วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการทำการวิจัยมีดังนี้

1. เก็บตัวอย่างตรวจของผู้ป่วย CML
2. เพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาวเพื่อตรวจหาโครโมโซมฟิลาเดลเฟีย (Ph^1) โดยวิธีไซโตเจเนติคส์
3. ตรวจหายีนลูกผสม bcr / abl โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ ซึ่งแบ่งขั้นตอนออกได้ดังนี้

   3.1 สกัด mRNA ตามวิธี Chomezynski และ Sacchi [26]

   3.2 สร้างดีเอ็นเอคู่สม หรือ cDNA (complementary DNA)

   3.3 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ แบบ Nested PCR

1. <u>เก็บตัวอย่างของผู้ป่วย CML</u>

เจาะเก็บไขกระดูกประมาณ 2-5 มล. หรือเลือด ประมาณ 10-20 มล. จากผู้ป่วย CML ที่เข้ารักษาตัวในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ใส่หลอดปราศจากเชื้อ ซึ่งมีเฮปารินเป็นตัวกันเลือดแข็ง (5θ iu/ 1 ml) โดย รศ.นพ.อานุภาพ เลขะกุล หรือโลหิตแพทย์ที่สังกัดสาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ท่านอื่น ๆ นำส่งห้องปฏิบัติการหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทันทีเพื่อดำเนินขั้นตอนต่อไป ถ้าไม่สามารถส่งได้ทันที ให้เก็บไว้ที่ 4-8°C ก่อนแต่ไม่ควรนานเกิน 24 ชั่วโมง เพราะจะทำให้ mRNA สลายได้

ผู้ป่วย 1 คน อาจถูกเจาะเก็บตัวอย่างส่งตรวจมากกว่า 1 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการติดตามผลการรักษา และการดำเนินของโรค โดยการเจาะส่ง 1 ครั้งถือเป็น 1 ตัวอย่างตรวจ

2. <u>เพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาวเพื่อตรวจหาโครโมโซมฟิลาเดลเฟีย(Ph^1) โดยวิธีไซโตเจเนติคส์</u> [27]

เพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาวจากไขกระดูกหรือเลือดที่อุณหภูมิ 37^0C นาน 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์แบ่งตัว หลังจากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ (harvesting) เพื่อให้ได้โครโมโซมที่อยู่ในระยะเมตาเฟส (metaphase) อันเป็นระยะที่โครโมโซมหดสั้นที่สุด เหมาะกับการนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

<u>น้ำยาและสารเคมีที่ใช้</u>

- อาหารเลี้ยงเซลล์ มี 2 ชนิด คือ RPMI 1640 และ Mc Coy's5A ซึ่งมี fetal calf serum ร้อยละ 15
- Colchicine ความเข้มข้น 10 µl/ 1 ml
- 0.075 M Kcl (hypotonic) ทำให้เซลล์บวม
- Carnoy's Fixative (methanol 3 ส่วน : acetic 1 ส่วน)
- 0.25 gram % trypsin
- Giemsa

<u>วิธีการ</u>

<u>2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)</u>

หยดเลือดหรือไขกระดูกลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 และ Mc Coy's 5A ในปริมาณเม็ดเลือดขาว

10^6 เซลล์ / 1 มล. อาหารเลี้ยงเซลล์ ทำเป็น 2 ชุด ชุดแรกเลี้ยงในตู้อบ 37°C นาน 24 ชั่วโมงและชุดที่สองเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง

2.2 การเก็บเกี่ยวเซลล์ (Harvesting)

ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเซลล์ประกอบด้วย

2.2.1 หยด colchicine ให้มีความเข้มข้นเป็น 1 µl /1ml ลงในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแล้วอบต่อที่ 37°C อีก 1 ชั่วโมง เพื่อหยุดเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวให้อยู่ในระยะเมตาเฟส หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ 1000 rpm นาน 10 นาที

2.2.2 เทส่วนน้ำใสข้างบนทิ้ง เหลือแต่ตะกอนเซลล์ที่ก้นหลอด เติม 0.075 M KCl จำนวน 5 มล. ลงไปผสมกันให้ดี ปั่นที่ 1000 rpm นาน 10 นาที

2.2.3 เทส่วนน้ำใสข้างบนทิ้ง เติม 0.075 M KCl จำนวน 5 มล. ลงในตะกอนเซลล์อีกครั้ง ตั้งไว้ที่ 37°C นาน 15-20 นาที ก่อนนำไปปั่นอีกครั้ง

2.2.4 เทส่วนน้ำใสทิ้ง หยด fixative จำนวน 3 มล. ที่ละหยดๆ ลงไปในตะกอนเซลล์ค่อยๆ ผสมให้เข้ากันดี ก่อนนำไปปั่นที่ 1000 rpm 10 นาที ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง

2.2.5 หลังจากปั่นครั้งสุดท้าย ตะกอนเซลล์ที่ได้จะเติม fixative ปริมาณ 0.05-1 มล. ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณของตะกอนเซลล์ที่ได้ ผสมให้เข้ากัน หยดส่วนผสมนี้ 1-2 หยด ลงบนสไลด์แก้วที่สะอาด อังใต้โคมไฟเพื่อให้สไลด์แห้ง เก็บสไลด์ไว้ที่ 37°C นาน 1 คืน

2.3 การย้อมแถบสีบนโครโมโซม (chromosome banding)

จุ่มสไลด์ที่เก็บค้างคืนไว้จากข้อ 2.2.5 ใน 0.25 gram % typsin 10-30 วินาที และจุ่มลงในสี 2% Giemsa นาน 4 นาที ล้างสีที่ติดสไลด์มากเกินไปออกด้วยน้ำกลั่น ตากให้แห้ง และนำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์

2.4 การวิเคราะห์โครโมโซม (chromosome analysis)

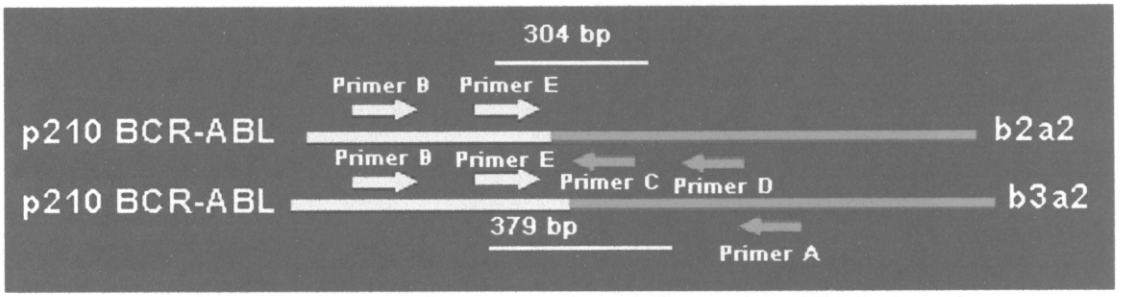
โดยดูการจัดเรียงโครโมโซมตามรูปร่างและขนาดที่เรียกว่าการทำ karyotyping เพื่อดูว่ามีโครโมโซมแท่งใดขาดหรือเกินมา หลังจากนั้นทำการเทียบแถบสีบนโครโมโซมกับแถบสีมาตรฐานตาม ISCN(1985) ดูว่ามีการเรียงตัวที่ผิดปกติของโครโมโซมที่เรียกว่า "translocation" เพื่อหาโครโมโซมฟิลาเดลเฟีย (ph^1) หรือความผิดปกติของโครโมโซมแบบอื่นๆ เช่นการขาดไปบางส่วน (deletion), การที่มีแต่แขนสั้นหรือแขนยาวของโครโมโซมต่อกัน (isochromosome) เป็นต้น

จะเริ่มเก็บเกี่ยวเซลล์ชุดแรกที่เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมงก่อนถ้าได้โครโมโซมที่มีคุณภาพดีคือมีขนาดยาว, การกระจายตัวดีไม่ค่อยทับกันและมีจำนวนไมโตซิสมากพอก็จะไม่เก็บเกี่ยวชุดที่ 2 แต่ถ้าชุดแรกไม่ดีก็จะเก็บเกี่ยวเซลล์ชุดที่ 2 โดยจะปรับวิธีการใหม่โดยดูปัญหาจากการเก็บเกี่ยวครั้งแรก เช่นเพิ่มเวลา colchicine ให้นานขึ้น หรือปรับการใช้ fixative ใหม่ เป็นต้น

3. ตรวจหายีนลูกผสม bcr / abl โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

เริ่มจากการสกัดอาร์เอ็นเอ จากตัวอย่างตรวจทั้งที่เป็นไขกระดูกหรือเลือดของผู้ป่วย CML ตามวิธีของ Chomzynske และ Sacchi หลังจากนั้นใช้อาร์เอ็นเอที่ได้เป็นแม่พิมพ์เพื่อสร้าง cDNA โดยออกแบบไพรเมอร์ให้จับกับบริเวณเอกซอน 3 ของยีน ABL คือ **ไพรเมอร์ A** (การเรียงตัวของเบส หรือ base sequence ดูได้จากหัวข้อ 3.3 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ แบบ Nested PCR)) จะใช้ไพรเมอร์ A เพียงตัวเดียวให้จับทางด้าน 3' ของอาร์เอ็น

เอแม่พิมพ์(RNA template) (ภาพที่ 5) และเมื่อเอ็นไซม์รีเวอส์ทรานสคริปเทส (reverse transcriptase enzyme) ทำงานจะสร้างสาย cDNA จากทางด้าน 3' ไปทางด้าน 5'



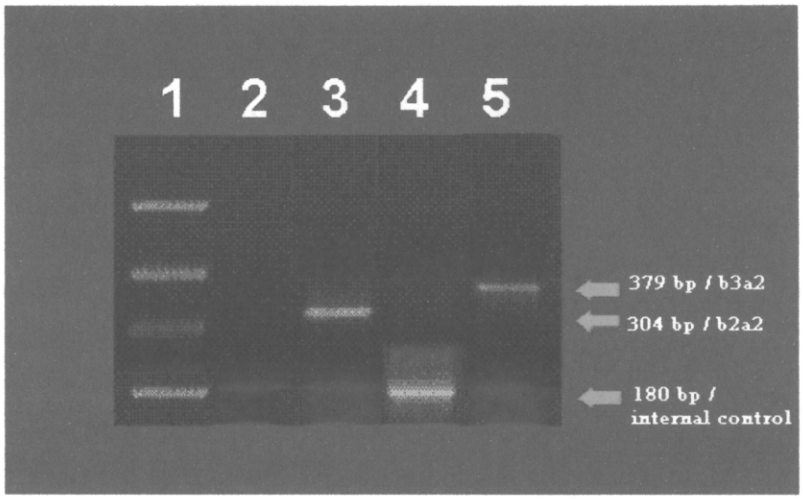
ภาพที่ 5 : แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ (primer) แต่ละคู่ที่ใช้ในการสร้าง cDNA และทำ nested PCR รวมทั้งขนาดของ DNA ที่ได้เมื่อมีและไม่มีเอกซอน b3

ใช้ cDNA ที่ได้เป็นแม่พิมพ์ เพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยใช้**ไพรเมอร์ A** จับกับเอกซอน 3 ของยีน ABL กับ **ไพรเมอร์ B** จับกับเอกซอน b1 ของ ยีน M-bcr การขยายดีเอ็นเอทำ 31 รอบ รายละเอียดดูในวิธีการ)

หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์อีกครั้ง ที่เรียกว่า nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ใหม่ที่อยู่ถัดจากไพรเมอร์คู่แรกเข้ามาด้านใน เรียกว่า internal primer ไพรเมอร์คู่นี้คือ **ไพรเมอร์ D** ซึ่งจะจับกับเอกซอน 3 ของยีน ABL และ **ไพรเมอร์ E** ซึ่งจะจับกับเอกซอน b1 ของยีน M-bcr การขยายดีเอ็นเอทำ 31 รอบ เช่นเดียวกันกับครั้งแรก ดีเอ็นเอที่ได้จะนำไปอ่านผลโดยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซิส และย้อยด้วยสี ethidium bromide

ถ้ามียีนลูกผสม bcr/abl ก็จะเห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 379 เบสกับ 304 เบส ขึ้นกับว่าจะได้เมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอแบบไหนมา ถ้าเป็นแบบที่มีเอกซอน b3 ของ M-bcr ก็จะได้ขนาด 379 เบส แต่ถ้าไม่มี b3 มีแต่ b2 ก็จะเป็นขนาด 304 เบส ถ้าไม่มียีนนี้เลย ก็จะไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏให้เห็น ซึ่งจะมีคำถามว่าจริงๆแล้ว ไม่มีดีเอ็นเอจริงๆหรือ ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอาร์ทีพีซีอาร์ล้มเหลว ดังนั้นจึงได้ทำ internal control โดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน ABL บนโครโมโซมคู่ที่ 9 ควบคู่ไปด้วยซึ่งยีนตัวนี้จะไม่ถูกทำให้ขาดหายไปเนื่องจากการเกิด "translocation" ดังนั้จะมีในทุกตัวอย่างตรวจ ถ้า internal control ไม่มีแถบดีเอ็นเอให้เห็นก็แปลว่าการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่ได้ผล แต่ถ้า interlnal control ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้เห็น แต่ไม่เห็นแถบดีเอ็นเอของยีนลูกผสมก็แปลว่าตัวอย่างตรวจนั้น ไม่มียีนลูกผสม bcr/abl จริงๆ (ภาพที่ 6)

ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับ internal control คือ **ไพรเมอร์ A** ซึ่งจับกับเอกซอน 3 ของยีน ABL กับ**ไพรเมอร์ C** จับกับเอกซอน 2 ของยีน ABL จะให้ดีเอ็นเอขนาด 180 เบส



ภาพที่6 : แสดงแถบดีเอ็นเอของยีนลูกผสมbcr/abl แถวที่ 1 เป็น DNA marker, แถวที่2 ไม่มี DNA แม่พิมพ์, แถวที่ 3,5 DNA ขนาด 379 และ 304 เบส แถวที่ 4 ขนาด 180 เบส เป็น internal control

3.1 สกัด mRNA ตามวิธี Chomezynski และ Sacchi

อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ ต้องทำด้วยความระมัดระวังอย่างมาก เพราะอาร์เอ็นเอสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ RNAase ที่มีอยู่ทั่วไปแม้แต่มือของเราเอง ดังนั้นจึงควรใส่ถุงมือทุกครั้งที่ทำงานและเครื่องแก้วที่ใช้ต้องแน่ใจว่าไม่มีเอนไซม์ RNAase ซึ่งทำได้โดยใช้เครื่องแก้วใหม่หรือแช่ในสารเคมี DEPC ซึ่งจะสลายเอนไซม์ RNAase ได้

น้ำยาและสารเคมีที่ใช้

- lysis bufer (155 mM NH_4Cl, 10 mM KHCO 3,0.5 mM EDTA)
- Denaturing solution (Solution D) (4M guanidinium thiocyante, 25 mM Sodium citrate pH7, 0.5 % sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethano)
- 2 M Sodium acetate pH 4
- Phenol (water saturated)
- Chloroform-isoamyl alcohol (49:1)
- isopropanol
- 75% ethanol
- 0.2 % EDPC water

วิธีการ

3.1.1 แยกเม็ดขาวออกจากเม็ดเลือดแดงโดย

- ผสมไขกระดูกหรือเลือด 1 ส่วน กับ lysis buffer 3 ส่วน ผสมให้เข้ากัน

- ปั่นที่ 2000 rpm, 4^{0}C นาน 10 นาที เทส่วนน้ำด้านบนทิ้ง แล้วเติม lysis buffer ทำเหมือนเดิมอีก 1 ครั้ง เก็บเม็ดเลือดขาวที่ได้ไว้ที่ -70^{0}C อย่างน้อย 1 คืน

3.1.2 ทำให้เม็ดเลือดขาวแตก (homogenizing) โดย

- นำเม็ดเลือดขาวที่เก็บไว้ที่ – 70^0 ออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเติม solution D ที่มี RNAase inhibitor อัตราส่วน 1 มล. ต่อเม็ดเลือดขาว 2-10 x 10^6 เซลล์ ลงไปทันที เพื่อยับยั้งการทำงานของ RNAase ที่จะย่อยสลาย mRNA ใช้ pipette เป่าหลาย ๆ ครั้งจนเป็นเนื้อเดียวกัน

- เติม 2 M Sodium acetate pH 4 ปริมาณ 0.1 มล. ลงไปผสมให้เข้ากัน เขย่าเบาๆ โดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมาหลายๆ ครั้งจนเป็นเนื้อเดียวกัน ระวังอย่าเขย่าแรงจะทำให้ RNA ที่ได้คุณภาพไม่ดี

- เติม phenol (water saturated) ปริมาณ 1 มล. ลงไป ผสมด้วยวิธีเดิม

- เติม chloroform-isoamy alcohol (49:1) ปริมาณ 0.2 มล. ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixture) ก่อนนำไปปั่นที่ 10,000 g , 4^0C นาน 20 นาที

- แยกเอาเฉพาะตะกอน RNA ที่ก้นหลอด เติม Solution D ประมาณ 0.3 – 0.5 มล. และเติม isopropanol ปริมาณเท่าๆ กัน ผสมให้เข้ากัน,เก็บที่ -20^0C อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปปั่น 10,000 g ที่ 4^0C นาน 20 นาที

- แยกตะกอน RNA ออกมาล้างด้วย 75 % ethanol ปริมาณ 1 มล. 2 ครั้ง

- ทำให้แห้งโดยวิธี Vacuum dried

- ละลายตะกอนที่ได้ใน 0.2 % DEPC water จำนวน 50 µl

- แบ่งส่วนหนึ่งไปวัดความเข้มแสง (OD 260) เพื่อหาปริมาณ RNA ที่สกัดได้ ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ 4^0C จนกว่าจะใช้งาน

การคำณวนปริมาณ RNA ที่สกัดได้ จำเป็นสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพราะว่า ถ้ามี RNA มากเกินกว่า 1 µg จะทำให้การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ผลไม่ดี

3.2 การสร้าง cDNA (complementaryDNA) [7,28]

ทำโดยการใช้ mRNA ที่สกัดได้เป็นแม่พิมพ์ ใช้ไพรเมอร์ A เป็นตัวจับที่บริเวณยีน ABL และเอ็นไซม์รีเวอส์ทรานสคริปเทสเป็นตัวสร้างสาย cDNA รายละเอียดดังกล่าวแล้ว

น้ำยาและสารเคมีที่ใช้

- 10x PCR buffer (10 mM tris-HCl pH 8.3,50 mM Kcl $MgCl_2$, 0.01 % gelatin)
- 10 mM dNTPs
- 40 u / µl RNain (RNAase inhibitor)
- 20 u / µl MMLV-RT (Moloney Murine Reverse Transcriptase)
- 4 pM primer A (5' TGT GAT TAT AGC CTA AGA CCC GGA GCT TTT 3')

วิธีการ

เตรียมส่วนผสม โดยมีส่วนประกอบดังนี้

10x PCR buffer	2.0 µl
dNTPs	8.0 µl
Primer A	2.5 µl
RNain	0.5 µl

MMLV-RT	1.0 µl
ตัวอย่าง RNA	6.0 µl

- ตั้งส่วนผสมที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C นาน 1 ชั่วโมง ควรใช้ water bath จะดีกว่าเพราะสามารถควบคุมอุณหภูมิได้คงที่มากกว่า หลังจากนั้นรีบวางลงบนน้ำแข็งทันทีที่ครบเวลา เป็นการป้องกันไม่ให้ cDNA ที่ได้เกิดการม้วนตัว ซึ่งจะทำให้การทำงานขั้นตอนต่อไปยากขึ้นหรือไม่ประสบผลสำเร็จ เก็บ cDNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ - 20 ^{0}C จนกว่าจะใช้งาน

3.3 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ แบบ Nested PCR

การตรวจหายีนลูกผสม bcr / abl ทำได้โดยใช้การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้คร่อมจุดต่อของยีนลูกผสมนั้นแล้วอ่านผลโดยวิธีอิเลคโตรโฟลิซิสและย้อมด้วยสารเอทิเดียมโบรไมด์

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์นี้ต้องทำ 2 ครั้ง (nested PCR) เพราะทำรอบเดียวให้ผลไม่ชัดเจนพอจะอ่านได้อย่างแม่นยำ เนื่องจาก RNA ของยีนลูกผสม bcr / abl มีน้อย โดยจะใช้ไพรเมอร์อีกชุดที่อยู่ถัดเข้ามาจากชุดแรก (ภาพที่ 5)

น้ำยาและสารเคมีที่ใช้

- 10x PCR buffer ($MgCl_2$free) (10 mM tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.01 % gelatin)
- 25 mM MgCl
- Tag polymerase
- 2 mM dNTPs
- 3 % Agaose gel (Nusieve และ ethidium bromide (1 mg/ml)
- 4 pM primer ของแต่ละตัว

ไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งแรก

Primer A : 5' TGT GAT TAT AGC CTA AGA CCC GGA GCT TTT 3'

Primer B : 5' GAG CGT GCA GAG TGG AGG GAG AAC ATC CGG 3'

วิธีการ

3.3.1 ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 1 โดยเจือจาง cDNA ที่สร้างไว้ให้มีความเข้มข้นของ mRNA 1 µg / µl เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

10x PCR buffer ($MgCl_2$ free)	5.0 µl
MgCl2(25mM)	5.0 µl
ไพรเมอร์ A	5.0 µl
ไพรเมอร์ B	5.0 µl
dNTPs	4.0 µl
Tag polymerase	0.5 µl
cDNA	5.0 µl
H_2O	20.5 µl

- ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR condition) จะเหมือนกันทั้ง 2 ครั้ง

รอบที่ 1	denaturation	95°C	5 นาที
รอบที่ 1-15	denaturation	94°C	1 นาที
	annealing+extension	65°C	1 นาที
รอบที่ 16-30	denaturation	94°C	1 นาที
	annealing+extension	65°C	2 นาที
รอบที่ 31	extension	65°C	2 นาที
		72°C	7 นาที

3.3.2 ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 2 โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 1มา ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์อีกครั้งด้วยน้ำยา,สารเคมีและขั้นตอนวิธีการเหมือนกัน แต่ใช้ไพรเมอร์อีกชุดคือไพรเมอร์ D และ E ดังนี้

ไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่สอง

Primer D : 5' CAC CCG GAG CTT TTC ACC TTT AGT T 3'

Primer E : 5' GAA GAA GTG TTT CAG AAG CTT CTC C 3'

3.3.3 นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 2 ปริมาณ 2 µl ไปทำ 3% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidum bromide อ่านแถบดีเอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 6

3.3.4 การทำ internal control น้ำยาและวิธีการเหมือนที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อหายีนลูกผสม bcr/abl เพียงแต่ทำปฏิกิริยาซีพีอาร์เพียงครั้งเดียวและใช้ไพรเมอร์ต่างไป ดังนี้

Primer A : 5' TGT GAT TAT AGC AGA CCC GGA GCT TTT 3'

Primer C : 5' TTC AGC GCC CAG TAG CAT CTG ACT 3'

แถบดีเอ็นเอที่ได้ จะมีขนาด 180 เบส