



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ ณ บริเวณปลาย ๕ ไพรม์ และ ๓ ไพรม์ ควบคุมการทำงานของยีนผ่าน  
กระบวนการเมธิลเลชันในโรคมะเร็ง

**Functional repetitive sequences on 5' and 3' regulatory region controls gene expression by  
methylation in cancer**

โดย นายชูพงศ์ อธิวิรุฒ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ ณ บริเวณปลาย 5' ไพรม์ และ 3' ไพรม์ ควบคุมการทำงานของยีนผ่าน  
กระบวนการเมธิลเลชันในโรคมะเร็ง

Functional repetitive sequences on 5' and 3' regulatory region controls gene expression by  
methylation in cancer

นายชูพงศ์ อธิวิรุฒ  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. ประจำปี พ.ศ.๒๕๕๓ เป็นเวลา ๒ ปี จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ร่วมกับจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิตางกูร ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่เป็นผู้จุดประกายแนวคิดการทำโครงการวิจัยนี้ และได้ให้คำปรึกษา ตลอดจนให้การอบรมสั่งสอนแนวทางและประพฤติตนเป็นแบบอย่างของการเป็นนักวิจัยที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ชนพ ช่างโซติ ผู้บังคับบัญชา ที่อนุญาตให้ใช้เวลาขณะปฏิบัติงาน ณ ศูนย์ Chula GenePRO คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำการวิจัยโครงการนี้ และท่านยังได้ทำหน้าที่พยาธิแพทย์ ร่วมกับ แพทย์หญิงอัญชลีรัตน์ เลิศสถิตย์ ประจำสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ ทำหน้าที่คัดเลือกตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เหมาะสมสำหรับทำโครงการวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยท่านอื่นๆ อาทิ คุณปิยะวรรณ แดงแก้ว และคุณพรณี วรรณทอง นักวิทยาศาสตร์ประจำศูนย์ Chula GenePRO ที่ได้ร่วมแรงร่วมใจและให้คำแนะนำในเชิงปฏิบัติการ เพื่อให้การดำเนินงานโครงการสำเร็จลุล่วง

และงานวิจัยโครงการนี้จะสำเร็จลุล่วงไปมิได้หากปราศจากการสนับสนุนและแรงบันดาลใจจากครอบครัว ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุพการี ขอขอบคุณภรรยาและบุตร ที่เป็นกำลังใจและอยู่เคียงข้างเพื่อสนับสนุนและเป็นแรงผลักดันชั้นดี เสมอมา

นายชูพงศ์ อธิริวุฒิ

๓๐ กันยายน ๒๕๕๕

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5380018  
 ชื่อโครงการ: ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำๆ ณ บริเวณปลาย ๕ ไพรม์ และ ๓ ไพรม์ ควบคุมการทำงานของยีนผ่านกระบวนการเมธิลเลชันในโรคมะเร็ง  
 ชื่อนักวิจัย: นายชูพงศ์ อธิธิวุฒิ  
 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 E-mail Address: chupongi@gmail.com  
 ระยะเวลาโครงการ : ๒ ปี

การศึกษานี้วิจัยเชิงพรรณนาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของระดับเมธิลเลชันที่บริเวณลำดับสารพันธุกรรมที่มีลักษณะซ้ำๆ กัน กระจายอยู่ทั่วจีโนม โดยเลือกศึกษาในลำดับสารพันธุกรรมที่มีรูปแบบ “ไลน์ ๑ (LINE-1 or L1)” ซึ่งพบราว ๑๗ เปอร์เซ็นต์ของจีโนมมนุษย์ การศึกษาในครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษารูปแบบเมธิลเลชัน ณ ตำแหน่งปลาย ๕ ไพรม์ของไลน์ ๑ ทั่วจีโนม ในการศึกษาอื่นๆ ที่มีมาก่อนหน้า โดยในครั้งนี้เป็นการศึกษารูปแบบเมธิลเลชันของไลน์ ๑ ณ ตำแหน่ง CpG ไดนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย ๓ ไพรม์ จากหลักฐานชิ้นสำคัญก่อนหน้านี้ที่ทำการเปรียบเทียบลำดับของสารพันธุกรรม ณ บริเวณทรานสคริปต์ขั้นสตาร์ทไซต์ (transcription start sites) บน mRNA ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญกับการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยเปรียบเทียบกับไลน์ ๑ ที่พบทั้งหมดในจีโนม (ทั้งไลน์ที่แทรกแบบสมบูรณ์และแบบไม่สมบูรณ์) พบว่าส่วนของทรานสคริปต์ขั้นสตาร์ทไซต์ของ mRNA จำนวนหนึ่ง ปรากฏอยู่ ณ บริเวณส่วนปลาย ๓ ไพรม์ของไลน์ ๑ ซึ่งการพบส่วนของไลน์ ๑ บริเวณปลาย ๓ ไพรม์ดังกล่าวในส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน ทำให้ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าการเกิดเมธิลเลชัน ณ บริเวณปลาย ๓ ไพรม์ของไลน์ ๑ อาจมีนัยสำคัญต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยเฉพาะรูปแบบการเกิดเมธิลเลชันที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง ผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาวิธีไพโรซีควนซิ่ง เพื่อวัดระดับเมธิลเลชันที่เกิดขึ้น ณ ปลาย ๓ ไพรม์ของไลน์ ๑ ในตัวอย่างดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อมะเร็งลำไส้ใหญ่ ๑๐ ราย และมะเร็งปอด ๑๓ ราย เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของชิ้นเนื้อปกติบริเวณที่ไม่ใช่อวัยวะโรค ของตัวอย่างรายเดียวกัน ผลการศึกษาไม่พบความแตกต่างของระดับเมธิลเลชัน ของตำแหน่ง CpG ไดนิวคลีโอไทด์ ๒ ตำแหน่ง ในกลุ่มมะเร็งและกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ได้สร้างเครื่องมือในการวัดระดับเมธิลเลชัน ณ ปลาย ๓ ไพรม์ของไลน์ ๑ เพื่อใช้เปรียบเทียบกับวิธีการวัดดั้งเดิมที่วัด ณ ปลาย ๕ ไพรม์ ทั้งวิธี COBRA-L๑ มาตรฐาน และวิธีไพโรซีควนซิ่งจากชุดตรวจสำเร็จรูป เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้ศึกษาเปรียบเทียบในการศึกษาอื่นต่อไป

คำสำคัญ: ไลน์ ๑ - เมธิลเลชัน - ปลาย 3 ไพรม์ - มะเร็งปอด - มะเร็งลำไส้ใหญ่

## ABSTRACTS

---

**Project Code:** TRG5380018

**Project Title:** Functional repetitive sequences on 5' and 3' regulatory region controls gene expression by methylation in cancer

**Investigator:** Chupong Ittiwut, Ph.D.  
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

**E-mail Address:** chupongi@gmail.com

**Project period:** 2 years

A descriptive study of correlation between methylation level of the interspersed repetitive sequences (IRS) and cancer was studied in long interspersed elements 1 (LINE-1 or L1), the most prevalent (approximately 17%) in the human genome. In spite of various studies of global methylation status of L1s CpG dinucleotides at 5' promoter, interestingly, previous comprehensive analysis has shown that predictive transcription start sites (TSSs) of expressed mRNAs were globally mapped to the 3'UTR sequences of full-length and 5'-truncated (fragmented) L1s. To address whether this L1s 3'promoter plays role in genes regulation and carcinogenesis via methylation, in this study, we developed a pyrosequencing-based analysis to evaluate methylation level of the CpGs at 3'UTR of the full-length L1s sequences. Bisulfite-converted genomic DNA derived from microdissected formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues of 23 cases matched tumors and normal adjacent tissues (10 colonic and 13 lung adenocarcinoms) were amplified by 2 separated primer pairs flanking 2 CpGs, which are located 67-bp apart, then pyro-sequenced in 2 separated reactions. Though, in this study, no significance was found between normal and tumor of lung and colonic adenocarcinoma, we have developed a new pyrosequencing-based method to measure methylation of the 2 CpG dinucleotides in L1s 3'UTR sequences in addition to the two widely used methylation detections at 5'-L1s; combined bisulfite restriction analysis of LINE-1 (COBRA-LINE1) and commercially-available kits.

**Keywords:** LINE-1, Methylation, 3'UTR, Adenocarcinoma

## บทนำ

กระบวนการเติมหมู่เมทิล หรือกระบวนการเมทิลเลชัน ณ ตำแหน่ง CG ของบริเวณ CpG island บนสายดีเอ็นเอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นหนึ่งในกระบวนการควบคุมเหนือพันธุกรรมหรือเอพิเจเนติกส์ (Epigenetics) เพื่อควบคุมการทำงานของยีน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดใดเกิดขึ้นกับลำดับของดีเอ็นเอ เกิดขึ้นในกระบวนการพัฒนาการและการแบ่งเซลล์ กระบวนการควบคุมความผิดปกติของการเกิดโรคและกลุ่มอาการหลายชนิด รวมทั้งในโรคมะเร็ง<sup>1 2</sup>

นอกจากกระบวนการเมทิลเลชัน ณ บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนเพื่อควบคุมการทำงานของยีนที่ตำแหน่งเฉพาะ (locus specific methylation) แล้ว ยังมีการศึกษาสถานะและระดับของการเติมหมู่เมทิล ณ บริเวณดีเอ็นเอที่มีลักษณะซ้ำๆ กัน ซึ่งพบกระจุกกระจายทั่วจีโนม ที่มีชื่อเรียกว่า interspersed repetitive sequences (IRS) ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด จำแนกตามลักษณะและลำดับของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไป การศึกษาระดับและสถานะของกระบวนการเมทิลเลชันของบริเวณ IRS ที่กระจุกกระจายเหล่านี้มีวัตถุประสงค์ที่ไม่เพียงแต่ใช้เป็นเครื่องหมายติดตาม (marker) หรือใช้เป็นตัวบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่างๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังที่กล่าวมาแล้ว กระบวนการเมทิลเลชัน ณ ตำแหน่ง IRS ที่แทรกอยู่ ณ ตำแหน่งต่างๆ ดังกล่าว ยังอาจมีนัยสำคัญในกระบวนการควบคุมการทำงานของยีน ณ ตำแหน่งที่ IRS เข้าไปแทรกอยู่ในจีโนมอีกด้วย

ปัจจุบัน มีการศึกษาสถานะและระดับของเมทิลเลชันที่ตำแหน่งของไลน์ ๑ (long interspersed elements 1; LINE-1 or L1) ซึ่งเป็น IRS ประเภทหนึ่งที่แทรกอยู่ทั่วจีโนม เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายติดตามกัน อย่างอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างมะเร็งชนิดต่างๆ กับกลุ่มควบคุม เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมทิลเลชันของไลน์ ๑ กับการเกิดมะเร็งชนิดนั้นๆ โดยการศึกษาจะเลือกดีเอ็นเอเฉพาะที่บริเวณปลาย ๕ ไพรม์ ที่มีรายงานว่าเป็นโปรโมเตอร์ของไลน์ ๑ เป็นลำดับดีเอ็นเออ้างอิง (บริเวณปลาย ๕ ไพรม์ดังกล่าวเป็นส่วนสำคัญที่มีรายงานว่าจะไลน์ ๑ จะสูญเสียความสามารถในการเปลี่ยนตำแหน่งโดยอัติโนมติ -transposable property- ไปแล้ว แต่ยังสามารถทำงานได้โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอเฉพาะ ณ บริเวณปลาย ๕ ไพรม์ดังกล่าวทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์) โดยคาดการณ์ว่า บริเวณดังกล่าวจะเป็นตัวแทนของไลน์ ๑ ที่แทรกอยู่ทั่วจีโนม ซึ่งจะทำให้สามารถศึกษาระดับของเมทิลเลชันของไลน์ ๑ โดยเฉลี่ยครอบคลุมทั้งจีโนมได้ การศึกษาลักษณะนี้เรียกว่า การศึกษาเมทิลเลชันทั่วจีโนม (global or genome-wide methylation) โดยใช้ไลน์ ๑ เป็นเครื่องหมายติดตาม ซึ่งระดับของเมทิลเลชันเฉลี่ยทั้งจีโนมสามารถวัดค่าออกมาได้ว่า อยู่ในระดับที่สูงหรือต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (hypermethylation or hypomethylation) โดยใช้การวัดและคำนวณนัยทางสถิติเป็นเครื่องมือ จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าในกลุ่มโรคมะเร็งจะมีระดับเมทิลเลชันของไลน์ ๑ ที่ลำดับดีเอ็นเอบริเวณ ๕ ไพรม์ดังกล่าว "ต่ำกว่า" ในสภาวะปกติ (hypomethylation in cancer)<sup>3-6</sup>

จากความสำคัญของลำดับดีเอ็นเอบริเวณ ๕' ไพรม์ดังกล่าว จึงถูกใช้เป็นเครื่องหมายติดตามเพื่อวัดระดับของเมทิลเลชันของไลน์ ๑ กันอย่างแพร่หลาย โดยวิธีการวัดสามารถใช้วิธี COBRA-LINE1 (combined bisulfite restriction analysis of LINE-1)<sup>7,8</sup> ซึ่งเป็นการออกแบบตำแหน่งจำเพาะที่สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่ง CpG ที่ถูกเติมหมู่เมทิลหลังจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงในหลอดทดลองโดยเติมสารไบซัลไฟต์เพื่อเปลี่ยน CpG ที่ไม่ถูกเติมหมู่เมทิลและ C ปกติให้กลายเป็น T ซึ่งนอกจากวิธี COBRA-LINE1 แล้วอาจใช้วิธีอื่น เช่น การตรวจ methylated CpG บริเวณปลาย ๕' ไพรม์ของไลน์ ๑ ด้วยเครื่องไพโรซีควเอนซิง (pyrosequencer) โดยอาจใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปหรือสามารถออกแบบเพื่อตรวจตำแหน่ง CpG อื่นๆ ที่บริเวณใกล้เคียง<sup>6,9</sup>

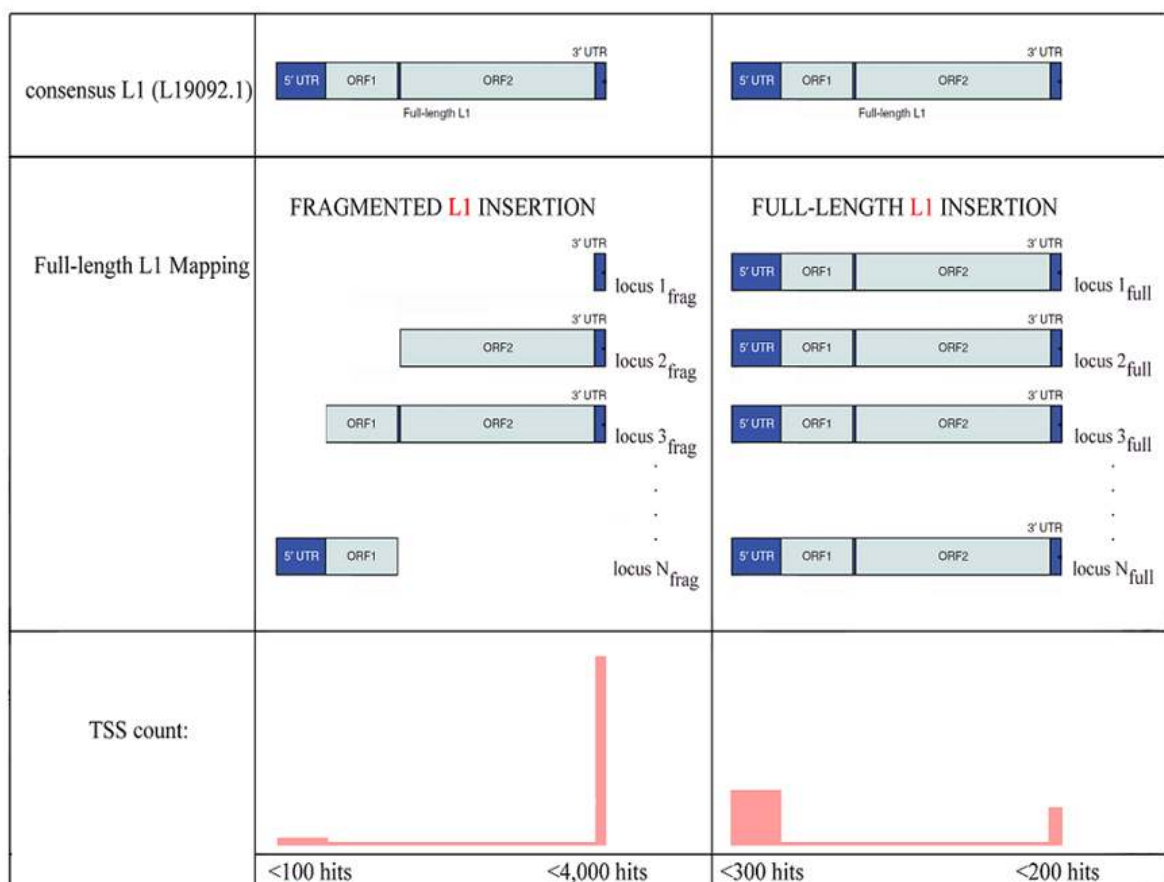
นอกจาก การเติมหมู่เมทิล ณ บริเวณปลาย ๕' ไพรม์ซึ่งเป็นบริเวณโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของไลน์ ๑ จะมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งชนิดต่างๆ มีรายงานจากการศึกษาของ Faulkner J et al. (Nat Genet 2009)<sup>10</sup> เมื่อเร็วๆ นี้ พบว่าลำดับดีเอ็นเออ้างอิง ณ ปลาย ๓' ไพรม์ของไลน์ ๑ อาจมีส่วนสำคัญกับการควบคุมการทำงานของยีนด้วย โดยคณะของ ดร. Faulkner ได้ทำการเปรียบเทียบข้อมูล ๓ ชุดซึ่งประกอบด้วย

ก) ข้อมูลชุดที่ ๑ ประกอบด้วยลำดับดีเอ็นเอบริเวณที่น่าจะเป็น trascription start site (TSS) ที่อยู่ ณ บริเวณปลาย ๕' ไพรม์ ซึ่งเป็นส่วนควบคุมการทำงานของยีนของ expressed mRNA ชนิดต่างๆ

ข) ข้อมูลชุดที่ ๒ แสดงตำแหน่งทั่วทั้งจีโนม ที่มีไลน์ ๑ แทรกอยู่แบบเต็มชิ้นส่วน (โดยใช้ลำดับดีเอ็นเออ้างอิง NCBI: L1 (L19092.1))<sup>11</sup> เป็นตัวเปรียบเทียบ

ค) ข้อมูลชุดที่ ๓ แสดงตำแหน่งทั่วทั้งจีโนม ที่มีไลน์ ๑ แทรกอยู่แบบไม่เต็มชิ้นส่วน (โดยใช้ลำดับดีเอ็นเออ้างอิง NCBI: L1 (L19092.1))<sup>11</sup> เป็นตัวเปรียบเทียบ) ซึ่งไลน์ ๑ ที่แทรกอยู่แบบดังกล่าว ณ บางตำแหน่งจะเป็นแบบมีเฉพาะด้านปลาย ๕' (3' truncated) หรือ ปลาย ๓' ไพรม์ (5' truncated) เท่านั้น และบางตำแหน่งก็มีทั้งสองปลายแต่ขาดชิ้นส่วนตรงกลางไป ทั้งนี้แต่ละตำแหน่งที่พบจะมีขนาดไม่เท่ากันและแตกต่างกันออกไป

กลุ่มวิจัยของ ดร. Faulkner J et al. ทำการเปรียบเทียบข้อมูลชุดที่ ๑ กับข้อมูลชุดที่ ๒ และ ๓ พบว่า TSS ของ expressed mRNA ทั้งหลายเหล่านั้น นอกจากจะปรากฏในปลาย ๕' ไพรม์แล้ว ยังปรากฏอยู่ในส่วนของปลาย ๓' ไพรม์ของไลน์ ๑ ที่แทรกอยู่แบบเต็มชิ้นส่วน และ บางส่วน (ข้อมูลชุดที่ ๒ และ ๓ ตามลำดับ) ดังแสดงในรูปที่ ๑



รูปที่ ๑ ลำดับดีเอ็นเอต้นปลาย ๓ ไพรม์ของไลน์ ๑ ซึ่งพบอยู่ใน TSS ของ expressed mRNA โดย  
Faulkner J et al. Nat Genet 2009<sup>10</sup>

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าลำดับของดีเอ็นเอที่ปลาย ๓ ไพรม์ของไลน์ ๑ น่าจะมีบางตำแหน่งที่ปรากฏเป็นส่วนเดียวกับ TSS ของบางยีนซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนบางกลุ่ม เช่นเดียวกับที่ปลาย ๕ ไพรม์ของไลน์ ๑ ได้แสดงบทบาทดังกล่าว และเมื่อเชื่อมโยงกับสมมติฐานที่ว่า การเติมหมู่เมทิล ณ บริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (regulatory region) จะมีส่วนสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของยีน จึงนำมาสู่สมมติฐานที่ว่า หากดีเอ็นเอบริเวณส่วนปลาย ๓ ไพรม์ของไลน์ ๑ มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของยีนในจีโนมจริง ระดับที่แตกต่างกันของเมทิลเลชันที่ ดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวเฉลี่ยทั่วทั้งจีโนมในกลุ่มรอยโรคมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม น่าจะเป็นเครื่องหมายติดตามแบบเหนือพันธุกรรม (epigenetic marker) นอกเหนือจากการใช้ระดับเมทิลเลชันที่บริเวณปลาย ๕ ไพรม์ ในมะเร็งชนิดต่างๆ ที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ จึงเป็นที่มาของการศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ของระดับเมทิลเลชันที่บริเวณปลาย ๓ ไพรม์ของไลน์ ๑ ในรอยโรคของมะเร็งชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาเรื้อรังในชั้นเนื้อเยื่อและมะเร็งลำไส้ใหญ่เปรียบเทียบกับบริเวณปกติที่ไม่ใช่อะโรยโรคในจากชั้นเนื้อเยื่อของผู้ป่วยรายเดียวกัน ในรายงานการวิจัยฉบับนี้



## วิธีการศึกษา

### ขั้นตอนที่ ๑ เลือกลำดับดีเอ็นเอของไลน์ ๑

เลือกใช้ลำดับดีเอ็นเอของไลน์ ๑ ที่เป็นตัวเต็ม (Full-length LINE1) รหัส gi|307102|gb|L19092.1 |HUM1G Human LINE1 (L1.4)<sup>11</sup> repetitive element DNA sequence (ดูภาคผนวก 1 ประกอบ) ซึ่งเป็นลำดับดีเอ็นเอที่มีรายงานว่าเป็นไลน์ ๑ ที่ยังสามารถทำงานได้ (active LINE-1) และมีผลิตภัณฑ์จากการแสดงออกของลำดับดีเอ็นเอดังกล่าว ซึ่งสามารถดาวน์โหลดได้จาก [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

ลำดับดีเอ็นเอของไลน์ ๑ ตัวเต็มดังกล่าวนี้ประกอบด้วย ๕ ส่วนได้แก่

- 1) 5' Untranslated Region (5' UTR)
- 2) Open Reading Frame 1 (ORF1)
- 3) ลำดับดีเอ็นเอระหว่าง ORF1 และ ORF2
- 4) Open Reading Frame 1 (ORF2)
- 5) 3' Untranslated Region (3' UTR)

### ขั้นตอนที่ ๒ การออกแบบไพรเมอร์ ณ ตำแหน่งปลาย ๓ ไพรม์ของไลน์ ๑

ก) ลำดับดีเอ็นเอของไลน์ ๑ ในส่วน 3'UTR บริเวณปลาย ๓ ไพรม์ (L19092.1) จากภาคผนวก 1) มีความยาวทั้งสิ้น 238 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วย CpG (ระบายด้วยเจดสีเทา) จำนวน ๒ ตำแหน่ง ดังนี้

```
GAACAATGAGATCACATGGACACAGGAAGGGGAATATCACACTCTGGGG
ACTGTGGTGGGGTCGGGGGAGGGGGGAGGGATAGCATTGGGAGATATAC
CTAATGCTAGATGACACATTAGTGGGTGCAGCGCACCAGCATGGCACAT
GTATACATATGTAACCTGCACAATGTGCACATGTACCCTAAACT
TAGAGTATAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

ข) ทั้งนี้ลำดับดีเอ็นเอดังกล่าวจะถูกตัดแปลงด้วยวิธีไบอัสไฟต์ (ภาคผนวก ๒) ดังนี้

```
GAAtAATGAGATtAtATGGAtAtAGGAAGGGGAATATtAtAtTtTGGGG
AtTGTGGTGGGGTCGGGGGAGGGGGGAGGGATAGtATTGGGAGATATAt
tTAATGtTAGATGAtAtATTAGTGGGTGtAGCGtAttAGtATGGtAtAT
```

ค) และสามารถออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรมไพรเมอร์ ๓ (<http://frodo.wi.mit.edu/> ผลลัพธ์จากภาคผนวก ๓) เพื่อให้ครอบคลุมตำแหน่ง CpG ทั้งสองตำแหน่งได้ดังนี้

[illegible]

โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะดังกล่าวไปจับเพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณ แต่สิ่งที่จะขาดไม่ได้สำหรับกระบวนการไพโรซีควอนซ์คือการสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่ติดฉลากไปโอดินด้วยวิธี 5' Biotinylation ซึ่งจะจับกับแบบเอนไซม์และสับสเตรตกับสารเคมีอื่นในกระบวนการหาลำดับด้วยวิธีไพโรซีควอนซ์ ทำให้สามารถมองเห็นและวัดการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันในแต่ละบริเวณที่มีตำแหน่ง CpG ได้ โดยทั่วไปจะใช้ไพรเมอร์ด้านปลาย ๓ ไพรม์ (REVERSE PRIMER) ที่ได้มาติดฉลากแต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากการติดฉลากไปโอดินมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างแพง เพื่อรับประกันความผิดพลาดที่เกิดขึ้น ผู้วิจัยจึงมักจะสังเคราะห์ไพรเมอร์แบบธรรมดา และนำมาทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าสามารถจับจำเพาะ

กับบริเวณดังกล่าวด้วยวิธีพีซีอาร์ได้เสียก่อน แล้วจึงส่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีลำดับเหมือนกันทุกประการแต่ติดฉลากไบโอตินขึ้นมาอีกครั้ง โดยระยะเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่ติดฉลากไบโอตินผ่านบริษัทคนกลางในประเทศไทย (เช่น Biodesign ของสวทช.) ใช้เวลาประมาณ ๓ สัปดาห์

**ขั้นตอนที่ ๓ การออกแบบไพรเมอร์พิเศษสำหรับการหาลำดับด้วยวิธีไพโรซีควенซ์**

โดยทั่วไปแล้วการวิเคราะห์โดยการใช่วิธีไพโรซีควนซ์จะใช้ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณเฉพาะและจำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์พิเศษเพิ่มขึ้นมาอีก ๑ เส้น สำหรับการเริ่มต้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยไพรเมอร์พิเศษดังกล่าวจะมีลักษณะเหมือนไพรเมอร์ในทิศทาง ๕' ไพรม์ (ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์) เพียงแต่จะวางไว้ที่ใกล้ๆ บริเวณก่อนที่จะถึง CpG แรกที่ต้องการจะศึกษาเล็กน้อย (ราวๆ ๓ ถึง ๕ นิวคลีโอไทด์) เพื่อเป็นตัวตั้งต้นของกระบวนการไพโรซีควนซ์ ซึ่งไพรเมอร์พิเศษดังกล่าวนี้จะใช้เฉพาะด้านปลาย ๕' ไพรม์ (ด้านฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์) เพียงเส้นเดียว

อย่างไรก็ตาม เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายการออกแบบไพรเมอร์เพื่อการวิเคราะห์ด้วยวิธีไพโรซีควนซ์ บางครั้งสามารถใช้ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ตัวเดียวกับที่ใช้ทำพีซีอาร์ได้เลย โดยในแต่ละปฏิกิริยาของ ๑ ไพรเมอร์ไพโรซีควนซ์ที่ใช้ ตามทฤษฎีสามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ประมาณ 40-60 ตัว และหากจะให้ได้ผลดีที่สุดในการใช้ฟังก์ชันอ่านการเปลี่ยนแปลงเฉพาะตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ (SNP Sequencing) ควรกำหนดให้มีการอ่านในบริเวณที่ต้องการประมาณ ๒๐ นิวคลีโอไทด์

เมื่อพิจารณาบริเวณของปลาย ๓ ไพรม์ของไลน์ ๑ ที่ต้องการจะวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันจากการทำพีซีอาร์ข้างต้น

GAAtAAATGAGATtAtATGGAtAtAGGAAGGGGAATATtAtAtTtTG GGG  
AtTGTGGTG GGGTCG GGGGAGGGGGGAGGGATAGtATTGGGAGATATAt  
tTAATGtTAGATGAtAtATTAGTGGGTGtAGCGtAttAGtATGGtAtAT  
GTATAtATATGTAAtTAAttTGtAtAATGTGtAtATGTAtttTAAAAtT  
TAGAGTATAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

จะเห็นว่าตำแหน่ง CpG ตำแหน่งแรกและตำแหน่งที่สองห่างกัน ๖๖ นิวคลีโอไทด์ การวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันเฉลี่ยของทั้งสองตำแหน่งจึงจำเป็นต้องทำ ๒ ครั้ง สรุปรไพรเมอร์ที่ใช้ (ในทิศทาง ๕' ไพรม์ไป ๓' ไพรม์) ได้ดังนี้

**๑) ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดสำหรับพีซีอาร์**

3UTRL1\_PSQ1\_F                      AYATYTG GGGAYTGTGGTG

๒) ไพร์เมอร์รีเวิร์สสำหรับพีซีอาร์ (ติดไปโอดิน)

3UTRL1\_RBttn                      CARRTTARTTACATATATATACATRTRCCATRCT

๓) ไพร์เมอร์สำหรับไพโรซีแควนซิ่ง CpG ตำแหน่งแรก

3UTRL1\_PSQ1b                      TGGGGATGTGGTGGGGT

๔) ไพร์เมอร์สำหรับไพโรซีแควนซิ่ง CpG ตำแหน่งที่สอง

3UTRL1\_PSQ2b                      TAATGYTAGATGAYAYATTAGTGGG

หมายเหตุ: Y = c/t      และ R = a/g

### ขั้นตอนที่ ๔ การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อมะเร็งที่ใช้

ตัวอย่างรอยโรคมะเร็ง (lesion) ที่ใช้ ได้แก่ ชิ้นเนื้อที่เก็บในบล็อกพาราฟิน (Formalin-fixed Paraffin Embedded) จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ ที่เก็บไว้ตั้งแต่ปี ๒๕๕๐ ถึง ๒๕๕๕

๑) กลุ่มมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (Lung adenocarcinoma) ๑๓ ราย

๒) กลุ่มมะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (Colon adenocarcinoma) ๑๐ ราย

โดยในรายเดียวกัน จะทำการคัดเลือกชิ้นเนื้อส่วนบริเวณที่เป็นรอยโรคผ่านทางกล้องจุลทรรศน์ มา สกัดดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของชิ้นเนื้อบริเวณใกล้เคียงที่ไม่มีรอยโรค (กลุ่มควบคุมปกติ) โดยพยาธิ แพทย์ผู้เชี่ยวชาญ

ดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจะถูกนำมาดัดแปลงด้วยวิธีไบซัลไฟต์โดยใช้ชุดดัดแปลงดีเอ็นเอสำเร็จรูป EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research) นำเข้าโดยบริษัท Sigma Ltd. ประเทศไทย

### รูปที่ ๒ ชุดดัดแปลงดีเอ็นเอด้วยวิธีไบซัลไฟต์

(protocol online:

<http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/56/d5001i.pdf>

picture from:

[http://bric.postech.ac.kr/upload/board/files/new\\_protecth/new\\_3/photo\\_0004503.jpg](http://bric.postech.ac.kr/upload/board/files/new_protecth/new_3/photo_0004503.jpg))



## ขั้นตอนที่ ๕ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ปริมาณสารและอุณหภูมิสำหรับแต่ละหลอดปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ปริมาตร ๒๐ ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| ๑. Forward primer (10 uM)    | 0.2 uL  |
| ๒. Reverse primer (10 uM)    | 0.2 uL  |
| ๓. PCR buffer (10X)          | 2.0 uL  |
| ๔. dNTP (10mM)               | 0.2 uL  |
| ๕. HotStar Taq               | 0.1 uL  |
| ๖. MgCl <sub>2</sub> (25 mM) | 2.0 uL  |
| ๗. dH <sub>2</sub> O         | 12.9 uL |
| ๘. Bisulfite DNA (10ng/uL)   | 2.0 uL  |

อุณหภูมิ สำหรับปฏิกิริยาได้แก่

95 C 5 min

94C-30 sec/ 55C-30 sec/ 72C-45sec 35 cycles

72C 5 min

ผ่านกระบวนการอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อดูขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อยืนยันขนาด ๑๓๑ นิวคลีโอไทด์

## ขั้นตอนที่ ๖ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีไพโรซีควенชิง

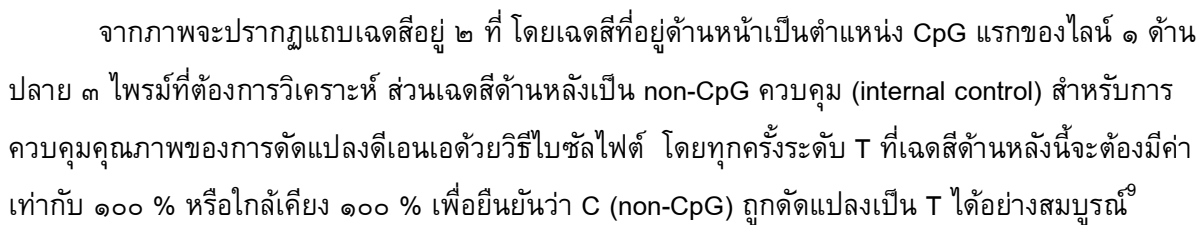
หลักการของการวัดระดับเมทิลเลชันที่ตำแหน่ง CpG ในนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยวิธีการไพโรซีควенชิง คือการวัดระดับสัญญาณของนิวคลีโอไทด์ C ณ ตำแหน่ง CpG ที่ไม่ถูกเปลี่ยนเป็น T หลังจากกระบวนการดัดแปลงดีเอ็นเอด้วยวิธีไบซัลไฟต์ โดยมี C ของ non-CpG ที่ตำแหน่งใกล้เคียงเป็นตัวควบคุมประสิทธิภาพความสมบูรณ์ของวิธีไบซัลไฟต์ ดังที่กล่าวมาเบื้องต้นในส่วนของบทนำ

GAAtAAATGAGATtAtATGGAtAtAGGAAGGGGAATATtAtAtTtTGGGG  
AtTGTGGTGGGGTCGGGGAGGGGGGAGGGATAGtATTGGGAGATATAt

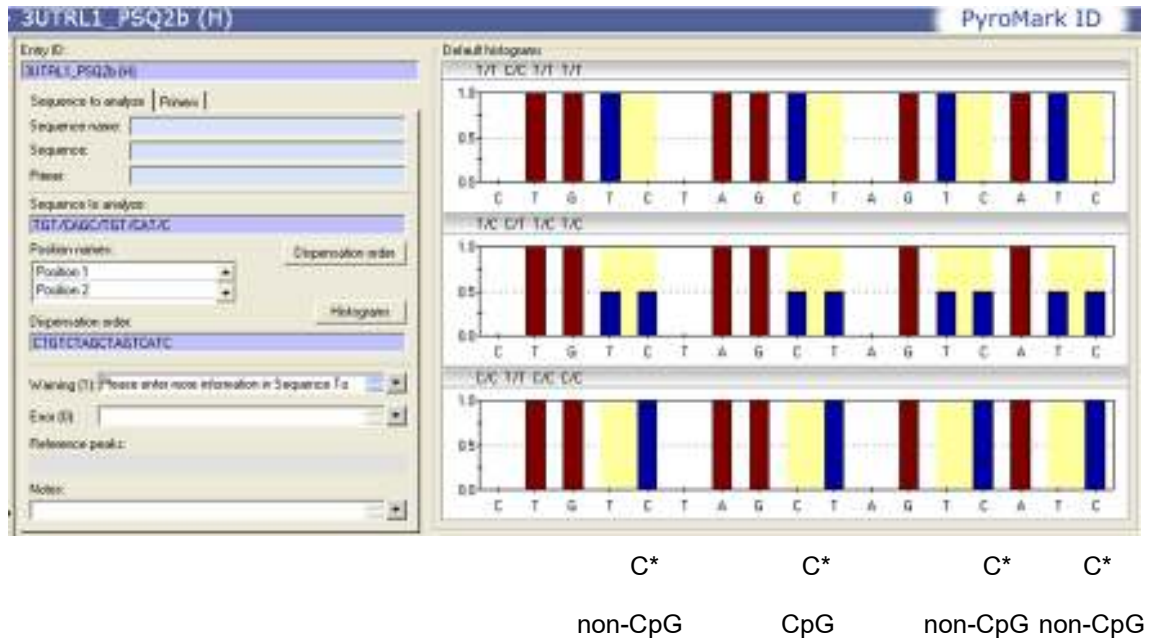
จากลำดับของดีเอ็นเอที่ดัดแปลงด้วยวิธีไบโชนัลไฟต์ข้างต้น จะถูกนำไปสร้างโปรแกรมเพื่อเตรียมวิเคราะห์สำหรับเครื่องไฟโรซีควอนซึ่งดังนี้

ลำดับดีเอ็นเอที่กรอก C/TGGGGGAGGGGGGAGGGATAGC/T

กรอกลงในช่อง sequence to analyze โปรแกรมจะทำการส่งลำดับดีเอ็นเอที่จะวิเคราะห์ในช่อง dispensation order ได้ว่า CTGAGGAGATAGCT และกำหนดเป็น default histogram สำหรับการวิเคราะห์ CpG ตำแหน่งที่ ๑ ได้ดัง รูปที่ ๓



ด้วยวิธีการเดียวกัน สามารถกำหนดโปรแกรมและ default histogram สำหรับ CpG ตำแหน่งที่ ๒ ได้ดัง รูปที่ ๔



sequence to analyze: TGT/CAGC/TGT/CAT/C

dispensation order: CTGTCAGCTAGTCATC

primer: 3UTRL1\_PSQ2b (TAATGYTAGATGAYAYATTAGTGGG)

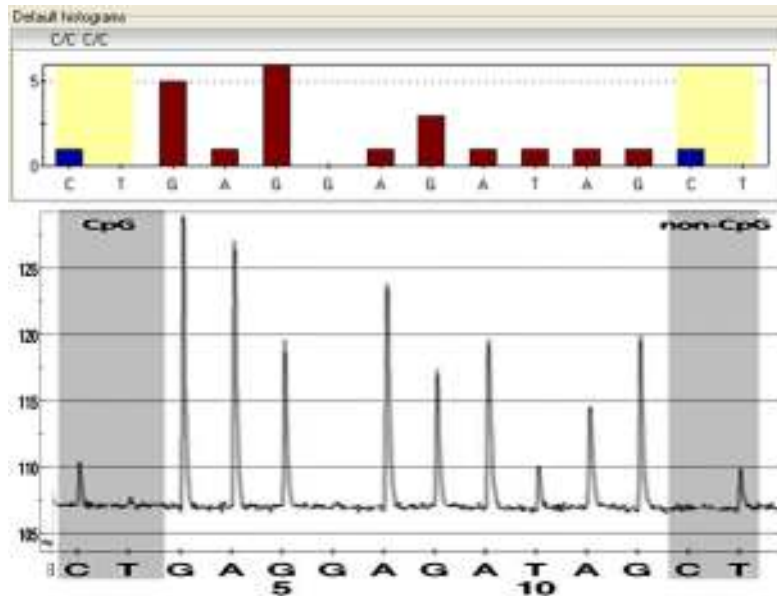
โดยจะวัด C ตำแหน่งที่ ๒ (จากภาพ) เทียบกับ C (non-CpG) ตำแหน่งที่ ๑ ๓ และ ๔ ที่เป็นตัวควบคุมคุณภาพของการดัดแปลงดีเอ็นเอด้วยวิธีไบซัลไฟต์ (internal control)

### ขั้นตอนที่ ๗ การแปลผลและการวิเคราะห์หัยสำคัญสถิติ

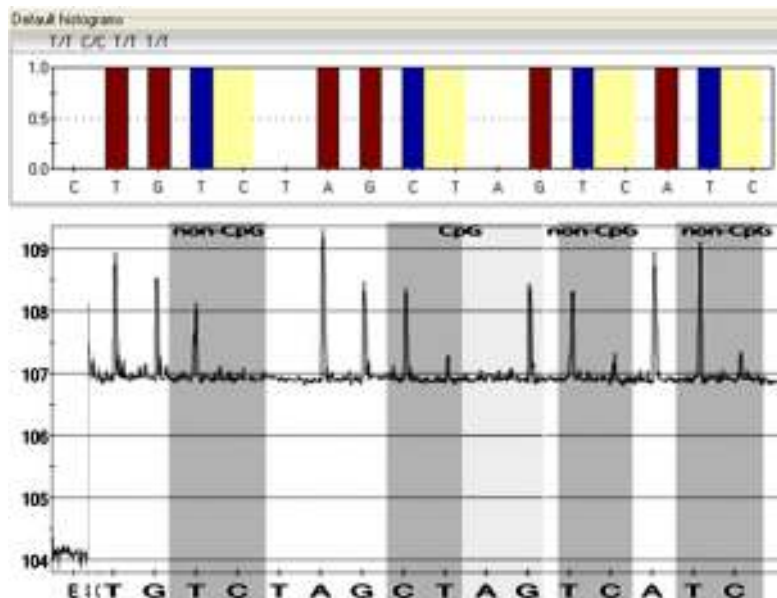
ระดับเมธิลเลชันของ CpG แต่ละตำแหน่งเท่ากับ %C ตำแหน่ง CpG ซึ่งจะแสดงค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์โดยอัตโนมัติจากการวัดโดยโปรแกรมของเครื่องไพโรโรซีควนซิ่ง ซึ่งคำนวณจาก  $C / (C+T)$  ณ ตำแหน่งเดียวกัน โดยระดับเมธิลเลชันที่ 3'UTR ของไลน์ ๑ ในการศึกษานี้จะเท่ากับ ค่าเฉลี่ยของระดับเมธิลเลชันของ CpG ตำแหน่งที่ ๑ บวกกับระดับเมธิลเลชันของ CpG ตำแหน่งที่ ๒

## ผลการทดลอง

การแสดงผลทางหน้าจอของการวัดระดับเมทิลเลชันของ CpG ทั้งสองตำแหน่ง ของลำดับดีเอ็นเอของ  
ไลน์ ๑ ทางด้านปลาย ๓ ไพรม์ แสดงได้ดังรูปภาพต่อไปนี้



รูปที่ ๕ CpG ตำแหน่งที่ ๑

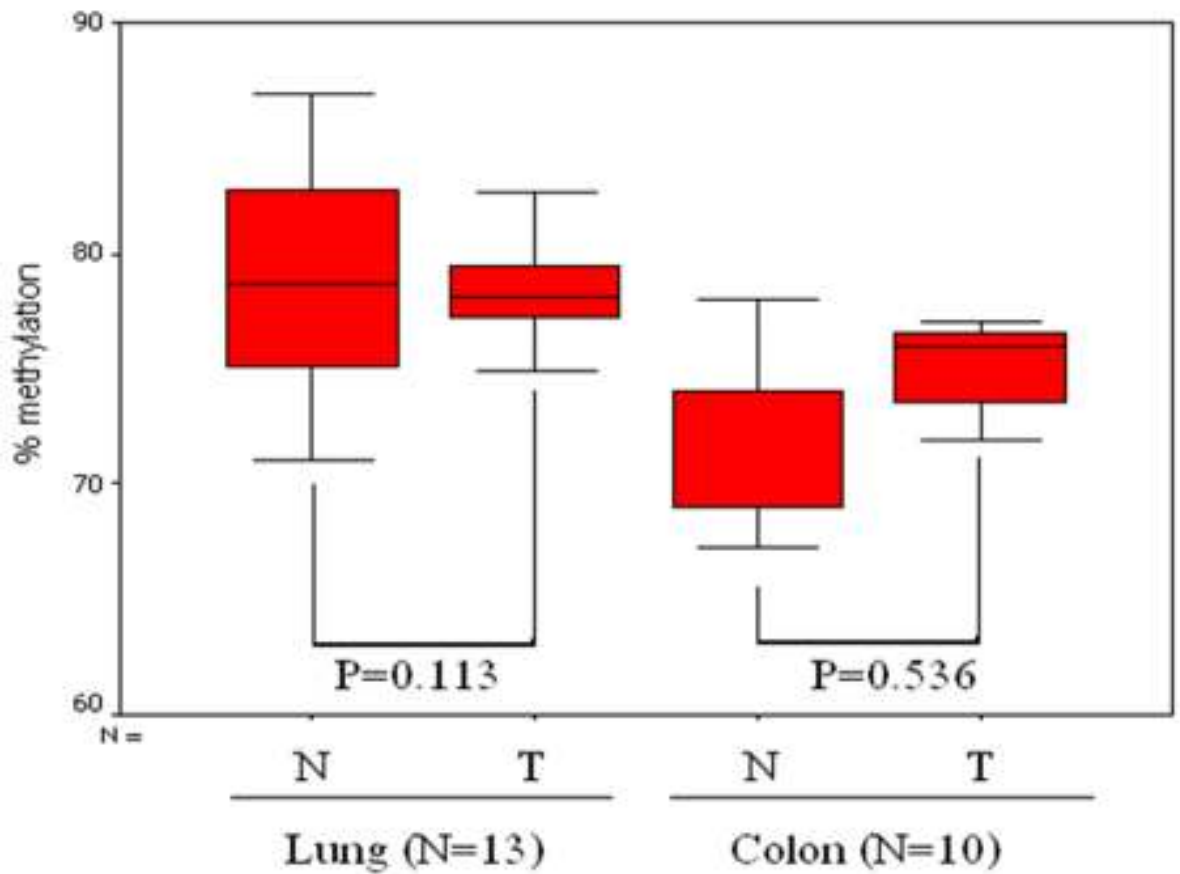


รูปที่ ๖ CpG ตำแหน่งที่ ๒

ระดับเมทิลเลชันเฉลี่ยของ CpG ของไลน์ ๑ ทั้งสองตำแหน่งทำการเปรียบเทียบกับค่าสถิติ  
ไครส์แควร์ (ANOVA post-hoc analysis) ในชั้นเนื้อมะเร็งปอดชนิดอะดิโนคาร์ซิโนมา กับดีเอ็นเอของชั้นเนื้อ



ปกติในผู้ป่วยรายเดียวกัน จำนวน ๑๓ ราย เท่ากับค่า  $p = 0.113$  และในชั้นเนื้อมะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิดอะดีโนคา  
ซิโนมา จำนวน ๑๐ ราย ด้วยวิธีการวิเคราะห์เดียวกัน พบว่า ค่า  $p = 0.536$



รูปที่ ๗ การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบระดับเมทิลเลชันของกลุ่มมะเร็งและกลุ่มควบคุม

จากการวิเคราะห์ดังกล่าวไม่พบว่า ระดับเมทิลเลชันของมะเร็งทั้งสองชนิด ในกลุ่มทดลองและกลุ่ม  
ควบคุมไม่มีความแตกต่างกัน ที่นัยสำคัญ  $p = 0.05$

## บทสรุปและวิจารณ์

การศึกษานี้เป็นการศึกษาระดับเมทิลเลชันทั้งจีโนม (Genomewide methylation) โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอของไลน ๑ ที่พบกระจายอยู่ทั่วจีโนมเป็นเครื่องหมายติดตาม โดยระดับเมทิลเลชันที่ได้จากค่าการวัด CpG ของไลน ๑ เป็นค่าเฉลี่ยของ CpG จากบริเวณที่กำหนดของตำแหน่งของไลน ๑ ทั้งหมดที่สามารถเพิ่มปริมาณแบบจำเพาะได้กับไพรเมอร์ที่ออกแบบมาสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อใช้เป็นตัวแทนของการเกิดเมทิลเลชันของทั้งจีโนม

ความแตกต่างของการศึกษานี้กับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่เกี่ยวกับระดับเมทิลเลชันของไลน ๑ ทั้งจีโนมสามารถแยกออกได้เป็นประเด็นได้ดังนี้ คือ

๑) วิธีการที่ใช้ศึกษาก่อนหน้านี้กับดีเอ็นเอของไลน ๑ ส่วนปลาย ๕ ไพรม์ มีทั้งที่ใช้วิธี COBRA-LINE1<sup>7</sup> ซึ่งเป็นวิธีการวัดระดับเมทิลเลชันด้วยเทคนิคผสมโดยใช้การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และวัดระดับอัตราส่วนการเรืองแสงของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ให้เป็นตัวแทนของ CpG ที่มีเมทิลเลชันและส่วนที่ไม่มี ที่เกิดจากการตัด ณ บริเวณ CpG ที่ถูกตัดแปลงแล้วด้วยวิธีไบซัลไฟต์ และนอกจากวิธี COBRA-LINE1 แล้ว การศึกษาด้านปลาย ๕ ไพรม์ยังมีการใช้วิธีการแสดงค่าด้วยเครื่องไฟโรซีควนซิง เช่นเดียวกับที่ใช้กับการวัดระดับเมทิลเลชันที่ปลาย ๓ ไพรม์ในการศึกษาครั้งนี้

๒. ตำแหน่งของบริเวณไลน ๑ ที่ทำการศึกษาต่างกัน ได้แก่ การศึกษานี้เป็นการศึกษาระดับเมทิลเลชันของไลน ๑ ที่ปลาย ๓ ไพรม์ในขณะที่การศึกษาก่อนหน้านี้ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับ การศึกษาด้วยวิธี COBRA-LINE1<sup>7,8</sup> และวิธีศึกษาจากชุดตรวจวัดระดับเมทิลเลชันของไลน ๑ ของบริษัท QIAGEN ที่เป็นที่ยอมรับทั่วไป<sup>6,9</sup> เป็นการศึกษาโดยใช้ลำดับดีเอ็นเอของไลน ๑ ที่ตำแหน่งปลาย ๕ ไพรม์ ณ ตำแหน่งที่เป็นโปรโมเตอร์และมีลักษณะเป็น CpG rich แสดงได้ดังนี้ (จากลำดับดีเอ็นเอตัวเต็มด้านปลาย ๕ ไพรม์ในภาคผนวก ๑)

GGGGGAGGAGCCAAGATGGCCGAATAGGAACAGCTCCGGTCTACAGCTCCCAGCGTGAGCGACGCAGAAGACGGTGATTTCTGCATTTCCATCTGAGGTACCGGGTTTCATCTCACTAGGGAGTGCCAGACAGTGGGCGCAGGCCAGTGTGTGTGCGCACCGTGCGCGAGCGAAGCAGGGCGAGGCATTGCCTCACCTGGGAAGCGCAAGGGGTCAAGGAGTTCCTTTCTGAGTCAAAGAAAGGGGTGACGGTCGCACCTGGAAAATCGGGTCACTCCCACCGAATATTGCGCTTTTCAGACCGGCTTAAAAAACGCGCACCACGAGACTATATCCACACCTGGCTCGGAGGGTCCTACGCCCACGGAATCTCGCTGATTGCTAGCACAGCATCTGAGATCAAAGTGAAGGCGGCAACGAGGCTGGGGAGGGGCGCCCGCCATTGCCAGGCTTGCTTAGGTAAACAAAGCAGCCGGGAAGCTCGAAC TGGGTGGAGCCCACCACAGCTCAAGGAGGCCTGCCTGCCTCTGTAGGCTCCACCTCTGGGGGCAGGGCACAGACAAACAAAGGCAGCAGTAACCTCTGCAGACTTAAGTGTCCTGTCTGACAGCTTTGAAGAGAGCAGTGGTTCTCCAGCACGCAGCTGGAGATCTGAGAACGGGCAGACAGACTGCCTCCTCAAGTGGGTCCCTGACTCCTGACCCCCGAGCAGCCTAACTGGGAGGCACCCCCAGCAGGGGCACACTGACACCTCACACCGGCAGGGTATTCCAACAGACCTGCAGCTGAGGGTCCTGTCTGTAGAAGGAAACTAACAACCAGAAAGGACATCTACACCGAAAAACCCATCTGTACATCACCATCATCAAAGACCAAAATAGATAAAACCACAAAG

Note: underlined = CpG island

CGCAAGGGGTCAAGGAGTTCCTTT

5'CCGTAAGGGGTAGGGAGTTTTT3' COBRA-LINE1 F<sup>7</sup>

CCGA

COBRA-LINE1 TaqI (TCGA) restriction site

**TTAA**

COBRA-LINE1 TasI (TTAA) restriction site

CCCACACCTGGCTCGGAGGGTCCTAC

5'RTAAACCCCTCCRAACCAATATAAA3' COBRA-LINE1 R <sup>7</sup>

CCGGCTTAAAGAAACGGCGCACCACGA

Pyromark (Qaigen Kit) LINE1 analysis Region

๓) จำนวนของตำแหน่ง **CpG** ที่ใช้เป็นตัวแทนเพื่อวัดระดับเมทิลเลชันแตกต่างกัน (ดูลำดับดีเอ็นเอในข้อ ๒ ประกอบ) ทั้งนี้การศึกษาโดยใช้วิธี COBRA-LINE1 ทำการวัดระดับเมทิลเลชันของ CpG ๒ ตำแหน่งแยกทีละครั้งก่อนนำมาเฉลี่ย เหมือนกับการศึกษาครั้งนี้ที่วัด ๒ ตำแหน่ง (แต่เป็นปลาย ๓ ไพรม์) ในขณะที่ชุดวัดระดับเมทิลเลชันของไลน์ ๑ สำเร็จรูปวัดและเฉลี่ยค่าเมทิลเลชันของ CpG จำนวน ๔ ตำแหน่ง (ภาคผนวก ๔)

อนึ่งการวัดระดับเมทิลเลชันด้วยวิธีไพโรซีควนซิง สิ่งที่ต้องตระหนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีนี้ที่ศึกษาในลำดับดีเอ็นเอ IRS หรือลำดับดีเอ็นเอที่มีหลาย copy และมีความหลากหลายอื่นๆ ผู้วิจัยต้องให้ความสำคัญต่อระวางกรณีที่ลำดับของดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันภายใน copy โดยที่หัวท้ายของ copy สามารถจับได้กับไพร์เมอร์ที่จำเพาะ แต่ภายในซึ่งมีความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอ จะทำให้ตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ล็อกไว้เพื่อวัดสัญญาณจะเปลี่ยนแปลง ไม่เป็นไปตามลำดับที่คาดไว้ และจะทำให้เกิดการแปรปรวนกับการแปลผล เช่นที่เกิดขึ้นกับลำดับดีเอ็นเอของไลน์ ๑ จากการศึกษา (กรณีนี้เช่นเดียวกับความแปรปรวนของการวิเคราะห์ด้วยไพโรซีควนซิง ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากมี variation ของดีเอ็นเอชนิด de novo mutation ทั้งประเภท insertion และ deletion เกิดขึ้น) ผู้วิจัยเสนอข้อไพโรซีควนซิง กับลำดับซ้ำๆ

จากผลการศึกษา สรุปได้ว่าวัดระดับเมทิลเลชันแบบ matched case-control ด้วยวิธีไพโรซีควนซิงที่ CpG ๒ ตำแหน่งบริเวณปลาย ๓ ไพรม์ของลำดับดีเอ็นเอของไลน์ ๑ ไม่พบนัยสำคัญระหว่างการเปรียบเทียบในกลุ่มมะเร็งปอดและมะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา กับกลุ่มควบคุมที่เป็นดีเอ็นเอจากผู้ป่วยรายเดียวกัน อย่างไรก็ตามแนวทางการวิจัยในอนาคตที่เป็นไปได้ สามารถใช้รูปแบบการวิจัยและวิธีการเดียวกัน (ไพโรซีควนซิง) ในตำแหน่งไลน์ ๑ บริเวณดังกล่าว เพื่อหาความสัมพันธ์ของระดับเมทิลเลชันในรูปแบบที่แตกต่างกันออกไป เช่น

- ก) เปรียบเทียบระดับเมทิลเลชันของไลน์ ๑ บริเวณปลาย ๓ ไพรม์และ ๕ ไพรม์
- ข) ขยายขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาให้มากกว่าการศึกษาครั้งนี้
- ค) เพิ่มของชิ้นเนื้อมะเร็งชนิดอื่นๆ ซึ่งอาจมีนัยสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันที่ไม่ใช้ชิ้นเนื้อมะเร็งปอดและมะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา <sup>7</sup>
- ง) การเปรียบเทียบวิธีตรวจวัดทั้งแบบ COBRA-LINE1 วิธีไพโรซีควนซิง และวิธีอื่นๆ ร่วมกัน

## เอกสารอ้างอิง

1. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood* 1999;93:4059-70.
2. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews Genetics* 2002;3:415-28.
3. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002;21:5400-13.
4. Brennan K, Flanagan JM. Is there a link between genome-wide hypomethylation in blood and cancer risk? *Cancer Prev Res (Phila)* 2012;5:1345-57.
5. Shuangshoti S, Hourpai N, Pumsuk U, Mutirangura A. Line-1 hypomethylation in multistage carcinogenesis of the uterine cervix. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2007;8:307-9.
6. Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, et al. LINE-1 hypomethylation in gastric cancer, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 2012.
7. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* 2004;23:8841-6.
8. Pattamadilok J, Huapai N, Rattanatanyong P, et al. LINE-1 hypomethylation level as a potential prognostic factor for epithelial ovarian cancer. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2008;18:711-7.
9. Iwagami S, Baba Y, Watanabe M, et al. Pyrosequencing assay to measure LINE-1 methylation level in esophageal squamous cell carcinoma. *Annals of surgical oncology* 2012;19:2726-32.
10. Faulkner GJ, Kimura Y, Daub CO, et al. The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nature genetics* 2009;41:563-71.
11. Dombroski BA, Scott AF, Kazazian HH, Jr. Two additional potential retrotransposons isolated from a human L1 subfamily that contains an active retrotransposable element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90:6513-7.

## Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

๑. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า)

ผลงานการวิจัยหลัก ยังไม่มีนัยสำคัญพอที่จะได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ ในขณะนี้ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ใช้ทุนสนับสนุนส่วนเดียวกันในการดำเนินงานวิจัยเรื่อง "MPS6 gene mutation" ไปพร้อมกัน และคาดว่าผลจากงานวิจัยรองน่าจะได้รับ การส่งไปขอรับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติภายในกลางปี พ.ศ. ๒๕๕๖ เพื่อให้บรรลุ วัตถุประสงค์ของ ผู้ให้ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยผู้วิจัยจะทำการแจ้งความคืบหน้า ให้ฝ่ายวิชาการของ สกว. ทราบเมื่อมีการส่งขอตีพิมพ์ และเมื่อได้รับการตีพิมพ์เรียบร้อยแล้ว ต่อไป

๒. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

๒.๑ เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป) - (ไม่มี)

๒.๒ เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบ ข้อบังคับหรือวิธีทำงาน) - (ไม่มี)

๒.๓ เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง) - (ไม่มี)

๒.๔ เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

ผู้วิจัยได้ใช้ส่วนหนึ่งของรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้ เป็น standard protocol สำหรับให้นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาและนักวิทยาศาสตร์ในกลุ่มวิจัยใช้เป็นแนวทางในการใช้เครื่องไพโรซีควอนซิงทั้งในแง่ของการออกแบบการทดลองและการออกแบบลำดับดีเอ็นเอที่จะใช้ศึกษา ทั้งในแบบ

ก) การใช้เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของ genomic DNA

ข) การตรวจวัดระดับเมทิลเลชั่นทั้งแบบวัดทั่วทั้งจีโนมโดยใช้ IRS ชนิดไลน์ ๑ หรือ IRS อื่นๆ เป็นเครื่องหมายติดตาม และแบบที่เป็นการวัดเมทิลเลชั่นเฉพาะตำแหน่ง (โปรโมเตอร์ หรือบริเวณอื่นของยีน)

๓. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

ผลของการวิจัยได้รับการนำเสนอใน "การประชุม "นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว." ครั้งที่ ๑๒ ระหว่างวันที่ ๑๐-๑๒ ตุลาคม ๒๕๕๕ ณ โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (ภาคผนวก ๕)

ภาคผนวก ๑) gi|307102|gb|L19092.1 sequence<sup>11</sup>

(A) ส่วน 5'UTR (ในกล่องสีเหลืองคือ CpG island)

```
GGGGGAGGAGCCAAGATGGCCGAATAGGAACAGCTCCGGTCTACAGCTCCACGCGTGAGCGACGCAGAAGACGGTGATTTCATGATTTCCATCTGAGGTACCGGGTTCATCTC
ACTAGGGAGTGCCAGACAGTGGGCGCAGGCCAGTGTGTGTGCGCACCGTGCGCGAGCCGAAGCAGGGCGAGGCATTGCCTCACCTGGGAAGCGCAAGGGGTGAGGGAGTTCOC
TTTCTGAGTCAAGAAAGGGGTGACGGTGCACCTGGAATACTCGGTCTACTCCACCCGAATATTGCGCTTTTCAGACCGGCTTAAGAAACGGGCGCACCCAGAGACTATATCC
CACACCTGGCTCGGAGGGTCTACGCCACGGAATCTCGTGATTGCTAGCACAGCAGTCTGAGATCAAACCTGCAAGGCCGCAACGAGGCTGGGGGAGGGGCGCCGCCATTG
CCAGGCTTGCTTAGTTAAACAAAGCAGCCGGGAAGTCTGAACTGGGTGGAGCCACCACAGCTCAAGGAGGCTGCCTGCCTCTGTAGGCTCCACCTCTGGGGGCGAGGGCAC
AGACAAACAAAAGGCAGCAGTAACCTCTGCAGACTTAAGTGTCCCTGTCTGCAGCTTTGAAGAGAGCAGTGGTTCTCCAGCAGCAGCTGGAGATCTGAGAACGGGCGAGA
CAGACTGCCTCCTCAAGTGGGTCCCTGACTCCTGACCCCCGAGCAGCTAAGTGGGAGGCACCCCCAGCAGGGGCACACTGACACCTCACAGGCAGGGTATTCCAACAGAC
CTGCAGCTGAGGGTCTGTCTGTAGTAAGGAAAATAACAACAGAAAGGACATCTACACCGAAAACCCATCTGTACATCACCATCATCAAGACCAGAAAGTAGATAAAACCA
CAAG
```

(B) ส่วน ORF1

```
ATGGGGAAAAACAGAACAGAAAACTGGAACCTCTAAAACGCAGAGCGCCTCTCCTCCTCCAAAGGAACGCAGTTCCTCACCAGCAACAGAACAAAGCTGGATGGAGAATGA
TTTTGACGAGCTGAGAGAAGAAGGCTTCAGACGATCAAATTACTCTGAGCTACGGGAGGACATTCAAACCAAAGGCAAGAAGTTGAAAACCTTTGAAAAAATTTAGAAGAAT
GTATAACTAGAAATAACCAATACAGAGAAGTGCCTAAAGGAGCTGATGGAGCTGAAACCAAGGCTCGAGAACTACGTGAAGAATGCAGAAGCCTCAGGAGCCGATGCGATCAA
CTGGAAGAAAGGGTATCAGCAATGGAAGATGAAATGAATGAAATGAAGCGAGAAGGGAAGTTAGAGAAAAAGAAATAAAAGAAATGAGCAAGCCTCCAAGAAATATGGGA
CTATGTGAAAAACCAAACTTACGTCTGATTGGTGTACCTGAAAGTGATGTGGAGAATGGAACCAAGTTGGAACACACTCTGCAGGATATTATCCAGGAGAACTTCCCAATC
TAGCAAGGCAGGCCAACGTTAGATTAGGAAATACAGAGAACGCCACAAAGATACTCTCGAGAAGAGCAACTCCAAGACACATAAATTGTCAGATTACCAAAGTTGAAATG
AAGGAAAAAATGTTAAGGCGAGCCAGAGAAAGGTCGGGTACCCTCAAAGGAAAGCCCATCAGACTAACAGTGGATCTCTCGCGAGAAACCTACAAGCCAGAAAGAGAGTG
GGGGCCAAATATTCAACATCTCTAAGAAAAAGAAATTTCAACCCAGAAATTTCAATATCCAGCCAAACTAAGCTTCATAAGTGAAGGAGAAATAAAATACTTTATAGACAAGCAAA
TGTTGAGAGATTTTGTCAACCACAGGCCTGCCCTAAAAGAGCTCCTGAAGGAAGCGCTAAACATGGAAGGAACAACCCGTACCAGCCGCTGCAAAATCATGCCAAATG
```

(C) ส่วนรอยต่อระหว่าง ORF1 และ ORF2

TAAAGACCATTGAGACTAGGAAGAACTGCATCAACTAATGAGCAAAATCACCAGTAAACATCAT

(D) ส่วน ORF2

```
ATGACAGGATCAAAATTCACACATAACAATATTAACCTTTAAATATAAATGGACTAAATTTGCAATTAAGACACAGACTGGCAAGTTGGATAAAGAGTCAAGACCCATCAGT
GTGCTGATTTACAGAAACCCATCTCACGTGCAGAGACACATAGGCTCAAAATAAAGGATGGAGGAAGATCTACCAAGCCAATGGAAAAACAAAAAGCGAGGGTTGCAA
TCCTAGTCTCTGATAAAACAGACTTTAAACCAACAAAGATCAAAGAGACAAAGAGGGCCATTACATAATGGTAAAGGGATCAATTCAACAGAGGAGCTAACTATCCCTAAAT
ATTTATGCACCCAATACAGGAGCACCCAGATTCTATAAGCAAGTCCCTGAGTGACCTACAAAGAGACTTAGACTCCCACACATTAATAATGGGAGACTTTAACACCCCACTGTC
AACATTAGACAGATCAACGAGACAGAAAGTCAACAAGGATACCCAGGAATTGAACCTCAGCTCTGCACCAAGCAGACCTAATAGACATCTACAGAACTCTCCAGCCCAATCAA
CAGAATATACCTTTTTTTCAGCACCACACCACCTATTCCAAAATTGACCACATAGTTGGAAGTAAAGCTCTCCTCAGCAATGTAAGAAGACAGAAATATAACAACTAT
CTCTCAGACCACAGTGCAATCAAACCTAGAACTCAGGATTAAGAATCTCACTCAAAGCCGCTCAACTACATGGAACCTGAACAACCTGCTCTGAATGACTACTGGGTACATAA
CGAAATGAAGGCAGAAATAAGATGTTCTTTGAAACCAACGAGAACAAGACACCACATACCAGAATCTCTGGGACGCATTCAAAGCAGTGTGTAGAGGGAAATTTATAGCAC
TAAATGCTTACAAGAGAAAGGAGAAAGATCCAAAATTGACACCTTAACATCAGAAATTAAGAACTAGAAAAGCAAGAGCAAAACCATTTCAAAGCTAGCAGAAGGCCAAGAA
ATAACTAAATCAGAGCAGAACTGAAGGAAATAGAGACACAAAAACCCCTTCAAAAAATCAATGAATCCAGGAGCTGGTTTTTGAAGGATCAACAAAATGATAGACCGCT
AGCAAGACTAATAAAGAAAAAGAGAGAAGAATCAATAGACACAATAAAAAATGATAAAGGGGATATCACCACCGATCCCACAGAAATACAACTACCATCAGAGAATACT
ACAAACACCTCTACGCAATAACTAGAAAATCTAGAAGAAATGGATACATCTCTGCACACATACACTCTCCCAAGACTAAACAGGAAGAAAGTTGAATCTCTGAATAGACCA
ATAACAGGCTCTGAAATTTGTGGCAATATCAATAGTTTACCAACCAAAAAGAGTCCAGGACCAGATGGATTACAGCCGAATTTTACCAGAGGTACATGGAGGAAGTGGTACC
ATTCCTTCTGAAACTATTCCAATCAATAGAAAAAGAGGGAATCCTCCTAATCATTTTATGAGGCCAGCATCTTCTGATACCAAGCCGGGCGAGAGACAAACAAAAAAG
AGAATTTTAGACAAATATCCTTGATGAACATTGATGCAAAAATCCTCAATAAAATCTGGCAAAACCGAATTCATTAGCACATCAAAAAGCTTATCCACCATGATCAAGTGGGC
TTATCGCTTGGGATCAAGGTGTTTCAATATACGCAAAATCAATAAATGTAATTCGAGATATAAACAGAGCCAAAGACAAAAACCATGATTATCTCAATAGATGCAGAAAA
AGCCTTTGACAAAATTCAACACCTTCATGTCTAAAACCTCTCAATAAATTAGGTATTGATGGGACGTATTTCAAAAATAAAGAGCTATCTATGACAAACCCACAGCCAAATA
TCATACTGAATGGGCAAAAACCTGGAAGCATTCCTCTTGAACACCGGCACAAAGACAGGGATGCCCTCTCTCACCGCTCCTTCAACATAGTGTGGAAAGTTCTGGCCAGGGCA
ATCAGGCAGGAGAAGGAATAAAGGGTATTCAATTAGGAAAGAGGAAGTCAAAATTTGCCCTGTTTGCAGACGACATGATTGTATATCTAGAAAAACCCCATCGTCTCAGCCCA
AAATCTCCTTAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAGTCTCAGGATACAAAATCAATGTACAAAAATCACAAGCATCTTATACACCAACAACAGACAAACAGAGAGCCAAATCA
TGGGTGAACCTCCCATTCGTAATTGCTTCAAAGAGAATAAAATACCTAGGAATCCAACCTTACAAGGGATGTGAAGGACCTCTTCAAAGGAGAACTACAAACCATGTCTAAGGAA
ATAAAGAGGACACAAACAAATGGAAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGAATCAATATCGTGAAAAATGGCCATACTGCCAAGGTAATTTACAGATTCAATGCCATCCC
CATCAAGCTACCAATGACTTTCTTACAGAAATTGGAAAAACTACTTTAAAGTTTCATATGGAACCAAAAAAGAGCCCGCATTTGCCAAGTCAATCCTTAAGCCAAAAGAACAAAG
CTGGAGGCATCACACTACCTGACTTCAAACCTATACATACAAGGCTACAGTAACCAAAACAGCATGGTACTGGTACCAAAACAGAGATATAGATCAATGGAACAGAACAGAGCCC
TCAGAAATAATGCCCATATCTACAACATCTGTATCTTTGACAAAACCTGAGAAAAACAAGCAATGGGGAAGGATTCCCTATTTAATAAATGGTGTGGGAAAACTGGCTAGC
CATATGTAGAAAGCTGAACCTGGATCCCTTCCCTTACACCTTATACAAAATCAATTCAAGATGGATTAAAGATTTAAACGTTAAACCTTAAACCAATAAAACCCCTAGAGAAGAA
ACCTAGGCATTACCAATTCAGGACATAGGCGTGGGCAAGGACTTCATGTCCAAAACACCAAAAGCAATGGCAACAAAAGACAAAATTGACAAATGGGATCTAATTAACATAAG
AGCTTCTGCACAGCAAAAGAACTACCATCAGAGTGAACAGGCACACCTACAACATGGGAGAAAAATTTTCGCAACCTACTCATCTGACAAAGGGCTAATATCCAGAATCTACAA
TGAACCTCAAACAAAATTTACAAGAAAAACAAACAACCCCATCAAAAAGTGGGTGAAGGACATGAACAGACACTTCTCAAAAGAAGACATTTATGCAGCCAAAAACACATGA
AGAAATGCTCATCATCACTGGCCATCAGAGAAATGCAAAATCAAAACCATGTAATTCGAGATATCATCTCACACCGATTAGAATGGGCAATTAATAAAGTCAAGAAACCAACAGGTGC
TGGAGAGGATCGGGAGAAATAGGAACACTTTTACACTGTTGGTGGGACTGTAACCTAGTTCAACCATTTGTGGAAGTCAGTGTGGCGATTCTCAGGATCTAGAATAGAAAT
ACCATTTGACCCAGCCATCCCATTTACTGGGTATATACCCAAATGAGTATAAATCATGCTGTCTATAAAGACACATGCACACGTATGTTTATGCGGCACATTCACAATAGCAA
AGACTTGGAAACCAACCCAAATGTCTCAACAAATGATAGACTGGATTAAGAAATGTGGCACATATACACCATGGAATACTATGCAAGCATTAATAAATGATGAGTTCAATCCTTT
GTAGGACATGGATGAAATGGAACCATCATCTCAGTAAACTATCGCAAGAACAAAAACCAACACCCGATATTTCTCACTCATAGGTGGGAATT
```

(D) ส่วน 3'UTR

```
GAACAATGAGATCACATGGACACAGGAAGGGGAATATCACACTCTGGGGACTGTGGTGGGGTGGGGGAGGGGAGGGATAGCATTGGGAGATATACCTAATGCTAGATGAC
ACATTAGTGGGTGCAGCGCACCCAGCATGGCACATGTATACATATGTAACCTGCACAAATGTGCACATGTACCCATAAACTTAGAGTATAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAA
```

## ภาคผนวก ๒) การเปลี่ยนลำดับดีเอ็นเอ เพื่อการวิเคราะห์ระดับเมธิลเลชัน

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อวัดระดับเมธิลเลชัน ณ ตำแหน่ง CpG ในลำดับดีเอ็นเอใดใด จำเป็นต้องทำการเปลี่ยนลำดับดีเอ็นเอเสมือนผลที่เกิดขึ้นหลังจากการเปลี่ยนด้วยสารไบซัลไฟต์ (Bisulfate solution) เพื่อที่จะเปลี่ยน C นิวคลีโอไทด์ และ CpG ที่ไม่ถูกเติมหมู่เมธิลเลชันให้กลายเป็น T นิวคลีโอไทด์

โดยสามารถทำได้โดยใช้โปรแกรม word processing ทั่วไป ยกตัวอย่างเช่นการวิเคราะห์ระดับเมธิลเลชันของลำดับดีเอ็นเอส่วน 3'UTR ณ บริเวณปลาย ๓ ไพรม์ของไลน์ ๑ (L19092.1) ประกอบด้วย CpG ๒ ตำแหน่งซึ่งถูกระบายด้วยเจดสีเทา

```
GAACAATGAGATCACATGGACACAGGAAGGGGAATATCACACTCTGGGG
ACTGTGGTGGGGTCGGGGGAGGGGGGAGGGATAGCATTGGGAGATATAC
CTAATGCTAGATGACACATTAGTGGGTGCAGCGCACCAGCATGGCACAT
GTATACATATGTAACCTGCACAATGTGCACATGTACCCTAAACT
TAGAGTATAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

ในกระบวนการทดลองและวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับเมธิลเลชัน ณ ตำแหน่ง C ของไดนิวคลีโอไทด์ CpG ซึ่งจะต้องมีการดัดแปลงลำดับดีเอ็นเอที่สนใจ ด้วยการเติมสารไบซัลไฟต์โดยปัจจุบันสามารถใช้ชุดดัดแปลงสำเร็จรูปที่มีขายตามท้องตลาด (เช่น EZ DNA methylation kit, Sigma Ltd.) โดยจะเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ ๒ ประเภทได้แก่

ก) นิวคลีโอไทด์ C (ที่ไม่มี G เป็นตัวถัดไปในทิศทาง ๓ ไพรม์) หรือ non-CpG C

ข) ไดนิวคลีโอไทด์ CpG (C ที่มี G เป็นตัวถัดไปในทิศทาง ๓ ไพรม์) ที่ไม่ถูกเติมหมู่เมธิล

โดย C ทั้ง ๒ ประเภทนี้ จะถูกเปลี่ยนให้เป็น T โดยการวัดระดับเมธิลเลชันที่ตำแหน่ง CpG นี้จะเป็นการวัดระดับสัมพัทธ์ของ C ที่ไม่ถูกเปลี่ยน T (เปรียบเทียบกับ C ที่เป็น non-CpG ในลำดับดีเอ็นเอบริเวณเดียวกัน ซึ่งจะต้องถูกเปลี่ยนเป็น T ทั้งหมด เมื่อการดัดแปลงดีเอ็นเอด้วยวิธีไบซัลไฟต์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์)

จากตัวอย่างของลำดับดีเอ็นเอของ 3'UTR บริเวณปลาย ๓ ไพรม์ของไลน์ ๑ ข้างต้น นิวคลีโอไทด์ C (non-CpG) จะถูกเปลี่ยนเป็น t ดังนี้

```
GAAtAATGAGATtAtATGGAtAtAGGAAGGGGAATATtAtAtTtTGGGG
AtTGTGGTGGGGTCGGGGGAGGGGGGAGGGATAGtATTGGGAGATATAt
tTAATGtTAGATGAtAtATTAGTGGGTGtAGCGtAttAGtATGGtAtAT
```

ทั้งนี้วิธีการที่กล่าวมาทั้งหมดนี้สามารถใช้กับการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ IRS ซึ่งเป็นการวัดระดับเมธิลเลชั่นเฉลี่ยของ IRS หลายๆ ตำแหน่ง ที่แทรกอยู่ในจีโนม (และจำเพาะกับไพรเมอร์เดียวกัน) และใช้ได้กับการวิเคราะห์ระดับเมธิลเลชั่นของลำดับดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณ (specific locus) เช่น กรณีต้องการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับเมธิลเลชั่นของบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนบางยีน

เมื่อทำการดัดแปลงลำดับดีเอ็นเอ ด้วยเสมือนว่าผ่านกระบวนการไบโซัลไฟต์ ดังที่ปรากฏในภาคผนวก 2) แล้วให้นำลำดับดีเอ็นเอดังกล่าวไปคำนวณเพื่อหาไพรเมอร์จำเพาะเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนดังกล่าว เพื่อใช้ในการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสำหรับเสร็จรูปไพรเมอร์ ๓ (PRIMER3) ที่เว็บไซต์ <http://frodo.wi.mit.edu/> ซึ่งสามารถใช้ออนไลน์โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ไพรเมอร์ที่ได้ปรากฏอยู่ในกรอบสี่เหลี่ยม

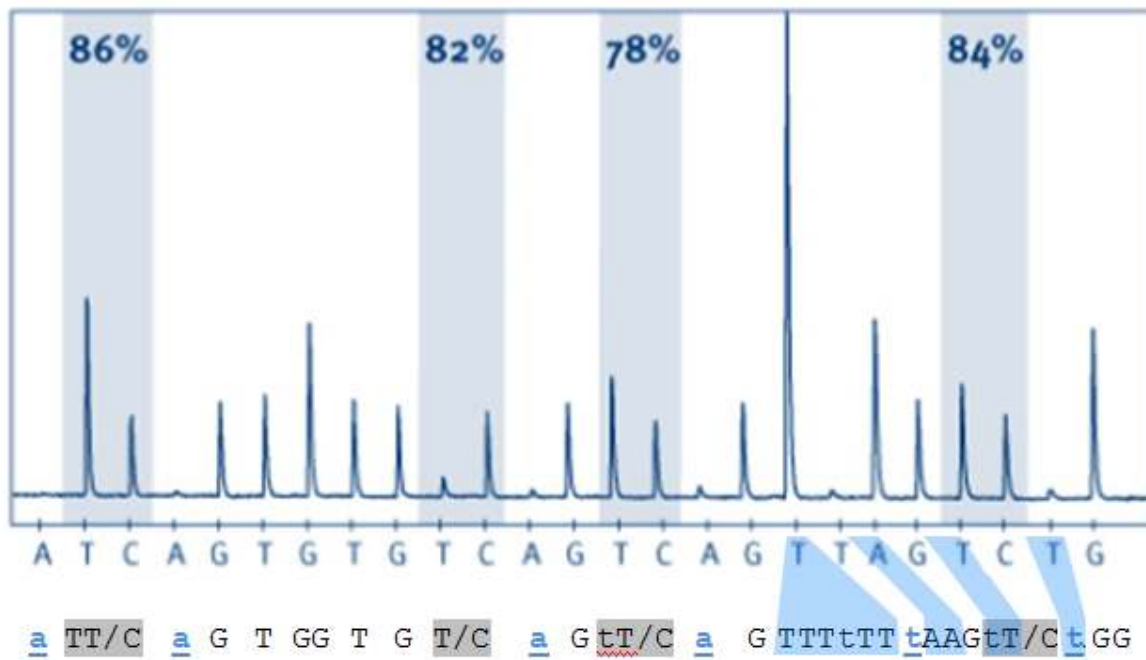
[illegible]

181 tATGTAtttTAAAtT TAGAGTATAAT

&lt;&lt;&lt;&lt;&lt; right primer



ภาคผนวก ๔) บริเวณวิเคราะห์ระดับเมทิลเลชัน ของชุดตรวจสำเร็จรูป Pyromark อยู่ในทิศทาง Reverse-complementary กับลำดับดีเอ็นเอไลน์ ๑ ตัวเต็ม (L19092.1)



(<http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=14600#line>)

a และ t คือนิวคลีโอไทด์ที่จะไม่ปรากฏอยู่ในลำดับดีเอ็นเอจริงและเติมลงไปเพื่อควบคุมสัญญาณ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะไม่ปรากฏสัญญาณขึ้น (negative signal control)

|                    |                                                  |                     |
|--------------------|--------------------------------------------------|---------------------|
| RV str bisulfite   | <u>a</u> TT/CaGTGGTGT/CaGtT/CaGTTTTTTtAAGtT/CtGG | Rev+comp (5' to 3') |
| RV str bisulfite   | TC/T GTGGTGC/T GtC/T GTTTTTT AAGtC/T GG          | Rev+comp (5' to 3') |
| RV str             | Tc GTGGTGC GcC GTTTcTT AAGcC GG                  | Rev+comp (5' to 3') |
| Ref str (L19092.1) | AG CACCACG CGG CAAAGAA TTCGG CC                  | (3' to 5')          |
| Ref str (L19092.1) | CCG GCT TAA GAA ACG GCG CAC CAC GA               | (5' to 3')          |

Note: RV str = reverse strand

Ref str = reference strand

Rev = reverse direction

comp = complementary sequences

PyroMark Q24 CpG LINE-1 Handbook

(<http://www.qiagen.com/resources/Download.aspx?id={D8398084-4746-4EB3-BCA3-04AE6CB28429}&lang=en&ver=1>)

ภาคผนวก ๕) โปสเตอร์ การประชุม "นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว." ครั้งที่ ๑๒ ระหว่างวันที่ ๑๐-๑๒ ตุลาคม ๒๕๕๕ ณ โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

