แบบฟอร์มสรุปรายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงงานวิจัยเรื่อง(ภาษาไทย) การวิเคราะห์โปรตีนในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมโดยเทคโนโลยีโปรตีโอมิคส์เพื่อเป็นดัชนีชี้วัดของการเกิดโรค

(ภาษาอังกฤษ)Proteomic analyses of urine from breast cancer patients for possible diagnostic protein markers

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี ..... 2553..... จำนวนเงิน ..... 300,000 บาท .....

ระยะเวลาทำการวิจัย..... 1 ปี ..... เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ..... พฤศจิกายน 2552 .....

รายนามคณะผู้วิจัย :

ชื่อ-สกุล	บทบาท	สัดส่วน
1. อจ. สุทัศน์ ดวงจิตร	หัวหน้าโครงการ	40 %
สังกัด คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์		
2. รศ.ดร. สุขกิจ ยะโสธรศรีกุล	ผู้ร่วมวิจัย	30 %
สังกัด คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์		
3. ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล	ผู้ร่วมวิจัย	20 %
สังกัด ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ		
4. ดร. นงลักษณ์ อยู่นิ่ม	ผู้ร่วมวิจัย	10 %
สังกัด คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์		

ความเป็นมาและวัตถุประสงค์

อุบัติการของมะเร็งเต้านมเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามรายงานของกระทรวงสาธารณสุขในโยบายหลักในการรณรงค์เพื่อลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งและอัตราการตายของประชากรเนื่องจากโรคมะเร็ง โดยมี แผนงานหลักๆ 4 ด้านคือ งานด้านการป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง (prevention) การพัฒนาวิธีการตรวจพบโรคมะเร็งในระยะแรกเริ่ม (early diagnosis) วิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพ (treatment) และการบรรเทาอาการของโรคให้ดีขึ้นโดยที่ไม่มีผลต่อการรักษา (palliative care) ซึ่งในการดำเนินงานทั้งหมดดังกล่าวให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและบรรลุถึงวัตถุประสงค์นั้นต้องอาศัยการศึกษาค้นคว้าและวิจัยเพื่อให้เข้าใจถึงสาเหตุและกลไกการ เกิดโรคมะเร็ง

กลไกการเกิดมะเร็งเต้านมในมนุษย์มีความซับซ้อนเป็นอย่างมาก มีปัจจัยมากมายจากทั้งทางกายภาพ ทางชีวภาพและทางพันธุกรรมมาเกี่ยวข้อง ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกการเกิดมะเร็งเต้านมจากเทคนิคใดเพียงเทคนิคเดียวหรือจากมิติเดียวอาจไม่สามารถตอบคำถามทั้งหมดได้ ดังนั้นการบูรณาการข้อมูลโปรตีโอมร่วมกับข้อมูลจีโนมที่มีอยู่ ทำให้ได้ข้อมูลในเชิงลึกที่มีคุณภาพและคุณค่ามากกว่าใช้เทคนิคเพียงเทคนิคเดียว การตรวจพิสูจน์ยีนที่ควบคุมการแสดงออกที่ระดับจีโนม จะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการ

- เติม Reagent B หลุมละ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

3. **การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE**
   - เตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากัน โดยซีรัมใช้ปริมาณโปรตีน 3 ไมโครกรัม ส่วนปัสสาวะใช้ปริมาณโปรตีน 10 ไมโครกรัม
   - ผสมตัวอย่างกับ sample buffer จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
   - นำตัวอย่างและ Standard Protein Marker ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า บน 12.5% Polyacrylamide Gel
   - ภายหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ตำแหน่งของแถบโปรตีนที่แยกออกจากกันจะปรากฏขึ้น เมื่อย้อมด้วยสีสารประกอบของ เงิน (silver stain)
4. **การย้อมโปรตีนด้วยสีสารประกอบของเงิน (silver stain)**
   - Fix เจลด้วย Fixing solution โดยเขย่าเจลเป็นเวลา 30 นาทีหรือข้ามคืน
   - ล้างเจลด้วย Washing solution 2 รอบ โดยเขย่าเจลเป็นเวลารอบละ 5 นาที
   - เขย่าเจลใน Sensitizing solution เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นล้างเจลด้วย DI water 2 รอบ โดยเขย่าเจลเป็นเวลารอบละ 5 นาที
   - ย้อมเจลด้วย Staining Solution โดยเขย่าเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างเจลด้วย DI water โดยเจลเขย่าเป็นเวลา 1 นาที
   - แช่เจลใน Developing solution และเขย่าเจลเบาๆ จนกว่าจะเห็นแถบของโปรตีนที่ชัดเจน จากนั้นแช่เจลลงใน Stopping solution และเขย่าเจลเป็นเวลา 20 นาที
   - ล้างเจลด้วย DI water 3 รอบ โดยเขย่าเจลเป็นเวลารอบละ 5 นาที
   - เก็บเจลที่ย้อมเสร็จแล้วใน 0.1% acetic acid แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. **การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง LC-MS/MS**
   - ทำการตัดแถบของโปรตีนตามช่วง marker จากนั้นตัดเจลให้มีขนาด 1x1x1 mm แล้วนำ gel plug ที่ตัดได้ใส่ลงใน 96 well plate โดยใส่ 4 ชิ้น/ตัวอย่าง/well
   - เติม 100% acetronitrile ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
   - ดูด acetronitrile ทิ้งไป แล้วปล่อยให้ gel plug แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที
   - เติม 10 mM Dithiothreitol/ 10 mM ammonium bicarbonate ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อสลายพันธะ disulfide
   - ดูด 10 mM Dithiothreitol/10 mM ammonium bicarbonate ทิ้งไป