บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วยการทดลอง 4 ส่วนดังนี้

1. การเก็บเนื้อเยื่อ การสกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) จากเนื้อเยื่อ การตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอรวม เพื่อนำอาร์เอ็นเอรวมไปสร้างซีดีเอ็นเอ
2. การสร้างซีดีเอ็นเอโดยใช้อาร์เอ็นเอรวมเป็นแม่แบบ เพื่อเปลี่ยนอาร์เอ็นเอนำรหัสให้อยู่ในรูปของซีดีเอ็นเอซึ่งเสถียรกว่าอาร์เอ็นเอนำรหัส
3. การสร้างและวิเคราะห์ดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสจากแม่แบบซีดีเอ็นเอและไพรเมอร์เฉพาะด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสโดยมีดีเอ็นเอของกลีเซอราลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH) เป็นตัวอ้างอิงปริมาณ เพื่อศึกษาการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติในผู้ป่วยคนเดียวกัน
4. การสร้างและวิเคราะห์ดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสจากแม่แบบซีดีเอ็นเอและไพรเมอร์เฉพาะด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสชนิดบอกปริมาณ โดยมีดีเอ็นเอของ GAPDH เป็นตัวอ้างอิงปริมาณเพื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติในผู้ป่วยคนเดียวกัน

วัสดุ อุปกรณ์

วัสดุ (สารเคมีทุกชนิดใช้ molecular grade หรือ analytical grade)

1. อาร์เอ็นเอเลเทอร์ (RNA later; Bio-Active, USA)
2. ไตรรีเอเจนท์ (Tri reagent; Molecular Research Center, Inc., USA)
3. คลอโรฟอร์ม (chloroform; APS Finechem, Australia)
4. ไอโซโพรพานอล (isopropanol; E.MERCK, Germany)
5. เอธานอล (ethanol; E-MERCK, Germany)
6. ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen; Thai Industrial Gas Co. Ltd.,Thailand)
7. ไดเอธิลไพโรคาร์บอเนต (diethyl pyrocarbonate, DEPC; Sigma Chemical Co., USA)
8. สารละลายสำหรับเก็บอาร์เอ็นเอ (RNA storage solution; Bio–active, USA.)
9. อะกาโรส (agarose; BioWhittaker Molecular Application Inc., USA)

10. ฟอร์มาลดีไฮด์ ร้อยละ 36.5–38 (36.5-38% formaldehyde ; Sigma Chemical Co.,USA)
11. ฟอร์มาไมด์ ปราศจากอิออน (deionized formamide; Bio Basic Inc., Canada)
12. มอบส์ (MOPS, 3-[N-morpholino]propanesulfonic acid]; Bio Basic Inc., Canada)
13. โซเดียมอะซีเตต (sodium acetate; Sigma Chemical Co., USA)
14. กรดเอธิลีนไดเอมีนเตตราอะซีติก (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA; E-MERCK, Germany)
15. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide; E-MERCK, Germany)
16. กลีเซอรอล (glycerol; Sigma Chemical Co., USA)
17. บรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue; Sigma Chemical Co., USA)
18. ไซลีนไซยานอลเอฟเอฟ (xylene cyanol FF; Research Organics Inc., USA)
19. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 35 (35% hydrogen peroxide; E-MERCK, Germany)
20. สีย้อมกรดนิวคลีอิกชนิดเจลสตาร์ (GelStar® Nucleic Acid Stain; BioWhittaker Molecular Applications Inc., USA)
21. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid; E-MERCK, Germany)
22. เมธานอล (methanol; E-MERCK, Germany)
23. น้ำปราศจากนิวคลีเอส (nuclease free water; Promega Corporation, USA)
24. ชุดสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (SuperScript™ First–Strand Synthesis System for RT-PCR; Roche, USA)
25. ทริส-(ไฮดรอกซีเมธิล)อะมิโนมีเธน [tris-(hydroxymethyl) aminomethane; Research Organics Inc., USA]
26. กรดอะซีติก (acetic acid; BDH laboratory Supplies, England)
27. แทคดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรสรีคอมบิแนนท์ 500 ยูนิต 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร (500 unit, 5u/μl Taq DNA polymerase recombinant; Roche, USA)
28. ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต (deoxyribonucleotidetriphosphate, dNTP; Bio Basic Inc., Canada)
29. ไพรเมอร์สำหรับกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (primers for glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH; Bio Basic Inc., Canada)
30. ไพรเมอร์สำหรับเฮพพาแรนเนส (primers for heparanase; Life Technologies, USA)
31. ฟิลม์ถ่ายรูปที 400 ซีเอ็น 41 (T400 cn41 film; Eastman Kodak company, USA)

32. หลอดพลาสติกสำหรับเก็บเนื้อเยื่อมีฝาเกลียวปิดทนต่ออุณหภูมิต่ำกว่า –80 °ซ ฆ่าเชื้อแล้ว ปราศจากอาร์เอ็นเอสและดีเอ็นเอสขนาด 5 มิลลิลิตร (cryovial tube; Greiner Labortechnik, Germany)
33. หลอดเหวี่ยงขนาด 0.5 1.5 1.7 2.0 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube; Aktiengesellschaft & Co., Germany)
34. หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube; Molecular Bio Products, USA)
35. ทิปใช้ครั้งเดียวทิ้งสำหรับไปเปตอัตโนมัติขนาด 10 200 1000 5000 ไมโครลิตร (disposable pipet tip; Labcon North America, USA)
36. ทิปแบบมีไส้กรองใช้ครั้งเดียวทิ้งสำหรับไปเปตอัตโนมัติขนาด 10 200 ไมโครลิตร (disposable filter pipet tip; Recovery, USA)
37. ถุงมือยางใช้ครั้งเดียวทิ้ง (disposable latex glove; บริษัทสยามเซพเพอร์เมดจำกัด, ประเทศไทย)
38. แผ่นกรองเชื้อแบคทีเรียขนาด 0.45 ไมโครเมตร (membrane filter; Gelman Sciences, USA)
39. หลอดฉีดยาขนาด 50 มิลลิลิตร (syringe; Terumo Corporation, Japan)
40. สารละลายสำหรับกำจัดอาร์เอ็นเอส (RNase AWAY solution; Molecular BioProducts, USA)
41. ชุดสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสซนิดบอกปริมาณ (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green1; Roche Diagnostics GmbH, Germany)
42. หลอดแก้วขนาดเล็กสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสซนิดบอกปริมาณ (capillaries: LightCycler; Roche Diagnostics GmbH, Germany)

หมายเหตุ รายละเอียด ชุดสังเคราะห์ เอนไซม์ ไพรเมอร์ และสารผสมต่างๆ แสดงภาคผนวก ข

<u>อุปกรณ์</u>

1. กระติกบรรจุไนโตรเจนเหลวขนาด 1.0 ลิตร (liquid nitrogen bucket; Bel-ART Inc., USA)
2. เครื่องบดด้วยมือ (hand homogenizer and teflon pestle; Bio Logics Inc., USA)
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave: Rexall, LS–2D; Rexall Industries Co. Ltd., Taiwan)
4. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV / VIS spectrophotometer: Ultrospec 3000; Amersham Pharmacia Biotech Inc., UK)
5. เครื่องสั่นไฟฟ้า (vortex: Genie 2; Scientific Industries, USA.)
6. เครื่องเหวี่ยง (centrifuge: Spectrafuge 16M; National Labnet Co., USA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. **เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง** (high speed centrifuge: Sorvall® Super T21; Dupont Company, USA.)
8. **อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ** (water bath: Heto DT-Hetotherm & PT923TBVS-02; Heto Lab Equipment A/S, Denmark)
9. **เครื่องนำความร้อนชนิดหลุม** (heating block; DB3A Techne; Techne Corporation, UK.)
10. **เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ** (polymerase chain reaction, PCR: PCR System 9700; Applied Biosystems, Roche Molecular System Inc., USA)
11. **เครื่องแยกอาร์เอ็นเอด้วยไฟฟ้าชนิดแนวนอน** (horizontal electrophoresis apparatus: GNA-100; Hoefer Pharmacia Biotech Inc., Sweden)
12. **เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยไฟฟ้าชนิดแนวนอน** (horizontal electrophoresis apparatus: model EC330; Thermo EC, USA)
13. **ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ภาพพร้อมคอมพิวเตอร์** (gel doc 1000 UV fluorescent gel documentation system–PC: model GS-700; Bio–Rad Laboratories, Inc., USA.)
14. **เครื่องชั่งไฟฟ้า** (analytical balance: AE200; Mettler-Toledo, Switzerland)
15. **เครื่องให้พลังงานไฟฟ้า** (power supply: PAC3000; Bio–Rad Laboratories, Inc., USA)
16. **เครื่องกรองน้ำปราศจากอิออน** (ultrapure water system: model D4745; Thermolyne Corporation, USA)
17. **ตู้อบเครื่องมือ** (hot air oven: model ULM 500; Memmert Gmblt CoKG., Germany)
18. **เครื่องส่องแสงผ่านทะลุชนิดดาร์ครีดเดอร์** (dark reader transilluminator: model DR-45M; Clare Chemical Research, USA)
19. **ปิเปตอัตโนมัติ** (automatic pipet; High tech lab, Poland)
20. **กล้องถ่ายรูป** (camera: model FM2; Nikon corporation, Japan)
21. **คิวเวทชนิดควอร์ซ** (quartz cuvette; Optiglass Ltd., Russia)
22. **กรรไกรชนิดสแตนเลสตัดเนื้อเยื่อ** (stainless scissors; J.S.L. intertrade Ltd., Thailand)
23. **ปากคีบสแตนเลสชนิดปลายแหลม** (stainless forceps; J.S.L. intertrade Ltd., Thailand)
24. **เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชนิดบอกปริมาณ** (real time polymerase chain reaction: LightCycler Instrument; Roche Diagnostics GmbH, Germany)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บเนื้อเยื่อ การสกัด การวัดปริมาณและการตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอรวมจากเนื้อเยื่อ (Chomczynskiและ Sacchi, 1987; Farrel, 1998; Sambrook และ Russell, 2001)

1.1 การเก็บเนื้อเยื่อ

นำก้อนเนื้อมะเร็งสความัสเซลล์ช่องปากจากผู้ป่วยที่ต้องได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดจากศัลยแพทย์ มาแยกเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติอย่างละ 2 ชิ้นทันทีโดยพยาธิแพทย์ ขนาดชิ้นละประมาณ 50–100 มิลลิกรัม แช่เนื้อเยื่อในหลอดที่บรรจุอาร์เอ็นเอเลเทอร์ ปริมาตร 5 เท่าของเนื้อเยื่อแล้วใส่ในกระติกบรรจุไนโตรเจนเหลวทันที เก็บเนื้อเยื่อทุกชิ้นไว้ในอุณหภูมิ –80°ซ จนกว่าจะทำการทดลองต่อไป มีงานวิจัยยืนยันว่าที่อุณหภูมินี้ไม่ทำให้อาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อสลาย (Baynes และ Dominiczak, 1999)

1.2 การสกัด (การเหวี่ยงทุกครั้งกระทำที่อุณหภูมิ 4°ซ)

สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ปฐมภูมิ $PDLF_3P_5$ เซลล์ไลน์ U2OS (ใช้เป็นตัวควบคุม) และเนื้อเยื่อโดยใช้สารละลายไตรรีเอเจนท์ซึ่งประกอบด้วย กวานิดีนไอโซไธโอไซยาเนต (guanidine isothiocyanate) และฟีนอล (phenol) เติมคลอโรฟอร์มเพื่อให้เกิดการแยกชั้นของสารที่สกัดได้ ดีเอ็นเอและโปรตีนจะอยู่ในชั้นสารละลายอินทรีย์ (organic phase) และอาร์เอ็นเอจะอยู่ในชั้นสารละลายใสที่อยู่ด้านบน (aqueous phase) ซึ่งสามารถตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล ปริมาณอาร์เอ็นเอรวมขึ้นกับปริมาณเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่นำมาสกัด

นำเนื้อเยื่อที่เก็บไว้มาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดด้วยมือที่บรรจุสารละลายไตรรีเอเจนท์ 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 0.3 มิลลิลิตร ผสมแบบกลับไปมาอย่างแรง (inversion) เป็นเวลา 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำหลอดไปเหวี่ยง 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที สารละลายจะแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างจะมีสีแดงของฟีนอล-คลอโรฟอร์มซึ่งบรรจุดีเอ็นเอและโปรตีน ส่วนชั้นบนไม่มีสีเป็นชั้นที่มีอาร์เอ็นเอรวมบรรจุอยู่ แยกเฉพาะสารละลายชั้นบนนำมาตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอลที่เย็น 0.85 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงนำไปเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ตะกอนที่ได้มีลักษณะเป็นสีขาวติดอยู่ที่ด้านข้างและก้นหลอด เทสารละลายส่วนบน (supernatant) ทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอธานอลร้อยละ 75 จากนั้นจึงนำหลอดไปเหวี่ยงที่ 7,500 g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ตะกอนรวมอยู่ก้นหลอด เทสารละลายเอธานอลทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง

1.3 การวัดปริมาณอาร์เอ็นเอรวมด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยสารละลายสำหรับเก็บอาร์เอ็นเอจำนวน 15-30 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหาปริมาณอาร์เอ็นเอโดยเจือจางสารละลายอาร์เอ็นเอจำนวน 2 ไมโครลิตร ให้เป็น 500 ไมโครลิตร ด้วยน้ำที่ปราศจากอาร์เอ็นเอส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้โปรแกรมตรวจวัดอาร์เอ็นเอ

ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอรวม = $\frac{OD_{260} \times 250 \times 40}{1000}$ ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

1 OD_{260} ของอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single strand RNA) = 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

ตรวจสอบอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280

1.4 การตรวจสอบคุณภาพของสารละลายอาร์เอ็นเอรวม (Baynes และ Dominiczak, 1999; Farrel, 1998; Sambrook และ Russell, 2001)

อาร์เอ็นเอในเซลล์ถูกสร้างจากขบวนการถ่ายทอดข้อมูลจากกรดนิวคลีอิกในสายดีเอ็นเอที่บริเวณจำเพาะโดยขบวนการทรานสคริปชัน (transcription) อาร์เอ็นเอที่สร้างได้แยกออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดแรกอาร์เอ็นเอไรโบโซม (ribosomal RNA, rRNA) มีมากที่สุดประมาณร้อยละ 80 ของอาร์เอ็นเอรวม ชนิดที่ 2 อาร์เอ็นเอถ่ายโอน (transfer RNA, tRNA) ประมาณร้อยละ 15 ชนิดที่ 3 อาร์เอ็นเอนำรหัส (messenger RNA, mRNA) ร้อยละ 5 อาร์เอ็นเอแต่ละชนิดมีขนาดที่แตกต่างกันตามค่าการตกตะกอนโดยการเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง คือ S (Svedbergs) หรือจำนวน นิวคลีโอไทด์ อาร์เอ็นเอไรโบโซมประกอบด้วยอาร์เอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 3 ขนาด ได้แก่ อาร์เอ็นเอ 28S (ประมาณ 5 กิโลเบส) อาร์เอ็นเอ 18S (ประมาณ 1.9 กิโลเบส) อาร์เอ็นเอ 5.8S (ประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์) อาร์เอ็นเอทั้ง 3 ขนาด จะมีอันตรกิริยาซึ่งกันและกัน อาร์เอ็นเอถ่ายโอนมีขนาดตั้งแต่ 65-110 นิวคลีโอไทด์ ส่วนอาร์เอ็นเอนำรหัสเป็นอาร์เอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันมากตั้งแต่ 500 นิวคลีโอไทด์ ถึงมากกว่า 2 กิโลเบส ในการตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอจำเป็นต้องทำให้อาร์เอ็นเอตัวอย่างเสียสภาพด้วยฟอร์มาไมด์และฟอร์มาลดีไฮด์ จึงสามารถแยกอาร์เอ็นเอออกมาตามขนาดในวุ้นอะกาโรสที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เข้มข้น 2.2 โมลาร์ ฟอร์มาลดีไฮด์จะทำให้เบสในอาร์เอ็นเอไม่จับคู่กันเอง

การเตรียมสารละลายอาร์เอ็นเอตัวอย่าง โดยให้มีปริมาณมากที่สุดไม่เกิน 20 ไมโครกรัมใส่ในหลอดเหวี่ยงขนาด 0.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์มอบส์ 10 เท่า จำนวน 2.0 ไมโครลิตร ฟอร์มาลดีไฮด์ 2.5 ไมโครลิตร ฟอร์มาไมด์ 8.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำ

หลอดไปเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายตกลงก้นหลอด เติมเจลโหลดดิงบัฟเฟอร์สำหรับฟอร์มาลดีไฮด์ 10 เท่า จำนวน 3 ไมโครลิตร ลงในแต่ละตัวอย่าง

ให้กระแสไฟฟ้าผ่านวุ้นอะกาโรสความต่างศักย์ 5 โวลท์ ต่อ 1 เซนติเมตร ของความยาวที่วัดจากขั้วบวกไปยังขั้วลบ (pre running) ในบัฟเฟอร์มอบส์ 1 เท่า เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายอาร์เอ็นเอตัวอย่างที่เตรียมลงในหลุมบนวุ้น ให้กระแสไฟฟ้าผ่านวุ้นอะกาโรสที่ความต่างศักย์เท่าเดิม ประมาณ 3 ชั่วโมง 30 นาที โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกชั่วโมง หยุดกระแสไฟฟ้า ย้อมวุ้นอะกาโรสด้วยสีย้อมกรดนิวคลีอิก 2 เท่าในบัฟเฟอร์มอบส์ 1 เท่า เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ถ่ายภาพแถบอาร์เอ็นเอในวุ้นอะกาโรสบนเครื่องส่องแสงผ่านทะลุชนิดดาร์ครีดเดอร์

ตัวควบคุมบวก (positive control) สารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดจากเซลล์ปฐมภูมิ $PDLF_3P_5$ และเซลล์ไลน์ U2OS

2. <u>การสร้างซีดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอรวม</u> (Farrel, 1998; Ikuta และคณะ, 2001; Sambrook และ Russell, 2001)

การสร้างซีดีเอ็นเอโดยใช้อาร์เอ็นเอรวมเป็นแม่แบบและเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเตส เป็นวิธีที่รวดเร็ว มีความแม่นยำและความไว ใช้วิเคราะห์การแสดงออกของยีน สามารถใช้อาร์เอ็นเอรวมหรืออาร์เอ็นเอนำรหัสเป็นแม่แบบ ใช้ไพรเมอร์ชนิดสุ่ม (random primer) ไพรเมอร์ชนิดโอลิโกดีที (oligo dT primer) หรือไพรเมอร์ชนิดยีนจำเพาะ (gene specific primer) ในการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ชนิดโอลิโกดีที และใช้อาร์เอ็นเอรวมเป็นแม่แบบสร้างซีดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเตส เมื่อสร้างซีดีเอ็นเอแล้วทำลายสายแม่แบบอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอชออกจากซีดีเอ็นเอ

บริเวณที่ทำการทดลองต้องทำให้ปราศจากอาร์เอ็นเอสด้วยสารละลายอาร์เอ็นเอสอะเวย์ เตรียมสารละลายอาร์เอ็นเอรวม 3.5 ไมโครกรัมในหลอดเหวี่ยงขนาด 0.5 มิลลิลิตร สารผสมดีเอ็นทีพี 1.0 ไมโครลิตร โอลิโกดีที 1.0 ไมโครลิตร น้ำปราศจากอาร์เอ็นเอสให้ปริมาตรเป็น 10.0 ไมโครลิตร บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 5 นาที เตรียมสารผสมที่ประกอบด้วยอาร์ทีบัฟเฟอร์ 10 เท่า 2 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์ 4 ไมโครลิตร ดีทีที 0.1 โมลาร์ 2 ไมโครลิตร อาร์เอ็นเอสอินฮิบิเตอร์ 1 ไมโครลิตร เติมสารผสมจำนวน 9 ไมโครลิตรลงในสารละลายอาร์เอ็นเอตัวอย่างข้างต้น บ่มสารละลายที่ 42°ซ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ซุปเปอร์สคริปทูอาร์ที 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มต่อเป็นเวลา 50 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดมาบ่มที่อุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 15 นาที เหวี่ยงให้สารละลายตกลงก้นหลอด เติมอาร์เอ็นเอสเอช 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 20 นาที

ซีดีเอ็นเอที่ได้นำไปขยายสร้างดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสและปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสชนิดบอกปริมาณหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า –20°ซ จนกว่าจะทำการทดลองต่อไป

ตัวควบคุมลบ (negative control) ไม่ใส่สารละลายอาร์เอ็นเอตัวอย่าง

ตัวควบคุมบวก (positive control) อาร์เอ็นเอควบคุมจากชุดสร้างซีดีเอ็นเอ

3. <u>การทดสอบการแสดงออกของยีนเฮพพาแรนเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสและวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอผลผลิตด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์</u> (Sambrook และ Russell, 2001)

ในการศึกษาการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อมะเร็งสความัสเซลล์ช่องปากและเนื้อเยื่อปกติที่อยู่รอบๆเนื้อเยื่อมะเร็งในผู้ป่วยคนเดียวกัน ต้องกำหนดปริมาณซีดีเอ็นเอที่สร้างจากเนื้อเยื่อทั้งสองเท่ากัน ด้วยการใช้การแสดงออกของยีน GAPDH เป็นตัวอ้างอิงปริมาณ และพิสูจน์ว่ายีน GAPDH มีการแสดงออกเท่ากันในเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดของผู้ป่วยคนเดียวกัน โดยเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน GAPDH กับการแสดงออกของยีนเบตากลอบินซึ่งเป็นยีนที่ยอมรับว่ามีการแสดงออกเพียงชุดเดียว (single copy gene) (Shindo และคณะ 1991) จากนั้นจึงใช้ปริมาณซีดีเอ็นเอที่ได้จากการปรับแล้วสร้างดีเอ็นเอของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดในผู้ป่วยคนเดียวกัน โดยใช้จำนวนรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสที่ทำให้ปฏิกิริยายังไม่เข้าสู่ระยะคงที่ เนื่องจากจะทำให้มีการเพิ่มของดีเอ็นเอผลผลิตที่แตกต่างกัน ถ้ามีจำนวนแม่แบบเริ่มต้นปฏิกิริยาไม่เท่ากัน จึงสามารถใช้ในการศึกษาการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสจากเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดได้

3.1 การสร้างดีเอ็นเอ GAPDH เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเบตากลอบินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสและวิเคราะห์ความเข้มแถบดีเอ็นเอผลผลิตด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (Sambrook และ Russell, 2001)

นำซีดีเอ็นเอรวมที่สกัดจากเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยรายที่ 1 3 และ 4 ในปริมาณที่เท่ากัน ใส่ในหลอดพีซีอาร์ที่เติมสารผสมซึ่งประกอบด้วยบัฟเฟอร์พีซีอาร์ชนิดปราศจากแมกนีเซียมคลอไรด์ 10 เท่า จำนวน 5 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1.5 ไมโครลิตร สารละลายดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ชนิดเซนส์และแอนไทเซนส์เข้มข้นชนิดละ 10 ไมโครโมลาร์ จำนวน 2 ไมโครลิตร เอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร จำนวน 0.4 ไมโครลิตร และน้ำปราศจากเชื้อ ให้ปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสจำนวน 30 รอบ ตามขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนเริ่มต้น (initiation step) อุณหภูมิ 94°ซ เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนแยกสาย (denaturation step) อุณหภูมิ 94°ซ เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนไพรเมอร์เชื่อมต่อ (annealing step) อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 1 นาที สำหรับดีเอ็นเอ GAPDH และอุณหภูมิ 55°ซ สำหรับเบตากลอบิน

ขั้นตอนต่อสายนิวคลีโอไทด์ (elongation step) อุณหภูมิ 72°ซ เป็นเวลา 1 นาที 20 วินาที

ขั้นตอนต่อสายนิวคลีโอไทด์สุดท้าย (last elongation step) อุณหภูมิ 72°ซ เป็นเวลา 7 นาที

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ GAPDH และเบตากลอบิน

แยกแถบดีเอ็นเอของ GAPDH และเบตากลอบินบนวุ้นอะกาโรสร้อยละ 2.0 ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 105 โวลท์ ในบัฟเฟอร์ทริสอะซีเตท 1 เท่า เป็นเวลา 30 นาที ย้อมวุ้นอะกาโรสด้วยสีย้อมกรดนิวคลีอิก 1 เท่า ในบัฟเฟอร์ทริสอะซีเตท 1 เท่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ่ายภาพแถบดีเอ็นเอในวุ้นอะกาโรสบนเครื่องส่องแสงผ่านทะลุชนิดดาร์ครีดเดอร์ และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานชี้บอกขนาด 100 ถึง 1500 คู่เบสสำหรับบ่งชี้ขนาดคู่เบส

นำภาพถ่ายมาวิเคราะห์หาความเข้มของแถบดีเอ็นเอ GAPDH และเบตากลอบิน เปรียบเทียบระหว่างความเข้มของเนื้อเยื่อปกติและความเข้มของเนื้อเยื่อของมะเร็งด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ ความเข้มดีเอ็นเอแต่ละชนิดในเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อใช้ปริมาณซีดีเอ็นเอเริ่มต้นที่เท่ากันในการทดลองต่อมาเมื่อใช้แม่แบบซีดีเอ็นเอสร้างดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนส จึงใช้ดีเอ็นเอ GAPDH เป็นดีเอ็นเอควบคุมปริมาณ

3.2 การวิเคราะห์จำนวนรอบสำหรับสร้างดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสและวิเคราะห์ความเข้มแถบดีเอ็นเอผลผลิตด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (Sambrook และ Russell, 2001)

นำซีดีเอ็นเอที่สร้างจากเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยรายที่ 4 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสและไพรเมอร์เฮพพาแรนเนสชนิดที่ 1 จำนวน 26 27 28 29 30 31 32 และ 33 รอบ โดยมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ GAPDH

แยกแถบดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสบนวุ้นอะกาโรสร้อยละ 2.0 ด้วยกระแสไฟฟ้าเช่นเดียวกับการแยกแถบดีเอ็นเอ GAPDH และเบตากลอบิน ถ่ายภาพแถบดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสในวุ้นอะกาโรสบนเครื่องส่องแสงผ่านทะลุชนิดดาร์ครีดเดอร์

นำภาพถ่ายมาวิเคราะห์หาความเข้มของแถบดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสที่ได้จากแต่ละรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ความเข้มของแถบดีเอ็นเอรอบที่ 31 32 และ 33 รอบ มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสที่รอบดังกล่าวถึงจุดสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว ดังนั้นในการทดลองต่อมา

จึงสร้างดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสโดยใช้จำนวนรอบ 30 รอบซึ่งเป็นจำนวนรอบสูงสุดที่ปฏิกิริยายังไม่ถึงจุดสิ้นสุด

3.3 การสร้างดีเอ็นเอ GAPDH และเฮพพาแรนเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสและวิเคราะห์ความเข้มแถบดีเอ็นเอผลผลิตด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (Sambrook และ Russell, 2001)

นำซีดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยรายที่ 1 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 14 15 16 17 19 20 และ 22 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ GAPDH ให้มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอใกล้เคียงกัน ใช้ปริมาณซีดีเอ็นเอดังกล่าวและไพรเมอร์เฮพพาแรนเนสชนิดที่ 1 (ดีเอ็นเอผลผลิต 648 คู่เบส) และไพรเมอร์ชนิดที่ 2 (ดีเอ็นเอผลผลิต 216 คู่เบส) สำหรับผู้ป่วยรายที่ 22 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสจำนวน 30 รอบ โดยมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ GAPDH

วิเคราะห์ดีเอ็นเอ GAPDH และเฮพพาแรนเนสโดยแยกแถบดีเอ็นเอของ GAPDH และเฮพพาแรนเนสบนวุ้นอะกาโรสร้อยละ 2.0 ด้วยกระแสไฟฟ้าและย้อมเช่นเดียวกับการแยกแถบดีเอ็นเอของ GAPDH และเบตากลอบิน ถ่ายภาพแถบดีเอ็นเอ GAPDH และเฮพพาแรนเนสในวุ้นอะกาโรสบนเครื่องส่องแสงผ่านทะลุชนิดดาร์ครีดเดอร์

ตัวควบคุมลบชนิดที่ 1 สร้างจากแม่แบบตัวควบคุมลบจากข้อ 2

ตัวควบคุมลบชนิดที่ 2 ไม่ใส่แม่แบบซีดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 1 สร้างจากแม่แบบตัวควบคุมบวกจากข้อ 2

ตัวควบคุมบวกชนิดที่ 2 สร้างจากซีดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนสซึ่งบรรจุในเวคเตอร์บลูสคริบ (bluescript vector) ด้วยไพรเมอร์เฮพพาแรนเนสชนิดที่ 1 และ 2

ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบสถึง 1500 คู่เบส สำหรับบ่งชี้ขนาดคู่เบส

นำภาพถ่ายมาวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอ GAPDH และเฮพพาแรนเนส เปรียบเทียบและวิเคราะห์การแสดงออกของเฮพพาแรนเนสในเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดของผู้ป่วยคนเดียวกัน

4. <u>การทดสอบการแสดงออกยีนเฮพพาแรนเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสชนิดบอกปริมาณ</u> (Bernard และ Wittwer 2002; Pfaffl,2001)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสชนิดบอกปริมาณเป็นวิธีที่สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมายได้ในทุกช่วงของปฏิกิริยา โดยวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนผลผลิตจากความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่ปล่อยออกมาจากสารเรืองแสง ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับผลผลิตของปฏิกิริยาและเป็นวิธีที่มีความไวสูง จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณการแสดงออกของเฮพพาแรนเนสจาก

เนื้อเยื่อปกติและมะเร็งของผู้ป่วยคนเดียวกัน และควบคุมปริมาณซีดีเอ็นเอรวมด้วยยีนของ GAPDH จึงต้องพิสูจน์เช่นเดียวกับในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสว่ายีน GAPDH มีการแสดงออกเท่ากันในเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด โดยเปรียบเทียบกับยีนเบตากลอบิน

นำซีดีเอ็นเอรวมของเนื้อเยื่อปกติและมะเร็งจากผู้ป่วยรายที่ 1 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเบตากลอบิน GAPDH และเฮพพาแรนเนส พบว่าดีเอ็นเอเบตากลอบินและดีเอ็นเอ GAPDH ให้ค่า cp (crossing point หมายถึง ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่สูงกว่าค่าพื้นฐาน) ของเนื้อเยื่อมะเร็งใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อปกติ จึงใช้ยีนของ GAPDH เป็นยีนอ้างอิงปริมาณในการทดลองต่อมาของผู้ป่วยรายอื่นๆเพื่อสร้างดีเอ็นเอเฮพพาแรนเนส ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 14 15 17 20 และ 22 ตามขั้นตอนดังนี้

ซีดีเอ็นเอรวม 1 ไมโครลิตรใส่ในหลอดแคปปิลารีย์ซึ่งมีสีไซเบอร์กรีน1 (SYBR green I) 1 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ สำหรับเพิ่มปริมาณ GAPDH และแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 4.0 ไมโครโมลาร์สำหรับเพิ่มปริมาณเฮพพาแรนเนส ไพรเมอร์ซนิดเซนส์และแอนไทเซนส์เข้มข้นชนิดละ 5 ไมโครโมลาร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร (ไพรเมอร์เฮพพาแรนเนสชนิดที่ 2 ให้ดีเอ็นเอผลผลิต 216 คู่เบส) ปรับปริมาตรเป็น 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสชนิดบอกปริมาณจำนวน 60 รอบ วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสองมากที่สุด (The second derivative maximun method)

ขั้นตอนเริ่มต้น (initiation step) อุณหภูมิ 95°ซ เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอนแยกสาย (denaturation step) อุณหภูมิ 95°ซ เป็นเวลา 1 วินาที

ขั้นตอนไพรเมอร์เชื่อมต่อ (annealing step) อุณหภูมิ 70-62°ซ เป็นเวลา 5 วินาที

ขั้นตอนต่อสายนิวคลีโอไทด์ (elongation step) อุณหภูมิ 72°ซ เป็นเวลา 9 วินาที

ขั้นตอนหา T_m (melting curve step) อุณหภูมิ 60-95°ซ

ขั้นตอนการทำให้เย็น (cooling step) อุณหภูมิ 40°ซ

อัตราการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 20°ซ ต่อวินาที

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ GAPDH และเฮพพาแรนเนสด้วยการวิเคราะห์ค่า cp และ T_m และแยกแถบดีเอ็นเอ GAPDH และเฮพพาแรนเนสด้วยกระแสไฟฟ้าเช่นเดียวกับข้อ 3.3

ตัวควบคุมบวก สร้างจากซีดีเอ็นเอซึ่งบรรจุในเวคเตอร์บลูสคริบท์และไพรเมอร์เฮพพาแรนเนสชนิดที่ 2

ตัวควบคุมลบ ไม่ใส่แม่แบบซีดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบสถึง 1500 คู่เบส สำหรับบ่งชี้ขนาดคู่เบส

หมายเหตุ รายละเอียดการเตรียมน้ำ สารเคมี ไพรเมอร์ และวัสดุอุปกรณ์ แสดงภาคผนวก ค