



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์การแสดงออกระดับอาร์เอ็นเอของยีน *STK38* ในมะเร็งรังไข่
Expression analysis at RNA level of the *STK38* gene in ovarian cancer

ชื่อนิสิต นางสาวธมนวรรณ มีสกุล เลขประจำตัว 5832117223

ภาควิชา พฤษศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การวิเคราะห์การแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีน STK38 ในมะเร็งรังไข่

นางสาวธมนวรรณ มีสกุล

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

EXPRESSION ANALYSIS AT RNA LEVEL OF THE *STK38* GENE IN OVARIAN
CANCER

Miss Tamonwan Meesakul

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Bachelor of Science

Program Genetics, Department of Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2018

ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	การวิเคราะห์การแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีน STK38 ใน มะเข็งรังไข่
ชื่อนิสิต	นางสาวธมนวรรณ มีสกุล
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกำธร
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการ
วิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์

.....*รัชนิกร ธรรมโชติ*..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ)

.....*นครินทร์ กิตกำธร*..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกำธร)

.....*ปฐมวดี ญาณทัสน์ยี่จิต*..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัสน์ยี่จิต)

ลิขสิทธิ์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	การวิเคราะห์การแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีน <i>STK38</i> ในมะเร็งรังไข่
ชื่อนิสิต	นางสาวธมนวรรณ มีสกุล
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกำธร
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

มะเร็งรังไข่เป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับที่ 4 ในสตรีไทย แต่รักษาได้ยากเนื่องจากผู้ป่วยในระยะแรกมักไม่แสดงอาการ สาเหตุของโรค เช่น การกลายพันธุ์ และสภาวะเหนือพันธุกรรม ดังนั้น การศึกษาพันธุกรรมในระดับโมเลกุลอาจมีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคได้ การศึกษาก่อนหน้าโดยการวิเคราะห์ผลจากการทดลองด้วยวิธีเมทิลเลชันไมโครอาร์เรย์ใน GEO dataset ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่มีการเกิดไฮโปเมทิลเลชันของยีน *serine/threonine kinase 38 (STK38)* ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน วัฏจักรของเซลล์ และอะพอพโทซิส รวมถึงมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีนนี้กับเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ด้วยวิธี duplex RT-PCR พบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ที่มีภาวะไฮโปเมทิลเลชันมีการแสดงออกของยีน *STK38* เพิ่มขึ้น ดังนั้นโครงการนี้จึงได้ทำการศึกษาต่อยอดจากการศึกษาการแสดงออกของยีน *STK38* ในระดับอาร์เอ็นเอ โดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คือ ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ 29 ตัวอย่าง และตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ 22 ตัวอย่าง และใช้เทคนิค quantitative real-time PCR (RT-qPCR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำมากกว่า ซึ่งจากผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่มีการแสดงออกของยีน *STK38* มากกว่าในเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ 4.82 เท่า โดยค่า *p-value* เท่ากับ 0.0509 สรุปได้ว่า การแสดงออกของยีน *STK38* ในระดับอาร์เอ็นเอไม่มีความสัมพันธ์กับมะเร็งรังไข่ แต่ควรทำการทดลองเพิ่มเติมโดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่าง เพื่อศึกษาแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างยีน *STK38* และมะเร็งรังไข่ที่มีความชัดเจนแม่นยำมากขึ้น

คำสำคัญ : มะเร็งรังไข่, อาร์เอ็นเอ, การแสดงออกของยีน, ยีน *STK38* , real-time PCR

Title	Expression analysis at RNA level of the <i>STK38</i> gene in ovarian cancer
Student name	Miss Tamonwan Meesakul
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Assist. Prof. Dr.Rachaneekorn Tammachote
Co-advisor	Assoc. Prof. Dr.Nakarin Kitkumthorn
Academic year	2018

Abstract

Ovarian cancer is the fourth most common cancer in Thai women, but it is difficult to treat as patients do not show any symptoms in the early stages. It can be caused by mutations or epigenetics. Therefore, molecular genetic analysis may be useful in the disease diagnosis. A previous study using data from methylation microarray method from GEO dataset in NCBI database indicated that ovarian cancer tissue has hypomethylation of the *serine/threonine kinase 38 (STK38)* gene. The *STK38* gene functions in protein phosphorylation, cell cycle, and apoptosis. Another study by duplex RT-PCR for expression analysis at the RNA level reported that hypomethylation of the *STK38* gene correlated with the increased expression of the gene in ovarian cancer tissue. Therefore, this study continues from the previous study by increasing samples which are ovarian cancer tissue 29 samples and normal ovarian tissue 22 samples and using quantitative real-time PCR (RT-qPCR) technique which is more accurate. The results and statistical analysis indicated that the *STK38* gene was expressed in the ovarian cancer tissue at a higher level than in normal ovarian tissues at 4.82 fold (p -value = 0.0509). In conclusion, the expression at RNA level of the *STK38* gene is not correlated with ovarian cancer. However, additional experiments by increasing sample numbers are needed to precisely indicate the trend of correlation between the *STK38* gene and ovarian cancer.

Keywords: Ovarian cancer, RNA, Gene expression, *STK38* gene, real-time PCR

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ และรองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกัธกร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม ผู้ที่กรุณาให้คำปรึกษาความช่วยเหลือ ชี้แนะแนวทาง ปรับปรุงข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ ตลอดจนให้กำลังใจตลอดการทำโครงการในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต ที่ให้คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร หัวหน้าห้องปฏิบัติการศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะด้านอนุพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่สำหรับการทำโครงการ และขอขอบคุณนางสาวอารียา อารยะทวีกุล รวมถึงสมาชิกในห้องปฏิบัติการทุกคน ที่คอยให้คำแนะนำ คำปรึกษา อำนวยความสะดวก และให้กำลังใจตลอดการทำโครงการ

ขอขอบคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างในการทำการทดลองในครั้งนี้

ขอขอบคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นแหล่งให้ความรู้ และขอกราบขอบคุณอาจารย์ในภาควิชาทุกท่านที่คอยอบรมสั่งสอนและให้ความรู้ รวมถึงขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในภาควิชาที่คอยอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ ให้โดยเสมอมา

ขอขอบคุณเงินทุนสนับสนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณนายฟาติมา ตีบทา และนายอนรรฆ ชูชม ที่คอยให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดการทำโครงการในครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวณัฐนิชา มุกดาม่วง และนายชวิศ พลพงษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือระหว่างการทำโครงการในครั้งนี้ และขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุน

ขอขอบคุณศิลปินเกาหลีวง EXO, NCT, WANNA-ONE, ปาร์คโยชิน และศิลปินทุก ๆ คน ที่เป็นกำลังใจที่สำคัญ และแรงผลักดันในการทำงาน ตลอดจนการบรรเทาความเครียดที่ได้ระหว่างการทำโครงการ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่ได้ส่งเสริมให้ได้รับการศึกษา ให้ความสนับสนุนในทุกด้าน คอยรับฟังปัญหา และเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง	24
บทที่ 5 อภิปรายผล และสรุปผล	29
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	37

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็งรังไข่ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เยื่อบุผิว	5
รูปที่ 2 กลไกการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 ของวงไซโทซีน โดยเอนไซม์ DNMTs	8
รูปที่ 3 ตำแหน่งของ CpG island ซึ่งมักพบบริเวณโปรโมเตอร์ จึงส่งผลต่อการแสดงออกของยีน	8
รูปที่ 4 ชนิดของอาร์เอ็นเอในจีโนมมนุษย์	10
รูปที่ 5 ตัวอย่างกราฟที่ได้จากการใช้เทคนิค real-time PCR โดยใช้สารพันธุกรรมหลายความเข้มข้น	12
รูปที่ 6 กลไกการทำงานของสารเรืองแสง SYBR Green	13
รูปที่ 7 ผลการทำ gradient PCR ของยีน <i>STK38</i>	25
รูปที่ 8 ผลการทำ gradient PCR ของยีน <i>GAPDH</i>	25
รูปที่ 9 กราฟค่าเฉลี่ย threshold cycle ของยีน <i>STK38</i> และ <i>GAPDH</i> ในแต่ละตัวอย่าง	27
รูปที่ 10 กราฟแสดงผลการหาสัดส่วนค่าการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นจำนวนเท่า	28
รูปที่ 11 ผลการคำนวณหาค่าความไว และค่าความจำเพาะของการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน <i>STK38</i> โดยการสร้างเส้นโค้ง Receiver Operator Characteristic (ROC curve)	28

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอ	22
ตารางที่ 2 ผลการคำนวณการแสดงออกของยีน <i>STK38</i> ด้วยวิธี $\Delta\Delta$ CT method	26
ตารางที่ 3 รายชื่อตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ที่ใช้ในการทดลอง	38
ตารางที่ 4 รายชื่อตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติที่ใช้ในการทดลอง	39
ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่วัดด้วยเครื่อง NanoDrop™ Spectrophotometer	40
ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยของ threshold cycle ของยีน <i>STK38</i> และ <i>GAPDH</i> ในตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่	42
ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยของ threshold cycle ของยีน <i>STK38</i> และ <i>GAPDH</i> ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ	44

บทที่ 1

บทนำ

มะเร็งรังไข่ เป็นมะเร็งที่พบบ่อยมากเป็นอันดับที่ 4 ในสตรีไทย รองจากมะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก โดยในประเทศไทยพบผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ประมาณ 1,600 รายต่อปี ซึ่งเป็นอัตราการเสียชีวิตที่สูงที่สุด เมื่อเทียบกับอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งทางนรีเวชชนิดอื่น ๆ อีกทั้งยังสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากแม่สู่ลูกได้ (รักชาย นุหงาชาติ, 2550) โดยอาการของโรคมะเร็งรังไข่ในระยะแรกจะไม่แสดงอาการ แต่เมื่อรุนแรงขึ้นจะคลำพบก้อนเนื้อที่โตขึ้นบริเวณท้องน้อย และจะกดเบียดอวัยวะข้างเคียง ทำให้เกิดอาการไม่สบายท้อง ปัสสาวะบ่อย ท้องผูก ท้องโตเนื่องจากมีน้ำในช่องท้อง ประจำเดือนมาไม่ปกติ รวมถึงอาการทั่วไป เช่น มีไข้ เบื่ออาหาร น้ำหนักลด เป็นต้น โดยมะเร็งรังไข่ในระยะแรกจะสามารถวินิจฉัยหรือตรวจพบได้ยาก เนื่องจากไม่แสดงอาการ จึงมักตรวจพบในระยะที่ 3 หรือระยะที่ 4 ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มะเร็งลุกลามไปยังเยื่อบุช่องท้องและอวัยวะข้างเคียงแล้ว ทำให้ยากต่อการรักษา ปัจจุบันทำได้เพียงรักษาตามอาการเท่านั้น ได้แก่ การใช้รังสีรักษาและการใช้เคมีบำบัด (Silva et al., 1991) ซึ่งแม้ว่าผู้ป่วยจะได้รับการผ่าตัดชิ้นเนื้อมะเร็งออกไปแล้ว อาจเกิดภาวะแทรกซ้อน หรือมีโอกาสกลับมาเป็นใหม่ได้ ดังนั้นหากสามารถวินิจฉัยโรคมะเร็งรังไข่ได้ในระยะแรก ๆ จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการรักษา

ปัจจัยเสี่ยงอันก่อให้เกิดมะเร็งรังไข่ ได้แก่ สตรีที่มีอายุประมาณ 63 ปีขึ้นไป สตรีที่มีบุตรน้อยหรือมีบุตรยาก การได้รับสารระคายเคืองต่อเยื่อบุช่องท้อง การใช้สารทดแทนฮอร์โมนเอสโตรเจนในสตรีวัยหมดประจำเดือน การที่ตนเองหรือครอบครัวเคยมีประวัติเป็นมะเร็งรังไข่ มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ หรืออาจเกิดเป็นโรคแทรกซ้อนจากโรคอ้วน (Braun, 2015) รวมไปถึงเคยมีการศึกษาเกี่ยวกับยีนอันเป็นปัจจัยทางพันธุกรรมของการเกิดมะเร็งรังไข่ โดยการเกิดสภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetics) ของยีน *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (ERBB2)*, *MYC proto-oncogene* และ *KRAS* จะส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนเหล่านี้มากกว่าปกติ (Aunoble et al., 2000) จากการศึกษาทำให้เห็นได้ว่า การแสดงออกที่ผิดปกติของยีนก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งรังไข่เช่นกัน

เนื่องจากสภาวะเหนือพันธุกรรม เป็นกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยไม่ข้องเกี่ยวกับลำดับพันธุกรรมนั้นมีหลายประเภท และการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปนี้สามารถผันกลับได้ รวมถึงสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกได้ เช่น การดัดแปลงหมู่ฮิสโตน การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโครมาติน (โชติกา หยกทองวัฒนา, 2554) อีกทั้งมีการศึกษาพบว่า ดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็ง โดยเซลล์ที่เกิดไฮโปเมทิลเลชัน (hypomethylation) ในยีนกลุ่มโปรโตออนโคยีน (proto-oncogene) จะทำให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนม และส่งผลให้ยีนในกลุ่มนี้มีการแสดงออกที่มากขึ้นจนนำไปสู่การเกิดมะเร็งขึ้นได้ ส่วนการเกิดไฮเปอร์เมทิลเลชัน (hypermethylation) ในยีนกลุ่มยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแบ่งเซลล์ การซ่อมแซมดีเอ็นเอ การถอดรหัส การส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ และอะพอพโทซิส (apoptosis) จะส่งผลให้ยีนในกลุ่มต้านมะเร็งมีการแสดงออกที่ลดลง ทำให้เกิดมะเร็งได้เช่นกัน (Robertson, 2005) ซึ่งโครงการนี้จะมุ่งเน้นศึกษาระดับการแสดงออกที่เป็นผลจากการเกิดไฮโปเมทิลเลชันของยีน

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า การเกิดไฮโปเมทิลเลชันของยีน *serine/threonine kinase 38 (STK38)* ในเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคนี ซึ่งอ้างอิงข้อมูลจาก GEO dataset ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้ข้อมูลที่ทดลองด้วยวิธีเมทิลเลชัน ไมโครอาร์เรย์ (methylation microarray) (ฟาติมา ตีบทา, 2560ก) อีกทั้งยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *STK38* ในระดับอาร์เอ็นเอกับการเกิดโรคมะเร็งรังไข่ว่า เนื้อเยื่อรังไข่ปกติจะมีภาวะไฮเปอร์เมทิลเลชัน ส่งผลให้ไม่มีการแสดงออกของยีน ส่วนในเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่มีภาวะไฮโปเมทิลเลชัน ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีน *STK38* มากขึ้น ซึ่งใช้วิธีการ duplex RT-PCR ในการศึกษา (ฟาติมา ตีบทา, 2560ข) ดังนั้นโครงการนี้จะศึกษาเพิ่มเติมต่อยอดจากการศึกษาดังกล่าว โดยจะเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือ และทำการศึกษาการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีน *STK38* ซึ่งใช้วิธีการที่ต่างไปจากการศึกษาก่อนหน้า ได้แก่ เทคนิค quantitative real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ ความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน (Machado et al., 2015)

โครงการนี้เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีน *STK38* หรือชื่ออื่น คือ *nuclear dbf2-related (NDR หรือ NDR1)* ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 บริเวณ p21.31 เป็นยีนที่ผลิตโปรตีนที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม AGC serine/threonine kinase ซึ่งมีหน้าที่ในการเติมหมู่ฟอสเฟต และมีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ อะพอพโทซิส รวมไปถึงการควบคุมเสถียรภาพและกระบวนการถอดรหัสของ *MYC oncogene* ด้วย ดังนั้นยีน *STK38* จึงถูกตีความว่าเป็น proto-oncogene (Bisikirska *et al.*, 2013) และอาจนำไปสู่การพัฒนาเพื่อเป็นยีนเป้าหมายในการวินิจฉัยและรักษามะเร็งรังไข่ได้ ซึ่งงานวิจัยนี้จะศึกษาการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีน *STK38* ในเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ โดยเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อรังไข่ของคนปกติ เพื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไป รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไฮโปเมทิลเลชันและระดับการแสดงออกบนยีน *STK38* ซึ่งโครงการนี้จะประโยชน์ และอาจนำไปสู่การพัฒนาทางการแพทย์ได้ เช่น แนวทางการวินิจฉัยโรคได้อย่างจำเพาะเจาะจง การคาดคะเนความเสี่ยง รวมถึงขั้นตอนการรักษา เป็นต้น

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีน *STK38* ในเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่

บทที่ 2

การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

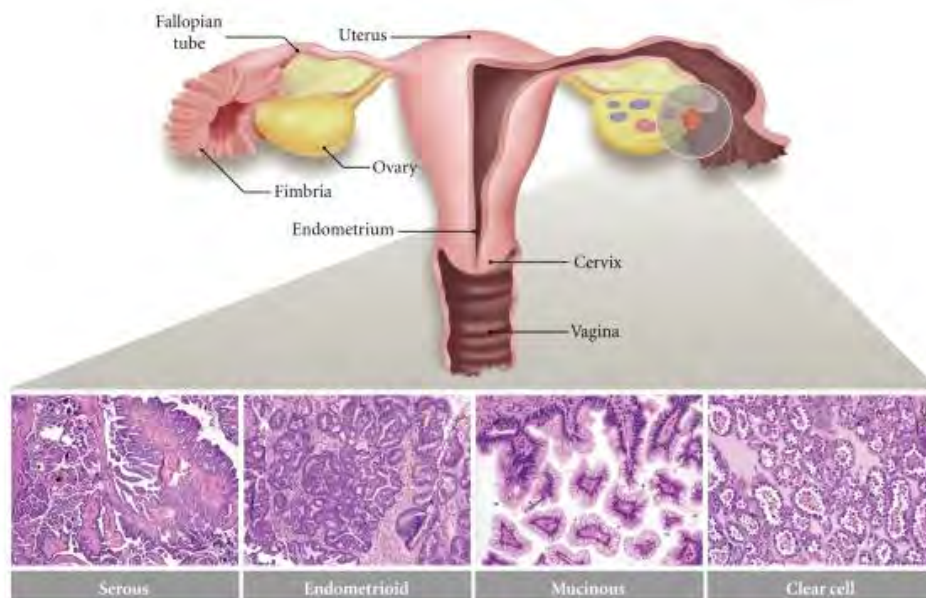
1. มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer)

มะเร็งรังไข่ เป็นโรคที่พบมากเป็นอันดับที่ 7 ของโลก โดยในปี 2012 พบผู้ป่วยมะเร็งรังไข่มากถึง 238,700 คน อีกทั้งมะเร็งรังไข่ยังเป็นสาเหตุการเสียชีวิตสูงถึงอันดับที่ 8 ของโลก ซึ่งมะเร็งรังไข่ได้คร่าชีวิตผู้คนไปมากถึง 151,900 คน อีกทั้งมะเร็งรังไข่ยังเป็นมะเร็งที่พยากรณ์โรคได้ยากที่สุดชนิดหนึ่งซึ่งมีอัตราการเสียชีวิตสูงที่สุดเมื่อเทียบจากมะเร็งทางนรีเวชวิทยาทั้งหมด และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของผู้หญิงในช่วงอายุ 35 ถึง 74 ปี มากเป็นอันดับที่ 5 ของโลก (Coburn et al., 2017; Torpy, Burke and Golub, 2011)

ในประเทศไทยพบผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ประมาณ 1,600 รายต่อปี ซึ่งเป็นอัตราการเสียชีวิตที่สูงที่สุด เมื่อเทียบจากอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งทางนรีเวชชนิดอื่น ๆ และผู้ป่วยมีอัตราการอยู่รอดในช่วง 5 ปีเพียง 26% เท่านั้น โดยพบว่าประมาณ 5-10% ของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ทั้งหมดมักได้รับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากแม่สู่ลูก (รักษาย นุหงาชาติ, 2550)

ชนิดของมะเร็งรังไข่

มะเร็งรังไข่แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท โดยใช้ชนิดของเซลล์ตั้งต้นเป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่ม ได้แก่ มะเร็งรังไข่ที่มีเซลล์ตั้งต้นมาจากเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell) มะเร็งรังไข่ที่มีเซลล์ตั้งต้นมาจากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (sex cord and stromal tumors) และมะเร็งรังไข่ที่มีเซลล์ตั้งต้นมาจากเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) ซึ่งเป็นประเภทที่พบมากถึง 80 – 85% ของมะเร็งรังไข่ทั้งหมด และมะเร็งรังไข่ที่มีเซลล์ตั้งต้นมาจากเซลล์เยื่อบุผิว ยังสามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภท โดยลักษณะทางพยาธิวิทยาเป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่ม (รูปที่ 1) นั่นคือ serous carcinomas พบมากที่สุดประมาณ 70% รองลงมาคือ endometrioid พบ 10% และ clear cell carcinomas พบประมาณ 5-10% ส่วนประเภทที่พบน้อยที่สุด ได้แก่ mucinous ซึ่งพบเพียง 3% เท่านั้น (Devouassoux-Shisheboran and Ganestie, 2015)



รูปที่ 1 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็งรังไข่ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เยื่อบุผิว

(Karst and Deraplin, 2010)

ปัจจัยเสี่ยงที่อาจเป็นสาเหตุในการก่อโรคมะเร็งรังไข่

มะเร็งรังไข่เกิดได้จากหลายปัจจัยร่วมกัน เช่น จากอายุที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากมะเร็งรังไข่มักพบในสตรีที่มีอายุมากกว่า 63 ปี และพบได้น้อยในสตรีที่อายุน้อยกว่า 40 ปี หรือสตรีที่หมดประจำเดือนช้า ตั้งครรภ์ไม่ครบตามระยะเวลา มีประวัติการแท้งลูก และสตรีที่มีบุตรช้าหรือมีบุตรยาก การมีน้ำหนักเกินเกณฑ์ หรือเป็นโรคอ้วนก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่อาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ อีกทั้งการใช้ยากระตุ้นฮอร์โมนเอสโตรเจนในวัยหมดประจำเดือน การได้รับสารที่ระคายเคืองต่อเยื่อบุผิว รวมไปถึงปัจจัยทางพันธุกรรม เช่น การมีประวัติครอบครัวเคยเป็นมะเร็งรังไข่ มะเร็งเต้านม หรือมะเร็งลำไส้ใหญ่ (American Cancer Society, 2018 : online) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนอันเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดมะเร็งรังไข่ ได้แก่ ยีน *breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1)* และ *breast cancer susceptibility gene 2 (BRCA2)* ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่เป็นยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแบ่งเซลล์ วัฏจักรของเซลล์ และการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ดังนั้นเมื่อยีนดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์จึงอาจส่งผลให้เกิดมะเร็งรังไข่ได้ โดยจากการศึกษาพบว่า 90% ของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ที่มีประวัติครอบครัวเคยเป็นมะเร็งรังไข่มาก่อน จะได้รับการสืบทอดการกลายพันธุ์ของยีน *BRCA1* หรือ *BRCA2* (Daniilidis and Karagiannis, 2007; Ramus and Gayther, 2009) นอกจากนี้ยังมียีนที่มีการถ่ายทอดและเพิ่มโอกาสเสี่ยงในการเป็นมะเร็งรังไข่อื่น ๆ อีก หากเกิดการกลายพันธุ์ซึ่งมักยีนต้านมะเร็ง เช่น ยีน *PTEN*, *CDKN2A*, *MLH1*, *CDH1*, *RASSF1A* และ *TP53* เป็นต้น รวมไปถึงการเกิดสภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetics) ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดมะเร็งรังไข่ได้

เนื่องจากส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนมากขึ้น หรือน้อยลงกว่าปกติ โดยการเกิดสภาวะเหนือพันธุกรรมที่พบมากในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ ได้แก่ ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) โดยการเติมหมู่เมทิลบนสายนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านมะเร็ง ร่วมกับการดัดแปลงหมู่ฮิสโตน จะส่งผลให้ยีนนั้น ๆ มีระดับการแสดงออกที่ลดลง จึงเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งรังไข่ได้ (Natanzon, Goode and Cunningham, 2018)

อาการของมะเร็งรังไข่

ประมาณ 60% ของผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ พบว่าเป็นโรคมะเร็งรังไข่ระยะลุกลามและไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ คือมีการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังกระแสเลือดหรืออวัยวะข้างเคียงแล้ว เนื่องจากในระยะเริ่มแรกมะเร็งรังไข่จะไม่มีการแสดงอาการที่ชัดเจนนัก จึงทำให้ตรวจพบและวินิจฉัยได้ยาก ส่วนในมะเร็งรังไข่ในระยะที่รุนแรงขึ้น ผู้ป่วยส่วนมากมักจะมีการแสดงอาการ ดังนี้ อ่อนแรง ปวดหลัง ท้องป่อง ปวดบริเวณช่องท้องที่อาจเกิดร่วมกับการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องอืด ท้องผูก เบื่ออาหารหรืออยากอาหารมากกว่าปกติ อาการไข้ รวมไปถึงอาจมีกลุ่มอาการทางเดินปัสสาวะร่วมด้วย เช่น กระเพาะปัสสาวะอักเสบ ภาวะกระเพาะปัสสาวะบีบตัวไวกว่าปกติ เป็นต้น นอกจากนี้อาจมีอาการแสดงทางผิวหนังของกลุ่มอาการพาราเนอพลาสติก (paraneoplastic syndromes) ซึ่งเป็นผลจากเซลล์มะเร็งมีการสร้างสารที่ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของร่างกาย อีกทั้งผู้ป่วยที่มะเร็งลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงและกระแสเลือดแล้ว อาจจะมีภาวะลำไส้อุดตัน ทางเดินปัสสาวะอุดตัน หรือหายใจลำบากได้ (Doubeni, Doubeni and Myers, 2016a)

การวินิจฉัยมะเร็งรังไข่

มะเร็งรังไข่ในระยะแรกจะไม่มีอาการแสดง ทำให้วินิจฉัยได้ยาก จึงมักตรวจพบมะเร็งรังไข่เมื่ออยู่ในระยะที่รุนแรงแล้ว อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยมะเร็งรังไข่ในปัจจุบันทำได้หลายวิธี เช่น การอัลตราซาวด์เพื่อตรวจหาก้อนมะเร็งบริเวณช่องท้อง ที่มักใช้กับผู้ป่วยที่มีอาการท้องบวมหรือมีก้อนเนื้อแล้ว และอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการวินิจฉัย ได้แก่ การตรวจในห้องปฏิบัติการ คือการเจาะเลือดผู้ป่วยเพื่อหาโปรตีน carbohydrate-antigen 125 (CA-125) และ human epididymis protein 4 (HE4) ซึ่งเป็นเครื่องหมายบ่งชี้มะเร็ง (tumor markers) โดยในผู้ป่วยมะเร็งจะมีค่าของโปรตีน CA-125 มากกว่าหรือเท่ากับ 35 U/ml และค่าของโปรตีน HE4 มากกว่าหรือเท่ากับ 140 pmol/l (Doubeni, Doubeni and Myers, 2016b; Wei, Li and Zhang, 2016)

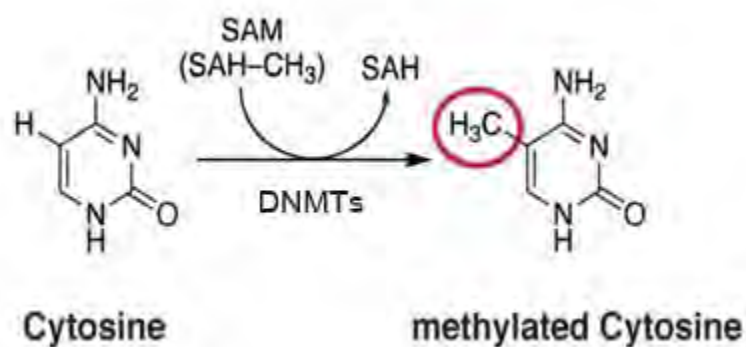
วิธีการรักษามะเร็งรังไข่

มะเร็งรังไข่ในปัจจุบันยังไม่มีการรักษาที่จำเพาะกับโรค และวิธีการรักษาจะต้องพิจารณาจากชนิดของมะเร็ง ความรุนแรงหรือระยะของมะเร็ง และสุขภาพของผู้รับการรักษา เพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงจากการรักษา โดยวิธีการรักษาที่มักใช้กับผู้ป่วยมะเร็งรังไข่คือ การผ่าตัดเอาชิ้นเนื้อมะเร็งออก และการใช้เคมีบำบัด หรืออาจใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันในการรักษา ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในการบำบัดเป็นยาที่มีสารประกอบแพลทินัม (platinum compound) หรือเทกเซน (taxane) เช่น แพคลิแท็คเซล (paclitaxel) โดซีแท็คเซล (docetaxel) และในผู้รับการรักษาบางคนอาจเกิดอาการเวียนหัว คลื่นไส้ อาเจียน เนื่องจากผลข้างเคียงของยาเคมี แต่หลังการรักษาครั้งแรกประมาณ 6 – 12 เดือน เซลล์มะเร็งจะสามารถแบ่งตัวขึ้นใหม่ได้อีก จึงจำเป็นต้องมีการติดตามอาการ และรักษาตามอาการควบคู่ไปด้วย (American Cancer Society, 2018 : online; Braun, 2015)

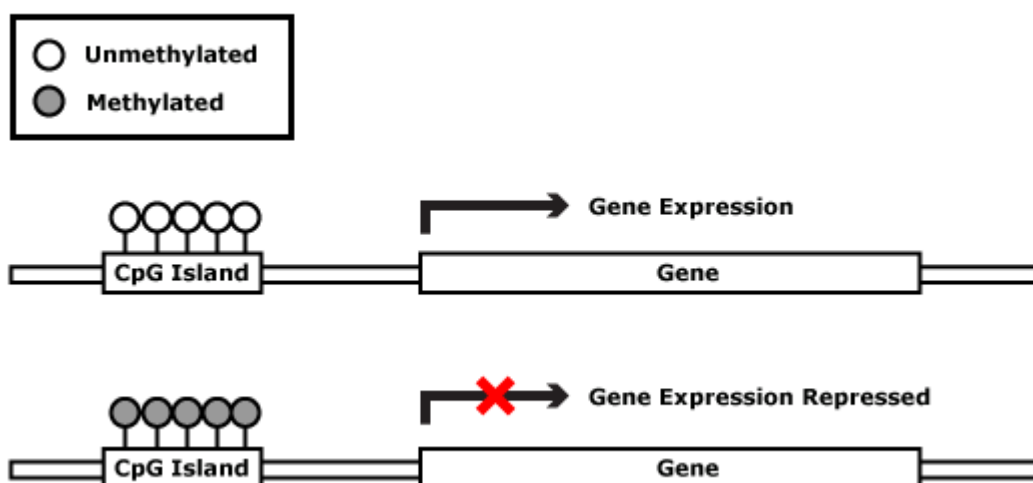
2. ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เป็นอีกกระบวนการหนึ่งของสภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetics) ซึ่งสภาวะเหนือพันธุกรรม คือ กระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยไม่เกี่ยวข้องกับลำดับเบสของพันธุกรรม โดยกลไกนี้สามารถถูกเปลี่ยนแปลงกลับไปมาได้ และสามารถส่งต่อลักษณะนั้นไปสู่รุ่นลูกได้ เช่น การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโครมาติน (chromatin remodeling) การดัดแปลงหมู่ฮิสโตน (histone modification) และดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) เป็นต้น (จันทนา รักแผน, 2555)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน และเป็นกระบวนการที่เกิดตามปกติในจีโนม โดยการเติมหมู่เมทิล ($-CH_3$) บนดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase; DNMTs) โดยจะเติมหมู่เมทิลจาก S-adenosylmethionine (SAM) ไปยังตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 ในวงไซโทซีน (cytosine ring) (รูปที่ 2) และ 98% ของการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน จะมีการเติมหมู่เมทิล ณ ตำแหน่งเบส cytosine (C) ที่ต่อด้วยเบส guanine (G) บนลำดับสารพันธุกรรม เรียกตำแหน่งนี้ว่า CpG dinucleotides โดยถ้ามีตำแหน่งที่เป็น CpG เป็นจำนวนมาก จะเรียกบริเวณนั้นว่า CpG island (รูปที่ 3) ซึ่งมักจะพบบริเวณ โพรโมเตอร์ ซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกของยีนได้ และการเกิดเมทิลเลชันจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการขดม้วนของโครมาติน (chromatin modification) โดยโครมาตินจะ ขดตัวกันแน่นกับโปรตีนฮิสโตน (histone protein) ทำให้ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ (transcription factors) ไม่สามารถลงมาจับกับโพรโมเตอร์ได้ จะส่งผลให้ยีนที่เกิดเมทิลเลชันมีระดับการแสดงออกที่ลดลง หรือยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ (Jin, Li and Robertson, 2011; Métivier et al., 2008)



รูปที่ 2 กลไกการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 ของวงไซโทซีน โดยเอนไซม์ DNMTs ทำหน้าที่ในการดึงหมู่เมทิลจาก SAM แล้วไปเติมที่เบสไซโทซีน (Walter, 2015)

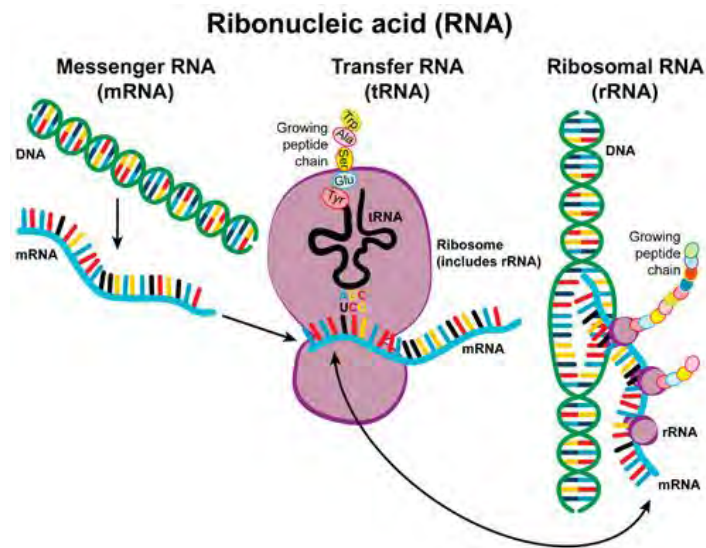


รูปที่ 3 ตำแหน่งของ CpG island ซึ่งมักพบบริเวณโปรโมเตอร์ จึงส่งผลต่อการแสดงออกของยีน (ที่มา: http://missinglink.ucsf.edu/lm/genes_and_genomes/methylation.html)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันมี 2 รูปแบบ ได้แก่ ไฮเปอร์เมทิลเลชัน (hypermethylation) และไฮโปเมทิลเลชัน (hypomethylation) โดยการเกิดไฮเปอร์เมทิลเลชันในโรคมะเร็ง เป็นการเกิดเมทิลเลชันมากกว่าปกติในจีโนมของมนุษย์ ซึ่งมักพบที่บริเวณ CpG island ที่โปรโมเตอร์ของยีนในกลุ่มยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) หรือบริเวณใกล้เคียง เช่น บริเวณเอ็กซอน (exon) ที่ 1 หรือ 2 เป็นต้น โดยปกติแล้วบริเวณนี้จะไม่มีการเกิดไฮเปอร์เมทิลเลชัน ส่งผลให้ยีนต้านมะเร็งเกิดความผิดปกติไปจากเดิม ทำให้มีการแสดงออกที่ลดลง และไม่สามารถผลิตโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการต้านมะเร็งได้ ส่วนไฮโปเมทิลเลชันที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง เป็นการเกิดเมทิลเลชันน้อยกว่าปกติในจีโนมของมนุษย์ ส่งผลให้มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนก่อมะเร็งหรือยีนกลุ่มโปรโตออนโคยีน (proto-oncogenes) และเปลี่ยนไปเป็นออนโคยีน (oncogenes) ซึ่งกลไกการเกิดเมทิลเลชันที่ผิดปกติไปนี้ ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติไป ส่งผลให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนม มีความผิดปกติของการควบคุมการแบ่งเซลล์ การซ่อมแซมดีเอ็นเอ กระบวนการถอดรหัส การส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ และการตายของเซลล์ชนิดอะพอพโทซิส (apoptosis) กล่าวคือเซลล์มีการแบ่งตัวตลอดเวลา และกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (Ehrlich, 2009; Herman, 1999; Robertson, 2005)

3. การแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ

อาร์เอ็นเอ เป็นข้อมูลทางพันธุกรรมที่เกิดจากกระบวนการถอดรหัสดีเอ็นเอแม่แบบ (transcription) เพื่อใช้เป็นแม่แบบในกระบวนการแปลรหัส (translation) เพื่อสังเคราะห์โปรตีนในการทำหน้าที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์ ซึ่งจะเกิดขึ้นในเวลาและปริมาณที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับหน้าที่และความจำเป็นของโปรตีนชนิดนั้น ๆ โดยในจีโนมของมนุษย์แบ่งอาร์เอ็นเอเป็น 3 ชนิดหลัก ๆ (รูปที่ 4) ได้แก่ transfer RNA (tRNA) เป็นอาร์เอ็นเอที่ทำหน้าที่ในการขนส่งกรดอะมิโนภายในเซลล์เพื่อมาต่อเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่ไรโบโซมระหว่างกระบวนการแปลรหัส ribosomal RNA (rRNA) เป็นอาร์เอ็นเอที่ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบของไรโบโซมอันเป็นบริเวณที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ และ messenger RNA (mRNA) เป็นอาร์เอ็นเอที่ได้จากการถอดรหัสสายดีเอ็นเอแม่แบบและเป็นสายแม่แบบในการสังเคราะห์โปรตีน โดยจะเรียงเป็นรหัสพันธุกรรม (codon) ซึ่งรหัสพันธุกรรมแต่ละรหัสจะกำหนดกรดอะมิโนหนึ่งชนิด (Lodish et al., 2000)



รูปที่ 4 ชนิดของอาร์เอ็นเอในจีโนมมนุษย์ (mRNA, tRNA และ rRNA ตามลำดับ โดยเรียงจากซ้ายไปขวา) (ที่มา: <http://www.alyvea.com/biologystudyguides/transcriptiontranslation.php>)

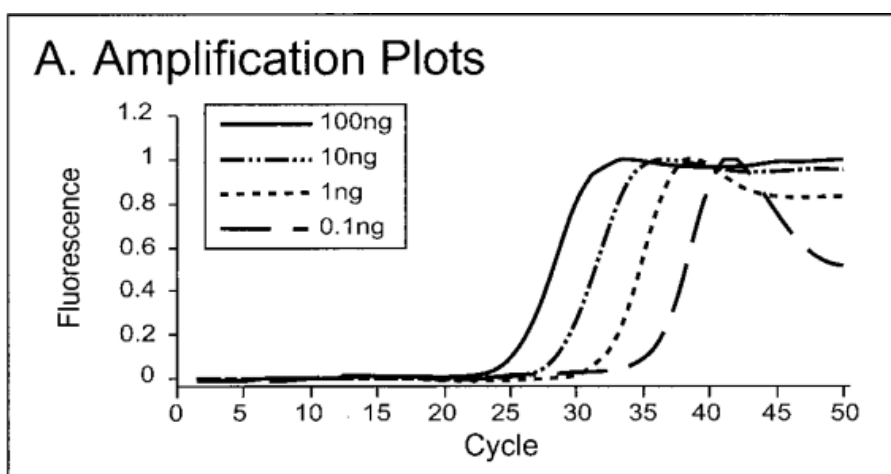
ดังนั้นหากมีการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน และเกิดการขัดตัวกันระหว่างโครมาตินและโปรตีนฮิสโตน จะทำให้ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ลงมาจับที่โพรโมเตอร์ไม่ได้ จึงไม่เกิดกระบวนการถอดรหัส และไม่มีการผลิตอาร์เอ็นเอซึ่งเป็นสายแม่แบบในการสังเคราะห์โปรตีนในกระบวนการแปลรหัส ส่งผลให้ยีนมีการแสดงออกที่ลดลงหรือมีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีน แต่หากเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันน้อยกว่าปกติ จะทำให้โครมาตินคลายตัว และพันกับโปรตีนฮิสโตนอย่างหลวม ๆ ซึ่งส่งผลให้ทรานสคริปชันแฟกเตอร์จับกับโพรโมเตอร์ได้ดีขึ้น ทำให้เกิดกระบวนการถอดรหัส และสังเคราะห์อาร์เอ็นเอได้มากขึ้น จึงทำให้มีการแสดงออกของยีนมากกว่าปกติ ดังนั้นถ้ายีนนั้นเป็นยีนในกลุ่มโปรโตออนโคยีนจะส่งผลให้เกิดเซลล์มะเร็งได้ (Tongelen, Lorient and Smet, 2017)

4. กระบวนการถอดรหัสย้อนกลับ (reverse transcription)

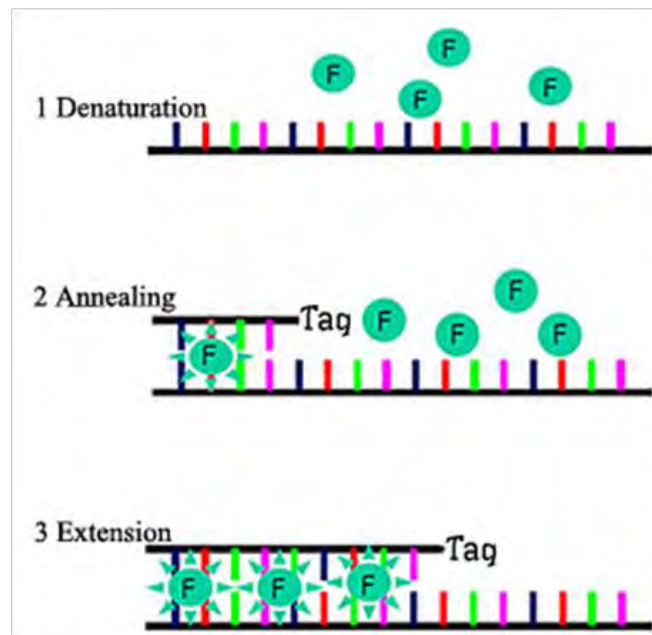
กระบวนการถอดรหัสย้อนกลับ พบครั้งแรกจากเอนไซม์ในไวรัสที่สามารถเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นดีเอ็นเอได้ เรียกเอนไซม์นี้ว่า รีเวิร์สทรานสคริปเทส (reverse transcriptase) ซึ่งทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' โดยดีเอ็นเอสายคู่ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการย้อนการถอดรหัสจะถูกเรียกว่า ดีเอ็นเอสายคู่สม (complementary DNA; cDNA) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย้อนการถอดรหัสนี้จะมีเฉพาะดีเอ็นเอส่วนที่เป็น exon เท่านั้น เนื่องจากสายอาร์เอ็นเอแม่แบบเป็น mRNA ซึ่งผ่านกระบวนการตัดแต่งหลังการถอดรหัส (post-transcriptional modification) และยังมีประโยชน์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกระบวนการ polymerase chain reaction (PCR) โดยไพรเมอร์ที่ใช้เป็นรหัสเริ่มต้นมี 3 ชนิด ได้แก่ gene specific primers (GSP) ที่มีความจำเพาะกับยีนที่ต้องการศึกษาและมักมีอุณหภูมิหลอมเหลวสูง (T_m) ทำให้การเข้าคู่กันของเบสมีความจำเพาะสูง ส่วน random hexamer สามารถเข้าคู่ได้กับทุกยีนบนสายแม่แบบ แต่อาจได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการมาด้วย และ oligo(dT) สามารถเข้าคู่กับทุกยีนบนสาย mRNA เนื่องจากไพรเมอร์นี้จะเข้าคู่กับเบส adenine (A) ที่ต่อกันเป็นสายยาว ซึ่งมีอยู่บน poly A tail ของ mRNA หลังผ่านกระบวนการตัดแต่งอาร์เอ็นเอหลังการถอดรหัส โดยกระบวนการนี้มีเฉพาะในสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอตเท่านั้น (ThermoFisher Scientific, 2018 : online)

5. real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

real-time PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือ PCR แบบดั้งเดิม (polymerase chain reaction หรือ conventional PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กับงานในระดับโมเลกุล โดยเทคนิค real-time PCR จะรวมขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ และขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ไว้ในเทคนิคเดียว นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูงกว่า PCR แบบดั้งเดิม เนื่องจาก real-time PCR สามารถติดตามปริมาณผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ ณ เวลานั้น ๆ ได้โดยไม่ต้องนำไปทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (รูปที่ 5) ในขณะที่ PCR แบบดั้งเดิมนั้น สามารถตรวจสอบได้เฉพาะปริมาณและขนาดของผลิตภัณฑ์เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจากการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเท่านั้น ทำให้ลดเวลา จำนวนอุปกรณ์ และสารเคมีในการปฏิบัติการน้อยลง โดยหลักการของเทคนิค real-time PCR คือการผสมสารพันธุกรรมตั้งต้นกับสารเรืองแสง โดยในโครงการนี้เลือกใช้ SYBR Green I Dye ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่จับกับดีเอ็นเอสายคู่เท่านั้น จึงเริ่มเรืองแสงในขั้น annealing และการเรืองแสงจะลดลงอีกครั้งเมื่อถึงขั้น denaturation (รูปที่ 6) เนื่องจากสารเรืองแสงจะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ เมื่อทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมต่อไป สารเรืองแสงจะเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณผลิตภัณฑ์ และจำนวนรอบที่ทำปฏิกิริยา จนกระทั่งมีการสะสมสารเรืองแสงของผลิตภัณฑ์มากกว่าค่าเรืองแสงเริ่มต้น (threshold) เรียกจุดนี้ว่า threshold cycle (C_t) หรือ crossing point โดยค่า C_t นี้สามารถนำไปคำนวณหาผลิตภัณฑ์หรือค่าการแสดงออกของยีนได้ (ศุภจิรา ศรีจางวาง, 2558; Bernard and Wittwer, 2002)



รูปที่ 5 ตัวอย่างกราฟที่ได้จากการใช้เทคนิค real-time PCR โดยใช้สารพันธุกรรมแม่แบบหลายความเข้มข้น ซึ่งสามารถนำไปคำนวณปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดลอง ณ เวลานั้น ๆ (Bernard and Wittwer, 2002)



รูปที่ 6 กลไกการทำงานของสารเรืองแสง SYBR Green สามารถจับกับพันธะไฮโดรเจนบนสารพันธุกรรมสายคู่ได้ ดังนั้นดีเอ็นเอสายคู่ถูกให้อุณหภูมิสูงและคลายพันธะออกจากสายคู่สมในขั้น denaturation นั้น สารเรืองแสง SYBR Green จึงไม่สามารถตรวจจับได้ แต่ในขั้น annealing และขั้น extension ที่มีการเข้าคู่กันของสายคู่สม สาร SYBR Green จะลงไปจับกับพันธะไฮโดรเจนและเรืองแสงออกมาได้ (ที่มา : <http://www.sinobiological.com/sybr-green-qpcr-method-cro-service.html>)

6. การคำนวณระดับการแสดงออกด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ เป็นการคำนวณค่าการแสดงออกของยีนที่ได้จากจากการใช้เทคนิค real-time PCR เพื่อหาสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกเป็นจำนวนเท่าระหว่างกลุ่มตัวอย่างของกรณีศึกษาและกลุ่มควบคุม โดยเริ่มจากการคำนวณ $\Delta\Delta Ct$ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษา ระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม โดยจะต้องตัดค่าจากการแสดงออกของยีน housekeeping ที่มีการแสดงออกเป็นพื้นฐานของแต่ละเซลล์ก่อน เช่น ยีน *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* หรือยีน *actin beta (ACTB)* เป็นต้น โดยยีน housekeeping จะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมภายในการบวกรวมการทดลอง เรียกว่า endogenous control หรือ internal control จากนั้นจึงจะนำค่าที่ได้ไปหาการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกเป็นจำนวนเท่า (Livak and Schmittgen, 2001) ดังสูตรต่อไปนี้

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{study} - Ct_{control})_{cancer} - (Ct_{study} - Ct_{control})_{normal}$$

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

โดย Ct_{study} ของ cancer คือ threshold cycle ของยีนที่ต้องการศึกษาจากตัวอย่างของมะเร็ง
 $Ct_{control}$ ของ cancer คือ threshold cycle ของยีน housekeeping จากตัวอย่างของมะเร็ง
 Ct_{study} ของ normal คือ threshold cycle เฉลี่ยของยีนที่ต้องการศึกษาจากตัวอย่างของคนปกติ
 $Ct_{control}$ ของ normal คือ threshold cycle เฉลี่ยของยีน housekeeping จากตัวอย่างของคนปกติ

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน

กลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่างจากผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ และตัวอย่างจากคนปกติหรือไม่ได้เป็นโรคมะเร็งรังไข่ โดยจำนวนตัวอย่างที่ใช้คือ ซึ้นเนื้อรังไข่จากผู้ป่วยมะเร็ง 34 ตัวอย่าง และซึ้นเนื้อรังไข่จากคนปกติ 22 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดได้รับมาจากภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยตัวอย่างจะต้องอยู่ในรูปของซึ้นเนื้อสดเท่านั้น ภายใต้การอนุมัติของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เอกสารรับรองโครงการวิจัยเลขที่ IRB no.396/59

เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์

- ตู้ปลอดเชื้อ class II (Biosafety cabinet class II) (Gelman science, Singapore)
- ตู้ปลอดเชื้อ class I (S.K. Powerable, Thailand)
- ตู้เลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี 5% CO₂ (Shel lab, USA)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)
- เครื่อง NanoDrop™ Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- เครื่อง Thermo cycler (Eppendorf, Germany)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟ (Bio-RAD, USA)
- เครื่องถ่ายภาพเจล (Image scanner (STORM)) (GE Healthcare Bio-sciences AB, Sweden)
- เครื่อง QuantiStudio™ 6 Flex Real-Time PCR (Thermo Scientific, USA)
- ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Panasonic, Japan)
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ ต่ำ -20 องศาเซลเซียส (Revco, Japan)
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ ต่ำ -80 องศาเซลเซียส (Revco, Japan)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Biobase, China)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Boeco, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 15 มิลลิลิตร (Boeco, Germany)
- กล้องจุลทรรศน์ phase contrast ชนิด 2 ตา (Nikon, Japan)

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)
- เครื่องควบคุมการดูด-จ่ายสารอัตโนมัติ (Pipette boy) (Integra Biosciences, Switzerland)
- ไมโครปิเปตขนาด 10 ไมโครลิตร (Trasferpette, Germany)
- ไมโครปิเปตขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Axygen, USA)
- ไมโครปิเปตทึบขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Axygen, USA)
- หลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 15 มิลลิลิตร (Corning, USA)
- หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ ขนาด 2.0 และ 1.5 ไมโครลิตร
- microtubes ขนาด 0.6 ไมโครลิตร
- PCR microtubes ขนาด 0.2 ไมโครลิตร
- แท่นวางหลอดเซนตริฟิวซ์ และหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ (Autopack, USA)
- เข็มฉีดยา ขนาด 21G x 1" (0.8 x 25 มม.) (Nipro, Japan)
- Real-Time PCR 96-well plate (Thermo Scientific, USA)
- Optical adhesive film (Thermo Scientific, USA)
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตร (Corning, USA)
- กล่องลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งเซลล์ (Cryobox) (Nalgene labware, USA)
- Cryovial tube (Corning, USA)
- กระบอกตวงขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร (Vitalab, Germany)
- ปีกเกอร์ขนาด 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร (Pyrex, USA)
- ถุงมือสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ (Sri Trang Gloves, Thailand)
- ถาดเตรียมเจลพร้อมหัว (Bio-Rad, USA)
- ถังไนโตรเจนเหลว
- ผ้ามีดผ่าตัด
- ใบบิดผ่าตัด เบอร์ 10

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์
 - Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Gibco, USA)
 - Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA)
 - Phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, USA)
 - Trypsin EDTA (Gibco, USA)
2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ
 - TRIzol™ reagent (Invitrogen, California, USA)
 - Chloroform (Merck, Germany)
 - Isopropanol (Merck, Germany)
 - 75% ethanol (Merck, Germany)
 - Type I water (RNase Free Water (DEPC))
 - Phosphate buffered saline (PBS)
3. สารเคมีที่ใช้ในสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)
 - RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA)
4. สารเคมีที่ใช้ในการทำ gradient PCR
 - Oligonucleotide primers (Integrated DNA Technologies, Korea)
 - PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Scientific, USA)
 - น้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ autoclave
5. สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค real-time PCR
 - Oligonucleotide primers (Integrated DNA Technologies, Korea)
 - PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Scientific, USA)
 - น้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ autoclave

-

6. สารเคมีที่ใช้ในการทำอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (acrylamide gel electrophoresis)

- 40% acrylamide (Bio-Rad, USA)
- Tris (Affymetrix, USA)
- Boric acid (Affymetrix, USA)
- EDTA (Affymetrix, USA)
- OmniPur® TEMED (Merck, Germany)
- 10% Ammonium Persulfate (APS) (Merck, Germany)
- 25 bp DNA ladder (Promega., USA)
- 6X bromophenol blue loading dye (Fermentas International Inc., Canada)
- SYBR™ Green I nucleic acid gel stain (Lonza, USA)

วิธีการดำเนินการ

การรวบรวมตัวอย่าง

ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่มาจากภาคสัตวศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เอกสารรับรองโครงการวิจัยเลขที่ IRB no. 396/59 โดยแช่แข็งชิ้นเนื้อรังไข่ในสารรักษาสภาพชิ้นเนื้อ (tissue freezing medium) (Leica Biosystems, Germany) ในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส

การเพาะเลี้ยงเซลล์

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งรังไข่สายพันธุ์ OVISe เนื่องจากมีอัตราการเจริญค่อนข้างเร็ว ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์เซลล์แช่แข็งจากห้องปฏิบัติการ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางอนุพันธุศาสตร์ของมะเร็ง และโรคของมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์จากเซลล์แช่แข็ง (thaw cell) และเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 ผสมกับ Fetal bovine serum (FBS) 10% จากนั้นนำหลอด cryovial tube ที่บรรจุเซลล์แช่แข็งมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิต่ำที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดเซลล์ภายในหลอด cryovial tube ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วบีบเปิดอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตร และเติมขวดเลี้ยงเซลล์ไป-มา เพื่อให้อาหารและเซลล์กระจายทั่วขวดเลี้ยงเซลล์ ต่อมาจึงนำขวดเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (v/v) ความชื้น 95% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะที่ผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ แล้วจึงนำมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์โดยบีบเปิดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมด แล้วเติมสาร Phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อดังอาหารเลี้ยงเซลล์ที่หลงเหลืออยู่ออกจากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ ซึ่งเมื่อผ่านไป 2 – 3 วัน หลังการเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์แล้วพบว่า เซลล์ที่เลี้ยงมีการกระจายตัวเต็มขวดเลี้ยงเซลล์มากกว่า 80% ของพื้นที่ในขวดเลี้ยงเซลล์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast ชนิด 2 ตา หรือพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่มี phenol red เป็นตัวชี้วัด (indicator) เปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง เนื่องจากเซลล์โตเต็มขวดเลี้ยงเซลล์ ทำให้เซลล์มีการผลิตของเสียที่มีสภาพเป็นกรดเพิ่มขึ้น รวมถึงเซลล์ไม่มีพื้นที่ในการเจริญได้อีก จึงควรทำการ subculture เพื่อให้เซลล์มีอาหารและพื้นที่ในการเจริญได้อีก โดยบีบเปิดอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และบีบเปิดสารละลายทิ้งไป จากนั้นเติมสาร trypsin EDTA ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 - 5 นาที เพื่อย่อยโปรตีนที่ยึดติดระหว่างเซลล์ ทำให้เซลล์หลุด

ออกจากกัน และหลุดจากพื้นขวดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการยับยั้งปฏิกิริยา ทริปซินในเซชัน (trypsinization) ด้วยการปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้น-ลง ให้ทั่วพื้นขวดเลี้ยงเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่เกาะกลุ่มกัน และกระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว แล้วจึงปิเปตอาหารที่มีเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ใหม่ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์เก่า 4.5 มิลลิลิตร และขวดเลี้ยงเซลล์ใหม่ 4 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ โดยจะทำการขึ้นตอน subculture ซ้ำไปเรื่อย ๆ จนกว่าจะได้ปริมาณเซลล์ที่เพียงพอ จึงจะทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ และนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ

การสกัดอาร์เอ็นเอ

ตัดแบ่งชิ้นเนื้อรังไข่ที่แช่แข็งไว้ในสารรักษาสภาพชิ้นเนื้อ (tissue freezing medium) (Leica Biosystems, Germany) แล้วล้างสารรักษาสภาพชิ้นเนื้อด้วยสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยจะทำซ้ำทั้งหมด 2 ครั้ง จากนั้นเติมสาร TRizol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใส่สารคลอโรฟอร์มปริมาตร 200 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จึงได้สารละลายที่แบ่งออกเป็น 3 ชั้น จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนสุดปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองใหม่ แล้วใส่สาร Isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ บ่มสารบนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายด้านบนทิ้งไป แล้วจึงล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% เอทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยจะล้างตะกอนซ้ำ 2 รอบ จากนั้นทำตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม type I water (DEPC) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อคงสภาพอาร์เอ็นเอ และสามารถนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปได้

การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ด้วยกระบวนการถอดรหัสย้อนกลับ (ดัดแปลงจาก Thermo Scientific, USA)

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ อาร์เอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer โดยควรมีค่ามากกว่า 1.8 จากนั้นเจือจางความเข้มข้นอาร์เอ็นเอด้วย type I water (DEPC) ให้ได้ 500 นาโนกรัม ปริมาตร 11 ไมโครลิตร ต่อมาจึงเติม 0.5 μg Oligo(dT)₁₈ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่อง Thermo cycler โดยระหว่างที่ป้อนอาร์เอ็นเอ จะทำการเตรียมสาร Master Mix สำหรับการสังเคราะห์ cDNA ซึ่งจะต้องเตรียมในที่เย็น โดยใช้สารจาก RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) จากนั้นเติม Master Mix ที่เตรียมไว้ลงในหลอดอาร์เอ็นเอที่ผ่านการป้อนมาแล้ว หลอดละ 8 ไมโครลิตร จะได้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปป้อนในเครื่อง Thermo cycler ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์ cDNA ซึ่งสามารถเก็บได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนอื่นๆต่อไป

การทำ gradient PCR

gradient PCR ทำเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ในการจับกับสายแม่แบบในขั้นตอน annealing ในการทดลองครั้งนี้ โดยจะต้องออกแบบไพรเมอร์ของยีน *STK38* และยีน *GAPDH* ให้คร่อมระหว่าง exon และมี annealing temperature (T_m) ใกล้เคียงกัน จากนั้นเตรียม Master Mix สำหรับการทำให้ real-time PCR โดยใช้สัดส่วนของสารเคมีต่อหนึ่งหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร คือน้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ autoclave แล้ว ปริมาตร 3.9 ไมโครลิตร 2X PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 5.0 ไมโครลิตร 20 μM Forward primer 0.05 ไมโครลิตร 20 μM Reverse primer 0.05 ไมโครลิตร และ cDNA ของเซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งรังไข่สายพันธุ์ OVISe ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา จากนั้นนำไปป้อนในเครื่อง Thermo cycler โดยมีขั้นตอนของการทำ PCR ดังนี้ เริ่มจาก ขั้น pre-denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ต่อมาเป็นขั้น denature 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ขั้น annealing ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 58 ถึง 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ขั้น extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที โดยจะทำซ้ำตั้งแต่ขั้น denature จนถึง ขั้น extension เป็นจำนวน 50 รอบ แล้วจึงเป็นขั้น post-extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 1 ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอ

Primer	Primer sequence	T _m (°C)	Product
Forward Primer <i>STK38</i>	5' CCTAAAAGATGAGGAGAAACGACTCCGG 3'	60.1	135 bp
Reverse Primer <i>STK38</i>	5' CCAAATGCTCCTCTGCCTATTACTTTTAAGG 3'	59.0	
Forward Primer <i>GAPDH</i>	5' TGGAAGGACTCATGACCACAG 3'	59.0	163 bp
Reverse Primer <i>GAPDH</i>	5' TTCAGCTCAGGGATGACCTT 3'	56.5	

การตรวจสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Acrylamide Gel electrophoresis)

เตรียมเจลอะครีลาไมด์ความเข้มข้น 8% โดยใช้สัดส่วนดังนี้ 40% acrylamide ปริมาตร 2 มิลลิลิตร 10X TBE ปริมาตร 1 มิลลิลิตร น้ำกลั่น (dH₂O) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร Tetramethylethylenediamine (TEMED) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ 10% Ammonium Persulfate (APS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจลอะครีลาไมด์เจล 1 เจล จากนั้นรอให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 30 นาที ต่อมาจึงหยอดดีเอ็นเอ และ 25 bp ladder ลงในเจลโดยผสมกับสี 6X Bromophenol blue loading dye ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วเปิดเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที เมื่อครบเวลาจึงแกะเจลออกจากกระจกแล้วแช่ในสารละลาย SYBR Green เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงบันทึกภาพเจลด้วยเครื่อง Image scanner (STORM) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)

การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

เตรียม Master Mix ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ autoclave แล้ว ปริมาตร 3.9 ไมโครลิตร 2X PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 5.0 ไมโครลิตร 20 μ M Forward primer 0.05 ไมโครลิตร 20 μ M Reverse primer 0.05 ไมโครลิตร (ตารางที่ 1) แล้วแบ่งใส่หลอดใน Real-time PCR 96 well-plate จากนั้นใส่ cDNA จากตัวอย่างลงไปหลอดละ 1 ไมโครลิตร แล้วติด optical adhesive film จากนั้นจึงนำไปใส่ในเครื่อง QuantStudio™ 6 Flex Real-time PCR (Thermo Fisher Scientific, USA) และตั้งค่าโปรแกรมโดยกำหนดให้มีปริมาณสาร 10 ไมโครลิตร ต่อหลอด และกำหนดขั้นตอนการทำ PCR ดังนี้ ขั้น holding stage ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ขั้น PCR stage ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที และที่อุณหภูมิที่ได้หลังจากการตรวจสอบด้วย gradient PCR เป็นเวลา 1 นาที โดยจะทำขั้น PCR stage ซ้ำจำนวน 50 รอบ จึงจะเข้าสู่ขั้น melt curve stage ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด จะได้ข้อมูลออกมาเป็นค่า threshold cycle (Ct) และการทดลองนี้จะทำซ้ำทั้งหมด 2 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง เพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อนในการทดลอง

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

คำนวณระดับการแสดงออกของยีน *STK38* ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta C_t}$ โดยเทียบกับยีน *GAPDH* ซึ่งเป็น endogenous control แล้วนำค่าการแสดงออกของยีนในทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างมาเปรียบเทียบกันด้วยวิธี Independent t-test เพื่อหาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน *STK38* ในระดับอาร์เอ็นเอในมะเร็งรังไข่ โดยกำหนดค่า p -value < 0.05 ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Science for Windows (SPSS) ในการวิเคราะห์ข้อมูล และใช้โปรแกรมในการคำนวณจุดตัด (cut-off point) ค่าความไว (sensitivity) และค่าความจำเพาะ (specificity) ของการแสดงออกของยีน *STK38* ด้วยการสร้างเส้นโค้ง Receiver Operator Characteristic (ROC curve) และคำนวณพื้นที่ใต้เส้นโค้งเพื่อพิจารณาความสามารถในการวินิจฉัยด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การรวบรวมตัวอย่าง

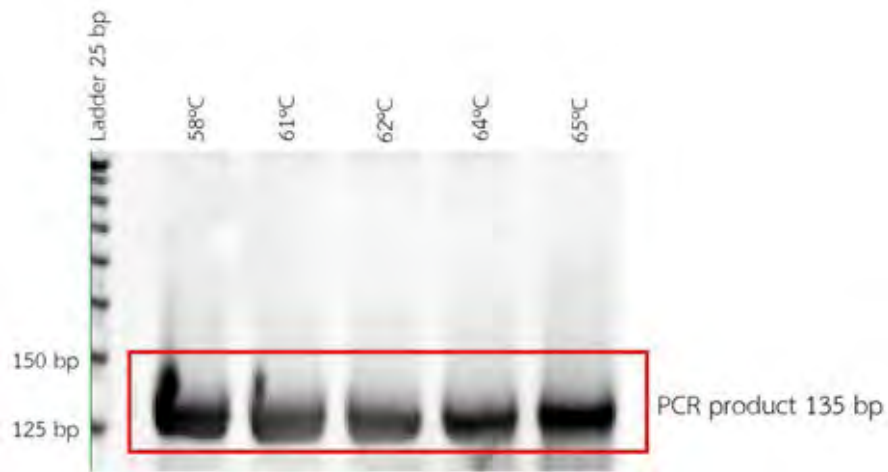
จากการรวบรวมตัวอย่างชิ้นเนื้อจากภาคสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้นำตัวอย่างชิ้นเนื้อรังไข่เก็บไว้ในสารแช่แข็งชิ้นเนื้อ (tissue freezing media) โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ชิ้นเนื้อรังไข่ปกติ 22 ตัวอย่าง และชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ 34 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นชนิด clear cell carcinomas 15 ตัวอย่าง endometrioid 6 ตัวอย่าง serous carcinomas 5 ตัวอย่าง mucinous 3 ตัวอย่าง และมะเร็งรังไข่ที่ไม่ได้มีเซลล์ตั้งต้นมาจากเซลล์เยื่อบุผิวหรือไม่ได้เป็นมะเร็ง 5 ตัวอย่าง ซึ่งไม่สามารถใช้เป็นกลุ่มตัวอย่างมะเร็งได้ จึงมีตัวอย่างมะเร็งรังไข่ 29 ตัวอย่าง จากนั้นจึงนำตัวอย่างทั้งหมดไปสกัดอาร์เอ็นเอ

ผลการสกัดอาร์เอ็นเอ

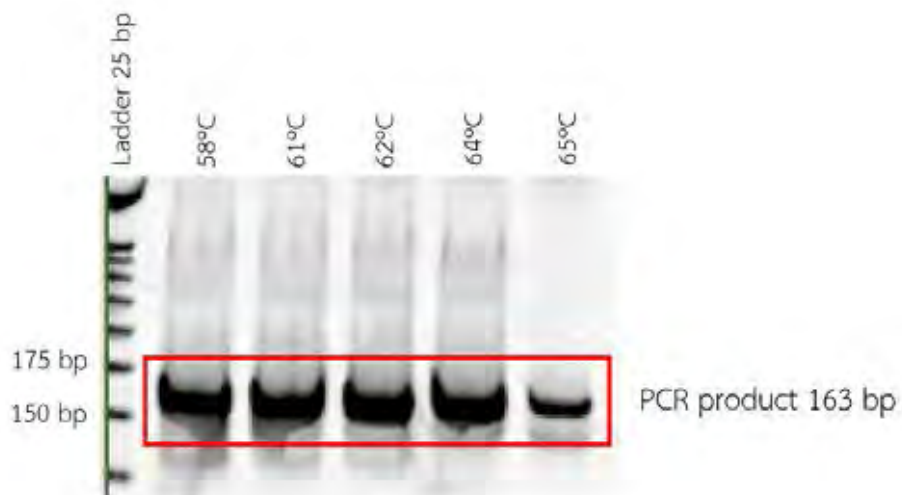
ตัวอย่างที่นำมาสกัดอาร์เอ็นเอมีทั้งหมด 51 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วยอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างมะเร็ง รังไข่ 29 ตัวอย่าง และอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างรังไข่ปกติ 22 ตัวอย่าง จากนั้นนำไปตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop™ Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) พบว่า อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อมีความ OD₂₆₀/OD₂₈₀ อยู่ในช่วง 1.8 ถึง 2.1 ซึ่งถือว่ามีความบริสุทธิ์สามารถนำไปสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ต่อไปได้

ผลการทำ gradient PCR และตรวจสอบด้วยอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตั้งค่าให้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing อยู่ในช่วง 58 ถึง 65 องศาเซลเซียส โดยใช้ cDNA ของเซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งรังไข่สายพันธุ์ OVISe เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวน cDNA เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์สำหรับยีน *STK38* และยีน *GAPDH* แล้วนำไปตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณ cDNA ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ด้วยอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ทั้งสองยีนมีผล PCR products ที่ถูกต้อง และชัดเจนที่สุด ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส (รูปที่ 7 และ 8)



รูปที่ 7 ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ของยีน *STK38* ด้วยกระบวนการ gradient PCR ที่ช่วงอุณหภูมิ 58 ถึง 65 องศาเซลเซียส ซึ่งได้ PCR product ขนาด 135 bp



รูปที่ 8 ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ของยีน *GAPDH* ด้วยกระบวนการ gradient PCR ที่ช่วงอุณหภูมิ 58 ถึง 65 องศาเซลเซียส ซึ่งได้ PCR product ขนาด 163 bp

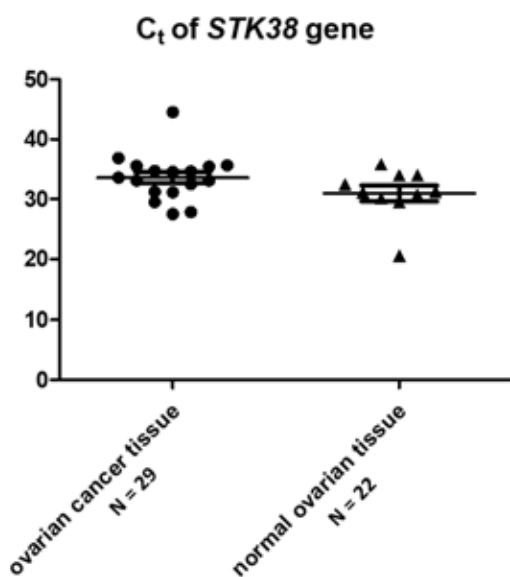
ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time polymerase chain reaction

เมื่อได้คุณสมบัติที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาแล้ว จึงนำ cDNA ของตัวอย่างชิ้นเนื้อรังไข่ที่ได้สังเคราะห์ไว้ในขั้นตอนก่อนหน้า มาเข้ากระบวนการ real-time PCR โดยใช้ positive control เป็น cDNA ของเซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งรังไข่สายพันธุ์ OVISE และ endogenous control เป็นยีน *GAPDH* หลังจากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้จากการทำ real-time PCR ในรูปแบบของค่า threshold cycle (C_t) มาคำนวณค่าการแสดงออกของยีน *STK38* และยีน *GAPDH* ด้วยวิธี $\Delta\Delta CT$ ซึ่งได้ผ่านการคำนวณและประเมินค่าผิดปกติ (outlier) อันเป็นข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากข้อมูลตัวอื่น ๆ ในตัวอย่าง จึงตัดค่าผิดปกติออกไปจากชุดข้อมูลจริง และได้ผลวิเคราะห์ตามตารางที่ 2 และรูปที่ 9

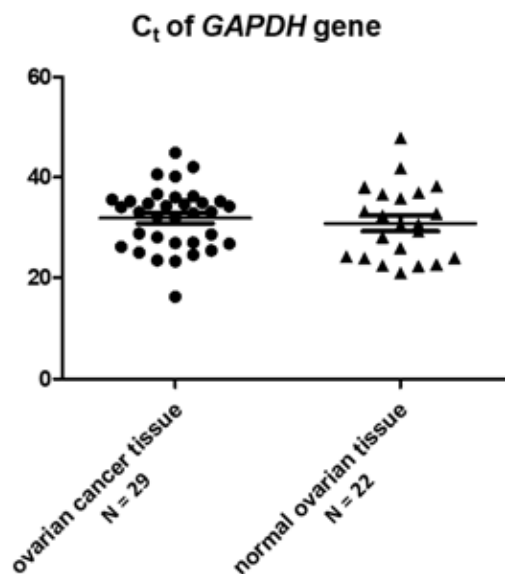
ตารางที่ 2 ผลการนำค่า threshold cycle (C_t) ของตัวอย่างชิ้นเนื้อรังไข่จากผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ และตัวอย่างชิ้นเนื้อรังไข่จากคนปกติ มาคำนวณหาการแสดงออกของยีน *STK38* ด้วยวิธี $\Delta\Delta CT$ method

Sample	Average of $2^{-\Delta\Delta CT}$	Relative of $2^{-\Delta\Delta CT}$
Ovarian cancer tissue (N = 29)	5.96 ± 6.67	4.82
Normal ovarian tissue (N = 22)	1.24 ± 0.87	

(ก)

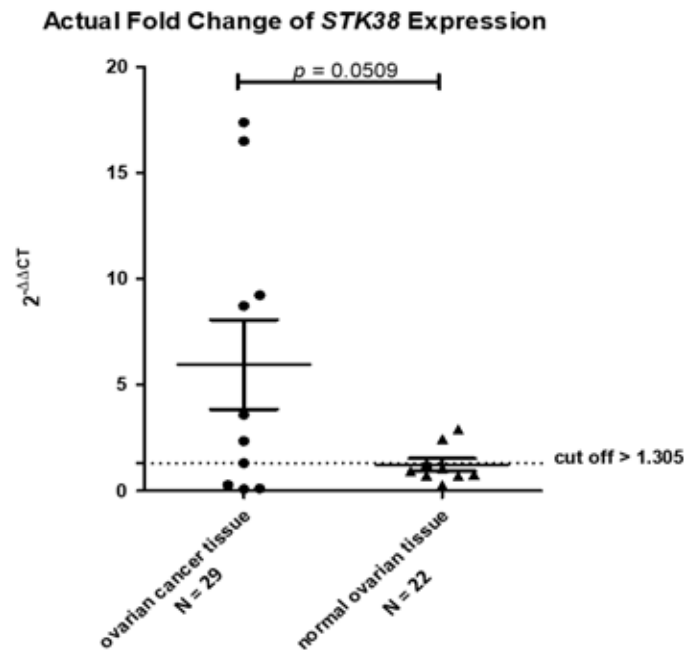


(ข)

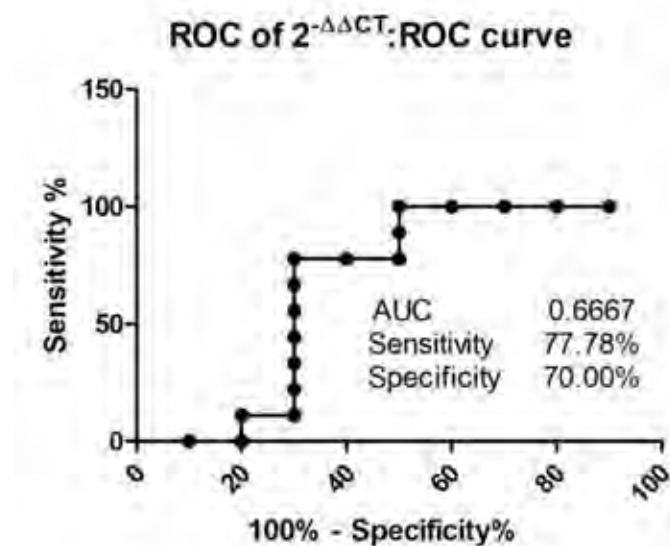


รูปที่ 9 (ก) กราฟค่าเฉลี่ย threshold cycle (C_t) ของยีน *STK38* ในแต่ละตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็น ตัวอย่างจากมะเร็งรังไข่ และตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ (ข) กราฟค่าเฉลี่ย threshold cycle ของยีน *GAPDH* ในแต่ละตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็นตัวอย่างจากมะเร็งรังไข่ 29 ตัวอย่าง และตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ 22 ตัวอย่าง โดยสัญลักษณ์รูปวงกลม คือ ค่า C_t ของตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ และสัญลักษณ์รูปสามเหลี่ยม คือ ค่า C_t ของตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ

จากการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ 29 ตัวอย่าง และกลุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ 22 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ทั้งหมดมีการแสดงออกของยีน *GAPDH* ส่วนตัวอย่างที่มีการแสดงออกของยีน *STK38* แบ่งเป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ จำนวน 14 ตัวอย่าง และตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ จำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อนำค่า threshold cycle ของทั้งสองกลุ่มตัวอย่างมาเปรียบเทียบเพื่อหาสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงจำนวนเท่า (fold change) จะได้สัดส่วนเท่ากับ 4.82 (รูปที่ 10) และเมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *STK38* กับมะเร็งรังไข่ ได้ค่า p -value เท่ากับ 0.0509 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 นั่นคือ ยีน *STK38* และมะเร็งรังไข่ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% รวมถึงได้นำค่า $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ของตัวอย่างทั้งสองกลุ่มไปหาความสัมพันธ์ระหว่างความไว และความจำเพาะ (sensitivity and specificity) โดยการสร้างกราฟ Receiver Operator Characteristic (ROC curve) ซึ่งมีพื้นที่ใต้กราฟ (area under the ROC curve: AUC) เท่ากับ 0.6667 และจะได้ค่า sensitivity เท่ากับ 77.78% และค่า specificity เท่ากับ 70.00% ดังรูปที่ 11



รูปที่ 10 กราฟแสดงผลการหาสัดส่วนค่าการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นจำนวนเท่า (actual fold change) ของกลุ่มตัวอย่างมะเร็งรังไข่จำนวน 29 ตัวอย่าง และกลุ่มตัวอย่างรังไข่ปกติ 22 ตัวอย่าง ที่มีค่าจุดตัด (cut-off point) ที่ 1.305 ซึ่งเป็นจุดที่แยกระหว่างค่าปกติและค่าผิดปกติ โดยสัญลักษณ์รูปวงกลม คือ ค่า $2^{-\Delta\Delta CT}$ ของตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ และสัญลักษณ์รูปสามเหลี่ยม คือ ค่า $2^{-\Delta\Delta CT}$ ของตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ



รูปที่ 11 ผลการคำนวณหาค่าความไว (sensitivity) และค่าความจำเพาะ (specificity) ของการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *STK38* โดยการสร้างเส้นโค้ง Receiver Operator Characteristic (ROC curve)

บทที่ 5

อภิปรายผล และสรุปผล

อภิปรายผลการทดลอง

โครงการวิทยาศาสตร์นี้เป็นการทดลองที่ต่อยอดจากโครงการวิทยาศาสตร์ของนายฟาติมา ตีบทา ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีน *STK38* ในมะเร็งรังไข่ ด้วยวิธี duplex-PCR (ฟาติมา ตีบทา, 2560ข) ซึ่งได้รายงานผลไว้ว่า มีการพบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *STK38* ในระดับอาร์เอ็นเอกับการเกิดโรคมะเร็งรังไข่ โดยในตัวอย่างมะเร็งรังไข่มีการแสดงออกของยีน *STK38* มากกว่าในตัวอย่างรังไข่ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p\text{-value} = 0.004$ เพราะการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในรูปแบบไฮโปเมทิลเลชัน แต่ในการทดลองดังกล่าวใช้ตัวอย่างจำนวนน้อย ซึ่งอาจทำให้ได้ผลวิเคราะห์ที่มีแนวโน้มไม่ชัดเจนนัก รวมถึงวิธีการทดลองที่ใช้ก็มีความแม่นยำน้อย ดังนั้นในโครงการวิทยาศาสตร์นี้จึงเพิ่มจำนวนตัวอย่างจากการศึกษาก่อนหน้า เพื่อให้ได้ผลวิเคราะห์ทางสถิติที่มีแนวโน้มชัดเจนมากขึ้น และให้เห็นความสัมพันธ์ของยีน *STK38* และการเกิดโรคมะเร็งรังไข่ได้อย่างชัดเจนมากขึ้น อีกทั้งยังออกแบบไพรเมอร์ที่คร่อมระหว่าง 2 exon เพราะมีความจำเพาะกับตัวอย่างที่เป็น mRNA มากกว่าไพรเมอร์ของการทดลองก่อนหน้านี้ และได้ใช้เทคนิค real-time PCR เนื่องจากมีความน่าเชื่อถือ และในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับมากกว่าวิธี duplex-PCR ที่ใช้ในการศึกษาก่อนหน้า แต่ผลที่ได้จากการทำการทดลองครั้งนี้พบว่า การแสดงออกของยีน *STK38* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ และตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p\text{-value} = 0.0509$

การรวบรวมตัวอย่าง สามารถรวบรวมตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติได้ 22 ตัวอย่าง และตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผ่านการวินิจฉัยด้วย biopsy ว่าเป็นมะเร็งรังไข่ได้ 34 ตัวอย่าง แต่เมื่อนำตัวอย่างชิ้นเนื้อทั้งหมดไปทำ formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) แล้วนำไปย้อมสี Hematoxylin and eosin stain (H&E stain) พบว่า ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ 5 ตัวอย่างไม่ได้เป็นมะเร็งรังไข่ที่มีเซลล์ตั้งต้นมาจากเซลล์เยื่อผิว (epithelial ovarian cancer) ซึ่งไม่สามารถใช้ในการทดลองได้ จึงใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ทั้ง 29 ตัวอย่างในการศึกษา

การออกแบบไพรเมอร์ในการทดลองนี้ต่างจากโครงการวิทยาศาสตร์ก่อนหน้านี้ของนายฟาติมา ตีบทา โดยออกแบบในบริเวณยีนที่ต่างกัน คือการศึกษาก่อนหน้าออกแบบ forward primer ที่บริเวณ exon ที่ 1 และ reverse primer ที่บริเวณ exon ที่ 2 ซึ่งหากในขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอไม่บริสุทธิ์มากพอ อาจทำให้มีสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะได้ PCR product ไม่แม่นยำ หรือมีแบนที่ได้จากดีเอ็นเอปนเปื้อนขึ้นบนเจล ดังนั้นในการทดลองนี้จึง

ได้ออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่โดย forward primer คร่อมระหว่าง exon ที่ 3 และ 4 คือจำเพาะกับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) มากกว่าการทดลองก่อนหน้า เนื่องจากตัดบริเวณที่เป็น intron ของยีนออกไปแล้ว ส่วน reverse primer อยู่บริเวณ exon ที่ 4 ดังนั้นแม้ว่าในขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอจะไม่บริสุทธิ์ หรือมีดีเอ็นเอปนเปื้อน ก็จะไม่ส่งผลให้ PCR product มี PCR product ที่ไม่ต้องการ จึงทำให้ไพรเมอร์ของการทดลองนี้มีแนวโน้มที่จำเพาะกับการแสดงออกของยีน *STK38* ในระดับอาร์เอ็นเอมากกว่า

เนื่องจากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ที่นำมาใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอและทำการทดลองเป็นตัวอย่างที่มีทั้งส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ และส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ อาจเป็นการแสดงออกของยีน *STK38* ของส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อรังไข่ปกติในชิ้นเนื้อ ดังนั้นก่อนทำการทดลองในชิ้นสกัดอาร์เอ็นเอจึงควรนำชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ประเมินบริเวณที่เป็นมะเร็ง โดยนำตัวอย่างชิ้นเนื้อไปทำ formalin-fixed paraffin-embed (FFPE) ทำสไลด์ ย้อมสี H&E ด้วยวิธีการทางจุลพยาธิวิทยา และให้แพทย์ผู้เชี่ยวชาญประเมินบริเวณที่เป็นมะเร็งก่อน แล้วจึงเลือกชิ้นเนื้อบริเวณนั้นมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เพื่อให้ได้ชิ้นเนื้อเฉพาะส่วนที่เป็นตัวอย่างมะเร็งรังไข่เท่านั้น

ขั้นตอนการทำ real-time PCR พบว่าเครื่อง QuantStudio™ 6 Flex Real-time PCR (Thermo Fisher Scientific, USA) พบปัญหาจากการที่เครื่อง real-time PCR ไม่สามารถตรวจจับยีน *STK38* ได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่บางตัวอย่าง แต่ในตัวอย่างเดียวกันนั้นก็กลับตรวจจับการแสดงออกและมีค่า threshold cycle ของยีน *GAPDH* ได้ที่จำนวนรอบที่ 40 เป็นต้นไป ซึ่งเป็นจำนวนรอบท้าย ๆ ของการทำปฏิกิริยา คือไพรเมอร์ของยีนเป้าหมายไม่สามารถตรวจจับและเข้าไปต่อสายคู่สมกับ cDNA ของตัวอย่างได้ ทำให้สาร SYBR Green ไม่สามารถตรวจจับพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายคู่สมได้ จึงเป็นไปได้ว่าตัวอย่างดังกล่าวไม่มีการแสดงออกของยีน *STK38* หรืออาจเกิดจากความผิดพลาดที่เกิดจากตัวอย่างนั้น ๆ เช่น มีการเก็บรักษาตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วยระยะเวลาที่นานเกินไป ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อ และการเสื่อมสภาพของสารพันธุกรรม หรืออาจเกิดจากข้อผิดพลาดของเทคนิคในการทดลองจากตัวผู้ทดลองเอง ไม่ว่าจะเป็นในขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ การสังเคราะห์สาย cDNA การเตรียมสาร Master Mix หรือการปนเปื้อนของดีเอ็นเอและสารอื่น จึงควรทำการทดลองโดยการเพิ่มจำนวนในการทำซ้ำ รวมถึงการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อที่สดใหม่อาจให้ผลการทดลองที่มีแนวโน้มที่แม่นยำมากขึ้น

จากผลที่ได้พบทั้งตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ที่มีการแสดงออกของยีน *STK38* และตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *STK38* จึงนำตัวอย่างเนื้อเยื่อนั้น ๆ ไปประเมินลักษณะทางพยาธิวิทยาและความรุนแรงของมะเร็งรังไข่โดยผู้เชี่ยวชาญพบว่า จากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ที่มีการแสดงออกของยีน *STK38* มีลักษณะทางพยาธิวิทยา ดังนี้ clear cell carcinomas 7 ตัวอย่าง endometrioid 2 ตัวอย่าง serous carcinomas 4 ตัวอย่าง และ mucinous 1 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *STK38* มีลักษณะทางพยาธิวิทยาแบบ clear cell carcinomas 8 ตัวอย่าง endometrioid 4 ตัวอย่าง serous carcinomas 1 ตัวอย่าง และ mucinous 2 ตัวอย่าง ซึ่งลักษณะทางพยาธิวิทยาของกลุ่มตัวอย่างที่มีการแสดงออกของยีน และกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของยีนมีสัดส่วนต่างกัน ดังนั้นผู้ทดลองจึงคาดว่า ระดับการแสดงออกของยีน *STK38* อาจขึ้นอยู่กับสภาพทางพยาธิวิทยาของมะเร็งรังไข่ด้วย จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

เมื่อคำนวณค่าหาสัดส่วนค่าการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นจำนวนเท่า (actual fold change) ในเริ่มแรก ได้ค่าสัดส่วนการแสดงออกที่เปลี่ยนไปเป็นจำนวนเท่าสูงผิดปกติ ซึ่งเกิดจากความผิดพลาดในการวิเคราะห์และคัดเลือกข้อมูลดิบ ดังนั้นก่อนคำนวณผลด้วยวิธีทางสถิติจึงได้ทำการคำนวณค่าผิดปกติ (outlier) และตัดทิ้งค่าผิดปกตินี้ออก ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากข้อมูลตัวอื่น ๆ ในตัวอย่างออกจากชุดข้อมูลจริงก่อน เพราะค่าดังกล่าวทำให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ และอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสำคัญในบทสรุปของการทดลอง

จากการศึกษาและวิเคราะห์ผลด้วย ROC curve พบว่า ที่ค่าจุดตัด (cut-off point) เท่ากับ 1.305 มีค่าความไวและค่าความจำเพาะที่สูงที่สุดอยู่ที่ 77.78% และ 70.00% ตามลำดับ โดยจุดตัดเป็นค่าที่ใช้ในการตัดค่าปกติและผิดปกติออกจากกันหมายความว่า ผู้ที่มีการแสดงออกของยีน *STK38* มากกว่า 1.305 มีความเสี่ยงที่จะเป็นโรคมะเร็งรังไข่ได้ นอกจากนี้จากการสร้างกราฟ ROC curve มักใช้ในการทดสอบความสามารถของการวินิจฉัยโรคพบว่า มีพื้นที่ใต้เส้นโค้ง (Area Under the Curve: AUC) ที่ 0.6667 ซึ่งอยู่ในระดับค่อนข้างต่ำถึงระดับพอใช้ เมื่อเทียบกับการศึกษาในยีนอื่น เช่น *BRCA1*, *CA125* และ *HE4* ซึ่งเป็นเครื่องหมายบ่งชี้มะเร็งของโรคมะเร็งรังไข่มีพื้นที่ใต้เส้นโค้งเท่ากับ 0.8700, 1.000 และ 1.000 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1.000 (Fawzy et al., 2016; Teixeira et al., 2017) แสดงว่า หากจะนำวิธีการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *STK38* ไปใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งรังไข่อาจมีความจำเพาะไม่มากพอ

เมื่อคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Independent t-test เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *STK38* และมะเร็งรังไข่ ได้ค่า *p-value* เท่ากับ 0.0509 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 นั่นคือ ยีน *STK38* ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งรังไข่อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ซึ่งผลการทดลองไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่คาดไว้ว่า เนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่จะมีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีน *STK38* มากกว่าเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ โดยทั้งนี้อาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนจากการคำนวณค่าทางสถิติ เทคนิคในห้องปฏิบัติการของผู้ทดลอง รวมถึงความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากอุปกรณ์ในการทดลอง อาจจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนตัวอย่างและการเพิ่มจำนวนซ้ำ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *STK38* และมะเร็งรังไข่ที่มีความแม่นยำมากขึ้น และอาจนำไปใช้ในการวินิจฉัยทางการแพทย์ได้ในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์การแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีน *STK38* ในมะเร็งรังไข่พบว่าการแสดงออกของยีน *STK38* ในระดับอาร์เอ็นเอของกลุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ และกลุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า *p-value* = 0.0509 โดยในตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่มีค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของยีนเท่ากับ 5.96 ± 6.67 ส่วนตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติมีค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของยีนเท่ากับ 1.24 ± 0.87 และสัดส่วนค่าการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นจำนวนเท่า (fold change) เท่ากับ 4.82

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า การแสดงออกของยีน *STK38* ในระดับอาร์เอ็นเอไม่มีความสัมพันธ์กันกับโรคมะเร็งรังไข่ จึงปฏิเสธสมมติฐานที่ว่า เนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่จะมีการแสดงออกของยีน *STK38* มากกว่าเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ

เอกสารอ้างอิง

- จันทนา รักแผน. 2555. Epigenetics and Myelodysplastic Syndrome. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต* 22 : 141-148.
- โชติกา หยกทองวัฒนา. 2554. เอพิเจเนติก-การควบคุมเหนือลำดับดีเอ็นเอ. *Genomic and Genetics* 4 : 71-84.
- ศุภจิรา ศรีจางวาง. 2558. เครื่อง Real-time PCR. *จดหมายข่าวศูนย์เครื่องมือวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น* 2 : 4-5.
- ฟาติมา ตีบทา. 2560ก. เครื่องหมายเมทิลเลชันสำหรับมะเร็งรังไข่. *โครงการวิทยาศาสตร์ปริญญาบัณฑิต, สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (เอกสารไม่ตีพิมพ์)*
- ฟาติมา ตีบทา. 2560ข. การวิเคราะห์การแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีน STK38 ในมะเร็งรังไข่. *โครงการวิทยาศาสตร์ปริญญาบัณฑิต, สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (เอกสารไม่ตีพิมพ์)*
- รักษาย บุนหาชาติ. 2550. สถานการณ์ปัจจุบันของมะเร็งรังไข่. *สงขลานครินทร์เวชสาร* 6 : 537-546.
- American Cancer Society. 2018. *Ovarian cancer causes, risk factors and prevention* [online]. Available from : <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html> [2018, September5]
- American Cancer Society. 2018. *Treating ovarian cancer* [online]. Available from : <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/treating.html> [2018,September6]
- Aunoble, B., Sanches, R., Didier, E., and Bignon, Y. J. 2000. Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Oncology* 16 : 567-643.
- Bernard, P.S. and Wittwer, C.T. 2002. Real-time PCR Technology for cancer diagnostics. *Clinical Chemistry* 48 : 1175-1185.
- Bisikirska, C.B. , et al. 2013. STK38 is a critical upstream regulator of MYC's oncogenic activity in human B-cell lymphoma. *Oncogene* 32 : 5283-5291.

- Braun, S.R. 2015. *Understanding ovarian cancer*. Illinois, United States : Society of Gynecologic Oncology.
- Coburn, S.B. , Bray, F. , Sherman, M.E. , and Trabert, B. 2017. International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histological subtype. *International Journal of Cancer* 140 : 2451-2460.
- Daniilidis, A., and Karagiannis, V. 2007. Epithelial ovarian cancer. Risk factors, screening and the role of prophylactic oophorectomy. *Hippokratia* 2007 : 63-66
- Devouassoux-Shisheboran, M. , and Genestie, C. 2015. Pathobiology of ovarian cancer. *Chinese Journal of Cancer* 34 : 50-55.
- D'Onofrio, A. 2016. *Transcription and translation* [online]. Available from : <http://www.alyvea.com/biologystudyguides/transcription-translation.php> [2018, September9]
- Doubeni, C.A. , Doubeni, A.R.B. , and Myers, A.E. 2016a. Diagnosis and management of ovarian cancer. *American Family Physician* 93 : 937-939.
- Doubeni, C.A. , Doubeni, A.R.B. , and Myers, A.E. 2016b. Diagnosis and management of ovarian cancer. *American Family Physician* 93 : 940-944.
- Ehrlich, M. 2009. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009 : 239-259.
- Fawzy, A., Mohamed, M.R., Ali, M.A., Abdel-Magied, M.H., and Helal, A.M. 2016. Tissue CA125 and HE4 gene expression levels offer superior accuracy in discriminating benign from malignant pelvic masses. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 17 : 323-333.
- Herman, J.G. 1999. Hypermethylation of tumor suppressor gene in cancer. *Cancer Biology* 9 : 359-367.
- Jin, B., Li, Y., and Robertson, K.D. 2011. DNA methylation: superior of subordinate in the epigenetic hierarchy. *Gene and Cancer* 2 : 607-617.
- Karst, A.M. and Drapkin, R. 2010. Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *Journal of Oncology* 2010 : 1-13.

- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25 : 402-408.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky S.L, Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. 2000. *Molecular Cell Biology 4th edition*. New York, United States : W. H. Freeman.
- Machado, R.D., et al. 2015. Comprehensive selection of reference genes for quantitative gene expression analysis during seed development in *Brassica napus*. *Plant Cell Reports* 34 : 1139-1149.
- Métivier, R., et al. 2008. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452 : 45-50.
- Natanzon, Y., Goode, E.L., and Cunningham, J.M. 2018. Epigenetics in ovarian cancer. *Seminars in Cancer Biology* 51 : 160-169.
- Ramus, S.J. and Gayther, S.A. 2009. The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer. *Molecular Oncology* 3 : 138-150.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., and Lin, X. 2013. An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics* 3 : 71-85.
- Robertson, K.D. 2005. DNA methylation and human disease. *Nature Review Genetics* 6 : 597-610.
- Silva, E.G., Tornos, C., Bailey, M.A., and Morris, M. 1991. Undifferentiated carcinoma of the ovary. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 115 : 377-381.
- Sino Biological. 2018. *SYBR Green qPCR method* [online] . Available from : <http://www.sinobiological.com/sybr-green-qpcr-method-cro-service.html> [2018, September10]
- Teixeira, N., et al. 2017. Predictability of *BRCA1/2* mutation status in patients with ovarian cancer: how to select women for genetic testing in middle-income countries. *Maturitas* 105 : 113-118.

- Thermo Fisher Scientific. 2018. *Reverset transcription reaction setup* [online]. Available from : <http://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-setup.html> [2018, September10]
- Tongelen, A.V., Lorient, A., and Smet, C.D. 2017. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germ line genes. *Cancer Letters* 396 : 130-137.
- Torpy, J.M., Burke, A.E, and Golub, R.M. 2011. Ovarian cancer. *Journal of the American Medical Association* 305 : 2484.
- UCSF school of medicine. 2007. *Gene and Genomes* [online]. Available from : http://missinglink.ucsf.edu/lm/genes_and_genomes/methylation.html [2018, September20]
- Walter, M. 2015. *Transposon regulation upon dynamic loss of DNA methylation*. Doctoral dissertation, Department of Genetics and Biological Development, Faculty of Science, Sorbonne University.
- Wei, S., Li, H., and Zhang, B. 2016. The diagnostic of serum HE4 and CA-125 and ROMA index in ovarian cancer. *Biomedical Reports* 5 : 41-44.

ภาคผนวก

รายชื่อของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของ ยีน STK38 ทั้งหมด 51 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ 29 ตัวอย่าง และกลุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ 22 ตัวอย่าง

ตารางที่ 3 รายชื่อตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ที่ใช้ในการทดลองจำนวน 29 ตัวอย่าง

รหัสตัวอย่าง	อายุ	ชนิด
OC11	47	clear cell
OC12	40	clear cell
OC13	61	endometrioid
OC15	52	clear cell
OC17	70	serous
OC18	57	clear cell
OC19	57	clear cell
OC20	52	poorly differentiated serous
OC23	-	mucinous
OC71	56	endometrioid
OC72	59	clear cell
OC75	72	clear cell
OC76	48	clear cell
OC77	41	clear cell
OC79	35	serous
OC80	52	mucinous
OC81	37	clear cell
OC82	47	clear cell
OC83	53	mucinous
OC85	40	clear cell
OC86	41	serous
OC87	59	poorly differentiated carcinoma:highly suspected to serous and clear cell (35%)

รหัสตัวอย่าง	อายุ	ชนิด
OC88	67	clear cell
OC92	42	clear cell
OC93	79	endometrioid
OC95	64	endometrioid
OC96	52	endometrioid
OC97	48	endometrioid
OC99	48	clear cell

ตารางที่ 4 รายชื่อตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ปกติที่ใช้ในการทดลองจำนวน 22 ตัวอย่าง

รหัสตัวอย่าง	อายุ	ชนิด
NO14	50	Leiomyoma
NO15	46	Leiomyoma
NO17	50	endometrioid
NO18	53	Myometrium adenomyosis
NO23	57	ovarian cysts
NO33	57	complex hyperplasia with atypia
NO41	49	Leiomyoma
NO42	48	Left ovarian cysts
NO44	52	Leiomyoma
NO45	50	Leiomyoma, cystis follicles
NO46	54	adenomyosis with Leiomyoma, ovarian cyst
NO47	63	Endometrium cyst, cervix carcinoma
NO49	49	Endometriotic cyst (right ovary)
NO50	59	endometrium : proliferative endometrium, endometrial polyp, left fallopain partubal cysts
NO51	47	no diagnosis

NO54	55	Adenomyosis, Leiomyoma
NO57		
NO58	47	Intramural leiomyoma, cystic follicles
NO59	51	Intramural leiomyoma
NO60	47	adenomyosis
NO61	50	left ovary hemorrhagic corpus luteum, Adenomyosis
NO62	50	right ovary cystic follicles, Adenomyosis

ตัวอย่างที่นำมาสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด 51 ตัวอย่าง รวมถึงเซลล์เพาะเลี้ยงสายพันธุ์ OVISE อีก 1 ตัวอย่าง มาวัดค่าการดูดกลืนแสงของแสงของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง NanoDrop™ Spectrophotometer พบว่า อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างที่สกัดแล้วมีค่า OD_{260}/OD_{280} อยู่ในช่วง 1.8 – 2.1

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอ ที่วัดด้วยเครื่อง NanoDrop™ Spectrophotometer

รหัสตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ng/μl)	260/280
OVISE	217.6	2
OC11	471.6	1.85
OC12	96.7	1.88
OC13	21.6	1.8
OC15	3962.3	1.82
OC17	2939.3	2.02
OC18	271.3	1.81
OC19	4334.8	1.91
OC20	1917.3	1.94
OC23	85.7	1.84
OC71	105.5	1.91
OC72	95.7	1.87
OC75	286.7	1.92
OC76	2407.6	2.01

รหัสตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ng/μl)	260/280
OC77	10.9	1.81
OC79	434	1.88
OC80	2520	1.92
OC81	2265.1	2.04
OC82	83.5	1.8
OC83	120.8	1.92
OC85	9.3	1.8
OC86	36.3	1.82
OC87	166.4	1.88
OC88	12.5	1.81
OC92	710.9	1.89
OC93	332.1	1.81
OC95	1048	1.9
OC96	31.8	1.84
OC97	665.9	1.9
OC99	56.5	1.82
NO14	2092.2	1.84
NO15	860.9	1.89
NO17	1162.5	1.85
NO18	1466	1.8
NO23	372.1	1.83
NO33	1237	1.9
NO41	8.5	1.8
NO42	91	1.96
NO44	13.8	1.8
NO45	17	1.8
NO46	129	1.85
NO47	100	1.81

รหัสตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ng/ μ l)	260/280
NO49	311.1	1.92
NO50	76.8	1.87
NO51	11.2	1.84
NO54	81.4	1.92
NO57	71	1.9
NO58	86.7	1.83
NO59	84.4	1.88
NO60	321.5	1.98
NO61	84.1	1.86
NO62	153.8	1.97

ค่าเฉลี่ยของ threshold cycle (Ct) ในแต่ละตัวอย่าง หลังจากทำซ้ำตัวอย่างละ 2 รอบ โดยในแต่ละตัวอย่างจะตรวจจับ 2 ยีน คือ ยีน *STK38* และยีน *GAPDH*

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยของ threshold cycle ของยีน *STK38* และยีน *GAPDH* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อ มะเร็งรังไข่

รหัสตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย Ct ของยีน <i>STK38</i>	ค่าเฉลี่ย Ct ของยีน <i>GAPDH</i>
OC11	34.580	23.297
OC12	Undetermined	34.062
OC13	Undetermined	36.673
OC15	29.519	24.556
OC17	31.218	26.175
OC18	31.126	27.001
OC19	34.7724	26.945
OC20	Undetermined	25.013
OC23	Undetermined	34.755
OC71	Undetermined	35.212
OC72	Undetermined	44.930
OC75	Undetermined	36.217

รหัสตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย Ct ของยีน <i>STK38</i>	ค่าเฉลี่ย Ct ของยีน <i>GAPDH</i>
OC76	27.510	23.460
OC77	Undetermined	35.595
OC79	27.874	16.223
OC80	Undetermined	34.242
OC81	34.624	34.634
OC82	Undetermined	34.903
OC83	33.601	32.153
OC85	Undetermined	40.633
OC86	35.549	28.616
OC87	33.113	26.789
OC88	44.501	42.061
OC92	Undetermined	40.155
OC93	Undetermined	35.207
OC95	33.084	33.084
OC96	Undetermined	33.138
OC97	35.421	25.411
OC99	Undetermined	32.826

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยของ threshold cycle ของยีน *STK38* และยีน *GAPDH* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อจริง
ไข่มุกติ

รหัสตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย Ct ของยีน <i>STK38</i>	ค่าเฉลี่ย Ct ของยีน <i>GAPDH</i>
NO14	32.482	23.857
NO15	31.166	24.287
NO17	Undetermined	30.666
NO18	31.272	22.621
NO23	Undetermined	28.056
NO33	34.022	23.984
NO41	33.978	25.919
NO42	30.750	22.461
NO44	Undetermined	36.556
NO45	Undetermined	41.859
NO46	Undetermined	47.888
NO47	Undetermined	38.290
NO49	Undetermined	38.006
NO50	Undetermined	35.805
NO51	Undetermined	36.946
NO54	29.501	20.940
NO57	Undetermined	32.322
NO58	Undetermined	32.759
NO59	Undetermined	33.254
NO60	20.566	30.405
NO61	30.140	22.349
NO62	35.852	29.222