

ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่งต่างๆ ด้วยวิธีการตรวจลำดับเบสและ
การแสดงออกเป็นโปรตีนด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในเยื่อกระดูกไขว้ไอออนเอสทราเจนเฟอรัส
ชนิดพี1 ในมะเร็งเต้านม

นางสาววัลลา พงษ์ชัยญา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

IMPACT OF THE LOCATION OF CpG METHYLATION WITHIN THE GSTP1 GENE ON PROTEIN
EXPRESSION OF BREAST CANCER

MISS VALLA FONGCHAIYA

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่งต่างๆ ด้วยวิธีการตรวจ
ลำดับเบสและการแสดงออกเป็นโปรตีนด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในยีนกลูตา
ไธโอนเอสทรานเฟอร์เรซินิตพี1 ในมะเร็งเต้านม

โดย

นางสาววัลลา ฟองชัยญา

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักศาสตราจารย์นายแพทย์พิเชฐสัมพันธ์พานุกุล

คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. วิไล ชินธเนศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิเชฐ สัมปทานุกุล)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชนพ ช่างไชติ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ศันสนีย์ วงศ์ไวศยวรรณ)

วัลลา พงษ์ชัยญา : ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่งต่างๆด้วยวิธีการตรวจลำดับเบสและการแสดงออกเป็นโปรตีนด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในยีนกลุ่มตัวโรไอออนเอสทรานเฟอร์เรสชนิด พี1 ในมะเร็งเต้านม (IMPACT OF THE LOCATION OF CpG METHYLATION WITHIN THE GSTP1 GENE ON PROTEIN EXPRESSION OF BREAST CANCER) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก :ศ. นพ. พิเชฐสัมพันธ์พานุกุล, 78 หน้า.

ที่มาและปัญหา: ยีนGSTP1 ผลิตภัณฑ์ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารคะตะลิสต์ในกระบวนการกำจัดสารพิษออกจากเซลล์ การเกิดเมทิลเลชันและไม่แสดงโปรตีนของยีนนี้พบว่ามีความสัมพันธ์กับการตอบสนองของการใช้ยา กลุ่มแทกเซนในมะเร็งเต้านม แต่ผลการตรวจเมทิลเลชันด้วยเทคนิค Methylation Specific PCR ของงานวิจัยก่อนหน้านี้นี้ พบว่ามีตัวอย่างบางรายที่ให้ผลไม่สอดคล้องกับผลการแสดงออกเป็นโปรตีนของเซลล์มะเร็ง

วัตถุประสงค์: เพื่อใช้เทคนิคการตรวจลำดับเบสหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่งต่างๆกับการแสดงหรือไม่แสดงออกเป็นโปรตีนของยีน GSTP1 ในมะเร็งเต้านม

วิธีการทดลอง: ใช้เทคนิคการตรวจลำดับเบส (Bisulfite sequencing technique) ศึกษาภาวะเมทิลเลชันในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมจำนวน 46 รายที่มีผลการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดี GSTP1 และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่งต่างๆกับผลของโปรตีน

ผลการทดลอง: การพบเมทิลเลชันซึ่งควรสอดคล้องกับการไม่มีโปรตีน ทำให้จำแนกผลการทดสอบได้เป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่ไม่พบเมทิลเลชันที่ตำแหน่งใด 17 รายซึ่งควรสอดคล้องกับการมีโปรตีน พบว่ามี 13 ราย สอดคล้องและ 4 รายไม่สอดคล้อง 2) กลุ่มที่พบซีพีจีที่เกิดเมทิลเลชันจำนวน 1-4 ตำแหน่ง มี 14 ราย ซึ่งควรสอดคล้องกับการไม่มีโปรตีน พบว่ามี 5 รายให้ผลสอดคล้อง และ 9 รายไม่สอดคล้อง และ 3) กลุ่มที่พบซีพีจีที่เกิดเมทิลเลชันจำนวนมากกว่า 4 ตำแหน่ง มี 15 ราย ซึ่งควรสอดคล้องกับการไม่มีโปรตีน พบว่า 13 ราย สอดคล้อง และ 2 รายไม่สอดคล้อง การวิเคราะห์ผลพบความสัมพันธ์ของจำนวนซีพีจีที่เกิดเมทิลเลชันกับการไม่แสดงออกเป็นโปรตีนมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) และการวิเคราะห์ตำแหน่งของซีพีจีที่เกิดเมทิลเลชัน พบ 12 ตำแหน่งที่มีผลต่อการไม่แสดงออกเป็นโปรตีน ได้แก่ ตำแหน่งที่ 3, 6, 10-13, 19-22, 25 และ 28 ในทางกลับกันพบ 6 ตำแหน่ง ที่ไม่มีผลต่อการไม่แสดงออกเป็นโปรตีน ได้แก่ ตำแหน่งที่ 8, 16, 24, 26, 30 และ 33

สรุปผลการทดลอง: การไม่แสดงออกเป็นโปรตีนของยีน GSTP1 ส่วนใหญ่สัมพันธ์กับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน อย่างไรก็ตาม การไม่แสดงออกของโปรตีนที่เกิดเมทิลเลชันยังมีปัจจัยที่มีผลคือจำนวนซีพีจีและตำแหน่งซีพีจีที่เกิดเมทิลเลชันนั้น การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจดีเอ็นเอเมทิลเลชันจึงควรคำนึงถึงปัจจัยดังกล่าว

สาขาวิชา ...วิทยาศาสตร์การแพทย์...

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา ...2555...

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

5374697330: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: HYPERMETHYLATION/UNMETHYLATION/ PROTEINEXPRESSION/BISULFITE SEQUENCING/ BREAST CANCER

VALLA FONGCHAIYA: IMPACT OF THE LOCATION OF CpG METHYLATION WITHIN THE GSTP1 GENE ON PROTEIN EXPRESSION OF BREAST CANCER. ADVISOR: PROF. PICHET SAMPATANUKUL, M.D., 78 pp.

Background: GSTP1 gene encodes a catalyst enzyme helping conjugating and getting rid of cellular toxic substances. DNA methylation resulting in absence of the protein is associated with response to Taxane treatment of breast cancers. However, some discordant cases occurred in the previous study using Methylation Specific PCR technique.

Objective: To use genomic sequencing method investigated the impact of location specific of CpG methylation on the expression of protein.

Material and methods: Bisulfite sequencing technique was employed for the 46 breast cancer specimens with known GSTP1 results by immunohistochemistry. Analyses were made between CpG location specific methylations and the protein results.

Results: The methylations should correlate with non-expression of protein; three groups were classified accordingly. There were 1) the group of 17 cases with no methylcytosine in all CpG sites (13 concordant cases were positive while 4 discordant cases negative for proteins), 2) the group of 14 cases with 1-4 methylcytosines (5 concordant cases and 9 discordant cases were negative and positive for protein respectively), and 3) the group of 15 samples with methylcytosines more than 4 sites (13 concordant for negative protein and 2 cases of discordance). The three categories were statistically different ($p < 0.01$). Regarding location impact, the methylation at CpG sites no. 3, 6, 10-13, 19-22, 25, and 28 had negative immunohistochemistry. On contrary, the methylation at CpG sites no. 8, 16, 24, 26, 30 and 33 showed no effect on protein expression.

Conclusion: Most cases of non-expression of protein are related to DNA methylation on the promoter region of the GSTP1 gene. However, the impacts of number and location specific of methylated CpG exist. Therefore, these two factors should be considered in primer design for detection of DNA methylation of this gene.

Field of Study : ...Medical Sciences...

Student's Signature.....

Academic Year : ...2012...

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์นายแพทย์พิเชฐสัมพันธ์มัทธานุกุลกิจอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ให้คำแนะนำข้อเสนอแนะและชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ในการทำงานรวมทั้งตรวจทานและแก้ไขรายงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคุณปรีชาเรืองวรเวชชัยเพื่อนนิสิตปริญญาโทและเจ้าหน้าที่ภาควิชาพยาธิวิทยาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทุกๆท่านที่คอยให้คำแนะนำรวมถึงให้ความช่วยเหลือในด้านเทคนิคต่างๆจนงานวิจัยชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่และครอบครัวที่คอยให้การสนับสนุนให้คำปรึกษาและคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
คำถามงานวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	2
กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework).....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	3
คำสำคัญ.....	4
ขั้นตอนของการวิจัย.....	5
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
กระบวนการเหนือพันธุกรรม (Epigenetic).....	7
ดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการเกิดมะเร็ง.....	8
หน้าที่และการทำงานของยีนกลูต้าไธโอนเอสทรานเฟอร์เรส	9
การคัดเลือกและการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำพีซีอาร์.....	12
หลักการของเทคนิค Bisulphite direct sequencing	15

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
รูปแบบการวิจัย.....	20
ประชากรศึกษา.....	20
ประเด็นจริยธรรม.....	20
เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย.....	21
สารเคมีและชุดทดลองที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
การบันทึกข้อมูล.....	34
การตรวจสอบข้อมูลและการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	34
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	36
ประชากรตัวอย่าง	36
การศึกษาโดยการหาลำดับเบส	36
ความสัมพันธ์ระหว่างเมทิลเลชันและการแสดงออกเป็นโปรตีน.....	46
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	55
รายการอ้างอิง.....	59
ภาคผนวก.....	62
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	78

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงไพรมอร์และคุณลักษณะของไพรมอร์ที่ใช้สำหรับงานวิจัยนี้.....	25
2	แสดงคุณทรมุมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ.	27
3	แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ.....	30
4	แสดงคุณทรมุมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ....	30
5	แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการหาลำดับเบส	32
6	แสดงแสดงคุณทรมุมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนในปฏิกิริยาการหาลำดับเบส...	32
7	แสดงการเปรียบเทียบจำนวนการเกิดเมทิลเลชันตามกลุ่มกับผลของอิมมูโนฮิสโตเคมี.....	47
8	แสดงการเปรียบเทียบความสอดคล้องของการแสดงออกเป็นโปรตีนในกลุ่มที่มีการแสดงออกเป็นโปรตีนชัดเจน.....	49
9	แสดงการเปรียบเทียบความสอดคล้องของการแสดงออกเป็นโปรตีนในกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกเป็นโปรตีนชัดเจน.....	51
10	แสดงการเปรียบเทียบความสอดคล้องของการแสดงออกเป็นโปรตีนในกลุ่มที่มีการแสดงออกเป็นโปรตีนไม่ชัดเจน.....	53

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงชนิดและกลไกการควบคุมแบบเหนื่อพันธุกรรม.....	7
2	แสดงปฏิกิริยาการเกิดเมทิลเลชั่นโดยการเติมหมู่เมทิลเข้าไปที่คาร์บอนของเบสไซโตซีน.....	8
3	แสดงความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิลเลชั่นและการเกิดมะเร็ง.....	9
4	แสดงการทำงานของยีนกลูต้าไธโอนเอสทรานเฟอร์เรส.....	10
5	แสดงการทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์บนลำดับเบสของดีเอ็นเอ.	15
6	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ dNTP และ ddNTP.....	18
7	แสดงการเกิดปฏิกิริยาการหาลำดับเบส แบบ dideoxy.....	19
8	แสดงข้อมูลของยีนกลูต้าไธโอนเอสทรานเฟอร์เรสชนิด พี1.....	24
9	แสดงผลผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไพรมอร์หลังการทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์.....	26
10	แสดงรูป Electrophorogram ของลำดับเบสที่ได้จากการตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติ.....	34
11	แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม Bioedit	35
12	แสดงตำแหน่งการเกิดเมทิลเลชั่นจากการหาลำดับเบส.....	37
13	แสดงการติดสีที่ให้ผลบวกของเซลล์มะเร็งจากการย้อมอิมมูโนฮิสเคมี.....	39

ภาพที่	หน้า
14 แสดงตำแหน่งการเกิดเมทิลเลชันของตัวอย่างในกลุ่มที่ให้ผลอิมมูโนฮิสโตเคมี เป็นบวก.....	39
15 แสดงภาพ electrophorogram ของลำดับเบส ในตัวอย่างที่ให้ผลอิมมูโนฮิสโต เคมีเป็นบวก.....	40
16 แสดงการติดสีที่ให้ผลลบของเซลล์มะเร็งจากการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี	41
17 แสดงตำแหน่งการเกิดเมทิลเลชันของตัวอย่างในกลุ่มที่ให้ผลอิมมูโนฮิสโตเคมี เป็นลบ.....	41
18 แสดงภาพ electrophorogram ของลำดับเบส ในตัวอย่างที่ให้ผลอิมมูโนฮิสโต เคมีเป็นลบ.....	42
19 แสดงการติดสีของเซลล์มะเร็งจากการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี.....	43
20 แสดงตำแหน่งการเกิดเมทิลเลชันของตัวอย่างในกลุ่มที่ให้ผลอิมมูโนฮิสโตเคมีไม่ ชัดเจน.....	44
21 แสดงภาพ electrophorogram ของลำดับเบส ในตัวอย่างที่ให้ผลอิมมูโนฮิสโต เคมีไม่ชัดเจน.....	45
22 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนตำแหน่งซีพีจีที่มีเมทิลเลชันและร้อยละของเซลล์ที่มี การแสดงโปรตีน.....	47

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ		คำเต็ม
GST	=	Glutathione S-transferase
GSTP1	=	Glutathione S-transferase class P1
PCR	=	Polymerase chain reaction
BS	=	Bisulfite sequencing
MSP	=	Methylation Specific Polymerase chain reaction
IHC	=	Immunohistochemistry
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
FFPE	=	Formalin-fixed paraffin-embedded
dATP	=	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	Deoxycytosine triphosphate
dTTP	=	Deoxythymidine triphosphate
dGTP	=	Deoxyguanosine triphosphate
dNTP	=	Deoxynucleotide triphosphate
ddATP	=	Dideoxyadenosine triphosphate
ddCTP	=	Dideoxycytosine triphosphate
ddTTP	=	Dideoxythymidine triphosphate
ddGTP	=	Dideoxyguanosine triphosphate
H&E	=	Haematoxylin and Eosin
CpG	=	Cytosine phosphodiester Guanine
A	=	Adenine
T	=	Thymine
G	=	Guanine
C	=	Cytosine

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในสตรีไทยและในหลายประเทศ [1] ประกอบด้วยชนิดย่อยต่างๆซึ่งมีพยากรณ์โรคและการรักษาที่แตกต่างกัน การจำแนกชนิดย่อยที่ใช้กันในปัจจุบันจะอ้างอิงจากการตรวจลักษณะทางอิมมูโนฮิสโตเคมีและ/หรือการตรวจทางอณูเป็นหลักร นอกจากการบ่งชี้พยากรณ์โรคยังช่วยให้ข้อมูลการตอบสนองต่อยาจำเพาะเพื่อเป็นแนวทางในการใช้ยาหรือไม่ใช้ยาจำเพาะนั้นๆ ในการดูแลรักษาผู้ป่วยด้วยยาจำเพาะที่เป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน ได้แก่ การใช้ยาต้านฮอร์โมนสำหรับมะเร็งเต้านมชนิดย่อยที่ให้ผลบวก ER และ PgR ขณะที่การใช้ยา antiHER-2 จะได้ผลสำหรับมะเร็งเต้านมชนิดย่อยที่มีโปรตีน HER-2 จำนวนมากเนื่องจากการแอมพลิฟิเคชันของยีน HER-2

ผู้วิจัยสนใจยีนกลูตาไธโอนเอสทรานส์เฟอร์เรส ชนิดพี1 ที่มีการศึกษาพบว่ามีการบ่งบอกการตอบสนองกับยา docitaxel and paclitaxel ซึ่งยากกลุ่ม Taxane เป็นยาที่จำเป็นสำหรับการรักษามะเร็งชนิดย่อยที่เป็น Triple negative เพราะช่วยเสริมการรักษาเมื่อไม่ได้ผลกับที่ใช้ปกติ [2]

แต่เนื่องจากยังมีความไม่ตรงกันของการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีและการศึกษาโดยวิธี MSP เพื่อดูภาวะเมทิลเลชัน [3] ผู้วิจัยจึงสนใจจะศึกษาปัจจัยที่ทำให้เกิดความไม่ตรงกัน โดยเชื่อว่า Bisulfite sequencing เป็นเทคนิคที่ศึกษาภาวะเมทิลเลชันได้ทุกตำแหน่งซีพีจีบนลำดับเบสจะสามารถหาคำตอบของความไม่ตรงกันดังกล่าวได้ [4]

การวิจัยนี้จึงเป็นการพัฒนาเทคนิคการตรวจภาวะเมทิลเลชันด้วยวิธี Bisulfite sequencing เพื่อเป็นการรวบรวมข้อมูลเมทิลเลชันที่มีผลต่อการแสดงออกเป็นโปรตีนของยีน

คำถามงานวิจัย

- คำถามหลัก การศึกษาเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน GSTP1 ด้วยเทคนิค Bisulfite sequencing จะให้ผลสอดคล้องกับการแสดงออกเป็นโปรตีน โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ได้ในชั้นเนื้อมะเร็งเต้านมหรือไม่
- คำถามรอง ผลการศึกษาเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน GSTP1 ด้วยเทคนิค Bisulfite sequencing ให้ผลสอดคล้องกับการแสดงออกเป็นโปรตีนใน ชั้นเนื้อมะเร็งเต้านมในด้านใด

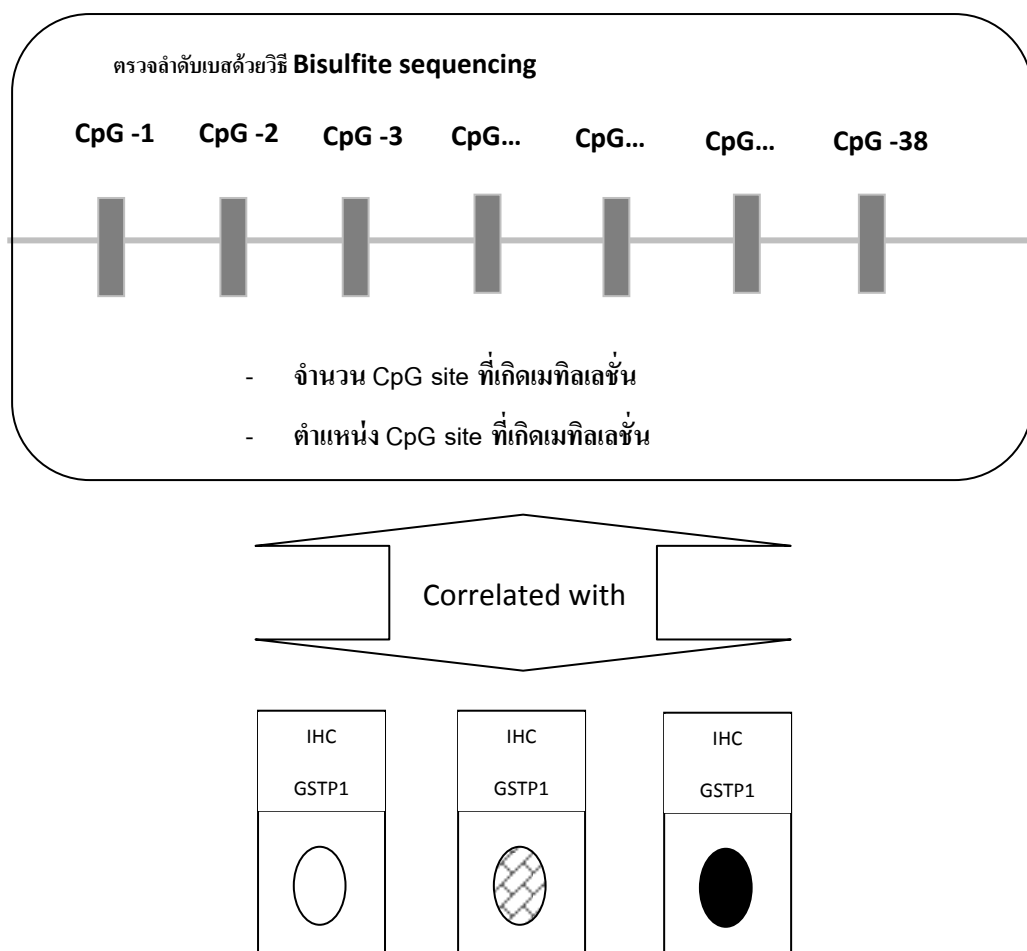
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาภาวะการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่งต่างๆบน CpG islands ของโปรโมเตอร์ ยีน GSTP1
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันบน CpG islands ของโปรโมเตอร์ ยีน GSTP1 กับการแสดงออกเป็นโปรตีนของยีน

สมมติฐานของการวิจัย

การเกิดเมทิลเลชันในแต่ละตำแหน่งของ CpG islands บนโปรโมเตอร์ยีน GSTP1 มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน

กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ซีพีจี (CpG site) หมายถึง ตำแหน่งบนดีเอ็นเอที่มีเบสไซโตซีนอยู่ติดกับเบสกวานีนโดยที่ ซี (C) หมายถึง เบสไซโตซีน จี (G) หมายถึงเบสกวานีน และพี (p) หมายถึง ฟอสเฟต หรือพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์(Phosphodiester bond) ซึ่งเป็นพันธะที่เชื่อมระหว่าง ไซโตซีนและกวานีน

ตำแหน่งซีพีจี หมายถึง แต่ละตำแหน่งของ CpG บนโปรโมเตอร์โดยที่กำหนดตำแหน่งที่ 1 คือ ตำแหน่งแรกจากปลายด้าน 5' ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ แล้วถัดไปจนถึงปลายด้าน 3' เป็น ตำแหน่งที่ 38

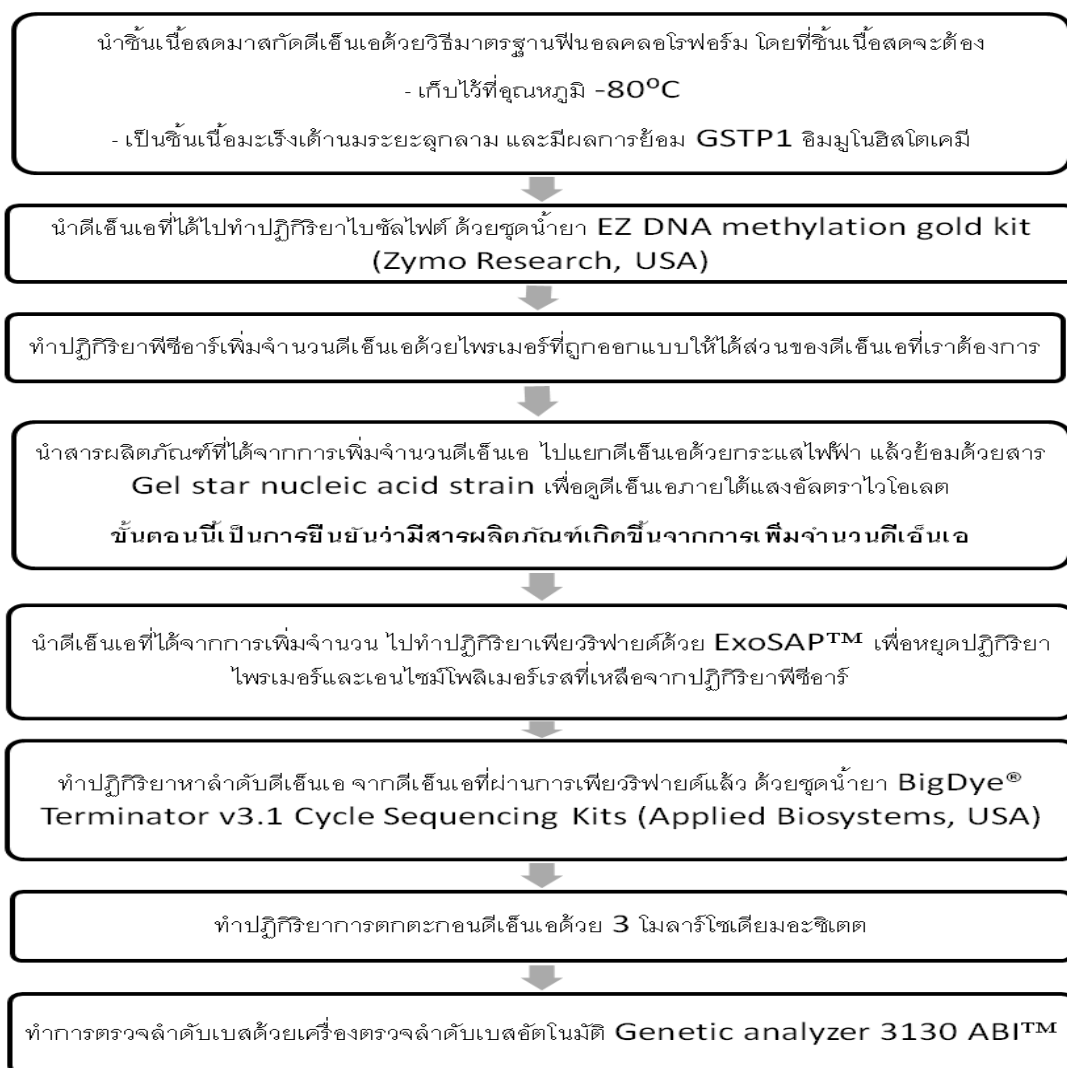
การเกิดเมทิลชัน หมายถึง การเติมหมู่เมทิล (-CH₃) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน (cytosine; C)

คำสำคัญ

Hypermethylation, Unmethylation, Protein expression, Bisulfite sequencing,
Breast cancer

ขั้นตอนของการวิจัย

ขั้นตอนการศึกษาลำดับเบส



ขั้นตอนการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลการยับยั้งภูมิโมโนฮิสโตเคมีและการหาลำดับเบส



ข้อจำกัดของการวิจัย

1. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อนำไปทำ Bisulfite sequencing เป็นชิ้นเนื้อสดที่ไม่มีการตรวจทางMorphology แต่ก็เป็นเนื้อเยื่อจากก้อนเดียวกับชิ้นเนื้อจากพยาธิเนบไลซิกที่ย้อมภูมิโมโนฮิสโตเคมี
2. โปรแกรมที่ใช้ในงานนี้เป็นโปรแกรมที่ถูกออกแบบเป็นครั้งแรก จึงไม่มีรายงานที่อ้างอิงได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อทราบถึงความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิลเลชันในยีน GSTP1(ตำแหน่งและจำนวนซิติลที่เกิดเมทิลเลชัน)กับการแสดงออกเป็นโปรตีน

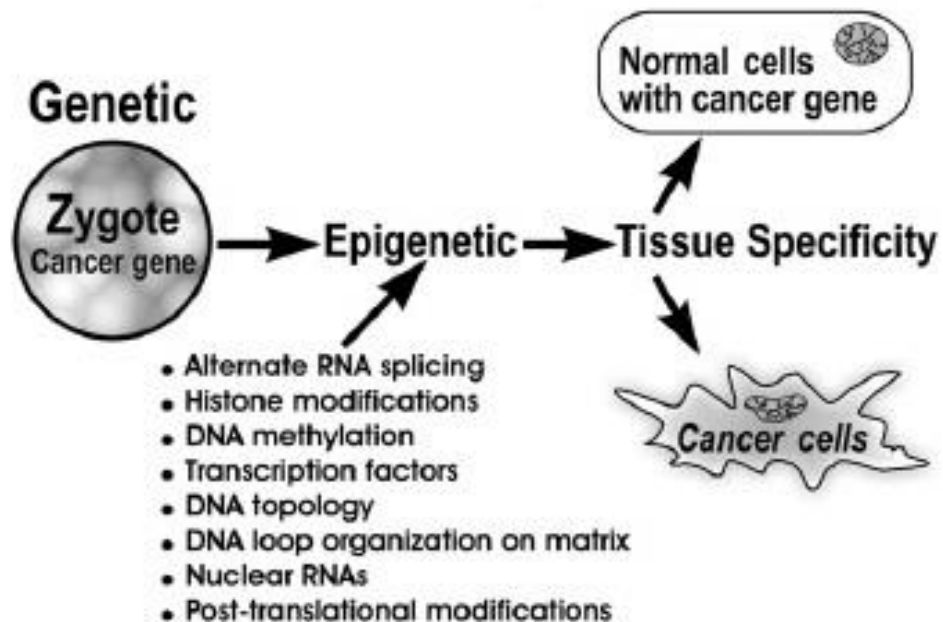
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระบวนการเหนือพันธุกรรม (Epigenetic)

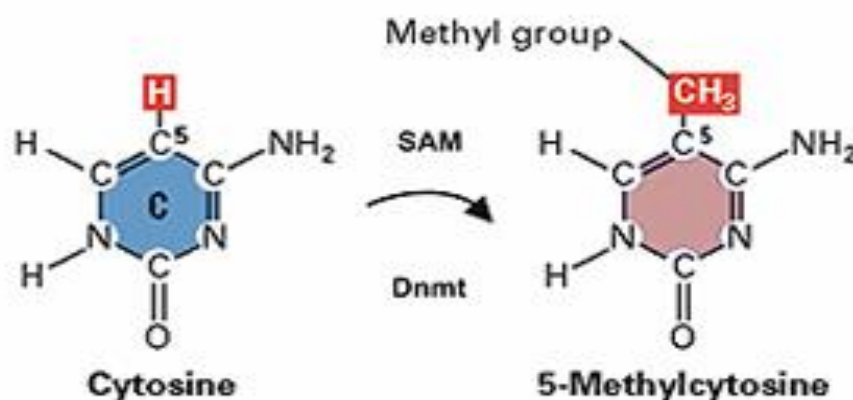
อีพีเจเนติกส์หรือกระบวนการเหนือพันธุกรรม คือการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน ที่เกิดจากกระบวนการอื่นนอกเหนือจากการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอ ตัวอย่างของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนแบบนี้เช่นการเติมหมู่เมธิลบนดีเอ็นเอหรือการถอนหมู่อะเซทิลออกจากฮิสโตน เป็นการยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้นๆ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับดีเอ็นเอในยีนนั้นๆ[5]

การควบคุมการแสดงออกในลักษณะนี้อาจสามารถคงอยู่ได้หลังการแบ่งเซลล์ และอาจคงอยู่ข้ามไปสู่สิ่งมีชีวิตรุ่นลูกและรุ่นต่อไปได้ แต่จะไม่มี การเปลี่ยนแปลงและไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยมีปัจจัยที่นอกเหนือจากพันธุกรรมที่ทำให้ยีนแต่ละยีนแสดงออก เปลี่ยนแปลงไปจากที่ควรเป็น[5]



ภาพที่ 1 แสดงชนิดและกลไกการควบคุมแบบเหนือพันธุกรรม

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นกระบวนการหนึ่งในการควบคุมแบบเหนือพันธุกรรมที่ถูกพูดถึงกันมากที่สุด ดีเอ็นเอเมทิลเลชันคือการเติมหมู่เมทิล (-CH₃) เข้าไปที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีนที่อยู่ลำดับติดกับเบสกวานีนในดีเอ็นเอ เรียกตำแหน่งนั้นว่า CpG [5] จำนวนของการเกิดเมทิลเลชัน ในดีเอ็นเอนั้นไม่เท่ากันในแต่ละยีนการกระจายของเมทิลเลชัน(5 mC) ในยีนนั้นเป็นแบบ non random โดยที่มากกว่า 90% ของ 5 mC จะพบในลำดับเบส CG และพบว่ายีนที่มีขบวนการ transcription เกิดอย่าง active นั้นจะมีจำนวนของ 5 mC น้อยกว่ายีนที่ไม่มีขบวนการ transcription เกิดขึ้น[5] ช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการเกิดเมทิลเลชันและเชื่อว่าการเกิดเมทิลเลชันมีความสำคัญต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดยการขัดขวางการทำงานของเหล่าโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ transcription ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน

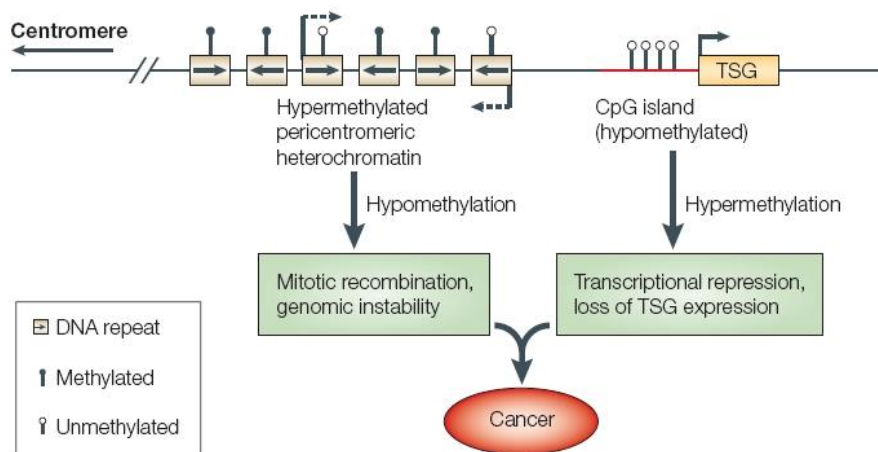


ภาพที่ 2 แสดงปฏิกิริยาการเกิดเมทิลเลชันโดยการเติมหมู่เมทิล (-CH₃) เข้าไปที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน (ภาพจาก <http://michaeldomingos.hubpages.com>)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการเกิดมะเร็ง

ซึ่งเป็นที่ทราบแล้วว่าเมทิลเลชันจะเกี่ยวข้องกับการทำให้ดีเอ็นเออยู่ในสภาพ Inactive ดังนั้น ในการเกิดมะเร็งจะพบการเกิดเมทิลเลชันใน 2 ลักษณะ คือ 1) Hypermethylation เป็นการที่มีหมู่เมทิลมาเติมที่ตำแหน่ง CpG มักพบบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ทำให้ยีนอยู่ในสภาพ Inactive ไม่สามารถเข้าสู่กระบวนการถอดรหัสได้หรือแสดงออกได้น้อย หากเกิดกับยีนชนิดยับยั้งมะเร็ง (Tumor suppressor gene) ก็จะมีผลต่อกระบวนการเกิดมะเร็ง 2) Hypomethylation คือ

การหายไปของเมทิลเลชันทำให้ยีนมีการแสดงออกที่มากเกินไป มักเกิดในจีโนม ถ้าเกิดในยีนมะเร็ง (Proto-onco gene) ก็จะมีผลต่อการเกิดมะเร็ง [6,7]

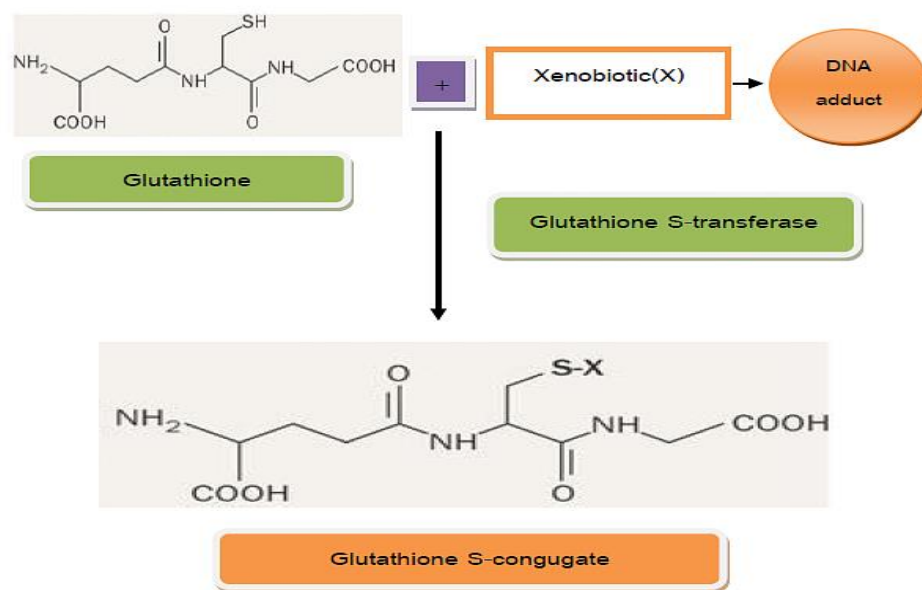


ภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิลเลชันและการเกิดมะเร็ง (ภาพจาก

http://www.nature.com/nrg/journal/v6/n8/fig_tab/nrg1655_F1.html)

หน้าที่และการทำงานของยีนกลูต้าไธโอนเอสทรานเฟอร์เรส

GSTs. หรือเอนไซม์กลูต้าไธโอนเอสทรานเฟอร์เรส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมทางด้าน Biotransformation ซึ่งเป็นกระบวนการทางเคมีในสิ่งมีชีวิตที่จะเปลี่ยนคุณสมบัติการละลายของสารที่มีพิษต่อร่างกายหรือสารที่ร่างกายไม่ต้องการให้กลายเป็นสารที่มีพิษน้อยลง และมีความสามารถในการละลายได้ดีขึ้นจึงสามารถถูกขับออกจากร่างกายได้ โดยปกติเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Biotransformation จะแบ่งการทำงาน 2 ช่วง คือ Phase I enzyme ได้แก่ Cytochrome P450 และ Phase II enzyme ได้แก่ กลูต้าไธโอนเอสทรานเฟอร์เรสจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการคอนจูเกตของกลูต้าไธโอนกับสารประกอบเชิงซ้อนที่เป็น electrophilic compound ได้แก่ พวกสารก่อมะเร็งต่างๆ (carcinogen) ผลผลิตจากภาวะ oxidative stress ตลอดจนยาที่มีพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic drug) ที่ใช้ในเคมีบำบัดของการรักษามะเร็ง เพื่อลดความเป็นพิษของสารดังกล่าว (ภาพที่4) [8]



ภาพที่ 4 แสดงการทำงานของยีนกลูต้าไธโอนเอสทรานเฟอเรส

กลูต้าไธโอนเอสทรานเฟอเรสประกอบด้วยกลุ่มยีนหลายคลาส ได้แก่ แอลฟา(alpha) มิว(mu) ธีต้า(theta) ไพ(pi) ซีต้า(zeta) ซิกมา(sigma) แคปป์(Kappa) โอเมก้า(omega) เป็นต้น [8]

ยีนกลูต้าไธโอนเอสทรานเฟอเรส ชนิด pi1 หรือ ยีน GSTP1 เป็นยีนหนึ่งในตระกูลกลูต้าไธโอนเอสทรานเฟอเรส ทำหน้าที่เป็นตัวคะตะลิสต์ในการกระบวนการคอนจูเกตของกลูต้าไธโอนกับสารประกอบเชิงซ้อนที่เป็นพิษต่อเซลล์ เช่น พวกสารประกอบ electrophilic ตลอดจนสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ช่วยให้ความเป็นพิษในเซลล์น้อยลง เชื่อว่ายีน GSTP1 มีความสำคัญต่อการปกป้องเซลล์ระหว่างกระบวนการเกิดมะเร็ง [9,10,11]

มีการพูดถึงยีนกลูต้าไธโอนเอสทรานเฟอเรส ชนิด pi1(GSTP1) ว่ามีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งชนิดต่างๆ เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งตับ มะเร็งคอและทางเดินอาหาร และมะเร็งเต้านม[4,8] โดยปกติในเซลล์เยื่อบุบริเวณเต้านม (normal epithelium breast cell) จะมีการแสดงออกของยีน GSTP1 และจากการศึกษาพบว่าร้อยละ 53 ของมะเร็งเต้านมไม่มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวเมื่อมีสารพิษเกิดขึ้นในเซลล์ดีเอ็นเอของเซลล์เหล่านั้นจึงถูกทำลายได้ง่ายขึ้น ส่งผลต่อกระบวนการเกิดมะเร็ง [9] อย่างไรก็ตามมีรายงานความเกี่ยวข้องระหว่างการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งกับการต่อต้านการตอบสนองของยาเนื่องจากยีน GSTP1 ทำ

หน้าที่ช่วยในการกำจัดสารพิษออกจากเซลล์ การใช้ยาบางชนิดอาจถูกกำจัดออกเหมือนสารพิษ จึงไม่ได้ผลกับมะเร็งในกลุ่มนี้ [2]

การศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน GSTP1 ในมะเร็งเต้านมไม่พบความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคและการตอบสนองต่อยาในกลุ่ม Taxane โดยที่รายงานดังกล่าวใช้เทคนิค Methylation Specific PCR (MSP) [9] ในการศึกษาภาวะเมทิลเลชัน ในขณะที่มีงานวิจัยที่ศึกษาการแสดงออกเป็นโปรตีนด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry; IHC) ของยีนนี้ในมะเร็งเต้านมเช่นกันกลับพบความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคและการใช้ยากลุ่ม Taxane [2] จากความไม่ตรงกันของผลการศึกษาดังกล่าว ในปี 2007 จึงมีผู้วิจัยสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเมทิลเลชันและการแสดงออกเป็นโปรตีน พบว่าร้อยละ 12 ของตัวอย่าง พบ hypermethylation และมีการแสดงออกเป็นโปรตีน ซึ่งเป็นความไม่ตรงกันเชิงชีววิทยา [12] ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของกลุ่มผู้วิจัยจึงทำการศึกษาในทำนองเดียวกันโดยใช้เทคนิค MSP ในการศึกษาภาวะเมทิลเลชัน และ IHC ในการตรวจการแสดงออกของยีน GSTP1 ก็พบความไม่สอดคล้องกันในจำนวนที่ใกล้เคียงกันคือ ร้อยละ 12.5 [3] นอกจากนี้ก็มีการศึกษาทำนองนี้ในยีนชนิดอื่นๆก็พบกลุ่มตัวอย่างที่มีความไม่สอดคล้องในทำนองเดียวกัน [13] และยังเป็นปัญหาที่นักวิจัยพยายามหาคำตอบในปี 2012 มีการใช้เทคนิคการหาลำดับเบส หรือ Bisulfite sequencing เพื่อศึกษาลักษณะการเกิดเมทิลเลชันของยีน GSTP1 ในมะเร็งเต้านม พบว่าในแต่ละชนิดย่อยของมะเร็งเต้านมชนิดเฉพาะเนื้อเยื่อปกติของเต้านม มีลักษณะการเกิดเมทิลเลชันที่แต่ละตำแหน่ง CpG แตกต่างกันในแต่ละชนิดย่อยอย่างชัดเจน [4] ผู้วิจัยจึงให้ความสนใจกับตำแหน่ง CpG ที่จะเกิดเมทิลเลชัน

เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาเมทิลเลชันมีหลากหลาย เช่น เทคนิคที่อาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยการทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์ [14,15,16] เทคนิค Methylation Specific-PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยการทำปฏิกิริยากับไซโตซีนไบซัลไฟต์เพื่อเปลี่ยนเบสไซโตซีนให้กลายเป็นยูราซิล ส่วนเบสไซโตซีนที่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่จะไม่ถูกเปลี่ยน หลังจากที่ดีเอ็นเอผ่านปฏิกิริยาไบซัลไฟต์ไซโตซีนในลำดับเบสจะถูกเปลี่ยนจนกลายเป็นไทมีน ในขณะที่เบสไซโตซีนที่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่จะยังคงเป็นไซโตซีนในลำดับเบส [16-21] หลักการของเทคนิค MSP จะใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ในการออกแบบไพรเมอร์จะออกแบบไพรเมอร์ที่

ครอบคลุมตำแหน่งซีพีจีที่ต้องการศึกษา โดยที่หนึ่งคู่จะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในกรณีที่ไม่มีเมทิลเลชัน และอีกคู่จำเพาะกับการเกิดเมทิลเลชันในตำแหน่งเดียวกัน การตรวจภาวะเมทิลเลชันด้วยเทคนิคนี้จึงถูกจำกัดด้วยตำแหน่งซีพีจีที่ไพโรเมอร์มาจับเท่านั้นซึ่งความยาวของไพโรเมอร์ประมาณ 20 คู่เบส ก็จะครอบคลุมซีพีจีได้ประมาณ 3 ถึง 4 ตำแหน่งเท่านั้น และเป็นที่น่าสังเกตว่าในงานวิจัยที่ผ่านมาก็มักจะใช้ไพโรเมอร์ที่อ้างอิงจากแหล่งเดียวกันมาศึกษา [3,19,21] เทคนิค Bisulfite sequencing เป็นเทคนิคที่อาศัยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ผ่านการทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์(รายละเอียดจะกล่าวในหัวข้อถัดไป) จึงนับว่าเป็นเทคนิคที่ให้ความละเอียดสูงคือสามารถดูการเกิดเมทิลเลชันได้ทุกๆตำแหน่งของซีพีจี อีกทั้งยังสามารถกำหนดจำนวนตำแหน่งซีพีจีที่ต้องการศึกษาจากการออกแบบไพโรเมอร์ให้มีความยาวของลำดับเบสสูงๆได้ ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากเทคนิค Bisulfite sequencing จึงสามารถให้รายละเอียดได้ระดับเบสต่อเบส [4] สามารถดูการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่งต่างๆได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งถือเป็นการลดข้อจำกัดของวิธีอื่นๆ และข้อมูลในระดับเบสนี้ น่าจะมีประโยชน์ต่อการศึกษาได้มากขึ้น

การคัดเลือกและการออกแบบไพโรเมอร์สำหรับการทำพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยวิธีพีซีอาร์อย่างมีประสิทธิภาพต้องอาศัยปัจจัยที่เกี่ยวข้องที่สำคัญปัจจัยหนึ่งคือการคัดเลือกออกแบบไพโรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา หลักการสำคัญที่ต้องคำนึงถึงสองประการคือ ความจำเพาะของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (specificity of amplification)และประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (efficiency of amplification) ความจำเพาะของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอคำนึงถึงปรากฏการณ์ mispriming คือการที่มีความคลาดเคลื่อนของการจับเบสคู่สมระหว่างไพโรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA)ทำให้ผลิตภัณฑ์ของดีเอ็นเอที่ได้ไม่จำเพาะ และในบางครั้งทำให้ยากแก่การวิเคราะห์ผล ส่วนประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับทำให้ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนมีประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ตามที่คาดไว้ ดังนั้นการออกแบบไพโรเมอร์จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากโดยสิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงในการออกแบบไพโรเมอร์มีดังต่อไปนี้

1. การเลือกตำแหน่งของไพรเมอร์ ควรเลือกตำแหน่งของลำดับ nucleotide ที่อยู่ขนาบข้าง (flanking) ดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการทำการเพิ่มปริมาณโดยที่ไพรเมอร์ที่ออกแบบนี้จะมีลำดับของ nucleotide ที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อให้ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูง จึงควรหลีกเลี่ยงลำดับ nucleotide ที่สามารถจับกับเบสคู่สมภายในตำแหน่งที่ นอกเหนือจากตำแหน่งที่จับกับไพรเมอร์ (primer binding site) ของดีเอ็นเอต้นแบบ
2. ควรเลือกตำแหน่งที่ลำดับ nucleotide มีการกระจายแบบ random โดยหลีกเลี่ยงลำดับ nucleotide ที่มีการเรียงลำดับ nucleotide ที่มีการเรียงตัวซ้ำๆกัน เช่นการหลีกเลี่ยงการ เรียงลำดับที่ซ้ำกันของนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มพิวรีน (polypurines) เช่นการมีลำดับ G หรือ A ที่ซ้ำกัน หรือในกลุ่มไพริมิดีน (polypyrimidines) คือการมีลำดับของ CหรือTที่ซ้ำกัน ทั้งนี้ เนื่องจากการมีเบสซ้ำกันเช่นนี้อาจทำให้ไพรเมอร์มีการจับกับเบสคู่สมบนดีเอ็นเอต้นแบบ ที่คลาดเคลื่อนได้
3. ลำดับ nucleotide ของไพรเมอร์ที่มีปลายทางด้าน 3' ควรเลือก nucleotide ที่มี G หรือ C ทั้งนี้เนื่องจากการจับกับเบสคู่สมของ G/C มีพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ที่ แข็งแรงกว่าการจับกันของ A/T ซึ่งจะทำให้การจับกันระหว่างไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง primer binding site ของดีเอ็นเอต้นแบบในกระบวนการannealing มีความจำเพาะและถูกต้อง มากยิ่งขึ้น
4. ขนาดของไพรเมอร์ควรมีความยาวประมาณ 18 ถึง 30 nucleotide และมีปริมาณและ สัดส่วนของ G และ C (GC content) อยู่ระหว่างร้อยละ 35 ถึง 65 โดยส่วนใหญ่นิยมให้มี ปริมาณ GC ที่ใกล้เคียงร้อยละ 50
5. ไพรเมอร์ที่เหมาะสมควรมี melting temperature (Tm) ของแต่ละไพรเมอร์ที่ใกล้เคียงกัน กับ 50 องศาเซลเซียส (โดยเฉลี่ยประมาณ40ถึง60องศาเซลเซียส) โดยเฉลี่ยแล้ว oligonucleotide ที่มีขนาดความยาว 23 nucleotide และมีปริมาณ GC ร้อยละ 50 จะมี ค่า Tm อยู่ในช่วง 52-62 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นค่าที่ทำปฏิกิริยาได้ดีในกระบวนการ annealing นอกจากนี้ค่า GC content และค่า Tm ของแต่ละไพรเมอร์ที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซี อาร์ ควรมีค่าที่ใกล้เคียงกัน โดยค่า Tm ของแต่ละไพรเมอร์จะมีผลต่อการจับกันของเบสคู่ สมระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบในกระบวนการ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ค่า

T_m ของไพรเมอร์แต่ละคู่ในปฏิกิริยาไม่ควรต่างกันเกิน 2-3 องศาเซลเซียสในกรณีที่มีค่า T_m ที่ต่างกันมากเกินไปจะทำให้ไพรเมอร์ที่มีค่า T_m สูงกว่ามีความจำเพาะต่ำในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีอุณหภูมิในกระบวนการ annealing ต่ำ สำหรับไพรเมอร์ที่มีค่า T_m ต่ำกว่าจะไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างมีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีอุณหภูมิในกระบวนการ annealing สูง ค่า T_m คำนวณได้จากการนับจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เป็น A และ T รวมกันแล้วคูณด้วย 2 และจำนวน G และ C รวมกันคูณด้วย 4 จากนั้นนำผลลัพธ์ที่ได้ทั้งสองมารวมกันได้เป็นค่า T_m ($T_m=2(A+T)+4(C+G)$)

6. ควรหลีกเลี่ยงการออกแบบไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลายด้าน 3' หรือบริเวณใด ๆ ของแต่ละไพรเมอร์ที่เป็นเบสคู่สมกัน เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด primer dimer ซึ่งเกิดจากลำดับเบสที่เป็นเบสคู่สมกันของภายในแต่ละไพรเมอร์มาจับกันเอง หรือการจับกันระหว่างไพรเมอร์ (cross dimer) ซึ่งการเกิด dimer จะทำให้มีการเพิ่มปริมาณของ primer ทั้งคู่จับกันเองแทนที่จะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ นอกจากนี้ในการออกแบบไพรเมอร์ยังควรหลีกเลี่ยงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกันภายในไพรเมอร์เดียวกัน (palindromic sequence) เพราะจะทำให้เกิดการจับกันเองของเบสคู่สมภายในไพรเมอร์

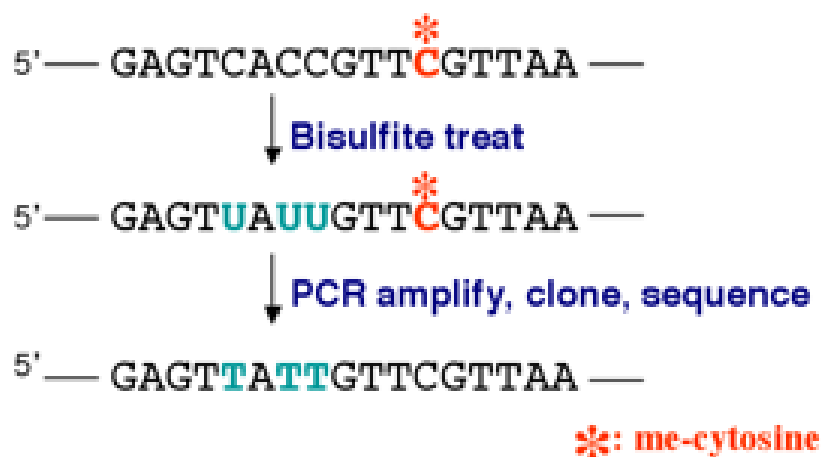
การออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

การออกแบบไพรเมอร์จำเป็นต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆตามหลักเกณฑ์การเลือกและการออกแบบไพรเมอร์ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ปัจจุบันนี้จึงนิยมออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรมการออกแบบไพรเมอร์ทางคอมพิวเตอร์กันมาก โปรแกรมเหล่านี้สามารถช่วยอำนวยความสะดวกและลดเวลาในการออกแบบและคัดเลือกไพรเมอร์ได้อย่างมาก นอกจากนี้ยังเพิ่มความถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

หลักการของเทคนิค Bisulfite direct sequencing

การทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์

เทคนิคไบซัลไฟต์เป็นเทคนิคที่อาศัยการทำปฏิกิริยาด้วยโซเดียมไบซัลไฟต์เป็นตัวบ่งบอกการเกิดเมทิลเลชันดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นการเติมหมู่เมทิลลงไปที่คาร์บอนตำแหน่งที่5 ของไซโตซีนการทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอด้วยโซเดียมไบซัลไฟต์เป็นการเปลี่ยนไซโตซีน (cytosine) ไปเป็นยูราซิล (uracil), ในขณะที่ 5-methylcytosine จะไม่ถูกเปลี่ยนจะยังคงเป็นไซโตซีน (cytosine) ปฏิกิริยาไบซัลไฟต์จึงเป็นปฏิกิริยาที่ใช้ศึกษาการเกิดเมทิลเลชัน (methylation status)



ภาพที่ 5 แสดงการทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์บนลำดับเบสของดีเอ็นเอ (ภาพจาก

<http://alphabiolab.com/page2/page2.html>)

DNA sequencing

ในการศึกษายีนนั้น การหาลำดับเบสของสาย DNA นั้นๆ มีความสำคัญและเป็นประโยชน์มาก เช่น ทำให้รู้ว่า ยีนนั้นเป็นยีนอะไร หรือมีความผิดปกติอย่างไร หรือเพื่อที่จะเปรียบเทียบลำดับของเบสของ DNA สายนั้นในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน เป็นต้น

เทคนิคในการหา DNA sequence นั้นมีการพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี 1970 โดยมี 2 วิธีด้วยกัน คือ

วิธีที่หนึ่งพัฒนาขึ้นโดย Allan Maxam และ Walter Gilbert โดยใช้สารเคมีตัดสาย DNA ที่ตำแหน่งต่างๆกันวิธีนี้เรียกว่า Maxam-Gilbert sequencing ส่วนอีกวิธีหนึ่งนั้นเรียกว่า

dideoxy sequencing หรือ Sanger sequencing ซึ่งพัฒนาขึ้นมาโดย Fred Sanger โดยวิธีการใช้ enzyme มาต่อสาย DNA จาก primer ในปัจจุบันวิธี dideoxy เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด และในงานวิจัยนี้ใช้วิธีนี้วิธีการหาลำดับเบสนั้นได้รับการพัฒนามาตลอดจนปัจจุบันนี้สามารถทำได้ง่ายและไม่ซับซ้อนยุ่งยากนักการหาลำดับเบสนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษา ยีนต่างๆทั้งในคนสัตว์และพืชโดยในคน human genome project เป็นโครงการที่จะศึกษาลำดับเบสทั้งหมดของคนซึ่งได้เริ่มและดำเนินการติดต่อกันมาหลายปีแล้ว

วิธีการหาลำดับเบสแบบ Maxam-Gilbert DNA Sequencing

เป็นวิธีการที่ใช้ปฏิกิริยาทางเคมีที่จะตัดสาย DNA ที่ตำแหน่งจำเพาะโดยที่สำคัญ DNA ที่เราจะนำมาทำการหาลำดับเบสนั้นจะต้องเป็น DNA ชนิดเดียวกันและมีขนาดประมาณ 200-1000 bp ในตัวอย่างนี้จะทำการหาลำดับเบสของสาย DNA ขนาด 10 bp

ขั้นตอนต่างๆ ในการหาลำดับ nucleotide โดยวิธี Maxam-Gilbert มีดังนี้คือ
 ขั้นที่ 1 ติดฉลากสาย DNA ด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (P^{32}) โดยแต่ละ strand ของ double-stranded DNA จะถูกติดฉลากที่ปลาย 5' หรือ 3' จากนั้น DNA นั้นจะถูกนำมา denature ให้เป็น single strand โดยที่ในแต่ละ strand จะถูกติดฉลากที่ปลายข้างหนึ่งข้างใดเท่านั้น

ขั้นที่ 2 การตัดสาย DNA

โดยในขณะนี้สาย DNA จะมีลักษณะเป็น $^{32}P5'$ _ _ _ _ _ $3'$

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

DNA จะถูกแบ่งเป็น 4 ส่วนแต่ละส่วนจะถูกนำมาทำปฏิกิริยาเคมีที่ต่างกันโดยจะทำการตัดสาย DNA นั้นที่ตำแหน่งของ base 1 ใน 4 นั้นๆเช่นในส่วนที่ 1 จะถูกนำไปทำปฏิกิริยาทางเคมีโดยจะตัดที่ตำแหน่งที่มี base เป็น T หรือ C เท่านั้นสำหรับส่วนที่กำหนดให้ตัดที่ตำแหน่ง G นั้นจะตัดที่ตำแหน่ง A ด้วยแต่จะตัดที่ตำแหน่งที่เป็น G มากกว่าในทำนองเดียวกันส่วนที่ถูกกำหนดให้ตัดที่ตำแหน่ง A จะตัดที่ G ด้วยแต่จะตัดที่ตำแหน่ง A มากกว่า

ขั้นที่ 3 เป็นการแยกขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทางเคมีตามขั้นตอนที่ 2 DNA ที่ได้จะถูกนำมาแยกขนาดตามความยาวของเบสโดยใช้วิธี polyacrylamide gel electrophoresis (เหมือนกับ agarose gel electrophoresis เพียงแต่ว่า polyacrylamide gel สามารถที่จะใช้แยกขนาดของ DNA ที่ต่างกันเพียงแค่ 1 bp ได้)

วิธีการหาลำดับเบสแบบ Dideoxy (Sanger DNA sequencing)

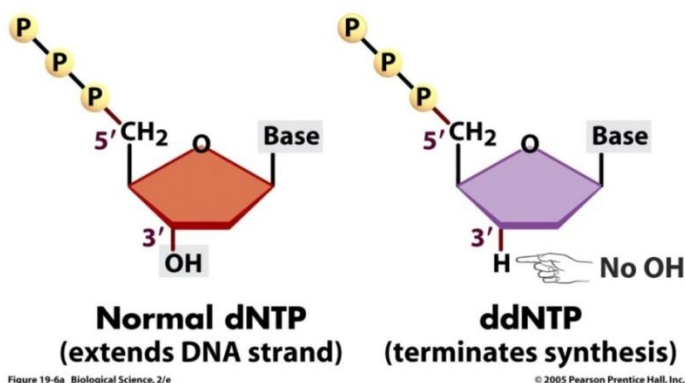
เช่นเดียวกับ Maxam-Gilbert sequencing โดยที่การหาลำดับเบสด้วยวิธีนี้ต้องการ DNA ที่เป็นชนิดเดียวกันซึ่งเป็น DNA สายคู่ที่จะถูก denature ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อนและ oligonucleotide สายสั้นๆซึ่ง complementary กับ DNA ส่วนที่ใกล้เคียงกับลำดับเบสที่เราต้องการทราบ (sequencing primer) โดยที่จะ anneal กับสาย DNA สายเดี่ยวเท่านั้น

Oligonucleotide primer จะถูกออกแบบให้ด้าน 3' อยู่ใกล้กับส่วนของ DNA ที่เราต้องการทราบลำดับของเบสโดย oligonucleotide นี้จะทำหน้าที่เป็น primer เพื่อให้มีการสังเคราะห์ DNA สายที่ complementary กับ DNA template ต่อไป

จากนั้น DNA ที่ anneal กับ oligonucleotide primer แล้ว (เราเรียก DNA ที่ต้องการจะหาลำดับเบสนี้ว่าเป็น template หรือ DNA template) จะถูกแบ่งเป็น 4 ส่วนแต่ละส่วนจะมี normal precursors ของ DNA เช่น dATP, dTTP, dCTP, dGTP และ DNA polymerase และตัว precursor นี้จะถูกติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (^{32}P)หรือสารเรืองแสงเพื่อที่จะสามารถตรวจสอบสาย DNA ที่สร้างใหม่ใน DNA แต่ละส่วนนั้นจะต่างกันที่จะใช้ modified nucleotide คือ dideoxy nucleotide ต่างชนิดกัน dideoxy nucleotide กับ deoxynucleotide นั้นจะต่างกันที่ dideoxy nucleotide มี 3'-H ที่ deoxyribose sugar แทนที่ 3'-OH ถ้าเราใช้ dideoxy nucleotide ในขบวนการสังเคราะห์ DNA dideoxy จะเข้าไปในสาย DNA ที่กำลังสังเคราะห์อยู่ได้แต่สาย DNA นั้นจะไม่สามารถที่จะสังเคราะห์ให้มีความยาวต่อไปได้อีกการสังเคราะห์ DNA สายนั้นก็จะหยุดเพราะเหตุว่าการที่ไม่มี 3'-OH จะป้องกันการเกิด phosphodiester bond กับ 5'P ของ DNA precursor ตัวที่จะเข้ามาใหม่ sequencing reaction แต่ละส่วนจะมี ddATP หรือ ddCTP หรือ ddTTP หรือ ddGTP อย่างใดอย่างหนึ่งร่วมกับมี normal precursor ทั้ง 4 ชนิดคือ

dATP dTTP dCTP และ dGTP ในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่จะมีการใช้ทั้ง dd NTP และ d NTP แบบสุ่มตัวอย่างแต่โดยทั่วไป dideoxy จะมีปริมาณ 1 ใน 100 ของ normal precursors ดังนั้นส่วนใหญ่ก็จะมีการใช้ deoxynucleotide เหมือนเช่นการสังเคราะห์ DNA ตามปกติซึ่ง primer ก็จะถูกต่อโดย DNA polymerase โดยมีลำดับเบสที่ complementary กับ template ถ้า dideoxynucleotide ถูก incorporate เข้าไปในสาย DNA ที่กำลังสร้างอยู่การสร้าง DNA สายนั้นก็ จะหยุดลงไม่สามารถสร้างต่อไปได้อีกส่วนสายที่มี deoxynucleotide incorporate เข้าไปก็ สามารถสังเคราะห์ไปได้เรื่อยๆจนกว่าจะ incorporate dideoxynucleotide เข้าไป

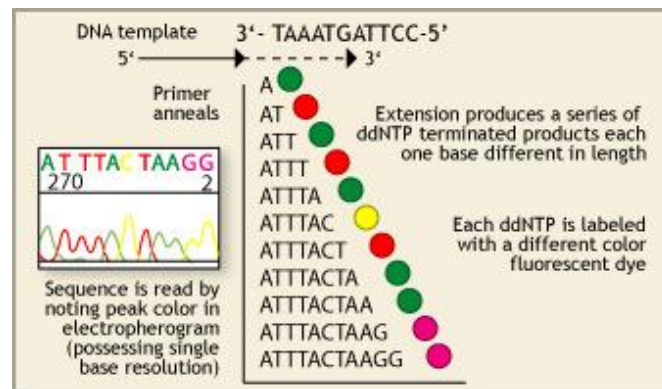
ddNTPs terminate DNA synthesis.



ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ dNTP และ ddNTP (ภาพจาก

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/techniques.htm>)

ดังนั้น DNA สายใหม่ที่กำลังสร้างอาจจะหยุดได้ทุกตำแหน่งที่มีการ incorporate dideoxynucleotide เข้าไปเช่นใน ddA reaction สายใหม่ขนาดต่างๆที่ถูกสร้างเหล่านี้จะมีปลายสุดทำเป็น ddA เสมอในขณะเดียวกัน ddG ddC ddT reaction ก็จะมี DNA สายใหม่ที่มีเบสสุดท้ายเป็น ddG, ddC และ ddT ทั้งสิ้นจากนั้นสาย DNA จะถูกนำมาแยกขนาดโดย polyacrylamide gel electrophoresis แล้วไปวิเคราะห์ตามแต่ละเทคนิค



ภาพที่ 7 แสดงการเกิดปฏิกิริยาการหาลำดับเบส แบบ dideoxy (ภาพจาก

http://www.nfstc.org/pdi/Subject09/pdi_s09_m02_01_f.htm)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive study)

ประชากรศึกษา

ประชากรศึกษาครั้งนี้เป็นการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างขึ้นเนื้อมะเร็งเต้านมที่เก็บไว้ในรูปเนื้อสดแช่แข็งที่มีผลการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยแอนติบอดี GST-pi1 จากการศึกษาที่ผ่านมา [3] ซึ่งขึ้นเนื้อทั้งหมดถูกเก็บไว้ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ฝ่ายพยาธิวิทยาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย) ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2553-2554 ตัวอย่างทั้งหมดถูกวินิจฉัยและคัดเลือกเข้าสู่การศึกษาโดยพยาธิแพทย์

โดยที่ตัวอย่างจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะการติดสียับยั้งอนุมูลอิสระโดยแอนติบอดี

- กลุ่มที่ 1 อนุมูลอิสระโดยแอนติบอดีให้ผลบวก คือ ติดสีเข้มชัดเจนทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมของเซลล์
- กลุ่มที่ 2 อนุมูลอิสระโดยแอนติบอดีให้ผลลบ คือ ทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมไม่ติดสีอย่างชัดเจน
- กลุ่มที่ 3 อนุมูลอิสระโดยแอนติบอดีให้ผลไม่ชัดเจน

ประเด็นทางจริยธรรม

การศึกษานี้เป็นการศึกษาจากชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านม โดยที่จะไม่มีการเปิดเผยข้อมูลความลับหรือเชื่อมโยงไปถึงข้อมูลส่วนบุคคลของผู้ป่วย และไม่มีผลใดๆ ต่อการดูแลรักษาของผู้ป่วย

โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Faculty of Medicine, Chulalongkorn University Ethics Committee) แล้ว รหัส IRB No.436/55

เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย

1. Pipette 2.5, 10, 20, 100, 200, 1000 μ l (Eppendorf, Germany)
2. Pipette tip 10, 20, 100, 200, 1000 μ l (Axygen, USA)
3. Centrifuge
4. Vortex mixture
5. PCR chamber
6. Thermal cycler (Applied Biosystem, USA)
7. Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo scientific, USA)
8. Power supply (Biored, USA)
9. Strom phosphoimager (Molecular Dynamics, UK)
10. Computer (with ImageQuant software, Molecular Dynamics, UK)
11. 4 $^{\circ}$ C Refrigerator
12. -20 $^{\circ}$ C Freezer
13. -80 $^{\circ}$ C Freezer
14. Autoclave
15. Septa 96-well plate
16. Automate Genetic Analyzer 3130 (ABI, USA)

สารเคมีและชุดทดลองที่ใช้ในงานวิจัย

แบ่งเป็นหมวดหมู่ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA

1. Lysis buffer
2. 10% SDS
3. Prteinase K

4. Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol mixture 25:24:1
5. Chloroform – isoamyl alcohol mixture 49:1
6. 2-Propanol
7. 3M Sodium acetate buffer solution pH 5.2
8. 70% ethanol
9. Tris-EDTA buffer solution pH 8.0

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับโซเดียมไบซัลไฟต์

1. EZ DNA methylation gold kit (Zymo Research, USA)
2. Deionized water

3. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

1. 10X buffer gold (Applied Biosystem, USA)
2. $MgCl_2$ solution (Applied Biosystem, USA)
3. dNTPs (Applied Biosystem, USA)
4. GSTP1 forward primer (Pacific science, Thailand)
5. GSTP1 reverse primer (Pacific science, Thailand)
6. AmpliTaq gold DNA polymerase (Applied Biosystem, USA)
7. Water

4. สารเคมีที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis

1. 5x Tris-EDTA
2. 40% Acrylamide-bis acrylamide

3. 10% Ammoniumpersulfate
4. Tetramethylethelenediammine
5. Gel star nucleic acid stain (Cambrex bioscience, USA)
6. Water

5. สารเคมีที่ใช้ในการทำ sequencing reaction และ capillary electrophoresis

1. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, USA)
2. 5x Sequencing buffer (Applied Biosystems, USA)
3. Primer 0.8 pmol/μl
4. ExoSAP™ (GE Healthcare, UK)
5. 3 M NaOAc, pH4.6
6. 95% Ethanol
7. 70% Ethanol
8. HiDi formamide (Applied Biosystems, USA)
9. POP™ Polymer (Applied Biosystems, USA)

วิธีดำเนินงานวิจัย

วิธีการดำเนินงานวิจัยจะถูกแบ่งออกเป็นขั้นตอนของการเก็บตัวอย่างและขั้นตอนของการศึกษาทางโมเลกุล (การหาลำดับเบส) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

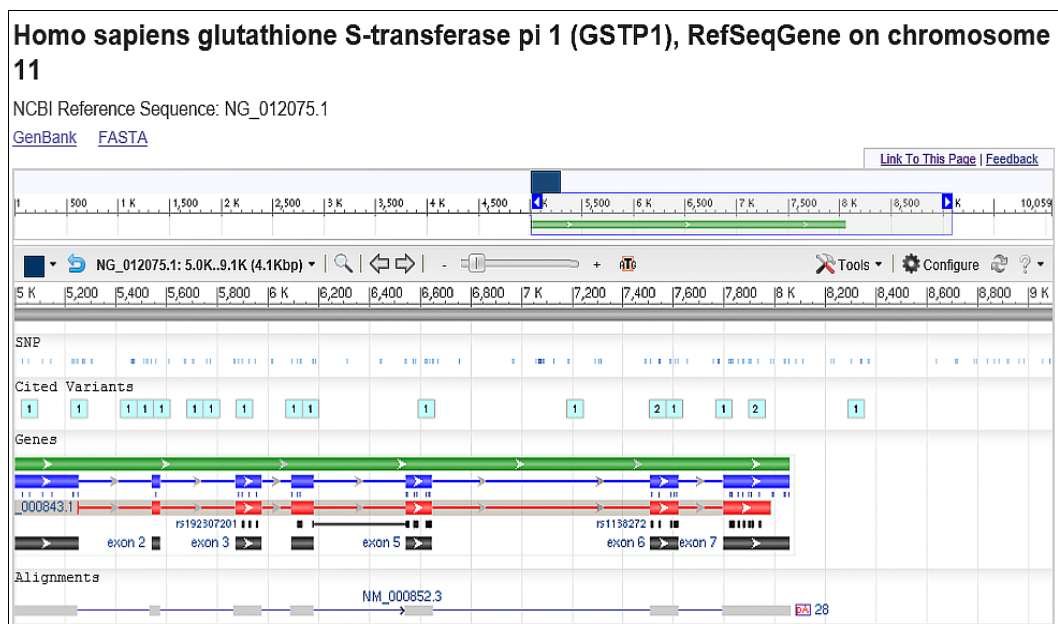
1. เก็บตัวอย่างโดยจะเก็บสองรูปแบบด้วยกันคือรูปแบบของเนื้อสดแช่แข็งและรูปแบบของเนื้อเยื่อฝังในพาราฟินบล็อกจากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยตั้งแต่พ.ศ. 2553-2554 จำนวน 52 ราย
2. ตัวอย่างรูปแบบของเนื้อสดจะถูกเก็บที่ -80°C เพื่อที่จะนำไปสกัดดีเอ็นเอ

- ตัวอย่างรูปแบบของพาราฟินบล็อกที่พยาธิแพทย์คัดเลือกสไลด์ที่ทำการย้อม H&E เรียบร้อยแล้วจะนำพาราฟินบล็อกไปตัดด้วย microtome ขนาด 2 ไมครอนเพื่อที่จะนำไปย้อมด้วยเทคนิค IHC เพื่อดูการแสดงออกเป็นโปรตีนของยีน GSTP1 [3]

ขั้นตอนของการศึกษาทางโมเลกุลหรือการหาลำดับเบสแบ่งออกเป็นขั้นตอนๆดังต่อไปนี้

1. การสืบค้นลำดับเบสของดีเอ็นเอ

ทำการสืบค้นลำดับดีเอ็นเอของยีนกลูต้าไธโอนเอสทรานเฟอรัส (Glutathione S-transferase; GSTP1) ของมนุษย์ ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 (11q13) จากเว็บไซต์ www.ncbi.nlm.nih.gov พบว่าลำดับเบสมีความยาว 10059 คู่เบส ประกอบด้วย 7 exon เริ่มตั้งแต่ตำแหน่งที่ 5001-8059 ส่วนตำแหน่งที่ผู้วิจัยสนใจคือ ตำแหน่งโปรโมเตอร์ตั้งอยู่ ลำดับเบสที่ 1-5000 รายละเอียดแสดงดังภาพ



ภาพที่ 8 แสดงข้อมูลของยีนกลูต้าไธโอนเอสทรานเฟอรัสชนิด พี1 จาก

www.ncbi.nlm.nih.gov

2. การออกแบบไพรเมอร์

ใช้โปรแกรม Methyl Primer Express Software™ (Applied Biosystem, USA) โดย
ขั้นตอนในการออกแบบเริ่มจาก

1. ใ้ลำดับเบสของยีน GSTP1 ที่ได้จากการสืบค้นลงในโปรแกรม
2. เลือกบริเวณของยีนที่สนใจ กำหนดข้อมูลที่สำคัญของยีน เช่น ตำแหน่ง
Transcription Start Site
3. เลือกชนิดของเทคนิคที่จะนำไพรเมอร์ไปใช้งาน
4. โปรแกรมจะทำการค้นหาตำแหน่ง CpG จากลำดับเบสที่ใส่ลงไป แล้วทำการ
ประมวลผลให้ไพรเมอร์ที่ครอบคลุมตำแหน่งที่เราสนใจ

จากโปรแกรมจะได้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ที่ครอบคลุมตำแหน่งโปรโมเตอร์แสดงใน
ภาคผนวกและแนะนำไพรเมอร์คู่ที่ดีที่สุดสำหรับยีนที่เราศึกษาพร้อมทั้งแสดงผลลักษณะพีซีอาร์
จากไพรเมอร์ในแต่ละคู่ส่วนไพรเมอร์คู่ที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้ได้แสดงดังตาราง

ตารางที่ 1 แสดงไพรเมอร์และคุณลักษณะของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับงานวิจัยนี้

Primer	Sequence	Length(bp)	Tm (°C)	Genomic position
Forward primer	5' ATTTGGGAAAGAGGGAAAGGT 3'	21	63.43	4998 - 5019
Reverse primer	5' AA ACTCTAAACCCCATCCCC 3'	20	62.65	5276 - 5296

ดีเอ็นเอที่ผ่านปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์คู่ดังกล่าวแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์
ที่มีความยาว 298 คู่เบส และประกอบด้วยตำแหน่งซีพีจี 38 ตำแหน่ง ดังแสดงในภาพที่ 9

PCR PRODUCT

5'

ATTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTGGTTAGTTGYGGYGATTYGGGGATTTAGGGYTTTTTTTGYGGTYG
 AYGTTYGGGGGTAGYGGTYGTYGGGGTTGGGGTYGGYGGGAGTTYGYGGGATTTTTAGAGAGYGGTYGGYGYG
 TGATTTAGTATTGGGGYGGAGYGGGGYGGGATTATTTTTATAAGGTTYGGAGGTYGYGAGGTTTTYGTGGAGTTY
 GTYGYGTAGTTTTYGTATTAGTGAGTAYGYGGTTYGYTTTTYGGGGATGGGGTTTAGAGTTT 3'

Length: 298 bp. %CGs=53.02

ภาพที่ 9 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไพรมอร์หลังการทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์ โดยที่ A แทน เบสอะดีนีนในลำดับดีเอ็นเอ T แทน เบสไทมีนในลำดับดีเอ็นเอ G แทน เบสกวานีนในลำดับดีเอ็นเอ และ Y แทนเบสไซโตซีนที่อยู่ในตำแหน่งซีพีจีซึ่งก็คือตำแหน่งซีพีจีที่เราศึกษานั้นเอง

3. การทดสอบไพรมอร์

เนื่องจากไพรมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ถูกสร้างขึ้นเป็นครั้งแรก ดังนั้นจำเป็นต้องมีขั้นตอนการทดสอบเพื่อหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยการปรับอุณหภูมิ annealing ตาม Tm ของไพรมอร์ เลือกทดสอบที่ 62 63 64 และ 65 องศาเซลเซียสพบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิที่ 64 และ 65 องศาเซลเซียสเท่านั้น ในขณะที่อุณหภูมิ annealing อื่นๆไม่เกิดปฏิกิริยา จากผลการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) ที่อุณหภูมิ 64 และ 65 องศาเซลเซียสให้ลักษณะของแบน (Band) ที่เกิดขึ้นทั้งความเข้มและความคมชัดไม่ต่างกัน งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 64 องศาเซลเซียส

ดังนั้น อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสำหรับไพรมอร์คู่นี้ แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
<i>Stage I</i>		
	95	15
<i>Stage II</i>		
Denaturation	95	1
Annealing	64	1
Extension	72	1
<i>Stage III</i>		
Elongation	72	4
		X45 cycle

4. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานฟีนอลคลอโรฟอร์ม

- นำชิ้นเนื้อออกจากหลอด (ชิ้นเนื้อที่ถูกเก็บไว้จะมีขนาด 1X0.5x0.5 เซนติเมตร)
- ใช้มีดฆ่าเชื้อตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดเล็กๆ แล้วใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- เติม Lysis buffer ปริมาณ 400 ไมโครลิตร 10%SDS ปริมาณ 25ไมโครลิตรและ ProteinaseK ปริมาณ 20 ไมโครลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 50องศาเซลเซียสนาน 16-18 ชั่วโมง
- เติม Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol ปริมาณ 500 ไมโครลิตรนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex) แล้วปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที หลังจากนั้นดูดูสารละลายใสด้านบน (upper phase)ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ทำซ้ำอีก 1 รอบ)
- เติมสารละลาย Chloroform ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex) แล้วปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที หลังจากนั้นดูดูสารละลายใสด้านบน (upper phase) ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

6. เติม 2-Propanol ปริมาณ 320 ไมโครลิตร และ Sodium acetate ปริมาณ 80 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex) แล้วปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อ นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเทสารละลายใส่ที่อยู่ด้านบนบั้ง
7. เติม 70% เอทานอล ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex) แล้วปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทสารละลายที่อยู่ด้านบนบั้งเปิดฝาทิ้งไว้ประมาณ 15-20 นาทีเพื่อให้เอทานอลระเหย
8. เติม Tris-EDTA buffer solution ปริมาณ 30 ไมโครลิตร

5. การทำปฏิกิริยากับไซเตียมไบซัลไฟต์

ตัวอย่างดีเอ็นเอจะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับสารไซเตียมไบซัลไฟต์เพื่อเปลี่ยนเบสไซโทซีนในสายดีเอ็นเอให้กลายเป็นยูราซิลโดยใช้ชุด EZ DNA methylation gold kit ของบริษัท Zymo Research ประเทศสหรัฐอเมริกา มีขั้นตอนดังนี้

การเตรียม CT conversion reagent

1. เติมน้ำ (DW) 900 ไมโครลิตร + M-dilution buffer 300 ไมโครลิตร + M-dissolving buffer 50 ไมโครลิตรลงในหลอดของ CT conversion reagent
2. Mix โดยการ shake หรือ vortex 10 นาที

ข้อแนะนำ:

1. 1 หลอดของ CT conversion reagent ใช้กับตัวอย่างดีเอ็นเอ 10 ราย
2. ห้ามโดนแสง
3. เก็บที่อุณหภูมิห้องได้ 1 คีน, เก็บที่ 4 °C ได้ 1 สัปดาห์, เก็บที่ -20 °C ได้ 1 เดือน

การเตรียม M-wash buffer

เติม absolute alcohol 24 ml ลงใน M-wash buffer 6 ml

ขั้นตอนของ DNA bisulfite

1. เติม CT conversion reagent 130 ไมโครลิตรลงในตัวอย่างดีเอ็นเอ 20 ไมโครลิตรใน PCR tube ผสมโดย pipetting up and down และนำมาปั่นเหวี่ยง ตั้งโปรแกรม 98 °C 10 นาที แล้ว 64 °C 2.5 ชั่วโมง
(เก็บสารที่ 4 °C ได้ไม่เกิน 20 ชั่วโมง)
2. เติม M-Binding Buffer 600 ไมโครลิตรลงบน Zymo-spin™ IC column และวาง column ลงใน Collection Tube
3. ใส่ตัวอย่างลงบน Zymo-spin™ IC column ซึ่งประกอบด้วย M-Binding Buffer หลังจากนั้นปิดฝาและกลับหลอดตัวอย่างไปมาหลายครั้ง
4. ทำการปั่นตัวอย่างที่ความเร็ว ($\geq 10000 \times g$) 30 วินาทีและเททิ้งส่วนที่เป็นของเหลว
5. เติม M-Wash Buffer 100 ไมโครลิตรลงบน column และทำการปั่น 30 วินาที
6. เติม M-desulphonation Buffer 200 ไมโครลิตรลงบน column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-20 นาทีและปั่น 30 วินาที
7. เติม M-Wash Buffer 200 ไมโครลิตรลงบน column และปั่น 30 วินาที
8. เติม M-Wash Buffer 200 ไมโครลิตรลงบน column และปั่น 30 วินาที
9. ใส่ column ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube เติม M-Elution Buffer 10 ไมโครลิตร
10. ทำการปั่น 30 วินาทีเพื่อล้างดีเอ็นเอลงสู่ microcentrifuge tube
11. ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

6. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

1. เตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยาดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

สาร	ปริมาณสารต่อหนึ่งตัวอย่าง (μl)
10x buffer solution	3
MgCl ₂ 25 mM	2.4
dNTPs	0.6
Forward primer	0.3
Reverse primer	0.3
AmpliTaq Gold 5U/μl	0.3
Deionized water	21.1
DNA template (5ng/μl)	2
Final volume	30

2. นำสารละลายที่เตรียมไว้ไปทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง PCR Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA) ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 4 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
<i>Step I</i>		
	95	15
<i>Step II</i>		
Denaturation	95	1
Annealing	64	1
Extension	72	1
<i>Step III</i>		
Elongation	72	4
		X45 cycles

3. หลังจากทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้ว จำเป็นต้องยืนยันผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) ในทุกรายผลิตภัณฑ์ที่ได้ จะต้องมีความยาว 298 คู่เบส ยืนยันผลโดยใช้ DNA Ladder เป็นตัวเปรียบเทียบ

7. การทำปฏิกิริยาการหาลำดับเบส

การทำปฏิกิริยาการหาลำดับเบสประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

7.1 การ purified PCR product

ก่อนที่ดีเอ็นเอจะเข้าสู่ปฏิกิริยาการหาลำดับเบส จะต้องผ่านขั้นตอนการ purified PCR product ด้วยเอนไซม์ Exonuclease ด้วยชุดน้ำยา ExoSAP™ โดยการ

1. เติม ExoSAP™ 2 ไมโครลิตรและ ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรลงในหลอดพีซีอาร์
2. วางในเครื่อง Thermo Cycler โดยตั้งอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
3. เก็บตัวอย่างที่ 4 องศาเซลเซียส

7.2 การทำปฏิกิริยาการหาลำดับเบส

1. วัดปริมาณดีเอ็นเอหลังจากขั้นตอนการ purified ดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ NanoDrop 2000c ThermoScientific แล้วปรับความเข้มข้นจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40 ng/μl
2. เตรียมสารเคมีสำหรับปฏิกิริยาการหาลำดับเบสลงในหลอดพีซีอาร์ ปริมาณต่อหนึ่งตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิบัติการหาลำดับเบส

สาร	ปริมาณสารต่อหนึ่งตัวอย่าง (µl)
BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Cycle kit	1
Reverse primer (0.8 pmol/µl)	4
DNA Template (40ng/µl)	2
5X Sequencing buffer	2
Deionized water	1
Final volume	10

3. หลังจากเตรียมสารเคมีเรียบร้อยแล้ว นำหลอดพีซีอาร์เข้าเครื่อง Thermo cycler โดยกำหนดโปรแกรม ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนในปฏิบัติการหาลำดับเบส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา(วินาที)
ขั้นที่ 1	95	60
ขั้นที่ 2 (x25 รอบ)	96	10
	50	5
	60	240
ขั้นที่ 3	60	240

หลังจากทำปฏิกิริยาเสร็จ ควรเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และควรระวังไม่ให้โดนแสงแดด

8. การตรวจลำดับเบสด้วยวิธี Capillary electrophoresis

8.1 ขั้นตอนการ Purified sequencing product

1. นำสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาการหาลำดับเบสจากหลอดพีซีอาร์ ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำ 7.25 ไมโครลิตรเอทานอล 31.25 ไมโครลิตรและ 3M Sodium acetate, pH 4.6 1.5 ไมโครลิตรปิดฝา แล้วเขย่าด้วยเครื่อง vortex
3. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
4. นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาที นาน 20 นาที
5. ค่อยๆ ใช้ปิเปตดูดส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง
6. เติม 70% เอทานอล 250 ไมโครลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าด้วยเครื่อง vortex
7. นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาที นาน 10 นาที
8. ค่อยๆ ใช้ปิเปตดูดส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง ส่วนที่เหลือนำหลอดไปวางที่ อุณหภูมิ 90°C นาน 1 นาที
9. เติมสารละลาย HiDi Formamide 10 ไมโครลิตรลงในหลอด ดูดสารละลายขึ้น-ลงเพื่อให้ ดีเอ็นเอละลายลงในสารละลาย
10. ดูดสารละลายลงใน 96 well-plate เพื่อเตรียมนำเข้าเครื่องวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอต่อไป

8.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง Automated sequencer ABI 3130

1. ทำการติดตั้ง POP-7 polymer ลงในเครื่อง Automate Genetic analyzer ABI 3130
2. เปิดโปรแกรม ที่คอมพิวเตอร์ ทำการกำหนดจำนวนตัวอย่าง เลือกโปรแกรมที่จะทำการตรวจวิเคราะห์ โดยที่ เครื่องจะทำการวิเคราะห์ได้ครั้งละ 4 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงควรใส่ตัวอย่างจำนวนที่เป็นเลขคู่ของ 4 (8,12,16 เป็นต้น)

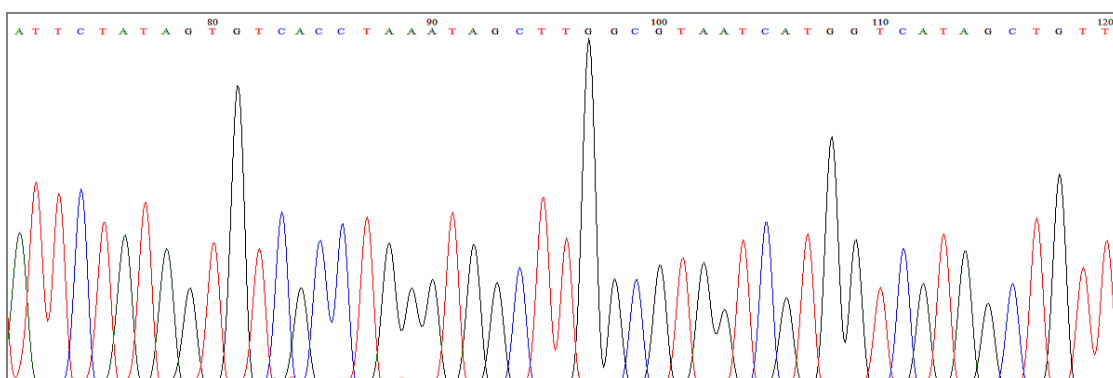
การบันทึกข้อมูล

สำหรับวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

สไลด์อิมมูโนฮิสโตเคมีนำมาทำการถ่ายภาพเซลล์ด้วยโปรแกรม Imagescope เลือกรูปภาพที่เป็นเซลล์มะเร็ง จำนวน 400 เซลล์ นับจำนวนเซลล์มะเร็งที่ให้ผลอิมมูโนฮิสโตเคมีเป็นบวก แล้วบันทึกเป็นร้อยละของเซลล์มะเร็งเต็มพื้นที่ให้ผลบวก

สำหรับวิธีการหาลำดับเบส

ผลการหาลำดับเบสจะแสดงเป็นภาพ electrophorogram โดยที่เบสไซโตซีนแสดงด้วยรูปกราฟสีน้ำเงินเบสกวานีนแสดงด้วยรูปกราฟสีดำเบสไทมีนแสดงด้วยรูปกราฟสีแดงและเบสอะดีนีนแสดงด้วยรูปกราฟสีเขียว ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แสดงรูป Electrophorogram ของลำดับเบสที่ได้จากการตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติ

การตรวจสอบข้อมูลและการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

การวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม Bioedit

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากปฏิกิริยาการหาลำดับเบส โดยการนำลำดับเบสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยคำสั่ง ClustalW Multiple alignment เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลกับข้อมูลของลำดับเบสเริ่มต้นของยีน GSTP1

จากภาพที่ 11 แสดงการวิเคราะห์ผลการหาลำดับเบสจำนวน 1 ตัวอย่าง บรรทัดบนของแต่
 ละแถวแสดงลำดับเบสปกติที่ได้จากปฏิกิริยาไบซัลไฟต์และปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยที่ตัวอักษร Y
 แสดงตำแหน่งของไซโตซีนในตำแหน่งซีพีจีที่สามารถเกิดเมทิลเลชันได้ บรรทัดล่างแทนลำดับ
 เบสของดีเอ็นเอที่จากการทำปฏิกิริยาการหาลำดับเบส ถ้าหากในตำแหน่งซีพีจีลำดับเบสพบเป็น
 ไซโตซีน(C) นั่นคือเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่งนั้น ส่วนกรณีที่พบไทมีน(T) นั่นคือไม่เกิดเมทิลเลชันที่
 ตำแหน่งนั้น แสดงดังภาพ โดยสีเหลืองแสดงการเกิดเมทิลเลชัน สีเขียวไม่เกิดการเมทิลเลชัน ส่วน
 สีแดงพบทั้งเบสไซโตซีนและไทมีนในตำแหน่งนั้น

Alignment: D:\GSTP1 Sequencing\Gr.16-30\Align with PCR Product\18.txt

	5 15 25 35 45 55 65 75
PCR Produc	-ATTTGGGAA A-GAGGGAAA GGTTTTTYY- GGTTAGTTGY GYGGYGATTT YGGGGATTTT AGGGYGTITTT TTTGYGGTYG
18 reverse	TATTTGGGAA AAGAGGGAAA GGTTTTTYY GGTTAGTTGY GYGGKGGATTT YGGGGATTTT AGGGTGTITTT TTTGTGGTGG

	85 95 105 115 125 135 145 155
PCR Produc	AYGTTYGGGG TGTAGYGGTY GTYGGGGTTG GGGTYGGYGG GAGTTYGYGG GATTTTTTAG AAGAGYGGTY GGYGTYGTGA
18 reverse	ATGTTYGGGG TGTAGCGGT GTYGGGGTTG GGGTCGGTGG GAGTTCGCGG GATTTTTTAG AAGAGCGGTC GGCGTCGTGA

	165 175 185 195 205 215 225 235
PCR Produc	TTTAGTATTG GGGYGGAGYG GGGYGGGATT ATTTTATAA GGTTYGGAGG TYGYGAGGTT T-TYGTGGA GTTTYGT-YG
18 reverse	TTTAGTATTG GGGCGGAGCG GGGCGGGATT ATTTTATAA GGTTGAGGAG TCGCGAGGTT TATCKKTGRA GWKWSGTACR

	245 255 265 275 285 295 ...
PCR Produc	TYGTAGTTTT YGTTATTAGT GAGTAYGYGY GGGTYGYGTT TTYGGGGATG GGGTTTAGAG TTT
18 reverse	WSGTAKTTTC MSKTYWMTWK TWTGSSSSC -----

ภาพที่ 11 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม Bioedit โดยที่ Y ในบรรทัดบนแทนเบสไซ
 โตซีนในตำแหน่งซีพีจี ส่วนบรรทัดล่างแสดงเบสที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ C แทนเบสไซโตซีน T แทน
 เบสไทมีน และ Y แทนตำแหน่งที่พบทั้งเบสไซโตซีนและไทมีน

บทที่ 4

ผลการศึกษา

ก. ประชากรตัวอย่าง

ได้ศึกษาประชากรตัวอย่างจากผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดลุกลามและมีผลการยับยั้งภูมิคุ้มกันฮิสโตเคมีด้วย GST-pi 1 antibody จำนวน 52 ราย โดยที่ 6 ราย ไม่สามารถทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้

ดังนั้น ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด จำนวน 46 ราย

ข. การศึกษาโดยวิธีการหาลำดับเบส

ผลการหาลำดับเบสด้วยไพโรเมอริที่ออกแบบในครั้งนี้อาจสามารถทำการหาลำดับเบสได้สูงสุดจำนวน 32 ตำแหน่ง จาก 38 ตำแหน่ง ตามที่ได้ออกแบบไว้ จากภาพที่ 12 จะเห็นว่ามีการสูญเสียลำดับเบสส่วนท้ายที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ประมาณ 100 คู่เบส ซึ่งครอบคลุมตำแหน่งซีพีจีประมาณ 5 ถึง 8 ตำแหน่ง

Group1	% IHC +ve	CpG Sites																																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38			
1	100	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
2	90.6	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
3	93.3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
4	95.8	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
5	86.2	T					T	T	T	T	T	T	T	T	T			C			T	T			T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
6	98.3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
7	30	T	Y			T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
8	96.8	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
9	95.5	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
10	98.5	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
11	99.5	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
12	95.3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
13	92.5	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
14	100	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
Group2		CpG Sites																																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38			
15	0			C	T		T		C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
16	0	Y	Y	Y		Y	T	T	T	T	T	C	T	Y	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
17	0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
18	0	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
19	11.3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
20	1.8	C	C	C	C	C					C	C	T	Y	C	Y	C								C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
21	5.2	T	C	C	C						C			C	C	C	C	C	T	T	C	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C		
22	2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Y	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	C	T	T	T	C	C													
23	6.4	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
24	0.4	C	Y	C	C					T	C	T	Y		T	T	C						C	C	C	C	C	C	T													
25	0		C	C	T	C				T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
26	0	Y	C	C	C	C				Y	C	Y	C	Y	C	C	T	C					C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
27	0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Group3		CpG Sites																																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38			
28	0	T	Y			T	C	T	T		T	C	C	C	C	C	C	Y	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
29	40	T	T	C						T	T	T	T	T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
30	5	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
31	0	T	Y	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
32	25		C				C				T	C	T	T	T	C	C			C	T	T	C	C	C	C	C	C	T													
33	29.7					T					T	C	C	C	T								T	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
34	99.8	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
35	0	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
36	1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
37	30	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
38	100	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
39	2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
40	100	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
41	0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
42	0	T	C	C	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
43	25	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
44	0	T	T	T			T	T	T			T						C	T	C					C			C	C													
45	7.8	C	C	C	C	T	C	C	Y		T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
46	30	T	T	Y	T	T	T	Y	T	T	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

ภาพที่ 12 แสดงตำแหน่งการเกิดเมทิลเลชันจากการหาลำดับเบสโดยที่ T หมายถึง unmethylated cytosine ที่ผ่านปฏิกิริยาไบซัลไฟต์จนกลายเป็นไทมีน ส่วน C แสดง methylated cytosine ที่ไม่ถูกเปลี่ยนเป็นไทมีนเมื่อผ่านปฏิกิริยาไบซัลไฟต์ Y หมายถึงตำแหน่งที่พบทั้งเบส C และ T และช่องว่างเป็นตำแหน่งที่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้

ตัวอย่างทั้ง 46 รายจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามการติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี

กลุ่มที่1 อิมมูโนฮิสโตเคมีให้ผลบวก คือติดสีเข้มทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมของเซลล์ มี 14 ราย พบว่า

- มี 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 57.14 ที่ไม่พบการเมทิลเลชั่นที่ตำแหน่งซีพีจีใดๆเลย
- มี 4 รายคิดเป็นร้อยละ 28.57 ที่พบการเมทิลเลชั่น 1 ตำแหน่ง
- มี 2 รายคิดเป็นร้อยละ 14.28 ที่พบการเมทิลเลชั่น 2 ตำแหน่ง

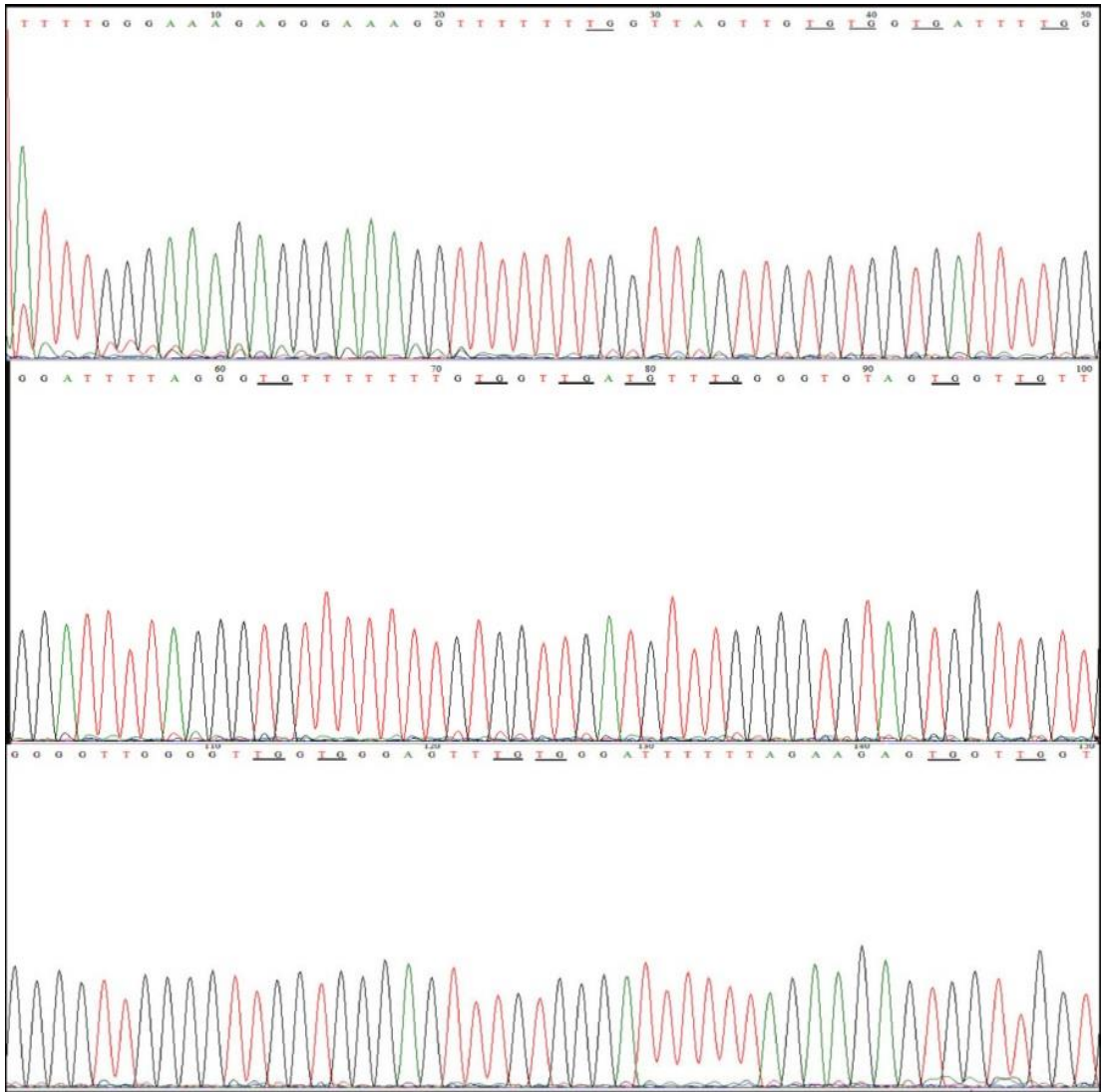
กลุ่มที่2 อิมมูโนฮิสโตเคมีให้ผลลบ คือทั้งในส่วนนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมไม่ติดสีอย่างชัดเจน มี 13 ราย พบว่า

- มี 1 รายคิดเป็นร้อยละ 7.69 ที่ไม่พบการเมทิลเลชั่นที่ตำแหน่งซีพีจีใดๆเลย
- มี 2 รายคิดเป็นร้อยละ 15.38 ที่พบการเมทิลเลชั่น 2 ตำแหน่ง
- มี 1 รายคิดเป็นร้อยละ 7.69 ที่พบการเมทิลเลชั่น 3 ตำแหน่ง
- มี 1 รายคิดเป็นร้อยละ 7.69 ที่พบการเมทิลเลชั่น 4 ตำแหน่ง
- มี 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 61.54 ที่พบการเมทิลเลชั่นมากกว่า 10 ตำแหน่ง และสูงสุด 27 ตำแหน่ง

กลุ่มที่3 อิมมูโนฮิสโตเคมีให้ผลไม่ชัดเจน การอ่านผลทำได้ยาก มี 19 ราย พบว่า

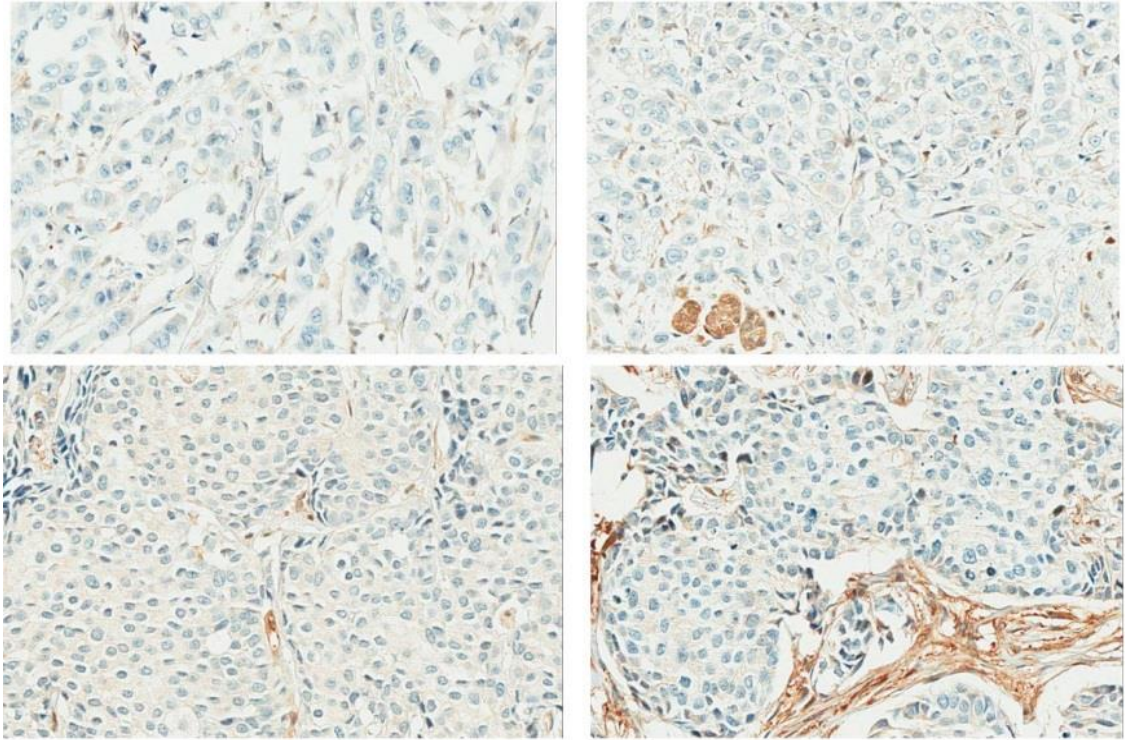
- มี 6 รายคิดเป็นร้อยละ 31.58 ที่ไม่พบการเมทิลเลชั่นที่ตำแหน่งซีพีจีใดๆเลย
- มี 2 รายคิดเป็นร้อยละ10.53 ที่พบการเมทิลเลชั่น1 ตำแหน่ง
- มี 2 รายคิดเป็นร้อยละ10.53 ที่พบการเมทิลเลชั่น 2 ตำแหน่ง
- มี 2 รายคิดเป็นร้อยละ10.53 ที่พบการเมทิลเลชั่น 4 ตำแหน่ง
- มี 1 รายคิดเป็นร้อยละ5.26 ที่พบการเมทิลเลชั่น 5 ตำแหน่ง
- มี 1 รายคิดเป็นร้อยละ5.26 ที่พบการเมทิลเลชั่น 6 ตำแหน่ง
- มี 1 รายคิดเป็นร้อยละ5.26 ที่พบการเมทิลเลชั่น 8 ตำแหน่ง
- มี 4รายคิดเป็นร้อยละ21.05 ที่พบการเมทิลเลชั่นมากกว่า 10 ตำแหน่ง และสูงสุด 26 ตำแหน่ง

ลักษณะภาพelectrophorogram ของกลุ่มนี้ให้ผลที่ชัดเจน ไม่มีสัญญาณรบกวน และสามารถตรวจลำดับเบสได้ครบทุกตำแหน่ง แสดงดังภาพที่ 15



ภาพที่15 แสดงภาพelectrophorogram ของลำดับเบส ในตัวอย่างที่ให้ผลอิมมูโนฮิสโตเคมีเป็นบวกโดยที่ กราฟสีเขียวแทนเบสอะดีนีน(A) กราฟสีแดงแทนเบสไทมีน(T) และกราฟสีดำแทนเบสกวานีน(G)

กลุ่มที่สอง การติดสีย้อมภูมิโนฮิสโตเคมีทั้งในส่วนนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมไม่ติดสีอย่างชัดเจน (13/46 ราย) (ภาพที่ 16)



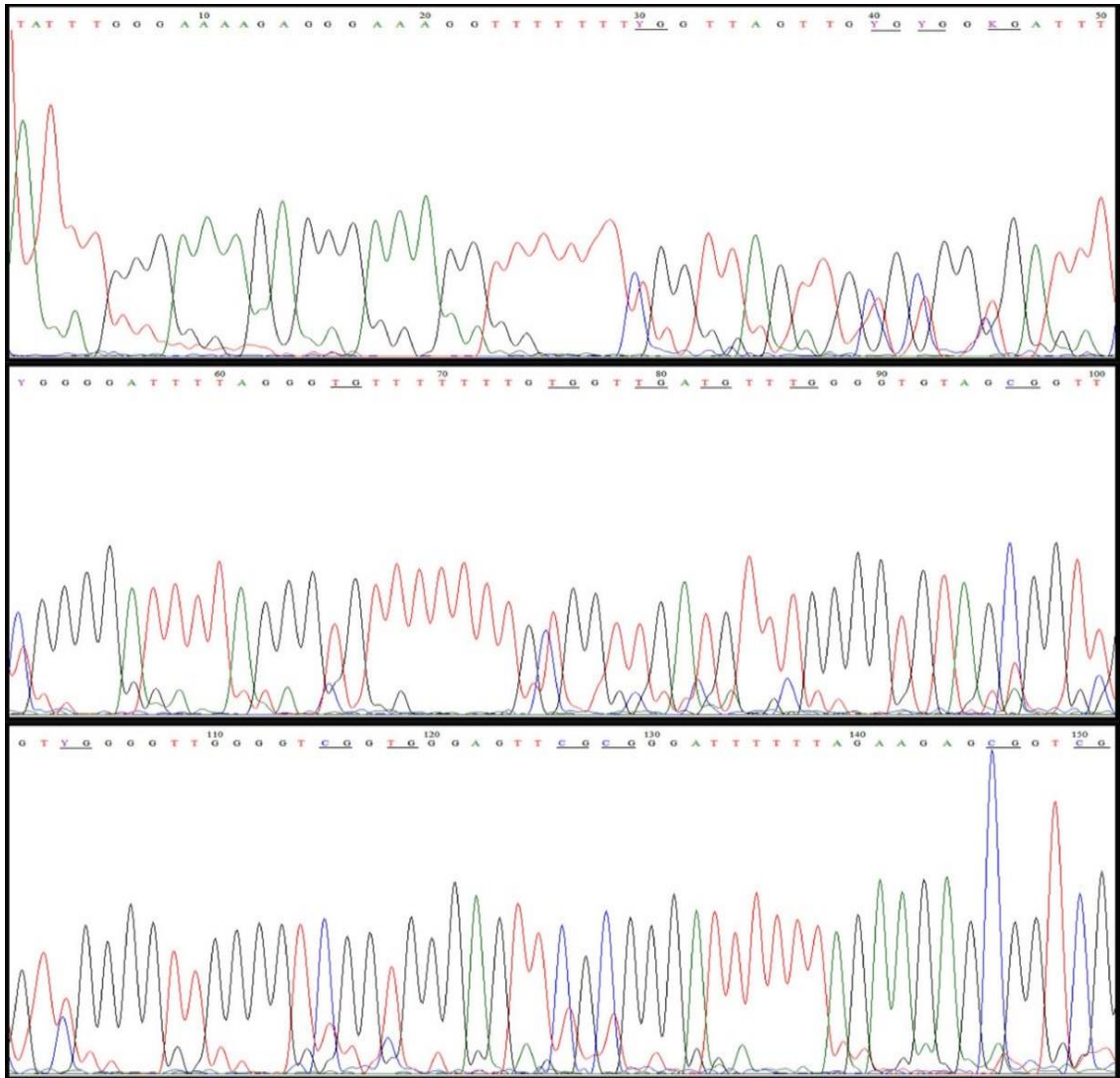
ภาพที่16 แสดงการติดสีที่ให้ผลลบของเซลล์มะเร็งจากการย้อมภูมิโนฮิสโตเคมี

ผลการตรวจลำดับเบสพบทั้ง “C” และ “T” ที่ตำแหน่งซีพีจีพบบการเมทิลเลชั่นสูงถึง 13 ราย จากจำนวน 13 ราย มีรายที่พบจำนวนตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชั่นต่ำกว่า 3 ตำแหน่ง เพียง 2 ราย มีเพียง 1 รายเท่านั้นที่ไม่พบการเกิดเมทิลเลชั่นที่ตำแหน่งใดเลย

Group2		CpG Sites																																															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38										
15	0			C	T	T		C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T				C	C	T																				
16	0	Y	Y	Y	Y	T	T	T	T	T	C	T	Y	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C																				
17	0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T					
18	0	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	Y																			
19	11.3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C																			
20	1.8	C	C	C	C	C	C				C	C	T	Y	C	Y	C									C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C				
21	5.2	T	C	C		C					C			C	C		C	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	C	T																	C			
22	2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Y	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	C	C	T																						
23	6.4	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	T	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C				
24	0.4	C	Y	C		C					T	C	T	Y		T	T	C					C	C		C	C	C	T																				
25	0		C	C	T		C			T	C		C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C				
26	0	Y		C	C	C	C				Y	C	Y	C	Y	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C			
27	0	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T																				

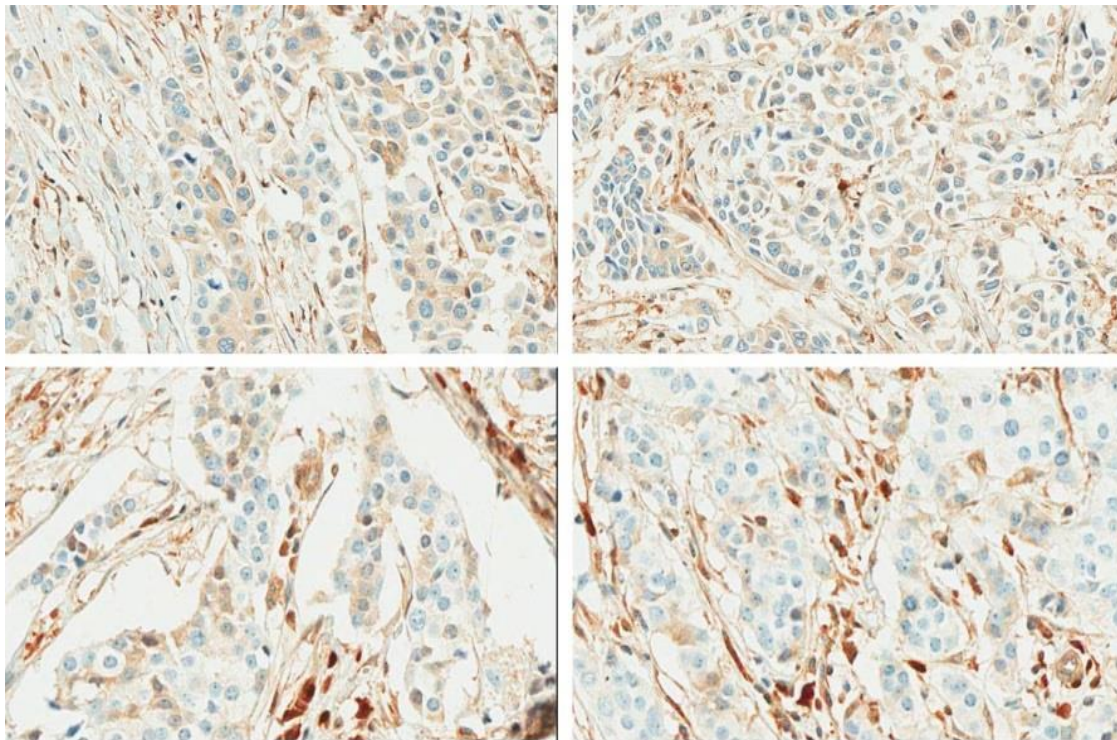
ภาพที่17 แสดงตำแหน่งการเกิดเมทิลเลชั่น(C)ของตัวอย่างในกลุ่มที่ให้ผลภูมิโนฮิสโตเคมีเป็นลบ

สัญญาณภาพ electrophorogram อยู่ในเกณฑ์ที่ดีแต่ไม่ชัดเจนเท่ากลุ่มแรกคือพบ
สัญญาณรบกวนอยู่บ้างแสดงดังภาพที่ 18



ภาพที่18 แสดงภาพelectrophorogram ของลำดับเบส ในตัวอย่างที่ให้ผลอิมมูโนฮิสโตเคมีเป็นลบ

กลุ่มที่สามารถติดสีย้อมภูมิโนฮิสโตเคมีไม่ชัดเจน การอ่านผลทำได้ยาก (19/46 ราย) (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 แสดงการติดสีของเซลล์มะเร็งจากการย้อมภูมิโนฮิสเคมี

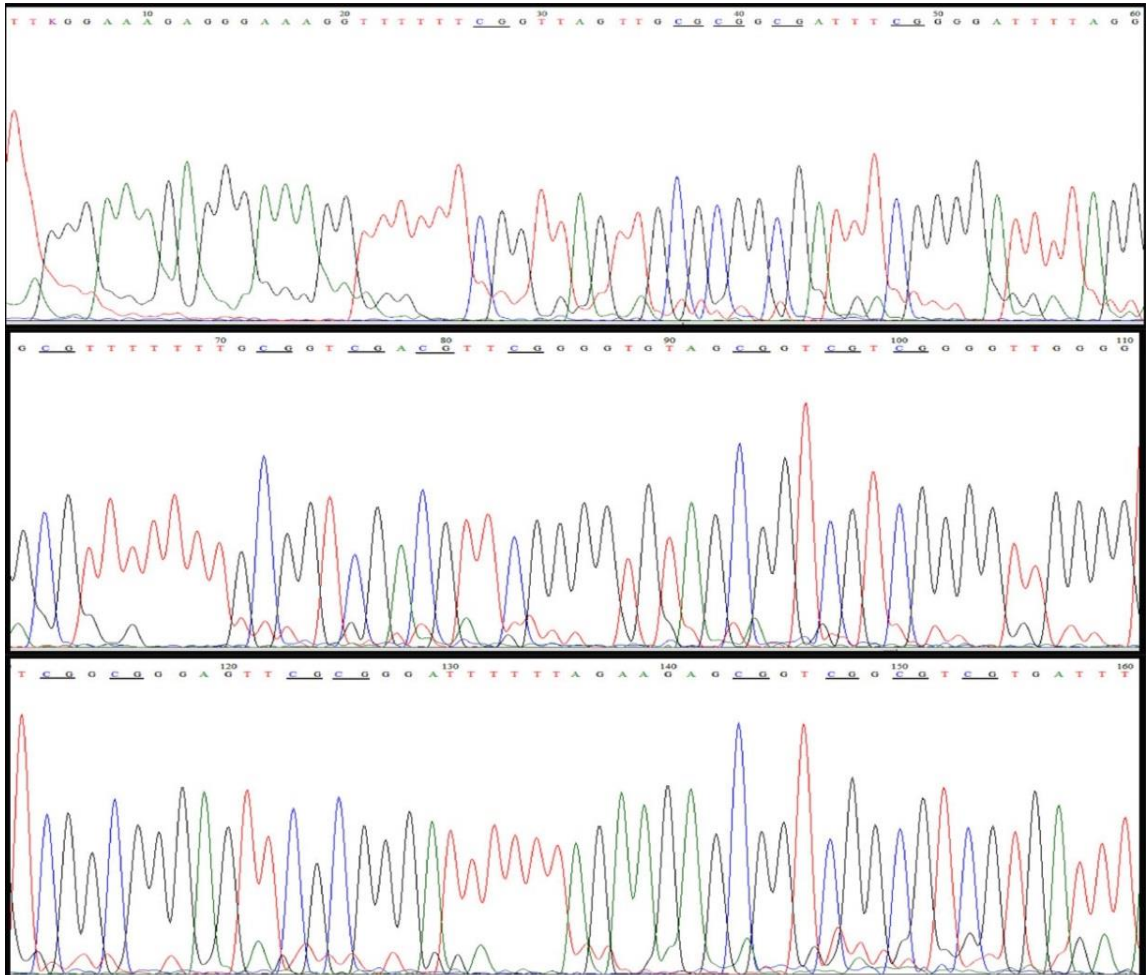
ผลการตรวจลำดับเบสพบทั้ง “C” และ “T” ในสายดีเอ็นเอคล้ายกับกลุ่มที่ให้ผลภูมิโนเป็นลบ พบ 6 รายที่ไม่พบการเมทิลเลชั่นที่ตำแหน่งใดเลย พบ 13 รายที่มีการเมทิลเลชั่น จำนวนตำแหน่งซีพีจีที่เกิดเมทิลเลชั่นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้ผลภูมิโนลบมีจำนวนต่ำกว่า

Group3		CpG Sites																																											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38						
28	0	T	Y			T	C	T	T		T	C	C	C	C	C	C	Y	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C							
29	40	T	T	C							T	T	T	T		Y	T	T	T	T					T	C	C	C	T																
30	5	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T						
31	0	T		Y	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T					
32	25			C				C			T	C	T	T	T			C	C			C	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T					
33	29.7											T	C	C	C	T						T	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T					
34	99.8	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T					
35	0	C	C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T				
36	1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T				
37	30	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T				
38	100	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T				
39	2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T				
40	100	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T			
41	0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T				
42	0	T		C	C	C	Y	T	T	T		T	T	C	T	T	T	C	T	T	Y	C	Y		C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
43	25	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Y			
44	0	T	T	T								T						C	T			C																			C	C			
45	7.8	C	C	C	C	T	C	T	C	C	C	Y		T	Y		T	T			T	T			T	T			T	T													T	T	T
46	30	T	T	Y	T	T	T	T	Y	T	T	T	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		

ภาพที่ 20 แสดงตำแหน่งการเกิดเมทิลเลชัน(C)ของตัวอย่างในกลุ่มที่ให้ผลอิมมูโนฮิสโตเคมีไม่

ชัดเจน

แต่สัญญาณภาพ electrophorogram มีสัญญาณที่รบกวนอยู่มาก



ภาพที่21 แสดงภาพelectrophorogram ของลำดับเบส ในตัวอย่างที่ให้ผลอิมมูโนฮิสโตเคมีไม่

ชัดเจน

ค. ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันและการแสดงออกเป็นโปรตีน

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชันและการแสดงออกเป็นโปรตีน

การแปลผลอิมมูโนฮิสโตเคมี

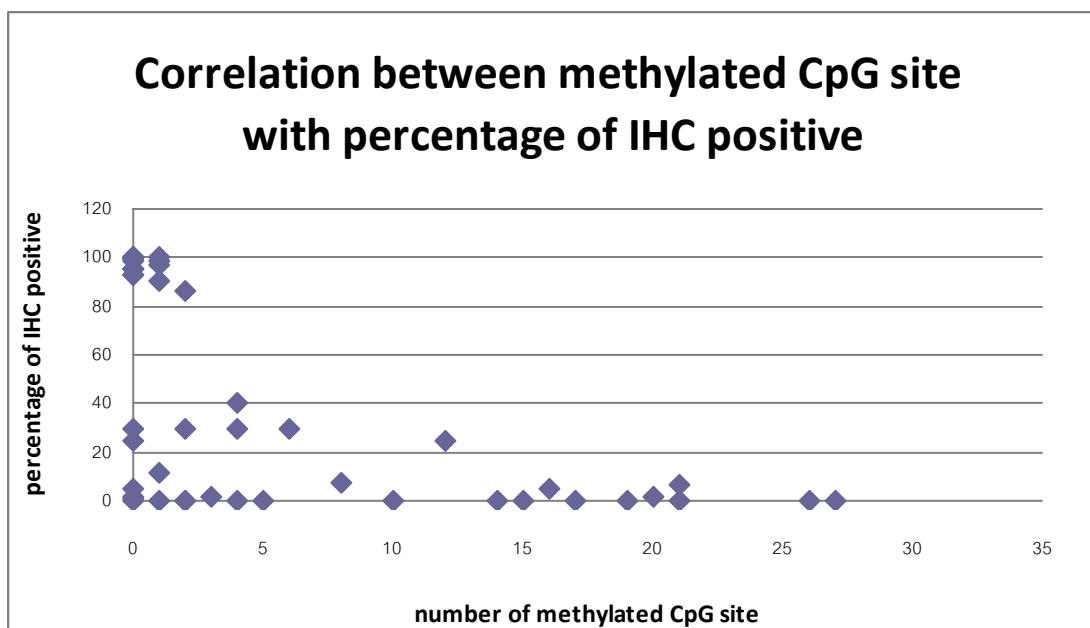
ทำการนับจำนวนเซลล์มะเร็งจำนวน 400 เซลล์จากสไลด์ขึ้นเนื่องจากการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกแล้วคำนวณเป็นร้อยละ

พบว่าจำนวน 15 รายที่ร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกเข้าใกล้ 100 (มากกว่าร้อยละ 90)

จำนวน 22 รายที่ร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกเข้าใกล้ 0 (น้อยกว่าร้อยละ 10)

จำนวน 9 รายที่ร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกเข้าใกล้อยู่ระหว่างร้อยละ 10-89

จากผลการหาลำดับเบสและการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี พบแนวโน้มความสัมพันธ์ของทั้ง 2 วิธี โดยถ้าดูที่กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนตำแหน่งซีพีจีที่มีเมทิลเลชันและร้อยละของเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงโปรตีน จากภาพที่ 22 จะเห็นได้ว่ากราฟจะหนาแน่นในช่วงแรกๆของการที่ตำแหน่งเมทิลเลชันต่ำกว่า 5 ตำแหน่งซีพีจี และที่ตำแหน่งการเกิดเมทิลเลชันเป็นศูนย์ร้อยละของการแสดงออกเป็นโปรตีนก็เข้าใกล้ 100% ในช่วงกลางถึงปลายของกราฟที่จำนวนตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันมากขึ้นร้อยละของจำนวนเซลล์ที่แสดงโปรตีนก็เข้าใกล้ศูนย์มากที่สุด



ภาพที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนตำแหน่งซีพีจีที่มีเมทิลเลชันและร้อยละของเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงโปรตีน

จากความสัมพันธ์ดังกล่าว เมื่อทำการแบ่งกลุ่มตามจำนวนตำแหน่งซีพีจีที่เกิดเมทิลเลชันเป็นสามกลุ่มคือ

- กลุ่มที่ไม่พบการเมทิลเลชันเลย (ตำแหน่งเมทิลไซโตซีนเป็นศูนย์)
- กลุ่มที่พบการเมทิลเลชัน 1 ถึง 4 ตำแหน่ง
- กลุ่มที่พบการเมทิลเลชันตั้งแต่ 5 ตำแหน่งขึ้นไป

พบความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบจำนวนการเกิดเมทิลเลชันตามกลุ่มกับผลของอิมมูโนฮิสโตเคมี

The number of methylated cytosine	IHC		p-value
	Positive (> 10%)	Negative (<10%)	
0	13 (76.47%)	4 (23.53%)	< 0.01
1-4	9 (64.29%)	5 (35.71%)	
>4	2 (13.33%)	13 (86.67%)	

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชันและการแสดงออกเป็นโปรตีน

เปรียบเทียบความตรงกันของผลการศึกษาเมทิลเลชันด้วยวิธี MSP[3]และ วิธี Bisulfite sequencing ที่ให้ความสอดคล้องกับการแสดงออกเป็นโปรตีนด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

โดยที่วิธี MSP จากการศึกษที่ผ่านมา พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ครอบคลุมตำแหน่งที่ 10-13 และ 20-22 ของการศึกษาในครั้งนี้ที่ใช้วิธี BS ซึ่งสามารถตรวจจีพีจีได้จำนวน 32 ตำแหน่ง

โดยแบ่งพิจารณาตามการติดสีจากการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีที่ได้แบ่งไว้ 3 กลุ่ม กำหนดให้กลุ่มที่ติดสีชัดเจนเป็นกลุ่มควบคุมบวก กลุ่มที่ไม่มีการติดสีอย่างชัดเจนเป็นกลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มที่มีการติดสีไม่ชัดเจนเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่มีการแสดงออกเป็นโปรตีนอย่างชัดเจนด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี หรือกลุ่มควบคุมบวก แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบความสอดคล้องของการแสดงออกเป็นโปรตีนในกลุ่มที่มีการแสดงออกเป็นโปรตีนชัดเจนด้วยวิธี IHC ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันด้วยวิธี MSP และ วิธี Bisulfite sequencing

No.	IHC	MSP	Number of C from BS	Site of CpG	Concordance with IHC	
					MSP	BS
1	+	u	1	33	/	
2	+	u	1	24	/	
3	+	u	0		/	/
4	+	u	0		/	/
5	+	u	2	16, 26	/	
6	+	u	0		/	/
7	+	u	2	8, 26	/	
8	+	u	1	30	/	
9	+	u	0		/	/
10	+	u	1	24	/	
11	+	u	0		/	/
12	+	u	0		/	/
13	+	u	0		/	/
14	+	u	0		/	/

- วิธี MSP ให้ผลสอดคล้องกับการแสดงออกเป็นโปรตีนด้วยวิธี IHC ในทุกราย แต่ในวิธี BS มี 6 รายที่พบการเมทิลเลชันอยู่พบมากที่สุดมากที่สุด 2 ตำแหน่ง นั้นหมายความว่า ตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชันนั้นจะไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน คือ ตำแหน่งที่ 8, 16, 24, 26, 30, 33

- การที่วิธี MSP ให้ผลสอดคล้องกับการแสดงออกเป็นโปรตีนด้วยวิธี IHC ในทุกราย นั่นคือ ตำแหน่งที่ครอบคลุมไพรเมอร์ของวิธี MSP มีผลต่อการแสดงออกเป็นโปรตีน นั่นคือ ตำแหน่งที่ 10-13 และ 20-22
- จากข้อมูลข้างต้นเป็นการยืนยันความไว (sensitivity) ของวิธี BS ที่สูงกว่าวิธี MSP

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกเป็นโปรตีนอย่างชัดเจนด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี หรือกลุ่มควบคุมลบ แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบความสอดคล้องของการแสดงออกเป็นโปรตีนในกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกเป็นโปรตีนชัดเจนด้วยวิธี IHC ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันด้วยวิธี MSP และ วิธี Bisulfite sequencing

No.	IHC	MSP	Number of C from BS	Site of CpG	Concordance with IHC	
					MSP	BS
15	-	u	4	3, 8, 25, 26		/
16	-	m	15	11, 14,16-28	/	/
17	-	u	0			
18	-	m	27	1-27	/	/
19	-	u	1	28		/
20	-	u	20	1-6,10,12,16,18,22-31		/
21	-	u	16	2,3,5,10,13,14,16,17,18, 21-23,25-27,31		/
22	-	u	3	19, 24, 25		/
23	-	u	21	2-11,13,16,17,18, 20,22,23,25-27,30		/
24	-	u	10	1,3,5,11,18,21,22,24,26,27		/
25	-	u	21	2,3,7,11,13,14,16-18, 21-32		/
26	-	m	19	3-6,11,14,16,17,19,21-26, 28,30-32	/	/
27	-	u	1	6		/

- พบว่า MSP ให้ผลสอดคล้องกับผลของ IHC ในรายที่มีจำนวนการเกิดเมทิลเลชันสูงๆ คือ 15 19 27 ตำแหน่ง
- มี 4 รายที่พบเมทิลเลชันเพียงบางตำแหน่งก็ไม่แสดงโปรตีน คือ ในรายที่ 15 พบเมทิลเลชัน 4 ตำแหน่ง รายที่ 19 พบเมทิลเลชัน 1 ตำแหน่ง รายที่ 22 พบเมทิลเลชัน 3 ตำแหน่ง และรายที่ 27 พบเมทิลเลชัน 1 ตำแหน่ง นั่นคือตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชันเหล่านี้น่าจะมีอิทธิพลต่อการแสดงโปรตีน ได้แก่ตำแหน่งที่ 3, 6, 19, 25, 28
- มี 1 ราย คือรายที่ 17 ไม่พบความสอดคล้องจากทั้งสองวิธี คือไม่มีการแสดงโปรตีนและไม่พบการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่งใดๆ จากการศึกษารหัสทั้งวิธี MSP และ Bisulfite sequencing สาเหตุของการไม่แสดงโปรตีนในรายนี้น่าจะมาจากกลไกอื่นๆที่วิธีที่ได้ใช้ยังไม่หาคำตอบ
- มี 4 ราย คือในรายที่ 20,23,24 และ 25 พบว่าเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่งที่เป็น binding primer ในวิธี MSP แต่วิธี MSP ให้ผลเป็น unmethylation สาเหตุที่เป็นเช่นนี้น่าจะมาจากเหตุผลทางเทคนิคและความจำเพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ให้ผลอิมมูโนฮิสโตเคมีที่ไม่ชัดเจนหรือกลุ่มเปรียบเทียบ แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบความสอดคล้องของการแสดงออกเป็นโปรตีนในกลุ่มที่การแสดงออกเป็นโปรตีนไม่ชัดเจนด้วยวิธี IHC ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันด้วยวิธี MSP และ วิธี Bisulfite sequencing

No.	IHC	MSP	Number of C from BS	Site of CpG	Concordance with IHC	
					MSP	BS
28	-	m	17	6,11-16,18-27	/	/
29	+	u	4	3, 25, 26, 27	/	
30	-	u	0			
31	-	m	2	8,24	/	/
32	+	m	12	3,7,11,16,17,19, 22-27		
33	+	m	6	12-14, 21-23		
34	+	u	0		/	/
35	-	m	26	1-7,9-27	/	/
36	-	u	0			
37	+	u	0		/	/
38	+	u	0		/	/
39	-	u	0			
40	+	u	0		/	/
41	-	u	2	24, 27		/
42	-	m	14	3-5, 14,18,19,23, 26-32	/	/
43	+	u	0		/	/
44	-	u	5	16, 18, 23, 26, 27		/
45	-	m	8	1-4,6,8-10	/	/
46	+	u	4	13, 14, 25, 26	/	

- มี 4 ราย ที่ผลจาก MSP และ BS ให้ผลไม่สอดคล้องกัน โดยรายที่ 29 และ 46 ผลจากวิธี IHC ให้ผลบวกคือแสดงโปรตีนซึ่งตรงกับวิธี MSP ที่ให้ผล unmethylation แต่พบตำแหน่งเมทิลเลชันจากวิธี BS นั่นคือ ตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชันในรายเหล่านี้ไม่มีผลต่อการแสดงโปรตีน คือ ตำแหน่งที่ 3, 13, 14, 25, 26, 27 ส่วนอีก 2 รายคือรายที่ 41 และ 44 ที่ไม่มีการแสดงโปรตีนจากวิธี IHC และวิธี MSP ให้ผล unmethylation ซึ่งไม่สอดคล้องกัน แต่จากวิธี BS พบว่ามีตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชัน คือ ตำแหน่งที่ 16, 18, 23, 24, 26, 27 นั่นคือ ตำแหน่งเหล่านี้น่าจะมีผลต่อการแสดงออกเป็นโปรตีนของยีนนี้
- มี 3 ราย คือรายที่ 30, 36 และ 39 ไม่พบความสอดคล้องจากทั้งสองวิธี คือไม่มีการแสดงโปรตีนและไม่พบการเกิดเมทิลเลชันที่ตำแหน่งใดๆ จากการศึกษาร่วมวิธี MSP และ Bisulfite sequencing โดยในรายที่ 39 ปัญหาน่าจะมาจากการแปลผลอิมมูโนฮิสโตเคมี ส่วนรายที่ 30 และ 36 สาเหตุของการไม่แสดงโปรตีนในรายนี้น่าจะมาจากกลไกอื่นๆที่วิธีที่ได้ใช้ยังไม่มีคำตอบ

โดยสรุป ในรายที่มีการแสดงออกเป็นโปรตีน ซึ่งการตรวจเมทิลเลชันควรให้ผลเป็น unmethylation จากการตรวจด้วยวิธี Bisulfite sequencing พบว่ามี 13 ราย ที่ให้ผลสอดคล้อง และ 10 รายที่ยังพบว่ามีตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชัน นั่นคือตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชันในกรณีนี้จะเป็นตำแหน่งที่ไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกเป็นโปรตีน ได้แก่ตำแหน่งที่ 8, 16, 24, 26, 30, 33 ส่วนในกรณีที่ไม่มีการแสดงโปรตีน การตรวจเมทิลเลชันควรให้ผลเป็น methylation พบว่ามี 19 รายที่ให้ผลสอดคล้อง ส่วนใน 4 รายที่ให้ผลไม่สอดคล้องยังเป็นกรณีที่ต้องศึกษาต่อไป ส่วนตำแหน่งที่พบว่าไม่มีอิทธิพลต่อการไม่แสดงออกเป็นโปรตีน ได้แก่ ตำแหน่งที่ 3, 6, 10-13, 19-22, 25, 28

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) เป็นหนึ่งในกลไกเหนือพันธุกรรม (epigenetic) ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน มีการศึกษามาเป็นเวลานานในแง่ของความสัมพันธ์กับมะเร็งชนิดต่างๆ [4-8,15,18-20] และมีการพัฒนาวิธีการตรวจอย่างต่อเนื่อง [2,6,7,9 -10,12,14,18 - 21] เพื่อให้สามารถใช้ในการบริการทางการแพทย์ที่เริ่มมีการใช้แล้วในปัจจุบัน [20, 22] วิธีการตรวจเมทิลเลชันแบ่งได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ แบบที่อาศัยการทำปฏิกิริยากับไบซัลไฟต์ และไม่ทำปฏิกิริยากับไบซัลไฟต์ [14-17] โดยเทคนิคที่อาศัยการทำปฏิกิริยากับไบซัลไฟต์ เช่น MSP Bisulfite sequencing และ Pyrosequencing เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้มากกว่า เพราะเป็นเทคนิคที่ได้ผลดี มีความน่าเชื่อถือและมีประสิทธิภาพ (reliability and robust) โดยมีการพัฒนาเพื่อให้ลดข้อจำกัดของเทคนิคเหล่านี้เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด [20,23] อย่างไรก็ตามการที่จะนำเทคนิคมาใช้ในการบริการจะต้องมีความเป็นไปได้ คือ มีความน่าเชื่อถือ (reliability) ราคาที่เหมาะสม (cost) และทำได้ง่าย [22]

การตรวจดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีข้อสำคัญที่จะได้ผลดีคือ ตัวอย่างต้องเหมาะสม คุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีจะต้องมีสายลำดับเบสที่ยาวเหมาะสมกับเทคนิคและ probe ที่ถูกออกแบบไว้ [3] การเลือกเทคนิคที่นำมาใช้ก็จำเป็นต้องเลือกที่เหมาะสมกับการศึกษายีน การศึกษาในปี 2012 Surbhi et al. ใช้เทคนิค Bisulfite sequencing ในการศึกษาเมทิลเลชันที่ตำแหน่งต่างๆของยีน GSTP1 พบว่า Bisulfite sequencing ให้ผลที่มีความจำเพาะมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Pyrosequencing และ MSP [4,20] และความสอดคล้องกับการพยากรณ์ของโรคในแง่ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นอัตราการรอดชีวิต (survival rate) การกลับมาเป็นซ้ำ (recurrence) ตลอดจนการตอบสนองต่อยา [2,3,9] ตำแหน่งซีพีจีที่เกิดเมทิลเลชันก็มีความสำคัญในการกำหนด specification ของการตรวจ และอาจเป็นสาเหตุของผลที่ไม่ตรงกับการแสดงออกเป็นโปรตีน [2,3,9,15] มีรายงานในมะเร็งตับ พบว่าตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชันมีความจำเพาะต่อการแบ่งชนิด

ย่อย [4] ในมะเร็งต่อมลูกหมากมีรายงานความเกี่ยวข้องระหว่างระดับเมทิลเลชันที่ตำแหน่งซีพีจีต่างๆบนโปรโมเตอร์กับความรุนแรงของโรค [24]

การตรวจดีเอ็นเอเมทิลเลชันในมะเร็งเต้านม มีงานวิจัยทำการศึกษาในแง่ของการช่วยวินิจฉัย การบอกรายการพยากรณ์โรค และการใช้ยา มีงานวิจัยที่พูดถึงการใช้ยาในกลุ่ม Taxane และมีความแตกต่างกันระหว่างผลของดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับผลของอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อการพยากรณ์ของโรคและการตอบสนองต่อยา [2,3,9] และทำให้ผู้วิจัยศึกษาถึงสาเหตุของความแตกต่างที่เกิดขึ้นนั้นและ [3]

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง DNA methylation โดยเทคนิค Bisulfite sequencing (BS) บนโปรโมเตอร์ของยีน GSTP1 และการแสดงออกเป็นโปรตีนของยีนโดยเทคนิคอิมมูโนเคมี (immunohistochemistry, IHC) จากการตรวจสอบรายละเอียดของยีน ผู้วิจัยพบว่าวคลีโอไทด์ในช่วงโปรโมเตอร์ของยีน GSTP1 ที่ทำการศึกษามีซีพีจีจำนวนทั้งสิ้น 32 ตำแหน่ง ได้พบซีพีจี 7 ตำแหน่งตรงกับ primer ที่ใช้ในการตรวจด้วยวิธี methylation specific PCR (MSP) ที่ได้ดำเนินการวิจัยก่อนหน้านี้ [3] จึงมีความสนใจว่า การออกแบบ primer ที่คุมจำนวนตำแหน่งของซีพีจีมากขึ้น และหรือคุมตำแหน่งที่สำคัญบางตำแหน่งเพิ่มเติม อาจสามารถอธิบายกรณีตัวอย่างมะเร็งเต้านมบางรายตรวจไม่พบโปรตีนโดยที่การตรวจด้วยวิธี MSP ให้ผลลบ

ผู้วิจัยได้ใช้ตัวอย่างจำนวนประมาณกึ่งหนึ่งของงานวิจัยครั้งที่แล้วมาทำการศึกษาโดยวิธี BS เพื่อตอบคำถามวิจัยว่า จำนวนตำแหน่งซีพีจีที่เกิด methylation มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน GSTP1 หรือไม่ และ มีซีพีจีที่ตำแหน่งใดที่มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน GSTP1 ที่ยังไม่ครอบคลุมโดย primer ก่อนหน้านี้หรือไม่

การเลือกใช้วิธี BS เพื่อศึกษาการเกิดเมทิลเลชัน สำหรับอธิบายความสัมพันธ์กับการไม่แสดงออกเป็นโปรตีน ในการวิจัยนี้ เนื่องจากเทคนิค BS ให้ resolution ของเทคนิคสูงถึงระดับเบสต่อเบส [4,15-17] ซึ่งตรงกับวัตถุประสงค์ของการวิจัย อย่างไรก็ตาม จากการศึกษา ได้พบข้อจำกัดของ BS ที่ไม่สามารถบอกระดับการเมทิลเลชันในแต่ละตำแหน่งได้ ทำให้มี ซีพีจี บาง

ตำแหน่งไม่สามารถระบุผลเมทิลเลชันได้ การศึกษาโดยเทคนิค Pyrosequencing ที่บอกข้อมูลได้ ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ [25] อาจสามารถให้ความกระจ่างเพิ่มเติมสำหรับตำแหน่งต่างๆ ที่ยังไม่มีผล ข้อจำกัดอีกประการหนึ่งได้แก่ การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างมะเร็งเต้านมจากเนื้อเยื่อสดแช่แข็ง อาจมีเซลล์และเนื้อเยื่ออื่นที่นอกเหนือจากเซลล์ของมะเร็งลุกลามปนอยู่ด้วยกันซึ่งเป็นสิ่งปนเปื้อน (contaminant) ของการวิจัย [3,25] แต่คิดว่า การปนเปื้อนในการวิจัยนี้ น่าจะไม่มาก จากการที่ผู้วิจัยมุ่งเก็บเนื้อเยื่อมะเร็งที่อยู่ในก้อนที่มองเห็นชัด และลักษณะกราฟที่ได้มีคุณภาพดี

จากรายงานที่ผ่านมา การพบความไม่สอดคล้องกันของการตรวจโปรตีน และการตรวจยีน มีถิ่นหลายยีนที่เป็นปัญหาได้แก่ MGMT GSTP1 เป็นต้น [3,13,25] แต่เป็นความไม่สอดคล้องนั้น มาจากวิธีการที่ใช้ตรวจนั้นยังมีข้อจำกัด MSP เป็นการตรวจเมทิลเลชันที่ตำแหน่งซีพีจีที่เป็น binding primer เท่านั้น การที่ไม่พบความสอดคล้องของการตรวจเมทิลเลชันกับการแสดงโปรตีน ด้วยวิธี MSP เป็นไปได้ว่า ตำแหน่ง binding primer ที่เลือกใช้ยังไม่ใช่ตำแหน่งที่มีความสำคัญ หรือเกี่ยวข้องกับกระบวนการแสดงออกของยีน การเลือกใช้เทคนิคที่มี high resolution ในระดับโมเลกุลทำให้สามารถอธิบายถึงกลไกของความไม่ตรงกันดังกล่าวได้

โดยปกติระดับเมทิลเลชันในยีนจะเป็นกลไกในการควบคุมการแสดงออกของยีน [5] เมื่อมีความผิดปกติของยีนที่แสดงออกมา ระดับเมทิลเลชันจึงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่นักวิจัยให้ความสนใจ มีรายงานความผิดปกติของการเกิดเมทิลเลชันในกลุ่มโรคที่หลากหลาย [4,5,6,15,22,24] ในมะเร็งตับพบว่าระดับเมทิลเลชัน (methylation pattern) สามารถบอกความแตกต่างในชนิดย่อยได้ ในมะเร็งต่อมลูกหมากซึ่งพบการเมทิลเลชันสูงในผู้ป่วยถึงร้อยละ 90 ยังมีรายงานความรุนแรงของโรคและการลุกลามของโรคสัมพันธ์กับระดับการเมทิลเลชัน (methylation pattern) ที่เกิดขึ้นด้วย [24]

ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้เมื่อพิจารณาจากจำนวนของเมทิลไซโตซีนที่พบในลำดับเบส จะเห็นว่าเมื่อแบ่งกลุ่มจำนวนเมทิลไซโตซีนเป็น 3 กลุ่ม ที่จำนวนเมทิลไซโตซีนเป็นศูนย์การแสดงออกเป็นโปรตีนเข้าใกล้ 100% ที่จำนวนเมทิลไซโตซีน 1 ถึง 4 ตำแหน่ง มีความแตกต่างของการ

แสดงโปรตีน และร้อยละการแสดงโปรตีนเข้าใกล้ศูนย์เมื่อจำนวนของเมทิลไซโตซีนมากกว่า 10 ตำแหน่ง การแบ่งกลุ่มจำนวนเมทิลไซโตซีนเป็น 3 กลุ่มดังกล่าวให้ความสัมพันธ์กับร้อยละการแสดงออกเป็นโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} < 0.01$)

ผลการศึกษาดำเน่งของเมทิลไซโตซีนที่มีผลต่อการไม่แสดงโปรตีนนั้น ทำการแบ่งการพิจารณาออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรก กลุ่มที่มีการแสดงโปรตีนชัดเจน ผลการแสดงโปรตีนจากวิธี IHC ในทุกรายให้ผลตรงกับวิธี MSP นั่นคือทุกตำแหน่งซีพีจีที่ไพรเมอร์ของวิธี MSP มาจับมีผลอิทธิพลต่อการไม่แสดงโปรตีนในขณะที่ยังพบว่ามีเมทิลไซโตซีนอยู่ (โดยที่ 4 รายพบเพียง 1 ตำแหน่ง และ 2 รายพบ 2 ตำแหน่ง) สามารถอธิบายได้ว่าตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชันดังกล่าวไม่มีอิทธิพลต่อการเกิดเมทิลเลชัน คือ ตำแหน่งที่ 8, 16, 24, 26, 30, 33 กลุ่มที่สอง กลุ่มที่ไม่มีการแสดงโปรตีนชัดเจน มี 12 ราย จาก 13 ราย มีพบตำแหน่งเมทิลไซโตซีน 8 รายที่ พบมากกว่า 10 ตำแหน่ง ส่วนอีก 4 รายที่พบเมทิลไซโตซีนเพียง 1, 3, และ 4 ตำแหน่ง นั่นคือ ตำแหน่งเหล่านี้ น่าจะมีอิทธิพลทำให้ไม่มีการแสดงโปรตีนออกมา ได้แก่ ตำแหน่งที่ 3, 6, 19, 25, 28

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาจากวิธี BS กับ วิธี MSP [3] พบว่า ทั้ง 2 เทคนิคจะให้ผลตรงกันก็ต่อเมื่อมีจำนวนเมทิลไซโตซีนมากกว่า 10 ขึ้นไปในกรณีของ methylation และมีจำนวนเมทิลไซโตซีนเป็นศูนย์ในกรณีที่ unmethylation สำหรับรายที่มีการแสดงโปรตีนชัดเจน การที่พบเมทิลไซโตซีนในบางตำแหน่งจากวิธี BS ในขณะที่วิธี MSP ให้ผลเป็น unmethylation นั้น ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้ว่าตำแหน่งที่พบเมทิลไซโตซีนนั้นไม่มีผลต่อการแสดงโปรตีน ข้อมูลดังกล่าวเป็นการแสดง sensitivity ของวิธี Bisulfite sequencing

ผลการศึกษานำไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจเมทิลเลชันด้วยวิธี MSP โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้ขยายออกไปเพื่อครอบคลุมตำแหน่งซีพีจีที่ 8 และ 9 รวมเข้าไปด้วยก็เพื่อให้เห็นเทคนิค MSP ให้ผลที่มีความถูกต้อง ความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ที่ใช้ถือเป็นเรื่องสำคัญสำหรับเทคนิคนี้และจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อยืนยันผลการศึกษาต่อไป

รายการอ้างอิง

- [1] World Health Organization. 2006. Available at: <http://un.by/en/who/news/world/2006/06-02-06-02.html> Accessed January 13, 2011
- [2] Arai, T., et al. Association of GSPT1 expression with resistance to docetaxel and paclitaxel in human breast cancers. *Eur J Surg Oncol*. 7(July 2008):734-8.
- [3] Pakdeethai, S., Fongchaiya, V., Pontheerat, T., Lampenkhae, K., and Sampatanukul, P. Relationship between promoter methylation and protein expression of glutathione S-transferase gene class P1 in breast cancer. *Asian ArchPath*. 8(October 2012):45-53.
- [4] Surbhi, J., et al. Impact of the Location of CpG Methylation within the GSTP1 Gene on Its Specificity as a DNA Marker for Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* 7(April 2012):e35789
- [5] Jovanovic, J., Ronneberg, J., Tost, J., and Kristensen, V. The epigenetics of breast cancer. *Mol Oncol*. 4(June 2010): 242-54.
- [6] Mutirangura, A. Quantitative PCR analysis for methylation level of genome: clinical implications in cancer. *Asian Biomed*. 1(August 2007):121-8.
- [7] Melanie, E. DNA Methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*. 21(August 2002):5400-13.
- [8] Di Pietro, G., Magno, LA., and Rios-Santos, F. Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 6(February 2010):153-70.

- [9] Gayatri, S., Sameer, M., and Rajinder, P. Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci.* 87(July 2010):83-91.
- [10] Jhaveri, MS. and Morrow, CS. Methylation-mediated regulation of the glutathione S-transferase P1 gene in human breast cancer cells. *Gene.*210 (March 1998):1-7.
- [11] Masood, N. and Kayani, MA. Mutational analysis of xenobiotic metabolizing genes (CYP1A1 and GSTP1) in sporadic head and neck cancer patients. *GENET MOL BIOL.*34(October2011): 533-8.
- [12] Lee, JS. GSTP1 promoter hypermethylation is an early event in breast carcinogenesis. *Virchows Archiv.* 450(June 2007):637-42.
- [13] Treilleux, I., et al. The molecular causes of low ATM protein expression in breast carcinoma; promoter methylation and levels of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *Histopathology.*51(July 2007):63-9.
- [14] Suijkerbuijk, KP., Pan, X., van der Wall, E., van Diest, PJ., and Vooijs, M. Comparison of different promoter methylation assays in breast cancer. *Anal Cell Pathol.*33(2010):133-41.
- [15] Fabienne, G., et al. GSTP1 Hypermethylation is associated with Reduced Protein Expression, Aggressive Disease and Prognosis in Neuroblastoma. *Gene Chromosome Canc.*51(February 2012):174-85.
- [16] Fraga, MF. and Esteller, M. DNA Methylation: A Profile of Methods and Application. *Biotechnology.*33(September 2002):632-49.
- [17] Petra, H., et al. *DNA-Methylation Ananalysis by the Bisulfite-Assisted Genomic Sequencing Method.* Volume 200. Springer New York: 2002.

- [18] Lee, WH., Isaacs, WB., Bova, GS., and Nelson, WG. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. **Cancer Epidemiol Biomarker Prev.** 6(June 1997):443-50.
- [19] Goessl, C., et al. Fluorescent Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction for DNA-based Detection of prostate Cancer in Bodily Fluids. **Cancer Res.** 60(November 2000):5941-5.
- [20] Havik, AB., et al. MGMT promoter methylation in gliomas assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. **J TRANSL MED.** 6(March 2012):10-36.
- [21] Millar, DS., et al. Detail methylation analysis of the glutathione S-transferases pi (GSTP1) gene in prostate cancer. **Oncogene.** 11(February 1999):1313-24.
- [22] Yachi, K., et al. Relevance of MSP assay for the detection of MGMT promoter hypermethylation in glioblastomas. **Int J Oncol.** 33(September 2008):469-75.
- [23] Han, W., Cauchi, S., Herman, JG., and Spivack, SD. DNA methylation mapping by tag-modified bisulfite genomic sequencing. **Anal Biochem.** 1(August 2006):50-61.
- [24] Lin, PC. et al. Epigenomic Alterations in Localized and Advanced Prostate Cancer. **Neoplasia.** 4(April 2013): 373–83.
- [25] Miyuki, U., et al. Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma. **CLINICS.** 10(2011):1747-55.

ภาคผนวก

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลูตาไธโอนเอสทรานเฟอรัส**BISULFITE SEQUENCING - GSTP1**INITIAL NUCLEOTIDE SEQUENCE

CCTGGAACCCTCCTGTGCTGCCGAGATATCAGGGAGGCGCTGGGTACTGCAAGGGG
AAGATGGCATTGCTATGGAGCCACTCTTGGTGAAGGTCAATGGGTGACATTGGAAG
TCTAGCTTTTCCTGAGGCTGGGGTCTGGACCTTGGTCTAGATCAGGGGTCAGCAAATT
TTTCTTGAAAATGTAGACAGAAAATATCTTAAGCTGGCCGGGCACGGTGGCTCACACC
TGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCAGGCGGATCACAAGGTGAGGAGATCG
AGACCATCCTGGCTAACACAGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGC
CGGGTGTGGTGGCGGGCGCCTGTAGTCCCAGCTACTCTGGAGGCTGAGGAAGGAG
AATGGCGTGAACCCGGGAGGTGGAGCTTGCAGTGAGCCAAGATCGTGCCACTGCAC
TCCAGCCTGGGCGACAGAGCCAGACTCCATCTCAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAGAAA
ATATCTTAAGCTTTGAGGACCACATAGTCTCTGTTGCAATCACTCATTGGGCCACTGT
AGCACAAAAACAACATAGATAACACACACATGAGTGAGCATGGCTGGGGCCCAATA
AACTTTATTTACACAAGCAGGTGATGAACCACGGTCCATAGTGTCCAATCCTTGATT
TAGATGGTGAACATCATGAGCTTTCGTTGCCCTCTCCGGTAGAAATATGGGAGAAAC
CACAGAGAGAAACAGAGATTTGAGGAAAACAGTAAATTAACAATAAAGTGAGACG
TCGCCCCTCCTGGAGGCTGCAGGCTGTGTTGAACCTGTGTGTGTCTGGGTGTACAGG
GATGTGAGTAGATGCGCGTGGAGATGTGTGTGTGGGTGGAGACTGAGCGTGGCTGG
AGGTGGCTGTGGTAGGATGCCAGAAGGAAGGAGTTTGCATTGATTCTTTATTAGTA
CTCTCTGGAGTTGTTGAGGGGATGTCACTGCTGAACACTGACCCTGGTGCAGGCTAA
ACCGAAGTTAGCCTCTGCTACCCTCTGCTGGGTGAGGCACTGGGGAGAACAGTGGG
ACTGAATGGGGCGGGCTTTCTCCCTCCCACACTTCCCCTGGAAACACCCAGCACCAG
CACATTAGAACATGGGGAGCCACCTTCCCAGCGCTGCTTCCAAGGTTCCGGAAGG
GGAACTCTGACCTCAAGCTCTGTTTGAAGAGCGATAGCAAAGGGGAGAGGTTGGCT
GTGGTTTGGTGGTGTCTTATCTCCTTCTTTGCTTTGAAACCACAGGCTGGCATACTACC
CGAGAGAATGACCAGTGCCACCAAGGGAAGGGCACAAGCTCACTGGTTCCAGGGGA
GACATCTCAGGGGACAGGAACATCCCCTGACGCTGAATGAGTGCAGCACACAGACG
GAGAATACACACAAGAGAAATCATGAGGACATGAGAGAAGGCACTGGCAATAGGAA

GTTACAAAAGCAACAAAAGAAAGAGTAGATATAAAAACAATAATCGAAGAAAGCCA
ACAACAGATGGGATGAATCATACGAGGTATGCGACTCATGGATGAAGAGGTGAGTGA
TGAGATCAGCTGGGGAACCTCTCTCCAGGAAAGACAAACCAGAAGAAACACAAATGA
CATCGAAGTGGCCAGGCGCAGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGCC
CGAGGCAGGTGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGGCCAACATGAT
GAAACCCTGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCCAGGTGTGGTGGCAGGCACCTGT
GATCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCAGGAAGCAGAG
ATTGCAGTGAGCTGAGATGGTGCCAGTGCCTCCAGCCTGGGCAGTAGAGTGACAG
CCTGTCTAAAAAAAAAAAAAGGCAGTAAAGTGATAGGAGGATAGATTAGAAGGGCCAT
TTTCCAGATAGTGCAAGGAAGAAAGAAGAAGAAGAGAGGAGGAGGAGGAAGA
GGAAGAAGACGGAGAAGAGGGCATCTCAGAAGAAACAATGGAGATACATTTCTCAA
ACTGAAGAAAGATGACCAACCTCAGACCGAAGGGCCAAGAGGCCAAACCAGAGAGA
CAGCTTGGCAAGCCAGGAAGAGCACCAAAGCTAGACAATTAGAGTGAAATTAAGAA
AACCCAAGGTGACAAAAATTTAAAAAGCTTCCTTGTGACCTCAGTCCATTGGTGAAAT
TTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGACAGCCTGGGCAACATGGTGAAACCCCATCTC
TACAAAAATACAAAATTAGCTGGGTGTGGTGGCACATGCCTGTAGTCCCAGCTATT
CGAGAGGCTAAGTAAGGCAGGAGGATCACTTGGGGCCAAGAGTTCCAGACCAGCTG
CGGCAACATACATGTTGTGGGAAGTCAGGCACCCCGAACGGAGGGACTGGCTGAAG
CCATGGCAGAAGAACATAAATTGTGAAGATTTTCATGGACATTTATCACTTCCCCAATCA
ATACTCTTGTGATTTCTATGCCTGTCTTTAATCTCTTAATCCTGTCATCTTCGTAACTG
AGGATGTATGTGCCTTAGGACCCTGTGATGACTGCGTAACTGCACAAATTGTTTGTA
GAGGACAATTGTTGTGTGTTTGAGCAATGTGAAATCTGGGCATCTTAAGAACAGGATA
ACAGCAATTTTCAGGGAACAAGGGAGATAACCTTAAAGTCTGGCTGCCTGTGGGCTG
GGCAGGACAGAGCCATACTTCTCTTATTACCGCAAACAGGTAAGAGAAATATCGCTGA
ATTCTTTCCCAGTAAGGAATATTAATAATTAACAGCCCTGAGAAAAGAATGCATTCCC
AGGGCCGGGCCACTGAAATGGCCTCCCTGAGAGTGCCTGCCTTTATTCAGAAGTAGA
AAGGGATGAAACACGCCCTAGTCTCCTGCAGCACCCCCAGACTTGATAGGATTAGGA
AATCCAGCCTGGCAAATTCTAGTCAGACCGGTTCTCTGCTCTTGAACCCTGACAGTG
CGTGACAGTGGGACCTGGAAGTTCATTAGTGATTCTAGTTTCGCCGTGACCTTCTGC

CCTGTGATCTTTTGTGCGCCCTTGAAGTATGTGATCTCTGTGACCCACACCCTGTTCGTG
CACTCCCTCCTCTTTGAAAATTGCTAATAAAAACTCGCTGGTTTTACGGCTCAGGGGG
CATCACGGAACCTGCGGACATGTGATGTCTCCCCTGGACACCCGGCTTTAAAATGTCT
CTCTTTTGTACTCTTCCCTTTATTTCTCAGGCCAGCCGACACTTAGGGAAAATAGGAA
AGGACCCACGTGAAATATTGGGGGCTGAATTTCCCCGATAATAAGTCTCTTAAAAAA
GACTTTTAAATGAAATTTCTTTGTTTTTAACTTTTATTTCTGTTTTGGGGGTACATGTGAA
GGTTTGTTACATAAGTAAACTCGTGTCTTCGGTGTTTGTTGTACAGAATATTTATCACC
CAGGTATTATGCCGAGTACCCAATAGTTCTCTTTCTGCTCCTCTCCTTCTCCCATCCT
GCACCCTGGAGTCAACCACAGTGTCTGTTGTTTCCTTGTTTGTTATAAGTTCTCATCA
TTTAGCTCCCACTTACAAGTGAGAACATCCAGTATTTGGATTTCTGTTCCCTGCATTAGTT
TGCTAAGGATAATAGCCTCTAGCTCCATCCATGTTCCACAAAAGACATGATCTAGTTC
TTTTTAATGGCTGCATTAAATGAAGTTTTAAAGATACAACATAAACACCAACCTCTTCCC
CACCACAAAAATCCCTTGCTGAATTTGATTACACTTAAATTAACGAGTTTTGTTTCATGA
AAGACTCCTTGGACAAACTTGACAGTTGATGGAATAGGAGAAGCTGTCTGTGATGTCT
AAAGCCAACAAGAGATCAATATCTAGAATAAATGGAGATCTGCAAATCAACAGAAAGT
AGGCAGCAAAGCCAAAGAAAATAGCCTAAGGCACAGCCACTAAAAGGAACGTGATC
ATGTCCTTTGCAGGGACATGGGTGGAGCTGGAAGCCGTTAGCCTCAGCAAACCTCACA
CAGGAACAGAAAACCAGCGAGACCGCATGGTCTCACTTATAAGTGGGAGCTGAACAA
TGAGAACACATGGTCACATGGCGGCGATCAACACACACTGGTGCCTGTTGAGCGGG
GTGCTGGGGAGGGAGAGTACCAGGAAGAATAGCTAAGGGATACTGGGCTTAATACCT
GGGTGATGGGATGATCTGTACAGCAAACCATCATGGCGCACACACCTATGTAACAAA
CCTGCACATCCTCTACATGTACCCAGAACTTCAAATAAAAGTTGGACGGCCAGGCGT
GGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAAGCCGAGGCGTGACAGATCACCT
AAGGTCAGGAGTTGAGACCAGCCCGGCCAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAA
AATACAAAAATCAGCCAGATGTGGCACGCACCTATAATTCCACCTACTCGGGAGGCT
GAAGCAGAATTGCTTGAACCCGAGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCGCCGAGATCGC
GCCACTGCACTCCAGCCTGGGCCACAGCGTGAGACTACGTCATAAAATAAAATAAAA
TAACACAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAAT
AAAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAGCAATTTCTTTCTCTAAGCGGCCTCCA

CCCCTCTCCCCTGCCCTGTGAAGCGGGTGTGCAAGCTCCGGGATCGCAGCGGTCTT
AGGGAATTTCCCCCGCGATGTCCCGGCGCGCCAGTTCGCTGCGCACACTTCGCTG
CGGTCCTCTTCTGCTGTCTGTTTACTCCCTAGGCCCCGCTGGGGACCTGGGAAAG
AGGAAAGGCTTCCCCGGCCAGCTGCGCGGCGACTCCGGGGACTCCAGGGCGCC
CCTCTGCGGCCGACGCCCGGGGTGCAGCGGCCGCCGGGGCTGGGGCCGGCGGG
AGTCCGCGGGACCCTCCAGAAGAGCGGCCGGCGCCGTGACTCAGCACTGGGGCG
GAGCGGGGCGGGACCACCCTTATAAGGCTCGGAGGCCGCGAGGCCTTCGCTGGA
GTTTCGCCGCCGAGTCTTCGCCACCAGTGAGTACGCGCGGCCCGCGTCCCCGGG
GATGGGGCTCAGAGCTCCCAGCATGGGGCCAACCCGCGAGCATCAGGCCCGGGCTC
CCGGCAGGGCTCCTCGCCCACCTCGAGACCCGGGACGGGGGCCTAGGGGACCCA
GGACGTCCCAGTGCCGTTAGCGGCTTTCAGGGGGCCCGGAGCGCCTCGGGGAGG
GATGGGACCCCGGGGGCGGGGAGGGGGGGCAGACTGCGCTCACCGCGCCTTGGC
ATCCTCCCCCGGGCTCCAGCAAACCTTTTCTTTGTTGCTGCGAGTGCCGCCCTACACCG
TGGTCTATTTCCCAGTTCGAGGTAGGAGCATGTGTCTGGCAGGGAAGGGAGGCAGG
GGCTGGGGCTGCAGCCCACAGCCCCTCGCCCACCCGGAGAGATCCGAACCCCTT
ATCCCTCCGTCGTGTGGCTTTTACCCCGGGCCTCCTTCCTGTTCCCCGCCTCTCCCGC
CATGCCTGCTCCCCGCCCCAGTGTTGTGTGAAATCTTCGGAGGAACCTGTTTCCCTGT
TCCCTCCCTGCACTCCTGACCCCTCCCCGGGTTGCTGCGAGGCGGAGTCGGCCCCG
TCCCCACATCTCGTACTTCTCCCTCCCCGCAGGCCGCTGCGCGGCCCTGCGCATGCT
GCTGGCAGATCAGGGCCAGAGCTGGAAGGAGGAGGTGGTGACCGTGGAGACGTGG
CAGGAGGGCTCACTCAAAGCCTCCTGCGTAAGTGACCATGCCCAGGCAAGGGGAG
GGGGTGTGGGCCTTAGGGGGCTGTGACTAGGATCGGGGGACGCCCAAGCTCAGT
GCCCTCCCTGAGCCATGCCTCCCCAACAGCTATACGGGCAGCTCCCCAAGTTCC
AGGACGGAGACCTCACCTGTACCAGTCCAATACCATCCTGCGTCACCTGGGCCGC
ACCCTTGGTGAGTCTTGAACCTCCAAGTCCAGGGCAGGCATGGGCAAGCCTCTGCC
CCCGGAGCCCTTTTGTAAATCAGCTGCCCGCAGCCCTCTGGAGTGGAGGAACT
GAGACCCACTGAGGTTACGTAGTTTGCCCAAGGTCAAGCCTGGGTGCCTGCAATCCT
TGCCCTGTGCCAGGCTGCCTCCCAGGTGTCAGGTGAGCTCTGAGCACCTGCTGTGTG
GCAGTCTCTCATCCTTCCACGCACATCCTCTTCCCCTCCTCCCAGGCTGGGGCTCAC
AGACAGCCCCCTGGTTGGCCCATCCCCAGTGACTGTGTGTTGATCAGGCGCCCAGTC

ACGCGGCCTGCTCCCCTCCACCCAACCCCAGGGCTCTATGGGAAGGACCAGCAGG
AGGCAGCCCTGGTGGACATGGTGAATGACGGCGTGGAGGACCTCCGCTGCAAATAC
ATCTCCCTCATCTACACCAACTATGTGAGCATCTGCACCAGGGTTGGGCACTGGGGG
CTGAACAAAGAAAGGGGCTTCTTGTGCCCTCACCCCCCTTACCCCTCAGGTGGCTTG
GGCTGACCCCTTCTTGGGTCAGGGTGCAGGGGCTGGGTCAGCTCTGGGCCAGGGG
CCCAGGGGCCTGGGACAAGACACAACCTGCACCCTTATTGCCTGGGACATCAACCA
GCCAAGTAACGGGTCATGGGGGCGAGTGCAAGGACAGAGACCTCCAGCAACTGGT
GGTTTCTGATCTCCTGGGGTGGCGAGGGCTTCTGGAGTAGCCAGAGGTGGAGGAG
GATTTGTCGCCAGTTTCTGGATGGAGGTGCTGGCACTTTTAGCTGAGGAAAATATGCA
GACACAGAGCACATTTGGGGACCTGGGACCAGTTCAGCAGAGGCAGCGTGTGTGCG
CGTGCGTGTGCATGTGTGTGCGTGTGTGTGTGTACGCTTGCATTTGTGTGCGGGTGGGT
AAGGAGATAGAGATGGGCGGGCAGTAGGCCAGGTCCCGAAGGCCTTGAACCCACT
GGTTTGGAGTCTCCTAAGGGCAATGGGGGCCATTGAGAAGTCTGAACAGGGCTGTGT
CTGAATGTGAGGTCTAGAAGGATCCTCCAGAGAAGCCAGCTCTAAAGCTTTTGCAATC
ATCTGGTGAGAGAACCCAGCAAGGATGGACAGGCAGAATGGAATAGAGATGAGTTG
GCAGCTGAAGTGGACAGGATTTGGTACTAGCCTGGTTGTGGGGAGCAAGCAGAGGA
GAATCTGGGACTCTGGTGTCTGGCCTGGGGCAGACGGGGGTGTCTCAGGGGCTGG
GAGGGATGAGAGTAGGATGATACATGGTGGTGTCTGGCAGGAGGCGGGCAAGGATG
ACTATGTGAAGGCACTGCCCGGGCAACTGAAGCCTTTTGAGACCCTGCTGTCCCAGA
ACCAGGGAGGCAAGACCTTCATTGTGGGAGACCAGGTGAGCATCTGGCCCCATGCT
GTTCCCTTCTCGCCACCCTCTGCTTCCAGATGGACACAGGTGTGAGCCATTTGTTTAG
CAAAGCAGAGCAGACCTAGGGGATGGGCTTAGGCCCTCTGCCCCCAATTCCTCCAG
CCTGCTCCCGCTGGCTGAGTCCCTGGCCCCCTGCCCTGCAGATCTCCTTCGCTGAC
TACAACCTGCTGGACTTGCTGCTGATCCATGAGGTCCTAGCCCCTGGCTGCCTGGAT
GCGTTCCCCCTGCTCTCAGCATATGTGGGGCGCCTCAGTGCCCGGCCCAAGCTCAA
GGCCTTCTGGCCTCCCCTGAGTACGTGAACCTCCCCATCAATGGCAACGGGAAACA
GTGAGGGTTGGGGGACTCTGAGCGGGAGGCAGAGTTTGCCTTCTTTCTCCAGGA
CCAATAAAATTTCTAAGAGAGCTACTATGAGCACTGTGTTTCTGGGACGGGGCTTAG
GGGTTCTCAGCCTCGAGGTCGGTGGGAGGGCAGAGCAGAGGACTAGAAAACAGCTC

CTCCAGCACAGTCAGTGGCTTCCTGGAGCCCTCAGCCTGGCTGTGTTTACTGAACCT
CACAACTAGAAGAGGAAGAAAAAAAAAGAGAGAGAGAAACAAAGAGAAATAACCAT
GGTCACTGTCCTGGAGCACCACACAGTGTATATAGAAGGAGAAAAGTCTCATAGAAA
CATGCTTTCTAGGCACAGCACGTGCCTGTCAGATGGACAGACTCCAGGATGGAGGGA
AATGAGGGATTCTGGGAAGGAGGGATGTGAGGAGTTCCTGTCCTGGGGGATTAGCT
GAGTAGCTCTGAGCAGCCCAGGTTGGTGGGAGGGTCATTCTGCTTGGATGGGGGCTT
TCCTGGCTTCCTGCTGACTTGTGAGTTTTGGTGCATCCTAGGCAAGCAATGACACTAC
TGTATTAGGATTCTCCAGAGAAGCTAAGCCAGTAAGATGCTGTAGGGCAGGCAAAATT
TTATCTCTGTCCTTTTAGGGTTTTTGGCTGGGCCTGAGAACTAAAGACATGAGCAAGA
GAAAAGCATTCAAATTTATCTAGGCTGGGCATAGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCA
CTTTGGGAGGCTGAGGCAGGTGAATCACTTGAGGTCAGGAGTCAAGACCAGCCTGA
CCAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAGGTGTGGTGGC
GGTTACCTGTAGTCCCTGCTACTTGGGAGGCTGAGGCATGAGAATCGCTCTCTCTCTC
CTGCCACCTTGTAAGATGTGCCTGCTTCCCCTTACCTTCCACCCTGATTGTAAGTTT
CCTGAGGCTTCCCAGTCATGCTCCTGTTAAGCCTGCAAAACTGTGAGTCAATTAAC
CTCTTTTCTTCATAAATACTCAGTCTCTGATAGGTCTTTGTAGCAGTGTGAGAATGGAC
TAATACACTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGAGATGGAGTCTCACTCTGGT
GCCTAGGCTGGAGTATAGTGGTGAATCTCTGCTCACTGTAACCTCTGCCTCTCAGAC
TCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGTGCCACCAC
CGCGCCTGGCTAATTTTTGTATTTTAGTAGAGATGGGCTTTCATCATGTTGGCCAGGC
TGGTTTCGGACTTTTAACCTCACGTGATCCACTCGCCTTGGGCTCCCAAAGTGCTGGG
ATTACAGGCGTGAGCCACCGCACCCAGCCTAATACGCTATATTAATCAGAACTGCCA
ACTAACCTCTAACTTGGGACTTTTCACTCTAACCAGTCAAATTTGTTTTCTTTGTCTGGC
TTCTGCAAAATGATTAAGTTTCACTTCCCCTCTAATAGAAGCACTAGCTGCTTTGGTCTT
GTGCTATCTTAATTTATGTGTCACTGAATGCTCAAATAAACTCTTTAGAATGTAATGGG
CTTAAGTTTATCTTCTAGCAGATCTGATGTCAGAGGTAGGATCCTTCAGAAGGACATCA
GAAGGATCTGAAGGATTTCTCCCCATCCTGGGCCAGTGATGGTCTCCAGGAGCAAT
GAGCAAACAGGTGTAGGCATTTCACTGAGCCCCCTGCACGCTGCTTCTGCAGCATA
TTTGAAGGTCATCACTGGTAAGTCCCCTCAGATACTGTATTAGTCCCCTTCTCACACTG

CTATAAAGAACTACCTGAGACTGGGTAATTTATAAAGAAAAGAGGCTAAGCCAGGTGT
 GGTGGCTCATACCTGTAATCCCAACACTTTGGTTTTTTTTCTGGTTGTTGTTGTTGTTGTT
 TTTTGAGTCAGAGTCTCACTCTGTCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTCAG
 CTCACTGCAACCTCCACTTTCTGGGTTCAAGTGATTCTCCTGCCT

BISULFITE MODIFICATION OF DNA

TTGTTTATTTTTAGGTTTCGTTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTTTCGGTTAG
 TTGCGCGGCGATTTCCGGGATTTTAGGGCGTTTTTTTTCGGTTCGACGTTCCGGGGTGTA
 GCGGTCGTCGGGGTTGGGGTCGGCGGGAGTTCGCGGGATTTTTTAGAAGAGCGGTC
 GGCGTCGTGATTTAGTATTGGGGCGGAGCGGGGCGGGATTATTTTTATAAGGTTCCG
 AGGTCGCGAGGTTTTCGTTGGAGTTTCGTCGTCGTAGTTTTTCGTTATTAAGTACG
 CGCGGTTCCGCGTTTTCCGGGATGGGGTTAGAGTTTTTAGTATGGGGTTAATTCGTAG
 TATTAGGTTCCGGTTTTCCGGTAGGGTTTTTCGTTTATTTTCGAGATTCGGGACGGGGGTT
 TAGGGGATTTAGGACGTTTTTAGTGTCGTTAGCGGTTTTTAGGGGGTTCGGAGCGTTTC
 GGGGAGGGATGGGATTTCCGGGGGCGGGGAGGGGGGGTAGATTGCGTTTATCGCGT
 TTTGGTATT

FORWARD

Length: 21bp.

5' ATTTGGGAAAGAGGGAAAGGT 3'

Tm=63.43; CpG=0; C=3

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' TAGGTTTYGTTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTYGGTTAGTTG 3'

REVERSE

Length: 20 bp.

5' AACTCTAAACCCCATCCCC 3'

Tm=62.65; CpG=0; C=4

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' TTAACCCCATACTAAAACTCTAAACCCCATCCCCRAAAACRCRAACCRC 3'

PCR PRODUCT

Length: 298 bp.

5'

ATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTT^TYGGTTAGTTGYGYGGYGATTTYGGGGATTTTAG
 GGYGTTTTTTTTGYGGTYGAYGTTYGGGGTGTAGYGGTYGTYGGGGTTGGGGTYGGYGG
 GAGTTYGYGGGATTTTTTAGAAGAGYGGTYGGYGTGTGATTTAGTATTGGGGYGGAG
 YGGGGYGGGATTATTTTTATAAGGTTYGGAGGTGYGAGGTTTTYGTTGGAGTTTYGTY
 GTYGTAGTTTTYGTTATTAGTGAGTAYGYGYGGTTYGYGTTTTYGGGGATGGGGTTTAGA
 GTTT 3'

%CGs=53.02

ADDITIONAL PRIMERS

NUMBER 2(4998,5018) -- (5277,5298)

FORWARD

Length:21 bp.

5' ATTTGGGAAAGAGGGAAAGGT 3'

Tm=63.43; CpG=0; C=3

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' TAGGTTTTYGTTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTT^TYGGTTAGTTG 3'

REVERSE

Length:22 bp.

5' TAAAACTCTAAACCCCATCCC 3' Tm=61.48; CpG=0; C=6

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' RAATTAACCCCATACTAAAACTCTAAACCCCATCCCCRAAAACRCRAACCR 3'

PCR PRODUCT

Length: 301 bp.

5'

ATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTT^TYGGTTAGTTGYGYGGYGATTTYGGGGATTTTAG
 GGYGTTTTTTTTGYGGTYGAYGTTYGGGGTGTAGYGGTYGTYGGGGTTGGGGTYGGYGG
 GAGTTYGYGGGATTTTTTAGAAGAGYGGTYGGYGTGTGATTTAGTATTGGGGYGGAG

YGGGGYGGGATTATTTTTATAAGGTTYGGAGGTYGYGAGGTTTTYGTTGGAGTTTYGTY
 GTYGTAGTTTTYGTTATTAGTGAGTAYGYGYGGTTYGYGTTTTYGGGGATGGGGTTTAGA
 GTTTTTA 3'

%CGs=52.49

NUMBER 3(4998,5018) -- (5277,5301)

FORWARD

Length:21 bp.

5' ATTTGGGAAAGAGGGAAAGGT 3'

Tm=63.43; CpG=0; C=3

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' TAGGTTTTYGTTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTYGGTTAGTTG 3'

REVERSE

Length:25 bp.

5' TACTAAAACTCTAAACCCCATCCC 3' Tm=62.55; CpG=0; C=7

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' TACRAATTAACCCCATACTAAAACTCTAAACCCCATCCCCRAAAACRCRAACCR 3'

PCR PRODUCT

Length: 304 bp.

5'

ATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTYGGTTAGTTGYGYGGYGATTTYGGGGATTTTAG
 GGYGTTTTTTTTGYGGTYGAYGTTYGGGGTGTAGYGGTYGTYGGGGTTGGGGTYGGYGG
 GAGTTYGYGGGATTTTTTAGAAGAGYGGTYGGYGTGTGATTTAGTATTGGGGYGGAG
 YGGGGYGGGATTATTTTTATAAGGTTYGGAGGTYGYGAGGTTTTYGTTGGAGTTTYGTY
 GTYGTAGTTTTYGTTATTAGTGAGTAYGYGYGGTTYGYGTTTTYGGGGATGGGGTTTAGA
 GTTTTTAGTA 3'

%CGs=52.30

NUMBER 4(4992,5009) -- (5276,5295)

FORWARD

Length:18 bp.

5' TTGGGGATTGGGAAAGA 3'

Tm=63.01; CpG=0; C=3

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' ATTTTTAGGTTTTYGTGGGGATTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTT 3'

REVERSE

Length:20 bp.

5' AAACCTAAACCCCATCCCC 3' Tm=62.65; CpG=0; C=4

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' TTAACCCCATACTAAAACTCTAAACCCCATCCCCRAAAACRCRAACCRC 3'

PCR PRODUCT

Length: 304 bp.

5'

TTGGGGATTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTGGTTAGTTGYGYGGYGATTTYGGGG
 ATTTTAGGGYTTTTTTTTGYGGTYGAYGTTYGGGGTGTAGYGGTYGTGGGGTTGGGGT
 YGGYGGGAGTTYGYGGGATTTTTTAGAAGAGYGGTYGGYGTGTGATTTAGTATTGGG
 GYGGAGYGGGGYGGGATTATTTTTATAAGGTTYGGAGGTYGYGAGGTTTTTGTGGAG
 TTTYGTYGTGTAGTTTTTGTATTAGTGAGTAYGYGGTTYGYGTTTTTGGGGATGGG
 GTTTAGAGTTT 3'

%CGs=53.29

NUMBER 5(4992,5009) -- (5277,5298)

FORWARD

Length:18 bp.

5' TTGGGGATTGGGAAAGA 3'

Tm=63.01; CpG=0; C=3

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' ATTTTTAGGTTTTYGTGGGGATTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTT 3'

REVERSE

Length:22 bp.

5' TAAAACTCTAAACCCCATCCC 3' Tm=61.48; CpG=0; C=6

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' RAATTAACCCCATACTAAAACTCTAAACCCCATCCCCRAAAACRCRAACCR 3'

PCR PRODUCT

Length: 307 bp.

5'

TTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTYGGTTAGTTGYGYGGYGATTTYGGGG
ATTTTAGGGYTTTTTTTTGYGGTYGAYGTTYGGGGTGTAGYGGTYGTGGGGTTGGGGT
YGGYGGGAGTTYGYGGGATTTTTTAGAAGAGYGGTYGGYGTGTGATTTAGTATTGGG
GYGGAGYGGGGYGGGATTATTTTTATAAGGTTYGGAGGTYGYGAGGTTTTTYGTTGGAG
TTTTYGTYGTGTAGTTTTYGTATTAGTGAGTAYGYGYGGTTYGYGTTTTTYGGGGATGGG
GTTTAGAGTTTTTA 3'

%CGs=52.77

NUMBER 6(4992,5010) -- (5276,5295)

FORWARD

Length:19 bp.

5' TTGGGGATTTGGGAAAGAG 3'

Tm=63.74; CpG=0; C=3

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' ATTTTTAGGTTTTYGTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTYG 3'

REVERSE

Length:20 bp.

5' AAACCTAAACCCCATCCCC 3' Tm=62.65; CpG=0; C=4

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' TTAACCCCATACTAAAACTCTAAACCCCATCCCCRAAAACRCRAACCRC 3'

PCR PRODUCT

Length: 304 bp.

5'

TTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTYGGTTAGTTGYGYGGYGATTTYGGGG
ATTTTAGGGYTTTTTTTTGYGGTYGAYGTTYGGGGTGTAGYGGTYGTGGGGTTGGGGT

YGGYGGGAGTTYGYGGGATTTTTAGAAAGAGYGGTYGGYGTGTGATTTAGTATTGGG
 GYGGAGYGGGGYGGGATTATTTTTATAAGGTTYGGAGGTYGYGAGGTTTTYGTTGGAG
 TTTYGTGTGTAGTTTTYGTATTAGTGAGTAYGYGYGGTTYGYGTTTTYGGGGATGGG
 GTTTAGAGTTT 3'

%CGs=53.29

NUMBER 7(4992,5010) -- (5277,5298)

FORWARD

Length:19 bp.

5' TTGGGGATTTGGGAAAGAG 3'

Tm=63.74; CpG=0; C=3

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' ATTTTTAGGTTYGTTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTYG 3'

REVERSE

Length:22 bp.

5' TAAAACTCTAAACCCCATCCC 3' Tm=61.48; CpG=0; C=6

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' RAATTAACCCCATACTAAAACTCTAAACCCCATCCCCRAAACRCRAACCR 3'

PCR PRODUCT

Length: 307 bp.

5'

TTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTYGGTTAGTTGYGYGGYGATTTYGGGG
 ATTTTAGGGYGTTTTTTTGYGGTYGAYGTTYGGGGTGTAGYGGTYGTGGGGTTGGGGT
 YGGYGGGAGTTYGYGGGATTTTTAGAAAGAGYGGTYGGYGTGTGATTTAGTATTGGG
 GYGGAGYGGGGYGGGATTATTTTTATAAGGTTYGGAGGTYGYGAGGTTTTYGTTGGAG
 TTTYGTGTGTAGTTTTYGTATTAGTGAGTAYGYGYGGTTYGYGTTTTYGGGGATGGG
 GTTTAGAGTTTTTA 3'

%CGs=52.77

NUMBER 8(4992,5009) -- (5277,5301)

FORWARD

Length:18 bp.

5' TTGGGGATTTGGGAAAGA 3'

Tm=63.01; CpG=0; C=3

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' ATTTTTTAGGTTTYGTTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTTY 3'

REVERSE

Length:25 bp.

5' TACTAAAACTCTAAACCCCATCCC 3' Tm=62.55; CpG=0; C=7

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' TACRAATTAACCCCATACTAAAACTCTAAACCCCATCCCCRAAAACRCRAACCR 3'

PCR PRODUCT

Length: 310 bp.

5'

TTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTTYGGTTAGTTGYGYGGYGATTTYGGGG
 ATTTTAGGGYGTTTTTTTGYGGTYGAYGTTYGGGGTGTAGYGGTYGTYGGGGTTGGGGT
 YGGYGGGAGTTYGYGGGATTTTTTAGAAGAGYGGTYGGYGTGTGATTTAGTATTGGG
 GYGGAGYGGGGYGGGATTATTTTTATAAGGTTYGGAGGTYGYGAGGTTTTTYGTTGGAG
 TTTYGTYGTGTAGTTTTTYGTTATTAGTGAGTAYGYGYGGTTYGYGTTTTTYGGGGATGGG
 GTTTAGAGTTTTTAGTA 3'

%CGs=52.58

NUMBER 9(4992,5010) -- (5277,5301)

FORWARD

Length:19 bp.

5' TTGGGGATTTGGGAAAGAG 3'

Tm=63.74; CpG=0; C=3

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' ATTTTTTAGGTTYGTTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTYG 3'

REVERSE

Length:25 bp.

5' TACTAAAACTCTAAACCCCATCCC 3' Tm=62.55; CpG=0; C=7

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' TACRAATTAACCCCATACTAAAACTCTAAACCCCATCCCCRAAAACRCRAACCR 3'

PCR PRODUCT

Length: 310 bp.

5'

TTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTYGGTTAGTTGYGYGGYGATTTYGGGG
 ATTTTAGGGYTTTTTTTTGYGGTYGAYGTTYGGGGTGTAGYGGTYGTGGGGTTGGGGT
 YGGYGGGAGTTYGYGGGATTTTTTAGAAGAGYGGTYGGYGTGTGATTTAGTATTGGG
 GYGGAGYGGGGYGGGATTATTTTTATAAGGTTYGGAGGTYGYGAGGTTTTYGTTGGAG
 TTTYGTGTGTAGTTTTYGTTATTAGTGAGTAYGYGYGGTTYGYGTTTTYGGGGATGGG
 GTTTAGAGTTTTTAGTA 3'

%CGs=52.58

NUMBER 10(4998,5018) -- (5281,5304)

FORWARD

Length:21 bp.

5' ATTTGGGAAAGAGGGAAAGGT 3'

Tm=63.43; CpG=0; C=3

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' TAGGTTYGTTGGGGATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTYGGTTAGTTG 3'

REVERSE

Length:24 bp.

5' CCATACTAAAACTCTAAACCCCA 3' Tm=60.58; CpG=0; C=7

You may modify the primer sequence if necessary, within this region:

5' TACTACRAATTAACCCCATACTAAAACTCTAAACCCCATCCCCRAAAACRCRA 3'

PCR PRODUCT

Length: 307 bp.

5'

ATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTYGGTTAGTTGYGYGGYGATTTYGGGGATTTTAG
GGYGTTTTTTTGYGGTYGAYGTTYGGGGTGTAGYGGTYGTYGGGGTTGGGGTYGGYGG
GAGTTYGYGGGATTTTTTAGAAGAGYGGTYGGYGTGTGATTTAGTATTGGGGYGGAG
YGGGGYGGGATTATTTTTATAAGGTTYGGAGGTYGYGAGGTTTTYGTTGGAGTTYGT
GTYGTAGTTTTYGTATTAGTGAGTAYGYGYGGTTYGYGTTTTYGGGGATGGGGTTTAGA
GTTTTTAGTATGG 3'

%CGs=52.44

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววัลลา พงษ์ชัยภูมเกิดเมื่อวันที่ 23 พฤศจิกายน พ.ศ. 2528 มีภูมิลำเนาอยู่ที่
จังหวัดระยองประเทศไทย

ประวัติการศึกษา

- ปีพ.ศ. 2546 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมจากโรงเรียนระยองวิทยาคม จังหวัดระยอง
- ปีพ.ศ. 2550 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิตภาคศึกษาศาสตรบัณฑิต
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ปีพ.ศ. 2552 เข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโทบัณฑิตศึกษามหาบัณฑิตแขนงวิชาพยาบาลวิทยา
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย