


การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A และการศึกษา Linkage analysis ในยีน SCN5A ,
KCND2 และ KCND3 ในครอบครัวหัวใจตาย



นางสาว ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0742-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF *SCN5A* GENE MUTATION AND LINKAGE ANALYSIS STUDY IN
SCN5A ,*KCND2* AND *KCND3* GENE IN SUDDEN UNEXPLAINED DEATH
SYNDROME FAMILIES

Miss Pattamawadee Yanatatsaneejit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Science

Program of Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0742-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A และการศึกษา Linkage analysis ในยีน SCN5A, KCND2 และ KCND3 ในครอบครัวไหลตาย

โดย นางสาว ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ นายแพทย์ สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ นายแพทย์ สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

..... กรรมการ
(อาจารย์ นายแพทย์ วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์)

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์

ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต : การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A และการศึกษา Linkage analysis ในยีน SCN5A, KCND2 และ KCND3 ในครอบครัวไหลตาย (Detection of SCN5A gene mutation and linkage analysis study in SCN5A, KCND2 and KCND3 gene in Sudden Unexplained Death Syndrome families) อ. ที่ปรึกษา : อาจารย์ นายแพทย์ สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์: 97 หน้า.

ISBN 974-03-0742-6

Sudden Unexplained Death Syndrome (SUDS) หรือโรคไหลตาย มีลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจเหมือนกับ Brugada syndrome คือพบ right bundle branch block และ ST segment elevation ใน lead V1 ถึง V3 Brugada syndrome เป็นโรคทางพันธุกรรม ถ่ายทอดแบบ autosomal dominant (โดยใช้ลักษณะคลื่นหัวใจดังกล่าว และการตายเฉียบพลันโดยไม่ทราบสาเหตุเป็น phenotype) ยีนที่เป็นสาเหตุของ Brugada syndrome คาดว่าน่าจะเป็นยีนที่สร้าง ion channel protein ต่าง ๆ ซึ่งประมาณ 15 % ของผู้ป่วย Brugada syndrome มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A นอกจากนี้ยังมียีนที่คาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุของ Brugada syndrome อีกอย่างน้อย 2 ยีน คือ ยีน KCND2 และ KCND3 วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาว่า โรคไหลตายเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน เหล่านี้หรือไม่ โดยทำ linkage studies ใน 4 ครอบครัวไหลตายพบว่ามีความสัมพันธ์กับ SCN5A 1 ครอบครัวจึงได้ทำ direct sequencing exon 5, 12, 17, 18, 23 และ 28 ในครอบครัวไหลตายนั้น เพื่อหาการกลายพันธุ์ 8 ตำแหน่งที่เคยมีรายงานมาก่อนจาก Brugada syndrome แต่ตรวจไม่พบในครอบครัวไหลตายนี้นี้ จึงสรุปได้ว่าโรคไหลตายมีการกลายพันธุ์ที่ไม่เหมือนกับใน Brugada syndrome ในต่างประเทศ และอาจจะเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนอื่นก็ได้ ที่ไม่ใช่ยีนที่ศึกษาอีก 2 ยีนก็คือยีน KCND2 และ KCND3 โดยอาศัยสมมติฐานที่ว่าโรคไหลตายน่าจะมาจากการกลายพันธุ์ของยีนเพียง 1 ยีน โดยได้ทำ linkage analysis ในครอบครัวไหลตาย 4 ครอบครัวที่มีคลื่นไฟฟ้าหัวใจดังกล่าวพร้อมๆไปกับยีน SCN5A ผลปรากฏว่าไม่พบยีนที่เป็นสาเหตุของการเกิดไหลตาย ดังนั้นจึงต้องหายีนที่เป็นสาเหตุของการเกิดไหลตายในการศึกษาครั้งต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักสูตร วิทยาศาสตร์การแพทย์
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

427 52291 30: MAJOR MEDICAL SCIENE

KEYWORDS : VENTRICULAR FIBRILLATION / SUDDEN UNEXPLAINED DEATH SYNDROME /
SCN5A MUTATION / LINKAGE ANALYSIS / POLYMORPHISM / LOD SCORE

PATTAMAWADEE YANATATSANEEJIT: DETECTION OF SCN5A GENE MUTATION
AND LINKAGE ANALYSIS STUDY IN SCN5A, KCND2 AND KCND3 GENE IN SUDDEN
UNEXPLAINED DEATH SYNDROME FAMILIES. THESIS ADVISOR: SOMKIAT
SANGWATANAROJ, M.D. 97pp. ISBN 974 - 03 - 0742 - 6

Sudden Unexplained Death Syndrome (SUDS) (or Lai-tai) shares the same ECG pattern as Brugada syndrome : right bundle branch block and ST segment elevation in V1 to V3. Brugada syndrome is a genetic disorder with the inheritance pattern of autosomal dominant (using the ECG pattern and unexplained sudden death as phenotype) and associate with cardiac sodium channels (*SCN5A*) mutations . To detect the *SCN5A* mutation in SUDS, we performed the direct sequencing in one family with some evidence of linkage to *SCN5A*. However, the direct sequencing in eight reported mutations (exon 5,12,17,18,23 and 28)in this family failed to demonstrate the mutations. We concluded that the mutations in SUDS maybe the novel mutations different from previously reported mutations or maybe caused by other mutations such as *KCND2* and *KCND3* gene. We performed the linkage study in four families in three gene, *SCN5A*, *KCND2* and *KCND3* and could not find the linkage to these genes. we concluded that these genes were not associated with SUDS .Further studies are needed to elucidate the molecular mechanism of this syndrome.

Field of study Medical science

Academic year 2001

Field of study Medical Science

Academic year 2001

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Student's signature.....

Advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ในขั้นต้น ขอขอบพระคุณอาจารย์ นายแพทย์ สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่คอยแนะนำความรู้ต่างๆและคอยเป็นกำลังใจ อีกทั้งยังคอยช่วยเหลือทุกสิ่งด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ และ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ที่ให้อาศัยใช้ห้องปฏิบัติการในการทำงานวิจัย อีกทั้งยังให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัย และ ขอขอบพระคุณอาจารย์นายแพทย์ วรรณศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดีและให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ ที่กรุณาให้เกียรติมาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณสายรุ้ง ศักดิ์กุล คุณอภิรดี เทียมบุญเลิศ คุณวิชัย พรธนเกษม และคุณ พจนาถ จันทร์ศรี ที่คอยแนะนำช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้ด้วยดีมาตลอด และขอขอบคุณ คุณ พิศาล จึงจำเจริญกิจ และ คุณ อมราวดี ญาณทัตต์นัยจิต ในการช่วยเหลือเรื่องคอมพิวเตอร์เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้โอกาสได้ศึกษาหาความรู้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณโครงการชีวโมเลกุล และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งประเทศไทยในส่วนเมธีวิจัยอาวุโส(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ) ที่สนับสนุนเงินทุนในการวิจัยในครั้งนี้

และสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ นายแพทย์ ธเนศ เย็นบุญโณสุข สำหรับคำแนะนำทางด้านคลินิกซึ่งเป็นประโยชน์เป็นอย่างมาก และขอขอบคุณทุกคนที่เป็นกำลังใจมาตั้งแต่เริ่มงานวิจัยจนสำเร็จ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฏ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
3. วิธีดำเนินการวิจัย	26
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	55
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	66
รายการอ้างอิง	76
ภาคผนวก	82
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	90

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1.1 แสดงค่า lod score ของ marker <i>D3S1298</i>	62
1.2. แสดงค่า lod score ของ marker <i>D3S3521</i>	62
1.3. แสดงค่า lod score ของ intragenic marker ของ ยีน <i>SCN5A</i> ในครอบครัว SSR.....	63
1.4. แสดงค่า lod score รวมของ ยีน <i>SCN5A</i>	63
2.1 แสดงค่า lod score ของ marker ภายใน ยีน <i>KCND2</i>	63
2.2 แสดงค่า lod score รวมของ ยีน <i>KCND2</i>	64
3.1 แสดงค่า lod score ของ marker <i>D1S2696</i>	64
3.2 แสดงค่า lod score ของ marker <i>D1S2746</i>	64
3.3 แสดงค่า lod score รวม ของ ยีน <i>KCND3</i>	65

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 α subunit cardiac sodium channel protein14 ในบริเวณที่มีการกลายพันธุ์ของSCN5A	
2.2 ศักย์ไฟฟ้าทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจระยะต่างๆ.....17	
2.3 การทำงานของประตูความต่างศักย์ที่ควบคุมการ ทำงานของ sodium.....18	
2.4 การทำงานของประตูความต่างศักย์ที่ควบคุมการ ทำงานของ potassium.....18	
2.5 ศักย์ไฟฟ้าขณะทำงานในกล้ามเนื้อหัวใจชั้น epicardium และ.....20 endocardium	
2.6 pedigree ในครอบครัว A.....23	
2.7 pedigree ในครอบครัว B 24	
2.8 pedigree ในครอบครัว C..... 25	
3.1 ตำแหน่งต่างๆของ marker บนโครโมโซมที่1..... 37	
3.2 ตำแหน่งของ KCND3 ที่น่าจะเป็นไปได้บนโครโมโซมที่1..... 38	
3.3 pedigree ของครอบครัว KEK.....51	
3.4 pedigree ของครอบครัว SSR..... 52	

3.5	pedigree ของครอบครัว LAP	53
3.6	pedigree ของครอบครัว IQ2I.....	54
4.1	ผลเจลของ marker <i>D3S3521</i> ในครอบครัว SSR.....	55
4.2	ผลเจลของ marker intragenic ในครอบครัว SSR.....	55
4.3	ลำดับเบสของผู้รอดชีวิตจากโหลตตายในครอบครัว SSR ที่ exon 5.....	57
4.4	ลำดับเบสของคนปกติ ที่ exon 5.....	57
4.5	ลำดับเบสของผู้รอดชีวิตจากโหลตตายในครอบครัว SSR ที่ exon 12.....	58
4.6	ลำดับเบสของคนปกติ ที่ exon 12	58
4.7	ผลเจลของยีน <i>KCND2</i> ในครอบครัว LAP และ IQ2I.....	59
5.1	แสดงการถ่ายทอด allele ในครอบครัว SSR ใน marker <i>D3S3521</i> และ intragenic	68
5.2	ตำแหน่งที่ exclude linkage ของ marker <i>D3S1298</i> และ <i>D3S3521</i>	69
5.3	ตำแหน่งของยีน <i>SCN5A</i> ที่อยู่ระหว่าง <i>D3S1298</i> และ <i>D3S3521</i> และ <i>D3S3521</i>	69
5.4	การexclude ยีน <i>SCN5A</i> ของ <i>D3S1298</i> และ <i>D3S3521</i>	70

สารบัญภาพ (ต่อ)

๗

	หน้า
5.5 ตำแหน่งที่ exclude linkage ของ marker D1S2696และ D1S2746.....	71
5.6 บริเวณของยีน KCND3 บนโครโมโซมที่3 (บริเวณที่1).....	72
5.7 บริเวณของยีน KCND3 บนโครโมโซมที่3 (บริเวณที่2).....	72
5.8 การexclude ยีน KCND3ของ D1S2696 และ D1S2746.....	73



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

SUDS	=	Sudden Unexplained Death Syndrome
RBBB	=	Right bundle branch block
PCR	=	Polymerase chain reaction



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคไหลตาย(Sudden Unexplained Death Syndrome:SUDS) จัดได้ว่าเป็นโรคหนึ่งที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขและสร้างปัญหาทางเศรษฐกิจและความเสียหายให้กับครอบครัวของผู้เสียชีวิตและประเทศชาติได้มากพอควร เนื่องมาจากผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้นักจะเป็นบุคคลที่มีอายุไม่มากนัก และมักจะเป็นกำลังหลักของครอบครัวในการดำรงชีวิต จากการเก็บอุบัติเหตุการเกิดโรคไหลตายในประเทศไทย ซึ่งมีอุบัติการณ์การเกิดอยู่ระหว่าง 23.8-38 คนต่อประชากร 1 แสนคน^(1,2,3) พบว่า มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลายประการไม่ว่าจะเป็นภาวะความเครียด⁽⁴⁾ , ภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ ซึ่งมักจะมาจากการได้รับโปแตสเซียมจากอาหารที่ไม่เพียงพอหรือเกิดจากโรคหลายโรคที่ทำให้เกิดภาวะดังกล่าวได้แก่ Distal Renal Acidosis⁽⁵⁾ และที่สำคัญจากการศึกษาของคณะผู้ทำการศึกษา 2 คณะคือ สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์ และคณะ⁽⁶⁾ กับปิยทัศน์ ทัศนาวินวัฒน์และคณะ⁽⁷⁾ ด้วยการทำ Pedigree พบว่าปัจจัยทางพันธุกรรมน่าจะเป็นปัจจัยหลักที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคไหลตายด้วย

ลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจของผู้ป่วยที่รอดชีวิตจากไหลตายนั้นจะพบว่ามี Right Bundle Branch Block และ ST Segment Elevation ใน Lead V1-V3ซึ่งจะนำไปสู่การเต้นของหัวใจที่ผิดปกติแบบ ventricular fibrillation ได้^(3,8) ลักษณะของคลื่นไฟฟ้าหัวใจดังกล่าวและอาการทางคลินิกอื่นๆ ของ ไหลตายนั้นคล้ายคลึงกับกลุ่มโรคอีกกลุ่มหนึ่งที่เคยมีการรายงานมาก่อนแล้วคือ Brugada Syndrome มาก⁽⁹⁾ และจากการศึกษาทางพันธุกรรมก่อนหน้านี้ พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับ Brugada Syndrome เป็นยีนที่ควบคุมการทำงานของ channel ต่างๆ ที่หัวใจ ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องแล้วอย่างน้อย 1 ยีนคือยีน SCN5A⁽¹⁰⁻²⁰⁾ และยังมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับยีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับ Brugada Syndrome อีกอย่างน้อย 2 ยีนคือ KCND2 และ KCND3 เนื่องจาก ทั้ง 2 ยีน เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ transient outward current (I_{to}) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการไหลออกของโปแตสเซียมในปลายระยะที่ 1 ของศักย์ไฟฟ้าขณะทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด Brugada syndrome^(21,22)

และจากการอนุมานด้วยลักษณะทางคลินิกและลักษณะของคลื่นไฟฟ้าหัวใจดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น จึงมีเหตุผลพอจะเชื่อได้ว่าไหลตายน่าจะเป็นกลุ่มโรคที่ใกล้เคียงหรืออาจจะเกี่ยวข้องกับ Brugada Syndrome ด้วย เพราะฉะนั้นเป้าหมายของการศึกษาคั้งนี้ก็คือเพื่อต้องการที่

จะพิสูจน์ว่ายีน SCN5A ซึ่งเป็นต้นเหตุของ Brugada Syndrome นั้น เป็นต้นเหตุการเกิด SUDS ด้วยหรือไม่ โดยนอกจากยีน SCN5A ซึ่งเป็นยีนหลักในการศึกษาครั้งนี้แล้ว ยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น KCND2 และ KCND3 ก็ยังได้รับการพิจารณาไปพร้อมๆ กันด้วย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้จากการศึกษาในครั้งนี้ก็คือ นอกจากจะทำให้เราถึงยีนที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคไหลตายแล้ว ยังจะทำให้เราสามารถวินิจฉัยโรคนี้ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงที่จะเกิดโรคเช่นกลุ่มญาติพี่น้องของผู้ป่วยได้ง่ายและสะดวกกว่าวิธีการเดิมคือ Procainamide Test ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความจำเพาะเจาะจงและความปลอดภัยค่อนข้างต่ำ อีกด้วย และประโยชน์ข้อสุดท้ายก็คือการวินิจฉัยโรคไหลตายได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำนั้นจะทำให้ประเทศชาติสูญเสียทรัพยากรบุคคลที่เป็นกำลังสำคัญของประเทศน้อยลงซึ่งจะเป็นการลดปัญหาเศรษฐกิจและปัญหาทางสังคมอันอาจจะตามมาได้อีกหลายประการ

สมมติฐานเบื้องต้น

เป็นที่น่าประหลาดใจว่าเพราะเหตุใดชายหนุ่มที่อยู่ในวัยทำงานและมีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ดีจึงเสียชีวิตอย่างกะทันหันโดยไม่มีสาเหตุ จากข้อสงสัยนี้ทำให้เกิดการศึกษาถึงสาเหตุของไหลตาย เนื่องจากอาการทางคลินิกของโรคไหลตายมีลักษณะเหมือนกับ Brugada Syndrome ดังนั้นสาเหตุของการเกิดไหลตายกับ Brugada Syndrome ก็น่าจะเป็นสาเหตุเดียวกัน จากการศึกษาถึงสาเหตุของ Brugada Syndrome พบว่ามีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของ ยีนที่ควบคุมchannel ต่างๆ ในหัวใจ คือ Sodium channel ดังนั้นสาเหตุของการเกิดโรคไหลตายก็น่าจะมาจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุม channel ต่างๆ ด้วยเช่นกัน และสาเหตุของการเกิดไหลตายน่าจะมาจากการกลายพันธุ์ของยีนเพียง 1 ยีน เนื่องมาจากมักจะพบโรคไหลตายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นส่วนมาก ซึ่งต่างไปจาก Brugada syndrome ซึ่งมีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ได้จากหลายยีน (Genetic heterogeneity)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาถึงการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A และศึกษาถึงการถ่ายทอดของ polymorphic markers ที่ใกล้เคียงกับยีน SCN5A, KCND2 และ KCND3 ในครอบครัวของผู้รอดชีวิตจากไหลตายที่มี ECG แบบ RBBB และ ST elevation ใน lead V1-V3

ขอบเขตของการวิจัย



นิยามเชิงปฏิบัติการ

Linkage analysis คือ การหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของโรคที่ต้องการศึกษา (phenotype) กับ candidate gene ที่ทำให้เกิดโรคนั้นโดยการศึกษาจาก polymorphic marker ที่อยู่ใกล้เคียงกับยีนนั้นหรืออยู่ในยีนนั้นเอง

ผู้เสียชีวิตจากไหลตาย คือ ผู้ที่เสียชีวิตอย่างเฉียบพลันโดยไม่ทราบสาเหตุส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างนอนหลับ โดยที่ผลการตรวจศพและตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบความผิดปกติอื่นใดที่อธิบายถึงสาเหตุการเสียชีวิตได้

ผู้รอดชีวิตจากไหลตาย คือ ผู้ที่มีอาการหัวใจเต้นผิดปกติอย่างรุนแรงและหมดสติไป แต่ได้รับการช่วยชีวิตโดยการนวดหัวใจจากผู้เห็นเหตุการณ์ได้ทันที และเป็นผู้มีสุขภาพแข็งแรงดีก่อนเกิดอาการ ผลการตรวจวินิจฉัยทางคลินิกไม่พบความผิดปกติของอวัยวะต่างๆ เช่น เนื้องอกในสมองหรือ โรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

- 1.) เป็นการยืนยันว่าโรคไหลตายมีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีน ซึ่งจะนำไปสู่บทสรุปต่อไปได้ว่าโรคไหลตายเป็นโรคทางกรรมพันธุ์
- 2.) เป็นจุดเริ่มต้นนำไปสู่การวินิจฉัยแนวใหม่ จากเดิมจะต้องตรวจดูคลื่นหัวใจ ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากมีหลายชั้น อีกทั้งยังเสี่ยงต่อการแพ้ยา Procainamide ของผู้ตรวจที่มีโอกาสเสี่ยง แต่ถ้าทราบถึงจุดที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน ต่อการเกิดโรคไหลตายก็สามารถวินิจฉัยโดยการตรวจ DNA ของผู้ถูกตรวจได้
- 3.) จากประโยชน์ทั้ง 2 ข้อจะนำไปสู่การป้องกันการเกิดโรคไหลตายได้ ดังนั้นถ้าพบว่าบุคคลใดบุคคลหนึ่งในครอบครัวเป็นโรคไหลตายแล้ว ก็สามารถตรวจได้ว่าบุคคลอื่นๆ ในครอบครัวเป็นโรคไหลตายด้วยหรือไม่ และถ้าพบว่าบุคคลในครอบครัวนั้นเป็นโรคไหลตายก็สามารถป้องกันได้โดยรักษาสุขภาพให้สมบูรณ์ ดูแลการกินอยู่หลับนอนให้ถูกสุขลักษณะ ระวังไม่ให้เกิดความเครียด ไปพบแพทย์เพื่อขอคำปรึกษาอย่างสม่ำเสมอ เพื่อป้องกันการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันก็สามารถลดจำนวนของคนที่เป็นโรคไหลตายลงได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ประชากรเป้าหมาย (target population)

ประชากรในภาคอีสานที่มีลักษณะอาการเข้ากันได้กับโรคไหลตาย รวมถึงครอบครัวของผู้ป่วยไหลตายและคนปกติที่อาศัยอยู่ในหมู่บ้านเดียวกันกับผู้ป่วยไหลตาย

1.1 inclusion criteria

1.1.1 ผู้รอดชีวิตจากไหลตายคือชาวไทยเดิมที่แข็งแรงดีไม่มีโรคประจำตัวเกิด cardiac arrest หรือ ventricular fibrillation ตรวจร่างกายปกติ และตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจไม่พบ long QT interval , blood chemistry , chest x-ray, echocardiography , exercise stress test และ coronary angiography อยู่ในเกณฑ์ปกติ

1.1.2 ครอบครัวผู้เสียชีวิตหรือรอดชีวิตจากไหลตายที่มีอายุ 15 ปีขึ้นไป ที่มีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ Right Bundle Branch Block และ ST segment elevation ใน lead V1-3 (ส่วนของ ST segment ที่ห่างจาก J point 0.08 วินาที ยกขึ้นสูงมากกว่า 0.01 mv. จาก baseline ใน lead V1-3 อย่างน้อย 2 ใน 3 lead) ไม่ว่าจะเกิดขึ้นเองหรือทำให้เกิดโดยใช้ยา Procainamide เป็นต้น โดยการฉีดยาเข้าทางหลอดเลือดดำ ญาติพี่น้องที่ไม่มี ECG ดังกล่าวถือว่าเป็นปกติ

1.2 exclusion criteria

1.2.1 ผู้ที่ไม่ร่วมมือในการทำวิจัย Procainamide test

1.2.2 ผู้ที่ 12 lead ECG มี prolong QT interval ($QTc > 0.44$ sec) มากกว่า 3 leads หรือมี second , high grade or third degree AV block

1.2.3 ผู้ที่มีประวัติแพ้ยา Procainamide

2. การเก็บตัวอย่างผู้ป่วย

case: ผู้ป่วยไหลตายและญาติ

control: คนปกติที่ไม่มีคลื่นหัวใจแบบ RBBB และ ST segment elevation หลังจากได้รับ procainamide

3. การดำเนินงานวิจัย

- เก็บเลือด
- สกัด DNA
- หา linkage analysis โดยวิธี microsatellite
- sequence analysis

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคไหลตาย คือโรคที่มีการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันในคนวัยหนุ่มและเกือบจะทั้งหมดเกิดกับผู้ชายวัยแรงงานที่แข็งแรงและไม่มีโรคประจำตัว อายุระหว่าง20-49ปี ส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างนอนหลับหรือขณะกำลังพักผ่อนโดยที่ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบความผิดปกติอื่นใดที่อธิบายสาเหตุการตายได้^(2,3,23,24)

2.1 ลักษณะอาการทางคลินิกของไหลตาย⁽²⁵⁾

สามารถแบ่งลักษณะอาการทางคลินิกของโรคไหลตายออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. ลักษณะอาการก่อนตาย แบ่งได้เป็น

- ไม่มีอาการที่แสดงถึงความผิดปกติ
- มีอาการเจ็บป่วยเล็กน้อยในช่วง2สัปดาห์ก่อนตาย ยกตัวอย่างเช่น มีอาการไข้ หายใจไม่อิ่ม ปวดท้อง ปวดขา ปวดเอว หงุดหงิด ปวดศีรษะ เหนื่อยเพลียหรือนอนไม่หลับ หรือท้องอืดซึ่งเป็นอาการที่สำคัญอาการหนึ่งของโรคไหลตาย

2. อาการแสดงขณะเกิดไหลตาย

แบ่งลักษณะอาการนี้ออกได้เป็น2กลุ่ม ตามลักษณะของการเกิดอาการ ตามช่วงเวลาการมีหรือไม่มีผู้เห็นเหตุการณ์ดังนี้

- กลุ่มที่ตายโดยไม่มีผู้เห็นเหตุการณ์ ไม่สามารถทราบได้ว่ามีอาการหรือไม่ญาติพบภายหลังว่าผู้ไหลตายได้ตายแล้วในขณะที่นอน กลุ่มนี้อาจเป็นกลุ่มที่ไม่มีอาการชัดเจนพอหรือขณะมีอาการไม่มีความรุนแรงเพียงพอที่จะเป็นที่ผิดสังเกตของญาติ
- กลุ่มที่มีผู้เห็นเหตุการณ์ แบ่งได้2กลุ่มคือ

1. กลุ่มที่ญาติเห็นเหตุการณ์ตั้งแต่เริ่มต้น ประมาณร้อยละ10 – 16 ของไหลตายเกิดเหตุการณ์ขณะนอนหรือนั่งพักผ่อน ในเวลากลางวัน เช่น กำลังสนทนา ดูโทรทัศน์ ฟังวิทยุ

2. กลุ่มที่ญาติเห็นเหตุการณ์ ซึ่งในกรณีนี้จะได้ประวัติเกี่ยวกับลักษณะอาการคือ มีเสียงดังในคอ เหมือนมีอาการหายใจลำบาก หายใจขัดหรือมีอาการเหมือนสำลัก หายใจไม่ทัน โดยไม่มีเสียงหวีดหวิว แต่จะเป็นเหมือนมีเสมหะติดคอ บางรายมีเสียงกรีดร้องเหมือนมีการฝืนร้ายหรือละเมอ นอกจากนี้ยังมีอาการเกร็งตัว ท้องแข็ง กำมือแน่น มีน้ำลายฟูมปาก บางรายมีปัสสาวะร่วมด้วย ทุกอย่างจะได้ประวัติของการปลุกตื่นลำบาก ในระยะที่ปลุกตื่นได้ญาติต้องใช้ความพยายามหลายอย่างเพื่อทำให้ผู้ไหลตายรู้สึกเจ็บแล้วตื่นขึ้นมา

ผู้ที่มีอาการแล้วถูกปลุกขึ้นมาได้ จะให้ประวัติเกี่ยวกับการมีปัญหของการหายใจเช่น รู้สึกเหมือนทางเดินหายใจอุดตัน มีความรู้สึกเหมือนถูกกดทับที่หน้าอก ทำให้หายใจลำบากหรือมีอาการมีนชาอ่อนแรง ในกรณีที่ปลุกไม่ตื่นส่วนใหญ่จะตายภายใน30นาที และมากกว่าร้อยละ90จะตายภายในเวลา1ชั่วโมงตั้งแต่เริ่มมีอาการ

2.1.1 ไหลตายซ้ำ

ผู้ที่รอดจากอาการไหลตายเหล่านี้บางรายจะตายในเวลาต่อมาภายหลังล้มตัวลงนอนอีกครั้ง หรือระหว่างเดินทางไปโรงพยาบาลในคืนเดียวกัน หรือในเวลาหลายชั่วโมงต่อมา การไหลตายยังอาจเกิดซ้ำได้อีกในระยะเป็นเดือนหรือปีภายหลังจากอาการครั้งแรก เนื่องจากอาการขณะเกิดไหลตายมีลักษณะคล้ายอาการชักของโรคลมบ้าหมู ทำให้ญาติหรือเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องทางการแพทย์เข้าใจผิด จึงเป็นสาเหตุให้ผู้ที่เกี่ยวข้องที่เกิดไหลตายซ้ำได้เหล่านี้ไม่ได้รับการตรวจรักษาที่เหมาะสมและตายในระยะเวลาต่อมา

2.1.2 สิ่งที่ตรวจพบก่อนตาย

เนื่องจากผู้ที่ไหลตายทุกรายไม่มีปัญหาสุขภาพที่รุนแรงพอที่จะรบกวนการทำงานในชีวิตประจำวัน ประกอบกับผู้ตายส่วนใหญ่ยังอยู่ในวัยฉกรรจ์ที่แข็งแรง จึงไม่ได้รับการตรวจสุขภาพอย่างจริงจังก่อนตาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสุขภาพของระบบหัวใจและหลอดเลือด อย่างไรก็ตามในรายที่เคยมีการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจมาก่อน อาจพบมีรายงานความผิดปกติบ้าง เช่น1ใน7รายที่รายงานโดย Gotoh พบว่ามี complete right bundle branch block และ left axis deviation ของ QRS Axis ส่วนอีก6รายไม่ได้มีการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจมาก่อน ผลการตรวจพยาธิสภาพของหัวใจทั้ง7ราย พบว่ามีความผิดปกติของระบบเหนี่ยวนำไฟฟ้าในหัวใจ

- Hayashi และคณะ ได้รายงานชาวญี่ปุ่น 2 ราย ที่ไม่มีความผิดปกติของโครงสร้างหัวใจมาก่อน แต่เกิดมีอาการวิงเวียนหรือหมดสติต้องเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลและตายในเวลากลางคืน ขณะติดเครื่องตรวจจับคลื่นไฟฟ้าหัวใจซึ่งพบว่ามี ventricular flutter และ ventricular fibrillation เกิดขึ้น
- สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์ และคณะ ได้รายงานถึงชาวไทยอายุ 29 ปี ซึ่งมีสุขภาพแข็งแรงมาก่อน จนกระทั่งอยู่มาวันหนึ่งเกิดหมดสติอย่างกะทันหันในขณะที่กำลังนั่งอ่านหนังสือพิมพ์ แต่สามารถปลุกตื่นขึ้นมาได้ และถูกนำส่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในขณะที่กำลังซักถามประวัติอยู่นั้นได้เกิดอาการหมดสติขึ้นมาอีกครั้งหนึ่ง ขณะติดเครื่องตรวจจับคลื่นไฟฟ้าหัวใจ พบว่ามี ventricular fibrillation เกิดขึ้นด้วยเช่นกัน⁽⁸⁾

2.1.3 สิ่งที่ตรวจพบหลังจากการฟื้นคืนชีพ

- กุลวี เนตรมณี และคณะ ได้ทำการตรวจหารูปแบบของคลื่นไฟฟ้าหัวใจในคนไข้ที่รอดชีวิตจากไหลตาย โดยศึกษาจากชายไทย 27 คน ที่รอดชีวิตจากอาการหมดสติเนื่องจาก ventricular fibrillation โดยที่คนไข้ทุกคนไม่มีความผิดปกติของโครงสร้างหัวใจแต่อย่างใด จากการศึกษพบว่า 16 คนจากคนไข้ 27 คนมีคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่ผิดปกติแบบ Right Bundle Branch Block และ ST segment elevation ใน lead V1-3 ซึ่งลักษณะที่ผิดปกติของคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบนี้ตรงกับคลื่นไฟฟ้าหัวใจใน Brugada syndrome⁽³⁾
- สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์ และคณะ พบผู้รอดชีวิตจากไหลตายอายุ 29 ปี โดยผลการตรวจร่างกายเป็นปกติ เช่นความดันเลือด (158/72 mmHg) อัตราการเต้นของหัวใจ (75/min) และอุณหภูมิของร่างกาย (36.6 องศาเซลเซียส) คลื่นไฟฟ้าหัวใจแสดงถึงความปกติของ sinus rhythm , P wave , ช่วง PR ปกติ และมีช่วง QT ปกติ (408 ms) แต่มี ST segment elevation ใน lead V2-3⁽⁸⁾
- ในระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2541 มีผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ด้วยเรื่องการตายเฉียบพลันโดยไม่ทราบสาเหตุระหว่างนอนหลับหรือขณะพัก เมื่อตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจพบ ventricular fibrillation ทุกราย และ 5 ใน 6 รายตรวจพบคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ Right Bundle Branch Block (RBBB) และ ST segment elevation ใน lead V1-3

ดังนั้นลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่ผิดปกติแบบ RBBB และ ST segment elevation ใน lead V1-3 น่าจะเป็นตัวบ่งบอกการเกิดการตายอย่างเฉียบพลัน (Arrhythmogenic marker) ในโรคไหลตาย

2.2 ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคไหลตาย

การบ่งบอกถึงสาเหตุที่แน่นอนยากที่จะบอกว่าเกิดขึ้นจากสาเหตุใด เนื่องจากการศึกษาโรคไหลตายยังมีน้อย การที่จะได้ข้อสรุปนั้นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกมาก แต่จากการศึกษาที่มีอยู่อาจจะแบ่งสาเหตุของการเกิดโรคไหลตายได้เป็น 2 สาเหตุใหญ่ๆ คือ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และ ปัจจัยทางพันธุกรรม

2.2.1 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

2.2.1.1 ภาวะโปตัสเซียมต่ำ

ได้มีผู้ตั้งข้อสังเกตว่าเหตุใดโรคไหลตายจึงเกิดกับประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมากกว่าประชากรในภาคอื่นๆ ทั้งนี้อาจจะอธิบายปรากฏการณ์นี้ด้วยเหตุผลและข้อมูลต่อไปนี้

- ประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความชุกของโรคหลายโรคที่อาจจะเกี่ยวข้องกับ การเกิดภาวะโปตัสเซียมในเลือดต่ำ เช่น distal renal tubular acidosis , hypokalemic periodic paralysis และโรคนี้วไต⁽⁵⁾
- อาจเกิดจากการบริโภคอาหารของชาวอีสาน เนื่องจากอาหารหลักของชาวอีสานมักจะเป็นอาหารที่มีค่าโปตัสเซียมต่ำมาก ได้แก่ข้าวเหนียวหนึ่ง ขนมะจิ้น และมะละกอดิบในรูปของส้มตำ และบริโภคอาหารในกลุ่มที่มีโปตัสเซียมสูงในปริมาณที่ไม่มากพอ ได้แก่อาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์ของถั่วต่างๆ และผลไม้ ได้แก่ มะยม มะเขือเทศ กัลฉ่าย^(26,27)

นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการสูญเสียโปตัสเซียมทางเหงื่อในฤดูหนาวเป็น $1/3$ และในฤดูร้อนเป็น $1/2$ ของโปตัสเซียมที่ขับออกมาทางปัสสาวะ แสดงว่ามีภาวะบกพร่องโปตัสเซียมด้วย โดยมีสาเหตุจากการรับประทานโปตัสเซียมน้อย แต่มีการสูญเสียโปตัสเซียมของเหงื่อมากทำให้มีโปตัสเซียมในเลือดและปัสสาวะต่ำ⁽²⁸⁾

จากเหตุผลและข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ น่าจะมีภาวะโปตัสเซียมในเลือดต่ำ และภาวะโปตัสเซียมในเลือดต่ำนี้เองน่าจะเป็นปัจจัยส่งเสริมภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะชนิด ventricular fibrillation

อย่างไรก็ดี แม้ภาวะโปตัสเซียมในเลือดต่ำจะเป็นสาเหตุให้หัวใจเต้นผิดจังหวะได้บ่อย แต่มักจะมีอาการของกล้ามเนื้ออ่อนแรงก่อนเกิดการตายกะทันหัน ซึ่งไม่ใช่ลักษณะอาการที่พบได้ในโหลตาย นอกจากนี้การมีภาวะโปตัสเซียมในเลือดต่ำร่วมกับมีความผิดปกติของหัวใจเช่นหัวใจโตจากโรคความดันโลหิตสูงหรือกล้ามเนื้อหัวใจตายก็อาจทำให้เกิดการเต้นผิดจังหวะชนิดรุนแรงถึงขั้นเกิด ventricular fibrillation ได้ ดังนั้นภาวะโปตัสเซียมในเลือดต่ำจึงเป็นเพียงปัจจัยหนึ่งเท่านั้นในการเกิดโหลตาย ไม่อาจกล่าวได้ว่าถ้าพบประชากรที่มีภาวะโปตัสเซียมในเลือดต่ำแล้วบุคคลผู้นั้นจะต้องเป็นโรคโหลตาย

2.2.1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเครียดกับโรคโหลตาย

ความเครียดก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งของโรคโหลตาย ดังเช่นที่ Goh KT และคณะ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบปัญหาทางจิตใจ อารมณ์ของคนงานไทยที่เกิดโหลตายโดยการชักประวัติเกี่ยวกับปัญหาต่างๆจากผู้ใกล้ชิด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นแรงงานไทยในประเทศสิงคโปร์ พบว่าในกลุ่มที่เกิดโหลตายมีปัญหาทางอารมณ์มากกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีปัญหาที่มีผลกระทบต่อจิตใจ ได้แก่ไม่สามารถปรับตัวได้ในสิ่งแวดล้อมใหม่ ความห่างไกลจากครอบครัว ภาวะหนี้สิน และชั่วโมงการทำงานที่ยาวนาน โดยที่ภาวะความตึงเครียดทั้งหมดนี้มีผลต่อการตายอย่างเฉียบพลันได้⁽⁴⁾

2.2.2 ปัจจัยทางพันธุกรรม

คณะวิจัยหลายคนเช่น สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์ และคณะ ปิยทัศน์ ทัศนาวินวัฒน์ และคณะ พบว่าโรคโหลตายสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ดังนี้

สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์ และคณะ ได้ศึกษาลักษณะแบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในครอบครัวผู้เสียชีวิตจากโหลตาย โดยการส่งแบบสอบถามญาติของผู้เสียชีวิตจากโหลตายที่สิงคโปร์ 45 รายพบว่า 33 % มีประวัติญาติในครอบครัวเสียชีวิตเฉียบพลันโดยไม่ทราบสาเหตุ 9ครอบครัวเป็นญาติฝ่ายบิดา ,2 ครอบครัวเป็นญาติฝ่ายมารดา และ2ครอบครัวเป็นญาติทั้งฝ่ายบิดาและมารดา และศึกษาจาก pedigree ที่มีญาติมากกว่า1รายเสียชีวิตแบบเดียวกัน ทั้งที่มีรายงานในวารสารการแพทย์ และสอบถามจากญาติผู้เสียชีวิตจากโหลตาย จำนวน32ครอบครัวพบว่า17ครอบครัวมีญาติฝ่ายบิดา และ 15 ครอบครัวมีญาติฝ่ายมารดาที่เสียชีวิตเฉียบพลันระหว่างนอนหลับ⁽²⁹⁾ นอกจากนี้แล้ว

ยังทำการศึกษาต่อไป พบว่าในครอบครัวใหญ่หลายครอบครัวที่มีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ Brugada syndrome พบรูปแบบของ pedigree เป็นแบบ vertical transmission ดังนั้นแบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นแบบ autosomal dominant⁽⁶⁾

ปิยทัศน์ ทศนาวิวัฒน์ และคณะ ได้สัมภาษณ์เครือญาติและเพื่อนบ้านผู้ใกล้ชิด เพื่อสอบสวนยืนยันความชุกของการตายที่มีลักษณะอาการเข้ากับหลักเกณฑ์และคำนิยามของไหลตายในครอบครัวที่มีไหลตายเกิดขึ้น การสอบสวนทำในสายเครือญาติทุกระดับชั้นและทุกครอบครัวที่เกี่ยวข้อง มีการทดสอบยืนยันความถูกต้องของประวัติที่ได้ โดยการสอบถามรายละเอียดจากผู้รู้เห็นเหตุการณ์เดียวกันหลายคน พบว่าในสมาชิก 49 ครอบครัวจำนวน 418 คน มีการตายที่มีลักษณะที่เข้าได้กับโรคไหลตายถึง 25 คน ใน 14 ครอบครัว ผู้ตายทุกคนเป็นชายมีอายุเฉลี่ย 31.26 ปี และมีช่วงอายุระหว่าง 25-50 ปี ในจำนวนนี้มีการตายในครอบครัวพ่อแม่เดียวกันถึง 6 ครอบครัว มีการตายของพี่ชาย น้องสาวรวม 3 คน ในครอบครัวเดียวกันถึง 3 ครอบครัว และ 2 คนในอีก 3 ครอบครัว⁽³⁰⁾ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าโรคไหลตายน่าจะถ่ายทอดทางพันธุกรรม

2.2.3 ปัจจัยร่วมระหว่างสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรม

ผู้ที่มีความผิดปกติของยีนอยู่ก่อนแล้วถ้ามีปัจจัยเสี่ยงจากภายนอกมากกระตุ้นอีก ยกตัวอย่างเช่นลักษณะการอยู่อาศัย สุขลักษณะในการบริโภคอาหาร หรือมีความเครียดเข้ามากระทบจิตใจ ก็จะเป็นปัจจัยเสริมทำให้นักคนผู้นั้นมีโอกาสต่อการเกิดการเต้นหัวใจผิดปกติแบบ ventricular fibrillation มากขึ้น⁽⁶⁾

2.3 Brugada syndrome คืออะไร

Brugada syndrome คือกลุ่มอาการที่มีการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันจาก ventricular fibrillation ที่เกิดกับผู้ที่อายุระหว่าง 30-40 ปี โดยที่ไม่มีความผิดปกติของโครงสร้างหัวใจแต่อย่างใด จากการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจพบว่า มีลักษณะเป็นแบบ Right Bundle Branch Block (RBBB) และ ST segment elevation ใน lead V1-3 ส่วนใหญ่เกิดในผู้ชาย^(9,11,31,32,33)

- Atarashi และคณะ รายงานว่า จากคนไข้ Brugada syndrome ทั้งหมด 63 คน เป็นผู้ชาย 60 คน (คิดเป็นร้อยละ 95.23)⁽⁹⁾
- Brugada และคณะ รายงานว่า จากคนไข้ Brugada syndrome ทั้งหมด 63 คน เป็นผู้ชาย 56 คน (คิดเป็นร้อยละ 88.89)⁽⁹⁾

2.3.1 รูปแบบคลื่นไฟฟ้าหัวใจและลักษณะอาการทางคลินิกของBrugada syndrome

- Brugada และคณะ พบว่าจากคนไข้ Brugada syndrome 63คน มีคนไข้ที่แสดงอาการ 41คน (คิดเป็นร้อยละ65) ซึ่งอาการดังกล่าวประกอบด้วย เป็นลมหมดสติ ร้อยละ22 หรือเกิดการเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันเนื่องมาจาก ventricular fibrillation ร้อยละ 78 ส่วนคนไข้ Brugada syndrome อีก22คนไม่มีอาการใดๆ⁽⁹⁾
- Atarashi และคณะ พบว่าจากคนไข้ Brugada syndrome 63 คน มีคนไข้ที่แสดงอาการ 29 คน อาการดังกล่าว ประกอบด้วยเป็นลมหมดสติ 12 คน เกิด ventricular fibrillation 17 คน ส่วนคนไข้ อีก 34 คน ไม่แสดงอาการใดๆ⁽⁹⁾

คนไข้ Brugada syndrome จะมีรูปแบบของคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (ECG) ผิดปกติ แบบ RBBB และ ST segment elevation ใน lead V1-3^(9,11,31,32,33)

2.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างไหลตายและ Brugada syndrome

ผู้ที่รอดชีวิตจากไหลตายส่วนใหญ่ตรวจพบคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ RBBB และ ST segment elevation ใน lead V1-3 ซึ่งลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบนี้เป็นลักษณะเดียวกับคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่พบในผู้ป่วย Brugada syndrome⁽³⁴⁾ นอกจากนี้แล้วลักษณะอาการทางคลินิกของไหลตาย และ Brugada syndrome มีลักษณะอาการที่คล้ายคลึงกันมาก คือเกิดในเพศชายเป็นส่วนใหญ่โดยมากเกิดในคนวัยหนุ่มที่แข็งแรงไม่มีโรคประจำตัวมาก่อน มักจะตายอย่างกะทันหันในขณะนอนหลับหรือพักผ่อนโดยที่ไม่มีความผิดปกติของโครงสร้างหัวใจแต่อย่างใด จากลักษณะอาการทางคลินิกและคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่เหมือนกันของทั้งไหลตายและ Brugada syndrome จึงน่าจะเกิดมาจากสาเหตุทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน

2.3.3 ปัจจัยทางพันธุกรรมของ Brugada syndrome

Brugada syndrome เป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม โดยรูปแบบของการถ่ายทอดเป็นแบบ autosomal dominant^(35,36) และจากรายงานจากหลายๆคณะวิจัยพบว่า Brugada syndrome เป็น genetic heterogeneity หมายความว่า โรคเดียวกันแต่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ต่างกัน ซึ่งยีนที่น่าจะเป็นสาเหตุของโรคได้แก่ ion channel ต่างๆในหัวใจ เช่น sodium channel หรือ potassium channel

2.3.3.1 Sodium channel

ยีนที่สร้าง cardiac sodium channel ที่มีหลายคณะวิจัยค้นพบว่าเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้เกิด Brugada syndrome นั่นคือ ยีน SCN5A ซึ่งเป็น α subunit cardiac sodium channel gene ประกอบไปด้วย 28 exon ซึ่งจะสร้าง α subunit cardiac sodium channel protein ซึ่งประกอบไปด้วย 4 domain แต่ละdomain ประกอบด้วย 6 transmembrane โดยมีปลาย carboxy (COOH) และปลาย amino(NH₂) อยู่ในintracellular⁽³⁷⁾ ซึ่งประมาณ 15-20 % ของคนไข้ Brugada syndrome เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนนี้^(15,38)

การกลายพันธุ์ของยีน SCN5A ที่ตำแหน่งต่างๆดังต่อไปนี้ทำให้เกิด Brugada syndrome

- **Qiuyun Chen และคณะ** รายงานถึงบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของ SCN5A โดยวิธี sequence analysis ดังต่อไปนี้⁽¹⁰⁾

- 1.) เกิดการ insertion ของ 2 nucleotide , AA ที่บริเวณ intron5 ซึ่งจะส่งผลให้ลำดับเบสที่บริเวณ splice-donor ของบริเวณ intron 5 ผิดไป
- 2.) เกิดการ deletion ของ nucleotide A ที่ codon 1397 ซึ่งจะทำให้เกิด stop codon ผลก็คือจะมีส่วนของ DIII / S6 , DIV /S1-6 และส่วนปลาย carboxy ของ cardiac sodium channel ขาดหายไป
- 3.) เกิดการเปลี่ยนแปลงเบสที่บริเวณ exon 28 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง codon ที่ 1620 (T1620M) ร่วมกับการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง codon ที่ 1232 (R1232W)

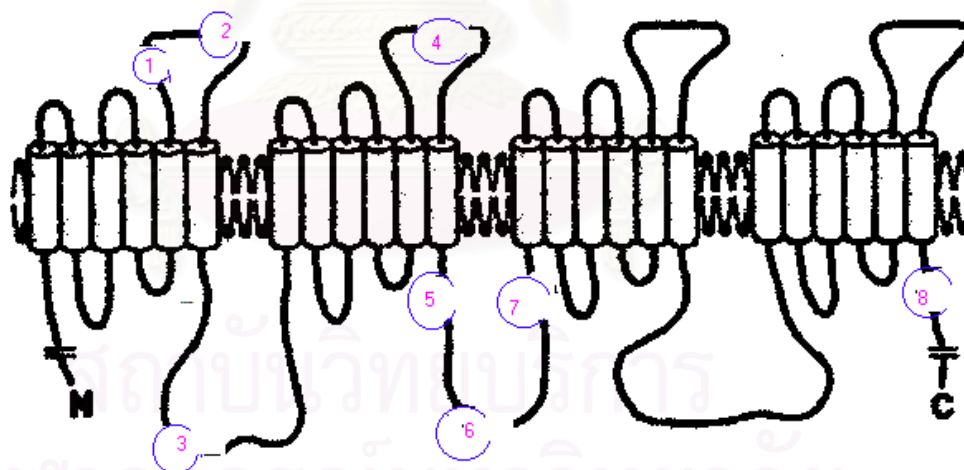
ที่ตำแหน่ง codon ที่ 1620 (T1620M) ได้มีอีกหลายคณะวิจัยตรวจพบได้แก่

- Wang และคณะ⁽¹¹⁾
- Baroudi และคณะ^(12,13)
- Wan X และคณะ⁽¹⁴⁾

- **silvia G และคณะ** ได้ทำการตรวจกรองหาการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A ในคนไข้ Brugada syndrome 52 คน โดยวิธี SSCP (Single strand Conformation

Polymorphism) พบว่าเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A 8 คน (คิดเป็นร้อยละ 15) โดยแบ่งเป็นคนไข้ที่แสดงอาการ 3 คน ไม่แสดงอาการ 5คน จากการวิจัยในครั้งนี้พบบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A ทั้งหมด 8บริเวณ คือ⁽¹⁵⁾

1. exon 7 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 298 (V294M)
2. exon 8 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 319 (G319F)
3. exon 12 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 567 (L567Q)
4. exon 16 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 892 (F892I)
5. exon 17 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid 2 ตำแหน่งคือ ที่ตำแหน่ง 965 (R965C) และที่ตำแหน่ง 1053 (E1053K)
6. exon 18 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 1114 (D1114N)
7. exon 28 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 1795 (Y1795H)



ภาพที่ 2.1 แสดงถึง α -subunit cardiac sodium channel protein ในบริเวณที่มีการกลายพันธุ์ของ SCN5A

- **Rook MB และคณะ** รายงานถึงบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของ SCN5A ที่ทำให้เกิด Brugada syndrome อีก 2 ตำแหน่งคือ⁽¹⁶⁾

- 1.) exon 26 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง codon ที่ 1512 (R1512W)
- 2.) exon 28 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง codon ที่ 1924 (A1924T)

- **Akai J และคณะ** รายงานถึงบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของ SCN5A อีก 1 ตำแหน่งคือที่บริเวณ exon28ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง1710 (S1710 L)⁽¹⁷⁾

- **Veldkamp และคณะ** รายงานถึงบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของ SCN5A อีก 1ตำแหน่ง คือเกิดการ insertion ของกรดอะมิโน aspartic acid ที่ codon ที่1795 (1795insD)⁽³⁹⁾

- **Baroudi G และคณะ** รายงานถึงบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของ SCN5A อีก 1ตำแหน่ง คือ ที่บริเวณ exon 24 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่ตำแหน่ง 1432 (R1432G)⁽⁴⁰⁾

2.3.3.2 Potassium channel

ยีนที่สร้าง Potassium channel protein ที่เกี่ยวข้องกับ Brugada syndrome ได้แก่ *KCND2* ซึ่งประกอบไปด้วย 6 exon และยีน *KCND3* ซึ่งประกอบไปด้วย 7 exon โดยที่ยีนทั้ง 2 นี้ เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง Potassium channel protein ที่เกี่ยวข้องกับ transient outward current (I_{to}) ที่เมื่อเกิดการกลายพันธุ์แล้วจะส่งผลให้เกิด Brugada syndrome แต่ยังไม่มีการรายงานการกลายพันธุ์ของยีนนี้ที่ทำให้เกิด Brugada syndrome มีเพียงแต่กล่าวว่ายีนทั้ง 2 นี้ น่าจะเป็น candidate เท่านั้น^(20,21)

2.3.4 การกลายพันธุ์ของ Sodium channel และ Potassium channel ทำให้เกิด Brugada syndrome ได้อย่างไร

SCN5A เป็นยีนที่สร้าง α subunit cardiac sodium channel ที่เกี่ยวข้องกับศักย์ไฟฟ้าขณะทำงาน (action potential) ของกล้ามเนื้อหัวใจ

2.3.4.1 คุณสมบัติทางไฟฟ้าของกล้ามเนื้อหัวใจ⁽⁴¹⁾

ความเข้มข้นของไอออนชนิดต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และของเหลว นอกเซลล์ (extracellular fluid) มีความแตกต่างกันคือ ภายในเซลล์มีโปตัสเซียม (ประมาณ 150 mmole) สูงกว่าภายนอกเซลล์ (ซึ่งมี 4 mmole) และโซเดียมอยู่ภายนอกเซลล์ (140 mmole) สูงกว่า ภายในเซลล์ (ซึ่งมี 30mmole) ภาวะปกติ ผนังเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีความสามารถในการซึมผ่านของโปตัสเซียมสูง ดังนั้นถ้าสอดขั้วไฟฟ้าขนาดเล็กเข้าไปภายในเซลล์จะได้ความต่างศักย์ระหว่างภายในเซลล์และนอกเซลล์ โดยภายในเซลล์มีค่าเป็นลบ ค่าของศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ขณะพักในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยทั่วไปเท่ากับ -80 ถึง -90 มิลลิโวลต์ ค่าของศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปได้เมื่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจถูกกระตุ้น ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการนำผ่านของไอออนผ่านผนังเซลล์ เกิดเป็นศักย์ไฟฟ้าทำงานเกิดขึ้น ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 ระยะ คือ

ระยะ 0 หมายถึงระยะที่มีดีโพลาไรเซชันอย่างรวดเร็ว และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์จากลบไปเป็นบวก เนื่องจากมีโซเดียมผ่านเข้าไปในเซลล์

ระยะ 1 หมายถึงระยะที่มีรีโพลาไรเซชันอย่างรวดเร็ว ซึ่งเกิดจาก inactivation ของ โซเดียม และ activation ของคลอไรด์ และบางส่วนจาก outward K current

ระยะ 2 หมายถึงระยะที่มีดีโพลาไรเซชันคงตัวอยู่เรื่อยๆหรือ plateau ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของศักย์ไฟฟ้าขณะทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ เกิดจาก activate Ca – sloe channel และมี K current จากนอกเซลล์เข้าไปในเซลล์

ระยะ 3 หมายถึงระยะที่มีรีโพลาไรเซชันอย่างรวดเร็ว กลับสู่ศักย์ไฟฟ้าขณะพักเกิดจาก activation ของ K current ทำให้โปตัสเซียมออกไปนอกเซลล์ และมี inactivation ของ Ca channel

ระยะ 4 หมายถึงระยะดีโพลาไรเซชันในขณะกล้ามเนื้อหัวใจคลายตัว ซึ่งมีความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์กลับสู่ระดับเดิมก่อนเกิดศักย์ไฟฟ้าขณะทำงาน ระดับของโซเดียมและโปตัสเซียมภายในเซลล์จะกลับสู่ปกติโดยอาศัยการทำงานของโซเดียมปั๊ม

2.3.4.2 activation และ inactivation gate ของ Sodium และ Potassium channel^(41,42)

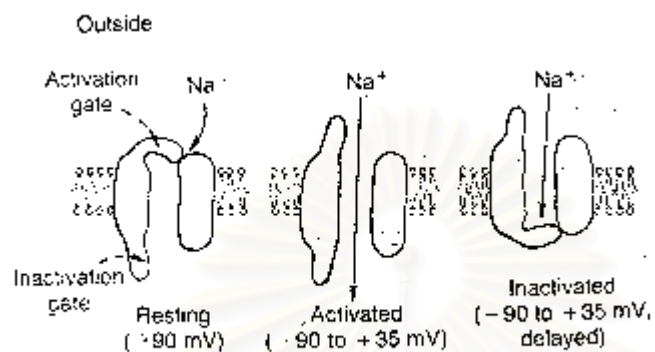
จากภาพที่ 3 แสดงการทำงานของประตูความต่างศักย์ของช่องทางโซเดียมใน 3 สภาวะ แต่ละช่องทางมี 2 ประตู ประตูหนึ่งอยู่ที่ช่องทางด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเรียก activation

gate และอีกประตูหนึ่งอยู่ที่ช่องทางด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเรียก inactivation gate ซ้ายมือสุด แสดงสถานะของเยื่อหุ้มเซลล์ขณะพักซึ่งมีความต่างศักย์ประมาณ -90 มิลลิโวลต์ ในสภาวะนี้ activation gate จะปิดสนิท ป้องกันการผ่านเข้าเซลล์ของโซเดียม แต่ inactivation gate จะเปิด เมื่อมีความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลงจาก -90 มิลลิโวลต์ มาอยู่ระหว่าง -70 และ -50 มิลลิโวลต์ จะทำให้ activation gate เปลี่ยนรูปร่างไปอยู่ในท่าเปิดเรียกว่า activated state ซึ่งทำให้โซเดียมสามารถวิ่งเข้าเซลล์ได้อย่างมากมายเพิ่มขึ้นจากเดิมเป็น $500-5000$ เท่า ระยะเวลาต่อมาภายในเศษหนึ่งส่วนหนึ่งของวินาที inactivation gate จะปิดทำให้โซเดียมไม่สามารถผ่านเข้าได้ ทำให้ความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์กลับคืนสู่ปกติ เกิดรีโพลาไรเซชัน inactivation gate นี้จะไม่เปิดอีกจนกว่าความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์ กลับคืนสู่ปกติขณะพัก

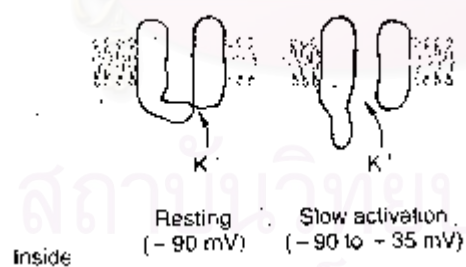
จากภาพที่ 4 แสดงสถานะของประตูความต่างศักย์ของช่องทางโปแตสเซียมในระยะพัก และระยะเกิดศักย์ไฟฟ้าขณะทำงาน ในระยะพัก ประตูนี้จะปิด โปแตสเซียมไม่สามารถผ่านเข้าออกจากเซลล์ได้ เมื่อความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลงจาก -90 มิลลิโวลต์ มาจนถึง $+35$ มิลลิโวลต์ จะทำให้ประตูค่อยๆ เปิดออกช้าๆ ทำให้โปแตสเซียมผ่านออกจากเซลล์ แต่เนื่องจาก ประตูโปแตสเซียมเปิดช้า โดยจะเปิดพร้อมๆ กับที่ประตูโซเดียม (inactivation gate) ปิด ดังนั้นระยะที่ลดการนำโซเดียมเข้าเซลล์จะตรงกับระยะที่มีการเพิ่มโปแตสเซียมออกจากเซลล์



ภาพที่ 2.2 แสดงถึงศักย์ไฟฟ้าทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ ในระยะต่างๆ



ภาพที่ 2.3 แสดงการทำงานของประตูความต่างศักย์ที่ควบคุมการทำงานของ Sodium



ภาพที่ 2.4 แสดงการทำงานของประตูความต่างศักย์ที่ควบคุมการทำงานของ Potassium channel

2.3.4.3 การกลายพันธุ์ของยีน SCN5A ทำให้เกิด Brugada syndrome ได้อย่างไร

การกลายพันธุ์ของยีน SCN5A ใน Brugada syndrome เป็นแบบ loss of function⁽⁴³⁾ เนื่องมาจากการกลายพันธุ์ทำให้เกิด inactivation ของ Sodium channel เร็วกว่าปกติ ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณของ sodium เข้าเซลล์น้อยกว่าปกติ ซึ่งความผิดปกตินี้เกิดขึ้นในช่วงปลายระยะ 0 ของศักย์ไฟฟ้าทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ และส่งผลให้เกิดระยะ 1 เร็วขึ้นกว่าปกติ ดังนั้นการกลายพันธุ์การกลายพันธุ์ของยีน SCN5A ที่ทำให้เกิด Brugada syndrome จึงเกี่ยวข้องกับ inactivation ของ Sodium channel ทำให้เกิดรีโพลาไรเซชันในกล้ามเนื้อหัวใจเร็วขึ้นกว่าปกติ^(10,31,38,43,44)

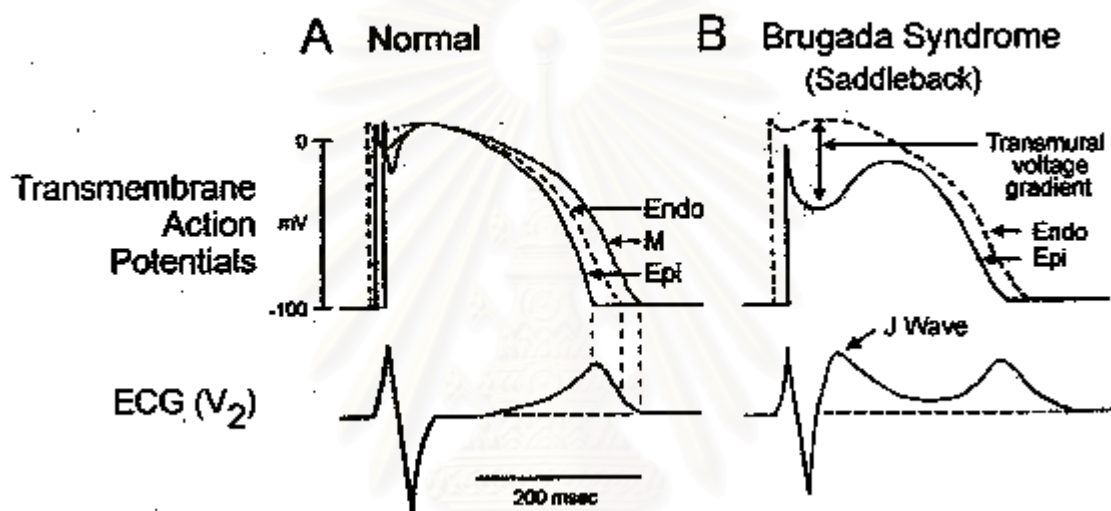
Brugada syndrome จะเกี่ยวข้องกับกล้ามเนื้อหัวใจในชั้น epicardium และ endocardium โดยการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A ทำให้เกิด inactivation ของ Sodium channel ในชั้น epicardium เร็วกว่าคนปกติ ในขณะที่ในชั้น endocardium เป็นไปตามปกติ ดังนั้นใน epicardium ของคนไข้ Brugada syndrome จึงมีจำนวนของโซเดียมที่เข้าเซลล์น้อยกว่า และเกิดรีโพลาไรเซชันได้เร็วกว่าใน endocardium จึงทำให้เกิดความต่างศักย์ระหว่าง epicardium และ endocardium ขึ้นในช่วงระยะ 1 ของศักย์ไฟฟ้าทำงานในกล้ามเนื้อหัวใจ (Transmural voltage gradient) ซึ่ง Transmural voltage gradient นี้ทำให้เกิดคลื่นหัวใจแบบ ST segment elevation^(31,38,45)

2.3.4.4 การกลายพันธุ์ของยีน KCND2 และ KCND3 ทำให้เกิด Brugada syndrome ได้อย่างไร

เนื่องจาก KCND2 และ KCND3 เป็นยีนที่สร้าง Potassium channel ที่เกี่ยวข้องกับ กระแสของโปแตสเซียมที่ไหลออกนอกเซลล์ (transient outward current ; I_{TO}) ซึ่งจะเกี่ยวข้องในปลายระยะ 1 ของศักย์ไฟฟ้าขณะทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ การกลายพันธุ์ของยีน KCND2 และ KCND3 ทำให้ I_{TO} ในปลายระยะที่ 1 ของศักย์ไฟฟ้าขณะทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ นี้ เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ ทำให้เกิดรีโพลาไรเซชันในกล้ามเนื้อหัวใจเร็วขึ้นกว่าปกติ ดังนั้น การกลายพันธุ์ของยีน KCND2 และ KCND3 ใน Brugada syndrome จึงเป็นแบบ gain of function^(21,22)

การกลายพันธุ์ของยีน KCND2 และ KCND3 ที่ทำให้เกิด Brugada syndrome ก็เนื่องมาจาก การเพิ่มขึ้นของกระแสของโปแตสเซียมที่ไหลออกนอกเซลล์ในปลาย ระยะที่ 1 ของ ศักย์ไฟฟ้าขณะทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจในชั้น epicardium โดยในขณะที่ชั้น endocardium

เป็นไปตามปกติ จึงทำให้เกิด Transmural voltage gradient ซึ่งเป็นสาเหตุของคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่ผิดปกติแบบ ST segment elevation⁽⁴⁶⁾



ภาพที่ 2.5 A แสดงถึงศักย์ไฟฟ้าขณะทำงานในกล้ามเนื้อหัวใจชั้น epicardium และ endocardium ในคนปกติ ภาพที่ 2.5 B เป็นภาพที่แสดงถึง Transmural voltage gradient ระหว่าง epicardium กับ endocardium ที่ทำให้เกิดคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ ST segment

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.5 Linkage Analysis⁽⁴⁷⁾

Linkage Analysis คือ การหาความสัมพันธ์ระหว่างโรคที่ต้องการศึกษากับ candidate gene ที่คิดว่าน่าจะเป็นสาเหตุของโรคนั้น โดยการศึกษาจาก polymorphic marker ที่อยู่ใกล้เคียงกับยีนนั้น หรืออยู่ภายในยีนนั่นเอง ในการทำ Linkage Analysis นั้นสามารถวิเคราะห์ผลได้จาก ค่า lod score

2.3.5.1 Lod score คืออะไร

Lod score คือค่าลอการิทึมของ likelihood ratio ซึ่ง likelihood ratio คือ อัตราส่วนระหว่าง link ต่อ unlink โดยมีสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{Lod score ; } Z = \frac{(1 - \theta)^m \cdot \theta^n}{(1/2)^{m+n}}$$

θ คือ recombination fraction

m คือ จำนวน meiosis ที่ไม่เกิด recombination (non- recombination) ในครอบครัวนั้น

n คือ จำนวน meiosis ที่เกิด recombination ในครอบครัวนั้น

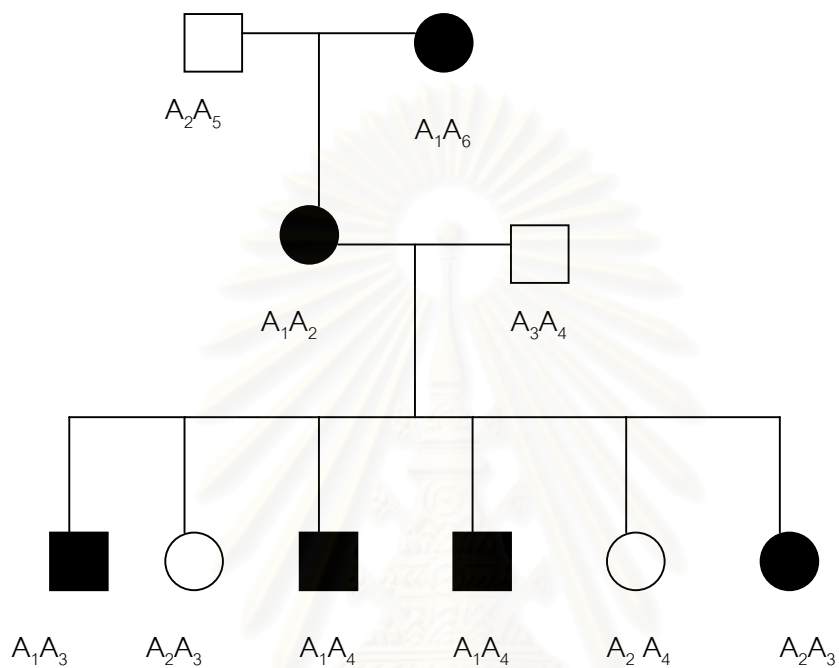
recombination fraction (θ) เป็นเครื่องมือสำหรับวัดระยะห่างระหว่าง 2 loci บน genetic map ยกตัวอย่างเช่น ถ้า recombination fraction เท่ากับ 0.01 หมายความว่า ระยะห่างระหว่าง 2 loci บน genetic map เท่ากับ 1 เซนติมอร์แกน (cM) โดยที่ค่าของ recombination fraction จะไม่เกิน 0.5

2.3.5.2 เกณฑ์ในการ Include และ exclude linkage

โดยพิจารณาจากค่า lod score ดังนี้

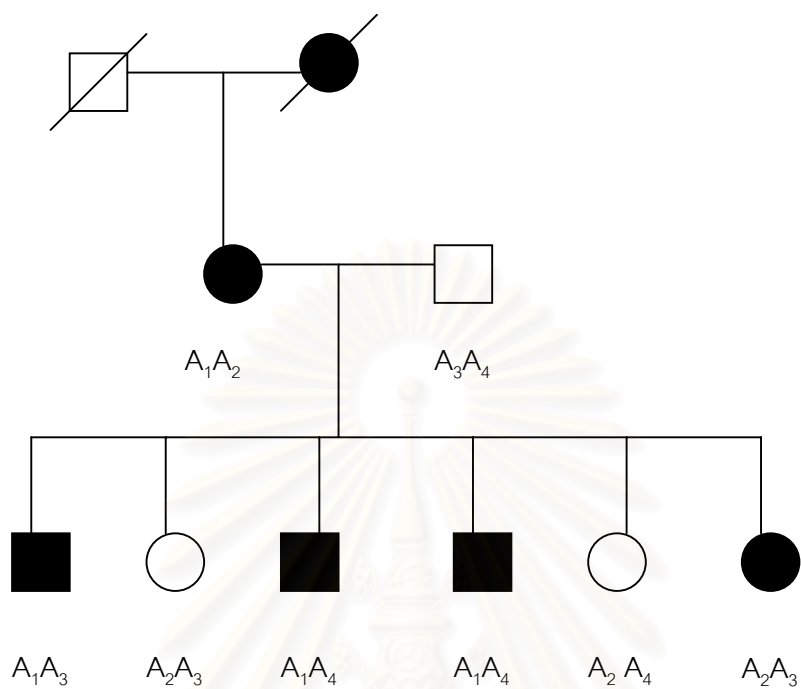
- 1.) ถ้าค่า lod score มีค่ามากกว่า 3 แสดงว่า 2 loci link กัน (Include)
- 2.) ถ้าค่า lod score มีค่าน้อยกว่า -2 แสดงว่า 2 loci ไม่ link กัน (Exclude)
- 3.) ถ้าค่า lod score มีค่าอยู่ระหว่าง -2 กับ 3 แสดงว่า ไม่สามารถ Include หรือ Exclude linkage ได้

การคำนวณค่า lod score จากสูตรข้างต้น สามารถทำได้ในกรณีที่ pedigree ไม่ซับซ้อนเกินไป ยกตัวอย่างเช่น ในรูป pedigree 2.6 ก และ 2.6 ข จะสามารถคำนวณค่า lod score จากสูตรได้ เนื่องจากใน pedigree ที่ 2.6 ก ทุก meiosis สามารถบอกได้ว่าการถ่ายทอด allele ทั้ง 2 มาจากใคร ดังนั้นจึงสามารถบอกได้อย่างชัดเจนว่า III₁ - III₅ ไม่เกิด recombination และ III₆ เกิด recombination ส่วนในรูป pedigree ที่ 2.6 ข ก็ยังสามารถคำนวณ lod score ด้วยสูตรได้ แต่จะยากกว่าในรูป 2.6 ก เนื่องจากใน II₁ ซึ่งมี allele A₁ A₂ และเป็นโรคด้วยนั้น ไม่สามารถบอกได้ว่า allele ใดที่เป็น allele ที่ทำให้เกิดโรค เพราะไม่ทราบ allele ของ I₁ และ I₂ ซึ่งเป็น พ่อ และแม่ ดังนั้น ในรุ่นที่ 3 ซึ่งเป็นลูกของ II₁ นั้น มีโอกาสเกิดขึ้นได้ 2 กรณีคือ III₁ - III₅ ไม่เกิด recombination และ III₆ เกิด recombination หรือ III₁ - III₅ เกิด recombination และ III₆ ไม่เกิด recombination ส่วนในรูป pedigree 2.6 ค นั้นถ้าเราพิจารณาที่ III₇ และ III₈ จะเห็นว่า ได้รับ allele A₁ ที่ทำให้เกิดโรคมมาจาก II₃ ซึ่งเป็นพ่อซึ่งไม่ทราบ genotype ดังนั้น เราจึงไม่สามารถแน่ใจได้ว่า allele A₁ ที่มาจาก II₃ นั้นจะเป็น allele เดียวกันกับที่มาจาก II₁ หรือไม่ เพราะเราไม่ทราบ allele ของ I₁ และ I₂ ว่าจะมี allele A₁ กี่ตัว เนื่องจากเราไม่ทราบ genotype ของ I₁ และ I₂ เช่นกัน ดังนั้นใน pedigree ลักษณะนี้ค่อนข้างจะยุ่งยากในการคิดคำนวณด้วยสูตร ดังนั้นจึงนิยมใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์มาช่วยในการหาค่า lod score ซึ่งในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ได้ใช้ LINKAGE program version 5.1 ของ J. Ott



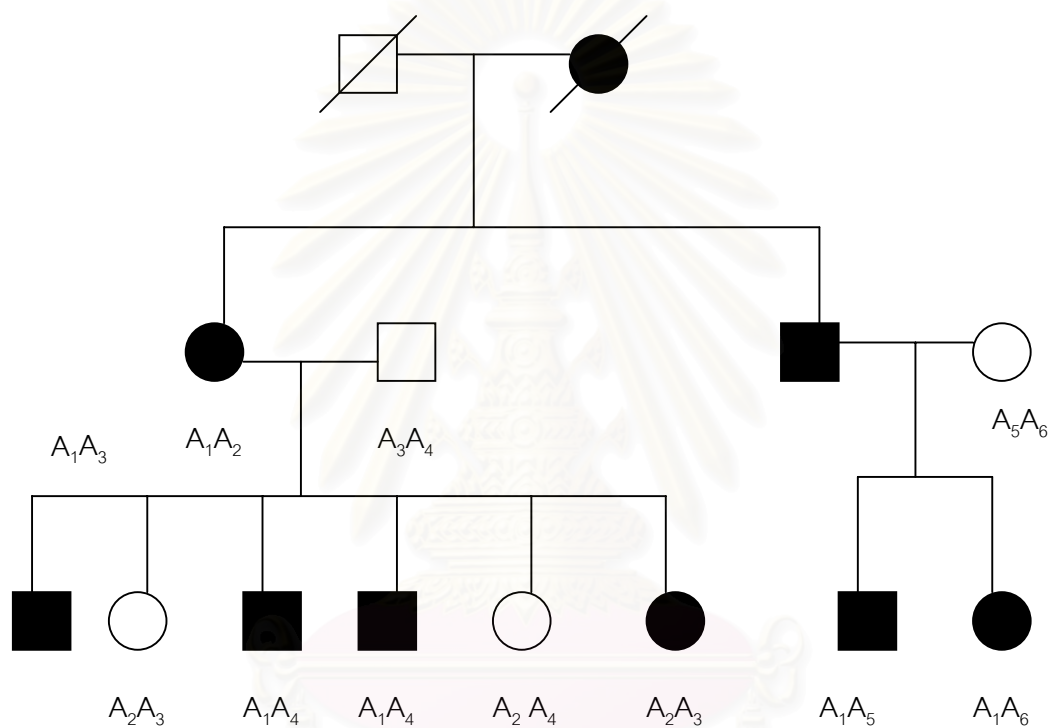
ภาพที่ 2.6 ก แสดงถึง pedigree ในครอบครัว A

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.6 ข แสดงถึง pedigree ในครอบครัว B

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาพที่ 2.6 แสดงถึง pedigree ในครอบครัว C

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ ใช้ตัวอย่างเลือดของผู้รอดชีวิตจากโผลตายรวมไปถึงญาติของผู้ป่วยและคนปกติที่ไม่มีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ RBBB และ ST-segment elevation

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. Pipette tip : 10 μ l , 1,000 μ l (Elkay , USA)
2. Microcentrifuge tube : 0.2 ml , 0.5 ml , 1.5 ml (Bio –rad , Elkay , USA)
3. Polypropylene canical tube : 15 ml (elkay , USA)
4. Beaker : 50 ml , 100ml , 200 ml , 500 ml , 1,000 ml (Pyrex)
5. Flask : 250 ml , 500 ml , 1,000 ml (Pyrex)
6. Reagent bottle : 100 ml , 250 ml , 500 ml , 1,000 ml (Duran , USA)
7. Cylinder : 25 ml , 50 ml , 100 ml , 250 ml , 500 ml , 1,000 ml (Duran ,USA)
8. Glass pipette : 5 ml , 10 ml (Witeg , Germany)
9. Pipette rack (Autopack , USA)
10. Thermometer (Precision , Germany)
11. Parafilm (American National Can , USA)
12. Plastic wrap
13. Stirring-magnetic bar
14. Combs
15. Electrophoresis chamber set
16. Automatic adjustable micropipette : P2(0.1-2 μ l) , P10 (0.5-10 μ l) , P20 (5-20 μ l) , P100 (20-100 μ l) , P1000 (0.1-1 ml) (Gilson , France)
17. Pipette boy (Tecnomara , Switzerland)
18. Vortex (Scientific Industry , USA)

19. PH meter (Eutech Cybernatics)
20. Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne , USA)
21. Balance (Precisa , Switzerland)
22. Microcentrifuge (Fotodyne , USA)
23. DNA Thermal cycle 480 (Perkin Elmer , Cetus USA)
24. Thermal cycle (Touch Down , Hybraid USA)
25. Power supply model 250 (Gibco BRL , Scotland)
26. Horizon 11-14 (Gibco BRL , Scotland)
27. Incubator (Mettler)
28. Thermostat shaking-water bath (Heto , Denmark)
29. Spectronic spectrophotometers (Genesys5 , Milon Roy USA)
30. UV Transilluminator (Fotodyne USA)
31. UV-absorbing face shield (Spectronic , USA)
32. Gel Doc 1000 (Bio-RAD)
33. Mitsubishi Video copy processor
34. Molecular Dynamics Storage Phosphor Screen
35. Thermal paper
36. Refrigerator 4⁰C (Mitsubishi , Japan)
37. Deep freeze -20⁰C , -80⁰C (Revco)
38. Water Purification equipment (Water pro Ps , Labconco USA)
39. Water bath

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีทั่วไป
 - 1.1 Absolute ethanol (Merck)
 - 1.2 Agarose , molecular grade (Promega)
 - 1.3 Ammonium acetate (Merck)
 - 1.4 Boric acid (Merck)
 - 1.5 Bromphenol blue (Pharmacia)
 - 1.6 Disodium ethylenediamine tetracetic acid : EDTA (Merck)
 - 1.7 Ethidium bromide (Gibco BRL)

- 1.8 Ficoll 400 (Pharmacia)
- 1.9 Hydrochloric acid (Merck)
- 1.10 Mineral oil (Sigma)
- 1.11 Phenol (Sigma)
- 1.12 Chloroform (Merck)
- 1.13 Isoamyl alcohol (Merck)
- 1.14 Sodium chloride (Merck)
- 1.15 Sodium dodecyl sulfate (Sigma)
- 1.16 Sodium hydroxide (Merck)
- 1.17 Sucrose (BDH)
- 1.18 Tris base (USB)
- 1.19 Triton X-100 (Pharmacia)
- 1.20 100 base pair DNA ladder (Biolabs)
- 1.21 Polyacrylamide
- 1.22 Ammonium Persulfate
- 1.23 Temed
2. สารเคมีสำหรับการทำ kinase
 - 2.1 10X kinase buffer
 - 2.2 T4 kinase (Biolabs)
 - 2.3 γ -P³² ATP (Dupont)
 - 2.4 Primer forward (GibThai)
3. สารเคมีสำหรับการทำ PCR
 - 3.1 10X PCR buffer (500 mM KCl , 200mM Tris-HCl pH 8.4) (Perkin)
 - 3.2 Magnesium chloride (GibcoBRL)
 - 3.3 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Promega)
 - 3.4 Oligonucleotide primers (GibThai)
 - 3.5 Tag DNA polymerase (Perkin , Dynazyne)
 - 3.6 Genomic DNA sample

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 กลุ่มตัวอย่าง

- กลุ่มตัวอย่างเลือดของผู้รอดชีวิตจากโหลตายและครอบครัว

ใช้ตัวอย่างเลือดของผู้รอดชีวิตจากโหลตายและครอบครัว 20 มิลลิลิตร 4 ครอบครัว ทุกคนในครอบครัวได้รับการวัดคลื่นหัวใจหลังได้รับยา Procainamide เพื่อตรวจวัดคลื่นหัวใจที่ผิดปกติแบบ RBBB และ ST-segment elevation ใน lead V1 ถึง V3

- กลุ่มตัวอย่างเลือดของคนปกติ

ใช้ตัวอย่างเลือดของคนปกติที่อยู่ในหมู่บ้านเดียวกันกับผู้รอดชีวิตจากโหลตาย ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

3.3.2 การสกัด ดีเอ็นเอ

นำเลือดปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาสกัด ดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำเลือด 20 มิลลิลิตร มา centrifuge ที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
2. เก็บส่วนที่เป็น buffy coat ไว้ในหลอด polypropylene หลอดใหม่ โดยเทส่วน supernatant ทิ้ง
3. เติม lysis buffer I ที่แช่เย็น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
4. นำมา centrifuge ที่ความเร็ว 1000 g เป็นเวลา 8 นาที จากนั้นนำส่วนใสทิ้ง
5. เติม lysis buffer I ที่แช่เย็น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมา centrifuge ที่ความเร็ว 1000 g เป็นเวลา 8 นาที แล้วเทส่วน supernatant ทิ้ง
6. เติม lysis buffer II ปริมาตร 900 ไมโครลิตร , สารละลาย proteinase K 10 ไมโครลิตร และ 10% SDS 50 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 15 วินาที
7. นำส่วนผสมทั้งหมดแช่ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน
8. เติม phenol-chloroform-isoamyl alcohol 1 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 6000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
9. ดูดส่วน supernatant ที่มี DNA อยู่ในหลอดใหม่
10. เติม 7.5 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ลงไปครึ่งหนึ่งของปริมาตรของ supernatant และเติม 100 % ethanol ลงไปด้วยปริมาตรเท่ากับปริมาตรของ supernatant ผสมให้เข้ากัน จะเห็นสายของดีเอ็นเอ จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง จะเห็น pellet ใสๆ อยู่ติดก้นหลอด

11. เติม 70% ethanol ลงไปล้าง pellet จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วน supernatant ทิ้ง
12. ละลาย ดีเอ็นเอ ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 20-300 ไมโครลิตร จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จน ดีเอ็นเอละลายหมด

3.3.3 การทำ Linkage analysis มีขั้นตอนดังนี้

3.3.3.1 การติดสลาก primer ด้วยสารกัมมันตภาพรังสี γ -p³² ARP โดยวิธี Kinase

ขั้นตอนที่ 1 ปริมาตรของส่วนผสม (ปริมาตรรวมขึ้นอยู่กับปริมาตรของ Primer ที่นำมาติดสลาก)

ความเข้มข้นในปฏิกิริยา ปริมาตรที่ใช้ในการ kinase

10x kinase buffer	10x	1x
T4 kinase (Biolabs)	10 U / μ l	1 U / μ l
γ -p ³² ARP (Dupant)	10 μ Ci / μ l	2 μ Ci / μ l
Primer (forward)	20 μ M	10 μ M
น้ำกลั่นจนครบ		ปริมาตรรวม

ขั้นตอนที่ 2 ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้สารที่ติดอยู่บนฝาหรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่ 3 incubate ส่วนผสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.3.3.2 การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ

ยีนที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ มีทั้งหมด 3 ยีน คือ SCN5A , KCND2 และ KCND3

3.3.3.2.1 การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ใน polymorphic marker ของยีน SCN5A marker ของยีนนี้มี 3 marker คือ D3S1298 , D3S3521 และ marker ภายในยีน (intragenic) มีขั้นตอนการทำดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 10 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) ประกอบด้วย
D3S1298

	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยา
10mM dNTP	0.2 mM	0.2 μ l
10x buffer	1X	1 μ l
25 mM MgCl ₂	1.5 mM	0.6 μ l
Tag DNA Polymerase (5U/ μ l)	2U / 100 μ l	0.04 μ l
DNA template (50ng/ μ l)	-	2 μ l
20 μ M labelled sense-primer	10 μ M	0.1 μ l
20 μ M antisense-primer	20 μ M	0.05 μ l
เติมน้ำกลั่นจนครบ		10 μ l

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

D3S3521

10mM dNTP	0.2 mM	0.2 μ l
10x buffer	1X	1 μ l

25 mM Mgcl ₂	1.5 mM	0.6 μl
Tag DNA Polymerase (5U/μl)	2U / 100 μl	0.04 μl
DNA template (50ng/μl)	-	2 μl
20 μM labelled sense-primer	10 μM	0.2 μl
20 μM antisense-primer	20 μM	0.1 μl
เติมน้ำกลั่นจนครบ		10 μl

Marker ภายในยีน

ความเข้มข้นในปฏิกิริยา ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา

10mMdNTP	0.2 mM	0.2 μl
10x buffer	1X	1 μl
25 mM Mgcl ₂	1.5 mM	0.6 μl
Tag DNA Polymerase (5U/μl)	2U / 100 μl	0.04 μl
DNA template (50ng/μl)	-	2 μl
20 μM labelled sense-primer	10 μM	0.1 μl
20 μM antisense-primer	20 μM	0.1 μl

เติมน้ำกลั่นจนครบ

10 μ l

ขั้นตอนที่2 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้สารที่อยู่บนฝา หรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Hybrid/DNA thermal cycle โดยใช้สภาวะต่อไปนี้

- Initiation 95 °C 2 นาที
- 35 PCR cycle of : Denaturation 94 °C 45 วินาที
Annealing 57 °C 45 วินาที
Extension 72 °C 1 นาที
- Final extension 72 °C 7 นาที

3.3.3.2.2 การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของ polymorphic marker ในยีน KCND2 : marker เป็น marker ภายในยีน

ขั้นตอนที่1 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) ประกอบด้วย

ความเข้มข้นในปฏิกิริยา ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา

10mM dNTP 0.2 mM 0.2 μ l

10x buffer 1X 1 μ l

25 mM MgCl₂ 1.5 mM 0.6 μ l

Tag DNA Polymerase (5U/ μ l) 2U / 100 μ l 0.04 μ l

DNA template (50ng/ μ l) - 2 μ l

100 μ M labelled sense-primer 50 μ M 0.1 μ l

100 μ M antisense-primer 100 μ M 0.05 μ l

เติมน้ำกลั่นจนครบ

10 μ l

ขั้นตอนที่2 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้สารที่อยู่บนฝาหรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Hybrid/DNA thermal cycle โดยใช้สภาวะต่อไปนี้

- | | | | |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------|
| ● Initiation | 95 $^{\circ}$ C | 2 | นาที |
| ● 35 PCR cycle of : | Denaturation | 94 $^{\circ}$ C | 45 วินาที |
| | Annealing | 56 $^{\circ}$ C | 45 วินาที |
| | Extension | 72 $^{\circ}$ C | 1 นาที |
| ● Final extension | 72 $^{\circ}$ C | 7 | นาที |

3.3.3.2.3 การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ของ polymorphic marker ในยีน *KCND3* :
marker ของยีนนี้มี 2 marker คือ D1S2696 และ D1S2746

ขั้นตอนที่1 10 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) ประกอบด้วย

D1S2696

ความเข้มข้นในปฏิกิริยา ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา

10mM dNTP 0.2 mM 0.2 μ l

10x buffer 1X 1 μ l

25 mM MgCl₂ 1.5 mM 0.6 μ l

Tag DNA Polymerase (5U/ μ l) 2U / 100 μ l 0.04 μ l

DNA template (50ng/ μ l) - 2 μ l

20 μ M labelled sense-primer 10 μ M 0.2 μ l

20 μ M antisense-primer	20 μ M	0.1 μ l
-----------------------------	------------	-------------

เติมน้ำกลั่นจนครบ		10 μ l
-------------------	--	------------

D1S2746

ความเข้มข้นในปฏิกิริยา ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา

10mM dNTP	0.2 mM	0.2 μ l
-----------	--------	-------------

10x buffer	1X	1 μ l
------------	----	-----------

25 mM MgCl ₂	1.5 mM	0.6 μ l
-------------------------	--------	-------------

Tag DNA Polymerase (5U/ μ l)	2U / 100 μ l	0.04 μ l
----------------------------------	------------------	--------------

DNA template (50ng/ μ l)	-	2 μ l
------------------------------	---	-----------

20 μ M labelled sense-primer	10 μ M	0.2 μ l
----------------------------------	------------	-------------

20 μ M antisense-primer	20 μ M	0.1 μ l
-----------------------------	------------	-------------

เติมน้ำกลั่นจนครบ		0 μ l
-------------------	--	-----------

ขั้นตอนที่ 2 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้สารที่อยู่บนฝา

หรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่ 3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Hybrid/DNA thermal cycle โดยใช้สภาวะต่อไปนี้

- Initiation 95 °C 2 นาที
- 35 PCR cycle of : Denaturation 94 °C 45 วินาที
- Annealing 58 °C 45 วินาที

Extension 72 °C 1 นาที

- Final extension 72 °C 7 นาที

มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่1 ส่วนผสมของเจล (ปริมาณขึ้นอยู่กับขนาดของเจล)

	50 ml	60 ml	80 ml	100 ml
Urea(g)	21	25.2	33.6	42
40%acrylamide : Bis19:1(ml)	7.5	9	12	15
10xTBE (ml)	5	6	8	10
H ₂ O(ml)	21	26	35	43
10%Ammonium persulfate (μ l)	330	396	528	660
TEMED(μ l)	29	34.8	46.4	58

ขั้นตอนที่2 ผสม 1X loading denature buffer 5 ไมโครลิตรลงใน PCR Product 10 ไมโครลิตร จากนั้นแยกสายดีเอ็นเอ ออกจากกันด้วยอุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่ใน ice box เพื่อป้องกันสายดีเอ็นเอกลับมาเข้าคู่กันอีกครั้ง

ขั้นตอนที่3 run gel บน 6% denaturing polyacrylamide gel

ขั้นตอนที่4 วิเคราะห์ผล Linkage analysis โดยใช้ LINKAGE program Version 5.1 ⁽⁴⁸⁾

3.3.4 Primer สำหรับ microsatellite

Polymorphic marker สำหรับ microsatellite มีทั้งหมด 6 marker ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

- Polymorphic marker สำหรับยีน SCN5A

- 1) *D3S1298* : ระยะห่างระหว่าง marker นี้กับยีน SCN5A เท่ากับ 1.767 เมกะเบส มี heterozygosity index เท่ากับ 0.8787 ⁽⁴⁹⁾
- 2) *D3S3521* : ระยะห่างระหว่าง marker นี้กับยีน SCN5A เท่ากับ 0.773 เมกะเบส มี heterozygosity index เท่ากับ 0.8276 ⁽⁴⁹⁾

โดยระยะห่างระหว่าง 2 marker ประมาณ 1 เซนติเมตร

- 3) Marker ภายในยีน SCN5A เป็น (CA)_n repeat ภายในยีนที่บริเวณ intron 16 โดยมี heterozygosity index เท่ากับ 0.8276 ⁽³⁷⁾

- Polymorphic marker สำหรับยีน KCND2 เป็น (CA)_n repeat โดยออกแบบ primer คร่อมบริเวณ (CA)_n repeat ที่ตำแหน่งเบสที่ 7241 โดยเริ่มออกแบบ primer ตั้งแต่

ตำแหน่งเบสที่ 7088 คร่อมไปจนถึงตำแหน่งเบสที่ 7354 โดยใช้โปรแกรม oligo ในการออกแบบ ซึ่งได้ primer sense และ antisense ดังนี้

sense GAAGGAAGGGAAGAGGGGTG

antisense TTGGCAACTATAAGCAAGGCTG

โดย หลักการ ของการออกแบบ primer ใช้หลักการคือ ต้องเลือกให้ไม่เกิดการจับคู่เบสกันเองของ sense และ antisense primer เพราะจะทำให้ primer ไม่สามารถเกาะสาย ดีเอ็นเอ ที่เราต้องการได้

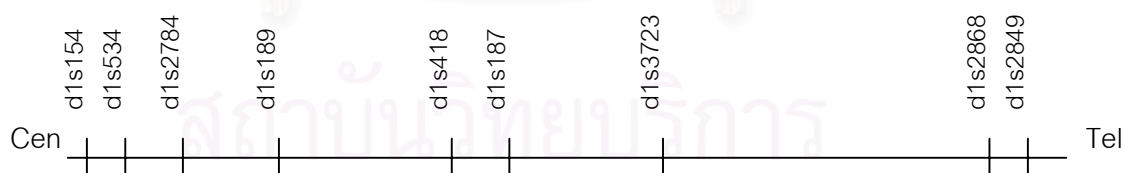
- Polymorphic marker สำหรับยีน KCND3

1) *D1S2696*

2) *D1S2746*

ระยะห่างระหว่าง marker ทั้งสองกับยีน *KCND3* ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัด เนื่องจากยีน *KCND3* เป็นยีนค่อนข้างใหม่ตรวจไม่พบใน Summary map แต่มีคณะวิจัยได้ทำการศึกษาถึงยีน *KCND3* ดังนี้

- Alex V. Postma และคณะ พบว่า *KCND3* อยู่ที่ตำแหน่ง 1P13.2⁽²¹⁾
- Hadas Lahat และคณะ ได้จัดทำแผนที่ของ marker ต่างๆที่อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ได้ผลดังนี้⁽⁵¹⁾



ภาพที่ 3.1 แสดงถึงตำแหน่งต่างๆของ marker ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 1

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ยีน *KCND3* อยู่ใกล้กับ *D1S187* ซึ่งเป็น polymorphic marker แต่ไม่สามารถนำมาทำ linkage analysis ในครั้งนี้ได้เนื่องจากไม่สามารถบอกgenetics distance ของ *D1S187* กับ อีก *D1S2746* และ *D1S2696* ได้ จึงไม่สามารถวิเคราะห์ค่า lod score ได้

จากเว็บไซต์ต่างๆต่อไปนี้

- www.cedar.genetics.soton.ac.uk ⁽⁴⁹⁾ ซึ่งเป็น summary map พบว่า D1S187 อยู่ตรงกลางระหว่าง D1S2696 และ D1S2746 ดังนั้น *KCND3* จึงน่าจะอยู่ระหว่าง D1S2696 และ D1S2746 ด้วย
- www.gdb.org บอกถึงค่าของ heterozygosity ⁽⁵²⁾ heterozygosity index ของ D1S2696 เท่ากับ 0.88 heterozygosity index ของ D1S2746 เท่ากับ 0.79 heterozygosity index ของ D1S187 เท่ากับ 0.71
- www.genome.wi.mit.edu ⁽⁵⁰⁾ พบว่า D1S2696 อยู่ห่างจาก D1S2746 เป็นระยะทาง 6 เซนติเมตร และ พบว่า D1S2746 อยู่ติดกับ D1S418 (ทั้ง 2 marker อยู่ที่ตำแหน่ง 152 เซนติเมตรเหมือนกัน) แต่ไม่บอกตำแหน่งของ D1S187 แต่จากแผนที่ของ Hadas Lahat และคณะ จะเห็นว่า D1S187 อยู่ใกล้กับ D1S418 (แต่ไม่ทราบระยะห่างที่แน่นอน) ดังนั้น D1S2746 จึงน่าจะอยู่ใกล้กับ D1S187 ด้วย และจากการที่พบว่า ยีน *KCND3* อยู่ใกล้กับ D1S187 ทำให้พอจะสรุปได้ว่ายีน *KCND3* ใกล้กับ D1S2746 เช่นกัน ซึ่งปัญหาต่อมาก็คือยีน *KCND3* นั้น ที่พบว่าอยู่ใกล้กับ D1S187 จะอยู่ห่างจาก D1S187 ไปทาง cen หรือ ทาง tel และ ซึ่งจากการพิจารณาจากแผนที่ของ Hadas แล้ว ยีน *KCND3* น่าจะอยู่ทาง tel ของ D1S187 และจาก www.gdb.org ⁽⁵²⁾ พบว่า D1S2746 และ D1S187 อยู่บน 1p13.2 เช่นเดียวกับยีน *KCND3* ดังนั้น ยีน *KCND3* จึงน่าจะอยู่ใกล้กับ D1S2746 ด้วยเช่นกัน แต่ไม่สามารถบอกตำแหน่งที่แน่ชัดของยีน *KCND3* ว่าจะอยู่ทาง cen หรือ tel ของ d1s2746 ดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 แสดงถึงตำแหน่งของ marker ต่างๆบนโครโมโซมที่ 1 ที่ใกล้เคียงกับยีน *KCND3* และแสดงถึงบริเวณที่น่าจะเป็นไปได้ของยีน *KCND3* (ลูกศรที่อยู่ระหว่าง D1S2746)

จากข้อมูลข้างต้นจึงเลือก *D1S2696* และ *D1S2746* เป็น marker สำหรับยีน *KCND3*

3.3.5 การหาตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธี *sequence analysis* ของยีน *SCN5A*

ตำแหน่งที่หาการกลายพันธุ์ คือที่บริเวณ exon5 , exon12(1) , exon12(2), exon17(1), exon17(2), exon18 , exon23, exon28(1), exon28(2) และ exon28(3) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.3.5.1 การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี *Polymerase Chain Reaction (PCR)* ในบริเวณ exon ต่างๆคือ

exon5 มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 50 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา *polymerase Chain Reaction (PCR)* ประกอบด้วย

	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา
10x PCR buffer with MgCl ₂	1x	5 μl
10mM dNTP	0.4 mM	2 μl
52.1 μM forward-primer	0.2 μM	0.2 μl
50.1 μM reverse-primer	0.2 μM	0.2 μl
Tag DNA polymerase (2U/μl)	0.16U/100 μl	0.4 μl
DNA template (50ng/μl)	-	4 μl
เติมน้ำกลั่นจนครบ	-	50 μl

ขั้นตอนที่2 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้สารที่อยู่บนฝาหรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Perkin-Elmer/genome PCR system 2400 โดยใช้สภาวะต่อไปนี้

- Initiation 95 °C 5 นาที
- 30 PCR cycle of : Denaturation 94 °C 30 วินาที
- Annealing 61 °C 30 วินาที
- Extension 72 °C 30 วินาที
- Final extension 72 °C 7 นาที
- Exon12(1) มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่1 50 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย

	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา
10x PCR buffer with MgCl ₂	1x	5 μl
10mM dNTP	0.4 mM	2 μl
42.4 μM forward-primer	0.08 μM	0.1 μl
49.8 μM reverse-primer	0.1 μM	0.1 μl
Tag DNA polymerase (2U/μl)	0.16U/100 μl	0.4 μl
DNA template (50ng/μl)	-	4 μl
เติมน้ำกลั่นจนครบ	-	50 μl

ขั้นตอนที่2 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้สารที่อยู่บนฝาหรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Perkin-Elmer/genome PCR system 2400 โดยใช้สภาวะต่อไปนี้

● Initiation	95 °C	5	นาที
● 30 PCR cycle of :			
Denaturation	94 °C	30	วินาที
Annealing	54 °C	30	วินาที
Extension	72 °C	30	วินาที
● Final extension	72 °C	7	นาที

Exon12(2) มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่1 50 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย

	ความเข้มข้นใน ปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา
10x PCR buffer with MgCl ₂	1x	5 µ l
10mM dNTP	0.4 mM	2 µ l
42.5 µM forward-primer	0.09 µM	0.1 µ l
38.8 µM reverse-primer	0.08 µM	0.1 µ l
Tag DNA polymerase (2U/µ l)	0.16U/100 µ l	0.4 µ l
DNA template (50ng/µ l)	-	5 µ l

เติมน้ำกลั่นจนครบ

-

50 μ l

ขั้นตอนที่2 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง(centrifuge)เพื่อให้สารที่อยู่บนฝาหรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Perkin-Elmer/genome PCR system 2400 โดยใช้สภาวะต่อไปนี้

- | | | | |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------|
| ● Initiation | 95 $^{\circ}$ C | 5 | นาที |
| ● 30 PCR cycle of : | Denaturation | 94 $^{\circ}$ C | 30 วินาที |
| | Annealing | 53 $^{\circ}$ C | 30 วินาที |
| | Extension | 72 $^{\circ}$ C | 1 นาที |
| ● Final extension | 72 $^{\circ}$ C | 7 | นาที |

Exon17(1) มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่1 50 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย

	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา
10x PCR buffer with MgCl ₂	1x	5 μ l
10mM dNTP	0.2 mM	1 μ l
39.5 μ M forward-primer	0.08 μ M	0.1 μ l
46.5 μ M reverse-primer	0.09 μ M	0.1 μ l
Tag DNA polymerase (2U/ μ l)	0.16U/100 μ l	0.4 μ l
DNA template (50ng/ μ l)	-	3 μ l

เติมน้ำกลั่นจนครบ

-

50 μ l

ขั้นตอนที่2 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้สารที่อยู่บนฝาหรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Perkin-Elmer/genome PCR system 2400 โดยใช้สภาวะต่อไปนี้

- | | | | |
|---------------------|-------|----|--------|
| ● Initiation | 95 °C | 5 | นาที |
| ● 30 PCR cycle of : | | | |
| Denaturation | 94 °C | 30 | วินาที |
| Annealing | 65 °C | 30 | วินาที |
| Extension | 72 °C | 1 | นาที |
| ● Final extension | 72 °C | 7 | นาที |

Exon17(2) มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่1 50 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย

	ความเข้มข้นใน ปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา
10x PCR buffer with MgCl ₂	1x	5 μ l
10mM dNTP	0.4 mM	2 μ l
42.7 μ M forward-primer	0.09 μ M	0.1 μ l
45.2 μ M reverse-primer	0.09 μ M	0.1 μ l
Tag DNA polymerase (2U/ μ l)	0.16U/100 μ l	0.4 μ l

DNA template (50ng/ μ l)	-	7 μ l
เติมน้ำกลั่นจนครบ	-	50 μ l

ขั้นตอนที่2 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้สารที่อยู่บนฝาหรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Perkin-Elmer/genome PCR system 2400 โดยใช้สภาวะต่อไปนี้

● Initiation	95 °C	5	นาที
● 30 PCR cycle of :			
Denaturation	94 °C	30	วินาที
Annealing	50 °C	30	วินาที
Extension	72 °C	30	วินาที
● Final extension	72 °C	7	นาที

Exon18 มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่1 50 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย

ความเข้มข้นใน
ปฏิกิริยา ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา

10x PCR buffer with MgCl ₂	1x	5 μ l
10mM dNTP	0.4 mM	2 μ l
34.5 μ M forward-primer	0.13 μ M	0.2 μ l
37.6 μ M reverse-primer	0.15 μ M	0.2 μ l
Tag DNA polymerase (2U/ μ l)	0.16U/100 μ l	0.4 μ l

DNA template (50ng/ μ l)	-	3 μ l
------------------------------	---	-----------

เติมน้ำกลั่นจนครบ	-	50 μ l
-------------------	---	------------

ขั้นตอนที่2 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้สารที่อยู่บนฝาหรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Perkin-Elmer/genome PCR system 2400 โดยใช้สภาวะต่อไปนี้

- | | | | |
|---------------------|-------|----|--------|
| ● Initiation | 95 °C | 5 | นาที |
| ● 30 PCR cycle of : | | | |
| Denaturation | 94 °C | 30 | วินาที |
| Annealing | 53 °C | 30 | วินาที |
| Extension | 72 °C | 30 | วินาที |
| ● Final extension | 72 °C | 7 | นาที |

Exon23 มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่1 50 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย

ความเข้มข้นใน ปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา
------------------------------------	---------------------------------

10x PCR buffer with MgCl ₂	1x	5 μ l
---------------------------------------	----	-----------

10mM dNTP	0.6 mM	3 μ l
-----------	--------	-----------

51.3 μ M forward-primer	0.2 μ M	0.2 μ l
-----------------------------	-------------	-------------

46.9 μ M reverse-primer	0.19 μ M	0.2 μ l
-----------------------------	--------------	-------------

Tag DNA polymerase (2U/ μ l)	0.16U/100 μ l	0.4 μ l
DNA template (50ng/ μ l)	-	2 μ l
เติมน้ำกลั่นจนครบ	-	50 μ l

ขั้นตอนที่2 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้สารที่อยู่บนฝาหรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Perkin-Elmer/genome PCR system 2400 โดยใช้สภาวะต่อไปนี้

● Initiation	95 $^{\circ}$ C	5	นาที
● 30 PCR cycle of :	Denaturation	94 $^{\circ}$ C	30 วินาที
	Annealing	59 $^{\circ}$ C	30 วินาที
	Extension	72 $^{\circ}$ C	30 วินาที
● Final extension	72 $^{\circ}$ C	7	นาที

Exon28(1) มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่1 50 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย

ความเข้มข้นใน ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา
ปฏิกิริยา

10x PCR buffer with Mgcl ₂	1x	5 μ l
10mM dNTP	0.4 mM	2 μ l
57.4 μ M forward-primer	0.11 μ M	0.1 μ l
49.9 μ M reverse-primer	0.1 μ M	0.1 μ l

Tag DNA polymerase (2U/ μ l)	0.16U/100 μ l	0.4 μ l
DNA template (50ng/ μ l)	-	2 μ l
เติมน้ำกลั่นจนครบ	-	50 μ l

ขั้นตอนที่2 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้สารที่อยู่บนฝาหรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Perkin-Elmer/genome PCR system 2400 โดยใช้สภาวะต่อไปนี้

● Initiation	94 $^{\circ}$ C	1	นาที
	55 $^{\circ}$ C	1	นาที
	72 $^{\circ}$ C	1	นาที
● 30 PCR cycle of :	Denaturation	94 $^{\circ}$ C	30 วินาที
	Annealing	67 $^{\circ}$ C	30 วินาที
	Extension	72 $^{\circ}$ C	30 วินาที
● Final extension	72 $^{\circ}$ C	7	นาที

Exon28(2) มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่1 50 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย

	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา
10x PCR buffer with MgCl ₂	1x	5 μ l
10mM dNTP	0.4 mM	2 μ l

46.1 μM forward-primer	0.09 μM	0.1 μl
49.2 μM reverse-primer	0.1 μM	0.1 μl
Tag DNA polymerase (2U/ μl)	0.16U/100 μl	0.4 μl
DNA template (50ng/ μl)	-	2 μl
เติมน้ำกลั่นจนครบ	-	50 μl

ขั้นตอนที่2 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้สารที่อยู่บนฝาหรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Perkin-Elmer/genome PCR system 2400 โดยใช้สภาวะต่อไปนี้

● Initiation		94 $^{\circ}\text{C}$	1	นาที
		55 $^{\circ}\text{C}$	1	นาที
		72 $^{\circ}\text{C}$	1	นาที
● 30 PCR cycle of :	Denaturation	94 $^{\circ}\text{C}$	30	วินาที
	Annealing	67 $^{\circ}\text{C}$	30	วินาที
	Extension	72 $^{\circ}\text{C}$	30	วินาที
● Final extension		72 $^{\circ}\text{C}$	7	นาที

Exon28(3) มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่1 50 ไมโครลิตรของปฏิกิริยา polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย

ความเข้มข้นใน ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา
ปฏิกิริยา

10x PCR buffer with MgCl_2	1x	5 μl
-------------------------------------	----	-----------------

10mM dNTP	0.4 mM	2 μ l
56.9 μ M forward-primer	0.113 μ M	0.1 μ l
49.4 μ M reverse-primer	0.098 μ M	0.1 μ l
Tag DNA polymerase (2U/ μ l)	0.16U/100 μ l	0.4 μ l
DNA template (50ng/ μ l)	-	2 μ l
	-	50 μ l
เติมน้ำกลั่นจนครบ	-	50 μ l

ขั้นตอนที่2 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้สารที่อยู่บนฝาหรือข้างหลอดตกลงมา

ขั้นตอนที่3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Perkin-Elmer/genome PCR system 2400 โดยใช้สภาวะต่อไปนี้

- Initiation

94 $^{\circ}$ C	1	นาที
55 $^{\circ}$ C	1	นาที
72 $^{\circ}$ C	1	นาที
- 30 PCR cycle of :

Denaturation	94 $^{\circ}$ C	30	วินาที
Annealing	67 $^{\circ}$ C	30	วินาที
Extension	72 $^{\circ}$ C	30	วินาที
- Final extension

	72 $^{\circ}$ C	7	นาที
--	-----------------	---	------

3.3.5.2 Run 2% agarose gel electrophoresis มีขั้นตอนดังนี้

- 1) ผสม 6X gel loading buffer กับ PCR product เข้าด้วยกัน
- 2) run gel บน 2% agarose gel
- 3) ดูผลของ gel

3.3.5.3 DNA sequencing มีขั้นตอนต่างๆดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1 Cycle sequencing

ส่วนผสมของขั้นตอนมีดังต่อไปนี้

template	6	μl
Terminator Ready Reaction Mix (Dye)	8	μl
Primer 3.2 Pmole	1	μl
น้ำ	5	μl
ปริมาตรรวม	20	μl

นำส่วนผสมทั้งหมดนี้เข้าเครื่อง PCR โดยใช้ condition ดังต่อไปนี้

อุณหภูมิ	เวลา
96 °C	10 วินาที
50 °C	5 วินาที
60 °C	4 นาที

ทำทั้งหมด 25 รอบ

ขั้นที่ 2 Purifying Extension Products เป็นขั้นตอนเพื่อล้างเอา Terminator dye

ส่วนเกินออกโดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

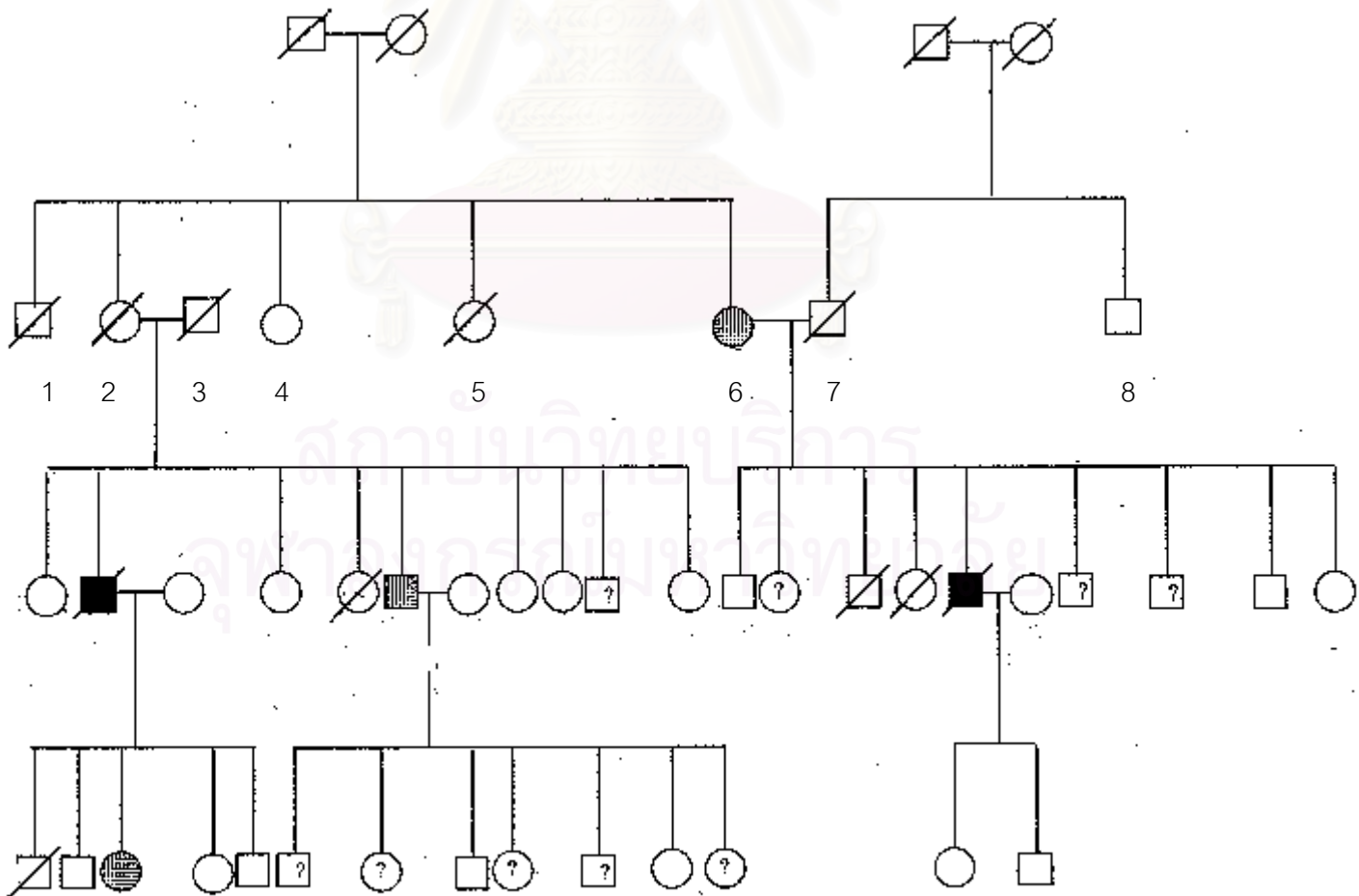
- 1) นำดีเอ็นเอ 20 ไมโครลิตร ที่ติด Terminator dye จากขั้นตอน Cycle sequencing มาใส่ลงใน 75% Isopropanol 80 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
- 2) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
- 3) centrifuge เป็นเวลา 20 นาที จะได้ตะกอนสีขาวของดีเอ็นเอ
- 4) ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% Isopropanol 250 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
- 5) centrifuge เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนที่ล้างเสร็จแล้วมาทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง vacuum

ขั้นที่ 3 preparing and loading the samples

สำหรับเครื่อง ABI Prism 310 มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

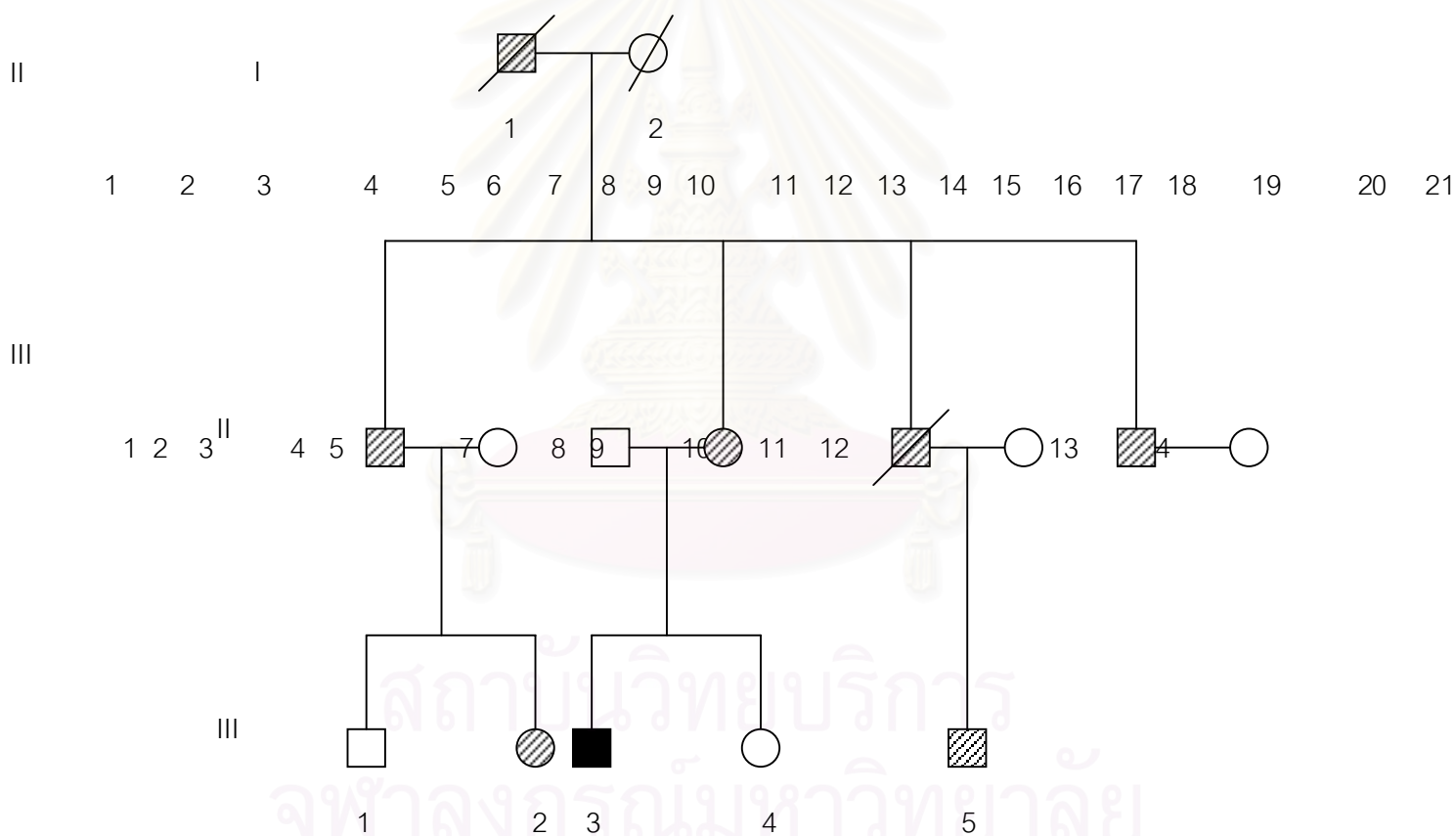
- 1) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 25 ไมโครลิตรของ Template suppression Reagent (TSR)

- 2) Vortex และ Spin samples
- 3) จากนั้นแยกสายดีเอ็นเอออกจากกันที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปแช่ใน ice box เพื่อป้องกันสายดีเอ็นเอกลับมาเข้าคู่กันอีกครั้ง
- 4) เปลี่ยน หลอด ใส samples เพื่อเตรียมสำหรับเข้าเครื่อง sequence
- 5) วิเคราะห์ผลโดยดูผลการเปลี่ยนลำดับเบส

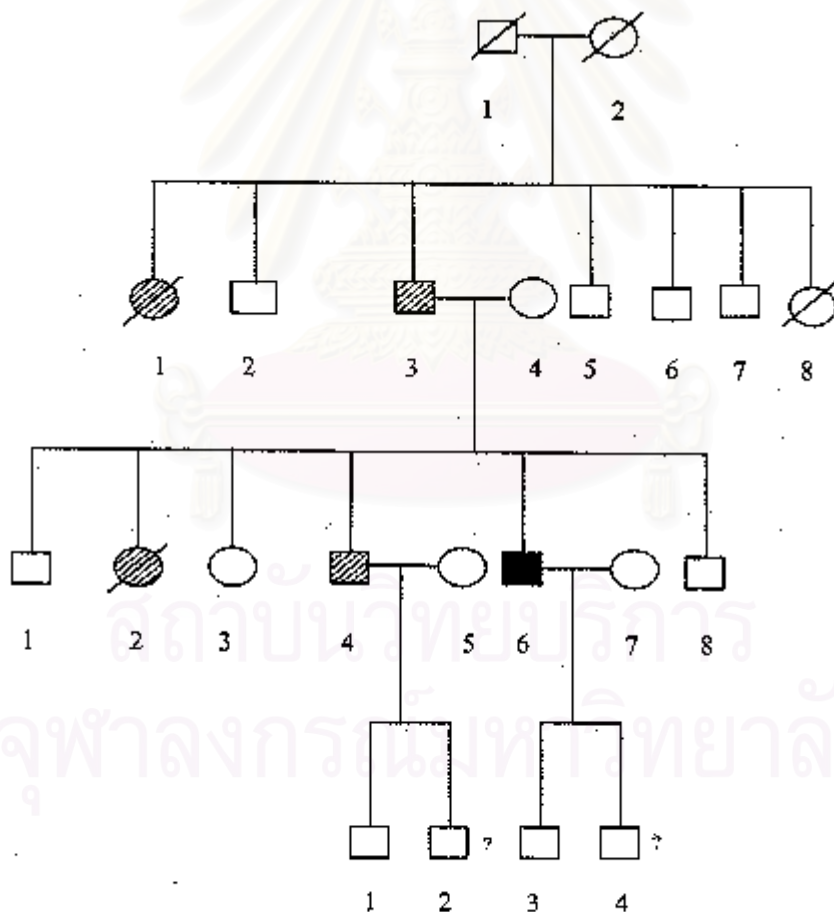


ภาพที่ 3.3 แสดงถึง pedigree ของครอบครัว KEK

- คือชายที่ปกติ ● คือหญิงที่ปกติ
- คือชายที่แสดงอาการของไหลตาย ● คือหญิงที่แสดงอาการของไหลตาย
- ▨ คือชายที่มีคลื่นหัวใจที่ผิดปกติแบบ Brugada syndrome ◐ คือหญิงที่มีคลื่นหัวใจที่ผิดปกติแบบ Brugada syndrome



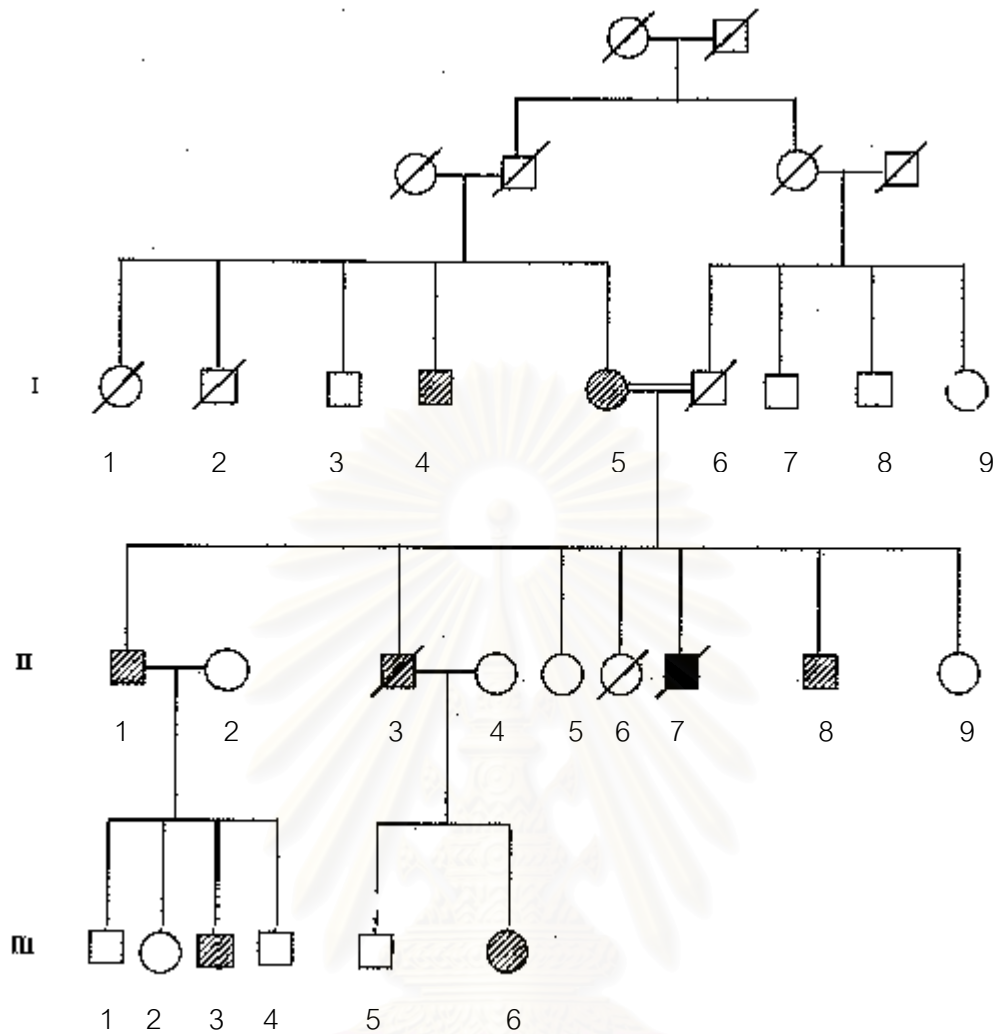
- | | | | |
|---|---|---|--|
| □ | คือชายที่ปกติ | ● | คือหญิงที่ปกติ |
| ■ | คือชายที่แสดงอาการของไหลตาย | ● | คือหญิงที่แสดงอาการของไหลตาย |
| ▨ | คือชายที่มีคลื่นหัวใจที่ผิดปกติแบบ Brugada syndrome | ◐ | คือหญิงที่มีคลื่นหัวใจที่ผิดปกติแบบ Brugada syndrome |



- | | | | |
|---|---|---|--|
|  | คือชายที่ปกติ |  | คือหญิงที่ปกติ |
|  | คือชายที่แสดง
อาการของโหลตาย |  | คือหญิงที่แสดง
อาการของโหลตาย |
|  | คือชายที่มีคลื่นหัวใจที่ผิดปกติแบบ Brugada syndrome |  | คือหญิงที่มีคลื่นหัวใจที่ผิดปกติแบบ Brugada syndrome |



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3.6 แสดงถึง pedigree ของครอบครัว Iq21

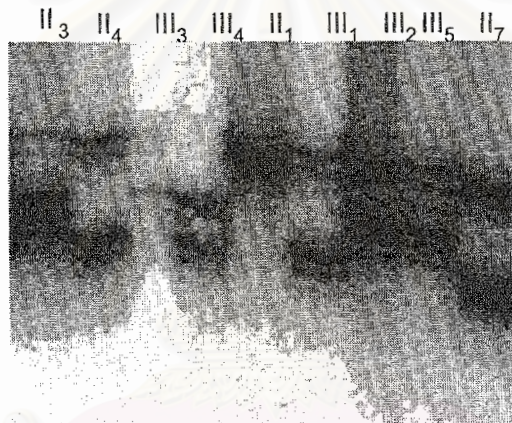
- | | | | |
|---|---|---|--|
|  | คือชายที่ปกติ |  | คือหญิงที่ปกติ |
|  | คือชายที่แสดง
อาการของไหลตาย |  | คือหญิงที่แสดง
อาการของไหลตาย |
|  | คือชายที่มีคลื่นหัวใจที่ผิดปกติแบบ Brugada syndrome |  | คือหญิงที่มีคลื่นหัวใจที่ผิดปกติแบบ Brugada syndrome |

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

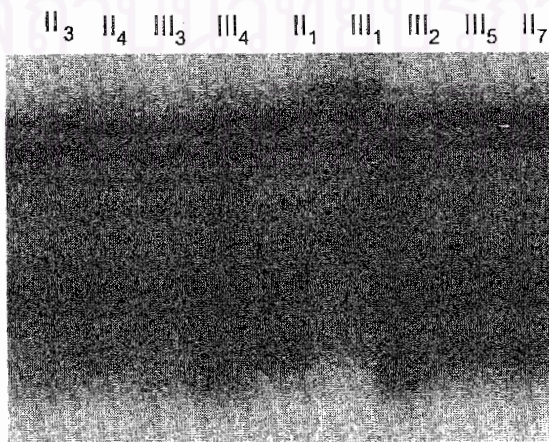
4.1 การตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน SCN5A

การตรวจหาการกลายพันธุ์ในครอบครัว SSR

จาก linkage analysis ของ markers ที่ใกล้กับยีน SCN5A ในครอบครัว SSR ผลที่ได้คือ ใน marker D3S3521 และ intragenic ไม่เกิด crossing over ดังภาพที่ 4.1 และ 4.2 ประกอบกับตรงกับใน Brugada Syndrome ที่ว่ายีนที่ทำให้เกิดโรคนี้คือ SCN5A ในขั้นตอนนี้จึงได้ทำการตรวจหาการ กลายพันธุ์ในผู้ที่รอดชีวิตจากไหลตายตามที่ได้เคยมีรายงานไว้ใน Brugada Syndrome



ภาพที่ 4.1 แสดงถึงผลเฉลของ marker d3s3521 ในครอบครัว

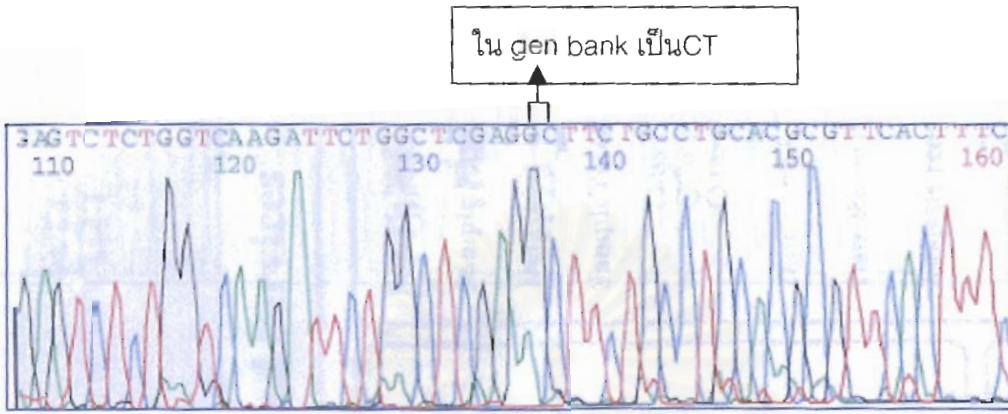


ภาพที่ 4.2 แสดงถึงผลเฉลของ marker ภายในยีน SCN5A (intragenic) ในครอบครัว SSR

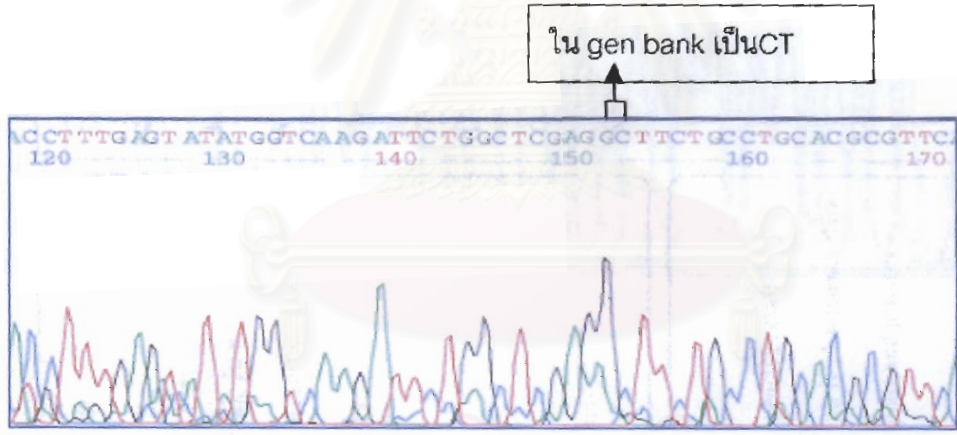
จากการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A ในผู้รอดชีวิตจากโหลตายในครอบครัว SSR บริเวณ exon 5 , 12 , 17, 18 23, และ 28 ตามที่ได้เคยมีรายงานไว้ในโรค Brugada syndrome ผลปรากฏว่าไม่พบการกลายพันธุ์ในบริเวณดังกล่าว พบเพียงแต่ polymorphism ในบริเวณต่างๆดังนี้

exon5 พบว่ามีการเปลี่ยน amino acid จากAlanine เป็น Glycine ที่ตำแหน่ง codon ที่ 180 (Ala180Gly) ซึ่ง amino acid ทั้ง 2 ตัวนี้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือเป็น amino acid ที่มีหมู่ R ที่ไม่มีขั้วเหมือนกัน และต่างจาก DNA sequence ใน genbank ที่รายงานไว้ทั้ง 2 alleles และพบในคนปกติด้วย ดังนั้นจึงน่าจะเป็นเพียง Polymorphism ดังรูป 4.3 และ 4.4

exon12 พบว่ามีการเปลี่ยน amino acid จาก Glycine เป็น Arginine ที่ตำแหน่ง codon ที่ 552 ซึ่ง amino acid ทั้ง 2 ตัวนี้อยู่คนละกลุ่ม โดยที่ Glycine อยู่ในกลุ่มที่หมู่ R ไม่มีขั้ว Arginine อยู่ในกลุ่มที่หมู่ R มีขั้วที่แสดงประจุ อาจจะทำให้มีฟังก์ชันที่เปลี่ยนไปได้ ดังนั้นจึงตรวจหาการกลายพันธุ์ในบริเวณนี้ในคนปกติอีก 1 คน ผลปรากฏว่าก็ยังคงเป็น Gly 552 Arg เช่นเดิม ดังรูป 4.5 และ 4.6



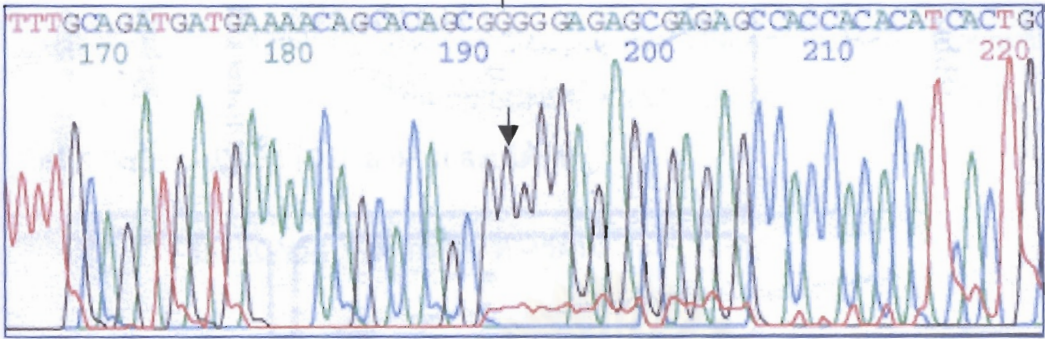
รูปที่ 4.3 แสดงถึงลำดับเบสของผู้รอดชีวิตจากโหลตายที่บริเวณ exon 5



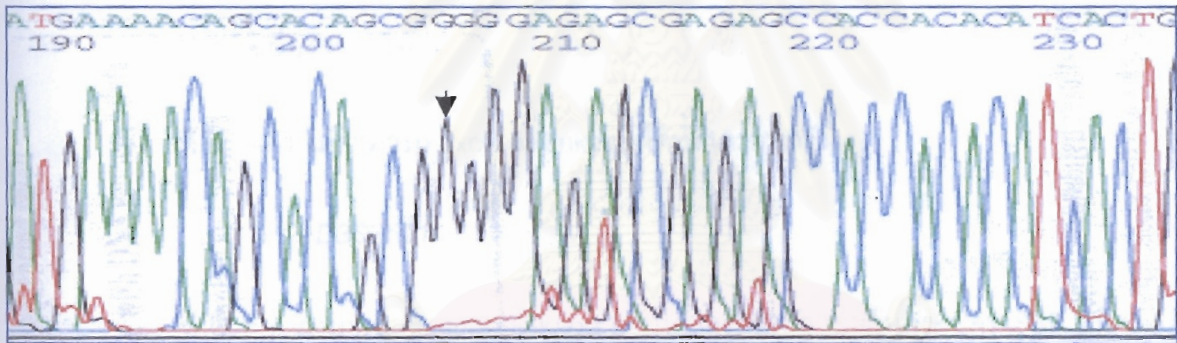
รูปที่ 4.4 แสดงถึงลำดับเบสของคนปกติที่บริเวณ exon 5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใน genbank เป็นC



รูปที่ 4.5 แสดงลำดับเบสของผู้รอดชีวิตจากโหลตายในครอบครัว SSR ที่บริเวณ exon12



รูปที่ 4.6 แสดงลำดับเบสของคนปกติที่บริเวณ exon12

ศูนย์บริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ผลการวิเคราะห์ Linkage Analysis (two point lod score)

จากการทำ microsatellite และวิเคราะห์ผลโดยใช้ MINK Program (version 5.1) ใน marker ต่างๆของทั้ง 3 ยีน คือ SCN5A, KCND2 ,KCND3 ใน 4ครอบครัว คือ ครอบครัว KEK SSR , LAP และ IQ2I สามารถสรุปได้ว่า

4.2.1 ยีน SCN5A ซึ่งมี marker ต่างๆดังนี้

- D3S1298

- ที่ $\theta = 0$ และ 0.01 สามารถ exclude linkage ออกได้ทั้ง 4 ครอบครัว เนื่องจากมีค่า lod score น้อยกว่า -2
- ที่ $\theta = 0.02, 0.03, 0.04, 0.05$ สามารถ exclude linkage ออกได้ 2 ครอบครัว คือ ครอบครัว KEK และ IQ2I ส่วนอีก 2 ครอบครัวคือ LAP และ SSR ไม่สามารถ exclude linkage ออกได้เนื่องจาก มีค่า lod score อยู่ในช่วง -2 กับ 3
- ที่ $\theta = 0.1$ ไม่สามารถ exclude linkage ได้ทั้ง 4 ครอบครัว

- D3S3521

- ที่ $\theta = 0$ สามารถ exclude linkage ออกได้ 3 ครอบครัว ยกเว้นครอบครัว SSR ที่มีค่า lod score 0.763
- ที่ $\theta = 0.01$ สามารถ exclude linkage ได้ 1 ครอบครัว คือ ครอบครัว LAP ส่วนอีก 3 ครอบครัวไม่สามารถ exclude linkage ได้
- ที่ $\theta = 0.02$ สามารถ exclude linkage ในครอบครัว LAP ได้
- ที่ $\theta = 0.03, 0.04, 0.05, 0.1$ ไม่สามารถ exclude linkage ได้ทั้ง 4 ครอบครัว

เนื่องจากตามสมมติฐาน เชื่อว่าโรคไหลตายน่าที่จะเกิดมาจากการกลายพันธุ์ของยีน เพียง 1 ยีนเท่านั้น จึงสามารถรวมค่า lod score เข้าด้วยกันได้ ผลที่ได้สามารถสรุปได้ดังนี้

- d3s1298 สามารถ exclude linkage ได้ที่ $\theta = 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05$ และ 0.1
- D3S3521 สามารถ exclude linkage ได้ที่ $\theta = 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04$ และ 0.05

4.2.2 ยีน KCND2

สำหรับยีน KCND2 สามารถหาค่า lod score ได้เพียง 2ครอบครัวเท่านั้น เนื่องจากในครอบครัว LAP และ IQ21 นั้น ไม่สามารถหาค่า LOD SCORE ได้เนื่องจากผลของ linkage analysis เป็น non - informative ดังภาพที่ 4.5

ภาพที่ 4.7 แสดงถึงผลเฉลยของ marker KCND2 ในครอบครัว LAP และ IQ21

ดังนั้นจึงสามารถหาค่า lod score ได้ใน 2ครอบครัวคือ SSR และ KEK ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

- ในครอบครัว KEK สามารถ exclude linkage ได้ตั้งแต่ $\theta = 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04$
- ในครอบครัว SSR สามารถ exclude linkage ได้ที่ $\theta = 0$ เท่านั้น

เมื่อนำค่า lod score มารวมกัน จะสามารถ exclude linkage ได้ตั้งแต่ $\theta = 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05$

4.2.3 ยีน KCND3

- D1S2696

- ที่ $\theta = 0$ และ 0.01 สามารถ exclude linkage ออกได้ 3 ครอบครัวยกเว้นครอบครัว SSR ที่มีค่า lod score อยู่ระหว่าง -2 กับ 3
- ที่ $\theta = 0.02, 0.03, 0.04, 0.05$ และ 0.1 มีเพียงครอบครัวเดียวเท่านั้นที่สามารถ exclude linkage ออกได้ คือ ครอบครัว Iq2I

- D1S2746

- ที่ $\theta = 0$ สามารถ exclude linkage ออกได้ 2 ครอบครัวยกเว้นครอบครัว SSR ที่มีค่า lod score 1.184 และครอบครัว LAP ที่มีค่า lod score 0.602
- ที่ $\theta = 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05$ สามารถ exclude linkage ออกได้เพียง 1 ครอบครัวยกเว้นครอบครัว KEK
- ที่ $\theta = 0.1$ ไม่สามารถ exclude linkage ได้เลยทั้ง 4 ครอบครัวยกเว้นครอบครัว KEK

เมื่อนำค่า lod score มารวมกันจะได้ผลดังนี้

- D1S2696 สามารถ exclude linkage ได้ที่ $\theta = 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1$
- D1S2746 สามารถ exclude linkage ได้ที่ $\theta = 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงถึงค่า lod score ของยีน SCN5A

ตารางที่ 1.1 แสดงถึงค่า lod score ของ D3S1298

ครอบครัว \ θ	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1
KEK	$-\alpha$	-4.26	-3.32	-2.77	-2.38	-2.07	-1.1
SSR	$-\alpha$	-4.10	-3.17	-2.62	-2.24	-1.94	-1.07
LAP	$-\alpha$	-2.26	-1.65	-1.32	-1.10	-0.93	-0.46
IQ2I	$-\alpha$	-3.43	-2.87	-2.57	-2.36	-2.21	-1.72

ตารางที่ 1.2 แสดงถึงค่า lod score ของ D3S3521

ครอบครัว \ θ	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1
KEK	$-\alpha$	-1.62	-1.08	-0.78	-0.57	-0.43	-0.06
SSR	0.76	0.74	0.72	0.69	0.68	0.66	0.61
LAP	$-\alpha$	-2.81	-2.22	-1.88	-1.64	-1.45	-0.89
IQ2I	$-\alpha$	-1.67	-1.38	-1.22	-1.11	-1.02	-0.75

ตารางที่ 1.3 แสดงถึงค่า lod score ของ intragenic ของยีน SCN5A ในครอบครัว SSR

θ marker	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1
intragene	0.213	0.206	0.200	0.194	0.187	0.181	0.150

ตารางที่ 1.4 แสดงถึงค่า lod score รวมของยีน SCN5A

θ marker	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1
D3D1298	$-\alpha$	-12.15	-9.62	-8.16	-7.13	-6.36	-4.03
D3S3521	$-\alpha$	-6.11	-4.69	-3.88	-3.32	-2.90	-1.17

ตารางที่ 2 แสดงถึงค่าของ lod score ของยีน KCND2

ตารางที่ 2.1 แสดงถึงค่า lod score ของ marker ภายในยีน KCND2

θ ครอบครัว	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1
KEK	$-\alpha$	-4.10	-3.17	-2.62	-2.24	-1.94	-1.07
SSR	$-\alpha$	-1.41	-1.12	-0.95	-0.83	-0.75	-0.48

ตารางที่ 2.2 แสดงถึงค่า lod score รวมของยีน *KCND2*

θ	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1
intragene	$-\alpha$	-5.50	-4.29	-3.58	-3.07	-2.69	-1.55

ตารางที่ 3 แสดงถึงค่า lod score ของยีน *KCND3*

ตารางที่ 3.1 แสดงถึงค่า lod score ของ marker *D1S2696*

θ ครอบครัว	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1
KEK	$-\alpha$	-2.64	-1.18	-1.33	-1.01	-0.78	-0.15
SSR	-1.13	-1.11	-1.08	-1.04	-0.99	-0.93	-0.66
LAP	$-\alpha$	-2.51	-1.93	-1.59	-1.36	-1.19	-0.67
IQ2I	$-\alpha$	-3.12	-2.81	-2.63	-2.51	-2.41	-2.06

ตารางที่ 3.2 แสดงถึงค่า lod score ของ marker *D1S2746*

θ ครอบครัว	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1
KEK	$-\alpha$	-4.78	-3.86	-3.32	-2.93	-2.63	-1.68
SSR	1.18	1.16	1.13	1.04	1.08	1.05	0.91
LAP	0.6	0.59	0.58	0.56	0.55	0.54	0.47
IQ2I	$-\alpha$	-1.47	1.14	-0.95	-0.81	-0.7	-0.36

ตารางที่ 3.3 แสดงถึงค่า lod scoreรวมของยีน *KCND3*

marker \ θ	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1
<i>D1S2696</i>	$-\alpha$	-9.39	-7.63	-6.60	-5.87	-5.30	-3.55
<i>D1S2746</i>	$-\alpha$	-4.50	-3.30	-2.60	-2.36	-2.05	-0.67

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 การหาการกลายพันธุ์ของยีน SCN5A ในครอบครัว SSR

ตามที่มีรายงาน ถึงสาเหตุที่ทำให้เกิด Brugada Syndrome ว่าเกิดจากการกลายพันธุ์ในบริเวณ exon ที่ 5 ,12 ,17 ,18 ,23 และ 28 โดยเฉพาะบริเวณ codon ที่ 1620 ที่เปลี่ยนจาก threonine เป็น methionine ที่บริเวณ exon ที่ 28 นั้น เมื่อได้ทำการตรวจหาการกลายพันธุ์ของผู้รอดตายในครอบครัว SSR ซึ่งไม่มี crossing over ในการทำ linkage analysis แล้ว ผลปรากฏว่าไม่พบการกลายพันธุ์ในบริเวณดังกล่าว พบเพียงแต่ polymorphism ในบริเวณ exon 5 , 12 , และ 17 เท่านั้น ซึ่งความเป็นไปได้เป็นไปได้หลายกรณี เช่น

5.1.1 ยังตรวจหาการกลายพันธุ์ไม่ทั่วทั้งยีน

ถ้ายีน SCN5A เป็นยีนที่ทำให้เกิดโรคไหลตายจริง ก็อาจเป็นไปได้ว่า การกลายพันธุ์ในยีนนี้อาจจะเป็นที่บริเวณอื่นที่ไม่ใช่ทั้ง 6 exon นี้ อาจจะเป็นที่ exon 7 , 8 , 16 หรือ 28 ที่ยังไม่ได้ตรวจหา ก็เป็นไปได้ (เนื่องจาก exon 28 เป็น exon ที่มีขนาดใหญ่) หรืออาจจะเป็นการกลายพันธุ์ที่บริเวณอื่นนอกเหนือจากที่เคยมีรายงานไว้ใน Brugada Syndrome นั่นคือการกลายพันธุ์ของไหลตายในยีน SCN5A ไม่จำเป็นต้องเหมือนกับใน Brugada Syndrome เพราะถ้าจะพิจารณาการกลายพันธุ์ของ Brugada Syndrome จริงๆ แล้วบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์บ่อยที่สุดคือ T1620M ซึ่งน่าจะเจอในไหลตายเช่นเดียวกัน แต่กลับไม่เจอการเปลี่ยนแปลงเบสเลย แม้แต่การเป็น polymorphism แต่กลับเจอ polymorphism ใน exon 5 และ 12 ดังนี้

- Polymorphism บริเวณ exon 5_ amino acid ที่เปลี่ยนไปนั้นอยู่ในกลุ่มเดียวกันจึงไม่น่าทำให้การทำงานต่างไปจากเดิม อีกทั้งผล ของ sequence ที่ได้ก็เป็น homozygous ซึ่งถ้าเป็น mutation ควรจะได้เป็น heterozygous เพราะการถ่ายทอดในครอบครัว SSR นั้นเป็นแบบ autosomal dominant ซึ่งเมื่อตรวจในคนปกติก็ได้ผลแบบเดียวกัน

- polymorphism บริเวณ exon 12_ amino acid ที่เปลี่ยนไปนั้นอยู่คนละกลุ่ม คือจากกลุ่มที่ไม่มีซ้ำไปเป็นกลุ่มที่มีซ้ำน่าจะทำให้การทำงานเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม และผลของ sequence ที่ได้ก็เป็น homozygous แต่เนื่องจากการเปลี่ยนกลุ่มของ amino acid ที่เปลี่ยนกลุ่มอย่างชัดเจนนั้น จึงตรวจหาการกลายพันธุ์ในคนปกติที่มีภูมิคุ้มกันเดิมและอาศัยอยู่ใน

กรุงเทพ เป็นเพศหญิง อายุ25ปี แต่ก็ไม่พบความแตกต่างระหว่าง ผู้รอดชีวิตกับคนปกติ ทั้งนี้อาจจะอธิบายได้เป็น2กรณีดังนี้

กรณีที่1

ที่ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์นี้อาจจะไม่ได้ทำให้รูปร่างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป จนถึงขั้นให้การทำงานของโปรตีนเปลี่ยนไปจากเดิม หรือที่ตำแหน่งนี้อาจจะไม่ได้เป็นตำแหน่งที่สำคัญในการทำให้เกิดโหลตายก็เป็นได้ ดังนั้นในคนปกติที่เป็นคนไทยและผู้รอดชีวิตจากโหลตายจึงมีลำดับเบสที่เหมือนกันในบริเวณนี้ แต่มีลำดับเบสที่แตกต่างไปจากใน Genbank ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า polymorphism ที่เกิดขึ้นนี้เป็น polymorphism ระหว่างเชื้อชาติ

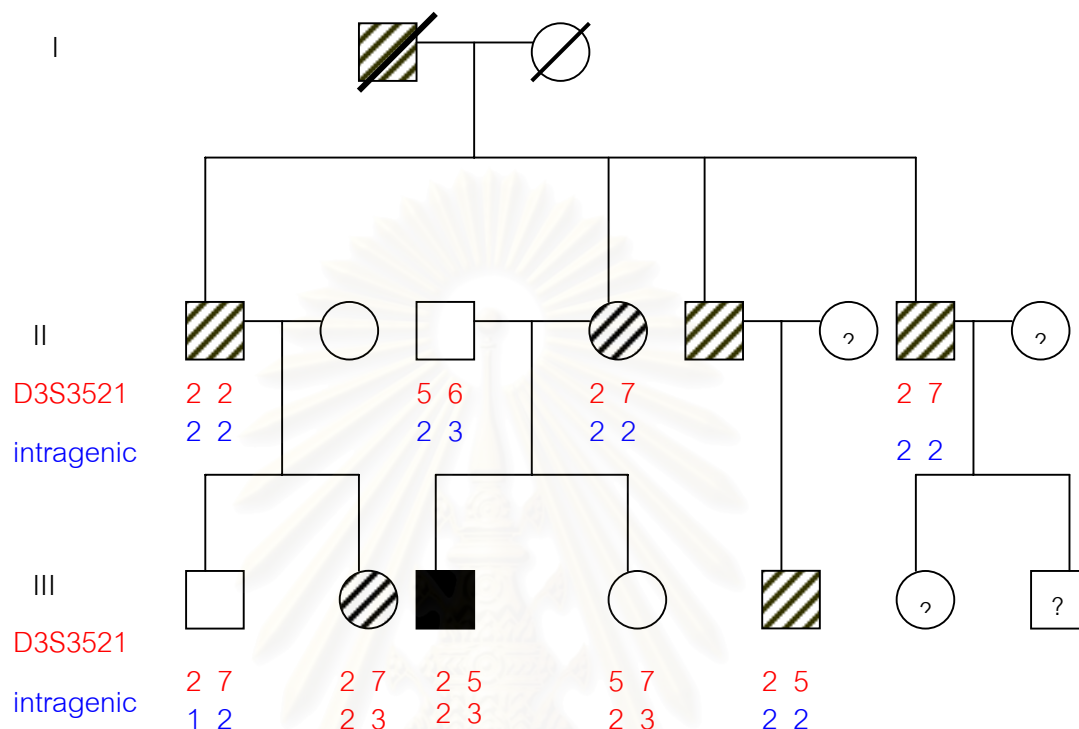
กรณีที่2

อาจเป็นไปได้ว่าลำดับเบสที่อยู่ในGenbank นั้นผิด นั่นคือจริงๆแล้วลำดับเบสที่ตำแหน่งที่1804 ควรจะต้องเป็น G (เหมือนกับในคนไทย) แต่ใน Genbank กลับเป็น C ทำให้เกิดการเข้าใจผิดได้ว่าเป็น polymorphism ซึ่งจากการตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ clone ทั้งหมดที่มีอยู่ใน genbank กับลำดับเบสที่ได้จากการทดลองนี้ ผลปรากฏว่า มีเพียงclone ที่ใช้เป็น control เท่านั้นที่มีลำดับเบสที่แตกต่างไปจากการทดลองนี้ ดังนั้นจึงน่าจะเป็นไปได้อย่างมากว่าลำดับเบสของ clone ที่ใช้เป็น control ผิด

เกิด non-informative ขึ้นใน marker D3S3521 และ intragenic

เนื่องจากเหตุผลที่น่าครอบครวั SSR มาตรวจหาการกลายพันธุ์ก็เพราะว่า ไม่มี crossing over เกิดขึ้นใน 2 marker นี้ แต่ถ้าจะพิจารณาจากภาพที่ 5.1 ให้ดีจะเห็นว่าใน marker d3s3521 ที่ III₁ ที่มี allele 2 อยู่ นั้น ไม่สามารถบอกได้ว่า allele 2 ไหนที่ถ่ายทอดลงมาให้ เนื่องจาก II₁ ที่เป็นบิดาและมีคลื่นไฟฟ้าแบบ Brugada นั้น มี allele 2 ทั้ง 2 allele ดังนั้น allele 2 ที่ถ่ายทอดจาก II₁ ลงมายัง III₁ นั้น อาจจะเป็น allele ที่ทำให้เกิดโรคหรือไม่เกิดโรคก็ได้ ถ้าเป็น allele ที่ทำให้เกิดโรคถ่ายทอดมาให้ ก็แสดงว่ามี crossing over เกิดขึ้น ใน marker d3s3521 ส่วนใน intragenic ก็เช่นเดียวกัน ยกตัวอย่างเช่นใน III₁ ที่มี allele 2 อยู่ นั้น ก็ไม่สามารถบอกได้เช่นเดียวกันว่า allele 2 ตัวไหนที่ถ่ายทอดลงมาให้จาก II₁ เนื่องจาก II₁ มี allele 2 ทั้ง 2 allele ถ้า II₁ ถ่ายทอด allele 2 ที่ทำให้เกิดโรคมาให้ III₁ ก็เกิด crossing over ขึ้นได้ นอกจากนี้ยังพิจารณาได้ใน III₃ ได้อีก ซึ่ง III₃ มี allele 2 ซึ่งได้จาก II₄ ที่มีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ Brugada โดยที่ไม่ทราบว่าจะ allele 2 ตัวไหนที่ถ่ายทอดลงมาให้ III₃ ถ้า allele 2 ตัวที่ถ่ายทอดลงมาไม่ได้เป็นตัวที่ทำให้เกิดโรค ก็

จะเกิด crossing over ขึ้น ซึ่งการเกิด crossing over ใน gene นั้น ก็ไม่น่าที่จะเป็นสาเหตุของโรค
นั้นได้ ดังนั้นจึงไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน SCN5A



ภาพที่ 5.1 แสดงการถ่ายทอด allele ในครอบครัว SSR ใน marker d3s3521 และ intragenic

5.2 การวิเคราะห์ผลของ linkage analysis

จากสมมติฐานที่ว่า โรคไหลตายนั้นน่าที่จะเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนเพียงยีนเดียว
ดังนั้นจึงสามารถรวมค่า lod score ที่ได้จาก 4 ครอบครัว ใน marker ต่างๆของทั้ง 2 ยีน และ
intragenic ของ KCND2 ได้ โดยจากการวิเคราะห์พอจะสรุปได้ดังนี้

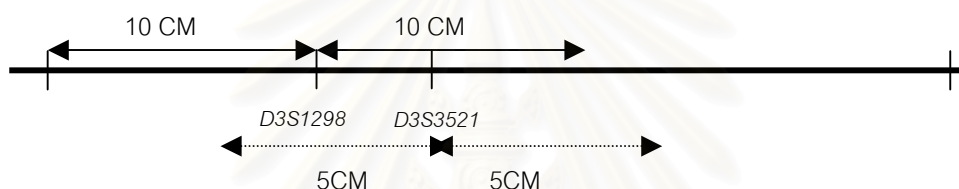
5.2.1 ยีน SCN5A ซึ่งมี marker ดังต่อไปนี้

- D3S1298

จากตารางที่ 1.4 พบว่า เราสามารถ exclude linkage ออกได้ตั้งแต่ $\theta = 0$ จนถึง 0.1
ซึ่งหมายความว่า นับจากตำแหน่งของ marker ไปจนถึง 10 เซนติมอร์แกน ทั้งชายและขวา เรา
สามารถ exclude linkage ออกได้

- *D3S3521*

จากตารางที่ 1.4 เช่นเดียวกันพบว่า เราสามารถ exclude linkage ออกได้ตั้งแต่ $\theta = 0$ จนถึง 0.05 หมายความว่า นับจากตำแหน่งของ marker ไปจนถึง 5 เซนติมอร์แกน ทั้งซ้ายและขวา เราสามารถ exclude linkage ออกได้



ภาพที่ 5.2 แสดงถึงบริเวณที่สามารถ exclude ออกได้ของทั้ง 2 markers คือที่ marker *D3S1298* สามารถ exclude ออกได้ที่ 10 CM และที่ marker *D3S3521* สามารถ exclude ออกได้ที่ 5 CM

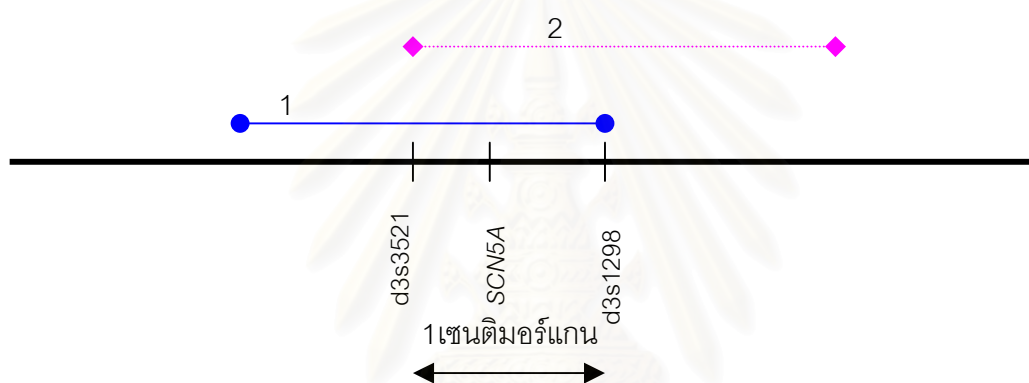
จากข้อมูลจาก summary map และ Whitehead Institute พบว่า ยีน *SCN5A* อยู่ระหว่าง *d3s1298* และ *d3s3521* โดยที่ ยีน *SCN5A* อยู่ระหว่าง ทั้ง 2 marker นี้ และ 2 marker นี้ อยู่ห่างกัน 1 เซนติมอร์แกน



ภาพที่ 5.3 แสดงถึงตำแหน่งของยีน *SCN5A* , *D3S1298* และ *D3S3521* บนโครโมโซมที่ 3

จากข้อมูลทั้งหมดทำให้สามารถสรุปได้ว่าทั้ง 2 markers นี้ อยู่ห่างจาก ยีน SCN5A ไม่ถึง 1 เซนติเมตร ดังนั้นสำหรับยีน SCN5A เราสามารถ exclude linkage ออกได้ตั้งแต่ $\theta = 0.01$ หรือที่ระยะห่างจาก marker นับไปจนถึงระยะ 1 เซนติเมตร

จากตารางที่ 1.3 จะเห็นว่า สำหรับ marker D3S1298 นั้น ที่ $\theta = 0.01$ มีค่า lod score เท่ากับ -12.148715 ซึ่งสามารถ exclude linkage ได้ และ ที่ marker D3S3521 นั้น ที่ $\theta = 0.01$ มีค่า lod score เท่ากับ -5.37169 ซึ่งสามารถ exclude linkage ได้ ซึ่งยีน SCN5A ก็อยู่ในบริเวณนี้ ดังนั้นเราสามารถ exclude ยีน SCN5A ออกได้



ภาพที่ 5.4 แสดงถึงการ exclude ออกของยีน SCN5A ของทั้ง 2 markers ลูกศรเส้นที่ 1 แสดงถึง exclude linkage ของ d3s3521 ที่ $\theta = 0.01$ ซึ่งรวม ยีน SCN5A อยู่ในบริเวณนี้ด้วย ลูกศรเส้นที่ 2 แสดงถึง exclude linkage ของ d3s1298 ที่ $\theta = 0.01$ ซึ่งรวม ยีน SCN5A อยู่ในบริเวณนี้ด้วย

จากข้อมูลข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า ยีน SCN5A ไม่น่าที่จะเป็นสาเหตุของโรคไหลตาย ดังนั้นในครอบครัว SSR ที่ได้ตรวจหาการกลายพันธุ์ เนื่องจากไม่มี crossing over ในการทำ linkage analysis เกิดขึ้นนั้น น่าที่จะเกิดจาก non-informative ใน marker D3S3521 และ intragenic ประกอบกับข้อมูลในการตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน SCN5A ซึ่งไม่เจอการกลายพันธุ์ในบริเวณที่น่าจะเกิดด้วยแล้ว ก็น่าจะเป็นสาเหตุที่จะสนับสนุนความคิดที่ว่ายีน SCN5A ไม่น่าที่จะเป็นสาเหตุของการเกิดไหลตาย

5.2.2 ยีน *KCND2*

จากการทำ linkage analysis ในยีน *KCND2* โดยใช้ intragenic เป็น marker ได้ค่า lod score ของยีนนี้ ดังตารางที่ 2.2 โดยที่ $\theta = 0$ มีค่า lod score เท่ากับ $-\alpha$ ซึ่งสามารถ exclude linkage ได้เลยทันที เนื่องจากภายในยีนไม่ควรจะมี crossing over เกิดขึ้น จากข้อมูลดังกล่าวสรุปได้ว่า ยีน *KCND2* ไม่น่าที่จะเป็นสาเหตุของการเกิดโหลตาย

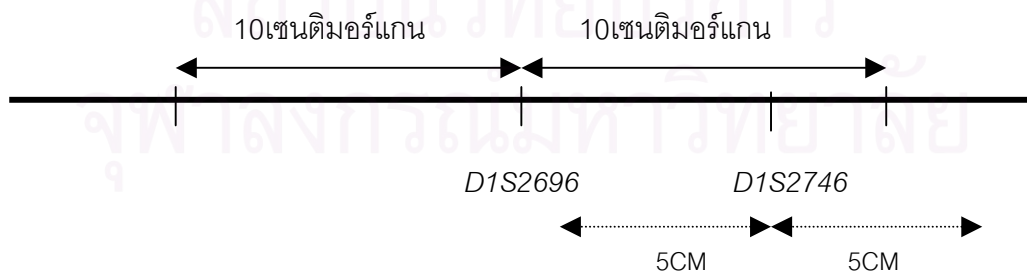
5.2.3 ยีน *KCND3* ซึ่งมี marker ดังต่อไปนี้

- *D1S2696*

จากตารางที่ 3.3 พบว่า เราสามารถ exclude linkage ออกได้ตั้งแต่ $\theta = 0$ จนถึง 0.1 ซึ่งหมายความว่า นับจากตำแหน่งของ marker ไปจนถึง 10 เซนติมอร์แกน ทั้งซ้ายและขวา เราสามารถ exclude linkage ออกได้

- *D1S2746*

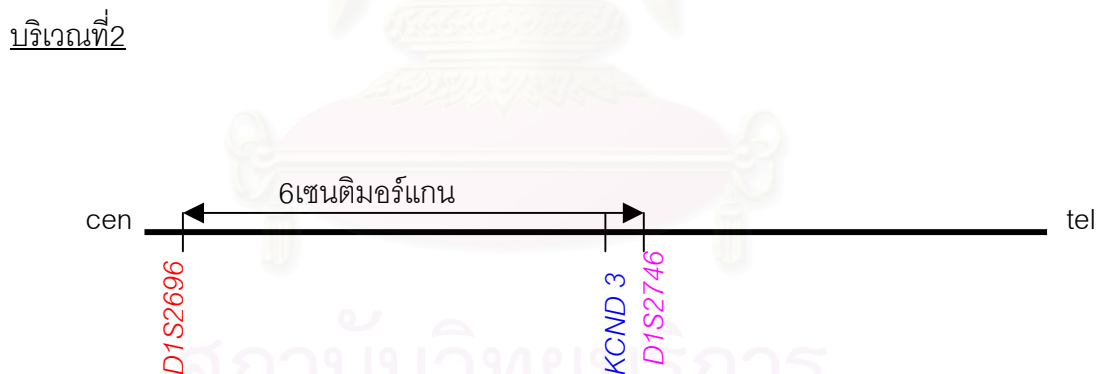
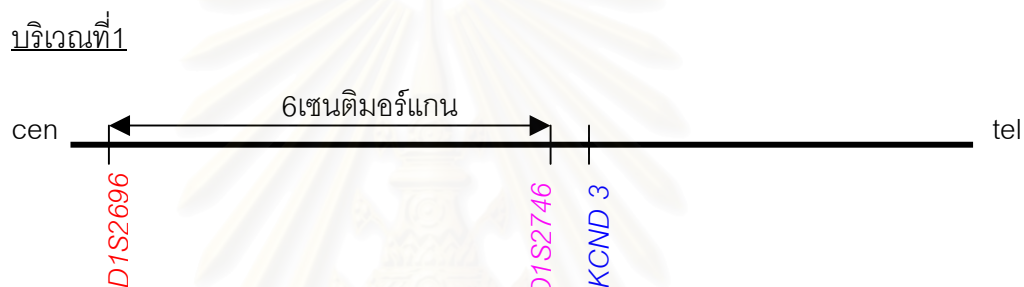
จากตารางที่ 3.3 เช่นเดียวกัน เราสามารถ exclude linkage ออกได้ตั้งแต่ $\theta = 0$ จนถึง 0.05 ซึ่งหมายความว่า นับจากตำแหน่งของ marker ไป จนถึง 5 เซนติมอร์แกน ทั้งซ้ายและขวา เราสามารถ exclude linkage ออกได้



ภาพที่ 5.5 แสดงถึงบริเวณที่สามารถ exclude ออกได้ของทั้ง 2 markers คือที่ marker *D1S2696* สามารถ exclude ออกได้ที่ 10 CM และที่ marker *D1S2746* สามารถ exclude ออกได้ที่ 5CM

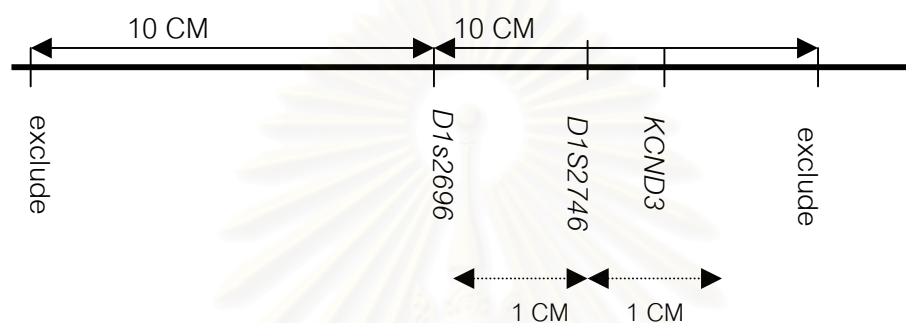
เนื่องจากยีน *KCND3* เป็นยีนที่ค่อนข้างใหม่ ยังมีคนที่ศึกษาถึงยีนนี้ค่อนข้างน้อย และยังไม่มียีนนี้อยู่ใน summary map ดังนั้นจึงไม่สามารถทราบถึงตำแหน่งที่แน่นอนของยีนนี้ได้ ทราบเพียงแต่ว่า ยีนนี้อยู่ในบริเวณ 1p13.2

แต่จากข้อมูลต่างๆที่กล่าวไว้ในข้างต้นทำให้สามารถคาดเดาบริเวณของยีน *KCND3* ได้ 2 บริเวณดังภาพที่ 5.6(บริเวณที่1) และภาพที่ 5.7(บริเวณที่2)



จากภาพข้างต้น จะเห็นว่า marker *D1S2696* มีระยะห่างจาก *D1S2746* อยู่ 6 เซนติเมอร์แกน โดยที่มียีน *KCND3* อยู่ติดกับ *D1S2746* นั่นคือ ยีน *KCND3* ไม่ได้อยู่กึ่งกลางระหว่าง 2 marker นี้อย่างแน่นอน ไม่ว่าจะยีน *KCND3* นี้จะอยู่ระหว่าง 2 marker นี้ หรืออยู่ถัดออกมาจาก *D1S2746* เล็กน้อย ระยะห่างระหว่างยีน *KCND3* กับ marker *D1S2696* ก็น่าที่จะเกิน 5 เซนติเมอร์แกน แต่ไม่เกิน 10 เซนติเมอร์แกน ดังนั้นจึงพิจารณาค่า lod score ที่ $\theta = 0.1$ จะได้ค่า lod score มีค่าเท่ากับ -3.547 ซึ่งยังสามารถ exclude linkage ออกได้

สำหรับ marker *D1S2746* นั้นจะเห็นว่าอยู่ติดกับยีน *KCND3* ดังนั้นระยะห่างจาก marker ถึงยีน ไม่น่าที่จะเกิน 1 เซนติเมอร์แกน ซึ่งเมื่อมาพิจารณาจากตารางที่ 3.3 แล้ว จะเห็นว่าที่ marker นี้ สามารถ exclude linkage ออกได้จนถึงระยะ 5 เซนติเมอร์แกน ดังนั้น จึงสามารถ exclude linkage ออกได้ใน marker *D1S2746*



ภาพที่ 5.8 แสดงถึงการ exclude ออกของยีน *KCND3* ของทั้ง 2 markers คือ *D1S2696* สามารถ exclude ออกได้ที่ $\theta = 0.1$ ซึ่งรวมยีน *KCND3* ด้วยและ *D1S2746* สามารถ exclude ออกได้ที่ $\theta = 0.01$ ซึ่งรวมยีน *KCND3* ด้วย

จากข้อมูลข้างต้นทำให้สามารถสรุปได้ว่ายีน *KCND3* ไม่น่าที่จะใช่สาเหตุของการเกิดโรคไหลตาย ถ้าเชื่อตามสมมติฐานที่ว่าโรคไหลตายน่าจะเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนเพียงยีนเดียว

แต่ถ้าพิจารณาดูรายละเอียดในแต่ละครอบครัวจะเห็นว่าที่ marker *D1S2746* ในครอบครัว LAP และ SSR นั้น มีค่า lod score ที่ $\theta = 0$ ไม่เท่ากับ $-\alpha$ ซึ่งเมื่อมาพิจารณาการอ่านผลของเจลจะเห็นว่าทั้ง 2 ครอบครัวนั้นผลที่อ่านได้เป็น non-informative เช่นเดียวกับใน marker *D3S3521* และ intragenic ของยีน *SCN5A* ในครอบครัว SSR และค่า lod score ของทั้ง 2 ครอบครัวนี้เป็นบวก ซึ่งจากผลดังกล่าวจึงสามารถคิดได้เป็น 2 กรณีคือ

กรณีที่ 1

ยังคงเป็นไปตามสมมติฐานเดิมนั้นคือ โรคโหลตายน่าจะเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนเพียงยีนเดียว ผลที่ได้จากทั้ง 2 ครอบครัวใน marker D1S2746 นั้นเกิดจาก non-informative ของ marker นั้นเอง แต่เมื่อรวมค่า lod score ใน marker นี้แล้ว ก็ยังสามารถ exclude linkage ได้และยังสรุปเหมือนเดิม นั่นคือ ยีน *KCND3* ไม่ได้เป็นสาเหตุของโรคโหลตาย

กรณีที่ 2

อาจจะเป็นไปได้ว่าโรคโหลตายอาจจะเกิดจากหลายยีน ซึ่งหมายความว่าในแต่ละครอบครัวก็อาจจะไม่ได้เกิดจากการกลายพันธุ์จากยีนเดียวกัน ซึ่งในกรณีนี้ไม่สามารถที่จะรวมค่า lod score ในแต่ละครอบครัวได้ และถ้าดูค่า lod score ในครอบครัว SSR จะเห็นว่าค่า lod score ยังไม่ถึง 3 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าจำนวนคนในครอบครัว SSR ยังมีน้อยเกินไป ถ้าต้องการยืนยันว่าในครอบครัว SSR นี้ มีสาเหตุของโหลตายมาจากการกลายพันธุ์ของยีน *KCND3* หรือไม่ อาจจะต้องตามเจาะเลือดคนอื่นๆในครอบครัวที่ยังไม่ได้เข้าร่วมในการวิจัย เพื่อทำ linkage analysis หา ค่า lod score ใหม่อีกครั้งหนึ่ง หรือถ้าไม่สามารถตามตัวได้ก็จะต้องตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน *KCND3* นี้ ซึ่งมีทั้งหมด 7 exon

แต่จากข้อมูลและผลการทดลองทั้งหมดน่าจะสรุปได้ว่าโรคโหลตายไม่น่าที่จะเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *KCND3* ค่า lod score ที่ได้ในครอบครัว SSR และ LAP ใน marker น่าที่จะเป็นเพราะ non-informative ของ marker มากกว่า

5.3 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองทั้งหมดทำให้สามารถสรุปได้ว่ายีน *SCN5A*, *KCND2* และ *KCND3* ไม่น่าที่จะใช้สาเหตุของการเกิดโรคโหลตาย น่าจะเป็น ion channel ตัวอื่นที่ทำให้เกิดโรคโหลตายมากกว่า อาทิเช่น Potassium channel ตัวอื่นๆ เช่น *KVLQT1*, *HERG* ซึ่งเป็น

ยีนที่ทำให้เกิด Long QT syndrome นอกจากนี้ยังมี *KCNA4* , *KCNA5* และ *KCNB1* นอก
จาก Potassium channel แล้ว ยังมี candidate gene ตัวอื่นๆอีก เช่น β subunit ของ *SCN5A*
ยีนที่เกี่ยวข้องกับ Calcium channel ต่างๆ หรือ อาจจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ Na – K exchange
ก็เป็นได้ซึ่งสามารถทำการศึกษาต่อไปได้ เพื่อที่จะได้ทราบถึงสาเหตุที่แท้จริงของโรคใหลตายต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

1. Tatsanavivat P., Chirawatkul A., Klungboonkrong V., Chaisiri S., Jarernyanyaruk L., Munger RG, et al. 1992. Sudden and unexplained deaths in sleep (LAI-TAI) of young men in rural Northeastern Thailand. Int J Epidemiol, 21; 904-10.
2. Tungsanga K., Sriboonlue P. 1993. Sudden Unexplained Death Syndrome in Northeast Thailand. Int J epidemiol, 22; 81-7.
3. Nademanee K., Veerakul G., Nimmanit S., Chaowakul V., Kiertijai B., Likittanasombat K., et al. 1997. Arrhythmogenic marker for the sudden unexplained death syndrome in Thai men. Circulation, 96; 2596-600.
4. Goh K.T., Chao T.C., Heng B.H., Koo C.C. and Poh S.C. 1993. Epidemiology of sudden unexpected death syndrome among Thai migrant workers in Singapore. Int J epidemiol, 22 ; 88-95.
5. Nimmanit S., Malasit P., Chaovakul V., Susgengrat W., Vasuvattakul S. and Nilwarangkur S. 1991. Pathogenesis of sudden unexplained death nocturnal death (LAI-TAI) and endemic distal renal tubular acidosis. Lancet, 338; 930-2.
6. Sangwatanaroj S., Ngamchgreon C. and Prechawat S. 2001. Pattern of Inheritance in three sudden unexplained death syndrome (LAI-TAI) families. J Med ASSOC Thai. 84; S443-51.
7. Tatsanavivat P., Chirawatkul A., Klungboonkrong V., Chaisiri S. and Saowakontha S. 1991. Familial clustering of presumptive sudden unexplained death syndrome (PSUDS). Southeast Asian J Trop Med Public Health, 22; 195-9.
8. Sangwatanaroj S., Preechawat S., Sunsarpewittayakul B., Sitthisook S., Tosukhowong P., and Tungsanga K. 2001. Right ventricular electrocardiographic leads for detection of brugada syndrome in sudden unexplained death syndrome survivors and their relatives. Clin. Cardiol, 24.
9. Corrado D., Buja G., Basso C., Nova A. and Thiene G. 1999. What is Brugada syndrome? Cardiol Review, 7; 191-4.

10. Chen Q., Kirsch G.E., Zhang D., Brugada R., Brugada J., Brugada P., et al. 1998. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. Nature, 392; 293-6.
11. Wang D.W., Makita N., Kitabatake A., Balsler J.R. and George A.L. 2000. Enhanced Na (+) channel intermediate inactivation in Brugada syndrome. Circ Res, 87; E37-43.
12. Baroudi G., Cabonneau E., Pouliot V. and Chahine M. 2000. SCN5A mutation (T1620M) causing Brugada syndrome exhibits different phenotype when expressed in Xenopus oocytes and mammalian cells. FEBS Lett, 467; 12-6.
13. Baroudi G., Deschenes I., Hosp L., Univ L., Canada S., Gvicheney P., et al. 1999. Characterization of two mutations in SCN5A sodium channel causing Brugada syndrome. Circulation, 100(suppli); I-278.
14. Wan X., Wang Q. and Kirsh G.E. 2000. Functional suppression of sodium channels by beta(1) – subunits as a molecular mechanism of idiopathic ventricular fibrillation. J Mol cell Cardiol, 32; 1873-84.
15. Priori S.G., Napolitano C., Gasparini M., Pappone C., Bella P.D., Brignole M., et al. 2000. Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST segment elevation syndrome; A Prospective evaluation of 52 families. Circulation, 1022; 509-15.
16. Rook M.B., Alshinawi C.B., Groenewegen W.A., Van Gelder I.C., Van Ginneken A.C., Jongsma H.J., et al. 1999. Human SCN5A gene mutations alter cardiac sodium channel kinetics and are associated with the Brugada syndrome. Cardiovas Res, 44; 507-17.
17. Akai J., Makita N., Sakurada H., Shirai N., Veda K., Kitabatake A., et al. 2000. A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG finding of Brugada syndrome. FEBS Lett, 479; 29-34.
18. Viswanathan P., Bezzina C., George A., Roden D., Rilde A. and Balsler J. 2001. Gating – dependent mechanisms for flecainide action in SCN5A – linked Arrhythmia syndromes. Circulation, 104; 1200-13.
19. Kyndt F., Probst V., Potet F., Demolombe S., Chevallier J., Baro I., et al. 2001. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect

- or Brugada syndrome in a large French family. Circulation, 104; 3081-6.
20. Bezzina C., Veldkamp M., Berg M., Postma A., Rook M.B., Viersma J., et al. 1999. A single Na⁺ channel mutation causing both Long QT and Brugada Syndrome. Circ Res, 85; 1206-13.
 21. Postma A.V., Bessina C.R., De Vries J.F., Wilde A.A., Moorman A.F., Mannens M.M. 2000. Genomic organization and chromosomal localization of two members of the KCND ion channel family, *KCND2* and *KCND3*. Human Genet, 106; 614-9.
 22. Isbrandt D., Leicher T., Waldschutz R., Zhu X., Luhmannu, Michel V., et al. 2000. Gene structures and expression profiles of three human KCND (KV4) potassium channels mediating A-type currents I_{TO} and I_{SA}. Genomics, 64; 144-54.
 23. Munger R.G. 1987. Sudden death in sleep of Loatian- Hmong refugees in Thailand: a case control study. Am J Public Health, 77; 1187-90.
 24. Pollanen M.S., Chiasson D.A., Cairns J. and Young J.G. 1996. Sudden unexplained death in Asian immigrants: recognition of a syndrome in metropolitan Toronto. CMAJ, 155; 537-4.
 25. ปิยทัศน์ ทักษณาวัดมนต์. โรคไหลตาย. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพมหานคร: พีบีฟอเรนส์บุคเซนเตอร์, 2540.
 26. Sriboonlue P., Prasongwattana V., Suwantrai S., Bovornpadungkitti Stungsnga K. and Tosukhowong P. 1998. Potassium contents of Northeastern Thai foods. J Med Assoc Thai, 81; 616-26.
 27. Tosukhowong P., Tungsanga K., Srisakul C., Prapunwattana P., Sitpraja V., Sriboonlue P., et al. 2001. Potassium status of Northeast Thai constructors in the different geographic locations. J Med Assoc Thai, 84; S163-9.
 28. Sriboonlue P., Prasongwattana V., Suwantrai S., Bovornpadunkitti S. Tungsanga K. and Tosukhowong P. 1998. Nutritional potassium status of healthy adult males residing in the rural northeast Thailand. J Med Assoc Thai, 81; 223-32.
 29. Sangwattaraj S., Tungsangs K., Tatsanavivat P., Seidman J.G., Seidman C.E. 1998. Familial sudden unexplained death syndrome (SUDS); an X linked

recessive disorder? Asian Heart J, 6; 49.

30. Tatsanavivat P., Chirawatkul A., Klungboonkrong V., Chaisiri S. and Saowakonthas 1991. Familial clustering of presumptive sudden Unexplained death syndrome (PSUDS). Southeast Asian J Trop Med Public Health, 22; 195-9.
31. Brugada R., Brugada J., Antzelevitch C., Kirsch G., Potenza D., Towbin J., et al. 2000. Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. Circulation, 101; 510-5.
32. Brugada P. and Brugada J. 1992. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. J Am Coll Cardiol, 20; 1391-6.
33. Dumaine R., Towbin J., Brugada P., Vatta M., Nesterenko D., Nesterenko V., et al. 1999. Ionic mechanisms responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature dependent. Cir Res. 85; 803-9.
34. Sangwattanoj S., Prechawat S., Sunsaneewitayakul B., Sitthisook S., Tosukhowong P. and Tungsanga K. 2001. New electrocardiographic leads and the procainamide test for the detection of the Brugada syndrome in sudden unexplained death syndrome survivors and their relatives. The European Society of Cardiology.
35. Brugada J., Brugada R. and Brugada P. 1999. Brugada syndrome. Arch Mal Coeurvaiss, 92; 847-50.
36. Priori S.G., Napolitano C., Giordano U., Collisani G., and Memmi M. 2000. Brugada syndrome and sudden cardiac death in children. Lancet, 101; 54-60.
37. Wang Q., Zhizhong Li., Shen J. and Keating M.T. 1996. Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. Genomics, 34; 9-16.
38. Naccarelli G.V. and Antzelevitch C. 2001. The Brugada syndrome: clinical, genetic, cellular and molecular abnormalities. Am J Med, 110; 573-81.

39. Veldkamp M.W., Viswanathan P.C., Bezzina C., Baartscheer A., Wilde A.A. and Balsler JR 2000. Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na (+) channel. *Circ Res*, 86; E91-7.
40. Baroudi G., Pouliot V., Denjoy I., Guicheney P., Shrier A. and Chahine M. 2001 Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an SCN5A mutant (R1432G). *Circ Res*, 88; E78-83.
41. ราตรี สุตทรวง. ประสาทสรีรวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานครสำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 1984.
42. Bertil Hille. Ionic channels of excitable membranes. Sinauer associates Inc, 1984.
43. Grant A.O. 2001. Molecular biology of sodium channels and their role in Cardiac arrhythmias. *Am J Med*, 110; 296-305.
44. Tan H.L., Margreet T.E., Boelkens B., Bezzina C.R., Viswanathan P.C., Beaufort-krol G., et al. 2001. A sodium – channel mutation causes Isolated cardiac conduction disease. *Nature*, 409; 1043-7.
45. Yan G.X. and Antzelevitch C. 1999. Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST segment elevation. *Circulation*, 100; 1660-6.
46. Litovsky S.H. and Antzelevitch C. 1988. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res*, 62; 116-26.
47. Strachan T. and Andrew P. Read. Human Molecular Genetics. Second Edition, Bios Scientific publishers Ltd. 1999.
48. J. Ott. LINKAGE Program version 5.1. New York: J. Ott, 1996.
49. Intragenic markers. www.cedar.genetics.soton.ac.uk.30-12-2001
50. Intragenic markers.www.genome.wi.mit.edu.30-12-2001
51. Lahat H., Eldar M., Levy – Nissenbaum E., Bahan T., Friedman E., Khoury A., et al. 2001. Autosomal recessive catecholamine – or exercise- induced polymorphic ventricular tachycardia: clinical features and assignment of the disease gene to chromosome 1P13-21. *Circulation*, 103; 2822-7.
52. Intragenic markers. www.gdb.org.30-12-2001

ภาคผนวก ก
BUFFERS AND REAGENT

1. Lysis Buffer I

Sucrose	109.54	g
1.0 M Tris – HCl (pH 7.5)	10	ml
1.0 M MgCl ₂	5	ml
Triton X – 100 (pure)	10	ml
Distilled water to	1,000	ml

Sterilize the solution by autoclaving and store in a refrigerator (at 4⁰C).

2. Lysis Buffer II

5.0 M NaCl	15	ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	48	ml
Distilled water to	1,000	ml

Sterilize the solution by autoclaving and store at room temperature.

3. 10% SDS solution

Sodium dodecyl sulfate	10	g
Distilled water to	100	ml

Mix the solution and store at room temperature.

4. 20 mg/ml Proteinase K

Proteinase K 2 mg

Distilled water to 1 ml

Mix the solution and store in a refrigerator (at -20°C).

5. 1.0 M Tris – HCl

Tris base 12.11 g

Dissolve in distilled water and adjusted pH to 7.5 with HCl

Distilled water to 100 ml

Sterilize the solution by autoclaving and store at room temperature.

6. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Disodium ethylenediamine tetraacetate. $2\text{H}_2\text{O}$ 186.6 g

Dissolve in distilled water and adjusted pH to 8.0 with NaOH

Distilled water to 1,000 ml

Sterilize the solution by autoclaving and store at room temperature.

7. 1.0 M MgCl_2 solution

Magnesium chloride. $6\text{H}_2\text{O}$ 20.33 g

Distilled water to 100 ml

Dispense the solution into aliquots and sterilize by autoclaving.

8. 5 M NaCl solution

Sodium chloride 29.25 g

Distilled water to 100 ml

Dispense the solution into aliquot and sterilize by autoclaving.

9. 10X Tris borate buffer (10X TBE buffer)

Tris – base 100 g

Boric acid 55 g

0.5 M EDTA (pH 8.0) 40 ml

Adjust volume to 1,000 ml with distilled water. The solution was mixed and store at room temperature.

10. 6X loading dye

Bromphenol blue 0.25 g

Xylene cyanol 0.25 g

Glycerol 50 ml

1M Tris (pH 8.0) 1 ml

Distilled water until 100 ml

Mixed and stored at 4°C

11. 7.5 M Ammonium acetate ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)

Ammonium acetate 57.81 g

Distilled water 80 ml

Adjust volume to 100 ml with distilled water and sterilize by autoclaving.

12. 25:24:1 (v/v) Phenol-chloroform-isoamyl alcohol

Phenol	25	volume
Chloroform	24	volume
Isoamyl alcohol	1	volume

Mix the reagent and store in a sterile bottle kept in a refrigerator.

13. 2% Agarose gel (w/v)

Agarose	1.6	g
1X TBE	80	ml

Dissolve by heating in microwave oven and occasional mix until no granules of agarose are visible.

14. Ethidium bromide

Ethidium bromide	10	mg
Distilled water	1	ml

Mix the solution and store at 4°C

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การคำนวณค่า lod score

การคำนวณค่า lod score โดยใช้ Linkage program version 5.1 มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. สร้าง Pedfile โดยใช้โปรแกรม MAKEPED
2. สร้าง DATAFILE โดยใช้โปรแกรม PEDFILE
3. เข้าโปรแกรม LCP เพื่อหาค่า lod score

การสร้าง PEDFILE มีขั้นตอนคือ

1. ในขั้นต้นต้องสร้างfile Sample.pre ขึ้นมาก่อน โดยใช้ข้อมูลจาก pedigree ดังนี้

I.D ของครอบครัว I.D.ของบุคคล I.D.ของพ่อ I.D.ของแม่ เพศ เป็น/ไม่เป็นโรค genotype

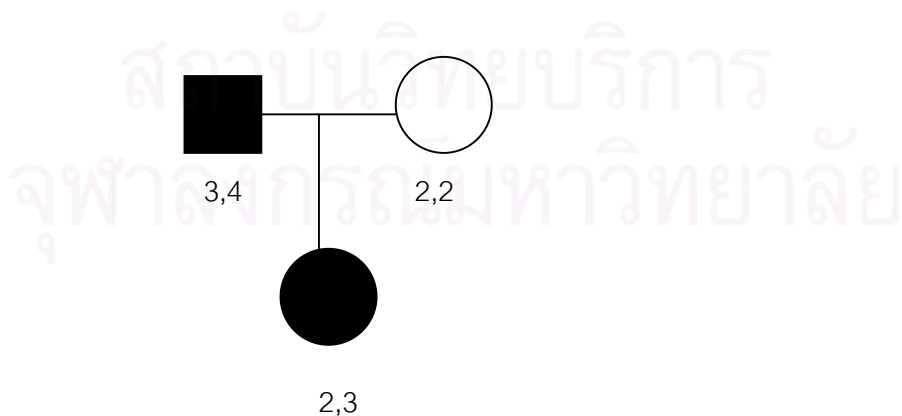
โดยกำหนดให้ เพศชาย คือ หมายเลข 1

เพศหญิง คือ หมายเลข 2

ไม่เป็นโรค คือ หมายเลข 1

เป็นโรค คือ หมายเลข 2

ยกตัวอย่าง จาก pedigree ดังนี้



จาก pedigree ข้างต้น สามารถสร้าง file Sample.pre ได้ดังนี้

1 1 0 0 1 2 1 2
 1 2 0 0 2 1 2 3
 1 3 1 2 1 2 2 2

โดยแต่ละคอลัมน์หมายความว่าดังต่อไปนี้

คอลัมน์ที่1 แสดงถึง เลขประจำตัวของแต่ละครอบครัว

คอลัมน์ที่2 แสดงถึง เลขประจำตัวของแต่ละบุคคล

คอลัมน์ที่3 แสดงถึง เลขประจำตัวของบิดา

คอลัมน์ที่4 แสดงถึง เลขประจำตัวของมารดา

คอลัมน์ที่5 แสดงถึง เพศ

คอลัมน์ที่6 แสดงถึง phenotype

คอลัมน์ที่7 แสดงถึง genotype

2. เรียกโปรแกรม Makeped แล้วใส่ข้อมูลดังนี้

input file : Sample.pre

output file : Sample.ped

loop : no

proband selected automatically : yes

การสร้าง DATAFILE มีขั้นตอนคือ

1. เลือกโปรแกรม PRELINK
2. เลือก see or modify loci description (k)
3. เลือก change locus type (c)
4. ใส่ตำแหน่งของ locus ที่ต้องการเปลี่ยน โดยในครั้งแรกใส่ตำแหน่งของ locus เป็นตำแหน่งที่ 1 ดังนี้
 - 4.1) เลือกไปที่ affection status (c)
 - 4.2) เลือก see or modify a locus (a)
 - 4.3) เลือกตำแหน่งของ locus เป็นตำแหน่งที่ 1 อีกครั้ง

4.4) เลือกไปที่ penetrance (c) จากนั้นกำหนดค่าของ penetrance โดยถ้า เป็นโรคที่ถ่ายทอดแบบ autosomal dominant อย่างเช่นในโรคโหดตายซึ่งให้ ค่า penetrance เป็น 100% จึงใส่ค่าดังนี้

Genotype 1 1 ใส่ค่า 0

Genotype 1 2 ใส่ค่า 1

Genotype 2 2 ใส่ค่า 1

4.5 เลือกไปที่ gene frequency (d) โดยใส่ค่า gene frequency เป็น 0.99 และ 0.01

4.6 เลือก exit (e) เพื่อออกจากเมนูนี้

5. เลือกไปที่ change locus type (e) อีกครั้งหนึ่ง

6. ใส่ตำแหน่งของ locus ที่ต้องการเปลี่ยน โดยในครั้งหลังนี้ใส่ตำแหน่งของ locus เป็น ตำแหน่งที่ 2 ดังนี้

6.1 เลือกไปที่ allele number (d)

6.2 เลือก see or modify a locus (a)

6.3 เลือกตำแหน่งของ locus เป็นตำแหน่งที่ 2 อีกครั้ง

6.4 เลือกไปที่ allele number

6.5 ใส่จำนวน allele ที่มีในครอบครัวนั้น

6.6 เลือกไปที่ gene frequency

6.7 ใส่ค่าความถี่ของยีน โดยคิดให้ค่าความถี่ของยีนเท่ากัน

6.8 กดเลือก exit (c) เพื่อออกจากเมนูนี้

7. กดเลือกไปที่ return to main menu (f) เพื่อกลับไปยังหน้าจอหลัก

8. เลือก write DATAFILE (n)

9. บันทึก file เป็น Sample.dat

10. กด exit ในหน้าจอหลัก (o) เพื่อเสร็จสิ้นการสร้าง DATAFILE (ถ้าไม่กด exit จะถือว่า ยังไม่ได้สร้าง DATAFILE เลย)

การเรียกโปรแกรมLCP มีขั้นตอนคือ

1. ใส่ชื่อ file ดังต่อไปนี้

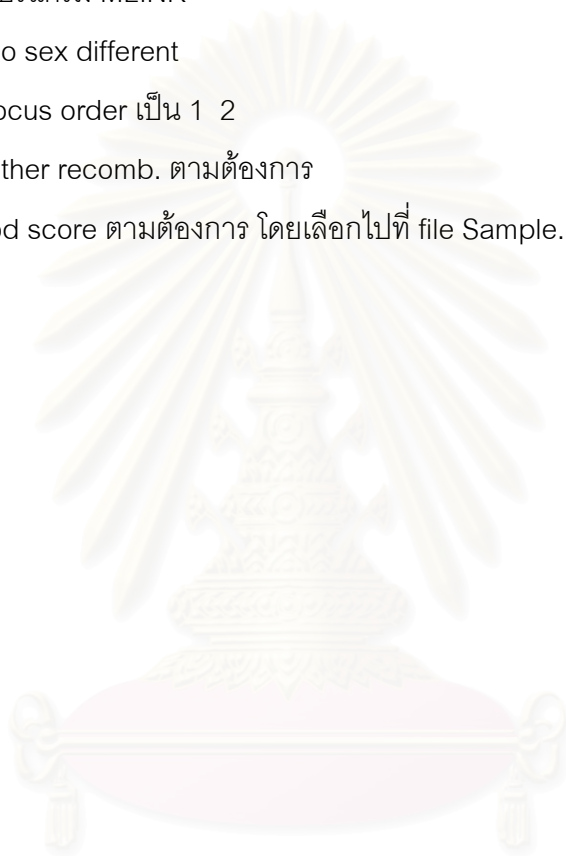
Command file name : Sample.bat

Pedigree file name : Sample.ped

Parameter file name : Sample.dat

2. เลือก general pedigree
3. เลือก lod score table
4. เลือก โปรแกรม MLINK
5. เลือก no sex different
6. เลือก locus order เป็น 1 2
7. เลือก other recomb. ตามต้องการ

สุดท้ายจะได้ค่า lod score ตามต้องการ โดยเลือกไปที่ file Sample.bat



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต เกิดเมื่อวันที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2515 สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีที่คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2537 และจบการศึกษาในระดับปริญญาโทที่คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2545



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

