



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ความสัมพันธ์ระหว่าง rs116909374 บนโครโมโซม 14q13.3
และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated ในประชากรไทย

Association between rs116909374 on 14q13.3
and differentiated thyroid cancer in Thai population

ชื่อนิสิต นางสาวสุนิตา ชุณห์กุล เลขประจำตัว 5832151523

ภาควิชา พญักษศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

ความสัมพันธ์ระหว่าง rs116909374 บนโครโมโซม 14q13.3
และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated ในประชากรไทย

นางสาวสุนิตา ชุณหะกุล

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาแพทยศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

Association between rs116909374 on 14q13.3
and differentiated thyroid cancer in Thai population

Miss Sunita Chunkul

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Bachelor of Science in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science, Chulalongkorn University
Academic Year 2018

| | |
|-------------------------|---|
| ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์ | ความสัมพันธ์ระหว่าง rs116909374 บนโครโมโซม 14q13.3 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated ในประชากรไทย |
| ชื่อนิสิต | นางสาวสุนิตา ชุณหกุล |
| สาขาวิชา | พันธุศาสตร์ |
| ภาควิชา | พฤกษศาสตร์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง |
| ปีการศึกษา | 2561 |

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงการวิทยาศาสตร์

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โสรัตน์ระกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| | |
|-------------------------|---|
| ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์ | ความสัมพันธ์ระหว่าง rs116909374 บนโครโมโซม 14q13.3 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated ในประชากรไทย |
| ชื่อนิสิต | นางสาวสุนิตา ชุณหกุล |
| สาขาวิชา | พันธุศาสตร์ |
| ภาควิชา | พฤกษศาสตร์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง |
| ปีการศึกษา | 2561 |

บทคัดย่อ

มะเร็งต่อมไทรอยด์ เป็นมะเร็งที่พบได้ทุกช่วงอายุ ซึ่งพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย โดยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated (DTC) เป็นชนิดที่สามารถพบบ่อยที่สุดของมะเร็งต่อมไทรอยด์ทั้งหมด จากการศึกษา Genome Wide Association Study (GWAS) ในประชากรประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า SNPs 5 ตำแหน่ง ได้แก่ rs965513 rs944289 rs116909374 rs2439302 และ rs966423 มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง rs116909374 บนโครโมโซม 14q13.3 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated ในประชากรไทย ผู้วิจัยทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จำนวน 207 คน และคนปกติจำนวน 179 คน จากนั้นศึกษาจีโนไทป์ของแต่ละคนด้วยวิธี PCR-RFLP และตรวจสอบด้วยวิธี Sequencing ผลการวิจัยพบว่าในผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC มีจีโนไทป์ CC และ CT จำนวน 206 และ 1 คน ตามลำดับ ส่วนคนปกติมีจีโนไทป์ CC จำนวน 179 คน ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้พบว่า rs116909374 บนโครโมโซม 14q13.3 ไม่มีความสัมพันธ์กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ในประชากรไทย จากการศึกษาในประเทศต่างๆ พบความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล T ของ rs116909374 กับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ในคนคอเคเซียน ในขณะที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง rs116909374 กับการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ในคนเอเชีย ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ ดังนั้น ทำให้ rs116909374 จึงไม่เหมาะสมในการใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำนายโอกาสการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ในประชากรไทย เนื่องจาก rs116909374 ไม่มีความสัมพันธ์กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ในประชากรไทย และคนเอเชีย ซึ่งมีความแตกต่างทางเชื้อชาติกับคนคอเคเซียนที่พบความสัมพันธ์ได้

คำสำคัญ: มะเร็งต่อมไทรอยด์, rs116909374, 14q13.3, PCR-RFLP

| | |
|----------------------|---|
| Title | Association between rs116909374 on 14q13.3 and differentiated thyroid cancer in Thai population |
| Student name | Miss Sunita Chunkul |
| Program | Genetics |
| Department | Botany |
| Advisor | Assist. Prof. Dr. Patra Yeetong |
| Academic year | 2018 |

Abstract

Thyroid cancer can be found at every age and women are more likely to develop thyroid cancer than men. Differentiated thyroid cancer (DTC) is the most common type of all thyroid cancers. Previous Genome Wide Association Study (GWAS) in United States population demonstrated that 5 SNPs including rs965513 rs944289 rs116909374 rs2439302 and rs966423 were associated with thyroid cancer. The objective of this study is to identify the association between rs116909374 on 14q13.3 and differentiated thyroid cancer in Thai population. Differentiated thyroid cancer patients and healthy controls of 207 and 179 individuals, respectively. PCR-RFLP analysis was used to determine the genotype and the results were confirmed by sequencing. We found that 206 and 1 individuals Thai differentiated thyroid cancer patients had CC and CT genotypes, respectively, while only CC genotype were found in the healthy controls. Hence, there was no significant association between the risk T allele of rs116909374 and DTC in Thai population. Previous study showed that no association was found between rs116909374 and thyroid cancer in Asian which corresponded with this study. In conclusion, rs116909374 is not an informative genetic markers for thyroid cancer prediction in Thai population.

Keywords: Thyroid cancer, rs116909374, 14q13.3, PCR-RFLP

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์นี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี โดยได้รับความปรึกษาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำโครงการ อีกทั้งยังช่วยแก้ไขปัญหาคือข้อบกพร่องต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง และอาจารย์ ดร.สุรัสวดี อิศวรรัตน์ ที่ช่วยเก็บตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทำโครงการ รวมทั้งให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์ในการทำโครงการครั้งนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โฉมดีตระกูล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์ กรรมการสอบ ที่ช่วยตรวจทาน ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ และแก้ไขโครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณเงินทุนสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2561 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบเงินทุนสำหรับการทำโครงการวิทยาศาสตร์ และเงินทุนอุดหนุนการศึกษาจากกองทุนสมเด็จพระบรมโอรสาธิราชเจ้าฟ้ามหาวชิราลงกรณ สยามมกุฎราชกุมาร

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้ อบรมสั่งสอน จนสามารถนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการทำโครงการให้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการ 306 และ ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และวัสดุอุปกรณ์การทดลอง ตลอดจนอำนวยความสะดวกต่างๆในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณนางสาวสโรชา มิตรบัญญัติ, นางสาวมณฑกา สิงห์พรม และนายรัฐพงศ์ โสมติด ที่ช่วยเหลือในการทำการทดลอง และกำลังใจจนทำให้โครงการนี้สำเร็จ

ขอขอบคุณตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ และคนปกติทุกคน สำหรับการทำการทดลองในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และเพื่อนๆ ทุกคน สำหรับการสนับสนุน การช่วยเหลือและกำลังใจในการทำโครงการครั้งนี้

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญภาพ | จ |
| สารบัญตาราง | ฉ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| บทที่ 2 การตรวจเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 4 |
| บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ | 12 |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง | 18 |
| บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา | 22 |
| บทที่ 6 สรุปผลการศึกษา | 24 |
| เอกสารอ้างอิง | 25 |
| ภาคผนวก | 28 |

สารบัญภาพ

| | หน้า |
|---|------|
| ภาพที่ 2.1 ก้อนมะเร็งที่ต่อมไทรอยด์ | 4 |
| ภาพที่ 2.2 การศึกษา Genome-wide association study (GWAS) | 7 |
| ภาพที่ 2.3 Single nucleotide polymorphisms (SNPs) | 8 |
| ภาพที่ 2.4 ตำแหน่งของ rs116909374 บนโครโมโซมที่ 14q13.3 | 8 |
| ภาพที่ 2.5 ขั้นตอนการทำงานของกระบวนการพีซีอาร์ ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ Denaturation, Annealing และ Extension | 10 |
| ภาพที่ 4.1 แผนภาพจำลองการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NsiI</i> | 19 |
| ภาพที่ 4.2 ผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ของ rs116909374 ที่อุณหภูมิ 56 และ 58 องศาเซลเซียส | 19 |
| ภาพที่ 4.3 ผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NsiI</i> | 20 |
| ภาพที่ 4.4 ผล DNA sequencing ของ rs116909374 | 21 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบข้อจำกัดของการตรวจสอบจีโนไทป์วิธี RFLP DNA sequencing และ HRM | 11 |
| ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ | 14 |
| ตารางที่ 3.2 สภาวะในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ | 15 |
| ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมที่ใช้ในปฏิกิริยาการตรวจสอบจีโนไทป์ | 16 |
| ตารางที่ 4.1 เพศ อายุ และช่วงอายุของผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC และคนปกติที่นำมาศึกษา | 18 |
| ตารางที่ 4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาที่ตำแหน่ง rs116909374 | 18 |
| ตารางที่ 4.3 สภาวะในปฏิกิริยาตรวจสอบจีโนไทป์ | 19 |
| ตารางที่ 4.4 ข้อมูลจีโนไทป์ของคนปกติ และผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ที่ทำการศึกษา | 20 |

บทที่ 1

บทนำ

ต่อมไทรอยด์ (thyroid gland) เป็นอวัยวะสร้างฮอร์โมน T3 (triiodothyronine) และ T4 (thyroxine) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเผาผลาญพลังงานของร่างกาย อุณหภูมิของร่างกาย ความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ ระดับไขมันในเลือด รวมทั้งอารมณ์และความรู้สึก เมื่อผิดปกติ บริเวณต่อมไทรอยด์จะมีลักษณะเป็นก้อนโตขึ้น ซึ่งอาจเกิดเป็นโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ (thyroid cancer) (Bonert and Friedman, 2007)

มะเร็งต่อมไทรอยด์ เป็นมะเร็งที่พบได้ทุกช่วงอายุ โดยพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ในปี 2559 โรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ถูกจัดอยู่ในอันดับที่ 14 ของโรคมะเร็งที่พบทั้งหมดในประเทศไทย และมะเร็งต่อมไทรอยด์ถูกจัดเป็นอันดับที่ 8 ของมะเร็งทั้งหมดที่พบในประชากรหญิงไทย (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2561) มะเร็งต่อมไทรอยด์มี 3 ชนิด ได้แก่ differentiated thyroid cancer (DTC) medullary thyroid cancer (MTC) และ anaplastic thyroid cancer (ATC) (Verburg, Brans, and Mottaghy, 2011) โดยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC เป็นชนิดที่สามารถพบได้ 94% ของมะเร็งต่อมไทรอยด์ทั้งหมด (Sherman, 2003) และสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดย่อย ได้แก่ papillary thyroid cancer (PTC) และ follicular thyroid cancer (FTC) (Verburg et al., 2011) ซึ่งชนิดย่อย PTC พบได้ 85% ของมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC (Palimeri, Gousis, and Vlassopoulou, 2015)

งานวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาถึงความผิดปกติแบบ somatic mutation จากก้อนมะเร็งต่อมไทรอยด์ ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันการเกิดโรค การวางแผนการรักษา ตลอดจนเพื่อการพยากรณ์โรค เช่น มิวเทชันในยีน *BRAF* ที่ตำแหน่ง c.1799T>A (p.V600E) พบมากถึง 40% ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC มิวเทชันในยีน *RAS* ที่โคดอน 12 13 หรือ 61 พบ 10-12% ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC และมิวเทชันในยีน *RET* ตรวจพบในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC 40-70% (Chien and Koeffler, 2012) เป็นต้น ในขณะที่การศึกษาความผิดปกติใน germline สามารถใช้ทำนายความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ได้ เรียกว่า Genetic predisposition หรือ Genetic susceptibility ที่เกิดความผิดปกติบนยีนแล้ว มีความสัมพันธ์กับการเกิดของโรค แต่อาจไม่ได้เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค เช่น

ยีน *FOXE1* บนโครโมโซม 9q22.33 และยีน *TTF-1* บนโครโมโซม 14q13.3 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC และ FTC (Gudmundsson et al., 2009)

จากการศึกษา Genome Wide Association Study (GWAS) ของการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC กับ SNPs ในผู้ป่วย จำนวน 1,216 คน และคนปกติจำนวน 1,416 คน พบว่า SNPs 5 ตำแหน่ง ได้แก่ rs965513 rs944289 rs116909374 rs2439302 และ rs966423 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC ในประชากรประเทศสหรัฐอเมริกา โดย rs965513 มีค่า OR=1.81 CI=1.62-2.04 และ p-value=8.20x10⁻²⁴ rs944289 มีค่า OR=1.23 CI=1.09-1.38 และ p-value=4.89x10⁻⁴ rs116909374 มีค่า OR=1.90 CI=1.44-2.53 และ p-value=7.54x10⁻⁶ rs2439302 มีค่า OR=1.30 CI=1.16-1.45 และ p-value=5.11x10⁻⁶ และ rs966423 มีค่า OR=1.27 CI=1.14-1.42 และ p-value=2.18x10⁻⁵ (Jendrzewski et al., 2016) ในการศึกษาประชากรประเทศไอซ์แลนด์ศึกษา SNPs 3 ตำแหน่ง ได้แก่ rs116909374 rs2439302 และ rs966423 พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC โดย rs116909374 มีค่า OR=2.03 CI=1.54-2.67 และ p-value=5.4x10⁻⁷ rs2439302 มีค่า OR=1.41 CI=1.23-1.62 และ p-value=1.3x10⁻⁶ และ rs966423 มีค่า OR=1.26 CI=1.11-1.43 และ p-value=3.8x10⁻⁴ (Gudmundsson et al., 2013) ส่วนคนประชากรประเทศจีนมีการศึกษา SNPs 5 ตำแหน่ง ได้แก่ rs965513 rs944289 rs116909374 rs2439302 และ rs966423 พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC เพียง 4 ตำแหน่ง ได้แก่ rs965513 rs944289 rs2439302 และ rs966423 โดยมีค่าความเสี่ยงในครอบครัวคือ 1.02 1.04 1.02 และ 1.05 ตามลำดับ (Guo et al., 2014)

จากการศึกษาในคนคอเคเซียน ได้แก่ ประชากรประเทศสหรัฐอเมริกา (Jendrzewski et al., 2016) ประชากรประเทศไอซ์แลนด์ ประชากรประเทศเนเธอร์แลนด์ และประชากรประเทศสเปน พบว่า rs116909374 บนโครโมโซม 14q13.3 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ (Gudmundsson et al., 2013) แต่จากการศึกษาในคนเอเชีย ได้แก่ ประชากรประเทศจีน พบว่า rs116909374 บนโครโมโซม 14q13.3 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ (Guo et al., 2014)

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยเลือกศึกษาความสัมพันธ์ของตำแหน่ง rs116909374 กับโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ เนื่องจาก rs116909374 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ในคนคอเคเซียน แต่ยังไม่พบความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC

ในคนเอเชีย และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำนายโอกาสการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ในประชากรไทยได้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง rs116909374 บนโครโมโซม 14q13.3 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด differentiated ในประชากรไทย

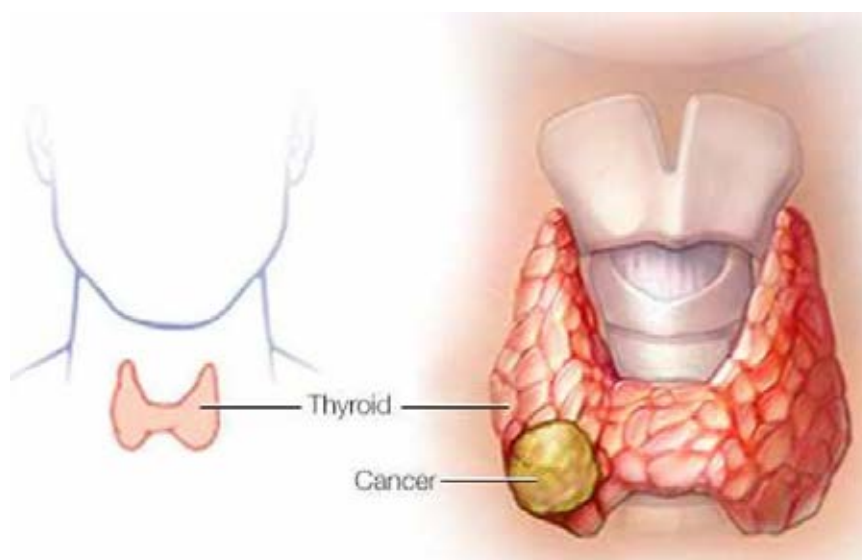
บทที่ 2

การตรวจเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ต่อมไทรอยด์และมะเร็งต่อมไทรอยด์

ต่อมไทรอยด์เป็นต่อมไร้ท่อที่ใหญ่ที่สุดในร่างกาย มีรูปร่างคล้ายกับผีเสื้อ อยู่บริเวณส่วนหน้าของลำคอ ประกอบด้วย 2 กลีบใหญ่ ได้แก่กลีบด้านซ้าย และกลีบด้านขวา ทั้ง 2 กลีบเชื่อมต่อกันด้วยเนื้อเยื่อบางๆ ที่เรียกว่า อีสท์มัส (Isthmus) นอกจากนี้ต่อมไทรอยด์ยังทำหน้าที่สร้างและหลั่งฮอร์โมนไทรอกซิน (thyroxine, tetraiodothyronine, T4) และไตรไอโอดไทโรนีน (triiodothyronine, T3) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีผลในการควบคุมเมแทบอลิซึมของเซลล์ต่างๆ โดยปกติแล้วเซลล์จะแบ่งตัวเพื่อสร้างเซลล์ใหม่และทดแทนเซลล์เก่าโดยการควบคุมของร่างกาย แต่ถ้ามีการแบ่งตัวมากเกินไป โดยที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ จะทำให้เกิดก้อนเนื้อขึ้น เรียกว่า มะเร็งต่อมไทรอยด์ (ปราณี ฉายศิริ, 2557) (ภาพที่ 2.1)

มะเร็งต่อมไทรอยด์เป็นมะเร็งที่พบได้ทุกช่วงอายุ โดยจะพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 นอกจากนี้มะเร็งต่อมไทรอยด์ถูกจัดอยู่ในอันดับที่ 14 ของมะเร็งทั้งหมดในประเทศไทย และถูกจัดอยู่ในอันดับที่ 8 ของมะเร็งที่พบในประชากรหญิงไทย (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2561)



ภาพที่ 2.1 ก้อนมะเร็งที่ต่อมไทรอยด์ (Mayo clinic, 2019 : online)

ประเภทของมะเร็งต่อมไทรอยด์

Differentiated thyroid cancer (DTC) เป็นชนิดที่สามารถพบได้ 94% ของมะเร็งต่อมไทรอยด์ทั้งหมด (Sherman, 2003) และสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดย่อย ได้แก่ ชนิด papillary thyroid cancer (PTC) พบได้ 85% ของมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC (Palimeri et al., 2015) พบมากในช่วงอายุระหว่าง 30-50 ปี มะเร็งชนิดนี้โตช้า ไม่มีอาการ หรือไม่แสดงอาการรุนแรง การแพร่กระจายส่วนใหญ่จะไปที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำคอ หรือถ้าเป็นมากอาจลุกลามไปที่ปอด และกระดูก มะเร็งชนิดนี้มักจะอยู่เฉพาะในกึ่งหนึ่งของไทรอยด์ หรืออาจข้ามไปอีกกึ่งหนึ่งทางต่อมน้ำเหลือง โดยมากมักเป็นก้อนขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร (Clayman, 2018 : online) และชนิด follicular thyroid cancer (FTC) พบได้ 15% ของมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC (Verburg et al., 2011) อาจพบได้บ่อยในเขตที่ขาดไอโอดีน มักจะพบในผู้หญิง และพบมากในช่วงอายุ 40-60 ปี ซึ่งการแพร่กระจายมะเร็งชนิดนี้จะลุกลามเข้าไปในโครงสร้างหลอดเลือดภายในต่อมไทรอยด์ และมะเร็งชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับการได้รับรังสีเพียงเล็กน้อย (Norman, 2016 : online)

Medullary thyroid cancer (MTC) พบได้ประมาณ 5% ของมะเร็งต่อมไทรอยด์ทั้งหมด (Sherman, 2003) สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (Sherman, 2003) คือ กลุ่ม Sporadic เป็นกลุ่มที่พบส่วนใหญ่ประมาณ 80% ส่วนมากพบในผู้ป่วยอายุประมาณ 45 ปี และเนื้องอกจับกับสารรังสีได้ต่ำกว่าเนื้อไทรอยด์ปกติ เป็น hypofunctioning หรือ cold nodule ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการท้องเดินร่วมด้วย หรือเรียกว่า กลุ่มอาการคุชชิง (Cushing's syndrome) และกลุ่ม Familial ส่วนใหญ่พบในผู้ป่วยอายุน้อย โดยมีอายุเฉลี่ย 35 ปี มักเกิดเป็นหลายก้อน และเป็นทั้งสองข้างของต่อมไทรอยด์ ถ้าพบผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด MTC ในเด็กส่วนใหญ่จะเกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal dominant ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโรค multiple endocrine adenomatosis type II หรือ type III

Anaplastic thyroid cancer (ATC) พบได้ประมาณ 1% ของมะเร็งต่อมไทรอยด์ทั้งหมด (Sherman, 2003) มะเร็งชนิดนี้จะไม่ตอบสนองต่อการรักษาใดๆ เนื่องจากเป็นมะเร็งที่มีความรุนแรง ส่วนใหญ่ผู้ป่วยจะเสียชีวิตใน 6-12 เดือน และไม่สามารถใช้แร่รังสีไอโอดีน-131 ในการรักษาได้ เพราะเซลล์มะเร็งไม่จับกับแร่รังสีไอโอดีน ส่วนใหญ่การรักษาจะประคับประคองตามอาการเท่านั้น มีผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด ATC ประมาณ 20% ที่มีเนื้องอกในต่อมไทรอยด์ โดยที่เซลล์มะเร็งมีลักษณะคล้ายกับเซลล์ปกติ เนื้องอกในต่อมไทรอยด์ส่วนใหญ่

เป็นแบบ PTC และอาจจะมี FTC ร่วมด้วย จึงเป็นไปได้ว่า มะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิดนี้อาจเกิดจากเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ปกติ (Ricarte-Filho et al., 2009)

สาเหตุการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์

ระดับ thyroid stimulating hormone (TSH) ในเลือดสูงเป็นเวลานานๆ จะไปกระตุ้นให้เซลล์เนื้องอกในต่อมไทรอยด์กลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ มะเร็งที่เกิดขึ้นมักเป็นชนิด papillary thyroid carcinoma (PTC) และ anaplastic thyroid carcinoma (ATC) (Farwell, 2014)

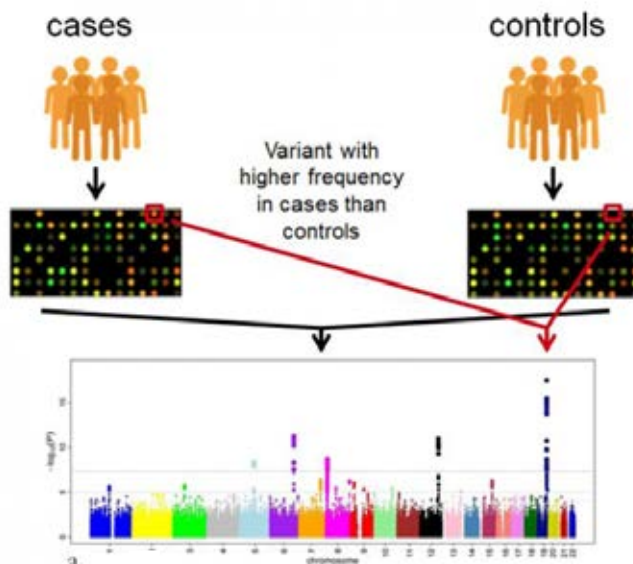
รังสีสามารถทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์และกลายเป็นมะเร็งได้ มีรายงานการใช้รังสีรักษาบริเวณศีรษะและลำคอ เช่น การรักษาโรคต่อมไทมัสโต หรือผู้ที่รอดชีวิตจากระเบิดปรมาณูในญี่ปุ่น ซึ่งจะกลายเป็นมะเร็งต่อมไทรอยด์ในภายหลัง แต่การกินน้ำแร่ไอโอดีน-131 เพื่อรักษาโรคไทรอยด์เป็นพิษยังไม่มียางานว่าทำให้เกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์ (Vaisman, Corbo, and Vaisman, 2011)

เกิดจากพันธุกรรม ในมะเร็งต่อมไทรอยด์บางชนิด เช่น papillary thyroid cancer (PTC) และ medullary thyroid carcinoma (MTC) มักมีประวัติเป็นในครอบครัว (Li, and Rawlings, 2018)

การเกิดมิวเทชันของยีนบางชนิด เช่น มิวเทชันในยีน *BRAF* ที่ตำแหน่ง c.1799T>A (p.V600E) พบมากถึง 40% ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC มิวเทชันในยีน *RAS* ที่โคดอน 12 13 หรือ 61 พบ 10-12% ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC และ มิวเทชันในยีน *RET* พบในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด PTC 40-70% (Chien and Koeffler, 2012)

Genome-wide association study (GWAS)

GWAS เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสที่แตกต่างกันในจีโนมของกลุ่มประชากรหนึ่งๆ ต่อลักษณะฟีโนไทป์หนึ่งๆ ที่มีความแตกต่างกัน มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบบริเวณของดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับลักษณะฟีโนไทป์ที่สนใจ ซึ่งทำได้โดยการนำกลุ่มประชากรหนึ่งๆ มาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยใช้ลักษณะฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำมาทำ SNP arrays ทั้งจีโนมของทั้ง 2 กลุ่ม แล้วจึงนำข้อมูลมาเขียนกราฟที่เรียกว่า Manhattan plot โดยจากกราฟ แกน y คือ $-\log p\text{-value}$ ของความสัมพันธ์แต่ละ SNPs และแกน x คือ ตำแหน่ง SNPs บนโครโมโซม ซึ่งหากแกน y มีค่ามาก และมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าตำแหน่งดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ที่สนใจ (ภาพที่ 2.2) ข้อดีของ GWAS คือ มีความละเอียด และแม่นยำสูง อีกทั้งช่วยร่นระยะเวลาและเพิ่มโอกาสในการค้นหาและระบุตำแหน่งยีนเป้าหมายเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสร้างแผนที่พันธุกรรมแบบดั้งเดิม (traditional linkage mapping) (Turner, 2018)



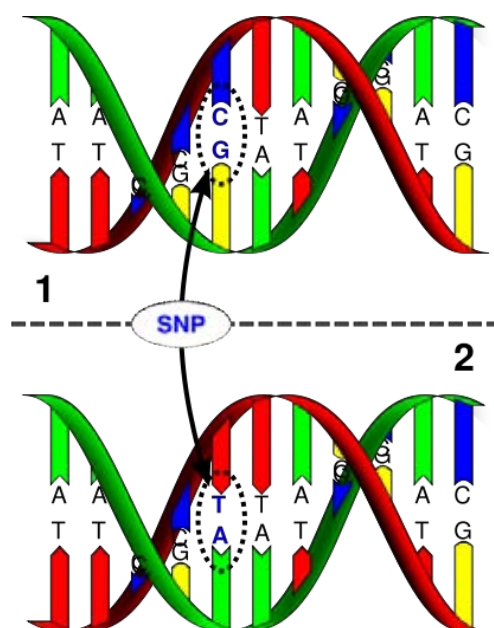
ภาพที่ 2.2 การศึกษา Genome-wide association study (GWAS) เป็นการนำกลุ่มประชากรหนึ่งๆมา แบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยใช้ลักษณะฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำมาทำ SNP arrays ทั้งจีโนมของทั้ง 2 กลุ่ม แล้วจึงนำข้อมูลมาเขียนกราฟที่เรียกว่า Manhattan plot โดยจากกราฟแกน y คือ $-\log p$ -value ของความสัมพันธ์แต่ละ SNPs และแกน x คือ ตำแหน่ง SNPs บนโครโมโซม โดย SNPs ที่มีค่า $-\log p$ -value มาก แสดงถึงตำแหน่งนั้นมีความสัมพันธ์กับลักษณะฟีโนไทป์ที่ต้องการศึกษา (EMBL-EBI, 2019 : online)

จากการศึกษา GWAS ของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ 1,216 คน กับกลุ่มปกติที่ไม่เป็นโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ 1,416 คน ในประชากรประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามี SNPs 5 ตำแหน่ง ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ ซึ่ง SNPs ได้แก่ rs965513 rs944289 rs116909374 rs2439302 และ rs966423 (Jendrzewski et al., 2016)

ภาวะพหุสัณฐานของยีน (polymorphisms)

ภาวะพหุสัณฐานของยีน (polymorphisms) คือ ความแตกต่างของรูปแบบทางพันธุกรรมมากกว่า 1 แบบขึ้นไป ซึ่งความแตกต่างนี้จะต้องมีมากกว่าร้อยละ 1 ของประชากรทั้งหมด โดยการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์หนึ่งโมเลกุลในจีโนมทำให้เกิดความแตกต่างจากจีโนมของสิ่งมีชีวิตอื่นในชนิดเดียวกัน หรือต่างจากโครโมโซมอีกแห่งหนึ่งในสิ่งมีชีวิตเดียวกัน เรียกว่า single nucleotide polymorphisms (SNPs) (ภาพที่ 2.3) SNPs เป็นการแปรผันทางพันธุกรรมที่มีความคงที่สูงที่สุด และยังสามารถพบได้บ่อยที่สุด โดยจะพบ SNPs 1 ครั้ง ได้ทุกๆ 100-300 เบส โดยพบได้ทั้งในส่วนที่สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีน (coding region) และส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน (non-coding region)

ซึ่งจะส่งผลต่อการแสดงออกของยีน ปริมาณและการทำงานของโปรตีน หรืออาจไม่ส่งผลกระทบใดๆเลยก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของ SNPs บนสายของ DNA (Jetanin, 2013 : online)



ภาพที่ 2.3 Single nucleotide polymorphisms (SNPs) เป็นการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์โมเลกุลหนึ่งในจีโนมทำให้เกิดความแตกต่างจากจีโนมของสิ่งมีชีวิตอื่นในชนิดเดียวกัน หรือต่างจากโครโมโซมอีกตำแหน่งหนึ่งในสิ่งมีชีวิตเดียวกัน (Genetics generation, 2015 : online)

rs116909374

rs116909374 เป็น SNPs ตำแหน่งหนึ่งที่อยู่บนโครโมโซมที่ 14q13.3 (ภาพที่ 2.4) ซึ่งมี major allele คือ allele C และ minor allele คือ allele T โดยค่า MAF (minor allele frequency) มีค่า 0.011 (1000 Gemones) (National Center for Biotechnology Information, 1992 : online)



ภาพที่ 2.4 ตำแหน่งของ rs116909374 บนโครโมโซมที่ 14q13.3 (UCSC genome browser, 2013 : online)

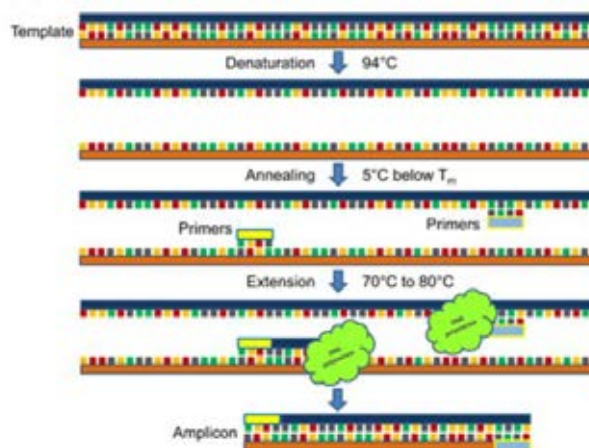
การศึกษาในคนคอเคเซียน ได้แก่ ประชากรประเทศสหรัฐอเมริกา (Jendrzewski et al., 2016) ประชากรประเทศไอซ์แลนด์ ประชากรประเทศเนเธอร์แลนด์ และประชากรประเทศสเปน พบว่า rs116909374 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ (Gudmundsson et al., 2013) แต่จากการศึกษาในคนเอเชีย ได้แก่ ประชากรประเทศจีน พบว่า rs116909374 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ (Guo et al., 2014)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นวิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis ในปี 1984 (Joshi and Deshpande, 2010) โดยเทคนิคนี้มีพื้นฐานมาจากการใช้ความสามารถของดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่มาประกอบเข้ากับดีเอ็นเอแม่แบบ เนื่องจากดีเอ็นเอพอลิเมอเรส สามารถเพิ่มนิวคลีโอไทด์ได้ต้องมีหมู่ 3'-OH มาก่อน จึงจำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์ที่สามารถจับกับ นิวคลีโอไทด์ตัวแรกได้ โดยข้อกำหนดนี้ทำให้นักวิจัยสามารถระบุขอบเขตของดีเอ็นเอแม่แบบ เฉพาะตำแหน่งที่ต้องการในการศึกษาได้ ซึ่งหลังจากการทำพีซีอาร์จะได้ดีเอ็นเอลำดับที่ต้องการ ออกมาหลายชุด (Abd-Elsalam, 2003)

พีซีอาร์สามารถแบ่งเป็นขั้นตอนได้ 3 ขั้นตอนหลักๆ (Joshi and Deshpande, 2010) (ภาพที่ 2.5) ได้แก่

1. Denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 90-97 องศาเซลเซียส
2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส
3. Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์จากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ ตามดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2.5 ขั้นตอนการทำงานของกระบวนการพีซีอาร์ที่ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนได้แก่ Denaturation, Annealing และ Extension (Lorenz, 2012)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นวิธีที่ตรวจสอบความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอของดีเอ็นเอ 2 โมเลกุลด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) ซึ่งลำดับดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จะได้ขนาดของดีเอ็นเอแตกต่างกันด้วย

หลังจากทำ PCR-RFLP แล้วจะตรวจสอบผลโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกชิ้นดีเอ็นเอ หรือโปรตีน (Kryndushkin et al., 2003) ที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันด้วยสนามไฟฟ้า ทั้งนี้เพราะดีเอ็นเอมีประจุลบจากหมู่ฟอสเฟต ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งมีมวลมากก็จะมีจำนวนประจุลบมากขึ้นด้วย ดังนั้นเมื่อพิจารณาสัดส่วนของประจุต่อมวลดีเอ็นเอแล้วจะเป็นค่าคงที่ agarose gel electrophoresis แยกดีเอ็นเอออกจากกันได้ โดยอาศัยแรงเสียดทานการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ แรงเสียดทานนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่างและขนาดของดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีแรงเสียดทานการเคลื่อนที่มากกว่า (Yilmaz, Ozic, and Gok, 2012)

DNA sequencing

DNA sequencing เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้สำหรับตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเบสอะดีนีน, กัวนีน, ไซโทซีน และไทมีน ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ โดยจะแยกแต่ละเบสด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ที่แตกต่างกัน ซึ่งข้อมูลจะแสดงออกมาเป็นกราฟโครมาโตแกรม (Chromatogram) (Kumar, 2012)

High resolution melt (HRM)

High resolution melt (HRM) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ตรวจสอบความแปรผันของยีน รวมไปถึงจีโนไทป์ของแต่ละบุคคล และ SNPs ได้ โดยใช้อุณหภูมิระหว่าง 55-95 องศาเซลเซียส และวัดค่า

สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้ในแต่ละช่วงของอุณหภูมิ ซึ่งจะแสดงข้อมูลเป็นกราฟ HRM plot (Slomka et al., 2017)

การตรวจสอบจีโนไทป์ของ SNPs มีหลายวิธี เช่น RFLP DNA sequencing และ HRM ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้เทคนิค RFLP เนื่องจากผู้วิจัยได้พิจารณาข้อจำกัดดังนี้ (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบข้อจำกัดของการตรวจสอบจีโนไทป์วิธี RFLP DNA sequencing และ HRM

| | RFLP | DNA sequencing | HRM |
|-------------|------|----------------|-----|
| ราคา | + | ++ | +++ |
| ความยาก | ++ | + | +++ |
| เวลา | +++ | + | ++ |
| ความทันสมัย | + | +++ | ++ |

หมายเหตุ ให้เครื่องหมาย + แสดงถึงความมากน้อยของข้อจำกัด

ข้อจำกัดของเทคนิค RFLP สามารถแบ่งได้เป็นข้อดีคือมีราคาถูกที่สุด และทำการทดลองง่ายที่สุด ส่วนข้อเสียคือเทคนิคนี้จะใช้เวลานานในการทดลอง และมีความทันสมัยที่น้อย เมื่อเทียบกับเทคนิค DNA sequencing และ HRM ซึ่งงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้เทคนิค RFLP เนื่องจากพิจารณาว่าเทคนิคนี้สามารถทดลองได้ง่าย ราคาถูก และสามารถตรวจสอบจีโนไทป์ของ SNPs ที่สนใจได้ นอกจากนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้เทคนิค DNA sequencing ซึ่งมีความทันสมัย โดยการสุ่มตัวอย่างตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค DNA sequencing เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของเทคนิค RFLP ส่วนเทคนิค HRM เป็นเทคนิคที่มีความทันสมัยเช่นกัน แต่การทดลองสามารถทำได้ยาก และราคาสูง จึงไม่เหมาะสมกับงานวิจัยนี้

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ

กลุ่มประชากรที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จากโรงพยาบาลศิริราช ซึ่งได้รับอนุมัติจากกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน จากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และสำหรับตัวอย่างเลือดคนปกติที่ไม่มีประวัติครอบครัวเป็นโรคเกี่ยวกับต่อมไทรอยด์ ได้รับการอนุญาตให้ใช้เลือดในการวิจัยจากแต่ละบุคคลแล้ว

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycler) (Bioer, China)
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis Machine) (Cosmo, Japan)
- เครื่อง Nanodrop spectrophotometer (Molecular Devices, USA)
- เครื่องถ่าย และบันทึกภาพเจล (gel documentation analysis) (Bio-Rad, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป
 - Distilled water
 - 70% alcohol
 - Agarose
 - Ethidium bromide (EtBr)
 - 100 bp DNA ladder (SMOBIO technology Inc., Taiwan)
 - 6X loading dye
2. สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ (Geneaid biotech Ltd., Taiwan)
 - 1X RBC lysis buffer
 - GT buffer
 - Proteinase K
 - GB buffer

- Elution buffer
 - Absolute ethanol
 - W1 buffer
 - Wash buffer
 - Preheated elution buffer
3. สารเคมีสำหรับทำพีซีอาร์ (Thermo Fisher Scientific Inc., America)
 - 10X Taq buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 - 25mM Magnesium chloride (MgCl_2)
 - 25mM Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)
 - 10 μM Forward primer
 - 10 μM Reverse primer
 - Taq DNA polymerase
 4. สารเคมีสำหรับตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (New England Biolabs Inc., America)
 - Restriction enzyme
 - NEBuffer 3.1
 5. สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างส่ง sequencing
 - ExoSAP-IT (Gibthai Inc., Thailand)

วิธีการดำเนินงาน

การศึกษาค้นคว้า และรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง

ศึกษาลำดับเบสของตำแหน่ง rs116909374 โดยค้นหาจากเว็บไซต์ www.NCBI.nih.gov และ www.ensemble.org และรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับกระบวนการพีซีอาร์

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อลำดับนิวคลีโอไทป์ที่ตำแหน่ง rs116909374 บนโครโมโซม 14q13.3 ให้ครอบคลุมส่วนที่ต้องการศึกษา และมีค่า %GC และค่า T_m ที่เหมาะสม โดยใช้โปรแกรม primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)

การออกแบบเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ออกแบบเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อตำแหน่ง rs116909374 ที่สามารถแยกจีโนมได้ทั้ง 3 แบบออกจากกันได้ โดยใช้โปรแกรม Webcutter2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>)

การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ และคนปกติมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GeneAid DNA Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) จากนั้นนำดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาวัดคุณภาพของดีเอ็นเอผ่านการวัดค่าดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง Nanodrop spectrophotometer (SpectraMax M3, Molecular Devices, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่า OD₂₆₀ ต่อ OD₂₈₀ ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอต่อค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน (OD₂₆₀/OD₂₈₀) สำหรับค่าการดูดกลืนแสงที่แสดงถึงดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์จะต้องมีค่ามากกว่า 1.8 (Sukumaran, 2011) หลังจากนั้นเก็บหลอดทดลองที่บรรจุดีเอ็นเอไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และใช้สารเคมีของบริษัท Thermo scientific (Thermo Fisher Scientific Inc., America) ซึ่งในหนึ่งปฏิบัติการของการทำ PCR ประกอบด้วยสารละลายปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร เป็นไปตามตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมที่ใช้ในปฏิบัติการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

| สาร | ความเข้มข้นสุดท้าย |
|---|--------------------|
| 10x Taq Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1X |
| 25 mM MgCl ₂ | 1.5 mM |
| 10 mM dNTP | 0.2 mM |
| 10 μM Forward primer | 0.15 μM |
| 10 μM Reverse primer | 0.15 μM |
| Taq DNA polymerase | 0.5 U |
| DNA sample (gDNA) | 50 ng |
| Distilled water | |

สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เป็นไปตามตารางที่ 3.2
 ตารางที่ 3.2 สภาวะในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

| ขั้นตอน | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) |
|-----------------------|-----------------------------|-------------|
| Initial denaturation | 94 | 5 |
| PCR cycle (35 cycles) | | |
| - Denaturation | 94 | 0.5 |
| - Annealing | ปรับตามความเหมาะสมของ T_m | 0.5 |
| - Extension | 72 | 0.75 |
| Final extension | 72 | 10 |

ในขั้น annealing ต้องปรับอุณหภูมิที่เหมาะสมกับ T_m ของไพรเมอร์ เพื่อให้ได้ขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการเพียงแถบเดียว และเหมาะสมกับการทดลองนี้

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยการทำให้เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมถาดสำหรับใส่เจล โดยเช็ดทำความสะอาด
2. วางถาดเจลไว้บนพื้นเรียบแล้วเสียบขั้วลวดบนด้านปลายของแผ่นเจล
3. เตรียมวุ้น agarose 1.5% โดยชั่งผง agarose 0.9 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำ 1X TBE buffer ปริมาตร 60 มิลลิลิตร และละลาย agarose โดยใช้เครื่องไมโครเวฟ จนกระทั่งได้สารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน
4. นำสารละลาย agarose จากข้อ 3 มาเทลงในถาดเจลที่เสียบขั้วแล้ว โดยเทให้มีความหนาประมาณ 5 มิลลิลิตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเจลแข็งตัว จากนั้นจึงค่อยๆ ดึงขั้วออกอย่างระมัดระวัง
5. นำถาดเจลไปใส่ใน electrophoresis chamber โดยให้ด้านที่มีรูอยู่ใกล้ขั้วลบ และเติมน้ำ 1X TBE buffer ให้ท่วมผิวหน้าเจล
6. ดูดสารละลาย 100 bp DNA ladder 1.5 ไมโครลิตร และ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 5 ไมโครลิตร ซึ่งผสมอยู่กับ 6X Loading dye 1 ไมโครลิตร ลงในรู
7. เมื่อโหลดตัวอย่างครบทุกหลุมแล้ว ปิดฝา electrophoresis chamber และเปิดกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

8. นำเจล agarose ไปแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นเวลา 10 นาที
9. นำแผ่นเจลไปส่องดูผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้โปรแกรม gel documentation analysis ทำการถ่ายภาพ และบันทึกภาพ ซึ่งจะพบแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ เทียบกับ 100 bp DNA ladder

การตรวจสอบจีโนไทป์ตำแหน่ง rs116909374

การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค RFLP และใช้สารเคมีของบริษัท BioLabs (New England Biolabs Inc., America) ซึ่งในหนึ่งปฏิบัติการของการทำ RFLP ประกอบด้วยสารละลายปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร เป็นไปตามตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมที่ใช้ในปฏิบัติการตรวจสอบจีโนไทป์

| สารประกอบ | ความเข้มข้นสุดท้าย |
|--------------------|--------------------|
| Restriction enzyme | 5 U |
| 10X NEBuffer 3.1 | 1X |
| DNA (PCR product) | |
| Distilled water | |

การตรวจสอบผลของจีโนไทป์ตำแหน่ง rs116909374 ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมภาตสำหรับใส่เจล โดยเช็ดทำความสะอาด
2. วางภาตเจลไว้บนพื้นเรียบแล้วเสียบหัวลงบนด้านปลายของแผ่นเจล
3. เตรียมวุ้น agarose 2% โดยชั่งผง agarose 1.2 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 1X TBE buffer ปริมาตร 60 มิลลิลิตร และละลาย agarose โดยใช้เครื่องไมโครเวฟ จนกระทั่งได้สารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน
4. นำสารละลาย agarose จากข้อ 3 มาเทลงในภาตเจลที่เสียบหัวแล้ว โดยเทให้มีความหนาประมาณ 5 มิลลิลิตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเจลแข็งตัว จากนั้นจึงค่อยๆ ดึงหัวออกอย่างระมัดระวัง

5. นำกรดเจลไปใส่ใน electrophoresis chamber โดยให้ด้านที่มีอยู่ใกล้ขั้วลบ และเติม 1X TBE buffer ให้ท่วมผิวหน้าเจล
6. ดูดสารละลาย 100 bp DNA ladder 1.5 ไมโครลิตร และ sample 20 ไมโครลิตร ซึ่งผสมอยู่กับ 6X Loading dye 1 ไมโครลิตร ลงในรู
7. เมื่อไหลดตัวอย่างครบทุกหลุมแล้ว ปิดฝา electrophoresis chamber และเปิดกระแสไฟฟ้า 135 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที
8. นำเจล agarose ไปแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นเวลา 10 นาที
9. นำแผ่นเจลไปส่องดูผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้โปรแกรม gel documentation analysis ทำการถ่ายภาพ และบันทึกภาพ ซึ่งจะพบแถบของดีเอ็นเอ เทียบกับ 100 bp DNA ladder

การตรวจสอบความถูกต้องของเทคนิค RFLP

การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค RFLP อาจเกิดความผิดพลาดบางอย่าง ส่งผลให้ผลของจีโนไทป์ผิดพลาด ซึ่งการตรวจสอบความถูกต้องของเทคนิค RFLP ทำได้โดยเทคนิค DNA sequencing (Macrogen Inc., Korea) ซึ่งในหนึ่งปฏิบัติการของการทำ DNA sequencing ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาณ 10 ไมโครลิตร และ ExoSAP-IT ปริมาณ 2 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เตรียมส่ง Macrogen Sequencing Service (Macrogen Inc., Korea)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ข้อมูลทั่วไปของประชากรที่ใช้ศึกษา ได้แก่ ผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC (DTC patients) จำนวน 207 คน และคนปกติ (Controls) จำนวน 179 คน ซึ่งข้อมูลต่างๆแสดงดังนี้ (ตารางที่ 4.1) ตารางที่ 4.1 เพศ อายุ และช่วงอายุของผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC และคนปกติที่นำมาศึกษา

| Characteristics | DTC patients | Controls |
|----------------------|--------------|-----------|
| Male/Female | 37/170 | 38/141 |
| Age (years)* | 51.6±14.6 | 30.6±11.8 |
| Range of age (years) | 19 - 88 | 19 - 87 |

*Mean±S.D.

ผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จำนวน 207 คน พบว่ามีเพศชาย จำนวน 37 คน และเพศหญิง จำนวน 170 คน ซึ่งผู้ป่วย DTC ทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยอายุเท่ากับ 51.6±14.6 และมีช่วงอายุระหว่าง 19-88 ปี ส่วนคนปกติ จำนวน 179 คน พบว่ามีเพศชาย จำนวน 38 คน และเพศหญิง จำนวน 141 คน ซึ่งคนปกติทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยอายุเท่ากับ 30.6±11.8 และมีช่วงอายุระหว่าง 19-87 ปี

จากการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง rs116909374 ได้ผลการออกแบบดังนี้ (ตารางที่ 4.2)

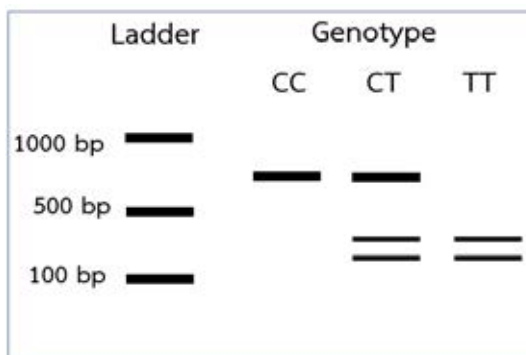
ตารางที่ 4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาที่ตำแหน่ง rs116909374

| Primer | Primer sequence (5'-3') | T _m (°C) | %GC | PCR-product size (bp) |
|----------------|-------------------------|---------------------|------|-----------------------|
| Forward primer | GAACAGCATTCACTTTGAGCA | 53.8 | 42.9 | 700 bp |
| Reverse primer | TGTGCTCTAATCCTAGCACCAT | 55.7 | 45.5 | |

จากการออกแบบเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อใช้ในการแยกจีโนมโทปีของตำแหน่ง rs116909374 ได้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nsi* (Biolabs, USA)



แผนภาพจำลองการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NsiI* (ภาพที่ 4.1) ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NsiI* สามารถแยกจีโนไทป์ทั้ง 3 รูปแบบออกจากกันได้ โดยจีโนไทป์ CC จะมีขนาดดีเอ็นเอ 700 bp. จีโนไทป์ CT มีขนาดดีเอ็นเอ 328, 372 และ 700 bp. และจีโนไทป์ TT มีขนาดดีเอ็นเอ 328 และ 372 bp. และสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบจีโนไทป์ เป็นไปตามตารางที่ 4.3

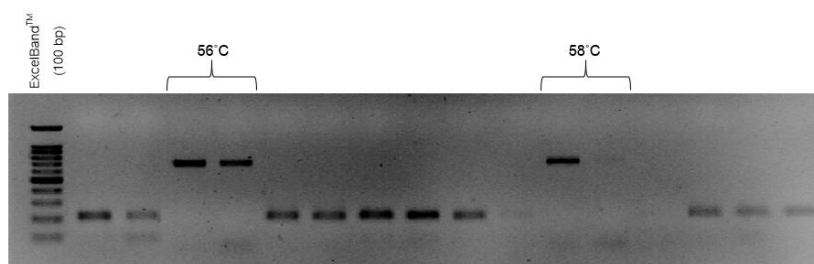


ภาพที่ 4.1 แผนภาพจำลองการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NsiI* โดยจีโนไทป์ CC จะมีขนาดดีเอ็นเอ 700 bp. จีโนไทป์ CT มีขนาดดีเอ็นเอ 328, 372 และ 700 bp. และจีโนไทป์ TT มีขนาดดีเอ็นเอ 328 และ 372 bp.

ตารางที่ 4.3 สภาวะในปฏิกิริยาตรวจสอบจีโนไทป์

| ขั้นตอน | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) |
|------------|-------------------------|-------------|
| Incubation | 37 | 15 |
| Inactivate | 65 | 20 |

จากการตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ด้วย PCR ที่อุณหภูมิ 56 และ 58 องศาเซลเซียส และนำมาวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel (ภาพที่ 4.2) แสดงว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของ rs116909374 ในขั้นตอน annealing คือ 56 องศาเซลเซียส

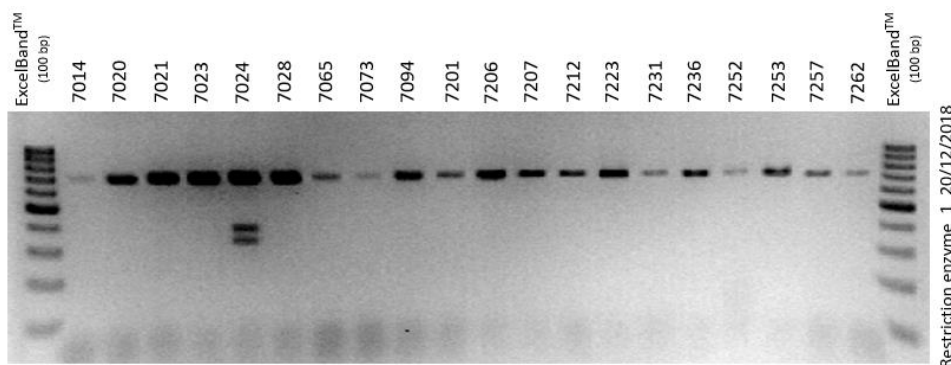


ภาพที่ 4.2 ผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ของ rs116909374 ที่อุณหภูมิ 56 และ 58 องศาเซลเซียส

จากการศึกษา rs116909374 บนโครโมโซมที่ 14q13.3 ในคนปกติ จำนวน 179 คน และผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จำนวน 207 คน ด้วยวิธี PCR-RFLP ได้ผลการตรวจสอบคือ ในคนปกติ จำนวน 179 คน พบว่ามีจีโนไทป์ CC ทั้งหมด แต่ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จำนวน 206 คน พบว่ามีจีโนไทป์ CC และจำนวน 1 คน พบว่ามีจีโนไทป์ CT (ตารางที่ 4.4) และตัวอย่างผลการตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพที่ 4.3)

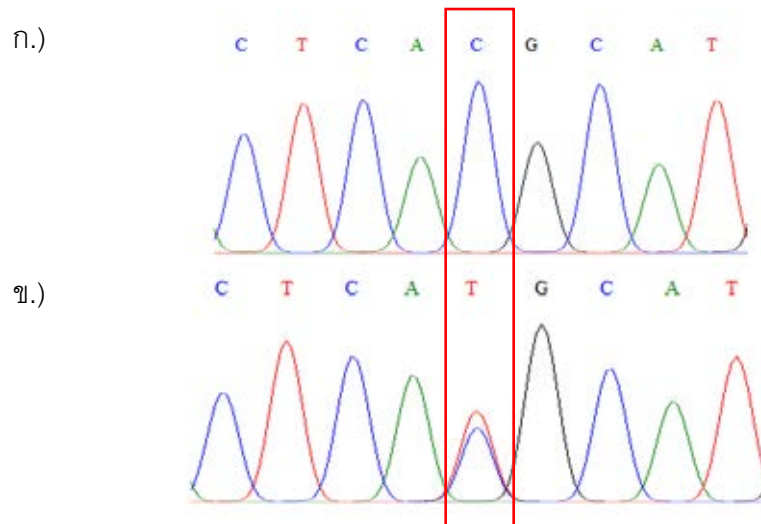
ตารางที่ 4.4 ข้อมูลจีโนไทป์ของคนปกติ และผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ที่ทำการศึกษา

| | Genotype | | | Total |
|--------------|----------|----|----|-------|
| | CC | CT | TT | |
| Controls | 179 | - | - | 179 |
| DTC patients | 206 | 1 | - | 207 |
| | | | | 386 |



ภาพที่ 4.3 ผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NsiI* โดยช่องที่ 1 และ 22 คือ DNA ladder และช่องที่ 2-21 แสดงการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NsiI* โดยรหัสตัวอย่าง 7014 7020 7021 7023 7028 7065 7073 7094 7201 7206 7212 7223 7231 7236 7252 7253 7257 และ 7262 แสดงจีโนไทป์ CC และรหัสตัวอย่าง 7024 แสดงจีโนไทป์ CT

จากการทำ DNA sequencing ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง โดยการสุ่มเลือกตัวอย่างที่ทำ PCR-RFLP แล้ว พบว่ามีจีโนไทป์ CC จำนวน 7 ตัวอย่าง และจีโนไทป์ CT จำนวน 1 ตัวอย่าง พบว่าผลของการทำ DNA sequencing มีจีโนไทป์เป็นไปตามผลของวิธี PCR-RFLP ทุกตัวอย่าง ซึ่งแสดงตัวอย่างดังนี้ (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 ผล DNA sequencing ของ rs116909374 ก.) แสดงจีโนไทป์ CC ข.) แสดงจีโนไทป์ CT

การวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) ได้ค่า $X^2 = 0$ พบว่า $p\text{-Value} > 0.05$ แสดงว่า การกระจายจีโนไทป์ของ rs116909374 ของตัวอย่างทั้งผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC และคนปกติอยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

จากการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC และคนปกติ จำนวน 386 คน พบจีโนไทป์ 2 แบบ คือ CC และ CT ความถี่จีโนไทป์ CC CT และ TT เท่ากับ 0.9974 0.0026 และ 0 ตามลำดับ และความถี่แอลลีล C มีค่า 0.9987 ความถี่แอลลีล T มีค่า 0.0013 จากการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จำนวน 207 คน พบจีโนไทป์ 2 แบบ คือ CC และ CT ความถี่จีโนไทป์ CC CT และ TT เท่ากับ 0.9952 0.0048 และ 0 ตามลำดับ และความถี่แอลลีล C มีค่า 0.9976 ความถี่แอลลีล T มีค่า 0.0024 และจากการศึกษาในคนปกติ จำนวน 179 คน พบจีโนไทป์ 1 แบบ คือ CC ความถี่จีโนไทป์ CC CT และ TT เท่ากับ 1 0 และ 0 ตามลำดับ และความถี่แอลลีล C มีค่า 1 ความถี่แอลลีล T มีค่า 0 จากการคำนวณทางสถิติ พบว่า ทั้งจีโนไทป์ CC และ CT มีค่า $p\text{-value}$ เท่ากับ 1.00 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่า สัดส่วนจีโนไทป์ CC และ CT ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC กับคนปกติ มีสัดส่วนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ส่วนจีโนไทป์ TT ไม่สามารถคำนวณค่า $p\text{-value}$ ได้ และทั้ง 3 จีโนไทป์ ไม่สามารถคำนวณค่า Odds Ratio และ 95% Confidence Interval ได้

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง rs116909374 กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ในประชากรไทย ผู้วิจัยได้รับตัวอย่างเลือดผู้ป่วย DTC จากโรงพยาบาลศิริราช และเก็บตัวอย่างเลือดจากคนปกติ จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GeneAid DNA Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) และวัดความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง Nanodrop spectrophotometer (SpectraMax M3, Molecular Devices, USA) ซึ่งความเข้มข้นที่วัดได้ในแต่ละตัวอย่างไม่เท่ากัน ผู้วิจัยจึงทำการปรับความเข้มข้นของตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยการเติมน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR และตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค RFLP เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอของดีเอ็นเอ 2 โมเลกุลด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าผู้ป่วย DTC มีจีโนไทป์ CC และ CT เท่ากับ 206 และ 1 คนตามลำดับ ส่วนคนปกติมีจีโนไทป์ CC เท่ากับ 179 คน และเพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของการตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ผู้วิจัยจึงสุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 8 ตัวอย่าง เพื่อนำไปทดสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค DNA sequencing ผลจากการยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าผลเป็นไปตามผลการตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP rs116909374 ไม่ได้ตั้งอยู่บนยีน ซึ่งจากการศึกษายีนใกล้เคียงพบยีน *LOC107984003* ซึ่งห่างจาก SNPs 4,207 เบส โดยยีนนี้มีการแสดงออกที่ต่อมไทรอยด์, ภาวะอาหาร และสมอง แต่ยังไม่มีการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนนี้ที่ชัดเจน (National Center for Biotechnology Information, 2018 : online)

จากผลการทดลองจะเห็นว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง rs116909374 กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ในประชากรไทยสอดคล้องกับการศึกษาของ Guo et al., 2014 ก่อนหน้านี้ในประชากรจีน ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง rs116909374 กับมะเร็งต่อมไทรอยด์เช่นกัน และพบว่าแอลลีล T ในประชากรจีนมีความถี่เท่ากับ 0 โดยศึกษาในผู้ป่วย PTC จำนวน 845 คน และคนปกติ จำนวน 1005 คน กล่าวคือประชากรไทย และจีน จัดเป็นประชากรในทวีปเอเชียเหมือนกัน จึงทำให้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง rs116909374 กับมะเร็งต่อมไทรอยด์เช่นเดียวกัน

สำหรับผลการทดลองในทวีปอเมริกา ของประชากรสหรัฐอเมริกา (Jendrzewski et al., 2016) และทวีปยุโรป ได้แก่ประชากรไอซ์แลนด์ ประชากรเนเธอร์แลนด์ และประชากรสเปน (Gudmundsson et al., 2013) พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง rs116909374 กับมะเร็ง

ต่อมไทรอยด์ ซึ่งในประชากรดังกล่าวมีความแตกต่างทางเชื้อชาติกับประชากรไทยซึ่งจัดเป็นประชากรในทวีปเอเชีย จึงทำให้ผลการทดลองแตกต่างกันด้วย

นอกจากนี้ การเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์มีสาเหตุมาจากหลายๆปัจจัย เช่น การใช้ชีวิตประจำวัน, การได้รับรังสีจากการรักษา รวมถึงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์จึงต้องดูตำแหน่งอื่นร่วมด้วย

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ระหว่าง rs116909374 บนโครโมโซม 14q13.3 และมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC โดยตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC จำนวน 207 คน และตัวอย่างเลือดคนปกติ จำนวน 179 คน จากนั้นตรวจสอบจีโนไทป์ของแต่ละบุคคลโดยเทคนิค PCR-RFLP และสุ่มตัวอย่างตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค DNA sequencing เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของเทคนิค PCR-RFLP ผลการทดลองพบว่าผู้ป่วย DTC มีจีโนไทป์ CC และ CT เท่ากับ 206 และ 1 ตามลำดับ คนปกติมีจีโนไทป์ CC เท่ากับ 179 คน ดังนั้นสรุปได้ว่า rs116909374 ไม่มีความสัมพันธ์กับมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC ในประชากรไทย

เอกสารอ้างอิง

- ปราณี นายศิริ. 2557. ผลสัมฤทธิ์ความถูกต้องในการใช้เทคนิคการตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมไทรอยด์ด้วยเทคนิคการย้อมสี H&E Staining แต่เพียงอย่างเดียว และเทคนิคการย้อมสี H&E Staining ร่วมกับเทคนิคการย้อมสีพิเศษ Immunohistochemistry (IHC) ของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาชิ้นเนื้อต่อมไทรอยด์ในโรงพยาบาลพระปกเกล้า ปีงบประมาณ 2556. วารสารศูนย์การศึกษาแพทยศาสตร์คลินิก โรงพยาบาลพระปกเกล้า 31 (กรกฎาคม-กันยายน 2557) : 194-204.
- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. 2561. ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2559. กรุงเทพมหานคร : กลุ่มงานเทคโนโลยีสารสนเทศสถาบันมะเร็งแห่งชาติ.
- Abd-Elsalam, K.A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. African Journal of Biotechnology 2 : 91-95.
- Bonert, V., and Friedman, T.C. 2007. The Thyroid Gland. In T.E. Andreoli, C.C.J. Carpenter, R.C. Griggs, and I. Benjamin (eds.), Andreoli and carpenter's Cecil essentials of medicine, 7th edition, pp.593-602. Philadelphia, United States.
- Chien, W., and Koeffler, H.P. 2012. Molecular biology of thyroid cancer. In G.D. Braunstein (ed.), Thyroid cancer, pp.35-44. United States.
- Clayman, G. 2018. Papillary Thyroid Cancer. Endocrineweb [Online]. Available from : <https://www.endocrineweb.com/conditions/thyroid-cancer/papillary-cancer> [2019,February 16]
- EMBL-EBI, 2019. What are genome wide association studies (GWAS) ? [Online]. Available from : <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/gwas-catalog-exploring-snp-trait-associations/why-do-we-need-gwas-catalog/what-are-genome> [2019,April 17]
- Farwell, A.P. 2014. Thyroid cancer. Clinical Thyroidology for the Pubic 7 : 11-12.
- Genetics generation. 2015. SNP's. [Online]. Available from : <http://knowgenetics.org/snps/> [2018, September 15]
- Gudmundsson, J., et al. 2009. Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European population. Nature Genetics 41 : 460-464.
- Gudmundsson, J., et al. 2013. Discovery of common variants associated with low TSH levels and thyroid cancer risk. Nature Genetics 44 : 319-322.

- Guo, S., et al. 2014. Significant SNPs have limited prediction ability for thyroid cancer. Cancer Medicine 3 : 731-735.
- Jendrzejewski, J., et al. 2016. Papillary Thyroid Carcinoma: Association between germline DNA variant markers and clinical parameters. Thyroid 26 : 1276-1284.
- Jetanin. 2013. SNPs: DNA for new life. [Online]. Available from :
http://www.jetanin.com/en/service/archive_detail/12 [2019,February 17]
- Joshi, M., and Deshpande, J.D. 2010. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. International Journal of Biomedical Research 1 : 81-97.
- Kryndushkin, D.S., Alexandrov, I.M., Ter-Avanesyan, M.D., and Kushnirov, V.V. 2013. Yeast [PSI+] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. Journal of Biological Chemistry 278 : 49636-49643.
- Kumar, B.R., 2012. DNA Representation. In Munshi, A. (ed.) DNA Sequencing – Methods and Applications, pp.3-14. Croatia.
- Li, Y., and Rawlings, J. 2018. The thyroid gland and thyroid cancer. Oxford University Hospitals : 1-11.
- Lorenz, T.C. 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. Journal of Visualized Experiments : 1-15.
- Mayo clinic. 2019. Thyroid cancer. [Online]. Available from :
<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/thyroid-cancer/symptoms-causes/syc-20354161> [2019, April 17]
- National Center for Biotechnology Information. 1992. dbSNP short genetic variations [Online]. Available form : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=116909374 [2018,September 15]
- National Center for Biotechnology Information. 2018. uncharacterized LOC107984003 [Online]. Available form : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=loc107984003> [2019,May 5]
- Norman, J. 2016. Thyroid cancer: Follicular cancer. Endocrineweb [Online]. Available from :
<https://www.endocrineweb.com/conditions/thyroid-cancer/thyroid-cancer-follicular-cancer> [2019,February 16]

- Palimeri, S., Gousis, P., and Vlassopoulou, B. 2015. Indications of radioactive iodine ablation in papillary thyroid cancer. Hellenic Journal of Surgery 87 : 53-57.
- Ricarte-Filho, J.C., et al., 2009. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for *BRAF*, *PIK3CA*, and *AKT1*. Cancer Res 69 : 4885-4893.
- Sherman, S.I. 2003. Thyroid carcinoma. The Lancet 361 : 501-511.
- Slomka, M., Sobalska-Kwapis, M., Wachulec, M., Bartosz, G., and Strapagiel, D. 2017. High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping – Limitations and Caveats in Practical Case Studies. International Journal of Molecular Science 18 : 1-21.
- Sukumaran, S. 2011. Concentration determination of nucleic acids and proteins using the micro-volume bio-spec nano spectrophotometer. Journal of Visualized Experiment 48 : 2699.
- Turner, S.D. 2018. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. Journal of Open Source Software 3 : 1-2.
- UCSC genome browser. 2013. Chromosome14p13-q32.33. [Online]. Available from : <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks> [2018,September 15]
- Vaisman, F., Corbo, R., and Vaisman, M. 2011. Thyroid carcinoma in children and adolescents-systematic review of the literature. Journal of Thyroid Research : 1-7.
- Verburg, F.A., Brans, B., and Mottaghy, F.M. 2011. Molecular nuclear therapies for thyroid carcinoma. Methods 55 : 230-237.
- Yilmaz, M., Ozic, C., and Gok, I. 2012. Principle of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis. In Magdeldin, S. (ed.) Gel Electrophoresis – Principle and Basics, pp.33-40. Croatia.

ภาคผนวก

ตารางข้อมูลผู้ป่วยมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด DTC

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|---------|--------|-----|----------|
| 1 | RS-P 3 | Female | 79 | CC |
| 2 | RS-P 8 | Female | 51 | CC |
| 3 | RS-P 10 | Female | 27 | CC |
| 4 | RS-P 11 | Female | 56 | CC |
| 5 | RS-P 12 | Female | 54 | CC |
| 6 | RS-P 13 | Female | 58 | CC |
| 7 | RS-P 14 | Female | 48 | CC |
| 8 | RS-P 15 | Female | 39 | CC |
| 9 | RS-P 16 | Female | 20 | CC |
| 10 | RS-P 17 | Female | 58 | CC |
| 11 | RS-P 18 | Female | 44 | CC |
| 12 | RS-P 19 | Female | 74 | CC |
| 13 | RS-P 21 | Female | 47 | CC |
| 14 | RS-P 24 | Female | 55 | CC |
| 15 | RS-P 25 | Female | 55 | CC |
| 16 | RS-P 27 | Female | 34 | CC |
| 17 | RS-P 32 | Male | 66 | CC |
| 18 | RS-P 44 | Female | 27 | CC |
| 19 | RS-P 48 | Female | 40 | CC |
| 20 | RS-P 52 | Female | 46 | CC |
| 21 | RS-P 53 | Female | 61 | CC |
| 22 | RS-P 56 | Female | 82 | CC |
| 23 | RS-P 59 | Female | 56 | CC |
| 24 | RS-P 61 | Female | 48 | CC |
| 25 | RS-P 64 | Female | 44 | CC |
| 26 | RS-P 65 | Male | 45 | CC |
| 27 | RS-P 67 | Male | 55 | CC |
| 28 | RS-P 68 | Female | 52 | CC |

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|----------|--------|-----|----------|
| 29 | RS-P 69 | Female | 56 | CC |
| 30 | RS-P 70 | Female | 49 | CC |
| 31 | RS-P 71 | Female | 42 | CC |
| 32 | RS-P 72 | Female | 53 | CC |
| 33 | RS-P 74 | Male | 81 | CC |
| 34 | RS-P 77 | Female | 38 | CC |
| 35 | RS-P 79 | Female | 21 | CC |
| 36 | RS-P 81 | Male | 64 | CC |
| 37 | RS-P 84 | Male | 78 | CC |
| 38 | RS-P 85 | Female | 63 | CC |
| 39 | RS-P 86 | Female | 44 | CC |
| 40 | RS-P 88 | Female | 50 | CC |
| 41 | RS-P 90 | Male | 65 | CC |
| 42 | RS-P 91 | Female | 57 | CC |
| 43 | RS-P 92 | Female | 53 | CC |
| 44 | RS-P 98 | Female | 54 | CC |
| 45 | RS-P 99 | Female | 49 | CC |
| 46 | RS-P 102 | Female | 45 | CC |
| 47 | RS-P 103 | Male | 55 | CC |
| 48 | RS-P 106 | Female | 53 | CC |
| 49 | RS-P 107 | Female | 48 | CC |
| 50 | RS-P 110 | Male | 38 | CC |
| 51 | RS-P 117 | Female | 57 | CC |
| 52 | RS-P 118 | Female | 57 | CC |
| 53 | RS-P 122 | Female | 44 | CC |
| 54 | RS-P 123 | Female | 65 | CC |
| 55 | RS-P 125 | Female | 22 | CC |
| 56 | RS-P 127 | Female | 53 | CC |
| 57 | RS-P 131 | Female | 55 | CC |

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|----------|--------|-----|----------|
| 58 | RS-P 133 | Female | 60 | CC |
| 59 | RS-P 134 | Female | 19 | CC |
| 60 | RS-P 136 | Female | 59 | CC |
| 61 | RS-P 137 | Male | 33 | CC |
| 62 | RS-P 142 | Male | 65 | CC |
| 63 | RS-P 144 | Female | 36 | CC |
| 64 | RS-P 147 | Female | 48 | CC |
| 65 | RS-P 152 | Male | 63 | CC |
| 66 | RS-P 153 | Female | 58 | CC |
| 67 | RS-P 160 | Female | 42 | CC |
| 68 | RS-P 161 | Female | 58 | CC |
| 69 | RS-P 164 | Female | 58 | CC |
| 70 | RS-P 167 | Female | 75 | CC |
| 71 | RS-P 169 | Female | 52 | CC |
| 72 | RS-P 171 | Female | 27 | CC |
| 73 | RS-P 173 | Female | 28 | CC |
| 74 | RS-P 174 | Female | 57 | CC |
| 75 | RS-P 177 | Male | 76 | CC |
| 76 | RS-P 179 | Male | 87 | CC |
| 77 | RS-P 180 | Male | 62 | CC |
| 78 | RS-P 182 | Female | 38 | CC |
| 79 | RS-P 187 | Female | 66 | CC |
| 80 | RS-P 188 | Female | 69 | CC |
| 81 | RS-P 189 | Male | 41 | CC |
| 82 | RS-P 191 | Female | 55 | CC |
| 83 | RS-P 192 | Female | 53 | CC |
| 84 | RS-P 194 | Female | 71 | CC |
| 85 | RS-P 195 | Male | 67 | CC |
| 86 | RS-P 197 | Female | 48 | CC |

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|----------|--------|-----|----------|
| 87 | RS-P 201 | Female | 64 | CC |
| 88 | RS-P 202 | Female | 45 | CC |
| 89 | RS-P 203 | Female | 40 | CC |
| 90 | RS-P 205 | Female | 68 | CC |
| 91 | RS-P 206 | Female | 52 | CC |
| 92 | RS-P 210 | Female | 55 | CC |
| 93 | 6255 | Female | 51 | CC |
| 94 | 6256 | Female | 71 | CC |
| 95 | 7005 | Male | 76 | CC |
| 96 | 7011 | Female | 26 | CC |
| 97 | 7014 | Female | 25 | CC |
| 98 | 7020 | Female | 57 | CC |
| 99 | 7021 | Male | 68 | CC |
| 100 | 7023 | Female | 40 | CC |
| 101 | 7024 | Female | 33 | CT |
| 102 | 7028 | Female | - | CC |
| 103 | 7065 | Female | 46 | CC |
| 104 | 7073 | Female | 45 | CC |
| 105 | 7094 | Female | 47 | CC |
| 106 | 7201 | Female | 41 | CC |
| 107 | 7206 | Female | 43 | CC |
| 108 | 7207 | Female | 20 | CC |
| 109 | 7212 | Male | 69 | CC |
| 110 | 7218 | Female | 64 | CC |
| 111 | 7221 | Female | 44 | CC |
| 112 | 7223 | Female | 41 | CC |
| 113 | 7231 | Female | 45 | CC |
| 114 | 7236 | Female | 31 | CC |
| 115 | 7249 | Male | 69 | CC |

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|------|--------|-----|----------|
| 116 | 7252 | Female | 26 | CC |
| 117 | 7253 | Female | 49 | CC |
| 118 | 7257 | Female | 51 | CC |
| 119 | 7262 | Female | 61 | CC |
| 120 | 7271 | Female | 39 | CC |
| 121 | 7274 | Male | 34 | CC |
| 122 | 7290 | Female | 55 | CC |
| 123 | 7363 | Male | 39 | CC |
| 124 | 7370 | Female | 65 | CC |
| 125 | 7374 | Female | 37 | CC |
| 126 | 7376 | Female | 49 | CC |
| 127 | 7380 | Female | 60 | CC |
| 128 | 7385 | Female | 40 | CC |
| 129 | 7389 | Female | 38 | CC |
| 130 | 7395 | Female | 49 | CC |
| 131 | 7396 | Female | 42 | CC |
| 132 | 7414 | Female | 58 | CC |
| 133 | 7433 | Female | 52 | CC |
| 134 | 7434 | Female | 37 | CC |
| 135 | 7439 | Female | 61 | CC |
| 136 | 7442 | Female | 33 | CC |
| 137 | 7444 | Female | 50 | CC |
| 138 | 7455 | Female | 28 | CC |
| 139 | 7457 | Male | 57 | CC |
| 140 | 7458 | Female | 67 | CC |
| 141 | 7466 | Female | 53 | CC |
| 142 | 7467 | Female | 85 | CC |
| 143 | 7469 | Female | 29 | CC |
| 144 | 7479 | Female | 50 | CC |

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|------|--------|-----|----------|
| 145 | 7552 | Female | 49 | CC |
| 146 | 7554 | Female | 66 | CC |
| 147 | 7560 | Female | 84 | CC |
| 148 | 7563 | Female | 50 | CC |
| 149 | 7565 | Female | 64 | CC |
| 150 | 7566 | Male | 71 | CC |
| 151 | 7569 | Female | 60 | CC |
| 152 | 7579 | Female | 59 | CC |
| 153 | 7585 | Female | 52 | CC |
| 154 | 7592 | Male | 65 | CC |
| 155 | 7598 | Female | 30 | CC |
| 156 | 7604 | Male | 55 | CC |
| 157 | 7609 | Female | 57 | CC |
| 158 | 7611 | Female | 50 | CC |
| 159 | 7612 | Male | 70 | CC |
| 160 | 7615 | Male | 63 | CC |
| 161 | 7617 | Female | 50 | CC |
| 162 | 7627 | Female | 56 | CC |
| 163 | 7632 | Male | 63 | CC |
| 164 | 7640 | Female | 64 | CC |
| 165 | 7656 | Female | 39 | CC |
| 166 | 7657 | Female | 53 | CC |
| 167 | 7660 | Female | 57 | CC |
| 168 | 7662 | Male | 63 | CC |
| 169 | 7665 | Female | 46 | CC |
| 170 | 7669 | Female | 47 | CC |
| 171 | 7670 | Female | 62 | CC |
| 172 | 7671 | Male | 88 | CC |
| 173 | 7680 | Female | 60 | CC |

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|------|--------|-----|----------|
| 174 | 7689 | Female | 63 | CC |
| 175 | 7694 | Female | 21 | CC |
| 176 | 7701 | Female | 37 | CC |
| 177 | 7703 | Male | 53 | CC |
| 178 | 7706 | Female | 34 | CC |
| 179 | 7707 | Male | 71 | CC |
| 180 | 7714 | Female | 78 | CC |
| 181 | 7723 | Male | 68 | CC |
| 182 | 7727 | Female | 73 | CC |
| 183 | 7738 | Female | 24 | CC |
| 184 | 7739 | Female | 58 | CC |
| 185 | 7740 | Male | 48 | CC |
| 186 | 7743 | Female | 32 | CC |
| 187 | 7797 | Female | 31 | CC |
| 188 | 7798 | Female | - | CC |
| 189 | 7800 | Female | 50 | CC |
| 190 | 7804 | Female | - | CC |
| 191 | 7806 | Female | 39 | CC |
| 192 | 7807 | Female | 54 | CC |
| 193 | 7810 | Female | 53 | CC |
| 194 | 7811 | Female | 40 | CC |
| 195 | 7813 | Male | 58 | CC |
| 196 | 7814 | Female | 30 | CC |
| 197 | 7815 | Female | 83 | CC |
| 198 | 7835 | Female | 57 | CC |
| 199 | 7838 | Female | 36 | CC |
| 200 | 7839 | Female | 31 | CC |
| 201 | 7840 | Female | 50 | CC |
| 202 | 7841 | Female | 41 | CC |

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|------|--------|-----|----------|
| 203 | 7847 | Female | 43 | CC |
| 204 | 7849 | Female | 41 | CC |
| 205 | 7852 | Female | 70 | CC |
| 206 | 7853 | Female | 44 | CC |
| 207 | 7854 | Female | 57 | CC |

ตารางข้อมูลคนปกติที่ไม่มีประวัติครอบครัวเป็นโรคเกี่ยวกับต่อมไทรอยด์

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|------|--------|-----|----------|
| 1 | C-1 | Female | 35 | CC |
| 2 | C-2 | Female | 21 | CC |
| 3 | C-3 | Female | 36 | CC |
| 4 | C-4 | Female | 21 | CC |
| 5 | C-6 | Female | 22 | CC |
| 6 | C-7 | Female | 24 | CC |
| 7 | C-8 | Female | 21 | CC |
| 8 | C-9 | Male | 21 | CC |
| 9 | C-10 | Female | 23 | CC |
| 10 | C-11 | Female | 21 | CC |
| 11 | C-12 | Male | 22 | CC |
| 12 | C-13 | Male | 22 | CC |
| 13 | C-14 | Male | 22 | CC |
| 14 | C-15 | Male | 22 | CC |
| 15 | C-16 | Male | 20 | CC |
| 16 | C-17 | Male | 23 | CC |
| 17 | C-18 | Male | 69 | CC |
| 18 | C-19 | Female | 63 | CC |
| 19 | C-20 | Male | 41 | CC |
| 20 | C-21 | Female | 34 | CC |

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|------|--------|-----|----------|
| 21 | C-22 | Female | 22 | CC |
| 22 | C-23 | Female | 22 | CC |
| 23 | C-24 | Female | 22 | CC |
| 24 | C-25 | Female | 24 | CC |
| 25 | C-26 | Female | 23 | CC |
| 26 | C-27 | Male | 32 | CC |
| 27 | C-29 | Female | 21 | CC |
| 28 | C-30 | Female | 21 | CC |
| 29 | C-31 | Male | 23 | CC |
| 30 | C-32 | Female | 20 | CC |
| 31 | C-33 | Female | 22 | CC |
| 32 | C-34 | Female | 21 | CC |
| 33 | C-35 | Female | 21 | CC |
| 34 | C-36 | Female | 20 | CC |
| 35 | C-37 | Female | 21 | CC |
| 36 | C-38 | Female | 21 | CC |
| 37 | C-39 | Female | 21 | CC |
| 38 | C-40 | Female | 21 | CC |
| 39 | C-41 | Male | 21 | CC |
| 40 | C-42 | Female | 60 | CC |
| 41 | C-43 | Female | 29 | CC |
| 42 | C-44 | Female | - | CC |
| 43 | C-45 | Male | 72 | CC |
| 44 | C-46 | Male | 53 | CC |
| 45 | C-47 | Female | 50 | CC |
| 46 | C-48 | Male | 43 | CC |
| 47 | C-49 | Female | 41 | CC |
| 48 | C-50 | Female | 22 | CC |
| 49 | C-51 | Female | 87 | CC |

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|-------|--------|-----|----------|
| 50 | C-52 | Female | 21 | CC |
| 51 | C-53 | Male | 21 | CC |
| 52 | C-54 | Male | 21 | CC |
| 53 | C-55 | Female | 21 | CC |
| 54 | C-56 | Male | 21 | CC |
| 55 | C-57 | Female | 20 | CC |
| 56 | C-58 | Male | 22 | CC |
| 57 | C-59 | Male | 21 | CC |
| 58 | C-60 | Male | 21 | CC |
| 59 | C-61 | Female | 21 | CC |
| 60 | C-62 | Male | 21 | CC |
| 61 | C-63 | Female | 40 | CC |
| 62 | C-64 | Male | 33 | CC |
| 63 | C-65 | Female | 20 | CC |
| 64 | C-311 | Female | 29 | CC |
| 65 | C-314 | Male | 31 | CC |
| 66 | C-316 | Female | 26 | CC |
| 67 | C-318 | Female | 23 | CC |
| 68 | C-319 | Female | 34 | CC |
| 69 | C-320 | Female | 27 | CC |
| 70 | C-321 | Female | 24 | CC |
| 71 | C-322 | Female | 29 | CC |
| 72 | C-323 | Male | 34 | CC |
| 73 | C-325 | Male | 33 | CC |
| 74 | C-326 | Female | 50 | CC |
| 75 | C-335 | Male | 34 | CC |
| 76 | C-337 | Female | 25 | CC |
| 77 | C-339 | Female | 27 | CC |
| 78 | C-341 | Female | 26 | CC |

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|-------|--------|-----|----------|
| 79 | C-342 | Female | 24 | CC |
| 80 | C-350 | Female | - | CC |
| 81 | C-356 | Male | 26 | CC |
| 82 | C-358 | Female | 33 | CC |
| 83 | C-361 | Female | 27 | CC |
| 84 | C-362 | Male | 23 | CC |
| 85 | C-363 | Female | 24 | CC |
| 86 | C-368 | Female | 25 | CC |
| 87 | C-369 | Male | 24 | CC |
| 88 | C-370 | Female | 22 | CC |
| 89 | C-371 | Female | 23 | CC |
| 90 | C-374 | Female | 24 | CC |
| 91 | C-375 | Female | 25 | CC |
| 92 | C-378 | Female | 30 | CC |
| 93 | C-379 | Female | 27 | CC |
| 94 | C-383 | Male | 28 | CC |
| 95 | C-384 | Female | 55 | CC |
| 96 | C-385 | Female | 30 | CC |
| 97 | C-387 | Female | 27 | CC |
| 98 | C-388 | Female | 25 | CC |
| 99 | C-389 | Male | 28 | CC |
| 100 | C-390 | Female | 36 | CC |
| 101 | C-391 | Female | 33 | CC |
| 102 | C-392 | Female | 23 | CC |
| 103 | C-399 | Female | 21 | CC |
| 104 | C-401 | Female | 21 | CC |
| 105 | C-402 | Female | 21 | CC |
| 106 | C-405 | Female | 21 | CC |
| 107 | C-414 | Female | 24 | CC |

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|-------|--------|-----|----------|
| 108 | C-415 | Female | 26 | CC |
| 109 | C-416 | Female | 24 | CC |
| 110 | C-417 | Female | 24 | CC |
| 111 | C-419 | Female | 30 | CC |
| 112 | C-464 | Female | 42 | CC |
| 113 | C-470 | Female | 49 | CC |
| 114 | C-471 | Female | 66 | CC |
| 115 | C-473 | Female | 46 | CC |
| 116 | C-474 | Female | 35 | CC |
| 117 | C-494 | Female | 42 | CC |
| 118 | C-496 | Female | 53 | CC |
| 119 | C-497 | Female | 41 | CC |
| 120 | C-502 | Female | 55 | CC |
| 121 | C-504 | Female | 30 | CC |
| 122 | C-505 | Female | 43 | CC |
| 123 | C-507 | Female | 40 | CC |
| 124 | C-510 | Female | 47 | CC |
| 125 | C-511 | Female | 55 | CC |
| 126 | C-512 | Male | 35 | CC |
| 127 | C-513 | Female | 41 | CC |
| 128 | C-514 | Female | 24 | CC |
| 129 | C-515 | Female | 28 | CC |
| 130 | C-516 | Female | 30 | CC |
| 131 | C-517 | Male | 36 | CC |
| 132 | C-525 | Female | 55 | CC |
| 133 | C-530 | Female | 23 | CC |
| 134 | C-531 | Female | 28 | CC |
| 135 | C-532 | Female | 22 | CC |
| 136 | C-533 | Male | 28 | CC |

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|-------|--------|-----|----------|
| 137 | C-535 | Female | 40 | CC |
| 138 | C-537 | Female | 20 | CC |
| 139 | C-538 | Female | 33 | CC |
| 140 | C-540 | Female | 29 | CC |
| 141 | C-541 | Female | 37 | CC |
| 142 | C-544 | Female | 37 | CC |
| 143 | C-546 | Female | 34 | CC |
| 144 | C-547 | Female | 23 | CC |
| 145 | C-548 | Female | 24 | CC |
| 146 | C-551 | Female | 27 | CC |
| 147 | C-552 | Female | 32 | CC |
| 148 | C-553 | Female | 19 | CC |
| 149 | C-554 | Female | 21 | CC |
| 150 | C-555 | Female | 33 | CC |
| 151 | C-557 | Female | 29 | CC |
| 152 | C-558 | Female | 22 | CC |
| 153 | C-559 | Female | 19 | CC |
| 154 | C-560 | Female | 30 | CC |
| 155 | C-561 | Female | 26 | CC |
| 156 | C-564 | Female | 26 | CC |
| 157 | C-568 | Female | 24 | CC |
| 158 | C-575 | Female | 19 | CC |
| 159 | C-576 | Female | 27 | CC |
| 160 | C-577 | Female | 23 | CC |
| 161 | C-579 | Female | 28 | CC |
| 162 | C-585 | Female | 19 | CC |
| 163 | C-586 | Female | 39 | CC |
| 164 | C-611 | Female | 41 | CC |
| 165 | C-612 | Female | 32 | CC |

| No. | Code | Gender | Age | Genotype |
|-----|-------|--------|-----|----------|
| 166 | C-613 | Female | 30 | CC |
| 167 | C-614 | Female | 27 | CC |
| 168 | C-615 | Female | 45 | CC |
| 169 | C-616 | Female | 30 | CC |
| 170 | C-617 | Female | 42 | CC |
| 171 | C-618 | Female | 34 | CC |
| 172 | C-619 | Female | 40 | CC |
| 173 | C-620 | Female | 50 | CC |
| 174 | C-621 | Female | 30 | CC |
| 175 | C-622 | Male | 50 | CC |
| 176 | C-623 | Male | 54 | CC |
| 177 | C-624 | Female | 27 | CC |
| 178 | C-625 | Male | 41 | CC |
| 179 | C-626 | Female | 28 | CC |

การเตรียมสารละลาย

- 5X TBE (Tris-Borate-EDTA)

Tris base 54 กรัม

Boric acid 27.5 กรัม

EDTA (pH 8.0) 3.72 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตร

- 1X TBE

5X TBE 1 ส่วน ต่อ น้ำกลั่น 4 ส่วน

- Ethidium bromide 10 mg/ml

Ethidium bromide 1 กรัม

Distilled water 10 มิลลิลิตร