

การวิเคราะห์เมทิลเลชั่นไมโครแอเรย์เพื่อการตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ

นายทัชพล เมืองทรัพย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ANALYSIS OF METHYLATION MICROARRAY FOR TISSUE SPECIFIC DETECTION

Mr. Tachapol Muangsub

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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์เมทิลเลชันไมโครเอเรย์เพื่อการตรวจแยกชนิด
ของเนื้อเยื่อ

โดย

นายทัชพล เมืองทรัพย์

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิตางกูร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์ นครินทร์ กิตกำธร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โสภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อภิวัฒน์ มุทิตางกูร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์ นครินทร์ กิตกำธร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมบูรณ์ คีลาวัฒน์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ศิษณุศ ทองสีมา)

ทัชพล เมื่องทรัพย์ : การวิเคราะห์เมทิลเลชันไมโครแอเรย์เพื่อการตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ. (ANALYSIS OF METHYLATION MICROARRAY FOR TISSUE SPECIFIC DETECTION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร. นพ. อภิวัฒน์ มุทิรากร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. ทพ. นครินทร์ กิตกำธร , 122 หน้า.

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) เป็นหลักการหนึ่งที่ได้รับการพัฒนาขึ้น เพื่อตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือการรวบรวมข้อมูลทางชีวสารสนเทศ เพื่อวิเคราะห์และค้นหาดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ ทางงานวิจัยได้คัดเลือกข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ที่ตรวจวัดได้จากเมทิลเลชันไมโครแอเรย์ (Methylation microarray) Illumina® HumanMethylation27 BeadChip Kit ของบริษัทอิลลูมินา (Illumina) ที่ประกอบไปด้วยอวัยวะพื้นฐาน 18 ชนิด ครอบคลุมซีพีจี 27,578 ตำแหน่งทั่วทั้งจีโนมของมนุษย์ ข้อมูลดังกล่าวนี้จะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM เพื่อหาค่าเมทิลเลชันเฉลี่ย จากนั้นจะถูกจัดกลุ่มลงในโปรแกรม Microsoft Excel และถูกนำมาสร้างกราฟของซีพีจีแต่ละตำแหน่งด้วยโปรแกรมอาร์ เพื่อค้นหาซีพีจีที่มีความจำเพาะในแต่ละอวัยวะ รวมถึงเพื่อนำมาออกแบบในการตรวจวัดด้วยเทคนิคเอ็มเอสพีซีอาร์ ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกซีพีจีที่ตำแหน่ง cg12620499 ของยีน DSU มาเพื่อในการตรวจยืนยันเนื้อเยื่อตับ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงค่าเมทิลเลชันของตับที่สูงกว่าอวัยวะอื่นๆ อย่างชัดเจน นอกจากนี้ผลการทดลองในตัวอย่างดีเอ็นเอจากซีรัม พบว่าค่าเมทิลเลชันของกลุ่มคนปกติมีความแตกต่างจาก กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับและโรคตับแข็งอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.0002$ และ $p=0.0047$ ตามลำดับ) ทางงานวิจัยคาดหวังว่าฐานข้อมูลนี้จะสามารถให้ประโยชน์ได้ ทั้งทางนิติเวชวิทยา และงานทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์	ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5474120630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : METHYLATION MICROARRAY, TISSUE SPECIFIC DETECTION, DNA METHYLATION, CU-DREAM

TACHAPOL MUANGSUB: ANALYSIS OF METHYLATION MICROARRAY FOR TISSUE SPECIFIC DETECTION. ADVISOR : PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D. Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. NAKARIN KITKUMTHORN, D.D.S. Ph.D., 122 pp.

DNA methylation is the notable marker used for tissue identification. Therefore, the purpose of this study is to use bioinformatics to analyze methylation data and discover the specific methylation marker for definite tissue. We collected DNA methylation profiles from 39 Illumina® HumanMethylation27 BeadChip Kit databases, which contain 18 common tissues, involving 27,578 CpG loci along the whole genome. The entire data was processed as follows; 1) Analyzed by CU-DREAM program for calculating the methylation's mean value. 2) Organized by Microsoft Excel program. 3) Used to plot graphs of each CpG locus by program R. Then, the complete database was analyzed to identify the most discriminative peak of each graph and validated the peak by methylation specific PCR. In this study, we selected DSU: cg12620499 as an indicator of liver tissue. We expect to establish the specific methylation markers for liver. The results show the methylation value from liver is clearly higher than the other organs. Interestingly methylation value from hepatoma patient group and cirrhosis patient group are higher than healthy with significant ($p=0.0002$ and $p=0.0047$ respectively) Furthermore, our database prospect to useful not only in forensic medicine but also in the other clinical applications.

Field of Study : Medical Science

Academic Year : 2013

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ศ. ดร. นพ. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผศ. ดร. ทพ. นครินทร์ กิตกำธร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำแนะนำ ให้คำสั่งสอน ตั้งแต่การรวบรวมข้อมูล การทดลอง การทำรูปเล่ม การนำเสนอ วิธีการทดลอง ตลอดจนให้ข้อแนะนำที่มีประโยชน์

ขอขอบพระคุณรศ. ดร. วิไล อโนมะศิริ ที่ยินดีเป็นประธานสอบ และให้คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รศ. นพ. สมบูรณ์ ศีลาวัฒน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อในพาราฟินบล็อกเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้ และยินดีเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ดร. ศิษฏาศ ทงสีมา ที่กรุณามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำด้านชีวสารสนเทศ

ขอขอบพระคุณ รศ. นพ. พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอจากซีรัมเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ Professor Kevin L Gunderson ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ ข้อมูลค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยจากอวัยวะ 14 ชนิด ให้กับงานวิจัย เพื่อความละเอียดของฐานข้อมูล

ขอขอบคุณ คุณภูมิพัฒน์ ทองอยู่ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเขียนคำสั่งโปรแกรมอาร์ เพื่อใช้สร้างกราฟซีจีทีทั้งหมด 27,578 ตำแหน่ง และขอขอบคุณ ร.ต.อ.หญิง จริญญา สามสุวรรณ ที่ให้ความช่วยเหลือในการคัดแยกกราฟ ตลอดจนความช่วยเหลืออื่นๆในระหว่างการทดลอง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนิสิตทุกท่าน โดยเฉพาะคุณประกาศิต รัตนตันหยง ที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ ที่ให้ความช่วยเหลือในตลอดการทดลองและให้คำแนะนำในหลายๆ เรื่อง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือรอบด้าน เช่น การออกจดหมาย การจัดงาน การจัดทำเอกสาร การเตรียมสถานที่ การเบิกใช้สิ่งของต่างๆ เป็นต้น

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา ที่เป็นผู้อุปการะในทุกๆ ด้านของชีวิต ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	5
แผนภาพสรุปที่มาและการดำเนินงานของงานวิจัย.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
การตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ.....	7
ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน.....	8
เมทิลเลชันไมโครแอเรย์.....	9
Gene Expression Omnibus (GEO).....	11
CU-DREAM.....	12
โปรแกรมอาร์ (R Program).....	14
โปรแกรมเดวิด (DAVID bioinformatics resources).....	15
ซีควนโลโก้ (Sequence Logo).....	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
ประชากร.....	18

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	19
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	20
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
การรวบรวมและคัดเลือกข้อมูลค่าเมทิลเลชันในอวัยวะต่างๆ.....	22
การสร้างฐานข้อมูลขอค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยในอวัยวะต่างๆ.....	23
การสร้างกราฟค่าเมทิลเลชันของซีพีจีแต่ละตำแหน่ง.....	24
การวิเคราะห์และค้นหากราฟของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะในอวัยวะแต่ละชนิด...	24
การค้นหาตำแหน่งบนจีโนมของซีพีจีจากกราฟที่คัดเลือกไว้.....	25
การออกแบบไพรเมอร์ของซีพีจีที่จำเพาะสำหรับเทคนิคเอ็มเอสพีซีอาร์.....	25
กลุ่มตัวอย่างและเกณฑ์การคัดเลือกสิ่งตัวอย่าง.....	26
การสกัดดีเอ็นเอ.....	26
กระบวนการไปซัลไฟด์ทรีทเมนต์.....	27
การทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ.....	28
กระบวนการเอ็มเอสพีซีอาร์.....	28
กระบวนการเจลอิลีคโตรโพรเรซิส.....	29
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	29
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	29
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	31
กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา.....	31
การคัดเลือกซีพีจีที่มีความจำเพาะในอวัยวะแต่ละชนิด.....	31
การวิเคราะห์ตำแหน่งของซีพีจีที่จำเพาะบนจีโนม.....	34
การวิเคราะห์ลำดับเบสที่อยู่ติดกับซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะด้วยซีควนโลโก้.....	41
การวิเคราะห์หีนที่มีซีพีจีที่จำเพาะ.....	52
ซีพีจีเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะต่อดับ.....	60
ผลการออกแบบไพรเมอร์.....	60
ผลการทดลองจากเทคนิคเอ็มเอสพีซีอาร์.....	61
การประยุกต์ใช้ซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะในอวัยวะดับ.....	62
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	64
ฐานข้อมูลซีพีจีเมทิลเลชัน.....	64

ซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อเนื้อเนื้อหรืออวัยวะ.....	65
ซีควนโดโล็กซ์ของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่ออวัยวะ.....	66
ยีนที่มีซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ.....	66
ซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อตับ.....	67
การประยุกต์ใช้ซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อตับ.....	68
อภิปรายผลการวิจัย.....	69
ข้อเสนอแนะ.....	69
รายการอ้างอิง.....	71
ภาคผนวก.....	75
ภาคผนวก ก.....	76
ภาคผนวก ข.....	80
ภาคผนวก ค.....	123
ภาคผนวก ง.....	126
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	134

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงข้อมูลกลุ่มประชากรที่เป็นตัวอย่าเนื้อเยื่อจากพาราฟินบล็อก.....	31
2	แสดงจำนวนของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่างอวัยวะต่างๆ.....	34
3	แสดงตำแหน่งของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะเทียบกับตำแหน่งภายในและ ภายนอกยีน.....	35
4	แสดงตำแหน่งของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะเทียบกับตำแหน่งเอ็กซอนและอิน ทรอน.....	36
5	แสดงตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะโดยแบ่งตามไฮเปอร์เมทิลเลชัน และไฮ โปเมทิลเลชัน ร่วมด้วยตำแหน่งเอ็กซอน และอินทรอน.....	38
6	แสดงตำแหน่งของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะเทียบกับตำแหน่ง CGI.....	39
7	แสดงตำแหน่งของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะเทียบกับตำแหน่งต่างๆบนจีโนม....	40
8	แสดงอัตราส่วนยีนที่มีหน้าจำเพาะในอวัยวะแต่ละชนิด.....	52
9	แสดงหน้าที่ของกลุ่มยีนที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเดวิด.....	53
10	แสดงหน้าที่ของกลุ่มยีนจากไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจีที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเดวิด	55
11	แสดงหน้าที่ของกลุ่มยีนจากไฮโปเมทิลเลชันซีพีจีที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเดวิด...	56

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภาพสรุปขั้นตอนของงานวิจัย.....	6
2	กลไกการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน.....	8
3	เทคนิคไบซัลไฟต์ที่รีทเมนท์.....	9
4	Illumina® HumanMethylation27 BeadChip Kit.....	10
5	ภาพเทคนิคโอลิโกนิวคลีโอไทด์บีดส์ของ Illumina® HumanMethylation27 BeadChip Kit.....	10
6	เว็บไซต์ของ GEO (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/).....	12
7	การใช้ข้อมูลและตั้งค่าการคำนวณความสัมพันธ์ของงานทดลองในรูปแบบไฟล์ Microsoft Excel ของโปรแกรม CU-DREAM.....	13
8	โปรแกรมอาร์.....	14
9	โปรแกรมเดวิด.....	15
10	ตัวอย่างผลลัพธ์ของการทำซีควนโลโก้.....	16
11	โปรแกรมซีควนโลโก้.....	17
12	คำสั่งเพื่อใช้สร้างกราฟจากฐานข้อมูล.....	24
13	โปรแกรมโอลิโกคอลล.....	25
14	ตัวอย่างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชัน รูปแบบที่ 1.....	32
15	ตัวอย่างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชัน รูปแบบที่ 2.....	32
16	ตัวอย่างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชัน รูปแบบที่ 3.....	32
17	ตัวอย่างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชัน รูปแบบที่ 4.....	33
18	ตัวอย่างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชัน รูปแบบที่ 5.....	33
19	กราฟแสดงจำนวนซีพีจีที่จำเพาะในเอ็กซอน และอินทรอน ของอวัยวะต่างๆ.....	37
20	กราฟแสดงตำแหน่งของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะแบบไฮเปอร์เมทิลเลชันเทียบกับ TSS.....	41
21	กราฟแสดงตำแหน่งของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะแบบไฮโปเมทิลเลชันเทียบกับ TSS.....	41
22	แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วยซีควนโลโก้.....	42
23	แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วยซีควนโลโก้ของไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจี.....	44

ภาพที่	หน้า
24	แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วยซีควนโลโก้ของไฮโปเมทิลเลชันซีพีจี..... 45
25	แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วยซีควนโลโก้ของไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจี ใน อวัยวะสมอง..... 46
26	แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วยซีควนโลโก้ของไฮโปเมทิลเลชันซีพีจี ในอวัยวะ สมอง..... 47
27	แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วยซีควนโลโก้ของไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจี ใน อวัยวะตับ..... 48
28	แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วยซีควนโลโก้ของไฮโปเมทิลเลชันซีพีจี ในอวัยวะ ตับ..... 49
29	แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วยซีควนโลโก้ของไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจี ใน อวัยวะอذنทะ..... 50
30	แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วยซีควนโลโก้ของไฮโปเมทิลเลชันซีพีจี ในอวัยวะ อذنทะ..... 51
31	กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด..... 54
32	กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจีที่วิเคราะห์ ได้จากโปรแกรมเดวิด..... 55
33	กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮโปเมทิลเลชันซีพีจีที่วิเคราะห์ได้ จากโปรแกรมเดวิด..... 56
34	กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจี จากอวัยวะ สมองที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด..... 57
35	กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮโปเมทิลเลชันซีพีจี จากอวัยวะ สมองที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด..... 57
36	กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจี จากอวัยวะ ตับที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด..... 58
37	กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮโปเมทิลเลชันซีพีจี จากอวัยวะตับ ที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด..... 58
38	กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจี จากอวัยวะ อذنทะที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด..... 59

ภาพที่		หน้า
39	กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮโปเมทิลเลชันซีพีจี จากอวัยวะ อวัยวะที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด.....	59
40	กราฟค่าเมทิลเลชันของยีน DSU ที่ตำแหน่ง cg12620499.....	60
41	ลำดับเบสบริเวณที่ติดกับกับ cg12620499.....	60
42	ผลการทดลองเอ็มเอสพีซีอาร์จากตัวอย่างพาราฟินบล็อกทรายที่ 11.....	61
43	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันในแต่ละกลุ่มอวัยวะ.....	62
44	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันในซีรุ่มดีเอ็นเอแต่ละกลุ่ม.....	63

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากขั้นตอนหนึ่ง ในหลายๆ งานทางห้องปฏิบัติการ เพราะเป็นขั้นตอนที่ให้ข้อมูลพื้นฐาน และสามารถกำหนดทิศทางในการดำเนินงานต่อ ยกตัวอย่างเช่น งานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์หรือนิติเวชวิทยา การตรวจยืนยันชนิดของเนื้อเยื่อที่เป็นหลักฐานในที่เกิดเหตุ สามารถให้ข้อมูลเพื่อใช้ในการสืบสวนหรือวิเคราะห์รูปคดีได้ เช่นหากพบว่า เนื้อเยื่อของเหยื่อที่พบในที่เกิดเหตุเป็นอวัยวะสำคัญ เช่น สมอง หรือหัวใจ ย่อมจะสืบสวนฐานได้ว่า เหยื่อน่าจะเสียชีวิตแล้ว แต่ปัญหาหลักอย่างหนึ่งของการตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ คือ เนื้อเยื่อหรือสิ่งตัวอย่างที่ทำการตรวจมีสภาพไม่เหมาะสมหรือเสื่อมสภาพ ทั้งจากการเก็บที่ไม่ได้คุณภาพ หรืออายุของสิ่งตัวอย่าง ทำให้การตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อขาดความแม่นยำ หรือไม่สามารรถตรวจหาชนิดของเนื้อเยื่อได้ ดังภาพที่ 1

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) เป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่มีความสำคัญต่อพัฒนาการหรือการเจริญในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งของภาวะเหนือพันธุกรรม (Epigenetic) ที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน (Gene expression) ที่ไม่ขึ้นกับลำดับเบส และไม่มี การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “กระบวนการควบคุมเหนือพันธุกรรม” ดีเอ็นเอเมทิลเลชันของแต่ละยีน ในเซลล์เนื้อเยื่อ แต่ละชนิดนั้น จะมีจำนวนและรูปแบบที่แตกต่างกัน เพื่อควบคุมระดับการแสดงออกของยีน ในแต่ละเนื้อเยื่อ[1] ทำให้เกิดปรากฏการณ์ต่างๆ เช่น การประทับตราทางพันธุกรรม (Genomic imprinting) หรือ การยับยั้งเอ็กซ์โครโมโซม (X-chromosome inactivation) [1-6] ซึ่งความแตกต่างของดีเอ็นเอเมทิลเลชันนี้ มีความจำเพาะในเซลล์แต่ละชนิดและสามารถนำมาตรวจวัดได้ จึงสามารถนำหลักการนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะได้ รวมถึงตรวจวิเคราะห์หาความผิดปกติของเซลล์ ที่เกิดขึ้นจากการแสดงออกของยีน [7, 8] นอกจากนี้ดีเอ็นเอเมทิลเลชันยังมีความเสถียรและคงทนต่อสภาพแวดล้อม ทำให้สามารถตรวจวัดได้จากสิ่งตัวอย่างที่เสื่อมสภาพแล้ว [9]

ในงานวิจัยนี้ได้นำข้อมูลของ ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ มารวบรวมเพื่อนำมาสร้างเป็นฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatics database) สำหรับใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิง ในการตรวจยืนยัน เนื้อเยื่อ หรือเซลล์ จากอวัยวะต่างๆ โดยใช้การรวบรวมข้อมูลของงานทดลองจากเว็บไซต์ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) [10] จำนวน 39

การทดลอง ที่เป็นเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์ 18 ชนิด ได้แก่ กระจก, ไชยกระจก, เลือด, สมอง, ปอด, เต้านม, หัวใจ, ตับ, กระเพาะอาหาร, ลำไส้, ไต, ตับอ่อน, ต่อมหมวกไต, ต่อมลูกหมาก, ปากมดลูก, ผิวหนัง, กล้ามเนื้อ, เซลล์เยื่อ และไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast) ซึ่งงานทดลองทั้ง 39 การทดลองนี้ ได้ใช้เมทิลเลชันไมโครเอเรย์ (Methylation microarray) ชนิดเดียวกัน คือ Illumina® HumanMethylation27 BeadChip Kit ที่ประกอบด้วยไปด้วยตำแหน่งของซีพีจี (CpG) บนยีนชนิดต่างๆ จำนวน 27,578 ตำแหน่ง ทั้งทั้งจีโนม และครอบคลุมตำแหน่งของยีนมากกว่า 14,000 ยีน [11, 12] ฐานข้อมูลนี้สามารถอ้างอิงค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันของซีพีจีตำแหน่งต่างๆ บนจีโนมในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดได้ จึงมีประโยชน์เป็นอย่างมากในการใช้ ระดับของค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เพื่อการตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ เพราะสามารถใช้ในการยืนยันตำแหน่งซีพีจีที่มีค่าเมทิลเลชันที่จำเพาะในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้างฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatics database) ของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ในแต่ละตำแหน่งของซีพีจีทั่วทั้งจีโนม ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ เพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงในการตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ
2. นำข้อมูลจากฐานข้อมูลที่ได้ มาออกแบบวิธีการตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อโดยอาศัยหลักการของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

ขอบเขตของการวิจัย

1. ในการรวบรวมข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชันเพื่อใช้ในการสร้างฐานข้อมูลของงานวิจัยนี้ ทางงานวิจัยได้คัดเลือกเฉพาะข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชันของเนื้อเยื่อปกติเท่านั้น ทำให้ฐานข้อมูลนี้ครอบคลุมเฉพาะการตรวจยืนยันเนื้อเยื่อเท่านั้น ซึ่งไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจยืนยันเนื้อเยื่อที่มีความผิดปกติเพื่อหาตรวจหาหรือวิเคราะห์โรคได้
2. กลุ่มประชากรในงานวิจัยนี้ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มประชากรที่เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อจากพาราฟินบล็อก (Paraffin blocks) ที่ได้มาจากการตรวจศพ (Autopsy) ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งงานวิจัยได้รับอนุญาต เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง และกลุ่มที่สองเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากซีรัม (Serum) ของผู้ป่วยในโรคที่มีการทำลายเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของตับ ได้แก่ มะเร็งตับ (Hepatoma), ตับแข็ง (Cirrhosis), ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus,

HBV) และ ไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C Virus, HCV) รวมถึงตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากซีรัมของคนปกติ

3. ระยะเวลา การศึกษาวิจัยครั้งนี้กระทำในปีการศึกษา 2555 เป็นเวลา 1 ปี
4. สถานที่ที่ใช้ในการวิจัย คือ อาคารแพทยพัฒน์ ห้อง 713 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของการทดสอบเครื่องมืออื่นๆ
2. ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มาจากทั้งสองกลุ่มประชากรนี้ได้รับอนุญาตให้สามารถนำไปใช้ในการทดลองได้ และทางงานวิจัยได้ขอจริยธรรมในการใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอเหล่านี้แล้ว

ข้อจำกัดของการวิจัย

ฐานข้อมูลและเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดซีพีจีเมทิลเลชันของงานวิจัยนี้สามารถใช้ตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ ได้เฉพาะในมนุษย์เท่านั้น เพราะในฐานข้อมูลมีข้อมูลครอบคลุมเฉพาะค่าเฉลี่ยดีเอ็นเอเมทิลเลชันของมนุษย์

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Methylation microarray เป็นเทคนิคที่ใช้การตรวจวัดค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชัน จากหลายๆตำแหน่งบนจีโนม หรือบริเวณที่สนใจพร้อมกัน ในการตรวจวัดหนึ่งครั้ง ซึ่งค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ตรวจวัดได้ มีความแม่นยำ และน่าเชื่อถือ
2. Tissue specific detection เป็นการตรวจหาหรือยืนยันชนิดของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะจากสิ่งตัวอย่าง เพื่อใช้ในการวินิจฉัยหรือวิเคราะห์โรคทางการแพทย์ รวมถึงงานในทางนิติวิทยาศาสตร์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบหลักฐาน
3. DNA methylation เป็นปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิลให้กับเบสในสายดีเอ็นเอ เกิดที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน ในบริเวณที่เบสไซโตซีนอยู่ติดกับเบสกวานีน ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งของสภาวะเหนือพันธุกรรม

4. CU-DREAM เป็นโปรแกรมทางชีวสารสนเทศที่พัฒนาขึ้น เพื่อนำมาคำนวณหาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนจากกลุ่มประชากรระหว่างงานทดลองสองกลุ่มได้ ซึ่งความสัมพันธ์ของกลุ่มยีน สามารถคำนวณในรูปแบบ up- หรือ down-regulation

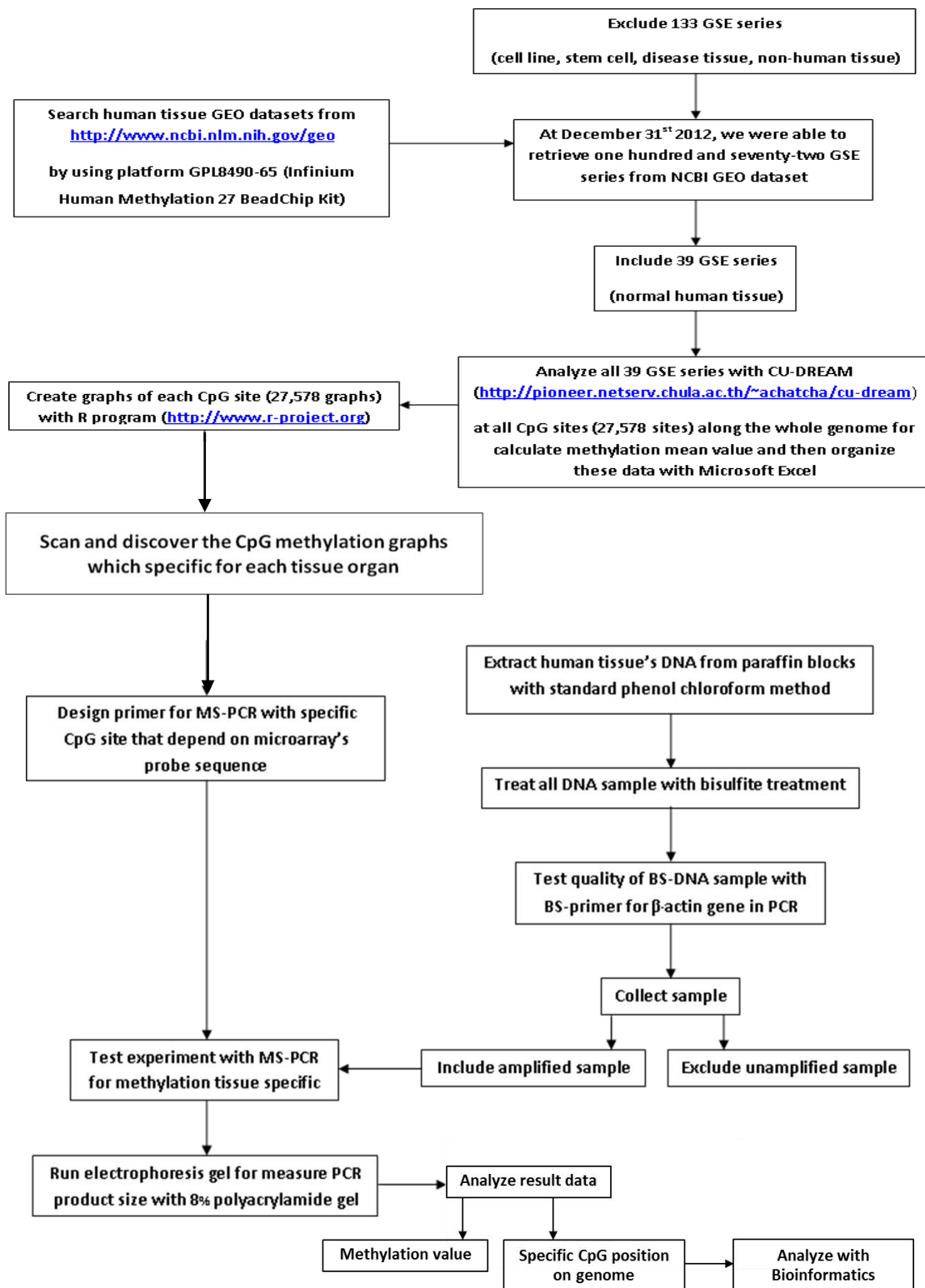
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ในงานวิจัยนี้ สามารถสร้างฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศของค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ซีพีจีตำแหน่งต่างๆบนจีโนม ในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะแต่ละชนิด ซึ่งสามารถนำฐานข้อมูลดังกล่าวมาใช้อ้างอิงการตรวจยืนยันหรือตรวจหาชนิดของเนื้อเยื่อจากสิ่งตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้ และยังสามารถนำฐานข้อมูลนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาความผิดปกติเกี่ยวกับ ระดับค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันของเซลล์เนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ได้เช่นกัน

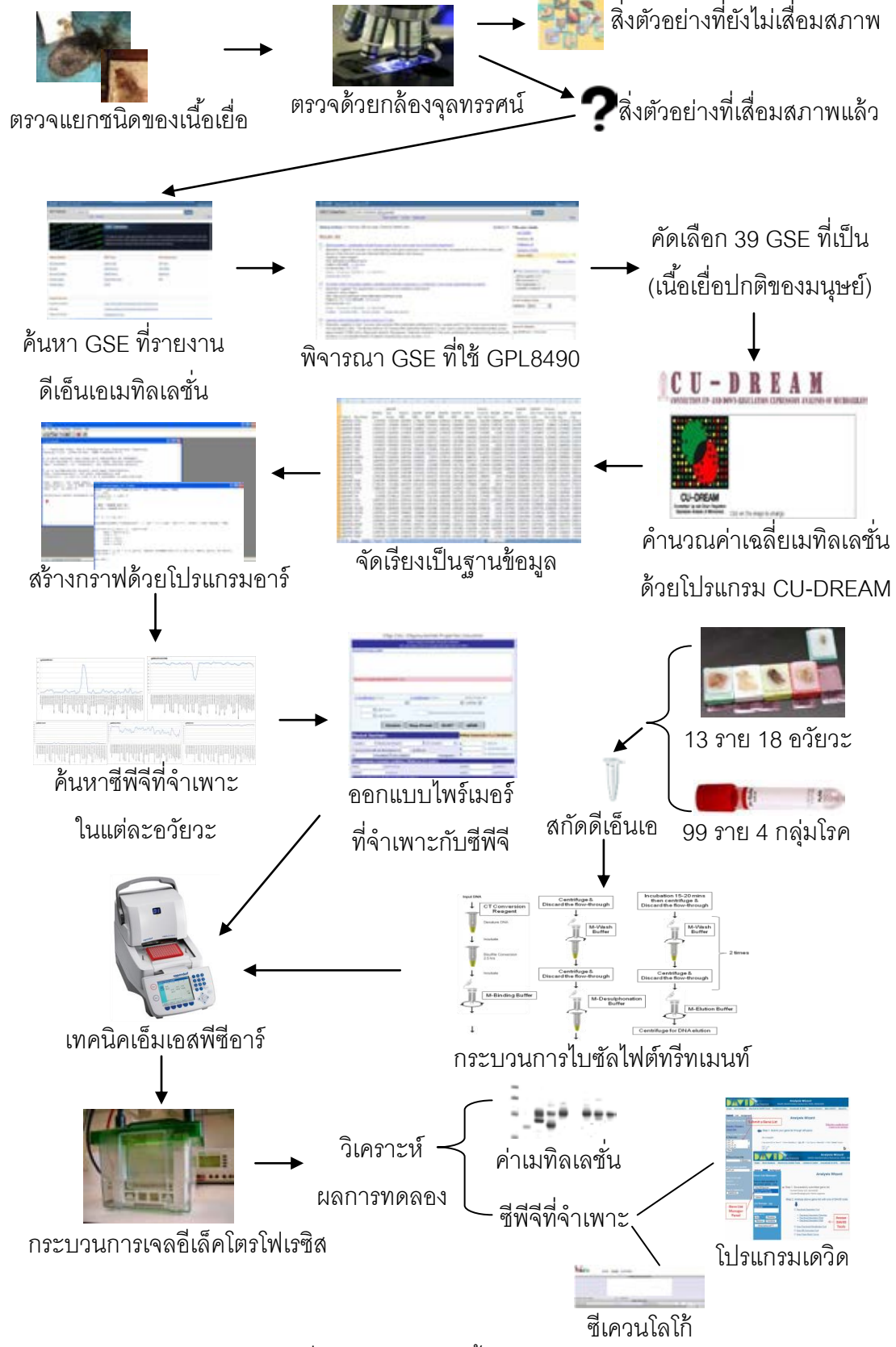
วิธีดำเนินการวิจัย

1. รวบรวมและคัดเลือกข้อมูลค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันในอวัยวะต่างๆ ของมนุษย์
2. สร้างฐานข้อมูลค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยของซีพีจีตำแหน่งต่างๆ ในอวัยวะแต่ละชนิด
3. ค้นหาและคัดเลือกซีพีจีเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะในอวัยวะชนิดต่างๆ
4. ออกแบบเทคนิคการตรวจวัด ของซีพีจีที่จำเพาะ
5. สกัดดีเอ็นเอจากสิ่งตัวอย่างในกลุ่มประชากร
6. นำดีเอ็นเอที่สกัดมาผ่านกระบวนการไฮเดียมไบซัลไฟด์ที่รีทเมนท์
7. นำไบซัลไฟด์ดีเอ็นเอแล้วมาเข้าสู่กระบวนการเอ็มเอสพีซีอาร์
8. ทำเจลอีเล็กโตรโฟเรซิส เพื่อวัดความเข้มของพีซีอาร์โปรดักส์
9. วิเคราะห์ผลการทดลอง ทั้งจำนวน รูปแบบ และตำแหน่งของซีพีจีที่จำเพาะ รวมถึงค่าเมทิลเลชันจากสิ่งตัวอย่างต่างๆที่วัดได้ โดยใช้โปรแกรมชีวสารสนเทศต่างๆ

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย



แผนภาพสรุปที่มาและการดำเนินงานของงานวิจัย



ภาพที่ 1 แผนภาพสรุปขั้นตอนของงานวิจัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ

การระบุชนิดหรือที่มาของเนื้อเยื่อชนิดต่างๆในมนุษย์นั้น เป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญมาก ทั้งในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ หรือนงานทางการแพทย์ เพราะเป็นขั้นตอนที่ให้ข้อมูลสำคัญหรือกำหนดทิศทางในการดำเนินงานต่อได้ [9] ยกตัวอย่าง เช่น การพิสูจน์ชนิดหรือที่มาของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่พบในที่เกิดเหตุ หากพบว่าเป็นอวัยวะสำคัญ เช่น สมอง, หัวใจ หรือตับ ย่อมจะสันนิษฐานได้ว่า เจ้าของอวัยวะนี้น่าจะเสียชีวิตไปแล้ว หรือสามารถให้ข้อมูลด้านอื่นๆ เช่น คดีข่มขืนหรือทำร้ายร่างกาย การตรวจพิสูจน์ชนิดของสิ่งตัวอย่างที่พบว่าเป็นคราบเลือดหรือคราบอสุจิ สามารถนำมาใช้อ้างอิงพฤติกรรมหรือการกระทำของผู้ต้องสงสัย ตลอดจนงานทางการแพทย์ที่ต้องอาศัยการตรวจยืนยันชนิดของเนื้อเยื่อ เพื่อใช้ประกอบในการวินิจฉัยหรือตรวจคัดแยกโรค แต่การตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่ออาจให้ผลที่ขาดความแม่นยำ หากสิ่งตัวอย่างมีสภาพไม่เหมาะสม เช่น มีการเสื่อมสภาพ ทั้งจากการเก็บที่ไม่ได้คุณภาพ หรืออายุของสิ่งตัวอย่าง รวมถึงขาดวิธีการตรวจวัดที่มีความแม่นยำสูง

วิธีการตรวจหาชนิดของเนื้อเยื่อสามารถตรวจหาได้หลายวิธีการ เช่น การตรวจจากเอ็นไซม์ หรือการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งต่างก็มีหลักการและความแม่นยำต่างกัน วิธีมาตรฐานอย่างหนึ่งของการตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ คือ การตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ [9, 13] แต่การตรวจดังกล่าวไม่สามารถตรวจวัดสิ่งตัวอย่างที่มีการเสื่อมสภาพไปแล้ว เทคนิคหนึ่งที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมา คือการแยกชนิดของเนื้อเยื่อโดยอาศัยการตรวจวัดจากโปรตีนที่จำเพาะในแต่ละเซลล์ เช่น ชุดตรวจบลูสตาร์ (Bluestar[®]) สำหรับตรวจหาฮีโมโกลบินในเลือด [9] แต่ข้อด้อยของวิธีนี้คือ โปรตีนมีความเสถียรและความคงทนน้อยกว่าดีเอ็นเอ จึงเกิดการเสื่อมสภาพได้ง่ายกว่า [9, 14] และไม่สามารถตรวจวัดออกมาเป็นเชิงปริมาณได้ นอกจากนี้การตรวจวัดจากโปรตีนส่วนมากมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและไม่ค่อยเป็นมาตรฐาน ทำให้ผลการตรวจที่ได้ อาจเกิดความคลาดเคลื่อนจากอคติของผู้ตรวจวัด [9]

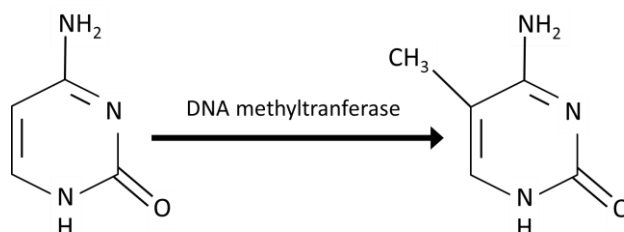
เทคนิคอื่นๆที่ถูกพัฒนาขึ้น คือ การตรวจหาเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) [9, 15-19] หรือไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) [14] ของแต่ละเซลล์ โดยอาศัยหลักการที่ระดับของการแสดงออกของยีนชนิดเดียวกันในเซลล์เนื้อเยื่อต่างชนิด จะมีระดับที่ไม่เท่ากัน หรือยีนชนิดเดียวกันมีรูปแบบการตัดยีนที่ต่างกันในแต่ละชนิด (Alternative splicing) ซึ่งวิธีนี้ให้ผลการตรวจที่แม่นยำกว่าการตรวจจากโปรตีน แต่ก็มีข้อด้อย เนื่องจากเอ็มอาร์เอ็นเอและไมโครอาร์เอ็นเอเสื่อมสภาพได้ง่ายกว่าดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับโปรตีน ทำให้ตรวจวัดได้ยากจากสิ่งตัวอย่างที่เสื่อมสภาพไปแล้ว [9, 19]

รวมถึงมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและซับซ้อน ในปัจจุบันเทคนิคการตรวจวัดระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชัน จึงถูกพัฒนาขึ้นมา [11] เพื่อใช้ในการตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ แต่ความจำเพาะ และความไวของเทคนิค ยังไม่มีประสิทธิภาพเป็นที่น่าพอใจ หรือสามารถนำมาใช้งานได้

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

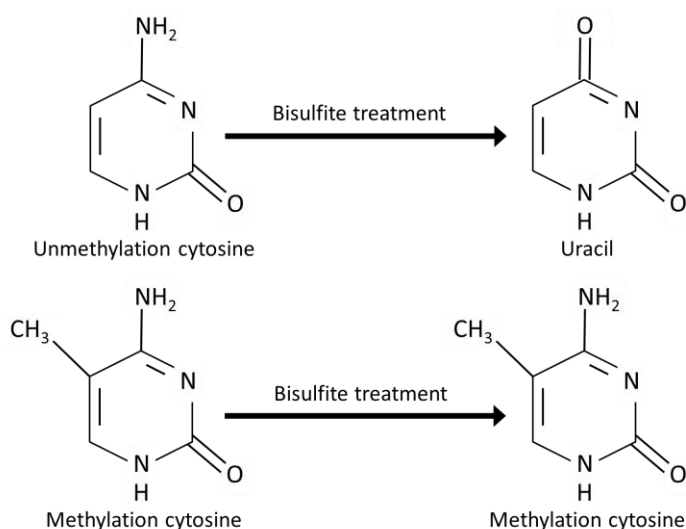
ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เป็นกระบวนการหนึ่งในภาวะเหนือพันธุกรรม ที่มีรูปแบบที่จำเพาะในเซลล์ของเนื้อเยื่อแต่ละชนิด เพื่อใช้ควบคุมระดับการแสดงออกของยีน [1-6] ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ยีนชนิดเดียวกันบางตัวมีระดับของการแสดงออกที่ต่างกัน ในเซลล์ของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างชนิดกัน นอกจากนี้ดีเอ็นเอเมทิลเลชันยังมีความเสถียร และคงทนต่อสภาพแวดล้อม ทำให้สามารถตรวจวัดได้ในสิ่งตัวอย่างที่เสื่อมสภาพแล้วได้ง่ายกว่าโปรตีน หรือเอ็มอาร์เอ็นเอ [9]

กลไกการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิล ลงบนอะตอมของคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานเฟอเรส (DNA methyltransferase) ดังภาพที่ 2 ในบริเวณที่เบสไซโตซีนอยู่ติดกับเบสกวานีน (Guanine) ซึ่งเรียกลำดับเบสบริเวณนี้ว่า ซีพีจี การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ซีพีจีนี้ สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนได้ เช่น การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ซีพีจีตรงบริเวณ โปรโมเตอร์ (Promoter) ของยีน ส่วนมากจะทำให้ยีนนั้นไม่เกิดการแสดงออก หรือไม่เกิดการถอดรหัสของยีน (Transcription) [20, 21] ซึ่งการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ซีพีจีจะมีความแตกต่างกันและมีความจำเพาะในเซลล์แต่ละชนิด



ภาพที่ 2 กลไกการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

การตรวจวัด ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน สามารถตรวจวัดได้หลายวิธี เช่น การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเมทิลเลชัน (Methylation-sensitive restriction enzymes) ที่เลือกตัดลำดับเบสที่จำเพาะที่ไม่มีหมู่เมทิล หรือการจับด้วยโปรตีนที่จำเพาะกับหมู่เมทิล (Recombinant proteins) ที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับหมู่เมทิลบนเบสไซโตซีน เทคนิคหนึ่งที่ได้รับคามนิยมแพร่หลายในการตรวจวัดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน คือ การใช้ไบซัลไฟต์ทรีทเมนต์ (Bisulfite treatment) เพื่อเปลี่ยนเบสไซโตซีนที่ไม่มีหมู่เมทิล (Unmethylated cytosine) ให้เป็นเบสยูราซิล (Uracil) โดยที่เบสไซโตซีนที่มีหมู่เมทิลจะยังคงสภาพเดิมอยู่ ดังภาพที่ 3 จึงเรียกดวงดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการนี้ว่าไบซัลไฟต์ดีเอ็นเอ (BS DNA) [11, 22-28]



ภาพที่ 3 เทคนิคไบซัลไฟต์ที่รีทเมนท์

เทคนิคไบซัลไฟต์ที่รีทเมนท์ได้รับความนิยม เพราะมีขั้นตอนไม่ยุ่งยากหรือซับซ้อน และราคาไม่สูง ซึ่งการตรวจวัดไบซัลไฟต์ดีเอ็นเอสามารถทำได้หลายเทคนิค ในแต่ละเทคนิคต่างก็มีข้อจำกัดที่แตกต่างกัน เช่น การตัดด้วยเอนไซม์ (Enzyme digestion) มีข้อจำกัดตรงที่ไม่สามารถใช้ตรวจวัดกับทุกลำดับเบสได้อย่างอิสระ หรือการใช้เทคนิคการทดสอบการตกตะกอนภูมิคุ้มกัน (Immunoprecipitation) วิธีนี้สามารถใช้ทุกลำดับเบสบนดีเอ็นเอได้ แต่ไม่สามารถให้ข้อมูลที่จำเพาะในแต่ละตำแหน่งของซีพีจีได้ [9, 11] ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดที่ลดข้อจำกัดดังกล่าวและเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวัดมากขึ้น ซึ่งสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้หลายตำแหน่งพร้อม โดยการใช้ไมโครแอรเรย์ในการตรวจวัด จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า เมทิลเลชันไมโครแอรเรย์ (Methylation microarray)

เมทิลเลชันไมโครแอรเรย์

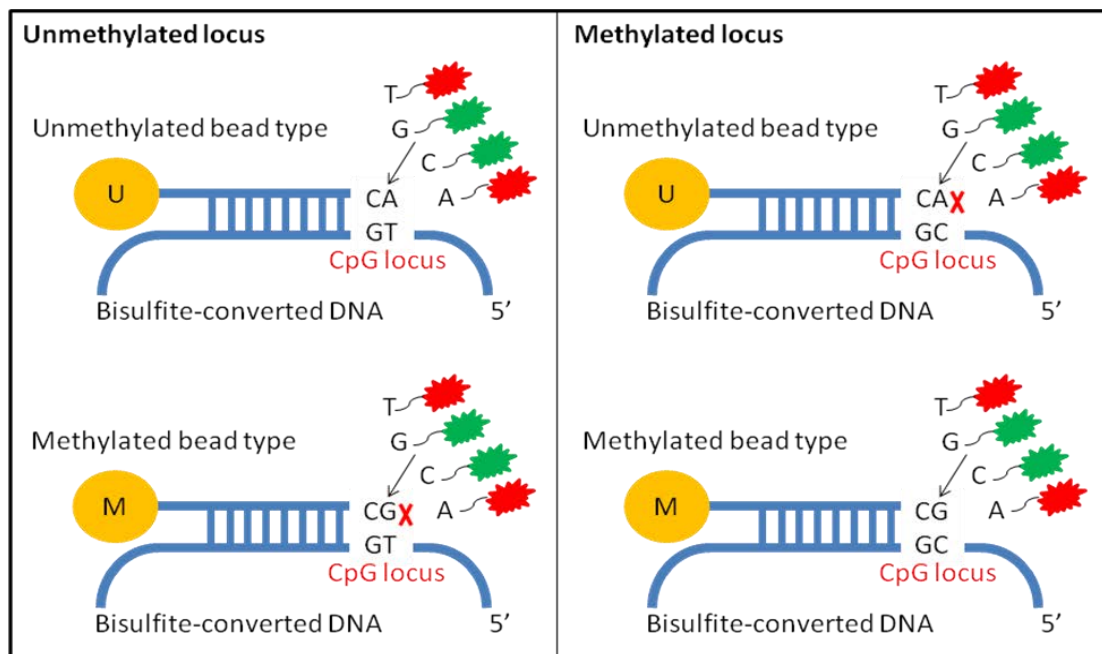
เมทิลเลชันไมโครแอรเรย์ เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาและตรวจวัดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ที่ต้องใช้การแสดงผลการตรวจวัดในระดับสูง (High-throughput) ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้ครั้งละหลายๆตำแหน่ง [29, 30] ทำให้ลดระยะเวลาและค่าใช้จ่าย รวมถึงค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ตรวจวัดได้ มีความแม่นยำที่น่าเชื่อถือ [11, 12] ในปัจจุบันเมทิลเลชันไมโครแอรเรย์จึงได้รับความนิยมในการนำมาใช้วัดค่าเมทิลเลชันจำนวนมากเพื่อสร้างเมทิลเลชันโปรไฟล์ (Methylation profiling) หรือตรวจวัดระดับเมทิลเลชันในสิ่งมีชีวิต หลักการตรวจวัดของเมทิลเลชันไมโครแอรเรย์มีหลายเทคนิค เช่น การใช้แอนติบอดี (Antibody) จับกับหมู่เมทิลบนเบสไซโตซีน หรือการใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์บีดส์ (Oligonucleotide beads) เพื่อตรวจแยกเมทิลเลชันและอันเมทิลเลชัน

เมทิลเลชันไมโครแอรเรย์ที่งานวิจัยนี้ได้เลือกมาเพื่อใช้ในการสืบค้นข้อมูลคือ Illumina[®] HumanMethylation27 BeadChip Kit ที่ถูกพัฒนาขึ้นโดยบริษัทอิลลูมินา (Illumina) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 Illumina[®] HumanMethylation27 BeadChip Kit

Illumina[®] HumanMethylation27 BeadChip Kit ใช้เทคโนโลยีอิลลิโกนิวคลีโอไทด์ปิดส์ (ภาพที่ 5) ในการตรวจวัดค่า ดีเอ็นเอเมทิลเลชันของซีพีจีในตำแหน่งบนจีโนม หลักการคือ ดีเอ็นเอตัวอย่างจะผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์ที่รีทริทเมนต์ จากนั้นจึงนำมาใส่ในแถบตรวจวัดของไมโครแอรเรย์ที่สามารถตรวจวัดซีพีจีได้ 27,578 ตำแหน่ง ซึ่งในแต่ละตำแหน่งตรวจวัด จะมีโพรบ (Probe) 2 ชนิด คือ เมทิลเลชันปิดส์ไทป์ (Methylation bead type) และอันเมทิลเลชันปิดส์ไทป์ (Unmethylation bead type) ที่จำเพาะกับลำดับเบสในแต่ละตำแหน่งตรวจวัด โดยที่ปลายด้าน 3' ของเมทิลเลชันโพรบจะจำเพาะกับตำแหน่งซีพีจีที่เป็นเมทิลเลชัน ขณะที่ปลายด้าน 3' ของอันเมทิลเลชันโพรบจะจำเพาะกับตำแหน่งซีพีจีที่เป็นอันเมทิลเลชัน ในซีพีจีตำแหน่งที่ต้องการตรวจวัด



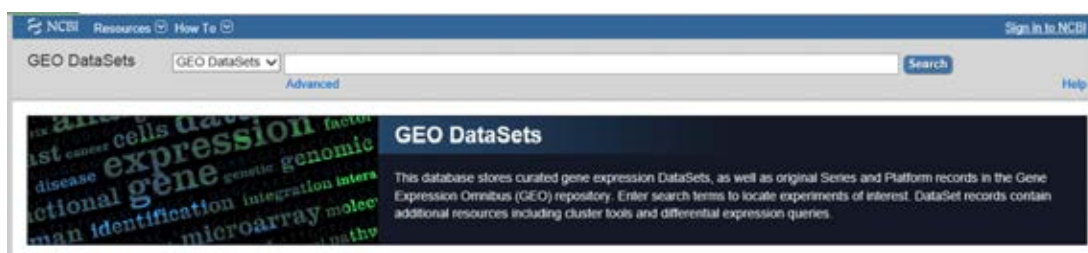
ภาพที่ 5 ภาพเทคนิคอิลลิโกนิวคลีโอไทด์ปิดส์ของ Illumina[®] HumanMethylation27 BeadChip Kit

เมื่อเริ่มปฏิกิริยาโพรบจะจับกับลำดับเบสเป้าหมาย หากตำแหน่งซีพีจีที่ตรวจวัดเป็นอิมเพิลเลชัน เบสไซโตซีนที่ถูกเปลี่ยนเป็นเบสยูราซิล ทำให้จับกับอิมเพิลเลชันโพรบได้อย่างสมบูรณ์ จึงเกิดการสร้างสายต่อ (Extension) และส่งสัญญาณของอิมเพิลเลชันออกมา ในทางกลับกัน หากหากตำแหน่งซีพีจีที่ตรวจวัดเป็นเมทิลเลชัน เบสไซโตซีนที่คงสภาพจะจับกับอิมเพิลเลชันโพรบได้อย่างสมบูรณ์ จึงเกิดการสร้างสาย และส่งสัญญาณของอิมเพิลเลชันออกมา [11]

ประสิทธิภาพการตรวจวัดของ Illumina[®] HumanMethylation27 BeadChip Kit นั้น สามารถตรวจวัดค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้มากถึง 27,578 ตำแหน่ง ประกอบด้วยยีนจำนวน 14,475 ยีน ตลอดบนจีโนมของมนุษย์ (Along human whole genome) และสามารถตรวจได้ 12 สิ่งตัวอย่าง ต่อการวัดหนึ่งครั้ง [11, 12] ทำให้เมทิลเลชันไมโครแอเรย์นี้ได้รับความนิยมในงานวิจัยต่างๆ [31-36] และมีฐานข้อมูลที่ใช้เมทิลเลชันไมโครแอเรย์ชนิดนี้ให้สืบค้นได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเมทิลเลชันไมโครแอเรย์ของบริษัทอื่นๆ ในฐานข้อมูลการทดลอง (GEO dataset) ของเว็บไซต์ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>) [10] ซึ่งมีข้อมูลการทดลองมากถึง 172 การทดลอง

Gene Expression Omnibus (GEO)

GEO เป็นฐานข้อมูลของเว็บไซต์ NCBI ที่รวบรวมข้อมูลงานวิจัยที่ใช้ไมโครแอเรย์ในการวัดผล ซึ่งเรียกข้อมูลในฐานข้อมูลนี้ว่า GEO dataset ในฐานข้อมูลจะประกอบด้วย งานทดลอง (Series) แพลตฟอร์มหรือไมโครแอเรย์ที่ใช้ (Platform) และประชากรหรือสิ่งตัวอย่าง (Sample) โดยใช้รหัสย่อขึ้นต้นด้วย GSE, GPL และ GSM ตามลำดับ GEO เป็นฐานข้อมูลงานทดลองสาธารณะที่มีขนาดใหญ่ที่สุด [10] และสามารถเข้าถึงข้อมูลหรือส่งต่อข้อมูลได้ง่าย ทำให้มีข้อมูลงานวิจัยที่มีความหลากหลายทางพันธุศาสตร์จำนวนมาก ทั้งในด้านแสดงออกของยีน ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) ทางงานวิจัยจึงใช้ฐานข้อมูลนี้ในการรวบรวมข้อมูลค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันจากอวัยวะต่างๆของมนุษย์ เพื่อนำมาสร้างเป็นฐานข้อมูล โดยคัดเลือกข้อมูลงานทดลองที่ใช้เมทิลเลชันไมโครแอเรย์ Illumina[®] HumanMethylation27 BeadChip Kit ของบริษัท อิลูมิน่า เพราะมีข้อมูลงานทดลองเป็นจำนวนมากที่สุดถึง 172 งานทดลอง และในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกข้อมูลการทดลองที่เป็นเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์ มาทั้งสิ้น 39 การทดลอง เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ในแต่ละตำแหน่งของซีพีจีบนจีโนม โดยใช้โปรแกรม CU-DREAM



ภาพที่ 6 เว็บไซต์ของ GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>)

CU-DREAM

CU-DREAM (Connection up- and down-regulation expression analysis of microarrays) [29] เป็นโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) ที่สามารถคำนวณและประเมินความสัมพันธ์ของแต่ละยีน ระหว่าง ข้อมูลการทดลองสองการทดลอง ที่อยู่ในรูปแบบ GSE ในฐานข้อมูล GEO [29, 37-40] จากเว็บไซต์ NCBI โดยหลักการของ CU-DREAM จะเป็นการแบ่งกลุ่มประชากรของสิ่งตัวอย่างในสองงานทดลองออกเป็นสองกลุ่มประชากร ได้แก่ กลุ่มทดลอง (Experimental group) และกลุ่มควบคุม (Control group) ที่อยู่ในรูปแบบไฟล์ Microsoft Excel (ภาพที่ 7) จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ยของค่าที่วัดได้จากไมโครแอเรย์หรือรูปแบบที่ใช้ เช่น ค่าการแสดงออกของยีน หรือค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชัน จากทุกๆ สิ่งตัวอย่างของ GEO ในแต่ละตำแหน่งตรวจวัดของไมโครแอเรย์ โดยอาศัยค่าอ้างอิงจากไฟล์ข้อมูลของทั้งสอง GSE ที่สามารถดาวน์โหลดได้จากเว็บไซต์ NCBI แล้วคำนวณหาผลต่างของ 2 กลุ่มประชากรที่ตำแหน่งตรวจวัดตำแหน่งเดียวกัน เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ของยีน ระหว่างข้อมูล 2 กลุ่ม ซึ่งสามารถเลือกดูความสัมพันธ์ได้ทั้ง up- หรือ down-regulation โดยพิจารณาจากค่า p -value ที่สามารถปรับตั้งค่าได้

Please fill the following boxes.

GSE file:		Series matrix file downloaded from www.ncbi.nlm.nih.gov	
Annotation file:		Annotation file downloaded from www.ncbi.nlm.nih.gov	
T-test parameter (tail):		Parameter for ttest() in Microsoft Excel	
T-test parameter (type):		Parameter for ttest() in Microsoft Excel	
Differential expression:		Direction of differential expression	
P-value threshold:		P-value threshold for t-test	
Warning for paired t-test: subjects in the same row are paired.			
Experimental group	Note (optional)	Control group	Note (optional)

ภาพที่ 7 การใส่ข้อมูลและตั้งค่าการคำนวณความสัมพันธ์ของงานทดลองในรูปแบบไฟล์

Microsoft Excel ของโปรแกรม CU-DREAM

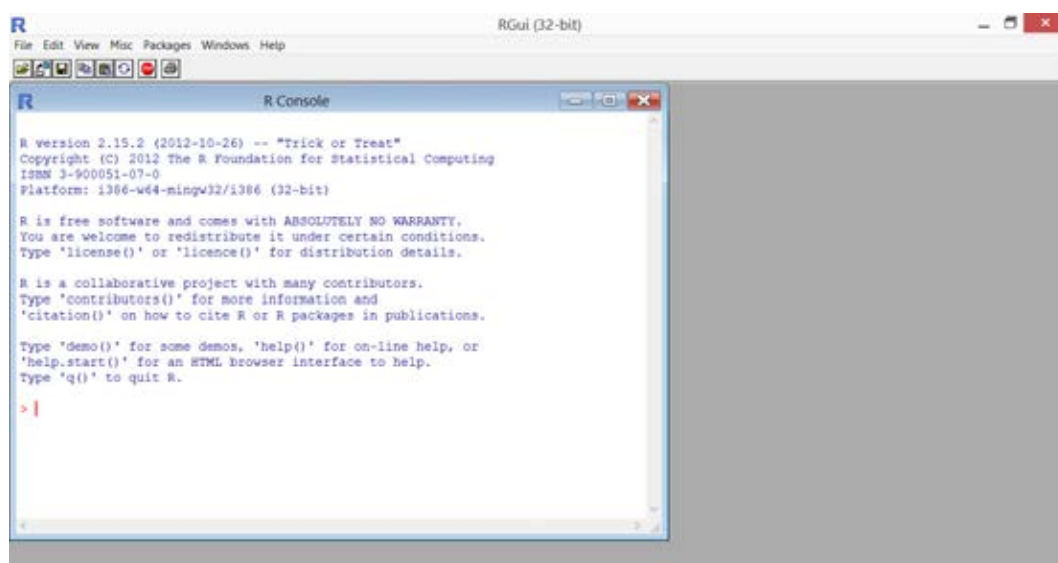
โปรแกรม CU-DREAM สามารถใช้กับ GEO dataset ได้หลายรูปแบบ ทั้งเอ็กซ์เพรสชันไมโครเอเรย์ (Expression microarray) และ เมทิลเลชันไมโครเอเรย์ โดยไมโครเอเรย์ที่นำมาใช้นั้น จำเป็นต้องเป็นไฟล์ที่มีคอลัมน์ข้อมูลของ Gene Symbol ที่เป็นชื่อของยีนชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการแปลผล ซึ่งโปรแกรม CU-DREAM นั้นทางงานวิจัยสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสร้างฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศที่แสดงค่าของยีนหรือตำแหน่งบนจีโนมที่ถูกตรวจวัดออกมาได้ในกลุ่มงานทดลองที่ใช้ไมโครเอเรย์หรือรูปแบบตัวเดียวกันในการวัดค่า ทั้งค่าการแสดงออกของยีนและค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกงานทดลองที่ใช้เมทิลเลชันไมโครเอเรย์ Illumina[®] HumanMethylation27 BeadChip Kit ของบริษัทอิลูมิน่า เนื่องจากเป็นไมโครเอเรย์ที่สามารถนำมาใช้คำนวณด้วย โปรแกรม CU-DREAM ได้ และมีข้อมูลการทดลองมากที่สุดบนเว็บไซต์ NCBI

ทางงานวิจัยได้อาศัยค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มตัวอย่างในแต่ละการทดลองในจีพีจี แต่ละตำแหน่งบนจีโนม จำนวน 27,578 ตำแหน่ง ที่ถูกคำนวณมาจากโปรแกรม CU-DREAM มาใช้ในการเปรียบเทียบหาความจำเพาะในแต่ละเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะ จากนั้นจึงใช้โปรแกรม Microsoft Excel ในการจัดเรียงค่าเฉลี่ย และจัดกลุ่มของอวัยวะในฐานข้อมูล นอกจากนี้ทางงานวิจัยยังได้รับข้อมูลของค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ของเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์ 14 ชนิด ที่วัดได้จาก HumanMethylation27 BeadChip Kit จากงานวิจัยของบริษัทอิลูมิน่าโดยได้รับความเอื้อเฟื้อข้อมูลจาก Professor Kevin L Gunderson (Genome-wide DNA methylation

profiling using Infinium[®] assay) [11] มาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อเพิ่มความแม่นยำและความครอบคลุมของฐานข้อมูล

โปรแกรมอาร์ (R Program)

โปรแกรมอาร์เป็นโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติที่มีลักษณะเป็นโปรแกรมเปิด (Open source software) ที่สามารถนำมาใช้คำนวณหรือวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในรูปแบบต่างๆ รวมถึงสามารถนำมาใช้ในการนำเสนอข้อมูลทั้งรูปแบบกราฟ แผนภูมิ หรือแผนภาพต่างๆ ในการใช้งานโปรแกรมจำเป็นต้องใช้การเขียนคำสั่งด้วยภาษา R ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับภาษา S ที่ใช้ในการเขียนคำสั่งทางคอมพิวเตอร์ ทำให้สามารถใช้คำสั่งจากภาษา S มาใช้ร่วมกับโปรแกรมอาร์ได้อย่างง่ายดาย นอกจากนี้โปรแกรมอาร์ยังมีเป็นโปรแกรมที่มีความยืดหยุ่นในการวิเคราะห์ทางสถิติ และปรับตั้งการคำนวณได้ จึงสามารถนำมาใช้งานได้หลากหลายประเภท รวมถึงงานทางด้านเมทิลเลชันไมโครเอเรย์ [12]



ภาพที่ 8 โปรแกรมอาร์

ทางงานวิจัยได้นำโปรแกรมอาร์มาใช้ในการสร้างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชันของอวัยวะต่างๆบนซีพีจีแต่ละตำแหน่งในฐานข้อมูล เนื่องจากโปรแกรมนี้สามารถสร้างกราฟทั้งหมดจำนวน 27,578 ตำแหน่งตามจำนวนซีพีจีบนเมทิลเลชันไมโครเอเรย์ที่ได้คัดเลือกมา ด้วยการเขียนคำสั่งเพียงหนึ่งครั้ง ทำให้ลดระยะเวลาและเพิ่มความสะดวกในการวิเคราะห์ค่าเมทิลเลชันที่ซีพีจีแต่ละตำแหน่ง ซึ่งกราฟที่ได้จากโปรแกรมอาร์จะถูกนำมาวิเคราะห์ เพื่อคัดเลือกตำแหน่งซีพีจีที่มีค่าเมทิลเลชันที่จำเพาะในอวัยวะชนิดต่างๆ

โปรแกรมเดวิด (DAVID bioinformatics resources)

โปรแกรมเดวิด (DAVID: the database for annotation, visualization and integrated discovery) เป็นโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ ที่มีวัตถุประสงค์ในการงาน เพื่อศึกษาวิเคราะห์ หรืออธิบายความสัมพันธ์ของหน้าที่หรือระบบของกลุ่มยีนจำนวนมากที่สนใจ [41] กลุ่มยีนดังกล่าวนี้ มักได้มากจากการใช้ไมโครแอรเรย์ในการวัดผลหรือคัดเลือกยีน รวมถึงได้มากจากการศึกษาโปรตีนในสิ่งมีชีวิต (Proteomics) โปรแกรมเดวิดสามารถวิเคราะห์กลุ่มยีนจำนวนมากได้ตั้งแต่ระดับ 100 ยีน จนถึง ระดับ 1,000 ยีน จึงมีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาระบบ หรือกลไกทางพันธุกรรมต่างๆ ภายในสิ่งมีชีวิต



ภาพที่ 9 โปรแกรมเดวิด [41]

โปรแกรมเดวิดเป็นโปรแกรมที่อยู่บนเว็บไซต์ <http://david.niaid.nih.gov> ซึ่งเป็นโปรแกรมที่เปิดให้ใช้งาน โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย (Freeware) และมีขั้นตอนการใช้งานที่ไม่ยุ่งยาก เพียงกรอกรายชื่อของกลุ่มยีนที่ต้องการศึกษา หรืออффไพลดรายชื่อยีนที่อยู่ในรูปแบบไฟล์ ต่างๆ เช่น Notepad แล้วเลือกตัวกรอง (Identifier) และ สปีชีส์ (Species) ของกลุ่มยีน จากนั้นเลือกดูรูปแบบของผลลัพธ์หรือพารามิเตอร์ (Parameter) ชนิดต่างๆ ที่ใช้

ทางงานวิจัยจึงได้เลือกโปรแกรมนี้มาใช้ในการวิเคราะห์หน้าที่ของกลุ่มยีนจากซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะ เพื่อดูความสัมพันธ์หรือหน้าที่ของกลุ่มยีน

ซีควนโลโก้ (Sequence Logo)

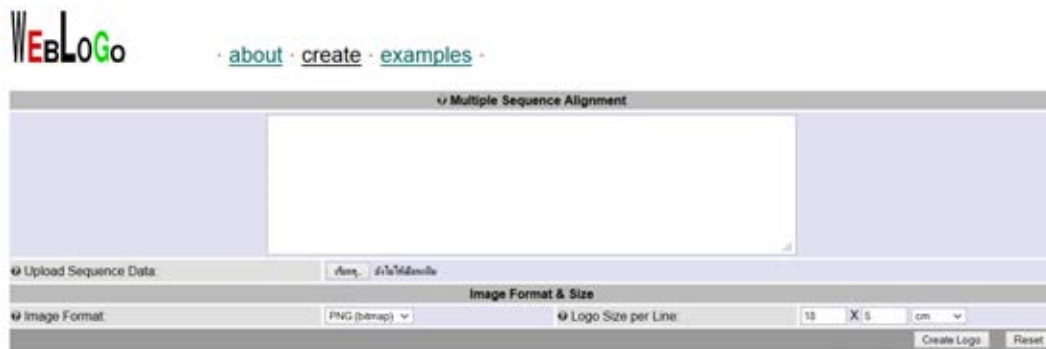
ซีควนโลโก้เป็นโปรแกรมทางชีวสารสนเทศที่ใช้ทำนายหรือแสดงผลของลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ ของทั้งดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ รวมถึงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีลักษณะเป็นการเรียงลำดับที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อย หรือคงสภาพการเรียงลำดับไว้ (Conserved sequence) จากกลุ่มประชากรหรือสิ่งตัวอย่าง ซึ่งจะนำเสนอในรูปแบบภาพกราฟิกสัญลักษณ์ของเบสหรือกรดอะมิโน ดังตัวอย่างในภาพที่ 10 โดยที่ความสูงของตัวอักษรจะแปรผันตรงกับความถี่ของเบสหรือกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ [42]



ภาพที่ 10 ตัวอย่างผลลัพธ์ของการทำซีควนโลโก้ [42]

การทำซีควนโลโก้มีจุดประสงค์เพื่อค้นหาลำดับเบสที่มีลักษณะเป็นลำดับที่มีการคงสภาพไว้ ของทั้งดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์หรือหน้าที่ในบริเวณนั้น เช่น ในจุดที่โปรตีนมาจับกับดีเอ็นเอ รวมถึงสามารถนำมาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบลำดับของดีเอ็นเอ, อาร์เอ็นเอ หรือโปรตีน ของสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์ต่างๆได้ เช่น การเปรียบเทียบสายพันธุ์ของไวรัส [43]

ในงานวิจัยนี้ได้อาศัยโปรแกรมซีควนโลโก้ของเว็บโลโก้ (WebLogo) จากเว็บไซต์ <http://weblogo.berkeley.edu/> (ภาพที่ 11) มาใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสที่อยู่คร่อมบริเวณซีพีจีเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ เพื่อศึกษาและวิเคราะห์รูปแบบของลำดับเบสที่อยู่ติดกับซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะ



ภาพที่ 11 โปรแกรมซีควนโลโก้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการทดลองแรก ทางงานวิจัยจึงได้อาศัยการอ้างอิงขนาดประชากรจากการทดลองที่มีลักษณะใกล้เคียงกันที่ดำเนินงานโดยผู้เชี่ยวชาญ โดยอ้างอิงจากการทดลองเรื่อง Epigenetic profiling of somatic tissues from human autopsy specimens identifies tissue- and individual-specific DNA methylation patterns, Byun H.M., et al. [44] ซึ่งในการทดลองดังกล่าวมีขนาดของกลุ่มตัวอย่าง 20 ตัวอย่าง สำหรับในงานวิจัยนี้ได้แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็นสองกลุ่ม ดังนี้

กลุ่มตัวอย่างแรกในงานวิจัยนี้ เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บไว้ในพาราฟินบล็อก (Paraffin blocks) ที่ได้มาจากการตรวจศพ (Autopsy) ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งทางงานวิจัยได้รับอนุญาต เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง ซึ่งเป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆของมนุษย์ จากผู้ป่วยที่เสียชีวิตไปแล้ว 13 ราย

กลุ่มตัวอย่างที่สองเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากซีรัม (Serum) ของผู้ป่วยในโรคที่มีการทำลายเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของตับ ได้แก่ มะเร็งตับ (Hepatoma) 21 ราย, ตับแข็ง (Cirrhosis) 9 ราย, ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus, HBV) 15 ราย และไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C Virus, HCV) 30 ราย รวมถึงคนปกติอีก 24 ราย รวมตัวอย่างดีเอ็นเอจากซีรัมทั้งสิ้น 99 ราย

เกณฑ์การคัดเลือกสิ่งตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างจากพาราฟินบล็อกทั้งหมดได้ผ่านการตรวจยืนยันทางกล้องจุลทรรศน์ โดยผู้เชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยา เพื่อตรวจยืนยันชนิดของสิ่งตัวอย่าง และตรวจสอบว่าสิ่งตัวอย่างไม่ได้เสื่อมสภาพ รวมถึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ชนิดของสิ่งตัวอย่าง ได้แก่ ไช กระดูก, ปอด, กล้ามเนื้อ, หลอดเลือดแดง, ลำไส้, ตับ, ม้าม, ตับอ่อน, ตับ, ต่อมหมวกไต, สมอง, ผิวหนัง, เซลล์ประสาท, ต่อมน้ำเหลือง, หัวใจ และกระเพาะอาหาร ซึ่งเนื้อเยื่อเหล่านี้จะถูกตรวจสอบทางพยาธิวิทยาอีกครั้งหนึ่ง เพื่อยืนยันว่าเป็นเนื้อเยื่อปกติ จากนั้นจะถูกนำพาราฟินออกด้วยไซลีน (Xylene) และนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มมาตรฐาน (Standard phenol chloroform)

เกณฑ์การเลือกเข้าของสิ่งตัวอย่าง จะคัดเลือกเอาสิ่งตัวอย่างเป็นเนื้อเยื่อปกติที่ไม่ได้มีความผิดปกติหรือเกิดโรค และยังไม่เสื่อมสภาพ สามารถนำมาสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ส่วนเกณฑ์การคัดออกของสิ่งตัวอย่าง จะทำการคัดแยกสิ่งตัวอย่างเป็นเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ เช่น เกิดการอักเสบ ติดเชื้อ หรือก่อโรค และสิ่งตัวอย่างที่เสื่อมสภาพ จนไม่สามารถสกัดหรือเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้

เกณฑ์การคัดเลือกของกลุ่มประชากรที่เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอจากซีรัมจะถูกตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ โดยใช้เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nano drop) จากนั้นจึงพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus, Japan)
2. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate stirer) (Labtech, Korea)
3. เครื่องเขย่าสาร (vortex) (Scientific Industries, USA)
4. เครื่องชั่งดิจิทัล (Precisa, Switzerland)
5. เครื่องตัดชิ้นเนื้อฮิสโต (microtome) (Leica, Germany)
6. เครื่องถ่ายและบันทึกภาพเจล (gel doc) (Syngene, UK)
7. เครื่องนิ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Hirayama, Japan)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดขนาด 1.5 ml (microcentrifuge) (Boeco, Germany)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดชนิด polypropylene conical (Boeco, Germany)
10. เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (ultrapure water type I) (Millipore, France)
11. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler) (Eppendorf, Germany)
12. เครื่องไมโครเวฟ (Sanyo, Japan)
13. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Denver Instrument, USA)
14. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (nano drop) (Thermo Scientific, USA)
15. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Bio-RAD, USA)
16. เครื่องหมุนเขย่าสาร (rotator) (Biosan, Latvia)
17. เครื่องให้ความร้อน (heat block) (Bockel, UK)

18. ชั้นวางปิเปตต์ (Mondotech, Thailand)
19. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20°C และ -80°C (Revco, Japan)
20. ตู้ดูดควัน (fume hood) (S.K.Powerable, Thailand)
21. ตู้เย็น (Misubishi, Japan)
22. ตู้อบ (incubator) (Mettler, Germany)
23. ไมโครปิเปตต์ขนาด P2, P20, P100 และ P1000 (Eppendorf, Germany)
24. ปิเปตต์ บอย (Tecnomara, Switzerland)
25. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Mettler, Germany)
26. Storm 840 and ImageQuant software (Amersham biosciences, UK)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระจกฟอยล์ (Aro, China)
2. กระจกตวงขนาด 100 ml และ 1,000 ml (Witeg, Germany)
3. ก่องลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งเซลล์ (Nalgene labware, USA)
4. ขวดดูแรนขนาด 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Duran, Germany)
5. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml, 500 ml, 1,000 ml และ 2,000 ml (Pyrex, USA)
6. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T25 และ T75 (Corning, USA)
7. ช้อนตักสาร
8. ถาดเตรียมเจลพร้อมหัว (Bioer, China)
9. ถุงมือยางพารา (Handpro, Thailand)
10. ทิปขนาด 10 ul, 200 ul และ 1,000 ul (Axygen, USA)
11. เทอร์โมมิเตอร์ (Precision, Germany)
12. แท่งแม่เหล็ก (Agimatic-e, China)
13. แท่นวางหลอด (rack) (Autopack, USA)
14. ปิเปตต์แบบฆ่าเชื้อขนาด 1ml, 5 ml, 10 ml และ 25 ml (Witeg, Germany)
15. พลาสติกสำหรับห่อ (Diamond, USA)

16. พาราฟิล์ม (Parafilm M, USA)
17. ปากคีบ (Forcep)
18. หลอดขนาด 0.2 ml, 0.5 ml และ 1.5 ml (Bio-rad Elkay, USA)
19. Polypropylene conical tube ขนาด 15 ml และ 50 ml (Elkay, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป

- 1.1 Absolute ethanol (Merck, Germany)
- 1.2 Agarose (Cambrex, USA)
- 1.3 Ammonium acetate (Merck, Germany)
- 1.4 Bromophenol blue (USB, Germany)
- 1.5 Chloroform (Merck, Germany)
- 1.6 Diethylpyrocaronate (DEPC)(Sigma, USA)
- 1.7 Dimethyl sulfoxide (DMSO)(Sigma, USA)
- 1.8 EDTA (USB, Germany)
- 1.9 Ethidium bromide (Gibco BRL, Scotland)
- 1.10 Formaldehyde (Merck, Germany)
- 1.11 Glycine (Amersham Bioscience, Sweden)
- 1.12 Glycogen (USB, Germany)
- 1.13 Hydroquinone (Merck, Germany)
- 1.14 Isopropanol (VWR, France)
- 1.15 Methanol (SK chemicals, Korea)
- 1.16 Nuclease free water (Fermentas, Canada)
- 1.17 Phenol (USB, Germany)
- 1.18 Potassium dihydrogen phosphate (Merck, Germany)
- 1.19 Proteinase K (USB, Germany)

- 1.20 RNase A (DNase-free) (Applichem, Germany)
- 1.21 Sodium metabisulfite (Sigma-aldrich, USA)
- 1.22 Sodium chloride (Merck, Germany)
- 1.23 SYBR green I nucleic acid gel stain (Lonza, USA)
- 1.24 Tris (Tris[hydroxymethyl] aminomethane) (Omnipur, Germany)
- 1.25 TritonX 100 (Bio-RAD, USA)
- 1.26 Trizol reagent (Invitrogen, USA)
- 1.27 Trypan blue (Sigma, USA)
- 1.28 Trypsin EDTA (Gibco, USA)
- 1.29 Tris base (USB, USA)
- 1.30 10 base pair DNA ladder (Promega, USA)
- 1.31 25 base pair DNA ladder (Promega, USA)
- 1.32 100 base pair DNA ladder (Promega, USA)
- 1.33 1K base pair DNA ladder (Promega, USA)

2.สารเคมีสำหรับทำ PCR

- 2.1 10X PCR buffer (Qiagen, Germany)
- 2.1 25mM Magnesium chloride (Qiagen, Germany)
- 2.2 10mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)
- 2.3 Oligonucleotide primers (Bioscience, Thailand)
- 2.4 Hot start *Taq* DNA polymerase (Qiagen, Germany)

การรวบรวมและคัดเลือกข้อมูลค่าเมทิลเลชันในอวัยวะต่างๆ

ในงานวิจัยได้ค้นหาและรวบรวมข้อมูลที่เป็นค่าเมทิลเลชันในอวัยวะต่างๆของมนุษย์ โดยอาศัยฐานข้อมูล GEO dataset จากเว็บไซต์ NCBI ซึ่งเป็นฐานข้อมูลจากงานทดลองที่ใช้ไมโครเอเรย์ในการวัดผล ทำให้ได้ข้อมูลจำนวนมากและมีความน่าเชื่อถือ ทางงานวิจัยได้ค้นหาข้อมูลที่ใช้เมทิลเลชันเมทิลชันไมโครเอเรย์ชนิด Infinium Human Methylation 27 BeadChip Kit ของบริษัทอิลลูมิน่า (Illumina) เพราะมีฐานข้อมูลให้สืบค้นได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเมทิล

เลขชี้ไม่โครเรย์ชนิดอื่นในฐานะข้อมูล GEO dataset ซึ่งมีข้อมูลการทดลองมากถึง 172 การทดลอง (ข้อมูลตั้งแต่วันที่ 18 สิงหาคม 2552 จนถึง 31 ธันวาคม 2555) และเมทิลเลชันโครแอเรียตัวนี้ สามารถตรวจวัดซีพีจีได้มากถึง 27,578 ตำแหน่ง ตลอดบนจีโนมของมนุษย์

ในการคัดเลือกข้อมูลทั้ง 172 งานทดลอง ทางงานวิจัยได้แยกงานทดลองที่เป็น เซลล์ไลน์ (Cell line), สเต็มเซลล์ (Stem cell), เนื้อเยื่อที่ก่อโรค และเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่มนุษย์ออก และเลือกเฉพาะงานทดลองที่เป็นเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์ ซึ่ง GEO dataset ที่ถูกคัดเลือกมามีจำนวน 39 งานทดลอง ได้แก่ GSE19711, GSE20067, GSE20080, GSE20712, GSE21232, GSE22249, GSE22595, GSE22867, GSE25062, GSE25706, GSE25869, GSE26033, GSE26126, GSE26989, GSE27130, GSE27284, GSE27899, GSE28746, GSE29490, GSE30229, GSE30601, GSE30760, GSE31788, GSE31835, GSE31979, GSE32867, GSE33065, GSE33510, GSE34008, GSE34355, GSE35146, GSE36002, GSE36166, GSE36194, GSE36353, GSE36637, GSE37988, GSE41037 และ GSE42510

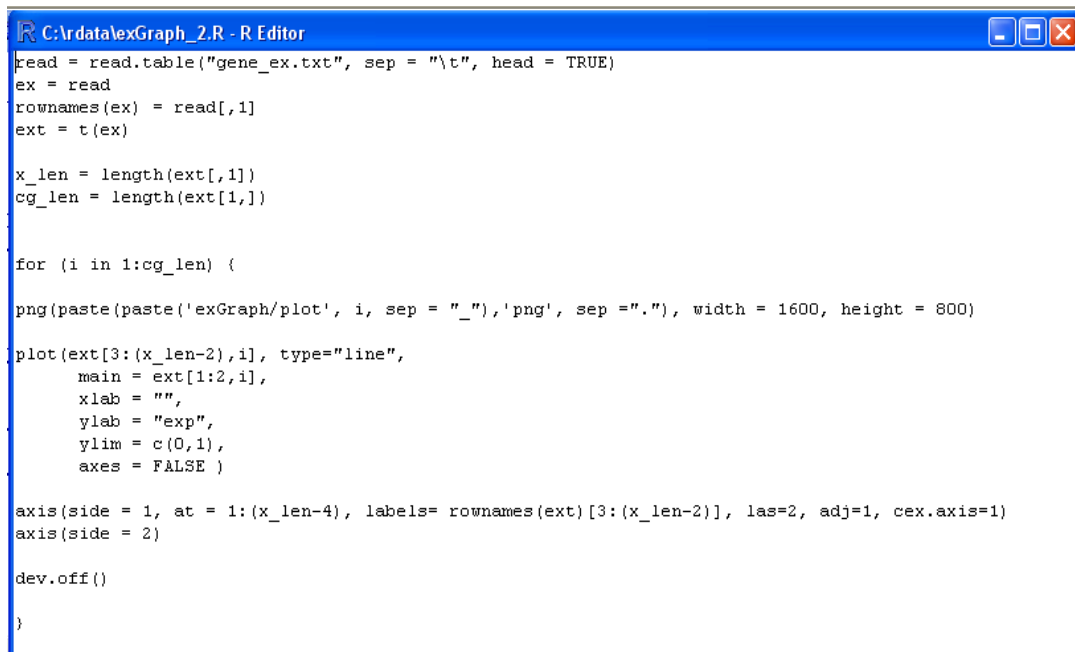
การสร้างฐานข้อมูลของค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยในอวัยวะต่างๆ

GEO dataset ที่ได้คัดเลือกไว้ 39 งานทดลอง จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM เพื่อคำนวณค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มตัวอย่างในแต่ละงานทดลองบนซีพีจี แต่ละตำแหน่ง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มารวบรวมและจัดเรียงลงในโปรแกรม Microsoft Excel เพื่อสร้างฐานเป็นข้อมูลของอวัยวะต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย กระจก, ไช้กระจก, เลือด, สมอง, ปอด, เต้านม, หัวใจ, ตับ, ภาวะอาหาร, ลำไส้, ไต, ตับอ่อน, ต่อมหมวกไต, ต่อมลูกหมาก, ปากมดลูก, ผิวหนัง, กล้ามเนื้อ, น้ำลาย และเยื่อบุกระเพาะปัสสาวะ

นอกจากนี้ทางงานวิจัยยังได้รับข้อมูลของค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันเฉลี่ยของเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์ 14 ชนิด ประกอบด้วย สมอง, ปอด, เต้านม, หัวใจ, ตับ, ม้าม, ภาวะอาหาร, ลำไส้, ไต, ตับอ่อน, ต่อมลูกหมาก, รังไข่, อัณฑะ และ กล้ามเนื้อโครงร่าง ที่วัดได้จาก Infinium Human Methylation 27 BeadChip Kit จากงานวิจัยของบริษัทลูมินา โดยได้รับความเชื่อเพื่อข้อมูลจาก Professor Kevin L Gunderson (Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium[®] assay) [11] ซึ่งข้อมูลอวัยวะทั้งหมดนี้จะถูกรวบรวมและจัดกลุ่มลงในโปรแกรม Microsoft Excel โดยให้กลุ่มอวัยวะชนิดเดียวกันอยู่ในคอลัมน์ที่ติดกัน เพื่อให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ทำให้สามารถอ่านค่าเมทิลเลชันตามกลุ่มอวัยวะต่างๆได้

การสร้างกราฟค่าเมทิลเลชันของซีพีจีแต่ละตำแหน่ง

ไฟล์ฐานข้อมูลจะถูกแปลงไฟล์จาก Microsoft Excel (.xls) เป็น Notepad (.txt) จากนั้นใช้โปรแกรมอาร์ (R Program) สร้างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชันจากไฟล์ฐานข้อมูลที่ถูกแปลงแล้ว โดยใช้การเขียนคำสั่งให้กับโปรแกรกดังภาพที่ 12



```

R C:\rdata\exGraph_2.R - R Editor
read = read.table("gene_ex.txt", sep = "\t", head = TRUE)
ex = read
rownames(ex) = read[,1]
ext = t(ex)

x_len = length(ext[,1])
cg_len = length(ext[1,])

for (i in 1:cg_len) {

png(paste(paste('exGraph/plot', i, sep = "_"), 'png', sep = "."), width = 1600, height = 800)

plot(ext[3:(x_len-2),i], type="line",
      main = ext[1:2,i],
      xlab = "",
      ylab = "exp",
      ylim = c(0,1),
      axes = FALSE )

axis(side = 1, at = 1:(x_len-4), labels= rownames(ext)[3:(x_len-2)], las=2, adj=1, cex.axis=1)
axis(side = 2)

dev.off()
}

```

ภาพที่ 12 คำสั่งเพื่อใช้สร้างกราฟจากฐานข้อมูล

ซึ่งจะได้กราฟทั้งหมด 27,578 กราฟ ตามจำนวนของซีพีจีบนเมทิลเลชันไมโครแอรเรย์ที่ใช้ โดยให้แกนตั้งของกราฟใช้แสดงค่าเมทิลเลชัน ส่วนแกนนอนใช้แสดงชนิดของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ จากฐานข้อมูล

การวิเคราะห์และค้นหากราฟของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะในอวัยวะแต่ละชนิด

กราฟทั้งหมด 27,578 กราฟ จะถูกวิเคราะห์และค้นหากราฟที่มีความจำเพาะในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะแต่ละชนิด โดยการมองด้วยสายตาเพื่อเปรียบเทียบค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยของซีพีจีที่มีค่าสูงหรือต่ำ อย่างเด่นชัดบนเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดใดชนิดหนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับอวัยวะอื่นๆ ร่วมกับการค้นหาโดยการสร้างสูตรเงื่อนไขในโปรแกรม Microsoft Excel ด้วยการใช้ผลต่างระหว่างค่าเมทิลเลชันต่ำสุดของกลุ่มอวัยวะชนิดหนึ่งกับค่าเมทิลเลชันสูงสุดของอวัยวะชนิดอื่นๆ หรือใช้ผลต่างระหว่างค่าเมทิลเลชันต่ำสุดของอวัยวะชนิดอื่นๆ กับค่าเมทิลเลชันสูงสุดของกลุ่มอวัยวะชนิดหนึ่ง เพื่อนำมาใช้ในการเรียงลำดับค่าเมทิลเลชันของซีพีจีในแต่ละกลุ่มอวัยวะ จากนั้นจึงคัดเลือกตำแหน่งซีพีจีที่อยู่อันดับต้นๆ เพื่อพิจารณากราฟของซีพีจีเหล่านั้น

การค้นหตำแหน่งบนจีโนมของซีพีจีจากกราฟที่คัดเลือกไว้

กราฟที่ถูกคัดเลือกไว้จะถูกตรวจสอบรหัสโพรบของกราฟ (Probe ID) โดยเทียบกับข้อมูลในไฟล์ GPL490-65 ที่ใช้ในโปรแกรม CU-DREAM ซึ่งในไฟล์ GPL นี้จะระบุตำแหน่งของซีพีจี ลำดับเบสที่อยู่ข้างเคียง และลำดับเบสที่ใช้ตรวจวัด ของซีพีจีทั้ง 27,578 ตำแหน่ง

การออกแบบไพรเมอร์ของซีพีจีที่จำเพาะสำหรับเทคนิคเอ็มเอสพีซีอาร์

ออกแบบไพรเมอร์ด้วยข้อมูลลำดับเบสที่อยู่ติดกับซีพีจีที่จำเพาะที่อ้างอิงจากไฟล์ GPL490-65 ในซีพีจีแต่ละตำแหน่งในไฟล์นี้จะมีโพรบสองตัวเพื่อตรวจวัดค่าเมทิลเลชัน คือ เมทิลเลชันโพรบ และอันเมทิลเลชันโพรบ ซึ่งจะใช้ลำดับเบสของโพรบสองตัวนี้ในการออกแบบ เมทิลเลชันไพรเมอร์ และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ โดยให้ตำแหน่งของเบสไซโตซีนจากซีพีจีที่จำเพาะอยู่ที่ปลายด้าน 3' ของเมทิลเลชันไพรเมอร์ (ในอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ปลายด้าน 3' จะเป็นเบสไทมีน) เพราะที่ปลายด้าน 3' ของไพรเมอร์เป็นตำแหน่งสำคัญในการเข้าจับระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย (Annealing) เพื่อสร้างสายต่อ [45] ซึ่งไพรเมอร์ทั้งสองชุดนี้จะออกแบบให้มีคุณสมบัติที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกันเพื่อให้แย่งจับดีเอ็นเอในปฏิกิริยาเดียวกัน แต่มีขนาดพีซีอาร์โปรดักส์ที่ต่างกัน ซึ่งทางงานวิจัยได้อาศัยโปรแกรมโอลิโกคาล (OligoCalc) บนเว็บไซต์ <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติและความหนาแน่นของเบสซีจี (CG content) ของไพรเมอร์แต่ละเส้น

ภาพที่ 13 โปรแกรมโอลิโกคาล

กลุ่มตัวอย่างและเกณฑ์การคัดเลือกสิ่งตัวอย่าง

ในงานวิจัยนี้กลุ่มตัวอย่างแรกเป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บไว้ในพาราฟินบล็อก ที่ได้มาจากการตรวจศพที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งทางงานวิจัยได้รับอนุญาต เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

กลุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อในพาราฟินบล็อกทั้งหมดได้ผ่านการตรวจยืนยันทางกล้องจุลทรรศน์ โดยผู้เชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยา เพื่อตรวจยืนยันชนิดของสิ่งตัวอย่าง และตรวจสอบว่าสิ่งตัวอย่างไม่ได้เสื่อมสภาพ รวมถึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ชนิดของสิ่งตัวอย่าง ได้แก่ ไขกระดูก, ปอด, กล้ามเนื้อ, หลอดเลือดแดง, ลำไส้, ไต, ม้าม, ตับอ่อน, ตับ, ต่อมหมวกไต, สมอง, ผิวหนัง, เซลล์ประสาท, ต่อมน้ำเหลือง, หัวใจ และกระเพาะอาหาร ซึ่งเนื้อเยื่อเหล่านี้จะถูกตรวจสอบทางพยาธิวิทยาอีกครั้งหนึ่ง เพื่อยืนยันว่าเป็นเนื้อเยื่อปกติ

เกณฑ์การเลือกเข้าของสิ่งตัวอย่างในพาราฟินบล็อก จะคัดเลือกเอาสิ่งตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อปกติที่ไม่ได้มีความผิดปกติหรือเกิดโรค และยังไม่เสื่อมสภาพ ซึ่งสามารถนำมาสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ส่วนเกณฑ์การคัดออกของสิ่งตัวอย่าง จะทำการคัดแยกสิ่งตัวอย่างเป็นเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ เช่น เกิดการอักเสบ ติดเชื้อ หรือก่อโรค และสิ่งตัวอย่างที่เสื่อมสภาพ จนไม่สามารถสกัดหรือเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้

ในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอจากซีรัมนั้นจะถูกตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ด้วยการใช้เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งสามารถวัดปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นของดีเอ็นเอ เทียบกับการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ที่เป็นความยาวคลื่นของโปรตีน

การสกัดดีเอ็นเอ

กลุ่มตัวอย่างตัวอย่างเนื้อเยื่อในพาราฟินที่ได้คัดเลือกไว้จะถูกสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มมาตรฐาน (Standard phenol chloroform) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดผิวหนังของตัวอย่างเนื้อเยื่อในพาราฟินบล็อก ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อฮิสโต (Microtome) แล้วนำมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml
2. ใส่ไซลีน (Xylene) 1 ml เพื่อละลายพาราฟินออก ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นปั่นแยก นำส่วนของเหลวทิ้ง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง
3. ใส่ 100% เอทานอล (Ethanol) 500 μ l ปั่นแยก นำส่วนของเหลวทิ้ง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง
4. ใส่ 95% เอทานอล 500 μ l ปั่นแยก นำส่วนของเหลวทิ้ง
5. ใส่ 90% เอทานอล 500 μ l ปั่นแยก นำส่วนของเหลวทิ้ง

6. ใส่ 70% เอทานอล 500 μ l ปั่นแยก นำส่วนของเหลวทิ้ง
7. ใส่ ไลซิสบู เอสดีเอส (Lysis II SDS) และ โปรตีนเนสเค (Proteinase K) บ่มที่ อุณหภูมิ 50°C ทิ้งไว้ข้ามคืน
8. เมื่อตัวอย่างเนื้อเยื่อละลายหมดใส่ฟีนอลคลอโรฟอร์ม 500 μ l ปั่นที่ความเร็ว 12,000 RPM 5 นาที นำส่วนส่วนใสย้ายมาใส่หลอดทดลองอีกหลอด
9. ใส่ 10 M แอมโมเนียมอะซิเตด ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 250 μ l และ 100% เอทานอล 500 μ l นำส่วนของเหลวทิ้ง
10. ใส่ 70% เอทานอล 500 μ l ปั่นแยก นำส่วนของเหลวทิ้ง
11. นำหลอดทดลองใส่ตู้อบ (Hot air oven) ทิ้งไว้ให้แห้ง
12. ใส่น้ำกลั่น 50 μ l บ่มที่ 50°C จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

กระบวนการไบซัลไฟต์ทรีทเมนต์

ใช้ชุดสำเร็จรูป EZ DNA Methylation ของบริษัท Zymo research เพื่อเปลี่ยนเบสไซโตซีนที่ไม่มีหมู่เมทิลให้กลายเป็นเบสยูราซิล ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมน้ำยา CT Conversion โดยใส่น้ำกลั่น 900 μ l, M-Dilution 300 μ l และ M-Dissolving 50 μ l เขย่าให้เข้ากัน 10 นาที
2. ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดไว้เป็น 750 ng ปริมาตร 20 μ l
3. ใส่น้ำยา CT Conversion ลงในดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 130 μ l ใช้ปิเปตต์ดูดผสมให้เข้ากัน
4. บ่มที่อุณหภูมิ 98 °C 10 นาที, 64°C 2.5 ชั่วโมง (ใช้เครื่องพีซีอาร์) จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4°C 20 ชั่วโมง
5. เตรียมคอลัมน์ของชุดสำเร็จรูป โดยประกอบคอลัมน์เข้ากับหลอดทดลองของชุดสำเร็จรูป จากนั้นใส่น้ำยา M-Binding buffer 600 μ l ลงในคอลัมน์
6. ใสดีเอ็นเอจากขั้นตอนที่ 4 ลงในคอลัมน์ ใช้ปิเปตต์ดูดผสมให้เข้ากัน จากนั้น ปั่นที่ความเร็วเต็มที่ (>10,000 g) 30 วินาที นำส่วนของเหลวที่อยู่ในหลอดทดลองทิ้ง
7. ใส่ M-Wash buffer 100 μ l ลงในคอลัมน์ ปั่นที่ความเร็วเต็มที่ 30 วินาที
8. ใส่ M-Desulphonation 200 μ l ลงในคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15-20 นาที จากนั้น ปั่นที่ความเร็วเต็มที่ 30 วินาที
9. ใส่ M-Wash buffer 200 μ l ลงในคอลัมน์ ปั่นที่ความเร็วเต็มที่ 30 วินาที ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

10. ย้ายคอลัมน์มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ใส่ M-Elution 10 μ l ลงในคอลัมน์
 ปั่นที่ความเร็วเต็มที่ 30 วินาที

การทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์ทรีทเมนต์แล้ว จะถูกทดสอบคุณภาพ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ของยีนเบต้าแอ็คติน (β -actin gene) ซึ่งเป็นยีนเจ้าบ้านของทุกเซลล์ (Housekeeping gene) แล้วจึงคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้

กระบวนการเอ็มเอสพีซีอาร์

ในกระบวนการเอ็มเอสพีซีอาร์นี้จะใช้ไพรเมอร์สองชุดในปฏิกิริยาเดียวกัน (Duplex) ซึ่งประกอบด้วย เมทิลเลชันไพรเมอร์ และอโนเมทิลเลชันไพรเมอร์ โดยใช้ส่วนผสม
 ดังนี้

- 10mM dNTP	0.2 μ l
- 10X buffer	1 μ l
- 25mM MgCl ₂	0.4 μ l
- 20 μ M Methylation Forward primer	0.15 μ l
- 20 μ M Methylation Reverse primer	0.15 μ l
- 20 μ M Unmethylation Forward primer	0.15 μ l
- 20 μ M Unmethylation Reverse primer	0.15 μ l
- Hot Start Taq. DNA polymerase enzyme	0.1 μ l
- น้ำกลั่น	6.7 μ l
- ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์ทรีทเมนต์	1 μ l

อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา

- 95°C	15 นาที	} 40 รอบ
- 95°C	45 วินาที	
- 65°C	45 วินาที	
- 72°C	45 วินาที	
- 72°C	7 นาที	

กระบวนการเจลอีเล็กโตรโฟเรซิส

นำพีซีอาร์โปรดักส์ที่ได้มาเข้าสู่กระบวนการเจลอีเล็กโตรโฟเรซิสบน 8% โพลีอะคริลาไมด์เจล (8% Polyacrylamide gel) เพื่อเปรียบเทียบขนาดของพีซีอาร์โปรดักส์ที่เกิดขึ้น ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังนี้

- 40% acrylamide	2 ml
- TEMED	10 µl
- 10% APS	100 µl
- 10X TBE	1 ml
- น้ำกลั่น	7 ml

โดยใช้กระแสไฟฟ้า 130 โวลต์ 50 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ใน 1X TBE ที่ผสม SYBR Green 40 นาที จากนั้นจึงนำเจลไปถ่ายภาพ

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ใช้การวัดความเข้มของพีซีอาร์โปรดักส์ของทั้งเมทิลเลชันไพรเมอร์และอันเมทิลเลชันไพรเมอร์ที่เกิดขึ้นบนเจล ด้วยโปรแกรม ImageQuant TL จากนั้นจึงเปรียบเทียบความเข้มของพีซีอาร์โปรดักส์ทั้งสองแบบ โดยการคำนวณเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ จากสูตร

$$\% \text{methylation} = \frac{\text{ความเข้มของ methylation band}}{\text{ความเข้มของ methylation band} + \text{unmethylation band}} \times 100 \text{ แล้ววิเคราะห์ผล}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในกลุ่มประชากรที่เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อจากพาราฟินบล็อก ทางวิจัยได้ใช้ค่าเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันที่คำนวณได้ในแต่ละสิ่งตัวอย่าง มาเปรียบเทียบทั้งในสิ่งตัวอย่างจากผู้ป่วยรายเดียวกัน และหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันของแต่ละกลุ่มอวัยวะจากกลุ่มประชากร เพื่อเปรียบเทียบค่าเมทิลเลชันในกลุ่มอวัยวะต่างๆ

ส่วนกลุ่มประชากรที่เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอจากซีรัม ทางงานวิจัยได้คำนวณค่าเฉลี่ยเมทิลเลชันในแต่ละกลุ่มอาการ จากนั้นจึงนำค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มอาการมาเปรียบเทียบทางสถิติกับค่าเฉลี่ยของกลุ่มคนปกติ โดยใช้การคำนวณ t-test ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism จากสูตร

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\left(\frac{(N_1 - 1)s_1^2 + (N_2 - 1)s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}\right)\left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}\right)}}$$

t	=	t-test
\bar{X}	=	ค่าเฉลี่ย
N	=	จำนวนประชากร
s	=	Standard deviation

จากนั้นนำค่า t ที่คำนวณ ไปเทียบหาค่า p-value เพื่อพิจารณาความแตกต่าง

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

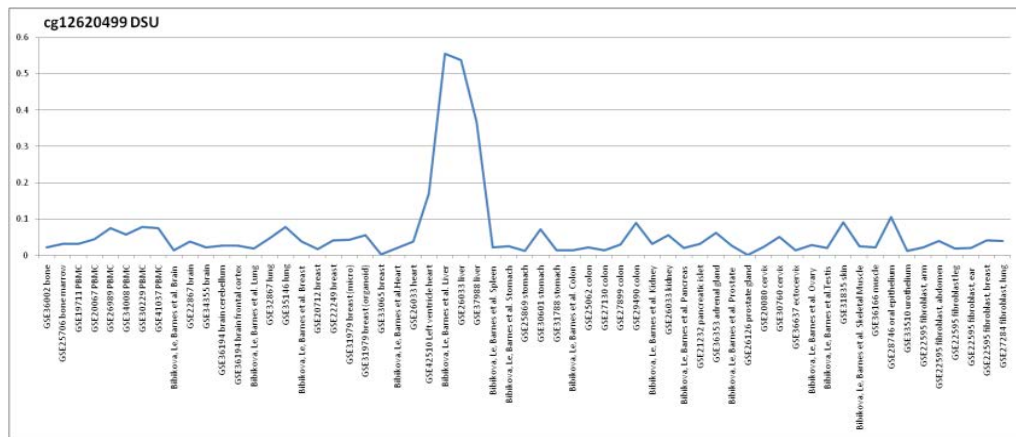
ในงานวิจัยนี้ มีกลุ่มประชากรที่ใช้ในการทดลองสองกลุ่ม คือ กลุ่มประชากรที่เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อจากพาราฟินบล็อก และกลุ่มประชากรที่เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากซีรัม ซึ่งสามารถจำแนกจำนวนและชนิดของกลุ่มประชากรได้ดังตารางที่ 1

กลุ่มประชากร		จำนวนประชากร (ราย)	ช่วงอายุ (ปี)	ค่ากลาง ของอายุ (ปี)	จำนวนเพศชาย ต่อเพศหญิง (คน:คน)
ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากพาราฟินบล็อก		13	6-83	72	6:7
ตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่สกัดจากซีรัม	คนปกติ	24	33-61	47	12:12
	ผู้ป่วยโรคตับแข็ง	9	46-63	59	6:3
	ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ	21	32-67	56	19:2
	ผู้ป่วยโรคไวรัสตับ อักเสบบี	15	19-54	38	7:8
	ผู้ป่วยโรคไวรัสตับ อักเสบบี	30	21-58	39	21:9
รวม		112			

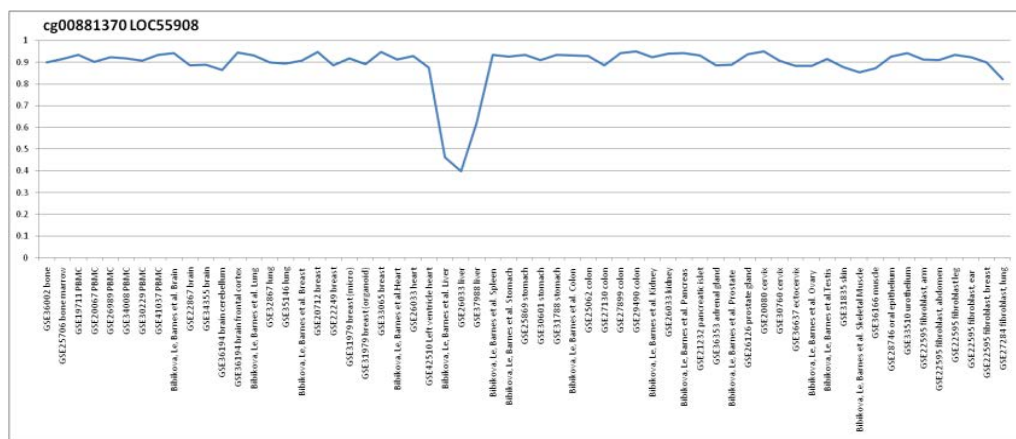
ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลกลุ่มประชากรที่เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อจากพาราฟินบล็อก

การคัดเลือกซีพีจีที่มีความจำเพาะในอวัยวะแต่ละชนิด

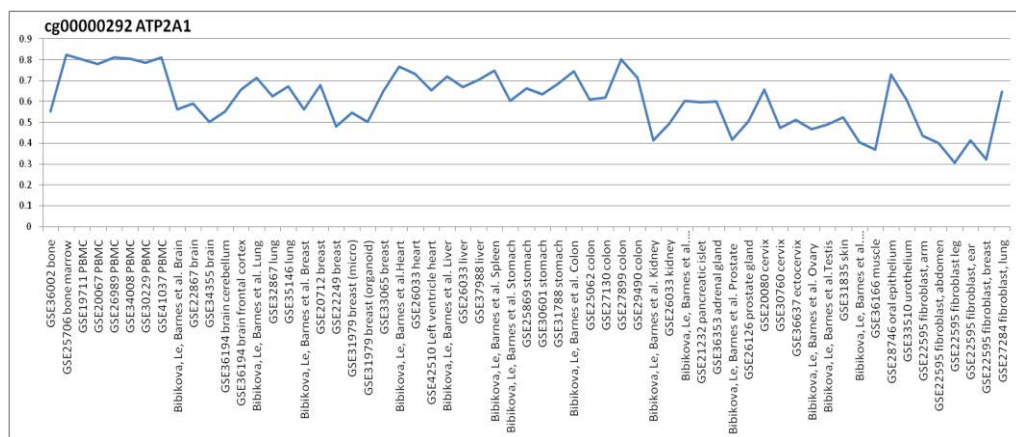
กราฟแสดงค่าเมทิลเลชันของซีพีจีทั้ง 27,578 ตำแหน่ง ที่สร้างจากโปรแกรมอาร์เอ็นเอ สามารถจำแนกลักษณะค่าเมทิลเลชันของซีพีจีในแต่ละกราฟได้ 5 รูปแบบ ดังภาพตัวอย่างกราฟด้านล่าง



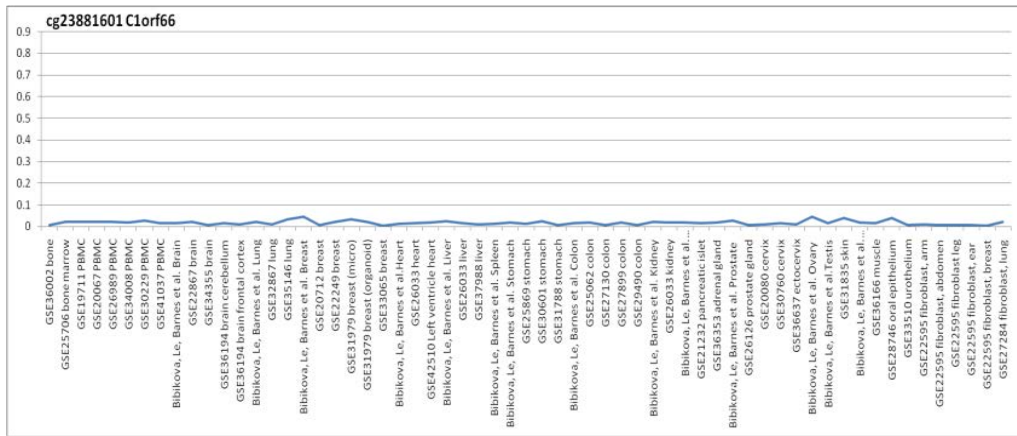
ภาพที่ 14 ตัวอย่างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชัน รูปแบบที่ 1



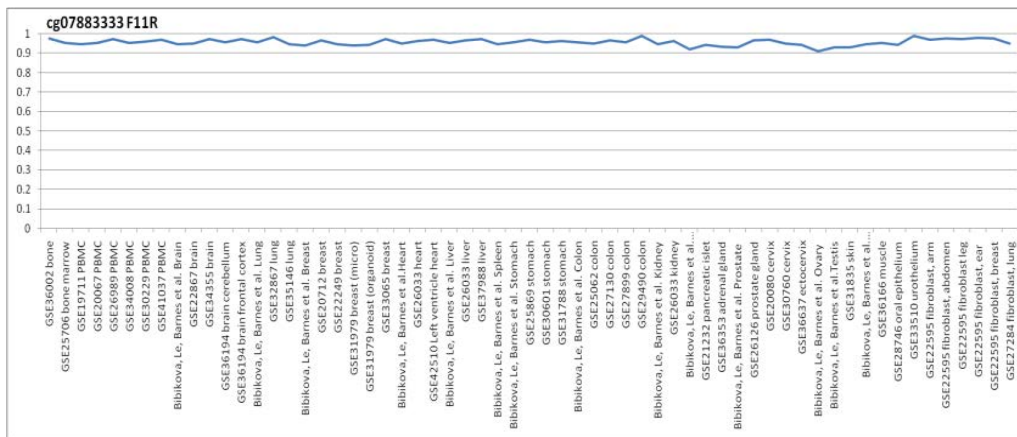
ภาพที่ 15 ตัวอย่างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชัน รูปแบบที่ 2



ภาพที่ 16 ตัวอย่างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชัน รูปแบบที่ 3



ภาพที่ 17 ตัวอย่างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชัน รูปแบบที่ 4



ภาพที่ 18 ตัวอย่างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชัน รูปแบบที่ 5

ทางงานวิจัยได้ใช้ตัวอย่างกราฟรูปแบบที่ 1 และ รูปแบบที่ 2 เป็นต้นแบบในการค้นหาและคัดเลือกกราฟที่มีความจำเพาะในอวัยวะแต่ละกลุ่ม เนื่องจากตัวอย่างกราฟทั้งสองรูปแบบนี้แสดงให้เห็นถึงค่าเมทิลเลชันที่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนในกลุ่มอวัยวะหนึ่ง เมื่อเทียบกับอวัยวะอื่นๆ ในตัวอย่างกราฟรูปแบบที่ 1 นั้นแสดงค่าเมทิลเลชันที่สูงอย่างเด่นชัดในกลุ่มอวัยวะหนึ่ง จึงเรียกรูปแบบกราฟนี้ว่า ไฮเปอร์เมทิลเลชัน (Hypermethylation) ขณะที่ตัวอย่างกราฟรูปแบบที่ 2 นั้นแสดงค่าเมทิลเลชันที่ต่ำอย่างชัดเจนในกลุ่มอวัยวะหนึ่ง จึงเรียกรูปแบบกราฟนี้ว่า ไฮโปเมทิลเลชัน (Hypomethylation)

ในการค้นหาและคัดเลือกซีพีจีที่มีค่าสูงหรือต่ำอย่างชัดเจนบนแต่ละกลุ่มอวัยวะ ทางงานวิจัยได้พิจารณาและคัดเลือกกราฟที่มีค่าเมทิลเลชันของกลุ่มอวัยวะที่มีค่าต่างกับกลุ่มอวัยวะอื่นๆ ประมาณ 0.2 จากกราฟ ซึ่งพบว่าซีพีจีทั้ง 27,578 ตำแหน่ง มีซีพีจีที่มีความจำเพาะอยู่

222 ตำแหน่งโดยแบ่ง เป็นกลุ่มไฮเปอร์เมทิลเลชั่น จำนวน 82 ตำแหน่ง และกลุ่มไฮโปเมทิลเลชั่น จำนวน 140 ตำแหน่ง ดังตารางที่ 2

อวัยวะ	จำนวนซีพีจีที่จำเพาะต่ออวัยวะ (%)		
	ไฮเปอร์เมทิลเลชั่น	ไฮโปเมทิลเลชั่น	รวม
ต่อมหมวกไต	3	5	8
สมอง	12	31	43
ปากมดลูก	0	2	2
หัวใจ	0	2	2
ไต	2	3	5
ตับ	22	34	56
ปอด	2	0	2
กล้ามเนื้อ	3	12	15
รังไข่	0	7	7
ตับอ่อน	8	4	12
ตับอ่อนและไฮสเลตออฟแลงเกอร์ฮานส์	6	1	7
ต่อมลูกหมาก	0	1	1
ม้าม	0	1	1
กระเพาะอาหาร	5	0	5
อวัยวะ	19	37	56
รวม	82 (36.94)	140 (63.06)	222

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนของซีพีจีเมทิลเลชั่นที่จำเพาะต่ออวัยวะชนิดต่างๆ

การวิเคราะห์ตำแหน่งของซีพีจีที่จำเพาะบนจีโนม

เมื่อนำตำแหน่งของซีพีจีที่จำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ ทั้ง 222 ตำแหน่ง บนจีโนมมาเปรียบเทียบกับบริเวณต่างๆในจีโนม สามารถแบ่งเป็นหัวข้อต่างๆดังนี้

ตำแหน่งภายในและภายนอกยีน (Intragenic, Intergenic)

ซีพีจีที่จำเพาะทั้ง 222 ตำแหน่งนั้น มีซีพีจีที่อยู่ภายในยีนมากถึง 208 ตำแหน่ง ซึ่งนับเป็น 93.69% ของทั้งหมด ขณะที่ซีพีจีอีก 14 ตำแหน่งที่เหลือจะอยู่บริเวณภายนอกหรือระหว่างยีน ดังตารางที่ 3 จึงกล่าวได้ว่า ซีพีจีที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อหรืออวัยวะนั้น ส่วนมากจะอยู่ในบริเวณที่เป็นยีน (Gene body)

อวัยวะ	จำนวนซีพีจีที่จำเพาะต่ออวัยวะ		
	ภายในยีน	ภายนอกยีน	รวม
ต่อมหมวกไต	7	1	8
สมอง	40	3	43
ปากมดลูก	1	1	2
หัวใจ	2	0	2
ไต	4	1	5
ตับ	55	1	56
ปอด	2	0	2
กล้ามเนื้อ	15	0	15
รังไข่	6	1	7
ตับอ่อน	12	0	12
ตับอ่อนและไอส์เลตออฟแลงเกอร์ฮานส์	7	0	7
ต่อมลูกหมาก	1	0	1
ม้าม	1	0	1
กระเพาะอาหาร	4	1	5
อวัยวะ	51	5	56
รวม	208 (93.69%)	14 (6.31%)	222

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะเทียบกับตำแหน่งภายในและภายนอกยีน

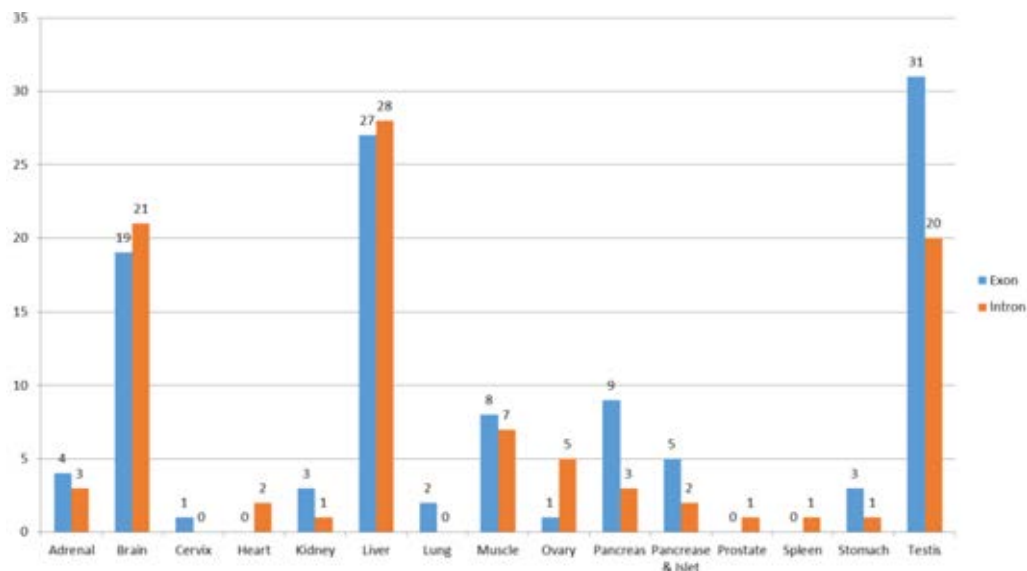
เอ็กซอนและอินทรอน (Exon & Intron)

เมื่อพิจารณาตำแหน่งของซีพีจีที่จำเพาะ โดยดูการวางตำแหน่งว่าอยู่ในบริเวณที่เป็นเอ็กซอนหรืออินทรอนของแต่ละยีน พบว่าซีพีจีทั้ง 208 ตำแหน่ง จากภายในยีน มีการกระจายตัวส่วนใหญ่ ในบริเวณเอ็กซอน ทั้งไฮเปอร์เมทิลเลชันและไฮโปเมทิลเลชัน ดังตารางที่ 4

อวัยวะ	จำนวนซีพีจีที่จำเพาะต่ออวัยวะ		
	เอ็กซอน	อินทรอน	รวม
ต่อมหมวกไต	4	3	7
สมอง	19	21	40
ปากมดลูก	1	0	1
หัวใจ	0	2	2
ไต	3	1	4
ตับ	27	28	55
ปอด	2	0	2
กล้ามเนื้อ	8	7	15
รังไข่	1	5	6
ตับอ่อน	9	3	12
ตับอ่อนและไฮสเลตออฟแลงเกอร์ฮานส์	5	2	7
ต่อมลูกหมาก	0	1	1
ม้าม	0	1	1
กระเพาะอาหาร	3	1	4
อวัยวะ	31	20	51
รวม	113 (54.33%)	95 (45.67%)	208

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะเทียบกับตำแหน่งเอ็กซอนและอินทรอน

ทางงานวิจัยได้วิเคราะห์เพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของตำแหน่งซีพีจีที่จำเพาะ กับบริเวณเอ็กซอน และอินทรอนโดยการสร้างกราฟ ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 กราฟแสดงจำนวนซีพีจีที่จำเพาะในเอ็กซอน และอินทรอน ของอวัยวะต่างๆ

จากกราฟสามารถจะเห็นได้ว่าซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะส่วนมากจะอยู่ในบริเวณที่เป็นเอ็กซอนของยีน ทางงานวิจัยจึงได้ศึกษาเพิ่มเติม โดยเพิ่มการแบ่งกลุ่มตามไฮเปอร์เมทิลเลชัน และไฮโปเมทิลเลชัน ดังตารางที่ 5

อวัยวะ	จำนวนซีพีจีที่จำเพาะต่ออวัยวะ						
	ไฮเปอร์เมทิลเลชั่น			ไฮโปเมทิลเลชั่น			รวม
	เอ็กซอน	อินทรอน	รวม	เอ็กซอน	อินทรอน	รวม	
ต่อมหมวกไต	2	1	3	2	2	4	7
สมอง	4	7	11	15	14	29	40
ปากมดลูก	0	0	0	1	0	1	1
หัวใจ	0	0	0	0	2	2	2
ไต	2	0	2	1	1	2	4
ตับ	10	12	22	17	16	33	55
ปอด	2	0	2	0	0	0	2
กล้ามเนื้อ	0	3	3	8	4	12	15
รังไข่	0	0	0	1	5	6	6
ตับอ่อน	6	2	8	3	1	4	12
ตับอ่อนและไอส์เลต ออฟแลงเกอร์ฮานส์	4	2	6	1	0	1	7
ต่อมลูกหมาก	0	0	0	0	1	1	1
ม้าม	0	0	0	0	1	1	1
กระเพาะอาหาร	3	1	4	0	0	0	4
อวัยวะ	13	4	17	18	16	34	51
รวม	46	32	78	67	63	130	208

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนซีพีจีเมทิลเลชั่นที่จำเพาะโดยแบ่งตามไฮเปอร์เมทิลเลชั่น และไฮโปเมทิลเลชั่น รวมด้วยตำแหน่งเอ็กซอน และอินทรอน

จากตารางจะเห็นว่าซีพีจีเมทิลเลชั่นที่จำเพาะ เมื่อแบ่งตามรูปแบบไฮเปอร์เมทิลเลชั่นและไฮโปเมทิลเลชั่น จะอยู่ในบริเวณเอ็กซอนมากกว่าอินทรอน

ซีพีจีไอส์แลนด์ (CpG Island, CGI)

ตำแหน่งของซีพีจีที่จำเพาะทั้ง 222 ตำแหน่ง เมื่อตรวจสอบตำแหน่งบนจีโนมว่า อยู่ในบริเวณซีพีจีไอส์แลนด์หรือไม่ พบว่ามีการกระจายตัวอย่างเท่าๆกัน เช่นเดียวกับ การเทียบตำแหน่งของอีทซอนและอินทรอน ดังตารางที่ 6

อวัยวะ	จำนวนซีพีจีที่จำเพาะต่ออวัยวะ		
	CGI	Non CGI	รวม
ต่อมหมวกไต	4	4	8
สมอง	17	26	43
ปากมดลูก	0	2	2
หัวใจ	0	2	2
ไต	3	2	5
ตับ	23	33	56
ปอด	2	0	2
กล้ามเนื้อ	5	10	15
รังไข่	3	4	7
ตับอ่อน	10	2	12
ตับอ่อนและไอส์เลตออฟแลงเกอร์ฮานส์	7	0	7
ต่อมลูกหมาก	1	0	1
ม้าม	0	1	1
กระเพาะอาหาร	5	0	5
อวัยวะ	40	16	56
รวม	120 (54.05%)	102 (45.95%)	222

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะเทียบกับตำแหน่ง CGI

และเมื่อนำข้อมูลตำแหน่งทั้งสามมาวิเคราะห์ร่วมกัน จะสามารถดูการกระจายตัวของซีพีจีที่จำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ บนจีโนม ได้ดังตารางที่ 7

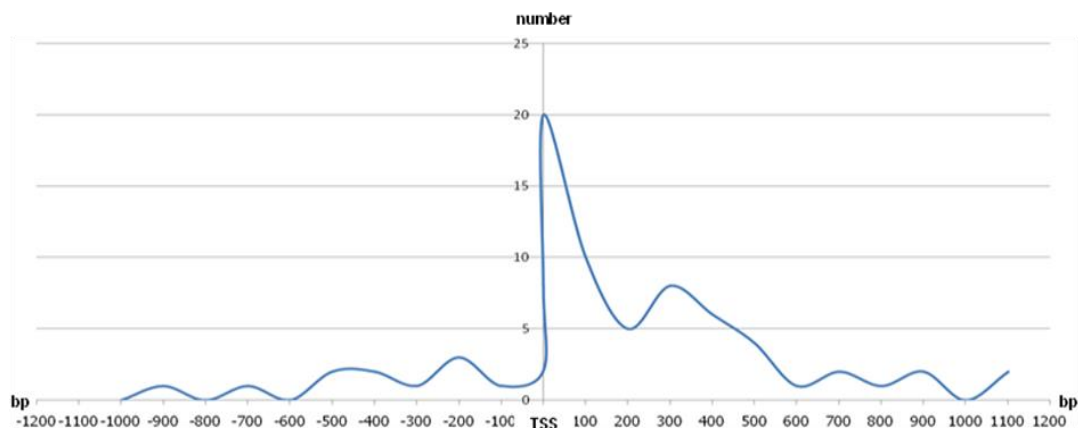
อวัยวะ	ภายในยีน				ภายนอก		รวม
	เอ็กซอน		อินทรอน		ยีน		
	CGI	Non CGI	CGI	Non CGI	CGI	Non CGI	
ต่อมหมวกไต	3	1	1	2	0	1	8
สมอง	6	13	9	12	2	1	43
ปากมดลูก	0	1	0	0	0	1	2
หัวใจ	0	0	0	2	0	0	2
ไต	2	1	0	1	1	0	5
ตับ	11	16	12	16	0	1	56
ปอด	2	0	0	0	0	0	2
กล้ามเนื้อ	2	6	3	4	0	0	15
รังไข่	1	0	2	3	0	1	7
ตับอ่อน	8	1	2	1	0	0	12
ตับอ่อนและไฮสเลตอพอแลงเกอร์ฮานส์	5	0	2	0	0	0	7
ต่อมลูกหมาก	0	0	1	0	0	0	1
ม้าม	0	0	0	1	0	0	1
กระเพาะอาหาร	3	0	1	0	1	0	5
อวัยวะ	20	11	16	4	4	1	56
รวม	63	50	49	46	8	6	222

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะเทียบกับตำแหน่งต่าง ๆ บนจีโนม

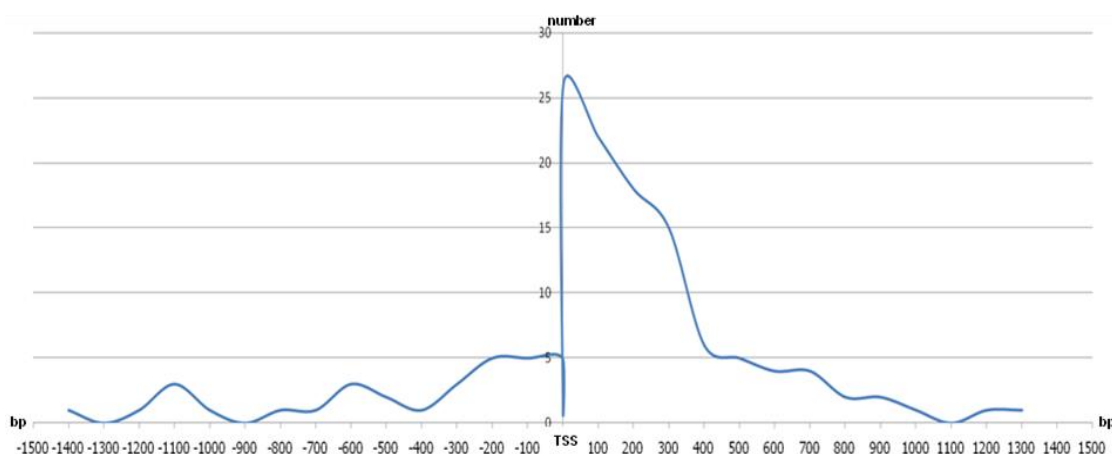
ทรานสคริปชันสตาร์ทไซต์ (Transcription Start Site, TSS)

จากการเปรียบเทียบตำแหน่งของซีพีจีที่จำเพาะกับตำแหน่งของ TSS ของแต่ละยีน ที่มีซีพีจีที่จำเพาะ โดยการสร้างกราฟ พบว่าตำแหน่งของซีพีจีที่จำเพาะส่วนมากจะอยู่ในบริเวณ

ที่เป็นยีน โดยเฉพาะบริเวณที่ห่างจาก TSS ประมาณ 0-100 เบส ทั้งซีพีจีที่เป็นไฮเปอร์เมทิลเลชั่น และไฮโปเมทิลเลชั่น ดังภาพที่ 20 และ 21



ภาพที่ 20 กราฟแสดงตำแหน่งของซีพีจีเมทิลเลชั่นที่จำเพาะแบบไฮเปอร์เมทิลเลชั่นเทียบกับ TSS

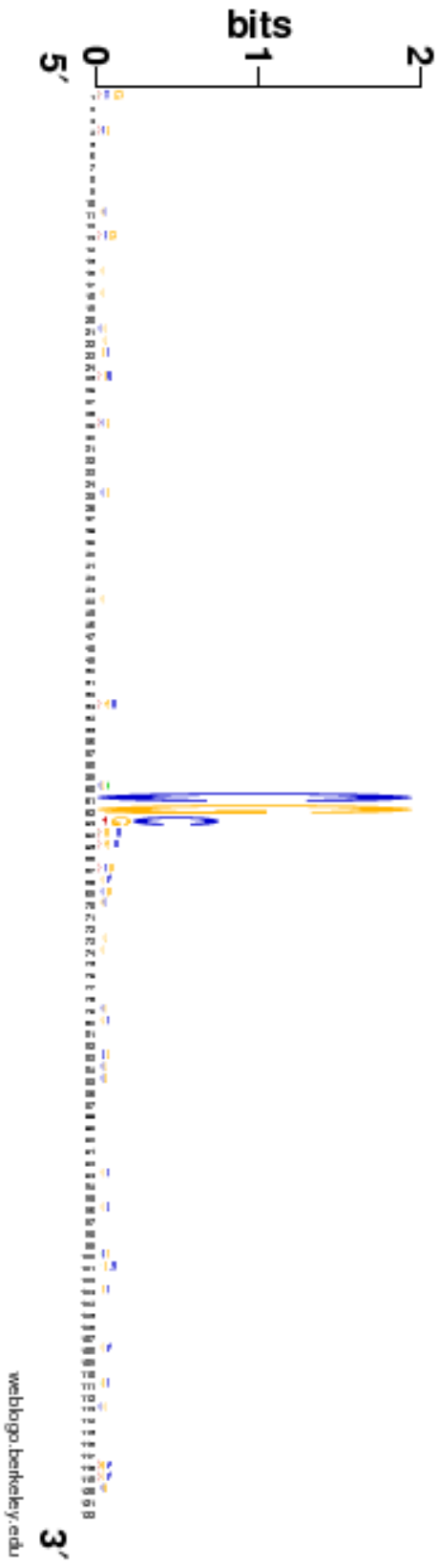


ภาพที่ 21 กราฟแสดงตำแหน่งของซีพีจีเมทิลเลชั่นที่จำเพาะแบบไฮโปเมทิลเลชั่นเทียบกับ TSS

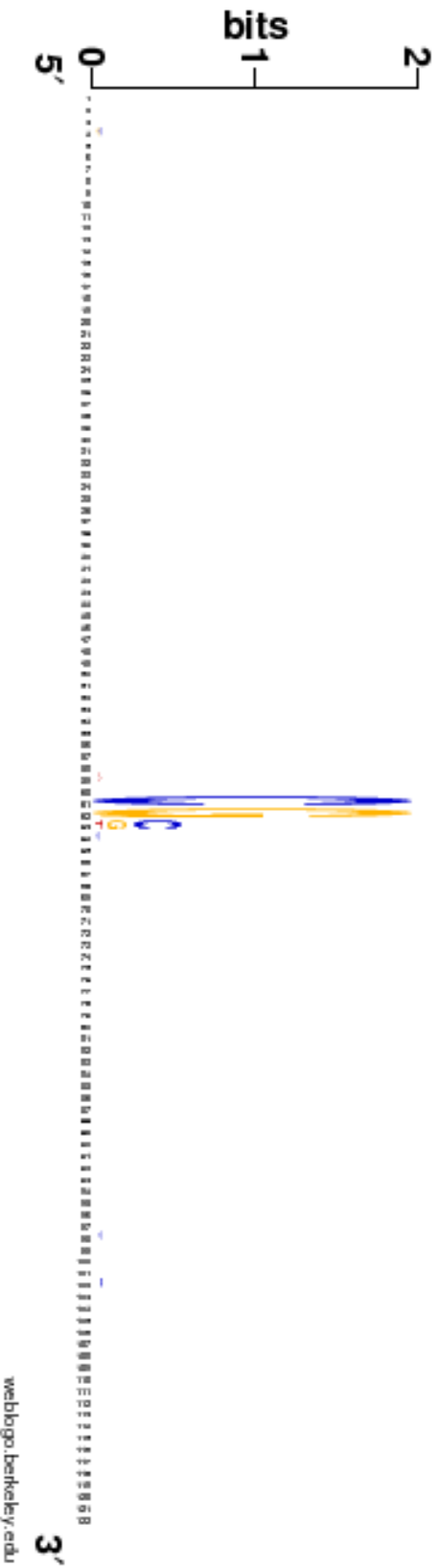
การวิเคราะห์ลำดับเบสที่อยู่ติดกับซีพีจีเมทิลเลชั่นที่จำเพาะด้วยซีควนโลโก้

ทางงานวิจัยได้นำลำดับเบสที่อยู่ในบริเวณเดียวกันกับซีพีจีเมทิลเลชั่นที่จำเพาะ โดยคัดเลือกลำดับเบสที่ครอบคลุมตำแหน่งซีพีจีแต่ละตำแหน่ง รวมความยาว 50 เบส ซึ่งอ้างอิงมาจากไฟล์ GPL8490-65.txt ที่เป็นข้อมูลเกี่ยวกับเมทิลเลชั่นไมโครแอเรย์ที่งานวิจัยนำมาใช้ มาวิเคราะห์เพื่อหาซีควนโลโก้ ทั้ง 222 ตำแหน่ง ด้วยโปรแกรมซีควนโลโก้ของเว็บไซต์ <http://www.weblogo.berkeley.edu/logo.cgi> ซึ่งให้ผลดังภาพที่ 22

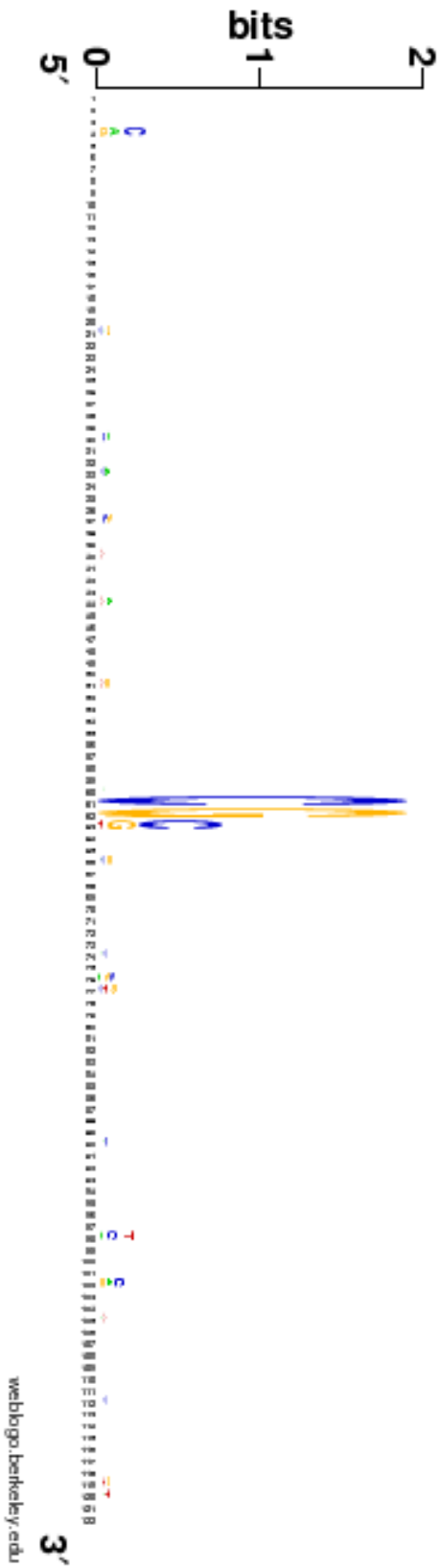
จากนั้นทางงานวิจัยได้วิเคราะห์เพิ่มเติม โดยวิเคราะห์แยกตามรูปแบบไฮเปอร์
เมทิลเลชัน และไฮโปเมทิลเลชัน รวมถึงวิเคราะห์แยกตามอวัยวะที่มีซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะมาก
ที่สุด 3 ชนิด ได้แก่ สมอง ตับ และอวัยวะ ซึ่งให้ผลดังภาพที่ 23-30



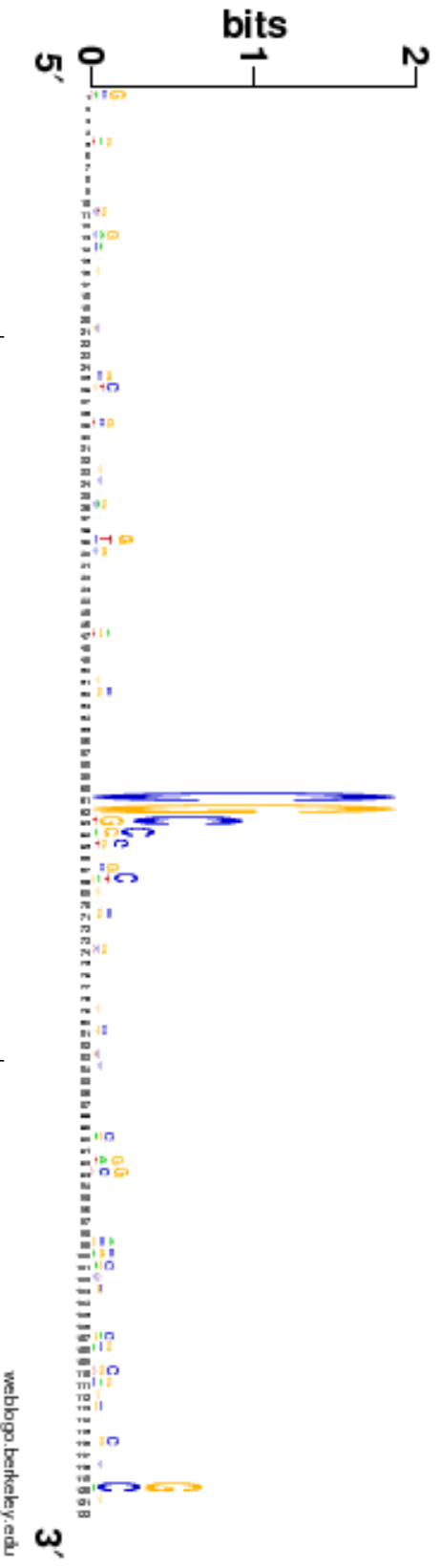
ภาพที่ 23 แสดงผลจากการวิเคราะห์โดยโปรแกรมในโปรแกรมที่แสดงในรูป



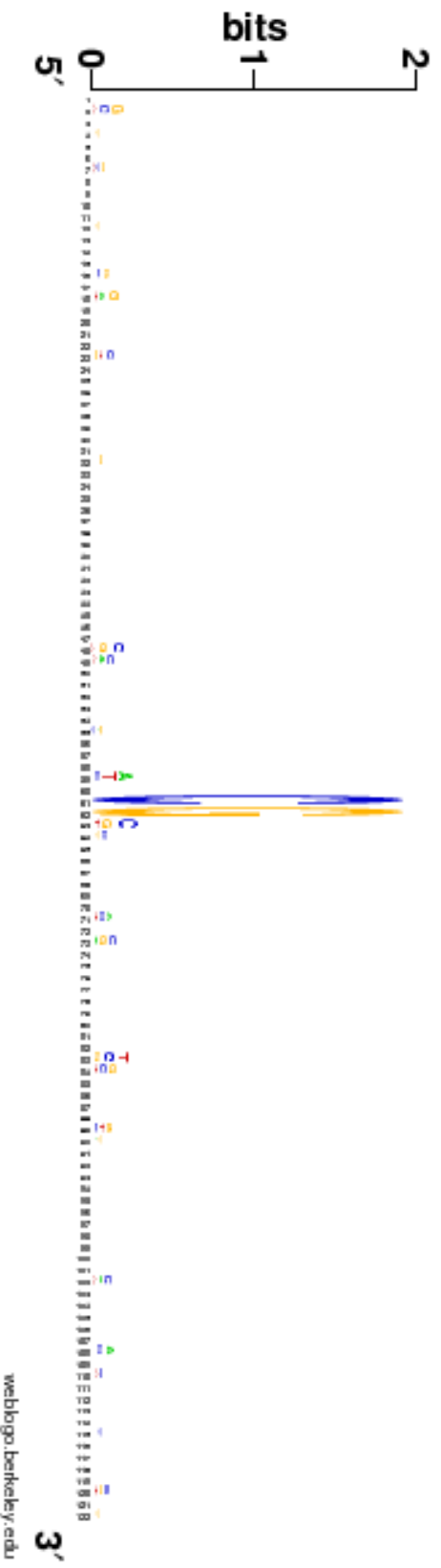
ภาพที่ 24 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ในโปรแกรมเว็บล็อก



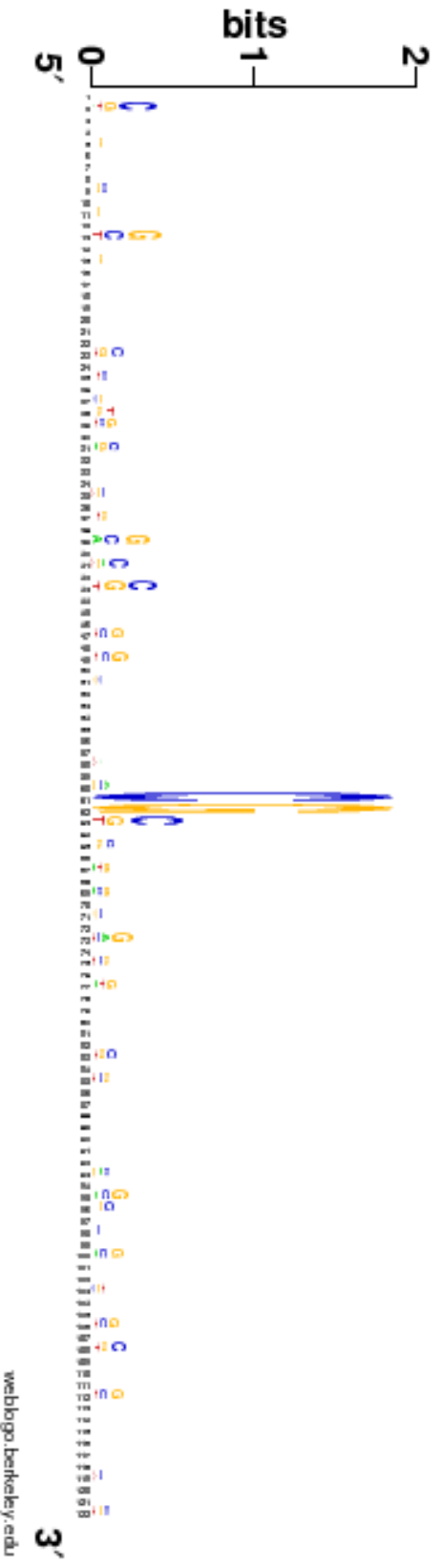
ภาพที่ 26 แสดงผลจากการวิเคราะห์ที่ได้โดยคอมพิวเตอร์ในโปรแกรมที่ใช้เพื่อแสดงสัญญาณ



ภาพที่ 27 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือของโปรแกรมที่แสดงในรูป ในตัวอย่างด้านบน

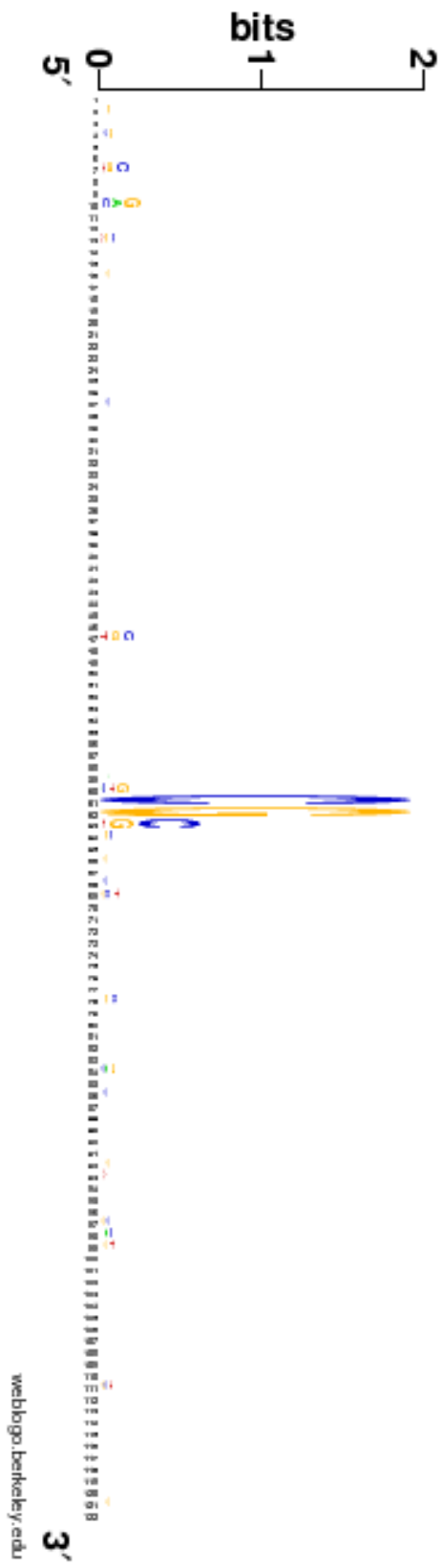


ภาพที่ 28 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ในโปรแกรม Bioinformatics ในคอมพิวเตอร์



ภาพที่ 29 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมโลโก้ของไฮเปอร์เมทีลเดชั่นในตัวอย่างตัวงูชะ

weblogo.berkeley.edu



ภาพที่ 30 แสดงผลจากการวิเคราะห์ที่ได้แสดงให้เห็นถึงข้อได้เปรียบของเบสในตำแหน่งที่ 10 และ 11 ของลำดับ 30

การวิเคราะห์ยีนที่มีซีพีจีที่จำเพาะ

หน้าที่ของยีน (Gene function)

ซีพีจีที่จำเพาะทั้ง 222 ตำแหน่ง มีการกระจายตัวอยู่ในยีนทั้งหมด 197 ยีน งานวิจัยพบว่ายีนทั้ง 197 ยีนนี้ ส่วนมากเป็นยีนที่ถูกถอดรหัสเพื่อสร้างโปรตีน (Protein coding gene) ซึ่งมีจำนวน 193 ยีน ที่เหลืออีก 4 ยีน เป็น ยีนเทียม (Pseudogene) 1 ยีน, โปรโมเตอร์ของ ไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA promoter) 1 ยีน และยีนที่ไม่ทราบหน้าที่ 2 ยีน ต่อมาทางงานวิจัยได้ จำแนกหน้าที่ของยีนทั้งหมด พบว่ามี 50 ซีพีจี จาก 197 ยีนที่มีหน้าที่จำเพาะกับอวัยวะที่จำเพาะของซีพีจีในยีนนั้นๆ ซึ่งสามารถเทียบอัตราส่วนได้ ดังตารางที่ 8

อวัยวะ	ซีพีจีของยีนที่มีหน้าที่จำเพาะในแต่ละอวัยวะเทียบกับซีพีจีที่จำเพาะทั้งหมด(%)	
	ไฮเปอร์เมทิลเลชั่น	ไฮโปเมทิลเลชั่น
ต่อมหมวกไต	0/2	1/5 (20)
สมอง	0/10	6/29 (20.67)
ปากมดลูก	0/0	0/2
หัวใจ	0/0	1/2 (50)
ไต	0/2	0/3
ตับ	0/15	12/31 (38.71)
ปอด	0/2	0/0
กล้ามเนื้อ	0/3	7/9 (77.78)
รังไข่	0/0	2/6 (33.33)
ตับอ่อน	1/8 (12.5)	2/4 (50)
ตับอ่อนและไอส์เลตออฟแลงเกอร์ฮานส์	0/6	0/1
ต่อมลูกหมาก	0/0	0/1
ม้าม	0/0	0/1
กระเพาะอาหาร	0/4	0/0
อวัยวะ	0/18	18/35 (51.43)
รวม	1/70 (1.43)	49/128 (38.28)

ตารางที่ 8 แสดงอัตราส่วนยีนที่มีหน้าที่จำเพาะในอวัยวะแต่ละชนิด

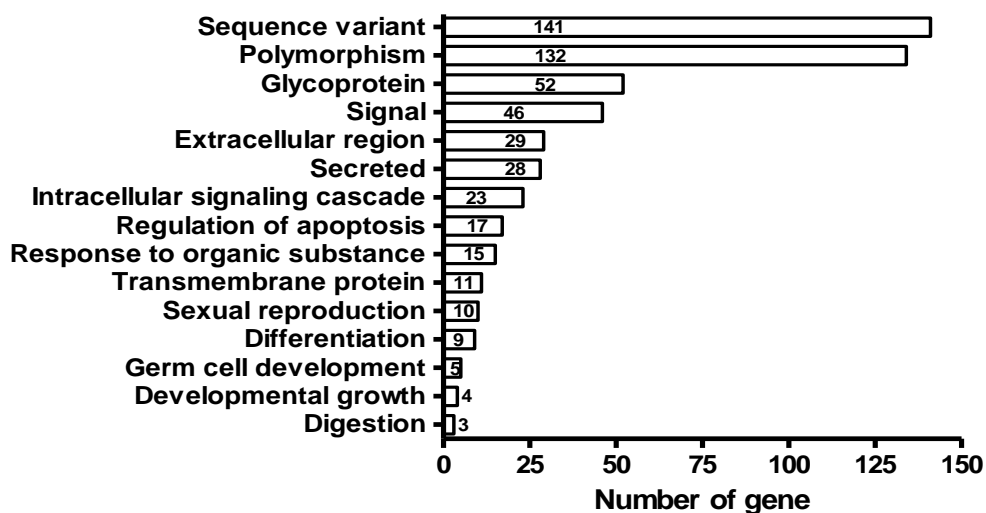
การวิเคราะห์กลุ่มยีนที่มีซีพีจีที่จำเพาะด้วยโปรแกรม (DAVID informatics)

ทางงานวิจัยได้รวบรวมยีนที่มีซีพีจีที่จำเพาะทั้ง 197 ยีน มาทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมเดวิด เพื่อวิเคราะห์หรือหาความสัมพันธ์ร่วมกันของกลุ่มยีน เช่น หน้าที่ หรือโปรตีนที่ได้จากยีน ซึ่งสามารถจำแนกหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มได้ตามตารางที่ 9 และภาพที่ 31

DAVID: Functional Annotation Chart	Number of gene	p-value
Sequence variant	141	0.00012
Polymorphism	134	0.00071
Glycoprotein	52	0.064
Signal	46	0.0067
Extracellular region	29	0.048
Secreted	28	0.0065
Intracellular signaling cascade	23	0.031
Regulation of apoptosis	17	0.023
Response to organic substance	15	0.039
Transmembrane protein	11	0.094
Sexual reproduction	10	0.083
Differentiation	9	0.079
Germ cell development	5	0.029
Developmental growth	4	0.079
Digestion	3	0.088

ตารางที่ 9 แสดงหน้าที่ของกลุ่มยีนที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเดวิด

DAVID: Functional Annotation Chart

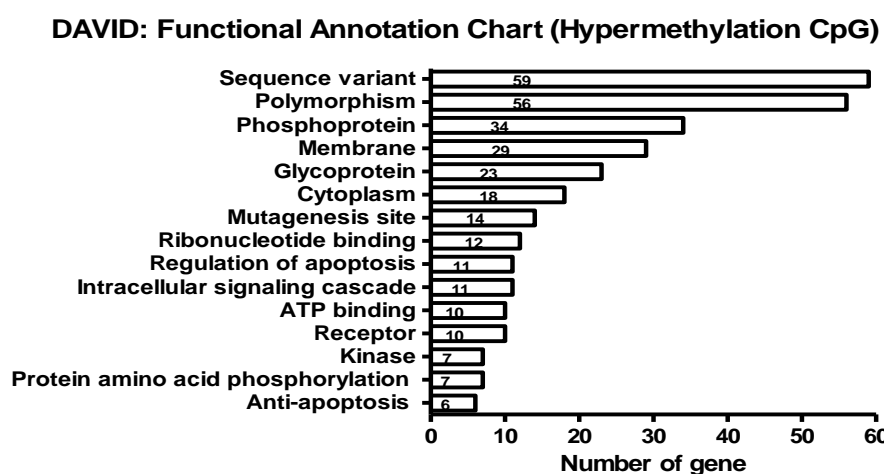


ภาพที่ 31 กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด

นอกจากนี้ทางงานวิจัยยังได้วิเคราะห์เพิ่มเติม เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างไฮเปอร์เมทิลเลชันและไฮโปเมทิลเลชันซีพีจี กับยีนและหน้าที่ของยีน ซึ่งงานวิจัยพบว่ายีนของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะทั้ง 197 ยีน สามารถแบ่งเป็นตาม ไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจีได้ 70 ยีน และ ไฮโปเมทิลเลชันซีพีจีได้ 128 ยีน โดยมี 1 ยีนที่มีเมทิลเลชันซีพีจีที่จำเพาะทั้งแบบไฮเปอร์เมทิลเลชันและไฮโปเมทิลเลชัน คือ ยีน CHRND มี cg11695684 ที่จำเพาะในกล้ามเนื้อแบบไฮโปเมทิลเลชัน และ cg23398241 ที่จำเพาะในอวัยวะแบบไฮเปอร์เมทิลเลชัน และทางงานวิจัยได้นำกลุ่มยีนที่แบ่งตามไฮเปอร์เมทิลเลชัน และไฮโปเมทิลเลชัน ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเดวิด ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 10 ถึง 11 และภาพที่ 32 ถึง 33

DAVID: Functional Annotation Chart	Number of gene	p-value
Sequence variant	59	0.0000048
Polymorphism	56	0.00004
Phosphoprotein	34	0.028
Membrane	29	0.058
Glycoprotein	23	0.028
Cytoplasm	18	0.054
Mutagenesis site	14	0.021
Ribonucleotide binding	12	0.052
Regulation of apoptosis	11	0.0015
Intracellular signaling cascade	11	0.032
ATP binding	10	0.072
Receptor	10	0.09
Kinase	7	0.03
Protein amino acid phosphorylation	7	0.057
Anti-apoptosis	6	0.0016

ตารางที่ 10 แสดงหน้าที่ของกลุ่มยีนจากไฮเปอร์เมทิลชันซีพีจีทีวีเคราะห์ด้วยโปรแกรมเดวิด

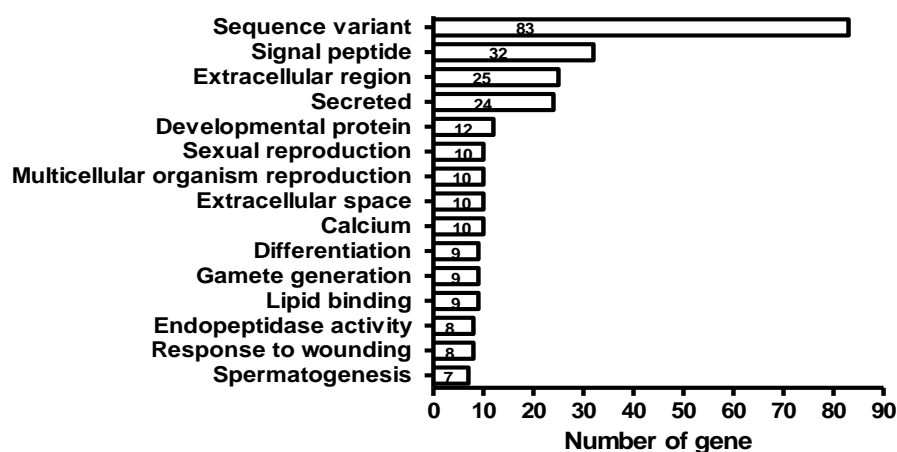


ภาพที่ 32 กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจีทีวีเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด

DAVID: Functional Annotation Chart	Number of gene	p-value
Sequence variant	83	0.096
Signal peptide	32	0.0082
Extracellular region	25	0.0011
Secreted	24	0.00028
Developmental protein	12	0.0095
Sexual reproduction	10	0.0068
Multicellular organism reproduction	10	0.0099
Extracellular space	10	0.029
Calcium	10	0.064
Differentiation	9	0.0082
Gamete generation	9	0.0089
Lipid binding	9	0.015
Endopeptidase activity	8	0.018
Response to wounding	8	0.097
Spermatogenesis	7	0.027

ตารางที่ 11 แสดงหน้าที่ของกลุ่มยีนจากไฮโปเมทิลชันซีพีจีทีวีเคราะห์ด้วยโปรแกรมเดวิด

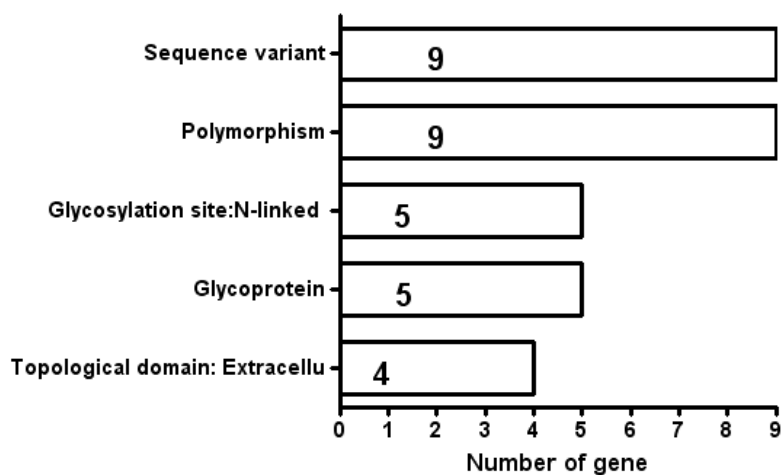
DAVID: Functional Annotation Chart (Hypomethylation CpG)



ภาพที่ 33 กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮโปเมทิลชันซีพีจีทีวีเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด

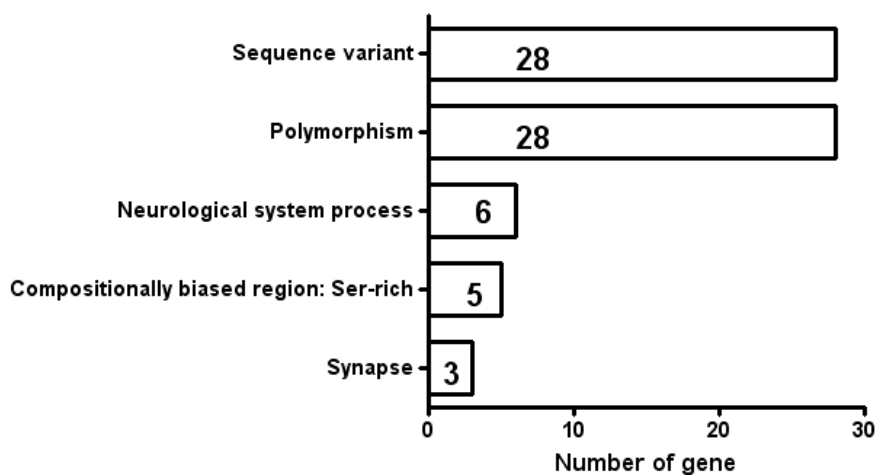
นอกจากนี้ทางงานวิจัยได้วิเคราะห์เพิ่มเติม โดยแยกตามอวัยวะที่มีซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะมากที่สุด 3 ชนิด ได้แก่ สมอง ตับ และอذنหะ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยซีควนโลโก้ ซึ่งให้ผลดังภาพที่ 34-39

DAVID: Functional Annotation Chart (Hypermethylation CpG: Brain)



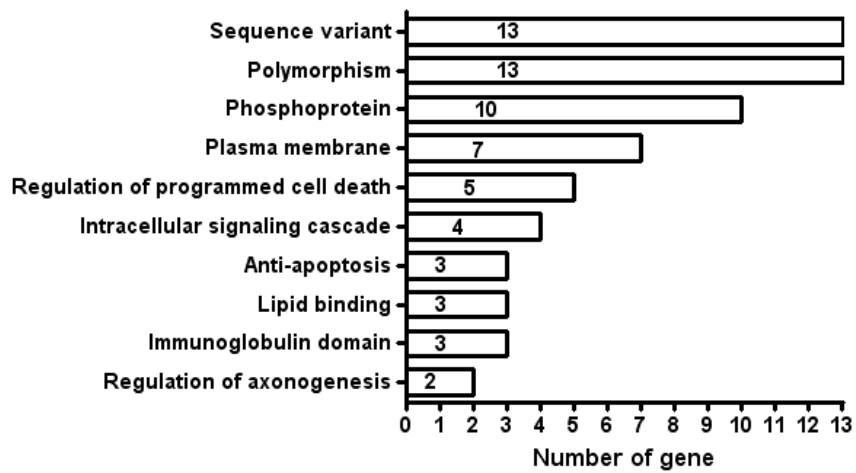
ภาพที่ 34 กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจี จากอวัยวะสมองที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด

DAVID: Functional Annotation Chart (Hypomethylation CpG: Brain)



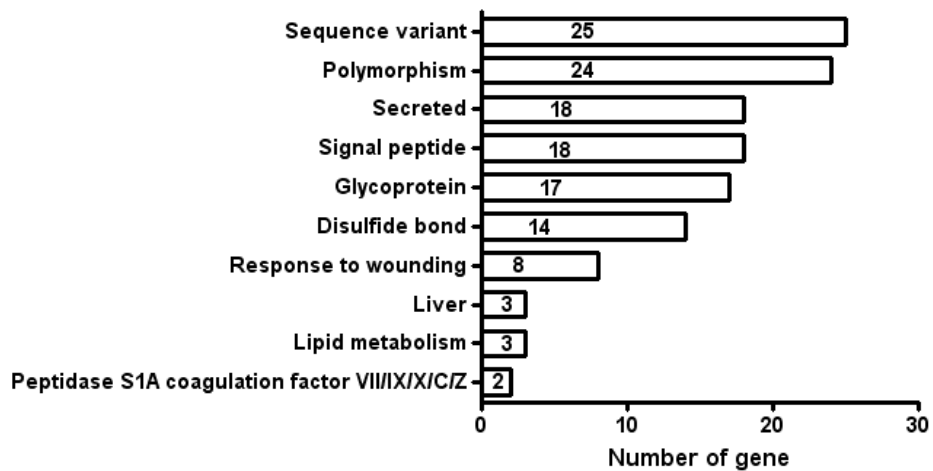
ภาพที่ 35 กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮโปเมทิลเลชันซีพีจี จากอวัยวะสมองที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด

DAVID: Functional Annotation Chart (Hypermethylation CpG: Liver)



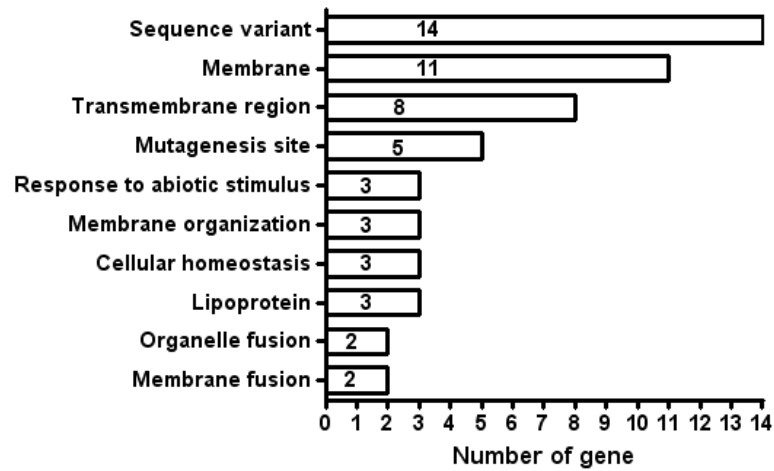
ภาพที่ 36 กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจี จากอวัยวะตับที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด

DAVID: Functional Annotation Chart (Hypomethylation CpG: Liver)



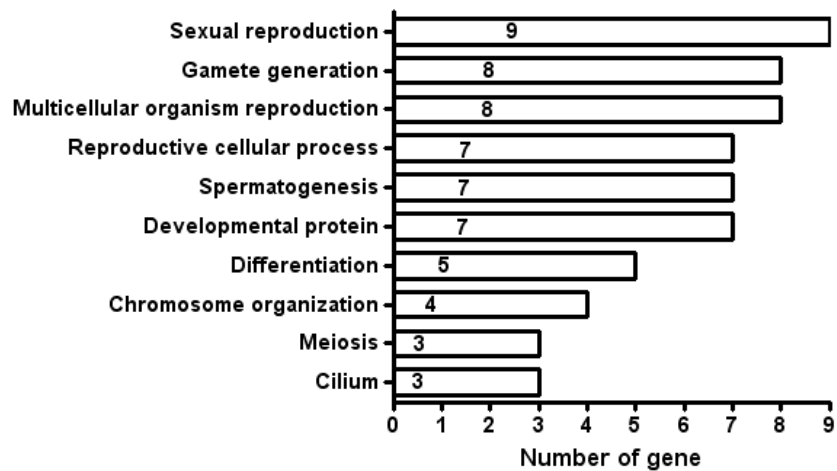
ภาพที่ 37 กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮโปเมทิลเลชันซีพีจี จากอวัยวะตับที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด

DAVID: Functional Annotation Chart (Hypermethylation CpG: Testis)



ภาพที่ 38 กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจี จากอวัยวะอัณฑะที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด

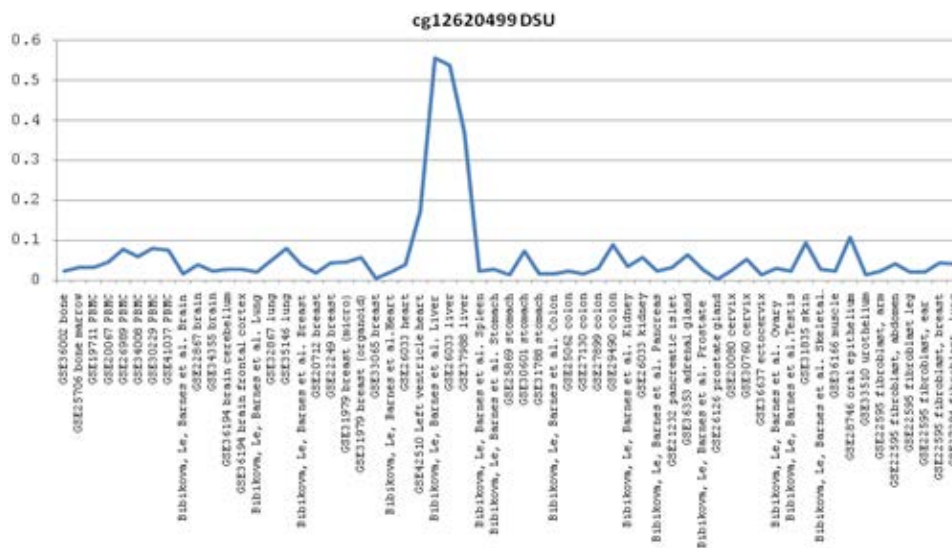
DAVID: Functional Annotation Chart (Hypomethylation CpG: Testis)



ภาพที่ 39 กราฟแสดงหน้าที่ส่วนใหญ่ของกลุ่มยีนจากไฮโปเมทิลเลชันซีพีจี จากอวัยวะอัณฑะที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมเดวิด

ซีพีจีเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะต่อบุคคล

ทางวิจัยได้เลือกดับ มาใช้ในการทดลองต้นแบบ เพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ จึงได้ทำการคัดเลือกซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อบุคคลได้พิจารณาจาก อันดับของกราฟที่มีความต่างของค่าเมทิลเลชันบนดับกับเนื้อเยื่ออื่นๆ มากเป็นอันดับต้นๆ ซึ่งในการทดลองนี้ได้เลือกซีพีจีของยีน *DSU* ณ ตำแหน่ง cg12620499 มาใช้ในการทดลอง โดยมีกราฟแสดงค่าเมทิลเลชัน และมีลำดับเบส ดังภาพที่ 40 และ 41 ตามลำดับ



ภาพที่ 40 กราฟค่าเมทิลเลชันของยีน *DSU* ที่ตำแหน่ง cg12620499

```
GTCCCCGCACCTGGACGCTGGCGCGGTGGCCGCGCCCCAGCCTCGATCGCTCGCCGCGGCGACTCGGCC
CCAGGCTTCCGGCGCCGGTGGGGGCCCTCGCTCTCCATGGGGCTGAGGGACTGGCTGAGAACC GTGTGC
TGCTGCTGCGGGTGCAGTGCTTGAGGAGCG [CG] CCCTGCCTGAGAAGGAGCCCCCTCGTCAGGTGGG
TGCGCCGCCCGGGCCGGGATCTGGGCTTACCTGGGCCGTAGCCGGGCGCCGAGAGT
```

ภาพที่ 41 ลำดับเบสบริเวณที่ติดกับกับ cg12620499

ผลการออกแบบไพรเมอร์

จากการคัดเลือกตำแหน่ง cg12620499 ของยีน *DSU* มาใช้ในการทดลอง ทางงานวิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งซีพีจีดังกล่าว โดยออกแบบเป็นไพรเมอร์ของเทคนิคเอ็มเอสพีซีอาร์ (Methylation Specific PCR, MS-PCR) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์สองคู่ ที่คู่หนึ่งจำเพาะกับลำดับเบสที่เป็นเมทิลเลชัน และอีกคู่จำเพาะกับลำดับเบสที่เป็นอโนเมทิลเลชัน

DSU: cg12620499

MET For primer 5'GGTGCGAGTGTGGAGGAGCGC3' 62.4 องศาเซลเซียส

MET Rev primer 5'CCGAACGACGCACCCACCTAACG3' 62.4 องศาเซลเซียส

พีซีอาร์โปรดักต์ 69 เบสแพร์ (Base pair)

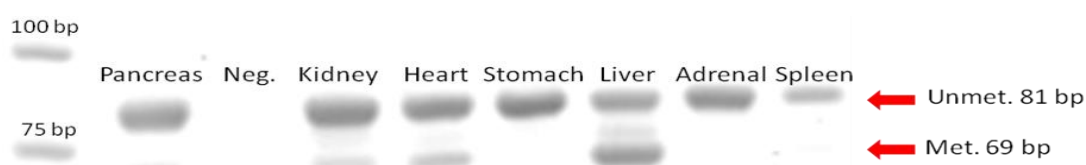
UNMET For primer 5'GTTGTGGGTGTGAGTGTGGAGGAGTGT3' 62.9 องศาเซลเซียส

UNMET Rev primer 5'CCCAACCCAAACAACACACCCACCTAACAA3' 62.9 องศาเซลเซียส

พีซีอาร์โปรดักต์ 81 เบสแพร์

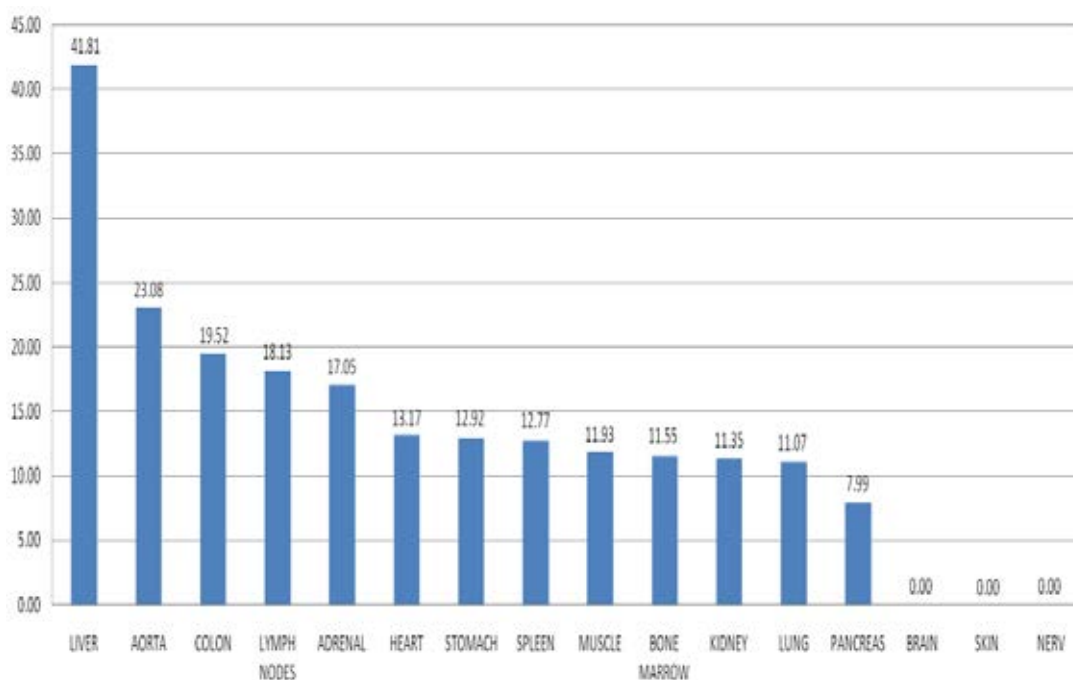
ผลการทดลองจากเทคนิคเอ็มเอสพีซีอาร์

จากผลการทดลอง เมื่อวัดค่าความเข้มของพีซีอาร์โปรดักต์ทั้งเมทิลเลชันและอันเมทิลเลชัน เพื่อดำเนินการหาค่าเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันในแต่ละอวัยวะจากกลุ่มประชากร พบว่าที่อวัยวะตับส่วนมากในกลุ่มประชากร มีค่าเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันที่สูงกว่าอวัยวะในกลุ่มอื่นๆ ดังตัวอย่างในภาพที่ 42



ภาพที่ 42 ผลการทดลองเอ็มเอสพีซีอาร์จากตัวอย่างพาราฟินบล็อกรายที่ 11

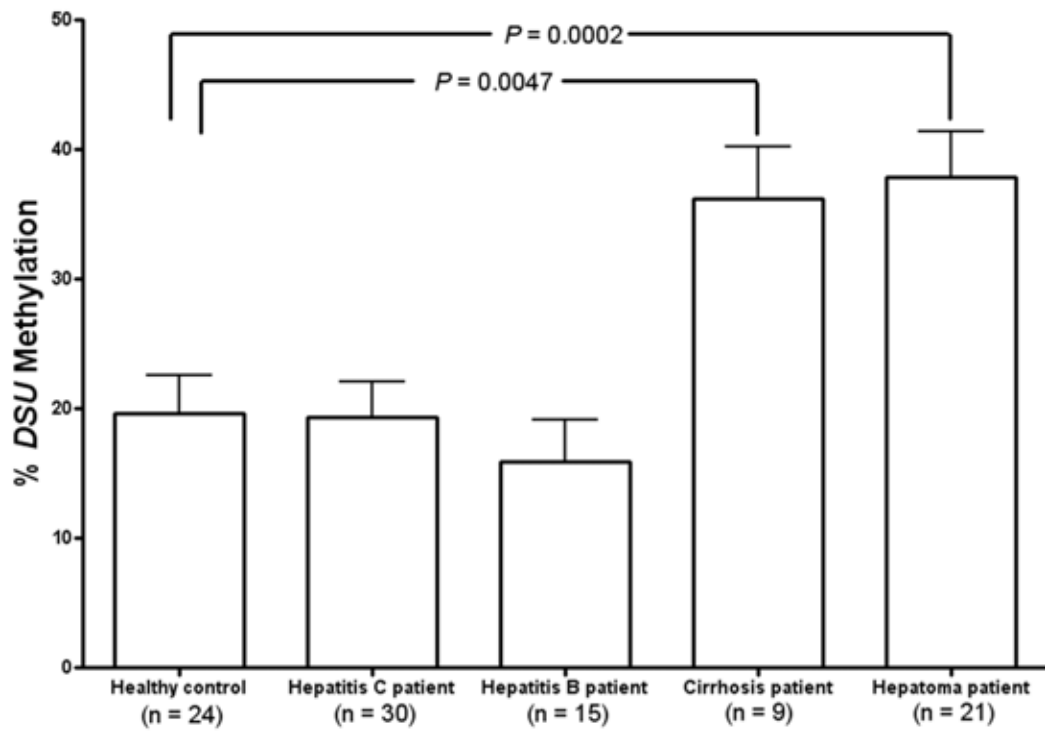
และจากนั้นได้ทางงานวิจัยทำการหาค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันในแต่ละกลุ่มอวัยวะ ซึ่งพบว่าที่กลุ่มอวัยวะตับมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันสูงกว่าอวัยวะอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด ดังภาพที่ 43



ภาพที่ 43 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันในแต่ละกลุ่มอวัยวะ

การประยุกต์ใช้ซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะในอวัยวะตับ

ทางงานวิจัยได้ทดลองความจำเพาะของซีพีจีเมทิลเลชันในตับ โดยการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอของตับในกระแสเลือด (Circulating liver DNA) ซึ่งสามารถพบได้ในผู้ป่วยที่มีภาวะการทำลายเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของตับ เช่น ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ (Hepatoma) หรือโรคตับแข็ง (Cirrhosis) ดังนั้นทางงานวิจัยจึงได้ทำการทดลองตรวจหาดีเอ็นเอของตับในกระแสเลือด โดยใช้เทคนิคซีพีจีเมทิลเลชันของ cg12620499 ของยีน *DSU* กับกลุ่มตัวอย่างที่เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้จากซีรัมจำนวน 99 ราย จากโรคที่มีการทำลายเนื้อเยื่อของตับ 4 โรค ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันของซีพีจี cg12620499 ของยีน *DSU* ในกลุ่มคนปกติมีค่าแตกต่างจากกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับและโรคตับแข็ง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P = 0.0002$ และ $P = 0.0047$ ตามลำดับ ดังภาพที่ 44



ภาพที่ 44 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันในซีรัมดีเอ็นเอแต่ละกลุ่ม

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ฐานข้อมูลซีพีจีเมทิลเลชัน

ทางงานวิจัยได้คัดเลือกและรวบรวมข้อมูลงานทดลองที่อยู่ในรูปแบบ GSE ใน GEO dataset ของเว็บไซต์ NCBI มาใช้ในการสร้างฐานข้อมูลซีพีจีเมทิลเลชันในอวัยวะต่างๆ โดยกำหนดให้คัดเลือกเฉพาะ GSE ที่ใช้ เมทิลเลชันไมโครแอเรย์ Illumina® HumanMethylation27 BeadChip Kit ในการวัดค่าเมทิลเลชันจากอวัยวะหรือเนื้อเยื่อปกติของมนุษย์ ซึ่งเหตุผลหลักที่ทางงานวิจัยได้คัดเลือกเมทิลเลชันไมโครแอเรย์ชนิดนี้ เนื่องจากจำนวนของ GSE ที่ใช้เมทิลเลชันไมโครแอเรย์ชนิดนี้มีจำนวนมากในฐานข้อมูลของ GEO dataset รวมถึงจำนวนของซีพีจีเมทิลเลชันไมโครแอเรย์ชนิดนี้สามารถตรวจวัดได้ (27,578 ตำแหน่ง) และจากงานผลการทดลองของ Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay [11] แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ Illumina® HumanMethylation27 BeadChip Kit สามารถตรวจแยกค่าเมทิลเลชันของอวัยวะชนิดต่างๆได้ ซึ่งในงานทดลองดังกล่าวได้เอื้อเพื่อข้อมูลของค่าเฉลี่ยดีเอ็นเอเมทิลเลชันจากอวัยวะปกติของมนุษย์ 14 ชนิด มาให้กับทางงานวิจัยอีกด้วย แต่ในปัจจุบันบริษัทอิลูมินาได้ยกเลิกการผลิตเมทิลเลชันไมโครแอเรย์ชนิดนี้แล้ว ทางงานวิจัยจึงได้ทำการรวบรวมข้อมูลของ GSE ที่ใช้เมทิลเลชันไมโครแอเรย์ชนิดนี้ จากเว็บไซต์ NCBI จนถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2555 เท่านั้น

จากการวิเคราะห์ฐานข้อมูลซีพีจีเมทิลเลชันของงานวิจัย โดยการสร้างกราฟแสดงค่าเมทิลเลชันของซีพีจีแต่ละตำแหน่งบนจีโนม ทั้ง 27,578 นั้น พบว่ารูปแบบของกราฟซีพีจีเมทิลเลชันสามารถจำแนกรูปแบบของกราฟได้ทั้งสิ้น 5 รูปแบบ ดังรูปที่ ซึ่งรูปแบบของกราฟที่งานวิจัยได้คัดเลือกมาเพื่อใช้ในการค้นหาซีพีจีที่จำเพาะในอวัยวะแต่ละชนิด คือ กราฟรูปแบบที่ 1 “ไฮเปอร์เมทิลเลชัน” และกราฟรูปแบบที่ 2 “ไฮโปเมทิลเลชัน” เพราะกราฟทั้งสองรูปแบบต่างก็มีค่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่สูงหรือต่ำอย่างเห็นได้ชัดในกลุ่มอวัยวะหนึ่งเมื่อเทียบกับอวัยวะอื่นๆ และจากผลการคัดเลือกซีพีจีที่จำเพาะในแต่ละกลุ่มอวัยวะ พบว่ามีซีพีจีที่จำเพาะต่ออวัยวะแต่ละชนิดจำนวน 222 ตำแหน่ง โดยแบ่งเป็น ไฮเปอร์เมทิลเลชันจำนวน 82 ตำแหน่ง และไฮโปเมทิลเลชันจำนวน 120 ตำแหน่ง ซึ่งอวัยวะที่มีซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะมากที่สุดฐานข้อมูลนี้ คือ ตับ (ไฮเปอร์เมทิลเลชัน 22 ตำแหน่ง ไฮโปเมทิลเลชัน 34 ตำแหน่ง) และ อัณฑะ (ไฮเปอร์เมทิลเลชัน 19 ตำแหน่ง ไฮโปเมทิลเลชัน 37 ตำแหน่ง) ทางงานวิจัยเชื่อว่าปัจจัยที่ทำให้อวัยวะทั้งสองชนิดมีซี

พีจีเอ็มทีลเลขชี้ที่จำเพาะเป็นจำนวนมากที่สุด อาจเพราะจำนวนข้อมูลงานทดลองที่ได้คัดเลือกมาสร้างฐานข้อมูล หรืออาจเพราะอวัยวะทั้งสองชนิดต่างก็มีหน้าที่จำเพาะและหลากหลาย

กราฟในรูปแบบที่ 4 และ 5 นั้น ต่างก็มีค่าเมทิลเลขชี้ไปในทิศทางเดียวกัน ในทุกอวัยวะ คือ มีค่าเมทิลเลขชี้ที่ต่ำหรือสูง ในทุกอวัยวะ จึงไม่สามารถนำซีพีจีเอ็มทีลเลขชี้ของกราฟดังกล่าวมาใช้ในการแยกอวัยวะต่างๆได้ ส่วนกราฟในรูปแบบที่ 3 มีค่าเมทิลเลขชี้ที่แตกต่างกันในทุกอวัยวะ ซีพีจีเอ็มทีลเลขชี้ของกราฟในรูปแบบนี้ จึงไม่สามารถนำมาใช้แยกชนิดของอวัยวะจากค่าเมทิลเลขชี้ได้เช่นกัน

ซีพีจีเอ็มทีลเลขชี้ที่จำเพาะต่อเนื้อเนื้อหรืออวัยวะ

จากผลการวิเคราะห์ตำแหน่งของซีพีจีเอ็มทีลเลขชี้ที่จำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ ทั้ง 222 ตำแหน่งบนจีโนม ทั้งตำแหน่งภายใน หรือภายนอกยีน, เอ็กซอน อินทรอน และ CGI พบว่าซีพีจีเอ็มทีลเลขชี้ที่จำเพาะส่วนมากมักอยู่ภายในยีน ตรงบริเวณที่เป็นเอ็กซอน ซึ่งมีการกระจายตัวอย่างเท่าๆ กัน ในบริเวณที่เป็น CGI และไม่ใช่ CGI และอยู่ในบริเวณที่ห่างจาก TSS ประมาณ 0-100 เบส ทั้งไฮเปอร์เมทิลชัน และไฮโปเมทิลชัน ผลการวิเคราะห์นี้สอดคล้องกับหลายๆ งานวิจัย ที่รายงานว่าซีพีจีเอ็มทีลเลขชี้ที่จำเพาะต่ออวัยวะมักพบในบริเวณที่อยู่ภายในยีน และกระจายตัวอย่างอิสระในบริเวณที่เป็น CGI และไม่ใช่ CGI [11, 46]

ผลการวิเคราะห์เพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของตำแหน่งซีพีจีเอ็มทีลเลขชี้ที่จำเพาะ กับบริเวณเอ็กซอน และอินทรอนโดยการสร้างกราฟ ดังภาพที่ 19 นั้น จะเห็นได้ว่าซีพีจีเอ็มทีลเลขชี้ที่จำเพาะส่วนมากจะอยู่ในบริเวณที่เป็นเอ็กซอนของยีน แม้ว่าเมื่อคำนวณทางสถิติด้วย t-test แล้วจำนวนของซีพีจีเอ็มทีลเลขชี้ที่จำเพาะที่อยู่ในเอ็กซอน จะไม่ได้มากกว่าอินทรอน อย่างมีนัยสำคัญก็ตาม ทางงานวิจัยจึงได้ศึกษาเพิ่มเติม โดยเพิ่มการแบ่งกลุ่มซีพีจีเอ็มทีลเลขชี้ที่จำเพาะ ตามรูปแบบของไฮเปอร์เมทิลชัน และไฮโปเมทิลชัน ดังตารางที่ 5 ซึ่งผลจากตารางแสดงให้เห็นถึงจำนวนซีพีจีเอ็มทีลเลขชี้ที่จำเพาะ ทั้งรูปแบบไฮเปอร์เมทิลชันและไฮโปเมทิลชัน จะอยู่ในบริเวณเอ็กซอนมากกว่าอินทรอน ทั้งนี้ทางงานวิจัยคาดว่าซีพีจีเอ็มทีลเลขชี้ที่จำเพาะในบริเวณเอ็กซอนของยีน อาจมีความเกี่ยวข้องกับการตัดยีนที่ต่างกันในแต่ละชนิด (Alternative splicing)

ในอนาคตหากมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ ซีพีจีเอ็มทีลเลขชี้ที่จำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ การศึกษาที่บริเวณลำดับเบสที่ 0-100 เบส นับจาก TSS จึงเป็นจุดน่าจะได้รับการศึกษาวเคราะห์ รวมถึงบริเวณที่เป็นที่เอ็กซอนของยีน

ชี้แจงความโลโก้ของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่ออวัยวะ

จากการสร้างชี้แจงความโลโก้ของซีพีจีเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะต่ออวัยวะชนิดต่างๆ ทั้ง 222 ตำแหน่ง พบว่าลำดับเบสที่อยู่ติดกับซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะส่วนมากในด้าน 3' จะเป็นเบสไซโตซีน กวานีน และไทมีน (Thymine) ตามลำดับ ทางงานวิจัยได้พยายามศึกษาวิเคราะห์ชี้แจงความโลโก้ของซีพีจีเมทิลเลชันที่เหลือที่ไม่ได้มีความจำเพาะต่ออวัยวะใดๆ อีก 27,356 ตำแหน่ง เพื่อเปรียบเทียบกับซีพีจีเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะทั้ง 222 ตำแหน่ง แต่ไม่สามารถกระทำได้ เนื่องจากข้อมูลลำดับเบสของซีพีจีเมทิลเลชันที่เหลือ มีขนาดใหญ่มากจึงไม่สามารถทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมชี้แจงความโลโก้ได้ ดังนั้นทางงานวิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์แยกตามรูปแบบไฮเปอร์เมทิลเลชัน และไฮโปเมทิลเลชัน และตามอวัยวะ สมอง ตับ และอวัยวะ ซึ่งได้ให้ผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกัน คือ ลำดับเบสส่วนมากที่ปลายด้าน 3' ที่อยู่ติดกับซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะ คือเบสไซโตซีน กวานีน และไทมีน

ยีนที่มีซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ

จากการคัดเลือกซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ ทางงานวิจัยพบว่าซีพีจีเมทิลเลชันทั้ง 222 ตำแหน่ง กระจายตัวอยู่ในยีน 197 ยีน เนื่องจากมียีนบางยีนที่มีซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะมากกว่า 1 ตำแหน่ง โดยยีนที่มีซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะมากที่สุดในฐานข้อมูล คือ ยีน *ESR1* ซึ่งมีซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่ออวัยวะดับมากถึง 4 ตำแหน่ง ในรูปแบบไฮเปอร์เมทิลเลชันทั้ง 4 ตำแหน่ง และเมื่อพิจารณาที่หน้าที่ของยีนทั้ง 197 ยีน พบว่ามียีน 50 ยีน ที่มีหน้าที่จำเพาะหรือตรงกับอวัยวะที่จำเพาะต่อเมทิลเลชันซีพีจีในยีนนั้น โดยแบ่งเป็น ไฮเปอร์เมทิลเลชัน 1 ยีน และไฮโปเมทิลเลชัน 49 ยีน ทางงานวิจัยตั้งสมมติฐานว่า ตำแหน่งของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะในยีนเหล่านั้น อาจมีความสัมพันธ์ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในอวัยวะต่างๆ

ต่อมาทางงานวิจัยได้นำยีนทั้ง 197 ยีน ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเดวิด เพื่อหาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนนี้ ในขั้นตอนการวิเคราะห์พบว่าจากยีน 197 ยีนสามารถวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเดวิดได้ 188 ยีน เนื่องจากยีนที่เหลืออีก 9 ยีน ไม่มีข้อมูลในฐานข้อมูลของโปรแกรมเดวิด ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่า กลุ่มยีนส่วนมากเป็นยีนที่มีลักษณะเป็นยีนที่มีลำดับเบสที่มีความหลากหลาย (Sequence variant) และเกี่ยวข้องกับรูปแบบหรือลักษณะต่างๆของเซลล์ (Polymorphism) ซึ่งหน้าที่และลักษณะดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการที่กลุ่มยีนเหล่านี้มีซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ

จากการวิเคราะห์เพิ่มเติม เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างไฮเปอร์เมทิลเลชัน และไฮโปเมทิลเลชันซีพีจี กับยีนและหน้าที่ของยีน ผลจากตารางที่ 10 ถึง 11 และภาพที่ 32 ถึง 33 จะพบว่าหน้าที่ส่วนใหญ่ของทั้งกลุ่มทั้งสองกลุ่มจะเกี่ยวข้องกับยีนที่มีลำดับเบสที่มีความหลากหลาย ในกลุ่มยีนจากไฮเปอร์เมทิลเลชันซีพีจีสามารถวิเคราะห์ได้ 67 ยีน จาก 70 ยีน ซึ่งหน้าที่ส่วนใหญ่ของยีนในกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับรูปแบบหรือลักษณะต่างๆ ของเซลล์ ขณะที่กลุ่มยีนจากไฮโปเมทิลเลชันซีพีจีสามารถวิเคราะห์ได้ 122 ยีน จาก 128 ยีน กลุ่มยีนนี้จะมีหน้าที่ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการทำงานร่วมกันของเซลล์ต่างๆ เช่น การส่งสัญญาณเพปไทด์ (Signal peptide), การทำงานบริเวณนอกเซลล์ (Extracellular region) และการหลั่ง (Secreted) รวมถึงกลไกของระบบสืบพันธุ์ จึงเป็นข้อสังเกตว่าตำแหน่งซีพีจีเมทิลเลชันของกลุ่มยีนอาจมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ หรือสร้างเซลล์สืบพันธุ์ นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์แยกตามชนิดของอวัยวะ ต่างก็ให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยกลุ่มยีนส่วนมากในรูปแบบไฮเปอร์เมทิลเลชันของอวัยวะทั้ง 3 ชนิด จะเกี่ยวข้องกับรูปแบบหรือลักษณะต่างๆ ของเซลล์ ขณะที่กลุ่มยีนในรูปแบบไฮโปเมทิลเลชัน จะเป็นกลุ่มยีนบางส่วนที่มีหน้าที่จำเพาะตามกลุ่มอวัยวะ เช่น ระบบประสาทในกลุ่มสมอง หรือการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในกลุ่มอวัยวะ

ซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อดับ

ในการศึกษาเพื่อพิสูจน์สมมติฐานและความแม่นยำของฐานข้อมูลซีพีจีเมทิลเลชันที่งานวิจัยได้รวบรวมขึ้นมานั้น ทางงานวิจัยได้เลือกใช้เทคนิคเอ็มเอสพีซีอาร์ในการทดลอง เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นเทคนิคพื้นฐานในการตรวจวัดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจากไบซัลไฟต์ดีเอ็นเอ ที่ใช้เวลาไม่มาก และสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ [7, 47] ซึ่งงานวิจัยได้ออกแบบจากการคัดเลือกซีพีจีเมทิลเลชันที่ตำแหน่ง cg12620499 ของยีน *DSU* มาใช้เพื่อออกแบบให้ไพรเมอร์ทั้งเมทิลเลชันและอันเมทิลเลชัน โดยออกแบบให้ที่ปลายด้าน 3' ของพรอวิเรตไพรเมอร์ทั้งสองตรงกับซีพีจีเมทิลเลชันดังกล่าว ในเมทิลเลชันไพรเมอร์ปลายด้าน 3' จะเป็นเบสไซโตซีน ส่วนอันเมทิลเลชันไพรเมอร์เป็นเบสไทมีน เพราะที่ตำแหน่งปลายด้าน 3' ของไพรเมอร์เป็นตำแหน่งที่สำคัญที่ไพรเมอร์ใช้จับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย เพื่อสร้างสายต่อ หากตำแหน่งนี้ไม่จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายจะไม่สามารถสร้างสายต่อได้ [45] ในส่วนอื่นๆ นั้นงานวิจัยได้ออกแบบให้ไพรเมอร์ทั้งสองแบบมีอุณหภูมิเข้าจับที่เท่าๆ กัน เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแย่งจับไป

ซัลไฟด์ดีเอ็นเอในกระบวนกรเอ็มเอสพีซีอาร์ แต่มีขนาดพีซีอาร์โปรดักส์ที่ต่างกัน เพื่อใช้ในการอ่านผล

จากผลการทดลองในการตรวจหาเนื้อเยื่อตับของน้ัน พบว่าผลการทดลองของเทคนิคเอ็มเอสพีซีอาร์ให้ผลสอดคล้องกับสมมติฐานของงานวิจัย เพราะสิ่งตัวอย่างที่เป็นอวัยวะส่วนมากให้ค่าเมทิลเลชันสูงกว่าอวัยวะอื่นในกลุ่มประชากร โดยเฉพาะค่าเฉลี่ยของอวัยวะนั้นให้ค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยสูงกว่าอวัยวะอื่นๆ อย่างชัดเจน แม้ว่าอวัยวะในตัวอย่างบางรายจะไม่มีค่าเมทิลเลชันที่สูงที่สุดในกลุ่มอวัยวะจากตัวอย่างรายเดียวกัน ทั้งนี้ทางงานวิจัยคาดว่าน่าจะเกิดจากความคาดเคลื่อนจากเอ็มเอสพีซีอาร์ หรือการเสื่อมสภาพของสิ่งตัวอย่าง เพราะในบางสิ่งตัวอย่างนั้น เมื่อผ่านกระบวนการเอ็มเอสพีซีอาร์แล้ว ไม่มีพีซีอาร์โปรดักส์เกิดขึ้นเลย ทั้งเมทิลเลชันและอันเมทิลเลชัน แม้ว่าทางงานวิจัยจะทำการตรวจสอบและคัดกรองคุณภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของยีนเบต้าแอสตินแล้วก็ตาม ทั้งนี้ทางงานวิจัยคาดว่าในบางสิ่งตัวอย่างอาจเกิดแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA break) ตรงบริเวณซีพีจีตำแหน่ง cg12620499 ของยีน *DSU* จึงส่งผลให้ตัวอย่างดีเอ็นเอดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งนี้ได้ นอกเหนือจากนี้ในตัวอย่างบางรายที่ค่าเมทิลเลชันในอวัยวะอื่นสูงกว่าอวัยวะนั้น ทางงานวิจัยคาดว่าอาจเกิดจากการปนเปื้อน (Contamination) ระหว่างการทดลอง จึงทำให้ค่าเมทิลเลชันที่วัดได้เกิดความคลาดเคลื่อน

การประยุกต์ใช้ซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อดับ

ผลการทดลองการตรวจหาดีเอ็นเอของตับในกระแผลเลือด โดยใช้ซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อดับที่งานวิจัยได้ออกแบบไว้ นั้น พบว่าซีพีจีเมทิลเลชันที่ตำแหน่ง cg12620499 ของยีน *DSU* สามารถตรวจแยกกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ และโรคตับแข็ง ออกจากกลุ่มคนปกติได้ โดยมีค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.0002$ และ $P = 0.0047$ ตามลำดับ) แต่ในกลุ่มผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบี และไวรัสตับอักเสบบี มีค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกับกลุ่มคนปกติ ทั้งนี้ทางงานวิจัยพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองโรคอยู่ในระยะของโรคที่ไม่เท่ากัน ในบางระยะของโรคอาจไม่พบการทำลายของเนื้อเยื่อตับ ทำให้ดีเอ็นเอของตับไม่ได้หลุดลอยเข้าสู่กระแสเลือด จึงทำส่งผลให้ไม่สามารถตรวจพบซีพีจีเมทิลเลชันของตับในกลุ่มตัวอย่างเหล่านั้น รวมถึงอาจมีสาเหตุมาจากการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอตัวอย่าง หรือการปนเปื้อนในระหว่างการทดลอง

จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการตรวจหาสารพันธุกรรมของ อวัยวะดับในกระแสเลือดของ ซีพีจีเมทิลเลชันที่ตำแหน่ง cg12620499 ของยีน *DSU* ซึ่ง ความจำเพาะนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาหรือคัดแยกโรคที่มีสภาวะการทำลาย เนื้อเยื่อหรือเซลล์ของอวัยวะดับได้

อภิปรายผลการวิจัย

เทคนิคการตรวจแยกชนิดของเนื้อเยื่อ โดยอาศัยหลักการดีเอ็นเอเมทิลเลชันนั้น เป็นเทคนิคหนึ่งที่ได้รับการพัฒนา และมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องในหลายๆงานวิจัย [5, 6, 9, 11, 23, 28, 46] แม้ว่าในปัจจุบันกลไกของดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ควบคุมการถอดรหัสของยีนยังไม่เป็นที่ ทราบแน่ชัดก็ตาม [46, 48] ในบางงานวิจัยได้แสดงผลการทดลอง หรือการวิเคราะห์ผลเกี่ยวกับ ตำแหน่งหรือบริเวณที่อยู่ของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะในอวัยวะต่างๆ เช่น ระยะห่างระหว่างซีพีจี กับ TSS เอ็กซอน อินทรอน หรือ CGI ซึ่งผลการผลการวิเคราะห์ตำแหน่งของซีพีจีเมทิลเลชันที่ จำเพาะต่ออวัยวะ จากงานวิจัยนี้ ให้ผลสอดคล้องกับ งานทดลองหรืองานวิจัยก่อนที่รายงาน ว่า ซี พีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะ ส่วนมากจะอยู่ในบริเวณยีน และมีการกระจายตัวอย่างเท่าๆกัน ใน บริเวณที่เป็น CGI และ ไม่ใช่ CGI [11, 46]

ในส่วนของผลการทดลองเพื่อพิสูจน์ซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อดับของซีพีจีที่ ตำแหน่ง cg12620499 ของยีน *DSU* นั้น จากค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากร แสดงให้เห็นถึงค่าเมทิล เลชันของกลุ่มอวัยวะดับที่มากกว่าอวัยวะกลุ่มอื่นๆอย่างเด่นชัด แม้ว่าค่าเมทิลเลชันของอวัยวะดับ จากตัวอย่างบางรายจะไม่ได้สูงที่สุด ซึ่งทางงานวิจัยคาดว่าอาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนในการ ทดลอง และจากการประยุกต์ใช้ซีพีจีเมทิลเลชันในการตรวจหาดีเอ็นเอของดับในกระแสเลือดนั้น พบว่าสามารถตรวจแยกผู้ป่วยโรคมะเร็งตับและผู้ป่วยโรคตับแข็ง จากกลุ่มคนปกติได้ ซึ่งค่าเมทิล เลชันที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นหลักการจึงสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการ ตรวจคัดกรองหรือติดตามโรคหรือสภาวะที่มีการทำลายของเนื้อเยื่อตับได้

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่น่าเสนอข้อมูลและเทคนิคการตรวจวัดดีเอ็นเอเมทิล เลชัน เพื่อใช้ในการตรวจหาชนิดของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ ในการรวบรวมข้อมูลเพื่อสร้าง

ฐานข้อมูลดีเอ็นเอเมทิลเลชันนั้น หากสามารถเพิ่มข้อมูลงานทดลองหรือ GSE เกี่ยวกับค่าเมทิลเลชันในอวัยวะต่างๆ ที่ใช้เมทิลเลชันไมโครแอเรย์ Illumina® HumanMethylation27 BeadChip Kit ได้ ย่อมจะเพิ่มความแม่นยำและความครอบคลุมของฐานข้อมูลนี้ได้ ซึ่งทางงานวิจัยคาดหวังว่า ในอนาคตข้อมูลงานทดลอง หรือ GSE ที่ใช้เมทิลเลชันไมโครแอเรย์ชนิดนี้จะมีจำนวนมากขึ้น เพื่อให้งานวิจัยสามารถรวบรวมข้อมูลได้มากยิ่งขึ้น

นอกเหนือจากนี้ จากผลการทดลองความจำเพาะของซีพีจีเมทิลเลชันที่ตำแหน่ง cg12620499 ของยีน *DSU* ต่อตัวอย่างดีเอ็นเอจากพาราฟินบล็อกนั้น ที่ในบางสิ่งตัวอย่างเกิดการเสื่อมสภาพในบริเวณซีพีจีตำแหน่งดังกล่าว ทางงานวิจัยได้ตั้งข้อสรุปว่าในการตรวจหาหรือยืนยันชนิดของเนื้อเยื่อจากสิ่งตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของดีเอ็นเอเมทิลเลชันนั้น ควรใช้ซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะมากกว่าหนึ่งตำแหน่ง เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการตรวจวัด และป้องกันความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอในบริเวณซีพีจีที่จำเพาะ ตลอดจนสภาวะต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อบริเวณซีพีจีที่จำเพาะ

รายการอ้างอิง

- [1]. Phutikanit, N., et al., *Different DNA methylation patterns detected by the Amplified Methylation Polymorphism Polymerase Chain Reaction (AMP PCR) technique among various cell types of bulls.* Acta Vet Scand. 52,(2010):18.
- [2]. Reik, W., F. Santos, and W. Dean, *Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy.* Theriogenology. 59,1(2003):21-32.
- [3]. Ehrlich, M., et al., *Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells.* Nucleic Acids Res. 10,8(1982):2709-21.
- [4]. Rougier, N., et al., *Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development.* Genes Dev. 12,14(1998):2108-13.
- [5]. Shiota, K., et al., *Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice.* Genes Cells. 7,9(2002):961-9.
- [6]. Song, F., et al., *Tissue specific differentially methylated regions (TDMR): Changes in DNA methylation during development.* Genomics. 93,2(2009):130-9.
- [7]. Sulewska, A., et al., *Detection of DNA methylation in eucaryotic cells.* Folia Histochem Cytobiol. 45,4(2007):315-24.
- [8]. Brena, R.M., T.H. Huang, and C. Plass, *Quantitative assessment of DNA methylation: Potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical settings.* J Mol Med (Berl). 84,5(2006):365-77.
- [9]. Frumkin, D., et al., *DNA methylation-based forensic tissue identification.* Forensic Sci Int Genet. 5,5(2011):517-24.
- [10]. Zhu, Y., et al., *GEOMETADB: powerful alternative search engine for the Gene Expression Omnibus.* Bioinformatics. 24,23(2008):2798-800.
- [11]. Bibikova, M., et al., *Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium(R) assay.* Epigenomics. 1,1(2009):177-200.
- [12]. Wang, D., et al., *IMA: an R package for high-throughput analysis of Illumina's 450K Infinium methylation data.* Bioinformatics. 28,5(2012):729-30.

- [13]. Virkler, K. and I.K. Lednev, *Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene*. Forensic Sci Int. 188,1-3(2009):1-17.
- [14]. Zubakov, D., et al., *MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation*. Int J Legal Med. 124,3(2010):217-26.
- [15]. Juusola, J. and J. Ballantyne, *mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR*. J Forensic Sci. 52,6(2007):1252-62.
- [16]. Zubakov, D., et al., *Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples*. Int J Legal Med. 122,2(2008):135-42.
- [17]. Fleming, R.I. and S. Harbison, *The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids*. Forensic Sci Int Genet. 4,4(2010):244-56.
- [18]. Juusola, J. and J. Ballantyne, *Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification*. Forensic Sci Int. 135,2(2003):85-96.
- [19]. Haas, C., et al., *mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR*. Forensic Sci Int Genet. 3,2(2009):80-8.
- [20]. Zilberman, D. and S. Henikoff, *Genome-wide analysis of DNA methylation patterns*. Development. 134,22(2007):3959-65.
- [21]. De Bustos, C., et al., *Tissue-specific variation in DNA methylation levels along human chromosome 1*. Epigenetics Chromatin. 2,1(2009):7.
- [22]. Adorjan, P., et al., *Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis*. Nucleic Acids Res. 30,5(2002):e21.
- [23]. Bibikova, M., et al., *High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays*. Genome Res. 16,3(2006):383-93.
- [24]. Clark, S.J., et al., *High sensitivity mapping of methylated cytosines*. Nucleic Acids Res. 22,15(1994):2990-7.

- [25]. Colella, S., et al., *Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites*. Biotechniques. 35,1(2003):146-50.
- [26]. Dupont, J.M., et al., *De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology*. Anal Biochem. 333,1(2004):119-27.
- [27]. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A. 89,5(1992):1827-31.
- [28]. Gitan, R.S., et al., *Methylation-specific oligonucleotide microarray: a new potential for high-throughput methylation analysis*. Genome Res. 12,1(2002):158-64.
- [29]. Aporn Dewan, C.a.A.M., *Connection up- and down-regulation expression analysis of microarrays (CU-DREAM): a physiogenomic discovery tool*. Asian Biomedicine. 5,No.2(2011):257-262.
- [30]. Smalheiser, N.R., *Informatics and hypothesis-driven research*. EMBO Rep. 3,8(2002):702.
- [31]. Breitling, L.P., et al., *Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication*. Am J Hum Genet. 88,4(2011):450-7.
- [32]. Cotton, A.M., et al., *Chromosome-wide DNA methylation analysis predicts human tissue-specific X inactivation*. Hum Genet. 130,2(2011):187-201.
- [33]. Sabbah, C., et al., *SMETHILLIUM: spatial normalization method for Illumina Infinium HumanMethylation BeadChip*. Bioinformatics. 27,12(2011):1693-5.
- [34]. Hennessey, P.T., et al., *Promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines is significantly different than methylation in primary tumors and xenografts*. PLoS One. 6,5(2011):e20584.
- [35]. Zhu, H., et al., *A genome-wide methylation study of severe vitamin D deficiency in African American adolescents*. J Pediatr. 162,5(2013):1004-9 e1.
- [36]. Poage, G.M., et al., *Global hypomethylation identifies Loci targeted for hypermethylation in head and neck cancer*. Clin Cancer Res. 17,11(2011):3579-89.

- [37]. Barrett, T., et al., *NCBI GEO: mining millions of expression profiles--database and tools*. Nucleic Acids Res. 33,Database issue(2005):D562-6.
- [38]. Edgar, R. and T. Barrett, *NCBI GEO standards and services for microarray data*. Nat Biotechnol. 24,12(2006):1471-2.
- [39]. Barrett, T., et al., *NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles--database and tools update*. Nucleic Acids Res. 35,Database issue(2007):D760-5.
- [40]. Barrett, T., et al., *NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data*. Nucleic Acids Res. 37,Database issue(2009):D885-90.
- [41]. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc. 4,1(2009):44-57.
- [42]. Schneider, T.D. and R.M. Stephens, *Sequence logos: a new way to display consensus sequences*. Nucleic Acids Res. 18,20(1990):6097-100.
- [43]. Flower, K., et al., *Epigenetic control of viral life-cycle by a DNA-methylation dependent transcription factor*. PLoS One. 6,10(2011):e25922.
- [44]. Byun, H.M., et al., *Epigenetic profiling of somatic tissues from human autopsy specimens identifies tissue- and individual-specific DNA methylation patterns*. Hum Mol Genet. 18,24(2009):4808-17.
- [45]. Herman, J.G., *Circulating methylated DNA*. Ann N Y Acad Sci. 1022,(2004):33-9.
- [46]. Wan, J., et al., *Integrative analysis of tissue-specific methylation and alternative splicing identifies conserved transcription factor binding motifs*. Nucleic Acids Res.(2013).
- [47]. How Kit, A., H.M. Nielsen, and J. Tost, *DNA methylation based biomarkers: practical considerations and applications*. Biochimie. 94,11(2012):2314-37.
- [48]. Yagi, S., et al., *DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression*. Genome Res. 18,12(2008):1969-78.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. Phenol-chloroform-isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25:24:1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร)

Phenol	25	ส่วน
Chloroform	24	ส่วน
Isoamyl	1	ส่วน

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Ethanol (95%, 90%, 70%)

Absolute ethanol	950, 900, 700	ml
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000	ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. 0.5M EDTA: Disodium ethylenediamine tetraacetate.2H₂O (pH 8.0)

EDTA	186.6	g
------	-------	---

ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000	ml
---------------------------	-------	----

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 psi นาน 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4. Lysis Buffer II

5M NaCl	15	ml
0.5M EDTA (pH 8.0)	48	ml

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 psi นาน 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. 10% SDS

$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ 10 g

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

6. Proteinase K (20m/ml)

Proteinase K 10 g

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. 10M Ammonium acetate ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)

$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 77 g

น้ำกลั่น 80 ml

ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 psi นาน 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8. 10X Tris borate buffer (10XTBE)

Tris-base 100 g

Boric acid 55 g

0.5M EDTA (pH 8.0) 40 ml

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. 10% APS (Ammonium persulfate, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 1 g

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. 1M Tris (pH 8.0)

Tris-base 12.11 g

ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย HCl

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 psi นาน 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

11. 6X loading dye

Bromphenol blue 0.25 g

Xylene cyanol 0.25 g

Glycerol 50 ml

1M Tris (pH 8.0) 1 ml

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข

ข้อมูลของงานทดลองที่ในการสร้างฐานข้อมูล

รายชื่อ GSE ที่นำมาในการสร้างฐานข้อมูล

Series	Title
GSE19711	Genome wide DNA methylation profiling of United Kingdom Ovarian Cancer Population Study (UKOPS)
GSE20067	Genome wide DNA methylation profiling of diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus
GSE20080	Epigenome analysis of normal and preinvasive cervical smear samples
GSE20712	Epigenetic portraits of human breast cancers (methylation data)
GSE21232	DNA methylation profiling of male human pancreatic islets identifies loci for type 2 diabetes
GSE22249	Epigenetic portraits of human breast cancers (methylation data 2)
GSE22595	Methylation Pattern of Human Dermal Fibroblasts
GSE22867	DNA Methylation Profiling of Glioblastoma: Impact on Gene Expression and Clinical Outcome (Illumina)
GSE25062	Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer
GSE25706	Epigenome analysis of patients with various myeloid malignancies including differential levels of 5-hydroxymethylcytosine
GSE25869	DNA methylation represents one of the key regulator that transcriptional control of highly expressed genes in gastric cancer.

GSE26033	A Genome-wide Study of DNA Methylation Patterns and Gene Expression Levels in Multiple Human and Chimpanzee Tissues
GSE26126	DNA methylation profiling reveals novel biomarkers and important roles for DNA methyltransferases in prostate cancer
GSE26989	DNA methylation analysis of ovarian cancers and normal peripheral blood lymphocyte DNA by Illumina Infinium platform
GSE27130	Anti-cancer drug sensitive DNA methylation marker research
GSE27284	Prognostic Gene Expression Signature of Carcinoma Associated Fibroblasts in Non-Small Cell Lung Cancer [methylation profiling]
GSE27899	Methylation profiling in Ulcerative colitis
GSE28746	Epigenome analysis of male identical twin pairs discordant for sexual orientation, age 21 to 55.
GSE29490	A Genome-wide DNA Methylation Study in Colorectal Carcinoma
GSE30229	Peripheral blood DNA methylation profiles are predictive of head and neck squamous cell carcinoma
GSE30601	Epigenetic analysis of gastric cancer
GSE30760	Cervical cancer
GSE31788	Aberrant DNA methylation epigenotype expanding to non-polycomb target genes, induced by Epstein-Barr virus infection in human gastric cancer [Illumina Methylation]
GSE31835	Global methylation analysis of psoriatic (involved and uninvolved) and control skin

GSE31979	Genome-wide methylation analysis detects genes specific to breast cancer hormone receptor status and risk of recurrence
GSE32867	DNA methylation and gene expression in lung adenocarcinoma
GSE33065	Genome-wide DNA methylation profiling of CpG islands in breast cancer
GSE33510	DNA methylation analyses of urothelial carcinoma reveal distinct epigenetic subtypes and an association between gene copy number and methylation status
GSE34008	Epigenome analysis of genomic DNA isolated from whole blood of non-diabetic control and type-2 diabetic individuals
GSE34355	Clonal Selection Drives Genetic Divergence of Metastatic Medulloblastoma [Illumina Infinium HumanMethylation27 Beadchip v1.2]
GSE35146	Epigenome analysis of normal and IPF lung tissue samples
GSE36002	Integrative analysis reveals relationships of genetic and epigenetic alterations in osteosarcoma [methylation]
GSE36166	Epigenetic analysis of healthy young men following a control and high-fat overfeeding diet
GSE36194	North American Brain Expression Consortium: DNA Methylation
GSE36353	Genome wide DNA Methylation analysis of benign and malignant adrenocortical tumors
GSE36637	Aberrant promoter methylation and expression of UTF1 during cervix carcinogenesis
GSE37988	Methylation in Taiwanese HCC tumor and adjacent tissues
GSE41037	Aging effects on DNA methylation modules in blood tissue

GSE42510 Alterations in cardiac DNA methylation in human dilated cardiomyopathy

รายชื่อซีพีจีเมทิลเลชั่นที่จำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ และยีน ส่วนที่ 1

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene		CGI
adrenal	methylation	CTSZ	cg01663968	intra	intron	TRUE
			cg13021192	intra	exon	TRUE
		TNFRSF10C	cg27090216	intra	exon	TRUE
	unmethylation	MYO9B	cg01103836	intra	exon	TRUE
		AGRP	cg04176254	intra	exon	FALSE
		CYP11A1	cg17790333	intra	intron	FALSE
		FAIM2	cg25936385	inter	intron	FALSE
		ELA1	cg27114026	intra	intron	FALSE
	brain	methylation	SLC5A5	cg01655355	intra	intron
EML2			cg03096975	intra	exon	TRUE
			cg20427879	intra	intron	TRUE
SP100			cg05091653	intra	exon	FALSE
CSMD2			cg05382123	inter	exon	TRUE
CASP4			cg08469834	intra	intron	FALSE
DHRS4L2			cg10677787	intra	intron	TRUE
TUBA6			cg12073537	intra	exon	TRUE
GPR30			cg16127845	intra	intron	TRUE
IER3			cg17067528	intra	intron	TRUE
IL10RB			cg17506742	intra	intron	TRUE
TRIM38			cg21844956	intra	exon	FALSE
unmethylation		NPFF	cg01657380	intra	exon	FALSE
		STMN4	cg02130905	intra	intron	FALSE
		NLGN2	cg03169180	intra	intron	FALSE
		BLK	cg03860768	intra	exon	FALSE
		GPR148	cg04037952	intra	exon	FALSE
		FAT2	cg04443324	intra	exon	FALSE
		RIT2	cg04711324	intra	exon	TRUE

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene		CGI
brain	unmethylation	40148	cg04761824	intra	intron	FALSE
		KIAA0802	cg05104081	intra	intron	FALSE
		FABP7	cg05798712	intra	exon	FALSE
		C16orf45	cg07977490	intra	intron	TRUE
		FLJ37538	cg08626653	intra	intron	FALSE
		SLC35A4	cg08948050	inter	exon	FALSE
		DLGAP4	cg09276978	intra	exon	FALSE
		MYT1	cg10071275	intra	exon	TRUE
			cg16772207	intra	intron	TRUE
		ZNF574	cg11719283	intra	exon	FALSE
		ABHD7	cg15156367	intra	intron	TRUE
		C10orf11	cg17238009	intra	exon	TRUE
		ELAVL4	cg18242139	intra	exon	FALSE
		MAPK4	cg18450227	intra	exon	TRUE
		TCF20	cg20051177	intra	intron	FALSE
		MGC27121	cg20189782	intra	intron	FALSE
			cg26790059	intra	exon	FALSE
		GARNL3	cg20864636	intra	intron	FALSE
		ANK3	cg22150335	intra	intron	FALSE
		AKAP6	cg24812523	intra	intron	FALSE
		C3orf40	cg25552889	intra	exon	FALSE
		MGC2747	cg25903122	intra	intron	FALSE
		GRM4	cg26424956	intra	exon	FALSE
ACD	cg26698580	inter	exon	TRUE		
cervix	unmethylation	PADI1	cg17502536	inter	intron	FALSE
		KRTHA2	cg23674788	intra	exon	FALSE
heart	unmethylation	MYBPC3	cg10335931	intra	intron	FALSE
		C3orf45	cg17272094	intra	intron	FALSE

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene		CGI
kidney	methylation	SPAG5	cg08062469	intra	exon	TRUE
		OXR1	cg16326979	intra	exon	TRUE
	unmethylation	CDH16	cg14221831	intra	exon	FALSE
		B3GALT7	cg19201019	intra	intron	FALSE
		PAQR5	cg20082641	inter	exon	TRUE
liver	methylation	ESR1	cg00655307	intra	exon	TRUE
			cg02720618	intra	intron	TRUE
			cg11251858	intra	exon	TRUE
			cg20253551	intra	exon	TRUE
		DSU	cg02668581	intra	exon	TRUE
			cg12620499	intra	exon	TRUE
		IGF2AS	cg04112019	intra	intron	TRUE
			cg10501065	intra	intron	TRUE
			cg16817891	intra	intron	TRUE
		TIAM1	cg04807655	intra	intron	TRUE
			cg15853125	intra	exon	TRUE
		LIMK1	cg05163588	intra	intron	TRUE
		GSTP1	cg09038676	intra	exon	TRUE
		SCYL1	cg10628098	intra	intron	TRUE
		NQO1	cg10708675	intra	exon	FALSE
		GPAM	cg12137206	intra	intron	TRUE
		AMIGO2	cg13640200	intra	intron	TRUE
		PARD6A	cg15426734	intra	intron	TRUE
		LRFN4	cg20358834	intra	exon	TRUE
		PTK7	cg21663580	intra	intron	TRUE
		RASSF5	cg23520347	intra	exon	TRUE
		PACS1	cg25034557	intra	intron	TRUE
		unmethylation	C14orf68	cg00239071	intra	exon

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene		CGI
liver	unmethylation	LOC55908	cg00881370	intra	exon	FALSE
			cg05718253	inter	exon	FALSE
		INHBC	cg03399971	intra	exon	FALSE
		DAK	cg03483654	intra	exon	FALSE
		ANGPTL7	cg04508649	intra	intron	FALSE
		SLC10A1	cg05633152	intra	exon	FALSE
		CCL16	cg05766474	intra	intron	FALSE
		SERPINA10	cg05788638	intra	exon	FALSE
		LOC284912	cg05976325	intra	intron	FALSE
		UROC1	cg06765947	intra	intron	FALSE
		HGFAC	cg07364841	intra	intron	FALSE
		THPO	cg09736922	intra	intron	FALSE
		PROZ	cg09878269	intra	intron	FALSE
		F9	cg10339201	intra	exon	FALSE
		ITIH1	cg10356463	intra	intron	FALSE
		CYP2D6	cg10840135	intra	exon	FALSE
		CYP2D7P1	cg11221132	intra	exon	FALSE
			cg19622372	intra	intron	FALSE
		CA5A	cg11667117	intra	exon	TRUE
			cg12343082	intra	intron	FALSE
		MASP2	cg12888113	intra	exon	TRUE
		NDST1	cg15467759	intra	intron	FALSE
		AGXT2	cg16297030	intra	exon	FALSE
		AGXT	cg16358738	intra	exon	FALSE
		PGLYRP2	cg17915429	intra	intron	FALSE
		AKR1D1	cg20647137	intra	exon	FALSE
		HPR	cg20672044	intra	intron	FALSE
		APOC3	cg20691580	intra	intron	FALSE

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene		CGI
liver	unmethylation	OKL38	cg22309489	intra	exon	FALSE
		SERPINF2	cg25803583	intra	intron	FALSE
		ITIH3	cg26099316	intra	exon	FALSE
		APCS	cg26353877	intra	intron	FALSE
		APOC2	cg27436184	intra	exon	FALSE
lung	methylation	MGC10471	cg15078027	intra	exon	TRUE
		FLJ23577	cg15128898	intra	exon	TRUE
muscle	methylation	EPHA1	cg02376703	intra	intron	TRUE
		TBX1	cg02887841	intra	intron	TRUE
		C1orf89	cg05588972	intra	intron	TRUE
	unmethylation	CASQ1	cg00327483	intra	exon	FALSE
		MYOG	cg01194444	intra	exon	FALSE
		TNNC2	cg02810134	intra	exon	FALSE
			cg08201421	intra	intron	FALSE
		ZNF537	cg03555203	intra	exon	TRUE
			cg08458170	intra	exon	TRUE
		CHRND	cg11695684	intra	exon	FALSE
		MYOZ3	cg13214422	intra	exon	FALSE
		STAC3	cg14747072	intra	intron	FALSE
			cg25189085	intra	intron	FALSE
		KRTHB4	cg24461814	intra	exon	FALSE
CLCN1	cg26756862	intra	intron	FALSE		
ovary	unmethylation	NR5A1	cg00691625	intra	intron	TRUE
			cg16666160	intra	exon	TRUE
		BPESC1	cg03552688	inter	intron	FALSE
		FLJ25102	cg06785822	intra	intron	FALSE
		FASLG	cg10161121	intra	intron	FALSE
		SSTR3	cg14297029	intra	intron	TRUE

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene		CGI
ovary	unmethylation	GMEB2	cg24674220	intra	intron	FALSE
pancreas	methylation	ITPKB	cg01259619	intra	intron	TRUE
		MXD3	cg02693857	intra	exon	TRUE
		TACC1	cg04017769	intra	exon	TRUE
		ZNF681	cg05520656	intra	exon	TRUE
		CKB	cg05786809	intra	intron	TRUE
		HSF4	cg06621126	intra	exon	TRUE
		EXOSC6	cg09594067	intra	exon	TRUE
		GPX1	cg15900980	intra	exon	TRUE
	unmethylation	CTRL	cg02126424	intra	exon	FALSE
		ELA2A	cg05221264	intra	intron	FALSE
		AQP12A	cg06356454	intra	exon	TRUE
		BHLHB8	cg07740640	intra	exon	TRUE
pancreas & islet	methylation	ACE	cg02131967	intra	intron	TRUE
		ITPKB	cg16340268	intra	exon	TRUE
		FRY	cg16941656	intra	exon	TRUE
		LDHA	cg20429911	intra	intron	TRUE
		BTBD6	cg23034818	intra	exon	TRUE
		TNFAIP8	cg23917399	intra	exon	TRUE
	unmethylation	RBPSUHL	cg16757724	intra	exon	TRUE
prostate	unmethylation	CXorf2	cg07356189	intra	intron	TRUE
spleen	unmethylation	C1orf54	cg15120247	intra	intron	FALSE
stomach	methylation	KCNK9	cg01717150	inter	intron	TRUE
		C10orf59	cg06812977	intra	exon	TRUE
			cg06981182	intra	exon	TRUE
		NEU1	cg14976276	intra	exon	TRUE
		NKD2	cg26054540	intra	intron	TRUE
testis	methylation	C6orf27	cg00728602	intra	exon	FALSE

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene		CGI
testis	methylation	SLC25A22	cg02973416	intra	exon	FALSE
		WFDC1	cg04195127	intra	exon	TRUE
		RIN1	cg05998426	intra	exon	FALSE
		FAM63A	cg06433658	intra	exon	FALSE
		P2RX7	cg07602200	intra	exon	TRUE
		OASL	cg11301598	intra	exon	FALSE
		GRIN2D	cg11953334	intra	intron	FALSE
		BAK1	cg14666892	intra	exon	FALSE
		MC1R	cg14696348	intra	exon	TRUE
			cg16790239	intra	exon	TRUE
		FAM57B	cg16152813	intra	exon	FALSE
		PRND	cg16977257	inter	intron	TRUE
		PTK6	cg18248891	inter	intron	TRUE
		GPR162	cg19286986	intra	exon	TRUE
		IKBKE	cg22577136	intra	intron	FALSE
		CHRND	cg23398241	intra	exon	FALSE
		GNG13	cg24889366	intra	intron	TRUE
	TSPAN1	cg26294850	intra	intron	FALSE	
	unmethylation	H1T2	cg00601486	intra	exon	TRUE
		SYCP3	cg01127428	intra	intron	TRUE
		H2-ALPHA	cg02774486	intra	intron	TRUE
		DDX4	cg02899723	intra	intron	TRUE
		DND1	cg03136712	intra	exon	TRUE
			cg16949889	intra	exon	TRUE
		SSX2	cg03712237	intra	intron	TRUE
		SLC25A31	cg04382920	intra	intron	TRUE
		MOV10L1	cg05070690	intra	exon	TRUE
ACTL7B		cg05156613	intra	exon	TRUE	

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Site in gene		CGI
testis	unmethylation	C3orf24	cg05291178	intra	intron	TRUE
		BCL10	cg05475904	intra	exon	FALSE
		PNLDC1	cg06479512	intra	intron	TRUE
		CETN1	cg06490951	intra	exon	TRUE
		PPP2R2A	cg10207787	inter	intron	TRUE
		RNF113B	cg11675413	intra	exon	TRUE
			cg23934633	inter	exon	FALSE
		MGC26816	cg11851098	intra	intron	TRUE
		FLJ35894	cg12441964	intra	intron	TRUE
		PRKACG	cg12493160	intra	exon	TRUE
		ZNF690	cg12784172	intra	exon	FALSE
		AP3B2	cg13140464	inter	exon	TRUE
		MAEL	cg13249256	intra	exon	TRUE
		PPM1G	cg15296858	intra	intron	TRUE
		CT45-2	cg16144006	intra	intron	TRUE
		ANKRD7	cg16192029	intra	intron	TRUE
		C5orf14	cg17067942	intra	intron	FALSE
		RNF17	cg17806989	intra	intron	TRUE
		SLC25A2	cg19215261	intra	intron	TRUE
		LDHAL6B	cg19636871	intra	exon	TRUE
		PEG10	cg19781251	intra	exon	TRUE
		HIST1H4G	cg19801560	intra	exon	TRUE
		CXorf2	cg23106779	intra	intron	TRUE
		DNAI2	cg24274272	intra	exon	TRUE
		TCEB3B	cg24883732	intra	exon	TRUE
		FLJ14768	cg26770281	intra	exon	FALSE
		C15orf2	cg27394486	intra	exon	TRUE

รายชื่อซีพีจีเมทิลเลชั่นที่จำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ และยีน ส่วนที่ 2

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
adrenal	methylation	CTS2	cg01663968	TCCGCTGGGGCGCAGGTGGGCACCCGGCGGGGAGGCAGCCCTGGGGGACG
			cg13021192	GGATCCAGAGCGGGAGCCGGCGCGGGATCTGGGACTCGGAGCGGGATCCG
	unmethylation	TNFRSF10C	cg27090216	CGGCACGAACCTCAGCCAA CGATTTCTGATAGATTTTGGGAGTTTGACC
			cg01103836	TGGCGTCCCTTGATGACGTCGAGGTGGTGTCTCTTGGTGGCAGTCACG
			cg04176254	CGGGATTCTTGCCTAGAGAGTTCCCGGCCACCCCGTGCCCTTGGCTTATA
			cg17790333	ACACAGGTTGTCTGCAGTCTTGACCAATGGCTGCCAGGGCATGGACTCCG
			cg25936385	CGCACAGGTTATGGCCGTAAAAGCACATAAAAGACCAAGAA GTGCTGGAA
			cg27114026	AAATTTTCCCTAA GTCCAGGCCA GCACCCCTGTCCCAGGGCAGGTGGGACG
			cg01655355	CGAGCTGCTCCCGTAAGCCCCAAAGGCGACCTCCAGCTGT CAGCGCTGAGC
			cg03096975	GTCTGGGTCCCAGGGGTGGGTGAAACCTGAGATCTAAGCCCCGGGAGCG
cg20427879	CTCCACAGCCACCCCTGGAGCCGGAGGGTCCCA CCGGGTCA CACATCCCCG			
brain	methylation	SP100	cg05091653	AAAAATAAACACTCCAGGGTAAACACCTGGCTTACTTTTAAA CATT CAGACG
			cg05382123	CGCCGCCCTTGCTGGGTGCCAAGAACCAACCGAA GCAGCCAGAACTCCTCA
			cg08469834	CGGAGGTCATATGTTTCCAGATGTCTTTGAGCCAGAAAGAAAGTTAATTC

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
brain	methylation	DHRS4L2	cg10677787	GGCTGGTGAATGATCAAAGCGCTCTCCGTTCAAATGGCTGTAGGGCTCG
		TUBA6	cg12073537	CGGACTCCTTGGTAGTCTGTTAGTGGAGATCCTTGTGCCCCCTCCCTTCG
		GPR30	cg16127845	CGCCTCAGGCTGCAGCAGCCGCATTTACTCATACTCAGCGGACAAAAGGATC
		IER3	cg17067528	GACATGCACAAATCCTAGGGCCCCAACTGCACGTTGTGAGTGTGTGAGTCCG
		IL10RB	cg17506742	CGCAACTAGGCTGCTGCTGCCGTCGATTCGTGTAACAGGAGAAAACCCCAT
		TRIM38	cg21844956	CGTCTTCAGAAAGAAAATCTGTGTGGCTTCAAAGAGACTGATCAAATTTGTGA
		NPFF	cg01657380	CGCTTTGTCAGAGCCAGGCCCTGGGGAGCCTTAGACGAAACCCCTAATCCC
		STMN4	cg02130905	ATTTAAAGGACCTAAAGATCCTGGAAATCATTCATTAATACCCCCAGCTCG
		NLGN2	cg03169180	CGCTAAAAGCCCTGCCCTGTTGGCCAAATCAAAGCCTAGCCCTTAGTGACCAG
		BLK	cg03860768	ACCTCCAATGCTGACTCTACAAAGTAATTTGCCCTGCCGTTGGACAAAACG
		GPR148	cg04037952	ATGTTAGCCGGGAGCAGGTAGTGGGGCTCCTGTGCGAGCCCGTTGGTTCCG
		FAT2	cg04443324	TTCTCCCAAAGACCATAATGTGGAGAGCTTCGAGAGAAAATGGGCATCTACCTCG
		RIT2	cg04711324	TTTATGATCGAGGTAAGAACCATCAGCGTCGGGCTGGCTGCTGGTCCCTCCG
		40148	cg04761824	CCCAAAGAGGCAGTCTCAATAATGCCATCTTTGTTGCAACGAGAAACAATCG
KIAA0802	cg05104081	CTTACAAAACACCAAGTCAGAAAAGCCGACTAAACATCAGACACAACTGCACG		
FABP7	cg05798712	CGGGGATCTTCTGGTCTAAATTTGCCACTGACGCTCAGAAGACCCCTTTACAC		
	unmethylation			

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
brian	unmethylation	C16orf45	cg07977490	CCCAAAGTGCATGCAAAACAATA TGAAC TACATAGGCATCCACTGTCCG
		FLJ37538	cg08626653	CGAAAGTAGGCCCTGGGCATAACTCTGCC TGTAGGTGTGCCAGTTCCTGT
		SLC35A4	cg08948050	CGGGTGGCC CAGGCAAAATGAAAGGCTTGGGGTTC CATGGTGTCAA AAA
		DLGAP4	cg09276978	TGATCAGAGGTGCCGGCAGGAAGCAGCTTGGGACAGGGGCTCTGCCACCCG
		MYT1	cg10071275	TGGAGCCCCAAGGGTTCATGGGTAGCGTATTTTACAAA GGAGCCTCCTCCG
			cg16772207	CATTA GCAGCGGTGGCACGGGCTGGCGGAGGAGGCTCCTTTG TAAATACG
		ZNF574	cg11719283	TCCCTTGTGGGGTTTGTGGGCCCTCAGCCCACTTCTCTGGACAGTCTTGACG
		ABHD7	cg15156367	AAC TTACAGAGAGCTGCAACCC CAGGGATACAA CGAATGCTTCAACAACG
		C10orf11	cg17238009	TCTGGCTGAAAGACCCGCAACTTTCACITTTGTTGAGAACCTTTAGCCAGCG
		ELAVL4	cg18242139	ATCTAGTCA TACC TACCATAA CCAATTC TTTATTTGGCAAATATTTGGGTCTCG
		MAPK4	cg18450227	GGGCACTGACCTGCAGGGT GAGCTGTTC AAGTTCAAGTTCA GCGTGGCGTACATCG
		TCF20	cg20051177	TGTATTAGGGT GATCACTGAACTGCGGGT TTTAAACACTGGCTGCTGATCG
		MGC27121	cg20189782	TTTTCTTCAGATCAGCATCA TTTCA CCA TGGCAACCAGCAGGCATCTGTACG
			cg26790059	CGCTGCAAGCATCAGGTAAGACA TATA GATGGCTCTTTCTTTGGAAA TGGAA
		GARNL3	cg20864636	GTTGAGCTCTGGGCAGACACAGCATTTAGTCAACAGCCATTTGGGCATCCG
		ANK3	cg22150335	CATGTCA TGGAAA CATGCCCA TGCCTATA TAAA GTGAAGCA CATTTCCG

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
brian	unmethylation	AKAP6	cg24812523	CTACATAATTTAAATTCCTATAATGACTCTTACAGGCCTTTGTCTTAACCCCG
		C3orf40	cg25552889	CTGGAGTGCAGCTGGTCACAACAACACATCTATAAAATCTTGTCTAGCCTACG
		MGC2747	cg25903122	CGGGCCATATGGTGTCTGTCTGGCACAACAATGTGACTCAGCTCTGCTGT
		GRM4	cg26424956	CGGGACAAGGATCAGAGCCCTTCCGTGCAACCCCGGCCACTGCCCTGCTGTCT
cervix	unmethylation	ACD	cg26698580	CGGCTGCACAAGCATGGTT'CAAGCCGCCCTGGGCTTCTACATCCGAGA
		PADI1	cg17502536	CGGGTGAACCTGCGTGGAA'GTTATAACTCTTACCACCTTACTAGCAGTGAGA
		KRTHA2	cg23674788	CGTTAAGGAAC'TGCATGGT'CTTCCCTCTCATTTGCCATTTGAAGGCCCTTCG
		MYBPC3	cg10335931	GAGCATGCTGGGCCCATAA'CCCTAAGGCTAACGGGTCAGGAGCATCCCTCG
kidney	methylation	C3orf45	cg17272094	ATGCTCTGT'CATGGGCCAT'AAACATGGAGCCATGGAGCAGACAGTCCCTACG
		SPAG5	cg08062469	TAGGTCC'TTATGCCCATTTAAA'TGAGCTACTACA'CGGCATTCGGCATAAGCG
		OXR1	cg16326979	CTGGGTCAGGTCTGATGGGCCCGGTGGCGCGCTAGTGGTGGCCGCCACCG
		CDH16	cg14221831	CGCCCCAAGACTGGCTCCCTTGGTCCAGCTGCCAAGCAAGAAAGAGAGCTCC
liver	methylation	B3GALT7	cg19201019	TGTTGGATCCAAGTTCCGGTTAGGCACCCCAAGCAAGC'TATTAGAACTACG
		PAQR5	cg20082641	CGGTT'CAAGATCCGTAAAAATGGCCGGAGATAA'TTGA'CT'GCAA'CC'TA'TTC
		ESR1	cg00655307	CGGCCAGGGACTGTTGCCTTGCCTTGCCTGACATTTGGCTTAAACA'CTCACTCCAG
			cg02720618	GGAGGTGTTT'TTCCCCCA'CAAAA'TAACTGCTGCTTGTCTGGT'TTTC'CAACG

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
liver	methylation	LRFN4	cg20358834	AGGGCCCGGAGCAGGGCGCTTGTCTGGCTGTCTGCAGAGTGAGGTTCCG
		PTK7	cg21663580	CGGCGCGCAGGTTGTTCGGCATCGGGCCCCAAACCAGCAACTCTTACCT
		RASSF5	cg23520347	TAGGGCTTACGCCAAGCGGAGCCCGGGGAGGGGTGCCACCTCCCTCCG
	unmethylation	PACS1	cg25034557	AATAATATCAAGAGATCTATACCACATCCATGTATGTACAGCTCCCGGGC
		C14orf68	cg00239071	CTGTTACCTCCGATGGCTCCAGCGACAAAATCCATGAACAAAGGTGTGGCG
	unmethylation	LOC55908	cg00881370	CGAGGAGTTCAAGCTGCATCTTCCAGCCTGCCGTGACAGGAACCAATCACC
		INHBC	cg05718253	CGTCCAAAGGCCGTGAGGCCAGACCCTCCCGGCCATCGGCAACTGTTACTCA
			cg03399971	CGCCCCAACACTGAACCGCCCTGTGTCCAGAGCTGCTTTGAGGACTGCACCT
		DAK	cg03483654	AAGGCGTGATTTGTGCCAGTCGACTCGGAGTTCCTTCCGCAGCTTGTATCCG
		ANGPTL7	cg04508649	CAGCATGGATTTACATTAACAGGCCCTCCCTGGGTGAGTAGCGTCTCTTTCCG
		SLC10A1	cg05633152	CGCCCCACAGACCTGGCACGTAGCGTCAATCCTGGTGTTCATGTTGTTCTTT
		CCL16	cg05766474	CGTGAAGAAATGGGCGAATGTGTGTCAAGTACCCTTACATGCCCTATCTTTA
		SERPINA10	cg05788638	AGTCTGCAGTGGTAGCCCCAGTAAATTCCTGGGTGCTCCTGGACATATATCCG
		LOC284912	cg05976325	CGCCTGGCTTCAATAAGCTATTTTGTGTTGAATGAACGAATGATTTTAGCAGGAA
		UROC1	cg06765947	CGCTGAAAGTGCCCTACCTGAGGCCAGTGACCCCTCCGACCTGCACATGGC
		HGFAC	cg07364841	CGCATCCAGACCCCAACAAGGTCCAAGAGGGGGCAGCCCCCAAGACCC

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
liver	unmethylation	THPO	cg09736922	CGCCTGCCTGGGCCACTTCTGCCCAATCAGAGAAGGGAGCCACCAGACAC
		PROZ	cg09878269	CGGGAAAGGGCCAAAATAGTGTCTGTCACTACAGCTCAGCACCAATTGTAGC
		F9	cg10339201	ACTAATCGACCTTACCACCTTCAACAATCTGCTAGCAAAGGTTATGCAGCG
		ITIH1	cg10356463	CGCAGTCTACACAGAGGGACATGGTCTGGAGCCCCCATCAGTAGTTTAAC
		CYP2D6	cg10840135	GCTGGGCAACCTGCTGCATGTGGACTTCCAGAAACACCCATACTGCTTCG
		CYP2D7P1	cg11221132	CGGGCTGGGCAACCTTGTGCAATGTGGACTTCCAGAAACACCCATACTGC
			cg19622372	CGGCAAGGACCTCTGGAGCAGCCCATACCTTGCCCTGGCCCTGACTCTGCCA
		CA5A	cg11667117	CAAAGTGTATTGCTGGTGTGCCATGCACAGGAAACGCTGAGAACACCATCG
			cg12343082	CGCCAGTCCACAGTGGTCCCTGATCAAAATGAGAACACAGACAGCGGAACA
		MASP2	cg12888113	CGGCGCTGGACCCCTGACTGCAACCCCGGGCTACCGCCCTGCGCCCTCTACTT
		NDST1	cg15467759	CGGCTGCCGAAACCAAGGTTGCATGATTTGGAGCAAAGCTCTTTAATATCTC
		AGXT2	cg16297030	GACTCTAATCTGGAGACATTTGCTGAGACCCCTTGTGCCTGGTCACITCCG
		AGXT	cg16358738	TGAGTGGGTTCCTGGTCTGGAACACACGTACTGGATGCCITTCCTTGATCTCG
		PGLYRP2	cg17915429	CGCCTTCTGCAGAGCCAAGAGGTTTGGTCCCAGGACTCTGCCCCCTGACT
		AKR1D1	cg20647137	CGGTGACTTGCAGCACTGAGATCCAATTTGTGGAGAACCTGACTGTAGGAGT
		HPR	cg20672044	CGTAGCTGTGAGCAATAGGATGGGGCATACAGCAGGCACTTTAACAAATACT

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
liver	unmethylation	APOC3	cg20691580	CAAAGACACACAGCATGTTGGCTGGACTGGACGGAGATCAGTCCAGACCG
		OKL38	cg22309489	GACGTGGACTTTCCTCCCTGCCATCTTGTTTACCTGTTAGGTGATTAATCG
		SERPINF2	cg25803583	GGTGGGGGGCCTGTGGGAAGGGTCGGTCTCCATCTGCTTGCCTCTTCCG
		ITIH3	cg26099316	CGCTCCTTATATGAGCAAGCCCTGGTGTCTTCCAAAGCAGGGTCAGTGACCT
		APCS	cg26353877	CGGGATAAAGAAAAGAAAGATAATGACCTTCAGTATAAATGCAGGGGAAAAG
		APOC2	cg27436184	GCGTGGTGGAGTCAGCAGGTCCCCATGATGGCCCTCACCTGAGAGCTTCG
lung	methylation	MGC10471	cg15078027	GAGCGGGCGGAGGCAGCAGCTCCACGCTGATTTGGCTGAAGGACGATACG
		FLJ23577	cg15128898	GCCTGGAATACGCTTCCATAGCAAAGGGTTGCCCTTGGCTACAGGAGGACG
muscle	methylation	EPHA1	cg02376703	CGCCCCAGTCTCATTCGGGTCAAGACGCCCTCCGGTTCCTTGAATTTGATTT
		TBX1	cg02887841	CGGCTGCCCTATACTCACCTCGCTTGAATTCGGACCCCCGGACCCCCGTTGCT
		C1orf89	cg05588972	CGGAGTCATAGAGAAAGAGGATCCACAAACCAGAGGAAAAAGGCCCTAGTCCA
		CASQ1	cg00327483	TCCATGAGTGCATACAGACAGGATGGGGCCCAAGAGCTGTGCCCGGGTCTGCC
		MYOG	cg01194444	AGGGAGCTGAGCAGGGCCCTGGAGGCCCTCGATGTACTGGATGGCACTGCC
	TNNC2	cg02810134	CCTTGTCCTTACCATGGTTGCTGGTGGTACCCGGGACTCCTCTGTGTGCAAGTCCG	
		cg08201421	GGGCCCTTGCAGAGAAAATTAAGCCCTCCAAGCAGGTGGCAGGCCCTTGACG	
	ZNF537	cg03555203	TAGCAGCAGCAGCAGCTGTGGCAGCGGGGAGCTTCGACTGGCACCCAGAGCGG	

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq		
muscle	unmethylation	ZNF537	cg08458170	CGCTTCAAAGTCAGCCATTCGGTCACTGGTCTCACTGATGTGTGACTCG		
		CHRND	cg11695684	CGGCTGATCCGGCACCTGTTCGAAGAGAAAGGCTACAACAAGGAGCTCCG		
		MYOZ3	cg13214422	CGGAAGCTACCAGCAGCTGACCCCTCAACATTTCCAGGTGACTTTGGTGTG		
		STAC3	cg14747072	CATGAACAGAAACTGTCCCTTCCITGAAATTCAGCCATTATTCACCTGTTCG		
			cg25189085	CGCCTAAAACCCCAAAAGACTCACAGACAAAGGAGAAAAATGAAGAAAGCTGA		
		KRTHB4	cg24461814	GTGGGCAACTTCAGCTCTTGTTCAGCAATGACACCACAGAACTTGAAATCG		
		CLCN1	cg26756862	ACCAGTAGTAGGCTTCCAGCTCCATGTCACTGGTCCCTCTATAAAATATCG		
		ovary	unmethylation	NR5A1	cg00691625	TGACTCTGCAGGCCCTCTCGCCCTTCTTTGTGTGGTGTTCCTTCATTTACG
					cg16666160	CGCACCCACAGTCGCCACCCTCCCACTGGGCTGCCGGAGCCTCCCCCTG
				BPESC1	cg03552688	CGCAATTA AAAAGGCATGAAGTGCCAGACAGCAAGGTTTCAGTTCTAGAAAT
FLJ25102	cg06785822			TTCCTGTCCAAAAGAGGTCGGCCAAATGGGGGCCATTCGTAGTTTCAGAAAACCG		
FASLG	cg10161121			TTCGGCCCAACAATTTCTGTATAACAGCCTTCAAGGCCCTCAGTTGCTGTCTG		
SSTR3	cg14297029			GTGACCTCCCGGTCCGGTGCAGGGGCAGGGCCGTTAGTCTCAGAAATCTCG		
GMEB2	cg24674220			CGTGGTCTTGACCCCTAAAGGGCAAGGGAAAGAAAACTGACCTACAGGATA		
ITPKB	cg01259619			CGCCCCGCACACAGCATATTCAGGAGCCAAAGGACTTGGACCTCGCTTCTC		
MXD3	cg02693857			GCACTTTTGTACAAAAGTAACTGACACGGTGCACAAAACACAGGGGCCCG		

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
pancreas	methylation	TACC1	cg04017769	CGTCCACCAGGGCCCCGACGGCACTCGTTTAAACCACATCCGGGCCCTCT
		ZNF681	cg05520656	TCTCACCAATTTCTAGGTTTCCGGGGACCCTGGCGTCTTAGCTATGGATCG
		CKB	cg05786809	CGCTTGGGTTCAATCCGCATCCTCGAGCCTGCCCGCTAGTCCAGCCAGCC
		HSF4	cg06621126	CAGCTCGGGGGGTCAGGGTCGGGGCACTCACACCCCTTGGAAATGACTACG
		EXOSC6	cg09594067	AGTGGATCGGGCAGGGCGTTGGGGGGAAGGGGTTCCGACGCCCAAGAACCG
		GPX1	cg15900980	CGTGGCCGCTGGTTGCCCTGGGCCAGACCAGACATGCCCTGCTGCTCCCTC
		CTRL	cg02126424	CGGCATTCCTGCCATCAAAACCGGCACTGAGCTTCAGCCAGAGGATTGTC
		ELA2A	cg05221264	CGCAGCAAGTGTAGTTTACATTTGTGTGGGTCGCTGCTTCCCTGACTCAAGA
		AQP12A	cg06356454	GGCGGTGGGTGGGGTGCAGCTCGGGGCCCTGCTGCCCTGGAGATGAGGACG
		BHLHB8	cg07740640	GTAGTTCTTTGGCCAGCGTGGCGGTTCTCGAATCTTTGGAGAGCTTCTTTGTCCG
pancreas & islet	methylation	ACE	cg02131967	CGGCCCTCCGGCTCGAATCTTCCAGCCCGACCCCGGAGCCCTCCCGCCTC
		ITPKB	cg16340268	CACCAGGCTATGAGGGCATAAGCAGTACACAGCCATAGTACTGGGTCCCCG
		FRY	cg16941656	GGTGGGGTCTTCCCTCGGTTCCGTACCTGGCTGGAGCCCGAGCTGGTGGGGC
		LDHA	cg20429911	GCTTTTGTGGCTCTATGGGGTCCGGAACCTGGAACCTCGAGTTTGTGCACCG
		BTBD6	cg23034818	GGTGGACCTGCTTGTGTGGCCATTTGCATTCGGAGTCTGCCCTCTGGCCG
		TNFAIP8	cg23917399	TGCTTTCGGAGTGCATAAATGTTCAGGATAAACCAAGTGCAGGGGGCGATTAACCG

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
pancreas & islet	unmethylation	RBPSUHL	cg16757724	GGGGTGTGCAGGGTTCAGCGACAGCAGCACTGGACTCGTCCAGAGGGCG
prostate	unmethylation	CXorf2	cg07356189	CGCCGTGCCCAAGTCCAGACATCCGGATCCCAAGTGTGTCTCTTGGTT
spleen	unmethylation	C1orf54	cg15120247	CTTTTATGTTTCCCATGTTCAATCAATTCAGAAACCCCTTAGCAACATACG
stomach	methylation	KCNK9	cg01717150	GCTGCCACACAGCCCTCGCCAGCTGGCTGGGACCAGGGCGGAGGTGGCG
		C10orf59	cg06812977	CGCTCTTTTGGTTCCGTGCTCCCTGGGCCGACCTGGGCCCTGAGCTTTCCCT
testis	methylation	NEU1	cg06981182	CAACAATAGCCCAACCAATTTCCAGGCTTTTCTGGCCGAGGGGCAAGGCG
		NKD2	cg14976276	AGCTAGACTCCACAGAGTCGGGAGTCAGCTGACCCGGACCCCTTTAAAGCG
		C6orf27	cg26054540	GGGGCGTGGGGCGGGGATGGGGAAACTGCAGTCGAAAGCACGGTGAGCCG
		SLC25A22	cg00728602	CGTCAACAGGGCACTTAGGTCAGAGTTATAATTAACCGAGGCTCAGCAGAG
		WFDC1	cg02973416	CCGAGGTGAAGGTTACGAGTCCCTGAGGATCTGTGGGTGTGAGCCAGCCCG
		RIN1	cg04195127	CGGGATTTCTCGGCCAGCCTCGCAGGCAATGCCCGTTTCCAGATAATCTTT
testis	methylation	FAM63A	cg05998426	CGCACATCCCCAGTGAGTAACACTTCCCTGAGGGGGGTCCGCCCTGTCAAC
		P2RX7	cg06433658	CGTCCGGGCCCTGACTACAAAGCTGGTTTTCAAAGGAAGTTTTGTGGTTTTT
		OASL	cg07602200	CGTGGAAAGAACCACTTAATGGTGGCCATAAATTCATGCTCTGGATCCGAGTG
		GRIN2D	cg11301598	GTGTGCTATACAGTTCCCTGCAATCAGTGCCATCTCTGTCCCGAGAGTACC
		GRIN2D	cg11953334	GGAAATTTGGGCCCCCGGACATTCAGAGAGGCTGTCCGGGGTGTCTCTTGGCCG

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
testis	unmethylation	DND1	cg16949889	CGGGCTAGGCATCACTGACACACGCAGACTCCGTGGTTGAGGCATTTTTA
		SSX2	cg03712237	CTTTGAGAAAGGTTCCGTCCCTGGAGCCGGGACTGATAGAAGCCACATCCG
		SLC25A31	cg04382920	GTGTAGGTGTACCGTGTACGGCGTCACTGGCTGGAGGCCGTTGGAGCG
		MOV10L1	cg05070690	CGGGGATCCCCGTTCGCCCTCAGGAGGCTTCCGACCCCCACAGCATCCCCGCC
		ACTL7B	cg05156613	CGCCAGCCTCCGGGACACACAGGTGGGCCACTCAGCTCAAGATGAAGCCCCA
		C3orf24	cg05291178	CGCTCTCGTCCCAATGTTGGTTCTGCCGAAATATTTAGGCTGACTCCTTGACC
		BCL10	cg05475904	CGCCATAGTAGTTAAAAATACGGTCTGGGATAGTCTCTCTTCATCAGTCTC
		PNLDC1	cg06479512	CGGGTGTTTTAATGTACGATTTGCTACAGAGGTTTGATTGCAATTGCAA
		CETN1	cg06490951	TGAGCTCGGGCTTAGGTGCCACCCTTCTCTTTTGGCCGGTGGAGGCAGCG
		PPP2R2A	cg10207787	CGGGATCCTTAGGCACTGCCGACACTAAGAGTGATTTCTAAGAGAAAACCT
		RNF113B	cg11675413	CGCCACCCTTCTCCAGGAAGGACGGCCGACCAAGCAGACCAGGTATGCACC
			cg23934633	CTCATCCATAAACACACAGGCGCTTGAAATGGGTAATTAATAAGCAACACACCG
		MGC26816	cg11851098	GGACAGGTACTGGGTGTGTATCTCCTCCTACTTCCACGAACAAGGTGTCTG
		FLJ35894	cg12441964	CTGGCATCTGTGCTGTGTGTTCTCCCTTTTGTGGGCACCTCGCTAAATCG
		PRKACG	cg12493160	CGAGTTCCTAGCCAAAAGCCAGAGGAGATTCCTCTACAGATGGGAAAACC
ZNF690	cg12784172	GTACAGGAACCTGCTCTAGCAACCAAGTCTCAAAATCTGCTCCTTGGTGGC		

Tissue	Type	Gene	Probe ID	SourceSeq
testis	unmethylation	AP3B2	cg13140464	CGCAGCAACTGTGTGCACCTTTGCACGTGTGTCTGCTCGTCCCAGGTCCCAG
		MAEL	cg13249256	CGGCGAGGGGGCCGGTGTCTTTGTCTGTCTGAGGCCAGGAAAGTTTGACCCG
		PPM1G	cg15296858	CGCCAAGATGAGTGACTTGGACTTTCATTTGTCTGCTCCCTGGTGTAAACCTTTGG
		CT45-2	cg16144006	GGTTCTGCAATTCCTACGCAATACGTTTGCCTGTGCAATTTGGTACTGAAAGGTCCG
		ANKRD7	cg16192029	TACGGCCGTTATGGCTGTTAAAGGTCGTTATGGTCCGGTCCCTAGGGGCTCG
		C5orf14	cg17067942	CGGGAGTCTTAAGAGAAAAATCTTGGAAATAGAGAGGATGACACCACCTAAT
		RNF17	cg17806989	CAC TGT T TGGCTATCTGCAGGGGCTGGCCCTCCAATGATTTGGTCCGTGCCCG
		SLC25A2	cg19215261	CGGCGTCTAGAGTTCCTCCGGCCATAAATTCGAAAGAAATTTATCGAAAAAGCTTTT
		LDHAL6B	cg19636871	CGCAGGCCAATGCCCAACCAGTCCAGTTCCTATGATGGAGACCCTTACTGTGA
		PEG10	cg19781251	CGGCAGTATTCAGAAATCAAAGACGATAGATCGAGTGCCTCCATGTGATATT
		HIST1H4G	cg19801560	TGATAAACAAGTCAGAACTATCTCTAAACAACAAACGATTAATCTCGCTTTCCG
		CXorf2	cg23106779	CGGCACCCACACAGCTAGTGGCCGGAACTTTTTTTGTGCAGAGAAAAGAACCC
		DNAI2	cg24274272	TACGTCAAGAA GCGCAGCGAGTTTCGGGAA GCAGTGCATTTCTCGGACCCG
		TCEB3B	cg24883732	GCTCTGTCTTTGGGGCTGCGGGACAGGAAAGTCTGGGGTGGCCGGTCCCTCG
		FLJ14768	cg26770281	CGGGATAATAGTCATCCAAACACGCTTACTTGTGTGGGTCTTTGCTGTGCAC
		C15orf2	cg27394486	TAGCTCTAAATGGGCAATTTACTTAGTAAATTTAGACCCCGGGTGGCCGCCG

รายชื่อซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่ออวัยวะต่างๆ และยีน ส่วนที่ 3

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Strand	Distance to TSS
adrenal	methylation	CTSZ	cg01663968	-	
			cg13021192	-	
		TNFRSF10C	cg27090216	+	27
	unmethylation	MYO9B	cg01103836	+	104
		AGRP	cg04176254	-	287
		CYP11A1	cg17790333	-	298
		FAIM2	cg25936385	-	1011
		ELA1	cg27114026	-	205
	brain	methylation	SLC5A5	cg01655355	+
EML2			cg03096975	-	95
			cg20427879	-	115
SP100			cg05091653	+	493
CSMD2			cg05382123	-	1142
CASP4			cg08469834	-	251
DHRS4L2			cg10677787	+	226
TUBA6			cg12073537	+	61
GPR30			cg16127845	+	89
IER3			cg17067528	-	193
IL10RB			cg17506742	+	299
TRIM38			cg21844956	+	371
unmethylation		NPFF	cg01657380	-	101
		STMN4	cg02130905	-	310
		NLGN2	cg03169180	+	1155
		BLK	cg03860768	+	50
		GPR148	cg04037952	+	227
		FAT2	cg04443324	-	199
		RIT2	cg04711324	-	24

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Strand	Distance to TSS
brain	unmethylation	40148	cg04761824	+	978
		KIAA0802	cg05104081	+	358
		FABP7	cg05798712	+	261
		C16orf45	cg07977490	+	385
		FLJ37538	cg08626653	+	772
		SLC35A4	cg08948050	+	1247
		DLGAP4	cg09276978	+	73
		MYT1	cg10071275	+	3
			cg16772207	+	20
		ZNF574	cg11719283	+	199
		ABHD7	cg15156367	+	554
		C10orf11	cg17238009	+	63
		ELAVL4	cg18242139	+	199
		MAPK4	cg18450227	+	799
		TCF20	cg20051177	-	875
		MGC27121	cg20189782	-	78
			cg26790059	-	117
		GARNL3	cg20864636	+	1433
		ANK3	cg22150335	-	529
		AKAP6	cg24812523	+	239
		C3orf40	cg25552889	+	575
		MGC2747	cg25903122	-	816
		GRM4	cg26424956	-	83
ACD	cg26698580	-	1271		
cervix	unmethylation	PADI1	cg17502536	+	615
		KRTHA2	cg23674788	-	325
heart	unmethylation	MYBPC3	cg10335931	-	345
		C3orf45	cg17272094	+	705

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Strand	Distance to TSS
kidney	methylation	SPAG5	cg08062469	-	571
		OXR1	cg16326979	+	67
	unmethylation	CDH16	cg14221831	-	52
		B3GALT7	cg19201019	-	550
		PAQR5	cg20082641	+	1039
liver	methylation	ESR1	cg00655307	+	57
			cg02720618	+	
			cg11251858	+	350
			cg20253551	+	
		DSU	cg02668581	-	25
			cg12620499	-	331
		IGF2AS	cg04112019	+	
			cg10501065	+	
			cg16817891	+	
		TIAM1	cg04807655	-	462
			cg15853125	-	977
		LIMK1	cg05163588	+	622
		GSTP1	cg09038676	+	322
		SCYL1	cg10628098	+	283
		NQO1	cg10708675	-	225
		GPAM	cg12137206	-	121
		AMIGO2	cg13640200	-	554
		PARD6A	cg15426734	+	410
		LRFN4	cg20358834	+	717
		PTK7	cg21663580	+	742
		RASSF5	cg23520347	+	
		PACS1	cg25034557	+	821
			unmethylation	C14orf68	cg00239071

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Strand	Distance to TSS
liver	unmethylation	LOC55908	cg00881370	+	313
			cg05718253	+	767
		INHBC	cg03399971	+	304
		DAK	cg03483654	+	76
		ANGPTL7	cg04508649	+	352
		SLC10A1	cg05633152	-	143
		CCL16	cg05766474	-	145
		SERPINA10	cg05788638	-	341
		LOC284912	cg05976325	-	522
		UROC1	cg06765947	-	148
		HGFAC	cg07364841	+	421
		THPO	cg09736922	-	44
		PROZ	cg09878269	+	444
		F9	cg10339201	+	35
		ITIH1	cg10356463	+	232
		CYP2D6	cg10840135	-	264
		CYP2D7P1	cg11221132	-	233
			cg19622372	-	121
		CA5A	cg11667117	-	150
			cg12343082	-	33
		MASP2	cg12888113	-	237
		NDST1	cg15467759	+	103
		AGXT2	cg16297030	-	53
		AGXT	cg16358738	+	433
		PGLYRP2	cg17915429	-	243
		AKR1D1	cg20647137	+	93
		HPR	cg20672044	+	627
		APOC3	cg20691580	+	420

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Strand	Distance to TSS
liver	unmethylation	OKL38	cg22309489	+	24
		SERPINF2	cg25803583	+	336
		ITIH3	cg26099316	+	20
		APCS	cg26353877	+	270
		APOC2	cg27436184	+	237
lung	methylation	MGC10471	cg15078027	+	134
		FLJ23577	cg15128898	+	40
muscle	methylation	EPHA1	cg02376703	-	145
		TBX1	cg02887841	+	444
		C1orf89	cg05588972	-	409
	unmethylation	CASQ1	cg00327483	+	191
		MYOG	cg01194444	-	444
		TNNC2	cg02810134	-	31
			cg08201421	-	198
		ZNF537	cg03555203	-	13
			cg08458170	-	301
		CHRND	cg11695684	+	343
		MYOZ3	cg13214422	+	162
		STAC3	cg14747072	-	139
			cg25189085	-	311
		KRTHB4	cg24461814	-	136
CLCN1	cg26756862	+	259		
ovary	unmethylation	NR5A1	cg00691625	-	108
			cg16666160	-	68
		BPESC1	cg03552688	+	658
		FLJ25102	cg06785822	+	179
		FASLG	cg10161121	+	165
		SSTR3	cg14297029	-	677

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Strand	Distance to TSS
ovary	unmethylation	GMEB2	cg24674220	-	672
pancreas	methylation	ITPKB	cg01259619	-	507
		MXD3	cg02693857	-	56
		TACC1	cg04017769	+	158
		ZNF681	cg05520656	-	48
		CKB	cg05786809	-	308
		HSF4	cg06621126	+	473
		EXOSC6	cg09594067	-	27
		GPX1	cg15900980	-	200
	unmethylation	CTRL	cg02126424	-	666
		ELA2A	cg05221264	+	289
		AQP12A	cg06356454	+	236
		BHLHB8	cg07740640	+	337
pancreas & islet	methylation	ACE	cg02131967	+	328
		ITPKB	cg16340268	-	23
		FRY	cg16941656	+	174
		LDHA	cg20429911	+	424
		BTBD6	cg23034818	+	419
		TNFAIP8	cg23917399	+	21
	unmethylation	RBPSUHL	cg16757724	+	37
prostate	unmethylation	CXorf2	cg07356189	-	109
spleen	unmethylation	C1orf54	cg15120247	+	1153
stomach	methylation	KCNK9	cg01717150	-	1196
		C10orf59	cg06812977	-	28
			cg06981182	-	200
		NEU1	cg14976276	-	53
		NKD2	cg26054540	+	36
testis	methylation	C6orf27	cg00728602	-	371

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Strand	Distance to TSS
testis	methylation	SLC25A22	cg02973416	-	152
		WFDC1	cg04195127	+	318
		RIN1	cg05998426	-	75
		FAM63A	cg06433658	-	212
		P2RX7	cg07602200	+	197
		OASL	cg11301598	-	12
		GRIN2D	cg11953334	+	269
		BAK1	cg14666892	-	1
		MC1R	cg14696348	+	509
			cg16790239	+	228
		FAM57B	cg16152813	-	503
		PRND	cg16977257	+	961
		PTK6	cg18248891	-	765
		GPR162	cg19286986	+	54
		IKBKE	cg22577136	+	369
		CHRND	cg23398241	+	210
		GNG13	cg24889366	-	53
	TSPAN1	cg26294850	+	515	
	unmethylation	H1T2	cg00601486	+	385
		SYCP3	cg01127428	-	207
		H2-ALPHA	cg02774486	+	261
		DDX4	cg02899723	+	1162
		DND1	cg03136712	-	103
			cg16949889	-	289
		SSX2	cg03712237	-	118
		SLC25A31	cg04382920	+	48
		MOV10L1	cg05070690	+	258
ACTL7B		cg05156613	-	81	

Tissue	Type	Gene	Probe ID	Strand	Distance to TSS
testis	unmethylation	C3orf24	cg05291178	-	449
		BCL10	cg05475904	-	206
		PNLDC1	cg06479512	+	137
		CETN1	cg06490951	+	68
		PPP2R2A	cg10207787	+	839
		RNF113B	cg11675413	-	39
			cg23934633	-	625
		MGC26816	cg11851098	+	548
		FLJ35894	cg12441964	-	337
		PRKACG	cg12493160	-	51
		ZNF690	cg12784172	-	151
		AP3B2	cg13140464	-	1388
		MAEL	cg13249256	+	62
		PPM1G	cg15296858	-	739
		CT45-2	cg16144006	-	103
		ANKRD7	cg16192029	+	285
		C5orf14	cg17067942	+	152
		RNF17	cg17806989	+	52
		SLC25A2	cg19215261	-	538
		LDHAL6B	cg19636871	+	349
		PEG10	cg19781251	+	
		HIST1H4G	cg19801560	-	48
		CXorf2	cg23106779	-	439
		DNAI2	cg24274272	+	372
		TCEB3B	cg24883732	-	263
		FLJ14768	cg26770281	-	918
		C15orf2	cg27394486	+	39

รายชื่อและข้อมูลของยีนที่มีซีพีจีเมทิลเลชั่นที่จำเพาะ

Gene	Gene_ID	Gene size	Number of exon	Gene type
CTSZ	GeneID:1522	13263	7	protein coding
TNFRSF10C	GeneID:8794	34283	8	protein coding
MYO9B	GeneID:4650	139956	49	protein coding
AGRP	GeneID:181	2443	4	protein coding
CYP11A1	GeneID:1583	31182	18	protein coding
FAIM2	GeneID:23017	38522	15	protein coding
ELA1	GeneID:1990	19437	8	protein coding
SLC5A5	GeneID:6528	24402	14	protein coding
EML2	GeneID:24139	39836	29	protein coding
SP100	GeneID:6672	129349	36	protein coding
CSMD2	GeneID:114784	653873	95	protein coding
CASP4	GeneID:837	27771	7	protein coding
DHRS4L2	GeneID:317749	37670	9	protein coding
TUBA6	GeneID:84790	85796	11	protein coding
GPR30	GeneID:2852	12808	5	protein coding
IER3	GeneID:8870	2556	2	protein coding
IL10RB	GeneID:3588	32077	10	protein coding
TRIM38	GeneID:10475	23519	8	protein coding
NPFF	GeneID:8620	2733	4	protein coding
STMN4	GeneID:81551	24298	8	protein coding
NLGN2	GeneID:57555	16187	10	protein coding
BLK	GeneID:640	71804	19	protein coding
GPR148	GeneID:344561	2467	1	protein coding
FAT2	GeneID:2196	66502	23	protein coding
RIT2	GeneID:6014	373667	7	protein coding
40148	GeneID:50514	261942	14	protein coding
KIAA0802	GeneID:23255	128318	26	protein coding

Gene	Gene_ID	Gene size	Number of exon	Gene type
FABP7	GeneID:2173	5800	4	protein coding
C16orf45	GeneID:89927	191934	33	protein coding
FLJ37538	GeneID:222950	12073	8	protein coding
SLC35A4	GeneID:113829	5848	3	protein coding
DLGAP4	GeneID:22839	263983	25	protein coding
MYT1	GeneID:4661	91661	24	protein coding
ZNF574	GeneID:64763	14273	7	protein coding
ABHD7	GeneID:253152	34755	7	protein coding
C10orf11	GeneID:83938	1129918	30	protein coding
ELAVL4	GeneID:1996	16973	17	protein coding
MAPK4	GeneID:5596	172947	11	protein coding
TCF20	GeneID:6942	184804	11	protein coding
MGC27121	GeneID:408263	5322	3	protein coding
GARNL3	GeneID:84253	170596	41	protein coding
ANK3	GeneID:288	706292	59	protein coding
AKAP6	GeneID:9472	50390	28	protein coding
C3orf40	GeneID:131408	11550	8	protein coding
MGC2747	GeneID:79086	30892	17	protein coding
GRM4	GeneID:2914	134972	18	protein coding
ACD	GeneID:65057	4481	14	protein coding
PADI1	GeneID:29943	42080	16	protein coding
KRTHA2	GeneID:3882	8819	8	protein coding
MYBPC3	GeneID:4607	22497	36	protein coding
C3orf45	GeneID:132228	10287	5	protein coding
SPAG5	GeneID:10615	22906	21	protein coding
OXR1	GeneID:55074	483651	30	protein coding
CDH16	GeneID:1014	12063	17	protein coding
B3GALT7	GeneID:374907	4572	4	protein coding

Gene	Gene_ID	Gene size	Number of exon	Gene type
PAQR5	GeneID:54852	110034	17	protein coding
ESR1	GeneID:2099	474130	21	protein coding
DSU	GeneID:55686	92463	9	protein coding
IGF2AS	GeneID:51214	9364	4	miRNA promoters
TIAM1	GeneID:7074	442758	34	protein coding, Cancer-related targets
LIMK1	GeneID:3984	40793	20	protein coding
GSTP1	GeneID:2950	4266	2	protein coding
SCYL1	GeneID:57410	14828	15	protein coding
NQO1	GeneID:1728	21156	9	protein coding
GPAM	GeneID:57678	66712	22	protein coding
AMIGO2	GeneID:347902	5445	3	protein coding
PARD6A	GeneID:50855	3030	5	protein coding
LRFN4	GeneID:78999	5029	4	protein coding
PTK7	GeneID:5754	86652	19	protein coding
RASSF5	GeneID:83593	82938	10	protein coding, Cancer-related targets
PACS1	GeneID:55690	175585	30	protein coding
C14orf68	GeneID:283600	8242	7	protein coding
LOC55908	GeneID:55908	5642	6	protein coding
INHBC	GeneID:3626	18516	4	protein coding
DAK	GeneID:26007	21286	20	protein coding
ANGPTL7	GeneID:10218	7841	5	protein coding
SLC10A1	GeneID:6554	23073	5	protein coding
CCL16	GeneID:6360	6204	5	protein coding
SERPINA10	GeneID:51156	11159	6	protein coding

Gene	Gene_ID	Gene size	Number of exon	Gene type
LOC284912	GeneID:284912	9342	2	unknown
UROC1	GeneID:131669	37693	21	protein coding
HGFAC	GeneID:3083	8798	14	protein coding
THPO	GeneID:7066	7410	6	protein coding
PROZ	GeneID:8858	14927	11	protein coding
F9	GeneID:2158	33901	8	protein coding
ITIH1	GeneID:3697	15676	23	protein coding
CYP2D6	GeneID:1565	5608	9	protein coding
CYP2D7P1	GeneID:1564	5563	11	pseudogene
CA5A	GeneID:763	49711	10	protein coding
MASP2	GeneID:10747	21911	10	protein coding
NDST1	GeneID:3340	73593	24	protein coding
AGXT2	GeneID:64902	51193	15	protein coding
AGXT	GeneID:189	13224	11	protein coding
PGLYRP2	GeneID:114770	31512	6	protein coding
AKR1D1	GeneID:6718	116863	21	protein coding
HPR	GeneID:3250	23824	11	protein coding, Cancer-related targets
APOC3	GeneID:345	4567	5	protein coding
OKL38	GeneID:29948	19251	12	protein coding
SERPINF2	GeneID:5345	13633	12	protein coding
ITIH3	GeneID:3699	15442	21	protein coding
APCS	GeneID:325	2241	2	protein coding
APOC2	GeneID:344	8528	7	protein coding
MGC10471	GeneID:81576	32737	11	protein coding
FLJ23577	GeneID:79925	197968	49	protein coding
EPHA1	GeneID:2041	19804	19	protein coding

Gene	Gene_ID	Gene size	Number of exon	Gene type
TBX1	GeneID:6899	28091	12	protein coding
C1orf89	GeneID:79363	9526	7	protein coding
CASQ1	GeneID:844	12592	13	protein coding
MYOG	GeneID:4656	4105	3	protein coding
TNNC2	GeneID:7125	11732	9	protein coding
ZNF537	GeneID:57616	75803	6	protein coding
CHRND	GeneID:1144	11875	13	protein coding
MYOZ3	GeneID:91977	19692	7	protein coding
STAC3	GeneID:246329	8941	12	protein coding
KRTHB4	GeneID:3890	9041	9	protein coding
CLCN1	GeneID:1180	37158	25	protein coding
NR5A1	GeneID:2516	27394	9	protein coding
BPESC1	GeneID:60467	22183	4	miRNA promoters
FLJ25102	GeneID:348738	71543	6	protein coding
FASLG	GeneID:356	9061	4	protein coding
SSTR3	GeneID:6753	9285	3	protein coding
GMEB2	GeneID:26205	40640	11	protein coding
ITPKB	GeneID:3707	108834	14	protein coding
MXD3	GeneID:83463	12497	12	protein coding
TACC1	GeneID:6867	126043	28	protein coding, Cancer-related targets
ZNF681	GeneID:148213	20897	4	protein coding
CKB	GeneID:1152	4653	6	protein coding
HSF4	GeneID:3299	7761	10	protein coding
EXOSC6	GeneID:118460	2900	2	protein coding
GPX1	GeneID:2876	2625	2	protein coding
CTRL	GeneID:1506	5975	3	protein coding

Gene	Gene_ID	Gene size	Number of exon	Gene type
ELA2A	GeneID:63036	16564	8	protein coding
AQP12A	GeneID:375318	7839	7	protein coding
BHLHB8	GeneID:168620	1906	1	protein coding
ACE	GeneID:1636	45984	46	protein coding
FRY	GeneID:10129	266558	65	protein coding
LDHA	GeneID:3939	15238	10	protein coding
BTBD6	GeneID:90135	3804	2	protein coding
TNFAIP8	GeneID:25816	127108	7	protein coding, Cancer-related targets
RBPSUHL	GeneID:11317	11513	13	protein coding
CXorf2	GeneID:1527	26067	9	protein coding
C1orf54	GeneID:79630	13928	11	protein coding
KCNK9	GeneID:51305	103419	7	protein coding
C10orf59	GeneID:55328	311867	8	protein coding
NEU1	GeneID:4758	6448	3	protein coding
NKD2	GeneID:85409	31315	11	protein coding
C6orf27	GeneID:80737	12942	19	protein coding
SLC25A22	GeneID:79751	9042	15	protein coding
WFDC1	GeneID:58189	39399	7	protein coding
RIN1	GeneID:9610	7799	9	protein coding
FAM63A	GeneID:55793	13027	13	protein coding
P2RX7	GeneID:5027	54455	14	protein coding
OASL	GeneID:8638	20125	6	protein coding
GRIN2D	GeneID:2906	51257	13	protein coding
BAK1	GeneID:578	8891	8	protein coding
MC1R	GeneID:4157	10059	4	protein coding
FAM57B	GeneID:83723	29752	16	protein coding

Gene	Gene_ID	Gene size	Number of exon	Gene type
PRND	GeneID:23627	7751	2	protein coding
PTK6	GeneID:5753	10146	8	protein coding
GPR162	GeneID:27239	7076	5	protein coding
IKBKE	GeneID:9641	27633	22	protein coding, Cancer-related targets
GNG13	GeneID:51764	3893	4	protein coding
TSPAN1	GeneID:10103	12086	12	protein coding
H1T2	GeneID:341567	2500	1	protein coding
SYCP3	GeneID:50511	12025	7	protein coding
H2-ALPHA	GeneID:113457	8042	6	protein coding
DDX4	GeneID:54514	80341	27	protein coding
DND1	GeneID:373863	3993	2	protein coding
SSX2	GeneID:6757	11494	10	protein coding
SLC25A31	GeneID:83447	45116	6	protein coding
MOV10L1	GeneID:54456	73012	29	protein coding
ACTL7B	GeneID:10880	3569	1	protein coding
C3orf24	GeneID:115795	28115	19	protein coding
BCL10	GeneID:8915	13041	4	protein coding
PNLDC1	GeneID:154197	21636	19	protein coding
CETN1	GeneID:1068	2358	1	protein coding
PPP2R2A	GeneID:5520	82390	18	protein coding
RNF113B	GeneID:140432	2681	3	protein coding
MGC26816	GeneID:164684	60932	12	protein coding
FLJ35894	GeneID:283847	47845	21	protein coding
PRKACG	GeneID:5568	2771	1	protein coding
ZNF690	GeneID:146050	14054	8	protein coding
AP3B2	GeneID:8120	51834	31	protein coding

Gene	Gene_ID	Gene size	Number of exon	Gene type
MAEL	GeneID:84944	34306	15	protein coding
PPM1G	GeneID:5496	30694	9	protein coding
CT45-2	GeneID:158852	10826	6	protein coding, Cancer-related targets
ANKRD7	GeneID:56311	29259	9	protein coding
C5orf14	GeneID:79770	28923	8	protein coding
RNF17	GeneID:56163	116970	39	protein coding
SLC25A2	GeneID:83884	2617	1	protein coding
LDHAL6B	GeneID:92483	2864	3	protein coding
PEG10	GeneID:23089	14571	3	protein coding
HIST1H4G	GeneID:8369	1574	1	protein coding
DNAI2	GeneID:64446	41838	16	protein coding
TCEB3B	GeneID:51224	4246	1	protein coding
FLJ14768	GeneID:84922	11791	3	protein coding
C15orf2	GeneID:23742	9253	1	protein coding

ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสของยีน *DSU* และไพรเมอร์

ลำดับเบสของยีน *DSU* ก่อนเข้ากระบวนการไบซัลไฟต์ทริทเมนต์

AGCCAATAAAAAGGTACGAATAGATTTCAGCCCAACCTCGTGCTCTGTGGCTCCAGGGCTTTCCCCTCCCC
 GCCCTCCCCCAGCCCGGCTGCCAGCCTCCGGTGGGATTTTGAGGACTGGCTGGAGTCCCTGCCTT
 CACCCTTAGAGGGCGGTAGCGGGGCGTCTCGTGACGCATGCGCCCCAAATTGCGCTCGGGGAATTTAAA
 AGAGGGGAAAAAAGCCCCGAAGAAAACCTCACGCCCCAAACAAAACGCAAGGAGAGGAGGGCGCGCGGCC
 TGCAGCCCTCGCCCGCTCCCCGGCCGCGGCGTGATGCGCGCGGACCAGCCCGCGACGCCCGGGCTGCC
 GCTGTCCCCGCACCTGGACGCTGGCGCGGTGGCCGCGCCCCAGCCTCGATCGCTCGCCGCGGCGACTCG
 GCCCCAGGCTTCCGGCGCCGGTGGGGCCCTCGCTCTCCATGGGGCTGAGGGACTGGCTGAGAACCGTG
TGCTGCTGCTCGGGTGCAGTGCTTGGAGGAGCGCGCCCTGCCTGAGAAGGAGCCCCCTCGTCAGGTGG
 GTGCGCCGCCCGGGCCGGATCTGGGCTTACCTGGGCCGTAGCCGGGCGCCGAGAGTGTGGACACCTGT
 GTGCTTGTGTGAGTTGGGGAGGTGGGCTTGTGGAAGGGCACGCGGAGGCCCATCTCAGCCCCTTGGT
 TCCTTATGGGATGTTTTGGGTTTGTTCCTTGAGTAAGATTTTTGCCGAAAAGCACAAATCTTCGGA

CG คือ ตำแหน่งของซีพีจีเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อดับ

ลำดับเบสของยีน *DSU* หลังผ่านกระบวนการไบซัลไฟต์ทริทเมนต์

AGTTAATAAAAAGGTACGAATAGATTTAGTTTAAATTTCTGTGTTTTGTGGTTTTAGGGTTTTTTTTTTTTTC
 GTTTTTTTTTAGTTCTGGTTGTAGTTTTCTGGTGTGTTGGGATTTTGAGGATTTGGTTGGAGTTTTTGT
 TTTTTTTAGAGGGCGGTAGCGGGGCGTTTCTGTGACGTATGCGTTTTTAAATGCGTTCTGGGAATTTAAA
 AGAGGGGAAAAAAGTTTGAAGAAAATTTACGTTTTTAAATAAAACTAAGGAGAGGAGGGCGCGCGGTT
 TGTAGTTTTCTGTCGCTTTTCTGGTGGCGCGGCGTGATGCGCGCGATTAGTTCTGCGACGTTCTGGGTTGTC
 GTTGTTTTTCTATTTGGACGTTGGCGCGGTGGTCTGCGTTTTTAGTTTCTGATCGTTCTGCGCGCGATTCTG
 GTTTTTAGGTTTTCTGCGCTCGGTGGGGTTTTCTGTTTTTTATGGGGTTGAGGGATTGGTTGAGAATCTGTG
 TGTGTTGTTGTTGCGGGTGCAGTGTTTGGAGGAGCGCGTTTTTGTGAGAAGGAGTTTTTTCTTAGGTGG
 GTGCGTCTGTTCTGGGTTTGGGTTTATTTGGGTCTAGTCTGGGCGTCTGAGAGTGTGGATATTTGT
 GTGTTTTGTGTGAGTTGGGGAGGTGGGTTTTGTTGGAAGGGTACCGCGAGGGCTTATTTTAGTTTTTTGGT
 TTTTTTATGGGATGTTTTGGGTTTGTTTTTGAGTAAGATTTTTGTCTGAAAAGTATAAATTTCTGGA

ไพรเมอร์ของยีน *DSU*

เมทิลเลชันไพรเมอร์

MET For primer	5'GGTGCAGTGTTTGGAGGAGCGC3'	62.4 องศาเซลเซียส
MET Rev primer	5'CCGAACGACGCACCCACCTAACG3'	62.4 องศาเซลเซียส

ฟิชอาร์โปรดักส์ 69 เบสแพร์ (Base pair)

อินเมทิลเลชันไพรเมอร์

UNMET For primer 5'GTTGTGGGTGTGAGTGTGGAGGAGTGT3' 62.9 องศาเซลเซียส

UNMET Rev primer 5'CCCAACCCAAACAACACACCCACCTAACA3'62.9 องศาเซลเซียส

พีซีอาร์โปรดัคต์ 81 เบสแพร์

ภาคผนวก ง

ภาคผนวก ง

ข้อมูลกลุ่มประชากรที่ใช้ในการทดลอง

กลุ่มประชากรที่เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อจากพาราฟินบล็อก

มาจากผู้ป่วยที่เสียชีวิตที่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 13 ราย ซึ่งประกอบด้วยอวัยวะทั้งหมด 16 ชนิด ได้แก่ ไชกระดูก, ปอด, กล้ามเนื้อ, หลอดเลือดแดง, ลำไส้, ตับ, ม้าม, ตับอ่อน, ตับ, ต่อมหมวกไต, สมอง, ผิวหนัง, เซลล์ประสาท, ต่อมน้ำเหลือง, หัวใจ และกระเพาะอาหาร

ตัวอย่าง	อายุ (ปี)	เพศ	อวัยวะ (แปลรื้เต็มค้ค่ามเทิลเลชั่น)															
			ใ้เกอระตุก	ค้อม	ค้มอง	ป้อด	ห้ดอด	ห้จ้ใจ	ค้ป	ค้าม	กระห้พะระ	ล้่าล้	ใ้ด	ค้ปค้อน	ค้อม	ค้วห้ง	ค้ล้ามค้	เทิลล้
1	83	ชาย	absence			0	17.91		20.38	0		18.68	11.11	0			26.33	
2	83	หญิง				0	absence		41.27	0		0	44.43		36.74		27.74	
3	71	ชาย				0			37.84			0	0	31.21			29.41	
4	50	ชาย	0			27.56			35.17	50.89		47.05	0	0			0	
5	6	หญิง			0	29.1			38.7	0			0				0	
6	73	หญิง	absence		0	41.5	14.61		23.86		0	0	0	0			0	0
7	65	หญิง			0	0			27.28		0	absence	absence			0	0	
8	79	หญิง			0	0	48.62		77.02		29.49	0	0	absence				
9	83	ชาย		23.42		0			47.36	35.35	21.36		0		34.62			
10	48	ชาย	23.1			12.41	15.44		44.35	17.89	0		0	15.69	30.93			
11	72	หญิง		absence					58.9	10.79	0		13.92	8.64				
12	70	ชาย		12.84		11.23	17		42.67	0		32.88	23.92	0				
13	74	หญิง					24.87		48.75	0	30.3	47.57	42.82	8.41				
		ค่าเฉลี่ย	11.55	18.13	0	11.07	23.075	13.17	41.81	12.77	12.915	19.52	11.35	7.99375	17.048	0	11.9257	0

กลุ่มประชากรที่เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอจากซีรัม

กลุ่ม	ตัวอย่าง	อายุ (ปี)	เพศ	ค่าเมทิลเลชั่น (เปอร์เซ็นต์)
คนปกติ	1	54	ชาย	7.24
	2	40	ชาย	26.85
	3	36	ชาย	22.94
	4	48	ชาย	28.9
	5	44	ชาย	0
	6	44	ชาย	11.97
	7	42	ชาย	0
	8	41	ชาย	0
	9	47	ชาย	31.87
	10	47	ชาย	31.72
	11	33	ชาย	0
	12	45	ชาย	9.96
	13	46	หญิง	24.6
	14	49	หญิง	17.05
	15	54	หญิง	31.93
	16	48	หญิง	40.05
	17	61	หญิง	27.34
	18	52	หญิง	0
	19	49	หญิง	37.44
	20	52	หญิง	22.33
	21	42	หญิง	0
	22	34	หญิง	23.54

กลุ่ม	ตัวอย่าง	อายุ (ปี)	เพศ	ค่าเมทิลเลชั่น (เปอร์เซ็นต์)
คนปกติ	23	51	หญิง	43.91
	24	52	หญิง	31.61
ค่าเฉลี่ย				19.64
ผู้ป่วยโรคตับแข็ง	1	60	ชาย	32.32
	2	59	ชาย	14.7
	3	54	หญิง	52.12
	4	60	หญิง	27.43
	5	63	ชาย	39.47
	6	60	หญิง	52.55
	7	51	ชาย	29.14
	8	49	ชาย	40.98
	9	46	ชาย	36.68
ค่าเฉลี่ย				36.15
ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ	1	54	ชาย	35.9
	2	67	ชาย	20.16
	3	57	ชาย	30.73
	4	52	ชาย	44.87
	5	58	ชาย	19.63
	6	66	ชาย	35.42
	7	60	ชาย	36.01
	8	64	ชาย	25.3
	9	53	ชาย	25.68
	10	57	ชาย	16.13
	11	33	ชาย	49.96
	12	54	หญิง	51.21

กลุ่ม	ตัวอย่าง	อายุ (ปี)	เพศ	ค่าเมทิลเลชั่น (เปอร์เซ็นต์)
ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ	13	49	หญิง	43.77
	14	58	ชาย	61.77
	15	58	ชาย	57.74
	16	48	ชาย	52.62
	17	66	ชาย	75.68
	18	56	ชาย	30.75
	19	43	ชาย	30.27
	20	44	ชาย	17.69
	21	32	ชาย	34.3
ค่าเฉลี่ย				37.89
ผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบี	1	37	ชาย	15.97
	2	53	ชาย	5.67
	3	53	หญิง	23.23
	4	39	หญิง	9.77
	5	40	หญิง	0
	6	29	หญิง	0
	7	19	หญิง	27.13
	8	38	ชาย	3.46
	9	24	ชาย	25.49
	10	43	ชาย	38.32
	11	35	หญิง	23.08
	12	42	หญิง	0
	13	29	ชาย	11.68
	14	31	หญิง	26.97
	15	54	ชาย	28.19

กลุ่ม	ตัวอย่าง	อายุ (ปี)	เพศ	ค่าเมทิลเลชั่น (เปอร์เซ็นต์)
ค่าเฉลี่ย				15.93
ผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบี	1	37	หญิง	19.16
	2	36	ชาย	19.39
	3	52	ชาย	34.71
	4	50	ชาย	35.13
	5	39	ชาย	0
	6	28	ชาย	47.11
	7	53	ชาย	0
	8	45	ชาย	25.92
	9	34	หญิง	32.91
	10	41	หญิง	42.48
	11	36	ชาย	7.7
	12	28	หญิง	33.25
	13	35	ชาย	0
	14	39	ชาย	39.36
	15	54	ชาย	0
	16	32	ชาย	17.9
	17	39	ชาย	0
	18	38	ชาย	15.39
	19	40	ชาย	0
	20	41	ชาย	16.07
	21	58	หญิง	17.77
	22	52	หญิง	20.29
	23	32	หญิง	13.34
	24	37	ชาย	10.33

กลุ่ม	ตัวอย่าง	อายุ (ปี)	เพศ	ค่าเมทิลเลชั่น (เปอร์เซ็นต์)
ผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบี	25	40	ชาย	21.6
	26	47	ชาย	0
	27	21	หญิง	30.62
	28	38	ชาย	0
	29	39	ชาย	38.53
	30	39	หญิง	40.04
ค่าเฉลี่ย				19.30

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นายทัชพล เมืองทรัพย์
วัน เดือน ปีเกิด	28 มีนาคม พ.ศ.2530
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ประสบการณ์การทำงาน	เจ้าหน้าที่บริการงานแพทย์(เทคนิคการแพทย์) ภาควิชา จุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2552 ถึง เดือน พฤษภาคม พ.ศ.2554
ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์	ชื่อเรื่อง ความคงทนของ Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV- 1) ระหว่างการเก็บรักษาและการขนส่งตัวอย่าง ลงในวารสาร เทคนิคการแพทย์ ฉบับปีที่ 37 ฉบับที่ : 2 เลขหน้า : 2819- 2826 ปีพ.ศ. : 2552