บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ประชากรเป้าหมาย

ประชากรไทยที่เป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการ และครอบครัวที่มารับการตรวจเพื่อทำการผ่าตัดตกแต่งความพิการจากโรคปากแหว่งเพดานโหว่จากจังหวัดกาฬสินธุ์ ตรัง นครราชสีมา น่าน แม่ฮ่องสอน สระแก้ว หนองคาย และอุทัยธานี จำนวน 100 คน

ประชากรกลุ่มควบคุม

ประชากรไทยที่ไม่เป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่ และไม่มีประวัติบุคคลในครอบครัวเป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่หรือโรคอื่น ๆ ที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *MSX1* และ *PVRL1* เช่น โรคงวงช้าง จากผู้บริจาคเลือดที่สภากาชาดจังหวัดกาฬสินธุ์ กำแพงเพชร หนองคาย หนองบัวลำภู และผู้มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 100 คน

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. Pipette tip : 10 µl, 200µl, 1,000 µl (Elkay, USA)
2. Microcentrifuge tube : 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (Bio-RAD, Elkay, USA)
3. Polypropylene conical tube : 15 ml (Elkay, USA)
4. Beaker : 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1,000 ml, 2,000 ml (Pyrex)
5. Flask : 250 ml (Pyrex)
6. Reagent bottle : 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
7. Cylinder : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1,000 ml (Witeg, Germany)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. Glass pipette : 5 ml, 10 ml (Witeg, Germany)

9. Pipette rack (Autopack, USA)

10. Thermometer (Precision, Germany)

11. Parafilm (American National Can, USA)

12. Plastic wrap

13. Stirring-magnetic bar

14. Combs

15. Automatic adjustable micropipette : P2 (0.1-2 μl), P10 (0.5-10 μl), P20 (5-20 μl), P100 (20-100 μl), P1000 (0.1-1 ml) (Gilson, France/Eppendorf, Germany)

16. Pipette boy (Tecnomara, Switzerland)

17. Vortex (Scientific Industry, USA)

18. pH meter (Eutech Cybernatics)

19. Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)

20. Centrifuge (J.P.Selecta, Spain)

21. Microcentrifuge (Eppendorf, Germany)

22. Mastercycler personal (Eppendorf, Germany)

23. Thermal cycler (Touch Down, Hybraid USA)

24. Power supply model 250 (Gibco BRL, Scothland)

25. Horizon 11-14 (Gibco BRL, Scothland)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

26. Spectronic spectrophotometers (Genesys5, Milon Roy USA)

27. UV Transilluminator (Fotodyne USA)

28. UV-absorbing face shield (Spectronic, USA)

29. Gel doc 1000 (Bio-RAD)

30. Refrigerator 4 ^{0}C (Misubishi, Japan)

31. Deep freeze -20 ^{0}C, -80 ^{0}C (Revco)

32. Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco USA)

33. Water bath (J.P.Selecta, Spain)

34. Storm 840 and ImageQuaNT software (Molecular dynamics)

<u>สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. สารเคมีทั่วไป

1.1 Absolute ethanol (Merck)

1.2 Agarose, molecular grade (Promega)

1.3 Ammonium acetate (Merck)

1.4 Boric acid (Merck)

1.5 Bromphenol blue (Pharmacia)

1.6 Disodium ethylenediamine tetracetic acid : EDTA (Merck)

1.7 Ethidium bromide (Gibco BRL)

1.8 Ficoll 400 (Pharmacia)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.9 Hydrochloric acid (Merck)

1.10 Mineral oil (Sigma)

1.11 Phenol (Sigma)

1.12 Chloroform (Merck)

1.13 Isoamyl alcohol (Merck)

1.14 Sodium chloride (Merck)

1.15 Sodium dodecyl sulfate (Sigma)

1.16 Sodium hydroxide (Merck)

1.17 Sucrose (BDH)

1.18 Tris base (USB)

1.19 Triton X-100 (Pharmacia)

1.20 100 base pair DNA ladder (Biolabs)

1.21 25 base pair DNA ladder (Biolabs)

1.22 40%acrylamide/bis solution 19:1 (Bio-RAD)

1.23 GelStar (Camberx)

2. สารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการหาลำดับเบส

2.1 10X PCR buffer (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 8.4) (Promega)

2.2 10X PCR buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.8% Nonidet P40) (Fermentas)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 Magnesium chloride (Promega)

2.4 Magnesium chloride (Fermentas)

2.5 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Promega)

2.6 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Fermentas)

2.7 Oligonucleotide primers (BSU)

2.8 Oligonucleotide primers (Biogenomed)

2.9 *Taq* DNA polymerase (Promega)

2.10 *Taq* DNA polymerase (Fermentas)

2.11 100% DMSO

2.12 Genomic DNA sample

2.13 ExoSAP-IT (USB, USA)

3. Restriction enzyme

3.1 *Dde* I (Biolabs)

3.2 *Hae* II (Fermentus)

3.3 *Mwo* I (Biolabs)

3.4 *Pml* I (Biolabs)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>เก็บตัวอย่างเลือด</u>

1.1 ประชากรเป้าหมาย

1.1.1. คัดกรองผู้ป่วยโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญและสืบประวัติครอบครัว พร้อมขอคำยินยอมเพื่อทำการเก็บตัวอย่างเลือด

1.1.2. ทำการเจาะเลือดผู้ป่วยปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร พร้อมครอบครัว

1.2 ประชากรกลุ่มควบคุม

1.2.1. ซักประวัติผู้บริจาคเลือด พร้อมขอคำยินยอมเพื่อทำการเก็บตัวอย่างเลือด

1.2.2. ทำการเจาะเลือดผู้ป่วยปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร

2. <u>เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ</u> เพื่อส่งตรวจหาการกลายพันธุ์

2.1 สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol chloroform extraction

2.1.1 นำเลือดปริมาณ 3-5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.1.2 ย้ายส่วนเม็ดเลือดขาวเก็บในหลอด polypropylene

2.1.3 เติม lysis buffer I ที่แช่เย็นรวมกับเม็ดเลือดขาวจนมีปริมาตรเป็น 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที เทส่วนใสทิ้ง

2.1.4 เติม lysis buffer I ที่แช่เย็นรวมกับเม็ดเลือดขาวจนมีปริมาตรเป็น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที เทส่วนใสทิ้ง

2.1.5 เติม lysis buffer II 900 ไมโครลิตร สารละลาย protinase K 10 ไมโครลิตร และ 10% SDS 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.1.6 เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 12-16 ชั่วโมง

2.1.7 เติม phenol-chloroform-isoamyl alcohol 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.1.8 เก็บส่วนบนใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร

2.1.9 เติม 7.5 M ammonium acetate 250 ไมโครลิตร และ 100% ethanol 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15-20 นาที จะเห็นตะกอนดีเอ็นเอสีขาวใสที่ก้นหลอด เทส่วนบนทิ้ง

2.1.10เติม 70% ethanol แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนบนทิ้ง ทิ้งให้แห้ง

2.1.11เติมน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

2.1.12วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer

2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยออกแบบ Primer ให้ครอบคลุมแต่ละ exon (ตารางที่ 3) สารเคมี และอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแสดงในตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 primer สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ยีน	Forward primer (5'->3')	Reverse primer (5'->3')
MSX1		
- exon 1	CCAGTGCTGCGGCAGAAGG	ATTCATCCGCTGGGGTGAA
- exon 2	GGCTGATCATGCTCCAATGC	CACCAGGGCTGGAGGAAT
PVRL1		
- exon 1	TGCAGCTGACCTGGATCCTT	GACCCAACTTTTCTGGCTCC
- exon 2	CTGTGCCTGACACTGACCAC	AGGTCACAGGCCTCTGGATG
- exon 3	CCTTTTGGCCGGTGCATCTT	AAGGAGAGGAGGAGGGAGGA
- exon 4	TCCTGGCTGAAGTTCCCTTG	GGTCCAGTCAGCTGTCTTCC
- exon 5	GGAACAGCTTCTTGAGGCTG	TCCTGCAGTGGCATTGCTCA
- exon 6	GAGCACACGCTGATGCTGTC	AGCGGTCACAGACAGAGGCT

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ปริมาณของสารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สารเคมี	ความเข้มข้น		
	MSX1 exon 1	***MSX1*** exon 2	***PVRL1*** exon1-6
10X PCR buffer	1X	1X	1X
25 mM Magnesium chloride	2.0 mM	1.875 mM	1.5 mM
10 mM Deoxynucleotide triphosphates	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM
10 µM Oligonucleotide primers	0.2 µM	0.15 µM	0.2 µM
5U/µl *Taq* DNA polymerase	0.5 U	0.5 U	0.5 U
100% DMSO	5%	5%	-
50 ng/µl Genomic DNA sample	2 µl	2 µl	2 µl

ตารางที่ 5 อุณหภูมิสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ขั้นตอน	จำนวนรอบ(อุณหภูมิ/เวลา)			
	MSX1 exon 1	***MSX1*** exon 2	***PVRL1*** exon 1	***PVRL1*** exon 2-6
Initiation	94°C/5min	95°C/5min	94°C/5min	94°C/5min
Denaturing	35(94°C/30sec)	35(94°C/1min)	35(94°C/45sec)	35(94°C/45sec)
Annealing	35(62°C/45sec)	35(58°C/1min)	35(60°C/30sec)	35(58°C/45sec)
Extension	35(72°C/1min)	35(72°C/1min)	35(72°C/30sec)	35(72°C/45sec)
Final extension	72°C/5min	72°C/7min	72°C/7min	72°C/7min

2.3 ตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วยวิธี sequencing analysis

การใช้ primer สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ โดยปกติจะใช้ primer ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วย แต่ในการศึกษานี้ exon 1 ของยีน *MSX1* ไม่สามารถใช้ primer สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จึงต้องออกแบบ primer ใหม่ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 primer สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ใน ยีน *MSX1* exon 1

ยีน	Forward primer (5'->3')	Reverse primer (5'->3')
MSX1		
- exon 1	CCAGTGCTGCGGCAGAAGG	TGGAACCTTCTTCCTGGGTG

3. <u>วิเคราะห์การกลายพันธุ์</u> เพื่อหาว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหรือเป็นโพลิมอร์ฟิซึม

3.1 หา conserve region ของโปรตีน msx1 และ nectin1 ด้วยโปรแกรม clustalX โดยเปรียบเทียบในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน เพื่อเป็นแนวทางว่าตำแหน่งใดน่าจะเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของยีนนั้น ๆ

3.2 ชนิดของการกลายพันธุ์ เพื่อศึกษาผลกระทบต่อหน้าที่ยีน

- การขาดหายไปของลำดับเบส (deletion)
- การเพิ่มจำนวนของลำดับเบส (insertion)
- การแทนที่ของลำดับเบส (substitution)

3.3 การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน เพื่อศึกษาว่าคุณสมบัติและโครงสร้างมีการเปลี่ยนมากน้อยเพียงใด

3.4 การตรวจการกลายพันธุ์ในคนปกติ

ตรวจหาการกลายพันธุ์ในครอบครัวของผู้ป่วย ที่พบการกลายพันธุ์ ที่คาดว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคและประชากรกลุ่มควบคุมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตามตารางที่ 7 โดยใช้ primer ชุดเดียวกับที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แต่เนื่องจากการกลายพันธุ์ที่ P147Q และ G267C ไม่มีตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดได้ หรือเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดได้แต่ได้ขนาดที่ไม่เหมาะสมทำให้ไม่สามารถแปลผลได้ จึงเลือกใช้วิธี mutagenesis primer เพื่อสร้างตำแหน่งที่เอนไซม์สามารถตัดได้ primer ดังกล่าวแสดงดังตารางที่ 8

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ 2 อย่าง

1. เพื่อยืนยันการเปลี่ยนเบสในผู้ป่วย นอกเหนือจากวิธี direct sequencing
2. เพื่อตรวจว่าการเปลี่ยนเบสไม่พบในคนปกติ

ตารางที่ 7 เอนไซม์ตัดจำเพาะ และชนิดและเปอร์เซ็นต์ของ gel

การกลายพันธุ์	เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ชนิดและเปอร์เซ็นต์ของ gel
PVRL1		
V936M	***Pml* I**	1.5% agarose
MSX1		
P147Q*	***Dde* I**	3% agarose
G267C*	***Dde* I**	3% agarose
P278S	***Mwo* I**	3% agarose

* ไม่มีตำแหน่งตัด หรือขนาดตัดไม่เหมาะสม จึงออกแบบ primer ใหม่

ตารางที่ 8 Mutagenesis primer สำหรับตำแหน่ง P147Q และ G267C

ยีน	Forward primer (5'->3')	Reverse primer (5'->3')
MSX1		
P147Q	CCGAGAGGACCCCGTGGAT	TGGAACCTTCTTCCTGGGTG
	GCAGAGCCCCCGCTTCTCTC	
G267C	GGCTGATCATGCTCCGATGC	CAGGAAACAGCTATGACCC
		TGGAAGGGGCCAGAGGCTC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย