กลไกระดับเหนือพันธุกรรมและพันธุกรรมในการควบคุมการแสดงออกของยีน Angiotensin-Converting Enzyme ของมนุษย์

นางสาวฤดี องุ่นศรี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EPIGENETIC AND GENETIC MECHANISMS FOR REGULATION OF THE HUMAN ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME GENE EXPRESSION

Miss Rudee Angunsri

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

510800

หัวข้อวิทยานิพนธ์	กลไกระดับเหนือพันธุกรรมและพันธุกรรมในการควบคุมการแสดงออกของยีน Angiotensin-Converting Enzyme ของมนุษย์
โดย	นางสาวฤดี องุ่นศรี
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.ณัฏฐิกา แสงกฤช)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฤดี อรุ่นศรี: กลไกระดับเหนือพันธุกรรมและพันธุกรรมในการควบคุมการแสดงออกของยีน Angiotensin-Converting Enzyme ของมนุษย์. (EPIGENETIC AND GENETIC MECHANISMS FOR REGULATION OF THE HUMAN ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME GENE EXPRESSION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร. เทวิน เทนคำเนาว์, 99 หน้า.

โรคซึมเศร้าเป็นปัญหาสุขภาพที่ทวีความรุนแรงมากขึ้นเรื่อยๆ และมีหลักฐานแสดงว่า Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) มีผลต่อการทำงานของระบบ Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical (HPA) ซึ่งพบว่าผู้ป่วยโรคซึมเศร้ามีการแสดงออกของยีน ACE ที่สูงกว่าปกติ คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาบทบาทของกลไกระดับเหนือพันธุกรรมและพันธุกรรมในการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE ต่อการเกิดโรคซึมเศร้าในมนุษย์ โดยแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ศึกษากลไกระดับเหนือพันธุกรรม โดยวิเคราะห์รูปแบบการเกิด DNA methylation ในท่อนโปรโมเตอร์ของยีน ACE ที่มีลำดับเบส C^{m}CWGG ณ ตำแหน่ง -122 และ-316 ในเซลล์มนุษย์เพาะเลี้ยง 6 ชนิด ด้วยเทคนิค methylation-sensitive isoschizomers ส่วนที่ 2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs (-240A/T, -93T/C) และโรคซึมเศร้าในคนไทย โดยการวิเคราะห์แบบ case-control ประกอบด้วยกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้า 187 ราย และกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี 207 ราย ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ส่วนที่ 3 ศึกษาบทบาทของ SNPs ของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93 T/C ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE ในเซลล์เพาะเลี้ยง 3 ชนิด ด้วยเทคนิค functional reporter gene assays ผลการศึกษาพบว่า การเกิด hypermethylation ที่ตำแหน่ง -316 บนโปรโมเตอร์ของยีน ACE สัมพันธ์กับการแสดงออกที่ลดลงของยีน ACE ส่วนผลของความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ของยีน ACE และโรคซึมเศร้า เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความถี่อัลลีลระหว่างทั้งสองกลุ่ม พบว่า เฉพาะกรณีของ -240 A/T ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.040, OR = 0.702, CI = 0.508 - 0.971) และผลการศึกษา promoter activity ของยีน ACE ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ณ ตำแหน่ง -93 แบบอัลลีล T และอัลลีล C ในเซลล์ HEK293 และ SH-SY5Y พบว่าอัลลีล T ส่งผลให้มีการแสดงออกที่สูงกว่าอัลลีล C ประมาณ 2 และ 4 เท่า ตามลำดับ ดังนั้น การศึกษานี้สะท้อนให้เห็นว่ากลไกระดับเหนือพันธุกรรมและพันธุกรรมมีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE และการเกิดโรคในมนุษย์

ภาควิชา เคมีคลินิก ลายมือชื่อนิสิต ฤดี อรุ่นศรี

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2551

5077202637 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE
KEYWORDS : ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME / EPIGENETICS / GENE EXPRESSION / GENETICS / METHYLATION

RUDEE ANGUNSRI : EPIGENETIC AND GENETIC MECHANISMS FOR REGULATION OF THE HUMAN ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME GENE EXPRESSION. ADVISOR : ASST.PROF.TEWIN TENCOMNAO, Ph.D., 99 pp.

Angiotensin-converting enzyme (ACE) has been evident to influence the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) system, which shows hyperactivity in the majority of patients with major depressive disorder (MDD), an increasing public health concern worldwide. This study aimed at determining epigenetic and genetic mechanisms for regulation of the ACE gene expression. This study was divided into 3 following parts: 1) study of pattern DNA methylation $C^{m}CWGG$ for ACE gene at -122 and -316 in 6 human cell lines was performed using a methylation-sensitive isoschizomers technique, 2) case-control association study between two SNPs (-240A/T and -93T/C) of the ACE gene promoter and MDD in northeastern Thais was conducted using a PCR-RFLP technique to genotype 187 unrelated patients with MDD (44.89±12.92 years) and 207 unrelated healthy controls (41.34±9.76 years), 3) functional study of -93T/C SNP in 2 cell lines (HEK293 and SH-SY5Y) was carried out using a reporter gene assay. We found that hypermethylation at -316 was correlated with the reduced ACE gene expression. A significant difference in allele frequencies was found only in case of the -240A/T SNP. The presence of -240A allele of ACE was associated with a decreased risk for MDD (P = 0.040, OR = 0.702, 95% CI = 0.508 - 0.971). With regard to the functional assay of the -93T/C SNP, we found T allele resulted in 2- and 4-fold higher transcriptional efficiency than that of C allele in HEK293 and SH-SY5Y, respectively.

Department : Clinical Chemistry   Student's Signature : ....

Field of Study : Clinical Biochemistry and Molecular Medicine   Advisor's Signature : ....

Academic Year : 2008

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาว์ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ในการทำงานด้วยดีตลอดมา ดิฉันขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ ดร.ณัฏฐิกา แสงกฤช ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศ.นพ.ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ศ.ดร.พรเทพ เทียนสิวากุล รศ.ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล รศ.นพ.วันล่า กุลวิชิต และProf. Dr. N.E. Fusenig ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ และขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Robert K. Yu ที่กรุณาเอื้อเฟื้อพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา และ ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต

ขอขอบพระคุณ ผศ.ศราวุธ สุทธิรัตน์ นพ.ฐปนัท ศรีธาราธิคุณ และคุณสุทัศน์ จ้อยภูเขียว ที่กรุณาประสานงานต่างๆ ในการเก็บตัวอย่างเลือดมาทำการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณ อาสาสมัครทุกท่านที่กรุณาให้ตัวอย่างเลือดของท่านมาทำการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน เมดิคัลเทคโนโลยี ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ ครุภัณฑ์วิจัย และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ป.โท ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาตลอด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฏ
สารบัญภาพ	ฏ
บทที่	
1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตของงานวิจัย	3
ข้อจำกัดของการวิจัย	4
ประโยน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลงานวิจัย	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
1 โรคซึมเศร้า	6
2 ACE	11
3 กลไกระดับเหนือพันธุกรรม	15
4 พันธุกรรมและการควบคุมระดับของ ACE	19
5 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE กับการเกิดพยาธิสรีรวิทยา	20
6 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE และโรคต่างๆ	20
6.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE และความดันโลหิต	20
6.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE และโรคหลอดเลือดหัวใจ	21
6.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE และโรคอัลไซเมอร์	21

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่	หน้า
6.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE และโรคซึมเศร้า...............	21
3 วิธีดำเนินการวิจัย..	22
1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในการวิจัย..........................	22
1.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง..	22
1.2 ประชากร...	23
2 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย..............................	26
3 วิธีการวิจัย...	30
3.1 ส่วนที่ 1 ศึกษาบทบาทของกลไกระดับเหนือพันธุกรรมของยีนACE.......	30
3.1.1 สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์เพาะเลี้ยง..................................	30
3.1.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR............	31
3.1.3 การทำนายบริเวณที่เกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง $C^{m}CWGG$ ของยีน ACE..	32
3.1.4 การทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ด้วยเทคนิค methylation-sensitive isoschizomers...	32
3.2 ส่วนที่ 2 ศึกษาบทบาทความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE.....	39
3.2.1 ขนาดตัวอย่าง (Sample size)..	39
3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)...	39
3.2.3 การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ของ SNPs -240A/T และ -93T/C ที่อยู่บนโปรโมเตอร์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง..	40
3.2.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล..	41
3.3 ส่วนที่ 3 ศึกษาบทบาทความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93 T/C และ ขนาดที่แตกต่างกันของโปรโมเตอร์ ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE ในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์................	42
3.3.1 การโคลนนิ่ง (Cloning)...	42
3.3.2 การคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการทดลอง..................	54
3.3.3 การถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง..................	56

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3.3.4 การทดสอบการแสดงออกของยีน Luciferase reporter ด้วยเทคนิค Reporter Gene Assay.. 58

3.3.5 การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล.. 58

4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.. 59

1 ส่วนที่ 1 ผลการศึกษาบทบาทของกลไกระดับเหนือพันธุกรรมของยีน ACE.... 59

1.1 ผลการทดสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน ACE............... 59

1.2 ผลการทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation................................ 60

1.3 ผลการหาเปอร์เซนต์ DNA methylation จากความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนเจล.. 63

2 ส่วนที่ 2 ผลการศึกษาบทบาทความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE... 65

2.1 ผลการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ของ SNP -240A/T ที่อยู่บนโปรโมเตอร์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง.. 65

2.2 ผลการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ของ SNP -93T/C ที่อยู่บนโปรโมเตอร์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง.. 67

2.3 ผลการวิเคราะห์ Linkage disequilibrium (LD) และ Haplotype......... 68

3 ส่วนที่ 3 ผลการศึกษาบทบาทความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93 T/C และ ขนาดที่แตกต่างกันของโปรโมเตอร์ ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE ในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์.. 69

3.1 ผลการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับการโคลนด้วยเทคนิค PCR........... 69

3.2 ผลการตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค Colony-PCR........................... 70

3.3 ผลการตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP).. 73

3.4 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิด.. 75

3.5 ผลการคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการทดลอง..................... 77

3.6 ผลการศึกษา promoter activity ของยีน ACE................................ 77

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่	หน้า
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	81
สรุปผลการวิจัย	81
อภิปรายผลการวิจัย	82
ข้อเสนอแนะ	86
รายการอ้างอิง	87
ภาคผนวก	95
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	99

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดง primers จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน ACE และ β-actin..........	32
3.2	แสดง primers ที่ใช้ทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^{m}CWGG ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -122 และ -316 บนโปรโมเตอร์ และขนาดของ PCR Product	36
3.3	แสดง primers ที่จำเพาะสำหรับการเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสำหรับโคลน......	42
4.1	แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ACE โดยใช้ยีน β-actin เป็นตัวควบคุมในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ..........	59
4.2	แสดงอัตราส่วนการแสดงออกของยีน ACE ต่อ ยีน β-actin โดยใช้ค่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนภาพเจลมาคำนวณหาค่าอัตราส่วน..........	60
4.3	แสดงเปอร์เซนต์ DNA methylation ของเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิดจากการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนเจล..........	64
4.4	แสดงการเปรียบเทียบผลการกระจายของจีโนไทป์และความถี่ของอัลลีลของยีน ACE SNP -240 A/T ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง..........	66
4.5	แสดงการเปรียบเทียบผลการกระจายของจีโนไทป์และความถี่ของอัลลีลของยีน ACE SNP -93T/C ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง..........	68
4.6	แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ Haplotype..........	69
4.7	แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละขนาดของโปรโมเตอร์ที่แตกต่างกันในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด..........	78
4.8	แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละขนาดของโปรโมเตอร์ที่แตกต่างกันในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด..........	79
5.1	แสดงความถี่อัลลีล SNPs -240A/T และ -93T/C ในกลุ่มคนปกติของแต่ละเชื้อชาติ..........	84

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แสดงโครงสร้างของฮอร์โมน cortisol	9
2.2	แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroidogenesis)	10
2.3	แสดงวิถีการสร้าง AII	11
2.4	แสดงถึงผลที่เกิดขึ้นจากการทำงานของ AII	12
2.5	แสดงโครงสร้างของยีน ACE และ ตำแหน่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE บางตำแหน่ง	13
2.6	แสดง Isoforms และ homologous ของยีน ACE	14
2.7	แสดงการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (DNA methylation)	15
2.8	แสดงการ deamination ของไซโทซีนและ 5-เมทิลไซโทซีน การ deamination ของไซโทซีนเป็นยูราซิล	16
2.9	แสดงโครงสร้าง 5-azacytidine ซึ่งเป็น 5-methylcytosine analogue	17
2.10	แสดงการควบคุมการถอดรหัสของยีนผ่านการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ	18
3.1	แสดงพื้นที่การให้บริการของโรงพยาบาลจิตเวชเลยราชนครินทร์ ซึ่งรับผิดชอบประชากรจังหวัดเลย จังหวัดหนองบัวลำภู และจังหวัดใกล้เคียง	25
3.2	ภาพวาดแสดงการออกแบบ primers เพื่อทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^{m}CWGG ของยีน ACE บนโปรโมเตอร์	35
3.3	ภาพวาดแสดงลักษณะของผลการทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^{m}CWGG ของยีน ACE บนโปรโมเตอร์ โดยการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรส	37
3.4	แสดงลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสำหรับโคลน	46
3.5	แสดงลักษณะของ TA Vector หรือ pGEM®-T Easy Vector	47
3.6	แสดงลักษณะของ promoterless luciferase expression vector pGL3-Basic	47
3.7	แสดงลักษณะของ Co-transfected pRL-CMV Vector	57
3.8	แสดงหลักการการถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง (Transfection) ด้วยชุดน้ำยา Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)	57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่		หน้า
4.1	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ACE โดยใช้ยีน β-actin เป็นตัวควบคุมในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ..	59
4.2	ผลการทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง $C^{m}CWGG$ ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -122 และ -316 บนโปรโมเตอร์ จากดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวก (Positive control) และ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวควบคุมลบ (Negative control)..	62
4.3	ผลการทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง $C^{m}CWGG$ ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -122 และ -316 บนโปรโมเตอร์ จากดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการแสดงออกที่ต่างกัน..	63
4.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์ methylation และระดับการแสดงออกของยีน ACE ของแต่ละเซลล์..	64
4.5	แสดงผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีน ACE ของ SNP rs4291 ณ ตำแหน่ง -240 A/T ในบริเวณ promoter ด้วยวิธี PCR-RFLP	65
4.6	แสดงผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีน ACE ของ SNP rs4292 ณ ตำแหน่ง -93T/C ในบริเวณ promoter ด้วยวิธี PCR-RFLP.........................	67
4.7	แสดงผลการเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์ ด้วยเทคนิค PCR..	70
4.8	แสดงผลที่ได้จากการทำ Colony-PCR จากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด246, 401 และ 528 คู่เบสกับ pGEM®-T Easy Vector ที่มีดีเอ็นเอขนาด 176 คู่เบส...........	71
4.9	แสดงผลที่ได้จากการทำ Colony-PCR จากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 161, 246, 401 และ 528 คู่เบสกับ pGL3-Basic Vector ที่มีดีเอ็นเอขนาด 121 คู่เบส........	72
4.10	แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิด phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc, phACE(-499)Luc, phACE(-93T)Luc และ phACE(-93C)Luc ที่สกัดได้ด้วยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP)...	74
4.11	แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิด phACE(-132)Luc ที่สกัดได้ด้วยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP)..	75
4.12	แสดงผลการวิเคราะห์ Transcription Factor บริเวณที่มีลำดับเบส -93Tด้วยโปรแกรม PROMO 3.0..	76

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่		หน้า
4.13	แสดงผลการวิเคราะห์ Transcription Factor บริเวณที่มีลำดับเบส -93C ด้วยโปรแกรม PROMO 3.0...	76
4.14	promoter activity ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ promoter ของยีน ACE ที่มีขนาดที่แตกต่างกันในเซลล์ HEK293, เซลล์ SH-SY5Y และเซลล์ HeLa..........	77
4.15	promoter activity ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ promoter ของยีน ACE ที่มีความหลากหลายของยีน ณ ตำแหน่ง -93 แบบอัลลีล T (phACE(-93T)Luc) และอัลลีล C (phACE(-93C)Luc) ในเซลล์ HEK293, เซลล์ SH-SY5Y และเซลล์ HeLa	79

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันโรคซึมเศร้า (major depression) เป็นปัญหาสุขภาพที่มีความรุนแรงและทวีจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากสังคมปัจจุบันเป็นสังคมที่มีการแข่งขันสูงและประชากรจำนวนมากมีโอกาสที่จะพบเรื่องราวที่บั่นทอนสุขภาพจิตบ่อย จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลกระบุว่า ณ ปัจจุบันนี้ ทั่วโลกมีผู้ป่วยด้วยโรคซึมเศร้าถึง 154 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 21 ของประชากรโลก จึงเป็นปัญหาที่องค์การอนามัยโลกได้พยากรณ์ว่า ในปี ค.ศ. 2020 โรคซึมเศร้าจะกลายเป็นปัญหาสาธารณสุข อันดับ 2 รองจากโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน[1] และในประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคซึมเศร้าประมาณ 5 เปอร์เซนต์ หรือกว่า 3 ล้านคน[2] ซึ่งผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้จะมีความเสี่ยงสูงต่อการเสียชีวิต จากการฆ่าตัวตายสูงถึงร้อยละ 60 โดยที่ภาวะโรคซึมเศร้าอาจจะเกิดโดยตรงหรือเกิดมาจากการมีปัญหาโรคทางกายอยู่ก่อนแล้วมีอาการซึมเศร้าภายหลัง แต่บางครั้งภาวะซึมเศร้าถูกมองข้ามไป ซึ่งส่งผลกระทบอย่างมากต่อตนเอง ครอบครัว เศรษฐกิจ และสังคม นอกจากนี้ยังพบว่า โรคซึมเศร้าเป็นโรคที่เป็นสาเหตุสำคัญของการสูญเสียปีสุขภาวะ (Disability adjusted life years, DALYs) ในปี พ.ศ. 2542 สูงที่สุด เมื่อวัดจากจำนวนปีที่สูญเสียไปเนื่องจากความพิการและความเจ็บป่วยโดยโรคซึมเศร้าก่อความสูญเสียเป็นอันดับที่ 1 ในหญิงไทย และเป็นอันดับที่ 3 ในชายไทย[3] ปัญหาโรคซึมเศร้าจึงเป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญและมีแนวโน้มจะทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น

การศึกษาด้านกลไกระดับเหนือพันธุกรรม (epigenetics) โดยเฉพาะการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอส่วนใหญ่จะศึกษาในยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง แต่ในปัจจุบันการศึกษากลไกระดับเหนือพันธุกรรมเริ่มเป็นที่สนใจในยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทางจิตเวช (mental disorders) และโรคทางระบบประสาท(neurological disorder)[4, 5] เช่น ยีน 5HTT (serotonin transporter)[6] และยีน RELN[7, 8] ซึ่งการเกิด methylation ในยีนดังกล่าวสามารถส่งผลต่อการแสดงออกของยีนซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดโรคทางจิตเวชและโรคทางระบบประสาทได้

นอกจากนี้ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม (genetics) เป็นสาเหตุที่สำคัญของการเกิดโรคซึมเศร้าประมาณร้อยละ 40[9] ซึ่งมีงานวิจัยจำนวนมากที่สนันสนุนสาเหตุดังกล่าว เช่น จากการศึกษาของ Levinson DF[10] พบว่าถ้าบิดาหรือมารดาคนใดคนหนึ่งเป็นโรคซึมเศร้า บุตรจะมีโอกาสเป็นด้วยในอัตราสูงกว่าเด็กทั่วไป 2-3 เท่า อย่างไรก็ตาม ปัจจัยทางด้านพันธุกรรมอย่าง

เดียวก็ไม่ได้ทำให้เกิดโรคซึมเศร้าได้ และเป็นที่ทราบว่าขึ้นอยู่กับปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมด้วย เช่น การเลี้ยงดูในวัยเยาว์[11, 12] เพราะฉะนั้นโรคซึมเศร้าจึงจัดเป็นโรคพหุปัจจัย (multifactorial disease)[13]

ถึงแม้ว่าการศึกษาทางพันธุกรรมของโรคซึมเศร้าในปัจจุบันได้มุ่งเน้นไปที่ ความผิดปกติของสารสื่อประสาท (neurotransmitter) และตัวรับ (receptor) ของสารสื่อประสาทนั้นๆ รวมทั้ง ยีนในวิถีอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับสารสื่อประสาทเหล่านี้ เช่น serotonin และdopamine แต่ในปัจจุบันได้มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบ Renin-Angiotensin System (RAS) ซึ่งสามารถพบได้ในผู้ป่วยโรคซึมเศร้า เนื่องจาก Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) นั้น มีหน้าที่ในการย่อยสลายสารสื่อประสาท dopamine[14, 15] ในสมองได้ทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะซึมเศร้าขึ้น นอกจากนี้ความผิดปกติของระบบ Hypothalamic- Pituitary-Adrenocortical (HPA) สามารถพบได้ในผู้ป่วยโรคซึมเศร้าเช่นกัน ซึ่งเกิดจากการทำงานของฮอร์โมน (neuroendocrine) ผิดปกติ[16-19] และในปัจจุบันมีผลงานวิจัยจำนวนมากที่ได้เริ่มศึกษาว่ายีน ACE มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคซึมเศร้า[20-22]

ACE ทำหน้าที่สำคัญ 2 ประการ[23] คือ 1. เป็นตัวนำในการผลิต Angiotensin II 2. เป็นตัวย่อยสลาย Bradykinin นอกจากนี้ ACE ยังทำหน้าที่เป็นตัวย่อย (hydrolysis) สารสื่อประสาทหลายชนิด ตัวอย่างเช่น substance P dopamine และneurotensin[14, 15] โดยปกติสารสื่อประสาท dopamine เป็นสารสื่อประสาทแห่งความสุข[24] แต่จากหน้าที่ของ ACE ที่เป็นตัวย่อย dopamine จึงทำให้เห็นได้ว่า ACE มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคซึมเศร้า นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าระดับ cortisol สามารถเพิ่มสูงขึ้นได้ในภาวะที่ร่างกายมีความเครียด ภาวะจิตกังวล ภาวะซึมเศร้า[21] โดย cortisol จะเป็นที่รู้จักกันในฐานะ “stress hormone” เมื่อมีความเครียดเกิดขึ้นร่างกายจะตอบสนองโดยการหลั่ง cortisol ออกมาสู่กระแสเลือดในปริมาณที่สูงทั้งนี้เนื่องมาจากการทำงานของ ACE ที่มากเกินไปจึงไปมีอิทธิพลต่อกลไกในระบบ HPA โดยอาศัยระบบ RAS จากการวิจัยได้พบว่าในผู้ป่วยโรคซึมเศร้าจะมี ACE activity ที่สูงขึ้น ซึ่งจะทำให้เกิดการทำงานของ HPA มากกว่าปกติด้วย ดังนั้นผู้ป่วยโรคซึมเศร้าจะมีระดับ cortisol สูงตลอดไม่มีการลดลงแบบ Diurnal Pattern

ACE เป็นเอนไซม์ในพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ยีนที่ถ่ายทอดรหัส ACE ตั้งอยู่บนแขนที่ยาวของโครโมโซมคู่ที่ 17 (17q23) ยีนนี้มีความยาว 21 kb และประกอบด้วย 26 exons และ 25 introns[25] ซึ่งใน National Center Biotechnology Information (NCBI) ได้บันทึกไว้ว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE หรือที่เรียกว่า genetic polymorphisms มากกว่า 160 ชนิด[23] ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะ Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) โดยใน

ปัจจุบันการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างมนุษย์แต่ละคนนั้นได้รับความสนใจและแพร่หลายในวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นอย่างมาก เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ เป็นการแปรผันในระดับของยีนซึ่งอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนด้วย และการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนไปนั้นก็สามารถที่จะนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ ได้ ดังนั้นการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของมนุษย์สามารถที่จะนำมาใช้ศึกษายีนที่ก่อให้เกิดโรคทั้งโรคทางร่างกายและโรคทางจิตใจ

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้น คณะวิจัยได้ตระหนักถึงความสำคัญของโรคซึมเศร้าและประสงค์จะทำการศึกษาถึงกลไกระดับเหนือพันธุกรรมและพันธุกรรมในการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE ที่อาจมีผลต่อการเกิดโรคซึมเศร้าในมนุษย์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าในการศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้กับโรคซึมเศร้า ทั้งในด้านการทำนายความเสี่ยง (prognosis) การป้องกัน (prevention) การตรวจวินิจฉัย (diagnosis) และการรักษา (treatment) เช่น การนำข้อมูลทางพันธุกรรม มาใช้งานด้านเภสัชพันธุศาสตร์ (pharmacogonomics) เพื่อค้นคว้าหายารักษาใหม่ หรือนำมาใช้ในการตรวจประเมินประสิทธิภาพ ร่วมทั้งผลข้างเคียงของยาเฉพาะบุคคลก่อนใช้ยารักษาจริง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษากลไกระดับเหนือพันธุกรรม (epigenetics) ในการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE ในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์ (*In Vitro* cell culture model)
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -240A/T และ-93T/C และโรคซึมเศร้าในคนไทย
3. เพื่อศึกษาบทบาทของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93 (-93 T/C polymorphism) และขนาดที่แตกต่างกันของโปรโมเตอร์ ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE ในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาบทบาททาง epigenetics ในการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE ในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์นั้นใช้เซลล์เพาะเลี้ยงทั้งหมด 6 ชนิด คือ เซลล์ Jurkat (Human T cell lymphoblast-like cell line) เซลล์ K562 (Human erythroleukemic cell line) เซลล์ HeLa (Human cervix carcinoma cell line) เซลล์ HaCaT (Human keratinocyte cell line) เซลล์ HEK 293 (Human embryonic kidney cell line) และเซลล์ SH-SY5Y (Human neuroblastoma

cell line) เพื่อเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต้นแบบที่ใช้ในการศึกษาด้าน epigenetics ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE

การศึกษาวิเคราะห์ในลักษณะ case-control ในประชากรไทยที่อาศัยอยู่ในจังหวัดเลย จังหวัดหนองบัวลำภู และจังหวัดใกล้เคียง โดยการเก็บข้อมูล และเลือดของอาสาสมัครทั้งกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้า (n = 187) และกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี (n = 207) โดยทั้งสองกลุ่มมาจากพื้นที่บริเวณเดียวกัน สะท้อนถึงปัจจัยในการดำรงอยู่ในสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ เศรษฐกิจและสังคมที่ใกล้เคียงกัน นอกเหนือจากการคัดเลือกทั้งสองกลุ่มให้มีความใกล้เคียงกันในด้านเพศ และอายุ เป็นต้น ปัจจัยด้านจิตสังคมที่บันทึกและวิเคราะห์ ได้แก่ เพศ อายุ สถานภาพสมรส อาชีพ วุฒิการศึกษา รายได้ การสูบบุหรี่ และการบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ในการคัดเลือกตัวอย่างนั้น ได้คัดเลือกจากพื้นที่รอบใน (อำเภอเมือง) และรอบนอก (เขตสุขาภิบาลและชนบท) ทั้งนี้ ใช้เทคนิค probability sampling ในการสุ่มตัวอย่าง

ในการศึกษาหน้าที่ของความหลากหลายของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93T/C ของการวิจัยครั้งนี้จะทำการทดลองเฉพาะในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model) ที่มาจากมนุษย์ โดยจะใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากตัวแทนอาสาสมัครที่มีความหลากหลายของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93T/C แบบจีโนไทป์ชนิด T/T กับ C/C จากประชากรไทย ข้อมูลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้นั้นจะถูกนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้สถิติ *t*-test ซึ่งกำหนดค่า *P*-value น้อยกว่า 0.05 ในการตัดสินใจว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ อย่างไร

ข้อจำกัดของการวิจัย

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้นั้น จะใช้การตรวจวัดการแสดงออกของยีน luciferase reporter โดยวัด luciferase activity ซึ่งอาจจะมีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้ เพราะไม่ได้ครอบคลุมถึงวงจรของการควบคุม (gene regulation) ในร่างกายมนุษย์ เช่น กลไกการควบคุมย้อนกลับ (negative feedback) ทำให้ค่าที่วัดได้อาจมากกว่าความเป็นจริง แต่การจะตรวจสอบระดับ (level) และการทำงาน (activity) ของ ACE ที่เกิดขึ้นจริงภายในเซลล์โดยที่มีกลไกการควบคุมย้อนกลับด้วยนั้นจำเป็นที่จะต้องให้ผู้ป่วยหยุดยาที่ใช้ก่อนที่จะได้รับการตรวจสอบระดับ และการทำงานของ ACE ซึ่งทำได้ยาก เนื่องจากการหยุดยาที่รักษาอาจส่งผลต่ออาการทางคลินิกของผู้ป่วยได้ นอกจากนี้การเก็บตัวอย่างจะต้องเก็บตัวอย่างเลือดในรูปแบบที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง (clot blood) เพื่อที่จะสามารถตรวจวัดระดับและการทำงานได้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำ แต่ตัวอย่างเลือดที่เก็บจากโรงพยาบาลจิตเวชเลยราชนครินทร์นั้นเป็นการเก็บเลือดในรูปแบบที่มีสารกันเลือดแข็ง (EDTA blood) จึงไม่สามารถนำมา

ทำการตรวจวัดได้เนื่องจากสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA เป็นตัวรบกวนการตรวจวัดซึ่งอาจทำให้ได้ค่าที่ผิดพลาด จึงทำให้เกิดข้อจำกัดของงานวิจัยครั้งนี้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สร้างองค์ความรู้ใหม่เชิงลึกทางอณูชีววิทยาที่แสดงให้เข้าใจถึงกลไกระดับเหนือพันธุกรรมและพันธุกรรมในการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE ในมนุษย์ ซึ่งจะนำไปสู่ประโยชน์มหาศาลต่อโรคซึมเศร้าทั้งในด้านการทำนายความเสี่ยง การป้องกัน การตรวจวินิจฉัยและการรักษา
2. สามารถนำองค์ความรู้ใหม่ไปใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยหรือป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากความผิดปกติของยีน
3. เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อต่อยอดงานวิจัยในระดับที่สูงขึ้นในอนาคตเพื่อสามารถประยุกต์ใช้ข้อมูลในการให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์แก่ประชาชนที่มีความหลากหลายของยีน ACE
4. คาดว่าจะสามารถนำผลงานวิจัยจากโครงการนี้ เพื่อไปนำเสนอผลงานวิชาการระดับนานาชาติ อย่างน้อย 1 ครั้ง และสามารถนำผลงานไปนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติได้อย่างน้อย 1 ครั้ง
5. สามารถผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโทที่มีคุณภาพจำนวน 1 คน ซึ่งเป็นการส่งเสริมให้มีการสร้างและพัฒนานักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่ เป็นการตอบสนองและสอดคล้องยุทธศาสตร์เพื่อเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของประเทศ ที่สร้างความเข้มแข็งในการสร้างองค์ความรู้ใหม่ และผลิตบุคลากรทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในระดับสูง อีกทั้งเพื่อสร้างบัณฑิตพร้อมทั้งผลงานวิจัยที่มีคุณภาพสูงสมดังเจตนารมย์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติหรือระดับนานาชาติ
2. ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับชาติหรือระดับนานาชาติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคซึมเศร้า[26]

โรคซึมเศร้า คือ ความรู้สึกทุกข์ใจ เศร้า เบื่อหน่าย ท้อแท้ ลักษณะสำคัญของโรคนี้คือผู้ป่วยมีอาการซึมเศร้าเป็นอาการเด่นชัดร่วมกับอาการสำคัญอย่างอื่น เช่น เบื่ออาหาร นอนไม่หลับ อ่อนเพลียไม่มีแรง ไม่มีสมาธิ รู้สึกไร้ค่าและมีความคิดเบื่อชีวิต

•อุบัติการณ์ของการเกิดโรคซึมเศร้า[3]

โรคซึมเศร้าเป็นโรคที่พบบ่อย ประชากร 5 ใน 100 คน จะเป็นโรคซึมเศร้าระดับรุนแรง และอีก 5 ใน 100 คน จะมีอาการซึมเศร้าระดับปานกลาง ในช่วงใดช่วงหนึ่งของชีวิตโรคนี้อาจเกิดขึ้นเมื่อใดก็ได้และเกิดได้กับคนทุกอายุทุกฐานะผู้หญิงมีโอกาสเป็นโรคนี้ได้มากกว่าผู้ชาย

•สาเหตุของการเกิดโรคซึมเศร้า[26]

โรคซึมเศร้าไม่ได้เกิดจากความอ่อนแอของจิตใจหรือบุคลิกภาพตามที่คนทั่วไปเข้าใจกัน ในปัจจุบันทางการแพทย์ พบว่า โรคซึมเศร้าเกิดขึ้นจากสาเหตุสำคัญดังนี้

ก. สารสื่อประสาทในสมองมีระดับไม่สมดุล

ในสมองมีสารประเภทนี้หลายตัว เช่น serotonin dopamine และnorepinephrine ฯลฯ สารพวกนี้จำเป็นในการทำงานของเซลล์สมอง เมื่อระดับของสารแต่ละตัวเปลี่ยนแปลงไป สมองแต่ละส่วนก็จะทำหน้าที่แปรปรวนเกิดเป็นอาการผิดปกติต่างๆดังที่กล่าวมาแล้ว มีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้ระดับสารเคมีเปลี่ยนแปลงไป เช่น พันธุกรรม ความเปราะบางทางชีวภาพเฉพาะบุคคล รวมไปถึงความตึงเครียดในชีวิตประจำวัน เป็นต้น

ข. ปัจจัยทางด้านจิตใจ จากการศึกษาพบว่า

1.โรคซึมเศร้ามักเกิดภายหลังผู้ป่วยที่มีปัญหาทางด้านจิตใจอย่างรุนแรง เช่น การเสียชีวิตของบุคคลผู้เป็นที่รัก มีเรื่องบาดหมางกับคู่ครอง การหย่าร้าง ประสบปัญหาทางด้านการงาน หรือเศรษฐกิจ

2. ผู้ป่วยที่มีอาการซึมเศร้าจะมีแนวความคิดเกี่ยวกับตนเองทางด้านลบ

ค. ปัญหาทางด้านสุขภาพ

โรคทางกายก็สามารถทำให้เกิดโรคซึมเศร้าได้ เช่น โรคหัวใจและอัมพาต ทำให้ผู้ป่วยไม่สนใจดูแลตนเอง และผู้ที่ด้อยทักษะต้องพึ่งพาผู้อื่น

ง. ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม

ปัจจัยทางด้านพันธุกรรมเป็นสาเหตุในการเกิดโรคซึมเศร้าประมาณร้อยละ 40[9]

การศึกษาพันธุกรรมของผู้ป่วยโรคซึมเศร้าบ่งว่าพันธุกรรมเป็นสาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งโดยพบลักษณะสำคัญดังนี้

1. ญาติสนิทของผู้ป่วยมีโอกาสเป็นโรคนี้ด้วยสูงกว่าประชากรทั่วไป 1.5-3 เท่า และมีโอกาสเป็นโรคพิษสุราเรื้อรังในอัตราที่สูงกว่าประชากรทั่วไป

2. ถ้าบิดาหรือมารดาคนใดคนหนึ่งเป็นโรคซึมเศร้า บุตรจะมีโอกาสเป็นด้วยในอัตราสูงกว่าเด็กทั่วไป 2-3 เท่า[10] และถ้าบิดาและมารดาเป็นโรคซึมเศร้า บุตรจะมีโอกาสเป็นโรคสูงกว่าเด็กทั่วไปถึง 4 เท่า

3. จากการศึกษาคู่แฝดพบว่าในคู่แฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน ถ้าคนหนึ่งเป็นโรคนี้อีกคนจะเป็นด้วยร้อยละ 60 ในขณะที่โอกาสที่คู่แฝดจากไข่คนละใบจะมีโอกาสเป็นโรคด้วยเพียงร้อยละ 20

4. การศึกษาโรคนี้ในบุตรบุญธรรมที่เกิดจากบิดาและมารดาเป็นโรคซึมเศร้าทั้ง 2 คน พบว่าบุตรบุญธรรมจะเป็นโรคซึมเศร้าด้วยในอัตราที่สูงกว่าบุตรบุญธรรมที่เกิดจากบิดามารดาซึ่งเป็นปกติ

แต่ถึงอย่างไรก็ตามปัจจัยทางด้านพันธุกรรมอย่างเดียวก็ไม่ได้ทำให้เกิดโรคซึมเศร้าได้ จะต้องอาศัยปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม การเลี้ยงดูเข้ามาร่วมด้วย เพราะฉะนั้นโรคซึมเศร้าจึงจัดเป็นโรคพหุปัจจัย[13]

โดยการศึกษาได้มุ่งถึงสาเหตุทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดโรคซึมเศร้า ซึ่งเกี่ยวข้องกับการมีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างมนุษย์แต่ละคนนั้น เป็นที่ได้รับความสนใจกันอย่างแพร่หลายในวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นอย่างมาก จึงได้มีการนำยีน ACE นี้มาศึกษา ซึ่งจากงานวิจัยของ TC Baghai[21] ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มคนเยอรมัน ซึ่งพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเกิดโรคซึมเศร้านั่นคือ ความหลากหลายบนโปรโมเตอร์ของยีน ACE ซึ่งเกิดจากเพียงนิวคลีโอไทด์เดียว (SNP) ณ ตำแหน่ง-240A/T (rs4291) มีผลต่อ activity ของ ACE โดยกลุ่มที่มีอัลลีล T จะมีระดับ ACE activity ที่สูงขึ้น ดังนั้นความหลากหลายของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -240A/T จึงถูกสงสัยว่าเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคซึมเศร้าได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโปรโมเตอร์ของยีน ACE ณ ตำแหน่ง-93T/C (rs4292)[27] ซึ่งมีผลต่อระดับของ

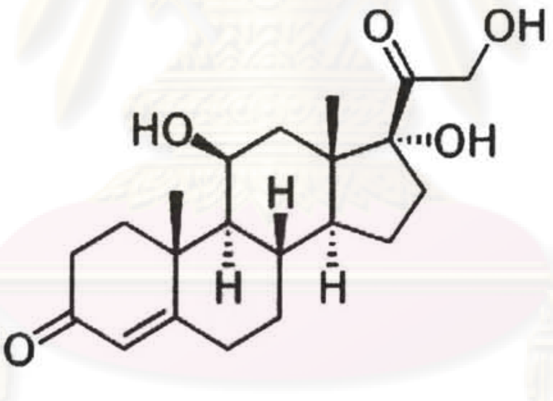
ACE ในกระแสเลือดอีกด้วย ส่วนการศึกษาทางด้านการแสดงออกของยีน ACE เริ่มมีการศึกษากันอย่างแพร่หลายโดยเริ่มจากการศึกษาถึงผลทางพันธุกรรมจากขนาดของโปรโมเตอร์ ณ ตำแหน่งต่างๆยีนACE ต่อการควบคุมการแสดงออกโดยใช้วิธี CAT reporter gene assay[28] ซึ่งพบว่าขนาดของโปรโมเตอร์มีผลต่อ CAT activity ที่แตกต่างกันทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการแสดงออกและไม่มีการแสดงออกของยีน ACE และต่อมาได้มีการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -240A/T ต่อการควบคุมการแสดงออกโดยใช้วิธี Luciferase reporter gene assay ในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์ (human neuroblastoma; IMR 32 และ human embryonic kidney; HEK 293)[29] ซึ่งพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -240A/T ทำให้มีการแสดงออกของยีน Luciferase ที่ไม่แตกต่างกันในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์ทั้ง 2 ชนิด

•สารเคมีของสมองที่ต้านความสุข

cortisol เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) ที่ถูกผลิตมาจากต่อมหมวกไต (Adrenal gland) ในส่วนของต่อมหมวกไตชั้นนอก (adrenal cortex) โดย cortisol จะเป็นตัวที่ทำหน้าที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด เพิ่มการสร้างกลูโคส (gluconeogenesis) และบรรเทาการอักเสบ เนื่องจาก cortisol มีฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive) โดยปกติ cortisol จะถูกสร้างและหลั่งออกมาสู่สิ่งแวดล้อมวันละประมาณ 20-30 mg ถูกหลั่งออกซึ่งจะมากหรือน้อยต่างกันตามช่วงเวลาโดยจะถูกสร้างสูงสุดตอนตื่นนอน และต่ำสุดตอนหลับ เรียกว่า “Diurnal Pattern” แต่ทั้งนี้ระดับ cortisol สามารถเพิ่มสูงขึ้นได้ถ้าเมื่อร่างกายอยู่ในภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่าปกติ การได้รับการผ่าตัด หรือ ภาวะที่มีการหลั่งฮอร์โมน Adrenocorticotrophic (ACTH) ผิดปกติ ร่างกายก็จะหลั่ง cortisol ออกมามากขึ้น เพื่อควบคุมสภาวะเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ผลต่อความสมดุลของเกลือแร่ อิเล็กโทรไลต์ น้ำ และบรรเทาการอักเสบ แต่การที่มีระดับ cortisol สูงในกระแสเลือด (hypercortisolism) นั้นจะส่งผลเสียต่อร่างกาย ทำให้เกิดโรค Cushing's syndrome ได้ โดยผลจากการที่มีภาวะ hypercortisolism คือเกิด glucose tolerance ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดโรคเบาหวาน กล้ามเนื้อลีบ อ่อนแรง และกระดูกพรุน เนื่องจากมีการสลายโปรตีนเพิ่มมากขึ้น การสลายไขมันเพิ่มมากขึ้น และมีผลต่อ electrolyte Metabolism ซึ่งจะทำให้มีผลต่อการเก็บโซเดียมและน้ำเพิ่มมากขึ้น จึงเกิดการบวมน้ำ และความดันโลหิตสูงตามมา แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ TC Baghai[21] พบว่าระดับ cortisol ยังสามารถเพิ่มสูงขึ้นได้ในภาวะที่ร่างกายมีความเครียด ภาวะจิตกังวล ภาวะซึมเศร้า โดย cortisol จะเป็นที่รู้จักกันในฐานะ “Stress hormone” เมื่อมีความเครียดเกิดขึ้นร่างกายจะตอบสนองโดยการหลั่ง cortisol ออกมาสู่กระแสเลือดในปริมาณที่สูงทั้งนี้เนื่องมาจากการทำงานของ ACE ที่

มากเกินไปจึงไปมีอิทธิพลต่อกลไกในระบบ HPA โดยอาศัยระบบ RAS นั่นก็คือ ACE จะทำการเปลี่ยน angiotensin I (AI) ให้เป็น angiotensin II (AII) ซึ่ง AII นั้นก็จะไปกระตุ้นระบบ HPA ให้ทำงานโดย AII จะไปกระตุ้นการหลั่ง Corticotrophin Releasing Hormone (CRH) ที่ต่อม hypothalamus และฮอร์โมน CRH ก็จะไปกระตุ้นต่อม pituitary ให้หลั่งฮอร์โมน ACTH ต่อไปด้วย และการที่ฮอร์โมน ACTH เพิ่มขึ้นนั้นก็จะไปกระตุ้นการหลั่ง cortisol จากต่อมหมวกไตชั้นนอกออกมา ซึ่งจากการวิจัยได้พบว่าในผู้ป่วยโรคซึมเศร้าจะมี ACE activity ที่สูงขึ้น ซึ่งจะทำให้เกิดการทำงานของ HPA มากกว่าปกติด้วย ดังนั้นผู้ป่วยโรคซึมเศร้าจะมีระดับ cortisol สูงตลอดไม่มีการลดลงแบบ Diurnal Pattern

แต่อย่างไรก็ตามกลไกที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคซึมเศร้านั้นยังไม่แน่นอน แต่ได้มีการศึกษาถึงการทางคลินิกพบว่าระดับ ซึ่งระดับ cortisol ที่สูงนั้นอาจส่งผลต่อระบบการสื่อประสาทที่เกี่ยวข้องกับ Na^+/K^+ ATPase Pump เนื่องจาก cortisol เป็นฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ในการรักษาระดับ Na^+ นอกเซลล์แต่เมื่อเกิดการสื่อประสาท (action potential) Na^+ ที่ปกติต้องเข้าเซลล์แต่กลับเข้าเซลล์ไม่ได้จึงทำให้เกิดการสื่อประสาทที่ผิดปกติ ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดโรคซึมเศร้าได้[30]



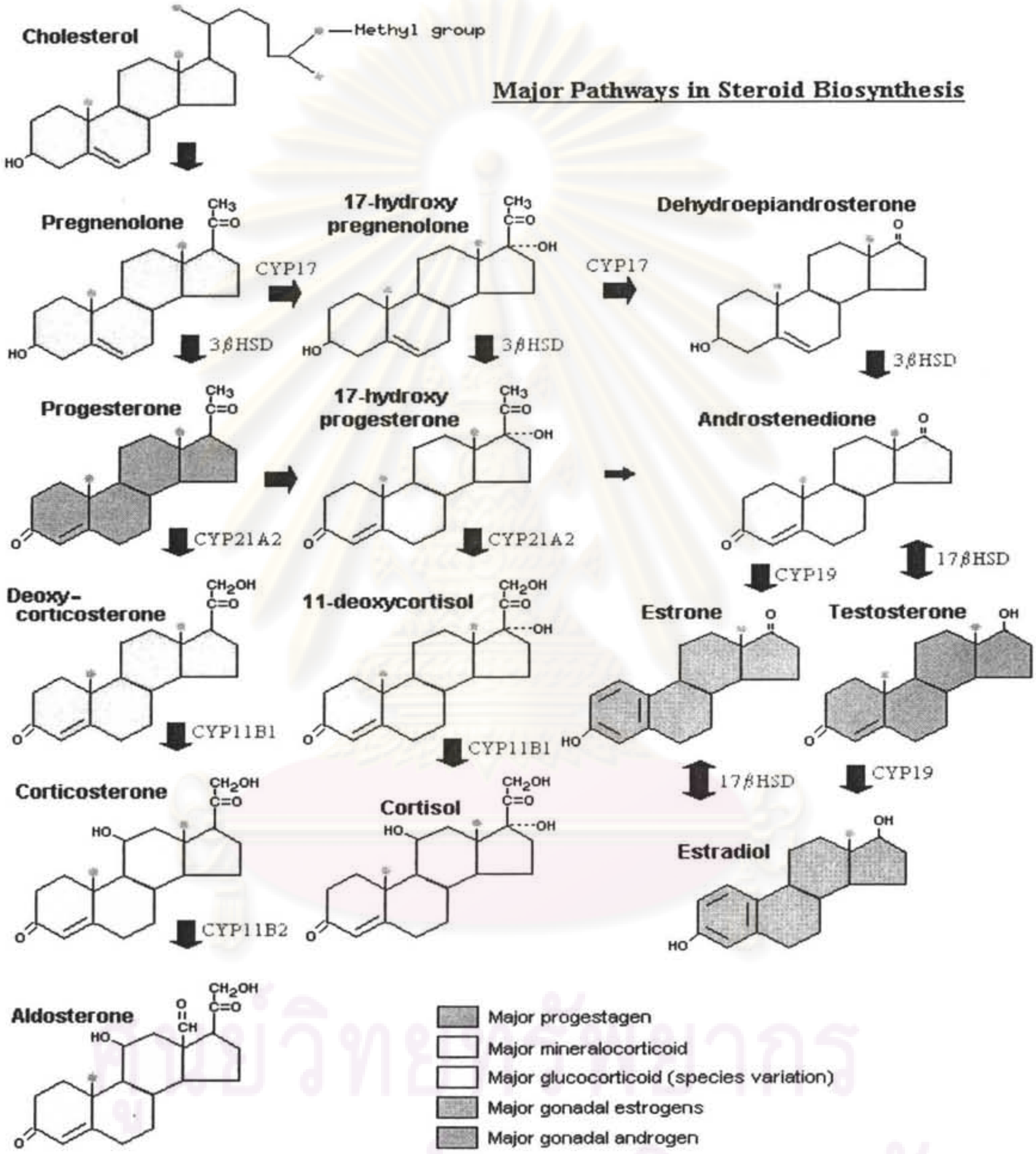
ภาพที่ 2.1 : แสดงโครงสร้างของฮอร์โมน cortisol

(https://www.treatmentonline.com/articles_pre/index.asp?article_id=46551&category)

•กลไกการสร้าง Cortisol

cortisol สร้างมาจาก cholesterol ซึ่งการสร้างนั้นสร้างจากต่อมหมวกไตชั้นนอกโซน Zona Fasciculate โดยการสร้าง cortisol ในต่อมหมวกไต เริ่มมาจากฮอร์โมน CRH ที่ถูกหลั่งมาจาก hypothalamus จะมากระตุ้นให้ต่อม pituitary ในส่วน Anterior lobe ผลิตฮอร์โมน ACTH ออกมา แล้วไปกระตุ้น cholesterol ที่สร้างมาจาก mitochondrial ในตับให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารตั้งต้นต่างๆ คือ pregnenolone และ progesterone เพื่อนำสารตั้งต้นดังกล่าวมาสร้างเป็นฮอร์โมนต่างๆคือ

1. cortisol ซึ่งกลไกนี้จะถูกควบคุมระดับฮอร์โมน ACTH
2. aldosterone ซึ่งกลไกนี้จะถูกควบคุมโดยระบบ RAS
3. androgens



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 2.2 : แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroidogenesis)

((http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/basics/steroidogenesis.htm)

2. ACE[23]

ACE หรือ ACE1 ทำหน้าที่สำคัญ 2 ประการ คือ

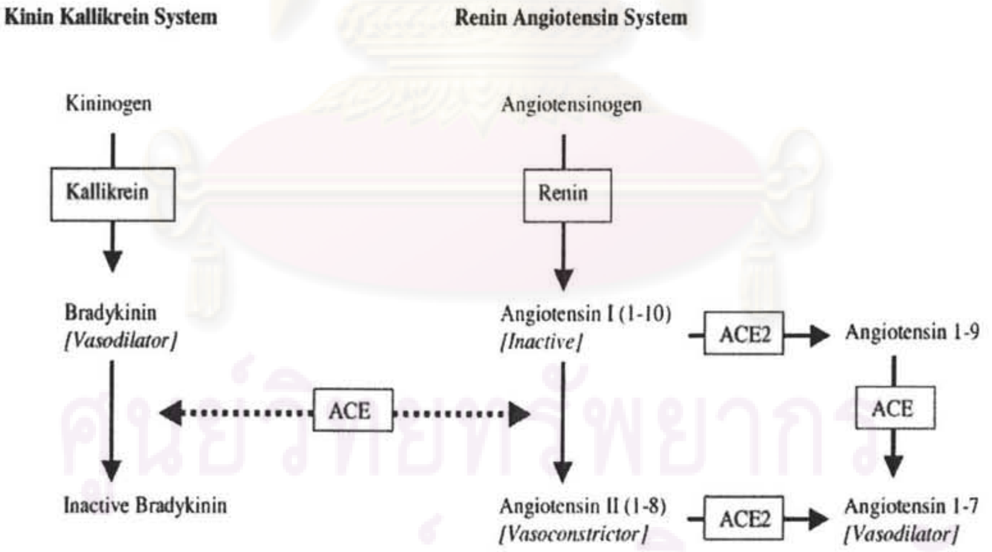
1. เป็นตัวนำในการผลิต AII

2. เป็นตัวย่อยสลาย Bradykinin

นอกจากนั้น คุณสมบัติอื่นๆของ ACE ยังเกี่ยวข้องกับพยาธิสรีรวิทยาด้วย ACE เป็นเอนไซม์พวก Zinc metallopeptide ซึ่งพบได้บนผิวของ endothelial และ epithelial cells

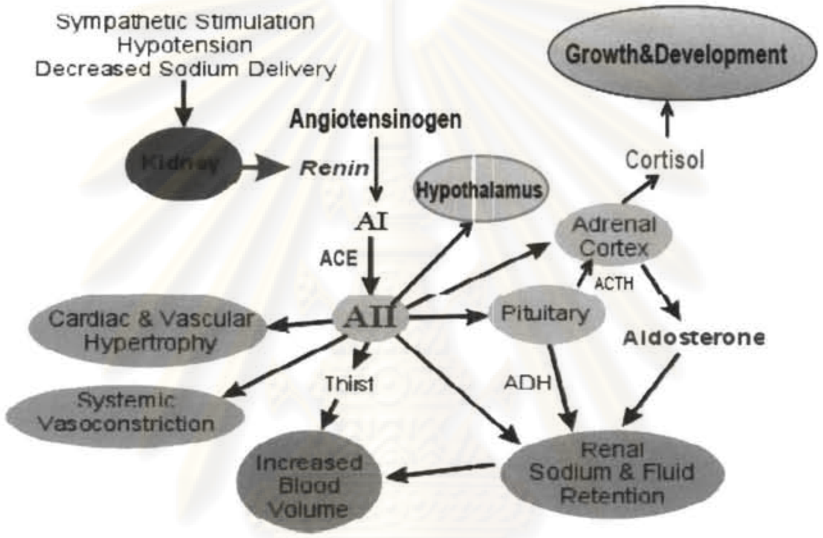
ACE จะมีหน้าที่เปลี่ยน inactive decapeptide (AI) ไปเป็น active octapeptide (Active AII) ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิดหลอดเลือดหดตัว (vasoconstrictor) โดย AII เป็นผลิตภัณฑ์หลักของระบบ RAS[31] ซึ่งเป็นระบบกลไกที่มีบทบาทในการควบคุมความดันเลือดและปริมาณเลือดในร่างกาย

renin ถูกปล่อยมาจากเซลล์ juxtaglomerular ในไต ซึ่งถูกควบคุมภายใต้ระดับของ Na ที่ลดลง, การสูญเสียปริมาตรของเลือด และการกระตุ้นของระบบซิมพาเทติก renin จะมีหน้าที่ไปตัด inactive peptide angiotensinogen (สังเคราะห์โดยตับ) ให้ได้เป็น AI ซึ่งเป็น inactive vasoconstrictor protein และในทางกลับกัน AI จะถูกเปลี่ยนไปเป็น AII โดย ACE (ดังภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 : แสดงวิถีการสร้าง AII[23]

AII เป็นตัวที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว ซึ่งสามารถส่งผลต่อต่อมหมวกไตชั้นนอก ทำให้เกิดการปล่อยของฮอร์โมน aldosterone ซึ่งไปกระตุ้นท่อในไต ซึ่งส่งผลให้ไตสามารถดูดกลับโซเดียมและน้ำจากปัสสาวะได้มาก[32] ซึ่งผลนี้เกิดมาจากการที่มีการสูญเสียปริมาตรของเหลวในเลือดนี้จึงทำให้ AII มาออกฤทธิ์ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของปริมาตรของเหลวในเลือด และความดันเลือดสูงขึ้น AII ยังเป็นสารสื่อกลางระหว่างการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์โดยการกระตุ้นของสารจำพวกไซโตคายน์ชนิดต่างๆ และgrowth factor[33] (ดังภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 : แสดงถึงผลที่เกิดขึ้นจากการทำงานของ AII[34]

นอกจากนั้น AII ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ endothelial ทำหน้าที่ผิดปกติโดยทำให้การผลิต nitric oxide จากเซลล์ endothelial ลดลง[35] (ปกติ nitric oxide จะเป็นสารที่เซลล์ endothelial สร้างขึ้นเพื่อปกป้องผนังชั้นในของหลอดเลือดจากสิ่งรบกวนต่างๆ) ซึ่งการค้นพบนี้ทำให้ต้องตระหนักถึงความสำคัญของ AII ในการเกิดพยาธิวิทยาของหลอดเลือด (cardiovascular pathophysiology) ที่เกี่ยวกับบทบาทของ RAS

ACE ยังมีบทบาทสำคัญในระบบฮอร์โมน นั่นคือ kinin-kallikrein cascade (ดังรูปที่ 2.3) ACE มีหน้าที่ในการสลาย bradykinin ซึ่งเป็นตัวที่ทำหน้าที่ขยายหลอดเลือด (vasodilation) ให้กลายเป็น inactive metabolite bradykinin 1-5

นอกจากนี้ ACE ยังมีบทบาทเด่นในกลุ่มของ Neurokinins ซึ่งเป็นหนึ่งในสารสื่อประสาทของระบบประสาทส่วนกลาง (Central Nervous System; CNS) ซึ่งทำหน้าที่ในการส่งผ่านความเจ็บปวด การควบคุมอารมณ์ กลไกการอักเสบ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน[36] ซึ่งการค้นพบเหล่านี้เป็นปัจจัยส่งเสริมให้มีการศึกษาโรคเกี่ยวกับสมอง เช่น โรคพาร์กินสัน[37] โรคซึมเศร้า[20-22] และความผิดปกติอื่นๆ

• ยีน ACE

ACE จะเป็นเอนไซม์ในพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ยีนที่ถ่ายทอดรหัส ACE ตั้งอยู่บนแขนที่ยาวของโครโมโซมคู่ที่ 17 (17q23) ยีนนี้มีความยาว 21 kb และประกอบด้วย 26 exons และ 25 introns ซึ่งใน NCBI ได้บันทึกไว้ว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE มากกว่า 160 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะ SNPs และI/D Polymorphisms

ภาพที่ 2.5 : แสดงโครงสร้างของยีน ACE และ ตำแหน่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE บางตำแหน่ง[38]

ยีน ACE สามารถถอดรหัสเป็น ACE 2 isoforms

1. Somatic form (sACE), มีมวลโมเลกุล 170 kDa ซึ่งมีการแสดงออกของยีนที่ Somatic tissue

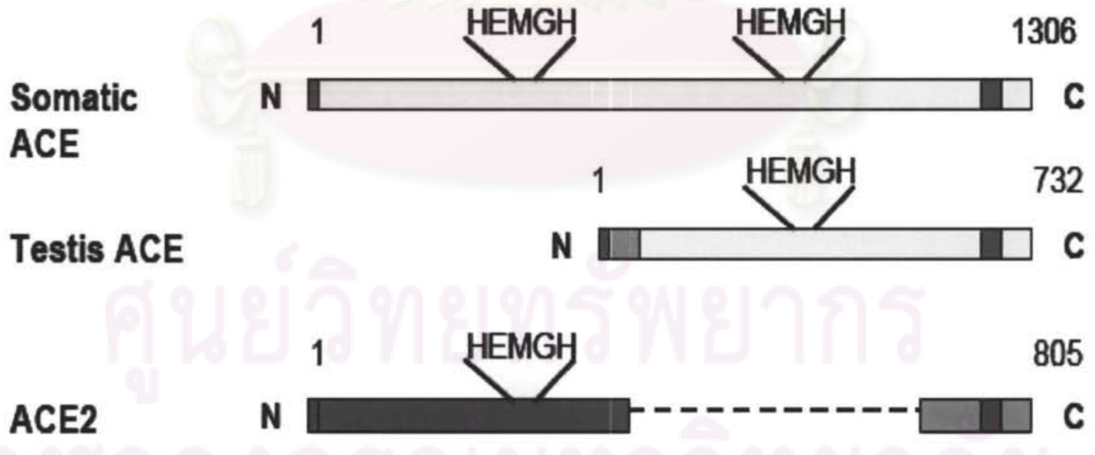
2. Testicular form (testis ACE, tACE) หรือเรียกว่า germinal ACE (gACE) มีมวลโมเลกุล น้อยกว่า 100 kDa ซึ่งมีการแสดงออกของยีนที่ germinal cells ใน testis[39] จากการที่มี 2 forms นี้เป็นผลมาจากการมีตำแหน่งของโปรโมเตอร์ที่ต่างกัน

➢ Somatic ACE ถูกถอดรหัสโดยการควบคุมของโปรโมเตอร์ ที่ตั้งอยู่บนตำแหน่ง 5' ของ exon 1 (Spro) และนำไปสู่การ transcription ตลอดทั้ง exon ซึ่งจะได้ mature sACE mRNA ที่ประกอบด้วย Exon 1-26 ที่ถูกถอดรหัสออกมา แต่ยกเว้น exon 13 ที่จะถูก splicing ออกไป

➢ Germinal ACE ถูกถอดรหัสจาก specific internal โปรโมเตอร์ ในตำแหน่งของ intron 12 (Gpro) ซึ่งจะได้ mature gACE mRNA ที่ประกอบด้วย Exon 13-26 ที่ถูกถอดรหัสออกมา

ความแตกต่างของ 2 forms นั้นอยู่ที่ sACE มี 2 active sites (N and C terminus) ในขณะที่ tACE มีเพียง active site อันเดียว ซึ่งคล้ายกับส่วน C-terminal ของ sACE (ดังภาพที่ 2.6) รายละเอียดของหน้าที่ของ tACE ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่น่าจะมีบทบาทในระบบสืบพันธุ์ของเพศชาย

Homologous ของเอนไซม์ ACE คือ ACE2 ซึ่งถูกค้นพบในมนุษย์ จากการโคลน human heart failure และ lymphoma cDNA libraries[40] ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับทางพันธุกรรมของยีน ACE2 ซึ่งประกอบด้วย 18 exons เอนไซม์นี้จะออกฤทธิ์ทั้งที่ AI และAII ทำให้ได้ Angiotensin 1-7 (ดังภาพที่ 2.3) ซึ่งมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับ Angiotensin 1-7[41] ว่ามีหน้าที่เป็นตัวขยายหลอดเลือด จึงทำให้เกิดความยุ่งยากกับระบบ RAS ในการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการทำงานของ ACE2 สำหรับ AII จะมากกว่า AI ถึง 400 เท่า ซึ่งบ่งชี้ว่าหน้าที่หลักของ ACE2 คือ การเปลี่ยน AII ให้เป็น Angiotensin 1-7 โดยบทบาทที่สำคัญของ Angiotensin 1-7 คือทำหน้าที่เป็น vasodilator antigrowth และ antiproliferative อย่างไรก็ตาม ACE2 จะถูกจำกัดการสร้างขึ้นมามากกว่า ACE ปัจจุบันมีการค้นพบ ACE3 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด เช่น หนู วัว และสุนัขขึ้นมาใหม่ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของโปรตีน ACE ในส่วน catalytic site ถึงอย่างไรก็ตามยังไม่ทราบหน้าที่ของ ACE3 อย่างชัดเจน[42]



ภาพที่ 2.6 : แสดง Isoforms และ homologous ของยีน ACE

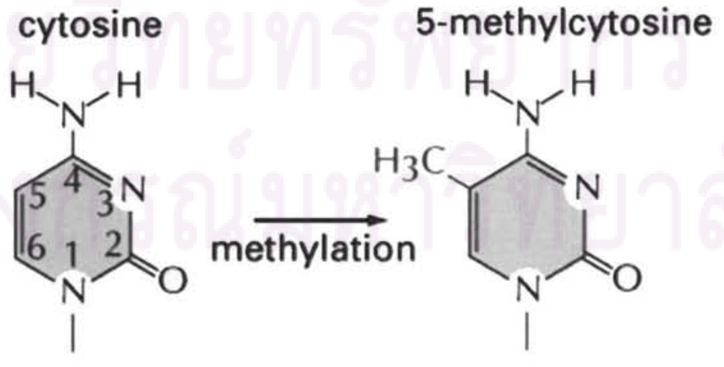
(http://www.fbs.leeds.ac.uk/staff/Hooper_N/vasopep.htm)

3. กลไกระดับเหนือพันธุกรรม

ในปี 1940 Waddington ได้ให้นิยามของคำว่า กลไกระดับเหนือพันธุกรรม ไว้ดังนี้ "อันตรกิริยาของยีนกับสิ่งแวดล้อมอันส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะฟีโนไทป์"[43] หลังจากนั้นได้มีการเพิ่มนิยามของกลไกระดับเหนือพันธุกรรมเข้าไปอีกว่า "การถ่ายทอดทางระดับเหนือพันธุกรรม (epigenetics inheritance) เป็นข้อมูลของเซลล์ซึ่งนอกเหนือจากข้อมูลบนลำดับเบส ซึ่งจะถ่ายทอดระหว่างการแบ่งเซลล์"[44] ผลกระทบทางกลไกระดับเหนือพันธุกรรมต่อการถอดรหัส (transcription) ในเซลล์เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน (gene expression) ดังนั้นความผิดปกติทาง epigenetics อาจส่งผลกระทบร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิต โดยเราสามารถแบ่งกลไกระดับเหนือพันธุกรรม ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (DNA methylation) และการดัดแปลงโครงสร้างของฮิสโตน (histone modification) โดยระหว่าง 2 ประการนี้นั้น DNA methylation เป็นที่ได้รับการศึกษามากที่สุด รวมทั้งงานวิจัยฉบับนี้ด้วย

- DNA methylation

DNA methylation เป็นการดัดแปลงทางพันธะโคเวเลนต์ของนิวคลีโอไทด์และมักจะเกิดขึ้นกับเบสไซโทซีน (cytosine; C) โดยเฉพาะบริเวณที่ไซโทซีนอยู่ร่วมกับกัวนีน (guanine; G) เป็นจำนวนมากที่เรียกว่า CpG dinucleotide ซึ่งเบสไซโทซีนจะถูกเติมหมู่เมทิลในบริเวณตำแหน่งคาร์บอนที่ห้าโดยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) ผ่าน universal methyl donor คือ Sadenosyl-L-methionine (SAM) จากการศึกษาพบว่า 5-เมทิลไซโทซีน (5-methylcytosine, 5-meC) จะมีประมาณร้อยละ 1 ของเบสบนดีเอ็นเอทั้งหมด และส่วนมากจะอยู่บน CpG dinucleotide ของ human somatic cell[45] หรือในบางกรณีอาจเกิด DNA methylation ในบริเวณที่มีเบส CCWGG ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ DNA cytosine methylase หรือเรียกว่า dcm โดยเอนไซม์ DNA cytosine methylase จะทำการเติมหมู่เมทิลให้กับเบสไซโทซีนตัวที่2ของ CCWGG nucleotide[46]



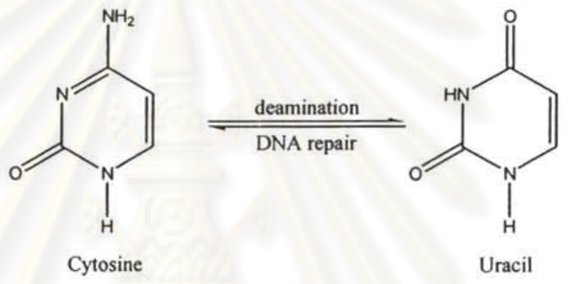
ภาพที่ 2.7 : แสดงการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ

อ้างอิงจากหนังสือ Molecular Biology of the cell, 4^{th} Edition

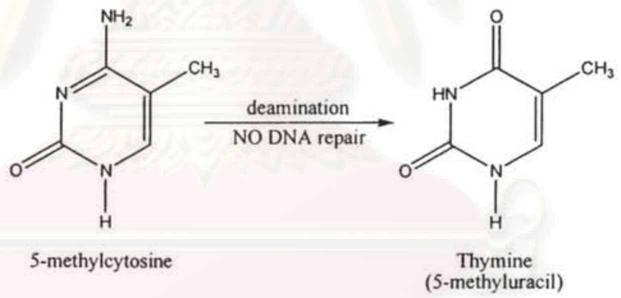
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

•การเกิด DNA methylation ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation)

5-เมทิลไซโทซีนสามารถเกิดการนำหมู่เอมีนออกได้โดยตัวเอง(spontaneous deamination) ได้เบสไทมีน (thymine; T) ในขณะที่ unmethylated cytosine ที่เกิด spontaneous deamination จะเปลี่ยนเป็นเบสยูราซิล (uracil; U) ซึ่งไม่พบบนสายดีเอ็นเอปกติ ทำให้กระบวนการตรวจสอบของดีเอ็นเอสามารถซ่อมแซมผ่านเอนไซม์ DNA-uracil glycosylase อย่างไรก็ตามกระบวนการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอจะไม่ทราบความผิดปกติจากการเปลี่ยน 5-เมทิลไซโทซีนเป็นเบสไทมีนแต่อย่างใด ดังนั้นการเกิด spontaneous deamination ของ 5-เมทิลไซโทซีนจะนำไปสู่การเกิดกลายพันธุ์ของเบสไซโทซีนเป็นเบสไทมีน (C to T transition mutation) ในจีโนม[47]



(1)



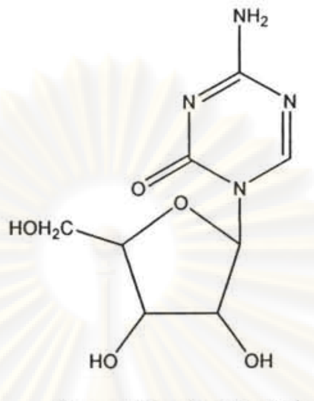
(2)

ภาพที่ 2.8 : แสดงการ deamination ของไซโทซีนและ 5-เมทิลไซโทซีน การ deamination ของไซโทซีนเป็นยูราซิล (1). จะมีการซ่อมแซม ส่วนการ deamination ของ 5-เมทิลไซโทซีนเป็นไทมีน (2). จะไม่มีการซ่อมแซม

•การเกิด DNA methylation ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด gene silencing

ความสัมพันธ์ระหว่างการเติมหมู่เมทิลลงบนดีเอ็นเอและการแสดงออกของยีนนั้นถูกตีพิมพ์ครั้งแรกเมื่อ 25 ปีที่แล้ว[48] โดย murine undifferentiated embryo cell จะถูกให้สาร 5-azacytidine ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเกิดการเติมหมู่เมทิลลงบนดีเอ็นเอก็ยังสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดต่างๆได้ตามปกติรวมทั้งเซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ไขมัน โดยการเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้น

ในรุ่นถัดไปของเซลล์ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการลดลงของการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอสามารถ reactivate ยีนบางยีนทำให้สามารถทำให้เกิดการพัฒนาของเซลล์ใหม่ที่ได้มาจากเอ็มบริโอได้



5-azacytidine (nucleoside)

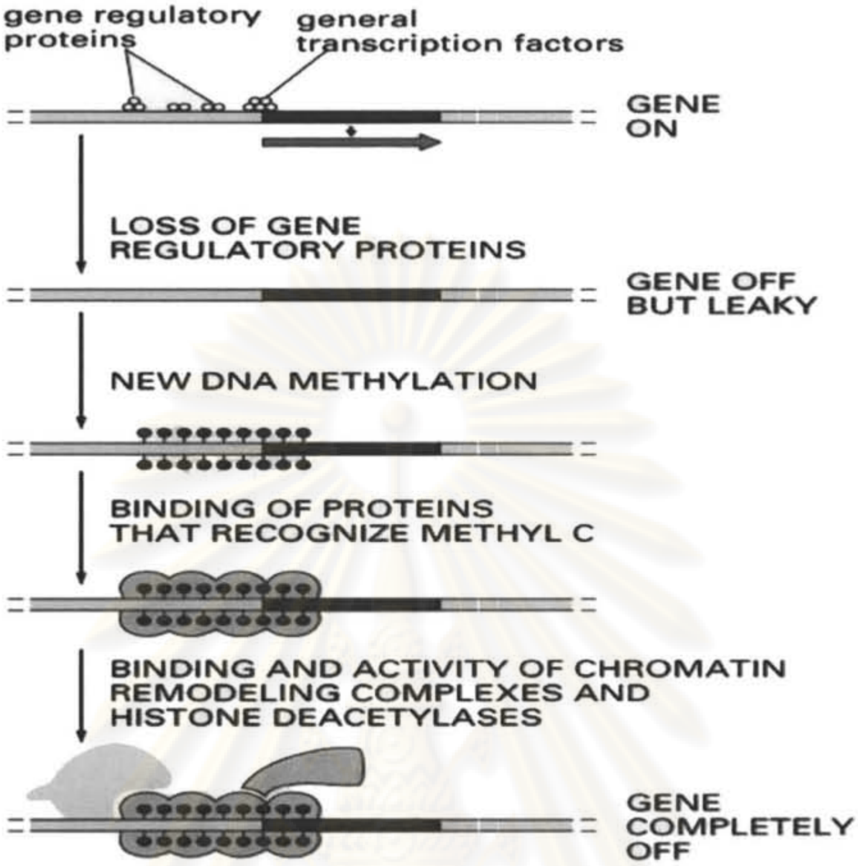
ภาพที่ 2.9 : แสดงโครงสร้าง 5-azacytidine ซึ่งเป็น 5-methylcytosine analogue

ทุกวันนี้มีวิถีสองวิถีที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการถอดรหัสของยีนผ่านการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ คือ

ประการแรก ดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมทิลจะทำให้ transcription factor ไม่สามารถเกาะบริเวณที่ transcription factor เกาะอยู่ตามปกติได้ โดยถึงแม้ว่าการควบคุมกระบวนการเหล่านี้ใน in vivo ยังพบน้อย แต่ว่า transcription factor จำพวก Ets-1[49] และ boundary element factor CTCF[50] ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอได้หากไซโทซีนในบริเวณที่จับจำเพาะของ transcription factor เหล่านั้นมีการเติมหมู่เมทิล

ประการที่สอง ดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมทิลจะทำให้โปรตีนที่จำเพาะต่อ methylated CpG หรือ CCWGG มาเกาะส่งผลให้มีการยับยั้งการถอดรหัสโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครมาทิน (Chromatin remodeling)[4]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.10 : แสดงการควบคุมการถอดรหัสของยีนผ่านการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ
อ้างอิงจากหนังสือ Molecular Biology of the cell, 4th Edition

จากตัวอย่างงานวิจัยที่มีการเริ่มศึกษาถึงกลไกระดับเหนือพันธุกรรม โดยเฉพาะการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอในยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทางจิตเวช เช่น โรคจิตเภท (schizophrenia) โรคอารมณ์เศร้าอารมณ์แปรปรวน (bipolar disorder) และโรคซึมเศร้า ดังตัวอย่างการศึกษาในสองยีน คือ เช่น ยีน 5HTT[6] และ ยีน RELN[7, 8] ซึ่งการเกิด DNA methylation ในยีนดังกล่าวสามารถส่งผลต่อการแสดงออกของยีนได้ โดยจากงานวิจัยของ Robert Philibert[6] ได้ศึกษาถึงการเกิด DNA methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน 5-HTT ซึ่งมี CpG Island อยู่ จึงส่งผลให้มีการเติมหมู่เมทิลที่บริเวณโปรโมเตอร์ โดยการเกิด DNA methylation นั้นส่งผลต่อระดับ mRNA ของ 5-HTT ที่แสดงออกโดย lymphoblast cell lineในปริมาณที่ลดลง นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Abdolmaleky HM[7] ได้ศึกษาถึงการเกิด DNA methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ ของยีน RELN ซึ่งมีความสำคัญเพราะ ยีน RELN ทำหน้าที่สร้างโปรตีน reelin เป็นโปรตีนที่ส่วนใหญ่พบในสมองแต่อาจพบได้ในกระแสเลือด และอวัยวะต่างๆในร่างกาย โปรตีน reelin ทำหน้าที่ในการควบคุมตำแหน่งในการเจริญของสมองในระยะที่

เป็นตัวอ่อนควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์สมองตัวอ่อนเพื่อที่จะสร้างเซลล์ประสาท (dendritic cell) และกระตุ้นการเจริญของเซลล์ประสาทอีกด้วย ดังนั้นถ้าขาดโปรตีน Reelin จะทำให้เกิดพยาธิสภาพทางสมองได้โดยการขาดโปรตีน Reelin มักเกิดจากการแสดงออกของยีน RELN ลดลงจึงส่งผลให้เกิดการสร้างโปรตีน Reelin ลดลงด้วย ซึ่งเป็นเหตุสำคัญในการเกิดโรคทางจิตเวช โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคทางจิต 10 ราย ซึ่งพบว่าเกิด hypermethylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน RELN ในผู้ป่วยทั้ง 10 ราย แสดงถึงว่าการเกิด DNA methylation ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีนในปริมาณที่ลดลงซึ่งผลการศึกษานี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Grayson DR[8] ได้ทำการศึกษาในลักษณะ case-control เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคทางจิตจำนวน 15 ราย และคนปกติจำนวน 15 ราย โดยได้ตรวจสอบการเกิด DNA methylation ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ ของยีน RELN เนื่องจากในตำแหน่งของโปรโมเตอร์ นั้นมี CpG Island อยู่จึงส่งผลให้มีการเติมหมู่เมทิลที่บริเวณโปรโมเตอร์ซึ่งการเกิดนี้จะพบได้ในผู้ป่วยโรคทางจิตเวชแสดงว่าการเกิด DNA methylation ส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ลดลง จึงส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดความผิดปกติขึ้นและนำไปสู่การเกิดโรคทางจิตเวช ถึงอย่างไรก็ตามการศึกษาการเกิด DNA methylation ที่บริเวณ $C^{m}CW(A/T)GG$ ยังไม่เป็นที่วิจัยอย่างแพร่หลายในโรคทางจิตเวช แต่ในปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันประเภท lymphoid cells (Acute lymphoblastic leukemia; ALL) แล้ว[51] โดยเป็นการศึกษาเกี่ยวกับการศึกษาการเกิด DNA methylation ที่บริเวณ $C^{m}CWGG$ ณ ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน TP53 ทำให้การแสดงออกของยีน TP53 ลดลงในผู้ป่วย ALL ดังนั้นเหตุผลจากตัวอย่างงานวิจัยที่ได้กล่าวมาแล้วสามารถสนับสนุนความรู้ที่เกี่ยวข้องกับกลไกระดับเหนือพันธุกรรมและการเกิดโรคทางจิตเวชได้ แต่ยังไม่มีการศึกษากลไกระดับเหนือพันธุกรรมของยีน ACE ดังนั้นคณะวิจัยจึงประสงค์จะทำการศึกษาถึงกลไกระดับเหนือพันธุกรรมของยีน ACE ที่อาจมีผลต่อการเกิดโรคซึมเศร้าในมนุษย์ได้

4. พันธุกรรมและการควบคุมระดับของ ACE

ปกติระดับ ACE ในกระแสเลือดจะคงที่แม้ว่าจะมีการทดลองซ้ำหลายครั้งด้วยวิธีเดียวกันโดยใช้ผู้ทดลองหลายๆคน ดังนั้นจึงได้มีการเสนอว่าการควบคุมระดับ ACE ในกระแสเลือดในระยะยาวอาจจะเกี่ยวข้องกับทางพันธุกรรม

Rigat และคณะ[52] ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ในชาวคอเคเซียน พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการมี (insertion, I) หรือการหายไป (deletion, D) ของดีเอ็นเอขนาด 287 คู่เบส (I/D polymorphism) ในส่วน intron 16 โดยพบว่าระดับ ACE activity ใน จีโนไทป์ DD มี activity มากเป็น2เท่าของ จีโนไทป์ II นอกจากนี้ Kario, K และคณะ[53] ได้ทำการศึกษา I/D polymorphism ในคนญี่ปุ่นพบว่า ระดับ ACE activity

ที่สูงจะพบใน จีโนไทป์ DD ซึ่งบุคคลดังกล่าวมักมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคต่างๆสูง เช่นหัวใจวาย และ Stroke

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมยีน ACE ที่เป็นลักษณะของ SNPs ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ TC Baghai และคณะ(21) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มคนเยอรมัน ซึ่งพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเกิดโรคซึมเศร้านั่นคือ ความหลากหลายบนโปรโมเตอร์ของยีน ACE ที่เกิดจาก SNP ณ ตำแหน่ง-240A/T (rs4291) มีผลต่อ activity ของ ACE โดยกลุ่มที่มีอัลลีล T จะมีระดับ ACE activity ที่สูงขึ้น ดังนั้นความหลากหลายของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -240A/T จึงถูกสงสัยว่าเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคซึมเศร้าได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโปรโมเตอร์ของยีน ACE ณ ตำแหน่ง-93T/C (rs4292)(27) ซึ่งมีผลต่อระดับของ ACE ในกระแสเลือดอีกด้วย

5. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE กับการเกิดพยาธิสรีรวิทยา

จากการศึกษาในประชากรชาวคอเคเซียน(54) พบว่า ระดับ ACE ในกระแสเลือดนั้นมีผลมาจากการที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE และหลักฐานส่วนใหญ่มักพบว่าความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE นั้นเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสรีรวิทยา ไปจนถึงระบบ RAS และระบบ HPA ซึ่งก็ได้มีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรม และผลแสดงออกทางคลินิก โดยการศึกษานั้นไม่ได้แค่เฉพาะการมีอยู่หรือการเกิดโรคเท่านั้น แต่ยังรวมไปถึงลักษณะอื่นๆด้วย เช่น อาการและการแสดงออก ประสิทธิภาพของยา การฟื้นตัวจากโรค การดำเนินไปของโรค และการรอดชีวิต

6. ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE และผลแสดงอาการทางคลินิก

6.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE และความดันโลหิต (Blood pressure)

มีหลักฐานการรายงานของ Levy และคณะ(55) กล่าวไว้ว่า ตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 17 ที่เป็นบริเวณที่ตั้งของยีน ACE นั้นมีความสัมพันธ์กับโรคความดันโลหิตสูง ต่อมา Xiaofeng Zhu และคณะ(56) ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรม และโรคความดันโลหิตสูงในชาวอัฟริกาตะวันตก พบว่า ภาวะความดันโลหิตสูงจะพบในคนที่มีอัลลีล T และ G ของความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบ -240A/T และ A2350G ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE และโรคหลอดเลือดหัวใจ (Coronary Heart Disease)

Carole A. Foy และคณะ[57] ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของ rs4291 (-240A/T) พบว่า จีโนไทป์ TT สัมพันธ์กับการเกิดโรค Myocardial Infarction (MI)

ในปี 1992 มีรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง อัลลีล D และ โรค MI โดย Cambien และคณะ[58] ได้ศึกษาแบบ case-control ซึ่งประกอบด้วย ผู้ป่วย MI 610 ราย และคนปกติ 733 ราย พบว่าจีโนไทป์ DD นั้นพบบ่อยในผู้ป่วยเพศชายที่เป็นโรค MI มากกว่าในคนปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ที่มีปัจจัยเสี่ยง เช่น ดัชนีมวลกายต่ำและระดับของ apolipoprotein B ในพลาสมาต่ำ

6.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE และโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease)

เนื่องจาก ACE ไปทำให้ amyloid beta peptide ในหลอดทดลองลดลง ซึ่งทำให้ระดับ ACE ที่สูงขึ้นเล็กน้อยอาจจะเป็นตัวช่วยป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์[59]

Patrick G Kehoe และคณะ[60] ได้ทำการศึกษาแบบ case-control พบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิด rs4291 ทำให้ระดับ ACE ในกระแสเลือดนั้นเปลี่ยนแปลงซึ่งอาจส่งผลต่อ age-at-onset ของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ นอกจากนี้ Kehoe และคณะ[61] ได้รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่าง I/D polymorphism และโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรกๆ โดยศึกษาแบบ case-control พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการมีอัลลีล I กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์

6.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE และโรคซึมเศร้า

TC Baghai และคณะ[21] ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มคนเยอรมัน ซึ่งพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเกิดโรคซึมเศร้านั่นคือ ความหลากหลายบนโปรโมเตอร์ของยีน ACE ที่เกิดจาก SNP ณ ตำแหน่ง-240A/T (rs4291) มีผลต่อ activity ของ ACE โดยกลุ่มที่มีอัลลีล T จะมีระดับ ACE activity ที่สูงขึ้น ดังนั้นความหลากหลายของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -240A/T จึงถูกสงสัยว่าเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคซึมเศร้าได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ มีรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง I/D polymorphism และโรคซึมเศร้า[62] พบว่า จีโนไทป์ ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ของยีน ACEแบบ DD จะมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคซึมเศร้า

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในการวิจัยมีดังนี้

1.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงมีดังนี้

1.1.1 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat (Human T cell lymphoblast-like cell line) ได้รับการอนุเคราะห์เซลล์จาก ศ.นพ.ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.2 เซลล์มะเร็งเลือดขาว K562 (Human erythroleukemic cell line) ได้รับการอนุเคราะห์เซลล์จาก ศ.ดร.พรเทพ เทียนสิวากุล ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.3 เซลล์ HeLa (Human cervix carcinoma cell line) ได้รับการอนุเคราะห์เซลล์จาก รศ.ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.4 เซลล์ HaCaT (Human keratinocyte cell line) ได้รับการอนุเคราะห์เซลล์จาก Prof.Dr.N.E.Fusenig, German Cancer Research Centre, Heidelberg ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

1.1.5 เซลล์ HEK 293 (Human embryonic kidney cell line) ได้รับการอนุเคราะห์เซลล์จาก รศ.นพ.วันล่า กุลวิชิต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.6 เซลล์ SH-SY5Y (Human neuroblastoma cell line) จัดซื้อจาก American Type Culture collection (Cat #: CRL-2266 ™; ATCC®, Manasas, VA, USA)

อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat และ เซลล์มะเร็งเลือดขาว K562 คือ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Hyclone, Logan, UT, USA) ที่ผสมกับ 10% Fetal Bovine Serum (Hyclone) และยาปฏิชีวนะซึ่งประกอบด้วย 100 U/100 μg/ml Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) และ 0.25 μg/ml Fungizone Amphotericin B (Invitrogen) โดยนำเซลล์มา incubate ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่มีอุณหภูมิ 37 °C และความเข้มข้นของ CO_2 ประมาณ 5 %

อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ HeLa, HaCaT และ HEK 293 คือ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone) ที่ผสมกับ 10% Fetal Bovine Serum และยา

ปฏิชีวนะซึ่งประกอบด้วย 100 U/100 µg/ml Penicillin-Streptomycin และ 0.25 µg/ml Fungizone Amphotericin B โดยนำเซลล์มา incubate ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่มีอุณหภูมิ 37 °C และความเข้มข้นของ CO_2 ประมาณ 5 %

อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ SH-SY5Y คือ Minimum Essential Medium (EMEM) (Hyclone) ผสมกับ Ham's F12 medium (Hyclone) ในอัตราส่วน 1: 1 10% Fetal Bovine Serum ยาปฏิชีวนะซึ่งประกอบด้วย 100 U/100 µg/ml Penicillin-Streptomycin และ 0.25 µg/ml Fungizone Amphotericin B โดยนำเซลล์มา incubate ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่มีอุณหภูมิ 37 °C และความเข้มข้นของ CO_2 ประมาณ 5 %

1.2 ประชากร

ประชากรเป้าหมาย (Target population) หมายถึง คนไทยที่ป่วยเป็นโรคซึมเศร้า ซึ่งเป็นผู้ที่เกิดในประเทศไทย อาศัยในประเทศไทย และรูปลักษณ์บ่งชี้ว่าเป็นคนเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทั้งนี้ ต้องมีภูมิลำเนาในจังหวัดเลย จังหวัดหนองบัวลำภู และจังหวัดใกล้เคียง ซึ่งเป็นพื้นที่การให้บริการของโรงพยาบาลจิตเวชเลยราชนครินทร์ อนึ่ง คณะผู้วิจัยเน้นการเก็บตัวอย่างในจังหวัดเลย จังหวัดหนองบัวลำภู เป็นหลัก เพราะมีอัตราความชุกของโรคซึมเศร้าสูงสุดในพื้นที่สาธารณสุขเขต 10

ประชากรตัวอย่าง (Sample population) หมายถึง 1. case: ผู้ป่วยคนไทยที่เป็นโรคซึมเศร้าที่เป็นประชากรเป้าหมาย และคุณสมบัติครบตาม criteria ที่กล่าวไว้ในกลุ่มตัวอย่าง 2. control: คนไทยที่มีสุขภาพดี ซึ่งมีภูมิลำเนาเดียวกันกับประชากรเป้าหมาย และคุณสมบัติครบตาม criteria ที่กล่าวไว้ในกลุ่มควบคุม

กลุ่มตัวอย่าง คือ ผู้ป่วยโรคซึมเศร้า ที่เข้ารับการรักษาในพื้นที่การให้บริการของโรงพยาบาลจิตเวชเลยราชนครินทร์ ดังแสดงในภาพที่ 3.1 ซึ่งประกอบด้วยจังหวัดเลย จังหวัดหนองบัวลำภู และจังหวัดใกล้เคียง โดยอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการต้องลงนามเป็นลายลักษณ์อักษรในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (แบบฟอร์มอยู่ในส่วนของภาคผนวก ข) พร้อมทั้งได้แจ้งข้อมูลสำหรับประชากรตัวอย่างหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย (แบบฟอร์มอยู่ในส่วนของภาคผนวก ค) ทั้งนี้ ได้เก็บตัวอย่างเลือดและบันทึกข้อมูลของผู้ป่วยโรคซึมเศร้าที่เข้าร่วมโครงการวิจัย 187 ราย มีอายุเฉลี่ย 44.89±12.92 ปี โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกประกอบด้วย inclusion criteria และ exclusion criteria อนึ่ง คณะผู้วิจัยได้ใช้เกณฑ์วินิจฉัย DSM-IV[63] ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคซึมเศร้าที่ใช้กันทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย[26, 64]

<u>Inclusion criteria</u>

1. เข้ารับการรักษาในพื้นที่การให้บริการของโรงพยาบาลจิตเวชเลยราชนครินทร์
2. ประชากรชายหรือหญิงอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป ที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

3. ไม่เจ็บป่วยทางจิตด้วยโรคต่างๆ เช่น schizophrenia, bipolar disorder, schizoaffective disorder และ substance abuse disorders เป็นต้น

4. ไม่เจ็บป่วยด้วยโรคทางกายรุนแรงจนเป็นอุปสรรคต่อการวิจัย

5. เข้าเกณฑ์การวินิจฉัยโรคซึมเศร้าโดยจิตแพทย์ คือ มีอาการต่อไปนี้อย่างน้อย 5 ข้อ เกิดขึ้นพร้อมกันอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานอย่างน้อย 2 สัปดาห์ อนึ่ง

ต้องมีอย่างน้อย 1 ใน 2 อาการหลักเหล่านี้

1. อารมณ์เศร้าเป็นตลอดทั้งวัน หรือเกือบทุกวัน
2. ความสนใจสิ่งต่างๆ ลดลงมาก หรือไม่อยากพูดคุยกับใคร ไม่อยากทำอะไร เกือบทุกวัน

และต้องมีอย่างน้อย 4 อาการรองเหล่านี้

3. น้ำหนักลดลงอย่างมากโดยที่ไม่ได้ตั้งใจอดอาหาร หรือน้ำหนักเพิ่มอย่างมาก เพราะกินจุ
4. นอนไม่หลับ หรือนอนมาก เกือบทุกวัน
5. การเคลื่อนไหวและความคิดเชื่องช้า หรือกระวนกระวาย อยู่ไม่สุข
6. อ่อนเพลีย เหนื่อยล้า ไม่มีเรี่ยวแรง เป็นเกือบทุกวัน
7. รู้สึกไร้ค่า หรือรู้สึกผิดมากกว่าปกติ เป็นเกือบทุกวัน
8. สมาธิไม่ดี คิดไม่ออก หรือตัดสินใจลำบาก เป็นเกือบทุกวัน
9. คิดอยากตาย หรือพยายามฆ่าตัวตาย

ทั้งนี้ ผู้ป่วยต้องไม่มีประวัติของอาการแมเนีย (mania) หรือ ไฮโปแมเนีย (hypomania)

Exclusion criteria

หากเข้าลักษณะข้อใด ข้อหนึ่งเหล่านี้

1. ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย
2. ไม่เข้าเกณฑ์การวินิจฉัยโรคซึมเศร้า
3. เคยมีอาการแมเนีย (mania) หรือไฮโปแมเนีย (hypomania)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 3.1 : พื้นที่การให้บริการของโรงพยาบาลจิตเวชเลยราชนครินทร์ ซึ่งรับผิดชอบประชากร จังหวัดเลย จังหวัดหนองบัวลำภู และจังหวัดใกล้เคียง

(ภาพจาก http://www.rploei.go.th/web/index.php?option=com_wrapper&Itemid=40)

กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี ซึ่งเป็นประชากรชายหรือหญิงอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป ที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยเลือกกลุ่มควบคุมที่มีความใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้าทั้งในด้านสัดส่วนระหว่างเพศ และอายุ (ความแตกต่างจากกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้าไม่เกิน ±5 ปี) รวมทั้งต้องมีภูมิลำเนาในบริเวณใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้า นั่นคือ การเลือกประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่จังหวัดเลย และจังหวัดหนองบัวลำภู เป็นหลัก นอกจากนี้ กลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีต้องไม่เจ็บป่วยทางจิตด้วยโรคต่างๆ เช่น schizophrenia, bipolar disorder schizoaffective disorder และ substance abuse disorders เป็นต้น และไม่เจ็บป่วยด้วยโรคทางกายรุนแรงจนเป็นอุปสรรคต่อการวิจัย อนึ่ง ได้เก็บตัวอย่างเลือดและบันทึกข้อมูลของผู้ที่มีสุขภาพดีที่เข้าร่วมโครงการวิจัย 207 ราย มีอายุเฉลี่ย 41.34±9.76 ปี

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ	**บริษัทผู้ผลิต**	**ประเทศ**
1. เครื่อง Micro High Speed Refrigerated Centrifuge รุ่น VS-15000CFNII	Vision Scientific Co.,Ltd	เกาหลีใต้
2. เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) รุ่น FINE VORTEX	Finepcr	เกาหลีใต้
3. เครื่อง Vacuum Concentrator (DNA SpeedVacs) รุ่น DNA110-230	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)	Memmert	เยอรมนี
5. เครื่อง Block Heater รุ่น HB-1 และ HB-2	Wealtec Corp.	สหรัฐอเมริกา
6. ตู้แช่แข็ง -20 °C (Top Open Chest Freezer)	Sanyo Electric Co.,Ltd	ญี่ปุ่น
7. ตู้แช่แข็ง -80 °C (ULT Deep Freezer) รุ่น DF8524	ilShin Lab Co.,ltd.	เกาหลีใต้
8. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น PTC-200	MJ Research, Inc.	สหรัฐอเมริกา
9. เครื่อง Themal Cyler รุ่น ep Gradient S	Eppendorf	เยอรมนี
10. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น GeneAmp PCR System 2400	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
11. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น PX2	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
12. ชุดถ่ายภาพเจล (Transilluminator และ Doc-Print)	Vilber Lourmat	ฝรั่งเศส
13. เครื่องวิเคราะห์และถ่ายภาพการวิเคราะห์สารพันธุกรรม (G:Box Chemi SD)	Syngene	สหรัฐอเมริกา
14. ตู้อบ (Incubator Shaker) Minitron	Appropriate Technical Resources, Inc.	สหรัฐอเมริกา
15. เครื่อง Suction รุ่น Pumpe 4010	Boehringer Mannheim	เยอรมนี
16. เครื่อง Cryocentrifuge รุ่น Biofuge Stratos	Kendro Laboratory Products	เยอรมนี
17. ตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 (CO_2 Incubator)	Sheldon Manufacturing Inc.	สหรัฐอเมริกา
18. ตู้อบ (Incubator)	Memmert	เยอรมนี
19. ตู้ปลอดเชื้อ (Class II Biosafety Cabinet) รุ่น NapFLOW	Thermo Scientific, Inc. (Napco)	สหรัฐอเมริกา
20. ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar Flow Cabinet)	E.S.I. Flufrance	ฝรั่งเศส
21. เครื่องวัดแสง luminescence (Luminometer) รุ่น VICTOR^3	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
22. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	Thermo	สหรัฐอเมริกา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(UV-Visible Spectrophotometer) NanoDrop รุ่น 1000		
23. เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น AB204-S CLASSIC	Mettler Toledo	สวิสเซอร์แลนด์
24. ถัง Liquid Nitrogen รุ่น XT20	Taylor-Wharton	สหรัฐอเมริกา
25. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) รุ่น Olympus CK30	Olympus	ญี่ปุ่น
26. เครื่อง Electroporator รุ่น EC100	EC Apparatus	สหรัฐอเมริกา
27. เครื่อง Power Supply รุ่น POWER PAC 200 และ 300	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
28. เครื่อง Power Supply รุ่น SX250 MightySlim PSU.	Hoefer, Inc.	สหรัฐอเมริกา

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. Oak Ridge Centrifuge tube (ขนาด 50 ml)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
4. Pipette tips (ขนาด 10, 200, 1000 µl)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
5. BARRIERTIPS (ขนาด 20, 200, 1000 µl)	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
6. Autopipette (ขนาด 20, 200, 1000 µl)	Gilson	ฝรั่งเศส
7. Autopipette (ขนาด 20 µl)	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
8. Pipette Aid รุ่น Portable XP	Drummond Scientific	สหรัฐอเมริกา
9. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri Dishes)	Bibby Sterilin Ltd.	อังกฤษ
10. Luminometer Plate	PerkinElmer	สหรัฐอเมริกา
11. Cell Culture Flask (ขนาด 25 cm^2 และ 75 cm^2)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
12. Disposable Serological pipette (ขนาด 5 ml และ 10 ml)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
13. Pasteur pipette	Copan innovation	สหรัฐอเมริกา
14. Cryovial tube (ขนาด 2 ml)	Simport plastics	แคนาดา
15. Cell Culture Dish (ขนาด 100mm X 20mm)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
16. 96 Well Cell Culture Cluster, Flat Bottom with Lid	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
17. SUB CELL รุ่น Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
18. SUB CELL รุ่น Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

19. Electroporation cuvettes ระยะห่างช่อง 1 mm.	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา

สารเคมี	**บริษัทผู้ผลิต**	**ประเทศ**
1. ชุดน้ำยา FlexiGene DNA Kit	Qiagen	เยอรมนี
2. Ethidium Bromide	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
3. 2-Propanol	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
4. Absolute Ethanol	Merck	เยอรมนี
5. n-butanol	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
6. GenePure LE Agarose	ISC BioExpress	สหรัฐอเมริกา
7. ชุดน้ำยา MasterTaq® Kit	Eppendorf	เยอรมนี
8. ชุดน้ำยา *Pfu* DNA polymerase	Fermentas	แคนนาดา
9. ชุดน้ำยา *Taq* DNA polymerase with standard *Taq* buffer	New England Biolabs, Inc.	สหรัฐอเมริกา
10. ชุดสกัดแยกดีเอ็นเอจากเจล (Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Column)	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
11. Sterile Water (deionized water)	General Hospital Products Public Co., Ltd	ประเทศไทย
12. ชุดน้ำยา pGEM®-T Easy Vector System	Promega	สหรัฐอเมริกา
13. เอนไซม์ *Psp*GI, *Kpn*I, *Hin*dIII, *Sma*I, *Xba*I DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs, Inc.	สหรัฐอเมริกา
14. เอนไซม์ *Mva*I, *Hin*dIII, *Sac*II, *Hin*fI,100 bp ladder	Fermentas	แคนนาดา
15. 25 bp ladder, 50 bp ladder	Promega	สหรัฐอเมริกา
16. ชุดน้ำยา T4 DNA Ligase	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
17. Tryptone Peptone	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
18. Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
19. Bacto-Agar	Becton Dickinson	สหรัฐอเมริกา
20. AMPILIN (Amplicilin,Ampicilin Sodium)	Atlantic Laboratories Corp. Ltd	ประเทศไทย
21. Sodium chloride	Merck	เยอรมนี
22. Calcium chloride dehydrate	Merck	เยอรมนี
23. Magnesium chloride	APS Finechem	ออสเตรเลีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

24. Sodium acetate	Merck	เยอรมนี
25. Potassium acetate	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
26. Tris Base	Promega	สหรัฐอเมริกา
27. Orthoboric acid	BDH	อังกฤษ
28. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt	BDH	อังกฤษ
29. Sodium hydroxide	Carlo Erba Reagenti	อิตาลี
30. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Bio-Rad	สหรัฐอเมริกา
31. ชุดสกัด PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
32. Ribonuclease A	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
33. น้ำยา TRIZOL® Reagent	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
34. ชุดน้ำยา Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (AMV-RT)	Promega	สหรัฐอเมริกา
35. RNase AWAY (for RNase Decontamination)	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
36. เอนไซม์ Deoxyribonuclease I, Amplification Grade	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
37. Chloroform	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
38. Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
39. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 4.00 mM/L Glutamine, 4500 mg/L Glucose without Sodium Pyruvate	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
40. Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) Medium with 2.05 mM L-Glutamine	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
41. Minimum Essential Medium (EMEM)	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
42. Ham's F12 medium	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
43. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS Modified) without Calcium, Magnesium	JRH Biosciences	สหรัฐอเมริกา
44. Fetal Bovine Serum (FBS)	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
45. HyQ Trypsin 0.25 % with EDTA with 2.5 g Porcine Trypsin without Calcium, Magnesium	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
46. Penicillin-Streptomycin Solution 10,000 units/ml	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Penicillin, 10,000 μg/ml Streptomycin

47. Fungizone Amphotericin B 250 μg/ml	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
48. Dimethyl Sulfoxide	Sigma Aldrich	สหรัฐอเมริกา
49. ชุดน้ำยา Lipofectamine™ 2000	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
50. ชุดน้ำยา Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega	สหรัฐอเมริกา

3. วิธีการวิจัย

3.1 <u>ส่วนที่ 1</u> ศึกษาบทบาทของกลไกระดับเหนือพันธุกรรมของยีน ACE (ศึกษาด้านการเกิด DNA methylation) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

3.1.1 สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) จาก เซลล์เพาะเลี้ยง 6 ชนิด คือ Jurkat, K562, HeLa, HaCaT, HEK 293 และ SH-SY5Y เพื่อตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน ACE กับการเกิด DNA methylation ว่ามีผลต่อการแสดงออกของแต่ละเซลล์หรือไม่

การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์เพาะเลี้ยง เริ่มต้นจากเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการสกัดใน cell culture dish (ขนาด 100 mm X 20 mm) ล้างเซลล์ด้วย Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) ที่เย็น แล้วรีบเติมน้ำยา TRIZOL® Reagent (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) ปริมาตร 3 ml ลงไปในจานเพาะเลี้ยง จากนั้นใช้ใบมีดที่ทำความสะอาดด้วย RNase AWAY (Continental Lab Products, Oxford, USA) ขูดเซลล์ให้หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยง ปิเปตต์สารละลายเซลล์ที่ได้ใส่หลอดและเติม chloroform ที่เย็นลงไป 200 μl ต่อปริมาตรน้ำยา TRIZOL® Reagent 1 ml เขย่าให้เข้ากันอย่างแรงแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 2 °C -8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 12,000 *g* นาน 15 นาที สารละลายที่ได้จะแยกออกเป็นชั้น โดยชั้นล่างสุดของหลอดคือชั้นที่มีสีแดงซึ่งเป็นชั้นของ organic phase (phenol-chloroform phase) ถัดขึ้นมาเป็นชั้น interphase และบนสุดคือชั้นน้ำที่ไม่มีสีเป็นชั้นของ aqueous phase ซึ่งอาร์เอ็นเอจะอยู่ในชั้นนี้ จากนั้นดูดเฉพาะส่วนใสชั้นบนสุดมาทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 100 % Isopropanol ปริมาตร 500 μl ต่อปริมาตรน้ำยา TRIZOL® Reagent 1 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่อุณหภูมิ 2 °C -8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 12,000 *g* นาน 10 นาที และล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol ปริมาตร 1 ml ทั้งหมด 3 รอบโดยปั่นที่อุณหภูมิ 2 °C -8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 7,500 *g* นาน 5 นาที สุดท้ายตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase (DEPC-treated water) ที่อุณหภูมิ 55 °C -60 °C นาน 10 นาที ซึ่งสาร ละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้นี้สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

3.1.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Reverse-Transcriptase PCR (RT-PCR)

ทำการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน ACE ในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อคัด เลือกเซลล์ที่เหมาะสมในการทดลอง ด้วยเทคนิค RT- PCR โดยใช้ยีน β-actin เป็นตัวควบคุม การทดลองครั้งนี้จะใช้ชุดน้ำยา Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (AMV-RT) (Promega, Madison, WI, USA) และใช้อาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นต้นแบบ (template) ในการทำปฏิกิริยา เริ่มจากการ treat อาร์เอ็นเอด้วย Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen) เพื่อกำจัดดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนจากการสกัดโดยผสมอาร์เอ็นเอความเข้มข้น 200 ng กับน้ำยา (1x DNase I Reaction buffer with $MgCl_2$, 1 U DNase I Amp Grade) ปรับปริมาตรให้ได้ 10 µl แล้วนำไปวางที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที เมื่อครบเวลาให้ inactivate เอนไซม์ DNase I ด้วย 25 mM EDTA, pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ผ่านการ treat DNase I มาเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา RT โดยผสมกับ 100 pM/ul Oligo-dT18 mer เพื่อเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็นซีดีเอ็นเอ จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 12.5 µl ด้วย DEPC-treated water แล้วตั้งที่อุณหภูมิ 75 °C 5 นาทีเพื่อกระตุ้นให้ RNA คลายโครงสร้างมาจับกับ Oligo-dT20mer จากนั้นวางบนน้ำแข็งทันทีเพื่อมิให้ RNA กลับมาจับโครงสร้างแบบเดิมแล้วเติมน้ำยา 1x AMV RT buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, 8.75 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT), 1 mM dNTP, 40 U RiboLock™ RNase inhibitor (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada) แล้วเติม 10 U AMV RT ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยตั้งที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบการแสดงออกของยีน ACE และ β-actin ของเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดน้ำยา *Taq* DNA Polymerase with standard *Taq* buffer (NEB, Beverly, MA, USA) และ primers ที่จำเพาะ primers สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ ดังตารางที่ 3.1 ทำการผสมซีดีเอ็นเอต้นแบบ จำนวน 5 µl กับ 20 µl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$), 0.2 mM dNTP Mix, 0.2 µM Forward และ Reverse primer, 12.5 U *Taq* DNA Polymerase โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ Primer ACE และ β-actin คือ 95.0 °C 5 นาที (1 รอบ), 95.0 °C 30 วินาที; 59.0 °C 30 วินาที; 72.0 °C 30 วินาที (45 รอบ), 72.0 °C 10 นาที (1 รอบ) เมื่อเสร็จแล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 2 % (2 % agarose gel electrophoresis) ย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล

ตารางที่ 3.1 : แสดง primers จำเพาะที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน ACE[65] และ β-actin[66]

Primer	Sequence	Product (คู่เบส)
ACE- Forward	5'-AAC AAG ACT GCC ACC TGC TGG-3'	392
ACE-Reverse	5'-CCA GCT CTG GGC CCA CAT GTC-3'	
β-actin-Forward	5'-ACG GGT CAC CCA CAC TGT GC-3'	656
β-actin-Reverse	5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT G-3'	

3.1.3 การทำนายบริเวณที่เกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^{m}C(A/T)GG หรือเรียกว่า C^{m}CWGG ของยีน ACE

การทำนายบริเวณที่เกิด DNA methylation ด้วยเทคนิควิเคราะห์เชิงชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) ซึ่งคณะผู้วิจัยใช้โปรแกรม Lasergene® 7 (www.biocompare.com/Articles/NewTechnology/1717/Lasergene-7-Software.html) โดยอาศัยความจำเพาะของเอนไซม์ *Mva*I (*Bst*NI) ที่จะตัดจำเพาะในตำแหน่ง C^{m}CWGG ในการหาบริเวณเพื่อใช้ตรวจสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ซึ่งพบว่าที่ตำแหน่ง -122 และ -316 บนโปรโมเตอร์ยีน ACE มีลำดับเบส C^{m}CWGG อยู่ คณะวิจัยจึงทำการตรวจสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ใน 2 ตำแหน่งนี้ ปกติการทำนายบริเวณที่เกิด DNA methylation จะใช้โปรแกรม Methylator (http://bio.dfci.harvard.edu/Methylator/) แต่ข้อจำกัดของโปรแกรมนี้คือสามารถทำนาย DNA methylation รูปแบบ CpG เท่านั้นไม่สามารถใช้ทำนายรูปแบบอื่นๆได้

3.1.4 การตรวจสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^{m}C(A/T)GG หรือเรียกว่า C^{m}CWGG ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -122 และ -316 บนโปรโมเตอร์ด้วยเทคนิค methylation-sensitive isoschizomers

3.1.4.1 ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation

1. ดีเอ็นเอพลาสมิดที่ผ่านการโคลนของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์ที่มีขนาด 528 คู่เบส (-499 ถึง +29) ซึ่งจะใช้เป็นตัวควบคุมบวก (Positive control) ของการเกิด DNA methylation เนื่องจากดีเอ็นเอพลาสมิดที่ถูกนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Transformation) จะถูกเอนไซม์ DNA cytosine methylase (dcm) ในเซลล์แบคทีเรียมาเติมหมู่เมทิลให้เสมอ [67]

2. ดีเอ็นเอพลาสมิดที่ผ่านการโคลนของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์ที่มีขนาด 528 คู่เบส (-499 ถึง +29) และได้ทำการเพิ่มจำนวนของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์นั้น

ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งจะใช้เป็นตัวควบคุมลบ (Negative control) ของการเกิด DNA methylation เนื่องจากดีเอ็นเอพลาสมิดที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยด้วยเทคนิค PCR จะเป็นดีเอ็นเอที่ไม่มีการเติมหมู่เมทิล เนื่องจากเทคนิค PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

3. นำดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการแสดงออกที่ต่างกันมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ของเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ

3.1.4.2 นำดีเอ็นเอตัวอย่าง (กล่าวในข้อ 3.1.4.1) มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 500 ng มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และหลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อดูรูปแบบของการเกิด DNA methylation โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้มีดังนี้

1. *Mva*I (*Bst*NI) (Fermentas) ($C^{m}CWGG$) ตัดได้ทุกตำแหน่งทั้งที่เกิด DNA methylation และ unmethylation (dcm:no effect) ซึ่งในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 1x Buffer R (10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10mM $MgCl_2$, 100mM KCl, 0.1 mg/ml BSA), 5 U *Mva*I และดีเอ็นเอตัวอย่าง 500 ng ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 20 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปตกตะกอน (precipitation) เพื่อให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้น โดยปิเปตต์สารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mva*I มาวัดปริมาตรแล้วเติมน้ำให้ครบ 100 µl ผสมให้เข้ากันกับ 3 M Sodium acetate, pH 5.0 ปริมาตร 10 µl และ 100 % Ethanol ปริมาตร 220 µl วางตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนที่ได้ด้วยการเติม 70% Ethanol 200 µl ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและตากตะกอนให้แห้งด้วยเครื่อง DNA SpeedVacs (Thermo Scientific) จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่น (deionized water) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาทีหรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมด และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C หรือนำไปทดสอบรูปแบบของการเกิด DNA methylation โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

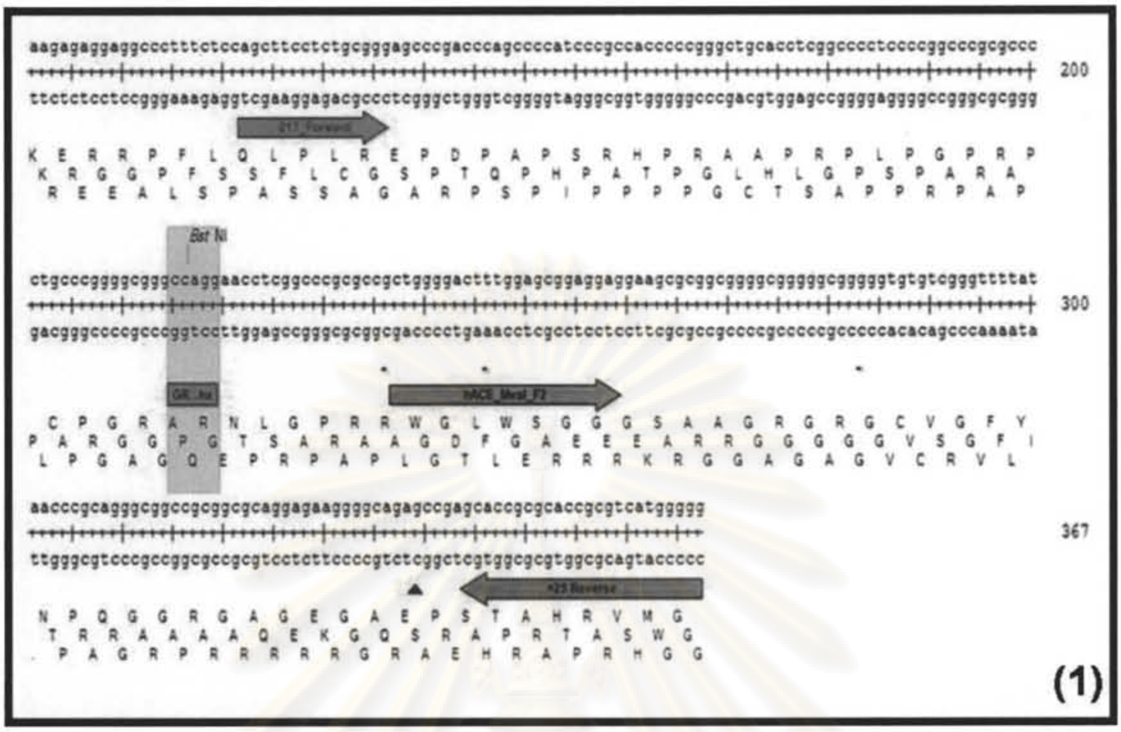
2. *Psp*GI (NEB) ($C^{m}CWGG$) ตัดตำแหน่งที่ไม่เกิด DNA methylation (dcm:block)) ซึ่งในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 1x NEBuffer 2 (50 mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 1M DTT, pH 7.9), 5 U *Psp*GI และดีเอ็นเอตัวอย่าง 500 ng ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 25 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปตกตะกอน (precipitation) เพื่อให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้น โดยปิเปตต์สารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Psp*GI มาวัดปริมาตรแล้วเติมน้ำให้

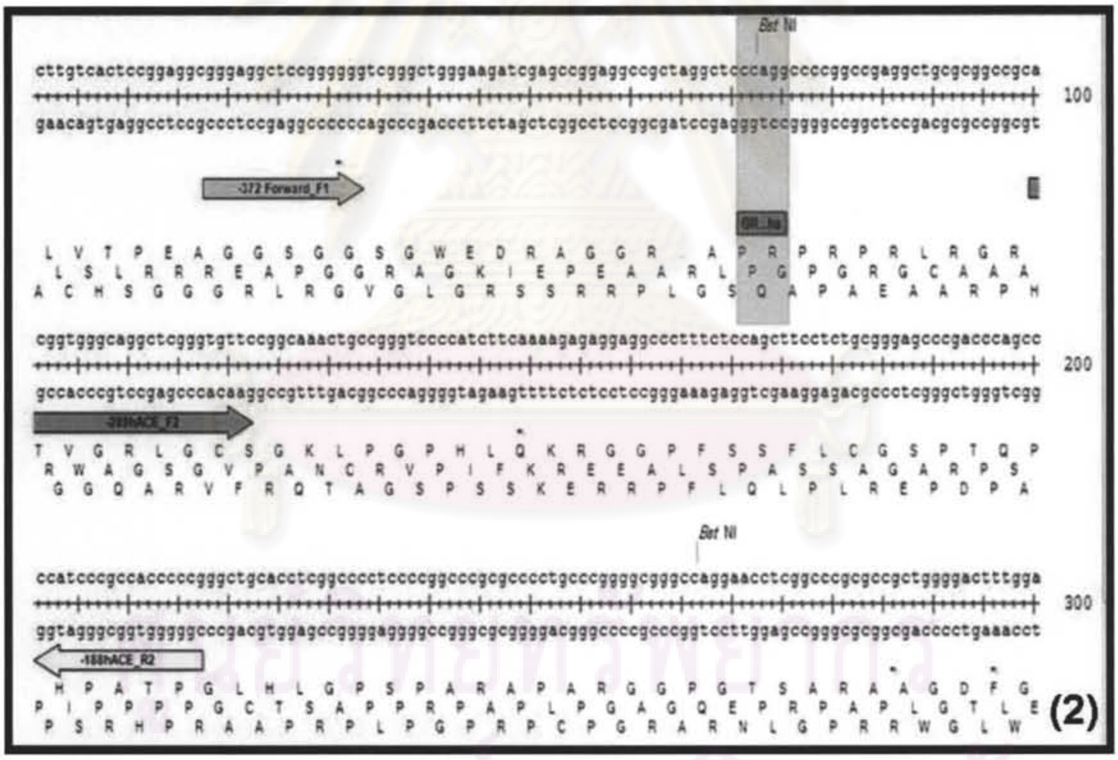
ครบ 100 µl ผสมให้เข้ากันกับ 3 M Sodium acetate, pH 5.0 ปริมาตร 10 µl และ 100 % Ethanol ปริมาตร 220 µl วางตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนที่ได้ด้วยการเติม 70% Ethanol 200 µl ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและตากตะกอนให้แห้งด้วยเครื่อง DNA SpeedVacs (Thermo Scientific) จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่น (deionized water) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาทีหรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมด และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C หรือนำไปทดสอบรูปแบบของการเกิด DNA methylation โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

3.1.4.3 ออกแบบ primers

การออกแบบ primers เพื่อทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง $C^{m}CWGG$ ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -122 และ -316 บนโปรโมเตอร์ จะต้องใช้ primers ทั้งหมด 3 เส้น คือเส้นที่ 1 ออกแบบให้ primer จับกับดีเอ็นเอ (แบบ Forward) บริเวณตำแหน่งก่อนที่เอนไซม์ *Mva*I และ *Psp*GI จะตัดจำเพาะ ซึ่งเป็นบริเวณที่ต้องการทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation เส้นที่ 2 ออกแบบให้ primer จับกับดีเอ็นเอ (แบบ Forward) บริเวณตำแหน่งหลังที่เอนไซม์ *Mva*I และ *Psp*GI ตัดจำเพาะ โดยห่างออกมาประมาณ 5-15 คู่เบส เส้นที่ 3 ออกแบบให้ primer จับกับดีเอ็นเอ (แบบ Reverse) บริเวณตำแหน่งหลังที่เอนไซม์ *Mva*I และ *Psp*GI ตัดจำเพาะ โดยห่างจากเส้นที่ 2 ออกมาอย่างน้อย 50 คู่เบส (ดังภาพที่ 3.2) โดย primers ที่ออกแบบได้แสดงในตารางที่ 3.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 3.2 : ภาพวาดแสดงการออกแบบ primers เพื่อทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^{m}CWGG ของยีน ACE บนโปรโมเตอร์ (1). primers 3 เส้นที่ใช้ทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ที่ตำแหน่ง -122 ของยีน ACE บนโปรโมเตอร์ (2). primers 3 เส้นที่ใช้ทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ที่ตำแหน่ง -316 ของยีน ACE บนโปรโมเตอร์

ตารางที่ 3.2 : แสดง primers ที่ใช้ทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^mCWGG ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -122 และ -316 บนโปรโมเตอร์ และขนาดของ PCR Product (คู่เบส)

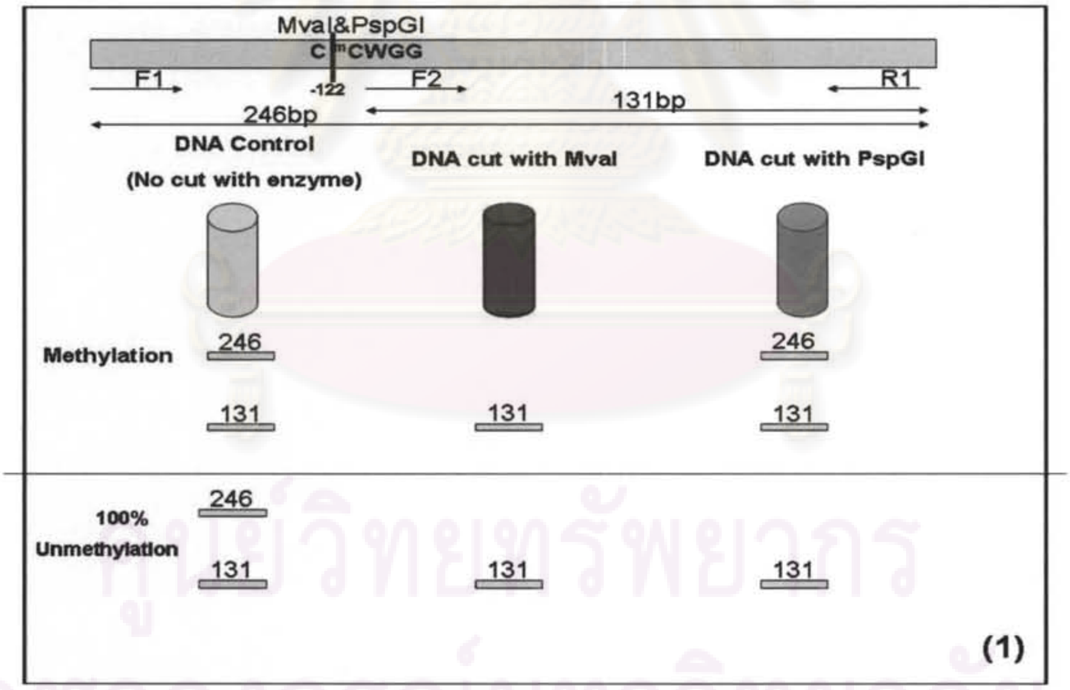
DNA methylation ที่ตำแหน่ง	Primer	Sequence	Product (คู่เบส)
ตำแหน่ง -122	-217hACE_F1	5'-CAT GGT ACC AGC TTC CTC TGC GGG-3'	246
	-102hACE_F2	5'-CTG GGG ACT TTG GAG CGG AGG AG-3'	131
	+29hACE_R1	5'-CAT AAG CTT CCC CCA TGA CGC GGT GC-3'	
ตำแหน่ง -316	-372hACE_F3	5' GGG AGG CTC CGG GGG G 3'	200
	-289hACE_F4	5' ACG GTG GGG CAG GCT CGG GTG TTC 3'	118
	-188hACE_R2	5' GCC CCC ACC GCC CTA CC 3'	

3.1.4.4 หลังจากที่นำดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.1.4.2 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อดูรูปแบบของการเกิด DNA methylation โดยเริ่มจากการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เพื่อให้ดีเอ็นเอตั้งต้นก่อนทำ PCR มีความเข้มข้นเท่ากันทุกหลอด (ในการทดลองครั้งนี้จะใช้ดีเอ็นเอตั้งต้น 15 ng/ul)

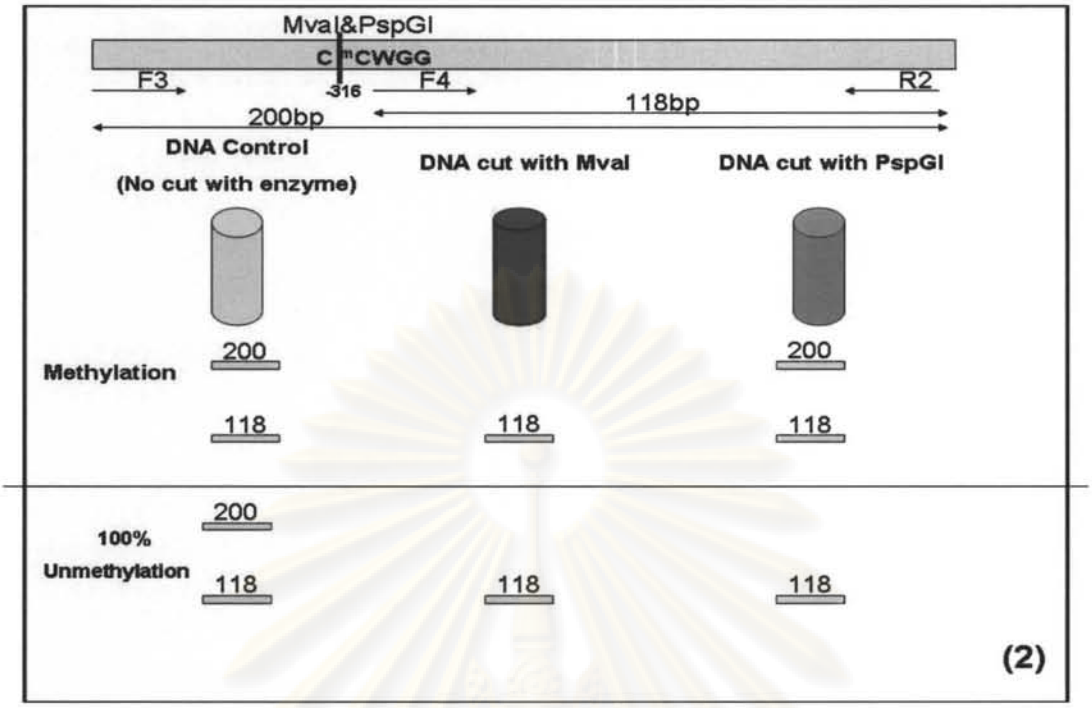
1. ทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^mCWGG ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -122 บนโปรโมเตอร์ ดังนี้ ทำการผสมดีเอ็นเอต้นแบบ (ที่ได้จากข้อ 3.1.4.2) จำนวน 2.5 µl กับ 22.5 µl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$), 0.2 mM dNTP Mix, 0.2 µM Forward และ Reverse primer, 12.5 U *Taq* DNA Polymerase (NEB) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ Primers -217hACE_F1 และ +29hACE_R1 คือ 94.0 ^oC 3 นาที (1 รอบ), 94.0 ^oC 30 วินาที; 50.1 ^oC 30 วินาที; 70.0 ^oC 30 วินาที (35 รอบ), 72.0 ^oC 10 นาที (1 รอบ) ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ Primers -102hACE_F2 และ +29hACE_R1 คือ 94.0 ^oC 3 นาที (1 รอบ), 94.0 ^oC 30 วินาที; 56.2 ^oC 30 วินาที; 70.0 ^oC 30 วินาที (35 รอบ), 72.0 ^oC 10 นาที (1 รอบ) เมื่อเสร็จแล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 2 % (2 % agarose gel electrophoresis) ย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล ตัวอย่างผลที่ได้จะออกมาในลักษณะภาพที่ 3.3 (1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง $C^{m}CWGG$ ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -316 บนโปรโมเตอร์ ดังนี้ ทำการผสมดีเอ็นเอต้นแบบ (ที่ได้จากข้อ 3.1.4..2) จำนวน 2.5 µl กับ 22.5 µl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$), 0.2 mM dNTP Mix, 0.2 µM Forward และ Reverse primer, 12.5 U *Taq* DNA Polymerase (NEB) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ Primers -372hACE_F3 และ +29hACE_R1 คือ 94.0 °C 3 นาที (1 รอบ), 94.0 °C 30 วินาที; 60.2 °C 30 วินาที; 70.0 °C 30 วินาที (35 รอบ), 72.0 °C 10 นาที (1 รอบ) ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ Primers -289hACE_F4 และ +29hACE_R1 คือ 94.0 °C 3 นาที (1 รอบ), 94.0 °C 15 วินาที; 60.2 °C 15 วินาที; 70.0 °C 30 วินาที (35 รอบ), 72.0 °C 10 นาที (1 รอบ) เมื่อเสร็จแล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 2 % (2 % agarose gel electrophoresis) ย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล ตัวอย่างผลที่ได้จะออกมาในลักษณะภาพที่ 3.3 (2)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3.3 : ภาพวาดแสดงลักษณะของผลการทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^{m}CWGG ของยีน ACE บนโปรโมเตอร์ โดยการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรส (1). ลักษณะของผลการทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^{m}CWGG ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -122 บนโปรโมเตอร์ (2). ลักษณะของผลการทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^{m}CWGG ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -316 บนโปรโมเตอร์

3.1.4.5 หาเปอร์เซนต์ DNA Methylation จากการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนเจล

นำค่าความเข้มของแถบ PCR product บนเจลที่ได้จากหลอดที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Psp*GI โดยนำค่าความเข้มแถบ PCR product ที่มีขนาดยาวหารด้วยค่าความเข้มแถบ PCR product ที่มีขนาดสั้น ได้เป็นค่า A จากนั้นนำค่าความเข้มของแถบ PCR product บนเจลที่ได้จากหลอดที่มีดีเอ็นเอตั้งต้นไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใดเลย โดยนำค่าความเข้มแถบ PCR product ที่มีขนาดยาวหารด้วยค่าความเข้มแถบ PCR product ที่มีขนาดสั้น ได้เป็นค่า B ต่อจากนั้นนำค่า A หารค่า B แล้วคูณด้วย 100 ซึ่งจะได้ค่าของเปอร์เซนต์ DNA methylation ค่าของ เปอร์เซนต์ DNA methylation ของแต่ละเซลล์สามารถนำมา plot กราฟเพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์ DNA methylation และระดับการแสดงออกของยีน ACE ของแต่ละเซลล์ โดยแกน X เป็นระดับการแสดงออกของยีน ACE ส่วนแกน Y เป็นเปอร์เซนต์ DNA methylation (ระดับการแสดงออกของยีน ACE ของแต่ละเซลล์หาได้จากความ

เข้มของแถบ PCR product บนเจลที่ได้จากหลอดที่ดูการแสดงออกของยีน ACE หารด้วยค่าความเข้มของแถบ PCR product บนเจลที่ได้จากหลอดที่ดูการแสดงออกของยีน β-actin ของแต่ละเซลล์)

3.2 **<u>ส่วนที่ 2</u>** ศึกษาบทบาทความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้

3.2.1 **ขนาดตัวอย่าง** (Sample size)

เนื่องจากการศึกษาลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE (-240A/T) และ (-93T/C) กับการเกิดโรคซึมเศร้านั้น ยังไม่มีคณะวิจัยใดที่ได้ทำการศึกษาในกลุ่มประเทศเอเชียซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วย ทางคณะผู้วิจัยจึงได้นำข้อมูลความถี่อัลลีลของคนปกติแต่ละ SNPs จากเชื้อชาติญี่ปุ่น (เอเชียตะวันออก) มาเป็นแนวทางในการคำนวณขนาดตัวอย่างในการศึกษานี้ โดยการใช้สูตรในการคำนวณ Sample size for case-control study จากโปรแกรม EpiCalc 2000 version 1.02 (http://www.brixtonhealth.com/epicalc.html) ซึ่งจะได้จำนวนขนาดกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง(ผู้ป่วยโรคซึมเศร้า) ในการวิจัย

SNP ACE -240A/T (rs 4291) มีความถี่อัลลีล A เท่ากับ 0.63 และ มีความถี่อัลลีล T เท่ากับ 0.37 เมื่อคำนวณขนาดตัวอย่างโดยการใช้สูตรในการคำนวณ Sample size for case-control study จากโปรแกรม EpiCalc จะได้จำนวนขนาดกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวอย่าง (ผู้ป่วยโรคซึมเศร้า) ในการวิจัยเท่ากับ 133 ราย

SNP ACE -93T/C (rs 4292) มีความถี่อัลลีล T เท่ากับ 0.64 และ มีความถี่อัลลีล C เท่ากับ 0.36 เมื่อคำนวณขนาดตัวอย่างโดยการใช้สูตรในการคำนวณ Sample size for case-control study จากโปรแกรม EpiCalc จะได้จำนวนขนาดกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวอย่าง (ผู้ป่วยโรคซึมเศร้า) ในการวิจัยเท่ากับ 133 ราย

<u>สรุป</u> สำหรับการศึกษาครั้งนี้จะใช้ขนาดกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง (ผู้ป่วยโรคซึมเศร้า) จำนวนอย่างน้อยกลุ่มละ 133 ราย เพื่อความน่าเชื่อถือของข้อมูล

3.2.2 **การสกัดดีเอ็นเอ** (DNA Extraction)

เก็บตัวอย่างจากเลือดของกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา FlexiGene DNA Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) โดยใช้หลักการ alkaline lysis ในการสกัด เริ่มจากปิเปตต์เลือดครบส่วน (whole blood) ปริมาตร 100 µl ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube เติม Buffer FG1 ลงไป 250 µl ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาประมาณ 5 ครั้ง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 1 นาที เสร็จแล้วเทส่วนใสทิ้งและตากตะกอนให้แห้ง จากนั้นเติม Buffer FG2 ที่ผสมกับ QIAGEN Protease

ในอัตราส่วน 1:100 (Protease : Buffer FG2) แล้วลงในหลอดทดลองปริมาตร 50 µl นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาที จะเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวเมื่อครบเวลา จากนั้นเติม 100% Isopropanol ลงไป 50 µl ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาประมาณ 20 ครั้ง จนกว่าจะเห็นตะกอนของดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 3-5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนที่ได้ด้วยการเติม 70 % Ethanol 50 µl ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 3-5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และตากตะกอนให้แห้งด้วยเครื่อง Speed Vac ขั้นสุดท้ายละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย Buffer FG3 ปริมาตร 100 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาที หรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายใน Buffer หมด และนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.2.3 การตรวจสอบหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ด้วยเทคนิค PCR – RFLP ของ SNP rs4291 ณ ตำแหน่ง -240 A/T และ SNP rs4292 ณ ตำแหน่ง -93T/C ที่อยู่บนโปรโมเตอร์ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวอย่าง

การตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรม ของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -240 A/T (rs4291) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในหลอดทดลอง (PCR tube) โดยใช้ชุดน้ำยา MasterTaq® Kit (Eppendorf , Westbury, NY, USA) และ primers ที่จำเพาะซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้ Forward primer ACE -240A/T (5'-TCG GGC TGG GAA GAT CGA GC-3') และ Reverse primer ACE -240A/T (5'-GAG AAA GGG CCT CCT CTC TCT-3')[68] ทำการผสมดีเอ็นเอต้นแบบ ที่สกัดได้ปริมาตร 2 µl กับ 23 µl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x TaqMaster, 1x Taq Buffer / Mg^{2+} (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM $Mg(OAc)_2$), 0.2 mM dNTP Mix, 0.2 µM Forward และ Reverse primer, 12.5 U *Taq* DNA Polymerase โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 95.0 °C 5 นาที (1 รอบ), 95.0 °C 30 วินาที; 61.0 °C 30 วินาที; 72.0 °C 30 วินาที (40 รอบ), 72.0 °C 10 นาที (1 รอบ) เมื่อทำ PCR เสร็จแล้วทำการตรวจสอบหาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยนำ PCR Product ที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ใช้เอนไซม์ *Xba*I (NEB) ซึ่งในปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะประกอบด้วย 1x NEBuffer 4 (50 mM Potassium acetate, 20mM Tris- acetate, 10 mM Magnesium acetate, 1M DTT, pH 7.9), 1x BSA, 5 U *Xba*I และ PCR Product 500 ng ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 25 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำไปทดสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนอกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นเป็น 3% (3% agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium

Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล หากแถบของดีเอ็นเอบนเจลมีขนาดประมาณ 137 คู่เบสจะเป็นอัลลีล A ส่วนแถบของดีเอ็นเอบนเจลมีขนาดประมาณขนาดประมาณ 114 และ 23 คู่เบสจะเป็นอัลลีล T

การตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรม ของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93T/C (rs4292) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในหลอดทดลอง (PCR tube) โดยใช้ชุดน้ำยา *Pfu* DNA Polymerase (Fermentas) และ primers ที่จำเพาะซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้ Forward primer ACE -93T/C (5'-TGT CAC TCC GGA GGC GGG AGG CT-3') และ และ Reverse primer ACE -93T/C (5'-CGG CTC TGC CCC TTC TCC TGC GC-3')[27] ทำการผสมดีเอ็นเอต้นแบบ ที่สกัดได้ปริมาตร 3 μl กับ 22 μl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x *Pfu* Buffer with $MgSO_4$ (10 mM KCl, 20 mM Tris-HCL pH 8.8, 2 mM $MgSO_4$, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Triton X-100,0.1 mg/ml BSA), 0.2 mM dNTP Mix, 0.2 μM Forward และ Reverse primer, 12.5 U *Pfu* DNA Polymerase โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 95.0 °C 5 นาที (1 รอบ), 98.0 °C 1 นาที; 69.6 °C 1 นาที; 75.0 °C 3 นาที (30 รอบ), 75.0 °C 5 นาที (1 รอบ) เมื่อทำ PCR เสร็จแล้วทำการตรวจสอบหาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยนำ PCR Product ที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI (Fermentas) ซึ่งในปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะประกอบด้วย 1x Buffer R (10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10mM $MgCl_2$, 100mM KCl, 0.1 mg/ml BSA), 5 U *Hin*fI และ PCR Product 500 ng ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 25 μl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำไปทดสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนอกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นเป็น 2% (2% agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล หากแถบของดีเอ็นเอบนเจลมีขนาดประมาณ 390 คู่เบสเป็นอัลลีล T ส่วนแถบของดีเอ็นเอบนเจลมีขนาดประมาณขนาดประมาณ 290 และ 100 คู่เบสเป็นอัลลีล C

3.2.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.2.4.1 การวิเคราะห์หาความสมดุล Hardy-Weinberg (HWE) ของการกระจายตัวจีโนไทป์ ใช้ *Chi*-square test ในการทดสอบทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่าง

3.2.4.2 การวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์ของคนปกติ และผู้ป่วยที่มีรูปแบบยีนแต่ละชนิด ใช้ *Chi*-square test สำหรับการทดสอบทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่าง ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้การคำนวณสถิติ *Chi*-square test ($P < 0.05$) ในการตัดสินใจว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่อย่างไร

3.2.4.3 การวิเคราะห์หา Linkage diseqilibrium (LD) และ Haplotype โดยใช้โปรแกรม HaploView 4.1 (http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/) เพื่อหาความสัมพันธ์ของตำแหน่ง SNP rs4291 และ SNP rs4292 บนโครโมโซมซึ่งสามารถบ่งบอกถึงการถ่ายทอดไปด้วยกัน และเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคและ SNPs ทั้งสองชนิด ตามลำดับ

3.3 <u>ส่วนที่ 3</u> ศึกษาบทบาทของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93 T/C และ ขนาดที่แตกต่างกันของโปรโมเตอร์ ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE ในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์ ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ดังนี้

3.3.1 การโคลนนิ่ง (Cloning)

3.3.1.1 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับการโคลน (Insert DNA) ด้วยปฏิกิริยา PCR

การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสำหรับใช้การโคลนนั้นจะต้องมีลำดับเบสที่ถูกต้องตามฐานข้อมูล GenBank แต่การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเรียงลำดับเบสไม่ถูกต้องได้ เนื่องจากเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ใช้ปกติจะเป็นเอนไซม์ที่ใช้ต่อสายดีเอ็นเอให้ยาว แต่เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ไม่สามารถตรวจความถูกต้องของการเรียงลำดับเบสได้ คณะผู้วิจัยจึงใช้ P*fu* DNA polymerase เข้ามาในปฏิกิริยา PCR เพื่อแก้ปัญหา PCR product เรียงลำดับเบสไม่ถูกต้อง โดยผสมเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase : P*fu* DNA polymerase ในอัตราส่วน 2:1 และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับการเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ณ ตำแหน่ง -93 T/C และprimers ที่จำเพาะสำหรับการเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์ ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 : แสดง primers ที่จำเพาะสำหรับการเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสำหรับโคลน

Primer	Sequence	Product (คู่เบส)
-217F/*Kpn*I	5'-CAT <u>GGT ACC</u> AGC TTC CTC TGC GGG-3'	246
-372F/*Kpn*I	5'-ACT T<u>GG TAC C</u>GG GAG GCT CCG GGG G-3'	401
-499F/*Kpn*I	5'-TAA <u>GGT ACC</u> GGC GAC GTC CCC GCC C-3'	528
+29R/*Hin*dIII	5'-CAT <u>AAG CTT</u> CCC CCA TGA CGC GGT GC-3'	

****หมายเหตุ****

1. การออกแบบ primers จะเพิ่มส่วน *Kpn*I site เข้าไปที่ด้านปลาย 5'ของ Forward primers และจะเพิ่มส่วน *Hin*dIII site เข้าไปที่ด้านปลาย 5'ของ Reverse primer เพื่อเป็นการเพิ่มส่วน restriction site เข้าไปในชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ

2. การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งที่ -132 จะใช้เทคนิค Convenient restriction endonucleases เป็นวิธีที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีตำแหน่ง -132 เพื่อให้ได้โคลนที่มีตำแหน่ง -132 บนโปรโมเตอร์ของยีน ACE ซึ่งจะกล่าวต่อไปในหัวข้อที่ 3.3.1.2 (2)

3. การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ณ ตำแหน่ง -93 T/C จะใช้ primers คู่ -372F/*Kpn*I และ +29R/*Hin*dIII ซึ่งจะทำให้ได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แตกต่างกันที่ตำแหน่ง -93 ของยีน ACE บนโปรโมเตอร์ ชิ้นส่วนหนึ่งเป็นอัลลีล T อีกชิ้นส่วนเป็นอัลลีล C โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี 1 ราย ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93T/C แบบจีโนไทป์ชนิด T/C โดยใช้เอนไซม์ *Hin*fI เป็นตัวตรวจสอบจีโนไทป์

การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ขนาด 246 คู่เบส จะใช้ primers -217F/*Kpn*I และ +29R/*Hin*dIII ทำการผสมดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ปริมาตร 5 μl กับ 20 μl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x *Pfu* Buffer without $MgSO_4$ (20 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM KCl, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA), 0.2 uM of each primer, 0.2 mM dNTP mix, 0.75 mM $MgSO_4$, 0.75U *Pfu* DNA polymerase (Fermentas) and 1.25U *Taq* DNA polymerase (NEB) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 95.0 °C 5 นาที (1 รอบ), 94.0 °C 30 วินาที; 50.1 °C 30 วินาที; 70.0 °C 1.30 นาที (45 รอบ), 72.0 °C 10 นาที (1 รอบ)

การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ขนาด 401 คู่เบส จะใช้ primers -372F/*Kpn*I และ +29R/*Hin*dIII ทำการผสมดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ปริมาตร 5 μl กับ 20 μl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x *Pfu* Buffer without $MgSO_4$ (20 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM KCl, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA), 0.2 uM of each primer, 0.2 mM dNTP mix, 1 mM $MgSO_4$, 0.75U *Pfu* DNA polymerase (Fermentas) and 1.25U *Taq* DNA polymerase (NEB) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 95.0 °C 5 นาที (1 รอบ), 94.0 °C 30 วินาที; 60.0 °C 30 วินาที; 70.0 °C 1.30 นาที (45 รอบ), 72.0 °C 10 นาที (1 รอบ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ขนาด 528 คู่เบส จะใช้ primers -499F/*Kpn*I และ +29R/*Hind*III ทำการผสมดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ปริมาตร 5 µl กับ 20 µl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x *Pfu* Buffer without $MgSO_4$ (20 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM KCl, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA), 0.2 uM of each primer, 0.2 mM dNTP mix, 1 mM $MgSO_4$, 0.75U P*fu* DNA polymerase (Fermentas) and 1.25U *Taq* DNA polymerase (NEB) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 95.0 °C 5 นาที (1 รอบ), 94.0 °C 30 วินาที; 52.9 °C 30 วินาที; 70.0 °C 1.30 นาที (45 รอบ), 72.0 °C 10 นาที (1 รอบ)

เมื่อเสร็จแล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 2 % (2 % agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล โดยแถบของดีเอ็นเอบนเจลจะมีขนาดประมาณ 246, 401 และ 528 คู่เบส ซึ่งจะเป็นส่วนของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์ที่มีขนาดแตกต่างกัน ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรม ณ ตำแหน่ง -93 (-93 T/C) จะพบ แถบของดีเอ็นเอบนเจลจะมีขนาดประมาณ 401 คู่เบส หลังจากนั้นทำการสกัดแยกเฉพาะชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจล ด้วยชุดสกัด Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) โดยใช้ใบมีดตัดเจลที่มีแถบของดีเอ็นเอที่ต้องการ สับเจลให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ลงใน Column จากนั้นนำไปไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 g เป็นเวลา 3 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ที่ก้นหลอด ขั้นตอนสุดท้ายนำไปตกตะกอน (precipitation) เพื่อให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้น โดยปิเปตต์สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้มาวัดปริมาตร แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 µl ผสมให้เข้ากันกับ 3 M Sodium acetate, pH 5.0 ปริมาตร 10 µl และ 100 % Ethanol ปริมาตร 220 µl วางตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนที่ได้ด้วยการเติม 70% Ethanol 200 µl ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและตากตะกอนให้แห้งด้วยเครื่อง DNA SpeedVacs (Thermo Scientific) จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่น (deionized water) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาทีหรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมด และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.3.1.2 **การสร้างดีเอ็นเอพลาสมิด** (luciferase reporter gene constructs)

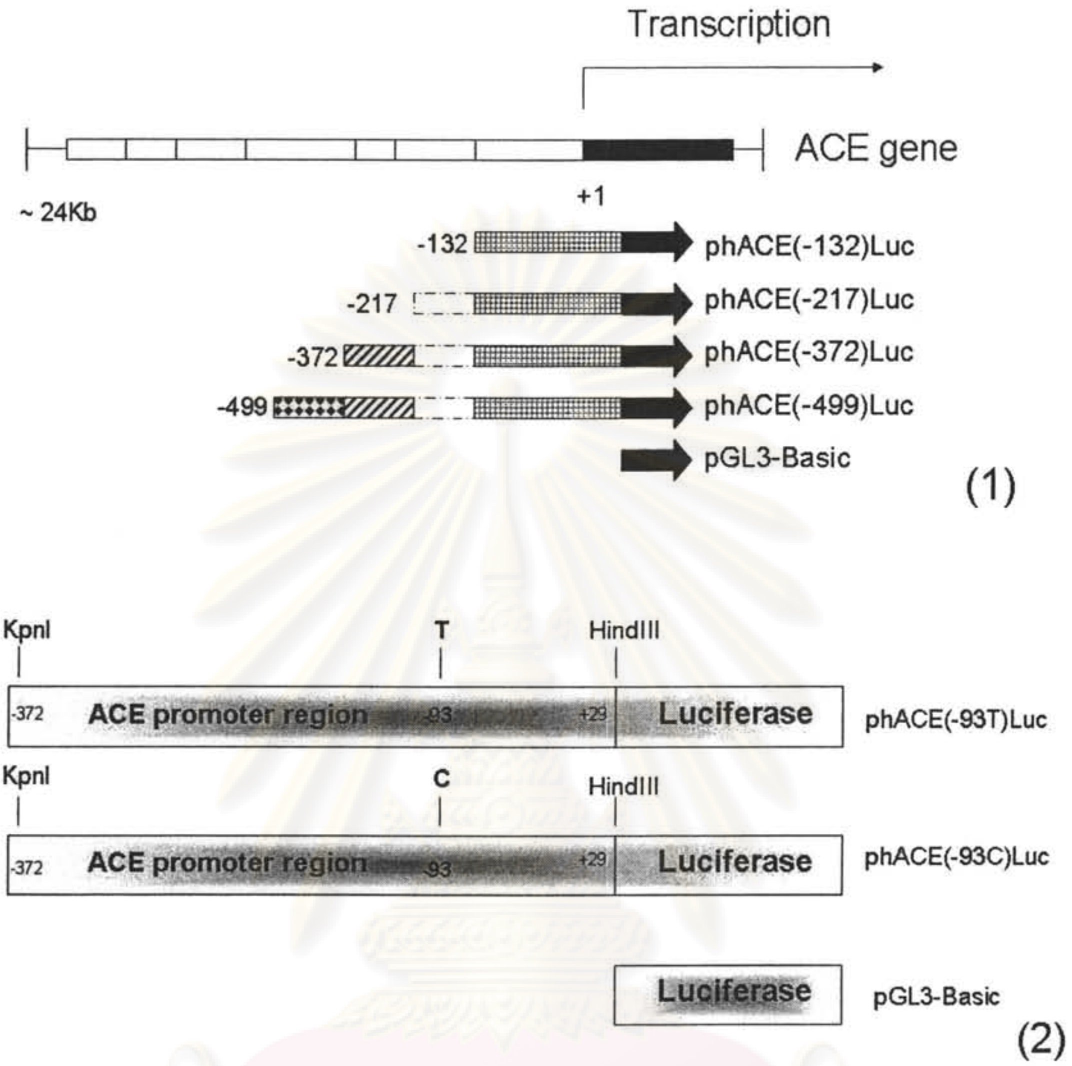
1. **สร้างดีเอ็นเอพลาสมิด** phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc, phACE(-499)Luc , phACE(-93T)Luc **และ** phACE(-93C)Luc

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 246, 401 และ 528 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์ที่มีขนาดแตกต่างกัน และชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ณ ตำแหน่ง -93 (-93 T/C) ได้แล้ว จะทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนเหล่านั้นกับ Plasmid Vector ที่ขาดส่วนของโปรโมเตอร์ (promoterless luciferase expression vector pGL3-Basic) (ได้รับการอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Robert K. Yu, Institute of Molecular Medicine and Genetics, Medical College of Georgia, Augusta, GA, USA) แต่เนื่องจากการโคลนโดยเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ pGL3-Basic Vector โดยตรงนั้นมีโอกาสสำเร็จค่อนข้างน้อย คณะผู้วิจัยจึงตัดสินใจที่จะโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับ TA Vector ก่อน ซึ่งใช้ชุดน้ำยา pGEM®-T Easy Vector System (Promega) มีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 1x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase, 5ng pGEM®-T Easy Vector, 3 Weiss units T4 DNA Ligase ผสมให้เข้ากันกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน โดยแสดงลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เตรียมนั้นไว้ดังรูปที่ 3.4 ลักษณะของ pGEM®-T Easy Vector ดังรูปที่ 3.5 และลักษณะของ pGL3-Basic Vector ดังรูปที่ 3.6

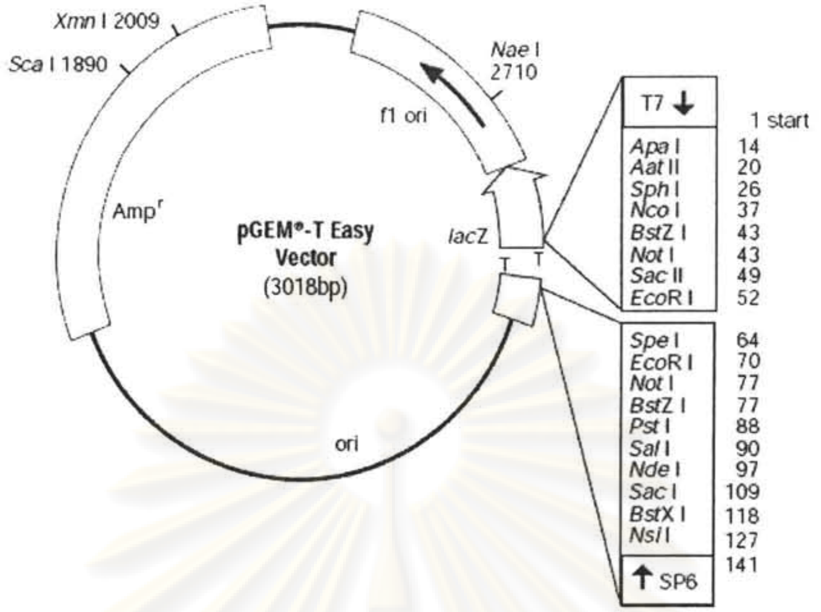
สำหรับการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ pGL3-Basic Vector นั้นจำเป็นที่จะต้องให้ปลายทั้งสองข้างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอและ Vector สามารถเชื่อมต่อกันได้อย่างจำเพาะ โดยทั้งคู่จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I (NEB) และ *Hind*III (NEB) สำหรับปลายแต่ละข้าง ซึ่งในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 1x NEBuffer 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7.9), 1x BSA, 1 U *Kpn*I, 1 U *Hind*III และชิ้นส่วนดีเอ็นเอ หรือ pGL3-Basic Vector ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ pGL3-Basic Vector โดยใช้ชุดน้ำยา T4 DNA Ligase (Invitrogen) มีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 1x DNA Ligase Reaction Buffer (250 mM Tris-HCL pH 7.6, 50 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 %(w/v) polyethylene glycol-8000), 1 U T4 DNA Ligase, pGL3-Basic Vector และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปลายทั้งสองข้างถูกตัดแล้ว นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



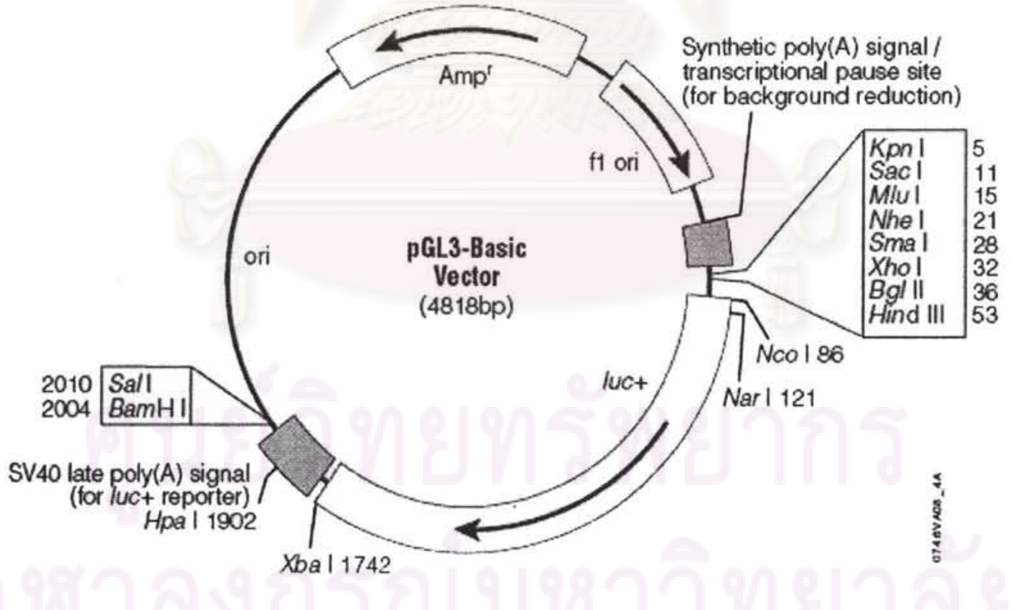
ภาพที่ 3.4 : แสดงลักษณะของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสำหรับโคลน (1.) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 246, 401 และ 528 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์ที่มีขนาดแตกต่างกัน (2.) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ณ ตำแหน่ง -93 (-93 T/C) ของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์ซึ่งมีขนาด 401 คู่เบสเท่ากัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3.5 : แสดงลักษณะของ TA Vector หรือ pGEM®-T Easy Vector

(http://www.promega.com/figures/popup.asp?fn=1473va&partno=A1360&product=pGEM%3Csup%3E%26%23x00AE%3B%3C%2Fsup%3E%2DT+Easy+Vector+System+I)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 3.6 : แสดงลักษณะของ promoterless luciferase expression vector pGL3-Basic

(http://www.promega.com/figures/popup.asp?fn=0746va&partno=E1751&product=pGL3%2DBasic+Vector)

2. สร้างดีเอ็นเอพลาสมิด phACE(-132)Luc

หลังจากสร้างดีเอ็นเอพลาสมิด phACE(-372)Luc เรียบร้อยแล้วจึงทำการเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งที่ -132 จะใช้เทคนิค convenient restriction endonucleases เป็นวิธีที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีตำแหน่ง -132 อยู่ (ในการทดลองนี้จะใช้ phACE(-372)Luc) เพื่อที่จะสร้างโคลนที่มีตำแหน่ง -132 บนโปรโมเตอร์ของยีน ACE (phACE(-132)Luc) โดยนำดีเอ็นเอพลาสมิด phACE(-372)Luc 500 ng มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I (NEB) ซึ่งในปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะประกอบด้วย 1x NEBuffer 4 (50 mM Potassium acetate, 20mM Tris- acetate, 10 mM Magnesium acetate, 1M DTT, pH 7.9), 20 U *Sma*I ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 20 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 20 นาที (ปลายของดีเอ็นเอพลาสมิดหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I จะมีลักษณะเป็น blunt ends) จากนั้นนำไปตกตะกอน (precipitation) เพื่อให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้น โดยปิเปตต์สารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I มาวัดปริมาตรแล้วเติมน้ำให้ครบ 100 µl ผสมให้เข้ากันกับ 3 M Sodium acetate, pH 5.0 ปริมาตร 10 µl และ 100 % Ethanol ปริมาตร 220 µl วางตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนที่ได้ด้วยการเติม 70% Ethanol 200 µl ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและตากตะกอนให้แห้งด้วยเครื่อง DNA SpeedVacs (Thermo Scientific) จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 10 µl (deionized water) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาทีหรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมด และหลังจากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตัวที่ 2 คือ เอนไซม์ *Kpn*I (NEB) ซึ่งในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 1x NEBuffer 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7.9), 1x BSA, 1 U *Kpn*I ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 20 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 20 นาที (ปลายของดีเอ็นเอพลาสมิดหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I จะมีลักษณะเป็น stricky ends) ซึ่งจะต้องนำดีเอ็นเอพลาสมิดไปตัดปลายข้างเพื่อให้มีลักษณะเป็น blunt ends โดยใช้เอนไซม์ 5 U DNA Polymerase Large (Klenow) Fragment (NEB) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 20 นาที (การตัดปลายข้างของดีเอ็นเอพลาสมิดอาศัยหลักการที่ว่าเอนไซม์ Klenow จะทำหน้าที่ 3'⟶5' exonuclease ตัดส่วนที่ยื่นออกมาให้เป็นลักษณะเป็น blunt ends) สุดท้ายจะ

ได้ดีเอ็นเอพลาสมิดที่ปลายทั้ง 2 ด้านมีลักษณะเป็น blunt ends ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอพลาสมิดสามารถเชื่อมต่อกันได้ จากนั้นนำไปตกตะกอน (precipitation) เพื่อให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้นอีกครั้ง และทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอพลาสมิด phACE(-132)Luc ให้ติดกัน โดยใช้ชุดน้ำยา T4 DNA Ligase (Invitrogen) มีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 1x DNA Ligase Reaction Buffer (250 mM Tris-HCL pH 7.6, 50 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 %(w/v) polyethylene glycol-8000), 1 U T4 DNA Ligase, phACE(-132)Luc ที่ยังไม่เชื่อมติดกัน นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน

3.3.1.3 **การนำดีเอ็นเอพลาสมิด** (Plasmid DNA) **เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย** (Transformation)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี electroporation โดยใช้เครื่อง EC100 Electroportor (E-C APPARATUS CORPORATION, Holbrook, NY, USA) ในการนำดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย และใช้เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ซึ่งการเตรียมเซลล์ให้พร้อม (competent cell) ก่อนที่จะทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ขั้นตอนการเตรียมเซลล์นั้นจะเริ่มต้นจากเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TB (TB broth) จำนวน 5 ml ข้ามคืน วันต่อมานำมาเลี้ยงต่อเพื่อเพิ่มจำนวนใน 370 ml TB broth โดย incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ในตู้อบ (shaking incubator) จนวัดความขุ่นของเซลล์ (OD_{590}) ได้ค่าประมาณ 0.4-0.6 ซึ่งจะใช้เวลานาน 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ที่ได้มีการเจริญอยู่ในช่วงของ early log phase หรือระยะทวีคูณ จากนั้นย้ายเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 250 ml (prechilled) นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งเหลือเฉพาะตะกอนเซลล์ เสร็จแล้วค่อยๆ เติมน้ำเย็นลงไปปริมาตร 200 ml และเขย่าให้ตะกอนเซลล์หลุดออกจากก้นขวด นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนเซลล์แล้วเติมน้ำเย็นลงไปปริมาตร 50 ml และเขย่าให้ตะกอนเซลล์หลุดออกจากก้นขวด หลังจากนั้นนำมาเทรวมกันให้เหลือ 1 ขวด นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนเซลล์ ทำการล้างเซลล์โดยเติมน้ำเย็นลงไปปริมาตร 200 ml และเขย่าให้ตะกอนเซลล์หลุดออกจากก้นขวด นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที (ทำขั้นตอนล้างเซลล์อย่างน้อย 3 ครั้ง) สุดท้ายทำการเก็บเซลล์โดยละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ในน้ำเย็นที่ผสม 10 % glycerol ปริมาตร 40 ml นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนเซลล์เขย่าให้ตะกอนเซลล์หลุดออกจากก้นขวด จะได้เซลล์ที่พร้อมทำการถ่ายโอน และแบ่งเซลล์แบคทีเรียเหล่านี้ไว้ใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดละ 50 µl โดย

สามารถนำมาใช้ได้เลยหรืออาจเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C เมื่อเตรียมเซลล์ได้แล้วจึงเริ่มทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดที่เชื่อมกับ pGEM®-T Easy Vector และ pGL3-Basic Vector แต่ก่อนที่จะเริ่มถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียจะต้องทำการล้างประจุของสารละลายดีเอ็นเอพลาสมิดโดยวิธีตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย n-butanol ใส่ n-butanol ปริมาตร 2เท่าของปริมาตรตั้งต้น ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm หรือ G-max นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งและตากตะกอนให้แห้งด้วยเครื่อง DNA SpeedVacs (Thermo Scientific) จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่น (deionized water) 5 µl ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาทีหรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมด หลังจากนั้นปิเปตต์ดีเอ็นเอพลาสมิดที่ต้องการถ่ายโอนนี้ปริมาตร 5 µl ลงในหลอดที่มีเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* ซึ่งผ่านการเตรียมแล้ว ผสมให้เข้ากันเบาๆ และดูดขึ้นมาทั้งหมดใส่ลงไปในStandard electroporation cuvette ขนาดระยะห่างช่อง 1 mm ที่แช่ในน้ำแข็งอยู่ จากนั้นนำ cuvette ใส่ลงไปในช่อง load cuvette ที่เครื่อง EC100 Electroporator แล้วกดปุ่ม pulse buttonค้างไว้ประมาณ 1-2 วินาที จากนั้นนำรีบ cuvette ออกจากเครื่องแล้วเติม TB broth ลงไป 1000 µl เลี้ยงเซลล์ต่ออีก 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) หลังจากนั้นปิเปตต์เซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนแล้ว 250 µl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (LB agar) ที่มีแอมพิซิลิน (100 µg/µl amplicilin) ผสมอยู่ แล้วใช้แท่งแก้ว spreader หมุนให้ทั่วหน้าอาหารแข็งเพื่อให้เชื้อกระจายได้ดี นำจานเพาะเชื้อไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้อบเป็นเวลา 1 คืน

3.3.1.4 การตรวจสอบโคลน (Colony Screening) ด้วยเทคนิค Colony-Polymerase Chain Reaction (Colony-PCR)

หลังจากถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียแล้ว จะต้องทำการเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อที่มีโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เราต้องการอยู่ด้วยเทคนิค Colony-PCR เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการนั้นมาศึกษาต่อไป

1. ตรวจสอบการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอกับ pGEM®-T Easy Vector (Promega) ด้วยเทคนิค Colony-PCR

การตรวจสอบโดยใช้ชุดน้ำยา *Taq* DNA Polymerase (NEB) และ primers ที่จำเพาะกับ pGEM®-T Easy Vector ซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้ Forward primer T7 promoter (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') และ Reverse primer SP6 (5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA-3') ทำการผสมโคโลนีแบคทีเรียที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อเพื่อเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ กับ 20 µl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$), 0.2 mM dNTP Mix, 0.2 µM Forward และ Reverse primer, 12.5 U *Taq* DNA Polymerase (NEB) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำ

ปฏิกิริยา คือ 94.0 °C 3 นาที (1 รอบ), 94.0 °C 30 วินาที; 50.0 °C 30 วินาที; 70.0 °C 1.30 นาที (35 รอบ), 70.0 °C 5 นาที (1 รอบ) ทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 2 % (2 % agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล ถ้าโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอกับ pGEM®-T Easy Vector ถูกต้องแถบของดีเอ็นเอบนเจลจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 246, 401 และ 528 คู่เบสรวมกับขนาดของ pGEM®-T Easy Vector ที่ primers เข้าไปจับอีกประมาณ 176 คู่เบส

2. ตรวจสอบการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอกับ pGL3-Basic Vector ด้วยเทคนิค Colony-PCR

การตรวจสอบโดยใช้ชุดน้ำยา *Taq* DNA Polymerase (NEB) และ primers ที่จำเพาะกับ pGL3-Basic Vector ซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้ Forward primer RV3 (5'- CAT GCA AAA TAG GCT GTC CC-3') และ Reverse primer GL2 (5'- CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC C-3') ทำการผสมโคโลนีแบคทีเรียที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อเพื่อเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ กับ 20 µl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$), 0.2 mM dNTP Mix, 0.2 µM Forward และ Reverse primer, 12.5 U *Taq* DNA Polymerase (NEB) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 94.0 °C 3 นาที (1 รอบ), 94.0 °C 30 วินาที; 51.9 °C 30 วินาที; 70.0 °C 1 นาที (35 รอบ), 70.0 °C 5 นาที (1 รอบ) ทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 2 % (2 % agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล ถ้าโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอกับ pGL3-Basic Vector ถูกต้องแถบของดีเอ็นเอบนเจลจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 246, 401 และ 528 คู่เบสรวมกับขนาดของ pGL3-Basic Vector ที่ primers เข้าไปจับอีกประมาณ 121 คู่เบส

3.3.1.5 การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณที่น้อยและอาศัยด่างในการสกัด (Alkaline Lysis Miniprep) เพื่อนำพลาสมิดที่สกัดได้ไปยืนยันผลอีกครั้งว่าได้โคลนที่ต้องการจริง

หลังจากตรวจสอบการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอกับ pGEM®-T Easy Vector (Promega) และ pGL3-Basic Vector ด้วยเทคนิค Colony-PCR แล้วว่าโคโลนีใดที่มีดีเอ็นเอพลาสมิดที่ต้องการอยู่ จากนั้นให้นำโคโลนีนั้นมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนใน LB broth และนำมาสกัดพลาสมิด ออกจากเซลล์ก่อน ซึ่งการสกัดพลาสมิดในการทดลองนี้เป็นการสกัดจากเซลล์แบคทีเรียในปริมาตรที่น้อยมาก และอาศัยด่างในการสกัด เรียกวิธีนี้ว่า alkaline lysis miniprep

เริ่มต้นจากการปั่นเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนใน LB Broth ปริมาตร 1 ml ที่ความเร็ว 8,000 rpm นาน 5 นาที จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ใน Buffer P1 (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 μg/ml RNase A) ปริมาตร 330 μl และ Buffer P2 (0.2 M NaOH, 10 % SDS) ปริมาตร 380 μl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จึงเติม Buffer P3 ที่เย็น (iced-cold 3 M potassium acetate (KAc) pH 5.5) ปริมาตร 380 μl แช่หลอดไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 9,500 rpm นาน 10 นาที และเก็บเฉพาะส่วนใสมาทำการตกตะกอนดีเอ็นเอต่อโดยเติม 100 % Isopropanol ลงไป 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำหลอดไปปั่นด้วยความเร็ว 13,500 rpm นาน 10 นาที จะได้ตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอด ล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol ปริมาตร 200 μl นำไปปั่นอีกครั้งและตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่อง DNA SpeedVacs (Thermo Scientific) จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น (deionized water) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5-10 นาทีหรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมด และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ทั้งนี้อาจสามารถตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งเพื่อให้ดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นได้ด้วย 3 M ammonium acetate หรือ sodium acetate, pH 5.0 ปริมาตร 20 μl กับ 100 % Ethanol ปริมาตร 440 μl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หรือที่ -70 °C ข้ามคืน แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 13,500 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol อีกครั้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่อง DNA SpeedVacs (Thermo Scientific) สุดท้ายละลายในน้ำกลั่น (deionized water) ปริมาตร 30-50 μl ตามต้องการและนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.3.1.6 **การตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ ด้วยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)**

1. **การตรวจสอบพลาสมิด phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc, phACE(-499)Luc , phACE(-93T)Luc และ phACE(-93C)Luc ด้วยเทคนิค RFLP**

ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการนั้น เนื่องจากดีเอ็นเอพลาสมิดที่ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เกิดจากเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ pGEM®-T Easy Vector และ pGL3-Basic Vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I (NEB) และ *Hin*dIII (NEB) ดังนั้นในการตรวจสอบจึงใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 1x NEBuffer 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7.9), 1x BSA, 1 U *Kpn*I, 1 U *Hin*dIII และดีเอ็นเอพลาสมิดที่สกัดได้ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 2 % (2 % agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล หากพลาสมิดนั้นมีชิ้นส่วนที่ต้องการ

ศึกษาอยู่ แถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลจะมีทั้งแถบของ pGEM®-T Easy Vector ขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส pGL3-Basic Vector ขนาดประมาณ 4,800 คู่เบส กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 246, 401 และ 528 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์ที่มีขนาดแตกต่างกัน

2. การตรวจสอบพลาสมิด phACE(-132)Luc ด้วยเทคนิค RFLP

ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการของโคลน เนื่องจากดีเอ็นเอพลาสมิด phACE(-132)Luc ที่ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เกิดจากตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ phACE(-372)Luc บางส่วนออกไปและเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหลือกลับเหมือนเดิม ดังนั้นในการตรวจสอบจึงใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดดีเอ็นเอพลาสมิด phACE(-132)Luc ให้ได้รูปแบบที่กำหนด (ในการทดลองนี้จะใช้เอนไซม์ *Sac*II (Fermentas) และ *Hind*III (Fermentas) ซึ่งในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 1x Tango™ Buffer (33 mM Tris-acetate (pH 7.9), 10 mM Magnesium acetate, 66mM Potassium acetate, 0.1mg/ml BSA), 20 U *Sac*II, 20 U *Hind*III และดีเอ็นเอพลาสมิดที่สกัดได้ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกาโรสที่มีความเข้มข้นเป็น 3 % (3 % agarose gel electrophoresis) จากนั้นย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล หากพลาสมิดนั้นมีชิ้นส่วนที่ต้องการศึกษาอยู่ แถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลจะมีทั้งแถบของ pGL3-Basic Vector ขนาดประมาณ 4,800 คู่เบส กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 50 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์

3.3.1.7 การตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิด phACE(-132)Luc, phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc, phACE(-499)Luc , phACE(-93T)Luc และ phACE(-93C)Luc ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบส (DNA Sequencing)

เมื่อตรวจสอบโคลน phACE(-132)Luc, phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc, phACE(-499)Luc , phACE(-93T)Luc และ phACE(-93C)Luc ด้วยเทคนิค RFLP แล้ว เพื่อยืนยันลำดับเบสที่ถูกต้องจึงนำไปตรวจสอบลำดับเบสของโคลนนั้นอีกครั้ง โดยเตรียมดีเอ็นเอพลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 3.3.1.6 ไปหาลำดับเบสที่ First BASE Laboratories (Selangor Darul Ehsan, Malaysia) และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้นั้นกับลำดับเบสใน GenBank accession No. EU332840

3.3.1.8 การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมาก (Maxiprep)

หลังจากคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการแล้ว ขั้นตอนต่อไปต้องทำการเพิ่มจำนวนพลาสมิดเหล่านี้ ให้มีปริมาณและความบริสุทธิ์สูงมากเพียงพอที่จะทำการทดลองใน

เซลล์เพาะเลี้ยงได้ โดยใช้ชุดสกัด PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits (Invitrogen) เป็นการสกัดจากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมากเรียกว่า Maxiprep เริ่มจากเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียใน LB Broth ปริมาตร 200 ml นำมาปั่นที่ความเร็ว 4,000g นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและเติมสารละลาย Resuspension Buffer (R3), Lysis Buffer (L7) และ Precipitation Buffer (N3) อย่างละปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 12,000 g นาน 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสเติมลงใน Column ที่ทำการ equilibrated แล้ว ภายใน Column จะมี anion-exchange resin ซึ่งจะจับกับประจุลบของดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนใส ขณะที่สารอื่นๆ จะถูกชะออกไปด้วย Wash Buffer 60 ml จากนั้นดีเอ็นเอที่อยู่ภายใน Column จะถูกชะออกมาพร้อมกับ Elution Buffer 15 ml แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอเหล่านั้นด้วย 100 % Isopropanol ปริมาตร 10.5 ml โดยปั่นที่ความเร็วมากกว่า 15,000 *g* อุณหภูมิ 4 °C นาน 30 นาที และล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol ปริมาตร 5 ml ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายในน้ำกลั่น (deionized water) ปริมาตร 200-500 µl ตามต้องการและนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.3.2. การคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการทดลอง

3.3.2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) จากเซลล์เพาะเลี้ยง6 ชนิด คือ Jurkat, K562, HeLa, HaCaT, HEK 293 และ SH-SY5Y เพื่อตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน ACE

การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์เพาะเลี้ยง เริ่มต้นจากเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการสกัดใน cell culture dish (ขนาด 100 mm X 20 mm) ล้างเซลล์ด้วย Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (JRH Biosciences) ที่เย็น แล้วรีบเติมน้ำยา TRIZOL® Reagent (Invitrogen) ปริมาตร 3 ml ลงไปในจานเพาะเลี้ยง จากนั้นใช้ใบมีดที่ทำความสะอาดด้วย RNase AWAY (Continental Lab Products) ขูดเซลล์ให้หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยง ปิเปตต์สารละลายเซลล์ที่ได้ใส่หลอดและเติม chloroform ที่เย็นลงไป 200 µl ต่อปริมาตรน้ำยา TRIZOL® Reagent 1 ml เขย่าให้เข้ากันอย่างแรงแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 2 °C -8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 12,000 *g* นาน 15 นาที สารละลายที่ได้จะแยกออกเป็นชั้น โดยชั้นล่างสุดของหลอดคือชั้นที่มีสีแดงซึ่งเป็นชั้นของ organic phase (phenol-chloroform phase) ถัดขึ้นมาเป็นชั้น interphase และบนสุดคือชั้นน้ำที่ไม่มีสีเป็นชั้นของ aqueous phase ซึ่งอาร์เอ็นเอจะอยู่ในชั้นนี้ จากนั้นดูดเฉพาะส่วนใสชั้นบนสุดมาทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 100 % Isopropanol ปริมาตร 500 µl ต่อปริมาตรน้ำยา TRIZOL® Reagent 1 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่อุณหภูมิ 2 °C -8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 12,000 *g* นาน 10 นาที และล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol ปริมาตร 1 ml ทั้งหมด 3 รอบ โดยปั่นที่อุณหภูมิ 2 °C -8 °C ด้วยความเร็วไม่เกิน 7,500 *g* นาน 5 นาที สุดท้ายตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วยน้ำที่ปราศจาก

เอนไซม์ RNase (DEPC-treated water) ที่อุณหภูมิ 55 °C -60 °C นาน 10 นาที ซึ่งสาร ละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้นี้สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

3.3.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

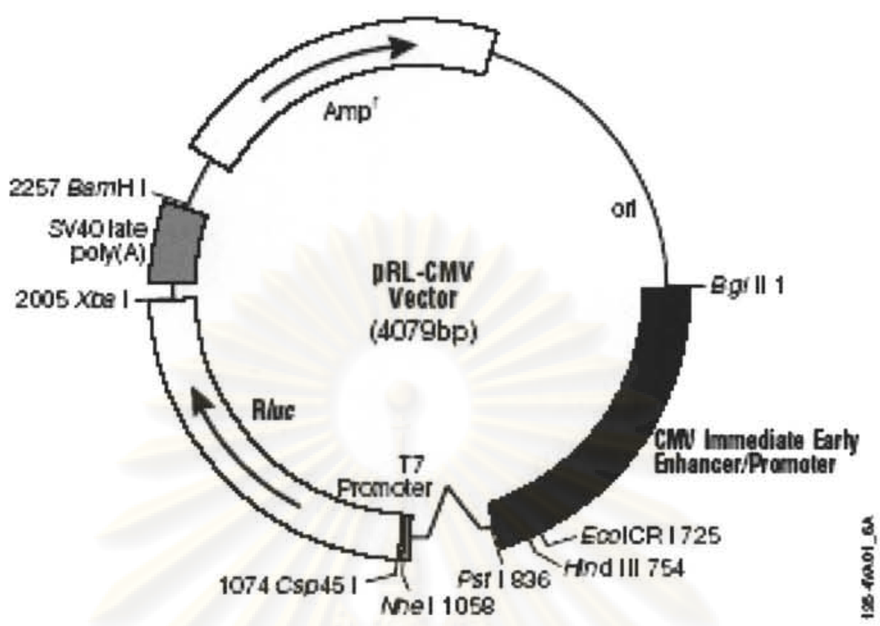
ทำการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน ACE ในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อคัด เลือกเซลล์ที่เหมาะสมในการทดลอง ด้วยเทคนิค RT- PCR โดยใช้ยีนβ-actin เป็นตัวควบคุม การทดลองครั้งนี้จะใช้ชุดน้ำยา Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (AMV-RT) (Promega, Madison, WI, USA) และใช้อาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นต้นแบบ ในการทำปฏิกิริยา เริ่มจากการ treat อาร์เอ็นเอด้วย Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) เพื่อกำจัดดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนจากการสกัดโดยผสมอาร์เอ็นเอความเข้มข้น 200 ng กับน้ำยา (1x DNase I Reaction buffer with $MgCl_2$, 1 U DNase I Amp Grade) ปรับปริมาตรให้ได้ 10 µl แล้วนำไปวางที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที เมื่อครบเวลาให้ inactivate เอนไซม์ DNase I ด้วย 25 mM EDTA, pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ผ่านการ treat DNase I มาเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา RT โดยผสมกับ 100 pM/ul Oligo-dT18 mer เพื่อเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็นซีดีเอ็นเอ จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 12.5 µl ด้วย DEPC-treated water แล้วตั้งที่อุณหภูมิ 75 °C 5 นาทีเพื่อกระตุ้นให้ RNA คลายโครงสร้างมาจับกับ Oligo-dT20mer จากนั้นวางบนน้ำแข็งทันทีเพื่อมิให้ RNA กลับมาจับโครงสร้างแบบเดิมแล้วเติมน้ำยา 1x AMV RT buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, 8.75 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT), 1 mM dNTP, 40 U RiboLock™ RNase inhibitor (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada) แล้วเติม 10 U AMV RT ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยตั้งที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบการแสดงออกของยีน ACE และ β-actin ของเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดน้ำยา *Taq* DNA Polymerase with standard *Taq* buffer (NEB, Beverly, MA, USA) และ primers ที่จำเพาะ primers สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ ดังตารางที่ 3.1 ทำการผสมซีดีเอ็นเอต้นแบบ จำนวน 5 µl กับ 20 µl ของน้ำยาในการทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ที่ประกอบด้วย 1x buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$), 0.2 mM dNTP Mix, 0.2 µM Forward และ Reverse primer, 12.5 U *Taq* DNA Polymerase โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ Primer ACE และ β-actin คือ 95.0 °C 5 นาที (1 รอบ), 95.0 °C 30 วินาที; 59.0 °C 30 วินาที; 72.0 °C 30 วินาที (45 รอบ), 72.0 °C 10 นาที (1 รอบ) เมื่อเสร็จแล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ จากการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอกา

โรสที่มีความเข้มข้นเป็น 2 % (2 % agarose gel electrophoresis) ย้อมเจลด้วยสาร Ethidium Bromide และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจล

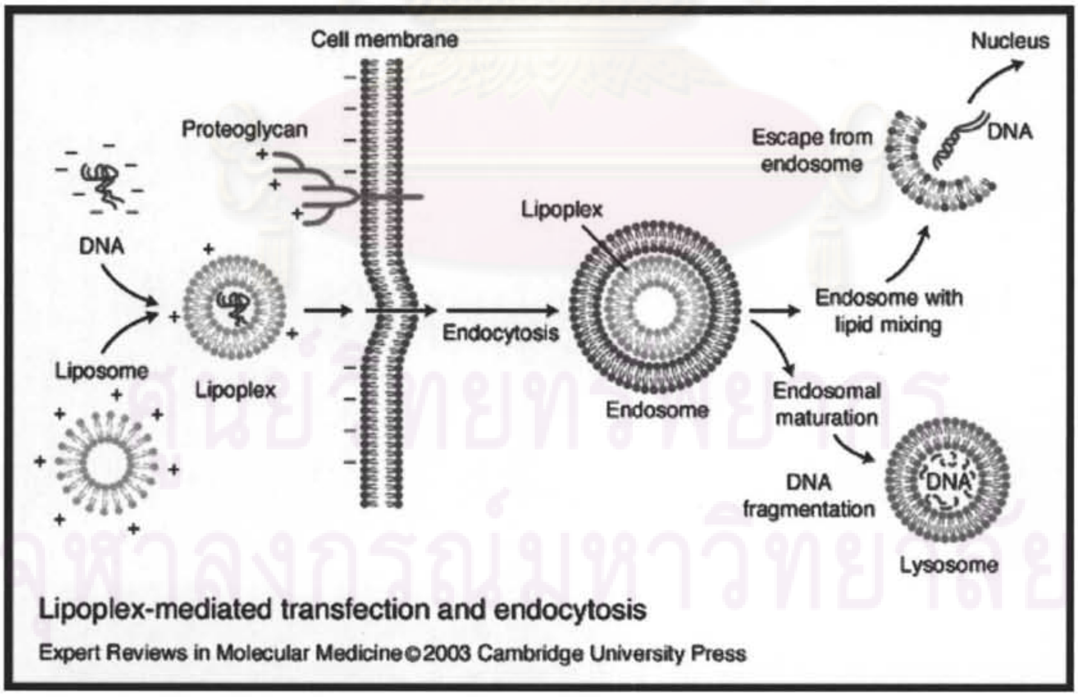
3.3.3 การถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง (Transfection)

นำดีเอ็นเอพลาสมิดที่สกัดได้ทั้ง 6 แบบ ซึ่งจะมีปริมาณและความบริสุทธิ์สูงมากเพียงพอที่จะทำการทดลอง มาทำการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เหมาะสมที่ผ่านการคัดเลือกแล้วด้วยชุดน้ำยา Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการทดสอบ (เซลล์ HeLa จำนวน 20,000 เซลล์ต่อหลุม, เซลล์ HEK 293 จำนวน 150,000 เซลล์ต่อหลุม และเซลล์ SH-SY5Y จำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุม) ใน 96 well cell culture plate และนำมา incubate ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้ปริมาณเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 90-95 % ในวันต่อไปที่จะทำการทดลอง ก่อนการถ่ายโอนดีเอ็นเอให้ล้างเซลล์ที่จะทดสอบ 2 รอบด้วยอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมและไม่มีซีรัม (serum) กับยาปฏิชีวนะผสมอยู่และจึงเติมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมและไม่มีซีรัมกับยาปฏิชีวนะนั้นลงไปหลุมละปริมาตร 100 µl จากนั้นเติมส่วนผสม (complexes) ของดีเอ็นเอพลาสมิดที่จะทำการถ่ายโอนให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอสุดท้ายเท่ากับ 0.2 µg และพลาสมิดร่วม (Co-transfected pRL-CMV Vector) ดังแสดงลักษณะของพลาสมิดในรูปที่ 3.7 (ได้รับการอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Robert K. Yu, Institute of Molecular Medicine and Genetics, Medical College of Georgia, Augusta, GA, USA) 0.02 µg ต่อหลุม กับน้ำยา Lipofectamine™ 2000 ปริมาตร 0.5 µl ต่อหลุม โดยเจือจางในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมและไม่มีซีรัมกับยาปฏิชีวนะผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที ซึ่งในขั้นตอนนี้อาจเห็นสารละลายเป็นสีขุ่นได้ และสามารถเก็บส่วนผสมนี้ไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 6 ชั่วโมง ขั้นต่อมาปิเปตต์ส่วนผสมที่เตรียมปริมาตร 50 µl ต่อหลุม ผสมให้เข้ากันโดยการเคาะ plate เบาๆ จากด้านข้าง แล้วนำมา incubate ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วันต่อมาจึงทำการเปลี่ยนเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมและมีซีรัมกับยาปฏิชีวนะผสมอยู่ เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะทดสอบการแสดงออกของยีน luciferase reporter ในวันต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่3.7 : แสดงลักษณะของ Co-transfected pRL-CMV Vector
(http://www.promega.com/figures/popup.asp?fn=1354va&partno=E2261&product=pRL%2DCMV+Vector)



ภาพที่ 3.8 : แสดงหลักการการถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง (Transfection)
(http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/fig001cns.gif)

3.3.4 การทดสอบการแสดงออกของยีน luciferase reporter ด้วยเทคนิค Reporter Gene Assay

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน luciferase reporter เพื่อศึกษา promoter activity ของยีน ACE จะทำการวัดโดยใช้ชุดน้ำยา Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) ซึ่งจะวัดทั้งปริมาณของ firefly luciferase จาก luciferase reporter gene constructs (pGL3-Basic Vector) ที่สร้างขึ้นกับปริมาณของ *Renilla* luciferase จาก pRL-CMV Vector ซึ่งเป็นตัวควบคุม (control reporter) ที่จะถูกถ่ายโอนร่วมกับดีเอ็นเอพลาสมิดที่ต้องการทดสอบ (co-transfected) เข้าไปด้วยพร้อมกัน เพื่อลดปัญหาผลกระทบจากจำนวนของเซลล์ที่ใช้ (cell number) และประสิทธิภาพในการ transfection (transfection efficiency) รวมถึงผลที่ไม่จำเพาะต่างๆ (global effects) เป็นต้น โดยนำเซลล์ที่จะตรวจวัดออกมาเติมน้ำยา Dual-Glo™ Luciferase Reagent (Dual-Glo™ Luciferase Buffer, Dual-Glo™ Luciferase Substrate) ปริมาตร 100 µl ต่อหลุมของ 96 well cell culture plate ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้ววัดปริมาณของ firefly luciferase จากนั้นเติมน้ำยา Dual-Glo™ Stop&Glo Reagent (Dual-Glo™ Stop&Glo Buffer, Dual-Glo™ Stop&Glo Substrate) อีก 100 µl ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้ววัดปริมาณของ *Renilla* luciferase ซึ่งค่าของปริมาณแสง luminescence ที่ได้ทั้งสองจะถูกวัดด้วยเครื่อง VICTOR^3 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)

3.3.5 การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้คือ activities ของ firefly luciferase กับ *Renilla* luciferase ซึ่งจะถูกนำมาเทียบเป็นอัตราส่วนของ firefly luciferase activities ต่อ *Renilla* luciferase activities ในแต่ละการทดลอง แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับอัตราส่วนที่มาจากการถูก transfect ด้วย negative control คือ pGL3-Basic plasmid ที่ไม่ถูกเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ค่าที่ได้นั้นจะถูกคำนวณเป็นจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) เพื่อนำมาเปรียบเทียบกันระหว่างค่าที่ได้จากเซลล์ ซึ่งถูกถ่ายโอนด้วยพลาสมิดที่มีขนาดของโปรโมเตอร์ของยีน ACE ที่แตกต่างกัน และพลาสมิดที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93T/C ซึ่งจะแสดงถึง promoter activity ของยีน ACE ในแบบต่างๆ รวมถึงการตรวจสอบความจำเพาะต่อเซลล์ ก็จะถูกวัดโดยการเปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่างเซลล์แต่ละชนิด (เซลล์ HeLa, เซลล์ HEK 293 และเซลล์ SH-SY5Y) ด้วย แต่ละการทดลองจะทำทั้งหมด 3 ครั้ง (tripicate) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้การคำนวณสถิติ *t*-test ($P < 0.05$) ในการตัดสินใจว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่อย่างไร

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

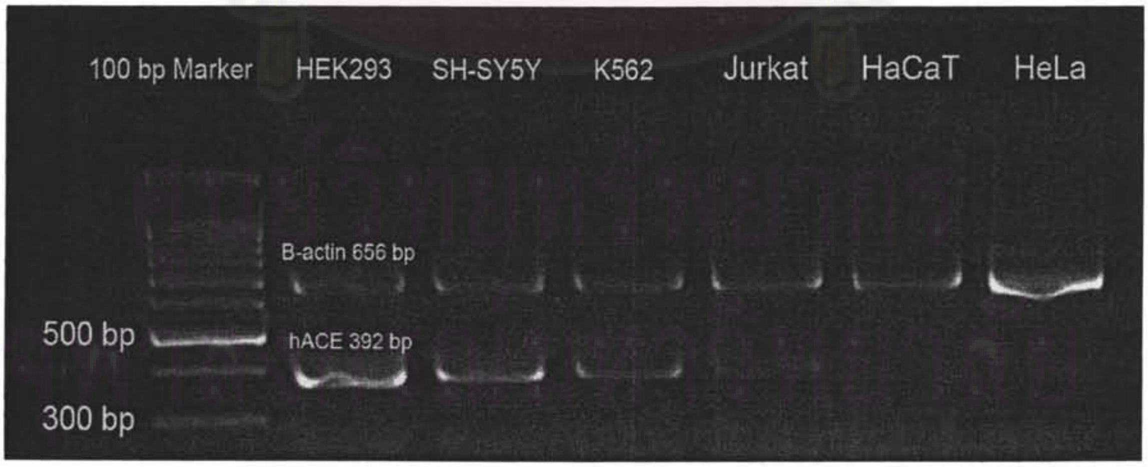
1. **<u>ส่วนที่ 1</u> ผลศึกษาบทบาทของกลไกระดับเหนือพันธุกรรมของยีน ACE**

1.1 ผลการทดสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน ACE ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิด

ในการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน ACE โดยใช้ยีน β-actin เป็นตัวควบคุม ในเซลล์เพาะเลี้ยง เซลล์ Jurkat, เซลล์ K562, เซลล์ HeLa, เซลล์ HaCaT, เซลล์ HEK 293 และเซลล์ SH-SY5Y เพื่อตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน ACE ผลการศึกษาที่ได้แสดงในตารางที่ 4.1และ ดังภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ACE โดยใช้ยีน β-actin เป็นตัวควบคุมในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ (เครื่องหมาย ✓ คือมีการแสดงออกของยีนและ ✗ คือไม่มีการแสดงออกของยีน)

เซลล์ / ยีน	HEK 293	SH-SY5Y	K562	Jurkat	HaCaT	HeLa
ACE	✓	✓	✓	✓	✗	✗
β-actin	✓	✓	✓	✓	✓	✓



ภาพที่ 4.1 : ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ACE โดยใช้ยีน β-actin เป็นตัวควบคุมในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ

นอกจากนี้การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ACE โดยใช้ยีน β-actin เป็นตัวควบคุมสามารถหาเป็นอัตราส่วนการแสดงออกของยีน ACE ต่อ ยีน β-actin โดยใช้ค่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนภาพเจลมาคำนวณหาค่าอัตราส่วน เพื่อที่จะได้นำค่าอัตราส่วนมาหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน ACE ของแต่ละเซลล์ และเปอร์เซนต์ DNA methylation ต่อไป (ในผลการทดลองข้อ 3 ส่วนที่ 1) อัตราส่วนที่ได้แสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งจะให้ได้เห็นว่าเซลล์ HEK 293 มีการแสดงออกของยีน ACE ต่อ ยีน β-actin มากที่สุด รองลงมาคือเซลล์ SH-SY5Y, เซลล์ K562 และเซลล์ Jurkat ตามลำดับ ส่วนเซลล์ HaCaT และ เซลล์ HeLa ไม่มีการแสดงออกของยีน ACE จึงไม่มีค่าอัตราส่วนการแสดงออกของยีน ACE ต่อ ยีน β-actin

ตารางที่ 4.2 : แสดงอัตราส่วนการแสดงออกของยีน ACE ต่อ ยีน β-actin โดยใช้ค่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนภาพเจลมาคำนวณหาค่าอัตราส่วน

เซลล์ที่ใช้ทดสอบ	**ยีน**	**ค่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอ**	**อัตราส่วนระหว่าง ACE: β-actin**
HEK 293	ACE	1688625	4.844619481
	β-actin	8180746	
SH-SY5Y	ACE	1631873	3.072767285
	β-actin	5014367	
K562	ACE	1590952	1.495113929
	β-actin	2378654	
Jurkat	ACE	2429622	0.416855116
	β-actin	1012800	
HaCaT	ACE	0	0
	β-actin	1950528	
HeLa	ACE	0	0
	β-actin	8854607	

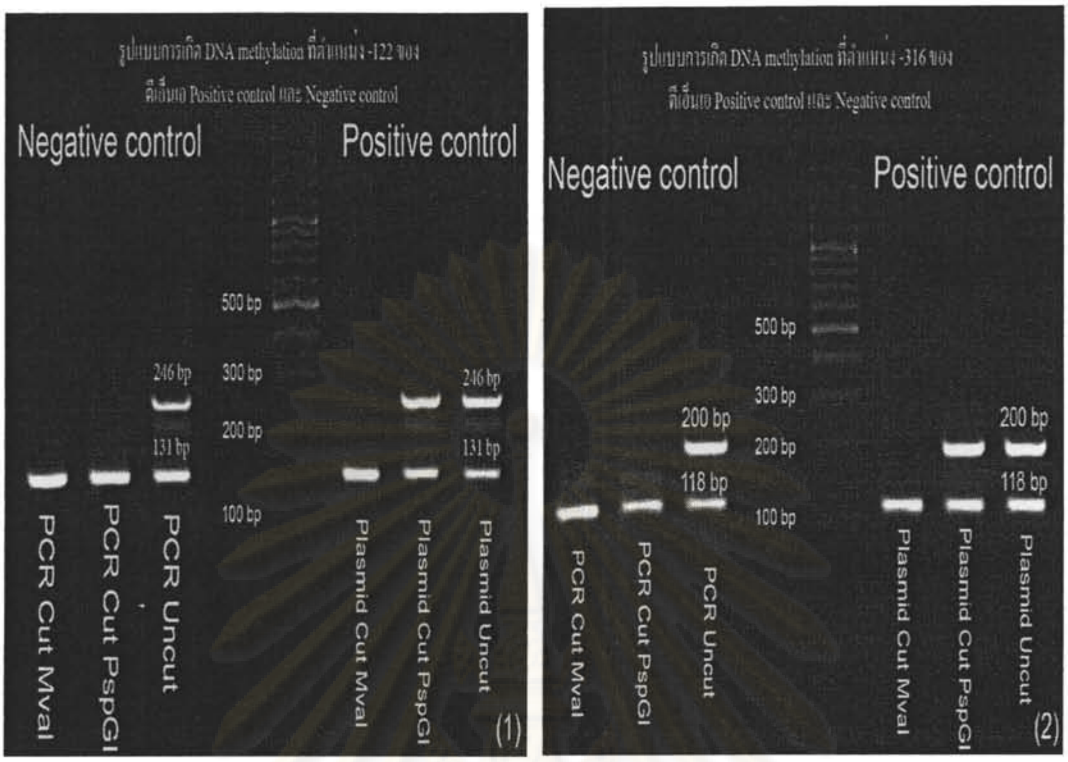
1.2 ผลการทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation **ณ ตำแหน่ง** $C^{m}CWGG$ **ของยีน** ACE **ที่ตำแหน่ง -122 และ -316 บนโปรโมเตอร์ด้วยเทคนิค** methylation-sensitive isoschizomers

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.1 ผลจากดีเอ็นเอพลาสมิดที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวก (Positive control) ของการเติมหมู่เมทิล (DNA methylation) เมื่อนำมาตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mva*I และ *Psp*GI จะพบว่า ดีเอ็นเอพลาสมิดจะถูกเอนไซม์ *Mva*I ตัดได้ทุกตำแหน่งทั้งที่เกิด DNA methylation และ DNA unmethylation (dcm:no effect) และเมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่ทดสอบการเกิด DNA methylation ของยีน ACE จะพบ PCR product 1 ขนาด คือ ขนาดสั้น แต่เมื่อนำดีเอ็นเอพลาสมิดมาตัดด้วยเอนไซม์ *Psp*GI จะไม่สามารถตัดได้เนื่องจากเอนไซม์ *Psp*GI ไม่สามารถตัดตำแหน่งที่เกิด DNA methylation ได้ (dcm:block) และเมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่ทดสอบการเกิด DNA methylation ของยีน ACE จะพบ PCR product 2 ขนาด คือ ขนาดสั้น และขนาดยาว และทุกครั้งที่ทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation จะต้องใช้ดีเอ็นเอพลาสมิด (Positive control) ที่ไม่ผ่านการตัดเอนไซม์ใดเลยมาเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อเป็นการทดลองควบคุม ซึ่งจะพบ PCR product 2 ขนาด คือ ขนาดสั้น และขนาดยาว ดังภาพที่ 4.2

1.2.2 ผลจากดีเอ็นเอพลาสมิดที่ใช้เป็นตัวควบคุมลบ (Negative control) ของการเติมหมู่เมทิล (DNA methylation) เมื่อนำมาทำการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mva*I และ *Psp*GI จะพบว่าดีเอ็นเอพลาสมิดจะถูกเอนไซม์ *Mva*I ตัดได้ทุกตำแหน่งทั้งที่เกิด DNA methylation และ DNA unmethylation (dcm:no effect) และเมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่ทดสอบการเกิด DNA methylation ของยีน ACE จะพบ PCR product 1 ขนาด คือ ขนาดสั้น แต่เมื่อนำดีเอ็นเอพลาสมิดที่ได้ทำการเพิ่มจำนวนของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์นั้นด้วยเทคนิค PCR แล้วมาตัดด้วยเอนไซม์ *Psp*GI จะพบว่าสามารถตัดได้เนื่องจากเอนไซม์ *Psp*GI สามารถตัดตำแหน่งที่ไม่เกิด DNA methylation ได้ และเมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่ทดสอบการเกิด DNA methylation ของยีน ACE จะพบ PCR product 1 ขนาด คือ ขนาดสั้นเท่านั้น และทุกครั้งที่ทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation จะต้องใช้ดีเอ็นเอพลาสมิด (Negative control) ที่ไม่ผ่านการตัดเอนไซม์ใดเลยมาเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อเป็นการทดลองควบคุม ซึ่งจะพบ PCR product 2 ขนาด คือ ขนาดสั้น และขนาดยาว ดังภาพที่ 4.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

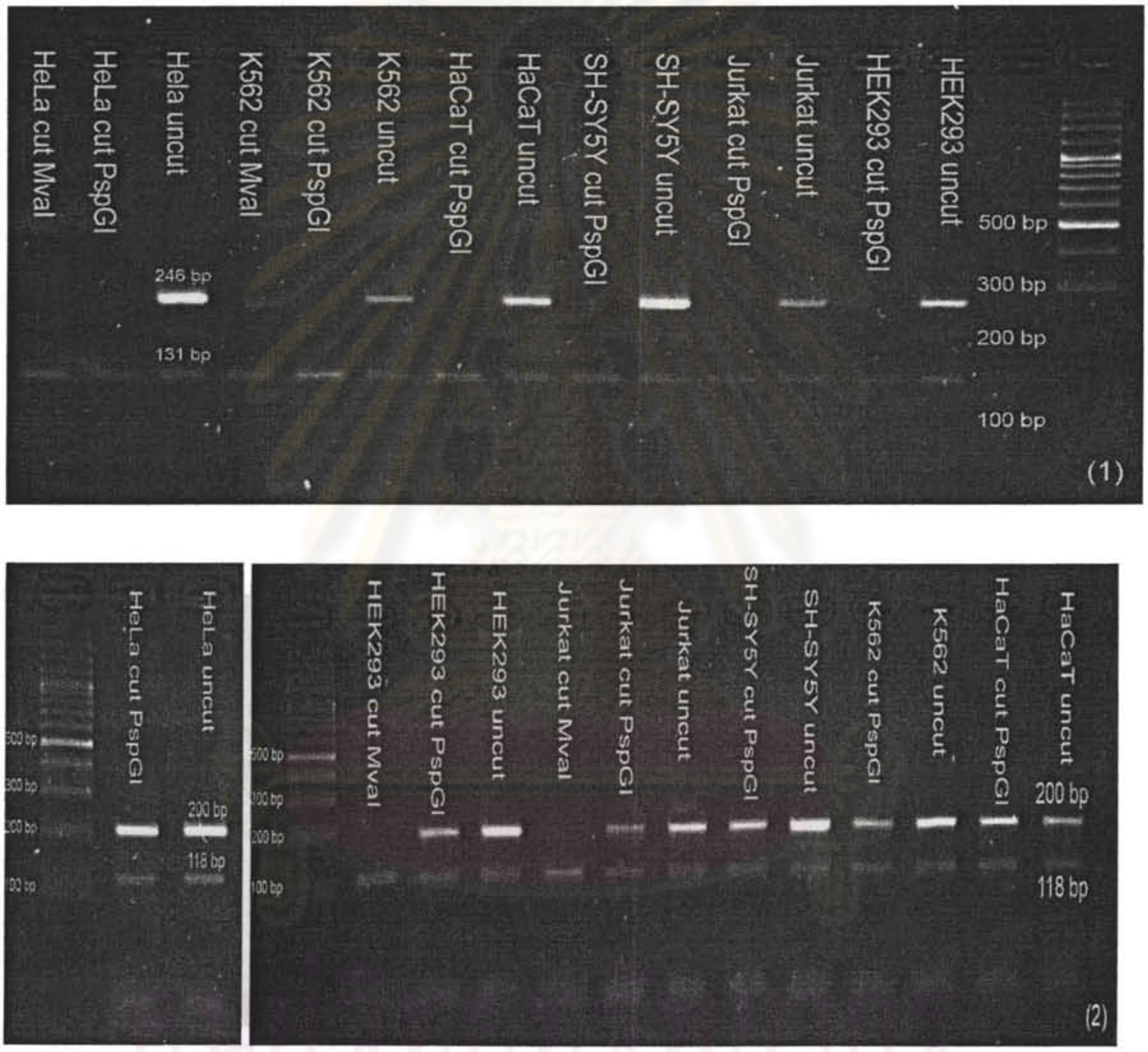


ภาพที่ 4.2 : ผลการทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^mCWGG ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -122 (1) และ -316 (2) บนโปรโมเตอร์ จากดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวก (Positive control) และ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวควบคุมลบ (Negative control)

1.2.3 ผลจากดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการแสดงออกที่ต่างกัน เมื่อมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mva*I และ *Psp*GI พบว่า 1. รูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^mCWGG ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -122 บนโปรโมเตอร์ จากดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิด เป็นตำแหน่งที่ไม่เกิด DNA methylation เนื่องจากเอนไซม์ *Psp*GI สามารถตัดดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ตำแหน่ง -122 ได้ และเมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers 2 คู่ คือ -217hACE_F1, +29hACE_R1 และ -102hACE_F2, +29hACE_R1 ก็จะพบ PCR product แค่ 1 ขนาด คือ 131 คู่เบส (ขนาดสั้น) เท่านั้น และทุกครั้งที่ทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation จะต้องใช้ดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่ผ่านการตัดเอนไซม์ใดเลยมาเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อเป็นการทดลองควบคุม ซึ่งจะพบ PCR product 2 ขนาด คือ 131 คู่เบส (ขนาดสั้น) และ 246 คู่เบส (ขนาดยาว) ดังภาพที่ 4.3 (1) 2. รูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^mCWGG ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -316 บนโปรโมเตอร์ จากดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิด เป็นตำแหน่งที่เกิด DNA methylation เนื่องจากเอนไซม์ *Psp*GI ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ตำแหน่ง -316 ได้ (dcm:block) และเมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers 2 คู่ คือ -

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

372hACE_F3, +29hACE_R1 และ -289hACE_F4, +29hACE_R1 ก็จะพบ PCR product 2 ขนาด 118 คู่เบส (ขนาดสั้น) และ 200 คู่เบส (ขนาดยาว) และทุกครั้งที่ทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation จะต้องใช้ดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่ผ่านการตัดเอนไซม์ใดเลยมาเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อเป็นการทดลองควบคุม ซึ่งจะพบ PCR product 2 ขนาด คือ 118 คู่เบส (ขนาดสั้น) และ 200 คู่เบส (ขนาดยาว) ดังภาพที่ 4.3 (2)



ภาพที่ 4.3 : ผลการทดสอบรูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง $C^{m}CWGG$ ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -122 (1) และ -316 (2) บนโปรโมเตอร์ จากดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการแสดงออกที่ต่างกัน

1.3. ผลการหาเปอร์เซนต์ DNA methylation จากการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนเจล

1.3.1 รูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง $C^{m}CWGG$ ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -122 บนโปรโมเตอร์ จากดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิด เป็นตำแหน่งที่ไม่เกิด

DNA methylation เพราะฉะนั้นเปอร์เซนต์ DNA methylation ของเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิด ที่ตำแหน่ง -122 บนโปรโมเตอร์มีค่าเป็น 0 เปอร์เซนต์

1.3.2 รูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง C^{m}CWGG ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -316 บนโปรโมเตอร์ จากดีเอ็นเอของเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิด เป็นตำแหน่งที่เกิด DNA methylation เพราะฉะนั้นเปอร์เซนต์ DNA methylation ของเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิด ที่ตำแหน่ง -316 บนโปรโมเตอร์มีค่าดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 : แสดงเปอร์เซนต์ DNA methylation ของเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิดจากการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนเจล

เซลล์ที่ใช้ทดสอบ	**อัตราส่วนความเข้มของแถบดีเอ็นเอ**(หลอด *Psp*GI)	**อัตราส่วนความเข้มของแถบดีเอ็นเอ**(หลอด uncut)	**เปอร์เซนต์ DNA Methylation**
HEK 293	2.424172	3.013031	80.45627
SH-SY5Y	2.742765	3.310672	82.84618
K562	2.687169	3.029793	88.69148
Jurkat	2.209675	2.469905	89.46396
HaCaT	2.257851	2.125676	106.2180
HeLa	2.669188	2.569661	103.8732

จากค่าอัตราส่วนการแสดงออกของยีน ACE ต่อยีน β-actin และค่าเปอร์เซนต์ DNA methylation สามารถนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน ACE ของแต่ละเซลล์ และเปอร์เซนต์ DNA methylation ดังภาพที่ 4.4

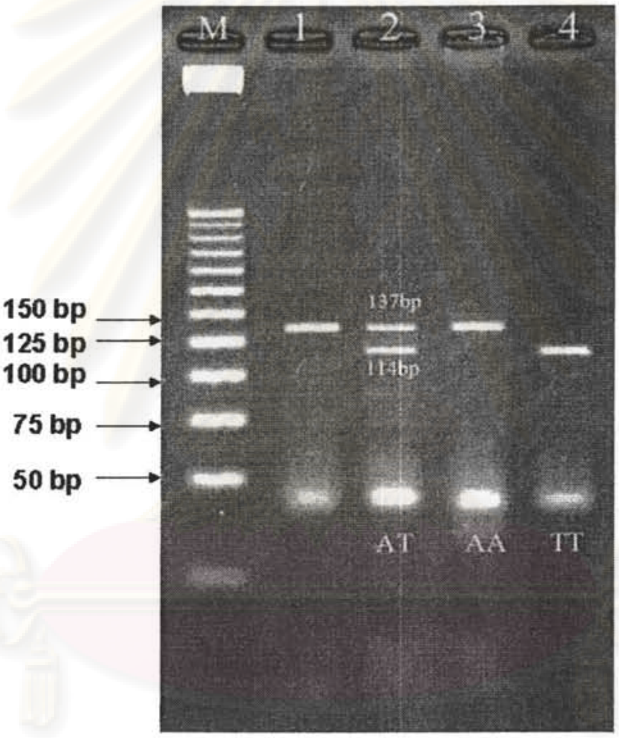
ภาพที่ 4.4 : กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์ DNA methylation และระดับการแสดงออกของยีน ACE ของแต่ละเซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. <u>ส่วนที่ 2</u> **ผลการศึกษาบทบาทความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE**

2.1. ผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ของ SNP rs4291 ณ ตำแหน่ง -240 A/T ในบริเวณโปรโมเตอร์ ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR – RFLP

การวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีน ACE ของ SNP rs4291 ณ ตำแหน่ง -240 A/T ในบริเวณ promoter ซึ่งสามารถแบ่งผลจีโนไทป์ที่เกิดขึ้นออกเป็น 3 แบบ คือ จีโนไทป์ homozygous AA จะพบขนาดดีเอ็นเอ 137 คู่เบส, จีโนไทป์ heterozygous AT จะพบขนาดดีเอ็นเอ 137, 114 และ 23 คู่เบส และ จีโนไทป์ homozygous TT จะพบขนาดดีเอ็นเอ 114 และ 23 คู่เบส ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* ดังแสดงในภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 : แสดงผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีน ACE ของ SNP rs4291 ณ ตำแหน่ง -240 A/T ในบริเวณ promoter ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยแถว M เป็น 25 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบสกำกับไว้, แถวที่ 1 เป็น PCR Product ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, แถวที่ 2-4 เป็นลักษณะของจีโนไทป์แบบ AT, AA และ TT ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีน ACE ของ SNP rs4291 ณ ตำแหน่ง -240 A/T ในบริเวณ promoter ด้วยวิธี PCR-RFLP ในกลุ่มควบคุมจำนวนทั้งหมด 207 ราย โดยเป็นเพศหญิง 129 ราย เพศชาย 78 ราย ซึ่งมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 41.34±9.76 ปี (mean ± SD) พบว่ามีการแสดงออกของจีโนไทป์แบบ AA จำนวน 122 ราย คิดเป็นร้อยละ 58.9, AT จำนวน 80

ราย คิดเป็นร้อยละ 38.6 และ TT จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 2.4 และเมื่อนำค่ามาวิเคราะห์หาความถี่ของอัลลีล พบว่า จากจำนวนอัลลีลทั้งหมด 414 อัลลีล เป็น A 324 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 78.3 และ T 90 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 21.7 และในกลุ่มตัวอย่างจำนวนทั้งหมด 187 ราย โดยเป็นเพศหญิง 122 ราย เพศชาย 65 ราย ซึ่งมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 44.89±12.92 ปี พบว่ามีการแสดงออกของจีโนไทป์แบบ AA จำนวน 95 ราย คิดเป็นร้อยละ 50.8 , AT จำนวน 78 ราย คิดเป็นร้อยละ 41.7 และ TT จำนวน 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.5 และเมื่อนำค่ามาวิเคราะห์หาความถี่ของอัลลีล พบว่า จากจำนวนอัลลีลทั้งหมด 374 อัลลีล เป็น A 268 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 71.7 และ T 106 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 28.3 ในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 : แสดงการเปรียบเทียบผลการกระจายของจีโนไทป์และความถี่ของอัลลีลของยีน ACE SNP -240 A/T ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง

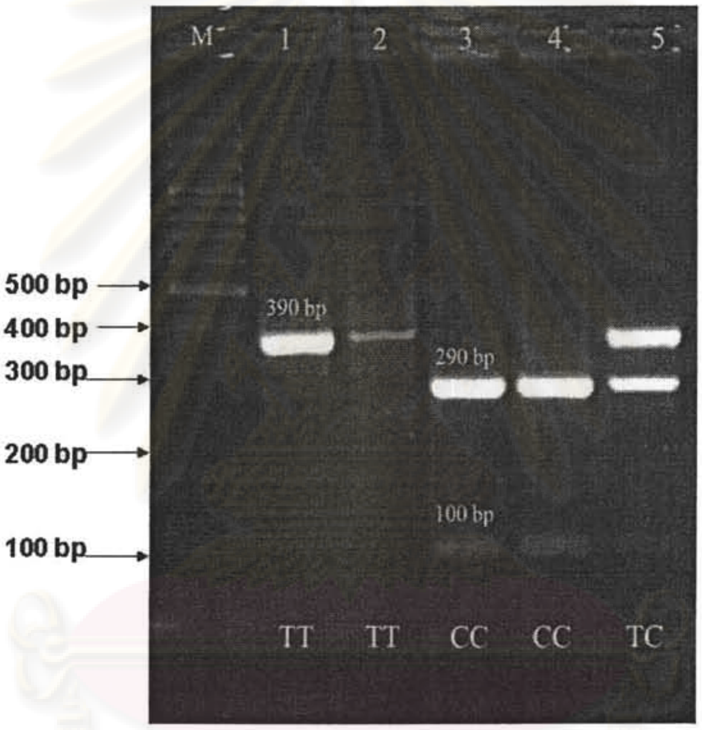
กลุ่ม (*n*)	Genotype distributions			Allele frequencies	
	AA	AT	TT	A	T
กลุ่มควบคุม (207)	122 (58.9%)	80 (38.6%)	5 (2.4%)	324 (78.3%)	90 (21.7%)
กลุ่มตัวอย่าง (187)	95 (50.8%)	78 (41.7%)	14 (7.5%)	268 (71.7%)	106 (28.3%)

จากข้อมูลในตารางสามารถนำมาคำนวณหาสมดุล Hardy-Weinberg (HWE) ของการกระจายตัวจีโนไทป์ของยีน ACE SNP -240 A/T โดยใช้ *Chi*-square test ในการทดสอบทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่าง ซึ่งพบว่าทั้งสองกลุ่มตัวอย่างมีการกระจายเป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg เพราะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P > 0.05$ (กลุ่มตัวอย่าง ; $\chi^2 = 0.14$, $df = 1$, $P = 0.713$ และ กลุ่มควบคุม; $\chi^2 = 3.82$, $df = 1$, $P = 0.051$) ระหว่างจำนวนการกระจายจีโนไทป์ที่พบ (observed numbers) และจำนวนการกระจายจีโนไทป์ที่คาดหวัง (expected numbers)

และจากข้อมูลในตารางเมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบความถี่อัลลีลของยีน ACE SNP -240 A/T ที่คำนวณได้ ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้าและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีแล้ว โดยใช้ *Chi*-square test ในการทดสอบทางสถิติ พบว่าทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ ($\chi^2 = 4.24$, $df = 1$, $P = 0.040$, OR = 0.702, 95% CI = 0.508 - 0.971)

2.2 ผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ของ SNP rs4292 ณ ตำแหน่ง -93T/C ในบริเวณโปรโมเตอร์ ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง ด้วยเทคนิค PCR – RFLP

การวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีน ACE ของ SNP rs4292 ณ ตำแหน่ง -93T/C ในบริเวณ promoter ซึ่งสามารถแบ่งผลจีโนไทป์ที่เกิดขึ้นออกเป็น 3 แบบ คือ จีโนไทป์ homozygous TT จะพบขนาดดีเอ็นเอ 390 คู่เบส, จีโนไทป์ heterozygous TC จะพบขนาดดีเอ็นเอ 390, 290 และ 100 คู่เบส และ จีโนไทป์ homozygous TT จะพบขนาดดีเอ็นเอ 290 และ 100 คู่เบส ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI ดังแสดงในภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 : แสดงผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีน ACE ของ SNP rs4292 ณ ตำแหน่ง -93T/C ในบริเวณ promoter ด้วยวิธี PCR-RFLP แถว M เป็น 100 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบสกำกับไว้, แถวที่ 1-2 เป็นลักษณะของจีโนไทป์แบบ TT, แถวที่ 3-4 เป็นลักษณะของจีโนไทป์แบบ CC และ แถวที่ 5 เป็นลักษณะของจีโนไทป์แบบ TC

ผลการวิเคราะห์หาความหลากหลายของยีน ACE ของ SNP rs4292 ณ ตำแหน่ง -93T/C ในบริเวณ promoter ด้วยวิธี PCR-RFLP ในกลุ่มควบคุมจำนวนทั้งหมด 207 ราย โดยเป็นเพศหญิง 129 ราย เพศชาย 78 ราย ซึ่งมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 41.34±9.76 ปี (mean ± SD) พบว่ามีการแสดงออกของจีโนไทป์แบบ TT จำนวน 104 ราย คิดเป็นร้อยละ 50.2, TC จำนวน 86 ราย คิดเป็นร้อยละ 41.5 และ CC จำนวน 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 8.2 และเมื่อนำค่ามาวิเคราะห์หา

ความถี่ของอัลลีล พบว่า จากจำนวนอัลลีล ทั้งหมด 414 อัลลีล เป็น T 294 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 71.0 และ C 120 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 29.0 และในกลุ่มตัวอย่างจำนวนทั้งหมด 187 ราย โดยเป็นเพศหญิง 122 ราย เพศชาย 65 ราย ซึ่งมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 44.89±12.92 ปี พบว่ามีการแสดงออกของจีโนไทป์แบบ TT จำนวน 97 ราย คิดเป็นร้อยละ 51.9 , TC จำนวน 79 ราย คิดเป็นร้อยละ 42.2 และ CC จำนวน 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 5.9 และเมื่อนำค่ามาวิเคราะห์หาความถี่ของอัลลีล พบว่า จากจำนวนอัลลีล ทั้งหมด 374 อัลลีล เป็น T 273 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 73.0 และ C 101 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 27.0 ในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 : แสดงการเปรียบเทียบผลการกระจายของจีโนไทป์และความถี่ของอัลลีลของยีน ACE SNP -93T/C ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่ม (*n*)	Genotype distributions			Allele frequencies	
	TT	TC	CC	T	C
กลุ่มควบคุม (207)	104 (50.2%)	86 (41.5%)	17 (8.2%)	294 (71.0%)	120 (29.0%)
กลุ่มตัวอย่าง (187)	97 (51.9%)	79 (42.2%)	11 (5.9%)	273 (73.0%)	101 (27.0%)

จากข้อมูลในตารางสามารถนำมาคำนวณหาสมดุล Hardy-Weinberg (HWE) ของการกระจายตัวจีโนไทป์ของยีน ACE SNP -93T/C โดยใช้ *Chi*-square test ในการทดสอบทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่าง ซึ่งพบว่าทั้งสองกลุ่มตัวอย่างมีการกระจายเป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg เพราะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P > 0.05$ (กลุ่มตัวอย่าง ; $\chi^2 = 0.96$, df = 1, $P = 0.328$ และ กลุ่มควบคุม; $\chi^2 = 0.02$, df = 1, $P = 0.895$) ระหว่างจำนวนการกระจายจีโนไทป์ที่พบ และจำนวนการกระจายจีโนไทป์ที่คาดหวัง

และจากข้อมูลในตารางเมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบความถี่อัลลีลของยีน ACE SNP -93T/C ที่คำนวณได้ ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้าและกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีแล้ว โดยใช้ *Chi*-square test ในการทดสอบทางสถิติ ไม่พบว่าทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P > 0.05$ ($\chi^2 = 0.29$, df = 1, $P = 0.590$, OR = 1.103, 95% CI = 0.808 - 1.507)

2.3 ผลการวิเคราะห์ Linkage diseqilibrium (LD) **และ** Haplotype

ผลการวิเคราะห์หา LD ของ SNPs ทั้งสองพบว่า -240A/T และ-93T/C ตั้งอยู่คนละ block เนื่องจากค่า D' = 0.438 และค่า $r^2 = 0.163$ ซึ่งเป็นค่าที่น้อยมาก โดยค่า D' และ r^2 เป็นตัวชี้วัด LD

ผลการวิเคราะห์หา Haplotype ของ SNPs ทั้งสอง พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคและการมีจีโนไทป์เป็น -240T/-93T แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 : แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ Haplotype

	Haplotype frequencies	Case, Control ratio counts	Case, Control frequencies	χ^2	*P* value*	Empirical *P* value**
-240A/T-93T/C						
A-T	0.619	222.1 : 151.9, 265.7 : 148.3	0.594, 0.642	1.916	0.166	NS
T-C	0.148	55.1 : 318.9, 61.7 : 352.3	0.147, 0.149	0.005	0.946	NS
A-C	0.132	45.9 : 328.1, 58.3 : 355.7	0.123, 0.141	0.559	0.455	NS
T-T	0.101	50.9 : 323.1, 28.3 : 385.7	0.136, 0.068	9.970	0.002	0.004

<u>หมายเหตุ</u> * วิเคราะห์ด้วยสถิติ *Chi*-square test;

** วิเคราะห์หลังจากการทำ permutations100000 ครั้ง; NS = Not significant.

จากตารางที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่า Haplotype -240T/-93T จะพบได้ในกลุ่มตัวอย่างมากกว่า 2 เท่าของกลุ่มควบคุม (OR = 2.177, 95%CI = 1.341 – 3.533, *P* = 0.002, empirical *P* = 0.004)

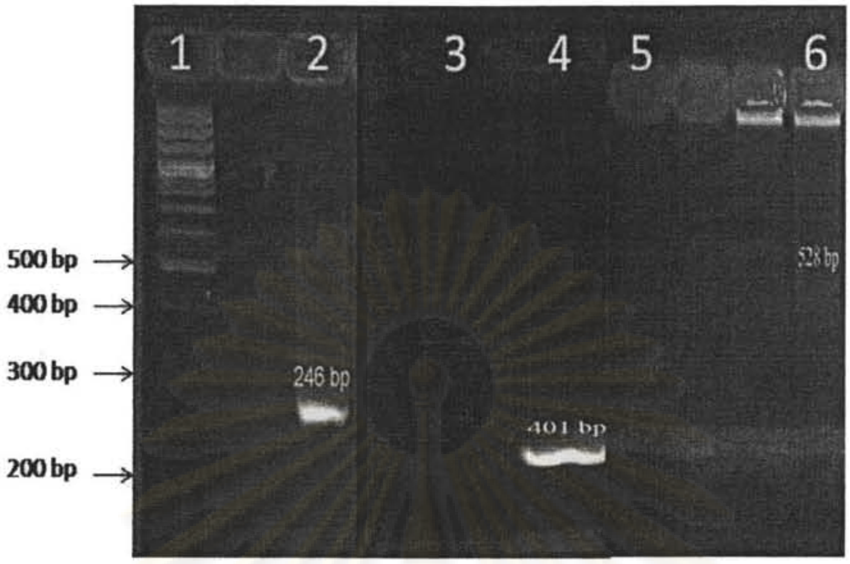
3. <u>ส่วนที่ 3</u> ผลการศึกษาบทบาทของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93 T/C และ ขนาดที่แตกต่างกันของโปรโมเตอร์ ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE ในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์

3.1 ผลการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับการโคลน ด้วยปฏิกิริยา PCR

ผลการเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ณ ตำแหน่ง -93 T/C ด้วยเทคนิค PCR คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการเลือกตัวอย่างดีเอ็นเอของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี 1 ราย ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93T/C แบบจีโนไทป์ชนิด T/C โดยใช้เอนไซม์ *Hin*fI เป็นตัวตรวจสอบจีโนไทป์ ดังภาพที่ 4.6 แถวที่ 5

สำหรับผลการเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ที่มีขนาดแตกต่างกันของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์ ด้วยเทคนิค PCR ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอมีขนาดดังนี้ 246, 401 และ 528 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.7 : แสดงผลการเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์ ด้วยเทคนิค PCR โดยแถวที่ 1, 3, 5 เป็น 100 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบสกำกับไว้ แถวที่ 2, 4, 6 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอมีขนาดดังนี้ 246, 401 และ 528 คู่เบสตามลำดับ

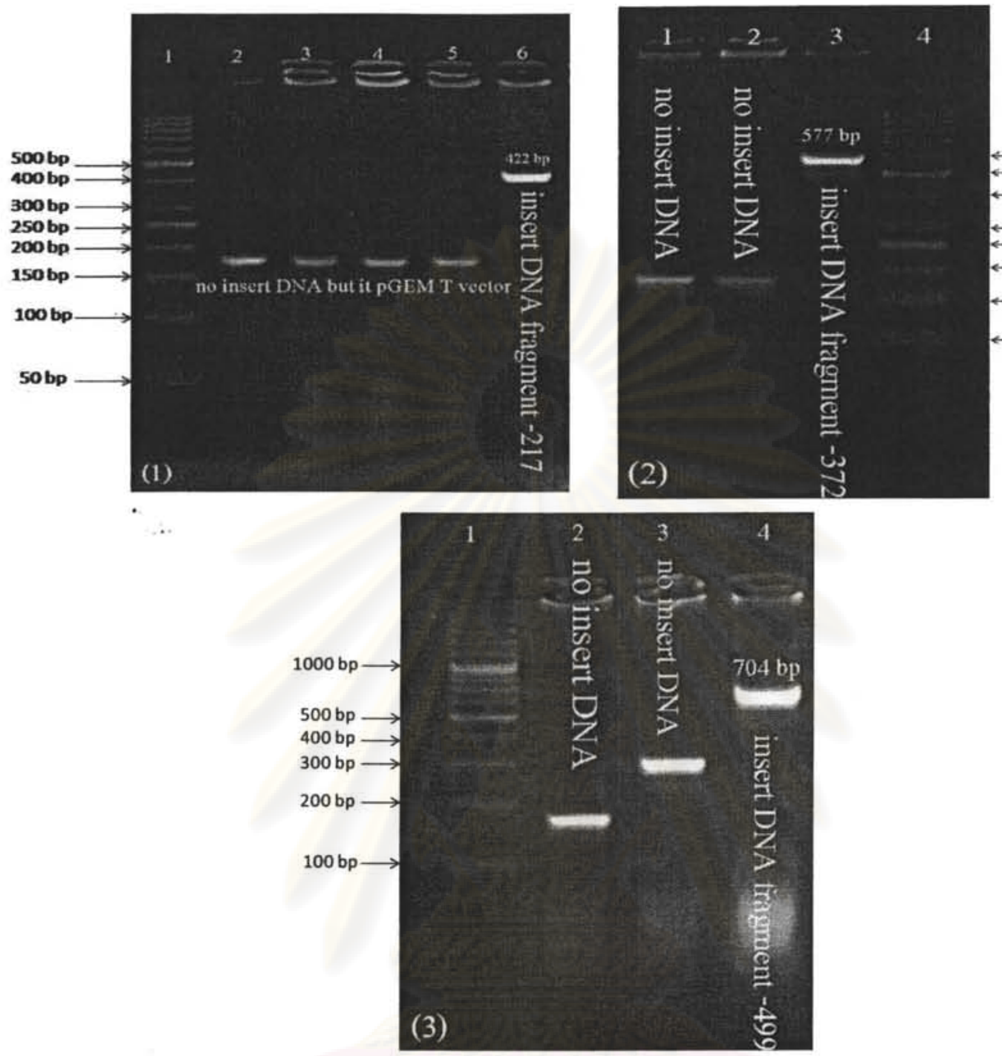
3.2. ผลการตรวจสอบโคลน (Colony Screening) ด้วยเทคนิค Colony-PCR

หลังจากสร้างดีเอ็นเอพลาสมิดและทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียแล้ว จะต้องทำการเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อที่มีโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เราต้องการ ด้วยเทคนิค Colony-PCR เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการนั้นมาศึกษา promoter activity ของยีน ACE ต่อไป

3.2.1 ผลตรวจสอบการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอกับ pGEM®-T Easy Vector (Promega) ด้วยเทคนิค Colony-PCR

ผลที่ได้จากการทำ Colony-PCR จากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 246, 401 และ 528 คู่เบสกับ pGEM®-T Easy Vector ที่มีดีเอ็นเอขนาด 176 คู่เบส ดังนั้นแถบของดีเอ็นเอบนเจลที่ได้จากการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกต้องจะมีขนาดประมาณ 422, 577 และ 704 คู่เบส แสดงดังภาพที่ 4.8 (1, 2, 3)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.8 : แสดงผลที่ได้จากการทำ Colony-PCR จากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 246, 401 และ 528 คู่เบสกับ pGEM®-T Easy Vector ที่มีดีเอ็นเอขนาด 176 คู่เบส (1). แถวที่ 1 เป็น 100 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบส กำกับไว้, แถวที่ 2-5 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ pGEM®-T Easy Vector ที่มีขนาด 176 คู่เบส และแถวที่ 6 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้โคลนอย่างถูกต้องซึ่งมีขนาดประมาณ 422 คู่เบส (2). แถวที่ 1-2 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ pGEM®-T Easy Vector ที่มีขนาด 176 คู่เบส, แถวที่ 3 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้โคลนอย่างถูกต้องซึ่งมีขนาดประมาณ 577 คู่เบส และแถวที่ 4 เป็น 100 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบส กำกับไว้ (3). แถวที่ 1 เป็น 100 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบส กำกับไว้, แถวที่ 2, 3 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ pGEM®-T Easy Vector ที่มีขนาด 176 คู่เบส และแถวที่ 4 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้โคลนอย่างถูกต้องซึ่งมีขนาดประมาณ 704 คู่เบส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 ตรวจสอบการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอกับ pGL3-Basic Vector **ด้วยเทคนิค** Colony-PCR

ผลที่ได้จากการทำ Colony-PCR จากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 161, 246, 401 และ 528 คู่เบสกับ pGL3-Basic Vector ที่มีดีเอ็นเอขนาด 121 คู่เบส ดังนั้นแถบของดีเอ็นเอบนเจลที่ได้จากการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกต้องจะมีขนาดประมาณ 282, 367, 522 และ 649 คู่เบส แสดงดังภาพที่ 4.9 (1, 2, 3, 4)

ภาพที่ 4.9 : แสดงผลที่ได้จากการทำ Colony-PCR จากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 161, 246, 401 และ 528 คู่เบสกับ pGL3-Basic Vector ที่มีดีเอ็นเอขนาด 121 คู่เบส (1). แถวที่ 1 เป็น 100 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบส กำกับไว้, แถวที่ 2 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ pGL3-Basic

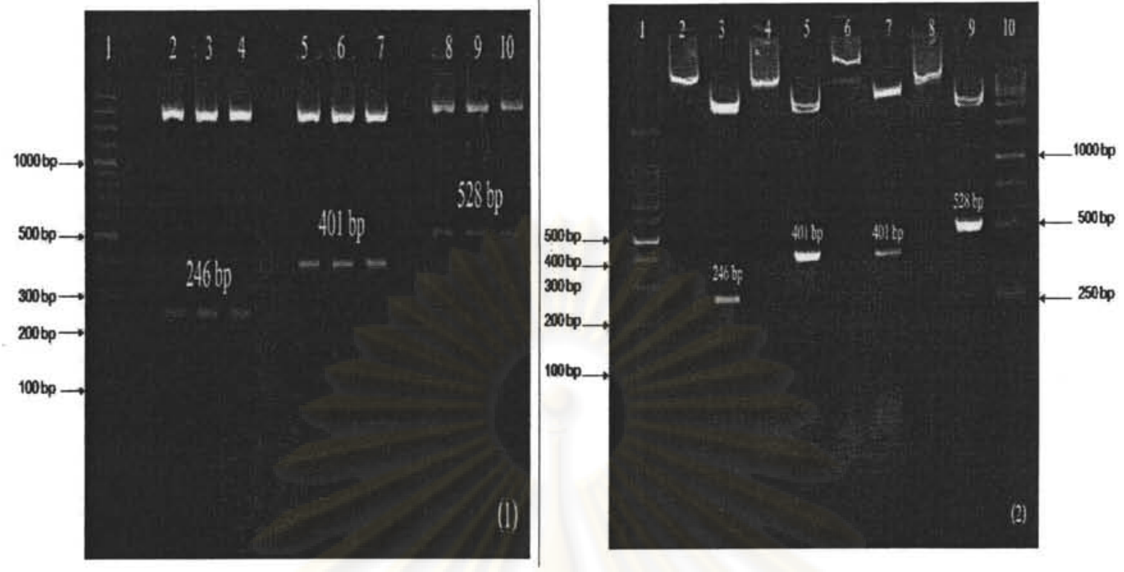
Vector ที่มีดีเอ็นเอขนาด 121 คู่เบส และแถวที่ 4 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้โคลนอย่างถูกต้องซึ่งมีขนาดประมาณ 282 คู่เบส (2). แถวที่ 1 เป็น 100 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบสกำกับไว้, แถวที่ 2-7 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้โคลนอย่างถูกต้องซึ่งมีขนาดประมาณ 367 คู่เบส และแถวที่ 8 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ pGL3-Basic Vector ที่มีดีเอ็นเอขนาด 121 คู่เบส (3). แถวที่ 1 เป็น 100 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบส กำกับไว้, แถวที่ 2-9 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้โคลนอย่างถูกต้องซึ่งมีขนาดประมาณ 522 คู่เบส และแถวที่ 11 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ pGL3-Basic Vector ที่มีดีเอ็นเอขนาด 121 คู่เบส (4). แถวที่ 1 เป็น 100 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบส กำกับไว้, แถวที่ 2-7 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้โคลนอย่างถูกต้องซึ่งมีขนาดประมาณ 649 คู่เบส และแถวที่ 8 เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ pGL3-Basic Vector ที่มีดีเอ็นเอขนาด 121 คู่เบส

3.3 ผลการตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ RFLP

3.3.1 ผลการตรวจสอบพลาสมิด phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc, phACE(-499)Luc , phACE(-93T)Luc และ phACE(-93C)Luc ด้วยเทคนิค RFLP

ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการนั้น เนื่องจากดีเอ็นเอพลาสมิดที่ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เกิดจากเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ pGEM®-T Easy Vector และ pGL3-Basic Vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I (NEB) และ *Hin*dIII (NEB) ดังนั้นในการตรวจสอบจึงใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ หากพลาสมิดนั้นมีชิ้นส่วนที่ต้องการศึกษาอยู่ แถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลจะมีทั้งแถบของ pGEM®-T Easy Vector ขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส pGL3-Basic Vector ขนาดประมาณ 4,800 คู่เบส กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 246, 401 และ 528 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์ที่มีขนาดแตกต่างกัน แสดงดังภาพที่ 4.10(1,2)

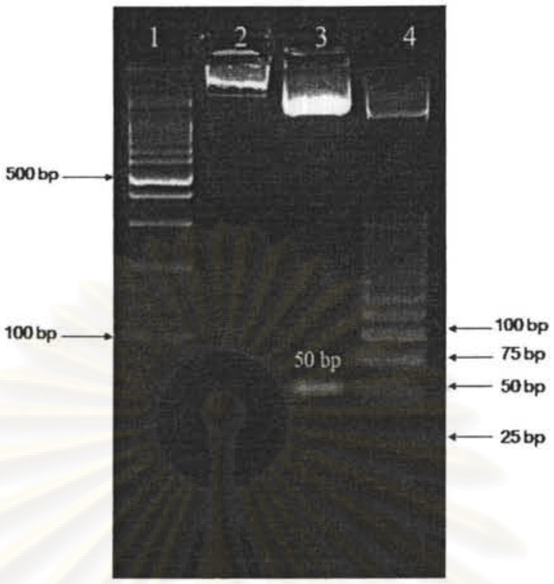
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.10 : แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิด phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc, phACE(-499)Luc , phACE(-93T)Luc และ phACE(-93C)Luc ที่สกัดได้ด้วยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP) (1). แถวที่ 1 เป็น 100 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบส กำกับไว้ แถวที่ 2-4, 5-7 และ8-10 เป็นแถบของดีเอ็นเอที่เป็นแถบของ pGEM®-T Easy Vector ขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 246, 401 และ 528 คู่เบส ตามลำดับ (2). แถวที่ 1 เป็น 100 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบส กำกับไว้ แถวที่ 2, 4, 6 และ8 เป็นแถบของดีเอ็นเอพลาสมิดที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แถวที่ 3, 5, 7 และ 9 เป็นแถบของดีเอ็นเอที่เป็นแถบของ pGL3-Basic Vector ขนาดประมาณ 4,800 คู่เบส กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 246, 401, 401 และ 528 คู่เบส ตามลำดับ

3.3.2 ผลการตรวจสอบพลาสมิด phACE(-132)Luc ด้วยเทคนิค RFLP

ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการของโคลน เนื่องจากดีเอ็นเอพลาสมิด phACE(-132)Luc ที่ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เกิดจากตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ phACE(-372)Luc บางส่วนออกไปและเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหลือกลับเหมือนเดิม ดังนั้นในการตรวจสอบจึงใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดดีเอ็นเอพลาสมิด phACE(-132)Luc ให้ได้รูปแบบที่กำหนด (ในการทดลองนี้จะใช้เอนไซม์ *Sac*II (Fermentas) และ *Hin*dIII (Fermentas) หากพลาสมิดนั้นมีชิ้นส่วนที่ต้องการศึกษาอยู่ แถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลจะมีทั้งแถบของ pGL3-Basic Vector ขนาดประมาณ 4,800 คู่เบส กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 50 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของยีน ACE บริเวณโปรโมเตอร์ แสดงดังภาพที่ 4.11

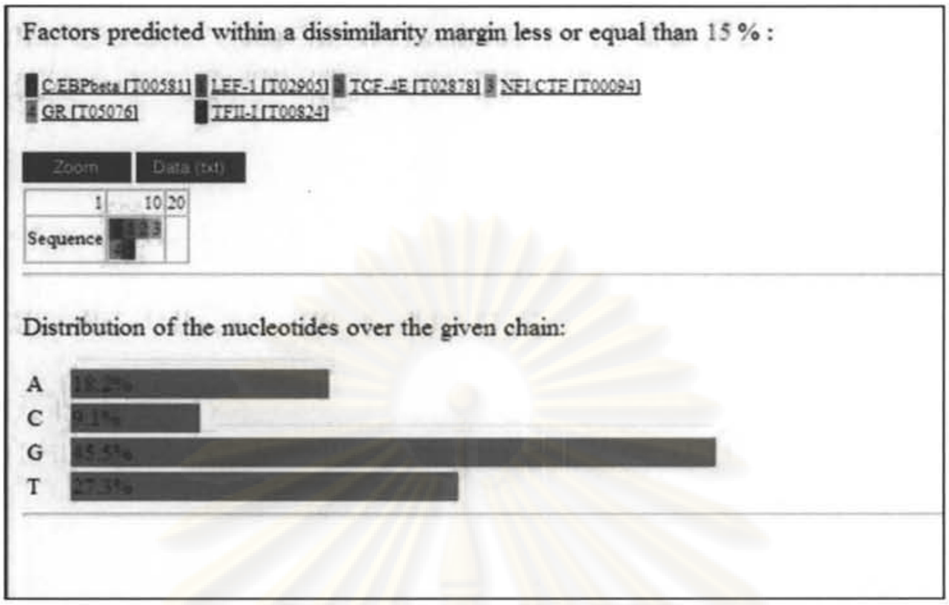


ภาพที่ 4.11 : แสดงผลการตรวจสอบพลาสมิด phACE(-132)Luc ที่สกัดได้ด้วยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP) แถวที่ 1 เป็น 100 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบส กำกับไว้, แถวที่ 2 เป็นแถบของดีเอ็นเอพลาสมิดที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, แถวที่ 3 เป็นแถบของดีเอ็นเอที่เป็นแถบของ pGL3-Basic Vector ขนาดประมาณ 4,800 คู่เบส กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 50 คู่เบส และแถวที่ 4 เป็น 25 bp DNA marker แสดงขนาดของคู่เบสกำกับไว้

3.4 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิด phACE(-132)Luc, phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc, phACE(-499)Luc , phACE(-93T)Luc และ phACE(-93C)Luc ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบส

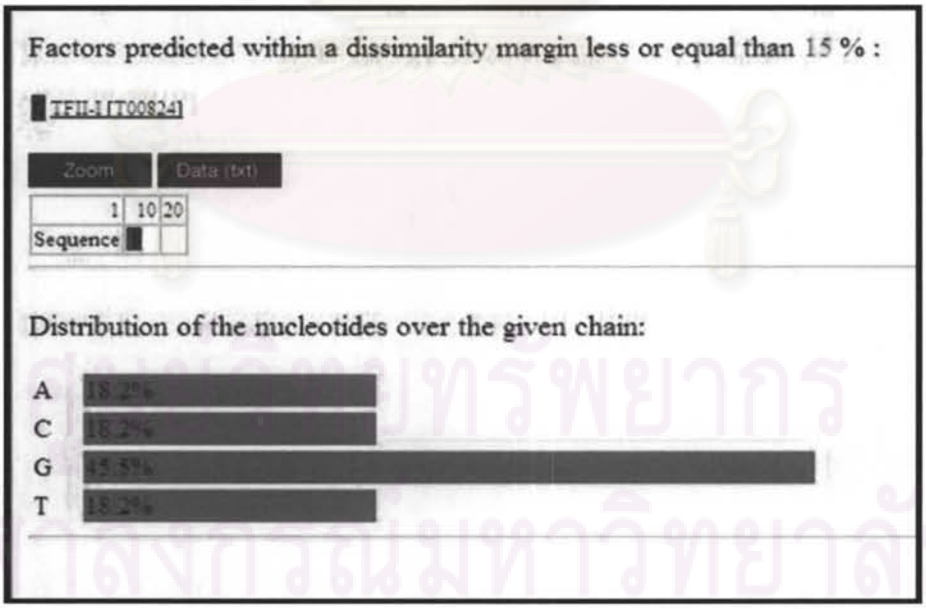
ผลการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอพลาสมิด phACE(-132)Luc, phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc, phACE(-499)Luc , phACE(-93T)Luc และ phACE(-93C)Luc ที่โคลนได้และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน ACE ใน GenBank accession No. EU332840 ด้วยวิธี Jotan Hein Method ในโปรแกรม MegAlign ของบริษัท DNASTAR ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีความคล้ายกันของลำดับเบสอยู่ประมาณ 90.2, 95.8, 94.6, 97.2, 95.5 และ 94.6 % ตามลำดับ

สำหรับผลการศึกษา Transcription Factor ในลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93T/C ด้วยโปรแกรม PROMO 3.0 version 8.3 (http://alggen.lsi.upc.es/recerca/menu_recerca.html) พบว่ามี Transcription Factor ของมนุษย์ ที่มีจำเพาะสูงกับลำดับเบส -93T ทั้งหมด 6 ตัว ได้แก่ C/EBPbeta, LEF-1, TCF-4E, NFI/CTF, GR และ TFII-I ดังแสดงในภาพที่ 4.12



ภาพที่ 4.12 : แสดงผลการวิเคราะห์ Transcription Factor บริเวณที่มีลำดับเบส -93T ด้วยโปรแกรม PROMO 3.0

และสำหรับผลการศึกษา Transcription Factor ของมนุษย์ ที่มีจำเพาะสูงกับลำดับเบส -93C ทั้งหมด 1 ตัว ได้แก่ TFII-I ดังแสดงในรูปที่ 4.13



ภาพที่ 4.13 : แสดงผลการวิเคราะห์ Transcription Factor บริเวณที่มีลำดับเบส -93C ด้วยโปรแกรม PROMO 3.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

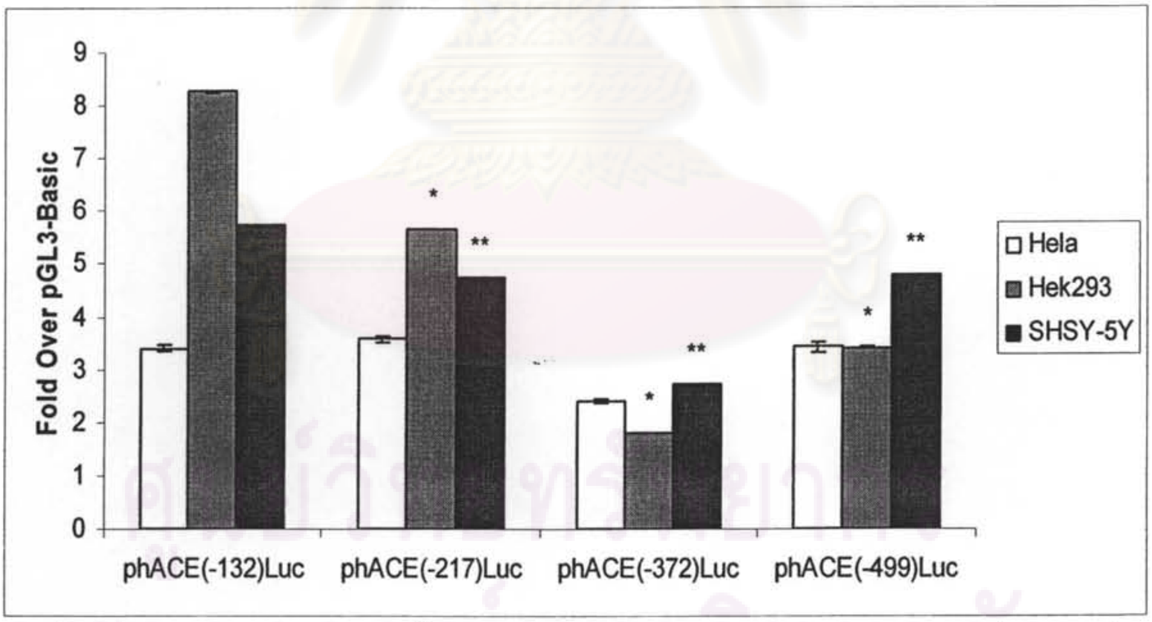
3.5 ผลการคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการทดลอง

ในการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน ACE โดยใช้ยีน β-actin เป็นตัวควบคุม ในเซลล์เพาะเลี้ยง เซลล์ Jurkat, เซลล์ K562, เซลล์ HeLa, เซลล์ HaCaT, เซลล์ HEK 293 และเซลล์ SH-SY5Y เพื่อตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน ACE ผลการศึกษาที่ได้แสดงในตารางที่ 4.1

จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ได้ คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้เซลล์ HEK 293 และเซลล์ SH-SY5Y ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีแหล่งกำเนิดจากเซลล์ไต และเซลล์ประสาทของมนุษย์ตามลำดับ เป็นตัวแทนของเซลล์ที่เหมาะสมเป็นตัวแทนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน ACE (positive) เพื่อใช้ในการศึกษา promoter activity ของยีน ACE ในการทดลองต่อไป และในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้เซลล์ HeLa เป็นตัวแทนของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน ACE (negative)

3.6 ผลการศึกษา promoter activity ของยีน ACE

3.6.1 ผลการศึกษา promoter activity ของยีน ACE ที่มีขนาดของโปรโมเตอร์ของยีน ACE ที่แตกต่างกัน (phACE(-132)Luc, phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc และ phACE(-499)Luc)ในเซลล์ HEK 293, เซลล์ SH-SY5Y และเซลล์ HeLa เป็นดังภาพที่ 4.14



ภาพที่ 4.14 : promoter activity ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ promoter ของยีน ACE ที่มีขนาดที่แตกต่างกันในเซลล์ HEK 293, เซลล์ SH-SY5Y และเซลล์ HeLa ซึ่งแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ พลาสมิด pGL3-Basic จะถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์พร้อมกับพลาสมิดร่วม pRL-CMV โดยค่า firefly luciferase activities ของแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจะถูกเทียบเป็นอัตราส่วนกับ *Renilla* luciferase activities และนำมาคำนวณเป็นจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicates)

และแสดงค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ในแต่ละแท่งกราฟ *$P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าของ phACE(-132)Luc ในเซลล์ HEK 293 ด้วยสถิติ t-test, **$P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าของ phACE(-132)Luc ในเซลล์ SH-SY5Y ด้วยสถิติ t-test

โดยพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละขนาดของโปรโมเตอร์ที่แตกต่างกันในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด จากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicates) แสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 : แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละขนาดของโปรโมเตอร์ที่แตกต่างกันในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด

เซลล์ ดีเอ็นเอพลาสมิด	HEK 293	SH-SY5Y	HeLa
phACE(-132)Luc	8.2664	5.7151	3.3985
phACE(-217)Luc	5.6617	4.7459	3.5676
phACE(-372)Luc	1.7911	2.6922	2.3845
phACE(-499)Luc	3.3951	4.7740	3.4112

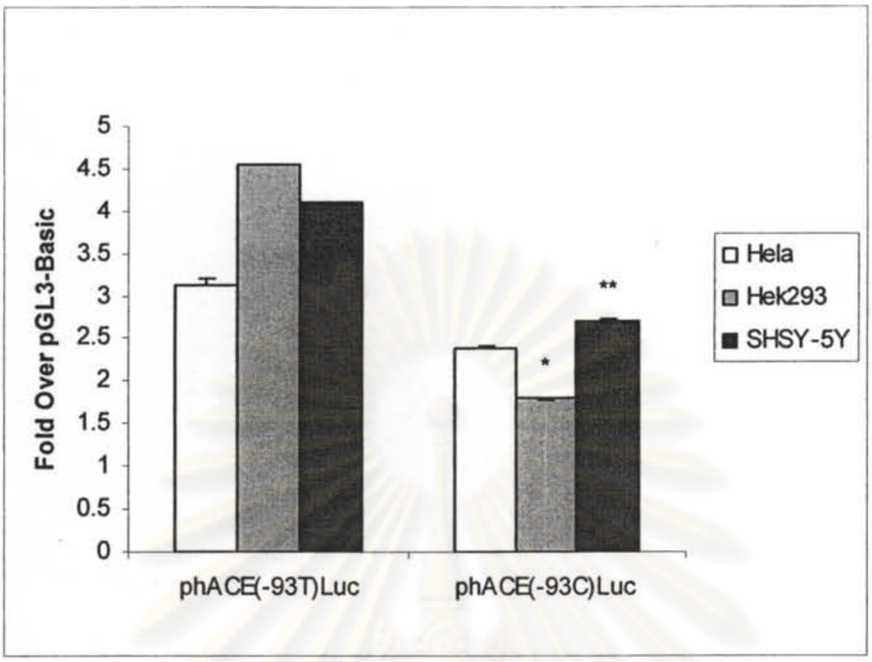
เมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณสถิติ *t*-test เพื่อเปรียบเทียบกันในเซลล์ HEK 293 พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ phACE(-132)Luc มากกว่าของ phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc และphACE(-499)Luc) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.047, 0.002 และ 0.008 ตามลำดับ)

เมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณสถิติ *t*-test เพื่อเปรียบเทียบกันในเซลล์ SH-ST5Y พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ phACE(-132)Luc มากกว่าของ phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc และphACE(-499)Luc) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.014, 0.001 และ 0.044 ตามลำดับ)

เมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณสถิติ *t*-test เพื่อเปรียบเทียบกันในเซลล์ HeLa พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ phACE(-132)Luc, phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc และphACE(-499)Luc) นั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.795, 0.122 และ 0.989 ตามลำดับ)

3.6.2 ผลการศึกษา promoter activity ของยีน ACE ที่มีความหลากหลายของยีน ณ ตำแหน่ง -93 แบบอัลลีล T (phACE(-93T)Luc) และอัลลีล C (phACE(-93C)Luc) ในเซลล์ HEK 293, เซลล์ SH-SY5Y และเซลล์ HeLa เป็นดังภาพที่ 4.15

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.15 : promoter activity ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ promoter ของยีน ACE ที่มีความหลากหลายของยีน ณ ตำแหน่ง -93 แบบอัลลีล T (phACE(-93T)Luc) และอัลลีล C (phACE(-93C)Luc) ในเซลล์ HEK 293, เซลล์ SH-SY5Y และเซลล์ HeLa ซึ่งแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ พลาสมิด pGL3-Basic จะถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์พร้อมกับพลาสมิดร่วม pRL-CMV โดยค่า firefly luciferase activities ของแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจะถูกเทียบเป็นอัตราส่วนกับ *Renilla* luciferase activities และนำมาคำนวณเป็นจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicates) และแสดงค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ในแต่ละแท่งกราฟ $*P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าของ phACE(-93T)Luc ในเซลล์ HEK 293 ด้วยสถิติ *t*-test, $**P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าของ phACE(-93T)Luc ในเซลล์ SH-SY5Y ด้วยสถิติ *t*-test

โดยพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละขนาดของโปรโมเตอร์ที่แตกต่างกันในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด จากการทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicates) แสดงดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 : แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ control (Fold over pGL3-Basic) ที่ได้ของแต่ละขนาดของโปรโมเตอร์ที่แตกต่างกันในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด

เซลล์ ดีเอ็นเอพลาสมิด	HEK 293	SH-SY5Y	HeLa
phACE(-93T)Luc	4.5415	4.0936	3.1342
phACE(-93C)Luc	1.7911	2.6922	2.3845

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณสถิติ *t*-test เพื่อเปรียบเทียบกันในเซลล์ HEK 293 พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ phACE(-93T)Luc มากกว่าของ phACE(-93C)Luc อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.001$)

เมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณสถิติ *t*-test เพื่อเปรียบเทียบกันในเซลล์ SH-SY5Y พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ phACE(-93T)Luc มากกว่าของ phACE(-93C)Luc อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.013$)

เมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณสถิติ *t*-test เพื่อเปรียบเทียบกันในเซลล์ HeLa พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเท่าของ phACE(-93T)Luc และ phACE(-93C)Luc นั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.228$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษากลไกระดับเหนือพันธุกรรมของยีน ACE พบว่า รูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง $C^{m}CWGG$ ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -122 บนโปรโมเตอร์ จากดีเอ็นเอของเซลล์ Jurkat, เซลล์ K562, เซลล์ HeLa, เซลล์ HaCaT, เซลล์ HEK 293 และเซลล์ SH-SY5Y เป็นตำแหน่งที่ไม่เกิด DNA methylation เพราะฉะนั้นการแสดงออกของยีน ACE ไม่ได้เกี่ยวข้องกับ DNA methylation ในตำแหน่ง -122 บนโปรโมเตอร์ แต่รูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง $C^{m}CWGG$ ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -316 บนโปรโมเตอร์ นั้นอาจจะมีผลต่อการแสดงออกของยีน ACE ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิด เนื่องจากเปอร์เซนต์การเกิด DNA methylation และระดับการแสดงออกของยีน ACE ของแต่ละเซลล์นั้นมีความสัมพันธ์กัน หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งได้ว่า การเกิด hypermethylation ที่ตำแหน่ง -316 บนโปรโมเตอร์ของยีน ACE อาจจะทำให้การแสดงออกของยีนนั้นลดลงได้ ทั้งนี้การแสดงออกของยีนอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆร่วมด้วย

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ของ SNP rs4291 ณ ตำแหน่ง -240 A/T ในบริเวณโปรโมเตอร์และโรคซึมเศร้าในคนไทย พบว่า เปอร์เซนต์ของความถี่จีโนไทป์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงว่า การพบจีโนไทป์ TT อาจสัมพันธ์กับการเกิดโรคซึมเศร้าในคนไทยได้ แต่ทั้งนี้การเกิดโรคซึมเศร้าไม่ได้เกิดจากสาเหตุทางพันธุกรรมอย่างเดียวอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆร่วมด้วย

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ของ SNP rs4292 ณ ตำแหน่ง -93T/C ในบริเวณโปรโมเตอร์และโรคซึมเศร้าในคนไทย พบว่า เปอร์เซนต์ของความถี่จีโนไทป์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แสดงว่า การพบจีโนไทป์ CC ไม่ได้สัมพันธ์กับการเกิดโรคซึมเศร้าในคนไทย

ผลการคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการทดลองโดยดูผลจากการแสดงออกของยีน คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้เซลล์ HEK 293 และเซลล์ SH-SY5Y ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีแหล่งกำเนิดจากเซลล์ไต และเซลล์ประสาทของมนุษย์ตามลำดับ เป็นตัวแทนของเซลล์ที่เหมาะสมเป็นตัวแทนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน ACE เพื่อใช้ในการศึกษา promoter activity ของ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยีน ACE ในการทดลองต่อไป และในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้เซลล์ HeLa เป็นตัวแทนของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน ACE

ผลการศึกษา Promoter activity ของยีน ACE ที่มีขนาดของโปรโมเตอร์ของยีน ACE ที่แตกต่างกันในเซลล์ HEK 293, เซลล์ SH-SY5Y และเซลล์ HeLa พบว่า phACE(-132)Luc มีการแสดงออกสูงกว่าโปรโมเตอร์ที่มีขนาดยาว ในเซลล์ SH-SY5Y และเซลล์ HEK 293 อาจเรียกได้ว่า ณ ตำแหน่ง -132 บนโปรโมเตอร์ของยีน ACE เป็น core promoter ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน ACE

ผลการศึกษา Promoter activity ของยีน ACE ที่มีความหลากหลายของยีน ณ ตำแหน่ง -93 แบบอัลลีล T (phACE(-93T)Luc) และอัลลีล C (phACE(-93C)Luc) ในเซลล์ HEK 293, เซลล์ SH-SY5Y และเซลล์ HeLa พบว่า phACE(-93T)Luc มีการแสดงออกที่สูงกว่า phACE(-93C)Luc ประมาณ 2 และ 4 เท่า ในเซลล์ SH-SY5Y และเซลล์ HEK 293 ตามลำดับ

อภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษากลไกระดับเหนือพันธุกรรมกับการแสดงออกของยีน ACE คณะผู้วิจัยได้พบว่ารูปแบบการเกิด DNA methylation ณ ตำแหน่ง $C^{m}CWGG$ ของยีน ACE ที่ตำแหน่ง -316 บนโปรโมเตอร์น่าจะส่งผลต่อการแสดงออกของยีน ACE ซึ่งการค้นพบนี้อาจนำไปสู่การรักษาโรคทางจิตเวช และโรคทางระบบประสาทได้ เช่นเดียวกับที่มีการศึกษากลไกระดับเหนือพันธุกรรมในยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง[51, 69] เพื่อการรักษาโรคมะเร็งที่เป็นที่นิยมกันในปัจจุบันนี้ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษากลไกระดับเหนือพันธุกรรมควรศึกษาโปรโมเตอร์ของยีนที่ต้องการศึกษาแบบครอบคลุมให้ได้มากที่สุดด้วยวิธี Bisulfite genomic sequencing[70] เพื่อที่จะสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด DNA methylation และระดับการแสดงออกของยีน ACE ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

ผลการศึกษา Transcription Factor ในลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -240A/T ด้วยโปรแกรม PROMO 3.0 version 8.3 พบว่ามี Transcription Factor ของมนุษย์ ที่มีจำเพาะสูงกับลำดับเบส -240A ทั้งหมด 3 ตัว ได้แก่ C/EBPbeta, GR และ TFIID สำหรับผลการศึกษา Transcription Factor ของมนุษย์ ที่มีความจำเพาะสูงกับลำดับเบส -240T ทั้งหมด 1 ตัว ได้แก่ TFIID ซึ่งบทบาทหรือความสำคัญของ Transcription Factor นี้ยังคงต้องศึกษาต่อไป โดยอาจใช้เทคนิค Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) ในการตรวจสอบว่ามีการจับกันของ Transcription Factor เหล่านี้ในบริเวณลำดับเบสของดีเอ็นเอหรือไม่อย่างไร

ผลการศึกษา Transcription Factor ในลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของยีน ACE ณ ตำแหน่ง -93T/C ด้วยโปรแกรม PROMO 3.0 version 8.3 พบว่ามี Transcription Factor ของมนุษย์ ที่มีจำเพาะสูงกับลำดับเบส -93T ทั้งหมด 6 ตัว ได้แก่ C/EBPbeta, LEF-1, TCF-4E, NFI/CTF, GR และ TFII-I และสำหรับผลการศึกษา Transcription Factor ของมนุษย์ ที่มีจำเพาะสูงกับลำดับเบส -93C ทั้งหมด 1 ตัว ได้แก่ TFII-I ซึ่งบทบาทหรือความสำคัญของ Transcription Factor นี้ยังคงต้องศึกษาต่อไป โดยอาจใช้เทคนิค EMSA ในการตรวจสอบว่ามีการจับกันของ Transcription Factor เหล่านี้ในบริเวณลำดับเบสของดีเอ็นเอหรือไม่ อย่างไร

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE ของ SNP rs4291 ณ ตำแหน่ง -240 A/T ในบริเวณโปรโมเตอร์และโรคซึมเศร้าในคนไทยว่าเปอร์เซนต์ของความถี่จีโนไทป์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงว่า การพบจีโนไทป์ TT อาจสัมพันธ์กับการเกิดโรคซึมเศร้าในคนไทยได้ เช่นเดียวกับผลการวิจัยของชาวเยอรมัน[21]

เมื่อการเปรียบเทียบความถี่อัลลีลของแต่ละเชื้อชาติ (แสดงดังตารางที่ 5.1) พบว่าความถี่อัลลีลของ SNP -240A/T ในเชื้อชาติไทยมีความเหมือนกันกับความถี่อัลลีลของเชื้อชาติได้หวัน เนื่องจากเป็นประเทศในกลุ่มเอเชียเหมือนกัน แต่มีความแตกต่างกันกับเชื้อชาติยุโรป และ เชื้อชาติอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.001$) ส่วน -93T/C ความถี่อัลลีลของ SNP -93T/C ในเชื้อชาติไทยมีความแตกต่างกันกับเชื้อชาติยุโรป และ เชื้อชาติอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.015$) ดังนั้นความแตกต่างของเชื้อชาติอาจทำให้พบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ต่างๆและการเกิดโรคกับที่แตกต่างกันได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 : แสดงความถี่อัลลีล SNPs -240A/T และ -93T/C ในกลุ่มคนปกติของแต่ละเชื้อชาติ

กลุ่มเชื้อชาติ (อ้างอิง)	จำนวน (ราย)	ความถี่อัลลีล (%)			
		-240A	-240T	-93T	-93C
กลุ่มที่ 1 : Europe descent					
UK[71]	1104	60.0	40.0	NA	NA
UK[57]	258	63.0	37.0	63.1	36.9
German[21]	603	64.4	35.6	NA	NA
Caucasian**	200	NA	NA	63.0	37.0
	198	62.6	37.4	NA	NA
กลุ่มที่ 2 : Asian descent					
Taiwanese[68]	159	81.8	18.2	NA	NA
Thai (การศึกษาครั้งนี้)	207	78.3	21.7	71.0	29.0
กลุ่มที่ 3 : อื่นๆ					
Tunisian[72]	100	66.0	34.0	NA	NA
African American**	200	NA	NA	87.0	13.0
	192	62.0	38.0	NA	NA
P-value*		0.001	0.001	0.015	0.015

<u>หมายเหตุ</u> NA = Not available; **P*-value < 0.05 ANOVA (Analysis of variation); **อ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI SNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/)

การตรวจหาจีโนไทป์ในแต่ละครั้งจะต้องมีความระมัดระวังอย่างมากในการวิเคราะห์ และออกผลจีโนไทป์ เนื่องจากการอ่านผลที่ผิดพลาดอาจทำให้ข้อมูลในการแปลผลผิดไปได้ และเมื่อเร็วๆนี้คณะผู้วิจัยได้ตรวจพบการหาจีโนไทป์ที่ผิดพลาดใน SNP -48A/G ของยีน Dopamine receptor D1[73]

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ นั้นพบว่านอกจากที่เคยมีการรายงานการแสดงออกของ ACE ในเซลล์ชนิดต่างๆ เช่น เซลล์ไต[29] เซลล์เม็ดเลือดขาว[74] และเซลล์รก[75] เป็นต้นแล้ว จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกของ ACE ในเซลล์ประสาท (SH-SY5Y) เซลล์เม็ดเลือดชนิด T-cell Lymphocyte (Jurkat) อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีการแสดงออกของ ACE ในเซลล์ผิวหนัง (HaCaT) และเซลล์ปากมดลูก (HeLa) ซึ่ง

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจึงเลือกที่จะใช้เซลล์ HEK 293 และเซลล์ SH-SY5Yมาเป็นตัวแทนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน ACE และเหมาะสมในการศึกษา promoter activity ของยีน ACE ที่มีขนาดของโปรโมเตอร์แตกต่างกัน และ ที่มีความหลากหลายของยีน ณ ตำแหน่ง -93 แบบอัลลีล T และอัลลีล C ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้เซลล์ HeLa เป็นตัวแทนของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน ACE ทำให้ทราบว่าผลที่เกิดขึ้นจำเพาะกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน ACE เท่านั้น

จากการศึกษาที่ผ่านมามักมุ่งเน้นไปที่การศึกษาในเซลล์ไต[29] เป็นต้นแบบ (model) หลัก เพื่อศึกษาถึง promoter activity ของความหลากหลายของยีน ACE แต่การรายงานถึงเซลล์ประสาทนั้นยังมีการศึกษาอยู่ค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะในเรื่องของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ACE แบบ SNP -93T/C ยังไม่มีการศึกษาเลย ถึงแม้ว่า ACE จะมีบทบาทสำคัญในการควบคุมระดับของ dopamine ของระบบประสาทก็ตาม ทำให้คณะผู้วิจัยเลือกที่จะใช้เซลล์จากระบบประสาทในการศึกษาครั้งนี้

ผลการศึกษา promoter activity ของยีน ACE ที่มีขนาดของโปรโมเตอร์แตกต่างกันในเซลล์ HEK 293, เซลล์ SH-SY5Y และ เซลล์ HeLa ซึ่งพบว่า basal activity ของ phACE(-132)Luc มากกว่าของ phACE(-217)Luc, phACE(-372)Luc และ phACE(-499)Luc ประมาณ 1.6, 8 และ 2.6 เท่าในเซลล์ HEK 293 และประมาณ 1.2, 2.2 และ 1.2 เท่าในเซลล์ SH-SY5Y ส่วนในเซลล์ HeLa เป็นเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน ACE จึงทำให้ activity ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าผลที่เกิดขึ้นจำเพาะกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน ACE เท่านั้น ซึ่งคล้ายคลึงกับกับผลการศึกษาในเซลล์ชนิดอื่น ได้แก่ การศึกษาของ Patrice Testut และคณะ[28] ในปี 1993 ที่รายงานว่า basal activity ของ pACE(-132)CAT มากกว่าของ pACE(-343)CAT, pACE(-472)CAT และ pACE(-754)CAT ประมาณ 5, 1 และ 3.9 เท่าในเซลล์ Tera-1 (Teratocarcinoma cell line)

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบองค์ความรู้ใหม่ถึงผลการศึกษา Promoter activity ของยีน ACE ที่มีความหลากหลายของยีน ณ ตำแหน่ง -93 แบบอัลลีล T และอัลลีล C ในเซลล์ HEK 293, เซลล์ SH-SY5Y และเซลล์ HeLa ซึ่งพบว่า basal activity ของอัลลีล T มีการแสดงออกที่สูงกว่าอัลลีล C ประมาณ 2 และ4 เท่า ในเซลล์ SH-SY5Y และ เซลล์ HEK 293 ตามลำดับ ส่วนในเซลล์ HeLa เป็นเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน ACE จึงทำให้ activity ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าผลที่เกิดขึ้นจำเพาะกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน ACE เท่านั้น

ในการศึกษา promoter activity ของยีน ACE ของงานวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการตรวจวัด promoter activity ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า luciferase reporter gene assay โดยตรวจวัด

promoter activity จากการแสดงออกของยีน luciferase reporter ซึ่งค่าที่ได้จะบ่งบอกถึง activity ขนาดของโปรโมเตอร์แตกต่างกัน และความหลากหลายของยีน ณ ตำแหน่ง -93 แต่ละอัลลีล ในการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบด้วยเทคนิคนี้อาจจะคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้ เพราะไม่ได้ครอบคลุมถึงวงจรของการควบคุม ในร่างกายมนุษย์ เช่น กลไกการควบคุมย้อนกลับ ทำให้ค่าที่วัดได้นั้นมากกว่าความเป็นจริง แต่การจะตรวจสอบระดับ และการทำงานของ ACE ที่เกิดขึ้นจริงภายในเซลล์โดยที่มีกลไกการควบคุมย้อนกลับด้วยนั้นจำเป็นที่จะต้องเก็บตัวอย่างของเลือดในรูปแบบที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง[57] เพื่อที่จะสามารถตรวจวัดระดับและการทำงานได้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำ แต่ตัวอย่างเลือดที่เก็บจากโรงพยาบาลจิตเวชเลยราชนครินทร์นั้นเป็นการเก็บเลือดในรูปแบบที่มีสารกันเลือดแข็ง จึงไม่สามารถนำมาทำการตรวจวัดได้เนื่องจากสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA เป็นตัวรบกวนการตรวจวัดซึ่งอาจทำให้ได้ค่าที่ผิดพลาด จึงทำให้เกิดข้อจำกัดของงานวิจัยครั้งนี้

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษากลไกระดับเหนือพันธุกรรมควรศึกษาโปรโมเตอร์ของยีนที่ต้องการศึกษาแบบครอบคลุมให้ได้มากที่สุดด้วยวิธี Bisulfite genomic sequencing[70] เพื่อที่จะสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด DNA methylation และระดับการแสดงออกของยีน ACE ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

2. สำหรับผลการศึกษา Transcription Factor ของมนุษย์ ที่มีจำเพาะสูงกับลำดับเบส -240A, -240T, -93T และ -93C ซึ่งบทบาทหรือความสำคัญของ Transcription Factor นี้ยังคงต้องศึกษาต่อไป โดยอาจใช้เทคนิค EMSA ในการตรวจสอบว่ามีการจับกันของ Transcription Factor เหล่านี้ในบริเวณลำดับเบสของดีเอ็นเอหรือไม่ อย่างไร

3. ควรศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNPs ตำแหน่งอื่นๆ ของยีน ACE เพื่อศึกษาบทบาทของยีนนี้ต่อไป

4. การเพิ่มขนาดตัวอย่างในการศึกษาเป็นสิ่งที่สำคัญ เพื่อความน่าเชื่อถือทางสถิติของข้อมูล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

[1] Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. Lancet 367 (May 2006): 1747-57.

[2] สาธารณสุข, กระทรวง. กรมสุขภาพจิต. กรมสุขภาพจิตเผย คนไทย 3 ล้านคนซึมเศร้า. กรมสุขภาพจิต: กรุงเทพธุรกิจ, 2008.

[3] สาธารณสุข, กระทรวง. กรมสุขภาพจิต. รู้จักโรคและยาต้านเศร้า. กรมสุขภาพจิต: DMH Staffs กรมสุขภาพจิต, 2007.

[4] Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. NEUROSCIENCE 8 (May 2007): 355-67.

[5] Jacob Peedicayil. The role of epigenetics in mental disorders. Indian J Med Res 126 (Aug 2007): 105-11.

[6] Philibert R, Madan A, Andersen A, Cadoret R, Packer H, Sandhu H. Serotonin transporter mRNA levels are associated with the methylation of an upstream CpG island. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 144B (2007): 101-5.

[7] Abdolmaleky HM, Cheng KH, Russo A, Smith CL, Faraone SV, Wilcox M, Shafa R, Glatt SJ, Nguyen G, Ponte JF, Thiagalingam S, Tsuang MT. Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 134B (2005): 60-6.

[8] Grayson DR, Jia X, Chen Y, Sharma RP, Mitchell CP, Guidotti A, Costa E. Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. Proc Natl Acad Sci U S A 102 (Jun 2005): 9341-6.

[9] Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. Am J Psychiatry 157 (Oct 2000):1552-62.

[10] Douglas F. Levinson. The genetics of depression: a review. Biol Psychiatry 60 (2006): 84-92.

[11] Kendler KS, Gardner CO, Prescott CA. Toward a comprehensive developmental model for major depression in women. Am J Psychiatry 159 (Jul 2002):1133-45.

[12] Kendler KS, Kuhn JW, Prescott CA. Childhood sexual abuse, stressful life events and risk for major depression in women. Psychol Med 34 (Nov 2004): 1475-82.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[13] Haeffel GJ, Getchell M, Koposov RA, Yrigollen CM, Deyoung CG, Klinteberg BA,Oreland L, Ruchkin VV, Grigorenko EL. Association between polymorphisms in the dopamine transporter gene and depression: evidence for a gene-environment interaction in a sample of juvenile detainees. Psychol Sci 19 (Jun 2008): 62-9.

[14] Jenkins TA, Mendelsohn FA, Chai SY. Angiotensin-converting enzyme modulates dopamine turnover in the striatum. J Neurochem 68 (Mar 1997): 1304-11.

[15] Van den Buuse M, Zheng TW, Walker LL, Denton DA. Angiotensin-converting enzyme (ACE) interacts with dopaminergic mechanisms in the brain to modulate prepulse inhibition in mice. Neurosci Lett 380 (May 2005): 6-11.

[16] Stokes PE, Stoll PM, Koslow SH, Maas JW, Davis JM, Swann AC, Robins E. Pretreatment DST and hypothalamic- pituitary-adrenocortical function in depressed patients and comparison groups. A multicenter study. Arch Gen Psychiatry 41 (Mar 1984): 257-67.

[17] Owens MJ, Nemeroff CB. The role of corticotropinreleasing factor in the pathophysiology of affective and anxiety disorders: laboratory and clinical studies. Ciba Found Symp 172 (1993): 296-308.

[18] Nemeroff CB. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. Mol Psychiatry 1 (Sep 1996): 336–42.

[19] Van Den Eede F, Van den Bossche B, Hulstijn W, Sabbe BG, Cosyns P, Claes SJ. Combined dexamethasone/CRF test in remitted outpatients with recurrent major depressive disorder. J Affect Disord 93 (Jul 2006): 259-63.

[20] Hong CJ, Wang YC, Tsai SJ. Association study of angiotensin I-converting enzyme polymorphism and symptomatology and antidepressant response in major depressive disorders. J Neural Transm 109 (Sep 2002): 1209-14.

[21] TC Baghai, EB Binder, C Schule, D Salyakina, D Eser, S Lucae, P Zwanzger, C Haberger,P Zill, M Ising, T Deiml, M Uhr, T Illig, H-E Wichmann, S Modell, C Nothdurfter, F Holsboer, B Muller-Myhsok, H-J Moller, R Rupprecht and B Bondy. Polymorphisms in the angiotensin-converting enzyme gene are associated with unipolar depression, ACE activity and hypercortisolism. Molecular Psychiatry 11 (Nov 2006): 1003-15.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[22] Saab YB, Gard PR, Yeoman MS, Mfarrej B, El-Moalem H, Ingram MJ. Renin-angiotensin-system gene polymorphisms and depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 31 (Jun 2007): 1113-8.

[23] Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Witteman JC. ACE Polymorphisms. Circ Res 98 (May 2006): 1123-33.

[24] Wickelgren I. Getting the brain's attention. Science 278 (Oct 1997):35-7.

[25] Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. J Biol Chem 266 (Aug 1991): 15377-83.

[26] สมภพ เรืองตระกูล. ตำราจิตเวชศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์, 2545.

[27] Villard E, Tiret L, Visvikis S, Rakotovao R, Cambien F, Soubrier F. Identification of new polymorphisms of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene, and study of their relationship to plasma ACE levels by two-QTL segregation-linkage analysis. Am J Hum Genet 58 (Jun 1996): 1268-78.

[28] Testut P, Soubrier F, Corvol P, Hubert C. Functional analysis of the human somatic angiotensin I-converting enzyme gene promoter. Biochem J 293 (Aug 1993):843-8.

[29] Wang HK, Fung HC, Hsu WC, Wu YR, Lin JC, Ro LS, Chang KH, Hwu FJ, Hsu Y, Huang SY, Lee-Chen GJ, Chen CM. Apolipoprotein E, angiotensin-converting enzyme and kallikrein gene polymorphisms and the risk of Alzheimer's disease and vascular dementia. J Neural Transm 113 (Oct 2006):1499-509.

[30] Sandle GI, Keir MJ, Record CO. The effect of hydrocortisone on the transport of water, sodium, and glucose in the jejunum. Perfusion studies in normal subjects and patients with coeliac disease. Scand J Gastroenterol 16 (1981): 667-71.

[31] Erdös EG, Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. Lab Invest 56 (Apr 1987): 345-8.

[32] Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. Am J Med 115 (Feb 2004): 263-72.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[33] Carluccio M, Soccio M, De Caterina R. Aspects of gene polymorphisms in cardiovascular disease: the renin-angiotensin system. Eur J Clin Invest 31 (Jun 2001): 476-88.

[34] Richard E. Klabunde. Cardiovascular pharmacology concepts http://www.cvpharmacology.com/vasculator/ACE.htm. Richard E. Klabunde, 2008.

[35] Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. J Clin Invest 97 (Apr 1996): 1916-23.

[36] Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. J Biol Chem 268 (May1993): 9496-503.

[37] G.D. Mellick, D.D. Buchanan, S.J. McCann, D.R. Davis, D.G. Le Couteur, D. Chan, A.G. Johnson. The ACE Deletion Polymorphism Is Not Associated with Parkinson's Disease. Eur Neurol 41 (1999): 103-6

[38] Bell CG, Meyre D, Petretto E, Levy-Marchal C, Hercberg S, Charles MA, Boyle C, Weill J, Tauber M, Mein CA, Aitman TJ, Froguel P, Walley AJ. No contribution of angiotensin-converting enzyme (*ACE*) gene variants to severe obesity: a model for comprehensive case/control and quantitative cladistic analysis of *ACE* in human diseases. European Journal of Human Genetics 15 (Mar 2007): 320-7.

[39] El-Dorry HA, Pickett CB, MacGregor JS, Soffer RL. Tissue-specific expression of mRNAs for dipeptidyl carboxypeptidase isoenzymes. Proc Natl Acad Sci U S A 79 (Jul 1982): 4295-7.

[40] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. Circ Res 87 (Sep 2000): E1-9.

[41] Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). Hypertension 30 (Sep 1997): 535-41.

[42] Rella M, Elliot JL, Revett TJ, Lanfear J, Phelan A, Jackson RM, Turner AJ, Hooper NM. Identification and characterisation of the angiotensin converting enzyme-3 (ACE3) gene: a novel mammalian homologue of ACE. BMC Genomics 8 (Jun 2007): 194.

[43] Chuan Yi. The meaning of epigenetics. Article in Chinese 24 (Nov 2002): 734-8.

[44] Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. Nat Rev Cancer 4 (Feb 2004): 143-53.

[45] Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. Nucleic Acids Res 10 (Apr 1982): 2709-21.

[46] Gonzalez-Nicieza R, Turner DP, Connolly BA. DNA binding and cleavage selectivity of the Escherichia coli DNA G:T-mismatch endonuclease (vsr protien). J Mol Biol 310 (2001): 501-8.

[47] Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in Escherichia coli. Nature 274 (Aug 1978):775-80.

[48] Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. Cell 17 (Aug 1979):771-9.

[49] Maier H, Colbert J, Fitzsimmons D, Clark DR, Hagman J. Activation of the early B-cell-specific mb-1 (Ig-alpha) gene by Pax-5 is dependent on an unmethylated Ets binding site. Mol Cell Biol 23 (Mar 2003):1946-60.

[50] Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. Nature 405 (May 2000): 482-5.

[51] Agirre X, Vizmanos JL, Calasanz MJ, García-Delgado M, Larráyoz MJ, Novo FJ. Methylation of CpG dinucleotides and/or CCWGG motifs at the promoter of TP53 correlates with decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients. Oncogene 22 (2003): 1070-2.

[52] Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene

accounting for half the variance of serum enzyme levels. J Clin Invest 86 (Oct 1990): 1343-6.

[53] Kario K, Hoshide S, Umeda Y, Sato Y, Ikeda U, Nishiuma S, Matsuo M, Shimada K. Angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme genotypes, and day and night blood pressures in elderly Japanese hypertensives. Hypertens Res 22 (Jul 1999): 95-103.

[54] Ueda S, Elliott HL, Morton JJ, Connell JM. Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. Hypertension 25 (Jun 1995): 1266 -9.

[55] Levy D, DeStefano AL, Larson MG, O'Donnell CJ, Lifton RP, Gavras H, Cupples AC, Myers RH. Evidence for a gene influencing blood pressure on chromosome 17: genome scan linkage results for longitudinal blood pressure phenotypes in subjects from The Framingham Heart Study. Hypertension 36 (Oct 2000): 477–83.

[56] Zhu X, Bouzekri N, Southam L, Cooper RS, Adeyemo A, McKenzie CA, Luke A, Chen G, Elston RC, Ward R. Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. Am J Hum Genet 68 (May 2001): 1139-48.

[57] Foy CA, Rice GI, Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Grant PJ. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms in patients characterised by coronary angiography. Hum Genet 100 (Sep 1997): 420-5.

[58] Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. Nature 359 (1992): 641-4.

[59] Hu J, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H. Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. J Biol Chem 276 (Dec 2001): 47863- 8.

[60] Kehoe PG, Katzov H, Andreasen N, Gatz M, Wilcock GK, Cairns NJ, Palmgren J, de Faire U, Brookes AJ, Pedersen NL, Blennow K, Prince JA. Common variants of

ACE contribute to variable age-at-onset of Alzheimer's disease. Hum Genet 114 (Apr 2004): 478-83.

[61] Kehoe PG, Russ C, McIlory S, Williams H, Holmans P, Holmes C, Liolitsa D, Vahidassr D, Powell J, McGleenon B, Liddell M, Plomin R, Dynan K, Williams N, Neal J, Cairns NJ, Wilcock G, Passmore P, Lovestone S, Williams J, Owen MJ. Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. Nat Genet 21 (Jan 1999): 71-2.

[62] Baghai TC, Schule C, Zwanzger P, Zill P, Ella R, Eser D, Deiml T, Minov C, Rupprecht R, Bondy B. Influence of a functional polymorphism within the angiotensin I-converting enzyme gene on partial sleep deprivation in patients with major depression. Neurosci Lett 339 (Mar 2003): 223-6.

[63] American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fourth edition. Washington DC: American Psychiatric Association, 1994.

[64] สมภพ เรืองตระกูล. โรคซึมเศร้าและการฆ่าตัวตาย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์, 2543.

[65] Isabelle Nonotte, Marie-France Laliberte., Nicole Remy-Heintz, Francois Lalibert, Claude Chevillard. Expression of angiotensin 1-converting enzyme in the human gastric HGT-1 cell line. Regulatory Peptides 59 (1995): 379-87.

[66] Fisker S, Hansen B, Fuglsang J, Kristensen K, Ovesen P, Ørskov H, Jørgensen JO. Gene expression of the GH receptor in subcutaneous and intraabdominal fat in healthy females: relationship to GH-binding protein. Eur J Endocrinol 150 (Jun 2004): 773-7.

[67] Marinus MG, Morris NR. Isolation of Deoxyribonucleic Acid Methylase Mutants of Escherichia coli K-12. J Bacteriol 114 (Jun 1973): 1143-50.

[68] Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Hsu CM, Lin CC, Tsai CH. Angiotensin I converting enzyme ACE 2350*G and ACE -240*T-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibility to endometriosis. Mol Hum Reprod 11 (Jan 2004): 11-4.

[69] Yanatatsaneejit P, Chalermchai T, Kerekhanjanarong V, Shotelersuk K, Supiyaphun P, Mutirangura A, Sriuranpong V. Promoter hypermethylation of CCNA1,

RARRES1, and HRASLS3 in nasopharyngeal carcinoma. Oral Oncol 44 (Apr 2008): 400-6.

[70] Yang I, Park IY, Jang SM, Shi LH, Ku HK, Park SR. Rapid quantification of DNA methylation through dNMP analysis following bisulfite-PCR. Nucleic Acids Res 34 (May 2006):e61.

[71] Gormley K, Bevan S, Markus HS. Polymorphisms in Genes of the Renin-Angiotensin System and Cerebral Small Vessel Disease. Cerebrovasc Dis 23 (2007): 148-55.

[72] Rebaï M, Kharrat N, Ayadi I, Rebaï A. Haplotype structure of five SNPs within the ACE gene in the Tunisian population. Ann Hum Biol 33 (2006): 319-29.

[73] Tencomnao T. Boonmalert R. Misgenotyping of dopamine receptor D1 gene -48A/G polymorphism. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 150B (2008): 447-9

[74] Koca E, Haznedaroglu IC, Acar K, Beyazit Y, Aksu S, Misirlioglu M, Tuncer S, Sayinalp N, Ozcebe OI, Uner A. Renin-angiotensin system expression in the K562 human erythroleukaemic cell line. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 8 (Sep 2007): 145-7.

[75] Villard E, Alonso A, Agrapart M, Challah M, Soubrier F. Induction of angiotensin I-converting enzyme transcription by a protein kinase C-dependent mechanism in human endothelial cells. J Biol Chem 273 (Sep 1998): 25191-7.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

LB broth ประกอบด้วย Bacto-tryptone 5 g
Bacto-yeast extract 2.5 g
NaCl 5 g
เติมน้ำกลั่น (DW) จนครบ 500 ml

LB agar ประกอบด้วย LB broth 500 ml
Bacto agar 7.5 g

LB agar/Amp$^+$ ผสม Amplicilin 100 µg ต่อ LB agar 1 ml

Buffer P1 ประกอบด้วย 10mM Tris, pH 8.0
1mM EDTA, pH 8.0
100µg/ml RNase A

Buffer P2 ประกอบด้วย 0.2M NaOH
10% SDS

Tris-borate (TBE) Buffer ประกอบด้วย 0.045 M Tris-borate
0.001 M EDTA, pH 8.0

DEPC-treated Water ประกอบด้วย 0.01 % (v/v) Diethylpyrocarbonate (DEPC)
ผสมกับน้ำในภาชนะที่ปราศจาก RNase
ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนและนำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

Subject No.............

ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (Consent form)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนต่างๆ และโรคซึมเศร้าในประชากรจังหวัดเลย จังหวัดหนองบัวลำภู และจังหวัดใกล้เคียง

วันที่ให้คำยินยอม วันที่..........เดือน............................พ.ศ..............

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว ....ได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย อันตรายหรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว

ข้าพเจ้าได้ซักถามและทำความเข้าใจเกี่ยวกับการศึกษาดังกล่าว โดยผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบัง ซ่อนเร้น จนข้าพเจ้าพอใจแล้ว

ข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้โดยความสมัครใจ และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่มีผลใดๆ ต่อข้าพเจ้า

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย (หรือข้าพเจ้าอนุญาตให้ผู้วิจัยเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องตามที่ผู้วิจัยเห็นสมควร

ในการวิจัยครั้งนี้ จะมีการเก็บเลือดเป็นจำนวนประมาณ 6 ซีซี เพียงหลอดเดียว

ผู้วิจัยได้อธิบายให้ข้าพเจ้าทราบและเข้าใจแล้วว่า การเก็บเลือดเพียงเล็กน้อย โดยทั่วไปจะไม่เกิดอันตรายใดๆ แก่ข้าพเจ้าเลย

ลงนาม..ผู้ให้การยินยอม วันที่ ..../........../.........

ลงนาม..พยาน วันที่........./........../..........

ลงนาม..พยาน วันที่........./........../..........

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

แบบสอบถามการวิจัยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนต่างๆ และโรคซึมเศร้าในประชากรจังหวัดเลย จังหวัดหนองบัวลำภู และจังหวัดใกล้เคียง

Subject No............

ชื่อ (นาย/นาง/น.ส)................................... นามสกุล..........................เพศ................

อายุ.................ปี วัน/เดือน/ปีเกิด.................................เบอร์โทรศัพท์......................

จำนวนสมาชิกในครอบครัวมีจำนวนทั้งหมด........คน เป็นชาย........คน เป็นหญิง........คน

โรคประจำตัว..........................ยาที่รับประทานประจำ...

ให้ทำเครื่องหมาย ✓ ในช่องว่าง ☐ ที่กำหนดให้

1. สถานะภาพ ☐ โสด ☐ สมรส

☐ หย่า ☐ แยกกันอยู่

2. อาชีพ ☐ รับจ้าง ☐ ค้าขาย

☐ ข้าราชการ ☐ พนักงานบริษัท

☐ นักเรียน/นักศึกษา ☐ อื่นๆระบุ.............................

3. วุฒิการศึกษา ☐ ต่ำกว่าประถมศึกษา

☐ ประถมศึกษา ☐ มัธยมศึกษาตอนต้น

☐ มัธยมศึกษาตอนปลาย ☐ ปวส./ปวช./อนุปริญญา

☐ ปริญญาตรี ☐ สูงกว่าปริญญาตรี

4. รายได้ ☐ ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 5,000 บาท

☐ 5,000 – 10,000 บาท

☐ มากกว่า 10,000 – 20,000 บาท

☐ มากกว่า 20,000 บาท

5. ท่านสูบบุหรี่หรือไม่ ☐ สูบ ☐ ไม่สูบ

6. ท่านดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์หรือไม่ ☐ ดื่ม ☐ ไม่ดื่ม

หมายเหตุอื่นๆ...

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ฤดี องุ่นศรี เกิดเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม พ.ศ.2526 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 1 สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2548 และได้เข้าทำงานที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร เมื่อปี พ.ศ. 2549 ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 โดยได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย