

Chulalongkorn University

Chula Digital Collections

Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)

2020

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็ก และอนุภาคนาโนทอง เพื่อใช้ในการระบุเลือด

ศุภราภรณ์ ชูชื่น
คณะ แพทยศาสตร์

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd>

Recommended Citation

ชูชื่น, ศุภราภรณ์, "การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็ก และอนุภาคนาโนทอง เพื่อใช้ในการระบุเลือด" (2020).
Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD). 4534.
<https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/4534>

This Thesis is brought to you for free and open access by Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD) by an authorized administrator of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นด้วยอนุภาคแม่เหล็ก และอนุภาคนาโนทอง เพื่อใช้ในการระบุเลือด



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A magnetic microspheres (MMPs) and gold nanoparticles method for DNA
methylation to identify blood



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

Common Course

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็ก และอนุภาคนาโนทอง เพื่อใช้ในการระบุเลือด
โดย	น.ส.ศุภราภรณ์ ชูชื่น
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงศักดิ์ วงศ์ไพศาลสิน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	
.....	ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงศักดิ์ วงศ์ไพศาลสิน)	
.....	กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)	
.....	กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค)	

ศุภราภรณ์ ชูชื่น : การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็ก และอนุภาคนาโนทอง เพื่อใช้ในการระบุเลือด. (A magnetic microspheres (MMPs) and gold nanoparticles method for DNA methylation to identify blood) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. นพ.เกรียงศักดิ์ไพศาลสิน

การระบุชนิดหรือที่มาของของเหลวจากร่างกายในทางนิติวิทยาศาสตร์ สามารถนำมาใช้เพื่ออ้างอิงบุคคลหรือการกระทำของผู้ต้องสงสัยเพื่อนำไปสู่การพิสูจน์ข้อเท็จจริงในกระบวนการยุติธรรมได้ ปัจจุบันมีการศึกษาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยเทคนิค bisulfite conversion ร่วมกับ pyrosequencing จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างชนิดต่าง ๆ มีปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อหรือเซลล์นั้น ๆ จึงสามารถนำมาใช้เพื่อระบุชนิดของตัวอย่างได้ แต่ด้วยตัวอย่างทางนิติวิทยาศาสตร์ที่พบได้นั้นมักจะมีคุณสมบัติเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ วิธีการที่อาศัยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอด้วยสารเคมีรุนแรงจึงอาจไม่เหมาะสม งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยอาศัยหลักการของ monoclonal antibody ที่จำเพาะกับ 5-methylcytosine (5mC) บนดีเอ็นเอ และ probe ที่จำเพาะกับตำแหน่งบนยีน C20orf117 ร่วมกับการใช้อนุภาคแม่เหล็กและอนุภาคนาโนทอง โดยสามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองที่อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร เมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานพบว่าจุดตัดผลบวก (cut-off point) มีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย เท่ากับ 0.797 ± 0.009 และมีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีแดงเป็นสีม่วงอย่างสังเกตเห็นได้ โดยค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่น้อยกว่าค่าจุดตัดผลบวกจะให้ค่าเป็นบวก เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองในตัวอย่างเลือดและน้ำลาย พบว่าตัวอย่างเลือดทั้งหมดจำนวน 62 ตัวอย่าง มีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยน้อยกว่าค่า cut-off point ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก และยังมีสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองเป็นสีแดง ในขณะที่ตัวอย่างน้ำลายจำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่า 4 จาก 6 ตัวอย่าง มีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยมากกว่าค่า cut-off point ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์เป็นลบ โดยสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคนาโนทองด้วยตาเปล่าได้ในเวลา 10 นาที จากผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ C20orf117 probe และอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันเพื่อระบุตัวอย่างเลือดได้ ผลจากงานวิจัยนี้ได้นำเสนอวิธีการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันซึ่งอาจเป็นทางเลือกที่เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้กับตัวอย่างทางนิติวิทยาศาสตร์ในการศึกษาต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5974118930 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: DNA methylation Magnetic microspheres Gold nanoparticles Identification of blood
Colorimetric assay

Suparaporn Choochuen : A magnetic microspheres (MMPs) and gold nanoparticles method for DNA methylation to identify blood. Advisor: Assoc. Prof. Kornkiat Vongpaisarnsin, M.D.

The body tissue identification is the crucial process in forensic science. The genetic pattern in body fluid could refer to a suspect in a criminal case. Recently, the technique of bisulfite conversion and pyrosequencing is a widely used method to detect the levels of DNA methylation. It is known that these levels on the specific gene present the exact value to a particular tissue or cell type. For this reason, we could observe the level of methylation for specific tissue identification. However, most forensic evidence contains a fragmented or degraded DNA template. The bisulfite conversion-based method that changed the structure of DNA by harsh chemicals is not proper for laboratory testing. In this study, we aimed to develop a new method for detecting DNA methylation level based on the enrichment of 5-methylcytosine (5mC) of DNA using a specific monoclonal antibody with a target-specific probe on C20orf117 gene, in a combination with magnetic microspheres (MMPs) and gold nanoparticles (AuNPs). The DNA methylation levels were determined by the color change of the AuNPs solution and the 630/520 nm absorbance ratio was also calculated. The standard curve was generated to determine a positive and negative cut-off points. The reference color change from red to dark blue was observed with an absorbance ratio of 0.797 ± 0.009 . The ratio of absorbance which is lower than the cut-off point value will be considered as a positive. This study demonstrated that all 62 blood samples had a low average absorbance ratio than the cut-off point and presented the red color of the gold nanoparticle solution. On the other hand, 4 saliva samples had a higher average absorbance ratio than the cut-off point, which gave a negative analysis result. In summary, we demonstrated that using the C20orf117 probe base on the MMPs method to detect the levels of DNA methylation for blood identification by observing the color change of the AuNPs solution with the naked eye in 10 minutes. The results of this research may provide an alternative method for DNA methylation levels detection for further study.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study: Medical Sciences
Academic Year: 2020

Student's Signature
Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงดิ วงศ์ไพศาลสิน อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่ได้ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ นครินทร์ กิตกำธร คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และพี่ ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือแนะนำข้อมูลที่เป็นประโยชน์ และให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องมือในการทำวิจัย

ขอบคุณพี่ ๆ ห้องนิติเวชวิทยา เพื่อน และน้อง ๆ ปริญญาโท ภาควิชานิติเวชศาสตร์ ที่ช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงเข้าร่วมโครงการวิจัยในการเก็บตัวอย่างน้ำลายในครั้งนี้

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับตัวอย่างเลือดมาจากโครงการตรวจสุขภาพประจำปีของบุคลากร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณบิดา-มารดา และครอบครัว ผู้ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจเสมอมา

ศุภราภรณ์ ชูชื่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา (background and rationale).....	1
1.2 คำถามของการวิจัย (research question).....	2
1.3 วัตถุประสงค์ (objective).....	2
1.4 สมมติฐานของการวิจัย (hypothesis).....	2
1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย (conceptual framework).....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (review of the related literatures).....	4
2.1 การระบุชนิดของของเหลวจากร่างกาย (body fluids identification).....	4
2.2 เอพิเจเนติกส์ (epigenetics).....	5
2.3 ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation).....	5
2.4 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (analysis of DNA methylation)	7
2.4.1 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธีมาตรฐาน bisulfite conversion.....	8
2.4.2 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี methylation-sensitive restriction enzymes (MSREs).....	11
2.4.3 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP).....	11

2.4.4 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็ก (MMPs) ร่วมกับอนุภาคนาโนทอง (AuNPs).....	12
2.5 รูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน C20orf117 (DNA methylation patterns on C20orf117 gene)	13
2.6 อนุภาคแม่เหล็ก (magnetic microspheres ; MMPs)	14
2.7 อนุภาคนาโนทอง (gold nanoparticles ; AuNPs).....	15
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย (research methodology).....	18
3.1 รูปแบบการทดลอง (experimental design).....	18
3.2 รูปแบบการวิจัย (research design).....	18
3.3 กลุ่มประชากรเป้าหมาย (target population).....	19
เกณฑ์คัดเข้า (inclusion criteria).....	19
3.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size).....	19
3.5 วิธีการดำเนินการวิจัย (methodology)	20
3.5.1 การเตรียมตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ (sample preparation and DNA extraction).....	20
3.5.2 การออกแบบ probe ที่จำเพาะบนยีน C20orf117	21
3.5.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง (gold nanoparticles synthesis).....	21
3.5.4 การตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคนาโนทอง (characteristics of gold nanoparticles).....	21
3.5.5 การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง.....	21
3.5.6 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง.....	22
1. การทำ DNA sonication	23
2. การเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป้าหมาย (enrichment of methylated DNA fragment).....	23

3. การจับกันของ C20orf117 probe และตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมาย	23
4. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วย C20orf117 probe และอนุภาคนาโนทอง	23
3.5.7 การวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis)	24
เกณฑ์การตัดสินผลบวก (cut-off point)	24
บทที่ 4 ผลการวิจัย (result)	25
4.1 ผลการออกแบบ probe ที่จำเพาะบนยีน C20orf117	25
4.2 ผลการเตรียมสารละลายอนุภาคนาโนทองและการตรวจสอบคุณลักษณะ	25
4.3 ผลการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง	25
4.4 เกณฑ์การตัดสินผลบวก (cut-off point)	29
4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง	29
4.5.1 ผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างเลือด	29
- การศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองในตัวอย่างเลือด	29
- การศึกษาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองในตัวอย่างเลือด	31
4.5.2 ผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำลาย	35
บทที่ 5 สรุปผลและอภิปรายการวิจัย (conclusion and discussion)	36
5.1 สรุปผลการเตรียมสารละลายอนุภาคนาโนทองและการตรวจสอบคุณลักษณะ	36
5.2 สรุปผลการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง	36
5.3 เกณฑ์การตัดสินผลบวก (cut-off point)	37
5.4 สรุปผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองในตัวอย่างเลือดและน้ำลาย	37
5.5 ข้อดี ข้อจำกัด และอุปสรรคของการวิจัย	38

5.6 แนวทางและข้อเสนอแนะการวิจัยต่อในอนาคต	38
5.7 สรุปผลการวิจัย	39
บรรณานุกรม.....	40
ประวัติผู้เขียน.....	45



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 รูปแบบเมทิลเลชั่นที่ CpG ตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน C20orf117, ZC3H12D, BCAS4 และ FGF7 จำเพาะต่อตัวอย่างเลือด น้ำลาย เซลล์เยื่อบุผิว และสเปิร์ม ตามลำดับ (6)	9
ตารางที่ 2 รูปแบบเมทิลเลชั่นที่ CpG ตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน ZC3H12D cg06379435 และ BCAS4 ที่จำเพาะต่อตัวอย่างน้ำอสุจิ เลือด น้ำลาย เลือดประจำเดือน เยื่อบุผิวบริเวณช่องจมูกส่วนหน้า และเยื่อบุผิวบริเวณช่องคลอด ตามลำดับ (32).....	10
ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ของช่วงความยาวคลื่นแสงที่ถูกดูดกลืนกับสีที่ถูกดูดกลืนและมองเห็น	16
ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ C20orf117 probe	25
ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารละลายอนุภาคนาโนทองเมื่อทำปฏิกิริยากับ C20orf117 probe ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และ 630 นาโนเมตร	26
ตารางที่ 6 อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร ของ negative control ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า log ของความเข้มข้น	28
ตารางที่ 7 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 1 และ 2 จากการทำการทดลองทั้งสองซ้ำ ที่อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร	30
ตารางที่ 8 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า log ความเข้มข้นของตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 3-38	32
ตารางที่ 9 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า log ความเข้มข้นของตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 39-62	33
ตารางที่ 10 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า log ความเข้มข้นของตัวอย่างน้ำลายจำนวน 6 ตัวอย่าง	35

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 กลไกทางเอพิเจเนติกส์ของ DNA methylation และ Histone modification (19)	5
รูปที่ 2 ปฏิกริยาการเกิด DNA methylation โดยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) (26)	6
รูปที่ 3 การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน 2 ชนิด ได้แก่ การเติมหมู่เมทิลเลชันแบบ maintenance methylation และการเติมหมู่เมทิลแบบ de novo methylation (27)	7
รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากเบสไซโตซีนไปเป็นเบสยูราซิลด้วยวิธี bisulfite conversion (18)	8
รูปที่ 5 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วย methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) 12	
รูปที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงของและการเปลี่ยนแปลงสีของ specific probe-AuNPs complex ในสถานะที่มีเกลือ (a). methylated APC sequence (b). unmethylated APC sequence (7) ...	13
รูปที่ 7 เปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันที่แตกต่างกันบนยีน C20orf117 ในเซลล์เนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ (41)	13
รูปที่ 8 Protein G Magnetic Beads และ Magnetic Racks simplify immunoprecipitation .	14
รูปที่ 9 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองแบบ Turkevich โดยการเกิดปฏิกิริยาของสารละลายทองและซิเตรตในน้ำเดือด (49)	15
รูปที่ 10 สีของสารละลายอนุภาคนาโนทองที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้น (Colors of various sized monodispersed gold nanoparticles)	16
รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคนาโนทองกับความยาวคลื่นซึ่งเกิดพีคที่ 520 nm สีของสารละลายอนุภาคนาโนทอง และขนาดของอนุภาคนาโนทองที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) (51). 17	
รูปที่ 12 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง	22
รูปที่ 13 ขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนทองที่ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (ซ้าย) สี และสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร (ขวา)	25

รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคนาโนทองที่ความยาวคลื่น 630 ต่อ 520 นาโนเมตรกับค่า log ความเข้มข้นของ C20orf117 probe เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง	27
รูปที่ 15 สีที่เปลี่ยนไปภายในเวลา 10 นาที ของ C20orf117 probe-gold nanoparticles ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่มีเกลือ (จากซ้ายไปขวาแสดงความเข้มข้นของ C20orf117 probe ที่ 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ).....	28
รูปที่ 16 สีที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 10 นาที ของตัวอย่าง negative control ภายใต้สภาวะที่มีเกลือ	28
รูปที่ 17 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง negative control บนกราฟมาตรฐาน	29
รูปที่ 18 ขนาดของซันดีเอ็นเอหลังการ sonicate บน 1% agarose gel ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ของตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 1 และ 2 จากการทำการทดลองทั้งสองซ้ำ.....	30
รูปที่ 19 สีที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 10 นาที ของ C20orf117 probe-Gold nanoparticles ในตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 1 และ 2.....	31
รูปที่ 20 ขนาดของซันดีเอ็นเอหลังการ sonicate บน 1% agarose gel ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ของตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 27-46.....	31
รูปที่ 21 สีที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 10 นาที ของ C20orf117 probe-Gold nanoparticles.....	34
รูปที่ 22 สีที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 10 นาที ของ C20orf117 probe-Gold nanoparticles.....	34
รูปที่ 23 สีที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 10 นาที ของ C20orf117 probe-Gold nanoparticles.....	35
รูปที่ 24 Box plot แสดงค่าการกระจายตัวของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร ของตัวอย่างเลือดเปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำลาย.....	37

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา (background and rationale)

สารคัดหลั่งในร่างกายมนุษย์มีหลากหลายชนิด เช่น เลือด น้ำลาย หรือ ของเหลวทางช่องคลอด หากปรากฏในสถานที่เกิดเหตุเป็นร่องรอยหรือคราบของชีววัตถุพยานที่สงสัย ซึ่งอาจไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และยากต่อการระบุชนิด เมื่อจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างเหล่านั้นสำหรับกระบวนการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์ การระบุชนิดของสารคัดหลั่งจึงเป็นกระบวนการเริ่มต้นเพื่อนำไปสู่การเลือกทดสอบต่อไปตามแต่ชนิดของตัวอย่างนั้น ๆ เช่น การระบุชนิดของตัวอย่างว่าเป็น เลือด น้ำลาย หรือคราบอสุจิ จะเป็นจุดเริ่มต้นของการสืบสวนสอบสวน เพื่อประเมินการเกิดเหตุหรือสาเหตุของการเสียชีวิตได้ (1) ดังนั้น การนำองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้เพื่อพิสูจน์ข้อเท็จจริงในกระบวนการยุติธรรมจึงมีความสำคัญ อีกทั้งการระบุชนิดของสารคัดหลั่งจะนำไปใช้เป็นหลักฐานในการบ่งชี้การเกิดเหตุการณ์หรือคดีบางประเภท เช่น การตรวจพบคราบอสุจิ ซึ่งใช้เป็นหลักฐานสำคัญในคดีข่มขืนกระทำชำเรา หรือการตรวจพบคราบเลือด ซึ่งใช้เป็นหลักฐานสำคัญในคดีทำร้ายร่างกาย เป็นต้น (2)

ปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ในการตรวจระบุชนิดของสารคัดหลั่งหรือของเหลวจากร่างกายมีอยู่อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็น 1.) การทดสอบทางเคมี (chemical test) ที่อาศัยหลักการการเปล่งแสงทางเคมีของสาร (chemiluminescence) 2.) การศึกษาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ในการกระตุ้นปฏิกิริยาของสารตั้งต้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (catalytic test) 3.) การทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunological test) ด้วยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่จำเพาะ 4.) นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธีการทางอนุพันธุศาสตร์ด้วยการตรวจ RNA ที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ หรือการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ซึ่งได้รับความสนใจอย่างมากในการใช้ระบุชนิดของของเหลวจากร่างกายด้วยปริมาณเมทิลเลชันที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน (3)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) เป็นกลไกหนึ่งในระดับเหนือพันธุกรรม (epigenetic) ที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน (gene expression) โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ โดยพบว่าปริมาณของเมทิลเลชันในแต่ละตำแหน่ง (methylated locus) เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนในระยะยาวที่จำเพาะต่อเซลล์ กล่าวได้ว่าเซลล์เนื้อเยื่อแต่ละชนิดสามารถถูกจำแนกได้ด้วยรูปแบบและปริมาณของเมทิลเลชันที่แตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้จึงสามารถนำหลักการดังกล่าวมาใช้ในการระบุชนิดของเนื้อเยื่อ และของเหลวจากร่างกายได้ (4-6)

วิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันสามารถทำได้หลายวิธี วิธีการหนึ่งที่ได้รับการนิยมน้อยแต่แพร่หลายและเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (gold standard) คือ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค bisulfite conversion ร่วมกับ pyrosequencing มีการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องในปี ค.ศ. 2012 โดย Tania Madi และคณะ ได้ศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่แตกต่างกันในตัวอย่าง 4 ชนิด ได้แก่ เลือด น้ำลาย สเปิร์ม และเซลล์เยื่อบุผิว ด้วยเทคนิค bisulfite conversion ร่วมกับ pyrosequencing จากการศึกษาพบว่าปริมาณของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่แตกต่างกันในบางตำแหน่ง (CpG site) ของยีน C20orf117 สามารถแยกตัวอย่างเลือดจากตัวอย่างทางชีวภาพอื่น ๆ ได้ โดยพบว่าบน CpG site ตำแหน่งที่ 6 และ 7 ในตัวอย่างเลือดมีปริมาณเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันเฉลี่ยมากถึง 79.2 ± 8.1 เปอร์เซ็นต์ และ 81.6 ± 11.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (6) แต่เนื่องจากวิธีการนี้มีความซับซ้อนในการ

ทดลอง วิเคราะห์ และแปลผล อีกทั้งตัวอย่างทางนิติวิทยาศาสตร์ที่พบได้ในพื้นที่เกิดเหตุ นั้นมักจะมีความเสื่อมสภาพ ส่งผลให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีสภาพที่ไม่สมบูรณ์เช่นกัน ซึ่งเป็นข้อจำกัดสำคัญต่องานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ที่โดยทั่วไปมักพบดีเอ็นเอบนวัตถุพยานในปริมาณน้อยและไม่คงทนต่อสภาพแวดล้อม วิธีการที่อาศัยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอด้วยสารเคมีรุนแรง (bisulfite conversion) จึงอาจไม่เหมาะสม และได้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นไม่มากพอสำหรับการทดลอง นอกจากนี้ จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องในปี ค.ศ. 2012 Chen chen Ge และคณะ พบว่าสามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในห้องปฏิบัติการด้วย probe ที่จำเพาะกับลำดับสารพันธุกรรมที่สังเคราะห์ขึ้นมาชนิด methylated DNA sequence บนยีน APC (Adenomatous polyposis coli) โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยอนุภาคแม่เหล็ก (MMPs) ร่วมกับอนุภาคนาโนทองคำสำเร็จ (AuNPs) ซึ่งสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสี (colorimetric assay) ของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำได้ด้วยตาเปล่า (naked eye detection) (7) แต่เนื่องจากผลการทดลองนั้นใช้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ และยังไม่มีการทดสอบความสามารถและประสิทธิภาพกับตัวอย่างชีววัตถุจริง

งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตัวอย่างเลือดโดยอาศัยหลักการของ monoclonal antibody ที่จำเพาะกับ 5-methylcytosine (5mC) บนดีเอ็นเอ และ probe ที่จำเพาะกับตำแหน่งบนยีน C20orf117 ซึ่งมีตำแหน่งของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อเลือด ร่วมกับหลักการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำที่สามารถอ่านผลการทดลองได้ง่าย และเป็นอีกวิธีหนึ่งของการวิเคราะห์ซึ่งอาจเป็นทางเลือกในการเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เหมาะสม

1.2 คำถามของการวิจัย (research question)

คำถามหลัก สามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อเลือดบนยีน C20orf117 โดยใช้ อนุภาคแม่เหล็ก และอนุภาคนาโนทองคำหรือไม่

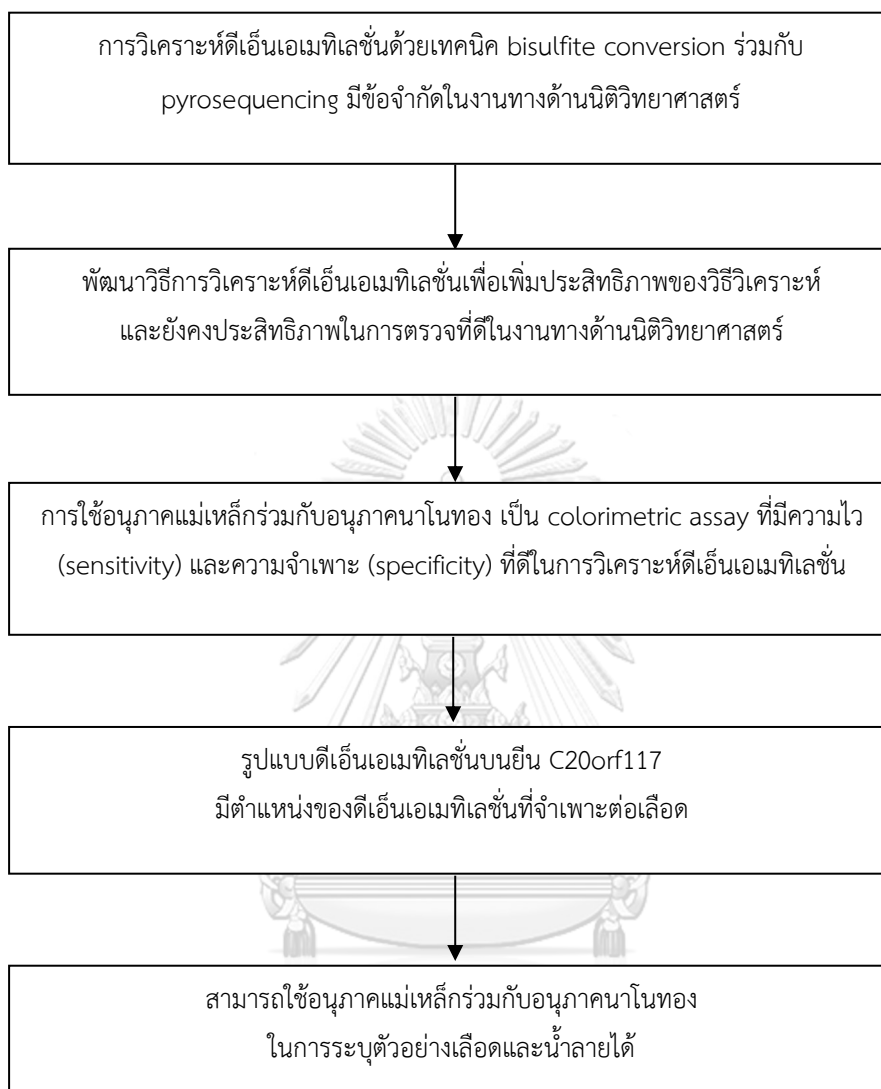
1.3 วัตถุประสงค์ (objective)

เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตัวอย่างเลือดด้วย probe ที่จำเพาะกับตำแหน่งบนยีน C20orf117 โดยใช้อนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองคำ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำได้ด้วยตาเปล่า

1.4 สมมติฐานของการวิจัย (hypothesis)

สมมติฐานหลัก ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตัวอย่างเลือดทำปฏิกิริยากับ probe ที่จำเพาะของยีน C20orf117 โดยใช้อนุภาคแม่เหล็ก และอนุภาคนาโนทองคำ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยาอนุภาคนาโนทองคำ

1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย (conceptual framework)



บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (review of the related literatures)

2.1 การระบุชนิดของของเหลวจากร่างกาย (body fluids identification)

การระบุชนิดหรือที่มาของของเหลวจากร่างกายมนุษย์เป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ เพราะเป็นข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ประกอบในคดีต่าง ๆ อีกทั้งยังสามารถนำมาใช้อ้างอิงพฤติกรรมหรือการกระทำของผู้ต้องสงสัยเพื่อคลี่คลายคดีได้ (1, 2)

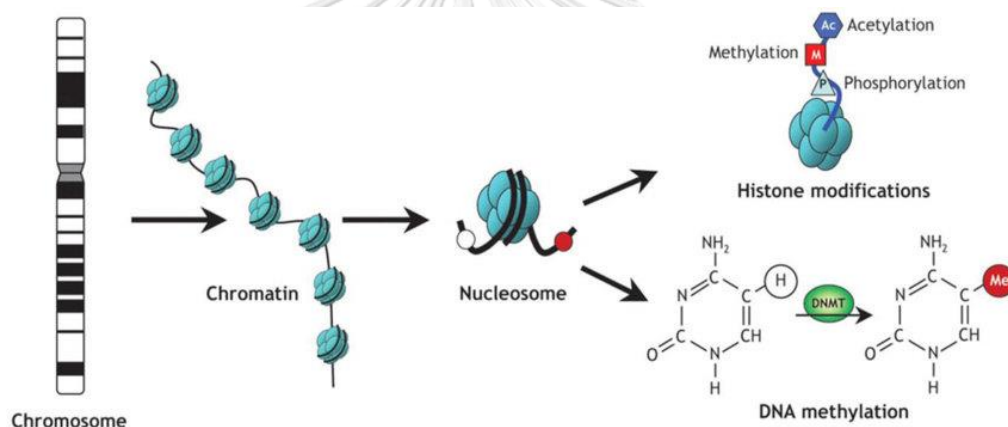
สามารถจำแนกการตรวจสอบการระบุชนิดของของเหลวจากร่างกายได้เป็น 2 ระดับ คือ การตรวจสอบเบื้องต้น (presumptive test) เป็นวิธีการตรวจสอบที่ทำได้ง่าย มีค่าใช้จ่ายต่ำ และมักมีความสามารถในการตรวจคัดกรองที่สูง เช่น การตรวจระบุเลือดด้วยสารลูมิโนล (luminol test) โดยสารลูมิโนลจะทำปฏิกิริยากับฮีโมโกลบินในเลือดและเกิดการเรืองแสงจากการกระตุ้นด้วยความยาวคลื่นแสงที่จำเพาะ ทำให้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า การตรวจเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ที่นำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจระบุน้ำลาย โดยเอนไซม์อะไมเลสที่มีอยู่ในน้ำลายจะมีระดับที่สูงกว่าของเหลวจากร่างกายชนิดอื่น ๆ การตรวจระบุน้ำอสุจิจากการทดสอบด้วย acid phosphatase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากต่อมลูกหมาก (prostate gland) (8) หรือการตรวจระบุสเปิร์ม (sperm) จากกล้องจุลทรรศน์ที่กำหนดให้เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) สำหรับการตรวจสเปิร์ม แต่อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นดังกล่าวอาจเกิดผลบวกปลอม (false positive) ต้องทำการตรวจสอบยืนยัน (confirmatory test) เพื่อยืนยันผลที่ในกรณีที่เกิดการทดลองให้ผลบวกจากการตรวจคัดกรองไม่ชัดเจนเพียงพอ (9, 10) การศึกษาการแสดงออกของ mRNA, micro RNAs หรือการใช้ epigenetic markers ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์และเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ จึงถูกนำมาใช้ในการช่วยยืนยันการตรวจ ซึ่งจะมีความจำเพาะและแม่นยำสูง

จากการศึกษาของ Bauer, M. และ Patzelt, D. ในปี ค.ศ. 2008 ได้ศึกษาผลการแสดงออกของ matrix metalloproteinases 7 (MMP-7) mRNA ที่มีความจำเพาะต่อเลือดจากประจำเดือน (menstrual blood) พบว่าสามารถระบุผลได้ถูกต้องถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (11) และจากงานวิจัยของ Courts และ Madea ในปี ค.ศ. 2011 ได้ศึกษาผลการแสดงออกของ micro RNA จากตัวบ่งชี้ (marker) miR-205 พบว่ามีความจำเพาะต่อน้ำลาย และใช้ในการระบุน้ำลายได้ (12) ซึ่งวิธีดังกล่าวข้างต้นนี้สามารถนำมาใช้ในการระบุชนิดของของเหลวจากร่างกายที่มีความจำเพาะและความไวที่สูง (high specificity and sensitivity) อย่างไรก็ตาม mRNA และ micro RNA ยังคงมีข้อจำกัดหลายประการโดยเฉพาะในเรื่องความเสถียรของอาร์เอ็นเอที่น้อยกว่าดีเอ็นเอ จึงไม่ได้เป็นที่นิยมนักในการตรวจทางนิติวิทยาศาสตร์ ในช่วงที่ผ่านมาพบการศึกษาจำนวนหนึ่งได้กล่าวถึงการใช้ตำแหน่งของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) สำหรับการระบุชนิดตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่ามีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1975 (13) และเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเอพิเจเนติกส์ (epigenetic) ที่มีความอนุรักษ์สูง พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ตั้งแต่เชื้อรา พืช และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (14) ด้วยรูปแบบของเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อเซลล์ชนิดต่าง ๆ จึงถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่มีประสิทธิภาพในการแยกประเภทของของเหลวจากร่างกายที่ตรวจพบได้ในสถานที่เกิดเหตุ

2.2 เอพิเจเนติกส์ (epigenetics)

Conrad Waddington ได้ให้นิยามคำว่า เอพิเจเนติกส์ (epigenetics) หมายถึง “ศาสตร์ทางด้านชีววิทยาว่าด้วยเรื่องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนและผลผลิตของยีน ซึ่งทำให้ลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตปรากฏขึ้น” (14) จากการศึกษาวิจัยทางด้านพันธุศาสตร์ที่พัฒนาต่อมานิยามในปัจจุบันของเอพิเจเนติกส์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอ ซึ่งการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปสามารถผันกลับได้ (reversible) และสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกและรุ่นหลานได้ (15)

การควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเอพิเจเนติกส์มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของการดัดแปร (modify) ทางเคมีชนิดต่าง ๆ ของโครมาติน เช่น การดัดแปรโปรตีนฮิสโตน หรือการเติมหมู่เมทิล (methyl) แสดงดังรูปที่ 1 การดัดแปรนี้เมื่อเกิดขึ้นร่วมกับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม chromatin remodeling complex จะช่วยรักษาสถิตูให้แก่นีย เพื่อให้นียมีการแสดงออกอย่างถูกต้องในระดับโมเลกุลและอยู่ในระยะเวลาที่เหมาะสม (16, 17) การเปลี่ยนแปลงนี้ท้ายที่สุดจะนำไปสู่การยับยั้งการแสดงของยีน และบ่อยครั้งที่การเปลี่ยนแปลงแบบ epigenetics จะเกิดผ่านกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) (18)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

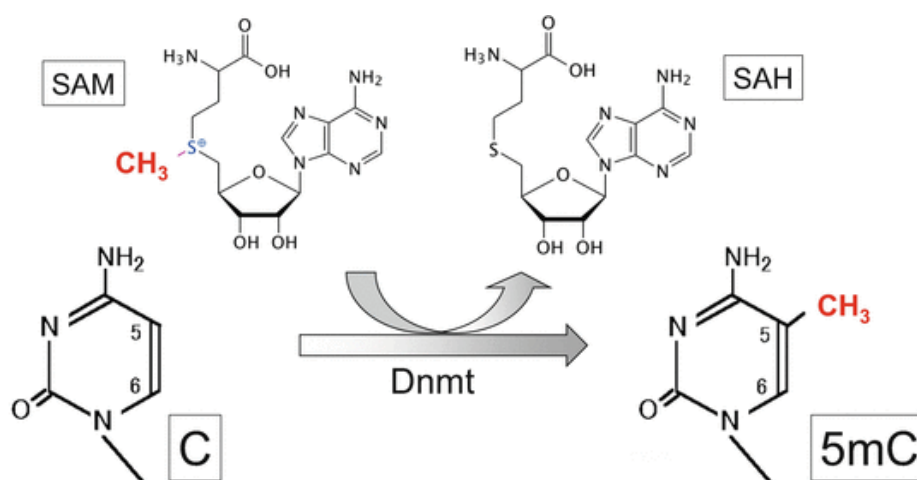
รูปที่ 1 กลไกทางเอพิเจเนติกส์ของ DNA methylation และ Histone modification (19)

2.3 ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) เป็นกระบวนการหนึ่งในการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเอพิเจเนติกส์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของอวัยวะและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อทำหน้าที่ต่าง ๆ (20) ดีเอ็นเอจะถูกเติมหมู่เมทิล (methyl) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน (cytosine (C)) โดยอาศัย S-adenosyl-L-methionine (SAM) เป็นโมเลกุลที่ให้หมู่เมทิล และเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) ได้ผลิตผลเป็น 5-methylcytosine (21) ดังรูปที่ 2 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ลำดับเบสไซโตซีน (cytosine (C)) อยู่ต่อกับเบสกวานีน (guanine (G)) โดยมีพันธะ phosphodiester เชื่อม และบริเวณที่มี CpG nucleotide อยู่อย่างหนาแน่นนี้จะเรียกว่า CpG island ซึ่งมักพบในบริเวณที่เป็น transcription promoter ของยีนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ของยีนทั้งหมด (18) โดยการเกิดเมทิลเลชันนั้นมักเกิดบนเบส cytosine บริเวณที่มีรหัสของยีน แต่ไม่

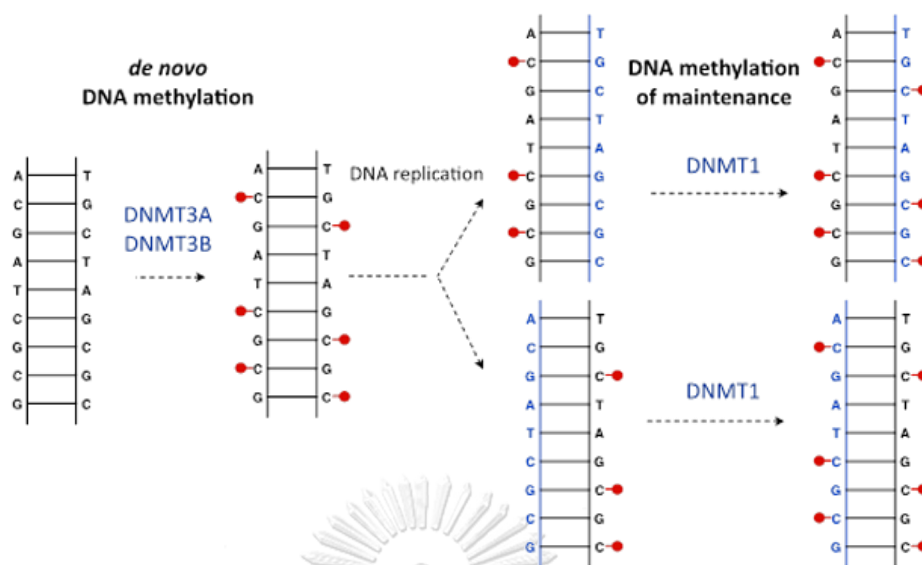
พบที่ promoter บน CpG island (22) อย่างไรก็ตามสามารถพบดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ไม่ใช่ CpG ได้ด้วย เช่น ในพืช จะพบดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เป็น CpHpG หรือ CpHpH (เมื่อ H = adenosine; A, thymine; T หรือ C) (23)

กระบวนการ DNA methylation สามารถส่งผลให้เกิดการแสดงของยีนที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ โดยแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ กระบวนการที่มีการเติมหมู่เมทิลบนเบส cytosine ที่สูงกว่าระดับปกติ (hypermethylation) และกระบวนการที่มีการเติมหมู่เมทิลบนเบส cytosine ที่ต่ำกว่าระดับปกติ (hypomethylation) (24) ในโรคมะเร็ง จะมีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ซับซ้อน และเกิดพร้อมกันทุกตำแหน่งในตำแหน่ง CpG ที่ไม่มีการเกิดมาก่อน การเพิ่มขึ้นของกระบวนการเกิด methylation นี้ ส่งผลให้การ transcription ของ promoter นั้น ๆ หยุดลง ซึ่งหากเป็นตำแหน่งของ tumor suppressor gene จะทำให้นั้นหยุดทำงาน (25)



รูปที่ 2 ปฏิกริยาการเกิด DNA methylation โดยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) (26)

การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ การเติมหมู่เมทิลเลชันแบบ maintenance methylation โดยจะเกิดหลังการจำลองตัวหรือการซ่อมแซมของดีเอ็นเอบนสายดีเอ็นเอที่มีดีเอ็นเอคู่สมสายหนึ่งถูกเติมหมู่เมทิลเดิมอยู่แล้ว โดยอาศัยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) ชนิด DNMT1 และเป็นต้นแบบในการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเออีกสายที่ถูกจำลองตัวขึ้นใหม่ การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันชนิดนี้สามารถรักษารูปแบบของการเติมหมู่เมทิลในดีเอ็นเอสายใหม่ได้ และการเติมหมู่เมทิลแบบใหม่ หรือ de novo methylation จะเป็นการเติมหมู่เมทิลบนเบสไซโตซีนตำแหน่งใหม่ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA methyltransferase ชนิด DNMT3A และชนิด DNMT3B ทำให้เกิดรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิม (14) แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน 2 ชนิด ได้แก่ การเติมหมู่เมทิลเลชันแบบ maintenance methylation และการเติมหมู่เมทิลแบบ de novo methylation (27)

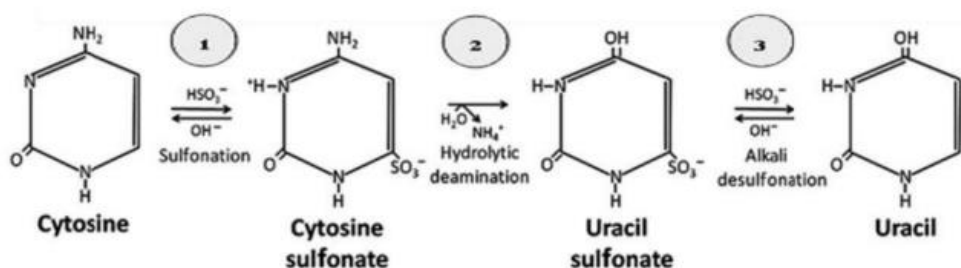
นอกจากนี้ได้มีการศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชันจากตัวอย่างเซลล์ที่มาจากอวัยวะแต่ละชนิด โดย Bird และคณะ ในปี ค.ศ. 2002 พบว่ารูปแบบที่ได้มีความแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง กล่าวได้ว่าเซลล์ที่มาจากอวัยวะที่แตกต่างกันจะมีรูปแบบ CpG methylation ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถนำรูปแบบของเมทิลเลชันมาใช้ในการระบุชนิดของเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้ (28, 29)

2.4 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (analysis of DNA methylation)

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันสามารถวิเคราะห์รูปแบบของ target sequence ในโมเลกุลของดีเอ็นเอแต่ละโมเลกุล หรือวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเลชันเฉลี่ยของ genomic locus ในดีเอ็นเอหลายโมเลกุลก็ได้ (30) ในที่นี้จะยกตัวอย่างวิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน 3 วิธีหลัก ได้แก่ 1. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธีมาตรฐาน bisulfite conversion 2. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี methylation-sensitive restriction enzymes (MSREs) และ 3. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) (31) นอกจากนี้จะกล่าวถึงวิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยใช้หลักการของ colorimetric assay ด้วยอนุภาคแม่เหล็ก (MMPs) ร่วมกับอนุภาคนาโนทอง (AuNPs) ซึ่งได้นำหลักการวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ด้วย

2.4.1 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธีมาตรฐาน bisulfite conversion

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี bisulfite conversion เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ซึ่งจัดเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่นิยมใช้วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันในปัจจุบัน โดยมีหลักการคือ ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (denaturation) ด้วยความร้อน จากนั้นดัดแปลงโครงสร้างด้วย Sodium bisulfite (HSO_3^-) โดยอาศัย 3 ปฏิกิริยา ปฏิกิริยาแรกคือ sulfonation เป็นกระบวนการเติมหมู่ซัลไฟต์ (SO_3^-) บนเบสไซโตซีนบริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ส่งผลให้เบสไซโตซีนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น cytosine sulfonate จากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยา hydrolytic deamination โดยมีการเติม H_2O และ NH_4^+ บริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ส่งผลให้หมู่เลกุลอยู่ในรูปที่เรียกว่า uracil sulfonate และกระบวนการสุดท้ายปฏิกิริยา alkali desulfonation เป็นการนำหมู่ SO_3^- ออกจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ทำให้เกิดเบสยูราซิล (uracil (U)) โดยปฏิกิริยาข้างต้นจะเกิดเฉพาะเบสไซโตซีนที่ไม่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่ แต่ในขณะเดียวกันจะไม่เปลี่ยนแปลงเบสไซโตซีนที่มีหมู่เมทิลเกาะอยู่ ส่งผลให้บริเวณนั้นยังคงเป็นเบสไซโตซีนดังเดิม (18) แสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากเบสไซโตซีนไปเป็นเบสยูราซิลด้วยวิธี bisulfite conversion (18)

จากผลการศึกษานววิจัยที่เกี่ยวข้องในปี ค.ศ. 2012 โดย Tania Madi และคณะ ได้ศึกษารูปแบบของเมทิลเลชันที่แตกต่างกันในตัวอย่าง 4 ชนิด ได้แก่ เลือด น้ำลาย สเปิร์ม และเซลล์เยื่อปิว โดยใช้เทคนิค bisulfite modification ร่วมกับ pyrosequencing พบว่ายีน ZC3H12D ในตัวอย่างสเปิร์มให้ผลการแสดงออกของเมทิลเลชันแตกต่างจากตัวอย่างทางชีวภาพอื่น ๆ เช่นเดียวกันกับยีน FGF7 โดยยีน FGF7 แสดงผลเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันเฉลี่ย (mean percent methylation) บน CpG site ทั้ง 8 ตำแหน่งเป็นไฮเปอร์เมทิลเลชัน (hypermethylation) หรือมีปริมาณเมทิลเลชันที่มากถึง 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น ๆ ในขณะที่ยีน ZC3H12D แสดงผลเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชัน บน CpG site ทั้ง 5 ตำแหน่งเป็นไฮโปเมทิลเลชัน (hypomethylation) หรือมีปริมาณเมทิลเลชันที่น้อย ซึ่งน้อยกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น ๆ ส่วนยีน C20orf117 และ BCAS4 นั้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น ๆ พบว่าแสดงผลเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันเฉลี่ยเป็นไฮเปอร์เมทิลเลชันทั้งคู่ และสามารถแยกตัวอย่างเลือดกับตัวอย่างน้ำลายได้ตามลำดับ โดยพบว่ายีน BCAS4 แสดงผลเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชัน บน CpG site ตำแหน่งที่ 1 ได้มากถึง 68.5 ± 6.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยีน C20orf117 พบว่าบน CpG site ตำแหน่งที่ 6 และ 7 มีเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันเฉลี่ยมากถึง 76.2 ± 8.1 เปอร์เซ็นต์ และ 81.6 ± 11.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (6) แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รูปแบบเมทิลเลชั่นที่ CpG ตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน C20orf117, ZC3H12D, BCAS4 และ FGF7 จำเพาะต่อตัวอย่างเลือด น้ำลาย เซลล์เยื่อบุผิว และสเปิร์ม ตามลำดับ (6)

Methylation patterns of the C20orf117 marker							
Tissue type	Number of samples	Mean percent methylation \pm SD ^{a)}					
		CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6
Blood	9	62.7 \pm 9.6	68.4 \pm 4.5	54.6 \pm 3.8	47.1 \pm 6.9	31.8 \pm 4.9	76.2 \pm 8.1
Saliva	11	15.8 \pm 11.0	17.5 \pm 9.9	15.7 \pm 6.7	15.3 \pm 5.6	8.3 \pm 4.2	20.6 \pm 10.7
Epithelial cells	1	9.0	11.0	8.0	9.0	3.0	15.0
Sperm	9	7.0 \pm 4.1	9.0 \pm 5.6	5.4 \pm 5.1	11.0 \pm 4.8	3.9 \pm 4.2	10.2 \pm 7.3

a) Standard deviation values for epithelial cells are not displayed because $n = 1$.


Methylation patterns of the ZC3H12D marker						
Tissue type	Number of samples	Mean percent methylation \pm SD				
		CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5
Blood	10	94.9 \pm 1.9	95.3 \pm 1.6	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	85.5 \pm 2.8
Saliva	11	86.6 \pm 3.3	82.6 \pm 4.8	100.0 \pm 0.0	88.1 \pm 4.1	82.6 \pm 4.8
Epithelial cells	8	83.9 \pm 30.3	94.3 \pm 5.9	100.0 \pm 0.0	83.3 \pm 30.2	93.1 \pm 5.5
Sperm	10	6.1 \pm 1.1	5.5 \pm 1.2	11.9 \pm 1.9	8.3 \pm 0.7	6.1 \pm 1.2

Methylation patterns of the BCAS4 marker					
Tissue type	Number of samples	Mean percent methylation \pm SD			
		CpG 1	CpG 4	CpG 5	CpG 6
Blood	10	11.0 \pm 4.2	8.0 \pm 3.2	10.0 \pm 5.0	21.1 \pm 8.7
Saliva	11	68.5 \pm 6.2	34.7 \pm 9.2	24.9 \pm 5.4	61.2 \pm 8.7
Epithelial cells	9	23.1 \pm 36.4	7.6 \pm 6.4	8.4 \pm 4.5	14.4 \pm 17.7
Sperm	10	5.6 \pm 1.0	6.4 \pm 1.8	9.4 \pm 2.6	19.3 \pm 3.4

Methylation patterns of the FGF7 marker							
Tissue type	Number of samples	Mean percent methylation \pm SD					
		CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7
Blood	10	19.6 \pm 12.0	28.0 \pm 12.6	28.7 \pm 13.3	29.2 \pm 13.0	28.0 \pm 12.8	29.4 \pm 13.7
Saliva	10	7.6 \pm 4.5	10.8 \pm 4.9	11.9 \pm 5.9	10.7 \pm 6.5	13.0 \pm 5.5	13.1 \pm 5.8
Epithelial cells	8	6.5 \pm 3.5	6.3 \pm 4.5	6.6 \pm 10.5	5.4 \pm 4.7	4.4 \pm 2.8	4.8 \pm 4.6
Sperm	9	66.3 \pm 12.2	64.7 \pm 11.4	67.2 \pm 17.0	66.6 \pm 19.2	65.7 \pm 18.5	72.8 \pm 21.4

นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2016 Deborah S.B.S. Silva และคณะ ได้ศึกษา DNA methylation markers ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ยีน ZC3H12D, cg06379435 และ BCAS4 ในการระบุชนิดของตัวอย่างเลือด น้ำอสุจิ และน้ำลาย ตามลำดับ โดยใช้เทคนิค bisulfite conversion และ pyrosequencing พบว่าสามารถแยกตัวอย่างแต่ละชนิดออกจากกันได้ตามความจำเพาะของตัวอย่าง ตามลำดับ โดยยีน ZC3H12D แสดงผลเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันเฉลี่ยเป็นไฮโปเมทิลเลชัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยโดย Tania Madi และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 ส่วนยีน cg06379435 และ BCAS4 แสดงผลเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันเฉลี่ยเป็นไฮเปอร์เมทิลเลชันทั้งคู่ (32) แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รูปแบบเมทิลเลชันที่ CpG ตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน ZC3H12D cg06379435 และ BCAS4 ที่จำเพาะต่อตัวอย่างน้ำอสุจิ เลือด น้ำลาย เลือดประจำเดือน เยื่อบุโพรงจมูกส่วนหน้า และเยื่อบุโพรงจมูกส่วนหลัง ตามลำดับ (32)



Marker	Body fluid	CpG (mean % methylation \pm SD)				
		CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5
ZC3H12D	Semen	5.4 \pm 4.0	5.3 \pm 3.9	6.7 \pm 4.3	6.3 \pm 4.0	5.1 \pm 3.7
	Blood	94.0 \pm 1.6	94.0 \pm 2.7	100 \pm 0.0	97.0 \pm 7.9	86.0 \pm 3.5
Specific for semen	Saliva	81.0 \pm 4.1	78.0 \pm 4.5	99.0 \pm 2.1	79.0 \pm 4.9	82.0 \pm 3.4
	Menstrual blood	80.0 \pm 4.7	79.0 \pm 6.2	98.0 \pm 2.9	77 \pm 12	74.3 \pm 3.5
	Nasal epithelia	83.0 \pm 6.4	83.0 \pm 6.8	99.0 \pm 1.2	78 \pm 11	77.0 \pm 6.9
	Vaginal epithelia	77.0 \pm 9.7	77 \pm 10	97.0 \pm 2.5	73 \pm 10	80.0 \pm 4.0
		CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5
cg06379435	Semen	3.4 \pm 1.7	2.4 \pm 1.8	2.7 \pm 1.1	1.8 \pm 1.3	3.1 \pm 1.2
	Blood	24.0 \pm 7.8	22.0 \pm 6.7	33.0 \pm 7.4	30.0 \pm 8.2	49 \pm 12
Specific for blood	Saliva	8.7 \pm 7.0	2.6 \pm 1.4	6.0 \pm 3.9	3.5 \pm 2.6	7.7 \pm 4.7
	Menstrual blood	10 \pm 12	12 \pm 19 ^a	12 \pm 18	8.0 \pm 12	23 \pm 30
	Nasal epithelia	5.7 \pm 5.5	5.0 \pm 6.9	9.7 \pm 11	7.7 \pm 11	18 \pm 22
	Vaginal epithelia	2.3 \pm 0.6	1.3 \pm 0.6	3.0 \pm 1.0	2.0 \pm 1.0	8.3 \pm 7.8
		CpG1	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7
BCAS4	Semen	3.9 \pm 1.6	2.5 \pm 1.1	3.0 \pm 1.1	5.6 \pm 1.6	2.3 \pm 0.9
	Blood	6.1 \pm 1.4	3.2 \pm 2.8	2.7 \pm 1.3	6.4 \pm 1.9	2.4 \pm 1.6
Specific for saliva	Saliva	64.0 \pm 7.1	27.0 \pm 5.6	16.0 \pm 4.5	44.0 \pm 6.7	11.0 \pm 2.7
	Menstrual blood	35.0 \pm 8.5	15.0 \pm 4.6	11.0 \pm 3.1	27.0 \pm 5.5	8.0 \pm 1.0
	Nasal epithelia	39 \pm 21	12.0 \pm 8.0	9.0 \pm 3.6	33 \pm 20	6.7 \pm 3.5
	Vaginal epithelia	36 \pm 17	13.0 \pm 7.5	11.0 \pm 4.9 ^b	30 \pm 11	6.7 \pm 3.2

^a The methylation level of CpG2 did not significantly differ when menstrual blood samples were compared to blood samples ($p > 0.05$).

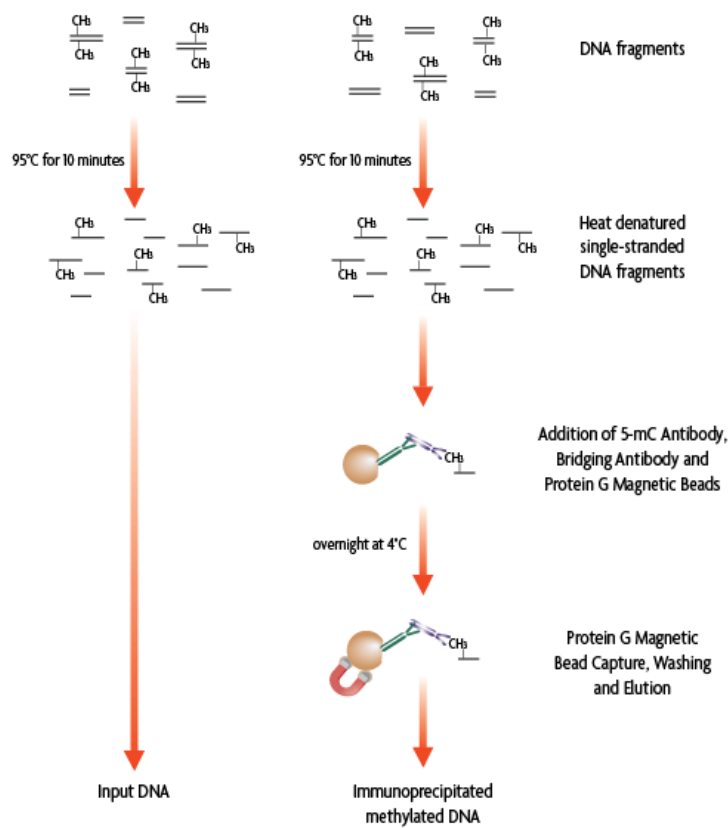
^b The methylation level of CpG5 did not significantly differ when vaginal epithelia samples were compared to saliva samples ($p > 0.05$).

2.4.2 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี methylation-sensitive restriction enzymes (MSREs)

Methylation-sensitive restriction enzymes (MSREs) เป็นการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันบน CpG sequence โดยอาศัย restriction enzyme ตัด DNA ให้เป็น fragment ในบริเวณตำแหน่งที่จดจำอย่างจำเพาะ (18, 31, 33) จากงานวิจัยของ Bird และ Southern ในปี ค.ศ. 1978 ได้กล่าวว่าเอนไซม์ที่เป็น isoschizomer กัน 1 คู่ สามารถใช้ในการแยกตำแหน่งที่ methylated หรือ unmethylated ในจีโนมได้ (34) ต่อมาในปี ค.ศ. 1979 Cedar และคณะ ได้ศึกษาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนลำดับดีเอ็นเอ พบว่าเอนไซม์ *HpaII* และ *MspI* มีความสามารถในการจดจำตำแหน่งเดียวกันคือ 5'-CCGG-3' โดยเอนไซม์ *MspI* จะตัดบนลำดับดีเอ็นเอโดยไม่คำนึงถึงว่ามีเบส CpG ที่ถูกเติมหมู่เมทิล (methylated) หรือไม่ ขณะที่เอนไซม์ *HpaII* จะตัดเฉพาะตำแหน่งที่เป็น unmethylated เท่านั้น (35) และจากการศึกษาในปี 2016 โดย Yu-Chih Lin และคณะ ได้ศึกษาการวิเคราะห์เมทิลเลชันในการระบุชนิดของของเหลวด้วยวิธี multiplex methylation sensitive restriction enzyme-PCR system หรือ MSRE-PCR โดยการใช้ restriction enzyme *HhaI* ตัดบนลำดับดีเอ็นเออย่างจำเพาะ โดยตัดเฉพาะตำแหน่งที่เป็น unmethylated แต่บริเวณเบส CpG ที่ถูกเติมหมู่เมทิลจะไม่ถูกตัดไปด้วย ร่วมกับการทำ PCR พบว่าสามารถระบุตัวอย่างเลือดดำ เลือดจากประจำเดือน น้ำอสุจิ น้ำลาย และของเหลวจากช่องคลอดได้ (36) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยการระบุชนิดของของเหลวด้วย MSRE-PCR และ SNaPshot multiplex systems โดย Ja Hyun An และคณะใน ค.ศ. ปี 2013 ซึ่งเป็น single base extension (SBE) method เพื่อวิเคราะห์เมทิลเลชันบนจีโนมิกดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ bisulfite conversion แล้วนำมาเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยใช้ ddNTP ที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ และนำไปวิเคราะห์ต่อยด้วย capillary electrophoresis จากการศึกษาได้วิเคราะห์เมทิลเลชันบนตำแหน่ง CpG ต่าง ๆ ที่จำเพาะบนยีนทั้ง 4 ยีน ได้แก่ USP49, DACT1, PRMT2 และ PFN3 พบว่าสามารถระบุตัวอย่างอสุจิที่มี spermatozoa ได้ และสามารถระบุตัวอย่างของเลือดจากประจำเดือน และของเหลวจากช่องคลอดได้เช่นกัน (37)

2.4.3 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยวิธี methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)

เป็นการแยก methylated DNA โดยอาศัยหลัก affinity purification มีหลักการวิเคราะห์คือการนำ genomic DNA มาทำให้ได้ชิ้นส่วนของ DNA เป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยใช้คลื่นเสียง (sonication) และตกตะกอนดีเอ็นเอ (immunoprecipitated) ด้วย monoclonal antibody ที่จับจำเพาะกับ 5-methylcytidine (5mC) ชิ้นส่วน methylated DNA จะถูกนำมาวิเคราะห์ต่อยด้วย PCR หรือวิเคราะห์ด้วย microarray hybridization ในระดับ genome-wide scale (38-40) แสดงดังรูปที่ 5

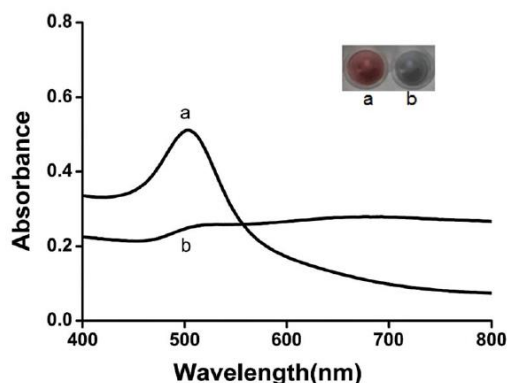


รูปที่ 5 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วย methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)

(ที่มา: <https://www.activemotif.com/catalog/736/medip>)

2.4.4 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็ก (MMPs) ร่วมกับอนุภาคนาโนทอง (AuNPs)

ในปี ค.ศ. 2012 Chen chen Ge และคณะ ได้ศึกษาวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันของดีเอ็นเอสังเคราะห์บน ยีน APC (Adenomatous polyposis coli) 2 แบบ ได้แก่ methylated APC sequence และ unmethylated APC sequence ด้วย probe ที่จำเพาะกับ methylated DNA sequence ร่วมกับอนุภาคแม่เหล็ก (MMPs) และอนุภาคนาโนทอง (AuNPs) พบว่าสามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองภายใต้สภาวะที่มีเกลือได้ด้วยตาเปล่า โดยตัวอย่างที่เป็น methylated APC sequence นั้น probe ที่ถูกแยกออกมาจะเข้าจับกับอนุภาคนาโนทองเกิดเป็นสารประกอบที่มีความเสถียรและคงสภาพเป็นสีแดง แสดงดังรูปที่ 6a ในขณะที่ตัวอย่างที่เป็น unmethylated APC sequence probe จะไม่สามารถเข้าจับกับอนุภาคนาโนทองภายใต้สภาวะที่มีเกลือได้และเกิดการรวมตัวกันเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองเป็นสีม่วง แสดงดังรูปที่ 6b โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ของสารละลายลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง methylated APC sequence แสดงดังรูปที่ 6 (7)



รูปที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงของและการเปลี่ยนแปลงสีของ specific probe-AuNPs complex ในสถานะที่มีเกลือ (a). methylated APC sequence (b). unmethylated APC sequence (7)

โดยการทดสอบที่กล่าวมาข้างต้นนั้นเป็นการใช้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ ไม่มีผลการศึกษาที่นำไปใช้ในตัวอย่างชีววัตถุจริง อย่างไรก็ตามสิ่งสำคัญของการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันคือการเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ที่เป็นกลางและสามารถตอบคำถามทางชีววิทยาของผู้วิจัยได้ ทั้งนี้ยังคงมีปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายประการที่ต้องพิจารณาต่อไป เช่น วัตถุประสงค์ของงานวิจัย ความไวและความจำเพาะของผลการวิจัย คุณภาพและปริมาณของตัวอย่างดีเอ็นเอ เป็นต้น (39)

2.5 รูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน C20orf117 (DNA methylation patterns on C20orf117 gene)

จากการศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่แตกต่างกันในปี ค.ศ. 2012 โดย Tania Madi และคณะ ในตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เลือด น้ำลาย สเปิร์ม และเซลล์เยื่อบุผิว โดยใช้เทคนิค bisulfite conversion ร่วมกับ pyrosequencing พบว่าตำแหน่งดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนยีน C20orf117 มีความจำเพาะต่อตัวอย่างเลือด (6) โดยอ้างอิงรูปแบบความจำเพาะจากการศึกษาก่อนหน้าในปี ค.ศ. 2006 โดย Florian Eckhardt และคณะ ซึ่งได้ศึกษารูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่แตกต่างกันในมนุษย์บนโครโมโซมคู่ที่ 6, 20 และ 22 จากผลการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันในเซลล์เม็ดเลือดขาวพบว่าตำแหน่งดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนยีน C20orf117 มีรูปแบบเป็นไฮเปอร์เมทิลเลชัน (> 80 เปอร์เซ็นต์ methylation) ใน CD4⁺ และ CD8⁺ lymphocytes ซึ่งมากกว่าเซลล์เนื้อเยื่ออื่น ๆ ในงานวิจัยแสดงดังรูปที่ 7 (41)

Gene	Ensembl ID	CD4+ Lymphocytes	CD8+ Lymphocytes	Fetal liver	Fetal skeletal muscle	Fibroblasts	Heart muscle	Keratinocytes	Liver	Melanocytes	Placenta	Skeletal muscle	Sperm
C20orf117	OTTHUMG00000032395	80	90	70	10	0	30	10	50	10	20	40	10

รูปที่ 7 เปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันที่ต่างกันบนยีน C20orf117 ในเซลล์เนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ (41)

โดยมีรายละเอียดข้อมูลของยีน C20orf117 ดังนี้

C20orf117 [*Homo sapiens* (human)] (GeneCards the human gene database)

Suppressor of Glucose, Autophagy Associated 1, Suppressor of Glucose by Autophagy, KIAA0889, Suppressor of Glucose, Autophagy-Associated Protein 1, Suppressor of Glucose from Autophagy, SOGA Family Member 1, C20orf117, SOGA, Chromosome 20 Open Reading Frame 117, Protein SOGA1

Genomic Locations: chr20:35,412,178-35,492,087 (GRCh37/hg19)

รายละเอียด

ยีน C20orf117 เป็นสมาชิกในกลุ่มของ SOGA family ควบคุมกลไกการกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) และมีบทบาทในการลดการผลิตกลูโคส (adiponectin และ insulin-dependent manner)

2.6 อนุภาคแม่เหล็ก (magnetic microspheres ; MMPs)

อนุภาคแม่เหล็ก ตัวอย่างดังรูปที่ 8 เป็นอนุภาคโมเลกุลเชิงประกอบ (complex molecules) ขนาดเล็ก ลักษณะกลม และมีคุณสมบัติทางแม่เหล็ก โดยทั่วไปมีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 1 ไมโครเมตร – 1,000 ไมโครเมตร (1 มิลลิเมตร) ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในระบบนำส่งยา (drug delivery system) การวินิจฉัยโรค (diagnostics) รวมถึงนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยอื่น ๆ สำหรับจับ (capture) กับเซลล์หรือสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์หลายประการ เช่น มีความสามารถในการใช้สนามแม่เหล็กคัดแยกหรือกรองที่สูง ปรับปรุงกระบวนการ PCR โดยเพิ่มความสำเร็จของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความไวในการตรวจหายีน (gene detection) และการทดสอบที่ต้องอาศัยแอนติเจนหรือแอนติบอดีร่วมด้วยได้ (immunoassay) เช่นเดียวกับกับอนุภาคอื่น ๆ อนุภาคแม่เหล็กอาจเคลือบด้วย recognition molecules หรือโมเลกุลที่สามารถจดจำและจับกับตัวอย่างเป้าหมายได้ โดยอาจเป็น functional groups เช่น หมู่ COOH หมู่ NH₂ หรืออาจเป็น affinity binding proteins เช่น streptavidin หรือ Biotin เคลือบบริเวณพื้นผิวของอนุภาคแม่เหล็กก็ได้ (42, 43)



รูปที่ 8 Protein G Magnetic Beads และ Magnetic Racks simplify immunoprecipitation

(ที่มา: <https://www.bio-rad.com/en-th/category/magnetic-beads-racks-for-immunoprecipitation?ID=N6AQ0815>)

2.7 อนุภาคนาโนทอง (gold nanoparticles ; AuNPs)

อนุภาคนาโน (nanoparticles) คือ อนุภาคของแข็งที่มีการกระจายตัว มีขนาด 10-1000 นาโนเมตร เนื่องจากอนุภาคที่มีขนาดเล็กและมีน้ำหนักเบาว่าอนุภาคขนาดใหญ่ จึงมีความสามารถในการยึดเกาะได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ (44)

อนุภาคนาโนทอง (gold nanoparticles; AuNPs) เป็นผลผลิตหนึ่งที่ได้จากนวัตกรรมทางนาโนเทคโนโลยีที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจากโลหะทองซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายคอลลอยด์สีแดงให้มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร ทำให้อนุภาคนาโนทองมีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่แตกต่างจากทองปกติ เช่น มีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาเคมี และนำไฟฟ้าได้ดี ทำให้สามารถประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ซึ่งเข้ามามีบทบาทในงานทางด้านเคมีวิเคราะห์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หาสารที่สนใจ (45)

ในปีค.ศ. 1951 Turkevich และคณะ ได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองโดยนำสารละลายของ HAuCl_4 ทำปฏิกิริยากับ citric acid ในน้ำเดือด โดย citrate จะเป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ทองประจุเป็น $3+$ (Au^{3+}) ได้เป็นอนุภาคนาโนทองที่มีประจุเป็น 0 (Au^0) และเป็นสารช่วยให้ความเสถียร (stabilizer agent) ล้อมรอบบนอนุภาคทองทำให้อนุภาคนาโนทองสามารถรักษารูปร่างและขนาดระดับนาโนอยู่ได้ (46, 47) แสดงดังรูปที่ 9 โดยมีปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังนี้



รูปที่ 9 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองแบบ Turkevich โดยการเกิดปฏิกิริยาของสารละลายทองและซิเตรดในน้ำเดือด (49)

ขนาดของอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์โดยวิธีแบบ Turkevich จะมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณของสารละลายไซเตียมซิเตรด โดยจะทำให้อนุภาคนาโนทองเกิดการรวมตัวกันและมีขนาดที่ใหญ่ขึ้น และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน (50) แสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 สีของสารละลายอนุภาคนาโนทองที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้น (Colors of various sized monodispersed gold nanoparticles)

(ที่มา: <https://nanocomposix.com/pages/gold-colloid#target>)

ซึ่งทองคำเมื่ออยู่ในรูปก้อนขนาดใหญ่จะมีสีเหลือง เนื่องจากทองคำดูดกลืนแสงสีน้ำเงินทำให้มองเห็นทองคำเป็นสีเหลือง แต่ถ้าทองคำถูกทำให้มีขนาดเล็กลงจนมีขนาดอนุภาคเล็กกว่าความยาวคลื่นแสงที่มากกระทบมาก ๆ จะทำให้อนุภาคนาโนทองเปลี่ยนความยาวคลื่นที่ดูดกลืนไปเป็นดูดกลืนแสงสีเขียว จึงทำให้มองเห็นอนุภาคนาโนทองเป็นสีแดง (49, 51) แสดงดังตารางที่ 3

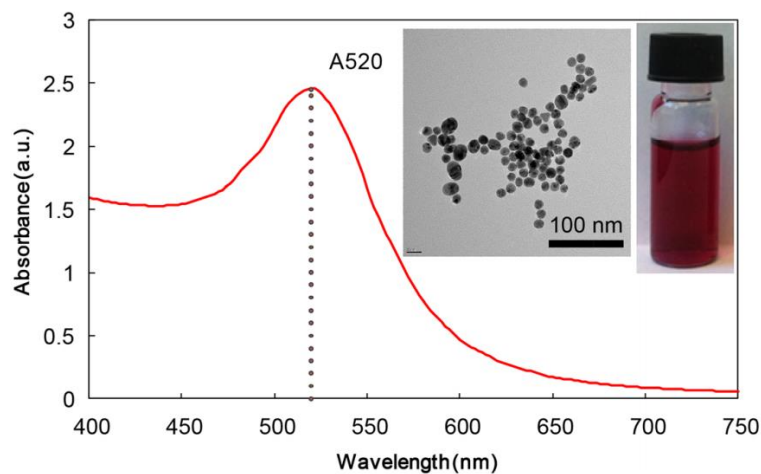
ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ของช่วงความยาวคลื่นแสงที่ถูกดูดกลืนกับสีที่ถูกดูดกลืนและมองเห็น

ความยาวคลื่นแสงที่ถูกดูดกลืน	สีที่ถูกดูดกลืน	สีที่มองเห็น
400 - 450	ม่วง	เหลืองแกมเขียว
450 - 480	น้ำเงิน	เหลือง
480 - 490	น้ำเงินแกมเขียว	ส้ม
490 - 500	เขียวแกมน้ำเงิน	แดง
500 - 560	เขียว	คราม
560 - 580	เหลืองแกมเขียว	ม่วง
580 - 600	เหลือง	น้ำเงิน
600 - 650	ส้ม	เขียวแกมน้ำเงิน
650 - 750	แดง	น้ำเงินแกมเขียว

(ที่มา: http://chem-around.blogspot.com/2015/02/blog-post_13.html)

กล่าวได้ว่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงขึ้นกับขนาดของอนุภาคนาโนทอง ทั้งนี้อนุภาคนาโนทองที่มีขนาดต่างกันก็จะมีสีที่แตกต่างกัน (49, 51) อนุภาคนาโนทองขนาดเล็กจะดูดกลืนความยาวคลื่นแสงในช่วงความยาวคลื่นสั้นที่ประมาณ 520 นาโนเมตร จึงทำให้เห็นอนุภาคนาโนทองเป็นสีแดงเข้ม และมีลักษณะเป็นทรงกลมแสดงดังรูปที่ 11 แต่เมื่ออนุภาคนาโนทองมีขนาดใหญ่ขึ้น อนุภาคนาโนทองจะดูดกลืนความยาวคลื่นแสงในช่วง

ความยาวคลื่นยาวขึ้น สีที่เห็นจึงเปลี่ยนเป็นสีม่วงและสีน้ำเงินตามขนาดของอนุภาคนาโนทองที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ (52)

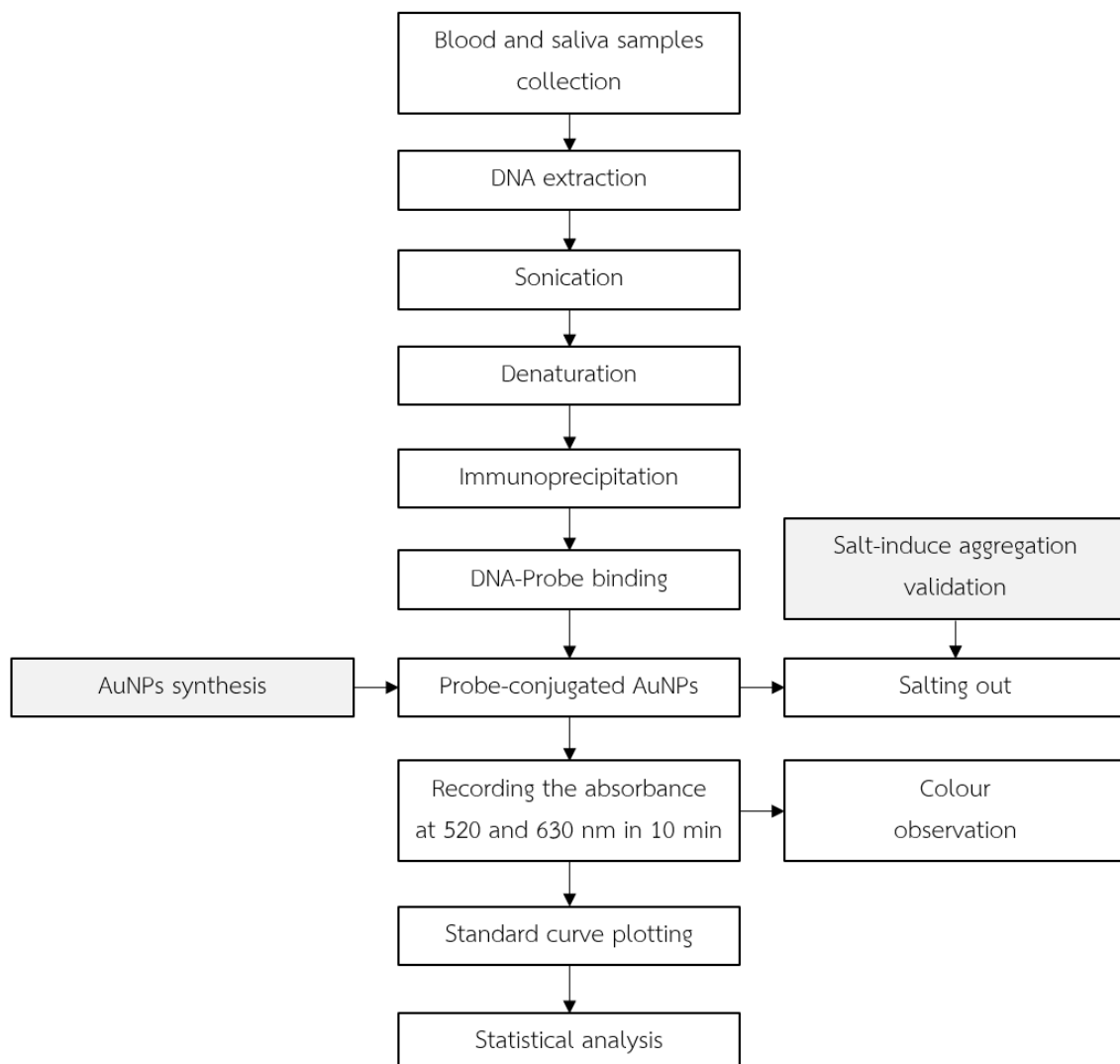


รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคนาโนทองกับความยาวคลื่นซึ่งเกิดพีคที่ 520 nm สีของสารละลายอนุภาคนาโนทอง และขนาดของอนุภาคนาโนทองที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) (51)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย (research methodology)

3.1 รูปแบบการทดลอง (experimental design)



3.2 รูปแบบการวิจัย (research design)

การวิจัยแบบ Diagnostic study

3.3 กลุ่มประชากรเป้าหมาย (target population)

เกณฑ์คัดเข้า (inclusion criteria)

1. ตัวอย่างเลือดจากผู้เข้ารับการตรวจสุขภาพประจำปีของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
2. มีอายุระหว่าง 26-40 ปี (53)
3. ไม่จำกัดเพศ (53)

3.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size)

การคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อใช้ในการประมาณค่าสัดส่วน สูตรโดย Cochran (ปีค.ศ.1963)

$$N = \frac{p(1-p)Z_{\alpha/2}^2}{d^2}$$

เมื่อ N คือ ขนาดของตัวอย่าง

p คือ ร้อยละของผลการวิเคราะห์ที่จะเกิดขึ้น (กำหนดให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องร้อยละ 80)

$Z_{\alpha/2}$ คือ ค่าที่ระดับความเชื่อมั่นหรือระดับนัยสำคัญ (กำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นหรือระดับนัยสำคัญที่ 0.05 ดังนั้น $Z_{0.025} = 1.960$)

d คือ ระดับความคลาดเคลื่อนของการสุ่มตัวอย่างที่ยอมให้เกิดขึ้นได้ (กำหนด = 0.1 (10%))

แทนค่าในสมการ

$$\begin{aligned} N &= \frac{p(1-p)Z_{\alpha/2}^2}{d^2} \\ &= \frac{0.8(1-0.8)1.96^2}{0.1^2} \\ &= 62 \end{aligned}$$

ดังนั้น ขนาดของตัวอย่างเท่ากับ 62 คน

3.5 วิธีการดำเนินการวิจัย (methodology)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (chemical reagent)

1. ChIP-Grade protein G magnetic beads (CST, USA)
2. Mouse monoclonal to 5-methylcytosine (5-mC) (Abcam, UK)
3. QIAamp DNA Blood Mini Kits (Qiagen)
4. Tri-Sodium citrate dihydrate (Merk Millipore)
5. Gold (III) chloride solution 99.99% (Sigma)
6. Standard Oligonucleotides: C20orf117 probe และ primers (Macrogen)
7. 3M Sodium acetate (Sigma)
8. Nuclease free water
9. 1X IP Buffer
10. 1X PBS buffer (pH 7.4)

เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย (research instrument)

1. High-speed refrigerated centrifuge
2. Microplate Reader (Varioskan Flash Multimode)
3. NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers
4. JEOL JEM-1400 Transmission Electron Microscope
5. Grant Bio PTR-35 360 Degree Vertical Multi-Function Rotator
6. Eppendorf™ ThermoMixer Temperature Control Device
7. Vortex Mixer GENIE 2 (G560E)
8. Magnetic rack
9. SONICS VCX Vibra 130 Tissue Sonicator

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ (sample preparation and DNA extraction)

ตัวอย่างเลือดปริมาณ 2 มิลลิลิตร จำนวน 62 ตัวอย่าง จากผู้เข้ารับการตรวจสุขภาพประจำปีของ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และตัวอย่างน้ำลายปริมาณ 1 มิลลิลิตร จำนวน 6 ตัวอย่าง จากนิสิตปริญญาโทและนักวิจัยห้องปฏิบัติการเซโร ฝายนิติเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งเป็นชายและหญิงที่มีอายุระหว่าง 26-40 ปี โดยตัวอย่างจะถูกเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำมาสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนของชุดสกัด QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen) และวัดปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างที่สกัดได้ด้วยเครื่อง NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers

3.5.2 การออกแบบ probe ที่จำเพาะบนยีน C20orf117

อ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับการออกแบบ probe บนยีน C20orf117 จากงานวิจัยของ Tania Madi และคณะ ในปีค.ศ. 2012 และฐานข้อมูล NCBI ในการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งจำเพาะกับยีน C20orf117 และมีตำแหน่งดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (CpG site) ที่มีปริมาณของเมทิลเลชันจำเพาะต่อการระบุเลือด เพื่อใช้ออกแบบ C20orf117 probe โดยใช้โปรแกรม Pyromark Q24 software 2.0 และ BioEdit Sequence Alignment Editor for Windows version 7.0.5

3.5.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง (gold nanoparticles synthesis)

สังเคราะห์อนุภาคนาโนทองให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 13 นาโนเมตร ตามวิธีของ Turkevich โดยเตรียมสารละลายทอง gold (III) chloride solution 99.99% (Sigma) ปริมาณ 32 ไมโครลิตรในน้ำปริมาณ 196 มิลลิลิตร ใน erlenmeyer flask นำไปต้มจนเดือดในสภาวะที่มีการกวนตลอดเวลา (stirring) จากนั้นเติมสารละลาย 1% trisodium citrate dihydrate ปริมาณ 3.6 มิลลิลิตร ทันที จะได้สารละลายสีแดงของอนุภาคนาโนทอง

3.5.4 การตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคนาโนทอง (characteristics of gold nanoparticles)

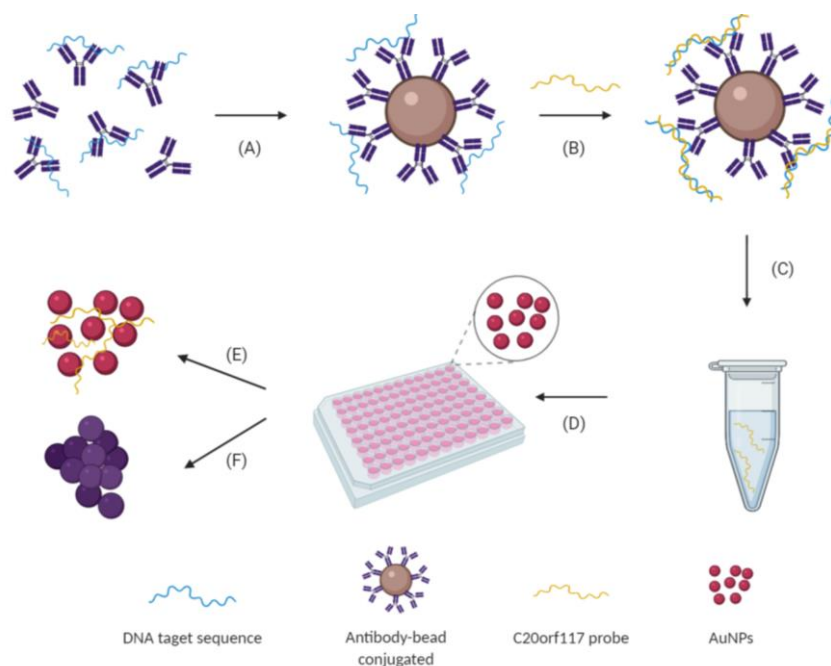
ตรวจสอบขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope: TEM) สังเกตสีและวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองด้วยเครื่อง microplate reader ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร

3.5.5 การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็ก ร่วมกับอนุภาคนาโนทอง

นำสารละลายมาตรฐาน ซึ่งในงานวิจัยนี้คือ C20orf117 probe ที่ทราบค่าความเข้มข้นแน่นอน ได้แก่ ความเข้มข้นที่ 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 ไมโครโมลาร์ เติมลงในสารละลายอนุภาคนาโนทองที่อยู่ใน 96-well plate จากนั้นทำการ salting out โดยการเติมสารละลาย PBS, สารละลาย PBS ที่มีสารละลาย NaCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ สารละลาย NaCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ตามลำดับ ในส่วนของ negative control ทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนจากสารละลายมาตรฐานเป็นน้ำ สังเกตสีที่เปลี่ยนไปภายในเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 630 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสีแดง และสีน้ำเงิน ตามลำดับ ด้วยเครื่อง microplate reader จากนั้นนำความสัมพันธ์ที่ได้ไปสร้างกราฟ

3.5.6 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง

แบ่งขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองเป็น 4 ขั้นตอน ได้แก่ 1. การทำ DNA sonication 2. การเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป้าหมาย (enrichment of methylated DNA fragment) 3. การจับกันของ C20orf117 probe และตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมาย และ 4. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วย C20orf117 probe และอนุภาคนาโนทอง แสดงวิธีการวิเคราะห์ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง
(ดัดแปลงรูปมาจาก Chen chen ge และคณะ)

โดย (A) 5-methylcytosine mouse monoclonal antibody ที่จับอย่างจำเพาะกับ 5-methylcytosine (5mC) บนดีเอ็นเอเป้าหมายเคลือบอยู่รอบอนุภาคแม่เหล็ก (MMPs) จะเกิดเป็น DNA-antibody-bead complex (B). เติม C20orf117 probe ซึ่งจำเพาะต่อตำแหน่งของดีเอ็นเอเมทิลเลชันของตัวอย่าง เลือดเลือดลงใน complex (C) ทำให้เกิดการปล่อย probe ที่จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายออกจาก complex โดยใช้ความร้อน (D) เติม probe ที่ถูกแยกออกมาลงในสารละลายอนุภาคนาโนทองที่อยู่ใน 96-well plate ภายใต้สภาวะที่มีเกลือ (E) ในสภาวะที่มีเกลือ C20orf117 probe จะเข้าจับกับอนุภาคนาโนทองเกิดเป็นสารประกอบที่มีความเสถียรและคงสภาพเป็นสีแดง (F) ในขณะที่หากไม่มี probe ภายใต้สภาวะที่มีเกลือ อนุภาคนาโนทองจะสามารถรวมตัวกันเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ และสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วงหรือน้ำเงิน ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

1. การทำ DNA sonication

นำ DNA ของตัวอย่างที่ได้จากการสกัดปริมาณ 1,000 นาโนกรัมต่อ 50 ไมโครลิตร ใน 1.5 eppendorf tube มาทำให้มีขนาดเล็กประมาณ 500-1,500 bp โดยใช้คลื่นเสียง (sonicate) ด้วยเครื่อง SONICS VCX Vibra 130 Tissue Sonicator (ตั้งค่าเครื่องอัตโนมัติ กำหนดเวลา: pulse on/off: 15 วินาที/30 วินาที ที่ 50% amplitude เป็นเวลาประมาณ 10 นาที) และตรวจสอบคุณภาพของ DNA บน 1% agarose gel ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

2. การเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป้าหมาย (enrichment of methylated DNA fragment)

นำตัวอย่างที่ผ่านการ sonicate แล้วไป denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำ immunoprecipitation หรือตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย monoclonal antibody ที่จับจำเพาะกับ 5-methylcytosine (5mC) บนชิ้นส่วนของ methylated DNA โดยเติม 5-methylcytosine mouse monoclonal antibody 5 ไมโครกรัม ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ในตัวอย่างที่ผ่านการ sonicate มาแล้ว และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 500 ไมโครลิตร ด้วย 1X IP buffer จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ด้วย rotating tube holder เติม magnetic beads ปริมาณ 30 ไมโครลิตร จะเกิดเป็น DNA-antibody-bead complex แล้วนำไป incubate ต่ออีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา ทำการแยกส่วนที่ไม่จับกับ complex ออกโดยนำตัวอย่างไปวางใน magnetic rack เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดสารละลายส่วนใสออก ทำการล้างตัวอย่างด้วย 1X IP buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปวางใน magnetic rack เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายส่วนใสออก และ resuspend ด้วย 1X IP buffer ปริมาณ 400 ไมโครลิตร

3. การจับกันของ C20orf117 probe และตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมาย

เติม C20orf117 probe ในตัวอย่างที่ผ่านการทำ immunoprecipitation มาแล้ว ปริมาณ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าเบาๆเป็นเวลา 30 นาที probe ที่ไม่ได้จับอย่างจำเพาะกับ DNA sequence จะถูกกำจัดออกภายใต้สนามแม่เหล็ก โดยนำไปวางไว้ใน magnetic rack เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการดูดสารละลายส่วนใสออก แล้ว resuspend ด้วย nuclease free water ปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากนั้นทำการปล่อย probe จาก DNA-Probe complex โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปวางไว้ใน magnetic rack เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายส่วนใส ซึ่งคือ C20orf117 probe ที่ถูกแยกออกมาใส่ใน 1.5 eppendorf tube หลอดใหม่

4. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วย C20orf117 probe และอนุภาคนาโนทอง

เติมสารละลายอนุภาคนาโนทองที่เตรียมไว้ปริมาณ 200 ไมโครลิตรใน 96-well plate จากนั้นใส่ C20orf117 probe ที่ถูกแยกออกมาจาก complex ปริมาณ 4 ไมโครลิตร และทำการ salting out โดยการเติมสารละลาย PBS สารละลาย PBS ที่มีสารละลาย NaCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ สารละลาย NaCl เข้มข้น 1.5 โม

ลาร์ ปริมาณ 40, 10 และ 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่าภายในเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 630 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปพลอตในกราฟมาตรฐาน

3.5.7 การวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis)

เกณฑ์การตัดสินผลบวก (cut-off point)

เกณฑ์การตัดสินผลบวกของการวิเคราะห์เมทิลเลชั่นด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองนั้น วิเคราะห์จากปริมาณ C20orf117 probe ต่ำสุดที่ทำให้สีของสารละลายอนุภาคนาโนทองยังคงเป็นสีแดงภายใต้สภาวะที่มีเกลืออย่างสังเกตเห็นได้ชัดเจน และทำการวิเคราะห์หาจุดตัดผลบวก (positive cut-off point) ที่เป็นค่าที่สามารถวัดได้จากอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร ซึ่งจากตัวอย่าง negative control



บทที่ 4

ผลการวิจัย (result)

4.1 ผลการออกแบบ probe ที่จำเพาะบนยีน C20orf117

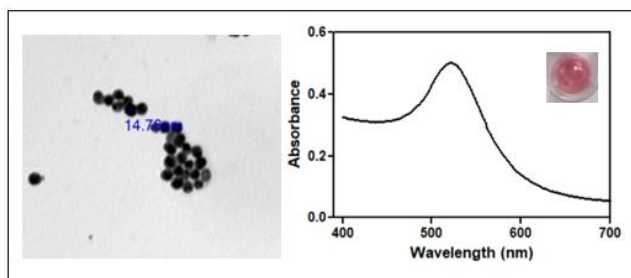
จากการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน C20orf117 จากฐานข้อมูล NCBI มาคัดเลือกตำแหน่งสำหรับการออกแบบ probe โดยใช้โปรแกรม Pyromark Q24 software 2.0 และ BioEdit Sequence Alignment Editor แสดงผลการออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ C20orf117 probe

C20orf117 gene	Sequence
probe	5'-CCTCCCTTTCTACCCGGGCGCCCCACCTTG-3'

4.2 ผลการเตรียมสารละลายอนุภาคนาโนทองและการตรวจสอบคุณลักษณะ

จากการตรวจสอบคุณสมบัติการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตามวิธีของ Turkevich และคณะ โดยตรวจสอบขนาดและรูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้ปรากฏเป็นคอลลอยด์สีแดง เป็นทรงกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 14.79 นาโนเมตร และมีช่วงการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แสดงดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 ขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนทองที่ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (ซ้าย) สี และสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนทองในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร (ขวา)

4.3 ผลการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง

จากการวัดค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคนาโนทองเมื่อทำปฏิกิริยากับ C20orf117 probe ที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 ไมโครโมลาร์ ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และ 630 นาโนเมตร พบว่าอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยความยาวคลื่นที่ 630 นาโนเมตรต่อ 520 นาโนเมตร ของ C20orf117 probe ที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 ไมโครโมลาร์ ในสภาวะที่มีเกลือ มีค่าเท่ากับ 0.271 ± 0.021 ,

0.437 ± 0.062 , 0.889 ± 0.058 , 1.125 ± 0.051 และ 1.195 ± 0.013 ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 5 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นหรือปริมาณของ C20orf117 probe ลดลง อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยจะมีค่าเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารละลายอนุภาคนาโนทองเมื่อทำปฏิกิริยากับ C20orf117 probe ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และ 630 นาโนเมตร

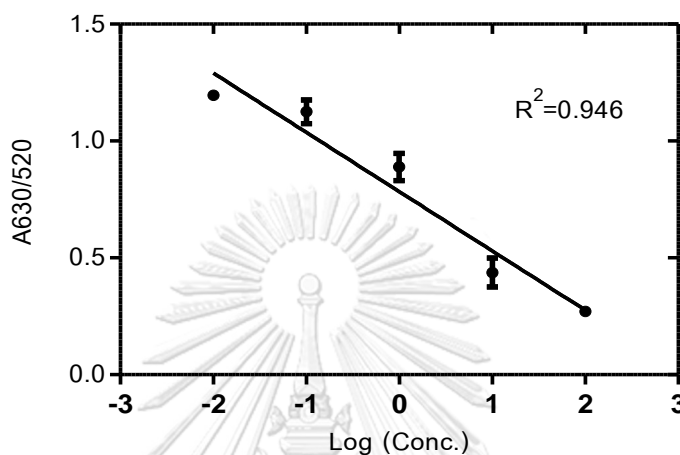
Conc. (μM)		100	10	1	0.1	0.01
Log (Conc.)		2	1	0	-1	-2
Absorbance at 520 nm		0.497	0.424	0.322	0.315	0.305
		0.496	0.436	0.341	0.308	0.305
		0.504	0.466	0.355	0.306	0.303
	Average	0.499	0.442	0.339	0.310	0.304
	SD	0.004	0.022	0.017	0.005	0.001
Absorbance at 630 nm		0.137	0.214	0.301	0.340	0.368
		0.143	0.187	0.311	0.344	0.365
		0.125	0.178	0.293	0.361	0.358
	Average	0.135	0.193	0.302	0.348	0.364
	SD	0.009	0.019	0.009	0.110	0.005
Absorbance at 630/520 nm		0.276	0.505	0.935	1.079	1.207
		0.288	0.429	0.912	1.117	1.197
		0.248	0.382	0.825	1.180	1.182
	Average	0.271	0.437	0.889	1.125	1.195
	SD	0.021	0.062	0.058	0.051	0.013

หมายเหตุ

Conc. คือ ความเข้มข้นในหน่วยไมโครโมลาร์ของ C20orf117 probe

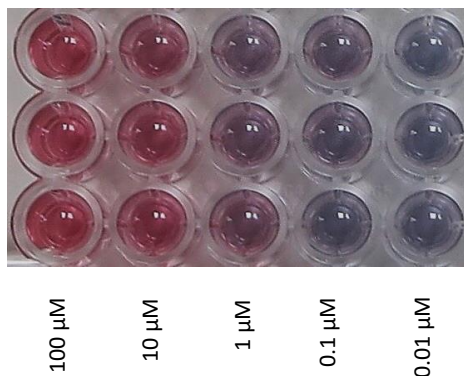
Log (Conc.) คือ ความเข้มข้นของ C20orf117 probe ที่แปลงเป็นค่า log

จากนั้นนำความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นที่แปลงเป็นค่า log แล้วของ C20orf117 probe ได้แก่ ความเข้มข้นที่ 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 ไมโครโมลาร์ กับอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตรที่ได้จากการทดลองไปสร้างกราฟ จะได้สมการกราฟเส้นตรงคือ $y = -0.2537x + 0.7832$ และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.946 แสดงดังรูปที่ 14 โดยค่า y แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร และค่า x แสดงค่า log ความเข้มข้นของ C20orf117 probe



รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคนาโนทองที่ความยาวคลื่น 630 ต่อ 520 นาโนเมตรกับค่า log ความเข้มข้นของ C20orf117 probe เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเช้นด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง

ผลจากการสังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 10 นาที พบว่าเมื่อความเข้มข้นหรือปริมาณของ C20orf117 probe ลดลง สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วงหรือสีน้ำเงิน แสดงดังรูปที่ 15 ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงความเสถียรของอนุภาคนาโนทองภายใต้สภาวะที่มีเกลือ โดยในสภาวะที่มีปริมาณของ C20orf117 probe มาก C20orf117 probe จะเข้าจับกับอนุภาคนาโนทองเกิดเป็นสารประกอบที่มีความเสถียรและคงสภาพเป็นสีแดง และจะดูดกลืนความยาวคลื่นแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ 520 นาโนเมตร ในทางกลับกันสภาวะที่มีปริมาณของ C20orf117 probe น้อย อนุภาคนาโนทองจะเข้ามารวมตัวกันเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีม่วงหรือสีน้ำเงิน อนุภาคนาโนทองจะดูดกลืนความยาวคลื่นแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ยาวขึ้นประมาณ 630 นาโนเมตร สีที่เห็นจึงเปลี่ยนเป็นสีม่วงและสีน้ำเงินตามขนาดของอนุภาคนาโนทองที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการคำนวณอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 630 นาโนเมตรต่อ 520 นาโนเมตร ที่จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นหรือปริมาณของ C20orf117 probe ลดลง



รูปที่ 15 สีที่เปลี่ยนไปภายในเวลา 10 นาที ของ C20orf117 probe-gold nanoparticles ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่มีเกลือ (จากซ้ายไปขวาแสดงความเข้มข้นของ C20orf117 probe ที่ 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ)

ทั้งนี้เมื่อได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองในตัวอย่าง negative control ซึ่งใช้น้ำแทนตัวอย่างดีเอ็นเอโดยการทดลอง 2 ซ้ำ พบว่ามีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตรเท่ากับ 0.797 โดยมีค่า log ของความเข้มข้นเท่ากับ -0.056 ซึ่งได้จากการแทนค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตรในสมการกราฟเส้นตรง แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร ของ negative control ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า log ของความเข้มข้น

negative control			
A630/520 nm	SD	Log (Conc.)	Conc.(μM)
0.797	0.009	-0.056	0.879

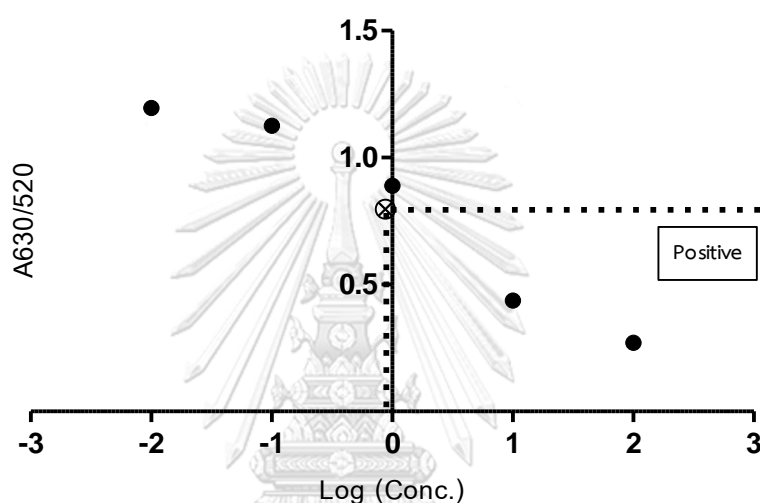
และเมื่อสังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 10 นาที ของตัวอย่าง negative control พบว่าสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วง เนื่องมาจากการเข้าจับกันเองของอนุภาคนาโนทองทำให้มีขนาดที่ใหญ่ และดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ยาวขึ้น แสดงดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 สีที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 10 นาที ของตัวอย่าง negative control ภายใต้สภาวะที่มีเกลือ

4.4 เกณฑ์การตัดสินผลบวก (cut-off point)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองในตัวอย่าง negative control ซึ่งใช้น้ำแทนตัวอย่างดีเอ็นเอ พบว่ามีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นเฉลี่ยที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตรเท่ากับ 0.797 ± 0.009 และมีสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วง ผู้ทำวิจัยจึงกำหนดจุดตัดของค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวเป็นค่า cut-off point กล่าวได้ว่าตัวอย่างที่มีผลอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่น้อยกว่า 0.797 จะให้ค่าเป็นผลบวก ในทางกลับกันหากมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.797 จะให้ค่าเป็นผลลบ แสดงจุดตัดค่า cut-off point บนกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 17



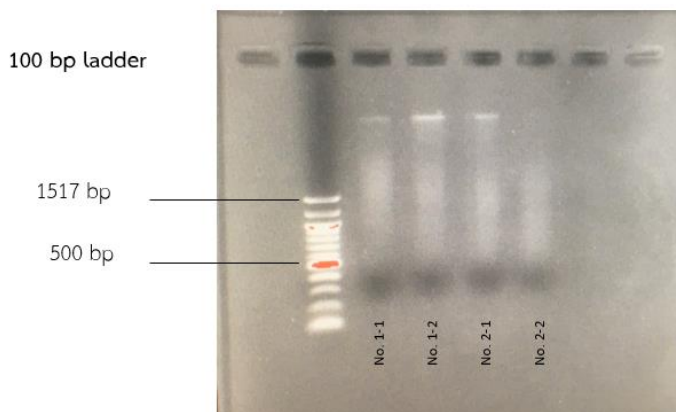
รูปที่ 17 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง negative control บนกราฟมาตรฐาน โดยที่ X คือตัวอย่าง negative control ซึ่งกำหนดให้เป็นค่า cut-off point

4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง

4.5.1 ผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างเลือด

- การศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองในตัวอย่างเลือด

จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองโดยการทดลองเบื้องต้น (preliminary test) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ในตัวอย่างเลือดจำนวน 2 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 62 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1 และ 2 (ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ) โดยการ sonicate ดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาณ 1,000 นาโนกรัม ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ด้วยเครื่อง sonicator แล้วนำมาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอบน 1% agarose gel ด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดทั้ง 2 ตัวอย่าง ส่วนใหญ่มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 500-1,500 bp แสดงดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอหลังการ sonicate บน 1% agarose gel ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ของตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 1 และ 2 จากการทำการทดลองทั้งสองซ้ำ

ดีเอ็นเอหลังการ sonicate ของตัวอย่างจะถูกนำมาทำ immunoprecipitation เพื่อคัดเลือกเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มี 5-methylcytosine (5mC) บนชิ้นส่วน จากนั้นจึงเติม C20orf117 probe ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ที่จำเพาะกับ DNA target sequence แล้วทำการล้าง probe ส่วนเกินออกจาก DNA-probe complex ภายใต้สภาวะแม่เหล็ก ก่อนทำการแยก complementary probe ออกจาก DNA-probe complex ด้วยความร้อน แล้วจึงนำ probe ที่แยกออกจาก DNA-probe complex มาทำปฏิกิริยากับสารละลายอนุภาคนาโนทองในสภาวะที่มีเกลือ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 1 และ 2 จากการทำการทดลองทั้งสองซ้ำ มีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร เท่ากับ 0.461 ± 0.055 และ 0.443 ± 0.008 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 7 ให้ค่าเป็นผลบวกทั้ง 2 ตัวอย่างโดยมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่น้อยกว่าค่า cut-off point ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.797

ตารางที่ 7 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 1 และ 2 จากการทำการทดลองทั้งสองซ้ำ ที่อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร

No.	Average absorbance at 630/520 nm	SD	Log (Conc.)	Conc.(μ M)
1	0.461	0.055	1.270	18.621
2	0.443	0.008	1.341	21.928

เมื่อนำอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร ของตัวอย่างเลือดที่ 43 และ 45 จากการทำการทดลองทั้งสองซ้ำมาแทนค่าในกราฟมาตรฐานสมการกราฟเส้นตรง $y = -0.2537x + 0.7832$ แทนค่าในสมการ y เท่ากับ 0.461 และ 0.443 ตามลำดับ และหาค่า x ซึ่งเป็นค่า log ความเข้มข้นของ C20orf117 probe จากสมการเส้นตรงข้างต้นจะได้ค่า x เท่ากับ 1.270 และ 1.341 ตามลำดับ และเมื่อทำการถอด

ค่า log จะได้ค่าความเข้มข้นของ C20orf117 probe ที่จับกับตัวอย่างที่ 1 และ 2 เท่ากับ 18.621 และ 21.928 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 8 ซึ่งมากกว่าปริมาณ probe ต่ำสุดที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองจากสีแดงเป็นสีม่วงที่มีค่าเท่ากับ 1 ไมโครโมลาร์ และยังคงมีสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองเป็นสีแดงทั้ง 2 ตัวอย่าง แสดงดังรูปที่ 19

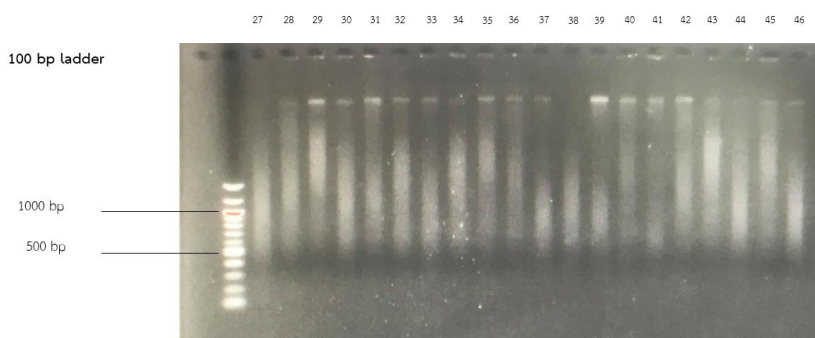


รูปที่ 19 สีที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 10 นาที ของ C20orf117 probe-Gold nanoparticles ในตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 1 และ 2

- การศึกษาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองในตัวอย่างเลือด

จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองโดยการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ดังที่กล่าวไปข้างต้น ต่อไปทำการวิเคราะห์เช่นเดิมในตัวอย่างเลือดที่เหลืออีก 60 ตัวอย่าง โดยในที่นี้จะแสดงตัวอย่างผลการ sonicate ดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 27-46 ดังรูปที่ 20 พบว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดมีขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอส่วนใหญ่ประมาณ 500-1,500 bp

เมื่อทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตัวอย่างเลือดที่เคลือบด้วยอนุภาคแม่เหล็กและทำปฏิกิริยากับสารละลายอนุภาคนาโนทองในสภาวะที่มีเกลือแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าตัวอย่างเลือดทุกตัวอย่างมีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร น้อยกว่าค่า cut-off point ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.797 ที่ให้ค่าเป็นผลบวก โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 0.442 ± 0.067 และมีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.783 ± 1.010 แสดงดังตารางที่ 8-9 โดยยังคงมีสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองเป็นสีแดงอยู่ แสดงดังรูปที่ 21-22



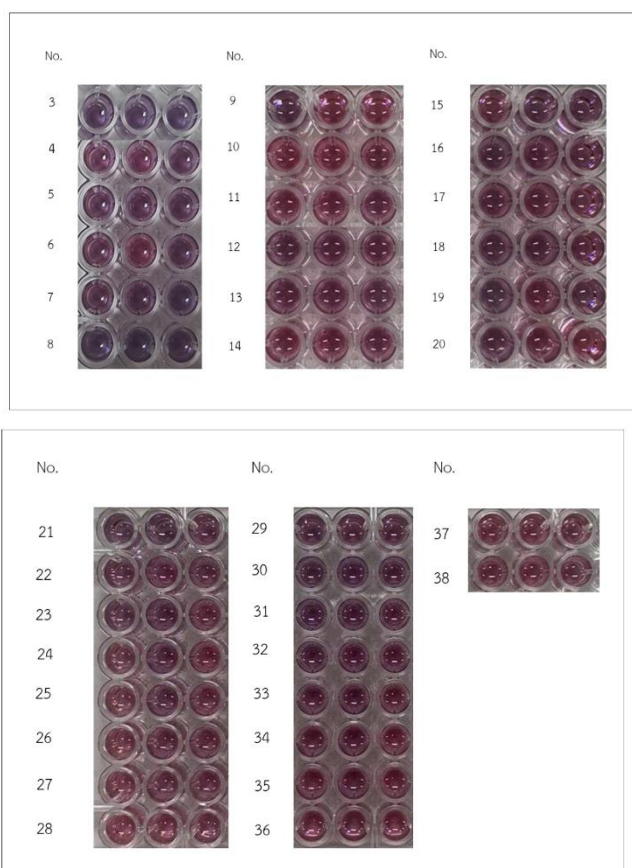
รูปที่ 20 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอหลังการ sonicate บน 1% agarose gel ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ของตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 27-46

ตารางที่ 8 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า log ความเข้มข้นของตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 3-38

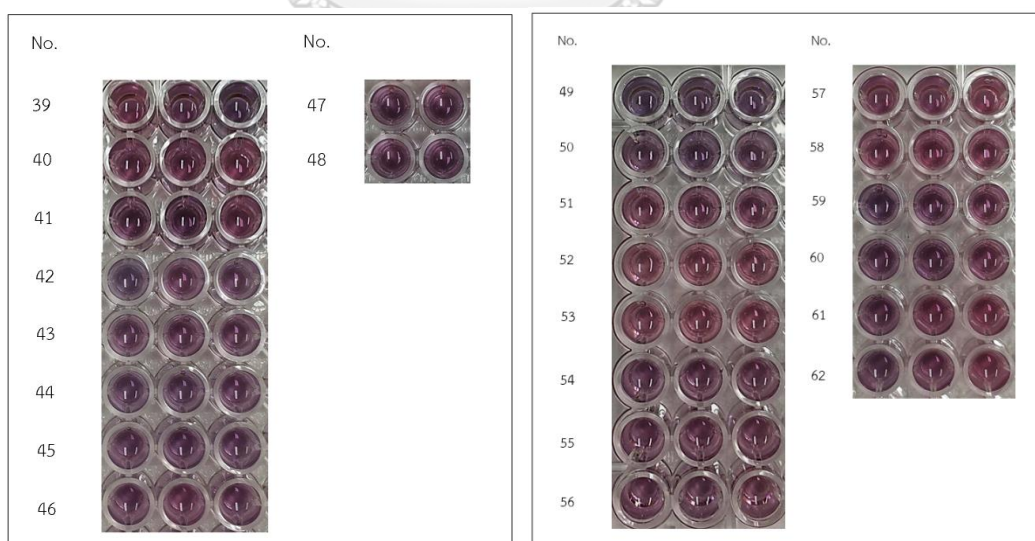
No.	Average absorbance at 630/520 nm	SD	Conc.(μ M)	No.	Average absorbance at 630/520 nm	SD	Conc.(μ M)
3	0.677	0.050	2.618	21	0.714	0.081	1.871
4	0.516	0.080	11.272	22	0.604	0.062	5.093
5	0.561	0.021	7.534	23	0.657	0.088	3.148
6	0.511	0.064	11.830	24	0.586	0.110	5.984
7	0.609	0.085	4.864	25	0.612	0.087	4.732
8	0.704	0.064	2.051	26	0.597	0.061	5.420
9	0.533	0.165	9.683	27	0.600	0.066	5.260
10	0.442	0.067	22.131	28	0.491	0.062	14.223
11	0.730	0.080	1.352	29	0.637	0.025	3.758
12	0.601	0.052	5.224	30	0.771	0.020	1.117
13	0.619	0.038	4.436	31	0.696	0.070	2.208
14	0.521	0.066	10.814	32	0.642	0.041	3.606
15	0.647	0.077	3.443	33	0.599	0.054	5.309
16	0.642	0.060	3.606	34	0.544	0.066	8.770
17	0.594	0.054	5.572	35	0.520	0.045	10.914
18	0.668	0.085	2.844	36	0.496	0.041	13.490
19	0.675	0.200	2.667	37	0.486	0.023	14.894
20	0.589	0.151	5.821	38	0.524	0.055	10.520

ตารางที่ 9 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร ส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ และค่า log ความเข้มข้นของตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 39-62

No.	Average absorbance at 630/520 nm	SD	Conc.(μ M)	No.	Average absorbance at 630/520 nm	SD	Conc.(μ M)
39	0.602	0.137	5.164	51	0.589	0.080	5.848
40	0.538	0.036	9.247	52	0.529	0.012	10.093
41	0.625	0.041	4.207	53	0.485	0.006	14.997
42	0.618	0.128	0.774	54	0.624	0.020	4.256
43	0.592	0.044	1.007	55	0.576	0.015	6.561
44	0.653	0.063	2.985	56	0.611	0.052	4.764
45	0.624	0.030	0.513	57	0.542	0.032	8.954
46	0.544	0.067	4.508	58	0.515	0.015	11.376
47	0.574	0.012	6.668	59	0.693	0.133	2.275
48	0.599	0.023	5.321	60	0.650	0.066	3.342
49	0.783	0.060	0.998	61	0.567	0.091	7.096
50	0.770	0.063	1.125	62	0.630	0.104	4.036



รูปที่ 21 สีที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 10 นาที ของ C20orf117 probe-Gold nanoparticles
ในตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 3-36



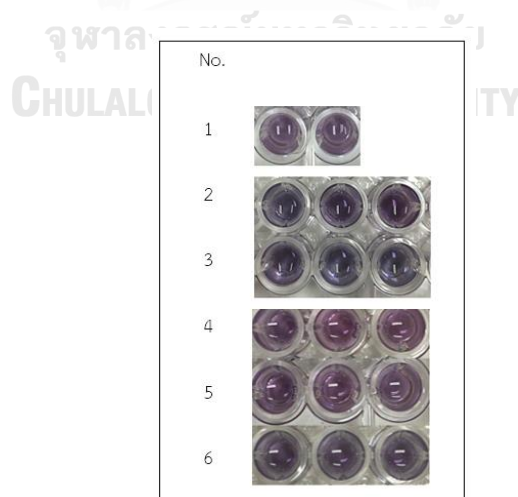
รูปที่ 22 สีที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 10 นาที ของ C20orf117 probe-Gold nanoparticles
ในตัวอย่างเลือดตัวอย่างที่ 39-62

4.5.2 ผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำลาย

จากผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง โดยทำการทดลองทั้งสามซ้ำในตัวอย่างน้ำลาย (ยกเว้นตัวอย่างที่ 1 ที่ทำการทดลองสองซ้ำ) เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในตัวอย่างเลือด พบว่าตัวอย่างน้ำลายทั้ง 6 ตัวอย่าง มีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร สูงสุดและต่ำสุดเท่ากับ 1.010 ± 0.024 และ 0.682 ± 0.061 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 10 โดยจากตัวอย่างน้ำลายทั้ง 6 ตัวอย่าง พบว่ามีอยู่ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 4 และ 5 มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยน้อยกว่าค่า cut-off point ที่มีค่าเท่ากับ 0.797 โดยมีค่าเท่ากับ 0.682 ± 0.061 และ 0.712 ± 0.022 ตามลำดับ และมีสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองเป็นสีแดงอมม่วง ส่วนตัวอย่างน้ำลายอีก 4 ตัวอย่างที่เหลือ ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 6 มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยมากกว่าค่า cut-off point และพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองจากสีแดงเป็นสีม่วงหรือน้ำเงิน ดังแสดงในรูปที่ 23

ตารางที่ 10 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า log ความเข้มข้นของตัวอย่างน้ำลายจำนวน 6 ตัวอย่าง

No.	Average absorbance at 630/520 nm	SD	Log (Conc.)
1	0.987	0.026	-0.803
2	0.832	0.091	-0.192
3	0.927	0.069	-0.567
4	0.682	0.061	0.397
5	0.712	0.022	0.279
6	1.010	0.024	-0.896



รูปที่ 23 สีที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 10 นาที ของ C20orf117 probe-Gold nanoparticles ในตัวอย่างน้ำลายจำนวน 6 ตัวอย่าง

บทที่ 5

สรุปผลและอภิปรายการวิจัย (conclusion and discussion)

5.1 สรุปผลการเตรียมสารละลายอนุภาคนาโนทองและการตรวจสอบคุณลักษณะ

จากผลการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทองพบว่าอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้ปรากฏเป็นคอลลอยด์สีแดง เป็นทรงกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 14.79 นาโนเมตร และมีสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และมีช่วงการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

ทั้งนี้อนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์โดยวิธีของ Turkevich จะมีสีที่แตกต่างกัน อนุภาคนาโนทองขนาดเล็กจะดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นสั้นที่ประมาณ 520 นาโนเมตร จึงทำให้เห็นอนุภาคนาโนทองเป็นสีแดงเข้ม แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของสารละลายโซเดียมซิเตรต จะทำให้อนุภาคนาโนทองเกิดการรวมตัวกันและมีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นยาวขึ้น สีที่เห็นจึงเปลี่ยนเป็นสีม่วงและสีน้ำเงินตามขนาดของอนุภาคนาโนทองที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ (49-52) โดยเมื่อทำการทดสอบ salting out สารละลายอนุภาคนาโนทองที่สังเคราะห์ได้ พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายดังที่กล่าวข้างต้น และสามารถมองเห็นได้ชัดเจนด้วยตาเปล่า จึงได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของ C20orf117 ในชิ้นตอนถัดไป

5.2 สรุปผลการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง

ผลการสร้างกราฟมาตรฐานได้สมการกราฟเส้นตรงคือ $y = -0.2537x + 0.7832$ และมีค่า R^2 ที่เข้าใกล้ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.946 โดยเมื่อวัดอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยความยาวคลื่นที่ 630 นาโนเมตรต่อ 520 นาโนเมตร ของสารละลายอนุภาคนาโนทองเมื่อทำปฏิกิริยากับ C20orf117 probe ที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับในสภาวะที่มีเกลือ พบว่าอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของ probe มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อมีปริมาณของ probe ที่ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐาน

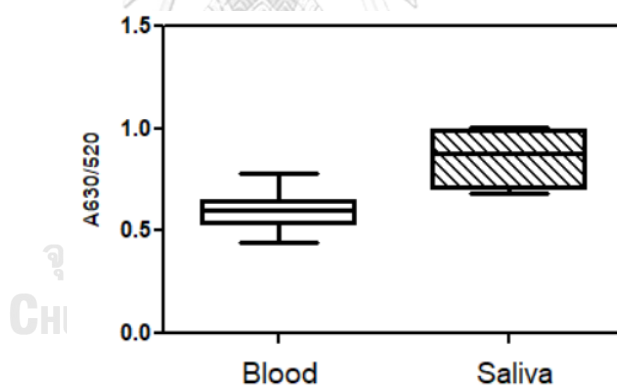
เมื่อมีปริมาณของ probe มาก สีของสารละลายอนุภาคนาโนทองจะยังคงเป็นสีแดงเช่นเดิม ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงความเสถียรของอนุภาคนาโนทองภายใต้สภาวะที่มีเกลือ โดย probe จะเข้าจับกับอนุภาคนาโนทองเกิดเป็นสารประกอบที่มีความเสถียรและคงสภาพเป็นสีแดง ดังนั้นสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองเมื่อทำปฏิกิริยากับ C20orf117 probe ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในสภาวะที่มีเกลือจึงมีสีที่แดง ในขณะที่หากไม่มี probe หรือมีปริมาณ probe น้อย เมื่อทำการ salting out อนุภาคนาโนทองจะเข้ามารวมตัวกันเองเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีแดงเป็นสีม่วงหรือสีน้ำเงิน เนื่องจากอนุภาคนาโนทองจะดูดกลืนความยาวคลื่นแสงในช่วงความยาวคลื่นยาวขึ้น สีที่เห็นจึงเปลี่ยนเป็นสีม่วงและสีน้ำเงินตามขนาดของอนุภาคนาโนทองที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ

5.3 เกณฑ์การตัดสินผลบวก (cut-off point)

เพื่อหาจุดตัดของผลการวิเคราะห์ที่ให้ผลบวกและผลลบ จากผลการวิเคราะห์ในตัวอย่าง negative control ซึ่งใช้น้ำแทนตัวอย่างดีเอ็นเอ พบว่ามีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นเฉลี่ยที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตรเท่ากับ 0.797 ± 0.009 และเกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองจากสีแดงเป็นสีม่วง ผู้ทำวิจัยจึงกำหนดจุดตัดของค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวเป็นค่า cut-off point ดังนั้นตัวอย่างที่มีผลอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่น้อยกว่า 0.797 จะให้ค่าเป็นผลลบ ในทางกลับกันหากตัวอย่างมีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าหรือเท่ากับ 0.797 จะให้ค่าเป็นผลบวก

5.4 สรุปผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองในตัวอย่างเลือดและน้ำลาย

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทองในตัวอย่างเลือดและน้ำลาย พบว่าตัวอย่างเลือดทั้งหมดจำนวน 62 ตัวอย่าง มีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร น้อยกว่าค่า cut-off point ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.797 ที่ให้ค่าเป็นผลลบ ในขณะที่ตัวอย่างน้ำลายจำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่า 4 ตัวอย่าง มีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยมากกว่าค่า cut-off point ให้ค่าเป็นผลบวก โดยจาก 6 ตัวอย่าง มีตัวอย่างน้ำลายจำนวน 2 ตัวอย่างที่มีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยน้อยกว่าค่า cut-off point และให้ค่าเป็นผลบวกลวง (false positive) ดังแสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 24 Box plot แสดงค่าการกระจายตัวของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร ของตัวอย่างเลือดเปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำลาย

เนื่องจากในขั้นตอนการออกแบบ specific probe ผู้วิจัยได้อ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์จากงานวิจัยของ tania madi และคณะ โดยทำการคัดเลือกตำแหน่ง CpG site เป็นช่วง บริเวณ CpG site ตำแหน่งที่ 5-7 ในขณะทำงานวิจัยของ tania madi และคณะ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตัวอย่างทางชีวภาพต่าง ๆ บนยีน C20orf117 ด้วยวิธีมาตรฐาน bisulfite conversion โดยเป็นการคำนวณเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันเฉลี่ยในแต่ละตำแหน่ง CpG site และพบว่ามีค่า SD หรือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่สูงในบางตำแหน่ง เช่นในตัวอย่างเลือดบน CpG site ตำแหน่งที่ 5 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันเฉลี่ยบนยีน C20orf117 เท่ากับ 31.8 ± 4.9 เปอร์เซ็นต์

ในขณะที่ตัวอย่างน้ำลายบน CpG site ตำแหน่งที่ 6 มีเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันเฉลี่ยเท่ากับ 20.6 ± 10.7 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 1 จะเห็นว่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ตำแหน่งนี้มีค่าค่อนข้างสูงและใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชัน บน CpG site ตำแหน่งที่ 5 ในตัวอย่างเลือด (6) จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดผลบวกлож (false positive) ของการวิเคราะห์ได้

โดยสามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตัวอย่างเลือดด้วย C20orf117 probe ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังมีข้อจำกัดในการอ่านผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำลาย ซึ่งสามารถวิเคราะห์ผลได้อย่างถูกต้องเพียง 66.67 เปอร์เซ็นต์

5.5 ข้อดี ข้อจำกัด และอุปสรรคของการวิจัย

ข้อดี

- สามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายอนุภาคนาโนทองด้วยตาเปล่าได้ และการวัดอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 630/520 นาโนเมตร
- ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีรุนแรงในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอ
- เครื่องมือพื้นฐานในห้องปฏิบัติการก็สามารถทำได้
- ไม่ต้องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR หรือทำ sequencing

ข้อจำกัด

- อาจเกิดผลบวกлож (false positive) ของวิธีวิเคราะห์ เนื่องจากตัวอย่างทางชีวภาพชนิดอื่น เช่น น้ำลาย อาจมีปริมาณเมทิลเลชันบางตำแหน่งบน C20orf117 probe ที่ใกล้เคียงกับเลือดได้
- ยังต้องใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นในปริมาณมาก ที่ความเข้มข้น 20 ng/uL, ปริมาตร 50 uL

อุปสรรค

- Probe เป็นส่วนที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารละลายอนุภาคนาโนทอง การเติม probe ใน negative control จึงต้องทำการล้าง probe ออกให้หมด ซึ่งการหลงเหลืออยู่ของ probe อาจเป็นที่มาของการเกิดสีที่ไม่สมบูรณ์ (สีม่วง หรือน้ำเงิน) จึงควรเพิ่มขั้นตอนการล้าง probe ก่อนการแยก probe ออกจาก complex

5.6 แนวทางและข้อเสนอแนะการวิจัยต่อไปในอนาคต

- เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็ก และอนุภาคนาโนทอง กับวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน bisulfite conversion
- ทดลองลดปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นเพื่อดูประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ต่อไป
- ใช้ตัวอย่างที่ใกล้เคียงกับตัวอย่างจริงที่พบได้ในสถานที่เกิดเหตุ เช่น ตัวอย่างคราบเลือดบนพื้นผิวต่าง ๆ ในการทดลอง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวิเคราะห์ (lower detection limit)
- เพิ่มช่วงอายุของตัวอย่างสำหรับการศึกษา เพื่อศึกษาผลของอายุต่อปริมาณเมทิลเลชันของยีน C20orf117
- เพิ่มจำนวนตัวอย่างน้ำลายสำหรับการวิเคราะห์ผล

5.7 สรุปผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตัวอย่างเลือดด้วย probe ที่จำเพาะกับตำแหน่งดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนยีน C20orf117 ด้วยอนุภาคแม่เหล็กร่วมกับอนุภาคนาโนทอง สามารถทำได้ดีบนตัวอย่างเลือด แต่ยังมีข้อจำกัดในการใช้วิเคราะห์ตัวอย่างชนิดอื่น ๆ เนื่องจากในตัวอย่างทางชีวภาพชนิดต่าง ๆ อาจมี CpG บางตำแหน่งบนยีน C20orf117 ที่มีปริมาณเมทิลเลชันที่ใกล้เคียงกับในตัวอย่างเลือดจึงทำให้เกิดผลบวกหลง (false positive) ของการวิเคราะห์ได้ โดยสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดได้ถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ และตัวอย่างน้ำลายเท่ากับ 66.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยความยาวคลื่นที่ 630 ต่อ 520 นาโนเมตร น้อยกว่า 0.797 ซึ่งให้ค่าเป็นผลบวก และสามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคนาโนทองได้ด้วยตาเปล่าได้ในเวลา 10 นาที ผลการวิจัยครั้งนี้จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เหมาะสมสำหรับการวิจัยต่อไป



บรรณานุกรม

1. รศ.ดร.บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค, คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล. วิทยาการก้าวหน้าด้านนิติพันธุศาสตร์ (Recent advances in forensic genetics)2018.
2. ผศ.ดร.ฐิติกา กิจพิพิธ. การประยุกต์ใช้ความรู้ทางชีววิทยาในงานนิติวิทยาศาสตร์ [online] 2017 [Available from: <http://biology.ipst.ac.th/?p=3314>.
3. Ja Hyun A, It, Sup, gt, It, Sup, et al. Body fluid identification in forensics. BMB Rep. 2012;45(10):545-53.
4. Forat S, Huettel B, Reinhardt R, Fimmers R, Haidl G, Denschlag D, et al. Methylation Markers for the Identification of Body Fluids and Tissues from Forensic Trace Evidence. PLOS ONE. 2016;11(2):e0147973.
5. Baron U, Türbachova I, Hellwag A, Eckhardt F, Berlin K, Hoffmueller U, et al. DNA Methylation Analysis as a Tool for Cell Typing2006. 55-60 p.
6. Madi T, Balamurugan K, Bombardi R, Duncan G, McCord B. The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing. 2012;33(12):1736-45.
7. Ge C, Fang Z, Chen J, Liu J, Lu X, Zeng L. A simple colorimetric detection of DNA methylation. The Analyst. 2012;137(9):2032-5.
8. Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. Forensic Science International. 2009;188(1):1-17.
9. Gefrides L, Welch K. Forensic Biology: Serology and DNA. In: Mozayani A, Noziglia C, editors. The Forensic Laboratory Handbook Procedures and Practice. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 15-50.
10. Peonim V, Chirachariyavej T, Atamasirikul K, Talthip J. Comparable between Rapid One Step Immunochromatographic Assay and ELISA in the Detection of Prostate Specific Antigen in Vaginal Specimens of Raped Women. J Med Assoc Thai. 2007;90(12).
11. Bauer M, Patzelt D. Identification of menstrual blood by real time RT-PCR: Technical improvements and the practical value of negative test results. Forensic Science International. 2008;174(1):55-9.
12. Courts C, Madea B. Specific Micro-RNA Signatures for the Detection of Saliva and Blood in Forensic Body-fluid Identification. 2011;56(6):1464-70.
13. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. Science. 1975;187(4173):226.

14. โชติกา หยกทองวัฒนา, ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. เอพิเจเนติก-การควบคุมเหนือลำดับดีเอ็นเอ. Thai Journal of Genetics. 2011;4(2):71-84.
15. Bird A. Perceptions of epigenetics. Nature. 2007;447:396.
16. Yang PK, Kuroda MI. Noncoding RNAs and Intranuclear Positioning in Monoallelic Gene Expression. Cell. 2007;128(4):777-86.
17. Grewal SIS, Jia S. Heterochromatin revisited. Nature Reviews Genetics. 2007;8:35.
18. Raungrut P, Petjaroen P, Geater SL, Keeratchananont W, Phuakoloun M, Suwivat S, et al. Methylation of 14-3-3 σ gene and prognostic significance of 14-3-3 σ expression in non-small cell lung cancer. Oncology letters. 2017;14(5):5257-64.
19. Wu Y, Sarkissyan M, Vadgama JV. Epigenetics in breast and prostate cancer. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2015;1238:425-66.
20. Jarunya Samsuwan DPY, Dr. Apiwat Mutirangura, Dr. Nakarin Kitkumthorn, Tachapol Muangsub. Brain tissue identification by site-specific CpG methylation. Graduate Research Conference, Khon Koen University. 2014:578-84.
21. Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. Neuropsychopharmacology. 2012;38:23.
22. Itzykson R, Fenaux P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. Leukemia. 2014;28(3):497-506.
23. Zabet NR, Catoni M, Prischi F, Paszkowski J. Cytosine methylation at CpCpG sites triggers accumulation of non-CpG methylation in gene bodies. Nucleic acids research. 2017;45(7):3777-84.
24. Woraruthai T, Charoenlap C, Hongsaprabhas C, Mutirangura A, Honsawek S. LINE-1 hypomethylation level in patients with soft tissue tumor. Chula Med J 2018;62(1):79-90.
25. จันทนา รักแผน, คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. บทความพินิจ: Epigenetics and Myelodysplastic Syndrome. J Hematol Transfus Med. 2012;22(2):141-8.
26. Suetake I, Watanebe M, Takeshita K, Takahashi S, Carlton P, editors. The Molecular Basis of DNA Methylation 2017.
27. Moison C, Guieysse-Peugeot A-L, Arimondo PB. DNA methylation in cancer. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. 2014.
28. Choi A, Shin K-J, Yang WI, Lee HY. Body fluid identification by integrated analysis of DNA methylation and body fluid-specific microbial DNA. International Journal of Legal Medicine. 2014;128(1):33-41.
29. Loh K, Modhukur V, Rajashekar B, Märtens K, Mägi R, Kolde R, et al. DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. Genome Biology. 2014;15(4):3248.
30. Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. Nature

Reviews Genetics. 2010;11(3):191-203.

31. Parle-Mcdermott A, Harrison A. DNA Methylation: A Timeline of Methods and Applications. 2011;2(74).
32. Silva DSBS, Antunes J, Balamurugan K, Duncan G, Alho CS, McCord B. Developmental validation studies of epigenetic DNA methylation markers for the detection of blood, semen and saliva samples. Forensic Science International: Genetics. 2016;23:55-63.
33. Zakhari S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. Alcohol Res. 2013;35(1):6-16.
34. Bird AP, Southern EM. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. Journal of Molecular Biology. 1978;118(1):27-47.
35. Cedar H, Solage A, Glaser G, Razin A. Direct detection of methylated cytosine in DNA by use of the restriction enzyme *MspI*. Nucleic acids research. 1979;6(6):2125-32.
36. Lin Y-C, Tsai L-C, Lee JC-I, Su C-W, Tzen JT-C, Linacre A, et al. Novel identification of biofluids using a multiplex methylation sensitive restriction enzyme-PCR system. Forensic Science International: Genetics. 2016;25:157-65.
37. An JH, Choi A, Shin K-J, Yang WI, Lee HY. DNA methylation-specific multiplex assays for body fluid identification. International Journal of Legal Medicine. 2013;127(1):35-43.
38. Mohn F, Weber M, Schübeler D, Roloff T-C. Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP). In: Tost J, editor. DNA Methylation: Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p. 55-64.
39. Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. Biology. 2016;5(1).
40. Zuo T, Tycko B, Liu TM, Lin JJ, Huang TH. Methods in DNA methylation profiling. Epigenomics. 2009;1(2):331-45.
41. Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. Nature Genetics. 2006;38:1378.
42. Satinder Kakar, Jain A. A Review on Magnetic Microsphere. International Journal of Biomedical Science and Engineering. 2017;5(5):48-52.
43. BangsLaboratories. Magnetic Microsphere [online] 2013 [Available from: <http://www.technochemical.com/bangs/img/TechNote%20102%20Web.pdf>
44. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arabian Journal of Chemistry. 2017.
45. Teepoo S, Chumsaeng P, Palasak K, Bousod N, Mhadbamrung N, Sae-lim P. Unmodified gold nanoparticles as a simple colorimetric probe for ramoplanin detection. Talanta. 2013;117:518-22.
46. A Reynolds R, A Mirkin C, L. Letsinger R. A Gold Nanoparticle/Latex Microsphere-Based

Colorimetric Oligonucleotide Detection Method 2000. 229-35 p.

47. Yeh Y-C, Creran B, Rotello VM. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*. 2012;4(6):1871-80.

48. อภิวัฒน์ ชมภูสอ. โครงสร้างระดับนาโนของทอง: การสังเคราะห์และการประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง. *KKU Sci J*. 2013;41(4):859-72.

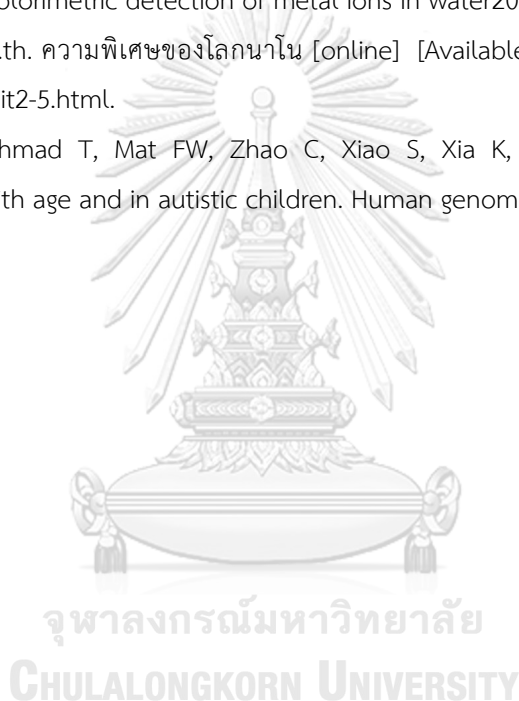
49. Imbraguglio D, Giovannozzi A, Rossi A. *Nanometrology* 2013. 193-220 p.

50. Paweenar, Duenchay. การประยุกต์ใช้อุณหภูมิของขนาดนาโนเมตรในการตรวจวัดเชิงสี. *Pathumwan Academic Journal*. 2019;9(26):34-50.

51. Zhao C, Zhong G, Kim D-E, Liu J, Liu X. A portable lab-on-a-chip system for gold-nanoparticle-based colorimetric detection of metal ions in water 2014. 052107 p.

52. il.mahidol.ac.th. ความพิเศษของโลกนาโน [online] [Available from: <https://il.mahidol.ac.th/e-media/nano/Page/Unit2-5.html>].

53. Tsang SY, Ahmad T, Mat FW, Zhao C, Xiao S, Xia K, et al. Variation of global DNA methylation levels with age and in autistic children. *Human genomics*. 2016;10(1):31.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวศุภรารักษ์ ชูชื่น
วัน เดือน ปี เกิด	15 มิถุนายน 2537
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	1. วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยศิลปากร พ.ศ.2555-2558 2. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (นิติวิทยาศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ.2559-25562
ที่อยู่ปัจจุบัน	26/86 ถนนสุขุมบูรณ์ ตำบลประจวบคีรีขันธ์ อำเภอเมืองประจวบคีรีขันธ์ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 77000

