

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมในส่วนโปรโมเตอร์และยีนไซโตไคน์ ประกอบด้วย *IL-10*, *TNF- α* และ *IFN- γ* ในประชากรไทยกับความสัมพันธ์ต่อผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยครอบคลุม SNPs 6 ตำแหน่งคือ โปรโมเตอร์ของยีน *IL-10* ตำแหน่ง -1082, -819 และ -592 โปรโมเตอร์ของยีน *TNF- α* ตำแหน่ง -308 และ -238 และยีน *IFN- γ* ตำแหน่ง +874 โดยวิธี polymerase chain reaction sequence specific primer (PCR-SSP)

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 371 ราย โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่หนึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีซึ่งหมายถึงผู้ที่มีผลการตรวจ HBs Ag, anti-HBs และ anti-HBc เป็นลบ (normal control) จำนวน 127 ราย กลุ่มที่สองเป็นผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังซึ่งตรวจพบ HBs Ag ในซีรัมนานเกินกว่า 6 เดือน (chronic) จำนวน 102 ราย กลุ่มที่สามเป็นผู้ที่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมีการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นโดยมีผลตรวจ HBsAg เป็นลบแต่พบ Anti-HBs และ Anti-HBc เป็นบวก (recovery) จำนวน 142 ราย ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดเป็นกลุ่มประชากรไทยที่มารับบริการโลหิต ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2553 – 2554 คัดเลือกโดยสุ่มจากตัวอย่างโลหิตที่ผู้บริจาคผ่านการตรวจคัดกรอง HBs Ag, anti-HCV และ HIV Ag/Ab ในงานประจำวัน แล้วทำการตรวจหา anti-HBs และ anti-HBc เพื่อทำการคัดแยกกลุ่มตัวอย่าง และเลือกเฉพาะผู้ที่มีเชื้อชาติไทยจากข้อมูลทะเบียนผู้บริจาคโลหิต

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องตรวจโลหิต Microplate Automation (EVOLIS Premium System, USA)
2. เครื่อง Thermocycler (TECHNE UK. รุ่น TC412, UK)
3. เครื่อง Gel electrophoresis (COSMOB10 รุ่น IMR-001, USA)
4. เครื่องถ่ายภาพจุล (UNTEC, UK)
5. pH meter (Precisa รุ่น pH 900, Switzerland)
6. เครื่องชั่ง (METTLER TOLEDO รุ่น PG603-S, Switzerland)
7. Spectrophotometer (SHIMADZU รุ่น UV-1601, Japan)

วัสดุอุปกรณ์

1. volumetric flask ขนาด 50, 250 และ 1,000 ml
2. beaker ขนาด 50, 250 และ 1,000 ml
3. autopipette ขนาด 10-100, 100-1,000 และ 1,000 μ l
4. pipette tip ขนาด 10-100, 100-1,000 และ 1,000 μ l
5. microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
6. PCR tube ขนาด 0.2 ml

น้ำยาและสารเคมี

1. ชุดตรวจ Anti-HBs (Monolisa™ Anti-HBs PLUS, France)
2. ชุดตรวจ Anti-HBc (Monolisa™ Anti-HBc PLUS, France)
3. Lysis buffer
4. Protein precipitation solution
5. Proteinase K (RBC Bioscience, Taiwan)
6. Absolute Isopropanol
7. 70% Ethanol (EMSURE™, Germany)
8. Tris EDTA (TE) buffer
9. Gel loading buffer
10. Tris boric EDTA (TBE) buffer
11. DNA ladder (RBC Bioscience, Taiwan)
12. Agarose (RESERCH ORGANIICS, USA)
13. Taq DNA polymerase, PCR buffer, $MgCl_2$ (RBC Bioscience, Taiwan)
14. dNTP (RBC Bioscience, Taiwan)
15. Primer (Bio Basic Inc., Canada)
16. Ethidium bromide (Fluka, Switzerland)
17. Gel/PCR DNA fragment extraction kit (RBC Bioscience, Taiwan)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การตรวจ HBV markers เพื่อแยกกลุ่มตัวอย่าง โดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ทำการเลือกกลุ่มตัวอย่างที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังโดยเลือกกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลตรวจ HBs Ag เป็นบวกแต่ anti-HCV และ HIV Ag/Ab เป็นลบโดยใช้ชุดตรวจ ARCHITECT HBsAg Qualitative II, ARCHITECT Anti-HCV และ ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo ตามลำดับ ซึ่งได้รับอนุเคราะห์ผลตรวจจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติและพบประวัติการบริจาคโลหิตย้อนหลังมีผล HBsAg เป็นบวกมากกว่า 6 เดือน จากนั้นคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลตรวจ HBs Ag, anti-HCV และ HIV Ag/Ab เป็นลบมาทำการตรวจหา anti-HBs และ anti-HBc เพื่อคัดเลือกรุ่น control และ recovery ซึ่งทำการตรวจหา anti-HBs และ anti-HBc โดยเครื่องตรวจโลหิต Microplate Automation รุ่น EVOLIS Premium System, USA ด้วยชุดตรวจ Monolisa™ Anti-HBs PLUS และชุดตรวจ Monolisa™ Anti-HBc PLUS วิธีการตามที่ระบุในเอกสารกำกับชุดตรวจ มีวิธีการโดยสังเขปดังนี้

Monolisa™ Anti-HBs PLUS เป็นชุดตรวจ Enzyme immunoassay สำหรับตรวจหา ระดับ anti-HBs ในซีรัมหรือพลาสมาโดยเติม specimen diluent 25 µl และเติมตัวอย่าง, calibrators และ control serum 75 µl ลงใน microplate ที่เคลือบด้วย HBs Ag จากนั้นนำไป incubate ที่ 37°C ±2°C เป็นเวลา 60±5 นาที จากนั้นล้าง plate 4 ครั้งด้วย washing buffer แล้วเติม horse reddish peroxidase conjugated anti-human globulin working solution 100 µl จากนั้น incubate ที่ 37°C ±1°C เป็นเวลา 60±5 นาทีตามด้วยการล้าง plate 4 ครั้ง เติม TMB substrate solution 100 µl จากนั้น incubate ที่ 18-30°C เป็นเวลา 30±5 นาที จากนั้นเติม stopping solution 100 µl อ่านค่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ OD 450/620-700 nm และ OD 405/620-700 nm แล้วคำนวณหา cutoff value และแปลผลการทดสอบ

Monolisa™ Anti-HBc PLUS เป็นชุดตรวจหา anti-HBc ในซีรัมหรือพลาสมาด้วยวิธี Enzyme immunoassay ใน microplate โดยเติม specimen diluent 200 µl และเติมตัวอย่างและ control serum 20 µl ลงใน plate ที่ถูกเคลือบด้วย HBc Ag จากนั้น incubate ที่ 37°C ±1°C เป็นเวลา 30±5 นาทีตามด้วยการล้าง plate 4 ครั้ง เติม horse reddish peroxidase conjugated anti-human globulin working solution 200 µl จากนั้น incubate ที่ 37°C ±1°C เป็นเวลา 60±5 นาที หลังจากนั้นล้าง plate 4 ครั้ง เติม TMB substrate solution 100 µl แล้ว incubate ที่ 18-30°C เป็นเวลา 30±5 นาทีแล้วเติม stopping solution 100 µl อ่านค่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ OD 450/620-700 nm แล้วคำนวณหา cutoff value และแปลผลการทดสอบ

2. การตรวจความหลากหลายของยีนโดยวิธี PCR-SSP

2.1 การสกัด DNA โดยวิธี Guanidine Thiocyanate

นำเลือดที่ผสมกับสารกันเลือดแข็ง Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA Blood) 5 ml ปั่นด้วยความแรง 2,000 g เป็นเวลา 10 นาทีแล้วแยกพลาสมาออก จากนั้นทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยการเติม Lysis buffer ปั่นล้างหลายๆ ครั้งจนกระทั่งไม่มีสีแดงของเม็ดเลือดแดงที่ pellet แล้วถ่ายลง microcentrifuge tube จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วสูง (13,000 rpm) 5 นาที ดูดส่วนน้ำไลทิ้ง เติม Lysis solution 300 μ l และ Proteinase K 1.5 μ l เขย่าผสมโดยใช้ vortex จากนั้นนำไปอุ่นที่ 55°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำหลอดตัวอย่างออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เติม Protein precipitation solution 100 μ l เขย่าผสมแล้วนำไปปั่นที่ความเร็วสูง 5 นาที ดูดส่วนน้ำไลทิ้ง microcentrifuge หลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอน DNA โดยการเติม Absolute Isopropanol 300 μ l แล้วเขย่าผสมแบบ invert เบาๆ ประมาณ 50 ครั้ง นำไปปั่นที่ความเร็วสูง 5 นาที เทส่วนน้ำไลทิ้ง แล้วเติม 70% Ethanol แล้ว invert หลายๆ ครั้งเพื่อล้างตะกอน จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วสูง 5 นาทีแล้วเทส่วนน้ำไลทิ้ง ปล่อยให้แห้งด้วยอากาศจากนั้นเติม 1X TE buffer 200 μ l แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนเพื่อละลายดีเอ็นเอแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

2.2 ขั้นตอนการวัดความเข้มข้น DNA โดยวัดค่า Optical density (OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer

ทำการเจือจาง DNA ในน้ำปราศจากอิออนเป็น 1:100 (DNA 5 μ l ในน้ำปราศจากอิออน 495 μ l) โดยใส่หลอด microcentrifuge จากนั้นทำการวัดค่า OD ของ DNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm และวัดค่า OD ของโปรตีนที่ 280 nm ของแต่ละตัวอย่าง ทำการบันทึกแล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ DNA จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของ DNA (ng/\mu l)} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{dilution factor} \times 50$$

จากนั้นคำนวณหาค่าความบริสุทธิ์ของ DNA จากสูตร

$$\text{ค่าความบริสุทธิ์} = \frac{\text{OD}_{260\text{nm}}}{\text{OD}_{280\text{nm}}}$$

พบว่าถ้ามีค่า $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนโปรตีน

2.3 การออกแบบ Primer

ทำการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วนโปรโมเตอร์ *IL-10*, *TNF- α* และ *IFN- γ* จาก Genbank โดยเลือก sequence ของยีนดังตาราง 3 นำมาใช้ในการออกแบบ primer

ตาราง 3 สายดีเอ็นเออ้างอิงในการออกแบบ primer

Cytokine	Chromosome	Location	Accession number
<i>IL-10</i>	1	1q31-32	NG_012088
<i>TNF-α</i>	6	6p21	NG_007462
<i>IFN-γ</i>	12	12q14	NG_015840

การออกแบบ Primer สำหรับทำ PCR เพื่อส่งตรวจลำดับดีเอ็นเอที่ออกแบบในตำแหน่งที่ครอบคลุมตำแหน่งที่เกิด SNP โดยให้ห่างจากตำแหน่งนี้อย่างน้อย 50 เบส แสดงดังตาราง 4 ส่วน primer สำหรับการตรวจ SNP โดยวิธี PCR-SSP นั้นออกแบบตำแหน่งที่เกิด SNP ไว้ที่ปลาย 3' ของ primer ข้างใดข้างหนึ่ง แสดงดังตาราง 4 เมื่อทำการออกแบบ primer ที่เหมาะสมแล้ว ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของ primer โดยใช้โปรแกรม OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, Inc) และทดสอบความจำเพาะโดยโปรแกรม BLAST (Basic local alignment search tool)

ตาราง 4 Primer สำหรับทำ PCR เพื่อส่งตรวจ DNA sequencing

Gene/position	Forward primer sequence (5'...3')	Reverse primer sequence (5'...3')	Product size (bp)
<i>IL-10</i> /-1082, -819, -592	GAA GTC CTG ATG TCA CTG	GGT GGG CTA AAT ATC CTC	724
<i>TNF-α</i> /-308, -238	TCA AGC CTG CCA CCA AGC	CTC GGT TTC TTC TCC ATC G	583
<i>IFN-γ</i> /+874	ATG ATT CTG GCT AAG GAA TG	ACTCCAAGGTCCCAAAAATA	724

ตาราง 5 Primer สำหรับทำ PCR เพื่อตรวจ SNPs

Gene/ position	Forward primer sequence (5'...3')	Reverse primer sequence (5'...3')	Product size (bp)
<i>IL-10</i> -1082	A allele: CTA AGG CTT CTT TGG GAA	GGT GGG CTA AAT ATC CTC	579
	G allele: CTA AGG CTT CTT TGG GAG		
<i>IL-10</i> -819	AAC TGG CTC CCC TTA CCT	T allele: ACT GAG GCA CAG AGA TA	382
		C allele: AAA CTG AGG CAC AGA GAT G	
<i>IL-10</i> -592	ACT CAA GAC AAC ACT ACT AA	A allele: AGA CTG GCT TCC TAC AGT	541
		C allele: AGA CTG GCT TCC TAC AGG	
<i>TNF-α</i> -308	G allele: AGG TTT TGA GGG GCA TGG	CTC GGT TTC TTC TCC ATC G	182
	A allele: AGG TTT TGA GGG GCA TGA		
<i>TNF-α</i> -238	G allele: TCC CCA TCC TCC CTG CTC C	TCA AGC CTG CCA CCA AGC	327
	A allele: TCC CCA TCC TCC CTG CTC T		
<i>IFN-γ</i> +874	A allele: TTA TNC TTA CAA CAC AAA ATC	TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA	267
	AAA TCA		
	T allele: TTA TNC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT		

2.4 การทำ PCR สำหรับส่งตรวจ DNA sequencing

เตรียม PCR reaction มีส่วนผสมดังตาราง 5 จากนั้นนำ PCR reaction เข้าเครื่อง Thermocycler ใช้ PCR profile ตาราง 6 จากนั้นจึงนำ PCR product มาแยกด้วย กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) ใน 2% Agarose gel ภายใต้ 0.5X TBE buffer โดยผสม 6X Gel loading buffer กับ DNA ในอัตราส่วน 1:5 ให้กระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ กระแสไฟฟ้า 135 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย Ethidium bromide ซึ่งมีความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 5 นาทีตามด้วยการนำไปแช่ในน้ำกลั่นอีก 5 นาที แล้วนำแผ่นเจลไปส่องดู ภายใต้แสง UV จากนั้นตัดเนื้อเจลส่วนที่มีขนาด PCR product ที่จำเพาะไปสกัดเอา PCR product ด้วย Gel/PCR DNA fragment extraction kit แล้วส่งตรวจ DNA sequencing

ตาราง 6 ส่วนผสมของ PCR reaction สำหรับ DNA sequencing

Component	Volume (25 μ l)	Final concentration (100 μ l)
10x PCR buffer	2.5	1x
50 mM MgCl ₂	1.25	2.5 mM
10 mM dNTP	0.5	100 pM
10 mM Forward Primer	1	40 pM
10 mM Reverse Primer	1	40 pM
5u/ μ l Taq polymerase	0.1	0.5 U
DNA	1	100 ng
Deionized water	17.65	

ตาราง 7 PCR profile สำหรับการส่งตรวจ DNA sequencing

Step	Temperature ($^{\circ}$ C)	Time	Number of cycles
Initial Denaturing	95	5 นาที	1
Denaturing	95	30 วินาที	40
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	45 วินาที	
Final Extension	72	10 นาที	1
Holding	25	∞	

2.5 การตรวจหา SNP ด้วยวิธี PCR-SSP

เตรียม PCR reaction ตามส่วนผสมดังตาราง 8 โดยใช้ actin gene เป็น internal control (IC) สำหรับการตรวจหา SNPs ของยีน *IL-10* และ *TNF- α* และใช้ human growth hormone gene เป็น internal control สำหรับการตรวจหา SNPs ของยีน *IFN- γ* ดังตาราง 7 จากนั้นนำ PCR reaction เข้าเครื่อง Thermocycler ใช้ PCR profile ดังตาราง 9 จากนั้นนำ PCR product มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น ทำการบันทึกภาพด้วยเครื่อง UVTEC Platinum D55 Gel Documentation

ตาราง 8 Primer ของ internal control สำหรับทำ PCR-SSP

Gene	Forward primer sequence (5'...3')	Reverse primer sequence (5'...3')	Product size (bp)
Actin	CAT GCC TGA GAG GGA AAT GAG	CTA ACA CTG GCT CGT GTG ACA AG	751
Human growth hormone	TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C	GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA	429

ตาราง 9 ส่วนผสมของ PCR reaction สำหรับการตรวจสอบหา SNPs

Component	Volume (13 μ l)	Final concentration (100 μ l)
10x PCR buffer	1.30	1x
50 mM MgCl ₂	0.63	2.5 mM
10 mM dNTP	0.26	100 pM
10 mM Forward Primer	0.50	40 pM
10 mM Reverse Primer	0.50	40 pM
5u/ μ l Taq polymerase	0.05	2 U
DNA	1	100 ng
Deionized water	8.81	

ตาราง 10 PCR profile สำหรับทำ PCR ตรวจสอบหา SNPs

Step	Step 1			Step 2			Step 3		
	Temp (°C)	Time	cycle	Temp (°C)	Time	cycle	Temp (°C)	Time	cycle
Initial									
denaturing	95	5 min							
Denaturing	95	30 S		95	30 S		95	30 S	
Annealing*	65	1 min	5	62	1 min	20	55	1 min	10
Extension	72	45 S		72	45 S		72	45 S	
Final									
Extension	72	10 min							
Holding	25 °C								

หมายเหตุ: *Annealing temperature ในตารางสำหรับตรวจ SNPs ของยีน *IL-10* และ *IFN- γ* ขณะที่อุณหภูมิสำหรับยีน *TNF- α* จะเป็น 67 °C, 62 °C, 55 °C สำหรับ step 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์หาความถี่ร้อยละของ allele, genotype และ haplotype ทดสอบ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความถี่ของ allele, genotype และ haplotype กับผลลัพธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยสถิติ Chi-square test (χ^2) และ Odds ratio (OR) ที่ระดับนัยสำคัญ p value <0.05