



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การดัดแปลงพันธุกรรมของหนูเพื่อใช้เป็นโมเดลสำหรับศึกษาภาวะ

การขาดภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการเกิดโรคอโตอิมมูน

Immunodeficiency transgenic mouse model for autoimmune disease

โดย

นางสาววรรณพร อธิธิประเสริฐ

สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหิดล

เดือนมิถุนายน 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การตกแต่งพันธุกรรมของหนูเพื่อใช้เป็นโมเดลสำหรับศึกษาภาวะ

การขาดภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการเกิดโรคออโตอิมมูน

Immunodeficiency transgenic mouse model for autoimmune disease

คณะผู้วิจัย

ดร. วรณพร อธิธิประเสริฐ
นางสาวไพรัช ทองงาม
นายฤทธิรงค์ อัญจะนะ
ผศ. ดร. สุรศักดิ์ กันตชูเวสศิริ
รศ. ดร. ยินดี กิตยำนันท์
ศ. ดร. กนก ภาวสุทธิพิสิฐ

สังกัด

สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ม.มหิดล
สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ม.มหิดล
สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ม.มหิดล
คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ม.มหิดล
คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล
คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้โดยคำแนะนำ คำปรึกษา ในด้านการวางแผนการวิจัย เทคนิคทาง พันธุวิศวกรรมและการผลิตโมเดลสัตว์ เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์ รวมถึงการเขียนบทความทาง วิทยาศาสตร์จากนักวิจัยอาวุโส และหน่วยงานต่าง ๆ ดังนี้

1. ผศ. ดร. สุรศักดิ์ กันตชูเวสศิริ นักวิจัยพี่เลี้ยงสังกัดภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทย ศาสตร์โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. ศ. ดร. กนก ภาวสุทธิพิศุทธิ์ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล

3. รศ. ยินดี กิตยานันท์ หัวหน้าโครงการวิจัยชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ของสัตว์บกเศรษฐกิจ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล

4. ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา ที่ปรึกษากิตติมศักดิ์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรม ศาสตร์

5. รศ. ดร. ประมวญ เทพไชยศรี คณบดีคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6. Professor John Mullins และ Dr. Linda Mullins The Wellcome Trust เมืองเอเดินเบิร์ ก สกอตแลนด์ ประเทศสหราชอาณาจักร

7. นักวิจัยและเจ้าหน้าที่ของศูนย์ปฏิบัติการเครื่องมือรวม สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยา ศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล

8. เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ศูนย์วิจัย คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัย มหิดล

9. นักวิจัยและนักศึกษาของโครงการวิจัยชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ของสัตว์บกเศรษฐกิจ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยและสนับสนุนการวิจัย ดังนี้

1. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ ปี 2546 แก่ นางสาววรรณพร อิทธิประเสริฐ

2. งบประมาณแผ่นดิน หมวดอุดหนุนการวิจัย ปี 2545- 2550 โครงการ “การปรับเปลี่ยน พันธุกรรมและการใช้ยีนที่เปลี่ยนแปลงเข้าสู่เอนมบริโอเนคสเต็มเซลล์ เพื่อการรักษาโรคเอสแอลอี” โดยมี รศ. ยินดี กิตยานันท์ เป็นหัวหน้าโครงการ

Project Code: TRG4680002

(รหัสโครงการ)

Project Title: Immunodeficiency transgenic mouse model for autoimmune disease

(ชื่อโครงการ) การตกแต่งพันธุกรรมของหนูเพื่อใช้เป็นโมเดลสำหรับศึกษาภาวะการขาดภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการเกิดโรคออโตอิมมูน

Investigator: นางสาววรรณพร อธิธิประเสริฐ

(ชื่อนักวิจัย) สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล

25/25 ถ. พุทธรณทล สาย 4 ต. ศาลายา อ. พุทธรณทล จ. นครปฐม 73170

โทร. 02-4419003-6 ต่อ 1389 แฟกซ์. 02-4411013

E-mail Address: wannaporni@yahoo.com

Project Period: 2 ปี

(ระยะเวลาโครงการ)

Keywords: mutant C4, systemic lupus erythematosus, BAC construction, C4 knockout

(คำหลัก) mouse fibroblast, human C4 gene expression

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)	6
บทคัดย่อภาษาไทย	7
บทนำ	
• ความสำคัญและที่มาของหัวข้อการวิจัย	8
• โรคเอสแอลอี	11
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	13
ขอบเขตของการวิจัย	14
วิธีการทดลอง	
• การตรวจภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 และภาวะมีวเตชันของยีน	16
• การสร้างยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนให้มีภาวะ 2-bp insertion ที่แอกซอน 29	20
• การนำยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนปกติและแบบภาวะมีวเตชันเข้าสู่เซลล์สัตว์	26
ผลการทดลอง	
• การตรวจภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 และภาวะมีวเตชันของยีน	28
• การสร้างยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนให้มีภาวะ 2-bp insertion ที่แอกซอน 29	31
• การนำยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนปกติและแบบภาวะมีวเตชันเข้าสู่เซลล์สัตว์	34
บทวิจารณ์	35
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	45

Abstract

Most previous studies have linked the deficiencies in C4 with systemic lupus erythematosus in Anglo- Irish, Americans, Australians and Japanese. Null alleles at either locus are relatively common in Americans occurring at the C4A and C4B loci in approximately 10% and 16% of normal individuals, respectively. In our study, we extensively examined the possible association between homozygous C4Q0 and SLE in a large cohort of Thai populations diagnosed as SLE and further attempted to identify the genetic basis of C4Q0. One hundred eighteen cases of SLE patients and 145 controls were genotyped by touchdown PCR. The results confirmed the previous studies that 5.93% of C4 null genes: 2.54% of C4AQ0 and 3.39% of C4BQ0 were found in SLE patients. In contrast to other studies, we found no cases of C4 null genes in normal control. To further investigate the genetic basis of C4 deficiency, all genomic DNAs were also analyzed for 2-bp (TC) insertion at codon 1213 in exon 29 which is a common mutation in many C4A null genes and a novel 1-bp deletion (C) at codon 522 in exon 13 that is common in most C4B null genes. Both mutation results in a frame- shift mutation and premature stop codon using sequence specific primers PCR and direct sequencing.

The results showed that there was 2-bp insertion in exon 29 of mutant C4B gene in one SLE patient carrying C4AQ0. There was no 2-bp insertion in exon 29 of both isotypes in controls and the rest of SLE patients. Thus, we concluded that both C4AQ0 and C4BQ0 are the strong predisposing factors for SLE in Thais with different racial and genetic backgrounds could alter the thresholds for requirement of C4 protein levels in immune tolerance and regulation.

At present, bacterial artificial chromosomes (BAC) offer many advantages for functional studies of large Eukaryotic genes. Here we constructed a simple and flexible step which permits 2- bp insertion to be introduced into BAC containing human complement C4 (BAC-hC4) without leaving any other residual change in the recombinant product. These BAC-hC4 and mutant type of BAC-hC4 (BAC-mutC4) was transfected into mouse fibroblast from C4 knockout mice (Kc-MFB) to study the human C4 expression in mouse. The results showed that BAC-mutC4 transfected Kc-MFB had a problem during C4A transcription. While C4B transcription and its protein production were still normal by RT-PCR and plate ELISA.

บทคัดย่อ

งานวิจัยหลายชิ้นในกลุ่มชาวไอริช อเมริกัน ออสเตรเลียและญี่ปุ่นสรุปว่า ภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 (C4Q0) นั้นเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อภาวะการเกิดโรคเอสแอลอี นอกจากนั้นการศึกษาในกลุ่มคนอเมริกันพบว่า ภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A (C4AQ0) และ C4B (C4BQ0) นั้นจะสามารถพบได้ในกลุ่มประชากรปกติประมาณ 10% และ 16% ตามลำดับ การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ C4AQ0 และ C4BQ0 ในกลุ่มประชากรไทยที่เป็นโรคเอสแอลอีเทียบกับกลุ่มคนปกติ โดยใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดจากเลือดของผู้ป่วยโรคเอสแอลอีจำนวน 118 ราย และกลุ่มคนปกติ 145 ราย มาศึกษาภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ ผลปรากฏว่า ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเอสแอลอีมีภาวะขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 ถึง 5.93% โดยขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B คือ 2.54% และ 3.39% ตามลำดับ ซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้า นอกจากนั้นยังพบว่าในกลุ่มคนไทยปกติไม่พบภาวะ C4Q0 เลย ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยในกลุ่มประชากรอื่น ๆ การศึกษาในลำดับต่อมา ได้ทำการตรวจหาภาวะมิวเตชันของยีนคอมพลีเมนต์ C4 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่และการหาลำดับเบส โดยศึกษาภาวะการมีเบสไทโรซีนและซิสโตซีน (2-bp insertion) แทรกในโคดอน 1213 แอ็กซอน 29 ซึ่งพบมากในภาวะ C4AQ0 และภาวะการขาดเบสซิสโตซีน (1-bp deletion) ในโคดอน 522 ในแอ็กซอน 13 ซึ่งพบมากในภาวะ C4BQ0 ซึ่งภาวะทั้งสองทำให้เกิดรหัสหยุดแอ็กซอนถัดไป มีผลให้เกิดภาวะการขาดโปรตีนคอมพลีเมนต์ดังกล่าวในกระแสเลือด

ผลการวิจัยพบภาวะ 2-bp insertion ในแอ็กซอน 29 ของยีน C4B ในผู้ป่วยหนึ่งรายที่มีภาวะ C4AQ0 ร่วมด้วย และไม่พบภาวะมิวเตชันทั้งสองชนิด ในกลุ่มคนปกติและผู้ป่วยเอสแอลอี ทำให้สรุปได้ว่า ภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 ไม่ว่าจะชนิดใด หรือชนิดใดเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อภาวะการเกิดโรคเอสแอลอีในกลุ่มประชากรไทย ซึ่งนอกจากปัจจัยทางพันธุกรรมแล้วปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ เช่น สภาวะแวดล้อม ที่อยู่อาศัย อาหารการกิน อาจจะมีผลต่อภาวะการแสดงออกของภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B ต่อโรคเอสแอลอีด้วย

นอกจากนั้น ยังได้นำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาช่วยในการปรับแต่ง Bacterial artificial chromosomes ที่มียีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคน ทำให้มีภาวะ 2-bp insertion ในแอ็กซอน 29 และนำยีนที่ปรับแต่งแล้วเข้าสู่เซลล์ไฟโบบลาสที่เพาะเลี้ยงได้จากหนูที่ขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 (C4 knockout mice) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนมิวเตชันดังกล่าวเทียบกับยีนปกติ พบว่า ภาวะ 2-bp insertion ในแอ็กซอน 29 ซึ่งส่งผลให้เกิดรหัสหยุดที่แอ็กซอน 30 นั้น ส่งผลในขั้นตอน C4 transcription ทำให้ไม่สามารถผลิตโปรตีนคอมพลีเมนต์นี้ได้ ยืนยันจากผลการทดลองด้วยเทคนิค RT-PCR และ ELISA

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของหัวข้อการวิจัย

นักวิจัยในต่างประเทศหลายกลุ่มได้รายงานความสัมพันธ์ของภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ โดยเฉพาะระบบ Classical complement (C1, C2, C4) ว่าเป็นปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีความเสี่ยงสูงต่อภาวะการเกิดโรคเอสแอลอี (systemic lupus erythematosus) จากการรายงานพบว่า ผู้ป่วยโรคเอสแอลอีทั้งหมดจะมีการขาดโปรตีนคอมพลีเมนต์ C1 และ/ หรือ C4 และผู้ป่วยเอสแอลอีประมาณ 30-50% มีการขาดโปรตีนคอมพลีเมนต์ C2 ในบางกรณีจะมีภาวะการขาดโปรตีนคอมพลีเมนต์ในช่วงระหว่างอาการแสดงของโรคนี้โดยไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอน สมมติฐานการพยากรณ์โรคเอสแอลอีมีได้หลายประการ สาเหตุหลัก คือ ร่างกายไม่สามารถสลายโปรตีนคอมเพลกซ์ระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (immune complex) ได้ ซึ่งเป็นบทบาทสำคัญของระบบคอมพลีเมนต์

คอมพลีเมนต์ C4 ในคนสามารถแบ่งเป็นชนิดเอและชนิดบี ซึ่งควบคุมด้วยยีน 2 ชนิด คือ C4A และ C4B ตามลำดับ ซึ่งอยู่บน Major Histocompatibility Complex (MHC) class III บนโครโมโซมที่ 6 ซึ่งลักษณะของโปรตีนคอมพลีเมนต์ C4 ทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันที่ลำดับกรดอะมิโนน้อยกว่า 1% การแสดงออกของยีนคอมพลีเมนต์ C4 นี้จะแสดงออกพร้อมกับยีน RP, cytochrome P₄₅₀ และ steroid 21- hydroxylase (CYP21A and B), ซึ่งตั้งอยู่บนแขน 3' ของยีน C4A และ C4B การสังเคราะห์โปรตีนคอมพลีเมนต์ C4 นี้ เริ่มจากการสังเคราะห์ native C4 ประกอบด้วยโซไกลโคโปรตีน 3 เส้น มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 185 กิโลดาลตัน ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้งสองชนิดนั้น มีผลให้ความสามารถในการทำงานของโปรตีนคอมพลีเมนต์ชนิดเอและบีแตกต่างกัน คือ โปรตีนคอมพลีเมนต์ C4A จัดเป็นหมู่เลือด **Rodgers (Rg)** blood group antigen มีประสิทธิภาพในการจับกับหมู่อะมิโนของโมเลกุลเป้าหมายได้มากกว่าโปรตีนคอมพลีเมนต์ C4B ถึง 100 เท่า แต่ประสิทธิภาพในการจับกับหมู่ไฮดรอกซิลของโมเลกุลเป้าหมายได้น้อยกว่าโปรตีนคอมพลีเมนต์ C4B ถึง 10 เท่า (1, 2) ซึ่งความสามารถในการจับกับกลุ่มเป้าหมายที่ต่างกันนี้มาจากลำดับกรดอะมิโนที่ต่างกันบนโคดอนที่ 1101 ถึง 1106 ซึ่งคอมพลีเมนต์ C4A จะมีลำดับกรดอะมิโนเป็น PCPVLVD ขณะที่คอมพลีเมนต์ C4B จัดเป็นหมู่เลือด **Chido (Ch)** blood group antigen มีลำดับกรดอะมิโนเป็น PCPVIH (3, 4).

ลักษณะทางจีโนไทป์ของคอมพลีเมนต์ C4 ก่อนข้างจะหลากหลายและมีความแปรปรวนสูง ความแปรปรวนดังกล่าวเกิดจากจำนวนและขนาดของยีนบนโครโมโซม (5) โดยทั่วไปประชากรปกติจะมีทั้งยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B โดยที่ความยาวของยีนทั้งสองอาจเป็น 21 หรือ 14.6 กิโลเบสก็ได้ ขึ้นอยู่กับว่าในตำแหน่งอินทรอนที่ 9 มียีนของ endogenous retrovirus HERV-K แทรกอยู่หรือไม่ (6-9) ซึ่งถ้ามียีน HERV-K อยู่จะเป็นยีนแบบยาว (L) ถ้าไม่มียีนของไวรัสชนิดนี้อยู่จะเป็นยีนแบบสั้น (S) นอกจากนั้น ยังขึ้นอยู่กับแสดงออกของยีนข้างเคียง ได้แก่ RP, steroid

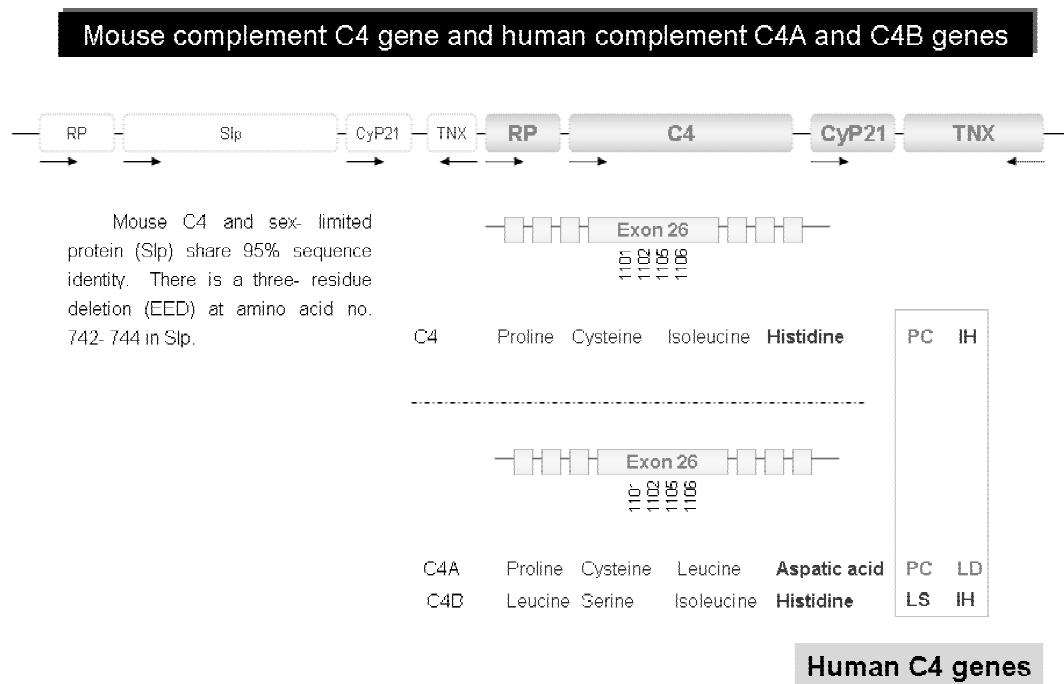
hydroxylase gene CYP21gene, extra cellular matrix protein gene tenascin TNX ที่ตั้งอยู่บนปลาย 3' ซึ่งมีปฏิกิริยาระหว่างการเกิดทราสคริปชันร่วมกันเสมอ จัดเป็นชุดการแสดงออกของยีนเรียกว่า RCCX module (10-12) ชุดการแสดงออกของยีนบนโครโมโซมสามารถทำให้เกิดความหลากหลายของยีนคอมพลีเมนต์ C4 ได้ 7 ชนิดตามความยาวและจำนวนของ RCCX module ดังนี้ monomodular L, monomodular S, bimodular LL, bimodular LS, trimodular LLL, trimodular LSS และ trimodular LLS

จากการศึกษายีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B ในคนคอเคเซียนที่มียีนแบบ bimodular structure โดย 55% มีทั้งยีน C4A และ C4B 13.3% มีเฉพาะยีน C4A และ 0.67% มีเฉพาะยีน C4B ส่วนอีก 31% ที่เหลือจะเป็น trimodular หรือ monomodular structures สำหรับประชากรที่มีโครงสร้างแบบ monomodular structure มีประมาณ 17% ประกอบด้วย มีแต่ยีน C4A 5% และมีแต่ยีน C4B 12% สำหรับประชากรที่มี trimodular structure นั้นมักจะเป็นแบบ LLL และ LSS ซึ่งประชากรสองในสามของพวก LLL จะเป็น C4A-C4A-C4B haplotypes ส่วนประชากรสองในสามของพวก LSS จะเป็น C4A-C4B-C4B haplotypes

จากข้างต้นสามารถบอกได้ว่ายีนบนโครโมโซมพวก diploid genome จะมี gene dosage เป็น 2 และ 6 ซึ่ง 52% ของประชากรจะมี C4 gene dosage เป็น 4 ส่วน gene dosage ที่ 2, 3, 5 และ 6 จะมีค่า 2%, 25.3%, 17.3% และ 3.3% ซึ่งอาจเกิดจากยีนคอมพลีเมนต์ C4 บนโครโมโซมเกิด unequal crossing-over และเป็นผลให้เกิด deletions และ homoduplications ของยีนคอมพลีเมนต์ C4 เองหรือยีนข้างเคียงทั้งสามชนิดได้ (13, 14, 15) ดังนั้น ยีนคอมพลีเมนต์ C4 จึงมีความแปรปรวนสูง ในปัจจุบันพบมากกว่า 40 variants รวมถึงภาวะการขาดยีนโปรตีนคอมพลีเมนต์ C4 (null alleles; C4Q0) (16) ซึ่งภาวะการขาดโปรตีนคอมพลีเมนต์ C4 ชนิดใดชนิดหนึ่งในพลาสมาสามารถตรวจพบได้ในประชากรปกติ คิดเป็นสถิติความถี่ 0.1- 0.3 (17) อย่างไรก็ตาม ภาวะการขาดยีนนี้ทั้งสองชนิดในคน ๆ เดียวกันนั้นพบได้ยาก มักพบในผู้ป่วยที่มีภาวะ severe immune complex disease (18) มีงานวิจัยมากกว่า 35 ชิ้น รายงานถึงความสัมพันธ์ของภาวะการขาดโปรตีนคอมพลีเมนต์ C4 แบบ heterozygous- และ homozygous deficiencies of C4A ประมาณ 40- 60% ในผู้ป่วยโรคเอสแอลอีในประชากรกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ ชาวยุโรป อเมริกัน ชาวจีน ชาวเกาหลี และชาวญี่ปุ่น (19-27) ในขณะเดียวกันงานวิจัยที่ศึกษาในประชากรชาวฝรั่งเศส พบว่า ภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A นั้นไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคเอสแอลอีและกลุ่มคนปกติ (28) ส่วนการศึกษาในกลุ่มคนคอเคเซียนและชาวแอฟริกัน พบว่า ภาวะของการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A ในผู้ป่วยโรคเอสแอลอี เป็นแบบการมีชุด RCCX-S module ของยีน C4A และ C4B อย่างละหนึ่งชุด และมีความผิดปกติของยีนเป็น 2- bp insertion ในโคดอน 1213 แยกซอน 29

ยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของหนูจะถูกกำหนดโดยยีน C4 และ Sex limited-protein (Slp) คล้ายกับลักษณะของยีนคอมพลีเมนต์ C4 ในคน แต่โปรตีนของคอมพลีเมนต์จะถูกสร้างขึ้นจากส่วนยีน C4 เท่านั้น ส่วนยีน Slp จะไม่แสดงออกเลย (รูปที่ 1)

งานวิจัยในกลุ่มประชากรชาวเอเชียยังมีอยู่น้อย และมักไม่พบภาวะ C4AQ0 อย่างไรก็ตามได้มีการรายงานความสัมพันธ์ของการขาดยีนชนิดเอว่า เกี่ยวข้องกับชนิดของยีน MHC class II ซึ่งอยู่บนโครโมโซมเดียวกันอีกด้วย นอกจากนี้ งานวิจัยในกลุ่มผู้ป่วยโรคเอสแอลอีชาวเม็กซิกัน ชาวสเปน ชาวอังกฤษ ชาวออสซี่ ชาวไต้หวัน ยังแสดงถึงภาวะการขาดโปรตีนคอมพลีเมนต์ C4B โดยมีลักษณะแบบมีชุด RCCX-L module ของ C4B (30-33)



รูปที่ 1 การเปรียบเทียบยีนคอมพลีเมนต์ C4 ระหว่างของคนและหนูสำหรับการเรียงลำดับเบสในแอกซอนที่ 26

โรคเอสแอลอี

โรคเอสแอลอี (SLE; Systemic Lupus Erythematosus) เป็นโรคที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต้านทานต่อเนื้อเยื่อตนเอง (autoimmunity) เป็นผลให้เกิดการอักเสบในอวัยวะต่าง ๆ เช่น ไต สมอ ระบบประสาทส่วนกลาง (ทำให้เกิดการสูญเสียความจำ ปัญหาการมองเห็น การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมหรืออัมพาต) หลอดเลือด กล้ามเนื้อหัวใจ ปอด เกิดปัญหาของระบบเลือด เช่น โลหิตจาง เม็ดเลือดขาวต่ำ เป็นต้น ผู้ป่วยที่มีอาการทางไตและสมอ จะมีพยากรณ์โรคเลวร้ายกว่าผู้ป่วยที่มีอาการอักเสบที่อวัยวะอื่น ๆ ไตอักเสบในผู้ป่วยเอสแอลอี พบบ่อยในประเทศไทยและบางรายมีอาการรุนแรงถึงขั้นไตวายและเสียชีวิต (34, 35) อาการแสดงออกของโรคเอสแอลอี ในผู้ป่วยแต่ละคนอาจจะแตกต่างกัน ซึ่งอาการที่พบบ่อยได้แก่ อ่อนเพลีย ปวดบวมตามข้อ เป็นไข้ไม่ทราบสาเหตุ ผื่นแดงตามผิวหนังโดยเฉพาะบนใบหน้า อาการของโรคจะมีระยะที่โรคกำเริบ (flares) และระยะที่โรคสงบ (remission) สลับกันไป โรคเอสแอลอี พบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย และพบมากในคนผิวดำมากกว่าผิวขาวซึ่งมีรายงานมากในประชากร Hispanic Asia และชนพื้นเมืองในอเมริกา อย่างไรก็ตามอัตราความชุก และข้อมูลทางการระบาดของโรคนี้นี้ยังไม่มี การสำรวจและรวบรวมอย่างจริงจังในประเทศไทย

สถิติจากประเทศจีนพบความชุกของโรคในอัตราประมาณ 40-70 คน ต่อประชากรแสนคน (36) และข้อมูลจากสหรัฐอเมริกา (37) พบว่าสตรีผิวดำมีโอกาสเกิดโรคนี้ประมาณ 1 ใน 200 คน ขณะที่สตรีผิวขาวมีความเสี่ยง 1 ใน 700 แพทย์ข้อมูลจากโรงพยาบาลรามาริบัติ พบว่า มีผู้ป่วยเอสแอลอีเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลคิดเป็นอัตรา 1 คน ต่อคนไข้ 200 คน แม้ว่าเมื่อพิจารณาอัตราความชุกของโรคนี้พบไม่มากเมื่อเทียบกับโรคอื่น ๆ เช่น โรคเบาหวาน หรือโรคหัวใจ แต่เมื่อพิจารณาผลกระทบจากโรคจะพบว่าเป็นโรคสำคัญที่มีผลกระทบต่อการพัฒนาประเทศอย่างมากและไม่ควรมองข้าม เนื่องจากโรคเอสแอลอี พบมากในคนหนุ่มสาวโดยเฉพาะสตรีวัยเจริญพันธุ์ (อายุระหว่าง 15-45 ปี) กว่าร้อยละ 80 ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรสำคัญที่สุดในการผลักดันความก้าวหน้าทางเศรษฐกิจ สังคม วิทยาการต่าง ๆ ของประเทศ ความรุนแรงของโรคทำให้ประชากรวัยทำงานต้องตกอยู่ในสภาวะพิการ ป่วยเรื้อรัง หรือเสียชีวิต เด็กจำนวนมากต้องกำพร้าแม่หรือขาดการดูแลเอาใจใส่จากแม่ซึ่งต้องรักษาโรคนี้แบบเรื้อรัง

ปัจจุบัน ยังไม่มีงานวิจัยใดที่สามารถสรุปสาเหตุการเกิดที่แน่นอนของโรคเอสแอลอีได้ แต่สาเหตุที่งานวิจัยยืนยันว่าเป็นสาเหตุของโรค ได้แก่ ปัจจัยทางพันธุกรรม ฮอริโมน สิ่งแวดล้อมและลักษณะการกินอยู่ แม้ว่าปัจจัยทางพันธุกรรมมีผลงานการวิจัยสนับสนุนมากกว่าพันธุกรรมมีส่วนร่วมที่สำคัญในการเกิดโรค แต่ยังไม่สามารถบ่งบอกยีนที่ทำให้เกิดโรคได้แน่ชัด (polygenic disease) (38, 39)

ตัวอย่างของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเกิดโรคเอสแอลอีในกลุ่มคนเอเชียและไทย ซึ่งทำให้เกิดอาการรุนแรงและไตอักเสบ เช่น จากการติดเชื้อไวรัสบางชนิด เช่น Retrovirus (40) กลไกการเกิดโรคอาจเกิดจาก Molecular mimicry ระหว่าง RNP antigen และ Retroviral core proteins มีผลให้เกิด autoimmune ในผู้ป่วยโรคเอสแอลอี (41) ประมาณ 30% ของผู้ป่วย นอกจากนั้นแสงแดด ความเครียดและยาบางชนิดก็อาจเป็นปัจจัยร่วมที่ทำให้เกิดโรคเอสแอลอีเช่นกัน

ในปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพด้านการรักษาโรคด้วยเซลล์ต้นกำเนิดและยีนได้รับความสนใจมากขึ้น ตั้งแต่ปี ค.ศ.1998 นักวิทยาศาสตร์สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดของเอ็มบริโอ (Embryonic Stem cells; ES cells) ซึ่งได้พัฒนาจากการทดลองวิจัยในสัตว์อื่น เช่น หนู และกระต่ายได้ในห้องปฏิบัติการและสามารถใช้เป็นเซลล์ต้นแบบเพื่อปรับเปลี่ยนยีน หรือสารพันธุกรรมก่อนที่จะให้เซลล์เหล่านี้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ ของร่างกาย และนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ในด้านการรักษาด้วย (gene therapy) หรือนำมาโคลนสัตว์ทดลองเพื่อให้เป็นรูปแบบของโรคชนิดต่าง ๆ (transgenic animal) นักวิจัย (39) ได้ทำการผลิตหนูให้เป็นโรคเอสแอลอี พบว่า หนูที่มีอาการไตอักเสบมักเกิดมากในหนูตัวเมีย และสรุปว่าฮอร์โมนอาจเป็นปัจจัยร่วมของความร้ายแรงของโรค

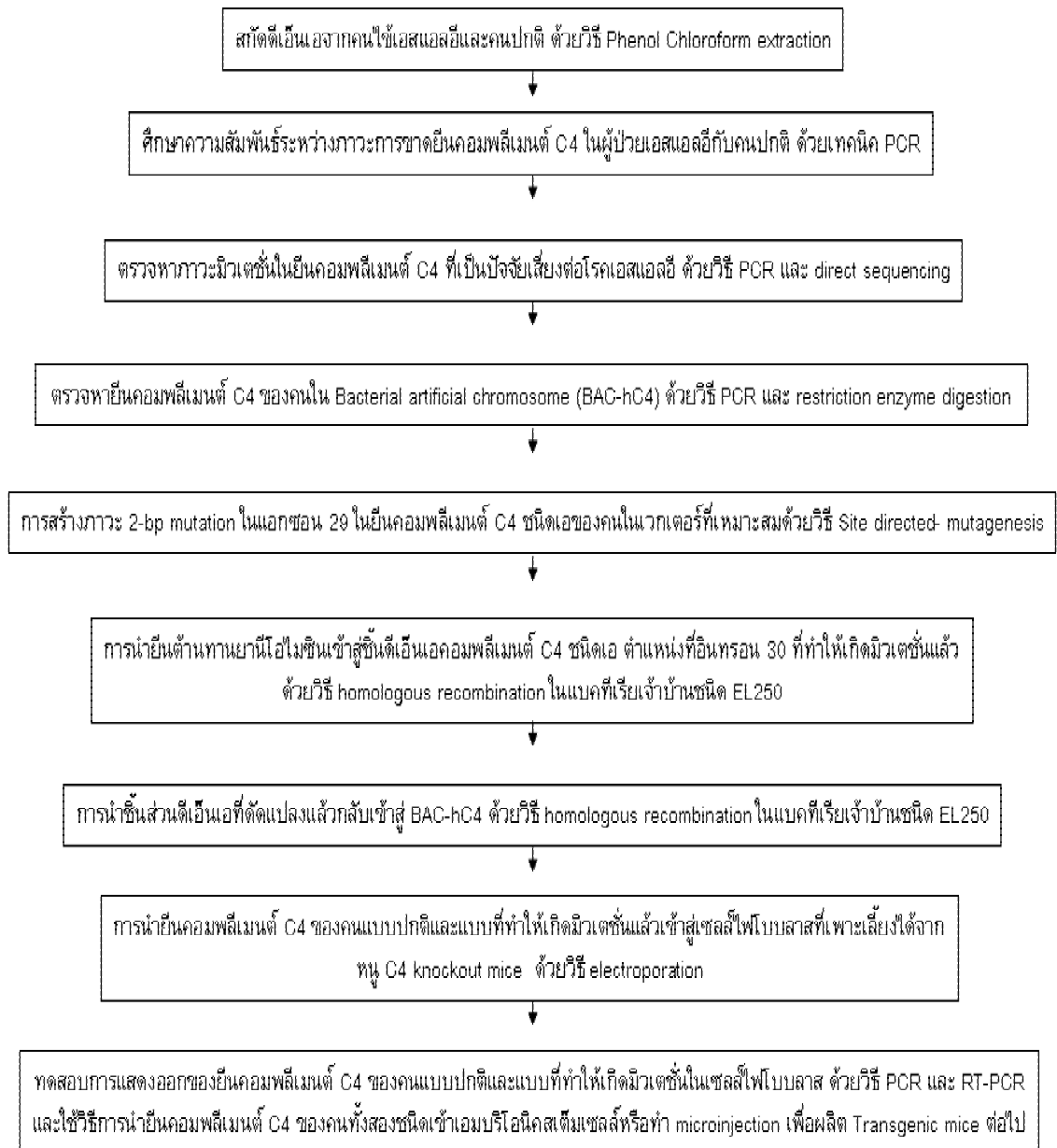
โรคเอสแอลอีเป็นโรคร้ายในอันดับต้นๆ ที่จะทำให้เกิดความพิการ เสื่อมสมรรถภาพในการทำงานและการสูญเสียชีวิตก่อนวัยอันสมควรทั้งจากตัวโรคและจากผลการรักษา และเนื่องจากโรคนี้พบในคนไทยด้วยสถิติมากขึ้นและร้ายแรงกว่าคนในประเทศตะวันตก นักวิจัยและนักวิทยาศาสตร์จึงจำเป็นต้องศึกษาค้นคว้าวิจัยโรคเอสแอลอี เพื่อประโยชน์ในการตรวจรักษา และป้องกันโรคที่เป็นอันตรายร้ายแรงต่อประชากรของเราเอง ปัญหาเบื้องต้นที่จะต้องศึกษาวิจัยคือการศึกษารูถึงสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรคโดยเฉพาะปัจจัยหลักจากพันธุกรรม รวมทั้งสิ่งแวดล้อมที่เป็นตัวเสริมให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำงานผิดปกติ จนก่อให้เกิดความแปรปรวนในร่างกายและแสดงออกเป็นอาการของโรค

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้น

- ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโรคเอสแอลอีและภาวะจีโนไทป์แบบ C4Q0 ซึ่งผลิตโปรตีนที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย คือ ระบบ Classical complement pathway ทำหน้าที่หลัก คือ จับกับแอนติบอดีที่ทำหน้าที่ดักจับอยู่กับแอนติเจนแปลกปลอม เซลล์ที่ติดเชื้อ หรือผิดปกติเพื่อควบคุมสมดุลในร่างกาย ในกลุ่มประชากรไทย
- ปรับแต่งยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนในหลอดทดลองด้วยเทคนิค site-directed mutation
- นำยีนคอมพลีเมนต์ C4 ที่ถูกปรับแต่งแล้วเข้าสู่เซลล์ไฟโบบลาของ C4 knockout mice
- ศึกษาการแสดงออกของยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคน ที่สามารถทดแทนยีนในเซลล์หนูได้ (gene rescue)

ขอบเขตของการวิจัย



วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองมีขั้นตอนโดยสรุป ดังนี้

ส่วนที่ I. การตรวจภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 และภาวะมิวเตชันของยีนในผู้ป่วยเอสแอลอีเทียบกับกลุ่มคนปกติในกลุ่มประชากรไทย

- การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของคนไข้โรคเอสแอลอี และคนปกติ
- การตรวจลักษณะทางจีโนไทป์ของเพื่อตรวจหาภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4
- การตรวจภาวะการเกิดมิวเตชันด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ และเทคนิค Direct sequencing

ส่วนที่ II. การสร้างยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนให้มีภาวะผิดปกติแบบ 2-bp insertion ด้วยวิธี Site directed- mutagenesis

- การตรวจยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนในเวกเตอร์ชนิด Bacterial Artificial chromosome (BAC); human complement C4- BAC clone (BAC-hC4) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่
- การทำให้เกิดมิวเตชันแบบ 2-bp insertion ที่แอกซอน 29 ด้วยวิธี site- directed mutagenesis
- การตรวจซีนดีเอ็นเอที่ผิดปกติด้วยเทคนิค Direct sequencing
- การนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผิดปกติเข้าสู่ BAC-hC4 clone

ส่วนที่ III. การนำยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนแบบปกติและแบบผิดปกติเข้าสู่เซลล์สัตว์

- การเตรียมและเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสจาก C4 knockout mice (Kc-MFB)
- การนำยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนที่ปกติและผิดปกติเข้าสู่เซลล์ไฟโบรบลาส
- การตรวจการแสดงออกของยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนในเซลล์ Kc-MFB

ส่วนที่ I. การตรวจภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 และภาวะมิวเตชันของยีน

ในผู้ป่วยเอสแอลอีเทียบกับกลุ่มคนปกติในประชากรไทย

1. การสกัดจีโนมิตีเอ็นเอจากเลือดของคนไข้โรคเอสแอลอี และคนปกติ

การสกัดจีโนมิตีเอ็นเอของผู้ป่วยโรคเอสแอลอี จำนวน 118 ราย และคนปกติจำนวน 145 ราย ได้มาจากเลือดของกลุ่มทดลองทั้งสองกลุ่มด้วยวิธี Phenol-Chloroform extraction และตรวจวัดความเข้มข้นด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ผู้ป่วยทั้ง 118 ราย นั้นเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลรามารับดี ซึ่งถูกวินิจฉัยว่าเป็นโรคเอสแอลอี จากการตรวจผลตรวจทางห้องปฏิบัติการและอาการทางคลินิก โดยอาศัยหลักการวินิจฉัยโรคจาก American College of Rheumatology (ACR) ซึ่งผู้ป่วยที่มีอาการมากกว่า 4 รายการจาก 11 รายการ (ตารางที่ 1 และ 2) จะถือว่าเป็นโรคเอสแอลอี

2. การตรวจลักษณะทางจีโนไทป์ของเพื่อหาภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B

ดีเอ็นเอปริมาณ 100 นาโนกรัมจากทุกตัวอย่างถูกนำมาตรวจลักษณะทางจีโนไทป์ เพื่อหาภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B (homozygous C4A/ C4B deficiencies; C4AQ0/ C4BQ0) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction; PCR) แบบ Touchdown PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีนคอมพลีเมนต์ C4 แต่ละชนิดอย่างจำเพาะ บน alleles ทั้งสอง โดยไพรเมอร์ Aup/L3 และ Bup/L3 ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำเพาะของยีน C4A และ C4B ที่ 377 คู่เบส (bp) ส่วนไพรเมอร์ Adown/L4 และ Bdown/L4 ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำเพาะของยีน C4A และ C4B ที่ 578 คู่เบส (ตารางที่ 3) ตัวอย่างที่ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากทั้ง 4 ไพรเมอร์ จัดว่าเป็นตัวอย่างปกติ (non C4Q0) ในขณะที่ตัวอย่างที่ดีเอ็นเอของผู้ที่ไม่มียีนดังกล่าวจะไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากปฏิกิริยานี้เลย

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละของผู้ป่วยโรคเอสแอลอีจำนวน 118 ราย ที่มีอาการทางคลินิกตามข้อกำหนดของ American College of Rheumatology criteria

ลักษณะของการวินิจฉัยโรคเอสแอลอี	จำนวนผู้ป่วย (%)		
	Non C4Q0	C4AQ0	C4BQ0
Malar rash	60 (50.85)	3 (100)	1 (25)
Discoid rash	36 (30.51)	1 (33.3)	1 (25)
Photosensitivity	42 (35.59)	2 (66.6)	1 (25)
Oral ulcers	39 (33.05)	3 (100)	2 (50)
Renal disorder	79 (66.95)	3 (100)	2 (50)
Neurological disorder	17 (14.41)	1 (33.3)	1 (25)
Hematological disorder	57 (48.31)	0 (0)	2 (50)
Immunological disorder	85 (72.03)	3 (100)	3 (75)
Arthritis	81 (68.64)	2 (66.6)	3 (75)
Serositis	14 (11.86)	2 (66.6)	0 (0)
Antinuclear antibody	118 (100)	3 (100)	4 (100)

ตารางที่ 2 สรุปจำนวนอาการของผู้ป่วยโรคเอสแอลอีทั้ง 118 ราย และผู้ที่มีภาวะ C4AQ0 และ C4BQ0 ตามการวินิจฉัยโรคของ ACR

จำนวนอาการแสดงของผู้ป่วยโรคเอสแอลอี	จำนวนผู้ป่วย (ราย)		
	Non C4Q0	C4AQ0	C4BQ0
4	47		
5	67		3
6	2	1	1
7	1	1	
≥8	1	1*	

* คนไข้ที่มีภาวะ C4AQ0 และมียีน C4B ที่มีภาวะ 2-bp insertion ในแอกซอน 29

ตารางที่ 3 ตารางแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ และความยาวของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ยีน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (จากปลาย 5' ไป 3')	ความยาวของชิ้นดีเอ็นเอ (bp)
C4A/ C4AQ0	Aup	cgca tgc tcc tgt cta aca ctg ga	377/ null
	L3	agc oca tcc agc agt ttc gga ag	
	Adown	agg acc cct gtc cagt tgt tag ac	578/ null
	L4	ata gga tcc taa ggt ccc ctg ggc ct	
C4B/ C4BQ0	Bup	tgc tcc tat gta tca ctg gag aga	377/ null
	L3	agc oca tcc agc agt ttc gga ag	
	Bdown	agg acc tct ctg cag tga tac at	578/ null
	L4	ata gga tcc taa ggt ccc ctg ggc ct	
C4 exon 29/ 2 bp insertion in exon 29	C4ins29F	cac ttt cag ata acc tgt act g	59/61
	C4ins29R	oga cac ggc att gct ctg ag	
C4 exon 26- 29 for 2 bp insertion	29INS	gct ctg aga acc agt gac tag ag	860
	C4E26.5	agg aac oca ggg gtc cag	
C4 exon 13 for 1 bp deletion	C413delF	cat cac ctg gca ccc tcc ttt a	400
	C413delR	ctt gcc cat gtt gag ggg ct	
21- hydroxylase	Cyp21A-F	tgt ggc cat tga gga gga a	757
	Cyp21B-R	tgc cac oga tca gga ggt c	
Specific fragment for sequencing	Adown or B down	as above	2,800/ null
	Exon 32	gca cgt ggc ctlt gac tgt ca	

3. การตรวจภาวะการเกิดมิวเตชันด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่

3.1 การตรวจหาภาวะมิวเตชันที่พบบ่อยของยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B

การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ที่ทำให้เกิดภาวะการขาดโปรตีนคอมพลีเมนต์ C4 ในกระแสเลือด ซึ่งเป็นลักษณะมิวเตชันที่พบได้บ่อยในกลุ่มคนมองโกลอยด์ที่เคยมีรายงานมาแล้ว ได้แก่ ภาวะ 1-bp deletion ในแอกซอน 13 ของยีน C4B และการมี 2-bp insertion ในแอกซอน 29 ของยีน C4A ซึ่งภาวะการเกิดมิวเตชันทั้งสองแบบนี้ ส่งผลให้เกิดรหัสหยุดในแอกซอนถัดมา การตรวจหาลักษณะทางจีโนไทป์นี้ใช้เทคนิค multiplex PCR ซึ่งสามารถตรวจหาภาวะการเกิดมิวเตชันของหนึ่งตัวอย่างได้ภายในหลอดทดลองเดียวกัน พร้อมกับมีปฏิกิริยาควบคุม (internal control) ในหลอดแต่หลอดทดลองอีกด้วย ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษามีจำนวน 3 คู่ ได้แก่ 13delB/C4E14.3 จะสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ผิดปกติได้ขนาด 400 bp; C4ins 29R/C4E26.5 จะสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอผิดปกติได้ขนาด 860 bp และชิ้นส่วนดีเอ็นเอปกติได้ขนาด 757 bp โดยไพรเมอร์ 21A5/21A3 (ตารางที่ 3)

3.2 การตรวจยืนยันภาวะ 2-bp insertion ที่แอกซอน 29 ด้วยเทคนิค SSP-PCR

การยืนยันผลการทดลองจากข้อ 3.1 ที่ตรวจพบภาวะ 2-bp insertion ที่แอกซอน 29 ได้ด้วยเทคนิค PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ C4ins29-F/C4ins29-R ซึ่งผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่จะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากคนปกติขนาด 59 bp ในขณะที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่มีภาวะผิดปกติจะมีขนาด 61 bp

3.3 การตรวจยืนยันภาวะ 2-bp insertion ที่แอกซอน 29 ด้วยเทคนิค direct-sequencing

การยืนยันผลการทดลองจากข้อ 3.1 ที่ตรวจพบภาวะ 2-bp insertion ที่แอกซอน 29 ด้วยเทคนิค direct sequencing จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2.8 Kb ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B ได้แก่ Adown หรือ Bdown/C4 exon 32 ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวจะถูกทำการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Turbo PCR kit (BIO 101) ก่อนนำไปทำ direct sequencing

ส่วนที่ II. การสร้างยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนให้มีภาวะผิดปกติแบบ 2-bp insertion ใน แอกซอน 29 ด้วยวิธี Site directed- mutagenesis

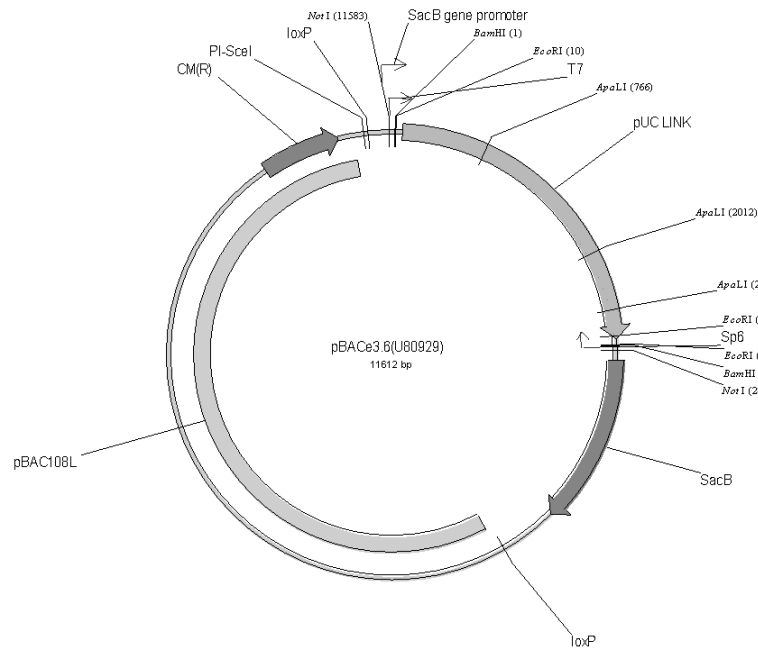
- การสร้างชิ้นส่วนยีนคอมพลีเมนต์ C4A ให้มีภาวะผิดปกติในเวกเตอร์ตัวกลาง
- การตรวจชิ้นดีเอ็นเอที่ผิดปกติด้วยเทคนิค Direct sequencing
- การนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผิดปกติเข้าสู่ human complement C4- BAC clone

1. การตรวจยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนใน Bacterial Artificial Chromosome (BAC-hC4)

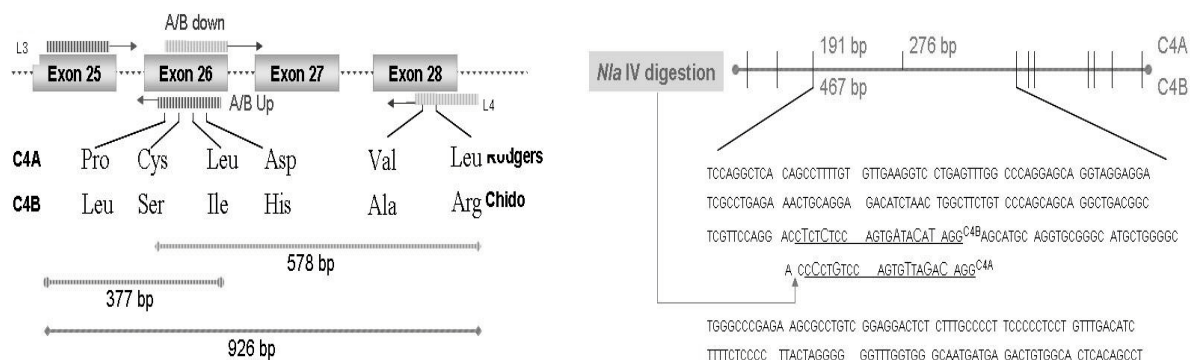
การวิจัยครั้งนี้ ได้นำ Bacterial Artificial Chromosome (BAC) ที่มีการตัดต่อชิ้นส่วนยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนเข้าไปในเวกเตอร์ pBACe 3.6 (รูปที่ 2) มาใช้ซึ่งมีความสามารถต้านทานยาคลอแรมฟินิคอล (Chloramphenicol; Cm) และตั้งชื่อเวกเตอร์ใหม่ว่า “BAC-hC4” ซึ่งโคลนดังกล่าวจำเป็นต้องตรวจความบริสุทธิ์และมียีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคน ทั้งชนิดเอและบี ครบหรือไม่ โดยเริ่มต้นจากการเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในแบคทีเรียเจ้าบ้าน คือ DH5- α โดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) และเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Cm (20 μ g/ml) ที่ 37°C นาน 1 คืน จากนั้น สุ่มเลือกโคโลนีจำนวน 8 โคโลนี และนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี Cm (20 μ g/ml) เช่นเดิมที่ 37°C นาน 16 ชั่วโมง พร้อมเขย่าที่ 225 รอบต่อนาที (round per minute; rpm) จากนั้นพลาสมิดดีเอ็นเอจากแต่ละโคลนถูกนำมาสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของพลาสมิดดีเอ็นเอสามารถวัดได้โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

พลาสมิดดีเอ็นเอจากทั้ง 8 โคลนถูกนำมาตรวจลักษณะทางจีโนไทป์ว่ามียีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนโดยใช้เทคนิค Touchdown PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ที่ใช้จำเพาะกับยีนคอมพลีเมนต์ C4 แต่ละชนิด ได้แก่ Aup/L3 และ Bup/L3 (ตารางที่ 3)

ส่วนอีกวิธีการหนึ่งที่น่ามาตรวจคุณสมบัติของ BAC-hC4 ดังกล่าวคือ การใช้ไพรเมอร์จำเพาะ (L3/L4) สร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 976 bp และนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ *NlaIV* ซึ่งหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวแล้ว ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B ตามคุณสมบัติการเรียงตัวของเบสที่แตกต่างกัน คือ ยีน C4A จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะที่ 276 bp และ 191 bp ในขณะที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน C4B จะได้ขนาด 476 bp (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 แสดงแผนภูมิเวกเตอร์ pBACe3.6 ซึ่งมีความสามารถในการต้านยา Chloramphenicol



รูปที่ 3 แสดงลักษณะลำดับเบสที่แตกต่างกันของยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B ในแอกซอน 26 ทำให้เมื่อนำมาผลิตผลจาก PCR ด้วยไพรเมอร์ L3/L4 แล้วนำมาตัดด้วย *Nla*IV ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกัน

นอกจากนั้นโคลน BAC-hC4 ดังกล่าวยังผ่านกระบวนการประมาณขนาดของโคลนดีเอ็นเอ โดยการย่อยด้วย Restriction enzymes หลายชนิดที่อุณหภูมิและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด และทำการศึกษาย่อยชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วย Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) จากนั้นจึงย้อมเจลเพื่อดูชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดออกด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide; EtBr) ซึ่งขนาดของโคลนนี้ประมาณค่าจากการรวมขนาดของชิ้นดีเอ็นเอแต่ละชิ้นเข้าด้วยกัน

2. การทำให้เกิด 2-bp insertion ที่แอกซอน 29 ด้วยวิธี site- directed mutagenesis

2.1 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนคอมพลีเมนต์ C4A ด้วยเทคนิค gene cloning

ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของยีนคอมพลีเมนต์ C4A ระหว่างแอกซอน 26-32 ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นโดยใช้ BAC-hC4 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะในช่วงยีนดังกล่าว (ตารางที่ 3) ซึ่งปรับแต่งให้มีจุดตัดที่ปลาย 5' ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *XhoI* และ *NotI* ตามลำดับ หลังจากการทำ PCR แล้ว ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอถูกนำมาศึกษาขนาดที่ถูกต้องด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล และทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้ให้บริสุทธิ์โดยการใช้น้ำยาสำเร็จรูป Bio101 และนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว โคลนเข้าเวกเตอร์ pALTER-MAX (รูปที่ 4) ที่มีขนาดประมาณ 5.5 kb ที่จะใช้เป็นเวกเตอร์ตัวกลางในการทำให้เกิดภาวะมิวเตชันโดยตัวเชื่อมที่เอนไซม์สองชนิดดังกล่าว ซึ่งเวกเตอร์ตัวนี้มีคุณสมบัติในการต้านยา Cm และยีนที่ควบคุมการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Ampicillin (Amp) ได้ถูกกักไว้ ซึ่งจะใช้ประโยชน์ในการทำให้เกิดภาวะมิวเตชันต่อไป โคลนนี้ถูกนำไปเลี้ยงในแบคทีเรียเจ้าบ้านคือ JM109

2.2 Sited- direct mutagenesis

การทำให้เกิดภาวะมิวเตชันในการวิจัยนี้ ได้ใช้ชุดสำเร็จรูปสำหรับการเกิดมิวเตชันจาก Promega คือ Altered SitesII[®] Mammalian Mutagenesis System ซึ่งวิธีการทำให้เกิดภาวะมิวเตชันนี้ สามารถทำได้ตามคู่มือที่บริษัทให้มา โดยสังเขป ดังนี้ การทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกโคลนเข้าไปในเวกเตอร์ pALTER-MAX มีภาวะมิวเตชันแบบ 2-bp insertion ที่แอกซอน 29 นั้น ได้อาศัย oligonucleotides 3 เส้น คือ

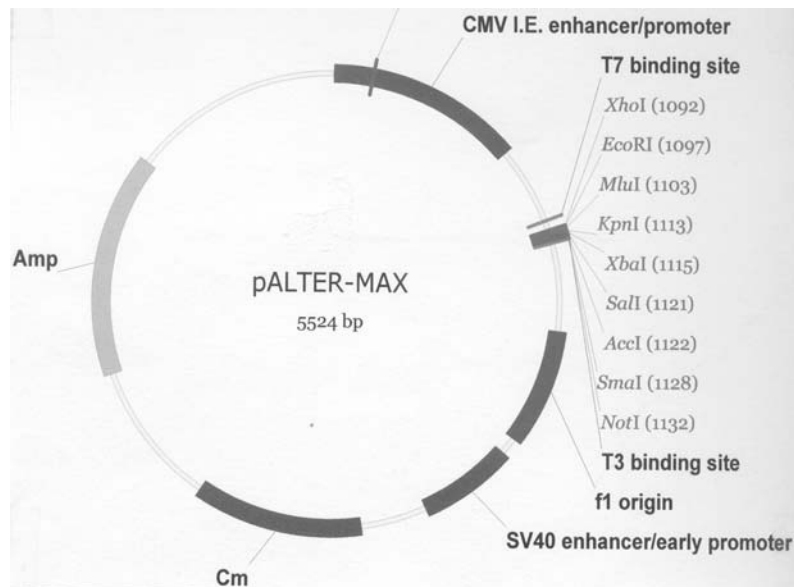
a) mutant oligonucleotide

b) oligonucleotide ที่จับกับส่วนที่เป็น Cm^r ให้เปลี่ยนเป็น Cm^s

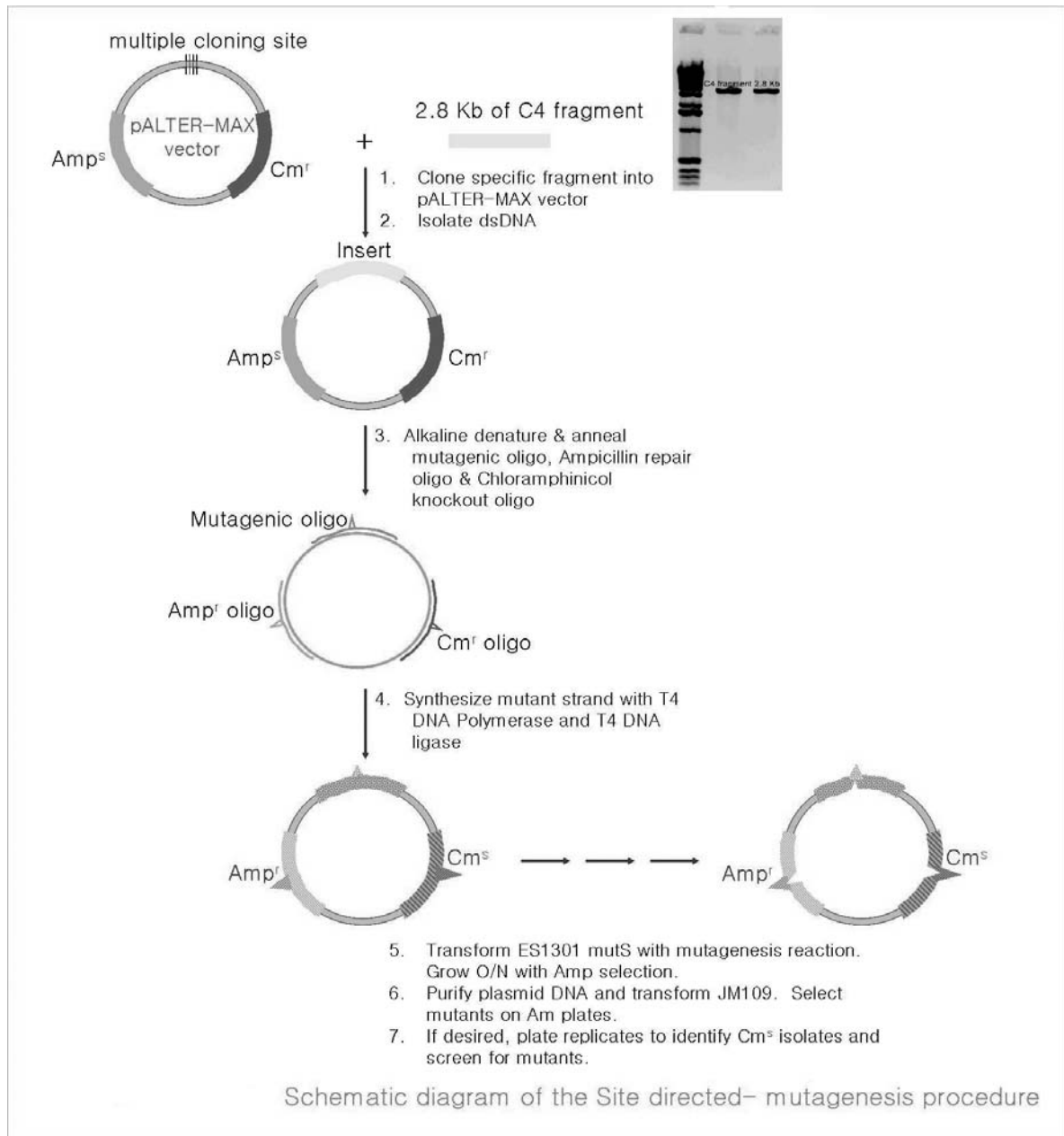
c) oligonucleotide ที่จับกับส่วนที่เป็น Amp^r ให้เปลี่ยนเป็น Amp^s ได้

ซึ่ง oligonucleotides สองชิ้นสุดท้ายชุดน้ำยาสำเร็จรูปได้มีมาให้แล้ว กระบวนการทำให้เกิดมิวเตชันได้ทำตามคู่มือที่ให้มาด้วยแล้ว โดยสรุปตามรูปที่ 5 คือ การนำพลาสมิดดีเอ็นเอดังกล่าวมาทำให้คลายด้วยกระบวนการ alkaline denature และใส่ oligonucleotides ทั้ง 3 ชนิด จากนั้นปล่อยให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยอาศัยเอนไซม์ T4 DNA polymerase และ T4 DNA ligase ซึ่งจะได้สายดีเอ็นเอสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่จะนำเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้านคือ ES1301 และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มียาปฏิชีวนะ Amp (100 µg/ml) ที่ 37°C, 16-18 ชั่วโมง จากนั้น นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และนำเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้านตัวใหม่ คือ JM109 ซึ่งมีคุณสมบัติในการรักษาคุณสมบัติมิวเตชันได้ดีกว่า ES1301 หลังจากการเพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มียา Cm (20 µg/ml) ที่

37°C นาน 1 คืน จากนั้นเลือกโคโลนีแบคทีเรียมา 10 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเหมือนข้างต้น แล้วนำไปตรวจหาภาวะ 2-bp insertion ในตำแหน่งที่ถูกต้องด้วยวิธี direct sequencing เหมือนการวิจัยส่วนที่ I



รูปที่ 4 แสดงแผนภูมิเวกเตอร์ pALTER-MAX ซึ่งมีความสามารถในการต้านยา Chloramphenicol และความสามารถในการต้านยา Ampicillin ถูกกวดไว้

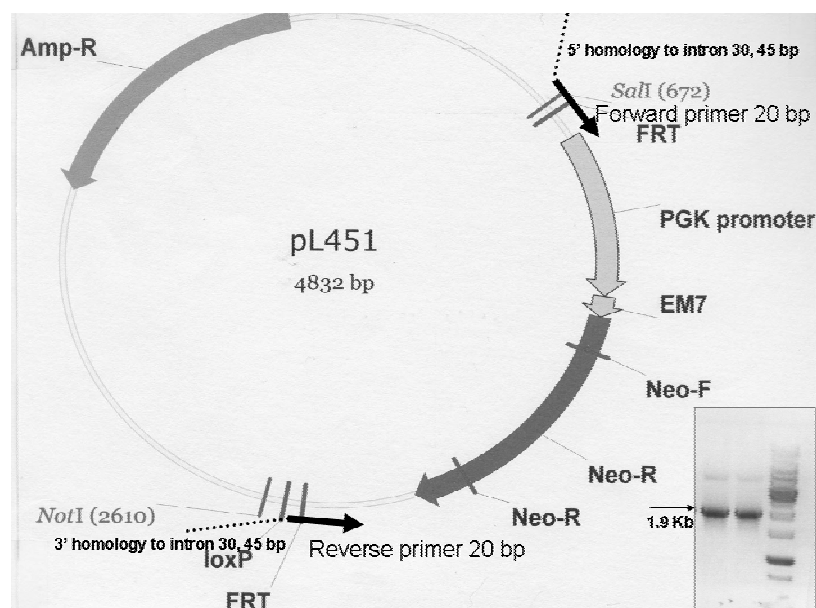


รูปที่ 5 แสดงรูปชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน C4A ขนาด 2.8 Kb (ขวามือ) ที่นำไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pALTER-MAX และขั้นตอนโดยสรุปของการทำให้เกิดมิวเตชันด้วยวิธี Sited- direct mutagenesis

2.3 การปรับแต่งเวกเตอร์โดยใส่ยีนต้านทานยาไฮโม่ซิน

โคลนที่ได้จากการทำมิวเตชัน และยืนยันการมี 2- bp insertion ที่แอกซอน 29 แล้ว ถูกเรียกว่า ALT-Mut ได้ถูกนำมาตกแต่งเพิ่มเติม คือ การเติมยีนต้านทานยาไฮโม่ซิน (Neo) เข้าไปที่อินทรอน 30 โดยเริ่มต้นจากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.9 Kb ที่มีประสิทธิภาพในการต้านยา Neo^R ดังกล่าวจากพลาสมิด pL451 เป็นดีเอ็นเอตั้งต้น ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วน FRT gene และเพิ่มลำดับเบส 45 เบสที่เหมือนกับส่วนของอินทรอน 30 เข้าที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ทั้งสอง ซึ่งใช้เป็น homology arms (รูปที่ 6) ในขั้นตอนการทำ homologous recombination ต่อไป

โคลนที่สามารถขึ้นได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาสองชนิด คือ Cm (20 µg/ml) และ Neo (100 µg/ml) จึงจะถูกนำมาใช้ในการทำ Homologous recombination กับ BAC-hC4 ที่อยู่ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน EL250 โคลนใหม่นี้ เรียกว่า “BAC-mutC4”



รูปที่ 6 แสดงแผนภูมิเวกเตอร์ pL451 และส่วนจับของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มส่วนของยีนต้านทานยาไฮโม่ซิน ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.9 Kb

ส่วนที่ III. การนำยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนแบบปกติและแบบผิดปกติเข้าสู่เซลล์สัตว์

1. การเตรียมและเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสจากหนูที่ขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4

หนูสายพันธุ์ C4 knockout mice ผลิตโดย Jackson Laboratory, สหรัฐอเมริกา เป็นหนูสายพันธุ์ที่ถูกปรับแต่งให้ขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 โดยการแทรกสอดยีนนีโอไมซินเข้าไปแทนที่แอกซอนที่ 23- 29 ทำให้หนูสายพันธุ์นี้ไม่มีโปรตีนคอมพลีเมนต์ C4 ในร่างกาย เซลล์ไฟโบรบลาสจากหนูสายพันธุ์นี้เตรียมได้จากผิวหนัง โดยการตัดผิวหนังเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วย่อยด้วย 0.25% Trypsin และ 5% Collagenase ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dolbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient mixture (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS) จากนั้นนำเซลล์ที่เป็น single cell suspension ไปเลี้ยงต่อใน DMEM, 10% FBS ที่ 37°C, 5% CO₂ เซลล์นี้ เรียกว่า "Kc-MFB"

2. การนำยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนที่ปกติและผิดปกติเข้าสู่เซลล์ไฟโบรบลาส (Transfection)

ดีเอ็นเอที่สกัดจากโคลน BAC-hC4 และ BAC-mutC4 ถูกนำเข้าสู่เซลล์ "Kc-MFB" ด้วย Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen Laboratory, USA) ตามคู่มือแนะนำโดยสรุป ดังนี้

2.1 ผสม 15 ไมโครลิตรของ Lipofectamine solution ใน 250 ไมโครลิตร ของ DMEM ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที

2.2 นำสารละลายจากข้อ 2.1 มาผสมกับ ดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมที่ละลายอยู่แล้วใน 250 ไมโครลิตร ของ DMEM ผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

2.3 นำสารละลายจากข้อ 2.2 ค่อย ๆ หยดลงในจานเลี้ยงเซลล์ Kc-MFB ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ประมาณ 2.5 มิลลิลิตร

2.4 เลี้ยงเซลล์ Kc-MFB ไว้ตามสภาวะเหมือนข้างต้นนาน 6 ชั่วโมง แล้วจึงคัดเลือกด้วยยา Neo แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM, 10% FBS จนกว่าจะได้ปริมาณเซลล์มากตามต้องการ เซลล์นี้ถูกเรียกว่า "hC4-MFB" สำหรับเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย BAC-hC4 และ "mutC4-MFB" สำหรับเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย BAC-mutC4

3. การตรวจการแสดงออกของยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนในเซลล์ Kc-MFB

3.1 การตรวจการแสดงออกของยีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคนในเซลล์ Kc-MFB ด้วยวิธี RT-PCR

อาร์เอ็นเอจากเซลล์ hC4-MFB และ mutC4-MFB ถูกสกัดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป และนำมาเตรียม cDNA ด้วยชุด Superscript III RT-PCR (Invitrogen Laboratory, USA) ด้วยไพรเมอร์

Aup/L3 และ Bup/L3 ที่จำเพาะต่อยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B (ตารางที่ 3) และตรวจขึ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.2 การตรวจหาโปรตีนคอมพลีเมนต์ C4 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ด้วยวิธี enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA)

อาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดได้นำมาตรวจหาโปรตีนคอมพลีเมนต์ C4 ด้วยวิธี plate ELISA โดยตรึงโปรตีนคอมพลีเมนต์ C4 บริสุทธิ์ (Sigma chemical, USA) และ อาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสอง ด้วยคาร์บอนเตตฟลูออไรด์ลงในหลุมของ ELISA plate แต่ละหลุม ๑ ละ 100 μ l จากนั้นเติม rabbit anti- human complement C4 antibody ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แต่ละหลุม ๑ ละ 100 μ l แล้วอุ่นที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำปฏิกิริยาด้วย goat anti- rabbit labelled alkaline phosphatase ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แต่ละหลุม ๑ ละ 100 μ l แล้วอุ่นที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วยอยเอนไซม์ฟอสฟาเทส ด้วยซับสเตรตเฉพาะ แต่ละหลุม ๑ ละ 50 μ l แล้วอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 402 นาโนเมตร เทียบกับหลุมควบคุม (หลุมตรึงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Kc-MFB) ซึ่งในการทดลองนี้ได้จำ human C4 protein สำเร็จรูปที่รู้ความเข้มข้นแน่นอน

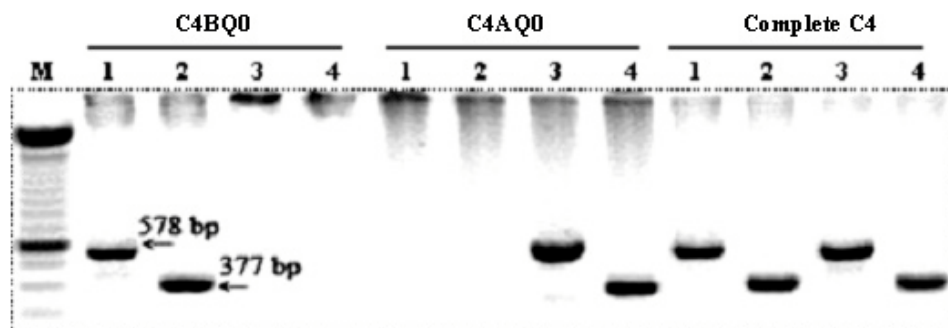
ผลการทดลอง

ส่วนที่ I. การตรวจภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 และภาวะมิวเตชันของยีน

ในผู้ป่วยเอสแอลอีเทียบกับกลุ่มคนปกติในกลุ่มประชากรไทย

1. การตรวจลักษณะทางจีโนไทป์เพื่อตรวจหาภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B

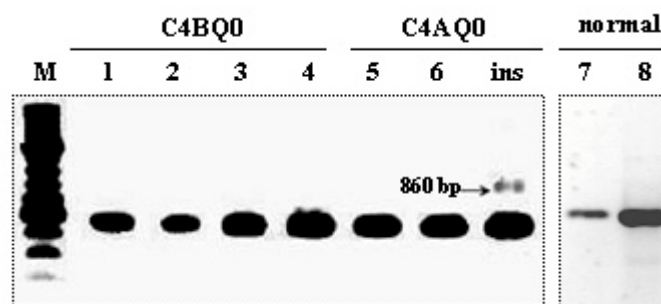
ผลการทดลองด้วย Touchdown PCR เพื่อตรวจภาวะ C4AQ0 และ C4BQ0 นั้นพบว่า มีผู้ป่วยจำนวน 3 รายที่อยู่ในภาวะขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A และมีผู้ป่วยจำนวน 4 รายที่มีภาวะขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4B ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 2.54 และ 3.39 ตามลำดับ ในขณะที่ไม่มีกลุ่มคนปกติมีภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 ชนิดใด ๆ เลย (รูปที่ 7) จากผลการวิจัยดังกล่าว ให้การสนับสนุนการวิจัยก่อนหน้านี้ คือ ภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ทั้งสองชนิด โดยเฉพาะชนิดเอ นั้นเป็นปัจจัยเสี่ยงอย่างยิ่งต่อการเกิดโรคเอส แอล อี แม้ว่า ในกลุ่มคนปกติของประชากรเหล่านั้น ได้แก่ กลุ่มประชากรมองโกลอยด์หรืออื่น ๆ ในประเทศสหรัฐอเมริกา สเปน อังกฤษ แอฟริกา เป็นต้น จะมีภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 ในกลุ่มประชากรปกติด้วยประมาณร้อยละ 2-3 ซึ่งผลการวิจัยกลุ่มประชากรปกติในประเทศไทยพบว่า ในกลุ่มคนปกติชาวไทย ไม่มีภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 เลย



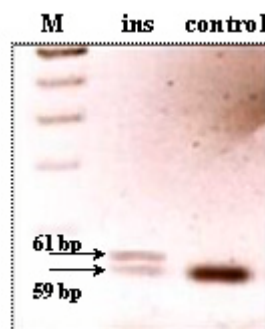
รูปที่ 7 แสดงผลของ Touchdown PCR บน 2% อะกาโรสเจลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจลักษณะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B แถวที่ 1- 4 แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนคอมพลีเมนต์ C4 ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 4 คู่ คือ Adown/L4, Aup/L3, Bdown/L4 และ Bup/L3, ตามลำดับ แถว M แสดง 100 bp DNA ladder

2. การตรวจภาวะการเกิดมิวเตชันด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่

จากการศึกษาภาวะการเกิดมิวเตชันด้วยเทคนิค Multiplex PCR นั้น พบว่า มีผู้ป่วยที่มีภาวะ C4AQ0 ร่วมกับภาวะ 2-bp insertion ในแอกซอน 29 (รูปที่ 8 และ 9) จำนวน 1 ราย โดยมี ซันดีเอ็นเอที่ 860 bp ซึ่งมาจากยีนมิวเตชัน และซันดีเอ็นเอที่ 757 bp ที่เป็น internal control ส่วนผู้ป่วยเอสแอลอีและกลุ่มคนปกติที่เหลือทั้งหมดไม่พบภาวะ 2-bp insertion ในแอกซอน 29 เลย โดยพบผลิตภัณฑ์ internal control จาก multiplex PCR เท่านั้น นอกจากนี้ ในตัวอย่างดีเอ็นเอจากทั้งสองกลุ่มประชากรไม่ตรวจพบภาวะ 1-bp deletion ในแอกซอน 13



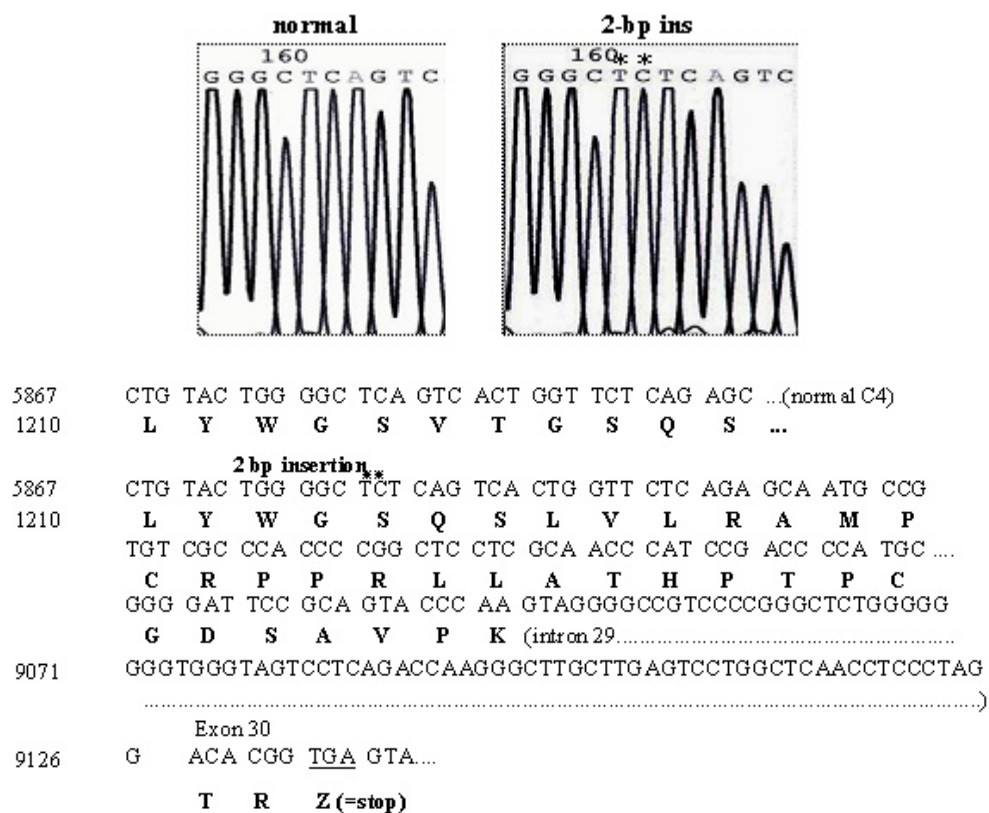
รูปที่ 8 แสดงผล Multiplex PCR ที่ใช้ตรวจหาภาวะ 2-bp insertion ที่แอกซอน 29) แล้วนำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิส แถวที่ 1- 6 แสดงผล PCR ที่ได้จากคนไข้ที่มีภาวะ C4BQ0 (4 ราย) และ C4AQ0 (2 ราย) ตามลำดับ ในแถวแต่ละแถวมี internal positive control ที่ 757 bp แถว ins แสดงผลของคนไข้ที่มีภาวะ C4AQ0 ร่วมกับการมีภาวะ 2 bp insertion ในแอกซอน 29 (860 bp) แถว M แสดง 100 bp DNA ladder



รูปที่ 9 แสดงผล SSP-PCR ที่ยืนยันภาวะการมี 2 bp insertion ในแอกซอน 29 และดูผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 10% acrylamide และย้อมด้วย EtBr แถว ins แสดงผลการมีภาวะมิวเตชัน โดยเห็นขนาดซันดีเอ็นเอสองขนาด คือ 59 และ 61 bp ในขณะที่แถว control พบขนาดซันดีเอ็นเอขนาด 59 bp เท่านั้น แถว M แสดง low range DNA marker

3. การตรวจภาวะ 2-bp insertion ที่ exon 29 ด้วยเทคนิค direct sequencing

การใช้วิธี direct sequencing ตรวจภาวะ 2-bp insertion ที่แอกซอน 29 จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำเพาะของยีน C4A และ C4B ขนาด 2.8 Kb ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ Adown/exon 32 หรือ Bdown/exon 32 (ตารางที่ 1) พบว่า ภาวะ 2-bp insertion ที่แอกซอน 29 บนยีน C4B ของผู้ป่วยที่มีภาวะ C4AQ0 ที่ตรวจยืนยันภาวะมิวเตชันนี้ด้วยวิธี multiplex PCR และ SSP-PCR ไปแล้ว ส่วนตัวอย่างอื่น ๆ ในทั้งสองกลุ่มตัวอย่างไม่มีภาวะมิวเตชันแบบนี้เลย (รูปที่ 10)

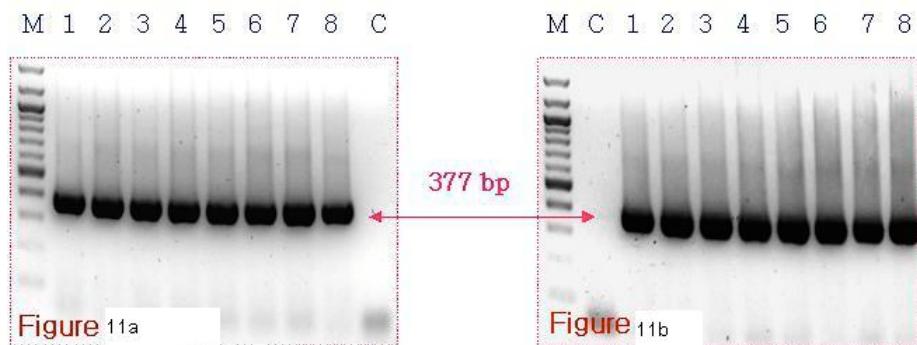


รูปที่ 10 ผล direct sequencing แสดง 2-bp insertion (TC) ที่ตำแหน่ง 161-162 ซึ่งส่งผลให้เกิดรหัสหยุดในแอกซอน 30

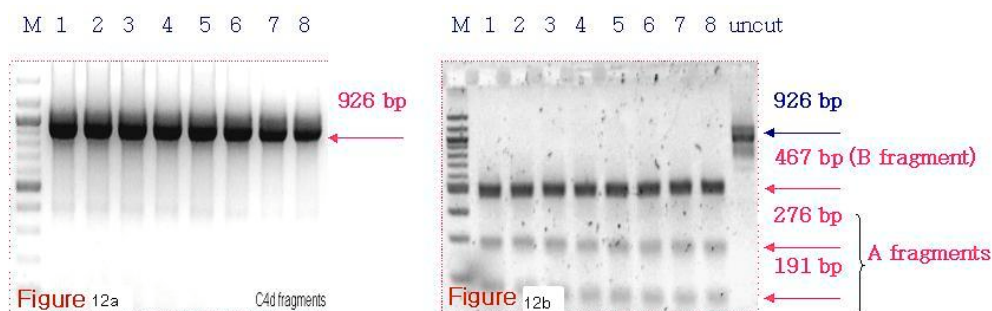
ส่วนที่ II. การสร้างยีนคอมพลีเมนต์ C4A ให้มีภาวะ 2-bp insertion ในแอกซอน 29 ด้วยวิธี Site directed- mutagenesis

1. การตรวจคุณสมบัติของ Bacterial Artificial Chromosome (BAC) clone

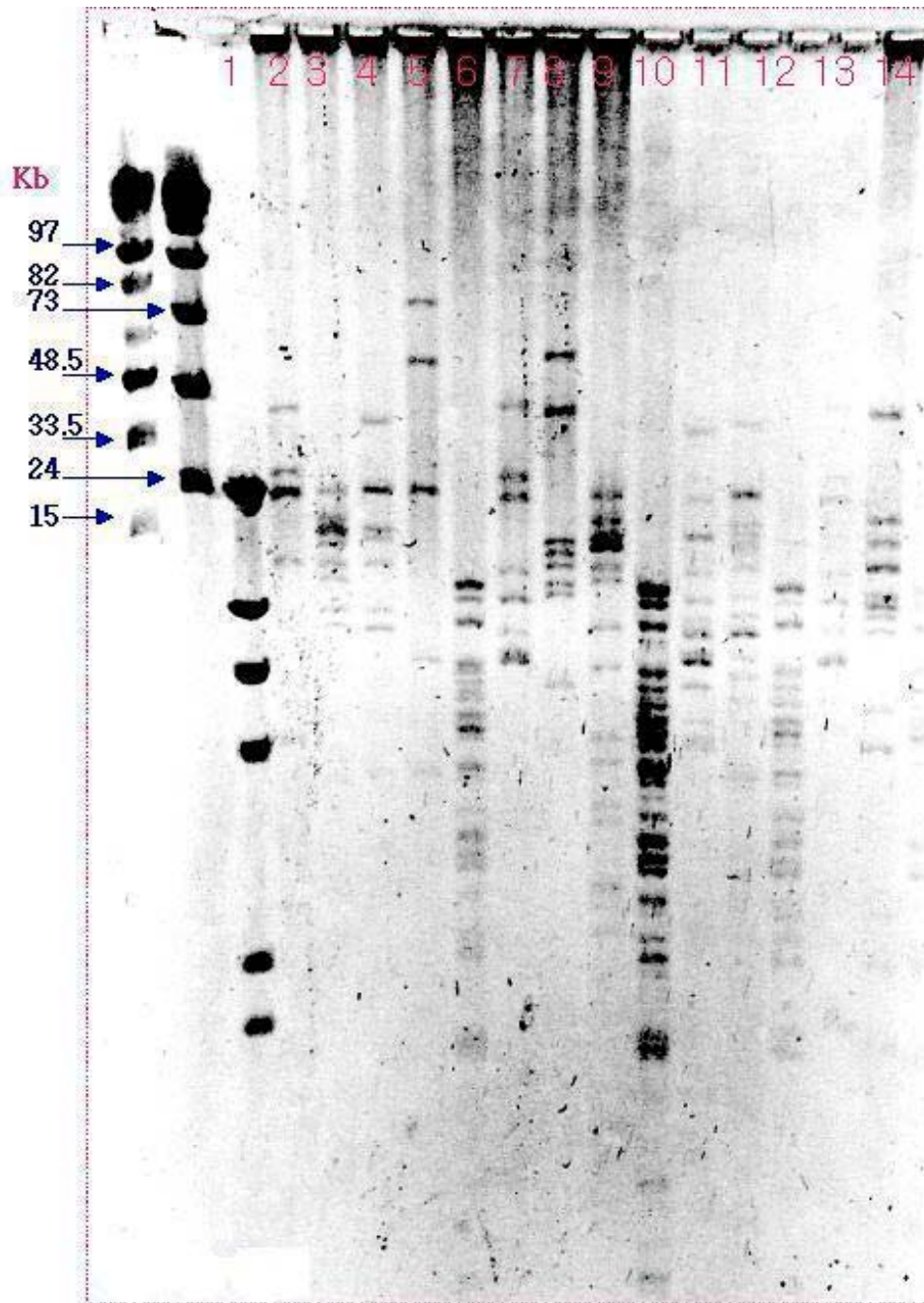
BAC-hC4 clone จำนวน 8 โคลนี หลังจากที่ได้ตรวจด้วยเทคนิค PCR และการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B ดังกล่าว สรุปได้ว่า BAC-hC4 clone นี้มีความเฉพาะตัวและไม่มีการปนเปื้อนด้วยดีเอ็นเออื่น ๆ และมียีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B (รูปที่ 11 และ 12) และจากการประมาณขนาดของ BAC-hC4 clone ด้วย PFGE สามารถประมาณขนาดของโคลนได้ว่ามีขนาดประมาณ 180 Kb ซึ่ง BAC clone (รูปที่ 13) นี้ พร้อมที่จะนำไปสร้าง Transgenic mouse ต่อไป



รูปที่ 11 แสดงรูปชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะยีนคอมพลีเมนต์ C4A (11a) และ C4B (11b) หลังการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ Aup/L3 และ Bup/L3 ตามลำดับใน original BAC-hC4



รูปที่ 12 แสดงรูปชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนคอมพลีเมนต์ C4 (12a) และหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *NlaIV* (12b) ซึ่งได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนคอมพลีเมนต์ C4A ขนาด 191 bp และ 276 bp ในขณะที่ยีน C4B ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 467 bp



รูปที่ 13 แสดงรูปชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ BAC-hC4 clone ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ แถวที่ 1-10 ใช้เอนไซม์ *AccI*, *BglI*, *HindIII*, *KpnI*, *NotI*, *SmaI*, *Sall*, *PacI*, *XhoI* และ *XbaI* ตามลำดับ แถวที่ 11-14 ย่อยด้วยเอนไซม์สองชนิดในตัวอย่างเดียวกัน (double digestion) ด้วยเอนไซม์ *PacI/Sall*, *PacI/XbaI*, *PacI/XhoI* และ *PacI/HindIII* ตามลำดับ

2. การทำให้เกิดมิวเตชันแบบ 2-bp insertion ที่แอกซอน 29 ด้วยวิธี site- directed mutagenesis

หลังจากกระบวนการทำให้เกิดมิวเตชันแล้ว ได้นำโคลน Mut-ALT ดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ Amp และ Cm อย่างละ 5 จานเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาความสำเร็จในการทำให้เกิดภาวะมิวเตชัน ปรากฏว่า ความสำเร็จในการทำให้เกิดมิวเตชันด้วยวิธีนี้ คือร้อยละ 40 และได้นำโคลนที่สามารถขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา Amp นั้นไปทำ direct sequencing เพื่อยืนยันการมี 2-bp insertion ที่แอกซอน 29 ด้วย ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีภาวะมิวเตชันนี้ จะถูกนำมาสร้างเพิ่มเติม คือ การสอดใส่ยีนของการต้านทานยา Neo เข้าไปที่อินทรอน 30 (รูปที่ 6) ด้วย เนื่องจากการเกิดภาวะ 2-bp insertion ที่แอกซอน 29 นั้นทำให้มีรหัสหยุดที่ส่วนต้นของแอกซอน 30 และการโคลนยีน Neo^r นี้ จะมีประโยชน์ในการเลือกโคลนที่ผิดปกติ หลังจากการนำชิ้นส่วนนี้ไปทำ homologous recombination กับ BAC-hC4 ซึ่งได้จำนวนโคลนที่สามารถขึ้นได้กับยาทั้งสองชนิด จำนวน 1 clone เรียกว่า BAC-mutC4