

- เติม 100 mM Iodoacetamide/10 mM ammonium bicarbonate ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เป็นการเติมหมู่ alkyl เข้าไปเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดพันธะ disulfide อีก เรียกว่าปฏิกิริยา carbamidomethyl (C)
- ดูด 100 mM Iodoacetamide/10 mM ammonium bicarbonate ทิ้งไป
- เติม 100% acetonitrile ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วดูด acetonitrile ทิ้งไป (ทำซ้ำ 2 รอบ)
- ย่อยโปรตีนด้วย 10 ng Trypsin in 50% acetonitrile/10 mM ammonium bicarbonate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ก่อนเติม 30% acetonitrile ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- ดูดของเหลวแต่ละตัวอย่างใส่ใน 96 well plate ใหม่ (1 ตัวอย่าง/well)
- สกัด peptide ที่เหลือใน gel plug ด้วย 50% acetonitrile/0.1% FA ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้น pool แต่ละตัวอย่างใส่ใน well เดิมใน plate จากข้อก่อนหน้า (ทำซ้ำ 2 รอบ)
- ทำการ dry ตัวอย่างด้วย incubator ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงหรือ 1 คืน (ใช้ heat box หรือ speed vac แทนได้)
- เก็บรักษาตัวอย่างที่ -80 องศาเซลเซียส รอนำไปวิเคราะห์ด้วย LC/MS
- ตัวอย่างที่ย่อยได้ 1 ตัวอย่าง จะมีหลาย well ให้เติม 0.1% FA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน well สุดท้ายของตัวอย่างแต่ละชนิด และทำการละลายตัวอย่างจาก well สุดท้ายมายัง well แรก
- เติม 0.1% FA อีก 10 ไมโครลิตร ลงใน well สุดท้ายของตัวอย่างแต่ละชนิด เพื่อละลาย peptide ที่เหลือในแต่ละ well แล้ว pool รวมกับ well แรกของตัวอย่างแต่ละชนิดในข้อก่อนหน้า
- นำไป centrifuge 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- ดูดใส่ insert tube เพื่อวิเคราะห์ผล

## ผลการทดลอง

### ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

เก็บตัวอย่างปัสสาวะ ชีรุม และเลือด

จากผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและกลุ่มควบคุมที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก รวมทั้งหมด 242

ตัวอย่าง สามารถจำแนกตามกลุ่มอายุและระยะของโรคได้ดังตารางสรุป

โดยเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้จำนวน 147 ตัวอย่าง

และเก็บตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมได้จำนวน 95 ตัวอย่าง โดยการขนส่งจากโรงพยาบาลพุทธชินราช

มายังคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และจากคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ไปยังศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย จังหวัดปทุมธานีในแต่ละครั้ง (รวมทั้งสิ้น 4 ครั้ง) จะขนส่งมาในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งแห้ง

และได้ทำการตรวจวัดอุณหภูมิภายในกล่องก่อนและหลังการขนส่งโดยวัดได้ที่อุณหภูมิเฉลี่ย -21 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังได้มีการตรวจสอบอุณหภูมิภายในตู้แช่แข็งที่ใช้เก็บตัวอย่างอาทิตย์ละ 2 ครั้ง ซึ่งก็วัดได้ที่อุณหภูมิเฉลี่ย -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1: สรุปอาสาสมัครที่เข้าร่วมงานวิจัย

	Covid	Breast Cancer	Total
เพศชาย	-	-	-
เพศหญิง	149	193	342
อายุ 20 - 30 ปี	6	1	7
อายุ 31 - 40 ปี	16	25	41
อายุ 41 - 50 ปี	73	92	165
อายุ 51 - 60 ปี	54	74	128
อายุ 61 ปีขึ้นไป	-	-	-
ไม่ทราบ	-	1	1
		ระยะที่ 1	39
		ระยะที่ 2	93
		ระยะที่ 3	23
		ระยะที่ 4	6
		ไม่ทราบ	32

#### การตกตะกอนโปรตีน

จำนวนตัวอย่างปัสสาวะที่สามารถตกตะกอนโปรตีนได้แล้วจากกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 100 ตัวอย่าง ส่วนกลุ่มควบคุมสามารถตกตะกอนโปรตีนได้เป็นจำนวน 95 ตัวอย่าง

#### การวัดปริมาณโปรตีน (Lowry Protein Assay)

ทำการวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างปัสสาวะและซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 100 ตัวอย่าง ส่วนกลุ่มควบคุมทำการวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างปัสสาวะและซีรัมได้เป็นจำนวน 95 ตัวอย่าง

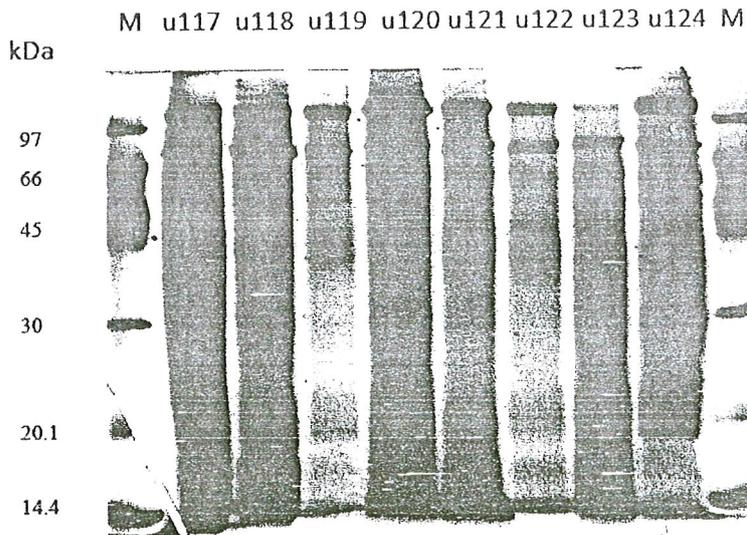
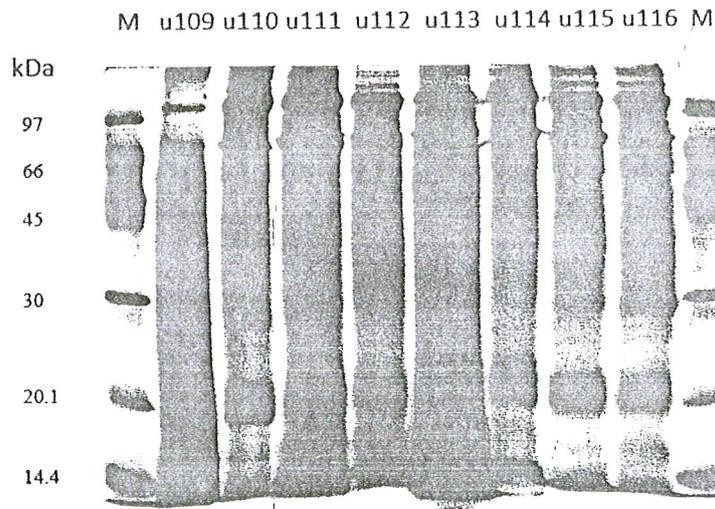
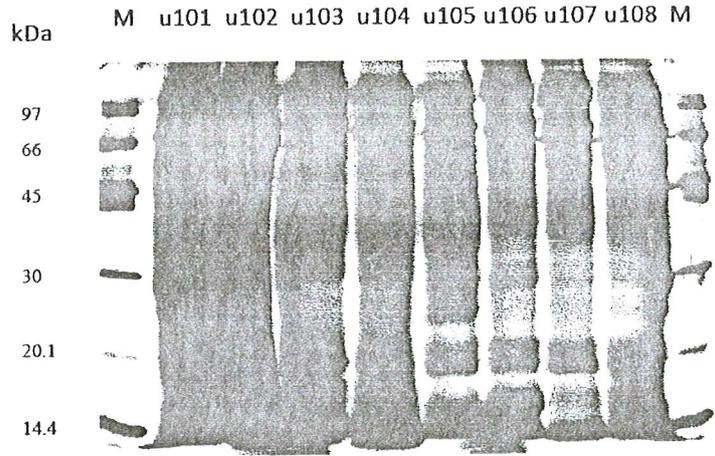
จากผลการทดลองพบว่าในซีรัมมีปริมาณโปรตีนที่สูงมากจึงต้องทำการเจือจางก่อนเพื่อให้โปรตีนที่ต้องการวัดอยู่ในช่วงที่เหมาะสม คือมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ระหว่าง 0-10 ไมโครกรัม

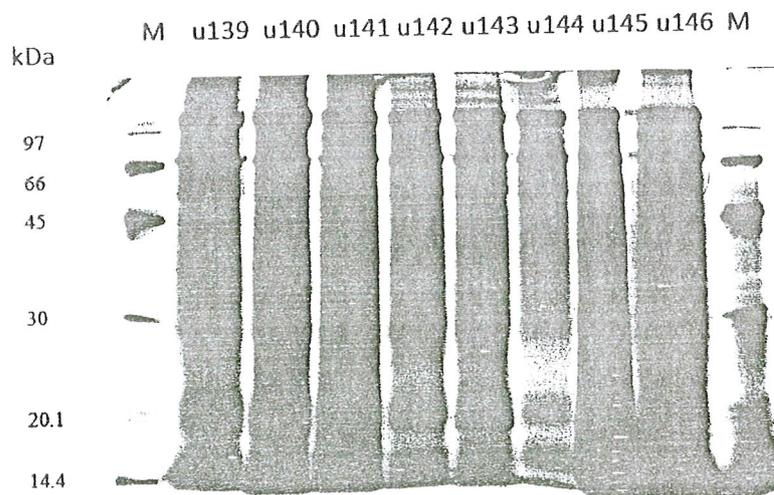
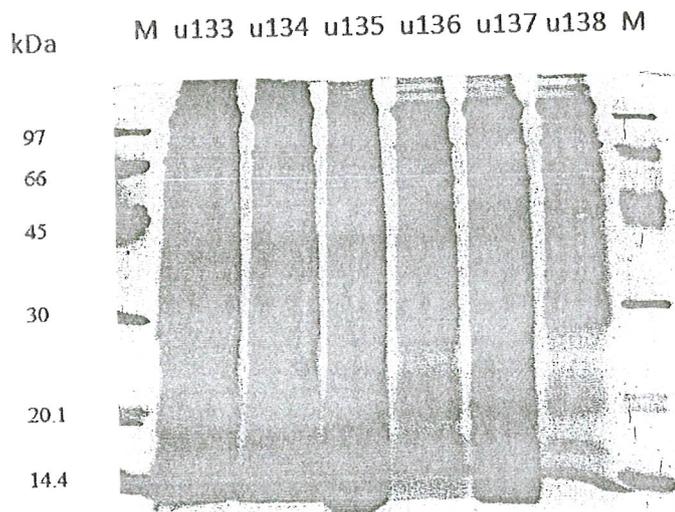
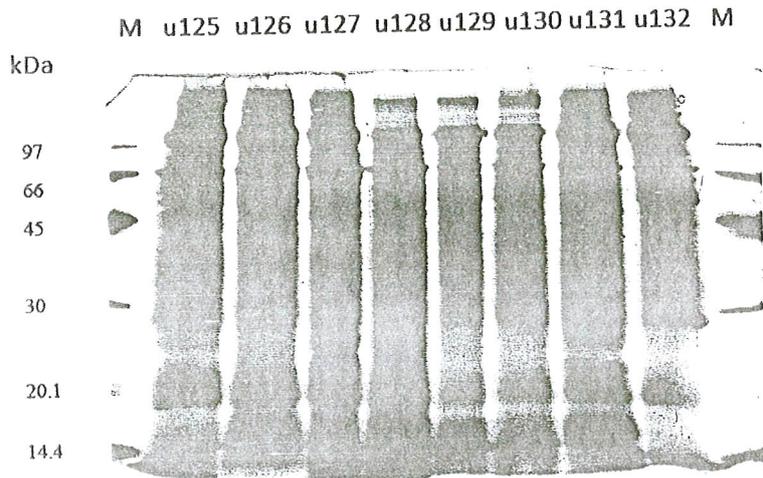
โดยเทียบกับกราฟของ BSA protein standard ส่วนในปีสภาวะนั้นพบว่ามีตัวอย่างบางส่วนที่มีปริมาณโปรตีนที่ต่ำมาก ซึ่งอาจไม่เพียงพอหรือไม่เหมาะสมที่จะทำการทดลองต่อไป

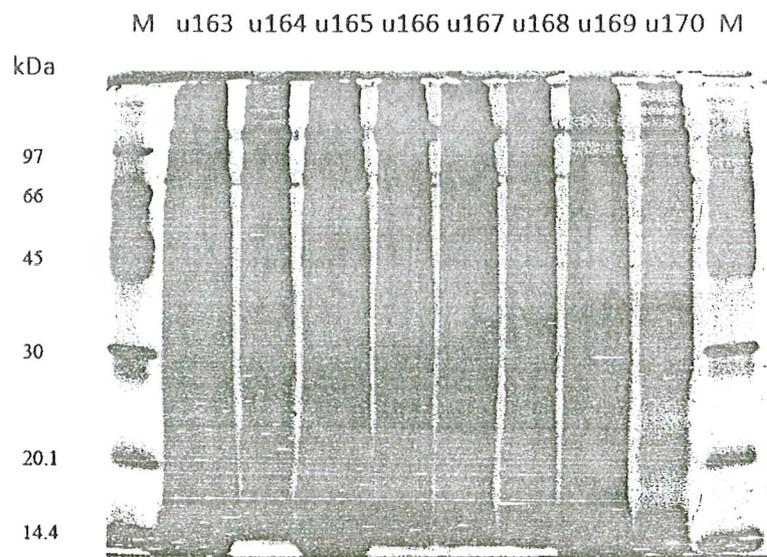
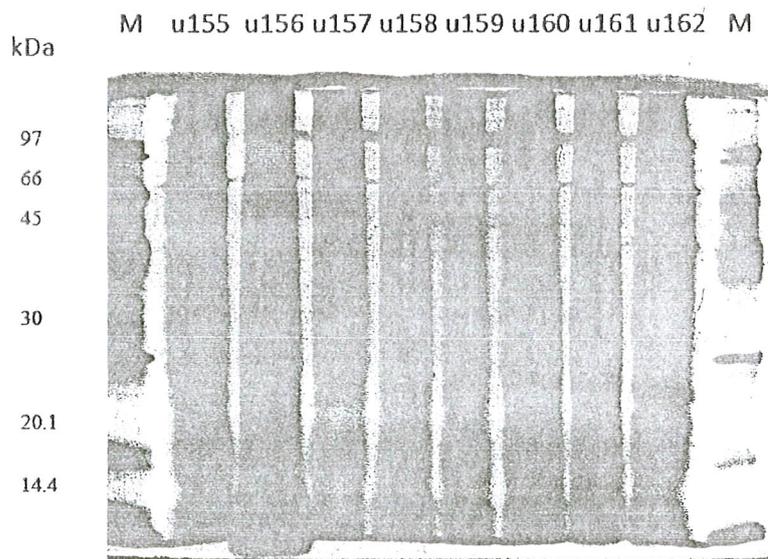
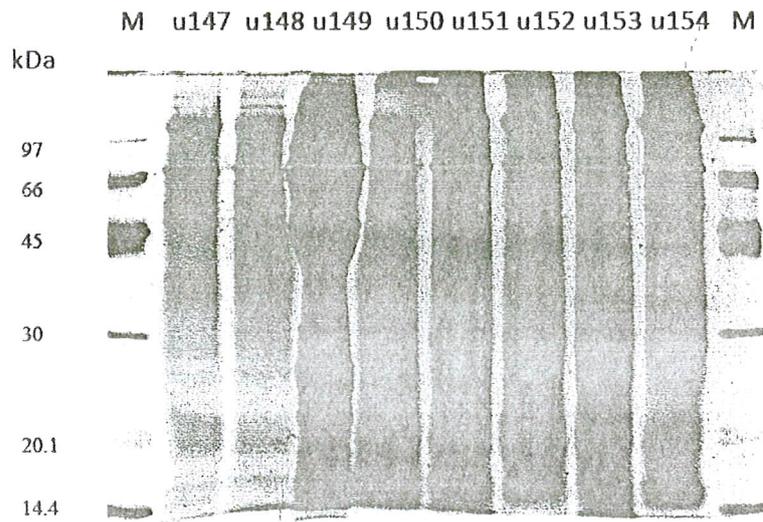
จากการทดลองเบื้องต้นในการใช้โปรตีนในปีสภาวะนั้น คณะผู้วิจัยพบว่ามีความผันแปรของแบบแผนของโปรตีนค่อนข้างสูงในกลุ่มคนปกติเอง คณะผู้วิจัยจึงใช้สมัครในการศึกษาด้วย

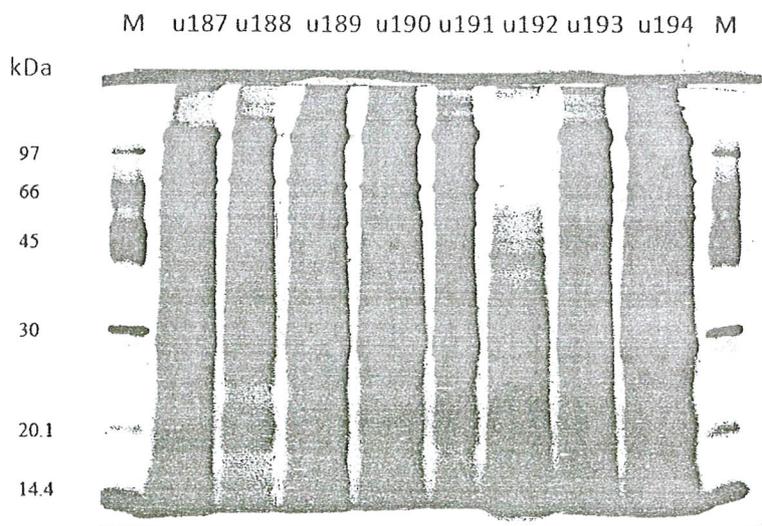
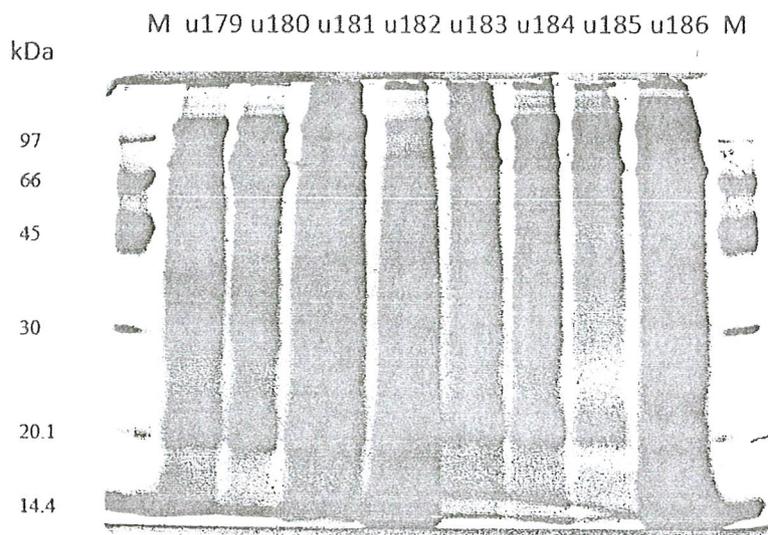
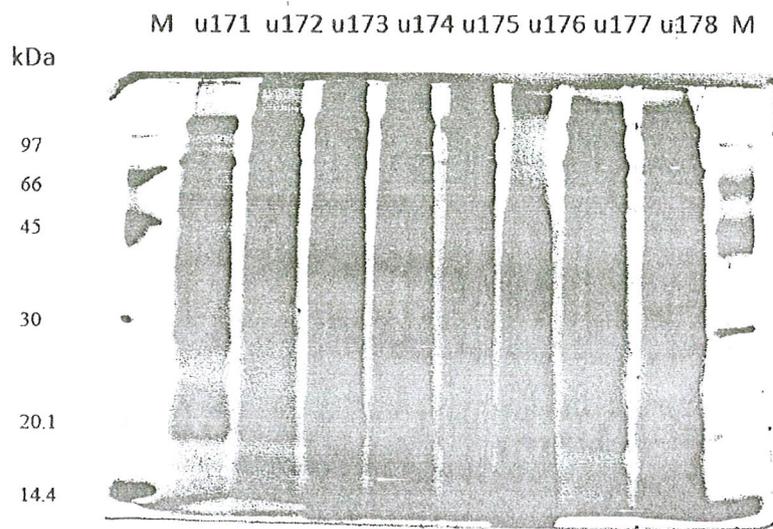
# ผลการแยกโปรตีนจากปัสสาวะ ด้วยวิธี SDS-PAGE

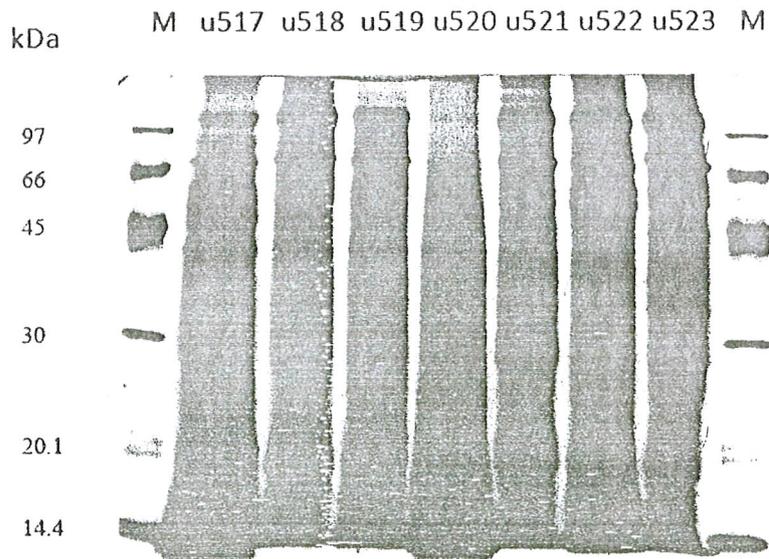
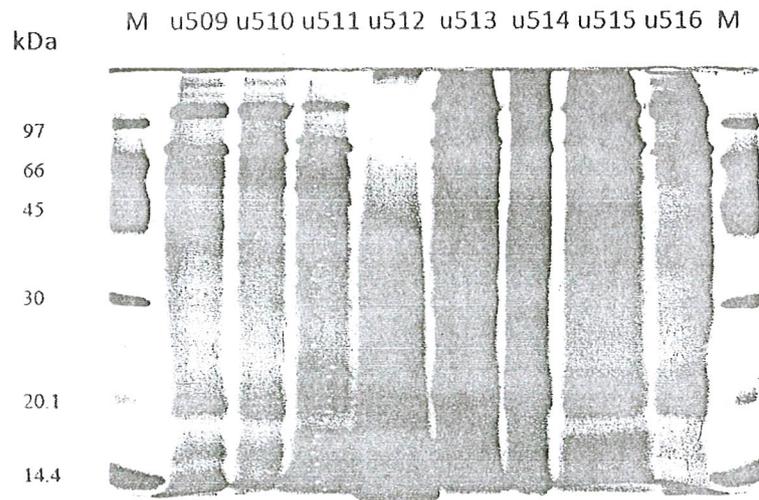
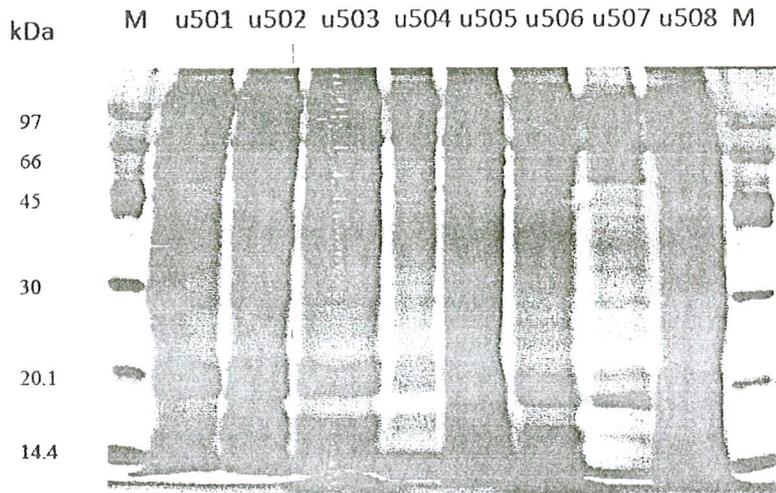
## Control group

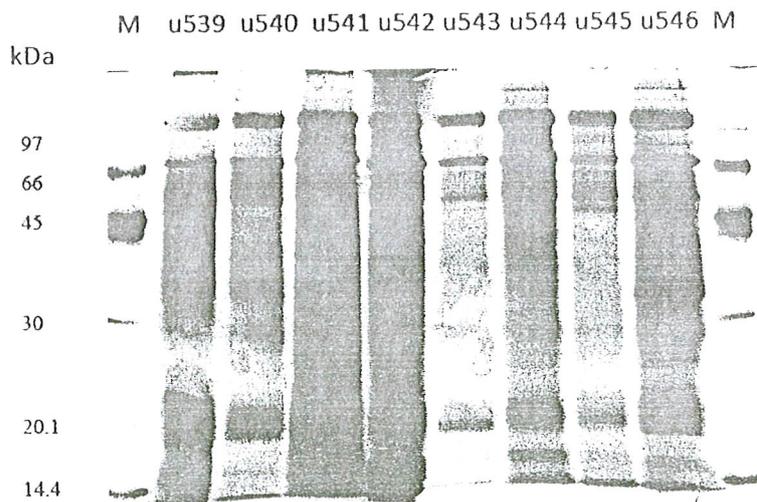
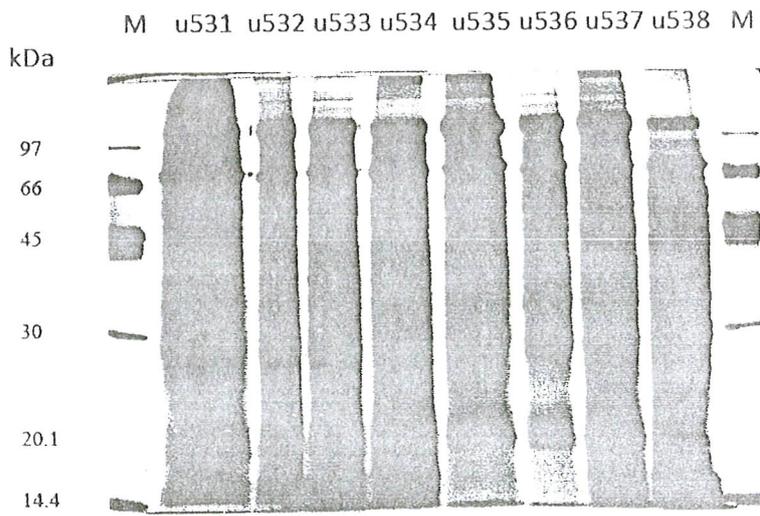
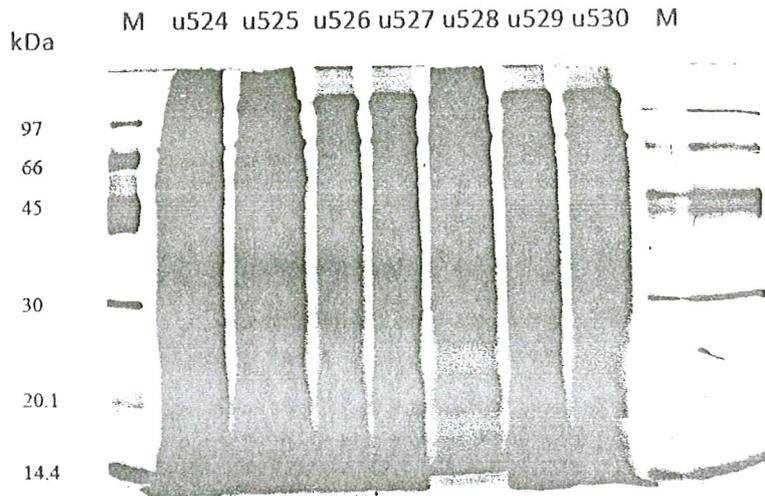










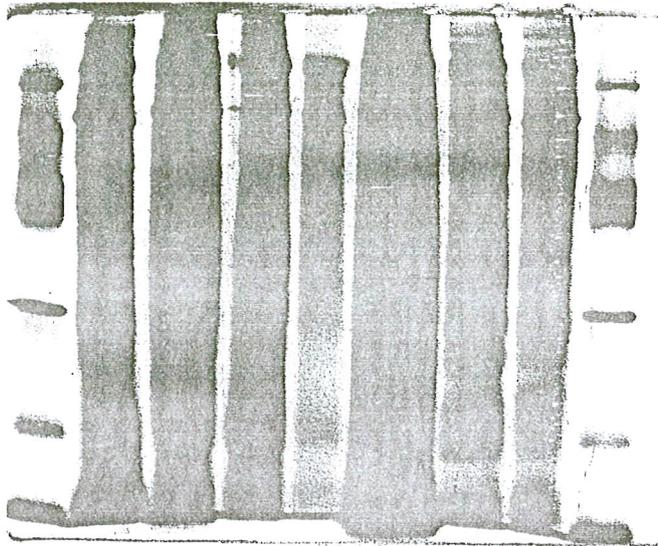


สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ  
ห้องสมุดงานวิจัย  
วันที่ 18 ต.ค. 2555  
เลขทะเบียน 213328  
เลขเรียกหนังสือ

M u547 u548 u549 u550 u551 u552 u553 M

kDa

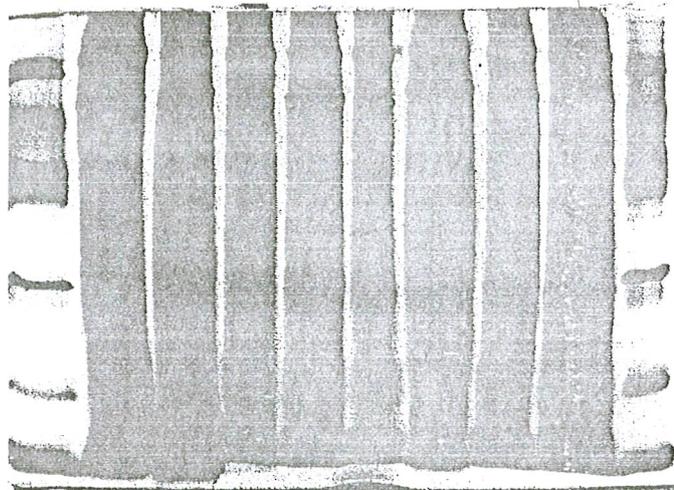
97  
66  
45  
30  
20.1  
14.4



M u554 u555 u556 u557 u558 u559 u560 u561 M

kDa

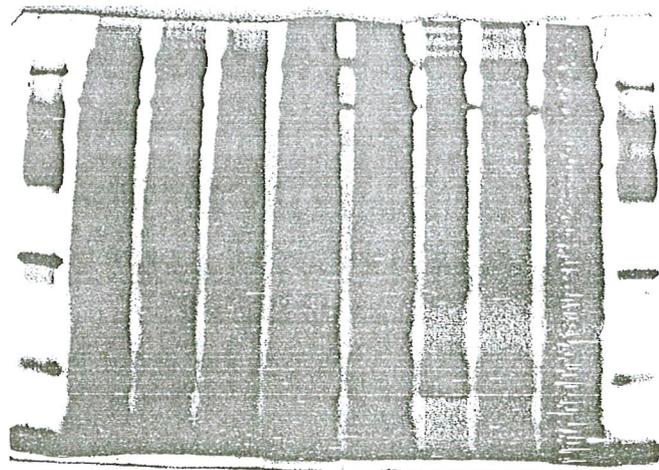
97  
66  
45  
30  
20.1  
14.4

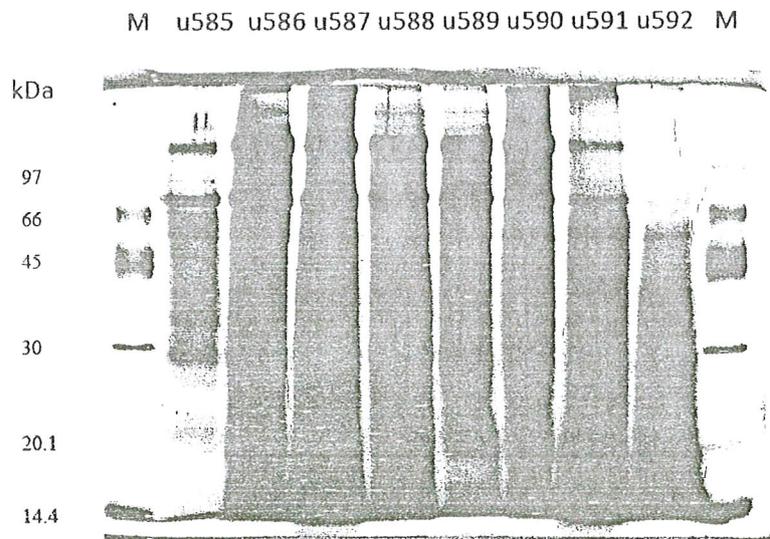
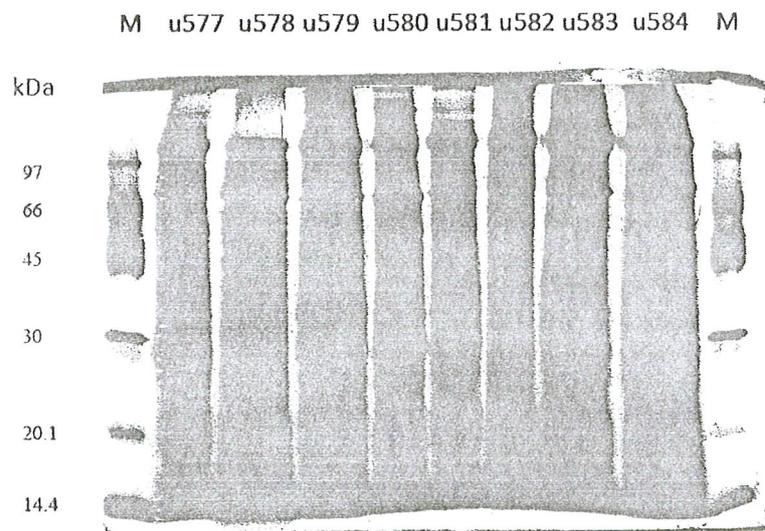
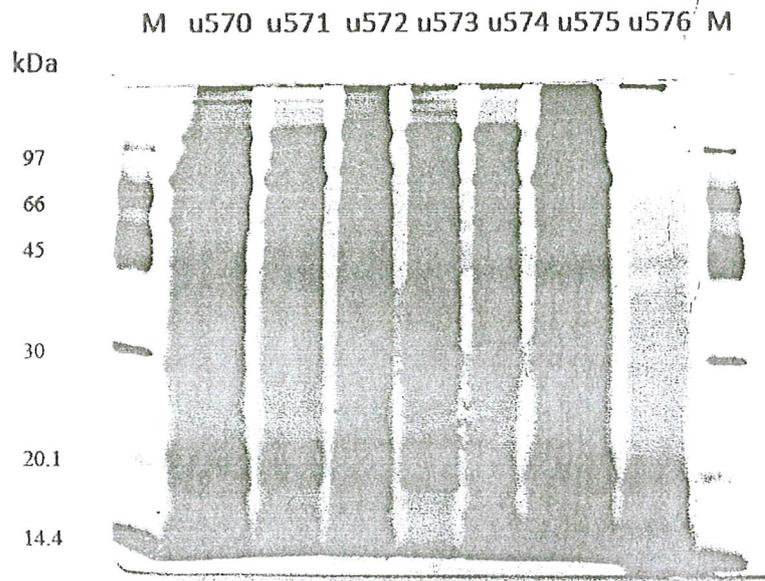


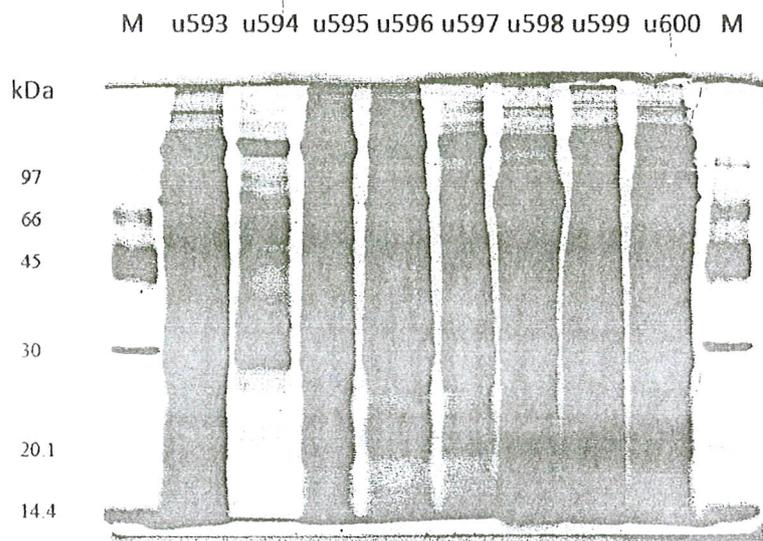
M u562 u563 u564 u565 u566 u567 u568 u569 M

kDa

97  
66  
45  
30  
20.1  
14.4

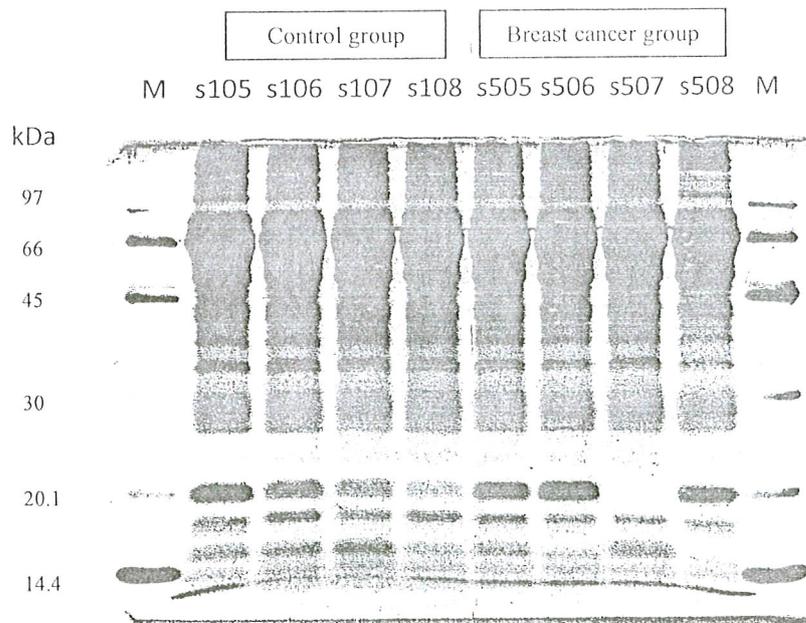
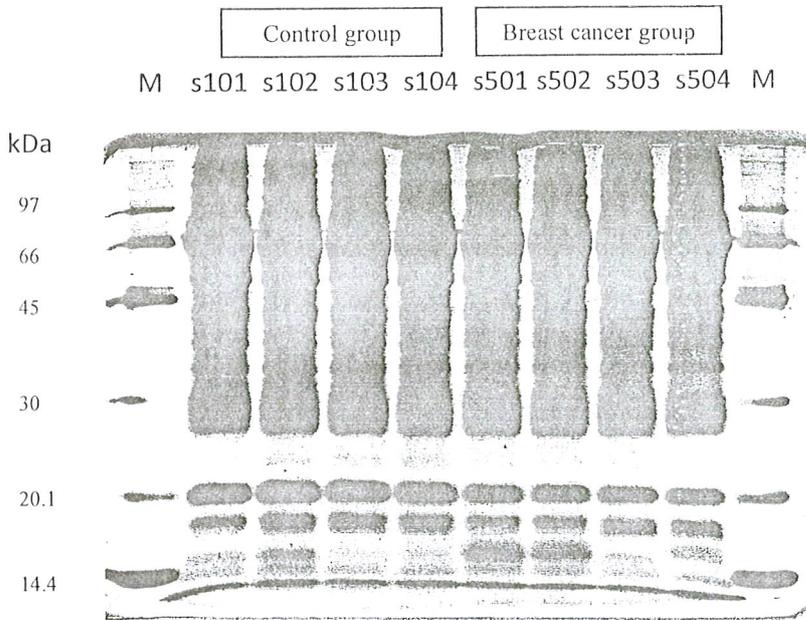


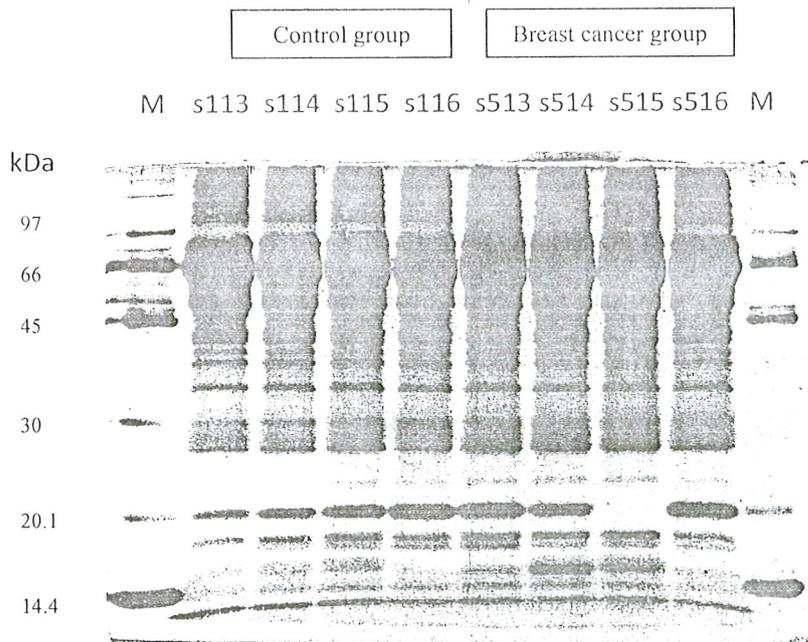
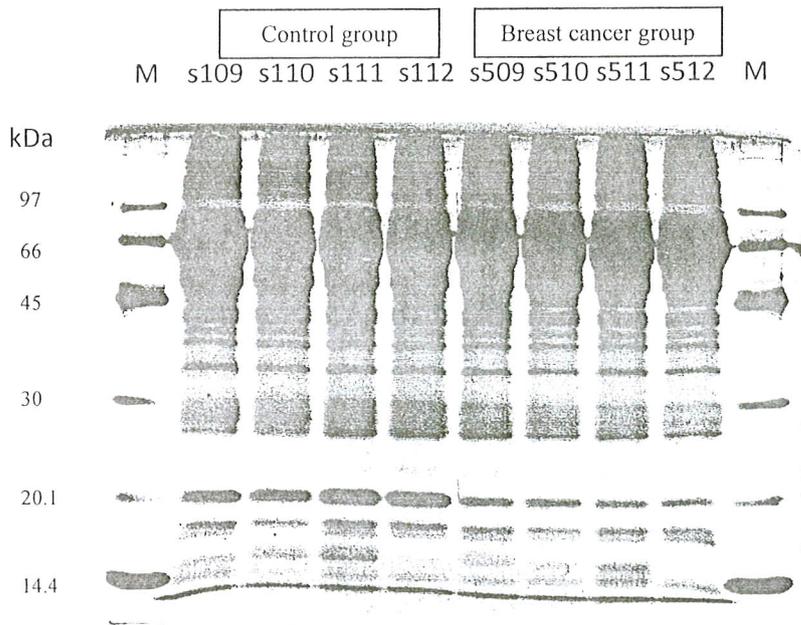


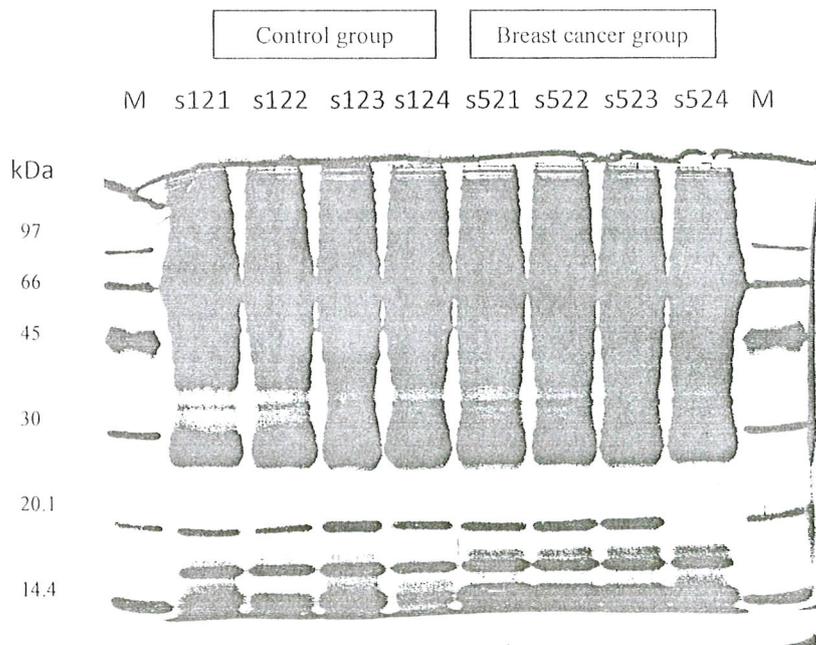
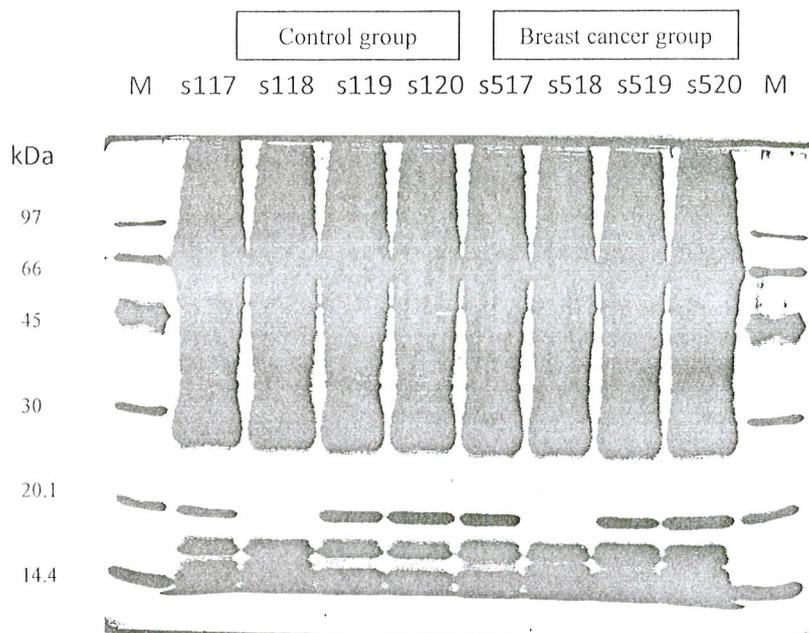


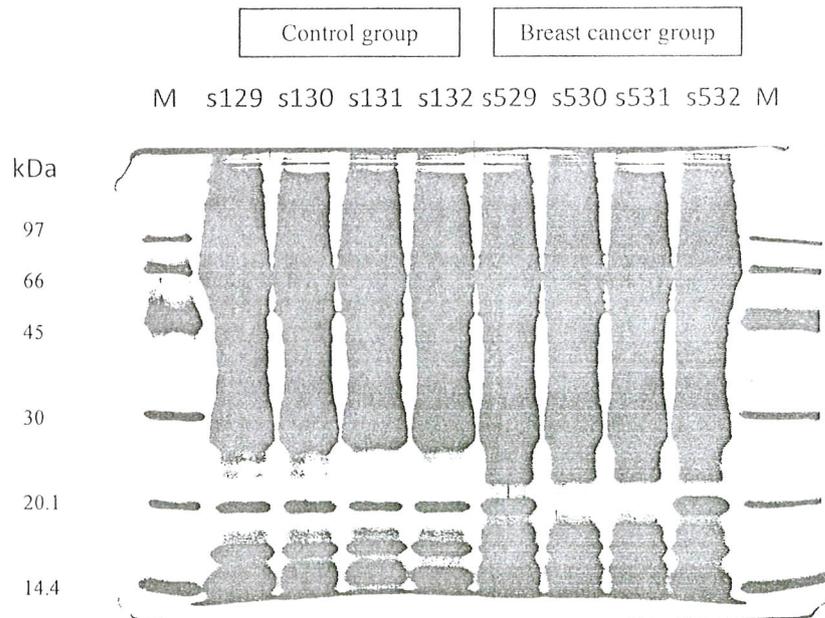
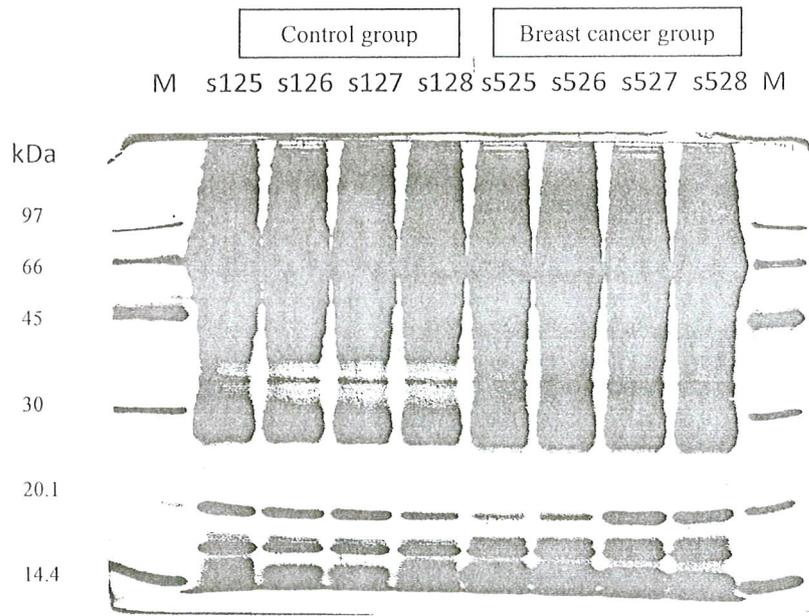
จากการแยกโปรตีนในปัสสาวะโดยวิธี SDS-PAGE ของกลุ่มคนปกติจำนวน 94 คน และกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จำนวน 100 คน พบว่าแผนภูมิของโปรตีนในแต่ละบุคคล จะมีความแตกต่างกัน ซึ่งพบทั้งในกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านม และจากการที่มีความแตกต่างในแต่ละบุคคลนี้ ทำให้เรายังไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างที่ชัดเจน ระหว่างแผนภูมิของโปรตีนของกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านม แต่อย่างไรก็ดีเราก็สังเกตเห็นความแตกต่างของแผนภูมิของโปรตีนระหว่างคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งเต้านมอยู่บ้างในโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 20 ถึง 45 kDa ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้เป็นเพียงการทดลองเบื้องต้นเท่านั้น คณะผู้วิจัยต้องการทำการเปรียบเทียบแผนภูมิโปรตีนในหมู่ประชากรที่เก็บตัวอย่างได้ที่มีจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นเพื่อ establish เป็นวิธีการต่อไปในอนาคต นอกจากนี้คณะผู้วิจัยจะลองใช้ SDS-PAGE เป็นการ screen ตัวอย่างในเบื้องต้นแล้วนั้น หากเราสามารถ establish แบบแผนโปรตีนของคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้ เราจะตัดเอา protein band ไปวิเคราะห์ว่าเป็นโปรตีนตัวใดซึ่งอาจนำไปใช้ในการเป็น marker ได้ต่อไป ในอนาคต นอกจากนี้คณะผู้วิจัยจะใช้ LC-MS/MS ในการวิเคราะห์แผนภูมิของโปรตีนอย่างละเอียดต่อไป

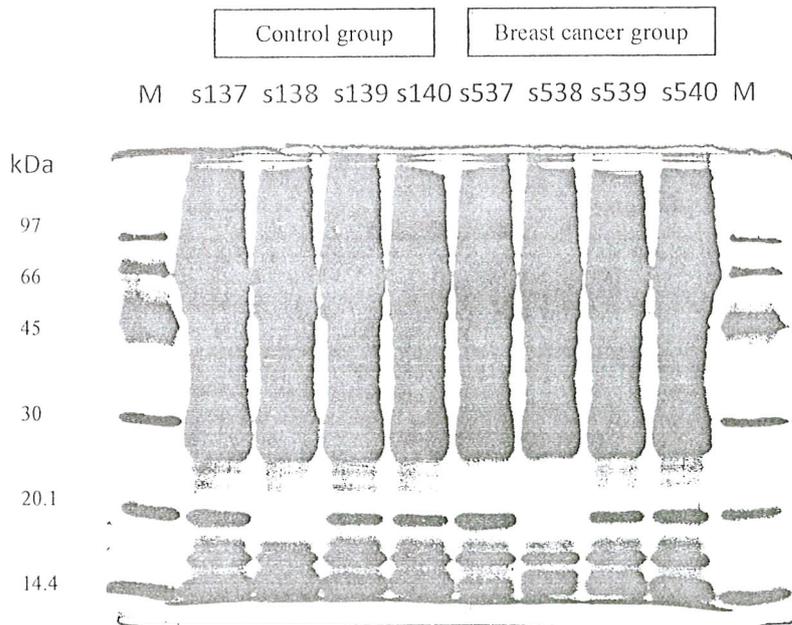
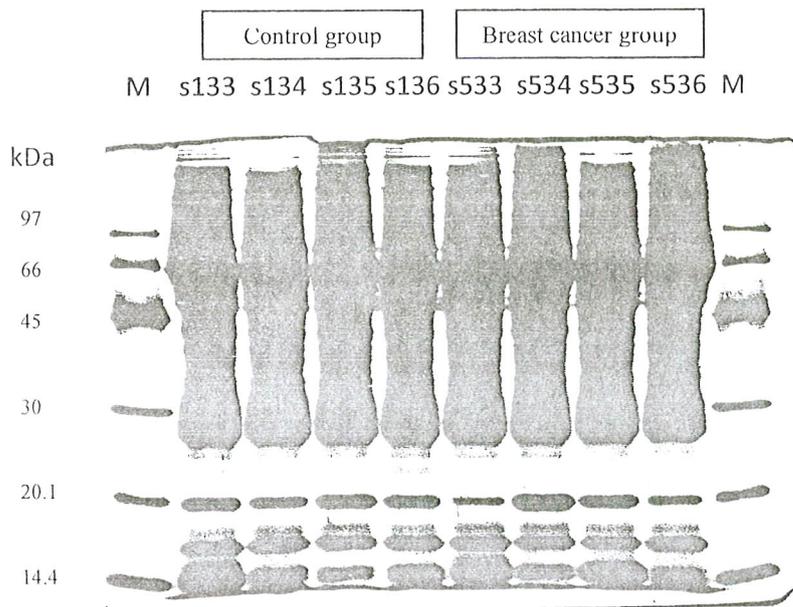
# การแยกโปรตีนจากซีรัม ด้วยวิธี SDS-PAGE

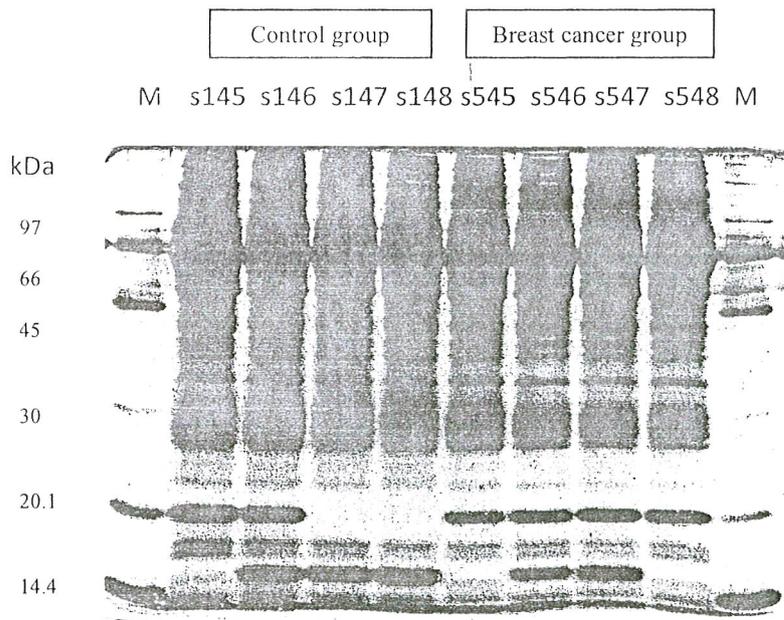
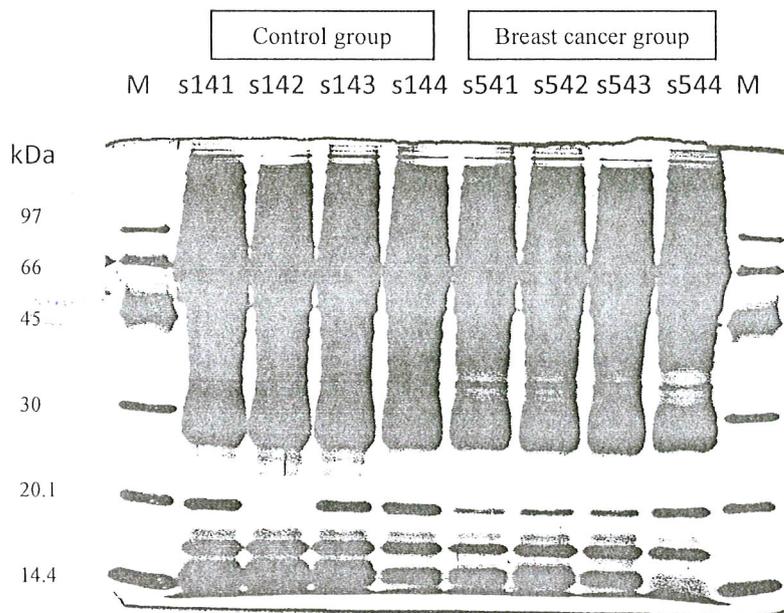


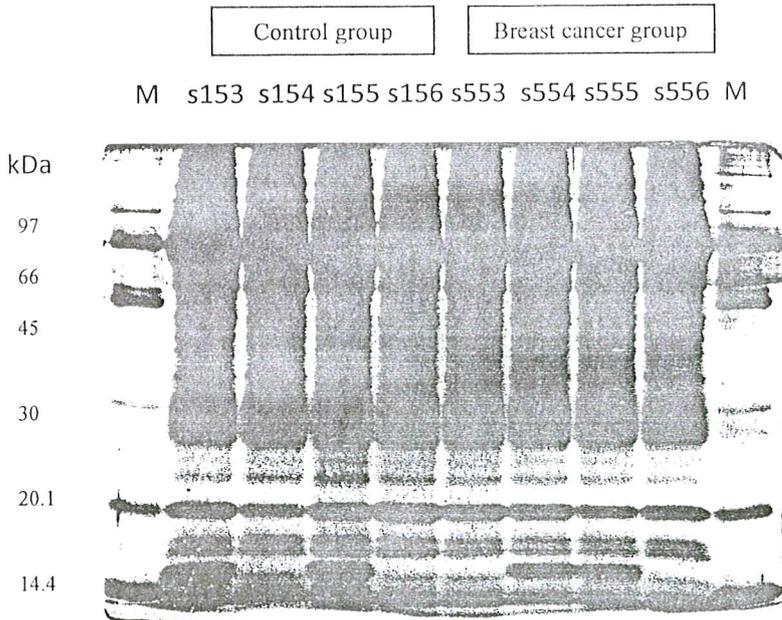
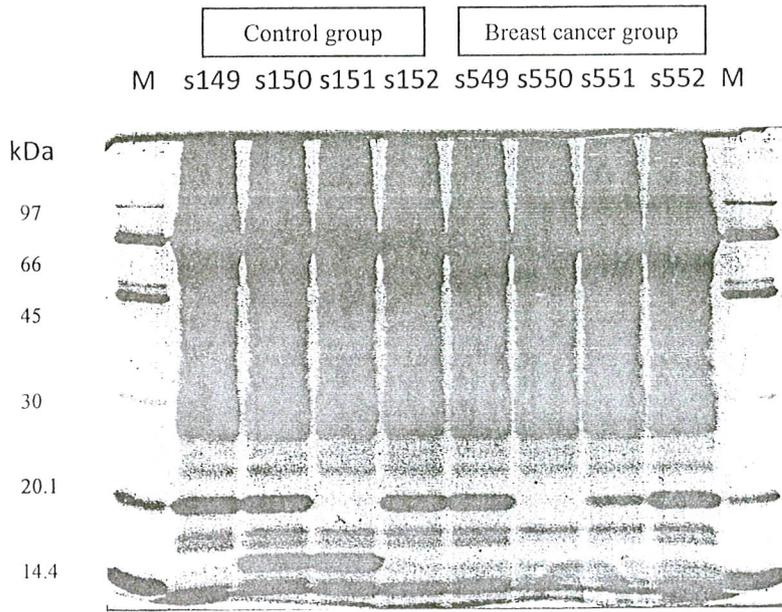


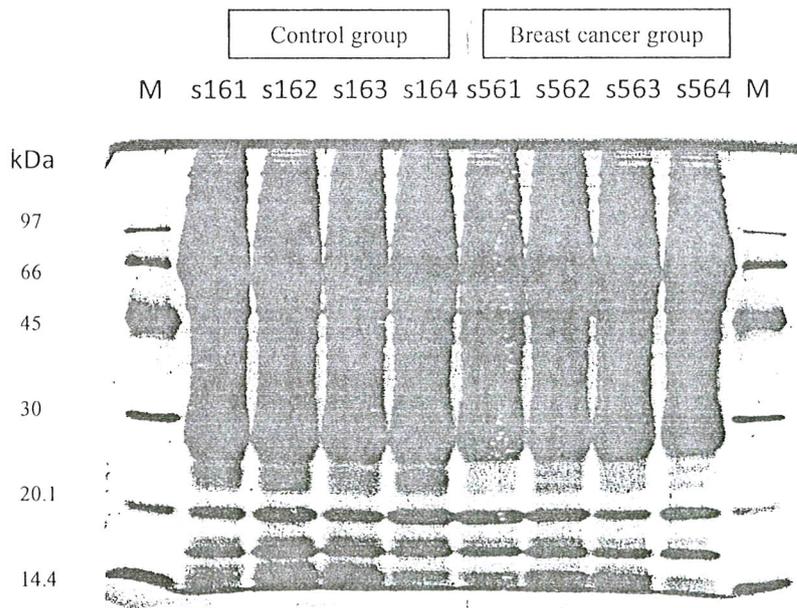
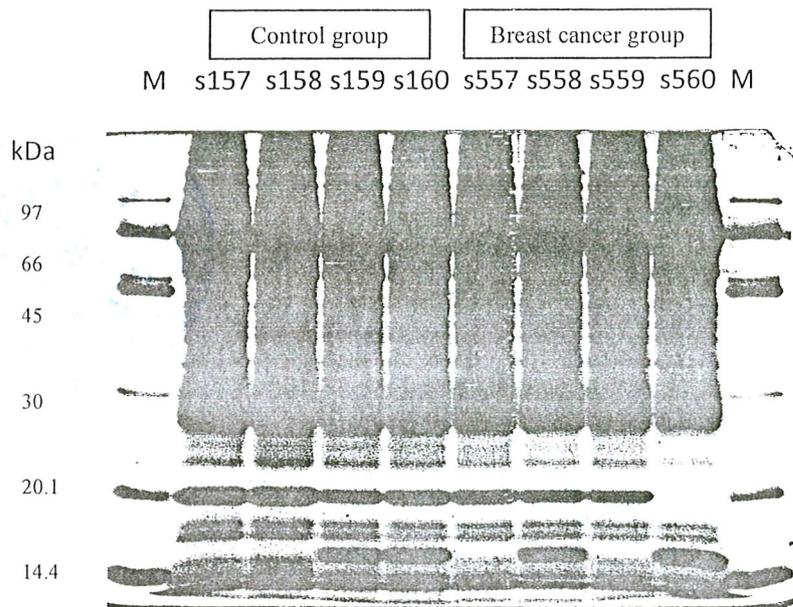


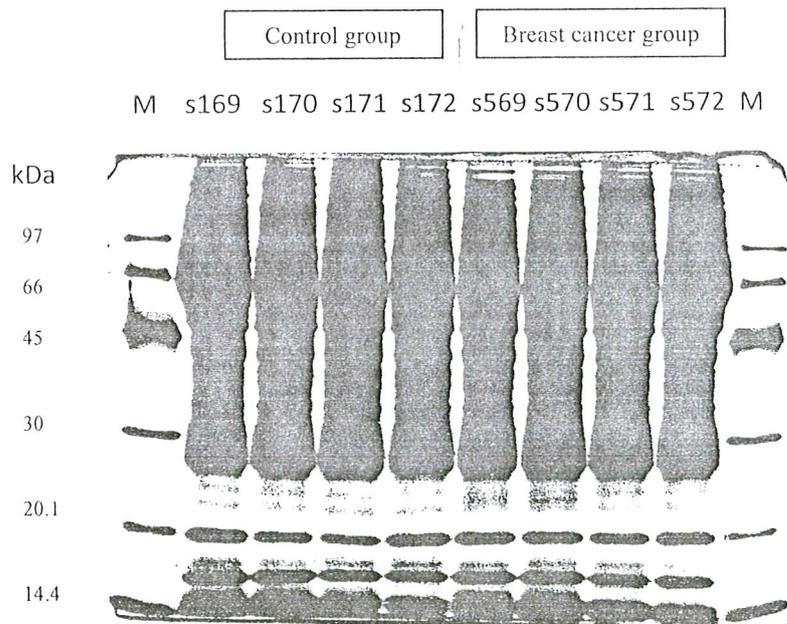
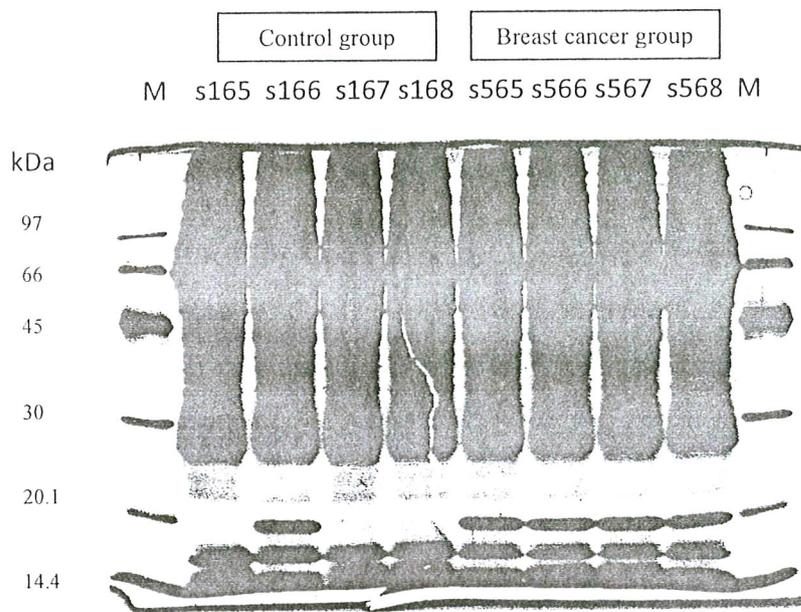


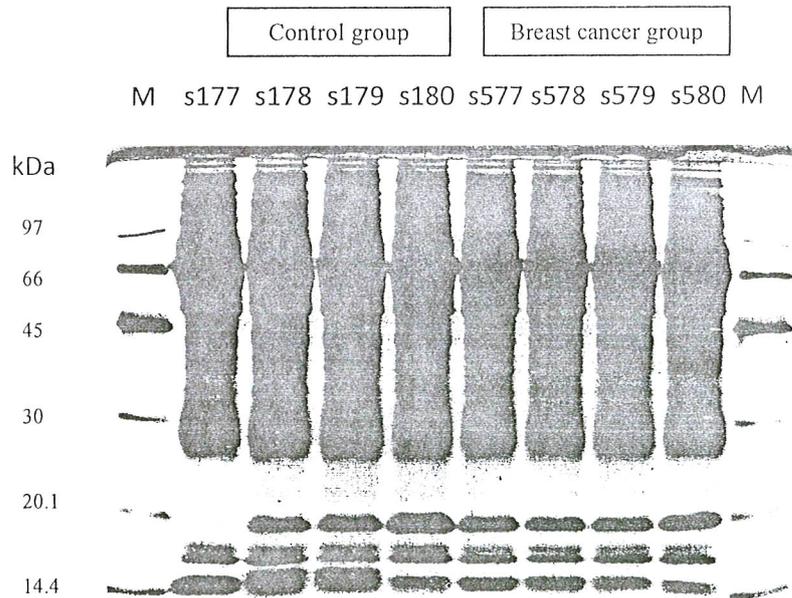
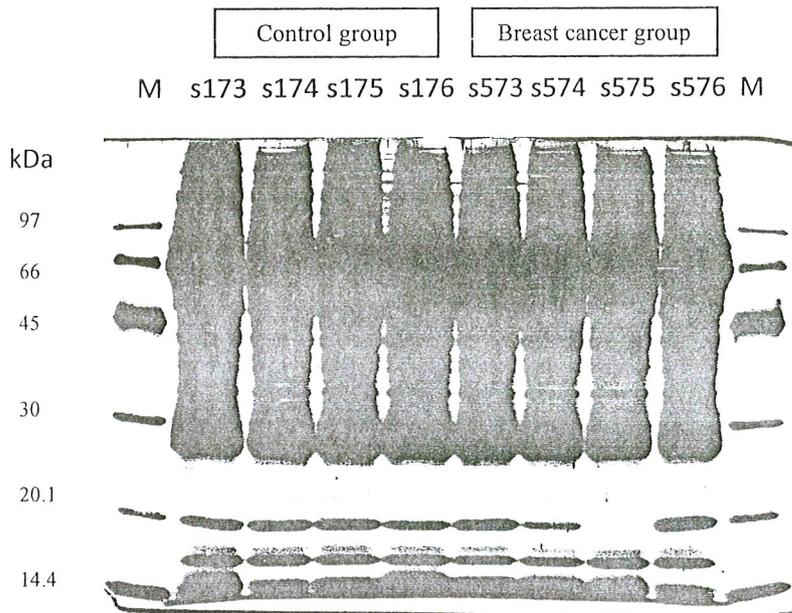


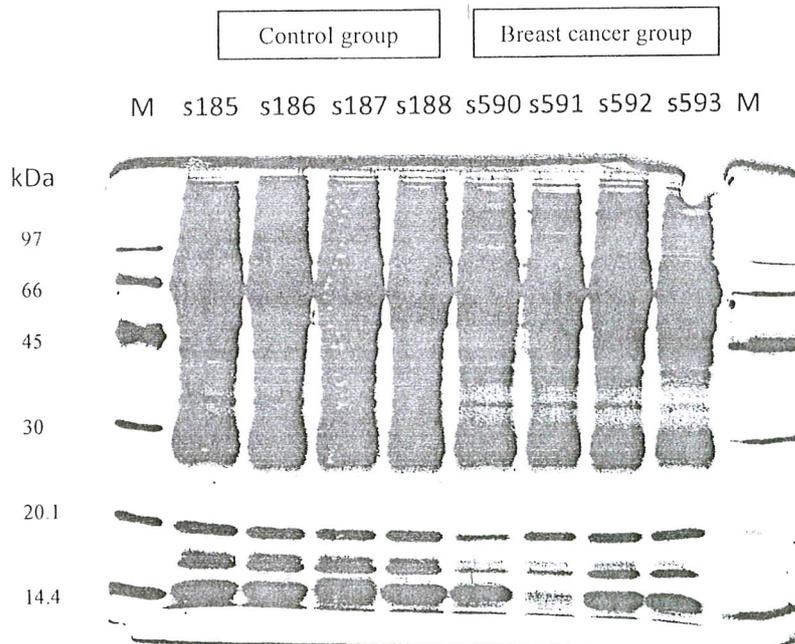
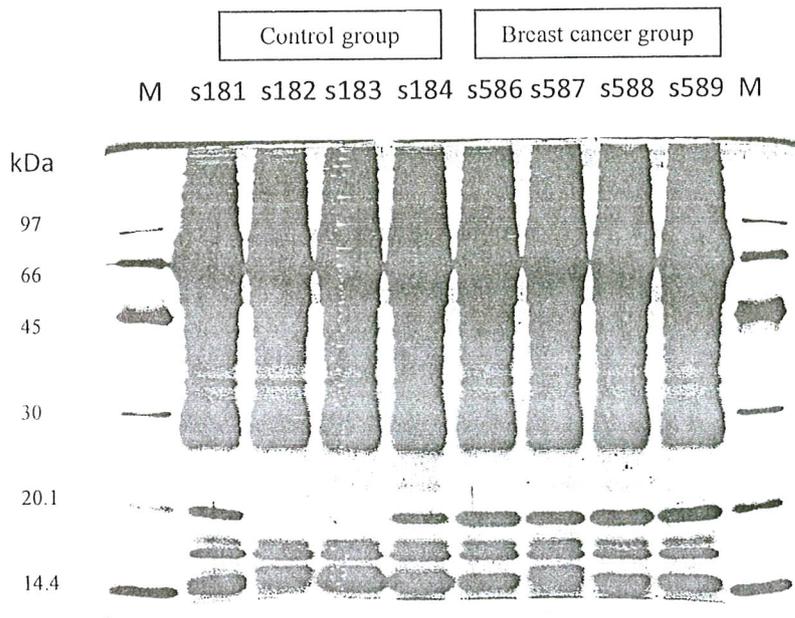


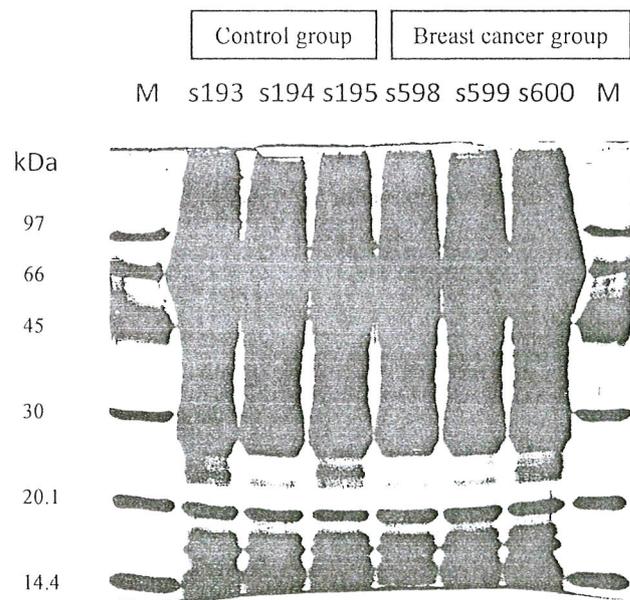
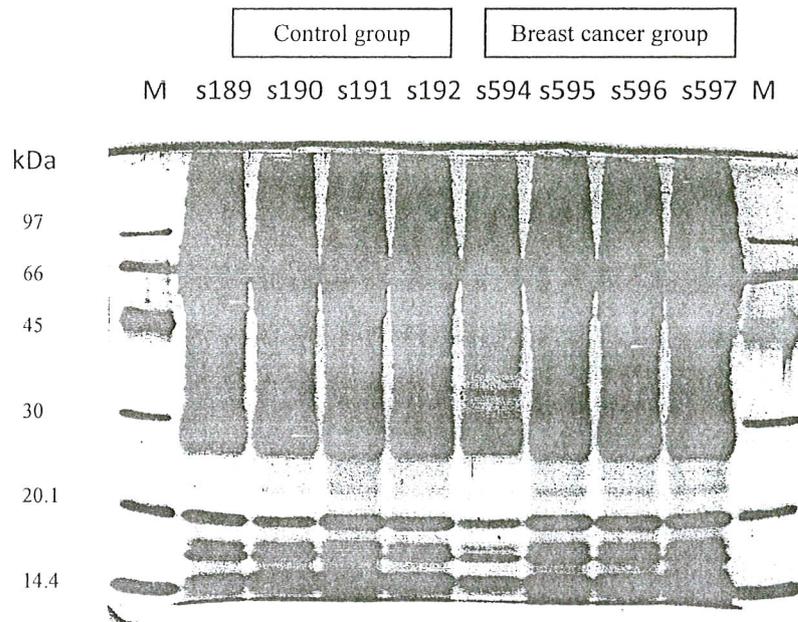












จากการแยกโปรตีนในซีรัมโดยวิธี SDS-PAGE ของกลุ่มคนปกติจำนวน 95 คน และกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จำนวน 95 คน (เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งเต้านม No. s581 ถึง s585 ไม่มีซีรัมมาในครั้งนี้นำตัวอย่างไปทำการทดลอง แต่ก็ได้สอบถามไปยังผู้เก็บตัวอย่าง ให้ทำการตรวจสอบอีกครั้ง) พบว่าแผนภูมิของโปรตีนในซีรัมโดยรวมจะไม่แตกต่างกันมากนัก