การตรวจหาเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *HCP5 HPC5* และ *TNFRSF8* ในมะเร็งปากมดลูก

นาย ชยุตม์ พานทองกชกร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
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.

DETECTION OF *HCP5, HPC5*, AND *TNFRSF8* PROMOTER METHYLATION IN CERVICAL CANCER

Mr. Chayuth Phantongkodchakorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Genetic

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *HCP5 HPC5* และ *TNFRSF8* ในมะเร็งปากมดลูก
โดย	นายชยุตม์ พานทองกชกร
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……. ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุมพล คุณวาสี)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต)

……. กรรมการ
(อาจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ)

……. กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. โชติกา สมรรคจันทร์)

ชยุตม์ พานทองกชกร : การตรวจหาเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *HCP5 HPC5* และ *TNFRSF8* ในมะเร็งปากมดลูก. (DETECTION OF *HCP5, HPC5,* AND *TNFRSF8* PROMOTER METHYLATION IN CERVICAL CANCER) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต 85 หน้า.

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดเป็นอันดับสามในสตรีทั่วโลกและเกิดขึ้นบ่อยในสตรีอายุน้อยกว่า 25 ปี สาเหตุของมะเร็งปากมดลูกเกิดจากการติดเชื้อ human papillomavirus 16 และ 18 (HPV16 และ HPV18) ซึ่งติดต่อผ่านทางผ่านทางเพศสัมพันธ์ สาเหตุการเกิดมะเร็งไม่เพียงแค่การติดเชื้อ HPV แต่ยังรวมถึงในระดับโมเลกุล ในงานครั้งนี้ศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชันของ *HCP5, HPC5* และ *TNFRSF8* โดย DNA methylation วิธี Methylation primer PCR (MSP - PCR) และ RT - PCR สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนเหล่านี้ ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเมทิลเลชันกับการแสดงออกของยีนใช้ HeLa ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก เลี้ยงในอาหารโดยใส่ยา 5'Azacytidine ผลการศึกษาพบว่ามีเพียง *TNFRSF8* ที่สามารถศึกษาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในมะเร็งปากมดลูกและเซลล์ปากมดลูกปกติ จาก เซลล์มะเร็งปากมดลูก 45 ตัวอย่างและเซลล์ปกติ 36 ตัวอย่าง พบดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์มะเร็งปากมดลูก 68.88% และตรวจพบเมทิลเลชันควบคู่กับอันเมทิลเลชันในเซลล์ปากมดลูกปกติ 44.44% สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน และการแสดงออกของยีน ผลพบว่าเมทิลเลชันลดลงเมื่อ เลี้ยง เซลล์ HeLa ร่วมกับ 5'Azacytidine แต่ ในการทดลองเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนปรากฏว่าผลการทดลองล้มเหลว ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้ ผลจากการศึกษาในยีน *HCP5* ตรวจพบเมทิลเลชันทั้งในเซลล์ HeLa และเซลล์เม็ดเลือดขาว จึงตัดยีนนี้ออกจากการทดลอง ผลจากการศึกษาในยีน *HPC5* ไม่สามารถหาลำดับนิวคลิโอไทด์ได้จากฐานข้อมูลทั้งหมด ดังนั้นจึงไม่สามารถทำการทดลองได้ จากผลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า *TNFRSF8* อาจจะเป็นยีนต้านมะเร็งในมะเร็งปากมดลูกในขณะที่ *HCP5* นี้ไม่ใช่ และ *HPC5* เป็น novel gene ที่จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่ามีอยู่จริง

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา พันธุศาสตร์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา 2554

5072634123 : MAJOR Science

KEYWORDS : DNA Methylation / Cervical Cancer / *TNFRSF8* / *HCP5* / *HPC5*

CHAYUTH PHANTONGKODCHAKORN : DETECTION OF *HCP5 ,HPC5,* AND *TNFRSF8* PROMOTER METHYLATION IN CERVICAL CANCER. ADVISOR : PATTAMAWADEE YANATATSANEEJIT,Ph.D., 85 pp.

Cervical cancer is the third most common cancer in women worldwide and occurs frequently in women under 25 years of age . Of the causes of cervical cancer, an infection of high risk human papillomavirus (HPV16 and HPV18) is most prevalent associated through sexual transmission. Not only HPV infection but also in molecular level is seen in carcinogenesis. Here, methylation status of *HCP5*, *HPC5*, and *TNFRSF8* was studied by methylation specific primer PCR (MSP-PCR) and RT-PCR was studied for the expression of these genes .For correlation and expression study, HeLa cervical cancer cell line was used as model, after treated with 5' Azacystidine, methylation and expression status were detected. The result showed that only *TNFRSF8* could be studied for methylation status in cervical cancer and normal cervix cells. From 45 cervical cancer cells and 36 normal cervix cells, methylation status in cervical were found 68.88% whereas both methylation and unmethylation could be detected in normal cervix 44.44 %. For correlation between methylation and expression, the result show that methylation decreased when treated HeLa cell with 5'Azacytidine, but the experiment in expression part was failed, therefore we could not interpret the result. *HCP5* was detected methylation in both HeLa and white blood cell, therefore this gene was excluded in this experiment. HPC5 could not find the sequence from all databases. Taken together, *TNFRSF8* may play role in tumor suppressor gene in cervical cancer whereas *HCP5* does not. And for *HPC5* ,it's a novel gene that need to study more to confirmed that it' actually exist.

Department : Botany ..... Student's Signature .....

Field of Study : Genetics ..... Advisor's Signature .....

Academic Year :2554 .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานนี้ ซึ่งได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ รวมทั้งดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดีตลอดมาตั้งแต่เริ่มจนโครงงานนี้สำเร็จ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ปร ะสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ให้คำชี้แนะ คำตักเตือน จนกระทั่งนิสิตดำเนินโครงงานนี้อย่างสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัวที่ให้กำลังใจ สนับสนุนและอยู่เคียงข้างนิสิตตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆและน้องๆ ที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกคน ที่ให้กำลังใจ ช่วยเ หลือและสนับสนุนในทุกๆเรื่อง

นอกจากนี้ขอขอบพระคุณในความเอื้อเฟื้อและความช่วยเหลือจากศาส ตราจารย์ นพ . อภิวัฒน์ มุทิรางกูรที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ สารเคมี และสถานที่ในการปฏิบัติงานวิจัย

ขอขอบพระคุณพี่แป๊ก พี่นัท พี่จ๋า พี่เกด และพี่ส้ม พี่ๆที่ห้องปฏิบัติงานวิจัยที่ให้ความช่วยเหลือและให้ความรู้แก่นิสิตเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่นิสิตปฏิบัติงานวิจัย

โครงงานวิทยาศาสตร์นี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอแสดงความขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…….. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... .. จ

กิตติกรรมประกาศ..... .. ฉ

สารบัญ..... ... ช

สารบัญตาราง..... ... ฌ

สารบัญภาพ..... ... ญ

บทที่

1. บทนำ……..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... .. 1

1.2 วัตถุประสงค์..... . 5

1.3 ขอบเขตการวิจัย..... .. 5

1.4 ข้อจำกัดของการวิจัย..... 5

1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย…….. 6

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... .. 6

1.7 วิธีดำเนินการวิจัย..... 7

1.8 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย…….. 8

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…….. 10

2.1 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 10

3. วิธีดำเนินการวิจัย…… 21

3.1 ประชากร..... 21

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 21

3.3 วิธีทดลอง..... 25

4. ผลการทดลอง……..... 41

5. สรุปผลการการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ……..... 62

6. รายการอ้างอิง……..... 65

7. ภาคผนวก..... 69

8. ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์…….. 85

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาตรของสารต่างๆที่ใช้เตรียม *8% non deturing polyacrylamide gel*.....	34
2	ผลการรันเจลจากการทำMSP-PCR ในตัวอย่างทั้ง81 ตัวอย่าง.....	43
3	ผลการรันเจลจากการทำ MSP-PCR เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งกับเซลล์ปกติ.....	43
4	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสจากการทำ sequencing เปรียบเทียบระหว่างระหว่างพลาสมิดที่สกัดกับลำดับเบสจากข้อมูล microarray data ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ในยีนTNFRSF8.....	56
5	ผลการ treat Hela cell ด้วย 5'Aza cystidine เปรียบเทียบปริมาตรเมทิลเลชันของยีน TNFRSF8 ระหว่างเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการทรีต กับเซลล์ที่ทรีต 5'Azacytidine ความเข้มข้น 20 µl	57
6	ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ของยีนเป้าหมาย.....	78
7	TM และขนาด product site ของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้.....	79

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ตำแหน่งเยื่อบุผนังปากมดลูก……	10
2	มะเร็งปากมดลูกในระยะต่างๆ.....	11
3	HPV – Virus.....	12
4	การทำ Pap Smear.....	13
5	ชนิดของเซลล์ที่ตรวจพบจากการทำ Pap Smear.....……	14
6	ปัจจัยก่อมะเร็งกระตุ้นให้ proto-oncogenes กลายเป็น oncogenesและทำให้เซลล์เป็นมะเร็งได้.....	15
7	ความผิดปกติในรูปแบบต่างๆของยีน ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนนั้นๆ…….	16
8	วงจรวัฏจักรเซลล์.....	17
9	จุด check point ในวัฏจักรเซลล์……..	18
10	แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ผ่าน bisulfite treaatment.....	31
11	โครงสร้างของเวกเตอร์ pGEM®-T Easy Vector System I.....	35
12	การทำโคลนนิ่ง	38
13	ผลการรันเจลพบเมทิลเลชันแบนค์ของยีน *TNFRSF8* ใน Hela ขณะที่ไม่พบแบนด์ในเซลล์เม็ดเลือดขาว……..	41
14	ผลการรันเจลพบอันเมทิลเลชันแบนค์ของยีน *TNFRSF8* ในเซลล์เม็ดเลือดขาว….....	42
15	ผลการรันเจลไม่พบเมทิลเลชันแบนค์ของยีน *TNFRSF8* ในเซลล์ HeLa…….	42
16	ผลการรันเจลพบเมทิลเลชันแบนค์ของยีน *HCP5* ทั้งใน Hela และเซลล์เม็ดเลือดขาว……	44
17	ผลการรันเจลไม่พบเมทิลเลชันแบนค์ของยีน *HCP5* ทั้งใน Hela และเซลล์เม็ดเลือดขาว……	44
18	โคโลนีที่ถูกคัดเลือกเพื่อการทำ sequencing……	45
19	ผลการรันเจลแสดงการสกัดพลาสมิดของโคลนที่ถ่ายยีนจาก HeLa เป็นผลสำเร็จ……	45
20	ผลการรันเจลแสดงการสกัดพลาสมิดของโคลนที่ถ่ายยีนจากเซลล์เม็ดเลือดขาวไม่เป็นผลสำเร็จ…….	46

21	The t-Distribution Table ……	59
22	ผลการรันเจลแสดงผลการทำ RT – PCR ของ *TNFRSF8* อาร์เอ็นเอ……	60
23	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (1)	70
24	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (2)	70
25	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (3)	71
26	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (4)	71
27	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (5)	71
28	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (6)	72
29	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (7)	72
30	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (8)	73
31	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (9)	73
32	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (10)	74
33	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (11)	74
34	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (12)	75
35	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (13)	75
36	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (14)	76
37	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (15)	76
38	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (16)	77
39	ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (17)	78

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งปากมดลูก เป็นโรคมะเร็งที่พบมากในหญิงเอเชีย และพบมากเป็นอันดับสองในหญิงไทยรองจากมะเร็งเต้านม พบได้ตั้งแต่อายุ 30 ปี จนถึง 80 ปี โดยพบมากในช่วงอายุ 35-50 ปี อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยสูงถึง 7 คนต่อวัน และพบผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่สูงถึง 6,000 คนต่อปี (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, มะเร็งปากมดลูก, แหล่งที่มา http://www.nci.go.th/Knowledge/pakmodluk.html) โรคมะเร็งปากมดลูก เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติไปของเซลล์บุผิวที่บริเวณปากมดลูกจนกลายเป็นเนื้อร้าย สามารถแพร่ขยายลุกลามไปยังอวัยวะใกล้เคียงมดลูกภายในอุ้งเชิงกราน และกระจายไปยัง ปอด ตับ ลำไส้ หรือสมอง ทำให้เกิดความผิดปกติกับอวัยวะเหล่านั้นได้

โรคมะเร็งปากมดลูกแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ

ระยะที่ 0 (Carcinoma *in situ*)

พบเซลล์ผิดปกติแต่ยังไม่ใช่เซลล์มะเร็ง โดยตรวจพบเซลล์ที่ผิดปกติบริเวณผิวนอกสุดของปากมดลูก

ระยะที่ 1

แบ่งออกเป็น ระยะ 1A และ ระยะ 1B ตามขนาดของมะเร็ง

ระยะ 1A เป็นระยะที่พบมะเร็งน้อยมาก สามารถเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์เท่านั้น

ระยะ 1A1 ตรวจพบมะเร็งที่มีความลึกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 มิลลิเมตร และความกว้างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 7 มิลลิเมตร

ระยะ 1A2 เป็นระยะที่ตรวจพบมะเร็งที่มีความลึกมากกว่า 3 มิลลิเมตร แต่ไม่มากกว่า 5 มิลลิเมตร และ ความกว้างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 7 มิลลิเมตร

ระยะ 1B เป็นระยะที่ตรวจพบมะเร็งที่มีความลึกมากกว่า 5 มิลลิเมตร หรือ ความกว้างมากกว่า 7 มิลลิเมตร สามารถมองเห็นมะเร็งได้ด้วยตาเปล่า

ระยะที่ 2

ตรวจพบมะเร็งกระจายออกไปจากปากมดลูกแล้วแต่ยังไม่ถึงเนื้อเยื่อของผนังด้านข้างของอุ้งเชิงกราน (pelvic wall) หรือมีการกระจายไปยังช่องคลอดแล้วแต่ยังไม่ถึงหนึ่งในสามส่วนล่างของช่องคลอด แบ่งออกเป็น ระยะ 2A และ 2B ตามความไกลในการกระจายของมะเร็ง

ระยะ 2A เป็นระยะที่มะเร็งกระจายออกจากปากมดลูกไปยังสองในสามส่วนบนของช่องคลอด แต่ยังไม่มีการกระจายเข้าไปในเนื้อเยื่อข้างตัวมดลูก

ระยะ 2B เป็นระยะที่มะเร็งกระจายออกจากปากมดลูกไปยังเนื้อเยื่อข้างตัวมดลูก

ระยะที่ 3

ตรวจพบมะเร็งกระจายออกไปยังหนึ่งในสามส่วนล่างของช่องคลอด โดยอาจมีการกระจายไปยังผนังด้านข้างของอุ้งเชิงกราน แบ่งออกเป็น ระยะ 3A และ ระยะ 3B โดยแบ่งตามความไกลในการกระจายของมะเร็ง

ระยะ 3A เป็นระยะที่มะเร็งกระจายไปยังหนึ่งในสามส่วนล่างของช่องคลอด แต่ยังไม่มีการกระจายไปยังผนังด้านข้างของอุ้งเชิงกราน

ระยะ 3B เป็นระยะที่มะเร็งกระจายไปยังผนังด้านข้างของอุ้งเชิงกราน มะเร็งอาจขยายตัวไปกดบริเวณท่อไต (Ureter) ทำให้เกิดการอุดตันของระบบปัสสาวะทำให้ไตมีขนาดใหญ่ขึ้น หรือทำงานได้แย่ลง ในระยะนี้อาจพบว่า เซลล์มะเร็งกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองภายในอุ้งเชิงกราน

ระยะที่ 4

ตรวจพบมะเร็งกระจายไปยังกระเพาะปัสสาวะ ทวารหนัก หรือส่วนอื่นๆ ของร่างกาย แบ่งออกเป็นระยะ 4 4A และ ระยะ 4B ซึ่งแบ่งจากตำแหน่งที่มะเร็งกระจาย

ระยะ 4A เป็นระยะที่มะเร็งกระจายไปยังกระเพาะปัสสาวะหรือทวารหนัก

ระยะ 4B เป็นระยะที่มะเร็งกระจายออกจากอุ้งเชิงกราน ไปยังส่วนอื่นๆของร่างกาย เช่น ช่องท้อง ตับ ลำไส้ หรือปอด เป็นต้น (ศูนย์รังสีรักษาและมะเร็งวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, แหล่งที่มา http://www.chulacancer.net/newpage/information/cervix_cancer04.html)

อาการของโรคมะเร็งปากมดลูกจะขึ้นอยู่กับระยะของโรค โดยระยะก่อตัว หรือระยะเริ่มต้นมักไม่แสดงอาการของโรค สามารถตรวจพบได้จากการตรวจคัดกรอง การตรวจภายใน และการทำแป๊บสะเมียร์ (pap-smear) เมื่อก้อนมะเร็งชัดเจนและมีขนาดใหญ่ขึ้นอาจมีอาการเลือดออกทางช่องคลอดเมื่อมีเพศสัมพันธ์ หากก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่ขึ้นอีกอาจมีอาการเลือดออกทางช่องคลอดผิดปรกติ มีประจำเดือนมาก หรือมาบ่อยผิดปรกติ มีอาการปวดบริเวณท้องน้อย และเมื่อมะเร็งลุกลามเข้ากระเพาะปัสสาวะหรือลำไส้ใหญ่จนทำให้อวัยวะดังกล่าวทะลุปัสสาวะและอุจจาระจะสามารถปนออกมาทางช่องคลอดได้

สาเหตุการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูกเกิดจากการติดเชื้อ Human Papillomavirus (HPV) โดย HPV จะไปเพิ่มการสะสมของการกลายพันธุ์ของเซลล์บุผิวที่บริเวณปากมดลูก และการเปลี่ยนแปลงของยีนมะเร็งหรือยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุ กล่าวคือ เกิดจากการขาดหายไปของยีนบนโครโมโซมที่เป็นโฮโมโลกัสโครโมโซม (loss of heterozygosity) การกลายพันธุ์ (mutation) หรือภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetic alteration) อย่างรุนแรงในยีนมะเร็งหรือยีนต้านมะเร็งก่อนจะลุกลามกลายเป็นมะเร็ง (Ferenczy and Franco, 2002) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetics) อาจเปลี่ยนแปลงโมเลกุลพื้นฐานของเนื้อเยื่อทำให้เนื้อเยื่อนั้นผิดปกติไป (Mutirangura *et al*., 1997)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA-methylation) คือ กระบวนการหนึ่งของภาวะเหนือพันธุกรรม โดยเป็นกระบวนการในการเติมหมู่เมทิลแทนที่อะตอมไฮโดรเจนในเบสไซโทซีนบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งส่วนใหญ่หมู่เมทิลจะถูกเติมที่บริเวณเบสไซโทซีนที่ติดกับเบสกัวนีน (CpG sites) ทำให้กลายเป็น Me-CpG ซึ่ง CpG sites ที่ผิดปกติไปนี้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังมักจะพบที่บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน และดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เกิดขึ้นสามารถส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนได้ (Walsh, 2006) โดยไปกดการแสดงออกของยีน

จากการศึกษาข้อมูล microarray data ใน NCBI พบว่ายีน Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 8 (*TNFRSF8*) และ HLA Complex P5 (*HCP5*) มีการแสดงออกลดลงใน

เซลล์มะเร็งปากมดลูกเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ จากปรากฏการณ์ดังกล่าวทำให้สมมติฐานว่า *TNFRSF8* และ *HCP5* น่าจะเป็นหนึ่งในยีนต้านมะเร็ง (candidate tumor suppressor genes) ในมะเร็งปากมดลูก เนื่องจากการสูญเสียหน้าที่ของยีนต้านมะเร็ง โดยอาจเกิดจากโครโมโซมแท่งหนึ่งมีการขาดหายไปของโครโมโซมบริเวณที่ยีนนั้นอยู่ และโครโมโซมอีกแท่งหนึ่งเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีนออกมาทำงานได้

ในการศึกษาในครั้งนี้สนใจยีนทั้งสิ้น 3 ยีนคือ

ยีน *TNFRSF8* อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 ตรงตำแหน่ง 1p36 ผลิตโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น receptor รับสัญญาณโปรแกรม apoptosis บน membraneของเซลล์

ยีน *HCP5* อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 6 ตรงตำแหน่ง 6p21.3 คือยีนในกลุ่ม HLA(Human leukocyte antigen) ทำหน้าที่สร้าง cell-surface antigen-presenting proteins

ยีน *HPC5* (Hereditary, Prostate Cancer 5) ยังไม่ทราบบทบาทการทำงานที่แน่ชัด แต่จากการศึกษาพบว่า ยีนนี้ไม่มีการทำงานในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก จึงจัดเป็นยีนต้านมะเร็งในมะเร็งต่อมลูกหมาก ซึ่งมีความน่าสนใจว่า จะมีบทบาทหน้าที่ในมะเร็งชนิดอื่นๆหรือไม่อย่างไร (Rökman et al. , 2004)

การศึกษาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน ศึกษาโดยการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติของผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกใน 81 ตัวอย่างซึ่งเป็นเซลล์ปกติ 36 ตัวอย่างและเซลล์มะเร็ง 45 ตัวอย่าง ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติของผู้ป่วยเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Methylated Specific Primer PCR (MSP-PCR) โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอไป ใส่สาร sodium bisulfide ก่อน ซึ่งจะเป็นการเปลี่ยนแปลงเบสบนสายดีเอ็นเอจากเบสไซโทซีนบนดีเอ็นเอไปเป็นเบสไทมีน ซึ่งจะสามารถตรวจสอบเมทิลเลชันได้ เนื่องจากการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันนั้นหมู่เมทิลจะถูกเติมที่เบสไซโตซีนที่ติดกับเบสกวานีน (CpG sites) บนสายของดีเอ็นเอ ดังนั้นเมื่อทำ sodium bisulfite treatment แล้วดีเอ็นเอที่มีเมทิลเลชันนั้นหมู่เมทิลจะไปขัดขวางการทำงานของ sodium bisulfite ทำให้เบสไซโตซีนที่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่ไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็นเบสไทมีน ตรงข้ามกันเบสไซโตซีนที่ไม่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่นั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเบสไทมีนทั้งหมด ทำให้สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้จากการเปลี่ยนแปลงของเบสบนสายของดีเอ็นเอเมื่อทำ sodium bisulfite treatment ด้วยวิธี MSP-PCR แล้วจึงวิเคราะห์ผลโดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (gel electrophoresis)

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเมทิลเลชันกับการแสดงออกของยีน *TNFRSF8 HCP5* และ *HPC5* นั้นทำได้โดยเลี้ยงเซลล์ HeLa ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูกควบคู่กับการใส่ยา 5'azacytidine โดยให้เป็นกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือไม่ใส่ยา 5'azacytidine หากเป็นไปตามสมมติฐานข้างต้นจะพบว่ายีนทั้งสามมีเมทิลเลชันที่ลดลง พร้อมทั้ง มีระดับการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มทดลองเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จะสามารถสรุปได้ว่าการเกิดเมทิลเลชันทำให้ยีนเป้าหมายมีการแสดงออกที่ลดลงในมะเร็งปากมดลูก และสามารถอนุมานได้ว่ายีน *TNFRSF8 HCP5* และ *HPC5* น่าจะเป็นยีนต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

โรคมะเร็งปากมดลูกซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเสียชีวิตของผู้หญิงไทยจำนวนมากนั้นมีการศึกษาเป็นจำนวนมาก แต่ยังมีการศึกษาที่เกี่ยวกับดีเอ็นเอเมทิลเลชันในมะเร็งปากมดลูกไม่มากนักและยังไม่เคยมีการศึกษาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *TNFRSF8 HCP5* และ *HPC5* ในโรคมะเร็งปากมดลูกมาก่อนอีกด้วย ด้วยเหตุนี้คาดว่าผลการศึกษาโครงงานวิทยาศาสตร์นี้จะเป็นประโยชน์อย่างมาก และอาจนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อพัฒนากระบวนการรักษาหรือป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูกต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาเมทิลเลชันของยีน *TNFRSF8 HCP5 และ HPC5* ในมะเร็งปากมดลูก

ขอบเขตของการวิจัย

ค้นหาและคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกของยีนลดลงในเซลล์มะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติในข้อมูล microarray ใน NCBI ออกแบบไพรเมอร์เพื่อทำ MSP-PCR เปรียบเทียบเมทิลเลชันของยีนในเซลล์ปกติเทียบกับเซลล์มะเร็ง ตรวจสอบและยืนยันลำดับเบสของยีนด้วยการทำโคลนนิงและ sequencing จากนั้นวิเคราะห์การแสดงออกของยีน โดยศึกษาผลของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่สกัดจาก HeLa 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเลี้ยงเซลล์ตามปกติ ขณะที่กลุ่มที่สองจะ demethylation ด้วยการ treat 5' AZA Cystedine

ข้อจำกัดของการวิจัย

จำนวนตัวอย่างจากคนไข้ ไม่เพียงพอต่อความต้องการ

ตัวอย่างเกิดการเสื่อมสภาพของยีน

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- Cervical Cancer หรือโรคมะเร็งปากมดลูก คือการเกิดเนื้อร้ายที่เติบโตอย่างผิดปกติในบริเวณปากมดลูก

- DNA methylation คือ สภาวะเหนือพันธุกรรมแบบหนึ่ง ที่มีการเติมหมู่เมทิลลงบนเบส cytosine หรือ adenine ซึ่งหากเกิดในบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน จะมีผลทำให้ยีนนั้นๆ ไม่มีการแสดงออก

- Tumor suppressor gene หรือ ยีนต้านมะเร็ง คือยีนที่มีบทบาทหน้าที่ในการระงับการกลายเป็นมะเร็งของเซลล์ โดยป กติยีนกลุ่มนี้มีหน้าที่ในการควบคุมวัฏจักรเซลล์ โดยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และควบคุมการตายของเซลล์

- Methylation specific primer Polymerase chain reaction (MSP-PCR) คือ การทำพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบรูปแบบความเป็นเมทิลเลชันของยีน โดยอาศัยการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มีเมทิลชันและยีนที่ไม่มีเมทิลเลชัน เมื่อผ่านการ treat ด้วย bisulfate

- Novel gene คือ บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเป็นไปได้ว่าน่าจะเป็นยีน แต่ยังไม่ได้รับการยืนยันว่าเป็นยีนจริง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ยืนยันว่าการเกิดเมทิเลชันของ candidate gene เกี่ยวข้องกับการเป็นมะเร็งปากมดลูก

2. เป็นแนวทางการวินิจฉัยโรคแบบใหม่ ซึ่งสามารถตรวจพบโรคได้ ก่อนมะเร็งจะก่อตัวขึ้น

3. สามารถทำนาย โอกาสและความเสี่ยงที่แต่ละคนจะเป็นโรคมะเร็งปากมดลูกได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ค้นคว้าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. ออกแบบ primer ที่จะใช้ในการตรวจหาเมทิเลชันของยีน

- หาโพรโมเตอร์ของยีนทั้งสาม โดยใช้ฐานข้อมูล NCBI และ Ensembl เลือกบริเวณที่เป็น CG rich
- ออกแบบ primer ที่จำเพาะเจาะจงต่อ methyated sequence และ unmethylated sequence เพื่อทำ Methylated Specific Primer PCR (MSP-PCR) ต่อไป โดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างของเบส C ที่มีเมทิเลชันและไม่มีเมทิเลชัน เมื่อผ่านการ treat ด้วย bisulfite เบส C ที่ไม่มีเมทิเลชันจะเปลี่ยนเป็น T และ เบส C ที่มีเมทิเลชันจะคงเดิม

3. การเก็บตัวอย่างเซลล์จากผู้ป่วย

Case: เซลล์มะเร็งปากมดลูกของผู้ป่วย

Control: เซลล์ปกติ

4. ตรวจสอบเมทิเลชันของยีนทั้งสาม ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก และเซลล์ปกติ

- นำเซลล์มะเร็งปากมดลูก และเซลล์ปกติจำนวน 45 ตัวอย่างและ 35 ตัวอย่างตามลำดับ ที่เก็บตัวอย่างจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยความอนุเคราะห์ ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มา treat ด้วย Sodium bisulfite
- ทำ PCR โดยใช้ primer ที่ specific ต่อ unmethylated sequence และ methylated sequence (MSP-PCR) (Yanatatsaneejit , et al. , 2001. ; Niklinska , et al. , 2001) ในตัวอย่างทั้งหมด
- วิเคราะห์ผล

5. ยืนยันลำดับเบสของโพรโมเตอร์

4.1) Cloning โดย insert PCR product ของแต่ละยีนเข้าไปใน pGEM-t Easy Vector system I จากนั้น transform recombinant plasmid เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ DH5α แล้วเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการเลือกโคโลนีทั้งสิ้น 5 โคโลนี โดยเลือกคนไข้ที่มีเมทิเลชันของยีนทั้งสาม สองราย

4.2) Sequencing ลำดับเบสของยีนจากโคโลนีที่คัดเลือก

6. ศึกษาความสัมพันธ์ของเมทิลเลชัน กับ expression

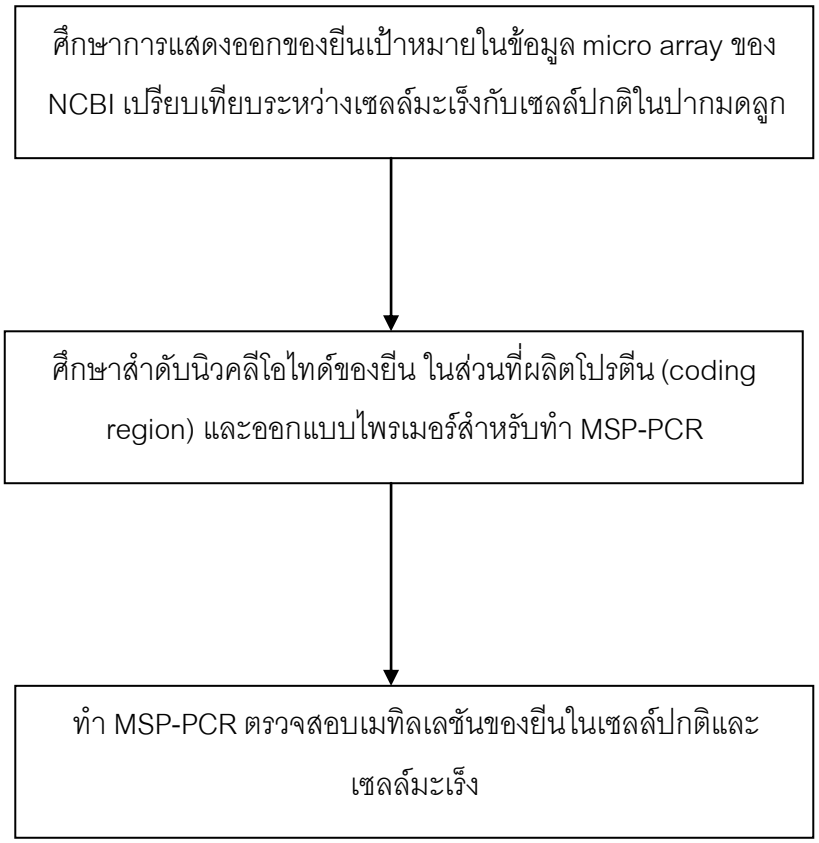
5.1) นำ HeLa ซึ่งเป็น cervical cancer cell line แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งเลี้ยงตามปกติ และกลุ่มที่สองเลี้ยงโดย treat ด้วย 5'-Azacytidine

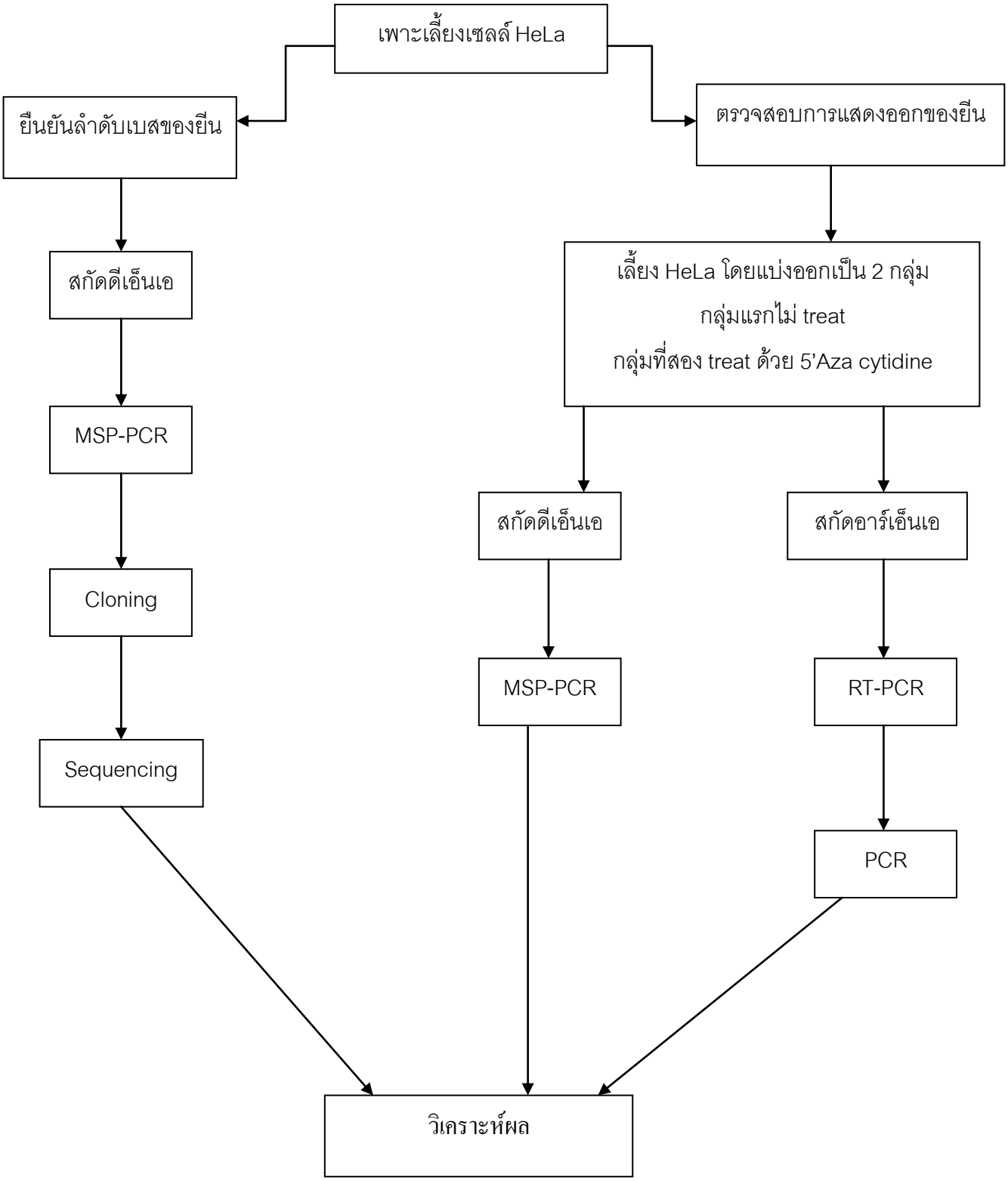
5.2) สกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Phenol Chloroform Extraction และสกัดอาร์เอ็นเอ ด้วย Trizol

5.3) หาเมทิเลชันของยีนทั้งสอง ด้วยการนำดีเอ็นเอมาทำ MSP-PCR และนำร์เอ็นเอมาทำ RT-PCR เปลี่ยน เป็น cDNA ใช้ไพรเมอร์ตรวจสอบการแสดงออกของยีน

7. สรุปผลและเขียนวิทยานิพนธ์

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

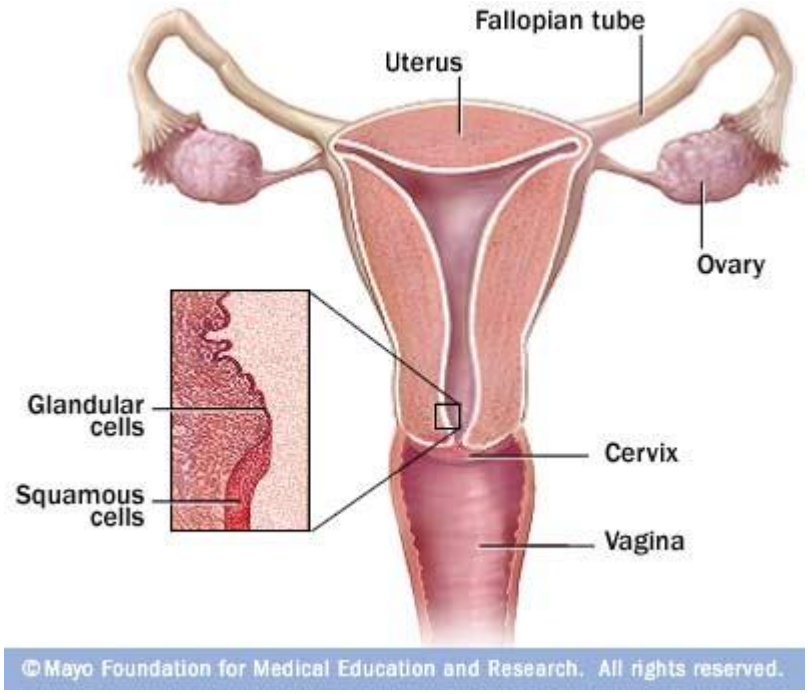



เพาะเลี้ยงเซลล์ HeLa
ยืนยันลำดับเบสของยีน
ตรวจสอบการแสดงออกของยีน
สกัดดีเอ็นเอ
เลี้ยง HeLa โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม
กลุ่มแรกไม่ treat
กลุ่มที่สอง treat ด้วย 5'Aza cytidine
MSP-PCR
สกัดดีเอ็นเอ
สกัดอาร์เอ็นเอ
Cloning
MSP-PCR
RT-PCR
Sequencing
PCR
วิเคราะห์ผล

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

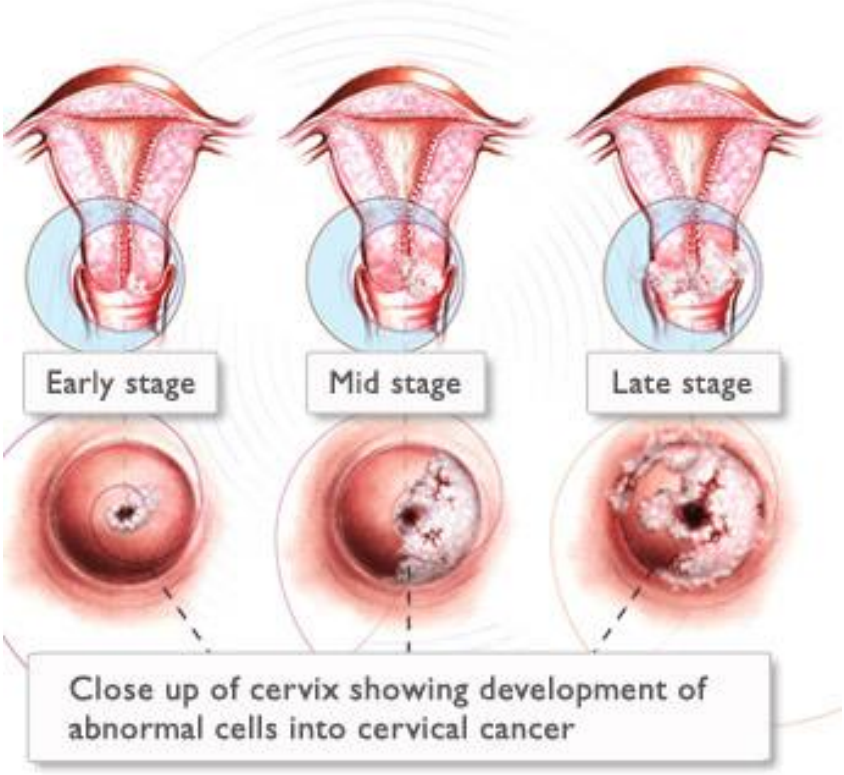


ภาพที่ 1 ตำแหน่งเยื่อบุผนังปากมดลูก (http://www.cancers.biz/wp-content/uploads/2011/07/cc.jpg)

- มะเร็งปากมดลูก คือ โรคที่เซลล์เยื่อบุปากมดลูก มีการแบ่งตัวอย่างผิดปกติ (Cervical Intraepithelium Neoplasia : CIN) โดยความผิดปกติแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ตามความหนาของเยื่อบุ ได้แก่ (ธีระ ทองสง, จตุพล ศรีสมบูรณ์ และคณะ , บรรณาธิการ. นรีเวชวิทยา ฉบับสอบบอร์ด. กรุงเทพฯ : พี.บี.ฟอเรน บุ๊คส์ เซนเตอร์. เรียบเรียงครั้งที่ 2. 2539, 295-327)

- CIN I มีการแบ่งตัวผิดปกติเฉพาะด้านบน (ความผิดปกติน้อยกว่า 1 ใน 3)
- CIN II มีการแบ่งตัวผิดปกติด้านล่าง และส่วนกลาง (ความผิดปกติถึง 2 ใน 3)

- CIN III มีความผิดปกติทุกชั้นของเยื่อบุปากมดลูก (ธีระ ทองสง , จตุพล ศรีสมบูรณ์ และคณะ , บรรณาธิการ. นรีเวชวิทยา ฉบับสอบบอร์ด. กรุงเทพฯ : พี.บี. ฟอเรน บุ๊คส์ เซนเตอร์. เรียบเรียงครั้งที่ 2. 2539, 295-327)



ภาพที่ 2 มะเร็งปากมดลูกในระยะต่างๆ (http://www.women-problems.com/wp-content/uploads/2011/05/Cervical-Cancer6.jpg)

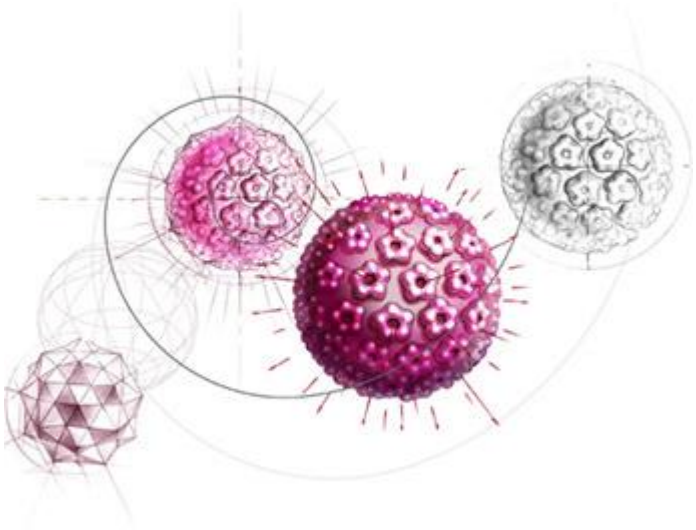
<u>อาการของโรค</u>

1. อาจจะไม่มีการผิดปกติ ในรายที่เริ่มเป็น และแผลยังเล็กอยู่
2. บางรายอาจจะมีเลือดออกกะปริบกะปรอย หรือมีเลือดออกในระหว่างหรือหลังจากการมีเพศสัมพันธ์
3. มีอาการตกขาวผิดปกติ
4. มีเลือดออกทางช่องคลอดทั้งที่อยู่ในวัยหมดประจำเดือนแล้ว

5. มีอาการอ่อนเพลีย ซีด เบื่ออาหาร น้ำหนักตัวลด
6. หากโรคมะเร็งปากมดลูกลุกลามไปแล้ว ทำให้มีอาการปวดในอุ้งเชิงกราน ตกเลือด ขาบวม ปวดหลัง

<u>ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูก</u> (สำนักพัฒนาวิชาการแพทย์ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, แนวทางเวชปฏิบัติการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก และการรักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของปากมดลูก (ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด). หน้า9.)

- การติดเชื้อไวรัส HPV



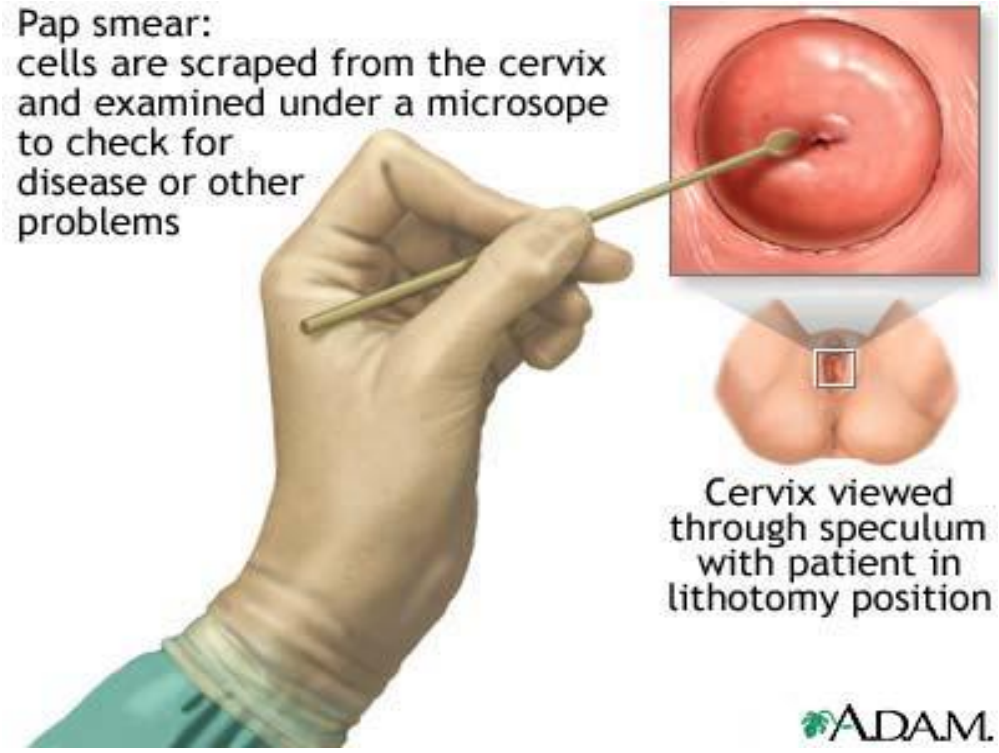
ภาพที่ 3 HPV-Virus (http://www.aribaskara.com/wp-content/uploads/2011/03/HPV-virus.jpg)

- สตรีที่มีเพศสัมพันธ์ตั้งแต่อายุยังน้อย และมีเพศสัมพันธ์กับชายหลายคน
- การสูบบุหรี่
- การใช้ยาฮอร์โมนเป็นประจำ
- มีลูกมาก

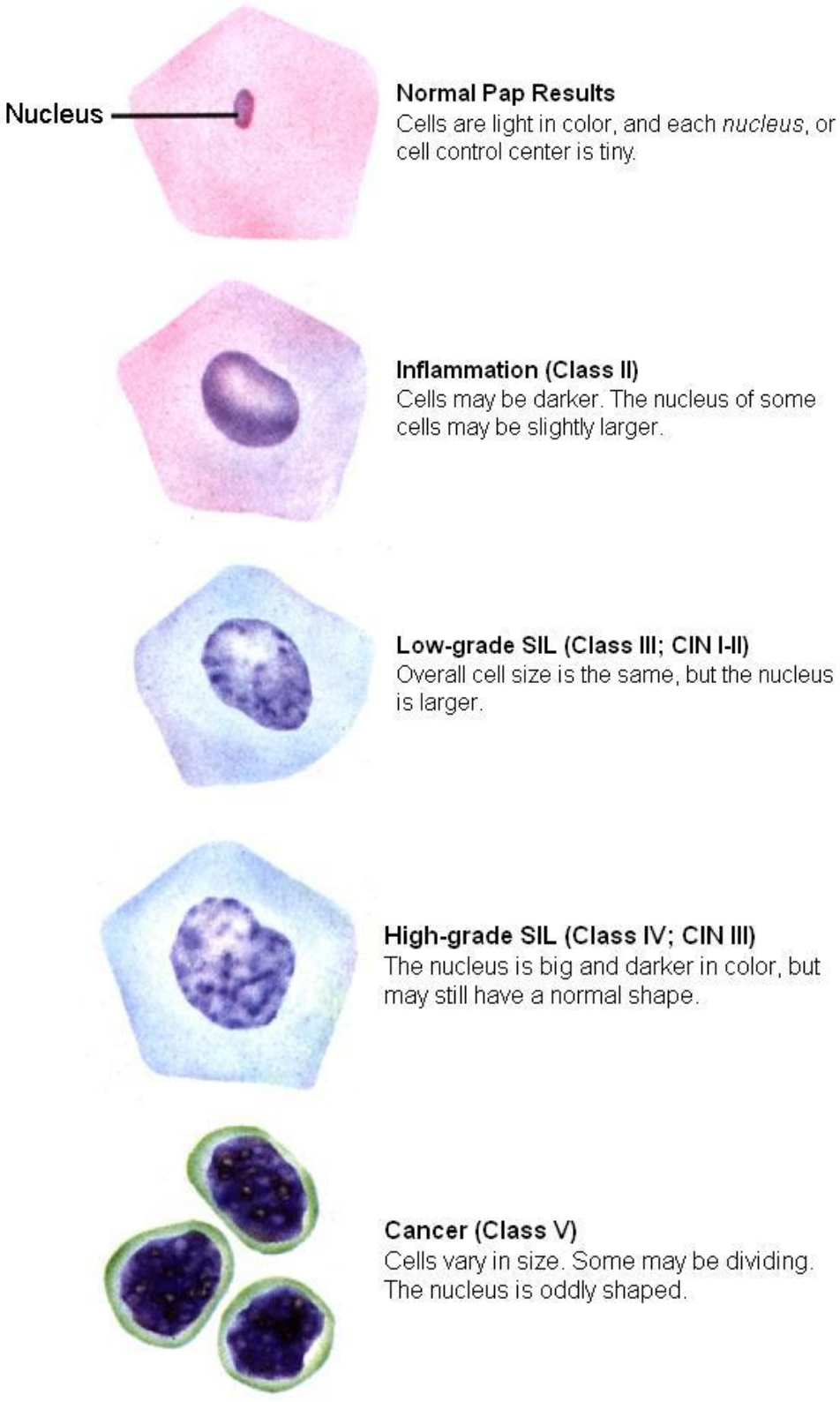
- มีประวัติคนในครอบครัวเคยเป็นมะเร็งปากมดลูก

Pap Test (Pap Smear) (สำนักพัฒนาวิชาการแพทย์ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, แนวทางเวชปฏิบัติการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก และการรักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของปากมดลูก (ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด).

คือวิธีการตรวจโรคมะเร็งปากมดลูกในปัจจุบัน โดย แพทย์จะใช้เครื่องมือใส่เข้าไปในช่องคลอดเพื่อดูลักษณะปากมดลูกที่อยู่ในช่องคลอด จากนั้นจะใช้ไม้พันสำลี และไม้ลักษณะแบนๆ เก็บเซลล์รอบๆและบนปากมดลูก รวมทั้งในปากมดลูกด้วย แพทย์จะส่งเซลล์ที่เก็บได้นี้ไปตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยการย้อมสีและส่องกล้องขยาย 400 – 1,000 เท่า เ ซลล์ปกติ และเซลล์ผิดปกติ เช่นเซลล์มะเร็งจะติดสีแตกต่างกัน จะทราบผลภายใน 3 -7 วัน



ภาพที่ 4 การทำ Pap Smear (http://women-health-info.com/images/Pap-test.jpg)

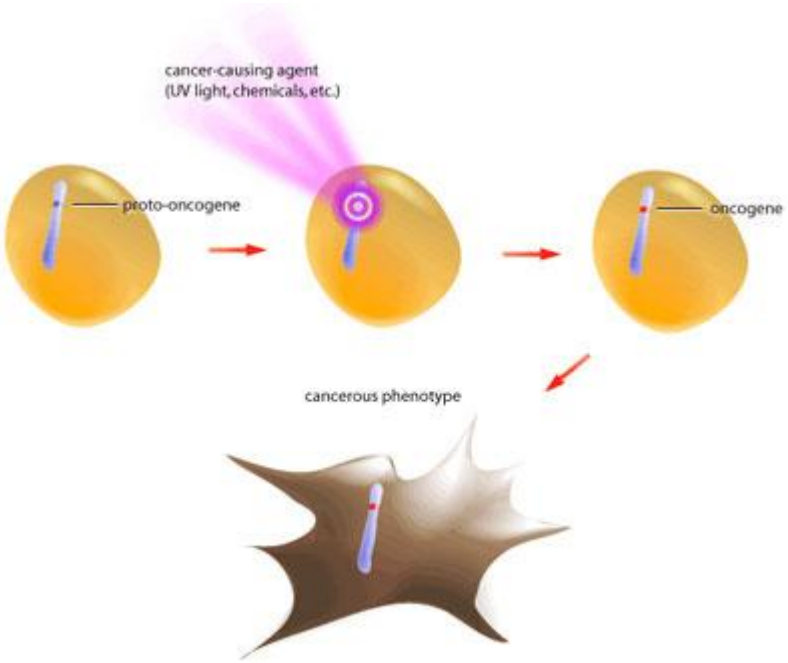


ภาพที่ 5 ชนิดของเซลล์ที่ตรวจพบจากการทำ Pap Smear

(http://www.monlezun.com/pap.htm)

<u>พันธุกรรมกับมะเร็ง</u>

ในทศวรรษที่ 80 มีการใช้เทคนิกทาง molecular ในทศวรรษที่ 80 มีการใช้เทคนิกทาง molecular genetic ในการศึกษาเซลล์มะเร็ง ทำให้ทราบถึงยีนหลักๆ ที่เกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็งอยู่ 2 กลุ่ม ได้แก่ oncogenes และ tumor suppressor genes



ภาพที่ 6 ปัจจัยก่อมะเร็งกระตุ้นให้ proto-oncogenes กลายเป็น oncogenesและทำให้เซลล์เป็นมะเร็งได้ (http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/07/oncogene-formation.jpg)

สามารถแบ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งได้เป็น 2 กลุ่มคือ

1. ยีนก่อมะเร็ง (oncogene)

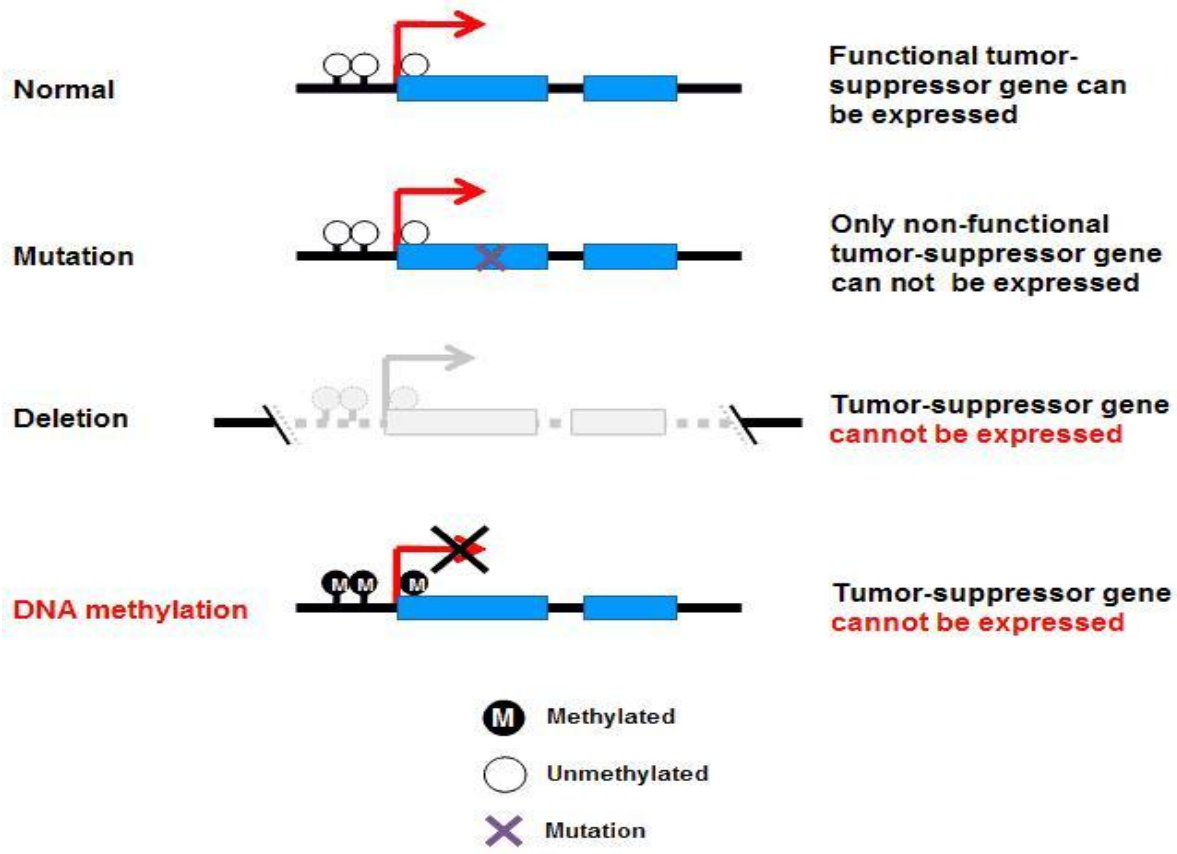
   ยีนในกลุ่ม proto-oncogenes ที่กลายพันธุ์ไป อันเนื่องจากการติดเชื้อไวรัส การฉายรังสี หรือได้รับ carcinogen ต่างๆ ยีนมะเร็งมีการแสดงออกแบบเด่น (dominant) ถึงแม้จะมีความผิดปกติบนโครโมโซมเพียง 1 ชุด โดยที่อีก 1 ชุดยังปกติอยู่ ก็สามารถทำให้เซลล์ปกติกลายไปเป็นเซลล์มะเร็งได้

2. ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene)

คือ ยีนในกลุ่มทีมีการแสดงออกเพื่อยับยั้งก ารแบ่งเซลล์ ดังนั้นหากสูญเสียหน้าที่ไม่สามารถแสดงออกได้ เซลล์จะแบ่งตัวโดยไม่สิ้นสุด ยีนต้านมะเร็งมีการแสดงออกแบบด้อย (recessive) ต้องมีความผิดปกติของยีนในทั้งสองชุดของโครโมโซม เซลล์ถึงจะมีโอกาสกลายเป็นเซลล์มะเร็ง

<u>ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน</u>

เป็น post-synthesis modification ประเภทหนึ่งของดีเอ็นเอ พบในบริเวณโพรโมเตอร์ของยีนมีผลในการระงับการแสดงออกของยีนนั้นๆ

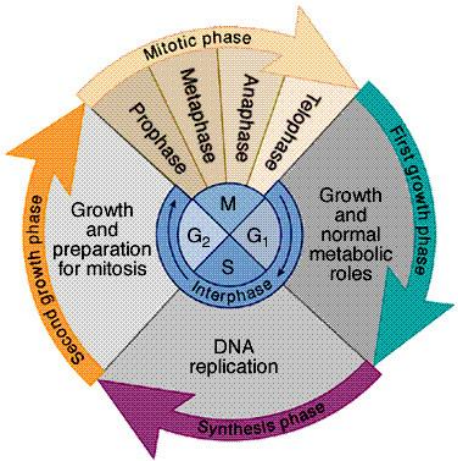


ภาพที่ 7 แสดงถึง ความผิดปกติในรูปแบบต่างๆของยีน ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนนั้นๆ

(http://www.ncc.go.jp/en/nccri/divisions/14carc/14carc01_2.html)

มีงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงถึงผลความสัมพันธ์ระหว่างเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็งกับการเป็นมะเร็ง เช่น Jianduan Lia และคณะ ศึกษาถึง “เมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน *IGSF4* และการระงับการแสดงออกในมะเร็งปากมดลูก” (2005) Ming-Tzeung Chunga และคณะ ศึกษาถึง "เมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน ***ตระกูล*** *SFRPs* ในมะเร็งปากมดลูก" (2009) Long-Cheng Li และคณะ ศึกษาถึง "**ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน**ในมะเร็งต่อมลูกหมาก" (2004) Gilbert Spizzo และคณะ ศึกษาถึง "เมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน Ep-CAM ในเซลล์มะเร็งเต้านม และเนื้อเยื่อเต้านม" (2007)

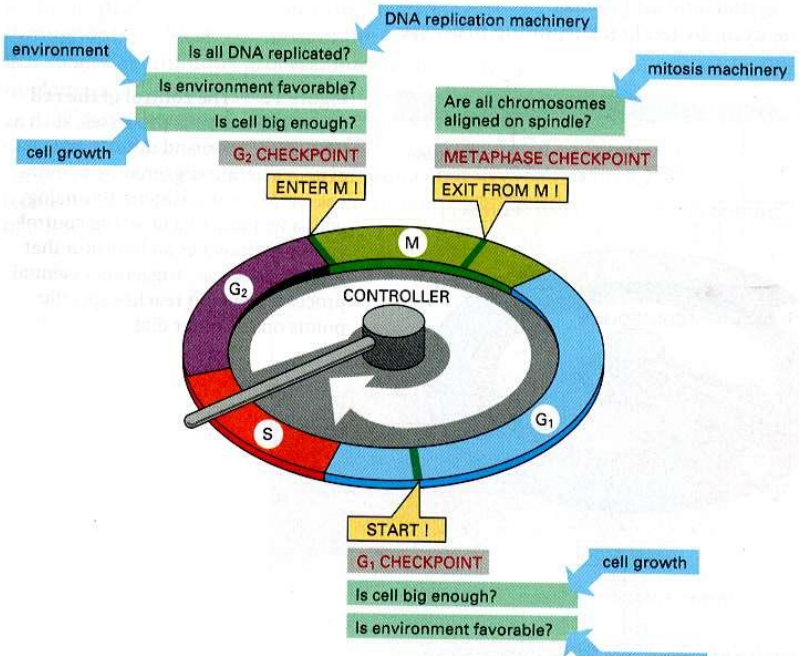
<u>วัฏจักรเซลล์ กับ มะเร็ง</u>



ภาพที่ 8 แสดงถึง วงจรวัฏจักรเซลล์

(http://www.biologycorner.com/worksheets/tiger/read6-2.html)

วัฏจักรเซลล์ (cell cycle) คือวงจรชีวิตของเซลล์ ตั้งแต่การเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวน จนถึงการสิ้นสุดของเซลล์ ถูกควบคุมโดยสัญญาณทางเคมีทั้งจากภายนอกและภายในเซลล์ เซลล์ในระยะต่างๆต้องการการกระตุ้นจากสัญญาณเคมีเหล่านี้ ถ้าสัญญาณทางเคมีเกิดผิดปกติ หรือเซลล์ไม่สามารถตอบสนองต่อสัญญาณทางเคมีเหล่านี้ได้ อาจทำให้เซลล์นั้นๆ ผิดปกติและกลายเป็นเซลล์มะเร็งในภายหลัง



ภาพที่ 9 แสดงถึงจุด check point ในวัฏจักรเซลล์

(http://web.campbell.edu/faculty/garrett/PHAR%20408/cell%20cycle%20checkpoints.jpg)

วัฏจักรเซลล์แบ่งออกเป็น 4 ระยะใหญ่ คือ G1, S, G2, M ซึ่งในระหว่างทั้ง 4 ขั้นตอน จะมีจุด checkpoint ที่ควบคุมกระบวนการภายในเซลล์ ว่าจะให้เดินหน้าหรือยับยั้ง หากไม่มีความผิดปกติเกิดขึ้น กิจกรรมภายในเซลล์จะเดินหน้าต่อ เมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้น เซลล์จะถูกยับยั้งกระบวนการ ให้แก้ไขความผิดปกติที่เกิดขึ้นก่อนจะเข้าสู่กระบวนการถัดไป กลไกที่ควบคุม checkpoint ประกอบด้วยโปรตีนหลักๆ 2 กลุ่ม คือ cyclins และ cyclin dependent kinases (CDKs) CDKs คือตัวเร่งในปฏิกิริยาของกระบวนการวัฏจักรเซลล์ โปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของโปรตีนอื่นๆ โดยการtransfer หมู่ฟอสเฟตให้โปรตีนเป้าหมาย CDKs เมื่อทำงานจะอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนกับ cyclin เป็น cyclin/CDK complexes เมื่อไม่มี cyclin CDKs จะไม่สามารถทำงานได้ วัฏจักรเซลล์ต้องการการสร้างและการสลายรูปของ complex นี้

Checkpoint ที่สำคัญที่สุดของเซลล์คือ START Checkpoint ในช่วง Mid G1 ที่เซลล์จะรับสัญญาณจากภายนอกและภายในเซลล์ว่าจะเข้าสู่ระยะ S phase ต่อไปหรือไม่ ที่จุด

checkpoint นี้ ถูกควบคุมโดย cyclin ชนิด D type กับ CDK4 เมื่อมีความผิดปกติภายในเซลล์ เช่นภาวะการขาดแคลนสารอาหาร หรือดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย Inhibitory proteins จะสลาย cyclin/CDK complex และป้องกันเซลล์เข้าสู่ระยะ S phase หากไม่มีปัญหา D/CDK4 complex จะนำเซลล์ผ่านระยะ G1 เข้าสู่ S phase ต่อไป

ในเซลล์มะเร็ง การทำงานของยีนที่ควบคุม checkpoint ในวัฏจักรเซลล์ลดลง เนื่องมาจากความผิดปกติของกลไกภายในเซลล์ ที่ทำให้จำนวนของ cyclin/CDK complex มีจำนวนเพิ่มขึ้นหรือลดลงผิดปกติ ตัวอย่างเช่น การเกิดการกลายพันธุ์หรือ deletion ของยีนที่สร้าง cyclins หรือ CDKs หรือการกลายพันธุ์ของยีนที่สร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อการทำงานของ cyclin/CDK complex (Snustad and Simmons , 2006)

เซลล์ที่สูญเสีย Start checkpoint จะกลายเป็นเซลล์มะเร็ง ในเซลล์ปกติกระบวนการจะถูกหยุดค้างที่ Start checkpoint จนกว่า ดีเอ็นเอที่เสียหายจะได้รับการซ่อมแซมจึงเข้าสู่ระยะต่อไป ในเซลล์ที่ผิดปกติกระบวนการดังกล่าวจะดำเนินการต่อไปเรื่อยๆ โดยไม่มีการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหาย เซลล์จะสะสมความผิดปกติ ของยีนและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ จนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง

<u>Program cell death กับ มะเร็ง</u>

Program cell death หรือ Apoptosis คือกลไกที่ทำให้เซลล์ถึงจุดจบ มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดมะเร็ง โดยกำจัดเซลล์ที่มีดีเอ็นเอผิดปกติ หรือเสียหายเกินกว่าจะซ่อมแซมแก้ไข โปรตีนในกลุ่ม capases มีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้ โดยทำหน้าที่แยกพันธะเปปไทด์ในโปรตีนอื่นๆ ทำให้โปรตีนเป้าหมายไม่อยู่ในสภาพที่ทำงานได้ ตัวอย่างเช่น lamins ซึ่งทำหน้าที่สร้างผนังนิวเคลียส ทำให้เซลล์เสียหายจนไม่อาจอยู่ได้ และถูกทำลายไปในที่สุด

Program cell death **มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดมะเร็ง ถ้ากระบวนการนี้ไม่ทำงานหรือทำงานผิดพลาด จะทำให้เซลล์ที่มีความผิดปกติอยู่รอดและขยายตัวไปเป็นมะเร็งได้** (Snustad and Simmons , 2006)

ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกสามยีนเพื่อนำมาตรวจสอบเมทิลเลชัน โดย *HCP5* และ *TNFRSF8* พบว่าการแสดงออกของยีนลดลงในเซลล์ผู้ป่วยเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ จากข้อมูล microarray ในฐานข้อมูล NCBI และยีน *HPC5* พบว่าน่าจะเป็นยีนต้านมะเร็งในมะเร็งต่อมลูกหมาก (Rökman et al. , 2004.)

ยีน *TNFRSF8* (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 8) คือยีนที่สร้างกลุ่ม cytokine receptor บนผิวเซลล์ซึ่งจับกับ Tumor Necrosis Factor (TNF) ทำให้เกิดสภาวะ cell death ของ Tumor Cells (แหล่งที่มา : http://www.genecards.org/CGi-bin/carddisp.pl?gene=TNFRSF8)

ยีน *HPC5* (Hereditary, Prostate Cancer 5) ยังไม่ทราบบทบาทการทำงานที่แน่ชัด แต่จากการศึกษาพบว่า ยีนนี้ไม่มีการทำงานในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก จึงจัดเป็นยีนต้านมะเร็งในมะเร็งต่อมลูกหมาก ซึ่งมีความน่าสนใจว่า จะมีบทบาทหน้าที่ในมะเร็งชนิดอื่นๆหรือไม่อย่างไร (Rökman et al. , 2004)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

เซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งของผู้ที่เข้ารับการตรวจรักษาโรคทางสูตินรีเวชในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 36 ตัวอย่างและ 45 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยชิ้นเนื้อทั้งหมดถูกเก็บรักษาบนสไลด์ (embedding paraffin block) โดยตัวอย่างเหล่านี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์แล้ว

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

<u>อุปกรณ์มาตรฐานทั่วไป</u>

ถุงมือยาง

ไมโครปิเปตต์ขนาด 10, 50, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร

ทิปไมโครปิเปตต์ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร

ถาดหลุมวางหลอด Eppendorf

หลอด Eppendorf ขนาด 100, 250 และ 1000 ไมโครลิตร

<u>อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (phenol entraction)</u>

อุปกรณ์

แท่นแม่เหล็กวางหลอด Eppendorf

เครื่อง centrifuge

เครื่อง vortex

เครื่อง spin down

เครื่อง water bath

สารเคมี

Phenol : Chloroform : IAA (25:24:1)

Glycogen

10 M NH_4OAC

100% Ethanol

TE Buffer pH = 8.0

<u>อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์</u>

อุปกรณ์

- เครื่อง centrifuge
- เครื่อง vortex
- เครื่อง spin down
- เครื่อง water bath
- เครื่อง Thermal cycler (BIO-RAD, USA)
- ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำพีซีอาร์

สารเคมี

- Taq DNA Polymerase 250 units (QIAGEN, Germany)
  - dNTP
  - 10x buffer
  - $MgCl_2$
  - Hot start Taq
- Primer (Biodesign, Thailand)

<u>อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ Hela</u>

อุปกรณ์

- ภาชนะสำหรับเลี้ยงเซลล์ (Polystyrene flasks) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- ภาชนะสำหรับเลี้ยงเซลล์ (Polystyrene flasks) ขนาด 150 มิลลิลิตร
- ปิเปตต์ขนาด 2 มิลลิลิตร
- ปิเปตต์ขนาด 10 มิลลิลิตร
- ปิเปตต์ขนาด 25 มิลลิลิตร
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow)
- ตู้บ่มเพาะเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 Incubator)
- กล้องจุลทรรศน์

สารเคมี

- DMEM (SIGMA – ALDRICH, USA)

- $NaHCO_3$ (MERCK, Germany)
- Fetal Bouvine Serum
- Antibiotic
- PBS
- เอนไซม์ Trypsin

<u>อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการ Treated Bisulfide</u>

อุปกรณ์

- แท่นแม่เหล็กวางหลอด Eppendorf
- เครื่อง centrifuge
- เครื่อง vortex
- เครื่อง spin down
- เครื่อง water bath
- เครื่อง Thermal cycler (Bio – Rad, USA)
- เครื่อง Vacuum pump

สารเคมี

- Hydroquinone
- Bisulfide (SIGMA – ALDRICH, USA)
- 80% Isopropanol
- 3 M NaOH (MERCK, Germany)
- 10 M NH4OAC (MERCK, Germany)
- 100% Ethanol
- 70% Ethanol
- Wizard DNA Clean-Up System (promega, USA)

<u>อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำ polyacrylamide gel electrophoresis</u>

อุปกรณ์

- บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
- เครื่อง Molecular Dynamics Storm 860 Phosphoimager

สารเคมี

- 40 % acrylamide : bis (19:1) (Bio – Rad, USA)
- 10X TBE
- 10 % ammonium persulfate
- TEMED

<u>อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ</u>

อุปกรณ์

- แท่นแม่เหล็กวางหลอด Eppendorf
- เครื่อง centrifuge

สารเคมี

- Trizol (invitrogen, USA)
- Isopropanol
- Chloroform

<u>อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำอาร์ที-พีซีอาร์</u>

อุปกรณ์

- เครื่อง centrifuge
- เครื่อง vortex
- เครื่อง spin down
- ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำพีซีอาร์
- เครื่อง Thermocycler (Bio- Rad, USA)

สารเคมี

- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA)
  - Oligo dT
  - 5X reaction buffer
  - Ribolock, Ribonuclease inhibitor
  - 10 mM dNTP
  - Reverse Transcriptase

วิธีทดลอง

1. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR

- ค้นหายีนเป้าหมายจากข้อมูล micro array ใน http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
- ศึกษาโพรโมเตอร์ของยีนทั้งสามโดยอาศัยข้อมูลจาก NCBI และ ensembl
- เลือกลำดับ Transcript ID ในส่วนที่เป็น protein coding
- เลือกบริเวณโพรโมเตอร์ของ exon ที่พบหมู่ CG อยู่มากในลำดับเบส

2. การรวบรวมกลุ่มตัวอย่างที่จะนำมาทำการทดลอง

- เซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจรักษาโรคทางสูตินรีเวชใน โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 36 ตัวอย่างและ 45 ตัวอย่าง โดยชิ้นเนื้อทั้งหมดถูกเก็บรักษาบนสไลด์ (embedded paraffin block)
- ตัวอย่างเม็ดเลือดขาวของคนปกติ
- เซลล์ HeLa ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก

3. การสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อด้วยวิธี phenol-chloroform หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดค่า Optical Density (OD) เพื่อทราบความเข้มข้มของดีเอ็นเอ โดยวัดที่ค่าความยาวแสง 260 นาโนเมตร ซึ่งค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จะอยู่ในหน่วยของ นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ให้เป็น 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.1) วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อที่ทำการ deparafin แล้ว

<u>ขั้นตอนการสกัด</u>

1. เตรียมหลอด Eppendorf
2. ดูดสารละลาย Lysis bufferll และ 10% SDS มา 400 µl (อัตราส่วนระหว่าง Lysis bufferll: 10% SDS เท่ากับ 19:1)
3. ดูดสารละลาย Lysis bufferll และ 10% SDS ประมาณ 20 µl หยดลงบนสไลด์ชิ้นเนื้อ
4. ใช้เข็มขูดชิ้นเนื้อที่มีอยู่บนสไลด์ตรงบริเวณที่วงไว้
5. นำใส่ลง Eppendorf ที่มีสารละลาย Lysis bufferll และ 10% SDS

6. เติม Protinase K (pK) 5-10 µl
7. Vortex แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50ºC เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง
8. เติมสารละลาย phenol:chloroform:isopropranol ในอัตราส่วน 25:24:1 ปริมาณ 1 เท่าของ volume
9. Vortex
10. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
11. ดูดส่วนล่างที่เป็น phenol:chloroform ทิ้ง
12. เก็บส่วนบนใส่ Eppendorf ใหม่
13. เติม -100%EtOH (4ºC) 1 เท่าของ volume (ประมาณ 400 µl)
    -3M NaAcOH 0.1 เท่าของ volume
    -glycogen 1 µl
14. บ่มที่อุณหภูมิ -20ºC เป็นเวลา 30 นาที
15. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
16. เทส่วนบนทิ้ง
17. เติม 70%EtOH ปริมาณ 500 µl
18. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
19. เทส่วนบนทิ้ง และทิ้งไว้จนแห้งสนิท
20. เติมสารละลาย TE หรือ dH_2O ปริมาณ 50 µl และบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 15 นาที
21. เก็บที่อุณหภูมิ -20ºC

2

3.2) วิธีการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจาก HeLa cell line

<u>ขั้นตอนการเก็บ cell</u>

1. ดูด media ทิ้ง
2. ล้างเซลล์ ด้วย PBS ประมาณ 5 ml ฉีดกลั้วๆแล้วดูด PBS ทิ้ง
3. ย่อยด้วย Trypsin ประมาณ 2 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ประมาณ 3 นาที
4. ใส่ media (เพื่อยับยั้งการทำงานของ Trypsin) ประมาณ 5 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

5. นำใส่หลอดทดลองขนาด 15 ml
6. ปั่นตกเซลล์ ที่ 120 g เป็นเวลา 5 นาที
7. เทส่วนบนทิ้ง ล้างด้วย PBS 2 รอบ

   รอบที่ 1 เติม PBS 5 ml (เขย่าแรงๆ) ปั่นตกที่ 150 g เป็นเวลา 5 นาที (เททิ้ง)

   รอบที่ 2 เติม PBS 2 ml แล้ว vortex ดูดย้ายมาข้อ 8.

<u>ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ</u>

8. เติมสารละลาย Lysis bufferll และ 10% SDS มา 400 µl (อัตรส่วนระหว่าง Lysis bufferll: 10% SDS เท่ากับ 19:1)
9. เติม Protinase K (pK) 20 µl
10. Vortex
11. บ่มที่อุณหภมิ 50ºC เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง
12. เติมสารละลาย phenol:chloroform:isopropranol ในอัตราส่วน 25:24:1 ปริมาณ 1 เท่าของ volumn
13. Vortex
14. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
15. ดูดส่วนล่างที่เป็น phenol:chloroform ทิ้ง
16. เก็บส่วนบนใส่ Eppendorf ใหม่
17. เติม - 100%EtOH (4ºC) 1 เท่าของ volume (ประมาณ 400 µl)
    - 3M NaAcOH 0.1 เท่าของ volume
    - glycogen 1 µl
18. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
19. เทส่วนบนทิ้ง
20. เติม 70%EtOH ปริมาณ 500 µl
21. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
22. เทส่วนบนทิ้ง และทิ้งไว้จนแห้งสนิท
23. เติมสารละลาย TE หรือ dH_2O ปริมาณ 20-50 µl
24. บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 15 นาที

25. เก็บที่อุณหภูมิ -20ºC

<u>ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ</u>

1. ดูดมาใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml (RNase free) ใส่เกือบเต็มหลอด แล้วปั่นตกที่ 150 g เป็นเวลา 5 นาที
2. เทส่วนใสทิ้ง
3. เติม Trizol reagent 1 ml/ 5-10 x 106 cell ผสมโดยใช้ปิเปตต์
4. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
5. เติม chloroform ปริมาณ 200 µl/ 1 ml Trizol ผสมให้เข้ากัน 15 วินาที
6. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที
7. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 15 นาที
8. ดูดส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่ (RNase free)
9. เติม 100%isopropranol ปริมาณ 500 µl/ 1ml Trizol เพื่อตกตะกอน RNA
10. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
11. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 10 นาที
12. เทส่วนใสทิ้ง
13. ล้างตะกอน RNA ด้วย 75%EtOH 1ml/ 1 Trizol
14. เทส่วนใสทิ้งและปล่อยไว้จนแห้ง
15. เติม DEPC water 20 µl
16. บ่มที่อุณหภูมิ 50ºC เป็นเวลา 10 นาที
17. วัดความเข้มข้นของ RNA และเก็บที่อุณหภูมิ -80ºC

4. การตรวจสอบเมทิลเลชันด้วยวิธี Methylation Specific Primer PCR (MSP-PCR)

4.1) การทำ sodium bisulfite treatment

จากตัวอย่างเซลล์ปกติจำนวน 36 ตัวอย่างและเซลล์มะเร็งปากมดลูกจำนวน 45 ตัวอย่าง นำดีเอ็นเอที่เตรียมความเข้มข้นเป็น 40 นาโกรัมต่อไมโครลิตร มาทำ sodium bisulfite treatment ซึ่งมีขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน ดังนี้

- ขั้นแรก การเปลี่ยนเบสบนสายดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 40 ng/ µl เติมสารละลาย 2M NaOH ปริมาณ 5.5 µl (ทำให้ dsDNA เป็น ssDNA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลาย 10 mM Hydroquinone ปริมาณ 30 µl และสารละลาย sodium bisulfite ปริมาณ 520 µl แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 50ºC เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง

ขั้นตอนการทำ

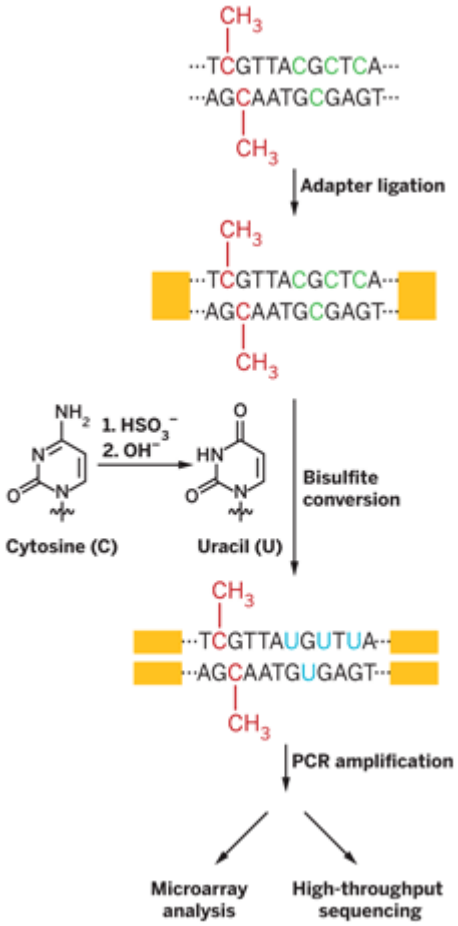
1. เตรียม - hydroquinone 55 mg/ 50 ml H_2O (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
   - sodium bisulfite 3.76 g/ 10 ml H_2O ปรับ pH เท่ากับ 5
2. เจือจางดีเอ็นเอให้เป็น 40 ng/ µl
3. เติมสารละลาย 2M NaOH ปริมาณ 5.5 µl แล้ว vortex (ทำให้ dsDNA เป็น ssDNA)
4. บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 10 นาที
5. เติมสารละลาย 10 mM hydroquinone ปริมาณ 30 µl แล้ว vortex (สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง)
6. เติมสารละลาย sodium bisulfite ปริมาณ 520 µl แล้ว vortex (สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีใส)
7. บ่มที่อุณหภูมิ 50ºC เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง

- ขั้นสอง การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการทำ

1. เตรียมเครื่อง pump เสียบ column วางลงบน vacuum จากนั้นสวม syringe และเปิด pump (purify DNA)

2. เติม Wizard Tm resis ปริมาณ 1 ml ผสมโดยใช้ปิเปตต์
3. ปิเปตต์ข้อ 9. ใส่ใน syringe เปิดเครื่องแล้วรอจนของเหลวไหลลงหมดจึงปิดเครื่อง จากนั้นล้างด้วย 80% isopropranol ปริมาณ 2 ml เปิดเครื่องแล้วรอจนของเหลวไหลลงหมดจับเวลา 30 วินาทีจึงปิดเครื่อง
4. วาง column บน Eppendrof นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 3 นาที
5. เปลี่ยน Eppendorf ใหม่ ล้างด้วย 95ºC H_2O ปริมาณ 50 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 20 วินาที ดีเอ็นเอจะย้ายลงมาอยู่ใน Eppendrof
6. เติม 3 M NaOH ปริมาณ 5.5 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
7. เติม glycogen 20 ng/µl ปริมาณ 2 µl
8. เติม 10 M NH_4OAc ปริมาณ 20 µl และ 100% EtOH ปริมาณ 200 µl ผสมให้เข้ากัน
9. บ่มที่อุณหภูมิ -20ºC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
10. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนบนทิ้ง
11. เติม 70% EtOH ปริมาณ 200 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
12. เทส่วนบนทิ้งแล้วคว่ำให้จนแห้ง
13. เติม dH_2O ปริมาณ 20 µl เพื่อละลายดีเอ็นเอ
14. บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 20 นาที
15. เก็บที่อุณหภูมิ -20 ºC



ภาพที่ 10 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ผ่าน *bisulfite treatment* (http://pubs.acs.org/cen/coverstory/87/8737cover.html)

4.2) การทำ MSP-PCR

จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกจำนวน 45 ตัวอย่าง และตัวอย่างเซลล์ปกติของคนปกติจำนวน 36 ตัวอย่าง หลังจากทำ sodium bisulfite treatment แล้วจึงนำดีเอ็นเอมาทำพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

TNFRSF8

Methylation primer PCR product 69 bp

Forward : 5'- CGCGCGCGGTTGAGAATCGTCG-3'

Reverse : 5'- CGCGCATCCCCGAAACCGAACG-3'

Unmet primer PCR product 70 bp

Froward : 5'- TGTGTGTGGTTGAGAATTGTTG-3'

Reverse : 5'- CACACATCCCCAAAACCAAACA-3'

HCP5

Methylation primer PCR product 69 bp

Forward : 5'-CGGATCCGAATCCTCCGCG-3'

Reverse : 5'-CGAGTCCGGGCTGGAGCG-3'

Unmet primer PCR product 70 bp

Froward : 5'-CTGGATCTGAATCCTCTGTG-3'

Reverse : 5'-CAAGTCCAGGCTGGAGCA-3' 1

โดยในกระบวนการทำพีซีอาร์ประกอบไปด้วยสารละลายทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ซึ่งจำแนกได้เป็น

Unmethylaion Primer

dNTP	0.4	µl
10x *Taq* polymerase buffer	2	µl
TNFRSF8 forward UNMET primer	0.3	µl
TNFRSF8 reverse UNMET primer	0.3	µl
dH_2O	14.8	µl
Hot Start *Taq* polymerase	0.2	µl
DNA	2	µl

PCR cycle condition ตั้งค่าตามลำดับ ดังนี้

initial denaturation	95°C	15	นาที

ตามด้วย 35 รอบของ			
denaturation	95ºC	1	นาที
annealing	59.3ºC	1	นาที
extension	72ºC	1	นาที
และ 1 รอบของ			
final extension	72ºC	7	นาที
Methylaion Primer			
dNTP	0.4	µl	
10x *Taq* polymerase buffer	2	µl	
$MgCl_2$	0.4	µl	
TNFRSF8 forward MET primer	0.3	µl	
TNFRSF8 reverse MET primer	0.3	µl	
dH_2O	14	µl	
Hot Start *Taq* polymerase	0.2	µl	
DNA	2	µl	
PCR cycle condition ตั้งค่าตามลำดับ ดังนี้			
initial denaturation	95ºC	15	นาที
ตามด้วย 35 รอบของ			
denaturation	95ºC	1	นาที
annealing	65ºC	1	นาที
extension	72ºC	1	นาที
และ 1 รอบของ			
final extension	72ºC	7	นาที

ในการทดลองได้ทำการทดลองควบคู่ไปกับ positive control ของไพรเมอร์เพื่อทดสอบเมทิลเลชัน (methylation) ที่เป็นดีเอ็นเอของเซลล์ HeLa ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูกที่พบว่ามีดีเอ็นเอเมทิลเลชันเกือบ 100 เปอร์เซนต์ (Mutirangura *et a.l*, 1998) positive control ของ ไพรเมอร์เพื่อทดสอบอันเมทิลเลชัน (unmethylation) คือเซลล์เม็ดเลือดขาว และใช้น้ำกลั่น

เป็น negative control เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนในขั้นตอนการทำพีซีอาร์ ตรวจสอบผลการแสดงออกของยีนด้วย polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซนต์ และวิเคราะห์ผลของความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการแสดงออกของยีน โดยนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่

4.3) การเตรียม polyacrylamide gel

8% non deturing polyacrylamide gel
แผ่นเจลขนาดความหนา 0.75 mm 1 แผ่น เตรียม

dH2O	3.5 ml
10 XTBE	0.5 ml
40 % acrylamide : bis (19:1)	1 ml
10% ammonium persulfate	50 µl
TEMED	5 µl
Total	5 ml

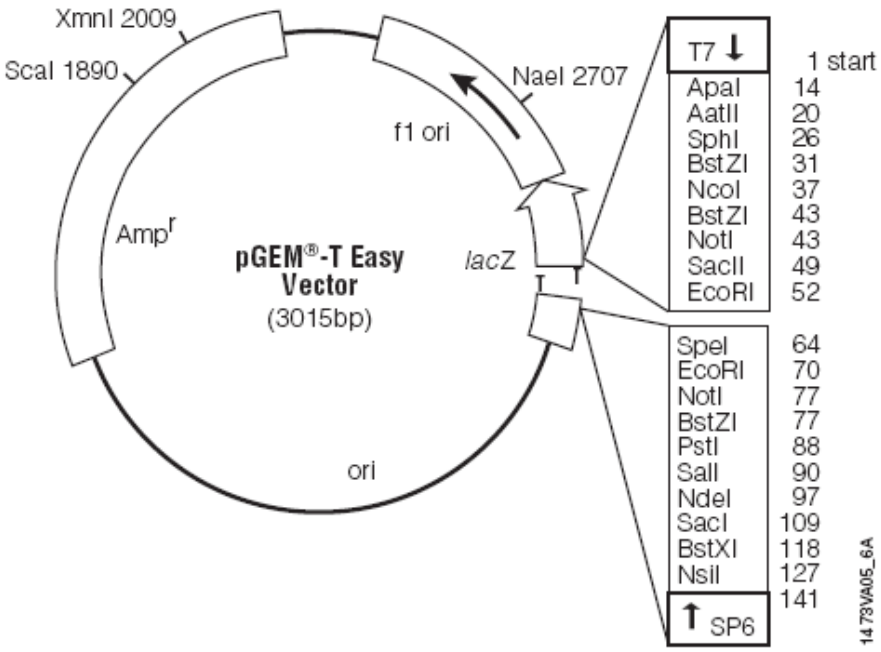
ตารางที่ 1 ปริมาตรของสารต่างๆที่ใช้ในการเตรียม *8% non deturing polyacrylamide gel*

5. Cloning & Sequencing

นำ PCR product ของ Hela Methylation sequence และ White Blood Cell Unmethylation sequence มารันเจล agarose แล้ว purified จากนั้น insert PCR product ของแต่ละยีนเข้าไปใน pGEM-t Easy Vector system I (Promega , USA.) จากนั้น transform recombinant plasmid เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ DH5α แล้วเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการเลือกโคโลนีทั้งสิ้น 5 โคโลนี โดยเลือกคนไข้ที่มีเมทิเลชันของยีน สองราย แล้ว Sequencing ลำดับเบสของยีนจากโคโลนีที่คัดเลือก

5.1) Ligation โดย PGEM Tool Kit (pGEM®-T Easy Vector System I)

. pGEM®-T Easy Vector Map and Sequence Reference Points



ภาพที่ 11 โครงสร้างของเวกเตอร์ pGEM®-T Easy Vector System I

(http://www.promega.com/resources/product-guides-and- selectors/protocols-and-applications-guide/cloning/)

<u>ขั้นตอนการทำ</u>

1. ใส่

- 2X rapid ligation buffer T4 DNA 2.5 µl
- PGEM-T 0.5 µl
- PCR-product 1.5 µl
- T$ DNA ligase 0.5 µl

แล้ว incubate 4°c ในตู้เย็น 16 ชั่วโมง (ห้ามเกิน)

5.2) วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ E.Coli

ขั้นตอนการทำ

การเตรียม LB Broth

- Tryptone 10 g
- Yeast Extract 5 g
- NaCl 10 g

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave

การเตรียม LB Agar

- LB Broth 1 ลิตร
- Agar 15 g

นำไป autoclave

การเตรียม SOB Media

- Tryptone 20 g
- Yeast Extract 5 g
- 5 M NaCl 2 ml
- 1 M KCl 2.5 ml

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave

เติมสารต่อไปนี้ในตู้ปลอดเชื้อ ผ่าน filter sterile

- 1 M $MgCl_2$ 10 ml
- 1 M $MgSO_4$ 10 ml

การเตรียม SOC Media

- SOB Media
- 20 mM glucose

แล้วนำไป autoclave

5.3) การเตรียม plate

<u>ขั้นตอนการทำ</u>

1. หลอม LB Agar ด้วยเครื่อง Autoclave แล้วนำไปแช่ที่ 50°c waterbath
2. นำ LB agar + ยาปฏิชีวนะ (amplicilin) ผสมในอัตราส่วน 1 mg/ 1 µl เทลง plate
3. รอจนเจลแข็ง เก็บไว้ในตู้เย็น 4°c หากยังไม่ใช้

5.4) วิธีการ Cloning

<u>ขั้นตอนการทำ</u>

1. เตรียม tube labelที่ฝา ตั้งในน้ำแข็งเอียง 45°c
2. เติม Plasmid (vector+insert) ลงไป tube ละ 2 µl on ice
3. นำ complement cell ใส่หลอดละ 100 µl แล้วหมุนหลอดในน้ำแข็งไปทางเดียว 1 รอบ ทิ้งไว้ 30 นาที
4. ดูด complement cell ใส่หลอดละ 100 µl หมุนหลอดในน้ำแข็ง 1 รอบ ทิ้งไว้ 30 นาที
5. ดูด IPTG + Xgal (1:1) ใส่ plate ละ 80 µl
6. Heat shock ใน 42 °c waterbath 45 sec แล้วใส่ในน้ำแข็ง 2 นาที
7. นำมาตั้งที่อุณหภูมิห้องเติม SOC media 900 µl Incubate กับเครื่อง shaking 37 °c 1 hr 250 rpm
8. นำ media ที่เพาะเชื้อมา spread ลง plate ตามปริมาตรที่ต้องการ (100-500 µl)
9. นำ plate เชื้อ ไปเพาะในตู้บ่ม 37°c 16 ชั่วโมง
10. เก็บ plate เอา parafilm พันรอบ plate ไว้ แช่ตู้เย็น 4°c 2ชั่วโมง เพื่อดูการเปลี่ยนสีของโคลน
11. Pick โคโลนีที่ยังคงเป็นสีขาว
    a. จุ่มลงใน LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ (10 ml: 10 µl) 5 ml

b. และจุ่มลงใน dH_2O 50 µl ตามลำดับ

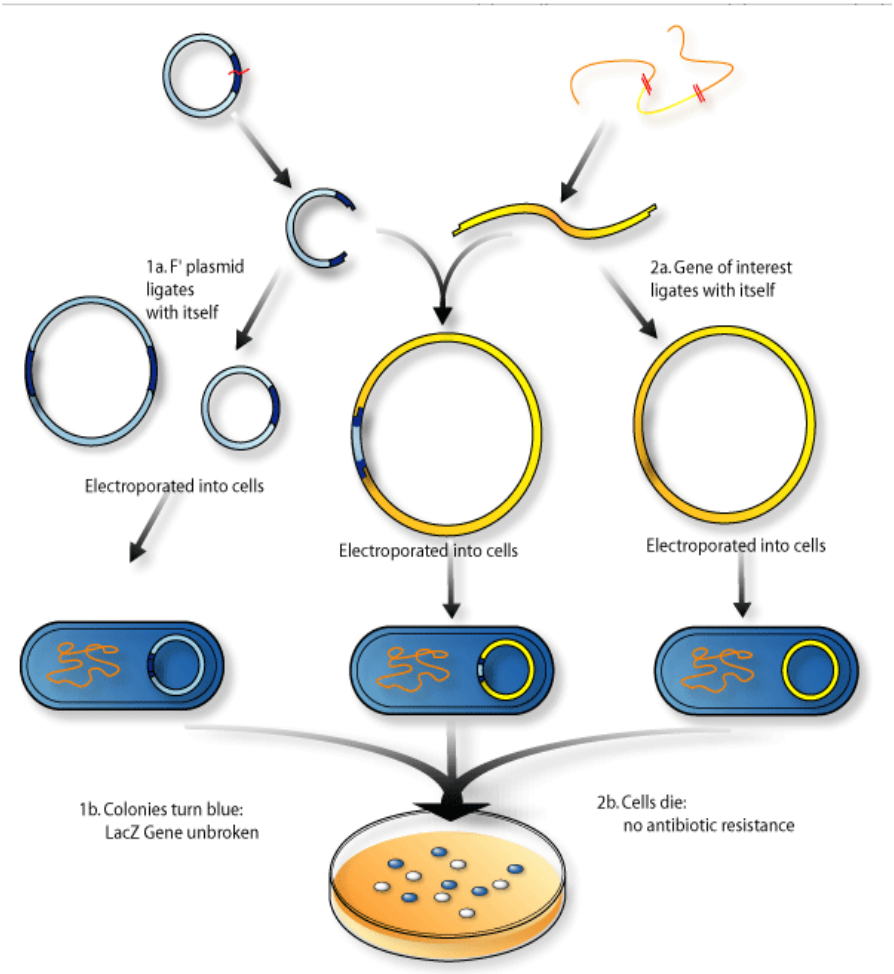
12. นำ

a. ลงไปเลี้ยงใน incubator shaker 37°c 250 rpm 12 ชั่วโมง

b. ไปทำ MSP-PCR ตรวจผลว่าขึ้นแบนด์หรือไม่

13. นำ a. ไปสกัดพลาสมิด รันอกาโรสเจลตรวจสอบผลว่าขึ้นหรือไม่

14. เลือกโคโลนีที่ a. และ b. ขึ้นแบนด์ ไปส่ง sequence



ภาพที่ 12 แสดงถึงการทำโคลนนิ่ง

(http://wiki.biomine.skelleftea.se/wiki/images/9/93/Cloning_with_the_help_of_LacZ_.png)

5.4) วิธีการสกัดพลาสมิดจาก Bacterial culture

<u>ขั้นตอนการทำ</u>

1. ดูด 1.5 ml Bacterial Culture ใส่หลอด
2. ปั่นเหวี่ยง 13000 rpm 2 นาที
3. เทน้ำทิ้ง complement cell เติม 400 µl แล้วหมุน ของ complete Lysis solution (cold) แล้ว vortex 30 วินาที
4. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที
5. ย้ายสารใส่ใน spin column แล้ว ปั่นเหวี่ยง 60 วินาที
6. ล้าง DNA ด้วย diluted wash buffer 400 µl
7. ปั่นเหวี่ยง 60 วินาที แล้วเทสารใน waste tube ชั้นล่างทิ้ง
8. นำ spin column ไป ปั่นเหวี่ยง 1 นาที
9. ย้าย spin column ไป ปั่นเหวี่ยง 1 นาที เติม elution buffer 35 µl
10. ปั่นเหวี่ยง 60 วินาที ได้ purified Plasmid เก็บไว้ที่ -20°c

6. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการแสดงออกของยีน

6.1) การเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ HeLa ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มีความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5 เปอร์เซ็นต์

6.2) การทำ 5'-azacytidine treatment

จากเซลล์ HeLa ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์และสภาวะที่เหมาะสมนำมานับจำนวนเซลล์ด้วย hemacytometer เพื่อให้ได้ชุดการทดลองจำนวน 6 ชุดที่มีเซลล์เริ่มต้นในการทดลองเป็น 50,000 เซลล์ โดย 3 ชุดการทดลองจะได้รับสาร 5'-azacytidine ความเข้มข้น 0 µM และอีก 3 ชุดการทดลองจะได้รับสาร 5'-azacytidineความเข้มข้น 20 µM ในทุกชุดการทดลองเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นเซลล์ที่ยังมีชีวิตในแต่ละชุดการทดลองถูกนำไปทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี MSP-PCR และสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *TNFRSF8* ในระดับของ เอ็มอาร์เอ็นเอ เปรียบเทียบผลที่ได้

6.3) การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *TNFRSF8*

จากการทดลองเซลล์ที่ยังมีชีวิตในแต่ละชุดการทดลองถูกนำมาทำการสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย Trizol reagent และนำอาร์เอ็นเอที่ได้มา

ทำอาร์ที-พีซีอาร์เพื่อสร้างสาย cDNA ด้วยชุดสังเคราะห์ cDNA RevertAid™First Strand cDNA Synthesis Kit ทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน

วิธีการสังเคราะห์ cDNA โดย RevertAid™First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA)

ขั้นตอนการสังเคราะห์

1. เตรียมความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ เป็น 5 µg/ DEPC water 11 µl
2. เติม oligo dT 1 µl (0.5 µg) ผสมให้เข้ากัน
3. บ่มที่อุณหภมิ 70ºC เป็นเวลา 5 นาที
4. สารละลายแช่บนน้ำแข็ง
5. เติม 5x reaction buffer ปริมาณ 4 µl
6. เติม 10 mM dNTP 2 µl
7. เติม Ribolock ; Ribonuclease (ยังยั้ง RNase) 20 U/ µl ปริมาณ 1 µl
8. เติม Revert Aid. M-muLv Reverse Transcriptase 200 U/ µl ปริมาณ 1 µl

ในการทดลองใช้น้ำกลั่นเป็น negative control เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนในขั้นตอนการทำพีซีอาร์ ตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน *TNFRSF8* ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซนต์ และวิเคราะห์ผลของความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการแสดงออกของยีน *TNFRSF8* โดยนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่

บทที่ 4

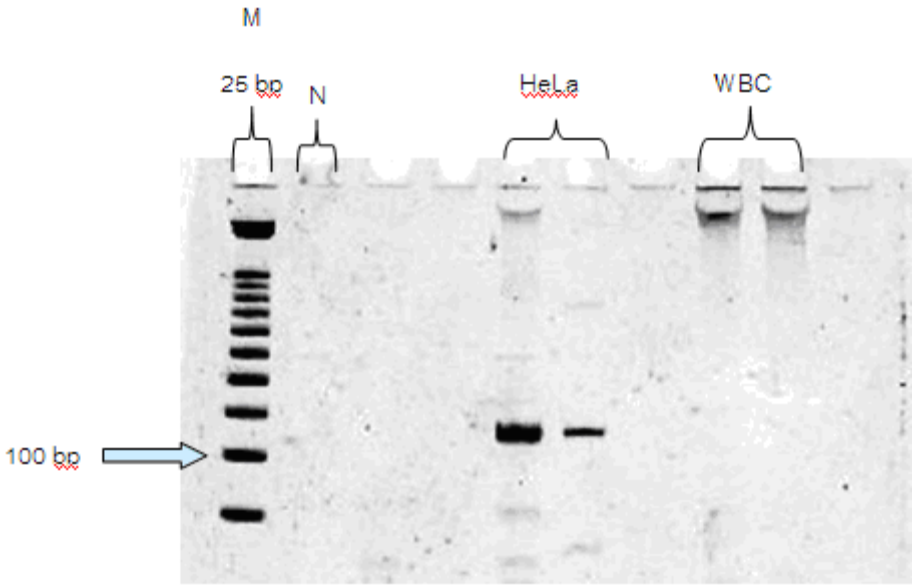
ผลการทดลอง

1. **การตรวจสอบเมทิลเลชันด้วยวิธี** Methylation Specificm Primer PCR (MSP-PCR)

ยีน *TNFRSF8*

- พบเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีนใน Hela cell และไม่พบในเซลล์เม็ดเลือดขาว

Methylation Primer



ภาพที่ 13 แสดงถึงผลการรันเจลพบเมทิลเลชันแบนด์ของยีน *TNFRSF8* ใน HeLa และไม่พบใน white blood cell

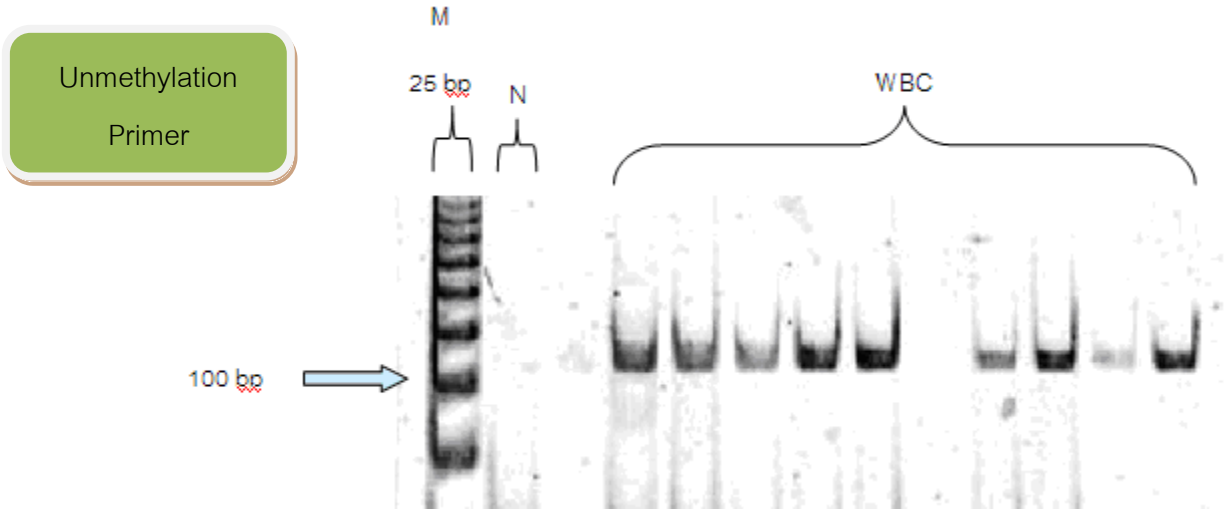
M = Marker 25 bp

N = Negative Control

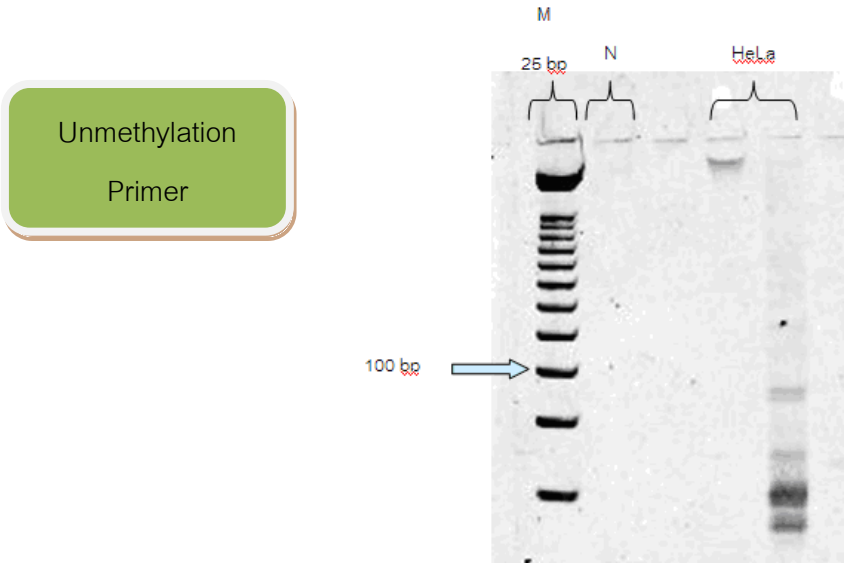
HeLa = PCR product of HeLa DNA

WBC = PCR product of white blood cell DNA

- พบ Unmethylation ของยีนนี้ในเซลล์เม็ดเลือดขาว และไม่พบในเซลล์ Hela



ภาพที่ 14 แสดงถึงผลการรันเจล gradient PCR พบอันเมทิลเลชันแบนด์ของยีน *TNFRSF8* ในเซลล์เม็ดเลือดขาว



ภาพที่ 15 แสดงถึงผลการรันเจลไม่พบอันเมทิลเลชันแบนด์ของยีน *TNFRSF8* ในเซลล์ HeLa

I จากตัวอย่างเซลล์ของคนไข้ทั้งหมด 81 ตัวอย่าง ได้ผลตามตาราง

	Met	Unmet	Met+Unmet	None	Total
เซลล์ปกติ	-	20	16	-	36
เซลล์มะเร็ง	13	9	18	6	45
					81

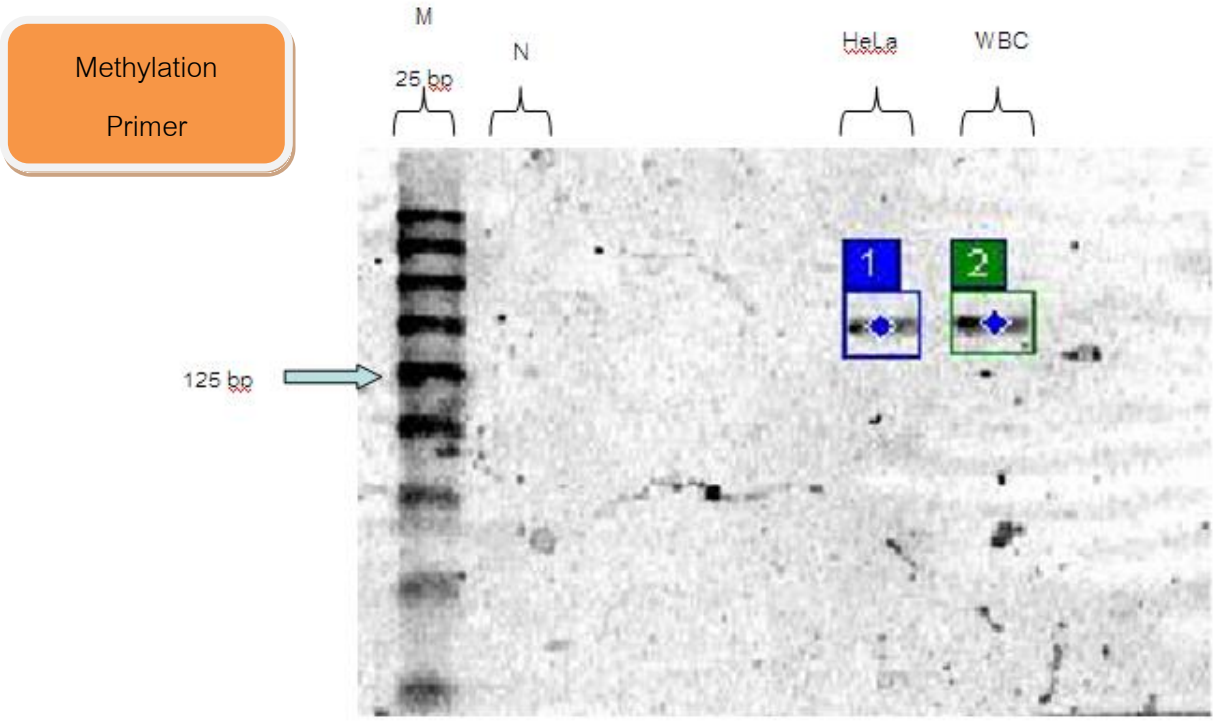
ตารางที่ 2 แสดงถึง ผลการรันเจลจากการทำ MSP-PCR ในตัวอย่างทั้ง 81 ตัวอย่าง

ชนิดของตัวอย่าง	**จำนวน (ตัวอย่าง)**	**จำนวนตัวอย่างที่พบดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (เปอร์เซ็นต์)**
เซลล์มะเร็ง	45	31 (68.88%)
เซลล์ปกติ	36	16 (44.44%)

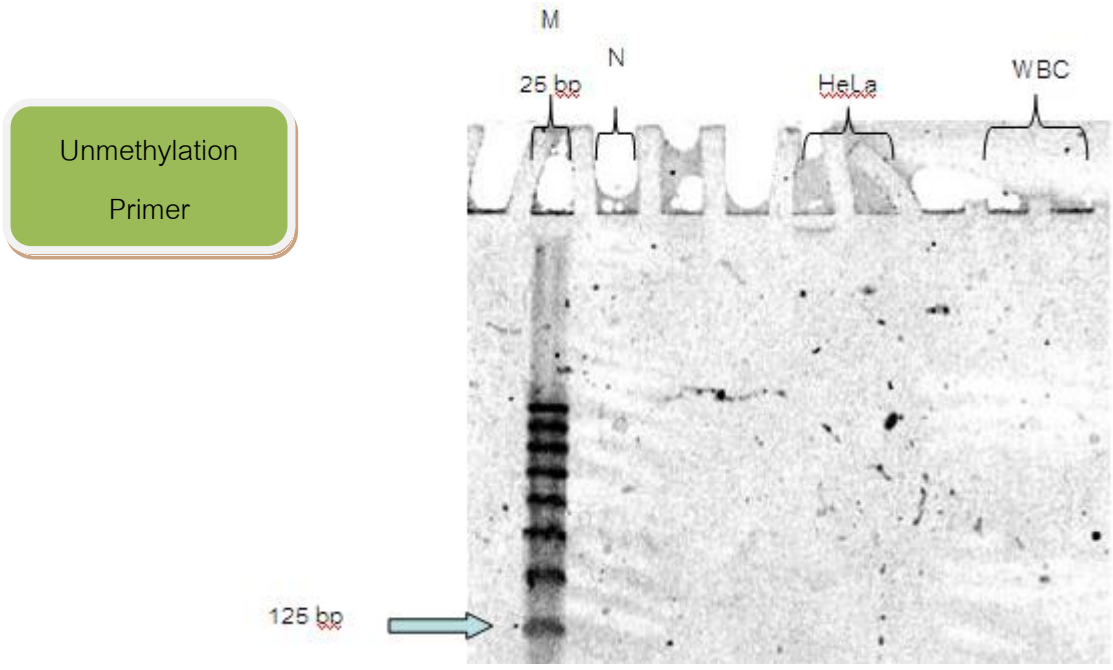
ตารางที่ 3 แสดงถึง ผลการรันเจลจากการทำ MSP-PCR เปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งกับเซลล์ปกติในยีน *TNFRSF8*

ยีน *HCP5*

- พบ Methylation บนโพรโมเตอร์ของยีนทั้งในเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ HeLa
- ไม่พบ Unmethylation ของยีนนี้ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ Hela



ภาพที่ 16 ผลการรันเจลพบเมทิลเลชันแบนค์ของยีน *HCP5* ทั้งใน Hela และเซลล์เม็ดเลือดขาว



ภาพที่ 17 ผลการรันเจลไม่พบเมทิลเลชันแบนค์ของยีน *HCP5* ทั้งใน Hela และเซลล์เม็ดเลือดขาว

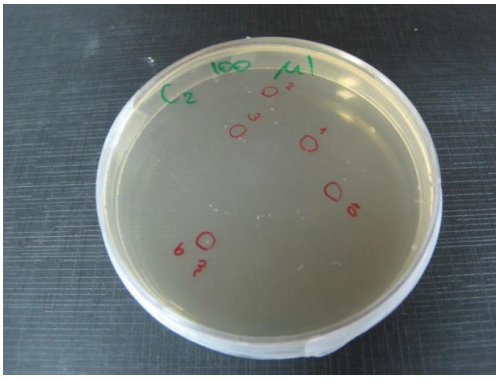
2. **การทำโคลนนิ่งและการยืนยันลำดับนิวคลิโอไทด์ด้วย** sequencing

2.1 โคลนนิ่ง

ผลโคลนนิ่ง methylation primer ของยีน *TNFRSF8* โดยใช้ HeLa

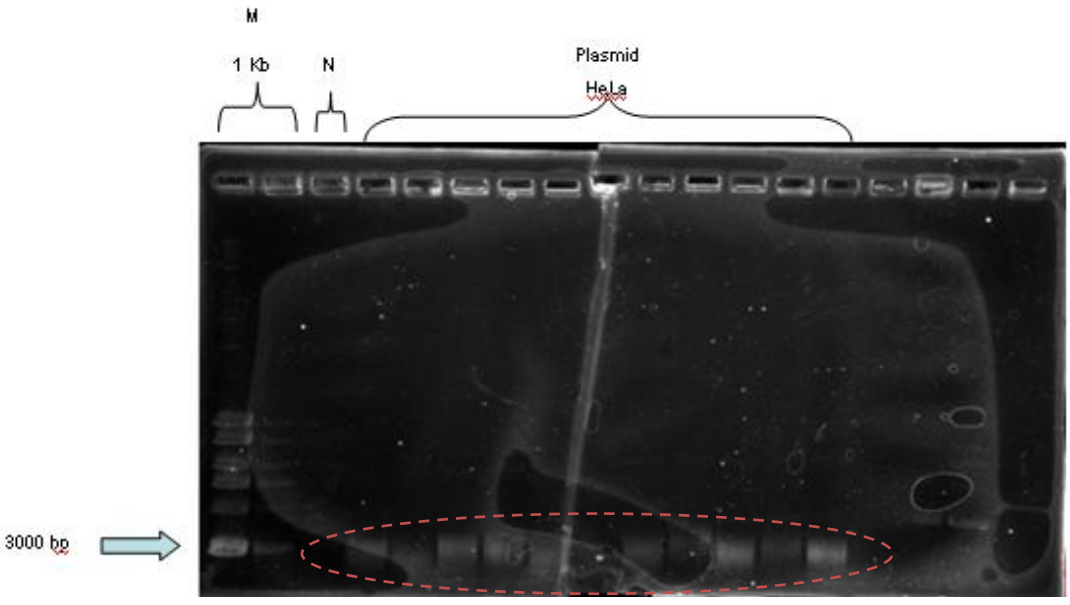
ผลการทรานสฟอร์เมชัน

จากภาพที่ 18 พบว่าสามารถทรานสฟอร์เมชันได้สำเร็จเนื่องจากพบโคโลสีขาวขึ้นมาในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 18 โคโลนีที่ถูกคัดเลือกเพื่อการทำ sequencing

TNFRSF 8 Methylation primer HeLa 5 โคลน

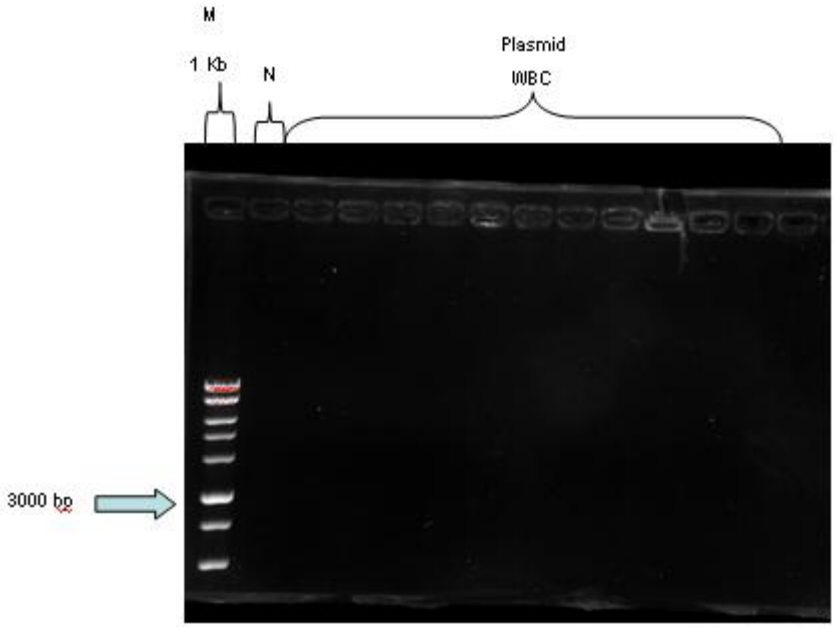


ภาพที่ 19 ผลการรันเจลแสดงการสกัดพลาสมิดของโคลนที่ถ่ายยีนจาก HeLa เป็นผลสำเร็จ

ผลโคลนนิ่ง unmethylation primer ของยีน *TNFRSF8* โดยใช้ white blood cell

ผลการทรานสฟอร์เมชัน

จากภาพที่ 20 หลังจากการไลเกท และทรานสฟอร์เมชันแล้วจะเห็นว่าไม่สามารถตรวจพบการสอดแทรกของยีน *TNFRSF8* จากการทำพีซีอาร์



ภาพที่ 20 ผลการรันเจลแสดงการสกัดพลาสมิดของโคลนที่ถ่ายยีนจากเซลล์เม็ดเลือดขาว ไม่เป็นผลสำเร็จ

2.2 Sequencing

ลำดับเบสของยีนเป้าหมาย TNFRSF8 ที่มีลักษณะเป็นเมทิลเลชัน เป็นดังนี้

CGCGCGCGGTTGAGAATCGTCGGGATCGTACGTTGGGCGTCGCGCGTTTTTTTCGTT
TTTTAGGTGGGTGTTTGTCGTTAGGTTATTTTACGTTCGGTTTCGGGGATGCGCG

ลำดับเบสที่ตรวจพบในพลาสมิด โคลนที่1

AGTCGACGTGATGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGC

CCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGA

ATTCGATTGAATCGTCGCGCGCGGTTGAGAATCGTCGGAATTC

GTACGTGGGCGTCGCGCGTTTTTTTCGTTTTTTAGGTGGGCG

TTTGTCGTTAGGTTATTTTACGTTCGGTTTCGGGGATGCGCG

AATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATAT

GGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTC

TATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC

TGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACA

ACATTACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGC

CTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACT

GCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATT

AATGAATCCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTA

TTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGC

TCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAA

GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA

GGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAA

CCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCC

GCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAG

AGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT

TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCT

GCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTTCTCCCTTCGGGAAG

CGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCG

GTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC

CCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCCGGTAACTATCGT

CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGC

AGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGT

GCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTACTACGGCCTACACCTAG

AAGAAACAAGTATTGGTATTCCTGGCGCCCCTTGCGCTGAGCCAGTT

A C TTT C G A A AG AG T T GTGA TA G C TC T G A T C GG C A A CA A A C AA C GC CT GTG TA T A C GC G G T G G T T T T G C TT G C CGA CCG A CG C CAG A A TA TA CTCATC G C GT C G C A C GCA

ผลตำแหน่งเบส sequencing จากพลาสมิดที่สกัดจากในโคลนที่1 มีลำดับเบสตรงกันกับลำดับเบสเป้าหมายของยีน TNERSF8 ที่ออกแบบไว้ดังนี้

Query 1
CGCGCGCGGTTGAGAATCGTCGGGATCGTACGTTGGGCGTCGCGCGTTTTTTTCGTT
TTT 59

Sbjct 91
CGCGCGCGGTTGAGAATCGTCGGGATCGTACGTTGGGCGTCGCGCGTTTTTTTCGTT
TTT 150

Query 60
tAGGTGGGCGTCGGTCGTTAGGTTATTTTACGTTCGGTTTCGGGGATGCGCG 111

Sbjct 151
TAGGTGGGTGTTTGTCGTTAGGTTATTTTACGTTCGGTTTCGGGGATGCGCG 202

ลำดับเบสที่ตรวจพบในพลาสมิด โคลนที่2

AGTCGACGTGATGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGC

CCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGA

ATTCGATTGAATCGTCGCGCGCGGTTGAGAATCGTCGGAATTC

GTACGTGGGCGTCGCGCGTTTTTTTCGTTTTTTAGGTGGGCG

TTTGTCGTTAGGTTATTTTACGTTCGGTTTCGGGGATGCGCG

AATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATAT

GGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTC

TATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC

TGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACA

ACATTACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGC

CTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACT

GCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATT

AATGAATCCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTA

TTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGC

TCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAA

GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA

GGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAA

CCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCC

GCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAG

AGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT

TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCT

GCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTTCTCCCTTCGGGAAG

CGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCG

GTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC

CCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCCGGTAACTATCGT

CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGC

AGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGT

GCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTACTACGGCCTACACCTAG

AAGAAACAAGTATTGGTATTCCTGGCGCCCCTTGCGCTGAGCCAGTT

A C TTT C G A A AG AG T T GTGA TA G C TC T G A T C GG C A A CA A A C AA C GC CT GTG TA T A C GC G G T G G T T T T G C TT G C CGA CCG A CG C CAG A A TA TA CTCATC G C GT C G C A C GCA

ผลตำแหน่งเบส sequencing จากพลาสมิดที่สกัดจากในโคลนที่2 มีลำดับเบสตรงกันกับลำดับเบสเป้าหมายของยีน TNERSF8 ที่ออกแบบไว้ดังนี้

Query 1
CGCGCGCGGTTGAGAATCGTCGGGATTCGTACGTGGGCGTCGCGCGTTTTTTTCGTT
TTT 59

Sbjct 98
CGCGCGCGGTTGAGAATCGTCGGAATTCGTACGTGGGCGTCGCGCGTTTTTTTCGTTT
TT 157

Query 60
tAGGTGGGCGTCGGTCGTTAGGTTATTTTACGTTCGGTTTCGGGGATGCGCG 111

Sbjct 158
TAGGTGGGCGTTTGTCGTTAGGTTATTTTACGTTCGGTTTCGGGGATGCGCG 209

ลำดับเบสที่ตรวจพบในพลาสมิด โคลนที่3

A C CAGG TAG TG A T T G T A TA C G A C T CA C TA T A G G G C G AAT T G G GC

CC G AC G T C G CA T G C T C C C G G C C G C CA T G G C G G C C G C G G G

AAT T C G AT T C G C G C G C G G T T G A G A AT C G T C G C C G T T C T T G A

GG C T G ACA CA G G AT G G C T T C G TT C G C C T T G T T CA G T T C G C C G C

C G C G A A T G T A G A T G C C G A T C A G G C C T T C C G A G A A C T G G C T

G C G TT C G G T T T C G G G G AT G C G C G A A T C A C T A G T G A A T T C G C

G G C C GC C T G C A G G T C G A C C A T A T G G G A G A G C T C C C A A C G C

G T T G G AT G C A T A G C T T G A G T A T T C T A T A G T G T C A C C T A A A T A

G C T T G G C G T A A T C A T G G T C A T A G C T G T T T C C T G T G T G A A A T T

G T T A T C C G CT CA C A A T T C C A C A C A A C A T A C G A G C C G G A A G C

A T A A A G T G T A A A G C C T G G G G T G C C T A A T G A G T G A G C T A A C T

C A C A T T A A T T G C G T T G C G C T C A C T G C C C G C T T T C CA G T C G G

G A A A C C T G T C G T GC C A G C T G C A T T A A T G A A T C G G C C A A C G C

G C G G G G AG A G G C G G T T T G C G T A T T G G G C G C T C T T C C G C T T C

C T C G C T C A C T G A C T C G C T G C G C T C G G T C G TT C G G C T G C G G

C G A G C G G T A T C A G C T C A CC T C A A A G G C G G T A A T A C G G T T A T

C C A C A G A A T C A G G G G AT A A C G C A G G A A A G A A C A T G T G A G C A

A A A G GC C A G C A A A A A G GC C A G G A AC C G T A A A A A G GC C G C G C G T T

G C T G G C G T T T T T C C A T A G G C T C C G C C C C C C T G AC G A G C AT C A

CA A A A A T C G A C G C T CA A G T C A G AG G T G G C G AA A C C C G A C A G

G A C T A T A A A G AT A C C A G G C G T T T C C CC C T G G AA G C TC C C T C G

T G C G C T C TC C T G T TC C G AC C C T G C C G C T T AAC C G G AT AC C T G T

C C G C C T T T C T C C C T T C G G G A A G C G T G G C G C T T T C T CAT A G C T

C A C G C T G TAG GT AT C T C A G T T C G G T G T A G T C G TT C G C T CC AA G

C T G G G C T G T G T GC AC G AA C C C C C C G TT C A G CCCC G A CC G C T G

C G CC T TA T CC GG T AA C T A T C G T C TT G A G T CC AA C C C GG T A G AC A

C G A C T T A TC G C A C T G C AG C A G C A C TGGG T A AC A GG A TT AG CA GA

A G CG A G T A T G T A G C G TTG CCTA CCA GA AG T TCTCT TG G AA G T G G

GTG G CC T A C TTA C G C CTCACA AC TA GA AGAG A A CAC G AG TAT T T GGG

TA TC CT GC GC C CTC T TCGC CGT G A G CC A G T A AC CT C T C G A A A AG A G T T G T GT AG CC C GT GG TA T C C G C A A C A A A C C A C C C C T C GT T A T C A A C G C A GC G G G A T T G TG TGCA

ผลตำแหน่งเบส sequencing จากพลาสมิดที่สกัดจากในโคลนที่3 มีลำดับเบสตรงกันกับลำดับเบสเป้าหมายของยีน TNERSF8 ที่ออกแบบไว้ดังนี้

Query 1 CGCGCGCGGTTGAGAATCGTCG 22

Sbjct 93 CGCGCGCGGTTGAGAATCGTCG 114

Query 90 CGTTCGGTTTCGGGGATGCGCG 111

Sbjct 209 CGTTCGGTTTCGGGGATGCGCG 230

ลำดับเบสที่ตรวจพบในพลาสมิด โคลนที่4

A GC A GG C G TG A T G T A TA C G A C T CA C TA T A G G G C G AAT T G G GC

CC G AC G T C G CA T G C T C C C G G C C G C CA T G G C G G C C G C G G G

AAT T C G AT T C G C G CA T C C C C G A A AC C G A A C G A T CA C G A C G A T

TT C T CA A C C G C G C G C G A A T C A C TA G T G A A T T C G C G G C C G C C T

G C A G G T C G AC C A T A T G G G A G A G C T C C CA A C G C G T T G G A T G C

A T A G C T T G A G T AT T C TA T A G T G T C A C C T A A A T A G C T T G G C G T A

A T C AA T G G T C A T A G C T G T T T C C T G T G T G A A A T T G T T A T C C G C

T C A C A A T T C CA C A C A A C A T A C G A G C C G G A A G C A T A A A G T G T

A A A G C C T G G G G G T G C C T A A T G A G T G A G C T A A C T C A C A T T A A T

T G C G T T G CC G C T C A C T G C C C G C T T T C CA G T C G G G A A A C C T G

T C G T G C C A G C T G C A T T A A T G A A T C G G C C A A C G C G C G G G G A

G A G G C G G T T T G C G T A T T G G G C G C T C T T C C G C T T C C T C G C T C

A C T G A C T C G C T G C GG C T C G G T C G T T C G G C T G C G G C G A G C G

G T A T C A G C T C A C T C A A A G G C G G T A A T A C G G T T A T C C A C A G A

A T C A G G G G AT A A C G C A G G A A A G A A AC A T G T G A G C A A A A G G C C

A G C A A A A G G C C A G G A A C C G TT A A A A A G G C C G C G T T G C T G G C

G T T T T T C CA T A G G C T C C G C C C C C C T G A C G A G C A T C A C A A A A

AT C G A C G C T C A A G T C A G A G G T G G C G A A A C C C G A C A G G AC T A

T A A A G AT A C C A G G C G T T T C C C C C T G GG A A G C T C C C T C G T G C

G C T C T C C T G T T C C G A C C C T G C C G C T T A C C G G A T AC C T G T C C

G C C T T T C TC C C T T C G G G AA G C G T G G C G C T T T C T C A T A G C T C

AC G C T G T A G G T A T C T C A G TT C G G T G T AG G T C G TT T C G C TC CA A

G C T G G G C T G T G T G C AC G A A C C C C C C G T T C A G C C C G AC C G C T

G C G C C TT A T CC G G T A A C T A T C G T C T T G A G T C C AA C C C G G T AA

G AC AC G A C TT A T C G CCA C T GG C A G C A G CC A C TGG TAAC A GGATT A

G C A G AG C G A GG T A T G T A G C G GT G C TA CA G A G TT C TT G AA G TGG T

GG CC T AA C TA C GG C T A CA C T A GA A G AA C A G T A TTT GG T A T C T G C

G C T C T G C T G AA G C A G T A C TT C GGG A A A A AGGAG T GG T A G C T C T

G A T C G C A AC A A CCA CC GCG C T GTG G T G AGC CG G TG TG T T TT TT TT T

G T T T G C A AG CGA GA CAG GA AT T A C C G C G C A G A A A A A G A T C T C AG A G AG A T C T G AA TC CT T T TC T C A C A C G G G T C TGC T GA G C G C CTCA TC A T G T G G AG CG C G A

ผลตำแหน่งเบส sequencing จากพลาสมิดที่สกัดจากในโคลนที่4 มีลำดับเบสตรงกันกับลำดับเบสเป้าหมายของยีน TNERSF8 ที่ออกแบบไว้ดังนี้

Query 1 CGCGCGCGGTTGAG-AATCGTCGGGATCGTACG 32

Sbjct 139 CGCGCGCGGTTGAGAAATCGTCGTGATCGTTCG 107

Query 90 CGTTCGGTTTCGGGGATGCGCG 111

Sbjct 112 CGTTCGGTTTCGGGGATGCGCG 91

ลำดับเบสที่ตรวจพบในพลาสมิด โคลนที่5

G GAAGG ACAG TG A TT G T A TA C G A C T CA C TA T A G G G C G AAT T G G G C
CC G A C G T C G CA T G C T C C C G G C C G C CA T G G C G G C C G C G G G A
AT T C G A T T C G C G C G C G G T T G A G A A T C G T C G T T C G G T T T C GG G
G G AT G C G C G A A T CA C TA G T G A A T T C G C G G C C G C C T G C A G G T
C G AC C A T A T G G G A G A G C T C C C A A C G C G T T G G A T G C A T A G C T
T G A G T A T T C T A T A G T G T C A C C T A A A T A G C T T G G C G T A A T C A T
G G TT C A T A G C T G T T T C C T G T G T G A A A T T G T T A T C C G C T CA C A A
T T C C A C A C A A C A T A C G A G C C G G A A G C A T A A A G T G T A A A G C C
T G G G G T G C C T A A T G A G T G A G C T A A C T C A C A T T A A T T G C G T T
G C G C T CC A C T G C C C G C T T T C CA G T C G G G A A A C C T G T C G T G C
C A G C T G C A T T A A T G A A T C G G C CA A C G C G C G G G G AG A G G C G
G T T T G C G T A T T G G G C G C T C T T C C G C T T C C T C G C T C A C T G A C
T C G C T G C G C T C GG G T C G T T C G G C T G C G G C G A G C G G T A T C A
G C T C A C T C A A A G G C G G T A A T A C G G T T A T C C A C A G A A T C A G G
G G AT A A C G C A G G A A A G A A C A T G T G A G C A A A A G G C C A G C A A A
A G G C C A G G A AC C G T A A A A AA A G G C C G C G T T G C T G G C G T T T T T
C CA T A G G C T C C G C C C C C C T G AC G A G C A T C A C A A A A A T C G A C
G C T C A A G T C A G A G G T G G C G A A A C C C G A C A G G AC T A T A A A G
AT A C C A G G C G T T T C C C C C T G G A A G C TT C C C T C G T G C G C T C T C
C T G T T C C G AC C C T G C C G C T T AC C G G A T AC C T G T C C G C C T T T C
TC C C T T C G GG A A G C G T G G C G C T T T C TC A T A G C T C AC G C T G TAG
G T AT C T C A G T T C G G T G T AG G T C G T T C G C TT C CAA G C T G G G C T G
T G T GC A C G A A C C C C C C G T T CA G C C C G AC C G C T G C G C C TT A T C
C G G T AA C T A T C G T C TT G A G T C C AA C C C G G T AA G AC AC G A C T T A
T C G CCA C TG G C A G C A G C CA C TGG T AAC A GGA TT A G C A G A G C G A
GG T A T G T A G C G T G C T ACA G A G TT C TT G AA G T G T GG CC T AA C T A C
GG C T A CA C TA G A G A C AG T A TTT GG T A T C T G C G C T C TG C T G A G C
A G T A C T C GG A A A A AGG AG T GG T A G C T C T T G A T C G C A C A CCA C
CCG C TGG A AG CG G G GT G G T T T T T T T G T T T G C A G C A G CA G A A T A

CC CG CA A G A A A A G A TTC C A G A A G A T CC A T T G A T C T T T C T A C G A TC TG G A CG C CT TC A G TGT A A A C G A A A A T CTC C C C G C

ผลตำแหน่งเบส sequencing จากพลาสมิดที่สกัดจากในโคลนที่5 มีลำดับเบสตรงกันกับลำดับเบสเป้าหมายของยีน TNERSF8 ที่ออกแบบไว้ดังนี้

Query 1 CGCGCGCGGTTGAGAATCGTCG 22

Sbjct 94 CGCGCGCGGTTGAGAATCGTCG 115

Query 90 CGTTCGGTTTC-GGGGATGCGCG 111

Sbjct 114 CGTTCGGTTTCGGGGGATGCGCG 136

ผบสรุปการยืนยัน sequence เป็นดังตารางที่ 4

โคลนที่	ความเข้ากันกับ sequence ที่ออกแบบ
1	111 bp (100%)
2	111 bp (100%)
3	44 bp (39.63%)
4	49 bp (44.14%)
5	43 bp (38.73%)

ตารางที่ 4 แสดงถึง ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสจากการทำ sequencing เปรียบเทียบระหว่างระหว่างพลาสมิดที่สกัดกับลำดับเบสจากข้อมูลใน ensembl ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ในยีน *TNFRSF8*

3. **การทำ Treated Hela cell ด้วย 5'Aza cytidine**

3.1) เซลล์ HeLa ที่ผ่านการ treat ด้วย 5'Aza มีปริมาณความเข้มข้นของเมทิลเลชันลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ผ่านการ treat ดังตารางที่ 5

Treated HeLa cell ด้วย 5'Aza ความเข้มข้น	**ปริมาตรแบนด์เมทิเลชันที่วัดได้**
sample 1 - 0 µl	1790245.11 (66.30%)
sample 2 - 0 µl	2589259.42 (95.89%)
sample 3 - 0 µl	1978996.49 (73.29%)
sample 1 - 20 µl	1642677.41 (60.83%)
sample 2 - 20 µl	1820194.53 (67.41%)
sample 3 - 20 µl	1457271.66 (53.97%)

ตารางที่ 5 ผลการ treat Hela cell ด้วย 5'Azacytidine เปรียบเทียบปริมาตรเมทิลเลชันของยีน *TNFRSF8* ระหว่างเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการทรีต กับเซลล์ที่ทรีต 5'Azacytidine ความเข้มข้น 20 µl

จากตารางที่ 5 คำนวณ T-test เพื่อยืนยันผลทางสถิติ

กำหนดให้ HeLa ที่ไม่ได้ treat 5'Aza = ประชากรกลุ่มที่ 1

กำหนดให้ HeLa ที่ treat 5'Aza = ประชากรกลุ่มที่ 2

ค่าเฉลี่ยของประชากร($\bar{\bar{x}}$) = $\frac{\sum x}{N}$

- กลุ่มที่ 1 $\bar{x}1 = \frac{66.30 + 95.89 + 73.29}{3} = 78.49$
- กลุ่มที่ 2 $\bar{x}2 = \frac{66.83 + 67.41 + 53.97}{3} = 60.73$

ค่าความแปรปรวนของประชากร (s^2) = $\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{N}$

- กลุ่มที่ 1 (S_1^2) = $\frac{(66.30-78.49)^2+(95.89-78.49)^2+(73.29-78.49)^2}{3}$

  = 159.47

- กลุ่มที่ 2 (S_2^2) = $\frac{(66.83-60.73)^2+(67.41-60.73)^2+(53.97-60.73)^2}{3}$

  = 30.11

สมมติฐาน

H0 = เมทิลเลชันของยีนใน HeLa ทั้ง 2 กลุ่มเท่ากัน ($\mu_1 = \mu_2$)

H1 = เมทิลเลชันของยีนใน HeLa กลุ่มที่ 1 มากกว่ากลุ่มที่ 2 ($\mu_1 > \mu_2$)

จากสูตร $t = \frac{(\bar{x}1-\bar{x}2)-0}{\sqrt{\frac{s1^2}{n1}+\frac{s2^2}{n2}}}$

$= \frac{(78.49-60.73)-0}{\sqrt{\frac{159.47}{3}+\frac{30.11}{3}}}$

= 2.41

จากตาราง T- distribution

Significance level = α

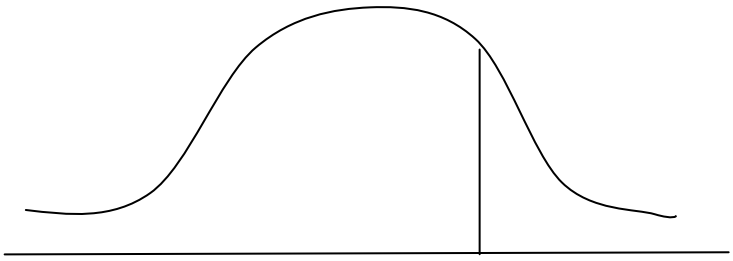
Degrees of Freedom	.005 (1-tail) .01 (2-tails)	.01 (1-tail) .02 (2-tails)	.025 (1-tail) .05 (2-tails)	.05 (1-tail) .10 (2-tails)	.10 (1-tail) .20 (2-tails)	.25 (1-tail) .50 (2-tails)
1	63.657	31.821	12.706	6.314	3.078	1.000
2	9.925	6.965	4.303	2.920	1.886	.816
3	5.841	4.541	3.182	2.353	1.638	.765
4	4.604	3.747	2.776	2.132	1.533	.741
5	4.032	3.365	2.571	2.015	1.476	.727
6	3.707	3.143	2.447	1.943	1.440	.718
7	3.500	2.998	2.365	1.895	1.415	.711
8	3.355	2.896	2.306	1.860	1.397	.706
9	3.250	2.821	2.262	1.833	1.383	.703
10	3.169	2.764	2.228	1.812	1.372	.700
11	3.106	2.718	2.201	1.796	1.363	.697
12	3.054	2.681	2.179	1.782	1.356	.696
13	3.012	2.650	2.160	1.771	1.350	.694
14	2.977	2.625	2.145	1.761	1.345	.692
15	2.947	2.602	2.132	1.753	1.341	.691
16	2.921	2.584	2.120	1.746	1.337	.690
17	2.898	2.567	2.110	1.740	1.333	.689
18	2.878	2.552	2.101	1.734	1.330	.688
19	2.861	2.540	2.093	1.729	1.328	.688
20	2.845	2.528	2.086	1.725	1.325	.687
21	2.831	2.518	2.080	1.721	1.323	.686
22	2.819	2.508	2.074	1.717	1.321	.686
23	2.807	2.500	2.069	1.714	1.320	.685
24	2.797	2.492	2.064	1.711	1.318	.685
25	2.878	2.485	2.060	1.708	1.316	.684
26	2.779	2.479	2.056	1.706	1.315	.684
27	2.771	2.473	2.052	1.703	1.314	.684
28	2.763	2.467	2.048	1.701	1.313	.683
29	2.756	2.462	2.045	1.699	1.311	.683

ภาพที่ 21 The t-Distribution Table

(http://mips.stanford.edu/courses/stats_data_analsys/principles/t_table.html)

ที่ค่าความเชื่อมั่น = o.o5 d.f. = 3

ค่าวิกฤติจะอยู่ที่ 2.353



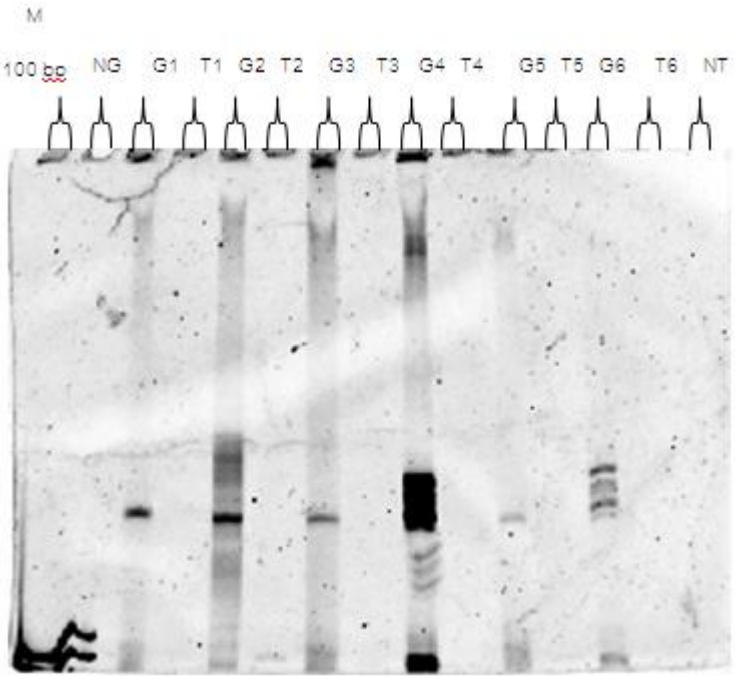
2.353

ค่าที่ได้จากการคำนวณ = 2.41 ซึ่งมากกว่าค่าที่จุดวิกฤติ

เพราะฉะนั้น ปฏิเสธ H0 ยอมรับ H1

ปริมาตรแบนด์เมทิเลชันที่วัดได้ของ HeLa ที่ไม่ผ่านการ treat ด้วย 5'Aza มากกว่า HeLa ที่ผ่านการ treat ด้วย 5'Aza อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.2) ไม่สามารถพบการแสดงออกของเซลล์ HeLa ที่ผ่านการ treat ด้วย 5'Aza ได้ดังในรูปที่ 22



ภาพที่ 22 ผลการรันเจลแสดงผลการทำ RT – PCR ของ *TNFRSF8* อาร์เอ็นเอ

M = Marker 100 bp

NG = Negative control ไพรเมอร์ *GAPDH*

NT = Negative control ไพรเมอร์ *TNFRSF8*

G1, G2, G3 = non treated 5'Aza with *GAPDH* primer

G4, G5, G6 = treated 5'Aza 20 µl with *GAPDH* primer

T1, T2, T3 = non treated 5'Aza with *TNFRSF8* primer

T4, T5, T6 = treated 5'Aza 20 µl with *TNFRSF8* primer

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

TNFRSF8

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าโพรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *TNFRSF8* มีความสัมพันธ์กับการเกิดเซลล์มะเร็งปากมดลูก จากตารางที่ 3 ในผลการทดลองพบว่า

1. พบการเกิดเมทิลเลขันของยีน *TNFRSF8* ในเซลล์มะเร็ง 68.88%
2. พบการเกิดเมทิลเลขันของยีน *TNFRSF8* ในเซลล์ปกติ 44.44%
3. พบการเกิดเมทิลเลขันของยีน *TNFRSF8* ในเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติอย่างมีนัยสำคัญ
4. ไม่พบตัวอย่างเซลล์ปกติที่เป็น methylation sequence แต่เพียงอย่างเดียวอยู่เลย

จากผลการทำโคลนนิ่งและ sequencing แสดงให้เห็นลำดับเบสของดีเอ็นเอ *TNFRSF8* ซึ่งมีเพียง 2 โคลนจาก 5 โคลน ที่มีผลลำดั บเบสตรงกับแถบดีเอ็นเอจากข้อมูลใน ensembl ในตอนแรก 100%

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการแสดงออกของยีน *TNFRSF8* ในเซลล์ HeLa โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองจำนวน 2 ชุดที่มีเซลล์เริ่มต้นในการทดลองเป็น 50,000 เซลล์ โดยทั้ง 2 ชุดการทดลองได้รับสาร 5'-azacytidine ความเข้มข้น 0 μM และ 20 μM ในทุกชุดการทดลองเป็นเวลา 7 วัน และผลการทดลองพบว่าการทดลองชุดที่เซลล์ HeLa เริ่มต้นเป็น 50,000 เซลล์ซึ่งได้รับสาร 5'-azacytidine ความเข้มข้น 20 μM เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันลดลง แต่ตรวจไม่พบผลการแสดงออกจากการทำ RT-PCR ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสภาวะการรันเจลที่ไม่เหมาะสม

HCP5

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าโพรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *HCP5* ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดเซลล์มะเร็งปากมดลูก

HPC5

ไม่สามารถสรุปได้ว่าโพรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *HPC5* มีความสัมพันธ์กับการเกิดเซลล์มะเร็งปากมดลูกหรือไม่

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการทดลองแสดงว่า ความเป็นเมทิลเลชันของยีน *TNFRSF8* มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก โดยพบความเป็นเมทิลเลชีนของยีนได้มากขึ้นในเซลล์มะเร็งเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ และไม่พบเซลล์ปกติที่มียีนที่เป็นเมทิลเลชันเพียงอย่างเดียวเลย ยีน *TNFRSF8* จึงน่าจะทำหน้าที่เป็นยีนต้านมะเร็งในมะเร็งปากมดลูก ในขณะที่ยีน *HCP5* ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งปากมดลูกแต่อย่างใด เนื่องจากพบเมทิลเลชัน ของยีน *HCP5* ได้ทั้งใน HeLa และเซลล์ปกติ โดยที่ไม่พบลักษณะที่เป็นอันเมทิลเลชันของยีนนี้ ในขณะที่ยีน *HPC5* ยังไม่อาจสรุปได้ว่ามีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งปากมดลูกหรือไม่ เนื่องจากมีข้อมูลของยีนนี้อยู่น้อยมาก แม้ในฐานข้อมูลของ ensembl ก็ยังไม่ได้ยืนยันการมีอยู่ของยีนนี้

การที่พบเมทิลเลชันของยีน *TNFRSF8* ในเซลล์ปกติ อาจเกิดได้จาก

1. ขั้นตอนการสกัดเซลล์จากสไลด์ อาจมีความผิดพลาดในการเก็บตัวอย่างเซลล์ปกติที่อยู่ร่วมกับเซลล์มะเร็ง ทำให้พบแบนด์เมทิลเลชันของยีน
2. เซลล์ที่พบมีความเป็น heterozygous ของยีน คือตำแหน่ง ณ ยีนนั้นๆของเซลล์มี locus หนึ่งเป็นยีนปกติ ขณะที่อีก locus หนึ่งเป็นยีนที่มีเมทิลเลชันของดีเอ็นเอ

ปัญหาการตรวจผลการแสดงออกของ *TNFRSF8* ในเซลล์ HeLa อาจเกิดจากความไม่เหมาะสมของสภาวะในการทำ PCR และการรันเจล

ข้อเสนอแนะ

เมื่อทำการศึกษาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในดีเอ็นเอตัวอย่างที่เป็น high-grade squamous intraepithelial lesion คือ เซลล์บริเวณปากมดลูกที่มีความผิดปกติรุนแรงซึ่งมีความเป็นไปได้สูงที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติจากตัวอย่างเดียวกันพบว่ามีดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์ที่เป็น high-grade squamous intraepithelial lesion แต่ไม่พบดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์ปกติจากตัวอย่างเดียวกัน จากผลการทดลองนี้อาจเป็นไปได้ว่า การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ยีน *TNFRSF8* จะเป็นหนึ่งในกระบวนการ Multistep process ของโรคมะเร็งปากมดลูก เนื่องจากไม่พบดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์ปกติ แต่พบดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์ที่เป็น high-grade squamous intraepithelial lesion จากผลดังกล่าวเป็นผลจากตัวอย่างที่มีเซลล์ที่เป็น high-grade squamous intraepithelial lesion และเซลล์ปกติอยู่บนตัวอย่างเดียวกัน เพียง 1 ตัวอย่าง ซึ่งควรจะมีตัวอย่างลักษณะดังกล่าวมากกว่านี้เพื่อผลการทดลองที่ถูกต้องมากที่สุด

ผลการรันเจลการตรวจสอบการแสดงออกไม่ขึ้นแบนด์ ต้องมีการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR จาก cDNA มากกว่านี้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ธีระ ทองสง, และคนอื่นๆ. นรีเวชวิทยา ฉบับสอบบอร์ด. เรียบเรียงครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: พี.บี.ฟอเรน บุ๊คส์ เซนเตอร์, 2539.

ศูนย์รังสีรักษาและมะเร็งวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ . มะเร็งปากมดลูก . แหล่งที่มา : http://www.chulacancer.net/newpage/information/cervix_cancer04.html

สำนักพัฒนาวิชาการแพทย์ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางเวชปฏิบัติการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก และการรักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของปากมดลูก . :**ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด**.

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. มะเร็งปากมดลูก. แหล่งที่มา: http://www.nci.go.th/Knowledge/pakmodluk.html

สุรินทร์ นิยมางกูร . สถิติวิจัย . พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , 2548.

ภาษาอังกฤษ

Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV infection fact sheet. [Online]. 2005. Available from: http://www.cdc.gov/std/hpv/stdfact-hpv.htm. [2005, July 22]

Dueñas-González, A., Lizano, M., Candelaria, M., Cetina, L., Arce, C., and Cervera, E. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. Mol Cancer 4 (October 2005): 38.

Gilbert Spizzo, et al. Methylation of the Ep-CAM promoter region in human breast cancer cell lines and breast tissue. Cancer Letters 246 (February 2007): 253-261

Han, Y. et al. The role of protective HCP5 and HLA-C associated polymorphisms in the control of HIV-1 replication in a subset of elite suppressors. [Online]. 2008. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez [2009, August 9]

Jianduan Lia, et al. IGSF4 promoter methylation and expression silencing in human cervical cancer. Gynecologic Oncology 96 (January 2005): 150-158.

Kitkumthorn, N., et al. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. BMC Cancer. (March 2006): 55.

Long-Cheng Li, Steven T. Okino, and Rajvir Dahiya. DNA methylation in prostate cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer 1704 (September 2004): 87-102.

Ming-Tzeung Chunga, b, et al. Promoter methylation of SFRPs gene family in cervical cancer. Gynecologic Oncology 112 (February 2009): 301-306.

Momparler, R. L. and Bovenzi, V. DNA methylation and cancer. Journal of Cellular Physiology. (2000): 145–154

Nakayama, S., Sasaki, A., Mese, H., Alcalde, R.E., Tsuji, T., and Matsumura, T. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinoma. Int J Cancer.(2001): 667-673.

National Cancer Institute. Division of Cancer Prevention. [Online]. 2005. Available from: http://www3.cancer.gov/prevention/alts/abouthpv.html. [2009, July 22]

Niklinska, W., Chyczewski, L., and Niklinski, J. New molecular approaches to lung cancer: biological and clinical implications of P53, P16 and K-RAS studies. Folia Histochem Cytobiol. 39 (2001): 99-103.

Rökman, A., et al. Hereditary prostate cancer in Finland: fine-mapping validates 3p26 as a major predisposition locus. [Online]. 2004. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=gene&Cmd=Link&LinkName=gene_pubmed&LinkReadableName=PubMed&IdsFromResult=619402 [2009, August 7]

Shaw, R.J., et al. Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. Br J Cancer 94 (2006): 561-568.

Shiina, T., Inoko, H., and Kulski, J.K. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations.[Online]. 2004. Available from: http://www.ncbi.nih.gov/. [2009, August 7]

Sriuranpong, V., et al. Global gene expression profile of nasopharyngeal carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. Clin Cancer Res. (2004, August): 4944-4958.

Snustad,J. and Simmons,D. Principle of genetics Fourth Edition. John Wiley & Sons (Asia) Pre Ltd, 2006

Strachan, T., et al. Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing. Cancer Res (2004, September): 5982-5987.

Walsh, C. Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory. Colorado: Roberts and Copany Publishers, 2006.

Wattanawaraporn, R., Singhsilarak, T., Nuchprayoon, I., and Mutirangura, A. Hypermethylation of TTC12 gene in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. (2007): 2370-2373.

Yanatatsaneejit, P., et al. Promoter hypermethylation of CCNA1, RARRES1, and HRASLS3 in nasopharyngeal carcinoma. Oral Oncol. (2008): 400-406.

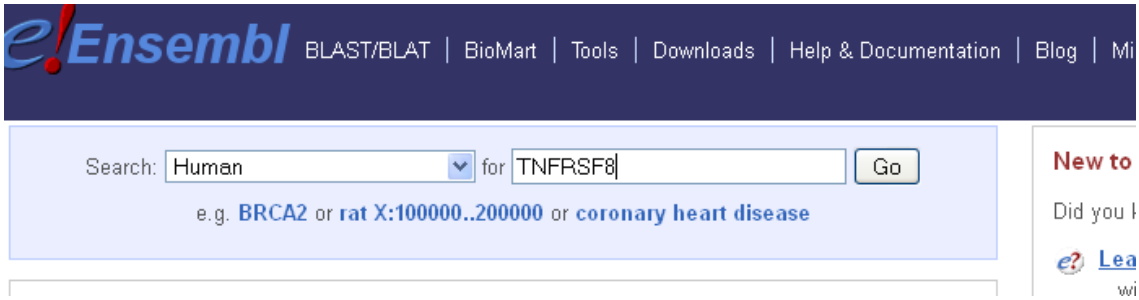
Yuan, Y.F., LI, J.Q., Yang, Z.L., and Wang, T.P. The roles of DNA methylation in human neoplasm. Ai Zheng. (2002): 1267-1277.

Zhang, Z., et al. Fine mapping and evaluation of candidate genes for cervical cancer on 11q23. Genes Chromosomes Cancer. (2005): 95-103.

ภาคผนวก

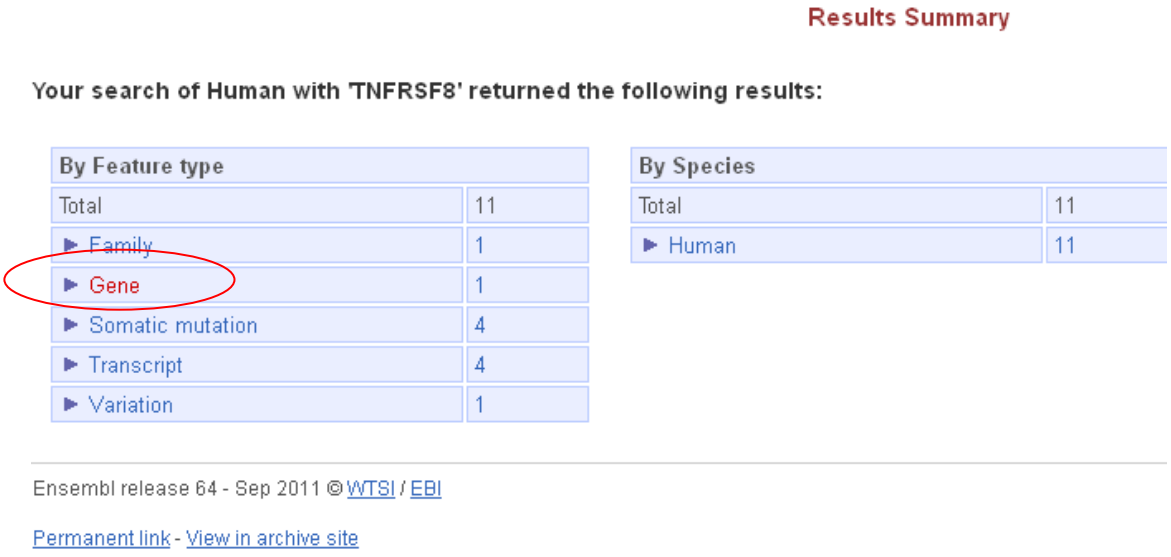
ภาคผนวก ก การออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR

1. เข้าเว็บ ensembl.org ใส่ชื่อลปีซีส์และยีนที่ต้องการค้นหา



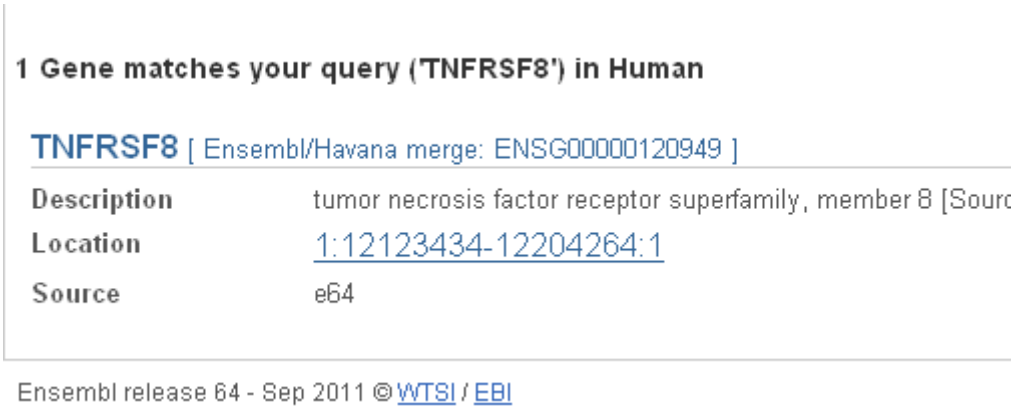
ภาพที่ 23 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (1)

2. คลิก Gene



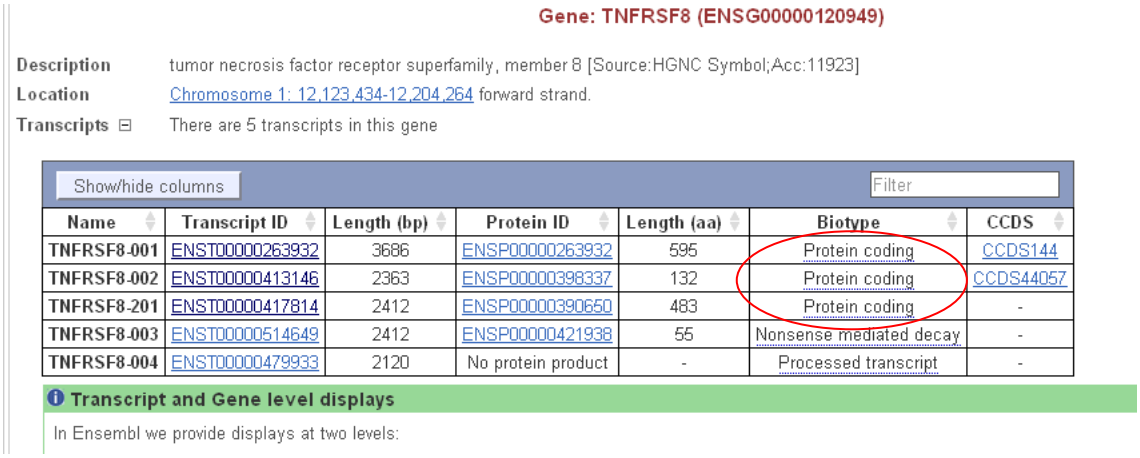
ภาพที่ 24 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (2)

3. คลิกเข้าข้อมูลของยีนที่ปรากฏ



ภาพที่ 25 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (3)

4. เลือกตรงส่วนที่เป็น Protein coding



ภาพที่ 26 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (4)

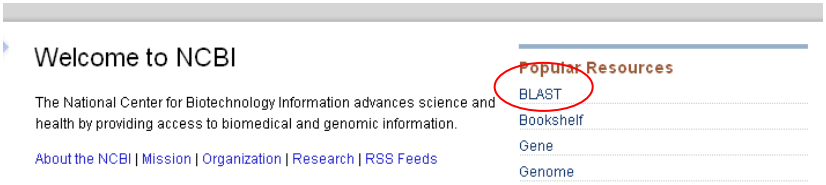
5. เนื่องจากยีนมี Transcript varient ไป NCBI เสิร์ช นิวคลีโอไทด์ของยีนที่ต้องการหา

ภาพที่ 27 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (5)

6. เลือกนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ต้องการ ที่เป็นของ Homo Sapiens

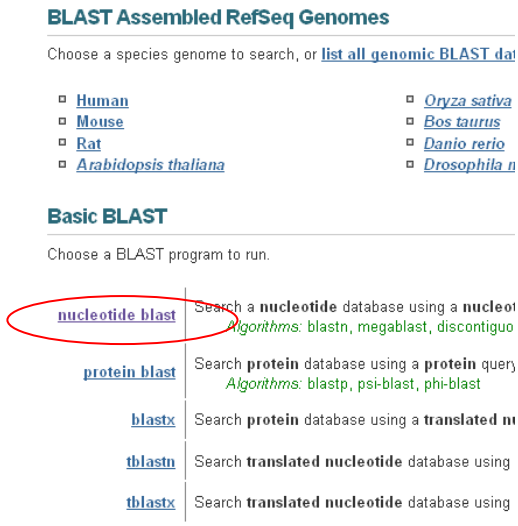
ภาพที่ 28 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (6)

7. ที่หน้าหลักของ NCBI เลือก BLAST



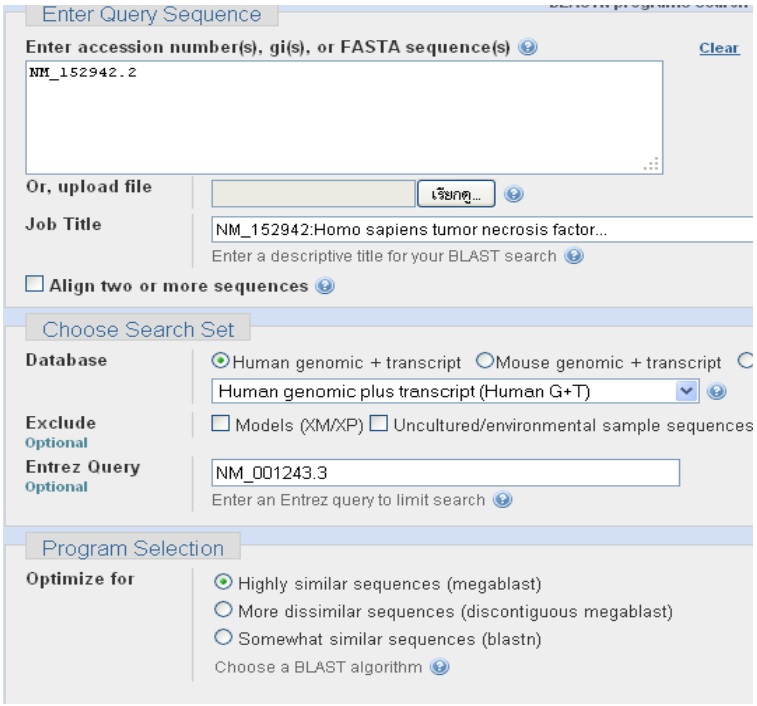
ภาพที่ 29 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (7)

8. เลือก nucleotide blast



ภาพที่ 30 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (8)

9. Blast เปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่เลือก เลือกblast แบบ Highly similar sequences (megablast)



ภาพที่ 31 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (9)

10. จะได้บริเวณลำดับเบสที่ทั้งสองนิวคลีโอไทด์ตรงกัน

>ref|NM_001243.3| Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8 (TNFRSF8), transcript variant 1, mRNA
Length=3686

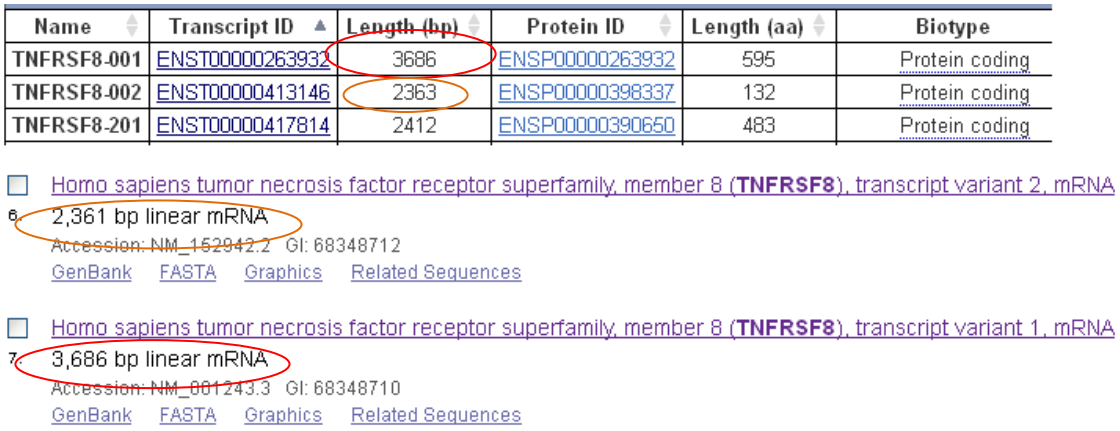
GENE ID: 943 TNFRSF8 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8 [Homo sapiens] **(Over 100 PubMed links)**

Score = 4274 bits (2314), Expect = 0.0
Identities = 2314/2314 (100%), Gaps = 0/2314 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  48    CAGGGCCAGTGCTCTTCTGGGTGATCCTGGTGTTGGTTGTGGTGGTCGGCTCCAGCGCCT  107
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1373  CAGGGCCAGTGCTCTTCTGGGTGATCCTGGTGTTGGTTGTGGTGGTCGGCTCCAGCGCCT  1432

Query  108   TCCTCCTGTGCCACCGGAGGGCCTGCAGGAAGCGAATTCGGCAGAAGCTCCACCTGTGCT  167
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1433  TCCTCCTGTGCCACCGGAGGGCCTGCAGGAAGCGAATTCGGCAGAAGCTCCACCTGTGCT  1492

Query  168   ACCCGGTCCAGACCTCCCAGCCCAAGCTAGAGCTTGTGGATTCCAGACCCAGGAGGAGCT  227
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1493  ACCCGGTCCAGACCTCCCAGCCCAAGCTAGAGCTTGTGGATTCCAGACCCAGGAGGAGCT  1552

Query  228   CAACGCAGCTGAGGAGTGGTGCGTCGGTGACAGAACCCGTCGCGGAAGAGCGAGGGTTAA  287
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1553  CAACGCAGCTGAGGAGTGGTGCGTCGGTGACAGAACCCGTCGCGGAAGAGCGAGGGTTAA  1612

Query  288   TGAGCCAGCCACTGATGGAGACCTGCCACAGCGTGGGGGCAGCCTACCTGGAGAGCCTGC  347
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1613  TGAGCCAGCCACTGATGGAGACCTGCCACAGCGTGGGGGCAGCCTACCTGGAGAGCCTGC  1672

Query  348   CGCTGCAGGATGCCAGCCCGGCCGGGGGCCCCTCGTCCCCCAGGGACCTTCCTGAGCCCC  407
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1673  CGCTGCAGGATGCCAGCCCGGCCGGGGGCCCCTCGTCCCCCAGGGACCTTCCTGAGCCCC  1732

Query  408   GGGTGTCCACGGAGCACACCAATAACAAGATTGAGAAAATCTACATCATGAAGGCTGACA  467
```

ภาพที่ 32 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (10)

11. เปรียบเทียบจากขนาดลำดับเบสว่านิวคลีโอท์ที่หาได้ตรงกับ Trancript variant ไหน ?



Name	Transcript ID	Length (bp)	Protein ID	Length (aa)	Biotype
TNFRSF8-001	ENST00000263932	3686	ENSP00000263932	595	Protein coding
TNFRSF8-002	ENST00000413146	2363	ENSP00000398337	132	Protein coding
TNFRSF8-201	ENST00000417814	2412	ENSP00000390650	483	Protein coding

6. Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8 (**TNFRSF8**), transcript variant 2, mRNA
2,361 bp linear mRNA
Accession: NM_152942.2 GI: 68348712
GenBank FASTA Graphics Related Sequences

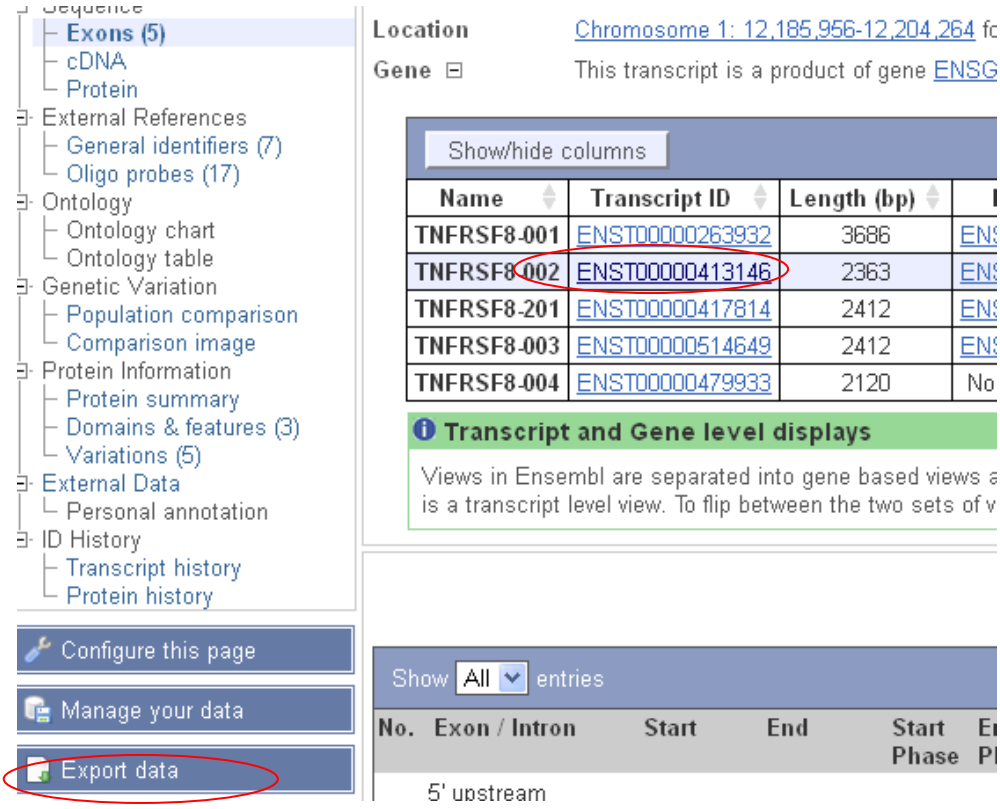
7. Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8 (**TNFRSF8**), transcript variant 1, mRNA
3,686 bp linear mRNA
Accession: NM_001243.3 GI: 68348710
GenBank FASTA Graphics Related Sequences

ภาพที่ 33 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (11)

12. ในกรณีตัวอย่างเลือก Transcript ID TNFRSF8-002 เพราะ เกือบทั้งสายเป็นคู่สมมูลกับ TNFRSF8-001 การออกแบบไพรเมอร์จาก Transcript ID นี้ จะครอบคลุมถึง variant อื่นๆ

ภาพที่ 34 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (12)

13. คลิกเลือก Transcript ID แล้วคลิก Export Data

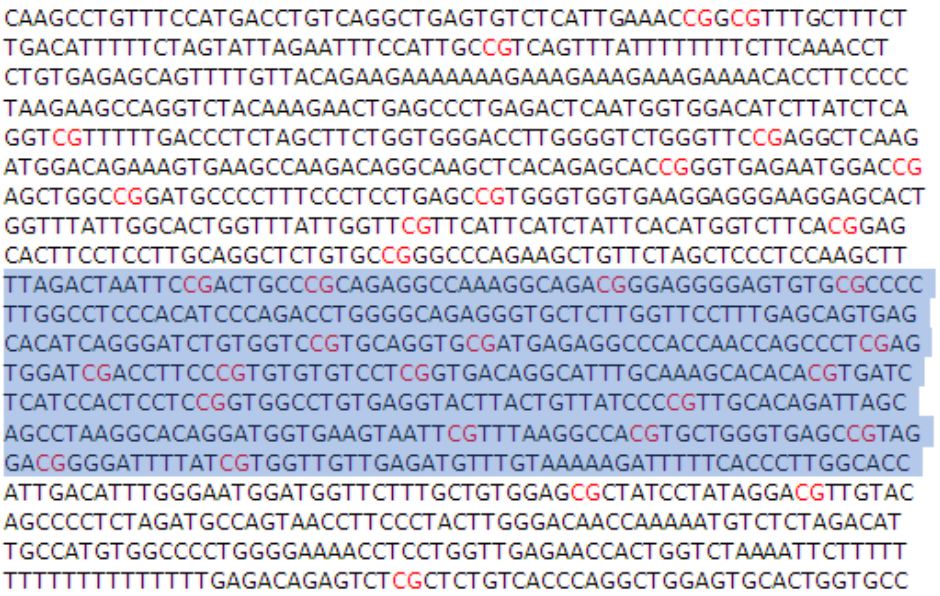


ภาพที่ 35 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (13)

14. เลือกตรงบริเวณที่ระบุว่าโครโมโซม

ภาพที่ 36 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (14)

15. คัดลอกลำดับที่เลือกลงใน word เปลี่ยนหมู่ CG ให้สังเกตชัด แล้วเลือกบริเวณที่มีหมู่ CG เยอะๆ

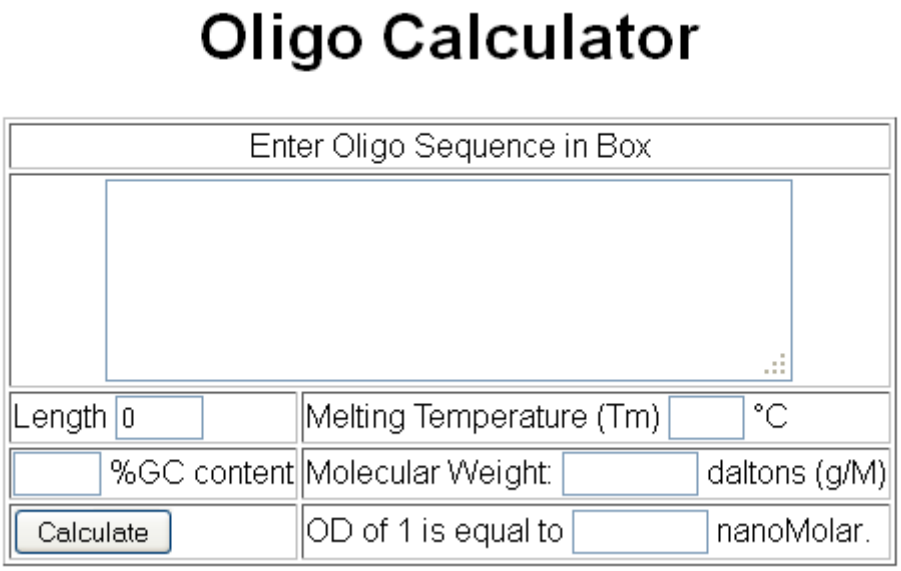


ภาพที่ 37 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (15)

16. นำ sequence ช่วงที่เลือก มาออกแบบเป็น methylation sequence กับ unmethylation sequence โดย Unmet sequence ใช้คำสั่ง replace ใน word เปลี่ยน จาก CG เป็น tg

ภาพที่ 38 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (16)

17. ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบสในช่วง sequence ที่เลือก โดยอาศัยโปรแกรม Oligo Calculator



ภาพที่ 39 ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ MSP-PCR (17)

ชื่อไพรเมอร์	ชนิดของเมทิลเลชัน	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' to 3')
TNFRSF 8 - FM	*Met Sequence*	CGCGCGCGGTTGAGAATCGTCG
TNFRSF 8 - RM	*Met Sequence*	CGCGCATCCCCGAAACCGAACG
TNFRSF 8 - FU	*Unmet Sequence*	TGTGTGTGGTTGAGAATTGTTG
TNFRSF 8 - RU	*Unmet Sequence*	CACACATCCCCAAAACCAAACA
HCP 5 - FM	*Met Sequence*	TGCGGGCGGCGCAGCCGGT
HCP 5 - RM	*Met Sequence*	CCACGGGCCGCCCACGTAT
HCP 5 - FU	*Unmet Sequence*	TGTGGGTGGTGCAGCTGGT
HCP 5 - RU	*Unmet Sequence*	CCACAGGCCACCCACATAT

ตารางที่6 แสดงถึง ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ของยีนเป้าหมาย

ชื่อไพรเมอร์	Temperature Melting Point (°c)	ขนาดของ product site (bp)
TNFRSF 8 - FM	62	111
TNFRSF 8 - RM	62	
TNFRSF 8 - FU	51	111
TNFRSF 8 - RU	53	
HCP 5 - FM	64	134
HCP 5 - RM	60	
HCP 5 - FU	55	134
HCP 5 - RU	53	

ตารางที่7 แสดงถึง TM และขนาด product site ของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

ภาคผนวก ข วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบต่างๆ

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อที่ทำการ deparafin แล้ว

<u>ขั้นตอนการสกัด</u>

22. เตรียม Eppendrof
23. ดูดสารละลาย Lysis bufferll และ 10% SDS มา 400 µl (อัตรส่วนระหว่าง Lysis bufferll: 10% SDS เท่ากับ 19:1)
24. ดูดสารละลาย Lysis bufferll และ 10% SDS ประมาณ 20 µl หยดลงบนสไลด์ชิ้นเนื้อ
25. ใช้ niddle ขูดชิ้นเนื้อที่มีอยู่บนสไลด์ตรงบริเวณที่วงกลมไว้
26. นำใส่ลง Eppendrof ที่มีสารละลาย Lysis bufferll และ 10% SDS
27. เติม Protinase K (pK) 5-10 µl
28. Vortex แล้วนำไปบ่มที่อุณหภมิ 50°C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง

29. เติมสารละลาย phenol:chloroform:isopropranol ในอัตราส่วน 25:24:1 ปริมาณ 1 เท่าของ volumn
30. Vortex
31. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
32. ดูดส่วนล่างที่เป็น phenol:chloroform ทิ้ง
33. เก็บส่วนบนใส่ Eppendrof ใหม่
34. เติม -100%EtOH (4ºC) 1 เท่าของ volume (ประมาณ 400 µl)
    -3M NaAcOH 0.1 เท่าของ volume
    -glycogen 1 µl
35. บ่มที่อุณหภูมิ -20ºC เป็นเวลา 30 นาที
36. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
37. เทส่วนบนทิ้ง
38. เติม 70%EtOH ปริมาณ 500 µl
39. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
40. เทส่วนบนทิ้ง และทิ้งไว้จนแห้งสนิท
41. เติมสารละลาย TE หรือ dH_2O ปริมาณ 50 µl และบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 15 นาที
42. เก็บที่อุณหภูมิ -20ºC

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจาก cell line

<u>ขั้นตอนการเก็บ cell</u>

26. ดูด media ทิ้ง
27. ล้าง cell ด้วย PBS ประมาณ 5 ml ฉีดกลั้วๆแล้วดูด PBS ทิ้ง
28. ย่อยด้วย Trypsin ประมาณ 2 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ประมาณ 3 นาที
29. ใส่ Media (เพื่อยับยั้งการทำงานของ Trypsin) ประมาณ 5 ml แล้วผสมให้เข้ากัน
30. นำใส่หลอดทดลองขนาด 15 ml
31. ปั่นตก cell ที่ 120 g เป็นเวลา 5 นาที
32. เทส่วนบนทิ้ง ล้างด้วย PBS 2 รอบ

รอบที่ 1 เติม PBS 5 ml (เขย่าแรงๆ) ปั่นตกที่ 150 g เป็นเวลา 5 นาที (เททิ้ง)

รอบที่ 2 เติม PBS 2 ml แล้ว vortex ดูดย้ายมาข้อ 8.

<u>ขั้นตอนการสกัด</u>

33. เติมสารละลาย Lysis bufferll และ 10% SDS มา 400 µl (อัตราส่วนระหว่าง Lysis bufferll: 10% SDS เท่ากับ 19:1)
34. เติม Protinase K (pK) 20 µl
35. Vortex
36. บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง
37. เติมสารละลาย phenol:chloroform:isopropranol ในอัตราส่วน 25:24:1 ปริมาณ 1 เท่าของ volumn
38. Vortex
39. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
40. ดูดส่วนล่างที่เป็น phenol:chloroform ทิ้ง
41. เก็บส่วนบนใส่ Eppendrof ใหม่
42. เติม
    - 100%EtOH (4°C) 1 เท่าของ volume (ประมาณ 400 µl)
    - 3M NaAcOH 0.1 เท่าของ volume
    - glycogen 1 µl
43. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
44. เทส่วนบนทิ้ง
45. เติม 70%EtOH ปริมาณ 500 µl
46. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
47. เทส่วนบนทิ้ง และทิ้งไว้จนแห้งสนิท
48. เติมสารละลาย TE หรือ dH_2O ปริมาณ 20-50 µl
49. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที
50. เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

ภาคผนวก ค วิธีการทำ sodium bisulfite treatment

วิธีการทำ sodium bisulfite treatment

ขั้นตอนการทำ

8. เตรียม - hydroquinone 55 mg/ 50 ml H_2O (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
   - sodium bisulfite 3.76 g/ 10 ml H_2O ปรับ pH เท่ากับ 5
9. เจือจางดีเอ็นเอให้เป็น 40 ng/ µl
10. เติมสารละลาย 2M NaOH ปริมาณ 5.5 µl แล้ว vortex (ทำให้ dsDNA เป็น ssDNA)
11. บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 10 นาที
12. เติมสารละลาย 10mM Hydroquinone ปริมาณ 30 µl แล้ว vortex (สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง)
13. เติมสารละลาย sodium bisulfite ปริมาณ 520 µl แล้ว vortex (สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีใส)
14. บ่มที่อุณหภูมิ 50ºC เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง
15. เตรียมเครื่อง pump เสียบ column วางลงบนลูกหมู จากนั้นสวม syringe และเปิด pump (purify DNA)
16. เติม Wizard Tm resis ปริมาณ 1 ml ผสมโดยใช้ปิเปตต์
17. ปิเปตต์ข้อ 9. ใส่ใน syringe เปิดเครื่องแล้วรอจนของเหลวไหลลงหมดจึงปิดเครื่อง จากนั้นล้างด้วย 80%isopropranol ปริมาณ 2 ml เปิดเครื่องแล้วรอจนของเหลวไหลลงหมดจับเวลา 30 วินาทีจึงปิดเครื่อง
18. วาง column บน Eppendrof นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 3 นาที
19. เปลี่ยน Eppendrof ใหม่ ล้างด้วย 95ºC H_2O ปริมาณ 50 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 20 วินาที ดีเอ็นเอจะย้ายลงมาอยู่ใน Eppendrof
20. เติม 3M NaOH ปริมาณ 5.5 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
21. เติม glycogen 20 ng/ µl ปริมาณ 2 µl
22. เติม 10M NH_4OAc ปริมาณ 20 µl และ 100%EtOH ปริมาณ 200 µl ผสมให้เข้ากัน
23. บ่มที่อุณหภูมิ -20ºC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
24. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนบนทิ้ง

25. เติม 70%EtOH ปริมาณ 200 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
26. เทส่วนบนทิ้งแล้วคว่ำให้จนแห้ง
27. เติม dH_2O ปริมาณ 20 µl เพื่อละลายดีเอ็นเอ
28. บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 20 นาที
29. เก็บที่อุณหภูมิ -20 ºC

ภาคผนวก ง วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอจาก cell line

วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ

ขั้นตอนการเก็บ cell

18. ดูด media ทิ้ง
19. ล้าง cell ด้วย PBS ประมาณ 5 ml ฉีดกลั้วๆแล้วดูด PBS ทิ้ง
20. ย่อยด้วย Trypsin ประมาณ 2 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ประมาณ 3 นาที
21. ใส่ Media (เพื่อยับยั้งการทำงานของ Trypsin) ประมาณ 5 ml แล้วผสมให้เข้ากัน
22. นำใส่หลอดทดลองขนาด 15 ml
23. ปั่นตก cell ที่ 120 g เป็นเวลา 5 นาที
24. เทส่วนบนทิ้ง ล้างด้วย PBS 2 รอบ

    รอบที่ 1 เติม PBS 5 ml (เขย่าแรงๆ) ปั่นตกที่ 150 g เป็นเวลา 5 นาที (เททิ้ง)

    รอบที่ 2 เติม PBS 2 ml แล้ว vortex ดูดย้ายมาข้อ 8.

ขั้นตอนการสกัด

25. ดูดมาใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml (RNase free) ใส่เกือบเต็มหลอด แล้วปั่นตกที่ 150 g เป็นเวลา 5 นาที
26. เทส่วนใสทิ้ง
27. เติม Trizol reagent 1 ml/ 5-10 x 106 cell ผสมโดยใช้ปิเปตต์
28. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
29. เติม chloroform ปริมาณ 200 µl/ 1 ml Trizol ผสมให้เข้ากัน 15 วินาที

30. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที
31. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 15 นาที
32. ดูดส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่ (R-NASE free)
33. เติม 100%isopropranol ปริมาณ 500 µl/ 1ml Trizol เพื่อตกตะกอน RNA
34. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
35. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 10 นาที
36. เทส่วนใสทิ้ง
37. ล้างตะกอน RNA ด้วย 75%EtOH 1ml/ 1 Trizol
38. เทส่วนใสทิ้งและปล่อยไว้จนแห้ง
39. เติม DEPC water 20 µl
40. บ่มที่อุณหภูมิ 50ºC เป็นเวลา 10 นาที
41. วัดความเข้มข้นของ RNA และเก็บที่อุณหภูมิ -80ºC

ภาคผนวก จ วิธีการสังเคราะห์ cDNA

วิธีการสังเคราะห์ cDNA โดย RevertAid™First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA)

<u>ขั้นตอนการสังเคราะห์</u>

9. เตรียมความเข้มข้นของ RNA เป็น 5 µg/ DEPC water 11 µl
10. เติม oligo dT 1 µl (0.5 µg) ผสมให้เข้ากัน
11. บ่มที่อุณหภูมิ 70ºC เป็นเวลา 5 นาที
12. สารละลายแช่บนน้ำแข็ง
13. เติม 5x reaction buffer ปริมาณ 4 µl
14. เติม 10 mM dNTP 2 µl
15. เติม Ribolock ; Ribonuclease (ยังยั้ง RNase) 20 U/ µl ปริมาณ 1 µl
16. เติม Revert Aid. M-muLv Reverse Transcriptase 200 U/ µl ปริมาณ 1 µl

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายชยุตม์ พานทองกชกร เกิดวันที่ 23 ธันวาคม พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียน วัดสุทธิวราราม และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิตจาก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2549