บทที่ 5

วิธีทำ

1. การเตรียมชิ้นเนื้อสำหรับใช้ในงานวิจัย (tissue section preparation)
    1.1 คัดเลือก paraffin-block section ของคนไข้ที่ต้องการจากแผนกพยาธิวิทยา และนำมาตัดเป็นสไลด์ซึ่งมีความหนาประมาณ 5μ จำนวน 3-5 แผ่น
    1.2 นำสไลด์ที่ได้มาผ่านขบวนการนำพาราฟินออกด้วย xylene
    1.3 ล้าง xylene ด้วย absolute ehanol เป็นเวลา 15 นาที
    1.4 ทำการย้อมสไลด์ด้วย eosin stock solution จำนวน 1-2 หยด และล้างสีที่มากเกินไปออกด้วย 95% ethanol
    1.5 ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2. การตัดชิ้นเนื้อระดับจุลภาค (microdissection)
    2.1 นำสไลด์มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเบอร์ 27-30 เขี่ยเอาเฉพาะเนื้อเยื่อส่วนที่ต้องการคือเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อตับปกติตามลำดับ
    2.2 นำชิ้นเนื้อที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.1 ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุ PET B solution จำนวน 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำการแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3. นำชิ้นเนื้อที่ได้จากการเตรียมมาสกัด DNA
    3.1 นำสารละลายที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.2 มาผสมกับ 25:24:1 phenol / chloroform / isoamyl alcohol ในปริมาณที่เท่ากัน
    3.2 นำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
    3.3 หลังจากขั้นตอนที่ 3.2 จะเห็นส่วนผสมที่แยกชั้นกันอยู่ ใช้ micropipette ดูดแต่ส่วนที่เป็นสารละลายที่เป็นน้ำชั้นบนและใส่ 24:1 chloroform/isoamyalcohol จำนวนเท่าเท่ากันลงไปเพื่อขจัด phenol ที่อาจจะหลงเหลืออยู่
    3.4 ทำขั้นตอน 3.2 ซ้ำอีกครั้ง เมื่อเสร็จขั้นตอนนี้จะได้สารละลายที่มี DNA เป็นส่วนผสม
    3.5 ประเมินปริมาณสารละลาย DNA ที่ได้ แล้วเติม 3 M Sodium acetate, pH 5.2 จำนวน 1/10 ของปริมาณที่ประเมินได้

3.6 เติม 1 - 2 ไมโครลิตรของ 20 mg/ml glycogen

3.7 เติม 100% alcohol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย DNA และแช่ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

3.8 นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ 15 นาที

3.9 เทน้ำส่วนบนออก หลังจากนั้นใส่ 70% ethyl alcohol จำนวน 500 ไมโครลิตร

3.10 ทำขั้นตอนที่ 3.8 อีกครั้ง

3.11 จะเห็น DNA ที่สกัดได้ตกตะกอนเป็น pellet อยู่ส่วนล่างของหลอด ค่อยๆเทสารละลายส่วนบนออกทิ้งไว้ให้แห้งและทำการละลายตะกอน DNA ด้วยสารละลาย TE buffer จำนวน 20 ไมโครลิตร และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมนำมาทำการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

4. เพิ่มปริมาณ DNA จากชิ้นเนื้อที่สกัดได้ทั้งจีโนมด้วยการทำ PCR โดยใช้ primer ที่ไม่จำเพาะเจาะจง (DOP, degenerated oligonucleotides primers)

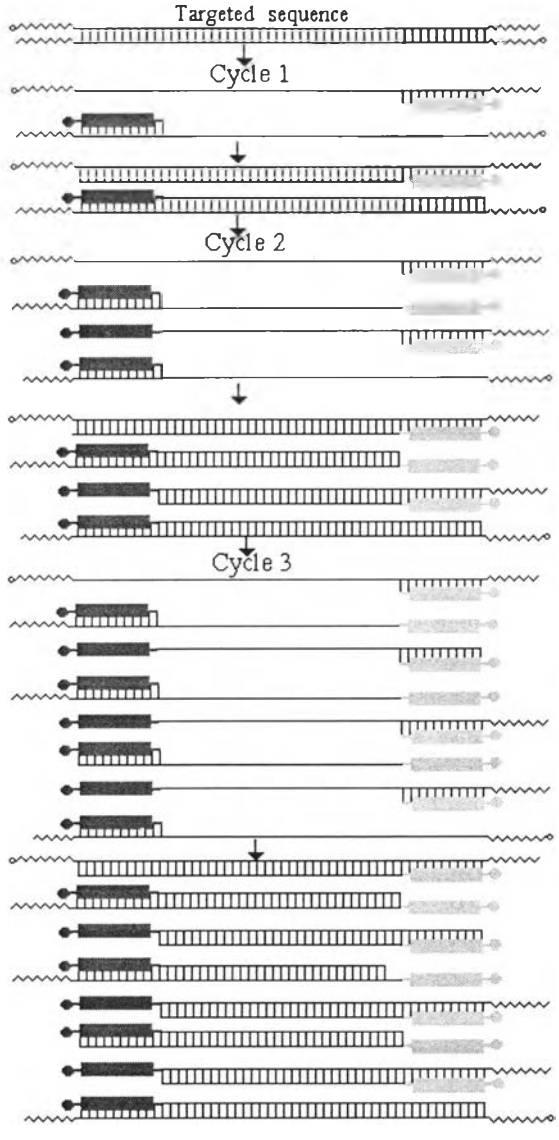
PCR (polymerase chain reaction) เป็นเทคนิคสำหรับการเพิ่มขยายจำนวนสารพันธุกรรมที่ทำได้ง่ายโดยปฏิกิริยาในหลอดทดลอง (in vitro) โดยมีหลักการพื้นฐานเลียนแบบธรรมชาติของขบวนการ DNA replication โดยปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทำให้มีการเพิ่มจำนวนอณู DNA เป็น 2 เท่าในทุกทุกรอบของปฏิกิริยา ซึ่งจะมี 3 ขั้นตอนในแต่ละรอบ (รูปที่ 12)

1. Denaturation เกิดที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90 -95 องศาเซลเซียส ทำให้ DNA ต้นแบบ (DNA template) ที่เป็นเกลียวคู่ (double-strand DNA) แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว 2 สาย (two single-strands DNA) อยู่เป็นอิสระและทำหน้าที่เป็นต้นแบบในการเกิดการสังเคราะห์สาย DNA ต่อไป

2. Primer annealing primers 2 สายที่ถูกสังเคราะห์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับปลาย 3' (3' end) ของ DNA ต้นแบบแต่ละสายเข้าไปจับตรงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมบนสาย DNA ต้นแบบ (annealing sites) ขบวนการนี้จะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิเหมาะสมในช่วง 40 - 60 องศาเซลเซียส

3. Primer extension (amplification step) ขั้นตอนการเพิ่มขยายจำนวน DNA เกิดขึ้นโดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งทำหน้าที่ต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของ primers ทั้งสองในทิศทางจาก 5' ไป 3' ในการวิจัยนี้ใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งต้องการสภาวะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

แต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR จะสามารถเพิ่มจำนวนผลิตผล (PCR product) ได้เป็นสองเท่าถ้าปฏิกิริยานั้นมีความสมบูรณ์ 100 เปอร์เซ็นต์ และโดยปกติจะให้ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นซ้ำๆกันจำนวน 30 - 40 รอบ



รูปที่ 12 แสดงขั้นตอนที่สำคัญของปฏิกิริยา PCR

Primers ที่ใช้ในขั้นตอนนี้คือ DOP หรือที่เรียกว่า degenerated oligonucleotides primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ทั้งสายโดยไม่จำเพาะเจาะจงตรงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง และขั้นตอนนี้เรียกว่า DOP-PCR จุดประสงค์ของขั้นตอนนี้เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อให้มีจำนวนมากพอที่จะนำมาทำการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา DOP-PCR มีดังต่อไปนี้

1. DNA template ที่สกัดได้
2. 20 μM ของ oligonucleotide primers
3. 20 mM $MgCl_2$
4. 500 mM KCl
5. 100 mM Tris-HCl, pH 8.4
6. 2 mM each dNTP (dATP, dCTP, dGTP)
7. 2 units *Taq* DNA polymerase

ขั้นตอนของการทำ PCR คือ ช่วงแรกทำ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเริ่มทำปฏิกิริยา PCR โดย 5 รอบแรกใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 องศาเซลเซียส 1 นาที และช่วงเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียสให้เป็น 72 องศาเซลเซียสอีก 3 นาที และทำปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียสอีก 1 นาที 35 รอบหลังใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 62 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที และจบปฏิกิริยาด้วยขบวนการ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

5. เพิ่มปริมาณ DNA เฉพาะตรงบริเวณที่ต้องการด้วยการใช้ primers ที่จำเพาะ

DNA ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณจากขั้นตอนที่ 4 จะถูกนำมาเพิ่มปริมาณเฉพาะตำแหน่งที่ต้องการโดยการทำ PCR และหลังจากนั้นทำการหา LOH โดยใช้ short tandem repeat polymorphic markers (STRPs) โดยในการศึกษานี้มี markers ที่ใช้ 9 markers ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ตำแหน่งของ STRPs ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Chromosome arm	Loci	Location
1p	AMY-2B	1p21
1q	AGT	1q42-1q43
4q	D4S192	4q25-4q34
	D4S194	4q25-4q34
8q	D8S88	8q22.2
16q	D16S514	16q21
18q	D18S70	18q23
	D18S55	18q22.1
	D18S57	18q12.2-18q13.3

5.1 ขั้นตอนการติดฉลาก oligonucleotide DNA ด้วยสารรังสี (End-labelling primer)

เนื่องจาก oligonucleotide สังเคราะห์มีสาย 5' เป็น OH group จึงใช้คุณสมบัติของเอนไซม์ T_4 polynucleotide kinase เติม γ^{-32}P-ATP เข้าไปที่ 5' OH group ของสาย oligonucleotide ได้ทันที

สารละลายในปฏิกิริยามีดังต่อไปนี้

1. 70 mM Tris-HCl, pH 7.4
2. 10 mM $MgCl_2$
3. 5 MDTT
4. T4 kinase
5. γ^{-32}-P-ATP
6. primers ที่ต้องการติดฉลาก

หลังจากผสมส่วนประกอบทั้งหมดแล้วทำการปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

5.2 เพิ่มปริมาณ DNA บริเวณที่ต้องการด้วยขบวนการ PCR

สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนนี้มีดังต่อไปนี้

1. 10 mM dNTP each
2. 10 mM Tris-HCl, pH 8.4
3. 50 mM Kcl
4. 1.5 mM $MgCl_2$
5. DNA ที่ผ่านขบวนการเพิ่มปริมาณจากขั้นตอนที่ 4
6. Primers แต่ละคู่ที่ติดฉลากสารรังสีไว้แล้วตามขั้นตอนที่ 5.1

ทำปฏิกิริยาเพิ่มขยาย (amplification) โดยขบวนการหลัก 3 ขั้นตอนซึ่งควบคุมอุณหภูมิและเวลาตามที่กำหนดโดยอาศัยเครื่องอัตโนมัติ (Programmable DNA Thermal Cycler) ทั้งหมด 25 รอบ

ขั้นตอน DNA denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 4 นาที

ขั้นตอน primer annealing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที

ขั้นตอน primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

6. ขั้นตอนตรวจวิเคราะห์ผลิตผล PCR (analysis of PCR products) โดยใช้วิธี gel electrophoresis

gel electrophoresis เป็นวิธีการแยกขนาดของ DNA โดยใช้การเคลื่อนที่ตามกระแสไฟฟ้า

6.1 ขั้นตอนการ run gel electrophoresis

6.1.1 เตรียม polyacrylamide gel

สารเคมีที่ใช้ประกอบด้วย

1. Urea
2. 40 % acrylamide bis
3. 10 x TBE
4. 10% ammonium persulfate
5. TE med

หลังจากผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันเรียบร้อยแล้วให้ทำการใส่ลงไปใน gel chamber และทิ้งไว้ให้แข็ง

6.1.2 ต่อขั้วไฟฟ้าของ electrophoretic chamber เข้ากับ power supply ปรับให้มีความต่างศักย์ไฟฟ้าประมาณ 90 วัตต์ รอจนกระทั่งเจลมีอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส

6.1.3 ผสม PCR products กับสี dye และนำ PCR products ที่ผสมสีแล้วไป incubate ที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาทีเพื่อแยกสาย DNA ออกเป็นสายเดี่ยว

6.1.4 หลังจากครบเวลาแล้ว นำมาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วเพื่อไม่ให้สาย DNA กลับมาจับกันอีก

6.1.5 หยอด PCR products ที่ผ่านขบวนการทั้งหมดเรียบร้อยแล้วลงไปตามช่องที่กำหนดไว้ และเปิดกระแสไฟฟ้าให้พาแถบสีเคลื่อนที่จนได้ระยะทางที่ต้องการ

6.1.6 นำแผ่นเจลออกมาจาก chamber และห่อไว้ด้วยพลาสติกถนอมอาหาร

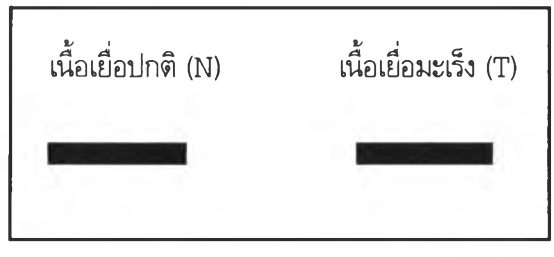
6.1.7 นำเจลมาประกบกับ phosphor screen (Kodak) เพื่อให้สารรังสีทำปฏิกิริยากับแผ่นฟิล์ม

6.1.8 ทำการ scan ด้วยเครื่อง phosphor image (strom) จะได้ลักษณะแถบของ DNA ที่ติดฉลากรังสีไว้ตามต้องการ

6.2 วิเคราะห์แถบ DNA (band pattern analysis)

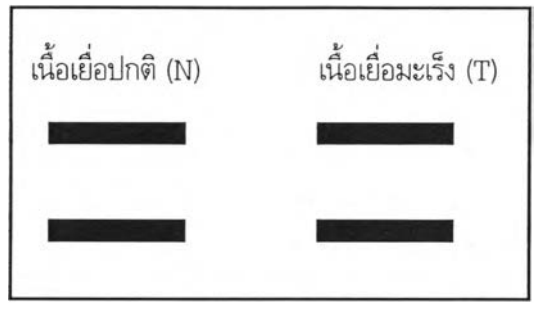
ตรวจวิเคราะห์ภาวะ LOH โดยใช้ตาเปล่าเปรียบเทียบความเข้มของแถบ DNA ที่ได้จากเนื้อเยื่อตับปกติและเนื้อเยื่อมะเร็ง ผลที่ได้จะออกมาเป็น 4 แบบดังต่อไปนี้

1. Uninformative case (U) คือ case ที่ได้แถบ DNA ของเนื้อเยื่อปกติออกมาเพียงแถบเดียว ซึ่งหมายความว่าอัลลีลที่ใช้ทดสอบนั้นไม่มีความเป็น heterozygote คือไม่มีความแตกต่างของลำดับชุดของ STRPs ระหว่างโครโมโซมคู่เหมือน ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้วิเคราะห์ได้



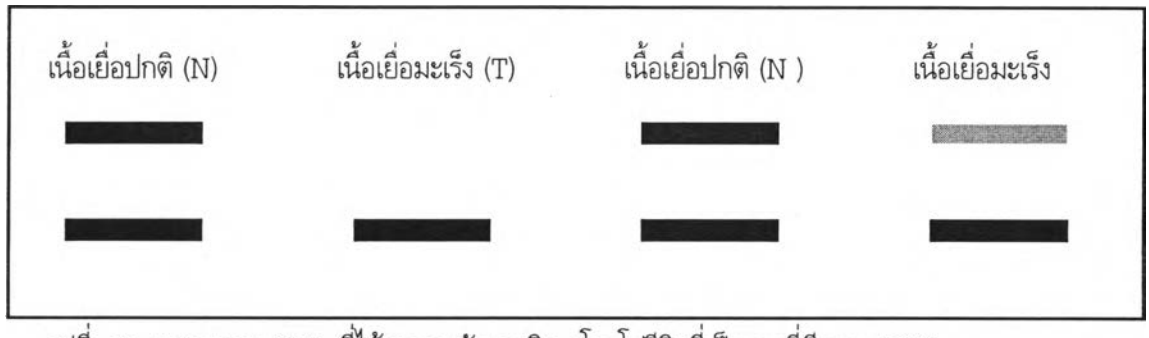
รูปที่ 13 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการรันเจลอิเลคโตรโฟรีซิสที่เป็น uninformative case

2. Retain heterozygote คือแถบ DNA เนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งมีสองอัลลีล (สองแถบ) ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงว่าไม่มีการขาดหายไปของชิ้นส่วนของโครโมโซมในเนื้อเยื่อมะเร็ง



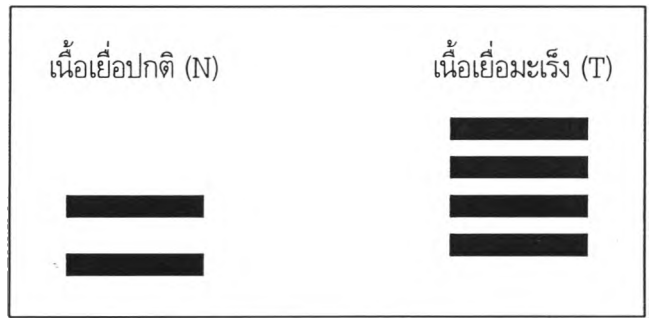
รูปที่ 14 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการรันเจลอิเลคโตรโฟรีซิสที่เป็นรายปกติ (retain heterozygote)

3. LOH คือภาวะที่เนื้อเยื่อที่ปกติมีสองอัลลีลแต่ของเนื้อเยื่อมะเร็งมีเพียงอัลลีลเดียวอย่างชัดเจนหรือมีการลดลงของความเข้มของอีกอัลลีลลงไปอย่างเห็นได้ชัด



รูปที่ 15 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการรันเจลอิเลคโตรโฟรีซิสที่เป็นรายที่มีภาวะ LOH

4. Microsatellite instability (MSI,I) คือภาวะที่เนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็งมีแถบ DNA ที่เกิดจากการจับของ primers ซ้ำกันหลายๆชุด ความผิดปกติแบบนี้เกิดจากมีความผิดปกติระดับโมเลกุลของเซลล์มะเร็งเกิดเนื่องจากความผิดปกติของ miss-matched repair genes



รูปที่ 16 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากการรันเจลอิเลคโตรโฟรีซิสที่เป็นลักษณะของ MSI

I18557058