บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย

ประชากรไทยที่รอดชีวิตจากไหลตายรวมถึงสมาชิกในครอบครัวของผู้ป่วยที่รอดชีวิตจากไหลตาย

1. กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้า(Inclusion Criteria)

1.1 ผู้รอดชีวิตจากไหลตายคือ ชาวไทยที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว เกิด cardiac arrest หรือ polymorphic ventricular tachycardia / ventricular fibrillation (VT/VF) และได้ทำ cardiopulmonary restriction สำเร็จ ไม่มีประวัติการใช้ยาที่ทำให้เกิด polymorphic VT/VF ตรวจร่างกายปกติและตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจไม่พบ long QT interval, blood chemistry, chest X-ray, echocardiography และ exercise stress รวมถึง coronary angiography อยู่ในเกณฑ์ปกติ

1.2 สมาชิกครอบครัวผู้เสียชีวิตหรือรอดชีวิตจากไหลตายที่มี ECG แบบ RBBB และ ST-segment elevation ใน Lead V_1-V_3 คือ ญาติพี่น้องของผู้เสียชีวิตหรือรอดชีวิตจากไหลตายอายุ 15 ปีขึ้นไป ที่ตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจพบ RBBB และ ST-segment elevation (ส่วนของ ST segment ที่ห่างจาก J point 0.08 วินาที) ยกสูงขึ้นมากกว่า 0.01 mV จาก base line ใน Lead V_1-V_3 อย่างน้อย 2 ใน 3 lead ไม่ว่าจะเกิดขึ้นเองหรือทำให้เกิดโดยใช้ยา Flecainide, Procainamine เป็นต้น โดยการฉีดยาเข้าทางหลอดเลือดดำของญาติพี่น้องที่ไม่มีคลื่นไฟฟ้าหัวใจลักษณะดังกล่าว

2. กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกออก(Exclusion Criteria)

2.1 ผู้ที่ไม่ร่วมมือในการทำวิจัย

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

2.3 ผู้ที่มีประวัติแพ้ยา Procainamide Flecainide

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

<u>วัสดุอุปกรณ์</u>

1. Automatic adjustable micropipette (Gilson, France)
2. Balancen (Prcisa, Switzerland)

3. Beaker (Pyrex)
4. Beta shield (C.B.S. sciencetific; CO)
5. Comb
6. Cylinder (Duran, USA)
7. Deep freeze -20° C, -80° C (Revco)
8. DNA thermal cycler 480 (Perkin Elmer, USA)
9. Electrophoresis chamber set
10. Flask (Pyrex)
11. Gel Doc 100 (Bio-Rad)
12. Glass pipette (Witeg, Germany)
13. Heat block (Bockel)
14. Horizon 11-14 (Gibco BRL, Scotland)
15. Incubator (Memmert)
16. Microcentrifuge tube(Elkay, USA)
17. Microcentrifuge (Fotodye, USA)
18. Strom Phosphor screen (Molecular Dynamics)
19. Paraflim (American National Can, USA)
20. pH meter (Eutech Cybernatics)
21. Pipette boy (Tecnomara, Switzerland)
22. Pipette rack (Autopack, USA)
23. Pipette tip (Elkay, USA)
24. Plastic wrap
25. Polypropylene canical tube
26. Power supply model 250 (Gibco BRL, Scotland)
27. Reagent bottle (Duran, USA)
28. Refrigerator 4° C (Mitsubishi, japan)
29. Spectronic spectrophotometer (Genesis5, Milon Roy USA)
30. Sequi-gen sequencing cell (Bio-Rad)
31. Stirring hot plate (Bamstead/ Thermolyne, USA)
32. Stirring-magnetic bar
33. Thermal cycle (Touch down, Hybraid USA)

34. Thermometer (Precision, Germany)
35. Thermostat shaking-อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Heto, Denmark)
36. UV transilluminater (Fotodye, USA)
37. UV –absorbing face shield (Spectronic, USA)
38. Vortex (Scientific Industry, USA)
39. Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco USA)
40. อ่างควบคุมอุณหภูมิ

<u>สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. สารเคมีทั่วไป
    - 1.1 Absolute ethano (Merck)
    - 1.2 Agarose, Molecular glade (Promega)
    - 1.3 Ammonium acetate
    - 1.4 Boric acid
    - 1.5 Bromphenol blue
    - 1.6 Disodium ethelenediamenetetracitric acid; EDTA
    - 1.7 Ethediumbromide (Gibco BRL)
    - 1.8 Ficoll 400 (Pharmacia)
    - 1.9 Hydrochroric acid
    - 1.10 Mineral oil
    - 1.11 Chloroform
    - 1.12 Phenol
    - 1.13 Isoamyl alcohol
    - 1.14 Sodium chloride
    - 1.15 Sodium dodecyl sulfate
    - 1.16 Sodium hydroxide
    - 1.17 Sucrose
    - 1.18 Tris base
    - 1.19 Triton X-100
    - 1.20 Polyacrylamide
    - 1.21 Ammonium persulfate
    - 1.22 Temed

1.23 100 base pair DNA ladder

2. สารเคมีสำหรับติดฉลาก primer

2.1 10X kinase buffer

2.2 T_4 kinase

2.3 γ-P^{32} ATP (Dupont)

2.4 primer forward (Invitrogen)

3. สารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

3.1 10X PCR Buffer

3.2 Magnesium chloride

3.3 Deoxynucleotide triphosphatase(dNTPs)

3.4 Oligonucleotide primers

3.5 Taq DNA polymerase

3.6 Genomic DNA sample

4. ชุด Gel Extraction Kit (QIAgen)

4.1 Spin Columns

4.2 Buffer QG

4.3 Buffer PE

4.4 Buffer EB

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างเลือด

1.1 ใช้ตัวอย่างเลือดปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากผู้รอดชีวิตจากไหลตาย

1.2 ใช้ตัวอย่างเลือดปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากสมาชิกในครอบครัวผู้เสียชีวิตหรือรอดชีวิตจากไหลตาย

1.3 ใช้ตัวอย่างเลือดปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากคนปกติที่อยู่ในหมู่บ้านเดียวกับผู้รอดชีวิตและตรวจไม่พบคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ RBBB และ ST-segment elevation ใน lead V_1-V_3

2. ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างเลือดที่ได้นำมาศึกษา ดังนี้

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

1) นำเลือดปริมาณ 20 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2) เก็บส่วน buffy coat ใส่ในหลอด polyprophyline หลอดใหม่

3) เติม lysis buffer I ที่แช่เย็น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่ม (incubate)ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 g เป็นเวลา 8 นาที แล้วเทส่วนใส (supernatant) ทิ้ง

5) เติม lysis buffer I ที่แช่เย็น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 g เป็นเวลา 8 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งวินาที

6) เติม lysis buffer II 900 ไมโครลิตร สารละลาย protinase K 10 ไมโครลิตร และ 10% SDS 50 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 15 วินาที

7) นำส่วนผสมทั้งหมดแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค้างคืน

8) เติม phenal-chloroform-isoamyl alcohol 1 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

9) ดูดส่วนบนใส่ในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร

10) เติม 7.5 M CH_3 COON H_3 ลงไปครึ่งหนึ่งของปริมาตรที่ดูดได้จากข้อ 9 และเติม 100% ethanol ลงไปในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรที่ดูดได้จากข้อ 9 แล้วผสมให้เข้ากันเบาๆ จะเห็นสายดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะเห็นตะกอนใสๆติดที่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง

11) เติม 70% ethanol เพื่อล้างตะกอน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

12) ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20-300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนตะกอนดีเอ็นเอ ละลายหมด

13) นำไปวัดเพื่อคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer ต่อไป

2.2 การทำ Linkage analysis โดยวิธี microsatellit ซึ่งติดฉลาก Primer ด้วยสารกัมมันตรังสี γ-P^{32} ATP โดยวิธี Kinase

1) polymorphic markers ที่ใช้มีรายละเอียดดังนี้

Gene	Primer	ระยะห่างจากยีน (Mb)	Hetrozygocity index
KCNA4	D11S1312	0.97	0.69
	D11S1324	1.12	0.88
	D11S4115	2.30	0.63
KCNA5	D12S314	0.19	0.78
	D12S99	0.41	0.81

ตารางที่ 4 แสดง polymorphic markers ที่ใช้ในการทำ linkage study[50]

2) ปริมาตรของส่วนผสม(ปริมาตรรวมขึ้นอยู่กับปริมาตรของ primer ที่นำมาติดฉลาก) มีดังนี้

สารเคมี	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ในการ Kinase
10x kinase buffer	10x	1x
T4 kinase	10 U/μl	1 U/μl
γ-P^{32} ATP	10 μCi/μl	2 μCi/μl
primer(forward)	20 μM	10 μM
น้ำกลั่น	-	จนครบปริมาตร

ตารางที่ 5 แสดงส่วนผสมในการติดฉลากด้วยสารรังสี

นำส่วนผสมดังกล่าวผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อใช้การทำ Linkage analysis โดยวิธี microsatellit ซึ่งติดฉลาก Primer ด้วยสารกัมมันตรังสี γ-P^{32} ATP

1) เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (polymerase chain reaction) ดังนี้

	สารเคมี	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา (μl)
10 mM	dNTPs	0.2 mM	0.2
10x	kinase buffer (with 15 mM $MgCl_2$)	10x	1
5 U/μl	Taq DNA polymerase	2 U/μl	0.04
50 ng/μl	DNA template	50 ng	1
20 μM	lebelled sense-primer	10 μM	0.1
20 μM	amtisense-primer	10 μM	0.1
	น้ำกลั่น	-	7.56
	ปริมาตรรวม		10

ตารางที่ 6 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR

2) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal Cycle โดยกำหนดอุณหภูมิดังนี้

ขั้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initiation	95	15 นาที	1
Denaturing	94	45 วินาที	25-30
Annealing	49-60	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1

ตารางที่ 7 แสดงอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

3) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มา run electrophoresis บน 6% denaturing polyacrylamide gel โดยเรียงลำดับความสัมพันธ์ในครอบครัวจาก พ่อ แม่ ลูก พี่ น้อง(เพื่อการวิเคราะห์ผลที่สะดวกและถูกต้อง)

สารเคมี	ปริมาตร			
	50 ml	60 ml	80 ml	100 ml
Urea (g)	21	25.2	33.6	42
40% acrylamide: Bis 19:1 (ml)	7.5	9	12	15
10X TBE (ml)	5	6	8	10
H_2O (ml)	21	26	35	43
10% Ammonium persulphate (μl)	330	396	528	660
TEMED (μl)	29.0	34.8	46.4	58.0

ตารางที่ 8 แสดงส่วนผสมในการเตรียม 6% denaturing polyacrylamide gel

4) นำแผ่น gel ที่ได้ไปอ่านผลด้วย autoradiography

5) วิเคราะห์ผล Linkage analysis โดยใช้โปรแกรม LINKAGE program version 5.1 ดังนี้

5.1) สร้างไฟล์พงศาวลี โดยใช้โปรแกรม Notepad

5.2) สร้าง Pedfile โดยใช้โปรแกรม MAKEPED

5.3) สร้าง DATAFILE โดยใช้โปรแกรม PEDFILE

5.4) หาค่า Lod score โดยใช้โปรแกรม LCP

2.4 การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *KCND3* ด้วยวิธี sequencing analysis

ขั้นตอนการทำ DNA sequencing มีดังนี้

1) เตรียมดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *KCND3* ที่ต้องการ ซึ่ง primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 9

2) เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (polymerase chain reaction) ดังในตารางที่ 10

3) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Thermal Cycle โดยกำหนดอุณหภูมิ ดังในตารางที่ 11

4) นำผลิตผล PCR ที่ได้มา run บน agarose gel

5) ตัดเจลเอาผลิตผล PCR ที่ต้องการ

6) purify ผลิตผล PCR ออกจากเจล[51] ดังนี้

1. เติม QG buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้
2. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (vortex ทุก 2-3 นาทีในระหว่างที่บ่ม)
3. ตรวจสอบว่าส่วนผสมเป็นสีเหลือง
4. เติม isopropanol ลงไป 1 เท่า และผสมให้เข้ากัน
5. เปลี่ยนใส่ spin column และปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที
6. เทส่วนที่ไหลผ่าน column ทิ้ง
7. เติม QG buffer 0.5 มิลลิลิตร เทส่วนที่ไหลผ่าน column ทิ้ง
8. เติม PE buffer 0.75 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที
9. เทส่วนที่ไหลผ่าน column ทิ้งและปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที
10. เปลี่ยนใส่หลอดใหม่
11. เติม EB buffer หรือน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร ลงบน membrane ใน column ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที
12. ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที
13. ทิ้งส่วน column จะได้ผลิตผลตามต้องการ

Exon	Forward primer	Reward primer
1	TGA TGA ACT AAC TCC AAG CTG G	CTC CTT GGT GTC CTC GTT GAA
1	GGT GGC CAA CTG CCC CAT GCC C	GTT CTC CCT CTT GCG GTC CTT
1	TGC TGC TAC GAG GAG TAC AAG	AGA AGA AGG CCA CCG AGT AG
1	TGG TGG AGA CGG TGC CGT GCG	CGG AGG CAC AGC TCT TCA GT
1	ACT GAA GAG CTG TGC CTC CG	GGC TGG TCT GCC CTC CAA CCT
2	AAC AGG TGA ATG ATT GGC AGG	AGC TCT AGT CCT GGC TCC CT
3	GGA AGC CAG CCT CAC AGC TTC	TGG TGA GAG TGC TGG TGT CCC
4	GCC CTT TGA CCT TTA GTG GAG A	GGC CCA GAG TGA AGA TGT GAG
5	AGG GGT GGA ATG TTT GAC TCA	AGA AGA ATC AGC AGC ACA TGC
6	CAG AAC AGA GAC AGG CAG CCA	GAT GAT TCG AGC CTT TGC GGG
7	CTC CTA GTT ACC ACG AGC AAG	AGT GAC CAC CCA CCA ACA TG

ตารางที่ 9 แสดง primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCRในส่วนของยีน *KCND3* [48]

	สารเคมี	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา (μl)
10 mM	dNTPs	0.2 mM	0.2
10x	kinase buffer (with 15 mM $MgCl_2$)	10x	1
5 U/μl	Taq DNA polymerase	2 U/μl	0.04
50 ng/μl	DNA template	50 ng	1
20 μM	Forward primer	10 μM	0.1
20 μM	Reward primer	10 μM	0.1
	น้ำกลั่น	-	7.56
	ปริมาตรรวม		10

ตารางที่ 10 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการตรวจกรองการกลายพันธุ์ในยีน *KCND3*

ขั้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initiation	95	15 นาที	1
Denaturing	94	45 วินาที	35-40
Annealing	49-60	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1

ตารางที่ 11 แสดงอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ของการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการตรวจกรองการกลายพันธ์ในยีน *KCND3*

7) นำ ดีเอ็นเอ ที่ได้จาก ข้อ 6) มาทำ cycle sequencing ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้

DNA template	6 μl
Terminator Ready Reaction Mix(dye)	8 μl
Forward primer 3.2 pmole	1 μl
น้ำกลั่น	5 μl

8) นำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่อง Thermal cycle โดยกำหนดอุณหภูมิดังนี้

อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	เวลา(วินาที)	
96	10	25 รอบ
50	5	
60	4	

ตารางที่ 12 แสดงอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาของ DNA sequencing

9) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไป purify เพื่อเอา terminator dye ส่วนเกินออก

10) นำดีเอ็นเอ 20 ไมโครลิตร จากข้อ 3 ใส่ลงใน 75% isopropanol 80 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

11) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

12) ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 20 นาที จะได้ตะกอนของดีเอ็นเอ

13) ล้างตะกอนด้วย 75% isopropanol 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยง 5 นาที

14) นำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Vacuum

15) Preparing and loading the sample

16) ละลายตะกอนดีเอ็นเอ STR (Template Suppression Reagent) 25 ไมโครลิตร แล้วเขย่า

17) จากนั้นแยกสายดีเอ็นเอ ด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปแช่ใน ice box

18) เปลี่ยนใส่หลอดใหม่เพื่อเตรียมเข้าเครื่อง automate sequence

19) วิเคราะห์ผลโดยดูผลการเปลี่ยนลำดับเบส