

การวิเคราะห์มิวเทชันของยีน *CYP11B1* ในผู้ป่วยชาวไทยที่มีภาวะขาด 11ปีตาไฮดรอกซิเลส



นางสาวภัทรณ์ชชา ชาญวิชัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MUTATION ANALYSIS OF *CYP11B1* GENE IN THAI PATIENTS  
WITH 11 $\beta$ -HYDROXYLASE DEFICIENCY

Miss Pattaranatcha Charnwichai



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Genetics  
Department of Botany  
Faculty of Science  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2015  
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์มีเวกชันของยีน <i>CYP11B1</i> ในผู้ป่วยชาวไทย ที่มีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส
โดย	นางสาวภัทรณัชชา ชาญวิชัย
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร. ภัทรา ยี่ทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ธนินี สหกิจรุ่งเรือง

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ดร. ภัทรา ยี่ทอง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ธนินี สหกิจรุ่งเรือง)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร.สุรัสวดี อัครวัฒน์)

ภัทรณัชชา ชาญวิชัย : การวิเคราะห์มิวเทชันของยีน *CYP11B1* ในผู้ป่วยชาวไทยที่มีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส (MUTATION ANALYSIS OF *CYP11B1* GENE IN THAI PATIENTS WITH 11 $\beta$ -HYDROXYLASE DEFICIENCY) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ดร. ภัทรา ยี่ทอง, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. พญ. ธนินี สหกิจรุ่งเรือง, 81 หน้า.

ภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส (11 $\beta$ -hydroxylase deficiency; 11 $\beta$ -OHD) เป็นภาวะที่พบได้มากเป็นอันดับที่สองในกลุ่มโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิด โดยพบประมาณร้อยละ 5-8 ของผู้ป่วยโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดทั้งหมด อาการหลักของผู้ป่วย คือ มีลักษณะที่แข็งแรงแบบเพศชายแม้ผู้ป่วยจะเป็นเพศหญิง, ความดันโลหิตสูง และมีอาการอวัยวะเพศกำกวมในเพศหญิง เนื่องมาจากความบกพร่องของเอนไซม์ 11บีตาไฮดรอกซิเลส ในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนคอร์ติซอล โดยสาเหตุเกิดมาจากการเกิดมิวเทชันในยีน *CYP11B1* ซึ่งเป็นยีนที่ผลิตเอนไซม์ 11บีตาไฮดรอกซิเลส วัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อวิเคราะห์หามิวเทชันในยีน *CYP11B1* ในผู้ป่วยชาวไทย 3 ราย ที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส อีกทั้งศึกษาผลของมิวเทชันที่พบในผู้ป่วยที่มีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส โดยได้วิเคราะห์และหามิวเทชันในทุกเอ็กซอนรวมทั้งรอยต่อระหว่างเอ็กซอนและอินทรอนของยีน *CYP11B1* พบว่าผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นพี่น้องกัน พบ compound heterozygous c.421C>T (p.R141X) และ c.1200+1G>A (IVS7 (ds, +1) GTG>ATG) ในผู้ป่วยรายที่ 3 พบ compound heterozygous c.714\_740delTTCATGCCAGGAGCCTGTCTCGCTG และ c.1121G>A (p.R374Q) จากนั้นทำการทดลองด้วย minigene เพื่อศึกษาผลของมิวเทชันแบบ splice site พบว่า อาร์เอ็นเอของผู้ป่วยมีความแตกต่างกับอาร์เอ็นเอของคนปกติ ซึ่งพบอาร์เอ็นเอที่ผิดปกติ 2 ชนิดด้วยกัน คือ อาร์เอ็นเอที่ไม่มีเอ็กซอนที่ 7 และอาร์เอ็นเอที่ไม่มีเอ็กซอนที่ 7-8 ในผู้ป่วยนั่นเอง จากการทดลองดังกล่าว ทำให้ยืนยันได้ว่า มิวเทชันแบบ splice site นี้ เป็นผลทำให้การตัดอินทรอนในกระบวนการถอดรหัสของผู้ป่วยเกิดความผิดพลาดและส่งผลให้เกิดภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส

ภาควิชา พญกษศาสตร์

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม .....

# # 5672044423 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS: 11 $\beta$ -HYDROXYLASE DEFICIENCY / CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA / CAH / CYP11B1

PATTARANATCHA CHARNWICHAJ: MUTATION ANALYSIS OF *CYP11B1* GENE IN THAI PATIENTS WITH 11 $\beta$ -HYDROXYLASE DEFICIENCY. ADVISOR: PATRA YEETONG, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. TANINEE PETWIJIT, M.D., 81 pp.

11 $\beta$ -hydroxylase deficiency (11 $\beta$ -OHD) is the second most common of congenital adrenal hyperplasia (CAH) accounting for 5-8% of all CAH cases. The main phenotype of this disorder is virilization, hypertension and ambiguous genitalia. 11 $\beta$ -OHD is an autosomal recessive enzyme defect impairing the biosynthesis of cortisol caused by mutation in *CYP11B1* gene. The purpose of this study is to screen the mutations in *CYP11B1* gene in three Thai patients with congenital adrenal hyperplasia due to 11 $\beta$ -OHD and to study the genotypic and phenotypic correlation of mutation in patients. We performed mutation analysis of the coding and intron-exon junction region of *CYP11B1* gene in two siblings and one unrelated Thai patient with 11 $\beta$ -OHD. The results of mutation analysis showed a compound heterozygous mutation; c.421C>T (p.R141X) and c.1200+1G>A (IVS7 (ds, +1) GTG>ATG) in two siblings and a compound heterozygous mutation; c.714\_740delTTCATGCCAGGAGCCTGTCTCGCTG and c.1121G>A (p.R374Q) in another patient. A splice site mutation in the splice donor site of intron 7 might be causing 11 $\beta$ -OHD. In addition, minigene experiment was performed to confirm the pathogenicity of the splicing variant. It showed 2 types of RNA; the first skipped exon 7 and the second skipped exon 7-8 which lead to produce abnormal protein. Thus, this splice site mutation causes 11 $\beta$ -OHD in the patient which affects the gene splicing during post-transcriptional process.

Department: Botany

Field of Study: Genetics

Academic Year: 2015

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากอาจารย์ ดร. ภัทรา ยี่ทอง และ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ธนินี สหกิจรุ่งเรือง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำชี้แนะและความช่วยเหลือในทุกๆด้าน ด้วยความทุ่มเทและความเอาใจใส่อย่างยิ่ง จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์ วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง กัญญา ศุภปีติพร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนิกร ธรรมโชติ และสมาชิกทุกท่านใน Center of excellence in Medical Genetics Research แห่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สำหรับคำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการวิจัย รวมทั้งความกรุณาในการอนุเคราะห์สถานที่สำหรับการวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ในภาควิชาพฤษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับคำแนะนำ คำสั่งสอน ความรู้และความเมตตาช่วยเหลือมาโดยตลอด

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองในวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา (CHULALONGKORN UNIVERSITY GRADUATE SCHOLARSHIP TO COMMEMORATE THE 72 nd ANNIVERSARY OF HIS MAJESTY KING BHUMIBOL ADULYADEJ) จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและครอบครัว ที่ให้โอกาสในการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนเป็นกำลังใจให้แก่ผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษาเสมอมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป .....	ญ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญแผนภาพ .....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
คำสำคัญ (Key word).....	3
คำถามในงานวิจัย (Research question) .....	3
สมมติฐาน (Hypothesis).....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย .....	3
ข้อจำกัดในการวิจัย.....	4
จริยธรรมทางการวิจัย .....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	4
วิธีดำเนินงานวิจัย .....	4
ลำดับขั้นตอนในการวิจัย (Conceptual framework).....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
โรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิด .....	7
ภาวะขาด 11ปีตาไฮดรอกซิเลส.....	11

ยีน <i>CYP11B1</i> .....	13
มิวเทชัน.....	14
การวินิจฉัยและการรักษา.....	18
<i>การวินิจฉัย</i> .....	18
<i>การรักษา</i> .....	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	19
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	19
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย.....	23
กลุ่มตัวอย่าง.....	23
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	24
1. วิเคราะห์ยีน <i>CYP11B1</i> เพื่อหามิวเทชันในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นภาวะขาด 11บีตา ไฮดรอกซิเลสทั้ง 3 ราย (mutation analysis).....	24
2. วิเคราะห์ว่ามิวเทชันที่พบในผู้ป่วยทั้ง 3 รายนั้น ได้รับการถ่ายทอดมาจากบิดา และ มารดาถูกต้องตามกฎการถ่ายทอดทางพันธุกรรมหรือไม่.....	30
3. วิเคราะห์ผลของมิวเทชันแบบ splice site ที่พบต่อกระบวนการ splicing ในยีน <i>CYP11B1</i> ของผู้ป่วย โดยการทำให้ minigene experiment.....	31
3.1 การสร้าง minigene.....	31
3.2 การนำ minigene construct เข้าสู่เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมแบบ ชั่วคราว (transient transfection).....	40
3.3 สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ COS-7 ที่ได้ทำ transient transfection แล้ว (RNA extraction).....	44
3.4 การเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็นซีดีเอ็นเอ (reverse transcription) และการ เปรียบเทียบผลของมิวเทชันแบบ IVS7+1G>A ที่พบต่อกระบวนการ splicing ของผู้ป่วยเทียบกับคนปกติ.....	45



บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	47
1. ผลของการวิเคราะห์ยีน <i>CYP11B1</i> เพื่อหามิวเทชันในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลสทั้ง 3 ราย (mutation analysis).....	47
2. ผลของการวิเคราะห์ว่ามิวเทชันที่พบในผู้ป่วยนั้นได้รับการถ่ายทอดมาจากบิดาและมารดาถูกต้องตามกฎการถ่ายทอดทางพันธุกรรมหรือไม่.....	50
3. ผลของการวิเคราะห์มิวเทชันแบบ splice site ที่พบ ต่อกระบวนการ splicing ในยีน <i>CYP11B1</i> ของผู้ป่วย.....	52
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	68
สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล .....	68
ข้อเสนอแนะ .....	72
รายการอ้างอิง .....	74
ภาคผนวก.....	78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	81

## สารบัญรูป

รูปที่ 1 ตำแหน่งและภาพตัดขวางของต่อมหมวกไต ( <a href="http://www.adrenalfatigue.co.nz/adrenal-gland-function/">http://www.adrenalfatigue.co.nz/adrenal-gland-function/</a> ).....	8
รูปที่ 2 โครงสร้างภายในของต่อมหมวกไต ( <a href="http://www.endocrinesurgery.net.au/adrenal-anatomy/">http://www.endocrinesurgery.net.au/adrenal-anatomy/</a> ).....	10
รูปที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมน (steroid biosynthesis) .....	10
รูปที่ 4 ภาพอวัยวะเพศกำกวมในผู้ป่วยเพศหญิง (ambiguous genitalia) ( <a href="http://www.soc.ucsb.edu/sexinfo/article/causes-intersexuality">http://www.soc.ucsb.edu/sexinfo/article/causes-intersexuality</a> ).....	12
รูปที่ 5 กระบวนการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมน (steroid biosynthesis) เมื่อเกิด ภาวะขาด เอนไซม์ 11ปีตาไฮดรอกซิเลส .....	13
รูปที่ 6 โครงสร้างยีน <i>CYP11B1</i> .....	14
รูปที่ 7 ลำดับเบสสำคัญของบริเวณ exon-intron junctions ( <a href="http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/lecture12.html">http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/lecture12.html</a> ) .....	16
รูปที่ 8 กระบวนการการตัดอินทรอน (splicing pathway) ( <a href="http://www.nature.com/nrn/journal/v8/n11/box/nrn2237_BX1.html">http://www.nature.com/nrn/journal/v8/n11/box/nrn2237_BX1.html</a> ).....	17
รูปที่ 9 ตำแหน่งของไพรเมอร์ในการตรวจหามิวเทชันในยีน <i>CYP11B1</i> ของผู้ป่วย.....	26
รูปที่ 10 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของเอ็กซอน 1 โดยใช้โปรแกรม Primer 3.....	26
รูปที่ 11 ตำแหน่งของมิวเทชันแบบ IVS7+1G>A ในยีน <i>CYP11B1</i> ของผู้ป่วย .....	33
รูปที่ 12 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับสร้าง minigene construct .....	33
รูปที่ 13 องค์ประกอบของพลาสมิด pcDNA <sup>TM</sup> 3.1/myc-His B mammalian expression vector .....	34
รูปที่ 14 ตำแหน่งของไพรเมอร์ <i>CYP11B1_IVS7_F_BamHI</i> -HF และไพรเมอร์ <i>CYP11B1_IVS7_R_XbaI</i> .....	35
รูปที่ 15 ขั้นตอนการสร้าง minigene construct .....	39
รูปที่ 16 การวางแผนการทำ transient transfection.....	41

รูปที่ 17 ปริมาณของสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ transient transfection .....	43
รูปที่ 18 งานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมที่มีการทำ transient transfection แล้ว .....	44
รูปที่ 19 Electropherogram จากการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing ของผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2 ซึ่งมีมิวเทชันแบบ nonsense ในเอ็กซอนที่ 3 .....	48
รูปที่ 20 Electropherogram จากการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing ของผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2 ซึ่งมีมิวเทชันแบบ splice site ในอินทรอนที่ 7 .....	48
รูปที่ 21 Electropherogram จากการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing ของผู้ป่วยรายที่ 3 ซึ่งมีมิวเทชันแบบ deletion ในเอ็กซอนที่ 4 .....	49
รูปที่ 22 Electropherogram จากการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing ของผู้ป่วยรายที่ 3 ซึ่งมีมิวเทชันแบบ missense ในเอ็กซอนที่ 6 .....	50
รูปที่ 23 แผนภาพ pedigree ของครอบครัวผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2 .....	51
รูปที่ 24 แผนภาพ pedigree ของครอบครัวผู้ป่วยรายที่ 3 .....	52
รูปที่ 25 ภาพเจลแสดงขนาดของดีเอ็นเอของคนปกติเมื่อทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับสร้าง minigene construct ซึ่งมีขนาด 1,638 คู่เบส .....	53
รูปที่ 26 ภาพเจลแสดงขนาดของดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยเมื่อทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับสร้าง minigene construct ซึ่งมีขนาด 1,638 คู่เบส .....	54
รูปที่ 27 ภาพเจลแสดงขนาดของดีเอ็นเอของคนปกติเมื่อทำ PCR ด้วยไพรเมอร์คู่ที่สอง ซึ่งมีขนาด 1,598 คู่เบส .....	54
รูปที่ 28 ภาพเจลแสดงขนาดของดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยเมื่อทำ PCR ด้วยไพรเมอร์คู่ที่สอง ซึ่งมีขนาด 1,598 คู่เบส .....	55
รูปที่ 29 ภาพเจลแสดงขนาดของพลาสมิด ดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วย เมื่อทำการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ .....	56
รูปที่ 30 ภาพเจลแสดงขนาดของพลาสมิด ดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยเมื่อทำการตัด ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ หลังจากเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน PCR .....	56
รูปที่ 31 ภาพเจลแสดงขนาดของพลาสมิด ดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยเมื่อทำการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งพบว่าขนาดของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ไม่ถูกต้อง .....	57

รูปที่ 32 ภาพเจลแสดงขนาดของพลาสมิด ดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยเมื่อทำการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ หลังจากเปลี่ยนพลาสมิด .....	58
รูปที่ 33 ภาพเจลแสดงขนาดโคลนีนของผู้ป่วยที่คัดเลือกมาจำนวนทั้งสิ้น 10 โคลนีน.....	59
รูปที่ 34 ภาพเจลแสดงขนาดโคลนีนของคนปกติที่คัดเลือกมาจำนวนทั้งสิ้น 10 โคลนีน.....	59
รูปที่ 35 ภาพเจลแสดงขนาดของชิ้นส่วน PCR คนปกติที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ <i>SacI</i> .....	60
รูปที่ 36 ภาพเจลแสดงขนาดของดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยเมื่อทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ CYP11B1_IVS7_F_ <i>BamHI</i> -HF และไพรเมอร์ CYP11B1_IVS7_R_ <i>XbaI</i> .....	61
รูปที่ 37 ภาพเจลแสดงขนาดของพลาสมิด ดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วย เมื่อทำการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ .....	61
รูปที่ 38 ภาพเจลแสดงขนาดโคลนีนของทั้งคนปกติและของผู้ป่วย .....	62
รูปที่ 39 เซลล์ COS-7 หลังจากทำการ subculture เป็นเวลา 2 วัน .....	63
รูปที่ 40 ขนาดของซีดีเอ็นเอของทั้งคนปกติและของผู้ป่วยที่มีมิวเทชันแบบ IVS7+1G>A.....	64
รูปที่ 41 แผนภาพการ splicing ของคนปกติและแสดงผลการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing จากซีดีเอ็นเอของคนปกติ.....	65
รูปที่ 42 แผนภาพการ splicing ของผู้ป่วยและแสดงผลการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing จากซีดีเอ็นเอของผู้ป่วยขนาด 481 คู่เบส.....	66
รูปที่ 43 แสดงแผนภาพการ splicing ของผู้ป่วยและแสดงผลการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing จากซีดีเอ็นเอของผู้ป่วยขนาด 283 คู่เบส.....	67

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ทั้ง 8 คู่ ที่มีความจำเพาะสูงต่อยีน <i>CYP11B1</i> .....	27
ตารางที่ 2 องค์ประกอบและปริมาณของสารละลายผสม ในหลอดของแต่ละเอ็กซอน (ยกเว้นเอ็กซอน 3) .....	28
ตารางที่ 3 องค์ประกอบและปริมาณของสารละลายผสม ในหลอดสำหรับเอ็กซอน 3 .....	28
ตารางที่ 4 ขนาดของผลผลิต PCR ของยีน <i>CYP11B1</i> แต่ละเอ็กซอน .....	29
ตารางที่ 5 องค์ประกอบและปริมาณของสารละลายผสมสำหรับเพิ่มจำนวนจีโนมิกดีเอ็นเอของ คนปกติและผู้ป่วยที่พบมิวเทชันแบบ splice site นี้ .....	35
ตารางที่ 6 องค์ประกอบของสารละลายผสมในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ .....	36
ตารางที่ 7 องค์ประกอบของสารละลายผสมในการทำ ligation .....	37
ตารางที่ 8 องค์ประกอบของสารละลายผสมในขั้นตอนที่ 1 .....	45
ตารางที่ 9 องค์ประกอบของสารละลายผสมในขั้นตอนที่ 2 .....	45
ตารางที่ 10 มิวเทชันแบบ splice site ที่ค้นพบในยีน <i>CYP11B1</i> (Nguyen, Nguyen et al., 2015) .....	71

## สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการทดลองด้วย minigene สำหรับมิวเทชันแบบ splice site ในยีน <i>CYP11B1</i> .....	31
--	----



# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิด (Congenital Adrenal Hyperplasia; CAH) เป็นหนึ่งในความผิดปกติทางต่อมไร้ท่อที่พบได้บ่อยในเด็ก และสาเหตุของโรคนั้นเกิดมาจากความผิดปกติทางพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดแบบยีนด้อยบนออโตโซม (autosomal recessive) โดยเกิดจากมิวเทชัน (mutation) ในยีน *CYP11B1* ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการสร้างฮอร์โมนคอร์ติซอล (cortisol) บริเวณต่อมหมวกไตชั้นนอก (adrenal cortex) ส่งผลให้เกิดการคั่งของสารตั้งต้นเหนือตำแหน่งเอนไซม์ที่ขาด อีกทั้งยังมีการหันไปวิถีทางอื่นด้วย (สมจิตร จารูรัตนศิริกุล, 2548) ความไม่สมดุลของระดับฮอร์โมนต่าง ๆ เหล่านี้ ทำให้เกิดอาการทางคลินิกได้ต่าง ๆ กันแล้วแต่ชนิดของเอนไซม์ที่ขาด เช่น มีอวัยวะเพศกำกวม (ambiguous genitalia) มีความไม่สมดุลของสารน้ำและเกลือแร่ มีการสูญเสียเกลือหรือมีการคั่งของเกลือ เป็นต้น หากไม่ได้รับการวินิจฉัยที่ถูกต้อง อาจส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ในช่วงวัยทารกตอนต้น โดยภาวะที่พบได้บ่อยที่สุดของโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดนี้ คือ ภาวะขาดเอนไซม์ 21ไฮดรอกซิเลส (21-hydroxylase deficiency) ซึ่งพบประมาณร้อยละ 90-95 (Rabbani, Mahdieh et al., 2011)

ภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส (11 $\beta$ -hydroxylase deficiency; 11 $\beta$ -OHD) เป็นภาวะที่พบได้มากเป็นอันดับที่สองของกลุ่มโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิด ซึ่งพบประมาณร้อยละ 5-8 ของผู้ป่วยโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดทั้งหมด (Reisch, Hogler et al., 2013) และมีส่วนมาจากการเกิดมิวเทชันในยีน *CYP11B1* ซึ่งเป็นยีนที่มีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ 11บีตาไฮดรอกซิเลส (11 $\beta$ -OH) โดยมิวเทชันที่เกิดจะต้องเป็นมิวเทชันแบบที่ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ 11บีตาไฮดรอกซิเลส หยุดการทำงานลงหรือทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ลดลง (inactivating mutation) อีกทั้งเอนไซม์ดังกล่าวยังมีความจำเป็นในกระบวนการสร้างฮอร์โมนอัลโดสเตอโรน (aldosterone) และฮอร์โมนคอร์ติซอล โดยจะเปลี่ยนคือออกซิคอร์ติโคสเตอโรน

(deoxycorticosterone; DOC) และ 11ดีออกซีคอร์ติซอล (11-deoxycortisol) ไปเป็น ฮอริโมน อัลโดสเตอโรนและฮอริโมนคอร์ติซอล ตามลำดับ ดังนั้น การขาดเอนไซม์ 11บีตาไฮดรอกซิเลสนี้ จึงทำให้การสร้างฮอริโมนอัลโดสเตอโรนและฮอริโมนคอร์ติซอลลดลง เป็นผลให้กลไกย้อนกลับที่ไปกระตุ้นต่อมใต้สมองในส่วนของการผลิตฮอริโมนให้แก่ต่อมหมวกไตพยายามผลิตฮอริโมนมากขึ้น ส่งผลให้เปลือกต่อมหมวกไตมีขนาดใหญ่ขึ้น อีกทั้งยังทำให้มีการสร้างฮอริโมนเพศชาย (androgen) มากขึ้นอีกด้วย สำหรับวิถีทางของอัลโดสเตอโรนนั้น แม้ว่าจะเกิดการขาดฮอริโมนอัลโดสเตอโรนแต่ก็ จะมีการคั่งของดีออกซีคอร์ติโคสเตอโรน ซึ่งมีฤทธิ์เป็นฮอริโมนมินเนอราโลคอร์ติคอยด์อย่างอ่อน (weak mineralocorticoid) เพียง 1/10-1/50 เท่าของอัลโดสเตอโรนเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตาม ถ้ามี ปริมาณของดีออกซีคอร์ติโคสเตอโรนมาก จะทำให้มีลักษณะทางคลินิกเหมือนกับมี ฮอริโมนอัลโดสเตอโรนปริมาณมากได้ โดยในทารกเพศหญิงจะมีวัยวะเพศกำกวม ในขณะที่ทารก เพศชายมีวัยวะเพศปกติ (Nimkarn and New, 2008)

ยีน *CYP11B1* เป็นยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 8 (8q21) ประกอบด้วยเอ็กซอนทั้งสิ้น 9 เอ็กซอน (Zhao, Han et al., 2008) แพลรหัสเป็นกรดอะมิโนทั้งสิ้น 503 กรดอะมิโน และมียีน *CYP11B2* เป็นยีนที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสเป็นอย่างมาก (Soardi, Penachioni et al., 2009) โดย ยีน *CYP11B1* ไม่มีการแสดงออกในเลือดแต่มีการแสดงออกมากที่ต่อมหมวกไต ดังนั้นการเกิด มิวเทชันในยีน *CYP11B1* จึงส่งผลให้เกิดภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส (White, Dupont et al., 1991)

ปัจจุบันพบว่ามียางงานการเกิดมิวเทชันในยีน *CYP11B1* มากกว่า 50 มิวเทชัน โดยพบได้ทั้ง มิวเทชันแบบ missense แบบ nonsense แบบ splice site แบบ small deletions แบบ small insertions แบบ gross deletions และแบบ complex rearrangements (Zhao, Han et al., 2008) ซึ่งมิวเทชันเหล่านี้จะส่งผลให้โปรตีนเปลี่ยนแปลงไป และจากการศึกษารายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่ายังไม่มีรายงานการวิจัยใดที่ศึกษาการเกิดมิวเทชันในผู้ป่วยชาวไทยเลย ดังนั้นจึงเป็นการดี เนื่องจากทางกลุ่มวิจัยที่ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มีผู้ป่วยที่วินิจฉัยเบื้องต้น โดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญแล้วว่าน่าจะเป็นภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส จึงจำเป็นที่จะต้อง ทำการศึกษา และวิเคราะห์ผู้ป่วยทางด้านพันธุกรรมระดับโมเลกุลเพื่อเป็นการยืนยันผลการวินิจฉัย ของแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ ซึ่งนำไปสู่การรักษาผู้ป่วยได้อย่างถูกต้อง และเพื่อให้ข้อมูลที่ถูกต้องกับผู้ป่วย



อีกทั้งเพื่อเป็นการค้นหามิวเทชันในยีน *CYP11B1* รูปแบบใหม่ และนำไปสู่การศึกษาความสัมพันธ์ของมิวเทชันรูปแบบใหม่นี้กับภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลสอีกด้วย

### คำสำคัญ (Key word)

11 $\beta$ -hydroxylase deficiency, congenital adrenal hyperplasia, 11 $\beta$ -OHD, CAH, *CYP11B1*

### คำถามในงานวิจัย (Research question)

สาเหตุทางพันธุกรรมที่ทำให้ผู้ป่วยชาวไทยทั้ง 3 ราย เกิดภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส?

### สมมติฐาน (Hypothesis)

มิวเทชันในยีน *CYP11B1* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลสในผู้ป่วยชาวไทยทั้ง 3 ราย

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์หามิวเทชันในยีน *CYP11B1* ของผู้ป่วยชาวไทยที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส
2. เพื่อศึกษาผลของมิวเทชันที่พบในผู้ป่วยชาวไทยที่มีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส

### ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษา ยีน *CYP11B1* ของผู้ป่วยชาวไทยทั้ง 3 รายที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญจากแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์แล้ว ว่ามีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส พร้อมทั้งศึกษา ยีน *CYP11B1* ของพ่อและแม่ของผู้ป่วยรายนั้นๆ ด้วย โดยจะวิเคราะห์ยีน *CYP11B1* เพื่อหามิวเทชัน (mutation analysis) ในผู้ป่วยแต่ละราย และเมื่อพบมิวเทชันของผู้ป่วยแล้ว ทำการวิเคราะห์ผลของมิวเทชันนั้นๆ โดยถ้าพบว่ามีวเทชันที่พบในผู้ป่วยเป็นแบบ nonsense, deletion หรือ insertion สามารถสรุปได้เลยเนื่องจากมิวเทชันดังกล่าวนี้มีผลทำให้โปรตีน *CYP11B1* ผิดปกติไป หากมิวเทชันที่พบเป็นแบบ splice site จะต้องวิเคราะห์ผลของมิวเทชันรูปแบบนี้โดยใช้การทดลองด้วย minigene และถ้ามิวเทชันที่พบเป็นแบบ missense จะต้องทำการวิเคราะห์ผลของมิวเทชันด้วยการทำ functional analysis

## ข้อจำกัดในการวิจัย

เนื่องจากยีน *CYP11B1* ไม่มีการแสดงออกในเลือด แต่มีการแสดงออกอย่างมากในต่อมหมวกไต ดังนั้น ในการศึกษาผลของการแสดงออกของมิวเทชัน จึงไม่สามารถที่จะสกัดอาร์เอ็นเอจากเลือดของผู้ป่วยมาศึกษาได้ และเป็นการยากที่จะสามารถนำต่อมหมวกไตของผู้ป่วยมาสกัดอาร์เอ็นเอได้เช่นกัน ดังนั้น ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *CYP11B1* ที่เกิดมิวเทชันนั้น จะต้องทำการศึกษาโดยการสร้าง construct ทั้งของคนปกติและของผู้ป่วยขึ้นมา แล้วนำไปใส่เข้าไปในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเพื่อให้เซลล์เหล่านั้นทำให้ยีน *CYP11B1* เกิดการแสดงออกแทนนั่นเอง

## จริยธรรมทางการวิจัย

การวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติการทำวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว (IRB No. 505/53 และ COA No. 092/2011)

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

### 1. ประโยชน์ต่อตัวผู้ป่วยและครอบครัว

การพบสาเหตุของความผิดปกติ จะทำให้การดูแลรักษาผู้ป่วยมีแนวทางที่ชัดเจนขึ้น จากผลการศึกษาทำให้แพทย์สามารถวินิจฉัยและให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์กับผู้ป่วยได้อย่างแม่นยำมากขึ้น และนำไปสู่การรักษาเพื่อบรรเทาอาการได้ดีขึ้น

### 2. ประโยชน์ต่อองค์ความรู้พื้นฐานสำหรับภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลสในประเทศไทย

สามารถพบปัจจัยทางพันธุกรรมที่เป็นสาเหตุของโรค ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเข้าใจในการเกิดโรค และนำไปสู่การรักษาที่ดีขึ้นในอนาคต

## วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งวิธีการดำเนินงานวิจัยออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. วิเคราะห์ยีน *CYP11B1* เพื่อหามิวเทชันในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นภาวะขาด 11 บีตาไฮดรอกซิเลสทั้ง 3 ราย (mutation analysis)

2. วิเคราะห์ว่ามีวเทชันที่พบในผู้ป่วยนั้นได้รับการถ่ายทอดมาจากบิดา และมารดาถูกต้องตามกฎการถ่ายทอดทางพันธุกรรมหรือไม่

3. วิเคราะห์ผลของมิวเทชันที่พบต่อโปรตีน CYP11B1 โดยมีวเทชันที่มีความเป็นไปได้ที่จะพบมีทั้งสิ้น 5 แบบ ดังนี้

1.) มิวเทชัน แบบ nonsense

2.) มิวเทชัน แบบ deletion

3.) มิวเทชัน แบบ insertion

4.) มิวเทชัน แบบ splice site (แบบใหม่)

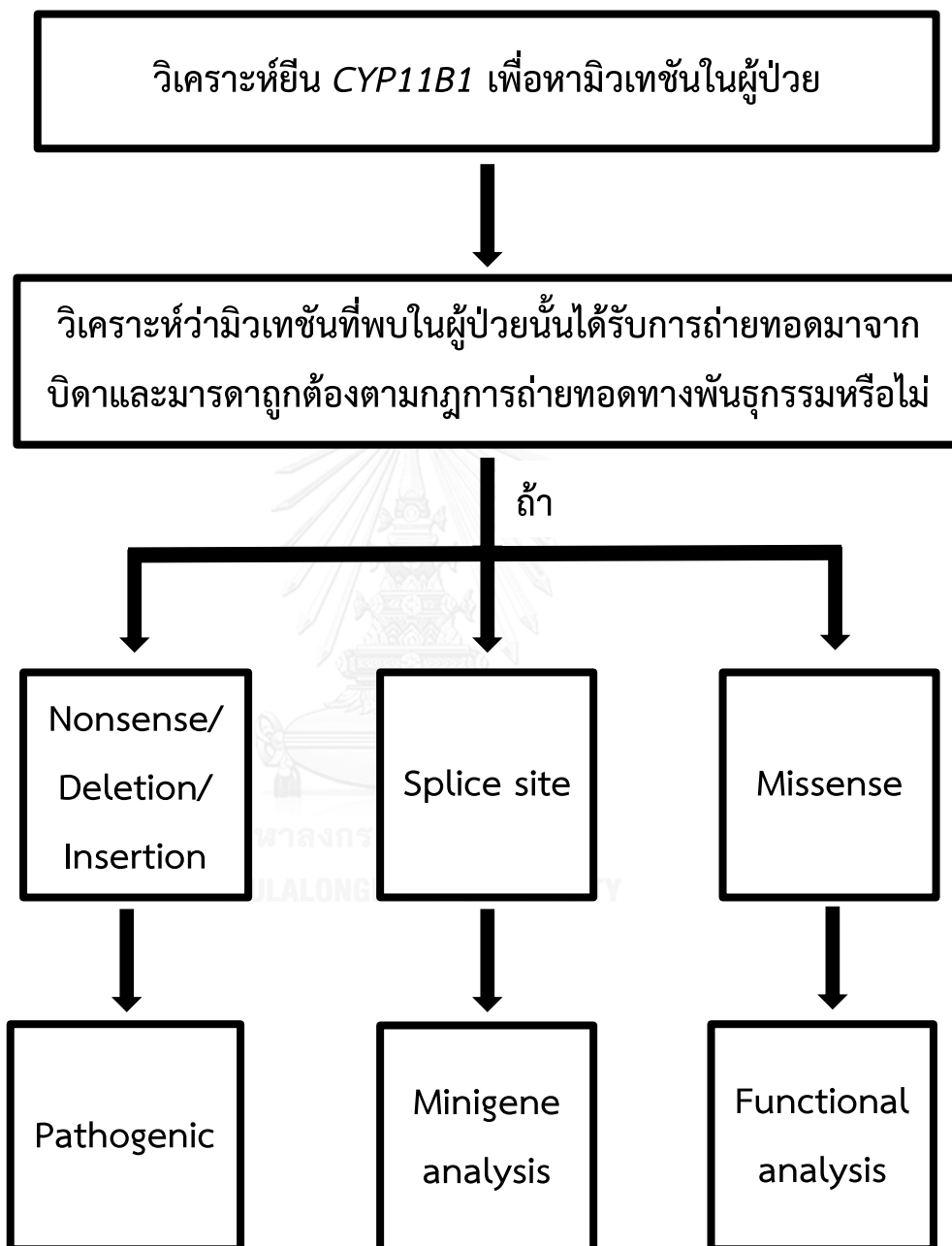
5.) มิวเทชัน แบบ missense (แบบใหม่)

3.1 ถ้ามิวเทชันที่พบเป็นแบบที่ 1-3.) มิวเทชันนั้นมีผลทำให้โปรตีน CYP11B1 ผิดปกติไป

3.2 ถ้ามิวเทชันที่พบเป็นแบบที่ 4.) จะต้องตรวจสอบว่ามีวเทชันนั้น มีผลทำให้เกิดการตัดอินทรอน (splicing) ผิดปกติไปหรือไม่ และมีผลทำให้เกิดอาร์เอ็นเอที่ผิดปกติหรือไม่ โดยการใช้การทดลองด้วย minigene

3.3 ถ้ามิวเทชันที่พบเป็นแบบที่ 5.) จะทำการวิเคราะห์มิวเทชันที่พบด้วยการทำ functional analysis

ลำดับขั้นตอนในการวิจัย (Conceptual framework)



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

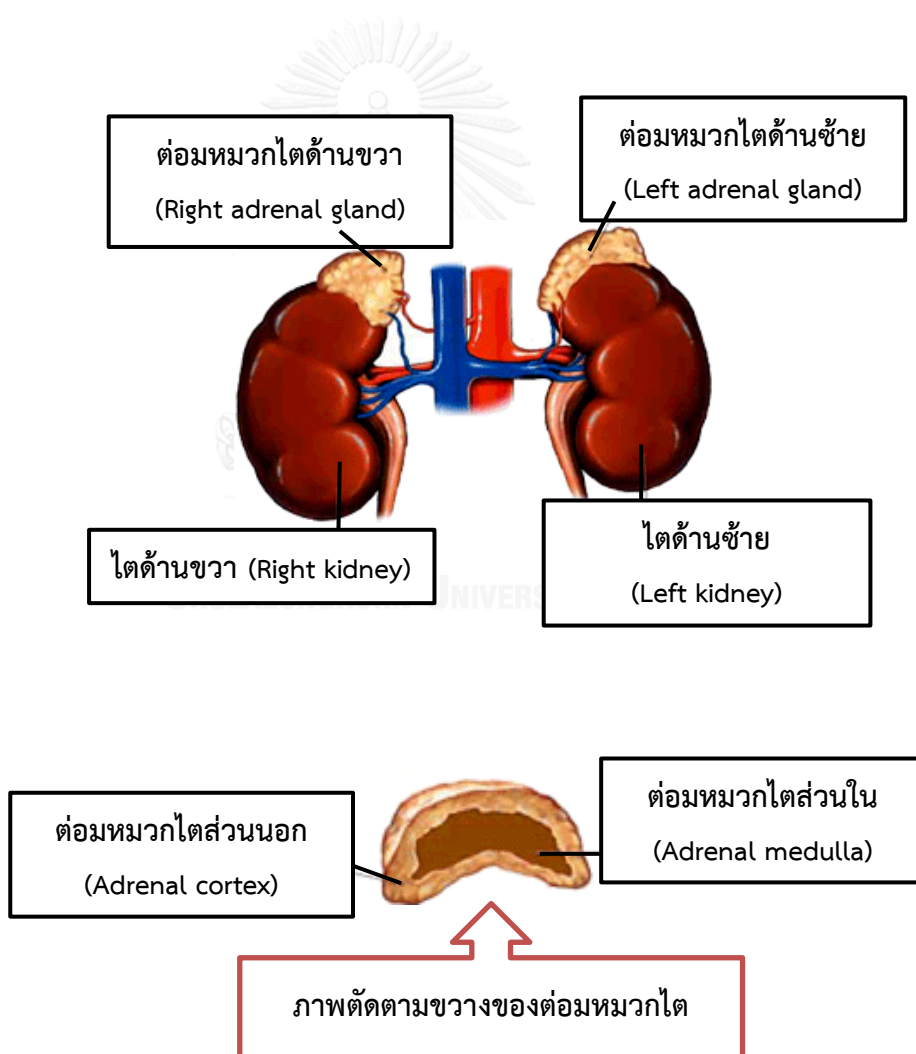
#### โรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิด

โรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิด (Congenital Adrenal Hyperplasia; CAH) เป็นหนึ่งในโรคทางเมแทบอลิซึมที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่พบได้มากที่สุดโรคหนึ่ง เกิดจากความผิดปกติของต่อมหมวกไตส่วนนอก (adrenal cortex) มีจำนวนเซลล์มากเกินไป เป็นผลให้ต่อมหมวกไตมีขนาดใหญ่กว่าปกติ อีกทั้งยังส่งผลให้มีการสร้างฮอร์โมนเพศชาย (androgen) จำนวนมากในระหว่างการเจริญเติบโตของตัวอ่อนอีกด้วย จึงทำให้ในกรณีของทารกเพศหญิงจะมีอวัยวะเพศกำกวม (ambiguous genitalia) คล้ายอวัยวะเพศของเพศชาย ส่วนในกรณีของทารกเพศชายจะมีอวัยวะเพศที่ปกติทำให้ตรวจไม่พบในระยะแรก โดยความผิดปกติดังกล่าวที่ส่งผลให้เกิดโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดนั้น เกิดมาจากการที่ต่อมหมวกไต ไม่สามารถสร้างฮอร์โมนคอร์ติซอลได้ เนื่องมาจากการขาดเอนไซม์ใดเอนไซม์หนึ่งในกระบวนการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมน ที่บริเวณของต่อมหมวกไตส่วนนอกนั่นเอง (สมจิตร์ จารุรัตน์ศิริกุล, 2548); (Krone and Artl, 2009)

โดยต่อมหมวกไต เป็นต่อมไร้ท่อที่อยู่บริเวณส่วนบนของไตทั้งสองข้าง (ดังรูปที่ 1) ภายในมีหลอดเลือด หลอดน้ำเหลืองและเส้นประสาทเข้ามายังต่อมหมวกไต เนื้อต่อมของต่อมหมวกไตจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ต่อมหมวกไตส่วนนอก มีลักษณะเป็นเนื้อสีเหลือง ซึ่งมีหน้าที่ในการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมนที่สำคัญ 3 ชนิด คือ ฮอร์โมนคอร์ติซอล แอลโดสเตอโรน (aldosterone) และฮอร์โมนเพศชาย และอีกส่วนหนึ่ง คือ ต่อมหมวกไตส่วนใน (adrenal medulla) อยู่ด้านในสุดมีสีน้ำตาลแดง และมีหน้าที่ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอมีนที่สำคัญ 2 ชนิด คือ เอพิเนฟรินและนอร์เอพิเนฟริน

ต่อมหมวกไตส่วนนอก ยังแบ่งออกเป็น 3 ชั้น (ดังรูปที่ 2) ได้แก่ ชั้นนอกสุด คือ zona glomerulosa เป็นชั้นที่อยู่ติดกับแคปซูล เซลล์มีขนาดเล็กจับกันเป็นกลุ่มกลม (glomerulus-like) หรือเป็นแฉกโค้ง (archlike-like) เซลล์ในบริเวณนี้มีลักษณะของเซลล์ที่มีการหลั่งของสเตอรอยด์

(steroid-secreting cells) แต่ไม่มีเอนไซม์  $17\alpha$ -ไฮดรอกซิเลส จึงไม่สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนคอร์ติซอลและฮอร์โมนเพศได้ เซลล์จึงทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แอลโดสเตอโรน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมปริมาณน้ำนอกเซลล์และสมดุลของโพแทสเซียม ชั้นกลาง คือ zona fasciculata เป็นชั้นที่หนาที่สุด เซลล์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ในชั้นแรกมีการจัดตัวเป็นแถวตรงเรียงขนานกัน โดยเซลล์ในบริเวณนี้มีลักษณะของเซลล์ที่มีการหลั่งของสเตอรอยด์เช่นกัน เพียงแต่เซลล์บริเวณนี้มีเอนไซม์  $17\alpha$ -ไฮดรอกซิเลส ดังนั้นเซลล์บริเวณนี้จึงสังเคราะห์และหลั่งฮอร์โมนคอร์ติซอล ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อร่างกายทั้งกระบวนการสร้างและกระบวนการสลาย ด้านภาวะเครียดและทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงอีกด้วย

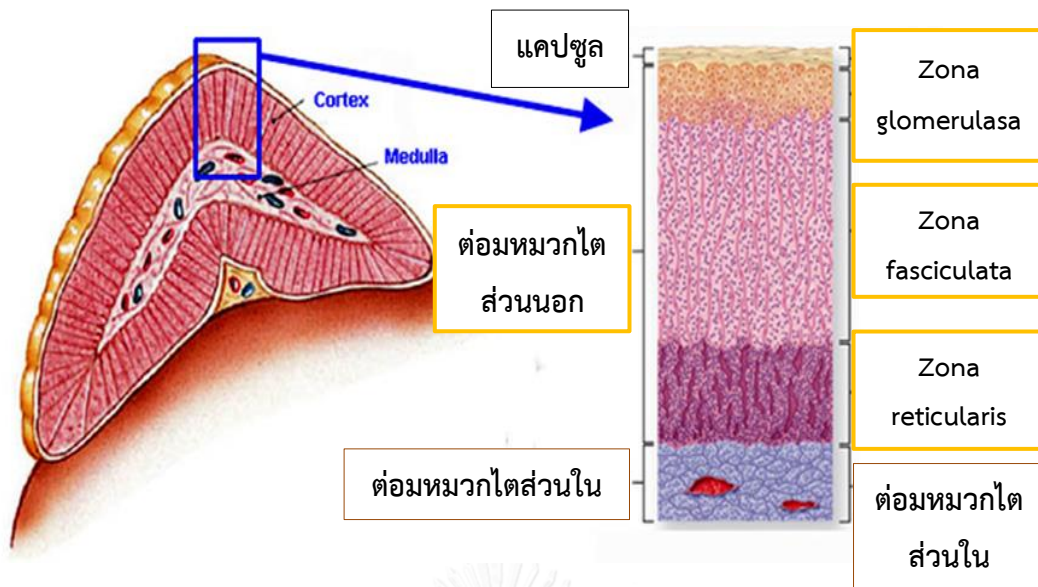


รูปที่ 1 ตำแหน่งและภาพตัดขวางของต่อมหมวกไต

(<http://www.adrenalfatigue.co.nz/adrenal-gland-function/>)

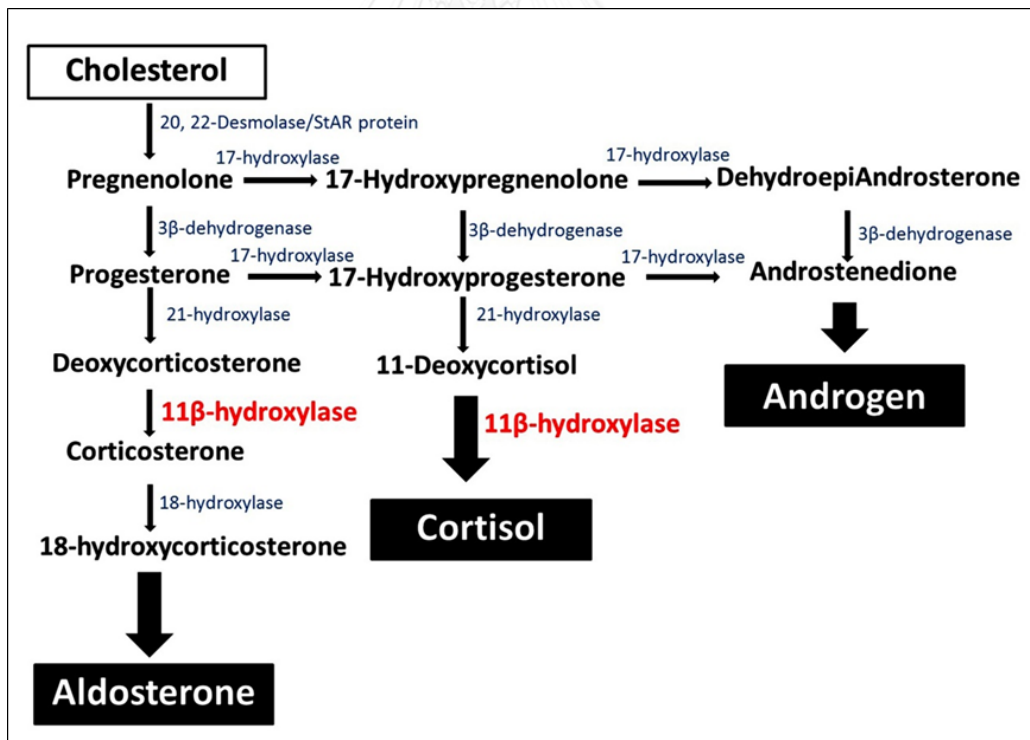
โดยกลไกในการควบคุมการสร้างและการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติซอล จะอาศัยกลไกย้อนกลับที่เรียกว่า hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis นอกจากนี้เซลล์บริเวณนี้ยังมีเอนไซม์ 17,20-ไฮดรอกซิเลส จึงสามารถสังเคราะห์และหลั่งฮอร์โมนเพศได้ด้วย และชั้นที่อยู่ใตสุด คือ zona reticularis เป็นชั้นในสุดของต่อมหมวกไตส่วนนอก เซลล์เรียงต่อกันเป็นร่างแหสั้นๆ เซลล์ในบริเวณนี้มีลักษณะของเซลล์ที่มีการหลั่งของสเตอรอยด์และทำหน้าที่ในการสังเคราะห์และหลั่งฮอร์โมนเพศชาย ซึ่งมีบทบาทในการเริ่มมีขนที่หัวหน่าวนั่นเอง (พรรณี หนูชื้อตรง and อรพิน เกิดประเสริฐ, 2555)

โรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิด เป็นกลุ่มของโรคที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ ยีนด้อยบนโครโมโซมร่างกาย (autosomal recessive) และมีสาเหตุมาจากการขาดเอนไซม์ใดเอนไซม์หนึ่งหรือการขาดแคลนโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องในกระบวนการของการสังเคราะห์ สเตอรอยด์ฮอร์โมน (รูปที่ 3) โดยสามารถจำแนกความผิดปกติในกลุ่มโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิด ได้ทั้งสิ้น 6 ชนิด ดังนี้ 21-hydroxylase deficiency (21-OHD), 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency (11 $\beta$ -OHD), 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency (3 $\beta$ -HSD), 17 $\alpha$ -hydroxylase deficiency (17-OHD), Steroidogenic acute regulatory protein (STAR) deficiency และ P450 oxidoreductase deficiency และความผิดปกติทุกชนิดมีการถ่ายทอดทาง พันธุกรรมแบบยีนด้อยบนโครโมโซมร่างกายทั้งสิ้น (สมจิตร จารูรัตน์ศิริกุล, 2548), (Krone and Arlt, 2009)



รูปที่ 2 โครงสร้างภายในของต่อมหมวกไต

(<http://www.endocrinesurgery.net.au/adrenal-anatomy/>)



รูปที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมน (steroid biosynthesis)

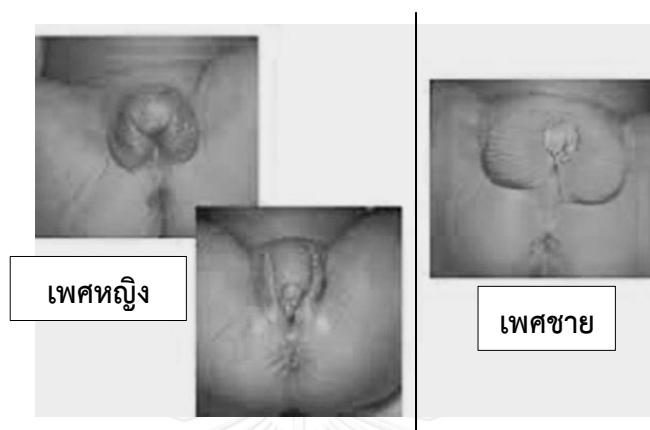


## ภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลส

ภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลส (11 $\beta$ -hydroxylase deficiency; 11 $\beta$ -OHD) เป็นความผิดปกติที่พบได้มากที่สุดเป็นอันดับที่สองในกลุ่มโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิด รองลงมาจากภาวะขาด 21ไฮดรอกซีเลส (21-hydroxylase deficiency) โดยพบประมาณ 5%-8% ของผู้ป่วยในกลุ่มโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดทั้งหมด หรือกล่าวได้ว่า ในประชากรทั่วไปจะพบผู้ป่วยด้วยโรคนี้ในอัตราส่วน 1 ใน 100,000 คน ถึง 1 ใน 200,000 คน (Mooij, Parajes et al., 2015) แต่พบว่าสำหรับประชากรชาวมุสลิมและชาวยิวในแถบตะวันออกกลางจะพบผู้ป่วยด้วยโรคนี้ถึง 15% ของผู้ป่วยในกลุ่มโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดทั้งหมด (Sahakitrungruang, 2015) หรือคือพบได้ในอัตราส่วน 1 ใน 7000 คน (Melcescu, Phillips et al., 2012)

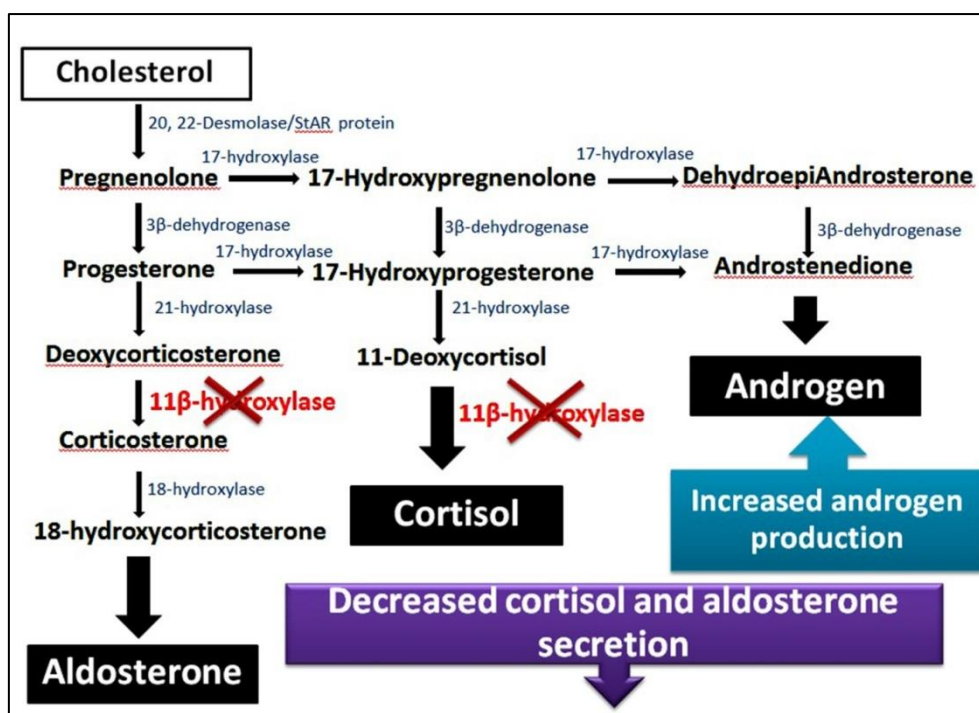
ผู้ป่วยที่มีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลส จะมีปริมาณของสเตอรอยด์ฮอร์โมนต่างๆ ที่ผิดปกติไป มีการคั่งของโซเดียม มีลักษณะของต่อมหมวกไตโตกว่าปกติ อีกทั้งในผู้ป่วยเพศหญิงยังมีอาการของอวัยวะเพศกำกวม (ambiguous genitalia) (รูปที่ 4) นอกจากนี้ยังมีอาการหลักๆ อยู่ 2 อาการที่สามารถใช้วินิจฉัยเบื้องต้นในการจำแนกโรคดังกล่าวนี้ออกจากโรคอื่นๆ ในกลุ่มโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดได้ นั่นคือ อาการที่ร่างกายมีลักษณะที่แข็งแรงแบบเพศชาย (virilization) และอาการความดันโลหิตสูง (hypertension) นั่นเอง โดยภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลส ถูกแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลส แบบ classic (classical 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency) และภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลส แบบ nonclassic (nonclassical 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency) ซึ่งภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลสทั้งสองชนิดนี้จะถูกแบ่งแยกกันด้วยความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยแต่ละราย โดยผู้ป่วยที่มีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลส แบบ classic พบว่าร่างกายจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วกว่าเกณฑ์ปกติในช่วงวัยเด็ก มีผมและขนตามร่างกายมาก มีโครงสร้างร่างกายและมีลักษณะที่แข็งแรงแบบเพศชาย อีกทั้งยังมีความสูงที่ต่ำกว่าเกณฑ์ปกติในช่วงวัยผู้ใหญ่ นอกจากนี้ในผู้ป่วยเพศหญิงจะมีอาการอวัยวะเพศคล้ายกับอวัยวะเพศของผู้ชาย อาการดังกล่าวเกิดมาจากการที่มีการหลั่งฮอร์โมนเพศชายในช่วงที่ผู้ป่วยยังเป็นตัวอ่อนอยู่ ส่วนในผู้ป่วยที่มีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลส แบบ nonclassic จะไม่มีอาการของอวัยวะเพศกำกวม แต่จะมีอาการที่เกิดมาจากการที่ฮอร์โมนเพศชายหลังมากเกินไป นอกจากนี้ผู้ป่วยเพศหญิงในช่วงของวัย

ผู้ใหญ่ผู้นั้น พบว่ามีภาวะที่มีขนแบบชาย (hirsutism) และภาวะเลือดประจำเดือนออกผิดปกติ (oligomenorrhea) ด้วย (Zhao, Han et al., 2008)



รูปที่ 4 ภาพอวัยวะเพศกำกวมในผู้ป่วยเพศหญิง (ambiguous genitalia)  
(<http://www.soc.ucsb.edu/sexinfo/article/causes-intersexuality>)

ภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ ดีออกซีคอร์ติโคสเตอโรน (deoxycorticosterone; DOC) ไปเป็น แอลโดสเตอโรน และการเปลี่ยนแปลง 11-ดีออกซีคอร์ติซอล (11-deoxycortisol) ไปเป็นฮอร์โมนคอร์ติซอล ที่ลดลง (รูปที่ 5) และเมื่อปริมาณของฮอร์โมนคอร์ติซอลลดลงเป็นผลให้เกิดการควบคุมย้อนกลับไปยังการหลั่งของ ACTH (adrenocorticotrophic hormone) ที่ลดลง ส่งผลให้เกิดการหลั่ง ACTH ที่มากเกินไป นอกจากนี้ยังเกิดการคั่งของสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมน มีผลทำให้สารตั้งต้นต่างๆ เหล่านั้นหันไปทางด้านของการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศชาย เป็นผลให้มีการหลั่งของฮอร์โมนเพศชายที่มากเกินไป โดยสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส คือ การเกิดมิวเทชันใน ยีน *CYP11B1* นั้นเอง (Nimkarn and New, 2008)

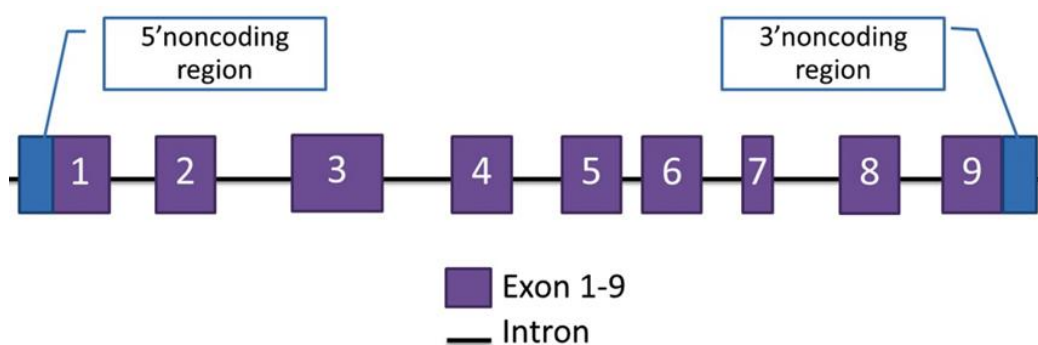


รูปที่ 5 กระบวนการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมน (steroid biosynthesis) เมื่อเกิดภาวะขาดเอนไซม์ 11บีตาไฮดรอกซิเลส

### ยีน *CYP11B1*

ยีน *CYP11B1* เป็นยีนที่อยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 8 (8q21) ประกอบด้วยเอ็กซอนทั้งสิ้น 9 เอ็กซอน (รูปที่ 6) ยีนมีขนาด 6.03 กิโลเบส เอ็มอาร์เอ็นเอมีขนาด 1,512 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ทั้งสิ้น 503 กรดอะมิโน โดยมีวเทชันที่เกิดขึ้นในยีน *CYP11B1* นี้จะทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ 11บีตาไฮดรอกซิเลสลดลงหรือไม่สามารถทำงานได้เลย (Zhao, Han et al., 2008) นอกจากนี้ ยีน *CYP11B1* ยังมียีน *CYP11B2* ซึ่งเป็นยีนที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสในบริเวณ coding ถึง 93% และมีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสในบริเวณอินทรอนถึง 90% อีกด้วย โดยที่ยีน *CYP11B2* นั้น มีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์อัลโดสเตอโรนซินเทส (aldosterone synthase) ในขณะที่ยีน *CYP11B1* มีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ 11บีตาไฮดรอกซิเลส ยีนทั้งสองยีนอยู่ห่างกันประมาณ 40 กิโลเบส โดยการแสดงออกของยีน *CYP11B1* นั้น จะถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนอะดรีโนคอร์ติโคโทรฟริก (adrenocorticotrophic hormone; ACTH)

และยีน *CYP11B1* ยังไม่มีการแสดงออกในเลือด แต่มีการแสดงออกมากที่ต่อมหมวกไตอีกด้วย (White, Dupont et al., 1991)



รูปที่ 6 โครงสร้างยีน *CYP11B1*

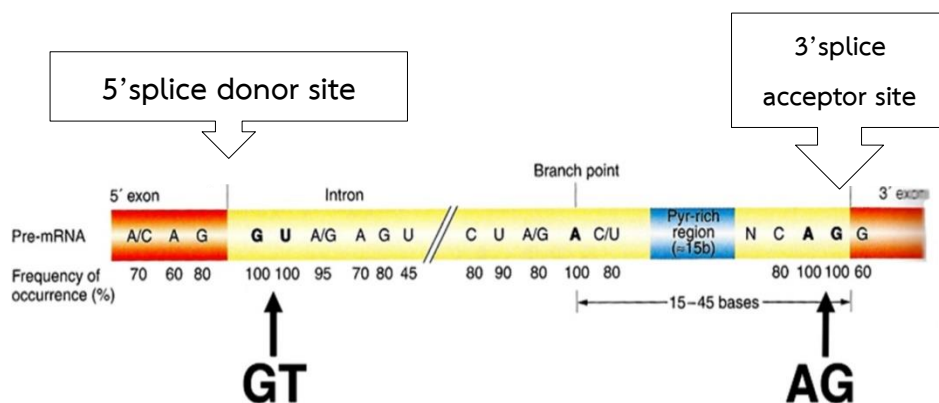
ในปี 1991 มีรายงานว่าพบมิวเทชันในยีน *CYP11B1* ครั้งแรก ซึ่งค้นพบโดย White และคณะ ต่อจากนั้นก็ได้มีการรายงานเกี่ยวกับมิวเทชันในยีน *CYP11B1* มากกว่า 50 ชนิด ซึ่งประกอบไปด้วย มิวเทชันทั้งแบบ missense แบบ nonsense แบบ splice sites แบบ deletions ขนาดเล็ก แบบ deletions ขนาดใหญ่ แบบ insertion และแบบ rearrangement ที่ซับซ้อน ถึงแม้จากรายงานที่ผ่านมามจะพบว่าการกระจายตัวของมิวเทชันในยีน *CYP11B1* มีการกระจายตัวทั่วทั้งยีน แต่ก็พบว่า มิวเทชันส่วนใหญ่จะพบในเอ็กซอนที่ 6, 7 และ 8 นั่นเอง ซึ่งบ่งบอกได้ว่าการกระจายตัวของมิวเทชันในยีน *CYP11B1* นั้น ไม่ได้มีการกระจายตัวแบบสุ่ม และสาเหตุที่พบมิวเทชันที่ก่อให้เกิดโรค ภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส จำนวนมากในเอ็กซอนที่ 6, 7 และ 8 เนื่องมาจากบริเวณเอ็กซอนทั้ง 3 เอ็กซอนนั้น เป็นบริเวณของลำดับเบสที่มีความสำคัญสำหรับการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ 11บีตาไฮดรอกซิเลส นั่นเอง (Zhao, Han et al., 2008)

### มิวเทชัน

มิวเทชัน หรือ การกลาย หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม และลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นจะสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ ซึ่งมิวเทชันมีทั้งในระดับของโครโมโซมและในระดับของยีน โดยในระดับยีนนั้น จะเกิดการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลดีเอ็นเอ จากนั้นจะส่งผ่านไป

ยังเอ็มอาร์เอ็นเอ และแปลงไปเป็นโปรตีนในที่สุด ซึ่งโปรตีนที่มาจากดีเอ็นเอที่เกิดมิวเทชันนั้นก็อาจจะทำให้การทำงานของโปรตีนนั้นๆ เปลี่ยนแปลงไปด้วยเช่นกัน (Clark and Pazdernik, 2013)

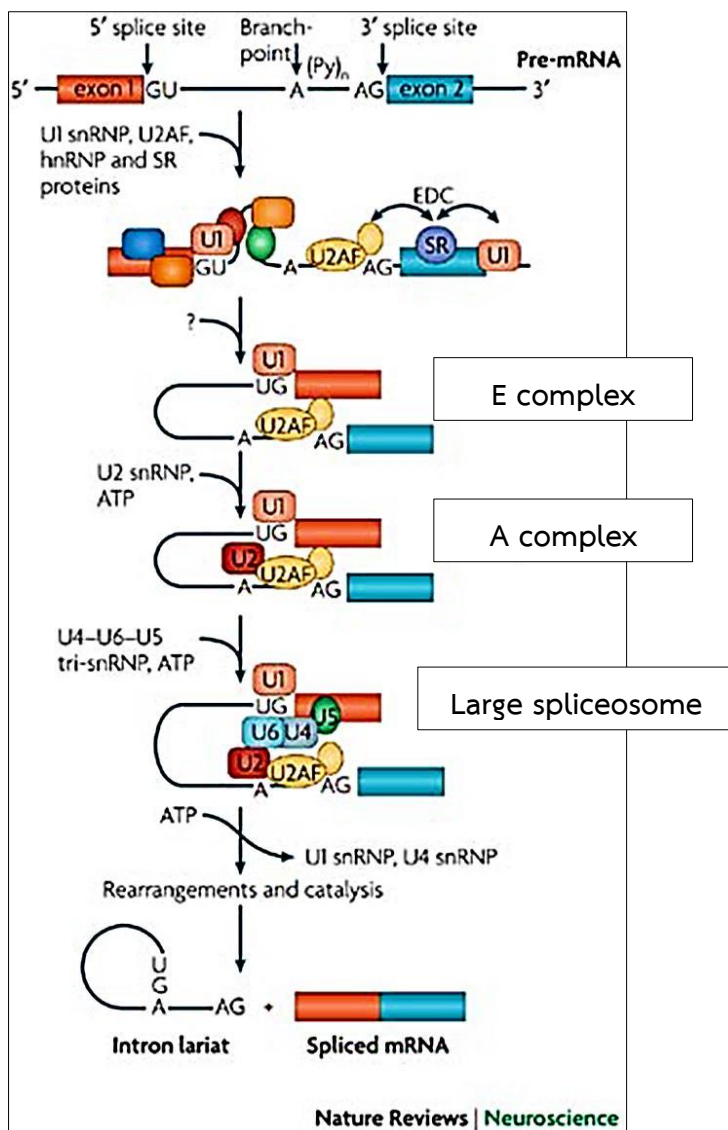
มิวเทชันมีด้วยกันหลายชนิด และมิวเทชันที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย อาจพบได้ทั้งมิวเทชันที่มีความเหมือนและหรือแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละราย โดยมิวเทชันที่แตกต่างกันก็จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่แตกต่างกันด้วย ซึ่งผลของมิวเทชันที่มีต่อโปรตีนนั้น มีด้วยกันหลายรูปแบบ อาทิเช่น เมื่อเกิดมิวเทชันแล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปของกรดอะมิโน (missense mutation) เมื่อเกิดมิวเทชันแล้วไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (silent mutation) เมื่อเกิดมิวเทชันแล้วทำให้เกิดเป็นรหัสหยุด (nonsense mutation) หรือเมื่อเกิดมิวเทชันจากการเพิ่มขึ้นของเบส (insertion) หรือจากการลดลงของเบส (deletion) แล้วทำให้เกิดเฟรมชิฟท์ (frameshift mutation) เป็นต้น (Taylor and Day, 2005) โดยจากข้อมูลของยีนทั้งหมดในฐานข้อมูล The Human Gene Mutation Database (HGMD) พบว่า มีมิวเทชันที่อยู่ในบริเวณส่วนที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (coding) ถึง 86% มีมิวเทชันในบริเวณอินทรอน 11% และมีมิวเทชันในบริเวณ regulatory 3% ดังนั้น มิวเทชันที่บริเวณส่วนที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน จึงเป็นบริเวณที่สนใจเป็นลำดับแรกในการค้นหามิวเทชันในผู้ป่วย และนอกจากในบริเวณของส่วนที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วนั้น ในบริเวณอินทรอน โดยเฉพาะในส่วนของลำดับเบสอนุรักษ์ (consensus sequences) ของ exon-intron splice junctions ก็เป็นบริเวณที่น่าสนใจเป็นลำดับต่อมาในการค้นหามิวเทชันในผู้ป่วยด้วย เนื่องจาก จากข้อมูลในฐานข้อมูลของ HGMD พบว่ามีมิวเทชันอยู่ในส่วนนี้ถึง 10% ของมิวเทชันในบริเวณอินทรอนทั้งหมดที่มีรายงานนั่นเอง (Cooper, Chen et al., 2010) และสำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการสูงจำพวกยูคาริโอตนั้น ความถูกต้องในการตัดอินทรอนและเชื่อมเอ็กซอน (splicing) จะขึ้นอยู่กับบริเวณ exon-intron junctions ซึ่งจะประกอบไปด้วยลำดับเบสที่มีการอนุรักษ์สำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ 5'-splice site, 3'-splice site และ branch site (ดังรูปที่ 7)



รูปที่ 7 ลำดับเบสสำคัญของบริเวณ exon-intron junctions

(<http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/lecture12.html>)

โดยที่ในบริเวณปลาย 5' ของอินทรอนจะเริ่มต้นด้วย splice donor site ซึ่งจะประกอบด้วยเบส GT เป็นเบสสองตัวแรกของอินทรอน ในขณะที่บริเวณปลาย 3' ของอินทรอนจะเป็นส่วนของ splice acceptor site ประกอบด้วยเบส AG เป็นเบสสองตัวสุดท้ายของอินทรอนเสมอ และในส่วน branch site จะมีส่วน branch point ซึ่งจะเป็นตำแหน่งของเบส A (Cartegni, Chew et al., 2002) และบริเวณของ exon-intron junctions ทั้ง 3 ส่วนนี้ จะเป็นบริเวณที่จับของโมเลกุลขนาดใหญ่ชนิดหนึ่ง ที่มีชื่อว่า spliceosome ในขั้นตอนของการตัดอินทรอน นั่นเอง โดย spliceosome เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ประกอบไปด้วย RNA-protein complexes ขนาดเล็ก ที่เรียกว่า snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles) ทั้งสิ้น 5 ชิ้น ได้แก่ U1, U2, U4, U5 และ U6 snRNPs โดยกระบวนการการตัดอินทรอน (splicing pathway) (รูปที่ 8) เริ่มต้นที่ U1 snRNP มาจับที่เบส GU บริเวณ 5' splice site และ U2 snRNP auxiliary factor (U2AF) ขนาด 65-kDa มาจับที่บริเวณ polypyrimidine tract (Py)n ในขณะที่ U2AF ขนาด 35-kDa มาจับกับเบส AG ที่บริเวณ 3' splice site จากนั้น U1 และ U2AF มาเชื่อมกันตรงบริเวณปลายอินทรอนทั้งสองด้าน



รูปที่ 8 กระบวนการการตัดอินทอรอน (splicing pathway)

([http://www.nature.com/nrn/journal/v8/n11/box/nrn2237\\_BX1.html](http://www.nature.com/nrn/journal/v8/n11/box/nrn2237_BX1.html))

กลายเป็น E complex ต่อมา E complex จะมาจับกับ U2 snRNP ที่บริเวณ branch point ซึ่งเรียกรวมตัวของ E complex กับ U2 snRNP ว่า A complex จากนั้น A complex จะจับกับ U4/U6/U5 tri-snRNP และเกิดการเรียงตัวใหม่ โดย U6 snRNP จะมาแทนที่ U1 snRNP กลายเป็น spliceosome ขนาดใหญ่ ในขณะที่ U1 และ U4 snRNPs จะหลุดและสลายไปจากนั้นเกิดการตัดอินทอรอนออก และเชื่อมเอ็กซอนเข้าด้วยกัน (Allison, 2012) ดังนั้นการที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปของ

เบสบริเวณ exon-intron junctions จึงอาจส่งผลให้กระบวนการการตัดอินทรอนไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพได้

## การวินิจฉัยและการรักษา

### การวินิจฉัย

สำหรับการวินิจฉัยโรคในกลุ่มโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดนั้น อัตราส่วนของสารตั้งต้นต่างๆ ในกระบวนการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมนเป็นหลักฐานสำคัญสำหรับการวินิจฉัยโรค ซึ่งภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส นั้น อาการที่แสดงออกในผู้ป่วยจะมีลักษณะที่ทับซ้อนกันกับภาวะ 21-OHD แบบ classic และภาวะ 3 $\beta$ -HSD โดยในการวินิจฉัยภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส สิ่งที่ต้องตรวจในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การเจาะหาเกลือแร่ในเลือด (electrolyte) ซึ่งจะพบโซเดียมสูงและโพแทสเซียมต่ำในเลือด พบระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลในเลือดต่ำ (<20 ไมโครกรัมต่อเดซิลิตร) และระดับ ACTH สูงในเลือด ระดับ plasma renin activity ต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ระดับโซเดียมในเลือดสูงจึงไปยับยั้งการทำงานของ renin ระดับของฮอร์โมน 17-OHP (17-OH Progesterone) มีค่าปกติ (200-1000 นาโนกรัมต่อเดซิลิตร) ในขณะที่ระดับ 11-คีออกซีคอร์ติซอล จะสูง (>1800 นาโนกรัมต่อเดซิลิตร) นอกจากนี้เมื่อตรวจ MRI ยังพบว่า ต่อมหมวกไตมีขนาดใหญ่ขึ้นทั้งสองข้างด้วย (สมจิตร์ จารุรัตนศิริกุล, 2548)

### การรักษา

สำหรับการรักษา พบว่า เป้าหมายหลักของการรักษาโรคในกลุ่มโรคเปลือกต่อมหมวกไตหนาแต่กำเนิดทั้งหมดมีด้วยกัน 2 เป้าหมายหลัก คือ การให้ฮอร์โมนเพื่อแทนที่ฮอร์โมนที่ขาดไปและลดผลกระทบที่เกิดจากสารตั้งต้นของฮอร์โมนที่มากเกินไป โดยสำหรับภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส นั้น จะให้ glucocorticoid แก่ผู้ป่วย เพื่อทำให้ลักษณะที่มีความแข็งแรงเหมือนผู้ชายลดลง ส่วนในผู้ป่วยที่มีอาการของอวัยวะเพศกำกวมควรผ่าตัดแก้ไขก่อนอายุ 3 ปีนั้นเอง (Turcu and Auchus, 2015)



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ไมโครปิเปต; P2 (0.1-2 ไมโครลิตร), P10 (1-10 ไมโครลิตร), P20 (2-20 ไมโครลิตร), P100 (10-100 ไมโครลิตร), P200 (20-200 ไมโครลิตร) และ P1000 (100-1000 ไมโครลิตร) (Thermo Scientific, USA)
2. ทิป; 10 ไมโครลิตร, 200 ไมโครลิตร และ 1000 ไมโครลิตร (Thermo Scientific, USA)
3. เซโรโลจิคัลปิเปตแบบฆ่าเชื้อ; 5 มิลลิลิตร, 10 มิลลิลิตร และ 25 มิลลิลิตร (SPL Life Sciences, Korea)
4. ปิเปต บอย (Jencons Scientific, MA)
5. หลอดชนิด microcentrifuge; 0.2 มิลลิลิตร, 0.6 มิลลิลิตร และ 1.5 มิลลิลิตร (Thermo Scientific, USA)
6. หลอดชนิด conical centrifuge; 15 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร (Thermo Scientific, USA)
7. กระบอกตวง; 100 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร (Pyrex<sup>®</sup>, USA)
8. แขนวางหลอด (rack) (Autopack, USA)
9. ขวดแก้วรูปชมพู่; 250 มิลลิลิตร (Pyrex<sup>®</sup>, USA)
10. ขวดดูแรน; 50 มิลลิลิตร, 100 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร (Duran, Germany)
11. ฟลาสค์; 250 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร (Pyrex)
12. พาราฟิล์ม (Parafilm M, USA)
13. กระดาษฟลอยด์ (Aro, China)
14. ถาดสำหรับเตรียมเจล พร้อมหวี

15. วอร์เธอร์ บาร์ (VWR, Singapore)
16. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (Thermo Scientific, USA)
17. ฟลาค์เลี้ยงเซลล์ T75 (Thermo Scientific, USA)
18. ซ้อนตักสาร
19. เครื่องนับเซลล์แบบดิจิทัลและสไลด์นับเซลล์ รุ่น Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, USA)
20. เครื่อง polymerase chain reaction (PCR) รุ่น Mastercycler® pro (Eppendorf, Germany)
21. เครื่องซิงติฟอล รุ่น XT 220A-FR (Precisa, Switzerland)
22. เครื่องอิเล็กทรอนิกส์รุ่น PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad Laboratories, USA)
23. เครื่องถ่ายภาพเจล รุ่น Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad, USA)
24. เครื่องไมโครเวฟ (Sharp, Japan)
25. เครื่องเพิ่มความเข้มข้น DNA (CentriVap DNA Vacuum Concentrators) (Labconco, MO)
26. เครื่อง autoclave รุ่น HIRAYAMA HI-CLAVE : HVE-50 (GSBC, Korea)
27. เครื่องวอร์เท็กซ์ รุ่น Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA)
28. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (nana drop) รุ่น NanaDrop 1000 (Thermo Scientific, USA)
29. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก รุ่น MiniSpin® (Eppendorf, Germany) และรุ่น Hettich® MIKRO 120 centrifuge (Sigma-Aldrich, USA)
30. เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Hettich Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Germany)
31. เครื่องปั่นตกเซลล์ (Eppendorf, Germany)
32. เครื่องทำความร้อน AccuBlock™ Digital Dry Baths (Labnet International, USA)
33. เครื่องกรองน้ำ (Scientific Promotion, Thailand)
34. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) (Microscope World, CA)

35. ตู้เย็น 4°C (Sandenintercool, Thailand)
36. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C (Thermo Scientific, USA)
37. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C รุ่น Forma™ 900 Series -86°C Upright Ultra-Low Temperature Freezers (Thermo Scientific, USA)
38. ตู้กรองอากาศสำหรับทำ PCR รุ่น Augustin Safety Cabinet (LioLab, Thailand)
39. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น LabGard ES Air Class II, Type A2 Biological Safety Cabinet (NuAire, USA)
40. ตู้เลี้ยงเซลล์ รุ่น SCO2W SHEL LAB CO2 Water Jacketed Incubator (Sheldon Manufacturing, OR)

#### สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. Absolute ethanol (Merck, Germany)
2. 100 base pair DNA ladder (New England BioLabs, UK)
3. 1 Kb pair DNA ladder (New England BioLabs, UK)
4. Tris-Base (USB)
5. Boric acid (Merck)
6. Disodium ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (Merck)
7. Bromphenol blue (Pharmacia)
8. Agarose gel electrophoresis, molecular glade (Vivantis, Malaysia)
9. RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)
10. 25 mM Magnesium chloride (Thermo Scientific, USA)
11. 10X Tag Buffer with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Thermo Scientific, USA)
12. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Thermo Scientific, USA)
13. Oigonucleotide primer (BioDesign)
14. 5 U/ $\mu\text{l}$  Taq DNA polymerase (Thermo Scientific, USA)
15. Water Distillation

16. ExoSAP-IT (USP Corporation, Cleveland, OH)
17. pcDNA™3.1/myc-His B mammalian expression vector (Invitrogen by Life Technologies, Carlsband, CA, USA)
18. pGEM®-T Easy vectors (Promega, USA)
19. T4 DNA ligase (New England BioLabs, UK)
20. 20,000 U/ml *Bam*HI-HF restriction enzyme (New England BioLabs, UK)
21. 20,000 U/ml *Xba*I restriction enzyme (New England BioLabs, UK)
22. Cutsmart Buffer (New England BioLabs, UK)
23. TransforMax™ EPI300
24. Ampicillin (Thermo Scientific, USA)
25. African green monkey kidney fibroblast-like cell line (COS-7 cell)
26. Sodium chloride (VWR, Singapore)
27. Tryptone powder (Bio Basic, Canada)
28. Yeast extract (Bio Basic, Canada)
29. Potassium chloride (VWR, Singapore)
30. Criterion™ Agar, Bacteriological Grade (Hardy Diagnostics, USA)
31. 100x penicillin/streptomycin (HyClone Laboratories, Utah)
32. Fetal Bovine serum (Sigma-Aldrich, Singapore)
33. Dulbecco's High Glucose Modified Eagles Medium (HyClone Laboratories, Utah)
34. 10X Phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich, Singapore)
35. Trypsin-EDTA (Thermo Scientific, USA)
36. Effectene Transfection Reagent (Qiagen, USA)
37. Beta-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Singapore)
38. ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega Corporation, USA)

39. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเลือด; QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA)
40. ชุดสกัดเจล; GenepHlow™ Gel Extraction Kit (Geneaid, Taiwan)
41. ชุดสกัดพลาสมิด; Geneaid™ Maxi Plasmid Kit (Geneaid, Taiwan)
42. ชุดสกัดพลาสมิด; High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan)
43. ชุดสกัด RNA; QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA)

### โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย

1. โปรแกรม Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)
2. โปรแกรม Oligos Microsoft Visual Studio 6.0 SP5, 2001 (University of Helsinki, Finland)
3. โปรแกรม Sequencher; version 4.2 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI)
4. โปรแกรม SnapGene® Viewer (GSL Biotech LLC, IL)
5. โปรแกรม Double Digest Finder (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>)

### กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างของงานวิจัยนี้ คือ ผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าข่ายเป็นภาวะขาด 11β-ไฮดรอกซิเลส จากแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทั้งสิ้น 3 ราย โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ผู้ป่วยรายที่ 1 เด็กผู้หญิง อายุประมาณ 3 ปี อาการที่แสดงออก คือ ความดันโลหิตสูง (hypertension) mucosal pigmentation และมีการแสดงออกของ ลักษณะอวัยวะเพศกำกวม (ambiguous genitalia) เมื่อทำการทดสอบการกระตุ้นด้วย ACTH พบว่าระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลต่ำ ระดับ 17-ไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน (17-OHP) ปกติ แต่พบว่าระดับ 11-ดีออกซีคอร์ติซอล และ ดีออกซีคอร์ติโคสเตอโรนสูงมาก

ผู้ป่วยรายที่ 2 เด็กผู้ชาย อายุ 2 ปี และเป็นน้องชายของผู้ป่วยรายที่ 1 อาการที่แสดงออก คือ มีการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าเด็กในวัยเดียวกันมากและมีขนาดของอวัยวะเพศที่ใหญ่กว่าเด็กในวัยเดียวกันด้วย

สำหรับ ผู้ป่วยรายที่ 3 นั้น ไม่ได้รับการเปิดเผยข้อมูลของผู้ป่วย แต่ได้มีการยืนยันและวินิจฉัยโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญจากแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์แล้วว่าผู้ป่วยรายนี้มีภาวะขาด 11ปีตาไฮดรอกซิเลส และการวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติการทำวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว (IRB No. 505/53 และ COA No. 092/2011)

### วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งวิธีการดำเนินงานวิจัยออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. วิเคราะห์ยีน *CYP11B1* เพื่อหามิวเทชันในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นภาวะขาด 11ปีตาไฮดรอกซิเลสทั้ง 3 ราย (mutation analysis)
2. วิเคราะห์ว่ามิวเทชันที่พบในผู้ป่วยทั้ง 3 รายนั้น ได้รับการถ่ายทอดมาจากบิดา และมารดาถูกต้องตามกฎการถ่ายทอดทางพันธุกรรมหรือไม่
3. วิเคราะห์ผลของมิวเทชันที่พบต่อกระบวนการ splicing ในยีน *CYP11B1* ของผู้ป่วย

#### 1. วิเคราะห์ยีน *CYP11B1* เพื่อหามิวเทชันในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นภาวะขาด 11ปีตาไฮดรอกซิเลสทั้ง 3 ราย (mutation analysis)

เนื่องจากทางกลุ่มวิจัยที่ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มีผู้ป่วยทั้งสิ้น 3 ราย ที่วินิจฉัยเบื้องต้นโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญแล้วว่าน่าจะเป็นภาวะขาด 11ปีตาไฮดรอกซิเลส จึงได้นำผู้ป่วยทั้ง 3 ราย มาทำการวิเคราะห์ยีน *CYP11B1* เพื่อหามิวเทชัน ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.1 ทำการเก็บเลือดของผู้ป่วยทั้ง 3 ราย พร้อมทั้งเก็บเลือดของพ่อและแม่ของผู้ป่วยแต่ละรายด้วย ซึ่งในการวิเคราะห์ยีน *CYP11B1* เพื่อหามิวเทชันในครั้งนี้ ได้รับการอนุมัติการทำวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB No. 505/53 และ COA No. 092/2011) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

1.2 นำเลือดของผู้ป่วยทั้ง 3 รายมา มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากเลือด ซึ่งคือ QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA) เพื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของผู้ป่วยทั้ง 3 ราย มาตรวจหามิวเทชันในยีน *CYP11B1*

1.3 ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงต่อยีน *CYP11B1* เพื่อใช้สำหรับการตรวจหามิวเทชันในยีน *CYP11B1* ของผู้ป่วยทั้ง 3 ราย เนื่องจากยีน *CYP11B1* มีลำดับเบสที่มีความคล้ายคลึงกันกับลำดับเบสของยีน *CYP11B2* ในบริเวณ coding ถึง 93% และมีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสในบริเวณอินทรอน 90% อีกด้วย ดังนั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะสูงต่อยีน *CYP11B1* เท่านั้น โดยในการตรวจหามิวเทชันนั้นจะตรวจหาบริเวณเอ็กซอนทุกเอ็กซอนของยีนและบริเวณ exon-intron boundaries ของแต่ละเอ็กซอนด้วย ฉะนั้น ในการออกแบบไพรเมอร์จึงต้องออกแบบไพรเมอร์คร่อมลำดับเบสในแต่ละเอ็กซอนของยีน *CYP11B1* ยกเว้น เอ็กซอนที่ 7 และ 8 สามารถรวมกันเป็นหนึ่งคู่ไพรเมอร์ได้ เนื่องจากเอ็กซอนมีขนาดเล็ก (ดังรูปที่ 9) โดยในการออกแบบไพรเมอร์ครั้งนี้ ได้ออกแบบไพรเมอร์แต่ละคู่ด้วยโปรแกรมชื่อ Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (ดังรูปที่ 10) และเนื่องจากยีน *CYP11B1* นี้ มีด้วยกันทั้งสิ้น 5 isoforms แต่มีเพียง 4 isoforms เท่านั้นที่ถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีน ดังนั้น จึงเลือก isoform หลักของยีน *CYP11B1* เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์และใช้ในการเปรียบเทียบลำดับเบสกับลำดับเบสของผู้ป่วยในขั้นของการหามิวเทชันในผู้ป่วยแต่ละราย โดย isoform หลักแปลรหัสออกมาได้ทั้งสิ้น 503 กรดอะมิโน ในขณะที่อีก 3 isoforms แปลรหัสได้ 574, 437 และ 181 กรดอะมิโน อีกทั้งควรเลือกไพรเมอร์ที่มีความยาวอยู่ระหว่าง 18 – 20 คู่เบส ไพรเมอร์นั้นควรมี Tm อยู่ในช่วง 55 – 66 องศาเซลเซียส และ Tm ของไพรเมอร์แต่ละเส้นในคู่หนึ่งๆ ควรมีอุณหภูมิต่างกันไม่เกิน 3 องศาเซลเซียส ไม่ควรเลือกคู่ไพรเมอร์ที่มีเบสซ้ำกันหลายๆเบส สำหรับช่วงลำดับเบส 5 เบสสุดท้ายของปลาย 3' ควรมีเบสกวานีนและเบสไซโทซีนไม่เกิน 2 เบส อีกทั้งเลี่ยงการเกิดการจับที่ไม่ตรงกันระหว่างไพรเมอร์และสายแม่แบบในบริเวณปลายทางด้าน 3' ด้วย





จากนั้นต้องตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligos Microsoft Visual Studio 6.0 SP5, 2001 (University of Helsinki, Finland) เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถจับได้กับยีนเพียงชนิดเดียวและบริเวณเดียวเท่านั้นหรือไม่ ซึ่งเมื่อออกแบบและตรวจสอบไพรเมอร์เรียบร้อยแล้ว ทำให้ได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมและมีความจำเพาะสูงต่อยีน *CYP11B1* มาทั้งสิ้น 8 คู่ ดังตารางที่ 1 โดยไพรเมอร์แต่ละคู่จะมีความจำเพาะต่อเอ็กซอนแต่ละเอ็กซอนของยีน *CYP11B1* นั้นเอง

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ทั้ง 8 คู่ ที่มีความจำเพาะสูงต่อยีน *CYP11B1*

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์
CYP11B1_Exon1_F	5'- GTTCTCCCATGACGTGATCCCTCT - 3'
CYP11B1_Exon1_R	5'- TCCAAAGGATGCAGAGTGCC - 3'
CYP11B1_Exon2_F	5' - TGGACAGGAGACACTTTGGAT - 3'
CYP11B1_Exon2_R	5' - TCGCCGCTTACAGCAAGAAC - 3'
CYP11B1_Exon3_F	5' - TGGGGACAAGGAGGATGGGATAC - 3'
CYP11B1_Exon3_R	5' - TGGTGGAGAGGGAGAAATTGGG - 3'
CYP11B1_Exon4_F	5' - CGTGGGAAGATCCAGCCTCAG - 3'
CYP11B1_Exon4_R	5' - GGAAGGTGAGGAATCCCCGAC - 3'
CYP11B1_Exon5_F	5' - AGGAGGAGGACACTGAAGGATG - 3'
CYP11B1_Exon5_R	5' - AGGCAGGCTTGGCATCACC - 3'
CYP11B1_Exon6_F	5' - GGCTCTGTCGTTCTCAGGGTATGC - 3'
CYP11B1_Exon6_R	5' - GGCGTTGAAGAGGGATTCCAGAG - 3'
CYP11B1_Exon7-8_F	5' - AGAGAGCACAGGAAGCCCCATC - 3'
CYP11B1_Exon7-8_R	5' - CAGTCCCACATTGCTCAAGC - 3'
CYP11B1_Exon9_F	5' - GTTCCCCCTTCAGCATAATCTC - 3'
CYP11B1_Exon9_R	5' - GCCCTCGGGAGTTCCATTT - 3'

1.4 นำจีโนมิกดีเอ็นเอของผู้ป่วยทั้ง 3 ราย มาทำให้ความเข้มข้นเป็น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนในส่วนของยีน *CYP11B1* ทั้ง 9 เอ็กซอน ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่เพอติเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 8 คู่ ที่ได้ออกแบบไว้ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.4.1 เตรียมสารละลายผสมในตู้กรองอากาศสำหรับทำ PCR ซึ่งในแต่ละหลอดของแต่ละเอ็กซอน (ยกเว้นเอ็กซอน 3) ประกอบด้วยสารต่างๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบและปริมาณของสารละลายผสม ในหลอดของแต่ละเอ็กซอน (ยกเว้นเอ็กซอน 3)

สาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
น้ำ	11.20
10X Taq DNA polymerase Buffer ( $\text{NH}_4^+$ )	2.00
25 mM $\text{MgCl}_2$	2.00
10 $\mu\text{M}$ dNTP	0.40
5 U/ $\mu\text{l}$ Taq DNA polymerase	0.40
10 $\mu\text{M}$ คู่ไพรเมอร์ของเอ็กซอนนั้นๆ	0.50
50 ng/ $\mu\text{l}$ ดีเอ็นเอของผู้ป่วย	2.00
<b>รวม</b>	<b>20.00</b>

ในขณะที่สารละลายผสมสำหรับเอ็กซอน 3 ประกอบด้วยสารต่างๆ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบและปริมาณของสารละลายผสม ในหลอดสำหรับเอ็กซอน 3

สาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
น้ำ	12.20
10X Taq DNA polymerase Buffer ( $\text{NH}_4^+$ )	2.00
25 mM $\text{MgCl}_2$	2.00
10 $\mu\text{M}$ dNTP	0.40
5 U/ $\mu\text{l}$ Taq DNA polymerase	0.40
10 $\mu\text{M}$ คู่ไพรเมอร์ของเอ็กซอนนั้นๆ	1.00

สาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
50 ng/ $\mu$ l ดีเอ็นเอของผู้ป่วย	2.00
<b>รวม</b>	<b>20.00</b>

1.4.2 นำเข้าเครื่อง polymerase chain reaction (PCR) และตั้งค่าของอุณหภูมิในเครื่อง ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอเกลียวคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denaturing) จากนั้นเป็น 65 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อให้เกิดการเข้าคู่กันของเบสคู่สมระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (extension) ทั้งหมด 38 รอบ PCR

1.5 แบ่งผลผลิต PCR ที่ได้ มา 5 ไมโครลิตร หลังจากทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเสร็จสิ้น เพื่อใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของขนาดชิ้นส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอในแต่ละเอ็กซอนด้วยการใช้กระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที (gel electrophoresis) โดยขนาดที่ถูกต้องในแต่ละเอ็กซอนมีขนาด ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ขนาดของผลผลิต PCR ของยีน *CYP11B1* แต่ละเอ็กซอน

เอ็กซอนที่	ขนาด (คู่เบส)
1	462
2	323
3	680
4	453
5	280
6	475
7-8	584
9	297

1.6 นำผลผลิต PCR ที่เหลือมาใส่ ExoSAP-IT โดยใส่ ExoSAP-IT 5 ไมโครลิตร ลงในผลผลิต PCR 15 ไมโครลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่อง PCR ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และที่

อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อขจัดส่วนของไพรเมอร์หรือชิ้นส่วนต่างๆที่ไม่ต้องการออกไป ส่งผลให้ผลผลิต PCR นั้นสะอาดขึ้น

1.7 นำผลผลิต PCR เหล่านี้ไปหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing โดยส่งไปที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

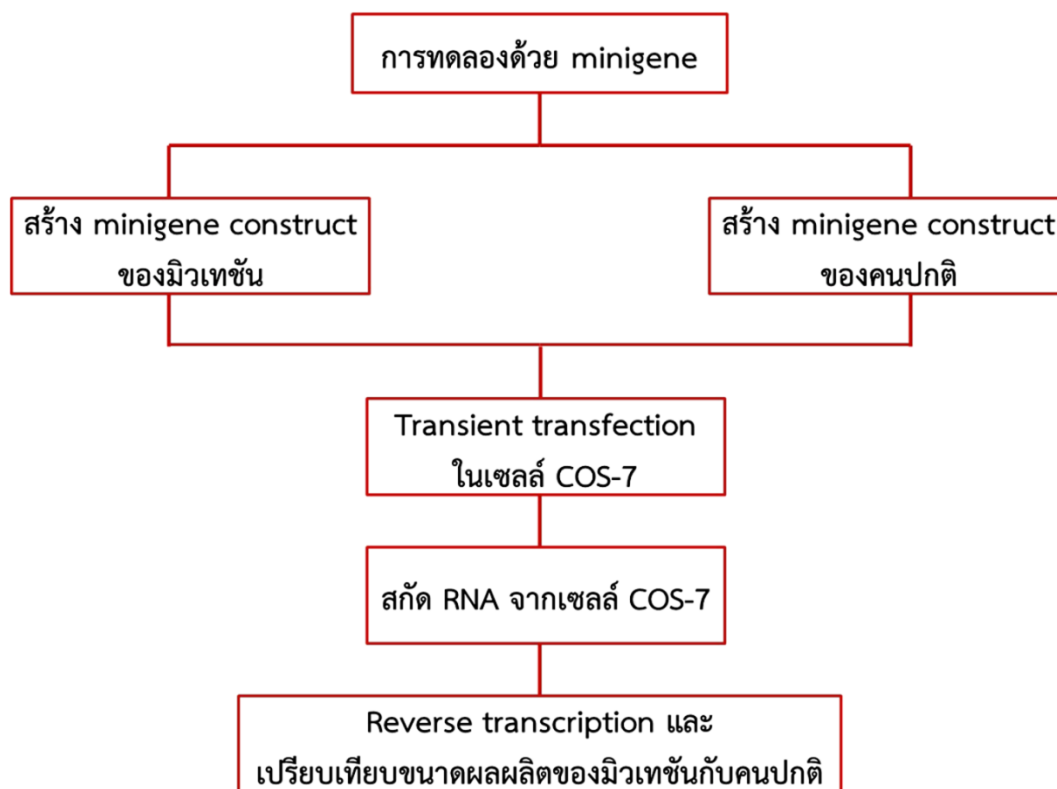
1.8 นำผลที่ได้มาจากบริษัท Macrogen มาวิเคราะห์หามิวเทชันในผู้ป่วยแต่ละรายด้วยโปรแกรม Sequencher (version 4.2; Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) โดยนำลำดับเบสของผู้ป่วยแต่ละรายมาเทียบกับลำดับเบสจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน *CYP11B1* ในฐานข้อมูลของ NCBI (NG\_007954.1)

## 2. วิเคราะห์หามิวเทชันที่พบในผู้ป่วยทั้ง 3 รายนั้น ได้รับการถ่ายทอดมาจากบิดา และมารดา ถูกต้องตามกฎการถ่ายทอดทางพันธุกรรมหรือไม่

หลังจากที่ได้วิเคราะห์หามิวเทชันในผู้ป่วยแต่ละรายแล้ว ทำให้ทราบชนิดของมิวเทชันในผู้ป่วยทั้ง 3 รายนั้น ว่าเป็นมิวเทชันชนิดใด และมิวเทชันนั้นๆ อยู่บริเวณใดของยีน *CYP11B1* ของผู้ป่วย หลังจากนั้นต้องตรวจสอบว่ามิวเทชันที่พบในผู้ป่วยแต่ละรายได้รับการถ่ายทอดมาจากบิดา และมารดาถูกต้องตามกฎการถ่ายทอดทางพันธุกรรมหรือไม่ และเนื่องจากภาวะขาด 11บีตา ไฮดรอกซิเลส นั้น มีการถ่ายทอดแบบยีนด้อยบนออโตโซม (autosomal recessive) ฉะนั้น ในยีน *CYP11B1* ของผู้ป่วยจะต้องพบมิวเทชันในทั้ง 2 แอลลีล และแอลลีลหนึ่งต้องมาจากพ่อ และอีกแอลลีลต้องมาจากแม่ของผู้ป่วย โดยขั้นตอนการวิเคราะห์เพื่อหามิวเทชันในพ่อและแม่ของผู้ป่วย มีขั้นตอนเหมือนการวิเคราะห์ยีน *CYP11B1* เพื่อหามิวเทชันในผู้ป่วยตามข้อ 1 ที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น แต่มีข้อแตกต่างเพียงเล็กน้อย นั่นคือ การวิเคราะห์หามิวเทชันในพ่อและแม่ของผู้ป่วยไม่ต้องวิเคราะห์ในทุกล็อกของยีน *CYP11B1* แต่ทำการวิเคราะห์เพียงเอ็กซอนที่พบมิวเทชันในผู้ป่วย กล่าวคือ พ่อและแม่ของผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2 ทำการวิเคราะห์หามิวเทชันเฉพาะในเอ็กซอนที่ 3 โดยใช้ไพรเมอร์ *CYP11B1\_ Exon3* และในเอ็กซอนที่ 7 โดยใช้ไพรเมอร์ *CYP11B1\_ Exon7-8* สำหรับพ่อและแม่ของผู้ป่วยรายที่ 3 ทำการวิเคราะห์หามิวเทชันเฉพาะในเอ็กซอนที่ 4 โดยใช้ไพรเมอร์ *CYP11B1\_ Exon4* และในเอ็กซอนที่ 6 โดยใช้ไพรเมอร์ *CYP11B1\_ Exon6* (ตารางที่ 1)

### 3. วิเคราะห์ผลของมิวเทชันแบบ splice site ที่พบต่อกระบวนการ splicing ในยีน *CYP11B1* ของผู้ป่วย โดยการทำให้ minigene experiment

จากการวิเคราะห์มิวเทชันในผู้ป่วยทั้ง 3 ราย พบว่ามีมิวเทชันแบบ splice site 1 ตำแหน่งที่ยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างมิวเทชันตำแหน่งนั้นกับอาการของโรค ดังนั้น เมื่อพบมิวเทชันตำแหน่งนี้ในผู้ป่วย จึงต้องตรวจสอบว่ามิวเทชันที่ตำแหน่งนี้นั้น มีผลทำให้เกิดการตัดอินทรอน (splicing) ผิดปกติไปหรือไม่ และมีผลทำให้เกิดอาร์เอ็นเอที่ผิดปกติหรือไม่ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างมิวเทชันของผู้ป่วยกับอาการที่แสดงออกในผู้ป่วยโดยใช้การทดลองด้วย minigene ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการทดลองด้วย minigene สำหรับมิวเทชันแบบ splice site ในยีน *CYP11B1*

#### 3.1 การสร้าง minigene

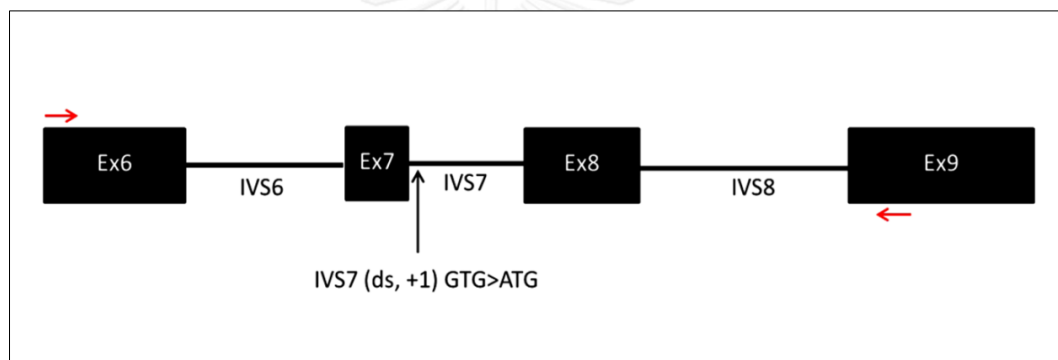
ในการศึกษาการ splicing ของยีน *CYP11B1* จะต้องทำการจำลองโครงสร้างยีน *CYP11B1* ของมิวเทชันนั้นและโครงสร้างยีน *CYP11B1* ของคนปกติในส่วนของสนใจขึ้นมา ซึ่งคือ การสร้าง

minigene construct เนื่องจากยีน *CYP11B1* ไม่มีการแสดงออกในเลือด แต่มีการแสดงออกอย่างมากในต่อมหมวกไตส่วนนอกชั้น zona fasciculata (White, New et al., 1987) ดังนั้นการที่จะศึกษาผลของการ splicing ในระดับอาร์เอ็นเอ จึงไม่สามารถทำได้โดยการสกัดอาร์เอ็นเอของยีน *CYP11B1* จากเลือดของผู้ป่วยได้โดยตรงนั่นเอง ซึ่งการสร้าง minigene construct มีขั้นตอนดังนี้

3.1.1 ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *CYP11B1* ในส่วนที่สนใจจะศึกษา และต้องมีเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมที่ปลายของไพรเมอร์ด้วย เพื่อใช้สำหรับการเชื่อมต่อกันส่วนของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าไปในพลาสมิดสำหรับสร้างเป็น minigene construct โดยใช้ลำดับเบสของยีน *CYP11B1* แบบ isoform หลัก จากฐานข้อมูลของ Ensembl (NM\_000497) เป็นแม่แบบในการออกแบบ ใช้โปรแกรม SnapGene® Viewer และโปรแกรม Primer3 ในการออกแบบ และตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligos Microsoft Visual Studio 6.0 SP5 สำหรับมิวเทชันแบบ splice site ที่พบในผู้ป่วย คือ การเปลี่ยนไปของเบส 1 เบส บริเวณ splice donor site ตำแหน่งเบสที่ 1 ในอินทรอนที่ 7 ของยีน *CYP11B1* โดยเปลี่ยนจากเบสกวานีนเป็นเบสอะลาanine (IVS7+1G>A) ดังรูปที่ 11 ฉะนั้น การออกแบบไพรเมอร์จะต้องออกแบบให้ครอบคลุมบริเวณของมิวเทชันนั้นๆ โดยเมื่อสังเกตรูปโครงสร้างของยีน *CYP11B1* และขนาดของเอ็กซอนแต่ละเอ็กซอนทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ครอบคลุมตั้งแต่เอ็กซอนที่ 6 ถึงเอ็กซอนที่ 9 (รูปที่12) ซึ่งมีขนาดทั้งสิ้น 1,488 คู่เบส

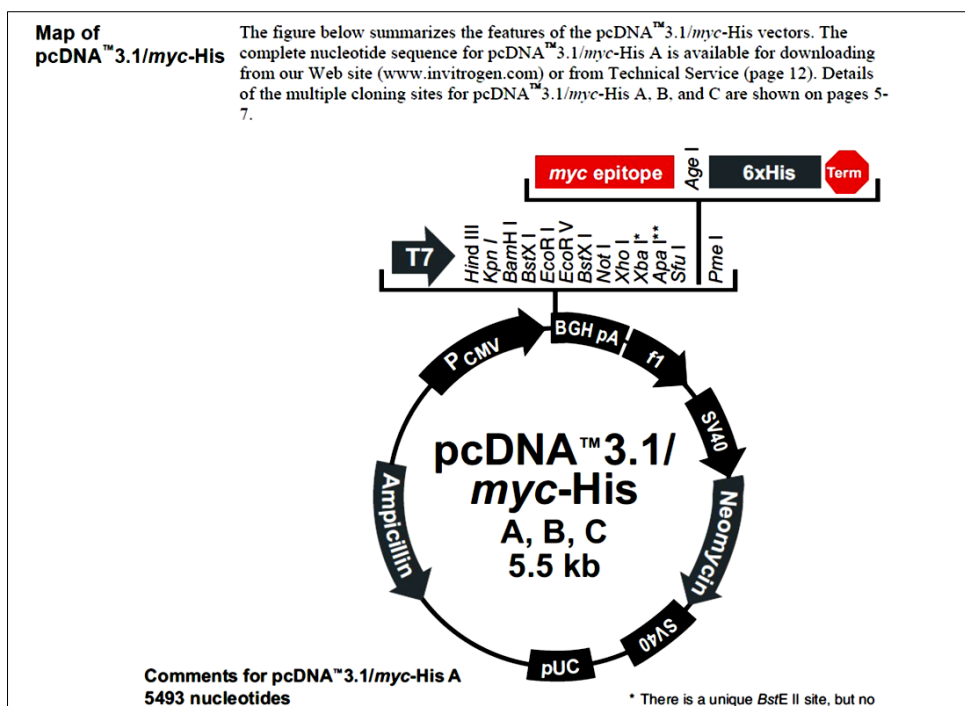


รูปที่ 11 ตำแหน่งของมิวเทชันแบบ IVS7+1G>A ในยีน *CYP11B1* ของผู้ป่วย



รูปที่ 12 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับสร้าง minigene construct

3.1.2 คัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม โดยเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีอยู่ในพลาสมิดที่ใช้และเอนไซม์ที่เลือกนั้นจะต้องไม่สามารถตัดในบริเวณขึ้นส่วนของจีโนมิกดีเอ็นเอทั้งของคนปกติและผู้ป่วยได้อีกด้วย โดยพลาสมิดที่ใช้ คือ pcDNA™3.1/myc-His B mammalian expression vector ซึ่งมีบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังรูปที่ 13 จากนั้นเมื่อทราบเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ให้นำเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ปรากฏในพลาสมิดไปตรวจสอบว่าเอนไซม์ใดในพลาสมิดบ้างที่ไม่สามารถตัดได้ในบริเวณขึ้นส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอของทั้งคนปกติและผู้ป่วยโดยใช้โปรแกรม SnapGene® Viewer ในการคัดเลือก



รูปที่ 13 องค์ประกอบของพลาสมิด pcDNA™ 3.1/myc-His B mammalian expression vector

หลังจากที่คัดเลือกและได้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ไม่สามารถตัดในบริเวณของจีโนมิตีเอ็นเอ แล้วจำนวนหนึ่ง ขั้นตอนต่อไปคือคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่ทำงานร่วมกันได้อย่างเหมาะสมโดยใช้โปรแกรม Double Digest Finder ในการคัดเลือก สาเหตุที่เลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิด เพราะเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนจีโนมิตีเอ็นเอ เข้าสู่พลาสมิดผิดด้านนั่นเอง โดยหลังจากคัดเลือกแล้วพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่เหมาะสม คือ เอนไซม์ *BamHI*-HF และเอนไซม์ *XbaI* ดังนั้น ไพรเมอร์สำหรับสร้าง minigene construct ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ในเอ็กซอน 6 และ เอ็กซอน 9 ดังรูปที่ 14 จะมีลำดับเบส ดังนี้

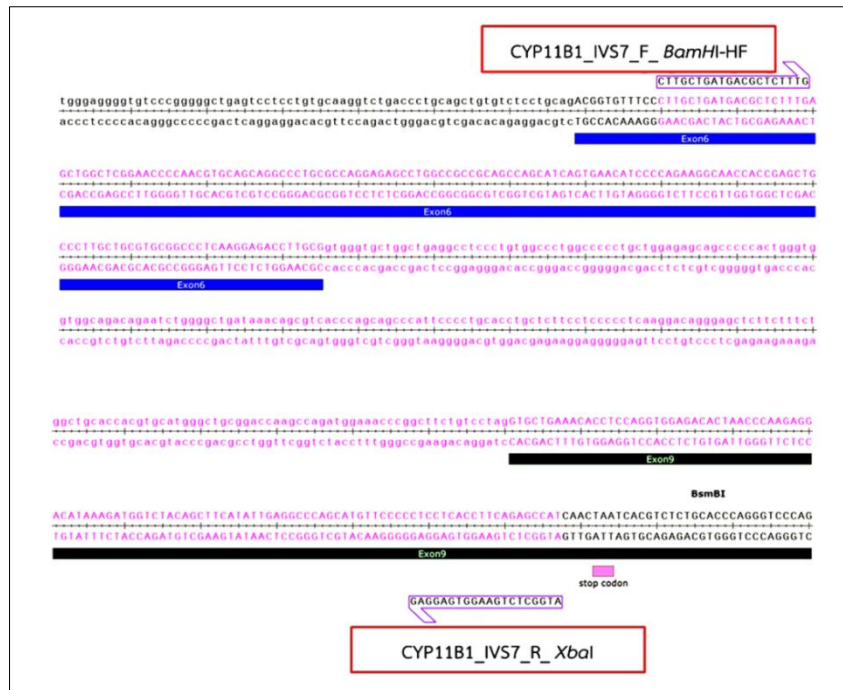
CYP11B1\_IVS7\_F\_ *BamHI*-HF ซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้

5' - AGTCGGATCCCTTGCTGATGACGCTCTTTG - 3'



CYP11B1\_IVS7\_R\_XbaI ซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้

5'- GTA CTCTAGA ATGGCTCTGAAGGTGAGGAG - 3'



รูปที่ 14 ตำแหน่งของไพรเมอร์ CYP11B1\_IVS7\_F\_BamHI-HF และไพรเมอร์ CYP11B1\_IVS7\_R\_XbaI

3.1.3 นำจีโนมิกดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยที่พบมีวเทชันแบบ splice site นี้มาเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่เพอไลเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ CYP11B1\_IVS7\_F\_BamHI-HF และไพรเมอร์ CYP11B1\_IVS7\_R\_XbaI ซึ่งสารละลายผสมมีองค์ประกอบ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 องค์ประกอบและปริมาณของสารละลายผสมสำหรับเพิ่มจำนวนจีโนมิกดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยที่พบมีวเทชันแบบ splice site นี้

สาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
น้ำ	13.20
10X Taq DNA polymerase Buffer (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	2.00
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.50

สาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
10 $\mu$ M dNTP	0.40
5 U/ $\mu$ l Taq DNA polymerase	0.10
10 $\mu$ M คู่ไพรเมอร์ของเอ็กซอนอื่นๆ	0.40
50 ng/ $\mu$ l ดีเอ็นเอของผู้ป่วย	2.00
<b>รวม</b>	<b>20.00</b>

หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR และตั้งค่าของอุณหภูมิในเครื่อง ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อ denaturing จากนั้นเป็น 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที สำหรับการ annealing และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที สำหรับการ extension ทั้งสิ้น 35 รอบ PCR และหลังจากการเพิ่มจำนวนเสร็จสิ้นแล้ว นำผลผลิต PCR ที่ได้มา ตรวจสอบขนาดโดยใช้วิธี gel electrophoresis ด้วยกระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ความเข้มข้นของเจลที่ใช้ คือ 1% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และขนาดของผลผลิต PCR ที่ถูกต้องของทั้งคนปกติและผู้ป่วย คือ 1,508 คู่เบส ซึ่งในการตรวจสอบขนาดในครั้งนี้ ให้ใส่ผลผลิต PCR ที่ได้ ทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ลงไปในเจล

#### 3.1.4 สกัดเจลด้วย ชุดสกัดเจล GenepHlow™ Gel Extraction Kit

3.1.5 หลังจากที่ได้ชิ้นส่วน PCR ที่ต้องการของทั้งคนปกติและผู้ป่วยแล้ว นำชิ้นส่วน PCR ของทั้งคนปกติและผู้ป่วยที่ได้ และพลาสมิด pcDNA™3.1/myc-His B mammalian expression vector ไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังที่ได้คัดเลือกและกล่าวไว้ข้างต้น ในขั้นตอนของการออกแบบไพรเมอร์ นั่นคือ เอนไซม์ *Bam*HI-HF และเอนไซม์ *Xba*I โดยเริ่มจากการทำสารละลายผสม ซึ่งมีองค์ประกอบดังตารางด้านล่าง ดังนี้

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของสารละลายผสมในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สาร	พลาสมิด (1X)	ผลผลิต PCR ของ คนปกติ (1X)	ผลผลิต PCR ของ ผู้ป่วย (1X)
น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	22.56	8.00	18.41
Cutsmart buffer (ไมโครลิตร)	3.00	3.00	3.00

สาร	พลาสติก (1X)	ผลผลิต PCR ของ คนปกติ (1X)	ผลผลิต PCR ของ ผู้ป่วย (1X)
BamHI-HF (ไมโครลิตร)	0.50	0.50	0.50
XbaI (ไมโครลิตร)	0.50	0.50	0.50
ผลผลิต 1 ไมโครกรัม (ไมโครลิตร)	3.44	18.00	7.59
<b>รวม (ไมโครลิตร)</b>	<b>30.00</b>	<b>30.00</b>	<b>30.00</b>

หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบ 12 ชั่วโมง นำผลผลิตที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมดไปตรวจสอบขนาดโดยใช้วิธี gel electrophoresis ด้วยกระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ความเข้มข้นของเจลที่ใช้ คือ 1% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำการตัดเจลและสกัดเจลด้วย ชุดสกัดเจล GenepHlow™ Gel Extraction Kit ซึ่งเมื่อสกัดเจลเรียบร้อยแล้ว จะได้ชิ้นส่วนของพลาสติก และชิ้นส่วนของทั้งคนปกติและชิ้นส่วนของผู้ป่วยที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเรียบร้อยแล้ว

3.1.6 ทำการ ligation กล่าวคือ การนำชิ้นส่วนของคนปกติมาเชื่อมต่อเข้ากับชิ้นส่วนของพลาสติก และนำชิ้นส่วนของผู้ป่วยมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสติกเช่นกัน โดยขั้นตอนแรก คือ การเตรียมสารละลายผสม ดังตารางด้านล่าง

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของสารละลายผสมในการทำ ligation

สาร	คนปกติ (1:3)	ผู้ป่วย (1:5)
น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	24.74	15.75
10X T <sub>4</sub> ligase buffer (ไมโครลิตร)	3.50	3.50
พลาสติก 100 นาโนกรัม (ไมโครลิตร)	1.75	3.75
ผลผลิต (ไมโครลิตร)	3.00	10.00
T <sub>4</sub> DNA ligase (ไมโครลิตร)	2.00	2.00
<b>รวม (ไมโครลิตร)</b>	<b>35.00</b>	<b>35.00</b>

เมื่อผสมสารละลายผสมเรียบร้อยแล้ว นำไปเข้าเครื่อง PCR ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อครบ 12 ชั่วโมงแล้ว จะได้ minigene construct ของทั้งคนปกติและผู้ป่วยที่สมบูรณ์แล้วนั่นเอง จากนั้นจะต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของ minigene construct ต่อไป

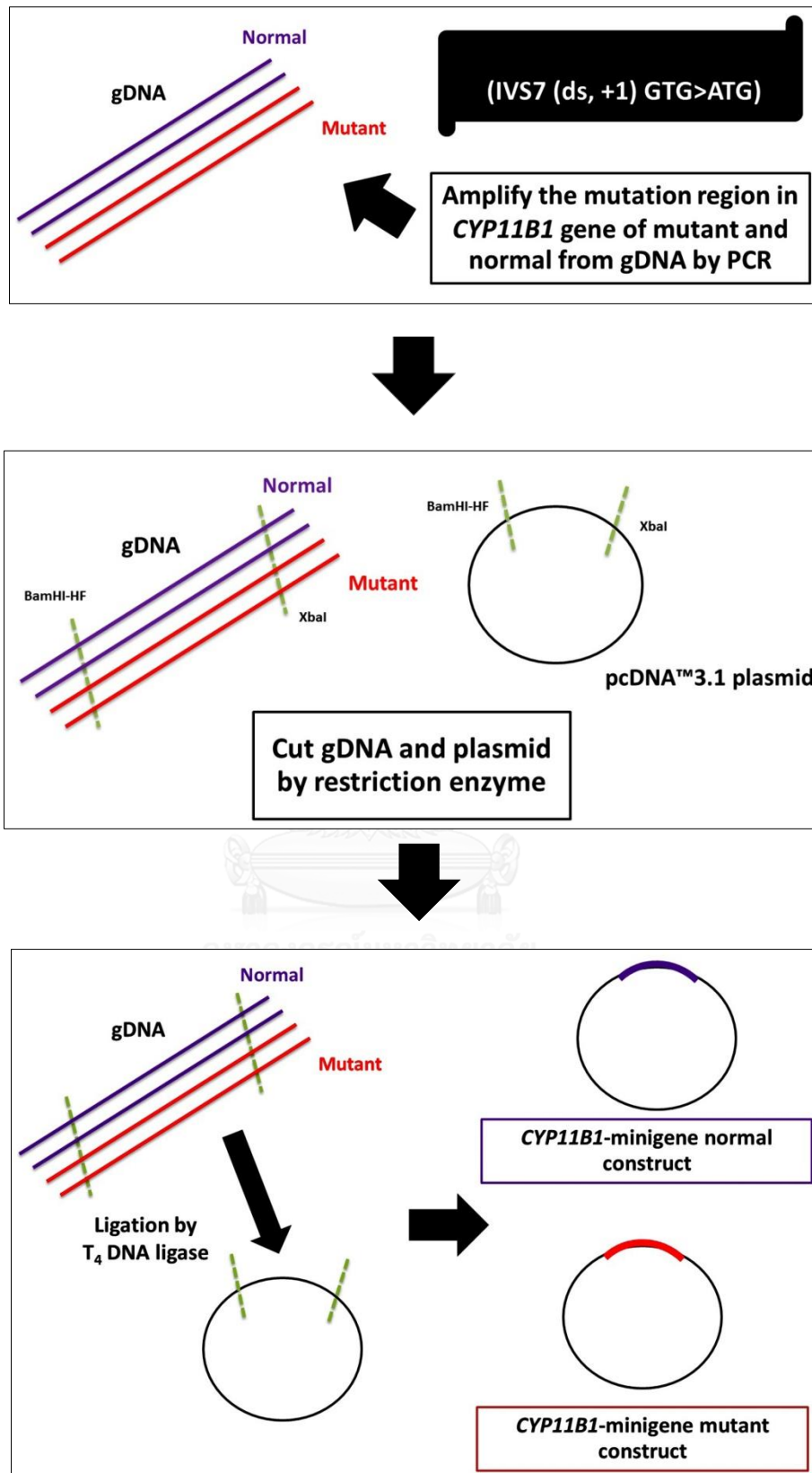
3.1.7 ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสใน minigene construct ซึ่งจะต้องมีความถูกต้องในส่วนของชิ้นส่วนที่ใส่เข้าไป 100 เบสขึ้นไป โดยการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสใน minigene construct มีขั้นตอนดังนี้

3.1.7.1 นำผลผลิตที่ได้จากการทำ ligation ทั้งของคนปกติและผู้ป่วยใส่เข้าไปในเซลล์ TransforMax™ EPI300™ ซึ่งเป็นเซลล์แบคทีเรียที่พร้อมรับดีเอ็นเอจากภายนอก (transformation) ด้วยวิธีการให้ความร้อน (heat shock) เพื่อเพิ่มจำนวน minigene construct ดังกล่าว โดยใส่ minigene construct 5 ไมโครลิตร ลงไปในเซลล์ TransforMax™ EPI300™ 50 ไมโครลิตรที่เตรียมไว้

3.1.7.2 ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที ในระหว่างนั้นเตรียมสารละลายผสม ซึ่งประกอบด้วย SOC media 490 ไมโครลิตร, แมกนีเซียม 5 ไมโครลิตร และกลูโคส 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.1.7.3 เติมสารละลายผสมเข้าไปอย่างช้าๆ จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 225 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

3.1.7.4 นำ minigene construct มาเลี้ยงในเพลทที่มียาแอมพิซิลินผสมอยู่ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง



รูปที่ 15 ขั้นตอนการสร้าง minigene construct

3.1.7.5 นำโคลนที่ขึ้นมาทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ CYP11B1\_IVS7\_F\_ BamHI-HF และ CYP11B1\_IVS7\_R\_ XbaI เพื่อคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนของ จีโนมิกดีเอ็นเอที่ต้องการ เพื่อนำไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing โดยส่งไปที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีต่อไป

3.1.7.6 เมื่อได้โคลนที่ต้องการแล้วนำโคลนนี้นั้นใส่ลงไปในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี LB Broth 10 มิลลิลิตร และยาเพนนิซิลิน 10 ไมโครลิตรผสมอยู่ จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 225 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.1.7.7 นำมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด High-Speed Plasmid Mini Kit แล้วส่งไปทำ direct sequencing ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

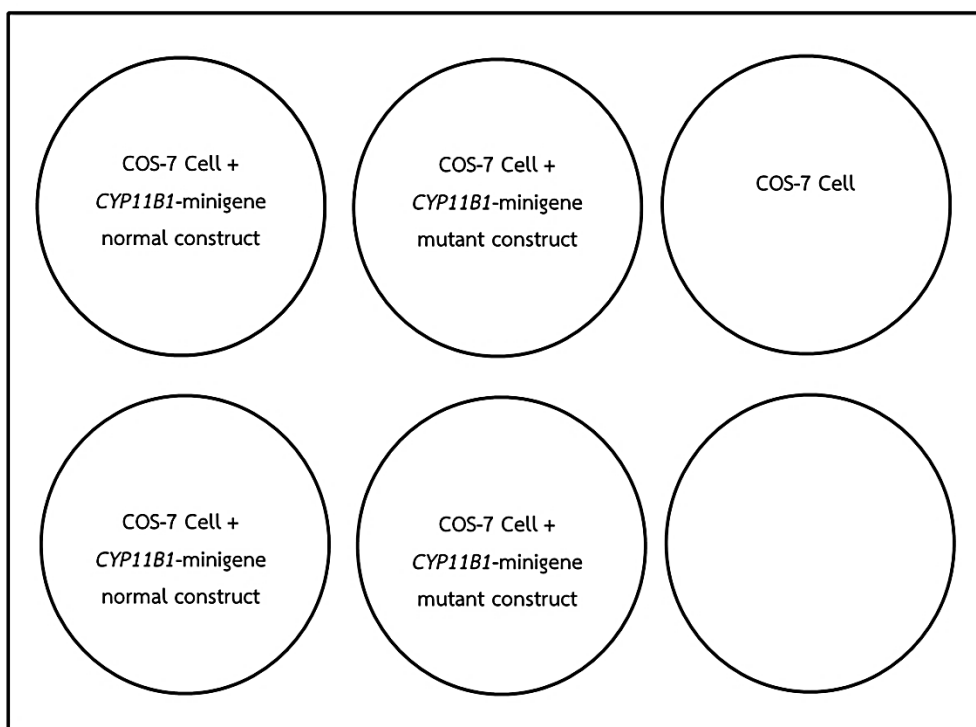
3.1.7.8 ทำการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยโปรแกรม Sequencher; version 4.2 โดย minigene construct ของคนปกติตรวจสอบ เปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล Ensembl (NM\_000497) ส่วน minigene construct ของผู้ป่วย เปรียบเทียบกับผลการทำ direct sequencing ของผู้ป่วย เอง (ผลจากขั้นตอนการทำ mutation analysis)

## 3.2 การนำ minigene construct เข้าสู่เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมแบบชั่วคราว (transient transfection)

เมื่อได้ minigene construct ของทั้งคนปกติและของผู้ป่วยเรียบร้อยแล้ว ต่อจากนั้นจะเป็น การนำ minigene construct เข้าสู่เซลล์ ซึ่งในการวิจัยนี้เซลล์ที่ใช้ คือ เซลล์ COS-7 (African Green Monkey *Cercopithecus aethiops* Fibroblast-like Kidney Cells) โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 นำเซลล์ COS-7 มาละลายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ D10 แบบเย็น ซึ่งอาหาร เลี้ยงเซลล์ D10 นั้น ประกอบด้วย DMEM + 10% FBS และเลี้ยงในฟลasks เลี้ยงเซลล์ ขนาด T75 ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อเลี้ยง เซลล์ไปได้สักระยะหนึ่งและสังเกตเห็นว่าเซลล์เริ่มมีปริมาณเต็มฟลask และเซลล์ดูแข็งแรงดี แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ การทำ transient transfection

3.2.2 วางแผนในการทำการ transient transfection ซึ่งต้องทำการออกแบบและวางแผนการทำ transient transfection ก่อน โดยในการวิจัยนี้ทำการศึกษาผลการถอดรหัสของคนปกติและผู้ป่วย ดังนั้น จึงออกแบบการทำ transient transfection ดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 การวางแผนการทำ transient transfection

3.2.3 ทำการ subculture เซลล์ COS-7 ออกมาจากพลาสติก T75 ใส่ในงานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม โดยใส่เซลล์จำนวน 400,000 เซลล์ต่อหลุม ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

3.2.3.1 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในพลาสติกทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 10 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆให้ทั่วทั้งพลาสติก แล้วดูด PBS ทิ้ง (ล้างด้วย PBS อย่างน้อย 2 รอบ)

3.2.3.2 ใส่ trypsin-EDTA 3 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆให้ทั่วพลาสติก แล้วดูด Trypsin-EDTA ทิ้ง

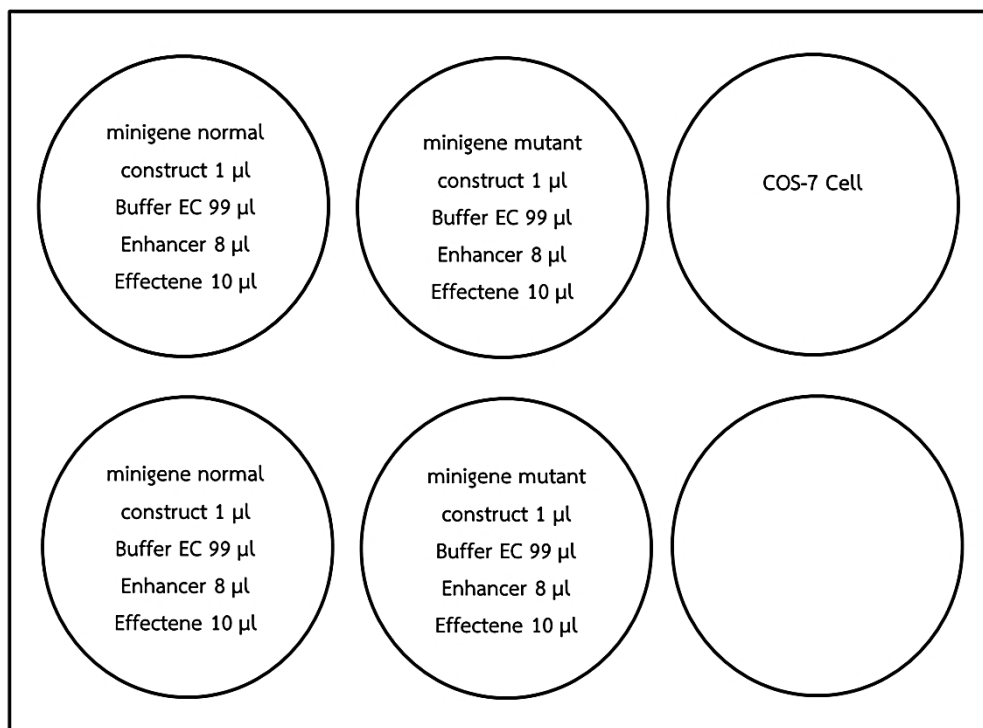
3.2.3.3 นำเซลล์ไปไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบ 5 นาที นำพลาสติกออกมาจะเห็นว่าเซลล์จะหลุดออกมา ให้ตบพลาสติกเบาๆ เล็กน้อย เพื่อให้เซลล์ที่ยังเกาะอยู่ที่ผิวพลาสติกหลุดออกมาด้วย

3.2.3.4 ใส่ D10 6 มิลลิลิตร และดูดทั้งเซลล์และ D10 ออกมาใส่หลอด 15 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปปั่นตกที่ความเร็ว 1.5 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทของเหลวทิ้งและกระจายเซลล์

3.2.3.5 ล้างเซลล์ด้วย PBS 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตกด้วยความเร็วและเวลาเท่าเดิม จากนั้นเท PBS ทิ้ง กระจายเซลล์ให้ไม่เป็นก้อนแล้วใส่ D10 6-8 มิลลิลิตร

3.2.3.6 ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่องนับเซลล์แบบดิจิตอล เมื่อนับจำนวนเซลล์เรียบร้อยแล้ว นำเซลล์ COS-7 ที่ได้ไปใส่ในงานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม ทั้งสิ้น 5 หลุม หลุมละ 400,000 เซลล์ แล้วนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยในระหว่างที่เลี้ยงเซลล์นั้นให้คำนวณปริมาณของสารต่างๆที่ต้องใช้ในการทำ transient transfection (ดังรูปที่ 17) โดยในการทำ transient transfection สำหรับการวิจัยนี้จะใช้ Effectene Transfection Reagent ต่อ minigene construct ในอัตราส่วน 1:10 และใช้ minigene construct 1 ไมโครกรัม ต่อหลุม





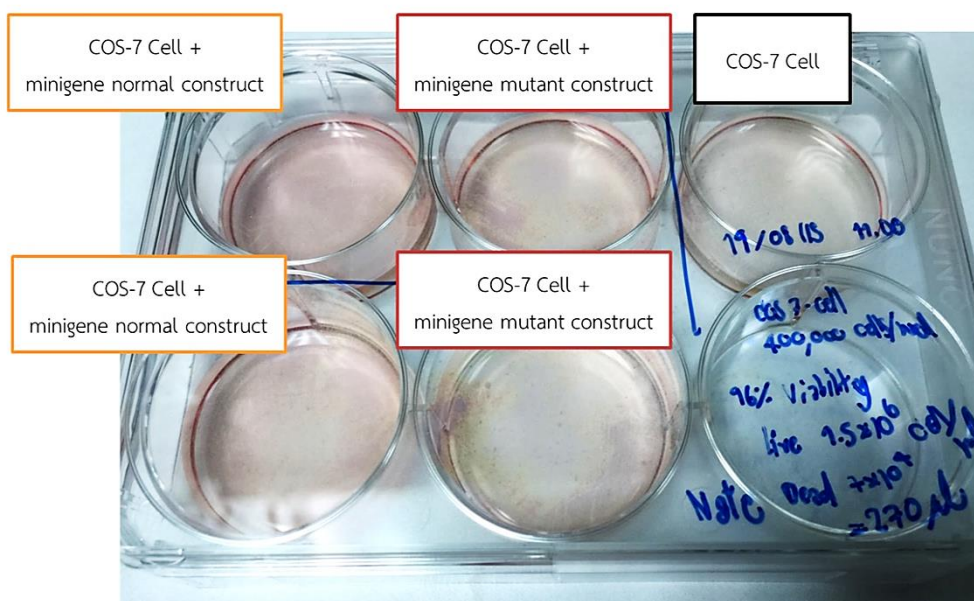
รูปที่ 17 ปริมาณของสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ transient transfection

3.2.4 เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว และเซลล์แข็งแรงดี ให้เริ่มดำเนินการทำ transient transfection เลย โดยเริ่มจาก

3.2.4.1 นำ Buffer EC 99 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในหลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ minigene construct 1 ไมโครลิตร ใส่ Enhancer 8 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันเบาๆ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

3.2.4.2 ใส่ Effectene reagent 10 ไมโครลิตร พร้อมทั้งผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ในระหว่างนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในเซลล์ COS-7 ที่ได้เลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง แล้วใส่ D10 เข้าไปใหม่ หลุมละ 1600 ไมโครลิตร แล้วนำเซลล์เข้าไปไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ตามเดิม

3.2.4.3 เมื่อครบ 10 นาทีแล้ว ใส่ D10 600 ไมโครลิตร ลงไปในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายผสมที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำสารละลายผสมทั้งหมดค่อยๆ หยดทีละหยดลงไปในเซลล์ที่เตรียมไว้ โดยหยดให้กระจายทั่วทั้งหลุมเบาๆ และเมื่อหยดเสร็จให้ค่อยๆ เขย่าจานเลี้ยงเซลล์ขึ้นลงเบาๆ แล้วนำเซลล์ที่ทำการ transient transfection แล้วเข้าไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 18 จานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมที่มีการทำ transient transfection แล้ว

### 3.3 สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ COS-7 ที่ได้ทำ transient transfection แล้ว (RNA extraction)

เมื่อเลี้ยงเซลล์ COS-7 ที่ทำการ transient transfection ครบ 48 ชั่วโมงแล้ว ให้ทำการเก็บเซลล์ COS-7 นั้น โดยขั้นตอนการเก็บเซลล์เหมือนกับการทำ subculture แตกต่างเพียงเมื่อล้างเซลล์ด้วย PBS หลังจากปั่นตกแล้ว ให้ดูด PBS ทิ้งให้หมด แล้วไม่ต้องใส่ D10 อีก จากนั้นเมื่อได้เซลล์เรียบร้อยแล้ว นำเซลล์ที่ได้ไปสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัด RNA ชื่อ QIAamp RNA Blood Mini Kit และเมื่อได้อาร์เอ็นเอที่สกัดจากเซลล์แล้ว จะต้องนำอาร์เอ็นเอที่ได้ใส่ในน้ำแข็งทันทีและนำไปเก็บในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเสถียรภาพของอาร์เอ็นเอ

### 3.4 การเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็นซีดีเอ็นเอ (reverse transcription) และการเปรียบเทียบผลของมิวเทชันแบบ IVS7+1G>A ที่พบต่อกระบวนการ splicing ของผู้ป่วยเทียบกับคนปกติ

หลังจากที่ได้อาร์เอ็นเอของทั้งคนปกติและผู้ป่วยแล้ว ขั้นตอนต่อไป คือการนำอาร์เอ็นเอมาเปลี่ยนเป็นซีดีเอ็นเอด้วยการทำ reverse transcription ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ประกอบด้วยการผสมสารละลายผสม ดังตารางที่ 8 เมื่อผสมสารละลายผสมเรียบร้อยแล้ว นำไปเข้าเครื่อง PCR และตั้งค่าอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เช่นกัน

ขั้นตอนที่ 2 นำสารละลายผสมในขั้นตอนที่ 1 มาเติมสารละลายผสมในขั้นตอนที่ 2 ซึ่งสารละลายผสมในขั้นตอนที่ 2 มีองค์ประกอบดังตารางที่ 9 จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR พร้อมทั้งตั้งค่าอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของสารละลายผสมในขั้นตอนที่ 1

สาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอ	10.10
Oligo dT	1.00
<b>รวม</b>	<b>11.10</b>

ตารางที่ 9 องค์ประกอบของสารละลายผสมในขั้นตอนที่ 2

สาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
5X ImPromII™ buffer	4.00 ไมโครลิตร
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2.40 ไมโครลิตร

สาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
10 mM dNTP	1.00 ไมโครลิตร
1 U/ml RNasin <sup>®</sup> Ribonuclease	0.50 ไมโครลิตร
ImPromII™ Reverse transcriptase	1.00 ไมโครลิตร
สารละลายผสมในขั้นตอนที่ 1	11.10 ไมโครลิตร
<b>รวม</b>	<b>20.00 ไมโครลิตร</b>

หลังจากนั้นนำซีดีเอ็นเอทั้งของคนปกติและผู้ป่วยที่ได้มาทำการเพิ่มจำนวนและตรวจสอบขนาด โดยใช้ไพรเมอร์, องค์กรประกอบของสารละลายผสมและขั้นตอนในการทำเช่นเดียวกับการเพิ่มจำนวนจีโนมิตีเอ็นเอในขั้นของการสร้าง minigene ที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

## บทที่ 4

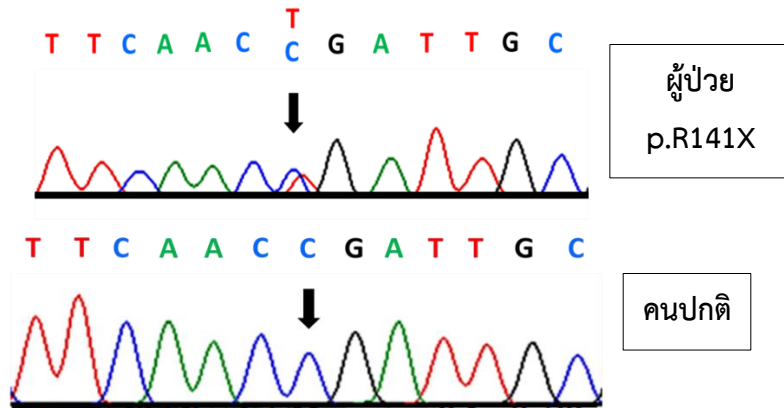
### ผลการศึกษา

#### 1. ผลของการวิเคราะห์ยีน *CYP11B1* เพื่อหามิวเทชันในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลสทั้ง 3 ราย (mutation analysis)

จากการวิเคราะห์ยีน *CYP11B1* เพื่อหามิวเทชันในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลสทั้ง 3 ราย ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่เพอติเมอเรสและการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing พบว่า

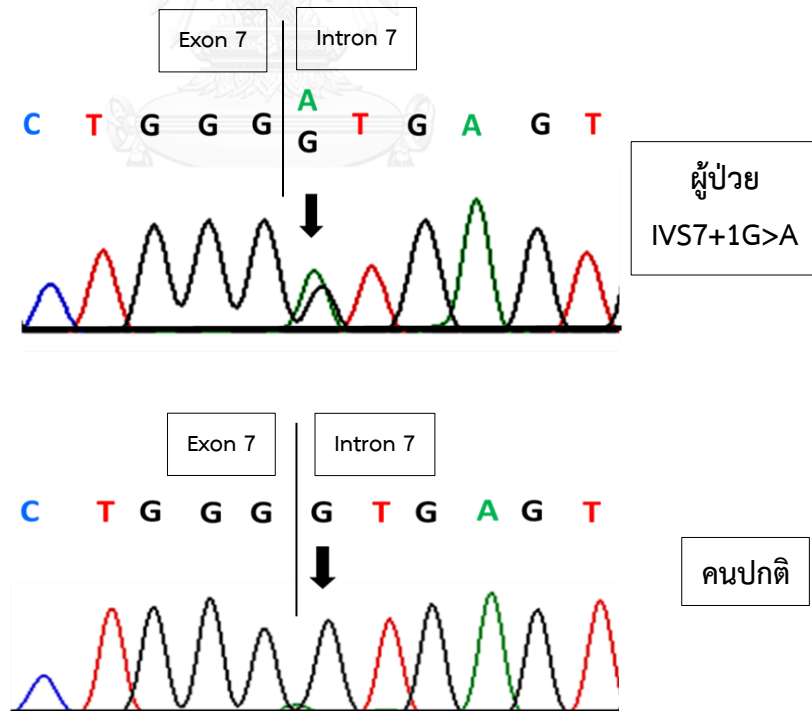
ผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นพี่น้องกันนั้น มีมิวเทชันแบบ compound heterozygous ในยีน *CYP11B1* กล่าวคือ การที่ผู้ป่วยมีมิวเทชันสองแบบและมิวเทชันแต่ละแบบของผู้ป่วยนั้นจะอยู่บนแอลลีลคนละแอลลีลของผู้ป่วย โดยจากการวิเคราะห์ยีน *CYP11B1* ในผู้ป่วยทั้ง 2 ราย พบมิวเทชันแบบ nonsense c.421C>T (p.R141X) ในเอ็กซอนที่ 3 และมิวเทชันแบบ splice site ในตำแหน่งเบสตัวแรกของอินทอนที่ 7 c.1200+1G>A (IVS7+1G>A) ในผู้ป่วยทั้ง 2 ราย (รูปที่ 19 และ 20)

### Exon3: Nonsense mutation p.R141X (CGA>TGA)



รูปที่ 19 Electropherogram จากการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing ของผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2 ซึ่งมีมิวเทชันแบบ nonsense ในเอ็กซอนที่ 3

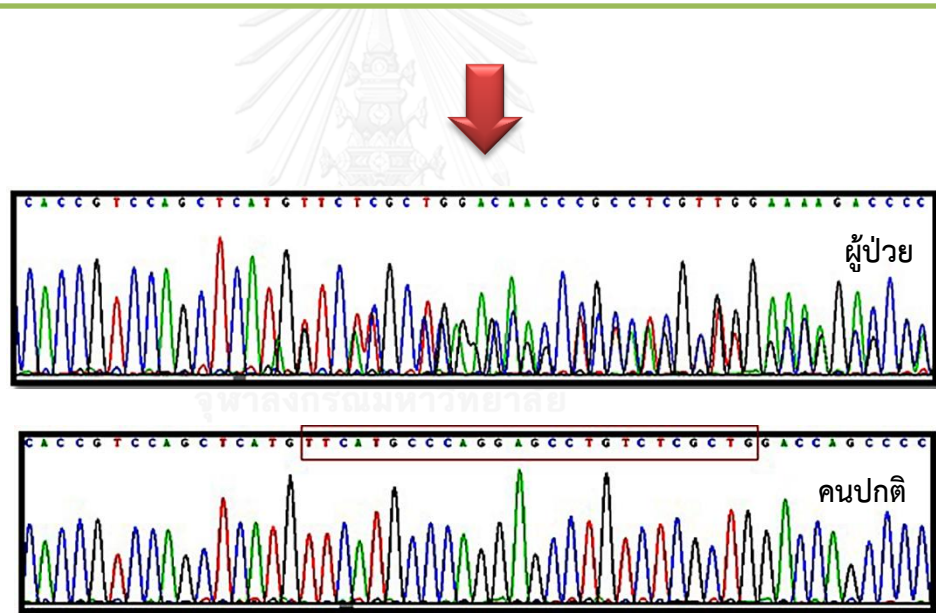
### Splice site mutation c.1200+1G>A (IVS7+1G>A)



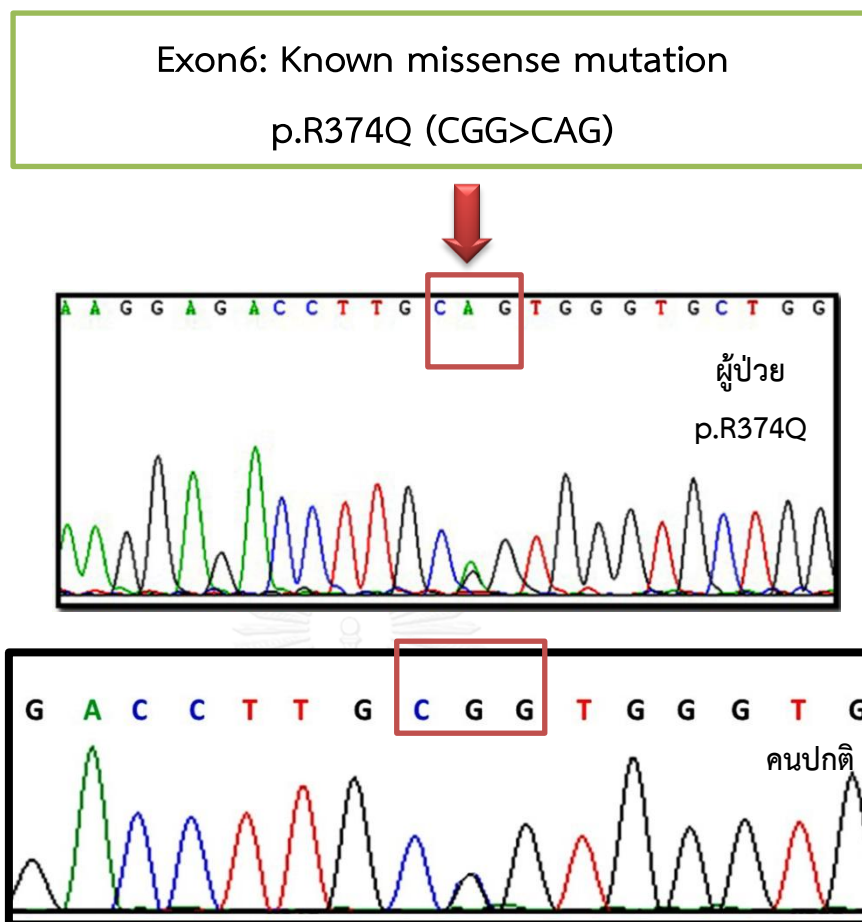
รูปที่ 20 Electropherogram จากการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing ของผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2 ซึ่งมีมิวเทชันแบบ splice site ในอินทรอนที่ 7

สำหรับ ผู้ป่วยรายที่ 3 พบมีวเทชันแบบ compound heterozygous เช่นกัน โดยจากการวิเคราะห์ยีน *CYP11B1* ในผู้ป่วยรายที่ 3 พบมีวเทชันแบบ deletion 26 คู่เบส ที่เอ็กซอนที่ 4 (p.Phe239Aspfs\*11) ซึ่งทำให้เกิดการ frameshift ทั้งสิ้น 10 กรดอะมิโน และพบมีวเทชันแบบ missense (p.R374Q) ที่เอ็กซอนที่ 6 (รูปที่ 21 และ 22)

**Exox4: Deletion**  
 c.714\_740delTTCATGCCAGGAGCCTGTCTCGCTG  
 frameshift 10 aa. To stop codon



รูปที่ 21 Electropherogram จากการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing ของผู้ป่วยรายที่ 3 ซึ่งมีวเทชันแบบ deletion ในเอ็กซอนที่ 4



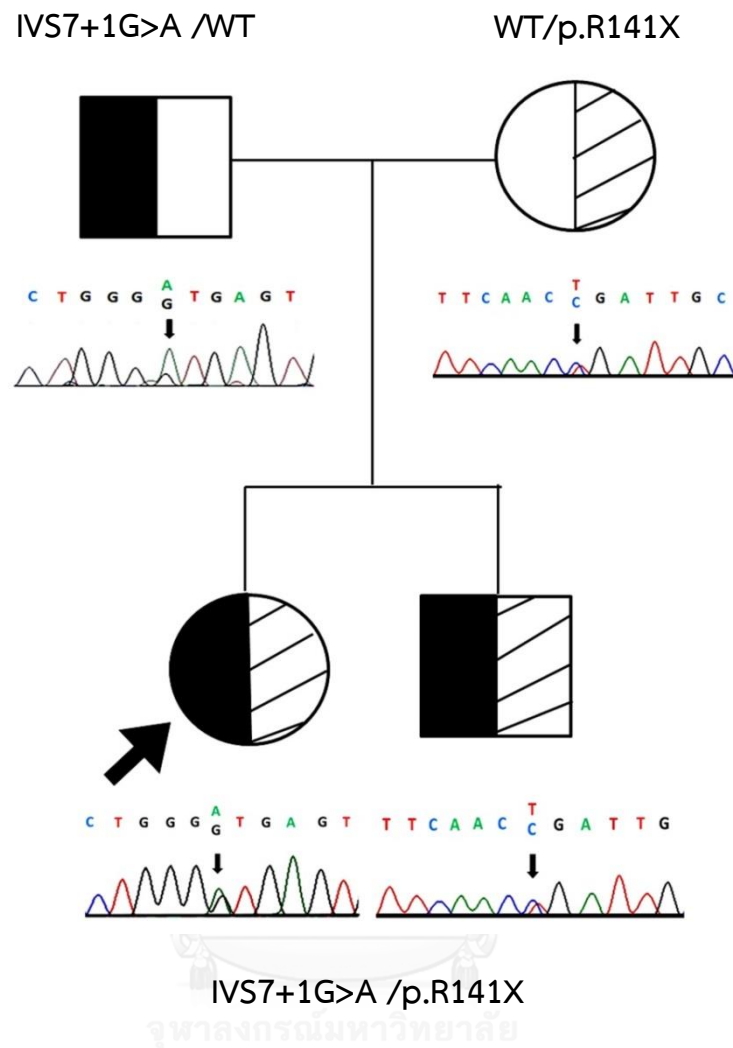
รูปที่ 22 Electropherogram จากการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing ของผู้ป่วยรายที่ 3 ซึ่งมีมิวเทชันแบบ missense ในเอ็กซอนที่ 6

## 2. ผลของการวิเคราะห์หามิวเทชันที่พบในผู้ป่วยนั้นได้รับการถ่ายทอดมาจากบิดาและมารดา ถูกต้องตามกฎหมายการถ่ายทอดทางพันธุกรรมหรือไม่

จากการวิเคราะห์และหามิวเทชันในพ่อและแม่ของผู้ป่วยทั้ง 3 ราย พบว่า มิวเทชันที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยทั้ง 3 รายนั้นเป็นไปตามกฎหมายการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ดังนี้

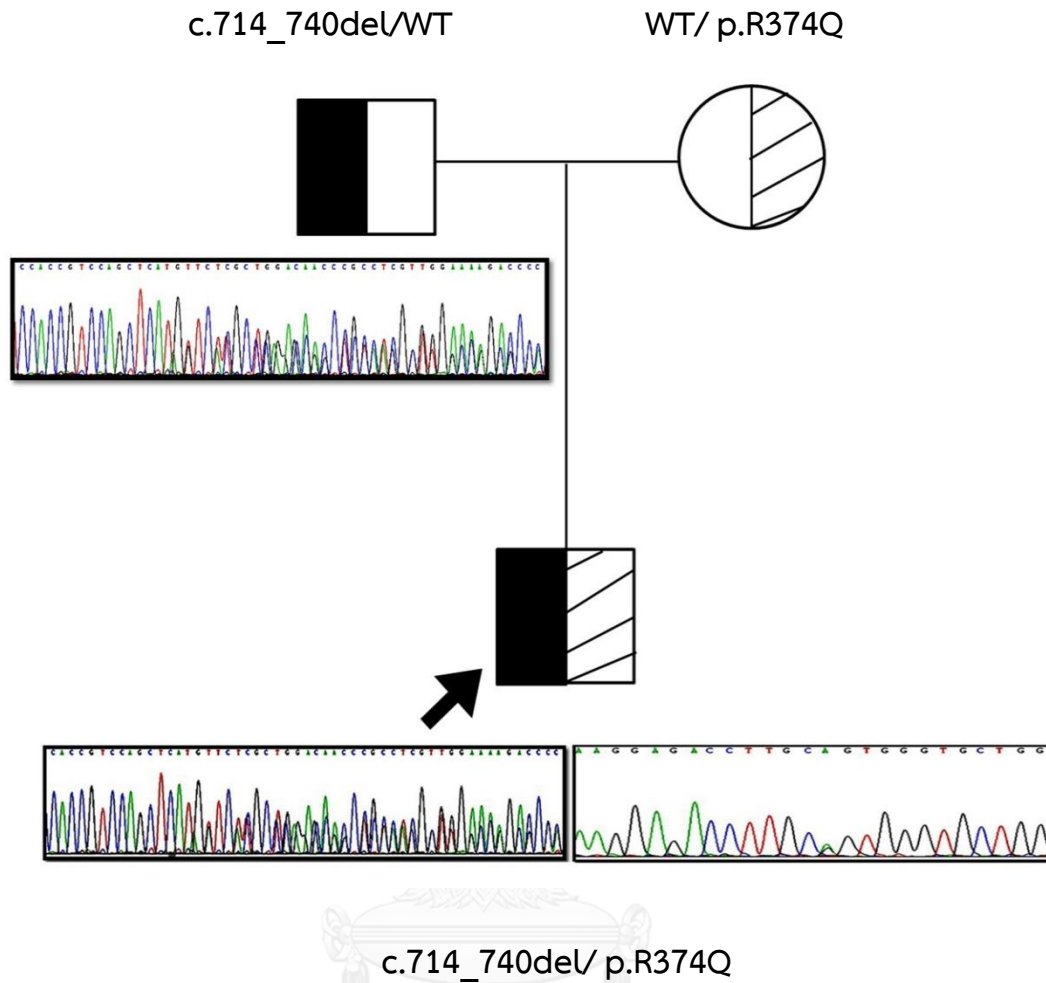
ผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2 ที่พบมิวเทชันแบบ nonsense ในเอ็กซอนที่ 3 (p.R141X) และมิวเทชันแบบ splice site ในอินทอนที่ 7 (IVS7+1G>A) พบว่า แม่ของผู้ป่วยเป็นพาหะของโรค และมีมิวเทชันแบบ nonsense ในเอ็กซอนที่ 3 (p.R141X) ส่วนพ่อของผู้ป่วยเป็นพาหะของโรคและมีมิวเทชันแบบ splice site ในอินทอนที่ 7 (IVS7+1G>A)





รูปที่ 23 แผนภาพ pedigree ของครอบครัวผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2

สำหรับผู้ป่วยรายที่ 3 ที่พบมิวเทชันแบบ deletion ที่เอ็กซอนที่ 4 และมีมิวเทชันแบบ missense ที่เอ็กซอนที่ 6 (p.R374Q) พบว่าแม่ของผู้ป่วยเป็นพาหะของโรคและมีมิวเทชันแบบ missense ที่เอ็กซอนที่ 6 (p.R374Q) และพ่อของผู้ป่วยก็เป็นพาหะของโรคเช่นกันและพบมิวเทชันแบบ deletion ที่เอ็กซอนที่ 4

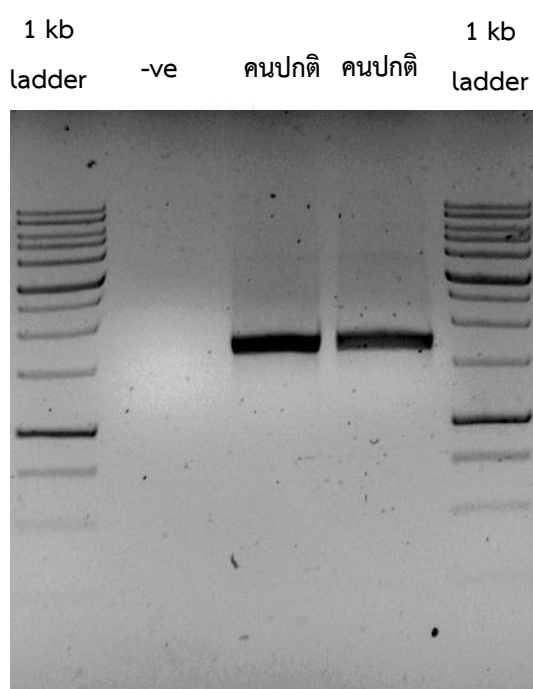


รูปที่ 24 แผนภาพ pedigree ของครอบครัวผู้ป่วยรายที่ 3

### 3. ผลของการวิเคราะห์หามิวเทชันแบบ splice site ที่พบ ต่อกระบวนการ splicing ในยีน *CYP11B1* ของผู้ป่วย

จากการวิเคราะห์หามิวเทชันในผู้ป่วยทั้ง 3 ราย และพบมิวเทชันแบบต่างๆ ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น พบว่า มีเพียงมิวเทชันแบบ splice site ที่พบในผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2 (IVS7+1G>A) เท่านั้น ที่ยังไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัดว่า มิวเทชันที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลทำให้เกิดภาวะขาด 11β-ไฮดรอกซิเลส ในผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2 ดังนั้น จึงจำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ผลของมิวเทชันแบบ splice site นี้ ว่ามีผลต่อกระบวนการ splicing ในยีน *CYP11B1* ของผู้ป่วยหรือไม่ โดยทำการทดลองด้วย minigene ซึ่งขั้นตอนในการทดลองด้วย minigene ได้กล่าวไว้ในบทที่ 3 แล้ว

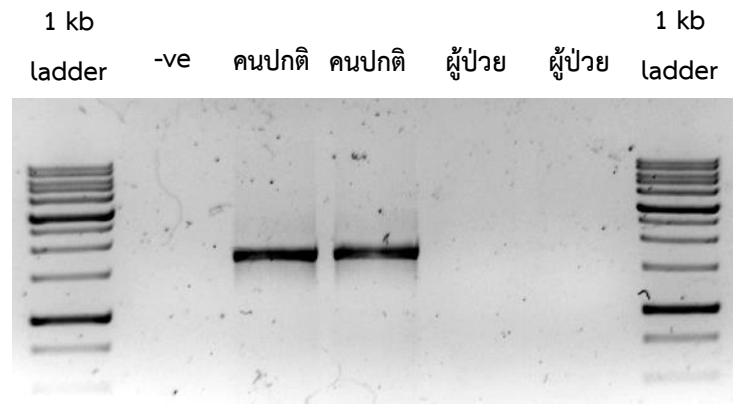
และอย่างที่ได้อธิบายไว้ในตอนต้นที่ว่า การออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *CYP11B1* เป็นเรื่องที่ทำได้ยาก ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์สำหรับสร้าง minigene construct ของยีน *CYP11B1* ก็ไม่ได้สำเร็จในครั้งแรก แต่ต้องออกแบบถึง 3 ครั้ง ถึงจะได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุด โดยการออกแบบไพรเมอร์ครั้งแรกนั้น เมื่อนำไพรเมอร์มาทำ PCR ในคนปกติ ก็พบว่า PCR ของคนปกติมีขนาด 1,638 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ถูกต้อง (ดังรูปที่ 25 )



2014-07-02 15hr 03min

รูปที่ 25 ภาพเจลแสดงขนาดของดีเอ็นเอของคนปกติเมื่อทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับสร้าง minigene construct ซึ่งมีขนาด 1,638 คู่เบส

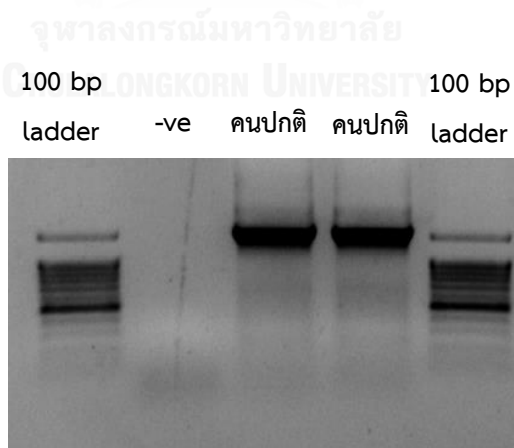
แต่เมื่อนำไพรเมอร์ ดังกล่าว ที่ใช้สำหรับการสร้าง minigene construct และได้ทำการลองทำ PCR ในคนปกติแล้วด้วยนั้น มาทำ PCR ในดีเอ็นเอของผู้ป่วย พบว่า ไม่ปรากฏภาพขนาดของดีเอ็นเอของผู้ป่วยบนเจล (ดังรูปที่ 26) แสดงให้เห็นว่า ไพรเมอร์คู่นี้ ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสร้าง minigene construct นี้ จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่อีกครั้ง



2014-08-05 17hr 08min

รูปที่ 26 ภาพเจลแสดงขนาดของดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยเมื่อทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับสร้าง minigene construct ซึ่งมีขนาด 1,638 คู่เบส

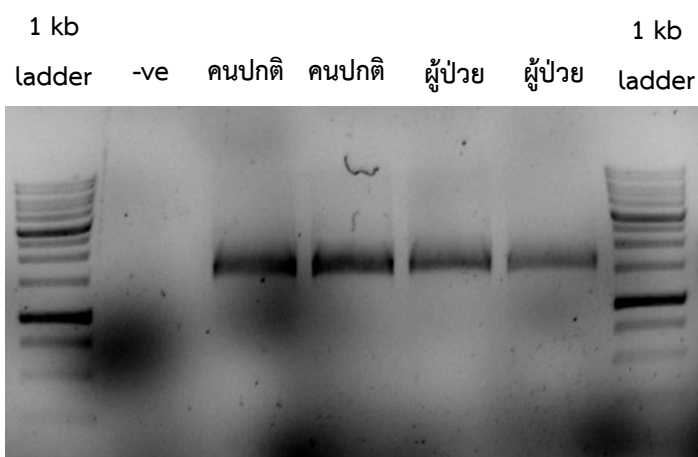
หลังจากเกิดปัญหาเรื่องไพรเมอร์คู่แรก ที่ไม่สามารถจะทำ PCR ในดีเอ็นเอของคนไข้ได้ จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ เป็นไพรเมอร์คู่ที่สองนั่นเอง จากนั้นได้นำไพรเมอร์คู่ที่สองดังกล่าว มาทำการ PCR ในดีเอ็นเอของคนปกติ (ดังรูปที่ 27)



2014-09-03 14hr 37min

รูปที่ 27 ภาพเจลแสดงขนาดของดีเอ็นเอของคนปกติเมื่อทำ PCR ด้วยไพรเมอร์คู่ที่สอง ซึ่งมีขนาด 1,598 คู่เบส

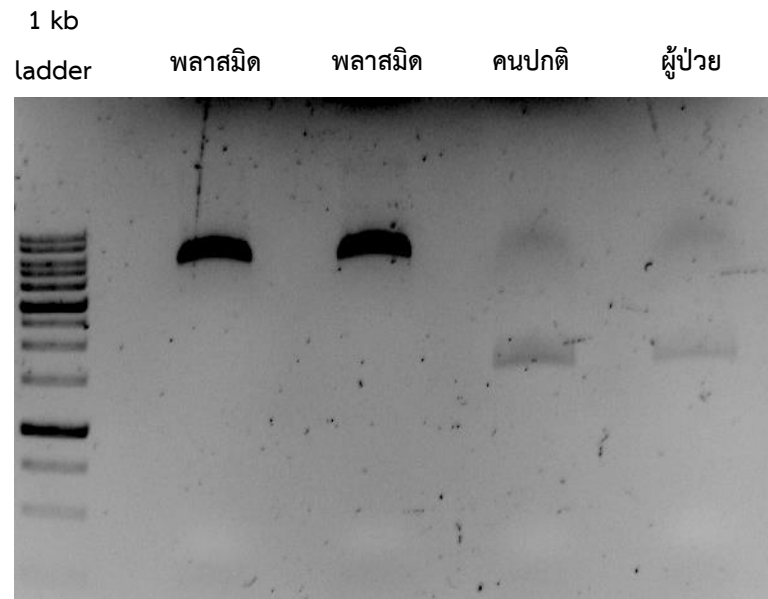
และเมื่อนำไพรเมอร์คู่ที่สองนี้ มาทำ PCR ในผู้ป่วยก็ได้ผล ดังรูปที่ 28 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไพรเมอร์คู่นี้ สามารถใช้ในการสร้าง minigene construct ได้



2014-09-09 16hr 17min

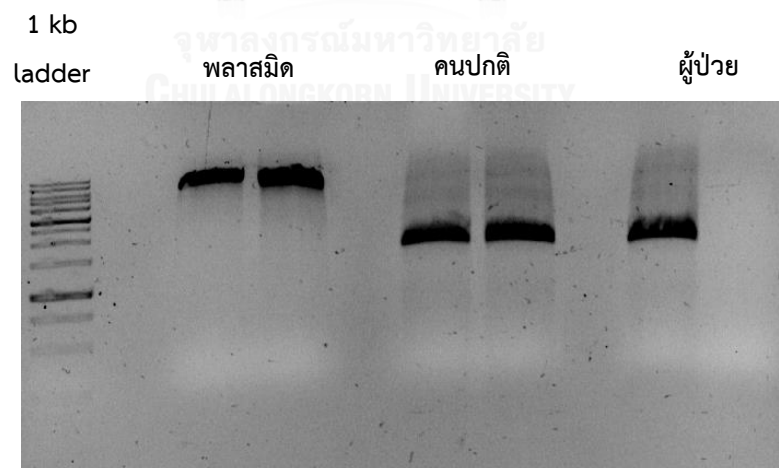
รูปที่ 28 ภาพเจลแสดงขนาดของดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยเมื่อทำ PCR ด้วยไพรเมอร์คู่ที่สอง ซึ่งมีขนาด 1,598 คู่เบส

เมื่อได้ชิ้นส่วน PCR ที่ต้องการของทั้งคนปกติและผู้ป่วยแล้ว จากนั้นต้องนำชิ้นส่วน PCR และพลาสมิดไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า ในระหว่างการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เกิดการสูญเสียชิ้นส่วน PCR ของทั้งคนปกติและผู้ป่วยไปในปริมาณมาก (ดังรูปที่ 29) ส่งผลให้ ปริมาณชิ้นส่วน PCR ของทั้งคนปกติและผู้ป่วยไม่เพียงพอที่จะนำไปทำการ ligation ต่อในขั้นตอนต่อไป



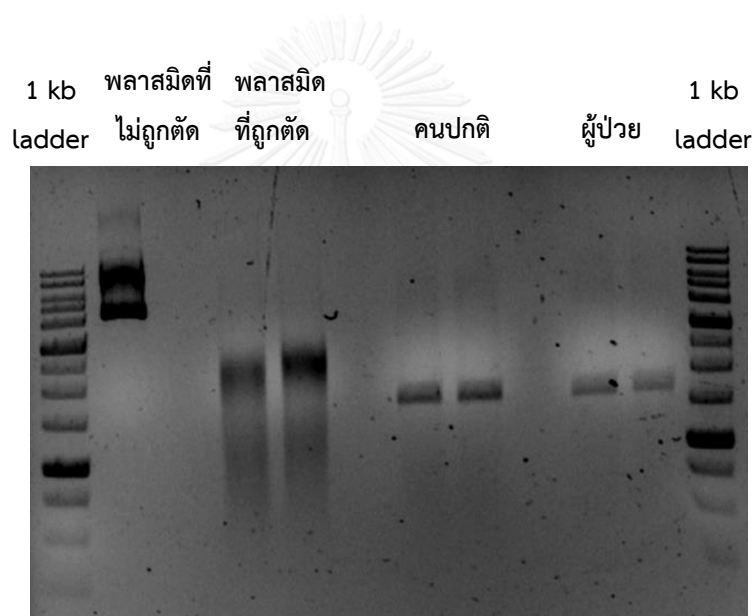
รูปที่ 29 ภาพเจลแสดงขนาดของพลาสมีด ดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วย  
เมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จึงต้องทำการแก้ไขด้วยการทำ PCR ดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยเพิ่มเติม จากนั้นนำมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้ผลดังรูปที่ 30



รูปที่ 30 ภาพเจลแสดงขนาดของพลาสมีด ดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยเมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หลังจากเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน PCR

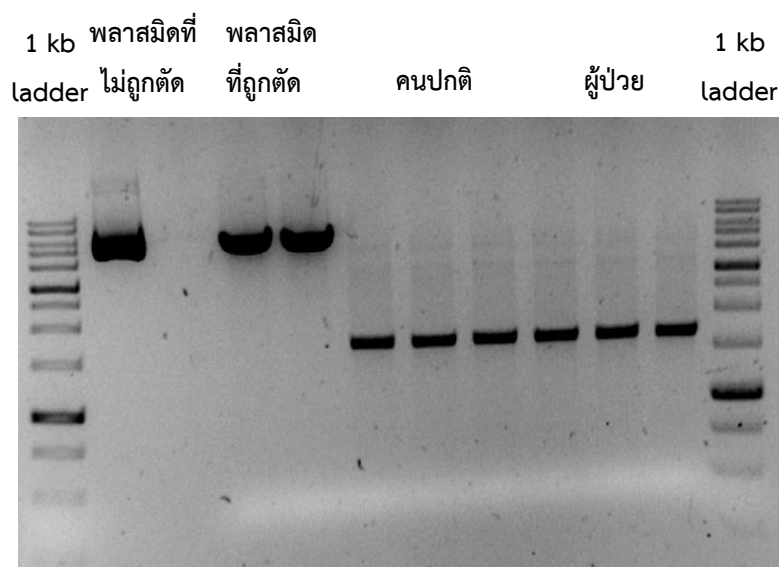
และเมื่อทำการสกัดเจลเพื่อนำชิ้นส่วนของพลาสมิด ชิ้นส่วน PCR ของทั้งคนปกติและผู้ป่วยออกมา และนำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nana drop พบว่า ความเข้มข้นของพลาสมิด คือ 9.1 ng/ $\mu$ l ความเข้มข้นของชิ้นส่วน PCR ของคนปกติ คือ 5.6 ng/ $\mu$ l และความเข้มข้นของชิ้นส่วน PCR ของผู้ป่วย คือ 5.6 ng/ $\mu$ l ซึ่งเมื่อดำเนินการแล้วเพียงพอต่อการนำไปทำการ ligation ต่อไป และเมื่อทำการ ligation แล้ว จึงได้นำ minigene construct นั้น ไปทำการ transformation พบว่า ไม่มีโคลนนิ่งของแบคทีเรียขึ้นเลย จึงต้องเริ่มทำการสร้าง minigene construct ใหม่ ตั้งแต่ขั้นแรก อีกครั้ง โดยสันนิษฐานว่า ที่โคลนนิ่งไม่ขึ้นอาจจะเกิดจากการที่ ชิ้นส่วน PCR ไม่เชื่อมเข้าไปในพลาสมิด จึงได้ทำการ PCR ในปริมาณที่มากขึ้น จากนั้นทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้ผลดังรูปที่ 31



2015-01-14 16hr 29min

รูปที่ 31 ภาพเจลแสดงขนาดของพลาสมิด ดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยเมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งพบว่าขนาดของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ไม่ถูกต้อง

โดยจากรูปที่ 31 พบว่า ขนาดของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่ถูกต้อง จึงทำให้ทราบว่าเกิดการปนเปื้อนขึ้นในพลาสมิดที่นำมาใช้ จึงต้องทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอีกครั้ง (ดังรูปที่ 32)

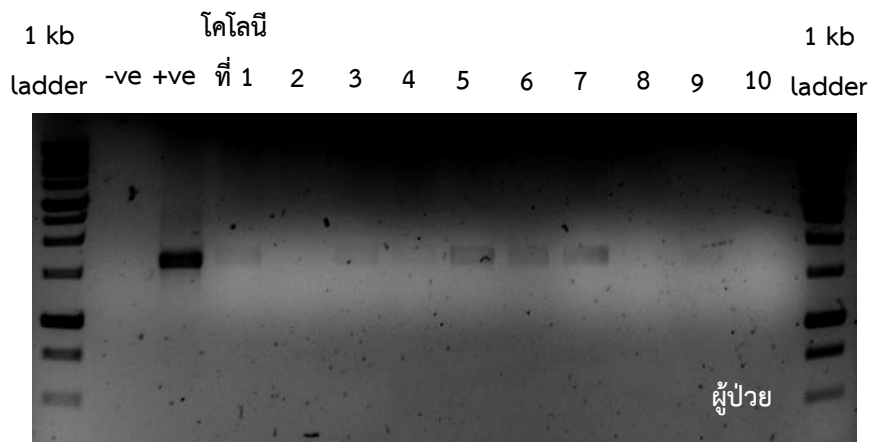


2015-02-04 14hr 58min

รูปที่ 32 ภาพเจลแสดงขนาดของพลาสมิด ดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยเมื่อทำการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ หลังจากเปลี่ยนพลาสมิด

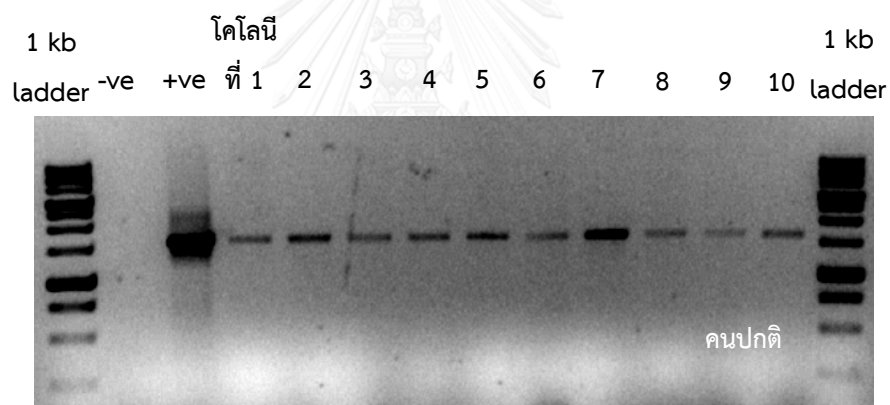
เมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว และปริมาณของชิ้นส่วนต่างๆมีปริมาณมากเพียงพอแล้ว จึงนำชิ้นส่วนของพลาสมิด ชิ้นส่วน PCR ของคนปกติ และผู้ป่วย ไปทำการ ligation และ transformation ตามลำดับ ซึ่งในครั้งนี้นับว่ามีโคโลนีเกิดขึ้นในเพลท จึงได้ทำการคัดเลือกโคโลนีอย่างสุ่ม อย่างละ 3 โคโลนี (ดังรูปที่ 33 และ 34) เพื่อนำไปตรวจสอบความถูกต้องของ minigene construct ด้วยการทำ direct sequencing โดยผลการตรวจสอบความถูกต้องของ minigene construct ของทั้งคนปกติและผู้ป่วย พบว่าไม่มีโคโลนีใดมีลำดับเบสที่ถูกต้องเลย





2015-03-19 15hr 10min

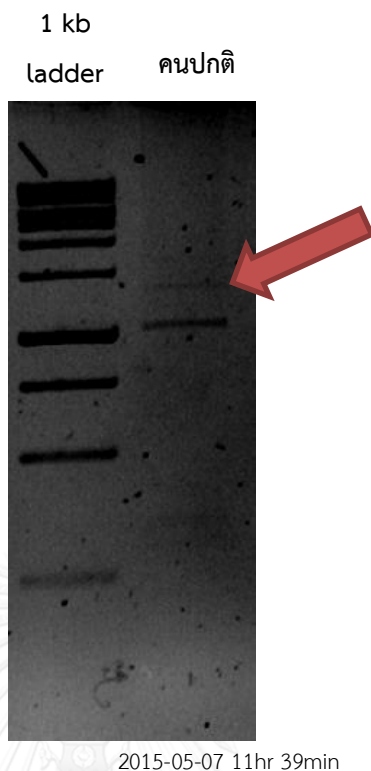
รูปที่ 33 ภาพเจลแสดงขนาดโคลนีนีของผู้ป่วยที่คัดเลือกมาจำนวนทั้งสิ้น 10 โคลนีนี



2015-03-19 16hr 16min

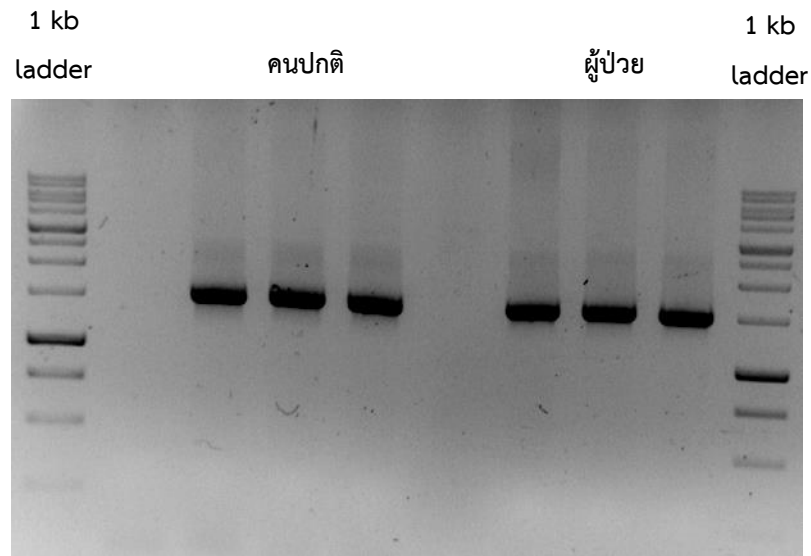
รูปที่ 34 ภาพเจลแสดงขนาดโคลนีนีของคนปกติที่คัดเลือกมาจำนวนทั้งสิ้น 10 โคลนีนี

หลังจากทำการสร้าง minigene construct ด้วยไพรเมอร์คู่ที่สองหลายครั้งแล้ว และทำการปรับเปลี่ยน และแก้ไขในหลายๆ จุดแล้ว แต่เมื่อทำ minigene construct ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสแล้ว แต่ก็ยังไม่พบโคลนีนีที่ถูกต้อง จึงตัดสินใจตรวจสอบไพรเมอร์นี้ด้วยการทำการตัดชิ้นส่วนของ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดูว่า ชิ้นส่วน PCR ที่ได้จากไพรเมอร์คู่นี้ คือ ชิ้นส่วนที่ถูกต้องจริงๆ หรือไม่ โดยเลือกเอนไซม์ *SacI* ในการตัดเพื่อตรวจสอบไพรเมอร์ ซึ่งถ้าชิ้นส่วน PCR ที่ถูกต้อง เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัวนี้ จะได้ตัดได้ทั้งสิ้น 3 ขนาด คือ 1,002 313 และ 285 คู่เบสตามลำดับ ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 35



รูปที่ 35 ภาพเจลแสดงขนาดของชิ้นส่วน PCR คนปกติที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *SacI*

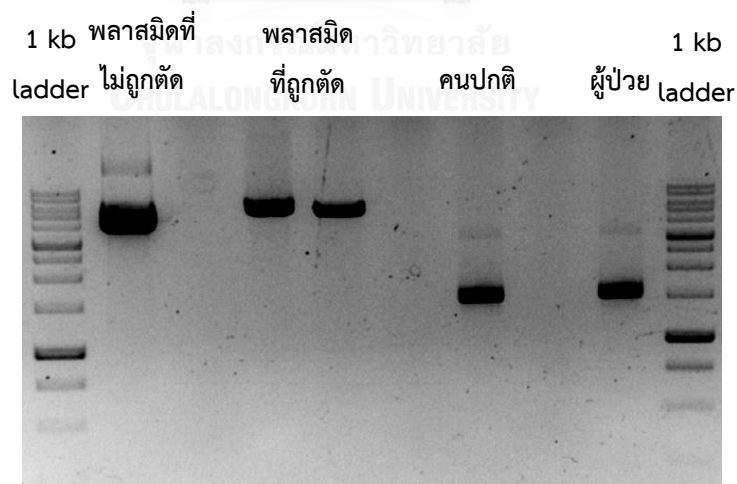
ซึ่งจากรูปที่ 35 แสดงให้เห็นว่า ไพรเมอร์คู่ที่สองนั้นไม่เหมาะสมในการนำมาทำการสร้าง minigene construct จึงจำเป็นต้องออกแบบไพรเมอร์ใหม่เป็นคู่ที่ 3 นั่นคือ ไพรเมอร์ CYP11B1\_IVS7\_F\_ *BamHI*-HF และไพรเมอร์ CYP11B1\_IVS7\_R\_ *XbaI* นั่นเอง โดยขั้นตอนของการออกแบบไพรเมอร์คู่นี้ ได้กล่าวไว้ในบทที่ 3 ในส่วนของการสร้าง minigene แล้ว และเมื่อได้ไพรเมอร์แล้ว นำไพรเมอร์คู่นี้มาทำ PCR ในดีเอ็นเอของทั้งคนปกติและดีเอ็นเอของผู้ป่วย โดยขนาดที่ถูกต้องของชิ้นส่วน PCR ที่ได้จากไพรเมอร์คู่นี้จะมีขนาด 1,508 คู่เบส ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 36



2015-06-08 16hr 45min

รูปที่ 36 ภาพเจลแสดงขนาดของดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วยเมื่อทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ CYP11B1\_IVS7\_F\_BamHI-HF และไพรเมอร์ CYP11B1\_IVS7\_R\_XbaI

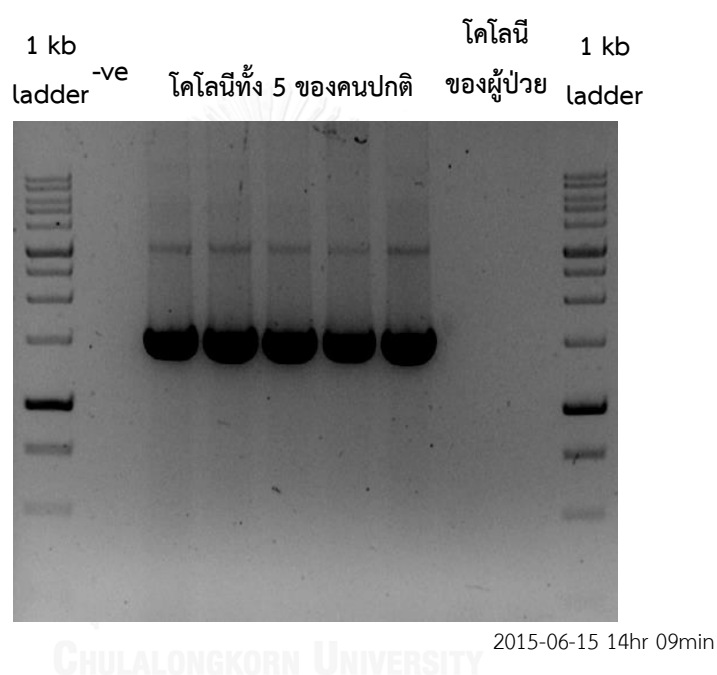
จากนั้นนำชิ้นส่วน PCR ของทั้งคนปกติและของผู้ป่วย รวมทั้งพลาสมิด ไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 37



2015-06-09 13hr 33min

รูปที่ 37 ภาพเจลแสดงขนาดของพลาสมิด ดีเอ็นเอของคนปกติและผู้ป่วย เมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากนั้นทำการสกัดเจลของทั้งพลาสมิด และชิ้นส่วน PCR แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็วสูงเพื่อเป็นการขจัดน้ำออก และทำให้ทั้งพลาสมิด และชิ้นส่วน PCR มีความเข้มข้นที่สูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพของการ ligation สูงยิ่งขึ้นด้วย โดยเมื่อปั่นเอาน้ำออกแล้ว พลาสมิด มีความเข้มข้น 56.9 ng/ $\mu$ l ชิ้นส่วน PCR ของคนปกติ มีความเข้มข้น 27.7 ng/ $\mu$ l และชิ้นส่วน PCR ของผู้ป่วย มีความเข้มข้น 34.5 ng/ $\mu$ l จากนั้นทำการ ligation พบว่า โคลนีย์ของคนปกติขึ้นทั้งสิ้น 5 โคลนีย์ และโคลนีย์ของผู้ป่วยขึ้นทั้งสิ้น 2 โคลนีย์ (รูปที่ 38)



รูปที่ 38 ภาพเจลแสดงขนาดโคลนีย์ของทั้งคนปกติและของผู้ป่วย

โดยจากภาพเห็นว่าโคลนีย์ของคนปกติเมื่อนำมาทำ PCR เห็นว่าภาพชัดเจนดี ดังนั้น จึงทำการสกัดเจลแล้วนำไป minigene construct ของคนปกติทั้ง 5 โคลนีย์ ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส และพบว่ามี 1 โคลนีย์ ที่มีลำดับเบสถูกต้องทั้งหมด ในขณะที่โคลนีย์ของผู้ป่วย เมื่อนำมาทำ PCR พบว่าไม่ปรากฏภาพของ PCR ของผู้ป่วย ดังนั้น จึงต้องเริ่มทำการสร้าง minigene construct ของผู้ป่วยอีกครั้ง โดยครั้งนี้ทำการ PCR ดีเอ็นเอของผู้ป่วยทั้งสิ้น 40 reactions เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของชิ้นส่วน PCR สูงที่สุด เพื่อประสิทธิภาพในการ ligation โดยในครั้งนี้ มีโคลนีย์ของผู้ป่วยขึ้นทั้งสิ้น 6 โคลนีย์ จึงทำการสกัดเจลและทำการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส ซึ่งจากผลการตรวจสอบ มีเพียง 1 โคลนีย์ เท่านั้นที่มีลำดับเบสถูกต้อง

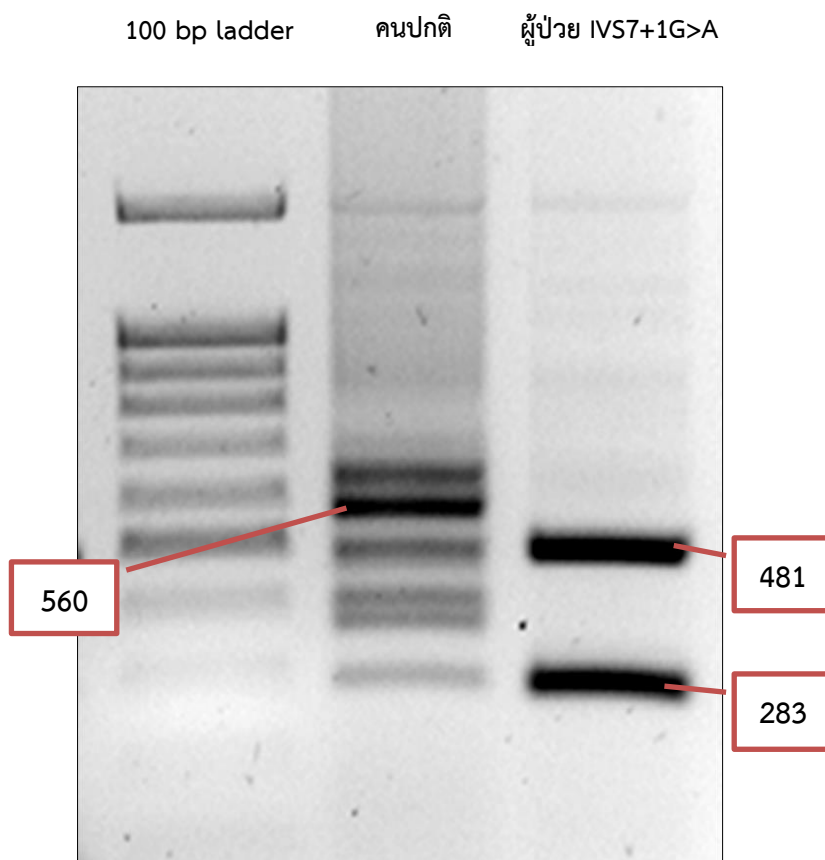
หลังจากที่ได้ minigene construct ของทั้งคนปกติและผู้ป่วยแล้ว ต่อไปเป็นขั้นตอนของการทำ transfection เข้าไปในเซลล์ COS-7 โดยเซลล์ COS-7 ที่เหมาะสมจะต้องเป็นเซลล์ที่ยังไม่แก่มากเกินไปทั้งในการเลี้ยงเซลล์ ก็ไม่ควรที่เลี้ยงเซลล์จนเซลล์หนาแน่นจนเกินไป เพราะจะทำให้เซลล์มีประสิทธิภาพที่ลดลง



รูปที่ 39 เซลล์ COS-7 หลังจากทำการ subculture เป็นเวลา 2 วัน

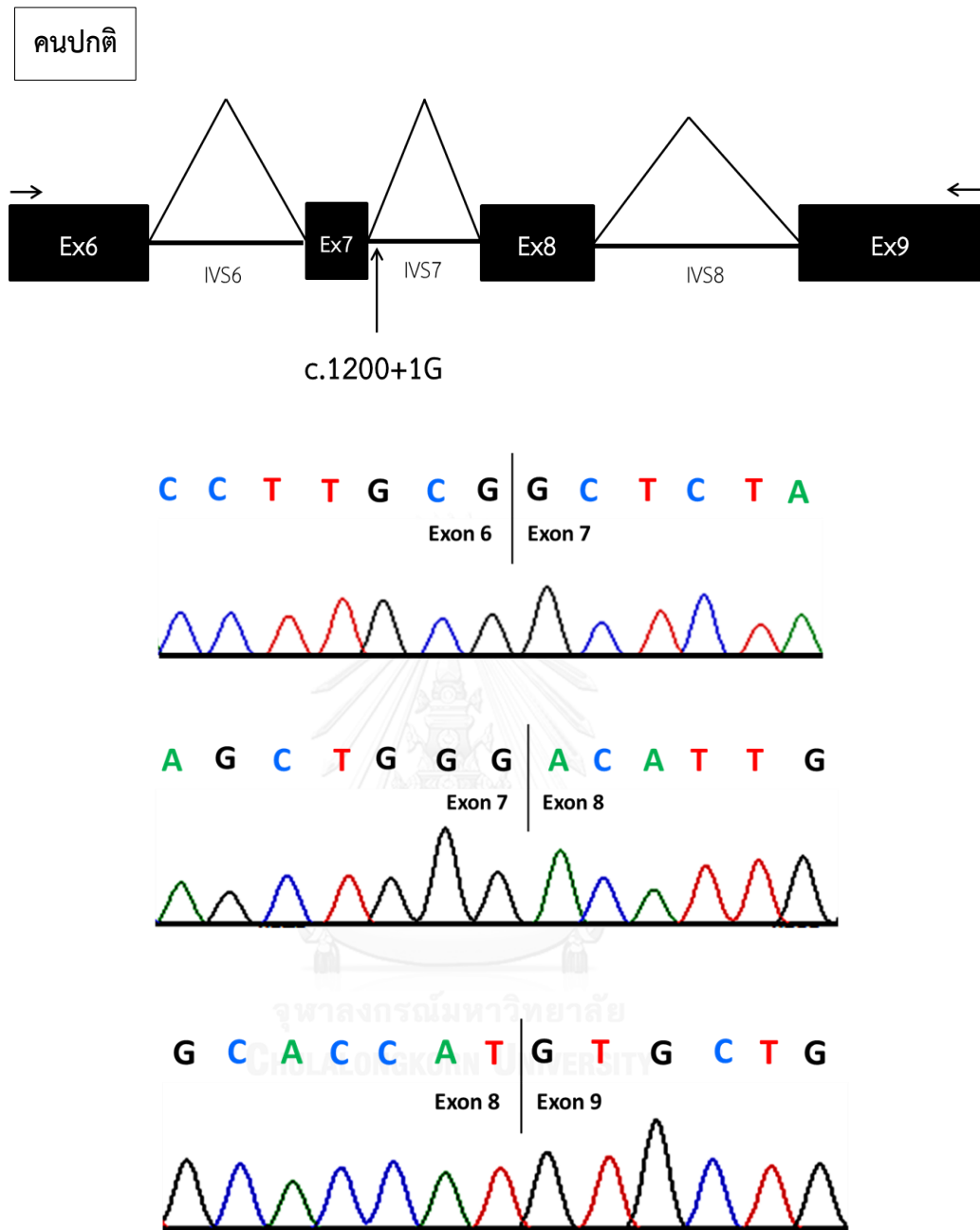
และในการทำ transfection ในแต่ละงานวิจัย ควรที่จะทำการหา condition ที่เหมาะสมสำหรับงานวิจัยนั้นๆ เพื่อประสิทธิภาพของการทำ transfection จากนั้นสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ COS-7 นี้ และเมื่อได้อาร์เอ็นเอแล้วควรริบนำอาร์เอ็นเอเก็บในตู้ -80 องศาเซลเซียส ทันทีเพื่อรักษาสภาพของอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาทำการเปลี่ยนเป็นซีดีเอ็นเอ และนำไปทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CYP11B1\_IVS7\_F\_BamHI-HF และไพรเมอร์ CYP11B1\_IVS7\_R\_XbaI ได้ผลดังรูปที่ 40



รูปที่ 40 ขนาดของซีดีเอ็นเอของทั้งคนปกติและของผู้ป่วยที่มีมิวเทชันแบบ IVS7+1G>A

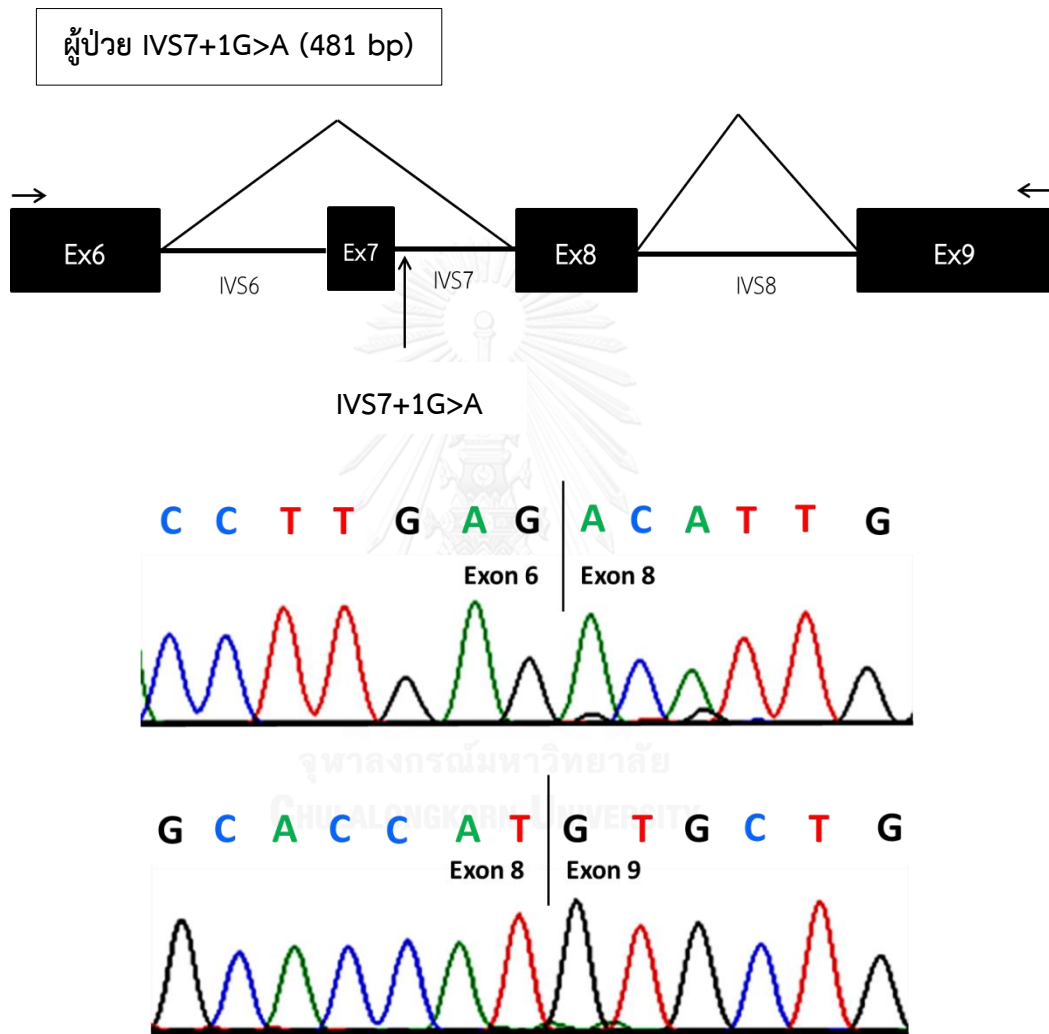
จากรูปที่ 40 แสดงให้เห็นว่า ขนาดของซีดีเอ็นเอของผู้ป่วยมีความแตกต่างกันกับซีดีเอ็นเอของคนปกติอย่างเห็นได้ชัด โดยขนาดของซีดีเอ็นเอของคนปกติมีขนาด 560 คู่เบส ในขณะที่ซีดีเอ็นเอของผู้ป่วยมี 2 ขนาดด้วยกัน คือ ขนาด 481 คู่เบส และขนาด 283 คู่เบส ซึ่งจะเห็นได้ว่าขนาดซีดีเอ็นเอของผู้ป่วยจะมีขนาดเล็กกว่าของคนปกติ ดังนั้น ซีดีเอ็นเอของผู้ป่วยจะต้องมีบางส่วนขาดหายไปนั่นเอง และเมื่อนำซีดีเอ็นเอของทั้งคนปกติและของผู้ป่วยไปหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing แล้ว พบว่า ซีดีเอ็นเอของคนปกติประกอบไปด้วยลำดับเบสของเอ็กซอน 6-9 เรียงต่อกันอย่างสมบูรณ์ ดังรูปที่ 41



รูปที่ 41 แผนภาพการ splicing ของคนปกติและแสดงผลการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing จากซีดีเอ็นเอของคนปกติ

ซึ่งจากรูปที่ 24 จะเห็นว่า การ splicing ของคนปกติทำงานอย่างมีประสิทธิภาพดี นั่นคือ เกิดการตัด intron ที่ 6, 7 และ 8 อีกทั้งยังเกิดการเรียงต่อกันของเอ็กซอน 6-9 อย่างสมบูรณ์อีกด้วย ในขณะที่ผลของการหาลำดับเบสจากซีดีเอ็นเอของผู้ป่วย พบว่า ซีดีเอ็นเอของผู้ป่วยที่มีขนาด 481 คู่เบสนั้น เกิด

การ splicing ที่ผิดพลาดไป โดยเกิดการตัดอินทรอนที่ 6, 7 และ 8 รวมทั้งเกิดการตัดเอ็กซอนที่ 7 ออกไปด้วยนั่นเอง (รูปที่ 42) ดังนั้น ซีดีเอ็นเอของผู้ป่วย ขนาด 481 คู่เบสนี้ จึงประกอบไปด้วยเอ็กซอน 6, 8 และ 9 ตามลำดับ

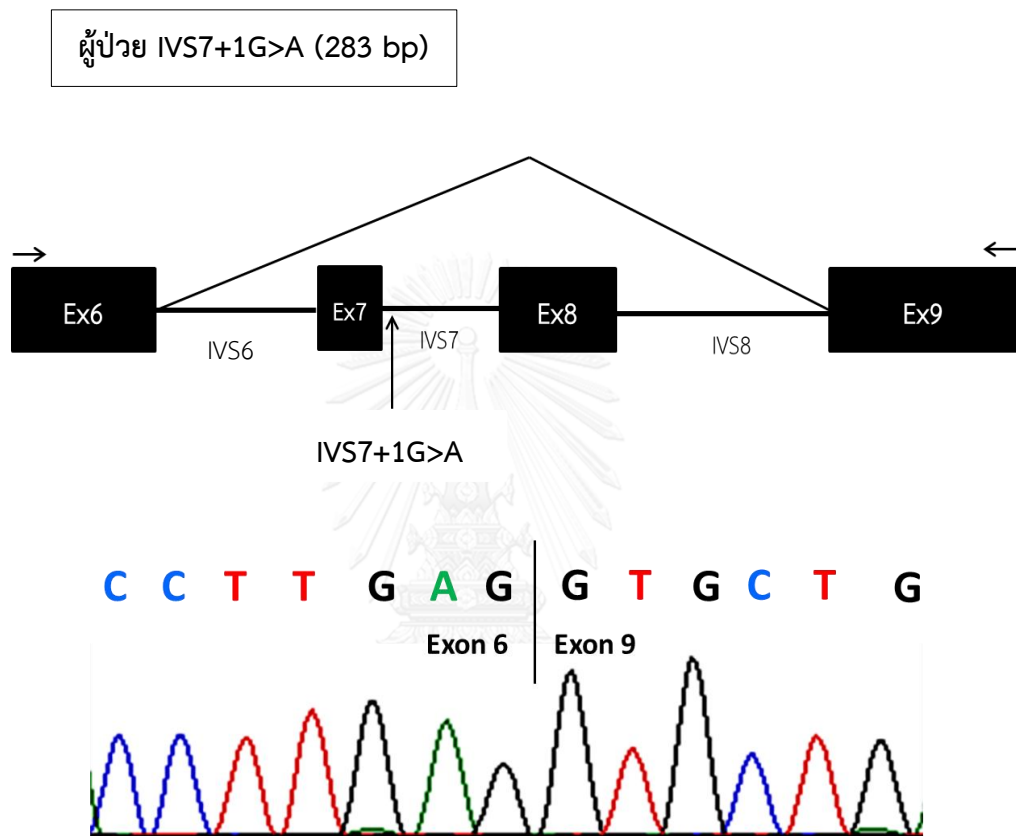


รูปที่ 42 แผนภาพการ splicing ของผู้ป่วยและแสดงผลการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing จากซีดีเอ็นเอของผู้ป่วยขนาด 481 คู่เบส

ในส่วนของซีดีเอ็นเอของผู้ป่วยที่มีขนาด 283 คู่เบสนั้น เมื่อนำซีดีเอ็นเอไปหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing พบว่า เกิดการ splicing ที่ผิดพลาดเช่นกัน คือ เกิดการตัด intron ที่ 6, 7 และ 8



รวมทั้งเอ็กซอนที่ 7 และ 8 ด้วย (รูปที่ 43) ดังนั้น ซีดีเอ็นเอของผู้ป่วยที่มีขนาด 283 คู่เบสนี้ จึงประกอบไปด้วย เอ็กซอนที่ 6 และเอ็กซอนที่ 9 ตามลำดับ



รูปที่ 43 แสดงแผนภาพการ splicing ของผู้ป่วยและแสดงผลการหาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequencing จากซีดีเอ็นเอของผู้ป่วยขนาด 283 คู่เบส

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

ภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลส เป็นโรคที่มีการถ่ายทอดแบบยีนด้อยบนโครโมโซมร่างกาย โดยพบผู้ป่วยด้วยโรคนี้เพียง 1 ใน 250,000 คน (Peter, 2002) แต่ถึงแม้จะเป็นโรคที่พบน้อยในประชากร แต่ก็ยังเป็นโรคที่มีลักษณะอาการที่หลากหลาย และความรุนแรงของโรคมักมีด้วยกันหลายระดับ ตั้งแต่ลักษณะอาการที่มีความรุนแรงมากไปจนถึงความรุนแรงน้อย อีกทั้งลักษณะอาการของโรคของผู้ป่วยบางรายยังมีความคล้ายคลึงกับอาการของโรคอื่นๆ นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลส ที่มีความรุนแรงของโรคมักก็ยังมีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตในวัยเด็กและยังอาจก่อให้เกิดปัญหาทางสภาพจิตใจของผู้ป่วยได้อีกด้วย จากการศึกษารายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ยังไม่มีรายงานการวิจัยใดที่ศึกษาเกี่ยวกับภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลสในประชากรชาวไทยเลย ดังนั้นจึงเป็นการดีที่ผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาและวิเคราะห์ผู้ป่วยที่มีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลสในผู้ป่วยชาวไทย โดยทางแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ได้วินิจฉัยผู้ป่วยและพบผู้ป่วยที่มีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลส ทั้งสิ้น 3 ราย อีกทั้งผู้ป่วยทั้ง 3 รายยังเป็นผู้ป่วยชาวไทยทั้งสิ้น และจากลักษณะอาการที่แสดงออกของผู้ป่วย พบว่าผู้ป่วยมีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลส แบบ classic ชนิดรุนแรง เนื่องมาจากผู้ป่วยมีอาการของความดันโลหิตสูงและมีลักษณะแข็งแรงแบบเพศชาย (virilization) ซึ่งเป็นลักษณะอาการหลักที่สำคัญของผู้ป่วยที่มีภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซีเลส แบบ classic นั้นเอง (Melcescu, Phillips et al., 2012) ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาและวิเคราะห์ยีน *CYP11B1* ของผู้ป่วยดังกล่าว ซึ่งจากการวิเคราะห์ยีน *CYP11B1* ของผู้ป่วยทั้ง 3 ราย พบมีวเทชันในยีน *CYP11B1* ในผู้ป่วยทุกราย

ผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นพี่น้องกัน มีมีวเทชันแบบ compound heterozygous โดยพบมีวเทชันแบบ nonsense ที่เอ็กซอนที่ 3 มีการเปลี่ยนแปลงของเบสไซโทซีน เป็นเบสไทมีน ส่งผลให้กรดอะมิโนตัวที่ 141 เปลี่ยนจากอาร์จินีนไปเป็นรหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีน (p.R141X) เป็นผล

ให้กรดอะมิโนเหลือเพียง 141 กรดอะมิโนจากทั้งสิ้น 503 กรดอะมิโน ทำให้โปรตีนดังกล่าวขาดกรดอะมิโนในช่วงของเอ็กซอนที่ 6-8 ไป ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญต่อการทำหน้าที่ของเอนไซม์ 11ปีตาไฮดรอกซิเลส มีผลให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ 11ปีตาไฮดรอกซิเลส ลดลงและนำไปสู่การเกิดภาวะขาด 11ปีตาไฮดรอกซิเลส และอีกมิวเทชันหนึ่ง คือ มิวเทชันแบบ splice site ในตำแหน่งเบสตัวแรกของอินทรอนที่ 7 โดยเปลี่ยนจากเบสกวานีนเป็นเบสอะดีนีน (IVS7+1G>A) ซึ่งมิวเทชันทั้ง 2 แบบที่พบในผู้ป่วยนั้นได้รับมาจากพ่อและแม่ของผู้ป่วย โดยพ่อของผู้ป่วยเป็นพาหะของมิวเทชันแบบ splice site ในอินทรอนที่ 7 (IVS7+1G>A) และแม่ของผู้ป่วยเป็นพาหะของมิวเทชันแบบ nonsense ในเอ็กซอนที่ 3 (p.R141X) นั่นเอง สำหรับผู้ป่วยรายที่ 3 พบว่ามีมิวเทชันแบบ compound heterozygous เช่นกัน โดยพบมิวเทชันแบบ deletion 26 คู่เบส ที่เอ็กซอนที่ 4 ส่งผลให้กรดอะมิโนตัวที่ 239 เปลี่ยนจากฟีนิลอะลานีนเป็นกรดแอสพาร์ติก อีกทั้งยังเหนี่ยวนำให้เกิด frameshift ทั้งสิ้น 10 กรดอะมิโน (p.Phe239Aspfs\*11) และนำไปสู่รหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีนเป็นผลให้โปรตีนนี้มีกรดอะมิโนเหลือเพียง 250 กรดอะมิโน ทำให้โปรตีนดังกล่าวขาดกรดอะมิโนในช่วงของเอ็กซอนที่ 6-8 ไป ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญต่อการทำหน้าที่ของเอนไซม์ 11ปีตาไฮดรอกซิเลส มีผลให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ 11ปีตาไฮดรอกซิเลส ลดลงและนำไปสู่การเกิดภาวะขาด 11ปีตาไฮดรอกซิเลส และพบมิวเทชันแบบ missense ในเอ็กซอนที่ 6 โดยมีการเปลี่ยนแปลงของเบสกวานีนเป็นเบสอะดีนีน ส่งผลให้กรดอะมิโนตัวที่ 374 เปลี่ยนจากอาร์จินีนเป็นกลูตามีน (p.R374Q) ซึ่งมิวเทชันที่พบในผู้ป่วยรายที่ 3 นี้ ได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อและแม่ของผู้ป่วยรายที่ 3 เช่นกัน คือ พ่อของผู้ป่วยรายที่ 3 เป็นพาหะของมิวเทชันแบบ deletion ที่เอ็กซอนที่ 4 ในขณะที่แม่ของผู้ป่วยรายที่ 3 เป็นพาหะของมิวเทชันแบบ missense ที่เอ็กซอนที่ 6 (p.R374Q)

โดยจากมิวเทชันที่พบทั้งสิ้น 4 แบบ ในผู้ป่วยทั้ง 3 รายนั้น มีเพียงมิวเทชันแบบ splice site ในอินทรอนที่ 7 (IVS7+1G>A) เท่านั้น ที่ยังไม่มีรายงานการวิจัยที่มายืนยันว่ามิวเทชันแบบดังกล่าวเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะขาด 11ปีตาไฮดรอกซิเลส ซึ่งในส่วนของมิวเทชันแบบ nonsense และ deletion ในยีน *CYP11B1* ที่พบนั้น เป็นที่แน่ชัดอยู่แล้วว่า เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดปกติขึ้นกับโปรตีน *CYP11B1* ของผู้ป่วยและนำไปสู่การเกิดภาวะขาด 11ปีตาไฮดรอกซิเลสดังกล่าว เนื่องจากมิวเทชันแบบ nonsense นั้นมีผลให้โปรตีนสั้นลงจากปกติ (Cartegni, Chew et al., 2002) จึงส่งผลให้โปรตีนนั้นไม่สามารถทำงานได้หรือทำงานได้อย่างไม่มีประสิทธิภาพ และในส่วนของ

มิวเทชันแบบ deletion นั้น เป็นผลให้เกิด frameshift ขึ้นในยีนของผู้ป่วยจึงส่งผลให้เกิดความผิดปกติขึ้นกับโปรตีน CYP11B1 ด้วยเช่นกัน โดยสำหรับมิวเทชันแบบ nonsense ในเอ็กซอนที่ 3 (p.R141X) มีรายงานการวิจัยกล่าวไว้ว่า มิวเทชันดังกล่าวมีผลทำให้การแสดงออกของยีน *CYP11B1* เหลือเพียง 4.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นผลทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส (Zhang, Liu et al., 2013) สำหรับมิวเทชันแบบ missense ในเอ็กซอนที่ 6 (p.R374Q) นั้นมีรายงานการวิจัยมายืนยันแล้วว่ามิวเทชันดังกล่าวเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส โดยมิวเทชันนี้ทำให้ยีน *CYP11B1* ไม่สามารถทำงานได้เลย เนื่องจากเมื่อนำมิวเทชันดังกล่าวไปทำ การตรวจสอบด้วยการทำ functional analysis พบว่าไม่มีการแสดงออกของฮอร์โมน 11-ดีออกซีคอร์ติซอลและฮอร์โมนคอร์ติซอล โดยบริเวณเอ็กซอนที่ 6 ของยีน *CYP11B1* เป็นส่วนของ substrate binding ดังนั้นเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นในเอ็กซอนที่ 6 จึงส่งผลให้โปรตีน CYP11B1 ไม่สามารถทำงานได้ (Curnow, Slutsker et al., 1993) และสำหรับมิวเทชันแบบ deletion 26 คู่เบส ในเอ็กซอนที่ 4 นั้น พบว่าทำให้ยีน *CYP11B1* เกิดการขาดหายไปของเอ็กซอนที่ 6-8 ซึ่งเป็นบริเวณที่สำคัญสำหรับ heme binding จึงส่งผลให้โปรตีน CYP11B1 ไม่สามารถทำงานได้เช่นกัน (Curnow, Slutsker et al., 1993)

จนถึงปัจจุบันนี้ มีรายงานการวิจัยที่พบมิวเทชันแบบ splice site ในยีน *CYP11B1* ทั้งสิ้น 8 แบบ ได้แก่ IVS4+5 G>C, IVS5-1 G>A, IVS5-1 G>C, IVS5+1 G>A, IVS5+1 G>C, IVS6+5 G>T, IVS7+1 G>A และ IVS8+4 A>G (ดังตารางที่ 10) และพบว่ามิวเทชันแบบ splice site IVS7+1G>A ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ในอินทรอนที่ 7 ถูกค้นพบครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่นในปี 2014 (Matsubara, Kataoka et al., 2014) แล้ว แต่จนถึงปัจจุบันนี้ก็ยังไม่มีการวิจัยออกมาระบุอย่างชัดเจนว่า มิวเทชันดังกล่าวเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส

Mutants of splice site have detected in the CYP11B1 gene.		
Genotype	Phenotype	Reference
IVS3+16G>T	CAH	Hampf et al., 2001
IVS4+1G>A	11-Hydroxylase deficiency	Soardi et al., 2009
IVS4+5G>C	11-Hydroxylase deficiency	Andrew et al., 2007
IVS5-1G>A	CAH	Skinner et al., 1996
IVS5-1G>C	11-Hydroxylase deficiency	Chabre et al., 2000
IVS5+1G>A	11-Hydroxylase deficiency	Merke et al., 1998
IVS5+1G>C	CAH	Bhangoo et al., 2006
IVS7+1G>A	CAH	Matsubara et al., 2014
IVS8+4A>G	11-Hydroxylase deficiency	Chabre et al., 2000

ตารางที่ 10 มิวเทชันแบบ splice site ที่ค้นพบในยีน *CYP11B1*

(Nguyen, Nguyen et al., 2015)

ดังนั้น เมื่อทางผู้วิจัยพบมิวเทชันนี้ในผู้ป่วยชาวไทย จึงได้ทำการวิจัยเพื่อศึกษาว่ามิวเทชันแบบ splice site (IVS7+1G>A) นี้ เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลสหรือไม่และอย่างไร โดยใช้การทดลองด้วย minigene เนื่องจากมิวเทชัน IVS7+1G>A ที่พบในผู้ป่วยนี้ เป็นมิวเทชันที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบส 1 เบส จากเบสกวานีนเป็นเบสอะดีนีนตรงตำแหน่งเบสตัวแรกของอินทรอนที่ 7 ซึ่งเป็นตำแหน่งของ splice donor site และเป็นบริเวณของตำแหน่งเบสอนุรักษ์สำหรับกระบวนการ splicing (splice site consensus sequence) โดยการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งอนุรักษ์ดังกล่าวส่วนมากจะมีผลทำให้เกิดการ splicing ที่ผิดปกติหรือผิดปกติไป เช่น การทำให้เกิดการขาดหายไปของเอ็กซอนข้างเคียง เป็นต้น และยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคต่างๆด้วย (Cartegni, Chew et al., 2002) โดยจากการทดลองด้วย minigene พบว่า อาร์เอ็นเอของผู้ป่วยมีความแตกต่างกับ อาร์เอ็นเอของคนปกติ โดยอาร์เอ็นเอของคนปกติประกอบด้วยเอ็กซอนที่ 6-9 เรียงต่อกันอย่างสมบูรณ์ ในขณะที่อาร์เอ็นเอของผู้ป่วยมีด้วยกัน 2 แบบ คือ แบบที่หนึ่งนั้น อาร์เอ็นเอประกอบด้วยเอ็กซอนที่ 6, 8-9 เรียงต่อกันโดยที่ไม่มีเอ็กซอนที่ 7 และอีกแบบหนึ่งคือ อาร์เอ็นเอประกอบด้วยเอ็กซอนที่ 6 และ 9 เรียงต่อกัน โดยที่ไม่มีเอ็กซอนที่ 7 และ 8 นั่นเอง ซึ่งจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาทำให้ทราบว่า มิวเทชันในยีน *CYP11B1* ส่วนใหญ่ที่เป็นสาเหตุให้เกิดภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส จะพบอยู่ในบริเวณเอ็กซอนที่ 6,7 และ 8 โดย 70% ของลำดับกรดอะมิโนในบริเวณของเอ็กซอนที่ 6-8 นี้ พบว่ามีความคล้ายคลึงกันในมนุษย์, วัวและหนู เนื่องจากบริเวณเอ็กซอนที่ 6-8 ของยีน *CYP11B1* นี้เป็นบริเวณของ heme binding ซึ่งมีหน้าที่สำคัญและส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำงานของ

โปรตีน CYP11B1 (Curnow, Slutsker et al., 1993) จึงทำให้เห็นได้ว่าบริเวณเอ็กซอน 6-8 ของยีน *CYP11B1* เป็นบริเวณที่จำเป็นต่อ enzymatic activity ของโปรตีน CYP11B1 อีกทั้งเมื่อไม่นานมานี้ ได้มีรายงานการวิจัยมาสนับสนุนว่า มิวเทชันแบบ IVS7+1G>A นี้ เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส เนื่องจากเมื่อทดลองด้วย minigene พบว่า อาร์เอ็นเอของผู้ป่วยประกอบด้วย เอ็กซอนที่ 7, อินทรอนที่ 7 และเอ็กซอนที่ 8 ซึ่งเป็นผลจากมิวเทชันดังกล่าวที่ทำให้ไม่เกิดการตัดอินทรอนนั่นเอง (Nguyen, Eiden-Plach et al., 2016) ดังนั้น มิวเทชัน IVS7+1G>A ซึ่งเป็นมิวเทชันที่เกิดในบริเวณของอินทรอนที่ 7 ในตำแหน่งของ splice donor site ของยีน *CYP11B1* จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส ขึ้นในผู้ป่วย

จากการวิจัยเกี่ยวกับภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส นี้ พบมิวเทชันแบบ compound heterozygous ในยีน *CYP11B1* ของผู้ป่วย ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของโปรตีน CYP11B1 ดังนั้น จากผลการวิจัยนี้จึงสามารถอธิบายได้ว่า มิวเทชันดังกล่าวที่พบในผู้ป่วยเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดภาวะขาด 11บีตาไฮดรอกซิเลส นอกจากนี้งานวิจัยในครั้งนี่ยังสามารถช่วยให้เข้าใจกลไกการทำงานของมิวเทชันแบบ splice site ได้ดียิ่งขึ้นและนำไปสู่การรักษาผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพในอนาคตด้วย

### ข้อเสนอแนะ

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ยีน *CYP11B1* เพื่อหามิวเทชันในผู้ป่วยจำเป็นที่จะต้องให้ความสำคัญในขั้นตอนของการออกแบบเป็นอย่างมาก เนื่องจากลำดับเบสของยีน *CYP11B1* มีความเหมือนกันกับลำดับเบสของยีน *CYP11B2* เป็นอย่างมาก ดังนั้นจำเป็นที่จะต้องออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะอย่างสูงต่อยีน *CYP11B1* โดยหลังจากออกแบบแล้วต้องตรวจสอบด้วยว่าไพรเมอร์นั้นๆ สามารถจับกับลำดับเบสของยีนเพียงยีนเดียวและตำแหน่งเดียวหรือไม่ และนอกจากการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ยีน *CYP11B1* เพื่อหามิวเทชันแล้ว การออกแบบ minigene construct สำหรับการศึกษากลไกของมิวเทชันแบบ splice site ก็มีความสำคัญยิ่งเช่นกัน เพราะเป็นการยากที่จะทราบว่าผลของมิวเทชันนั้นๆ จะเป็นเช่นไร เนื่องมาจากผลจากมิวเทชันแบบ splice site นั้นเกิดได้หลายแบบ อาทิเช่น การขาดหายไปของเอ็กซอนบางเอ็กซอนที่อยู่ข้างเคียงในยีน, การทำให้เกิด pseudo-exon, การคงอยู่ของอินทรอน เป็นต้น และจากผลการวิจัยก่อนหน้านี้นี้ พบว่าการขาดหายไปของเอ็กซอนบางเอ็กซอนที่อยู่ข้างเคียงเป็นรูปแบบที่เกิดขึ้นมากที่สุดใมนุษย์ (Scotti and Swanson, 2016) ดังนั้น ในการออกแบบชิ้นส่วนของยีนที่จะ

นำไปใส่เข้าไปในพลาสมิดเพื่อสร้าง minigene construct จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยควรที่จะ ออกแบบชิ้นส่วนของยีนให้มีขนาดใหญ่ที่สุดที่จะสามารถใส่เข้าไปในพลาสมิดได้ โดยชิ้นส่วนเหล่านั้น ควรจะประกอบด้วยเอ็กซอนและอินทรอนข้างเคียงทั้งสองข้างของเอ็กซอนและอินทรอนที่เกิด มิวเทชันด้วยนั่นเอง

ในส่วนของการนำ minigene construct เข้าสู่เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมแบบชั่วคราว นั้น ควรเลือกสารเคมีที่เหมาะสมกับเซลล์นั้นๆ หรืออาจจะเลือกสารเคมีที่ใช้ได้และมีอยู่แล้วใน ห้องปฏิบัติการ อีกทั้งในการนำ minigene construct เข้าสู่เซลล์ ควรจะมีการทดสอบหาสัดส่วนที่ เหมาะสมของสารเคมี, minigene construct และเซลล์นั้นๆ ให้เหมาะสมกับงานแต่ละงานก่อน ทุกครั้ง เพื่อประสิทธิภาพของการทำการศึกษาในขั้นต่อไป



## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

พรรณณี หนูชื้อตรง and อรพิน เกิดประเสริฐ. 2555. กายวิภาคศาสตร์และสรีรวิทยาของระบบต่อมไร้ท่อ Anatomy and Physiology of Endocrine System. กรุงเทพมหานคร: บริษัทวี.พรีนธ์ (1991) จำกัด.

สมจิตร จารูรัตน์ศิริกุล. 2548. พัฒนาการของระบบอวัยวะเพศและความผิดปกติที่พบในผู้ป่วยเด็ก. สงขลา: ชานเมืองการพิมพ์.

### ภาษาอังกฤษ

Allison, L. A. 2012. Fundamental Molecular Biology, 2e. United States: John Wiley & Sons, Inc.

Cartegni, L., Chew, S. L. and Krainer, A. R. 2002. Listening to Silence and Understanding Nonsense: Exonic Mutations That Affect Splicing. Nature Reviews Genetics **3**: 285-298.

Clark, D. P. and Pazdernik, N. J. 2013. Molecular Biology Second Edition. USA: Elsevier Inc.

Cooper, D. N., Chen, J. M., Ball, E. V., Howells, K., Mort, M., Phillips, A. D., Chuzhanova, N., Krawczak, M., Kehrer-Sawatzki, H. and Stenson, P. D. 2010. Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics. Hum Mutat **31**: 631-655.

Curnow, K. M., Slutsker, L., Vitek, J., Cole, T., Speiser, P. W., New, M. I., White, P. C. and Pascoe, L. 1993. Mutations in the CYP11B1 gene causing congenital adrenal hyperplasia and hypertension cluster in exons 6, 7, and 8. Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 4552-4556.



Krone, N. and Arlt, W. 2009. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **23**: 181-192.

Matsubara, K., Kataoka, N., Ogita, S., Sano, S., Ogata, T., Fukami, M. and Katsumata, N. 2014. Uniparental disomy of chromosome 8 leading to homozygosity of a CYP11B1 mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia: implication for a rare etiology of an autosomal recessive disorder. Endocr J **61**: 629-633.

Melcescu, E., Phillips, J., Moll, G., Subauste, J. S. and Koch, C. A. 2012. 11Beta-hydroxylase deficiency and other syndromes of mineralocorticoid excess as a rare cause of endocrine hypertension. Horm Metab Res **44**: 867-878.

Mooij, C. F., Parajes, S., Rose, I. T., Taylor, A. E., Bayraktaroglu, T., Wass, J. A., Connell, J. M., Ray, D. W., Arlt, W. and Krone, N. 2015. Characterization of the molecular genetic pathology in patients with 11beta-hydroxylase deficiency. Clin Endocrinol (Oxf) **83**: 629-635.

Nguyen, H. H., Eiden-Plach, A., Hannemann, F., Malunowicz, E. M., Hartmann, M. F., Wudy, S. A. and Bernhardt, R. 2016. Phenotypic, metabolic, and molecular genetic characterization of six patients with congenital adrenal hyperplasia caused by novel mutations in the CYP11B1 gene. J Steroid Biochem Mol Biol **155**: 126-134.

Nguyen, T. P., Nguyen, T. H., Ngo, D. N., Vu, C. D., Nguyen, T. K., Nong, V. H. and Nguyen, H. H. 2015. A novel homozygous mutation IVS6+5G>T in CYP11B1 gene in a Vietnamese patient with 11beta-hydroxylase deficiency. Gene **565**: 291-294.

- Nimkarn, S. and New, M. I. 2008. Steroid 11beta- hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. Trends Endocrinol Metab **19**: 96-99.
- Peter, M. 2002. Congenital Adrenal Hyperplasia: 11beta-Hydroxylase Deficiency. SEMINARS IN REPRODUCTIVE MEDICINE **20**: 249-254.
- Rabbani, B., Mahdieh, N., Hagi Ashtiani, M. T., Akbari, M. T. and Rabbani, A. 2011. Molecular Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia in Iran: Focusing on CYP21A2 Gene. Iranian Journal of Pediatrics **21**: 139-150.
- Reisch, N., Hogler, W., Parajes, S., Rose, I. T., Dhir, V., Gotzinger, J., Arlt, W. and Krone, N. 2013. A diagnosis not to be missed: nonclassic steroid 11beta-hydroxylase deficiency presenting with premature adrenarche and hirsutism. J Clin Endocrinol Metab **98**: E1620-1625.
- Sahakitrungruang, T. 2015. Clinical and molecular review of atypical congenital adrenal hyperplasia. Ann Pediatr Endocrinol Metab **20**: 1-7.
- Scotti, M. M. and Swanson, M. S. 2016. RNA mis-splicing in disease. Nat Rev Genet **17**: 19-32.
- Soardi, F. C., Penachioni, J. Y., Justo, G. Z., Bachega, T. A., Inacio, M., Mendonca, B. B., de Castro, M. and de Mello, M. P. 2009. Novel mutations in CYP11B1 gene leading to 11 beta-hydroxylase deficiency in Brazilian patients. J Clin Endocrinol Metab **94**: 3481-3485.
- Taylor, G. R. and Day, I. N. M. 2005. Guide to Mutation Detection. United States: John Wiley & Sons, Inc.
- Turcu, A. F. and Auchus, R. J. 2015. The next 150 years of congenital adrenal

hyperplasia. J Steroid Biochem Mol Biol **153**: 63-71.

White, P. C., Dupont, J., New, M. I., Leiberman, E., Hochberg, Z. and Rosler, A. 1991. A mutation in CYP11B1 (Arg-448----His) associated with steroid 11 beta-hydroxylase deficiency in Jews of Moroccan origin. J Clin Invest **87**: 1664-1667.

White, P. C., New, M. I. and Dupont, B. 1987. Congenital Adrenal Hyperplasia. New England Journal of Medicine **316**: 1580-1586.

Zhang, M., Liu, Y., Sun, S., Zhang, H., Wang, W., Ning, G. and Li, X. 2013. A prevalent and three novel mutations in CYP11B1 gene identified in Chinese patients with 11-beta hydroxylase deficiency. J Steroid Biochem Mol Biol **133**: 25-29.

Zhao, L. Q., Han, S. and Tian, H. M. 2008. Progress in molecular-genetic studies on congenital adrenal hyperplasia due to 11beta-hydroxylase deficiency. World J Pediatr **4**: 85-90.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเลือดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากเลือด QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำเลือดของผู้ป่วยมาปั่นตกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยแรงเหวี่ยง 2,000 rcf เป็นเวลา 10 นาที หลังจากปั่นตกแล้วจะเห็นตะกอนเม็ดเลือดขาวอยู่ก้นหลอด
2. เทเลือดทิ้งแล้วใส่ cell lysis 3 มิลลิลิตร พร้อมกับเขย่าให้เข้ากันเพื่อแตกเซลล์เม็ดเลือด
3. ใส่ protein precipitation 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตก 5 นาที เพื่อแยกโปรตีนออก
4. แยกส่วนที่เป็นของเหลวใสๆออกมาใส่ในหลอด 15 มิลลิลิตร ใส่ isopropanol 1 เท่าของส่วนใสที่ได้มาพร้อมทั้งเขย่าเบาๆ และนำไปปั่นตกเป็นเวลา 3 นาที เพื่อดึงน้ำออกจากดีเอ็นเอ
5. เทส่วนของของเหลวทิ้ง ใส่ 70% ethanol 3 มิลลิลิตรและปั่นตกเป็นเวลา 1 นาที เมื่อปั่นตกเสร็จเรียบร้อยแล้ว พยายามย้ายก้อนดีเอ็นเอลงมาใส่ในหลอดสำหรับเก็บดีเอ็นเอ จากนั้นตากดีเอ็นเอให้แห้งสนิท และเมื่อดีเอ็นเอแห้งสนิทแล้วให้ใส่ DNA hydration ประมาณ 20-200 ไมโครลิตร โดยสังเกตจากขนาดของก้อนดีเอ็นเอที่ได้ จากนั้นเมื่อได้จีโนมิกดีเอ็นเอของผู้ป่วยแล้วให้นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สกัดเจลด้วย ชุดสกัดเจล GenepHlow™ Gel Extraction Kit โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ตัดเจลในส่วนที่มีขนาดที่ถูกต้องตามที่ต้องการ นำมาใส่ QG buffer 500 ไมโครลิตร พร้อมทั้งวอร์เท็กซ์ แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. นำของเหลวผสมที่ได้ใส่ในคอลัมน์ ปริมาตรไม่เกิน 800 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
3. กำจัดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที

4. กำจัดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แล้วเติม Wash buffer 600 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
5. กำจัดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นแห้งอีก 3 นาที ที่ความเร็วเท่าเดิม
6. นำคอลัมน์ไปใส่ในหลอด 1.5 ไมโครลิตร เติม Elution buffer 20 ไมโครลิตร บริเวณกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (NanoDrop)

**สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ด้วยชุดสกัด RNA ชื่อ QIAamp RNA Blood Mini Kit โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้**

1. ใส่ RLT (ที่ผสม beta-mercaptoethanol แล้ว) 350 ไมโครลิตร ลงไปในเซลล์ ผสมให้เข้ากันอย่าให้เซลล์เกาะกันเป็นก้อน จากนั้นดูดของเหลวทั้งหมดมาใส่ในคอลัมน์ นำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที
2. เติม 70% ethanol 350 ไมโครลิตร ลงไปในของเหลวที่ได้ จากนั้นดูดของเหลวทั้งหมดใส่ในอีกคอลัมน์หนึ่ง นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที เมื่อปั่นเสร็จแล้วกำจัดของเหลวทิ้ง
3. เติม RW1 buffer 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นกำจัดของเหลวทิ้ง
4. เติม RPE buffer 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที กำจัดของเหลวทิ้ง
5. เติม RPE buffer 500 ไมโครลิตรอีกครั้ง แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 3 นาที กำจัดของเหลวทิ้งแล้วนำไปปั่นแห้งที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
6. นำคอลัมน์ไปใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วใส่ RNase-free water 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที ก็จะได้อาร์เอ็นเอที่สกัดจากเซลล์

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ : นางสาวภัทรณัชชา ชาญวิชัย

เพศ : หญิง

วันเกิด : 27 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2533

สถานที่เกิด : กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย

เชื้อชาติ : ไทย

สัญชาติ : ไทย

ที่อยู่ปัจจุบัน : 101/119 ซอยประชาราษฎร์ 12 ถนนประชาราษฎร์  
ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

การศึกษา

ระดับมัธยมศึกษา : โรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี)

ระดับปริญญาตรี : สาขามัธยมศึกษาวิทยาศาสตร์ เอกชีววิทยา  
คณะครุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาในปัจจุบัน : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

254 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330