บทที่ 4

วิธีดำเนินการศึกษา

ขั้นตอนการศึกษาความผิดปกติของยีน GH-1 ทั้งหมดมี 6 ขั้นตอน คือ

4.1 การเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วย และสมาชิกในครอบครัว

4.2 การสกัดจีโนมิก ดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยและสมาชิกในครอบครัว

4.3 การศึกษาการขาดหายไปของยีน GH-1 (GH-1 gene deletion) โดยวิธี PCR และ restriction enzyme analysis

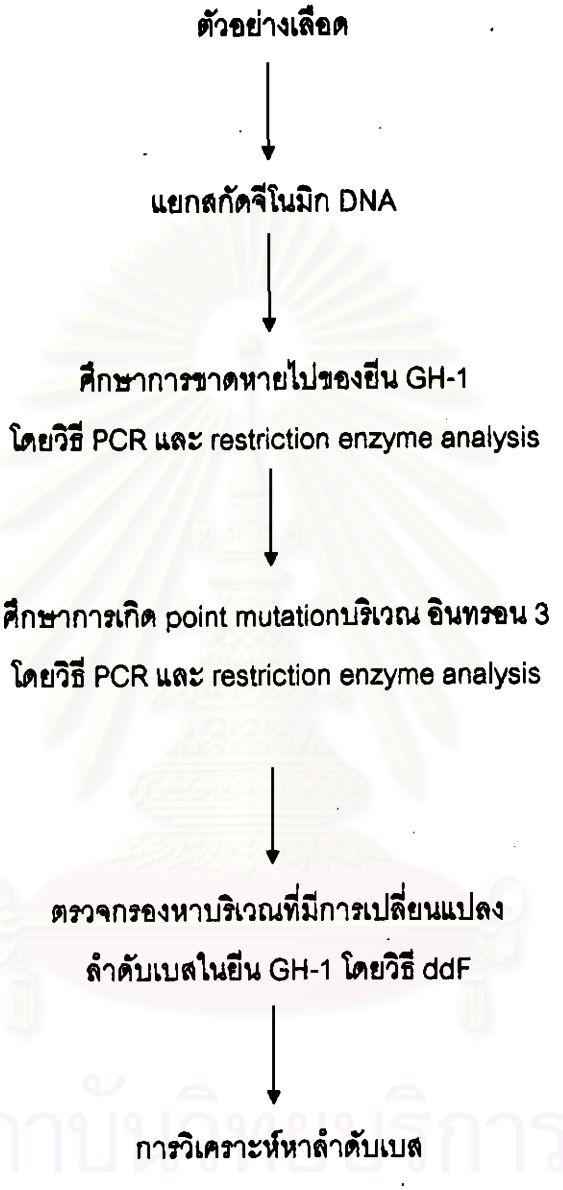
4.4 การศึกษาการเกิด point mutation บริเวณ อินทรอน 3 (IVS 3) โดยวิธี PCR และ restriction enzyme analysis

4.5 การตรวจกรองหาบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีน GH-1 โดยวิธี dideoxy fingerprinting (ddF)

4.6 การวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ผิดปกติ โดยวิธี sequencing analysis

ขั้นตอนการศึกษาทั้งหมด โดยสังเขป แสดงไว้ในรูปที่ 4.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาทั้งหมด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

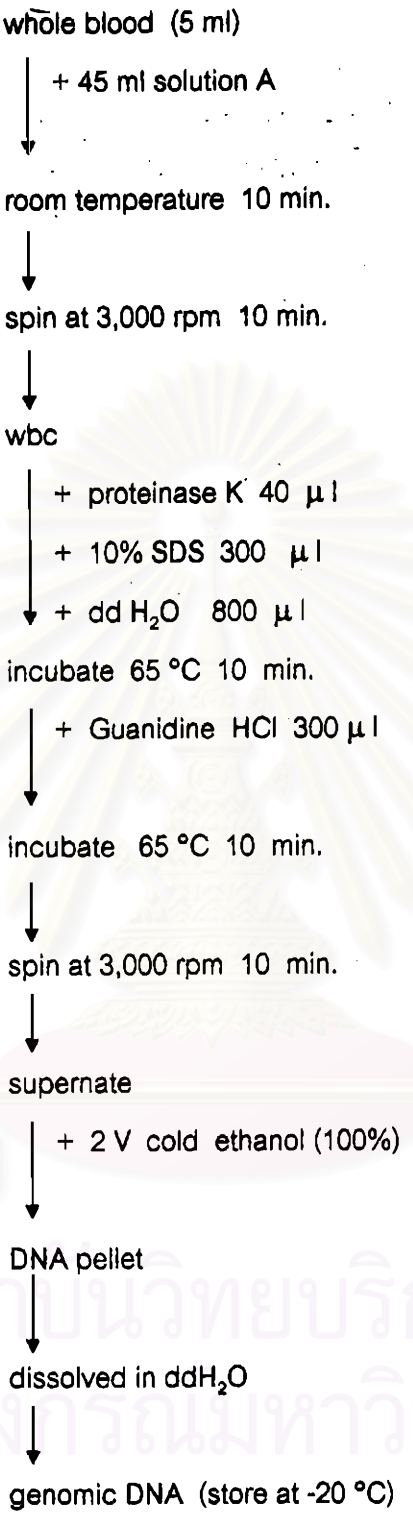
4.1 การเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วย และสมาชิกในครอบครัว

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยเด็กที่มีภาวะขาดฮอร์โมนเติบโตที่มารับการรักษาในภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โรงพยาบาลศิริราช และสมาชิกในครอบครัว รวมทั้งสิ้น 39 ราย ปริมาตรคนละ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปลอดเชื้อที่มี 0.2 M. EDTA 0.5 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างเลือดดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ (ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 5 วัน)

4.2 การสกัดจีโนมิก ดีเอ็นเอจากเลือดผู้ป่วย และสมาชิกในครอบครัว

ทำตามขั้นตอนที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Herrman และ Frischaauf (1987) ดังนี้

1. นำตัวอย่างเลือด 5 มิลลิลิตร ที่ใช้ EDTA เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว มาใส่ในหลอดทดลอง 50 มิลลิลิตร แล้วเติม solution A 45 มิลลิลิตร
2. ปิดฝาให้แน่น แล้วกลับหลอดขึ้นลง เพื่อให้สารผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที
3. ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำใส เก็บตะกอนมาผสมกับ proteinase K 40 ไมโครลิตร 10% SDS 300 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 800 ไมโครลิตร ด้วยเครื่อง Vortex แล้วนำไป incubate ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 65 °C นาน 10 นาที
4. เติม Guanidine HCl 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 10 นาที
5. นำไปปั่นแยกที่ 3,000 rpm นาน 10 นาที ใช้ปิเปตดูดเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำใส มาใส่หลอดใหม่ที่ปลอดเชื้อ แล้วเติม 100% เอธานอลที่เย็นจัดลงไป (ประมาณ 2 เท่า) กลับหลอดขึ้นลงจะสังเกตเห็นเส้นใยดีเอ็นเอเกิดขึ้น
6. นำไปปั่นที่ 3,000 rpm นาน 10 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำ แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอธานอล 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ 3,000 rpm นาน 10 นาที
7. ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำใส แล้วตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นานประมาณ 10 นาที
8. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C แสดงเป็นแผนภูมิได้ดังรูปที่ 4.2

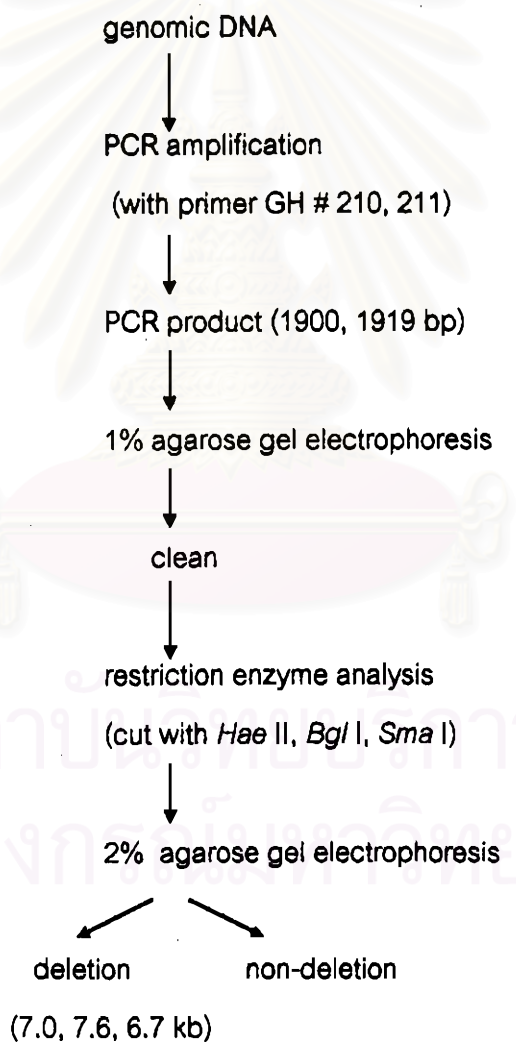


รูปที่ 4.2 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการเตรียมจีโนมิกดีเอ็นเอ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การศึกษาการขาดหายไปของยีน GH-1 โดยวิธี PCR และ restriction enzyme analysis

การตรวจหาความผิดปกติชนิดนี้อาศัยการเปรียบเทียบรูปแบบที่แตกต่างกันของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของผู้ป่วย สมาชิกในครอบครัวและคนปกติที่ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Sma* I, *Hae* II และ *Bgl* I โดยการนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 4.2 มาเพิ่มปริมาณด้วยการทำ PCR ที่ใช้ไพรเมอร์จำเพาะและสภาวะการเพิ่มปริมาณที่เหมาะสม นำ PCR product ที่ได้ไปตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Sma* I, *Hae* II และ *Bgl* I แล้วนำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ ตัดจำเพาะ ดังกล่าวนี้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้วุ้นอากาโรส ก็จะได้ชิ้นส่วนขนาดต่างๆ กันของดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนโดยสังเขปดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาการขาดหายไปของยีน GH-1

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ บริเวณ flanking region ของยีน GH-1 มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมหลอด ไมโครทิวบ์ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร และเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

DNA Template	4	µl
10 x Buffer	10	µl
10 mM $MgCl_2$	4	µl
1 mM dNTPs	10	µl
primer (10 pmol/µl)		
GH # 210	5	µl
GH # 211	5	µl
Tag polymerase	2.5	µl
ddH_2O	59.5	µl

โดยที่มีปริมาตรรวมทั้งหมดของปฏิกิริยาเท่ากับ 100 ไมโครลิตร แล้วเติม mineral oil 2 หยด

2. เริ่มทำ PCR โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler 480 โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาตามลำดับดังนี้

95 °C	:	5 นาที	1 รอบ
90 °C	:	45 วินาที	
65 °C	:	30 วินาที	33 รอบ
72 °C	:	2 นาที	
72 °C	:	5 นาที	1 รอบ

เก็บหลอด PCR product ไว้ที่ 4 °C

3. นำ PCR product ที่ได้ มาตรวจ โดยการทำ 1% agarose gel electrophoresis ย้อมแถบ ดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูภายใต้แสง UV เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้กับ DNA size marker

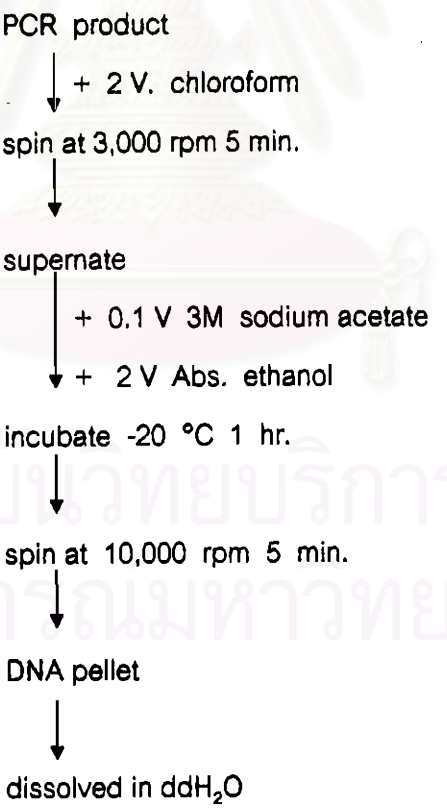
การทำความสะอาด PCR product

PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ก่อนที่จะนำไปตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะนั้น จะต้องนำมาทำความสะอาดเสียก่อน เพื่อกำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการออกให้เหลือเพียงแต่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. ใช้ปิเปต ดูด PCR product ทั้งหมด มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิตร เติม chloroform 2 V ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นด้วยความเร็ว 3,000 rpm นาน 5 นาที

2. ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสด้านบนออกมาใส่หลอดใหม่ แล้วเติม 3 M sodium acetate (0.1 V) และ 100% เอธานอล (2 V) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

3. นำมาปั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอธานอล ตากตะกอนให้แห้งแล้วละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทำความสะอาด PCR product

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ PCR product ขนาด 1900 และ 1919 bp โดยวิธีตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Sma* I, *Hae* II และ *Bgl* I มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมหลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ แต่ละตัว ดังนี้

Sma I

PCR product	10	µl
10 x NE buffer 4	3	µl
restriction enzyme *Sma* I	2	µl
ddH_2O	15	µl
total volume	30	µl

: ผสมให้เข้ากันแล้ว incubate ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C ข้ามคืน

Hae II

PCR product	10	µl
10 x NE buffer 4	3	µl
purified BSA 100X	0.5	µl
restriction enzyme *Hae* II	2	µl
ddH_2O	14.5	µl
total volume	30	µl

: ผสมให้เข้ากันแล้ว incubate ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C ข้ามคืน

Bgl I

PCR product	10	µl
One - Phor - All buffer	3	µl
restriction enzyme BglI	2	µl
ddH_2O	15	µl
total volume	30	µl

: ผสมให้เข้ากันแล้ว incubate ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C ข้ามคืน

2. นำไปแยกโดย 2% agarose gel electrophoresis

3. ย้อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดได้หรือตัดไม่ได้นั้นด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ได้ตัด (uncut) โดยส่องดูภายใต้แสง UV ซึ่งรูปแบบของการตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด เป็นดังนี้ (ตารางที่ 4.1)

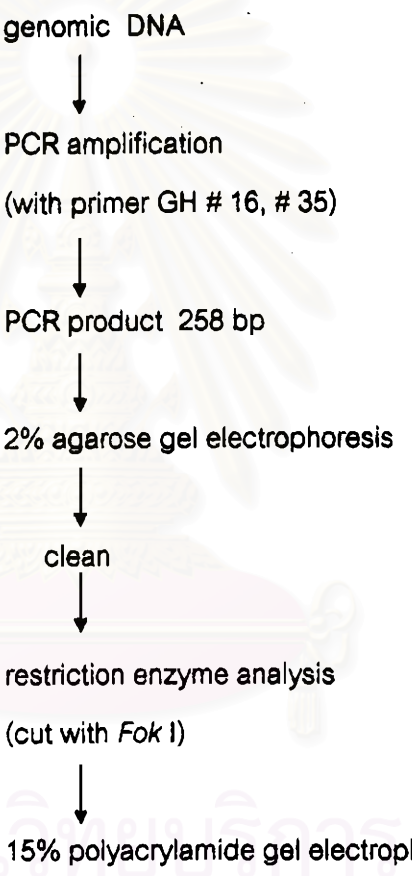
ตารางที่ 4.1 แสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แบบปกติ และแบบที่มีการขาดหายไปของยีน ซึ่งตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Sma* I, *Hae* II และ *Bgl* I

restriction enzyme	normal (bp)	deletion (bp)		
		7.0 kb	6.7 kb	7.6 kb
Sma I	1900 762 711 446	762 711 446	1472 446	1900
Hae II	1919 1529 371	1919	1918	1529 371
Bgl I	1919 1188 712	1919	1200 712	1188 712

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การศึกษาการเกิด point mutation บริเวณอินทรอน 3 (IVS3) โดยวิธี PCR และ restriction enzyme analysis

การเกิด point mutation บริเวณอินทรอน 3 ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด skipping splice site ของ แอกซอน 3 ได้ การวิเคราะห์หาความผิดปกติดังกล่าวนี้ กระทำได้โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Fok* I ซึ่งมีขั้นตอนแสดงไว้ ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาการเกิด point mutation บริเวณอินทรอน 3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ บริเวณอินทรอน 3 ขนาด 258 bp (โดยใช้ PCR kit ของบริษัท QIAGEN) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียมหลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร และเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

DNA Template	2	µl
10 x Buffer	5	µl
Q solution	10	µl
1 mM dNTPs	2	µl
primer (10 pmol/µl)		
GH # 16	1.5	µl
GH # 35	1.5	µl
Tag polymerase	0.25	µl
ddH_2O	27.75	µl

โดยที่มีปริมาตรรวมทั้งหมดของปฏิกิริยาเท่ากับ 50 ไมโครลิตร แล้วเติม mineral oil 2 หยด

2. เริ่มทำ PCR โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler 480 โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาตามลำดับดังนี้

94 °C	:	3 นาที	1 รอบ
94 °C	:	1 นาที	
63 °C	:	45 วินาที	31 รอบ
72 °C	:	1 นาที	
72 °C	:	10 นาที	1 รอบ

เก็บหลอด PCR product ไว้ที่ 4 °C

3. นำ PCR product ที่ได้มาตรวจ โดยการทำ 2% agarose gel electrophoresis ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูภายใต้แสง UV เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้กับ DNA size marker

4. ทำความสะอาด PCR product โดยใช้วิธีเดียวกับที่ได้บรรยายไว้ในข้อ 4.3

การวิเคราะห์ PCR product ขนาด 258 bp โดยวิธีตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Fok* I มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

PCR product (258 bp)	20	µl
10 x buffer 4	3	µl
restriction enzyme *Fok* I	2	µl
ddH_2O	5	µl

2. ผสมให้เข้ากัน แล้ว incubate ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอ็นไซม์ *Fok* I อีกหลอดละ 1 ไมโครลิตร แล้ว incubate ต่ออีก 2 ชั่วโมง

3. นำ PCR product ที่ได้จากการตัดด้วย เอ็นไซม์ ตัดจำเพาะ *Fok* I มาตรวจดูผล โดยการทำ 15% polyacrylamide gel electrophoresis

4. ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูภายใต้แสง UV

ในคนปกติชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 258 bp จะมีตำแหน่งที่เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Fok* I ตัดได้ 2 ตำแหน่ง จึงทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 194, 433 และ 21 bp ตามลำดับ แต่ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงของเบสที่มีผลต่อตำแหน่งตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ *Fok* I จะทำให้จำนวนและขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอเปลี่ยนไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การตรวจกรองหาบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีน GH-1 โดยวิธี dideoxy fingerprinting (ddF)

ยีน GH-1 ซึ่งใช้เป็นแม่พิมพ์ในการทำ ddF ในครั้งนี้ ได้มาจากการทำ PCR 2 ครั้ง โดยครั้งแรก จะเพิ่มปริมาณยีน GH-1 จากจีโนมิกดีเอ็นเอ ซึ่งจะได้ PCR product ขนาดประมาณ 2.7 kb ส่วนครั้งที่ 2 เป็นการทำ Nested PCR โดยใช้ PCR product ที่ได้ในครั้งแรกเป็นแม่พิมพ์ ทำให้ได้ PCR product ที่มีขนาดสั้นลง คือประมาณ 2.6 kb และจากวิธีการนี้ ยังทำให้แน่ใจอีกว่า PCR product ที่ได้มานั้นเป็นส่วนของยีน GH-1 จริงๆ โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้คือ

1. การเพิ่มปริมาณยีน GH-1 จากจีโนมิก ดีเอ็นเอ เพื่อให้ได้ PCR product ขนาด 2.7 kb ส่วนผสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ต่อ 1 ตัวอย่างมีดังนี้

DNA Template	4	µl
10 x Buffer	10	µl
25 mM $MgCl_2$	10	µl
1 mM dNTPs	20	µl
primer (10 pmol/µl)		
GH # 11	5	µl
GH # 2a	5	µl
Tag polymerase	1.5	µl
ddH_2O	44.5	µl

รวมส่วนผสมทั้งหมดใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร พร้อมทั้ง mineral oil 2 หยด จากนั้นเริ่มทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาตามลำดับดังนี้

95 °C	:	4 นาที	1 รอบ
95 °C	:	30 วินาที	5 รอบ
68 °C	:	2 นาที 45 วินาที	
94 °C	:	45 วินาที	
63 °C	:	30 วินาที	27 รอบ
72 °C	:	2 นาที 45 วินาที	
72 °C	:	7 นาที	1 รอบ

เก็บหลอดที่บรรจุ PCR product ไว้ที่ 4° C จากนั้นตรวจดูผลการเพิ่มปริมาณยีน GH-1 โดยการทำ 1% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ DNA size marker

PCR product ที่ได้ทั้งหมดนี้ จะนำมาทำความสะอาดโดยใช้ QIA quick RCR Purification kit แล้วตรวจดูบน 1% agarose gel electrophoresis อีกครั้ง เพื่อที่จะได้ปรับระดับความเข้มข้นของ PCR product ให้อยู่ในระดับเดียวกัน และเหมาะสมที่จะใช้เป็นแม่พิมพ์สำหรับทำ Nested PCR ในข้อ 2 ต่อไป

2. การทำ Nested PCR จาก 2.7 kb GH PCR Template

เพื่อที่จะได้แม่พิมพ์สำหรับทำ finger printing ที่ถูกต้อง และมีปริมาณมากขึ้น จึงนำ PCR product ขนาด 2.7 kb ที่ได้จากข้อ 1 มาทำ Nested PCR อีกครั้งหนึ่ง โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ (ใช้ PCR kit ของบริษัท QIAGEN)

ส่วนผสมที่ใช้ทำปฏิกิริยาต่อหนึ่งตัวอย่างมีดังนี้

DNA Template (2.7 kb)	2	µl
10 x Buffer	10	µl
Q solution	20	µl
1 mM dNTPs	2	µl
primer (10 pmol/µl)		
GH # 32	5	µl
GH # 33	5	µl
Tag polymerase	2	µl
ddH_2O	54	µl

รวมส่วนผสมทั้งหมดใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร พร้อมทั้ง mineral oil 2 หยด จากนั้นเริ่มทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาตามลำดับดังนี้

96 °C	:	6 นาที	1 รอบ
94 °C	:	1 นาที	
54 °C	:	45 วินาที	33 รอบ
72 °C	:	3 นาที	
72 °C	:	10 นาที	1 รอบ

เก็บหลอดที่บรรจุ PCR product ไว้ที่ 4 °C จากนั้นตรวจดูผล โดยการทำ 1% agarose gel electrophoresis และทำความสะอาดโดยใช้ QIA quick PCR Purification kit เช่นเดียวกับในข้อ 1. นำ PCR product ที่ทำความสะอาดเรียบร้อยแล้วนี้ ไปใช้เป็นแม่พิมพ์ในการทำ ddF ซึ่งจะอธิบายต่อไป

การทำเทคนิค dideoxy fingerprinting (ddF)

dideoxy fingerprinting เป็นวิธีการตรวจหา point mutation บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR อย่างมีประสิทธิภาพ โดยที่ ddF ที่ได้จะแสดงตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงเบสที่ผิดปกติไป ในตัวอย่างที่มีตำแหน่งของความผิดปกติที่แตกต่างกัน ก็จะให้ ddF pattern ในตำแหน่งที่ต่างกันด้วย ซึ่งสามารถใช้เทคนิคนี้หาความผิดปกติของยีนบนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ได้อย่างรวดเร็ว ด้วยเทคนิคการตรวจกรองเป็นช่วงสั้นๆ หลายๆ ช่วง สำหรับ ddF Primers ที่ออกแบบมาใช้ในการตรวจกรองยีน GH-1 มีทั้งหมด 8 ไพรเมอร์ ดังนี้ คือ

GH # 27 (4677 - 4696) ใช้ในการตรวจกรอง ส่วนนอก promotor
GH # 39 (4935 - 4957) ใช้ในการตรวจกรอง ส่วนใน promotor
GH # 41 (5186 - 5206) ใช้ในการตรวจกรอง แอกซอน 1
GH # 43 (5467 - 5486) ใช้ในการตรวจกรอง แอกซอน 2
GH # 3 (5716 - 5738) ใช้ในการตรวจกรอง อินทรอน 2
GH # 37 (5934 - 5956) ใช้ในการตรวจกรอง แอกซอน 3 และอินทรอน 3
GH # 47 (6180 - 6196) ใช้ในการตรวจกรอง แอกซอน 4 และอินทรอน 4
GH # 49 (6537 - 6556) ใช้ในการตรวจกรอง แอกซอน 5

ขั้นตอนในการทำ ddF มีดังนี้

1. การติดฉลากไพรเมอร์

นำไพรเมอร์ที่กล่าวแล้วข้างต้น ที่จะใช้ทำ ddF มาติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (γ - P^{32}) โดยใช้ BRL Cycle Sequencing kit ซึ่งส่วนผสมที่ใช้ทำปฏิกิริยามีดังนี้ คือ

- นำกลั่น	1	µl
- kinase buffer	1	µl
- primer (1 µM stock)	1	µl
- γ P^{32}	1	µl
- kinase	1	µl

(ส่วนผสมนี้ใช้ได้กับ 4 ตัวอย่าง)

นำไพรเมอร์ที่จะติดฉลากแต่ละหลอดไปเข้าเครื่อง PCR Themal Cycler 480 โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้คือ 37 °C : 30 นาที และ 55 °C : 10 นาที จากนั้นเก็บไพเมอร์ที่ติดฉลากแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

2. เตรียม ddF Master mix ประกอบด้วย

น้ำกลั่น	17.5	µl
10 x Tag sequence Buffer	4.5	µl
Termination Mix (G, A, T หรือ C)	9	µl
BRL Tag polymerase	5	µl
end-labeled primer	5	µl

ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex (ส่วนผสมนี้ใช้สำหรับ 4 ตัวอย่าง)

3. เตรียมหลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ใส่ DNA Template (2.6 kb) 2 ไมโครลิตร และ ddF Master mix อีก 8 ไมโครลิตร จากนั้นหยด mineral oil 1 หยด แล้วจึงไปทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้

95 °C	:	10 นาที	1 รอบ
95 °C	:	30 วินาที	
55 °C	:	30 วินาที	20 รอบ
70 °C	:	1 นาที	
95 °C	:	30 วินาที	10 รอบ
70 °C	:	1 นาที	
72 °C	:	10 นาที	1 รอบ

4. เมื่อครบตามจำนวนรอบและเวลาแล้วจึงใส่ TdT (Therminal Deoxynucleotidyl Transferase) หลอดละ 1 ไมโครลิตร แล้ว incubate ที่ 37 °C ต่ออีก 30 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution โดยใส่หลอดละ 5 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะทำ non - denaturing gel electrophoresis

5. การทำ non - denaturing gel electrophoresis

- 5% ddF Gel ประกอบด้วย

40% acrylamide stock	12.5	ml
10 x TBE buffer	5	ml
dH_2O	82.5	ml
20% APS	500	µl
TEMED	50	µl

ผสมทุกอย่างให้เข้ากัน แล้วเทลงในชุดกระจก sequencing ที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้ว ระวังอย่าให้มีฟองก๊าซ ใส่ comb ข้างบน แล้วใช้คลิปหนีบให้แน่น เมื่อเจลแข็งตัวแล้วจึงห่อด้วยพลาสติก เก็บไว้ที่ 4 °C ข้ามคืน

- ทำการ Pre-running gel electrophoresis ที่ 25 วัตต์ เป็นเวลา 15 นาที ระหว่างนี้ก็นำ ddF samples ที่เก็บไว้มา denature ที่ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ลงในน้ำแข็ง เพื่อลดอุณหภูมิลงทันที

- หยอด ddF samples ลงในเจลที่ Pre-run แล้ว โดยหยอดตัวอย่างละ 3 ไมโครลิตร แล้วเปิดเครื่อง run ที่ 25 วัตต์ นาน 2 1/2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C (ในตู้เย็น)

6. ค่อยๆ แกะกระจกออกจากกัน แล้วใช้กระดาษกรองซับเจลออกจากแผ่นกระจก จากนั้นจึงนำไปทำให้แห้ง โดยใช้เครื่อง gel dryer ประมาณ 2 ชั่วโมง

7. นำกระดาษกรองที่มีเจลแห้งติดอยู่มาตรวจความแรงของกัมมันตภาพรังสี โดยใช้เครื่อง Geiger Mueller Counter แล้ววางลงใน cassette จากนั้นนำไปประกบกับฟิล์มเอ็กซเรย์ในห้องมืด ทิ้งไว้ 10 ชั่วโมง จึงนำฟิล์มไปล้างด้วยเครื่องล้างฟิล์มอัตโนมัติ

8. อ่านผลจากฟิล์มเอ็กซเรย์ ถ้าพบความผิดปกติของ band pattern ไม่ตรงกับของคนปกติในแต่ละไพรเมอร์ จึงนำตัวอย่างที่ตรวจพบความผิดปกตินั้นมาทำการหาลำดับเบส ในบริเวณไพรเมอร์นั้น เปรียบเทียบกับคนปกติ ซึ่งจะกล่าวถึงขั้นตอนการทำ sequencing analysis ในหัวข้อต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 การวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ผิดปกติ โดยวิธี sequencing analysis

ขั้นตอนการทำ cycle sequencing นี้คล้ายกับข้อ 4.5 เพียงแต่ใช้ Termination Mix A, C, G และ T ทั้งหมด มิได้ใช้เพียงตัวใดตัวหนึ่งเหมือนการทำ ddF โดยการเริ่มติดฉลาก ไพรเมอร์ที่ต้องการจะทำ sequencing จากนั้นทำ Prereaction Mixture โดยมีส่วนผสมดังนี้คือ

DNA template (2.6 kb)	8	µl
end - labeled primer reagent	5	µl
น้ำกลั่น	18	µl
10 x Tag sequence Buffer	4.5	µl
Tag DNA polymerase	0.5	µl

เตรียมหลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 0.5 ไมโครลิตร ใส่ Termination Mix A, C, G และ T อย่างละ 2 ไมโครลิตร (ต่อหนึ่งตัวอย่าง) จากนั้นนำ Prereaction Mixture ใส่ลงในหลอดที่มี Termination หลอดละ 8 ไมโครลิตร เติม mineral - oil 1 หยด แล้วนำไปทำ PCR โดยใช้เวลาและอุณหภูมิเช่นเดียวกับการทำ ddF รวมทั้งการเติม TdT และ stop reaction จากนั้นนำไปแยกโดยการทำ 6% Sequencing gel electrophoresis ที่อุณหภูมิห้อง โดยหยอดเรียง G, A, T, C ตามลำดับ ของแต่ละตัวอย่าง ใช้ไฟ 80 วัตต์ แล้วนำเจลไปทำให้แห้ง ประกบกับฟิล์มเอ็กซเรย์ และล้างฟิล์มเช่นเดียวกับในข้อ 4.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียม 6% sequencing gel (denaturing gel)

ส่วนผสมที่ใช้เตรียมคือ

40% acrylamide	15	ml
10 x TBE	10	ml
Urea	42.42	g
dH_2O	add to 100	ml
20% APS	500	µl
TEMED	50	µl

ขั้นตอนการทำ

1. เช็ดกระจก sequencing ด้วย 95% เอธานอล ให้สะอาด แล้วประกอบขึ้นเป็นชุดเตรียม sequencing gel
2. ละลาย Urea กับน้ำกลั่น, 10 x TBE และ 40 % acrylamide stock ให้มีปริมาตรรวมทั้งหมด 100 ml โดยใช้เครื่องกวนอัตโนมัติ (นานประมาณ 1 ชั่วโมง)
3. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2 ที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว มากรองด้วยกระดาษกรองอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นจึงเติม 20 % APS และ TEMED ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วหยอดลงในกระจก sequencing (ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ)
4. ใส่ comb ด้านบนของเจล แล้วใช้คลิปหนีบให้แน่น รอจนเจลแข็งตัว
5. หุ้มรอบๆ กระจกด้วยสำลี หรือกระดาษชำระที่เปียกน้ำ แล้วสวมทับด้วยถุงพลาสติกอีกครั้ง ปล่อยทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องข้ามคืน วันรุ่งขึ้นจึงนำมาทำ sequencing gel electrophoresis (ในข้อ 4.6)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำ 15% polyacrylamide gel electrophoresis มีขั้นตอนดังนี้คือ

1. ทำความสะอาดแผ่นกระจก, spacer และ comb ด้วย แอลกอฮอล์ แล้วประกอบเข้ากันเป็นชุดเตรียมเจล
2. เตรียมส่วนผสม ดังนี้

40% acrylamide stock	3.75	ml
10 x TBE	1	ml
dH_2O	5.25	ml
10% APS	80	µl
TEMED	7.5	µl

ผสมทั้งหมดเบาๆ ให้เข้ากันดี แล้วเทลงในกระจกของชุดเตรียมเจลใส่ comb ลงบนเจล แล้วทิ้งไว้จนแข็งตัว (ประมาณ 1 ชั่วโมง)

3. นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่ มาประกอบเข้ากับ chamber แล้วใส่ 1 x TBE ลงใน chamber ทั้งด้านบนและด้านล่างของเจล
4. ใช้ปิเปตดูดชิ้นส่วน DNAที่ต้องการจะแยก มาผสมกับ dye แล้วหยอดลงในช่องของแผ่น polyacrylamide โดยเว้นช่องแรกไว้สำหรับ DNA size marker
5. เปิดเครื่อง power supply ให้แถบสีวิ่งไปจนเกือบสุดเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า
6. ย้อมแผ่น polyacrylamide ในสารละลาย เอธิเดียมโบรไมด์ 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นาน 5 นาที แล้วล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกลั่น
7. นำแผ่นเจลมาตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ภายใต้แสง UV

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำ Agarose gel electrophoresis มีขั้นตอนดังนี้คือ

1. ละลายอะกาโรส ใน 1 x TBE buffer (W/V) ตามเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นที่ต้องการใช้แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาดต่างๆ นำไปต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วยกลงตั้งทิ้งไว้ จนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60 °C

2. ทำความสะอาดชุดเตรียมเจลด้วย 70% เอธานอล แล้วประกอบเข้าด้วยกัน พร้อมทั้งใส่ comb ตามขนาดและจำนวนช่องที่ต้องการ

3. เทเจลที่หลอมแล้วลงในชุดเตรียมเจล ให้มีความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณครึ่งชั่วโมงจนกว่าเจลจะแข็งตัว จึงนำมาวางลงใน chamber แล้วเติม 1 x TBF buffer จนท่วมหน้าเจล พร้อมทั้งค่อยๆ ถอด comb ออกจากแผ่นเจล

4. ใช้ปิเปตดูด PCR product หรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ มาผสมกับ dye ในอัตราส่วน 5:1 แล้วหยอดลงในหลุมของเจล ให้ครบตามจำนวนตัวอย่างพร้อมทั้งหยอด DNA size markers ลงในหลุมใดหลุมหนึ่ง เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ

5. ปิดฝา chamber และต่อสายไฟเข้ากับเครื่อง power supply ให้เรียบร้อยแล้วเปิดเครื่อง แรงเคลื่อน 65-80 โวลต์ ปล่อยไว้จนกระทั่งแถบสีเคลื่อนที่ไปบนเจลได้ระยะที่ต้องการ จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

6. นำแผ่นเจลนั้นมาย้อมในสารละลาย เอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นานประมาณ 5 นาที

7. ล้างสีส่วนเกินออกมาด้วยน้ำกลั่น แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ภายใต้แสง UV

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย