บทที่ 4

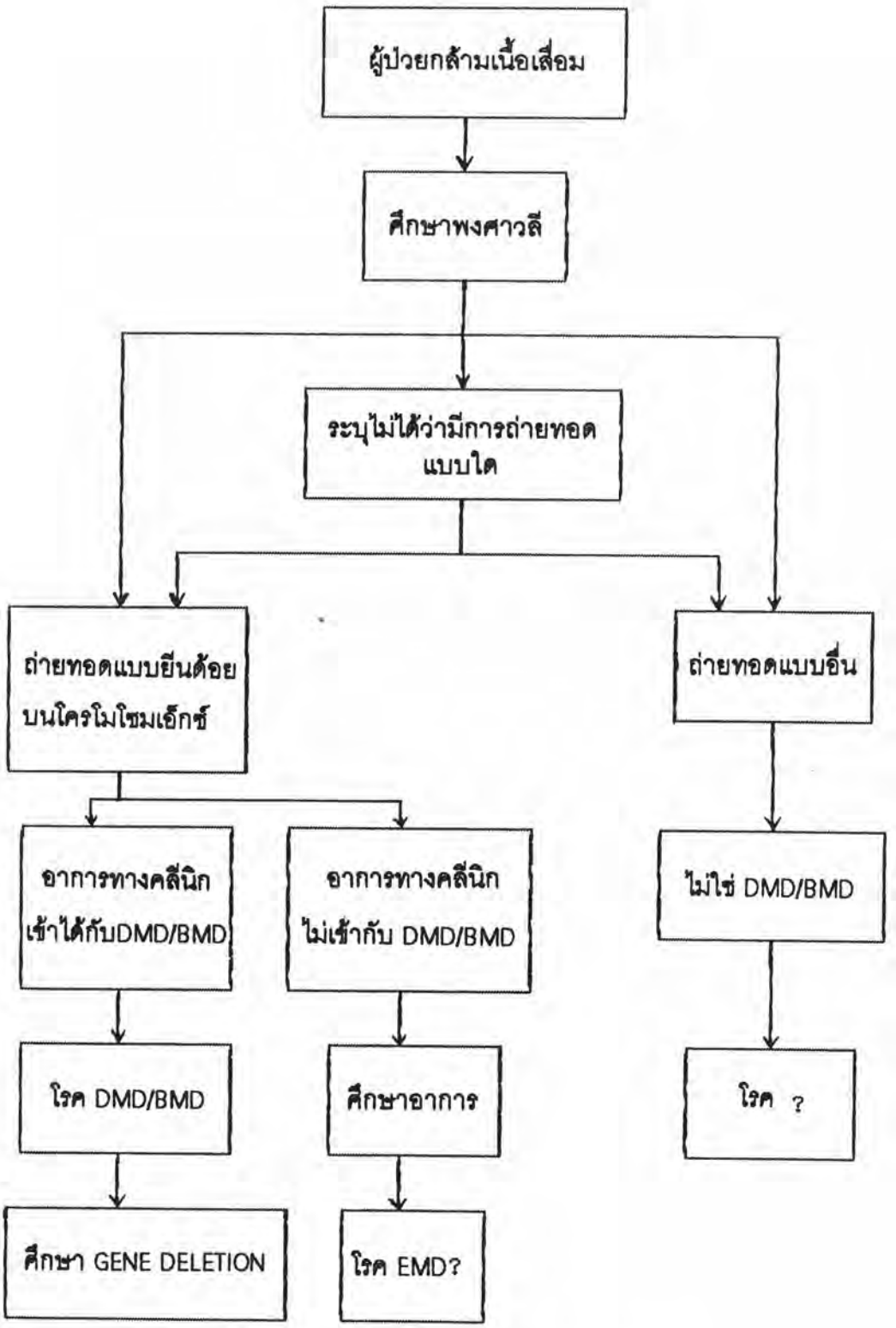
วิธีดำเนินการศึกษา

ขั้นตอนการดำเนินการศึกษา แบ่งเป็น 5 ขั้นตอน คือ

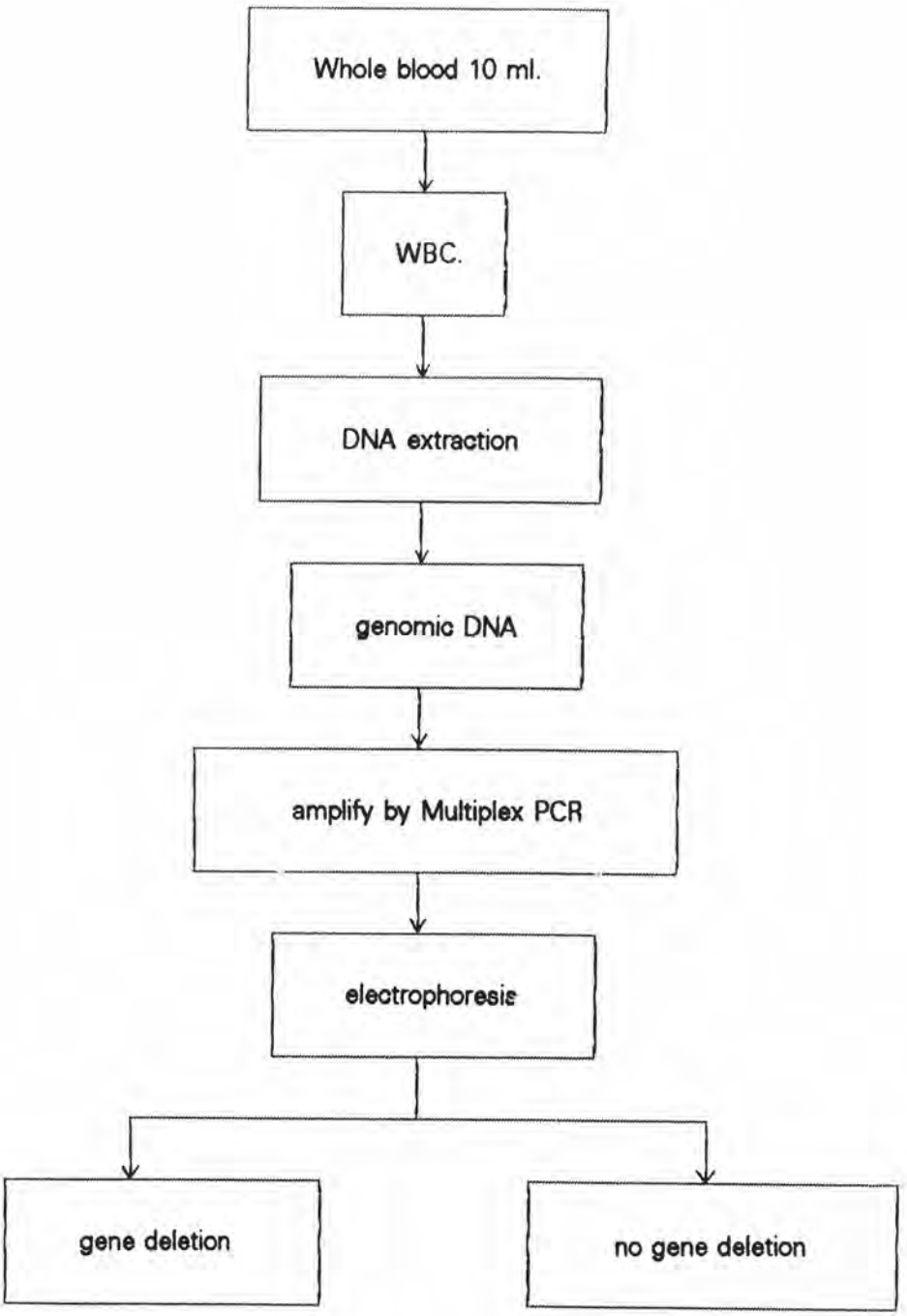
4.1 การศึกษาพงศาวลีของครอบครัวผู้ป่วยที่เป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อม
4.2 การเก็บเลือดผู้ป่วย
4.3 การสกัด ดีเอ็นเอ จากเลือดผู้ป่วย
4.4 การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ
4.5 การวิเคราะห์ผลโดยการทำอิเลกโตรโฟรีซิส

4.1 การศึกษาประวัติครอบครัวผู้ป่วย หรือ การทำพงศาวลี (pedigree) การศึกษาประวัติครอบครัว จะซักถามอย่างน้อย 3 รุ่น (generation) แล้วนำมาเขียนแผนภูมิ

4.2 การเก็บเลือดของผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อเสื่อม เก็บเลือดของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ได้แก่ โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า และโรงพยาบาลศิริราช และนอกโรงพยาบาล บริเวณจังหวัดหนองคาย บุรีรัมย์ และชัยนาท ปริมาตรคนละ 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่มี 0.2 M EDTA 0.5 มิลลิลิตร ต่อเลือด 10 มิลลิลิตร กรณีที่ผู้ป่วยไม่ได้เข้ารับการรักษาตามโรงพยาบาล ผู้ทำการศึกษาต้องหาข้อมูล และเดินทางไปพบผู้ป่วย ถามประวัติครอบครัวเพื่อทำพงศาวลี โรคที่เราสามารถนำเลือดผู้ป่วยมาศึกษาได้ คือ โรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิด ดูเชน/เบกเกอร์ (DMD/BMD) ซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดโดยยีนด้อยบน



ภาพที่ 10 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษา



ภาพที่ 11 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษา gene deletion

โครโมโซมเอ็กซ์ หากข้อมูลพงศาวลีบ่งว่าน่าจะเป็นโรคนี้ จะขอเจาะเลือดผู้ป่วยมาศึกษาต่อไป ทั้งนี้ต้องขึ้นกับความยินยอมของผู้ป่วยด้วย

4.3 การสกัดจีโนมิก ดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากเลือดผู้ป่วย ทำตามขั้น ตอน ดังนี้ (ธันยชัย สุระ, 2534)

1. นำตัวอย่างเลือด 10 มิลลิลิตร ที่ใช้ EDTA เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว มาใส่ในหลอดทดลอง เติม Lysis buffer 45 มิลลิลิตร
2. ปิดฝาให้แน่น แล้วกลับหลอดไปมา เพื่อให้สารผสมกัน แล้วนำไปปั่น 3000 rpm 10 นาที
3. ทิ้งส่วนใส เหลือแต่ตะกอนไว้ ใส่ 1X STE buffer 4.5 มิลลิลิตร เขย่าตะกอนให้แตก
4. ใส่ 10% SDS 250 ไมโครลิตร และ ใส่ proteinase K 50 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 4-5 ครั้ง แล้วนำไป incubate ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 55 ^{o} C ข้ามคืน เพื่อให้การย่อยเม็ดเลือดขาวเป็นไปอย่างสมบูรณ์
5. เติมฟีนอล 5 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาประมาณ 50 ครั้ง
6. ปั่น 3000 rpm 10 นาที ดูดแยกชั้นบนออกใส่หลอดใหม่ที่สะอาดปลอดเชื้อโดยใช้ปิเปตพลาสติก
7. ทำซ้ำข้อ 5-6 อีกครั้ง
8. เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมา แล้วนำไป ปั่น 3000 rpm 10 นาที ดูดแยกชั้นบนออกเบา ๆ
9. ทำซ้ำข้อ 8
10. เติม 2 M sodium acetate ลงไป ให้ได้ความเข้มข้นของ sodium acetate เท่ากับ 0.2-0.3 M ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 100% เอธานอล ที่เย็นจัด ลงไป (ปริมาตร 2.5 เท่า) ผสม เบา ๆ จะเห็นใยของ ดีเอ็นเอ ลอยในหลอดทดลอง
11. เขี่ยเอาใยของดีเอ็นเอ ใส่ใน microfuge tube แล้วล้างด้วย 70 % ethanol

ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บไว้ที่ 4 ° C

4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย มัลติเพล็กซ์ พีซีอาร์ ในการตรวจสอบยีนดิสโทรฟินนี้ ใช้ปฏิกริยามัลติเพลกซ์ พีซีอาร์ 2 ครั้ง ต่อเลือดตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง โดยที่ปฏิกริยาแรก เพิ่มปริมาณโดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้น 8 คู่ และ ปฏิกริยาที่ 2 ใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้น 2 คู่ มีขั้น ตอนดังนี้

1. ตั้งสภาวะอุณหภูมิของเครื่อง DNA thermal cycler ที่ใช้ในปฏิกริยา 2 สภาวะ คือ สภาวะที่ 1 เพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer 8 คู่

denature	94 ° C 7 นาที	
denature และ anealing	94 ° C 30 วินาที	65 °C 4 นาที
elongation	65 ° C 10 นาที	

สภาวะที่ 2 เพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer 2 คู่

denature	94 ° C 7 นาที	
denature และ anealing	94 ° C 30 วินาที	60 ° C 4 นาที
elongation	60 ° C 10 นาที	

2. เตรียม PCR mixture ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. โดยเติมองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้

2.1 <u>สำหรับ primer 8 คู่</u> (ส่วนผสมสำหรับ 1 ตัวอย่าง)

น้ำกลั่น	32.0 µl
10X PCR buffer	5.0 µl
0.25 mM dNTP	7.5 µl
25 µM primer	2.0 µl
Taq polymerase	0.8 µl

2.2 สำหรับ primer 2 คู่ (ส่วนผสมสำหรับ 1 ตัวอย่าง)

น้ำกลั่น	36.5 µl
10X PCR buffer	5.0 µl
0.25 mM dNTP	7.5 µl
25 µM primer	2.0 µl
Taq polymerase	0.2 µl

3. เติม genomic DNA ตัวอย่างของผู้ป่วย และของเด็กชายปกติ (normal control) ความเข้มข้น 50 ng/µl ปริมาตร 5 µl ลงในหลอดทดลอง เพื่อให้ได้ genomic DNA 250 ng
4. เติม mineral oil 3 หยด (ประมาณ 100 µl) ในแต่ละหลอดทดลองให้ท่วม DNA ตัวอย่าง เพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย
5. denature DNA ตัวอย่าง ในเครื่อง DNA thermal cycler จากนั้นเติม PCR mixture แล้วตามด้วยการ anealing และ elongation

4.5 การวิเคราะห์ผลโดยการทำอิเลกโตรโฟรีซิส

เมื่อได้ PCR product หรือ ดีเอ็นเอ ที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ แล้ว นำดีเอ็นเอนั้นมาวิ่งใน 10%โพลีอะคริลลาไมด์เจล (10% Polyacrylamide gel)

เนื่องจากขนาดของรูพรุนของสารนี้ เหมาะสมในการแยก PCR product ขนาดตั้งแต่ 72 ถึง 1,353 คู่เบส ออกจากกันได้ดี

1. เตรียม Polyacrylamide เข้มข้น 10% ในสารละลาย TBE โดยการเตรียมสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบต่างๆ ดังรายละเอียดข้างล่าง แล้วเทลงในที่เตรียมเจล

1.1 การเตรียม 10% Polyacrylamide gel ผสมสารเคมีต่าง ๆ ใน อัตราส่วนดังนี้

1.1.1 stock acrylamide: 30% acrylamide ปริมาตร 8 มล.

1.1.2 TBE buffer: 10X TBE 2 มล.

1.1.3 3% ammonium persulfate 420 µl

1.1.4 Distilled water 9.6 มล.

(ผสมให้เข้ากันดี แล้ว deairate โดยการใช้ vaccum pump ดูดอากาศในภาชนะออก 5 นาที แล้วเติมสารตัวสุดท้าย)

1.1.5 TEMED 10 µl

(mix สารเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วเทเจล)

1.2 การเตรียม Chamber

1.2.1 ประกอบ chamber ตามส่วนประกอบต่าง ๆ เท acrylamide ลงในชุดเตรียมเจล แล้วใส่หวี (comb) ลงไป ในขณะที่เจลยังไม่แข็งตัว ทิ้งไว้จนเจลแข็ง นำไปประกอบเข้ากับ chamber ที่มี TBE buffer อยู่

1.2.2 ดูดส่วนใสใต้ชั้น mineral oil 10 µl ผสมกับ tracking dye 5 µl ในหลอด microtube ผสมให้เข้ากัน แล้วหยอดลงในช่องของแผ่น acrylamide ที่เตรียมไว้จนครบทุกช่อง เว้นช่องแรกสำหรับใส่ DNA size marker คือ ϕ X 174/Hae III DNA [50 ng/µl] ปริมาตร 3 - 5 µl

1.2.3 เปิดเครื่อง electrophoresis ให้แถบสีวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก โดยให้แถบสีวิ่งไปจนสุดเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

1.2.4 ย้อมแผ่น acrylamide ในสารละลาย ethidium bromide

เข้มข้น 2 µg/ml นาน 5 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ในขั้นตอนนี้ต้องสวมถุงมือ

1.2.5 ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ภายใต้แสง UV

1.2.6 บันทึกภาพด้วยการถ่ายภาพโพลารอยด์