

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 และ 75 cm²
2. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม
3. ขวด Duran ขนาด 250 500 และ 1000 ml
4. ขวด Medical flat ขนาด 100 ml
5. Erlenmeyer flask ขนาด 100 ml
6. เครื่องกรองอาหารเลี้ยงเซลล์
7. แผ่นกรองขนาด 0.22 μ m
8. ขวดฝาเงินขนาด 28 ml
9. ปีกเกอร์ขนาด 250 และ 500 ml
10. กระบอทดวงขนาด 100 500 และ 1000 ml
11. ปิเปตแก้วขนาด 1 และ 10 ml
12. แท่งแก้วคนสาร
13. หลอดปั่นขนาด 50 ml
14. microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
15. ขวดหยด (bottle dropper)
16. Freezer box
17. Rack
18. กรวยแก้ว (funnel)
19. ซ้อนดักสาร
20. Pipette tips
21. ถูมมือยาง
22. อะลูมิเนียมฟอยล์
23. สำลี
24. ปากคีบ (forcep)

25. parafilm (laboratory film)

เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) (Olympus, CKX41)
2. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope (Olympus, CX31)
3. ตู้ถ่ายเชื้อ (biosafety carbinet class I) (SCIENCE TECT CO.,LTD)
4. ตู้เลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator) (Shellab, 2323-2)
5. ตู้แช่แข็ง -20 °C (Sanyo, SF-C991 NG) และ -80 °C (Sanyo, MPF-392)
6. ตู้ดูดควัน (fume hood) (I-Lab ,IIM)
7. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Binder, ED 115)
8. ตู้เย็น (LFS, Thailand)
9. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) (Tomy, SS-325)
10. เครื่องปั่นแบบควบคุมอุณหภูมิ (Sanyo, Harrier 18/80 และ Hettich, EBA 12R)
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Metrohm, 713)
12. เครื่องชั่งอย่างละเอียด (Ohaus Adventurer, ARC 120)
13. Agarose gel electrophoresis chamber (PRIMO, EC 320)
14. Automatic pipette 0.5-1000 ml (Biohit)
15. Electrophoresis power supply (Amersham Pharmacia Bioteth, EPS 301)
16. Hemacytometer (Improve Neubauer hemacytometer)
17. Hot plate (Clifton, CERASTIR)
18. Pipetboy (TECNOMARA)
19. Rocking platform (ELMI, S 4)
20. Thermal cycler (Applied Biosystem, Gene Amp PCR System 9700)
21. UV transilluminator (Vilber Lourmat, V03 6685)
22. Vacuum pump (Rocker 400)
23. Vortex mixer (Gemmy Industrial Copp., VM-300)
24. Water bath (Memmert, WB-10)

เชื้อจุลินทรีย์

1. เชื้อ Herpes Simplex Virus type 1 สายพันธุ์ F (HSV-1F) จากสถาบันวิทยาศาสตร์-การแพทย์ทหาร โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า (AFRIM)
2. เชื้อ Herpes Simplex Virus ตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 32 ตัวอย่าง จากสถาบันวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า (AFRIM) และแขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เซลล์เพาะเลี้ยง

Green Monkey Kidney cell (GMK)

ยาที่ใช้ทดสอบการต้านเชื้อไวรัส

Acyclovir [acycloguanosine, 9-2-(hydroxyethoxy methyl) guanine] บริษัท SIGMA-Aldrich CHEMIE GmbH Co.Po., Germany

อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ภาคผนวก ก)

1. Crystal violet ใน 1% ethanol, 0.1%
2. EDTA, 10 mg/ml
3. Growth medium (GMEM)
4. Inactivated serum
5. Maintenance medium
6. Minimum Essential Medium (MEM)
7. NaHCO_3 , 100 mg/ml
8. Overlay medium
9. Phosphate Buffered Saline (PBS) (10X) และ (1X)
10. Sodium Carboxy Methylcellulose, 15 mg/ml
11. Trypsin, 10 mg/ml
12. Trypsin-EDTA, 0.1%

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA (ภาคผนวก ข)

1. Absolute ethanol

2. Chloroform: isoamyl alcohol (50: 1)
3. DNase free and RNase free water
4. EDTA pH 8.0, 0.5M
5. Ethanol, 70%
6. Lysing solution
7. Phenol: chloroform: isoamyl alcohol (50: 50:1)
8. Proteinase K, 10 mg/ml
9. RNase A, 10 mg/ml
10. Sodium acetate, 3M
11. Sodium chloride, 5M
12. Sodium Dodecyl Sulphate (SDS), 100 mg/ml
13. Tris-HCl pH 8.0, 1M

สารเคมีที่ใช้ใน Agarose gel electrophoresis (ภาคผนวก ก)

1. Agarose gel, 0.8% และ 1.0%
2. DNA ขนาดมาตรฐาน 10 kb (Lamda DNA /Eco 130I (SylI) Marker, 16)
3. Ethidium bromide
4. Loading buffer
5. 1X Tris-acetate (TAE) buffer

ชุดสารเคมีสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, UK)

Primer

1. P1 5'-ATGCGAAAGCAGATCCGCTCGC-3'
2. P2 5'-GGCTCTATGCAACATTCGACG-3'
3. PF5 5'-CCCGGTTTCATCCTGGACAACCC-3'
4. PR4 5'-GATGGCGGCCTGCTGCTTGCTCC-3'

วิธีการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยง Green Monkey Kidney cell (GMK)

- 1.1 นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เจริญเต็มผิว (monolayer) flask ขนาด 25 cm² มาทำการ subculture เซลล์ โดยเทอาหารออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ และล้างผิวเซลล์ด้วย PBS (1X) 2 ครั้ง
- 1.2 เติม 0.1% Trypsin-EDTA 0.3-0.5 ml ทิ้งไว้จนเซลล์แยกตัวออกจากกัน แล้วจึงเท 0.1% Trypsin-EDTA ทิ้ง
- 1.3 เติม growth medium และใช้ปิเปตทำการดูดปล่อย medium เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด เพื่อให้เซลล์แยกตัวออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ
- 1.4 แบ่งเซลล์ใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ใหม่ โดยใช้อัตราส่วนในการแบ่งเซลล์เท่ากับ 1:3 หรือ 1:4 และเติม growth medium จนครบ 5 ml ในแต่ละขวด
- 1.5 เอียงขวดเลี้ยงเซลล์ไปมา เพื่อให้เซลล์เดี่ยวๆ กระจายจนทั่ว แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลาประมาณ 2-3 วัน โดยสังเกตการเจริญเติบโตเป็น monolayer ด้วย inverted microscope จากนั้นนำไป subculture ต่อไป ตามวิธีข้างต้นด้วยวิธีปลอดเชื้อ

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ GMK ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม

- 2.1 เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เจริญเต็มผิว (monolayer) และล้างผิวเซลล์ด้วย PBS (1X) 2 ครั้ง
- 2.2 เติม 0.1% Trypsin-EDTA 0.3-0.5 ml ทิ้งไว้จนเซลล์แยกตัวออกจากกัน แล้วจึงเท 0.1% Trypsin-EDTA ทิ้ง
- 2.3 เติม growth medium และใช้ปิเปตทำการดูดปล่อย medium แล้วปรับเซลล์ให้ได้ปริมาณ 1×10^5 cells/ml โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์จนครบ 12 ml เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน
- 2.4 ดูดเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์ ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุมๆละ 500 μ l แล้วเขย่าเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วหลุม
- 2.5 นำไปบ่มที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลาประมาณ 2-3 วัน โดยตรวจดูการเจริญของเซลล์ จนเต็มพื้นที่ผิวของแต่ละหลุมด้วย inverted microscope

3. การเพิ่มปริมาณไวรัส

- 3.1 ดูดอาหารออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เจริญอยู่เต็มพื้นที่ผิว โดยให้มีอาหารเหลืออยู่ในขวดเลี้ยงเซลล์ 1 ml
- 3.2 เติมไวรัสจาก stock 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่อง rocking platform เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ครบเวลาเทไวรัสทิ้ง
- 3.3 เติม maintenance medium 3 ml บ่มที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator ประมาณ 2-3 วัน

- 3.4 สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิด cytopathic effect (CPE) ด้วย inverted microscope จนเซลล์ติดเชื้อไวรัสทั้งหมด แต่ไม่หลุดออกจากพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ (CPE 4+)
- 3.5 นำขวดเลี้ยงเซลล์ไปแช่แข็งที่ -80°C
- 3.6 นำมาทำการละลาย แล้วแช่แข็งเซลล์ติดเชื้อใหม่ ทำ 2 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แตก และเก็บไวรัสที่ -80°C

4. การหาปริมาณไวรัสโดยวิธี Plaque Titration Assay

- 4.1 เพาะเลี้ยง Green Monkey Kidney cell (GMK) ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม
- 4.2 นำเซลล์ที่เจริญเต็มพื้นที่ผิวในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป หลุมละ 300 μl ยกเว้นหลุมเซลล์ควบคุมไม่ต้องดูดอาหารทิ้ง
- 4.3 เจือจางไวรัสจาก stock แบบ 10 เท่าลำดับส่วน (serial ten-fold dilution) ตั้งแต่ $1:10$ - $1:10^6$ โดยขณะทดลองให้แช่ในกล่องน้ำแข็งตลอดเวลา
- 4.4 เติมไวรัสแต่ละความเจือจางใส่ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุมๆละ 100 μl โดยเติมความเจือจางละ 2 หลุม ส่วนหลุมเซลล์ควบคุมไม่ต้องเติมไวรัส
- 4.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่อง rocking platform 1 ชั่วโมง
- 4.6 ครอบเวลา เติม overlay medium ทุกหลุมๆละ 500 μl จากนั้นบ่มที่ 37°C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลาประมาณ 3-4 วัน
- 4.7 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมทิ้งไป และล้างด้วย PBS (1X) 1 ครั้ง ประมาณ 100 μl ทุกหลุม แล้วย้อมสีเซลล์ติดเชื้อด้วย 0.1% crystal violet ใน 1% ethanol โดยหยดลงในแต่ละหลุมประมาณ 3-4 หยด พอให้ท่วมเซลล์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที แล้วดูดสีย้อมทิ้ง
- 4.8 ตรวจสอบการติดสีย้อม นับปริมาณ plaque ที่เกิดขึ้นและคำนวณหาปริมาณไวรัสโดยมีหน่วยเป็น Plaque Forming Unit/ml (PFU/ml)

5. การทดสอบยาต้านไวรัส Acyclovir (ACV) ในการยับยั้งเชื้อไวรัสมาตรฐาน HSV-1 และ เชื้อไวรัสตัวอย่าง โดยวิธี Plaque Reduction Assay

- 5.1 เพาะเลี้ยง Green Monkey Kidney cell (GMK) ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม
- 5.2 นำเซลล์ที่เจริญเต็มหลุมในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป 400 μl ทุกหลุม

- 5.3 เติมไวรัสที่เจือจางแล้วหลุมละ 100 μ l โดยใช้ค่าความเจือจางของไวรัสที่ได้ปริมาณ plaque ไม่เกิน 300 plaque บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้เครื่อง rocking platform
- 5.4 เจือจางยา ACV ด้วยวิธี serial two-fold dilution โดยให้มีความเข้มข้นของยาเริ่มต้นเป็น 100 μ g/ml ทำการเจือจางจำนวน 11 ความเจือจาง แล้วเติม ACV ในแต่ละความเจือจางลงในหลุมไวรัสหลุมละ 200 μ l จำนวน 2 หลุม จนครบ 11 ความเจือจาง ยกเว้นหลุมควบคุมที่ไม่ได้เติมยา
- 5.5 ปิดทับผิวหน้าด้วย overlay medium หลุมละ 400 μ l และนำไปบ่มที่ 37 °C ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 4 วัน
- 5.6 ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกทุกหลุม เติม PBS (1X) หลุมละ 100 μ l ทุกหลุม เพื่อล้างเซลล์ แล้วดูดออก เติม 0.1% Crystal violet ใน 1% ethanol จำนวน 3-4 หยดลงในแต่ละหลุม เพื่อให้ท่วมเซลล์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ดูสีข้อมออก
- 5.7 บันทึกผลจำนวน plaque ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นของ ACV ในการยับยั้งเชื้อไวรัส

6. การสกัด DNA ของไวรัส

- 6.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ GMK ในขวดเพาะเลี้ยงขนาดพื้นที่ผิว 75 cm² จนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิว
- 6.2 ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง โดยเหลืออาหารในขวดเลี้ยงเซลล์ประมาณ 5 ml เติมไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และเชื้อไวรัสตัวอย่าง 100 μ l ลงในแต่ละขวดเลี้ยงเซลล์
- 6.3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง rocking platform ครบเวลา เทไวรัสทิ้ง
- 6.4 เติม maintenance medium 20 ml บ่มที่ 37 °C ใน 5% CO₂ incubator
- 6.5 สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (CPE) ด้วย inverted microscope จนเซลล์ติดเชื้อไวรัสทั้งหมด แต่ไม่หลุดออกจากพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ (CPE 4+) จึงนำมาสกัด DNA
- 6.6 เทอาหารทิ้ง เติม PBS (แช่เย็นจัด) 20 ml ดูดปล่อย PBS จนเซลล์หลุดออกจากพื้นผิวขวดเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด แล้วจึงดูดใส่หลอดปั่นขนาด 50 ml ขณะทดลองให้แช่ในถาดน้ำแข็งตลอดเวลา
- 6.7 นำเซลล์ที่ติดเชื้อไปปั่นที่ 1,200 rpm 4 °C 5 นาที เท PBS ทิ้ง
- 6.8 ละลายตะกอนด้วย PBS 1 ml ดูดใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ปั่นที่ 1,200 rpm 4 °C 5 นาที ดูด PBS ทิ้ง

- 6.9 เติม lysing solution (แช่เย็น) 1 ml ผสมสารละลายโดยใช้ vortex mixer และบ่มที่ 4 °C 5 นาที
- 6.10 เติม 5M sodium chloride 40 µl ปั่นที่ 10,000 rpm 4 °C 10 นาที
- 6.11 ถ่ายสารละลายใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม 10% SDS 55 µl 10 mg/ml proteinase K 10.5 µl และ RNase A 5 µl ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดไปมา และบ่มที่ 37 °C 1 ชั่วโมง ใน water bath
- 6.12 เติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (50: 50:1) ปริมาณเท่ากับสารละลายในหลอด จากนั้นผสมสารละลายโดยใช้ vortex mixer และนำไปปั่นที่ 10,000 rpm 4 °C 5 นาที
- 6.13 นำสารละลายใสด้านบนใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (50: 1) ปริมาณเท่ากับสารละลายในหลอด ผสมสารละลายโดยใช้ vortex mixer และนำไปปั่นที่ 10,000 rpm 4 °C 5 นาที
- 6.14 ดูดสารละลายใสด้านบนใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม 3M sodium acetate ปริมาณ 0.1 เท่าของสารละลายใส และเติม absolute ethanol (แช่เย็นจัด) ปริมาณ 2 เท่าของสารละลายใส จากนั้นผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดไปมา
- 6.15 นำส่วนผสมที่ได้บ่มที่ -20 °C อย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาปั่นที่ 10,000 rpm 4 °C 15 นาที
- 6.16 เทสารละลายใสทิ้ง แล้วล้างตะกอน DNA ด้วยการเติม 70% ethanol 250 µl จึงปั่นที่ 10,000 rpm 4 °C 5 นาที
- 6.17 เท 70% ethanol ทิ้ง ปล่อยให้ตะกอน DNA แห้ง แล้วจึงละลายด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ 20 µl เก็บ DNA ที่ -20 °C
- 6.18 ตรวจสอบ DNA ที่สกัดได้ ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

7. การหาสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ DNA polymerase gene ของเชื้อไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และเชื้อไวรัสตัวอย่าง

- 7.1 ออกแบบ primer P1, P2, PF5 และ PR4 เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ที่บริเวณ DNA polymerase gene จากลำดับเบสของเชื้อไวรัสมาตรฐาน HSV-1F ที่ได้จาก Entrez (National Center for Biotechnology Information, NCBI)
- 7.2 นำ DNA ของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F ที่สกัดได้ มาทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ซึ่งได้แก่ ความเข้มข้นของ MgCl₂ dNTPs และ primer รวมไปถึงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในขั้นตอนต่างๆของการทำ PCR ดังนี้

7.2.1 $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0.5-2.5 mM (มนิชญา, 2549)

7.2.2 dNTPs ความเข้มข้น 0.1-0.5 mM (มนิชญา, 2549)

7.2.3 primer ความเข้มข้น 0.5-1.5 μM (มนิชญา, 2549)

7.2.4 ขั้น initial denaturation 94 -95 °C เป็นเวลา 1-3 นาที

7.2.5 ขั้น denaturation 94 -95 °C เป็นเวลา 45 วินาที-1 นาที

7.2.6 ขั้น annealing 55 -65 °C เป็นเวลา 45 วินาที-1 นาที

7.2.7 ขั้น extension 72 °C เป็นเวลา 1-4 นาที

โดยที่ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 50 μl

7.3 ตรวจสอบชิ้นส่วน DNA ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

8. การสกัดชิ้นส่วน DNA (PCR product) ให้บริสุทธิ์

8.1 ตรวจสอบแถบ DNA (PCR product) บน 1% agarose gel ภายหลังจากการทำ electrophoresis โดยส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

หมายเหตุ : เพื่อป้องกันอันตรายจากแสงอัลตราไวโอเลตที่จะเกิดกับตา ควรสวมแว่นตาที่ป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลตได้ ขณะดูผลการทดลอง

8.2 จากนั้นใช้ใบมีดตัด agarose gel บริเวณแถบของ DNA (PCR product) ทำภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

8.3 นำเจลที่ตัดได้ปริมาณ 300 mg ใส่ใน microcentrifuge tube ทำการสกัด DNA (PCR product) ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, UK) (รายละเอียดของวิธีสกัด PCR product ให้บริสุทธิ์ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ง)

8.4 เมื่อได้ชิ้นส่วน DNA (PCR product) ที่บริสุทธิ์ ปราศจาก non-specific fragments แล้วจึงนำไปตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DNA polymerase ของเชื้อไวรัสตัวอย่าง

9. การตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DNA polymerase ของเชื้อไวรัส HSV-1 ที่มี

ความสัมพันธ์เกี่ยวกับการดื้อยา acyclovir

9.1 หลังจากเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน DNA polymerase ของเชื้อไวรัสตัวอย่างที่ให้ค่า IC_{50} สูง สัมพันธ์กับการดื้อยา acyclovir ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะสำหรับยีน DNA polymerase ของเชื้อไวรัส HSV-1 และได้ purified PCR product แล้ว จึงนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป ซึ่งดำเนินการโดยบริษัท Macrogen, Inc. ประเทศเกาหลีใต้

- 9.2 ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ด้วยการประกอบลำดับเบสของเชื้อไวรัสแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ และเปรียบเทียบลำดับเบส โดยวิธี alignment ในส่วนของยีน DNA polymerase ของเชื้อไวรัสมาตรฐาน HSV-1F กับเชื้อไวรัสตัวอย่าง
- 9.3 ตรวจสอบผลของการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DNA polymerase ของเชื้อไวรัสตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา acyclovir แล้วจึงนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นไปวิเคราะห์การแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรมจากฐานข้อมูล GenBank ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi> (Miller and Lipman, 2008)