บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ประชากรและตัวอย่าง

1.1 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือก

1.1.1 กลุ่มผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินที่เข้ามาพบแพทย์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จำนวนทั้งสิ้น 36 ราย

1.1.2 กลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีซึ่งเป็นผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการแห่งชาติสภากาชาดไทย นิสิต / นักศึกษา และบุคลากรจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ซึ่งไม่เคยมีประวัติคนในครอบครัว หรือเครือญาติเป็นโรคสะเก็ดเงิน โรคมะเร็ง หรือโรคที่เกี่ยวข้องกับสารสื่อประสาทซีโรโทนิน จำนวนทั้งสิ้น 69 ราย

1.2 หลักเกณฑ์ในการคัดออก

1.2.1 กลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีที่มีประวัติคนในครอบครัวหรือเครือญาติเป็นโรคสะเก็ดเงิน โรคมะเร็ง หรือโรคที่เกี่ยวข้องกับสารสื่อประสาทซีโรโทนิน

1.2.2 ผลของ PCR product ไม่มีหรือไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบโดยการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ได้ทั้งกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี

2. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. เครื่อง Micro High Speed Refrigerated Centrifuge รุ่น VS-15000CFNII	Vision Scientific Co., Ltd	เกาหลีใต้
2. เครื่อง Cryocenyrifuge รุ่น Biofuge Stratos	Kendro Laboratory Product	เยอรมนี
3. เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) รุ่น FINE VORTEX	FINE PCR	เกาหลีใต้
4. เครื่อง Vacumm Concentrator (DNA SpeedVacs) รุ่น DNA110-230	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา

5. เครื่อง Block Heater รุ่น HB-1 และ HB-2	Wealtec Corp.	สหรัฐอเมริกา
6. เครื่อง Microcentrifuge รุ่น FORCE6	Arvada, Co., Ltd	สหรัฐอเมริกา
7. ตู้เย็น 4 °C	Hitachi	ญี่ปุ่น
8. ตู้แช่แข็ง -20 °C (TOP open Chest Freezer)	SANYO Electric Co., Ltd	ญี่ปุ่น
9. ตู้แช่แข็ง -80 °C (ULT Deep Freezer) รุ่น DF 8524	ilShin Lab Co., Ltd	เกาหลีใต้
10. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น PTC-200	MJ Research, Inc.	สหรัฐอเมริกา
11. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น GeneAmp PCR System 2400	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
12. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น PX2	Thermal Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
13. ชุดถ่ายภาพเจล (Transilluminator และ DOC-Print)	VILBER LOURMAT	ฝรั่งเศส
14. เครื่องถ่ายภาพเจล (GEL DOC 1000)	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
15. เครื่อง Power Supply รุ่น POWER PAC 200 และ 300	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
16. เครื่อง Power Supply รุ่น SX250 MightySlim PSU.	Hoefer, Inc.	สหรัฐอเมริกา
17. ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar Flow Cabinet)	E.S.I. FLUFRANCE	ฝรั่งเศส
18. เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น AB204-S CLASSIC	METTLER TOLEDO	สวิตเซอร์แลนด์
19. เครื่องอ่านค่าดูดกลืนแสง (Absorbance Photometer) รุ่น zenith 340 st	Anthos	ออสเตรีย
20. เครื่อง ELISA washer รุ่น M8/2R	TACAN	ออสเตรีย
21. เครื่อง HPLC รุ่น Schimadzu Scientific Instruments Chromatography LC-10AT/VP	Schimadzu Scientific Instruments	ญี่ปุ่น
22. เครื่องตรวจวัดเรืองแสง (Fluorescence detector) รุ่น RF-10A	Schimadzu Scientific Instruments	ญี่ปุ่น

23. เครื่องประมวลผลคอมพิวเตอร์ รุ่น VP version 6.10 software	Schimadzu Scientific Instruments	ญี่ปุ่น

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. Microcentrifuge tube (ขนาด 0.5 ml และ 1.5 ml) และ PCR tube	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
2. Centrifuge tube (ขนาด 15 ml และ 50 ml)	BioLogix Research	สหรัฐอเมริกา
3. Pipette tips (ขนาด 10, 200 และ 1000 µl)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
4. Auto pipette (ขนาด 20, 200 และ 1000 µl)	GILSON	ฝรั่งเศส
5. Auto pipette (ขนาด 20 µl)	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
6. Pipette Aid รุ่น Portable XP	Drummond Scientific	สหรัฐอเมริกา
7. Microtiter plates 96 wells cataloque number 439454	MaxiSorp, Nunc	สหรัฐอเมริกา
8. คอลัมน์ (revers-phase column) pinnace C18, column length; 150 mm, Inside diameter; 4.6 mm, particle size; 110 A°	Restex	สหรัฐอเมริกา
9. Integral HPLC Guard column	Restex	สหรัฐอเมริกา
10. Microvolume Syringe for Rheodyne and Valco Valves, Fixed Needle volume 100 µl, needle length x O.D. 2 in. x 0.028 in.	SGE Analytical Science Pty. Ltd.	ออสเตรเลีย
11. Sero pipettes (ขนาด 1, 5 และ 10 ml)	Henneberg-Sander GmbH	เยอรมนี

12. กระดาษกรอง (Regenerated cellulose, Aqueous solutions pH 3-12, solvent- resistant, pore size; 0.45 μm)	Sartorius	เยอรมนี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. ชุดน้ำยา FlexiGene DAN kit	QIAGEN	เยอรมนี
2. 100% isopropanol	Sigma	สหรัฐอเมริกา
3. Absolute ethanol	BDH	อังกฤษ
4. Ethyl alcohol grade A	BDH	อังกฤษ
5. ชุดน้ำยา MasterTaq kit	Eppendorf	สหรัฐอเมริกา
6. ชุดน้ำยา Taq PCRx DNA polymerase	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
7. ชุดน้ำยา RealTaq DNA polymerase	United Bioinformatica Inc.	แคนาดา
8. 50 และ 100 bp DNA ladder	New England BioLabs	สหรัฐอเมริกา
9. 100 mM dATP, dCTP, dGTP และ dTTP	Fermentas	สหรัฐอเมริกา
10. Agarose gel	ISC BioExpress	สหรัฐอเมริกา
11. Sense primer (100 pmol/μl) (5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATTGC-3') สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาความหลากหลายชนิด 5HTTLPR	BSU	ประเทศไทย
12. Anti-sense primer (100 pmol/μl) (5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACC AC-3') สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาความหลากหลายชนิด 5HTTLPR	BSU	ประเทศไทย

13. Sense primer (100 pmol/µl) (5'-TGG ATT TCC TTC TCT CAG TGA TTG G-3') สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาความหลากหลายชนิด STin2	BSU	ประเทศไทย
14. Anti-sense primer (100 pmol/µl) (5'-TCA TGT TCC TAG TCT TAC GCC AGT G-3') สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาความหลากหลายชนิด STin2	BSU	ประเทศไทย
15. Tris base buffer	Sigma	สหรัฐอเมริกา
16. Boric acid	Sigma	สหรัฐอเมริกา
17. Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	Sigma	สหรัฐอเมริกา
18. Ethidrium bromide	Sigma	สหรัฐอเมริกา
19. Sodium chloride (NaCl)	Sigma	สหรัฐอเมริกา
20. Potassium chloride (KCl)	Sigma	สหรัฐอเมริกา
21. Di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Sigma	สหรัฐอเมริกา
22. Potassium di-hydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Sigma	สหรัฐอเมริกา
23. Sulfuric acid (H_2SO_4)	MERCK	เยอรมนี
24. Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	MERCK	เยอรมนี
25. Sodium carbonate (Na_2CO_3)	MERCK	เยอรมนี
26. Bovine serum albumin (BSA)	Calbiochem	สหรัฐอเมริกา
27. Methanol (HPLC grade)	BDH	อังกฤษ
28. 60% Perchloric acid ($HClO_4$)	MERCK	เยอรมนี
29. Ammonium acetate ($C_2H_7NO_2$)	BDH	อังกฤษ
30. ชุดน้ำยา ELISA สำหรับตรวจวัดซีโรโทนิน	Diagnostic System Laboratories	สหรัฐอเมริกา
31. 5-hydroxytryptamine (serotonin)	Sigma	สหรัฐอเมริกา
32. Tween 20	MERCK	เยอรมนี

33. TritonX 100	MERCK	เยอรมนี
34. 0.01 M Phosphate buffered saline (pH 7.4)	Sigma	สหรัฐอเมริกา
35. Peroxidase conjugated goat anti-human IgG Fcγ fragment specific	Jackson ImmunoResearch	สหรัฐอเมริกา
36. Peroxidase conjugated goat anti-human IgM Fc5μ fragment specific	Jackson ImmunoResearch	สหรัฐอเมริกา
37. ชุดน้ำยา Peroxidase substrate ABTS	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
38. ชุดน่ำยา Peroxidase substrate TMB	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา

3. ขั้นตอนการแยกเก็บตัวอย่าง

ทำการเจาะเก็บเลือดจากกลุ่มตัวอย่างประมาณ 10 ml จากนั้นทำการแยกเก็บเป็นส่วนๆ ดังนี้

3.1 ซีรัม โดยการเจาะเก็บเลือดลงในหลอดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง ปริมาตร 2 ml เมื่อเลือดเกิดการแข็งตัวแล้ว จึงนำมาปั่นแยกที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.2 เลือดครบส่วน โดยการเจาะเก็บเลือดลงในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) ปริมาตร 8 ml และแยกเก็บใน microcentrifuge tube จำนวน 3 หลอด หลอดที่ 1 ปริมาตร 6 ml หลอดที่ 2 ปริมาตร 500 μl สำหรับนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจวิเคราะห์หา 5HTTLPR และ 5HTTVNTR และหลอดที่ 3 ปริมาตร 1 ml สำหรับนำไปตรวจ complete blood count (CBC) ทางห้องปฏิบัติการ

3.3 พลาสมาที่มีปริมาณเกล็ดเลือดสูง โดยการนำเลือดครบส่วนจากหลอดที่ 1 ในข้อที่ 3.2 ปริมาตร 6 ml มาปั่นแยกที่ 200 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และแยกเก็บใน microcentrifuge tube จำนวน 2 หลอด ดังนี้ หลอดที่ 1 ปริมาตร 200 μl สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณเกล็ดเลือด ส่วนที่เหลือเก็บในหลอดที่ 2 สำหรับตรวจหาปริมาณซีโรโทนิน (153)

3.4 เกล็ดเลือด โดยการนำพลาสมาที่มีปริมาณเกล็ดเลือดสูงปริมาตร 200 μl ผสมกับ physiological saline ปริมาตร 800 μl จากนั้นนำมาปั่นแยกที่ 4,500 g 10 นาที ที่ 4 °C ค่อยๆ เท

ส่วน supernatant ทิ้งระวังอย่าให้ตะกอนหลุดออก และเติม distilled water ปริมาตร 200 µl ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ยังไม่ทำการทดลองสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะทำการตรวจวิเคราะห์

4. ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (DNA)

โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAGEN™ FlexiGene® kit ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธี alkaline lysis วิธีการนี้ทำได้โดยปล่อยดีเอ็นเอออกจากเซลล์โดยการทำให้เซลล์แตก (lysis) จากนั้นทำให้โครโมโซมดีเอ็นเอเสียสภาพด้วย denaturation buffer และ protease และให้เกิดความเป็นกลาง ซึ่งจะส่งผลให้ดีเอ็นเอตกตะกอนเป็นเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำ แล้วทำการกำจัดโปรตีนและอาร์เอ็นเอโดยการใช้การหมุนเหวี่ยง เสร็จแล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 100% isopropanol และทำให้บริสุทธิ์โดยการล้างด้วย 70% ethanol สุดท้ายทำการเติมน้ำหรือ hydration buffer เพื่อให้ดีเอ็นเอกลับเป็นสารแขวนลอย

4.1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา

4.1.1 QIAGEN® Protease stock solution เติม distilled water ปริมาตร 7 ml ลงใน lyophilized QIAGEN® Protease จากนั้นแบ่งเป็น aliquots แล้วจึงนำไปใช้ หรือเก็บที่ -20 °C ไว้ใช้คราวต่อไป

4.1.2 Buffer FG2/ QIAGEN® Protease mixture ผสม Buffer FG2 ปริมาตร 150 µl กับ QIAGEN® Protease ปริมาตร 1.5 µl (อัตรส่วน 100:1) โดยทำการคำนวณปริมาณ Buffer FG2 และ QIAGEN® Protease ที่จะใช้จากเลือดครบส่วนที่นำมาสกัดและต้องเตรียมส่วนผสมนี้เพื่อใช้ภายใน 1 ชั่วโมง

4.2 วิธีการ

4.2.1 เติม Buffer FG1 ปริมาตร 750 µl ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml และเติมเลือดครบส่วนปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 5 ครั้ง

4.2.2 นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 20 วินาที โดยหัวปั่นหมุนแบบ fixed-angle rotor

4.2.3 ค่อยๆ เทส่วน supernatant ทิ้ง (ระวังอย่าให้ตะกอนหลุดออก) วางหลอดคว่ำลงบนกระดาษทิชชูที่เตรียมไว้ให้แห้งเป็นเวลา 2 นาที โดยไม่ให้ส่วนปากและฝาปิดของหลอดแต่ละหลอดสัมผัสกันเพื่อป้องกันการ contaminate

4.2.4 เติม Buffer FG2/ QIAGEN® Protease mixture ที่เตรียมไว้ปริมาตร 150 µl แล้ว mix ด้วย vortex mixer ทันที 3-4 ครั้ง ครั้งละ 5 วินาที จนเป็นเนื้อเดียวกัน

4.2.5 นำไป incubate ใน heat block ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที

4.2.6 เติม 100% isopropanol ปริมาตร 150 µl ลงในหลอดและผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาประมาณ 20 ครั้ง จะสังเกตเห็นตะกอนดีเอ็นเอเป็นเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำอยู่ที่ก้นหลอด (ในตัวอย่างที่มีเม็ดเลือดขาวน้อยอาจจะมองไม่เห็นตะกอนดีเอ็นเอ)

4.2.7 นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 3 นาที

4.2.8 ค่อยๆ เทส่วน supernatant ทิ้ง (ระวังอย่าให้ตะกอนหลุด) วางหลอดคว่ำลงบนกระดาษทิชชูที่เตรียมไว้ให้แห้งเป็นเวลา 2 นาที

4.2.9 เติม 70% ethanol ปริมาตร 150 µl ลงในหลอด

4.2.10 นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 3 นาที

4.2.11 ค่อยๆ เทส่วน supernatant ทิ้ง (ระวังอย่าให้ตะกอนหลุดออก)

4.2.12 ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งเองโดยใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที

4.2.13 ละลายดีเอ็นเอใน Buffer FG3 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที และเก็บที่ -20 °C จนกว่าจะนำมาทำการตรวจวิเคราะห์

5. ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์เตอร์บริเวณ promoter (serotonin transporter gene; 5HTTLPR) โดยวิธี PCR

5.1 วิธีการ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ในการตรวจการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์เตอร์ชนิด 5HTTLPR โดยวิธี PCR ซึ่งใช้ primers ที่จำเพาะ เริ่มจากการเตรียม master mix โดยใช้ชุดน้ำยา MasterTaq kit (Eppendorf) (ดังแสดงตารางที่ 3.1) และในกรณีที่ต้องการตรวจยืนยันใช้ชุดน้ำยา PCR-X (Invitrogen) (ดังแสดงในตารางที่ 3.2) ซึ่งมีส่วนประกอบ สำหรับปฏิกิริยาจำนวน 4 หลอด ดังนี้

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบชุดน้ำยา MasterTaq kit (Eppendorf) สำหรับทำปฏิกิริยาเพื่อตรวจวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์เตอร์ชนิด 5HTTLPR

ส่วนประกอบ MasterTaq kit (Eppendorf)	ปริมาตรสำหรับ 4 หลอด (µl)
1. DMSO	5
2. 5X Taq M	20
3.10X PCR buffer	10
4. dNTP mix (10 mM)	4
5. Sense primer (100 pmol/µl)	0.5
6. Anti-sense primer (100 pmol/µl)	0.5
7. Taq polymerase	0.5
8. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	51.5
รวม	92

ตารางที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบชุดน้ำยา Taq PCRx DNA polymerase (Invitrogen) สำหรับทำปฏิกิริยาเพื่อตรวจวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์-เตอร์ชนิด 5HTTLPR

ส่วนประกอบ PCR-X (Invitrogen)	ปริมาตรสำหรับ 4 หลอด (µl)
1. 10X PCR-X Amp Buffer	10
2. 10 mM dNTP mixture	2
3. 50 mM $mgSO_4$	3
4. Sense primer (10 µM)	2
5. Anti-sense primer (10 µM)	2
6. Taq PCR-X DNA polymerase	1
7. 10X PCR-X Enhancer	30
8. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	42
รวม	92

เมื่อผสม master mix ให้เข้ากันดีแล้ว แบ่ง master mix ปริมาตร 23 µl ใส่หลอดปฏิกิริยา PCR (microtube) ที่มีดีเอ็นเอต้นแบบหลอดละ 2 µl (ประมาณ 100-200 ng) ดังนั้นแต่ละหลอดปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรรวมเป็น 25 µl ภายหลังจากการผสมให้ส่วนประกอบทั้งหมดเข้ากันดีแล้ว นำหลอดปฏิกิริยา PCR เข้าเครื่อง thermal cycler ที่มีการตั้งโปรแกรม ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.3 แสดงโปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR (touchdown PCR) สำหรับชุดน้ำยา MasterTaq kit (Eppendorf) เพื่อตรวจวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์เตอร์ชนิด 5HTTLPR

Stage1 Intial Denaturation	Step1 95.0 °C	5 นาที	1 รอบ
Stage2 Denaturation	Step1 94.0 °C	1 นาที	25 รอบ
Annealing	Step2 68.0-0.5 °C	1 นาที	
Extension	Step3 72.0 °C	1 นาที	
Stage3 Denaturation	Step1 94.0 °C	1 นาที	10 รอบ
Annealing	Step2 50.0 °C	1 นาที	
Extension	Step3 72.0 °C	1 นาที	
Stage4 Extension	Step1 72.0 °C	10 นาที	1 รอบ
	Hold Temp 4.0 °C	∞	

ตารางที่ 3.4 แสดงโปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ชุดน้ำยา Taq PCRx DNA polymerase (Invitrogen) เพื่อตรวจวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์เตอร์ชนิด 5HTTLPR

Stage1 Intial Denturation	95.0 °C	2 นาที	1 รอบ
Stage2 Denaturation	95.0 °C	30 วินาที	35 รอบ
Stage3 Annealing	60.0 °C	30 วินาที	
Stage4 Extension	68.0 °C	1 นาที	
Stage5 Final Extention	68.0 °C	10 นาที	1 รอบ
	Hold Temp. 4.0 °C	∞	

ภายหลังจากเครื่อง thermal cycler ทำงานเสร็จแล้ว นำ PCR product ไปตรวจสอบหาความหลากหลายของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์เตอร์ชนิด 5HTTLTR โดยใช้เทคนิค 3% agarose gel electrophoresis เพื่อดูขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน โดยอัลลีล s มี 484 bp, อัลลีล l มี 528 bp และอัลลีล xl มี 613 bp

6. ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์เตอร์บริเวณ intron 2 (variable number of tandom repeats of the serotonin transporter gene; 5HTTVNTR,STin2) **โดยวิธี** PCR

6.1 วิธีการ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ในการตรวจการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์เตอร์ชนิด STin2 โดยวิธี PCR ซึ่งใช้ primers ที่จำเพาะ เริ่มจากการเตรียม master mix โดยใช้ชุดน้ำยา MasterTaq kit (RealTaq DNA polymerase) ซึ่งมีส่วนประกอบ สำหรับ ปฏิกิริยาจำนวน 4 หลอด ดังแสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 แสดงส่วนประกอบชุดน้ำยา RealTaq DNA polymerase (United Bioinformatica Inc.) สำหรับทำปฏิกิริยาเพื่อตรวจวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์เตอร์ชนิด STin2

ส่วนประกอบ	ปริมาตรสำหรับ 4 หลอด (µl)
1. 10X TBE buffer	10
2. dNTP mix (10 mM)	2
3. Sense primer (100 pmol/µl)	0.5
4. Anti-sense primer (100 pmol/µl)	0.5
5. Taq polymerase	0.5
6. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	78.5
รวม	92

เมื่อผสม master mix ให้เข้ากันดีแล้ว แบ่ง master mix ปริมาตร 23 µl ใส่หลอดปฏิกิริยา PCR (microtube) ที่มีดีเอ็นเอต้นแบบหลอดละ 2 µl (ประมาณ 100-200 ng) อยู่แล้ว ดังนั้นแต่ละหลอดปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรรวมเป็น 25 µl ภายหลังจากการผสมให้ส่วนประกอบทั้งหมดเข้ากันดีแล้ว นำหลอดปฏิกิริยา PCR เข้าเครื่อง thermal cycler ที่มีการตั้งโปรแกรม ดังแสดงในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 แสดงโปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับชุดน้ำยา RealTaq DNA polymerase (United Bioinformatica Inc.) เพื่อตรวจวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์เตอร์ชนิด STin2

Stage1 Intial Denaturation	94.0 °C	5 นาที	1 รอบ
Stage2 Denaturation	94.0 °C	30 วินาที	40 รอบ
Stage3 Annealing	57.0 °C	30 วินาที	
Stage4 Extension	72.0 °C	1 นาที	
Stage5 Final Extension	72.0 °C	10 นาที	1 รอบ
	Hold Temp. 4.0 °C	∞	

ภายหลังจากเครื่อง thermal cycler ทำงานเสร็จแล้ว นำ PCR product ไปตรวจสอบหาความหลากหลายของยีนซีโรโทนินทรานสปอร์เตอร์ชนิด STin2 โดยใช้เทคนิค 3% agarose gel electrophoresis เพื่อดูขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน โดย 12 repeats มี 389 bp และ 10 repeats มี 369 bp

7. ขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณซีโรโทนินในซีรัมโดยใช้เทคนิค ELISA

ELISA kit ของ Diagnostic System Laboratories ; DSL (cataloque number LDNBA 10090 serotonin EIA 96T) อาศัยหลักการ competitive ELISA โดยการเคลือบซีโรโทนิน (serotonin) บน solid phase ของ microtiter plate และเติม antiserotonin ที่มีปริมาณจำกัดลงไปพร้อมกับตัวอย่างที่มีหรือไม่มีซีโรโทนิน จะเกิดปฏิกิริยาจับกันของ serotonin กับ antiserotonin ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นการแย่งจับระหว่าง serotonin ที่อยู่บน solid phase และ serotonin ที่อยู่ในตัวอย่าง โดยจะแย่งจับกับ antiserotonin เมื่อระบบเข้าสู่สมดุล ทำการล้างเอา free serotonin หรือ free antiserotonin ออก และเติม anti-rabit/peroxidase (anti-antiserotonin ที่ conjugated ด้วยเอ็นไซม์ peroxidase) ซึ่งจะไปจับกับ serotonin-antiserum complexs ที่อยู่บน solid phase จากนั้นทำการล้างเอาส่วนเกินของปฏิกิริยาออก และเติม substrate TMB หยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution และนำไปอ่านผลด้วยเครื่อง absorbance photometer ที่ความยาวคลื่น 450 nm

7.1 วิธีการ

7.1.1 เติม standards,controls และซีรัมของคนปกติที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินปริมาตร 10 µl ลงใน acylation microtiter plate เพื่อให้ซีโรโทนิน อยู่ในรูปที่เหมือนกับซีโรโทนินที่เคลือบอยู่บน microtiter plate

7.1.2 เติม acylation buffer ปริมาตร 250 µl ลงใน acylation microtiter plate

7.1.3 เติม acylation reagent ปริมาตร 25 µl ลงใน acylation microtiter plate

7.1.4 Incubate บน shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

7.1.5 นำ standards, control และซีรัมที่ทำปฏิกิริยาไว้ มาอย่างละ 10 µl เติมลงใน serotonin microtiter strips

7.1.6 เติม antiserotonin ลงในแต่ละหลุมอย่างละ 50 µl

7.1.7 Incubate บน shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

7.1.8 ล้าง microtiter strips ด้วย wash buffer ปริมาตร 300 µl จำนวน 3 ครั้งต่อหลุม

7.1.9 เติม enzyme conjugate ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุม

7.1.10 Incubate บน shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

7.1.11 ล้าง microtiter strips ด้วย washing buffer ปริมาตร 300 µl จำนวน 3 ครั้ง ต่อหลุม

7.1.12 เติม substrate TMB ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุมหลีกเลี่ยงการโดนแสงโดยตรง

7.1.13 ห่อ microtiter strips ด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ และ Incubate บน shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-30 นาที

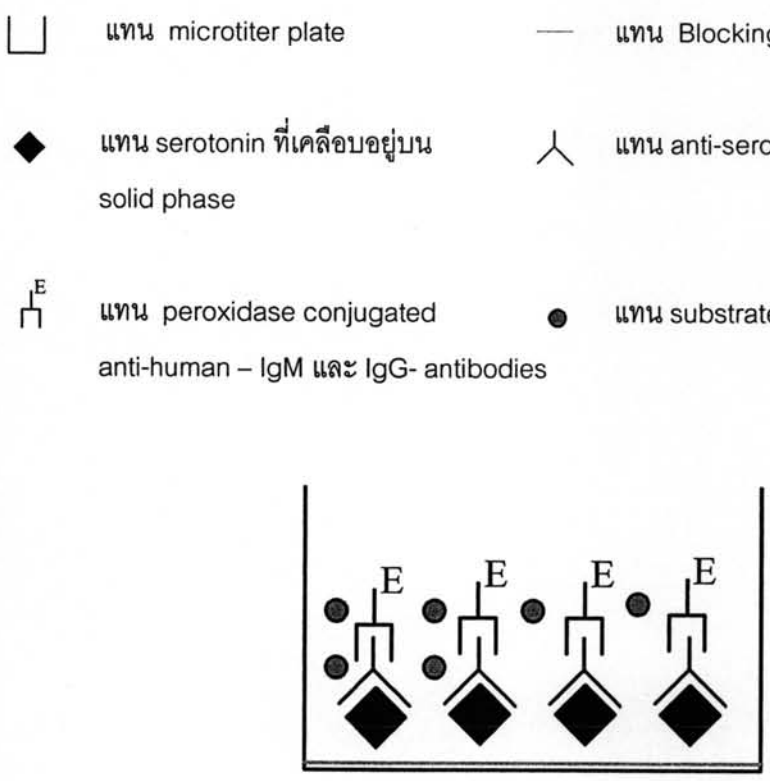
7.1.14 เติม stop solution ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุมผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันบน shaker จนสารเป็นเนื้อเดียวกัน

7.1.15 นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงภายใน 10 นาทีด้วยเครื่อง absorbance photometer ที่ความยาวคลื่น 450 nm และใช้ reference wavelength ตั้งแต่ 620 ถึง 650 nm

7.1.16 นำค่า standards ที่ได้มา plot กราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของซีโทนิน แล้วนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของซีโรโทนินในซีรัมต่อไป

8. ขั้นตอนการตรวจหาแอนติบอดีของตนเองต่อซีโรโทนินทั้งชนิด IgG และ IgM ในซีรัม โดยใช้เทคนิค ELISA

วิธีการตรวจหาแอนติบอดีของตนเองต่อซีโรโทนินในการวิจัยนี้ ได้ทำการดัดแปลงมาจากเทคนิคของ Professor Dr. Reinhind Klien (129) ที่ใช้หลักการ indirect method โดยเคลือบซีโรโทนิน บน solid phase ของ microtiter plate (cataloque number 439454) ขนาด 96 หลุม และเติมซีรัมตัวอย่างที่มี antiserotonin ลงไป จะเกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง serotonin กับ antiserotonin เมื่อระบบเข้าสู่สมดุล ล้างเอา antiserotonin ส่วนเกินของปฏิกิริยาออก และเติม peroxidase conjugated anti-human – IgG และ IgM- antibodies ซึ่งจะไปจับกับ serotonin-antiserotonin complex ประเภท IgM หรือ IgG ทำการล้างเอาส่วนเกินของปฏิกิริยาออก จากนั้นเติม substrate และหยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution และนำไปอ่านผลด้วยเครื่อง absorbance photometer ซึ่งมีหลักการการตรวจวัดดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงการตรวจหาแอนติบอดีของตนเองต่อซีโรโทนินทั้งชนิด IgM และ IgG ใน ซีรัมโดยใช้เทคนิค ELISA ซึ่งอาศัยหลักการ indirect method

8.1 วิธีการ

8.1.1 เตรียมซีโรโทนินมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน coating buffer

8.1.2 เจือจางซีโรโทนินมาตรฐานด้วย coating buffer ให้ได้ความเข้มข้น 10 µg/ml (เจือจาง 1,000 เท่า)

8.1.3 เคลือบ microtiter plate โดยการเติมซีโรโทนิน 10 µg/ml ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุม incubate ที่ 4 °C ข้ามคืน

8.1.4 ล้าง microtiter plate ด้วย washing buffer ปริมาตร 150 µl จำนวน 3 ครั้ง ต่อหลุม และเติม blocking buffer ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุม และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

8.1.5. เจือจางซีรัมของคนปกติที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ด้วย 60 mM PBS, pH 7.5 ที่ประกอบด้วย 0.1% BSA และ 0.2% TritonX 100 ในอัตราส่วน 1:4,000 และ 1:2,000 เพื่อตรวจหาแอนติบอดีของตนเองต่อซีโรโทนินชนิด IgG และ IgM ตามลำดับ

8.1.6 เติม ซีรัมปริมาตร 100 µl ลงใน microtiter plates และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที

8.1.7 ล้าง microtiter plate ด้วย washing buffer ปริมาตร 150 µl จำนวน 3 ครั้ง ต่อหลุม

8.1.8 เจือจาง peroxidase conjugated goat anti-human IgM antibodies ด้วย 60 mM PBS, pH 7.5 ที่ประกอบด้วย 0.5% BSA และ 0.2% TritonX 100 ในอัตราส่วน 1:2,000 (ในกรณีที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดีของตนเองต่อซีโรโทนินชนิด IgG)

8.1.9 เจือจาง peroxidase conjugated goat anti-human IgG antibodies ด้วย 60 mM PBS, pH 7.5 ที่ประกอบด้วย 0.5% BSA และ 0.2% TritonX 100 ในอัตราส่วน 1:5,000 (ในกรณีที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดีของตนเองต่อซีโรโทนินชนิด IgM)

8.1.10 เติม diluted anti-human IgM – และ IgG – antibodies หลุมละ 100 µl ลงใน microtiter plate และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

8.1.11 ล้าง microtiter plate ด้วย washing buffer ปริมาตร 150 µl จำนวน 3 ครั้ง ต่อหลุม

8.1.12 เติม peroxidase substrate ABTS ปริมาตร 150 µl ลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที หลีกเลี่ยงการโดนแสงโดยตรง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 25% sulphuric acid (stop solution) ปริมาตร 50 µl ลงในแต่ละหลุม และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm (ในกรณีที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดีของตนเองต่อซีโรโทนินชนิด IgG)

8.1.13 เติม peroxidase substrate TMB ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลีกเลี่ยงการโดนแสงโดยตรง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 25% sulphuric acid ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุม และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm (ในกรณีที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดีของตนเองต่อซีโรโทนินชนิด IgM)

9. ขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณซีโรโทนินในซีรัม พลาสมาที่มีปริมาณเกล็ดเลือดสูง และเกล็ดเลือด โดยใช้เทคนิค HPLC ที่พัฒนาขึ้นเอง

เทคนิค HPLC แบบ gradient สำหรับแยกซีโรโทนินออกจากตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 3.2

9.1 วิธีการ

9.1.1 เตรียม 10 % perchloric acid ($HClO_4$) สำหรับละลายซีโรโทนินมาตรฐานและเจือจางซีโรโทนินมาตรฐาน และ 6 % perchloric acid ($HClO_4$) สำหรับตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่างและเจือจางตัวอย่าง

9.1.2 เตรียม mobile phase 2 ชนิด คือ 100 % methanol และ 100 mmol/l ammonium acetate pH 4.5 จากนั้นนำไปกรองและกำจัดฟองอากาศ

9.1.3 เตรียม stock ซีโรโทนินมาตรฐาน 1 mg/ml จากนั้นเจือจางซีโรโทนินมาตรฐานให้มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, และ 0 ng/ml (n = 20)

9.1.4 เตรียมตัวอย่างสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย 6 % perchloric acid ($HClO_4$) ในอัตราส่วน 1:2 (200:200 µl) ผสมให้ตัวอย่างกับสารเข้ากันด้วย vortex mixer สังเกตจะเห็นตะกอนขุ่นขาว

ชัดเจน จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 11,000 g 3 นาที ดูดส่วนใส (ส่วนที่ใช้ในการตรวจวัด) เก็บไว้อีกหลอดหนึ่ง ตะกอนที่เหลือทิ้ง

9.1.5 ทำการล้างเครื่อง HPLC ด้วย น้ำ milli-Q จากนั้นทำคอลัมน์อยู่ในสภาวะสมดุล (column equilibrium time) ด้วย mobile-phase 2 ชนิด ซึ่งทำการตั้งโปรแกรม gradient ดังแสดงในตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 แสดงเทคนิค HPLC แบบ gradient สำหรับแยกซีโรโทนินออกจากตัวอย่าง

เวลา (Time)	Pump A 100 mmol/l $C_2H_7NO_2$ (%A)	Pump B 100 % methanol (%B)
0	88	12
10	82	18
12	82	18
15	88	12

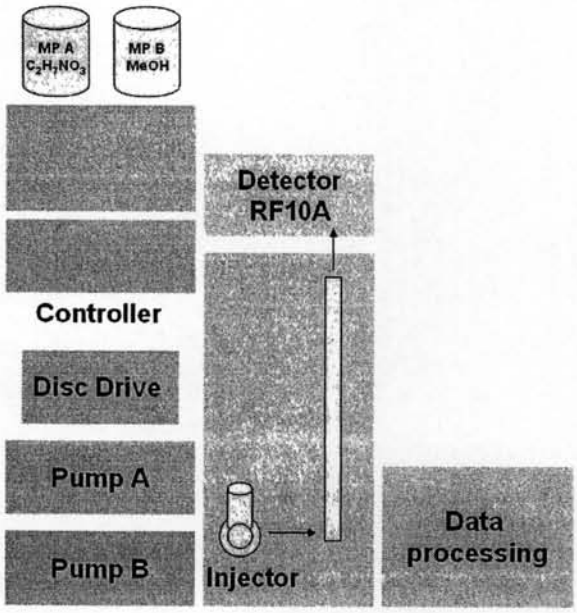
9.1.6 เมื่อคอลัมน์อยู่ในสภาวะสมดุลแล้วทำการฉีดซีโรโทนินมาตรฐานที่เตรียมไว้ ณ ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งหมดโดยใช้เวลาอย่างละ 15 นาที

9.1.7 เมื่อฉีดซีโรโทนินมาตรฐานที่เตรียมไว้ ณ ความเข้มข้นต่างๆ หมดแล้วให้นำตัวอย่างที่ตกตะกอนโปรตีนเรียบร้อยแล้วฉีดต่อได้เลย

9.1.8 นำซีโรโทนินมาตรฐานที่ตรวจวัดได้แล้วมา plot กราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซีโรโทนินที่ทำการตรวจวัดได้

9.1.9 คำนวณหาความเข้มข้นของซีโรโทนินในตัวอย่างจากความสัมพันธ์จากกราฟ

9.1.10 สรุป และวิเคราะห์ผลสถิติด้วยโปรแกรม SPSS และ SigmaPlot



รูปที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบหลักของเครื่องมือ HPLC