บทที่ 4

วิธีดำเนินการศึกษา

ขั้นตอนการศึกษาทั้งหมด มี 9 ขั้นตอน

4.1 การเก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรชาวกูย

4.2 การแยกเซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cell) และเซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cell) ออกจากกัน

4.3 การเตรียมน้ำละลายฮีโมโกลบิน

4.4 การศึกษาชนิดฮีโมโกลบิน โดยวิธี เซลลูโลสอะซิเตทอิเลคโตรโฟเรซีส

4.5 การเตรียมจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากตัวอย่างเลือดประชากรชาวกูย

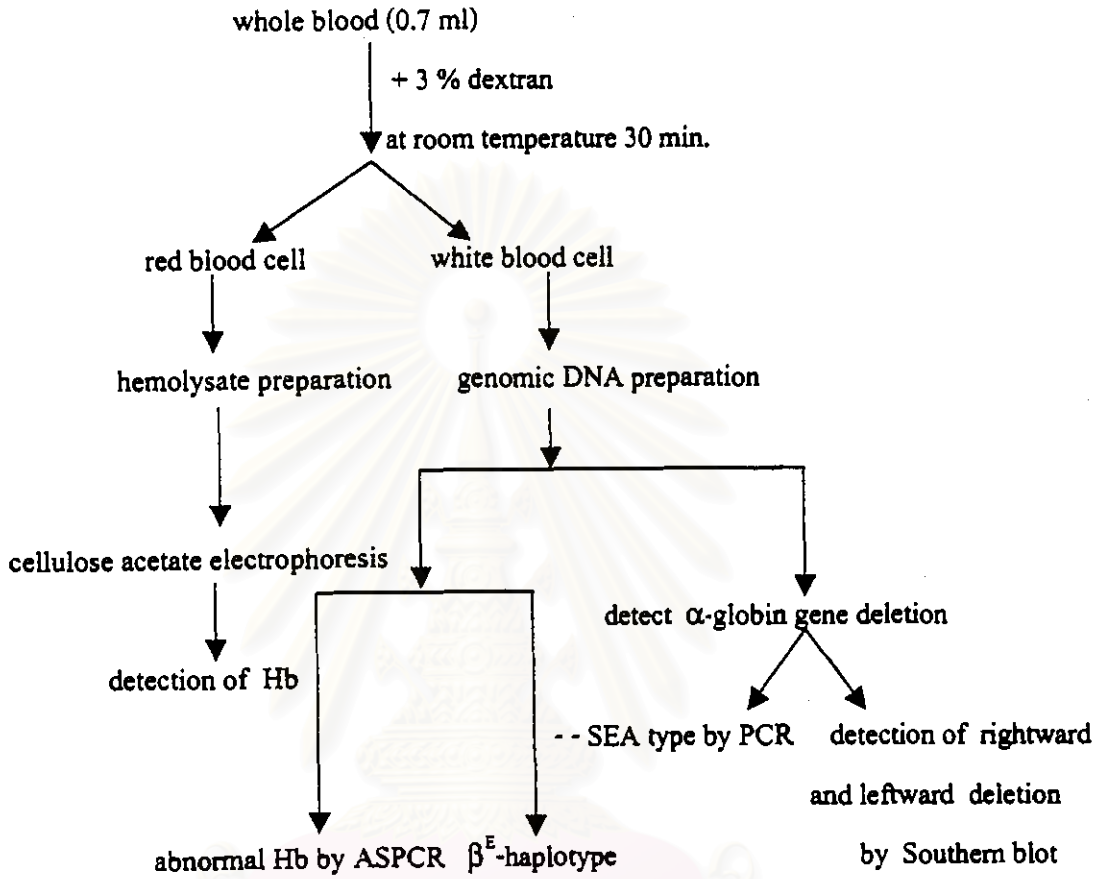
4.6 การหาชนิด Hb Pyrgos โดยวิธี ASPCR

4.7 การศึกษาแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน โดยวิธี PCR และเอนไซม์ตัดจำเพาะ

4.8 การศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟ่าโกลบินแบบ Southeast Asian Type (--SEA) โดยวิธี PCR

4.9 การศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟ่าโกลบินแบบ rightward deleion และ leftward deletion โดยวิธี Southern blot

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาทั้งหมด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1 การเก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรชาวกูย

เก็บตัวอย่างเลือด โดยการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำรายละ 3 มิลลิลิตร จากประชากรชาวกูยในจังหวัดมหาสารคาม และสุรินทร์ ใส่ในหลอดสูญญากาศที่มีสาร EDTA กันเลือดแข็งตัว จำนวน 132 ราย ประกอบด้วย

- ชาวกูยบ้านสะเดาหวาน ตำบลนาภู อำเภอยางสีสุราช จังหวัดมหาสารคาม จำนวน 55 ราย
- ชาวกูยบ้านตากลาง ตำบลกระโพ อำเภอท่าตูม จังหวัดสุรินทร์ จำนวน 77 ราย

นำเลือดที่ได้มาศึกษาในห้องปฏิบัติการวิจัย คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

4.2 การแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากกัน

นำตัวอย่างเลือดปริมาตร 0.7 มล. ใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มล. เติม 3 % dextran ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ตัวอย่างเลือดจะแยกออกเป็น 2 ส่วน คือ

- ส่วนของชั้นบนที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาว เก็บไว้ในหลอด microtube หลอดใหม่ขนาด 1.5 มล.
- ส่วนของชั้นล่างที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดง เก็บไว้ในหลอด microtube หลอดเดิม

4.3 การเตรียมน้ำละลายฮีโมโกลบิน

4.3.1 นำน้ำเลือดส่วนของชั้นล่าง ที่เก็บไว้ใน microtube หลอดเดิม เติม 0.85 % NaCl โดยใช้ปริมาตรสารละลาย NaCl มากกว่าเม็ดเลือดแดง ประมาณ 10 เท่า ปั่นที่ 5,000 rpm นาน 3 นาที จำนวน 3 ครั้ง หรือจนกว่าไม่มีพลาสมาปน

4.3.2 เติมน้ำกลั่นโดยใช้ปริมาตร 1.5 เท่า ของปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดแดง หลังจากนั้นปั่นแยกน้ำส่วนที่เป็นน้ำเกลือทิ้งไป

4.3.3 นำเม็ดเลือดแดงที่ผสมกับน้ำกลั่นที่มีปริมาตร 1.5 เท่า ไปทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกโดย vortex mixer

4.3.4 เติม CCl_4 ในปริมาตรครึ่งหนึ่งของน้ำละลายฮีโมโกลบิน ที่ได้ในข้อ 3 เขย่าอย่างแรงด้วย vortex mixer นำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำละลายฮีโมโกลบินที่อยู่ส่วนบนใส่ในหลอด microtube หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มล. เก็บที่ 4 °C เพื่อที่จะตรวจหาชนิดฮีโมโกลบิน ต่อไป

4.4 การศึกษาหาชนิดฮีโมโกลบิน โดยวิธี เซลลูโลสอะซิเตทอิเลคโตรโฟเรซีส

4.4.1 แช่แผ่นเซลลูโลสอะซิเตท ใน Tris EDTA – borate buffer นาน 5 นาที

4.4.2 ซับบัฟเฟอร์ที่มากเกินพอ ออกด้วยกระดาษกรอง

4.4.3 หยดน้ำละลายฮีโมโกลบินลงบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท ด้วยอุปกรณ์สำหรับหยดน้ำละลาย ฮีโมโกลบิน (sample application) ให้ห่างจากปลายด้านหนึ่งประมาณ 2 นิ้ว

4.4.4 ขึงแผ่นเซลลูโลสอะซิเตทใน chamber ใส่บัฟเฟอร์ตัวนำไฟฟ้า โดยให้ปลายแผ่นเซลลูโลสอะซิเตททั้งสองข้างจุ่มอยู่ในบัฟเฟอร์ โดยปลายด้านที่มีน้ำละลายฮีโมโกลบินอยู่ทางด้านขั้วลบ

4.4.5 ปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าไปโดยให้มีศักย์ไฟฟ้าคงที่ ขนาด 350 โวลต์ ที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 20 – 35 นาที หรือจนกว่าแถบฮีโมโกลบินแยกกันชัดเจน

4.4.6 นำแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท ที่แยกชนิดฮีโมโกลบินเสร็จแล้ว มาย้อมด้วยสี poceau S โดยแช่ในกล่องย้อมสีนาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปล้างใน 5 % acetic acid จนสะอาดเสร็จแล้วอ่านผล อ่านผลเสร็จเก็บใส่ถุงพลาสติกปิดให้สนิท เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

4.5 การเตรียมจีโนมิคดีเอ็นเอ จากตัวอย่างเลือดประชากรชาวกูย

4.5.1 นำ supernatant ที่เก็บไว้ใน microtube หลอดใหม่ นำมาปั่นที่ 5,000 rpm นาน 5 นาที เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวตกตะกอน ดูดน้ำส่วนบนทิ้งเติม lysis buffer 500 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ 5,000 rpm นาน 5 นาที จนกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวจะขาว

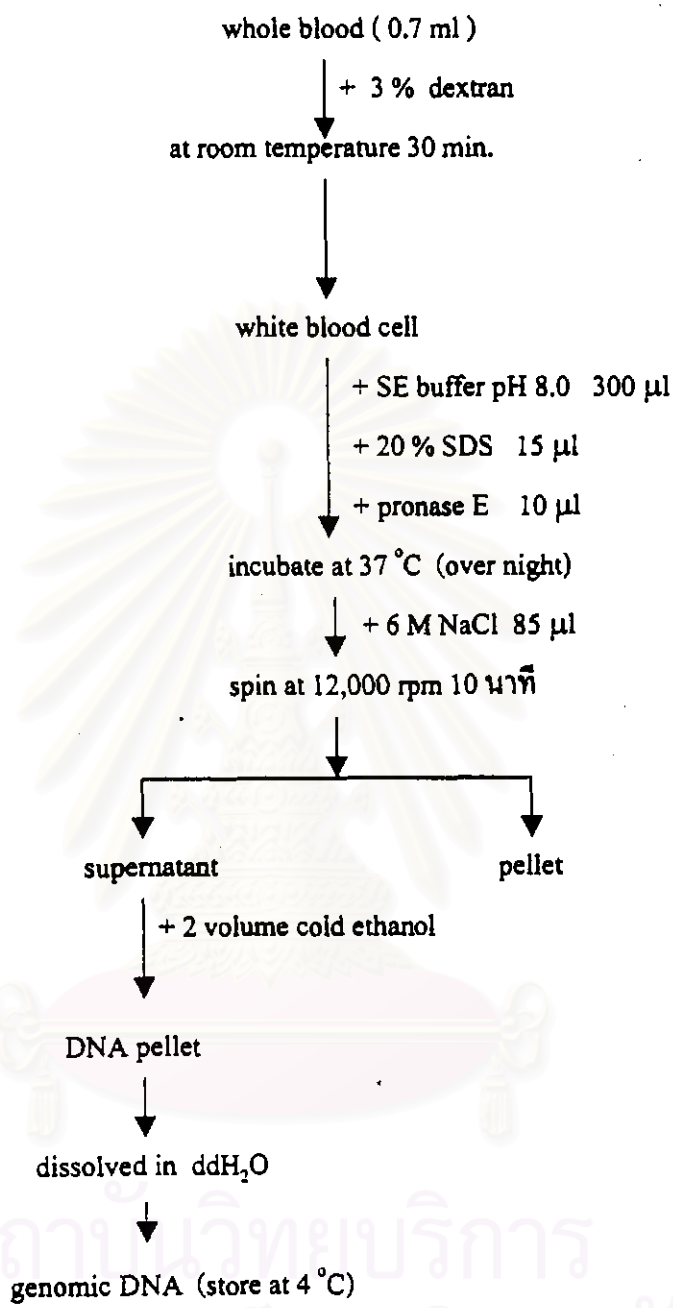
4.5.2 ดูดน้ำส่วนบนทิ้งเติม SE-buffer 300 µl 20 %SDS 15 µl และ Pronase E 10 µl ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 37 °C ใน waterbath ข้ามคืน หรือจนกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวจะถูกย่อยหมด

4.5.3 เติม saturated sodium chloride (6 M NaCl) 0.84 µl ลงใน supernatant ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ดูดเอา supernatant ส่วนบน ใส่ใน microtube หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มล.

4.5.4 เติม 100 % cold absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของ supernatant เขย่าเบาๆ จนเห็นดีเอ็นเอจับกันเป็นเส้นสีขาว ดูด 100 % cold absolute ethanol ทิ้งให้หมด แล้วล้างด้วย 70 % cold absolute ethanol ต่อ หลังจากนั้นดูด 70 % cold absolute ethanol ออกให้หมด

4.5.5 นำดีเอ็นเอที่อยู่ในหลอด microtube หลอดเดิม ไปทำให้แห้งโดย บ่มใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5 – 10 นาที หรือ จนกว่าดีเอ็นเอแห้งสนิท ละลายดีเอ็นเอที่ได้ ด้วยน้ำกลั่น (ddH_2O) 600 µl เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C ขั้นตอนทั้งหมดแสดง ดังรูปที่ 4.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการเตรียมจีโนมิคดีเอ็นเอ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 การศึกษาหาชนิด HbPyrgos โดยวิธี ASPCR

หลังจากการศึกษาชนิดฮีโมโกลบิน โดยวิธีเซลลูโลสอะซิเตทอิเลคโตรโฟเรซีส พบฮีโมโกลบินผิดปรกติชนิดหนึ่ง ซึ่งยังไม่ทราบชนิดที่แน่นอน ฮีโมโกลบินผิดปรกติชนิดนี้ เคลื่อนที่บนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตทได้เร็วกว่า HbA แต่จะช้ากว่า Hb Bart's เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าฮีโมโกลบินผิดปรกติชนิดนี้ เป็นฮีโมโกลบินผิดปรกติชนิดใด จึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบ โดยวิธี ASPCR (Fucharoen และคณะ, 1997) โดยใช้ไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 ขั้นตอนทั้งหมดแสดงดังรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.1 แสดงชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา ASPCR

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับเบสจาก 5'→ 3'
G32	CACGACAACCTCAAGGA
G8	GCTTGGACTCAGAATTAATCC
γ_4	GGCCTAAAACCACAGAGAGT
γ_5	CCAGAAGCGAGTGTGTGGAA

ขั้นตอนการตรวจหา HbPyrgos โดยวิธี ASPCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่อไปนี้

4.6.1 เตรียมหลอดไมโครทิวป์ขนาด 0.5 มล. และเติมสารต่างๆ ต่อไปนี้

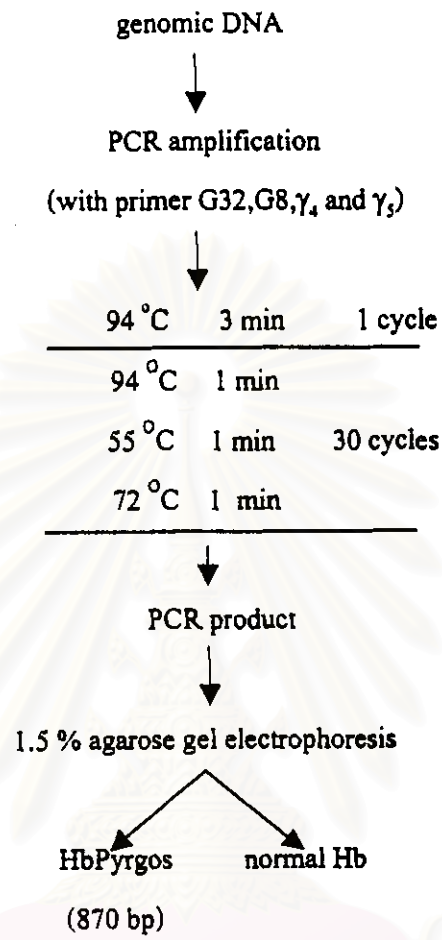
extracted DNA	1	µl
10 X Taq buffer	5	µl
dNTPs	2	µl
γ_4 (10 pmol / µl)	0.25	µl
γ_5 (10 pmol / µl)	0.25	µl
G 32 (30 pmol / µl)	0.5	µl
G 8 (30 pmol / µl)	0.5	µl
Taq DNA polymerase	0.5	µl
sterile distilled H_2O to	50	µl

4.6.2 เริ่มทำ PCR โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler 480 โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาตามลำดับดังต่อไปนี้

94 ^{o}C	3 นาที	1 รอบ
94 ^{o}C	1 นาที	
55 ^{o}C	1 นาที	30 รอบ
72 ^{o}C	1 นาที	

4.6.3 ตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้นมาได้ โดยการทำ 1.5 % อะกาโรสเจล อิเล็คโตรโฟเรซีส เทียบกับขนาด DNA size marker (λ/*Hind* III) และ ตัวอย่าง DNAที่มียีน HbPyrgos (control)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



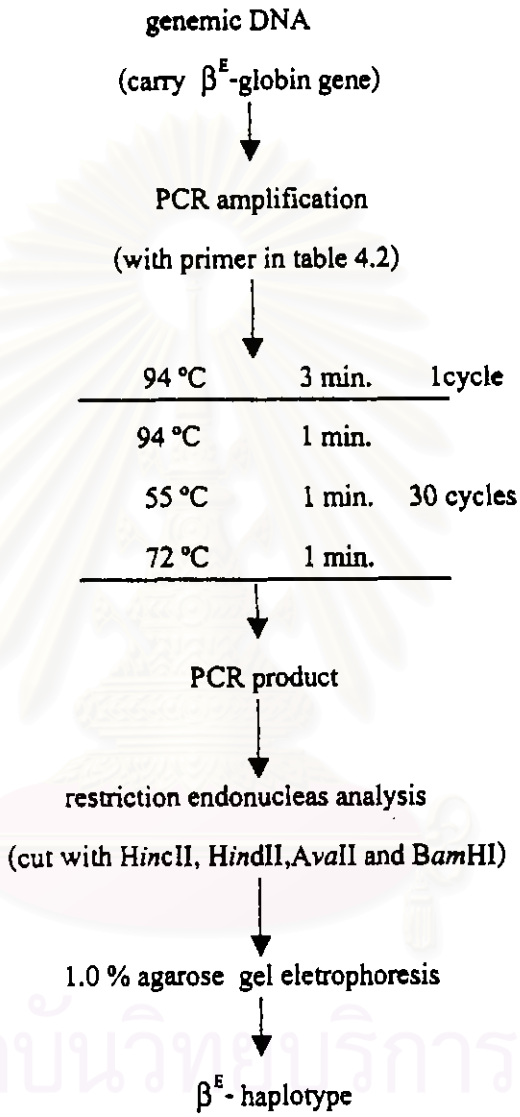
รูปที่ 4.3 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการตรวจสอบ HbPyrgos โดยวิธี ASPCR

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 การศึกษาแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน โดยวิธี PCR และเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

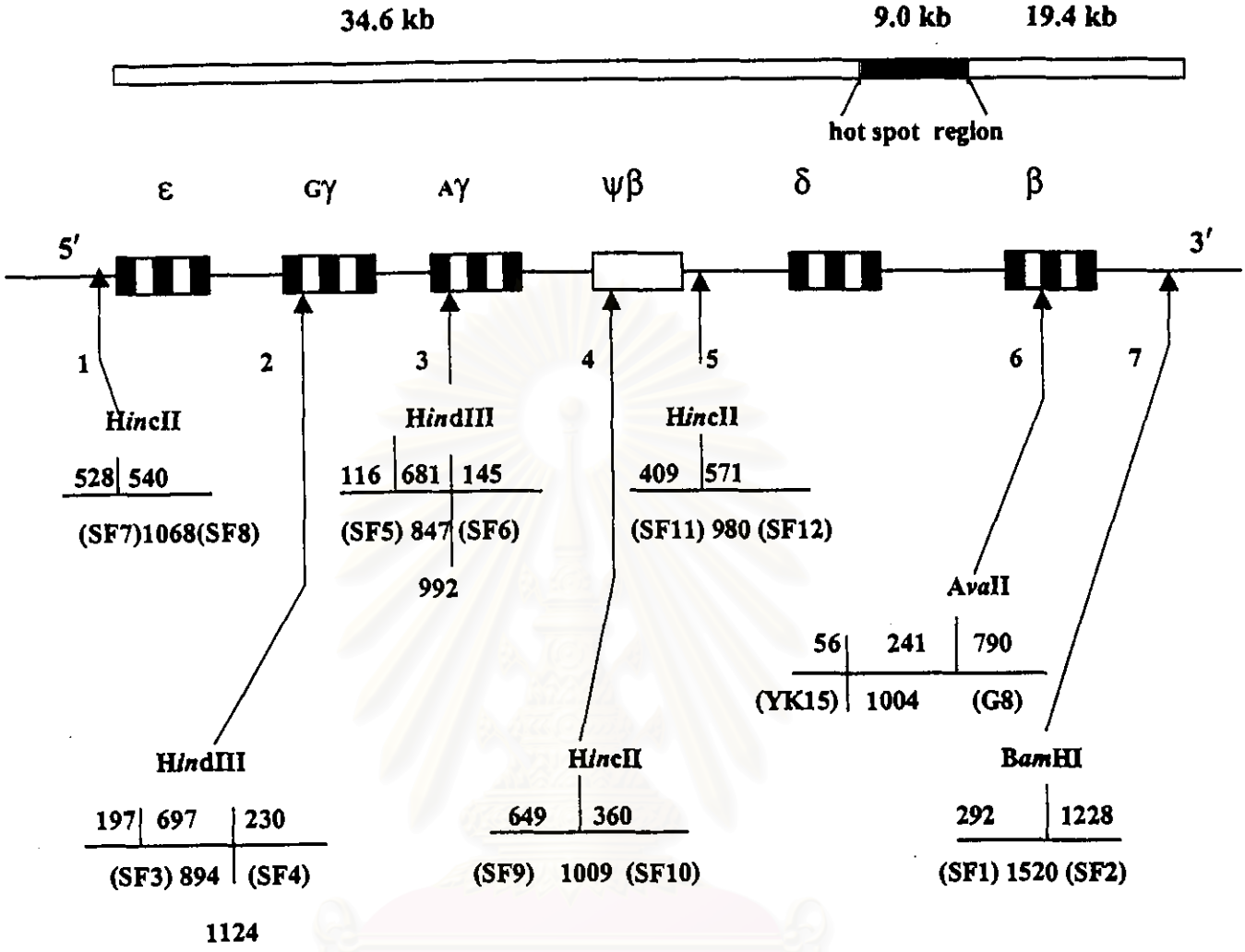
ในการศึกษาครั้งนี้ นำจีโนมิคดีเอ็นเอของประชากรชาวกูยที่มีฮีโมโกลบินอี แบบเฮทเตอโรไซโกต หรือ แบบโฮโมไซโกต มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ภายในกลุ่มยีนบีตาอีโกลบินจำนวน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 1 5' ε-*Hin*cII หมายถึง เอ็นไซม์ *Hin*cII ตัดบริเวณ 5' ถึง β-globin gene ตำแหน่งที่ 2 Gγ-*Hin*dIII หมายถึง เอนไซม์ *Hin*dIII ตัดในส่วน IVS-2 ของ Gγ-globin gene ตำแหน่งที่ 3 Aγ-*Hin*dIII หมายถึง เอนไซม์ *Hin*dIII ตัดในส่วน IVS-2 ของ Aγ-globin gene ตำแหน่งที่ 4 β-*Hin*cII หมายถึง เอนไซม์ *Hin*cII ตัดในส่วน IVS-2 ของ β-globin gene, ตำแหน่งที่ 5 3' β-*Hin*cII หมายถึงเอนไซม์ *Hin*cII ตัดในส่วน ε- globin gene บริเวณ 3' ถึงส่วนของ β-globin gene, ตำแหน่งที่ 6 β-*Ava*II หมายถึง เอนไซม์ *Ava*II ตัดในส่วนของ β-globin gene และตำแหน่งที่ 7 3' β-*Bam*HI หมายถึง เอนไซม์ *Bam*HI ตัดในส่วน 3' ถึงส่วนของ β-globin gene ดังรูปที่ 4.5 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาแต่ละตำแหน่ง แสดงไว้ใน ตารางที่ 4.2 ขั้นตอนการศึกษาทั้งหมดแสดงไว้ ดังรูปที่ 4.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบิน ทั้งหมด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 แสดงตำแหน่งของ DNA restriction polymorphism ที่ทำการศึกษาภายในกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน ที่ประกอบด้วย 7 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 1 5'ε -*Hin*cII, ตำแหน่งที่ 2 Gγ-*Hin*dIII,ตำแหน่งที่ 3 Aγ-*Hin*dIII ตำแหน่งที่ 4 ψβ-*Hin*cII ตำแหน่งที่ 5 3'ψβ-*Hin*cII ตำแหน่งที่ 6 β-A*va*II และตำแหน่งที่ 7 3' β-B*am*HI hot spot region เป็นบริเวณที่เกิด recombination ได้ง่าย มีความยาวประมาณ 9.0 kb อยู่ระหว่างส่วนของ 5' haplotype และ FW ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ PCR โปรแกรม 125 (เครื่อง DNA thermal cycle 9600) ทุกตำแหน่งยกเว้นเพียงตำแหน่งที่ 2 Gγ-*Hin*dIII โดยใช้โปรแกรม 7 และ 14 ตามลำดับ (เครื่อง DNA thermal cycle 480) อาศัยไพรเมอร์และเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อตำแหน่งนั้นๆ (Fukumaki และ Fucharoen, 1991) ยกตัวอย่าง เช่นตำแหน่งที่ 1 5' ε-*Hin*cII หมายถึงบริเวณจากส่วน 5' จนถึงส่วนของยีน ε-globin gene ซึ่งจะถูกเพิ่มดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้น โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อตำแหน่งนั้น เช่น ถ้าใช้ไพรเมอร์ SF7 และ SF8 จะทำให้ได้ขนาดดีเอ็นเอ 1068 bp เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*cII จะทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 540 bp และ 528 bp รายละเอียดของไพรเมอร์ต่างๆ แสดงไว้ในตาราง 4.2

ตารางที่ 4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และตำแหน่งของยีนภายในกลุ่มยีนบีตาโกลบิน ที่ใช้ในการศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินในประชากรชาวกูย

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5' → 3'	โพลีมอร์ฟิกไซท์	ยีน
[1]SF7	GGCACATGGATCGAATTGA	*Hinc*III	5'ε
[2]SF8	ACCATGTGCCAGGCCTGAG		
[1]SF3	GTTTGTGTGTGTGTGAGAGC	*Hind*III	Gγ
[2]SF4	GTCTTTAGGCATGCGTCAACA		
[1]SF5	TTAACGTCTTCAGCCTACAA	*Hind*III	Aγ
[2]SF6	CAATCTGCACACTTGAGGGGC		
[1]SF9	GGGAACATAATTTTGTGTGT	*Hinc*II	ψβ
[2]SF10	CCTCTTTTCTTGCAGGATTGC		
[1]SF11	GCTCCATGAACAAACATTCC	*Hinc*II	3'β
[2]SF12	AAGGAGCACCCACTAGCTCA		
[1]YK15	TCTCTCTGCCTATTGGTCTA	*Ava*II	β
[2]G8	GCTTGGACTCAGAATAATCC		
[1]SF1	GCCCACATCACCAAGGCAAT	*Bam*HI	3'β
[2]SF2	GCTCTACGGATGTGTGAGAT		

1 = upstream primers

2 = downstream primers

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ภายในกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน โดยวิธี PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่อไปนี้

1. เตรียม หลอด microtube ขนาด 0.2 มล. และเติมสารต่างๆ ต่อไปนี้

extracted DNA	1 µl
10 x Taq buffer	2.5 µl
dNTPs mixture	1 µl
upstream primers	0.5 µl *
downstream primer	0.5 µl *
Taq DNA polymerase	1 µl
sterile distilled H_2o to	18.5 µl

* รายละเอียดของไพรเมอร์ แสดงไว้ในตารางที่ 4.2

2. ทำ PCR product โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle 9600 โดยใช้โปรแกรม 125 ซึ่งใช้อุณหภูมิและเวลาตามลำดับดังนี้ ยกเว้นตำแหน่ง Gγ-HindIII ที่ใช้โปรแกรม 7 และ 14 ตามลำดับ โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle 480 (รายละเอียดของโปรแกรมแสดงไว้ในภาคผนวก)

94 °C	3 นาที	1 รอบ
94 °C	1 นาที	
55 °C	1 นาที	30 รอบ
72 °C	1 นาที	

3. นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มา 5 µl ผสมกับ loading dye 1µl ไปตรวจดูโดยการทำ 1% อะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซีส เทียบกับตัวเทียบขนาดและย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์และถ่ายรูปตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มได้จะปรากฏเป็นขนาดต่างๆ กันตามชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ในตำแหน่ง polymorphic restriction sites นั้นๆ เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR แล้วนำไปศึกษาต่อ

วิเคราะห์ DNA ที่เพิ่มปริมาณได้ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่อไปนี้

1. เตรียมหลอด microtube ขนาด 1.5 มล. และเติมสารต่างดังต่อไปนี้

PCR product	10 µl
10 x enzyme buffer	1.5 µl
100 mM spermidine	0.1 µl *
distilled H_2O	3.2 µl *
restriction endonuclease	0.1 µl

* รายละเอียดของเอนไซม์และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แสดงไว้ในตารางที่ 4.3

2. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เบาๆ แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C ใน waterbrath ข้ามคืน
3. นำดีเอ็นเอที่ผ่านขั้นตอนการตัดด้วยเอ็นไซม์ เติม loading dye ในอัตราส่วน 5:1 นำไปแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยทำ 1% อะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซีส
4. ย้อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่ตัดได้ หรือ ไม่ได้ ด้วยสารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์
5. เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ (DNA uncut)

ตารางที่ 4.3 แสดงเอนไซม์ตัดจำเพาะและบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในปฏิกิริยาการตัดจำเพาะ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	บัฟเฟอร์
H*inc*II	B-buffer
H*ind*III	B-buffer
AvaII	A*va*II buffer
B*am*H1	E-buffer

จากนั้น ตรวจดูผลโดยการทำ agarose gel electrophoresis

การทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟเรซีส ประกอบด้วยขั้นตอนต่อไปนี้

1. ละลายผง agarose ใน 1 x TAE buffer ตามเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นที่ต้องการ นำไปหลอมละลายในตู้ไมโครเวฟ ประมาณ 2 นาที นำออกมาตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60 ^{0}C
2. เทลงแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ โดยมีหวีเสียบ (comb) วางอยู่ในแนวตั้งฉากกับแผ่นกระจก โดยให้หวี ห่างขึ้นจากแผ่นกระจกเพียงเล็กน้อย
3. ตั้งเจลที่เทไว้ ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าเจลจะแข็งตัวเป็นแผ่น นานประมาณ 10 นาที (ถ้าต้องการ
4. เก็บแผ่นเจล ควรห่อด้วยพลาสติกและเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 °C
5. วางแผ่นเจลใน chamber ที่มี 1xTAE buffer อยู่ภายใน โดยให้ตำแหน่งหลุมของแผ่นเจลอยู่ทางขั้วลบ ใช้ autopipette ดูดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ หรือ PCR product มาผสมกับ loading dye ใน อัตราส่วน 5:1 แล้วหยอดลงในหลุมของเจล ที่อยู่ใน chamber ที่มี 1 x TAE buffer อยู่ภายใน ให้ครบตามจำนวนตัวอย่างทั้งหมด พร้อมทั้งหยอด DNA size marker และ control ในหลุมใดหลุมหนึ่ง เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ
6. เปิดเครื่อง mini gel electrophoresis ให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวกประมาณ 2 ใน 3 ของ แผ่นเจล (เพื่อความชัดเจนในการแยกดีเอ็นเอ)
7. นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์ (0.5mg/ml) ประมาณ 10 นาที
8. ถ่ายรูปแถบดีเอ็นเอใน gel documentary and analytical system, Gel DOG 1000 (Biorad) เก็บไว้อ่านผล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 การศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ Southeast Asian type (- -SEA) หรือ α^0–thalassemia โดยวิธี PCR

Southeast Asian type (--SEA) เกิดจากการขาดหายไปของดีเอ็นเอประมาณ 20 kb ซึ่งทำให้ยีน α_2 และ α_1 ขาดหายไปบนกลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน ทำการศึกษาโดยนำจีโนมิคดีเอ็นเอของประชากรชาวกูย มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็น โดยการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน แสดงไว้ในตารางที่ 4.4 ไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิด จะเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอแตกต่างกัน โดยไพรเมอร์ A7 และ A9 ซึ่งคร่อมอยู่บริเวณที่ขาดหายไปในยีน --SEA สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 660 bp ส่วนในคนปรกติ ไพรเมอร์ A7 และ A1B จะสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 314 bp ได้จากคนปรกติ ดังรูปที่ 5.13 (Fucharoen และคณะ,1995)

ตารางที่ 4.4 แสดงชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5' ⟶ 3'
A7	CTCTGTGTTCTCAGTATTGGAG
A1B	GGTCCCTGAGCCCGACGACG
A9	ATATATTGGGTCTGAAGTGTATC

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการตรวจหารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ (- -SEA) โดยวิธี PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่อไปนี้

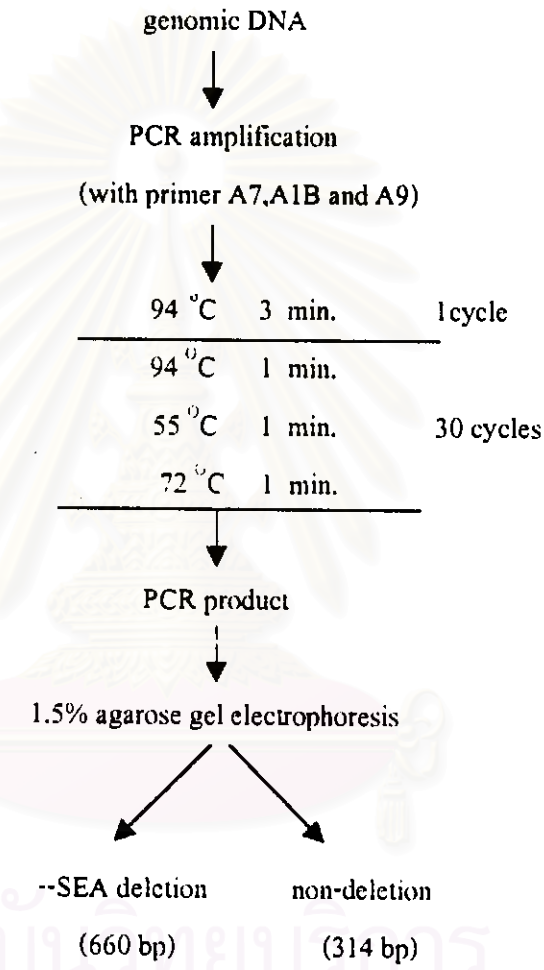
1. เตรียมหลอด microtube ขนาด 0.2 มล. และเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

extracted DNA	1	µl
10 X Taq buffer	2.5	µl
dNTPs	1	µl
50 % Glyceral	5	µl
A7 (15 pmol/µl)	0.7	µl
A9 (15 pmol/µl)	1.7	µl
A1B (1 pmol/µl)	1.5	µl
Taq polymerase	1	µl
sterile distilled H_2O to	25	µl

2. เริ่มทำ PCR โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle 9600 โปรแกรม 125 ใช้อุณหภูมิและเวลาตามลำดับดังต่อไปนี้

94 °C 3 นาที	1 รอบ
94 °C 1 นาที	
55 °C 1 นาที	30 รอบ
72 °C 1 นาที	

2. ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นมาได้ โดยการทำ 1.5% อะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรซีส เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอที่ได้กับ DNA size marker (λ/*Hin*dIII) และ ตัวอย่าง DNAที่มียีน --SEA (control)



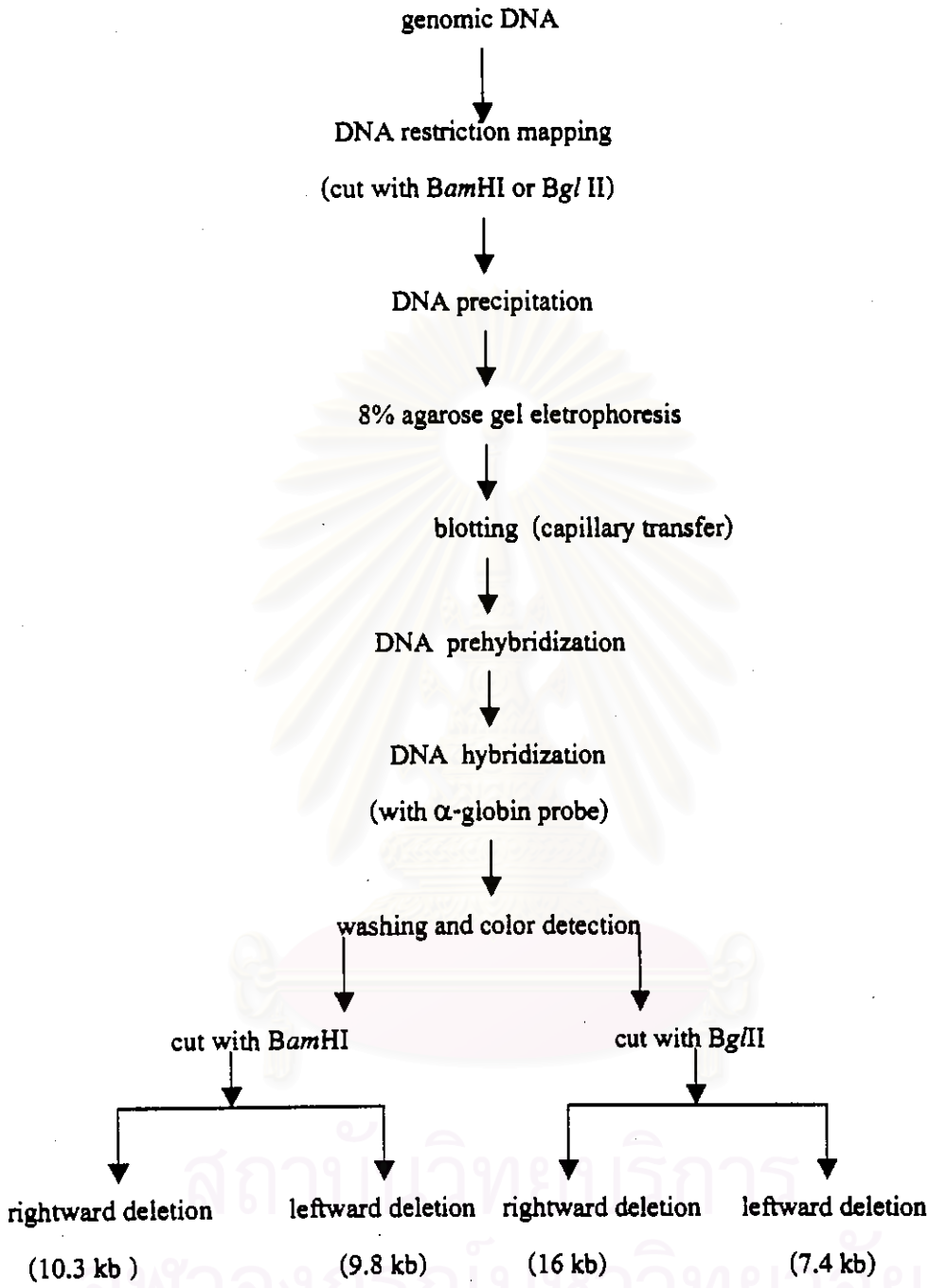
รูปที่ 4.6 แผนภูมิแสดงขั้นตอนในการตรวจสอบ Southeast Asian Type (--SEA) โดยวิธี PCR

4.9 การศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) หรือ α^{+}-thalassemia โดยวิธี Sounthern blot

ในการศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินโดยวิธี Southern blot ครั้งนี้ ทำโดยการนำจีโนมิคดีเอ็นเอ มาตัดด้วยเอนไซม์ B*am*HI ในครั้งแรก ในคนปรกติจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 14 kb ส่วนในคนที่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 10.3 kb และ 9.8 kb ตามลำดับ แต่ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ทั้งสองนี้ มีขนาดใกล้เคียงกันมาก จนไม่สามารถแยกได้ชัดเจน จึงใช้เอนไซม์ B*gl* II ตัดจีโนมิคดีเอ็นเอในตัวอย่างเดิมอีกครั้ง

ซึ่งในคนปรกติจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 12 kb และ 7.4 kb ส่วนในคนที่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ rightward deletion และ leftward deletion จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 16 kb และ 7.4 kb ตามลำดับ ขั้นตอนของการทำ Southern blot โดยตัดจีโนมิคดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ B*am*H1 หรือ B*gl* II จะทำเหมือนกันทุกขั้นตอน ตามคู่มือ Boeringer Mannheim, Germany ดังแสดงในรูปที่ 4.7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.7 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษา Southern blot

ขั้นตอนการศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion และ leftward deletion โดยวิธี Southern blot

ขั้นตอนการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ B*am*HI หรือ B*gl* II ประกอบด้วยขั้นตอนต่อไปนี้

1. เตรียม หลอด microtube ขนาด 1.5 มล และเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

DNA 3-5 µg ในน้ำกลั่นปริมาตรรวม	250 µl
10X E buffer	30 µl
100 mM spermidine	9 µl
น้ำกลั่น	15.5 µl
B*am*HI	1.5 µl

อุ่นที่ 37 °C ใน warterbaht นาน 12 - 18 ชั่วโมง (ข้ามคืน)

2. เตรียม หลอด microtube ขนาด 1.5 มล และเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

DNA 3-5 µg ในน้ำกลั่นปริมาตรรวม	250 µl
10X E buffer	30 µl
100 mM spermidine	9 µl
น้ำกลั่น	15.5 µl
B*gl* II	1.5 µl

อุ่นที่ 37 °C ใน warterbaht นาน 12 - 18 ชั่วโมง (ข้ามคืน)

3. การตกตะกอนดีเอ็นเอหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ B*am*HI หรือ B*gl* II

3.1 เติม 0.5 M EDTA 1/50 volume ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มล ที่ผ่านปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ B*am*HI หรือ B*gl* II

3.2 เติม 2 M NaOAE 1/10 volume ในหลอด microtube หลอดเดิม

3.3 เติม 100 % ethanol 2 volume ในหลอด microtube หลอดเดิม

3.4 นำไป freeze ที่ -70 °C เวลา 15 นาที

3.5 ปั่นที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที

3.6 ดูดน้ำส่วนบนทิ้งแล้วล้างตะกอน DNA ด้วย 70 % ethanol

3.7 ดูด 70 % ethanol ทิ้ง แล้วทำให้ตะกอน DNA แห้งที่ 37 °C นาน 5 – 10 นาที

3.8 ละลายตะกอน DNA ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 µl เก็บที่ 4 °C

4. ขั้นตอนการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI หรือ *Bgl* II โดยวิธี อะกาโรสเจล อิเล็คโตรโฟเรซีส

4.1 เตรียม agarose gel ให้มีความเข้มข้น 0.8 % ใช้ comb ขนาด 15 หลุม ใช้ 1XTAE-buffer ในขั้นตอนการเตรียมเจลและการทำอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซีส

4.2 นำ DNA ตัวอย่างที่ต้องการตรวจ 10 µl และ DNA control 10 µl ที่ตกตะกอนเสร็จแล้ว มาผสมกับ dye 3 µl เตรียมไว้หยอด ส่วน DNA size marker (λ/*Hin*dIII) 5 µl จะต้องเติม TE buffer 5 µl และ dye 3 µl ก่อนหยอด

4.3 ใช้ autopipette ดูดตัวอย่าง DNA ที่ต้องการตรวจสอบ, DNA control และ DNA size marker ที่เตรียมไว้ หยอดลงในหลุมของแผ่นเจล ที่วางอยู่ใน chamber ที่มีสารละลาย 1XTAE-buffer อยู่จนครบทุกหลุม

4.4 จ่ายกระแสไฟฟ้าขนาด 150 mA จนกระทั่ง DNA ที่หยอดเข้าสู่เนื้อเจลจนหมด จากนั้น เปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็นขนาด 35 mA ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หรือจนกว่า dye เคลื่อนที่ได้ประมาณ 2/3 ของความยาวเจล หลังจากนั้นหยุดการจ่ายกระแสไฟฟ้า

4.5 ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์ 0.5 µg/ml เป็นเวลานาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

4.6 นำไปส่องภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง UV transluminator เพื่อบันทึกระยะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอในแต่ละขนาดของ DNA size marker

4.7 จากนั้นถ่ายรูปเจล (gel documentary and analytical system, Gel Doc 1000 (Biorad) เก็บไว้

5. ขั้นตอนการทำ blotting (capillary transfer)

5.1 แช่แผ่นเจลใน 0.25 M HCl 10 นาที ซึ่งเป็นขั้นตอนของ partial depurination ขณะแช่ เขย่าตลอดเวลาจนครบ 10 นาที

5.2 แช่แผ่นเจลใน alkaline denaturation solution จนครบ 30 นาที ขณะแช่เขย่าตลอดเวลา ที่อุณหภูมิห้อง เสร็จแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

5.3 แช่แผ่นเจลใน Neutralizing buffer จนครบ 30 นาที ขณะแช่เขย่าตลอดเวลา ที่อุณหภูมิห้อง

5.4 ตัดกระดาษ 3 MM จำนวน 3 แผ่น ตามความยาวของถาดสี่เหลี่ยมสแตทเลท ที่เตรียมไว้ เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวกลางเชื่อมกับสารละลาย 20 X SSC ที่อยู่ในถาด โดยมีแผ่นกระจกขั้นวางกับความ ยาวถาดสี่เหลี่ยมสแตทเลท

5.5 ตัดแผ่น nylon membrane 1 แผ่น, ตัดกระดาษ 3MM จำนวน 6 แผ่น และตัดกระดาษหนังสือพิมพ์ โดยให้มีขนาดเท่ากับเจล

5.6 แช่แผ่น nylon membrane ในน้ำกลั่น (autoclave) 5 นาที เสร็จแล้วแช่ต่อใน 20 X SSC (autoclave) อีก 5 นาที

5.7 เทสารละลาย 20X SSC ที่เตรียมไว้โดยไม่ต้อง autoclave ลงในถาดสี่เหลี่ยมสแตนเลท โดยให้มีความสูงประมาณ 2/3 ของถาด วางแผ่นกระดาษ 3 MM จำนวน 3 แผ่น ค่อมแผ่นกระจกที่วางขวางบนถาดสี่เหลี่ยมสแตนเลท โดยให้ปลายของกระดาษ 3 MM จำนวน 3 แผ่น จุ่มในสารละลาย 20X SSC ที่อยู่ในถาดสี่เหลี่ยมสแตนเลท จากนั้นวางแผ่นเจลบนกระดาษ 3MM ซึ่งค่อมผ่านแผ่นกระจก

5.8 นำแผ่น nylon membrane ที่แช่อยู่ในสารละลาย 20 X SSC (autoclave) วางลงบนแผ่นเจล แล้ววางกระดาษ 3 MM จำนวน 6 แผ่น ทับแผ่น nylon membrane อีกครั้ง ก่อนที่จะวางทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ โดยให้มีขนาดหนาประมาณ 10 เซนติเมตร จากนั้นวางทับด้วยกล่องพลาสติกบรรจุน้ำ โดยมีน้ำหนักตามความต้องการ

5.8 DNA จะถูกถ่ายจากแผ่นเจลสู่แผ่น nylon membrane จนหมด ใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง (ระยะ เวลาขึ้นอยู่กับความหนาของแผ่นเจล และเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของเจล)

5.9 นำแผ่น nylon membrane ไปอบที่ 80 °C ในตู้อบ hot air oven นาน 2 ชั่วโมง ก่อนจะเอาไปทำในขั้นตอน DNA prehybridization

6. ขั้นตอน DNA prehybridization

6.1 เตรียม Prehybridization buffer ที่ประกอบด้วยสารต่างๆดังต่อไปนี้

- 20 X SSC (autoclave)	10 มล.
- 20 % N - Laurylsarcosine	0.4 มล.
- 10 % SDS	0.08 มล.
- blocking powder	0.4 g.
- ddH_2O	29.12 มล.

6.2 เทสารละลาย prehybridization buffer ลงในถุงพลาสติกที่มีแผ่น nylon membrane บรรจุอยู่ ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิดถุงพลาสติกให้สนิท

6.3 นำไปอบที่ 65 °C (hot air oven) ข้ามคืน (หรืออย่างน้อย 4 ชั่วโมง)

7. ขั้นตอน DNA hybridization

7.1 เตรียมสารละลาย α- globin probe (ขั้นตอนการเตรียมโพรบ แสดงไว้ในภาคผนวก) โดยนำสารละลาย α- globin probe ไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที นานประมาณ 5 นาที

7.2 ผสม α- globin probe ที่เตรียมได้กับสารละลาย prehybridization 4 มล. จากนั้นเทลงในถุงที่มี nylon membrane นำไปอบที่ 65 °C (hot air oven) ข้ามคืน

8 ขั้นตอนการ washing และ color detection

8.1 ดูดเอา α- globin probe ออกให้หมดและเก็บ α- globin probe ที่ใช้แล้ว ไว้ที่ อุณหภูมิ -20 °C

8.2 นำแผ่น nylon membrane ใส่ในกล่องพลาสติกที่มี washing 1 อยู่ประมาณ 150 มล. จากนั้นเขย่าตลอดเวลาจนครบ 20 นาที ทำเช่นเดียวกันนี้อีกครั้งหนึ่ง

8.3 ล้างด้วย washing 2 โดยทำการเขย่าตลอดเวลา จนครบ 20 นาที ทำเช่นเดียวกันนี้อีกครั้งหนึ่ง โดยเปลี่ยน washing 2 ให้มีอุณหภูมิ 65 °C จากนั้นล้าง nylon membrane ด้วย buffer 1 ประมาณ 30 วินาที

8.4 นำแผ่น nylon membrane ใส่ถุงพลาสติกใหม่ แล้วเติม buffer 2 ลงในถุงพลาสติก 20 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

8.5 รีดเอา buffer 2 ออกให้หมด เติม antibody solution ที่ประกอบ buffer 2 20 มล.และ Dig Ab 4 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

8.6 ล้างด้วย buffer 1 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

8.7 ล้างด้วย buffer 3 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที จากนั้นนำ nylon membrane ใส่ในถุงพลาสติกใหม่

8.8 เติม color solution ที่ประกอบด้วย buffer 3 15 มล, vial 9 50 µl และ vial 10 50 µl

8.9 เก็บไว้ในที่มืดประมาณ 12 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน

8.10 หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย buffer 4 โดยการล้าง 1 ครั้ง

8.11 เก็บแผ่น nylon membrane ไว้ใน buffer 4 ตลอดโดยเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดถุงสนิท บันทึกผล