สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การตรวจสอบโครโมโซม Y ในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดย เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

นางสาวจินดานันท์ หิรัญจันทร์

นายเจษฎา สว่างเนตร

วพ.
ล4736
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72600
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

b. 11769890
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Detection of Y Chromosome in Bladder Cancer Tissue

by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

Jindanan Hiranchan

Chetsada Sawangnet

A Special Project Submitted in Partial 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 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การตรวจสอบโครโมโซม Y ในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)
นักศึกษา	นางสาวจินดานันท์ หิรัญจันทร์ รหัส 46050114
	นายเจษฎา สว่างเนตร รหัส 46050632
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์	
กรรมการ	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

.....
(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การตรวจสอบโครโมโซม Y ในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

นักศึกษา นางสาวจินตานันท์ หิรัญจันทร์

นายเจษฎา สว่างเนตร

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2549

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

ในประเทศไทย โรคมะเร็งเป็นสาเหตุของการตายเป็นอันดับ 3 รองลงมาจากโรคหัวใจและอุบัติเหตุ โดยในเพศชายโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเป็นมะเร็งชนิดที่พบมากที่สุดเป็นอันดับ 5 การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงความผิดปกติของโครโมโซม Y ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 4 ราย โดยเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization บริเวณตำแหน่งเซนโทร-เมียร์ของโครโมโซม X และโครโมโซม Y ด้วยตัวติดตามสำเร็จรูปของบริษัท Vysis พบความผิดปกติในหลายๆรูปแบบ แต่ที่ตรวจพบได้มากที่สุด คือ การขาดหายไปของโครโมโซม โดยคิดเป็นร้อยละ 47.58 จึงอาจกล่าวได้ว่าการขาดหายไปของโครโมโซม Y มีผลเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Detection of Y Chromosome in Bladder Cancer Tissue by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

Name Jindanan Hiranjan

Chetsada Sawangnet

Department Applied Biology

Program Biotechnology

Academic Year 2006

Special Project Advisor Asst. Prof. Dr. Supattar Poeaim

ABSTRACT

In Thailand, cancer is the cause of death of many people at the third. First and second in heart disease and accident. Bladder cancer that has been found in male at the fifth. In this study, Y chromosome aberration was studied in four male bladder cancer patients by Fluorescence *in situ* Hybridization technique with DNA probe specific to centromeric of Y and X chromosome. In this experiment was found various types of abnormality chromosome. The most of aberration at 47.58 % is deletion of Y chromosome. Thus, the deletion of Y chromosome is cause of bladder carcinogenesis.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ถูกจัดทำขึ้นเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และโครงงานพิเศษนี้จะสำเร็จลงไม่ได้หากขาดซึ่งความกรุณาจาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ให้ความรู้และคำแนะนำที่มีประโยชน์ตลอดทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างสูง จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์ ประธานกรรมการ และ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อคุมสอบโครงงานพิเศษนี้ รวมทั้งคำแนะนำต่างๆที่มีประโยชน์แก่ข้าพเจ้าเป็นผลให้โครงงานพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์แบบมากขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ และแม่บ้านทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ตลอดทั้งเพื่อนๆนักศึกษาทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีเสมอมา ทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินงานได้อย่างราบรื่น และมีประสิทธิภาพ

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และทุกคนในครอบครัวที่ให้คำแนะนำในการทำงานที่มีคุณค่าและมีประโยชน์อย่างมาก ตลอดทั้งกำลังใจที่มีให้ด้วยดีตลอดมา

ข้าพเจ้าขอมอบประโยชน์ที่พึงจะได้รับจากโครงงานพิเศษฉบับนี้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นางสาวจินดานันท์ หิรัญจันทร์
นายเจษฎา สว่างเนตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 กระเพาะปัสสาวะ	3
2.2 มะเร็ง	3
2.3 มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	8
2.3.1 ชนิดของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	8
2.3.2 อาการของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	10
2.3.3 การตรวจและวินิจฉัย	10
2.3.4 การรักษาโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	11
2.4 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)	11
2.4.1 การเตรียมตัวติดตาม (DNA probe)	12
2.4.2 การติดสารเรืองแสงตัวติดตาม	14
2.4.3 Hybridization	15
2.4.4 การตรวจสอบสัญญาณ	15
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	17
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	17
3.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*	17
3.1.2 การสกัด Plasmid DNA	17
3.1.3 การตรวจสอบขนาดและปริมาณดีเอ็นเอ	17
3.1.4 การติดฉลากตัวติดตามด้วยวิธี Nick translation	18
3.1.5 การตกตะกอนตัวติดตาม	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1.6 การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ	18
3.1.7 การ Pretreatment slide	19
3.1.8 Hybridization	19
3.1.9 Washing	20
3.1.10 การตรวจสอบสัญญาณ	21
3.2 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	21
3.3 วิธีการทดลอง	21
3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*	21
3.3.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin	22
3.3.3 การหาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง	23
3.3.4 การติดฉลากตัวดิดตามโดยวิธี Nick translation	24
3.3.5 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า	25
3.3.6 การดกดะกอนตัวติดตาม	25
3.3.7 การเตรียมสไลด์	26
3.3.8 การ Pretreatment slide	27
3.3.9 Hybridization	27
3.3.10 Washing	28
3.3.11 การตรวจสอบสัญญาณ	29
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	30
4.1 การเตรียมสไลด์	30
4.2 การเตรียมตัวติดตาม	30
4.3 การตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม ด้วยเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization โดยตัวติดตามสำเร็จรูปของบริษัท Vysis	31
4.4 การตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม ด้วยเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization โดยตัวติดตามที่สร้างขึ้น	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงชนิดของ BAC clone ที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นตัวติดตาม	21
3.2 แสดงสารต่างๆและปริมาณที่ใช้ในการทำ Nick translation โดยชุดสำเร็จรูปของ Vysis	24
4.1 ผลการตรวจนับสัญญาณที่ได้จากการใช้เทคนิค FISH ในเซลล์ผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ตำแหน่งของกระเพาะปัสสาวะและอวัยวะข้างเคียงในเพศชายและหญิง	3
2.2 กระบวนการเกิดเซลล์มะเร็ง	4
2.3 การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งสู่อวัยวะอื่นๆ	7
2.4 แสดงลักษณะมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะชนิด Transition cell carcinoma (TCC)	9
2.5 แสดงลักษณะมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะชนิด Squamous cell carcinoma (SCC)	9
2.6 แสดงลักษณะมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะชนิด Adenocarcinoma (AC)	10
2.7 แสดงการใช้กล้องขนาดเล็กสอดเข้าไปเพื่อตรวจความผิดปกติของกระเพาะปัสสาวะ	10
2.8 หลักการศึกษาด้วยเทคนิค FISH	12
2.9 แสดงการติดฉลากด้วยวิธี Nick translation	13
2.10 แสดงการติดฉลากตัวติดตามชนิด indirect และ direct label probe	14
2.11 แสดงการตรวจผลการย้อมสีโครโมโซมด้วยเทคนิค FISH ในเซลล์ระยะ Interphase (ก.) และ Metaphase (ข.) ตามลำดับ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์	15
4.1 การเปรียบเทียบขนาดพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอ (ก.) และหลังการทำ Nick translation (ข.) โดยวิธีการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า	31
4.2 ผลการตรวจสอบสัญญาณสารเรืองแสงในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะด้วยเทคนิค FISH โดยตัวติดตามสำเร็จรูปของ Vysis	32
4.3 ผลการตรวจสอบสัญญาณสารเรืองแสงในเนื้อเยื่อมะเร็งกระปัสสาวะด้วยเทคนิค FISH โดยตัวติดตามที่สร้างขึ้น	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุที่คร่าชีวิตของประชากรไทยมากเป็นอันดับ 3 รองลงมาจากโรคหัวใจและอุบัติเหตุ มะเร็ง คือ ก้อนเนื้อที่เติบโตโดยมีการสูญเสียคุณสมบัติการเจริญและการแบ่งเซลล์อย่างปกติ โดยมีสาเหตุการเกิดจากหลายปัจจัยรวมกันทั้งสภาพแวดล้อม การติดเชื้อและทางพันธุกรรม ซึ่งกระบวนการเกิดเป็นมะเร็ง (carcinogenesis) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นจากกลไกมีการสะสมความผิดปกติทางพันธุกรรมหรือมิวเทชั่นเป็นระยะเวลานานจนเกิดเป็นเซลล์มะเร็ง (อมรา, 2546)

ในประเทศไทยพบโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในเพศชายได้มากกว่าเพศหญิง โดยเป็นอันดับ 5 ในเพศชายและมีโอกาสเกิดขึ้น 5.2 คนต่อจำนวนประชากรหนึ่งแสนคน ผู้ป่วยเพศชายที่เป็นโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีความทุกข์ทรมานต่อการขับถ่ายปัสสาวะเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งกระเพาะสามารถตรวจได้จากการดูจากลักษณะภายนอกของตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยซึ่งจะเป็นระยะที่เซลล์มะเร็งมีการพัฒนาไปมากแล้ว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาและวิจัยหาเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยเพื่อให้ทราบถึงสาเหตุหรือการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่การเกิดมะเร็งในระยะเริ่มแรก เพื่อให้การวินิจฉัย การรักษา และการป้องกันให้เป็นไปอย่างถูกต้องและทันท่วงที

เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) นั้นเป็นเทคนิคที่น่าสนใจ มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบช่วงลำดับเบสที่สนใจหรือยีนบนแท่งโครโมโซม (Gene mapping) โดยผสมผสานงานทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลและด้านไซโตเจเนติกเข้าด้วยกัน เพื่อตรวจหาตำแหน่งของยีนโดยใช้สัญญาณสารเรืองแสง (Fluorophores) เทคนิค FISH เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่แม่นยำและรวดเร็ว การตรวจด้วยเทคนิคนี้สามารถกระทำได้ในโครโมโซมทั้งในระยะอินเทอร์เฟส (Interphase) และระยะเมทาเฟส (Metaphase) หลักการของเทคนิค FISH เป็นการเข้าคู่กัน (Hybridization) ระหว่างตัวติดตาม (Probe) ที่ถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสงกับโครโมโซม โดยตัวติดตามที่ใช้ได้เป็นทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสคู่สมกับยีนหรือโครโมโซมที่ต้องการศึกษา

ในประเทศไทย มีการศึกษาในระดับโมเลกุลในเนื้อเยื่อมะเร็งน้อยมาก สำหรับในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสวะ สุพัตรา และคณะ (2546) ได้ทำการศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรม โดยเทคนิค Comparative Genomic Hybridization (CGH) พบว่ามีการขาดหายไปของโครโมโซม Y ในมะเร็งชนิดที่ไม่ลุกลามคิดเป็นร้อยละ 25 และในมะเร็งชนิดที่ลุกลามร้อยลุกลามร้อยละ 36.36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะทำการศึกษาถึงความผิดปกติของโครโมโซม Y ของผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเพศชายในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค FISH

โดยการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อ

1. ตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม Y ในเนื้อเยื่อะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยเทคนิค FISH

2. พัฒนาตัวติดตามชนิด Direct label

3. เพื่อเรียนรู้และพัฒนาทักษะทางกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ ตลอดจนพัฒนาเจตคติที่ดีต่อการเป็นนักวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 กระเพาะปัสสาวะ

กระเพาะปัสสาวะ คือ อวัยวะที่ตั้งอยู่ที่บริเวณท้องน้อยในอุ้งเชิงกรานด้านหลังของกระดูกหัวเหน่า ซึ่งในผู้ชายจะอยู่ข้างหน้าทวารหนัก ในผู้หญิงอยู่ข้างหน้าตรงบริเวณด้านหน้าของช่องคลอด และคอมดลูก ดังรูปที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างประกอบด้วยกล้ามเนื้อดีทรูเซอร์ (Detrusor) 3 ชั้น ชั้นในและชั้นนอกเรียงตัวตามยาว ส่วนชั้นกลางเรียงตัวเป็นวงกลม ผนังด้านในสุดของกระเพาะปัสสาวะมีรอยย่น (Rugae) ซึ่งทำให้สามารถยืดขยายรองรับน้ำปัสสาวะได้มากขึ้น กระเพาะปัสสาวะมีช่องเปิด 3 ช่อง คือ ช่องบน 2 ช่อง เป็นที่เปิดของท่อไต อีก 1 ช่อง เปิดด้านล่างเป็นที่ตั้งต้นของท่อปัสสาวะ ซึ่งผนังด้านในของกระเพาะปัสสาวะตรงบริเวณรูเปิดทั้ง 3 แห่งนี้เป็นแอ่งรูปสามเหลี่ยม และเป็นบริเวณที่ไม่มีการหดหรือขยายตัวตามปริมาณของปัสสาวะ บริเวณส่วนล่างของกระเพาะปัสสาวะตรงคอคอดคับท่อปัสสาวะส่วนต้นมีกล้ามเนื้อหูรูด ทำหน้าที่เป็นหูรูดชั้นในปิดกั้นไม่ให้ปัสสาวะไหลออกมา ความจุของกระเพาะปัสสาวะมีความแตกต่างในแต่ละบุคคลและวัยสำหรับผู้ใหญ่ประมาณ 150 - 500 มิลลิลิตร สามารถกระตุ้นให้รู้สึกปวดอยากถ่ายปัสสาวะ แต่สามารถพบได้ว่ากระเพาะปัสสาวะสามารถขยายรับน้ำปัสสาวะได้มากถึง 1,000 - 3,000 มิลลิลิตร (http://classroom.psu.ac.th)

รูปที่ 2.1 ตำแหน่งของกระเพาะปัสสาวะและอวัยวะข้างเคียงในเพศชายและหญิง
(ที่มา : http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/1122.htm)

2.2 มะเร็ง

มะเร็ง คือ กลุ่มอาการของโรคที่เกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์ของร่างกายเกิดความผิดปกติที่ดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตและมีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวดเร็วและมากกว่าปกติ ดังรูปที่ 2.2 ดังนั้นจึงอาจทำให้เกิดก้อนเนื้อผิดปกติและในที่สุดก็ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ในก้อนเนื้อนั้น เนื่องจากขาดเลือดไปเลี้ยง เพราะการเจริญเติบโตของก้อนเนื้อร้าย ถ้าเซลล์พวกนี้เกิดอยู่ในอวัยวะใดก็สามารถเรียกชื่อมะเร็งตามอวัยวะนั้นเช่น มะเร็งปอด มะเร็งสมอง มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น เท่าที่มีรายงานไว้ในขณะนี้มะเร็งที่พบในร่างกายมนุษย์มีมากกว่า 100 ชนิด โดยการเปลี่ยนแปลงของมะเร็งจะมีหลายระยะดังนี้

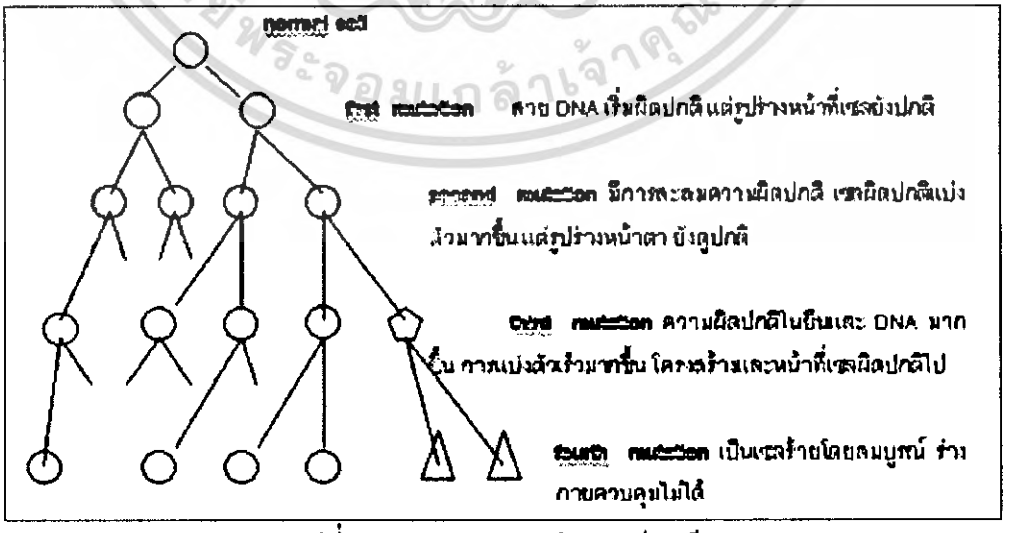
ระยะเริ่มต้น (Initiation) เป็นระยะที่สารพันธุกรรมที่อยู่ภายในเซลล์เริ่มเกิดการผิดปกติอันเกิดจากการได้รับสารก่อมะเร็งหรือกระบวนการอื่นๆ

ระยะส่งเสริม (Promotion) สารพันธุกรรมที่ผิดปกติจะมีการส่งเสริมให้เกิดความผิดปกติมากขึ้น

ระยะเปลี่ยนแปลงเป็นโรคมะเร็ง (Conversion) เซลล์ที่สารพันธุกรรมภายในผิดปกติเกิดการเปลี่ยนแปลงกลายไปเป็นเซลล์มะเร็ง

ระยะแพร่กระจาย (Progression) เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปสู่อวัยวะข้างเคียงหรือส่วนต่างๆของร่างกายโดยผ่านทางเดินน้ำเหลืองหรือกระแสเลือด

มะเร็งแต่ละชนิดจะมีการดำเนินของโรคไม่เหมือนกัน เช่น มะเร็งปอด มะเร็งสมอง จะมีการดำเนินชนิดของโรคที่รุนแรง ผู้ป่วยจะมีชีวิตการอยู่รอดสั้นกว่าผู้ป่วยมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น ดังนั้นการรักษามะเร็งแต่ละชนิดจะไม่เหมือนกัน มีวิธีการรักษาที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอวัยวะที่เป็นมะเร็ง ระยะของมะเร็ง สภาพร่างกาย และความเหมาะสมของผู้ป่วยโรคมะเร็ง การรักษาจะยากหรือง่ายนั้นก็ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์มะเร็งและการดำเนินโรคของมะเร็งด้วย เช่น มะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งผิวหนัง รักษาง่ายกว่า มะเร็งปอด มะเร็งสมอง เป็นต้น (http://www.nci.go.th)



รูปที่ 2.2 กระบวนการเกิดเซลล์มะเร็ง

(ที่มา : http://dental.anamai.moph.go.th/)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาเหตุของการเกิดมะเร็งนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่ามีปัจจัยหลายๆ อย่างร่วมกัน ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ ปัจจัยภายในและภายนอกร่างกาย

1. ปัจจัยภายในร่างกาย ได้แก่

- ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย
- เชื้อชาติ เช่น ชาวญี่ปุ่นเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารมาก ชาวจีนเป็นมะเร็งของโพรงหลังจมูก และหลอดอาหารมาก
- เพศ เช่น มะเร็งตับ มะเร็งปอด พบมากในเพศชาย มะเร็งเต้านมและมะเร็งผิวหนัง พบมากในเพศหญิง
- อายุ เช่น มะเร็งของลูกตา (Retinoblastoma) มะเร็งไต พบมากในเด็ก
- กรรมพันธุ์ พบว่าการเกิดมะเร็งเต้านมบางชนิด มะเร็งของต่อมไทรอยด์บางชนิด มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งตับอ่อนและมะเร็งลำไส้ใหญ่ ส่วนหนึ่งมีสาเหตุจากการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์

2. ปัจจัยภายนอกร่างกาย ได้แก่

สารกายภาพต่างๆ ได้แก่ การระคายเคืองเรื้อรัง เช่น

- ฟันปลอมที่ไม่กระชับ เวลาเคี้ยวอาหารจะมีการเสียดสีกับเหงือกหรือเพดานปาก อาจทำให้เกิดมะเร็งของเหงือก หรือเพดานปากได้
- การกินอาหารหรือดื่มเครื่องดื่มร้อนจัดเป็นประจำ อาจจะมีการระคายบริเวณหลอดอาหารอาจทำให้เป็นมะเร็งของหลอดอาหารได้
- รังสีต่างๆ ถ้าร่างกายได้รับเป็นระยะนาน ๆ ก็อาจเกิดมะเร็งอวัยวะต่าง ๆ ได้
- แสงอัลตราไวโอเลต อาจทำให้เป็นมะเร็งของผิวหนัง และริมฝีปาก ถ้าถูกแดดจัด ๆ เป็นระยะนาน ๆ

สารเคมี ในปัจจุบันพบสารก่อมะเร็ง (carcinogen) มากกว่า 450 ชนิด อยู่ในรูปของอาหาร พืช และสารเคมีต่าง ๆ เช่น

- สารหนู อาจทำให้เป็นมะเร็งของผิวหนัง
- บุหรี่ มีสารเบนซ์ไพรีน (benzpyrine) ที่เรียกว่า "ทาร์" หรือ "น้ำมันดิน" และสารเคมีพวกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon) ทำให้เกิดมะเร็งปอด ช่องปาก ลำคอ กล่องเสียง หลอดอาหาร ตับอ่อน ปากมดลูก กระเพาะปัสสาวะได้
- แอลกอฮอล์ ทำให้เกิดมะเร็งช่องปาก ลำคอ กล่องเสียง ตับ หลอดอาหาร ลำไส้ใหญ่และเต้านม
- เบนซีน ทำให้เกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว
- การเคี้ยวหมากหรือการจุกยาฉุน นอกจากจะมีการระคายเรื้อรังแล้ว ยังมีสารเคมีที่ทำให้เป็นมะเร็งของช่องปากได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สารไนโตรซามีน (nitrosamine) ในอาหาร ทำให้เกิดมะเร็งของตับ กระเพาะอาหาร และลำไส้ใหญ่

- ดีดีที เมื่อเข้าในร่างกาย อาจเปลี่ยนเป็นสารไดไนโตรซามีน ซึ่งมีฤทธิ์เหมือนไนโตรซา-มีน

ฮอร์โมน เช่น ฮอร์โมนเอสโตรเจน มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งช่องคลอด และโพรงมดลูก ฮอร์โมนแอนโดรเจน มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก

การติดเชื้อ เช่น

- การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบี และซี มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ

- การติดเชื้อไวรัสเอชพีวี (HPV/Human papilloma virus) มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก มะเร็งกล่องเสียง หรือทอนซิล

- การติดเชื้อไวรัสเอชทีแอลวี-1 (HTLV-1/Human T-cell leukemia virus) มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว และมะเร็งต่อมน้ำเหลือง

- การติดเชื้อไวรัสอีบีวี (EBV/Epstein-Bar virus) สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งต่อมน้ำเหลือง ชนิดเบอร์กิต (Burkitt's lymphoma) และมะเร็งโพรงหลังจมูก

- การติดเชื้อเอชไอวี (เอดส์) มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งของหลอดเลือดที่เรียกว่า Kaposi sarcoma

- การติดเชื้อ เอชไพโลไร (H. pylori/Helicobacter pylori) มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร

สารพิษ เช่น อะฟลาท็อกซิน (Aflatoxin) จากเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหาร ทำให้เกิดมะเร็งตับ

พยาธิ เช่น พยาธิใบไม้ตับ ทำให้เกิดมะเร็งของตับ

อาหาร เช่น

- ภาวะขาดอาหาร เช่น โรคตับแข็ง ซึ่งเกิดจากการขาดสารโปรตีน จะกลายเป็นมะเร็งตับได้ง่าย

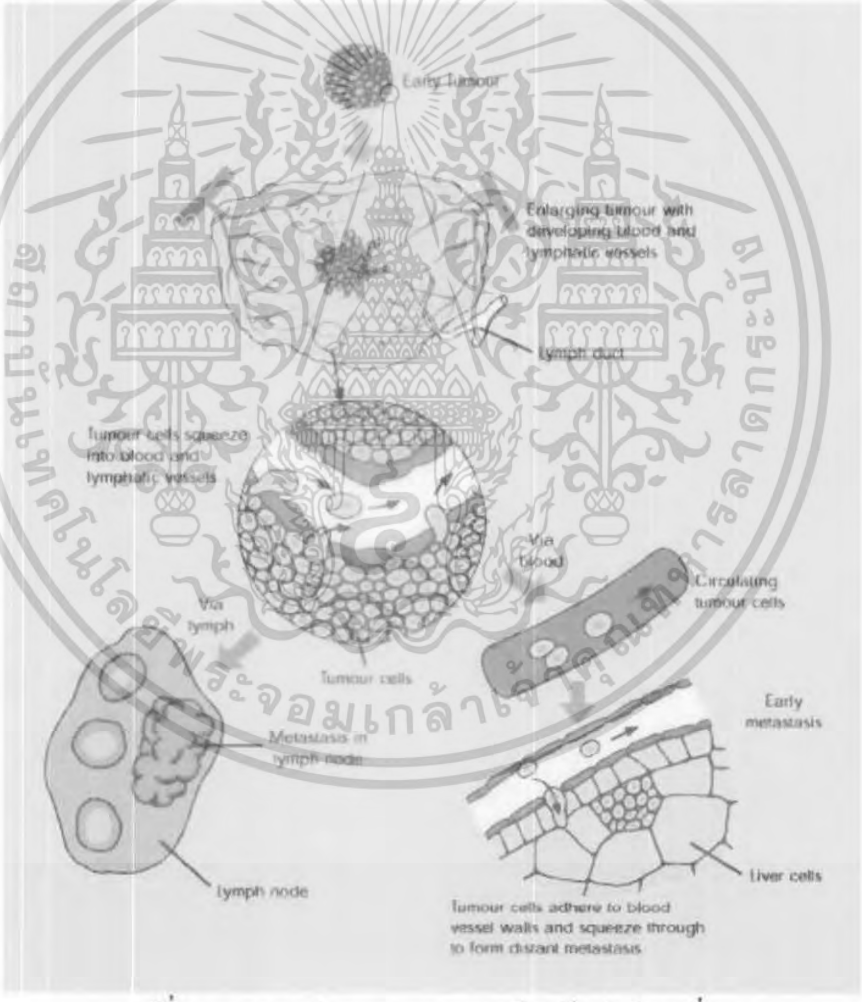
- การบริโภคอาหารพวกไขมันมาก อาจสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งเต้านม ลำไส้ใหญ่ รังไข่ ต่อมลูกหมาก มดลูก และตับอ่อน

- การบริโภคผักและผลไม้ วันละ 400-800 กรัม ช่วยลดการเกิดมะเร็งช่องปาก ลำคอ หลอดอาหารกระเพาะอาหาร ลำไส้ใหญ่ ตับอ่อน เต้านม และกระเพาะปัสสาวะ (http://www.thailabonline.com/sec7cancer.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์มะเร็งมีลักษณะทั่วไปที่แตกต่างจากเซลล์ปกติ ดังนี้

- สามารถปฏิเสธสัญญาณจากตนเองหรือเซลล์อื่นให้หยุดการแบ่งตัว (Contact inhibition)
- สามารถปฏิเสธสัญญาณการพัฒนาเฉพาะของเซลล์ (Cell differentiation) ทำให้การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ตัวอ่อนไปเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่เฉาะถูกยับยั้ง
- สามารถหลีกเลี่ยงโปรแกรมการตายของเซลล์ (Apoptosis)
- สามารถแบ่งตัวได้อย่างต่อเนื่องเป็นอมตะ (Immortalization)
- มีการสร้างเส้นเลือดใหม่จำนวนมาก (Angiogenesis) สามารถเบียดเบียนแทรกอวัยวะข้างเคียง (Invasion) หรือกระจายสู่อวัยวะห่างไกลอื่นๆ (Metastasis) ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งสู่อวัยวะอื่นๆ

(ที่มา : http://library.thinkquest.org)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คือ กลุ่มของเนื้อร้ายที่เกิดขึ้นบริเวณกล้ามเนื้อและเยื่อบุผนังของกระเพาะปัสสาวะ พบในเพศชายที่มีอายุเฉลี่ยประมาณ 50-70 ปี มากกว่าในเพศหญิง ในประเทศไทยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะสามารถพบได้มากเป็นอันดับ 5 ในเพศชาย โดยมีโอกาสเกิดขึ้น 5.2 คน ต่อจำนวนประชากรหนึ่งแสนคน และเป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในมะเร็งของระบบขับถ่ายปัสสาวะ ส่วนสาเหตุยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการสูบบุหรี่เพราะบุหรี่มีสารน้ำมันที่เรียกว่าสารทาร์ซึ่งเชื่อว่าเป็นสารก่อมะเร็ง สารชนิดนี้สามารถก่อมะเร็งได้โดยถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด และขับถ่ายออกทางปัสสาวะโดยตรง ฉะนั้นเยื่อบุกระเพาะปัสสาวะของเราจึงถูกสัมผัสโดยตรงกับสารทาร์ นอกจากนี้ยังพบว่าสีย้อมผ้าที่ปะปนมากับอาหารหรือในอุตสาหกรรมสียาง สารเคมีและสายไฟฟ้าต่างๆ ทั้งการระคายเคืองเรื้อรังของเยื่อบุกระเพาะปัสสาวะอยู่บ่อยๆ นอกจากนี้ยังพบว่าในผู้ป่วยโรคนิ่วกระเพาะปัสสาวะ หรือมีพยาธิชนิดหนึ่งที่ชอบไข่อยู่ตามผนังของกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งพบพยาธิชนิดนี้มากในแถบประเทศตะวันออกกลาง ทำให้มีการระคายเคืองเรื้อรังเรื้อรังและเกิดเป็นมะเร็งได้ (http://www.healthymanual.com) มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีทั้งประเภทที่เป็นเนื้อร้ายอยู่กับกระเพาะปัสสาวะเท่านั้น และชนิดที่สามารถแพร่กระจายไปสู่อวัยวะข้างเคียงหรือที่อยู่ติดกัน เช่น ลำไส้ตรง ลำไส้ใหญ่ ต่อมลูกหมาก มดลูก ไขกระดูกและกระดูกเชิงกราน โดยผ่านทางระบบไหลเวียนโลหิต

2.3.1 ชนิดของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

มะเร็งกระเพาะปัสสาวะสามารถแบ่งเป็นชนิดต่างๆ ได้ ตามลักษณะทาง Histopathology ได้แก่ Transition cell carcinoma (TCC), Squamous cell carcinoma, Adenocarcinoma และ Sarcomatoid variants โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือชนิด Transition cell carcinoma (TCC) พบมากถึงร้อยละ 90 ของผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้งหมด (http://library.med.utah.edu)

2.3.1.1 Transition cell carcinoma (TCC) เป็นเซลล์มะเร็งชนิดที่พบมากที่สุดถึงร้อยละ 90ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เกิดขึ้นจากการแบ่งตัวที่ผิดปกติของเนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะชั้น Transition cell (TC) หรือ Uroepithelial ที่มีหน้าที่ในการห่อหุ้ม และควบคุมการหดและขยายตัวของกระเพาะปัสสาวะ ดังรูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

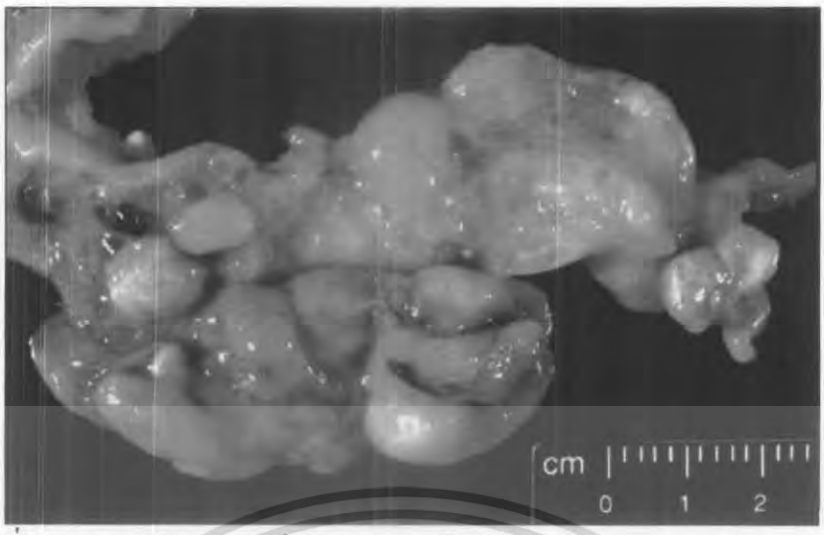
รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะชนิด Transition cell carcinoma (TCC)
(ที่มา : http://www.med.cmu.ac.th/student/patho/Kamthorn/314.html)

2.3.1.2 Squamous cell carcinoma (SCC) เป็นเซลล์มะเร็งชนิดที่เกิดจากการแบ่งตัวที่ผิดปกติของ Squamous cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นเยื่อหุ้มชั้นนอกของกระเพาะปัสสาวะ ดังรูปที่ 2.5

รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะชนิด Squamous cell carcinoma (SCC)
(ที่มา : http://studentweb.tulane.edu/~sthibode/cancer/Figure14.jpg)

2.3.1.3 Adenocarcinoma (AC) เกิดจากการแบ่งตัวที่ผิดปกติของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายต่อม อยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของกระเพาะปัสสาวะ เป็นชนิดที่พบได้น้อยมากประมาณร้อยละ 1 ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้งหมด ดังรูปที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะชนิด Adenocarcinoma (AC) (ที่มา : http://eal.vet.upenn.edu/pathterm/images/lgirreg.jpg)

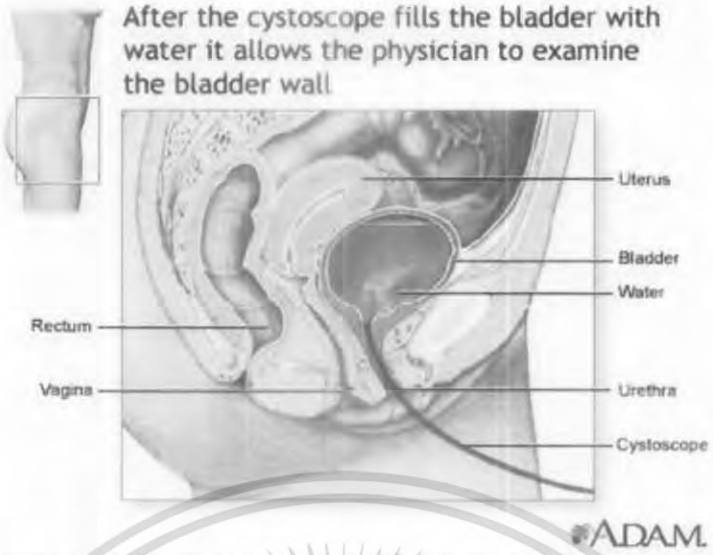
2.3.2 อาการของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะนั้นจะมีอาการแสดงดังนี้ คือ ถ่ายปัสสาวะเป็นเลือดโดยเฉพาะจะมีเลือดออกเมื่อเวลาถ่ายปัสสาวะสุด ต่อมาเลือดจะออกมากตลอดจนมีเลือดออกมาเป็นลิ่มๆ ทำให้มีปัสสาวะหรือถ่ายปัสสาวะบ่อยๆ และมีอาการปวดขณะถ่ายร่วมด้วย เมื่อเนื้อร้ายมีการเจริญและพัฒนาสู่ระยะที่สูงขึ้น ทำให้มีอาการเพิ่มขึ้นดังนี้ คือ น้ำหนักลด เบื่ออาหาร เป็นไข้ ปวดบริเวณลำไส้ กระดูกเชิงกราน และทวารหนัก (http://Bladder Cancer Comprehensive Cancer Center of Wake Forest University.htm)

2.3.3 การตรวจและวินิจฉัย

การวินิจฉัยและการตรวจหาเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในทางการแพทย์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ การตรวจด้วยรังสีเอ็กซ์ และการใช้กล้องขนาดเล็กสอดเข้าไปในกระเพาะปัสสาวะ ดังรูปที่ 2.7 เมื่อพบความผิดปกติที่บริเวณเยื่อบุกระเพาะปัสสาวะจึงทำการตัดเอาชิ้นส่วนเนื้อเยื่อนั้นมาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ ต่อไป (http://Bladder Cancer Comprehensive Cancer Center of Wake Forest University.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 แสดงการใช้กล้องขนาดเล็กสอดเข้าไปเพื่อตรวจความผิดปกติของกระเพาะปัสสาวะ (ที่มา : http://www1.wfubmc.edu/cancer/Types+of+Cancer/Bladder+Cancer/)

2.3.4 การรักษาโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

วิธีการรักษามะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับลักษณะและการแพร่กระจายของโรคที่เป็น และความสมบูรณ์ของสภาพร่างกายของผู้ป่วยเป็นสำคัญ ดังนี้

1. การผ่าตัดเอาเนื้อร้ายออก เพื่อเป็นการป้องกันการลุกลามไปสู่อวัยวะอื่น
2. การฉายรังสี เป็นการใช้รังสีในการรักษาร่วมกับการผ่าตัดเพื่อยับยั้งและทำลายเซลล์มะเร็ง
3. เคมีบำบัด เป็นการใช้สารเคมีร่วมกับการผ่าตัดในการรักษา

การรักษาโดยวิธีการฉายรังสีและเคมีบำบัดนั้นเป็นวิธีที่ค่อนข้างอันตรายและมีผลกระ-ทบข้างเคียงต่อผู้ป่วยสูง เนื่องจากรังสีหรือสารเคมีที่ใช้เข้าไปทำลายเซลล์ทุกเซลล์และส่งผลเป็นวงกว้างไม่เพียงแต่เซลล์มะเร็งเท่านั้น ดังนั้นการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งกระปัสสาวะแต่ละคนจึงมีความแตกต่างกัน ตามแต่ระยะของมะเร็งและสภาพร่างกายของผู้ป่วย

2.4 Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

เทคนิค FISH เป็นเทคนิคทางไซโตเจเนติกระดับโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซม โดยรวมหลักการของการย้อมสีโครโมโซมและการเข้าคู่กันของโครโมโซมเข้าไว้ด้วยกัน ทำให้มีการเข้าคู่กันระหว่างเป้าหมายและตัวติดตามที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสที่เป็นคู่สมกัน ตัวติดตามที่ใช้มีลักษณะเป็นสายดีเอ็นเอสั้นๆ คล้าย Primer ผ่านการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่ปรากฏสัญญาณแสงสีต่างๆ (อมรา, 2546) ดังรูปที่ 2.8 เมื่อทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เช่น Spectrum green ให้สัญญาณแสงสีเขียวและ Spectrum orange ให้สัญญาณแสงสีแดง เป็นต้น

2.4.1 การเตรียมตัวติดตาม (DNA probe)

การเตรียมตัวติดตามเป็นการนำเอาตัวติดตามที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษา มาทำการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง โดยทั่วไปสามารถทำได้ 2 วิธีดังนี้

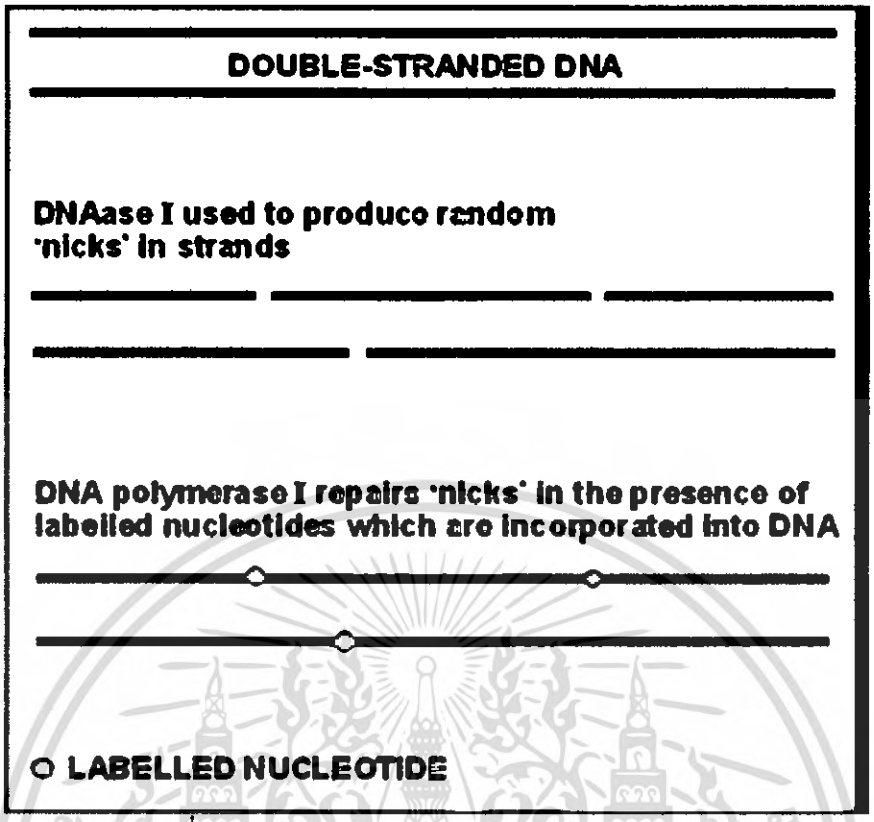
1. Random primer labeling เป็นการติดฉลากดีเอ็นเอขนาด 100 คู่เบส ขึ้นไป โดยทำการแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว แล้วทำการสังเคราะห์สายใหม่โดยเอนไซม์ Klenow นำเอา dNTP ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงมาสร้างเป็นตัวติดตามสายใหม่

2. Nick translation ทำการตัดสาย DNA ให้ขาดแบบสุ่มด้วยเอนไซม์ DNase I แล้วใช้เอนไซม์ Polymerase I เติม dNTP ที่ติดฉลากแล้วลงไปบริเวณที่ขาด โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับติดฉลากดีเอ็นเอขนาด 200 คู่เบสขึ้นไป ดังรูปที่ 2.9 (วสันต์และคณะ, 2539)

รูปที่ 2.8 หลักการการศึกษาด้วยเทคนิค FISH

(ที่มา : http://www.urovysion.com/FISHUroVysion_265.asp)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 แสดงการติดฉลากด้วยวิธี Nick translation

(ที่มา :http://users.wmin.ac.uk/~redwayk/lectures/images/nick_translation.gif)

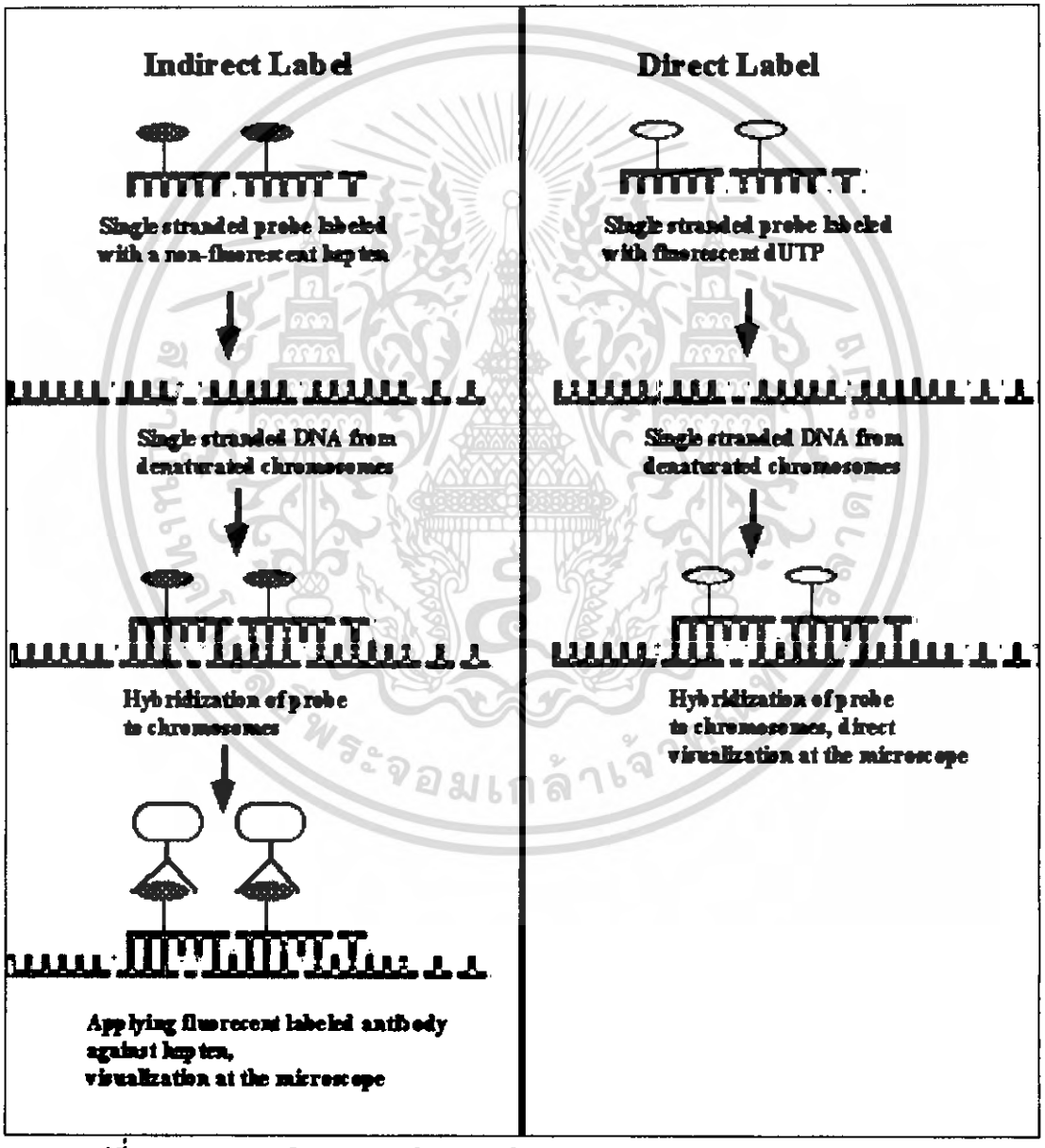
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การติดสารเรืองแสงตัวติดตาม มี 2 ชนิดคือ

1.Direct label method **ใช้สารเรืองแสงติดฉลากที่ตัวติดตามโดยตรง** สามารถนำมาตรวจสอบสัญญาณทันทีด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์หลังจากทำการ Hybridization

2. Indirect label method **การติดฉลากตัวติดตามด้วยสาร** non radioactive เช่น biotin หรือ digoxygenin แล้วนำสารที่เป็นสาร antibody กับสารข้างต้นคือ avidin และ anti-digoxygenin ที่ติดกับสารเรืองแสงมาต่ออีกครั้งหนึ่ง **เพื่อเป็นการเพิ่มสัญญาณแล้วนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์** (วสันต์และคณะ, 2539) ดังรูปที่ 2.10

ก. ข.



รูปที่ 2.9 แสดงการติดฉลากตัวติดตามชนิด indirect (ก.) และ direct label probe (ข.)

(ที่มา : http://www.chrombios.com/AboutFISH/TheLabeling.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 Hybridization

ทำการแยกดีเอ็นเอสายคู่ของทั้งตัวติดตามที่ผ่านการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงและดีเอ็นเอเป้าหมายที่ติดอยู่บนสไลด์ซึ่งแยกให้เป็นสายเดี่ยวด้วยอุณหภูมิสูง หลังจากนั้นจึงนำเอาตัวติดตามหยดลงบนสไลด์ ลดอุณหภูมิลงเพื่อให้เพื่อให้เกิดการเข้าคู่กันระหว่างสายดีเอ็นเอตัวติดตามกับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยการ Hybridization นี้ตัวติดตามจะเข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายตรงบริเวณที่มีลำดับเบสที่เหมือนกัน หลังจากนั้นจึงนำไปทำการตรวจสอบสัญญาณ (อมรา,2546)

2.4.4 การตรวจสอบสัญญาณ

เมื่อผ่านการ Hybridization เรียบร้อยแล้วนำสไลด์ที่ได้ไปทำการตรวจสอบสัญญาณด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ดังรูปที่ 2.11

ก. ข.

รูปที่ 2.11 การตรวจผลการย้อมสีโครโมโซมด้วยเทคนิค FISH ในเซลล์ระยะ Interphase (ก.) และ Metaphase (ข.) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

(ที่มา : http://www.imas.co.uk/pages/cytogenetic_img/mfish/mfishhome.html)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Reeder และคณะ (1998) ได้ศึกษาความแม่นยำและความจำเพาะในการตรวจสอบมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยการใช้เทคนิค FISH ควบคู่กับเทคนิค DNA cytometry โดยใช้เนื้อเยื่อตัวอย่างของคนปกติ 37 คนและใช้เนื้อเยื่อตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 317 คน ที่อยู่ในระหว่างการวินิจฉัยโดยการส่องตรวจ (cystoscopic) ความแม่นยำในการและความจำเพาะ (specific) ในการตรวจสอบมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเป็นร้อยละ 92 ความไว (sensitive) ในการตรวจสอบในระยะที่ 1 เป็นร้อยละ 69 ระยะที่ 2 เป็นร้อยละ 72 และในระยะที่ 3 เป็นร้อยละ 97 และในการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นี้ยังเป็นตัวสนันสนุนการผิดปกติของโครโมโซมคู่ที่ 9 ส่งผลให้เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในผู้ป่วย

Sayed และ Khale (1999) ทำการศึกษาเกี่ยวกับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่เกิดขึ้นในประเทศอียิปต์และประเทศแถบตะวันตก พบว่ามะเร็งกระเพาะปัสสาวะเกิดการติดจากปรสิต *Schistosoma haematobium* เรียกสาเหตุการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจากการติดเชื้อจากปรสิตว่า Bilharzial Bladder Cancer การศึกษาความผิดปกติทางจำนวนโครโมโซมโดยใช้เทคนิค FISH จำนวนโครโมโซมที่ผิดปกติสามารถเป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิด Bilharzial Bladder Cancerได้ โดยใช้เนื้อเยื่อตัวอย่างของผู้ป่วยที่ถูกเก็บแช่แข็งไว้ ตัวติดตามใช้ centromere specific probe (biotinylate repititive) ที่จำเพาะกับโครโมโซมคู่ที่ 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 16 และ 17 ทำการตรวจนับจำนวนโครโมโซมที่หายไป ในตัวอย่างผู้ป่วยชาวอียิปต์ 31 ราย ความผิดปกติที่พบได้มากที่สุดคือการขาดหายไปโครโมโซมคู่ที่ 9 และรองลงมาคือการหายไปของโครโมโซมคู่ที่ 17 โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขาดหายไปบางส่วนของโครโมโซมคู่ที่ 9 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกับการเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในระยะเริ่มแรก จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้ทราบว่าเทคนิค FISH เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ความผิดปกติทางจำนวนและโครงสร้างของโครโมโซมในเซลล์ระยะ Interphase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

- เชื้อ *E. coli* ชนิด BAC Clone 2 ชนิด ได้แก่ RP 13-971O21 ใช้เป็นตัวติดตามของบริเวณเซนโทรเมียร์ ตำแหน่ง p 11.1 – p 11.22 บนโครโมโซม X และ RP 11-75F5 ใช้เป็นตัวดิดตามของบริเวณเซนโทรเมียร์ ตำแหน่ง q 11.1 บนโครโมโซม Y
- จานเพาะเชื้อ
- หลอดทดลอง
- ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Lurai-Bertani medium (LB)
- วุ้นผง (Agar)
- ยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอลความเข้มข้น 1 กรัม

3.1.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

- ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin
- เครื่องหมุนเหวี่ยง

3.1.3 การตรวจสอบขนาดและปริมาณดีเอ็นเอ

3.1.3.1 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis)

- 1X TBE buffer
- Loading dye
- Ethedium bromide
- Agarose gel
- DNA marker ขนาด 100 และ 1,000 คู่เบส

3.1.3.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

- คิวเวท (cuvett)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
- น้ำกลั่นสำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
72600

3.1.4 การติดฉลากตัวติดตามด้วยวิธี Nick translation

- ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดในข้อ 3.1.2
- หลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร
- Spectrum orange ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์
- Spectrum green ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์
- สารละลายผสม dATP, dCTP, dGTP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์
- สารละลาย dTTP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์
- 10X Nick translation buffer
- Nick translation enzyme

3.1.5 การตกตะกอนตัวติดตาม

- ดีเอ็นเอที่ผ่านการติดฉลากแล้วจากข้อ 3.1.4
- Salmon sperm ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- Human Cot1 DNA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70
- Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 100
- Potassium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์
- Hybridization buffer
- น้ำกลั่น

3.1.6 การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ

- เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
- ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- สไลด์
- จานเพาะเลี้ยงเซลล์
- Pasteur pipet
- น้ำกลั่น
- Fixative solution (Methanol : Acetic acid = 3 : 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.7 การ Pretreatment slide

- Glass jar
- Micropipet
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water baht) อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- 2X SSC
- เอนไซม์ RNase ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- เอนไซม์ Pepsin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- HCl ความเข้มข้น 1 นอร์มอล
- Phosphate buffer saline (PBS)
- Formaldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 37
- $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์
- Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70
- Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 85
- Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 100

3.1.8 Hybridization

3.1.8.1 ตัวติดตามสำเร็จรูปของ Vysis

- ตัวติดตามสำเร็จรูปของ Vysis ชนิด Direct label chromosome ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซม X และ Y โดยโครโมโซม X ติดฉลากด้วย Spectrum orange และ โครโมโซม Y ติดฉลากด้วย Spectrum green
- สไลด์ตัวอย่างที่ผ่านการ pretreatment แล้ว
- Deionized formamide
- Formamide ความเข้มข้นร้อยละ 70
- กระจกปิดสไลด์
- Rubber glue
- ถาดสแตนเลส
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ 74 องศาเซลเซียส
- เครื่องอุ่นสไลด์ (Slide warmer) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
- Moister chamber
- ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.8.2 ตัวติดตามที่สร้างขึ้น

- ตัวติดตามที่ได้จากข้อ 3.1.5
- สไลด์ตัวอย่างที่ผ่านการ pretreatment แล้ว
- Deionized formamide
- Formamide ความเข้มข้นร้อยละ 70
- กระจกปิดสไลด์
- Rubber glue
- ถาดสแตนเลส
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส
- เครื่องอุ่นสไลด์อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
- Moister chamber
- ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.1.9 Washing

3.1.9.1 ตัวติดตามสำเร็จรูปของ Vysis

- Cover slip
- Glass jar
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส
- 0.4X SSC
- 2X SSC ที่เติม 0.1% NP-40
- DAPI II ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.9.1.2 ตัวติดตามที่สร้างขึ้น

- Cover slip
- Glass jar
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส
- 0.4X SSC
- 2X SSC
- DAPI II ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.10 การตรวจสอบสัญญาณ

- กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์
- Immersion oil

3.2 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จากผู้ป่วยเพศชายจำนวน 4 ราย ได้แก่ตัวอย่าง BC 02/1, BC 08, BC 10 และ BC 11/2 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลราชวิถี และเซลล์จากเนื้อเยื่อบุผนังแก้มในเพศชายจำนวน 1 ตัวอย่างใช้เป็นตัวควบคุม

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

การเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ในการทดลองนี้ เป็นการเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำหรับนำไปทำเป็นตัวติดตาม โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอลเพื่อเป็นการคัดเลือกเชื้อ เนื่องจากพลาสมิดที่ต้องการนี้มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอลอยู่

เชื้อ *E. coli* ที่ใช้เพาะเลี้ยงเพื่อสกัดพลาสมิดนี้ มีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิดด้วยกัน ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงชนิดของ BAC clone ที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นตัวติดตาม

รหัส	ตำแหน่งบนโครโมโซม	FISH	ขนาดพลาสมิด	โคลน	Gene Bank
RP 13-971O21	Xp 11.1-11.22	Interphase	58 Mb	BAC	AL 591645.35
RP 11-75F5	Yq11.1	Interphase	12 Mb	BAC	AC 011293.5

วิธีการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกเชื้อ

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่ผสมกับ ยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล ความเข้มข้น 0.1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร
2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อ รอให้อาหารแข็งตัว
3. ทำการ Cross streak เชื้อ *E. coli* ลงในจานเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว
4. นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. เขี่ยเชื้อ *E.coli* จากโคโลนีเดี่ยวในจานเลี้ยงเชื้อจานแรกมาทำการ Cross streak ลงในจานที่ 2

6. นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

7. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่ผสมกับยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 0.1 ไมโครลิตร ต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร

8. เขี่ยเชื่อจากโคโลนีเดี่ยวในจานเลี้ยงเชื้อจานที่ 2 ใส่ลงใน LB broth ที่เตรียมไว้

9. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

10. เก็บเซลล์เพื่อนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin

1. แบ่งสารละลายที่มีเชื้อ *E. coli* และอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอดต่อเชื้อ 1 ชนิด

2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง

3. เติมสารละลาย A1 ปริมาณ 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1 ผสมให้เข้ากัน

4. ดูดสารละลายจากหลอดที่ 1 ใส่ลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน

5. เติมสารละลาย A2 ปริมาณ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆ ห้ามนำไป Vortex แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

6. เติมสารละลาย A3 ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ห้ามนำไป Vortex

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

8. ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ใส่ลงใน Nucleospin plasmid column

9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง

10. เติมสารละลาย AW ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาณ 500 ไมโครลิตร

11. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง

12. เติมสารละลาย A4 ปริมาณ 600 ไมโครลิตร

13. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง

14. ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

15. นำ Plasmid column ไปประกอบเข้ากับหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่

16. เติมสารละลาย AE ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เพื่อเป็นการชะดีเอ็นเอที่ดิดอยู่กับ Column ออกมา บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที
18. เก็บส่วนใสที่อยู่ในหลอดทดลองด้านล่าง ซึ่งก็คือพลาสมิดดีเอ็นเอที่ต้องการ

3.3.3 การหาปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

การวัดค่าการดูดกลืนแสงนั้นเป็นการหาปริมาณและดูความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ การวัดค่าการดูดกลืนแสงนี้ใช้ช่วงความยาวคลื่นแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร โดยความคลื่นแสงที่ 260 นาโนเมตร จะใช้ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอส่วนความยาวคลื่นแสงที่ 280 นาโนเมตร เป็นการวัดปริมาณการปนเปื้อนของโปรตีน โดยนำเอาพลาสมิดดีเอ็นเอมาทำการเจือจาง 100 เท่า ด้วยน้ำกลั่น ซึ่งการเจือจางทำโดยใช้ปริมาณของดีเอ็นเอ 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 495 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณสารละลายสุทธิ 500 มิลลิลิตร

$$\text{การเจือจาง} = \frac{\text{ปริมาณสารละลายสุทธิ}}{\text{ปริมาณดีเอ็นเอ}} = \frac{500}{5} = 100 \text{ เท่า}$$

เมื่อทำการเจือจางแล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่อไป โดยคำนวณได้จาก

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัม / ไมโครลิตร) = A x 50 (ไมโครลิตร / มิลลิลิตร) x B

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

B = ค่าการเจือจาง (เท่า)

ค่าความบริสุทธิ์ของ DNA ดูได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโน-เมตรต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร โดยค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 1.80 – 2.00 ในกรณีที่มีค่ามากกว่า 2.00 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอแต่ถ้าค่าที่ได้น้อยกว่า 1.80 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การติดฉลากตัวติดตามโดยวิธี Nick translation

การติดฉลากตัวติดตามเป็นการติดสารเรืองแสงลงบนตัวติดตามที่เตรียมไว้ ในการทดลองนี้จะใช้ชุด Nick translation สำเร็จรูปของ Vysis โดยมีปริมาณสารที่ใช้ดังในตารางที่ 3.2 ซึ่งเป็นการติดฉลากแบบ Direct method

ตารางที่ 3.2 แสดงสารต่างๆและปริมาณที่ใช้ในการทำ Nick translation โดยชุดสำเร็จรูปของ Vysis

สาร	ปริมาณ
0.2 mM Spectrum green and Spectrum orange	2.5 ไมโครลิตร
0.1 mM dTTP	5 ไมโครลิตร
0.1 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP)	10 ไมโครลิตร
10x Nick translation buffer	5 ไมโครลิตร
Nick translation enzyme	10 ไมโครลิตร
DNA template (1 ug)	X ไมโครลิตร
Sterile water	17.5 – X ไมโครลิตร
Total	50 ไมโครลิตร

วิธีการ

1. นำสารละลายดังในตารางที่ 3.2 ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร ที่ห่อด้วยฟรอยต์ เพื่อป้องกันไม่ให้โดนแสง โดยใส่เอนไซม์ลงไปเป็นอันดับสุดท้าย ผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex และ Spin down

2. นำสารละลายที่ได้ไปเข้าเครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (Thermal cycle) โดยใช้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

3. ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอระหว่างทำปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยการนำออกมาทำการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าหากได้ขนาดที่เหมาะสมก็ให้นำไปทำการหยุดปฏิกิริยา แต่ถ้าขนาดยังใหญ่เกินไปก็ให้นำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อ

4. หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 10 นาที

5. เก็บตัวดิตตามที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า

การทำแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าเพื่อเป็นการตรวจสอบว่าตัวติดตามที่ได้มีขนาดที่เหมาะสมกับการนำไปทำ Hybridization หรือไม่ โดยขนาดที่เหมาะสมคือยาวประมาณ 300 – 500 คู่เบส โดยเทียบขนาดจาก DNA marker ด้วยการแยกขนาดโดยใช้กระแสไฟฟ้า บน Agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม Agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยละลายผง Agarose ในสารละลาย 1X TBE buffer
2. ละลายผง Agarose โดยนำไปใส่ในเครื่องไมโครเวฟ (Micro wave) จน ละลายหมด ทิ้งไว้ให้ได้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45 – 50 องศาเซลเซียส
3. เท Agarose gel ลงในถาดเจลที่เสียบหวีเตรียมไว้ รอจนเจลแข็งตัว ประมาณ 15 นาที
4. ค่อยๆดึงหวีออก นำเจลที่ได้ใส่ลงในอ่างสำหรับทำ Gel electrophoresis
5. เทสารละลาย 1X TBE buffer ลงไปให้ท่วมเจล
6. หยด DNA marker ขนาด 100 คู่เบส ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรกของเจล
7. ผสม DNA ที่ต้องการศึกษาเข้ากับน้ำกลั่นและสีย้อม หยดลงในหลุมของเจล โดยให้หลุมสุดท้ายเป็น Negative control
8. เปิดเครื่องโดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 40 นาที หรือสังเกตจากสีย้อมที่วิ่งไปบนเจลประมาณร้อยละ 80 ของความยาวเจล
9. นำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 4 นาที
10. ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 20 นาที
11. นำเจลไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อตรวจสอบขนาดตัวติดตาม

3.3.6 การตกตะกอนตัวติดตาม

1. ปิเปตน้ำกลั่นทำผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 7.4 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ที่ห่อด้วยฟรอยด์
2. เติมสารละลายตัวดิดตามที่ผ่านการดิดฉลากเรียบร้อยแล้ว ปริมาณ 10 ไมโครลิตร
3. เติม Human Cot-1 DNA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 ไมโครลิตร และ เดิม Salmon sperm ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 0.6 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เติม 3M Sodium acetate ปริมาณ 2 ไมโครลิตร และเติม Ethanol ความเข้มข้นร้อยละร้อยที่เย็นอยู่ลงไปปริมาณ 50 ไมโครลิตร

5. นำไป Vortex และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหรือ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

7. เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติม Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70 ที่เย็นอยู่ ปริมาณ 50 ไมโครลิตร

8. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

9. เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ปล่อยทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้งประมาณ 15 - 30 นาที

10. ละลายตะกอนด้วย Hybridization buffer ปริมาณ 20 ไมโครลิตร

11. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

12. นำตัวติดตามที่ได้ปริมาณทั้งหมด 20 ไมโครลิตรไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.7 การเตรียมสไลด์

1. นำตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อออกจากหลอดเก็บโดยใช้ใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดออกมา

2. เช็ดสไลด์ให้สะอาดโดยใช้สารละลาย Fixative (Methanol : Acetic acid = 3 : 1)

3. นำชิ้นเนื้อเยื่อใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ เพื่อล้างคราบไขมันและสิ่งที่ติดอยู่กับเซลล์ ทำการล้าง 2 ครั้ง

4. นำชิ้นเนื้อที่ผ่านการล้างเรียบร้อยแล้วใส่ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์ หยดน้ำกลั่นลงไป

5. ทำการสับเซลล์ด้วยใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ละเอียดที่สุด จนเป็นเนื้อเดียวกับสารละลาย

6. ดูดสารละลายเซลล์นำไปหยดลงบนสไลด์ รอจนสไลด์แห้ง

7. นำไปตรวจดูปริมาณและการกระจายของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase contrast

8. เก็บในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.8 การ Pretreatment slide

1. ล้างสไลด์ตัวอย่างที่เตรียมไว้ด้วย 2X SSC ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

2. หยดสารละลายเอนไซม์ RNase (RNase 1 ไมโครลิตร / 2X SSC 200 ไมโครลิตร) ลงบนสไลด์ตัวอย่าง ปิดสไลด์ด้วยพาราฟิล์ม บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. ค่อยๆ ดึงพาราฟิล์มออก ล้างสไลด์ด้วย 2X SSC จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และเขย่าสไลด์ทุกๆ 2 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4. กำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกด้วยเอนไซม์ Pepsin (น้ำกลั่น 49.5 มิลลิลิตร, 1N HCL 500 ไมโครลิตร, Pepsin 50 ไมโครลิตร) ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. ล้างสไลด์ด้วยสารละลาย 1X PBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

6. ตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย 37% Formaldehyde 1.3 มิลลิลิตร / 1M $MgCl_2$ 2.5 มิลลิลิตร ในสารละลาย PBS 47.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 นาที

7. ล้างสารละลายที่ใช้ตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย 1X PBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

8. ทำการดึงน้ำออกจากสไลด์ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70, 85 และ 100% นานครั้งละ 3 นาที ตามลำดับ แล้วปล่อยให้สไลด์แห้ง

3.3.9 Hybridization

3.3.9.1 ตัวติดตามสำเร็จรูปของ Vysis

1. ทำการ Denature สไลด์โดยนำไปใส่ลงในถาดสแตนเลสที่ลอยอยู่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส หยดสารละลาย 70% Formamide/2X SSC pH 7.0 – 8.0 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงบนสไลด์บริเวณที่มีเซลล์ให้ทั่ว ทิ้งไว้เป็นเวลา 8 นาที

2. นำสไลด์ไปแช่ใน Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70, 85 และ 100 ที่เย็น นานครั้งละ 3 นาที ทำให้สไลด์แห้งบนเครื่องอุ่นสไลด์อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 2 นาที

3. หยดตัวติดตามลงบนสไลด์ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ (Cover slip)

4. นำสไลด์ไปใส่ลงในถาดสแตนเลสที่ลอยอยู่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที

5. ทำการปิดขอบกระจกปิดสไลด์ด้วย Rubber glue รอให้แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. นำสไลด์ที่ได้ใส่ใน Moister chamber นำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

3.3.9.2 ตัวติดตามที่สร้างขึ้น

1. ปิเปตตัวติดตามโครโมโซม X และ Y แต่ละชนิดปริมาณ 2 ไมโครลิตร และ Deionized formamide ปริมาณ 4 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร ที่ห่อด้วยกระดาษฟรอยด์ นำไป Vortex และ Spin down ตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2. ทำการ Denature สไลด์โดยนำไปใส่ลงในถาดที่ลอยอยู่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส หยดสารละลาย 70% Formamide/2X SSC pH 7.0 - 8.0 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงบนสไลด์บริเวณที่มีเซลล์ให้ทั่ว ทิ้งไว้เป็นเวลา 8 นาที

3. นำสารละลายจากข้อที่ 1 ไปทำการ Denature ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที

4. นำสไลด์ไปแช่ใน Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70, 85 และ 100 ที่เย็น นานครั้งละ 3 นาที ทำให้สไลด์แห้งบนเครื่องอุนสไลด์อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

5. หยดตัวติดตามลงบนสไลด์ ปิดสไลด์ด้วย Cover slip

6. นำสไลด์ไปใส่ลงในถาดสแตนเลสที่ลอยอยู่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที

7. ทำการปิดขอบกระจกปิดสไลด์ด้วย Rubber glue รอให้แห้ง

8. นำสไลด์ที่ได้ใส่ใน Moister chamber นำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

3.3.10 Washing

3.3.10.1 ตัวติดตามสำเร็จรูปของบริษัท Vysis

1. นำสไลด์อกจาก Moister chamber ดึง Rubber glue และ กระจกปิดสไลด์ออก

2. ล้างสไลด์ด้วย 0.4X SSC ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3. ล้างสไลด์ด้วย 2X SSC ที่เติม 0.1%NP-40 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ตากสไลด์ในที่มืดจนแห้ง

4. หยด DAPI II ปริมาณ 4 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ ปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดใส

5. นำสไลด์ไปตรวจสอบสัญญาณด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.10.2 ตัวติดตามที่สร้างขึ้น

1. นำสไลด์ออกจาก Moister chamber ดึง Rubber glue และกระจกปิดสไลด์ออก

2. ล้างสไลด์ด้วย 0.4X SSC ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

3. ล้างสไลด์ด้วย 2X SSC ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ตากสไลด์ในที่มืดจนแห้ง

4. หยด DAPI II ปริมาณ 4 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ ปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดใส

5. นำสไลด์ไปตรวจสอบสัญญาณด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

3.3.11 การตรวจสอบสัญญาณ

นำสไลด์ที่ผ่านการ Hybridization แล้วไปทำการตรวจสอบสัญญาณด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ที่กำลังขยาย 400 และ 1,000 เท่า ทำการนับเซลล์ที่เป็นเซลล์เดี่ยวไม่ติดกันแล้วทำการถ่ายรูปเก็บไว้ ปริมาณ 100 – 500 เซลล์

ในการตรวจสอบสัญญาณจะทำการตรวจสอบด้วยเฟสของกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์จำนวน 4 เฟส โดยใช้เฟส DAPI ในการตรวจสอบขอบเขตของเซลล์ ใช้เฟสสีแดงในการตรวจสอบสัญญาณของ Spectrum orange บนโครโมโซม X ใช้เฟสสีเขียวในการตรวจสอบสัญญาณของ Spectrum green บนโครโมโซม Y และเฟสรวมเพื่อตรวจสอบสัญญาณโดยรวมทั้งหมด

ในระหว่างขั้นตอนการทำ FISH การเก็บและขนย้ายต้องระวังไม่ให้สไลด์สัมผัสกับแสงสว่าง เพราะจะทำให้สารเรืองแสงเสียสภาพเพื่อเป็นการป้องกันการลดลงของสัญญาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การเตรียมสไลด์

การเตรียมสไลด์ที่เป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการติดเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะลงบนสไลด์เพื่อทำการศึกษาโดยเทคนิค FISH คือการทำให้เซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

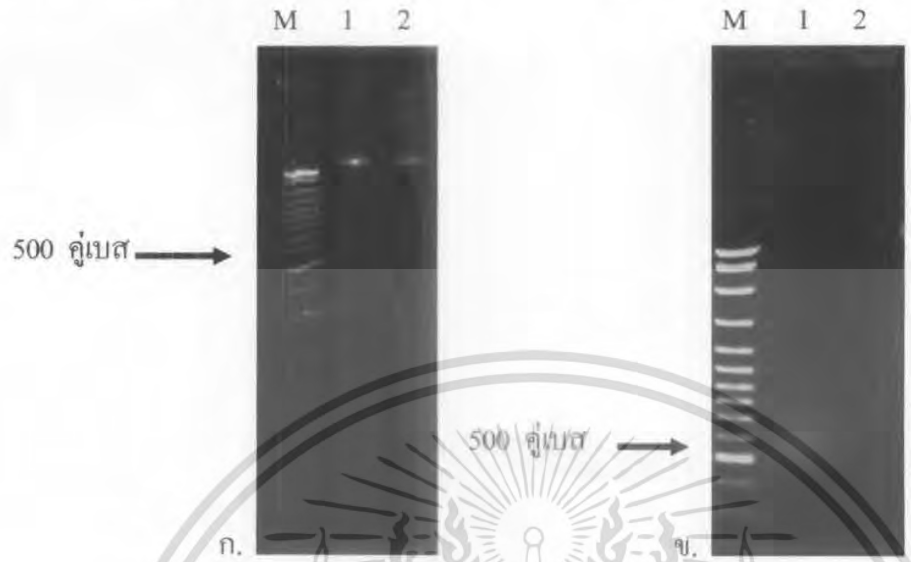
การนำชิ้นเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะสับในจานเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อทำให้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยใช้น้ำทำได้โดยนำเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมาล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ ทำการสับเนื้อเยื่อด้วยใบมีดจนได้สารละลายที่มีสีขาวขุ่น ดูดสารละลายที่ได้นำมาหยดลงบนสไลด์ที่ได้ทำการเช็ดด้วยสารละลาย fixative ไว้แล้ว จากนั้นตากสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ให้สไลด์แห้งเอง ผลปรากฏว่าเซลล์สามารถติดบนสไลด์ได้ค่อนข้างมากและมีลักษณะเรียงเป็นเซลล์เดี่ยวได้ดีกว่าการใช้สารละลาย 1X PBS หรือสารละลาย Fixative ในการล้างเซลล์ หรือการตากสไลด์ให้แห้งบนเครื่องอุ่นสไลด์ เนื่องจากการแช่เซลล์สารละลาย 1X PBS และสารละลาย Fixative หรือการตากสไลด์ให้แห้งบนเครื่องอุ่นสไลด์ล้วนแล้วแต่ทำให้เซลล์เสียรูปร่างและมีขนาดเหี่ยวลง ส่งผลให้รูปพรรณสัณฐานของเซลล์เปลี่ยนไป สไลด์ที่ทำไว้ยังสามารถเก็บไว้ได้ทั้งในอุณหภูมิห้อง และที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ควรตรวจบริเวณและปริมาณความหนาแน่นของเซลล์รวมทั้งการกระจายตัวของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Phase Contrast ก่อนนำมาใช้

4.2 การเตรียมตัวติดตาม

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดจาก BAC clone (Bacterial artificial clone) โคลน 2 ชนิด คือ BAC RP13-971O21 และ BAC RP11-75F5 ซึ่งเป็นโคลนที่พลาสมิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับบริเวณเซนโทรเมียร์ของโครโมโซม X และ โครโมโซม Y ตามลำดับ ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Nucleospin ตรวจสอบความเข้มข้นและปริมาณของดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำสายดีเอ็นเอมาทำการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ด้วยวิธี Nick translation โดยใช้เอนไซม์ DNase ในการตัดชิ้นส่วนของพลาสมิด และใช้เอนไซม์ DNA polymerase ในการสร้างสายดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวติดตามด้วย dNTP และ dUTP ที่มีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (Fluorophore) ซึ่งตัวติดตามโครโมโซม X ทำการติดฉลากด้วย Spectrum orange ให้สัญญาณสีแดง ส่วนตัวติดตามโครโมโซม Y ทำการติกฉลากด้วย Spectrum green ให้สัญญาณสีเขียว เอนไซม์ทั้งสองชนิดจะทำปฏิกิริยาในสภาวะที่เหมาะสมต่อการตัดสายและเชื่อมต่อพลาสมิดดีเอ็นเอ คือ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เวลา 1 – 1.30 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอซึ่งใช้เป็นตัวติดตามขนาด 300-500 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสม โดยพบว่าสายพลาสมิดที่ได้จากการสกัดจาก BAC clone มีใกล้เคียงกัน ดังรูป 4.1ก เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ทำให้ได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอติดตามที่ไม่เท่ากัน ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงผลการเปรียบเทียบขนาดพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอ (ก.) และหลังการทำ Nick translation (ข.) ด้วยวิธีแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า โดย M คือ Marker 100 คู่เบส, 1 คือ พลาสมิดชนิด RP13-971O21 และ 2 คือ พลาสมิดชนิด RP11-75F5

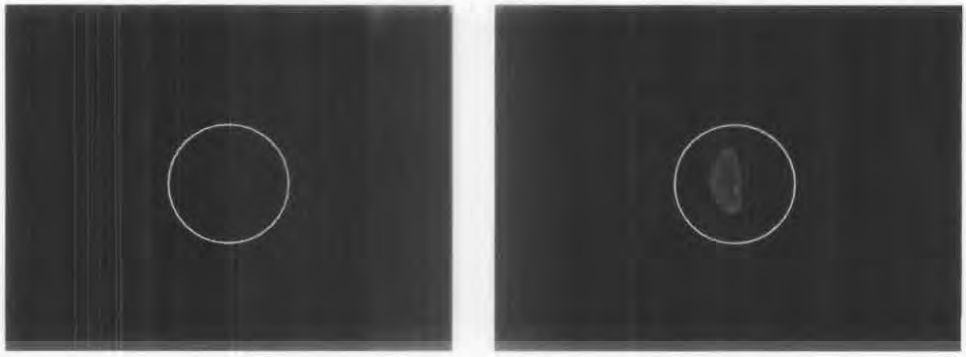
ผลการทดลองพบว่า ขนาดของชิ้นส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอหลังจากการทำ Nick translation BAC RP 13-971021 ซึ่งใช้เป็นตัวติดตามของ โครโมโซม X มีขนาด 500 คู่เบส BAC RP 11-75F5 ซึ่งใช้เป็นตัวติดตามของโครโมโซม Y มีขนาดเล็กกว่า 200 คู่เบส ดังรูปที่ 4.1(ข)

4.3 การตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิค FISH โดยตัวติดตามสำเร็จรูปของบริษัท Vysis

การตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม Y ด้วยเทคนิค FISH โดยตัวติดตามสำเร็จรูปของ Vysis นอกจากสามารถตรวจพบสัญญาณทั้งสัญญาณสีแดงซึ่งอยู่บริเวณเซนโทรเมียร์ของโครโมโซม X และสัญญาณสีเขียวซึ่งอยู่บริเวณเซนโทรเมียร์ของโครโมโซม Y ตามปกติดังรูปที่ 4.2ก แล้วยังพบความผิดปกติอื่นๆ เช่น การขาดหายไปของสัญญาณสีเขียว ดังรูปที่ 4.2ข และการขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นของสัญญาณสีแดง โดยการตรวจสอบขอบเขตของเซลล์สามารถตรวจสอบได้โดยการตรวจสอบด้วยเฟส DAPI และตรวจสอบสัญญาณสีแดงและสีเขียวด้วยเฟส 3 สี ของกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ที่กำลังขยาย 400 และ 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. ข.



รูปที่ 4.2 ผลการตรวจสอบสัญญาณสารเรืองแสงในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ด้วยเทคนิค FISH โดยตัวติดตามสำเร็จรูปของ Vysis

ก. ตัวควบคุมใช้เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มจากชายที่ไม่เป็นที่ไม่เป็นโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบสัญญาณสีเขียวและแดงปกติ

ข. ตัวอย่าง BC 10 เซลล์จากเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเพศชายตัวอย่างที่ 10 ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบสัญญาณสีแดงเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจนับสัญญาณที่ได้จากการใช้เทคนิค FISH ในเซลล์ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ตัวอย่าง	เพศ	จำนวนเซลล์	โครโมโซมปกติ (XY)	โครโมโซม X		โครโมโซมY		ไม่มีโครโมโซม	อื่นๆ
				ขาด	เกิน	ขาด	เกิน		
Control	ชาย	90	86 95.56%	3 3.34%	1 1.12%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%
BC 02/1	ชาย	158	51 32.28%	4 2.53%	0 0%	92 58.23%	0 0%	0 0%	11 6.96%
BC 08	ชาย	210	55 26.19%	5 2.38%	0 0%	145 69.04%	0 0%	2 0.95%	3 1.42%
BC 11/2	ชาย	529	352 66.58%	26 4.91%	55 10.39%	31 5.86%	25 4.72%	0 0%	40 7.56%
BC 10	ชาย	152	18 11.84%	2 1.32%	0 0%	87 57.2%	0 0%	39 25.66%	6 3.95%
เฉลี่ย			34.22%	2.79%	2.60%	47.58%	1.18%	6.65%	5.06%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าความผิดปกติที่ตรวจพบได้มากที่สุด คือการขาดหายของโครโมโซม Y ในเซลล์เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ คิดเป็นร้อยละ 47.58 รองลงมาคือโครโมโซมขาดทั้งโครโมโซม X และ Y คิดเป็นร้อยละ 6.65 ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งการขาดหายไปของโครโมโซม Y นี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาต่างๆ ก่อนหน้านี้ เช่น Sauter และคณะ (1995) ที่พบการขาดหายไปของโครโมโซม Y ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชาวดะวันตก เป็นร้อยละ 34 Aurelia และคณะ (1995) ศึกษาการขาดหายของโครโมโซม Y ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 25 ราย โดยเป็นเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด Transition cell carcinoma (TCC) พบว่ามีการขาดหายของโครโมโซม Y เป็นร้อยละ 10 จากตัวอย่างทั้งหมด รวมทั้ง Stamouli และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาด้วยวิธี multiplex FISH ในผู้ป่วย 32 ราย ในเซลล์เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด Transitional cell carcinoma (TCC) พบว่าโครโมโซม X มีความปกติในผู้ป่วยเพศหญิง และพบการขาดหายของโครโมโซม Y ในผู้ป่วยเพศชาย

Neuhaus และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาความผิดปกติที่เกิดขึ้นในมะเร็งกระพาะปัสสาวะชนิด pTa และ pT1 ในตัวอย่างผู้ป่วย 105 ราย พบว่าความผิดปกติของโครโมโซมคู่ที่ 1 และ 17 มีผลต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด pTa และ pT1 แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการขาดหายไปของโครโมโซม Y ซึ่งมีความขัดแย้งกับผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม ด้วยเทคนิค FISH โดยตัวติดตามที่สร้างขึ้น

ในการตรวจสอบผลการตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม Y ด้วยเทคนิค FISH โดยตัวติดตามชนิดสร้างขึ้น สามารถตรวจพบได้เพียงสัญญาณของสีแดงของโครโมโซม X แต่ไม่สามารถตรวจพบสัญญาณสีเขียวของโครโมโซม Y ทั้งในตัวอย่างควบคุมชนิดเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม ดังรูปที่ 4.3 ก และในตัวอย่างเนื้อเยื่อผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ ดังรูปที่ 4.3 ข

ก

ข

รูปที่ 4.3 ผลการตรวจสอบสัญญาณสารเรืองแสงในเซลล์จากเนื้อเยื่อมะเร็งกระปัสสาวะด้วยเทคนิค FISH โดยตัวติดตามที่สร้างขึ้น

ก. ตัวควบคุมใช้เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มจากชายที่ไม่เป็นที่ไม่เป็นโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ที่ทำการตรวจสัญญาณด้วยเฟสสีรวม (1) และเฟส DAPI (2) กำลังขยาย 400 เท่า พบสัญญาณสีแดงเพียงสัญญาณเดียว

ข. ตัวอย่าง BC 08 เซลล์จากเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเพศชายตัวอย่างที่ 8 ที่ทำการตรวจสัญญาณด้วยเฟสสีรวม (1) และเฟส DAPI (2) กำลังขยาย 1,000 เท่า พบสัญญาณสีแดงเพียงสัญญาณเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการตรวจสอบเซลล์ด้วยตัวติดตามที่สร้างขึ้นทำการตรวจสอบสัญญาณ จากรูปที่ 4.3 ก ใช้เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มในการตรวจสอบสอบสัญญาณ เปรียบเทียบเซลล์ในเฟสที่ตรวจสอบสัญญาณสีฟ้า DAPI (2) เพื่อตรวจสอบขอบเขตของเซลล์กับเซลล์ในเฟสที่ตรวจสอบสัญญาณทั้งสีฟ้า (สีDAPI), สีแดง (โครโมโซมX), สีเขียว (โครโมโซมY) (1) จากการเปรียบเทียบพบว่าสามารถตรวจสอบได้แค่สัญญาณสีแดง เมื่อทำการทดลองกับเซลล์เนื้อเยื่อในตัวอย่างรายอื่น เช่น BC 08 และ BC 10 ทำการเปรียบเทียบทั้ง 2 เฟส ดังที่กล่าวมาแล้วในข้างต้น พบว่าได้ผลเช่นเดียวกันคือสามารถตรวจสอบได้แค่สัญญาณสีแดงไม่ปรากฏการแสดงสัญญาณสีเขียวทั้งเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มและเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งผลมาจากน่าจะเป็นจากขนาดของตัวติดตามโครโมโซม Y ที่ใช้มีขนาดเล็กจนเกินไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม Y ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 4 ตัวอย่าง โดยเทคนิค FISH โดยใช้ตัวติดตามสำเร็จรูปจากบริษัท Vysis ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งเซนโตเมียร์ของโครโมโซม Y และ X ทำให้พบความผิดปกติของโครโมโซม Y โดยเฉพาะการขาดหายไปของโครโมโซม Y ถึงร้อยละ 47.58 และจากการศึกษาการสร้างตัวติดตามที่สร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในด้านการลดต้นทุนในการศึกษาและวิจัย ซึ่งผลที่ได้สามารถพัฒนาตัวติดตามโครโมโซม X ซึ่งให้สัญญาณสีแดงของ Spectrum orange ส่วนตัวติดตามที่สร้างขึ้นเพื่อตรวจสอบสัญญาณโครโมโซม Y ไม่สามารถตรวจสอบสัญญาณได้ อาจกล่าวได้ว่าการขาดหายไปของโครโมโซม Y ซึ่งอาจมีผลเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ข้อเสนอแนะ

1. ขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ใช้มีขนาดเล็ก ควรเพิ่มปริมาณตัวอย่างเพื่อการยืนยันผลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น
2. ควรเพิ่มปริมาณของพลาสมิดชนิด RP11-75F5 ที่ใช้สร้างตัวติดตามโครโมโซม Y ในขั้นตอนการทำ Nick translation ให้มีปริมาณมากขึ้นจากเดิม เพื่อเพิ่มปริมาณของตัวติดตาม
3. ควรลดเวลาในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ ในขั้นตอนการทำ Nick translation ของพลาสมิดชนิด RP11-75F5 ลงเพื่อเพิ่มขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำมาใช้เป็นตัวติดตามบริเวณเซนโทร-เมียร์ของโครโมโซม Y ซึ่งให้สัญญาณสีเขียว เพื่อให้ตัวติดตามแสดงสัญญาณได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

วสันต์ จันทราทิตย์และคณะ . 2539 .วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก . คณะเทคนิคการแพทย์ . มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อมรา คัมภิรานนท์. 2546. พันธุศาสตร์ของเซลล์ พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Aurelia M.M., Peier A.P., Kingsley K.L. and Sandberg A.A. 1995. FISH studies of urinary cells of patients with bladder cancer. *Urology onco* 1: 234-239

Neuhaus M., Wagner U., Schmid U., Ackermann D., Zellweger T., Ma R., Alund G., Knonagel H., Rist M., Moch H., Mihatsch M.J., Gasser T. and Sauter G. 1999. Polysomies but not Y chromosome losses have prognostic significance in pTa/pT1 urinary bladder cancer. *Hum Pathol* 30: 81–6.

Reeder J.E., O'Connell M.J., Yang Z., Morreale J.F., Collins L., Frank NI., Messing M.E., Cockett T.K., Cox C., Robinson R.D.. 1998. DNA cytometry and chromosome 9 aberrations by Fluorescence *in situ* Hybridization of irrigation specimens from bladder cancer patients . *urology* 51: 58-61.

Sauter G., Moch H., Wagner U., Novotna H., Gasser T.C., Mattarelli G., Mihatsch M.J. and Waldman F.M.. 1995. Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 82: 163-169.

Sayed M.A. and Khaled H.M. 1999. Chromosomal Aberrations in Bilharzial Bladder Cancer as Detected by Fluorescence In Situ Hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 114: *62-67*

Stamouli M.I., Ferti A.D., Panani A.D., Raftakis J., Consoli C., Raptis S.A. and Young B.D. 2004. Detection of genetic alterations in primary bladder carcinoma with dual-color and multiplex fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 149: 107-113.

Pocaim S., Rerkamnuaychoke., Jesdapatarakul S. and Campiranon A. 2005. Chromosome alterations in colorectal cancer in Thai patients. *Cancer Genet Cytogenet* 160: 152-159

http://en.wikipedia.org/wiki/Cancer

http://www.classroom.psu.ac.th

http://www.nci.go.th

http://www.dental.anamai.moph.go.th

http://www.thailabonline.com/sec7cancer.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

http://library.thinkquest.org

http://www.healthymanual.com

http://www.med.cmu.ac.th/student/patho/Kamthorn/314.html

http://studentweb.tulane.edu/~sthibode/cancer/Figure14.jpg

http://cal.vet.upenn.edu/pathterm/images/lgirreg.jpg

http://Bladder Cancer Comprehensive Cancer Center of Wake Forest University.htm

http://www1.wfubmc.edu/cancer/Types+of+Cancer/Bladder+Cancer

http://www.urovysion.com/FISHUroVysion_265.asp

http://users.wmin.ac.uk/~redwayk/lectures/images/nick_translation.gif

http://www.chrombios.com/AboutFISH/TheLabeling.html

http://www.imas.co.uk/pages/cytogenetic_img/mfish/mfishhome.html

http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/1122.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

สารเคมี

- LB agar ในการเตรียม 1 ลิตร

Casein triptic peptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
Agar	15 กรัม
H_2O	1,000 มิลลิกรัม

ปรับ pH 7.2

Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

- LB borth ในการเตรียม 1 ลิตร

Casein triptic peptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
H_2O	1,000 มิลลิกรัม

ปรับ pH 7.2

Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

- ความเข้มข้นของปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอลในอาหาร LB

ใส่ยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล 0.1 ไมโครลิตร ต่อ อาหาร LB 1 มิลลิลิตร (0.1µl/1ml)

- 20 X SSC (pH 7) ในการเตรียม 500 มิลลิตร

NaCl	87.66 กรัม
Tri-Na-citrate	44.12 กรัม

นำไปปรับ pH 7.0 (HCl)

Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

- เอนไซม์ RNase ความเข้มข้น 20 µg/1 ml

ชั่งเอนไซม์ RNase ซึ่งมีลักษณะเป็นผง ลงใน 1.5 ml ไมโครเซนตริฟิวทิวบ์ ใส่น้ำกลั่นปลอด เชื้อโดยใช้เข็มฉีดยาตูดแล้วนำมาใส่ผสมกันในทิวบ์ เขย่าให้เอนไซม์จนละลายหมด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก (ต่อ)

- Deionized formamide ในการเตรียม 10 มิลลิลิตร

Resin	0.5 กรัม
Formamide	10 มิลลิลิตร

กวนสารเป็นเวลา 30 นาทีและกรองเอา resin ออก แบ่งใส่หลอดทดลอง เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

- Hybridization buffer ในการเตรียม 5 มิลลิลิตร

2 X SSC	5 มิลลิลิตร
Dextran sulfate	1 กรัม

แบ่งใส่หลอดทดลองเก็บที่ - 20 องศาเซลเซียส

- 70%formamide/2X SSC ในการเตรียม 10 มิลลิลิตร pH 7.0 – 8.0

Formamide	7 มิลลิลิตร
2 X SSC	3 มิลลิลิตร

- PBS ในการเตรียม 500 มิลลิลิตร

$MgCl_2$	2.5 มิลลิลิตร
Potassium dihydrogen phosphate	625 ไมโครลิตร
H_2O	500 มิลลิลิตร

ปรับ pH 7.2

Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

- 100 mg/ml Pepsin ในการตรียม 1 มิลลิลิตร

Pepsin	100 มิลลิกรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1 มิลลิลิตร

- การเตรียม Pepsin ในขั้นตอน Pretreament

น้ำกลั่น	49.5 มิลลิลิตร
1 N HCl	500 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก (ต่อ)

100 mg/ml Pepsin 50 ไมโครลิตร

- การเตรียม formaldehyde ในขั้นตอนการ pretreatment

น้ำกลั่น	47.5	มิลลิลิตร
1 N $MgCl_2$	2.5	มิลลิลิตร
37% Formaldehyde	1.3	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้