ข้อถือสิทธิ

1. กรรมวิธีการตรวจหาออโตแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็ง โดยการประยุกต์ใช้ข้อมูลการแสดงออกของยีนร่วมกับเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ก. การคัดเลือกยีนที่ต้องการทดสอบความเป็นทีเอเอจากฐานข้อมูลการแสดงออกของยีนหรือจากวารสารที่มีการตีพิมพ์ โดยเลือกยีนที่มีรายงานว่ามีการแสดงออกที่สูงผิดปกติในระยะใดระยะหนึ่งของมะเร็งหรือในสับทัยป์ (subtype) ต่างๆ ของมะเร็งแต่ละชนิด

ข. การโคลนยีนที่คัดเลือกมาเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกยีน เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มี 6-ฮิสทิดีน (6-Histidine) เป็นอิพิโทปแท็ก (Epitope tag) ในระบบของ *E.coli* โดยมีการตรวจสอบความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งในส่วนของลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequence) ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อยืนยันว่าพลาสมิดที่ได้มียีนประมวลรหัสโปรตีนที่ต้องการ รวมทั้งตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ โดยวิธีเอสดีเอส-เพจ (SDS-PAGE; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) ร่วมกับเวสเทิร์นบลอท (Western blot transfer) และการโพรบ (probe) ด้วยแอนติบอดีต่ออิพิโทปแท็ก

ค. การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละชนิดในซีรั่มจากผู้ป่วยมะเร็ง และกลุ่มควบคุม ด้วยวิธีวิเคราะห์ด้วยเวสเทิร์นบลอท โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนในรูปของสารสกัดหยาบของ *E.coli* มาแยกขนาดด้วยเอสดีเอส-เพจ ตามด้วยเวสเทิร์นบลอทเพื่อเคลื่อนย้ายรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้ไปอยู่บนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน จากนั้นในขั้นตอนการตรวจหาแอนติบอดี้ในซีรั่ม เมมเบรนจะถูกนำมาประกบใน ดีคาร์-โพรบอินคูเบชั่น แมนิโฟลด์ (Deca-Probe incubation manifold) ซึ่งช่วยให้เกิดการแบ่งช่องสำหรับโพรบด้วยซีรั่มต่างๆ กันบนเมมเบรนเดียวกัน จากนั้นทำการโพรบด้วยซีรั่มที่ถูกเจือจางในบัฟเฟอร์สำหรับการเจือจาง (diluting buffer) ที่ 1:100 หรือ 1:200 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการตรวจสอบว่าซีรั่มที่ใช้มีแอนติบอดีที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนบนเมมเบรนหรือไม่ โดยใช้แอนติบอดีลำดับที่สอง (secondary antibody) ที่จำเพาะต่อแอนติบอดีชนิดไอจีจีของคน (anti human IgG) ที่มีเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP; alkaline phosphatase) ติดฉลากอยู่ที่ความเจือจาง 1:5000 ตามด้วยการเติมสับสเตรทสี (color substrate) ของแอลคาไลน์ฟอสฟาเตส คือ BCIP/NBT ลงไปทำปฏิกิริยา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นอ่านผลหลังจากหยุดปฏิกิริยาด้วยบัฟเฟอร์สำหรับหยุดปฏิกิริยา (stop buffer) ซึ่งผลบวก (positive) จะปรากฏในลักษณะเป็นแถบสีม่วงที่ตำแหน่งตามขนาดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดนั้นๆ

ง. การคำนวณและแปลความหมายจากความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างการตรวจพบแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนนั้นๆ ในตัวอย่างตรวจซีรั่มกับการเป็นมะเร็ง เพื่อหาออโตแอนติบอดีที่มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งในซีรั่ม

โดยไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ผ่านขั้นตอนการทำให้เกิดสีแล้วจะถูกนำมาแสกนและอ่านค่าความเข้มของแถบสีที่เกิดจากการโพรบด้วยซีรั่มแต่ละซีรั่ม จากนั้นนำค่าความเข้มของแถบสี (band intensity) ที่ได้มาเทียบกับความเข้มของแถบสีที่ได้จากซีรั่มอ้างอิงผลบวกเพื่อแปลงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของความเข้มแถบสี (percent intensity) ตามด้วยการนำค่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มของแถบสีที่ได้จากตัวอย่างตรวจในกลุ่มทดลองที่เป็นโรคมะเร็งและกลุ่มควบคุมมาทำการกระจายข้อมูลและหาค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่ม และนำค่าที่ได้มาตรวจสอบค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างตัวอย่างตรวจทั้งสองกลุ่ม สำหรับแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกตรวจพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมจะถูกนำไปศึกษาต่อเพิ่มเติมในตัวอย่างตรวจที่มากขึ้นเพื่อพิจารณาว่าเป็นอินฟอร์เมติกออโตแอนติบอดี (informatic autoantibody) คือมีศักยภาพสำหรับการใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งในซีรั่มทั้งในแง่ความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ต่อไป

2. กรรมวิธีตามข้อถือสิทธิ 1 ที่ซึ่งทีเอเอที่ใช้เป็นแอนติเจนเป้าหมายในการตรวจหาออโตแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งโพรงหลังจมูก เลือกได้จาก B2M, KLK6, P53 และ UCK2