

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง PCR MJ mini gradient Thermal cycle (Bio-Rad, USA)
2. เครื่อง Refrigerated centrifuge (Sanyo model MSE)
3. ตู้ดูดควัน LABORATORY FUME HOOD (ILAB)
4. ตู้ถ่ายเชื้อ (Astec Microflow Model ABS 1200)
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Julabo model TW12)
6. ชุด Gel eletrophoresis (Amersham Biosciences, USA)
7. เครื่อง UV transilluminator (Gene Flash)
8. ตู้แช่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและ -20 องศาเซลเซียส
9. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
10. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (GALLENKAMP, UK)
11. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยมสามตำแหน่ง (Mettler Toledo AB304-S)
12. หม้อนึ่งความดันไอ (Tomy model SS-325)
13. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Metrohm 713)
14. เครื่อง vortex (MS1 Minishaker)
15. Adjustable automatic pipettes
16. Multi pipette tip ขนาดต่าง ๆ
17. Centrifuge tube
18. Microcentrifuge tube
19. PCR tube
20. Microcentrifuge storage box
21. เตาอบไมโครเวฟ

อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

LB Broth

LB Agar

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาด้านอนุชีววิทยา

1. TRIzol Reagent (Invitrogen, USA)
2. 5% chelex (Bio-Rad, USA)
3. Chloroform
4. Isopropanol
5. 75% ethanol
6. RNase-free water, DEPC-treated water หรือ Deionized water
7. Random hexamer (Fermentas, USA)
8. 5X reaction buffer (Fermentas, USA)
9. 10 mM dNTP mix (Fermentas, USA)
10. RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (Fermentas, USA)
11. RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, USA)
12. 10X *Taq* buffer (Fermentas, USA)
13. 25 mM MgCl₂ (Fermentas, USA)
14. Primer (Fermentas, USA)
15. *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA)
16. Agarose
17. TAE buffer (ภาคผนวก ข)
18. Molecular weight marker
 - 18.1 100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA)
 - 18.2 1 kb DNA Ladder (Fermentas, USA)
19. Loading dye (Fermentas, USA)
20. Ethidium bromide (ภาคผนวก ข)
21. GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, USA)
22. pGEM-T Easy Vectors (Promega, USA)
23. JM109 Competent Cells (Promega, USA)
24. Aurum™ Plasmid Mini Kit (Bio rad, USA)
25. Ampicillin 0.1 g/ml
26. IPTG 100 mM
27. X-Gal 50 mg/ml

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายนปี พ.ศ. 2549 ถึงเดือนสิงหาคมปี พ.ศ. 2550 จากฟาร์มต่าง ๆ ทางภาคเหนือของประเทศไทย 7 จังหวัด คือ จังหวัดลำพูน ลำปาง เชียงราย พะเยา น่าน แพร่ เชียงใหม่ จำนวน 9, 9, 5, 8, 6, 5 และ 4 ฟาร์มตามลำดับ เก็บตัวอย่างแบบสุ่มโดยทำการสกัดผึ้งพันธุ์ตัวเต็มวัย (adult) จากเฟรม (frame) ประมาณ 200 - 250 ตัว แช่ตัวอย่างใน 70% ethanol สำหรับผึ้งพันธุ์ตัวอ่อน (brood) นั้นเก็บตัวอย่างโดยใช้ปากคีบคีบแต่ละตัวเก็บใน microcentrifuge tube และทำการเก็บไรโดยการแช่ตัวเต็มวัยใน 70% ethanol ทิ้งไว้ 15 นาที ตัวไรจะหลุดจากตัวผึ้งพันธุ์ แยกชนิดของไรพร้อมนับปริมาณไรแต่ละชนิด แล้วเก็บตัวอย่างทั้งหมดที่อุณหภูมิ -20 °C จนกระทั่งสกัด RNA

2. การสกัด RNA จากตัวอย่างผึ้ง

2.1 นำตัวอย่างผึ้งพันธุ์จากรังเดียวกันจำนวน 10 ตัว ใส่ลงในถุงพลาสติก 2 ชั้น เติม TRIzol Reagent 5 ml แล้วจึงใช้โกร่งทำการบดผึ้งให้ละเอียด

2.2 คัดเฉพาะสารละลายส่วนใสใส่ใน microcentrifuge tube ถ้าพบตะกอนมากควรนำสารที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที เพื่อเอาตะกอนที่ค้างอยู่ทิ้งไป ดูดส่วนใสที่ได้แยกไปปั่นที่ 30 °C 5 นาที

2.3 เติม chloroform 1 ml เขย่า 15 วินาที แล้วนำไปปั่นที่ 30 °C 3 นาที

2.4 ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 4 °C 15 นาที

2.5 คัดสารละลาย supernatant ขึ้นบนใสใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ และเติม isopropanol 2.5 ml ปั่นที่ 30 °C 10 นาที

2.6 ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 4 °C 10 นาที

2.7 ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol ที่แช่เย็นลงไป 5 ml แล้วนำไปผสมด้วยการ vortex และเก็บไว้ที่ -20 °C ข้ามคืน

2.8 ปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 rpm 4 °C 10 นาที

2.9 ละลายตะกอน RNA ด้วย RNase-free water 100 µl เก็บไว้ที่ -80 °C

3. การสกัด RNA จากตัวอย่างไรวาร์รัว (Tangjingjai *et al.*, 2003)

3.1 นำตัวอย่างไรวาร์รัวจำนวน 10 ตัว ใส่ลงใน microcentrifuge tube แล้วเติม 5% chelex 350 µl แล้วจึงใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบดไรให้ละเอียด

- 3.2 นำไปผสมด้วยการ vortex 30 วินาที
- 3.3 บ่มที่ 55 °C 3 ชั่วโมง และที่ 100 °C 7 นาที
- 3.4 ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
- 3.5 ดูด supernatant เก็บไว้ที่ 4 °C

4. การสังเคราะห์ complementary DNA โดยใช้ M-MuLV reverse transcriptase และ random hexamer

4.1 เตรียมส่วนผสมต่อไปนี้ลงใน PCR tube โดยแช่หลอดในน้ำแข็ง

Total RNA ของผิว (ของไร)	5 (10)	μl
Random hexamer	1	μl
DEPC-treated water (สำหรับไร)	5 (0)	μl

4.2 บ่มส่วนผสมดังกล่าวที่ 70 °C 5 นาที แล้วทำให้เย็นโดยการแช่น้ำแข็ง

4.3 เติมสารดังต่อไปนี้ตามลำดับ

5X reaction buffer	4	μl
10 mM dNTP mix	2	μl
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor	0.5	μl
DEPC-treated water	1.5	μl

4.4 บ่มส่วนผสมที่ 25 °C 5 นาที

4.5 เติม RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μl

4.6 บ่มที่ 25 °C 10 นาที และที่ 42 °C 60 นาที ตามลำดับ

4.7 หยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่ 70 °C 10 นาที

4.8 เก็บ cDNA ที่ได้ไว้ที่ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5. การเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

5.1 ทำการเพิ่มจำนวนเพื่อตรวจสอบหาเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ ในสิ่งปนื้อและไรวาร์ร่ว โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้คือเริ่มจากการเตรียม Master mix ใน microcentrifuge tube ที่แช่ในน้ำแข็ง ดังนี้

<u>Component</u>	<u>Final concentration</u>	<u>Volume/reaction</u>
10X <i>Taq</i> buffer	1X	5 μl
MgCl ₂	2.5 mM	5 μl

dNTP mix	0.2	mM	1	μl
Primer F	0.5	μM	2.5	μl
Primer R	0.5	μM	2.5	μl
<i>Taq</i> DNA polymerase	2.5	unit/reaction	0.5	μl
cDNA template	-		3	μl
Deionized water	-		30.5	μl
Total volume	-		50	μl

สำหรับ forward primer และ reverse primer ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสแต่ละชนิดนั้น มีลำดับ

DNA ดังตาราง 2

ตาราง 2 forward primer และ reverse primer ที่ใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิด

Virus	Forward primer	Reverse primer	Length (bp) ^a	เอกสาร อ้างอิง
ABPV	TGAGAACACCTGTAATGTGG	ACCAGAGGGTTGACTGTGTG	452	Tentcheva <i>et al.</i> , 2004b
BQCV	GGACGAAAGGAAGCCTAAAC	ACTAGGAAGAGACTTGCACC	424	Tentcheva <i>et al.</i> , 2004b
CBPV	AGTTGTCATGGTTAACAGGATACGAG	TCTAATCTTAGCACGAAAGCCGAG	455	Ribière <i>et al.</i> , 2002
DWV	TTTGCAAGATGCTGTATGTGG	GTCGTGCAGCTCGATAGGAT	395	Tentcheva <i>et al.</i> , 2004a
KBV	GATGAACGTCGACCTATTGA	TGTGGGTTGGCTATGAGTCA	393	Stoltz <i>et al.</i> , 1995
SBV	GGATGAAAGGAAATTACCAG	CCACTAGGTGATCCACACT	426	Tentcheva <i>et al.</i> , 2004b

^a ความยาวของ PCR product

5.2 คูณส่วนผสมดังกล่าวแบ่งใส่ลงใน PCR tube แล้วเติม cDNA template ในขั้นตอนสุดท้าย

5.3 นำ PCR tube เข้าเครื่อง Thermal cycle โดยตั้งโปรแกรมของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

Innitial denaturation	95 °C	2 นาที	} 40 รอบ
Denature	95 °C	30 วินาที	
Annealing	56 °C	45 วินาที	
Extension	72 °C	1 นาที	
Final extension	72 °C	10 นาที	

สำหรับเชื้อไวรัส KBV ตั้งอุณหภูมิ Annealing ที่ 47 °C

5.4 เก็บ PCR product ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (เก็บระยะสั้น) หรือ -20 °C (เก็บระยะยาว)

6. การแสดงผลของ PCR product โดยวิธี Agarose gel electrophoresis

6.1 เตรียม agarose gel โดยการละลาย agarose 1.5% ด้วย 1X TAE buffer ผสมให้หลอมละลายเข้ากัน

6.2 เท agarose gel ที่เตรียมลงใน gel chamber ที่วาง comb ไว้แล้วเพื่อให้เกิดเป็นหลุมสำหรับหยดตัวอย่าง ปลดอยให้แข็งตัวประมาณ 30 - 45 นาที

6.3 ค้าง comb ออกอย่างระมัดระวังอย่าให้เจลเสียสภาพ แล้วนำมาวางลงใน gel chamber เท 1X TAE buffer ให้ท่วมตัวเจลประมาณ 1 มิลลิเมตร

6.4 ผสม loading dye กับ PCR product อัตราส่วน 1:5 แล้วหยดลงในแต่ละหลุมของเจล โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA ladder

6.5 ทำการ run agarose gel โดยใช้ electrophoresis จ่ายกระแสไฟฟ้าที่ 100 V เป็นเวลา 45 นาทีหรือสังเกตการเคลื่อนที่ของสี methylene blue แล้วจึงหยุดกระแสไฟฟ้าเมื่อถึงระยะที่เหมาะสม

6.6 ย้อมเจลโดยการแช่ในสารละลาย ethidium bromide นาน 10 นาที แล้วล้างเจลโดยการแช่ในน้ำกลั่นนาน 10 นาที นำไปดูผลด้วยเครื่อง UV transilluminator และถ่ายภาพเก็บไว้

7. การเตรียม DNA ให้บริสุทธิ์จากเจลโดยใช้ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, USA)

7.1 ตัดเจลบริเวณที่มีชิ้น DNA ขนาดที่ต้องการใส่ลงใน microcentrifuge tube

7.2 เติม capture buffer 10 µl ต่อน้ำหนัก agarose gel 10 mg

7.3 นำไปบ่มที่ 60 °C นาน 15 - 20 นาที หรือจนกว่า agarose gel ละลายหมด

7.4 กด agarose gel ที่ละลายแล้วใส่ลงใน GFX column บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที

7.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 4 °C 30 วินาที เทสารละลายส่วนใสใน collection tube

ทิ้ง

- 7.6 เติม wash buffer 500 μ l แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 4 °C 30 วินาที
- 7.7 ย้ายส่วนของ GFX column ใส่ลงใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ ที่ตัดฝาทิ้งแล้ว
- 7.8 เติม elution buffer 10-50 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที
- 7.9 ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 4 °C 1 นาที
- 7.10 คัดสารละลายส่วนใส (DNA บริสุทธิ์) ใส่ลงใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

8. การเชื่อมต่อ DNA เข้ากับ pGEM-T Easy vectors (Promega, USA)

8.1 ผสมสารเหล่านี้ในหลอด PCR tube

	<u>SD reaction</u>	<u>Positive control</u>	<u>Negative control</u>
2X rapid ligation buffer	5 μ l	5 μ l	5 μ l
pGEM-T Easy vector	1 μ l	1 μ l	1 μ l
insert (purified DNA)	2 μ l	-	-
Control insert DNA	-	2 μ l	-
T4 DNA ligation	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Deionized water to a final	1 μ l	1 μ l	3 μ l
ปริมาตรใน 10 μ l			

8.2 บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน

9. การถ่ายโอนยีนโดยวิธี Transformation

9.1 เติม *Escherichia coli* JM 109 Competent Cell (Promega, USA) 50 μ l ลงในหลอด microcentrifuge tube โดยหลอดแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา

9.2 เติม recombinant plasmid ที่ได้จากการทำ ligation ไว้แล้วลงไป 5 μ l เขย่าเบาๆ ให้ผสมกัน

9.3 นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

9.4 นำไปบ่มที่ 42 °C (Heat shock) 45 วินาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที

9.5 เติม LB broth 900 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ใน shaking incubator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

9.6 คูดเชื้อแบคทีเรีย 100 μ l หยดลงบนอาหาร LB plate ที่มี ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 μ g/ml IPTG 100 μ l (stock 100 mM) และ X-Gal 20 μ l (stock 50 mg/ml) แล้วทำการ spread plate

9.7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง

9.8 คัดเลือก colony สีขาวจาก LB plate ที่ทำการ spread plate ไว้ โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วแตะ colony มาขีดบนอาหารที่มี ampicillin/IPTG/X-Gal และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง เพื่อยืนยันว่า colony เป็นสีขาวจริง

10. การตรวจสอบ insert product ใน plasmid โดยวิธี Colony PCR

สามารถตรวจหา insert product ได้ด้วยวิธี Colony PCR โดยใช้ primer ชุดเดียวกับที่ใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสแต่ละชนิดและใช้เซลล์ transformant ที่ได้จากข้อ 9 เป็นแหล่งของ DNA template โดยตรง ทำตามวิธีในข้อ 5 แล้วใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วแตะ colony ที่ต้องการตรวจสอบผสมลงไปใน PCR tube เล็กน้อย โดยไม่คิดปริมาตรของ template ที่ผสมลงไป และแสดงผล PCR product ตามวิธีในข้อ 6 เพื่อตรวจสอบว่ามีชิ้นส่วนที่ insert จริง

11. การสกัด plasmid โดยใช้ Aurum™ Plasmid Mini Kit (Bio rad, USA)

11.1 เลี้ยง transformant ที่ได้จากข้อ 9.8 ในอาหาร LB broth ที่มี ampicillin (0.1 mg/ml) 10 ml นำไปเขย่าที่ 37 °C 24 ชั่วโมง

11.2 คูดแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ 3 ml ปั่นเก็บเซลล์ที่ 6,000 rpm 4 °C 10 นาที ทำซ้ำสองรอบ

11.3 เติม resuspension solution 250 ไมโครลิตร แล้วนำไป vortex เพื่อละลายตะกอน

11.4 เติม lysis solution 250 μ l กลับหลอดไปมา 5 - 6 ครั้ง หรือใช้ autopipette คูดขึ้นลงอย่างช้า ๆ

11.5 เติม neutralization solution 350 μ l กลับหลอดไปมา 5 - 6 ครั้ง หรือใช้ autopipette คูดขึ้นลงอย่างช้า ๆ

11.6 ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 4 °C 5 นาที คูดเฉพาะส่วนใสไว้ใน plasmid mini column

11.7 ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 4 °C 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง

11.8 เติม wash solution 750 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 4 °C 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำไปปั่นอีกครั้งหนึ่ง

11.9 นำส่วน plasmid mini column ใสไว้ใน microcentrifuge tube ใหม่

11.10 เติม elution solution 50 μ l ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที

11.11 ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 4 °C 1 นาที คัดเฉพาะส่วนใสที่กรองผ่าน plasmid mini column ใส่ลงไปใน microcentrifuge tube ใหม่ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

12. การวิเคราะห์หาลำดับเบสของ RT-PCR product

ส่งตัวอย่างผล RT-PCR product ที่ได้เพื่อตรวจหาลำดับเบส (DNA sequencing) ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี จากนั้นนำผลลำดับเบสที่ได้จากการทดลองมาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของเชื้อไวรัสในฐานข้อมูลของ NCBI GenBank โดยวิธีการทำ BLAST search เพื่อยืนยันผลที่ได้ว่าเป็นเชื้อไวรัสชนิดนั้นจริง

13. การศึกษาความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างเชื้อไวรัสในฝั่กพันธุ์และไร่วารัรว

ทำการคำนวณเกี่ยวกับความถี่ของการตรวจพบเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ ในฝั่กพันธุ์และในไร่วารัรวของฟาร์มฝั่กจากทางภาคเหนือของประเทศไทย พร้อมทั้งวิเคราะห์ผลทางด้านสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 14.0 for Windows Evaluation Version