

การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และ  
ไส้ตรง โดยวิธี Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction

นางสาวศิริรัตน์ สีขุนทด



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
เป็นแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ที่ส่งมาที่คลังปัญญาจุฬาฯ

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF *K-ras* GENE MUTATION FROM FORMALIN-FIXED, PARAFFIN-  
EMBEDDED TISSUE AMONG COLORECTAL CANCER PATIENTS BY MULTIPLEX ALLELE-  
SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION

Miss Sirirat Seekhantod



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Microbiology and Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University



ศิริรัตน์ สีขุนทด : การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง โดยวิธี Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (DETECTION OF *K-ras* GENE MUTATION FROM FORMALIN-FIXED, PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE AMONG COLORECTAL CANCER PATIENTS BY MULTIPLEX ALLELE-SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: พญ.ภานินี ถาวรังกูร, 198 หน้า.

ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* (*V-Ki-ras2* Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) จะไม่ตอบสนองต่อการให้ยาเคมีบำบัดชนิดโมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่จะไปยับยั้งการส่งสัญญาณบนผิวเซลล์ของ epidermal growth factor receptor (EGFR) จึงมีความจำเป็นในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ก่อนการให้ยากับผู้ป่วยเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาให้เหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละราย ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี Multiplex Allele-Specific PCR (MAS-PCR) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 นิวคลีโอไทด์ที่ 34 35 และ 38 ทั้งสิ้น 7 ชนิด คือชนิด G12D, G12A, G12R, G12C, G12S, G12V, และ G13D ในหลอดทดลองเดี่ยว ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง ทำการตรวจวิเคราะห์กับ AS-primer ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์และ AS-primer ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ ทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ที่วิธี MAS-PCR สามารถตรวจวัดได้ ผลการศึกษาพบว่าวิธี MAS-PCR ที่ใช้ AS-primers ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ สามารถแยกการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ออกจากดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้ ขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ที่ 50-55 เปอร์เซ็นต์ mutant allele ขณะที่วิธี MAS-PCR ที่ใช้ AS-primers ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ 7 ชนิดนั้น สามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้ ยิ่งไปกว่านั้น ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินจำนวน 270 ตัวอย่าง ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี MAS-PCR ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับวิธี Pyrosequencing ในระดับดีมาก ( $k = 0.947$ ) มีเพียง 7 ตัวอย่างเท่านั้นที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน วิธี MAS-PCR สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้ต่ำสุดที่ 1-2 เปอร์เซ็นต์ mutant allele ชนิดการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยคือ ชนิดการกลายพันธุ์ G13D ที่ตำแหน่งโคดอน 13 คิดเป็น 49.17 เปอร์เซ็นต์ ชนิดการกลายพันธุ์ G12D คิดเป็น 25.83 เปอร์เซ็นต์ และชนิดการกลายพันธุ์ G12V คิดเป็น 12.50 เปอร์เซ็นต์ ที่ตำแหน่งโคดอน 12 ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับลักษณะพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วย ที่เกี่ยวข้องกับ อายุ เพศ ลักษณะทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อ และตำแหน่งของก้อนมะเร็ง วิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ซึ่งเป็นวิธีที่นำเชื่อถือ รวดเร็ว ราคาไม่แพง และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือขั้นสูง

ภาควิชา เวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยา ลายมือชื่ออนิสิต .....

คลินิก ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยา ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

ทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน



# # 5676658537 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORDS: K-RAS MUTATIONS, MULTIPLEX ALLELE-SPECIFIC PCR (MAS-PCR), METASTATIC COLORECTAL CANCER (MCRC)

SIRIRAT SEEKHUNTOD: DETECTION OF *K-ras* GENE MUTATION FROM FORMALIN-FIXED, PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE AMONG COLORECTAL CANCER PATIENTS BY MULTIPLEX ALLELE-SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION. ADVISOR: ASST. PROF. NUNTAREE CHAICHANAWONGSAROJ, Ph.D., CO-ADVISOR: PANINEE THAVARUNGKUL, M.D., 198 pp.

Colorectal cancer patients with *K-ras* (V-Ki-*ras*2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) mutations do not respond to epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors and fail to benefit from adjuvant chemotherapy. Mutation analysis of *K-ras* is necessary before starting treatment with monoclonal anti-EGFR antibodies for effective and appropriate treatment for individual patients. The objective of this study is to develop a Multiplex Allele-Specific PCR (MAS-PCR) assay for analysis of the mutational status of *K-ras* codons 12 and 13, at nucleotides 34, 35 and 38, including 7 type of *K-ras* mutations (G12D, G12A, G12R, G12C, G12S, G12V, and G13D) in a single-tube. Two hundred and seventy of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) colorectal cancer tissues were analyzed using AS-primers specific for wild-type DNA and AS-primers specific for mutant DNA. The limit of detection (% mutant allele) of the MAS-PCR assay was determined. MAS-PCR assay using AS-primers specific for wild-type DNA could separate *K-ras* mutations from wild-type DNA, but it could not identify specific type of mutations. The limit of detection was detected at 50-55% mutant allele. While MAS-PCR assay using AS-primers specific for each of seven *K-ras* point mutations were successfully amplify each mutant alleles. Moreover, the MAS-PCR analysis of 270 FFPE samples shown good concordance ( $k = 0.947$ ) with Pyrosequencing, only seven discordant samples were found. The MAS-PCR assay reproducibly detected 1 to 2% mutant alleles. The most common mutations were G13D in codon 13 (49.17%), G12D (25.83%) and G12V (12.50%) in codon 12. No correlation was found between *K-ras* mutations and patient's demographic characteristics regard to age, gender, histologic grade and tumor site. Our developed MAS-PCR can applied for detection of *K-ras* gene mutations in FFPE colorectal cancer tissues which is a reliable, rapid, cost-effective method and no need of advance instruments.

Department: Transfusion Medicine and Student's Signature .....

Clinical Microbiology Advisor's Signature .....

Field of Study: Molecular Science of Medical Co-Advisor's Signature .....

Microbiology and Immunology

Academic Year: 2015

## กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณ แพทย์หญิงภานินี ถาวรังกูร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณ อ. ดร. เขมาภรณ์ บุญบำรุง ที่กรุณารับเป็นประธานสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ อ. ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. พรพิมล รงค์นพรัตน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณารับเป็นกรรมการนอกมหาวิทยาลัยในการสอบวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านในหลักสูตรวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความรู้ จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบคุณ ดร. ชูพงศ์ อิทธิวุฒิ หน่วยเมตาบอลิซึมและพันธุศาสตร์ และ ดร. รุ่งภา อิทธิวุฒิ ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์ด้านเวชพันธุกรรม ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ และความรู้ ในการทำ Pyrosequencing ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ งานอนุพยาธิวิทยา กลุ่มงานชั้นสูงพิเศษ สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความช่วยเหลือ ในด้านอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณามอบทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณามอบทุนจากกองทุนวิจัยคณะสหเวชศาสตร์ ที่สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ทุนสนับสนุนการศึกษา พัฒนาข้าราชการ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่สนับสนุนเงินทุนการศึกษาทั้งหมด ตลอดหลักสูตร ในการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ นิสิตปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆตลอดการทำวิจัย จนประสบความสำเร็จได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัย ขอขอบคุณครอบครัว คุณพ่อ คุณแม่ และคุณศักรินทร์ หนูนวงศ์ ที่ให้ความรัก ความเข้าใจ กำลังใจ และความช่วยเหลือตลอดมา

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	17
สารบัญภาพ.....	20
บทที่ 1 บทนำ.....	27
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	27
1.2 คำถามของการวิจัย .....	30
1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย.....	30
1.4 วัตถุประสงค์การวิจัย .....	30
1.5 ขอบเขตของงานวิจัย.....	31
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	31
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	32
2.1 โรคมะเร็ง.....	32
2.1.1 ความหมาย.....	32
2.1.2 ประเภท.....	32
2.1.3 สาเหตุ .....	33
2.1.3.1 เหตุส่งเสริมที่อยู่ภายในร่างกาย .....	33
2.1.3.2 เหตุส่งเสริมที่อยู่ภายนอกในร่างกาย.....	36
2.1.4 ระยะ (Grading and Staging of tumor).....	38
2.1.4.1 การ Grading ของเซลล์มะเร็ง .....	38

2.1.4.2 การ Staging ของเนื้องอก.....	39
2.1.5 อุบัติการณ์และโรคมะเร็งที่พบบ่อย.....	40
2.2 มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง .....	42
2.2.1 ความหมาย.....	42
2.2.2 สาเหตุ.....	43
2.2.3 อนุชีวิวิทยาระดับโมเลกุลการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง .....	43
2.2.4 อาการ .....	44
2.2.5 ระยะและความรุนแรง.....	44
2.2.6 การวินิจฉัย.....	45
2.2.6.1 การวินิจฉัยอาการทางคลินิก.....	45
2.2.6.2 การวินิจฉัยลักษณะทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อ .....	46
2.2.7 อุบัติการณ์.....	47
2.2.8 การรักษา.....	47
2.2.8.1 การรักษาหลัก.....	47
2.2.8.2 การรักษาเสริม.....	48
2.2.8.2.1 รังสีรักษา .....	48
2.2.8.2.2 ยาเคมีบำบัด .....	48
2.3 ยาเคมีบำบัดชนิด anti-EGFR monoclonal antibody.....	50
2.3.1 โครงสร้างและลักษณะทั่วไป .....	50
2.3.1.1 ยา Cetuximab (Erbitux).....	50
2.3.1.2 ยา Panitumumab (vectibix®).....	51
2.3.2 กลไกการทำงานของยา Cetuximab และ Panitumumab.....	52
2.4 ยีน K-ras (V-Ki-ras 2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog).....	54

2.4.1	ลักษณะทั่วไป .....	54
2.4.2	ตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์ .....	56
2.4.3	เทคนิคการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> .....	58
2.4.3.1	วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Direct sequencing).....	58
2.4.3.2	วิธี High Resolution Melting Analysis (HRM).....	58
2.4.3.3	วิธี Mutant-enriched PCR assay.....	59
2.4.3.4	วิธี co-amplification at lower denaturation temperature PCR .	59
2.4.3.5	วิธี digital PCR .....	60
2.4.3.6	การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing .....	61
2.4.3.7	ชุดทดสอบสำเร็จรูป (commercial kit).....	64
2.5	Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain (MAS-PCR) .....	67
2.5.1	หลักการของ MAS-PCR.....	67
2.5.2	การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR .....	69
2.5.3	การประยุกต์ใช้เทคนิค MAS-PCR ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน .....	69
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	71
3.1	สารเคมีและน้ำยา .....	71
3.2	เครื่องมือ.....	72
3.3	วิธีการทดลอง .....	73
3.3.1	ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน (Formalin-fixed, paraffin-embedded : FFPE tissue).....	73
3.3.2	การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction).....	74
3.3.3	การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องนาโนทรอป.....	74
3.3.4	การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>K-ras</i> ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี Pyrosequencing .....	75

3.3.4.1 ปฏิกริยา Polymerase chain reaction (PCR) ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 สำหรับทำ Pyrosequencing .....	75
3.3.4.2 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ด้วย gel electrophoresis .....	76
3.3.4.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี Pyrosequencing.....	76
3.3.4.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 .....	77
3.3.5 การโคลนยีน K-ras ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 .....	78
3.3.5.1 ปฏิกริยา Polymerase chain reaction ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 สำหรับทำการโคลนยีน .....	78
3.3.5.2 การโคลนยีน K-ras ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 เข้าสู่ Vector pSC-A-amp/kan.....	79
3.3.6 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR ที่ AS-primer จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์.....	80
3.3.6.1 ออกแบบ Allele-specific (AS-primer) primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ .....	80
3.3.6.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกริยา MAS-PCR กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์.....	81
3.3.6.2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Allele-specific Primer ในปฏิกริยา AS-PCR.....	81
3.3.6.2.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกริยา AS-PCR .....	82
3.3.6.2.3 การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของปฏิกริยา AS-PCR .....	82
3.3.6.2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกริยา MAS-PCR สำหรับยีน K-ras ตำแหน่ง โคดอน 12.....	83
3.3.6.2.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกริยา MAS-PCR สำหรับยีน K-ras ตำแหน่ง โคดอน 12 และ 13.....	84

3.3.6.3 ทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ในปฏิกิริยา MAS-PCR กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์.....	85
3.3.6.3.1 ทดสอบหาความไวในการตรวจยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ด้วย MAS-PCR.....	85
3.3.6.3.2 ทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras .....	85
3.3.6.4 การทดสอบวิธี MAS-PCR ที่มี AS-Primer จำเพาะกับยีน K-ras ที่ไม่กลายพันธุ์ ที่พัฒนาขึ้น กับตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง.....	86
3.3.7 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR ที่ AS-primer จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์.....	87
3.3.7.1 ออกแบบ AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์.....	87
3.3.7.2 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์.....	89
3.3.7.2.1 ทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-Primer ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35.....	89
3.3.7.2.1.1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR.....	89
3.3.7.2.1.2 ทดสอบหาขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของปฏิกิริยา MAS-PCR ที่เหมาะสม.....	90
3.3.7.2.1.3 ทดสอบความเข้มข้นของ AS-primer ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35.....	91

3.3.7.2.2 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-Primer ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34.....	91
3.3.7.2.3 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-Primer ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38.....	92
3.3.7.2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับยีน K-ras ตำแหน่ง โคดอน 12 และ 13 ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 34, 35 และ 38 .....	93
3.3.7.3 ทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles) ของยีน K-ras ในปฏิกิริยา MAS-PCR กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์.....	94
3.3.7.4 การทดสอบความแม่นยำ และทำการทดสอบซ้ำ (Precision and reproducibility) ของวิธี MAS-PCR สำหรับชุด AS-primer ที่มี ความจำเพาะกับยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์.....	95
3.3.7.5 การทดสอบวิธี MAS-PCR ที่มี AS-Primer จำเพาะกับยีน K-ras ชนิด กลายพันธุ์ ที่พัฒนาขึ้น กับตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็ง ลำไส้ใหญ่และไส้ตรง.....	96
3.3.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Direct sequencing.....	96
3.3.9 การวิเคราะห์สถิติ .....	97
บทที่ 4 ผลการทดลอง .....	98
4.1 ลักษณะพื้นฐานทั่วไป และลักษณะทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง.....	98
4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี Pyrosequencing .....	99
4.3 การโคลน ยีน K-ras.....	103



4.4 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR ที่ AS-primer จำเพาะต่อยีน <i>K-ras</i> ชนิดไม่กลายพันธุ์.....	105
4.4.1 การออกแบบ AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน <i>K-ras</i> ชนิดไม่กลายพันธุ์.....	105
4.4.2 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน <i>K-ras</i> ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34.....	106
4.4.2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-Primer ในปฏิกิริยา AS-PCR .	106
4.4.2.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR .....	107
4.4.2.3 การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR .....	109
4.4.3 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน <i>K-ras</i> ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35.....	110
4.4.3.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-Primer ในปฏิกิริยา AS-PCR .	110
4.4.3.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR .....	111
4.4.3.3 การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR .....	112
4.4.4 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน <i>K-ras</i> ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38.....	113
4.4.4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-Primer ในปฏิกิริยา AS-PCR .	113
4.4.4.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR .....	114
4.4.4.3 การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR.....	115
4.4.5 การหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับยีน <i>K-ras</i> ตำแหน่ง โคดอน 12 ต่อ 1 หลอดทดลอง.....	116
4.4.6 การหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับยีน <i>K-ras</i> ตำแหน่ง โคดอน 12 และ 13 ต่อ 1 หลอดทดลอง.....	116
4.4.7 การทดสอบปฏิกิริยา AS-PCR ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 กับตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมบวกและตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟิน.....	117

4.4.8 การทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles) ในการตรวจหาการ กลายพันธุ์ ของยีน K-ras ในปฏิกิริยา AS-PCR กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์.....	119
4.4.8.1 การทดสอบความไวในการตรวจหาการกลายพันธุ์ ของยีน K-ras.....	119
4.4.8.2 ทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหา การกลายพันธุ์ ของยีน K-ras .....	120
4.4.9 การทดสอบวิธี AS-PCR ที่มี AS-Primer จำเพาะกับยีน K-ras ที่ไม่กลายพันธุ์ ที่ พัฒนาขึ้น กับตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ ตรง .....	124
4.5 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR ที่ AS-primer จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์.....	129
4.5.1 ออกแบบ Allele-specific (AS-primer) primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิด กลายพันธุ์.....	129
4.5.2 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์ การกลายพันธุ์ยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 กับชุด AS-primer ที่ จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์.....	132
4.5.2.1 ทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-Primer ที่ จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 ....	132
4.5.2.1.1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS- PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35.....	132
4.5.2.1.2 สถานะอุณหภูมิของ ปฏิกิริยา AS-PCR ที่เหมาะสม ในตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ที่ 35.....	134
4.5.2.1.3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 35 ในหลอดเดียว ....	135
4.5.2.2 ทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-Primer ที่ จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 ....	136

4.5.2.3 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-Primer ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38....	138
4.5.2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับยีน K-ras ตำแหน่ง โคดอน 12 และ 13 ตำแหน่งที่ 34, 35 และ 38.....	139
4.5.3 ทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles) ของยีน K-ras ในปฏิกิริยา MAS-PCR กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ .....	141
4.5.4 การทดสอบความแม่นยำ และทำการทดสอบซ้ำ (Precision and reproducibility) ของวิธี MAS-PCR สำหรับชุด AS-primer ที่มีความจำเพาะกับยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ .....	145
4.5.5 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ด้วยวิธี MAS-PCR .....	153
4.6 การเปรียบเทียบผลการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR และวิธี Pyrosequencing.....	159
4.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ด้วยวิธี Direct sequencing .....	160
4.8 การศึกษาอุบัติการณ์ การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงในประเทศไทย .....	160
4.9 ศึกษาความสัมพันธ์ของ ลักษณะพื้นฐานทั่วไป และลักษณะทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยกับการเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13.....	161
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	163
สรุปผลการทดลอง.....	169
รายการอ้างอิง .....	170
ภาคผนวก.....	183
การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง .....	184

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน Homo sapiens Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), transcript variant b, mRNA, NCBI Reference Sequence: NM_004985.4 .....	187
รายละเอียดข้อมูลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ด้วยวิธี Pyrosequencing.....	194
รายละเอียดข้อมูลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ด้วยวิธี MAS-PCR .....	196
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	198



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ข้อมูลสถิติโรคมะเร็งที่พบบ่อยมากที่สุด 10 อันดับแรกในประเทศไทย .....	41
ตารางที่ 2	ยาเคมีบำบัดที่ใช้รักษา Metastatic Colorectal Cancer ในปัจจุบัน .....	49
ตารางที่ 3	รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่พบได้บ่อย (Hot spots).....	57
ตารางที่ 4	ข้อดีและข้อเสีย ของวิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras .....	66
ตารางที่ 5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ในการเพิ่มจำนวนยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 สำหรับทำ Pyrosequencing .....	75
ตารางที่ 6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับทำ Pyrosequencing ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13.....	77
ตารางที่ 7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ในการเพิ่มจำนวนยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 สำหรับการโคลนยีน .....	78
ตารางที่ 8	อัตราส่วนดีเอ็นเอต้นแบบชนิดกลายพันธุ์ต่อชนิดไม่กลายพันธุ์ สำหรับทำปฏิกิริยา AS-PCR เพื่อทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจหาการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles).....	85
ตารางที่ 9	ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมของ ปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 35.....	90
ตารางที่ 10	อัตราส่วนของ AS-primer ของปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 .....	91
ตารางที่ 11	อัตราส่วนของ AS-primer ของปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 .....	92
ตารางที่ 12	อัตราส่วนของ AS-primer ของปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 .....	92
ตารางที่ 13	อัตราส่วนของ AS-primer ของปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34,35 และ 38 สำหรับ AS-primer ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D.....	94

- ตารางที่ 14 อัตราส่วนดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ต่อดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ สำหรับทำปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุดในการตรวจหาการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles) กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์..... 95
- ตารางที่ 15 อัตราส่วนดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ต่อดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ สำหรับทำ MAS-PCR เพื่อทดสอบความแม่นยำและความถูกต้อง ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles) ) กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอต้นแบบชนิดกลายพันธุ์..... 95
- ตารางที่ 16 ลักษณะพื้นฐานทั่วไป และลักษณะทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง..... 98
- ตารางที่ 17 รายละเอียดไพรเมอร์ ของปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ AS-primer จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ..... 106
- ตารางที่ 18 ผลการทดสอบวิธี AS-PCR ที่มี AS-Primer จำเพาะกับยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่พัฒนาขึ้น โดยการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 41 ตัวอย่าง ..... 125
- ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องของวิธี MAS-PCR เทียบกับวิธี Pyrosequencing โดยพิจารณาจาก 3 กลุ่ม เปอร์เซ็นต์ mutant allele ที่แตกต่างกัน ..... 128
- ตารางที่ 20 รายละเอียดไพรเมอร์ ของปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ AS-primer จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ..... 131
- ตารางที่ 21 ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR และวิธี Pyrosequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง ..... 155
- ตารางที่ 22 ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นด้วยหลักการ AS-primer ด้านปลาย 3' จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ และวิธี Pyrosequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 8 ตัวอย่าง ที่พบการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่ง ..... 156

ตารางที่ 23	การเปรียบเทียบและความสอดคล้องของผลตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR และวิธี Pyrosequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง.....	159
ตารางที่ 24	จำนวนและชนิดการถูกแทนที่นิวคลีโอไทด์ ของยีน <i>K-ras</i> ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง.....	161
ตารางที่ 25	การศึกษาความสัมพันธ์ของ ลักษณะพื้นฐานทั่วไป และลักษณะทางพยาธิวิทยาของ ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง กับการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13.....	162
ตารางที่ 26	ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี Pyrosequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง.....	194
ตารางที่ 27	ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี Pyrosequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง (ต่อ).....	195
ตารางที่ 28	ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นด้วยหลักการ AS-primer ด้านปลาย 3' จำเพาะต่อดีเอ็นเอต้นแบบชนิดกลายพันธุ์ จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง.....	196
ตารางที่ 29	ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นด้วยหลักการ AS-primer ด้านปลาย 3' จำเพาะต่อดีเอ็นเอต้นแบบชนิดกลายพันธุ์ จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง (ต่อ).....	197

## สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 อัตราการพบมะเร็งแต่ละชนิดในเพศชายและหญิง.....	34
ภาพที่ 2 การ Grading ของเนื้องอก.....	38
ภาพที่ 3 การ Staging ของเนื้องอก.....	39
ภาพที่ 4 ตำแหน่งการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง.....	42
ภาพที่ 5 มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ระยะต่างๆ.....	45
ภาพที่ 6 โครงสร้างของยาเคมีบำบัด Cetuximab.....	50
ภาพที่ 7 โครงสร้างของยาเคมีบำบัด Panitumumab.....	51
ภาพที่ 8 กลไกของยาเคมีบำบัด (Cetuximab และ Panitumumab).....	52
ภาพที่ 9 ตำแหน่งและปฏิกิริยาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras.....	55
ภาพที่ 10 หลักการและขั้นตอนของวิธี digital PCR.....	61
ภาพที่ 11 หลักการของปฏิกิริยา Pyrosequencing.....	62
ภาพที่ 12 การออกแบบ Allele-specific primer (AS-primer).....	67
ภาพที่ 13 หลักการ Multiplex Allele-specific PCR (MAS-PCR).....	68
ภาพที่ 14 vector armori-PCR product-vector armamp/kan.....	79
ภาพที่ 15 การออกแบบ AS-primer ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38.....	80
ภาพที่ 16 ผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากรวมปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34 และ 35 เป็น 1 หลอดการทดลอง.....	83
ภาพที่ 17 ผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากรวมปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 เป็น 1 หลอดการทดลอง.....	84
ภาพที่ 18 ผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ของปฏิกิริยา AS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 แยกการทดสอบการกลายพันธุ์แต่ละนิวคลีโอไทด์ในแต่ละหลอดทดลอง.....	86



ภาพที่ 19 การออกแบบ AS-primer ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 .....	88
ภาพที่ 20 ผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ของปฏิกิริยา AS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 รวมการทดสอบการกลายพันธุ์ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ ชนิด G13D ใน 1 หลอดทดลอง.....	93
ภาพที่ 21 ผลการรันเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ก่อนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing.....	99
ภาพที่ 22 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing ของตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ .....	100
ภาพที่ 23 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing ของตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34.....	101
ภาพที่ 24 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing ของตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35.....	102
ภาพที่ 25 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing ของตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38.....	103
ภาพที่ 26 แสดงผลเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ของผลผลิตพีซีอาร์จากตัวอย่างโคลนของยีน K-ras. 104	
ภาพที่ 27 แสดงผลการยืนยันการโคลนที่ให้ผลบวก ด้วยการทำ Direct Sequencing.....	104
ภาพที่ 28 การออกแบบ AS-Primer ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบชนิดไม่กลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 34, 35 และ 38.....	106
ภาพที่ 29 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-primer ด้วยการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34.....	107
ภาพที่ 30 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา MAS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34.....	108
ภาพที่ 31 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา MAS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34.....	109
ภาพที่ 32 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-primer ด้วยการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35.....	110

ภาพที่ 33 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา MAS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 .....	111
ภาพที่ 34 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา MAS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 .....	112
ภาพที่ 35 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-primer ด้วยการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38.....	113
ภาพที่ 36 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา MAS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 .....	114
ภาพที่ 37 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา MAS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 .....	115
ภาพที่ 38 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ที่รวมนิวคลีโอไทด์ 34 และ 35 เป็น 1 หลอดการทดลอง .....	116
ภาพที่ 39 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ที่รวมนิวคลีโอไทด์ 34, 35 และ 38 เป็น 1 หลอดการทดลอง.....	117
ภาพที่ 40 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับ AS-primer ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 .....	118
ภาพที่ 41 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ทดสอบปฏิกิริยา MAS-PCR กับตัวอย่างทางคลินิก	119
ภาพที่ 42 แสดงผลการทดสอบความไวในการตรวจหาการกลายพันธุ์ ของยีน K-ras ในปฏิกิริยา MAS-PCR กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอต้นแบบชนิดไม่กลายพันธุ์ .....	120
ภาพที่ 43 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน K-ras ที่กลายพันธุ์ชนิด G12S .....	121
ภาพที่ 44 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน K-ras ที่กลายพันธุ์ชนิด G12R .....	121

ภาพที่ 45 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน <i>K-ras</i> ที่กลายพันธุ์ชนิด G12C .....	122
ภาพที่ 46 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน <i>K-ras</i> ที่กลายพันธุ์ชนิด G12D .....	122
ภาพที่ 47 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน <i>K-ras</i> ที่กลายพันธุ์ชนิด G12A .....	123
ภาพที่ 48 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน <i>K-ras</i> ที่กลายพันธุ์ชนิด G12V .....	123
ภาพที่ 49 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน <i>K-ras</i> ที่กลายพันธุ์ชนิด G13D .....	124
ภาพที่ 50 แสดงการออกแบบ AS-Primer ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบทั้ง 3 ชนิดกลายพันธุ์ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 34 .....	130
ภาพที่ 51 แสดงการออกแบบ AS-Primer ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบทั้ง 3 ชนิดกลายพันธุ์ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 35 .....	130
ภาพที่ 52 แสดงการออกแบบ AS-Primer ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบทั้ง 1 ชนิดกลายพันธุ์ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 38 .....	130
ภาพที่ 53 แสดงผลของปฏิกิริยา AS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ยีน <i>K-ras</i> ชนิด G12D, G12A และ G12V .....	133
ภาพที่ 54 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G12D, G12A และ G12V .....	135
ภาพที่ 55 แสดงผลของปฏิกิริยา AS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ยีน <i>K-ras</i> ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 ชนิด G12D, G12A และ G12V .....	136

ภาพที่ 56 แสดงผลของปฏิกิริยา AS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ยีน <i>K-ras</i> ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 ชนิด G12S, G12R และ G12C.....	137
ภาพที่ 57 แสดงผลการรันเจลของปฏิกิริยา AS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ยีน <i>K-ras</i> ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 ชนิด G13D.....	138
ภาพที่ 58 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D สภาวะที่ 1 .....	140
ภาพที่ 59 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D สภาวะที่ 2 .....	140
ภาพที่ 60 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D สภาวะที่ 3 .....	141
ภาพที่ 61 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน <i>K-ras</i> ที่กลายพันธุ์ชนิด G12S .....	142
ภาพที่ 62 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน <i>K-ras</i> ที่กลายพันธุ์ชนิด G12R.....	142
ภาพที่ 63 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน <i>K-ras</i> ที่กลายพันธุ์ชนิด G12C.....	143
ภาพที่ 64 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน <i>K-ras</i> ที่กลายพันธุ์ชนิด G12D.....	143
ภาพที่ 65 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน <i>K-ras</i> ที่กลายพันธุ์ชนิด G12A.....	144

ภาพที่ 66 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน <i>K-ras</i> ที่กลายพันธุ์ชนิด G12V .....	144
ภาพที่ 67 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน <i>K-ras</i> ที่กลายพันธุ์ชนิด G13D.....	145
ภาพที่ 68 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ชนิด G12S.....	146
ภาพที่ 69 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ชนิด G12R .....	147
ภาพที่ 70 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ชนิด G12C .....	148
ภาพที่ 71 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ชนิด G12D .....	149
ภาพที่ 72 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ชนิด G12A .....	150
ภาพที่ 73 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ชนิด G12V .....	151
ภาพที่ 74 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ชนิด G13D .....	152
ภาพที่ 75 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับตรวจแยกดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์และไม่กลายพันธุ์ของยีน <i>K-ras</i> ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงจำนวน 8 ตัวอย่าง .....	154
ภาพที่ 76 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR ของตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ที่พบการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่ง .....	157

ภาพที่ 77 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ทดสอบการกลายพันธุ์ 1 นิวคลีโอไทด์ต่อ 1 หลอด  
การทดลอง ของตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ที่  
พบการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่ง..... 158



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (Colorectal cancer) เป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อย เป็นลำดับที่ 3 ของโรคมะเร็งที่พบทั่วโลก ในปี 2012 ทั่วโลกพบผู้ป่วยใหม่โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงประมาณ 1.4 ล้านคนต่อปี พบในเพศชาย 7.46 คน ต่อประชากรชาย 100,000 คน และพบในเพศหญิง 6.14 คน ต่อประชากรหญิง 100,000 คน คาดการณ์ว่าในปี 2035 ทั่วโลกจะพบผู้ป่วยใหม่โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงทั้งเพศชายและเพศหญิงสูงถึง 1.36 และ 1.08 ล้านคน ตามลำดับ (1) จากข้อมูลทะเบียนมะเร็งในประเทศไทย ปี 2007-2009 พบว่าโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง พบเป็นอันดับ 3 ในเพศชาย โดยมีอุบัติการณ์ 14.7 ต่อประชากรชาย 100,000 คน และเป็นอันดับ 5 ในเพศหญิง โดยมีอุบัติการณ์ 11 ต่อประชากรหญิง 100,000 คน (2) ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ประมาณ เปอร์เซ็นต์ 50-60 มะเร็งจะมีการลุกลามไปยังอวัยวะอื่นๆ (metastatic colorectal cancer) อวัยวะที่พบการลุกลามบ่อยได้แก่ ตับ ปอด ท้องและเยื่อช่องท้อง (3, 4) การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะลุกลามนั้น แพทย์จะทำการพิจารณาทำการผ่าตัดชิ้นเนื้อมะเร็งออก (resection) แต่อย่างไรก็ตามผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะลุกลามนั้น ส่วนใหญ่ไม่สามารถผ่าตัดออกได้ (unresection) ดังนั้นแพทย์จะรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (preoperative chemotherapy) เพื่อลดขนาดของก้อนมะเร็งลงก่อนเพื่อให้สามารถทำการผ่าตัดชิ้นเนื้อมะเร็งออกได้

ในปัจจุบันเครือข่ายโรคมะเร็งแห่งสหรัฐอเมริกา (NCCN : National Comprehensive Cancer Network) ได้แนะนำยาเคมีบำบัดที่ใช้รักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงในระยะลุกลาม คือ กลุ่มยา anti-EGFR monoclonal antibody เช่นยา Cetuximab (Erbix) และยา Panitumumab (Vectibix) เป็นยาเคมีบำบัดชนิด IgG1 human/mouse chimeric monoclonal antibody และชนิด fully IgG2 human monoclonal antibody ตามลำดับ ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ epidermal growth factor receptor (EGFR) ของเซลล์มะเร็ง ทำให้ขัดขวางไม่ให้ epidermal growth factor (EGF) และ transforming growth factor-alpha จับกับ EGFR เพื่อยับยั้งกลไกที่เซลล์มะเร็งส่งสัญญาณไปให้นิวเคลียสเพื่อทำงานต่อไป (5) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างเซลล์ยับยั้งกระบวนการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) และยับยั้งการเกิด metastasis จึงเป็นการส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งเกิดการตาย (apoptosis) โดยธรรมชาติ โดยกลุ่มยา anti-EGFR monoclonal antibody นั้นจะให้ผลการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาที่แตกต่างกันคือเซลล์มะเร็งที่มียีน K-ras

ชนิดไม่กลายพันธุ์ (wild-type) จะให้ผลการรักษาที่ดี แต่เซลล์มะเร็งที่มียีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ (mutant) จะให้ผลการรักษาไม่ดี (5-7) และในปี 2009 เครือข่ายโรคมะเร็งแห่งสหรัฐอเมริกาและสมาคมมะเร็งวิทยาแห่งสหรัฐอเมริกา : American Society of Clinical Oncology (ASCO) ได้แนะนำว่าก่อนที่จะเริ่มให้ยาเคมีบำบัดกลุ่ม anti-EGFR monoclonal antibody ควรที่จะตรวจข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน *K-ras* ก่อนว่ามีการกลายพันธุ์หรือไม่ ยา anti-EGFR monoclonal antibody ควรให้กับผู้ป่วยที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* เท่านั้น (8) ดังนั้นการตรวจยีน *K-ras* ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง เพื่อบ่งชี้ว่ายีน *K-ras* กลายพันธุ์หรือไม่ ก่อนการรักษา จะช่วยให้แพทย์วางแผนการรักษาให้เหมาะสมและให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดกับผู้ป่วยแต่ละรายได้ (9)

*K-ras* (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) เป็นยีนอยู่ใน Ras gene family ซึ่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 12(12p) (10) โดยยีน *K-ras* นี้เป็นพันธุกรรมหนึ่งที่มีหน้าที่ในการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการเจริญเติบโตของเซลล์ เรียกว่าโปรตีน RAS ทำงานแบบ molecular switch ทำหน้าที่ควบคุมการถ่ายทอดสัญญาณ (transduction signal) เช่น Epidermal growth factor receptor (EGFR) -induced cell signaling โดยส่งสัญญาณจาก receptor บนผิวเซลล์ไปยังบริเวณเป้าหมายภายในเซลล์หากมีการกลายพันธุ์ (mutant) จะเป็นสาเหตุทำให้ *ras* gene เปลี่ยนจาก proto-oncogene เป็น oncogene ทำให้เกิดความผิดปกติของโปรตีน RAS เนื่องจาก amino acid ในสายของโปรตีนผิดไปจากเดิม โปรตีน GTPase ไม่สามารถเปลี่ยนรูปจาก active form (ras-GTP) กลับเป็น inactive form (ras-GDP) ได้ เกิดการถ่ายทอดสัญญาณ กระตุ้นเซลล์เป้าหมายตลอดเวลา ทำให้เกิดเซลล์ทำงานผิดปกติขาดการควบคุม เช่นกระตุ้นการสร้างโปรตีนมากขึ้น นานขึ้น ทำให้เซลล์แบ่งตัวเร็วขึ้น และแพร่กระจายง่ายขึ้น ซึ่งสามารถใช้ยีน *K-ras* เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพตัวแรกในการคาดการณ์ถึงผลการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงในระยะลุกลามได้ (9) โดยตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่พบได้บ่อย ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงคือ ตำแหน่งโคดอน 12 (GGT) และโคดอน 13 (GGC) พบมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (11-15) และรูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยคือ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V, และ G13D (15-17)

ปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* มีหลากหลายวิธี เช่น วิธี Direct Sequencing (12, 18-21) วิธี high resolution melting (HRM) (18), วิธี mutant-enriched PCR assay (19), วิธี Pyrosequencing (11, 16, 22), วิธี co-amplification at lower denaturation temperature PCR (23), และวิธี digital PCR (19, 24) นอกจากนี้ยังมีชุดทดสอบสำเร็จรูป (commercial kit) ของบริษัทต่างๆ เช่นชุดทดสอบ cobas® KRAS Mutation Test, theascreen® DxS KRAS Kit, EntroGen's *K-ras* Mutation Analysis Kit for Real-Time PCR, และชุดทดสอบ KRAS StripAssay Kit (20, 25) อย่างไรก็ตามวิธีทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้น ต้องการเครื่องมือที่จำเพาะ



มีต้นทุนที่สูง และต้องอาศัยความชำนาญในการวิเคราะห์ผล โรงพยาบาลหรือห้องปฏิบัติการในที่ห่างไกล ขาดต้นทุน ขาดแคลนเครื่องมือที่จำเพาะเช่นเครื่อง Real-time PCR, เครื่อง Sequencer Analyzer, และเครื่อง Pyrosequencer ซึ่งเครื่องดังกล่าวมีราคาแพง จึงทำให้เป็นข้อจำกัดในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* สำหรับพื้นที่ที่ขาดแคลนเทคโนโลยีขั้นสูง

เทคนิค Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและความไวสูง ราคาไม่แพง โดยอาศัยหลักการของ Polymerase Chain Reaction ในขั้นตอนของ extension คือเอนไซม์ DNA Polymerase จะไม่ทำปฏิกิริยา หากด้านปลาย 3' ของ Allele-specific primer (AS-Primer) ไม่เป็นนิวคลีโอไทด์คู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) และสามารถตรวจสอบได้ด้วยการ run gel electrophoresis เทคนิค MAS-PCR จึงเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ตรวจการกลายพันธุ์ของยีนได้ (26) ปัจจุบันเทคนิค MAS-PCR ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางด้าน genetic อย่างแพร่หลายเช่น งานวิจัยของ Shi และคณะ ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธี MAS-PCR เพื่อตรวจหาการดื้อยา Rifampin ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 511, 516, 526 และ 531 มีความไวสูงถึง 94.2 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (27) งานวิจัยของ Allegui และคณะ ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธี MAS-PCR เพื่อตรวจหาการดื้อยา Isoniazid และ Rifampin (Multi-drug resistant: MDR) ของเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 516, 526 และ 531 การกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่ง mabA-inhA: -15 พบว่าวิธี MAS-PCR เมื่อตรวจหา MDR มีความไวสูงถึง 92.6 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (28) เป็นต้น

ดังนั้นการศึกษานี้ จึงมุ่งพัฒนาวิธี MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่ง โคดอน 12 และ 13 ทั้ง 7 รูปแบบการกลายพันธุ์คือ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V, และ G13D ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการวางแผนการรักษาและเลือกใช้ยาเคมีบำบัดได้อย่างเหมาะสม ทำให้การรักษามีความคุ้มค่าและเกิดประโยชน์ต่อผู้ป่วยสูงสุด

## 1.2 คำถามของการวิจัย

1. เทคนิค Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) สามารถตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ได้หรือไม่

2. เทคนิค Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่าเทคนิค Pyrosequencing ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง หรือไม่

3. อุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ในประเทศไทย แตกต่างจากประเทศอื่นๆ หรือไม่

## 1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย

1. เทคนิค Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) สามารถตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ได้

2. เทคนิค Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่า เทคนิค Pyrosequencing ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และตรง

3. อุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ในประเทศไทย ไม่แตกต่างจากประเทศอื่นๆ

## 1.4 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคนิค Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) ตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง

2. เพื่อเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ด้วยเทคนิค Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) กับ เทคนิค Pyrosequencing

3. เพื่อสำรวจอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ใน มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ในประเทศไทย

4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง กับการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13

### 1.5 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะพัฒนาเทคนิค Multiplex Allele-specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) เทียบกับเทคนิคมาตรฐาน Pyrosequencing เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* เฉพาะตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 นิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ที่มีรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V, และ G13D ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบบ่อย โดยจะตรวจวิเคราะห์จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เหลือจากงานตรวจบริการของสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ และเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ด้วยเทคนิค MAS-PCR และเทคนิค Pyrosequencing ทำการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจหาการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles) ของยีน *K-ras* โดยใช้ตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอผสมระหว่าง ดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์แต่ละชนิด กับดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์

### 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ในประเทศไทย

2. ทราบความสัมพันธ์ของลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง กับการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13

3. สามารถใช้เทคนิค Multiplex Allele-specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) ตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ในห้องปฏิบัติการทางไกล ขาดแคลนเทคโนโลยีสมัยใหม่เช่นเครื่อง Pyrosequencing, Sequencing Analyzer และสามารถพัฒนาต่อยอดเป็นชุดทดสอบได้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 โรคมะเร็ง

##### 2.1.1 ความหมาย

มะเร็ง หรือ Cancer มาจากคำศัพท์ในภาษากรีกคือ Carcinus หรือ Karkinos ซึ่งแปลว่าปู ซึ่งหมายถึง “กระบวนการไร้ระเบียบ ไม่มีอะไรมาขัดขวางการใช้อำนาจควบคุม” มะเร็งหรือทางการแพทย์เรียกว่า “เนื้องอกที่เป็นเนื้อร้าย” คือ กลุ่มของโรคที่เกิดเนื่องจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติ ที่ดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วและมากกว่าปกติ เป็นลักษณะของการแบ่งเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ ดังนั้นจึงอาจทำให้เกิดก้อนเนื้อผิดปกติ และในที่สุดทำให้เกิดการตายของเซลล์ในก้อนเนื้อนั้น เนื่องจากขาดเลือดไปเลี้ยง ถ้าเซลล์มะเร็งเกิดอยู่ในอวัยวะใดเรียกชื่อมะเร็ง ตามอวัยวะนั้นๆ เช่น มะเร็งปอด มะเร็งสมอง มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น และเซลล์มะเร็งยังมีความสามารถที่จะลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่ออื่นๆ โดยวิธีการใดวิธีการหนึ่ง เช่น เจริญเติบโตโดยตรงเข้าไปในเนื้อเยื่อข้างเคียง (Invasion) หรือการอพยพเคลื่อนย้ายเซลล์ไปยังตำแหน่งที่ไกลๆ (Metastasis) (29-31)

##### 2.1.2 ประเภท

มะเร็งมีมากกว่า 200 ชนิด ขึ้นอยู่กับว่าเกิดขึ้นอยู่ในอวัยวะใด โดยสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 5 กลุ่ม ดังนี้ (32)

###### 2.1.2.1 มะเร็งกลุ่ม Carcinoma

มะเร็งซึ่งมาจากเซลล์เยื่อบุผิวของอวัยวะทั้งภายในและภายนอกในร่างกาย ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ของผู้ป่วย จะอยู่ในประเภทนี้ ซึ่งเซลล์เยื่อบุผิวของร่างกายมี 4 ชนิด ได้แก่

2.1.2.1.1 Glandular คือ กลุ่มของเซลล์เยื่อบุผิวที่สร้างสารคัดหลั่ง

2.1.2.1.2 Squamous คือ กลุ่มของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีลักษณะแบนบางหลายเหลี่ยม

2.1.2.1.3 Transitional คือ เซลล์เยื่อบุผิวที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ตามการขยายและหดตัวของอวัยวะนั้นๆ จะพบในอวัยวะ เช่น ท่อทางเดินปัสสาวะ

2.1.2.1.4 Pseudostratified คือ เซลล์เยื่อผิวที่เรียงตัวหลายชั้นเทียม จะพบในอวัยวะ เช่น ปอด มะเร็งสามารถเกิดขึ้นได้จากเซลล์เยื่อผิวอวัยวะชนิดต่างๆ เหล่านี้ ตัวอย่างเช่น มะเร็งเต้านม (Breast Carcinoma) ส่วนใหญ่เกิดจากเซลล์เยื่อของต่อมสร้างน้ำนม

#### 2.1.2.2 มะเร็งกลุ่ม Sarcoma

หมายถึง มะเร็งที่เกิดจากเนื้อเยื่ออ่อน (Soft Tissue) ของร่างกาย หรือเนื้อเยื่อเสริม (Supportive Tissue) ซึ่งได้แก่ ไขมัน กล้ามเนื้อ เส้นประสาท และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน นอกจากนี้ ยังรวมถึงกระดูกและกระดูกอ่อนด้วย

#### 2.1.2.3 มะเร็งกลุ่ม Lymphoma

หมายถึง มะเร็งที่พัฒนามาจากต่อมน้ำเหลือง และเนื้อเยื่อของระบบภูมิคุ้มกัน

#### 2.1.2.4 มะเร็งกลุ่ม Leukemias

หมายถึงมะเร็งของระบบโลหิต เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่อยู่ในไขกระดูก (Bone Marrow)

#### 2.1.2.5 มะเร็งกลุ่ม Melanoma

หมายถึง มะเร็งที่มาจากเซลล์ผลิตเม็ดสี (Melanocytes) ซึ่งจะพบตามผิวหนัง ฝ้า (Mole) เป็นการเจริญเติบโต ของเซลล์เม็ดสีประเภทไม่เป็นอันตราย

### 2.1.3 สาเหตุ

สาเหตุการเกิดโรคมะเร็งนั้นยังไม่สามารถสรุปสาเหตุได้ชัดเจน แต่อาจจะสรุปได้ว่า มีเหตุส่งเสริมที่สำคัญ 2 สาเหตุร่วมกัน อันจะทำให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง การเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตจากเซลล์มะเร็งเพียงเซลล์เดียว กลายเป็นก้อนมะเร็งขึ้นมา ต่อมาจะมีการลุกลามเฉพาะที่ และเกิดการแพร่กระจายไปสู่อวัยวะอื่นในที่สุด (33)

#### 2.1.3.1 เหตุส่งเสริมที่อยู่ภายในร่างกาย

เหตุส่งเสริมนี้ขึ้นอยู่กับภาวะภายในร่างกายในแต่ละบุคคล เช่น

##### 2.1.3.1.1 ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายของแต่ละบุคคล

โดยปกติเซลล์มะเร็งสามารถสร้างสารต่างๆ ออกมาในรูปของโปรตีน และ โพลีเปปไทด์ (Polypeptides) หลายๆ ชนิด ซึ่งจะพบได้ที่พื้นผิวหรือผนังของเซลล์มะเร็ง เรียกว่า Tumor Associated Antigen -TAA หรือ Tumor Specific Transplantation Antigen - TSTA โดยปกติร่างกายของคนเรา สามารถจะรับรู้แอนติเจนชนิดนี้ จึงสามารถสร้างภูมิคุ้มกัน หรือ

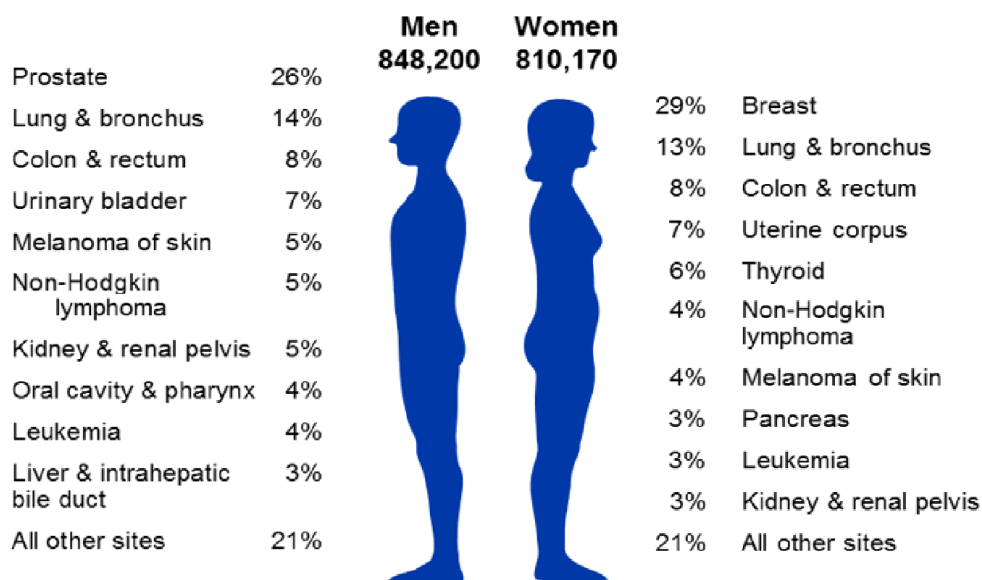
แอนติบอดีที่จะมาต้านแอนติเจนนี้ได้ เมื่อร่างกายไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต้านแอนติเจนนี้ได้ จะโดยสาเหตุใดก็ตามที่ร่างกายไม่สามารถค้นพบ ทำให้เกิดเซลล์มะเร็งขึ้นได้

#### 2.1.3.1.2 เชื้อชาติ

การเกิดมะเร็งบางชนิดมีความสัมพันธ์กับเชื้อชาติ โดยมะเร็งบางชนิดจะพบมากในเฉพาะบางเชื้อชาติ เช่น มะเร็งโพรงหลังจมูก พบมากในชาวจีน จากข้อมูลทางสถิติของหน่วยงาน World Cancer Research Fund International แห่งสหราชอาณาจักร พบว่า 10 ลำดับแรกของประเทศที่พบโรคมะเร็งมากที่สุดในกลุ่มประเทศโซนยุโรป, โอเชียเนีย, อเมริกาทางตอนเหนือ และเอเชีย เช่นประเทศเดนมาร์ก พบผู้ป่วยมะเร็งสูงถึง 338.1 ต่อประชากร 1 แสนคน, ประเทศสหรัฐอเมริกา พบผู้ป่วยมะเร็ง 318.0 ต่อประชากร 1 แสนคน และประเทศสาธารณรัฐเกาหลี พบผู้ป่วยมะเร็ง 307.8 ต่อประชากร 1 แสนคน เป็นต้น (34)

#### 2.1.3.1.3 เพศ

การเกิดมะเร็งบางชนิดมีความสัมพันธ์และขึ้นอยู่กับลักษณะของเพศที่แตกต่างกัน จากรายงานของสมาคมอเมริกัน (American Cancer Society) ปี 2015 รายงานว่าอัตราการพบมะเร็งแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยมะเร็งบางชนิดพบมากในเพศชาย เช่น มะเร็งปอด มะเร็งตับ แต่มะเร็งบางชนิดพบมากในเพศหญิง เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก เป็นต้น แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 อัตราการพบมะเร็งแต่ละชนิดในเพศชายและหญิง (31)

#### 2.1.3.1.4 อายุ

มะเร็งส่วนใหญ่มักเกิดในประชากรที่มีอายุตั้งแต่ 55 ปีขึ้นไป เช่น มะเร็งของเยื่อที่เรียกว่า Carcinoma แต่อย่างไรก็ตามประชากรที่อายุน้อยก็สามารถเกิดมะเร็งบางชนิดได้บ่อยกว่าเช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia), มะเร็งของเนื้อเยื่อที่เรียกว่า Sarcoma และ มะเร็งบางชนิดจะพบเฉพาะในเด็กเท่านั้น เช่น มะเร็งของลูกตาชนิดเรติโนบลาสโตมา (Retinoblastoma) เป็นต้น มะเร็งกระดูกชนิด Osteosarcoma จะพบมีอุบัติการณ์สูงในช่วงอายุ 2 ช่วง คือ ช่วงอายุ 10-20 ปี และมากกว่า 60 ปีขึ้นไป

#### 2.1.3.1.5 พันธุกรรม (Hereditary)

ปัจจัยด้านพันธุกรรมเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการเกิดโรคมะเร็ง โดยสามารถแบ่งรูปแบบของการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของมะเร็งออกเป็น 3 รูปแบบ (35) คือ

##### 2.1.3.1.5.1 Inherited Cancer Syndromes

ผลของความผิดปกติของยีนเดี่ยวทำให้เพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง และโดยส่วนมากแล้วยีนเหล่านี้จะถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ Autosomal dominant pattern ตัวอย่างความผิดปกติของยีนรูปแบบ Inherited Cancer Syndromes คือ 40 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยมะเร็งชนิด Retinoblastoma จะพบญาติพี่น้องเจ็บป่วยด้วยมะเร็งดังกล่าว และ Familial adenomatous polyposis (FAP) ซึ่งเป็นโรคถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งดังกล่าว จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจนกลายเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่เมื่ออายุ 50 ปี

##### 2.1.3.1.5.2 Familial Cancers

มะเร็งที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ไม่สามารถบอกรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ชัดเจน เพียงแต่พบว่า ในบางครอบครัวมีการเจ็บป่วยเนื่องจาก มะเร็งบางชนิดได้บ่อย โดยเฉพาะรุ่นที่ใกล้ชิดกัน เช่น พี่กับน้อง รุ่นพ่อหรือแม่กับรุ่นลูก เป็นต้น มะเร็งที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเต้านม มะเร็งรังไข่ และมะเร็งสมอง

##### 2.1.3.1.5.3 Autosomal Recessive Syndromes of Defective ดีเอ็นเอ Repair

มะเร็งที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีน้อย การถ่ายทอดพันธุกรรมจะเป็นแบบ Autosomal recessive ยีนที่ผิดปกตินี้เกี่ยวข้องกับขบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) เช่น โรค Xeroderma pigmentosum

#### 2.1.3.1.6 ความผิดปกติต่างๆของร่างกาย

ความผิดปกติต่างๆของร่างกาย เช่นในกรณีที่ร่างกายเป็นไฟ หรือปานดำ มีโอกาสจะกลายเป็นมะเร็งผิวหนังเมลาโนมาชนิดร้าย (Malignant Melanoma) ได้ และเด็กที่มีความพิการ มาแต่ กำเนิดมีโอกาสเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น

#### 2.1.3.2 เหตุส่งเสริมที่อยู่ภายนอกร่างกาย

เหตุส่งเสริมนี้ไม่ขึ้นอยู่กับภาวะภายในร่างกาย แต่ขึ้นกับสภาวะภายนอกต่างๆหลายสาเหตุ เช่น

##### 2.1.3.2.1 สารทางกายภาพต่างๆ (Physical Agents)

สารทางกายภาพต่างๆ โดยส่วนใหญ่แล้ว จะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อร่างกายหรือเซลล์ ทำให้เกิดการความผิดปกติและพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ เช่น ฟันปลอมที่ไม่กระชับ เวลาเคี้ยวอาหาร จะมีการเสียดสีกับเหงือกหรือเพดานปาก อาจจะทำให้เกิดมะเร็งของเหงือกหรือเพดานปากได้ การกระทบกระแทก การคลอดบุตรหลายๆ คน หรือการมีกระบังลมหย่อนในหญิงสูงอายุ ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูกได้ง่าย การได้รับรังสีต่างๆเป็นประจำ เป็นต้น

##### 2.1.3.2.2 สารเคมีก่อมะเร็ง (Chemical Carcinogens)

สารเคมีก่อมะเร็ง จะเป็นตัวกระตุ้นในระยะเริ่มต้น หรือ Initiator มีทั้งที่เป็น สารเคมีในธรรมชาติและสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นมาเอง แบ่งตามการออกฤทธิ์ได้ 2 กลุ่มคือ สารเคมีที่สามารถออกฤทธิ์ได้เลย (Direct-acting compound) และสารเคมีที่ต้องผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมก่อนจึงจะมีฤทธิ์ก่อมะเร็งได้ (Indirect-acting compound) ตัวอย่างสารก่อมะเร็งเช่น สารจำพวก Polycyclic aromatic hydrocarbons มีแหล่งที่มาจากกาเผาไหม้ของยาสูบ โดยเฉพาะการสูบบุหรี่ ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งปอด สาร Aflatoxin B1 เป็นสารเคมีที่ได้จากเชื้อราชนิด *Aspergillus flavus* มักจะปนเปื้อนกับอาหารจำพวกถั่ว ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ สาร Nitrosamines เป็นสารก่อมะเร็งที่สำคัญ ซึ่งปนเปื้อนในอาหารและเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งหลอดอาหาร และสารโลหะชนิดต่างๆเช่น นิกเกิล สารตะกั่ว แคดเมียม โคลบอล สามารถทำลายสารพันธุกรรม ทำให้เกิดการผ่าเหล่าของยีน และทำให้เกิดมะเร็งได้ (36)



#### 2.1.3.2.3 รังสีก่อมะเร็ง (Radiant energy)

สารรังสีก่อมะเร็งที่สำคัญในสิ่งแวดล้อมคือ รังสีอุลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet Radiation) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งที่ผิวหนังเช่น มะเร็งชนิด Basal cell carcinoma, Squamous cell carcinoma และ Melanoma เป็นต้น และสารกัมมันตภาพรังสี (Ionizing radiation) มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดชนิด Leukemia เป็นต้น (37)

#### 2.1.3.2.4 ฮอรโมน (Hormone)

มะเร็งบางชนิดเช่น มะเร็งเต้านมจะมีความสัมพันธ์กับระดับฮอรโมนเพศหญิง คือ เอสโตรเจน และโปรเจสโตโรน หรือมะเร็งต่อมลูกหมาก จะมีความสัมพันธ์กับฮอรโมนเพศชายแอนโดรเจน (38) เป็นต้น

#### 2.1.3.2.5 เชื้อโรคที่ก่อโรคมะเร็ง (Oncogenic microbes)

เชื้อโรคที่ก่อมะเร็ง ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อไวรัสก่อโรคมะเร็ง (Viral carcinogenesis) การติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิต พบเป็นสาเหตุส่วนน้อย เช่น การติดเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* มีความสัมพันธ์กับการก่อมะเร็งที่กระเพาะอาหาร และการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ มีความสัมพันธ์กับการก่อมะเร็งที่ตับ เชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดเนื้องอกหรือมะเร็ง (Oncogenic Viruses, Tumour Viruses) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะของกรดนิวคลีอิก คือ ไวรัสดีเอ็นเอ และไวรัสอาร์เอ็นเอ เมื่อไวรัสเข้าไปในเซลล์แล้ว ก็จะมีการเพิ่มจำนวน หรืออาจจะไม่เพิ่มจำนวนก็ได้ แต่จะสามารถทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงในรูปร่างไปได้ (Transformation) จากการที่ยีนหรือดีเอ็นเอของไวรัส (Viral genome หรือ Viral DNA) ไปแทนที่ดีเอ็นเอของเซลล์ สำหรับในคนไวรัสอาจจะ เป็นสาเหตุ หรือเกี่ยวข้องกับมะเร็งบางชนิด เช่น Epstein-Barr Virus มีความสัมพันธ์กับมะเร็งโพรงหลังจมูก และมะเร็งของต่อมน้ำเหลืองเบอร์คิตต์ (Burkitt's Lymphoma) หรือ Human papilloma virus ชนิด 16, 18, 31, 33, 35, 51 มีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งชนิด Squamous cell carcinoma โดยเฉพาะที่ปากมดลูก หรือ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus) ที่อาจเป็นสาเหตุการเกิดมะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma เป็นต้น (39, 40)

### 2.1.4 ระยะ (Grading and Staging of tumor)

การ Grade และ Stage ของเนื้องอกแสดงถึงพฤติกรรมของเนื้องอกนั้นๆ และบ่งบอกถึงพยากรณ์โรคและแนวทางการรักษา

#### 2.1.4.1 การ Grading ของเซลล์มะเร็ง

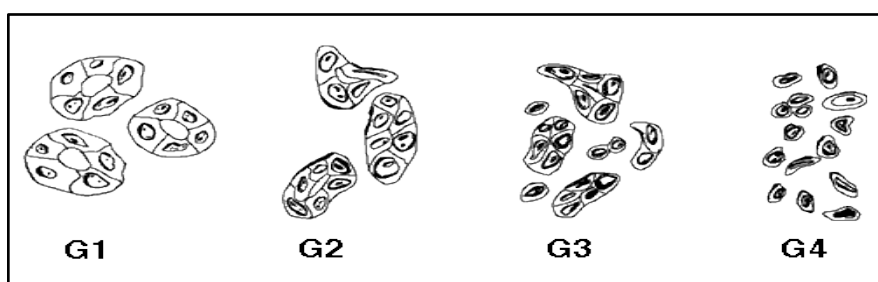
การ Grading ของเซลล์มะเร็งนั้น ในทางพยาธิวิทยา จะแบ่งความรุนแรงของเซลล์มะเร็งออกเป็น 4 เกรด (Grade) ตามการจำแนกลักษณะของเซลล์มะเร็ง (Differentiation) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส และจำนวนของการแบ่งตัวหรือ Mitosis ของเซลล์มะเร็งที่แตกต่างจากลักษณะของเซลล์ปกติ ทั้งในด้านลักษณะรูปร่างและการทำงาน (function) เพื่อบอกพฤติกรรมของเซลล์มะเร็งนั้นๆ โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 4 เกรด (Grade) โดยเรียงลำดับความรุนแรงจากน้อยไปมากดังนี้

เกรด 1 (Grade 1) หรือ Well differentiation หมายถึง เซลล์มะเร็งทั้งหมดมีลักษณะรูปร่างและการทำงานใกล้เคียงกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อต้นกำเนิดมาก ร่วมกับมี Mitoses น้อย แสดงถึงว่า เนื้องอกชนิดดังกล่าวมีการเจริญที่ดี

เกรด 2 (Grade 2) หรือ Moderately differentiation หมายถึง เซลล์มะเร็ง 3 ใน 4 มีลักษณะรูปร่างและการทำงานใกล้เคียงกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อต้นกำเนิด และมีการเจริญของเซลล์ที่กำลังระหว่าง 2 ชนิดคือ Well differentiation และ Poorly differentiation

เกรด 3 (Grade 3) หรือ Poorly differentiation หมายถึง เซลล์มะเร็งครึ่งหนึ่งมีลักษณะรูปร่างและการทำงานใกล้เคียงกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อต้นกำเนิด และมีเซลล์ที่มีลักษณะแตกต่างจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อปกติมาก

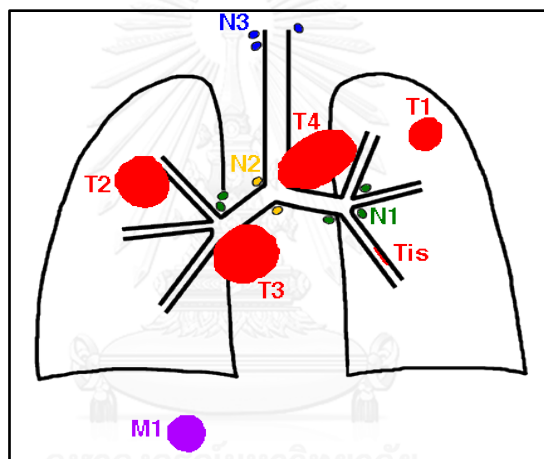
เกรด 4 (Grade 4) หรือ Undifferentiation หมายถึง เซลล์มะเร็งมีลักษณะรูปร่างแตกต่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อต้นกำเนิด จนแทบจะบอกเซลล์หรือเนื้อเยื่อต้นกำเนิดไม่ได้ ร่วมกับมี Mitoses มาก ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การ Grading ของเนื้องอก (41)

### 2.1.4.2 การ Staging ของเนื้องอก

อาศัยคุณลักษณะของเนื้องอก 3 ประการ คือ ขนาดของเนื้องอก (T) การแพร่กระจายของเนื้องอกไปตามต่อมน้ำเหลืองบริเวณเนื้องอก (N) การมีการแพร่กระจายของเนื้องอกไปตามกระแสเลือด (M) การกำหนดคุณลักษณะของเนื้องอกทั้ง 3 ประการตามระดับที่แบ่งย่อยของแต่ละคุณลักษณะ คือ แบ่งขนาดของเนื้องอก เป็น 4 หรือ 5 ระดับ (T0-T3 หรือ 4) โดย T0 คือเนื้องอกที่ยังไม่มีการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง มีขนาดเล็ก การแพร่กระจายของเนื้องอกไปตามต่อมน้ำเหลือง แบ่งเป็น 3-4 ระดับ ขึ้นกับตำแหน่งและจำนวนของต่อมน้ำเหลืองที่มีการกระจายของเนื้องอก (N0-N2 หรือ 3) โดย N0 คือไม่มีการกระจายของเนื้องอกไปที่ต่อมน้ำเหลือง และแบ่งตามการแพร่กระจายของเนื้องอกไปตามกระแสเลือดแบ่งเป็น 3 ระดับ (M0-M2) โดย M0 คือไม่มีการกระจายของเนื้องอกไปตามกระแสเลือด ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การ Staging ของเนื้องอก (41)

การแพร่กระจายของเนื้องอกมะเร็งไปเจริญเติบโตในเนื้อเยื่อส่วนอื่น (Metastasis) หมายถึง การที่เนื้อมะเร็งสามารถแพร่กระจายจากแหล่งกำเนิดไปเจริญในเนื้อเยื่อห่างไกลส่วนอื่นๆ การแพร่กระจายของเนื้อมะเร็ง แบ่งออกได้ 3 แบบ คือ

การแพร่กระจายไปตาม Body cavities ต่างๆ เช่น การแพร่กระจายของมะเร็งรังไข่ไปที่ Peritoneal cavity ทำให้ภายในช่องท้องเต็มไปด้วยมะเร็งและสารเมือกที่สร้างจากเซลล์มะเร็งดังกล่าว เรียกว่า Pseudomyxoma peritonei

การแพร่กระจายไปตามกระแสน้ำเหลือง (Lymphatic Spread) ระบบน้ำเหลืองจัดเป็นทิศทางการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ที่พบบ่อยที่สุด โดยการกระจายที่เกิดขึ้นจะขึ้นกับแนวทางการไหลเวียนของกระแสน้ำเหลือง เช่น กรณีของมะเร็งที่เกิดอยู่บริเวณ Upper Outer quadrant ของเต้านมซ้าย จะแพร่กระจาย ตามระบบน้ำเหลืองไปที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้ด้านซ้าย แต่ถ้ามะเร็ง

เกิดอยู่ในบริเวณ Inner quadrant ของเต้านมซ้ายก็จะพบการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ภายในทรวงอกรอบๆ Internal mammary arteries แทน

การแพร่กระจายไปตามกระแสเลือด (Hematologic Spread) การกระจายไปตามกระแสเลือด โดยมากแล้วเซลล์มะเร็งจะรุกรานเข้าสู่เส้นเลือดดำ เนื่องจากมีผนังบางกว่าเส้นเลือดแดง และจากนั้นกลุ่มเซลล์มะเร็งดังกล่าวสามารถลัดสูเส้นเลือดแดง ผ่าน Pulmonary arteriovenous shunts ที่ปอด ลักษณะที่พบกลุ่มเซลล์มะเร็งลอยอยู่ในกระแสเลือดจะเรียกว่า Tumor emboli หลังจากนั้นกลุ่มเซลล์มะเร็งก็อาจจะไปเจริญเติบโตอยู่ตามอวัยวะอื่น ที่พบบ่อยๆคือ ปอด ตับ กระดูก และ สมอง

ในด้านการรักษา มีการแบ่งความรุนแรงของมะเร็งตามระยะของโรค โดยอาศัยการลุกลามของโรคออกไปเป็น 4 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 : มะเร็งมีขนาดเล็ก และยังไม่ลุกลาม ยังจำกัดอยู่เฉพาะในที่เริ่มเป็น

ระยะที่ 2 : มะเร็งมีขนาดใหญ่ขึ้น เริ่มลุกลามภายในเนื้อเยื่อข้างเคียง หรือลุกลามทะลุผ่านอวัยวะที่เป็นโพรง

ระยะที่ 3 : มะเร็งมีขนาดใหญ่ขึ้น เริ่มลุกลามอวัยวะข้างเคียง และลุกลามเข้าต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้เนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เป็นมะเร็ง

ระยะที่ 4 : มะเร็งมีขนาดใหญ่โตมาก และลุกลามเข้าเนื้อเยื่อหรืออวัยวะข้างเคียง จนทะลุเข้าต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้ก่อนมะเร็ง แพร่กระจายเข้ากระแสโลหิต แพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ที่อยู่ไกลออกไป เช่น ปอด ตับ สมอง กระดูก ไชกระดูก ต่อมน้ำนม ท่อน้ำเหลืองในช่องท้อง ในช่องอก

### 2.1.5 อุบัติการณ์และโรคมะเร็งที่พบบ่อย

ในปี 2558 ประเทศสหรัฐอเมริกาพบผู้ได้รับการวินิจฉัยเป็นผู้ป่วยรายใหม่จากโรคมะเร็งประมาณ 1,658,370 ราย และพบผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคมะเร็งสูงถึง 589,430 ราย (31)

ในปี 2557 จากรายงานสถิติสาธารณสุข ของกระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย มีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งเป็นอันดับ 1 จำนวน 70,075 ราย (42) โดยในเพศชาย พบมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดีมากที่สุด 10,800 ราย รองลงมา คือ โรคมะเร็งปอด, โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ส่วนเพศหญิง พบมะเร็งเต้านม มากที่สุด 3,455 ราย รองลงมาคือ มะเร็งปากมดลูก มะเร็งตับ จากข้อมูลสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ โรคมะเร็งที่พบมากที่สุด 10 อันดับแรกในประเทศไทย แยกตามจำนวนเปอร์เซ็นต์ที่พบในเพศชายและเพศหญิง แสดงดังตารางที่ 1

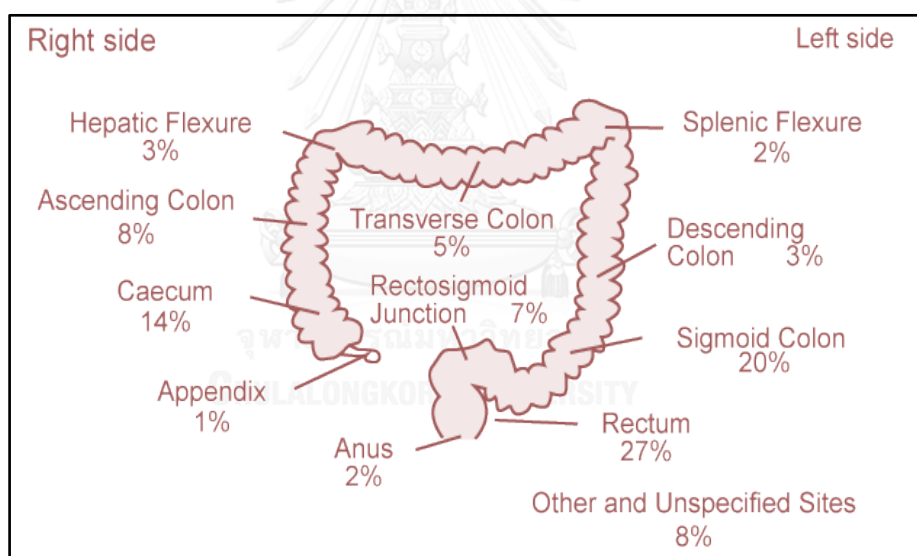
ตารางที่ 1 ข้อมูลสถิติโรคมะเร็งที่พบบ่อยมากที่สุด 10 อันดับแรกในประเทศไทย (43)

อันดับ	โรคมะเร็งที่พบบ่อย ในเพศชาย	จำนวน (เปอร์เซ็นต์)	โรคมะเร็งที่พบบ่อย ในเพศหญิง	จำนวน (เปอร์เซ็นต์)
1	มะเร็งตับและท่อน้ำดี (Liver, Bile ducts)	33.9	มะเร็งเต้านม (Breast)	28.5
2	มะเร็งหลอดลมและปอด (Trachea, Bronchus, Lung)	22.7	มะเร็งคอมดลูก (Cervix uteri)	14.4
3	มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colon, Rectum)	14.4	มะเร็งตับและท่อน้ำดี (Liver, Bile ducts)	12.9
4	มะเร็งต่อมลูกหมาก (Prostate)	7.1	มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colon, Rectum)	11.2
5	มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด แพร่กระจายเร็ว (Non-Hodgkin lymphoma)	6.2	มะเร็งหลอดลมและปอด (Trachea, Bronchus, Lung)	10.1
6	มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia)	5.2	มะเร็งรังไข่ (Ovary)	6.0
7	มะเร็งช่องปาก (Oral cavity)	5.1	มะเร็งต่อมไทรอยด์ (Thyroid)	5.1
8	มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Bladder)	4.2	มะเร็งต่อมน้ำเหลือง ชนิดแพร่กระจายเร็ว (Non-Hodgkin lymphoma)	4.5
9	มะเร็งหลอดอาหาร (Esophagus)	3.9	มะเร็งมดลูก (Corpus uteri)	4.3
10	มะเร็งกระเพาะอาหาร (Stomach)	3.6	มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia)	4.0

## 2.2 มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง

### 2.2.1 ความหมาย

มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง เป็นมะเร็งที่พบบากทั้งเพศชายและเพศหญิงเป็นอันดับต้นๆในประเทศไทย เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ (Epithelial) มีการเปลี่ยนแปลงและเจริญเติบโตอย่างผิดปกติ เกิดเป็นก้อนเนื้อที่มีขนาดผิดปกติจนกลายเป็นเนื้องอกชนิดร้ายแรง โดยพบบากในผู้ที่มีอายุ 50 ปีขึ้นไป (44) ตำแหน่งมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่พบบากส่วนใหญ่ 65-70 เปอร์เซ็นต์ อยู่ด้านซ้ายต่ำกว่า splenic flexure โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ rectum และ sigmoid ที่เหลือ 30-35 เปอร์เซ็นต์ จะอยู่ด้านขวา (45, 46) ดังภาพที่ 4 พยาธิสภาพมะเร็งลำไส้ใหญ่ 98 เปอร์เซ็นต์ เป็นมะเร็งชนิด adenocarcinoma ซึ่งแบ่งเป็นเกรด well-differentiated, moderately-differentiated และ poorly-differentiated ซึ่งมีการพยากรณ์โรคไม่ดี และพบบากประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นชนิด mucinous และพบบากประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นชนิด colloid เนื่องจากการสะสม mucin ในเซลล์มากและจะมีการดำเนินโรคที่รุนแรงกว่า (47)



ภาพที่ 4 ตำแหน่งการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (45)

มะเร็งลำไส้ใหญ่ส่วนใหญ่ก้อนมะเร็งโตอย่างรวดเร็วและก่อให้เกิดอาการจากก้อนมะเร็งที่โตขึ้นไปกดเบียดอวัยวะใกล้เคียงหรือลำไส้ใหญ่อุดตัน และการลุกลามของมะเร็งไปทำลายเนื้อเยื่อปกติและหลอดเลือดเกิดเป็นแผลและสูญเสียเลือด เมื่อมะเร็งลุกลามทำให้เกิดการแตกทะลุของลำไส้ใหญ่และแพร่กระจายไปยังอวัยวะที่อยู่ไกล โดยผ่านทางระบบน้ำเหลือง ระบบไหลเวียนเลือด ซึ่งมักแพร่กระจายไปที่ ตับ ปอด และกระดูกเป็นส่วนใหญ่

## 2.2.2 สาเหตุ

มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุของโรคที่แท้จริง ทั้งนี้พบว่ามียีนเป็นตัวควบคุมให้เซลล์ปกติเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง และมีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ปัจจัยหลัก ได้แก่ ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม (environmental factors) เป็นต้นว่าพฤติกรรมการบริโภคอาหาร และปัจจัยด้านพันธุกรรม (genetic factors) (48) ตัวอย่างสาเหตุมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง เช่น เคยมีประวัติของการเป็นโรคลำไส้บางชนิด ได้แก่ ตึ้งเนื้องอกที่ผนังลำไส้ (Adenomatous Polyps) โรคแผลอักเสบของลำไส้เรื้อรัง (Chronic ulcerative colitis) นาน 10 ปี หรือมากกว่า จะมีโอกาสเกิดโรคลำไส้ใหญ่ 5-10 เท่า มีสาเหตุจากกรรมพันธุ์ ยีน คือมีประวัติโรคลำไส้ใหญ่ในครอบครัว ผู้หญิงที่มีประวัติโรคมะเร็งเต้านม รังไข่ หรือมดลูก จะมีโอกาสเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่มากขึ้น สาเหตุจากพฤติกรรมการบริโภคอาหาร ประเภทเนื้อสัตว์และไขมันสูง อาหารที่มีแคลอรีสูง, กากใยน้อย อาหารปนเปื้อนสารพิษ หรือการสะสมแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ การคั่งค้างของเสียจนเกิดเป็นสารก่อมะเร็ง โดยเฉพาะบริเวณลำไส้ส่วนปลาย เป็นบริเวณที่สัมผัสกากอาหารที่มีสารก่อมะเร็งเป็นเวลานาน หรือสาเหตุจากปัจจัยอื่นๆ เช่น การดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่มากและนานกว่า 35 ปี จะเพิ่มอัตราการก่อโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยไม่ทราบสาเหตุ รวมถึงอาจเกิดจาก ลักษณะพื้นฐานของลำไส้ใหญ่คืออยู่ในตำแหน่งระหว่างลำไส้เล็กและทวารหนัก มีหน้าที่หลักคือดูดซึมน้ำ เกลือแร่และสารอาหาร รวมถึงเป็นที่เก็บของเสียต่างๆ ของร่างกาย เช่น กากอาหาร และอุจจาระ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้มีการเปลี่ยนแปลง หนาตัวขึ้น และเจริญเติบโตอย่างผิดปกติ เกิดเป็นติ่งก้อนเนื้อที่มีขนาดผิดปกติจนกลายเป็นเนื้อมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ และเนื่องจากลักษณะทางชีวภาพของลำไส้ใหญ่ นั้นยังเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เป็นแหล่งสะสมทั้งปัจจัยทางกายภาพ และสารเคมี ด้วยเหตุนี้เอง อาจเป็นการเพิ่มการพัฒนาโรคต่างๆ รวมทั้งโรคมะเร็งด้วย เป็นต้น (44)

## 2.2.3 อนุชีววิทยาระดับโมเลกุลการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ จากเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ จนกลายเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ได้นั้น มีการเปลี่ยนแปลงอนุชีววิทยาระดับโมเลกุลหลายขั้นตอนและมียีนที่เกี่ยวข้องหลายยีน โดยเริ่มจาก การสูญเสีย genetic information ของ tumor suppressor gene คือเกิด allelic loss อยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมที่ 5 (5q) ของยีน Adenomatous Polyposis Coli (APC) เป็นผลทำให้เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่แบ่งเซลล์มากกว่าปกติ เกิดเป็นก้อนเนื้องอกแบบไม่ร้ายแรง (benign adenoma) การกลายพันธุ์ของยีน K-ras ซึ่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 12 (12p) และยีน Deleted in Colorectal Carcinoma (DCC) ซึ่งอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมที่ 18 (18q) การกลายพันธุ์ทั้งยีน K-ras และยีน DCC ร่วมกับการสูญเสียการทำงานของยีน p53 บนแขนข้างสั้นของ

โครโมโซมที่ 17 จะทำให้ก้อนเนื้ออกเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นลักษณะร้ายแรง (mild, moderate และ severe dysplasia) จนกลายเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ ทั้งนี้การดำเนินของโรครจาก adenoma กลายเป็น carcinoma ใช้เวลา 5-10 ปี (44, 47, 49, 50)

#### 2.2.4 อาการ

อาการของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่าผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะแรกๆจะไม่แสดงอาการ โดยส่วนใหญ่จะพบอาการ อุจจาระเป็นเลือดเป็นมูกและ/หรือ เป็นมูกเลือดท้องผูกสลับท้องเสียหาสาเหตุไม่ได้ ซีดโดยไม่ทราบสาเหตุ มีเลือดออกที่ล้นน้อยเรื้อรังจากแผลมะเร็งโดยไม่รู้ตัว อาจมีท้องผูกมากผิดปกติ หรือปวดท้องเรื้อรังจากก้อนมะเร็งอุดกั้นทางเดินอุจจาระ และขึ้นอยู่กับตำแหน่งของมะเร็งที่เป็น ตัวอย่างเช่น พบก้อนมะเร็งที่ตำแหน่งลำไส้ใหญ่ด้านขวา มักมีอาการอ่อนเพลีย ปวดท้องเป็นประจำ หรือมีเลือดออกในทางเดินอาหาร คลำได้ก้อนที่ท้องบริเวณด้านขวา ซีด และน้ำหนักลด พบก้อนมะเร็งที่ตำแหน่งลำไส้ใหญ่ด้านซ้าย มักมีอาการของลำไส้อุดตันหรือถ่ายผิดปกติ ท้องผูกสลับท้องเสีย ท้องอืด ไม่ผายลม ปวดท้องรุนแรงหรือถ่ายเป็นมูกปนเลือด พบก้อนมะเร็งที่ตำแหน่งลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย มักมีอาการปวดทวารหนัก ถ่ายเป็นเลือดสด รู้สึกถ่ายไม่สุด ปวดเบ่ง และหากพบก้อนมะเร็งที่ตำแหน่งช่องทวารหนัก สามารถคลำก้อนได้ ถ่ายเป็นเลือดปน มีต่อมน้ำเหลืองที่ขาหนีบโต เป็นต้น (51)

#### 2.2.5 ระยะและความรุนแรง

การแบ่งระยะและความรุนแรงของมะเร็งลำไส้ใหญ่ ใช้หลักการเช่นเดียวกับมะเร็งชนิดอื่นๆ โดยอาศัยตำแหน่งที่พบก้อนมะเร็งและการลุกลามของมะเร็ง โดยสามารถแบ่งออกไปเป็น 4 ระยะดังนี้

ระยะที่ 0 (Carcinoma in situ) คือ มะเร็งระยะต้นๆ ยังเจริญอยู่บนชั้นของเซลล์ปกติไม่แทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อปกติ

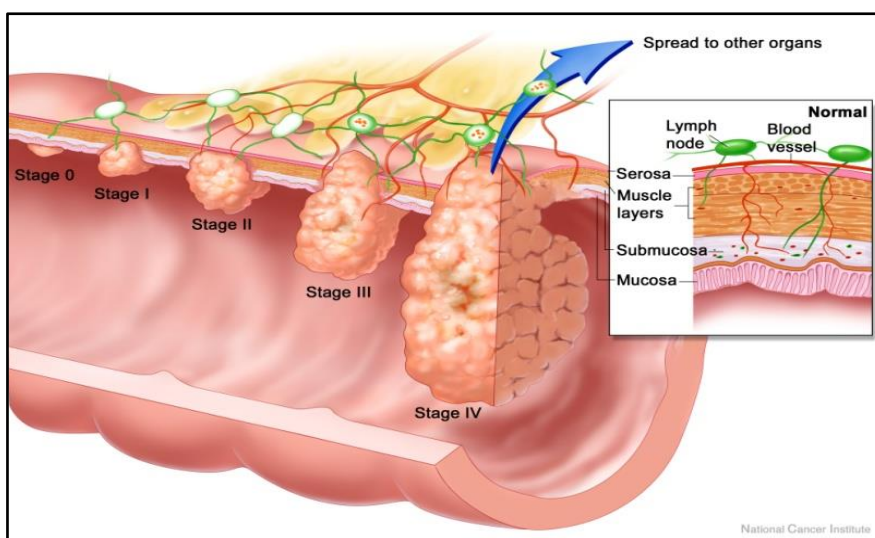
ระยะที่ 1 (Localized) คือ มะเร็งที่มีขนาดตั้งแต่ 3-5 เซนติเมตร สามารถมองเห็นได้ มะเร็งระยะนี้จะยังคงจำกัดอยู่ในอวัยวะที่เกิดคือยังอยู่ในเยื่อบุลำไส้เท่านั้น

ระยะที่ 2 (Early Locally advanced) คือ มะเร็งจะกระจายออกไปในบริเวณเนื้อเยื่อใกล้เคียงอวัยวะที่กำเนิดมะเร็ง โดยมะเร็งทะลุเข้าไปในชั้นกล้ามเนื้อของลำไส้ และ/หรือทะลุถึงเยื่อหุ้มลำไส้ ลุกลามเข้าเนื้อเยื่อหรืออวัยวะข้างเคียง

ระยะที่ 3 (Late Locally advanced) คือ มะเร็งจะกระจายออกไปยังต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง และก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่ขึ้น



ระยะที่ 4 (Metastasized) คือ มะเร็งระยะลุกลามแพร่กระจาย เซลล์มะเร็งแบ่งตัว เพิ่มจำนวนนอกเหนือการควบคุมจากร่างกาย โดยเซลล์มะเร็งแพร่กระจายและลุกลามเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ไกลออกไป ลุกลามตามกระแสโลหิตไปยังอวัยวะอื่นๆที่อยู่ไกลออกไป เช่น ช่องท้อง ตับ ปอดหรือกระดูก เป็นต้น ดังภาพที่ 5 (52, 53)



ภาพที่ 5 มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ระยะต่างๆ (54)

## 2.2.6 การวินิจฉัย

### 2.2.6.1 การวินิจฉัยอาการทางคลินิก

แพทย์จะทำการวินิจฉัยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงได้จาก ประวัติการป่วย ผู้ป่วยที่มาตรวจด้วยอาการผิดปกติที่สงสัยว่าเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จะแสดงอาการเช่น ถ่ายอุจจาระเป็นมูกเลือด อุจจาระลำเล็กลง ท้องผูกสลับท้องเสีย เลือดจางโดยหาสาเหตุไม่พบ ควรได้รับการพิจารณาตรวจทางคลินิก (48) ดังนี้

1. ชักประวัติ ปัจจัยเสี่ยง อาการแสดง ประวัติการเป็นมะเร็งของครอบครัว และตรวจร่างกายโดยละเอียด
2. ทำการตรวจทางทวารหนักด้วยนิ้วมือ (Digital Rectal Examination : DRE)
3. ทำการตรวจทางรังสี โดยการใช้สารแบเรียม (Double Contrast Barium Enema : DCBE) สามารถเห็นเนื้องอก แต่ไม่เห็นความผิดปกติในบริเวณลำไส้ใหญ่ส่วนตรงและส่วนล่าง

4. ทำการส่องกล้องตรวจภายในลำไส้ใหญ่ (Colonoscopy) สามารถตรวจดูได้ตลอดความยาวของลำไส้ใหญ่และเห็นก้อนมะเร็งที่อยู่ส่วนบนของลำไส้ใหญ่ชัดเจนระหว่างส่องกล้องสามารถตัดชิ้นเนื้อเยื่อของลำไส้ใหญ่ เพื่อตรวจหาเซลล์มะเร็ง
5. ทำการตรวจทางห้องปฏิบัติการ การตรวจเลือดในอุจจาระ (Fecal Occult Blood Test : FOBT) การตรวจหาแอนติเจนของเซลล์มะเร็ง (Carcino Embryonic Antigen : CEA)
6. ทำการตัดชิ้นเนื้อหรือชิ้นเนื้อที่สงสัย ตรวจทางพยาธิวิทยา เพื่อยืนยันการวินิจฉัยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงเสมอ

### 2.2.6.2 การวินิจฉัยลักษณะทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อ

การตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อหรือชิ้นเนื้อที่ผิดปกติ ทางพยาธิวิทยาโดยขั้นแรกพยาธิแพทย์จะตรวจชิ้นเนื้อด้วยตาเปล่า เพื่อดูว่าชิ้นเนื้อดังกล่าวมีลักษณะที่ผิดปกติหรือไม่ เมื่อพบความผิดปกติจะตัดชิ้นเนื้อนั้นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำชิ้นเนื้อนั้นผ่านขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อ (tissue processing) คือการคงสภาพชิ้นเนื้อและทำให้ชิ้นเนื้อแข็งตัว โดยการทำให้ชิ้นเนื้อผ่านน้ำยาเคมี และทำการตรึงชิ้นเนื้อด้วยการฝังชิ้นเนื้อในพาราฟินให้เป็นบล็อกชิ้นเนื้อ (formalin-fixed, paraffin-embedded tissue) และตัดให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ (ribbon) ขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตร วางบนแผ่นสไลด์แก้วและย้อมสี Hematoxylin and eosin stain (H&E stain) พยาธิแพทย์จะวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาจากการศึกษารายละเอียดต่างๆของชิ้นเนื้อในระดับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วจึงจะรายงานให้แพทย์ผู้ส่งตรวจหรือทำการรักษาทราบ สำหรับชิ้นเนื้อของผู้ป่วยบางรายที่มีความซับซ้อน จำเป็นต้องศึกษาด้วยการตรวจพิเศษอื่นๆเพิ่มเติม เพื่อช่วยให้พยาธิแพทย์ใช้ผลร่วมในการวินิจฉัยแบบชี้เฉพาะเช่น การวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งชนิดใด เป็นเซลล์มะเร็งชนิดใด การพยากรณ์โรคของผู้ป่วยเช่นการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองหรือไม่ หรือแม้กระทั่งการให้ยาเคมีบำบัดแบบมุ่งเป้าได้ผลหรือไม่ ต้องอาศัยการตรวจพิเศษเพิ่มเติมเช่น การย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry), การย้อมสีพิเศษ (special stains), การตรวจทางอณูพยาธิวิทยา (molecular pathology) เป็นต้น (55) ผลการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์เป็นชนิด adenocarcinoma ผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้ออื่นๆที่พบได้ ได้แก่ carcinoid tumors, leiomyosarcoma, lymphoma และ squamous cell carcinoma และ ลักษณะ เซลล์ adenocarcinoma ที่พบส่วนใหญ่เป็นชนิด well-differentiated และ moderate-differentiated

### 2.2.7 อุบัติการณ์

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (Colorectal Cancer) เป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อย อยู่ในลำดับที่ 3 ของโรคมะเร็งที่พบทั่วโลก ในปี 2012 ทั่วโลกพบผู้ป่วยใหม่โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงประมาณ 1.4 ล้านคนต่อปี ในเพศชายมีอุบัติการณ์ 7.46 คน ต่อประชากรชาย 100,000 คน และในเพศหญิงมีอุบัติการณ์ 6.14 คน ต่อประชากรหญิง 100,000 คน คาดการณ์ว่าในปี 2035 ทั่วโลกพบผู้ป่วยรายใหม่โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ทั้งเพศชายและเพศหญิงสูงถึง 1.36 และ 1.08 ล้านคน ตามลำดับ (1) อุบัติการณ์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงในประเทศไทย จากข้อมูลทะเบียนมะเร็งในประเทศไทย ปี 2007-2009 พบว่าโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง เป็นอันดับ 3 ในเพศชายมีอุบัติการณ์ 14.7 คน ต่อประชากรชาย 100,000 คน และเป็นอันดับ 5 ในเพศหญิง มีอุบัติการณ์ 11 คน ต่อประชากรหญิง 100,000 คน โดยกลุ่มผู้ป่วยส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในเขตกรุงเทพมหานครและในเขตเมืองใหญ่ ส่วนใหญ่พบในอายุมากกว่า 50 ปี แต่มีแนวโน้มพบในคนอายุน้อยลง (2, 47, 56)

### 2.2.8 การรักษา

การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงให้ได้ผลดี ต้องเป็นการรักษาร่วม แบบสหสาขาวิชา ประกอบด้วย การผ่าตัด การให้ยาเคมีบำบัด และการให้รังสีรักษา โดยพิจารณาตามความเหมาะสม และข้อบ่งชี้ในผู้ป่วยแต่ละราย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของแพทย์ที่ทำการรักษา (48)

#### 2.2.8.1 การรักษาหลัก

การรักษาหลักของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงคือ การผ่าตัด มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) ชนิดการผ่าตัดขึ้นอยู่กับตำแหน่งของมะเร็ง โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อตัดก้อนมะเร็งพร้อมขอบเขตที่กว้าง (wide margin) ควรได้อย่างน้อย 5 เซนติเมตร ผ่าตัดตามแนวเส้นเลือดที่เลี้ยงลำไส้ ส่วนนั้นจนถึง vascular pedicle รวมทั้งต่อมน้ำเหลืองตามแนวก้อนมะเร็งออก ส่วนมะเร็งไส้ตรง (rectum cancer) ชนิดการผ่าตัดขึ้นอยู่กับตำแหน่งและการลุกลามของโรค โดยมีหลักการคือ ผ่าตัดก้อนมะเร็งรวมทั้งขอบเขต 2-3 เซนติเมตร รวมทั้งต่อมน้ำเหลืองรอบไส้ตรง รวมทั้ง vascular pedicle ออก

## 2.2.8.2 การรักษาเสริม

### 2.2.8.2.1 รังสีรักษา

รังสีรักษา มีบทบาทน้อยในมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) เนื่องจากแนวทางการกระจายของต่อมน้ำเหลืองเข้าไปทั่วช่องท้องทำให้การให้รังสีรักษาเพื่อควบคุมโรคมะเร็งทำได้ยาก และสำหรับรังสีรักษาในมะเร็งไส้ตรง (rectum cancer) นั้น รูปแบบและบทบาทการให้รังสีรักษาขึ้นอยู่กับตำแหน่งและการลุกลามของโรค ตัวอย่างเช่น รูปแบบ Adjuvant postoperative chemoradiation มีบทบาทในมะเร็งไส้ตรงระยะ T3 และ T4 หรือ N+ เพื่อเพิ่มผลการควบคุมเฉพาะที่ โดยไม่มีผลต่ออัตราการอยู่รอด และรูปแบบ Endocavitary radiation เป็นการรักษามะเร็งไส้ตรง โดยสอดเครื่องมือให้รังสีเข้าไปจ่อที่รอยโรคมะเร็ง ซึ่งจะช่วยลดผลข้างเคียงจากการรักษาด้วยรังสี แต่การรักษาแบบนี้ใช้ได้เฉพาะผู้ป่วยที่มีรอยโรคขนาดเล็ก อยู่เฉพาะที่และยังไม่ลุกลามเท่านั้น

### 2.2.8.2.2 ยาเคมีบำบัด

การให้ยาเคมีบำบัด มีบทบาทเพื่อลดการแพร่กระจายของโรคมะเร็งไปยังกระแสเลือด สำหรับผู้ป่วยระยะลุกลาม (Metastatic Colorectal Cancer) ทั้งกรณีที่มีมะเร็งกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองและกรณีที่มีมะเร็งลุกลามออกนอกลำไส้แล้ว นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มผลควบคุมโรคมะเร็งเฉพาะที่ (local control) เมื่อใช้ร่วมกับรังสีรักษา (concurrent chemoradiation) และยังช่วยเพิ่มอัตราการอยู่รอด (overall survival) ของผู้ป่วยได้อีกด้วย การรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงในระยะลุกลาม ปัจจุบันมียาเคมีบำบัดที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยา ของประเทศสหรัฐอเมริกา (FDA : The United States Food and Drug Administration) เป็นยาเคมีบำบัดแบบมุ่งเป้าที่เซลล์มะเร็งโดยตรง โดยมีรายละเอียดและข้อดี-ข้อเสีย (57) ดังแสดงในตารางที่ 2

ปัจจุบันมีการเลือกใช้กลุ่มยา anti-EGFR monoclonal antibody คือ Cetuximab (Erbix) และ Panitumumab (Vectibix®) อย่างกว้างขวางในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะลุกลาม (Metastatic Colorectal Cancer) ทั้งนี้เพราะเป็นยาเคมีบำบัดที่รักษาอย่างเฉพาะเจาะจง โดยตัวยาออกฤทธิ์ต้านตัวรับสัญญาณที่เซลล์มะเร็งโดยตรง และมี predictive marker ชัดเจน Cetuximab และ Panitumumab เป็นยา anti-EGFR ออกฤทธิ์โดยการจับเซลล์มะเร็งโดยตรง โดยจับกับ receptor ของเซลล์มะเร็งเพื่อยับยั้งกลไกที่เซลล์มะเร็งส่งสัญญาณไปให้นิวเคลียสทำงานต่อไป และยังกระตุ้น innate immunity ให้มาจับกินเซลล์มะเร็งได้อีกทางหนึ่ง (5) โดยยา Cetuximab และ Panitumumab นี้เกี่ยวข้องกับโปรตีน RAS ที่มีความสัมพันธ์กับการถ่ายทอดสัญญาณจาก cell surface receptor ผ่านกลไก mitogen-activated protein kinase (MAPK) คือ Ras-Raf-Mek-MAPK อีกด้วย (57, 58)

ตารางที่ 2 ยาเคมีบำบัดที่ใช้รักษา Metastatic Colorectal Cancer ในปัจจุบัน (59)

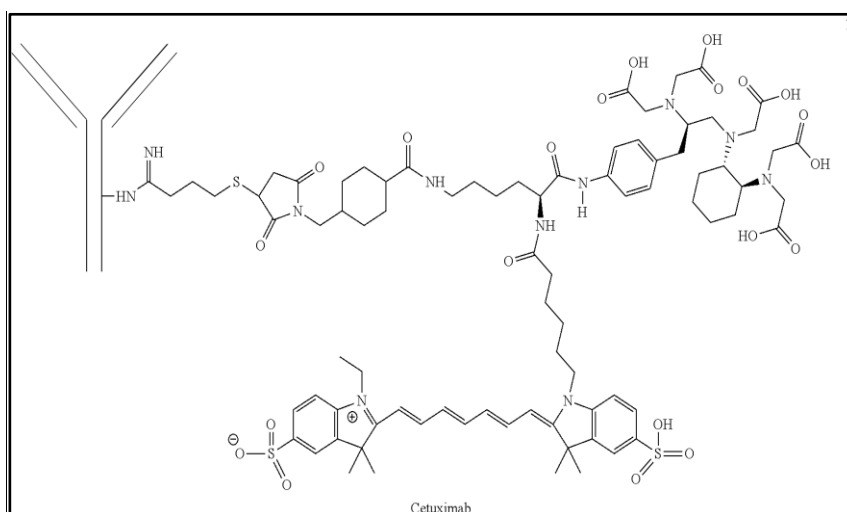
FDA-Approved Agents and Indications in Metastatic Colorectal Cancer (2013)					
กลุ่มของยา	ชื่อยา	เป้าหมาย	ออกฤทธิ์	ข้อดี	ข้อเสีย
Cytotoxic chemotherapy	- Irinotecan - Oxaliplatin - Fluorouracil - Capecitabine	ดีเอ็นเอ synthesis	- Inhibitor topoisomerase I - Inhibitor ดีเอ็นเอ synthesis	- cost-effective - รักษาเมื่เริ่มได้หลายชนิด	รักษาไม่เฉพาะเจาะจง
VEGF inhibitor	- Bevacizumab - Aflibercept	Anti-VEGF	Angiogenesis Inhibitor	ไม่มี predictive marker	hypertension, bleeding, GI poriferation
EGFR antibody	-Cetuximab (Chimeric) -Panitumumab (Humanised)	Anti-EGFR	-Inhibitor EGFR signaling - Apoptosis	มี predictive marker	ใช้เวลานานในการตรวจดูลักษณะของยีน K-ras
Multikinase inhibitor	Regorafenib	Tyrosine kinase Inhibitor	Antineoplastics, Angiogenesis Inhibitor	เมื่อดื้อยา มาตรฐานทุกชนิด	Side effects สูง เช่น Serious liver

## 2.3 ยาเคมีบำบัดชนิด anti-EGFR monoclonal antibody

### 2.3.1 โครงสร้างและลักษณะทั่วไป

#### 2.3.1.1 ยา Cetuximab (Erbixux)

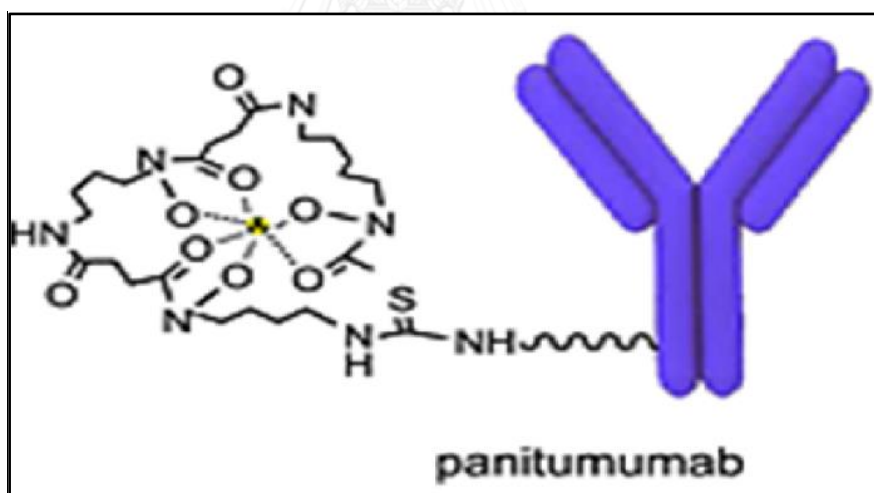
ยาเคมีบำบัด Cetuximab มีชื่อทางการค้าคือ Erbitux มีสูตรโมเลกุล คือ  $C_{6484}H_{10042}N_{1732}O_{2023}S_{36}$  มีมวลโมเลกุล 145781.6 กรัม/โมลาร์ ยาจัดเป็นโมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) ชนิด chimeric mouse/human IgG1 ซึ่งเกิดจากการตัดต่อพันธุกรรมของดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบในการสร้างแอนติบอดีของมนุษย์และหนู โดยมีสัดส่วนของมนุษย์อยู่ 65-90 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถไปแย่งจับ epidermal growth factor receptor (EGFR), erbB1(HER1) และ c-erbB1 ทำให้เกิด internalization ของตัวรับ (receptor) จึงยับยั้งการเกิด Autophosphorylation ของ EGFR และ antibody complex ทำให้เซลล์ไม่สามารถรับสัญญาณการกระตุ้น สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและตายโดยธรรมชาติ นอกจากนี้ ยาเคมีบำบัด Cetuximab ยังออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิด ADCC อีกด้วย (60) ยาเคมีบำบัด Cetuximab นี้ ใช้รักษาโรคมะเร็งบริเวณศีรษะและลำคอ มะเร็งปอด รวมถึงมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงในระยะลุกลาม ในปี 2547 สถาบัน Food and Drug Administration แห่งสหรัฐอเมริกาอนุมัติให้ใช้ยาเคมีบำบัดนี้ ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงในระยะลุกลาม และปี 2552 ได้แนะนำให้ใช้ยาเคมีบำบัดนี้กับผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มียีน *K-ras* ไม่กลายพันธุ์ (wild-type) เท่านั้น รวมถึงแนะนำให้ตรวจลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *K-ras* ก่อนการให้ยาเคมีบำบัด Cetuximab (61, 62) ยาเคมีบำบัด Cetuximab มีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายที่สูงถึง \$9,621.25 ต่อสัปดาห์ (63) ซึ่งโครงสร้างของยา Cetuximab ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 โครงสร้างของยาเคมีบำบัด Cetuximab (64)

### 2.3.1.2 ยา Panitumumab (vectibix®)

ยาเคมีบำบัด Panitumumab มีชื่อทางการค้าคือ Vectibix® มีสูตรโมเลกุล คือ  $C_{6306}H_{9732}N_{1672}O_{1994}S_{46}$  มีมวลโมเลกุล 144324.12 กรัม/โมลาร์ ยาจัดเป็นโมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) ชนิด fully IgG2 human monoclonal antibody ซึ่งเกิดจากการตัดต่อพันธุกรรมของดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบในการสร้างแอนติบอดีของมนุษย์ โดยมีสัดส่วนของมนุษย์อยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถไปแย่งจับ epidermal growth factor receptor (EGFR), ErbB-1 และ HER1 (60) กลไกการออกฤทธิ์คล้ายกับยาเคมีบำบัด Cetuximab ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถรับสัญญาณกระตุ้น สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ (65) ใช้รักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงในระยะลุกลาม ในปี 2549 สถาบัน Food and Drug Administration แห่งสหรัฐอเมริกา ยอมรับให้ใช้ยาเคมีบำบัดนี้ ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงในระยะลุกลาม และปี 2552 ได้แนะนำให้ตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ก่อนใช้ยานี้กับผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง และแนะนำให้ใช้กับผู้ป่วยที่มียีน *K-ras* ไม่กลายพันธุ์ (wild-type) เท่านั้น (61, 62) เช่นเดียวกับยาเคมีบำบัด Cetuximab ยาเคมีบำบัด Panitumumab มีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายที่สูงถึง \$8,146.32 ต่อสัปดาห์ (63) ซึ่งโครงสร้างของยา Panitumumab ดังแสดงในภาพที่ 7



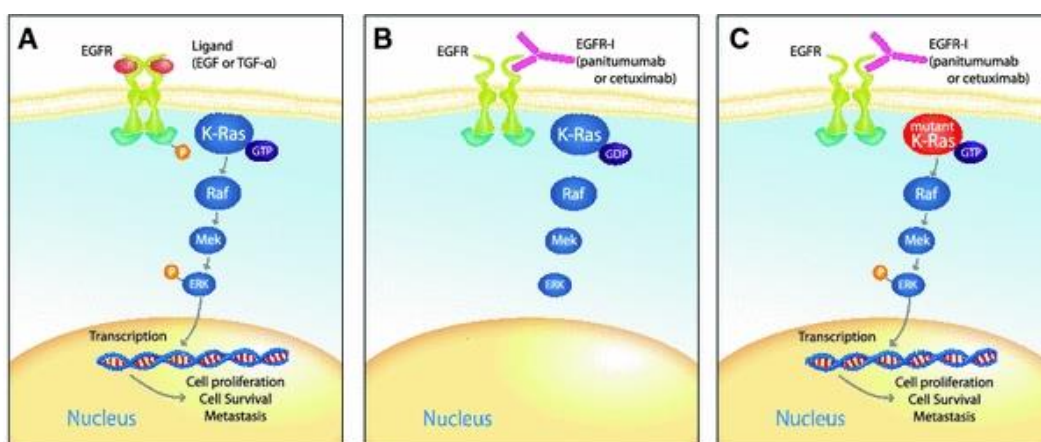
ภาพที่ 7 โครงสร้างของยาเคมีบำบัด Panitumumab (66)

### 2.3.2 กลไกการทำงานของยา Cetuximab และ Panitumumab

กลไกของยา Cetuximab และ Panitumumab มีความสัมพันธ์กับ EGFR โดยการถ่ายทอดสัญญาณจาก cell surface receptor ผ่านกลไก MAPK ดังภาพที่ 8 A ที่ตำแหน่ง ligands ของ epidermal growth factor (EGF) ถูกกระตุ้นและจับด้วย Growth factor ฮอร์โมน ชนิดต่างๆทำให้มีการเติมหมู่ฟอสเฟสแก่ Receptor Tyrosine Kinase (RTK) มีผลทำให้กระตุ้นโปรตีน RAS จาก Inactive form (RAS-GDP) เป็น Active form (RAS-GTP) ทำให้ RAF gene กระตุ้น MEK และ ERK1/2 (MAPK) ทำให้มีการกระตุ้นให้ดีเอ็นเอเกิดการ Transcription, เกิดการสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis) นำไปสู่การควบคุมการแสดงออกของยีนจำนวนมาก ที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดและแบ่งตัวของเซลล์ทำให้เซลล์มะเร็งเพิ่มจำนวนและอยู่รอดได้ (42, 67)

เมื่อได้รับยา Cetuximab และ Panitumumab ที่เป็น chimeric IgG1 และ fully human monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะสูงต่อ EGFR โดยสามารถที่จะแย่งจับกับ ligand แล้วเกิด internalization ของ antibody complex และยับยั้งกระบวนการ ligand induced phosphorylation ของวิถีสัญญาณ MAPK ซึ่งผลสุดท้ายทำให้เซลล์มะเร็งหยุดเติบโตและตายโดยธรรมชาติ (apoptosis) ดังภาพที่ 8 B

ตรงกันข้ามถ้ามีการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* แม้จะได้รับยา Cetuximab และ Panitumumab เซลล์มะเร็งที่มีการกลายพันธุ์ของ *K-ras* นั้นจะเป็นอิสระ ไม่ขึ้นกับ EGFR และโปรตีน RAS ไม่สามารถเปลี่ยนรูปจาก ras-GTP กลับเป็น ras-GDP ได้ดังนั้นจึงกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผ่านทางวิถีสัญญาณ MAPK ต่อไปได้ นำไปสู่การควบคุมการแสดงออกของยีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดและแบ่งตัวของเซลล์ทำให้เซลล์มะเร็งเพิ่มจำนวนและอยู่รอดต่อไปได้ ดังภาพที่ 8 C



ภาพที่ 8 กลไกของยาเคมีบำบัด (Cetuximab และ Panitumumab) (68)



ทั้งนี้ยา Cetuximab และ Panitumumab จะให้ผลการตอบสนองต่อการรักษาที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของยีน *K-ras* ซึ่งมีอยู่ 2 ชนิด คือ ชนิดปกติ หรือ *K-ras* ที่ไม่กลายพันธุ์ ศัพท์ทางการแพทย์เรียกว่า *K-ras* แบบ Wild type จะให้ผลการรักษาที่ดี และ *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ หรือ *K-ras* แบบ Mutant จะให้ผลการรักษาไม่ดี (5-7) ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการรักษาผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยยา Cetuximab ดังนี้คืองานวิจัยของ Tol และคณะ ศึกษาการให้ยา chemotherapy, bevacizumab และ Cetuximab ในผู้ป่วยมะเร็งชนิด Metastatic Colorectal Cancer จำนวน 755 ตัวอย่างพบว่ามียาอย่างมีนัยสำคัญโดยลดค่า median progression-free survival และผู้ป่วยที่ได้รับ Cetuximab มีคุณภาพชีวิตที่ดีกว่า แต่ผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* พบว่าเมื่อได้รับ Cetuximab จะมีผล progression-free survival สั้นกว่าการได้รับยาเคมีบำบัดตัวอื่นๆ (6) งานวิจัยของ Bokemeyer และคณะ ทำการศึกษาการให้ยาในผู้ป่วย Metastatic Colorectal Cancer จำนวน 338 ตัวอย่าง และแบ่งกลุ่มผู้ป่วยแบบสุ่ม กลุ่มหนึ่งให้ยา Cetuximab ร่วมกับ folfox-4 regimen กลุ่มที่สองให้เฉพาะ folfox-4 regimen ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่มที่ได้รับ Cetuximab ร่วมกับ folfox-4 regimen มีค่า overall response rate (ORR) สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ folfox-4 regimen เพียงอย่างเดียว และในผู้ป่วยที่มียีน *K-ras* ไม่กลายพันธุ์ พบว่าเมื่อเพิ่มการให้ยา Cetuximab เข้าไปใน folfox-4 regimen พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ response อย่างมีนัยสำคัญ (69)

การศึกษาคือการให้ยา Cetuximab ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด Metastatic Colorectal Cancer พบว่าการให้ยา Cetuximab กับผู้ป่วยชนิดไม่กลายพันธุ์ของยีน *K-ras* เท่านั้นจึงจะมีประโยชน์และได้ผลดี ส่วนผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* จะไม่ได้รับผลดี (5, 7) งานวิจัยของ Price และคณะ ทำการศึกษาการให้ยา Cetuximab และ Panitumumab ในผู้ป่วย Metastatic Colorectal Cancer โดยผู้ป่วยที่ศึกษาทั้งหมดต้องไม่พบการกลายพันธุ์ที่ยีน *K-ras* จำนวน 1010 ตัวอย่าง และแบ่งกลุ่มผู้ป่วยแบบสุ่มด้วยอัตราส่วน 1 : 1 และแยกกลุ่มให้ยาเคมีบำบัดต่างชนิดกันคือ Cetuximab และ Panitumumab ผลการศึกษาพบว่า ยาเคมีบำบัดทั้ง 2 ชนิดให้ผลการรักษาเท่าเทียมกัน และมีประโยชน์ต่ออัตราการรอดชีวิตที่คล้ายกัน (70)

ดังนั้นการตรวจลักษณะของยีน *K-ras* ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง เพื่อบ่งชี้ว่ายีน *K-ras* กลายพันธุ์หรือไม่ ก่อนการรักษา จะช่วยให้แพทย์วางแผนการรักษาให้เหมาะสมและเกิดประสิทธิภาพสูงสุดกับผู้ป่วยแต่ละราย (9)

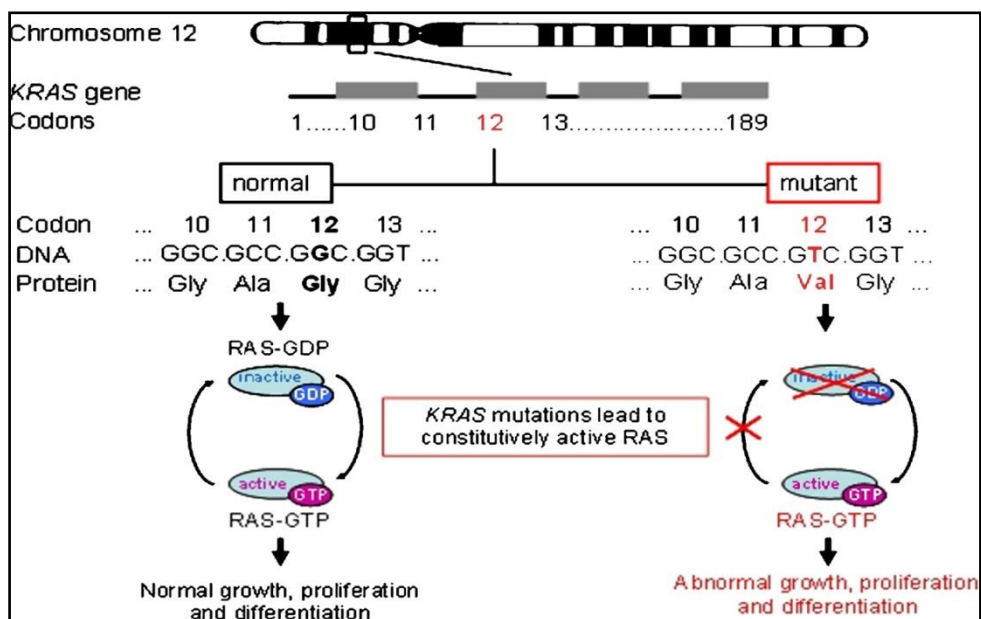
## 2.4 ยีน K-ras (V-Ki-ras 2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)

### 2.4.1 ลักษณะทั่วไป

Ras gene เป็น proto-oncogene ชนิดหนึ่งอยู่ใน ras gene family ประกอบด้วย H-ras, N-ras, K-ras โดยมีบทบาทหน้าที่เหมือนกัน (71) ดังนี้คือ N-ras (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา GTP/GDP binding และ GTPase activity ซึ่งมีบทบาทหน้าที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth) และเมื่อมีการกลายพันธุ์ของยีน N-ras ที่ตำแหน่ง codon 12, 13 และ 61 จะทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไป รวมถึงทำให้เซลล์มะเร็งมีความหลากหลายได้ (72) H-ras (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 11 เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ small GTPases โดยเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ (cell division) H-ras มีการทำงานแบบ molecular switch ในการเปลี่ยนแปลง GTP เป็น GDP เมื่อมีการกลายพันธุ์ของยีน H-ras จะทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์และการแบ่งเซลล์เป็นไปอย่างไร้การควบคุม (73) และ K-ras (V-Ki-ras 2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) อยู่บนโครโมโซมที่ 12 สามารถสร้างโปรตีนขนาด 21,000 ดาลตัน ประกอบด้วย amino acid เรียงต่อกัน 188-189 residues (10) ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ ชักนำให้มีการกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติโดยกลไก Apoptosis

โปรตีน RAS เป็นโปรตีนขนาดเล็ก (small GTP-binding protein) ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์และมีอยู่ในทุกเซลล์ของร่างกาย ยีน K-ras เป็นหนึ่งในวงจรมูลฐานที่ส่งสัญญาณจากผิวเซลล์สู่นิวเคลียส ภายหลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย Growth factors ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยแอลฟา ( $\alpha$ ) ของ G-Protein มีการทำงานแบบ molecular switch ทำหน้าที่เปิด-ปิด ส่งผลต่อการถ่ายทอดสัญญาณ โปรตีน RAS จึงทำหน้าที่ควบคุมการถ่ายทอดสัญญาณ (transduction signal) เช่น EGFR-induced cell signaling โดยส่งสัญญาณจาก receptor บนผิวเซลล์ไปยังบริเวณเป้าหมายภายในเซลล์ โปรตีน RAS มี 2 รูปแบบ คือ Active form (RAS-GTP) และ Inactive form (RAS-GDP) ทั้งนี้ โปรตีน RAS สามารถเปลี่ยนรูปร่างกลับไปมาได้ คือกระตุ้นให้เป็น RAS-GTP ด้วย Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) และกระตุ้นให้เป็น RAS-GDP ด้วย GTPase activating protein (GAPs) หากมีการกลายพันธุ์ จะเป็นสาเหตุทำให้ ras gene เปลี่ยนจาก proto-oncogene เป็น oncogene ทำให้เกิดความผิดปกติของโปรตีน RAS เนื่องจาก amino acid ในสายของโปรตีนผิดไปจากเดิม โปรตีน GAPs ไม่สามารถเปลี่ยนรูปร่างจาก RAS-GTP กลับเป็น RAS-GDP ได้ เกิดการถ่ายทอดสัญญาณ กระตุ้นเซลล์เป้าหมายตลอดเวลา โดยสามารถแบ่งตัวได้เองโดยไม่ต้องอาศัยการกระตุ้นด้วย Growth factors ใดๆ ทำให้เกิดความผิดปกติของการ

เจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ดังกล่าวได้ด้วยตนเอง ตัวอย่างเช่น เมื่อยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 คือ GGC : Glycine ไม่กลายพันธุ์ RAS-GTP จะเปลี่ยนกลับเป็น RAS-GDP ซึ่งเป็น inactive form ได้ แต่เมื่อมีการกลายพันธุ์เป็น GTC : Valine, RAS-GTP จะไม่สามารถเปลี่ยนรูป กลับเป็น RAS-GDP ได้ เกิดการถ่ายทอดสัญญาณ กระตุ้นเซลล์เป้าหมายตลอดเวลา ดังภาพที่ 9 (74-76)



ภาพที่ 9 ตำแหน่งและปฏิกิริยาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* (77)

บทบาทและความสำคัญของยีน *H-ras*, *N-ras*, *K-ras* ทางคลินิกพบว่า การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* (5, 14) ความสำคัญของยีน *K-ras* ทางคลินิก พบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งปอด (lung adenocarcinoma), mucinous adenoma, มะเร็งเต้านม (ductal carcinoma), มะเร็งตับอ่อน (pancreas carcinoma) รวมทั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (colorectal carcinoma) ซึ่งมีบทบาทและความสำคัญแตกต่างกันไป การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่พบในอัตราสูงได้แก่ มะเร็งตับอ่อน (pancreas carcinoma) พบ 95 เปอร์เซ็นต์, มะเร็งต่อมไทรอยด์ (thyroid carcinoma) พบ 55 เปอร์เซ็นต์, มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal carcinoma) พบ 35 เปอร์เซ็นต์ และโรคมะเร็งปอด (lung adenocarcinoma) พบ 35 เปอร์เซ็นต์ (78) เช่นตัวอย่าง งานวิจัยของ Maughan และคณะ ศึกษาการกลายพันธุ์ของ *ras* gene กับการให้ยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งชนิด Metastatic Colorectal Cancer จำนวน 1630 ตัวอย่าง พบอัตราการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* สูงถึง 43 เปอร์เซ็นต์ อัตราการกลายพันธุ์ของยีน *B-raf* พบ 8 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการกลายพันธุ์ของยีน *N-ras* พบ 4 เปอร์เซ็นต์ (5)

## 2.4.2 ตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์

ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่พบได้บ่อย (Hot spots) ในมะเร็งลำไส้ใหญ่คือ ตำแหน่งโคดอน 12 (GGT) และโคดอน 13 (GGC) พบมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยมีงานวิจัยหลายฉบับที่สนับสนุนข้อมูลดังกล่าวคือ งานวิจัยของ Poehlmann และคณะ ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่จำนวน 65 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Pyrosequencing พบว่าอัตราการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เกิดที่ตำแหน่งโคดอน 12 และโคดอน 13 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เกิดที่โคดอน 61 (11, 12) งานวิจัยของ Brink และคณะ ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ จำนวน 737 ตัวอย่าง ด้วยวิธี direct sequencing พบว่าอัตราการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 สูงถึง 93 เปอร์เซ็นต์ และพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่นๆ 7 เปอร์เซ็นต์ (13) งานวิจัยของ Prior และคณะ พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 13 ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ และการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 61 เพียงประมาณ 2-3 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (14) งานวิจัยของ Weidlich และคณะ พบอัตราการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* สูงถึง 89 เปอร์เซ็นต์ เกิดที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 และเกิดที่โคดอนอื่นๆคือโคดอน 14, 22 และ 146 พบเพียง 11 เปอร์เซ็นต์ (79) งานวิจัยของ Normanno และคณะพบอัตราการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* สูงถึง 98.2 เปอร์เซ็นต์ เกิดที่ตำแหน่งโคดอน 12 และโคดอน 13 และ 1.8 เปอร์เซ็นต์ เกิดที่โคดอนอื่นๆ คือโคดอน 19, 22, 59, 61 และ 146 (15)

โดยตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่โคดอน 12 และ 13 มักเกิดการกลายพันธุ์อยู่ 6-7 รูปแบบด้วยกันคือ ตำแหน่งโคดอน 12 นิวคลีโอไทด์ที่ 34 และ 35 นิวคลีโอไทด์ชนิด guanine (G) จะถูกแทนที่ด้วย นิวคลีโอไทด์ชนิด adenine (A), thymine (T) หรือ cytosine (C) และตำแหน่งโคดอน 13 นิวคลีโอไทด์ที่ 38 นิวคลีโอไทด์ชนิด guanine (G) จะถูกแทนที่ด้วยนิวคลีโอไทด์ชนิด adenine (A) โดยมีงานวิจัยหลายฉบับที่สนับสนุนข้อมูลดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่พบได้บ่อย (Hot spots)

งานวิจัย	รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่พบ			ตำแหน่งอื่นๆ
	โคดอน 12		โคดอน 13	
	นิวคลีโอไทด์ 34	นิวคลีโอไทด์ 35	นิวคลีโอไทด์ 38	
(80)	GGT→AGT (6.5 เปอร์เซ็นต์) GGT→CGT (1.25 เปอร์เซ็นต์) GGT→TGT (8 เปอร์เซ็นต์)	GGT→GAT (36 เปอร์เซ็นต์) GGT→GCT (6 เปอร์เซ็นต์) GGT→GTT (21.75 เปอร์เซ็นต์)	GGC→GAC (18.75 เปอร์เซ็นต์)	นิวคลีโอไทด์ 37 GGC→TGC (0.75 เปอร์เซ็นต์) GGC→CGC (0.25 เปอร์เซ็นต์)
(81)	GGT→AGT (9 เปอร์เซ็นต์) GGT→CGT (0 เปอร์เซ็นต์) GGT→TGT (12 เปอร์เซ็นต์)	GGT→GAT (33 เปอร์เซ็นต์) GGT→GCT (7 เปอร์เซ็นต์) GGT→GTT (18 เปอร์เซ็นต์)	GGC→GAC (21 เปอร์เซ็นต์)	
(79)	GGT→AGT (8.57 เปอร์เซ็นต์) GGT→CGT (0 เปอร์เซ็นต์) GGT→TGT (11.43 เปอร์เซ็นต์)	GGT→GAT (22.86 เปอร์เซ็นต์) GGT→GCT (2.86 เปอร์เซ็นต์) GGT→GTT (25.71 เปอร์เซ็นต์)	GGC→GAC (17.14 เปอร์เซ็นต์)	โคดอน 146 (5.71 เปอร์เซ็นต์) โคดอน 14 (2.86 เปอร์เซ็นต์) โคดอน 22 (2.86 เปอร์เซ็นต์)
(11)	-	GGT→GAT (21 เปอร์เซ็นต์) GGT→GCT (6 เปอร์เซ็นต์) GGT→GTT (26 เปอร์เซ็นต์)	GGC→GAC (42 เปอร์เซ็นต์)	โคดอน 61 (5.26 เปอร์เซ็นต์)
(13)	GGT→AGT (6 เปอร์เซ็นต์) GGT→CGT (2 เปอร์เซ็นต์) GGT→TGT (7 เปอร์เซ็นต์)	GGT→GAT (27 เปอร์เซ็นต์) GGT→GCT (6 เปอร์เซ็นต์) GGT→GTT (24 เปอร์เซ็นต์)	GGC→GAC (21 เปอร์เซ็นต์) GGC→GCC (1 เปอร์เซ็นต์) GGC→GTC (0.4 เปอร์เซ็นต์)	
(15)	GGT→AGT (7.6 เปอร์เซ็นต์) GGT→CGT (0.9 เปอร์เซ็นต์) GGT→TGT (8.8 เปอร์เซ็นต์)	GGT→GAT (32.5 เปอร์เซ็นต์) GGT→GCT (6.4 เปอร์เซ็นต์) GGT→GTT (22.5 เปอร์เซ็นต์)	GGC→GAC (19.5 เปอร์เซ็นต์)	โคดอน 19,22,59,61,146 (1.8 เปอร์เซ็นต์)

### 2.4.3 เทคนิคการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน K-ras

เทคนิคที่ใช้ตรวจการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ในปัจจุบันมีหลากหลายวิธี เช่น วิธี Direct Sequencing (12, 18-21) วิธี high resolution melting (HRM) (18), วิธี mutant-enriched PCR assay (19), วิธี Pyrosequencing (11, 16, 22), วิธี co-amplification at lower denaturation temperature PCR (23), และวิธี digital PCR (19, 24) นอกจากนี้ยังมีชุดทดสอบสำเร็จรูป (commercial kit) ของบริษัทต่างๆ เช่น ชุดทดสอบ cobas® KRAS Mutation Test, theascreen® DxS KRAS Kit, EntroGen's K-ras Mutation Analysis Kit for Real-Time PCR, และชุดทดสอบ KRAS StripAssay Kit (20, 25) ทุกวิธีต้องอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ซึ่งมีความจำเพาะ ความไว ต้นทุน ข้อจำกัด ข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน โดยมีรายละเอียดของแต่ละวิธีดังนี้

#### 2.4.3.1 วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Direct sequencing)

วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี direct sequencing ตามวิธีของ sanger มีข้อดี คือเป็นวิธีที่มีความแม่นยำและความน่าเชื่อถือสูง สามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้ ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน K-ras เช่น งานวิจัยของ Jedpiyawongse และคณะ ใช้วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจการกลายพันธุ์ของยีน K-ras จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 24 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่า ไม่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12, 13 และ 61 (12) และมีอีกหลายงานวิจัยที่ใช้วิธี direct sequencing นี้เป็น gold standard (18-20) แต่วิธี direct sequencing นี้มีความไวต่ำ ต้องการ เปอร์เซ็นต์ mutant allele สูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ถึงจะสามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้ และวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct sequencing เป็นวิธีที่ซับซ้อน มีขั้นตอนหลายขั้นตอน ต้องใช้เวลานาน นอกจากนี้ยังต้องมีเครื่อง Sequencer analyzer ที่มีราคาแพง

#### 2.4.3.2 วิธี High Resolution Melting Analysis (HRM)

วิธี HRM อาศัยหลักการความแตกต่างกันเพียง 1 นิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้ melting temperature (T<sub>m</sub>) แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ด้วย Real-time PCR ด้วยโหมด HRM ทำให้เป็น curve ที่แตกต่างกัน สามารถตรวจสอบ PCR product ได้ในปริมาณน้อย และสามารถแยกชนิดของ PCR product ที่มีความแตกต่างกันแม้เพียง 1-2 นิวคลีโอไทด์ได้ รวมไปถึงสามารถใช้วิเคราะห์ single nucleotide polymorphism (SNP) ได้ด้วย ข้อดีของวิธี HRM คือเป็นระบบปิด ใช้เวลารวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย มีความแม่นยำและความไวสูง สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ขีดจำกัดต่ำสุดที่ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant allele แต่วิธีนี้ไม่สามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้ ตัวอย่างงานวิจัยของ Tsiatis และคณะ ใช้วิธี HRM เปรียบเทียบกับวิธี direct sequencing และวิธี

Pyrosequencing ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟิน จำนวน 180 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่า การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* 62.2 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการกลายพันธุ์ 37.8 เปอร์เซ็นต์ วิธี HRM และวิธี Pyrosequencing ไม่พบผลบวกปลอม และไม่พบผลลบปลอม วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct sequencing พบผลบวกปลอม 11.1 เปอร์เซ็นต์ และพบผลลบปลอม 6.1 เปอร์เซ็นต์ ชัดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ได้ ของวิธี direct sequencing, วิธี HRM และวิธี Pyrosequencing คือ 15-20 เปอร์เซ็นต์, 10 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant allele ตามลำดับ (18)

#### 2.4.3.3 วิธี Mutant-enriched PCR assay

วิธี mutant-enriched PCR assay อาศัยหลักการความแตกต่างกันระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบชนิดกลายพันธุ์และไม่กลายพันธุ์ โดย amplify ดีเอ็นเอต้นแบบที่สนใจ ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ หากดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์จะไม่ถูก amplify จึงไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สำหรับดีเอ็นเอต้นแบบชนิดกลายพันธุ์จะถูก amplify เป้าหมายการกลายพันธุ์นั้นขึ้นมา และเป้าหมายดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถตัดได้ แล้วเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจนั้นให้มีปริมาณมากขึ้นด้วยการทำพีซีอาร์ และวิเคราะห์ผลด้วย direct sequencing หรือการทำ single base primer extension (SBE) ข้อดีของวิธีนี้ เป็นวิธีที่มีความแม่นยำและมีความจำเพาะสูง แต่มีความยุ่งยาก ซับซ้อน ตัวอย่างงานวิจัยของ Chang และคณะ ใช้วิธี mutant-enriched PCR assay และตรวจวัด PCR-product ด้วยวิธี single base primer extension และใช้วิธี direct sequencing เป็น gold standard ทำการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟินจำนวน 83 ตัวอย่าง และจากตัวอย่างชิ้นเนื้อสดจำนวน 106 ตัวอย่าง ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ผลการทดลองพบว่า มีทั้งหมด 13 ตัวอย่างที่ให้ผลไม่ตรงกับวิธี direct sequencing ทดสอบความไวของวิธีนี้ พบว่าที่โคดอน 12 และ 13 สามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้ต่ำสุดที่ 1:1000 และ 1:400 (อัตราดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์) ตามลำดับ (19)

#### 2.4.3.4 วิธี co-amplification at lower denaturation temperature PCR

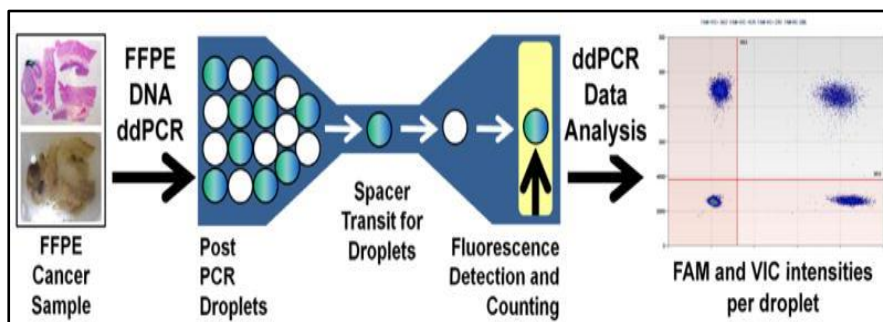
วิธี co-amplification at lower denaturation temperature PCR หรือ COLD-PCR เป็นวิธีที่ประยุกต์หลักการพีซีอาร์ โดยอาศัยหลักการที่ว่า ความแตกต่างกันของดีเอ็นเอต้นแบบเพียง 1 นิวคลีโอไทด์ ทำให้อุณหภูมิ  $T_m$  แตกต่างกัน 0.2-1.5 องศาเซลเซียส สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 200 bp หรือมากกว่า อุณหภูมิของ  $T_m$  นี้มีความสัมพันธ์กับ denaturation temperature ( $T_c$ ) ที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถใช้ตรวจสอบ variant alleles mutant ที่ผสมอยู่ใน

ดีเอ็นเอที่ไม่กลายพันธุ์ (wild type) โดยสามารถ ระบุชนิดของ mutant allele ที่พบน้อยใน somatic ดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ได้ วิธี COLD-PCR มีข้อดี คือเป็นวิธีที่มีความแม่นยำและมีความจำเพาะสูง แต่มีความยุ่งยาก และซับซ้อน ตัวอย่างงานวิจัยของ Liu และคณะ ใช้วิธี COLD-PCR ร่วมกับ TaqMan®-MGB ตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 ชนิดการกลายพันธุ์ G12D จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟินและตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยรายเดียวกัน ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 62 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่าวิธี COLD-PCR ร่วมกับ TaqMan®-MGB ตรวจพบการกลายพันธุ์รูปแบบ G12D 21 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างพลาสมา และพบ 19.4 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟิน (23)

#### 2.4.3.5 วิธี digital PCR

วิธี Digital polymerase chain reaction หรือ digital PCR เป็นวิธีที่ประยุกต์และพัฒนาจากวิธี Conventional PCR โดยวิธี digital PCR นี้สามารถหาปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายสุทธิได้โดยตรง จากการตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์หลังสิ้นสุดปฏิกิริยา สามารถวัด clonally amplify nucleic acids ได้ทั้ง ดีเอ็นเอ, cDNA หรือ RNA หลักการทำงานของวิธีดังกล่าว เป็นการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายในหยดอีมีลชัน ตัวอย่างจะถูกแบ่งออกเป็น partitions จำนวนมาก และในแต่ละ partitions นั้นจะเกิดปฏิกิริยาเฉพาะตัวของ partitions นั้นๆ ก่อนการนำไปตรวจวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ณ จุดสิ้นสุดปฏิกิริยา การแยกตัวอย่างในลักษณะนั้นทำให้ปฏิกิริยามีความน่าเชื่อถือมากขึ้นและเพิ่มความไวในการวัดดีเอ็นเอต้นแบบในตัวอย่างนั้นๆ สามารถประยุกต์ใช้ในงานทางชีวโมเลกุลต่างๆ ตั้งแต่การหา copy number variants และการตรวจหาดีเอ็นเอกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ (82) แสดงหลักการและขั้นตอนของวิธี digital PCR ดังภาพที่ 10 วิธี digital PCR มีข้อดี คือเป็นวิธีที่มีความแม่นยำ ความจำเพาะ และความไวสูง ตัวอย่างงานวิจัยของ Taly และคณะ ใช้วิธีการ digital PCR ตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ทั้ง 7 รูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยคือ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D จากตัวอย่างพลาสมา ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 50 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบการกลายพันธุ์ 26 ตัวอย่าง พบว่า วิธี digital PCR สามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์เหมือนกับผลชิ้นเนื้อจำนวน 21 ตัวอย่าง ไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์จำนวน 2 ตัวอย่าง ระบุชนิดการกลายพันธุ์ไม่ตรงกันผลชิ้นเนื้อ 1 ตัวอย่าง และ และ วิธี digital PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์แต่ผลชิ้นเนื้อตรวจไม่พบ 2 ตัวอย่าง (24)

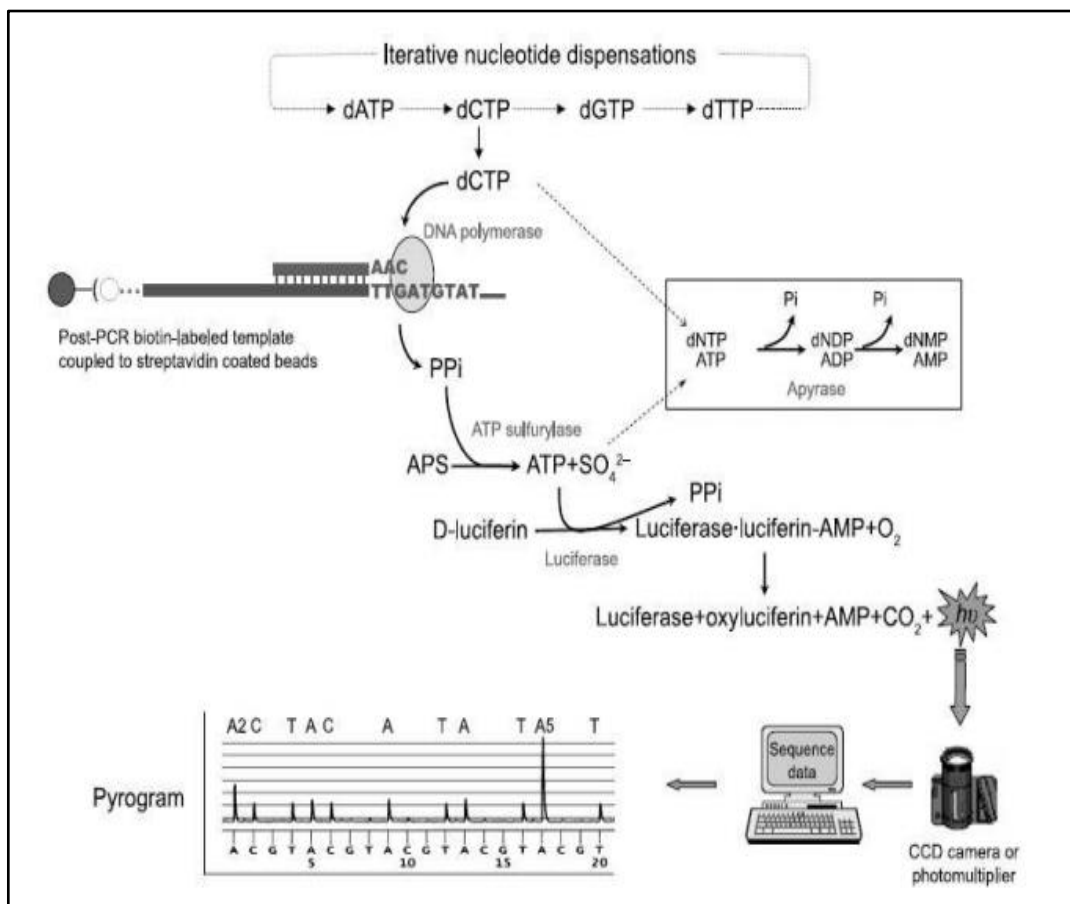




ภาพที่ 10 หลักการและขั้นตอนของวิธี digital PCR (83)

#### 2.4.3.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing

Pyrosequencing เป็นเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของรหัสพันธุกรรมของดีเอ็นเอสายสั้นๆเพียง 100 นิวคลีโอไทด์ ด้วยการสังเคราะห์ (sequencing by synthesis) ซึ่งเป็นการตรวจวัดไพโรฟอสเฟต (Inorganic Pyrophosphate : PPI) จากปฏิกิริยาเคมี (chemiluminescence) และใช้การอ่านสัญญาณตามจังหวะแสงของนิวคลีโอไทด์คู่สม (84, 85) โดยในปฏิกิริยา Pyrosequencing ประกอบด้วย Post-PCR biotin-labeled template เอนไซม์ DNA Polymerase, ATP sulfurylase, luciferase และ apyrase และมีสารตั้งต้น (substrate) คือ adenosine 5' phosphate (APS) และ luciferin ขั้นตอนปฏิกิริยา เริ่มจากการตรึง Post-PCR biotin-labeled template ด้วย streptavidin-coated sepharose beads (SSB) จากนั้น denature ด้วย denaturation solution และล้างด้วย 1X wash buffer จากนั้น primer เข้ามาจับกับ Post-PCR biotin-labeled template ที่ถูกตรึงด้วย SSB แล้ว Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) ตัวแรกถูกใส่เข้ามาในปฏิกิริยา เอนไซม์ DNA polymerase เริ่มปฏิกิริยาการเติมเบส (dNTP) เข้าที่ primer ถ้า dNTP ที่เติมเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ปฏิกิริยาจะปลดปล่อย PPI ออกมาซึ่งในสถานะที่มี APS เอนไซม์ ATP sulfurylase จะเปลี่ยน PPI เป็น ATP ซึ่ง ATP ที่เกิดขึ้นจะขับเคลื่อนให้ Luciferase เปลี่ยน Luciferin เป็น OxyLuciferin ในปฏิกิริยานี้จะทำให้เกิดแสงขึ้น โดยปริมาณแสงที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณ ATP ที่เกิดขึ้นและเอนไซม์ Apyrase ยังทำหน้าที่ย่อยสลาย dNTP และ ATP ที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยา การเติม dNTPs ตัวต่อไปจะดำเนินต่อไปเรื่อยๆจนเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ลำดับเบสของดีเอ็นเอจะแสดงอยู่ในรูปของ signal peaks หรือ pyrogram (84-86) ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 หลักการของปฏิกิริยา Pyrosequencing (84)

ปัจจุบันเทคนิค Pyrosequencing ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการประยุกต์ในงานวิจัยด้านต่างๆ เช่น งานวิจัยทางจุลชีววิทยา อณูพันธุศาสตร์ อณูพยาธิวิทยา และที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือการประยุกต์ใช้เทคนิค Pyrosequencing ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีนต่างๆ เช่น งานวิจัยของ Zheng และคณะ ได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธี Pyrosequencing เพื่อตรวจหาการดื้อยาหลายชนิด (MDR-TB) คือ rifampin (RIF), isoniazid (INH), ethambutol (EMB), streptomycin (SM), ofloxacin (OFL) และ amikacin (AMK) ของ *M. tuberculosis* ในตัวอย่างเสมหะของคนไข้วัณโรคปอด จากตัวอย่างทางคลินิกจำนวน 205 ตัวอย่าง และตัวอย่างเสมหะจำนวน 24 ตัวอย่าง โดยตรวจหาการดื้อยาจากการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ยีน *gyrA* ยีน *KatG*, ยีน *rpsL*, ยีน *embB*, ยีน *gyrA* และยีน *rrs* จากการเปรียบเทียบผลของวิธี Pyrosequencing กับผลของวิธี Bactec MGIT 960 mycobacterial detection system พบว่าวิธี Pyrosequencing มีความถูกต้องสูงในการตรวจการดื้อยา RIF, INH, EMB, SM, AMK และ OFL ในตัวอย่างทางคลินิก 95.0, 79.2, 70.3, 84.5, 96.5 และ 91.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในตัวอย่างเสมหะ พบความ

ถูกต้อง 83.3, 83.3, 60.9, 83.3, 87.5 และ 91.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นวิธี Pyrosequencing เป็นวิธีที่รวดเร็ว และมีประโยชน์มากใช้ในการตรวจติดตามหลังการรักษาผู้ป่วยวัณโรคได้ (87) งานวิจัยของ Guerra และคณะ ได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของ ยีน *K-ras* และ *N-ras* ของตัวอย่างเซลล์ของไทรอยด์ (fine-needle aspiration cytology: FNAC) จากตัวอย่างทั้งหมด 37 ตัวอย่าง ที่แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่เป็น benign hyperplastic nodules (BN) (n=16) และ กลุ่มที่เป็น มะเร็ง follicular thyroid carcinomas (FTC) (n=21) ด้วยวิธี Pyrosequencing พบว่าวิธี Pyrosequencing เป็นวิธีที่น่าเชื่อถือ สามารถตรวจการกลายพันธุ์ของ กลุ่มยีน *ras* ในตัวอย่าง FNAC ได้ โดยการกลายพันธุ์ของยีน *ras* ในตัวอย่าง BN และ FTC พบ 31 และ 62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (88) งานวิจัยของ Arita และคณะ ได้พัฒนาวิธี Pyrosequencing เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน IDH 1/2 ของโรคนีื้องอกในสมอง (gliomas) จาก 160 ตัวอย่าง พบว่ามีความไวสูง สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ต่ำสุดที่ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ซึ่งมีความไวกว่าวิธีของ direct sequencing ที่ต้องมีการกลายพันธุ์ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ถึงจะวิเคราะห์ได้ และวิธี Pyrosequencing ยังสามารถวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้ใน 3 ตัวอย่างที่วิธี direct sequencing วิเคราะห์ไม่ได้อีกด้วย (89) งานวิจัยของ Sahnane และคณะ ได้ใช้เทคนิค Pyrosequencing ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน EGFR จากตัวอย่าง 53 ตัวอย่าง เทียบกับวิธี direct sequencing พบว่ามีความไวสูงกว่าวิธี direct sequencing และวิธี Pyrosequencing ยังสามารถใช้วัดปริมาณของ mutant alleles โดยเทียบกับจำนวนที่เพิ่มขึ้นของ EGFR copy number ด้วยวิธีของ fluorescence in situ hybridization (FISH) ได้อีกด้วย (90) มีการใช้วิธี Pyrosequencing ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ของชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินโดยตรวจหา การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ทั้งนี้เทียบผลกับวิธี direct sequencing พบว่าวิธี Pyrosequencing มีความไวสูง โดยสามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ต่ำสุดที่ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles (16, 22)



โคดอน 12, 13, 61, 117 และ 146 ชุดทดสอบนี้ สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้ต่ำสุดที่ 1 เปอร์เซ็นต์ mutant allele (20, 25)

ตัวอย่างงานวิจัยของ Jancik และคณะ ได้ศึกษาเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* โดยใช้ชุดทดสอบ theascreen® DxS KRAS Kit และชุดทดสอบ KRAS StripAssay Kit เทียบกับวิธี direct sequencing, Pyrosequencing และ high resolution melting (HRM) analysis พบว่าชุดทดสอบ theascreen® DxS KRAS Kit และชุดทดสอบ *K-ras* StripAssay Kit มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* แต่พบว่ามีความแม่นยำกับเทคนิคอื่น 6.1 เปอร์เซ็นต์ (20) งานวิจัยของ Gonzalez de Castro และคณะ ได้ศึกษาเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* โดยใช้ชุดทดสอบ cobas® KRAS Mutation Test ชุดทดสอบ theascreen® DxS KRAS Kit และวิธี direct sequencing ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝัังพาราฟิน จำนวน 120 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่า ชุดทดสอบ cobas® KRAS Mutation Test ชุดทดสอบ theascreen® DxS KRAS Kit สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้ต่ำสุดที่ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant allele ส่วนวิธี direct sequencing สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้ต่ำสุดที่ 19 เปอร์เซ็นต์ mutant allele (91) งานวิจัยของ Fariña Sarasqueta และคณะ ศึกษาการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี SNaPshot และวิธีชุดทดสอบ StripAssay โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน direct sequencing จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝัังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ จำนวน 296 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของวิธี direct sequencing, วิธี SNaPshot และวิธีชุดทดสอบ StripAssay คือที่ 20 เปอร์เซ็นต์, 10 เปอร์เซ็นต์ และ 1 เปอร์เซ็นต์ mutant allele ตามลำดับ (92)

วิธีที่ใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* แต่ละวิธี มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ข้อดีและข้อเสีย ของวิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras

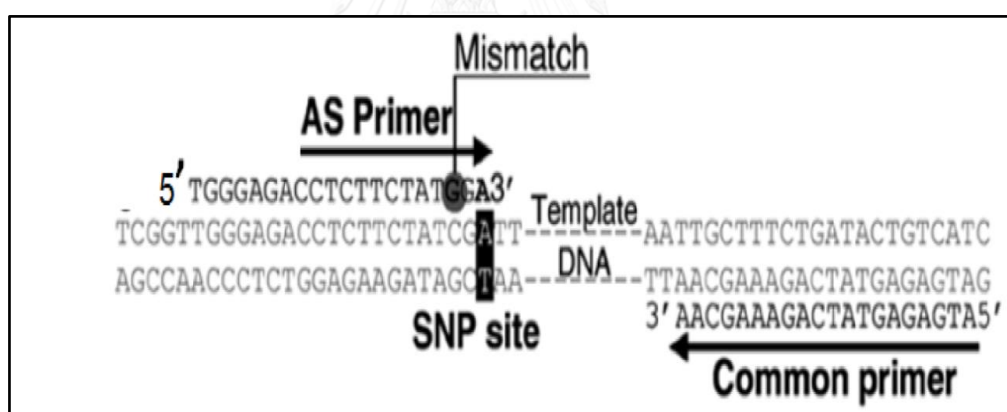
วิธี	ข้อดี	ข้อเสีย
Direct sequencing	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เป็นวิธีมาตรฐาน</li> <li>- ทราบชนิดการกลายพันธุ์</li> </ul>	ราคาแพง, ขั้นตอนซับซ้อน, ใช้ระยะเวลานาน, ความไวต่ำ (สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ 20-25 เปอร์เซ็นต์ mutant allele) และต้องมีเครื่อง Sequencer Analyzer
Pyrosequencing	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ความไวสูง (สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant allele)</li> <li>-ทราบชนิดการกลายพันธุ์</li> <li>-รวดเร็ว, ไม่ต้อง Purify PCR Product</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ราคาแพง</li> <li>- ต้องมีเครื่อง Pyrosequencer</li> </ul>
high resolution melting analysis (HRM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ความไวสูง (สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant allele)</li> <li>- รวดเร็ว, เป็นระบบปิด</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ไม่ทราบชนิดการกลายพันธุ์</li> <li>- ต้องมีเครื่อง Real-time PCR ที่ต้องมี HRM Mode</li> </ul>
Mutant-enriched PCR assay	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ความไวสูง (สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ mutant allele)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ขั้นตอนยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้เวลานาน</li> </ul>
COLD-PCR	ราคาไม่แพง	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ขั้นตอนยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้เวลานาน</li> </ul>
Digital-PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ความไวสูง (สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ที่น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ mutant allele)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ราคาแพง</li> <li>- ต้องมีเครื่อง Digital-PCR</li> </ul>
ชุดตรวจสำเร็จรูป (commercial kit)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- อ่านผลได้รวดเร็ว</li> <li>- ความไวสูง (สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ 1-5 เปอร์เซ็นต์ mutant allele)</li> </ul>	ราคาแพง, ต้องมีเครื่องมือที่รองรับชุดทดสอบนั้นๆ
MAS-PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ใช้เพียง Thermal cyclers</li> <li>- ราคาไม่แพง</li> <li>- สามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้</li> </ul>	ใช้เวลานาน

## 2.5 Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain (MAS-PCR)

### 2.5.1 หลักการของ MAS-PCR

MAS-PCR เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาและดัดแปลงจากเทคนิค Multiplex Polymerase Chain Reaction (M-PCR) ร่วมกับเทคนิค Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (AS-PCR) โดยการออกแบบ AS-primer หลายๆตำแหน่งเป้าหมายให้มีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกัน และสามารถตรวจวัดด้วยการ run gel electrophoresis ทั้งแบบ agarose gel และ polyacrylamide gel ขึ้นกับขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ ทั้งนี้สามารถพัฒนาให้ตรวจหายีนหรือดีเอ็นเอเป้าหมายได้พร้อมกันหลายยีน หลายตำแหน่ง ในปฏิกิริยาเดียว (26, 93)

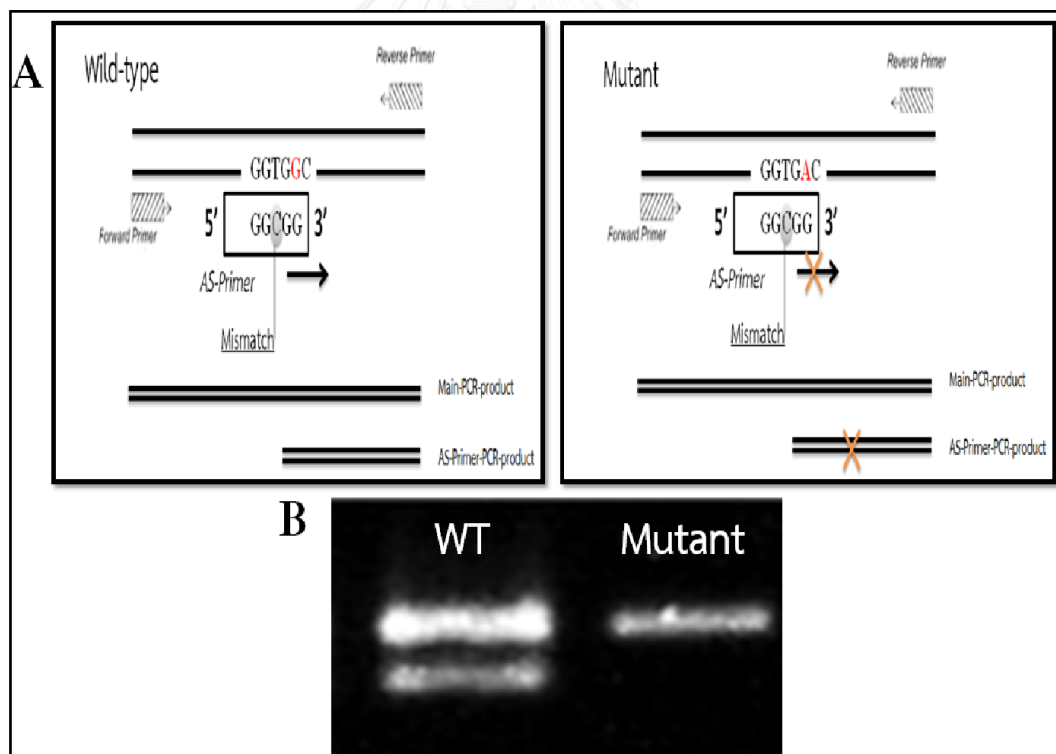
เทคนิค MAS-PCR อาศัยหลักการของ Polymerase Chain Reaction ในขั้นตอนของ extension คือเอนไซม์ DNA Polymerase จะไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้ หากด้านปลาย 3' ของ AS-primer ไม่เป็นนิวคลีโอไทด์คู่สม (complementary) กับดีเอ็นเอต้นแบบ และเพิ่มความจำเพาะของ AS-primer ด้วยการออกแบบ mismatch base ภายในบริเวณ 5 นิวคลีโอไทด์แรกก่อนถึงด้านปลาย 3' ของ AS-primer ดังภาพที่ 12 (26)



ภาพที่ 12 การออกแบบ Allele-specific primer (AS-primer) (26)

เทคนิค MAS-PCR เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและความไวสูง ราคาไม่แพง เป็นเทคนิคที่สามารถประยุกต์ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนได้ โดยการเลือกออกแบบ AS-primer ให้มีนิวคลีโอไทด์คู่สมกับดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์หรือชนิดไม่กลายพันธุ์หากออกแบบ AS-primer ให้มีนิวคลีโอไทด์คู่สมกับ ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นชนิดไม่กลายพันธุ์ (Wild-type) ถ้าในปฏิกิริยา MAS-PCR มีดีเอ็นเอต้นแบบเป็นชนิด Wild-type ในขั้นตอนของ extension เอนไซม์ DNA Polymerase จะสามารถทำปฏิกิริยาได้ แต่หากในปฏิกิริยา MAS-PCR มีดีเอ็นเอต้นแบบเป็นชนิด Mutant ในขั้นตอนของ extension เอนไซม์ DNA Polymerase จะไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้ ดังภาพที่ 13 A และเมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้มาตรวจวัดด้วยการ Run gel electrophoresis ถ้าดีเอ็นเอต้นแบบเป็นชนิด

Wild-type จะพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด ที่เกิดจากการ amplify จาก oligonucleotide primer คู่หลัก และเกิดจากการ amplify จาก AS-primer แต่หากในปฏิกิริยา MAS-PCR ที่มีดีเอ็นเอต้นแบบเป็นชนิด Mutant จะพบผลผลิตพีซีอาร์ เพียง 1 ขนาด ที่เกิดจากการ amplify จาก oligonucleotide primer คู่หลักเท่านั้น ดังภาพที่ 13 B (94) ในทางตรงกันข้าม หากออกแบบ AS-primer ให้มีนิวคลีโอไทด์คู่สมกับ ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นชนิดกลายพันธุ์ (Mutant) ถ้าในปฏิกิริยา MAS-PCR มีดีเอ็นเอต้นแบบเป็นชนิด Mutant ในขั้นตอนของ extension เอนไซม์ DNA Polymerase จะสามารถทำปฏิกิริยาได้ แต่หากในปฏิกิริยา MAS-PCR มีดีเอ็นเอต้นแบบเป็นชนิด Wild-type ในขั้นตอนของ extension เอนไซม์ DNA Polymerase จะไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้ เมื่อตรวจวัดด้วยการ Run gel electrophoresis ถ้าดีเอ็นเอต้นแบบเป็นชนิด Mutant จะพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด หรือมากกว่า ขึ้นอยู่กับจำนวน point mutation ของดีเอ็นเอต้นแบบนั้นๆ ที่เกิดจากการ amplify จาก oligonucleotide primer คู่หลัก และเกิดจากการ amplify จาก AS-primer แต่หากในปฏิกิริยา MAS-PCR ที่มีดีเอ็นเอต้นแบบเป็นชนิด Wild-type จะพบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 ขนาด ที่เกิดจากการ amplify จาก oligonucleotide primer คู่หลักเท่านั้น



ภาพที่ 13 หลักการ Multiplex Allele-specific PCR (MAS-PCR) (26)



## 2.5.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR จะมีการออกแบบ Allele-specific primer (AS-primer) อยู่ 2 รูปแบบคือ การออกแบบไพรเมอร์ MAS-PCR ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบชนิดไม่กลายพันธุ์ (Wild-type) และการออกแบบไพรเมอร์ MAS-PCR ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบชนิดกลายพันธุ์ (Mutant) โดยทั้ง 2 รูปแบบนี้ จำเป็นต้องทราบตำแหน่ง single nucleotide polymorphisms (SNPs) และทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณรอบๆ SNPs นั้นๆด้วย ทั้งนี้การออกแบบ AS-primer ทุกๆเส้นของปฏิกิริยา MAS-PCR ต้องตรวจสอบคุณสมบัติพื้นฐานของไพรเมอร์คือ ตรวจสอบลักษณะ hair-pin loops, primer-dimer เป็นต้น

ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการออกแบบไพรเมอร์คู่หลักและ AS-primer สำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR (26) มีดังนี้ ด้านปลาย 3' ของ AS-primer ต้องเป็นนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง SNPs ของดีเอ็นเอต้นแบบ, ความยาวของ AS-primer ต้องออกแบบให้ melting temperature ( $T_m$ ) อยู่ในช่วงระหว่าง 50-65 องศาเซลเซียส, แต่ละ AS-primer และไพรเมอร์คู่หลักทั้งฝั่ง Reverse และ Forward อุณหภูมิ  $T_m$  ควรไม่ต่างกันเกิน 5 องศาเซลเซียส, การเพิ่ม-ลด ความยาวของไพรเมอร์ควรเพิ่ม-ลด นิวคลีโอไทด์เฉพาะด้านปลาย 5' เท่านั้น โดยการเพิ่ม-ลด ทีละ 1-2 นิวคลีโอไทด์ และความยาวของแต่ละไพรเมอร์ควรอยู่ระหว่าง 18-22 bp, ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ออกแบบ ควรอยู่ระหว่าง 100-200 bp และหากต้องการเพิ่มความจำเพาะของ AS-primer ด้วยการออกแบบ mismatch base ต้องออกแบบ mismatch base ภายในบริเวณ 5 นิวคลีโอไทด์แรก ก่อนถึงด้านปลาย 3' ของ AS-primer เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรันเจลให้เห็นความแตกต่างมากขึ้น ควรเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5' ของ AS-primer ส่วนหาง (tails) ให้ผลผลิตของ MAS-PCR แต่ละรูปแบบต่างกัน 10 นิวคลีโอไทด์ (26)

## 2.5.3 การประยุกต์ใช้เทคนิค MAS-PCR ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน

ปัจจุบันได้นำเทคนิค MAS-PCR มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยต่างๆ อย่างหลากหลาย เช่น งานวิจัยของ Shi และคณะ ได้พัฒนาวิธีตรวจหาการดื้อยา rifampin ของเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 511, 516, 526 และ 531 โดยนักวิจัยได้ประยุกต์ใช้เทคนิค MAS-PCR และเพิ่มความจำเพาะของ AS-primer เป็น chimeric-primer ด้วยการต่อ TAG-sequence เข้าด้านปลาย 5' ของ primer โดยศึกษาจากตัวอย่างทางคลินิก 135 ตัวอย่าง พบว่าวิธี MAS-PCR เมื่อเทียบกับวิธี direct sequencing มีความไวสูงถึง 94.2 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (27) งานวิจัยของ Allegui และคณะ ได้พัฒนาวิธีตรวจหาการดื้อยา isoniazid และ rifampin ของเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของ

ยีน *rpoB* สำหรับการดื้อยา rifampin ที่ตำแหน่งโคดอน 516, 526 และ 531 และการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และ ยีน *inhA* สำหรับการดื้อยา isoniazid ที่ยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่ง mabA-inhA: -15 โดยศึกษาจากตัวอย่างทางคลินิก 53 ตัวอย่าง ด้วยวิธี MAS-PCR โดยเปรียบเทียบกับวิธี Phenotypic drug susceptibility test นาโนกรัม (DST) พบว่าวิธีดังกล่าวเมื่อตรวจ INH mutations มีความไวสูงถึง 88.6 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ตรวจ RIF mutations มีความไวสูงถึง 92.8 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และตรวจ MDR mutation มีความไวสูงถึง 92.6 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (28) งานวิจัยของ Evans และ Segal ได้พัฒนาวิธีตรวจหาการดื้อยา ofloxacin และยา kanamycin ซึ่งเป็น second-line drug ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *GyrA D94G* และ *rrs A1401G* ด้วยวิธี MAS-PCR พบว่ามีความไวในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *GyrA D94G* 54.5 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีความไวในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rrs A1401G* สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (95) งานวิจัยของ Chia และคณะ ได้พัฒนาวิธีตรวจหาการดื้อยา MDR ของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนที่ 5 ตำแหน่ง hotspots คือ ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 516, 526 และ 531 สำหรับการดื้อยา rifampin และตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่ง mabA-inhA: -15 สำหรับการดื้อยา isoniazid พบว่าเมื่อเปรียบเทียบวิธี MAS-PCR กับวิธี Phenotypic DST สำหรับการตรวจหาการดื้อยา rifampin มีความไวสูงถึง 82.8 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และตรวจหาการดื้อยา isoniazid มีความไวสูงถึง 98.4 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบวิธี MAS-PCR กับวิธี direct sequencing เพื่อตรวจหาการดื้อยา rifampin และ isoniazid พบว่าทั้ง 2 กรณีมีความไวและความจำเพาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (96)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สารเคมีและน้ำยา

3.1.1 LB broth, Bacteriological Agar [บริษัท Oxoid ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.1.2 Absolute Ethanol [บริษัท Merck ประเทศเยอรมันนี]

3.1.3 Boric acid, Ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA] [บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.1.4 SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain [บริษัท Lonza ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.1.5 Bromophenol blue, 5 - bromo -4 - chloro -3- inodlyl - $\beta$ -D- galactopyranoside [X-Gal], Xylenecyanol, Tris base [บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.1.6 Amplitag Gold DNA Polymerase [บริษัท Applied Biosystems ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.1.7 40 เปอร์เซ็นต์ acrylamide/bis solution (19:1), Ammonium persulphate (APS), N, N, N', N'-tetramethylethane-diamine (Temed), ดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp ladder , ดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต [dNTPs] [บริษัท New England Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.1.8 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder [บริษัท Thermo scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.1.9 StrataClone PCR Cloning โนแกรม Kit [บริษัท Agilent Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.1.10 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Wizard® genomic DNA purification kit [บริษัท Geneaid, Taipei ประเทศไต้หวัน]

3.1.11 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit [บริษัท Qiagen ประเทศเยอรมันนี]

3.1.12 ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับย้อมชิ้นเนื้อ Hematoxylin and Eosin (H&E) [บริษัท Dako ประเทศเดนมาร์ก]

3.1.13 streptavidin-conjugated Sepharose beads [บริษัท Amersham Biosciences AB ประเทศสวีเดน]

3.1.14 ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับทำ Pyrosequencing ประกอบด้วย PyroMark® Gold Q96 reagent [บริษัท Qiagen ประเทศเยอรมันนี]

## 3.2 เครื่องมือ

3.2.1 เครื่องปั่นตกตะกอนขนาดเล็ก (Mini microcentrifuge) [บริษัท Extragene ประเทศไต้หวัน]

3.2.2 กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Heat block) [บริษัท Labnet ประเทศญี่ปุ่น]

3.2.3 เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) [บริษัท Scientific industry ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.2.4 เครื่องปั่นความเร็วสูง (High Speed Centrifuge) [บริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.2.5 เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้าและชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis), เครื่อง Thermo cycler รุ่น C1000 หัวบล็อกคู่ [บริษัท Bio-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.2.6 เครื่องถ่ายภาพแผ่นเจล (Gel Documentation) และเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator) [บริษัท Syngene ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.2.7 เครื่องนาโนดรอป (Nanodrop) [บริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.2.8 ตู้บ่มเชื้อร่วมกับเครื่องเขย่าต่อเนื่อง (Shaker incubator) [บริษัท Infor HT ประเทศสวิตเซอร์แลนด์]

3.2.9 เครื่องเขย่าแบบ plate (Plate shaker) [บริษัท Desaga ประเทศเยอรมันนี]

3.2.10 กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Heat block) แบบ 96 well plate (96 well plate heat box) [บริษัท Major science ประเทศไต้หวัน]

3.2.11 เครื่องนึ่งความดันสูง (Autoclave) [บริษัท Hirayama ประเทศญี่ปุ่น]

3.2.12 เครื่องหาลำดับเบส Pyrosequencing [บริษัท Qiagen ประเทศเยอรมันนี]

3.2.13 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) [บริษัท Sheldon ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3.2.14 Microplate centrifuge [บริษัท Kisker ประเทศเยอรมันนี]

### 3.3 วิธีการทดลอง

#### 3.3.1 ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน (Formalin-fixed, paraffin-embedded : FFPE tissue)

เก็บรวบรวมตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ที่ส่งตรวจกับสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ในปี 2556-2557 จำนวน 270 ตัวอย่าง ตรวจลักษณะทางพยาธิวิทยาโดยดูลักษณะและความผิดปกติของเซลล์ชิ้นเนื้อ (histopathology) จากสไลด์ Hematoxylin and Eosin stain (H&E) และวงพื้นที่บริเวณรอยโรคมะเร็ง (Adenocarcinoma) โดยพยาธิแพทย์ ตัวอย่างทั้งหมดในงานวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ เอกสารรับรองเลขที่ IOP-KM-R57-007 การคำนวณขนาดตัวอย่างด้วยวิธีทางสถิติ ดังแสดง

#### จากสูตร

$$n = \frac{Z^2_{\alpha/2} p (1-p)}{e^2} \quad \text{แทนค่า} \quad 266.671 = \frac{1.96^2 (0.51) (0.49)}{(0.06)^2}$$

$$e = Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{p (1-p)}{n}} \quad \text{แทนค่า} \quad 0.06 = \sqrt{\frac{(0.51) (0.49)}{239}}$$

โดยกำหนด ระดับความเชื่อมั่นของข้อมูลที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (95 เปอร์เซ็นต์ Confidence interval)

$p = 0.51$  คือค่าอุบัติการณ์การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ส่งตรวจในสถาบันพยาธิวิทยา เท่ากับ 51 เปอร์เซ็นต์

$e = 0.06$  คือค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ ซึ่งได้จากการคำนวณอุบัติการณ์ที่เกิดจากจำนวน 239 ตัวอย่าง

ดังนั้น ขนาดของตัวอย่างที่เหมาะสมที่ต้องใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ต้องไม่น้อยกว่า 266.671 เพื่อความเหมาะสมจึงใช้ 270 ตัวอย่าง

### 3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

ตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินถูกนำมาตัดเป็น ribbon section หนา 10 ไมโครเมตร บนสไลด์แก้ว จำนวน 4-8 สไลด์ๆละ 1-2 แผ่น ชุดชิ้นเนื้อบริเวณพื้นที่รอยโรคมะเร็ง (Adenocarcinoma) ด้วยเข็มที่ปลอดเชื้อใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ละลายพาราฟินด้วย xylene ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดเป็นเวลา 30 วินาที นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่มีส่วนใสด้านบน และล้างด้วย absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดเป็นเวลา 30 วินาที นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ปล่อยให้ absolute ethanol ระเหยจนแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อโดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA FFPE tissue Kit (Qiagen, Germany) มีขั้นตอนดังนี้ คือเติมสารละลาย ATL 180 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Proteinase K 20 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลาข้ามคืนหรือจนกว่าสารละลายจะใส (ไม่มีตะกอนชิ้นเนื้อ) จากนั้นบ่มหลอดตัวอย่างที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่น เพื่อให้ไออน้ำที่ติดผาหลอดตก เติมสารละลาย AL 200 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 200 ไมโครลิตร นำไป vortex และดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน Filter column และปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำ column ใส่ในหลอดใหม่และเติมสารละลาย AW1 500 ไมโครลิตร และปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำ column ใส่ในหลอดใหม่และเติมสารละลาย AW2 500 ไมโครลิตร และปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำ column ใส่ในหลอดใหม่และปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที นำ Filter column ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ และเติมสารละลาย ATE 20-50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.3.3 การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องนาโนดรอป

วัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอพร้อมทั้งการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องนาโนดรอป ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $A_{260}$ ) และ 280 นาโนเมตร ( $A_{280}$ ) โดยพิจารณาจากอัตราส่วน  $A_{260}/A_{280}$  ควรอยู่ในช่วงระหว่าง 1.80-2.00 แสดงว่าดีเอ็นเอนั้นบริสุทธิ์ แต่ถ้าอัตราส่วนมีค่าน้อยกว่า 1.80 แสดงว่าดีเอ็นเอ มีโปรตีนปนเปื้อนสูง และถ้ามีค่าอัตราส่วนมากกว่า 2.00 แสดงว่าดีเอ็นเอ มีการปนเปื้อนอาร์เอ็นเอ และทำการเจือจางดีเอ็นเอให้มีปริมาณความเข้มข้นที่ 50-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

### 3.3.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี Pyrosequencing

#### 3.3.4.1 ปฏิกริยา Polymerase chain reaction (PCR) ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 สำหรับทำ Pyrosequencing

นำตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ที่ได้จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่ส่งตรวจที่สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 270 ตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอตามข้อที่ 3.3.2 มาทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือเตรียมส่วนผสมประกอบพีซีอาร์ ปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Buffer 3 ไมโครลิตร, MgCl<sub>2</sub> (25 มิลลิโมลาร์) 3 ไมโครลิตร, dNTP (10 มิลลิโมลาร์) 0.6 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 20.65 ไมโครลิตร, เอนไซม์ AmpliTaq DNA Polymerase (ABI) 5 U/ไมโครลิตร 0.15 ไมโครลิตร, ไพโรเมอร์ KrasPyro-F (10 ไมโครโมลาร์) และ KrasPyro-R (biotin) (10 ไมโครโมลาร์) สั่งสังเคราะห์ไพโรเมอร์ที่บริษัท Biosearch ประเทศสหรัฐอเมริกา รายละเอียดดังตารางที่ 5 อย่างละ 3 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบ 50-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอประกอบด้วย 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที, และตามด้วย 35 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาทีและสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที โดยเครื่องพีซีอาร์ Thermocycle Bio-Rad รุ่น C1000 แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR products) ไปวิเคราะห์ผลด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพโรเมอร์ ในการเพิ่มจำนวนยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 สำหรับทำ Pyrosequencing (16)

Primer name	Primer Sequences 5'-3'	Product Size (bp)	GenBank Accession number
KrasPyro-F	5'-GGCCTGCTGAAAATGACTGAA-3'	82 bp	NM_004985.4
KrasPyro-R (biotin)	5'-biotin-TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT-3'		

### 3.3.4.2 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ด้วย gel electrophoresis

เตรียม 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ปริมาตรรวม 10 ml ประกอบด้วย น้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร, 40 เปอร์เซ็นต์ acrylamide/bis solution (19:1) 2 มิลลิลิตร, 5X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer 2 มิลลิลิตร, 10 เปอร์เซ็นต์ APS 100 ไมโครลิตร และ Temed 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เวลานาน 15-20 นาที ผสมผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ 6X Loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปลอຍกระแสไฟฟ้าที่ 140 โวลต์ นาน 40 นาที และย้อมแผ่นเจลด้วย 1:400 SYBR® Green I nucleic acid gel stain นาน 30 นาที ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตบนเครื่องถ่ายภาพแผ่นเจล (Gel documentation) ผลผลิตพีซีอาร์ มีขนาด 82 bp โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder

### 3.3.4.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี Pyrosequencing

ขั้นตอนการทำ Pyrosequencing ประกอบด้วย การตรึงผลผลิตพีซีอาร์ ด้วย SSB (Streptavidin-coated sepharose beads:SSB) ผสม SSB stock 3 ไมโครลิตร, binding buffer 40 ไมโครลิตร, ผลผลิตพีซีอาร์ 20 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 17 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Plate shaker ความเร็ว 1400 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วทำการแยกสายดีเอ็นเอที่ถูกตรึงดังกล่าว ด้วยการจุ่มในสารเคมีต่างๆ เป็นลำดับ ดังนี้ 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol นาน 5 วินาที, Denaturation solution นาน 5 วินาที, 1X wash buffer นาน 10 วินาที จากนั้นเติม 40 ไมโครลิตร ของ 0.4 ไมโครโมลาร์ sequencing primer ชนิด purify แบบ HPLC โดยสั่งสังเคราะห์ไพร์เมอร์ที่บริษัท Biosearch ประเทศสหรัฐอเมริกา รายละเอียดไพร์เมอร์ดังตารางที่ 6 ปั่นที่ 400 rpm นาน 1 นาที และบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ก่อนเข้าเครื่อง Pyrosequencing



ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับทำ Pyrosequencing ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 (16)

Primer name	Primer Sequences 5'-3'	Target Detection	
KRAS SEQ PF-1	5'-TGTGGTAGTTGGAGCTG-3'	nt. 35G>A	Gly12Asp (G12D)
		nt. 35G>C	Gly12Ala (G12A)
		nt. 35G>T	Gly12Val (G12V)
		nt. 38G>A	Gly13Asp (G13D)
KRAS SEQ PF-2	5'-TGTGGTAGTTGGAGCT-3'	nt. 34G>A	Gly12Ser (G12S)
		nt. 34G>C	Gly12Arg (G12R)
		nt. 34G>T	Gly12Cys (G12C)

#### 3.3.4.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13

วิเคราะห์ Histogram peak ที่ได้จากการทำ Pyrosequencing โดยลำดับแรก ตรวจสอบความสูงและคุณภาพของ Histogram peak โดยเทียบกับ Reference peak และดูความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ว่าตรงกับ dispending order sequencing ที่ได้จากเครื่องหรือไม่ จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรมในเครื่อง Pyrosequencing โดยเลือกใช้โหมด single nucleotide polymorphism (SNP) เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของ genotype ของดีเอ็นเอต้นแบบ และโหมด Allele quantification (AQ) เพื่อดูเปอร์เซ็นต์ mutant allele ที่เกิดขึ้น โดยงานวิจัยนี้ใช้ค่า cut off ที่มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ mutant allele ในการอ่านค่าการเกิดการกลายพันธุ์

### 3.3.5 การโคลนยีน *K-ras* ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13

การ cloning ยีน *K-ras* ของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่พบการกลายพันธุ์และไม่กลายพันธุ์ ในตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ที่ทราบและยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีมาตรฐาน Direct sequencing และวิธี Pyrosequencing ทั้งหมด 8 รูปแบบ คือ ดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ (Wild-type) และชนิดกลายพันธุ์ (Mutant) ทั้ง 7 รูปแบบ ดังนี้ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมบวก ในการพัฒนาวิธี MAS-PCR

#### 3.3.5.1 ปฏิกิริยา Polymerase chain reaction ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 สำหรับการโคลนยีน

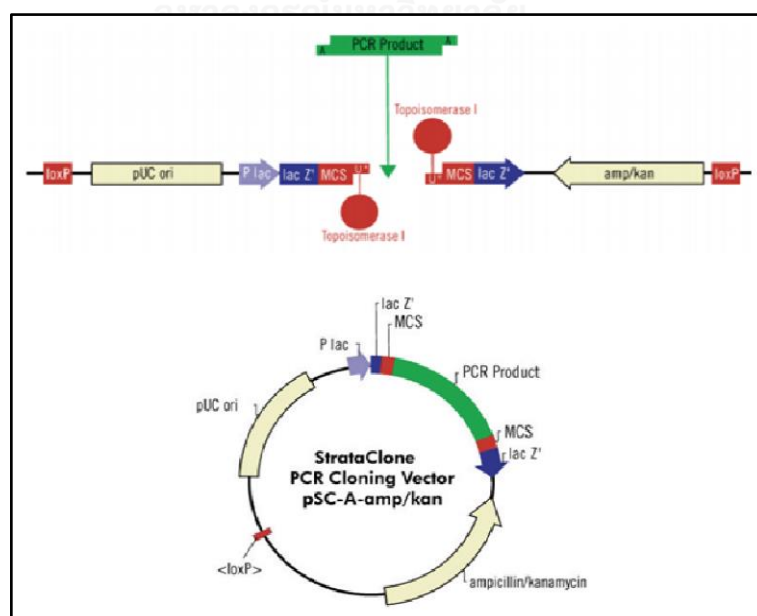
นำตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มียีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ จำนวน 1 ตัวอย่าง และชนิดกลายพันธุ์ จำนวน 7 ตัวอย่าง ดังนี้ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D ทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนที่ 3.3.2 และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบด้วยการทำพีซีอาร์ โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมส่วนผสมของพีซีอาร์ ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Buffer 2.5 ไมโครลิตร, MgCl<sub>2</sub> (25 มิลลิโมลาร์) 1.5 ไมโครลิตร, dNTP (10 มิลลิโมลาร์) 1 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 16.375 ไมโครลิตร, เอนไซม์ AmpliTaq DNA Polymerase 5 U/ไมโครลิตร 0.125 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ KRAS-codon 12/13-F (10 ไมโครโมลาร์) และ KRAS-codon 12/13-R (10 ไมโครโมลาร์) อย่างละ 1 ไมโครลิตร ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรมเมอร์ แสดงดังตารางที่ 7 และดีเอ็นเอต้นแบบ 50-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอประกอบด้วย 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, และ 40 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, 62 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที โดยเครื่องพีซีอาร์ Thermocycle Bio-Rad รุ่น C1000 นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 ผลผลิตพีซีอาร์ มีขนาด 259 bp

ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรมเมอร์ ในการเพิ่มจำนวนยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 สำหรับการโคลนยีน (12)

Primer name	Primer Sequences 5'-3'	Product Size (bp)	GenBank Accession number
KRAS-codon 12/13-F	5'-CTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATT-3'	259 bp	NM_004985.4
KRAS-codon 12/13-R	5'-ATCTGTATCAAAGAATGGTCCTG-3'		

### 3.3.5.2 การโคลนยีน *K-ras* ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 เข้าสู่ Vector pSC-A-amp/kan

ทำการโคลนยีน *K-ras* ความยาว 259 bp เข้าสู่ vector ด้วยชุดโคลนสำเร็จรูป StrataClone PCR Cloning Kit ดีเอ็นเอพาหะ (vector) ที่ใช้คือ pSC-A-amp/kan ดังภาพที่ 14 ขั้นตอนการโคลนมีดังนี้ เตรียม Ligation reaction mixture โดยการผสม Strataclone Cloning buffer 1.5 ไมโครลิตร, Strataclone Vector Mix amp/kan 0.5 ไมโครลิตร และผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 จำนวน 2 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที และทำการ Transform เข้า Competent cells โดยผสม Ligation reaction mixture 4 ไมโครลิตร กับ Competent Cells 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ดังภาพที่ 14 เติมน Luria-Bertani (LB) broth 250 ไมโครลิตร ลงใน transformation reaction mixture บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อบน LB-ampicillin plates ที่มี 40 ไมโครลิตร ของ 2 เพอร์เซ็นต์ X-gal และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการสุ่มเลือกโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงใน LB-broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำเชื้อใน LB-broth มาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Wizard® genomic DNA purification kit และตรวจสอบว่ามียีน *K-ras* ที่สนใจหรือไม่ ด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังขั้นตอนตามข้อ 3.3.5.1 และยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธี Direct sequencing โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท Bioneer Corporation, Daejeon, Republic ประเทศเกาหลี และ เก็บ stock เชื้อที่โคลนสำเร็จด้วยใน 40 เพอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล เก็บไว้ที่ - 80 องศาเซลเซียส

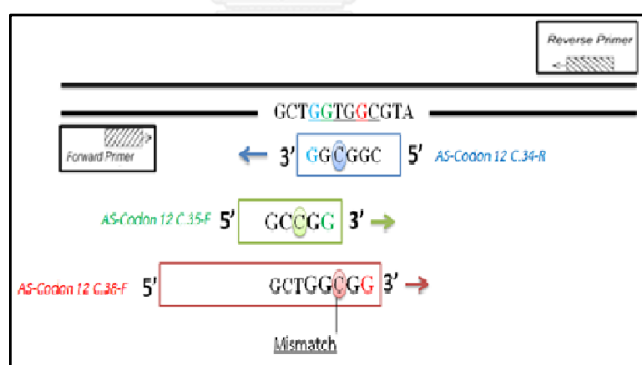


ภาพที่ 14 vector armori-PCR product-vector armamp/kan (97)

### 3.3.6 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR ที่ AS-primer จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์

#### 3.3.6.1 ออกแบบ Allele-specific (AS-primer) primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์

ทำการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อตรวจการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ที่นิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 จาก ยีน K-ras (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog ; NM\_004985.4) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (98) โดยออกแบบไพรเมอร์คู่หลักจากตำแหน่งที่ 170 bp ถึง 282 bp และออกแบบ AS-primer ให้ด้านปลาย 3' จำเพาะต่อดีเอ็นเอต้นแบบชนิดไม่กลายพันธุ์ และเพิ่มความจำเพาะของ AS-primer ด้วยการเติม mismatch base ในบริเวณนิวคลีโอไทด์ตัวที่ 3 ก่อนถึงด้านปลาย 3' ของ AS-primer ดังภาพที่ 15 ออกแบบขนาดผลผลิตพีซีอาร์ให้มีความแตกต่างกันระหว่างการกลายพันธุ์แต่ละชนิด ความยาวของจำนวนนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แต่ละเส้น ขึ้นอยู่กับค่าอุณหภูมิของ melting temperature (Tm) และคุณสมบัติพื้นฐานของไพรเมอร์ เช่น ลักษณะ hair-pin loops, primer-dimer และทำการเพิ่ม-ลด ความยาวของไพรเมอร์โดยการ เพิ่ม-ลด นิวคลีโอไทด์เฉพาะด้านปลาย 5' เท่านั้น โดยการเพิ่ม-ลด ที่ละ 1-2 นิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 15 การออกแบบ AS-primer ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 (GGT GGC)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์คู่หลักและ AS-Primer มาตรวจสอบความจำเพาะกับยีน K-ras โดยโปรแกรม Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (99) ทำการทดสอบคุณสมบัติของ AS-primers ด้วยโปรแกรม Oligo calc: Oligo nucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) (100) เพื่อใช้ในการเลือก AS-primers ที่เหมาะสมมาทดสอบในปฏิกิริยา MAS-PCR สั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งหมดจากบริษัท Biodesign ประเทศไทย โดยคุณภาพของไพรเมอร์ทั้งหมดเป็นชนิด Desalt

### 3.3.6.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์

ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR โดยทำการทดสอบกับตัวอย่างควบคุมบวก ที่ได้จากการโคลนยีน K-ras ทั้ง 8 ชนิด ที่ได้จากข้อ 3.3.5 ประกอบด้วย ยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ และชนิดกลายพันธุ์ ทั้ง 7 รูปแบบ คือ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D โดยแยกการทดสอบการกลายพันธุ์แต่ละชนิดในแต่ละหลอดทดลอง

#### 3.3.6.2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Allele-specific Primer ในปฏิกิริยา AS-PCR

เตรียมปฏิกิริยา AS-PCR ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Buffer 2.5 ไมโครลิตร,  $MgCl_2$  (25 มิลลิโมลาร์) 2.5 ไมโครลิตร, dNTP (10 มิลลิโมลาร์) 0.5 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 16.875 ไมโครลิตร, เอนไซม์ AmpliTaq DNA Polymerase 5 U/ไมโครลิตร 0.125 ไมโครลิตร, ไพเมอร์คู่หลัก KRAS-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.125 ไมโครลิตร, KRAS-(113bp)-R (10 ไมโครโมลาร์) 0.25 ไมโครลิตร และ AS-Primer ที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 0.002, 0.0025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ จำนวน 0.125 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบ 50-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และหลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ

ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังนี้ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที, 10 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 60 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, 20 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 64 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, 20 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยเครื่องพีซีอาร์ Thermocycle Bio-Rad รุ่น C1000

วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้เวลาในการรันเจลให้นานขึ้นเป็นเวลา 60 นาที พิจารณาผลโดยเลือกความเข้มข้นของ AS-Primer ที่ทำให้ได้ผลผลิต AS-PCR มากที่สุด และสามารถแยกดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ และชนิดกลายพันธุ์ ออกจากกันได้ชัดเจนที่สุด โดยดีเอ็นเอต้นแบบ ชนิดไม่กลายพันธุ์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาดที่เกิดจากไพเมอร์คู่หลัก และเกิดจาก AS-primer แต่หากในปฏิกิริยา AS-PCR ที่มีดีเอ็นเอต้นแบบเป็นชนิดกลายพันธุ์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์ เพียง 1 ขนาด ที่เกิดจากไพเมอร์คู่หลักเท่านั้น

### 3.3.6.2.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR

ทำปฏิกิริยา AS-PCR โดยมีส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังข้อ 3.3.6.2.1 โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของ AS-primer ที่เหมาะสมจากการทดลองข้อที่ 3.3.6.2.1 และทำการเพิ่มดีเอ็นเอต้นแบบด้วยขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามข้อ 3.3.6.2.1 ยกเว้นอุณหภูมิในช่วง annealing ใช้ที่อุณหภูมิที่ 64, 65.3, 67, 69, 72.2, 74.6, 76.2 และ 77 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และหลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอแม่แบบ

วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้เวลาในการรันเจลให้นานขึ้นเป็นเวลา 60 นาที พิจารณาผลโดยเลือกอุณหภูมิ ที่ทำให้ได้ผลผลิต AS-PCR มากที่สุด และสามารถแยกดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ และชนิดกลายพันธุ์ ออกจากกันได้ชัดเจนที่สุด โดยดีเอ็นเอต้นแบบชนิดไม่กลายพันธุ์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาดที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และเกิดจาก AS-primer แต่หากในปฏิกิริยา AS-PCR ที่มีดีเอ็นเอต้นแบบเป็นชนิดกลายพันธุ์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์ เพียง 1 ขนาด ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักเท่านั้น

### 3.3.6.2.3 การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR

ทำปฏิกิริยา AS-PCR โดยมีส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังข้อ 3.3.6.2.1 โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของ AS-primer ที่เหมาะสมจากการทดลองข้อที่ 3.3.6.2.1 และเลือกใช้ อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมจากการทดลองข้อที่ 3.3.6.2.2 โดยกำหนดจำนวนรอบของขั้นตอน การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในการทำปฏิกิริยา AS-PCR คือ 10, 20, 30, 40 และ 45 รอบ และหลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอแม่แบบ

วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้เวลาในการรันเจลให้นานขึ้นเป็นเวลา 60 นาที พิจารณาผลโดยเลือกจำนวนรอบ ที่ทำให้ได้ผลผลิต AS-PCR มากที่สุด และสามารถแยกดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ และชนิดกลายพันธุ์ ออกจากกันได้ชัดเจนที่สุด โดยดีเอ็นเอต้นแบบชนิดไม่กลายพันธุ์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาดที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และเกิดจาก AS-primer แต่หากในปฏิกิริยา AS-PCR ที่มีดีเอ็นเอต้นแบบเป็นชนิดกลายพันธุ์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์ เพียง 1 ขนาด ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักเท่านั้น

### 3.3.6.2.4 การหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับยีน K-ras ตำแหน่ง โคดอน 12

รวมปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34 และ 35 เป็น 1 หลอดการทดลอง โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในของแต่ละนิวคลีโอไทด์ มีส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ และความเข้มข้นของ AS-primer ที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.6.2.1 เลือกใช้ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอและอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมจากการทดลองข้อที่ 3.3.6.2.2 และเลือกใช้จำนวนรอบของ AS-PCR จากการทดลองข้อที่ 3.3.6.2.3 และหลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอแม่แบบ

วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้เวลาในการรันเจลให้นานขึ้นเป็นเวลา 60 นาที หากไม่พบการกลายพันธุ์ ทั้ง 2 นิวคลีโอไทด์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์ 3 ขนาด คือ 1 ขนาด เกิดจากการ amplify จากไพรเมอร์คู่หลัก และ 2 ขนาด เกิดจากการ amplify จาก AS-primer ทั้ง 2 ตำแหน่ง ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 และ 35 แต่หากในปฏิกิริยา MAS-PCR มียีน K-ras เป็นชนิดกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ที่ 34 จะพบผลผลิต 2 ขนาด ที่เกิดจากการ amplify จากไพรเมอร์คู่หลัก และ 1 ขนาด ที่เกิดจากการ amplify จาก AS-primer ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 35 ในกรณีหากในปฏิกิริยา MAS-PCR ที่มียีน K-ras เป็นชนิดกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ที่ 35 จะพบผลผลิต 2 ขนาด ที่เกิดจากการ amplify จากไพรเมอร์คู่หลัก และ 1 ขนาด เกิดจากการ amplify จาก AS-primer ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 34 แสดงดังภาพที่ 16

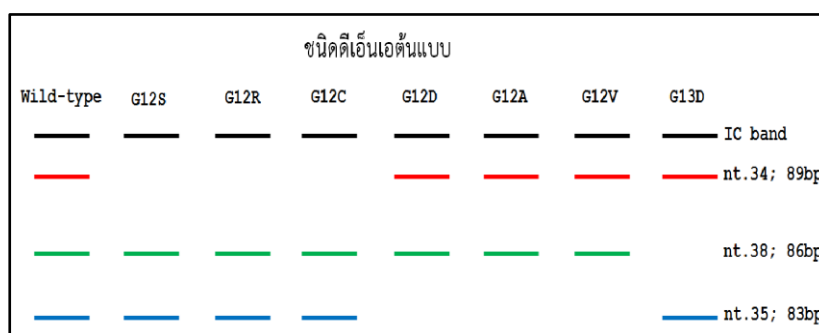


ภาพที่ 16 ผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากรวมปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34 และ 35 เป็น 1 หลอดการทดลอง

### 3.3.6.2.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับยีน K-ras ตำแหน่ง โคดอน 12 และ 13

รวมปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 เป็น 1 หลอด การทดลอง โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในของแต่ละนิวคลีโอไทด์ มีส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ และความเข้มข้นของ AS-primer ที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.6.2.1 เลือกใช้ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอและอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมจากการทดลองข้อที่ 3.3.6.2.2 และเลือกใช้จำนวนรอบของ AS-PCR จากการทดลองข้อที่ 3.3.6.2.3 และหลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอแม่แบบ

วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้เวลาในการรันเจล เป็นเวลา 60 นาที หากไม่พบการกลายพันธุ์ ทั้ง 3 นิวคลีโอไทด์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์ 4 ขนาด คือ 1 ขนาด เกิดจากการ amplify จากไพรเมอร์คู่หลัก และ 3 ขนาด เกิดจากการ amplify จาก AS-primer ทั้ง 3 ตำแหน่ง ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 แต่หากในปฏิกิริยา MAS-PCR มียีน K-ras เป็นชนิดกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ที่ 34 จะพบผลผลิต 3 ขนาด ที่เกิดจากการ amplify จากไพรเมอร์คู่หลัก และ 2 ขนาด ที่เกิดจากการ amplify จาก AS-primer ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 35 และ 38 ในกรณีหากในปฏิกิริยา MAS-PCR ที่มียีน K-ras เป็นชนิดกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ที่ 35 จะพบผลผลิต 3 ขนาด ที่เกิดจากการ amplify จากไพรเมอร์คู่หลัก และ 2 ขนาด เกิดจากการ amplify จาก AS-primer ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 34 และ 38 และในกรณีหากในปฏิกิริยา MAS-PCR ที่มียีน K-ras เป็นชนิดกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ที่ 38 จะพบผลผลิต 3 ขนาด ที่เกิดจากการ amplify จากไพรเมอร์คู่หลัก และ 2 ขนาด เกิดจากการ amplify จาก AS-primer ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 34 และ 35 แสดงดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 ผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากรวมปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 เป็น 1 หลอดการทดลอง



### 3.3.6.3 ทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ในปฏิกิริยา MAS-PCR กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์

#### 3.3.6.3.1 ทดสอบหาความไวในการตรวจยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ด้วย MAS-PCR

นำตัวอย่างดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ มาทำปฏิกิริยา AS-PCR โดยมีสภาวะและส่วนประกอบที่เหมาะสมตามข้อ 3.3.6.2.1-3.3.6.2.3 โดยทำการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่ 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร โดยหลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้เวลาในการรันเจลให้นานขึ้นเป็นเวลา 60 นาที เพื่อหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ที่พบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือจากไพรเมอร์คู่หลัก และจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ที่มีขนาดแตกต่างกัน ตามลำดับ

#### 3.3.6.3.2 ทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras

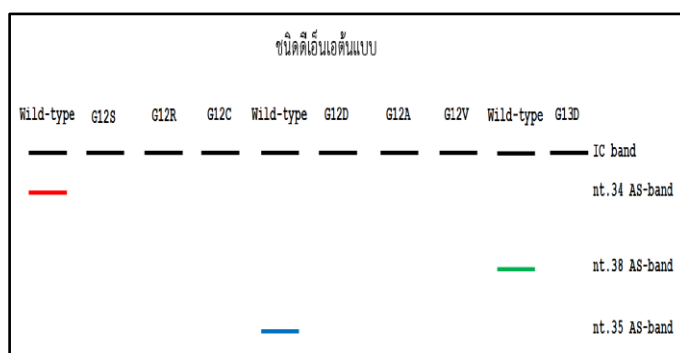
นำตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบชนิดไม่กลายพันธุ์ และ การกลายพันธุ์ 7 ชนิด คือชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D ที่ได้จากการโคลนยีน ตามข้อ 3.3.5.2 ชนิดละ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ผสมดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ในอัตราส่วนตั้งแต่ 100, 90, 80, 70, 65, 60, 55, 50, 30, 25, 15, 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ดังตารางที่ 8 นำดีเอ็นเอผสมมาทำปฏิกิริยา AS-PCR โดยมีสภาวะและส่วนประกอบดังข้อ 3.3.6.2.1-3.3.6.2.3 โดยหลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้เวลาในการรันเจล 60 นาที พิจารณาจากอัตราส่วนต่ำสุดที่สามารถอ่านผลบนแผ่นเจลได้ โดยสามารถแยกยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ และยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ออกจากกันได้

ตารางที่ 8 อัตราส่วนดีเอ็นเอต้นแบบชนิดกลายพันธุ์ต่อชนิดไม่กลายพันธุ์ สำหรับทำปฏิกิริยา AS-PCR เพื่อทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุดในการตรวจหาการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles)

เปอร์เซ็นต์ mutant alleles		เปอร์เซ็นต์												
		100	90	80	70	65	60	55	50	30	25	15	10	5
อัตราส่วน (ไมโครลิตร)	Mutant	100	90	80	70	65	60	55	50	30	25	15	10	5
	Wild-type	0	10	20	30	35	40	45	50	70	75	85	90	95

### 3.3.6.4 การทดสอบวิธี MAS-PCR ที่มี AS-Primer จำเพาะกับยีน *K-ras* ที่ไม่กลายพันธุ์ ที่พัฒนาขึ้น กับตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จากข้อ 3.3.2 มาแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ตามข้อมูล เปอร์เซ็นต์ mutant allele ที่ได้จากการวิเคราะห์ Pyrosequencing ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างที่มี เปอร์เซ็นต์ mutant allele  $\leq 25$  เปอร์เซ็นต์, กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างที่มี เปอร์เซ็นต์ mutant allele อยู่ระหว่าง 25-60 เปอร์เซ็นต์ และ กลุ่มที่ 3 เป็นตัวอย่างที่มี เปอร์เซ็นต์ mutant allele  $\geq 60$  เปอร์เซ็นต์ นำตัวอย่างแต่ละกลุ่มมาทำการทดสอบด้วยวิธี AS-PCR โดยมีสภาวะและส่วนประกอบดังข้อ 3.3.6.2.1-3.3.6.2.3 โดยหลอดควบคุมลบ ใช้ น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้ผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และใช้เวลาในการรันเจลให้นานขึ้นเป็นเวลา 60 นาที พิจารณาผลโดย ตัวอย่างที่ยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ ทั้ง 3 หลอดการทดลองของนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 พบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือจากไพรเมอร์คู่หลักและจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์นั้นๆ และตัวอย่างที่ยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ใด จะไม่พบผลผลิตพีซีอาร์จาก AS-primer นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งนั้นๆ แต่จะพบผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์คู่หลักและจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์อื่นๆ ยกตัวอย่างเช่น ดีเอ็นเอต้นแบบกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 หลอดทดลองของนิวคลีโอไทด์ที่ 34 พบผลผลิตพีซีอาร์ เพียง 1 ขนาด คือจากไพรเมอร์คู่หลัก และต้องไม่พบผลผลิตพีซีอาร์ ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ที่ 34 และหลอดทดลองของนิวคลีโอไทด์ที่ 35 และ 38 พบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือจากไพรเมอร์คู่หลัก และจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ที่ 34 และ 35 ตามลำดับ ดังแสดงดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ของปฏิกิริยา AS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 แยกการทดสอบการกลายพันธุ์แต่ละนิวคลีโอไทด์ในแต่ละหลอดทดลอง

### 3.3.7 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR ที่ AS-primer จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์

#### 3.3.7.1 ออกแบบ AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์

ออกแบบ AS-primer โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *K-ras* (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog ; NM\_004985.4) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (98) ตำแหน่งที่ 170 ถึง 282 โดยให้ปลายด้าน 3' ของ AS-primer เป็นนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกับดีเอ็นเอต้นแบบของยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์

ออกแบบ AS-Primer จำเพาะกับตำแหน่งกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* โคดอน 12 นิวคลีโอไทด์ที่ 34 (GGT) ทั้งหมด 3 รูปแบบ คือ GGT→AGT, GGT→CGT และ GGT→IGT โดยให้ปลายด้าน 3' ของ AS-primer เป็นนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกับดีเอ็นเอต้นแบบของยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ คือด้านปลาย 3' ของ AS-primer แต่ละเส้นคือ A (adenine), C (cysteine) และ T (thymine) ตามลำดับ

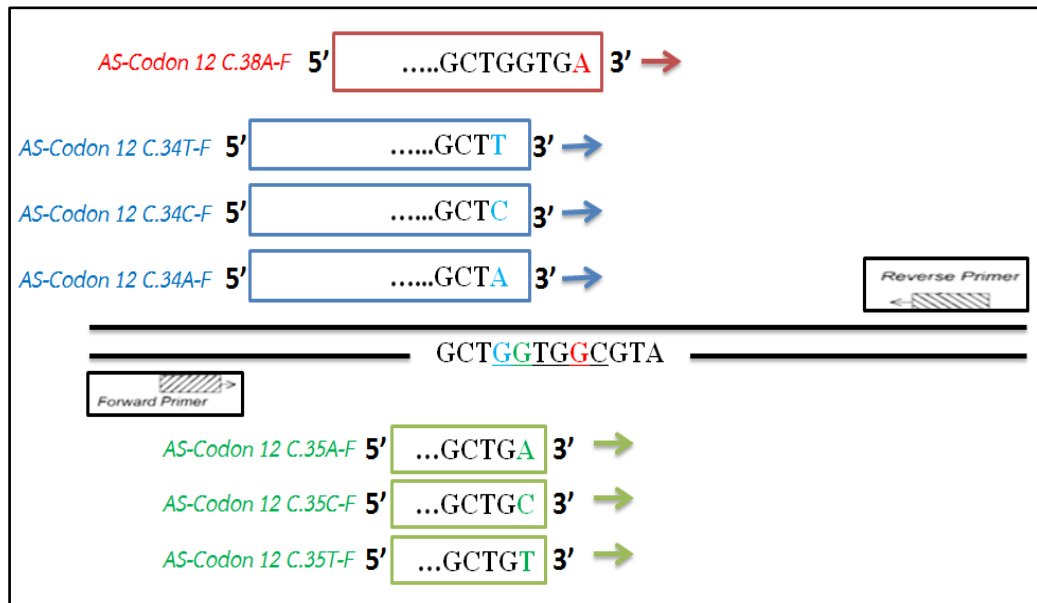
ออกแบบ AS-Primer จำเพาะกับตำแหน่งกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* โคดอน 12 นิวคลีโอไทด์ที่ 35 (GGT) ทั้งหมด 3 รูปแบบ คือ GGT→GAT, GGT→GCT และ GGT→GIT โดยให้ปลายด้าน 3' ของ AS-primer เป็นนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกับดีเอ็นเอต้นแบบของยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ คือด้านปลาย 3' ของ AS-primer แต่ละเส้นคือ A (adenine), C (cysteine) และ T (thymine) ตามลำดับ

ออกแบบ AS-Primer จำเพาะกับตำแหน่งกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* โคดอน 13 นิวคลีโอไทด์ที่ 38 (GGC) ทั้งหมด 1 รูปแบบคือเปลี่ยนจาก GGC→GAC โดยให้ปลายด้าน 3' ของ AS-primer เป็นนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกับดีเอ็นเอต้นแบบของยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ คือด้านปลาย 3' ของ AS-primer เส้นนี้คือ A (adenine)

ทั้งนี้การกำหนดชนิด Forward-primer หรือ Reverse-primer ขึ้นอยู่กับขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ต้องการ โดยออกแบบขนาดผลผลิตพีซีอาร์ให้มีความแตกต่างกันระหว่างการกลายพันธุ์แต่ละชนิด และความยาวของจำนวนนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แต่ละเส้น ขึ้นอยู่กับค่าอุณหภูมิของ melting temperature (Tm) และคุณสมบัติพื้นฐานของไพรเมอร์ เช่น ลักษณะ hair-pin loops, primer-dimer และทำการเพิ่ม-ลด ความยาวของไพรเมอร์โดยการ เพิ่ม-ลด นิวคลีโอไทด์เฉพาะด้านปลาย 5' เท่านั้น โดยการเพิ่ม-ลด ทีละ 1-2 นิวคลีโอไทด์เท่านั้น จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ มาตรวจสอบความจำเพาะกับยีน *K-ras* และทดสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์ดังข้อ

3.3.6.1 และสิ่งสังเคราะห์ AS-Primer ทั้งหมดจากบริษัท Biodesign ประเทศไทย โดยคุณภาพของไพรเมอร์ทั้งหมดเป็นชนิด Desalt

การออกแบบ AS-primer ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ทั้ง 7 รูปแบบการกลายพันธุ์คือ AGT, CGT, IGT GAT, GCT, GIT และ GAC แสดงดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 การออกแบบ AS-primer ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38

### 3.3.7.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์

#### 3.3.7.2.1 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-Primer ที่จำเพาะกับยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35

##### 3.3.7.2.1.1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR

ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR โดยทำการทดสอบกับพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีน *K-ras* 4 ชนิด ที่ได้จากข้อ 3.3.5 ดังนี้ ยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์, ชนิดกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ที่ 35 แบบ G12D, G12A และ G12V โดยแต่ละชนิด การกลายพันธุ์ต่อ 1 หลอดทดลอง ทำปฏิกิริยา AS-PCR มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Buffer 5 ไมโครลิตร, MgCl<sub>2</sub> (25 มิลลิโมลาร์) 5 ไมโครลิตร, dNTP (10 มิลลิโมลาร์) 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ AmpliTaq DNA Polymerase 5 U/ไมโครลิตร 0.125 ไมโครลิตร, ไพเมอร์คู่หลัก KRAS-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.25 ไมโครลิตร, KRAS-(179bp)-R (10 ไมโครโมลาร์) 0.375 ไมโครลิตร, น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 50 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอต้นแบบ 50-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และ AS-Primer (10 ไมโครโมลาร์) สำหรับชนิดการกลายพันธุ์ G12D, G12A และ G12V ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 0.75 ไมโครลิตร, 0.25 ไมโครลิตร ตามลำดับ และหลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ

สภาวะปฏิกิริยาดังนี้ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที, 10 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 63 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, 10 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 69 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, 30 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาทีและ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยเครื่องพีซีอาร์ Thermocycle Bio-Rad รุ่น C1000 แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์วิเคราะห์ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้เวลาในการรันเจลให้นานขึ้นเป็นเวลา 60 นาที

### 3.3.7.2.1.2 ทดสอบหาขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของปฏิกิริยา MAS-PCR ที่เหมาะสม

ผสม AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ ของนิวคลีโอไทด์ที่ 35 ทั้ง 3 ชนิด (G12D, G12A และ G12V) ใน 1 หลอดการทดลอง ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 35 โดยใช้ส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากการทดลองข้อ 3.3.7.2.1.1 ทำพีซีอาร์โดยใช้ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 สภาวะ ดังแสดงรายละเอียดดังตารางที่ 9 และหลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอแม่แบบ วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้เวลาในการรันเจลให้นานขึ้นเป็นเวลา 60 นาที

ตารางที่ 9 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 35

สภาวะที่ 1	สภาวะที่ 2	สภาวะที่ 3
95°C นาน 10 นาที	95°C นาน 10 นาที	95°C นาน 10 นาที
จำนวน 10 รอบ	จำนวน 5 รอบ	จำนวน 5 รอบ
95°C นาน 30 วินาที	95°C นาน 30 วินาที	95°C นาน 30 วินาที
60°C นาน 45 วินาที	59°C นาน 45 วินาที	62°C นาน 45 วินาที
72°C นาน 1 นาที	72°C นาน 1 นาที	72°C นาน 1 นาที
จำนวน 20 รอบ	จำนวน 25 รอบ	จำนวน 25 รอบ
95°C นาน 30 วินาที	95°C นาน 30 วินาที	95°C นาน 30 วินาที
64°C นาน 45 วินาที	64°C นาน 45 วินาที	69°C นาน 45 วินาที
72°C นาน 1 นาที	72°C นาน 1 นาที	72°C นาน 1 นาที
จำนวน 20 รอบ	จำนวน 20 รอบ	จำนวน 20 รอบ
95°C นาน 30 วินาที	95°C นาน 30 วินาที	95°C นาน 30 วินาที
55°C นาน 45 วินาที	55°C นาน 45 วินาที	55°C นาน 45 วินาที
72°C นาน 1 นาที	72°C นาน 1 นาที	72°C นาน 1 นาที
72°C นาน 10 นาที	72°C นาน 10 นาที	72°C นาน 10 นาที

### 3.3.7.2.1.3 ทดสอบความเข้มข้นของ AS-primer ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 35

ผสม AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ ของนิวคลีโอไทด์ที่ 35 ทั้ง 3 ชนิด (G12D, G12A และ G12V) ใน 1 หลอดการทดลอง ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 35 โดยใช้ส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากการทดลองข้อ 3.3.7.2.1.1 แต่ทำการปรับอัตราส่วนความเข้มข้นของ AS-primer ดังแสดงในตารางที่ 10 และใช้ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากการทดลองข้อที่ 3.3.7.2.1.2 และหลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอแม่แบบ วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้เวลาในการรันเจลให้นานขึ้นเป็นเวลา 60 นาที สำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 35 จะผสมไพรเมอร์ที่จำเพาะกับการกลายพันธุ์ ทั้ง 3 ชนิด ข้างต้น ใน 1 หลอดการทดลอง

ตารางที่ 10 อัตราส่วนของ AS-primer ของปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35

MAS-primer	ส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์				
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4	ชุดที่ 5
KRAS-G12D-F	0.025 ไมโครโมลาร์	0.025 ไมโครโมลาร์	0.025 ไมโครโมลาร์	0.025 ไมโครโมลาร์	0.025 ไมโครโมลาร์
KRAS-G12A-F	0.3 ไมโครโมลาร์	0.15 ไมโครโมลาร์	0.025 ไมโครโมลาร์	0.025 ไมโครโมลาร์	0.025 ไมโครโมลาร์
KRAS-G12V-R	0.02 ไมโครโมลาร์	0.02 ไมโครโมลาร์	0.02 ไมโครโมลาร์	0.015 ไมโครโมลาร์	0.01 ไมโครโมลาร์

### 3.3.7.2.2 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-Primer ที่จำเพาะกับยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34

ผสม AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34 ทั้ง 3 ชนิด (G12S, G12R และ G12C) ใน 1 หลอดการทดลอง ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34 โดยใช้ส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากการทดลองข้อ 3.3.7.2.1.1 แต่ทำการปรับอัตราส่วนความเข้มข้นของ AS-primer ดังแสดงในตารางที่ 11 และใช้ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากการทดลองข้อที่ 3.3.7.2.1.2 และหลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอแม่แบบ วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้เวลาในการรันเจลให้นานขึ้นเป็นเวลา 60 นาที สำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34 จะผสมไพรเมอร์ที่จำเพาะกับการกลายพันธุ์ ทั้ง 3 ชนิด ข้างต้น ใน 1 หลอดการทดลอง

ตารางที่ 11 อัตราส่วนของ AS-primer ของปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34

MAS-primer	ส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์		
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3
KRAS-G12S-R	0.015 ไมโครโมลาร์	0.25 ไมโครโมลาร์	0.05 ไมโครโมลาร์
KRAS-G12R-F	0.25 ไมโครโมลาร์	0.25 ไมโครโมลาร์	0.25 ไมโครโมลาร์
KRAS-G12C-F	0.25 ไมโครโมลาร์	0.015 ไมโครโมลาร์	0.01 ไมโครโมลาร์

### 3.3.7.2.3 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-Primer ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 38 โดยใช้ส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Buffer 2.5 ไมโครลิตร, MgCl<sub>2</sub> (25 มิลลิโมลาร์) 2.5 ไมโครลิตร, dNTP (10 มิลลิโมลาร์) 0.5 ไมโครลิตร, เอนไซม์ AmpliTaq DNA Polymerase 5 U/ไมโครลิตร 0.125 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 25 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอต้นแบบ 50-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แต่ทำการปรับความเข้มข้นไพรเมอร์คู่หลัก และ AS-primer ดังแสดงในตารางที่ 12 และใช้ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากการทดลองข้อที่ 3.3.7.2.1.2 และหลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอแม่แบบ วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้เวลาในการรันเจลให้นานขึ้นเป็นเวลา 60 นาที สำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 38 จะผสมไพรเมอร์ที่จำเพาะกับการกลายพันธุ์ชนิด G13D ใน 1 หลอดการทดลอง

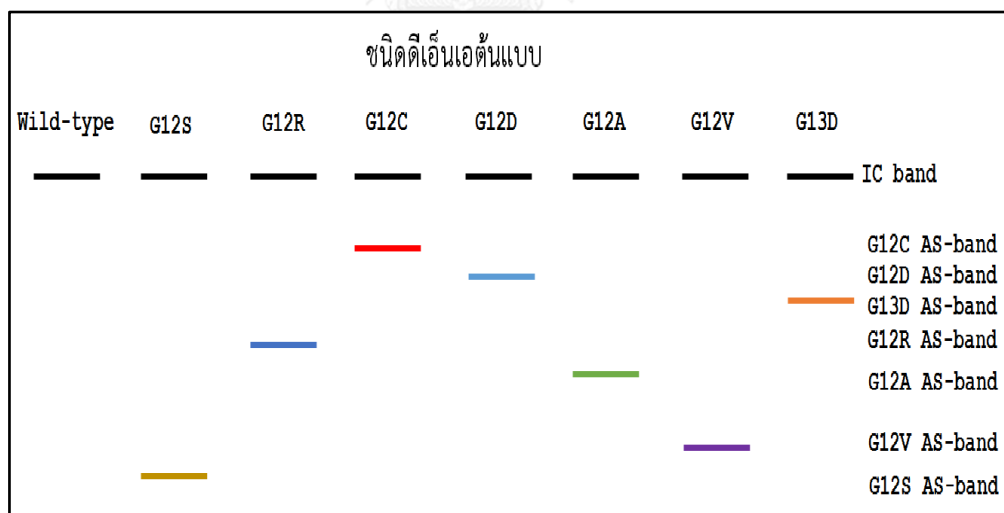
ตารางที่ 12 อัตราส่วนของ AS-primer ของปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38

MAS-primer	ส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์		
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3
KrasPyro-F	0.05 ไมโครโมลาร์	0.1 ไมโครโมลาร์	0.1 ไมโครโมลาร์
Kras-codon 12/13-R	0.1 ไมโครโมลาร์	0.1 ไมโครโมลาร์	0.1 ไมโครโมลาร์
KRAS-G13D-F	0.5 ไมโครโมลาร์	0.025 ไมโครโมลาร์	0.5 ไมโครโมลาร์



### 3.3.7.2.4 การหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับยีน K-ras ตำแหน่ง โคดอน 12 และ 13 ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 34, 35 และ 38

ผสม AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ทั้ง 7 ชนิด (G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D) ใน 1 หลอด การทดลอง โดยทดสอบความเข้มข้น AS-primer ที่เหมาะสมดังตารางที่ 13 และส่วนประกอบ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.3.7.2.1.1 และใช้ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากการทดลองข้อที่ 3.3.7.2.1.2 หลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอแม่แบบ วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้เวลาในการรันเจลให้นานขึ้นเป็นเวลา 60 นาที โดยพิจารณาผลจาก หากไม่พบการ กลายพันธุ์ ทั้ง 7 ชนิดคือ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D จะพบผลผลิต พีซีอาร์เพียง 1 ขนาดเท่านั้น ที่เกิดจากการ amplify จากไพรเมอร์คู่หลัก และหากพบการกลายพันธุ์ 1 ใน 7 ชนิด ของ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D จะพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือ 1 ขนาด ที่เกิดจากการ amplify ของไพรเมอร์คู่หลัก และ 1 ขนาด ที่เกิดจากการ amplify ของ AS-primer ในแต่ละชนิดการกลายพันธุ์นั้นๆ ดังแสดงดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 ผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ของปฏิกิริยา MAS-PCR ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 รวมการทดสอบการกลายพันธุ์ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D ใน 1 หลอดทดลอง

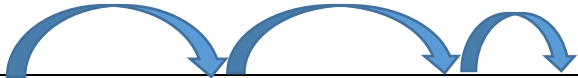
ตารางที่ 13 อัตราส่วนของ AS-primer ของปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34,35 และ 38 สำหรับ AS-primer ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D

MAS-primer	ส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์		
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3
KRAS-G12S-R	0.05 ไมโครโมลาร์	0.05 ไมโครโมลาร์	0.05 ไมโครโมลาร์
KRAS-G12R-F	0.025 ไมโครโมลาร์	0.025 ไมโครโมลาร์	0.025 ไมโครโมลาร์
KRAS-G12C-F	0.01 ไมโครโมลาร์	0.02 ไมโครโมลาร์	0.01 ไมโครโมลาร์
KRAS-G12D-F	0.025 ไมโครโมลาร์	0.02 ไมโครโมลาร์	0.02 ไมโครโมลาร์
KRAS-G12A-F	0.025 ไมโครโมลาร์	0.02 ไมโครโมลาร์	0.02 ไมโครโมลาร์
KRAS-G12V-R	0.015 ไมโครโมลาร์	0.05 ไมโครโมลาร์	0.02 ไมโครโมลาร์
KRAS-G13D-F	0.025 ไมโครโมลาร์	0.0125 ไมโครโมลาร์	0.0125 ไมโครโมลาร์

### 3.3.7.3 ทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles) ของยีน *K-ras* ในปฏิกิริยา MAS-PCR กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์

นำตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบชนิดไม่กลายพันธุ์ และการกลายพันธุ์ 7 ชนิด คือ ชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D ที่ได้จากการโคลนยีน ตามข้อ 3.3.5.2 ชนิดละ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ผสมดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ในอัตราส่วน ตั้งแต่ 100, 50, 25, 10, 5, 2, 1 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ดังตารางที่ 14 นำดีเอ็นเอ ผสมมาทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยมีสภาวะและส่วนประกอบดังข้อ 3.3.7.2.4 โดยหลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ พิจารณาจากอัตราส่วนต่ำสุด ที่สามารถอ่านผลบนแผ่นเจลได้ โดยสามารถแยกชนิดยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ และยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ออกจากกันได้

ตารางที่ 14 อัตราส่วนดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ต่อดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ สำหรับทำปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจหาการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles) กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์




เปอร์เซ็นต์ mutant alleles		เปอร์เซ็นต์							
		100	50	25	10	5	2	1	0.1
อัตราส่วน (ไม่โครลิตร)	Mutant	100	50	25	10	5	2	10	10
	Wild-type	0	50	75	90	95	98	90	90

### 3.3.7.4 การทดสอบความแม่นยำ และทำการทดสอบซ้ำ (Precision and reproducibility) ของวิธี MAS-PCR สำหรับชุด AS-primer ที่มีความจำเพาะกับยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์

ทดสอบความแม่นยำและทำการทดสอบซ้ำ ของวิธี MAS-PCR โดยการนำตัวอย่างยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ และ 7 ชนิดการกลายพันธุ์ คือ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D เจือจางดีเอ็นเอ ด้วยอัตราส่วนดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ต่อดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ ในช่วงขีดจำกัดต่ำสุดที่ MAS-PCR ตรวจวัดได้ คือ 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ดังตารางที่ 15 และทำปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับการตรวจสอบยีน K-ras ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35, และ 38 โดยมีสถานะและส่วนประกอบดังข้อ 3.3.7.2.4 โดยทำการทดลอง ซ้ำ 4 ครั้ง หลอดควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ พิจารณาผลตามข้อ 3.3.7.3 ว่าผลการตรวจวิเคราะห์ทั้ง 4 ครั้ง ในแต่ละอัตราส่วนดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ต่อดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ ให้ผลเหมือนหรือต่างกันหรือไม่อย่างไร

ตารางที่ 15 อัตราส่วนดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ต่อดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ สำหรับทำ MAS-PCR เพื่อทดสอบความแม่นยำและความถูกต้อง ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles) ) กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอต้นแบบชนิดกลายพันธุ์



เปอร์เซ็นต์ mutant alleles		เปอร์เซ็นต์					
		10	5	2	1	0.1	0.01
อัตราส่วน (ไม่โครลิตร)	Mutant	10	5	2	2	2	2
	Wild-type	90	95	98	18	18	18

### 3.3.7.5 การทดสอบวิธี MAS-PCR ที่มี AS-Primer จำเพาะกับยีน *K-ras* ชนิด กลายพันธุ์ ที่พัฒนาขึ้น กับตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จากข้อ 3.3.2 จำนวน 270 ตัวอย่าง ทำการทดสอบวิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นด้วยหลักการที่ AS-primer ด้านปลาย 3' นั้น จำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นชนิดกลายพันธุ์ (mutant) สำหรับการตรวจสอบยีน *K-ras* ใน ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35, และ 38 โดยมีสถานะและส่วนประกอบดังข้อ 3.3.7.2.4 โดยหลอด ควบคุมลบ ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามขั้นตอนข้อที่ 3.3.4.2 แต่ใช้ผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เวลาในการรันเจลให้นานขึ้นเป็นเวลา 60 นาที

### 3.3.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Direct sequencing

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ที่ให้ผลการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ด้วยวิธี MAS-PCR ไม่ตรงกับผลของวิธี Pyrosequencing มาทำการยืนยันด้วยการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ด้วยวิธี Direct sequencing โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอ จากข้อ 3.3.2 ทำการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมาย ตามขั้นตอนข้อ 3.5.1 และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ โดยการรันเจล ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis ตามข้อ 3.3.4.2 จะพบผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 259 bp และเตรียมตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ดังกล่าวที่ความเข้มข้น 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ KRAS-codon 12/13-F (5' CTG-GTG-GAG-TAT-TTG-ATA-GTG-TAT-T 3') ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Direct sequencing ที่บริษัท Bioneer Corporation, Daejeon, Republic ประเทศเกาหลี นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog [(Homo sapiens (human))] ในธนาคารยีน (NCBI) GenBank Accession number: NM\_004985.4 (98) เพื่อตรวจสอบหาการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ของยีน *K-ras* โดยโปรแกรม Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (99)

### 3.3.9 การวิเคราะห์สถิติ

การเปรียบเทียบผลการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ด้วยวิธี MAS-PCR และวิธี Pyrosequencing โดยนำผลการทดสอบหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ที่นิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 จำนวนทั้งหมด 270 ตัวอย่าง ที่ตรวจวิเคราะห์โดย 2 วิธี มาเปรียบเทียบความสอดคล้องกัน (agreement) โดยใช้สถิติ Kappa (K) ในการทดสอบความสอดคล้องกัน (agreement) ระหว่างวิธีการตรวจวิเคราะห์ 2 วิธี โดยกำหนดค่า  $K = 0.0-0.4$  คือค่าการไม่ยอมรับ ค่า  $K = 0.41-0.6$  คือค่าการยอมรับได้ในระดับปานกลาง ค่า  $K = 0.61-0.8$  คือค่าการยอมรับได้ในระดับดี และหากค่า  $K = 0.81-1.0$  คือค่าการยอมรับได้ในระดับดีมาก (101) และทดสอบหาค่า positive และ negative agreement ของวิธี MAS-PCR และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วย ประกอบด้วย อายุ เพศ ผลทางจุลพยาธิวิทยา และระยะโรค ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง กับการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* และ การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอนที่ 12 และ 13 โดยใช้ chi-square test ในการทดสอบ และกำหนดใช้ค่า  $P$  ที่ 0.05 เป็นค่านัยสำคัญทางสถิติ ทดสอบโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS (version 11.5)

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ลักษณะพื้นฐานทั่วไป และลักษณะทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง

ลักษณะพื้นฐานทั่วไป และลักษณะทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง พบว่ามีอายุอยู่ระหว่าง 27-90 ปี อายุเฉลี่ยที่ 62 ปี และพบผู้ป่วยในช่วงอายุ 60-79 ปี สูงสุดถึง 55.2 เปอร์เซ็นต์ พบผู้ป่วยเพศชายสูงถึง 60.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าเพศหญิงที่พบเพียง 39.3 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อที่พบสูงสุดคือลักษณะ Moderate differentiated grade พบสูงถึง 64.8 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือลักษณะ Well differentiated grade พบ 28.5 เปอร์เซ็นต์ และ Poorly differentiated grade พบเพียง 6.7 เปอร์เซ็นต์ ตำแหน่งของมะเร็งที่พบส่วนใหญ่พบที่ Colorectal primary พบสูงถึง 88.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะพื้นฐานทั่วไป และลักษณะทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วย จำนวน 270 ตัวอย่าง แสดงดังตารางที่ 16

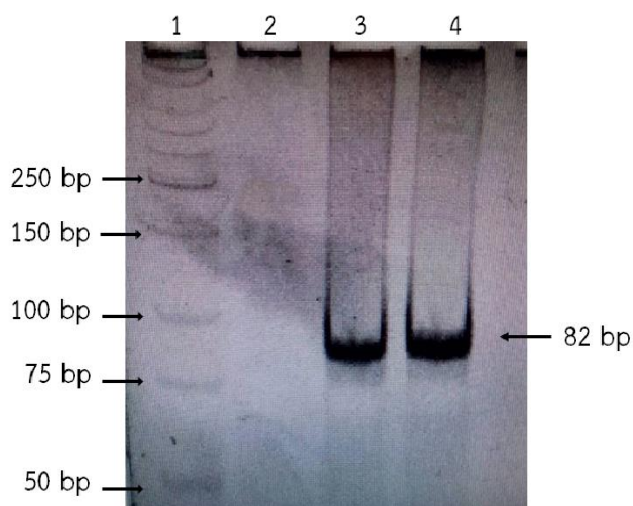
ตารางที่ 16 ลักษณะพื้นฐานทั่วไป และลักษณะทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง

ลักษณะพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วย	จำนวน	เปอร์เซ็นต์
อายุเฉลี่ย (ช่วงอายุ)	62 (ช่วงอายุ: 27-90 ปี)	
20-39 ปี	11	4.1 เปอร์เซ็นต์
40-59 ปี	98	36.3 เปอร์เซ็นต์
60-79 ปี	149	55.2 เปอร์เซ็นต์
80-90 ปี	12	4.4 เปอร์เซ็นต์
เพศ:		
ผู้ชาย	164	60.7 เปอร์เซ็นต์
ผู้หญิง	106	39.3 เปอร์เซ็นต์
ลักษณะทางพยาธิวิทยา:		
Well differentiated	77	28.5 เปอร์เซ็นต์
Moderate differentiated	175	64.8 เปอร์เซ็นต์
Poorly differentiated	18	6.7 เปอร์เซ็นต์
ตำแหน่งก้อนมะเร็ง:		
Colorectal primary	239	88.5 เปอร์เซ็นต์
Metastasis	31	11.5 เปอร์เซ็นต์

## 4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี

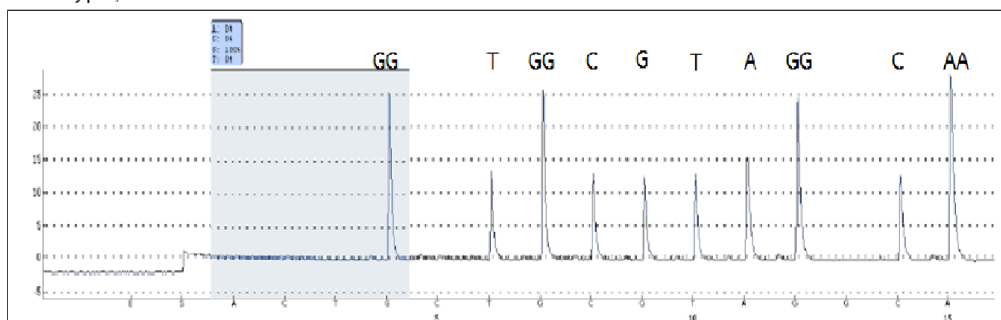
### Pyrosequencing

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี Pyrosequencing กับตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง โดยการศึกษาครั้งนี้ทำการหาการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง 7 รูปแบบคือ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V, และ G13D ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 เท่านั้น โดยทำการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จะพบผลผลิตพีซีอาร์ขนาดของยีนเป้าหมายคือขนาด 82 bp ดังแสดงในภาพที่ 21 เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing ได้ผลเป็น histogram peak และวิเคราะห์ยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ ดังแสดงในภาพที่ 22 และยีน *K-ras* ชนิดการกลายพันธุ์ 7 รูปแบบ ดังแสดงในภาพที่ 23-25

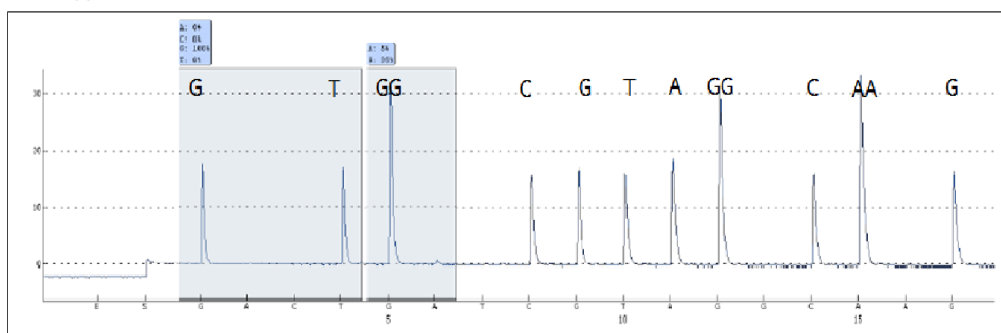


ภาพที่ 21 ผลการรันเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ก่อนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-4 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง รหัส FFPE-1 และ FFPE-212 ตามลำดับ

## 1. Wild-type ; GGT



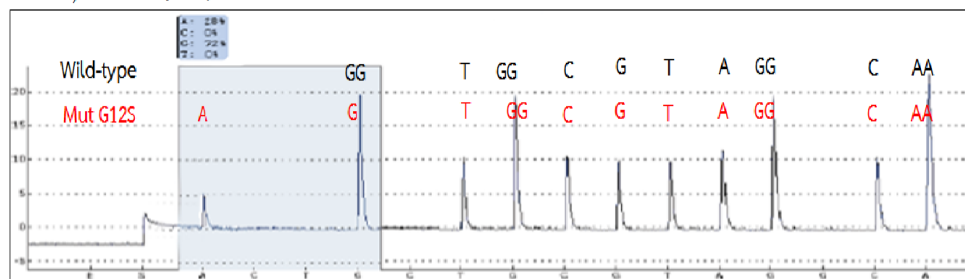
## 2. Wild-type ; GGC



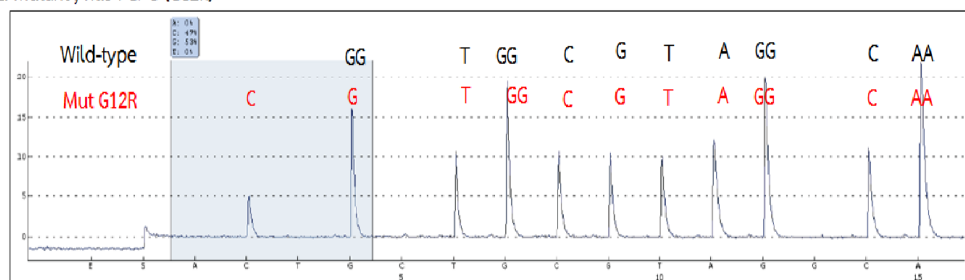
ภาพที่ 22 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing ของตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ จากตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝัองพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง รหัส FFPE-1, หมายเลขที่ 1 แสดงยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, หมายเลขที่ 2 แสดงยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 และ 38



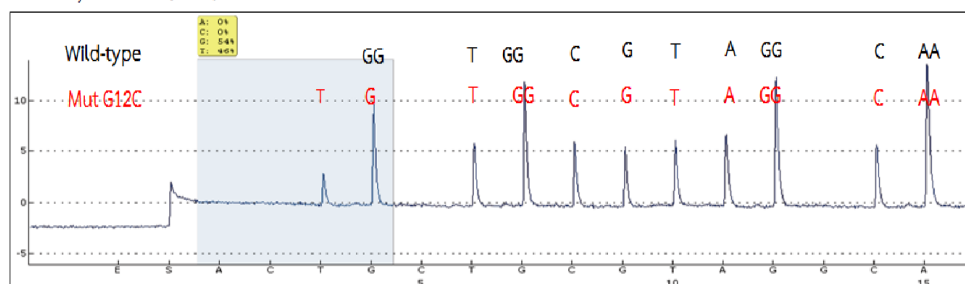
## 1. Mutant ; nt.34 G&gt;A (G12S)



## 2. Mutant ; nt.34 G&gt;C (G12R)

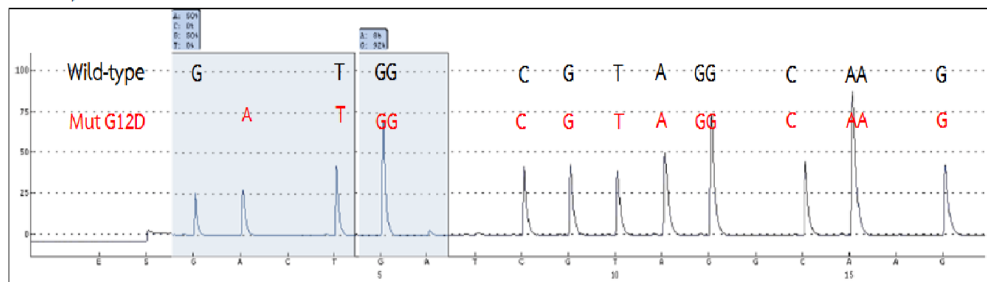


## 3. Mutant ; nt.34 G&gt;T (G12C)

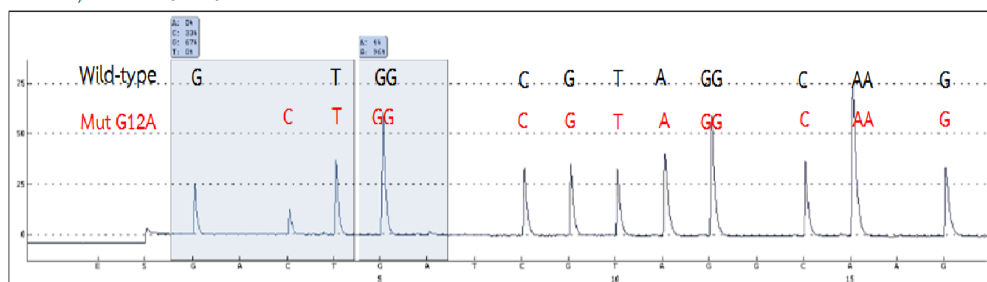


ภาพที่ 23 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing ของตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, หมายเลขที่ 1 แสดงยื่น *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด nt. 34 G>A (G12S) จากตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง รหัส FFPE-151, หมายเลขที่ 2 แสดงยื่น *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด nt. 34 G>C (G12R) จากตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง รหัส FFPE-154, หมายเลขที่ 3 แสดงยื่น *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด nt. 34 G>T (G12C) จากตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง รหัส FFPE-155

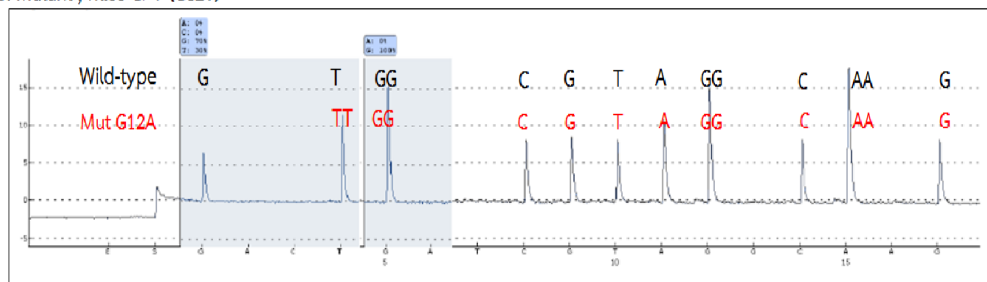
## 1. Mutant ; nt.35 G&gt;A (G12D)



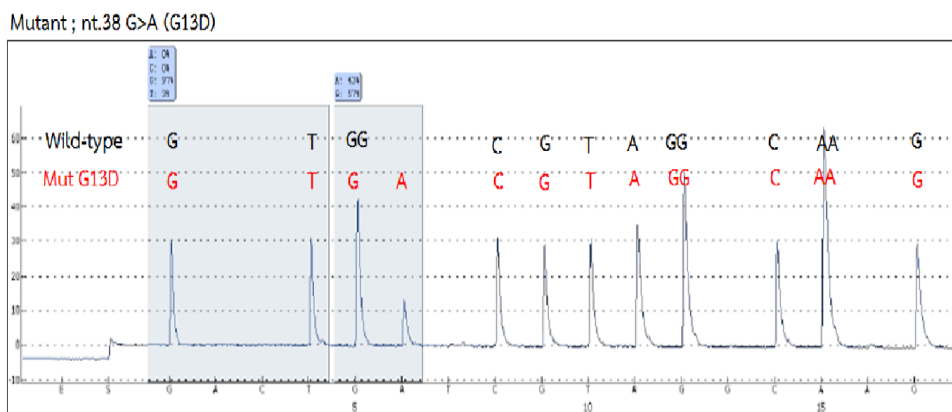
## 2. Mutant ; nt.35 G&gt;C (G12A)



## 3. Mutant ; nt.35 G&gt;T (G12V)



ภาพที่ 24 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing ของตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35, หมายเลขที่ 1 แสดงยื่น K-ras กลายพันธุ์ชนิด nt. 35 G>A (G12D) จากตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝัองพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง รหัส FFPE-159, หมายเลขที่ 2 แสดงยื่น K-ras กลายพันธุ์ชนิด nt. 35 G>C (G12A) จากตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝัองพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง รหัส FFPE-190, หมายเลขที่ 3 แสดงยื่น K-ras กลายพันธุ์ชนิด nt. 35 G>T (G12V) จากตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝัองพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง รหัส FFPE-197



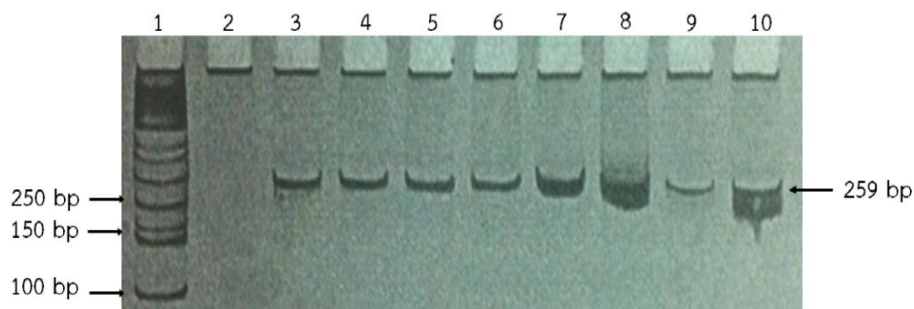
ภาพที่ 25 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing ของตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 การกลายพันธุ์ชนิด nt. 38 G>A (G13D) จากตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝัังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง รหัส FFPE-212

จากตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงทั้งหมด 270 ตัวอย่าง เมื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Pyrosequencing พบว่าตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ จำนวน 150 ตัวอย่าง คิดเป็น 55.55 เปอร์เซ็นต์ และตรวจพบการกลายพันธุ์ จำนวน 120 ตัวอย่าง คิดเป็น 44.44 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้งหมดเป็น single point mutation โดยพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 จำนวน 61 ตัวอย่าง คิดเป็น 50.83 เปอร์เซ็นต์ แยกเป็นรูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบสูงสุดที่ตำแหน่งโคดอน 12 คือ การกลายพันธุ์รูปแบบ G12D คิดเป็น 25.83 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ G12V คิดเป็น 12.50 เปอร์เซ็นต์ และการกลายพันธุ์รูปแบบที่พบน้อยคือ G12A, G12C, G12S และ G12R คิดเป็น 5.83 เปอร์เซ็นต์, 3.33 เปอร์เซ็นต์, 2.50 เปอร์เซ็นต์ และ 0.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 13 มีการกลายพันธุ์รูปแบบเดียวคือ G13D คิดเป็น 49.17 เปอร์เซ็นต์ แสดงรายละเอียดสรุปดังตารางที่ 21

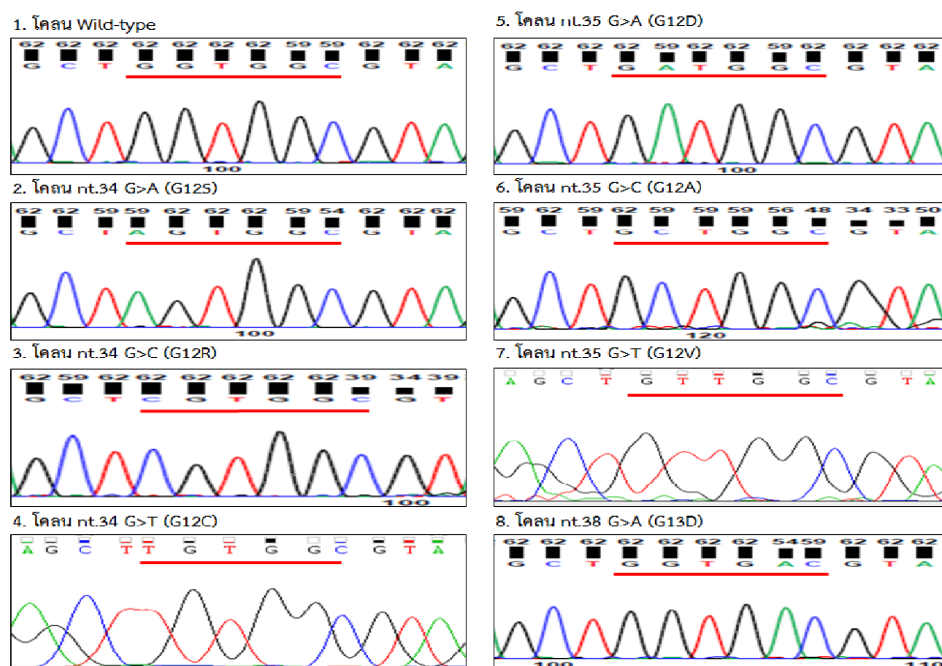
#### 4.3 การโคลน ยีน K-ras

ทำการโคลนยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์และชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 7 ชนิดคือ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V, และ G13D เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมบวก ในการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี MAS-PCR โดยขั้นแรกเพิ่มปริมาณยีน K-ras 8 รูปแบบ จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝัังพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ และทำการยืนยันด้วยวิธี Pyrosequencing และ Direct sequencing โคลนยีน K-ras เข้าสู่ Vector pSC-A-amp/kan และ transform เข้าสู่เชื้อ *E. coli* ทำการยืนยันผลสมมติดีเอ็นเอที่โคลนได้ ด้วยการทำพีซีอาร์ และ

ตรวจสอบผลจากเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส จะพบขนาดผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 259 bp ดังแสดงดังภาพที่ 26 และยืนยันผลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Direct sequencing ดังแสดงดังภาพที่ 27 และจากผลการโคลนยีน พบว่าสามารถโคลนยีนทั้ง 8 รูปแบบ ได้สำเร็จ



ภาพที่ 26 แสดงผลเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ของผลผลิตพีซีอาร์จากตัวอย่างโคลนของยีน *K-ras*, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), 3-10 ตัวอย่างโคลนของยีน *K-ras* ชนิด wild-type, G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V, และ G13D ตามลำดับ



ภาพที่ 27 แสดงผลการยืนยันการโคลนที่ให้ผลบวก ด้วยการทำ Direct Sequencing, หมายเลขที่ 1-8 แสดงโคลนของยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ (wild-type ; GGT GGC), กลายพันธุ์ชนิด (G12S ; AGT GGC), ชนิด (G12R ; CGT GGC), ชนิด (G12C ; IGT GGC), ชนิด (G12D ; GAT GGC), ชนิด (G12A ; GCT GGC), ชนิด (G12V ; GIT GGC) และชนิด (G13D ; GGT GAC) ตามลำดับ

#### 4.4 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR ที่ AS-primer จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์

##### 4.4.1 การออกแบบ AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* (*V-Ki-ras2* Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog ; NM\_004985.4) (98) บริเวณโคดอน 12 และ 13 นิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35, และ 38 (GGT GGC) ให้มีขนาดผลผลิตพีซีอาร์แตกต่างกัน 4 ขนาด คือ 113 bp สำหรับใช้เป็น Internal control และผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 89 bp, 83 bp และ 86 bp สำหรับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ตามลำดับ การออกแบบ AS-primer แต่ละนิวคลีโอไทด์ดัง แสดงรายละเอียดดังภาพที่ 28 และแสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ดังตารางที่ 17 ดังนี้

การออกแบบ AS-primer ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 (GGT) นั้นในงานวิจัยนี้ ออกแบบ AS-primer ฝั่ง forward ให้ปลายด้าน 3' ของ AS-primer เป็นนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกับดีเอ็นเอต้นแบบของยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ คือด้านปลาย 3' ของ KRAS-nt.34-WT-F primer เส้นนี้คือ G (guanine) และเพิ่มความจำเพาะของ AS-primer ด้วยการออกแบบ mismatch base ในบริเวณนิวคลีโอไทด์ตัวที่ 3 ก่อนถึงด้านปลาย 3' ของ AS-primer คือ นิวคลีโอไทด์ชนิด T (thymine)

การออกแบบ AS-primer ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 (GGT) นั้นในงานวิจัยนี้ ออกแบบ AS-primer ฝั่ง forward ให้ปลายด้าน 3' ของ AS-primer เป็นนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกับดีเอ็นเอต้นแบบของยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ คือด้านปลาย 3' ของ KRAS-nt.35-WT-F primer เส้นนี้คือ G (guanine) และเพิ่มความจำเพาะของ AS-primer ด้วยการออกแบบ mismatch base ในบริเวณนิวคลีโอไทด์ตัวที่ 3 ก่อนถึงด้านปลาย 3' ของ AS-primer คือ นิวคลีโอไทด์ชนิด C (cytosine)

การออกแบบ AS-primer ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 (GGC) นั้นในงานวิจัยนี้ ออกแบบ AS-primer ฝั่ง forward ให้ปลายด้าน 3' ของ AS-primer เป็นนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกับดีเอ็นเอต้นแบบของยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ คือด้านปลาย 3' ของ KRAS-nt.38-WT-F primer เส้นนี้คือ G (guanine) และเพิ่มความจำเพาะของ AS-primer ด้วยการออกแบบ mismatch base ในบริเวณนิวคลีโอไทด์ตัวที่ 3 ก่อนถึงด้านปลาย 3' ของ AS-primer คือ นิวคลีโอไทด์ชนิด C (cytosine)

<p style="text-align: center;">KRAS-nt.38-WT-F-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGGcGG→</p> <p style="text-align: center;">KRAS-nt.35-WT-F-GTGGTAGTTGGAGCcGG→</p> <p style="text-align: center;">KRAS-nt.34-WT-F-AAACTTGTGGTAGTTGGAGtG→</p> <p>KRAS-Forward primer→</p> <p style="text-align: center;"><u>GGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATT</u> <u>CAGAATCATTGTGGACGAATATGATCC</u></p> <p style="text-align: center;">←KRAS (113bp)-Reverse primer</p>
---

ภาพที่ 28 การออกแบบ AS-Primer ที่จำเพาะกับยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 34, 35 และ 38

ตารางที่ 17 รายละเอียดไพรเมอร์ ของปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ AS-primer จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13

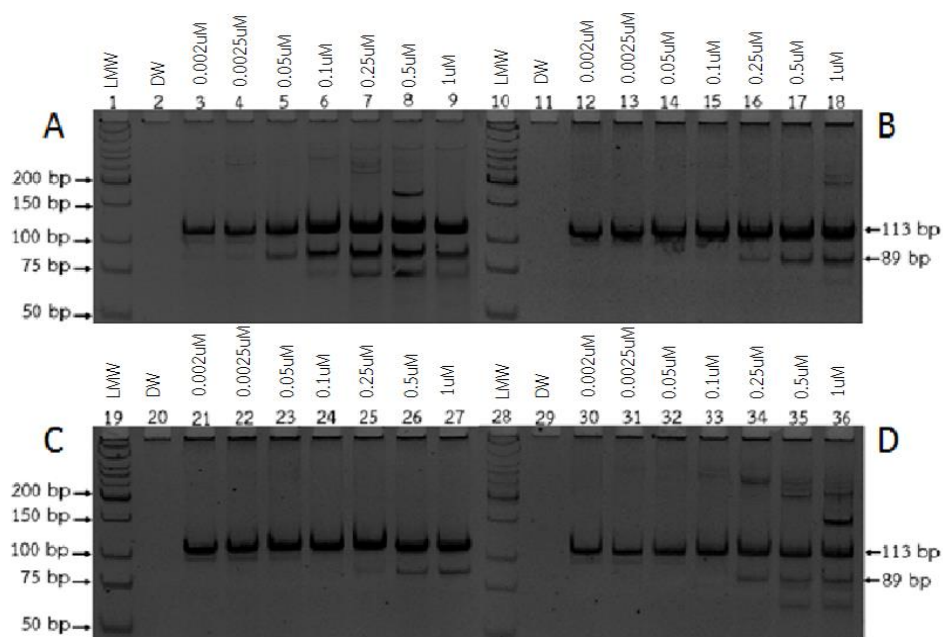
ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ค่า Tm	ความยาว (bp)	ขนาดผลผลิต พีซีอาร์ (bp)
KRAS-F	5'-GGCCTGCTGAAAATGACTGAA-3'	59.5	21	113 bp
KRAS-(113bp)-R	5'-GGATCATATTCGTCCACAAAATG-3'	59.2	23	113 bp
KRAS-nt.34-WT-F	5'-AAACTTGTGGTAGTTGGAGtG-3'	58.4	22	89 bp
KRAS-nt.35-WT-F	5'-GTGGTAGTTGGAGCcGG-3'	57.3	17	83 bp
KRAS-nt.38-WT-F	5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGGcGG-3'	68.3	23	86 bp

#### 4.4.2 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน K-ras ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34

##### 4.4.2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-Primer ในปฏิกิริยา AS-PCR

ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-primer ที่ความเข้มข้นที่ต่างกันคือ 0.002, 0.0025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ มีความเหมาะสม โดยยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ (ภาพที่ 29 A) ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และ 89 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 และ ยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิด ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 คือ G12S, G12R และ G12C (ภาพที่ 29 B, C, D) ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 ขนาด ที่

เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักเท่านั้น แต่ผลพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.05 ไมโครโมลาร์ (แถวที่ 5, 14, 23, 32) เป็นความเข้มข้นที่สามารถแยกชนิดดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ออกจากชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดคือ G12S, G12R และ G12C ได้ จึงเลือกใช้ AS-primer ที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป แสดงดังภาพที่ 29



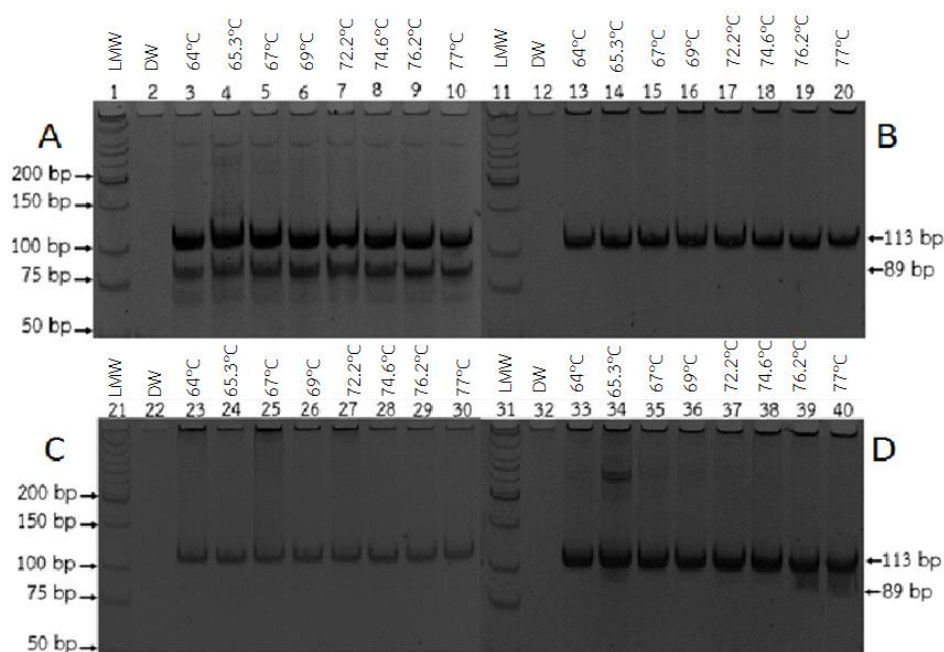
ภาพที่ 29 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-primer ด้วยการทำปฏิกิริยา AS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, แถวที่ 1, 10, 19 และ 28 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2, 11, 20 และ 29 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-9 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกชนิดไม่กลายพันธุ์, แถวที่ 12-18 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ G12S, แถวที่ 21-27 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ G12R, และแถวที่ 30-36 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ G12C โดยทั้ง 4 ชนิดดีเอ็นเอนี้ทำการทดสอบกับ AS-primer ที่มีความเข้มข้นที่ 0.002, 0.0025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

#### 4.4.2.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR

การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR เลือกใช้ AS-primer ที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ ในการทดสอบกับอุณหภูมิที่ต่างกันคือ 64, 65.3, 67, 69, 72.2, 74.6, 76.2 และ 77 องศาเซลเซียส โดยยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ (ภาพที่ 30 A) ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และ 89 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 และยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์



ทั้ง 3 ชนิด ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 คือ G12S, G12R และ G12C (ภาพที่ 30 B, C, D) ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 ขนาด ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักเท่านั้น ผลการทดลองพบว่าทุกอุณหภูมิมีความเหมาะสมสามารถแยกชนิดดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ออกจากชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดคือ G12S, G12R และ G12C ได้ แต่อย่างไรก็ตามได้ทำการทดสอบที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 พบว่าอุณหภูมิที่ 67 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสม และจุดมุ่งหมายของผู้วิจัยต้องการใช้อุณหภูมิเดียวกันในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทั้ง 3 นิวคลีโอไทด์ ผู้วิจัยจึงใช้อุณหภูมิที่ 67 องศาเซลเซียส ในการทดสอบหาจำนวนรอบที่เหมาะสมต่อไป แสดงดังภาพที่ 30

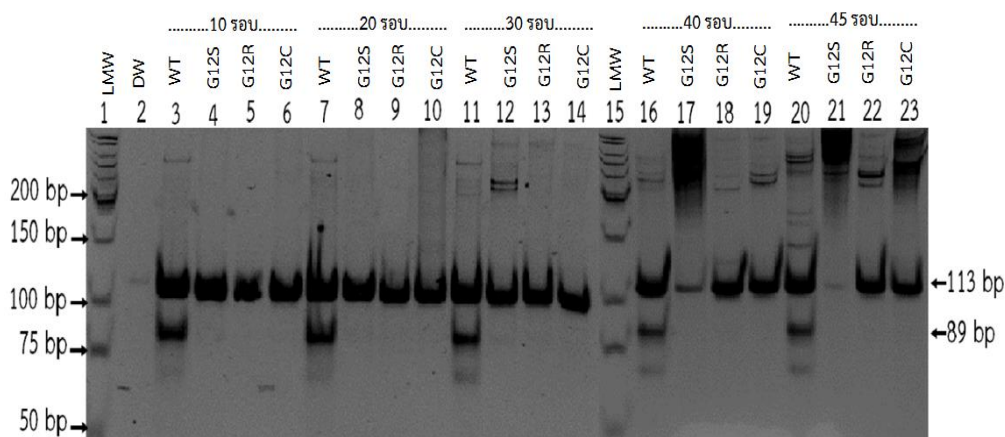


ภาพที่ 30 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, แถวที่ 1, 11, 21 และ 31 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2, 12, 21 และ 31 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกชนิดไม่กลายพันธุ์, แถวที่ 13-20 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ G12S, แถวที่ 23-30 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ G12R และแถวที่ 33-40 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ G12C โดยทั้ง 4 ชนิดดีเอ็นเอนี้ทำการทดสอบกับอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 64, 65.3, 67, 69, 72.2, 74.6, 76.2 และ 77 องศาเซลเซียส ตามลำดับ



#### 4.4.2.3 การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR

ทำการทดสอบหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR เลือกใช้ AS-primer ที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ และอุณหภูมิ Tm ที่ 67 องศาเซลเซียส ทดสอบกับจำนวนรอบที่แตกต่างกันคือ 10, 20, 30, 40 และ 45 รอบ โดยยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และ 89 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 และยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิด ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 คือ G12S, G12R และ G12C ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 ขนาด ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักเท่านั้น ผลการทดลองพบว่าที่จำนวนรอบ 10, 20 และ 30 รอบ สามารถแยกชนิดดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ออกจากชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดคือ G12S, G12R และ G12C ได้ แต่อย่างไรก็ตามได้ทำการทดสอบที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 พบว่าที่ 20 รอบมีความเหมาะสม และจุดมุ่งหมายของผู้วิจัยต้องการใช้ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเดียวกันในทั้ง 3 นิวคลีโอไทด์ ผู้วิจัยจึงใช้ที่ 20 รอบในการทดสอบปฏิกิริยา MAS-PCR แสดงดังภาพที่ 31

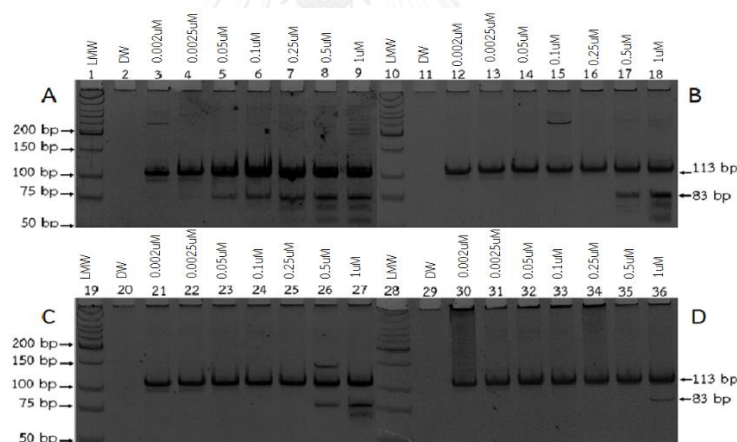


ภาพที่ 31 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, แถวที่ 1 และ 15 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-6 ทดสอบกับ 10 รอบ, แถวที่ 7-10 ทดสอบกับ 20 รอบ, แถวที่ 11-14 ทดสอบกับ 30 รอบ, แถวที่ 16-19 ทดสอบกับ 40 รอบ และแถวที่ 20-23 ทดสอบกับ 45 รอบ ของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR โดยทั้ง 5 รูปแบบจำนวนรอบ ที่แตกต่างกันนี้ ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกชนิดไม่กลายพันธุ์, กลายพันธุ์ชนิด G12S, กลายพันธุ์ชนิด G12R และกลายพันธุ์ชนิด G12C ตามลำดับ

#### 4.4.3 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35

##### 4.4.3.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-Primer ในปฏิกิริยา AS-PCR

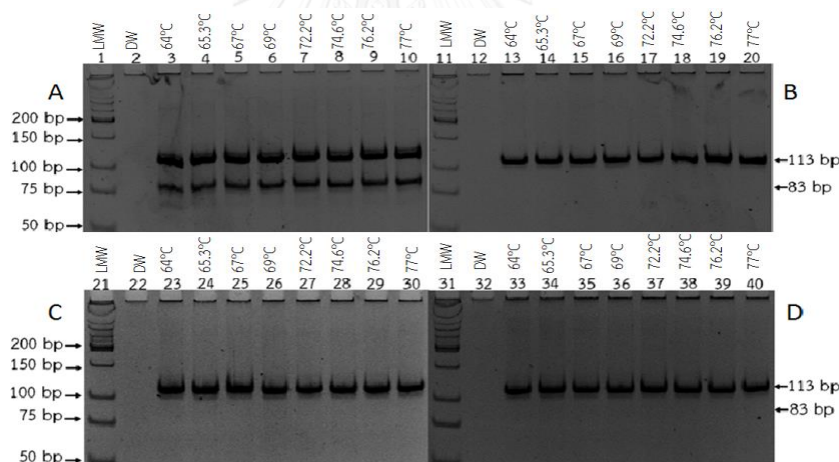
ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-primer ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0.002, 0.0025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ มีความเหมาะสม โดยยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ (ภาพที่ 32 A) ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และ 83 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 และยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิด ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 คือ G12D, G12A และ G12V (ภาพที่ 32 B, C, D) ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 ขนาด ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักเท่านั้น แต่ผลพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.05 ไมโครโมลาร์ (แถวที่ 5, 14, 23, 32) เป็นความเข้มข้นที่สามารถแยกชนิดดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ออกจากชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดคือ G12S, G12R และ G12C ได้ จึงเลือกใช้ AS-primer ที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป แสดงดังภาพที่ 32



ภาพที่ 32 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-primer ด้วยการทำปฏิกิริยา AS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35, แถวที่ 1, 10, 19 และ 28 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2, 11, 20 และ 29 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-9 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกชนิดไม่กลายพันธุ์, แถวที่ 12-18 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ชนิด G12D, แถวที่ 21-27 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ชนิด G12A, แถวที่ 30-36 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ชนิด G12V โดยทั้ง 4 ชนิดดีเอ็นเอนี้ทำการทดสอบกับ AS-primer ที่มีความเข้มข้นที่ 0.002, 0.0025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

#### 4.4.3.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR

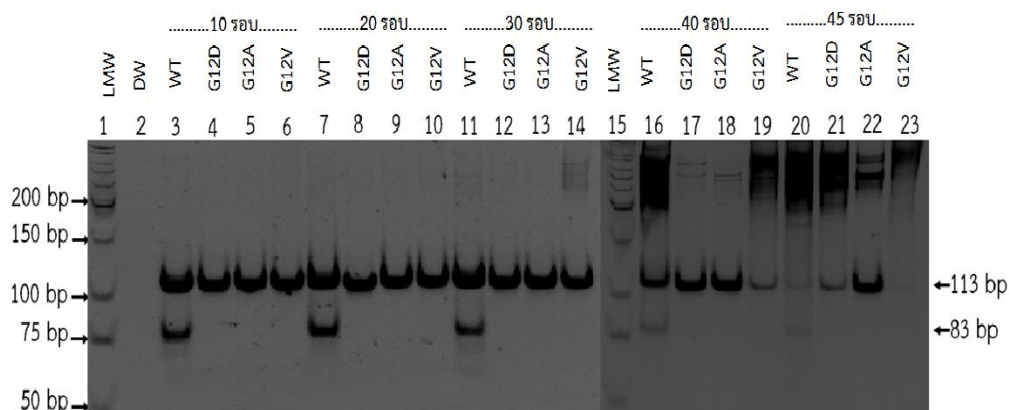
การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR เลือกใช้ AS-primer ที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ ในการทดสอบกับอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 64, 65.3, 67, 69, 72.2, 74.6, 76.2 และ 77 องศาเซลเซียส โดยยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ (ภาพที่ 33 A) ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และ 83 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 และยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิด ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 คือ G12D, G12A และ G12V (ภาพที่ 33 B, C, D) ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 ขนาด ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักเท่านั้น ผลการทดลองพบว่าทุกอุณหภูมิมีความเหมาะสมสามารถแยกชนิดดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ออกจากชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดคือ G12D, G12A และ G12V ได้ แต่อย่างไรก็ตามได้ทำการทดสอบที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 พบว่าอุณหภูมิที่ 67 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสม และจุดมุ่งหมายของผู้วิจัยต้องการใช้อุณหภูมิเดียวกันในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทั้ง 3 นิวคลีโอไทด์ ผู้วิจัยจึงใช้อุณหภูมิที่ 67 องศาเซลเซียส ในการทดสอบหาจำนวนรอบที่เหมาะสมต่อไป แสดงดังภาพที่ 33



ภาพที่ 33 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35, แถวที่ 1, 11, 21 และ 31 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2, 12, 22 และ 32 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกชนิดไม่กลายพันธุ์, แถวที่ 13-20 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ชนิด G12D, แถวที่ 23-30 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ G12A, และแถวที่ 33-40 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ G12V โดยทั้ง 4 ชนิดดีเอ็นเอนี้ทำการทดสอบกับอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 64, 65.3, 67, 69, 72.2, 74.6, 76.2 และ 77 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

#### 4.4.3.3 การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR

ทำการทดสอบหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR เลือกใช้ AS-primer ที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ และอุณหภูมิ Tm ที่ 67 องศาเซลเซียส ในทดสอบกับจำนวนรอบที่แตกต่างกันคือ 10, 20, 30, 40 และ 45 รอบ โดยยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และ 83 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 และยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ ทั้ง 3 ชนิด ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 คือ G12D, G12A และ G12V ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 ขนาด ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักเท่านั้น ผลการทดลองพบว่าจำนวนรอบ 10, 20 และ 30 รอบ มีความเหมาะสม สามารถแยกชนิดดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ออกจากชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดคือ G12D, G12A และ G12V ได้ แต่อย่างไรก็ตามได้ทำการทดสอบที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 พบว่าที่ 20 รอบมีความเหมาะสม และจุดมุ่งหมายของผู้วิจัยต้องการใช้ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเดียวกันในทั้ง 3 นิวคลีโอไทด์ ผู้วิจัยจึงใช้ที่ 20 รอบในการทดสอบปฏิกิริยา MAS-PCR แสดงดังภาพที่ 34

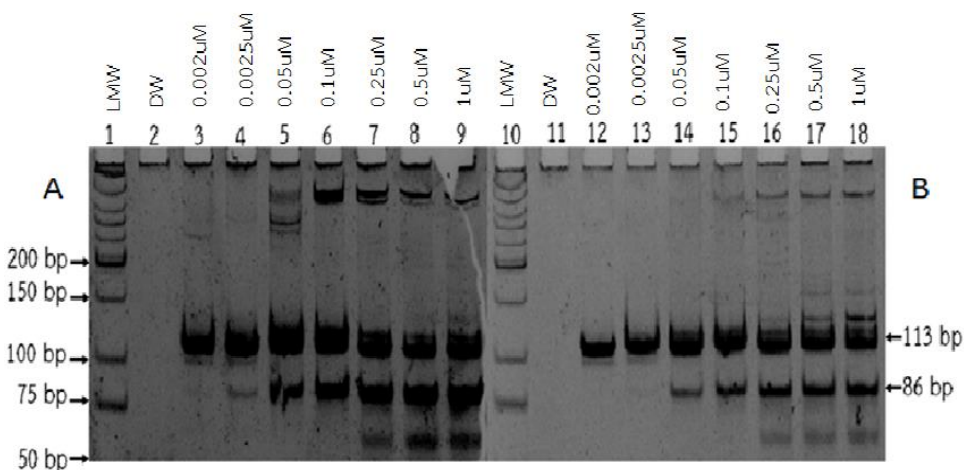


ภาพที่ 34 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35, แถวที่ 1 และ 15 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-6 ทดสอบกับ 10 รอบ, แถวที่ 7-10 ทดสอบกับ 20 รอบ, แถวที่ 11-14 ทดสอบกับ 30 รอบ, แถวที่ 16-19 ทดสอบกับ 40 รอบ และแถวที่ 20-23 ทดสอบกับ 45 รอบ ของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR โดยทั้ง 5 รูปแบบจำนวนรอบที่แตกต่างกันนี้ ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมชนิดไม่กลายพันธุ์, กลายพันธุ์ชนิด G12D, กลายพันธุ์ชนิด G12A และกลายพันธุ์ชนิด G12V ตามลำดับ

#### 4.4.4 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38

##### 4.4.4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-Primer ในปฏิกิริยา AS-PCR

ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-primer ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0.002, 0.0025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 0.0025 ไมโครโมลาร์ มีความเหมาะสม โดยยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ (ภาพที่ 35 A) ต้องพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 2 ขนาด คือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และ 86 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 และยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ G13D (ภาพที่ 35 B) ต้องพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เพียง 1 ขนาด ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักเท่านั้น แต่ผลพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.0025 ไมโครโมลาร์ (แถวที่ 4 และ 13) เป็นความเข้มข้นที่สามารถแยกชนิดดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ออกจากชนิดกลายพันธุ์ G13D ได้ จึงเลือกใช้ AS-primer ที่ความเข้มข้น 0.0025 ไมโครโมลาร์ ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป แสดงดังภาพที่ 35

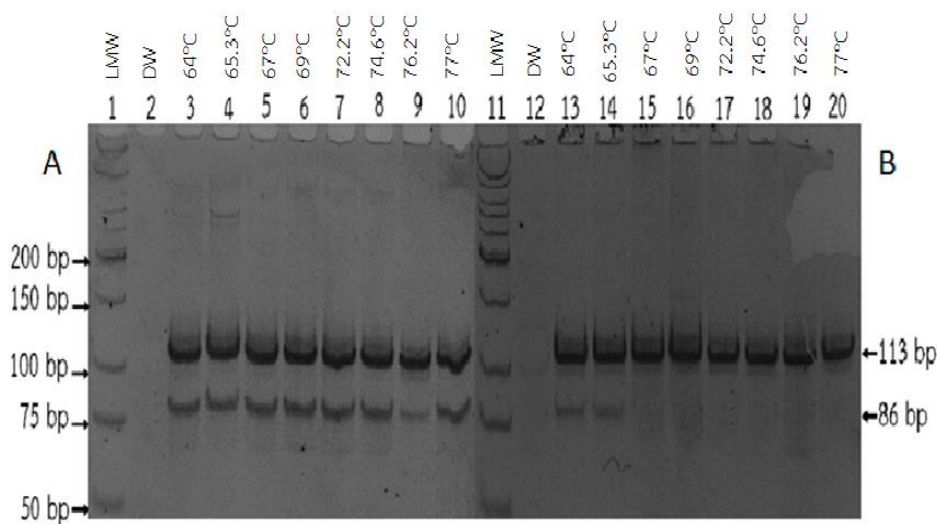


ภาพที่ 35 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-primer ด้วยการทำปฏิกิริยา AS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38, แถวที่ 1 และ 10 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 และ 11 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-9 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกชนิดไม่กลายพันธุ์, แถวที่ 12-18 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ชนิด G13D โดยทั้ง 2 ชนิดดีเอ็นเอนี้ทำการทดสอบกับ AS-primer ที่มีความเข้มข้นที่ 0.002, 0.0025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ



#### 4.4.4.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR

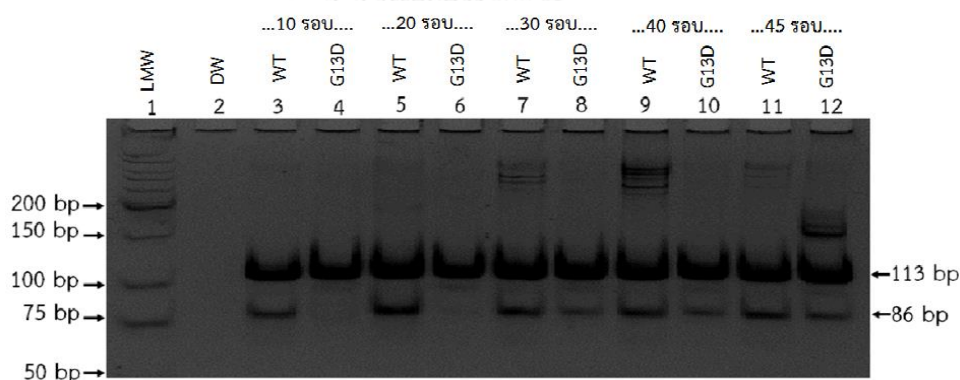
การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR เลือกใช้ AS-primer ที่ความเข้มข้น 0.0025 ไมโครโมลาร์ ในการทดสอบกับอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 64, 65.3, 67, 69, 72.2, 74.6, 76.2 และ 77 องศาเซลเซียส โดยยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ (ภาพที่ 36 A) ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และ 86 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 และยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ G13D (ภาพที่ 36 B) ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 ขนาด ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก เท่านั้น ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 67, 69, 72.2, 74.6, 76.2 และ 77 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสม สามารถแยกชนิดดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ออกจากชนิดกลายพันธุ์ G13D ได้ แต่อย่างไรก็ตามอุณหภูมิสูงอาจส่งผลกระทบต่อตัวอย่างทางคลินิกจำพวกตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ผู้วิจัยจึงเลือกใช้อุณหภูมิต่ำสุดที่ 67 องศาเซลเซียส ในการทดสอบหาจำนวนรอบของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ในปฏิกิริยา MAS-PCR ต่อไป แสดงดังภาพที่ 36



ภาพที่ 36 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38, แถวที่ 1 และ 11 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 และ 12 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกชนิดไม่กลายพันธุ์, แถวที่ 13-20 ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ชนิด G13D โดยทั้ง 2 ชนิดดีเอ็นเอนี้ทำการทดสอบกับอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 64, 65.3, 67, 69, 72.2, 74.6, 76.2 และ 77 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

#### 4.4.4.3 การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR

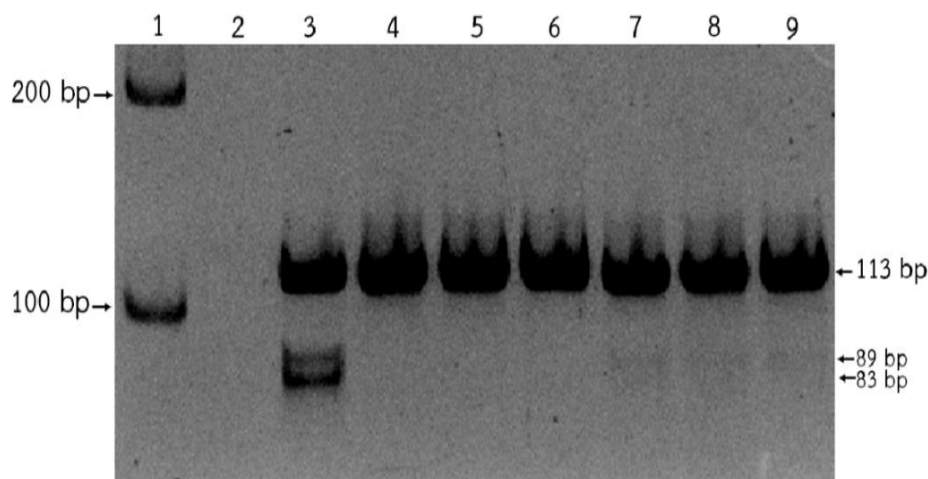
ทำการทดสอบหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR เลือกใช้ AS-primer ที่ความเข้มข้น 0.0025 ไมโครโมลาร์ และอุณหภูมิ Tm ที่ 67 องศาเซลเซียส ในทดสอบกับจำนวนรอบที่แตกต่างกันคือ 10, 20, 30, 40 และ 45 รอบ โดยยีน K-ras ชนิดไม่กลายพันธุ์ ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และ 86 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 และยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ G13D ต้องพบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 ขนาด ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักเท่านั้น ผลการทดลองพบว่า จำนวนรอบ 10 และ 20 รอบ มีความเหมาะสม สามารถแยกชนิดดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ออกจากชนิดกลายพันธุ์ G13D ได้ แต่อย่างไรก็ตามที่ 20 รอบมีความเหมาะสมกว่า 10 รอบ เพราะให้ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดใหญ่ เข้มและชัดเจนกว่า และจุดมุ่งหมายของผู้วิจัยต้องการใช้ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเดียวกันในทั้ง 3 นิวคลีโอไทด์ โดยการทดลองที่ผ่านมาที่นิวคลีโอไทด์ที่ 34 และ 35 จำนวนรอบที่เหมาะสมคือ 20 รอบ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ที่ 20 รอบในการทดสอบปฏิกิริยา MAS-PCR แสดงดังภาพที่ 37



ภาพที่ 37 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3 และ 4 ทดสอบกับ 10 รอบ, แถวที่ 5 และ 6 ทดสอบกับ 20 รอบ, แถวที่ 7 และ 8 ทดสอบกับ 30 รอบ, แถวที่ 9 และ 10 ทดสอบกับ 40 รอบ และแถวที่ 11 และ 12 ทดสอบกับ 45 รอบ ของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AS-PCR โดยทั้ง 5 รูปแบบจำนวนรอบ ที่แตกต่างกันนี้ ทดสอบกับดีเอ็นเอควบคุมบวกชนิดไม่กลายพันธุ์และดีเอ็นเอกลายพันธุ์ชนิด G13D ตามลำดับ

#### 4.4.5 การหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับยีน *K-ras* ตำแหน่ง โคนตอน 12 ต่อ 1 หลอดทดลอง

ผลการรวมปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34 และ 35 เป็น 1 หลอดการทดลอง ผลการทดสอบพบว่าไม่สามารถแยกการกลายพันธุ์ออกจากชนิดไม่กลายพันธุ์ได้ แสดงผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังภาพที่ 38

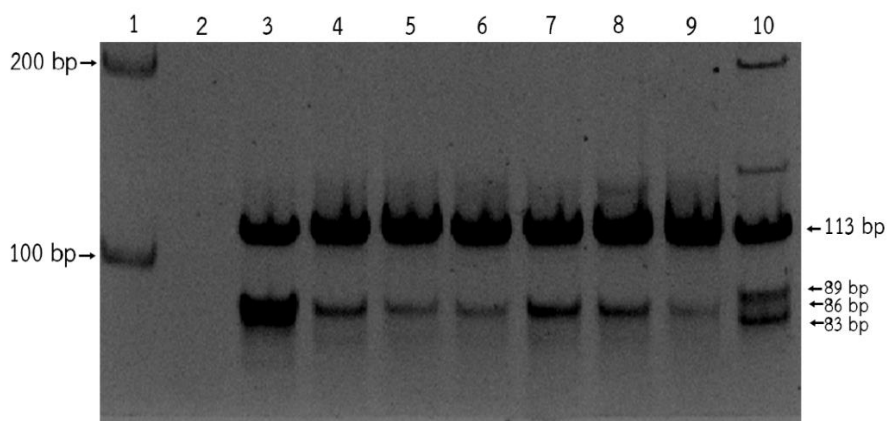


ภาพที่ 38 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ที่รวมนิวคลีโอไทด์ 34 และ 35 เป็น 1 หลอดการทดลอง, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-9 ทดสอบกับชนิดดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ และกลายพันธุ์ชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A และ G12V ตามลำดับ

#### 4.4.6 การหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับยีน *K-ras* ตำแหน่ง โคนตอน 12 และ 13 ต่อ 1 หลอดทดลอง

ผลการรวมปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 เป็น 1 หลอดการทดลอง ผลการทดสอบพบว่าไม่สามารถแยกการกลายพันธุ์ออกจากชนิดไม่กลายพันธุ์ได้ เนื่องจาก พบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด ทั้งในตัวอย่างที่กลายพันธุ์และไม่กลายพันธุ์ แสดงผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังภาพที่ 39



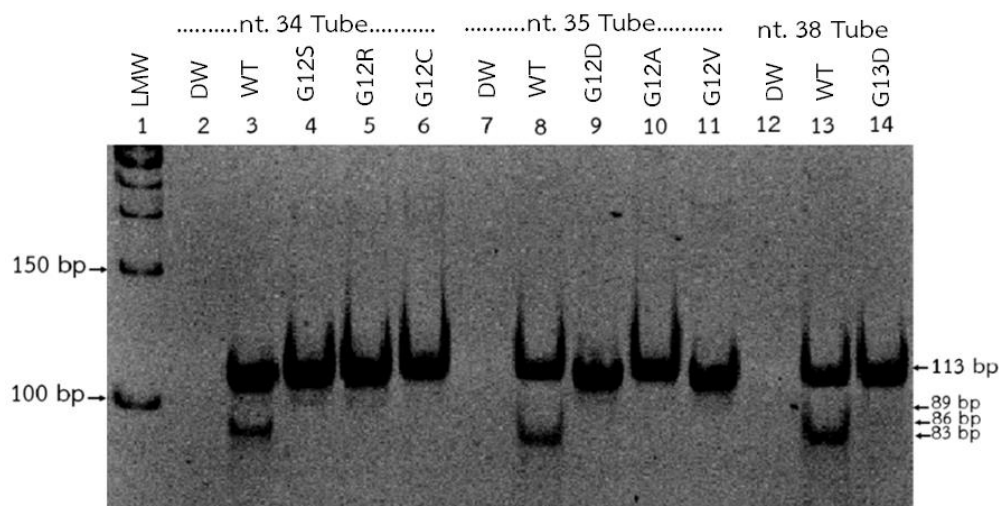


ภาพที่ 39 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ที่รวมนิวคลีโอไทด์ 34, 35 และ 38 เป็น 1 หลอดการทดลอง, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 ทดสอบกับชนิดดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ และกลายพันธุ์ชนิด ชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D ตามลำดับ

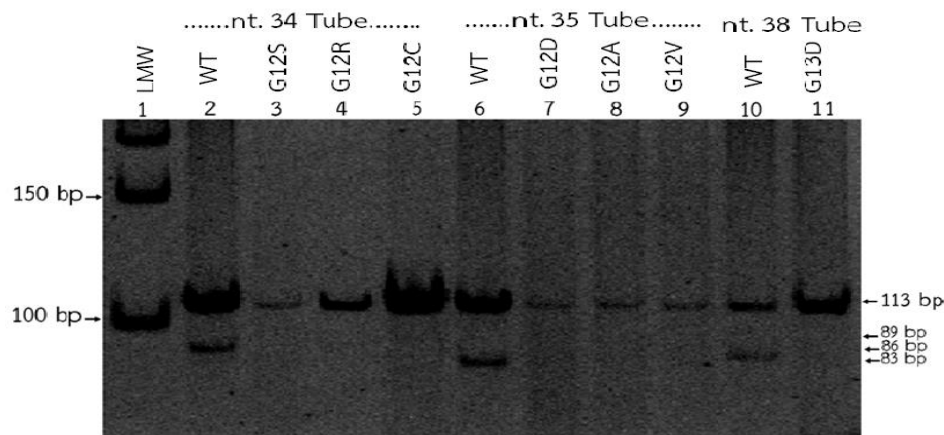
#### 4.4.7 การทดสอบปฏิกิริยา AS-PCR ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 กับ ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมบวกและตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟิน

เนื่องจากการผสม AS-Primer ที่จำเพาะต่อโคดอนที่ 12 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 และ 35 และผสม AS-Primer ที่จำเพาะต่อโคดอนที่ 12 และ 13 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 นั้น ไม่สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีการกลายพันธุ์จากดีเอ็นเอที่ไม่มีกลายพันธุ์ได้ จึงแยกการทดสอบปฏิกิริยา AS-PCR โดยใช้ AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ของแต่ละนิวคลีโอไทด์ต่อ 1 หลอดการทดลอง จากไพรเมอร์ตามข้อที่ 4.4.1 โดยทดสอบนิวคลีโอไทด์ที่ 34 ต่อ 1 หลอดการทดลอง ใช้ความเข้มข้นของ AS-primer ที่ 0.05 ไมโครโมลาร์ , อุณหภูมิ Tm ที่ 67 องศาเซลเซียส และใช้จำนวนรอบของพีซีอาร์ที่ 20 รอบ ตามการทดสอบข้อ 4.4.2 ทดสอบนิวคลีโอไทด์ที่ 35 ต่อ 1 หลอดการทดลอง ใช้ความเข้มข้นของ AS-primer ที่ 0.05 ไมโครโมลาร์, อุณหภูมิ Tm ที่ 67 องศาเซลเซียส และใช้จำนวนรอบของพีซีอาร์ที่ 20 รอบ ตามการทดสอบข้อ 4.4.3 และทดสอบนิวคลีโอไทด์ที่ 38 ต่อ 1 หลอดการทดลอง ใช้ความเข้มข้นของ AS-primer ที่ 0.0025 ไมโครโมลาร์, อุณหภูมิ Tm ที่ 67 องศาเซลเซียส และใช้จำนวนรอบของพีซีอาร์ที่ 20 รอบ ตามการทดสอบข้อ 4.4.4 ผลการทดสอบพบว่าสามารถแยกการกลายพันธุ์ในทั้ง 3 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ออกจากชนิดไม่กลายพันธุ์ได้ แต่ทั้งนี้ไม่สามารถทราบชนิดการกลายพันธุ์ ทราบเพียงแต่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ใดเท่านั้น ดังแสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังภาพที่ 40

ทำการทดสอบปฏิกิริยา AS-PCR กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างทางคลินิกคือชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน ทั้ง 8 รูปแบบชนิดยีน คือ ชนิดไม่กลายพันธุ์ และชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 7 รูปแบบ ประกอบด้วยชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D ผลการทดสอบพบว่าทุกตัวอย่างสามารถวิเคราะห์ผลการทดลองได้และให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับดีเอ็นเอควบคุมบวกที่ได้จากการโคลน แสดงผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังภาพที่ 41



ภาพที่ 40 แสดงผลของปฏิกิริยา AS-PCR สำหรับ AS-primer ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2, 7 และ 12 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ) ของปฏิกิริยา AS-PCR นิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ตามลำดับ, แถวที่ 3-6 แสดงปฏิกิริยา AS-ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 34 ทดสอบกับดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ และดีเอ็นเอกลายพันธุ์ชนิด G12S, G12R และ G12C ตามลำดับ, แถวที่ 8-11 แสดงปฏิกิริยา AS-PCR ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 35 ทดสอบกับดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ และดีเอ็นเอกลายพันธุ์ชนิด G12D, G12A และ G12V ตามลำดับ และแถวที่ 13 และ 14 แสดงปฏิกิริยา AS-PCR ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 38 ทดสอบกับดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ และดีเอ็นเอกลายพันธุ์ชนิด G13D ตามลำดับ



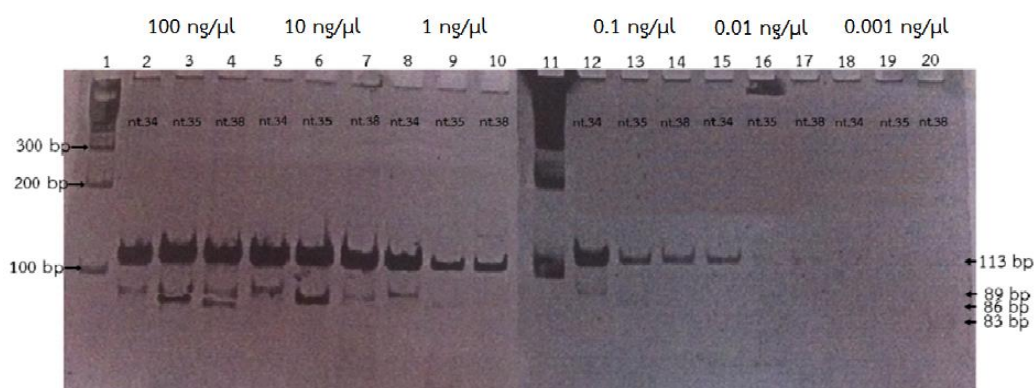
ภาพที่ 41 แสดงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ทดสอบปฏิกิริยา MAS-PCR กับตัวอย่างทางคลินิก แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2-5 แสดงปฏิกิริยา MAS-ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 34 ทดสอบกับดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ และดีเอ็นเอกลายพันธุ์ชนิด G12S, G12R และ G12C ตามลำดับ, แถวที่ 6-9 แสดงปฏิกิริยา MAS-ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 35 ทดสอบกับดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ และดีเอ็นเอกลายพันธุ์ชนิด G12D, G12A และ G12V ตามลำดับ และแถวที่ 10 และ 11 แสดงปฏิกิริยา MAS-ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 38 ทดสอบกับดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ และดีเอ็นเอกลายพันธุ์ชนิด G13D ตามลำดับ

#### 4.4.8 การทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ ของยีน *K-ras* ในปฏิกิริยา AS-PCR กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์

##### 4.4.8.1 การทดสอบความไวในการตรวจหาการกลายพันธุ์ ของยีน *K-ras*

ทำการเจือจางตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ (wild-type) ที่ได้จากการโคลนยีนในข้อ 3.3.5 ให้มีความเข้มข้นที่ 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จากนั้นตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ด้วยวิธี AS-PCR กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 โดยใช้ไพรเมอร์ KRAS-F และ KRAS-(113bp)-R สำหรับผลผลิตพีซีอาร์ Internal control และ AS-primer ชนิด KRAS-nt.34-WT-F, KRAS-nt.35-WT-F และ KRAS-nt.38-WT-F สำหรับผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ 34, 35 และ 38 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอไม่กลายพันธุ์ ต่ำสุดที่ตรวจวัดยีน *K-ras* ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ได้ คือ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร โดยพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักและขนาด 89 bp, 83 bp และ 86 bp ที่เกิดจาก AS-

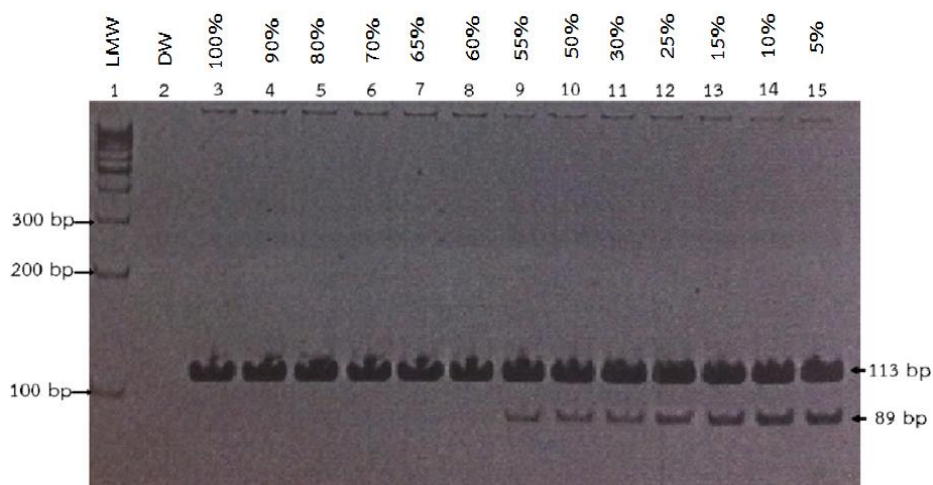
primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ขณะที่ความเข้มข้น 1 และ 0.1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ไม่ถูกต้อง เนื่องจากพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ เพียง 1 ขนาด คือ 113 bp ทำให้แปลผลผิดเป็นดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ และ ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ 0.01 และ 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ไม่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ดังแสดงในภาพที่ 42



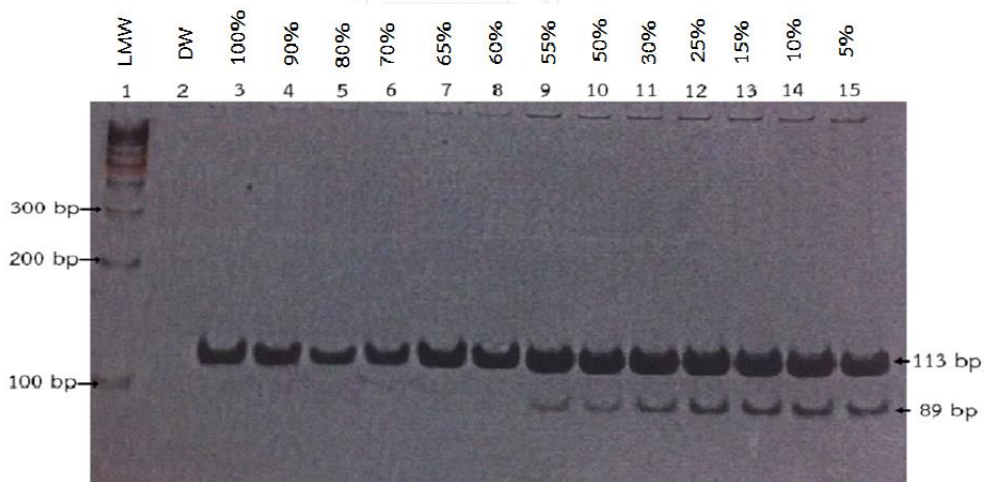
ภาพที่ 42 แสดงผลการทดสอบความไวในการตรวจหาการกลายพันธุ์ ของยีน *K-ras* ในปฏิกิริยา AS-PCR กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์, แลวที่ 1 และ 11 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp, แลวที่ 2-4 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร, แลวที่ 5-7 ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร, แลวที่ 8-10 ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร, แลวที่ 12-14 ความเข้มข้น 0.1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร, แลวที่ 15-17 ความเข้มข้น 0.01 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และแลวที่ 18-20 ความเข้มข้น 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร โดยใช้ AS-primer ที่จำเพาะกับตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ตามลำดับ

#### 4.4.8.2 ทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ ของยีน *K-ras*

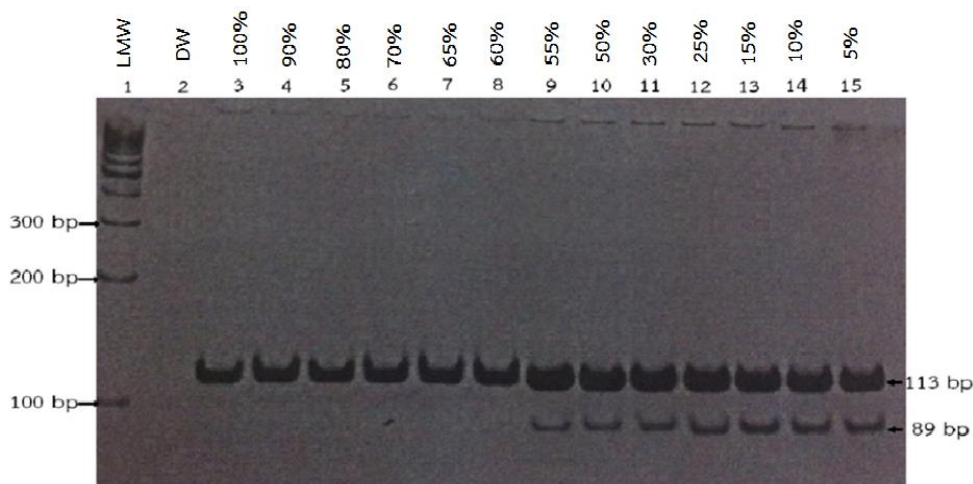
นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ และชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 7 ชนิด คือ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D ที่ได้จากการโคลนยีนในข้อ 3.3.5 มาผสมกันในสัดส่วนของดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ในความเข้มข้นรวม 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ที่อัตราส่วน 100, 90, 80, 70, 65, 60, 55, 50, 30, 25, 15, 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ด้วยวิธี AS-PCR คือที่ 55 เปอร์เซ็นต์ mutant allele สำหรับรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A และ G12V ดังแสดงในภาพที่ 43-48 ตามลำดับ และที่ 50 เปอร์เซ็นต์ mutant allele สำหรับรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิด G13D ดังแสดงในภาพที่ 49



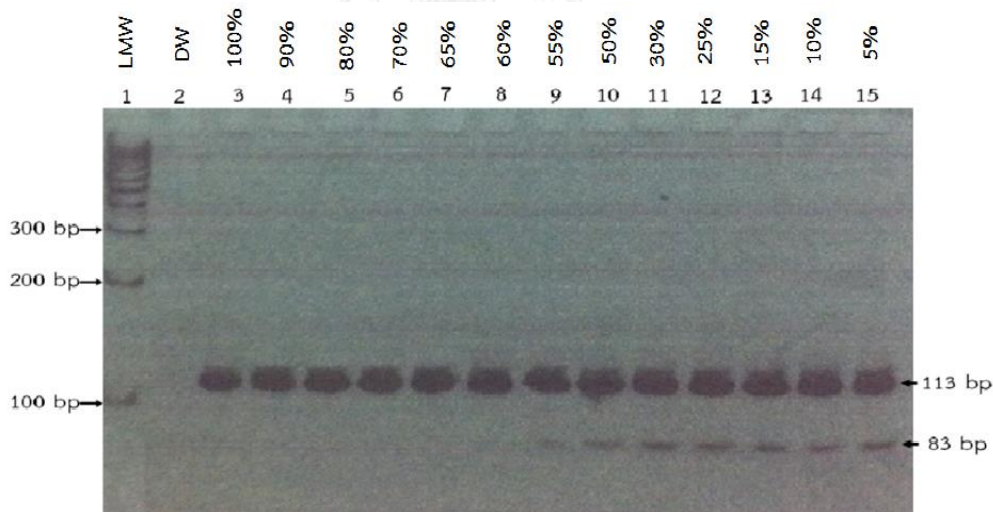
ภาพที่ 43 แสดงผลการทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G12S, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-15 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G12S ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 90, 80, 70, 65, 60, 55, 50, 30, 25, 15, 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ



ภาพที่ 44 แสดงผลการทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G12R, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-15 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G12R ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 90, 80, 70, 65, 60, 55, 50, 30, 25, 15, 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ

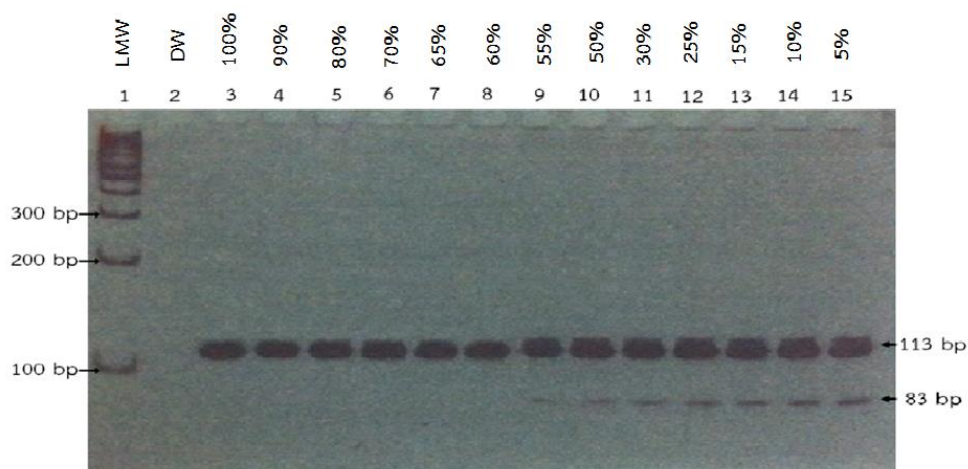


ภาพที่ 45 แสดงผลการทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G12C, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-15 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G12C ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 90, 80, 70, 65, 60, 55, 50, 30, 25, 15, 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ

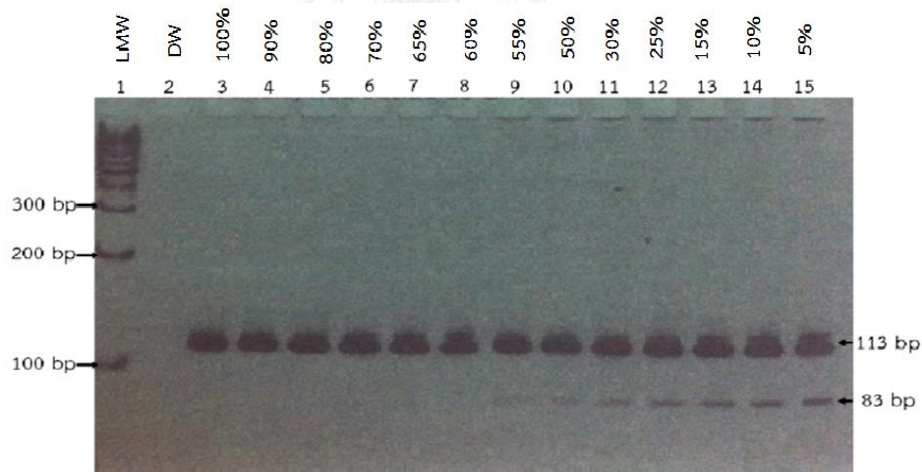


ภาพที่ 46 แสดงผลการทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G12D, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-15 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G12D ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 90, 80, 70, 65, 60, 55, 50, 30, 25, 15, 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ

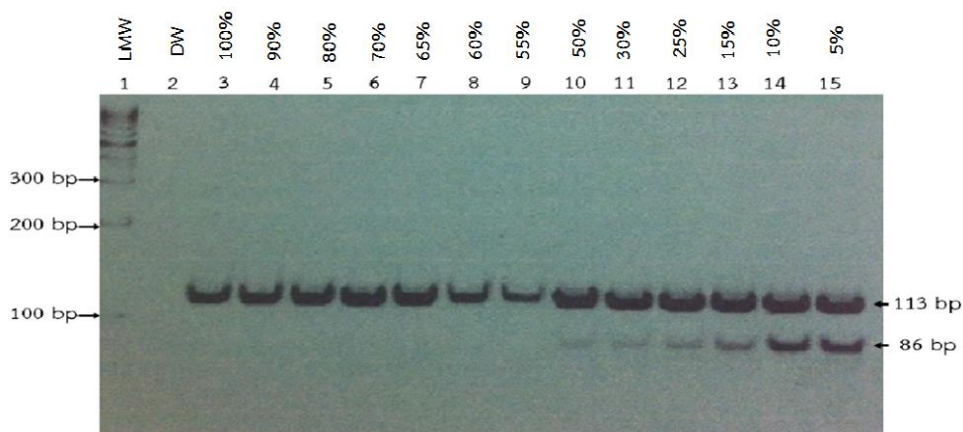




ภาพที่ 47 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G12A, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-15 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G12A ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 90, 80, 70, 65, 60, 55, 50, 30, 25, 15, 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ



ภาพที่ 48 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G12V, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-15 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G12V ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 90, 80, 70, 65, 60, 55, 50, 30, 25, 15, 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ



ภาพที่ 49 แสดงผลการทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G13D, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-15 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G13D ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 90, 80, 70, 65, 60, 55, 50, 30, 25, 15, 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ

#### 4.4.9 การทดสอบวิธี AS-PCR ที่มี AS-Primer จำเพาะกับยีน *K-ras* ที่ไม่กลายพันธุ์ ที่พัฒนาขึ้น กับตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง

จากผลการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Pyrosequencing พบเปอร์เซ็นต์ mutant allele ตั้งแต่ 11 ถึง 80 allele และจากผลทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ ของยีน *K-ras* ในข้อ 4.4.8.2 พบว่าชนิดจำกัดต่ำสุดของดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ต่อ ดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตรวจวัดได้ คือ 50-55 เปอร์เซ็นต์ mutant allele แต่ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง พบตัวอย่างสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเปอร์เซ็นต์ mutant allele ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จึงทำการจัดแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 3 กลุ่ม โดยใช้ เปอร์เซ็นต์ mutant allele เป็นเกณฑ์ ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างที่มี เปอร์เซ็นต์ mutant allele  $\leq 25$  เปอร์เซ็นต์, กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างที่มีเปอร์เซ็นต์ mutant allele อยู่ระหว่าง  $>25 < 60$  เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 3 เป็นตัวอย่างที่มี เปอร์เซ็นต์ mutant allele  $\geq 60$  เปอร์เซ็นต์



โดยทำการทดสอบเบื้องต้น 41 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างชนิดไม่กลายพันธุ์ 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างกลายพันธุ์ชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D จำนวน 3, 1, 4, 10, 6, 5 และ 9 ตัวอย่าง ตามลำดับ จากการทดสอบจากตัวอย่างทั้งหมด 41 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่าทั้ง 2 วิธีคือวิธี Pyrosequencing และ MAS-PCR ให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกัน จำนวน 13 ตัวอย่าง คิดเป็น 30.95 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 2 ตัวอย่าง ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ และ 11 ตัวอย่าง ที่พบการกลายพันธุ์ แต่ มีจำนวน 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 35.71 เปอร์เซ็นต์ ที่วิธี MAS-PCR ให้ผลการตรวจที่ไม่ถูกต้อง คือวิธี Pyrosequencing ตรวจพบการกลายพันธุ์ แต่วิธี MAS-PCR ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ และมีจำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็น 26.19 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ผลได้ ทั้งนี้เพราะตัวอย่างดังกล่าวไม่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ นอกจากนี้ยังมี 2 ตัวอย่างที่พบผลบวกปลอม (false positive) คือวิธี Pyrosequencing ตรวจพบการกลายพันธุ์ชนิด G12D และ G12V ตามลำดับ แต่วิธี MAS-PCR ทั้ง 2 ตัวอย่างดังกล่าว ตรวจพบการกลายพันธุ์ทั้ง 3 ตำแหน่งทั้งนิวคลีโอไทด์ 34, 35 และ 38 ดังสรุปในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ผลการทดสอบวิธี AS-PCR ที่มี AS-Primer จำเพาะกับยีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่พัฒนาขึ้น โดยการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 41 ตัวอย่าง

ชนิดยีน <i>K-ras</i>	ชื่อตัวอย่าง	วิธี Pyrosequencing		ผลการทดสอบด้วยวิธี MAS-PCR
		ผลการทดสอบ	ช่วงเปอร์เซ็นต์ mutant allele	
ไม่กลายพันธุ์ (wild-type)	FFPE-117	WT	-	WT
	FFPE-118	WT	-	WT
	FFPE-051	WT	-	No amplify
กลายพันธุ์ ชนิด G12S	FFPE-152	nt.34 G>A	A=60 เปอร์เซ็นต์	nt.34 mutant
	FFPE-153	nt.34 G>A	A=62 เปอร์เซ็นต์	No amplify
	FFPE-151	nt.34 G>A	A=65 เปอร์เซ็นต์	No amplify
กลายพันธุ์ ชนิด G12R	FFPE-154	nt.34 G>C	C=62 เปอร์เซ็นต์	nt.34 mutant
กลายพันธุ์ ชนิด G12C	FFPE-155	nt.34 G>T	T=21 เปอร์เซ็นต์	WT
	FFPE-158	nt.34 G>T	T=32 เปอร์เซ็นต์	WT
	FFPE-156	nt.34 G>T	T=46 เปอร์เซ็นต์	WT
	FFPE-157	nt.34 G>T	T=49 เปอร์เซ็นต์	WT

กลายพันธุ์ ชนิด G12D	FFPE-159	nt.35 G>A	A=14 เปอร์เซ็นต์	No amplify
	FFPE-160	nt.35 G>A	A=20 เปอร์เซ็นต์	WT
	FFPE-164	nt.35 G>A	A=23 เปอร์เซ็นต์	nt.34,35,38 mutant
	FFPE-170	nt.35 G>A	A=38 เปอร์เซ็นต์	WT
	FFPE-180	nt.35 G>A	A=49 เปอร์เซ็นต์	WT
	FFPE-183	nt.35 G>A	A=52 เปอร์เซ็นต์	nt.35 mutant
	FFPE-184	nt.35 G>A	A=54 เปอร์เซ็นต์	nt.35 mutant
	FFPE-185	nt.35 G>A	A=59 เปอร์เซ็นต์	nt.35 mutant
	FFPE-186	nt.35 G>A	A=62 เปอร์เซ็นต์	nt.35 mutant
	FFPE-187	nt.35 G>A	A=80 เปอร์เซ็นต์	nt.35 mutant
กลายพันธุ์ ชนิด G12A	FFPE-192	nt.35 G>C	C=13 เปอร์เซ็นต์	No amplify
	FFPE-193	nt.35 G>C	C=25 เปอร์เซ็นต์	WT
	FFPE-191	nt.35 G>C	C=32 เปอร์เซ็นต์	WT
	FFPE-194	nt.35 G>C	C=33 เปอร์เซ็นต์	No amplify
	FFPE-196	nt.35 G>C	C=45 เปอร์เซ็นต์	nt.35 mutant
	FFPE-195	nt.35 G>C	C=66 เปอร์เซ็นต์	No amplify
กลายพันธุ์ ชนิด G12V	FFPE-207	nt.35 G>T	T=11 เปอร์เซ็นต์	WT
	FFPE-199	nt.35 G>T	T=21 เปอร์เซ็นต์	WT
	FFPE-205	nt.35 G>T	T=30 เปอร์เซ็นต์	No amplify
	FFPE-206	nt.35 G>T	T=40 เปอร์เซ็นต์	nt.34,35,38 mutant
	FFPE-197	nt.35 G>T	T=64 เปอร์เซ็นต์	No amplify
กลายพันธุ์ ชนิด G13D	FFPE-213	nt.38 G>A	A=12 เปอร์เซ็นต์	WT
	FFPE-222	nt.38 G>A	A=14 เปอร์เซ็นต์	nt.38 mutant
	FFPE-227	nt.38 G>A	A=15 เปอร์เซ็นต์	WT
	FFPE-236	nt.38 G>A	A=22 เปอร์เซ็นต์	WT
	FFPE-267	nt.38 G>A	A=37 เปอร์เซ็นต์	No amplify
	FFPE-249	nt.38 G>A	A=39 เปอร์เซ็นต์	nt.38 mutant
	FFPE-252	nt.38 G>A	A=43 เปอร์เซ็นต์	nt.38 mutant
	FFPE-262	nt.38 G>A	A=53 เปอร์เซ็นต์	No amplify
	FFPE-258	nt.38 G>A	A=61 เปอร์เซ็นต์	WT

เมื่อทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของวิธี MAS-PCR เทียบกับวิธี Pyrosequencing โดยพิจารณาจาก 3 กลุ่ม เปอร์เซ็นต์ mutant allele ที่แตกต่างกัน พบว่า กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่มี เปอร์เซ็นต์ mutant allele  $\leq 25$  เปอร์เซ็นต์ นั้นวิธี MAS-PCR สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้ถูกต้องเพียง 1 ใน 9 ตัวอย่างคิดเป็น 11.11 เปอร์เซ็นต์ พบความผิดพลาดเมื่อเทียบกับ Pyrosequencing สูงถึง 8 ใน 9 ตัวอย่างคิดเป็น 88.89 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มี เปอร์เซ็นต์ mutant allele  $> 25 < 60$  เปอร์เซ็นต์ นั้น วิธี MAS-PCR สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้ถูกต้องเพียง 6 ใน 12 ตัวอย่างคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ และพบความผิดพลาดเมื่อเทียบกับ Pyrosequencing คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 3 ตัวอย่างที่มี เปอร์เซ็นต์ mutant allele  $\geq 60$  เปอร์เซ็นต์ นั้นพบว่าวิธี MAS-PCR สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้ถูกต้องสูงถึง 4 ใน 5 ตัวอย่างคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ พบความผิดพลาดเมื่อเทียบกับ Pyrosequencing เพียง 1 ใน 5 ตัวอย่างคิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นตัวอย่างที่จะสามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องนั้นควรมี เปอร์เซ็นต์ mutant allele  $\geq 60$  เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องของวิธี MAS-PCR เทียบกับวิธี Pyrosequencing โดยพิจารณาจาก 3 กลุ่ม เปอร์เซ็นต์ mutant allele ที่แตกต่างกันนั้น สรุปในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้องของวิธี MAS-PCR เทียบกับวิธี Pyrosequencing โดยพิจารณาจาก 3 กลุ่ม เปอร์เซ็นต์ mutant allele ที่แตกต่างกัน

กลุ่ม เปอร์เซ็นต์ mutant allele	ค่า เปอร์เซ็นต์ mutant allele	ผลการทดสอบ	
		วิธี Pyrosequencing	วิธี MAS-PCR
≤ เปอร์เซ็นต์ 25 mutant allele	nt.35 G>T=11 เปอร์เซ็นต์	G12V	WT
	nt.38 G>A=12 เปอร์เซ็นต์	G13D	WT
	nt.38 G>A=14 เปอร์เซ็นต์	G13D	nt.38 mutant
	nt.38 G>A=15 เปอร์เซ็นต์	G13D	WT
	nt.35 G>A=20 เปอร์เซ็นต์	G12D	WT
	nt.34 G>T=21 เปอร์เซ็นต์	G12C	WT
	nt.35 G>T=21 เปอร์เซ็นต์	G12V	WT
	nt.38 G>A=22 เปอร์เซ็นต์	G13D	WT
> 25 < 60 เปอร์เซ็นต์ mutant allele	nt.34 G>T=32 เปอร์เซ็นต์	G12C	WT
	nt.35 G>C=32 เปอร์เซ็นต์	G12A	WT
	nt.35 G>A=38 เปอร์เซ็นต์	G12D	WT
	nt.38 G>A=39 เปอร์เซ็นต์	G13D	nt.38 mutant
	nt.38 G>A=40 เปอร์เซ็นต์	G13D	nt.38 mutant
	nt.35 G>C=45 เปอร์เซ็นต์	G12A	nt.35 mutant
	nt.34 G>T=46 เปอร์เซ็นต์	G12C	WT
	nt.34 G>T=49 เปอร์เซ็นต์	G12C	WT
	nt.35 G>A=49 เปอร์เซ็นต์	G12D	WT
	nt.35 G>A=52 เปอร์เซ็นต์	G12D	nt.35 mutant
	nt.35 G>A=54 เปอร์เซ็นต์	G12D	nt.35 mutant
nt.35 G>A=59 เปอร์เซ็นต์	G12D	nt.35 mutant	
≥ 60 เปอร์เซ็นต์ mutant allele	nt.34 G>A=60 เปอร์เซ็นต์	G12S	nt.34 mutant
	nt.38 G>A=61 เปอร์เซ็นต์	G12D	WT
	nt.34 G>C=62 เปอร์เซ็นต์	G12R	nt.34 mutant
	nt.35 G>A=62 เปอร์เซ็นต์	G12D	nt.35 mutant
	nt.35 G>A=80 เปอร์เซ็นต์	G12D	nt.35 mutant

#### 4.5 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR ที่ AS-primer จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์

##### 4.5.1 ออกแบบ Allele-specific (AS-primer) primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog ; NM\_004985.4) บริเวณโคดอน 12 และ 13 นิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35, และ 38 (GGT GGC) โดยในแต่ละนิวคลีโอไทด์มีรูปแบบการกลายพันธุ์คือ

ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 (GGT) มีการกลายพันธุ์เป็น 3 รูปแบบคือ AGT (G12S), CGT (G12R) และ TGT (G12C) จึงทำการออกแบบ AS-primer แต่ละเส้น ให้ปลายด้าน 3' จำเพาะต่อยีน นิวคลีโอไทด์ชนิดกลายพันธุ์นั้น โดย AS-primer ทั้ง 3 เส้นคือ KRAS-G12S-R, KRAS-G12R-F และ KRAS-G12C-F โดย AS-primer ทั้ง 3 เส้นนี้ใช้ไพรเมอร์ร่วมกับไพรเมอร์คู่หลักคือ KRAS-F และ KRAS-(113bp)-R รายละเอียดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังสรุปในตารางที่ 20 เมื่อทำปฏิกิริยา MAS-PCR จะได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกัน 4 ขนาดคือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และขนาด 64 bp, 85 bp และ 97 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G12S, G12R และ G12C ตามลำดับ ดังภาพที่ 50

ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 (GGT) มีการกลายพันธุ์เป็นทั้งหมด 3 รูปแบบคือ GAT (G12D), GCT (G12A) และ GIT (G12V) จึงทำการออกแบบ AS-primer แต่ละเส้น ให้ปลายด้าน 3' จำเพาะต่อยีน นิวคลีโอไทด์ ชนิดกลายพันธุ์นั้น โดย AS-primer ทั้ง 3 เส้นคือ KRAS-G12D-R, KRAS-G12A-F และ KRAS-G12V-F โดย AS-primer ทั้ง 3 เส้นนี้ใช้ไพรเมอร์ร่วมกับไพรเมอร์คู่หลักคือ KRAS-F และ KRAS-(113bp)-R รายละเอียดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังสรุปในตารางที่ 20 เมื่อทำปฏิกิริยา MAS-PCR จะได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกัน 4 ขนาดคือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และขนาด 91 bp, 83 bp และ 68 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G12D, G12A และ G12V ตามลำดับ ดังภาพที่ 51

ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 (GGC) มีการกลายพันธุ์ทั้งหมด 1 รูปแบบคือ GAC (G13D) จึงทำการออกแบบ AS-primer ให้ปลายด้าน 3' จำเพาะต่อยีน นิวคลีโอไทด์ ชนิดกลายพันธุ์นั้น โดย AS-primer เส้นนี้คือ KRAS-G13D-F ใช้ไพรเมอร์ร่วมกับไพรเมอร์คู่หลักคือ KRAS-F และ KRAS-(113bp)-R รายละเอียดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังสรุปในตารางที่ 20 เมื่อทำปฏิกิริยา MAS-PCR จะได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกัน 2 ขนาดคือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักและ 89 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G13D ดังภาพที่ 52



ตารางที่ 20 รายละเอียดไพรเมอร์ ของปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ AS-primer จำเพาะต่อยีน K-ras ชนิดกลายพันธุ์ สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ค่า Tm	ความยาว (bp)	ขนาดผลผลิต พีซีอาร์ (bp)
KRAS-F	5'-GGCCTGCTGAAAATGACTGAA-3'	59.5	21	113 bp
KRAS-(113bp)-R	5'-GGATCATATTCGTCCACAAAATG-3'	59.2	23	113 bp
KRAS-G12S-R	5'-CACTCTTGCCTACGCCACI-3'	59.5	19	64 bp
KRAS-G12R-F	5'-TTGTGGTAGTTGGAGCTC-3'	53.8	18	85 bp
KRAS-G12C-F	5'-CTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTI-3'	66.7	30	97 bp
KRAS-G12D-F	5'-ATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGA-3'	62.5	25	91 bp
KRAS-G12A-F	5'-GTGGTAGTTGGAGCTGC-3'	54.9	17	83 bp
KRAS-G12V-R	5'-AAGGCACTCTTGCCTACGCCA-3'	64.2	22	68 bp
KRAS-G13D-F	5'-AACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGA-3'	66.2	26	89 bp

4.5.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์

4.5.2.1 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-Primer ที่จำเพาะกับยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35

4.5.2.1.1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35

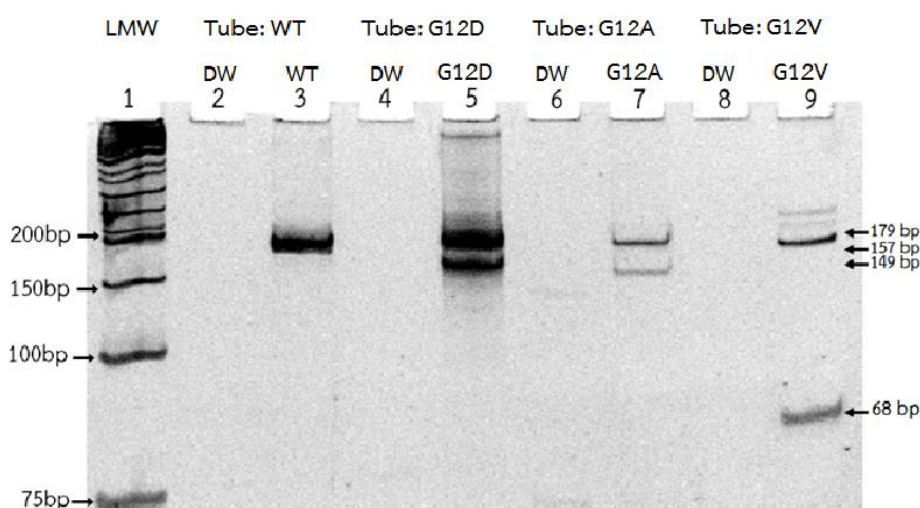
การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา AS-PCR กับตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ และชนิดกลายพันธุ์ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 ทั้ง 3 ชนิดคือ G12D, G12A และ G12V ที่ได้จากการโคลนยีนในข้อ 3.3.5 โดยการทดสอบนี้ทดสอบแต่ละชนิดการกลายพันธุ์ต่อ 1 หลอดทดลองและใช้ไพรเมอร์คู่หลักฝั่ง Reverse เป็น KRAS-(179bp)-R (5'-CAGGACCATTCTTTGATACAGAT-3')

ผลการทดสอบพบว่าส่วนประกอบของปฏิกิริยา AS-PCR มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Buffer 5 ไมโครลิตร, MgCl<sub>2</sub> (25 มิลลิโมลาร์) 5 ไมโครลิตร, dNTP (10 มิลลิโมลาร์) 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ AmpliTaq DNA Polymerase 5 U/ไมโครลิตร 0.125 ไมโครลิตร, ไพเมอร์คู่หลัก KRAS-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.25 ไมโครลิตร, KRAS-(179bp)-R (10 ไมโครโมลาร์) 0.375 ไมโครลิตร, น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 50 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอต้นแบบ 50-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และ AS-Primer (10 ไมโครโมลาร์) สำหรับชนิดการกลายพันธุ์ G12D, G12A และ G12V ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 0.75 ไมโครลิตร, 0.25 ไมโครลิตร ตามลำดับ

โดยทั้ง 3 ชนิดการกลายพันธุ์ใช้อุณหภูมิเดียวกันในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที, 10 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 63 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, 10 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 69 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, 30 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที



ซึ่งส่วนประกอบของปฏิกิริยา AS-PCR ดังกล่าวมีความเหมาะสม สามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีการกลายพันธุ์และชนิดไม่กลายพันธุ์ได้อย่างถูกต้อง พร้อมทั้งยังสามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้ด้วย โดยดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์พบผลผลิตพีซีอาร์ 1 ขนาดคือ 179 bp และดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ G12D พบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาดคือ 179 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และ 157 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อชนิดกลายพันธุ์ G12D ดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ G12A พบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาดคือ 179 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และ 149 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อชนิดกลายพันธุ์ G12A และดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ G12V พบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาดคือ 179 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก และ 68 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อชนิดกลายพันธุ์ G12V ดังภาพที่ 53



ภาพที่ 53 แสดงผลของปฏิกิริยา AS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ยีน *K-ras* ชนิด G12D, G12A และ G12V, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ) ของปฏิกิริยาพีซีอาร์จากไพรเมอร์คู่หลัก, แถวที่ 3 แสดงผลของดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์, แถวที่ 4 แสดง negative control ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ AS-primer จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ G12D, แถวที่ 5 แสดงผลของดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ G12D, แถวที่ 6 แสดง negative control ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ AS-primer จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ G12A, แถวที่ 7 แสดงผลของดีเอ็นเอชนิด G12A, แถวที่ 8 แสดง negative control ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ AS-primer จำเพาะกับดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ G12V แถวที่ 9 แสดงผลของดีเอ็นเอชนิด G12V ตามลำดับ

#### 4.5.2.1.2 สภาวะอุณหภูมิของ ปฏิกริยา AS-PCR ที่เหมาะสม ใน ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35

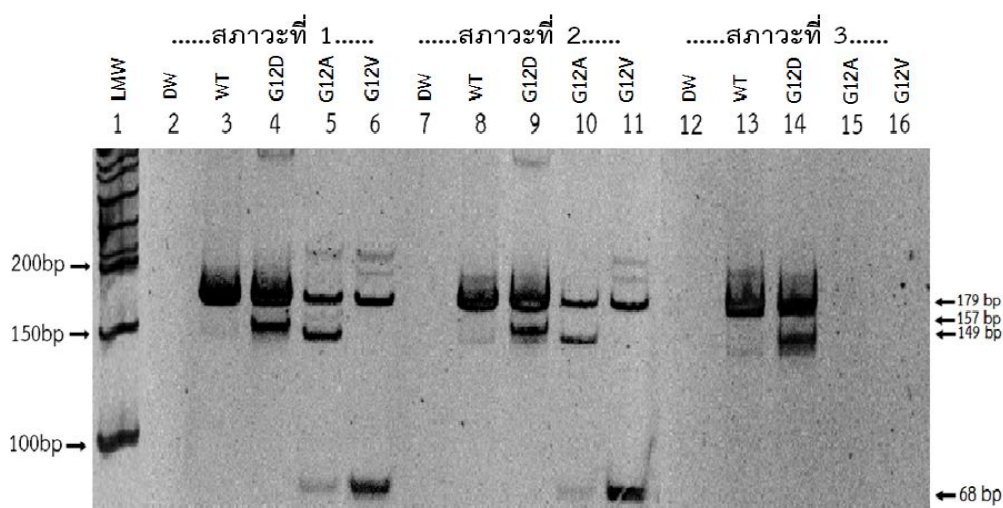
ทำการทดสอบหาขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของปฏิกริยา AS-PCR ที่เหมาะสม กับตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ และชนิดกลายพันธุ์ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 ทั้ง 3 ชนิดคือ G12D, G12A และ G12V ที่ได้จากการโคลนยีนในข้อ 3.3.5 โดยเปรียบเทียบ 3 สภาวะที่มีความแตกต่างกันของอุณหภูมิ  $T_m$  คือ

สภาวะที่ 1 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที, ตามด้วย 10 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 60 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, ตามด้วย 20 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 64 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

สภาวะที่ 2 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที, ตามด้วย 10 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 59 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, ตามด้วย 20 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 64 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

สภาวะที่ 3 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที, ตามด้วย 10 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 62 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, ตามด้วย 20 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 69 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ผลการทดสอบพบว่าสภาวะที่ 1 เป็นสภาวะที่มีแนวโน้มเหมาะสมที่สุด สามารถแยกชนิดดีเอ็นเอที่มีการกลายพันธุ์และชนิดไม่กลายพันธุ์ออกจากกันได้ พร้อมทั้งยังสามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้ด้วย โดยดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์พบผลผลิตพีซีอาร์ 1 ขนาดคือ 179 bp, G12D พบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาดคือ 179 bp และ 157 bp, G12A พบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาดคือ 179 bp ที่ และ 149 bp แต่พบขนาด 68 bp ซึ่งเป็นผลผลิตของ G12V ในปริมาณน้อยร่วมด้วย, G12V พบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาดคือ 179 bp และ 68 bp แต่อย่างไรก็ตามสภาวะที่ 1 มีแนวโน้มที่ดีกว่าสภาวะที่ 2 และ 3 จึงเลือกใช้สภาวะนี้ในการทดสอบและพัฒนาปฏิกริยา MAS-PCR อื่นๆต่อไป ส่วนสภาวะที่ 2 ให้ขนาดผลพีซีอาร์จาก AS-primer ที่มีขนาดเล็กกว่า และสภาวะที่ 3 มีอุณหภูมิ  $T_m$  ที่สูงเกินไป ตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอกลายพันธุ์ชนิด G12A และ G12V ไม่สามารถ amplify ได้ แสดงผลดังภาพที่ 54

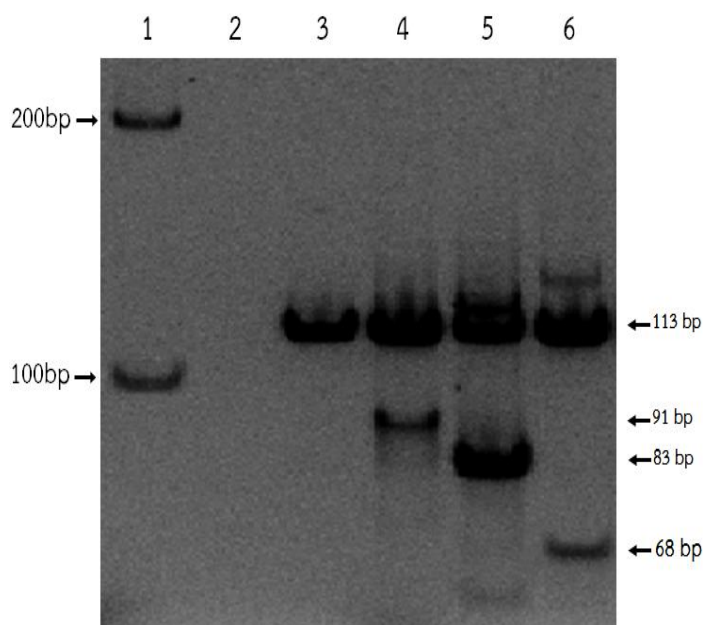


ภาพที่ 54 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ชนิด G12D, G12A และ G12V, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2-6 สภาวะที่ 1, แถวที่ 7-11 สภาวะที่ 2, แถวที่ 12-16 สภาวะที่ 3, โดยเรียงลำดับดังนี้ negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), ดีเอ็นเอควบคุมบวกชนิดไม่กลายพันธุ์, ดีเอ็นเอควบคุมบวกกลายพันธุ์ชนิด G12D, G12A และ G12V ตามลำดับ

#### 4.5.2.1.3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 35 ในหลอดเดียว

การทดสอบปฏิกิริยา MAS-PCR กับตัวอย่าง พลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ และชนิดกลายพันธุ์ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 ทั้ง 3 ชนิดคือ G12D, G12A และ G12V เป็น 1 หลอดการทดลอง โดยทดสอบหาส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสม ผลการทดสอบพบว่าส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสม มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Buffer 5 ไมโครลิตร,  $MgCl_2$  (25 มิลลิโมลาร์) 5 ไมโครลิตร, dNTP (10 มิลลิโมลาร์) 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ AmpliTaq DNA Polymerase 5 U/ไมโครลิตร 0.125 ไมโครลิตร, ไพเมอร์คู่หลัก KRAS-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.25 ไมโครลิตร, KRAS-(113bp)-R (10 ไมโครโมลาร์) 0.375 ไมโครลิตร, AS-primer ทั้ง 3 เส้นคือ KRAS-G12D-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.125 ไมโครลิตร, KRAS-G12A-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.125 ไมโครลิตร, KRAS-G12V-R (5 ไมโครโมลาร์) 0.2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบ 50-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 50 ไมโครลิตร โดยสามารถแยกการกลายพันธุ์ออกจากชนิดไม่กลายพันธุ์ได้ พร้อมทั้งยังสามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้ด้วย คือดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 ขนาดคือ 113 bp แต่ดีเอ็นเอชนิด

กลายพันธุ์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกัน 4 ขนาดคือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักและขนาด 91 bp, 83 bp และ 68 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G12D, G12A และ G12V ตามลำดับ ดังภาพที่ 55



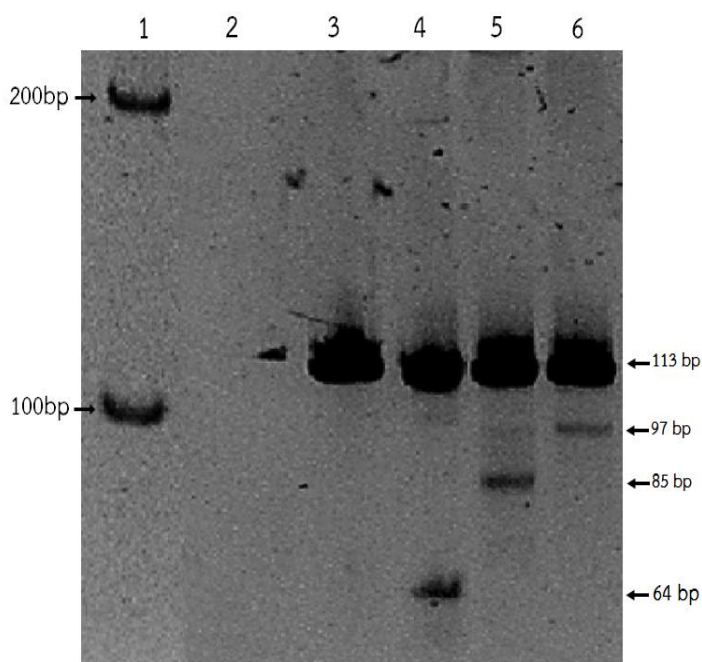
ภาพที่ 55 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ยีน *K-ras* ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 35 ชนิด G12D, G12A และ G12V, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-6 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมบวก ชนิดไม่กลายพันธุ์, การกลายพันธุ์ชนิด G12D, G12A และ G12V ตามลำดับ

CHULALONGKORN UNIVERSITY

#### 4.5.2.2 ทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-Primer ที่จำเพาะกับยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34

การทดสอบปฏิกิริยา MAS-PCR กับตัวอย่าง พลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ และชนิดกลายพันธุ์ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 ทั้ง 3 ชนิดคือ G12S, G12R และ G12C ที่ได้จากการโคลนยีนในข้อ 3.3.5 เป็น 1 หลอดการทดลอง โดยทดสอบหาส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสม ผลการทดสอบพบว่าส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสม มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Buffer 5 ไมโครลิตร, MgCl<sub>2</sub> (25 มิลลิโมลาร์) 5 ไมโครลิตร, dNTP (10 มิลลิโมลาร์) 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ AmpliTaq DNA Polymerase 5 U/ไมโครลิตร 0.125 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์คู่หลัก KRAS-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.25 ไมโครลิตร, KRAS-(113bp)-R (10 ไมโครโมลาร์) 0.375 ไมโครลิตร, AS-primer ทั้ง 3 เส้นคือ KRAS-G12S-R (10 ไมโครโมลาร์) 0.25

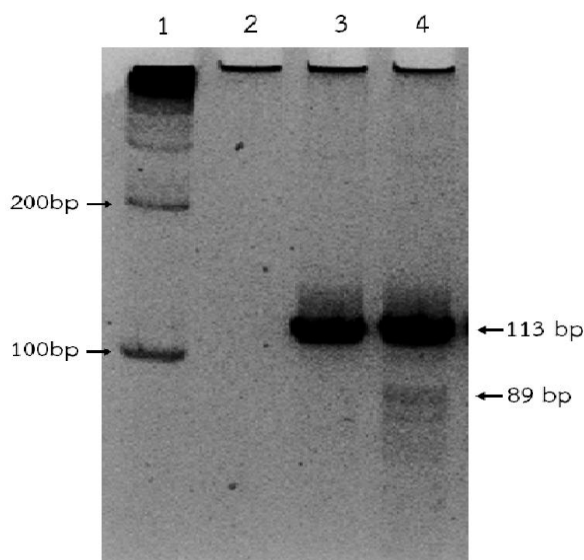
ไมโครลิตร, KRAS-G12R-F (10 ไมโครโมลาร์) 1.25 ไมโครลิตร, KRAS-G12C-F (1 ไมโครโมลาร์) 0.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบ 50-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 50 ไมโครลิตร โดยสามารถแยกการกลายพันธุ์ออกจากชนิดไม่กลายพันธุ์ได้ พร้อมทั้งยังสามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้ด้วย คือดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 ขนาดคือ 113 bp แต่ดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกัน 4 ขนาดคือ 113 bp ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลักและขนาด 64 bp, 85 bp และ 97 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G12S, G12R และ G12C ตามลำดับ ดังภาพที่ 56



ภาพที่ 56 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ยีน *K-ras* ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34 ชนิด G12S, G12R และ G12C, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-6 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมบวก ชนิดไม่กลายพันธุ์, การกลายพันธุ์ชนิด G12S, G12R และ G12C ตามลำดับ

#### 4.5.2.3 ทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-Primer ที่จำเพาะกับยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38

การทดสอบปฏิกิริยา MAS-PCR กับตัวอย่าง พลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ และชนิดกลายพันธุ์ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 ชนิด G13D ที่ได้จากการโคลนยีนในข้อ 3.3.5 เป็น 1 หลอดการทดลอง โดยทดสอบหาส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสม ผลการทดสอบพบว่าส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสม มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Buffer 2.5 ไมโครลิตร, MgCl<sub>2</sub> (25 มิลลิโมลาร์) 2.5 ไมโครลิตร, dNTP (10 มิลลิโมลาร์) 0.5 ไมโครลิตร, เอนไซม์ AmpliTaq DNA Polymerase 5 U/ไมโครลิตร 0.125 ไมโครลิตร, ไพเมอร์คู่หลัก KRAS-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.25 ไมโครลิตร, KRAS-(113bp)-R (10 ไมโครโมลาร์) 0.25 ไมโครลิตร, AS-primer คือ KRAS-G13D-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.125 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบ 50-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 25 ไมโครลิตร โดยสามารถแยกการกลายพันธุ์ออกจากชนิดไม่กลายพันธุ์ได้ พร้อมทั้งยังสามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้ด้วย คือดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์เพียง 1 ขนาดคือ 113 bp แต่ดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ G13D จะพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาดคือ 113 bp ที่เกิดจากไพเมอร์คู่หลักและขนาด 89 bp ที่เกิดจาก AS-primer ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G13D ดังภาพที่ 57



ภาพที่ 57 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ยีน *K-ras* ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 38 ชนิด G13D, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3, 4 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมบวกชนิดไม่กลายพันธุ์ และการกลายพันธุ์ชนิด G13D ตามลำดับ

#### 4.5.2.4 การหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับยีน *K-ras* ตำแหน่ง โคดอน 12 และ 13 ตำแหน่งที่ 34, 35 และ 38

การทดสอบปฏิกิริยา MAS-PCR ของ AS-primer ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอต้นแบบชนิด กลายพันธุ์ ของนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ทั้งหมด 7 รูปแบบ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D โดยทดสอบความเข้มข้นไพรเมอร์ที่เหมาะสม จำนวน 3 สถานะ

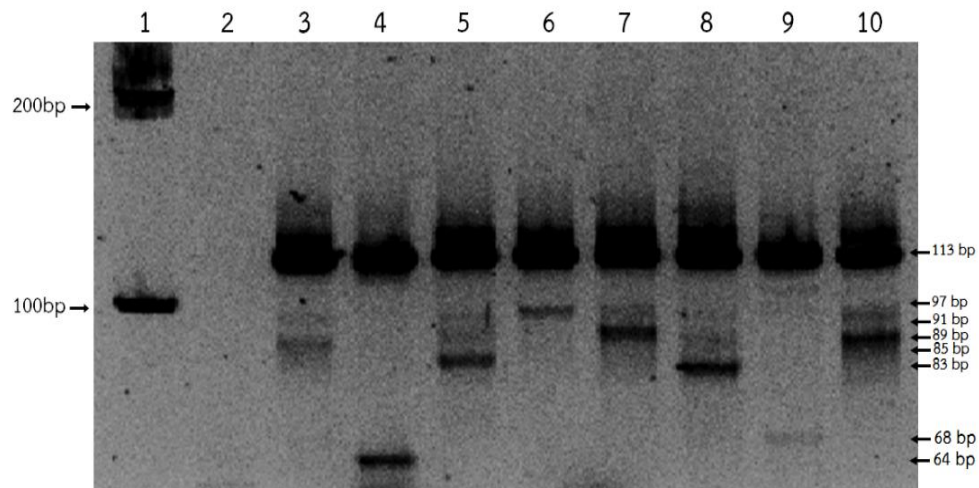
สถานะที่ 1 ใช้ AS-primer ทั้ง 7 เส้นคือ KRAS-G12S-R (10 ไมโครโมลาร์) 0.25 ไมโครลิตร, KRAS-G12R-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.125 ไมโครลิตร, KRAS-G12C-F (1 ไมโครโมลาร์) 0.5 ไมโครลิตร, KRAS-G12D-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.125 ไมโครลิตร, KRAS-G12A-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.125 ไมโครลิตร, KRAS-G12V-R (1 ไมโครโมลาร์) 0.75 ไมโครลิตร และ KRAS-G13D-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.125 ไมโครลิตร

สถานะที่ 2 ใช้ AS-primer ทั้ง 7 เส้นคือ KRAS-G12S-R (10 ไมโครโมลาร์) 0.25 ไมโครลิตร, KRAS-G12R-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.125 ไมโครลิตร, KRAS-G12C-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.1 ไมโครลิตร, KRAS-G12D-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.1 ไมโครลิตร, KRAS-G12A-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.1 ไมโครลิตร, KRAS-G12V-R (10 ไมโครโมลาร์) 0.25 ไมโครลิตร และ KRAS-G13D-F (5 ไมโครโมลาร์) 0.125 ไมโครลิตร

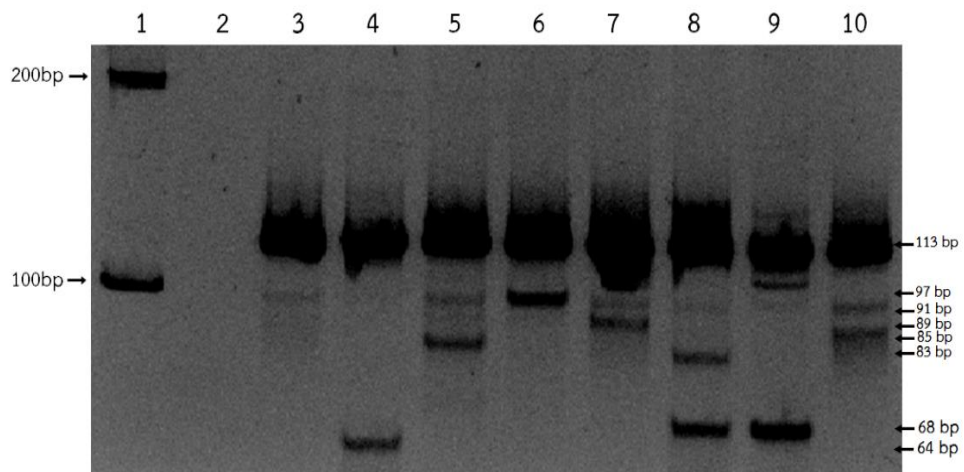
สถานะที่ 3 ใช้ AS-primer ทั้ง 7 เส้นคือ KRAS-G12S-R (10 ไมโครโมลาร์) 0.25 ไมโครลิตร, KRAS-G12R-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.125 ไมโครลิตร, KRAS-G12C-F (1 ไมโครโมลาร์) 0.5 ไมโครลิตร, KRAS-G12D-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.1 ไมโครลิตร, KRAS-G12A-F (10 ไมโครโมลาร์) 0.1 ไมโครลิตร, KRAS-G12V-R (10 ไมโครโมลาร์) 0.1 ไมโครลิตร และ KRAS-G13D-F (5 ไมโครโมลาร์) 0.125 ไมโครลิตร

ผลการทดสอบพบว่าส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ สถานะที่ 3 เหมาะสมที่สุด ทั้งนี้สามารถแยกการกลายพันธุ์ออกจากชนิดไม่กลายพันธุ์ได้ พร้อมทั้งยังสามารถระบุ 7 ชนิดการกลายพันธุ์ ประกอบด้วยชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D ได้ด้วย กล่าวคือ ดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่พบการกลายพันธุ์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์ 1 ขนาด คือ 113 bp ส่วนดีเอ็นเอต้นแบบที่มีการกลายพันธุ์แต่ละชนิด จะพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือ 113 bp และ 97 bp, 91 bp, 89 bp, 85 bp, 83 bp, 68 bp และ 64 bp สำหรับดีเอ็นเอต้นแบบชนิดการกลายพันธุ์ G12C, G12D, G13D, G12R, G12A, G12V และ G12S ตามลำดับ ดังแสดงภาพที่ 60 สำหรับส่วนประกอบปฏิกิริยา MAS-PCR สถานะที่ 1-2 ไม่สามารถแยกการกลายพันธุ์ออกจากชนิดไม่กลายพันธุ์ได้ และยังไม่สามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ผลแสดงดังภาพที่ 58-59



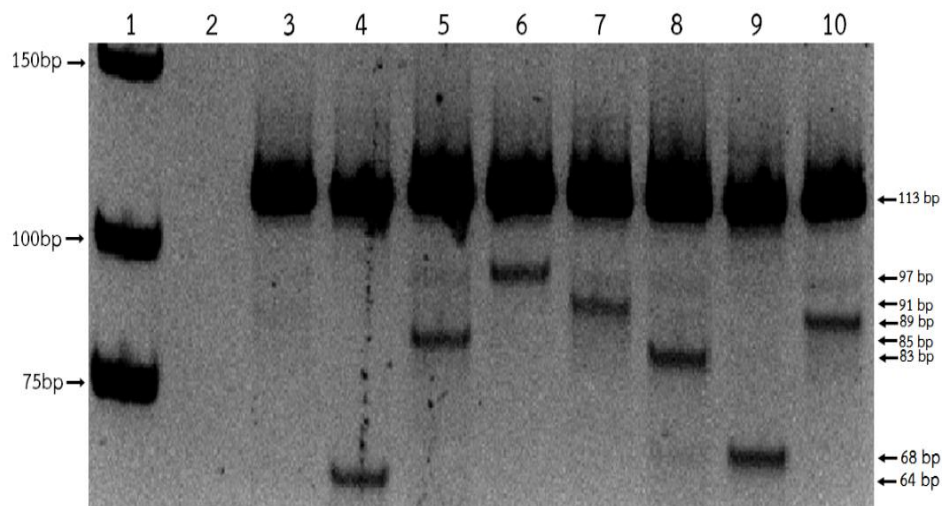


ภาพที่ 58 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D สภาวะที่ 1, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมบวกชนิดไม่กลายพันธุ์, การกลายพันธุ์ชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D ตามลำดับ



ภาพที่ 59 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D สภาวะที่ 2, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมบวกชนิดไม่กลายพันธุ์, การกลายพันธุ์ชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D ตามลำดับ

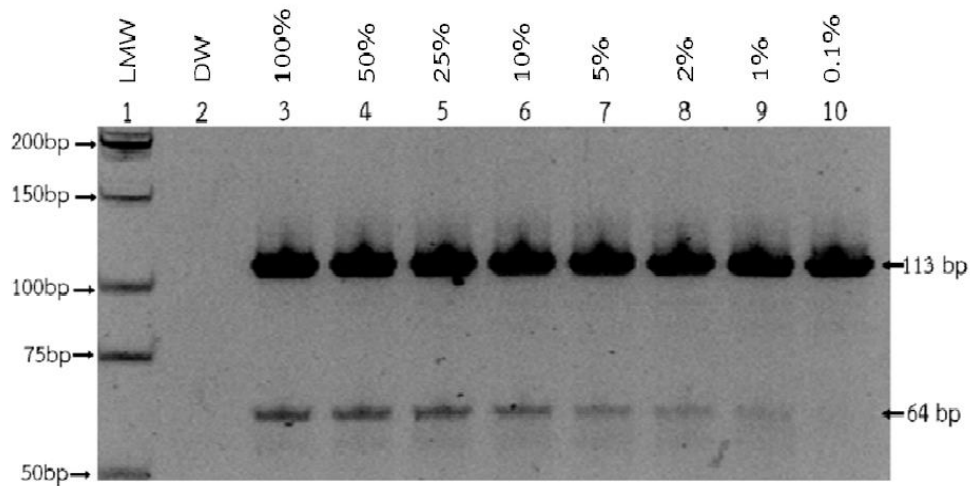




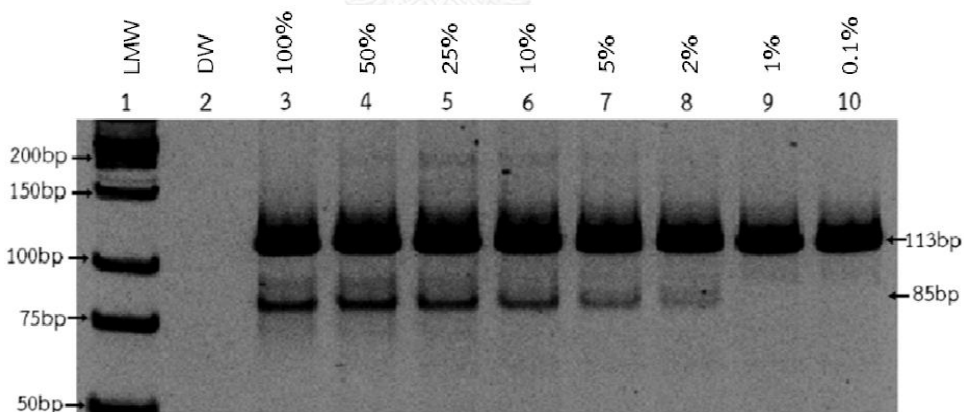
ภาพที่ 60 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D สภาวะที่ 3, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมบวกชนิดไม่กลายพันธุ์, การกลายพันธุ์ชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D ตามลำดับ

#### 4.5.3 ทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์ mutant alleles) ของยีน *K-ras* ในปฏิกิริยา MAS-PCR กับชุด AS-primer ที่จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์

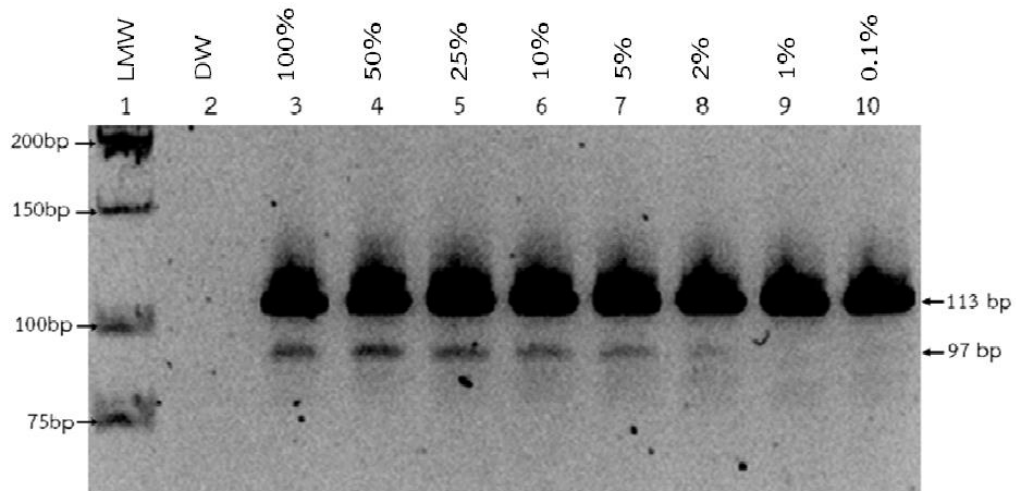
นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* ชนิดไม่กลายพันธุ์ และชนิดการกลายพันธุ์ทั้ง 7 ชนิดคือ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D ที่ได้จากการโคลนยีนในข้อ 3.3.5 มาผสมกันในสัดส่วนของดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ในความเข้มข้นรวม 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ที่อัตราส่วน 100, 50, 25, 10, 5, 2, 1 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ด้วยวิธี MAS-PCR คือที่ 1 เปอร์เซ็นต์ mutant allele สำหรับรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิด G12S แสดงดังภาพที่ 61 และ 2 เปอร์เซ็นต์ mutant allele สำหรับรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิด G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D แสดงดังภาพที่ 62-67 ตามลำดับ



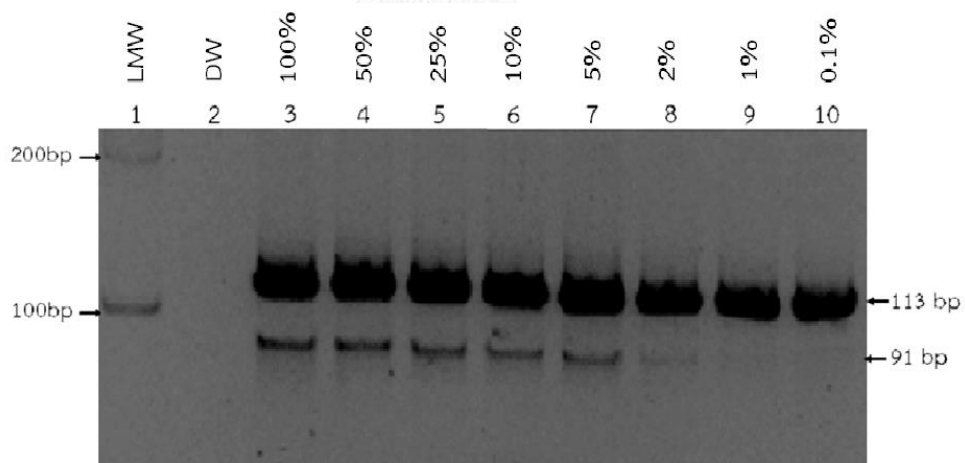
ภาพที่ 61 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G12S, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA Ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G12S ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 50, 25, 10, 5, 2, 1 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ



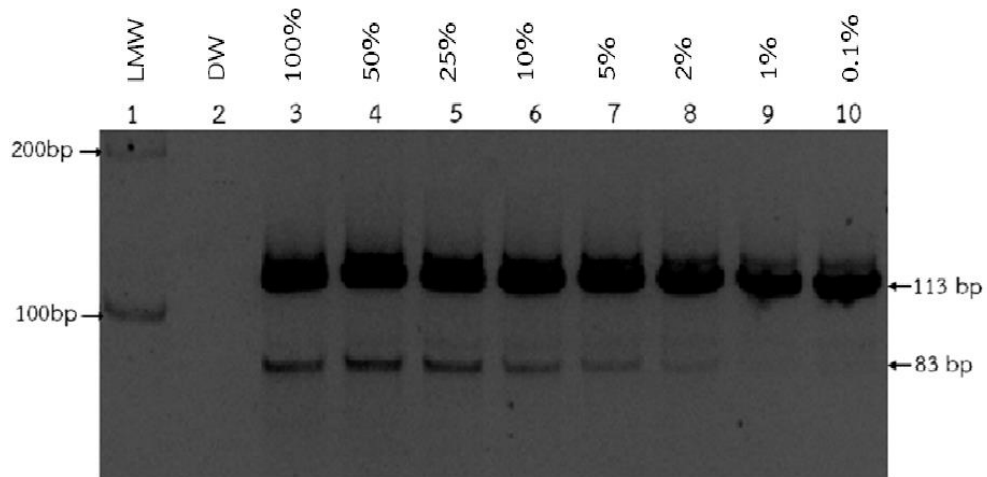
ภาพที่ 62 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G12R, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA Ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G12R ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 50, 25, 10, 5, 2, 1 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ



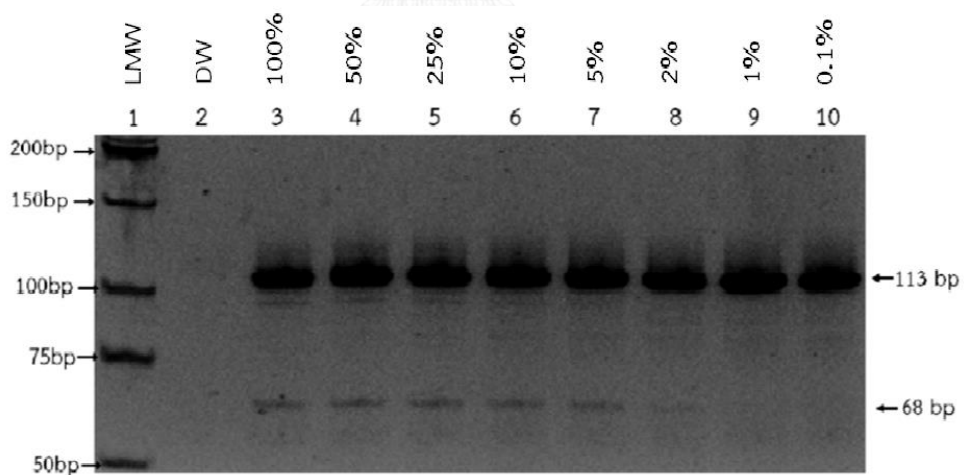
ภาพที่ 63 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G12C, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA Ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G12C ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 50, 25, 10, 5, 2, 1 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ



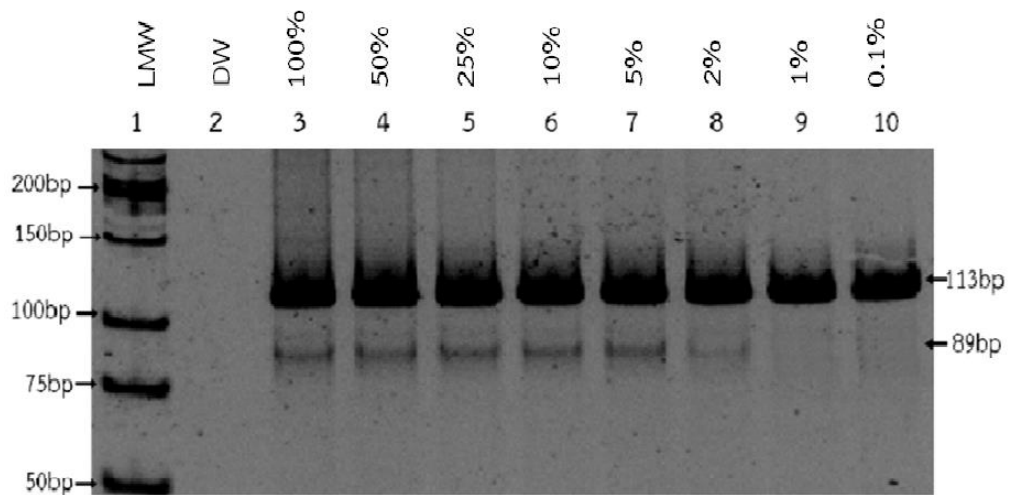
ภาพที่ 64 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G12D, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA Ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G12D ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 50, 25, 10, 5, 2, 1 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ



ภาพที่ 65 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G12A, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA Ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G12A ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 50, 25, 10, 5, 2, 1 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ



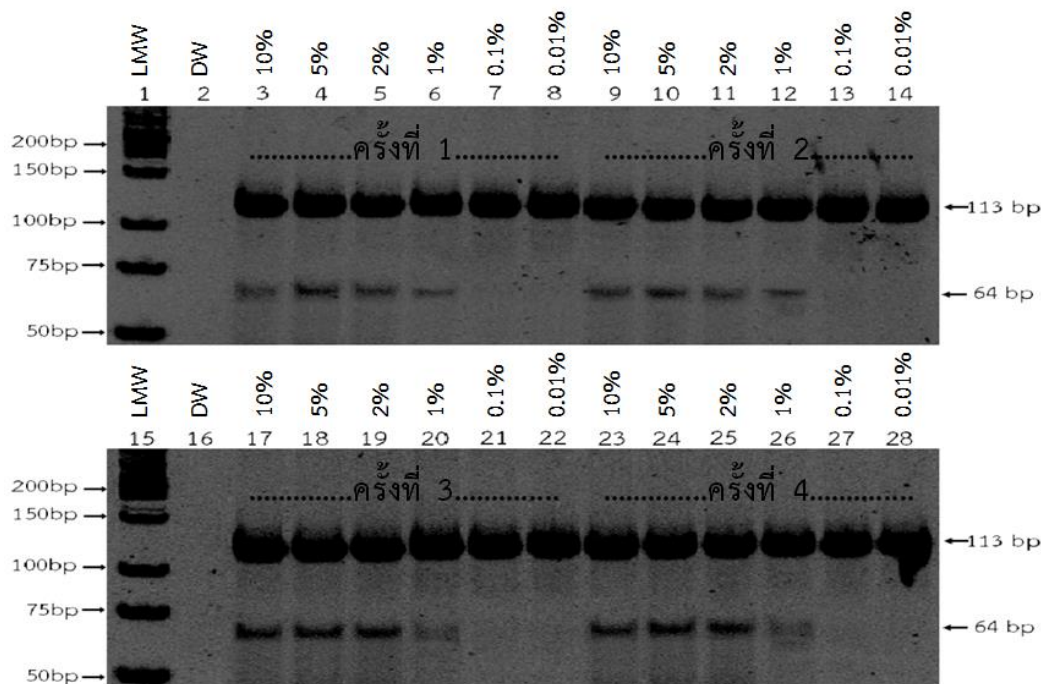
ภาพที่ 66 แสดงผลการทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G12V, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G12V ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 50, 25, 10, 5, 2, 1 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ



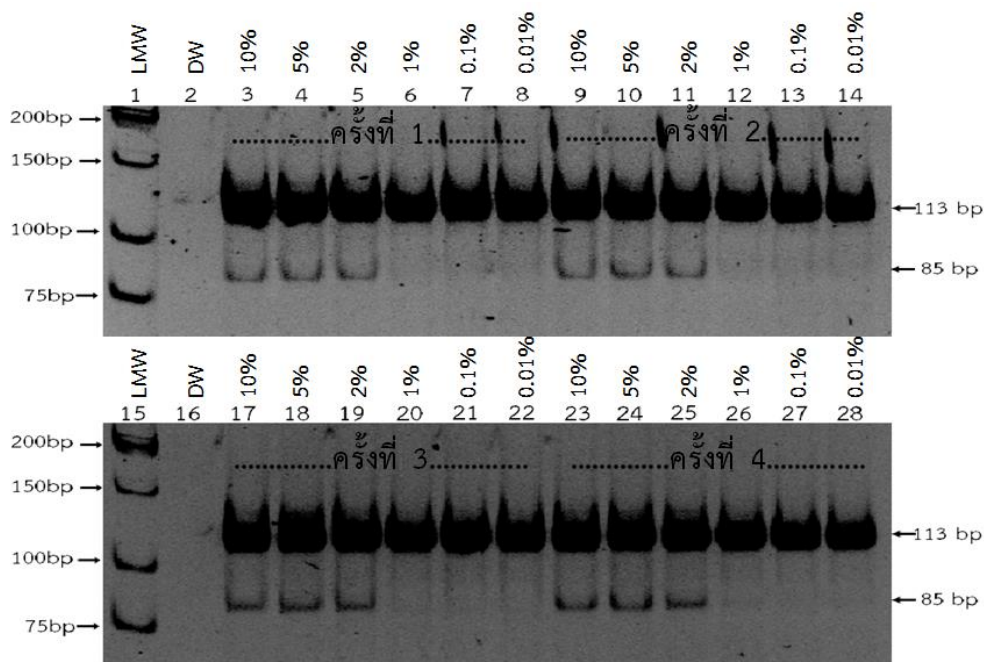
ภาพที่ 67 แสดงผลการทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* กับพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน *K-ras* ที่กลายพันธุ์ชนิด G13D, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA Ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 แสดงความเจือจางของดีเอ็นเอการกลายพันธุ์ชนิด G13D ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 100, 50, 25, 10, 5, 2, 1 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ

#### 4.5.4 การทดสอบความแม่นยำ และทำการทดสอบซ้ำ (Precision and reproducibility) ของวิธี MAS-PCR สำหรับชุด AS-primer ที่มีความจำเพาะกับยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์

การทดสอบความแม่นยำของของวิธี MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน *K-ras* จะเลือกอัตราส่วนดีเอ็นเอชนิดการกลายพันธุ์แต่ละชนิด (G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และชนิด G13D) ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ในช่วงขีดจำกัดต่ำสุดที่ 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles มาทำการทดสอบ 4 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่าการทดสอบทั้ง 4 ซ้ำ ให้ผลการทดสอบที่ตรงกัน ในทุกอัตราส่วนของดีเอ็นเอ คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ด้วยวิธี MAS-PCR ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ mutant allele สำหรับรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิด G12S แสดงดังภาพที่ 68 และ 2 เปอร์เซ็นต์ mutant allele สำหรับรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิด G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D แสดงดังภาพที่ 69-74 ตามลำดับ

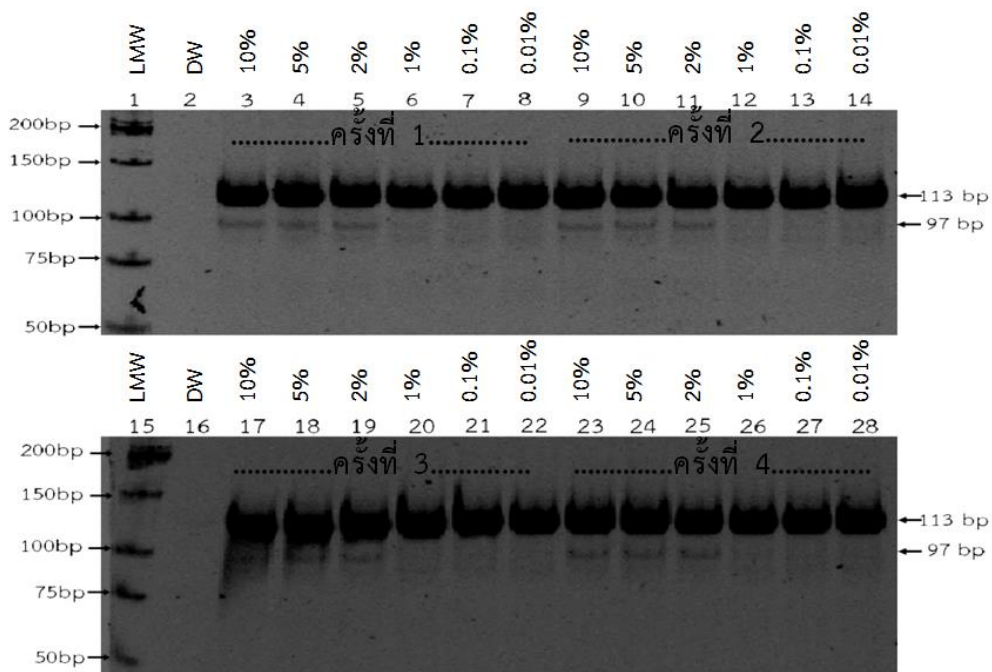


ภาพที่ 68 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ชนิด G12S, แถวที่ 1 และ 15 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 และ 16 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-8 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12S ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 1, แถวที่ 9-14 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12S ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 2, แถวที่ 17-22 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12S ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 3, แถวที่ 23-28 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12S ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 4



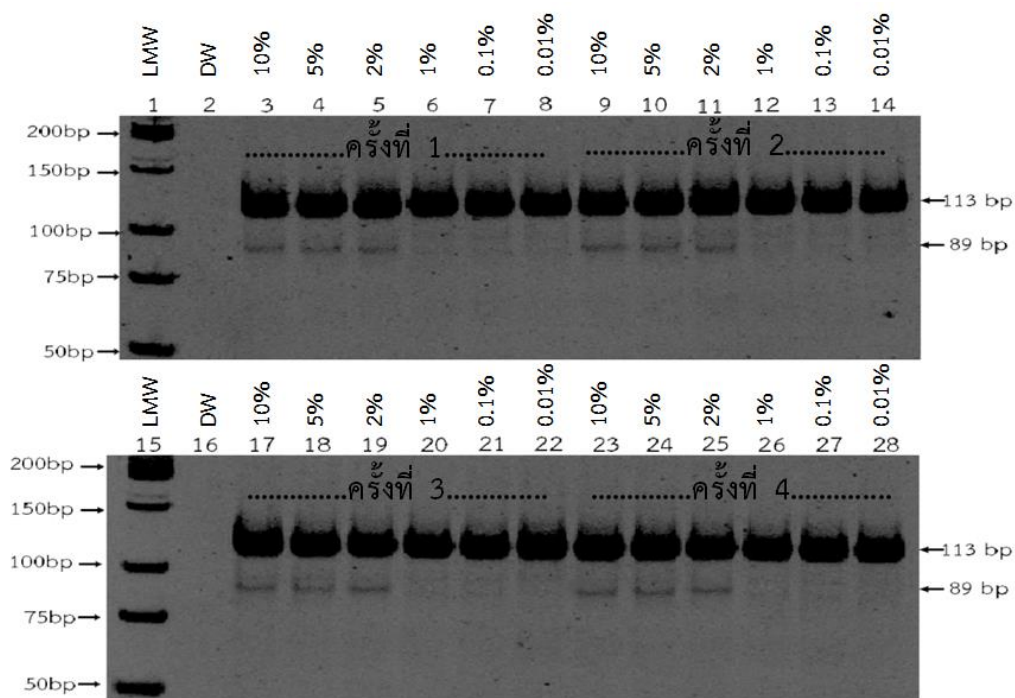
ภาพที่ 69 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ชนิด G12R , แถวที่ 1 และ 15 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA Ladder, แถวที่ 2 และ 16 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-8 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12R ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 1, แถวที่ 9-14 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12R ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 2, แถวที่ 17-22 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12R ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 3, แถวที่ 23-28 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12R ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 4



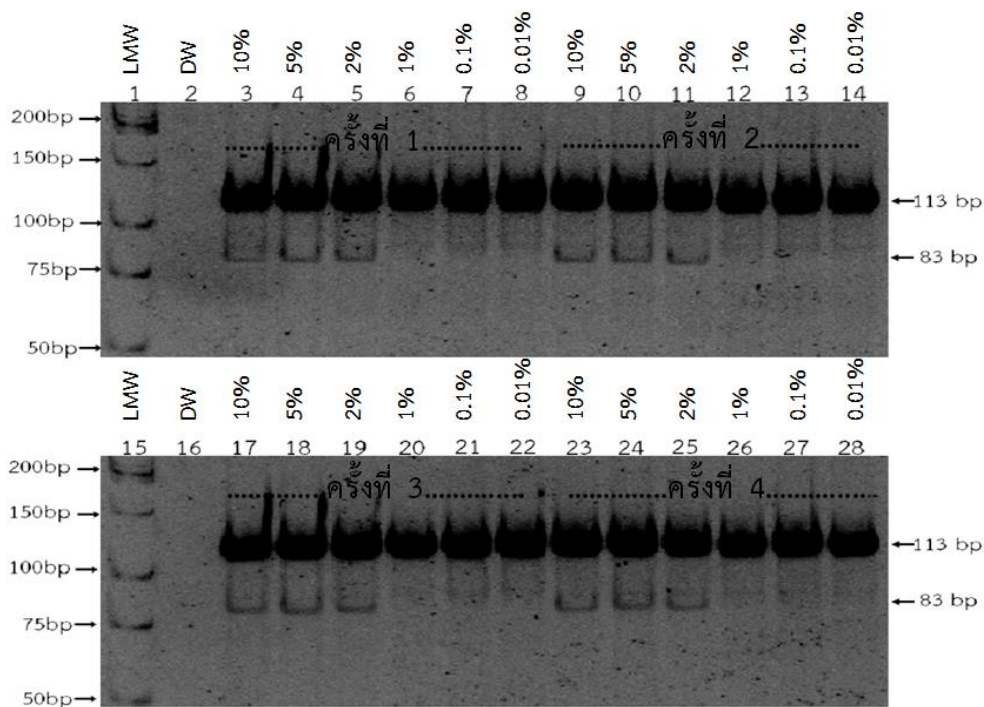


ภาพที่ 70 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ชนิด G12C, แถวที่ 1 และ 15 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA Ladder, แถวที่ 2 และ 16 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-8 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12C ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 1, แถวที่ 9-14 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12C ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 2, แถวที่ 17-22 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12C ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 3, แถวที่ 23-28 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12C ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 4

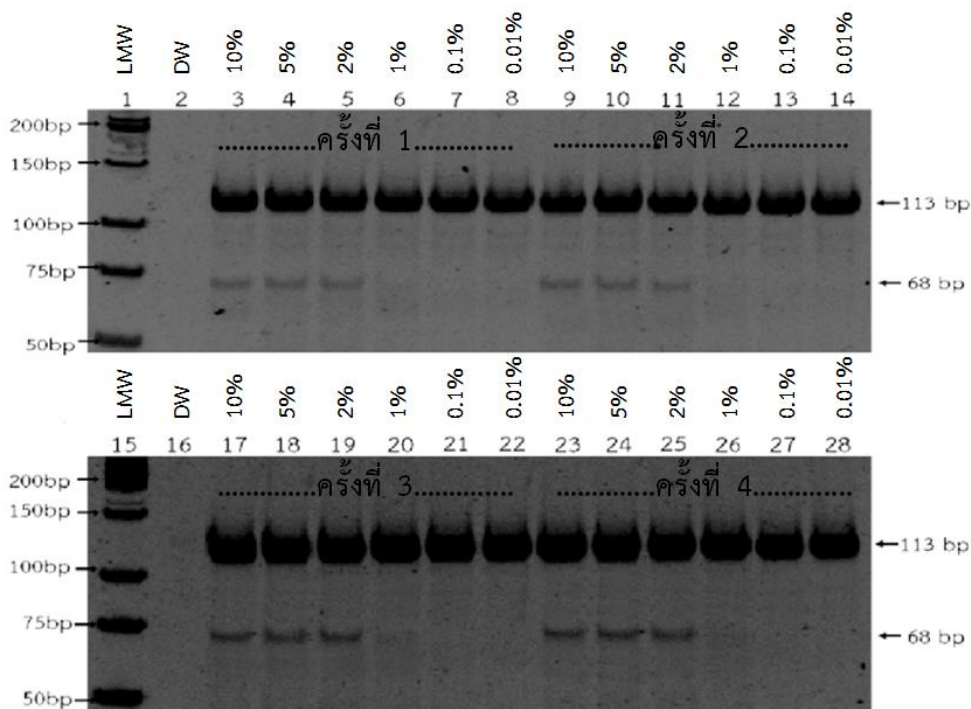




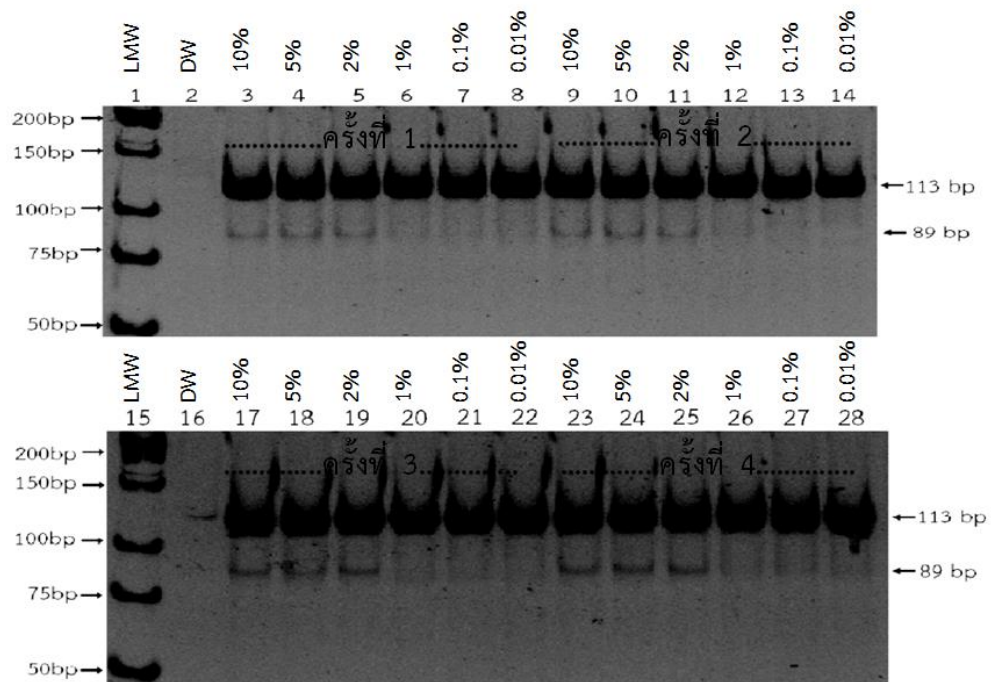
ภาพที่ 71 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ชนิด G12D, แถวที่ 1 และ 15 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA Ladder, แถวที่ 2 และ 16 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-8 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน K-ras กลายพันธุ์ชนิด G12D ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 1, แถวที่ 9-14 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน K-ras กลายพันธุ์ชนิด G12D ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 2, แถวที่ 17-22 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน K-ras กลายพันธุ์ชนิด G12D ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 3, แถวที่ 23-28 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน K-ras กลายพันธุ์ชนิด G12D ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 4



ภาพที่ 72 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ชนิด G12A, แถวที่ 1 และ 15 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA Ladder, แถวที่ 2 และ 16 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-8 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12A ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 1, แถวที่ 9-14 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12A ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 2, แถวที่ 17-22 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12A ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 3, แถวที่ 23-28 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12A ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 4



ภาพที่ 73 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ชนิด G12V, แถวที่ 1 และ 15 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA Ladder, แถวที่ 2 และ 16 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-8 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12V ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 1, แถวที่ 9-14 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12V ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 2, แถวที่ 17-22 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12V ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 3, แถวที่ 23-28 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G12V ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 4

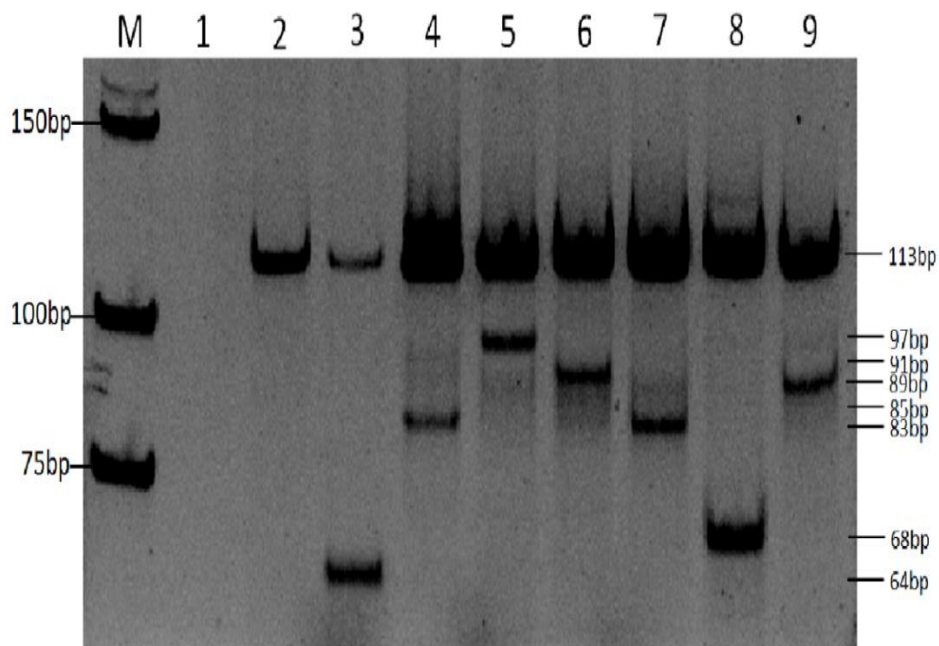


ภาพที่ 74 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของเครื่องมือ (MAS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ชนิด G13D, แถวที่ 1 และ 15 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA Ladder, แถวที่ 2 และ 16 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-8 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G13D ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 1, แถวที่ 9-14 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G13D ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 2, แถวที่ 17-22 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G13D ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 3, แถวที่ 23-28 แสดงสัดส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *K-ras* กลายพันธุ์ชนิด G13D ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ ที่อัตราส่วน 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles ตามลำดับ สำหรับการทดสอบครั้งที่ 4

#### 4.5.5 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จาก ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ด้วยวิธี MAS-PCR

การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นด้วยหลักการที่ AS-primer ด้านปลาย 3' จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ กับ ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง โดยทำ ปฏิกิริยา MAS-PCR และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยการรันเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พิจารณาผลโดย เทียบกับดีเอ็นเอควบคุมบวก คือดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่พบการกลายพันธุ์ จะพบผลผลิตพีซีอาร์ 1 ขนาด คือผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 113 bp ที่ได้จากไพรเมอร์คู่หลักเท่านั้น ส่วนดีเอ็นเอต้นแบบที่มีการกลายพันธุ์แต่ละชนิด จะพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 ขนาด คือผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 113 bp ที่ได้จากไพรเมอร์คู่หลัก และผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจาก AS-primer มีผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 97 bp, 91 bp, 89 bp, 85 bp, 83 bp, 68 bp และ 64 bp สำหรับดีเอ็นเอต้นแบบชนิดการกลายพันธุ์ G12C, G12D, G13D, G12R, G12A, G12V และ G12S ตามลำดับ ตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ของดีเอ็นเอต้นแบบชนิดไม่กลายพันธุ์และกลายพันธุ์ทั้ง 7 รูปแบบ ของตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง แสดงดังภาพที่ 75

ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมด 270 ตัวอย่าง พบว่าวิธี MAS-PCR ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ จำนวน 157 ตัวอย่าง คิดเป็น 58.15 เปอร์เซ็นต์ และตรวจพบการกลายพันธุ์ จำนวน 113 ตัวอย่าง คิดเป็น 41.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วยวิธี MAS-PCR นี้ ให้ผลการตรวจวิเคราะห์สอดคล้องกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Pyrosequencing จากการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบทั้งหมด จำนวน 113 ตัวอย่าง พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 จำนวน 54 ตัวอย่าง คิดเป็น 47.79 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย การกลายพันธุ์ที่พบสูงสุดที่ตำแหน่งโคดอน 12 คือ การกลายพันธุ์ชนิด G12D คิดเป็น 24.78 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยการกลายพันธุ์ชนิด G12V คิดเป็น 13.27 เปอร์เซ็นต์ กลายพันธุ์ชนิด G12A และ G12C พบอัตราเท่ากัน คิดเป็น 3.54 เปอร์เซ็นต์ พบการกลายพันธุ์ชนิด G12S คิดเป็น 2.65 เปอร์เซ็นต์ และตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ชนิด G12R สำหรับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 13 ชนิด G13D พบการกลายพันธุ์คิดเป็น 52.21 เปอร์เซ็นต์ สำหรับตำแหน่งโคดอน 13 รูปแบบ G13D ทั้งหมด 59 ตัวอย่าง ให้ผลสอดคล้องกับวิธี Pyrosequencing ทั้งหมด คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามมี 7 ตัวอย่างที่วิธี MAS-PCR ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ แต่วิธี Pyrosequencing ตรวจพบ โดยทั้ง 7 ตัวอย่างประกอบด้วย การกลายพันธุ์ชนิด G12D และ G12A จำนวนชนิดละ 3 ตัวอย่าง และการกลายพันธุ์ชนิด G12R จำนวน 1 ตัวอย่าง ดังสรุปรายละเอียดในตารางที่ 21



ภาพที่ 75 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR สำหรับตรวจแยกดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์และไม่กลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 8 ตัวอย่าง, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3-10 แสดงผลผลิตพีซีอาร์จากตัวอย่างชนิดไม่กลายพันธุ์ และชนิดกลายพันธุ์ G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D ตามลำดับ



ตารางที่ 21 ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR และวิธี Pyrosequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง

K-ras status	ชนิดการกลายพันธุ์และการเปลี่ยนแปลง Amino acid	วิธี Pyrosequencing จำนวนที่พบการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์)	วิธี MAS-PCR จำนวนที่พบการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์)
ชนิดการกลายพันธุ์	ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13	120/270 (44.44 เปอร์เซ็นต์)	113/270 (41.85 เปอร์เซ็นต์)
ตำแหน่งโคดอน 12	โคดอน 12	61/120 (50.83 เปอร์เซ็นต์)	54/113 (47.79 เปอร์เซ็นต์)
G12D	GGT>GAT Gly→Arg	31/120 (25.83 เปอร์เซ็นต์)	28/113 (24.78 เปอร์เซ็นต์)
G12V	GGT>GTA Gly→Val	15/120 (12.50 เปอร์เซ็นต์)	15/113 (13.27 เปอร์เซ็นต์)
G12A	GGT>GCT Gly→Ala	7/120 (5.83 เปอร์เซ็นต์)	4/113 (3.54 เปอร์เซ็นต์)
G12S	GGT>AGT Gly→Ser	3/120 (2.50 เปอร์เซ็นต์)	3/113 (2.65 เปอร์เซ็นต์)
G12C	GGT>IGT Gly→Cys	4/120 (3.33 เปอร์เซ็นต์)	4/113 (3.54 เปอร์เซ็นต์)
G12R	GGT>CGT Gly→Arg	1/120 (0.83 เปอร์เซ็นต์)	0/113 ND
ตำแหน่งโคดอน 13	โคดอน 13	59/120 (49.17 เปอร์เซ็นต์)	59/113 (52.21 เปอร์เซ็นต์)
G13D	GGC>GAC Gly→Asp	59/120 (49.17 เปอร์เซ็นต์)	59/113 (52.21 เปอร์เซ็นต์)

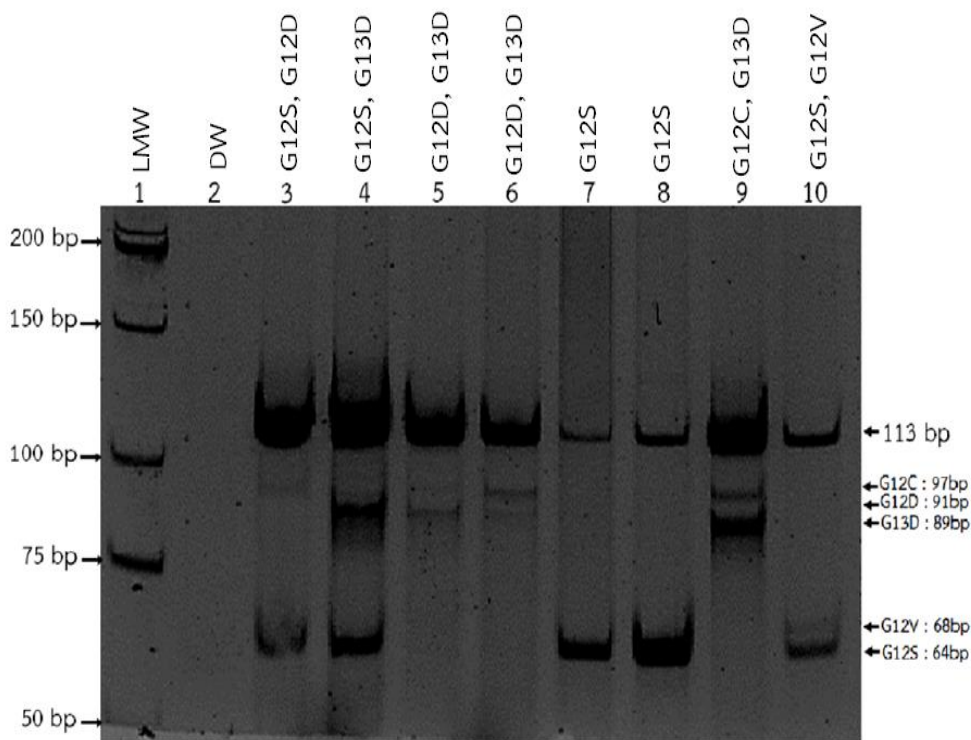
โดยกำหนด นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้ แสดงตำแหน่งการเกิดการกลายพันธุ์ และ ND แสดงการตรวจไม่พบการกลายพันธุ์

เนื่องจากการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่งนั้น มีอุบัติการณ์ต่ำ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบเบื้องต้นว่า วิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่มีการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่งได้หรือไม่ โดยการนำตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ที่พบการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่ง จำนวน 8 ตัวอย่าง ดังนี้ ตัวอย่างกลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12D จำนวน 3 ตัวอย่าง, ตัวอย่างกลายพันธุ์ชนิด G12S และ G13D จำนวน 1 ตัวอย่าง, ตัวอย่างกลายพันธุ์ชนิด G12D และ G13D จำนวน 2 ตัวอย่าง, ตัวอย่างกลายพันธุ์ชนิด G12C และ G13D จำนวน 1 ตัวอย่าง, ตัวอย่างกลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12V จำนวน 1 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบ ผลพบว่าวิธี MAS-PCR ตรวจพบการกลายพันธุ์สอดคล้องกับวิธี Pyrosequencing คือตรวจพบ double mutation จำนวน 6 ตัวอย่าง และมี 2 ตัวอย่าง ที่ 2 วิธีดังกล่าว ให้ผลการตรวจการกลายพันธุ์ไม่สอดคล้องกัน คือวิธี Pyrosequencing ตรวจพบ double mutations แต่วิธี MAS-PCR ตรวจพบเพียง single mutation แสดงดังภาพที่ 76 และ ตารางที่ 22 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบการกลายพันธุ์แบบ 1 หลอดทดลองต่อ 1 นิวคลีโอไทด์ พบว่าทั้ง 2 ตัวอย่าง ดังกล่าว สามารถตรวจพบ double mutations แสดงดังภาพที่ 77

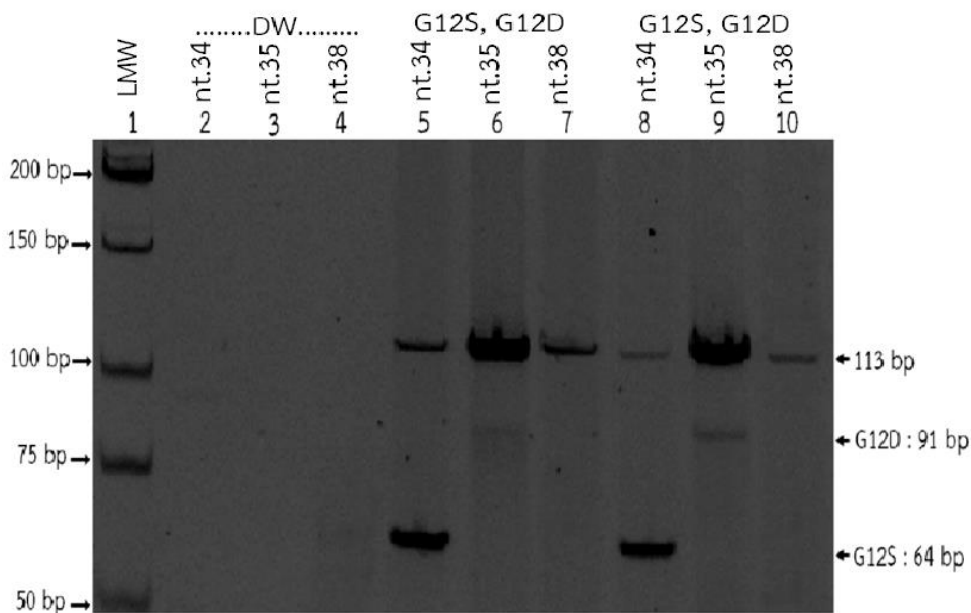
ตารางที่ 22 ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นด้วยหลักการ AS-primer ด้านปลาย 3' จำเพาะต่อยีน *K-ras* ชนิดกลายพันธุ์ และวิธี Pyrosequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 8 ตัวอย่าง ที่พบการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่ง

K-ras status	ผลการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์	
	วิธี Pyrosequencing นาโนแกรม	วิธี MAS-PCR
G12S และ G12D	กลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12D	กลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12D
G12S และ G13D	กลายพันธุ์ชนิด G12S และ G13D	กลายพันธุ์ชนิด G12S และ G13D
G12D และ G13D	กลายพันธุ์ชนิด G12D และ G13D	กลายพันธุ์ชนิด G12D และ G13D
G12D และ G13D	กลายพันธุ์ชนิด G12D และ G13D	กลายพันธุ์ชนิด G12D และ G13D
G12S และ G12D	กลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12D	กลายพันธุ์ชนิด G12S
G12S และ G12D	กลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12D	กลายพันธุ์ชนิด G12S
G12C และ G13D	กลายพันธุ์ชนิด G12C และ G13D	กลายพันธุ์ชนิด G12C และ G13D
G12S และ G12V	กลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12V	กลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12V





ภาพที่ 76 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR ของตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ที่พบการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่ง, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ), แถวที่ 3 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง กลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12D, แถวที่ 4 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง กลายพันธุ์ชนิด G12S และ G13D, แถวที่ 5 และ 6 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง กลายพันธุ์ชนิด G12D และ G13D, แถวที่ 7 และ 8 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง กลายพันธุ์ชนิด G12S, แถวที่ 9 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง กลายพันธุ์ชนิด G12C และ G13D และแถวที่ 10 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง กลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12V



ภาพที่ 77 แสดงผลของปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ทดสอบการกลายพันธุ์ 1 นิวคลีโอไทด์ต่อ 1 หลอดการทดลอง ของตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ที่พบการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่ง, แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน Low molecular weight DNA ladder, แถวที่ 2-4 แสดง negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอต้นแบบ) สำหรับหลอดทดสอบนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ตามลำดับ, แถวที่ 5-7 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง กลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12D พบการกลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12D สำหรับหลอดทดสอบนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และไม่พบการกลายพันธุ์สำหรับหลอดทดสอบนิวคลีโอไทด์ที่ 38 ตามลำดับ, แถวที่ 8-10 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง กลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12D พบการกลายพันธุ์ชนิด G12S และ G12D สำหรับหลอดทดสอบนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และไม่พบการกลายพันธุ์สำหรับหลอดทดสอบนิวคลีโอไทด์ที่ 38 ตามลำดับ

#### 4.6 การเปรียบเทียบผลการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR และวิธี Pyrosequencing

ทำการเปรียบเทียบและทดสอบความสอดคล้องของผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR และวิธี Pyrosequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง ดังสรุปในตารางที่ 21 พบว่าจำนวน 263 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่สอดคล้องกันเมื่อทดสอบด้วย 2 วิธี และเมื่อคำนวณทางสถิติ โดยใช้ค่าสถิติ kappa (k) พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ค่า  $k = 0.947$  [CI = 0.909 ถึง 0.986,  $P < 0.05$ ] ทั้ง 2 วิธีคือ MAS-PCR และ Pyrosequencing ให้ผลความสอดคล้องกันระดับดีมาก การทดสอบค่า positive agreement และ negative agreement ของวิธี MAS-PCR เมื่อเทียบกับวิธี Pyrosequencing มีค่าสูงถึง 94 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้แสดงผลการเปรียบเทียบและการทดสอบค่าทางสถิติ ดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 การเปรียบเทียบและความสอดคล้องของผลตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR และวิธี Pyrosequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง

	วิธี Pyrosequencing		ตัวอย่างทั้งหมด
	พบการกลายพันธุ์	ไม่พบการกลายพันธุ์	
วิธี MAS-PCR			
พบการกลายพันธุ์	113	0	113
ไม่พบการกลายพันธุ์	7	150	157
ตัวอย่างทั้งหมด	120	150	270
Positive agreement: 94 เปอร์เซ็นต์, CI 95 เปอร์เซ็นต์ [88 เปอร์เซ็นต์; 97 เปอร์เซ็นต์]			
Negative agreement: 100 เปอร์เซ็นต์, CI 95 เปอร์เซ็นต์ [98 เปอร์เซ็นต์; 100 เปอร์เซ็นต์]			

#### 4.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ด้วยวิธี Direct sequencing

จากผลการเปรียบเทียบวิธีการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 นิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ทั้ง 2 วิธีคือ MAS-PCR และ Pyrosequencing พบ 7 ตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ไม่สอดคล้องกัน คือวิธี MAS-PCR ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ แต่วิธี Pyrosequencing ตรวจพบการกลายพันธุ์ชนิด G12D จำนวน 3 ตัวอย่าง, การกลายพันธุ์ชนิด G12A จำนวน 3 ตัวอย่าง และการกลายพันธุ์ชนิด G12R จำนวน 1 ตัวอย่าง จึงทำการตรวจยืนยันเพิ่มเติมด้วยวิธี Direct sequencing พบว่าทั้ง 7 ตัวอย่างให้ผลที่สอดคล้องกับวิธี Pyrosequencing

#### 4.8 การศึกษาอุบัติการณ์ การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงในประเทศไทย

ในการศึกษานี้ ได้ศึกษาอุบัติการณ์ การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงในประเทศไทย จำนวน 270 ตัวอย่าง พบการกลายพันธุ์ 44.44 เปอร์เซ็นต์

ชนิดการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยคือชนิด G13D, G12D และ G12V ตามลำดับ การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จากการกลายพันธุ์ทั้งหมด 120 ตัวอย่าง พบการแทนที่นิวคลีโอไทด์แบบ transitions จากชนิด G→A พบอุบัติการณ์สูงถึง 93 ตัวอย่าง คิดเป็น 77.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ การแทนที่นิวคลีโอไทด์แบบ transversions จากชนิด G→T พบอุบัติการณ์ 19 ตัวอย่าง คิดเป็น 15.83 เปอร์เซ็นต์ และการแทนที่นิวคลีโอไทด์แบบ transversions จากชนิด G→C พบอุบัติการณ์ 8 ตัวอย่าง คิดเป็น 6.67 เปอร์เซ็นต์ ในตำแหน่งโคดอน 12 พบการกลายพันธุ์ชนิด G12D (GAT) สูงสุด ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน glycine เป็นชนิด asparagine พบ 31 ตัวอย่าง จากการกลายพันธุ์ทั้งหมด 61 ตัวอย่าง คิดเป็น 25.83 เปอร์เซ็นต์ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 24

ตารางที่ 24 จำนวนและชนิดการถูกแทนที่นิวคลีโอไทด์ ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ของตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง

ตำแหน่งโคดอน	ชนิดการกลายพันธุ์	การเกิด point mutation จำนวน (เปอร์เซ็นต์)	โคดอนชนิดไม่ กลายพันธุ์ (กรดอะมิโน)	โคดอนชนิด กลายพันธุ์ (กรดอะมิโน)
12	ตัวอย่างทั้งหมด			
นิวคลีโอไทด์ที่ 34	G→A	3 (2.5 เปอร์เซ็นต์)	GGT (Gly)	AGT (Ser)
	G→C	1 (0.83 เปอร์เซ็นต์)		CGT (Arg)
	G→T	4 (3.33 เปอร์เซ็นต์)		IGT (Cys)
นิวคลีโอไทด์ที่ 35	G→A	31 (25.83 เปอร์เซ็นต์)	GGC (Gly)	GAT (Asp)
	G→C	7 (5.83 เปอร์เซ็นต์)		GCT (Ala)
	G→T	15 (12.50 เปอร์เซ็นต์)		GIT (Val)
13	G→A	59 (49.17 เปอร์เซ็นต์)	GGC (Gly)	GAC (Asp)

#### 4.9 ศึกษาความสัมพันธ์ของ ลักษณะพื้นฐานทั่วไป และลักษณะทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วย กับ การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13

การศึกษาครั้งนี้ ศึกษาความสัมพันธ์ของ ลักษณะพื้นฐานทั่วไปประกอบด้วย อายุ เพศ และ ลักษณะทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยประกอบด้วย ผลทางจุลพยาธิวิทยา และระยะโรค กับเกิดการกลายพันธุ์หรือไม่เกิดการกลายพันธุ์ รวมถึงการความสัมพันธ์การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวนทั้งสิ้น 270 ตัวอย่าง จากการศึกษาพบว่า 4 ช่วงอายุคือ 20-39 ปี, 40-59 ปี, 60-79 ปี และ 80-90 ปี มีความสัมพันธ์ทำให้เกิดการกลายพันธุ์หรือไม่กลายพันธุ์ ไม่แตกต่างกัน โดยค่า  $P=0.117$  เพศหญิงและชาย มีความสัมพันธ์ทำให้เกิดการกลายพันธุ์หรือไม่กลายพันธุ์ ไม่แตกต่างกัน โดยค่า  $P=0.329$  ลักษณะทางพยาธิวิทยา ประกอบด้วย Well-differentiated, Moderate-differentiated และ Poorly-differentiated มีความสัมพันธ์ทำให้เกิดการกลายพันธุ์หรือไม่กลายพันธุ์ ไม่แตกต่างกัน โดยค่า  $P=0.057$  และตำแหน่งก้อนมะเร็งที่ Colorectal primary และ Metastasis มีความสัมพันธ์ทำให้เกิดการกลายพันธุ์หรือไม่กลายพันธุ์ ไม่แตกต่างกัน โดยค่า  $P=0.066$  และความสัมพันธ์การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ทั้ง 4 ช่วงอายุคือ 20-39 ปี, 40-59 ปี, 60-79 ปี และ 80-90 ปี มีความสัมพันธ์ไม่แตกต่างกัน โดยค่า  $P=0.268$  เพศหญิงและชาย มีความสัมพันธ์การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ไม่

แตกต่างกัน โดยค่า  $P=0.733$  ลักษณะทางพยาธิวิทยา ประกอบด้วย Well-differentiated, Moderate-differentiated และ Poorly-differentiated มีความสัมพันธ์การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ไม่แตกต่างกัน โดยค่า  $P=0.641$  และตำแหน่งก้อนมะเร็งที่ Colorectal primary และ Metastasis มีความสัมพันธ์การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ไม่แตกต่างกัน โดยค่า  $P=0.323$  โดยตั้งสรุปในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 การศึกษาความสัมพันธ์ของ ลักษณะพื้นฐานทั่วไป และลักษณะทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง กับการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13

ลักษณะพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วย	WT KRAS จำนวน (%)	MT KRAS จำนวน (%)	ค่า $P$	Codon 12 mutated จำนวน (%)	Codon 13 mutated จำนวน (%)	ค่า $P$
อายุเฉลี่ย (ช่วงอายุ)						
20-39 ปี	7 (63.6 %)	4 (36.4%)	0.117	1 (25.0%)	3 (75.0%)	0.268
40-59 ปี	48 (49.0%)	50 (51.0%)		28 (56.0%)	22 (44.0%)	
60-79 ปี	85 (57.0%)	64 (43.0%)		30 (46.9%)	34 (53.1%)	
80-90 ปี	10 (83.3%)	2 (16.7%)		2 (100%)	0	
เพศ:						
ผู้ชาย	95 (57.9%)	69 (42.1%)	0.329	36 (52.2%)	33 (47.8%)	0.733
ผู้หญิง	55 (51.9%)	51 (48.1%)		25 (49.0%)	26 (51.0%)	
ลักษณะทางพยาธิวิทยา:						
Well differentiated	35 (45.5%)	42 (54.5%)	0.057	19 (45.2%)	23 (54.8%)	0.641
Moderate- differentiated	102 (58.3%)	73 (41.7%)		39 (53.4%)	34 (46.6%)	
Poorly differentiated	13 (72.2%)	5 (27.8%)		3 (60.0%)	2 (40.0%)	
ตำแหน่งก้อนมะเร็ง:						
Colorectal primary	128 (53.6%)	111 (46.4%)	0.066	55 (49.5%)	56 (50.5%)	0.323
Metastasis	22 (71.0%)	9 (29.0%)		6 (66.7%)	3 (33.3%)	

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (Colorectal Cancer) เป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อย อยู่ในลำดับที่ 3 ของโรคมะเร็งที่พบทั่วโลก (1) ในประเทศไทยก็เช่นกัน โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง พบเป็นอันดับ 3 ในเพศชายมีอุบัติการณ์ 14.7 คน ต่อประชากรชาย 100,000 คน และพบเป็นอันดับ 5 ในเพศหญิง มีอุบัติการณ์ 11 คน ต่อประชากรหญิง 100,000 คน (2, 47, 56) ผลการศึกษาจากหลากหลายงานวิจัยพบว่าการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* (*V-Ki-ras2* Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) มีความสัมพันธ์เชื่อมโยง กับโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (23, 74-76, 102-104) พบว่า ผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* จะต้องการให้ยาเคมีบำบัดในกลุ่มยา anti-EGFR Monoclonal antibody เช่น cetuximab และ panitumumab (9, 18) ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* เป็นสิ่งสำคัญในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่แต่ละราย ในปัจจุบันสถาบัน European Society for Medical Oncology (105) และสถาบัน American Society of Clinical Oncology (8) ได้กำหนดแนวทางการรักษาโดยให้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ก่อนการให้ยากกลุ่ม anti-EGFR Monoclonal antibody และให้ยานี้ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* เท่านั้น (18, 23)

ปัจจุบันการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* มีหลายวิธี รวมทั้งมีชุดตรวจสำเร็จรูปจำหน่าย (7, 11, 16, 18, 25) ซึ่งแต่ละวิธีมีปัญหาและข้อจำกัดแตกต่างกัน เช่นวิธี Direct sequencing เป็นวิธีที่ใช้กันโดยทั่วไป แต่วิธีดังกล่าวมีความไวที่ต่ำ สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้ต่ำสุดที่ 10-30 เปอร์เซ็นต์ mutant allele (18, 25, 106) วิธี HRM เป็นวิธีที่รวดเร็ว มีความไวในการตรวจวิเคราะห์ระดับปานกลางที่ 5-6 เปอร์เซ็นต์ mutant allele (18, 106) วิธี HRM ยังไม่สามารถแยกชนิดการกลายพันธุ์ได้ จำเป็นต้องอาศัยวิธี Direct sequencing หรือวิธีอื่นๆ ช่วยในการยืนยันชนิดการกลายพันธุ์ (107) วิธี Pyrosequencing เป็นวิธีที่มีความถูกต้อง รวดเร็ว และพบว่ามี ความไวสูง สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้ต่ำสุดที่ 5 เปอร์เซ็นต์ mutant allele (11, 16, 18) แต่อย่างไรก็ตามวิธี Pyrosequencing ต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง จึงไม่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการทั่วไป ที่ขาดแคลนเครื่องมือขั้นสูง หรือไม่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการในประเทศที่กำลังพัฒนาและด้อยพัฒนา (25) ชุดทดสอบสำเร็จรูป พบว่า มีความรวดเร็ว และ มีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูง สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้ต่ำสุดที่ 1-5 เปอร์เซ็นต์ mutant allele

ง่ายในการวิเคราะห์ผล สามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลายตำแหน่งรวมถึงสามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้ แต่การใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปนี้ต้องการเครื่องมือที่จำเพาะ ราคาแพง (25)

งานวิจัยนี้ ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธี Multiplex Allele-Specific PCR (MAS-PCR) เพื่อใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ตำแหน่งที่พบบ่อยคือโคดอน 12 และ 13 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟิน ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง โดยเทียบผลการตรวจวิเคราะห์กับวิธีที่มีความไวสูงคือวิธี Pyrosequencing โดยชุด AS-primers ที่ได้ทำการออกแบบนั้น ออกแบบให้ปลายด้าน 3' สามารถจับกันอย่างจำเพาะกับ 7 รูปแบบการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน และให้ผลผลิตขนาดต่างๆกันดังนี้คือ G12S mutant (64 bp), G12R mutant (85 bp), G12C mutant (97 bp), G12D mutant (91 bp), G12A mutant (83 bp), G12V mutant (68 bp), และ G13D mutant (89 bp) นอกจากนี้แล้ววิธี MAS-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นนี้ สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ทั้ง 7 รูปแบบ ใน 1 หลอดทดลอง จึงง่าย สะดวก รวดเร็ว ประหยัดน้ำยา และลดโอกาสปนเปื้อนที่อาจเกิดจากการทำ PCR หลายขั้นตอนหรือในหลายหลอดทดลอง (108) ไม่มีความจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ในการตรวจวิเคราะห์ที่มีราคาแพง เช่น Pyrosequencing หรือ Real-time PCR ใช้เพียงเครื่อง PCR เท่านั้น ทำให้สามารถนำวิธี MAS-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นนี้ไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการต่างๆไป ที่ห่างไกล หรือห้องปฏิบัติการที่ขาดแคลนเครื่องมือขั้นสูงได้ (27)

การออกแบบ AS-primer ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์นั้น ไพรเมอร์ชุดผลิตพีซีอาร์ขนาดใหญ่ จำนวนไพรเมอร์ทั้งหมด 5 เส้นประกอบด้วย KRAS-F และ KRAS-(179bp)-R ใช้เป็นไพรเมอร์คู่หลัก และ AS-primer 3 เส้น ประกอบด้วย KRAS-nt.34-WT-F, KRAS-nt.35-WT-F และ KRAS-nt.38-WT-F ให้ขนาดผลผลิตพีซีอาร์แตกต่างกัน 4 ขนาด คือ 179 bp สำหรับ ยีน *K-ras* ที่ใช้เป็น Internal control และขนาด 155 bp, 149 bp และ 152 bp สำหรับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ตามลำดับ ผลการทดสอบกับพลาสมิดดีเอ็นเอที่เป็นดีเอ็นเอควบคุมบวก 8 ชนิด คือดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ และดีเอ็นเอกลายพันธุ์ชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D สามารถแยกชนิดกลายพันธุ์ออกจากชนิดไม่กลายพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอจากตัวอย่างจำพวกชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟินได้ เพราะผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดใหญ่พบว่าไม่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟิน เนื่องจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝั่งพาราฟินต้องผ่านขั้นตอนการ fixation ด้วย formalin เป็นเวลานาน เป็นผลให้คุณภาพดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างเหล่านี้มีคุณภาพต่ำ และ พบการแตกหักของดีเอ็นเอในอัตราที่สูง (109) รวมถึงดีเอ็นเอเกิดการ cross-linking ระหว่าง nucleic acid และโปรตีน ส่งผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (110, 111) การออกแบบไพรเมอร์ KRAS-(113bp)-R ใหม่ ด้วยการขยับไพรเมอร์ด้าน reverse เข้า



มา เพื่อให้ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดเล็กลง แต่ยังคงใช้ AS-primer ทั้ง 3 เส้น ประกอบด้วย KRAS-nt.34-WT-F, KRAS-nt.35-WT-F และ KRAS-nt.38-WT-F และไพรเมอร์ KRAS-F เดิม ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกัน 4 ขนาด คือ 113 bp สำหรับ ยีน *K-ras* ที่ใช้เป็น Internal control และขนาด 89 bp, 83 bp และ 86 bp สำหรับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38 ตามลำดับ พบว่าไพรเมอร์ชุดนี้ สามารถแยกดีเอ็นเอชนิดการกลายพันธุ์ออกจากชนิดไม่กลายพันธุ์ได้ และสามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินได้ เช่นเดียวกับหลายงานวิจัยที่ออกแบบไพรเมอร์ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดเล็ก เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน เช่น งานวิจัยของ Ogino และคณะ ได้พัฒนาวิธี Pyrosequencing เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน โดยงานวิจัยดังกล่าวออกแบบไพรเมอร์ให้มีผลผลิตพีซีอาร์ขนาดเล็กเพียง 82 bp (16) งานวิจัยของ Poehlmann และคณะ ได้พัฒนาวิธี Pyrosequencing เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน โดยงานวิจัยดังกล่าวออกแบบไพรเมอร์ให้มีผลผลิตพีซีอาร์ขนาดเล็กเพียง 91 bp (11) อย่างไรก็ตามการทดสอบทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุด (เปอร์เซ็นต์ mutant allele) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ ของไพรเมอร์ชุดหลังนี้ พบว่าขีดจำกัดต่ำสุดของดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์ที่ตรวจวัดได้ คือ 50-55 เปอร์เซ็นต์ mutant allele ในกลุ่มตัวอย่างที่มี เปอร์เซ็นต์ mutant allele  $\leq 25$  เปอร์เซ็นต์ พบว่า AS-primer ให้ผลการทดสอบไม่ตรงกับผล Pyrosequencing สูงถึง 8 ใน 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 88.89 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กลุ่มตัวอย่างที่มี เปอร์เซ็นต์ mutant allele  $\geq 60$  เปอร์เซ็นต์ AS-primer ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ตรงกับผล Pyrosequencing สูงถึง 4 ใน 5 ตัวอย่าง คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการใช้ AS-primer ชุดที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอชนิดไม่กลายพันธุ์นี้ จึงไม่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้งานในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงได้ เพราะอาจเกิดเป็น false negative ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง เนื่องจาก ตัวอย่างส่วนใหญ่ จะมี เปอร์เซ็นต์ mutant allele ต่ำ ในการวิจัยนี้พบ เปอร์เซ็นต์ mutant allele  $\leq 50$  เปอร์เซ็นต์ สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ตัวอย่างที่มี เปอร์เซ็นต์ mutant allele  $\geq 60$  เปอร์เซ็นต์ มีเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นจากตัวอย่างทั้งหมด

การออกแบบ AS-primer ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ 7 รูปแบบ นั้น จำนวน AS-primer ทั้งหมด 9 เส้น ประกอบด้วย KRAS-F และ KRAS-(113bp)-R ใช้เป็นไพรเมอร์คู่หลัก และ AS-primer 7 เส้น ประกอบด้วย KRAS-G12S-R, KRAS-G12R-F, KRAS-G12C-F, KRAS-G12D-F, KRAS-G12A-F, KRAS-G12V-R และ KRAS-G13D-F ให้ขนาดผลผลิตพีซีอาร์แตกต่างกัน 8 ขนาด คือ 113 bp สำหรับ

ยีน *K-ras* ที่ใช้เป็น Internal control และขนาด 64 bp, 85 bp, 97 bp, 91 bp, 83 bp, 68 bp, และ 89 bp สำหรับการกลายพันธุ์ชนิด G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D ตามลำดับ ใช้ขั้นตอนการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอแบบ Temperature Switch PCR (TSP) คือมีขั้นตอนของอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ช่วงอุณหภูมิดังนี้ ช่วงอุณหภูมิที่ 1 ออกแบบให้ใช้อุณหภูมิ  $T_m$  (melting temperature) เพื่อ amplify เป้าหมายที่เกิดจากไพรเมอร์คู่หลัก ในช่วงเวลาสั้นๆ ช่วงอุณหภูมิที่ 2 ทำการเพิ่มอุณหภูมิ  $T_m$  ให้สูงขึ้นประมาณ 4-6 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะ และช่วงอุณหภูมิที่ 3 ออกแบบให้ใช้อุณหภูมิ  $T_m$  เหมาะสมและจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจ (27, 108) ขั้นตอนการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ดังนี้ คือ เริ่มต้นขั้นตอน Denature ด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ช่วงอุณหภูมิที่ 1 ใช้อุณหภูมิ  $T_m$  ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 รอบ, ช่วงอุณหภูมิที่ 2 ใช้อุณหภูมิ  $T_m$  ที่ 64 องศาเซลเซียส นาน 20 รอบ, ช่วงอุณหภูมิที่ 3 ใช้อุณหภูมิ  $T_m$  ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 20 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย Extension ด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที งานวิจัยของ Shi และคณะ พัฒนาวิธี M-ARMS-PCR เพื่อตรวจหาการดื้อยาของเชื้อ *M. tuberculosis* ประกอบด้วยไพรเมอร์ถึง 8 เส้น และใช้ขั้นตอนการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอต้นแบบโดยอาศัยหลักการ TSP ด้วยเช่นกัน ซึ่งประสบความสำเร็จในการแยกเชื้อที่ไม่ดื้อยา rifampin ออกจากเชื้อที่ดื้อยา rifampin ได้ (27)

ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่เหมาะสม ประกอบด้วยสารต่างๆดังนี้ 2.5 มิลลิโมลาร์  $MgCl_2$ , 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTP, 0.625 Unit/ไมโครลิตร เอนไซม์ Taq DNA polymerase, 50-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบ และไพรเมอร์แต่ละชนิด KRAS-F, KRAS-(113bp)-R, KRAS -G12S-R, KRAS-G12R-F, KRAS-G12C-F, KRAS-G12D-F, KRAS-G12A-F, KRAS-G12V-R, KRAS- G13D-F ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05, 0.075, 0.05, 0.025, 0.01, 0.02, 0.02, 0.02, 0.0125 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งองค์ประกอบและความเข้มข้นของสารต่างๆในปฏิกิริยา MAS-PCR คล้ายคลึงงานวิจัยของ Shi X. และคณะ (27)

การตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ด้วยวิธี MAS-PCR ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอชนิดกลายพันธุ์ กับตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง เทียบกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Pyrosequencing พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่สอดคล้องกันถึง 97.40 เปอร์เซ็นต์ (263/270) เมื่อคำนวณความสอดคล้องกันของทั้ง 2 วิธี พบว่ามีความสอดคล้องกันระดับดีมาก ( $k = 0.947$ ) แต่อย่างไรก็ตาม มี 7 ตัวอย่างที่ ทั้ง 2 วิธีให้ผลไม่สอดคล้องกันคือ Pyrosequencing สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* คือ G12D จำนวน 3 ตัวอย่าง, G12A จำนวน 3 ตัวอย่าง และ G12S จำนวน 1 ตัวอย่าง แต่วิธี MAS-PCR ไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ ผลการยืนยันทั้ง 7 ตัวอย่างด้วยการทำ Direct

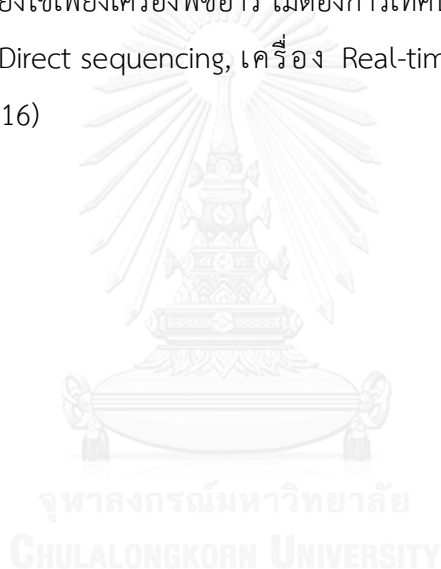
sequencing ให้ผลตรงกับวิธี Pyrosequencing การที่วิธี MAS-PCR ไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ในทั้ง 7 ตัวอย่าง อาจเกิดจาก biased amplification และการจับกันเองระหว่าง AS-primer (27, 112) รวมทั้งการแตกหักของดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินเอง ที่ผ่านกระบวนการ fixation เป็นเวลานาน ทำให้ดีเอ็นเอไม่มีคุณภาพ (109) และดีเอ็นเอเกิดการ cross-linking กับโปรตีน ซึ่งยับยั้งปฏิกิริยา MAS-PCR ได้ (110, 111)

วิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้น สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้ต่ำสุดที่ 1-2 เปอร์เซ็นต์ mutant allele จึงมีความไวสูงกว่าวิธี Direct sequencing และวิธี HRM ซึ่งมีความไวที่ 5-20 เปอร์เซ็นต์ mutant allele และวิธี MAS-PCR นี้มีความไวใกล้เคียงกับวิธี Pyrosequencing และชุดทดสอบสำเร็จรูป ซึ่งมีความไวที่ 1-5 เปอร์เซ็นต์ mutant allele (16, 25, 106) ยิ่งไปกว่านั้น ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า วิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้น มีความแม่นยำที่ดี โดยได้ทำการทดสอบตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสมระหว่างดีเอ็นเอที่กลายพันธุ์แต่ละชนิดกับดีเอ็นเอที่ไม่กลายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 10, 5, 2, 1, 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ mutant alleles การทดสอบซ้ำ 4 ครั้ง พบให้ผลการทดสอบที่เหมือนกัน

ในการศึกษานี้พบอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงในประเทศไทย จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่ส่งตรวจกับสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 270 ตัวอย่าง พบว่ามี การกลายพันธุ์ทั้งหมด 44.44 เปอร์เซ็นต์ (120/270) ซึ่งอุบัติการณ์การเกิดการกลายพันธุ์นี้อยู่ในช่วง 20-50 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับรายงานวิจัยอื่นๆก่อนหน้านี้ (17, 113) โดยพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 เท่ากับ 50.83 เปอร์เซ็นต์ (61/123) และพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 13 เท่ากับ 49.17 เปอร์เซ็นต์ (59/123) อัตราการกลายพันธุ์ที่พบในงานวิจัยนี้สูงกว่างานวิจัยอื่นๆก่อนหน้านี้ ซึ่งพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 ประมาณ 70-90 เปอร์เซ็นต์ และพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 13 ประมาณ 10-30 เปอร์เซ็นต์ (14, 17, 113) แต่อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยของ Poehlmann และคณะ ที่พบการกลายพันธุ์ที่คล้ายคลึงกับงานวิจัยนี้ คือพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 เท่ากับ 52.62 เปอร์เซ็นต์ และพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 13 เท่ากับ 42.12 เปอร์เซ็นต์ (11) และชนิดการกลายพันธุ์ที่พบสูงสุดคือ ชนิดการกลายพันธุ์ G13D, G12D และ G12V ซึ่งคล้ายคลึงกับงานวิจัยอื่นๆก่อนหน้านี้ (11, 17, 113) รูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบสูงสุดเกิดจากการแทนที่ลำดับเบส Glycine (G) ด้วย Aspartic (A) พบถึง 78.04 เปอร์เซ็นต์ (96/123) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (11, 17)

ลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง อันประกอบด้วย ช่วงอายุ เพศ ลักษณะทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อ และตำแหน่งของก้อนมะเร็ง พบว่ามีความสัมพันธ์ในการเกิดการกลายพันธุ์และไม่กลายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน รวมถึงพบความสัมพันธ์กับการเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 และอัตราการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ไม่แตกต่างกันด้วย แต่มีบางรายงานการวิจัยที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในเพศหญิงสูงกว่าเพศชาย (114, 115) ซึ่งตรงข้ามกับรายงานการวิจัยของ Poehlmann และคณะ ที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในเพศชายสูงกว่าเพศหญิง (11)

วิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้น เป็นวิธีที่รวดเร็ว ใช้เวลาน้อยกว่า 4 ชั่วโมง ในการทดสอบจนเสร็จสมบูรณ์ ทั้งนี้ไม่รวมขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ และเป็นวิธีที่ราคาไม่แพง เสียค่าใช้จ่ายประมาณ 280 บาท/ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังใช้เพียงเครื่องพีซีอาร์ ไม่ต้องการเทคนิคพิเศษหรือเครื่องมือที่จำเพาะที่มีราคาสูง เช่น เครื่อง Direct sequencing, เครื่อง Real-time PCR, Digital PCR หรือเครื่อง Pyrosequencing (26, 116)



## สรุปผลการทดลอง

วิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้น สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน *K-ras* ที่ตำแหน่งโคดอนที่ 12 และ 13 ที่พบบ่อย ทั้ง 7 รูปแบบคือ G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V และ G13D ในหลอดเดียว โดยตรวจวิเคราะห์จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงได้ จึงง่าย และ สะดวก ต่อ การนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการต่างๆ ใช้เพียงเครื่องพีซีอาร์ ซึ่งเป็นเครื่องมือพื้นฐานที่มีในห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา รวมทั้งในปัจจุบันมีในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลศูนย์ โรงพยาบาลขนาดใหญ่และขนาดกลาง จึงสามารถนำวิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ ไปใช้ตรวจวิเคราะห์ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงก่อนการให้ยา anti-EGFR Monoclonal antibody ได้ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและเหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละราย วิธีที่พัฒนาขึ้นยังมีความไวสูง สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ได้ต่ำสุดที่ 1-2 เปอร์เซ็นต์ mutant allele มีความแม่นยำสูง และยังสามารถนำข้อมูลและความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ไปพัฒนาต่อยอดเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปในอนาคตได้ต่อไป

## รายการอ้างอิง

1. colorectal cancer statistics [Internet]. 2014. Available from: [http://www.wcrf.org/cancer\\_statistics/data\\_specific\\_cancers/colorectal\\_cancer\\_statistics.php](http://www.wcrf.org/cancer_statistics/data_specific_cancers/colorectal_cancer_statistics.php).
2. Thiravud Khuhaprema MD, F.I.C.S. , Pattarawin Attasara MD, Hutcha Sriplung MD, Surapon Wiangnon MD, Suleeporn Sangrajrang PD. Cancer in Thailand 2007-2009. IARC. 2013;7.
3. Van Cutsem E, Nordlinger B, Adam R, Kohne CH, Pozzo C, Poston G, et al. Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur J Cancer*. 2006;42(14):2212-21.
4. Yoo PS, Lopez-Soler RI, Longo WE, Cha CH. Liver resection for metastatic colorectal cancer in the age of neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab. *Clin Colorectal Cancer*. 2006;6(3):202-7.
5. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, Meade AM, Seymour MT, Wilson RH, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *The Lancet*. 2011;377(9783):2103-14.
6. Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJM, Schrama JG, et al. Chemotherapy, Bevacizumab, and Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer. *J Mol Diagn*. 2009;360(6):563-72.
7. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(17):1757-65.
8. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*. 2009;27(12):2091-6.

9. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006;66(8):3992-5.
10. Franz Watzinger TL. KRAS (Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog) Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology 1999;3(2):66-7.
11. Poehlmann A, Kuester D, Meyer F, Lippert H, Roessner A, Schneider-Stock R. K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. *Pathol Res Pract.* 2007;203(7):489-97.
12. Jedpiyawongse A, Roytrakul S, Karalak A, Chariyalertsak S, Sumatechotemeta W, Lausontornsiri W. K-ras Mutation among Colorectal Cancer Patients at the National Cancer Institute, Thai-land. *Thai Cancer J.* 2011;31:106-14.
13. Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, et al. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis.* 2003;24(4):703-10.
14. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 2012;72(10):2457-67.
15. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009;6(9):519-27.
16. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn.* 2005;7(3):413-21.
17. Miglio U, Mezzapelle R, Paganotti A, Allegrini S, Veggiani C, Antona J, et al. Mutation analysis of KRAS in primary colorectal cancer and matched metastases by means of highly sensitivity molecular assay. *Pathol Res Pract.* 2013;209(4):233-6.

18. Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, et al. Comparison of Sanger Sequencing, Pyrosequencing, and Melting Curve Analysis for the Detection of KRAS Mutations. *J Mol Diagn.*12(4):425-32.
19. Chang YS, Er TK, Lu HC, Yeh KT, Chang JG. Detection of KRAS codon 12 and 13 mutations by mutant-enriched PCR assay. *Clin Chim Acta.* 2014;436:169-75.
20. Jancik S, Drabek J, Berkovcova J, Xu YZ, Stankova M, Klein J, et al. A comparison of Direct sequencing, Pyrosequencing, High resolution melting analysis, TheraScreen DxS, and the K-ras StripAssay for detecting KRAS mutations in non small cell lung carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;31:79.
21. How Kit A, Mazaleyrat N, Daunay A, Nielsen HM, Terris B, Tost J. Sensitive detection of KRAS mutations using enhanced-ice-COLD-PCR mutation enrichment and direct sequence identification. *Hum Mutat.* 2013;34(11):1568-80.
22. Dufort S, Richard MJ, de Fraipont F. Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues. *Anal Biochem.* 2009;391(2):166-8.
23. Liu P, Liang H, Xue L, Yang C, Liu Y, Zhou K, et al. Potential clinical significance of plasma-based KRAS mutation analysis using the COLD-PCR/TaqMan((R)) - MGB probe genotyping method. *Exp Ther Med.* 2012;4(1):109-12.
24. Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem.* 2013;59(12):1722-31.
25. Herreros-Villanueva M, Chen CC, Yuan SS, Liu TC, Er TK. KRAS mutations: analytical considerations. *Clin Chim Acta.* 2014;431:211-20.
26. Gaudet M, Fara AG, Beritognolo I, Sabatti M. Allele-specific PCR in SNP genotyping. *Methods Mol Biol.* 2009;578:415-24.



27. Shi X, Zhang C, Shi M, Yang M, Zhang Y, Wang J, et al. Development of a single multiplex amplification refractory mutation system PCR for the detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene*. 2013;530(1):95-9.
28. Allegui Z, Ghariani A, Draoui H, Ghezal A, Mehiri E, Slim-Saidi L. Detection of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. *Int J Mycobacteriol*. 2012;1(1):34-9.
29. Defining Cancer [Internet]. National Cancer Institute. 2015 [cited 2015 Nov 1]. Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>.
30. Cancer Fact sheet [Internet]. World Health Organization. 2015 [cited 2015 Nov 1]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
31. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures. 2015 Atlanta: American Cancer Society. Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>.
32. Types of Cancer [Internet]. The American Society of Clinical Oncology (ASCO). 2015 [cited 2015 Nov 1]. Available from: <http://www.cancer.net/cancer-types>.
33. Cole L, Kramer PR. Chapter 6.3 - Human Cancers and Carcinogenesis. *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*. Boston: Academic Press; 2016. p. 197-200.
34. Cancer Incidence and Mortality Worldwide [Internet]. IARC. 2014 [cited 2015 Nov 1]. Available from: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-cancer-frequency-country>.
35. Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol*. 2005;23(2):276-92.
36. Melnick RL, Ward JM, Huff J. War on Carcinogens: industry disputes human relevance of chemicals causing cancer in laboratory animals based on

- unproven hypotheses, using kidney tumors as an example. *Int J Occup Environ Health*. 2013;19(4):255-60.
37. Sery TW, Dougherty TJ. Photoradiation of rabbit ocular malignant melanoma sensitized with hematoporphyrin derivative. *Curr Eye Res*. 1984;3(4):519-28.
  38. Holmboe SA, Vradi E, Jensen TK, Linneberg A, Husemoen LL, Scheike T, et al. The Association of Reproductive Hormone Levels and All-Cause, Cancer, and Cardiovascular Disease Mortality in Men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(12):4472-80.
  39. Brindley PJ, Costa JMCd, Sripa B. Why Does Infection With Some Helminths Cause Cancer? *Trends Cancer*. 2015;1(3):174-82.
  40. Antonelli G, Spagnoli GC. Why do infections cause cancer? *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(11):967-8.
  41. AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York: American Joint Committee On Cancer 2010.
  42. สถิติสาธารณสุข [Internet]. 2557 [cited 2015 Nov 1]. Available from: <http://bps2.moph.go.th/content/%E0%B8%AA%E0%B8%96%E0%B8%B4%E0%B8%95%E0%B8%B4%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%98%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%93%E0%B8%AA%E0%B8%B8%E0%B8%82-%E0%B8%9B%E0%B8%B5-2557>.
  43. Imsamran W, Chaiwerawattana A, Wiangnon S, Pongnikorn D, Suwanrungruang K, Sangrajrang S, et al. Cancer in Thailand Vol. VIII, 2010-2012. Bangkok: Bangkok Medical Published; 2015. p. 6-71.
  44. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalsecience*. 2015;9:520.
  45. Al-Jashamy KA. Principles and Practice-of Cancer prevention and control : Colorectal Cancer: OMICS eBOOKS Group.

46. Bear HD, MacIntyre J, Burns HJG, Jarrett F, Wilson RE. Colon and rectal carcinoma in the west of Scotland: Symptoms, histologic characteristics, and outcome. *Am J Surg*. 1984;147(4):441-6.
47. อาคม ชัยวีระวัฒน์, อนันต์ กรลักษ์, ชีรวิทย์ คุหะเปรมะ. แนวทางการตรวจคัดกรองวินิจฉัย และรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และไส้ตรง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ: สถาบันมะเร็งแห่งชาติ; 2552.
48. โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colon cancer) [Internet]. 2013 [cited 2015 Nov 10]. Available from: <http://haamor.com/th/%E0%B8%A1%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%A3%E0%B9%87%E0%B8%87%E0%B8%A5%E0%B8%B3%E0%B9%84%E0%B8%AA%E0%B9%89%E0%B9%83%E0%B8%AB%E0%B8%8D%E0%B9%88/>.
49. Boyle P, Levin B. World Cancer Report. World Health Organization; 2008.
50. Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer*. 1997;21(5):233-300.
51. Panzuto F, Chiriatti A, Bevilacqua S, Giovannetti P, Russo G, Impinna S, et al. Symptom-based approach to colorectal cancer: survey of primary care physicians in Italy. *Dig Liver Dis*. 2003;35(12):869-75.
52. Colorectal Cancer Staging. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2004;54(6):362-5.
53. Hari DM, Leung AM, Lee J-H, Sim M-S, Vuong B, Chiu CG, et al. AJCC Cancer Staging Manual 7th Edition Criteria for Colon Cancer: Do the Complex Modifications Improve Prognostic Assessment? *J Am Coll Surg*. 2013;217(2):181-90.
54. Bowel Cancer Staging [Internet]. Bowel Cancer Atlas of Australia. 2014 [cited 2014 Sep 20]. Available from: <https://www.bowelcanceraustralia.org/bowel-cancer-staging>.
55. Introduction to pathology [Internet]. 2014 [cited 2014 Sep, 29]. Available from: <http://www.med.nu.ac.th/pathology/405213/book55/introduction-word.pdf>.

56. สำนักเทคโนโลยีสารสนเทศ. Hospital-based cancer registry annual report 2012. ANNUAL REPORT 2012. 2014:59-61.
57. de Gramont A, de Gramont A, Chibaudel B, Larsen AK, Tournigand C, André T. The Evolution of Adjuvant Therapy in the Treatment of Early-Stage Colon Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2011;10(4):218-26.
58. Poulogiannis G, Luo F, Arends MJ. RAS signalling in the colorectum in health and disease. *Cell Commun Adhes*. 2012;19(1):1-9.
59. Sridharan M, Hubbard JM, Grothey A. Colorectal cancer: how emerging molecular understanding affects treatment decisions. *Oncology (Williston Park)*. 2014;28(2):110-8.
60. Grunwald V, Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(12):851-67.
61. Messersmith WA, Ahnen DJ. Targeting EGFR in Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(17):1834-6.
62. "Class Labeling Changes to anti-EGFR monoclonal antibodies, cetuximab (Erbix) and panitumumab (Vectibix): KRAS Mutations" [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. 2010 [cited 2015 Nov 10]. Available from: <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm172905.htm>.
63. Shankaran V. Cost Considerations in the Evaluation and Treatment of Colorectal Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2015;16(8):41.
64. Brechbiel MW, Xu H, Baidoo K. Trifunctional imaging agent for monoclonal antibody tumor-targeted imaging. Google Patents; 2011.
65. Del Prete M, Giampieri R, Faloppi L, Bianconi M, Bittoni A, Andrikou K, et al. Panitumumab for the treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *Immunotherapy*. 2015;7(7):721-38.
66. Wei L, Shi J, Afari G, Bhattacharyya S. Preparation of clinical-grade <sup>89</sup>Zr-panitumumab as a positron emission tomography biomarker for evaluating

- epidermal growth factor receptor-targeted therapy. *J Labelled Comp Radiopharm.* 2014;57(1):25-35.
67. Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, et al. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2009;360(14):1408-17.
  68. Siddiqui AD, Piperdi B. KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(4):1168-76.
  69. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(5):663-71.
  70. Price TJ, Peeters M, Kim TW, Li J, Cascinu S, Ruff P, et al. Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2014;15(6):569-79.
  71. Cox AD, Der CJ. Ras Family Signaling: Therapeutic Targeting. *Cancer Biol Ther.* 2002;1(6):599-606.
  72. Taparowsky E, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M. Structure and activation of the human N-ras gene. *Cell.* 1983;34(2):581-6.
  73. Franz Watzinger TL. HRAS (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.* 1999;3(2):63-5.
  74. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989;49(17):4682-9.
  75. Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:779-827.
  76. Bos JL. p21ras: an oncoprotein functioning in growth factor-induced signal transduction. *Eur J Cancer.* 1995;31A(7-8):1051-4.

77. van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch.* 2008;453(5):417-31.
78. Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1756(2):81-2.
79. Weidlich S, Walsh K, Crowther D, Burczynski ME, Feuerstein G, Carey FA, et al. Pyrosequencing-based methods reveal marked inter-individual differences in oncogene mutation burden in human colorectal tumours. *Br J Cancer.* 2011;105(2):246-54.
80. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract.* 2009;205(12):858-62.
81. Jonsson M, Ekstrand A, Edekling T, Eberhard J, Grabau D, Borg D, et al. Experiences from treatment-predictive KRAS testing; high mutation frequency in rectal cancers from females and concurrent mutations in the same tumor. *BMC Clin Pathol.* 2009;9:8.
82. Hudecova I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clin Biochem.* 2015;48(15):948-56.
83. Nadauld L, Regan JF, Miotke L, Pai RK, Longacre TA, Kwok SS, et al. Quantitative and Sensitive Detection of Cancer Genome Amplifications from Formalin Fixed Paraffin Embedded Tumors with Droplet Digital PCR. *Transl Med* 2012;2(2).
84. Fakruddin M, Chowdhury A, Hossain MN, Mannan KSB, Mazumdar RM. Pyrosequencing-Principles and applications *Int J Life science & Pharma Res.* 2012;2(2):56-76.
85. Marsh S. Pyrosequencing applications. *Methods Mol Biol.* 2007;373:15-24.

86. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(9):1296-303.
87. Zheng R, Zhu C, Guo Q, Qin L, Wang J, Lu J, et al. Pyrosequencing for rapid detection of tuberculosis resistance in clinical isolates and sputum samples from re-treatment pulmonary tuberculosis patients. *BMC Infect Dis.* 2014;14:200.
88. Guerra A, Carrano M, Angrisani E, Puzziello A, Izzo G, Di Crescenzo V, et al. Detection of RAS mutation by pyrosequencing in thyroid cytology samples. *Int J Surg.* 2014;12 Suppl 1:S91-4.
89. Arita H, Narita Y, Matsushita Y, Fukushima S, Yoshida A, Takami H, et al. Development of a robust and sensitive pyrosequencing assay for the detection of IDH1/2 mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2014.
90. Sahnane N, Gueli R, Tibiletti MG, Bernasconi B, Stefanoli M, Franzi F, et al. Pyrosequencing for EGFR mutation detection: diagnostic accuracy and clinical implications. *Diagn Mol Pathol.* 2013;22(4):196-203.
91. Gonzalez de Castro D, Angulo B, Gomez B, Mair D, Martinez R, Suarez-Gauthier A, et al. A comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens. *Br J Cancer.* 2012;107(2):345-51.
92. Fariña Sarasqueta A, Moerland E, de Bruyne H, de Graaf H, Vrancken T, van Lijnschoten G, et al. SNaPshot and StripAssay as Valuable Alternatives to Direct Sequencing for KRAS Mutation Detection in Colon Cancer Routine Diagnostics. *J Mol Diagn.* 2011;13(2):199-205.
93. WU Mei DZ-w, LIU Jia-nan, SONG Yang, WANG Ya-li and ZHANG Gui-zhen. Improved Allele-specific Polymerase Chain Reaction for Single Nucleotide Polymorphism Genotyping. *CHEM RES.* 2010;26(2):259-62.
94. Cantafora A, Blotta I, Mercuri E, Calandra S, Bertolini S. Simple detection of a point mutation in LDL receptor gene causing familial hypercholesterolemia in

- southern Italy by allele-specific polymerase chain reaction. *J Lipid Res.* 1998;39(5):1101-5.
95. Evans J, Segal H. Novel multiplex allele-specific PCR assays for the detection of resistance to second-line drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(5):897-900.
96. Chia BS, Lanzas F, Rifat D, Herrera A, Kim EY, Sailer C, et al. Use of multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) to detect multidrug-resistant tuberculosis in Panama. *PLoS One.* 2012;7(7):e40456.
97. StrataClone PCR Cloning Kit Instruction Manual [Internet]. 2014 [cited 2014 Sep 20]. Available from: <http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/240205.pdf>.
98. Homo sapiens Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), transcript variant b, mRNA [Internet]. 2014 [cited 2014 Aug, 20]. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_004985.3](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_004985.3).
99. Blast. Nucleotide blast [Internet]. 2015 [cited 2015 Apr 20]. Available from: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).
100. Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator [Internet]. 2015 [cited 2015 Nov 11]. Available from: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>.
101. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med.* 2005;37(5):360-3.
102. Dolatkah R, Somi MH, Bonyadi MJ, Asvadi Kermani I, Farassati F, Dastgiri S. Colorectal cancer in Iran: molecular epidemiology and screening strategies. *J Cancer Epidemiol.* 2015;2015:643020.
103. Bosman F, Yan P. Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol J Pathol.* 2014;65(4):257-66.



104. Span M, Moerkerk PT, De Goeij AF, Arends JW. A detailed analysis of K-ras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 1996;69(3):241-5.
105. Van Cutsem E, Oliveira J. Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2009;20 Suppl 4:61-3.
106. Ausch C, Buxhofer-Ausch V, Oberkanins C, Holzer B, Minai-Pour M, Jahn S, et al. Sensitive detection of KRAS mutations in archived formalin-fixed paraffin-embedded tissue using mutant-enriched PCR and reverse-hybridization. *J Mol Diagn*. 2009;11(6):508-13.
107. Malapelle U, Carlomagno C, Salatiello M, De Stefano A, De Luca C, Bianco R, et al. KRAS mutation detection by high-resolution melting analysis significantly predicts clinical benefit of cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012;107(4):626-31.
108. Zhang C, Liu Y, Ring BZ, Nie K, Yang M, Wang M, et al. A novel multiplex tetra-primer ARMS-PCR for the simultaneous genotyping of six single nucleotide polymorphisms associated with female cancers. *PLoS One*. 2013;8(4):e62126.
109. Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One*. 2007;2(6):e537.
110. Dietrich D, Uhl B, Sailer V, Holmes EE, Jung M, Meller S, et al. Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PLoS One*. 2013;8(10):e77771.
111. Ludyga N, Grunwald B, Azimzadeh O, Englert S, Hofler H, Tapio S, et al. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch*. 2012;460(2):131-40.
112. Li J, Mao NY, Zhang C, Yang MJ, Wang M, Xu WB, et al. The development of a GeXP-based multiplex reverse transcription-PCR assay for simultaneous

- detection of sixteen human respiratory virus types/subtypes. *BMC Infect Dis.* 2012;12:189.
113. Bader T, Ismail A. Higher prevalence of KRAS mutations in colorectal cancer in Saudi Arabia: Propensity for lung metastasis. *Alexandria J Med.* 2014;50(3):203-9.
114. Wang J, Yang H, Shen Y, Wang S, Lin D, Ma L, et al. Direct sequencing is a reliable assay with good clinical applicability for KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Cancer Biomark.* 2013;13(2):89-97.
115. Liou JM, Wu MS, Shun CT, Chiu HM, Chen MJ, Chen CC, et al. Mutations in BRAF correlate with poor survival of colorectal cancers in Chinese population. *Int J Colorectal Dis.* 2011;26(11):1387-95.
116. Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet.* 2001;Chapter 9:Unit 9.8.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

### 1. การเตรียม EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ชั่ง  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 186.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และผสมให้เข้ากัน โดยการใส่แท่งแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer) แล้วทำการปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วยการเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 10 โมลาร์ ลงไป หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) เกือบที่ 4 องศาเซลเซียส

### 2. การเตรียม 10x Tris-borate EDTA buffer (TBE)

ชั่ง Tris base จำนวน 108 กรัม และ Boric acid จำนวน 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เติมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการใส่แท่งแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer) และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) เกือบที่อุณหภูมิห้อง

### 3. การเตรียม 5x Tris-borate EDTA buffer (TBE)

นำ 10x TBE ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (sterile water) จนครบ 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เกือบที่อุณหภูมิห้อง ใช้สำหรับการเตรียม 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis

### 4. การเตรียม 1x Tris-borate EDTA buffer (TBE)

นำ 10x TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (sterile water) จนครบ 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เกือบที่อุณหภูมิห้อง ใช้เป็น buffer สำหรับการรันเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส

### 5. การเตรียม 40 เปอร์เซ็นต์ Acrylamide (19:1) Acrylamide:Bis acrylamide

ชั่ง acrylamide จำนวน 95 กรัม และ N,N'-Methylene-bis-Acrylamide จำนวน 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (sterile water) หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร เก็บภายใต้หลอดแสงไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

### 6. การเตรียม 10 เปอร์เซ็นต์ Ammonium persulphate

ชั่ง Ammonium persulphate 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (sterile water) หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร เก็บภายใต้หลอดแสงไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

## 7. การเตรียม 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel electrophoresis

ทำการตวงน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (sterile water) 6.5 มิลลิลิตร, ตวง 5X TBE buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร, ตวงสารละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ (19:1) Acrylamide:Bis acrylamide ปริมาตร 3 มิลลิลิตร, ดูด 10 เปอร์เซ็นต์ Ammonium persulphate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ ดูดสารละลาย TEMED ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการใช้แท่งแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer) พร้อมทั้งประกอบเป็นแผ่นเจลที่มีความหนา 1 มิลลิเมตร ใส่หวี (comb) เพื่อให้เกิดช่องว่างของแผ่นเจลเพื่อใส่ตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เจลแข็ง นาน 15-20 นาที

## 8. การเตรียม 1:400 เท่า SBRgreen I nucleic acid staining

ทำการตวง 1x Tris-borate EDTA buffer (TBE) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร และดูด 10,000X SBRgreen I nucleic acid staining ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บภายใต้หลอดแสงไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

## 9. การเตรียม 2 เปอร์เซ็นต์ X-gal

ทำการชั่ง 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal) จำนวน 0.2 กรัม ทำให้ละลายด้วยการเติมสารละลาย dimethylformamide (DMF) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้งาน ดูดสารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์ X-gal ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และทำการ Spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ให้ทั่วและผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB แห่งก่อนใช้งาน

## 10. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar

ทำการชั่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth จำนวน 25 กรัม, Agar จำนวน 20 กรัม เเทลงในขวด Duran ละลายในน้ำกลั่น หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นเทอาหารลงจานอาหาร จานละ 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้แข็งตัว เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

### 11. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ทำการชั่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth จำนวน 25 กรัม, Agar จำนวน 20 กรัม เติลงในขวด Duran ละลายในน้ำกลั่น หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส เติมยา ampicillin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยที่ขณะเติมยา ให้อาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทอาหารลงจานอาหาร จานละ 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้แข็งตัว เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

### 12. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth

ทำการชั่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth ปริมาตร 25 กรัม เติลงในขวด Duran ละลายในน้ำกลั่น หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดขนาดเล็ก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อหลอด และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

### 13. การเตรียม 40 เปอร์เซนต์ glycerol

ทำการตวง glycerol ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน Homo sapiens Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), transcript variant b, mRNA, NCBI Reference Sequence: NM\_004985.4

LOCUS NM\_004985 5765 bp mRNA linear PRI 06-SEP-2015  
DEFINITION Homo sapiens Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), transcript variant b, mRNA.  
ACCESSION NM\_004985  
VERSION NM\_004985.4 GI:575403057  
KEYWORDS RefSeq.  
SOURCE Homo sapiens (human)  
ORGANISM Homo sapiens  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 5765)  
AUTHORS Hou ไม่ทราบ W, Abi-Raad R, Alomari AK, Hui P and Buza N.  
TITLE Diagnostic application of KRAS mutation test ไม่ทราบ in uterine microglandular proliferations  
JOURNAL Hum. Pathol. 46 (7), 1000-1005 (2015)  
PUBMED 25997988  
REMARK GeneRIF: KRAS mutation analysis may offer additional discriminatory power in separatiไม่ทราบ benign microglandular hyperplasia from endometrial adenocarcinoma with microglandular pattern.

REFERENCE 2 (bases 1 to 5765)  
AUTHORS Sato S, Motoi N, Hiramatsu M, Miyauchi E, Ono H, Saito Y, Nagano H, Ninomiya H, Inamura K, Uehara H, Mun M, Sakao Y, Okumura S, Tsuchida M and Ishikawa Y.  
TITLE Pulmonary adenocarcinoma in situ: analyses of a large series with reference to smokiไม่ทราบ, driver mutations, and receptor tyrosine kinase pathway activation  
JOURNAL Am. J. Surg. Pathol. 39 (7), 912-921 (2015)  
PUBMED 25970685  
REMARK GeneRIF: Our results suggest that smokiไม่ทราบ is not a major cause of adenocarcinomas in situ. Rather, smokiไม่ทราบ may play a role in progression of adenocarcinomas in situ to invasive adenocarcinoma with AIS features

REFERENCE 3 (bases 1 to 5765)  
AUTHORS He M, Jackson CL, Gubrod RB, Breese V, Steinhoff M, Lawrence WD and Xiouไม่ทราบ J.  
TITLE KRAS Mutations in Mucinous Lesions of the Uterus  
JOURNAL Am. J. Clin. Pathol. 143 (6), 778-784 (2015)  
PUBMED 25972319  
REMARK GeneRIF: The results suggest a possible association between KRAS mutations and mucinous differentiation in endometrial carcinogenesis

REFERENCE 4 (bases 1 to 5765)  
AUTHORS Mazhab-Jafari MT, Marshall CB, Smith MJ, Gasmi-Seabrook GM, Stathopoulos PB, Inagaki F, Kay LE, Neel BG and Ikura M.  
TITLE Oncogenic and RASopathy-associated K-ras mutations relieve membrane-dependent occlusion of the effector-binding ไม่ทราบ site  
JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112 (21), 6625-6630 (2015)  
PUBMED 25941399  
REMARK GeneRIF: The effector-binding ไม่ทราบ region of activated K-ras4B is occluded by interaction with the membrane in one of the NMR-observable, and thus highly populated, conformational states.

REFERENCE 5 (bases 1 to 5765)  
AUTHORS Gripp, K.W. and Lin, A.E.  
TITLE Costello Syndrome  
JOURNAL (in) Pagon RA, Adam MP, Ardiไม่ทราบer HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fouไม่ทราบ CT, Smith RJH and Stephens K (Eds.); GENEREVIEWS (R); (1993)  
PUBMED 20301680

REFERENCE 6 (bases 1 to 5765)  
AUTHORS Rauen, K.A.  
TITLE Cardiofaciocutaneous Syndrome  
JOURNAL (in) Pagon RA, Adam MP, Ardiไม่ทราบer HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fouไม่ทราบ CT, Smith RJH and Stephens K (Eds.);

GENEREVIEWS (R);  
(1993)  
PUBMED 20301365  
REFERENCE 7 (bases 1 to 5765)  
AUTHORS Allanson, J.E. and Roberts, A.E.  
TITLE Noonan Syndrome  
JOURNAL (in) Pagon RA, Adam MP, Ardiani <sup>พินทุวรี</sup> HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean L JH, Bird TD, Dolan CR, Fournier <sup>พินทุวรี</sup> CT, Smith RJH and Stephens K (Eds.);  
GENEREVIEWS (R);  
(1993)  
PUBMED 20301303  
REFERENCE 8 (bases 1 to 5765)  
AUTHORS Grimmond SM, Raghavan D and Russell PJ.  
TITLE Detection of a rare point mutation in Ki-ras of a human bladder cancer xenograft by polymerase chain reaction and direct sequencing <sup>พินทุวรี</sup>  
JOURNAL Urol. Res. 20 (2), 121-126 (1992)  
PUBMED 1553789  
REFERENCE 9 (bases 1 to 5765)  
AUTHORS Haritani H, Esumi M, Uchida T and Shikata T.  
TITLE Oncogene expression in the liver tissue of patients with nonneoplastic liver disease  
JOURNAL Cancer 67 (10), 2594-2598 (1991)  
PUBMED 2015559  
REFERENCE 10 (bases 1 to 5765)  
AUTHORS Slebos RJ, Habets GG, Evers SG, Mooi WJ and Rodenhuis S.  
TITLE Allele-specific detection of K-ras oncogene expression in human non-small-cell lung <sup>พินทุวรี</sup> carcinomas  
JOURNAL Int. J. Cancer 48 (1), 51-56 (1991)  
PUBMED 1850383  
COMMENT REVIEWED REFSEQ: This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from M54968.1, AK292510.1, AW117295.1, AC092794.10 and CD245555.1. This sequence is a reference standard in the RefSeqGene project. On Jan 22, 2014 this sequence version replaced gi:34485723.

Summary: This gene, a Kirsten ras oncogene homolog from the mammalian ras gene family, encodes a protein that is a member of the small GTPase superfamily. A single <sup>พินทุวรี</sup> amino acid substitution is responsible for an activating <sup>พินทุวรี</sup> mutation. The transformant <sup>พินทุวรี</sup> protein that results is implicated in various malignancies, including <sup>พินทุวรี</sup> lung adenocarcinoma, mucinous adenoma, ductal carcinoma of the pancreas and colorectal carcinoma. Alternative splicing <sup>พินทุวรี</sup> leads to variants encoding <sup>พินทุวรี</sup> two isoforms that differ in the C-terminal region. [provided by RefSeq, Jul 2008].

Transcript Variant: This variant (b) is composed of five exons and lacks exon 4a which the longer <sup>พินทุวรี</sup> transcript variant (a) includes. This predominant variant (b) has a cds that terminates in exon 4b and encodes isoform b.

Sequence Note: This RefSeq record was created from transcript and genomic sequence data to make the sequence consistent with the reference genome assembly. The genomic coordinates used for the transcript record were based on transcript alignments.

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the publications that are available for this gene. Please see the Gene record to access additional publications.

##Evidence-Data-START##

Transcript exon combination :: M54968.1, AK292510.1 [ECO:0000332]  
RNAseq introns :: <sup>พินทุวรี</sup> sample supports all introns  
SAMEA2145743 [ECO:0000348]

##Evidence-Data-END##

COMPLETENESS: complete on the 3' end.

PRIMARY	REFSEQ_SPAN	PRIMARY_IDENTIFIER	PRIMARY_SPAN	COMP
	1-225	M54968.1	1-225	
	226-935	AK292510.1	187-896	
	936-1369	AW117295.1	1-434	c
	1370-3220	AC092794.10	18464-20314	



	3221-3902	CD245555.1	17-698
	3903-5765	AC092794.10	20997-22859
FEATURES	Location/Qualifiers		

source 1..5765  
 /organism="Homo sapiens"  
 /mol\_type="mRNA"  
 /db\_xref="taxon:9606"  
 /chromosome="12"  
 /map="12p12.1"

gene 1..5765  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A; K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /note="Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog"  
 /db\_xref="GeneID:3845"  
 /db\_xref="HGNC:HGNC:6407"  
 /db\_xref="HPRD:01817"  
 /db\_xref="MIM:190070"

exon 1..181  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A; K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /inference="alignment:Splign:1.39.8"

misc feature 130..132  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A; K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /note="upstream in-frame stop codon"

STS 178..303  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A; K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /standard\_name="GDB:177365"  
 /db\_xref="UniSTS:154863"

exon 182..303  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A; K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /inference="alignment:Splign:1.39.8"

CDS 193..759  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A; K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /note="isoform b is encoded by transcript variant b; v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog; transforminโปรตีน protein p21; c-Kirsten-ras protein; K-ras p21 protein; oncogene KRAS2; PR310 c-K-ras oncogene; cellular c-Ki-ras2 proto-oncogene; GTPase KRas; K-ras 2"  
 /codon\_start=1  
 /product="GTPase KRas isoform b"  
 /protein\_id="NP\_004976.2"  
 /db\_xref="GI:15718761"  
 /db\_xref="CCDS:CCDS8702.1"  
 /db\_xref="GeneID:3845"  
 /db\_xref="HGNC:HGNC:6407"  
 /db\_xref="HPRD:01817"  
 /db\_xref="MIM:190070"

```
/translation="MTEYKLVVVGAGVGKSAITQLIQNHVDEYDPTIEDSYRKQV
VIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHYYREQIKR
VKDSEEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLV
REIRKHKEKMSKDGKKKKKKSKTKCVIM"
```

STS 195..301  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
 K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /standard\_name="GDB:177541"  
 /db\_xref="UniSTS:154920"

STS 204..302  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
 K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /standard\_name="GDB:177536"  
 /db\_xref="UniSTS:154916"

exon 304..482  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
 K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /inference="alignment:SpIign:1.39.8"

STS 304..482  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
 K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /standard\_name="GDB:181550"  
 /db\_xref="UniSTS:155276"

STS 306..433  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
 K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /standard\_name="GDB:177540"  
 /db\_xref="UniSTS:154919"

exon 483..642  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
 K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /inference="alignment:SpIign:1.39.8"

exon 643..5765  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
 K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /inference="alignment:SpIign:1.39.8"

STS 723..1099  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
 K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /standard\_name="GDB:182559"  
 /db\_xref="UniSTS:155390"

STS 783..1081  
 /gene="KRAS"  
 /gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
 K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
 /standard\_name="GDB:182132"  
 /db\_xref="UniSTS:155355"

STS 832..1031  
/gene="KRAS"  
/gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
/standard\_name="G44377"  
/db\_xref="UniSTS:95161"

STS 1092..1219  
/gene="KRAS"  
/gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
/standard\_name="RH65999"  
/db\_xref="UniSTS:85156"

STS 1790..1932  
/gene="KRAS"  
/gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
/standard\_name="GDB:384734"  
/db\_xref="UniSTS:157091"

STS 3050..3260  
/gene="KRAS"  
/gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
/standard\_name="RH80031"  
/db\_xref="UniSTS:91103"

STS 3394..3519  
/gene="KRAS"  
/gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
/standard\_name="SHGC-64023"  
/db\_xref="UniSTS:44527"

STS 4502..4641  
/gene="KRAS"  
/gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
/standard\_name="G62075"  
/db\_xref="UniSTS:139200"

STS 4621..5466  
/gene="KRAS"  
/gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
/standard\_name="KRAS2\_V192"  
/db\_xref="UniSTS:277443"

STS 5562..5687  
/gene="KRAS"  
/gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
/standard\_name="SHGC-33831"  
/db\_xref="UniSTS:32288"

STS 5591..5688  
/gene="KRAS"  
/gene\_synonym="C-K-ras; CFC2; K-ras2A; K-ras2B; K-ras4A;  
K-ras4B; KI-ras; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RALD; RASK2"  
/standard\_name="Bda12d09"  
/db\_xref="UniSTS:86214"

## ORIGIN

1 tcctagggcgg cggccgcggc ggcggaggca gcagcggcgg cggcagtggc ggcggcgaag  
 61 gtggcggcgg ctcggccagt actcccggcc cccgccattt cggactggga gcgagcggcg  
 121 cgcaggcact gaaggcggcg gcggggccag aggctcagcg gctcccaggt gcgggagaga  
 181 ggcctgctga aaatgactga atataaactt gtggtagttg gagctgggtgg cgtaggcaag  
 241 agtgccttga cgatacagct aattcagaat cattttgtgg acgaatatga tccaacaata  
 301 gaggattcct acaggaagca agtagtaatt gatggagaaa cctgtctctt ggatattctc  
 361 gacacagcag gtcaagagga gtacagtgca atgagggacc agtacatgag gactggggag  
 421 ggctttcttt gtgtatttgc cataaataat actaaatcat ttgaagatat tcaccattat  
 481 agagaacaaa ttaaaagagt taaggactct gaagatgtac ctatggctct agtaggaaat  
 541 aaatgtgatt tgccttctag aacagttagc acaaaacagg ctccaggactt agcaagaagt  
 601 tatggaattc cttttattga aacatcagca aagacaagac aggggtgtga tgatgccttc  
 661 tatacattag ttcgagaaat tcgaaaacat aaagaaaaga tgagcaaaaga cgttaaaaag  
 721 aagaaaaaga agtcaaagac aaagtgtgta attatgtaaa tacaatttgt actttttct  
 781 taaggcatac tagtacaagt ggtaattttt gtacattaca ctaaattatt agcatttggt  
 841 ttagcattac ctaatttttt tctgtctcca tgcagactgt tagcttttac cttaaagtct  
 901 tatttttaaa tgacagtgga agtttttttt tctctaaagt gccagatttc ccagattttt  
 961 ggtttttgaa ctagcaatgc ctgtgaaaaa gaaactgaat acctaagatt tctgtcttgg  
 1021 ggtttttggt gcatgcagtt gattacttct tatttttctt accaattgtg aatgttgggtg  
 1081 tgaacaaaat taatgaagct ttgaaatcat ccctattctg tgttttatct agtcacataa  
 1141 atggattaat tactaatttc agttgagacc ttctaattgg tttttactga aacattgagg  
 1201 gaacacaaa ttaaggctct cctgatgatg attcctctag gcatcatgtc ctatagtttg  
 1261 tcaccctga tgaatgtaaa gttacactgt tcacaaaagg tttgtctctt ttccactgct  
 1321 attagtcatg gtcactctcc ccaaaaatatt atattttttc tataaaaaga aaaaaatgga  
 1381 aaaaaattac aaggcaatgg aaactattat aaggccattt ccttttcaca ttagataaat  
 1441 tactataaag actcctaata gcttttctcg ttaaggcaga cccagtatga aatggggatt  
 1501 attatagcaa ccattttggg gctatattta catgctacta aatttttata ataattgaaa  
 1561 agattttaac aagtataaaa aattctcata ggaatataat gtagtctccc tgtgtcagac  
 1621 tgctctttca tagtataact ttaaactctt tcttcaactt gagtctttga agatagtttt  
 1681 aattctgctt gtgacattaa aagattattt gggccagtta tagcttatta ggtgttgaag  
 1741 agaccaaggt tgcaaggcca ggcctgtgtg gaacctttga gctttcatag agagtttcac  
 1801 agcatggact gtgtcccac ggtcoatccag tgttgtcatg cattggttag tcaaaatggg  
 1861 gagggactag ggcagtttgg atagctcaac aagatacaat ctcaactctgt ggtggtcctg  
 1921 ctgacaaatc aagagcattg cttttgtttc ttaagaaaaa aaactctttt ttaaaaatta  
 1981 cttttaaata ttaactcaaa agttgagatt ttgggggtgg ggtgtgcca gacattaatt  
 2041 ttttttttaa acaatgaagt gaaaaagttt tacaatctct aggtttggct agttctctta  
 2101 acaactggta aattaacatt gcataaacac ttttcaagtc tgatccatat ttaataatgc  
 2161 tttaaaataa aaataaaaac aatccttttg ataaatttaa aatggttact attttaaaat  
 2221 aaatgaagtg agatggcatg gtgaggtgaa agtatcactg gactaggaag aaggtgactt  
 2281 aggttctaga taggtgtctt ttaggactct gattttgagg acatcactta ctatccattt  
 2341 cttcatgtta aaagaagtca tctcaaacct ttagtttttt ttttttaca ctatgtaatt  
 2401 tatattccat ttacataaag atacacttat ttgtcaagct cagcacaatc ttaaaaattt  
 2461 taacctatgt tacaccatct tcagtgccag tcttgggcaa aattgtgcaa gaggtgaagt  
 2521 ttatatttga atatccatct tcgttttagg actcttcttc catattagtg tcaatctgcc  
 2581 tccctacett ccacatgccc catgacttga tgcagtttta atacttgtaa tccccctaac  
 2641 ctaaaagatt actgctgctg tggatatctc catgaaagtt tcccactgag tcaactcaga  
 2701 aatgccttac atcttatttc ctccagggctc aagagaatct gacagatacc ataaaaggat  
 2761 ttgacctaat cactaatttt caggtgtgtg ctgatgcttt gaacatctct ttgctgcccc  
 2821 atccattagc gacagttaga tttttcaaac ctggatgtaa tagacagaac ccatccagct  
 2881 gcaaggagaa ttaataaag atagtgtgta aagaattcct taggtaatct aactatgaga  
 2941 ctactcctgg taacagtaat acattccatt gttttagtaa ccgaaatct tcatgcaatg  
 3001 aaaaataact taattcatga agcttacttt ttttttttgg tgtcagagtc togtcttgt  
 3061 caccaggctt ggaatgcagt ggcgcatctc cagctcactg caacctccat ctcccagggt  
 3121 caagcgattc tcgtgcctcg gctcctgag tagctgggat tacaggcgtg tgccactaca  
 3181 ctcaactaat tttgtattt ttaggagaga cggggtttca cctgttggc caggctgggtc  
 3241 tcgaactcct gacctcaagt gattcaccac ccttggcctc ataaacctgt tttgcagaac  
 3301 tcatattatc agcaaatatt tattgagtgc ctaccagatg ccagtcaccg cacaaggcac  
 3361 tgggtatatg gtatcccaa acaagagaca taatcccgtt ccttaggtag tgctagtgtg  
 3421 gtctgtaata tcttactaag gcctttgta tacgaccag agataaacag atgctgtattt  
 3481 tagttttgca aagaaggggt ttggtctctg tgccagctct ataattgttt tgctacgatt  
 3541 ccaactgaaac tcttcgatca agctacttta tgtaaactac ttcatgtttt taagggaata  
 3601 aacttgatta tattgtttt ttatttggca taactgtgat tcttttagga caaactctgt  
 3661 acacattaaag gtgtatgtca gatattcata ttgaccctaa tgtgtaatat tccagttttc  
 3721 tctgcataag taattaaaat atacttaaaa ataatagtt ttatctgggt acaataaac  
 3781 aggtgcctga actagttcac agacaaggaa acttctatgt aaaaatcact atgatttctg  
 3841 aattgctatg tgaactaca gatcttttga acactgttta ggtagggtgt taagacttac  
 3901 acagtacctc gtttctacac agagaaaaga atggccatac ttcaggaaact gcagtgttta  
 3961 tgaggggata tttaggcctc ttgaattttt gatgtagatg ggcatttttt taaggtagtg  
 4021 gtttaattacc tttatgtgaa ctttgaatgg ttaacaaaaa gatgtttttt taagagatt  
 4081 ttaaaagggg agaattctag aaataaatgt tacctaatta ttacagcctt agagcaaaa  
 4141 atccttgggtg aagttttttt aaaaaaagct aaattacata gacttaggca ttaacatggt

```

4201 tgtggaagaa tatagcagac gtatattgta tcatttgagt gaatgttccc aagtaggcat
4261 tctaggctct atttaactga gtcacactgc ataggaattht agaacctaac tttttaggtg
4321 tatcaaaact gttgtacca ttgcacaatt ttgtccta atatacatag aaactttgtg
4381 gggcatgtta agttacagtt tgcaacaagt catctcattt gtattccatt gatthttttt
4441 ttcttctaaa cattttttct tcaaacagta tataactttt tttaggggat ttttttttag
4501 acagcaaaaa ctatctgaag atttccattt gtcaaaaagt aatgatttct tgataattgt
4561 gtagtaagt tttttagaac ccagcagtta ccttaaagct gaatttatat ttagtaactt
4621 ctgtgttaat actggatagc atgaattctg cattgagaaa ctgaaatagct gtcataaaaat
4681 gaaactttct ttctaaagaa agatactcac atgagttctt gaagaatagt cataactaga
4741 ttaagatctg tgtttttagt taatagtttg aagtgcctgt ttgggataat gataggtaat
4801 ttagatgaat ttaggggaaa aaaaagtta ctgcagatat gttgagggcc catctctccc
4861 cccacacccc cacagagcta actgggttac agtggtttat cggaaagttht ccaattccac
4921 tgtcttgtgt tttcatgttg aaaactttt tgcatthttc ctttgagtgc caatttctta
4981 ctagtactat ttcttaatgt aacatgttta cctggaatgt atthtaacta tttttgtata
5041 gtgtaaaactg aaacatgcac atthtgtaca ttgtgctthc ttttggtgga catatgcagt
5101 gtgatccagt tgthttccat catttggttg cgctgaccta ggaatgttg tcatatcaaa
5161 cattaaaaat gaccactctt ttaattgaaa ttaactthta aatgtthata ggagtatgtg
5221 ctgtgaagtg atctaaaatt tgaatattt ttgtcatgaa ctgtactact cctaattatt
5281 gtaatgtaat aaaaatagtt acagtgacta tgagtgtgta tttattcatg aaatttgaac
5341 tgthttgccc gaaatggata tggaaactt tataagccat agacactata gtataccagt
5401 gaatctthta tgcagcttgt tagaagtatc cthttttct aaaaggtgct gtggatatta
5461 tgtaaaaggcg tgthttgctta aacttaaac catatthtaga agtagatgca aaacaaatct
5521 gcctthtatga caaaaaata ggataacatt atthtttat thcctthtat caaagaaggt
5581 aattgataca caacaggtga ctggthttta ggcccaagg tagcagcagc aacattaata
5641 atggaataa ttgaatagtt agttatgtat gthaatgcca gtcaccagca ggctatthca
5701 aggtcagaag taatgactcc atacatatta thtttttcta taactacatt taaatcatta
5761 ccagg

```

//

\*\* บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์คู่หลักให้คร่อมยีน *K-ras* ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13, บริเวณตัวอักษรหนาและ label สีเหลือง แสดงตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 ที่นิวคลีโอไทด์ที่ 34, 35 และ 38

## รายละเอียดข้อมูลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ด้วยวิธี Pyrosequencing

ตารางที่ 26 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี Pyrosequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง (FFPE)	ผลการตรวจวิเคราะห์	ตัวอย่าง(FFPE)	ผลการตรวจวิเคราะห์	ตัวอย่าง(FFPE)	ผลการตรวจวิเคราะห์
1	Wild-type	46	Wild-type	91	Wild-type
2	Wild-type	47	Wild-type	92	Wild-type
3	Wild-type	48	Wild-type	93	Wild-type
4	Wild-type	49	Wild-type	94	Wild-type
5	Wild-type	50	Wild-type	95	Wild-type
6	Wild-type	51	Wild-type	96	Wild-type
7	Wild-type	52	Wild-type	97	Wild-type
8	Wild-type	53	Wild-type	98	Wild-type
9	Wild-type	54	Wild-type	99	Wild-type
10	Wild-type	55	Wild-type	100	Wild-type
11	Wild-type	56	Wild-type	101	Wild-type
12	Wild-type	57	Wild-type	102	Wild-type
13	Wild-type	58	Wild-type	103	Wild-type
14	Wild-type	59	Wild-type	104	Wild-type
15	Wild-type	60	Wild-type	105	Wild-type
16	Wild-type	61	Wild-type	106	Wild-type
17	Wild-type	62	Wild-type	107	Wild-type
18	Wild-type	63	Wild-type	108	Wild-type
19	Wild-type	64	Wild-type	109	Wild-type
20	Wild-type	65	Wild-type	110	Wild-type
21	Wild-type	66	Wild-type	111	Wild-type
22	Wild-type	67	Wild-type	112	Wild-type
23	Wild-type	68	Wild-type	113	Wild-type
24	Wild-type	69	Wild-type	114	Wild-type
25	Wild-type	70	Wild-type	115	Wild-type
26	Wild-type	71	Wild-type	116	Wild-type
27	Wild-type	72	Wild-type	117	Wild-type
28	Wild-type	73	Wild-type	118	Wild-type
29	Wild-type	74	Wild-type	119	Wild-type
30	Wild-type	75	Wild-type	120	Wild-type
31	Wild-type	76	Wild-type	121	Wild-type
32	Wild-type	77	Wild-type	122	Wild-type
33	Wild-type	78	Wild-type	123	Wild-type
34	Wild-type	79	Wild-type	124	Wild-type
35	Wild-type	80	Wild-type	125	Wild-type
36	Wild-type	81	Wild-type	126	Wild-type
37	Wild-type	82	Wild-type	127	Wild-type
38	Wild-type	83	Wild-type	128	Wild-type
39	Wild-type	84	Wild-type	129	Wild-type
40	Wild-type	85	Wild-type	130	Wild-type
40	Wild-type	86	Wild-type	131	Wild-type
42	Wild-type	87	Wild-type	132	Wild-type
43	Wild-type	88	Wild-type	133	Wild-type
44	Wild-type	89	Wild-type	134	Wild-type
45	Wild-type	90	Wild-type	135	Wild-type

ตารางที่ 27 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี Pyrosequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง (ต่อ)

ตัวอย่าง(FFPE)	ผลการตรวจวิเคราะห์	ตัวอย่าง(FFPE)	ผลการตรวจวิเคราะห์	ตัวอย่าง(FFPE)	ผลการตรวจวิเคราะห์
136	Wild-type	181	nt.35 G>A (G12D)	226	nt.38 G>A (G13D)
137	Wild-type	182	nt.35 G>A (G12D)	227	nt.38 G>A (G13D)
138	Wild-type	183	nt.35 G>A (G12D)	228	nt.38 G>A (G13D)
139	Wild-type	184	nt.35 G>A (G12D)	229	nt.38 G>A (G13D)
140	Wild-type	185	nt.35 G>A (G12D)	230	nt.38 G>A (G13D)
141	Wild-type	186	nt.35 G>A (G12D)	231	nt.38 G>A (G13D)
142	Wild-type	187	nt.35 G>A (G12D)	232	nt.38 G>A (G13D)
143	Wild-type	188	nt.35 G>A (G12D)	233	nt.38 G>A (G13D)
144	Wild-type	189	nt.35 G>A (G12D)	234	nt.38 G>A (G13D)
145	Wild-type	190	nt.35 G>C (G12A)	235	nt.38 G>A (G13D)
146	Wild-type	191	nt.35 G>C (G12A)	236	nt.38 G>A (G13D)
147	Wild-type	192	nt.35 G>C (G12A)	237	nt.38 G>A (G13D)
148	Wild-type	193	nt.35 G>C (G12A)	238	nt.38 G>A (G13D)
149	Wild-type	194	nt.35 G>C (G12A)	239	nt.38 G>A (G13D)
150	Wild-type	195	nt.35 G>C (G12A)	240	nt.38 G>A (G13D)
151	nt.34 G>A (G12S)	196	nt.35 G>C (G12A)	241	nt.38 G>A (G13D)
152	nt.34 G>A (G12S)	197	nt.35 G>T (G12V)	242	nt.38 G>A (G13D)
153	nt.34 G>A (G12S)	198	nt.35 G>T (G12V)	243	nt.38 G>A (G13D)
154	nt.34 G>C (G12R)	199	nt.35 G>T (G12V)	244	nt.38 G>A (G13D)
155	nt.34 G>T (G12C)	200	nt.35 G>T (G12V)	245	nt.38 G>A (G13D)
156	nt.34 G>T (G12C)	201	nt.35 G>T (G12V)	246	nt.38 G>A (G13D)
157	nt.34 G>T (G12C)	202	nt.35 G>T (G12V)	247	nt.38 G>A (G13D)
158	nt.34 G>T (G12C)	203	nt.35 G>T (G12V)	248	nt.38 G>A (G13D)
159	nt.35 G>A (G12D)	204	nt.35 G>T (G12V)	249	nt.38 G>A (G13D)
160	nt.35 G>A (G12D)	205	nt.35 G>T (G12V)	250	nt.38 G>A (G13D)
161	nt.35 G>A (G12D)	206	nt.35 G>T (G12V)	251	nt.38 G>A (G13D)
162	nt.35 G>A (G12D)	207	nt.35 G>T (G12V)	252	nt.38 G>A (G13D)
163	nt.35 G>A (G12D)	208	nt.35 G>T (G12V)	253	nt.38 G>A (G13D)
164	nt.35 G>A (G12D)	209	nt.35 G>T (G12V)	254	nt.38 G>A (G13D)
165	nt.35 G>A (G12D)	210	nt.35 G>T (G12V)	255	nt.38 G>A (G13D)
166	nt.35 G>A (G12D)	211	nt.35 G>T (G12V)	256	nt.38 G>A (G13D)
167	nt.35 G>A (G12D)	212	nt.38 G>A (G13D)	257	nt.38 G>A (G13D)
168	nt.35 G>A (G12D)	213	nt.38 G>A (G13D)	258	nt.38 G>A (G13D)
169	nt.35 G>A (G12D)	214	nt.38 G>A (G13D)	259	nt.38 G>A (G13D)
170	nt.35 G>A (G12D)	215	nt.38 G>A (G13D)	260	nt.38 G>A (G13D)
171	nt.35 G>A (G12D)	216	nt.38 G>A (G13D)	261	nt.38 G>A (G13D)
172	nt.35 G>A (G12D)	217	nt.38 G>A (G13D)	262	nt.38 G>A (G13D)
173	nt.35 G>A (G12D)	218	nt.38 G>A (G13D)	263	nt.38 G>A (G13D)
174	nt.35 G>A (G12D)	219	nt.38 G>A (G13D)	264	nt.38 G>A (G13D)
175	nt.35 G>A (G12D)	220	nt.38 G>A (G13D)	265	nt.38 G>A (G13D)
176	nt.35 G>A (G12D)	221	nt.38 G>A (G13D)	266	nt.38 G>A (G13D)
177	nt.35 G>A (G12D)	222	nt.38 G>A (G13D)	267	nt.38 G>A (G13D)
178	nt.35 G>A (G12D)	223	nt.38 G>A (G13D)	268	nt.38 G>A (G13D)
179	nt.35 G>A (G12D)	224	nt.38 G>A (G13D)	269	nt.38 G>A (G13D)
180	nt.35 G>A (G12D)	225	nt.38 G>A (G13D)	270	nt.38 G>A (G13D)

## รายละเอียดข้อมูลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ด้วยวิธี MAS-PCR

ตารางที่ 28 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นด้วยหลักการ AS-primer ด้านปลาย 3' จำเพาะต่อดีเอ็นเอต้นแบบชนิดกลายพันธุ์ จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง (FFPE)	ผลการตรวจวิเคราะห์	ตัวอย่าง (FFPE)	ผลการตรวจวิเคราะห์	ตัวอย่าง (FFPE)	ผลการตรวจวิเคราะห์
1	Wild-type	46	Wild-type	91	Wild-type
2	Wild-type	47	Wild-type	92	Wild-type
3	Wild-type	48	Wild-type	93	Wild-type
4	Wild-type	49	Wild-type	94	Wild-type
5	Wild-type	50	Wild-type	95	Wild-type
6	Wild-type	51	Wild-type	96	Wild-type
7	Wild-type	52	Wild-type	97	Wild-type
8	Wild-type	53	Wild-type	98	Wild-type
9	Wild-type	54	Wild-type	99	Wild-type
10	Wild-type	55	Wild-type	100	Wild-type
11	Wild-type	56	Wild-type	101	Wild-type
12	Wild-type	57	Wild-type	102	Wild-type
13	Wild-type	58	Wild-type	103	Wild-type
14	Wild-type	59	Wild-type	104	Wild-type
15	Wild-type	60	Wild-type	105	Wild-type
16	Wild-type	61	Wild-type	106	Wild-type
17	Wild-type	62	Wild-type	107	Wild-type
18	Wild-type	63	Wild-type	108	Wild-type
19	Wild-type	64	Wild-type	109	Wild-type
20	Wild-type	65	Wild-type	110	Wild-type
21	Wild-type	66	Wild-type	111	Wild-type
22	Wild-type	67	Wild-type	112	Wild-type
23	Wild-type	68	Wild-type	113	Wild-type
24	Wild-type	69	Wild-type	114	Wild-type
25	Wild-type	70	Wild-type	115	Wild-type
26	Wild-type	71	Wild-type	116	Wild-type
27	Wild-type	72	Wild-type	117	Wild-type
28	Wild-type	73	Wild-type	118	Wild-type
29	Wild-type	74	Wild-type	119	Wild-type
30	Wild-type	75	Wild-type	120	Wild-type
31	Wild-type	76	Wild-type	121	Wild-type
32	Wild-type	77	Wild-type	122	Wild-type
33	Wild-type	78	Wild-type	123	Wild-type
34	Wild-type	79	Wild-type	124	Wild-type
35	Wild-type	80	Wild-type	125	Wild-type
36	Wild-type	81	Wild-type	126	Wild-type
37	Wild-type	82	Wild-type	127	Wild-type
38	Wild-type	83	Wild-type	128	Wild-type
39	Wild-type	84	Wild-type	129	Wild-type
40	Wild-type	85	Wild-type	130	Wild-type
40	Wild-type	86	Wild-type	131	Wild-type
42	Wild-type	87	Wild-type	132	Wild-type
43	Wild-type	88	Wild-type	133	Wild-type
44	Wild-type	89	Wild-type	134	Wild-type
45	Wild-type	90	Wild-type	135	Wild-type



ตารางที่ 29 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นด้วยหลักการ AS-primer ด้านปลาย 3' จำเพาะต่อดีเอ็นเอต้นแบบชนิดกลายพันธุ์ จากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จำนวน 270 ตัวอย่าง (ต่อ)

ตัวอย่าง (FFPE)	ผลการตรวจวิเคราะห์	ตัวอย่าง (FFPE)	ผลการตรวจวิเคราะห์	ตัวอย่าง (FFPE)	ผลการตรวจวิเคราะห์
136	Wild-type	181	nt.35 G>A (G12D)	226	nt.38 G>A (G13D)
137	Wild-type	182	nt.35 G>A (G12D)	227	nt.38 G>A (G13D)
138	Wild-type	183	nt.35 G>A (G12D)	228	nt.38 G>A (G13D)
139	Wild-type	184	nt.35 G>A (G12D)	229	nt.38 G>A (G13D)
140	Wild-type	185	nt.35 G>A (G12D)	230	nt.38 G>A (G13D)
141	Wild-type	186	nt.35 G>A (G12D)	231	nt.38 G>A (G13D)
142	Wild-type	187	nt.35 G>A (G12D)	232	nt.38 G>A (G13D)
143	Wild-type	188	nt.35 G>A (G12D)	233	nt.38 G>A (G13D)
144	Wild-type	189	nt.35 G>A (G12D)	234	nt.38 G>A (G13D)
145	Wild-type	190	Wild-type	235	nt.38 G>A (G13D)
146	Wild-type	191	nt.35 G>C (G12A)	236	nt.38 G>A (G13D)
147	Wild-type	192	nt.35 G>C (G12A)	237	nt.38 G>A (G13D)
148	Wild-type	193	nt.35 G>C (G12A)	238	nt.38 G>A (G13D)
149	Wild-type	194	Wild-type	239	nt.38 G>A (G13D)
150	Wild-type	195	Wild-type	240	nt.38 G>A (G13D)
151	nt.34 G>A (G12S)	196	nt.35 G>C (G12A)	241	nt.38 G>A (G13D)
152	nt.34 G>A (G12S)	197	nt.35 G>T (G12V)	242	nt.38 G>A (G13D)
153	nt.34 G>A (G12S)	198	nt.35 G>T (G12V)	243	nt.38 G>A (G13D)
154	Wild-type	199	nt.35 G>T (G12V)	244	nt.38 G>A (G13D)
155	nt.34 G>T (G12C)	200	nt.35 G>T (G12V)	245	nt.38 G>A (G13D)
156	nt.34 G>T (G12C)	201	nt.35 G>T (G12V)	246	nt.38 G>A (G13D)
157	nt.34 G>T (G12C)	202	nt.35 G>T (G12V)	247	nt.38 G>A (G13D)
158	nt.34 G>T (G12C)	203	nt.35 G>T (G12V)	248	nt.38 G>A (G13D)
159	Wild-type	204	nt.35 G>T (G12V)	249	nt.38 G>A (G13D)
160	nt.35 G>A (G12D)	205	nt.35 G>T (G12V)	250	nt.38 G>A (G13D)
161	nt.35 G>A (G12D)	206	nt.35 G>T (G12V)	251	nt.38 G>A (G13D)
162	Wild-type	207	nt.35 G>T (G12V)	252	nt.38 G>A (G13D)
163	nt.35 G>A (G12D)	208	nt.35 G>T (G12V)	253	nt.38 G>A (G13D)
164	nt.35 G>A (G12D)	209	nt.35 G>T (G12V)	254	nt.38 G>A (G13D)
165	Wild-type	210	nt.35 G>T (G12V)	255	nt.38 G>A (G13D)
166	nt.35 G>A (G12D)	211	nt.35 G>T (G12V)	256	nt.38 G>A (G13D)
167	nt.35 G>A (G12D)	212	nt.38 G>A (G13D)	257	nt.38 G>A (G13D)
168	nt.35 G>A (G12D)	213	nt.38 G>A (G13D)	258	nt.38 G>A (G13D)
169	nt.35 G>A (G12D)	214	nt.38 G>A (G13D)	259	nt.38 G>A (G13D)
170	nt.35 G>A (G12D)	215	nt.38 G>A (G13D)	260	nt.38 G>A (G13D)
171	nt.35 G>A (G12D)	216	nt.38 G>A (G13D)	261	nt.38 G>A (G13D)
172	nt.35 G>A (G12D)	217	nt.38 G>A (G13D)	262	nt.38 G>A (G13D)
173	nt.35 G>A (G12D)	218	nt.38 G>A (G13D)	263	nt.38 G>A (G13D)
174	nt.35 G>A (G12D)	219	nt.38 G>A (G13D)	264	nt.38 G>A (G13D)
175	nt.35 G>A (G12D)	220	nt.38 G>A (G13D)	265	nt.38 G>A (G13D)
176	nt.35 G>A (G12D)	221	nt.38 G>A (G13D)	266	nt.38 G>A (G13D)
177	nt.35 G>A (G12D)	222	nt.38 G>A (G13D)	267	nt.38 G>A (G13D)
178	nt.35 G>A (G12D)	223	nt.38 G>A (G13D)	268	nt.38 G>A (G13D)
179	nt.35 G>A (G12D)	224	nt.38 G>A (G13D)	269	nt.38 G>A (G13D)
180	nt.35 G>A (G12D)	225	nt.38 G>A (G13D)	270	nt.38 G>A (G13D)

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นางสาวศิริรัตน์ สีขุนทด เพศ หญิง อายุ 31 ปี เกิดเมื่อวันที่ 29 มิถุนายน พ.ศ. 2527 สถานที่เกิด โรงพยาบาลด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา ที่อยู่ 223 หมู่ 7 บ้านกุดพิमान ตำบลกุดพิमान อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา 30210 สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา) จากคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ในปี พ.ศ. 2550 เข้าศึกษาต่อ ระดับปริญญาโท ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2556 ปัจจุบันรับราชการตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปฏิบัติการ สังกัด งานอณูพยาธิวิทยา กลุ่มงานชั้นสูงพิเศษ สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

