13/0158/42

In situ PCR เพื่อตรวจสอบ MSP-1 ในเชื้อไข้มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

In situ PCR FOR MSP-1 DETECTION IN *PLASMODIUM FALCIPARUM*

มาลินี ฉัตรมงคลกุล[1] **ธาดา สืบหลินวงศ์**[2]

[1]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

[2]*ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

Abstract

This study describes a method which *in situ* PCR is used to amplify MSP-1 gene of *Plasmodium falciparum* in thin blood smear. After PCR, the amplified DNA is hybridized to biotinylated probe. Biotin labelling is detected with streptavidin conjugated to alkaline phosphatase.

Many factors affect efficiency, specificity and sensitivity of *in situ* PCR. The technique utilized in this procedure namely: preparation of glass slides, fixation, proteinase K treatment, *in situ* PCR amplification, hybridization and color development are described. This study provides a starting point for those who wish to begin using *in situ* PCR for their researchs.

Key words : *In situ* PCR

บทคัดย่อ

การศึกษานี้กล่าวถึง เทคนิค *in situ* PCR เพื่อเพิ่มขยายยีน MSP-1 ของเชื้อไข้มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมบนแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบาง ตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายได้ด้วย biotinylated probe ตามด้วย streptavidin alkaline phosphatase conjugate

มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อเทคนิค *in situ* PCR ในด้านประสิทธิภาพ ความจำเพาะ และความชัดเจน การศึกษานี้ได้กล่าวถึงขั้นตอนต่างๆของ *in situ* PCR อันได้แก่ การเตรียมกระจกสไลด์ การรักษาสภาพเซลล์ การย่อยผนังเซลล์ด้วย proteinase K การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ การไฮบริไดเซชัน การตรวจสอบสี การศึกษานี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจจะนำเทคนิคดังกล่าวไปใช้ในงานวิจัยต่อไป

บทนำ

In situ PCR เป็นเทคนิคใหม่ที่ได้รับการพัฒนาขึ้น ให้มีความไวสูง สามารถใช้ในการตรวจหา DNA หรือ RNA ในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ได้ (Bagasra *et al.*, 1993) เทคนิคนี้ได้รวมเอาเทคนิค PCR ซึ่งใช้ในการเพิ่มขยายปริมาณ DNA เข้ากับเทคนิค *in situ* hybridization ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจหา DNA หรือ RNA ภายในเซลล์ โดยที่เซลล์เหล่านั้นยังคงสัณฐานดังเดิม แต่ *in situ* hybridization มีขีดจำกัด คือ ภายในเซลล์ต้องมี DNA เป้าหมายอย่างน้อย 10-20 ชุด จึงจะสามารถตรวจพบได้ เมื่อนำมาประยุกต์ร่วมกับ PCR ทำให้สามารถศึกษายีนที่มีเพียง 1 ชุดต่อเซลล์ได้

Merozoite surface protein – 1 (MSP-1) ของเชื้อไข้มาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* เป็นโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นในระยะไซซอนท์ ซึ่งพบว่าสามารถชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *P. falciparum* ในสัตว์ทดลองได้ MSP-1 จึงเป็นโปรตีนที่ได้รับการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการที่จะนำมาผลิตเป็นวัคซีน ยีนที่ควบคุมการสร้าง MSP-1 อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 9 และมีเพียง 1 ชุดต่อจีโนม (Kemp *et al.*, 1990) จำนวนกรดอะมิโนที่ถอดรหัสให้เป็นยีน MSP-1 อยู่ระหว่าง 1631 - 1726 ตัว แตกต่างไปตามสายพันธุ์ของเชื้อไข้มาลาเรีย ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MSP-1 ของเชื้อ *P. falciparum* หลายสายพันธุ์ทำให้สามารถแบ่งยีน MSP-1 ออกเป็น 17 บล็อค ประกอบด้วยส่วนที่เป็น conserved 5 บล็อค (มี nucleotide sequence homology > 87 %) , semiconserved 5 บล็อค (มี nucleotide sequence homology ระหว่าง 13-87 %) และ variable 7 บล็อค (มี nuclotide sequence homology < 13 %) (Tanabe *et al.*, 1987) นอกจากนี้พบว่าบริเวณบล็อคที่ 2 ซึ่งเป็น variable บล็อคที่อยู่ด้าน N- terminus เป็นบริเวณที่มีลำดับของนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 3 แบบ หรือพบยีนส่วนนี้ได้ 3 อัลลีล ได้แก่ K1, MAD20 และ RO33 (Peterson *et al.*, 1988; Jongwutiwes *et al.*, 1992)

การศึกษานี้กล่าวถึงขั้นตอนต่างๆ ของ เทคนิค *in situ* PCR เพื่อเพิ่มขยายยีน MSP-1 ของเชื้อไข้มาลาเรียชนิด *P. falciparum* เริ่มตั้งแต่ การเตรียมกระจกสไลด์ การรักษาสภาพเซลล์ การย่อยผนังเซลล์ด้วย proteinase K การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ การไฮบริไดเซชัน การตรวจสอบสี การศึกษานี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจจะนำเทคนิคดังกล่าวไปใช้ในงานวิจัยต่อไป

วิธีดำเนินการ

1. เชื้อไข้มาลาเรียชนิด *P. falciparum*

เชื้อไข้มาลาเรียชนิด *P. falciparum* ที่เพาะเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ G112CB1.3 และ T9/94RC17 ซึ่งมียีน MSP-1 เป็นอัลลีลชนิด K1 และ MAD20 ตามลำดับ

2. PCR primer มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

MSP-1 O1 5'-CAC ATG AAA GTT ATC AAG AAC TTG TC-3'

และ MSP-1 O2 5'-GTA CGT CTA ATT CAT TTG CAC G-3'

3. Biotinylated allele specific probes

K1 5'biotin-GCA TCA GCT GGA GGG CTT GCA CCA GAT-3'

4. เครื่อง *in situ* PCR

ในงานวิจัยนี้ใช้ Perkin-Elmer Gene Amp *In situ* PCR System 1000 เครื่องมือนี้ประกอบด้วย thermal cycler, เครื่องมือช่วยในการปิด discs และ clips, เครื่องมือช่วยในการเปิด discs และ clips, amplicover discs และ clips, *in situ* PCR glass slides (silane-coated, 1.2 mm thick)

5. *In Situ* Hybridization and Detection System ของ GIBCO-BRL

มีส่วนประกอบดังนี้

2X hybridization buffer [4X SSC, 0.2 M sodium phosphate (pH 6.5), 2X Denhardt's solution, 0.1 mg/ml sodium azide]

20% dextran sulfate (in formamide)

blocking solution [50 mg/ml protein in 100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 150 mM NaCl, 0.2 mg/ml sodium azide]

streptavidin- alkaline phosphatase (40 μg/ml in conjugate dilution buffer)

conjugate dilution buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM $MgCl_2$, 10 mg/ml BSA, 0.2 mg/ml sodium azide)

NBT [75 mg/ml in 70% (V/V) dimethylformamide]

BCIP [50 mg/ml in 100% (V/V) dimethylformamide]

6. การเตรียมกระจกสไลด์

จุ่มกระจกสไลด์ลงในสารละลาย 2% 3-aminopropyltriethoxysilane ใน acetone ประมาณ 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7. ขั้นตอนของเทคนิค *in situ* PCR

7.1 การรักษาสภาพเซลล์

ทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางบนกระจกสไลด์ แล้ววางบน hot plate อุณหภูมิ 92 $^{\circ}$C 1 นาที แช่ใน 2% paraformaldehyde ใน PBS เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ล้างด้วย 3X PBS เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย PBS อีก 10 นาที ล้างในน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

7.2 การย่อยผนังเซลล์

ในการวิจัยนี้ได้ทดลองหาความเข้มข้นของ proteinase K และระยะเวลาที่เหมาะสม มีขั้นตอนการทดลองดังนี้ หยด proteinase K ที่มีความเข้มข้น 3, 5, 7 และ 10 µg/ml ละลายใน PBS ให้ท่วมแผ่นฟิล์มเลือด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 , 10 และ 15 นาที วางสไลด์บน hot plate อุณหภูมิ 92 °C 2 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ proteinase K ล้างด้วย PBS 10 วินาที ล้างในน้ำกลั่น 10 วินาที ทิ้งไว้ให้แห้ง ตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเชื้อไข้มาลาเรีย โดยนำสไลด์ไปย้อมด้วยสียิมซ่า

7.3 การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ

ได้เปรียบเทียบผลการเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยใช้ส่วนผสมของ PCR ซึ่งมีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่างกัน 2 แบบ ตามรายการต่อไปนี้

	PCR1		PCR2	
	Final Concentration	volume (µl)	Final Concentration	volume (µl)
10X PCR buffer	1X	10	1X	10
100X dNTP (7.5 mM)	7.5 µM	1	7.5 µM	1
100X O1 (10 µM)	100 nM	1	100 nM	1
100X O2 (10 µM)	100 nM	1	100 nM	1
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	10	4.2 mM	16.8
gelatin 2%	0.02 %	1	0.02 %	1
Taq DNA polymerase(5 U/µl)		2		2
ddH_2O		74		67.2
ปริมาตรรวม (µl)		100		100

เตรียมส่วนผสมของ PCR ตามปริมาณที่ต้องการ (50 µl / reaction) ในหลอดไมโครทิว (ยังไม่ใส่ *Taq* DNA polymerase) อุ่นที่อุณหภูมิ 70 °C ใส่ *Taq* DNA polymerase วางแผ่นสไลด์บนเครื่องมือช่วยในการปิดสไลด์ ซึ่งตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 70 °C หยดส่วนผสม PCR จำนวน 50 µl ปิดด้วย amplicover discs และ clips วางแผ่นสไลด์ที่ปิดเรียบร้อยแล้วในเครื่อง thermal cycler ซึ่งตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 70 °C ก่อน เมื่อปิดสไลด์ครบทุกแผ่นแล้ว จึงเปิดเครื่อง thermal cycler ตามอุณหภูมิและเวลาที่กำหนดไว้

กำหนดอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนมีดังนี้

1) denaturation 94 °C 1 นาที
annealing 50 °C 35 วินาที
extention 68 °C 2 นาที 30 วินาที
จำนวน 1 รอบ

2) denaturation 94 °C 30 วินาที
annealing 50 °C 35 วินาที
extention 68 °C 2 นาที 30 วินาที
จำนวน 29 รอบ

3) extention 68 °C 5 นาที

4) hold ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

7.4 การไฮบริไดเซชัน

แกะ amplicover discs และ clips ออก ดูดส่วนผสม PCR ที่เหลือบนสไลด์ใส่หลอดไมโครทิวเพื่อตรวจหา DNA โดยวิธีเจลอีเลคโทรโฟรีซีส ล้างสไลด์ด้วย PBS 10 วินาที จุ่มใน absolute ethanol 1 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง ผสม K1-probe กับ hybridization buffer จำนวน 100 µl / สไลด์ โดยให้ความเข้มข้นของ K1-probe เท่ากับ 0.5 µg/ml หยดบนสไลด์และปิดด้วย cover glass ขนาด 22X50 mm วางบน hot plate อุณหภูมิ 92 °C 2 นาที ระวังอย่าให้สไลด์แห้ง โดยทายาทาเล็บรอบ cover glass บ่มที่อุณหภูมิ 42 °C 12 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 74 °C 1 ชั่วโมง ในกล่องความชื้น (moisture chamber) แกะ cover glass ออก ล้างด้วย 2X SSC 2 ครั้งๆละ 10 นาที และ 0.2X SSC 2 ครั้งๆละ 10 นาที ในการวิจัยได้เปรียบเทียบผลการใช้ hybridization buffer 2 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกันดังนี้

ส่วนประกอบ	อุณหภูมิ, ระยะเวลา
1. <u>Hybridization buffer ชนิดที่ 1</u> (จาก *in situ* Hybridization and Detection System ของ GIBCO-BRL) ประกอบด้วย 2X hybridization buffer และ 20% dextran sulfate (in formamide) ในอัตราส่วน 1:1	42 °C, 12 ชั่วโมง หรือ 74 °C, 1 ชั่วโมง
2. <u>Hybridization buffer ชนิดที่ 2</u> มีส่วนประกอบและการเตรียมดังนี้ 20X SSC 250 ml hybridization buffer component 1 g 10% SDS 2 ml blocking agent 5 g ละลายส่วนประกอบดังกล่าวในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 ml	74 °C, 1 ชั่วโมง

7.5 การตรวจสอบสี

หยด blocking solution จำนวน 100 µl บนสไลด์ ปิดด้วย cover glass ขนาด 22x50 mm ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เตรียมส่วนผสมของ working conjugate solution ซึ่งประกอบด้วย streptavidin-alkaline phosphatase conjugate ปริมาตร 10 µl และ conjugate dilution buffer ปริมาตร 90 µl แกะ cover glass ออก แล้วใช้กระดาษซับแตะขอบสไลด์ ค่อยๆซับ blocking solution ออก หยด working conjugate solution ปริมาตร 100 µl บนสไลด์ ปิดด้วย cover glass ใช้ยาทาเล็บแตะที่มุมสไลด์ บ่มในกล่องความชื้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แล้วแกะ cover glass ออก ล้างด้วย TBS 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที ล้างด้วย alkaline-substrate buffer 5 นาที เตรียมสารละลาย NBT/BCIP โดยอุ่น alkaline-substrate buffer ปริมาตร 10 ml ที่อุณหภูมิ 37 °C ใส่ NBT ปริมาตร 40 µl และ BCIP ปริมาตร 33 µl ผสมให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้) จุ่มสไลด์ในสารละลาย NBT/BCIP บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างสไลด์ในน้ำกลั่นหลายๆครั้ง counterstain ด้วยสี nuclear fast red 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกหลายๆครั้ง mount ด้วย glycerol

ทดลองเปรียบเทียบการ incubate และ ไม่ incubate ใน blocking solution ถ้าไม่ incubate ใน blocking solution ทำโดย เตรียม working conjugate solution แล้วหยดบนสไลด์หลังจากขั้นตอนการไฮบริไดเซชัน ตามด้วยขั้นตอนต่อไปจนจบการตรวจสอบสี

ผลการทดลอง

ผลการทดลองแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. การย่อยผนังเซลล์

ความเข้มข้นของ proteinase K และเวลาที่ใช้ในการย่อยที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง ตัดสินได้โดยเลือกความเข้มข้น proteinase K สูงสุด และระยะที่ใช้มากที่สุดที่ไม่ทำให้ลักษณะรูปร่างของเซลล์เสียไป ผลปรากฏว่า ความเข้มข้นของ proteinase K ที่เหมาะสมคือ 7 µg/ml ใช้เวลาย่อย 10 นาที

2. การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ

ผลการตรวจหา DNA ด้วยวิธีเจลอีเลคโตรโฟรีซีสของส่วนผสม PCR ที่เหลือบนสไลด์ พบว่า ในส่วนผสม PCR ที่มี 2.5 mM $MgCl_2$ ตรวจพบแถบ DNA ที่จำเพาะสำหรับยีน MSP-1 เกิดขึ้น ส่วน PCR ที่มี 4.2 mM $MgCl_2$ ไม่พบแถบ MSP-1 สรุปได้ว่า 2.5 mM $MgCl_2$ มีความเหมาะสมกว่า 4.2 mM $MgCl_2$

3. การไฮบริไดเซชันและการตรวจสอบสี

สไลด์ที่ใช้กับเครื่อง Perkin-Elmer Amp *In situ* System 1000 สามารถทำการทดลองได้ 3 ตัวอย่างต่อสไลด์ ได้ทำแผ่นฟิล์มชนิดบาง โดยใช้เชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ที่มียีน MSP-1 เป็นอัลลีลชนิด K1 และ MAD20 เป็นตัวอย่างในการศึกษา ทำแผ่นฟิล์มเลือดบนสไลด์และเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

P. falciparum	PCR	หมายเหตุ
จุดที่ 1 K1-type	ไม่ใส่ *Taq* poly.	Negative control
จุดที่ 2 K1- type	ใส่ *Taq* poly.	Positive control
จุดที่ 3 MAD20- type	ใส่ *Taq* poly.	Negative control

ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผล *in situ* PCR **ของเชื้อ** *P. falciparum* **และไฮบริไดซ์ด้วย** k1-probe **ใน** 2 ภาวะ

P. falciparum	42 °C 12 ชั่วโมง		74 °C 1 ชั่วโมง		
	buffer1		buffer1	buffer2	
	+blocking solution	-blocking solution	-blocking solution	+blocking solution	-blocking solution
K1-type (-*Taq*)[1]	-	-	รูปร่าง	-	-
K1-type (+*Taq*)[2]	-	+	ลักษณะของ	?	+
MAD20-type (+*Taq*)[3]	-	-	เชื้อไม่ดี	-	-

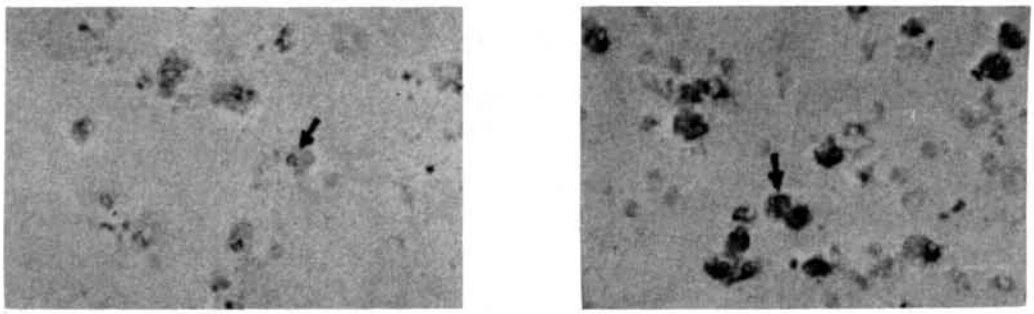
หมายเหตุ 1 = negative control - = บริเวณนิวเคลียสของเชื้อไม่ติดสี
2 = positive control + = บริเวณนิวเคลียสของเชื้อ ติดสีม่วงเข้ม
3 = negative control ? = ผลไม่ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ negative control

สรุปผลการทดลองในตารางที่ 1 ดังนี้

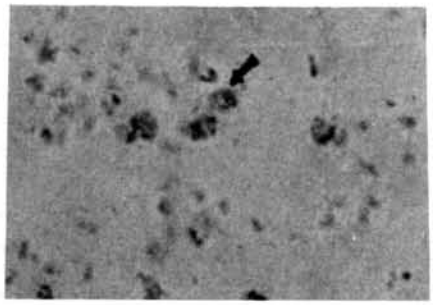
<u>การใช้ hybridization buffer ชนิดที่ 1</u> ไฮบริไดซ์ที่อุณหภูมิ 42 °C 12 ชั่วโมง ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. falciparum* ไม่เปลี่ยนแปลง คือเห็นผนังเซลล์ และนิวเคลียสชัดเจน แต่เมื่อไฮบริไดซ์ ที่อุณหภูมิ 74 °C 1 ชั่วโมง ลักษณะรูปร่างของเชื้อจะเปลี่ยนไป คือ ไม่เห็นผนังเซลล์หรือเซลล์แตก ผนังเซลล์เว้าไปมา นิวเคลียสแตก

<u>การ incubate ใน blocking solution</u> ไม่เห็นความแตกต่างระหว่าง positve และ negative control คือไม่มีการติดสีม่วงเข้มบริเวณนิวเคลียส ซึ่งมี DNA target อยู่

<u>การไม่ incubate ใน blocking solution</u> (รูปที่ 1, 2) ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน ระหว่างการใช้ hybridization buffer ชนิดที่ 1 ที่อุณหภูมิ 42 °C 12 ชั่วโมง และ hybridization buffer ชนิดที่ 2 ที่อุณหภูมิ 74 °C 1 ชั่วโมง คือ ในสไลด์ของ K1-probe (+*Taq*) = positive control จะเห็นบริเวณนิวเคลียสของเชื้อระยะไซซอนท์ติดสีม่วงเข้ม ส่วน negative control ไม่ติดสี



a b



c

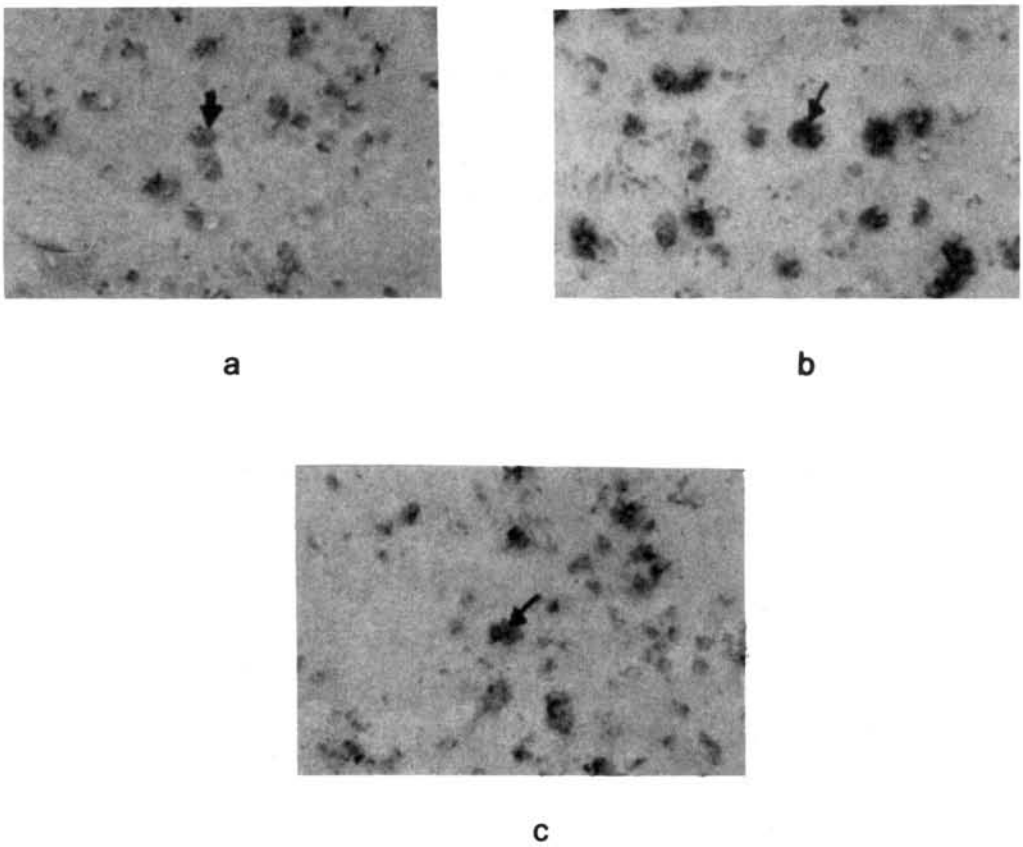
รูปที่ 1 เชื้อ *P. falciparum* หลังทำ *in situ* PCR และไฮบริไดซ์ด้วย K1 - probe ใน hybridization buffer ชนิดที่ 1 ที่อุณหภูมิ 42 ^{o}C12 ชั่วโมง โดยไม่ผ่านการ incubate ใน blocking solution

a K1-type (-*Taq*); negative control
เชื้อ *P. falciparum* ไม่ได้เพิ่มขยายจำนวน DNA

b K1-type (+*Taq*); positive control
เชื้อ *P. falciparum* เพิ่มขยายจำนวน DNA ด้วย PCR

c MAD20-type (+*Taq*); negative control
เชื้อ *P. falciparum* เพิ่มขยายจำนวน DNA ด้วย PCR

จากการเปรียบเทียบ a, b และ c จะเห็นว่านิวเคลียสของเชื้อระยะไซซอนท์ในรูป b ติดสีม่วงเข้มชัดเจน (ลูกศรชี้ในรูปคือเชื้อระยะไซซอนท์)



รูปที่ 2 เชื้อ *P. falciparum* หลัง *in situ* PCR และ ไฮบริไดซ์ด้วย K1-probe ใน hybridization buffer ชนิดที่ 2 ที่อุณหภูมิ 74°C 1 ชั่วโมง โดยไม่ผ่านการ incubate ใน blocking solution

a K1-type (-*Taq*); negative control
เชื้อ *P. falciparum* ไม่ได้เพิ่มขยายจำนวน DNA

b K1-type (+*Taq*); positive control
เชื้อ *P. falciparum* เพิ่มขยายจำนวน DNA ด้วย PCR

c MAD20-type (+*Taq*); negative control
เชื้อ *P. falciparum* เพิ่มขยายจำนวน DNA ด้วย PCR

จากการเปรียบเทียบ a, b และ c จะเห็นว่านิวเคลียสของเชื้อระยะไซซอนท์ในรูป b ติดสีม่วงเข้มชัดเจน (ลูกศรชี้ในรูปคือเชื้อระยะไซซอนท์)

วิจารณ์และสรุป

1. การเตรียมกระจกสไลด์และการรักษาสภาพเซลล์

ปัญหาสำคัญที่พบใน *in situ* PCR ประการหนึ่ง คือ การหลุดของเซลล์ออกจากสไลด์ระหว่างกระบวนการไฮบริไดเซชันและการล้าง แก้ไขได้โดยการเคลือบกระจกสไลด์ด้วย 3'- aminopropyltriethoxy saline ก่อนทำแผ่นฟิล์มเลือดบนสไลด์ เพื่อทำให้ผิวหน้ากระจกสไลด์เป็น hydrophobic ซึ่งจะทำให้เซลล์เกาะติดสไลด์แน่นขึ้น หลังทำแผ่นฟิล์มเลือดบนสไลด์แล้วจึงนำไป fix ด้วย 2% paraformaldehyde ข้ามคืนหรือเป็นเวลา 15 ชั่วโมง

2. การย่อยผนังเซลล์

เมื่อเซลล์ถูก fix โปรตีนและกรดนิวคลีอิคจะจับกัน (protein DNA binding)ไปปิดรูต่างๆบนผนังเซลล์ การย่อยผนังเซลล์ด้วย proteinase K จะทำให้ DNA polymerase, primer และสารต่างๆที่จำเป็นสำหรับกระบวนการ PCR ผ่านผนังเซลล์เข้าไปทำปฏิกิริยากับ target DNA ภายในเซลล์ได้ ดังนั้นขั้นตอนการย่อยผนังเซลล์จึงต้องทำอย่างระมัดระวัง ความเข้มข้นของ proteinase K และระยะเวลาที่ใช้มีความสำคัญมาก ถ้าย่อยผนังเซลล์มากเกินไปอาจทำให้เซลล์หลุดออกจากแผ่นสไลด์ หรือทำให้สัณฐานของเซลล์เสียไปได้ หรือ DNA ที่เพิ่มขยายได้จะหลุดรอดออกนอกเซลล์ทำให้ผลไม่ชัดเจนมี background สูง ถ้าย่อยน้อยเกินไป สารที่จำเป็นต่างๆจะไม่สามารถผ่านผนังเซลล์เข้าไปได้ จากการทดลองพบว่า proteinase K ความเข้มข้น 7 μg/ml ระยะเวลาย่อย 10 นาที เป็นช่วงที่เหมาะสม สำหรับขั้นตอนนี้อาจใช้เอ็นไซม์อื่นได้ เช่น trypsin, pronase และ pepsin (Bagasra *et al.*,1994)

3. การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ

การทำ PCR กับเซลล์ที่ติดอยู่บนสไลด์โดยทั่วไปจะมีประสิทธิภาพของการเพิ่มขยาย DNA ต่ำกว่าการทำ PCR ในหลอดทดลอง การเพิ่มปริมาณสารสำคัญในส่วนผสม PCR เช่น ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และ *Taq* DNA polymerase อาจทำให้มีการเพิ่มขยายปริมาณ DNA มากขึ้นได้ (O'Leary *et al.*, 1994) ผู้วิจัยจึงได้เปรียบเทียบการใช้ส่วนผสม PCR ที่มี $MgCl_2$ 2.5 mM และ 4.2 mM และใช้ *Taq* DNA polymerase 5 Unit ต่อ reaction ผลปรากฏว่า ส่วนผสม PCR ที่มี 4.2 mM $MgCl_2$ ไม่เหมาะสม คือ ไม่มีการเพิ่มขยายปริมาณ DNA เกิดขึ้นเลย แต่ส่วนผสม PCR ที่มี 2.5 mM $MgCl_2$ มีการเพิ่มปริมาณ DNA เกิดขึ้น

4. กระบวนการไฮบริไดเซชันและการตรวจสอบสี

การไฮบริไดเซชันโดยใช้ probe ที่ติดฉลากเข้าไปใน DNA target ที่มีความจำเพาะภายในเซลล์และการตรวจสอบความจำเพาะโดยดูสัญญาณจากสารติดฉลากที่เกาะติดบนสายของ probe สารปลอดรังสีที่นิยมใช้ติดฉลากเข้ากับสาย probe มากที่สุด คือ biotin และเมื่อนำมาผนวกกับขั้นตอนการตรวจสอบซึ่งใช้ streptavidin ปรากฏว่า มีความไวสูง ผู้วิจัยใช้ probe ที่มีความจำเพาะต่ออัลลีล K1 โดยติด biotin ที่ด้าน 5' และใช้ *in situ* hybridization and detection system ของ GIBCO-BRL สำหรับขั้นตอนในการตรวจสอบ

การไฮบริไดเซชันโดยใช้ K1-probe ใน hybridization buffer ชนิดที่ 1 (ซึ่งเป็น buffer ที่มีอยู่ใน *in situ* hybridization and detection system ของ GIBCO-BRL) ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ incubate ใน blocking solution เพื่อล้าง probe ที่เหลือ และ probe ซึ่งจับอยู่กับ DNA ที่ไม่มีความจำเพาะออก แล้วตรวจสอบด้วย streptavidin alkaline phosphatase conjugate ผลปรากฏว่าไม่สามารถตรวจสอบการติดสีได้ แต่ถ้าตัดขั้นตอนการ incubate ใน blocking solution ออก สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อ *P. falciparum* ที่มีอัลลีลชนิด K1 และ MAD20 ได้

ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบผลดังกล่าวข้างต้นกับการไฮบริไดเซชันที่อุณหภูมิ 74°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ไฮบริไดซ์ กับ K1-probe ในวิธีของ Southern blot hybridization (กาญจนา, 2538) ปรากฏว่าการไฮบริไดเซชันด้วย hybridization buffer ชนิดที่ 1 ทำให้ลักษณะรูปร่างของเซลล์เสียไป ส่วนการใช้ hybridization buffer ชนิดที่ 2 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อ *P. falciparum* ที่มีอัลลีลชนิด K1 และ MAD20 ได้ เช่นเดียวกัน

ดังนั้นสรุปได้ว่าการไฮบริไดเซชันและการตรวจสอบสีโดยใช้ *in situ* hybridization and detection system ของ GIBCO-BRL และการไฮบริไดเซชันที่อุณหภูมิ 42°C 12 ชั่วโมงด้วย hybridization buffer ชนิดที่ 1 หรือ 74°C 1 ชั่วโมง ด้วย hybridization buffer ชนิดที่ 2 ให้ผลไม่แตกต่างกัน คือสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อ *P. falciparum* ที่มีอัลลีลชนิด K1 และ MAD20 ได้ แต่ขั้นตอนการล้าง probe ที่จับกับดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะออกมีความสำคัญมาก

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง เป็นอย่างสูงที่ได้อนุญาตให้ทำการวิจัยในห้องปฏิบัติการฝ่ายศูนย์วิจัยมาลาเรีย ตลอดจนการใช้เครื่องมือและวัสดุบางอย่างด้วย ขอขอบคุณบริษัท Perkin Elmer (Thailand) จำกัด ที่ได้อนุเคราะห์ให้ขอยืมเครื่อง Perkin-Elmer Gene Amp *In situ* System 1000 ขอขอบคุณ คุณอารีย์ เสือก้อน และ คุณนภาพร ศิริพูล จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้ให้เชื้อไข้มาลาเรียสำหรับการทดลอง งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. กาญจนา รังษีหิรัญรัตน์. 2538. ความหลากหลายของแอนติเจนยีนสองชนิด (เอ็มเอสพี 1 และ เอ็มเอสพี 2) ของ *Plasmodium falciparum* ในประเทศไทย ตรวจหาโดยพีซีอาร์และดีเอ็นเอติดตาม. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

2. Bagasra O, Seeshama T, and Pomerantz RJ. 1993. Polymerase chain reaction *in situ* : intercellular amplification and detection of HIV-1 proviral DNA and other specific genes. J. Immunol. Methods. 158: 131-145.

3. Jongwutiwes S, Tanabe K, Nakazawa S, Yonagi T, and Kanbara H. 1992. Sequence variation in the tripeptide repeats and T cell epitopes in p190 (MSP1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. Mol. Biochem. Parasitol. 51: 81-90.

4. Kemp DJ, Cowman AF, and Walliker D. 1990. Genetic diversity in *Plasmodium falciparum*. Advances in Parasitology. 29: 75-149.

5. O' Leary JJ, Browne G, Landers RJ, Crowley M, Bailey Healy I, Street JT, Pollock AM, Murphy J, Johnson MI, Lewis FA, Mohamdee O, Cullinane C, and Doyle CT. 1994. The importance of fixation procedures on DNA template and its suitability for solution-phase polymerase chain reaction and PCR *in situ* hybridization. Histochemical Journal. 26: 337-346.

6. Peterson MG, Coppel RL, McIntyre P, Landford CJ, Woodrow G, Brown GV, Anders RF, and Kemp DJ. 1988. Variation in the precursor to the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 27: 291-302.

7. Tanabe K, Mackay M, Gowman M, and Scaif JG. 1987. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J. Mol. Biol. 195: 273-287.