วิธีการศึกษา

1. ผู้เข้าร่วมวิจัยทุกคนได้รับคำอธิบายและ เอกสารชี้แจงรายละเอียดข้อมูล/คำแนะนำของโครงการวิจัยจนเข้าใจ และสมัครใจเข้ารับการศึกษาโดยลงนามในหนังสือยินยอมโดยได้รับการบอกกล่าวและเต็มใจ

2. การเก็บข้อมูล

2.1 ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการซักประวัติโดยผู้ทำวิจัย เพื่อถามข้อมูลทั่วไป ภูมิลำเนาที่เกิด ประวัติการดื่มสุรา ประวัติอาการอ่อนแรงเป็นๆหายๆในอดีต กิจกรรมที่กระทำก่อนมีอาการอ่อนแรง ประวัติสาเหตุโรคไทรอยด์เป็นพิษตาม ระดับ potassium ขณะที่มี attack

2.2 ผู้เข้าร่วมวิจัยได้รับการเจาะเลือด venous blood 10 ml โดยเก็บเป็น EDTA blood10 ml

3. เกณฑ์การคัดผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

1. Case ได้แก่ ผู้ป่วยโรคไทรอยด์เป็นพิษที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น THPP

เกณฑ์ที่คัดเลือกเข้าโครงการ

1. ผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษที่มีผลการตรวจระดับฮอร์โมนไทรอยด์ (TSH, FT4, T3) ยืนยันการวินิจฉัย

2. มีอาการอ่อนแรงต้นแขนและขาเป็นพักๆร่วมกับมีระดับโพแทสเซียมต่ำ โดยมีผลการตรวจทางห้องปฏิบัติระหว่างที่มีอาการ ระดับโปแตสเซียม < 3.5 mg/dl

3. ไม่มีอาการและอาการแสดงที่บ่งบอกถึงสาเหตุอื่นที่ทำให้ระดับโปแตสเซียมต่ำ เช่น การเสีย Potassium ทางปัสสาวะ หรือทางเดินอาหาร โดยการตรวจ Urine Potassium < 15 meq/dl และ/หรือ คำนวณค่า TTKG < 4

2. Control ได้แก่ ผู้ป่วยโรคไทรอยด์เป็นพิษที่ไม่มีอาการอ่อนแรงและระดับโพแทสเซียมปกติ

เกณฑ์ที่คัดเลือกเข้าโครงการ

1. ผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษที่มีผลการตรวจระดับฮอร์โมนไทรอยด์ (TSH, FT4, T3) ยืนยันการวินิจฉัย

2. ระดับโพแทสเซียม $\geq$ 3.5 mg/dl และไม่มีประวัติอาการอ่อนแรงเป็นพักๆ มาก่อน

ในการศึกษานี้เก็บเป็น 2 cohort เรียกว่า test cohort และ replication cohort โดยใช้ เกณฑ์การคัดเลือกเดียวกัน แต่คนละกลุ่มประชากรกัน ไม่เป็นญาติที่เกี่ยวข้องกัน

4. ขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

Test cohort

- ผู้ป่วย THPP 80 คน
- ผู้ป่วย ไทรอยด์เป็นพิษ ไม่มีอาการอ่อนแรง 80 คน

Replication cohort

- ผู้ป่วย THPP 30 คน
- ผู้ป่วย ไทรอยด์เป็นพิษ ไม่มีอาการอ่อนแรง 30 คน

5. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การวิจัยแบบ GWAS-Pooled DNA approach

ขั้นตอนที่ 1 การสร้าง Pooled DNA

1. การสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาว

   ด้วย Salted out DNA extraction method

2. สร้าง pooled DNA samples

จากอาสาสมัครที่เป็น THPP และกลุ่มควบคุม 2 กลุ่มๆ ละ 80 ราย โดยทำการเจือจาง DNA ที่ได้จากการสกัดข้างต้นให้ได้ความเข้มข้น 200, และ 100 ng/μl ตามลำดับโดยวัดความเข้มข้นของ DNA จากแต่ละคนด้วย Spectrophotometer จากนั้นเจือจาง ความเข้มข้นของ DNA ให้ได้เท่ากันคือ 50 ng/μl โดยวัดด้วย fluorimetry (ใช้ PicoGreen® dsDNA quantitation reagent (Cambridge, Bioscience, UK) ซึ่งมีค่าความแม่นยำสูง มาสร้างเป็น Pooled DNA 2 กลุ่ม โดยรวม DNA คนละ 5 μl แบ่งตามกลุ่มกลุ่มละ 80 คน

3. Purification ด้วย Spin column Qiagen PCR purification kit® (USA) และเตรียมให้ได้ความเข้มข้นของ DNA สุดท้ายคือ 50 ng/μl

ขั้นตอนที่ 2 การทำ Pooled genomic DNA Genotyping ด้วย Affymetrix GeneChip 500K mapping array platform

เริ่มจาก สร้างปฏิกิริยา hybridization reaction โดยใช้ single probe technique บน Affymatrix GeneChip® Mapping 500K Arrays ตามคู่มือใน Affymetrix GeneChip Mapping Assay ทั้งนี้ต้องทำปฏิกิริยา 2 ครั้งต่อการ Hybridization ลงบน 250 K array โดยใช้เอนไซม์เพื่อย่อย 2 ชนิดแยกกันได้แก่ Nsp I และ Sty I เป็นขั้นตอนดังต่อไปนี้.

1. 250 นาโนกรัมของ pooled genomic DNA นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ Nsp I สำหรับ Chip แรก และ Sty I สำหรับ Chip ที่ 2

2. ligate สาย DNA ที่ตัดแล้วด้วย adaptor ที่มาในชุดน้ำยาที่เชื่อมต่อจำเพาะกับ 4 basepairs ส่วนปลายที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ในข้อ 1

3. สร้างปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนสายสำหรับ Hybridization ต่อไป โดยใช้ Primer ที่จับตรงกับตำแหน่ง DNA ของ Adaptor ที่ ligation แล้วนำมาทำ PCR และตั้งเครื่อง PCR machine ดังนี้

95°C hot start 3 นาที

95°C เป็นเวลา 20 sec

59°C เป็นเวลา15 วินาที

72°C เป็นเวลา 15 นาที

ทั้ง 3 ขั้นตอนนี้ให้วน 35 รอบ และสุดท้าย extension time 72°C 7 นาที

4. Purification PCR products ด้วย MinElute 96 UF kits, Qiagen, Valencia, CA

5. ย่อยสาย PCR ที่ได้ด้วย DNase I ที่ความเข้มข้น 0.04 unit/μL เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้ได้สาย DNA ยาว 200-1100 bp ทั้งนี้ตรวจสอบความยาวของสาย NDA โดยการ run ลงบน agarose gel

6. ติดสี end-labeled เพื่อติดตามการเกิดปฏิกิริยาจาก Hybridization โดยใช้ terminal deoxynucleotidyl transferase และ biotinylated dideoxynucleotides

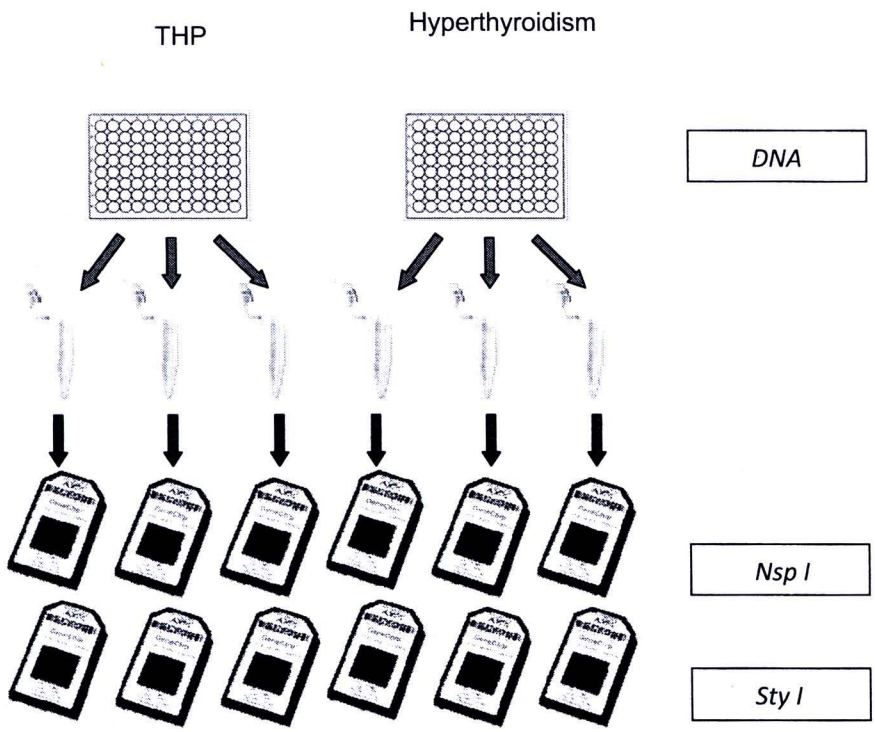
7. ใส่ DNA ที่ได้จากข้อ 6 ลงใน 250K GeneChip arrays (Affymetrix) และนำเข้าเครื่อง microarray เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา hybridization

8. สร้างสีและล้างด้วยน้ำยา immunopure streptavidin (Pierce), biotinylated antistreptavidin antibody (Vector Laboratories), และ R-phycoerythrin streptavidin (Molecular Probes) ที่เตรียมไว้เพื่อล้างส่วนเกินของปฏิกิริยาออก ตามขั้นตอนที่มีมาในคู่มือ

9. นำ Chip ที่เสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้วมาอ่านใน Scanner และ ประมวลผลด้วย GTYPE โปรแกรม

ในการศึกษานี้เป็นการทำ triplicate คือ 1 กลุ่ม DNA pooled นำมาทดสอบบน Chip ชนิดเดียวกัน 3 Chip ดังในรูปแผนภูมิที่ 1

<u>แผนภูมิที่ 1</u> แสดงการทำการทดลองแบบ Triplicate ลงบน Affymetrix gene chip genotyping



ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์การ SNPs ที่พบว่ามีความแตกต่างใน Estimated allele frequencies ระหว่าง Cases และ Controls โดย

- วิเคราะห์หา Estimated allele frequencies ระหว่าง Cases และ Controls โดยนำข้อมูล signal intensity ของแต่ละ SNPs จาก Cel file มาคำนวณหาค่า Discrimination score (DS)

โดยสูตร $DS = \frac{PM-MM}{PM+MM}$ PM =perfect match, MM = mismatch

ตามปกติค่าที่เกิดจาก PM probe ต้องมากกว่า MM probe มากๆ ค่า DS ควรเข้าใกล้ 1 ถ้าค่าต่ำแสดงว่ามี signal ที่เกิดจาก MM probe สูง ทั้งนี้เอาเกณฑ์ DS<0.08 บ่งบอกถึงภาวะ hybridization error ต้องคัดออก

- คำนวณหาค่าที่เรียกว่า relative signal (RAS) ของแต่ละ SNPs จากแต่ละ Chip ดังนั้นแต่ละ SNPs จะมี 3 RAS $= \frac{(PM-MM)}{(PM-MM)a+ (PM-MM)b}$

RAS value นำมาคำนวณค่าเฉลี่ย (RASav) และค่า SD

- ค่า estimated SNP allele frequencies มาจากค่า RASav และเลือก SNPs ที่มีค่า SD ต่ำๆ และมีค่าอยู่ ระหว่าง 0.05 และ 0.95

- เปรียบเทียบค่าต่าง RASav ระหว่าง THPP และ control และคำนวณ Odd ratios ระหว่าง 2 กลุ่มโดยใช้ MATLAB program

ขั้นตอนที่ 4 validate Actual allele frequencies

เลือก SNPs ที่น่าสนใจมาศึกษาได้แก่

- SNPs ที่มี allele frequencies ต่างกันมาก และมีค่า SD ระหว่าง SNPs น้อย

- SNPs ของยีนที่ไม่เคยศึกษามาก่อนและพบว่ามี biological function ที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

- SNPs ที่เกี่ยวข้องกับ Candidate genes เพื่อยืนยันผลการศึกษาเดิม

- SNPs ของยีนที่ไม่เคยกล่าวถึงหรือศึกษามาก่อน

นำ SNPs ที่คัดเลือกมาทำการทดสอบหา Actual allele frequencies เพื่อยืนยันผล estimated frequencies ที่ได้จากการ genotyping ใน pooled DNA ด้วยวิธี Allele specific PCR โดย

1. ออกแบบ Primers ให้มี common 3' primer 1 ชุด และมี 5' primer 1 คู่ ที่มีความแตกต่างกันเพียง 1 nucleotide ที่ตำแหน่ง 3' end ของ primers

2. ทำการตรวจสอบ individual SNPs allele frequencies จะใช้วิธี allele specific polymerase chain reaction โดยใช้ 3' Locked nucleic acid (LNA) allele specific ที่ 3' of PCR primers และ SYBR® green ทำปฏิกิริยาและอ่านผลด้วย เครื่อง ABI 7900 Taqman® Real-Time Quantitative PCR machine หรือ วิธี PCR-RFLP แล้วแต่ความเหมาะสม

การวิจัยแบบ GWAS for individual DNA

ขั้นตอนที่1 วัดระดับDNA

1. วัดความเข้มข้นของDNA ให้มีความเข้มข้นที่50 mg/µl ด้วยวิธีNanodrop
2. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของDNA ด้วยวิธีการrun gel electrophoresis เพื่อดูDNA band

ขั้นตอนที่2 การตรวจหาSNPs genotyping โดยใช้Illumina Human-Hap610 Genotyping BeadChip (San Diego, CA) โดยทำการทดลองตามคู่มือการใช้

ขั้นตอนที่ 3 ยืนยัน allele frequencies ของ SNPs ด้วยการทดสอบด้วย allele-specific PCR และตรวจสอบ geotyping signal ด้วยmultiplex-PCR-based invader assay (Third Wave Technologies, Madison, WI)

การยืนยันผลการศึกษาที่ได้ในreplication cohort

นำ SNPs ที่พบว่ามี allele frequencies ต่างกันระหว่างกลุ่ม ผู้ป่วย THPP และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญจากทั้ง GWAS-Pooled DNA GWAS individual genotyping โดยทำการ genotype อีกครั้งด้วยวิธี multiplex-PCR-based invader assay (Third Wave Technologies, Madison, WI) ใน replication cohortเพื่อยืนยันผลที่ได้

การDirect sequencing ยีนที่อยู่ใกล้กับSNPs ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคTHPP

ขั้นตอนนี้เป็นการExtend study ทดสอบหาความผิดปกติmutation หรือgenetic polymorphisms ของทั้งยีนที่อยู่ใกล้กับSNPs ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคTHPPในขั้นตอนที่ 4

1. เลือกออกแบบPrimers สำหรับทุกexons ของยีนที่ต้องการศึกษาโดยต้องครอบคลุมintron-exon boundary และบริเวณPromoter ด้วยprogram primer 3.0 ให้ได้product size 500 basepairs
2. PCR optimization primers ที่เลือกไว้
3. PCR product purification ด้วยและทำ Direct sequencing โดยใช้ABI PRISM® BigDye™ Terminators V 3.0และอ่านผลด้วยเครื่อง ABI direct sequencing machineเพื่อหา- ความผิดปกติของเบสในกลุ่มTHPPถ้าพบความผิดปกติจะนำผลมาเทียบกับSNPs database เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นMutation จริงและทำการตรวจหาตำแหน่งที่ผิดปกติเดียวกันนี้ในกลุ่มควบคุมด้วยวิธีต่างๆเช่นRestriction fragment length polymorphisms, direct sequencing หรือAllele Specific Amplification ขึ้นอยู่กับชนิดและตำแหน่งของความผิดปกติของลำดับเบสนั้น

การตรวจสอบFunctional study

เนื่องจากอาการและอาการแสดงของโรคTHPP เป็นการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อลายเป็นหลักและพยาธิกำเนิดของภาวะระดับโพแทสเซียมต่ำเกิดจากการเคลื่อนที่ของโพแทสเซียมเข้าเซลล์กล้ามเนื้อลายดังนั้นในการศึกษาfunctional study จึงเลือกใช้C2C12 ซึ่งเป็นmouse myoblast cell lines

Cell culture and plasmid

Murine myoblast cell line (C2C12) จะถูกเลี้ยงด้วยสารละลายDMEM และ 10% FBS และ 1% penicillin-streptomycin

การสร้าง **THPP model** ในเซลล์ **C2C12**.

- ทำการทดสอบผลของเติมสารต่อไปนี้ในmedium เป็นเวลา24 ชั่วโมง
  1. ฮอร์โมนไทรอยด์ LT4 25 mg/ml
  2. insulin (10 IU/ml)
- ตรวจสอบ Myoblast morphology, growth, myotubes formation, and วัดปริมาณของ GABRA3 protein expression โดยวิธี western blotting analysis โดยใช้ rabbit anti-GABRA3 antibody ที่ 48 ชั่วโมงหลังการใส่สารที่ทำการศึกษา

Western blotanalysis

- เซลล์จะได้รับการล้างและเก็บเกี่ยว (harvest) และสลายส่วนของเซลล์เมแบรนด้วย NE-PER extraction kit (PIERCE) เพื่อให้ได้โปรตีนใน cytoplasmและนิวเคลียส
- วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วย BCA protein assay (Pierce).
- Cell lysates ปริมาณ 30 g จะถูกแยกด้วย10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE และถ่ายลงบน Hybond-enhanced chemiluminescence (ECL) nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, UK).
- Incubate เมเบรนด้วย TBST (12.5 mM Tris-HCl pH 7.5, 68.5 mM NaCl, 0.1% Tween 20) และ 5% goat serum, 5% skim milk ที่ 4°C ข้ามคืน.
- Incubate เมเบรนต่อด้วยprimary Ab rabbit anti-GABRA3 antibody เป็นเวลา 1–2 ชม.
- Incubate เมเบรนด้วยhorseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (Ig) (Amersham Biosciences).
- สร้าง blots ด้วย ECL substrate solution (Amersham Biosciences)
- ถ่ายลงบน Kodak X-Omat Blue film (NEN Life Sciences, Inc. Boston, MA, USA).
- ใช้การตรวจสอบ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็น internal loading control และ blots จะถูกแช่ใน rabbit anti-GAPDH antibody (sc-25778, at 1:500 dilution) (Santa Cruz Biotech, Inc. CA)และ HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:2000 dilution).

6. สถิติที่ใช้

- แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย+ ค่าความผิดพลาด(mean $\pm$ SEM)
- เปรียบเทียบค่าcontinuous value ได้แก่อายุน้ำหนักระหว่างด้วยunpaired t-test

- เปรียบเทียบ Estimated allele frequencies ระหว่างกลุ่ม pooled DNA และ ทดสอบความแตกต่างกันระหว่าง SNP allele frequencies ของ GWAS-individual ด้วย Fisher's extract และ Chi-square test

- ในการคำนวณ genetic association studies จะเป็นการเปรียบเทียบ allele และ genotype ในกลุ่ม ผู้ป่วย THPP และกลุ่มควบคุมใน 3 รูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้แก่ dominant- and recessive-inheritance models โดย two-tail Fisher's exact test.

- ค่าที่จัดว่ามีนัยสำคัญทางสถิติสำหรับ GWAS ได้แก่ 9.83×10^{-8} (0.05/508,393) และ 0.05 สำหรับผลการศึกษาใน GWAS-pooled DNA และ replication cohort

- ใช้โปรแกรม principal component analysis (PCA) จาก EIGENSOFT package 20 เพื่อเปรียบเทียบข้อมูล Genotyping ระหว่างกลุ่มที่ทำการวิจัยและประชากรของญี่ปุ่นและจีนจาก International HapMap project และสร้าง PCA plot เพื่อหาภาวะ population stratification อันจะนำมาสู่การเกิดผลบวกลวง

- สร้าง LD map จากผลของ SNPs genotyping ที่ได้ด้วยโปรแกรม Haploview software.