

การศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของคนไทยด้วยเทคนิค
Polymerase Chain Reaction



เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....61810
วัน,เดือน,ปี..... 21 น.ศ. 2549

b.....11603A58
i.....

โครงการพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2547

Genetic Aberration in Bladder cancer Detected by Polymerase Chain Reaction



A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of
Bachelor of science
Department of Applied Biology
Faculty of science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ เรื่อง การศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
 ของคนไทยโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction
 นักศึกษา นายธีระพงษ์ โห
 นางสาวภัทริน พินภูจิต
 นางสาวสุพัชระยา พลอยงาม
 ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
 สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
 อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
 ลาดกระบัง อนุมัติให้ โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชราวลีย์	
กรรมการ ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
กรรมการ อาจารย์สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

..... นอน นน

(รศ.ดร.นवलพรรณ ณ.ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ	เรื่อง การศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ของคนไทยโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction
นักศึกษา	นายธีระพงษ์ โห นางสาวภัทริน พินภูจิต นางสาวสุพัชรา พลอยงาม
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

ศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของคนไทยด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction จากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 12 ราย โดยได้ ทำการศึกษา oncogene ชนิด *c-myc* ที่อยู่บนโครโมโซม 8q 21-24 เปรียบเทียบความแตกต่างของการ เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของลำดับดีเอ็นเอจากคนปกติ พบว่ามีการเพิ่มจำนวนชุดของลำดับดีเอ็นเอ ของยีน *c-myc* ในเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 6 ราย จากตัวอย่างทั้งหมด 12 ราย

Special Project Title	Genetic Aberration in Bladder cancer Detected by Polymerase Chain Reaction	
Name	Mr. Teerapong	Ho
	Miss. Pattarin	Pinpuchit
	Miss. Suphutcharasa	Ployngam
Department	Applied Biology	
Program	Biotechnology	
Academic Year	2004	
Special Project Advisor	Supattar	Poeaim

ABSTRACT

The genetic aberration in bladder cancer was investigated by Polymerase Chain Reaction technique using DNA isolated from 12 Thai bladder cancer patient tissues. The different copy number of *c-myc* gene which is located on chromosome 8q 21 – 24 was found. The result showed that the DNA amplification of *c-myc* gene in bladder cancer tissues was increased in six from twelve tissue sample.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงการพิเศษ ในหัวข้อเรื่องการศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของคนไทยโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction โครงการพิเศษนี้ไม่สามารถลุล่วงไปด้วยดีหากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ทางผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณอาจารย์สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ การตอบข้อซักถามของผู้จัดทำ และข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทดลอง และตรวจแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นจนกระทั่งโครงการพิเศษนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการโครงการพิเศษที่ให้ความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับการทดลองพร้อมทั้งข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการพิเศษนี้ และตรวจแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อุ้นเรือน เพชรวิไลย์ ประธานกรรมการโครงการพิเศษที่ได้กรุณาตรวจแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและเบิกอุปกรณ์หรือสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณแม่บ้านตึกจุฬารัตน์ ชั้น 4 ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเปิดประตูห้องปฏิบัติการและห้องอาจารย์

ขอขอบคุณพี่ปริญาโทและเพื่อน ๆ ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในเรื่องต่าง ๆ ทำให้การทำโครงการพิเศษเป็นไปได้อย่างดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา - มารดา ของผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนกำลังทรัพย์ในการทำโครงการพิเศษในครั้งนี้

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานที่ได้จัดทำขึ้นฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงการพิเศษฉบับนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นายธีระพงษ์ โห

นางสาวภัทริน พินภูจิต

นางสาวสุพัชรา พลอยงาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของโครงการ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer)	3
2.2 วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle)	6
2.3 ยีนมะเร็ง (oncogene)	6
2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)	10
2.5 ชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatic)	11
2.6 อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)	13
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	31
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ	31
3.2 น้ำยาและสารเคมี	31
3.3 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ (specimens)	32
3.4 การออกแบบไพรเมอร์ (primer design)	33
3.5 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)	35
3.6 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR analysis)	41
3.7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์	42
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	43
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	55

สารบัญ (ต่อ)

บรรณานุกรม

หน้า

56



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลกับขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด	15
2	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ของอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส	17
3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของโปรตีน <i>c-myc</i> กับการเพิ่มขึ้นของยีน <i>c-myc</i> ในโรคมะเร็งเต้านม	25
4	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มจำนวนชุดของยีน <i>c-myc</i> และ stage/grade ของตัวอย่างต่างๆ	30
5	แสดงลักษณะสภาพทางคลินิกของตัวอย่าง 12 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	34
6	แสดงไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบโดยการใช้ฐานข้อมูลของยีน <i>c-myc</i> เป็นต้นแบบ	34
7	แสดงลักษณะสภาพทางคลินิกและลักษณะการเกิดความผิดปกติของแต่ละตัวอย่าง	51
8	แสดงการเกิดความผิดปกติของยีน <i>c-myc</i> ลักษณะต่างๆ ที่สัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ	53

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งบริเวณกระเพาะปัสสาวะ ในระยะ T (tumor)	4
2	แสดงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปสู่อวัยวะอื่นๆ (metastasis) ผ่านทางระบบเลือด และระบบน้ำเหลือง	4
3	แสดงการเข้าคู่กันของโปรตีน Max กับ <i>c-myc</i> หรือโปรตีน Mad กระบวน การลอรหัสของการเข้าคู่กันของยีนสองชนิดดังกล่าวจะทำการควบคุมการ ลอรหัสที่บริเวณ E-box element	8
4	แสดงการทดสอบด้วยเทคนิค M-FISH ในเซลล์ไอน์ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ RT112	19
5	กราฟแสดงจำนวนโครโมโซมต่างๆ ที่เกิดการแตกหักทำให้เกิดความผิดปกติ แบบ translocation	20
6	แสดงโครงสร้างของยีน <i>c-myc</i> แสดงตำแหน่งของ exons และแสดงตำแหน่ง ของ introns และแสดงรายละเอียดจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ	21
7	แสดงตำแหน่งที่มีการแสดงออกของยีน <i>c-myc</i> ที่บริเวณตำแหน่ง exons ที่ 2	22
8	แสดงการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP จากเซลล์ไอน์ดีเอ็นเอ	22
9	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>H-RAS</i> ตำแหน่งโคดอนที่ 12 และ 61 และแสดงบริเวณตำแหน่งการจับของไพรมอร์ และ แสดงบริเวณจุดตัดของ เอนไซม์ตัดจำเพาะ	23
10	แสดงการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิต PCR จากการกลายพันธุ์ของยีน <i>H-RAS</i>	23
11	แสดงการเพิ่มขึ้นของยีน <i>c-myc</i> ในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว	24
12	การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Multiplex PCR ของยีน <i>c-myc</i> ในโรคมะเร็งเต้านม เมื่อเนื้อเยื่อมะเร็ง (T) และ adjacent non-neoplastic tissue (N)	25
13	แสดงการเพิ่มขึ้นของยีน <i>c-myc</i> ในตัวอย่างมะเร็งเต้านม 8 ตัวอย่าง โดยการ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Southern blot	26
14	แสดงผลความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายจากการทำเทคนิค PCR	27

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
15	แสดงการวิเคราะห์การเพิ่มขึ้นของยีน <i>c-myc</i> ด้วยเทคนิค PCR ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมในระยะต่าง ๆ	28
16	แสดงการวิเคราะห์การเพิ่มขึ้นของยีน <i>c-myc</i> ด้วยเทคนิค LS –PCR	29
17	แสดงการหาลำดับเบสของยีน <i>c-myc</i> จากฐานข้อมูล GenBank	35
18	แสดงการหาลำดับเบสของยีน <i>c-myc</i> จากฐานข้อมูล GenBank	36
19	แสดงการออกแบบไพรเมอร์โดยการใช้โปรแกรม Primer 3	36
20	แสดงการใช้โปรแกรม Oligocalc ในการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของไพรเมอร์	37
21	แสดงการใช้โปรแกรม Oligocalc ในการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของไพรเมอร์	37
22	แสดงการเกิด Primer – dimer ของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้	38
23	แสดงการเกิด Hair pin loop ของไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบ	39
24	แสดงจีโนมิกดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็ง และจีโนมิกดีเอ็นเอของเซลล์ปกติ และ marker 100 bp DNA ladder	43
25	แสดงการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย	45
26	แสดงการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของปริมาณ $MgCl_2$	47
27	แสดงการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	49
28	แสดงการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	50

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโรคมะเร็ง

ในประเทศไทยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบมากเป็นอันดับ 5 ในเพศชายรองจากมะเร็งช่องท้อง โดยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเป็นโรคที่พบได้ในเพศชายมากกว่าเพศหญิง โดยเชื่อว่าเป็นผลมาจากสิ่งแวดล้อมและสารพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งเป็นผลมาจากการสะสมของสารทาร์ (tar) ที่ได้จากการสูบบุหรี่หรือจากการระคายเคืองเนื่องจากพยาธิในเส้นเลือด (schistosoma) การสัมผัสสารเคมีในที่ทำงาน ตัวอย่างเช่น แอลฟาและเบต้าแนฟทิลลามีน (Alpha & Beta-Naphthylamine) พาราอะมิโนไดฟีนิล (para-aminodiphenyl) เบนซิดีนและอนุพันธ์ของเบนซิดีน (benzidine and derivatives of benzidine) ซึ่งอาชีพที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งคือ ผู้ที่ทำงานในโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันดิบ ยาง โคละ โรงงานผลิตสีและโรงย้อมผ้า เป็นต้น

โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะแบ่งตามพยาธิวิทยาและอาการทางคลินิกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ชนิดที่ไม่ลุกลามจนถึงชั้นกล้ามเนื้อของกระเพาะปัสสาวะหรือชนิดพื้นผิว (noninvasive tumor : pTa-pT1) และชนิดลุกลามถึงชั้นกล้ามเนื้อของกระเพาะปัสสาวะ และ / หรือ กระจายไปตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย (invasive tumor : pT2-pT4) อาการและการแสดงออกของผู้ป่วยจะมีอาการถ่ายปัสสาวะเป็นเลือดโดยไม่ร่วมกับอาการปวด ปวดปัสสาวะบ่อยและถ่ายปัสสาวะไม่ออก เมื่ออาการลุกลามจะมีการอุดตันที่ระบบทางเดินเลือดและน้ำเหลืองมีผลทำให้มีอาการเท้าบวม ผู้ป่วยอาจมีอาการคั่งของสารพิษในกระแสโลหิต (uremia) มีอาการทางสมอง เช่น สับสน มึนงงและโคม่า นอกจากนี้อาจพบอาการเนื่องจากการกระจายของมะเร็งไปที่ตำแหน่งอื่น ๆ เช่น การกระจายของมะเร็งไปที่ปอด กระดูก ตับ สมองและตำแหน่งอื่นซึ่งพบได้ไม่บ่อยบ่อยนัก ได้แก่ ผิวหนัง ฤๅนน้ำดี เป็นต้น (นเรศ และคณะ, 2541)

การเข้าใจถึงพยาธิกำเนิดของโรคมะเร็งและรู้ถึงความแตกต่างทางชีววิทยาของเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งจะทำให้สามารถพัฒนาวิธีการตรวจ วินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งที่มีประสิทธิภาพได้ ซึ่งในปัจจุบันมีการประยุกต์เทคนิคต่าง ๆ ในการศึกษาการเกิดและการดำเนินของโรคมะเร็งมากขึ้น โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งจัดได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ oncogene และ tumor suppressor gene (TSG) เมื่อยีนกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งหรือทั้งสองกลุ่มนี้เปลี่ยนแปลงไปมีผลทำให้เกิดความไม่สมดุลภายในจีโนมเป็นสาเหตุทำให้เกิดความผิดปกติของการเจริญเติบโตและการแบ่งตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเซลล์อันทำให้เซลล์พัฒนาไปเป็นมะเร็งได้ สำหรับในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของคนไทยศึกษาด้วยเทคนิค Comparative Genomic Hybridization (CGH) พบความผิดปกติที่พบได้บ่อยคือการขาดหายไป (deletion) ของโครโมโซม Y และการเพิ่มขึ้นมาของดีเอ็นเอ (gain) บนโครโมโซมแท่งที่ 8q โดยมีตำแหน่งที่มีการเพิ่มจำนวนชุดของลำดับดีเอ็นเอ (amplification) มากคือ 8q21-qter, 6p21-25, และ 10p13-14 (อมรา คัมภีรานันท์, 2546) สำหรับมะเร็งชนิดอื่น ๆ เช่น meningiomas (Logan และคณะ, 1990) ตำแหน่งที่น่าสนใจคือ 8q21-24 ซึ่งพบว่ามี การเพิ่มจำนวนชุดของลำดับดีเอ็นเอ (amplification) นั้นเชื่อว่าน่าจะมียีนชนิด oncogene ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคเนื่องจากตัวอย่างที่มีความผิดปกติชนิดนี้อยู่ในระยะ pT2-pT4 โดยตำแหน่ง 8q24 มี *c-myc* ซึ่งเป็นยีนชนิด oncogene (Sauter และคณะ, 1995; Bruch และคณะ, 1998) และมีการศึกษามะเร็งรังไข่ด้วยเทคนิค PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism) พบว่าในวัฏจักรการตายของเซลล์ (apoptotic pathway) เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *p53* จะมีผลต่อการแสดงออกของยีน *c-myc* ซึ่งก่อให้เกิดมะเร็งรังไข่ (Iba และคณะ, 2004)

ในการศึกษาวิจัยถึงข้อมูลความผิดปกติทางพันธุกรรมนี้เพื่อนำไปสู่การสร้างเทคโนโลยีที่สูงขึ้นในการตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและให้ทันทางที่ต่อการรักษา เช่น การสร้างชุดตรวจสำเร็จรูป การสร้างตัวติดตามเพื่อการวินิจฉัย โดยในการศึกษาวิจัยในที่นี้ใช้เทคนิค polymerase chain reaction ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัยโรคได้ เช่น สดการเจ็บปวดจากการส่องกล้องตรวจและได้ผลการตรวจวินิจฉัยและติดตามผลได้อย่างรวดเร็ว โดยการศึกษาได้นำความรู้ทางด้านชีวสารสนเทศ (bioinformatic) เข้ามาช่วยในการช่วยในการออกแบบไพรเมอร์ (primer) และการตรวจสอบความมีประสิทธิภาพในการทำงานของไพรเมอร์ (primer)

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
2. เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างความผิดปกติทางพันธุกรรมกับระยะต่าง ๆ ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

1.3 ขอบเขตของโครงการ

ทำการศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมของลำดับเบสบริเวณยีน *c-myc* เท่านั้น

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

ในสภาพปกติทั่วไป เซลล์จะต้องดำรงอยู่อย่างมีสมดุลคือ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เท่า ๆ กับการตายของเซลล์ (ขึ้นอยู่กับชนิดของอวัยวะและอายุของอวัยวะนั้น ๆ ด้วย) หากเกิดความผิดปกติ โดยมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์และ/หรือมีการตายของเซลล์ลดลงจะทำให้เกิดมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างผิดปกติไม่มีความสมดุลและเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญที่เกิดขึ้นในโรคมะเร็งนั่นเอง

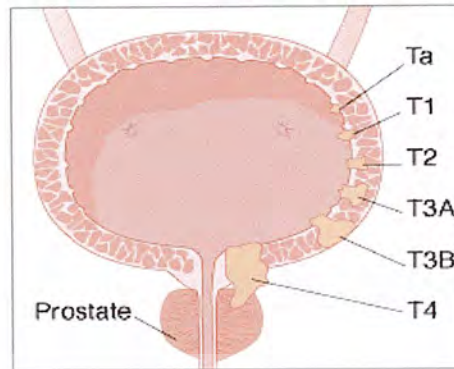
(อมรา คัมภีรานันท์, 2546)

2.1 มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer)

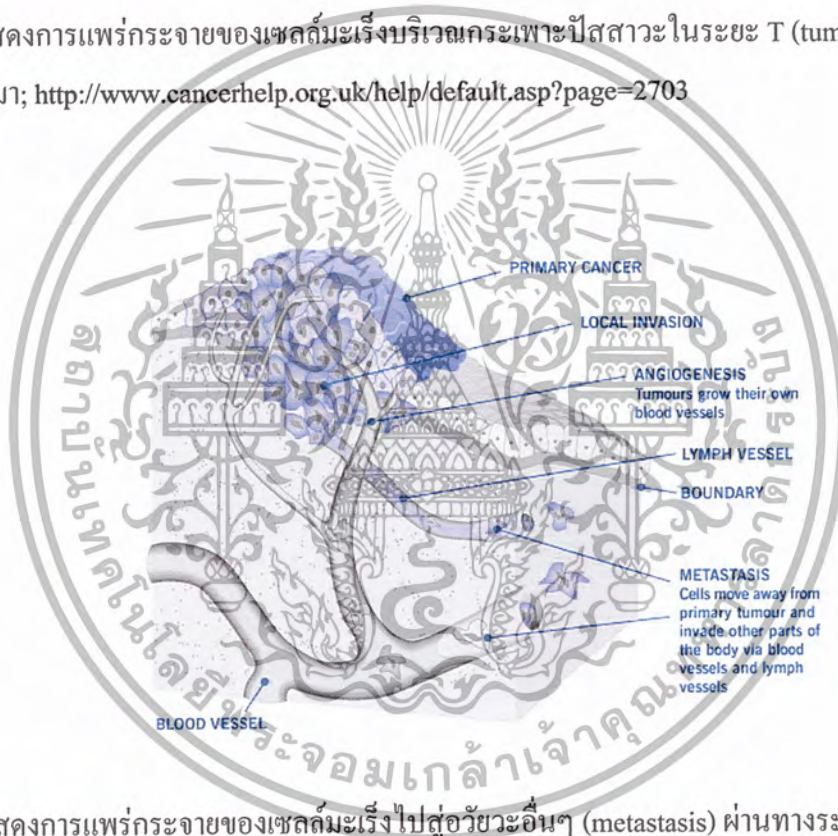
มะเร็งกระเพาะปัสสาวะเป็นมะเร็งของระบบทางเดินปัสสาวะที่พบบ่อยเป็นอันดับ 2 ในระบบอวัยวะขับถ่ายและอวัยวะสืบพันธุ์เพศชายรองมาจากมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยพบประมาณ 2.88 เปอร์เซ็นต์ของมะเร็งทั้งหมด ส่วนใหญ่พบในคนอายุ 60-70 ปีขึ้นไป โดยเฉพาะพบมากกว่าเพศหญิงในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 (http://www.siamca.com/Backup2002/3_14.html)

2.1.1 ระยะและระดับเกรดของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

นิยมนิยามผลเป็นทั้งระยะ (stage) และระดับเกรด (grade) โดยระยะของมะเร็งเป็นการบ่งบอกข้อมูลจากกรวินิจฉัยของแพทย์ว่ามะเร็งมีการกระจายไปมากเพียงใด เพื่อการวิเคราะห์การบำบัดรักษาต่อไป ในทางการแพทย์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะนิยมแบ่งระยะของมะเร็งเป็นระบบ TNM (TNM classification) TNM มีความหมายคือ tumor node และ metastasis โดย tumor เป็นการบอกถึงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเข้าสู่เนื้อเยื่อชั้นต่าง ๆ ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ node เป็นการบอกถึงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองและ metastasis เป็นการแสดงถึงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะอื่น ๆ ที่อยู่ไกลออกไป สำหรับการรายงานผลนิยามบอกระยะเป็น early (superficial) bladder cancer invasive bladder cancer และ advanced bladder cancer (<http://www.cancerhelp.org.uk/help/default.asp?page=2703>)



รูปที่ 1 แสดงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งบริเวณกระเพาะปัสสาวะในระยะ T (tumor) ที่มา; <http://www.cancerhelp.org.uk/help/default.asp?page=2703>



รูปที่ 2 แสดงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปสู่อวัยวะอื่นๆ (metastasis) ผ่านทางระบบเลือด และระบบน้ำเหลือง

ที่มา; <http://www.cancervic.org.au/cancer1/patients/cervical/whatscancer.htm>

2.1.2 สาเหตุ

พบอุบัติการณ์สูงในคนที่สูบบุหรี่ และผู้ที่ทำงานในโรงงานอุตสาหกรรมทำสี โรงงานทอผ้า โรงงานฟอกหนัง อุตสาหกรรมยาง พลาสติก สิ่งพิมพ์ โลหะบางชนิด รวมถึงช่างทำผม สารเคมีจากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งมีหลักฐานว่าทำให้เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เช่น B-

Naphthylamine, Xenylamine, 4-Nitrcbiphenyl, Benzidine จากสถิติพบว่า 33 เปอร์เซ็นต์ของมะเร็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระเพาะปัสสาวะเป็นคางงานหรือผู้ที่อยู่ใกล้เคียงกับโรงงานอุตสาหกรรมดังกล่าว โดยเฉพาะผู้ที่ทำงานเกี่ยวกับสารเคมี เช่น สีอะนิลีน (aniline) หรือสารพวกไฮโดรคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารจำพวกหมักดอง อาหารใส่สารกันบูด อาหารที่เก็บไว้นาน ๆ รวมถึงอาหารผสมสารให้ความหวานจำพวกแซคคารีน ไซคลาเมต ซันทอสกร เครื่องดื่มและยาที่มีคาเฟอีน ยาแก้ปวด ฟีนาเซดิน เหล่านี้ เมื่อร่างกายเผาผลาญและเปลี่ยนแปลงภายในร่างกายเป็นสารก่อมะเร็งกึ่งค้างอยู่ในร่างกาย ไม่สลายไปตามกระบวนการเผาผลาญของร่างกาย ทำให้เกิดการกระตุ้นให้เซลล์เยื่อกระเพาะปัสสาวะเปลี่ยนแปลงและก่อกำเนิดเป็นเซลล์มะเร็งขึ้นนั่นเอง

การระคายเคืองและอักเสบเรื้อรังของกระเพาะปัสสาวะ ไม่ว่าจะเนื่องจากการติดเชื้อโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะเชื้อไวรัส พยาธิพวกชิสโตโซมา (*Schistosoma Haematobium*) หรือจากก้อนนิ่วในกระเพาะปัสสาวะ การคั่งของน้ำปัสสาวะนาน ๆ จากโรคอัมพาตครึ่งล่างของร่างกายหรือโรคอื่น ๆ เช่น โรคไขสันหลัง โรคเบาหวาน ตลอดจนจากการอักเสบเนื่องจากการใช้ยา สารเคมี การใช้รังสีรักษาในบริเวณอุ้งเชิงกราน ก็เป็นสาเหตุชักนำของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้เช่นกัน (http://www.siamca.com/Backup2002/3_14.html)

2.1.3 อาการแสดง

พบว่าประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยมักมีอาการปัสสาวะเป็นเลือด โดยไม่มีอาการเจ็บปวด บางรายอาจมีเพียงเลือดหยดออกมาเมื่อปัสสาวะสุด บางครั้งอาจจะมีอาการคล้ายกระเพาะปัสสาวะอักเสบ คือ ถ่ายปัสสาวะบ่อยแสบหรือขัดเนื่องจากเลือดที่ออกจับตัวเป็นลิ่ม ในระยะลุกลามจะมีอาการปวดได้มาก และบางรายมีการอุดตันของท่อไต ทำให้มีอาการปวดหลังได้ด้วยเช่นกัน

(http://www.siamca.com/Backup2002/3_14.html)

2.1.4 การวินิจฉัยและการรักษา

การตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคโดยการตรวจปัสสาวะนั้น มักจะพบว่าจำนวนเม็ดเลือดแดงหรือเลือดมีจำนวนมาก หากสงสัยจะทำการตรวจโดยการส่องกล้องเข้าไปในกระเพาะปัสสาวะหรือเอ็กซเรย์โดยการฉีดสารทึบรังสีที่ขับออกทางปัสสาวะ เพื่อแสดงตำแหน่งหรือร่องรอยของโรคภายในกระเพาะปัสสาวะ โดยการรักษาในระยะเริ่มแรกที่มีเพียงรอยแผลตื้น ๆ อาจรักษาให้หายขาดได้ด้วยการผ่าตัดส่วนในระยะลุกลามจะใช้การรักษาร่วมระหว่างการผ่าตัด การฉายรังสี และการให้ยาเคมีบำบัด (http://www.siamca.com/Backup2002/3_14.html)

2.2 วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle)

ขบวนการสำคัญที่นำไปสู่การเพิ่มจำนวนของเซลล์นั้นคือ วัฏจักรของเซลล์ การที่เซลล์เข้าสู่วัฏจักรของเซลล์และดำเนินไปครบวงจรนี้จำเป็นต้องมีขบวนการตรวจสอบ เพื่อป้องกันและกำจัดเซลล์ที่เกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรมไม่ให้เข้าสู่วัฏจักรของเซลล์ และเกิดการเพิ่มจำนวนขึ้น เรียกการตรวจสอบนี้ว่า cell-cycle control เซลล์ที่ผิดปกติจะถูกหยุดไว้ที่ระยะใดระยะหนึ่งของวัฏจักรของเซลล์ และได้รับการแก้ไขซ่อมแซมสารพันธุกรรมที่ผิดปกติก่อนจะแบ่งตัวต่อไป หรือหากไม่สามารถแก้ไขได้จะถูกบังคับให้เข้าของสู่ภาวะการตายของเซลล์ (apoptosis) ต่อไป cell cycle control นี้ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่บริเวณระยะต่อของแต่ละระยะ เช่น โปรตีน p53 ซึ่งเป็นผลผลิตของยีนต้านมะเร็ง *p53* (*p53* tumor suppressor gene) เป็นโปรตีนสำคัญที่ทำหน้าที่ที่ตำแหน่ง G1/S checkpoint การสูญเสียการควบคุมวัฏจักรของเซลล์เป็นสาเหตุให้เกิดการแบ่งเซลล์และการดำรงอยู่ของเซลล์ที่มีสารพันธุกรรมผิดปกติ เมื่อไม่มีการแก้ไขและควบคุมความผิดปกตินี้ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ (histopathology) ของเนื้อเยื่อนั้นจากสภาพที่มีรูปร่างเซลล์ปกติได้เกิดการหนาตัวของเนื้อเยื่อ (hyperplasia) จนกระทั่งเกิดความผิดปกติในรูปร่างลักษณะของเซลล์ในเนื้อเยื่อนั้น ๆ (dysplasia) จนกระทั่งกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด

2.3 ยีนมะเร็ง (Oncogene)

ขั้นตอนแรกของการเกิดโรคมะเร็งเรียกว่า initiation เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์ โดยมียีนที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 กลุ่ม คือ oncogenes และ tumor suppressor genes ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญในการควบคุมการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์ (อมรา คัมภีรานันท์, 2546) ยีนมะเร็งเกิดขึ้นเมื่อเกิดการแปรผันทางพันธุกรรม หรือ มีการแสดงความผิดปกติในระดับที่สูงมาก ยีนมะเร็งหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้มีการออกฤทธิ์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะจับอยู่กับหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน โดยมีลักษณะต่อไปนี้

1. ตัวอย่าง โปรตีนที่ถูกกำหนดรหัสโดย *SRC*, *RAS* และ *RAF*, *ABL* ที่ถูกกำหนดรหัสโดย *Bcr/Abl* ที่พบในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวระยะเรื้อรัง (chronic myelogenous leukemia)
2. ปฏิกริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตจะกระตุ้นให้โปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสัญญาณส่งไปทีนิวเคลียส
3. ปัจจัยที่ทำให้เกิดปฏิกริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตจะจับอยู่กับตัวส่งเสริมในดีเอ็นเอ เพื่อทำให้ยีนที่เกี่ยวข้องทำงาน ตัวอย่างเช่น AP-1 ซึ่งเป็นเฮเทอโรไดเมอร์ (heterodimer) ของโปรตีนที่ถูกกำหนดรหัสโดย *jun* และ *fos*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ยีนบางชนิดจะทำงานโดยปัจจัยที่ทำให้เกิดการลอรหัส โดยจะทำให้มีการกำหนดรหัส โดยปัจจัยตัวอื่น เช่น ยีน *myc*

5. ปัจจัยที่ทำให้เกิดการ ทำงานบางชนิดของยีนมีการกำหนดรหัสโดย *cyclin* เพื่อเตรียมที่จะมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส

ยีนที่มีส่วนร่วมในการทำงานในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งอาจทำให้กลายเป็นยีนมะเร็งได้ ถ้า

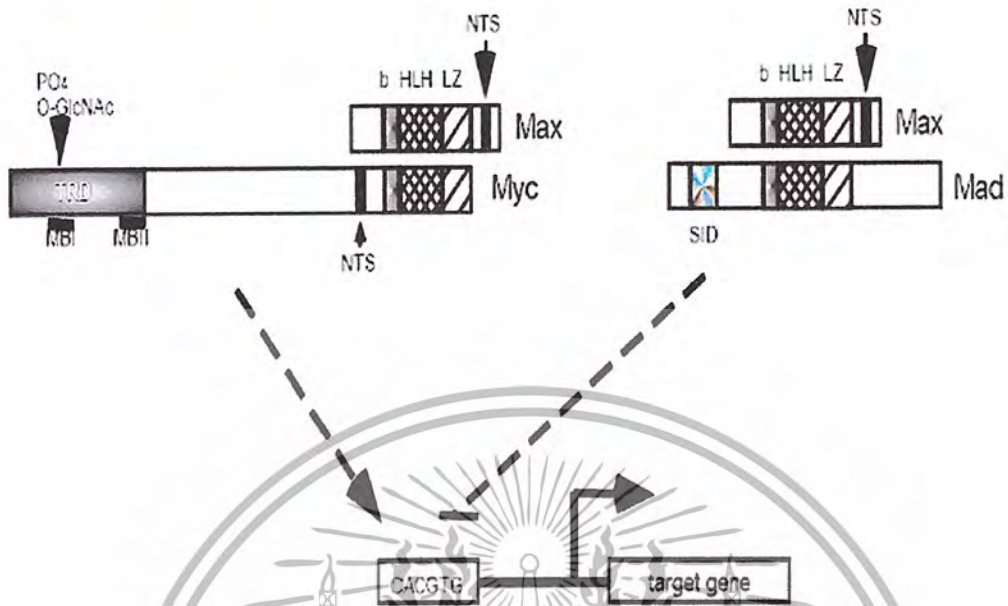
1. ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งมีผลทำให้ผลิตผลที่เกี่ยวข้องถูกกระตุ้นตลอดเวลา ทำให้ว่องไว (active) ตลอดเวลาแม้ไม่มีการกระตุ้นโดยรหัสสัญญาณก่อน

2. ยีนที่มีการผลิตผลิตผลที่มากเกินไป เพราะเกิดความผิดปกติที่ตัวส่งเสริม ตัวอย่าง การถ่ายโอนยีนในหนูจะมีการลอกแบบยีน *myc* ภายใต้อิทธิพลของตัวส่งเสริมที่มีฤทธิ์สูง ยีนมะเร็ง (oncogene) เป็นยีนเด่นถ้ามียีนปกติ (proto-oncogene) ที่ตำแหน่งที่มียีนมะเร็งอยู่ผลิตผลที่ผิดปกติจะถูกควบคุมด้วยยีนมะเร็งตัวเดียวไม่มีความสามารถที่ทำให้เกิดมะเร็ง แต่จะมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสไปเรื่อยๆ ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของยีนที่ผิดปกติ (oncogene) ไปเรื่อยๆ หากไม่สามารถควบคุมได้จะกลายเป็นยีนมะเร็ง

(<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/O/Oncogenes.html>)

2.3.1 ยีน *c-myc*

โดยยีน *c-myc* เป็น oncogene ที่สำคัญยีนหนึ่งมีตำแหน่งบนโครโมโซมมนุษย์คือ 8q24 ซึ่งจะประกอบไปด้วยตำแหน่งที่มีการถ่ายทอดยีน (exon) 3 บริเวณ การลอรหัสอาจจะเริ่มต้นที่บริเวณที่เป็นตำแหน่งที่ RNA polymerase มาจับเพื่อเริ่มต้นการสร้าง RNA (promoter) การแปลรหัสจะเริ่มต้นด้วยรหัส AUG ซึ่งจะอยู่ที่บริเวณตำแหน่ง exon ที่ 2 จะผลิตกรดอะมิโนหลัก ๆ ได้หลายชนิด รวมทั้งโปรตีนจากยีน *c-myc* ด้วย (64 kDa *c-myc* protein) การแปลรหัสจะเริ่มต้นจากตำแหน่งบริเวณดังกล่าวทั้งโปรตีนในรูปแบบที่เป็นสายสั้นและสายยาว โปรตีน *c-myc* เป็นการเชื่อมต่อโดยอะตอมของออกซิเจน (O-linked glycosylated) และ หมู่ฟอสเฟต



รูปที่ 3 แสดงการเข้าคู่กันของโปรตีน *Max* กับ *c-myc* หรือโปรตีน *Mad* กระบวนการลอครหัสของการเข้าคู่กันของยีนสองชนิดดังกล่าวจะทำให้การควบคุมการลอครหัสที่บริเวณ E-box element (5'-CACGTG-3') *c-Myc-Max* จะทำการลอครหัสโดยผ่านกระบวนการ histone acetylation และ การทำปฏิกิริยาโดยตรงกับกลไกการแปลรหัส ส่วนสารประกอบเชิงซ้อน *Max-Mad* และ ตัวยับยั้งที่ทำงานร่วม (co-repressor) และ histone ที่มีกรดไขมัน acetyl ออกเป็นตัวยับยั้งการลอครหัสที่มา; Gardner และคณะ (2002)

ทั้งยีน *Myc*, *Mad* และ *Max* (เรียกอีกชื่อว่า *SIN3*) ต่างมีส่วนที่เหมือนกันคือจะประกอบไปด้วย basic-helix leucine zipper (b HLH LZ) แสดงให้เห็นดังภาพ ส่วน NTS คือ สัญญาณที่ทำให้เกิดการลอครหัสของยีนเป้าหมาย (nuclear targeting signal) TRD คือ บริเวณที่จะเกิดการควบคุม (transregulatory domain) SID คือ บริเวณที่มีการทำปฏิกิริยากับ *SIN3*, *MB1* และ *MB2* เป็นส่วนรหัสของอนุพันธ์ต่างๆ ของโปรตีน *Myc* ตำแหน่งการเติมฟอสเฟตและการเติมไกลโคซิล (phosphorylation and glycosylation) ที่บริเวณ *Myc Boxes 1* แสดงให้เห็นโดยสัญลักษณ์ PO_4 และ $O-GlcNAc$ ตามลำดับดังรูปที่ 3

ในเซลล์ปกติการแสดงออกของยีน *c-myc* จะถูกควบคุมโดยสัญญาณจากภายนอก เช่น growth factor และการเชื่อมต่อกับของเหลวภายนอกเซลล์ เซลล์ปกติจะมีการแสดงออกของยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

c-myc เล็กน้อย แต่ถ้าหากมีการกระตุ้นโดย growth factor จะมีการแสดงออกของยีน *c-myc* เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการตอบสนองของยีนอย่างทันที การแสดงออกของยีน *c-myc* จะเกิดขึ้นในกระบวนการแบ่งเซลล์และสามารถกลับสู่สภาวะปกติในรูปของเซลล์ลูก (daughter cell) ในเซลล์ระยะเริ่มแรกจะมีการป้องกันเซลล์ที่ผิดปกติของยีน *c-myc* โดยวิธีที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์โดยจะขึ้นอยู่กับการชักนำของยีน *p19/p14 ARF* และ *p53* แสดงให้เห็นว่าในยีนปกติจะมีกระบวนการกำจัดยีน *c-myc* ที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในสิ่งมีชีวิต โดยทำให้เซลล์ที่ผิดปกตินั้นตาย (apoptosis) จึงเป็นการป้องกันการแปรเปลี่ยนไปของเนื้อเยื่อในสิ่งมีชีวิตด้วย ในเซลล์ปกติการพัฒนาของเซลล์ในตัวอ่อนจะถูกควบคุมโดยการแสดงออกของยีน *c-myc* เช่นเดียวกับอนุพันธ์ มีการตรวจสอบการพัฒนาตัวอ่อนของหนูที่มีการบกพร่องของยีน *c-myc* สองแอลลีล พบว่าตัวอ่อนจะตายตั้งแต่เริ่มต้นการพัฒนาของตัวอ่อน โดยเกิดความผิดปกติในการเริ่มสร้างโลหิต จากการศึกษาจะพบว่ายีน *c-myc* จะมีส่วนเกี่ยวข้องในการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีการศึกษาในแมลงหวี่ (*Drosophila*) พบว่าหากมีการผิดปกติของยีน *myc* จะมีขนาดเล็กกว่าเผ่าพันธุ์ปกติของมันบ่งชี้ได้ว่า *myc* อาจเป็นส่วนหนึ่งในการควบคุมเซลล์ที่ปกติและขนาดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นผลมาจากความผิดปกติในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ทำให้ลักษณะรูปร่างมีขนาดเล็กกว่าปกติ

การทำงานของยีน *c-myc* ซึ่งมีผลทำให้เกิดมะเร็งในมนุษย์สามารถเกิดได้หลายสาเหตุ เช่น เกิดการย้ายที่ของส่วนของโครโมโซมในกรณีของ Burkitt's lymphoma การเพิ่มจำนวนของยีน *myc* ทำให้เพิ่มการแสดงออกของยีน *myc* มากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด การที่ความผิดปกติโดยมีการลอคกรหัสของยีน *myc* เพิ่มขึ้นพบได้ในการเกิดมะเร็งลำไส้ในมนุษย์ การลอคกรหัสเกิดขึ้น โดยการทำงานของยีน β -catenin (co-activator) ซึ่งจะไม่ทำงานเมื่อจับกับโปรตีน adenomous polyposis coli (APC) จะกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ *myc* ในสถานะที่ไม่มี APC แต่จะจับอยู่กับปัจจัยที่ทำให้เกิดการลอคกรหัส TCF4 (transcription factor) ซึ่งในมะเร็งลำไส้จะพบการกลายพันธุ์ของยีน β -catenin ซึ่งจะทำให้การควบคุมการแสดงออกของยีน *myc* เกิดความผิดปกติก่อให้เกิดการพัฒนาของมะเร็งชนิดนี้

ส่วนกลไกอื่นที่ทำให้เกิดการผิดปกติที่ยีน *c-myc* เช่น การหายไปของรหัส 3'UTR ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ *myc* mRNA, การแทนที่ของ retroviruses ที่บริเวณตำแหน่งใกล้เคียงกับยีน *myc* ทำให้มีการแสดงออกโดยผ่านรหัสที่ควบคุมโดย retroviral ยีน *ras* ซึ่งเป็นยีนมะเร็ง (oncogene) ที่มีผลในการเปลี่ยนแปลงกลไกการแปลรหัสขั้นตอนสุดท้ายของการผลิตโปรตีน *myc* การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกในยีน *c-myc* โดยวิธีที่กล่าวมาจะไม่มีผลในการเกิดมะเร็งในมนุษย์

ถึงแม้ว่าความสัมพันธ์ระหว่าง *c-myc* และมะเร็ง สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในหลอดทดลองและ

ในสิ่งมีชีวิต กลไกของเซลล์ระดับโมเลกุลที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของยีน *c-myc* จะไม่มีผลที่แน่ชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ได้มีการแสดงบทบาทของยีน *c-myc* ในวัฏจักรของเซลล์ กระบวนการตายของเซลล์และความคงที่ในระดับพันธุกรรม พบว่าการที่ยีน *c-myc* สนับสนุนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และมีส่วนเกี่ยวข้องในการคงที่ทางพันธุกรรมโดยจะมีบทบาทในระยะ G1 และ S ในการแบ่งเซลล์ และมีการเพิ่มกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยปกติแล้วในเซลล์ปกติจะทำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) แต่ในยีนที่มีการกลายพันธุ์จะทำให้มีการทำงานของ antiapoptosis signal ทำให้อาจมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเนื้อเยื่อเป็นเซลล์มะเร็งได้ (Gardner และคณะ, 2002)

2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายช่วงสั้น ๆ แบบปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อนทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ เช่น การวินิจฉัยโรคหรือการศึกษาความรู้พื้นฐานต่าง ๆ ปัจจัยสำคัญในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีดังนี้

1. Template เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณช่วงดีเอ็นเอที่พร้อมจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะต้องแยกจากดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว
2. Primer เป็น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณทั้งด้านปลาย 5' และ 3' ทำหน้าที่เป็นแม่แบบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
3. เอนไซม์โพลีเมอเรส เป็นเอนไซม์ทนความร้อนสูงใช้เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยา ปัจจุบันนิยมใช้ *Taq* DNA polymerase สามารถทนความร้อนในช่วงที่แยกดีเอ็นเอจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยที่ไม่ต้องเติมเอนไซม์ทุกครั้งรอบทำให้เกิดความสะดวก และเป็นการประหยัดเวลา
4. ดิวอกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ซึ่งมีอยู่ 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP, dTTP ทำหน้าที่เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอชนิดต่างๆ
5. ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ น้ำ เกลือชนิดต่างๆ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. Denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอสายเดี่ยวทั้งสองสายที่แยกได้จะถูกใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อไป

2. Primer annealing ขั้นตอนนี้จะเป็นการลดอุณหภูมิลงมาที่ช่วง 40-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับคู่อย่างจำเพาะที่ด้านปลาย 3' ของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณทั้งสองสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Primer extension ขั้นตอนนี้จะสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่ให้ยาวขึ้น โดยมีการเชื่อมต่อกของ dNTP ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่มีทิศทางจาก 5' ไป 3' สายดีเอ็นเอใหม่ที่สังเคราะห์ต่อจากไพรเมอร์ โดยจะมีลำดับเบสที่จับคู่จำเพาะกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยามักอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั้ง 3 ขั้นตอน นับเป็น 1 รอบ ดีเอ็นเอสายใหม่ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ นับเป็นผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR product) ซึ่งผลที่ได้มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเดิมสองสายเป็นสี่สาย ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมารอบขึ้น อัตราการเพิ่มปริมาณจะเป็นทวีคูณ คือ 2^n โดยที่ n เท่ากับจำนวนรอบของการสังเคราะห์

การใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมิทั้งข้อดีและข้อจำกัด ข้อดีที่นิยมใช้เนื่องจากดีเอ็นเอเป้าหมายที่นำมาศึกษาไม่จำเป็นต้องใช้ปริมาณมาก การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสามารถทำได้จำนวนมากในเวลาที่ยากัด ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มนี้มีขนาดเบสได้ตั้งแต่ 50 คู่เบส - 2000 คู่เบส สำหรับข้อจำกัดที่ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนั้น ได้แก่ การพิจารณาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมและทราบลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษาค้นคว้า การปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนเตรียมดีเอ็นเอจะมีผลต่อการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2543)

2.5 ชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatic)

ชีวสารสนเทศศาสตร์หรือ bioinformatic เป็นศาสตร์ที่ว่าด้วยการนำข้อมูลทางชีววิทยามาใช้อย่างเป็นระบบ รวมทั้งการจัดเก็บ การพัฒนาโปรแกรมประยุกต์แบบต่าง ๆ สำหรับเปรียบเทียบ วิเคราะห์ คำนวณ และประเมินผลข้อมูลที่ได้จากการสืบค้นจากคอมพิวเตอร์ระดับองค์กรหรือระหว่างองค์กร ทั้งในและต่างประเทศผ่านเครือข่ายสารสนเทศต่าง ๆ ชีวสารสนเทศศาสตร์ได้ถูกใช้ในการหาคำตอบหรือตอบคำถามทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพในหลายรูปแบบ ซึ่งเดิมทำได้ยากหรือไม่อาจทำได้เลย เป็นเครื่องมือที่ปรับเปลี่ยนรูปแบบหลัก (Paradigm shift) ของการค้นคว้าวิจัยจากแบบดั้งเดิมซึ่งใช้เวลาส่วนใหญ่ในห้องปฏิบัติการแต่อย่างเดียว มาเป็นการผสมผสานกับการสืบค้น วิเคราะห์หรือแม้กระทั่งทำการทดลองบนเครื่องคอมพิวเตอร์โดยการจำลอง (simulation) โดยใช้ข้อมูล (digital data) เป็นวัตถุดิบจากนั้นจึงนำกลับมาวิจัยในห้องปฏิบัติการ (wet lab) เพื่อยืนยันผลลัพธ์ที่ได้จากการประเมินหรือวิเคราะห์ผลจากข้อมูลเหล่านั้น อันเป็นการประหยัดทั้งเวลาและงบประมาณการวิจัย

การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยอย่างหนึ่ง คือ การบริการวิเคราะห์ข้อมูลทางอนุชีววิทยา โดยใช้ซอฟต์แวร์บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต โดยมีการติดตั้งซอฟต์แวร์สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลไว้บน

คอมพิวเตอร์ขนาดใหญ่และมีศักยภาพสูงมากซึ่งเป็นที่รู้จักกันในชื่อ public domain การวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลบนเครื่อง Public domain นี้ทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว อันเนื่องจากผู้ดูแลจะทำการปรับเปลี่ยนซอฟต์แวร์ให้ทันสมัยและทำงานได้ตลอดเวลา โดยมากไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย ต่อไปนี้เป็นตัวอย่างซอฟต์แวร์ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางอนุชีววิทยา ซึ่งถูกจัดหมวดหมู่ตามลักษณะการทำงานดังนี้

1. บริการกลับทิศสายนิวคลีโอไทด์ และบริการหาเส้นคู่สม (complementary)
 2. บริการหาลักษณะทางกายภาพและทางเคมี (physico-chemical)
 3. บริการแปลงสายดีเอ็นเอเป็นสายโปรตีน (DNA translation)
 4. บริการแปลงสายโปรตีนเป็นสายดีเอ็นเอ (backtranslation)
 5. บริการแปลงรูปแบบ (format) ของสายโปรตีนและสายดีเอ็นเอให้เหมาะสมต่อการเก็บรักษาและให้อยู่ในรูปแบบที่จำเพาะเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้ซอฟต์แวร์อื่นๆต่อไป (sequence conversion)
 6. บริการหาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนสายดีเอ็นเอ (restriction map analysis)
 7. บริการเปรียบเทียบความเหมือน (identity) หรือความคล้ายคลึง (similarity) ระหว่างสายดีเอ็นเอหรือสายโปรตีนที่สนใจกับฐานข้อมูล
 8. บริการเปรียบเทียบความเหมือน หรือความคล้ายคลึงระหว่างกลุ่มของสายดีเอ็นเอหรือสายของโปรตีนที่กำลังศึกษา (sequence alignment)
 9. บริการสร้าง phylogenetic tree จากลำดับเบสหรือกรดอะมิโนหรือจากค่า genetic distance
 10. บริการวิเคราะห์หาส่วนของสายดีเอ็นเอที่อาจจะเป็นยีนและผ่านกระบวนการทางอนุชีววิทยาเพื่อสร้างสายโปรตีนได้ (computational gene identification)
 11. บริการหาโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน (protein secondary structure)
 12. บริการหาโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน (protein tertiary structure)
 13. บริการให้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาลูกลูโซโฟลีสีเมอเรส และบริการออกแบบชิ้นดีเอ็นเอเพื่อเป็นไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาลูกลูโซโฟลีสีเมอเรส
- โดยไพรเมอร์ก็เป็นปัจจัยสำคัญสำหรับปฏิกิริยาลูกลูโซโฟลีสีเมอเรส ดังนั้นจึงมีผู้คิดค้นซอฟต์แวร์สำหรับให้บริการออกแบบไพรเมอร์มากมายหลายโปรแกรม แต่ละโปรแกรมจะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไป เป็นหน้าที่ของผู้ใช้ที่จะเลือกใช้บริการให้ตรงกับข้อมูลและวัตถุประสงค์ ยกตัวอย่าง เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. โปรแกรม webprimer (stanford) webprimer หรือ rawprimer ใช้เพื่อต้องการทราบว่าตำแหน่งโคดอนสายดีเอ็นเอที่น่าจะเป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์สำหรับใช้ในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อหาพารามิเตอร์ (T_m ของไพรเมอร์ ความยาวของไพรเมอร์และขนาดของซิงซ์พีซีอาร์) ที่เหมาะสมเบื้องต้น สำหรับเป็นแนวทางในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะซึ่งยุ่งยากซับซ้อนต่อไปก็ทดลองใช้

2. โปรแกรม genefisher ใช้ในกรณีที่ต้องการออกแบบไพรเมอร์จากกลุ่มยีนที่สนใจซึ่งข้อมูลลำดับเบสของทั้งกลุ่มยีน ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการเปรียบเทียบหาความเหมือน (Sequence alignment) มาก่อนเพราะก่อนจะออกแบบไพรเมอร์ โปรแกรม genefisher จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลของกลุ่มยีนโดยเปรียบเทียบหาความเหมือนระหว่างลำดับเบส เพื่อค้นหาช่วงลำดับเบสอนุรักษ์บนสายดีเอ็นเอของทั้งกลุ่มยีนก่อน แล้วจึงทำการออกแบบไพรเมอร์ให้ตรงกับพารามิเตอร์ที่ผู้ใช้กำหนด เช่น ความยาวไพรเมอร์ ความยาวของซิงซ์พีซีอาร์ T_m ของไพรเมอร์ เบสที่ปลายสาย 3' ของไพรเมอร์ เป็นต้น

3. โปรแกรม primers ใช้เมื่อต้องการออกแบบไพรเมอร์จากดีเอ็นเอชิ้นเดียว แต่ทราบแน่นอนแล้วว่าตำแหน่งโคดอนสายดีเอ็นเอเป็นลำดับเบสอนุรักษ์ หรือต้องการความจำเพาะสูงสุดลดความไม่จำเพาะที่อาจเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Nonspecific PCR product) ผู้ใช้สามารถระบุให้โปรแกรมวิเคราะห์หา Forward primer และ Reverse primer จากช่วงลำดับเบสเฉพาะเท่านั้น

4. โปรแกรม Primer 3 เป็นโปรแกรมที่มีพารามิเตอร์จำนวนมากเพื่อควบคุมการวิเคราะห์เพื่อออกแบบไพรเมอร์ทำให้สามารถประยุกต์ใช้ได้กับเทคนิคเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ได้หลากหลาย

5. โปรแกรม Primer calculator Rawtm Olicocalc Melting และ Netprimer หลังจากออกแบบไพรเมอร์แล้วได้ผลลัพธ์เป็นไพรเมอร์หลายเส้น ต้องการทราบว่าควรเลือกเส้นไหน แต่ละเส้นมีค่า T_m (melting temperature) เท่าไหร่หรือควรจับคู่กับเส้นใดเพื่อนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรสจริง (วสันต์ จันทราทิพย์และคณะ, 2544)

2.6 อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis)

อิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่สำคัญที่ใช้สำหรับวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลโดยทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ เคลื่อนที่เข้าไปภายในร่างแหของเจลอะกาโรส เจลนี้จะอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีการให้กระแสไฟฟ้าที่ขั้วบวกและขั้วลบ จะมีทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของฟองก๊าซไฮโดรเจน

ออกห่างจากขั้วลบ และฟองก๊าซออกซิเจนเคลื่อนที่ออกห่างจากขั้วบวก จึงส่งผลให้เกิดสนามไฟฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(<http://www.electrophoresis.apbiotech.com/>)

2.6.1 หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

อิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นวิธีการที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก ซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารนั้นๆ ในสนามไฟฟ้า ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกนั้น การแยกชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสมักจะทำในตัวอย่างกลาง โดยการใส่สารที่ต้องการแยกลงในตัวอย่างกลางแล้วจึงปล่อยกระแสไฟฟ้าให้ผ่านตัวอย่างกลางนั้น ดังนั้นจึงมีอิเล็กโตรโฟรีซิสหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดตัวอย่างกลาง เช่น โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวอย่างกลางเป็นโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) สตาร์ชเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (starch gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวอย่างกลางเป็นสตาร์ชเจล (starch gel) เป็นต้น ส่วนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสก็คืออิเล็กโตรโฟรีซิสที่ทำในตัวอย่างกลางที่เป็นอะกาโรสเจลนั่นเอง

ในการแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จะทำในบัฟเฟอร์ซึ่งมีพีเอชประมาณ 8 ซึ่งที่พีเอชนี้ดีเอ็นเอจะมีประจุลบ เนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอสเฟต อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.6.1.1 ขนาดและโครงรูป (conformation) ของดีเอ็นเอ

เมื่อพิจารณาจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอจะเห็นได้ชัดเจนว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ถึงแม้จะมีจำนวนประจุลบสูงเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอขนาดเล็ก (จำนวนหมู่ฟอสเฟตมากกว่า) แต่อัตราส่วนของประจุลบต่อมวล (mass) ของดีเอ็นเอไม่ว่าโมเลกุลใหญ่หรือเล็กจะเท่ากัน ดังนั้นอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า จึงเป็นผลมาจากขนาดของดีเอ็นเอโดยตรง ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แต่ทั้งนี้หมายถึงการเปรียบเทียบในขณะที่ดีเอ็นเอเหล่านั้นอยู่ในโครงรูปแบบเดียวกัน ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่โครงรูปต่างกันจะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันไปด้วย ตัวอย่างที่เห็นได้ชัด ได้แก่ เมื่อพลาสมิดชนิดหนึ่ง ๆ อยู่ในรูปที่เรียกว่าซูเปอร์คอยล์ (supercoil form) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเมื่ออยู่ในรูปปลายเปิด (linear form) และรูปรีแลกซ์ (relaxed form) ตามลำดับ

2.6.1.2 ความเข้มข้นของอะกาโรส (Agarose concentration)

ขณะอิเล็กโตรโฟรีซิสดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่ผ่านรูพรุน (pore) ภายในเจล ถ้ารูพรุนมีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอก็จะสูง ขนาดของรูพรุน (pore size) ภายในเจลจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้เตรียมเจล กล่าวคือ เมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นสูง ๆ ขนาดรูพรุนก็จะเล็กกว่าเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นต่ำ ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะกาโรส

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจนนี้นี้ดังสมการ

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r C$$

เมื่อ μ = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

μ_0 = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสภาวะที่ไม่มีอะกาโรสเจล

C = ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล

K_r = สัมประสิทธิ์ความหน่วง (retardation coefficient)

โดยปกติค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วง (K_r) เป็นค่าคงที่ขึ้นกับขนาดและโครงสร้างของดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจนนี้นี้ถ้ากำหนดให้ดีเอ็นเอปลายเปิดรูปร่างเป็นแท่งกลมยาวค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วงจะขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอนี้ ดังนั้นที่ความเข้มข้นหนึ่ง ๆ ของอะกาโรสเจล ค่า \log ของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอเองจะมีความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันกับการเคลื่อนที่ ดังนั้นในการแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆจะต้องเลือกความเข้มข้นของอะกาโรสให้เหมาะสม

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลกับขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด

ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล (%)	ขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด (กิโลเบส)
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.2	6-0.4
1.5	4-0.2
2.0	3-0.1

2.6.1.3 ความต่างศักย์ไฟฟ้า

โดยปกติการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสจะทำโดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 0.5- 5 โวลต์/เซนติเมตร แต่ค่าความต่างศักย์ที่นิยมใช้มักจะมีค่าต่ำๆ (ประมาณ 1 โวลต์/เซนติเมตร) ทั้งนี้เพราะที่ความต่างศักย์ต่ำ ๆ อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดจะเป็นสัดส่วนกับความต่างศักย์ แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้นการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดโมเลกุลใหญ่จะเพิ่มขึ้นมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก เป็นเหตุให้เมื่อใช้ความต่างศักย์สูง ๆ ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่แยกได้จะแคบลง สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่เฉพาะดีเอ็นเอที่ใหญ่กว่า 70 กิโลเบส การที่จะทำให้แยกจากกันได้ดีจะต้องใช้ความต่างศักย์ต่ำ ๆ (0.5 โวลต์/เซนติเมตร)

เมื่อใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำๆ (1 โวลต์/เซนติเมตร) เวลาสำหรับการแยกจะค่อนข้างยาว (มากกว่า 10 ชั่วโมง) ฉะนั้นจะเกิดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กได้มากทำให้แถบดีเอ็นเอที่แยกได้ไม่คม หรือในกรณีที่มีขนาดโมเลกุลไม่ต่างกันมากจะไม่สามารถแยกออกจากกันได้เลย ดังนั้นสำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก (ต่ำกว่า 2 กิโลเบส) จึงมักจะใช้อิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ความต่างศักย์สูงๆ เพื่อลดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอลง

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสมักจะทำในแนวราบ โดยที่อะกาโรสเจลจะจมอยู่ที่บัฟเฟอร์ประมาณไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ด้วยเหตุที่ความต้านทานไฟฟ้าในอะกาโรสเจลและในบัฟเฟอร์ใกล้เคียงกันมาก ฉะนั้นกระแสไฟฟ้าส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสจะเคลื่อนผ่านแผ่น อะกาโรสเจล โดยที่อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสมักจะทำที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้เพราะอัตราเร็วสัมพัทธ์ของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดขนาดต่าง ๆ จะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 4-30 องศาเซลเซียส แต่กรณีที่ใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลต่ำกว่า 0.5 % มักจะทำอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ 4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพราะเมื่อความเข้มข้นของอะกาโรสต่ำลงจะอยู่ในสภาพค่อนข้างหนืด ในที่เย็นจะช่วยให้เจลอยู่คงรูปมากขึ้น

2.6.1.4 ชนิดของบัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส แสดงดังตารางที่ 2 ในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีการทดลองที่ใช้ TBE buffer ซึ่งสามารถทำอิเล็กโตรโฟรีซิสได้ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูง (50-100 volt) ในระยะเวลาสั้น แต่การใช้ความต่างศักย์ที่สูงขึ้นจะลดประสิทธิภาพการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็ก ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงจะมีผลให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในเจลได้เร็วขึ้น แต่อาจมีผลให้เกิดแถบ (band) ดีเอ็นเอเป็นรูปตัวยู

นอกจากนี้ยังจะทำให้ความร้อนเกิดขึ้นในระบบ ในกรณีที่ความร้อนสูงอาจทำให้เจลละลายได้ มีผลให้ช่องว่างภายในเจลเปลี่ยนแปลงไป ปกติแล้วจะไม่ใช่ความต่างศักย์สูงเกิน 125 โวลต์ในเจลขนาดเล็ก

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้

บัฟเฟอร์	สารละลายเข้มข้นต่อลิตร (Stock solution)	องค์ประกอบของสารละลาย เข้มข้น
Tris-acetate (TAE)	40 mM Tris-acetate 2 mM EDTA	50X: 242 g Tris-base 57.1 ml. glacial acetic acid 200 ml. 0.5 M EDTA(pH 8.0)
Tris-phosphate (TPE)	89 mM Tris-phosphate 2 mM EDTA	10X: 108 g Tris-base 15.5 ml of 86% phosphoric acid (1.679 mg/ml)40 ml.0.5 M EDTA (pH8.0)
Tris-borate (TBE)	89 mM Tris-borate 89 mM Boric acid 2 mM EDTA	5X: 54 g Tris-base 27.5 g. borie acid 20 ml 0.5 M EDTA(pH8.0)

2.6.2 การติดตามการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอไม่สามารถมองได้ด้วยตาเปล่าในขณะที่อเล็กโตรโฟรีซิส ดังนั้นจึงต้องใช้สารสำหรับบอกถึงการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอ อย่างคร่าว ๆ โดยที่มีการผสมตัวอย่างของดีเอ็นเอกับสารละลายสีย้อมสำหรับการหยอดดีเอ็นเอ ที่เรียกว่า Loading dye ลงในช่องเจล ในสารละลายสีย้อมนี้จะมีองค์ประกอบของ Ficoll 400 ซึ่งมีผลให้สารละลายดีเอ็นเอมีน้ำหนักและจมอยู่ในช่องเจลไม่ฟุ้งกระจายในบัฟเฟอร์ก่อนการให้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลที่ให้สีในสารละลายสีย้อมซึ่งเรียกว่า แทรกกิงได (tracking dye) จะใช้ติดตามการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ได้แก่ โบรโมฟินอล บลู (bromophenol blue) มีสีม่วงจะเคลื่อนที่ในเจลความเข้มข้นร้อยละ 0.8 ได้อัตราเร็วใกล้เคียงกับ

ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส ส่วนไซลีนไซยานอล (xylene cyanol) จะมีสีฟ้ามีขนาดใหญ่กว่าจะเคลื่อนที่ได้ในอัตราเร็วใกล้เคียงกับดีเอ็นเอ 900 คู่เบส ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยทั่วไป พลาสมิดดีเอ็นเอจะแยกจากกันได้ดีเมื่อโปรโมทีนอล บูล เคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้นประมาณ 40 – 70 เซนติเมตร ประมาณ 2 ใน 3 เจล

2.6.3 การย้อมสีดีเอ็นเอและการตรวจสอบดีเอ็นเอ

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายในเจลซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงต้องย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent) ส่วนใหญ่จะใช้เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) โดยสารประกอบดีเอ็นเอและเอธิเดียมโบรไมด์ จะดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่น 302 และ 366 นาโนเมตร การดูดกลืนคลื่นแสงนี้ส่งผลให้เกิดการแตกตัวของพลังงาน และปลดปล่อยแสงสีส้มที่มีความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และตรวจสอบโดยการวางเจลที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์แล้วบนแหล่งกำเนิดแสงที่ให้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่นปานกลาง (260-360 นาโนเมตร) ควรหลีกเลี่ยงหลอดไฟที่ให้ความยาวคลื่นสั้นเนื่องจากจะเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และทำลายดีเอ็นเอ ส่วนความยาวคลื่นยาว (black light) นั้นจะปลอดภัยแต่จะให้ความเข้มแสงต่ำ แสงอัลตราไวโอเลตนั้นสามารถทำลายเรตินาของดวงตาได้ไม่ควรดูด้วยตาเปล่า (กนกพร สมพร โพลิน. 2547)

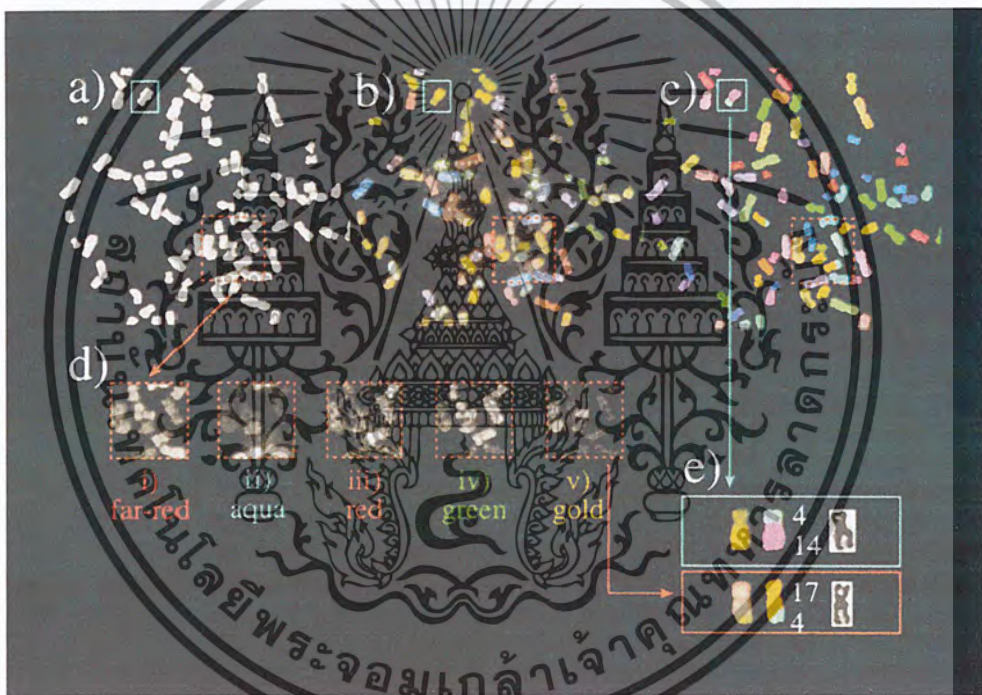
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเป็นมะเร็งของระบบทางเดินปัสสาวะที่พบบ่อยเป็นอันดับ 2 ซึ่งเป็นมะเร็งที่พบในระบบอวัยวะสืบถ่ายและอวัยวะสืบพันธุ์เพศชายรองมาจากมะเร็งต่อมลูกหมาก (http://www.siamca.com/Backup2002/3_14.html) จึงทำให้มีความสนใจในการศึกษาถึงการเกิดความผิดปกติที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในสาขาวิชาต่าง ๆ เช่น พันธุศาสตร์ของเซลล์หรืออณูพันธุศาสตร์ จึงได้มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

Strefford และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์ไลน์ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยใช้เทคนิค M-FISH (multiplex fluorescence in situ hybridization) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบถึงการผิดปกติต่าง ๆ เช่น การขาดหายของชิ้นส่วนโครโมโซม การเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนโครโมโซม การเกิดการย้ายของชิ้นส่วนโครโมโซม (translocation) และการกลับทิศทางของโครโมโซม (inversion) ดังรูปที่ 4 โดยความผิดปกติที่สามารถตรวจสอบได้ในระดับพันธุศาสตร์ของเซลล์ในเนื้อเยื่อชนิด TCC (transitional cell carcinoma) คือการเกิดการขาดหายของโครโมโซมบริเวณ 17p 13q 4p 8p 11p 14q และ 18q และการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านจำนวน (numerical changes) ของโครโมโซมที่ 1, 7, 9 และ 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

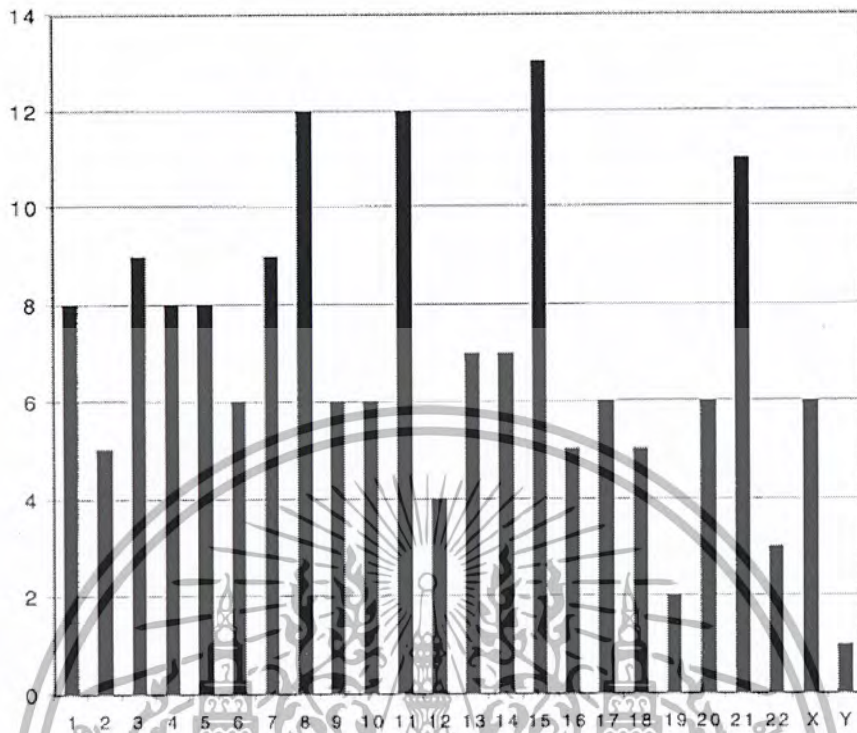
และในการศึกษาทางด้านอณูพันธุศาสตร์ได้ทำการศึกษาการเกิดความผิดปกติของยีนส่วนใหญ่ คือ ยีน *RBI*, *TP53*, *ERBB2*, *C-MYC*, *PTEN*, *PAX5*, *NF1* และ *TP73* จากการศึกษาพบว่าเกิดการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีความผิดปกติของโครโมโซมส่วนใหญ่ที่บริเวณโครโมโซมที่ 9 และมีจำนวนการเกิดการหักของโครโมโซมบริเวณเซนโทรเมียร์ในเซลล์ไลน์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้งหมด 60 เปอร์เซ็นต์ (99/165 ตัวอย่าง) และการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมที่ 19 และโครโมโซม Y เกิดขึ้นในปริมาณน้อย (2/165) และ (1/165) ตามลำดับ ดังรูปที่ 5 และการเกิด isochromosome ของโครโมโซมที่ 8q, 10q, 13q, 14q และ 21q และการเกิดการขาดหายของโครโมโซมบริเวณ 4q, 6q, 8p, 9p, 11p, 12q, 13q และ 15q



รูปที่ 4 แสดงการทดสอบด้วยเทคนิค M-FISH ในเซลล์ไลน์ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ RT112 เมื่อ a) เซลล์เมทาเฟสที่ย้อมด้วยสี DAPI b) เซลล์เมทาเฟสที่ย้อมด้วยสี Blend (Blend color) c) เซลล์เมทาเฟสที่ใช้คอมพิวเตอร์ในการประมวลผลรวมของสี d) ตัวอย่างของภาพสีขาวดำจากตัวกรองแสงฟลูออเรสเซนซ์ e) ตัวอย่างโครโมโซมที่ผิดปกติโดยใช้เทคนิค M-FISH ในการตรวจสอบ

ที่มา; Strefford และคณะ (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 กราฟแสดงจำนวนโครโมโซมต่างๆ ที่เกิดการแตกหักทำให้เกิดความผิดปกติแบบ translocation

ที่มา: Strefford และคณะ (2002)

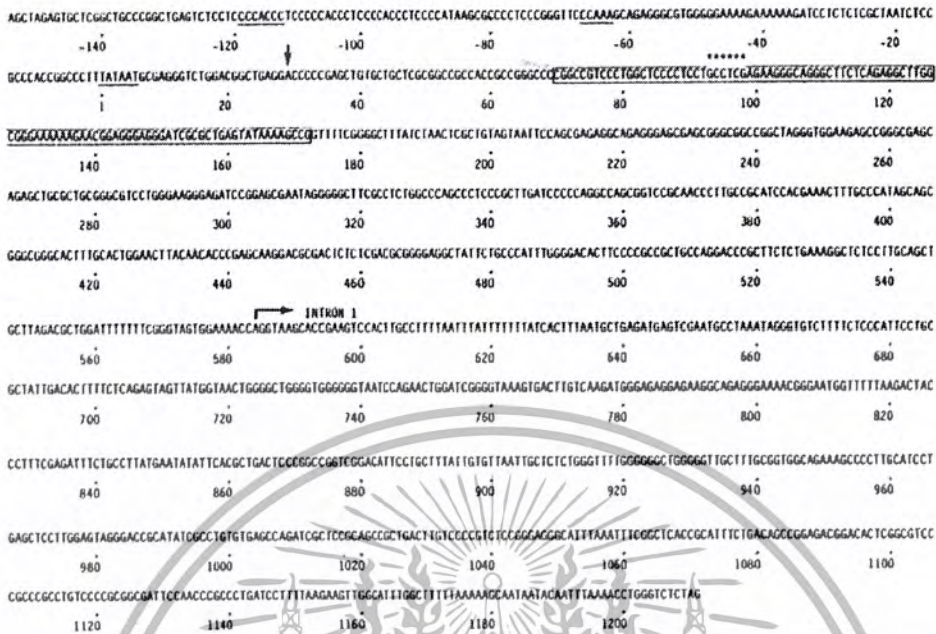
Robert และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาความผิดปกติในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะด้วยเทคนิค FISH (Fluorescence In situ Hybridization) โดยพบว่าการเกิดการขาดหายไปของเบสในส่วนของยีน *P53* ที่ทำให้เกิดการพัฒนาของเซลล์เป็นเซลล์มะเร็งได้ โดยพบการขาดหายไปบนโครโมโซมที่ 17 บริเวณ p13.1 ถึง 84 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างทั้งหมด

Rosemary และคณะ (1983) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างและลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาย 5' ของยีนมะเร็ง *c-myc* ในมนุษย์ (*c-myc* oncogene) โดยพบว่ายีน *c-myc* เป็นยีนมะเร็งที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 8 บริเวณ q24 (บริเวณแขนข้างยาวที่ตำแหน่ง 24) และพบว่ายีน *c-myc* ประกอบด้วย 3 exons และ 2 introns แสดงดังรูปที่ 6 และพบว่าตำแหน่งที่มีการแสดงออกโดยตำแหน่งที่เป็นบริเวณจดจำของ RNA polymerase อยู่ที่บริเวณ exons ที่ 2 ดังรูปที่ 7

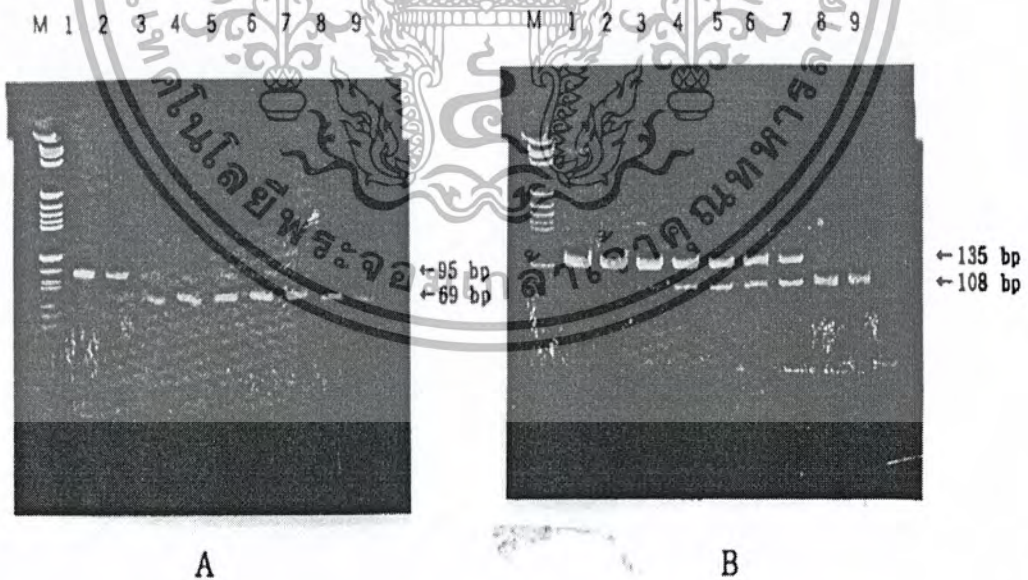
Hong และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาการเกิดการแสดงออกของยีน *H-RAS* และการเกิดการ

กลายพันธุ์แบบ point mutation ในตำแหน่งโคดอนที่ 12 และ โคดอนที่ 61 ในมะเร็งกระเพาะ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งที่มีการแสดงออกของยีน *c-myc* ที่บริเวณตำแหน่ง exons ที่ 2 ที่หมา; Rosemary และคณะ (1983)

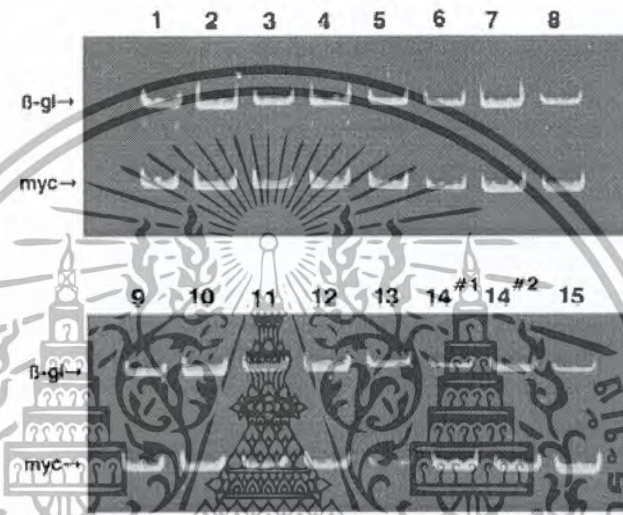


รูปที่ 8 แสดงการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP จากเซลล์ไลน์ดีเอ็นเอ A) เซลล์ไลน์ดีเอ็นเอ T24 B) เซลล์ไลน์ดีเอ็นเอ SK

ที่มา: Hong และคณะ (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Karasawa และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ใน CML (chronic myelogenous leukemia) โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยการใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ exons ที่ 1 ของยีน *c-myc* และใช้ไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบของดีเอ็นเอควบคุมโดยการใช้ไพรเมอร์ β - globin จากการศึกษาพบว่ามีเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* เป็นชุด ๆ ในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ดังรูปที่ 11

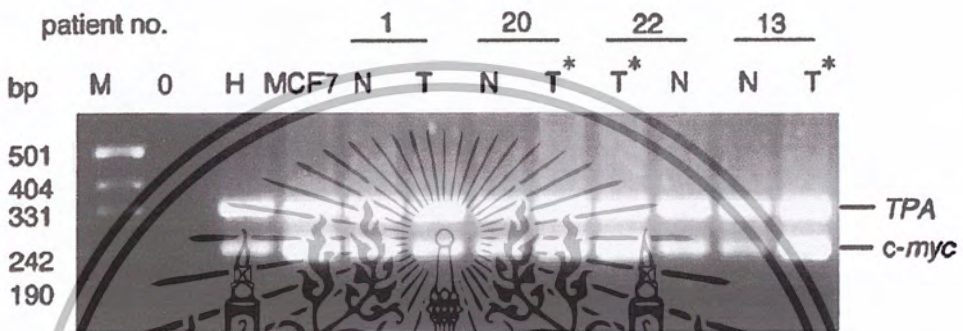


รูปที่ 11 แสดงการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ; เลนที่ 1-4 เนื้อเยื่อชนิด AML (acute myelogenous leukemia), เลนที่ 5-8 เนื้อเยื่อชนิด ALL (acute lymphocytic leukemia), เลนที่ 9-11 เนื้อเยื่อชนิด CML-CP (chronic myelogenous leukemia - chronic phase), เลนที่ 12-13 เนื้อเยื่อชนิด CML-BC (chronic myelogenous leukemia - blastic phase), เลนที่ 14#1 เนื้อเยื่อชนิด dmin(+) CML-BC (double minute chromosomes (+) chronic myelogenous leukemia - blastic phase), เลนที่ 14#2 เนื้อเยื่อชนิด dmin(-) CML-BC (double minute chromosomes (-) chronic myelogenous leukemia - blastic phase), และ เลนที่ 15 เนื้อเยื่อชนิด HL-60 เซลล์ไคน์
ที่มา; Karasawa และคณะ (1996)

Pawel และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาการเกิดความคิดปกติในการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* และการแสดงออกของโปรตีน *c-myc* ในมะเร็งเต้านมและ adjacent non-neoplastic tissue โดยมีการรายงานถึงจำนวนของยีน *c-myc* และการทำงานในการแสดงออกของยีน *c-myc* ที่มีความสัมพันธ์ในการเกิดความคิดปกติของมะเร็งเต้านม โดยความสัมพันธ์ของจำนวนการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* กับระดับการแสดงออกของโปรตีน *c-myc* จะมีความสัมพันธ์แบบมีนัยสำคัญ โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาได้ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่ามีการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ถึง 21 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างทั้งหมด 94 ตัวอย่าง (20/94) แสดงดังรูปที่ 12 และการเกิดการแสดงออกของระดับโปรตีน *c-myc* กับ การแสดงการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* จะมีความสัมพันธ์กันในการเกิดโรคมะเร็งเต้านม แสดงในตารางที่ 3



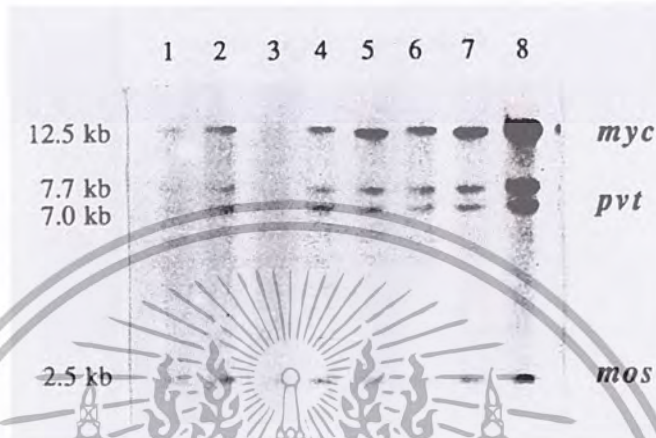
รูปที่ 12 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Multiplex PCR ของยีน *c-myc* ในโรคมะเร็งเต้านม เนื้อเยื่อมะเร็ง (T) และ adjacent non-neoplastic tissue (N) ที่มา; Pawel และคณะ (2001)

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของโปรตีน *c-myc* กับ การเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ในโรคมะเร็งเต้านม ที่มา; Pawel และคณะ (2001)

c-Myc protein level	Status of <i>c-myc</i> gene	
	Normal n=74	Amplification n=20
Normal	50	5
Overexpression	24	15*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Borg และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ในโรคมะเร็งเต้านม โดยการใช้เทคนิค Southern blot ในการวิเคราะห์ โดยพบว่ามีการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* และมีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยที่มีอายุมาก (40-50 ปี) ดังรูปที่ 13

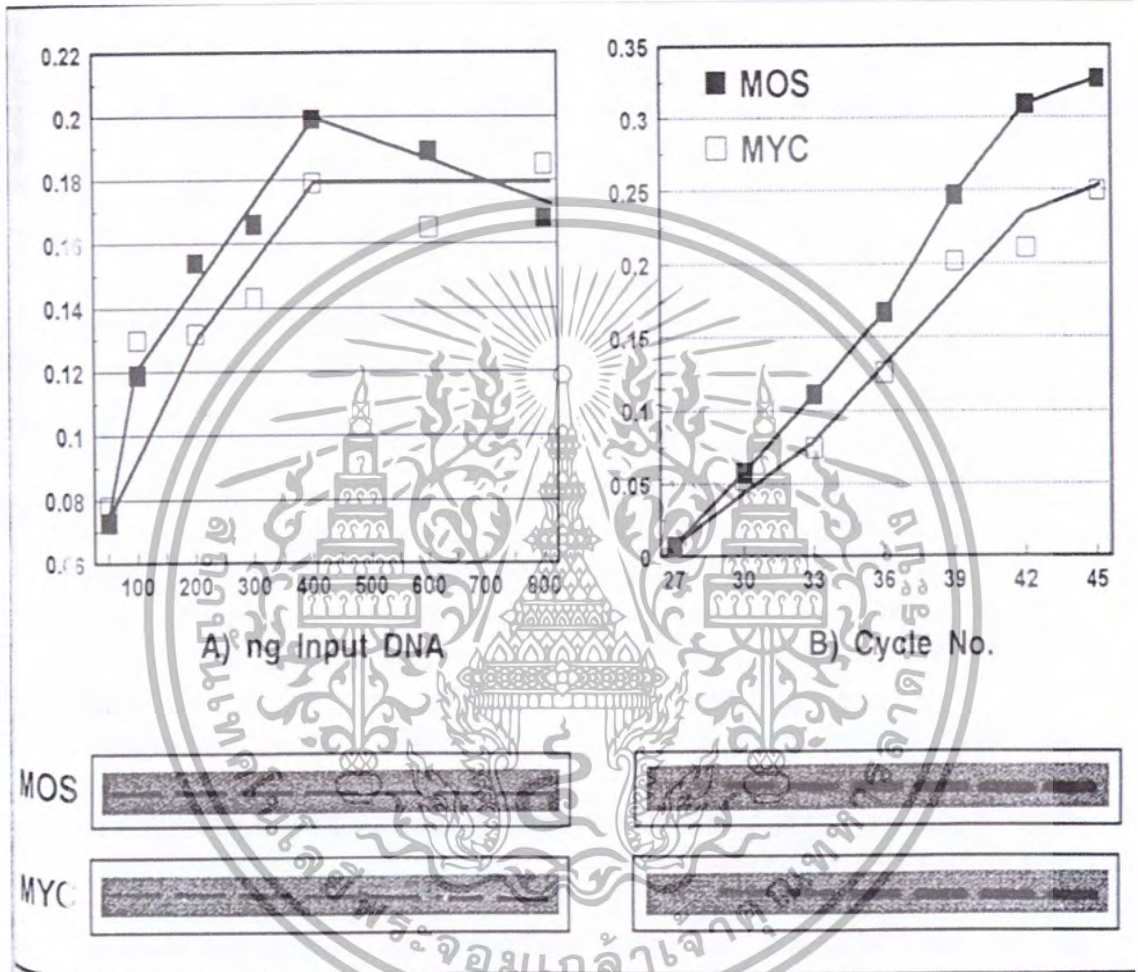


รูปที่ 13 แสดงการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ในตัวอย่างมะเร็งเต้านม 8 ตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Southern blot ที่มา; Borg และคณะ (1992)

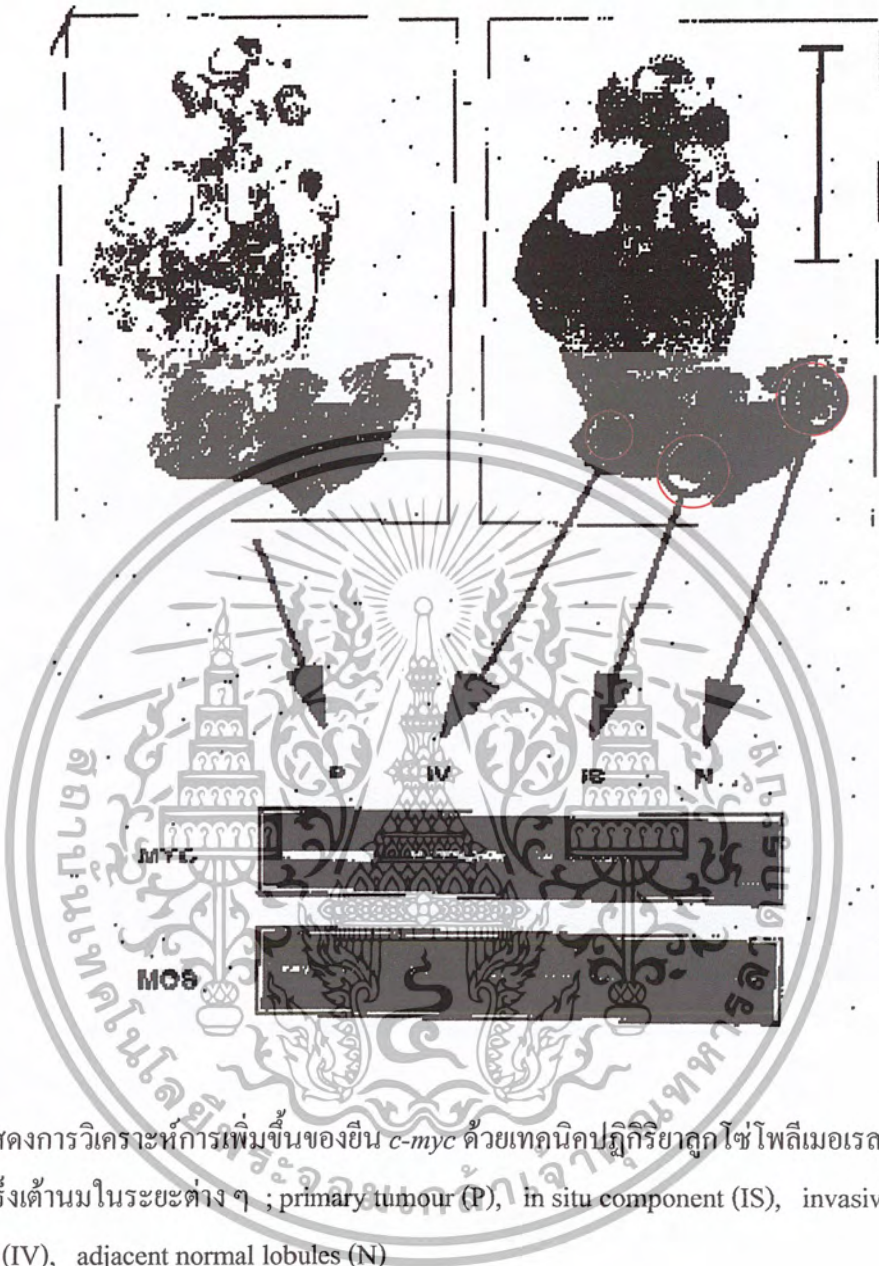
Watson และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ในโรคมะเร็งเต้านม กับเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีการรุกรานและเนื้อเยื่อที่มีการแพร่กระจายไปตามระบบท่อน้ำเหลือง โดยการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ลำดับของดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล GenBank รหัส J00120 และ J00119 ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยแถบดีเอ็นเอของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ และจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ดังรูปที่ 14 และผลของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของเนื้อเยื่อมะเร็งในระยะต่าง ๆ ดังรูปที่ 15

Abba และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาการเกิดความผิดปกติของยีน *c-myc* ในโรคมะเร็งปากมดลูกที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* และที่เกิดจากการบุกรุกของไวรัส HPV (*Human Papillomavirus*) โดยการใช้เทคนิค LS – PCR (Low Stringency - polymerase chain reaction) และเทคนิค RG – PCR (Reference Gene Polymerase Chain Reaction) ในการตรวจสอบ พบว่าการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ในเนื้อเยื่อชนิด epithelial จะมีเปอร์เซ็นต์สูงมาก และโรคมะเร็งส่วนใหญ่จะมีการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ประมาณ 3-7 ชุดของยีน และพบการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc*

ในมะเร็งปากมดลูกประมาณ 24 เปอร์เซ็นต์ (72/304) และพบการบุกรุกของไวรัสประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ (117/304) ดังรูปที่ 16

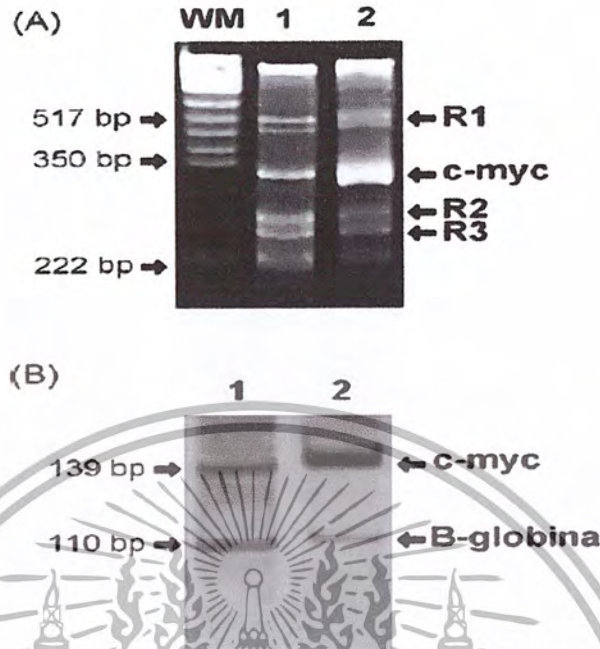


รูปที่ 14 แสดงผลความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
 A) ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ B) จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
 ที่มา; Watson และคณะ (1993)



รูปที่ 15 แสดงการวิเคราะห์การเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาชุดโซ่โพลีเมอเรส ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมในระยะต่างๆ ; primary tumour (P), in situ component (IS), invasive component (IV), adjacent normal lobules (N)

ที่มา; Watson และคณะ (1993)



รูปที่ 16 แสดงการวิเคราะห์การเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ด้วยเทคนิค LS-PCR (A) และด้วยเทคนิค RG-PCR (B), เมื่อ 1) เนื้อเยื่อปกติ 2) เนื้อเยื่อมะเร็ง ที่มา; Abba และคณะ (2004)

Christoph และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกและการเกิดการเพิ่มขึ้นของ ยีน *c-myc* ในมะเร็งที่ระบบทางเดินปัสสาวะ (urothelial carcinoma) ในมนุษย์ ได้ทำการศึกษาด้วย เทคนิค competitive PCR ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้งหมด 47 ตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ *c-myc* (sense 5'-GGA ACA AGA AGA TGAG-3' , antisense 5'-CCA AGA CGT TGT GTG-3') โดยใช้สภาวะดังนี้

- step 1 94 องศาเซลเซียส 3 นาที
- step 2 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
- 57 องศาเซลเซียส 30 วินาที
- 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที
- 29 รอบ(cycle)
- Step 3 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

โดยจากการศึกษาพบว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะ 47 ตัวอย่างได้ทำการตรวจสอบทั้งหมด 40 ตัวอย่างพบว่ายีน *c-myc* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งมีการเพิ่มจำนวนชุดของยีนมากกว่าเนื้อเยื่อปกติ 35% (14/40) โดยในจำนวนนี้จะมี 3 ตัวอย่างที่มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีนมากกว่าตัวอย่างอื่น (strong increase amplification) และจะพบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างนี้อยู่ในระยะ (stage) pT3 เกรด (grade) G3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *c-myc* และ stage/grade แสดงไว้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *c-myc* และ stage/grade ของตัวอย่างต่างๆ ที่มา; Christoph และคณะ(1999)

	<i>c-myc</i> - gene copy number			Total
	Normal	Medium	High	
Tumor stage				
pTa	3	1	0	4
pT1	4	1	0	4
pT2	4	3	0	5
pT3	10	3	3	18
pT4	5	3	0	9
Tumor grade				
G1	0	1	0	1
G2	10	2	0	12
G3/4	16	8	3	27
Total	26 (65%)	11 (28%)	3 (8%)	40 (100%)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ

3.1.1 อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอแบบใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

- เพลต (plate)
- หลอด eppendroff
- เครื่องผสม (vortex)
- ปากคีบ
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- ใบมีด
- อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (water bath)
- parafilm
- ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (NucleoSpin® Tissue)

3.1.2 อุปกรณ์ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

- PCR-200 Peltier Thermal Cycler

3.1.3 อุปกรณ์ในการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

- ชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ (Gel Document)

3.2 น้ำยาและสารเคมี

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

- PBS (phosphate buffer saline)
- buffer T1
- Proteinase K
- RNase
- buffer B3
- buffer BW

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- buffer B5
- ethanol 96-100 เปอร์เซ็นต์
- buffer BE (Elution buffer)
- TE buffer : 10 mM Tris-HCl (pH = 8.0), 1 mM EDTA (pH = 8.0), H₂O

3.2.2 ปฏิกริยาอุทกโซโพลีเมอเรส

PCR reaction mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

- 5 U/μl Taq polymerase	0.4	ไมโครลิตร
- 50 mM MgCl ₂	3	ไมโครลิตร
- 1.25 mM dNTPs	8	ไมโครลิตร
- 20 μmol/μl Primer forwards	1	ไมโครลิตร
- 20 μmol/μl Primer Rewards	1	ไมโครลิตร
- template DNA 300 ng/μl	1	ไมโครลิตร
- 10xBuffer	5	ไมโครลิตร
- H ₂ O	30.6	ไมโครลิตร

3.2.3 การตรวจสอบชนิดเอ็นเอ

1. TBE (Tris-borate)

Tris-borate	89	มิลลิโมลาร์
Boric acid	89	มิลลิโมลาร์
EDTA pH8.0	2	มิลลิโมลาร์

2. Dye

3. Agarose gel

4. Marker 100 bp ladder

3.3 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ (specimens)

การทดลองครั้งนี้ทำการศึกษาตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้งหมด 12 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้งหมด 12 ราย เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาด้วยเทคนิค PCR โดยได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจากห้องผ่าตัดศัลยกรรม มะเร็งกระเพาะปัสสาวะของโรงพยาบาลราชวิถี (กรุงเทพมหานคร) โดยในตารางที่ 5 เป็นตาราง แสดงลักษณะสภาพทางคลินิกของตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษา

3.4 การออกแบบไพรเมอร์ (primer design)

ไพรเมอร์เป็นสิ่งสำคัญในการทำเทคนิค PCR โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้เหมาะสมนั้น จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณก่อนหรือรู้ลำดับเบสส่วนหัว และ ส่วนท้ายของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณ เพื่อที่จะสามารถทำการออกแบบไพรเมอร์ให้เหมาะสมได้ โดยในการศึกษาครั้งนี้ทำการใช้ลำดับเบสของยีน *c-myc* จากฐานข้อมูล GenBank โดยผลที่ได้จะให้ฐานข้อมูลของยีน *c-myc* ออกมาหลายฐานข้อมูลตามจำนวนของฐานข้อมูลที่มีผู้ ทำการศึกษาและส่งฐานข้อมูลมาเก็บไว้ที่ฐานข้อมูลรวม GenBank ดังรูปที่ 17 และ 18 เมื่อได้ ฐานข้อมูลของยีน *c-myc* แล้วทำการศึกษาความเหมือนกันของฐานข้อมูลต่าง ๆ โดยการใช้ โปรแกรม Clustal X และทำการสร้างสายนิวคลีโอไทด์อนุกรมเพื่อเป็นตัวแทนของสายลำดับ นิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลต่าง ๆ เพื่อนำไปทำการออกแบบไพรเมอร์โดยการใช้โปรแกรม Clustal X เช่นกัน เมื่อได้สายนิวคลีโอไทด์อนุกรมแล้วทำการออกแบบไพรเมอร์ตามต้องการโดยการใช้ โปรแกรม Primer 3 ดังรูปที่ 19 โดยการกำหนดขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ให้มีความจำเพาะต่อการเพิ่มปริมาณได้สูง และการกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เพื่อให้ได้ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด หลังจากที่ได้ไพร- เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายแล้วจึงทำการตรวจสอบและทำการ คำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เพื่อเป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานของไพรเมอร์ให้ได้ ไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยการใช้โปรแกรม Oligocalc ดังรูปที่ 20 และ 21 หรือ โปรแกรม Oligoanalyzer และการตรวจการจับกันตัวเองของไพรเมอร์ที่เป็นแบบสร้างไปข้างหน้า (Forward primer) และ ไพรเมอร์แบบที่สร้างย้อนกลับ (reverse primer) หรือเรียกว่าการเกิดไพรเมอร์ ไดเมอร์ (primer – dimer) ดังรูปที่ 22 และการวักกลับมาจับเป็นวงของไพรเมอร์ (hair pin loop) ดัง รูปที่ 23 โดยการใช้โปรแกรม mfold เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของไพรเมอร์แล้วจึง ได้ไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมากได้อย่างจำเพาะ เจาะจงและมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยตารางที่ 6 เป็นตารางแสดงไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบ โดยการใช้ฐานข้อมูลของยีน *c-myc* เป็นต้นแบบ

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะสภาพทางคลินิกของตัวอย่าง 12 ตัวอย่าง ที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่าง	เพศ	อายุ (ปี)	ลักษณะเนื้อเยื่อ	เกรด
B1	หญิง	65	NF	NF
B2	ชาย	72	TCC	3
B3	ชาย	68	TCC	2
B4	ชาย	43	TCC	1-2
B5	ชาย	58	TCC	3-4
B6	ชาย	65	TCC	1-2
B7	ชาย	72	TCC	3-4
B8	ชาย	55	TCC	3-4
B9	ชาย	63	TCC	2
B10	ชาย	63	TCC	3-4
B11	ชาย	55	TCC	2-3
B12	ชาย	60	TCC	3-4

TCC – Transitional Cell Cacinoma, NF = ไม่ปรากฏ (Not Found)

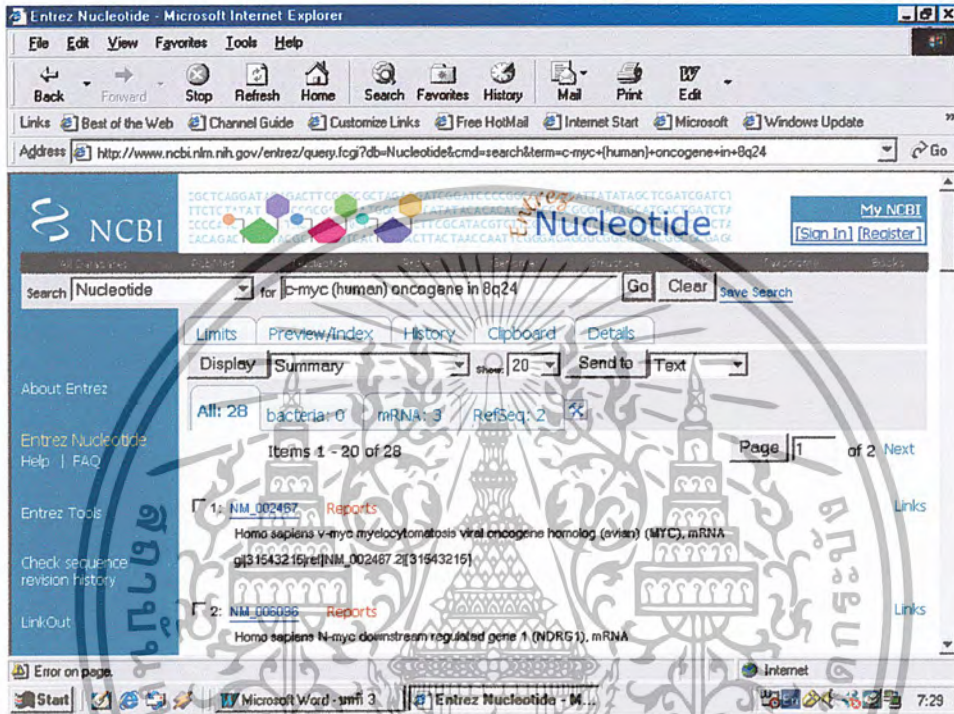
ตารางที่ 6 แสดงไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบโดยการใช้ฐานข้อมูลของยีน *c-myc* เป็นต้นแบบ

ชนิด	Start	ความยาว (คู่เบส)	ค่า Tm	เปอร์เซ็นต์ GC	ขนาดของผลิตภัณฑ์ 202 คู่เบส
Left Primer	634	20	60	50.00	5' CTTGAACAGCTACGGAACTC 3'
Right Primer	835	20	56	40.00	5' TCCAATTTGAGGCAGTTTAC 3'

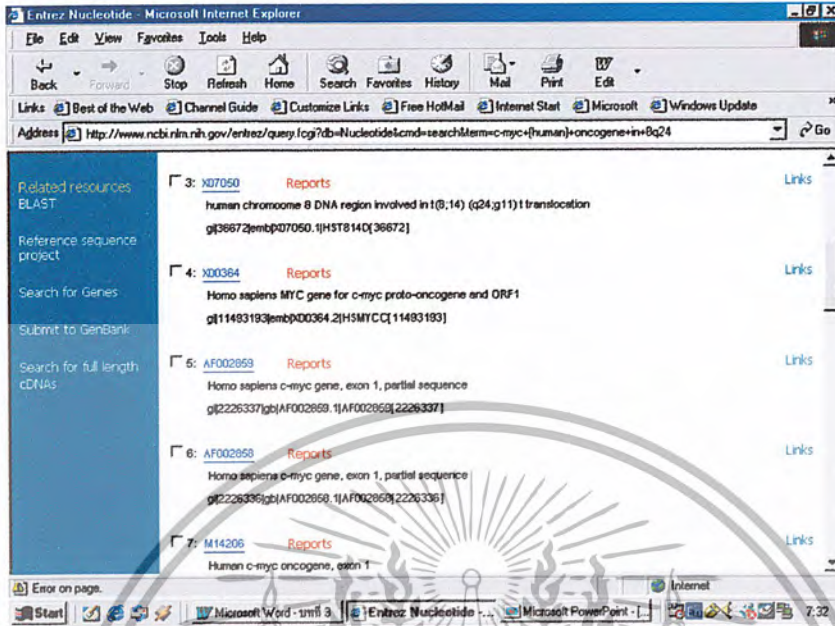
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

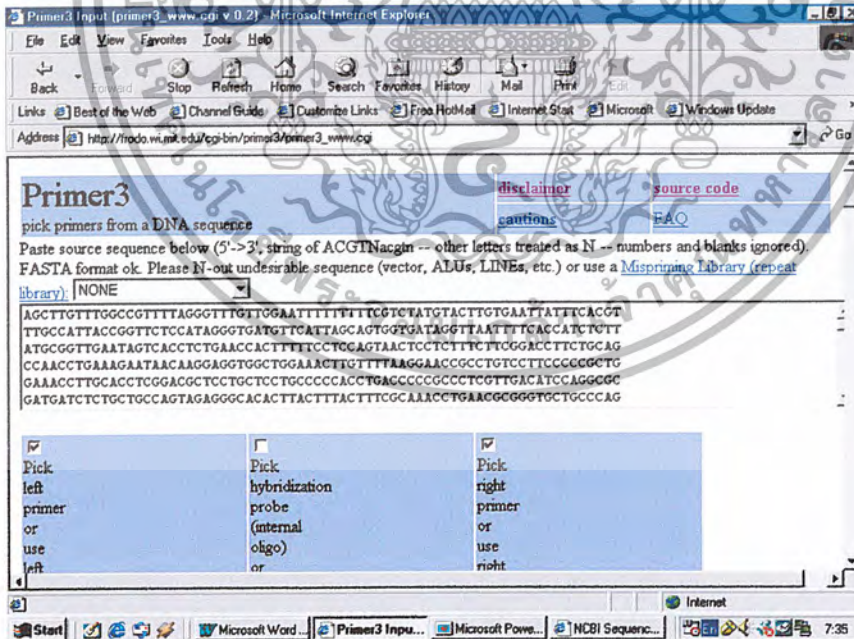
ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ทำการศึกษาเป็นตัวอย่างใหม่ (fresh tissue) ที่ทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อโดยใช้ชุดสกัด



รูปที่ 17 แสดงการหาลำดับเบสของยีน *c-myc* จากฐานข้อมูล GenBank
ที่มา; www.ncbi.nlm.nih.gov

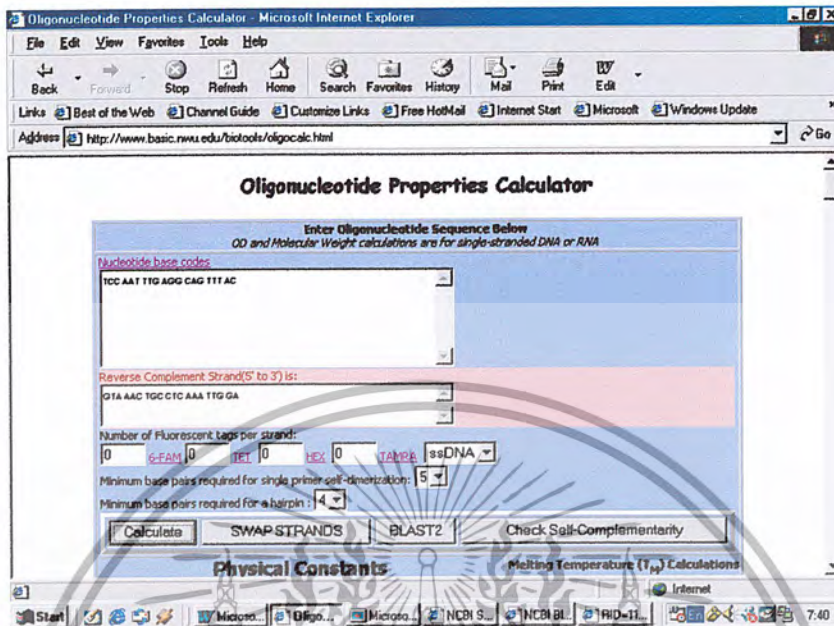


รูปที่ 18 แสดงการหาลำดับเบสของยีน *c-myc* จากฐานข้อมูล GenBank
 ที่มา; www.ncbi.nlm.nih.gov

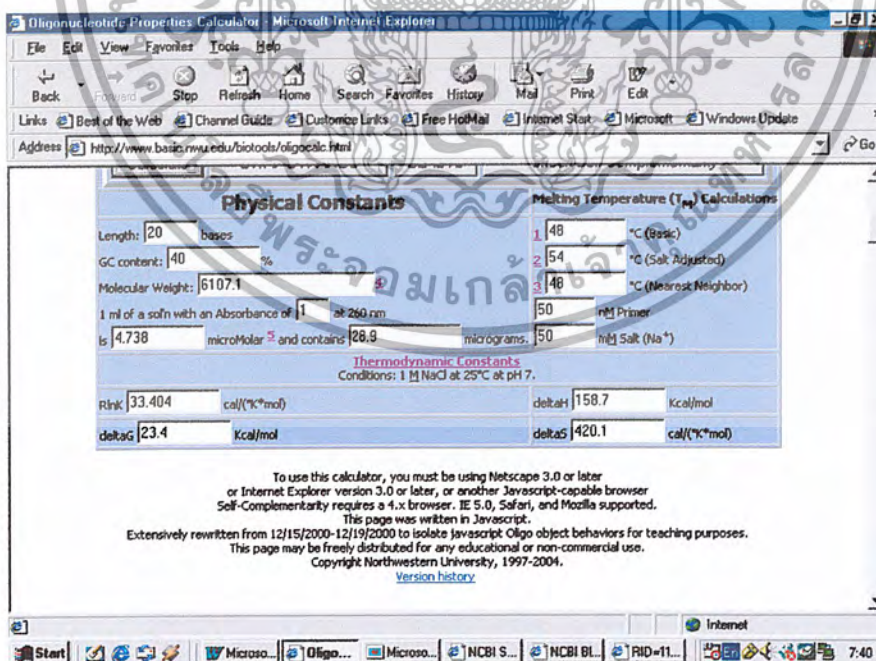


รูปที่ 19 แสดงการออกแบบไพรเมอร์โดยการใช้โปรแกรม Primer 3
 ที่มา; www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3_www.cgi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



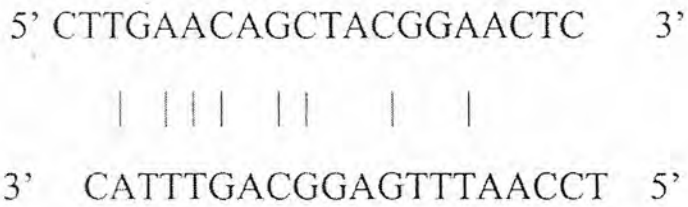
รูปที่ 20 แสดงการใช้โปรแกรม Oligocalc ในการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของไพรเมอร์
ที่มา; www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html



รูปที่ 21 แสดงการใช้โปรแกรม Oligocalc ในการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของไพรเมอร์
ที่มา; www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Primer-dimer



รูปที่ 22 แสดงการเกิด Primer-dimer ของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้
ที่มา; <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna>

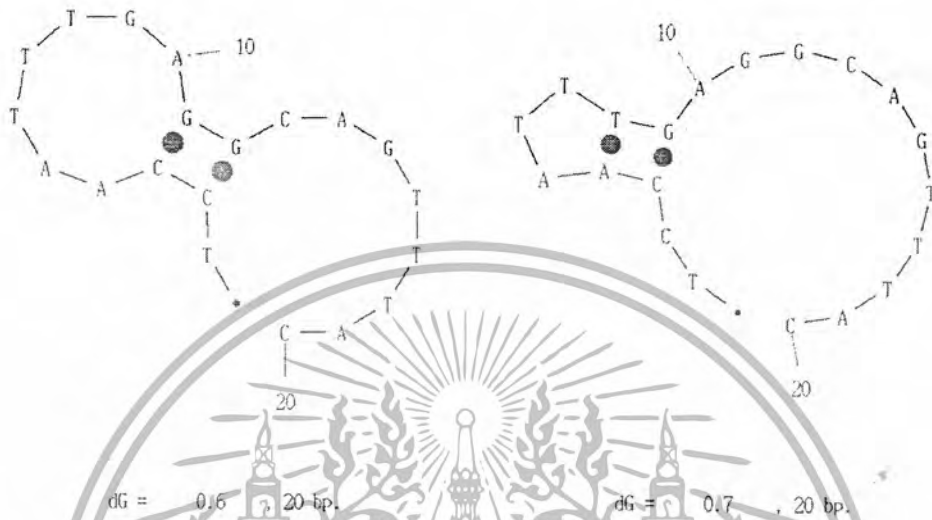
ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อสำเร็จรูป NucleoSpin[®] Tissue kit และทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรงดี ไม่เคยป่วยเป็นโรคร้ายแรง และไม่เคยป่วยเป็นโรคทางโลหิตมาก่อน โดยจะนำมาใช้เป็นตัวควบคุมการทดลองเพื่อนำมาทำการเปรียบเทียบการเกิดความแตกต่างของความผิดปกติของยีนที่ทำให้เกิดเป็นมะเร็งขึ้น โดยการสกัดดีเอ็นเอของเลือดอาสาสมัครทำได้โดยการสกัดแบบฟีนอลคลอโรฟอร์ม (phenol chloroform extraction) โดยเริ่มด้วยการเจาะเลือดปริมาณ 10 มิลลิลิตร ที่มีการใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (heparinized blood) แล้วนำมาใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง และทำการเติมบัฟเฟอร์เพื่อทำให้เซลล์แตก โดยทำบนอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา หลังจากนั้นทำการเขย่าอย่างระมัดระวังให้สารละลายผสมกัน และทำการบ่มทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดูดเอาสารละลายส่วนใสทิ้งไปและนำตะกอนที่ได้มาทำการละลายอีกครั้งด้วยการเติมบัฟเฟอร์เพื่อทำให้เซลล์แตก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อเสร็จจากการปั่นเหวี่ยงทำการดูดสารละลายส่วนใสออก และทำการเติมสารละลาย SE buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อทำการละลายตะกอน หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และทำการดูดส่วนสารละลายใสออก และทำการละลายตะกอนด้วยการเติมสารละลาย SE buffer และทำการย่อยโปรตีนด้วยการเติมสารละลาย proteinase K ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย SDS 1 % ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RIGHT PRIMER TCCAATTTGAGGCAGTTTAC

©1997 by D. Steward and M. Zoller
 EMBL Heidelberg University

©1997 by D. Steward and M. Zoller
 EMBL Heidelberg University



รูปที่ 23 แสดงการเกิด Hair pin loop ของไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบ

ที่มา; <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna>

อย่างระมัดระวัง และทำการปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อครบเวลาทำการ
 เติมนสารละลาย SE buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย phenol/SE ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
 และทำการเขย่าเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อทำการตกตะกอนโปรตีนและเซลล์ หลังจากนั้นทำการปั่น
 เหยียงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เมื่อปั่นเหยียงแล้วทำการย้ายส่วน
 ของเหลวใสด้านบนออกมาใส่หลอดใหม่และทำการเติมนสารละลาย phenol/SE ปริมาตร 10
 มิลลิลิตร และทำการเขย่าเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อทำการตกตะกอนโปรตีนอีกครั้ง หลังจากนั้นทำการ
 ปั่นเหยียงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และทำการย้ายส่วนของเหลวใส
 ด้านบนใส่หลอดใหม่แล้วทำการเติมนสารละลาย phenol/SE ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย
 chloroform/ isoamylalcohol อัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าเป็นเวลา 30
 นาที หลังจากนั้นทำการปั่นเหยียงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจาก
 นั้นนำส่วนใสด้านบนมาทำการเติมนสารละลาย chloroform/ isoamylalcohol อัตราส่วน 24 : 1
 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าเป็นเวลา 30 นาที และทำการปั่นเหยียงที่ความเร็วรอบ 3000
 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โดยทำการเติมนสารละลาย chloroform/ isoamylalcohol อัตราส่วน

24 : 1 หนึ่งเดิมอีก 2 รอบ และนำส่วนใสที่ได้มาใส่หลอดใหม่และทำการเติมนสารละลาย sodium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่ภายใต้การสนับสนุนของมูลนิธิส่งเสริมศิลปวัฒนธรรมแห่งรัฐไทย การนำเอกสารนี้ไปใช้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acitate (พีเอช 5.2) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 1 ส่วน 10 ของปริมาตรของเหลวใสที่ได้ และทำการเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่า เพื่อทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ หลังจากนั้นทำการเขย่าเบา ๆ เพื่อให้ ดีเอ็นเอตกตะกอน แล้วทำการย้ายดีเอ็นเอที่ได้ใสในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วทำการล้างดีเอ็นเอด้วยการเติมแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และทำให้ดีเอ็นเอแห้งโดยการผึ่งไว้ประมาณ 30 นาที และทำการละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเก็บดีเอ็นเอไว้ใช้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทำการสกัดด้วยการใช้ชุดสกัดเนื้อเยื่อนิวคลีโอโซม โดยทำการสกัดตามขั้นตอนตามที่ชุดสกัดได้กำหนดมาให้ โดยเริ่มด้วยการนำเอาตัวอย่างเนื้อเยื่อมาทำการตัดให้ได้ประมาณ 25 มิลลิกรัม และทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้มีขนาดเล็กลงด้วยการใช้โฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer) หรือการใช้ใบมีดในการสับให้ได้เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ มากที่สุด โดยจะมีการเติมสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 50–75 ไมโครลิตร เพื่อป้องกันเซลล์แห้งในขณะทำการบดเซลล์ หลังจากนั้นทำการใส่ตัวอย่างลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (ขนาด 1.5 มิลลิลิตร) และทำการเติมสารละลาย T1 buffer ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และทำการเขย่า (vortex) (โดยที่สารละลายจะต้องมีปริมาตรปกคลุมตัวอย่าง) และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1–3 ชั่วโมง โดยต้องทำการเขย่าตลอดเวลาการบ่ม (โดยอาจใช้ตุ้มเขย่าชนิดเขย่า) หรืออาจทำการบ่มข้ามคืนเพื่อให้การเกิดปฏิกิริยาเกิดได้มากที่สุด หลังจากนั้นทำการบดเวลาทำการเขย่าสารละลายตัวอย่างและทำการเติมสารละลาย B3 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และทำการเขย่าอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำมาทำการเขย่า หลังจากนั้นทำการเติมเอทานอล (96 – 100 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 210 ไมโครลิตร ลงในหลอดสารละลายตัวอย่างและทำการเขย่าเพื่อทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ หลังจากนั้นทำการเตรียมหลอด Collecting tube โดยมีหลอดคอลัมน์ Nucleospin[®] Tissue column อยู่ด้านบนซึ่งทำหน้าที่ในการกรองดีเอ็นเอ และทำการเติมสารละลายตัวอย่างลงในคอลัมน์และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 x g เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่ได้ภายในหลอด Collecting tube หลังจากนั้นทำการล้างดีเอ็นเอด้วยสารละลาย BW buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 x g และทิ้งส่วนใสที่ได้ ภายในหลอด Collecting tube ทำการล้างดีเอ็นเอด้วยสารละลาย B5 buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 x g และทิ้งส่วนใสที่ได้ภายในหลอด Collecting tube หลังจากนั้นทำปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 11,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้แผ่นกรองแห้ง หลังจากนั้นทำการละลายดีเอ็นเอลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยการใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย BE buffer ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และทำการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 11,000 x g และทำการเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หลังจากที่ได้สารละลายดีเอ็นเอทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ ความบริสุทธิ์และ คำนวณหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอในสารละลาย โดยการทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอ และความบริสุทธิ์โดยการใช้อัตราส่วนของ A_{260} / A_{280}

3.6 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR analysis)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของยีน *c-myc* โดยการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนั้น เพื่อทำการตรวจสอบการเกิดความผิดปกติของเซลล์มะเร็ง โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนั้นจะต้องใช้สารเคมีต่าง ๆ ในการทำให้เกิดการสร้างนิวคลีโอไทด์สายใหม่ขึ้น โดยในปฏิกิริยาหนึ่งจะประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ความเข้มข้น 100–300 นาโนกรัม ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (dNTP) ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ พิซีอาร์บัพเฟอร์ ความเข้มข้น 1 เท่า แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ไพรมเมอร์แต่ละชนิด (forward and reward primer) ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase) ความเข้มข้น 1 ยูนิต โดยปริมาตรสุดท้ายของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 50 ไมโครลิตร

โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส คือ ทำการเตรียมพร้อมดีเอ็นเอโดยการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นทำการเริ่มทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และลดอุณหภูมิให้ไพรมเมอร์สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที และทำการสร้างสายนิวคลีโอไทด์สายใหม่ โดยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสโดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ และสุดท้ายเพื่อให้เอนไซม์สามารถสร้างสายนิวคลีโอไทด์สายใหม่ได้อย่างสมบูรณ์โดยการใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 นาที

โดยในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมากจำเป็นต้องมีไพรมเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพรมเมอร์คือ forward primer 5' CTTGAACAGCTACGGAAGCTC 3' และ reward primer 5' TCCAATTTGAGGCAGTTTAC 3' เมื่อใช้ไพรมเมอร์ชนิดนี้ในการทำเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จะให้ผลิตภัณฑ์ของสายนิวคลีโอ-

ไทด์เท่ากับ 202 คู่เบสโดยการใช้ดีเอ็นเอเป็นต้นแบบของการเพิ่มปริมาณ และสามารถทำการ

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และทำการย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide stained) นำมาการตรวจสอบด้วยการใช้เครื่องส่องเจล โดยมี การต่อกับเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยจะมีโปรแกรมสำหรับใช้ในการตรวจสอบการเรืองแสงยูวีของสาร เอธิเดียมโบรไมด์ จึงสามารถทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้

3.7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์

ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการเกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยการใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกันในยีน *c-myc* ของดีเอ็นเอของเซลล์ปกติที่ใช้เป็นตัวควบคุม และจีโนมดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็ง โดยดูความสัมพันธ์ในการเกิดมากหรือน้อยกว่าตัวควบคุม



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การออกแบบไพรเมอร์จากกลุ่มยีนที่สนใจ คือยีน *c-myc* โดยใช้โปรแกรม Primer 3 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่มีพารามิเตอร์จำนวนมาก ทำการออกแบบไพรเมอร์ให้ตรงกับพารามิเตอร์ที่กำหนด เราสามารถหาขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองได้มีขนาดเท่ากับ 202 คู่เบส (bp)

4.2 จากตัวอย่างดีเอ็นเอของคนไข้โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวนทั้งหมด 12 รายและตัวอย่างดีเอ็นเอของคนปกติจำนวน 2 ราย เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอทั้ง 14 ราย มาทำอิลีกโตรโฟรีซิสเพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอ ได้ผลดังรูป

B12 B11 B10 B9 B8 B7 B6 B5 B4 B3 B2 B1 N2 N1 Marker



รูปที่ 24 แสดงดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็ง (เลน 4 -14) ดีเอ็นเอของเซลล์ปกติ (เลน 2 - 3) และ marker 100 bp DNA ladder (เลน 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสคือปฏิกริยาเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับ ปฏิกริยา ได้แก่

- ปริมาณสายดีเอ็นเอแม่แบบ
- ความเข้มข้นของ Mg^{2+}
- จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
- อุณหภูมิในการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ

โดยตลอดการทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้ทำการปรับสภาวะของเครื่องพีซีอาร์ตาม สภาวะดังต่อไปนี้

step 1	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 3 นาที
step 2	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 50 วินาที
	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
step 3	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 9 นาที

โดยทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสดังนี้

1. ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบ (ng/ μ l)

ทำการศึกษหาปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่เหมาะสม โดยทำการศึกษาที่ระดับความเข้มข้น 100 200 และ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยได้ใช้สารเคมีในปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในแต่ละ ปฏิกริยามี ดังนี้

10 x PCR	5	μ l
50 mM $MgCl_2$	3	μ l
1.25 mM dNTPs	8	μ l
<i>c-myc</i> primer Forward	1	μ l
<i>c-myc</i> primer Rerword	1	μ l
2 U Taq polymerase	0.4	μ l

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดย ใช้เวลา 1 ชั่วโมง 40 นาที ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 25 แสดงการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบ โดย Marker 100 bp DNA ladder (เลนที่ 1), contaminate control (เลนที่ 2), ปริมาณดีเอ็นเอของคนที่มีความเข้มข้น 300 ng/μl (เลนที่ 3), ปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อมะเร็ง B9 ที่ความเข้มข้น 100 200 และ 300 ng/μl (เลนที่ 4, 5, 6 ตามลำดับ)

จากรูปที่ 25 ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบ จะพบแถบที่มีขนาดของดีเอ็นเอขนาด 202 คู่เบส ที่มีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบที่ 300 ng/μl ชัดเจนที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

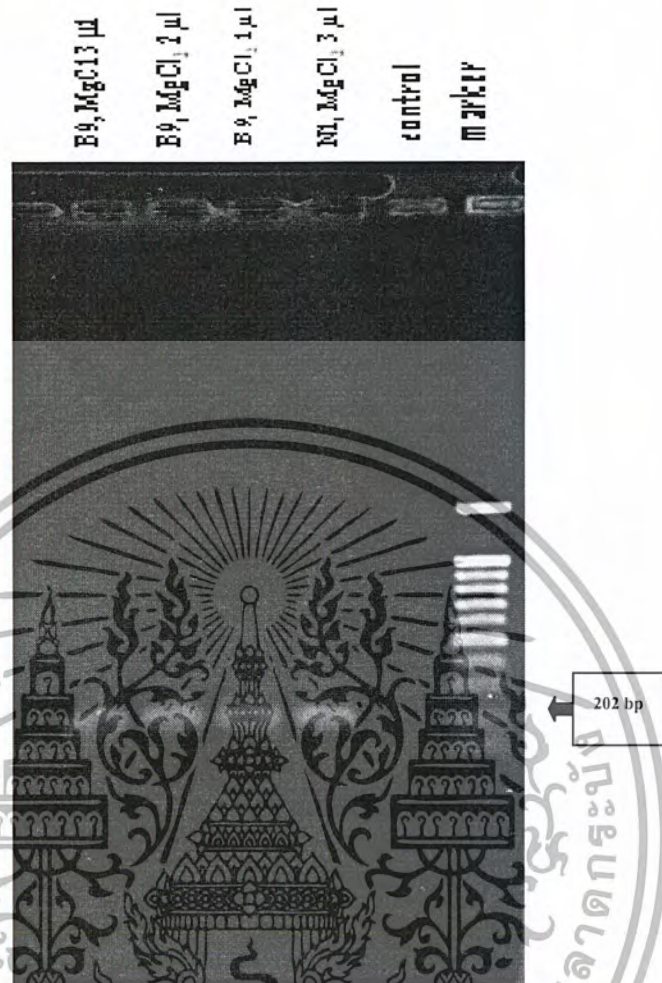
2. ปริมาตรของ $MgCl_2$ (μl) โดยใช้ $MgCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 50 mM

ทำการศึกษาหาปริมาณของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสม โดยใช้ $MgCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 1 2 และ 3 μl สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสในแต่ละปฏิกิริยา มีดังนี้

10 x PCR	5	μl
1.25 mM dNTPs	8	μl
<i>c-myc</i> primer Forward	1	μl
<i>c-myc</i> primer Reword	1	μl
2 U Taq polymerase	0.4	μl
300 ng/ μl ดีเอ็นเอแม่แบบ	1.2	μl

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลา 1 ชั่วโมง 40 นาที ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 26

จากรูปที่ 26 การหาสถานะที่เหมาะสมโดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณ $MgCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 50 mM พบว่าปริมาณของ $MgCl_2$ ที่ 3 μl มีความจำเพาะและได้ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้แถบสีเข้มชัดเจนที่สุดสรุปได้ว่า ปริมาณของ $MgCl_2$ ที่ 3 μl เหมาะสมที่สุด



รูปที่ 26 แสดงการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของปริมาณ $MgCl_2$ โดยใช้ $MgCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 50 mM โดย Marker 100 bp DNA ladder (เลนที่ 1), contaminate control (เลนที่ 2), ดีเอ็นเอคนปกติที่ใช้ปริมาณ $MgCl_2$ 3 μ l (เลนที่ 3), ดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อมะเร็ง B9 ที่ใช้ปริมาณ $MgCl_2$ 1 , 2 และ 3 μ l (เลนที่ 4, 5, 6 ตามลำดับ)

4.4 ผลการทดลองในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อเปรียบเทียบการเกิดการเพิ่มจำนวนชุดของลำดับ ดีเอ็นเอ (amplification) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมากกว่าตัวอย่างดีเอ็นเอของคนปกติและการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อเปรียบเทียบการเกิด amplification ของตัวอย่างเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเท่ากับตัวอย่างดีเอ็นเอของคนปกติ และในกรณีไม่มีการเกิด

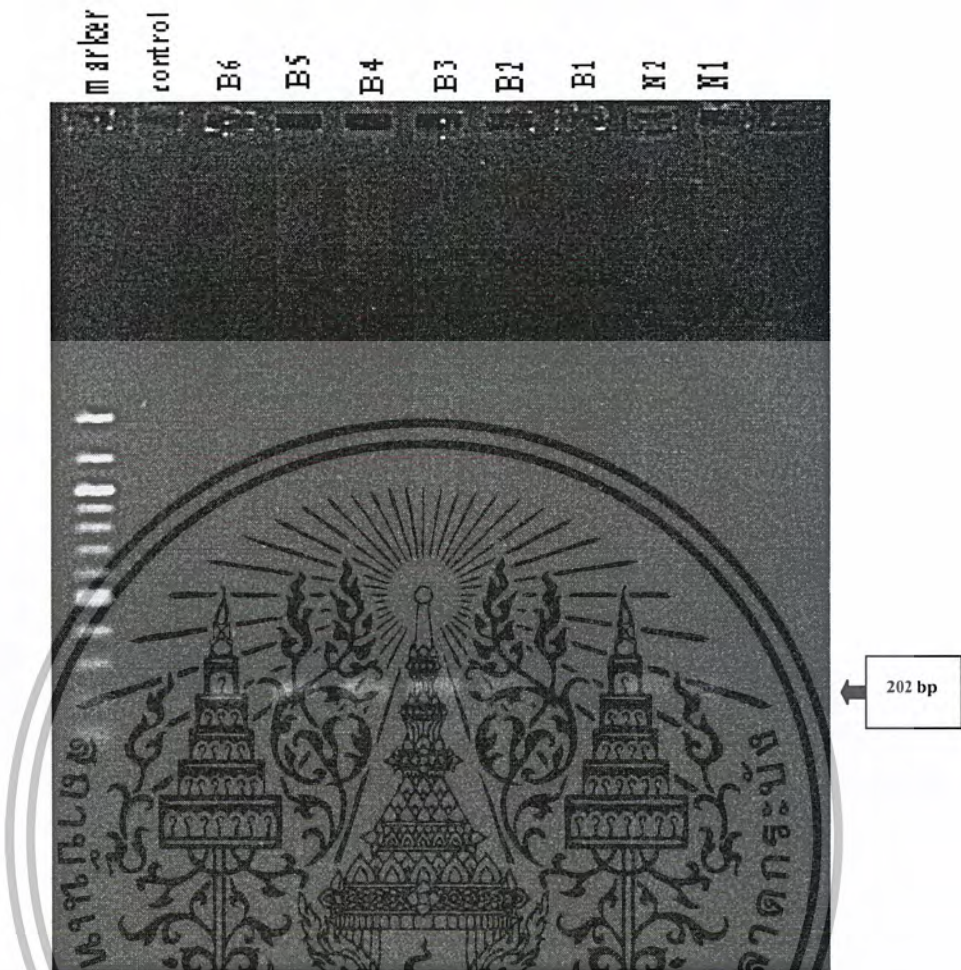
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

amplification ของตัวอย่างเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาถูกโซ-
โพลีเมอเรสในแต่ละปฏิกิริยา มีดังนี้

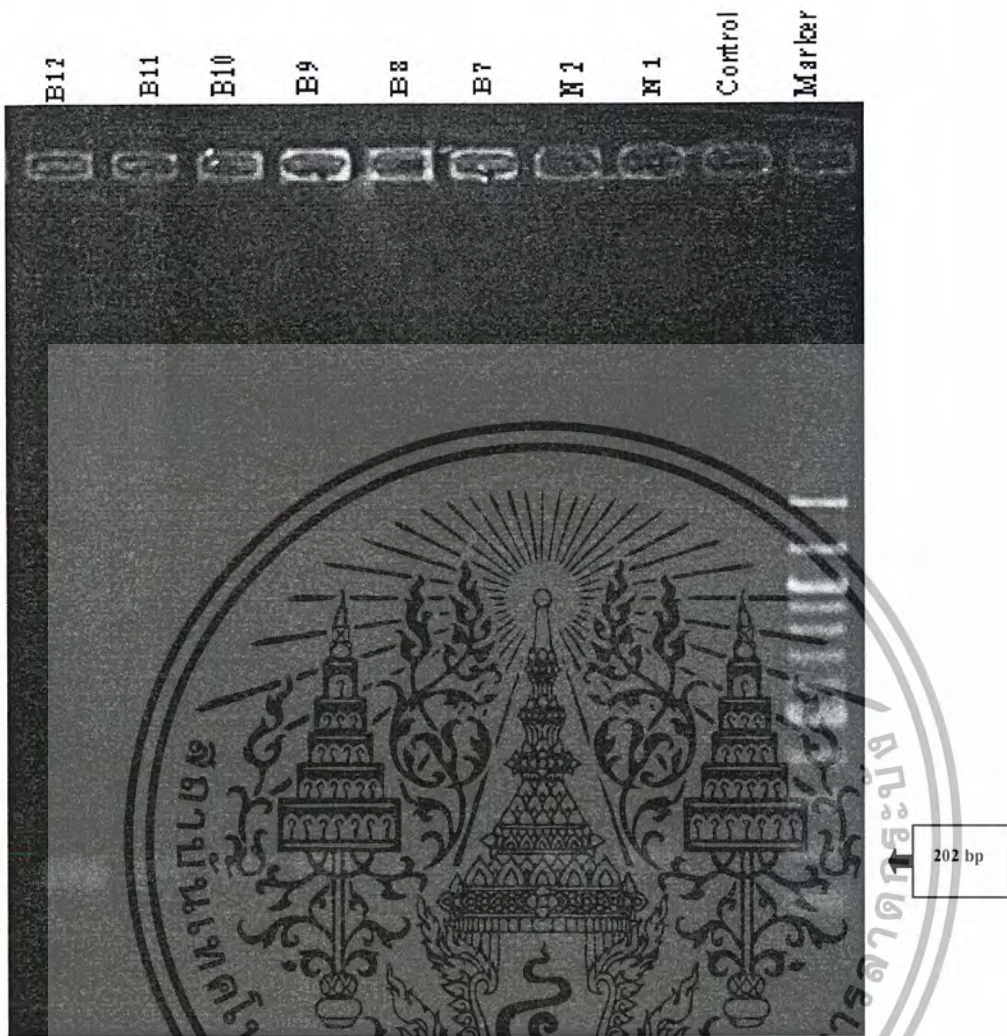
10 x PCR	5	μl
1.25 mM dNTPs	8	μl
50 mM MgCl ₂	3	μl
<i>c-myc</i> primer Forward	1	μl
<i>c-myc</i> primer Reword	1	μl
2 U Taq polymerase	0.4	μl

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์
โดยใช้เวลา 1 ชั่วโมง 40 นาที ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 27 และ 28 โดยสามารถสรุปลักษณะการ
เกิดตามความผิดปกติของยีน *c-myc* ได้ดังตารางที่ 7





รูปที่ 27 แสดงการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดย Marker 100 bp DNA ladder (เลนที่ 1), contaminate control (เลนที่ 2), ดีเอ็นเอคนปกติ (เลนที่ 9-10), ดีเอ็นเอเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ B6-B1 (เลนที่ 3-8 ตามลำดับ)



รูปที่ 28 แสดงการทำเจลอิเล็กโตร โฟริซิสของตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดย Marker 100 bp DNA ladder (เลนที่ 1), contaminate control (เลนที่ 2), ดีเอ็นเอคนปกติ (เลนที่ 3-4), ดีเอ็นเอเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ B7-B12 (เลนที่ 5-10 ตามลำดับ)

จากรูปที่ 27 และ 28 แสดงให้เห็นถึงการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่-โพลีเมอเรสขนาด 202 คู่เบส และแสดงให้เห็นถึงความเข้มของแถบดีเอ็นเอ โดยเลน contaminate control ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเนื่องจากใช้น้ำปราศจากไอออนแทนการใส่ดีเอ็นเอ ทำให้ไม่มีปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายจึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และจากรูปที่ 27 และ 28 พบว่าตัวอย่าง B1, B7, B8 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับเลน Control พบว่าตัวอย่าง B7 ไม่มีปริมาณดีเอ็นเอดังรูปที่ 28 จึงทำให้การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแล้วไม่พบแถบดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับตัวอย่าง B1

เมื่อทำการสืบค้นจากประวัติคนไข้พบว่าเป็นดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อที่ตายแล้วไม่ใช่ดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มะเร็งและตัวอย่าง B7 มีปริมาณของดีเอ็นเอน้อย เมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจึงทำให้ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และตัวอย่าง B2, B10, B11 มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอเท่ากับตัวอย่างของคนปกติ และตัวอย่าง B3, B4, B5, B6, B9, B12 มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากกว่าตัวอย่างของคนปกติ

ตารางที่ 7 แสดงลักษณะสภาพทางคลินิกและลักษณะการเกิดความผิดปกติของแต่ละตัวอย่าง

ตัวอย่าง	อายุ (ปี)	ลักษณะเนื้อเยื่อ	เกรด	ลักษณะการเกิดความผิดปกติ
B1	65	NF	NF	-
B2	72	TCC	3	+
B3	68	TCC	2	++
B4	43	TCC	1-2	++
B5	58	TCC	3-4	++
B6	65	TCC	1-2	++
B7	72	TCC	3-4	-
B8	55	TCC	3-4	-
B9	63	TCC	2	++
B10	63	TCC	3-4	+
B11	55	TCC	2-3	+
B12	60	TCC	3-4	++
NM (normal)	NF	BLOOD	NF	+
NO (normal)	NF	BLOOD	NF	+

TCC – transitional cell cacinoma, NF – ไม่ปรากฏ (not found)

- ไม่มีการ amplified
- + มีการเกิด amplified เท่ากับตัวอย่างดีเอ็นเอของคนปกติ
- ++ มีการเกิด amplified มากกว่าตัวอย่างดีเอ็นเอของคนปกติ

จากตารางที่ 7 พบว่าตัวอย่างที่ B1, 7 และ 8 ไม่มีการเกิดแถบดีเอ็นเอเมื่อเทียบกับตัวอย่าง

ดีเอ็นเอของคนปกติ และตัวอย่างที่ B2, 10 และ 11 มีการเกิด amplified เท่ากับตัวอย่างดีเอ็นเอของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คนปกติ และตัวอย่างที่ B3, 4, 5, 6, 9 และ 12 เกิดการ amplified มากกว่าตัวอย่างดีเอ็นเอของคนปกติ โดยสามารถคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์

จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดการ amplified ระหว่างตัวอย่างดีเอ็นเอคนไข้โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและตัวอย่างดีเอ็นเอของคนปกติ พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 3 กรณี แสดงดังตารางที่ 7 คือ

- เกิดการ amplified ของตัวอย่างเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมากกว่าตัวอย่างดีเอ็นเอของคนปกติ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้งหมด แสดงได้ว่าการเพิ่มจำนวนชุดของลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีน *c-myc* เมื่อเทียบกับคนปกติ

- เกิดการ amplified ของตัวอย่างเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเท่ากับตัวอย่างดีเอ็นเอของคนปกติ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้งหมด แสดงได้ว่าลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีน *c-myc* ไม่มีการเพิ่มจำนวนชุดขึ้นเมื่อเทียบกับคนปกติ อาจเนื่องมาจากการเกิดเป็นเซลล์มะเร็งมีหลายสาเหตุ ซึ่งอาจจะเกิดจากความผิดปกติของยีนอื่น ๆ ที่ไม่เกิดการเพิ่มจำนวนชุดดีเอ็นเอ เช่นการเกิดการขาดหายไปของยีน *P53* (Robert และคณะ, 2003)

- ไม่เกิดการ amplified ของตัวอย่างเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของคนปกติ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้งหมด แสดงได้ว่าไม่มีปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายหรือมีดีเอ็นเอเล็กน้อยเกินไปในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ดังตัวอย่างที่ B7 สำหรับตัวอย่างที่ B1 และ B8 ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเออาจเนื่องมาจากการเกิดการกลายพันธุ์แบบ point mutation ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าคู่ได้ ดังเช่นการทดลองของ Christoph ไม่พบการเกิด amplification ในตัวอย่างเนื้อเยื่อ (Christoph และคณะ, 1999)

จากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าการเกิดความผิดปกติของยีน *c-myc* โดยส่วนใหญ่จะเกิดความผิดปกติแบบเกิดการเพิ่มจำนวนชุดของลำดับดีเอ็นเอของยีน *c-myc* และการเพิ่มจำนวนชุดของลำดับดีเอ็นเอของยีน *c-myc* นั้นเป็นความผิดปกติหนึ่งที่เกิดขึ้นในโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และมักจะเกิดในผู้ที่มีอายุมาก ประมาณ 40-70 ปี โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาทั้งหมด 12 ตัวอย่าง โดยการเกิดความผิดปกติที่พบเกิดขึ้น 3 ลักษณะคือ เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของลำดับดีเอ็นเอของยีน *c-myc* ที่มากกว่าตัวควบคุม (ดีเอ็นเอคนปกติ) เท่ากับ 50 % (6/12) เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของลำดับดีเอ็นเอของยีน *c-myc* ที่เท่ากับตัวควบคุม 25 % (3/12) และไม่เกิดการเพิ่ม

จำนวนชุดของลำดับดีเอ็นเอเมื่อทำด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเท่ากับ 25 % (3/12) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อแบ่งตามลักษณะของเพศ พบว่าเพศชายมีการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะแบบมีการเกิดการ amplification ของยีน *c-myc* เท่ากับ 55 % (6/11) และในเพศหญิงไม่เกิด amplification 100 % (1/1) และเมื่อแบ่งตามระดับเกรดของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบว่า เกรดที่ 1-2 มีการเกิดการ amplification 100 % (4/4) และระดับเกรดที่ 2-3 มีการเกิดการ amplification 50 % (2/4) และเกิดการ amplification ที่เท่ากับตัวอย่างคนปกติ 50 % (2/4) เช่นกัน ส่วนระดับเกรดที่ 3-4 จะมีการเกิดการ amplification 33.3 % (2/6) และเกิดการ amplification ที่เท่ากับตัวอย่างคนปกติ 33.3 % (2/6) และไม่เกิด amplification 33.3 % (2/6)

ตารางที่ 8 แสดงการเกิดความผิดปกติของยีน *c-myc* ในลักษณะต่างๆ ที่สัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ

ลักษณะต่าง ๆ	Amplification	Amplification เท่ากับ normal	not amplification
- ตัวอย่าง	50 % (6/12)	25 % (3/12)	25 % (3/12)
- เพศ			
ชาย	55 % (6/11)	27 % (3/11)	18 % (2/11)
หญิง	-	-	100 % (1/1)
- Grade			
G 1-2 (case B3, B4, B6, B9)	100 % (4/4)	-	-
G 2-3 (case B2, B3, B9, B11)	50 % (2/4)	50 % (2/4)	-
G 3-4 (case B2, B5, B7, B8, B10, B12)	33 % (2/6)	33 % (2/6)	33 % (2/6)

เมื่อ (-) ไม่มีข้อมูล

จากการทดลองพบว่าเกิดการเพิ่มขึ้นแบบเป็นชุดของยีน *c-myc* ในโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองของ Christoph และคณะ (1999) ที่ทำการวิเคราะห์การ

เกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ในโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ด้วยเทคนิค competitive PCR พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดการ amplification ของยีน *c-myc* ในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะถึง 35 % (14/40) และพบการ amplification ของยีน *c-myc* แบบ high increase amplification ทั้งหมด 3 ตัวอย่างที่อยู่ในระยะ pT3 และเกรด G3 เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Pawel และคณะ (2001) ที่ทำการวิเคราะห์การเกิด amplification ของยีน *c-myc* ในมะเร็งเต้านมด้วยเทคนิค PCR ซึ่งพบความผิดปกติของการเกิด amplification ของยีน *c-myc* ถึง 21 % และผลการทดลองของ Abba และคณะ (2004) ที่ทำการวิเคราะห์การเกิด amplification ของยีน *c-myc* ในมะเร็งปากมดลูก ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งพบความผิดปกติโดยเกิดการ amplification ของยีน *c-myc* ถึง 24 และให้ผลขัดแย้งกับการทดลองของ Christoph และคณะ (1999) พบว่าการเกิด amplification ของยีน *c-myc* ในโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจะเกิดขึ้นในระยะของเนื้อเยื่อมะเร็งที่รุนแรง และระดับเกรดที่รุนแรง



บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยทำการศึกษาในตำแหน่งของยีน *c-myc* จากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 12 ตัวอย่าง และทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ส โดยได้ทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะต่อการศึกษา ยีน *c-myc* พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาด 202 คู่เบส และการหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาโพลีเมอร์ส พบว่าปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมอยู่ที่ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และปริมาตรของ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 50 mM ที่ปริมาตร 3 μ l เหมาะสมที่สุด เมื่อทำการทดลองปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์สกับตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้ง 12 ตัวอย่าง พบว่าเกิดความผิดปกติ 3 ลักษณะคือ การเกิด amplification ของยีน *c-myc* ที่มากกว่าตัวอย่างดีเอ็นเอคนปกติเท่ากับ 50 % การเกิด amplification ของยีน *c-myc* ที่เท่ากับตัวอย่างดีเอ็นเอคนปกติเท่ากับ 25 % และไม่เกิดการ amplification ของยีน *c-myc* เมื่อทำด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์สเท่ากับ 25 %

เมื่อทำการศึกษาโดยแบ่งตามลักษณะของเพศ พบว่าในเพศชายพบการเกิด amplification บริเวณของยีน *c-myc* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะถึง 55 % โดยในเพศหญิงไม่เกิด amplification เท่ากับ 100 % และเมื่อแบ่งตามระดับเกรดของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบว่า เกรดที่ 1-2 มีการเกิด amplification ที่มากกว่าตัวอย่างดีเอ็นเอคนปกติเท่ากับ 100 % และระดับเกรดที่ 2-3 มีการเกิด amplification ที่มากกว่าตัวอย่างดีเอ็นเอคนปกติเท่ากับ 50 % และเกิด amplification ที่เท่ากับตัวอย่างคนปกติ 50 % เช่นกัน ส่วนระดับเกรดที่ 3-4 มีการเกิด amplification ที่มากกว่าตัวอย่างดีเอ็นเอคนปกติเท่ากับ 33.3 % และเกิด amplification ที่เท่ากับตัวอย่างคนปกติ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับไม่เกิด amplification เกิดขึ้น 33.3 %

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากในการทดลองนี้ได้ใช้ตัวอย่างในการทดลองน้อยเกินไป จึงควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างเนื้อเยื่อให้มากขึ้น เพื่อให้ผลการทดลองเป็นที่น่าเชื่อถือมากขึ้น

บรรณานุกรม

- กนกพร สมพรไพลิน. 2547. เอกสารบทปฏิบัติการเรื่องการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ.
- นเรศ สุขเจริญ., อภิวัฒน์ มุทิตางกูล., ยืน ภู่วรรณ. 2541. **อณูชีววิทยาทางการแพทย์.** กรุงเทพฯ:โครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วสันต์ จันทราพิศ และคณะ. 2544. ชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics). การใช้บริการค้นหาและวิเคราะห์ข้อมูลด้านอณูชีววิทยานบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต. 71-104.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อมรา คัมภีรานนท์. 2546. มะเร็ง โครโมโซมและ oncogene. **พันธุศาสตร์ของเซลล์.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 241-245.
- Abba M.C., Laguens R.M., Dulout F.N., and Golijow C.D. 2004. The *c-myc* activation in cervical carcinomas and HPV 16 infections. **Genetic toxicology and environmental mutagenesis.** 557(2):151 – 158.
- Borg A., Baldetorp B., Fern M., Olsson H. and Sigurdsson H. 1992. *c-myc* amplification is an independent prognostic factor in postmenopausal breast cancer. **International journal of cancer.** 51:687 - 691.
- Bruch J., Wöhr G., Hautmann R., Mattfeldt T., Bruderlein S., Möller P., Sauter S., Hameister H., Vogel W. and Paiss T. 1998. Chromosomal changes during progression of transitional cell carcinoma of the bladder and delineation of the amplified interval on chromosome arm 8q. **Gene chromoosomes Cancer.** 23:167-174.
- Christoph F., Schmidt B., Schmitz-Drager B.J., Schulz W.A. 1999. Over-expression and amplification of the *c-myc* gene in human urothelial carcinoma. **International journal of cancer.** 84(2):169 - 73.
- Gardner L., Lee L. and Dang C. 2002. The *c-myc* oncogenic transcription factor. **The encyclopedia of cancer.** 2:1 - 13.
- Hong S.J., Lee T., Park Y.S., Lee K.O., Chung B.H. and Lee S.H. 1996. A PCR-RFLP method for the detection of activated *H-RAS* oncogene with a point mutation at codon 12 and 61. **Yonsei medical journal.** 37(6):371 - 379.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Iba T., Kigawa J., Kanamori Y., Itamochi H., Oishi T., Simada M., Uegaki K., Naniwa J. and Terakawa N. 2004. Expression of the *c-myc* gene as a predictor of chemotherapy response and a prognostic factor in patients with ovarian cancer. **Cancer science**. 95:418-423.
- Karasawa M., Okamoto K., Maehara T., Tsukamoto N., Morita K., Naruse T. and Omine M. 1996. Detection of *c-myc* oncogene amplification in a cyblastic phase patient with double minute chromosomes. **Leukemia research**. 20:85-91.
- Logan J.A., Seizinger B.R., Atkins L., Martuza R.L. 1990. Loss of the Y chromosome in meningiomas. A molecular genetic approach. **Cancer genetics and cytogenetics**. 45:41-47.
- Pawel C., Jaroslaw S., Andrzej K. and Tadeusz P. 2001. Amplification of *c-myc* gene and overexpression of *c-myc* protein in breast cancer and adjacent non-neoplastic tissue. **Clinical biochemistry**. 34:557 - 562.
- Przybojewska B., Jagiello A. and Jalmuzna P. 2000. *H-RAS*, *K-RAS*, and *N-RAS* gene activation in human bladder cancers. **Cancer genetics and cytogenetics**. 121(1): 73 - 77.
- Robert S., Peter W. and Arndt H. 2003. Lasermicrodissection--an important prerequisite for the molecular-genetic analysis of bladder cancer. **Pathology research and practice**. 199(6):355 - 362.
- Rosemary W., Kazuko N., Jennifer S., Abbas A.R., Carlo M.C. and Giovanni R. 1983. The structure and nucleotide sequence of the 5' end of the human *c-myc* oncogene. **Genetics**. 80: 6307 - 6311.
- Sauter G., Carrol P., Moch H., Kallioniemi A., Kerschmann R., Narayan P., Mihatsch M.J. and Waldman FM. 1995. *c-myc* copy number gain in bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. **American journal of pathology**. 146: 1131-1139.
- Strefford J.C., Lillington D.M., Steggall M., Lane T.M., Nouri A.M., Young B.D. and Oliver R.T. 2002. Novel chromosome findings in bladder cancer cell lines detected with multiplex fluorescence in situ hybridization. **Cancer genetics and cytogenetics**. 135(2):139 - 146.

Watson P.H., Safneck J.R., Le K., Dubik D. and Shiu R.P.C. 1993. Relationship of *c-myc* amplification to progression of breast cancer from in situ to invasive tumor, and lymph node metastasis. **Journal of the national cancer institute**. 85:902 - 907.

<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>

<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna>

<http://www.cancerhelp.org.uk/help/default.asp?page=2703>

<http://www.cancervic.org.au/cancer1/patients/cervical/whatscancer.htm>

<http://www.electrophoresis.apbiotech.com/>

<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/www.cgi>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

http://www.siamca.com/Backup2002/3_14.html

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/O/Oncogenes.html>

