สัญญาเลขที่ MRG4680122

โครงการ: Application Use of Comparative Genomic Hybridization Technique in Early Diagnosis of Head and Neck Cancer

สรุปรายงานความก้าวหน้าฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ Application Use of Comparative Genomic Hybridization Technique in Early Diagnosis of Head and Neck Cancer

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ทพ.ดร. อาทิพันธุ์ พิมพ์ขาวขำ

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา 1. รศ.ดร. บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค

2. PROF. JOHJI INAZAWA

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2546 **ถึงวันที่** 30 มิถุนายน 2548

1. การดำเนินงาน

☒ ได้ดำเนินงานตามแผนที่วางไว้

☐ ได้ดำเนินงานล่าช้ากว่าแผนที่วางไว้

☐ ได้เปลี่ยนแผนงานที่วางไว้ดังนี้_____

2. รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

2.1 ผลงานวิจัยที่ทำประกอบด้วย

1. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาและสร้างฐานข้อมูลการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลในมะเร็งศีรษะและคอ
2. เพื่อประยุกต์การใช้เทคนิค CGH ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งศีรษะและคอ

2. การดำเนินงานวิจัย

I. การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดและตัวอย่างส่งตรวจ(Isolation of genomic DNA)

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดและตัวอย่างส่งตรวจทำโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป จากเลือดของอาสาสมัครเพศชายที่มีสุขภาพสมบูรณ์ดีไม่ป่วยเป็นโรค จำนวน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 01 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 247341
เลขเรียกหนังสือ

10 ตัวอย่าง และตัวอย่างส่งตรวจที่มีความผิดปกติของโครโมโซมจำนวนอย่างน้อย 30 ตัวอย่าง จากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ ด้วยเทคนิควิธี Agarose gel electrophoresis และวิธีการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มีค่าอัตราส่วนระหว่าง OD_{260}/OD_{280} ประมาณ 1.7-1.8 นำดีเอ็นเอที่ได้มาใช้เป็นตัวติดตามชนิด Reference DNA (ดีเอ็นเอของคนปกติ) หรือ ตัวติดตามชนิด Test DNA (สำหรับดีเอ็นเอของตัวอย่างส่งตรวจที่มีความผิดปกติของโครโมโซม) ในขั้นตอนต่อไป

II. การเตรียมโครโมโซมจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (Preparation of metaphase chromosome)

การเตรียมเมตาเฟสโครโมโซมซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA target) ต้องได้เมตาเฟสโครโมโซมที่มีคุณภาพ โครโมโซมมีความยาวพอเหมาะ ไม่ซ้อนทับกัน และไม่มีส่วนของไซโตพลาสซึม ใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติเพศชาย มาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1. การเตรียมเลือด เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำของบุคคลตัวอย่างแต่ละคนประมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารเฮปาริน (heparin) เขย่าเบาๆ ให้เลือดกับเฮปารินเข้ากันโดยใช้เฮปาริน 50 I.U. ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัว แล้วนำเลือดไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นเม็ดเลือดขาว
2. การเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย RPMI medium 80% และ Fetal bovine serum 20% และ phytohemagglutinin(PHA) เพื่อกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัว ใส่เลือดที่ดูดจากชั้นเม็ดเลือดขาวและบริเวณซีรั่ม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในทุกขั้นตอนทำในตู้ปลอดเชื้อ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
3. การเก็บเกี่ยวเซลล์ ก่อนครบชั่วโมงที่ 72 ประมาณ 30 นาที หยดคอร์เซมิด (corcemid) เพื่อหยุดเซลล์ที่ระยะเมตาเฟสโดยการยับยั้งการเกิดเส้นใยสปิล

เดิล แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 1 ชั่วโมง จึงเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยการทำให้เซลล์บวมโดยบ่มเซลล์ใน Hypotonic solution ซึ่งเป็นสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.075 โมลต่อลิตร ตามด้วยการคงสภาพเซลล์ด้วยน้ำยาคงสภาพ (fixative solution) ที่ประกอบด้วยเมธานอล 3 ส่วน และกรดอะซิติก 1 ส่วน

4. การเตรียมสไลด์โดยการหยดโครโมโซมในระยะเมตาเฟสซึ่งเตรียมได้ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด นำมาตรวจดูลักษณะและการกระจายตัวของโครโมโซม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ Phase contrast เลือกสไลด์ที่มีโครโมโซมกระจาย โครโมโซมทุกแท่งไม่ควรซ้อนทับกัน ปล่อยให้แห้ง แล้วนำสไลด์ที่เลือกไว้แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เพื่อทำให้สภาพของโครโมโซมเหมาะต่อการไฮบริไดซ์

5. ทำคอมพาราทีฟ จีโนมิกไฮบริไดเซชั่น โดยทำการย้อมสี ดีเอนเอจากตัวอย่างด้วยสีเขียว และย้อมสีดีเอนเอจากเลือดด้วยสีแดง จากนั้นนำดีเอนเอที่ย้อมสีแล้วมาผสมกันร่วมกับ Cot 1 DNA แล้วทำการDenature ใน 50%Formaldehyde/2xSSC ก่อนที่จะนำไป Hybridize บนเมตาเฟสโครโมโซมที่ทำการ Denature แล้ว ทิ้งไว้ที่ตู้อบ 37 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำสไลด์มาล้างด้วย 4xSSC/0.01%triton X และ 2xSSC ตามลำดับ หลังจากทิ้งไว้ให้สไลด์แห้งมาดๆ จึงหยด DAPI และปิดด้วย cover slide เก็บไว้ที่ 4 C 30 นาที

6. วิเคราะห์ข้อมูล โดยการนำสไลด์ที่ได้มาดูด้วยกล้อง Fluorescence Microscope แล้วบันทึกภาพที่ได้ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (Quip) บน Macintouch operating system พ้อมทั้งทำการวิเคราะห์อัตราส่วนของfluorescenceเขียวต่อแดง (Green-red ratio)

7. เริ่มเตรียม manuscript เสร็จ