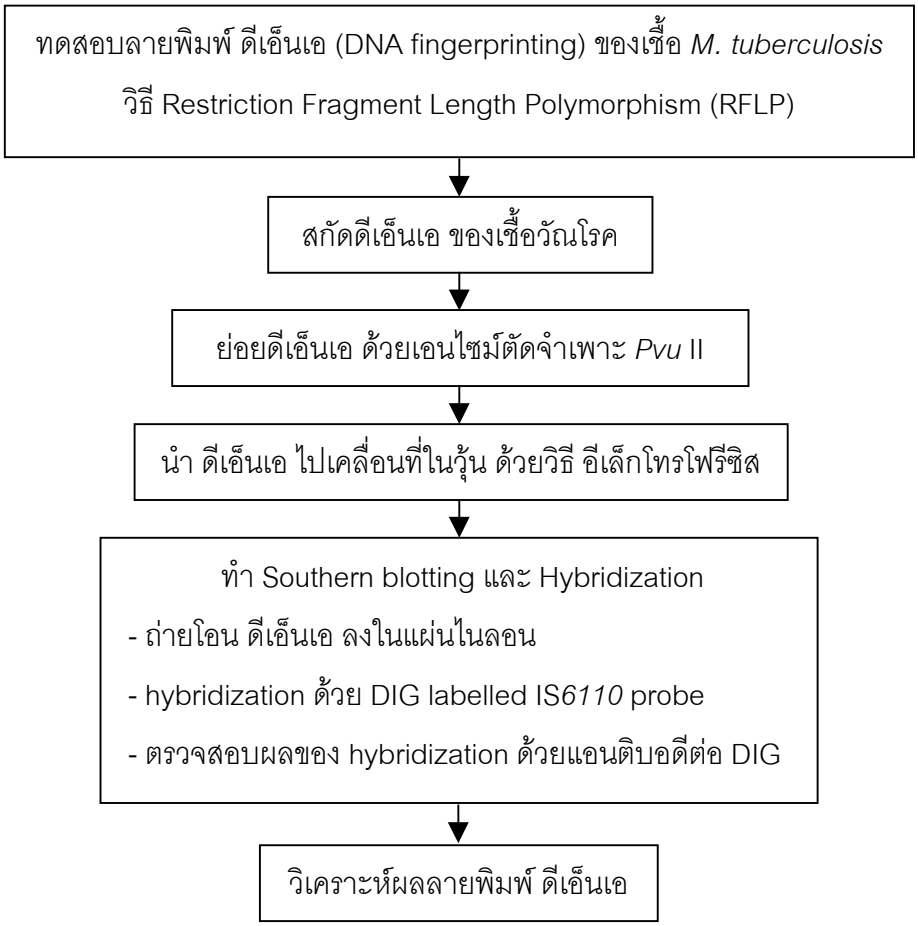
2.3.7.6 การตรวจสอบผลของ hybridization กับแอนติบอดีต่อ DIG

ล้างแผ่นไนลอนในบัฟเฟอร์ 1 (ภาคผนวก ข 2.1) ประมาณ 1 นาที แล้วเปลี่ยนเป็นบัฟเฟอร์ 2 (ภาคผนวก ข 2.2) นาน 30 นาที เตรียมสารละลายแอนติบอดีต่อ DIG ที่จับกับ alkaline phosphatase โดยเจือจางในสัดส่วน 1:2500 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 2 บ่มแผ่นไนลอนในสารละลายแอนติบอดีนาน 30 นาที จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1 ประมาณ 100 มิลลิลิตร นาน 15 นาที แล้วล้างซ้ำอีกครั้ง จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ 3 ประมาณ 20 มิลลิลิตร นาน 2 นาที เททิ้ง แล้วแช่แผ่นไนลอนใน color solution (Nitroblue tetrasodium : NBT 45 ไมโครลิตร และ X-phosphate solution 35 ไมโครลิตรใน 10 มิลลิลิตรของบัฟเฟอร์ 3 (ภาคผนวก ข 2.3))วางในที่มืด ปฏิกิริยาจะเกิดเห็นสีภายใน 2-3 นาที ถ้ายังไม่เกิดอาจทิ้งไว้ 30-60 นาที หรือ 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดย

ล้างในบัฟเฟอร์ 4 (ภาคผนวก ข 2.4) 50 มิลลิลิตร นำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส สามารถเก็บแผ่นไนลอนเมมเบรนที่เห็นผลได้เป็นระยะเวลานาน



ภาพประกอบ 2.3 ขั้นตอนการทดสอบตัวอย่างตรวจเสมหะ และเลือด



ภาพประกอบ 2.4 ขั้นตอนการ ทดสอบ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อวัณโรค