



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

| | |
|-------------|---|
| ชื่อโครงการ | การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนยีน <i>GDF5</i> ในโรคข้อเข่าเสื่อม |
| ชื่อนิสิต | นางสาววิมลดา กลั่นขจร |
| ภาควิชา | พฤกษศาสตร์ |
| ปีการศึกษา | 2561 |

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนยีน *GDF5* ในโรคข้อเข่าเสื่อม

นางสาวรินรดา กลั่นขจร

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญา
วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

DNA methylation on the *GDF5* gene in knee osteoarthritis


Ms. Rinrada Klankajorn


A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements For the Degree of
Bachelor of Science in Genetic Department of Botany Faculty of Science,
Chulalongkorn University Academic Year 2018


ชื่อเรื่อง การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนยีน *GDF5* ในโรคข้อเข่าเสื่อม
ชื่อนิสิต นางสาวรินรดา กลั่นขจร
สาขาวิชา พันธุศาสตร์
ภาควิชา พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม รองศาสตราจารย์.ดร.ทันตแพทย์ นครินทร์ กิตกำจร
ปีการศึกษา 2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงการวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงการวิทยาศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์.ดร.ทันตแพทย์ นครินทร์ กิตกำจร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| | |
|-----------------------------|---|
| ชื่อเรื่อง | การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนยีน <i>GDF5</i> ในโรคข้อเข่าเสื่อม |
| ชื่อนิสิต | นางสาวรินรดา กลั่นขจร |
| สาขาวิชา | พันธุศาสตร์ |
| ภาควิชา | พฤกษศาสตร์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม | รองศาสตราจารย์.ดร.พันตแพทย์ นครินทร์ กิตกำธร |
| ปีการศึกษา | 2561 |

บทคัดย่อ

โรคข้อเข่าเสื่อม (knee osteoarthritis) เป็นโรคที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ เกิดจากความเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อ ทำให้เกิดความเจ็บปวดและส่งผลต่อการดำเนินชีวิตประจำวัน โรคข้อเข่าเสื่อมเกิดได้จากหลายสาเหตุ รวมทั้งพันธุกรรม แต่ที่มุ่งเน้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ คือ การเปลี่ยนแปลงเหนือสภาวะพันธุกรรม (epigenetics) ด้วยดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมทิลเลชันบนยีน *Growth differentiation factor 5 (GDF5)* กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม โดยยีน *GDF5* เป็นยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการบำรุงรักษาของข้อต่อ และมีการศึกษาในเมทิลเลชันอาร์เรย์ที่ระบุว่าเมทิลเลชันในยีนนี้อาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้ การทดลองนี้ได้นำดีเอ็นเอจากเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมกับกลุ่มคนปกติ (ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 50 คน กับ คนปกติ 50 คน ตามลำดับ) มาตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันในยีน *GDF5* ด้วยเทคนิค Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) และได้ใช้ดีเอ็นเอควบคุมที่มีเมทิลเลชันและดีเอ็นเอที่ไม่มีเมทิลเลชันมาใช้เปรียบเทียบบ่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาพบอุปสรรค คือ ไม่สามารถระบุไพรเมอร์ในการทำ PCR ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์ไปแล้ว จึงเสนอแนะว่าควรใช้วิธีอื่นในการตรวจสอบเมทิลเลชันของยีนนี้ในการทำการศึกษาค้นคว้าต่อไป

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน, Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA), *GDF5*, โรคข้อเข่าเสื่อม

| | |
|--------------|--|
| Title | DNA methylation on the <i>GDF5</i> gene in knee osteoarthritis |
| Student name | Rinrada Klankajorn |
| Program | Genetic |
| Department | Botany |
| Advisor | Assist.Prof.Dr. Rachaneekorn Tammachote |
| Co-advisor | Assoc.Prof.Dr. Nakarin Kitkumthon |
| Academic | 2018 |

Abstract

Knee osteoarthritis is a common disease found in elderly people. It is caused by degeneration of articular cartilage of the joint resulting in pain and effecting daily life. Knee osteoarthritis can be caused by several factors, including genetics. This study focuses on epigenetics by DNA methylation. The objective of this research is to study the association between the methylation level on the *Growth differentiation factor 5* (*GDF5*) gene and knee osteoarthritis. *GDF5* is a gene that is responsible for the growth and maintenance of joints. A previous study in methylation array indicated that methylation of this gene may be associated with knee osteoarthritis. In this study, DNA samples from blood of patients with knee osteoarthritis patients and controls (50 samples from knee osteoarthritis patients and 50 samples from normal control, respectively) were analyzed by Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) to determine the methylation level in the *GDF5* gene. Methylated and unmethylated control DNAs were used to compare the samples. However, the study encountered obstacle that we were unable to find PCR primers that are specific to the DNA that has undergone bisulfite process. Therefore, we recommend using other methods in the future studies to analyze the methylation of this gene.

Keywords: DNA Methylation, Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA), *GDF5*, knee osteoarthritis

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้จะสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่ายขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนิกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำโครงการวิทยาศาสตร์ และกรุณา ช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์.ดร.ทันตแพทย์ นครินทร์ กิตติกำจร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิทยาศาสตร์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน และให้ความอนุเคราะห์ในการจัดหาตัวอย่างในการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์ ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงการวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้ง ให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสับสนุนทุนวิจัย

ขอขอบพระคุณอาสาสมัครทั้งผู้ป่วยและบุคคลปกติจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่ได้ให้ตัวอย่างเลือดมาใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการห้อง 306 และห้องปฏิบัติการกลางภาควิชาพฤกษศาสตร์ที่กรุณาให้ใช้อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงการวิทยาศาสตร์นี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพลินพิศ ไชคชัยชำนาญกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ และให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบพระคุณนางสาวจุฑามาศ สิทธิกรไพบุลย์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำในเรื่องต่างๆในห้องปฏิบัติการทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้มาโดยตลอด สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณเอกวิรินทร์และคุณธิดาชนัย กลิ่นขจร บิดา มารดา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกด้านอย่างเต็มที่

สารบัญ

| เรื่อง | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | จ |
| กิตติกรรมประกาศ | ฉ |
| สารบัญ | ๗ |
| สารบัญภาพ | ๗ |
| สารบัญตาราง | ฎ |
| บทที่ | |
| 1 บทนำ | 1 |
| 2 การตรวจเอกสาร | 3 |
| 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา | 9 |
| 4 ผลการศึกษา | 14 |
| 5 อภิปรายผลการศึกษา | 38 |
| 6 สรุปผลการศึกษา | 42 |
| เอกสารอ้างอิง | 44 |
| ภาคผนวก | 47 |
| ภาคผนวก ก โปรแกรมที่ใช้ในการหาไพรมเมอร์ | 48 |
| ภาคผนวก ข สูตรการคำนวณสารในการทำ PCR | 52 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | หน้า |
|--|------|
| 1 อาการที่เกิดภายในข้อเช่าของผู้ป่วยข้อเช่าเสื่อม | 4 |
| 2 ขั้นตอนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน | 5 |
| 3 ขั้นตอนที่ดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีผลต่อการแสดงออกของยีน | 6 |
| 4 ขั้นตอนการทำ Bisulfite conversion | 7 |
| 5 การตรวจสอบดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วย COBRA ด้วยเอนไซม์ <i>TaqI</i> และ <i>BstUI</i> | 8 |
| 6 โพรโมเตอร์และตำแหน่ง CG(บริเวณที่เน้นสีแดง) ของยีน <i>GDF5</i> | 14 |
| 7 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ unmethylated DNA | 15 |
| 8 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 1 | 16 |
| 9 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 2 | 17 |
| 10 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 3 | 19 |
| 11 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 4 | 19 |
| 12 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 5 | 19 |
| 13 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 6 | 21 |
| 14 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 7 | 21 |
| 15 เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมดที่สามารถตัดได้ unmethylated DNA ของ ยีน <i>GDF5</i> | 22 |
| 16 เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมดที่สามารถตัดได้ Methylated DNA ของ ยีน <i>GDF5</i> | 22 |

| ภาพที่ | หน้า |
|---|------|
| 17 ตัวอย่างการตัดของเอ็นไซม์บน recognition site | 23 |
| 18 ตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>MluI</i> บนโพรโมเตอร์ | 23 |
| 19 ตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>BstBI</i> บนโพรโมเตอร์ | 24 |
| 20 PCR Product ของ <i>MluI</i> | 24 |
| 21 PCR Product ของ <i>BstBI</i> | 25 |
| 22 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส | 26 |
| 23 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสกับตัวอย่างดีเอ็นเอผู้ป่วยที่ได้ทำการไบซัลไฟต์ | 27 |
| 24 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสกับตัวอย่างดีเอ็นเอผู้ป่วยที่ได้ทำการไบซัลไฟต์ | 27 |
| 25 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 1 | 28 |
| 26 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 1 โดยเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing เป็น 52 องศาเซลเซียส | 29 |
| 27 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 2 | 30 |
| 28 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 3 | 31 |
| 29 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 3 ของ reverse primer 5 กับ Positive control | 32 |
| 30 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 3 ของ reverse primer 5 และ reverse primer 6 กับ Positive control | 33 |
| 31 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 4 ที่ได้จากโปรแกรม MethPrimer | 34 |
| 32 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 4 ที่ได้จากโปรแกรม MethPrimer | 35 |
| 33 ผลจากการส่ง sequencing ของไพรเมอร์คู่ที่ 5 ตัดเจลในบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ นั่นคือบริเวณ 300-400 bp ของ methylated DNA | 36 |

| ภาพที่ | หน้า |
|--|------|
| 34 ผลจากการส่ง sequencing ของไพรเมอร์คู่ที่ 5 ตัดเจดในบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ นั้นคือบริเวณ 300-400 bp ของ unmethylated DNA | 36 |
| 35 ภาพหน้าจอเริ่มต้นของโปรแกรม Primer3 ในการออกแบบไพรเมอร์ | 49 |
| 36 ภาพหน้าจอเริ่มต้นของโปรแกรม OligocalC ในการออกแบบไพรเมอร์ | 49 |
| 37 ภาพหน้าจอเริ่มต้นของโปรแกรม BiSearch ในการออกแบบไพรเมอร์ | 50 |
| 38 ภาพหน้าจอเริ่มต้นของโปรแกรม MethPrimer ในการออกแบบไพรเมอร์ | 51 |
| 39 ภาพหน้าจอเริ่มต้นของโปรแกรม UCSC In-Silico PCR ในการออกแบบไพรเมอร์ | 51 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| 1 ผลของการออกแบบไพรเมอร์คู่ที่ 1 และคุณสมบัติของไพรเมอร์ของยีน <i>GDF5</i> Methylation | 16 |
| 2 ผลของการออกแบบไพรเมอร์คู่ที่ 2 และคุณสมบัติของไพรเมอร์ของยีน <i>GDF5</i> methylation | 17 |
| 3 ผลของการออกแบบไพรเมอร์คู่ที่ 3, 4 และ 5 และคุณสมบัติของไพรเมอร์ของยีน <i>GDF5</i> methylation | 18 |
| 4 ผลของการออกแบบไพรเมอร์คู่ที่ 6 และ 7 และคุณสมบัติของไพรเมอร์ของยีน <i>GDF5</i> methylation | 20 |
| 5 ผลของการออกแบบไพรเมอร์และคุณสมบัติของไพรเมอร์ของยีน <i>GDF5</i> Methylation ในครั้งแรก | 25 |
| 6 สูตรการคำนวณสารในการทำ PCR | 53 |
| 7 การตั้งค่าเครื่อง PCR | 54 |

บทที่ 1

บทนำ

โรคข้อเข่าเสื่อม (osteoarthritis, OA) เป็นโรคที่พบได้บ่อยในวัยกลางคนและผู้สูงอายุ และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อย่างต่อเนื่องผู้ป่วยจะต้องได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมเพื่อไม่ให้อาการของโรคดำเนินต่อไปเรื่อยๆ จนก่อให้เกิดผลกระทบในการใช้ชีวิตประจำวัน โรคข้อเข่าเสื่อมหมายถึงโรคที่เกิดจากความเสื่อมของกระดูกผิวอ่อนทั้งข้อ ทั้งด้านรูปร่าง โครงสร้าง การทำงานของข้อต่อและกระดูกบริเวณใกล้เคียงข้อต่อ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นไม่สามารถเปลี่ยนกลับมาให้อยู่ในสภาพเดิมได้ โดยโรคข้อเข่าเสื่อมแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามลักษณะการเกิด คือ ความเสื่อมแบบปฐมภูมิ ซึ่งเป็นความเสื่อมที่ไม่ทราบสาเหตุจะสัมพันธ์ตามวัย น้ำหนัก และพันธุกรรม และความเสื่อมแบบทุติยภูมิ ซึ่งเป็นความเสื่อมที่ทราบสาเหตุ เช่น เคยประสบอุบัติเหตุมาก่อน เป็นต้น (วิโรจน์ กวินวงศ์โกวิท, 2558)

การเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ที่มีสาเหตุจากพันธุกรรมมีได้หลายชนิด เช่น การเกิดการมิวเทชันแบบ deletion ในยีน *Cartilage acidic protein 1 (CRTAC1)* ที่ทำให้การแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ที่เกี่ยวข้องกับกระดูกอ่อนลดลง (Ge et al., 2016) เป็นต้น หรือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเหนือสภาวะพันธุกรรม (epigenetics) เช่น การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน จากการศึกษาที่มีการค้นพบยีน ดีเอ็นเอเมทิลเลชันหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อมดังตัวอย่างเช่น *Deiodinase Iodothyronine Type II (DIO2)* (Bomer et al., 2015) และ *Growth differentiation factor 5 (GDF5)* (Reynard et al., 2011) ต่างก็ส่งผลกับโรคข้อเข่าเสื่อม หรือเกิดจาก Single nucleotide polymorphism (SNP) ที่บริเวณ rs143383 (C>T) ซึ่งเป็นบริเวณที่เป็น polymorphism ที่มีบริเวณควบคุมยีน *GDF 5* อยู่ด้วยเช่นกัน (Syddall et al., 2013) ซึ่งการพบความผิดปกติเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

สาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม คือ การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงสภาวะเหนือพันธุกรรม มีการย้ายหมู่เมทิลที่เข้าที่เบสไซโตซีน บริเวณ CpG site (Moore, Le, and Fan, 2013) การที่มีการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีนจะขัดขวางการจับของ transcription factor ที่บริเวณโพรโมเตอร์ทำให้การแสดงออกของยีนนั้นลดน้อยลงหรือไม่แสดงออกเลย เพราะไม่สามารถเกิดการถอดรหัสได้ รวมทั้งหากเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบริเวณยีนจะทำให้ RNA polymerase ทำงานได้น้อยลงส่งผลให้การแสดงออกของยีนน้อยลงไปด้วย (Jin, Li, and Robertson, 2011)

จากการศึกษาในยีนที่เกิดเมทิลเลชันในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจากเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ซึ่งพบว่ามีการศึกษาในยีน *GD5* เป็นจำนวนมากจึงสนใจศึกษาในยีนนี้ ซึ่งยีน *GDF5* เป็นยีนที่จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการบำรุงรักษาของข้อต่อ (Reynard et al., 2011) จากการศึกษาครั้งนี้คาดว่าจะพบว่ามีการศึกษาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *GDF5* ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมาแล้วซึ่งการที่การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันและยังมีบริเวณ SNP ที่เปลี่ยนเบสไซโตซีนเป็นเบสไทมีนผสมกันแล้วจะทำให้การแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงไป โดยการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะเพิ่มการแสดงออกของยีน *GDF5* (Loughlin, 2015) ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจมุ่งเน้นไปที่การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในยีน *GDF5* จากเลือดแทน โดยจะใช้ดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์แล้วจากเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมชาวไทย 50 คน และในคนปกติ 50 คน นำมาเปรียบเทียบกัน โดยใช้เทคนิค Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) เพื่อตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันในยีน *GDF5* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งประโยชน์ในการศึกษาครั้งนี้ คือ อาจนำไปพัฒนาใช้ในการทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมและช่วยหาสาเหตุของโรคได้ต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาระดับเมทิลเลชันบนยีน *GDF5* ในดีเอ็นเอจากเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

บทที่ 2

การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคข้อเข่าเสื่อม (osteoarthritis, OA)

โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมแบบเรื้อรังของข้อต่อหรือเกิดจากการเสียหายของข้อต่อและยังเป็นหนึ่งในโรคที่พบบ่อยมากโรคหนึ่งของโลกซึ่งได้คาดการณ์ไว้ว่าประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของประชากรบนโลกที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป จะได้รับผลกระทบจากโรคข้อเข่าเสื่อม โดยลักษณะของโรคเกิดได้หลายรูปแบบแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล รวมถึงความเจ็บปวดและความแข็งแรงของข้อต่อก็มีระดับความรุนแรงต่างกันไป ถ้าความรุนแรงมากขึ้นจะส่งผลให้สูญเสียการทำงานของข้อต่อได้ โดยการเพิ่มความรุนแรงอาจเกิดได้หลายปัจจัยทั้งอายุ น้ำหนัก การบาดเจ็บของข้อต่อ และพันธุกรรม (Thysen, Luyten, and Lories, 2015)

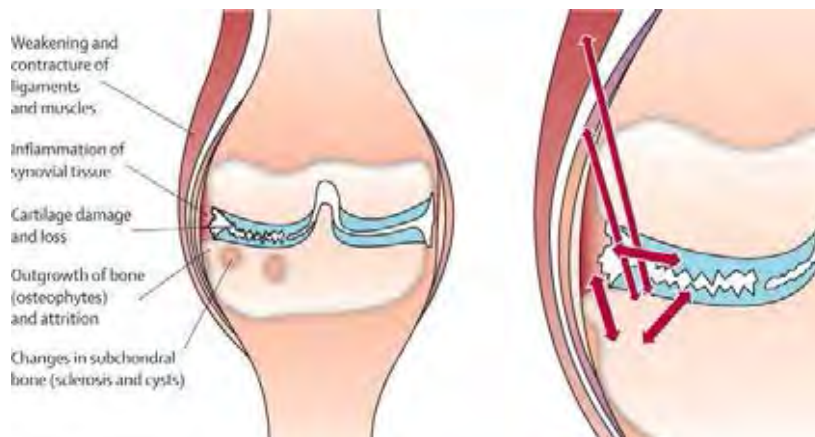
สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม มีหลายปัจจัยทั้งน้ำหนัก อายุ เพศ และอาการบาดเจ็บที่ส่งผลกระทบต่อข้อเข่าและยังมีสาเหตุที่สำคัญอีกอย่างคือจากพันธุกรรม โดยสาเหตุมีการศึกษาเป็นอย่างมากและมีความซับซ้อนเนื่องจากการถ่ายทอดที่ไม่ได้เป็นไปตามกฎของเมนเดล (Fernández-Moreno et al, 2008) เป็นโรคที่เกิดจาก หลายยีน (polygenic disease) การเกิดสภาวะเหนือพันธุกรรม (Epigenetics) ได้แก่ DNA methylation, histone modifications และ non-coding RNAs โดยผลกระทบของสภาวะเหนือพันธุกรรมจะเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของเนื้อเยื่อและกระดูกอ่อนบนบริเวณข้อต่อ นอกจากนี้การเกิดพหุสัญญาณในยีนก็เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมด้วย (Reynard, and Loughlin, 2012)

การวินิจฉัยโรคและอาการของโรค

การวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อม โดยลักษณะที่จัดมานำการวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อมคือ ผู้ป่วยจะมีอาการปวดข้อ เคลื่อนไหวไม่สะดวกข้อแข็งไม่สามารถงอได้ น้ำหนักเกินและอายุที่มากขึ้น ซึ่ง 1 ใน 4 ของคนที่อายุมากกว่า 55 ปีขึ้นไปจะมีอาการปวดข้อเข่าซึ่งเป็นสัญญาณเริ่มต้นของการเกิดข้อเข่าเสื่อม โดยปกติการปวดข้อคือเกิดจากการทำกิจกรรมที่รุนแรงกับข้อต่อแต่เมื่อพักอาการก็จะหายไป แต่ถ้าอาการยังดำเนินต่อเนื่องในขณะที่พักจะถือว่ามีความผิดปกติของโรค ถ้าไม่ได้รับการวินิจฉัยและรักษาอย่างทันถ่วงทีจะนำไปสู่ความพิการในอนาคตได้ (Hunter and Felson, 2006) โดยอาการการปวดข้อจะเกิดจากกระดูกอ่อนสูญเสียหรือถูกทำลาย, การอักเสบของข้อต่อ

การเสื่อมของเอ็น และอื่นๆ ตามรูปที่แสดงในรูปที่ 1 ซึ่งทำให้เกิดอาการของโรคเนื่องจากการเสียดสีของกระดูกข้อเข่า(Bijlsma, Berenbaum, and Lafeber, 2011)



รูปที่ 1 อาการที่เกิดภายในข้อเข่าของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม
ที่มา (Bijlsma, Berenbaum and Lafeber, 2011)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นของโรคข้อเข่าเสื่อม

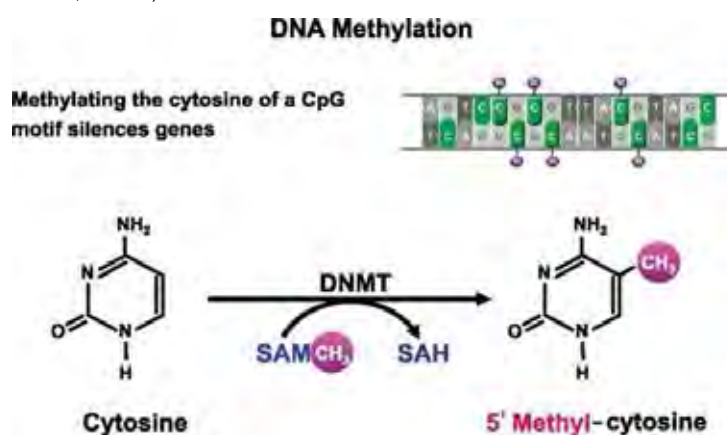
โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดความพิการในหมู่ผู้สูงอายุ ทำให้เกิดเป็นปัญหาสังคมทั้งค่าใช้จ่าย การเลี้ยงดู การรักษาและการเยียวยาผู้ป่วย ทั้งในด้านภาครัฐและส่วนบุคคลจะได้รับผลกระทบทั้งนั้น ดังนั้นการวางแผนป้องกันตั้งแต่เนิ่นๆจึงเป็นเรื่องที่ควรคำนึงถึง รวมถึงการศึกษาวิจัยเพื่อเป็นแนวทางในการรักษาและป้องกันไม่ให้เกิดทำให้ดีมากยิ่งขึ้น (Hunter, Schofield, and Callander, 2014)

การรักษา

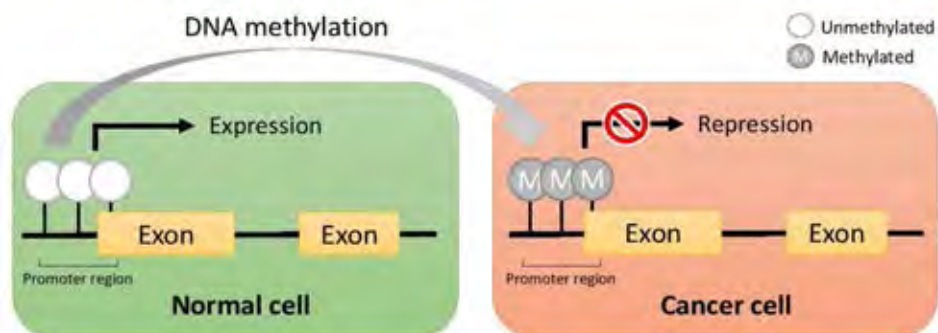
การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมมีทั้งการรักษาทางกายภาพและการรักษาทางเคมี การรักษาทางกายภาพ ทำได้โดยลดน้ำหนักควบคุมอาหารของผู้ป่วยที่เป็นโรคอ้วนหรือน้ำหนักเกินเพื่อลดการกระแทกข้อต่อขณะเคลื่อนไหวในชีวิตประจำวัน นอกจากนี้การทำกายภาพบำบัดก็เป็นอีกวิธีที่จะบรรเทาความเจ็บปวดลงได้บ้าง การรักษาทางเคมี คือการให้ผู้ป่วยรับประทานยา แต่ทั้งนี้การใช้ยาและประสิทธิภาพที่ให้ผลในแต่ละบุคคลมีความแตกต่างกันและบางคนก็อาจเกิดผลข้างเคียงด้วย หรือจะใช้การผ่าตัดก็เป็นอีกวิธีที่นิยมใช้ในการรักษา (Arden et al., 2015)

2. ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA Methylation)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันคือการเปลี่ยนแปลงเหนือสภาวะพันธุกรรม โดยจะมีการเติมหมู่ methyl เข้าไปในดีเอ็นเอชั้นต่อนี้จะเกิดขึ้นได้โดยจะได้รับการช่วยเหลือจากเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) และ s-adenosylmethionine (SAM) ที่เกิดขึ้นจาก methionine การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีการศึกษาอย่างกว้างขวางส่วนใหญ่จะศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมนุษย์ก็เป็นหนึ่งในนั้น การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ histone modifications ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของดีเอ็นเอโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครมาทิน และยีนที่ถูกการเปลี่ยนแปลงโดยดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะถูกเก็บไว้และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ การศึกษาเรื่องดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะมีความสำคัญในการเกิดและพัฒนาของโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคภูมิคุ้มกันและโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท ดีเอ็นเอเมทิลเลชันสามารถนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงเหนือสภาวะพันธุกรรม เนื่องจากควบคุมการแสดงออกของยีน ด้วยการควบคุมการถอดรหัส (Kandi, and Vadakedath, 2015) ขั้นตอนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะเกิดเมื่อมีการถ่ายโอนของกลุ่มเมทิลไปยังตำแหน่ง คาร์บอนที่ 5 ของ cytosine บริเวณ CpG site เพื่อสร้าง 5-methylcytosine ตามที่แสดงในรูปที่ 2 ดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะควบคุมการแสดงออกของยีนโดยหา gene repression หรือ ยับยั้งการเข้ามาจับโปรโมเตอร์ที่ transcription factor จึงทำให้มีผลต่อการถอดรหัสทำให้ยีนแสดงออกได้น้อยหรือไม่ได้เลย ตามที่แสดงในรูปที่ 3 (Moore, Le, and Fan, 2013)



รูปที่ 2 ขั้นตอนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยการเติมหมู่เมทิลลงบนเบสไซโตซีนโดยอาศัยเอนไซม์ DNMT และ SAM ที่มา (Zakhari, 2013)

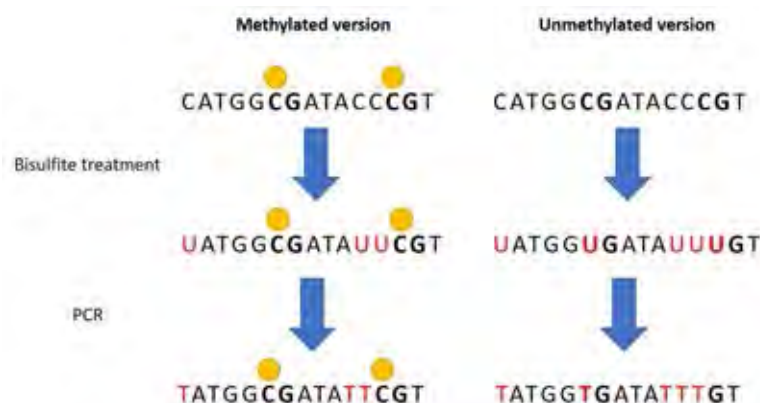


รูปที่ 3 ชั้นตอนที่ดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เมื่อดีเอ็นเอไม่ถูกเมทิลเลชันยีนสามารถแสดงออกได้ปกติ (ขวา) ชั้นตอนที่ดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็ง เมื่อมีหมู่เมทิลเข้ามาทำให้ดีเอ็นเอเกิดเมทิลเลชันไปยับยั้งการแสดงออกของยีน (ซ้าย)

ที่มา <https://atlasofscience.org/dna-methylation-markers-in-colorectal-cancer-state-of-the-art/>

การตรวจสอบดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

เป็นวิธีการตรวจสอบดีเอ็นเอเมทิลเลชันซึ่งมีหลายแบบด้วยกันแต่ Bisulfite conversion ยังเป็นมาตรฐานที่นิยมใช้ตรวจสอบอย่างแพร่หลายโดยจะตรวจดูบริเวณ CpG methylation โดยขั้นตอนของวิธีการนี้คือใช้ bisulfite treatment เพื่อที่จะเปลี่ยนเบสไซโตซีนที่ไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันให้เป็นเบสยูเรซิลและหลังจากการทำ Polymerase Chains reaction (PCR) จะเปลี่ยนเป็นเบสยูเรซิลเปลี่ยนเบสไทมีน ส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเมทิลเลชันจะเป็นเบสไซโตซีนดั้งเดิมตามที่แสดงในรูปที่ 4 วิธีการนี้ส่งผลให้การตรวจจะเน้นไปที่ลำดับของคู่เบส (Leontiou et al., 2015)

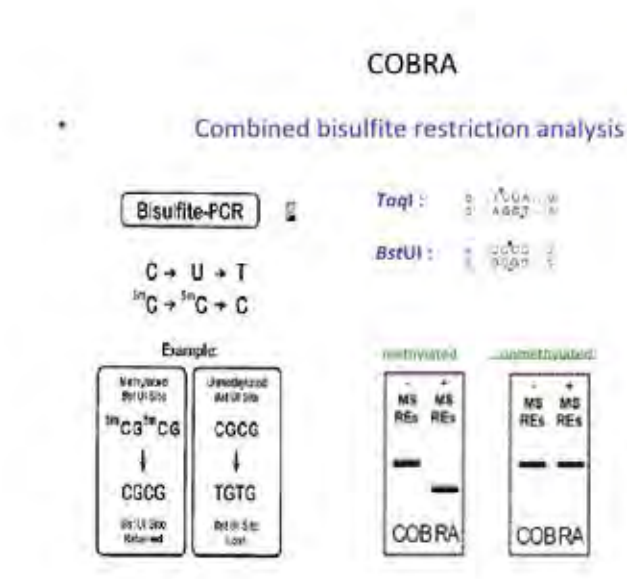


รูปที่ 4 ขั้นตอนการทำ Bisulfite conversion ทั้งในดีเอ็นเอที่ถูกเมทิลเลชันและที่ไม่ถูกเมทิลเลชัน โดยการทำให้ไซท์ไฟต์กับ methylated DNA จะไม่เปลี่ยนเบสไซโทซีนบริเวณเบสไซโทซีนที่ติดกับเบสไทมีนส่วนใน unmethylated DNA จะเปลี่ยนเบสไซโทซีนบริเวณที่ติดกับเบสไทมีนเป็นเบสยูเรซิลและเมื่อผ่านขั้นตอน PCR และจะเปลี่ยนเบสยูเรซิลเป็นเบสไทมีน

ที่มา <https://toptipbio.com/bisulfite-pyrosequencing/dna-bisulfite-treatment/>

3. Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

ในการตรวจสอบ methylated และ unmethylated DNA หลังจากที่ถูก Bisulfite conversion มาแล้วได้รับการทำ PCR มาแล้วผล PCR ที่ได้รับมาจะแยกความแตกต่างได้อย่างไร การแยกความแตกต่างของ Methylated และ Unmethylated DNA จะใช้เทคนิค Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) ข้อดีในการใช้เทคนิค COBRA ก็คือสามารถใช้กับตัวอย่างได้หลายชนิดทั้งเนื้อเยื่อ, เซลล์, เลือดและชิ้นส่วนที่อยู่ในพาราฟินบลิ๊อค นอกจากนี้การทำ COBRA ยังเป็นวิธีที่ใช้แรงงานน้อยและมีราคาถูก แต่ประเด็นสำคัญของเทคนิค COBRA คือ การหาเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมโดยจะทำจะตัด methylated หรือ unmethylated DNA แล้วแต่ความจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำให้ PCR Product สุกทำยมีขนาดที่เหมาะสมสามารถนำไปตรวจสอบบน การทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วเห็นแถบได้ชัดเจนสามารถแยกความแตกต่างของ methylated และ unmethylated DNA ได้ ดังรูปที่ 5 (Eads, and Laird, 2002)



รูปที่ 5 การตรวจสอบดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วย COBRA ด้วยเอนไซม์ *TaqI* และ *BstUI* ที่มา <https://www.slideshare.net/acme970/promoter-methylation-of-genes-in-and-around-the-03>

4. Growth differentiation factor 5 (GDF5)

Growth differentiation factor 5 (GDF5) ซึ่งรู้จักกันในชื่อ cartilage-derived morphogen protein of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการซ่อมแซม, บำรุงรักษาและพัฒนาการเจริญเติบโตของกระดูกและกระดูกอ่อน จึงทำให้ความผิดปกติของยีน *GDF5* จะนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการผิดปกติในการเจริญและการทำงานของกระดูกและกระดูกอ่อนได้ เช่น *ondrodysplasia*, *sympalangism* และ *brachydactyly type C* และโรคข้อเข่าเสื่อมดังที่กำลังจะศึกษาต่อไปเป็นต้น (Elazeem, Abdelaleem, and Mohamed, 2017)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ

กลุ่มประชากรที่ศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาจะเป็นการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้รับการบันทึกข้อมูล (เพศ, ส่วนสูง, น้ำหนัก, BMI) และผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์แล้ว ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 50 คน และกลุ่มควบคุมจำนวน 50 คน ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วย และกลุ่มควบคุมเหล่านี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติแล้ว โดยผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม หมายถึง ผู้ป่วยที่เป็นประชากรไทย ซึ่งได้รับการวินิจฉัยโดยแพทย์เฉพาะทางแล้วว่ามีอาการของโรคข้อเข่าเสื่อมจริง กลุ่มควบคุม หมายถึง ประชากรไทยอายุมากกว่า 55 ปีขึ้นไป ที่เข้ารับการตรวจสุขภาพประจำปีกับโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และได้รับการตรวจแล้วว่าไม่เป็นโรคข้อเข่าเสื่อม

วัสดุอุปกรณ์

1. Micropipette
2. Pipette tip
3. Beaker
4. Flask
5. Rack
6. Vortex machine
7. Centrifuge
8. DNA Thermal Cycler
9. Electrophoresis tank
10. Power supply
11. Gel doc Biolat 2000
12. Belly dancer
13. Microtube
14. Collection tube

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการละลายและเจือจางไพรมเมอร์
 - TE buffer
 - Primer *GDF5*-met (Gibthai, Thailand)
2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR
 - 10x reaction buffer (Apsalagen, Thailand)
 - Primer *GDF5*-met (Gibthai, Thailand)
 - 10 mM dNTP Mix (Invitrogen by Life Technologies, USA)
 - 50 mM MgCl₂ (Apsalagen, Thailand)
 - *Taq* DNA polymerase 5 U/μl (Apsalagen, Thailand)
 - Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers) (Zymoresearch, USA)
3. สารเคมีที่ใช้ในการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส
 - 2% agarose gel (Vetec, Singapore)
 - RedSafe Nucleic acid solution (iNtRON Biotechnology, USA)
 - 1x TBE
 - DNA ladder: OneMARK 100 (GeneDireX, Taiwan), Hyper ladder (Bioline, USA)
 - loading dye (biotechrabbit, Germany)
 - Ethidium bromide
4. สารเคมีที่ใช้ในการตัดเจลและทำเจลให้บริสุทธิ์
 - Gel/PCR Purification Mini Kit (Favor,gen biotech, Taiwan)

วิธีการดำเนินงาน

คัดเลือกยีนที่ใช้ในการศึกษา

คัดเลือกยีนที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) โดยทำการรวบรวมข้อมูลจาก The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ที่เป็นฐานข้อมูลที่มีการรวบรวมงานวิจัยไว้เป็นจำนวนมากโดยจะพิจารณายีนที่ถูกกล่าวถึงในงานวิจัยเรื่องโรคข้อเข่าเสื่อม และมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันนำมาเลือกเป็นยีนที่สนใจ

การหาไพรโมเตอร์

หลังจากได้ยีนที่จะใช้ในการศึกษาแล้ว ขั้นตอนมาเป็นขั้นตอนของการออกแบบไพรเมอร์ โดยจะเริ่มจากการหาลำดับเบสของไพรโมเตอร์ใช้โปรแกรม Ensembl (<https://asia.ensembl.org/index.html>) จากนั้นจะเลือกยีนที่มีตำแหน่ง CG มากที่สุด หลังจากนั้นจะได้ไพรโมเตอร์ที่ต้องการจาก 5' Flanking sequence โดยกำหนดให้มีขนาด 1000 bp ขั้นตอนต่อไปจะต้องระบุตำแหน่ง CG ทั้งหมดบนไพรโมเตอร์เพื่อนำมาแยกเป็น DNA methylation และ DNA unmethylation โดยเมื่อผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์แล้ว DNA unmethylation ต้องเปลี่ยนเบส C ทั้งหมดให้เป็นเบส T ส่วน DNA methylation จะเปลี่ยนเบส C ทั้งหมดให้เป็นเบส T เช่นเดียวกัน ยกเว้นบริเวณ CG เนื่องจากเบสไซโตซีนบริเวณนี้มีหมู่เมทิลเข้ามาเกาะ

การออกแบบไพรเมอร์

เมื่อได้ไพรโมเตอร์ที่ต้องการแล้วจากขั้นตอนข้างต้น ขั้นตอนต่อมาจึงจะหาไพรเมอร์ได้โดยการออกแบบไพรเมอร์ด้วยวิธีการ COBRA ไพรเมอร์จะต้องไม่ปรากฏเบส CG บนไพรเมอร์เลยเนื่องจากกระบวนการไบซัลไฟต์ที่จะทำให้ DNA methylation และ DNA unmethylation มีเบสที่ต่างกันบริเวณ CG ดังนั้นจึงจะหาไพรเมอร์ได้โดยใช้โปรแกรม BiSearch (<http://bisearch.enzim.hu/>) โดยกำหนดเงื่อนไขให้มี PCR product ขนาดไม่เกิน 400 bp ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาใส่ในโปรแกรมจะต้องเป็นลำดับที่ไม่ถูกกระบวนการไบซัลไฟต์มาก่อน จากนั้นให้เลือกช่องไบซัลไฟต์ เพื่อให้โปรแกรมคำนวณไพรเมอร์ที่เป็นไปได้เมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GDF5* ถูกไบซัลไฟต์แล้วให้เหมาะสมแก่การทำงาน หลังจากที่ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บนโปรแกรม BiSearch แล้วโปรแกรมจะคำนวณและแสดงไพรเมอร์ที่เป็นไปได้ จะเห็นว่าบนลำดับนิวคลีโอไทด์จะมีตำแหน่งเบสที่แสดงเป็น Y และ R ในผลการคำนวณนั้นหมายความว่าเบสของไพรเมอร์บริเวณนั้นเป็นตำแหน่ง CG ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไม่ต้องการเพราะเมื่อนำไปใช้ในขั้นตอน PCR จะไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้เพราะความแตกต่างของ unmethylated DNA และ methylated DNA ที่บริเวณ CG ดังนั้นจึงจะเลือกนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีตำแหน่งเบสที่แสดงเป็น Y และ R เป็นไพรเมอร์ที่น่าสนใจนำมาทำการทดลองมากที่สุดผลที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์ของยีน *GDF5* เมื่อโปรแกรม BiSearch

ทำการทดลองไม่ประสบความสำเร็จจึงทำให้ต้องออกแบบไพรเมอร์ใหม่โดยใช้โปรแกรม Primer3 แทน เพราะด้วยข้อจำกัดในการหาไพรเมอร์ของ Bsearch ทำให้อุณหภูมิ Tm (°C) ที่ได้จากการคำนวณ และการสังเคราะห์ไพรเมอร์จริงไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง จึงใช้โปรแกรม Primer3 แทน แล้วตรวจสอบอุณหภูมิ Tm (°C) ด้วยโปรแกรม Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) เมื่อยังไม่ประสบความสำเร็จในการทดลองจึงทำให้ในการหาไพรเมอร์ครั้งต่อมาได้ใช้ความรู้จากการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ถึงการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบสที่ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์มาแล้วเพื่อศึกษาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้มีการแนะนำให้ใช้โปรแกรม MethPrimer (<https://www.urogene.org/methprimer/>) จะได้ไพรเมอร์เหมาะสมกับกระบวนการไบซัลไฟต์มากกว่าวิธีที่ออกแบบมาข้างต้น (Reynard et al., 2011)

การคัดเลือกเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

หลังจากที่ได้ไพรเมอร์มาแล้ว ขั้นตอนต่อไปนำลำดับเบสทั้งของ DNA Methylation กับ DNA Unmethylation มาเข้าในโปรแกรม NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) จากนั้นให้คัดเลือกเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดแตกต่างจำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่งของ DNA methylation และ DNA unmethylation และคัดเลือกเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม เมื่อได้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะแล้วให้หา recognition site ของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะว่าตัดอยู่ตรงตำแหน่งใดบนโครโมโซม เมื่อตัดได้แล้วขนาดของ PCR product ที่ได้นั้นจะต้องเหมาะสมแก่การทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย และเอ็นไซม์ตัดจำเพาะจะต้องมี recognition site ที่มีความจำเพาะบนลำดับนิวคลีโอไทด์ นอกจากนั้นแล้วจะพิจารณาเลือกเอ็นไซม์ใดก็จะต้องขึ้นกับราคาของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดนั้นด้วย

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ PCR

ขั้นแรกเป็นการทำให้สารมีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทดลองโดยการนำหลอดสารมาวางในน้ำแข็ง หลังจากนั้นจะมาเตรียม Master Mix จะประกอบด้วย 10x rxn buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, 50mM dNTP mixture ปริมาณ 0.4 ไมโครลิตร, forward primer ปริมาณ 0.4 ไมโครลิตร, reverse primer ปริมาณ 0.4 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ ปริมาณ 0.8 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (Apsalagen) ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, template DNA ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, nuclease free H₂O ปริมาณ 13.8 ไมโครลิตร รวมปริมาตรสุทธิของสารที่ใช้ในกระบวนการ PCR สำหรับ 1 Master Mix มีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ขั้นตอนในกระบวนการ PCR ประกอบไปด้วยขั้น initial activation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที 1 รอบ, ขั้น denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 35 รอบ, ขั้น annealing ที่อุณหภูมิ 52 และ 54 องศาเซลเซียส (ตรวจสอบว่าควรใช้อุณหภูมิใด) เป็นเวลา 15 วินาที 35 รอบ, ขั้น extension ที่

อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25, 30 และ 40 วินาที 35 รอบ จะใช้เวลาเท่าไรขึ้นอยู่กับ PCR product size, ขั้น final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ จะได้ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการ

ตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ขั้นตอนในการตรวจสอบ PCR products โดย จะต้องคำนึงถึงขนาดของ PCR products ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมา โดยวิธีการนี้จะใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2% ในการตรวจสอบ มี DNA ladder คือ OneMARK 100 (GeneDireX, Inc.) และ HyperLadder (Biolone) เป็น DNA Marker เพื่อใช้เปรียบเทียบและยืนยันขนาดของ PCR products หลังจากนั้นใส่ loading dye รวมกับ PCR products ในการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ electrophoresis power supply ที่มีกำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 หรือ 30 นาที ขึ้นอยู่กับขนาดของ PCR product แล้วนำไปอ่านผลที่เครื่อง gel documentation analysis ทำการบันทึกภาพและเก็บข้อมูล ถ้าแถบดีเอ็นเอไม่คมชัดจะย้อมด้วย EtBr 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำอีก 5 นาที แล้วนำไปอ่านผลที่เครื่อง gel documentation analysis ทำการบันทึกภาพและเก็บข้อมูลอีกครั้ง

ตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยการส่ง Sequencing

หลังจากการที่ได้ทำ PCR และ run gel electrophoresis แล้วเมื่อทำการบันทึกภาพและวิเคราะห์ผลของขนาดเจลที่เกิดขึ้น เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วว่าตรงกับขนาด PCR product ที่ได้ ออกแบบไว้ในครั้งการออกแบบไพรเมอร์ดังที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ จะต้องทำการตรวจสอบลำดับเบสดีเอ็นเอของ PCR product ว่าตรงกับตำแหน่งที่ได้ออกแบบมาหรือไม่ ซึ่งจะทำได้โดยการตัด เจลโดยจะตัดเจลในบริเวณส่วนที่ต้องการเท่านั้นและทำเจลให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR Purification Mini Kit (Favorgen biotech, Taiwan) ในการทดลอง จากนั้นส่งทำ sequencing ที่ บริษัท U2bio เมื่อได้ผล sequencing แล้วจะต้องนำลำดับเบสดีเอ็นเอมาทำการ BLAST โดยใช้ NCBI ในการ BLAST ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn &PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) เพื่อตรวจสอบว่าลำดับดีเอ็นเอนี้อยู่บน ยีน *GDF5* บนโครโมโซมคู่ที่ 20 จริง แล้วจะถือว่า PCR product ที่ได้จากการทดลองนั้นตรงกับ บริเวณที่ได้ออกแบบไว้ในครั้งแรก

บทที่ 4 ผลการศึกษา

คัดเลือกยีนที่ใช้ในการศึกษา

หลังจากที่ได้เลือกศึกษาข้อมูลจากงานวิจัยต่างๆแล้วมีความสนใจในยีน *Growth differentiation factor 5 (GDF5)* เนื่องจากมียีนชนิดนี้ปรากฏอยู่ในงานวิจัยเกี่ยวกับโรคข้อเสื่อมเป็นจำนวนมาก

การหาโปรโมเตอร์

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกศึกษา ยีน *Growth differentiation factor 5 (GDF5)* ซึ่งจากโปรแกรม *ensembl* จะเห็นว่าได้ยีนมาสองแบบซึ่งการคัดเลือกว่าจะเอายีนไหนนั้นจะเลือกจากว่าโปรโมเตอร์ที่เลือกมานั้นอันไหนมี CG มากกว่ากันหลังจากได้ทำการเปรียบเทียบแล้วก็จะเห็นว่า *GDF5-202* มีตำแหน่ง CG จึงนำตัวนี้มาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

```

CAAAGAGGGGCGGAAAGTAACTTTGTGCACAGTAGTGCAAAAACAGAAAGTAATGCAGCTGCCTGGAGAAG
GGCTGAGAAGATACTTCAGCAGGGTCTGAAGAATGGGAGCTCCAGAGTGGGTGGGGTGGGACTGGGCTTT
GATAGATTATGCAAATCCAGGACACAGGGAGAGGGGGGGGGGGGCGAGAGGGGGCCTCACCTCCCC
AGCCTGGGATTGGCTACTGGACAAGGGTGGGAAGCTCTCTTGGTCCACTGGAGCTTAGGTGCTGGGCA
GCAAGAAGCTGAGGCAAGGGCCCGGGCCCTAACTAATCTCCAGCCCCCTCTGGGCCTGGTTCTCCGGTA
ACAAGAGGCCTGCTGCTAAAGGGATTCCCTCAGGCCCTAGAGGGGGTCTGGCCTGGAGGTAAACCAG
CACCTCCCACCTGCCCCGAGGCCCCACCTCACCACTGGCTCCAGAGGCCGGCTAGTTGCTCAATTATTGAGCTG
AGCAGCCTGCTAAGGCCCTGGGGAGGGGGAGGCCACCCAGGCAGAGGGCCAGGCCCCCCCCCCAA
ACTCCCCCTTTGGGAGGGGCCCCCCCTCAAGTCCTGCACCTATAGGCAGACTGAGCGGAGCAGGGCCTCCCAT
GTTGGGTATTGGCAGCACCTTACTAGAGAGGCCCTGAAGGAAAGGGGGTATTATTTAAGAATTATAAGATCCTAGCCA
GAAATGGGGAAGTCAGGGTCTCTGGATTCTGAAAGGGACATTTGAAGCAGAAAAGAAAAATTGCCCTCAATCATT
CTTTTGGCTCAGTGTTACATACAGTCATGTGCAAGGTCACCTGGTTCTAGGTGCCCTGCACAGCTCCACCTACAA
ACCAGACTACAATTACAACCTGAGAAACAAAGGGGCT

```

รูปที่ 6 โปรโมเตอร์และตำแหน่ง CG (บริเวณที่เน้นสีแดง) ของยีน *GDF5*

เมื่อได้โปรโมเตอร์และระบุตำแหน่งของ CG ตามที่แสดงในรูปที่ 6 และเมื่อนำมาลำดับเบส ที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated หรือ unmethylated DNA จะได้ลำดับเบสที่ เปลี่ยนแปลงไปดังรูปที่ 7

Unmethylated DNA

```

TAAAGAGGGGTGGGAAAGTAATTGTGTATAGTAGTGTA AAAATGAGAAGTAATGTAGTTGTTTGGAGAAGGGT
TGAGAAGATATTTTAGTAGGGTTTTGAAGAATGGGAGTTTAGAGTGGTGGGGTGGGATTGGGTTTTGATAGATTA
GTGTA AATTATTAGGATATAGGGAGTAGGGGGGGGGGGGTAGAGAGTGGTTTTTATTTTTTAGTTGGGATTGG
TTATTGGATAAGGGTGGGAAGTTTTTTTGGTGTATTGGAGTTAGTGTGGGTAGTAAGAAGTTGAGGTAAG
GGTTTTGGTTTTAAAGAGTTTTTAGTTTTTTGGGTTTGGTTTTTTGGTAATAAGAGGTTTGTGTTAAAGGATT
TTTTTAGGTTTTTAGATGGGGGGTTTTGGTTTGGATGGTAATTAGTATTTTTATTGTTTTGAGGTTTTATTTATTA
TTTTGTTTTAGATGGTGGTAGTTGTTTGGATTGAGTTGGTAGTATTGTTAAGGTTTTGGGGAGGGGG
GAGTTATTTAGGTAGAGGGTTAGGTTTTTTTTTAAATTTTTTTTGGGAGGGGTTTTTTTTAAGTTTTGTATTAT
AGGTAGATTGAGTGGTAGGGTTTTTTATGTTGGGTATTGGTAGTATTATTAGAGAGGTTTTGAAGGAAAGGGGGT
ATTATTTAAGAATTATAAGATTTTAGTTAGAAATGGGGAAGTTAGGGTTTTGGATTCTTAAAGGGATATTTGAAAGTAG
AAAAGAAAATTGTTTTAATTATTTTTTTGGTTTTAGTGTATATATAGTATGTGTAAGGTTATTTGGTTTTAGGTGTT
TGTTATAGTTTTATTTATAAATTAGATTATAATTATGTAAGAAATAAAGGGGTT

```

Methylated DNA

```

TAAAGAGGGGTGGGAAAGTAATTGTGTATAGTAGTGTA AAAATCGAGAAGTAATGTAGTTGTTTGGAGAAGGGT
TGAGAAGATATTTTAGTAGGGTTTTGAAGAATGGGAGTTTAGAGTGGTGGGGTGGGATTGGGTTTTGATAGATTA
GTGTA AATTATTAGGATATAGGGAGTAGGGGGGGGGGGGTAGAGAGTGGTTTTTATTTTTTAGTTGGGATTGG
GTTATTGGATAAGGGTGGGAAGTTTTTTTGGTGTATTGGAGTTAGTGTGGGTAGTAAGAAGTTGAGGTAAG
AGGGTTTTGGTTTTAAAGAGTTTTTAGTTTTTTGGGTTTGGTTTTTTGGTAATAAGAGGTTTGTGTTAAAGG
ATTTTTTAGGTTTTTAGATGGGGGGTTTTGGTTTTGAGATGTTAATTAGTATTTTTATTGTTTTGAGGTTTTATTT
ATTAATTGTTTTAGATGGTGGTAGTTGTTTGGATTGAGTTGGTAGTATTGTTAAGGTTTTGGGGAGGG
GGGAGGTTTTATTAGGTAGAGGGTTAGGTTTTTTTTTAAATTTTTTTGGGAGGGGTTTTTTTTAAGTTTTGTA
TTTATAGGTAGATTGAGTGGTAGGGTTTTTTATGTTGGGTATTGGTAGTATTATTAGAGAGGTTTTGAAGGAAAGG
GGGTATTATTTAAGAATTATAAGATTTTAGTTAGAAATGGGGAAGTTAGGGTTTTGGATTCTTAAAGGGATATTTGAA
GTAGAAAAGAAAATTGTTTTAATTATTTTTTTGGTTTTAGTGTATATATAGTATGTGTAAGGTTATTTGGTTTTAGGTG
TTTTGTATAGTTTTATTTATAAATTAGATTATAATTATGTAAGAAATAAAGGGGTT

```

รูปที่ 7 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ unmethylated DNA โดยบริเวณที่เน้นด้วยสีแดงแสดงถึงเบส CG ที่ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์

การออกแบบไพรเมอร์

ขั้นตอนต่อมาจึงจะหาไพรเมอร์ได้โดยใช้โปรแกรม BiSearch (<http://bisearch.enzim.hu/>) จะได้ผลของการออกแบบไพรเมอร์จากโปรแกรมตามตารางที่ 1 และอยู่บริเวณตามรูปที่ 8 บน methylated DNA ของยีน *GDF5*

ตารางที่ 1 ผลของการออกแบบไพรเมอร์คู่ที่ 1 และคุณสมบัติของไพรเมอร์ของยีน *GDF5* Methylation

| Primer (1) | Primer sequences (5' to 3') | Length | Tm (°C) | C:G content (%) | PCR products size (bp) |
|------------------|-----------------------------|--------|---------|-----------------|------------------------|
| Forward primer 1 | GTAGTAAGAAGTTGAGGTAAG | 21 | 55.5 | 38.1 | 377 |
| Reverse primer 1 | CTACCTATAAATACAAAACCTT | 21 | 49.6 | 23.8 | |

TAACGAGGGGTCGGGAAAGTAATTCGGTGTATAGCGAGTGTA AAAATCGAGAAGCGAATGTAGTTG
CGTTTGGAGAAGGCGGTTGAGAAGCGATATTTAGTAGGGTTTTGAAGAATGGGAGTTTTAGAGTCG
GGTGGCGGGTGGGATTGGTTTTCGGATAGATTACGTGTAAATTCTTAGGATATAGGGAGCGAGG
GGCGGGGGGGCGGTAGAGCGCGGCGTTTTATTTTTAGTTGGGATTGCGGTTATTGGATACGAGG
GTCGGGAAGTTTTTTTCGGCGTCGATTGGAGTTTAGCGTGTGGCGTAGTAAGAAGTTGAGGTA
GCGGGTTTCGGGTTTTAACGACGCGTTTTAGTTTTTTTTGGGTTTCGGGTTTTTCGGGTAATAAGA
GGTCGTTGTTTCGAACGGGATTTTTTAGGCGTTTTAGACGGGCGGGTTTTTCGGGTTTCGGACGGTTAA
TTCGAGTATTTTTATTTGTTTTGAGGTTTTATTTATTACGTTTCGGTTTTTCGTAGACGTTTCGGTTAGTT
GTTTCGCGATTGAGTTGCGGTAGTCGTTGTTAAGGTTTTGCGGGGGACCGGGGGCGGAGTTTATTTTCG
AGGTAGAGGGTTAGGTTTCGTTTTTTAAATTTTCGTTTTTTGGGAGGGGTTTCGTTTTTTAAGTTTTGT
ATTTATAGGTAGATTGAGTCGGCGTAGGGTTTTTCGTTATGTTGGGATTGTTAGTCGATTATTAGA
GAGGTTTTGAAGGAAAGGGGTATTATTTAAGAATTATAAGATTTTTAGTTAGAAATGGGGACGGT
TAGGGTTTTGGATTTCGCGAAAGGGATATTTTCGGAAGTAGAAAAGAAAAATTGTTTTAATTATTTTCG
TTTTGGTTTTAGTGTTATATATAGCGTATGTGAAGGTTATTTGGTTTTAGTGCGTTTCGTTATAGTT
TTATTATAAATTAGATTATAATTATAATTGTCGAGAAATAAAGGGGTT

รูปที่ 8 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 1

หลังจากนั้นจะหาไพรเมอร์ชุดที่ 2 ได้จากโปรแกรม Primer3 เนื่องจากการหาไพรเมอร์ครั้งที่ 1 ด้วยโปรแกรม Bisearch ยังไม่ประสบผลสำเร็จ แล้วตรวจสอบคุณสมบัติ Tm (°C) ด้วยโปรแกรม Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) ผลที่ได้จากการออกแบบจะเป็นไปตามตารางที่ 2 และอยู่บริเวณตามรูปที่ 9 บน methylated DNA ของยีน *GDF5*

ตารางที่ 2 ผลของการออกแบบไพรเมอร์คู่ที่ 2 และคุณสมบัติของไพรเมอร์ของยีน *GDF5* methylation

| Primer (2) | Primer sequences (5' to 3') | Length | Tm (°C) | C:G content (%) | PCR products size (bp) |
|------------------|-----------------------------|--------|---------|-----------------|------------------------|
| Forward primer 1 | GTAGTAAGAAGTTGAGGTAAG | 21 | 55.5 | 38.1 | 421 |
| Reverse primer 2 | ACTACCAATACCCAACATAA | 20 | 52.3 | 35 | |

TAACGAGGGGTGGGAAAGTAATTCGGTGTATAGCGAGTGTAAAAATCGAGAAGCGAATGTAGTTGCGTTT
 GGAGAAGGCGGTTGAGAAGCGATATTTAGTAGGGTTTTGAAGAATGGGAGTTTTAGAGTCGGGTGGCGG
 GTGGGATTGGTTTTCGGATAGATTACGTGTAAATTCGTTAGGATATAGGGAGCGAGGGGCGGGGGGGCG
 GTAGAGCGCGGTTTTATTTTTAGTTGGGATTGCGGTTATTGGATACGAGGGTCGGGAAGTTTTTTTC
 GCGTTCGATTGGAGTTAGCGTGTGGCGCTAGTAAGAAGTTBAGGTAAGCGGGTTTCGGGTTTTAACGAC
 GCGTTTTAGTTTTTTTTGGGTTTCGGGTTTTTTTCGGGTAATAAGAGGTCGTTGTTCGAACGGGATTTTTTA
 GGCGTTTTAGACGGGCGGGTTTTCGGGTTTCGGACCGGTTAATTCGAGTATTTTTATTGTTTTGAGGTTTTA
 TTTATTACGTTCGGTTTTCGTAGACGTTCGGTTAGTTGTTTCGCGATTGAGTTGCGGTAGTCTGTTGTTAAGGT
 TTTGCGGGGGACGGGGCGGAGTTTATTTCGAGGTAGAGGGTTAGGTTTCGTTTTTTAAATTTTCGTTTTTT
 GGGAGGGGTTTCGTTTTTTAAGTTTTGTATTTATAGGTAGATTGAGTCCGCGTAGGGTTTTTCGTTATGTTGG
 GTATTGGTAGTTCGATTTATTAGAGAGTTTTGAAGGAAAGGGGGTATTATTTAAGAATTATAAGATTTTTAG
 TTAGAAATGGGGACGGTTAGGGTTTTGGATTCCGCAAAGGGATATTCGGAAGTAGAAAAGAAAATTGT
 TTTAATTTTCGTTTTTTGGTTTTAGTGTATATATAGCGTATGTGTAAGGTTATTTGGTTTTAGGTGCGTTTG
 CGTATAGTTTTATTATAAATTAGATTATAATTATAATTGTTCGAGAAATAAAGGGGTT

รูปที่ 9 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 2

ในการหาไพรเมอร์ครั้งต่อมาได้ออกแบบไพรเมอร์ด้วยตนเองและตรวจสอบคุณสมบัติ Tm (°C) และ CG content percent ด้วยโปรแกรมและ Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) โดยในครั้งนี้จากการออกแบบไพรเมอร์ได้ใช้ forward primer ชุดเดียวกับครั้งก่อนหน้าแล้วได้ออกแบบ reverse primer ใหม่อีก 3 ชุด ผลที่ได้จากการออกแบบจะเป็นไปตามตารางที่ 3 และอยู่บริเวณตามรูปที่ 10, 11 และ 12 ตามลำดับ บน methylated DNA ของยีน *GDF5*

ตารางที่ 3 ผลของการออกแบบไพรเมอร์คู่ที่ 3, 4 และ 5 และคุณสมบัติของไพรเมอร์ของยีน *GDF5* methylation

| Primer (3) | Primer sequences (5' to 3') | Length | Tm (°C) | C:G content (%) | PCR products size (bp) |
|------------------|-----------------------------|--------|---------|-----------------|------------------------|
| Forward primer 1 | GTAGTAAGAAGTTGAGGTAAG | 21 | 55.5 | 38.1 | 448 |
| Reverse primer 4 | TTCCTTCAAACCTCTCTAATAAA | 24 | 56.7 | 29.2 | |
| Primer (4) | Primer sequences (5' to 3') | Length | Tm (°C) | C:G content (%) | PCR products size (bp) |
| Forward primer 1 | GTAGTAAGAAGTTGAGGTAAG | 21 | 55.5 | 38.1 | 313 |
| Reverse primer 5 | AAACCTAACCTCTACCTC | 19 | 55.2 | 47.4 | |
| Primer (5) | Primer sequences (5' to 3') | Length | Tm (°C) | C:G content (%) | PCR products size (bp) |
| Forward primer 1 | GTAGTAAGAAGTTGAGGTAAG | 21 | 55.5 | 38.1 | 623 |
| Reverse primer 6 | CACCTAAAACCAAATAACCTTAC | 23 | 57.5 | 34.8 | |

TAA**CG**AGGGGT**CG**GGAAAGTAATT**CG**GTGTATAG**CG**AGTGTAAAAAT**CG**GAGAAG**CG**AATGTAGTT**CG**TTT
GGAGAAG**CG**GTTGAGAAG**CG**ATATTTAGTAGGGTTTTGAAGAATGGGAGTTTAGAGT**CG**GGTGG**CG**GG
TGGGATTGGGTTTT**CG**GATAGATT**CG**TGAAATT**CG**TAGGATATAGGGAG**CG**AGGGG**CG**GGGGGG**CG**GT
AGAG**CG**CG**CG**CGTTTATTTTTTAGTTGGGATT**CG**GGTTATTGGAT**CG**AGGGT**CG**GGAAAGTTTTTTTT**CG**G
CGT**CG**ATTGGAGTTAG**CG**TGTTGG**CG**GTAGTAAGAA**CG**GTAAAG**CG**GGTTT**CG**GGTTTTAACGAC**CG**CG
TTTTAGTTTTTTTTGGGTTT**CG**GGTTTTTTTT**CG**GGTAATAAGAGGT**CG**TTGTT**CG**AAC**CG**GGATTTTTTAGG**CG**
CGTTTTAGAC**CG**GG**CG**GGTTTT**CG**GGTTT**CG**GAC**CG**GTTAATT**CG**AGTATTTTTATTGTTTTGAGGTTTTATTT
ATTAC**CG**TT**CG**TTTT**CG**TAGAC**CG**TT**CG**GTTAGTTGTTT**CG**CGATTGAGTT**CG**GTAAGT**CG**TTGTTAAGGTTTTG
CGGGGGAC**CG**GGGG**CG**GAGTTTATT**CG**AGGTAGAGGGTTAGGTTT**CG**TTTTTTAAATTT**CG**TTTTTGGGA
GGGTT**CG**TTTTTTAAAGTTTTGTATTATAGGTAGATTAGT**CG**GG**CG**TAGGGTTTT**CG**TTATGTTGGGTATT
GGTAGT**CG**ATTATTAGAGAG**CG**TTTTGAAG**CG**AAAGGGGATTATTTAAGAATTATAAGATTTTTAGTTAGA
AATGGGA**CG**GTTAGGGTTTTGGATT**CG**CGAAAGGGATATT**CG**GAAGTAGAAAAGAAAAATGTTTTAA
TTATTT**CG**TTTTTGGTTTTAGTGTATATAG**CG**TATGTGTAAGGTTATTGGTTTTAGGT**CG**TTTT**CG**GATA
GTTTTATTATAAATTAGATTATAATTATAATTGT**CG**GAGAAATAAAGGGTT

รูปที่ 10 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ
ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 3

TAA**CG**AGGGGT**CG**GGAAAGTAATT**CG**GTGTATAG**CG**AGTGTAAAAAT**CG**GAGAAG**CG**AATGTAGTT**CG**TTTGGAGAA
GG**CG**GTTGAGAAG**CG**ATATTTAGTAGGGTTTTGAAGAATGGGAGTTTAGAGT**CG**GGTGG**CG**GGTGGGATTGGGTT
TT**CG**GATAGATT**CG**TGAAATT**CG**TAGGATATAGGGAG**CG**AGGGG**CG**GGGGGG**CG**GTAGAG**CG**CG**CG**CGTTTTATT
TTTTAGTTTGGGATT**CG**GGTTATTGGAT**CG**AGGGT**CG**GGAAAGTTTTTTTT**CG**GG**CG**T**CG**ATTGGAGTTAG**CG**GTG
CGGTAGTAAGAA**CG**GTAAAG**CG**GGTTT**CG**GGTTTTAACGAC**CG**CGTTTTAGTTTTTTTTGGGTTT**CG**GGTTTTT
T**CG**GGTAATAAGAGGT**CG**TTGTT**CG**AAC**CG**GGATTTTTTAGG**CG**TTTTAGAC**CG**GG**CG**GGTTTT**CG**GGTTT**CG**GAC**CG**GT
TAATT**CG**AGTATTTTTATTGTTTTGAGGTTTTATTTATT**CG**TT**CG**TTTT**CG**TAGAC**CG**TT**CG**GTTAGTTGTT**CG**CG
ATTGAGTT**CG**GTAAGT**CG**TTGTTAAGGTTTT**CG**GGGGAC**CG**GGGG**CG**GAGTTATTT**CG**AGGTAGAGGGTTAGGTTT
CGTTTTTTAAATTT**CG**TTTTTGGGAGGGGTT**CG**TTTTTTAAAGTTTTGTATTATAGGTAGATTGAGT**CG**GG**CG**TAGG
GTTTT**CG**TTATGTTGGGTATTGGTAGT**CG**ATTATTAGAGAGGTTTTGAAGGAAAGGGGATTATTTAAGAATTAT
AAGATTTTAGTTAGAAATGGGGA**CG**GTTAGGGTTTTGGATT**CG**CGAAAGGGATATT**CG**GAAGTAGAAAAGAAAA
ATTGTTTTAAATTT**CG**TTTTTGGTTTTAGTGTATATAG**CG**TATGTGTAAGGTTATTGGTTTTAGGT**CG**TTT**CG**
CGTATAGTTTTATTATAAATTAGATTATAATTATAATTGT**CG**GAGAAATAAAGGGTT

รูปที่ 11 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ
ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 4

TAA**CG**AGGGGT**CG**GGAAAGTAATT**CG**GTGTATAG**CG**AGTGTAAAAAT**CG**GAGAAG**CG**AATGTAGTT**CG**TTTGGAA
GAAGG**CG**GTTGAGAAG**CG**ATATTTAGTAGGGTTTTGAAGAATGGGAGTTTAGAGT**CG**GGTGG**CG**GGTGGGATTGGGA
TTGGGTTTT**CG**GATAGATT**CG**TGAAATT**CG**TAGGATATAGGGAG**CG**AGGGG**CG**GGGGGG**CG**GTAGAG**CG**CG
CGCGTTTTATTTTTTAGTTGGGATT**CG**GGTTATTGGAT**CG**AGGGT**CG**GGAAAGTTTTTTTT**CG**GG**CG**T**CG**ATTGG
AGTTTAG**CG**TGTTGG**CG**GTAGTAAGAA**CG**GTAAAG**CG**GGTTT**CG**GGTTTTAACGAC**CG**CGTTTTAGTTTTTTTT
TGGGTTT**CG**GGTTTTTTTT**CG**GGTAATAAGAGGT**CG**TTGTT**CG**AAC**CG**GGATTTTTTAGG**CG**TTTTAGAC**CG**GG**CG**
GTTTT**CG**GGTTT**CG**GAC**CG**GTTAATT**CG**AGTATTTTTATTGTTTTGAGGTTTTATTTATT**CG**TT**CG**GGTTTT**CG**T
AGAC**CG**TT**CG**GTTAGTTGTTT**CG**CGATTGAGTT**CG**GGTAGT**CG**TTGTTAAGGTTTT**CG**GGGGAC**CG**GGGG**CG**GAG
TTTTTT**CG**AGGTAGAGGGTTAGGTTT**CG**TTTTTTAAATTT**CG**TTTTTGGGAGGGGTT**CG**TTTTTTAAAGTTTTG
TATTATAGGTAGATTGAGT**CG**GG**CG**TAGGGTTTT**CG**TTATGTTGGGATTGGTAGT**CG**ATTATTAGAGAGGTTT
TGAAGGAAAGGGGTTATTTAAGAATTATAAGATTTTAGTTAGAAATGGGGAC**CG**GTTAGGGTTTTGGATT
CGCGAAAGGGATTT**CG**GAAGTAGAAAAGAAAAATGTTTTAAATTT**CG**TTTTTGGTTTTAGTGTATATATA
CGGTATGTTAAGGTTATTGTTTTAGGT**CG**TTT**CG**GATAGTTTTATTATAAATTAGATTATAATTATAATTG
TCGAGAAATAAAGGGTT

รูปที่ 12 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ
ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 5

ในการหาไพรเมอร์ครั้งต่อมาหลังจากได้ใช้โปรแกรม MethPrimer จะได้ผลไพรเมอร์ออกมาสองชุดดังตารางที่ 4 และอยู่บริเวณตามรูปที่ 13 และ 14 ตามลำดับ บน methylated DNA ของยีน *GDF5*

ตารางที่ 4 ผลของการออกแบบไพรเมอร์คู่ที่ 6 และ 7 และคุณสมบัติของไพรเมอร์ของยีน *GDF5* methylation

| Primer (6) | Primer sequences (5' to 3') | Length | Tm (°C) | C:G content (%) | PCR products size (bp) |
|------------------|-----------------------------|--------|---------|-----------------|------------------------|
| Forward primer 2 | ATTTTAGTAGGGTTTTGAAGAATGG | 25 | 58.2 | 32.0 | 404 |
| Reverse primer 7 | CCTCAAAAACAAATAAAAAATACTC | 25 | 54.9 | 24.0 | |
| Primer (7) | Primer sequences (5' to 3') | Length | Tm (°C) | C:G content (%) | PCR products size (bp) |
| Forward primer 3 | GGTTTTGAAGAATGGGAGTTTTAG | 24 | 59.4 | 40.0 | 623 |
| Reverse primer 7 | CCTCAAAAACAAATAAAAAATACTC | 25 | 54.9 | 24.0 | |


```

TAACGAGGGGTGGGAAAGTAATTCGGTGTATAGCGAGTGTAAAAATCGAGAAGCGAATGTAGTTGCGTTTGGAGAA
GGCGGTTGAGAAGCGATATTTTAGTAGGGTTTGAAGAAATCGGAGTTTTAGAGTCGGGTGGCGGGTGGGATTGGGTTT
TCGGATAGATTACGTGTAATTCGTTAGGATATAGGGAGCGAGGGGCGGGGGGCGGTAGAGCGCGCGTTTTATTTT
TTAGTTGGGATTGCGTTATTGGATACGAGGGTCGGGAAGTTTTTTTCGGCGTTCGATTGGAGTTTAGCGTGTGGC
GGTAGTAAGAAGTTGAGGTAAGCGGGTTTCGGGTTTTAACGACCGTTTTAGTTTTTTTTGGGTTTCGGGTTTTTCG
GGTAATAAGAGGTCTTGTTCGAACGGGATTTTTTAGGCGTTTTAGACGGGCGGGTTTTCGGGTTTCGGACCGTTAAT
TCGAGTATTTTATTGTTTTGAGTTTTTATTTATTACGTTTCGGTTTTCTAGACGTTTCGGTTAGTTGTTTCGCGATTG
AGTTGCGGTAGTCGTTGTTAAGGTTTTCGGGGGAAGGGGCGGAGTTTTATTTCGAGGTAGAGGGTTAGGTTTCGTTT
TTTTAAATTTTCGTTTTTGGGAGGGGTTTCGTTTTTAAAGTTTGTATTATAGGTAGATTGAGTCGGCGTAGGGTTTT
CGTTATGTTGGGTATTGGTAGTCGATTTATTAGAGAGGTTTTGAAGGAAAGGGGTATTATTTAAGAATTATAAGATT
TTAGTTAGAAATGGGACGGTTAGGGTTTTGGATTCCGCAAAGGGATATTCGGAAGTAGAAAAGAAAAATTGTTTT
AATTATTTTCGTTTTTGGTTTTAGTGTATATATAGCGTATGTGTAAGGTTATTTGGTTTTAGGTGCGTTTTCGTTATAGTTT
ATTTATAAATTAGATTATAATTATAATTGTTCGAGAAATAAAGGGGTT

```

รูปที่ 13 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ
ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 6

```

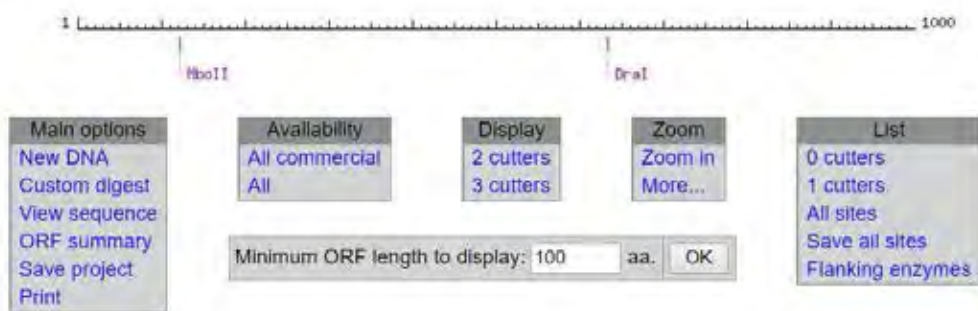
TAACGAGGGGTGGGAAAGTAATTCGGTGTATAGCGAGTGTAAAAATCGAGAAGCGAATGTAGTTGCGTTTGGAGAAG
GCGGTTGAGAAGCGATATTTTAGTAGGGTTTGAAGAAATCGGAGTTTTAGAGTCGGGTGGCGGGTGGGATTGGGTTTT
GGATAGATTACGTGTAATTCGTTAGGATATAGGGAGCGAGGGGCGGGGGGCGGTAGAGCGCGCGTTTTATTTT
AGTTGGGATTGCGTTATTGGATACGAGGGTCGGGAAGTTTTTTTCGGCGTTCGATTGGAGTTTAGCGTGTGGCGGTA
GTAAGAAGTTGAGGTAAGCGGGTTTCGGGTTTTAACGACCGTTTTAGTTTTTTTTGGGTTTCGGGTTTTTCGGGTAAT
AAGAGGTCTTGTTCGAACGGGATTTTTTAGGCGTTTTAGACGGGCGGGTTTTCGGGTTTCGGACCGTTAATTCGAGT
TTTTTATTGTTTTGAGTTTTTATTTATTACGTTTCGGTTTTCTAGACGTTTCGGTTAGTTGTTTCGCGATTGAGTTGCGG
TAGTCGTTGTTAAGGTTTTCGGGGGAAGGGGCGGAGTTTTATTTCGAGGTAGAGGGTTAGGTTTCGTTTTTTAAATTT
CGTTTTTGGGAGGGGTTTCGTTTTTAAAGTTTGTATTATAGGTAGATTGAGTCGGCGTAGGGTTTTTCGTTATGTTGGG
TATTGGTAGTCGATTTATTAGAGAGGTTTTGAAGGAAAGGGGTATTATTTAAGAATTATAAGATTTTAGTTAGAAATG
GGGACGGTTAGGGTTTTGGATTCCGCAAAGGGATATTCGGAAGTAGAAAAGAAAAATTGTTTTAATTATTTTCGTTTT
GGTTTTAGTGTATATATAGCGTATGTGTAAGGTTATTTGGTTTTAGGTGCGTTTTCGTTATAGTTTTATTTATAAATTAGATT
ATAATTATAATTGTTCGAGAAATAAAGGGGTT

```

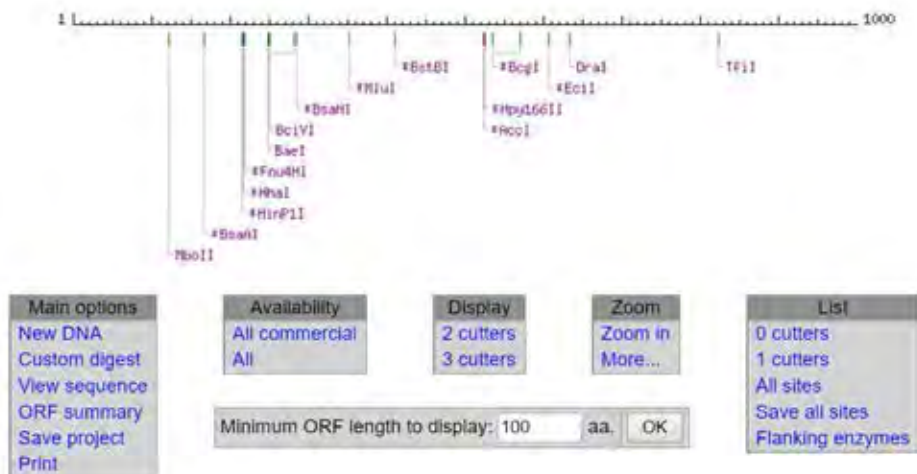
รูปที่ 14 ลำดับเบสที่ผ่านการทำ bisulfite conversion ทั้ง methylated DNA และ
ตำแหน่งไพรเมอร์คู่ที่ 7

การคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากนั้นนำลำดับเบสทั้ง methylation กับ unmethylation มาเข้าในโปรแกรม NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) เพื่อหาเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยกความแตกต่าง methylation กับ unmethylation DNA



รูปที่ 15 เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมดที่สามารถตัดได้ unmethylated DNA ของ ยีน *GDF5* ที่มา (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>)



รูปที่ 16 เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมดที่สามารถตัดได้ Methylated DNA ของ ยีน *GDF5* ที่มา (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>)



รูปที่ 17 ตัวอย่างการตัดของเอ็นไซม์บน recognition site

ที่มา (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>)

จากรูปที่ 15 16 และ 17 จะเห็นว่ามีเอ็นไซม์ตัดจำเพาะจำนวนหนึ่งที่สามารถตัด methylation กับ unmethylation DNA ได้แต่ทั้งนี้จำเป็นต้องการแยกความแตกต่างจึงจำเป็นต้องเลือกเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดเฉพาะ methylation หรือ unmethylation DNA เท่านั้นจึงเลือกออกมาตามความเหมาะสม

โดยจากรูปที่ 15 และ 16 เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดเฉพาะ methylation หรือ unmethylation DNA จะเลือกเอ็นไซม์ที่มีจดจำตำแหน่ง recognition site นั่นคือ *MluI*, *BstBI*, *HinP1* และ *HhaI* หลังจากนั้นนำมาเทียบในลำดับเบสตัวที่เหมาะสมคือไม่อยู่บริเวณช่วงต้นหรือช่วงปลายของไพรโมเตอร์จนเกินไป หรือ เมื่อนำมาตัดแล้ว PCR product จะมีขนาดใหญ่หรือเล็กจนเกินไป จึงได้เลือก *MluI* และ *BstBI* มาพิจารณาเป็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

```

TAACGAGGGGTCGGGAAAGTAATTCGGTGTATAGCGAGTGTA AAAATCGAGAAGCGAATGTAGTTGCGTTTGGAGAAGGCGGT
TGAGAAGCGATATTTTAGTAGGGTTTTGAAGAATGGGAGTTTTAGAGTCGGGTGGCGGGTGGGATTGGGTTTTCGGATAGATTA
CGTGAAATTCGTTAGGATATAGGGAGCGAGGGGCGGGGGGGCGGTAGAGCGCGGCGTTTTATTTTTTAGTTTGGGATTGCGG
GTTATTGGATACGAGGGTCGGGAAGTTTTTTTTCGGGCTCGATTGGAGTTTAGCGTGTGGCGGTAGTAAGAAGTTGAGGTAAG
CGGGTTTCGGGTTTTAACGAGCGCTTTTAGTTTTTTTTGGGTTTCGGGTTTTTTTCGGGTAATAAGAGGTCGTTGTTTGAACGGG
ATTTTTTAGGCGTTTAGACGGGCGGGTTTTCGGGTTTCGGACGGTTAATTCGAGTATTTTTATTTGTTTTGAGGTTTTATTTT
ATTACGTTTCGGTTTTTCGTAGACGTTTCGGTTAGTTGTTTCGGGATTGAGTTGCGGTAAGTCGTTGTTAAGTTTTGCGGGGACGGG
GGCGGAGTTTATTTTCGAGGTAGAGGGTTAGGTTTCGTTTTTAAATTTTCGTTTTTGGGAGGGGTTTCGTTTTTAAAGTTTTGTA
TTTATAGGTAGATTGAGTCGGCTAGGGTTTTTCGTTATGTTGGGTATTGGTAGTCGATTATTAGAGAGGTTTTGAAAGGAAAGG
GGGTATTATTTAAGAATTATAAGATTTTTAGTTAGAAATGGGGACGGTTAGGGTTTTTGGATTCGCGAAAGGGGATATTTTCGGAA
GTAGAAAAGAAAAATTGTTTTAATTATTTTCGTTTTTGGTTTTAGTGTATATATAGCGTATGTGTAAGGTTATTTGGTTTTAGGTG
CGTTTCGCTATAGTTTTATTATAAATTAGATTATAATTATAATTGTCGAGAAATAAAGGGGTT

```

รูปที่ 18 ตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* บนไพรโมเตอร์

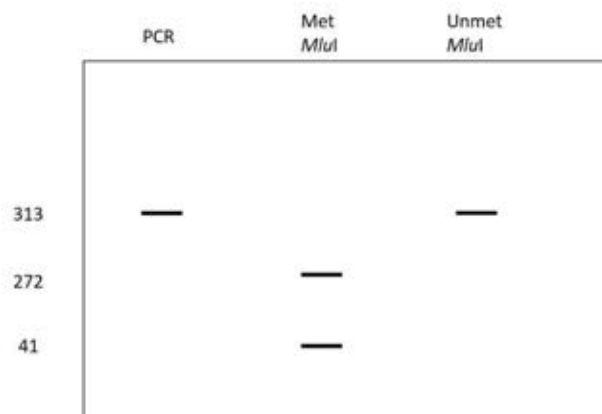
```

TAACGAGGGGTCGGGAAAATAATTCGGGTATAGCGAGTGAAAAATCGAGAAGCGAATGTAGTTGCGTTTGGAGAAGGGGGT
TGAGAAGCGATATTTAGTAGGGTTTTGAAGAATGGGAGTTTTAGAGTCGGGTGGCGGGTGGGATTGGGTTTTCGGATAGATTA
CGTGTAATTCGTTAGGATATAGGGAGCGAGGGGCGGGGGGGCGGTAGAGCGCGGGCTTTTATTTTTTAGTTTGGGATTGCG
GTTATTGGATACGAGGGTCGGGAAGTTTTTTTTCGGCGTCGATTGGAGTTTAGCGTGTGGCGGTAGTAAGAAGTTGAGGTAAG
CGGGTTTCGGGTTTAAACGACGCGTTTTAGTTTTTTTTGGGTTTCGGGTTTTTTTCGGGTAATAAGAGGTCGTTGTTGGGTCGGG
ATTTTTTAGGCGTTTTAGACGGGCGGGTTTTCGGGTTTCGGACGGTTAATTCGAGTATTTTTATTTGTTTTGAGGTTTATTTT
ATTACGTTTCGGTTTTCGTAGACGTTTCGGTTAGTGTTCGCGATTGAGTTGCGGTAGTCGTTGTTAAGGTTTTGCGGGGACGGG
GGCGGAGTTTATTCGAGGTAGAGGGTTAGGTTTCGTTTTTTAAATTTTCGTTTTTTGGGAGGGGTTTCGTTTTTAAAGTTTTGTA
TTTATAGGTAGATTGAGTCGGCGTAGGGTTTTTCGTTATGTTGGGTATTGGTAGTCGATTTATTAGAGAGGTTTTGAAAGAAAGG
GGGTATTATTTAAGAATTATAAGATTTTTAGTTAGAAATGGGGACGGTTAGGGTTTTGGATTCGCGAAAGGGATAATTCGGAA
GTAGAAAAGAAAATGTTTTTAATTTATTTGTTTTGTTTTAGTGTATATATAGCGTATGTGTAAGGTTATTTGGTTTTAGGTG
CGTTTGCATAGTTTTATTTATAAATTAGATTATAATTATAATTGTCGAGAAAATAAAGGGGTT

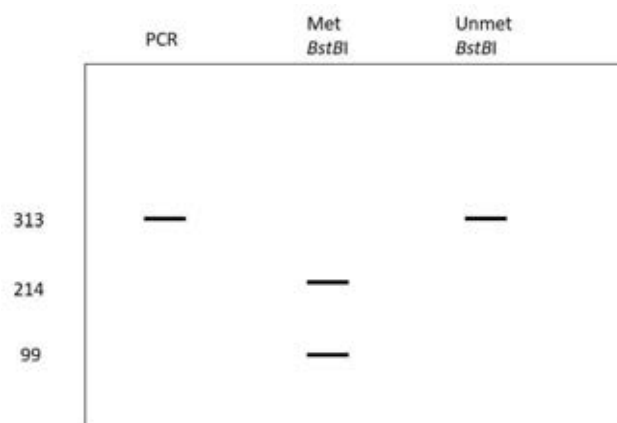
```

รูปที่ 19 ตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *BstBI* บนโพรโมเตอร์

จากรูปที่ 18 และ 19 สรุปได้ว่าเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* อยู่ตำแหน่งที่ 353 บนโพรโมเตอร์ และเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *BstBI* อยู่ตำแหน่งที่ 410 บนโพรโมเตอร์ ถ้าใช้ forward primer 1 กับ reverse primer 5 จะตัด PCR product และมีขนาดของ PCR product ที่ตัดได้เป็นไปตามรูปที่ 20 และ 21 ตามลำดับ



รูปที่ 20 PCR Product ของ *MluI*



รูปที่ 21 PCR Product ของ *BstBI*

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ PCR

เมื่อวัดค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ และพบว่าสามารถนำมาใช้ในการทดลองได้ เมื่อวัสดุต่างๆพร้อมใช้สำหรับการทดลอง ขั้นตอนต่อมาจึงเป็นขั้นตอนของกระบวนการ PCR และตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

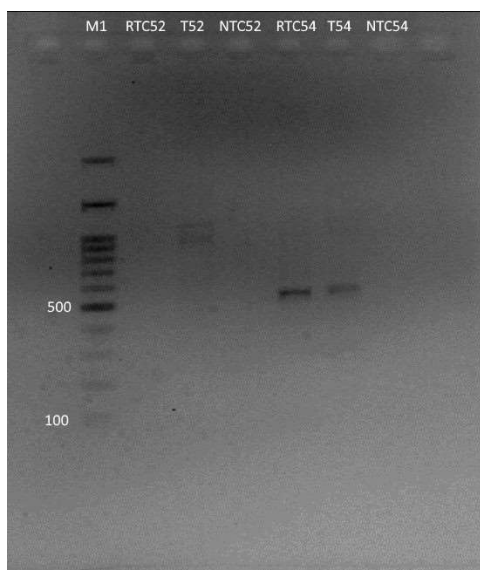
ตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

หลังจากที่ได้ทำ PCR โดยที่ PCR products มีขนาด 520 bp โดยทดสอบสองเงื่อนไข annealing ที่อุณหภูมิ 52 และ 54 องศาเซลเซียส โดยครั้งแรกที่ได้ทำ ได้ออกแบบไพรเมอร์ไว้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลของการออกแบบไพรเมอร์และคุณสมบัติของไพรเมอร์ของยีน *GDF5* Methylation ในครั้งแรก

| Primer (8) | Primer sequences (5' to 3') | Length | Tm (°C) | C:G content (%) | PCR products size (bp) |
|------------------|-----------------------------|--------|---------|-----------------|------------------------|
| Forward primer 0 | GAGTGCAAAAACCGAGAAGC | 20 | 60.00 | 50.00 | 520 |
| Reverse primer 1 | CTCAATCGCGGAGCAACTA | 19 | 60.10 | 52.63 | |

จะเห็นว่าบริเวณไพรเมอร์นั้นยังมีลำดับเบส CG ติดอยู่ด้วยแล้วจะสังเกตเห็นว่าเบส C ยังเหลืออยู่ในไพรเมอร์ forward เมื่อทำการ PCR ออกมาจะได้ตามรูปที่ 22



รูปที่ 22 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

หมายเหตุ M1 คือ marker

RTC52 คือ DNA control ที่ใช้ annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส

T52 คือ DNA control ที่ใช้ annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส

NTC52 คือ non template DNA control ที่ใช้ annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส

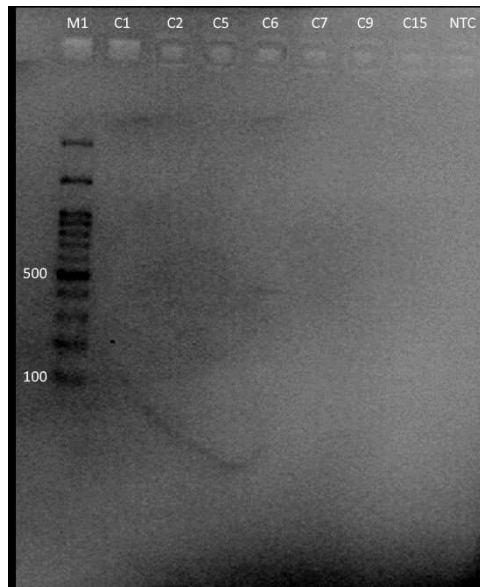
RTC54 คือ DNA control ที่ใช้ annealing ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส

T54 คือ DNA control ที่ใช้ annealing ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียสและ

NTC54 คือ non template DNA control ที่ใช้ annealing ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 22 จะเห็นว่าแถบดีเอ็นเอขึ้นในเงื่อนไข annealing ที่ 54 องศาเซลเซียส และมีขนาด PCR products อยู่ระหว่าง 500-600 bp ซึ่งเป็นไปตามที่ได้ออกแบบไพรเมอร์ไว้ ดังนั้นทำให้เงื่อนไขนี้สามารถนำไปใช้ในการทดลองในครั้งนี้ ส่วน เงื่อนไข annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส ไม่มีแถบดีเอ็นเอขึ้นจึงไม่สามารถนำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้

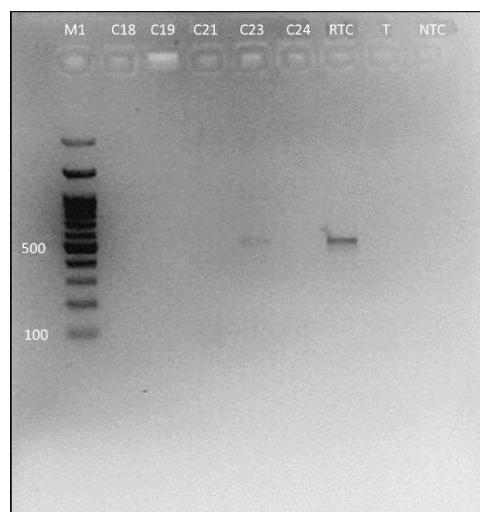
เมื่อทำการทดลองครั้งที่ 2 กับตัวอย่างดีเอ็นเอผู้ป่วยที่ได้ทำการไบซัลไฟต์มาแล้วปรากฏว่าบนเจลไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเออยู่เลย ดังรูปที่ 23 แต่เนื่องจากไม่มี Positive control จึงไม่สามารถหาข้อสรุปได้ว่าเหตุใดผลจึงปรากฏแบบนี้ อาจเป็นเพราะข้อผิดพลาดของผู้ปฏิบัติการทดลองในการทำการทดลอง อาจเกิดจากการดีเอ็นเอที่เสื่อมสภาพแล้ว หรืออาจเกิดจากการออกแบบไพรเมอร์



รูปที่ 23 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสกับ ตัวอย่างดีเอ็นเอผู้ป่วยที่ได้ทำการไบซัลไฟต์

หมายเหตุ M1 คือ marker
C1-C15 คือ DNA control
NTC คือ non template DNA

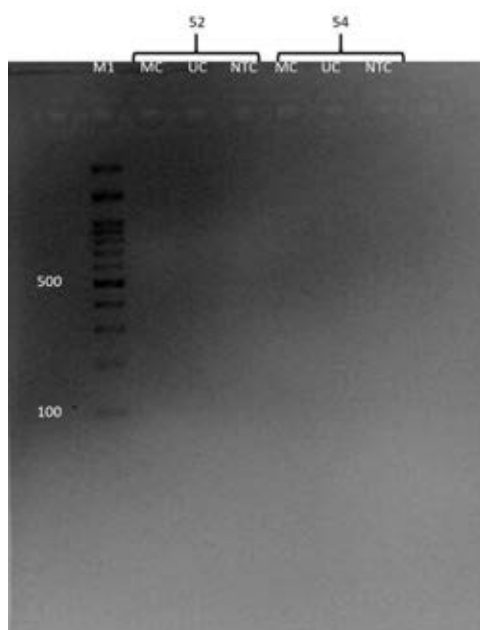
ดังนั้นเมื่อทำการทดลองครั้งที่ 3 จึงได้ Positive control ในครั้งแรกลงไปด้วยในการทดลอง ดังรูปที่ 24 จะเห็นว่าบางแถบดีเอ็นเอก็ปรากฏแถบดีเอ็นเอบางแถบก็ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเออยู่เลย



รูปที่ 24 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสกับ ตัวอย่างดีเอ็นเอผู้ป่วยที่ได้ทำการไบซัลไฟต์ โดยที่ให้ T และ RTC เป็น Positive control

ด้วยขั้นตอนนี้จึงทราบว่ามีความผิดพลาดในการออกแบบไพรเมอร์ทำให้บางแถบดีเอ็นเอก็ปรากฏแถบดีเอ็นเอบางแถบก็ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเออยู่เลย เพราะบริเวณไพรเมอร์ที่มีเบส CG อยู่ แล้วลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผิดพลาดในการทำไบซัลไฟต์จึงทำให้ผลการทดลองไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง นอกจากนั้นแล้ว Positive control ยังเป็นดีเอ็นเอ ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์จึงไม่สามารถนำมาเป็น positive control ได้จึงต้องใช้ Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers) (Zymoresearch, USA) ในการทดลองและใช้โปรแกรม Bisearch (<http://bisearch.enzim.hu/>) แทน Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) เพื่อการทำไบซัลไฟต์ที่ถูกต้อง และจะได้ไพรเมอร์ใหม่ตามตารางที่ 1 และขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว

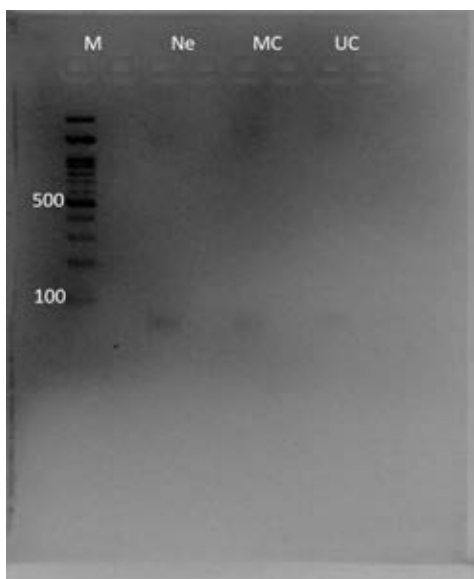
เมื่อนำไพรเมอร์ชุดที่ 2 ที่ออกแบบตามตารางที่ 1 โดยใส่ positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers) (Zymoresearch, USA) ในการทดลอง



รูปที่ 25 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 1 กับ positive control ที่เป็น Human Methylated (MC) & Non-methylated(UC) DNA Set (DNA w/ primers)

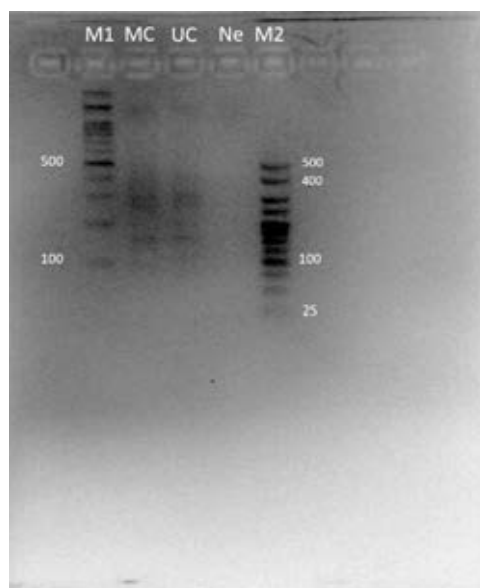
จากรูปที่ 25 จะเห็นว่าเมื่อทำการทดลองครั้งที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ชุดที่ 2 ตามตารางที่ 1 กับ Positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers) ปรากฏว่าบนเจลไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเออยู่เลย ซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่าอุณหภูมิค่า T_m ($^{\circ}\text{C}$) ที่มีค่า

แตกต่างกันมากจึงทำให้ในขั้นตอน annealing ไม่สามารถทำได้โดยในการทดลองนี้ได้ตั้งอุณหภูมิ annealing ไว้ที่ 50 และ 54 องศาเซลเซียส นี่จึงเป็นผลที่ทำให้การทดลองในครั้งนี้ไม่สำเร็จ และหลังจากนั้นได้ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองในครั้งนี้แล้วแต่เปลี่ยนอุณหภูมิ annealing เป็น 52 องศาเซลเซียสจะได้ผลตามรูปที่ 26 ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลยืนยันการทดลองที่ผ่านมาว่าไพรเมอร์คู่นี้ไม่สามารถนำมาใช้ได้



รูปที่ 26 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟลิซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 1 กับ Positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers) โดยเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing เป็น 52 องศาเซลเซียส

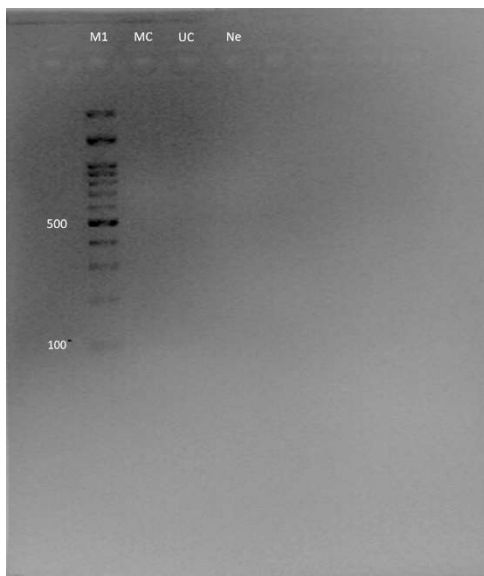
เมื่อนำไพรเมอร์ชุดที่ 3 ที่ออกแบบตามตารางที่ 2 โดยใส่ Positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers) (Zymoresearch, USA) ในการทดลอง แล้วตรวจสอบอุณหภูมิ T_m ($^{\circ}\text{C}$) ด้วยโปรแกรมและ Oligo CalC เพื่อป้องกันข้อผิดพลาดที่อุณหภูมิอีกจะได้ผลตามรูปที่ 27



รูปที่ 27 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 2 กับ Positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers)

จากรูปที่ 27 จะเห็นว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นในเจลของ methylated DNA และ unmethylated DNA แต่เนื่องจากการออกแบบไพรเมอร์ชุดนี้ขนาดของ PCR product เท่ากับ 422 bp แต่ผลที่ได้จากรูปที่ 27 มี PCR product ทั้งบริเวณประมาณ 100-200 bp และบริเวณ 300-400 bp ซึ่งทั้งสองบริเวณนี้ไม่ใช่บริเวณตามที่ออกแบบไว้ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะไพรเมอร์มีการจับที่ non-specific จึงไม่สามารถนำไพรเมอร์ชุดนี้มาใช้ในการทำงานได้

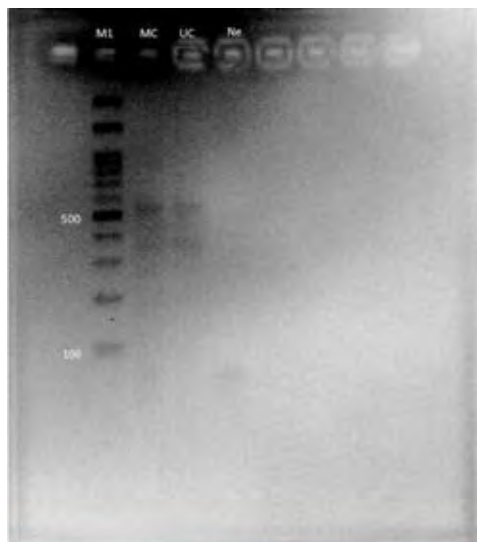
ทำการทดลองหาไพรเมอร์ชุดที่ 4 ได้ผลการออกแบบตามตารางที่ 3 โดยใส่ Positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers) (Zymoresearch, USA) ในการทดลอง โดยที่ยังคง forward primer ไว้ดั้งเดิมจะได้ไพรเมอร์ออกมาตามรูปที่ 28



รูปที่ 28 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 3 ของ reverse primer 4 กับ Positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers)

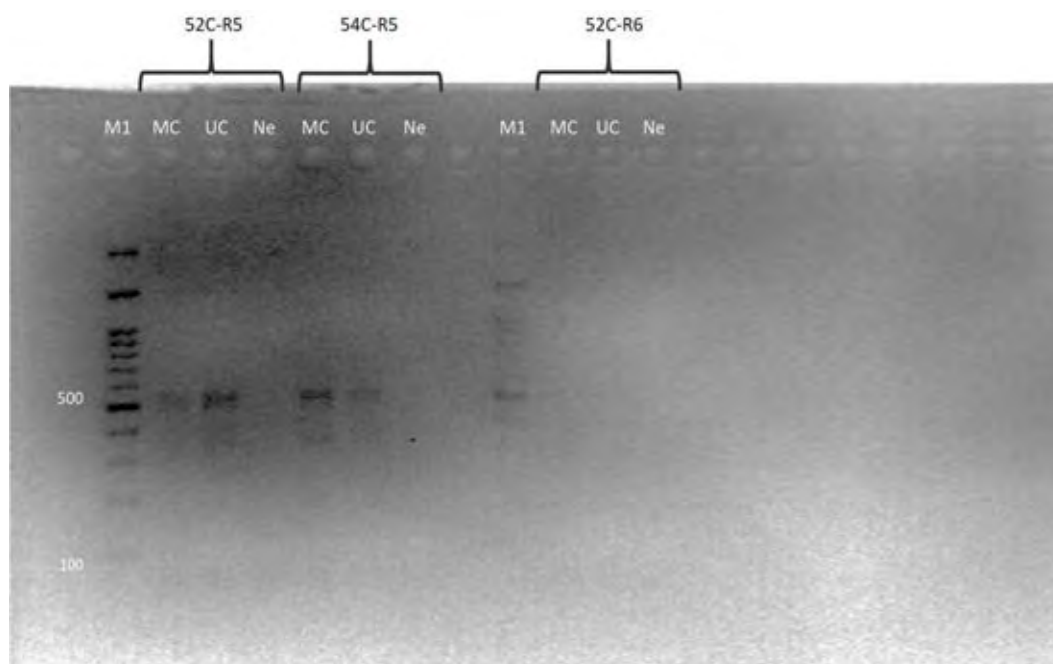
จากรูปที่ 28 จะเห็นว่าในการทดลองครั้งนี้ของไพรเมอร์ที่ใช้ reverse 4 ตามตารางที่ 3 ไม่เห็นแถบดีเอ็นเอขึ้นบนเจลเลยจึงไม่สามารถใช้ไพรเมอร์ชุดนี้ในการทดลองได้

ทำการทดลองหาไพรเมอร์ชุดที่ 5 ที่ได้ผลจากการออกแบบตามตารางที่ 3 โดยใช้ positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers) (Zymoresearch, USA) ในการทดลอง โดยที่ยังคง forward primer ไว้ดั้งเดิมจะได้ไพรเมอร์ออกมาตามรูปที่ 29



รูปที่ 29 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลิอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรมเมอร์ตามตารางที่ 3 ของ reverse primer 5 กับ Positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers) โดยในการทดลองครั้งนี้ใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 29 จะเห็นว่าแถบดีเอ็นเอขึ้น 2 บริเวณคือบริเวณ 300-400 bp และ 500-600 bp ซึ่งขนาด PCR product ที่ได้ออกแบบมาตามตารางที่ 3 มีขนาดเท่ากับ 313 bp ดังนั้นจากรูปที่ 29 มีบริเวณที่อยู่ในช่วงที่ต้องการแต่ก็มีบริเวณที่ไม่ต้องการด้วย จึงต้องทำการทดลองเพิ่มเติมโดยจะเปลี่ยนอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ให้เท่ากับ 52 องศาเซลเซียสและ 54 องศาเซลเซียส ดังรูปที่



รูปที่ 30 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 3 ของ reverse primer 5 และ reverse primer 6 กับ Positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers)

หมายเหตุ 52C-R5 คือ PCR product ที่ใช้ reverse primer 5 และมีขั้นตอน ที่ใช้

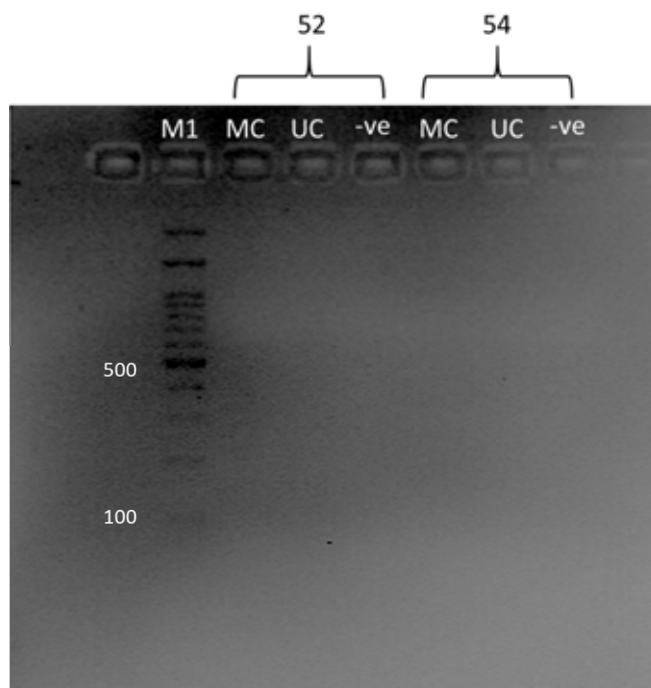
อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 52 องศาเซลเซียส

54C-R5 คือ PCR product ที่ใช้ reverse primer 5 และมีขั้นตอนที่ใช้อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 54 องศาเซลเซียส

52C-R6 คือ PCR product ที่ใช้ reverse primer 6 และมีขั้นตอนที่ใช้อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 52 องศาเซลเซียส

จะเห็นว่าจากรูปที่ 30 ในการทดลองที่ใช้ reverse primer 5 โดยที่เปลี่ยนอุณหภูมิ annealing เป็น 52 และ 54 องศาเซลเซียส (52C-R5, 54C-R6) ตามลำดับผลที่ได้ยังคงขึ้นแถบดีเอ็นเอเหมือนครั้งก่อนตามรูปที่ 29 และได้ทำการทดลองโดยใช้ reverse primer 6 ที่อุณหภูมิ annealing 52 องศาเซลเซียส จะเห็นว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นบนเจล จึงทำ reverse primer 6 ไม่สามารถใช้ในการทดลองได้

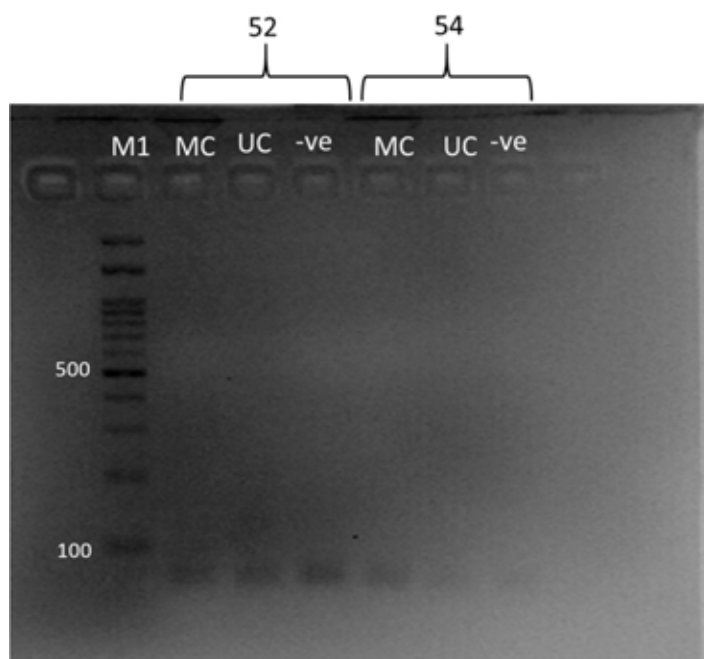
ทำการทดลองหาไพรเมอร์คู่ที่ 7 ในครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม MethPrimer ได้ผลจากการออกแบบตามตารางที่ 4 โดยใส่ positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers) (Zymoresearch, USA) ในการทดลองได้ผลการทดลองตามรูปที่ 31



รูปที่ 31 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลิเล็กโทรโฟริซิสด้วยไพรมเมอร์ตามตารางที่ 4 ที่ได้จากโปรแกรม MethPrimer โดยใช้ Positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers)

จะเห็นว่าจากรูปที่ 31 ทำการทดลองโดยใช้ forward primer 3 และ reverse primer 7 ที่อุณหภูมิ annealing 52 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ annealing 54 องศาเซลเซียส จะเห็นว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นบนเจล จึงทำ ไพรมเมอร์คู่นี้ไม่สามารถใช้ในการทดลองได้ และหลังจากนั้นได้ทำการทดลองซ้ำโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบและเพิ่มความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เพื่อที่จะให้ Taq polymerase ทำงานได้ดีขึ้นแต่ยังไม่ประสบความสำเร็จ

ทำการทดลองหาไพรมเมอร์คู่ที่ 8 ในครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม MethPrimer ได้ผลจากการออกแบบตามตารางที่ 4 โดยใส่ positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers) (Zymoresearch, USA) ในการทดลองได้ผลการทดลองตามรูปที่ 32

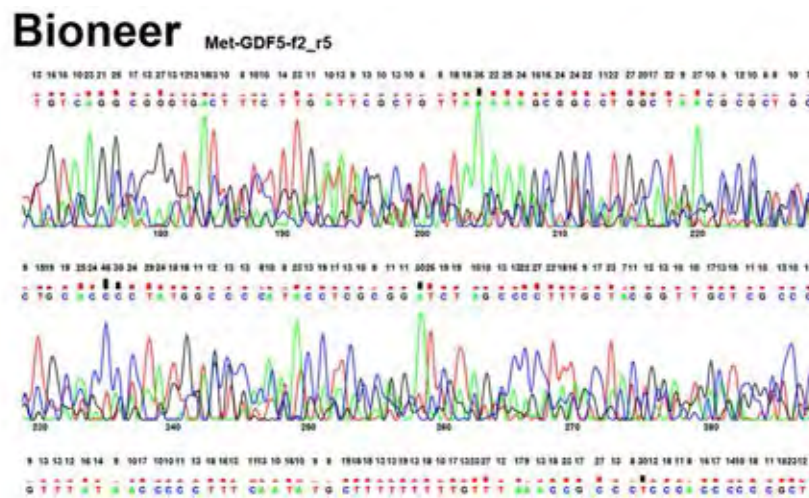


รูปที่ 32 ผลการทำ PCR products ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยไพรเมอร์ตามตารางที่ 4 ที่ได้จากโปรแกรม MethPrimer โดยใช้ Positive control ที่เป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers)

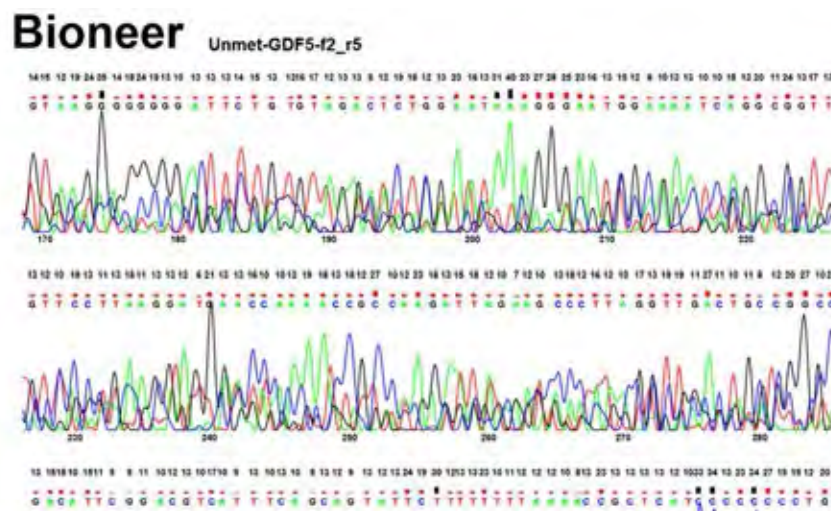
จะเห็นว่าจากรูปที่ 32 ทำการทดลองโดยใช้ forward primer 4 และ reverse primer 7 ที่อุณหภูมิ annealing 52 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ annealing 54 องศาเซลเซียส จะเห็นว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นบนเจล จึงทำ ไพรเมอร์คู่นี้ไม่สามารถใช้ในการทดลองได้หลังจากนั้นได้ทำการทดลองซ้ำโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบและเพิ่มความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เพื่อที่จะให้ Taq polymerase ทำงานได้ดีขึ้นแต่ยังไม่ประสบความสำเร็จ

ตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วยการส่ง Sequencing

จากไพรเมอร์คู่ที่ 5 ที่ได้ทำการทดลองทำ PCR และ run gel electrophoresis แล้วได้ผลดังรูปที่ 23 จะเห็นว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นสองแถบที่บริเวณคือบริเวณ 300-400 bp และ 500-600 bp ซึ่งขนาด PCR product ที่ได้ออกแบบมาตามตารางที่ 3 มีขนาดเท่ากับ 313 bp ดังนั้นจากรูปที่ 23 มีบริเวณที่อยู่ในช่วงที่ต้องการแต่ก็มีบริเวณที่ไม่ต้องการปนมาด้วยทำให้จะต้องทำการตัดเจลซึ่งในการตัดเจลจะตัดเจลในบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการนั่นก็คือบริเวณ 300-400 bp ทั้งบริเวณของ methylated DNA และ unmethylated DNA และหลังจากนั้นนำเจลไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR Purification Mini Kit (Favorgen biotech, Taiwan) และส่งไปตรวจกับบริษัท U2bio ผลที่ได้จากการส่ง sequencing จะได้ตามรูปที่ 33 และ 34



รูปที่ 33 ผลจากการส่ง sequencing ของไพรเมอร์คู่ที่ 5 ตัดเจดในบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ
นั่นคือบริเวณ 300-400 bp ของ methylated DNA



รูปที่ 34 ผลจากการส่ง sequencing ของไพรเมอร์คู่ที่ 5 ตัดเจดในบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ
นั่นคือบริเวณ 300-400 bp ของ unmethylated DNA

จะเห็นว่าจากรูปที่ 26 และ 27 ที่เป็นผลจากการทำ sequencing ผลที่ได้จากกราฟนั้นมีขนาดหลายพีคมากจึงไม่สามารถอ่านค่าลำดับเบสดีเอ็นเอได้ และเมื่อนำลำดับดีเอ็นเอบางส่วนมาทำการ BLAST โดยใช้ NCBI ในการ BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) จะเห็นว่าผลที่ทำการ BLAST มานั้นไม่ตรงกับยีน *GDF5* หรืออยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 20 จึงทำให้ PCR product ที่ได้มาจากการทดลองนี้ไม่ตรงกับที่ออกแบบไว้ในตอนแรกทำให้การทดลองนี้ไม่สามารถใช้ได้

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

จากการศึกษาค้นคว้าหาข้อมูลยีน *GDF5* เป็นยีนเข้ารหัสที่ทำหน้าที่หลังสาร TGF-beta (transforming growth factor-beta) เป็น superfamily โพรตีน และโปรตีนเข้ารหัสที่ยีนนี้สร้างจะมีหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของเนื้อเยื่อและเซลล์หลายชนิดรวมทั้งกระดูกอ่อน ข้อต่อ ฟันและการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาท axon และ dendrites (NCBI, 2019 : online) จึงคาดว่ายีนนี้เหมาะสมกับการทดลองทำงานวิจัยเนื่องด้วยข้อเข้าเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากกระดูกอ่อนที่ผิดปกติ

การหาโพรโมเตอร์จะเห็นว่าโพรโมเตอร์ที่เลือกมานั้นจะต้องเป็นโพรโมเตอร์ที่มี CpG island สูง (Yamashita, Hosoda, Nishizawa, Katoh and Watanabe, 2018) เนื่องจากบริเวณที่มี CpG island จะมีลำดับเบสไซโตซีนที่ติดกับเบสกวานีน ซึ่งจะเป็นบริเวณที่มีหมู่เมทิลเข้ามาจับที่เบสไซโตซีนเมื่อเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ซึ่งจะตรงกับที่ต้องการจะศึกษาถ้าตำแหน่ง CpG island น้อยเบสไซโตซีนที่ติดกับเบสกวานีนอาจจะไม่ถูกดีเอ็นเอเมทิลเลชันเลยก็ได้ ก็จะทำให้ไม่สามารถนำไปศึกษาต่อได้

จากผลของการคัดเลือกเอ็นไซม์ตัดจำเพาะและการออกแบบไพรเมอร์ จะเห็นว่าการออกแบบไพรเมอร์มีความซับซ้อนเพราะในขั้นตอนการทำ COBRA จำเป็นจะต้องออกแบบไพรเมอร์ให้สามารถจับได้ทั้ง methylated และ unmethylated DNA (Eads and Laird, 2002) และตำแหน่งที่สามารถนำเอ็นไซม์ตัดจำเพาะได้โดยส่วนมากจะมีเพียงตำแหน่งเดียว ซึ่งจะแตกต่างจากวิธี Methylation-specific PCR (MSP-PCR) ที่ไม่ต้องใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และสามารถศึกษาได้หลายตำแหน่งเนื่องด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อ methylated DNA และ unmethylated DNA (Herman, Graff, Myöhänen, Nelkin and Baylin, 1996)

โดยครั้งแรกที่ทำการทดลองไม่ได้พิจารณาตำแหน่ง CG บนไพรเมอร์ และในการทดลองในครั้งแรกได้ทำกับดีเอ็นเอที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์จึงทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นบนเจลแต่เมื่อมาทำการทดลองครั้งที่ 2 และ 3 กับดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์มาแล้วจะเห็นว่าผลการทดลองไม่เป็นไปตามที่คาดหวังแถบดีเอ็นเอบางแถบปรากฏบ้างแถบไม่ปรากฏ ซึ่งมาจากความผิดพลาดในการออกแบบไพรเมอร์และการเปลี่ยนลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ในการไบซัลไฟต์จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนวิธีการออกแบบไพรเมอร์ใหม่โดยใช้ Bisearch (<http://bisearch.enzim.hu/>) เพราะเป็นโปรแกรมที่สามารถออกแบบไพรเมอร์ในการใช้ไบซัลไฟต์มาแล้วได้ (Tusnády, Simon, Váradi and Arányi, 2005) จึงได้ไพรเมอร์คู่ใหม่ที่ไม่มีบริเวณที่เป็น

เบส CG อยู่ ซึ่งได้ PCR product คือ 375 bp หลังจากการทดลองจะเห็นว่ายังไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้นบนเจลจึงทำให้ไพรเมอร์ในครั้งนี้อาจไม่สามารถนำมาใช้ได้เนื่องจากอุณหภูมิ forward primer และ reverse primer มีความแตกต่างกันมากถึง 6.9 องศาเซลเซียสจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลของ PCR ไม่ขึ้น จึงต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่โดยในครั้งนี้อาจใช้โปรแกรม Primer3 แทนด้วยข้อจำกัดในการหาไพรเมอร์ของ Bisearch ทำให้อุณหภูมิ T_m ($^{\circ}\text{C}$) ที่ได้จากการคำนวณและการสังเคราะห์ไพรเมอร์จริงไม่ตรงตามที่ออกแบบไว้ จึงใช้โปรแกรม Primer3 แทน แล้วตรวจสอบอุณหภูมิ T_m ($^{\circ}\text{C}$) ด้วยโปรแกรมและ Oligo Calc เพื่อใช้ในการยืนยันอีกครั้งหนึ่งและช่วยกลับเบสคู่สมของ reverse primer ให้อยู่ทิศ 5' ไป 3' ด้วย (Kibbe, 2007) และจึงไปพิจารณาเลือกเอ็นไซม์ที่มีไพรเมอร์นี้ครอบคลุม ซึ่งจากการศึกษาได้แนะนำให้ออกแบบไพรเมอร์หลีกเลี่ยงบริเวณ CG แต่ในความเป็นจริงนั้นสามารถเลือกสิ่งไพรเมอร์แบบ degenerated primer (C/T) ซึ่งจะทำให้หมดปัญหาค่าเปอร์เซ็นต์ GC ต่ำและยังมาต้องคำนึงถึงตำแหน่งของ CG อีกด้วย

เนื่องจากมีไพรเมอร์คู่ใหม่จึงจำเป็นต้องคัดเลือกเอ็นไซม์ใหม่จะเห็นว่าการคัดเลือกเอ็นไซม์ดูได้จากหลายปัจจัยจะเห็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ตัด methylated และ unmethylated DNA มีหลายชนิดแต่ก็จะเลือกตัวที่ตัดเพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่งเท่านั้นเพื่อที่จะได้เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง methylated และ unmethylated DNA ได้ นอกจากนั้นยังคำนึงถึง PCR Product เพราะว่าเมื่อตัดมาแล้วถ้าสั้นไป หรือ ยาวไป เมื่อทำเจลอเล็กโทรโฟรีซิสก็อาจจะไม่เห็นแถบดีเอ็นเอได้ จึงได้เลือกเอ็นไซม์ที่น่าสนใจอยู่ 2 ตัวเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* และ *BstBI* เพราะว่ามีตำแหน่งตัดจำเพาะที่จดจำและมีตำแหน่งตัดเพียงตำแหน่งเดียวไม่เหมือนกับ *HinP1* และ *HhaI* ที่มีตำแหน่งตัดหลายตำแหน่ง จึงไม่เหมาะสมในการทำ โดยที่ *MluI* อยู่ตำแหน่งที่ 353 บนโพรโมเตอร์ และ *BstBI* อยู่ตำแหน่งที่ 410 บนโพรโมเตอร์ หลังจากที่ได้ทำการทดลองไพรเมอร์ที่พอนำมาใช้ในการคัดเลือกเอ็นไซม์ได้คือไพรเมอร์ชุดที่มี forward 1 และ reverse 5 ที่ได้ขนาดของ PCR product ตามที่ได้ออกแบบไว้ในโปรแกรมจึงนำมาคัดเอ็นไซม์ได้ดังนี้ เมื่อมี PCR product เท่ากับ 313 ถ้าเลือกใช้เอ็นไซม์ *BstBI* จะตัดขนาดของ PCR product ที่ methylation ได้ 214, 99 bp ดังนั้นจึงเลือกใช้เอ็นไซม์ *BstBI* เพราะถ้าเลือกใช้เอ็นไซม์ *MluI* จะตัดขนาดของ PCR product ที่ methylation ได้ 272, 41 bp ซึ่ง 41 bp อาจจะเล็กลงไปเมื่อทำการรันเจลแล้วดีเอ็นเออาจจะหลุดออกนอกเจลไปได้จึงไม่เลือกนำมาใช้ จึงสรุปได้ว่าควรใช้เอ็นไซม์ *BstBI* เพราะความเหมาะสมในการทำเจลอเล็กโทรโฟรีซิส

จากผลการทำ PCR ในครั้งแรก ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอตัวอย่างเพื่อทดสอบเงื่อนไขการทำงานและตรวจสอบความถูกต้องของการออกแบบไพรเมอร์และการเลือกเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ จะ

เห็นว่าจากตัวอย่างดีเอ็นเอ RTC และ T จะทดสอบทั้งหมด 2 เงื่อนไข เพื่อที่จะกำหนดชั้นของอุณหภูมิในการทำ PCR ในขั้น Annealing ซึ่งกำหนดไว้ 2 อุณหภูมิ นั่นก็คือ 52 และ 54 องศาเซลเซียส จากผลจะเห็นว่าช่องที่อยู่ในเงื่อนไข 54 องศาเซลเซียส จะเห็นแถบปรากฏอยู่บนตัวเจล หลังจากที่ทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความแตกต่างของอุณหภูมิทำให้ amplified DNA ขึ้นหรือไม่ขึ้นก็เพราะค่าความแตกต่างของค่า T_m จากไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้น ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบก่อนว่าการใช้อุณหภูมิจะต้องเท่าไร ก่อนลงมือจริงเสมอ แต่เมื่อทำการทดลองครั้งที่ 2 และ 3 กับดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการซัลไฟต์มาแล้วจะเห็นว่าผลการทดลองไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง แถบดีเอ็นเอบางแถบปรากฏบางแถบไม่ปรากฏ ทำให้ต้องมีการออกแบบไพรเมอร์อาจทำให้เงื่อนไขของอุณหภูมิในข้างต้นที่กล่าวไปนั้นจะต้องเปลี่ยนไปตามค่าคุณสมบัติของไพรเมอร์ใหม่ที่ได้ออกแบบไป

จากผลการทดลองทำ PCR กับชุดไพรเมอร์ที่ 2 ที่ได้เปลี่ยน positive control มาเป็น Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers) (Zymoresearch, USA) ซึ่งเป็น DNA control ที่ได้ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์มาแล้ว เพราะในครั้งก่อนไม่ได้ใช้ positive control ที่ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์ จึงทำให้ผลที่ไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง จากผลการทดลองที่ได้ยังไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้นบนเจลเนื่องจากอุณหภูมิของ forward primer 1 และ reverse primer 2 มีความแตกต่างกันถึง 6.9 องศาเซลเซียส สืบเนื่องมาจากการคำนวณด้วยโปรแกรมกับการสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีความคลาดเคลื่อน ทำให้ในการทดลองครั้งต่อไปใช้โปรแกรม Oligo Calc เพื่อใช้ในการยืนยันอุณหภูมิอีกครั้งหนึ่งอีก ซึ่งในการทดลองกับไพรเมอร์ชุดที่ 3 forward primer 1 และ reverse primer 3 จากผลการทดลองจะเห็นว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้นในช่วง 100-200 bp และ 300-400 bp ซึ่ง PCR product ขนาดที่เราต้องการคือ 422 bp (จากตารางที่ 2) นั้นหมายความว่า แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นมานั้นไม่ใช่ PCR product ที่ต้องการที่เป็นแบบนี้ เนื่องจากไพรเมอร์มีการจับ non-specific ขึ้นเพราะเมื่อได้ทำการนำไพรเมอร์นี้ไปทำการ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) จะเห็นว่าไพรเมอร์นี้จับได้หลายตำแหน่งมากจึงมีความเป็นไปได้ที่จะทำให้เกิดการจับ non-specific ขึ้นได้ หลังจากนั้นได้ทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อหาไพรเมอร์ใหม่โดยยังคงใช้ forward primer 1 ดังเดิมเพราะว่ามีอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์ CG ที่เหมาะสมแล้ว จึงออกแบบ reverse primer โดย reverse ที่ 4 และ 6 จะเห็นว่าทั้งสองชุดไพรเมอร์นี้ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้นอาจจะเป็นเพราะว่าไพรเมอร์ยังไม่เหมาะสมทำให้ยังไม่เกิดการจำเพาะในการจับไพรเมอร์ ส่วนในการทดลองที่ใช้ reverse 5 จากผลการทดลองจะเห็นว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้นบนเจลสองช่วงคือบริเวณ 300-400 bp และบริเวณ 500-600 bp ซึ่ง PCR product ที่

ต้องการคือ 313 bp (จากตารางที่ 3) ซึ่งก็ปรากฏแถบดีเอ็นเอบริเวณนั้นขึ้นเช่นเดียวกันเลยได้ทำการทดลองเพิ่มโดยปรับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing จาก 50 องศาเซลเซียสไปเป็น 52 และ 54 องศาเซลเซียสโดยที่คาดหวังว่าจะลดการจับของไพรเมอร์ที่เป็น non-specific ออกไปแต่ผลที่ได้ก็ยังคงเดิม จึงทำการทดลองเพิ่มเติมโดยการตัดเจลบริเวณที่สนใจแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปส่ง sequence เพื่อยืนยันว่าไพรเมอร์ได้จับบริเวณที่ได้ออกแบบไว้จริงหรือไม่

จากผลการส่ง sequence นั้นไม่สามารถอ่านค่าดังที่เห็นในรูปที่ 26 และ 27 จะเห็นว่าการอ่านในตำแหน่งหนึ่งมีหลายพีคจึงไม่สามารถอ่านค่าได้เหมือนเป็นเพียงค่ารบกวนเท่านั้น ที่เกิดเช่นนี้มีหลายสาเหตุคือ บริเวณที่ได้ตัดเจลนั้นจะเห็นได้จากรูปที่ 23 ว่า แถบดีเอ็นเอบริเวณนั้นค่อนข้างจางอยู่แล้ว ทำให้การส่ง sequence นั้นอาจมีตัวอย่างไม่เพียงพอ และอาจเป็นได้ว่าดีเอ็นเอที่เกิด amplify ขึ้นมานั้นเป็น non specific ทำให้ค่าที่อ่านได้เป็นเพียงค่าที่ถูกรบกวนเป็นส่วนใหญ่ เมื่อนำบริเวณดีเอ็นเอที่ส่ง sequence บางบริเวณที่สามารถพออ่านค่าได้นั้นไปทำการ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) จะได้ค่าที่อ่านได้ไม่ตรงกับยีน *GDF5* บริเวณโครโมโซมที่ 20 นั้นหมายความว่าบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น PCR product นั้นไม่ตรงกับที่ได้ออกแบบไว้ ส่วนการที่ BLAST ไม่ตรงนั้นเกิดได้จากการที่ผล sequence ที่มีการอ่านค่าได้ในระดับที่ไม่ดีทำให้ลำดับเบสผิดเพี้ยนไปและยังเกี่ยวข้องกับเอ็นเอที่เกิด amplify ขึ้นมานั้นเป็น non specific ด้วยเช่นกันซึ่งจะไม่ตรงกับยีนที่จะศึกษาอยู่แล้ว

ในการทดลองครั้งต่อมาโดยการออกแบบไพรเมอร์ออกมานั้นได้ใช้โปรแกรม MethPrimer ช่วยในการออกแบบ (Kurdyukov and Bullock, 2016) ซึ่งจากผลการออกแบบไพรเมอร์ตามที่แสดงตามตารางที่ 4 จะเห็นว่าการซ้ำของเบสอะดีนีนและเบสไทมีนมากซึ่งเป็นผลให้เปอร์เซ็นต์ GC ต่ำมากจึงส่งผลให้ประสิทธิภาพของไพรเมอร์ต่ำดังนั้นในการทำ PCR และรันเจลจึงไม่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นดังรูปที่ 24 และ 25 จึงจะเห็นว่าการออกแบบไพรเมอร์ไม่สำเร็จเช่นกัน

ในการทดลองทั้งหมดที่ผ่านมาจะเห็นว่าการออกแบบไพรเมอร์นั้นเป็นไปได้ยาก เนื่องจาก ไพรเมอร์มัก amplify PCR ที่ไม่จำเพาะเจาะจง เพราะกระบวนการไปซัลไฟต์จะทำให้มี A และ T ที่มากทำให้ไพรเมอร์นั้นเกิดการผิดพลาดในการเข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบได้ (Reynard et al., 2011) จึงได้ขอเสนอแนะว่ายีน *GDF5* นี้ควรใช้วิธีอื่นในการออกแบบเช่น Methylation-specific PCR (MSP-PCR) เนื่องจากว่ายีน *GDF5* นี้มีตำแหน่ง CG บนลำดับเบสมากซึ่งจะทำให้มีหลายตำแหน่งที่สามารถออกไพรเมอร์ได้ไม่ควรใช้ COBRA ที่จะต้องหาเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้เพียงตำแหน่งเดียวมาศึกษา

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษา

การหาตำแหน่งบริเวณบนยีนเพื่อนำมาศึกษา

ในการหาตำแหน่งที่จะนำมาศึกษาจะต้องใช้บริเวณไพรโมเตอร์เนื่องจากการศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้อยู่บนบริเวณของยีน *GDF5* และบริเวณ 1000 bp นี้มีบริเวณของเบส CG มากเหมาะสำหรับการศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

การหาเอนไซม์ตัดจำเพาะบนยีน *GDF5*

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาใช้คือเอนไซม์ *Bst*BI และ *Mlu*I ที่สามารถนำไปตัดบริเวณ methylated DNA ได้ และสามารถนำไปตรวจสอบดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้

การออกแบบไพรเมอร์หลังจากที่ลำดับเบสดีเอ็นเอผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์

การออกแบบไพรเมอร์จะต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่างประกอบกันเพื่อที่จะให้การทดลองประสบความสำเร็จซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องนั้นคือ ค่าเปอร์เซ็นต์ CG ไม่ควรต่ำกว่า 35 % ค่าอุณหภูมิ T_m ($^{\circ}\text{C}$) ระหว่าง forward primer และ reverse primer ไม่ควรห่างกันเกิน 5 องศาเซลเซียส ขนาดของ PCR product จำนวนซ้ำของเบสอะดีนีนและเบสไทมีน และยังต้องคำนึงถึงบริเวณที่เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดได้ด้วยเนื่องจากขั้นตอนการตรวจสอบดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี COBRA ได้ ซึ่งปัจจัยทั้งหมดที่กล่าวมาส่งผลกับ amplify ดีเอ็นเอในขั้นตอน PCR ทำให้ผลการทดลองประสบความสำเร็จได้

การทำ PCR และ run gel electrophoresis

ต้องมีการตรวจสอบอุณหภูมิในขั้น annealing ให้เหมาะสมกับการทำ PCR ในแต่ละครั้ง และเวลาในการทำงานของเครื่อง PCR ในขั้น extension เนื่องด้วยขนาดของ PCR product ในแต่ละครั้งนั้นไม่เท่ากัน และยังเพิ่มความเข้มข้นของ MgCl_2 ให้เป็น 3 mM ให้ Taq polymerase จับได้ดีขึ้น เพิ่มดีเอ็นเอต้นแบบเป็น 3 μl จากที่เคยใช้ 1 μl นอกจากนั้นในการทดลองทำ PCR ทุกครั้งจะต้องมีตัวควบคุมหรือ positive control ที่ใช้คือ Human Methylated & Non-methylated DNA Set (DNA w/ primers)

เนื่องจากปัจจัยที่ได้กล่าวมาข้างต้นในเรื่องการออกแบบไพรเมอร์นั้นลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน *GDF5* นี้มีข้อจำกัดที่ยีนได้ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์มาแล้วเบสที่ซ้ำมากขึ้นทำให้การทำงานของไพรเมอร์นั้นไม่สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ PCR ไม่สามารถ amplify ดีเอ็นเอได้หรือ amplify ได้ non specific ดีเอ็นเอ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปแนะนำให้ใช้วิธีอื่นในการ

ตรวจสอบดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เช่น Methylation-specific PCR (MSP-PCR) หรือ real time PCR น่าจะให้ผลการทดลองที่เหมาะสมกว่า

เอกสารอ้างอิง

- วิโรจน์ กวินวงศ์โกวิท. 2558. โรคข้อเข่าเสื่อม. *นิตยสารวาไรตี้เพื่อสุขภาพ* 21 : 1-2.
- Arden, N. et al., 2015. Can we identify patients with high risk of osteoarthritis progression who will respond to treatment? a focus on biomarkers and frailty. *Drugs & Aging*. 32 : 525–535.
- Bijlsma, J., Berenbaum, F., and Lafeber, F. 2011. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 377 : 2115-2126.
- Bomer, N. et al. 2015. Underlying molecular mechanisms of *DIO2* susceptibility in symptomatic osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 8 : 1571– 1579.
- Eads, C., and Laird, P., 2002. Combined bisulfite restriction analysis (COBRA). *DNA Methylation Protocols* 200 : 71-86.
- Elazeem, M., Abdelaleem, E., and Mohamed, R. 2017. Genetic influence of growth and differentiation factor 5 gene polymorphism (+104T/C) on the development of knee osteoarthritis and its association with disease severity. *Eur J Rheumatol* 4 : 98–103.
- Fernández-Moreno, M., Rego, I., Carreira-Garcia, V., and Blanco, F. 2008. Genetics in osteoarthritis. *Current Genomics* 9 : 542–547.
- Ge, X., Ritter, S., Tsang, K., Shi, R., Takei, K., and Aliprantis, A. 2016. Sex-specific protection of osteoarthritis by deleting cartilage acid protein 1. *PLoS One* 11 : 1–17.
- Herman, J., Graff, J., Myöhänen, S., Nelkin, B., and Baylin, S. 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 9821–9826.
- Hunter, D. and Felson, D. 2006. Osteoarthritis. *BMJ* 332 : 639–642.
- Hunter, D., Schofield, D., and Callander, E. 2014. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 10 : 437–441.

- Jin, B., Li, Y., and Robertson, K. 2011. DNA methylation superior or subordinate in the epigenetic hierarchy. *Genes Cancer* 2 : 607–617.
- Kandi, V. and Vadakedath, S. 2015. Effect of DNA methylation in various diseases and the probable protective role of nutrition: a mini-review. *Cureus* 7 : 309.
- Kibbe, W. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 35 : W43–W46.
- Kurdyukov, S., and Bullock, M. 2016. DNA methylation analysis: choosing the right method. *Biology (Basel)* 5 : 3.
- Leontiou, C., Hadjidaniel, M., Mina, P., Antoniou, P., Ioannides, M., and Patsalis, P. 2015. Bisulfite conversion of DNA : performance comparison of different kits and methylation quantitation of epigenetic biomarkers that have the potential to be used in non-invasive prenatal testing. *PLoS One* 10 : 1-24.
- Loughlin, J. 2015. Genetic contribution to osteoarthritis development: current state of evidence. *Rheumatology* 27 : 284–288.
- Moore, L., Le, T., and Fan, G. 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 38 : 23–38.
- NCBI, *NCBI Gene*. [online]. Available from : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8200> [2019, May 12]
- Reynard, L., Bui, C., Canty-Laird, E., Young, D., and Loughlin, J. 2011. Expression of the osteoarthritis-associated gene *GDF5* is modulated epigenetically by DNA methylation. *Human Molecular Genetics* 20 : 3450–3460.
- Reynard, L., and Loughlin, J. 2012. Genetics and epigenetics of osteoarthritis. *Maturitas* 71 : 200-204.
- Syddall, C., Reynard, L., Young, D., and Loughlin, J. 2013. The identification of trans-acting factors that regulate the expression of *GDF5* via the osteoarthritis susceptibility SNP rs143383. *PLoS Genetics* 7 : 1-11.
- Thysen, S., Luyten, F., and Lories, R. 2015. Targets, models and challenges in osteoarthritis research. *Disease Models & Mechanisms* 8 : 17-30.

- Tusnády, G., Simon, I., Váradi, A., and Arányi T. 2005. BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes. *Nucleic Acids Res* 33 : e9.
- Yamashita, K., Hosoda, K., Nishizawa, N., Katoh, H., and Watanabe, M. 2018. Epigenetic biomarkers of promoter DNA methylation in the new era of cancer treatment. *Cancer Sci* 12 : 3695-3706.
- Zakhari, S. 2013. Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res* 35 : 6-16.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
โปรแกรมที่ใช้ในการหาไพรมเมอร์

โปรแกรมที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ใช้ในการทดลอง

1. Primer 3



รูปที่ 35 ภาพหน้าจอเริ่มต้นของโปรแกรม Primer3 ในการออกแบบไพรเมอร์

(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)

สำหรับโปรแกรมนี้จะช่วยออกแบบไพรเมอร์ได้แต่ไม่สามารถใช้ได้กับบริเวณเบส CG ที่ได้ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์มาได้แล้วได้ สามารถกำหนดตำแหน่งไพรเมอร์ได้อย่างหายาๆแต่ต้องไปคำนวณเองต่อเนื่องด้วยการทำไบซัลไฟต์

2. OligocalC



รูปที่ 36 ภาพหน้าจอเริ่มต้นของโปรแกรม OligocalC ในการออกแบบไพรเมอร์

(<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)

โปรแกรม OligocalC นั้นจะช่วยในการตรวจสอบค่าอุณหภูมิ Tm ค่าเปอร์เซ็นต์ GC เหมาะสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ด้วยตนเองนอกจากนั้นยังช่วยกลับสายของเบสคู่สมใน reverse

primer อีกด้วย และยังเหมาะกับการตรวจสอบค่าอุณหภูมิ T_m ที่จะได้จริงเมื่อไพรเมอร์ถูกสังเคราะห์มาจากที่บริษัทจะทำให้ค่า T_m ในการทดลองไม่คลาดเคลื่อน

3. BiSearch

รูปที่ 37 ภาพหน้าจอเริ่มต้นของโปรแกรม BiSearch ในการออกแบบไพรเมอร์

(<http://bisearch.enzim.hu/?m=search>)

ในโปรแกรม BiSearch นี้จะช่วยออกแบบไพรเมอร์ที่ได้ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์มาแล้วแต่ยังมีการแนะนำคู่ไพรเมอร์ที่มีเบส CG อยู่และมีการคลาดเคลื่อนของค่า T_m มากทำให้มีการคลาดเคลื่อนในการทำการทดลองได้มาก

4. MethPrimer



รูปที่ 38 ภาพหน้าจอเริ่มต้นของโปรแกรม MethPrimer ในการออกแบบไพรเมอร์

(www.urogene.org/methprimer/)

โปรแกรมนี้จะช่วยออกแบบไพรเมอร์ที่ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์มาแล้วและยังคำนวณจำนวนเบส CG ที่อยู่บนบริเวณเบสที่ไพรเมอร์จับได้ แต่ยังมีข้อผิดพลาดเคลื่อนการคำนวณเปอร์เซ็นต์ CG และไม่ได้คำนึงถึงเบสที่ชั้นมากที่จะทำให้ไพรเมอร์ทำงานไม่ได้

5. UCSC In-Silico PCR



รูปที่ 39 ภาพหน้าจอเริ่มต้นของโปรแกรม UCSC In-Silico PCR ในการออกแบบไพรเมอร์

(http://rohsdb.cmb.usc.edu/GBshape/cgi-bin/hgPcr)

โปรแกรมนี้จะช่วยในการตรวจสอบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมานั้นสามารถใช้ได้กับการทดลอง PCR ในยีนที่กำลังศึกษาได้หรือไม่ แต่การใช้โปรแกรมนี้จะต่อคำนึงไพรเมอร์ที่กำลังศึกษานั้นผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์มาแล้วในการตรวจสอบอาจไม่แม่นยำได้

ภาคผนวก ข
สูตรการคำนวณสารในการทำ PCR

สูตรในการคำนวณสารในการทำ PCR

ตารางที่ 6 สูตรการคำนวณสารในการทำ PCR

| สาร | C1 | V1 (µl) | C2 |
|--------------------------------|----------|-----------|--------------|
| 10x reaction buffer | 10x | 2 | 1x |
| 50 mM MgCl ₂ | 50 mM | 0.8-1.2 | 2.0-3.0 |
| 10 mM dNTP mixture | 10 mM | 0.4 | 200 µm |
| Forward primer | 10 µm | 0.4 | 0.2 µm |
| Reverse primer | 10 µm | 0.4 | 0.2 µm |
| Template DNA | 50 ng/µl | 1-3 | 50-150 ng/µl |
| Taq DNA polymerase | 5u | 0.2 | 1u |
| Nuclease free H ₂ O | | 13.8-14.6 | |

จากตารางที่ 5 แสดงการคำนวณสารในการทำ PCR จะเห็นว่ามี การเปลี่ยนความเข้มข้น MgCl₂ และดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งในแต่ละครั้งทำเพื่อปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่ได้ ออกแบบมาในแต่ละครั้งเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุด แต่ในการทำการทดลองทุกครั้งจะได้ ปริมาตรสุดท้ายที่ 20 µl ทุกครั้ง

นอกจากนั้นการตั้งค่า PCR ก็เป็นสิ่งสำคัญในการทำ PCR เช่นกัน

ตารางที่ 7 การตั้งค่าเครื่อง PCR

| Protocol | Temperature (°C) | Time | Cycle |
|--------------------|------------------|--------------|-------|
| Initial activation | 94 | 3 นาที | 1 |
| Denaturation | 94 | 30 วินาที | 35 |
| Annealing | 50-54 | 15 วินาที | 35 |
| Extension | 72 | 25-40 วินาที | 35 |
| Final extension | 72 | 5 นาที | 1 |

จากตารางที่ 7 จะแสดงถึงการตั้งค่าเครื่อง PCR จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ annealing มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากค่า T_m ของคู่ไพรมอร์ที่ต่างกันในการออกแบบไพรมอร์ในแต่ละครั้ง เช่นเดียวกันกับเวลาที่เปลี่ยนแปลงไปในขั้น extension นั้นเกิดจากขนาดของ PCR product ในการออกแบบไพรมอร์ในแต่ละครั้ง