อณูชีววิทยาสำหรับศัลยแพทย์
(Molecular Biology for Surgeons)

สุรศักดิ์ สังขทัต ณ อยุธยา

บทนำ

การค้นพบโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกในปีคริสตศักราช 1953 เป็นการเปิดประตูให้กับชีววิทยายุคใหม่ซึ่งมุ่งศึกษาสารพันธุกรรมในฐานะของสารเคมีซึ่งเป็นรากของกระบวนการชีวิต กรดนิวคลีอิกกล่าวคือ deoxyribonucleic acid (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) เป็นกลุ่มสารเคมีซึ่งทำงานร่วมกันในการกำหนดการเติบโต การเจริญ การครองธาตุ (metabolism) การแก่ (senescence) การเกิดโรค และการเข้าสู่ความตายของเซลล์ผ่านกระบวนการนำสัญญาณในระดับเซลล์และเนื้อเยื่อ

ชีววิทยาระดับโมเลกุลหรืออณูชีววิทยาได้รับการประยุกต์เข้ากับการศึกษาพยาธิกำเนิดและพยาธิสรีรวิทยาของโรคในทุกแขนงทางการแพทย์รวมทั้งโรคในทางศัลยศาสตร์ ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดคือการค้นพบเครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular disease marker) ซึ่งช่วยในการวินิจฉัย พยากรณ์การตอบสนองต่อยา (predictive marker) หรือพยากรณ์การดำเนินโรค (prognostic marker) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มเนื้องอกและมะเร็ง ความรู้ความเข้าใจในหลักการพื้นฐาน ตลอดจนเทคนิคทางอณูชีววิทยาสมัยใหม่ นอกจากจะช่วยให้การสื่อสารระหว่างศัลยแพทย์และสมาชิกในทีมรักษาเป็นไปอย่างไร้รอยต่อ ยังจะเป็นการเปิดทรรศนะในการมองพยาธิสภาพในลักษณะของกระบวนการที่เกิดต่อเนื่องจากสมมติฐานซึ่งเป็นผลรวมของทั้งปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม

การถ่ายทอดพันธุกรรม

ในมุมมองของอณูชีววิทยาสมัยใหม่ ยีน (gene) เป็นชุดของสารพันธุกรรมบน

ตารางที่ 1 การค้นพบที่นำมาซึ่งความก้าวหน้าอย่างก้าวกระโดดของอณูชีววิทยา

ปีที่รายงาน (ค.ศ.)	ผู้รายงาน	
1953	James Watson และ Francis Crick[1]	โครงสร้างเกลียวคู่ของกรดนิวคลิอิก
1952	Salvador Luria[2]	เอนไซม์ restriction endonuclease
1972	David Jackson[3]	เทคโนโลยี recombinant DNA และ molecular cloning
1986	Kary Mullis[4]	Polymerase chain reaction
1989	Mario Capecchi[5]	การสร้าง Gene knockout mouse
1995	Mark Schena[6]	DNA microarray
1998	Andrew Fire[7]	การลดการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RNA interference

DNA ซึ่งเป็นแม่แบบของการสร้าง RNA และโปรตีน คำจำกัดความดังกล่าวนี้ต่างไปจากทรรศนะเดิมของ classical genetic ซึ่งมองยีนเป็นหน่วยบนโครโมโซม ซึ่งทำหน้าที่กำหนดลักษณะ (trait) ซึ่งสามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปยังลูก ในปัจจุบัน การอ่านลำดับของสารพันธุกรรมบนยีนซึ่งหมายถึง genotype สามารถกระทำได้อย่างเป็นอัตนัย ในทางกลับกัน ลักษณะที่ปรากฏกับสิ่งมีชีวิต (phenotype) เป็นผลรวมของ genotype และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม กลับมีความหลากหลายและหากต้องการศึกษา มักจำเป็นต้องกำหนดเกณฑ์วินิจฉัยเข้าจับ

จีโนมของมนุษย์มีลักษณะเป็น diploid ซึ่งหมายถึงยีนแต่ละตัวปรากฏสองชุด หรือสอง allele ที่ตำแหน่ง chromosome locus เดียวกัน โดย allele หนึ่งรับถ่ายทอดมาจากพ่อ และอีก allele รับถ่ายทอดมาจากแม่ เมื่อเซลล์มีการแบ่งตัวเพื่อการเจริญเติบโตซึ่งเป็นการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ทั้งสอง alleles จะถูกถ่ายทอดไปด้วยกัน ขณะที่ในการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งเป็นการแบ่งเซลล์แบบ meiosis และผลการแบ่งให้เซลล์สืบพันธุ์ที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid) นั้น allele ทั้งสองจะถูกแยกออก

จากกัน ลักษณะการส่งผ่านสารพันธุกรรมจากพ่อแม่สู่ลูกที่กล่าวมาเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นกับสารพันธุกรรมในนิวเคลียสซึ่งหมายถึง autosome และโครโมโซมเพศ (sex chromosome) เท่านั้น ส่วนการถ่ายทอดของสารพันธุกรรมในไมโตคอนเดรียนั้นมนุษย์ได้รับการถ่ายทอดจากแม่แต่เพียงฝ่ายเดียว

ในทรรศนะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบเมนเดล (Mendelian genetics) ซึ่งหนึ่งยีนกำหนดหนึ่ง phenotype การถ่ายทอดทางพันธุกรรม (mode of inheritance) เป็นลักษณะ dominant เมื่อ phenotype ที่สัมพันธ์กับ allele นั้นเกิดขึ้น แม้มีเพียงหนึ่ง allele อยู่ในเซลล์ในลักษณะ heterozygote ในขณะที่การถ่ายทอดเป็นลักษณะ recessive เมื่อ phenotype นั้นตรวจพบว่าเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อมี allele ซึ่งกำหนด phenotype นั้นอยู่ในจีโนมสองชุด กรณีซึ่ง phenotype เป็นลักษณะลูกผสมของทั้งสอง alleles เรียกว่า semidominant โรคหรือภาวะในมนุษย์ซึ่งถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแบบเมนเดลได้รับการรวบรวมลงทะเบียนเลขหกหลักไว้ในฐานข้อมูล Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) ซึ่งสามารถเข้าถึงได้ที่ http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim

แม้ทฤษฎี single-gene traits ของเมนเดลจะสามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง genotype และ phenotype (genotype-phenotype relationship) บางประการได้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามโรคหรือลักษณะซึ่งถูกกำหนดโดยยีนเดียวกลับเป็นเรื่องที่พบได้น้อย เนื่องจากโดยทั่วไป phenotype เป็นผลรวมที่เกิดจากการแสดงออกของยีนหลายตัวซึ่งอาจมี mode of inheritance แตกต่างกัน อีกทั้งยังได้รับอิทธิพลจากปัจจัยของสิ่งแวดล้อมร่วมด้วย และแม้ยีนใดยีนหนึ่งจะได้รับการพิสูจน์ว่ามีความจำเพาะต่อ phenotype ของโรคชัดเจน โอกาสที่จะเกิดโรคเมื่อสิ่งมีชีวิตรับถ่ายทอด genotype ที่จำเพาะนั้นยังอาจไม่สมบูรณ์ เรียกกรณีดังกล่าวว่า incomplete penetrance นอกจากนี้ genotype ที่จำเพาะต่อโรคบางอย่าง ยังอาจให้ phenotype ที่หลากหลายในต่างบุคคลซึ่งมีพื้นฐานทางพันธุกรรมต่างกัน ซึ่งเรียกว่ามี variable expressivity โรคในมนุษย์ซึ่งเกิดจากความผิดปกติในหลายยีนมีตัวอย่างเช่น Hirschsprung's disease มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของ RET protooncogene ในลักษณะ autosomal dominant ร่วมกับ incomplete penetrance และเชื่อว่าปัจจัยซึ่งมีอิทธิพลต่อ genotype-phenotype correlation ในกรณีนี้เป็นยีนอื่นที่เกี่ยวข้องในพัฒนาการของเซลล์ neural crest[8]

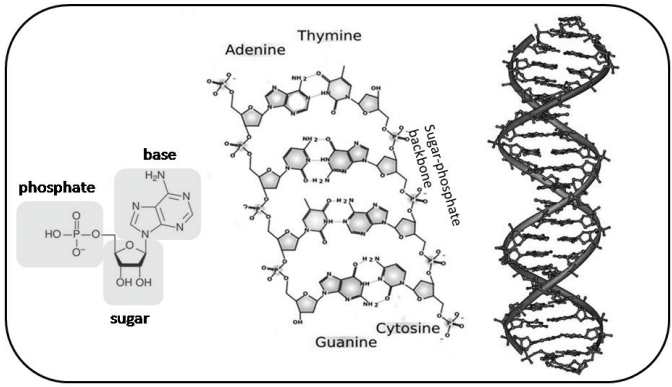
โครงสร้างและกระบวนการทำงานของสารพันธุกรรม

โครงสร้างของ DNA

DNA มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น nucleotide โดยในแต่ละโมเลกุลของ nucleotide มีองค์ประกอบ 3 ประการคือ เบส น้ำตาลเพนโตส และหมู่ฟอสเฟต โดยเบสแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ pyrimidines [cytosine (C) และ thymine (T)] และ purines [adenine (A) และ guanine (G)] การจับกันของเบสหนึ่งตัวเข้ากับน้ำตาลเพนโตสก่อให้เกิดหน่วยย่อย เรียกว่า nucleoside และการจับกันของ nucleoside กับหมู่ฟอสเฟต 1-3 ตัวก่อให้เกิดโมเลกุลของ nucleotide ที่สมบูรณ์[9]

สาย DNA ที่เป็นสายเดี่ยวเป็นโพลิเมอร์ที่เกิดจากการจับกันของ nucleotide ด้วยพันธะ covalent phosphodiester ระหว่างตำแหน่ง 5' ของวงน้ำตาลเพนโตสโมเลกุลหนึ่งกับ 3' ของอีกโมเลกุลหนึ่งต่อกันไปเรื่อยจนเป็นสายของ nucleotides ซึ่งโดยทั่วไปจะนับลำดับเบสทาง 5' เป็นฝั่ง upstream และ 3' เป็นฝั่ง downstream และไล่เรียงลำดับเบสจาก 5' ไปยัง 3' สาย DNA ในธรรมชาติเป็นสายคู่ (double-stranded DNA) ซึ่งมีเกิดจากการเข้าคู่กันในแนวขนานของ DNA สายเดี่ยวสองสาย โดยหากพิจารณา DNA สายหลัก (sense strand) ในทิศทาง 5'ไปยัง 3' สายซึ่งมาเข้าคู่ (antisense strand) มีการเรียงลำดับ DNA ในทิศทางตรงข้ามกล่าวคือจาก 3' ไปยัง 5' DNA สายคู่มีสมบัติการดูดกลืนรังสีเหนือม่วงได้ดีที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร[10,11] (รูปที่ 1)

DNA สายคู่มีโครงสร้างบิดเป็นเกลียว (helix) คล้ายบันไดเวียนขวาซึ่งมีน้ำตาลเป็นราวบันได หมู่ฟอสเฟตอยู่ด้านนอกและเบสคู่สม (complementary base) คล้ายเป็นขั้นบันไดด้านใน การจับกันของ DNA แต่ละสายเกิดจากพันธะ hydrogen ที่เกิดระหว่างเบสคู่สมโดย A จับกับ T ด้วยพันธะคู่ และ C จับกับ T ด้วยพันธะสาม แต่ละตำแหน่งของเบสคู่สมเรียกว่า base pairs (bp) ซึ่งอีกนัยหนึ่งสามารถใช้เป็นหน่วยวัดขนาดของยีน เช่น kilobase (kb) หมายถึง 10^3 เบส หรือ megabase (Mb) หมายถึง 10^6 เบส และเนื่องจากแต่ละสายของ DNA ซึ่งเข้าคู่กันเป็น double-stranded DNA วางตัวในทิศทางตรงกันข้ามและมีการเรียงลำดับในลักษณะเบสคู่สม DNA สายหนึ่งจึงเป็นแม่แบบที่สมบูรณ์ในการสร้าง DNA สายตรงข้ามในกระบวนการจำลองแบบ (replication)[10,11]

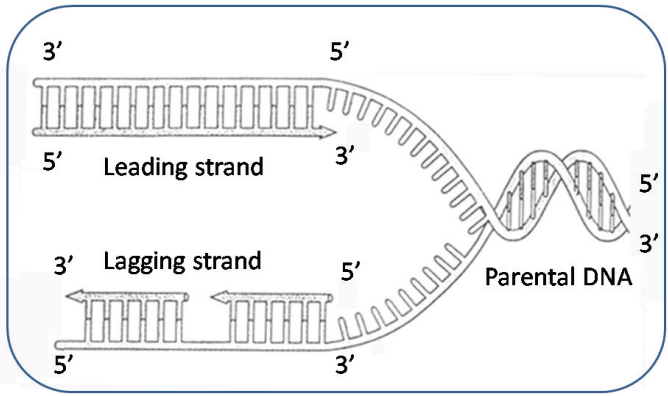


nucleic acid nucleotide chain double helix DNA

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ deoxyribonucleic acid (DNA) จากหน่วยย่อยคือกรดนิวคลิอิกไปยังโครงสร้างของDNA สายคู่ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่มีรูปร่างทุติยภูมิเป็นเกลียวคู่ (double helix) โดย phosphodeoxyribonucleic acid เป็นราวบันไดที่จับกันด้วยพันธะ phosphodiester ในขณะที่เบส adenine (A) thymine (T) guanine (G) และ cytosine (C) เปรียบเสมือนขั้นบันไดที่ยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไฮโดรเจน

กระบวนการจำลองแบบ

กระบวนการจำลองแบบของ DNA เริ่มจากการคลายเกลียวโดยเอนไซม์ helicase เปิดโอกาสให้เอนไซม์ DNA polymerase เข้าจับและสร้าง DNA สายใหม่โดยต่อ nucleotide ลงบน DNA แม่แบบตามลำดับเบสคู่สม การสร้าง DNA สายใหม่เกิดขึ้นในทิศทาง 5' ไปยัง 3' โดย DNA เส้นใหม่สายหนึ่งถูกสร้างอย่างต่อเนื่อง เรียกเป็น leading strand และ อีกเส้นหนึ่ง (lagging strand) ถูกสร้างเป็นช่วงสั้นหลายชิ้น (Okazaki fragments) ซึ่งจะถูกประกอบเข้าเป็นสายเต็มในภายหลังด้วยเอนไซม์ DNA ligase (รูปที่ 2) เมื่อสิ้นสุดแต่ละรอบในกระบวนการจำลองแบบของ DNA ผลลัพธ์ที่ได้เป็น DNA สายคู่สองชุด ซึ่งแต่ละชุดประกอบด้วย DNA เส้นเก่าหนึ่งสาย ในภาพรวม การจำลองแบบของ DNA จึงมีลักษณะเป็น semiconservative และ semidiscontinuous ในเซลล์ eukaryote กระบวนการดังกล่าวนี้ได้การตรวจสอบความถูกต้อง (proof reading) โดยเอนไซม์กลุ่ม DNA polymerase III และ DNA polymerase I



รูปที่ 2 ลักษณะการจำลองแบบของ DNA ซึ่งอยู่ในลักษณะ semidiscontinucous กล่าวคือสายหนึ่งเป็นการสร้าง nucleotide ต่อเนื่อง ในขณะที่อีกสายหนึ่งจำลองแบบเป็นปล้อง Lagging strands (Okazaki's fragments) แล้วนำมาเชื่อมกันภายหลังด้วย DNA ligase

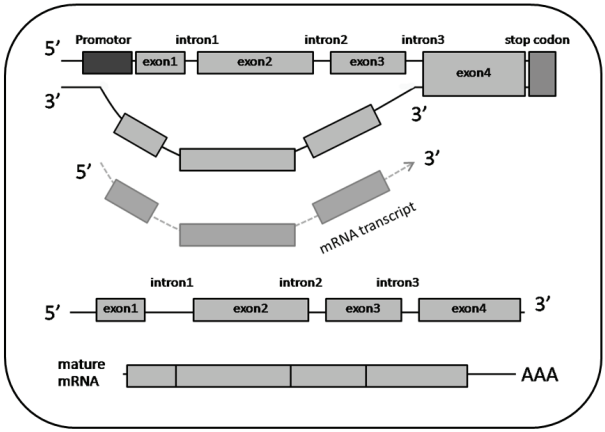
โครงสร้างของ RNA และการแสดงออกของยีน

RNA มีความแตกต่างจาก DNA สองประการ ประการแรกคือชนิดของน้ำตาลเพนโตสซึ่งเป็น ribose แทนที่จะเป็น deoxyribose (ขาดหมู่ -OH ที่ตำแหน่ง 2') และชนิดของเบส pyrimidine ซึ่งเป็น uracil (U) แทนที่จะเป็น thymine ความแตกต่างประการหลังเป็นสิ่งที่ทำให้ RNA มีเสถียรภาพน้อยกว่า DNA หน้าที่หลักของ RNA คือเป็นผู้ถอดรหัสทางพันธุกรรมจาก DNA ไปยังการสร้างโปรตีน กระบวนการดังกล่าวก่อให้เกิดการนำสารซึ่งบรรจุไว้บนยีนบนสาย DNA ออกไปกำหนดกระบวนการชีวิตผ่านการสร้างโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของร่างกาย เอนไซม์และฮอร์โมนซึ่งอำนวยให้เกิดสรีรภาพการครองธาตุตลอดจนการสื่อสารภายในร่างกายสิ่งมีชีวิต การถอดรหัสทางพันธุกรรมจาก DNA ไปยัง RNA (transcription) และการสร้างโปรตีนโดยใช้ RNA เป็นแม่แบบ (translation) จึงถูกมองในภาพรวมเป็น 'การแสดงออกของยีน' (genetic expression)[12]

กระบวนการ transcription เริ่มจากการสร้างสาย messenger RNA (mRNA) ซึ่งคล้ายกับกระบวนการสร้าง DNA ในกระบวนการจำลองแบบ แต่เกิดขึ้นเฉพาะส่วนของสารพันธุกรรมซึ่งบรรจุรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนชนิดที่จะมีการแสดงออกในขณะนั้น

ลำดับเบสบนสาย mRNA เป็นเบสคู่สมกับแม่แบบบน DNA ในเซลล์ eukaryote ซึ่งมีผนังนิวเคลียส กระบวนการ translation เกิดขึ้นนอกนิวเคลียส ribosomal (rRNA) ในมนุษย์ rRNA ซึ่งมีขนาด 60S และ 40S ทำหน้าที่เป็นสถานประกอบการ (active site) ในกระบวนการ translation โดยการเป็นจุดเกาะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเริ่ม (initiation) การต่อสาย (elongation) และการสิ้นสุด (termination) การสร้าง และเป็นจุดเกาะของ transfer RNA (tRNA) ซึ่งทำหน้าที่ในการนำ amino acid มาต่อสายกันอย่างเป็นลำดับจำเพาะต่อลำดับเบสบน mRNA และต่อพันธะ covalent ระหว่าง amino acid จนเป็นสาย peptide chain ความจำเพาะในการวางลำดับ amino acid แต่ละตัวเกิดจากการรับรู้ (recognize) ลำดับ nucleotide ครั้งละสามตัวบน mRNA ซึ่งเรียกว่า codon ส่วนของ mRNA ซึ่งถูกถอดรหัสเป็นโปรตีนเรียกว่า exon (expressed sequence) ถูกคั่นด้วยส่วนซึ่งมิได้เข้ารหัสสำหรับโปรตีนไว้ (non-coding sequence) เรียกว่า intron (intervening sequence) โดยบริเวณ intron ซึ่งอยู่ upstream ต่อยีนอาจมีบทบาทในกระบวนการแสดงออกของยีนคือเป็นบริเวณเข้าจับของ transcription factor หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งเป็นส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน (promoter element) นอกจากกระบวนการตัดส่วนของ intron ออกและเชื่อม exon เข้าด้วยกันก่อนกระบวนการ translation ซึ่งเรียกว่า splicing กระบวนการดัดแปลง RNA (post-transcriptional modification) ยังประกอบด้วยการเติม 5'cap ด้วย methylguanosine และการเติม poly-A-tail กระบวนการเหล่านี้ส่งเสริมให้เกิดความเสถียรและช่วยในการนำส่ง mRNA ออกสู่ cytoplasm[11,12] (รูปที่ 3)

เนื่องจากแต่ละ codon ประกอบด้วยตัวอักษร 3 ตัว (triplet) และแต่ละตัวมีความเป็นไปได้ 4 แบบ รหัสทางพันธุกรรม (genetic code) จึงมีความเป็นไปได้ทั้งหมด 4^3 หรือ 64 แบบ ในขณะที่ amino acid มี 20 ชนิด แต่ละชนิดจึงมี genetic code ได้มากกว่า 1 แบบ การเข้าจับของ tRNA เพื่อเติม amino acid ให้กับสายโปรตีนเป็นไปตามหลักของเบสคู่สม โดย tRNA มี anticodon triplet ซึ่งเข้าคู่กับลำดับเบสบน mRNA การสร้างสาย peptide เกิดในทิศทางจาก 5' ไปยัง 3' บนสาย mRNA ซึ่งเป็นทิศทางจาก amino (N) terminus ไปยัง carboxy (C) terminus โดยจุดเริ่มต้นการ translation ของโปรตีนทุกครั้งคือ AUG ซึ่งเป็นรหัสของ methionine และถือเป็น start codon ใน



รูปที่ 3 กระบวนการถอดรหัส (transcription) จาก template DNA ไปยัง mRNA ซึ่งมีกระบวนการ splicing กระบวนการ 5′ capping และ การเติม poly A ด้าน 3′ เพื่อให้ได้ mRNA ที่เสถียรและพร้อมที่จะส่งออกไปยัง cytoplasm เพื่อสร้างโปรตีนด้วยกระบวนการแปลรหัส (transcription)

ขณะที่ UAA UAG และ UGA ไม่ได้เข้ารหัสสำหรับ amino acid และก่อให้เกิดการหยุดการแปลรหัส กล่าวคือเป็น stop codon[11,12] (ตารางที่ 2)

หลังจากที่การสร้างสายโปรตีนเสร็จสมบูรณ์ สายโปรตีนจะเข้าสู่กระบวนการ post-translational modification เพื่อให้เป็นโปรตีนซึ่งสามารถทำหน้าที่ได้ เช่นการตัดบางส่วนออก การเกิด hydroxylation และ phosphorylation หรือการเติมหมู่ข้างเคียง (side chain) เช่น glycosylation โปรตีนส่วนหนึ่งถูกบีบอัดและส่งออกนอกเซลล์ผ่าน endoplasmic reticulum

การควบคุมการแสดงออกของยีน

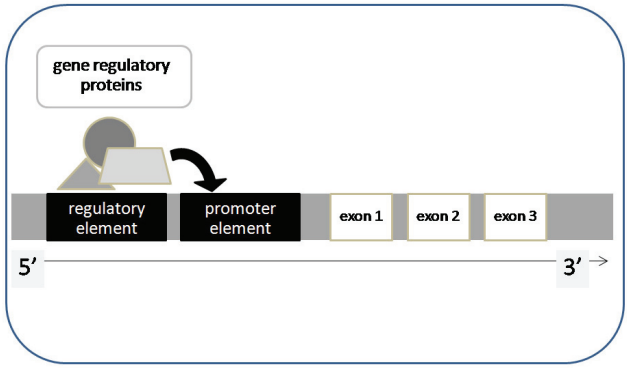
ในขณะที่แม่แบบของยีนประมาณ 30,000 ยีนถูกเข้ารหัสไว้บน DNA อย่างเท่าเทียมกัน การแสดงออกของยีนแต่ละยีนมีความแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของเซลล์ แต่ละช่วงของพัฒนาการ นอกจากนี้การแสดงออกของยีนมีอิทธิพลซึ่งกันและกันในลักษณะของโครงข่ายสัญญาณ (signaling system) กระบวนการหลักในการควบคุม

ตารางที่ 2 รหัสบน mRNA ซึ่ง code สำหรับ amino acid แต่ละชนิดและสัญญาณหยุด

Amino acid	Triple codon	Amino acid	Triple codon
Start	AUG	His	CAU CAC
Phe	UUU UUC	Gln	CAA CAG
Leu	UUA UUG	Asn	AAU AAC
	CUU CUC CUA CUG	Lys	AAA AAG
Ile	AUU AUC AUA	Asp	GAU GAC
Met	AUG	Glu	GAA GAG
Val	GUU GUC GUA GUG	Cys	UGU UGC
Ser	UCU UCC UCA UCG	Trp	UGG
	AGU AGC	Arg	CGA CGC CGA CGG
Pro	CCU CCC CCA CCG		AGA AGG
Thr	ACU ACC ACA ACG	Gly	GGU GGC GGA GGG
Ala	GCU GCC GCA GCG	Stop	UAA UAG UGA
Tyr	UAU UAC		

การแสดงออกของยีนคือ promoter element ซึ่งอยู่ upstream (5') ต่อ start codon ส่วนของ intron (รูปที่ 4) ที่กล่าวเป็นบริเวณเข้าจับของ RNA polymerase และ transcription factors โดย promoter sequence มักมีชุดของลำดับเบสซึ่งเป็นแบบแผนเช่น TATAAA ซึ่งอยู่ 19-27 bp ในทาง upstream ต่อ start codon เป็นต้น นอกจาก promoter แล้ว ลำดับเบสซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนยังประกอบด้วย regulatory sequence ซึ่งเป็นบริเวณเกาะของ regulatory proteins ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการรวมกลุ่ม (assembly) ของ transcription factors บน promoter โดย regulatory protein เหล่านี้เป็นได้ทั้ง co-activator ซึ่งกระตุ้นการแสดงออกและ co-repressor ซึ่งยับยั้งการแสดงออกของยีน

นอกจากการกระตุ้นหรือยับยั้งการแสดงออกผ่าน transcription factors และ gene regulatory proteins แล้ว การแสดงออกของยีนยังถูกควบคุมด้วยกระบวนการทาง epigenetics ได้แก่ภาวะ DNA methylation ซึ่งเมื่อเกิดกับ promoter จะยับยั้งการแสดงออกของยีน กระบวนการ chromatin/histone modification ซึ่งส่งผลต่อโครงสร้างของ chromatin และการเข้าจับของโปรตีนซึ่งมีอิทธิพลต่อส่วนควบคุมการ



รูปที่ 4 ส่วนควบคุมการแสดงออกของยีนทางด้าน upstream (5′) ซึ่งประกอบด้วย promoters ซึ่งเป็นที่เกาะของ transcription factors และ regulatory elements ซึ่งเป็นที่เกาะของ regulatory proteins

แสดงออก[10-12]

สารพันธุกรรมของไมโตคอนเดรีย (mitochondrial genome)

ไมโตคอนเดรียเป็น organelle ทำหน้าที่สร้างพลังงานในเซลล์สัตว์ การมีอยู่ของไมโตคอนเดรียมีลักษณะคล้ายเป็นปรสิตซึ่งอิงอาศัยใน cytoplasm และมีชุดสารพันธุกรรมของตนเอง จีโนมของไมโตคอนเดรียในมนุษย์มีรูปร่างกลมและมีความยาว 16.5 kb ภายในบรรจุยีนซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้าง rRNA tRNA และโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา oxidative phosphorylation การจำลองแบบของจีโนมของไมโตคอนเดรียเป็นอิสระจากจีโนมหลักในนิวเคลียส โรคในมนุษย์ซึ่งมีพยาธิกำเนิดจากการกลายพันธุ์บนไมโตคอนเดรียมักเกี่ยวข้องกับความพิการของระบบประสาทและกล้ามเนื้อ นอกจากนี้เนื่องจากไมโตคอนเดรียถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านทางแม่เท่านั้น การศึกษาจีโนมของไมโตคอนเดรียจึงเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางมนุษยวิทยาตลอดจนการระบุความสัมพันธ์ระหว่างแม่และลูก

เทคนิคในการศึกษาทางอณูชีววิทยา

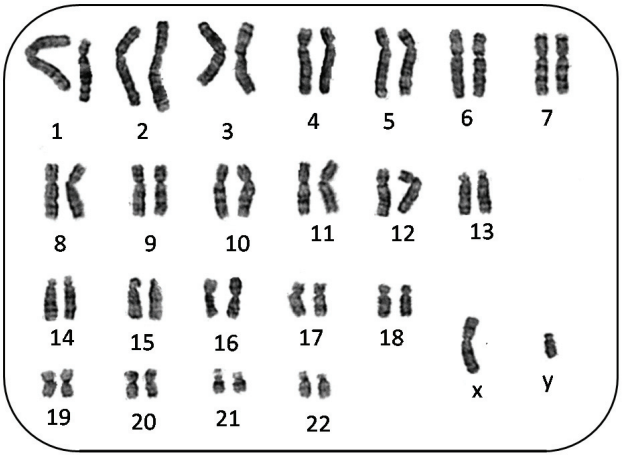
การถอดรหัสทางพันธุกรรมจาก DNA ไปยัง mRNA และการแปลรหัสเป็นโปรตีน

ซึ่งเป็นแก่นธรรม (central dogma) ของอณูพันธุศาสตร์มีวิวัฒนาการของเทคนิคการศึกษาเป็นลำดับ การศึกษาพันธุศาสตร์เริ่มตั้งแต่ระดับโครโมโซมมาจนกระทั่งสามารถศึกษาลำดับเบสบน DNA ของยีนที่สนใจ ศึกษาการแสดงออกในระดับผ่านการตรวจวัดปริมาณ mRNA และปริมาณโปรตีนของยีนที่สนใจ กระทั่งศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนโดยระงับการแสดงออกในแบบจำลองระดับเซลล์หรือสัตว์ทดลอง เทคนิคในปัจจุบันขยายฐานการศึกษาในทางกว้างจากการศึกษาทีละยีน (single gene approach) ไปสู่การศึกษาทั้งจีโนม (whole genome approach)

การศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโครโมโซม

โครโมโซมของมนุษย์ประกอบด้วย autosome 22 คู่ ซึ่งเรียงลำดับจากใหญ่ที่สุด (คู่ที่ 1) จนเล็กที่สุด (คู่ที่ 22) และโครโมโซมเพศ 1 คู่ การศึกษาลักษณะของโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กระทำโดยการหยุดการแบ่งเซลล์ไว้ในระยะ metaphase และจัดเรียงโครโมโซมตามขนาดเพื่อศึกษารูปร่างและตำแหน่งของ centromere เรียกการศึกษาลักษณะนี้ว่า G-band karyotyping (รูปที่ 5) ความผิดปกติซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการศึกษา karyotyping จะต้องมีขนาดใหญ่เพียงพอ ตัวอย่างเช่น โครโมโซมซ้อน (duplication) ส่วนของโครโมโซมขาดหาย (deletion) หรือการสลับขาซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 4 Mb ขึ้นไป[12] ตลอดจนภาวะ trisomy หรือการเกิดวงแหวน (ring chromosome) เป็นต้น เนื่องด้วยโครโมโซมมีปลายต่อจาก centromere 2 ด้านซึ่งมีความยาวไม่เท่ากัน การระบุตำแหน่งพยาธิสภาพบนโครโมโซมจึงอาจระบุเป็น แขนยาว (q) หรือ แขนสั้น (p) และอาจระบุระยะจาก centromere ต่อไปอีกตัวอย่างเช่น 11p13 หมายถึงแถบ (band) ที่ 13 บนแขนสั้นของโครโมโซมที่ 11 เป็นตำแหน่งของยีนซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงได้บ่อยในผู้ป่วยมะเร็ง nephroblastoma (Wilms' tumor)

การศึกษาพยาธิสภาพในส่วนของโครโมโซมซึ่งมีความละเอียดยิ่งขึ้นอาจกระทำได้โดยการใช้ probe เข้าทำปฏิกิริยา in-situ hybridization โดย probe ดังกล่าวเป็นสาย nucleotide ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมจำเพาะต่อยีนหรือส่วนของโครโมโซมที่สนใจและติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (รูปที่ 6) ตัวอย่างเช่นการศึกษา amplification ของยีน HER2/Neu ในมะเร็งเต้านม ด้วยเทคนิค fluorescent in-situ hybridization (HER2-FISH)



รูปที่ 5 ภาพถ่ายโครโมโซม 46 XY ซึ่งได้จากการจัดเรียงโดยวิธี G-band karyotyping สังเกตการจัดเรียงโครโมโซมที่เป็น autosome จากยาวมาหาสั้นและแยก sex chromosome ออกต่างหาก

ใช้หลักการดังกล่าวนี้ การศึกษาใช้ probe ซึ่งจำเพาะต่อบริเวณ 17q12 ซึ่งเป็นตำแหน่งของยีน HER2 ร่วมกับ probe ซึ่งจำเพาะต่อบริเวณ centromere ของโครโมโซมคู่ที่ 17 และติดสี fluorescence ต่างไปจาก probe ของ HER2 การอ่านสภาวะ amplification ใช้อัตราส่วนของจำนวนจุดสี fluorescence ของ HER2-probe ต่อจำนวนจุดสี fluorescence ของ centromere ของโครโมโซมคู่ที่ 17 และโดยทั่วไปอ่านผลบวก (มี amplification) เมื่ออัตราส่วนดังกล่าวมากกว่าหรือเท่ากับ 2.0 โดยทั่วไป amplification ซึ่งหมายถึงจำนวน template ที่มากขึ้นส่งผลให้การแสดงออกของยีนมากขึ้น (การแสดงออกที่สูงขึ้นไม่จำเป็นจะต้องมาจาก amplification เสมอไป เนื่องจากมีปัจจัยควบคุมการแสดงออกของยีนประการอื่นดังอธิบายข้างต้น) การศึกษา MYCN amplification ในมะเร็ง neuroblastoma ในเด็กใช้หลักการเดียวกันนี้ หากมีความแตกต่างในการแปลผลซึ่งถือนัยสำคัญทางคลินิกเมื่อมีจำนวน copy number ของ MYCN ตั้งแต่ 10 copies ขึ้นไป

การศึกษาในระดับอณูพันธุศาสตร์

รูปที่ 6 การศึกษา copy number variation ของจีนที่สนใจด้วยเทคนิค fluorescence in situ hybridization วงสีฟ้า (ในรูปสี) เป็นขอบเขตของนิวเคลียสซึ่งย้อมด้วย 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ในภาวะปกติ จำนวนจุดปรากฏของยีนที่ศึกษา (สีแดงในรูปสี) เทียบกับจุดปรากฏของ centromere (สีเขียว) จะมีอัตราส่วนไม่เกิน 2.0 อัตราส่วนที่มากแสดงถึงภาวะ amplification คือมีจำนวน DNA copy number มากกว่าปกติ และอาจเป็นเหตุของการแสดงออกของยีนที่มากขึ้น

การศึกษาจีโนมมนุษย์ในระดับอณูพันธุศาสตร์มองสารพันธุกรรมในรูปของโพลิเมอร์ของกรดนิวคลิอิกโดยก้าวข้ามภาพของโครโมโซมลงไปยังลำดับเบส ซึ่งจีโนมมนุษย์ประกอบด้วยลำดับเบสราว 3,000,000,000 bps และมุ่งศึกษาส่วนที่เข้ารหัสสำหรับการสร้างโปรตีน กล่าวคือยีนซึ่งจีโนมมนุษย์มีอยู่ประมาณ 30,000 ยีน เป็นสำคัญ สารพันธุกรรมสามารถถูกสกัดจากเซลล์ซึ่งมีนิวเคลียส เช่นเมื่อสกัดจากเลือด สารพันธุกรรมจะได้จากเม็ดเลือดขาวเป็นหลัก

การศึกษาอณูพันธุศาสตร์ในระยะเริ่มต้นอาศัยเทคโนโลยีของ restriction endonuclease เป็นหลัก เอนไซม์กลุ่มนี้ recognize และตัดสาย double-stranded DNA อย่างจำเพาะต่อลำดับเบส เช่นเอนไซม์ ECO RI ตัด DNA ซึ่งมีลำดับเบส G/AATTC หลังจากจีโนมถูกตัดเป็นชิ้นย่อย การศึกษาต่อไปสามารถกระทำได้โดยมีตัวอย่างเช่นการถ่ายฝากเข้าสู่พลาสมิดของแบคทีเรียเพื่อตรวจสอบและเพิ่มจำนวน (molecular cloning)

การทำ nucleotide separation โดยใช้สนามไฟฟ้า (electrophoresis)[13]

การทำ nucleotide separation ด้วยสนามไฟฟ้าอาศัยสมบัติประจุลบของกรดนิวคลิอิก และอาศัยความแตกต่างในขนาดของสาย nucleotide หลังจากถูกตัดด้วยชุดเอนไซม์ restriction endonuclease ในการทำ electrophpresis กรดนิวคลิอิกจะถูกทำให้วิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวกผ่านตัวกลางซึ่งเป็นวุ้น (gel) ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้วุ้นสาหร่าย (agarose gel) ซึ่งมีความสามารถในการแยก nucleotide ขนาดตั้งแต่ 100 bps ถึง 25 kb การแยก nucleotide ซึ่งมีความแตกต่างของขนาดน้อยกว่านั้นอาจใช้วุ้นชนิด polyacrylamide

สารพันธุกรรมไม่มีสีในย่านที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า การตรวจสอบแถบสารพันธุกรรมบนวุ้นหลังการแยกด้วยกระแสไฟฟ้ากระทำได้โดยการย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งจะทำให้แถบ DNA คายแสง fluorescence เมื่อกระทบรังสีเหนือม่วง หรือย้อมตรวจด้วย silver nitrate ซึ่งนิยมใช้กับแถบสารพันธุกรรมที่มีขนาดเล็กบนวุ้น acrylamide นอกจากการตรวจสอบด้วยการย้อมสารเคมีซึ่งแปลผลได้เพียงการมีกรดนิวคลิอิกอยู่บนวุ้นและทราบขนาดของชิ้น nucleotide นั้น การมีอยู่ของสารพันธุกรรมซึ่งมีลำดับกรดนิวคลิอิกจำเพาะกระทำได้โดยใช้ probe ซึ่งมี complementary nucleotide โดย probe อาจติดฉลากด้วยสารเรืองแสงดังกรณีของ FISH อาจสร้างให้คายสารกัมมันตรังสี (radioactive) โดยติดฉลากสารกัมมันตรังสีบนโครงสร้างอะตอมของธาตุบน probe เช่น ^{32}P ^{3}H หรือ ^{35}S เป็นต้น การใช้ probe เพื่อศึกษาสารพันธุกรรมที่สนใจสามารถกระทำบนตัวอย่างเนื้อเยื่อโดยตรง (in-situ hybridization) หรือกระทำหลังจากสกัดสารพันธุกรรม ตัดด้วย restriction enzymes แยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า และถ่ายโอนไปยังแผ่น nitrocellulose หรือ nylon membrane ก่อน ประการหลังเป็นเทคนิคซึ่งเรียก Southern blotting ตามชื่อของอาจารย์ Edwin Southern[11]

การศึกษาการแสดงออกในระดับ mRNA กระทำโดยใช้หลักการเดียวกันนี้ ต่างตรงที่กรดนิวคลิอิกซึ่งแยกขนาดและถ่ายโอนไปยังแผ่น nitrocellulose เป็น mRNA ส่วนการศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนซึ่งเรียกว่า Western blotting เป็นการแยกขนาดโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าบนวุ้น ถ่ายโอนโปรตีนไปยังแผ่น membrane และทำปฏิกิริยาด้วย antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนนั้น ซึ่งทำปฏิกิริยากับโปรตีนเป้าหมายในลักษณะปฏิกิริยาระหว่าง antigen-antibody มิใช่การจับกันของเบสคู่สม

การเพิ่มปริมาณส่วนของสารพันธุกรรมซึ่งสนใจศึกษา

การเพิ่มปริมาณส่วนของสารพันธุกรรมซึ่งสนใจศึกษาเป็นงานต้นน้ำซึ่งมีความจำเป็นสำหรับการศึกษาทางอณูชีววิทยาเกือบทั้งหมด ขั้นตอนในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มปริมาณสายกรดนิวคลิอิกซึ่งบรรจุยีนที่กำลังสนใจศึกษาหรือส่วนของยีนดังกล่าวให้มีปริมาณมากพอที่จะถูกวิเคราะห์ต่อ หรือนำไปถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์เป้าหมายเพื่อดูหน้าที่การทำงานของยีนนั้น หรือนำไปถ่ายฝากให้จุลชีพซึ่งสามารถสร้างโปรตีนที่เกิดจากยีนนั้นเพื่อนำโปรตีนมาใช้ เป็นต้น การขยายส่วนของสารพันธุกรรมกระทำได้สองวิธีหลัก คือ cell-based amplification โดยใช้แบคทีเรียและกระทำในหลอดทดลองโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

Cell-based nucleic acid amplification

เป็นการฝาก (insert) ส่วนของกรดนิวคลิอิกที่สนใจ ซึ่งอาจได้มาจากการตัดด้วย restriction enzyme หรือได้มาจากการทำ PCR เข้าสู่เวคเตอร์ของแบคทีเรีย (bacterial plasmid vector) โดยพลาสมิดเป็นสารพันธุกรรมนอกจีโนม (extragenomic DNA) ของแบคทีเรียซึ่งมีรูปร่างกลม (circular DNA) สามารถถูกถ่ายฝาก (transformed) เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ ไม่เข้าไปรวมตัวกับ genomic DNA ของเจ้าบ้านและสามารถจำลองแบบตนเองและเพิ่มจำนวนตามการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียได้ด้วยหลักการดังกล่าว ส่วนของแบคทีเรียที่ถูกฝากก็จะเพิ่มจำนวนตามการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วของแบคทีเรีย เทคนิคที่กล่าวนี้เป็นก้าวกระโดดที่สำคัญของเทคโนโลยีชีวภาพและเป็นที่รู้จักกันในชื่อ recombinant DNA technology ในระยะถัดมาพลาสมิดถูกพัฒนาให้มีส่วนประกอบของยีนต้านยาปฏิชีวนะเพื่อให้สามารถคัดเลือกให้เฉพาะแบคทีเรียซึ่งมีพลาสมิดในเซลล์เท่านั้นที่จะเจริญต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ เซลล์เจ้าบ้านซึ่งนำมาใช้ในกระบวนการนี้มีคุณสมบัติในการสามารถรับ recombinant plasmid จากภายนอกผ่านกระบวนการ transformation ได้ดี เรียกว่า competent cell และตัวอย่างที่ใช้กันมากที่สุดคือ Escherichia coli

ด้วยสมบัติของแบคทีเรียซึ่งในแต่ละเซลล์จะมีพลาสมิดเพียงแบบเดียวเท่านั้น ทำให้การ clone ยีนอาจเริ่มจากการตัดทั้งจีโนมด้วย restriction enzymes จากนั้นผูก

ชิ้นเล็กชิ้นน้อยที่ถูกตัดแล้วเข้ากับ plasmid vectors และ transform เข้าสู่แบคทีเรียปริมาณมากพร้อมกัน จากนั้นแยกแบคทีเรียเป็นโคโลนีเดี่ยวซึ่งแต่ละโคโลนีมีชนิดของชิ้นยีนเพียงแบบเดียว วิธีการนี้จะทำให้ได้ 'ห้องสมุด DNA' (DNA library) ซึ่งสามารถเลือกยีนที่ต้องการศึกษาต่อมาขยายได้โดยการคัดกรองโคโลนีที่มีส่วนของยีนที่ต้องการและนำมาเลี้ยงให้เจริญต่อ และหากต้องการสร้างห้องสมุดที่มีเฉพาะส่วนของ DNA ซึ่งเป็น coding region ก็กระทำได้โดยเปลี่ยน mRNA ให้กลับเป็น DNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ก่อน DNA ที่ได้จากการย้อนกระบวนการดังกล่าวเรียกว่า cDNA และเรียกห้องสมุดในลักษณะหลังนี้ว่า cDNA library

เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความยุ่งยากมากกว่าและใช้เวลานานกว่าเมื่อเทียบกับกระบวนการขยายส่วนของสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง การขยายส่วนของสารพันธุกรรมด้วยวิธี cell-based amplificationนี้เหมาะกับชิ้น DNA ซึ่งมีขนาดใหญ่เช่น cDNA ของทั้งยีนซึ่งมีขนาดราว 1-3 kb หรือเลือกในกรณีซึ่งไม่ทราบลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษาชัดเจน

การขยายส่วนของสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (In-vitro amplification)

เป็นการประกอบสาย DNA ขึ้นบนแม่แบบในหลอดทดลองโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี นิยมใช้กับการขยายส่วนของสารพันธุกรรมขนาดสั้นกว่า 1 kb ปฏิกิริยากระทำในหลอดทดลองขนาด 20-100 ไมโครลิตรและมีองค์ประกอบ 5 ประการ

1) DNA แม่แบบ อาจเป็น genomic DNA ซึ่งสกัดได้จากเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต plasmid หรือ cDNA ซึ่งสร้างมาจาก RNA อีกที

2) nucleotide เส้นเดี่ยวขนาดสั้น (19-25 nt) ซึ่งทราบลำดับเบส เรียกว่า primer ใช้เป็นจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดการสังเคราะห์ nucleotide สายใหม่ ดังนั้นในแต่ละปฏิกิริยาจะมี primer 2 เส้น เส้นที่อยู่ทางฝั่ง 5' เรียกว่า Forward (upstream) primer อีกเส้นที่อยู่ทาง 3' เรียกว่า Reverse (downstream) primer อุณหภูมิซึ่ง primers เข้าสร้างพันธะในลักษณะเบสคู่สมกับ DNA แม่แบบเรียกว่า annealing temperature มีความสำคัญต่อการออกแบบปฏิกิริยา

3) Nucleotide โมเลกุลเดี่ยว (dNTP) ซึ่งเป็นหน่วย nucleotide ทั้ง 4 แบบ

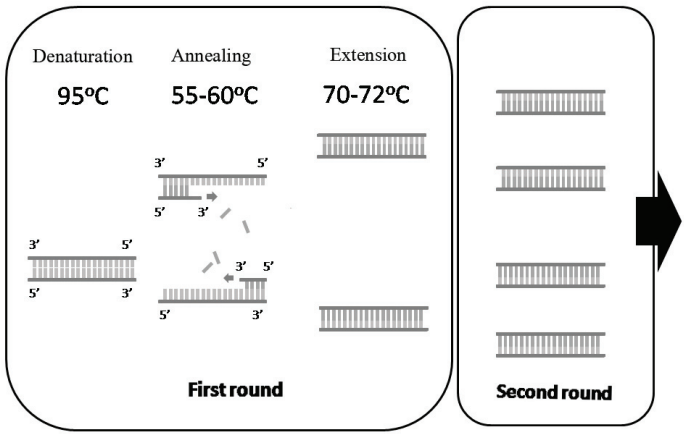
ได้แก่ dATP dGTP dTTP และ dCTP

4) Buffer รวมทั้งเกลือแมกนีเซียมซึ่งจำเป็นต่อการเข้าสร้างพันธะระหว่าง primers และ DNA แม่แบบ

5) DNA polymerase ซึ่งทนความร้อน polymerase enzyme ซึ่งใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้มาจากจุลชีพซึ่งเจริญในอุณหภูมิสูง (thermophilic organism) เช่น Taq polymerase ได้มาจาก Thermus aquaticus อันเป็นแบคทีเรียซึ่งเจริญในบ่อน้ำพุร้อน

เหตุซึ่งปฏิกิริยาจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ทนอุณหภูมิคือในแต่ละรอบปฏิกิริยาของการจำลองแบบในหลอดทดลองเริ่มจากการใช้อุณหภูมิสูง (95°C) เพื่อคลี่สายให้ DNA สายคู่คลี่สายคลายเกลียว (denaturation) และเปิดโอกาสให้ polymerase เข้าจับ (anneal) เมื่อลดอุณหภูมิลงมาจนถึง annealing temperature และสร้าง DNA สายใหม่ซึ่งมีลำดับเบสระหว่าง upstream และ downstream primers ผ่านกระบวนการ polymerization เมื่อขยับอุณหภูมิของระบบไปที่ 70-72°C (extension)[12-14] (รูปที่ 7)

ในทางทฤษฎีแต่ละรอบของปฏิกิริยาจะก่อให้ส่วนที่ต้องการขยายปริมาณกลายเป็น



รูปที่ 7 ไดอะแกรมแสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา polymerase chain reaction เมื่อจบแต่ละรอบปฏิกิริยา ปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนที่สนใจจะถูกขยายเป็นสองเท่าของต้นแบบ

2 เท่าของปริมาณตั้งต้น และเมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาจะได้ 2^n copies และโดยทั่วไปปฏิกิริยา PCR เพื่อขยายสารพันธุกรรมจะทำ 30-40 รอบซึ่งจะทำให้ได้ส่วนซึ่งต้องการขยายปริมาณกลายเป็น 2^{30} หรือ 1, 073. 741, 824 copies ซึ่งใช้เวลาบนเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) ในเวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง การตรวจสอบผลการขยายสารพันธุกรรมโดยทั่วไปกระทำโดยการทำ agarose gel electrophoresis และย้อมดูแถบ DNA ซึ่งได้จากปฏิกิริยา เทคโนโลยีในปัจจุบันช่วยให้สามารถตรวจจับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทันทีในทุกรอบที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นโดยใช้ probe ซึ่งแสดงสัญญาณเมื่อเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอน extension เรียกว่า real-time PCR

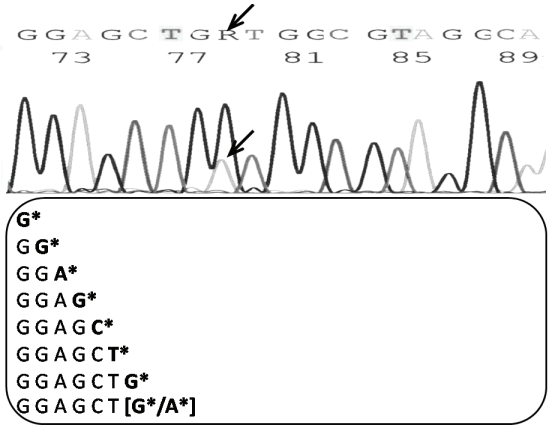
ข้อจำกัดของปฏิกิริยา PCR คือเนื่องจากปฏิกิริยามีความไวสูง กล่าวคือแม่แบบปริมาณน้อยก็สามารถถูกขยายให้มีปริมาณมากและหากการจับของ primers กับแม่แบบเป็นไปอย่างไม่จำเพาะก็จะเกิด non-specific amplification ซึ่งหมายถึงผลบวกลวง นอกจากนี้การจำลองแบบโดยใช้ Taq polymerase ไม่มีระบบตรวจสอบความถูกต้อง และมีโอกาสที่จะเกิดความผิดพลาดขึ้นตั้งแต่หนึ่ง nucleotide ใน 10^6 - 10^4 หน่วยย่อย ซึ่งเรียงต่อสาย เทคโนโลยีของ PCR ระยะถัดมาจึงมุ่งพัฒนา polymerase ซึ่งลดโอกาสการ anneal ที่ไม่จำเพาะเช่นใช้ polymerase ซึ่งจะเริ่มทำงานก็ต่อเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอุณหภูมิสูงในระยะเวลาหนึ่งก่อน (hot-start polymerase) หรือพัฒนา polymerase ซึ่งมี proof reading activity เช่นที่ได้จาก Thermococcus litoralis หรือ Pyrococcus furiosus เป็นต้น

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในลำดับเบสและการแสดงออกของยีน

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในลำดับเบสบนสารพันธุกรรมเริ่มต้นจากการขยายส่วนของสารพันธุกรรมด้วย PCR ตามด้วยการวิเคราะห์ส่วนที่ได้จากปฏิกิริยา (PCR product) ซึ่งในสมัยหนึ่งอาจใช้วิธีการตัด PCR product ด้วย restriction endonuclease เรียกว่า restriction fragment length polymorphisms (RFLP) ข้อจำกัดของวิธีการนี้คือ ใช้ศึกษาได้เฉพาะ mutation ที่ทราบแล้วและตำแหน่งของ mutation จะต้องอยู่บนบริเวณ recognition ของเอนไซม์ จึงจะให้ความแตกต่างที่ตรวจสอบได้ อีกวิธีการหนึ่งคือ single-stranded conformation polymorphism (SSCP) อาศัยสมบัติทางประจุของ single-

stranded DNA ที่จะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการเปลี่ยนลำดับเบส มีข้อจำกัดด้านความไวและไม่สามารถบอกรายละเอียดการเปลี่ยนแปลงของ nucleotide ได้ วิธีการซึ่งนิยมใช้ในการศึกษาลำดับเบสในปัจจุบันคือ direct DNA sequencing (Sanger's sequencing) โดยใช้ capillary electrophoresis หลักการคือหลังจากที่ได้ PCR product ของบริเวณที่ต้องการศึกษาแล้ว ใช้ PCR product นั้นเป็นแม่แบบของ sequencing PCR ซึ่งใส่ dideoxynucleotide (ddNTP) ลงในปฏิกิริยา ddNTP มีสมบัติสองประการที่แตกต่างจาก dNTP ซึ่งใช้ใน PCR ปกติ ประการแรกคือหลังจากที่ถูกต่อเข้าไปในสายนิวคลิโอไทด์จะทำให้การต่อสายเส้นนั้นสิ้นสุดลงทันที ประการที่สองคือ nucleotide ทั้ง 4 แบบถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสดงต่างสี ในทางทฤษฎี เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา sequencing PCR จึงได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 1 เบสไปจนกระทั่งขนาดเต็มความยาวของ PCR product ซึ่งถูกใช้เป็นแม่แบบ เมื่อถูกนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนเครื่อง capillary electrophoresis ซึ่งใช้ laser capture ตรวจจับความยาวและสีของสารเรืองแสง จะทำให้ได้ข้อมูลการเรียงลำดับเบสบนส่วนของสารพันธุกรรมได้ ข้อจำกัดของ direct sequencing คือการอ่านและแปลผลจะทำได้ก็ต่อเมื่อ PCR product ที่ใช้เป็นแม่แบบของ sequencing PCR จะต้องปราศจาก non-specific amplification ซึ่งจะทำให้เกิด electropherograms ซ้อนและอ่านแยกลำดับเบสปกติและพยาธิสภาพได้ยาก (รูปที่ 8)

นอกจากการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง การเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของยีนยังมีความสัมพันธ์ต่อพยาธิกำเนิดและการดำเนินโรคในมนุษย์อย่างกว้างขวาง ตัวอย่างการศึกษาการแสดงออกของยีนซึ่งศัลยแพทย์รู้จักดีคือการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี immunohistochemistry วิธีการดังกล่าวเป็นการศึกษาปริมาณโปรตีนที่จำเพาะในเนื้อเยื่อโดยใช้ antibody เข้าทำปฏิกิริยา การศึกษาการแสดงออกในระดับ mRNA นอกจากจะกระทำได้โดยใช้ hybridization probe กล่าวคือ Northern blotting ยังอาจศึกษาด้วยวิธี reverse transcription PCR (RT-PCR) ซึ่งมีหลักการคือใช้เอนไซม์ reverse transcriptase สร้าง cDNA โดยใช้ RNA เป็นแม่แบบ และเมื่อผนวกเทคโนโลยีของ real-time PCR เข้ากับ RT-PCR จะทำให้ได้การศึกษาการแสดงออกในระดับ mRNA ที่มีความเป็นปรนัยมากขึ้นและเรียกเทคนิคประการหลังนี้ว่า quantitative RT-PCR[11]



รูปที่ 8 Electropherogram ที่ได้จาก Sanger's sequencing ร่วมกับ capillary electrophoresis ลำดับเบสที่ได้มาจากการอ่านสัญญาณ fluorescence จาก nucleotide ตัวสุดท้าย (ddNTP) บนสายซึ่งกำหนดให้มีสีที่ต่างกัน ddNTP เหล่านี้ไม่มี nucleotide มาต่อสายทาง 3′ ได้อีก ดังนั้นความยาวของสายกระทั่งถึงจุดสิ้นสุดจึงเป็นตัวบอกตำแหน่งของ ddNTP บนเส้นซึ่งเป็นแม่แบบ ลูกศรชี้ตัวอย่างจุดซึ่งมีการกลายพันธุ์ชนิด point mutation สังเกต genotype ที่เป็น heterozygous คือมี nucleotide 2 แบบ [Guanine/Adenine] บนตำแหน่งเดียวกัน

พยาธิสภาพในระดับอณูพันธุศาสตร์

ความแตกต่างในขนาดและลำดับกรดนิวคลิอิกบนสารพันธุกรรมกำหนดความเป็นปัจเจกของสิ่งมีชีวิตตั้งแต่ระดับอาณาจักร (kingdom) จนกระทั่งระดับความแตกต่างระหว่างบุคคล และเมื่อความเข้าใจในรหัสที่ถูกบรรจุบนสารพันธุกรรมกระจ่างมากขึ้น ความเข้าใจในชะตากรรมทางสุขภาพของแต่ละบุคคลก็จะเป็นไปได้มากขึ้น ความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบนสารพันธุกรรมซึ่งอาจก่อโรคเป็นไปได้ตั้งแต่การเปลี่ยนแปลงขนาดใหญ่ระดับโครโมโซมไปจนกระทั่งการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงตัวเดียว (single-base alteration) การเปลี่ยนแปลงซึ่งพบได้น้อยในหมู่ประชากรและก่อโรคหรือกลุ่มอาการทางพันธุกรรมโดยทั่วไปถือเป็นการกลายพันธุ์ (mutation) การกลายพันธุ์บน coding sequence อาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตัวอย่างเช่น ทำให้ชนิดของ amino acid

เปลี่ยนแปลงเรียกว่า missense mutation ทำให้เกิดสัญญาณหยุด เรียกว่า non-sense mutation และเนื่องจาก amino acid แต่ละชนิดถูกเข้ารหัสบน codon ได้มากกว่าแบบเดียว จึงมีกรณีซึ่งการเปลี่ยนแปลงในชนิดของเบสไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของ amino acid ซึ่งเรียกว่า silence mutation การแบ่ง mutation อาจแบ่งทางกายภาพเป็นการเปลี่ยนแปลงของ nucleotide (substitution) การขาดหายของลำดับเบส (deletion) การเพิ่มขึ้นของลำดับเบส (insertion) และสองประการหลังเมื่อเกิดขึ้นกับ nucleotide น้อยกว่า 3 ตัวบน coding sequence ก็จะก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนของกรอบการถอดรหัสที่ถัดจากจุดของการกลายพันธุ์ทั้งหมด (frame-shift mutation) การกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมเพียงตำแหน่งเดียวนำไปสู่การเป็นโรคได้ผ่านการเปลี่ยนแปลงของชนิด amino acid บนโปรตีน ตัวอย่างเช่นการกลายพันธุ์ของยีน leutinizing hormone receptor (LHR) เพียงตำแหน่งเดียวส่งผลให้ตัวรับฮอร์โมน leutinizing บนผิวเซลล์อัณฑะทำงานมากขึ้นและก่อให้เกิดการเจริญอย่างผิดปกติจนเป็นเนื้องอก[14]

การกลายพันธุ์ซึ่งก่อให้เกิดโรคหรือกลุ่มอาการที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นการกลายพันธุ์ซึ่งเกิดกับเซลล์ร่างกายทุกเซลล์ของผู้ซึ่งรับถ่ายทอด genotype นั้น เรียกว่า germline mutation เช่นการกลายพันธุ์ของยีนในกลุ่ม mismatched repair gene ในผู้ป่วย hereditary non-polyposis colonic cancer การตรวจการกลายพันธุ์ชนิด germline ใช้เซลล์ร่างกายส่วนใดก็ได้และนิยมตรวจจาก DNA ที่ได้จากเลือด การกลายพันธุ์อีกรูปแบบหนึ่งเกิดขึ้นเฉพาะเนื้อเยื่อที่มีพยาธิสภาพเช่นการกลายพันธุ์ของยีน K-Ras ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง เกิดขึ้นเฉพาะเนื้อเยื่อมะเร็งเท่านั้นและเรียกว่า somatic mutation[16] การตรวจการกลายพันธุ์ซึ่งเป็น somatic mutation ใช้เนื้อเยื่อซึ่งมีพยาธิสภาพเท่านั้น การกลายพันธุ์ชนิด germline ในผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับถ่ายทอดมาจากบิดาและ/หรือมารดา ส่วนน้อยเกิดขึ้นเองในระดับเซลล์สืบพันธุ์หรือ zygote เรียกว่า de novo mutation การกลายพันธุ์ประเภทนี้มีโอกาสที่จะถ่ายทอดต่อไปยังรุ่นลูกหลานได้เสมอ ส่วนการกลายพันธุ์ชนิด somatic เกิดขึ้นเฉพาะเนื้อเยื่อ อาจสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรม

การเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมซึ่งพบเกิดขึ้นมากกว่าร้อยละ 1 ของประชากร

ทั่วไป อาจถือเป็น genetic polymorphisms หรือความแปรผัน (variation) ในสารพันธุกรรม ความแปรผันเหล่านี้ส่วนหนึ่งเป็นความแตกต่างบน nucleotide เดียวซึ่งเรียกว่า single nucleotide polymorphism (SNP) ซึ่งนิยมอ่านเลียนเสียงกันว่า 'สนิป' ประมาณกันว่าบนจีโนมของมนุษย์มี SNP หนึ่งตัวในทุก 300 bp โดย SNP เหล่านี้ส่วนหนึ่งเกิดบน non-coding region (intron) ส่วนหนึ่งเกิดขึ้นบน coding sequence แต่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ amino acid เรียกว่า synonymous SNP และส่วนหนึ่งทำให้เกิดการผันแปรของ amino acid ร่วมด้วย เรียกว่า non-synonymous SNP

SNP ส่วนใหญ่เป็นการผันแปรในลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรม มิได้มีกำหนด phenotype หรือก่อโรคโดยตรง อย่างไรก็ตาม SNP ส่วนหนึ่งได้รับการวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่ามีความสัมพันธ์ (association) กับความน่าจะเป็นในการเกิดโรค (likelihood of disease) และแม้ SNP ส่วนใหญ่จะไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน ความสัมพันธ์กับโรคดังกล่าวส่วนหนึ่งอธิบายจากการที่ SNP อาจมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนเมื่ออยู่ในตำแหน่งใกล้ promoter หรือมีอิทธิพลต่อเสถียรภาพของ mRNA ก่อนที่จะถูกถอดรหัสไปยังโปรตีน เทคโนโลยี microarray ในปัจจุบันช่วยให้สามารถศึกษา SNP พร้อมกับทั้งจีโนมและวิเคราะห์หายีนซึ่งน่าจะมี association กับโรคที่สนใจเรียกว่าเทคนิค genome wide association study (GWAS)[17]

การศึกษาหน้าที่การทำงานของยีน

แม้ในปัจจุบันลำดับเบสบนยีนราว 30,000 ยีนในมนุษย์จะเป็นที่ทราบจนเกือบสมบูรณ์แล้ว หน้าที่การทำงานของยีนยังเป็นพื้นที่ซึ่งต้องการการศึกษาวิจัยต่อไปอีก เทคนิคการศึกษาการทำงานของยีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอาศัยแบบจำลองในสัตว์ทดลองและในเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นหลัก

การศึกษาการทำงานของยีนโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเป็นแบบจำลอง

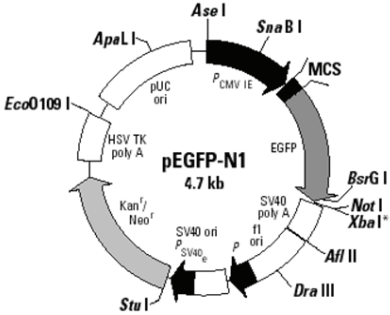
เซลล์เพาะเลี้ยง (cultured cell) เป็นเซลล์ซึ่งอาจได้จากจากเนื้อเยื่อปกติหรือเนื้อเยื่อมะเร็งและนำมาเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งปรับสภาพให้อำนวยให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ไปจนกระทั่งศึกษาวิจัย ข้อจำกัดที่สำคัญของเซลล์เพาะเลี้ยงคือกระบวนการชรา

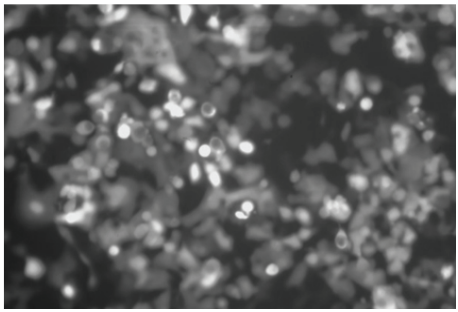
ของเซลล์ (senescence) ซึ่งเกิดจากการสั้นลงของ telomere เมื่อเซลล์แบ่งตัวทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวต่อไปอีกเมื่อเลี้ยงไประยะหนึ่ง จึงต้องมีการดัดแปลงสารพันธุกรรมเพื่อให้การมีเจริญเติบโตต่อไปได้นานพอ เซลล์ซึ่งสามารถเลี้ยงต่อไปจนกระทั่งมีการเจริญเติบโตอย่างไม่จำกัด ทั้งสามารถถูกแช่แข็งและละลายออกมาเลี้ยงต่อไปได้อีกเรียกว่าเป็น cell line

การศึกษาการทำงานของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยงกระทำได้สองทาง ทางหนึ่งคือทำให้การแสดงออกของยีนมากขึ้นและดูผลที่เกิดขึ้น อีกทางคือดูผลจากการแสดงออกที่ลดลง โดยการทำให้เกิดการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นกระทำโดยถ่ายฝากชิ้นยีนเข้ากับ expression vector ซึ่งเป็นพลาสมิดประดิษฐ์ (artificial plasmid DNA) ที่ออกแบบให้อำนวยการแสดงออกซึ่งยีนที่ถ่ายฝากเข้าไปเมื่อเข้าไปอยู่ในเซลล์โดยการใส่ transcription promoter หรือ enhancer เช่น transcription unit ซึ่งได้จาก simian virus (SV40) เข้าไปเป็นองค์ประกอบของพลาสมิด นอกจากนี้พลาสมิดจะมีองค์ประกอบของยีนต้านยาปฏิชีวนะเพื่ออำนวยให้สามารถคัดแยกเซลล์ซึ่งรับพลาสมิดเข้าไปและมีการแสดงออกของยีน (รูปที่ 9)

การลดการแสดงออกของยีนที่สนใจกระทำได้โดยใช้เทคนิค RNA interference (RNAi) วิธีการดังกล่าวลดการแสดงออกเช่นใช้ double-stranded RNA ขนาดสั้น (21-23 bp) เรียกว่า short interfering RNA (siRNA) เมื่อเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง siRNA จะถูกคลายเกลียวเป็น single-stranded RNA และเข้าจับกับ mRNA เป้าหมายใน cytoplasm ซึ่งมีเบสคู่สม การจับระหว่าง siRNA และ mRNA เป้าหมายทำให้เกิด RNA-induced silencing complex (RISC) ซึ่งเป็นการชี้เป้าให้เกิดการทำลาย mRNA นั้นโดย RNAase ก่อนที่จะเกิดการสร้างโปรตีน การยับยั้งการแสดงออกโดย siRNA จึงเป็นไปในลักษณะ post-transcriptional inhibition[12]

กระบวนการนำ expression plasmid หรือ siRNA เข้าสู่เซลล์กระทำผ่านกระบวนการ nucleotide transfection ซึ่งมีหลักการคือการใช้ตัวพา (vehicle) ซึ่งมีประจุบวกและมีขนาดเล็กเช่นอนุภาคไขมันขนาดเล็ก (liposome) เป็นตัวเชื่อม nucleotide ซึ่งมีประจุลบเข้ากับผิวเซลล์เป้าหมายเพื่อให้เกิด endocytosis นำเอา nucleotide เข้าสู่ cytoplasm และเมื่อเข้าสู่เซลล์แล้ว จะต้องมีกระบวนการแยก nucleotide นั้นออกจาก





รูปที่ 9 Expression vector ชนิด pEFFP-N1 เป็น artificial plasmid DNA ซึ่งถูกออกแบบให้มี promoter ชนิด SV40 มียีนต้านยา Kanamycin และ Neomycin มีจุดตัดของ restriction enzyme หลายชนิด MCS คือบริเวณซึ่งสามารถถ่ายฝากยีนที่สนใจเข้าไป (multi-cloning site) และนอกจากนี้ได้ใส่ sequence ของ green fluorescence protein ไว้ในวงพลาสมิดด้วย เมื่อพลาสมิดถูก transfect เข้าสู่เซลล์มีการแสดงออกของยีนที่ถ่ายฝากเข้าไปก็จะมีการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงชนิดนี้ ทำให้ตรวจสอบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนส์ดังภาพด้านขวา (เซลล์ HEK293 กำลังขยาย 40X)

ตัวพาเพื่อให้สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นแสดงออกซึ่งยีนที่ถ่ายฝากไว้ในกรณีของพลาสมิดหรือเข้ายับยั้ง mRNA เป้าหมายในกรณีของ siRNA โดยทั่วไป nucleotide ซึ่งถูก transfected เข้าสู่เซลล์จะถูกกำจัดออกจากเซลล์ในเวลาไม่นาน นั่นหมายถึงทั้งการคงอยู่ของสารพันธุกรรมจากภายนอกตลอดจนผลทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องเป็นเรื่องชั่วคราว (transient transfection) การทำให้สารพันธุกรรมซึ่งใส่เข้าไปอยู่นานขึ้นหรือแม้กระทั่งแทรกตัวเข้าเป็นส่วนหนึ่งของสารพันธุกรรมของเซลล์เจ้าบ้านทำได้โดยการกดดันให้เกิดการคัดเลือกให้เฉพาะเซลล์ที่ถูก transfected ด้วยสารพันธุกรรมนั้นและยังแสดงออกซึ่งสารพันธุกรรมดังกล่าวภายในเซลล์เท่านั้นที่อยู่ได้ ซึ่งกระทำโดยใช้ยาปฏิชีวนะชนิดซึ่งพลาสมิดที่ใส่เข้าไปบรรจุยีนต้านยาอยู่เป็นต้น วิธีการดังกล่าวเรียกว่า stable transfection และเซลล์โคลนที่แยกได้จากการคัดเลือกแบบนี้จะแสดงออกซึ่งยีนที่ศึกษาอย่างถาวรเรียกว่า stable cell clone

นอกจากการใช้พาหะที่เป็นอนุภาคประจุลบ การนำยีนจากภายนอกเข้าสู่เซลล์

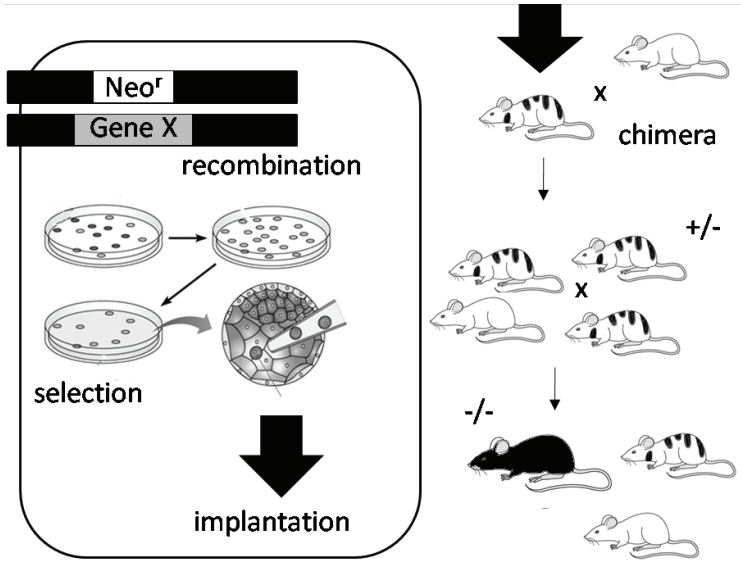
อาจกระทำได้โดยฉีดเข้าสู่เซลล์ (microinjection) โดยตรงซึ่งเหมาะกับเซลล์ขนาดใหญ่ เช่นเซลล์ไข่ การใช้กระแสไฟฟ้าเปิดผนังเซลล์ (electroporation) หรือการใช้ไวรัสหรือส่วนของไวรัสนำส่ง เป็นต้น วิธีการเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่างกัน การนำส่งสารพันธุกรรมเข้าสู่เนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต (in-vivo transfection) มีข้อจำกัดที่สำคัญคือระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและความจำเพาะในการมุ่งเป้าต่ออวัยวะเป้าหมาย

การศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนโดยใช้สัตว์ทดลอง

การใช้สัตว์ดัดแปลงทางพันธุกรรมเป็นแบบจำลองซึ่งนิยมใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งการสร้างแบบจำลองของโรคหรือกลุ่มอาการที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม สัตว์ทดลองที่นิยมใช้มีตัวอย่างเช่นหนู mouse แมลงหวี่ ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการศึกษา การดัดแปลงทางพันธุกรรมในสัตว์ประกอบด้วยสองประเภทใหญ่คือ transgenic animal และ genetic knockout animal

Transgenic animal หมายถึงสัตว์ซึ่งเพิ่มส่วนของยีนที่ออกถูกแบบให้เป็นไปตามต้องการเข้าไปในสารพันธุกรรมอาจกระทำโดยฉีดสารพันธุกรรมเข้าไปโดยตรงใน pro-nucleus (pronuclear microinjection) ในระยะ zygote สารพันธุกรรมที่ใส่เข้าไปจะแทรกเข้าไปเป็นส่วนหนึ่งของเซลล์ตัวอ่อนและเจริญเป็น transgenic animal สารพันธุกรรมซึ่งเพิ่มเข้าไปมีโอกาสถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานผ่านเซลล์สืบพันธุ์ อีกวิธีการเริ่มจากการนำ expression vector ซึ่งมี genotype ที่กำหนดเข้าสู่ embryonic stem cell ในระยะ blastocysts และถ่ายฝากคืนเข้าสู่ตัวอ่อน ตัวอ่อนซึ่งเจริญต่อไปก็จะอยู่ในลักษณะ chimera กล่าวคือมีทั้งเซลล์ที่ปกติและเซลล์ซึ่งมี genotype ซึ่งกำหนดในร่างกายตลอดจนเซลล์สืบพันธุ์ ลักษณะ genotype ดังกล่าวมีโอกาสที่จะถ่ายทอดไปยังลูกหลานผ่านการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ สัตว์ทดลองที่เป็นลูกผสมจะได้รับการผสมจนกระทั่งได้ลูกหลานซึ่งมี genotype ที่ต้องการศึกษา วิธีการประการหลังนี้อาจเรียกว่า ‘knock-in’

Genetic knockout animal หมายถึงสัตว์ซึ่งถูกออกแบบทางพันธุกรรมให้ขาดยีนซึ่งสนใจศึกษาโดยนำส่วนของสารพันธุกรรมซึ่งตัดส่วนของยีนดังกล่าวเข้าผสมให้เกิด



รูปที่ 10 การสร้าง genetic knockout mouse โดยการใส่ส่วนของจีนซึ่งแทนจีนที่สนใจด้วยจีนต้านยาและทำให้เกิด recombinant กับ host genome ใน embryonic stem cell ซึ่งแยกออกมาจากตัวอ่อนระยะ blastocyst ของหนูทดลอง หลังจากที่ select เซลล์ที่มี genetic recombination ด้วยยาปฏิชีวนะและใส่เซลล์กลับเข้าสู่ตัวอ่อนของหนู หนูที่โตมาจาก blastocyst จะมีสารพันธุกรรมสองชุด กล่าวคือเป็น chimera จากนั้น embryonic stem cell ซึ่งมี deleted genotype ส่วนหนึ่งจะพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์และให้ลูกหลานที่มี heterozygous สำหรับ null genotype กระทั่งเมื่อผสมพันธุ์ต่อไปก็จะได้ homozygous null (-/-) ในที่สุด

homozygous recombination กับสารพันธุกรรมของเซลล์ในระยะ embryonic stem cell จากนั้นจึงถ่ายคืนให้ตัวอ่อนกระทั่งเกิด male chimera และผสมจนได้รุ่นลูกหลานซึ่งเป็น homozygous null (-/-) ผลงานเรื่อง genetic knock-out mouse เป็นงานซึ่งทำให้ Mario Capecchi นักอณูชีววิทยาได้รับรางวัลโนเบลสาขา Physiology or Medicine ในปี ค.ศ. 2007 (รูปที่ 10)

วิถีสัญญาณ (signaling pathways)

การทำงานของโมเลกุลในระดับเซลล์เป็น interaction ระหว่างชุดของโปรตีนซึ่งทำหน้าที่ต่างกัน ตัวอย่างเช่นวิถีสัญญาณซึ่งนำสัญญาณการกระตุ้นจากภายนอกเซลล์เข้าไปสู่การกระตุ้นการแสดงออกของยีนมีโปรตีนเข้ามาเกี่ยวข้องตั้งแต่ตัวรับบนผิวเซลล์ (membrane receptor) ซึ่งส่งสัญญาณต่อไปยังโมเลกุลกลางภายในเซลล์ซึ่งเป็นชุดของโปรตีน (signaling protein) หรือโมเลกุลกลางอย่างอื่น receptor บนผิวเซลล์มี 3 ชนิดหลักได้แก่

- Ion-channel-linked receptor เป็น primitive receptor ซึ่งทำงานผ่านการควบคุมการผ่านเข้าออกบนผิวเซลล์ (membrane permeability) ตัวอย่างของตัวรับกลุ่มนี้ได้แก่ตัวรับบนปลายประสาท

- G-protein linked receptor ใช้โปรตีนตัวกลางคือระบบของ G-protein ในการส่งสัญญาณ เข้าสู่เซลล์โดยการควบคุมปริมาณของ second messenger คือ cyclic AMP หรือ Ca++ วิถีสัญญาณเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การทำงานของฮอร์โมนจากต่อมไร้ท่อ และการนำส่งสัญญาณประสาทเข้าสู่ร่างกายเช่นสัญญาณจากการมองเห็น การได้กลิ่น

- Enzyme-linked receptor ใช้ระบบการส่งสัญญาณผ่านการกระตุ้นเป็นทอดจากโปรตีนตัวรับบนผิวเซลล์ไปยังโปรตีนซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนในนิวเคลียส การส่งผ่านการกระตุ้นมักกระทำโดยปฏิกิริยา phosphorylation วิถีสัญญาณเหล่านี้มี tyrosine-kinase receptor เป็นกลุ่มหลักและมักเกี่ยวข้องกับการนำสัญญาณการแบ่งเซลล์ การ differentiation ตลอดจนการอยู่รอดของเซลล์ จึงเป็นเป้าหลักของการรักษาในกลุ่ม targeted therapy

นอกจากการส่งสัญญาณต่อกัน โปรตีนในเซลล์ยังอาจทำหน้าที่ควบคุมการทำหน้าที่ซึ่งกันและกันในลักษณะการก่อให้เกิดการทำลาย เช่นโปรตีน APC ในวิถีสัญญาณ Wnt ทำหน้าที่ควบคุมให้เกิดการทำลายของโปรตีน transcription factor คือ beta-catenin เมื่อมีการกลายพันธุ์บนยีน APC เช่นที่พบในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทำให้โปรตีนผิดปกติไป โปรตีน beta-catenin จึงสั่งสมภายในเซลล์และก่อให้เกิดการแบ่งตัวที่ผิดปกติ[19]

Human genome project (HGP)[20]

HGP เป็นโครงการระหว่างชาติซึ่งเริ่มก่อร่างขึ้นในประเทศสหรัฐอเมริกาในปีค.ศ. 1984-1986 ซึ่งมีวาระหลักสองประการ ประการแรกคือการสร้างลำดับเบสอ้างอิง (reference sequence) สำหรับจีโนมของมนุษย์โดยมุ่งหวังว่าจะก่อให้เกิดคุณูปการอย่างกว้างขวางในงานวิจัยทางชีวเวชศาสตร์ ประการที่สองคือการสร้างความร่วมมือระดับนานาชาติ การเริ่มต้นโครงการในประเทศสหรัฐอเมริกาเกิดขึ้นโดยความร่วมมือระหว่าง 2 สถาบันหลักคือกระทรวงพลังงาน (Department of Energy) และสถาบันสุขภาพแห่งชาติ (National Institute of Health) ในระยะต่อมาโครงการได้รับความร่วมมือจากสถาบันทั้งภาครัฐและเอกชนในประเทศอังกฤษ ฝรั่งเศส สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น เยอรมันและยีน โครงการ HGP ใช้เวลาประมาณหนึ่งทศวรรษในการศึกษาซึ่งไม่เพียงสร้างแผนที่ทางกายภาพซึ่งเชื่อมโยงกับหน้าที่การทำงานซึ่งใกล้เคียงสมบูรณ์ของจีโนมมนุษย์ ยังทำงานคู่ขนานไปบนจีโนมของหนูและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นการศึกษาเป็นไปในลักษณะ large scale sequencing โดยใช้ library ซึ่งได้จากการเชื่อมชิ้นย่อยของสารพันธุกรรมเข้าสู่ bacterial artificial chromosome (BAC) ตามด้วยการจัดการข้อมูลโดยตัดส่วนเหลื่อมซ้อนออกและ sequence ซ้ำบน whole genome เพื่อเติมช่องว่าง

ร่าง (draft) ซึ่งครอบคลุมมากกว่าร้อยละ 90 ของลำดับเบสบนจีโนมมนุษย์เสร็จสิ้นในปีค.ศ. 2001 และประกอบด้วยข้อมูลที่สำคัญคือ genomic DNA sequence, cDNA sequence, single nucleotide polymorphisms (SNP) เป็นต้น ข้อมูลดังกล่าวเป็นพื้นฐานของการศึกษาทางพันธุกรรมในลักษณะ high-throughput genetic analysis ในระยะถัดมา

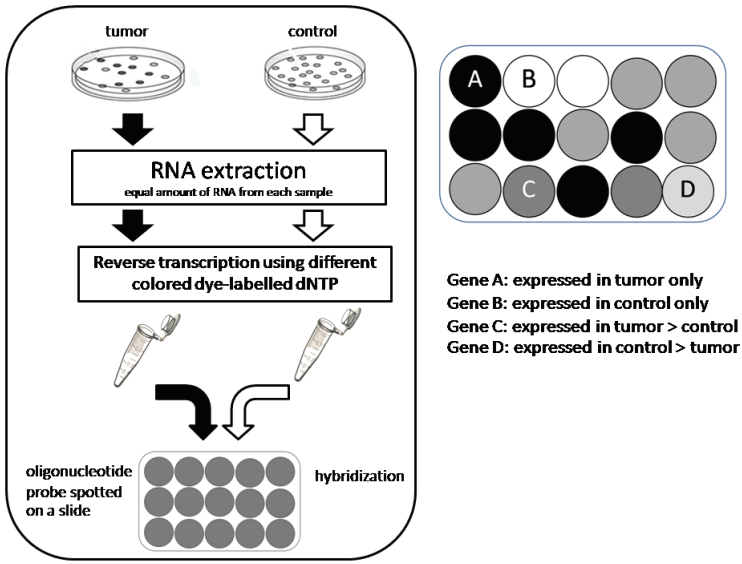
เทคโนโลยี high-throughput genetic analysis

การศึกษาอณูชีววิทยาในปัจจุบันกำลังอยู่ในระยะเปลี่ยนผ่านจากการศึกษาทีละยีนหรือกลุ่มยีนจำนวนจำกัดเป็นการศึกษาซึ่งให้ขนาดผลการศึกษาอย่างกว้างขวางในคราวเดียว การศึกษาซึ่งเป็น high-throughput analysis มีตัวอย่างเช่นการหาลำดับเบสทั้งจีโนมของปัจเจกบุคคล (whole genome sequencing) โดยเทคนิค next generation sequencing[21] การสำรวจการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบและการศึกษา SNP

ตลอดจีโนมโดยวิธี microarray เทคโนโลยีเหล่านี้จะนำไปสู่การแพทย์ในลักษณะ personalized medicine

การศึกษา expression microarray เป็นการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ในตัวอย่าง 2 ชุด โดย reverse transcribe เป็น cDNA และติดฉลากด้วยสีที่ต่างกัน นิยมใช้สีเขียวและแดง จากนั้นนำ cDNA เข้าทำปฏิกิริยา hybridization กับ oligonucleotide probes ซึ่งตรึงไว้บนสไลด์มากกว่าหมื่นจุด โดยแต่ละจุดอาจหมายถึงแต่ละยีนที่ศึกษา ซึ่งจะทำให้ศึกษาการแสดงออกได้มากกว่า 3-4 หมื่นยีนพร้อมกัน โดยเมื่อจุดใดจุดหนึ่งแสดงผลเป็นสีเหลือง หมายถึงการแสดงออกในระดับ mRNA ของทั้งสองตัวอย่างเท่ากัน สีที่ค่อนไปในทางเขียวหรือแดงบนจุดใดแสดงถึงการแสดงออกของยีนนั้นที่มากกว่าในตัวอย่างใดตัวอย่างหนึ่ง[22] (รูปที่ 11)

ในทางการศึกษาวิจัย การศึกษาในลักษณะ high-throughput เป็นคล้ายการคัด



รูปที่ 11 หลักการของ expression microarray study ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่สนใจ (ในที่นี้คือ tumor) เทียบกับตัวอย่างควบคุม เช่นเนื้อเยื่อปกติของอวัยวะเดียวกัน

กรอง (screening study) เพื่อให้เห็นแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างยีนหรือ SNP กับการเกิดโรค ข้อมูลซึ่งได้รับจากการชี้นำจาก microarray จำเป็นต้องได้รับการศึกษายืนยัน (verification study) โดยวิธีการดั้งเดิม เช่น เมื่อได้กลุ่มยีนซึ่งน่าจะมีการแสดงออกมากขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดหนึ่งเทียบกับเนื้อเยื่อปกตินักวิจัยจะศึกษายืนยันด้วยวิธีqRT-PCR ในลักษณะ single gene approach อีกครั้ง หรือเมื่อค้นพบ SNP ซึ่งน่าจะมี genetic association กับโรค นักวิจัยจะศึกษายืนยันโดยศึกษา genotype เฉพาะกลุ่ม SNPs ในยีนนั้นในกลุ่มประชากรจำเพาะเชื้อชาติในลักษณะ case-control ต่อไป

ตารางที่ 3 ตัวอย่างการประยุกต์เทคนิคทางอณูชีววิทยากับการดูแลผู้ป่วยทางศัลยศาสตร์

กลุ่มการประยุกต์ใช้	ตัวอย่างการประยุกต์ใช้
การวินิจฉัย	- การตรวจการแสดงออกของยีนหรือการกลายพันธุ์จำเพาะ (molecular signature)เพื่อวินิจฉัย undifferentiated tumor - การวินิจฉัย topical pancreatitis ด้วยการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน SPINK1 - การระบุผู้ได้รับถ่ายทอดทางพันธุกรรมของโรค familial adenomatous polyposis coli ด้วยการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน APC
การจัดกลุ่มการวินิจฉัย	- การตรวจหา micrometastasis หรือ circulating tumor cells ด้วยเทคนิค quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)
การพยากรณ์โรค	- การใช้ gene array ในการพยากรณ์การกลับเป็นซ้ำในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแรก
การพยากรณ์การตอบสนองต่อยา	- การตรวจหาการกลายพันธุ์ของจีน K-Ras ก่อนให้การรักษาด้วย cetuximab ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง - การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน c-Kit เพื่อทำนายการตอบสนองต่อยา imatinib
การติดตามการรักษา	- การติดตาม minimal residual disease ในมะเร็งโดยใช้เทคนิค qRT-PCR

พันธุกรรมบำบัด (gene therapy)

พันธุกรรมบำบัดมีความหมายในทางกว้างคือการดัดแปลงสารพันธุกรรมในเซลล์ของผู้ป่วยเพื่อให้เกิดผลในทางการรักษา เช่นการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ การใช้ antisense oligonucleotide เข้าจับและทำลายเซลล์ซึ่งมีความผิดปกติทางพันธุกรรม การวิจัยทางพันธุกรรมบำบัดซึ่งเป็นที่กล่าวถึงมากที่สุดเป็นการใส่ยีน cystic fibrosis เข้าสู่เซลล์ปอดโดยใช้ adenovirus เป็นตัวพา cystic fibrosis เป็นโรคซึ่งทราบพยาธิกำเนิดในระดับโมเลกุลชัดถึงระดับตำแหน่งของการกลายพันธุ์ บนยีนซึ่งกำหนดโปรตีน cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) การรักษามุ่งนำชิ้นยีนซึ่งเป็น wildtype เข้าสู่เซลล์ปอดโดยมุ่งหวังให้มีการแสดงออกและสร้างโปรตีนชนิดนี้มากขึ้น[23,24]

ข้อจำกัดสำคัญของพันธุกรรมบำบัดในปัจจุบันอยู่ตรงที่ยังขาดระบบนำส่งยีนหรือสารพันธุกรรมไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะ

พันธุศาสตร์กับศัลยแพทย์

ความก้าวหน้าเทคโนโลยีการศึกษาพันธุศาสตร์จะทำให้การตรวจหาข้อมูลบนสารพันธุกรรมของมนุษย์ในฐานะปัจเจกบุคคลมิใช่เรื่องไกลตัวอีกต่อไปในเวลาอันใกล้ ข้อมูลดังกล่าวจะมีผลกระทบอย่างกว้างขวางในการทำนายความเสี่ยงของโรค การจัดกลุ่มของโรคตลอดจนทำนายผลการรักษา และเลือกวิธีรักษา และป้องกันโรค ตัวอย่างที่ทำให้เห็นภาพดังกล่าวเช่นการตัดลำไส้ใหญ่ในผู้ซึ่งมีการกลายพันธุ์ของยีนAPC[25] การเฝ้าระวังมะเร็งเต้านมอย่างเข้มข้นในผู้ป่วยซึ่งมีการกลายพันธุ์ของยีน BRCA หรือการตรวจการแสดงออกของยีน 16 ยีนซึ่งได้รับการพัฒนาเป็นชุดตรวจ Oncotype DX เพื่อเลือกให้ยาเคมีบำบัดในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมซึ่งไม่พบการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง[26,27] ศัลยแพทย์ในฐานะผู้ดูแลโรคซึ่งเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมจึงเลี่ยงไม่ได้ที่จะต้องรับรู้และเข้าใจเรื่องราวของหน่วยพื้นฐานของชีวิตซึ่งมีขนาดเล็กแต่มีความหมายอย่างมหาศาลดังกล่าว (ตารางที่ 3)

เอกสารอ้างอิง

1. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 1953;171:737-8.

2. Luria SE, Human ML. A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. J Bacteriol 1952;64:557-69.
3. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA 1972;69:2904-9.
4. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1986;51 Pt 1:263-73.
5. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. Science. 1989;244:1288-92.
6. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 1995;270:467-70.
7. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 1998;391:806-11.
8. Phusantisampan T, Sangkhathat S, Phongdara A, Chiengkriwate P, Patrapinyokul S, Mahasirimongkol S. Association of genetic polymorphisms in the RET-protooncogene and NRG1 with Hirschsprung disease in Thai patients. J Hum Genet 2012;57:286-93.
9. Strachan T, Read AP. DNA structure and gene expression. In: Strachan T, Read AP, editors. Human Molecular Genetics. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc; 1999. p. 1-18
10. Boulanger SC, Caty MG, Glick PL. Molecular biology for pediatric surgeons. J Pediatr Surg 1999;34:917-30.
11. Paolella P. Introduction to molecular biology. Boston: Mac Graw Hill; 1998.
12. Hogan K. Principles and techniques of molecular biology. In: Hopkins P, Hemmimgs HC, editors. Basic and applied science for anesthesia. New York: Mosby, Wolfe; 2000. p. 37-54.
13. Sambrook J, Russel J. The condensed protocols: from molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Habor; 2006.
14. Strachan T, Read AP. PCR, DNA sequencing and in vitro mutagenesis. In: Strachan T, Read AP, editors. Human Molecular Genetics. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc; 1999. p. 119-35.
15. Sangkhathat S, Kanngurn S, Jaruratanasirikul S, Tubtawee T, Chaiyapan W, Patrapinyokul S, et al. Peripheral precocious puberty in a male caused by Leydig cell adenoma harboring a somatic mutation of the LHR gene: report of a case. J Med Assoc Thai 2010;93:1093-7.

16. Chaiyapan W, Duangpakdee P, Boonpipattanapong T, Kanngern S, Sangkhathat S. Somatic mutations of K-Ras and BRAF in Thai colorectal cancer and their prognostic value. Asian Pacific J Cancer Prev 2013;14:329-32.
17. Hartman M, Loy EY, Ku CS, Chia KS. Molecular epidemiology and its current clinical use in cancer management. Lancet Oncol 2010;11:383-90.
18. Sangkhathat S, Kusafuka T, Miao J, Yoneda A, Nara K, Yamamoto S, et al. In vitro RNA interference against beta-catenin inhibits the proliferation of pediatric hepatic tumors. Int J Oncol 2006;28:715-22.
19. Wanitsuwan W, Kanngurn S, Boonpipattanapong T, Sangthong R, Sangkhathat S. Overall expression of beta-catenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers. World J Gastroenterol 2008;14:6052-9.
20. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature 2004;431:931-45.
21. Gullapalli RR, Desai KV, Santana-Santos L, Kant JA, Becich MJ. Next generation sequencing in clinical medicine: Challenges and lessons for pathology and biomedical informatics. J Pathol Inform 2012;3:40.
22. Broadhead ML, Clark JCM, Dass CR, Choong PFM. Microarray: an instrument for cancer surgeons of the future?. ANZ J Surg 2010;80:531-536
23. Prickett M, Jain M. Gene therapy in cystic fibrosis. Transl Res 2013;161:255-64.
24. Podolska K, Stachurska A, Hajdukiewicz K, Malecki M. Gene therapy prospects-intranasal delivery of therapeutic genes. Adv Clin Exp Med 2012;21:525-34.
25. Wanitsuwan W, Boonpipattanapong T, Kanngurn S, Chaiyapan W, Graidist P, Sangkhathat S. Benefits from genetic test in descendants of familial adenomatous polyposis syndrome: Report of a family in southern Thailand. Asian Biomed 2011;5:553-557.
26. Cronin M, Sangli C, Liu ML, Pho M, Dutta D, Nguyen A, et al. Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. Clin Chem 2007;53:1084-91.
27. Kelly CM, Krishnamurthy S, Bianchini G, Litton JK, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, et al. Utility of oncotype DX risk estimates in clinically intermediate risk hormone receptor-positive, HER2-normal, grade II, lymph node-negative breast cancers. Cancer 2010;116:5161-7.