บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. ประชากร (subjects)

การศึกษาเป็นแบบ unmatched case-control โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มคนปกติ คือ กลุ่มตัวอย่าง (case group) เป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma หรือ cholangiocarcinoma และต้องเข้ารับการผ่าตัดชิ้นเนื้อตับที่โรงพยาบาลศิริราช ส่วนกลุ่มคนปกติ (control group) เป็นกลุ่มคนสุขภาพดี ไม่มีประวัติเป็นมะเร็ง และไม่มีประวัติครอบครัวเป็นมะเร็ง

3.1.1. เกณฑ์การคัดเลือกประชากร (inclusion criteria) [17]

กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับจะทำการคัดเลือกจากผู้ป่วยคนไทย ทั้งเพศชายและเพศหญิง ไม่จำกัดอายุ มีเชื้อชาติไทย และได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma หรือ cholangiocarcinoma ที่ต้องเข้ารับการรักษาด้วยวิธีการผ่าตัดชิ้นเนื้อตับที่โรงพยาบาลศิริราช ซึ่งงานวิจัยนี้ได้รับการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล (เลขที่อนุมัติ 117/2551) แต่ในงานวิจัยนี้ใช้ DNA ของผู้ป่วยเดิม (left over specimen) จากโครงการวิจัยเรื่อง "ความหลากหลายของยีนซิป2ดี6 ในคนไทย" (เลขที่อนุมัติ124/2003) และใช้ตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อตับจากโครงการวิจัยเรื่อง "ลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ซิป2ดี6 ในคนไทยและความสัมพันธ์กับมะเร็งตับและมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ" (เลขที่อนุมัติ 156/2007) ซึ่งในการเก็บชิ้นเนื้อตับ (hepatectomy) นั้นจะตัดจากชิ้นเนื้อตับที่ถูกตัดออกมาจากร่างกายของผู้ป่วยแล้ว และเลือกตัดบริเวณปกติที่ไม่ใช่ก้อนเนื้อมะเร็งมาประมาณ 2-3 กรัม ซึ่งในการผ่าตัดนี้จะกระทำโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางภายใต้ขั้นตอนและมาตรฐานสากล ส่วนการเจาะเลือดจะกระทำโดยแพทย์หรือพยาบาลผู้เชี่ยวชาญ ซึ่งผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการชี้แจงขั้นตอนในการปฏิบัติวิจัยอย่างละเอียดพร้อมทั้งต้องได้รับความยินยอมจากผู้เข้าร่วมวิจัย (consent form) และข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยของผู้เข้าร่วมวิจัยจะถือเป็นข้อมูลส่วนบุคคลและเก็บเป็นความลับ โดยโครงการวิจัย

ทั้ง 2 หัวข้อดังกล่าวนี้ได้อนุญาตให้นำส่วนของตัวอย่างเลือดและ DNA มาใช้ในการศึกษาวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้องได้

กลุ่มคนปกติ คัดเลือกจากผู้ที่มาบริจาคเลือดที่ธนาคารเลือด (blood bank) ของโรงพยาบาลศิริราช ที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง และไม่มีประวัติว่ามีคนในครอบครัวเป็นมะเร็ง และมีอายุตั้งแต่ 40 ปีขึ้นไป โดยอาสาสมัครที่มารับการบริจาคเลือด จะยินยอมให้นำเลือดไปใช้ในการศึกษาวิจัย (นำเลือดที่ได้นำไปใช้ในการสกัด DNA) โดยผู้วิจัยไม่สามารถบ่งถึงตัวของอาสาสมัครได้

3.1.2. เกณฑ์การคัดออกประชากร (exclusion criteria) [17]

- ผู้ป่วยมะเร็งตับที่ไม่ใช่คนไทย
- ผู้ป่วยที่ไม่ทราบว่าตนเองเป็นมะเร็ง
- ผู้ป่วยที่ไม่ประสงค์จะเข้าร่วมโครงการวิจัย

3.2. จำนวนกลุ่มตัวอย่าง

งานวิจัยนี้เป็นการทดลองโดยใช้เลือดและชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยมะเร็งตับทั้งเพศชายและเพศหญิง ไม่จำกัดอายุ และมีเชื้อชาติไทย โดยมีผู้เข้าร่วมวิจัยจำนวน 140 คน ในการศึกษาชนิดและความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* จากตัวอย่างเลือดของผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ เปรียบเทียบกับคนปกติ จำนวน 280 คน (คิดเป็น 2 เท่าของกลุ่มผู้ป่วย) แล้วนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ชนิด M1, P1 และ T1 ต่อความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับเปรียบเทียบกับคนปกติ (genetic association) และมีผู้เข้าร่วมวิจัยอีกจำนวน 100 คน ในการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในตับ (phenotypic determination) เปรียบเทียบกับชนิดของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* (genotypic determination) จากตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อตับของผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ (โดยตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อตับที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยนั้นจะต้องเป็นของบุคคลเดียวกัน) แล้วนำไปหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* เปรียบเทียบกับการทำงานของเอนไซม์ในผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีจีโนไทป์ต่างกัน (genotype-phenotype correlation)

โดยการคำนวณจำนวนกลุ่มตัวอย่างของผู้เข้าร่วมวิจัยและกลุ่มปกติใช้โปรแกรม QUANTO Version.1.1 ซึ่งโปรแกรมนี้สามารถดาวน์โหลดได้จาก http://hydra.usc.edu/gxe โดย

ในการคำนวณได้กำหนดค่าต่าง ๆ เป็นดังนี้ คือ unmatched case control (จำนวนประชากรกลุ่มตัวอย่าง: กลุ่มปกติ คิดเป็น 1:2) เป็นการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน (gene-gene interaction) มีอุบัติการณ์ของความชุก (p; prevalence) ในการเกิดมะเร็งตับในคนไทยคิดเป็น 37.6 ต่อประชากร 100,000 คน (ASR; Age-Standardized Rate) หรือคิดเป็นร้อยละ 0.037 ซึ่งเป็นอุบัติการณ์ในการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทยในระหว่างปี 2540-2545 จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ และกำหนดค่า power, odds ratio มีค่าเท่ากับ 0.7 และ1.75 ตามลำดับ ซึ่งเป็นข้อมูลดังกล่าวนี้ได้มาจากการทบทวนวรรณกรรม [12]

3.3. วัสดุและอุปกรณ์การวิจัย

3.3.1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. Refrigerated water bath (Jalabo F-1250)
2. Fume hood (ASTEC sensair)
3. Centrifuge (Hermle ZK380)
4. Ultracentrifuge (BECKMAN L-80)
5. Microcentrifuge (Biofuge Pico kendro)
6. Horizontal electrophoresis set (GelMate 2000m TOYOBO)
7. Vortex mixer (vortex-gene2 TM)
8. Autipipettes (Gibson)
9. Homogenizer (ART-MICCRA D-1)
10. PCR system (Touchgene TM Gradient, GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmet TM, PTC-100TM, MJ Researcher)
11. Gel documentation system (Sysgene GeneGenius,Gene Tool Match)
12. Spectrophotometer (Genesys 10 UV / Shimadzu UV-160A)
13. LightCycler LC II system (Roche®)
14. WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System 3500 HT (Transgenomic, San Jose, CA)
15. DNASep® HT column alkylated nonporous poly(styrene-divinylbenzene) (Transgenomic, San Jose, CA)

3.3.2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

การสกัด DNA (DNA extraction): NaCl, KCl, Na_2HPO_4, KH_2PO_4,NH_4Cl, $KHCO_3$, Phenol, 8-hydroxyquinoline, TE 20-5 Chloroform-Isoamyl alcohol, Absolute ethanol (Merck®), $Na_2EDTA.H_2O$ (Biobasic®,USA.), Trizma® base (Sigma chemical Co.), RBC lysis, Phosphate Buffer Solution; PBS, soldium Decadocyl Sulfate; SDS (Sigma chemical Co.), ProteinkinaseK® (Amercham, USA Seakam®)

การทำปฏิกิริยา PCR: Quinogen Taq polymerase, Immulase hot start Taq polymerase/ buffer, dNTPs (Perkin Elmer®), primers (Bio Service Unit; BSU, Thailand), 10 NE buffer 3 (Merck®), restriction enzyme; BsmAI (Biorad Inc.), Triton X-100

การตรวจ gel electrophoresis: LE Agarose (FMC Bioproducts), ethidium bromide (Pacific Science, USA), GenerulerTM 50 100 bp DNA ladder (Gibco BRL), Gel electrophoresis apparatus (BIO-RAD)

การสกัด cytosol: Tris-HCl, EDTA, NaCl, Phosphate buffer solution; pH 6.5, 1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene; CDNB (Sigma chemical Co.), Glutathione reduce; GSH (Sigma chemical Co.)

การวัดปริมาณโปรตีน: Bovine Serum Albumin; BSA, Folin& Ciocalten's phenol reagent, Na_2CO_3, sodium citrate, $CuSO_4$, NaOH

การทำ DHPLC: 0.1 M Triethyl ammonium acetate; TEAA (Transgenomic, Crewe, UK), 2.5% CAN in 0.1 M TEAA, 8% Acetonitrile HPLC grade (LabScan Asia), 75% Acetonitrile

3.4. วิธีดำเนินการวิจัย

แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ การหาชนิดและความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* จากตัวอย่างเลือดของผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับและคนปกติ และแล้วนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ต่อความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับเปรียบเทียบกับคนปกติ (genetic association) และศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ (phenotypic determination) เปรียบเทียบกับชนิดของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* (genotypic determination) จากตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อตับของผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ (โดยตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อตับที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยนั้นจะต้องเป็นของบุคคลเดียวกัน) แล้วนำไปหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* เปรียบเทียบกับการทำงานของเอนไซม์ในผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีจีโนไทป์ต่างกัน (genotype-phenotype correlation)

3.4.1. การหาชนิดและความถี่ของความหลากหลายของยีน *GSTs* (genotypic determination)

การหาชนิดของความหลากหลายของยีน *GSTs* ทำโดยการนำตัวอย่างเลือดที่เก็บได้จากผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ และกลุ่มคนปกติ มาทำการแยกเม็ดเลือดขาว เพื่อนำมาสกัด DNA โดยวิธี phenol/ chloroform หรือ salting-out แล้วทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA) ด้วยเทคนิค และ primer ที่มีความจำเพาะในการตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* เช่น polymerase chain reaction (PCR), multiplex PCR, PCR-RFLP (Restriction Fragment Length), real time-PCR และ DHPLC เป็นต้น

โดยความหลากหลายของยีน *GSTs* ที่พบมีหลากหลายชนิด (ตารางที่ 1) จึงไม่สามารถทำการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมดตามที่เคยมีการรายงานไว้ เนื่องจากต้องใช้เวลา และงบประมาณเป็นจำนวนมาก โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมดังกล่าวอาจตรวจไม่พบในกลุ่มประชากรตัวอย่าง ซึ่งการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ยังไม่มีข้อมูลการศึกษาในกลุ่มประชากรไทยมากนัก ดังนั้นในงานวิจัยในครั้งนี้จึงทำการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ชนิด M1, P1 และ T1 (ตารางที่ 6) ในกลุ่มตัวอย่างของประชากรไทยที่เป็นมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma หรือ cholangiocarcinoma

เปรียบเทียบกับคนปกติ เพื่อหาชนิด และความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ในกลุ่มประชากรไทยเปรียบเทียบกับประชากรในเชื้อชาติอื่น

ตารางที่ 6. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ที่ทำการวิจัย [6]

Class	Allele	Nucleotide change(s)	Protein change (s)*
Mu (μ)	*GSTM1*A*	wild type	-
	*GSTM1*0*	gene deletion	No protein
Pi (π)	*GSTP1*A*	313A, 341C, 555C	Ile^{105}, Ala^{114}, Ser^{185}
	*GSTP1*B*	313G, 341C, 555T	Val^{105}, Ala^{114}, Ser^{185}
	*GSTP1*C*	313G, 341T, 555T	Val^{105}, Val^{114}, Ser^{185}
Theta (θ)	*GSTT1*A*	wild type	-
	*GSTT1*0*	gene deletion	No protein

*Numbering of amino acids includes initiator methionine.

3.4.1.1. การแยกเม็ดเลือดขาวเพื่อเตรียมสกัด DNA

นำตัวอย่างเลือดที่เก็บจากผู้เข้าร่วมวิจัย ประมาณ 5-10 ml โดยมี EDTA ผสมอยู่ 200 μl

↓ ปั่นที่ 3,000 rpm นาน 5 นาที 4°C เพื่อตกตะกอน lymphocyte

กำจัดส่วน supernatant (plasma) โดยใช้ pipette

↓ ล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) จำนวน 2 ครั้ง

เติม 3-5 volumes ของ lysis buffer

↓ ตั้งทิ้งไว้ที่ T=25° C นาน 10 นาที

นำไปปั่น (centrifuge) เพื่อกำจัด RBC lysis

↓

ล้าง WBC ด้วย PBS 2 ครั้ง และเก็บ WBC ไว้ สำหรับเตรียมสกัด DNA ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.4.1.2. การสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาวโดยวิธี phenol/chloroform

เติม 4 ml ของ TE20-5 เขย่าจน WBC แตกกระจายออก

(TE20-5 จะประกอบด้วย 20mM Tris-HCl pH 7.5 และ 5 mM EDTA)

↓ เติม 10% SDS จำนวน 200 µl และ

2 mg/ml proteinaseK จำนวน 200 µl

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ใน water bath ที่ T= 37°C ทิ้งไว้ข้ามคืน

↓

เติม ½ volumes ของ phenol (pH=8.0)

และ½ volumes ของ $CHCl_3$-isoamyl alcohol (24:1)

↓ ปั่นที่ 2,500 rpm นาน 10 นาที 4°C

กำจัดชั้น organic phase (ชั้นล่าง) ด้วย pipette

} 2 ครั้ง

↓

เติม 1 volume ของ $CHCl_3$-isoamyl alcohol (24:1)

↓ ปั่นที่ 2,500 rpm นาน 10 นาที 4°C

กำจัดชั้น organic phase (ชั้นล่าง) ด้วย pipette

} 2 ครั้ง

↓

เติม 1/10 volume ของ 4M NaCl และ 2 volumes ของ absolute alcohol

ที่เย็น พลิกกลับไปมาเพื่อให้ DNA ตกตะกอน

↓ ปั่นที่ 3,000 rpm นาน 10 นาที 4°C

ล้าง DNA ด้วย 70% ethanol จำนวน 5 ml

↓ ปั่นที่ 3,000 rpm นาน 10 นาที 4°C

ตั้งทิ้งไว้จน DNA แห้งที่ T=25°C และนำ DNA ไปละลายด้วยน้ำ

↓

นำไปวัด ODที่ 260 nm และคำนวณอัตราส่วนระหว่าง OD 260/280

และคำนวณความเข้มข้นของ DNA จากสูตร

DNA concentration in µg/ml or ng/µl = OD 260×50×dilution factor

3.4.1.3. การสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาวโดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือ (salting-out)

เติม 3 ml ของ nuclei lysis buffer เขย่าจน WBC แตกกระจายออก

↓ เติม 10% SDS จำนวน 200 µl และ 20 mg/ml proteinaseK จำนวน 25 µl

ผสมให้เข้ากันแล้ว incubated ใน water bath ที่ T= 37°C ทิ้งไว้ข้ามคืน

↓

เติม 6M saturated NaCl จำนวน 1 ml เขย่าให้เข้ากันประมาณ 15 วินาที

↓ ปั่นที่ 2,500 rpm นาน 15 นาที 4°C

ดูดเอาชั้น supernatant (ชั้นบน) ซึ่งมี DNA ด้วย pipette ไปใส่หลอดใหม่

↓

เติม 2 volume ของ absolute ethanol ที่เย็น

พลิกกลับไปมา จะได้ สายของ DNA ออกมา

↓ ปั่นที่ 3,000 rpm นาน 5 นาที4°C

DNA ตกตะกอน

↓

ล้าง DNA ด้วย 70% ethanol จำนวน 1 ml

↓ ปั่นที่ 3,000 rpm นาน 10 นาที4°C } 2 ครั้ง

ตั้งทิ้งไว้จน DNA แห้งที่ T=25°C และนำ DNA ไปละลายด้วยน้ำ

↓

นำไปวัด OD ที่ 260 nm และคำนวณอัตราส่วนระหว่าง OD 260/280

และคำนวณความเข้มข้นของ DNA จากสูตร

DNA concentration in µg/ml or ng/µl = OD 260×50×dilution factor

3.4.1.4. ขั้นตอนการหาชนิดและความถี่ของความหลากหลายของยีน *GSTs*

นำตัวอย่างเลือดจากผู้เข้าร่วมวิจัยประมาณ 5-10 ml

ใส่ในหลอดที่มี EDTA 200 µl ผสมอยู่

↓

สกัด genomic DNA จากตัวอย่างเลือดโดยใช้วิธี

phenol / chloroform หรือวิธี salting-out

↓

นำ genomic DNA ที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ด้วย primer

และเทคนิคที่มีความจำเพาะ (ตารางที่ 7 และ 8)

↓

ตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis

↓

และคำนวณหาร้อยละความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs*

หมายเหตุ: ถ้าไม่นำมาสกัด DNA ทันที จะต้องเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่ 4 °C

ตารางที่ 7. แสดงลำดับเบส และขนาดของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา [18, 19, 20]

Name	Sequence	Size (bp)
GSTP1F	5′-CCAGTGACTGTGTGTTGATC-3′	189
GSTP1R	5′-CAACCCTGGTGCAGATGCTC-3′	
GSTM1F	5′-CTGCCCTACTTGATTGATGGG-3′	273
GSTM1R	5′-CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3′	
SGSTT1F	5′-CCAGCTCACCGGATCATGGCCAG-3′	466
SGSTT1R	5′-CCTTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3′	
LGSTT1F	5′-CAGTTGTGAGCCACCGTACCC-3′	1460
LGSTT1R	5′-CGATAGTTGCTGGCCCCCTC-3′	
ACTBF	5′-GGCCCCTCCATCGTCCACCG-3′	496
ACTBR	5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′	
CX26F	5'-TCTTTTCCAGAGCAAACCGC-3'	267
CX26R	5'-GACACGAAGATCAGCTGCAG-3'	
CX4R	5′-TTTTCGGTCTCTCTGCTGGTCAGTG -3′	196
CX4F	5′-CAAAGCCCTCACTCAAACAGTAAGC-3′	

ตารางที่ 8. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* และเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) [18, 19, 20]

GENE	*GSTM1*	*GSTP1*	*GSTT1*
Located	1p13.3	11q13	22q11.2
Detected mutation	deletion	SNPs	deletion
Method	multiplex PCR	PCR-RFLP	multiplex PCR
Internal control	β-actin	-	-
Enzyme cut	-	*BsmAI* GTCTC (N)	-
Fragment pattern wild-type heterozygous mutant	 273 bp - deletion	 189 bp 41bp/189 bp 41 bp	 466 bp 466 bp / 1.46 kb 1.46 kb

3.4.1.5. Condition ในการทำ PCR ของยีน *GSTM1* [20]

DNA (100 ng)	4	µl
10X PCR buffer	2.5	µl
50 mM $MgCl_2$	0.75	µl
2 mM dNTPs	2.5	µl
10 pmol/ µl GSTM1F	1	µl
10 pmol/ µl GSTM1R	1	µl
10 pmol/ µl ACTBF	1	µl
10 pmol/ µl ACTBR	1	µl
5U/µl Taq (Imulase®)	0.2	µl
1% Triton X-100	0.25	µl
Sterile distilled water	10.8	µl
Total	25	µl

Thermal cycle condition			
95.0°C	10	min	
95.0°C	1	min	35 cycles
61.0°C	30	sec	
72.0°C	1	min	
72.0°C	7	min	
4.0°C	∞		

Gel electrophoresis 1.5% agarose (110V 30 min)

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ primer 2 คู่ คือ *GSTM1* และ β-actin ทั้ง forward และ reverse primer เพื่อแยก homozygous mutant ออกจาก wild type หรือ heterozygous mutant จากนั้นนำ PCR product มาตรวจสอบผลด้วย electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel (110V เป็นเวลา 30 min) พบว่าถ้าไม่ปรากฏ band ขึ้นที่ 273 bp แสดงว่าเป็น homozygous mutant แต่ถ้าปรากฏ band ขึ้นที่ 273 bp แสดงว่าไม่เกิดการขาดหายไปของยีน *GSTM1* จึงไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น wild type หรือ heterozygous mutant จึงต้องนำแยกต่อโดยใช้เทคนิค real time-PCR หรือ DHPLC ซึ่งในปฏิกิริยานี้ใช้ β-actin เป็น internal control โดยจะปรากฏ band ขึ้นที่ 496 bp

3.4.1.6. Condition ในการทำ PCR ของยีน *GSTP1* [19]

DNA (100 ng)	4	µl
10X PCR buffer	2.5	µl
50 mM $MgCl_2$	0.75	µl
2 mM dNTPs	2.5	µl
10 pmol/ µl GSTP1F	1.0	µl
10 pmol/ µl GSTP1R	1.0	µl
5U/µl Taq (Imulase®)	0.15	µl
Sterile distilled water	13.1	µl
Total	25	µl

Thermal cycle condition			
95.0°C	10	min	
95.0°C	30	min	30 cycles
60.0°C	30	sec	
72.0°C	30	sec	
72.0°C	7	min	
4.0°C	∞		

Gel electrophoresis 1.5% agarose (110V 40 min), overnight 16 hrs. incubate 55°C

Enzyme cut reagent:	10 NE buffer 3	5	µl
	PCR product	20	µl
	enzyme *BsmAI*	2	µl
	Sterile distilled water	23	µl
	Total	50	µl

Gel electrophoresis 2% agarose (110V 1.15 hrs)

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR-RFLP โดยใช้ primer 1 คู่ คือ *GSTP1* ทั้ง forward และ reverse primer หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำการตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ BsmAI ซึ่งมีความจำเพาะกับลำดับเบส [-GTCTC (N)-] เพื่อแยกว่าเป็น wild type หรือ heterozygous mutant หรือ homozygous mutant จากนั้นนำมาตรวจสอบผลด้วย electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel (110V เป็นเวลา 1.15 hrs) ซึ่ง wild type จะปรากฏ band ขึ้นที่ 189 bp, heterozygous mutant จะปรากฏ band ขึ้นที่ 41 bp/189 bp, และ homozygous mutant จะปรากฏ band ขึ้นที่ 41 bp

3.4.1.7. Condition ในการทำ PCR ของยีน *GSTT1* [18]

DNA (100 ng)	4	µl
10X PCR buffer	2.5	µl
2 mM dNTPs	2.5	µl
10 pmol/ µl LGSTT1F	0.5	µl
10 pmol/ µl LGSTT1R	0.5	µl
10 pmol/ µl SGSTT1F	2.0	µl
10 pmol/ µl SGSTT1R	2.0	µl
5U/µl Taq (Qiagen®)	0.2	µl
Sterile distilled water	10.8	µl
Total	25	µl

Thermal cycle condition			
95.0°C	15	min	
94.0°C	30	sec	35 cycles
68.0°C	30	sec	
72.0°C	1	min	
72.0°C	7	min	
4.0°C	∞		

Gel electrophoresis 1.5% agarose (110V 40 min)

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ primer 1 คู่ คือ *GSTT1* ทั้ง forward และ reverse primer เพื่อแยกว่าเป็น wild type หรือ heterozygous mutant หรือ homozygous mutant จากนั้นนำ PCR product มาตรวจสอบผลด้วย electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel (110V เป็นเวลา 40 min) ซึ่ง wild type จะปรากฏ band ขึ้นที่ 459 bp, heterozygous mutant จะปรากฏ band ขึ้นที่ 459 bp /1.46 kb, และ homozygous mutant จะปรากฏ band ขึ้นที่ 1.46 bp

3.4.1.8. Condition ในการทำ real time-PCR

***GSTM1* gene**

10 pmol/ µl primer GSTM1R	0.5	µl
10 pmol/ µl primer GSTM1F	0.5	µl
CYBR	2.0	µl
Sterile distilled water	4.0	µl
5 ng/ µl genomic DNA	3.0	µl
Total	10	µl

Connexin 26 (*CX26*) gene

10 pmol/ µl primer CX26R	0.5	µl
10 pmol/ µl primer CX26F	0.5	µl
CYBR	2.0	µl
Sterile distilled water	4.0	µl
5 ng/ µl genomic DNA	3.0	µl
Total	10	µl

Thermal cycle condition

95 °C	15	min	
95 °C	10	sec	30 cycles
62 °C	5	sec	
72 °C	13	sec	
40 °C	30	sec	

ในปฏิกิริยาของ real time-PCR ทำเพื่อแยกว่าเป็น wild type หรือ heterozygous mutant ในยีน *GSTM1* คือ ในปฏิกิริยานี้ต้องทำแยกหลอดกันระหว่างยีน *GSTM1* ซึ่งเป็นยีนที่ต้องการศึกษา กับยีน *CX26* ซึ่งเป็น internal control เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบในการคำนวณว่าปริมาณ DNA ตั้งต้นมีปริมาณเท่ากัน จึงจะสามารถแยกบอกว่าเส้นกราฟที่ขึ้นก่อนเป็น wild type และ เส้นกราฟขึ้นที่หลังจะเป็น heterozygous mutant และเมื่อนำมาเข้าสูตรก็จะพบว่าค่าที่ได้จากการคำนวณจะมีความแตกต่างกันเป็น 0.5 คือ wild type มีค่าเท่ากับ 1 แต่ heterozygous mutant มีค่าเท่ากับ 0.5 ดังนั้นจึงใช้ real time-PCR นี้ในการหา wild type และ heterozygous mutant ที่เป็นเพศหญิงและเพศชาย เพื่อนำไปใช้กับ condition ของ DHPLC ต่อไป ซึ่งในการทำปฏิกิริยา real time-PCR นั้นจะต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของสาร เนื่องจากวิธีนี้มีความไวในการตรวจสอบสูง มีราคาแพง และต้องทำให้ปริมาณ DNA ตั้งต้นของสารเท่ากันในทุกๆ หลอด จึงจะทำให้แปรผลได้อย่างชัดเจน ทำให้สูญเสียเวลา และสิ้นเปลือง

3.4.1.9. Condition ในการทำ DHPLC [21]

DNA (100 ng)	4	µl
10X PCR buffer	2.5	µl
50 mM $MgCl_2$	0.75	µl
2 mM dNTPs	2.5	µl
10 pmol/ µl GSTM1F	1	µl
10 pmol/ µl GSTM1R	1	µl
5.5 pmol/ µl ACTBF	1	µl
5.5 pmol/ µl ACTBR	1	µl
9.5 pmol/ µl CX4R	1	µl
9.5 pmol/ µl CX4F	1	µl
5U/µl Taq (Imulase®)	0.2	µl
1% Triton X-100	0.25	µl
Sterile distilled water	10.3	µl
Total	25	µl

Thermal cycle condition

95.0°C	10	min	
95.0°C	1	min	24 cycles
61.0°C	30	sec	
72.0°C	1	min	
72.0°C	7	min	
4.0°C	∞		

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้วิธี multiplex PCR โดยใช้ primer 3 คู่ คือ *GSTM1* *ACTB* และ *CX4* ทั้ง forward และ reverse primer แล้วนำ PCR product ที่ได้ปริมาณ 20 µl นำมาฉีดในเครื่อง DHPLC ผลที่ได้จะเป็น quantitative analysis โดยดูจากความสูงของกราฟ (peak height) ซึ่งจะได้กราฟออกมา 3 อัน เรียงต่อกันเป็น *CX4* *GSTM1* และ *ACTB* ตามลำดับ โดยที่ *CX4* เป็นโครโมโซมเพศ (sex chromosome) ซึ่งสามารถใช้ในการบอกเพศ *GSTM1* เป็นยีนที่ต้องการศึกษา และ*ACTB* (β-actin) เป็นโครโมโซมร่างกาย (autosome) โดยทำการเปรียบเทียบภายในคนเดียวกัน ทำให้มีความแม่นยำ และไม่จำเป็นต้องทำให้ DNA ตั้งต้นเท่ากันในทุกหลอด โดยได้กำหนดให้ เพศหญิง (XX) ที่เป็น wild type มีความสูงของ peak ในทั้ง 3 ยีนเท่ากันทุก peak แต่ถ้าในเพศหญิงที่เป็น heterozygous mutant พบว่าความสูงของ peak ในยีน *GSTM1* จะลดลงเป็นครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบความสูงของยีน *ACTB* และ*CX4* ส่วนในเพศชาย (XY) ที่เป็น wild type ความสูงของ sex chromosome ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับความสูงใน peak ของ *GSTM1* และ *ACTB* แต่ในเพศชายที่ที่เป็น heterozygous mutant พบว่าความสูงของ peak ในยีน *ACTB* จะสูงเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับยีน *CX4* และ *GSTM1*

3.4.2. การหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs (phenotypic determination)

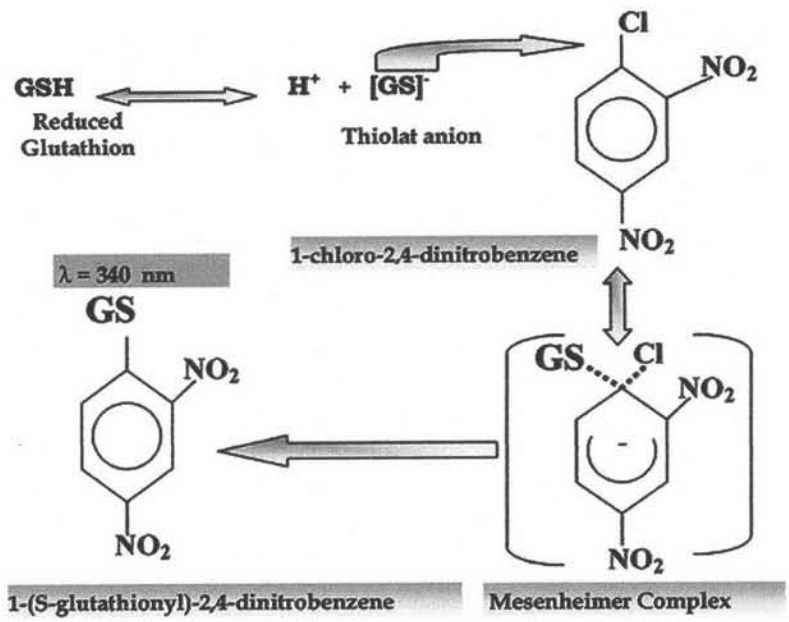
การวิเคราะห์ฟีโนไทป์ (phenotype) ของยีน *GSTs* ในงานวิจัยนี้วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ GSTs จากชิ้นเนื้อตับของผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ ซึ่งเอนไซม์ GSTs นั้นพบได้ทั้งในส่วนของไมโครโซม (microsomal membrane) และส่วนของไซโทซอล (subcellular membrane) แต่ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในส่วนของไซโทซอลนั้นจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าในส่วนของไมโครโซม [22, 23] เนื่องจากมีปริมาณของเอนไซม์ GSTs อยู่ในปริมาณมาก โดยนำมาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นของเอนไซม์ GSTs คือ 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) [24] ซึ่งเป็นสารที่มีความจำเพาะเจาะจง (specific substrate) ของเอนไซม์ GSTs (ตารางที่ 9) ชนิด M1 และ P1 และใช้ GSH (reduced glutathione) เป็น co-substrate แล้วตรวจวัดระดับสาร 1-(S-glutathionyl)-2,4-dinitrobenzene;GS-DNB (metabolite) ที่เกิดขึ้นหลังจากทำปฏิกิริยา (รูปที่ 7)

ตารางที่ 9. แสดงสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะ (specific substrate) กับเอนไซม์ GSTs [10]

	GST								
Substrate	A1-1	A2-2	M1-1	M2-2	M3-3	M4-4	P1-1	T2-2	Microsomal
CDNB	80	80	180	220	7	1.4	105	ND	1.9 (24)[a]
Ethacrynic acid	0.2	0.1	0.08	0.2	0.2	0.1	0.9		ND
Leukotriene A_4	0.009		0.04				0.002		
Styrene, 7,8-oxide	0.02		2.6				0.14		
trans-Stilbene oxide	0.002		5.2	0.0003	0.0004	0.003	0.002		
BP 4,5-oxide	0.05		0.9				0.13		
BP, 7,8-diol-9,10-oxide	0.04		0.6				0.8		
Cumene hydroperoxide	10	100	0.6				0.03	7	0.04(3)[a]

CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; BP, benzo[*a*]pyrene; ND, no detectable activity. [a]Values in parentheses are for activated enzyme.

จากตารางที่ 9 แสดงสารตั้งต้น (substrate) ที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ GSTs ซึ่งมีสารหลายชนิดที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ GSTs แต่สารทั้งหมดนี้มีความจำเพาะกับเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าในการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้สาร CDNB เนื่องมาจากเป็นสารที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ GSTs ชนิด M1 และ P1 มากที่สุด โดยขั้นตอนในการทดลองหาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ในงานวิจัยนี้ แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ได้แก่ การสกัด cytosolic fraction จากชิ้นเนื้อตับ การทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น การวัดปริมาณโปรตีน และการจัด haplo-group ของยีน *GSTs* ชนิด M1 และ P1



รูปที่ 7. แสดงปฏิกิริยาระหว่าง glutathione conjugation กับสารตั้งต้น (CDNB) [25]

3.4.2.1. ขั้นตอนการสกัด cytosol จากชิ้นเนื้อตับตามวิธีของChirst Von Bahr *et al.* [26]

สารเคมี (Buffer): 10 mM Tris-HCl; pH 7.5 ประกอบด้วย 10 mM EDTA, 100 mM NaCl

นำชิ้นเนื้อตับแช่แข็งมาละลายใน buffer ที่แช่เย็น

↓

ตัดชิ้นเนื้อตับเป็นชิ้นเล็กๆ เติม buffer ในปริมาณ 12 ml

↓

จากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อตับไปบดผสม โดยใช้เครื่อง homogenizer

จนเห็นว่าละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน (ประมาณ 15 นาที)

↓

นำไปปั่น (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 10,000 ×g เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 °C

↓

จากนั้นเอาชั้นน้ำส่วนบน (supernatant; S9 fraction) ไปปั่นต่อที่ความเร็วรอบ

100,000 ×g 60 นาที ที่ 4 °C

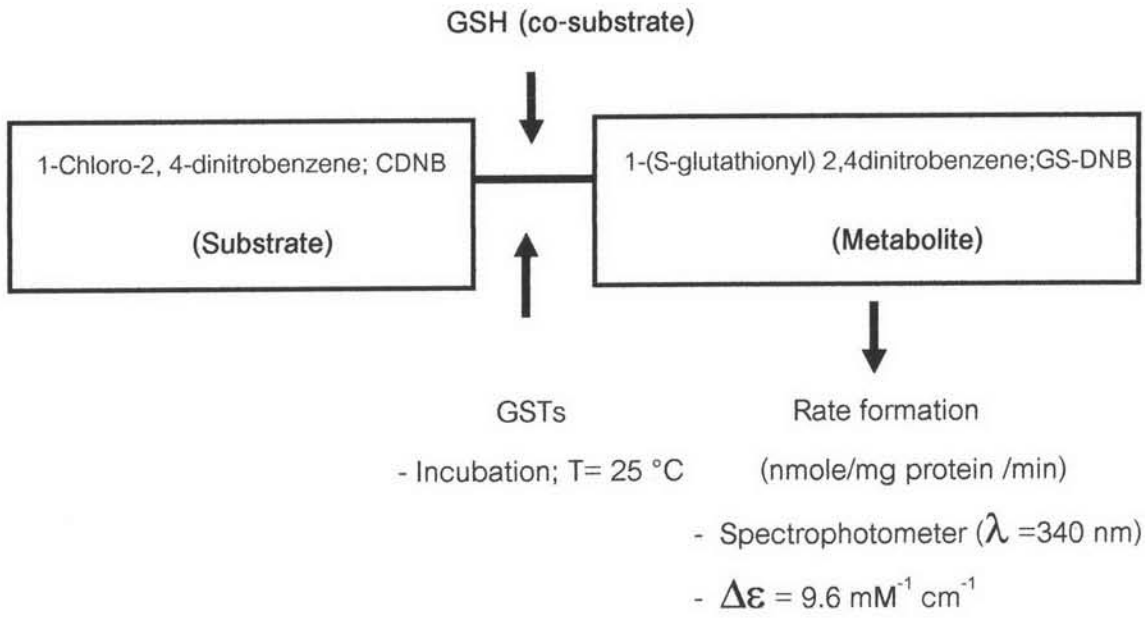
↓

นำส่วนบน (supernatant; cytosolic fraction) ที่ได้ เก็บไว้ที่ -80 °C

และแบ่งส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ **Lowry *et al.***

หมายเหตุ: ชิ้นเนื้อตับที่ตัดออกมาจากผู้ป่วย ถ้ายังไม่นำไปสกัด cytosol และหาปริมาณ enzyme activity ทันที ให้เก็บชิ้นเนื้อตับหรือ cytosolic fraction ที่สกัดไว้แล้วที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะวิเคราะห์ ซึ่งจะไม่ทำให้ปริมาณ enzyme activity เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ

3.4.2.2. การทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ GSTs กับสารตั้งต้น CDNB [25]



โดยในการศึกษาครั้งนี้วัดอัตราการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 1 วินาที โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer UV-VIS (Shimadzu UV-160A) ฟังก์ชั่น kinetic ที่ความยาวคลื่น 340 nm โดยทำปฏิกิริยาในหลอด cuvette 1 ml ซึ่งจะประกอบด้วย 50 µl CDNB, 50 µl GSH, 800 µl potassium phosphate buffer solution; pH 6.5 และ 100 µl cytosol (catalytic enzyme) ที่อุณหภูมิ 25°C (ตารางที่ 10) โดยปริมาณ enzyme activity ที่วัดออกมาได้จะมีหน่วยเป็น nmol/min per mg protein จากนั้นนำค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงต่อนาที($\Delta A/\Delta T$) มาคำนวณ enzyme activity ของสาร1-(S-glutathionyl)-2,4-dinitrobenzene (metabolite) ที่เกิดขึ้น จากสมการของ Beer's Law ในหน่วย nmol/mg protein/min [27]

สมการของ Beer's Law

$$A = \varepsilon bC$$

$$C = A/\varepsilon b$$

หมายเหตุ: ถ้ายังไม่ได้วิเคราะห์หาปริมาณ metabolite ทันทีสามารถเก็บไว้ได้ที่ -20 °C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

ตารางที่ 10. แสดง Conditions ที่ใช้ในการประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) โดยเครื่อง spectrophotometer [2]

Substrate	[substrate] Mm	pH	λ_{max} (nm)	$\Delta\varepsilon$ ($mM^{-1}cm^{-1}$)
1,2-Dichloro-4-nitrobenzene[a]	1.0	7.5	345	8.5
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene[b]	1.0	6.5	340	9.6
4-Nitropyridine-N-oxide	0.2	7.0	295	7.0
p-Nitrophenethyl bromide	0.1	6.5	310	1.2
p-Nitrobenzyl chloride	1.0	6.5	310	1.9
1,2-Epoxide-3-(p-nitrophenoxyl) propane	5.0	6.5	310	1.9
1,2-Napthalene oxide	0.1	8.5	260	8.1
Bromosilfophthalein	0.1	8.5	260	8.1
1-Menaphthyl sulfate[c]	0.03	7.5	330	4.5[e]
Trans-4-Phenyl-3-buten-2-one[d]	0.05	6.5	290	-24.8
Ethacynic acid[d]	0.2	6.5	270	5.0

[a] Modification of an devoiced by Booth et al.(1).

[b] At a GSH concentration of 1 mM.

[c] Assay devised by Gillham (14).

[d] At a GSH concentration of 0.25 mM.

[e] Data derived from Fig. 7 of Goldstein and Combes (15).

โดยละลายสาร CDNB และ GSH ใน absolute ethanol และ potassium phosphate buffer; pH 6.5 ตามลำดับ โดยเมื่อละลายสารดังกล่าวแล้ว ควรใช้ให้หมดภายใน 2 ชั่วโมง และควรเก็บไว้ในที่ป้องกันแสง

3.4.2.3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry *et al.* [28]

ตารางที่ 11. แสดงการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (protein determination)

Standard tube	1	2	3	4	5	6	7	Sample
10 mg/ml BSA	0	2	4	6	9	12	18	10 (cytosolic)
0.5 M NaOH	50	48	46	44	41	38	32	40

เติมสารในแต่ละหลอด ตามที่แสดงในตารางที่ 11 แล้วผสมให้เข้ากัน

↓

เติม working solution จำนวน 650 µl ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (T= 25° C)

↓

เติม Folin & Ciocalteu's phenol จำนวน 20 µl ผสมให้เข้ากัน

↓

หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง Nanodrop® (ฟังก์ชั่นการหาโปรตีนของ Lowry) ที่ความยาวคลื่น 735 nm

หมายเหตุ: ในการทดลองแต่ละครั้งต้องทำ standard curve ทุกครั้ง เพื่อนำค่าโปรตีนที่วัดได้ของสารตัวอย่างนำไปเปรียบเทียบ โดยปริมาณโปรตีนที่วัดออกมาได้มีหน่วยเป็น mg/ml

3.4.3. การจัด haplo-group ของยีน *GSTs*

การจัด haplo-group ของยีน *GSTs* ในงานวิจัยนี้ ทำโดยการนำจีโนไทป์ที่พบในยีน *GSTs* ชนิด M1 และ P1 มาจัดกลุ่ม โดยเรียงลำดับยีนเป็น *GSTs* ชนิด M1 และ P1 ตามลำดับ เช่น WH, WW, HH และ MH ฯลฯ โดยที่ W=wild type, M=homozygous mutant และ H= heterozygous แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยของค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในแต่ละกลุ่ม และนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ชนิด M1 และ P1 กับผลประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ (genotype-phenotype correlation) ในผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ

3.5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลจะถูกบันทึกลงในโปรแกรม Microsoft Excel เพื่อนำไปคำนวณหาร้อยละความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ความแตกต่างของความถี่ของ genotype ที่พบในกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมโดยใช้สถิติเฉพาะทางคือ chi-square with genetic model จำนวน 5 model ดังนี้คือ multiplicative, recessive, dominant, allele positivity, และ Armitage's trend test โดยใช้โปรแกรมที่สามารถดาวน์โหลดได้จาก http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl และทำการวิเคราะห์หาปฏิสัมพันธ์ของยีน (gene interaction or epistasis) *GSTs* ชนิด M1, P1 และ T1 ที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของความความหลากหลายของยีน *GSTs* ในความโน้มเอียงต่อการเกิดมะเร็งตับ โดยใช้โปรแกรม multifactor dimensionality reduction (MDR) ซึ่งสามารถดาวน์โหลดได้จาก http://sourceforge.net/projects/mdr/