ผลของการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำโดยใช้ชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำในการผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดน้ำมัน

สหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ[1] อารีย์ เกตุสุวรรณวงศ์[1]

บทคัดย่อ

ในการผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดน้ำมันระดับอุตสาหกรรม การปรับอุณหภูมิวัตภาคน้ำจาก 4° ซ. ให้ได้ 25° ซ. ในถังผสมที่มีผนัง 2 ชั้น ขนาด 600 ลิตร อาจมีการสูญเสียปริมาณไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Inactivated FMDV) ได้ เนื่องจากอุณหภูมิของน้ำไหลเวียนและระยะเวลาที่ใช้ในการปรับอุณหภูมิ จึงได้ทดลองใช้ชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำในการปรับอุณหภูมิโดยตั้งค่าของ Temperature regulator ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน บันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการปรับ บันทึกอุณหภูมิสูงสุดของน้ำไหลเวียน และหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียปริมาณอนุภาค 146S หลังการปรับอุณหภูมิ พบว่าเมื่อตั้งค่าอุณหภูมิของ Temperature regulator ที่ 18° ซ., 19° ซ., 20° ซ., 21° ซ., 22° ซ., 23° ซ., 24° ซ. และ 25° ซ. เวลาที่ใช้ในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำเฉลี่ยเท่ากับ 42, 40, 31, 28, 25, 23, 22 และ 20 นาที ตามลำดับ อุณหภูมิสูงสุดของน้ำไหลเวียนที่ใช้ปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำเฉลี่ยเท่ากับ 48.9° ซ., 49.8° ซ., 50.7° ซ., 51.5° ซ., 52.2° ซ., 53.0° ซ., 53.9° ซ. และ 54.6° ซ. ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การสูญเสียปริมาณอนุภาค 146S ในวัตภาคน้ำเท่ากับ 3.46%, 3.50%, 3.56%,3.63%, 3.67%, 3.62%, 3.65% และ 3.84% ตามลำดับ ดังนั้นสามารถตั้งค่าอุณหภูมิของ Temperature regulator ตั้งแต่ 18° ซ. ถึง 25° ซ. ในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียปริมาณอนุภาค 146S อยู่ระหว่าง 3.46% ถึง 3.84%

คำสำคัญ: การปรับอุณหภูมิ ชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำ การผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยชนิดน้ำมัน

---

[1] กลุ่มผลิตชีวภัณฑ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

อนุภาค 146S เป็นอนุภาคสมบูรณ์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในสัตว์ได้ และเป็นมาตรฐานในการกำหนดปริมาณไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Inactivated FMDV) ในวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกรชนิดน้ำมัน การผสมวัคซีนใช้เทคนิคการกลับวัตภาค (Phase inversion technique) ซึ่งจำเป็นที่จะต้องปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำ (aqueous phase) ที่มีปริมาณเท่ากับวัตภาคน้ำมัน (oily phase) จาก 4° ซ. ให้มีอุณหภูมิเท่ากับวัตภาคน้ำมันที่ 25° ซ. ทำการผสมและได้วัคซีนชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water, o/w) ที่ 4° ซ. (นริศ และคณะ, 2543) ในการผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกรชนิดน้ำมันในระดับอุตสาหกรรม การปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำในถังผสมที่มีผนัง 2 ชั้น ขนาดความจุ 600 ลิตร[1] (600 liters doubled jacket mixing tank) ปริมาตรของวัตภาคน้ำที่ต้องปรับอุณหภูมิแต่ละครั้งจำนวน 272 ลิตร จำเป็นต้องนำชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำ[2] สำหรับถังผสมที่มีผนัง 2 ชั้น ขนาดความจุ 600 ลิตร มาใช้ปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำจาก 4° ซ. ให้ได้ 25° ซ. ซึ่งชุดควบคุมนี้จะมี Temperature regulator[3] ที่สามารถตั้งค่าอุณหภูมิได้ การปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำจะอาศัยการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำไหลเวียน (circulating water) จากอุณหภูมิห้องให้มีอุณหภูมิสูงขึ้นเพื่อปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำให้ได้ 25° ซ. ตามต้องการ แต่บางครั้งอุณหภูมิของน้ำไหลเวียนที่ใช้ปรับมีอุณหภูมิสูงไม่เท่ากันแม้ว่าค่าอุณหภูมิที่ได้ตั้งไว้ใน Temperature regulator จะเท่ากัน ทั้งนี้สาเหตุอาจเกิดจากอุณหภูมิของน้ำไหลเวียนที่ใช้เริ่มต้นไม่เท่ากันจากการวัดอุณหภูมิพบว่าอยู่ระหว่าง 27° ซ. ถึง 30° ซ. ซึ่งในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำจะมีความสำคัญมาก เนื่องจากหากใช้น้ำไหลเวียนที่มีอุณหภูมิสูงเกินไป จะทำให้วัตภาคน้ำมีอุณหภูมิสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ไม่สม่ำเสมอ และอาจสูงเกินความต้องการ ซึ่งจะมีผลต่อความคงตัวของวัคซีนได้ หากอุณหภูมิขณะผสมของวัตภาคน้ำและวัตภาคน้ำมัน แตกต่างกันมากกว่า 2-3 องศา (พิมพร, 2534) และยังทำให้ปริมาณอนุภาค 146S ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ inactivated ด้วยสาร aziridine ลดลงได้ เมื่ออยู่ในสภาวะอุณหภูมิสูง ในระยะเวลาสั้น (Doel and Baccarini, 1981) แต่ในทางกลับกันการใช้น้ำไหลเวียนที่มีอุณหภูมิสูงเพียงเล็กน้อยก็จะใช้ระยะเวลานานทำให้ขบวนการผลิตวัคซีนสิ้นเปลืองเวลามากขึ้น หรือไม่สามารถปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำได้ตามต้องการ

---

[1] RHONE MERIEUX® S/N28.88, France [2] RHONE MERIEUX® - SPEICHIM®, France

[3] MORS® MTRD R2 P14, Canada

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการตั้งค่าอุณหภูมิต่าง ๆ กัน ของ Temperature regulator ในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำให้ได้ 25° ซ. ต่อการสูญเสียปริมาณอนุภาค 146S ในการผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสำหรับสุกรชนิดน้ำมันในระดับอุตสาหกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำ

ชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำสำหรับถังผสมที่มีผนัง 2 ชั้น ขนาดความจุ 600 ลิตร การปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำอาศัยปั๊ม[4] (circulating pump) ให้น้ำไหลเวียนผ่านถังผสมและเพิ่มอุณหภูมิของน้ำไหลเวียนจากอุณหภูมิห้องให้สูงขึ้น โดยการเปิดวาล์วไอน้ำร้อน[5] (steam solenoid valve) ให้ไหลเข้าระบบโดยอัตโนมัติ ทำให้วัตภาคน้ำมีอุณหภูมิสูงขึ้นจนมีค่าเท่ากับอุณหภูมิที่ได้กำหนดไว้ที่ Temperature regulator เครื่องจะปิดวาล์วไอน้ำร้อนทันที แต่ถ้าอุณหภูมิของวัตภาคน้ำยังคงสูงขึ้นอีกชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำจะทำการลดอุณหภูมิของน้ำไหลเวียนลง โดยการเปิดวาล์วน้ำเย็น[6] (cold water solenoid valve) ให้ไหลเข้าระบบโดยอัตโนมัติ ซึ่งจะทำให้อุณหภูมิของน้ำไหลเวียนลดต่ำลง

2. วัตภาคน้ำ

ประกอบด้วย ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์ โอ เอ และเอเชียวัน ซึ่งถูก inactivate ด้วย binary ethylenimine ปั่นผสมในวัตภาคน้ำ ปริมาณไม่น้อยกว่า 10.5 ไมโครกรัม/มล. (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, ติดต่อส่วนบุคคล)

3. ขวดเก็บตัวอย่างขนาด 250 มล.

วิธีการ

1. การเตรียมวัตภาคน้ำก่อนการปรับอุณหภูมิ

ปั่นผสมแอนติเจนไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซึ่งถูก inactivate ด้วย binary ethyleneimine รวม 3 ไทป์ ในวัตภาคน้ำปริมาตร 272 ลิตร ในถังผสมที่มีผนัง 2 ชั้น ความจุ 600 ลิตร ที่ 4° ซ. ความเร็วรอบของ agitator[7] ไม่น้อยกว่า 80 รอบ/นาที นาน 1 ชม. จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างวัตภาคน้ำก่อนปรับอุณหภูมิ (4° ซ.) ในขวดเก็บตัวอย่างจำนวน 50 มล.

---

[4] SALMSON® CXL8032, France

[5] BURKERT® 255A05 MCG1/4, Germany

[6] BURKERT® 330A04 BG1/4, Germany

[7] SEW.USOCOME® SF40GN90L, France

2. การปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำให้ได้อุณหภูมิ 25° ซ.

เปลี่ยนน้ำไหลเวียนที่อยู่รอบ ๆ ถังผสมจากน้ำ 4° ซ. มาเป็นน้ำที่อุณหภูมิห้องแล้วตั้งค่าอุณหภูมิใน Temperature regulator เปิดชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำ เครื่องจะทำการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำจาก 4° ซ. ให้มีอุณหภูมิสูงขึ้น โดยอาศัย probe[8] วัดอุณหภูมิ เมื่อได้อุณหภูมิของวัตภาคน้ำตามที่ต้องการแล้วปิดเครื่อง ทำการเก็บตัวอย่างวัตภาคน้ำหลังจากปรับอุณหภูมิได้ 25° ซ. ในขวดเก็บตัวอย่างจำนวน 50 มล. บันทึกอุณหภูมิของวัตภาคน้ำที่ได้ บันทึกอุณหภูมิสูงสุดของน้ำไหลเวียน บันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำ และเตรียมการสำหรับผสมวัตภาคน้ำลงในวัตภาคน้ำมันที่มีอุณหภูมิเท่ากันที่ 25° ซ. ต่อไป

3. ทำการทดลองตามข้อ 1 และข้อ 2 โดยตั้งค่าอุณหภูมิใน Temperature regulator ที่ 18° ซ., 19° ซ., 20° ซ., 21° ซ., 22° ซ., 23° ซ., 24° ซ. และ 25° ซ. ตามลำดับ

4. ตรวจหาปริมาณอนุภาค 146S (ไมโครกรัม/มล.) โดยวิธี Sucrose density gradient ultracentrifugation (Bartelling and Neloen, 1974; Doel et al., 1982; Doel and Nowat, 1985; มนตรีและเชาวฤทธิ์, 2535) ในตัวอย่างก่อนและหลังการปรับอุณหภูมิ

5. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และสรุปผล

ผลการทดลอง

จากการใช้ชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำสำหรับถังผสมที่มีผนัง 2 ชั้น ขนาดความจุ 600 ลิตร ในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำที่มีปริมาตร 272 ลิตร จาก 4° ซ. ให้ได้ 25° ซ. โดยตั้งค่าอุณหภูมิใน Temperature regulator ที่อุณหภูมิ 18° ซ., 19° ซ., 20° ซ., 21° ซ., 22° ซ., 23° ซ., 24° ซ. และ 25° ซ. (ตารางที่ 1) พบว่าเวลาที่ใช้ในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำเฉลี่ยเท่ากับ 42, 40, 31, 28, 25, 23, 22 และ 20 นาที ตามลำดับ อุณหภูมิสูงสุดของน้ำไหลเวียนที่ใช้ปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 48.9° ซ., 49.8° ซ., 50.7° ซ., 51.5° ซ., 52.2° ซ., 53.0° ซ., 53.9° ซ. และ 54.6° ซ. ตามลำดับ อุณหภูมิของวัตภาคน้ำก่อนผสมกับวัตภาคน้ำมันเฉลี่ยเท่ากับ 24.0° ซ., 24.5° ซ., 25.0° ซ., 25.0° ซ., 25.0° ซ., 25.0° ซ., 26.0° ซ. และ 27.0° ซ. ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การสูญเสียปริมาณอนุภาค146Sจากการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำเท่ากับ 3.46%, 3.50%, 3.56%,3.63%, 3.67%, 3.62%, 3.65% และ 3.84% ตามลำดับ จากผลการทดลองสามารถใช้ชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำได้ ซึ่งสามารถตั้งค่าอุณหภูมิใน Temperature regulator ที่ 18° ซ. ถึง 25° ซ.ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียปริมาณอนุภาค 146S อยู่ระหว่าง 3.46% ถึง 3.84%

[8] Omron® Pt 100 Ω Ø 6 x 230 mm, Japan

วิจารณ์

การปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำจาก 4° ซ. ให้ได้ 25° ซ. ด้วยชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำสำหรับถังผสมที่มีผนัง 2 ชั้น ขนาดความจุ 600 ลิตร โดยกำหนดค่าอุณหภูมิใน Temperature regulator ที่ 18° ซ. ถึง 25° ซ. พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การสูญเสียปริมาณอนุภาค 146S อยู่ระหว่าง 3.46% ถึง 3.84% และค่าเฉลี่ยปริมาณอนุภาค 146S หลังการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำที่ได้มีค่าไม่น้อยกว่า 10.5 ไมโครกรัม/มล. (สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, ติดต่อส่วนบุคคล) แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำได้ โดยมีผลต่อการสูญเสียปริมาณอนุภาค 146S ไม่แตกต่างกัน การลดลงของปริมาณอนุภาค 146S ในวัตภาคน้ำนี้อาจเป็นผลมาจากปัจจัยร่วมกันระหว่างอุณหภูมิของน้ำไหลเวียน และระยะเวลาที่ใช้ในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำ ซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การสูญเสียมีค่าใกล้เคียงกัน ถึงแม้ว่าอุณหภูมิของน้ำไหลเวียนที่ใช้จะสูงขึ้น แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำก็จะลดลงด้วย ดังนั้นควรจะได้มีการศึกษาปัจจัยอย่างใดอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อการสูญเสียปริมาณอนุภาค 146S ที่ชัดเจนในโอกาสต่อไป

จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าการตั้งค่าอุณหภูมิของ Temperature regulator ของชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำ ในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำให้ได้ 25° ซ. เพื่อการผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมที่เหมาะสม สามารถตั้งค่าอุณหภูมิได้ระหว่าง 20° ซ. ถึง 23° ซ. เนื่องจากสามารถปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำได้ 25° ซ. ตามต้องการและใช้ระยะเวลาในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำสั้น อีกทั้งยังสะดวกในการปฏิบัติงานผสมวัคซีนชนิดน้ำมันที่จำเป็นต้องปรับวัตภาคน้ำและวัตภาคน้ำมันให้มีอุณหภูมิเท่ากัน

การกำหนดค่าอุณหภูมิของ Temperature regulator ที่ 18° ซ. ถึง 19° ซ. พบว่าใช้เวลาในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำนานกว่า และอุณหภูมิของวัตภาคน้ำที่ได้ต่ำกว่า 25° ซ. ในขณะที่การกำหนดค่าอุณหภูมิของ Temperature regulator ที่ 24° ซ. ถึง 25° ซ. นั้น จะใช้ระยะเวลาสั้นกว่า แต่อุณหภูมิของวัตภาคน้ำก็จะสูงเกิน 25° ซ. ซึ่งอาจไม่สะดวกในการปฏิบัติงานเนื่องจากต้องปฏิบัติงานอย่างเร่งรีบในขั้นตอนการผสมวัตภาคน้ำลงในวัตภาคน้ำมันโดยที่วัตภาคทั้งสองมีอุณหภูมิเท่ากัน แต่ทั้งนี้ก็อาจสามารถผสมวัตภาคน้ำกับวัตภาคน้ำมันที่มีอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่า 25° ซ.ได้ แต่อุณหภูมิขณะผสมของวัตภาคทั้งสองจะต้องไม่แตกต่างกันมากกว่า 2 ถึง 3 องศา และจะต้องสูงกว่าอุณหภูมิกลับวัตภาคของวัคซีนอีมัลชั่นด้วย (พิมพร, 2534)

สรุป

สามารถใช้ชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำมาใช้ปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำจาก 4° ซ. ให้ได้ 25° ซ. เพื่อการผสมวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียปริมาณอนุภาค 146S อยู่ระหว่าง 3.46%-3.84% และการกำหนดค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมใน Temperature regulator ของชุดควบคุมอุณหภูมิน้ำที่สามารถปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำได้ 25° ซ. และใช้ระยะเวลาในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำสั้น คือ 20° ซ. ถึง 23° ซ. ซึ่งทำให้การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันมีความสะดวกรวดเร็ว และได้วัคซีนที่มีคุณภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณพนักงานและเจ้าหน้าที่หน่วยเตรียมและบรรจุวัคซีนฯ ทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้การทดลองครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณนายวาทิต โสภณ ที่ช่วยให้คำปรึกษาด้านเครื่องมืออุปกรณ์และคณะกรรมการตรวจสอบผลงานทางวิชาการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ที่ช่วยในการตรวจ แก้ไขต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

นริศ ว่องวัฒนากูล สินสมุทร นิลฉวี และสหวัชร์ อึ้งวนิชบรรณ 2543 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกลับวัตภาคและปริมาณความเข้มข้นของ Montanide 80 ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 10(1-2): 51-60

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ 2534 อีมัลชั่นทางเครื่องสำอางค์ (cosmetic emulsion) ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หน้า 1-192.

มนตรี มนต์ธุรพจน์ และเชาวฤทธิ์ บุญมาทิต 2535 การวัดหาปริมาณ 146S อนุภาคสมบูรณ์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย วารสารชีวผลิตภัณฑ์ 3(1): 31-41.

Bartelling, S.J. and Neloen, R.H. 1974. A simple method for quantification 140S particles of Foot and Mouth Disease Virus (FMDV). Arch. Ges. Virusforsch. 45: 362-364.

Doel, T.R. and Baccarini, P.J. 1981. Thermal stability of Foot and Mouth Disease Virus. Arch. Virol. 70: 21-32.

Doel, T.R., Flettom, B.W. and Steppie, R.F. 1982. Further development in the quantification of small RNA viruses by U.V. photometry of sucrose density gradient. Develop. Bio. Standard. 50: 209-219.

Doel, T.R. and Nowat, G.N. 1985. An international collaborative study on Foot and Mouth Disease Virus assay methods. 2 Quantification of 146S particles. J. Bio. Standard. 13: 335-344.

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยเวลาที่ใช้ในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำ อุณหภูมิสูงสุดของน้ำไหลเวียน อุณหภูมิของวัตภาคน้ำก่อนผสมกับวัตภาคน้ำมัน ปริมาณอนุภาค 146S ในวัตภาคน้ำก่อนและหลังการปรับอุณหภูมิ และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียปริมาณอนุภาค 146S ที่ค่าอุณหภูมิต่าง ๆ ของ Temperature regulator

ค่าอุณหภูมิของ Temperature regulator (° ซ.)	ค่าเฉลี่ย					
	เวลาที่ใช้ในการปรับอุณหภูมิของวัตภาคน้ำ (นาที)	อุณหภูมิสูงสุดของน้ำไหลเวียน (° ซ.)	อุณหภูมิของวัตภาคน้ำก่อนผสมกับวัตภาคน้ำมัน(° ซ.)	ปริมาณอนุภาค 146 S ในวัตภาคน้ำ (ไมโครกรัม/มล.)		เปอร์เซ็นต์การสูญเสีย(%)
				ก่อนการปรับอุณหภูมิ (4° ซ.)	หลังการปรับอุณหภูมิ (25° ซ.)	
18 (n=5)	42	48.9	24.0[1]	12.72	12.28	3.46
19 (n=5)	40	49.8	24.5[1]	11.70	11.29	3.50
20 (n=5)	31	50.7	25.0	11.79	11.37	3.56
21 (n=5)	28	51.5	25.0	12.12	11.68	3.63
22 (n=5)	25	52.2	25.0	12.00	11.56	3.67
23 (n=5)	23	53.0	25.0	12.70	12.24	3.62
24 (n=5)	22	53.9	26.0[2]	11.50	11.08	3.65
25 (n=5)	20	54.6	27.0[2]	12.75	12.26	3.84

[1] อุณหภูมิไม่ได้ตามต้องการ (ต่ำกว่า 25° ซ.) [2] อุณหภูมิไม่ได้ตามต้องการ (สูงกว่า 25° ซ.)

Effect of Adjusting Aqueous Phase Temperature using the Water Temperature Regulator in the Formulation of Oil FMD Vaccine

Sahawatchara Ungvanijban[1] Aree Katsuwonnawong[1]

Abstract

In the large scale formulation of oil FMD vaccine, the adjustment of temperature in the aqueous phase from 4°C to 25°C in a 600L double jacket mixing tank may lead to loss of 146S particles due to the temperature of circulating water and time used. In this experiment, the water temperature regulator was used and set at different temperatures, the results were recorded in time used, maximum temperature of circulating water and percentage loss of 146S particles. It was conducted by setting temperature of the water temperature regulator at 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 and 25°C. The average time used were 42, 40, 31, 28, 25, 23, 22 and 20 minutes, respectively. The maximum temperature mean of circulating water were 48.9, 49.8, 50.7, 51.5, 52.2, 53.0, 53.9 and 54.6°C, respectively and the percentage loss of 146S particles were ranged from 3.46% to 3.84%. Therefore, it was found that the water temperature regulator could be used in adjusting the aqueous phase temperature in the process of the formulation oil FMD vaccine in the large scale due to the low percentage loss of 146S particles.

Key words: adjusting of aqueous phase temperature, the water temperature regulator, formulation of oil FMD vaccine

---

[1] Veterinary Biologics Factory Sub-division, Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima. 30130

การหาขนาดภูมิคุ้มกันโรค 50% ของวัคซีนกัมโบโรเชื้อเป็น สเตรนซียู-วัน เอ็มในไก่ปลอดเชื้อ

กมลทิพย์ ธัญพิมล[1] พรชัย ศรีดามา[1]

บทคัดย่อ

ปริมาณไวรัสในวัคซีนกัมโบโรเชื้อเป็นสเตรนซียู-วัน เอ็ม ที่กระตุ้นให้เกิดความคุ้มโรค 50% ในไก่ปลอดเชื้อ จากการฉีดเชื้อพิษทับหลังจากให้วัคซีน 2 สัปดาห์ โดยการหยอดตาไก่ทดลองปลอดเชื้อเฉพาะ อายุ 3 สัปดาห์ 8 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว ในขนาดโด๊สต่างๆ กัน คือ กลุ่มที่ 1 ใช้ขนาด 1 โด๊สปกติ ซึ่งมีความเข้มข้นไวรัส (Virus content) $10^{4.20}$ ELD_{50}/dose (ไตเตรตไวรัสผ่านทางเยื่อ chorio-allantoic membrane) กลุ่มที่ 2-7 เจือจางวัคซีนเป็น 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500 และ 1:600 เท่าของโด๊สปกติ และกลุ่มที่ 8 หยอดด้วย PBS เป็นกลุ่มควบคุม ไก่ทดลองที่มีความคุ้มโรคต่อเชื้อพิษทับโรคกัมโบโรนั้นจะไม่แสดงอาการป่วยหรือพบวิการที่ต่อมเบอร์ซา ผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่ 1 ถึง 8 มีความคุ้มโรค 100%, 100%, 80%, 65%, 40%, 25%, 10% และ 0% ตามลำดับ คำนวณหาปริมาณไวรัสในวัคซีนกัมโบโรเชื้อเป็น สเตรนซียู-วัน เอ็ม ที่กระตุ้นให้เกิดความคุ้มโรค 50% ในไก่ปลอดเชื้อได้ค่าเป็น $10^{1.64}$ ELD_{50}/PD_{50}

คำสำคัญ: ความคุ้มโรค 50% ในไก่ปลอดเชื้อ วัคซีนกัมโบโรเชื้อเป็น สเตรนซียู-วัน เอ็ม

---

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

โรคกัมโบโรเป็นโรคติดต่อที่รุนแรง อัตราการตายสูงในลูกไก่อายุน้อยเพราะโรคนี้จะไปทำลายระบบภูมิคุ้มกันโรคในร่างกาย (Wyeth and Kouwenhoven, 2000) ทำให้ติดเชื้อแทรกซ้อนได้ง่ายและเป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก โดยทั่วไปการผลิตวัคซีนควรมีการตรวจสอบประสิทธิภาพในการคุ้มโรคต่อเชื้อที่มีการระบาดในท้องถิ่นเป็นระยะๆ เพื่อความมั่นใจว่าไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนยังมีคุณสมบัติคุ้มโรคนั้นๆ อยู่ จึงได้ทำการทดสอบหาค่า PD_{50} ซึ่งนอกจากจะทำให้ทราบว่าวัคซีนยังคงมีประสิทธิภาพในการให้ความคุ้มโรคต่อเชื้ออยู่หรือไม่ ยังทำให้ทราบถึงปริมาณไวรัสที่เหมาะสมในกรณีที่เชื้อในพื้นที่มีความรุนแรงเพิ่มขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างวัคซีนกัมโบโรเชื้อเป็นสเตรนซียู-วัน เอ็มซนิดดูดแห้งชุดที่ 2/97 เตรียมจากไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ ผลิตโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ จำนวน 5 ขวด

2. ไข่ไก่ฟักพันธุ์ LSL ของบริษัท Lahmann ประเทศเยอรมนี อายุ 9 วัน จากงานผลิตไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะ โครงการผลิตวัคซีนป้องกันโรคสัตว์ปีกเพื่อสนับสนุนการส่งออก สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา จำนวน 30 ฟอง

3. ไก่ทดลองพันธุ์ LSL ของบริษัท Lahmann ประเทศเยอรมนี อายุ 14 วัน จากงานผลิตไข่ไก่ฟักปลอดเชื้อเฉพาะจำนวน 160 ตัว เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ของอาคารทดสอบคุณภาพวัคซีน สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์

4. เชื้อไวรัสโรคกัมโบโร เป็นเชื้อที่แยกได้ในท้องถิ่น(Local strain) ที่มีความรุนแรง $10^{4.0}$ CID_{50}/มล. เก็บที่อุณหภูมิ -80°C ใช้ในการฉีดพิษทับ

วิธีการ

1. การเตรียมวัคซีน

ละลายตัวอย่างวัคซีนจำนวน 5 ขวด ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4 จำนวน 1 มล./ขวด เขย่าให้เข้ากัน แบ่งวัคซีนออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปทดสอบหาปริมาณไวรัส อีกส่วนหนึ่งนำไปหาค่า PD_{50}

2. ตรวจหาปริมาณไวรัส (Virus content test)

ทำการเจือจางน้ำวัคซีนที่ผสมแล้วในข้อ1 แบบ ten fold dilution ฉีดไวรัสความเจือจางตั้งแต่ 10^{-4} ถึง 10^{-8} เข้าไข่ไก่ฟักอายุ 9 วัน ทาง Chorio-allantoic membrane โดยวิธีของ Gorham (1957) method A. ในขนาด 0.1 มล. / ฟอง ความเจือจางละ 5 ฟอง และฉีดสารละลาย PBS เป็นชุดควบคุม 5 ฟอง เก็บเข้าตู้ฟักไข่ 37 ^{o}C ส่องคัดไข่ทุกวันแล้วบันทึกอัตราการตายเป็นเวลา 7 วัน แล้วคำนวณหาค่าปริมาณไวรัสตามวิธีการของ Reed and Muench (1938)

3. การหาค่า PD_{50} ของวัคซีน

ทำการเจือจางวัคซีน โดยใช้น้ำวัคซีน (ที่ผสมแล้วในข้อ 1 ก่อนทำ ten fold dilution) 1 มล. ผสมกับ PBS 29 มล. (ซึ่งเท่ากับ 1,000 โด๊ส ตามที่ระบุในคู่มือการใช้วัคซีน) เจือจางวัคซีนเป็น 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500 และ 1:600 เท่า ตามลำดับ นำวัคซีนที่ความเจือจางต่างๆ กันทั้งหมดไปหยอดตาไก่ทดลอง 7 กลุ่มๆ ละ 20 ตัวๆ ละ 30 ไมโครลิตร ด้วยไมโครไปเปตขนาด 0-200 ไมโครลิตร ส่วนกลุ่มควบคุมหยอดตาด้วยสารละลาย PBS แทนวัคซีน 20 ตัวๆ ละ 30 ไมโครลิตร หลังจากทำวัคซีน 14 วัน ให้เชื้อพิษไวรัสโรคกัมโบโรที่แยกได้ในท้องถิ่น (Local strain) ที่มีความเข้มข้นไวรัส $10^{4.0}$ CID_{50}/มล. โดยการหยอดตาในไก่ทดลองทุกตัวๆ ละ 30 ไมโครลิตร ไก่จะได้รับเชื้อพิษไวรัสโรคกัมโบโรขนาด $10^{2.5}$ CID_{50}/ตัว แล้วบันทึกอาการป่วยหรือตายทุกวัน ถ้ามีไก่ตายในช่วงนี้ทำการผ่าซากเพื่อดูวิการของต่อมเบอร์ซา สังเกตอาการเป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้นทำการผ่าซากไก่ทดลองทั้งหมดเพื่อดูวิการโดยเฉพาะที่ต่อมเบอร์ซา

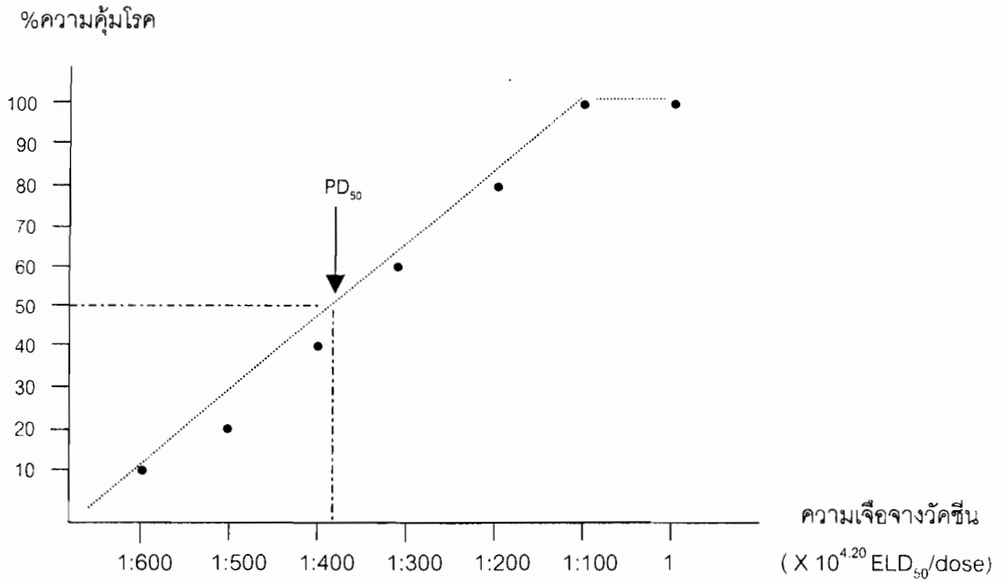
วัคซีนจะผ่านการทดสอบประสิทธิภาพเมื่อจำนวนไก่ที่ทำวัคซีนอย่างน้อย 90% จะต้องไม่แสดงอาการป่วยและไม่พบวิการอย่างรุนแรงคือ มีจุดเลือดออก หรือบวมน้ำ หรือมีหนองข้น หรือฝ่อ ที่ต่อมเบอร์ซา ในขณะที่จำนวนไก่ในกลุ่มควบคุมมากกว่า 50% พบวิการอย่างรุนแรงที่ต่อมเบอร์ซา (Wyeth and Kouwenhoven, 2000) คำนวณหาค่า 50% Protective Dose (PD_{50}) ของวัคซีน โดยวิธี Reed and Muench (1938)

ผลการทดลอง

การตรวจสอบปริมาณไวรัสวัคซีนกัมโบโรซนิดดูดแห้งชุดที่ 2/97 ด้วยวิธี Virus titration ได้ค่า $10^{4.20}$ ELD_{50} / dose ผลการทดลองพบว่า ไก่กลุ่มที่ได้รับวัคซีนในขนาด 1 โด๊สปกติ และความเจือจางเป็น 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500 และ 1:600 เท่าของโด๊สปกติ และกลุ่มควบคุม หลังจากหยอดตาด้วยเชื้อพิษไวรัสโรคกัมโบโรขนาด $10^{2.5}$ CID_{50}/ตัว เป็นเวลา 10 วัน ไก่ทดลองมีความคุ้มโรคตามตารางที่ 1 เมื่อคำนวณหาค่า PD_{50} ของวัคซีนตามวิธีการของ Reed and Muench (1938) ได้ค่าเท่ากับ $10^{1.64}$ ELD_{50}/PD_{50} หรือที่ความเจือจาง 1:360 เท่าของโด๊สปกติ ดังแสดงในรูปที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนกัมโบโรที่ความเจือจางต่างๆ กัน

กลุ่มที่	ความเจือจาง (เท่าของโด๊สปกติ)	ปริมาณไวรัส (ELD_{50}/dose)	อัตราไก่ที่พบวิการอย่างรุนแรงที่ต่อมเบอร์ซา / ทั้งหมด	ความคุ้มโรค (เปอร์เซ็นต์)
1	1	$10^{4.20}$	0/20	100
2	1:100	$10^{2.20}$	0/20	100
3	1:200	$10^{1.90}$	4/20	80
4	1:300	$10^{1.72}$	7/20	65
5	1:400	$10^{1.60}$	12/20	40
6	1:500	$10^{1.50}$	15/20	25
7	1:600	$10^{1.42}$	18/20	10
8	PBS	0	20/20	0



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเจือจางไวรัสกับระดับความคุ้มโรค

วิจารณ์

การศึกษาในครั้งนี้พบว่า จากการคำนวณค่า PD_{50} ของวัคซีนกัมโบโรเชื้อเป็นชุดที่ 2/97 มีค่าเป็น $10^{1.64}$ ELD_{50}/PD_{50} ซึ่งค่านี้สามารถใช้เป็นแนวทางกำหนดเกณฑ์ในการผลิตวัคซีนโดยการกำหนดให้มีปริมาณเชื้อไวรัสในวัคซีนเป็นจำนวนเท่าของค่า PD_{50} ตามที่กำหนดในมาตรฐานของวัคซีนแต่ละชนิด เช่น วัคซีนนิวคาสเซิลเชื้อตายชนิดน้ำมันในหนึ่งโด๊สมีปริมาณไวรัสไม่น้อยกว่า 50 เท่าของ PD_{50} (Central Medicines Directorate, 1990)

สรุป

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าค่า PD_{50} ของวัคซีนกัมโบโรเชื้อเป็นชุดที่ 2/97 มีค่าเป็น $10^{1.64}$ ELD_{50}/PD_{50} (โดยวิธีการไตเตรตผ่านทางเยื่อ Chorio-allantoic membrane of method A.)

เอกสารอ้างอิง

Central Medicines Directorate. 1990. Guidelines for the production and control of avian virus vaccine. p. 48.

Gorham, J.R. 1957. A simple technique for the inoculation of the chorio-allantoic membrane of chicken embryos. Am. J. Vet. Res. 18 : 691-692.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493-497.

Wyeth, P.J. and Kouwenhoven. 2000. Infectious bursal disease (Gumboro disease). OIE Manual standards for diagnostic tests and vaccines, 4th ed. 2.7.1: 647-656.

The PD_{50} of Live Gumboro Disease Vaccine, CU-1 M strain, in SPF Chicken

Kamontip Thunpimon[1] Pornchai Sridama[1]

Abstract

The PD_{50} of live Gumboro disease vaccine, CU-1 M strain, was determined in three weeks old chicken from a specific pathogen free flock (SPF) by challenge with virulent Infectious Bursal Disease Virus 2 weeks after vaccination. The chicken were allocated into eight groups of twenty birds each. The 1^{st} to 7^{th} groups were vaccinated intraocularly with different dilutions of the vaccine and the 8^{th} group was inoculated with PBS as control. The first group was vaccinated with one dose of vaccine at the titre of $10^{4.20}$ ELD_{50}/dose (virus titration via chorio-allantoic membrane). The 2^{nd} to 7^{th} groups were vaccinated with 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500 and 1:600 dilutions of vaccine dose, respectively. The result determined by no evidence of clinical sign or lesion of bursa of Fabricius, showed that the protection rate in the 1^{st} to 8^{th} groups were 100%, 100%, 80%, 65%, 40%, 25%,10% and 0%,respectively. The PD_{50} of Gumboro disease vaccine, CU-1 M strain, in SPF chicken calculated from this test was $10^{1.64}$ ELD_{50}/PD_{50}.

Key words: PD_{50}, live Gumboro disease vaccine, CU-1 M strain

---

[1]Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima. 30130

ผลของสารต้านจุลชีพ Marbofloxacin ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ IFFA-3

อารีย์ เกตุสุวรรณวงศ์[1] วรัญญู ชมเฟื่องแก้ว[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของสารต้านจุลชีพ Marbofloxacin สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ทั้งแบบ Monolayer และ Suspension ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 μg/ml, 3.8 μg/ml และ 7.6 μg/ml ตามลำดับ จำนวน 10 passage หลังจากเพาะเลี้ยงครบ 48 ชั่วโมง ได้ทำการตรวจสอบความสมบูรณ์ของเซลล์และวัดผลการเจริญเติบโต โดยนำค่า Multiplication rate เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพ Marbofloxacin ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ IFFA-3 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05)

คำสำคัญ: Marbofloxacin, เซลล์ IFFA-3, Multiplication rate

---

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

บทนำ

ฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ได้ผลิตวัคซีนด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดแขวนลอย (Suspension cell culture) (Makarasen and Sinsuwongwat, 1986) โดยนำเซลล์ IFFA-3[1] ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากตัวอ่อนของหนูแฮมสเตอร์ มาเพาะเลี้ยงใน Basal Medium Eagle (BME) (Nardelli and Panina,1976)

ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 จาก Seed stock ขึ้นสู่สายการผลิตซึ่งต้องเพาะขยายจาก Ampule ขนาด 2 มล. ผ่านขวดเพาะเซลล์ขนาดต่าง ๆ ที่ใช้ในงานผลิต จึงมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีในมีเดียมที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ โดยเฉพาะมีเดียมที่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ การใช้สารต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีหนึ่งที่จะลดความสูญเสียจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ ของงานเพาะเลี้ยงเซลล์ได้

ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ มีการใช้สารต้านจุลชีพผสมลงในมีเดียม BME สำหรับเพาะเซลล์ IFFA-3 2 กลุ่มคือกลุ่ม Penicillin และกลุ่ม Aminoglycoside ซึ่งมีการใช้ต่อเนื่องมาเป็นเวลานาน ความไวต่อเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดอาจลดลง ดังนั้นการเลือกใช้สารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์วงกว้างและเป็นสารต้านจุลชีพที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ เชื้อจุลินทรีย์ยังไม่มีการดื้อยาจึงเป็นทางเลือกที่ดี ซึ่งในปัจจุบันมีสารต้านจุลชีพที่พัฒนาขึ้นมาใหม่คือ Marbofloxacin ซึ่งเป็นสารต้านจุลชีพ Third generation กลุ่ม Quinolone มีฤทธิ์เป็น Bactericidal ต่อ Gram-positive และ Gram-negative bacteria โดยยับยั้ง Bacterial Enzyme DNA Gyrase และไม่ทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย (Frechin, 1999) ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์เช่นนี้มีข้อดีคือ ไม่เกิดการแพร่กระจายของเอ็นโดท็อกซิน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของ Marbofloxacin ในระดับความเข้มข้น 2.0 µg/ml ซึ่งเป็นค่า Minimum Inhibition Concentrations (MICs) ที่มีผลกับเชื้อแบคทีเรีย 1,307 สเตรน, ระดับ 3.8 µg/ml ซึ่งเป็นค่า MICs ที่มีผลกับเชื้อแบคทีเรีย 1,369 สเตรน (Frechin,1999) และระดับ 7.6 µg/ml ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้น 2 เท่าของ MICs ที่มีผลกับเชื้อแบคทีเรีย 1,369 สเตรน ตามลำดับ ต่อการเพิ่มจำนวน (Multiplication rate) ของเซลล์ IFFA-3 ที่เพาะเลี้ยงทั้งแบบ Monolayer และ Suspension โดยวัดผลการเจริญเติบโตของเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงครบ 48 ชั่วโมง และนำค่าผลการแบ่งตัวมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีผลการแบ่งตัวตามมาตรฐานของเซลล์

---

[1] Continuous Cell lines, Rhone Merieux, France

IFFA-3 ซึ่งอยู่ในช่วง 4 - 6 เท่า หลังเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง (APHIS–US Department of Agriculture, 1989) ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เซลล์ IFFA-3

   เซลล์ IFFA-3 เก็บในสภาพแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว

2. มีเดียมสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

   ใช้ Basal Medium Eagle[1] + 5% Calf Serum[2] (v/v) จำนวน 40 ลิตร

3. สารละลาย Marbofloxacin[3] 2% (w/v)

วิธีการ

1. การเตรียมความเข้มข้นของ Marbofloxacin ในมีเดียม BME

เติมสารละลาย Marbofloxacin ลงในมีเดียม BME ซึ่งผ่านการปรับ pH เท่ากับ 6.80 แล้วทำการกรอง ด้วยเครื่องกรอง Disc filter ใช้แผ่นกรองขนาด 0.45 และ 0.2 ไมครอนตามลำดับ แบ่งมีเดียม ออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 10 ลิตร กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมใช้มีเดียม BME ไม่เติมสารละลาย Marbofloxacin กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 เติมในระดับความเข้มข้น 2.0 µg/ml, 3.8 µg/ml และ 7.6 µg/ml ตามลำดับ

2. การเตรียมและการเพาะ เลี้ยงเซลล์ IFFA-3

ขยายเซลล์ IFFA-3 จาก Seed Ampule แบบ Monolayer ใน BME+5% Calf serum ให้ได้เซลล์ จำนวน $1.00x10^8$ เซลล์ ซึ่งเป็นเซลล์ Passage ที่ 31 มาเป็นเซลล์เริ่มต้นสำหรับการทดลองโดยทำการนับจำนวนด้วย Haemocytometer ชนิด Spencer Bright line และตรวจดูความสมบูรณ์ของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

---

[1] GIBCO®, U.S.A. Batch no.1024954

[2] Starrate®, AUSTRALIA, Batch no. 19-250

[3] Marbocyl®, FRANCE, Batch no. 14018 y

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ Monolayer นำเซลล์ IFFA-3 มาเพาะเลี้ยงในขวด Roux ปริมาตรพื้นที่ 200 ซม^2 โดยใช้มีเดียมที่ได้จากข้อ 1 กลุ่มละ 120 มล. แล้วนำไป incubate ที่ 37°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ต่อ 1 passage ทำการ trypsinized เซลล์ เก็บตัวอย่างจำนวน 2 มล. เพื่อตรวจดูลักษณะและนับจำนวน แล้วทำการ Subculture โดยใช้เซลล์เริ่มต้นครั้งละ 8.30 มล. x 10^4 เซลล์/มล. จนครบ 5 passage

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ Suspension นำเซลล์ IFFA-3 จากแต่ละกลุ่มมีเดียม มาเพาะเลี้ยงในขวด woulff โดยใช้ มีเดียมที่ได้จากข้อ 1 กลุ่มละ 1 ลิตรเพาะเลี้ยงในชุด Suspension cell culture ควบคุม pH โดยใช้ 4% CO_2 ควบคุมอุณหภูมิ 37° ซ. ความเร็วรอบในการเพาะเลี้ยง 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ต่อ 1 passage เก็บตัวอย่างครั้งละ 2 มล. เพื่อตรวจดูลักษณะและนับจำนวนเซลล์ ทำการ Subculture โดยใช้เซลล์เริ่มต้นครั้งละ 0.3x10^6 เซลล์/มล. จนครบ 5 passage

3. การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกผลเป็นจำนวน เซลล์/มล. แล้วนำมาคำนวณหาค่า Multiplication rate โดยคำนวณจากจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ลบด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้น นำผลที่ได้หารด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้น นำค่า Multiplication rate ของแต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์และสรุปผลเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วย t –test

ผลการทดลอง

การทดลองนี้ใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากันทุก passage ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งแบบ Monolayer และ Suspension สภาพเซลล์มีความสมบูรณ์ และมีการเพิ่มจำนวนดังแสดงใน Table 1 และ 2 ตามลำดับ เมื่อนำผลการเพาะเลี้ยงมาคำนวณหาค่า Multiplication rate ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ ทั้ง 2 แบบ พบว่าค่า Multiplication rate ของทุกกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (Table 3)

Table 1 Results of IFFA-3 monolayer cell culture after 48 hours of cultivation

Passage number	Marbofloxacin concentration in Basal Medium Eagle			
	0 μg/ml	2.0 μg/ml	3.8 μg/ml	7.6 μg/ml
32	7.17×10^5 cell/ml	7.08×10^5 cell/ml	7.43×10^5 cell/ml	7.52×10^5 cell/ml
33	7.92×10^5 cell/ml	7.92×10^5 cell/ml	7.92×10^5 cell/ml	8.03×10^5 cell/ml
34	8.02×10^5 cell/ml	8.50×10^5 cell/ml	7.92×10^5 cell/ml	7.83×10^5 cell/ml
35	8.41×10^5 cell/ml	8.33×10^5 cell/ml	7.92×10^5 cell/ml	7.93×10^5 cell/ml
36	7.83×10^5 cell/ml	7.92×10^5 cell/ml	8.50×10^5 cell/ml	8.00×10^5 cell/ml
Mean	7.87×10^5 cell/ml	7.95×10^5 cell/ml	7.94×10^5 cell/ml	7.86×10^5 cell/ml

Table 2 Results of IFFA-3 suspension cell culture after 48 hours of cultivation

Passage number	Marbofloxacin concentration in Basal Medium Eagle			
	0 μg/ml	2.0 μg/ml	3.8 μg/ml	7.6 μg/ml
37	1.50×10^6 cell/ml	1.91×10^6 cell/ml	1.43×10^6 cell/ml	1.41×10^6 cell/ml
38	1.84×10^6 cell/ml	1.90×10^6 cell/ml	1.86×10^6 cell/ml	1.73×10^6 cell/ml
39	1.86×10^6 cell/ml	1.92×10^6 cell/ml	1.80×10^6 cell/ml	1.94×10^6 cell/ml
40	1.90×10^6 cell/ml	1.80×10^6 cell/ml	1.88×10^6 cell/ml	1.84×10^6 cell/ml
41	1.95×10^6 cell/ml	1.96×10^6 cell/ml	1.80×10^6 cell/ml	1.96×10^6 cell/ml
Mean	1.81×10^6 cell/ml	1.88×10^6 cell/ml	1.75×10^6 cell/ml	1.78×10^6 cell/ml

Table 3 Multiplication rate after 48 hours cultivation of IFFA-3 monolayer and suspension cell cultures

Type of cell culture	Marbofloxacin concentration in Basal Medium Eagle			
	0 μg/ml	2.0 μg/ml	3.8 μg/ml	7.6 μg/ml
monolayer	8.48±0.47	8.58±0.59	8.56±0.41	8.47±0.22
suspension	5.03±0.51	5.27±0.19	4.85±0.55	4.92±0.66

No significant difference ($P > 0.05$)

วิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ Monolayer ในทุกกลุ่มความเข้มข้นของ Marbofloxacin หลังการเพาะเลี้ยงครบ 48 ชั่วโมง ค่า Multiplication rate ของทุกกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) กับกลุ่มควบคุม เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงแบบ Monolayer ของการทดลองนี้ไม่มีการเปลี่ยนสภาพแวดล้อม Seed Cell เริ่มต้นเป็น Monolayer และเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเซลล์จึงเจริญเติบโตได้ดีทั้ง 4 กลุ่มทดลอง

เมื่อวัดผลค่า Multiplication rate ของการเพาะเลี้ยงแบบ Suspension พบว่ากลุ่มที่มีค่า Multiplication rate สูงสุดคือ กลุ่มความเข้มข้น 2.0 μg/ml รองลงมาคือ กลุ่มควบคุมการทดลอง และกลุ่มความเข้มข้น 7.6 μg/ml และกลุ่มความเข้มข้น 3.8 μg/ml ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากจำนวนเซลล์ในแต่ละ passage ของแต่ละกลุ่มทดลองแล้ว ตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อค่า Multiplication rate ของแต่ละกลุ่มอยู่ที่การเจริญแบ่งตัวใน passage แรกของการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการปรับตัวของเซลล์กับสภาพแวดล้อม (Freshney, 1994) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแล้วไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) และเนื่องจาก Marbofloxacin มีผลต่อดีเอ็นเอของแบคทีเรีย จึงควรจะทำการศึกษาในด้านพิษวิทยาและการกลายพันธุ์ของเซลล์ในรายละเอียดต่อไป

สรุป

ผลการใช้สารต้านจุลชีพ Marbofloxacin ระดับความเข้มข้น 2.0 μg/ml, 3.8 μg/ml และ 7.6 μg/ml ใน Basal Medium Eagle ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ IFFA-3 ทั้งแบบ Monolayer และ Suspension โดยวัดผลการเจริญเติบโตหลังการเพาะเลี้ยงครบ 48 ชั่วโมงพบว่าสารต้านจุลชีพ Marbofloxacin ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ IFFA-3

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.วัชรี สินสุวงศ์วัฒน์ น.สพ.เสริมศักดิ์ เจี๊ยบนา คุณสายพิณ ขุมทรัพย์ พนักงานหน่วยเพาะเซลล์ และผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

APHIS –US Department of Agriculture. 1989. Results of the IFFA–3 cell quality control, APHIS – US Department of Agriculture, Hyattsville, Maryland. p.1-8.

Frashney, R.I. 1994. Culture of animal cell. In : A manual of basic technique. 3rd ed., Wiley – Liss, Inc. publisher, New York. p.71-103.

Frechin, E. 1999. Marbofloxacin reference book vetoquinol veterinary pharmaceuticals. France. p.11 –15.

Makarasen, P. and Sinsuwonkwat, P. 1986. Vaccine and vaccine production, Third country training program on Foot and Mouth Disease control (Group training course) February 24 – March 16, Bangkok, Thailand. p.180-183.

Nardelli, L. and Panina, G.F. 1976. The use of suspension cultures for FMD vaccine production. Criteria for the evaluation of cells, virus and vaccine. In : International symposium on Foot and Mouth Disease, Lyon, Develop. Biol. Standard. Vol. 35. p. 9-25.

Effect of Antimicrobial Agent, Marbofloxacin, on the Multiplication rate of IFFA-3 cell

Aree Katsuwonnawong[1] Varunyu Chomfuangkaew[1]

Abstract

Effect of antimicrobial agent, Marbofloxacin, on the multiplication rate of IFFA-3 cell cultivation using monolayer and suspension cell culture was studied. Cells were cultivated in the medium containing Marbofloxacin at the concentration of 2.0 μg/ml, 3.8 μg/ml and 7.6 μg/ml for 10 passages each. Each passage, cell number was measured at 48 hours after cultivation and the multiplication rate was compared to the control group (without Marbofloxacin). The results showed that Marbofloxacin had no effect to IFFA-3 cell multiplication (P>0.05).

Key words: Marbofloxacin, IFFA-3 cell, Multiplication rate

---

[1]Bureau of Veterinary Biologics, Pakchong, Nakhonratchasima. 30130

ความรู้พื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์

Gibthai Training Center

กรดนิวคลิอิก

กรดนิวคลีอิกค้นพบครั้งแรกโดยนักเคมีชาวสวิส กล่าวคือสารนี้ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดลักษณะต่างๆ ของสิ่งชีวิต เป็นสารที่ทำหน้าที่เก็บหน้าเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตและสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ (ดังรูปที่ 1) กรดนิวคลีอิกเป็นโพลีเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) คือในโมเลกุลของมันประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์หลายๆหน่วยต่อเข้าด้วยกันเป็นโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) เมื่อนำมาสลายให้เป็นโมเลกุลเล็กลงไปอีกจะได้ผลผลิต 3 ชนิด เป็นองค์ประกอบเสมอคือ เบสไนโตรเจน (nitrogeneous base) น้ำตาลเพนโทส (pentose) และกรดฟอสฟอริก ในธรรมชาติมีชีวโมเลกุลกลุ่มหนึ่งมีขนาดใหญ่ประกอบด้วยเบส น้ำตาล และฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบเรียกว่า กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) กรดนิวคลีอิกสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทซึ่งแตกต่างกันที่น้ำตาล กรดนิวคลีอิกที่มีน้ำตาลไรโบส (ribose) เป็นส่วนประกอบเรียกว่า กรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า อาร์เอ็นเอ (RNA) พวกที่ประกอบด้วยน้ำตาลดีออกซิไรโบส เรียกว่า กรดดีออกซิไรโบส(deoxyribonucleic acid) หรือ ดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งมีอยู่ในนิวเคลียสไมโตรคอนเดรีย และคลอโรพลาสท์ ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรม (genetic material)

จากการศึกษาองค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด พบว่ามีปริมาณเบสต่างๆ แตกต่างกัน และวิเคราะห์โครงสร้างดีเอ็นเอด้วยวิธีการหักเหกระจายของรังสีเอ็กซ์ (X-ray diffraction) ของ James Watson และ Francis Crick พบว่าอะดีนีนจะจับคู่กับไธมีน และกวานีนจะจับคู่กับไซโตซีน (complementary base pairing) การจับคู่กันอย่างจำเพาะนี้อาศัยพันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างดีเอ็นเอในธรรมชาติมีลักษณะเป็นเกลียวคู่ (double helix) ประกอบด้วยสายดีเอ็นเอ 2 สายที่กลับทิศทางกัน (anti parallel) ดีเอ็นเอทั้ง 2 สาย จะพันเป็นเกลียววนขวาในลักษณะรอบแกนร่วมเดียวกัน ถ้าสายหนึ่งวางตัวจากปลาย 5′ ไป 3′ (5′-3′) อีกสายหนึ่งจะวางตัวจากปลาย 3′ ไปปลาย 5′ (3′-5′) การพันเป็นเกลียวคู่เช่นนี้จะก่อให้เกิดร่อง (groove) ในสายของดีเอ็นเอซึ่งมี 2 ขนาด (minor groove และร่องขนาดใหญ่ (major groove) ทั้ง 2 สายจะเอาส่วนที่เป็นแกนหลักไว้ด้านนอก และหันส่วนที่เป็นเบสเข้าไปไว้ตรงกลาง โดยเบสแต่ละตัวจะยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่า DNA เกลียวคู่ตามที่เสนอโดย Watson และ Crick นี้เป็นโครงสร้างตามธรรมชาติของดีเอ็นเอ และเป็นโครงสร้างที่เสถียรที่สุดที่ไม่สลายได้ง่าย ดังนั้นการอธิบายเกี่ยวกับปรากฏการณ์และการทำงานของ DNA ส่วนใหญ่จะใช้โครงสร้างเกลียวคู่เป็นหลัก

คุณสมบัติของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอมีสมบัติเฉพาะตัวหลายอย่าง เช่น

1.การเป็นกรด ดีเอ็นเอแสดงสมบัติเป็นกรด เนื่องจากมีหมู่ฟอสเฟตเป็นจำนวนมาก

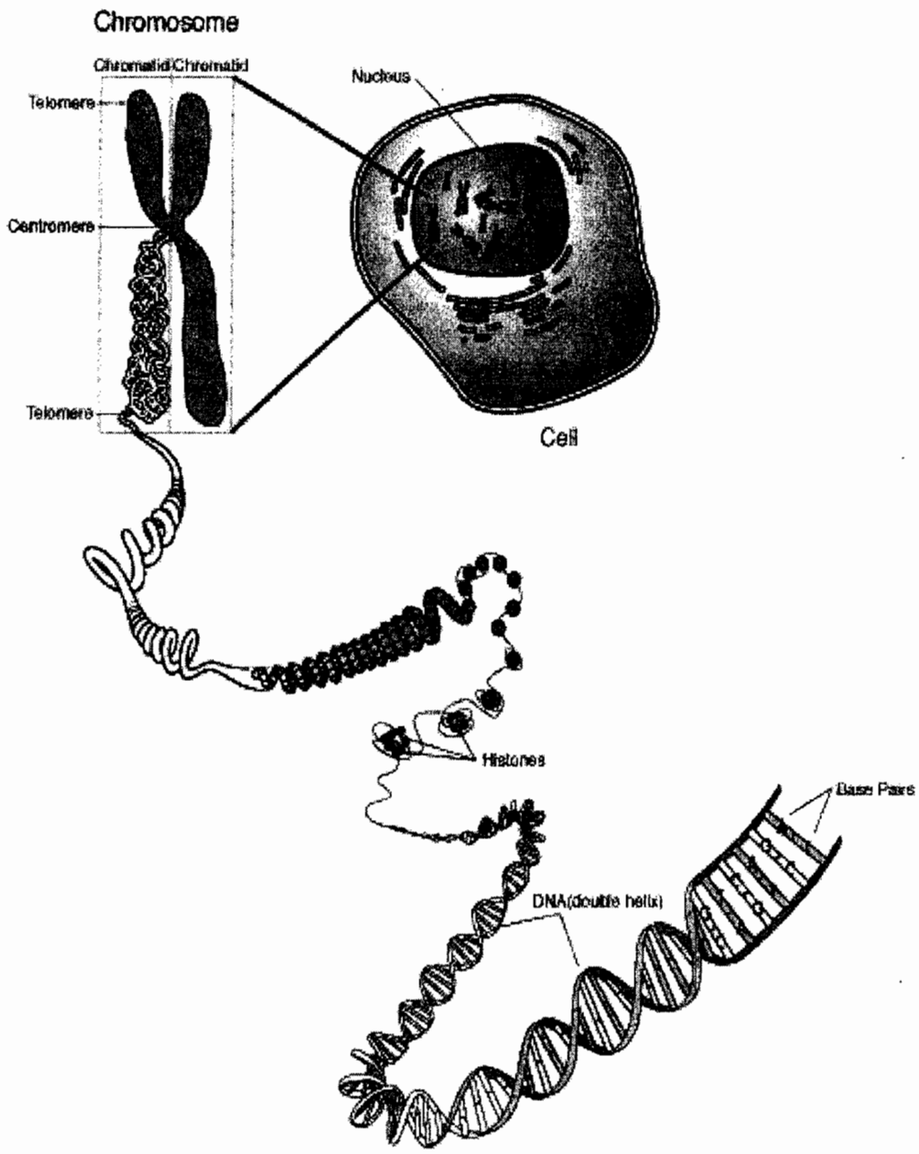
2.ความหนืด ความหนืดของดีเอ็นเอจะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อรูปร่างของมันเปลี่ยนแปลงไป ถ้าแยกเป็นสายเดี่ยวความหนืดก็ลดลง

3.การเสียสภาพและการกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติ การเสียสภาพธรรมชาติ หมายถึง การทำให้ดีเอ็นเอ สองสายแยกออกเป็นสายเดี่ยวปัจจัยที่ทำให้เสียสภาพธรรมชาติคือ ความร้อน กรด ด่าง รังสีเอกซ์ และสารเคมีบางชนิด ถ้าปรับสภาพแวดล้อมเสียใหม่ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะสามารถกลับเข้าคู่กันและประกอบกันขึ้นเป็นเกลียวคู่ใหม่อีกครั้งได้

4.สมบัติในการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ เนื่องจากเบสในดีเอ็นเอจะสามารถดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

ทฤษฎีและหลักการของเทคนิคการทำ Polymerase Chain Reaction

เทคนิคการทำ Polymerase Chain Reaction โดยทั่วไปมักมีวัตถุประสงค์ที่จะให้ได้ยีนที่ต้องการ และเพิ่มขยายยีนดังกล่าว ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่า โดยการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจในหลอดทดลอง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า In vitro enzymatic gene amplification วิธีนี้มีประโยชน์ในการตรวจหาชิ้นส่วนหรือเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในสิ่งส่งตรวจ ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะ ในปี 1983 โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติที่ว่าโดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอ็นไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอา นิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด dATP, dGTP, dCTP, dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ (template) ส่วนประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA), thermostable DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด, Oligonuclotide primer อย่างน้อย 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆรอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (ดังรูปที่ 2) คือ



รูปที่ 1 ภาพตัดขวางนิวเคลียสเพื่อแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอที่เป็นสารพันธุกรรมที่ถูกบรรจุอยู่ภายในอยู่ภายในนิวเคลียส

1. ขั้นตอน denaturation : เป็นขั้นตอนการทำให้ DNA สายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอน primer annealing: เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอ ต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม
3. ขั้นตอน primer extension: เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับนิวคลิโอไทด์เข้าที่ปลาย 3 ของ primer แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5 ไป 3 โดยอาศัยเอนไซม์ Thermostable DNA polymerase เช่น Taq polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง70-75 องศาเซลเซียส

ถ้าพิจารณาสายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ เมื่อทำเช่นนี้หลายๆ รอบของ PCR ดีเอ็นเอก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของทุกๆ รอบลักษณะทวีคูณเป็น 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ดีเอ็นเอ 2^{20} ชุด หรือมีปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 1 ล้านเท่า

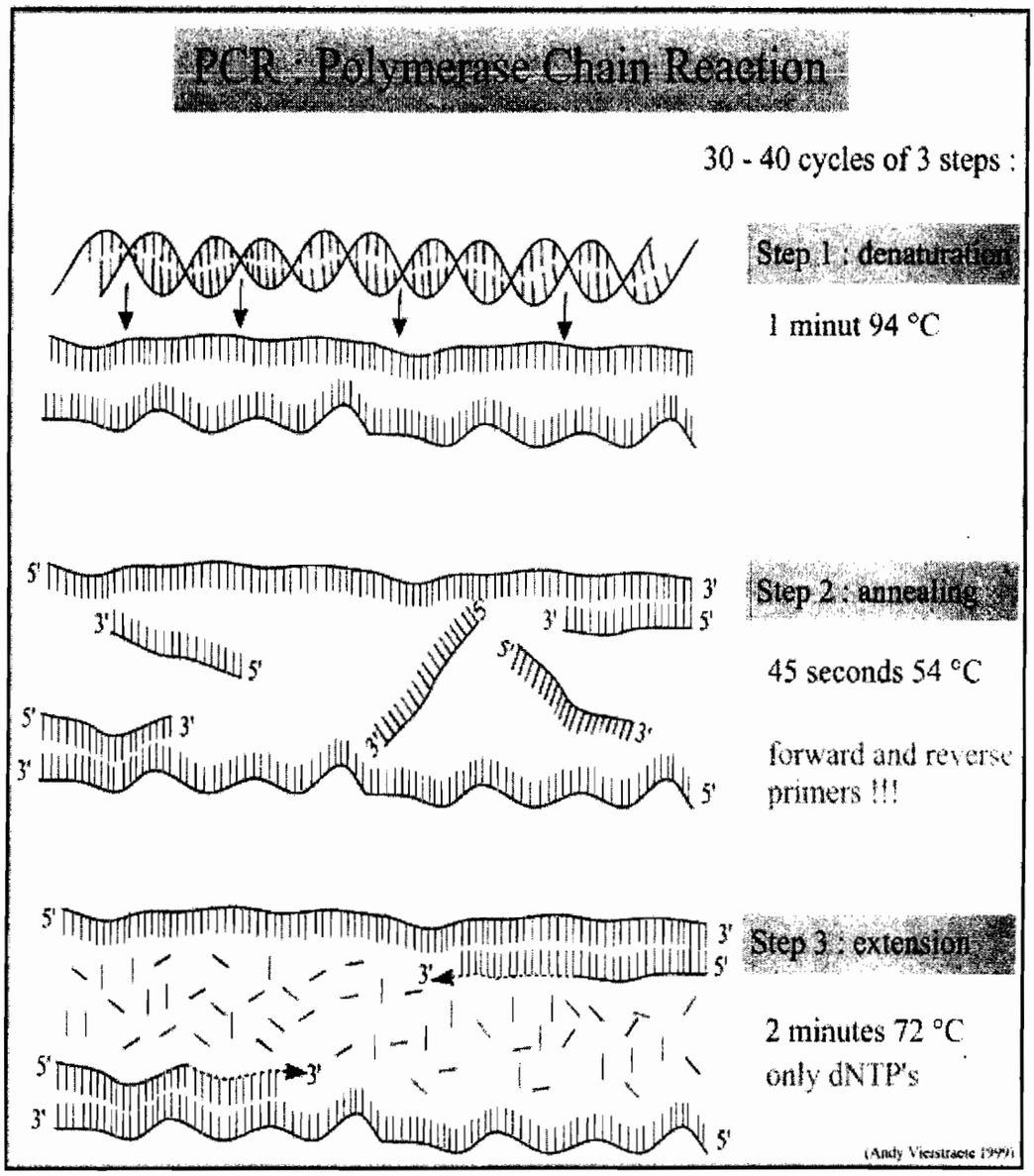
การเตรียมและขั้นตอนการทำ PCR

1. **การเก็บสิ่งส่งตรวจหรือตัวอย่างเพื่อสกัดดีเอ็นเอ**

ตัวอย่างที่ส่งตรวจอาจเป็นเนื้อเยื่อจากพืช สัตว์ หรือสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยเช่น เลือด สารน้ำต่าง ๆ ชิ้นเนื้ออาจเป็น Fixed paraffin-embedded tissue สามารถเอามาสกัดสารพันธุกรรมที่เป็น DNA หรือ RNA ก็ได้ โดยใช้วิธีง่ายๆ และรวดเร็ว ซึ่งมีหลายวิธีซึ่งสามารถสกัดเอา DNA ปริมาณน้อยๆ ได้เนื่องจากเทคนิค PCR มีความไวสูงและอาศัย DNA ปริมาณน้อยๆ ได้ ทั้งสามารถเลือกเพิ่มจำนวนDNA ช่วงสั้นๆ ได้ดี จึงสามารถใช้กับสิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างที่เก็บไว้เป็นระยะเวลานาน ทำให้มีประโยชน์นำไปใช้กับงานทางด้านโบราณคดีหรืองานนิติเวชได้

2. **ดีเอ็นเอต้นแบบ** (Template DNA)

DNA ต้นแบบที่มีลำดับเบสเป้าหมายหรือดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA Target) สามารถจะใช้ในปฏิกิริยาของ PCR ในลักษณะ DNA สายเดี่ยวหรือ DNA สายคู่ก็ได้ แม้ว่าขนาดของดีเอ็นเอไม่ใช่จุดที่มีปัญหามากนัก แต่การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอมีขนาดสั้นๆ อยู่ในรูปปลายเปิด จะมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเพราะ primer จะเข้าไปจับ ซึ่งช่วยให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนและลดผลผลิต DNA ที่ไม่จำเพาะลง โดยทั่วไปควรทดสอบปริมาณ DNA ต้นแบบที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณ DNA ที่ต้องการเพียงพอและมีความไวที่เหมาะสม



รูปที่ 2 แผนภาพขั้นตอนการทำ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ขั้นตอน Denaturation, Annealing และ Extension

3. **นิวคลีโอไทด์ตั้งต้น** (Primer)

การเลือกออกแบบ Primer ที่จะใช้ต้องเลือกให้เหมาะสมกับแต่ละงานโดยอาศัยหลักการจับคู่กันแบบจำเพาะของสายดีเอ็นเอ ที่ต้องการตรวจหากับ primer โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงต้องทราบลำดับเบสที่นำมาสังเคราะห์ primer

ข้อแนะนำในการเลือกและออกแบบ Primer ได้แก่

1) ความยาวของ Primer: ควรมีความยาวประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์ ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้
2) ควรเลือก Primer ที่มีการกระจายของเบสอย่างสม่ำเสมอ
3) ควรเลือก Primer ที่มี GC-content อยู่ระหว่าง 50-60% ไม่ควรเลือก primer ทีมีปริมาณ GC content ที่สูงเกินไป
4) Primer ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมาย (target sequence) ในดีเอ็นเอต้นแบบ นั่นคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสายดีเอ็นเอต้นแบบ
5) หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จับกับลำดับเบสของตัวเอง
6) ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสของแต่ละ Primer ไม่ให้เป็นคู่สมกันเอง
7) ค่า Tm (melting temperature) ของแต่ละ primer ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปควรอยู่ในช่วง 55-80 องศาเซลเซียส
8) Primer ควรมีลำดับคู่สมกับปลายด้าน 3 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของดีเอ็นเอต้นแบบ

4. Thermostable DNA polymerase

Thermostable DNA polymerase ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ Taq DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนที่มีชื่อ *Thermus aquaticuse* (*Taq*) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน denature และสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสร้าง DNA ได้ที่อุณหภูมิสูงคือ 70-85 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ 72 องศาเซลเซียส

Taq DNA polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 กิโลดาลตัน ขาดคุณสมบัติ 3-5 exonuclease activity จึงขาดคุณสมบัติในการตรวจสอบที่เรียกว่า proofreading ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Taq* DNA polymerase อยู่ในช่วง 1.0-2.5 units ความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นกับปริมาณและลักษณะของดีเอ็นเอต้นแบบ, primer รวมทั้งสารประกอบอื่นๆ ด้วย การใช้เอนไซม์ที่มากเกิน

ไปจะทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะขึ้น ทำให้เกิด nonspecific background มาก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยเกินไปก็จะทำให้ได้ผลผลิตน้อย

5. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

ความเข้มข้นของ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ปกติอยู่ระหว่าง 50-200 uM ของแต่ละ dNTP แต่ถ้าเป็น dNTPs ทั้ง 4 ตัว จะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 uM ถ้าหากมีการใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้นที่สูงเกินไป จะเกิดการต่อลำดับเบสคู่สมที่ผิดพลาด การเตรียม dNTPs ควรเตรียมเป็น primary stock solution ที่เจือจาง 10 mM แล้วแบ่ง aliquot เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส

6.บัฟเฟอร์ (Buffer)

ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCl, KCl, $MgCl_2$ และ Glycerol ความเข้มข้นและภาวะที่เหมาะสมของส่วนประกอบต่าง ๆ ในบัฟเฟอร์มีดังนี้

1) **ความเข้มข้นของ** Magnesium ion (Mg^{2+})

Taq DNA polymerase ต้องการ magnesium ion เพื่อช่วยส่งเสริมให้ปฏิกิริยาการขยายสายดีเอ็นเอดำเนินต่อไปได้ โดย magnesium ion จะทำหน้าที่เป็น co-factor นอกจากนั้น magnesium ion ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย (enzyme fidelity) และมีผลต่อการ anneal ของprimer ความเข้มข้นของ Magnesium ion ต้องปรับเปลี่ยนให้พอเหมาะกับความเข้มข้นของ dNTPs โดยทั่วไปความเข้มข้นที่พอเหมาะของ magnesium ion คือต้องเหลือ magnesium ในรูปอิสระประมาณ 0.5-1.0 mM โดยทั่วไปมักใช้ magnesium ความเข้มข้นทั้งหมดเป็น 1.5 mM ความเข้มข้นของ magnesium ion ที่มากเกินไป ทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ และพบว่าการปรับค่า magnesium ion ก็ช่วยให้ primer มีการ anneal ทีมีความจำเพาะขึ้นเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

2) pH

pH ที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับ *Taq* DNA polymerase คือที่ pH 7-7.5 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส แต่ปกติ Taq DNA polymerase จะอยู่ใน Tris buffer ซึ่งมี pH 8.5-9.0 ที่ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจาก pH ของ Tris–buffer จะลดลงประมาณ 0.03 ของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นแต่ละองศา ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 72 องศาเซลเซียส จะได้ pH 7.3

7. องค์ประกอบอื่นในปฏิกิริยา PCR

โดยทั่วไปส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ใน PCR คือ 10-15 mM Tris-HCl ที่ pH8.4 ที่ 25 องศาเซลเซียส, 50 mMKCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% gelatin (W/V) หรืออาจใช้ non-ionic detergent อื่นแทน gelatin ได้ เช่น 0.01% NP40 และ 0.01% Tween 20 การทดลองบางแห่งใช้ DMSOใส่ลงไปในปฏิกิริยาเพื่อลด secondary structure ของ DNA แต่พบว่า 10% DMSO ไม่เหมาะกับ Taq DNA polymerase เพราะไปยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่น้อยลง Gelatin หรือ Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (100 ug/ml) สามารถช่วยคงสภาพของเอนไซม์ได้ แต่ BSA ถูกทำลายได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงและอาจตกตะกอนกับ *Taq* DNA polymerase

Temperature cycling

1. ขั้นตอน Denaturation อุณหภูมิที่ใช้สวนใหญ่ประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30-60 วินาที อย่างไรก็ดีการใช้เวลานานและอุณหภูมิที่สูงเกินไป จะทำให้เอนไซม์และนิวคลีโอไทด์สูญเสียคุณสมบัติได้ แต่ถ้าใช้เวลาน้อยและอุณหภูมิที่ต่ำเกินไป จะทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันได้ไม่ดี ทำให้ผลผลิตของ PCR ลดลง กรณีที่ DNA ต้นแบบมีปริมาณ G+C content ที่สูงมาก ต้องเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นด้วย
2. ขั้นตอน Primer annealing โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในขั้นตอนนี้ประมาณ 55-72 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้อุณหภูมิ annealing temperature ที่ต่ำกว่า Tm ของ Primer ประมาณ 5 องศาเซลเซียส การใช้อุณหภูมิที่สูงในขั้นตอนนี้จะช่วยในการเพิ่มความจำเพาะในการจับคู่ เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ประมาณ 30 วินาที
3. ขั้นตอน Primer extension เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของ DNA ต้นแบบ โดยทั่วไปใช่เวลาประมาณ 1 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส โดยปกติ *Taq* DNA polymerase สามารถเพิ่มความยาวของสาย DNA ได้ประมาณ 6,000 นิวคลีโอไทด์ต่อนาทีที่อุณหภูมิ 72 อาศาเซลเซียส การใช้เวลาที่มากในขั้นตอนแรกจะมีประโยชน์สำหรับดีเอ็นเอต้นแบบที่มีจำนวนน้อย

จำนวนรอบในการทำ PCR (cycle number)

จำนวนรอบในการทำ PCR ขึ้นกับปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบตั้งต้น ถ้าใช้จำนวนรอบที่มากขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะได้ผลผลิต PCR ผิดพลาดก็มากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากผลผลิต PCR ที่ได้จะมีความจำเพาะเจาะจงที่น้อยลง และ Background มากขึ้น แต่ใช้จำนวนรอบน้อยเกินไปผลผลิตที่ได้ก็น้อยลงด้วย

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR (PCR Product)

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตมีด้วยกันหลายวิธี ที่นิยมใช้กันทั่วไปคือ

1. Gel electrophoresis โดยนำผลผลิต PCR ที่สร้างได้มาแยกตามขนาด DNA โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยก DNA บน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน จากนั้นย้อมชิ้น ดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ผลผลิต PCR ที่ดีควรให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ชัดเจน และตรงตามขนาดความต้องการ แต่ถ้ามีขนาดเล็กและแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน อาจเป็นดีเอ็นเอที่เป็น primer dimer
2. Nucleic acid hybridization ในกรณีที่ดูผลจากเจลไม่ชัดเจน สามารถนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรึงกับแผ่น nitrocellulose หรือ แผ่น nylon แล้วนำมาทำ southern blot, dot blot หรือ slot blot โดยอาศัยตัวติดตาม (probe) ที่จำเพาะกับเบสคู่สม ซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลอดรังสี แล้วจึงนำผลไปดูการจับของผลผลิต PCR กับตัวติดตามได้
3. Direct sequencing ในกรณีต้องการรู้รายละเอียดของลำดับเบสหรือของผลผลิต PCR ว่าถูกต้องแน่นอนหรือไม่ สามารถตรวจหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing PCR ที่เป็นสายคู่ (double strand PCR products) หรืออาจจะ sequencing PCR ที่เป็นสายเดี่ยว (single stranded PCR products)

ข้อควรระวังในการทำ PCR

การปนเปื้อน (Contamination)

ถึงแม้ว่าเทคนิค PCR นี้จะเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้มากหลายล้านเท่า แต่ก็สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยได้มากเช่นกัน ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ การปนเปื้อนอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุเช่น การสกัดแยกดีเอ็นเอ หรือจากการปนเปื้อนของผลผลิต PCR ครั้งก่อน (carry over contamination) ซึ่งมักจะอยู่ในรูปละอองลอย (aerosol) ที่มักเกิดขึ้นขณะการเปิด-ปิดฝาหลอด และการปั่นตกตะกอน ละอองลอยนี้สามารถปนเปื้อนกับสิ่งต่างๆ ในห้องปฏิบัติการทั้งอุปกรณ์เครื่องมือและวัสดุต่างๆ รวมทั้งผิวหนัง ผม และมือผู้ปฏิบัติการได้ ดังนั้นจึงควรมีการระวังการปนเปื้อนให้มาก โดยเฉพาะการปนเปื้อนชนิด carry-over contamination

วิธีการที่จะป้องกันการปนเปื้อนมีด้วยกันหลายอย่างเช่น

1) ควรแบ่งพื้นที่หรือห้องทำงานในช่วงก่อนและหลังทำ PCR (separate workspace)
2) แบ่งสารเคมีหรือน้ำยาลงในหลอดเล็กๆ (Aliquot) เพื่อให้การนำมาใช้แต่ละครั้งไม่ปนกัน
3) ใช้ Micropipette และ Filter tip ซึ่งเป็นทิปชนิดพิเศษที่ป้องกันการแพร่กระจายของละอองลอย โดยมีลักษณะสำคัญคือมีไส้กรอง (membrane) อยู่ภายใน
4) มีตัวควบคุมที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยตัวควบคุมจะมีด้วยกัน 3 แบบ คือ แบบแรกเป็นตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ (no template) เพื่อเป็นการควบคุมการปนเปื้อนของสารที่ใช้ (negative control) แบบที่สองเป็นตัวควบคุมทีมี DNA ชนิดที่ไม่มีลำดับเบสเป้าหมายอยู่ (negative control) และแบบที่สามเป็นตัวควบคุมที่มีดีเอ็นเอต้นแบบที่ถูกต้อง (positive control)
5) การปฏิบัติงานด้วยขบวนการปราศจากเชื้อ (Sterile technique) และด้วยความระมัดระวัง เช่นการสวมถุงมือและเปลี่ยนถุงมือบ่อยๆ
6) ลดขั้นตอนย้ายถ่ายสารละลาย (Minimize handling of the solutions) เช่นลดขั้นตอนการใช้ปิเปต โดยการทำ master mix เมื่อต้องทำ PCR หลายตัวอย่าง

ข้อจำกัดทางด้านเทคนิคของวิธี PCR

แม้ว่าเทคนิค PCR จะมีประสิทธิภาพสูง แต่มีข้อจำกัดบางอย่างเช่น

1. ข้อผิดพลาดในการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase มีความผิดพลาดในการนำเบสที่ไม่ใช่ คู่สมมาต่อกับดีเอ็นเอ ที่กำลังสร้างขึ้นมาเท่ากับ 10^{-5} error/base เมื่อทำ PCR ไป 30 รอบ โอกาสที่จะผิดพลาดจะพบ 1 ใน 3000 bp ของผลผลิต PCR
2. ความยาวของขนาด PCR ถึงแม้ว่า PCR จะสามารถทำให้ได้ผลผลิตที่มีขนาดยาว 10 kb ได้ แต่ส่วนใหญ่จะได้ผลดีที่สุด เมื่อขนาดของ PCR ไม่มากกว่า 2 kb เพราะถ้ายาวกว่านี้ความผิดพลาดจะมากขึ้น เนื่องจาก primer และ *Taq* DNA polymerase ทำงานไม่สมบูรณ์ โดยจะมีการจับ dNTPs ที่ไม่ถูกต้องมาต่อเข้าภายในสาย DNA มากขึ้น

ปัจจุบันพบว่า PCR เป็นเทคนิคที่นำไปใช้ประโยชน์ได้หลายสาขาทั้งการแพทย์, การเกษตร, โบราณคดี, อุตสาหกรรม และอื่น ๆ อีกมากมาย จึงนับว่าเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์มหาศาล ปัจจุบัน PCR มีเทคนิคใหม่ๆ ที่เพิ่มขึ้นมากมายจึงเรียกว่า Advanced PCR อันได้แก่ Nested PCR, Reverse transcriptase PCR (RT-PCR), PCR-SSCP, Multiplex PCR, Random Amplified Polymorphism of DNA (RAPD) และ Realtime PCR เป็นต้น ทำให้มีความหลากหลายในการเลือกใช้ให้เหมาะสมกับงาน และได้ประโยชน์ยิ่งขึ้น

Advanced Techniques of PCR

Polymerase Chain Reactions (PCR) ได้ถูกนำประยุกต์ใช้และการพัฒนาปรับปรุงวิธีต่างๆเพื่อให้สามารถนำไปศึกษาค้นคว้า วิจัย ความรู้ใหม่ๆ ตลอดจนการแก้ไขปัญหาที่ไม่อาจทำได้ในอดีต เนื่องจากเทคโนโลยีของ PCR ได้ก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว โดยเริ่มต้นตั้งแต่มีการรายงานการเกิด PCR ครั้งแรกในปี 1985 ซึ่งเป็น simple PCR จนกระทั่งในปัจจุบันมีเทคนิคชั้นสูง (Advanced techniques of PCR) ออกมาใหม่ๆ ให้นำมาใช้อยู่มากมาย ในบทนี้จะขอกล่าวถึงโดยย่อเฉพาะเทคนิค PCR ชั้นสูงที่พบมากได้นำมาประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ โดยจะขอกล่าวถึงคุณสมบัติพิเศษของวิธี PCR นั้นๆ ข้อบ่งที่จะนำไปใช้ PCR ชั้นสูงที่ได้มีการพัฒนาดัดแปลงเฉพาะเทคนิคพื้นฐานดังต่อไปนี้

1. Multiplex PCR

เป็นเทคนิคการทำ PCR ซึ่งทำการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ primer หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน โดย primer แต่ละคู่ที่นำมาต้องออกแบบให้ดี ไม่มี complementary กัน และเมื่อนำไปทำ PCR จะให้ผลผลิตที่มีขนาดความยาวที่แตกต่างกัน การทำ multiplex PCR ต้องปรับสภาวะพอเหมาะของปฏิกิริยา เพื่อให้สามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอจากทุก Primer ที่ใส่ลงไปได้เท่ากัน และเนื่องจากในปฏิกิริยานี้จะมี primer หลายคู่

2. Nested PCR

เป็นเทคนิค PCR ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการให้ได้ผลผลิต PCR ที่มากขึ้น เทคนิคนี้ทำได้โดยอาศัย PCR 2 ขั้นตอนด้วย Primer 2 คู่ โดย primer คู่แรกจะใช้ในตอน PCR ขั้นตอนแรก และ primer คู่แรกจะอยู่รอบนอกของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอเป้าหมายแต่มีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ภายในลำดับเบสของผลผลิตของดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำเอาผลผลิตของ PCR ขั้นตอนแรกไปทำ PCR ขั้นตอนที่สอง โดยใช้ primer คู่ที่ 2 ซึ่งออกแบบให้สำหรับเพิ่มขยายได้เฉพาะดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ถัดเข้าไปจาก primer คู่แรก การทำ PCR ขั้นตอนที่สองนั้นอาจทำปฏิกิริยา 25-30 รอบ ในที่สุดก็ได้ผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มขยายจำนวนมากตามที่ต้องการเทคนิคนี้นิยมนำไปใช้ในการประยุกต์เรื่องชันสูตรโรค

3. PCR cloning

คุณสมบัติของ PCR ทำให้เราสามารถสร้างดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาได้เป็นจำนวนมาก ดีเอ็นเอดังกล่าวนี้สามารถนำไปทำ cloning เข้าไปใน plasmid vector, M13 vector หรือ vector ชนิดอื่นๆ ได้อาศัยคุณสมบัติการออกแบบ primer ที่เหมาะสม เช่นเพิ่มส่วนที่เป็น restriction site

ก็ทำให้เราสามารถนำเอา PCR นั้นมาตัดด้วย restriction enzyme แล้ว clone เข้าสู่ vector ที่ต้องการได้ การ cloning อาจจะอาศัย primer ที่ออกแบบเป็น blunt end หรือ sticky end ก็ได้ข้อดีของการใช้ PCR ในการ cloning ก็คือสามารถ clone ได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น โดยได้ fragment ที่ต้องการ ประหยัดเวลาในการเตรียมดีเอ็นเอตั้งต้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องการ clone gene ที่มีดีเอ็นเอ ตั้งต้นปริมาณน้อยๆ ส่วนข้อเสียนั้นการโคลน ด้วยวิธีนี้ และจำเป็นต้องรู้ลำดับหัว-ท้ายของจีนที่เรากำลังจะโคลน

4. PCR-SSCP

เป็นเทคนิคที่ผสมเอาหลักการของ Single–strand conformation polymorphism (SSCP) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเพียง 1 bp (base pair) ในสายของดีเอ็นเอสั้นๆ เข้ากับวิธีของ PCR ดังนั้นการทำ PCR-SSCP นั้นจะเริ่มจากการเพิ่มขยายดีเอ็นเอ เป้าหมายต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเพียง 1 bp ในสายของดีเอ็นเอประมาณ 100-500 bp ด้วยวิธี simple PCR จากนั้นนำเอา PCR product มาทำ SSCP นั้น จะอาศัยหลักการที่ว่า denature PCR product ให้เป็น single strand แล้วจึงนำเอาดีเอ็นเอ นี้ไปแยกด้วย non-denaturing gel เพื่อดูการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ถ้าดีเอ็นเอสายนั้นมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไปเพียง 1 bp ก็จะทำให้การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในเจลแตกต่างไปจากเดิม ส่วนใหญ่ของการทำ SSCP นั้นมักจะใช้วิธีการ labeled PCR product ด้วย และแยกบน 5% non-denaturing polyacrylamide gel แล้วทำ ^{32}P autoradiography

5. RT-PCR

เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายจีนที่สนใจจากอาร์เอ็นเอแม่แบบ โดยหลักการคือ ทำการสกัดอาร์เอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการสังเคราะห์สาย cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription โดยอาศัย enzyme reverse transcriptase (RT) อนไซม์นี้ทำงานโดยสามารถสร้างสายดีเอ็นเอได้ทั้งจากแม่พิมพ์ที่เป็นดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยทั่วไป RT ที่ใช้ในงาน cDNA เป็นเอนไซม์ที่ได้มาจาก retroviruses สองตัว Avian myeloblastosis (AMV) และ Moloney murine leukemia virus (MMlV) ซึ่ง RT จากไวรัสทั้งสองตัวมีประสิทธิภาพในการสร้าง cDNA ไม่แตกต่างกัน โดยขั้นตอนนี้อาจใช้ primer ที่เป็น gene specific primer (GSP) ซึ่งเป็น primers ที่สามารถใช้ในการสร้างสาย cDNA ที่จำเพาะที่สุด หรือจะใช้ Oligo (dT) primer ซึ่งการใช้ primer ประเภทนี้จะมีอาร์เอ็นเอจำเพาะที่เป็น Poly(A)$^+$ RNA เท่านั้นที่ถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบ

ในการสร้างสาย cDNA หรือการใช้ Random primer เป็น primer ที่ไม่มีความจำเพาะ จึงสามารถเข้าจับกับอาร์เอ็นเอทุกชนิด ดังนั้น cDNA ที่เกิดขึ้นจึงมีความหลากลายมากที่สุด

จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนสุดท้ายในการทำ PCR โดยอาศัยแม่แบบจาก cDNA ที่ถูกสร้างขึ้นมาจากแล้ว โดยสร้างสายดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่มีลักษณะรูปแบบการทำเหมือน PCR ธรรมดา ในท้ายที่สุดจะได้สายดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนมากมายจากสายอาร์เอ็นเอตั้งต้น ดังรูปที่ 10

6. **เทคนิค** RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

เป็นการศึกษาการผันแปรของดีเอ็นเอในโครโมโซมของกลุ่มสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยการตัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมด้วย Restriction enzyme ที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดเป็นแบบแผนที่จำเพาะและมีความแตกต่างในระหว่างกลุ่ม หรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ แบบแผนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดย restriction enzyme เหล่านี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ agarose gel electrophoresis

ในบางกรณีการดูแบบแผนของชิ้นดีเอ็นเอจากเจลไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างของแบบแผนเหล่านั้นได้อย่างชัดเจน สามารถนำเอาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือยีน หรือลำดับเบสที่จำเพาะมาเป็นตัวตรวจสอบ (Probe) โดยวิธี southern blot hybridization เช่นการทำ Ribotyping หรือ DNA fingerprinting ทั้ง 2 วิธีสามารถนำมาบ่งบอกความแตกต่างของชนิด หรือความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดของ Restriction enzyme ที่เหมาะสม

7. **เทคนิค** RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

เป็นการศึกษาการผันแปรของดีเอ็นเอในโครโมโซมของกลุ่ม ชนิดและเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกัน แต่อาศัยเทคนิคหรือวิธีการที่แตกต่างจาก RFLP กล่าวคือจะอาศัยการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยอาศัย PCR ที่มีการเลือกใช้ primer ของการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นชนิดสุ่ม (random primer) หลังจากการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแล้ว แบบแผนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะถูกนำมาวิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis เช่นเดียวกันความสามารถในการบ่งบอกความแตกต่างหรือความผันแปรในกลุ่มชนิดของสิ่งมีชีวิตได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของ primer ที่ใช้ ซึ่งถ้าการสุ่มมีความจำเพาะในส่วนของดีเอ็นเอที่ผันแปรมาก ก็จะได้แบบแผนที่สามารถบ่งบอกความแตกต่างได้มากนั่นเอง

ในปัจจุบันได้มีการเลือกใช้ Primer ที่มีความจำเพาะจากส่วนของ intergenic region ของจีนไรโบโซม และการเลือกใช้ repetitive region ซึ่งมักพบกระจายอยู่หลังจีนโครงสร้างในสิ่งมีชีวิต

ชั้นต่ำ เมื่อนำมาใช้เป็นตัวเกาะใน PCR แล้วจะให้แบบแผนที่สามารถแยกความแตกต่างของกลุ่มและชนิดของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้

8. **เทคนิค** Quantitative Realtime PCR

เป็นการนำเทคโนโลยีฟลูออเรสเซนส์ผสมผสานกับการทำ Thermal cycling แบบ Rapid PCR ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไปพร้อมกับการคำนวณ และวิเคราะห์ผลในเวลาเดียวกันภายในหลอดทดลองในระยะเวลาอันสั้น โดยจะตรวจตามผลจากสัญญานฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นระหว่างทำ PCR นอกจากนี้ยังสามารถทำ Melting curve analysis สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ (Mutation detection) และหาคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ PCR ได้ในเวลาอันรวดเร็วอีกด้วย

นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการใช้งานเพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ ได้มากมาย เช่น การตรวจหาและแก้ไขการเกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอบริเวณที่ไม่จำเพาะ (Non-specific amplification), การจำแนก Genotype ได้โดยไม่ต้องทำการแยกหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing Electrophoresis), การตรวจหาการเกิด Point Mutation และปัจจุบันยังเพิ่มคุณสมบัติ Dual-color detection เมื่อนำมาใช้ร่วมกับ Color- compensation software ทำให้สามารถศึกษาการเกิดการกลายพันธุ์ที่มีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้นได้อีกด้วย

สรุป

การแพทย์ PCR ได้ให้คุณประโยชน์ในการวินิจฉัยโรค การรักษาโรค และการป้องกันโรคหลายชนิด เช่น การใช้ตัวตรวจดีเอ็นเอจากยีนของเชื้อมาลาเรียหรือไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำเทคนิค PCR จะช่วยวินิจฉัยว่ามีเชื้อมาเลเรียหรือไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคหรือไม่ วิธีนี้จะสามารถตรวจเชื้อได้รวดเร็วใช้ตัวอย่างเลือดน้อยและมีความแม่นยำดี เช่น การตรวจหาไวรัสโรคเอดส์ (AIDS) ปัจจุบันนี้ได้มีการใช้ตัวตรวจหาความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของโรคพันธุกรรมต่างๆ เช่น โรคธาลัสซีเมีย (Thalassemia) และโรคมะเร็ง รวมทั้งการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อบ่งบอกความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น บ่งบอกความเป็นพ่อ-แม่ ลูกกันได้ ใช้ในการศึกษา DNA polymorphism และการทำ genetic mapping ใช้ในการจำแนกสายพันธ์ของไวรัส และใช้ในการศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งประโยชน์ที่กล่าวมานั้นล้วนแล้วแต่ก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่องานวิจัยและพัฒนาหลายด้าน เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็วและให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือและแม่นยำ

เอกสารอ้างอิง

1. มนตรี จุฬาวัฒนทล, ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, ยงยุทธ ยุทธวงศ์ และคณะ: ชีวเคมี. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร, 2542
2. พจน์ ศรีบุญลือ, โสพิศ วงศ์คำ, พัชรี บุญศิริ และคณะ: ตำราชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่2 โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา ขอนแก่น, 2540
3. จริยา ชมวารินทร์, ชาญวิทย์ ลีลายุวัฒน์, เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์ และคณะ: PCR Technology and Applications. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น, 2540
4. วสันต์ จันทราทิตย์, ปราณี ลี้ชนะชัย, วาสนา ศิริรังษี และคณะ: วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. โรงพิมพ์พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์ เชียงใหม่, 2539.

****