ผลการยับยั้งของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

In Vitro Inhibitory Effects of Antitumor Platinum Complexes on DNA Synthesis

จณิศรา ฤดีอเนกสิน

Janisara Rudeeaneksin

เลขหมู่ ก TP245.P7 จ31 2543 ฉ. 2
Bib Key 204650
- 8 ธ.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2543

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลการยับยั้งของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง
ผู้เขียน	นางสาวจณิศรา ฤดือเนกสิน
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อดิศร รัตนพันธ์)

....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

คณะกรรมการสอบ

....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อดิศร รัตนพันธ์)

....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ฉวีวรรณ จั่นสกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปิติ ทฤษฎิคุณ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

หอสมุด คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่
ได้รับจาก
บัณฑิตวิทยาลัย
- 8 ธ.ค. 2545
วันที่......เดือน......พ.ศ.

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลการยับยั้งของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

ผู้เขียน นางสาวจณิศรา ฤดีอเนกสิน

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2543

บทคัดย่อ

อันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม ซิสพลาติน คาร์โบพลาติน หรือทรานส์พลาตินกับพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 มีผลต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การเปลี่ยนแปลงโครงรูปของดีเอ็นเอ และความว่องไวของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะ ที่อัตราส่วนโมลาร์ (สารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม / นิวคลีโอไทด์) เท่ากับ 0.01 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส ถูกยับยั้งโดยซิสพลาติน คาร์โบพลาติน และทรานส์พลาติน ประมาณร้อยละ 42, 9, และ 26 ตามลำดับ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส ถูกยับยั้งประมาณร้อยละ 34, 12 และ 32 ตามลำดับ และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบส ถูกยับยั้งประมาณร้อยละ 31, 0 และ 10 ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์จำนวนอะตอมพลาตินัมบนดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมทั้งสามชนิดด้วยเทคนิค Quantitative Polymerase Chain Reaction (QPCR) พบว่ามีจำนวนอะตอมพลาตินัมเท่ากับ 0.56±0.013, 0.065±0.008 และ 0.35±0.010 อะตอม/1,478 คู่เบส 0.42±0.012, 0.10±0.002 และ 0.39±0.010 อะตอม/992 คู่เบส 0.37± 0.013, 0.00±0.0002 และ 0.10±0.010 อะตอม/621 คู่เบส ตามลำดับ จากการศึกษาเปรียบเทียบผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 2,105, 1,478 และ 621 คู่เบส ที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมทั้งสามชนิดด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ พบว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 2,105 คู่เบส มีแนวโน้มที่ถูกยับยั้งมากกว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 และ 621 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์จำนวนอะตอมพลาตินัมบนดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาติน คาร์โบพลาติน และทรานส์พลาตินบนพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี (Inductively coupled plasma/mass spectrometry) ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ

0.01 พบว่ามีจำนวนอะตอมพลาตินัมเท่ากับ 0.7, 0.09 และ 0.2 อะตอม/10^3 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.1 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะถูกยับยั้งประมาณร้อยละ 50 เมื่อดีเอ็นเอเกิดอันตรกิริยากับซิสพลาติน คาร์โบพลาติน และทรานส์พลาติน ภายใน 3 นาที 24 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

การเคลื่อนที่ของพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดพันตัวเองบนอะกาโรสเจล เคลื่อนที่ช้าลงเมื่ออัตราส่วนโมลาร์เพิ่มขึ้น พลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดพันตัวเองคลายตัวเป็นวงและเคลื่อนที่ช้าที่สุดเมื่ออัตราส่วนโมลาร์ของซิสพลาติน คาร์โบพลาติน และทรานส์พลาตินเท่ากับ 0.1, 2 และ 0.2 ตามลำดับ ผลของระยะเวลาการเกิดดีเอ็นเอแอดดัคเนื่องจากซิสพลาติน คาร์โบพลาติน และทรานส์พลาติน ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของดีเอ็นเอจากรูปขดพันตัวเองไปเป็นรูปคลายตัวเป็นวง เกิดขึ้นภายในระยะเวลา 0.5, 48 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากการศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะต่อดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นเนื่องจากซิสพลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.01 คาร์โบพลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.1 และทรานส์พลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์ เท่ากับ 0.025 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Bam*H I, *Pvu* II และ *Hpa* II ได้ดีกว่าเอนไซม์ *Eco*R I และ *Hind* III แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมมักจะเกิดแบบอินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ในลักษณะ d(GpG) หรือแบบอินเตอร์สแตรนด์ครอสลิงค์ในลักษณะ d(GpC) หรือ d(CpG) ได้ดีกว่าการเกิดดีเอ็นเอแอดดัคแบบอินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ในลักษณะ d(GpA) หรือ d(ApA)

แม้ว่าทรานส์พลาตินจะไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา แต่จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าที่ระดับอัตราส่วนโมลเดียวกันทรานส์พลาตินมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอ และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะได้น้อยกว่าซิสพลาติน แต่มากกว่าคาร์โบพลาติน

Thesis Title	*In Vitro* Inhibitory Effects of Antitumor Platinum Complexes on DNA Synthesis
Author	Miss Janisara Rudeeaneksin
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2000

Abstract

Interaction of platinum complexes (cisplatin, carboplatin and transplatin) with pUC 19 plasmid affected on DNA synthesis, DNA conformational change and sensitivity to some restriction endonucleases. At the molar ratio of 0.01, DNA synthesis of 1,478 base pair fragment was inhibited at the level of 42, 9 and 26 percent by cisplatin, carboplatin and transplatin, respectively. DNA synthesis of 992 base pair fragment was inhibited at the level of 34, 12 and 32 percent and those of 621 base pair fragment was inhibited at the level of 31, 0 and 10 percent, respectively. The amount of platinum atom of DNA adducts induced by cisplatin, carboplatin and transplatin was measured by Quantitative Polymerase Chain Reaction (QPCR) with 0.56 ± 0.013, 0.065 ± 0.008 and 0.35 ± 0.010 Pt atom / 1,478 base pair fragment, 0.42 ± 0.012, 0.10 ± 0.002 and 0.39 ± 0.010 Pt atom / 992 base pair fragment and 0.37 ± 0.013, 0.00 ± 0.0002 and 0.10 ± 0.010 atom / 621 base pair fragment, respectively. Multiplex PCR was used to study the inhibition of these three platinum complexes on DNA synthesis of 2,105, 1,478 and 621 base pair fragments. The results indicated that DNA synthesis of 2,105 base pair fragment was inhibited by these three platinum complexes more than that of 1,478 and 621 base pair fragment, respectively. The amount per 10^3 nucleotides of platinum measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP/MS) at the molar ratio of cisplatin, carboplatin and transplatin of 0.01 were 0.7, 0.09 and 0.2, respectively.

At the molar ratio of 0.01, DNA synthesis was inhibited approximately 50 percent by cisplatin, carboplatin and transplatin within 3 min, 24 and 4 h, respectively.

The electrophoretic mobility of supercoiled DNA on agarose gel decreased as the molar ratio increased. DNA conformational changes from supercoil form to relax form induced by cisplatin, carboplatin and transplatin occurred when the molar ratio of cisplatin, carboplatin and transplatin reached 0.1, 2 and 0.2, respectively. These conformational changes occurred within 0.5, 48 and 1 h, respectively. To analyze the base-specificity of the cisplatin, carboplatin or transplatin-DNA adducts, the measurement for sensitivity of DNA adducts to some restriction endonucleases was conducted. At the molar ratio of cisplatin, carboplatin and transplatin of 0.01, 0.025 and 0.1 inhibited enzyme activities of *Bam*H I, *Hpa* II and *Pvu*II more than those of *Eco*R I and *Hind* III. This indicated that platinum complexes attacked preferentially the sequence of d(GpG) of intrastrand crosslink or d(GpC) or d(CpG) of interstrand crosslink more than the sequence of d(ApA) or d(GpA) of intrastrand crosslink.

Although transplatin is a pharmacological inactive platinum complex, it showed inhibitory effects on DNA synthesis *in vitro*, DNA conformational change and sensitivity to some restriction endonucleases less than cisplatin but more than carboplatin.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อดิศร รัตนพันธ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ ในการทำวิจัยและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และรศ.ดร.ฉวีวรรณ จั่นสกุล กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนในการสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หน่วยวิจัยและพัฒนาเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์เพื่อทำวิจัย และบริษัททักษิณไซเบอร์เน็ตที่ให้ที่พักอาศัยในระหว่างทำงานวิจัย และอำนวยความสะดวกในการสืบค้นข้อมูลทางอินเตอร์เน็ต

ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่ และคุณพี่ ด้วยความเคารพรักยิ่งที่ให้กำลังใจและสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้ามาโดยตลอด ขอขอบคุณเพื่อน ๆ น้อง ๆ และเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ให้กำลังใจและมีส่วนช่วยในการทำงานวิจัย

จณิศรา ฤดือเนกสิน

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(12)
รายการรูป	(13)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
1. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต	2
2. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง	10
3. สารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม	16
4. ผลของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ	22
5. การเปลี่ยนแปลงโครงรูปดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับ สารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม	24
วัตถุประสงค์	27
ประโยชน์ที่ได้รับ	27
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	29
วัสดุ	29
อุปกรณ์	31
วิธีการ	33
1. การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19	33
2. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)	36

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส แบบมัลติเพล็กซ์ (multiplex polymerase chain reaction) 38
4. การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม 39
5. การหาปริมาณอะตอมพลาตินัมที่เกิดพันธะกับดีเอ็นเอด้วยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี (Inductively coupled plasma/mass spectrometry, ICP/MS) 41
6. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม 42
7. การศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะต่อดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมและพลาสมิดดีเอ็นเอ 43

3. ผลการทดลอง 45
1. การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ 45
2. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 44
3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ 48
4. การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม 48
5. ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์เนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม 60
6. ผลของระยะเวลาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างดีเอ็นเอกับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ 63

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
7. การเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอเมื่อเกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม	63
8. ความว่องไวของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะต่อดีเอ็เอแอดดัคที่เกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม	71
9. การหาปริมาณอะตอมพลาตินัมด้วยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี	80
4. วิจารณ์	81
1. การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมในหลอดทดลอง	81
2. การเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม	85
3. ความว่องไวของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะต่อดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม	90
5. สรุป	94
เอกสารอ้างอิง	96
ภาคผนวก	108
ภาคผนวก ก. พลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19	108
ภาคผนวก ข. การเตรียมสารเคมี	114
ภาคผนวก ค. สารละลายบัฟเฟอร์	117
ภาคผนวก ง. ข้อมูลการวิเคราะห์หาปริมาณอะตอมพลาตินัมของดีเอ็นเอแอดดัคด้วยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี	118
ประวัติผู้เขียน	121

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่พบใน *E. coli*	6
2	คุณสมบัติของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสในเซลล์ยูคาริโอท	7
3	โปรตีนที่มีส่วนร่วมในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใน *E. coli*	8
4	องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	37
5	สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	37
6	องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์	38
7	การวิเคราะห์หาปริมาณอะตอมพลาตินัมที่เกิดพันธะกับพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี	80
ตารางผนวกที่ 1	ชนิดและตำแหน่งของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะบนพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19	110
ตารางผนวกที่ 2	ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่เกิดอันตรกิริยากับพลาสมิดดีเอ็นเอ	115
ตารางผนวกที่ 3	คุณสมบัติของไพรเมอร์	116

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	จุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ	3
2	การสร้างดีเอ็นเอสายใหม่บนดีเอ็นเอแม่พิมพ์	5
3	หลักการการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	11
4	โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม	17
5	กลไกจลนพลศาสตร์ของซิสพลาตินที่เกิดอันตรกิริยากับดีเอ็นเอ	19
6	ลักษณะการเกิดพันธะระหว่างอะตอมพลาตินัมกับดีเอ็นเอ	20
7	การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	40
8	แผนผังและตำแหน่งของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะชนิดต่าง ๆ ของพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19	44
9	แถบพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 ที่สกัดได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5α	46
10	แผนผังการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 992 และ 621 คู่เบส และไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆ	47
11	แถบผลิตผลดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโพลีเมอเรส	49
12	ผลการยับยั้งดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบสเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ต่าง ๆ	51
13	ความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส และอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ กัน	52

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนอะตอมพลาตินัมบนดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส และอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ	53
15	ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบสเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ต่าง ๆ	54
16	ความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส และอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ กัน	56
17	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนอะตอมพลาตินัมบนดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส และอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ กัน	57
18	ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบสเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ต่าง ๆ	58
19	ความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบส และอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ กัน	59
20	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนอะตอมพลาตินัมบนดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบส และอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆกัน	61
21	ผลยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621 1,478 และ 2,105 คู่เบสที่อัตราส่วนโมลาร์ต่าง ๆ	62
22	การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส เนื่องจากเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมกับดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.1 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	64

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
23	ความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส และระยะเวลาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆกัน	65
24	ผลของอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปพลาสมิดดีเอ็นเอ	66
25	ผลของระยะเวลาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอ	68
26	การเปรียบเทียบการเคลื่อนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิด ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.1 ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ	70
27	Restriction digestion ของดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเอนไซม์ *Bam*H I	72
28	Restriction digestion ของดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเอนไซม์ *Eco*R I	74
29	Restriction digestion ของดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเอนไซม์ *Hin*d III	75
30	Restriction digestion ของดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเอนไซม์ *Pvu* II	77
31	Restriction digestion ของดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเอนไซม์ *Hpa* II	79
32	รูปจำลองที่เป็นไปได้ของการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่อัตราส่วนโมลาร์ต่าง ๆ	86
รูปผนวกที่ 1	กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์หาปริมาณอะตอมพลาตินัมด้วยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี	119
รูปผนวกที่ 2	ไอซีพีแมสสเปกตรัมของอะตอมพลาตินัมของดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากซิสพลาติน ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.1	120

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

มะเร็งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย ปัจจุบันประชากรมีแนวโน้มจะเป็นมะเร็งกันมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสาเหตุใหญ่ ๆ หลายประการเช่น สารเคมี รังสี และเชื้อไวรัส เป็นต้น สำหรับการรักษามะเร็งมีหลายวิธี เช่น วิธีศัลยกรรม วิธีฉายรังสี วิธีเคมีบำบัด หรือ ในบางครั้งอาจใช้หลายวิธีร่วมกัน สำหรับการรักษามะเร็งด้วยวิธีเคมีบำบัดมียารักษามะเร็งหลายชนิดซึ่งแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์ได้แก่สารอัลคีเลติง (alkylating agents) สารแอนติเมตาบอไลต์ (antimetabolites) สารปฏิชีวนะ (antibiotics) ฮอร์โมน (hormones) และยาอื่น ๆ เป็นต้น

ซิสพลาติน [cisplatin, *cis*-diaminedichloroplatinum (II)] เป็นยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายกับสารอัลคีเลติง เป็นยาที่ใช้ได้ผลดีในการรักษามะเร็งลูกอัณฑะ มะเร็งรังไข่ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มะเร็งที่ส่วนศีรษะ และคอ เป็นต้น (Frei, 1985; Loehrer and Einhorn, 1984; Pratt, *et al.,* 1994) ความเป็นพิษของซิสพลาตินต่อเซลล์มะเร็งเกิดจากอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างซิสพลาตินกับดีเอ็นเอ โดยเกิดพันธะระหว่างอะตอมพลาตินัมกับดีเอ็นเอเรียกว่าดีเอ็นเอแอดดัค (platinum-DNA adducts) ที่ตำแหน่ง N7 ของเบสกัวนีน (guanine, G) กับที่ตำแหน่ง N7 ของเบสกัวนีนหรือกับที่ตำแหน่ง N7 ของเบสอะดีนีน (adenine, A) ที่อยู่ติดกันในสายดีเอ็นเอเดียวกันเรียกว่าอินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ (intrastrand crosslink) หรือคนละสายกันเรียกว่าอินเตอร์สแตรนด์ครอสลิงค์ (interstrand crosslink) หรือเกิดพันธะระหว่างอะตอมพลาตินัมกับเบสกัวนีนในสายใดสายหนึ่งของดีเอ็นเอกับชีวโมเลกุลอื่นๆ ภายในเซลล์เรียกว่าอินเตอร์โมเลคูลาร์ครอสลิงค์ (intermolecular crosslink) การเกิดพันธะระหว่างอะตอมพลาตินัมกับดีเอ็นเอทำให้เกิดการยับยั้งการจำลองแบบของดีเอ็นเอ (DNA replication) การถอดรหัสของดีเอ็นเอ (DNA transcription) และการแปลรหัสจากอาร์เอ็นเอเป็นโปรตีน (translation) ส่งผลให้เซลล์มะเร็งตายในที่สุด

ถึงแม้ว่าซิสพลาตินจะให้ผลรักษามะเร็งได้หลายชนิดก็ตาม แต่ผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับการรักษาด้วยยาซิสพลาตินมักประสพปัญหาจากผลข้างเคียงของยาชนิดนี้ เช่น ความเป็นพิษต่อไต หู และระบบประสาท รวมถึงอาการคลื่นไส้อาเจียนอย่างรุนแรงเกิดขึ้นด้วย ปัจจุบันได้มีการพัฒนายาคาร์โบพลาติน [carboplatin, *cis*-diammine (1,1-cyclobutyldicarboxylato)platinum(II)] ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของยาซิสพลาตินและเป็นสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมรุ่นที่สองที่นำมาใช้แทนยาซิสพลาตินเพื่อลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการรักษามะเร็งด้วยยาซิสพลาติน

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ใช้เป็นยาเช่น ซิสพลาติน และคาร์โบพลาตินต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเออันเนื่องมาจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม ศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะต่อดีเอ็นเอแอดดัค และการหาปริมาณอะตอมพลาตินัมที่เกิดพันธะกับพลาสมิดดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบผลการทดลองดังกล่าวกับผลของทรานส์พลาติน [transplatin, *trans*-diaminedichloro platinum(II)] ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่เป็นไอโซเมอร์ของซิสพลาตินและไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ตรวจเอกสาร

1. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

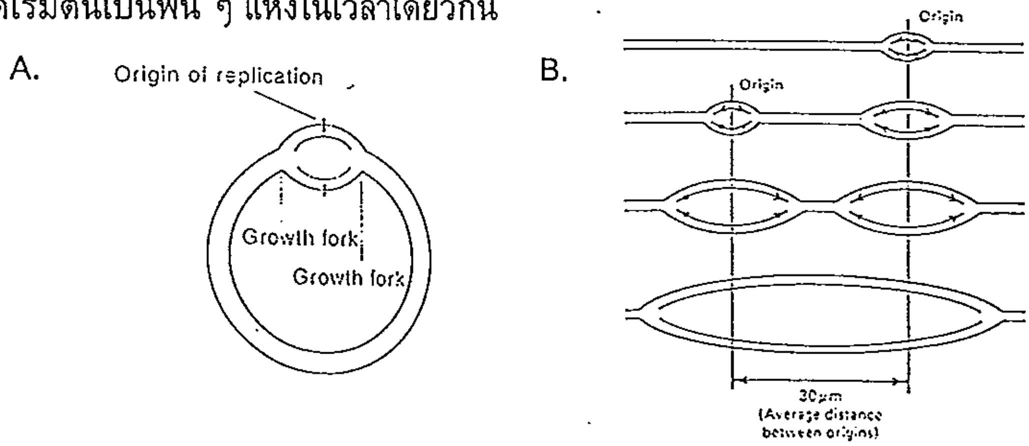
การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA synthesis) หรือการจำลองแบบของดีเอ็นเอเป็นการสร้างข้อมูลพันธุกรรมชุดใหม่ที่มีลักษณะเหมือนชุดเดิมทุกประการขึ้นมาอีกชุดหนึ่งก่อนการแบ่งเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้เพื่อเป็นการถ่ายทอดลักษณะปรากฏต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในเซลล์รุ่นพ่อแม่ไปยังเซลล์รุ่นลูกรุ่นหลาน

จากการศึกษาของ Meselson และ Stahl (1958) ได้แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นแบบกึ่งอนุรักษ์ (semiconservative) คือดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่เกิดขึ้นใหม่เกิดจากดีเอ็นเอเส้นที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่หนึ่งเส้นและดีเอ็นเอเส้นเก่าอีกหนึ่งเส้น การสังเคราะห์ดีเอ็นเอภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเป็นกระบวนการที่สลับซับซ้อนประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ที่ต่อเนื่องกันมากมาย ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์

และโปรตีนมากกว่า 20 ชนิดนับตั้งแต่จุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (replication origin) บริเวณการคลายเกลียวของดีเอ็นเอ (replication fork) การทำให้สายดีเอ็นเอแม่พิมพ์แยกจากกัน การสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ การสิ้นสุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และการม้วนตัวให้อยู่ในรูปเกลียวคู่ ขั้นตอนทั้งหมดนี้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งในโปรคาริโอท (prokaryotes) และยูคาริโอท (eukaryotes) มีหลักการที่คล้ายกัน แต่ต่างกันเล็กน้อยโดยที่ดีเอ็นเอของยูคาริโอทมีโปรตีนฮิสโตน (histone) จับอยู่ในรูปของโครมาติน (chromatin) ขั้นตอนสำคัญของกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอมีดังนี้

1.1 จุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์และบริเวณการคลายเกลียวของดีเอ็นเอ

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เกลียวคู่ของดีเอ็นเอจะต้องมีการแยกตัวออกจากกัน โดยจะมีจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ตรงบริเวณที่มีลำดับเบส (base sequences) พิเศษประมาณ 100-200 ตัว และมีโปรตีนพิเศษเป็นตัวจับกับลำดับเบสบริเวณนี้ส่งผลทำให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการแยกตัวของเกลียวคู่ (รูปที่ 1) จากการทดลองพบว่าโครโมโซมที่เป็นเกลียวคู่รูปวงแหวนของแบคทีเรีย และไวรัสมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากจุดเริ่มต้นไปทั้ง 2 ทิศทาง (bidirectional) ส่วนในโครโมโซมของพวกยูคาริโอทซึ่งจัดตัวอยู่ในรูปนิวคลีโอโซม (nucleosome) มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นแบบ 2 ทิศทางเช่นกัน แต่อัตราเร็วเป็นไปอย่างช้า ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยูคาริโอทจะเริ่มจากจุดเริ่มต้นเป็นพัน ๆ แห่งในเวลาเดียวกัน

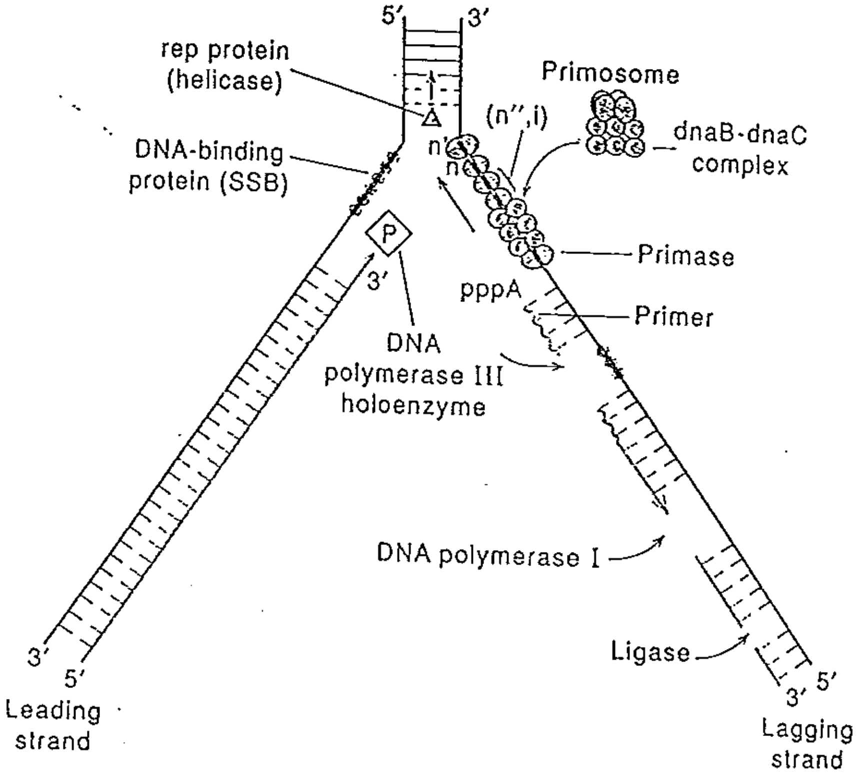


รูปที่ 1 จุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ : A.โปรคาริโอท B.ยูคาริโอท
ที่มา : Zubay และคณะ (1995)

1.2 การสร้างดีเอ็นเอสายใหม่บนสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์

ในแต่ละสายของดีเอ็นเอเกลียวคู่มีการจัดเรียงตัวของเบสเป็นแบบสวนทิศทางกัน (antiparallels) ในทิศทาง 5′→3′ เมื่อมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นบนดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ทั้งสองสาย ดีเอ็นเอสายใหม่สายหนึ่งจะต้องถูกสังเคราะห์ขึ้นในทิศทาง 5′→3′ และอีกสายหนึ่งในทิศทาง 3′→5′ แต่เนื่องจากเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) สามารถเร่งปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชัน (polymerization) ได้เฉพาะในทิศทาง 5′→3′ เท่านั้น ดังนั้นดีเอ็นเอสายใหม่ที่ต้องสังเคราะห์ในทิศทาง 3′→5′ จึงไม่น่าจะเกิดขึ้นได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าดีเอ็นเอสายใหม่เส้นนี้จะถูกสังเคราะห์เป็นเส้นสั้น ๆ ในทิศทาง 5′→3′ เรียกว่า โอคาซากิแฟรกเมนท์ (Okazaki fragment) ในโปรคาริโอทมีโอคาซากิแฟรกเมนท์ยาวประมาณ 1000-2000 นิวคลีโอไทด์ ส่วนของยูคาริโอทมีความยาวประมาณ 200 นิวคลีโอไทด์ เรียกดีเอ็นเอสายใหม่ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นอย่างต่อเนื่องว่าสายนำ (leading strand) และเรียกดีเอ็นเอสายใหม่ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นอย่างไม่ต่อเนื่องว่าสายตาม (lagging strand) (รูปที่ 2)

การสร้างโอคาซากิแฟรกเมนท์บนสายตามโดยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์ซึ่งจะเป็นอาร์เอ็นเอไพรเมอร์ (RNA primer) เส้นสั้น ๆ (ประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์) อาร์เอ็นเอไพรเมอร์นี้จะถูกสังเคราะห์เป็นระยะ ๆ โดยเอนไซม์อาร์เอ็นเอไพรเมส (RNA primase) [การสังเคราะห์อาร์เอ็นเอไพรเมอร์นี้จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอไพรเมส (DNA primase) ซึ่งสามารถใช้ไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (ribonucleoside triphosphates) สำหรับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอไพรเมอร์เส้นสั้น] เมื่อสายดีเอ็นเอถูกสังเคราะห์ต่อจากดีเอ็นเอไพรเมอร์จนชิดกับอาร์เอ็นเอไพรเมอร์ ส่วนของอาร์เอ็นเอไพรเมอร์จะถูกตัดออกจากนั้นที่ปลาย 3′ และที่ปลาย 5′ ของดีเอ็นเอที่ถูกสร้างใหม่จะถูกเชื่อมต่อเข้าด้วยกันโดยเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase) ซึ่งในแบคทีเรียจะใช้นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์หรือเอ็นเอดี (nicotinamide adeninedinucleotide; NAD) ส่วนในเซลล์สัตว์จะใช้อะดีโนซีนไตรฟอสเฟตหรือเอทีพี (adenosine triphosphate; ATP) เป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor)



รูปที่ 2 การสร้างดีเอ็นเอสายใหม่บนดีเอ็นเอแม่พิมพ์
ที่มา : Zubay (1993)

1.3 การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส

กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอภายในเซลล์จำเป็นต้องอาศัยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxyribonucleotidetriphosphate; dNTP) แมกนีเซียม และเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสสำหรับปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชันดังนี้

$$\text{poly (nucleotide)}_n\text{-}3'\text{-OH} + \text{dNTP} \xrightarrow[\text{Mg}^{2+}]{\text{DNA polymerase}} \text{poly(nucleotide)}_{n+1}\text{-}3'\text{-OH} + \text{PP}$$

PP คือ ไพโรฟอสเฟต (pyrophosphate) ที่ถูกตัดออกไปจากดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต

Kornberg (1980) พบว่าใน *E.coli* มีเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส 3 ชนิดคือ I, II และ III (ตารางที่ 1) แต่เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เพิ่มความยาวให้แก่ดีเอ็นเอสายใหม่คือเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส III การทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการแมกนีเซียมเป็นโคแฟคเตอร์ และไม่สามารถเริ่มทำงานได้ด้วยตัวเอง แต่จะต้องอาศัยทั้งตัวเริ่มต้นหรือไพรเมอร์ และเอนไซม์ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ส่วนดีเอ็นเอโพลีเมอเรส I และ II มีหน้าที่ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอเมื่อดีเอ็นเอได้รับความเสียหาย

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่พบใน *E.coli*

Polymerase	I	II	III
M_r	109000	120000	180000
Structure, subunits, M_r	One	One	α 140000 ε 25000 θ10000
Polymerization			
$5' \rightarrow 3'$	+	+	+
Exonuclease activity			
$5' \rightarrow 3'$	+	-	-
$3' \rightarrow 5'$	+	+	-

ที่มา : Smith and Wood (1991)

ในยูคาริโอทมีเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังแสดงในตารางที่ 2 ในปัจจุบันพบว่ามีเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส 5 ชนิด ได้แก่ ชนิด อัลฟา (alpha, α) เบต้า (beta, β) แกมมา (gamma, γ) เดลตา (delta, δ) และแอฟซีลอน (epsilon, ε) เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส อัลฟา เดลตา และแอฟซีลอน ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โครโมโซมอลดีเอ็นเอ (chromosomal DNA) ส่วนเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสเบต้าทำหน้าที่สำคัญในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสแกมมาเป็นเอนไซม์

ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และคลอโรพลาส (chloroplast) (Mathews and van Holde, 1996)

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสในเซลล์ยูคาริโอท

Polymerase	α	β	γ	δ	ε
Cell comparment	Nucleus	Nucleus	Mitochondrion	Nucleus	Nucleus
Associated primase	+	-	-	-	-
Biological role	Lagging strand replication	DNA repair	Mitochondria DNA replication	Leading strand replication	Replication
Number of subunits	4	1	4 (identical)	2	?
M_r of catalytic subunit, kDa	160-185	40	125	125	210-230
Exonuclease $3' \rightarrow 5'$	-	-	+	+	+

ที่มา: ดัดแปลงจาก Mathews and van Holde (1996)

1.4 โปรตีนที่มีส่วนร่วมในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

จากการศึกษาใน *E. coli* พบว่ามีโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการจำลองแบบของดีเอ็นเอ โปรตีนเหล่านี้แสดงในตารางที่ 3 การทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจะเกิดขึ้นได้เมื่อดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายคู่ถูกแยกออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเส้นตรงซึ่งต้องอาศัยโปรตีนต่อไปนี้

1.4.1 ดีเอ็นเอเฮลิเคส (DNA helicases) เป็นโปรตีนที่ต้องการพลังงานในรูปเอทีพีเพื่อช่วยผลักดันให้ตัวมันเคลื่อนที่ไป หน้าที่ของโปรตีนกลุ่มนี้คือช่วยแยกเกลียวคู่ของดีเอ็นเอให้ออกจากกันตรงบริเวณคลายเกลียวของดีเอ็นเอ

1.4.2 ซิงเกิลสแตรนด์ไบดิงโปรตีน (single strand binding protein; SSB) เป็นโปรตีนที่จับกับสายเดี่ยวของดีเอ็นเอ มีส่วนช่วยให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวแต่ละสายมีความคงตัว และป้องกันไม่ให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวเข้าจับคู่กันอีก

ตารางที่ 3 โปรตีนที่มีส่วนร่วมในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใน *E. coli*

Protein	Native Mass (Kdal)	Subunits		Function
SSB	74	4		Single-strand binding
Protein i	66	3		Primosome and function
Protein n	28	2		
Protein n′	76	1		
Protein n″	17	1		
Dna C	29	1		
Dna B	300	6		
Primase	60	1		Primer synthesis
Pol III Holoenzyme	(760)	(2)		
α	140	1	X2	Processive chain elongation
ε	25	1		
θ	10	1		
β	37	1		
γ	52	1		
δ	32	1		
τ	83	1		
Pol I	102	1		Gap filling, primer excision

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Protein	Native Mass (Kdal)	Subunits	Function
Ligase	74	1	Ligation
Topoisomerase II (gyrase)	400	4	
Gyr A	210	2	Supercoiling
Gyr B	190	2	
Rep	65	1	Helicase
Helicase II	75	1	Helicase
Dna A	48		Origin of replication
Topoisomerase I	100	4	Relaxing negative supercoil

ที่มา : Kornberg and Baker (1991)

นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่เรียกว่า โพรลิเฟอเรติงเซลล์นิวเคลียร์แอนติเจน (proliferating cell nuclear antigen; PCNA) ซึ่งมีส่วนร่วมในการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสอัลฟาเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายตาม และการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสเดลตาเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายนำ (Mathews and van Holde, 1996)

1.5 การเกิดเกลียวคู่ของดีเอ็นเอที่สร้างใหม่

ดีเอ็นเอสายใหม่ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะจับคู่กับเบสที่เป็นคู่สมกันของดีเอ็นเอสายเก่าตามธรรมชาติ ดีเอ็นเอจำเป็นต้องมีการจัดตัวในลักษณะขดพันตัวเอง (supercoil DNA) เพื่อให้ตัวมันเองอยู่ในลักษณะที่เสถียรที่สุด ซึ่งจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโทโปไอโซเมอเรส II (DNA topoisomerase II) ในกระบวนการดังกล่าว (Mathews and van Holde, 1990)

1.6 ความแม่นยำเที่ยงตรงของกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเออาจเกิดความผิดพลาดขึ้นได้เช่น กรณีเกิดการจับคู่ผิดของเบส (mismatch) หรือเกิดกระบวนการเมธิเลชัน (methylation) ของเบส ซึ่งความผิดพลาดดังกล่าวจะถูกสะสมไว้ และสามารถถ่ายทอดต่อไปได้เมื่อมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นเซลล์ต้องมีระบบการตรวจสอบความถูกต้อง (proof reading หรือ editing function) ที่เกิดขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ในโปรคาริโอทจะใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส I ส่วนในยูคาริโอทใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสแกมมา เดลตา และแอฟซีลอนในการตรวจสอบความถูกต้องของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติในการย่อยสายดีเอ็นเอจากปลาย $3'$ ไปยังปลาย $5'$ ($3' \rightarrow 5'$ exonuclease)

1.7 สารที่ยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอภายในเซลล์

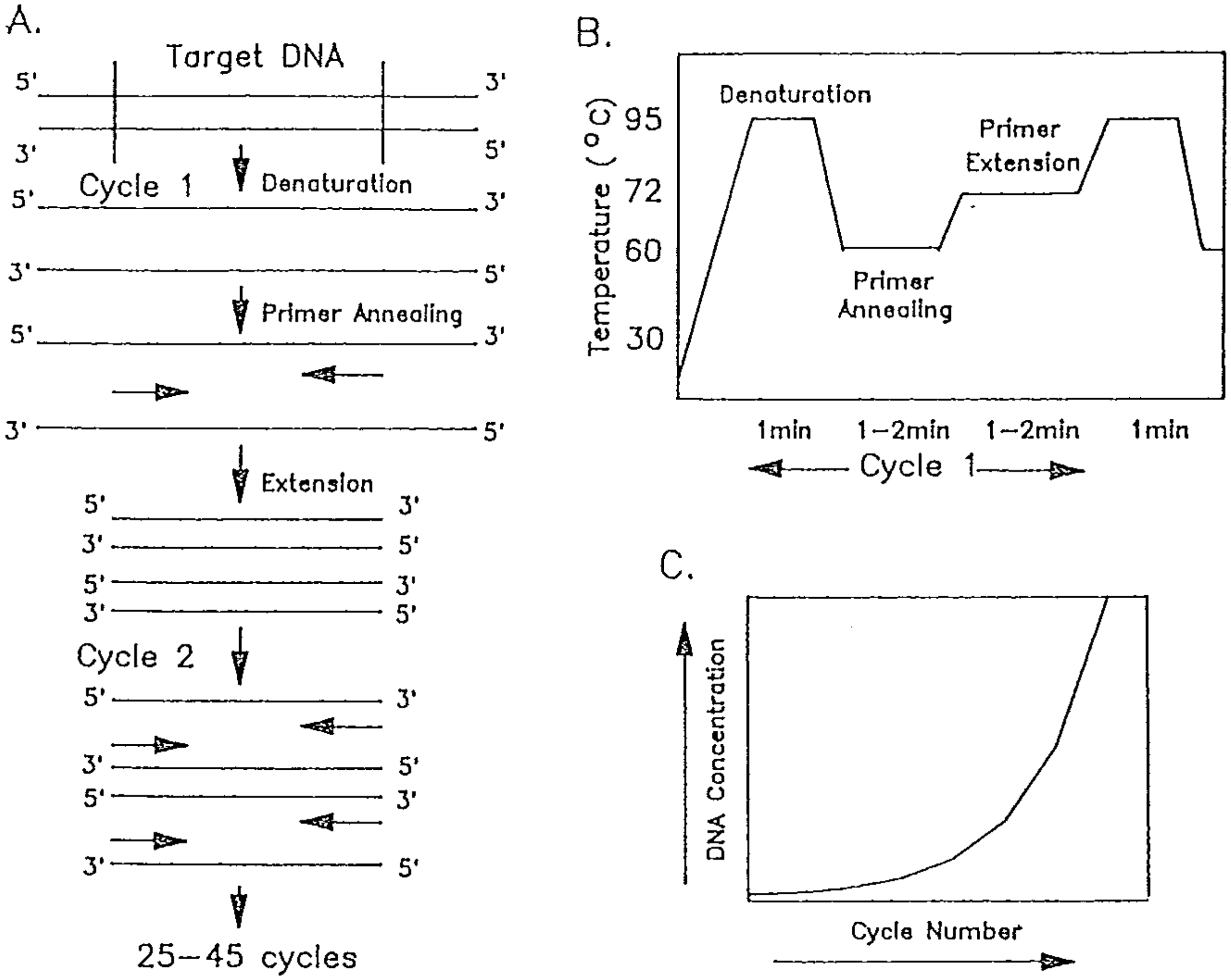
การทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสอัลฟา เดลต้า และ แอฟซีลอนจะถูกยับยั้งโดยอะฟิดิโคลิน (aphidicoline) ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายคลึงกับสเตียรอยด์ทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสิ้นสุดลง ในบางเซลล์ที่มีการผ่าเหล่า (mutation) ของยีนของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสอัลฟาทำให้เซลล์เหล่านี้ดื้อต่ออะฟิดิโคลิน (Mathews and van Holde, 1996)

2. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

2.1 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction หรือ PCR)

จากการค้นพบเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ Mullis (1986) ได้นำไปสู่วิวัฒนาการครั้งยิ่งใหญ่ทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยมีหลักการคล้ายกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอที่สนใจที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยให้มีปริมาณสูงขึ้นถึงล้านเท่าโดยการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาในหลอดทดลองที่เกิดซ้ำ ๆ กัน

หลาย ๆ รอบ โดยในแต่ละรอบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน (รูปที่ 3) ดังนี้



รูปที่ 3 หลักการการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

A : ไดอะแกรมแสดงการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ

B : กราฟแสดงอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอในแต่ละรอบ

C : ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

2.1.1 Denaturation step เป็นขั้นตอนที่ให้ความร้อนแก่ดีเอ็นเอสายคู่ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 94 - 95 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว

2.1.2 Annealing step เป็นขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์หรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (oligonucleotide primer) กับบริเวณของดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นที่อุณหภูมิประมาณ 35 - 60 องศาเซลเซียส

2.1.3 Extension step เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยการต่อนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3′-ไฮดรอกซิลของไพรเมอร์โดยใช้เอนไซม์ที่ทนความร้อน ปกติแล้วจะใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase)

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั้งสามขั้นตอนจะใช้เวลาสั้น ๆ และจะหมุนเวียนเป็นรอบ ๆ ประมาณ 25-40 รอบขึ้นอยู่กับการทดลองนั้น ๆ ในแต่ละรอบจะได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจากเดิมในลักษณะเอ็กซ์โปเนนเชียล (exponential) เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ)

2.2 องค์ประกอบหลักของปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส

2.2.1 เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส

เอนไซม์ที่ใช้ในช่วงแรกของเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสคือเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส I หรือ คลีเนาว์แฟรกเมนท์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (klenow fragment DNA polymerase) (Klenow and Henningen, 1970) โดยมีคุณสมบัติเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในทิศทาง $5' \rightarrow 3'$ แต่เนื่องจากเอนไซม์นี้ไม่ทนต่อความร้อนในขั้นตอนของการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันซึ่งใช้อุณหภูมิสูง ทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติและไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ จึงต้องเติมเอนไซม์ใหม่ลงไปในขั้นตอนการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ในทุกรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งนอกจากจะทำให้ส่วนผสมของปฏิกิริยามีปริมาตรเพิ่มขึ้นแล้วยังต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมากด้วย ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและเกิดปัญหาเมื่อทำปฏิกิริยาในเครื่องอัตโนมัติ

ต่อมาได้ค้นพบเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ทนความร้อนสูงได้ (thermostable DNA polymerases) ซึ่งได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* แบคทีเรียชนิดนี้เจริญเติบโตได้ในบ่อน้ำพุร้อนในอุทธยานแห่งชาติเยลโลสโตน (yellow stone national park) ประเทศสหรัฐอเมริกา (Brock and Freeze, 1969) แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่สกัดได้จากแบคทีเรียในช่วงแรก ๆ มีประสิทธิภาพไม่ดีนัก ต่อมามีการพัฒนาการสังเคราะห์เอนไซม์นี้โดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากขึ้น และมีความบริสุทธิ์สูง นอกจากนี้ได้ค้นพบเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำพุร้อน เช่น *Thermus thermophilus, Thermus flavas, Thermus ruber, Themococcus litoralis* และ *Pyrococcus sp.* เป็นต้น (Carballeira, *et al*., 1990; Cariello; *et al*., 1991; Landberg, *et al*., 1991 and Mattila, *et al*., 1991) พบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียเหล่านี้มีคุณสมบัติคล้ายกับแทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส และทนความร้อนได้สูงแตกต่างกันออกไป เอนไซม์ที่ใช้ในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสในปัจจุบันได้แก่ แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เวนท์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Vent DNA polymerase) ดีพเวนท์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (deep vent DNA polymerase) เป็นต้น (ทรงศักด์ เพ็ชรมิตร, 2536)

แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรสนอกจากจะสามารถทนความร้อนได้สูงแล้วยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากสายอาร์เอ็นเอแม่พิมพ์ได้อีกด้วย (reverse transcriptase activity) และสามารถนำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสายอาร์เอ็นเอได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามพบว่าดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่สกัดได้จาก *Thermus thermophilus* สามารถเร่งปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้ดีกว่าแทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (ทรงศักด์ เพ็ชรมิตร, 2536)

2.2.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

ไพรเมอร์เป็นส่วนสำคัญอย่างมากในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ไพรเมอร์ที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้

2.2.2.1 มีความจำเพาะกับลำดับเบสคู่สมในดีเอ็นเอแม่พิมพ์

2.2.2.2 สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ได้อย่างคงตัว

2.2.2.3 ไม่เกิดการจับกับตัวมันเองในลักษณะแฮร์พินลูป (hairpin loop) หรือไม่เกิดการจับกับไพรเมอร์ของอีกสายหนึ่ง

นอกจากคุณสมบัติทั้งสามประการดังกล่าวแล้ว การจับกันระหว่างดีเอ็นเอแม่พิมพ์กับไพรเมอร์ยังขึ้นอยู่กับสภาวะการทดลองที่เหมาะสม เช่น ความเข้มข้นของเกลือในปฏิกิริยา ขนาดความยาวของไพรเมอร์ ปริมาณและสัดส่วนของเบสกัวนีนและเบสไซโตซีน ซึ่งมีผลต่ออุณหภูมิหลอมตัว (melting temperature: T_m) ของไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน annealing step การเลือกใช้ไพรเมอร์ให้เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้ได้ผลิตผลดีเอ็นเอตามต้องการ ปัจจุบันมีการรวบรวมข้อมูลลำดับเบสหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้เป็นฐานข้อมูล (database) ขนาดใหญ่หลายแห่ง เช่น GenBank ของประเทศสหรัฐอเมริกา EMBL ของประเทศเยอรมนี และ DDBL ของประเทศญี่ปุ่น เป็นต้น จากข้อมูลดังกล่าวทำให้สามารถกำหนดตำแหน่งของไพรเมอร์ กำหนดอุณหภูมิหลอมตัว ปริมาณเบสกัวนีนและเบสไซโตซีนที่ต้องใช้ ขนาดและความยาวของสายไพรเมอร์ โอกาสความน่าจะเป็นที่เกิดแฮร์พินลูป

ไพรเมอร์ที่ใช้ในปัจจุบันสังเคราะห์ได้จากเครื่องอัตโนมัติ (automated DNA synthesizer) โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีฟอสโฟไตรเอสเตอร์ (phosphotriester reaction) ทำให้เกิดการเชื่อมต่อของสายนิวคลีโอไทด์จากปลายด้าน 3′ ไฮดรอกซิลกับปลายด้าน 5′ ฟอสเฟตของนิวคลีโอไทด์อีกตัวหนึ่งเพื่อให้ได้ขนาดความยาวของสายนิวคลีโอไทด์ตามที่ต้องการ (มนตรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536)

2.2.3 เครื่องอัตโนมัติที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR Automation)

เครื่องอัตโนมัติที่ใช้ในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมมีส่วนประกอบที่สำคัญได้แก่ ส่วนที่วางหลอดทดลอง(microcentrifuge tube) ซึ่งถูกควบคุมด้วยอุณหภูมิ ส่วนที่ทำความร้อน (heating system) ส่วนที่ทำความเย็น (cooling system) ส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในแต่ละขั้นตอนของแต่ละรอบ อัตราเร็วของการเพิ่มและลดอุณหภูมิ และจำนวนรอบที่ใช้ทำปฏิกิริยา เครื่องอัตโนมัติที่ใช้ในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมีอยู่หลายประเภทซึ่งขึ้นอยู่กับบริษัทผู้ผลิต

2.2.4 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอเรสในหลอดทดลอง

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยทั่วไปมีส่วนประกอบต่าง ๆ ได้แก่ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ สารละลายบัฟเฟอร์ (ประกอบด้วยทริส-ไฮโดรคลอไรด์ โปแตสเซียมคลอไรด์ เจลาติน ไตรตอนเอ็กซ์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต แมกนีเซียมคลอไรด์ ไพรเมอร์ แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส สัดส่วนขององค์ประกอบต่างๆ เหล่านี้สามารถปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสมของแต่ละงาน

ไพรเมอร์ที่ใช้ควรมีปริมาณมากเพียงพอที่จะสังเคราะห์ผลิตผลดีเอ็นเอได้ในปริมาณที่ต้องการ การออกแบบ และคัดเลือกไพรเมอร์เป็นขั้นตอนที่สำคัญเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสขึ้นได้สมบูรณ์และมีประสิทธิภาพ ไพรเมอร์ที่ดีควรมีขนาดความยาว 15 - 30 เบส มีสัดส่วนของเบสกัวนีนและเบสไซโตซีนอยู่ร้อยละ 50 ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในไพรเมอร์ ไม่ควรมีลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) หรือโครงสร้างอื่น ๆ เช่น โพลีพิวรีน (polypurine) หรือ โพลีไพริมิดีน (polypyrimidine) ซึ่งจะรบกวนการจับคู่ระหว่างดีเอ็นเอแม่พิมพ์กับไพรเมอร์ในขั้นตอน annealing step นอกจากนี้ควรหลีกเลี่ยงปัจจัยที่ทำให้เกิดการจับคู่กันเองระหว่างสองไพรเมอร์ (primer-dimer) ส่วนอุณหภูมิหลอมตัวควรอยู่ในช่วง 55 - 80 องศาเซลเซียส การออกแบบและเลือกไพรเมอร์ในปัจจุบันสามารถทำได้ง่ายโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Blair and Zajdel, 1992)

อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing step มีความสำคัญมากเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างจำเพาะเจาะจง หากใช้อุณหภูมิต่ำจะทำให้ปฏิกิริยามีความจำเพาะน้อยลง และความเข้มข้นของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรสควรเหมาะสมเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (Blair and Zajdel, 1992)

ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรสในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ส่วนประกอบต่าง ๆ สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสอื่น ๆ เช่น ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ สารคีเลติง (chelating agent) ที่มีอยู่ในสารละลายหรือสารตัวอย่าง หรือดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต และโปรตีนอื่น ๆ ที่ปะปนมาล้วนมีผลต่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ใช้แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจะไม่สามารถทำงานหรือทำงานไม่สมบูรณ์ถ้าความเข้นข้นของแมกนีเซียมไม่เพียงพอ ในทางตรงกันข้ามถ้าความเข้มข้นของ

แมกนีเซียมมากเกินไป ก็จะไปลดความเที่ยงตรง (fidelity) ของเอนไซม์หรืออาจทำให้ได้ผลิตผลดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific amplification) (Blair and Zajdel, 1992)

3. สารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

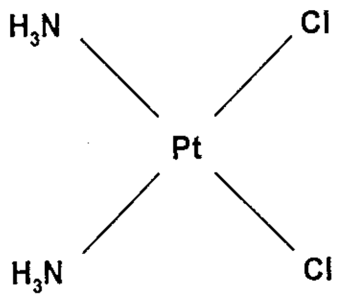
3.1 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

พลาตินัมเป็นโลหะทรานซิชัน (transition) ในหมู่ VIII b ที่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับลิแกนด์ (ligands) ต่าง ๆ ได้หลายชนิด พลาตินัมที่มีเลขออกซิเดชัน (oxidation number) เท่ากับ 2 จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับลิแกนด์ที่มีรูปทรงเรขาคณิตแบบระนาบจตุรัส (square planar) โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมบางชนิดแสดงในรูปที่ 4

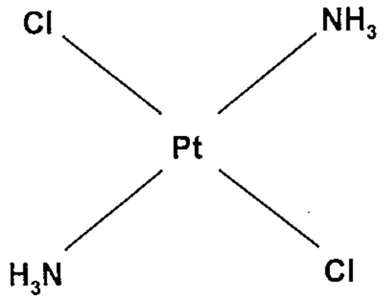
3.2 ประวัติ และความสำคัญของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

Rosenberg และคณะ (1965) พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมสามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ *E. coli* ในสนามไฟฟ้าจากกระบวนการอิเล็กโตรไลซิส (electrolysis) ที่ใช้พลาตินัมเป็นอิเล็กโตรด (platinum eletrode) ต่อมาพบว่าซิสพลาตินมีฤทธิ์ต่อต้านเซลล์ Sarcoma 180 และ L1210 Lukemia ในหนูถีบจักร จากการค้นพบสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมดังกล่าวได้มีการพัฒนาสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมเพื่อใช้เป็นยาในการบำบัดรักษาโรคมะเร็งมากขึ้น ซึ่งมีรายงานการนำยาซิสพลาตินมาใช้บำบัดมะเร็งลูกอัณฑะ มะเร็งรังไข่ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มะเร็งที่ส่วนศีรษะและคอ (Frei, 1985; Loehrer and Einhorn, 1984; Pratt, *et al.*, 1994) อย่างไรก็ตามในการใช้ยาชนิดนี้บำบัดมะเร็งก่อให้เกิดผลกระทบข้างเคียงขึ้น เช่น มีความเป็นพิษต่อไต ระบบทางเดินอาหาร และระบบประสาท เป็นต้น ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนายาสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับยาซิสพลาตินคือ คาร์โบพลาติน ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมรุ่นที่สองเป็นอนุพันธ์ของยาซิสพลาติน ปัจจุบันนิยมใช้คาร์โบพลาตินในรักษามะเร็งเพื่อลดอาการข้างเคียงดังกล่าว (Kelland, *et al.*,1992) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาเภสัชจลนพลศาสตร์

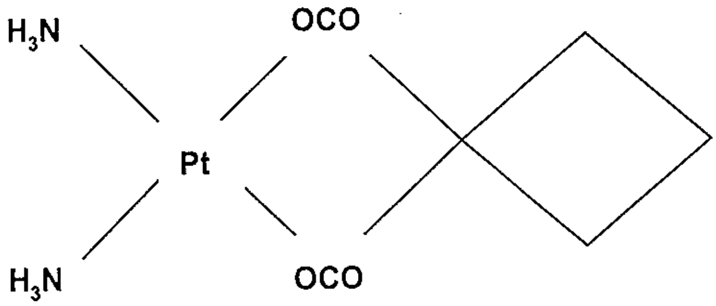
(pharmacokinetics) ของยาคาร์โบพลาตินและยาซิสพลาติน พบว่าคาร์โบพลาตินยังคงความเป็นพิษต่อไขกระดูก และอัตราการเกิดปฏิกิริยาภายในเซลล์มะเร็งของยาซิสพลาตินนั้นเร็วกว่าของยาคาร์โบพลาติน และพบว่าภายในระยะเวลา 24 ชั่งโมงหลังจากที่ผู้ป่วยโรคมะเร็งได้รับยาซิสพลาตินไปแล้วยาจะถูกขับออกทางยูเรียเพียงประมาณร้อยละ 30 ในขณะที่ยาคาร์โบพลาตินจะถูกขับออกทางยูเรียประมาณร้อยละ 60-70 (Pratt, *et al.*, 1994)



ซิสพลาติน



ทรานส์พลาติน



คาร์โบพลาติน

รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

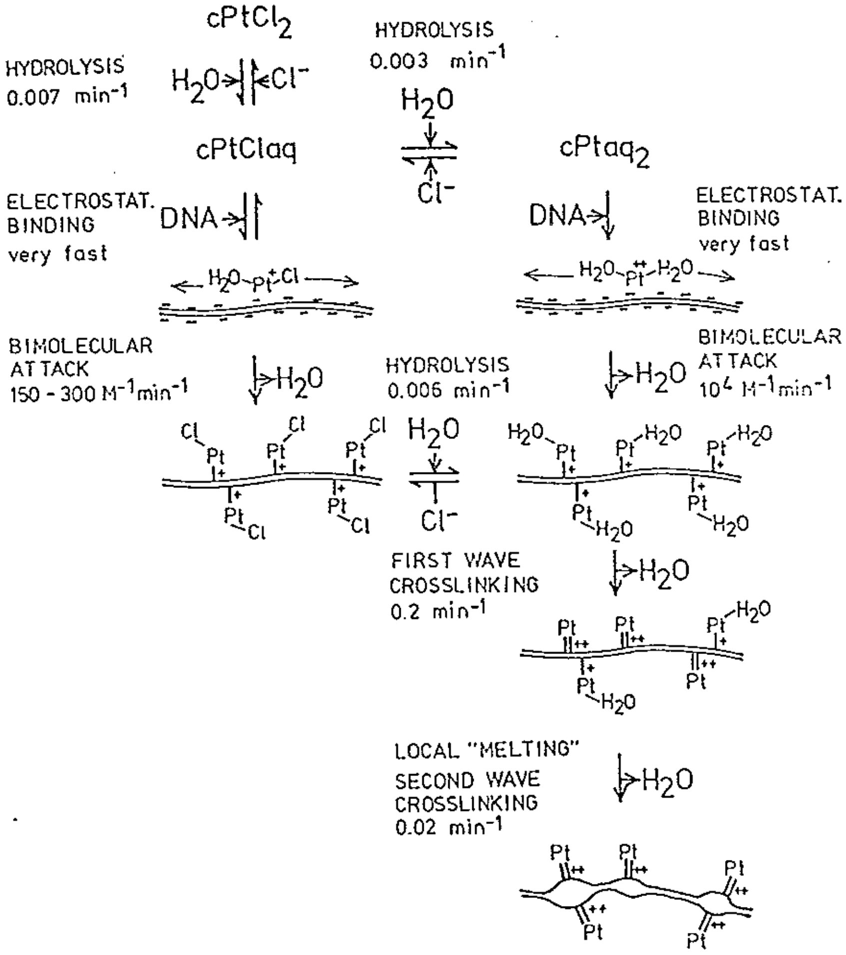
3.3 การเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมกับดีเอ็นเอ

3.3.1 จลนพลศาสตร์การเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมกับดีเอ็นเอ

ภายใต้สภาวะทางสรีระของร่างกายโดยปกติแล้วของเหลวภายนอกเซลล์ (extracellular fluid) จะมีความเข้มข้นคลอไรด์อิสระประมาณ 150 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ของเหลวภายในเซลล์ (intracellular fluid) มีความเข้มข้นคลอไรด์อิสระเพียง 3 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นเมื่อร่างกายได้รับยาซิสพลาตินเข้าไปจะเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โมเลกุลของน้ำจะเข้าแทนที่หมู่คลอไรด์ตัวแรกของซิสพลาตินด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 0.007 ต่อนาที ได้สารประกอบเชิงซ้อนโมโนอะควาคอมเพล็กซ์ [monoaqua complex, *cis*-diamminechloroaquaplatinum(II)] และมีค่าครึ่งชีวิตแรกเท่ากับ 2 ชั่วโมง แล้วจึงเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสต่อไป น้ำจะเข้าแทนที่หมู่คลอไรด์ตัวที่สองด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 0.003 ต่อนาที ได้เป็นไดอะควาคอมเพล็กซ์ [diaqua complex, *cis*-diamminediaquaplatinum(II)] (Appleton, 1984) ขึ้นภายในเซลล์ และยิ่งความเข้มข้นคลอไรด์ลดต่ำลงมาก ๆ จะทำให้ได้สารประกอบเชิงซ้อนไดอะควาคอมเพล็กซ์ จากนั้นไดอะควาคอมเพล็กซ์จะเกิดอันตรกิริยากับดีเอ็นเอ กลไกจลนพลศาสตร์ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมกับดีเอ็นเอแสดงในรูปที่ 5

3.3.2 ลักษณะการเกิดพันธะระหว่างอะตอมพลาตินัมของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมกับดีเอ็นเอ

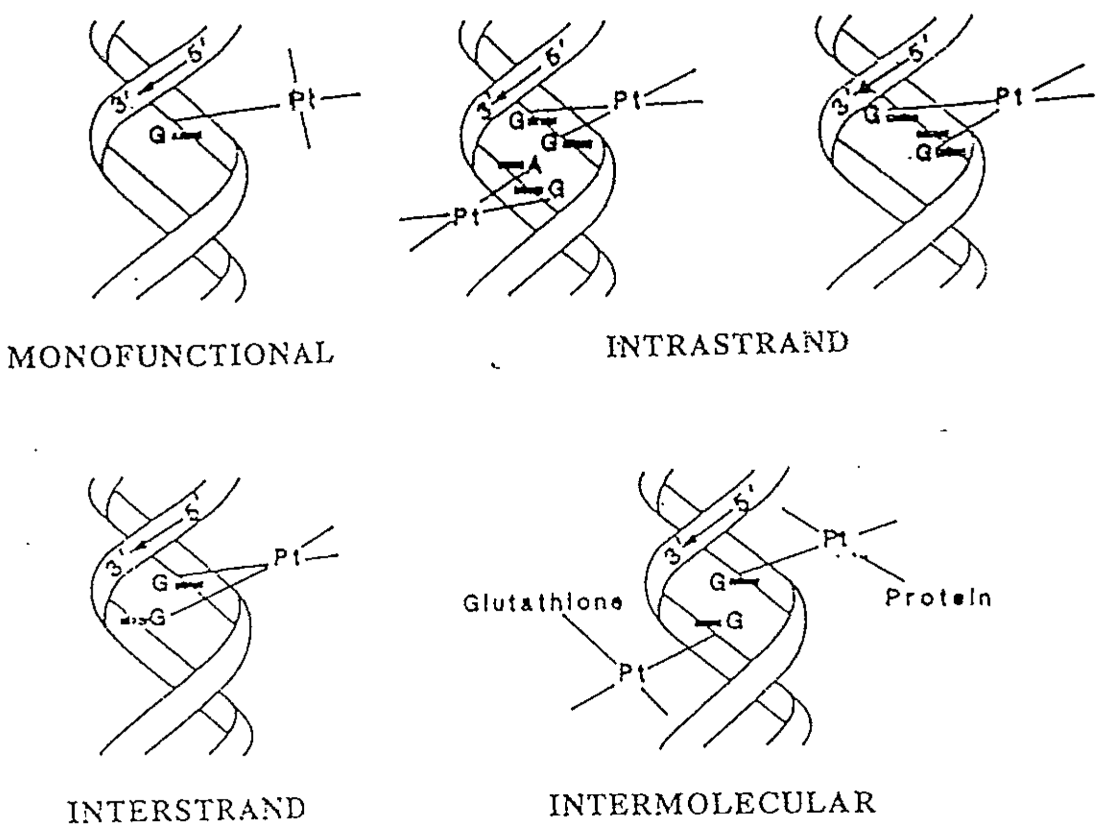
การเกิดอันตรกิริยาของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมกับดีเอ็นเอมี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเกิดโมโนฟังค์ชันนอลแอดดัค (monofunctional adduct) ขั้นตอนที่สองเกิดไบฟังค์ชันนอลแอดดัค (bifunctional adduct) การเกิดแอดดัคในขั้นตอนที่สองจะมีหลายรูปแบบดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 5 กลไกจลนพลศาสตร์ของซิสพลาตินที่เกิดอันตรกิริยากับดีเอ็นเอ เส้นขนานสองเส้นเป็นสัญญลักษณ์ที่ใช้แทนดีเอ็นเอ การเกิดโมโนฟังค์ชันนอลแอดดัคจากซิสพลาตินแสดงโดยการเกิดพันธะเดี่ยว และการเกิดไบฟังค์ชันนอลแอดดัคแสดงโดยใช้พันธะคู่ เครื่องหมาย – หมายถึงประจุลบ และเครื่องหมาย + หมายถึงประจุบวก

ที่มา : Holler (1993)

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY



รูปที่ 6 ลักษณะการเกิดพันธะระหว่างอะตอมพลาตินัมกับดีเอ็นเอ

3.3.2.1 อินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ เป็นการเกิดพันธะระหว่างอะตอมพลาตินัมกับดีเอ็นเอซึ่งอาจเกิดขึ้นที่ตำแหน่งของเบสกัวนีนกับเบสกัวนีน [d(GpG)] หรือ เบสกัวนีนกับเบสอะดีนีน [d(GpA)] ก็ได้ โดยอาจเกิดในลักษณะ 1,2 หรือ 1,3 อินตราสแตรนด์คลอสลิงค์ ภายในสายดีเอ็นเอเดียวกัน

3.3.2.2 อินเตอร์สแตรนด์ครอสลิงค์ เป็นการเกิดพันธะระหว่างอะตอมพลาตินัมกับดีเอ็นเอคนละสายที่อยู่ตรงกันข้ามกันซึ่งอาจเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง [d(GpG)] หรือ [d(GpA)] ก็ได้

3.3.2.3 อินเตอร์โมเลคูลาร์ครอสลิงค์ เป็นการเกิดพันธะระหว่างอะตอมพลาตินัมกับดีเอ็นเอสายใดสายหนึ่งกับเกิดพันธะกับโมเลกุลอื่น เช่น โปรตีน กลูตาไธโอน (glutathione) หรือ โมเลกุลขนาดใหญ่อื่น ๆ ภายในเซลล์

Eastman (1982) รายงานผลของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างซิสพลาตินกับเบสในดีเอ็นเอ พบว่าเกิดโมโนฟังค์ชันนอลแอดดัคที่ตำแหน่ง N3 ของเบสไซโตซีน ที่ตำแหน่ง N7 ของเบสกัวโนซีน ที่ตำแหน่ง N1 หรือ N7 ของเบสอะดีนีน และเกิดไบฟังค์ชันนอลแอดดัค ที่ตำแหน่ง N7 ของเบสกัวนีนกับกัวนีน ที่ตำแหน่ง N1 ของเบสอะดีนีนกับตำแหน่ง N7 ของเบสกัวนีน และที่ตำแหน่ง N7 ของเบสอะดีนีนกับ N7 ของเบสกัวนีน นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดไบฟังค์ชันนอลแอดดัคที่ตำแหน่ง N1 ของเบสกัวนีนกับที่ตำแหน่ง N7 ของเบสอะดีนีน และที่ตำแหน่ง N7 ของเบสอะดีนีนกับที่ตำแหน่ง N7 ของเบสกัวนีน และพบว่าอะตอมพลาตินัมสามารถเกิดพันธะกับเบสกัวนีนที่ตำแหน่ง N7 ได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นเบสอะดีนีนที่ตำแหน่ง N7 เบสอะดีนีนที่ตำแหน่ง N1 และเบสไซโตซีนที่ตำแหน่ง N3 ตามลำดับ โดยเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างอะตอมพลาตินัมกับอะตอมของไนโตรเจนที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวที่ตำแหน่งที่ N7 ของเบสกัวนีนหรือตำแหน่ง N1 ของเบสอะดีนีน อะตอมพลาตินัมยังสามารถเกิดพันธะกับอะตอมของออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวนของน้ำตาลได้ แต่โอกาสเกิดค่อนข้างน้อย (Lim and Martin, 1976) นอกจากนี้ยังพบว่าอะตอมพลาตินัมสามารถเกิดปฏิกิริยากับ 5′-ฟอสเฟต ($5'$-PO_4^{3-}) ได้เร็วกว่ากับ 3′-ฟอสเฟต ($3'$-PO_4^{3-}) (Bose, *et al.*,1986)

พันธะที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมพลาตินัมกับดีเอ็นเอสามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่นการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะ (restriction endonuclease) (Sklar, 1988 ; Scanlon, *et al.*, 1989) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนสเปกโทรสโคปี (nuclear magnetic resonance spectroscopy; NMR) (Eastman and Schulte, 1988) การเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส (electrophoretic gel mobility shift) (Donahue, *et al.*, 1990) เป็นต้น และพบว่ามากกว่าร้อยละ 90 ของพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมพลาตินัมกับดีเอ็นเอจะเกิดในลักษณะอินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ โดยเกิดในลักษณะ d(GpG) d(ApG) และ d(GpNpG) ร้อยละ 65 25 และ 6 ตามลำดับ (Eastman, 1986; Fichtinger-Schepman, *et al.*, 1987) นอกจากนี้จากการศึกษาโดยใช้เทคนิควิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunochemical analysis) พบว่าพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมพลาตินัมกับดีเอ็นเอจะเกิดในลักษณะอินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ในลักษณะ d(GpG) ประมาณร้อยละ 50-75 ของปริมาณดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นทั้ง

หมดในเซลล์เพาะเลี้ยง และจากการศึกษาการเกิดพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมพลาตินัมของยาคาร์โบพลาตินกับดีเอ็นเอ พบว่าหลังจากที่บ่มดีเอ็นเอด้วยยาคาร์โบพลาตินเป็นระยะเวลา 7-12 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอีไลซ่า (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) พบว่าดีเอ็นเอแอดดัคจะเกิดในลักษณะ d(GpG) ร้อยละ 30 d(ApG) ร้อยละ 16 และหลังจากบ่ม 12 ชั่วโมง พบว่าเกิดอินเตอร์ สแตรนครอสลิงค์ในลักษณะ d(GpG) ร้อยละ 10 อย่างไรก็ตามอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมพลาตินัมของยาคาร์โบพลาตินกับดีเอ็นเอจะเกิดช้ากว่าของซิสพลาติน และต้องใช้ปริมาณความเข้มข้นของยาคาร์โบพลาตินสูงกว่ายาซิสพลาตินถึง 230 เท่าที่จะทำให้เกิดดีเอ็นเอแอดดัคเท่ากันหลังจากบ่มไปแล้ว 4 ชั่วโมง (Blommaert, *et al.,* 1995) และจากรายงานการศึกษาเปรียบเทียบเภสัชจนลพลศาสตร์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เซลล์ L1210 (lymphosarcoma) CC531 (colonic carcinoma) และ COV413-B (human ovarian carcinoma) พบว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถนำยาคาร์โบพลาตินเข้าสู่เซลล์น้อยกว่าปริมาณการนำยาซิสพลาติน 1.5 - 3 เท่า และเมื่อบ่มเซลล์มะเร็งด้วยขนาดของยาซิสพลาตินหรือคาร์โบพลาตินในระดับที่เท่ากันพบว่าจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่เกิดจากยาคาร์โบ พลาตินมีปริมาณน้อยกว่าจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นจากยาซิสพลาติน 5 - 25 เท่า (Los, *et al.,* 1991)

4. ผลของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

Hoffmann และคณะ (1989) พบว่าซิสพลาตินมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของดีเอ็นเอสายเดี่ยวเอ็ม 13 (single-stranded M 13 phage DNA) ที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาติน

Los และคณะ (1991) ศึกษาผลยับยั้งของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็ง โดยติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ CC531 colonic carcinoma และ COV413-B human ovarian carcinoma ที่บ่มด้วยยาคาร์โพลาตินหรือยาซิสพลาตินด้วย ^{3}H thymidine พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงเหลือร้อยละ 50 เมื่อบ่มเซลล์ด้วยยาคาร์โบพลาตินที่มีปริมาณความเข้มข้นสูงกว่าปริมาณความเข้นของซิสพลาติน 16 - 69 เท่า

Ponti และคณะ (1991) ศึกษาผลของซิสพลาตินต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่าซิสพลาตินยับยั้งกระบวนการโพลีเมอไรเซชัน (polymerization) ของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ Murray และคณะ (1992) ได้นำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจหาตำแหน่งเบสที่ถูกยับยั้งในกระบวนการสังเคราะห์การสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาติน และพบว่าพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมพลาตินัมกับดีเอ็นเอจะเป็นแบบอินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ในลักษณะ d(GpG), d(ApG) หรือ d(GpA) และจากการศึกษาเปรียบเทียบตำแหน่งของเบสจำเพาะที่เกิดพันธะกับอะตอมพลาตินัมจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม 11 ชนิด ได้แก่ ซิสพลาติน คาร์โบพลาติน *cis*-dichlorobis(isopropylamine) platinum(II) *cis*-dichloro-trans-dihydroxybis(isopropylamine)platinum(IV) tetrachloro(1,2-diamminocyclohexane)platinum(IV)(RR isomer) *cis*-dichlorobis (isopropylamine)platinum(II)(RR isomer) dichloro(1,2-diaminocyclohexane) platinum(II)(RR isomer) dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II)(SS isomer) *cis*-bis(cyclohexylamine)dichloroplatinum(II) *cis*-dichlorobis (isopentylamine)platinum(II) ทรานส์พลาติน chloro(diethylenetriamine)platinum (II)chloride และ *cis*-diamminechloro(1-octyamine)platinum(II)chloride พบว่ามีเพียง 3 ชนิด ได้แก่ ทรานส์พลาติน chloro(diethylenetriamine)platinum(II)chloride และ *cis*-diamminechloro(1-octyamine)platinum(II)chloride ที่ยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในลักษณะที่แตกต่างจากซิสพลาติน (Murray, *et al.*,1997)

Holler และคณะ (1992) พบว่าโมโนฟังค์ชันนอลแอดดัคสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์คลีเนาว์แฟรกเมนท์ แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรสดีเอ็นเอโพลีเมอเรสอัลฟาของเซลล์ *Physarum polycephalum* และ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสอัลฟาของคาล์ฟไทมัส (calf thymus)

Comess และคณะ (1992) ศึกษาสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ยีนของฟาจเอ็ม 13 ที่ประกอบด้วยอินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ d(GpG) d(ApG) d(GpCpG) และ (GpCpG) โดยใช้เอนไซม์แบคเทอริโอฟาจทีเซเวนดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Bacteriophage T7 DNA polymerase) คลีเนาว์แฟรกเมนท์ และแบคเทอริโอฟาจทีโฟดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Bacteriophage T4 DNA polymerase) พบว่าที่ตำแหน่งดังกล่าวเอนไซม์เหล่านี้ไม่สามารถทำงานได้

Hoffmann และคณะ (1995) พบว่าดีเอ็นเอแอดดัคแบบอินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ที่เกิดจากซิสพลาตินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาล์ฟไทมัสดีเอ็นเอโพลีเมอเรส อัลฟา เดลตา และแอฟซีลอน (calf thymus DNA polymerase α δ and ε) แต่ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสเบต้า

Grimadi และคณะ (1994) ได้นำเทคนิค single strand ligation PCR มาวิเคราะห์หาตำแหน่งที่ซิสพลาตินเกิดอันตรกิริยากับยีน N-ras พบว่าอะตอมพลาตินัมเกิดพันธะในลักษณะ d(GpG) และ d(ApG) และจากการศึกษาด้วยเทคนิคเดียวกันนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าซิสพลาตินมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอบนสายดีเอ็นเอที่ถูกถอดรหัส (transcribed DNA strand) ได้ดีกว่าสายดีเอ็นเอที่ไม่ถูกถอดรหัส (nontranscribed DNA strand) (Bingham, *et al.*,1996)

Gac และคณะ (1998) พบว่าดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นในลักษณะ d(GpG) จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไวรอลดีเอ็นเอเฮลิเคส-ไพรเมส (viral DNA helicase-primase) ในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเฮอร์เปสซิมเพล็กซ์ไวรัส I รีเวิร์สทรานสคริฟเตส (herpes simplex virus type-1)

Suo และคณะ (1999) พบว่าซิสพลาตินที่เกิดอันตรกิริยากับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ในลักษณะ d(GpG) นอกจากมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเอนไซม์ทีเซเวนดีเอ็นเอโพลีเมอเรสแล้ว ยังมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เฮชไอวีวันรีเวิร์สทรานสคริพเตส (HIV-1 reverse transcriptase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์อาร์เอ็นเออีกด้วย

5. การเปลี่ยนแปลงโครงรูปดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

Butour และ Macquct (1978) ได้ศึกษาผลของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อการสอดแทรก (intercalation) ของเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ในสายดีเอ็นเอ โดยที่ดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นจะไปยับยั้งการสอดแทรกของเอธิเดียมโบรไมด์ส่งผลทำให้ความเข้มของเอธิเดียมโบรไมด์ลดลง

Inagaki และ Kidani (1980) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต และอุณหภูมิหลอมตัว (melting temperature) ของดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม พบว่าอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตรต่อการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ($\Delta A_{270}/\Delta A_{295}$) ของดีเอ็นเอที่เกิดพันธะกับอะตอมพลาตินัมสามารถนำมาใช้เป็นดัชนีบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของดีเอ็นเอได้ เนื่องจากดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตรเกิดจากการสูญเสีย base stacking ของดีเอ็นเอ และการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร เกิดจากการกระจายอิเล็กตรอนของเบสภายในสายดีเอ็นเอ โดยพบว่าอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่เกิดพันธะกับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่มีคุณสมบัติต้านมะเร็งจะมีค่าเท่ากับ 2 ในขณะที่อัตราส่วนของการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่เกิดพันธะสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ไม่มีคุณสมบัติต้านมะเร็งจะมีค่าเท่ากับ 1

นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอจากรูปที่ขดพันตัวเองไปเป็นรูปคลายตัวเป็นวง โดยศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดพันธะกับอะตอมพลาตินัมบนเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส เมื่อปริมาณของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมเพิ่มมากขึ้น พลาสมิดดีเอ็นเอเกิดการคลายเกลียวทำให้การเคลื่อนที่บนเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสช้าลง และจะช้าลงจนกระทั่งเท่ากับการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปคลายตัวเป็นวง (Cohen, *et al.*, 1979; Cohen, *et al.*, 1980; Ushay, *et al.*, 1981; Zhang, *et al.*, 1992)

Bellon (1991) ศึกษาการคลายเกลียวของดีเอ็นเอซึ่งเกิดพันธะกับซิสพลาตินในลักษณะอินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ โดยนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาดต่าง ๆ มาทำปฏิกิริยากับซิสพลาติน แล้วนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินบนโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอเรซิส พบว่าพันธะระหว่างอะตอมพลาตินัมกับดีเอ็นเอในลักษณะ d(GpG) และ d(ApG) มีระดับการคลายเกลียวไป 13 องศา และในลักษณะ d(GpTpG) มีระดับการคลายเคลียวไป 23 องศา

Keck และ Lippard (1992) ศึกษาระดับการคลายเกลียวของพลาสมิดดีเอ็นเอเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม โดยอาศัยเทคนิคการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิด *cis*-$[(Pt(NH_3)_2(N8\text{-}Etd)\ Cl]^{2+}$, *cis*-$[Pt(NH_3)_2(N3\text{-}Etd)Cl]^{2+}$, *cis*-$[Pt(NH_3)_2(N8\text{-}Etd)Cl_2]^{+}$, *cis*-$[Pt(NH_3)(N3\text{-}Etd)Cl_2]^{+}$, *trans*-$[Pt(NH_3)_2(N8\text{-}Etd)$

$Cl]^{2+}$, $Pt(malonate)(NH_3)]_2H_2N(CH_2)_4NH_2$, *trans*-[Pt $Cl((NH_3)_2)_2H_2N(CH_2)_2]Cl_2$, cisplatin และ transplatin] ทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอคลายเคลียวได้ 6-19 องศา และการคลายเกลียวที่เกิดจากโมโนฟังค์ชันนอลแอดดัคมีโอกาสเกิดขึ้นน้อยกว่าการคลายเกลียวที่เกิดจากไบฟังค์ชันนอลแอดดัค

นอกจากนี้มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอเนื่องจากซิสพลาตินของผลึก DNA dodecamer duplex ซึ่งเกิดดีเอ็นเอแอดดัคในลักษณะ d(GpG) อยู่หนึ่งตำแหน่ง โดยใช้เทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (x-ray diffraction) พบว่าโครงสร้างของผลึกดีเอ็นเอเมื่ออยู่ในสารละลายเกิดการโค้งงอ 39-55 องศา และคลายเกลียว 78 องศา นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างของดีเอ็นเอแบบ B จะเปลี่ยนกลับเป็นแบบ A (Gelasco and Lippard, 1998; Takahara, *et al.*, 1995)

Boudvillan และคณะ (1995) พบว่ามุมของการคลายเกลียวและการโค้งงอของดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับทรานส์พลาตินแบบ 1,3 อินตราสแตรนด์ครอสลิงค์มีค่าเท่ากับ 16 และ 45 องศาเซลเซียส

Coste และคณะ (1999) พบว่าโครงสร้างผลึกของ DNA dodecamer duplex ที่เกิดพันธะกับอะตอมพลาตินัมในลักษณะอินเตอร์สแตรนด์ครอสลิงค์ ทำให้ดีเอ็นเอเกิดการโค้งงอ 47 องศา และเกิดการคลายเกลียวไป 70 องศา

ถึงแม้ว่าซิสพลาตินจะให้ผลรักษามะเร็งได้หลายชนิดก็ตาม แต่ทรานส์พลาตินซึ่งเป็นไอโซเมอร์ของซิสพลาติน มีสูตรโมเลกุลเหมือนกับซิสพลาตินแต่มีโครงสร้างทางสเตอริโอเคมี (stereochemistry) แตกต่างกันกลับไม่ให้ผลในการรักษามะเร็ง การศึกษาในหลอดทดลองสามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างระหว่างทรานส์พลาตินและซิสพลาตินได้หลายประการ เช่น ทรานส์พลาตินให้ผลยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอน้อยกว่าซิสพลาติน (Harder and Rosenber, 1970) และพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างทรานส์พลาตินกับดีเอ็นเอมีความแตกต่างไปจากซิสพลาตินโดยพบว่าดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะเกิดแบบ 1,3-อินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ในลักษณะ d(GpNpG) d(ApNpG) และ d(GpNpC) (van der Veer, *et al.*, 1986; Lippard and Pinto, 1985; Eastman, *et al.*, 1986) นอกจากนี้ยังพบว่าภายในเซลล์มีกลไกซ่อมแซมพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างทรานส์พลาตินกับดีเอ็นเอได้ดีกว่าซิสพลาติน (sherman and Lippard,1987) อย่างไรก็ตามแม้ว่ายาคาร์โบพลาตินจะมี

สูตรโครงสร้างที่แตกต่างไปจากซิสพลาติน แต่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งซึ่งทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อยาคาร์โบพลาตินเข้าสู่ร่างกายแล้วยาจะอยู่ในรูปไดอะควาคอมเพล็กซ์คล้ายกับซิสพลาติน และพร้อมที่จะเกิดอันตรกิริยากับดีเอ็นเอภายในเซลล์ได้ถึงแม้ว่าความไวในการเกิดอันตรกิริยาจะช้ากว่าของซิสพลาตินก็ตาม แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างทางสเตอริโอเคมีของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมมีบทบาทต่อการออกฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้แตกต่างกันไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง
2. ศึกษาหาปริมาณอะตอมพลาตินัมที่เกิดพันธะกับพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเออันเนื่องมาจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม
4. ศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะต่อดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมและพลาสมิดดีเอ็นเอ

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ทราบปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่มีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ
2. ทราบอัตราเร็วของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่เกิดอันตรกิริยากับพลาสมิดดีเอ็นเอและการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอ
3. สามารถคาดคะเนตำแหน่งของเบสบนสายดีเอ็นเอที่อะตอมพลาตินัมเกิดพันธะกับพลาสมิดดีเอ็นเอ
4. โครงสร้างทางสเตอริโอเคมีของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่แตกต่างกันมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การเปลี่ยนแปลงโครงรูปพลาสมิดดีเอ็นเอ และการทำงานของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะไม่เท่ากัน

5. เป็นแนวทางในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างดีเอ็นเอกับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมชนิดใหม่ ๆ ที่สังเคราะห์ขึ้น

6. เป็นแนวทางในการพัฒนายาต้านมะเร็งประเภทสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมในอนาคต

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. จุลินทรีย์

E. coli สายพันธุ์ DH5α มีลักษณะ genotype : F^{-} φ 80 d *lac* Z Δ M 15 Δ (*lac* ZYA-*arg* F) U 169 *deo* R *rec*A 1 *end*A 1 *hsd*R 17 (r_k^- , m_k^+) *pho* A *sup*E 44 thi-1 *gyr*A 96 relA1 จากบริษัท Life technologies

2. พลาสมิดดีเอ็นเอ (ภาคผนวก ก)

พลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 (pUC 19 plasmid DNA) จากบริษัท New England Biolabs

3. อาหารเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ DH5α และ transformed *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

อาหารเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ได้แก่ Luria-Bertani (LB)(ภาคผนวก ข) และอาหารเลี้ยง transformed *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ได้แก่ LB ที่เติมแอมพิซิลลิน (ampicillin) เข้มข้น 50 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

4. สารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมจากบริษัท Sigma ได้แก่

4.1 ซิสพลาติน [*cis*-diamminedichloroplatinum (II), cisplatin]

4.2 ทรานส์พลาติน [*trans*-diamminedichloroplatinum (II), transplatin]

4.3 คาร์โบพลาติน [*cis*-diammine (1,1- cyclobutyldicarboxylato) platinum (II), carboplatin]

5. เอนไซม์

5.1 เอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะ (restriction endonucleases)

5.1.1 เอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะที่สามารถตัดพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 ได้หนึ่งตำแหน่งได้แก่ *Bam*H I *Eco*R I และ *Hin*d III จากบริษัท New England Biolabs

5.1.2 เอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะที่สามารถตัดพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 ได้สองตำแหน่งได้แก่ *Pvu* II จากบริษัท New England Biolabs

5.1.3 เอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะที่สามารถตัดพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 ได้มากกว่าสองตำแหน่งได้ *Hpa* II จากบริษัท Stratagene

5.2 เอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) จากบริษัท Gibco BRL®

5.3 เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) จากบริษัท Sigma

6. ไพรเมอร์ (คัดเลือกโดยการสุ่มจากลำดับเบสบนดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19) จาก บริษัท Gibco BRL® มีสองประเภทดังนี้

6.1 ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (Forward primer) ได้แก่

F_{929} : 5′-gaa acc cga cag cag gac tat aaa g-3′

F_{1078} : 5′-gta tct cag ttc ggt gta ggt cgt-3′

F_{2413} : 5′-ggg tga gca aaa aca gga agg c-3′

6.2 รีเวิร์สไพรเมอร์ (Reverse primer) ได้แก่

R_{2407} : 5′-cgc tgg tga aag taa aag atg c-3′

R_{2070} : 5′-ctg cgg cca act tac ttc tga caa c-3′

R_{348} : 5′-ccc aac tta atc gcc ttg cag c-3′

7. ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxyribonucleotidetriphosphate; dNTP) จากบริษัท Promega ได้แก่

7.1 ดีออกซีกัวโนซีน 5′ ไตรฟอสเฟต (deoxyguanosine 5′-triphosphate; dGTP)

7.2 ดีออกซีอะดีโนซีน 5′ ไตรฟอสเฟต (deoxyadenosine 5′-triphosphate; dATP)

7.3 ดีออกซีไซติดีน 5′ ไตรฟอสเฟต (deoxycytidine 5′-triphosphate; dCTP)

7.4 ดีออกซีไทมิดีน 5′ ไตรฟอสเฟต (deoxythymidine 5′-triphosphate; dTTP)

8. ผงอะกาโรส (agarose) (เกรดอิเล็กโตรฟอเรซิส) จากบริษัท Promega

9. สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) (ภาคผนวก ค)

10. สารเคมีอื่น ๆ

10.1 สารเคมี (เกรดวิเคราะห์) สำหรับเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (tris-HCl) อีดีทีเอ (EDTA; disodiumethylenediamine tetraacetate) ไตรตอนเอ็กซ์-100 (triton x-100) โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) ไอโซโพรพานอล (isopropanol) เอธานอล (ethanol)

10.2 สารเคมี (เกรดวิเคราะห์) สำหรับวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรฟอเรซิส ได้แก่ กรดบอริค (boric acid) โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) ทริส-เบส (tris-base) กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ซูโครส (sucrose) และเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) อีดีทีเอ

อุปกรณ์

1. อ่างอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส (Agarose gel electrophoresis chamber) รุ่น EC 370 บริษัท E-C Apparatur ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (Power supply) รุ่น EC 135 บริษัท E-C Apparatur ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Spectrophotometer) รุ่น Genesis 5 บริษัท Spectronic ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. เครื่องอัตโนมัติพีซีอาร์ (PCR automation)
   รุ่น GeneAmp 9600 บริษัท Perkin – Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา

5. เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated microcentrifuge)
   รุ่น Kubota 1910 บริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น

6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
   รุ่น KB 5260 บริษัท Termaks ประเทศนอร์เวย์

7. อ่างเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ (Shaking bath)
   รุ่น SBO 50 BIO บริษัท Heto lab Equipment ประเทศสหรัฐอเมริกา

8. ตู้แช่แข็ง –86 องศาเซลเซียส (Deep freezer)
   รุ่น 938 บริษัท Forma Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

9. ตู้แช่แข็ง –20 องศาเซลเซียส (freezer)
   รุ่น Hotpack บริษัท Forma Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

10. เครื่องวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ (Gel documentation)
    รุ่น 1000 บริษัท BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา

11. เครื่อง Densitometer
    รุ่น 700 บริษัท BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา

12. เครื่องวิเคราะห์ธาตุไอซีพีแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Inductively coupled plasma / mass spectrometer; ICP/MS)
    รุ่น ultraMass 700 บริษัท Varian ประเทศออสเตรเลีย

13. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) รุ่น HA-3D บริษัท Hirayama ประเทศญี่ปุ่น

วิธีการ

1. การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 (Sambrook, *et al.*, 1989)

1.1 การเตรียมเซลล์ให้อยู่ในสภาพพร้อมรับดีเอ็นเอจากภายนอกเซลล์ (competent *E.coli*)

นำเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α จากโคโลนีเดียว 1 โคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB 10 มิลลิลิตร เขย่าเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาหนึ่งคืนจากนั้นนำมาเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ (subculture) โดยเทน้ำเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว LB 100 มิลลิลิตร เขย่าเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที ติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร (OD_{610}) ประมาณ 0.5-0.6

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ 10 มิลลิลิตรมาเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000×g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาทำเป็นสารละลายแขวนลอยโดยเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้นข้น 50 มิลลิโมลาร์ที่เย็น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000×g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนของเซลล์มาเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ที่เย็น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจะได้ competent *E. coli* และเก็บเซลล์ไว้ในที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส หรือนำ competent *E. coli* ไปใช้ในการถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

1.2 การถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ (transformation of plasmid DNA)

นำ competent *E. coli* 200 ไมโครลิตร มาผสมด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 1 ไมโครกรัม แล้วแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ

42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นนำมาทำให้เย็นลงทันทีโดยวางสารละลายไว้บนน้ำแข็ง เติมอาหารเหลว LB 800 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นำ *E. coli* มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง สังเกต transformed cell จากโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งดังกล่าว และเก็บโคโลนีไว้เพื่อทำการเพิ่มขยายปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

1.3 การเพิ่มขยายปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ

นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB 2 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 1 คืน แล้วทำการเพิ่มปริมาณเซลล์โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงสู่อาหารเหลว LB 50 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร เขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จะได้น้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี transformed cell ประมาณ 10^{8} เซลล์ /มิลลิลิตร

1.4 การเก็บเกี่ยว transformed cell (harvesting)

นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาแบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000×g เป็นเวลา 30 วินาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนเซลล์ไว้เพื่อทำการแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นตอนถัดไป

1.5 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

นำตะกอนเซลล์มาทำให้เป็นเซลล์แขวนลอยด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ STET (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค) 350 ไมโครลิตร ย่อยผนังเซลล์ด้วยสารละลายไลโซไซม์ 25 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000×g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ และเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตดเข้มข้น 2.5 โมลาร์ พีเอช 5.2 40 ไมโครลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย

ไอโซโพรพานอล 420 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอลร้อยละ 70 1 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000×g เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งอีกครั้ง และทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8 (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค) เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ในการทดลองในขั้นตอนถัดไป

1.6 การวัดหาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี (Spectrophotometry) (Sambrook, *et al.*, 1989)

วิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอโดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 1.5 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 100 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) คำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ที่ได้คูณกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร (ค่า OD_{260} เท่ากับ 1 หมายถึง ในสารละลายมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอสายคู่เท่ากับ 50 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

วิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอโดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 1.5 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 100 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ หาอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{260} / OD_{280}) ถ้าค่าอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 1.65 - 1.85 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้บริสุทธิ์

1.7 การศึกษาคุณลักษณะของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส

เตรียมอะกาโรสเจลร้อยละ 1 โดยนำผงอะกาโร 0.4 กรัม ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ TBE (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค) 40 ไมโครลิตร นำไปหลอมละลายด้วยไมโครเวฟ ตั้งสารละลายอะกาโรสไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุณหภูมิของสารละลาย

อะกาโรสลดลงถึง 50 องศาเซลเซียส นำสารละลายอะกาโรสไปเทลงในอุปกรณ์หล่อเจลที่เตรียมไว้เรียบร้อย รอให้สารละลายอะกาโรสแข็งตัวกลายเป็นเจล นำเจลไปใส่ในอ่างอิเล็กโตรฟอเรซิส เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ลงในอ่างที่มีเจลอยู่ โดยให้ระดับของสารละลายบัฟเฟอร์อยู่เหนือผิวเจลเล็กน้อย นำสารตัวอย่างดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอแอดดัคมาผสมด้วย 6× gel loading buffer (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค) ให้เข้ากันแล้วนำไปหยดลงในหลุมบน อะกาโรสเจลที่แช่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ในอ่างอิเล็กโตรฟอเรซิส ให้ความต่างศักย์ขนาด 80 โวลต์ เป็นเวลา 100 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 30 นาที ตรวจวิเคราะห์การเคลื่อนของแถบดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอแอดดัคบนอะกาโรสเจลโดยการส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

2. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (ดัดแปลงจาก Jennerwein and Eastman, 1992)

2.1 การเตรียมดีเอ็นเอแม่พิมพ์

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 1.5 มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะ *Eco*R I ตามวิธีการในหัวข้อ 10 จะได้ดีเอ็นเอในรูปเชิงเส้น แล้วตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเอธานอลบริสุทธิ์ ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี ตามวิธีการในข้อ 1.6

2.2 สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

นำดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเชิงเส้นที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร นำหลอดปฏิกิริยาผสมที่ได้มาวางลงบนบล็อคของเครื่องอัตโนมัติพีซีอาร์ และตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ (thermal cycling) ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

Component	**Volume (μ l) / reaction**	**Final concentration**
1. double distilled water	13.5	-
2. PCR buffer	5	1X PCR buffer
3. $MgCl_2$	4	2 mM $MgCl_2$
4. dNTP	5	0.2 mM dNTP
5. Taq DNA polymerase	2.5	2.5 U Taq DNA polymerase
6. F-primer	5	100 pmol F-primer
7. R-primer	5	100 pmol R-primer
8. linear pUC 19 DNA template	10	100 ng linear pUC 19 DNA template
Total volume	50 μ l	

ตารางที่ 5 สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

Time & Temperature				
Initial Step	**Each of 25 cycles**			**Final Step**
	Melt	**Anneal**	**Extend**	
4 min 94 ^{O}C 1 cycle	1 min 94^{O}C	2 min 55^{O}C	2 min 72^{O}C	10 min 4^{O}C

2.3 การตรวจหาผลิตผลพีซีอาร์ (PCR products)

นำผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร สังเกตแถบผลิตผลพีซีอาร์จากการใช้

ไพรเมอร์ F_{929} และ R_{2407} (ขนาด 1478 คู่เบส) ไพรเมอร์ F_{1078} และ R_{2070} (ขนาด 992 คู่เบส) ไพรเมอร์ F_{2413} และ R_{348} (ขนาด 621 คู่เบส) โดยเปรียบเทียบกับแถบของ DNA marker

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ (Multiplex Polymerase Chain Reaction)

นำดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่อยู่ในรูปเชิงเส้นซึ่งเตรียมได้จากข้อ 2.1 ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 6 ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร นำหลอดปฏิกิริยาผสมที่ได้มาวางลงบนบล็อคของเครื่องอัติโนมัติพีซีอาร์ และตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์

Component	Volume (μl) / reaction	Final concentration
1. double distilled water	3.5	-
2. PCR buffer	5	1X PCR buffer
3. $MgCl_2$	4	2 mM $MgCl_2$
4. dNTP	5	0.2 mM dNTP
5. Taq DNA polymerase	2.5	2.5 U Taq DNA polymerase
6. F_{2413}-primer	5	100 pmol F_{2413}-primer
7. F_{929}-primer	5	100 pmol F_{929}-primer
8. R_{348}-primer	5	100 pmol R_{348}-primer
9. R_{2407}-primer	5	100 pmol R_{2407}-primer
10. linear pUC 19 DNA template	10	100 ng linear pUC 19 DNA template
Total volume	50 μl	

4. การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

4.1 การศึกษาผลของอัตราส่วนโมลระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมกับนิวคลีโอไทด์

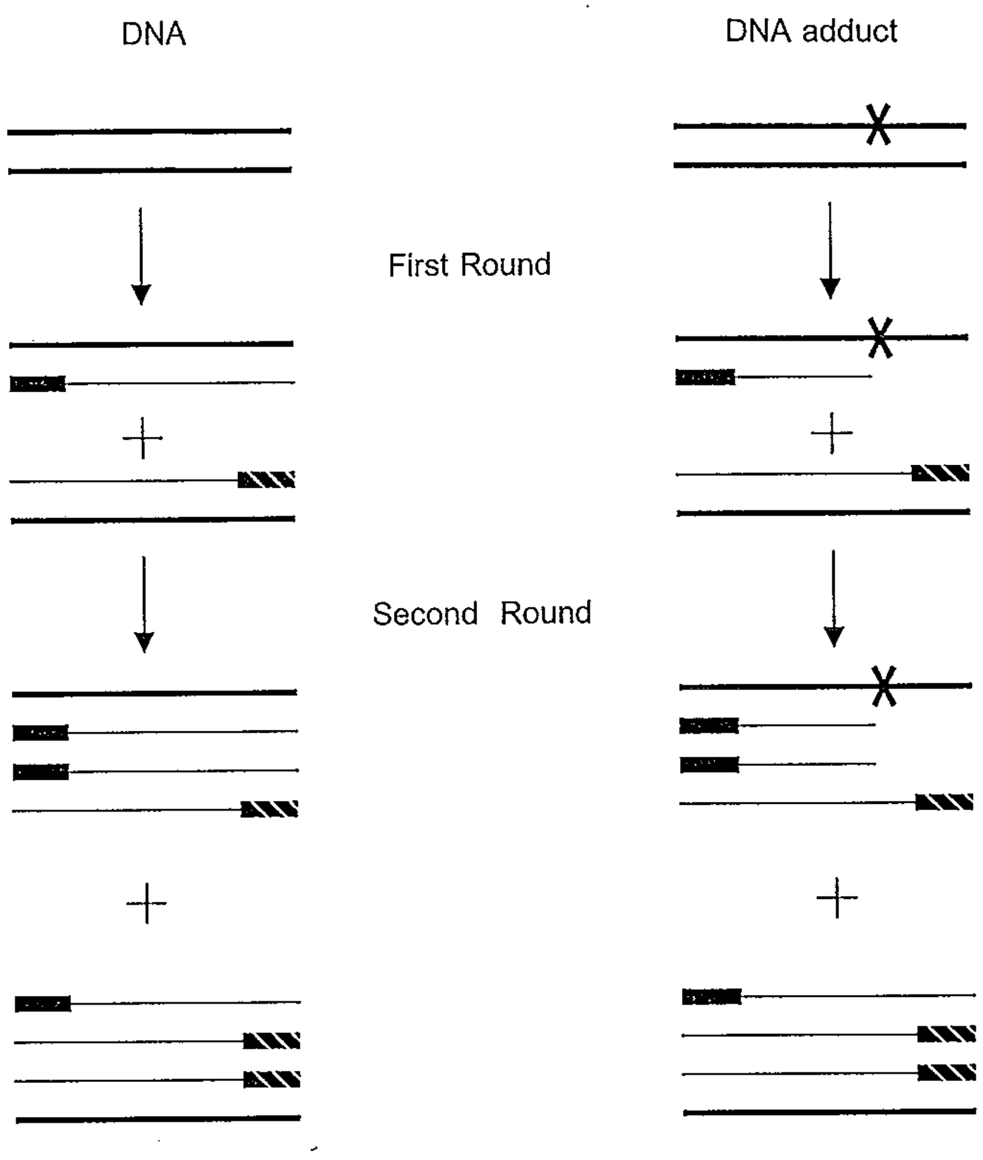
นำดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเชิงเส้น 0.2 ไมโครกรัมซึ่งเตรียมได้จากข้อ 2.1 มาบ่มด้วยสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติพีซีอาร์ตามวิธีการในข้อ 2 และ ข้อ 3

4.2 การศึกษาผลของระยะเวลาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมและนิวคลีโอไทด์

นำดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปคลายตัวเป็นเส้น 0.2 ไมโครกรัม ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 2.1 มาบ่มด้วยสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่อัตราส่วนโมลเท่ากับ 0.1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด ที่เวลาต่าง ๆ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีพีซีอาร์ตามวิธีการในข้อ 2

4.3 การหาปริมาณอะตอมที่เกิดพันธะกับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Quantitative Polymerase Chain Reaction (QPCR)

นำผลิตผลพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร มาแยกบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส ตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่ต้องการโดยการย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และวิเคราะห์หาปริมาณของดีเอ็นเอโดยการสแกนบน BIO RAD Molecular Imager เนื่องจากดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ส่งผลให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอลดลง (รูปที่ 7) ในกรณีนี้ดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นเป็นแบบ ramdom distribution ดังนั้นการคำนวณจำนวนอะตอมพลาตินัมที่เกิดต่อหนึ่งสายดีเอ็นเอสามารถคำนวณได้จากสมการ Poisson equation (Houten, *et al.*, 1992) ดังนี้



รูปที่ 7 การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (x คือตำแหน่งที่เกิดดีเอ็นเอแอดดัค)

ที่มา : Houten และคณะ (1992)

$$S = -\ln (Ad/A)$$

S คือจำนวนอะตอมพลาตินัมต่อดีเอ็นเอ (Pt atom / DNA)

Ad คือค่าความเข้ม (optical density) ของแถบผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแอดดัคบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส

A คือค่าความเข้ม (optical density) ของแถบผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอที่ไม่ได้เกิดพันธะกับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

ปริมาณดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการใช้ดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เทียบกับปริมาณการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอปกติเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ซึ่งคำนวณได้ดังจากสมการดังต่อไปนี้

ปริมาณการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA synthesis ,%) = (Ad/A) x 100

Ad คือค่าความเข้ม (optical density) ของแถบผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแอดดัคบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส

A คือค่าความเข้ม (optical density) ของแถบผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอที่ไม่ได้เกิดพันธะกับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส

5. การหาปริมาณอะตอมพลาตินัมที่เกิดพันธะกับดีเอ็นเอด้วยวิธี ไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี (Inductively Coupled Plama / Mass Spectrometry, ICP/MS)

นำสารละลายดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอแอดดัคที่ได้จากข้อ 6.1 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 300 - 1 : 2000 วัดหาปริมาณอะตอมพลาตินัมด้วยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี เมื่อสารละลายตัวอย่างเข้าไปสู่เครื่องวิเคราะห์ ICP/MS สารละลายตัวอย่างจะถูกเปลี่ยนให้เป็นละอองลอย (aerosol) โดยขบวนการ

nebulization และเดินทางเข้าสู่พลาสมา โดยตั้งโปรแกรมให้เครื่องนำสารละลายตัวอย่าง (nebulizer flow) ผ่านเข้าสู่ทอร์ช (torch) ด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 0.7 ลิตร / นาที อัตราการไหลของพลาสมา (plasma flow) เท่ากับ 15.5 ลิตร / นาที อัตราการไหลของแก๊สอาร์กอน (auxillary flow) เท่ากับ 1.30 ลิตร / นาที เมื่อสารละลายตัวอย่างเข้าสู่พลาสมา พลาสมาจะกระตุ้นอะตอมของพลาตินัมให้แตกเป็นไอออน และผ่านเข้าสู่ส่วนที่เรียกว่า MS interface ผ่านไปยังส่วน ion transfer optic และ quadrupole mass analyzer ซึ่งเป็นส่วนที่คัดเลือกมวลของสารที่สนใจ ภายในเวลา 100 ไมโครวินาที ภายใต้ระยะเวลาเดียวกันนี้เครื่องจะวิเคราะห์หามวลของพลาตินัมซ้ำกัน 7 ครั้ง และในแต่ละครั้งจะมีการสแกนมวลของพลาตินัม 25 ครั้ง โดยตัวตรวจ (detector) จะนับข้อมูลแล้วส่งข้อมูลออกมาเป็นความเข้มข้นของธาตุที่สนใจไปยังหน่วยประมวลผลซึ่งทำหน้าที่แปลงข้อมูลโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำไว้แล้ว

6. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

6.1 การศึกษาผลของอัตราส่วนโมลาร์ต่ออันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมกับนิวคลีโอไทด์

นำดีเอ็นเอ 10 ไมโครกรัมมาบ่มกับสารละลาย ซิสพลาติน ทรานส์พลาติน หรือคาร์โบพลาติน เข้มข้น 1.5-3000 ไมโครโมลาร์ ในอัตราส่วนโมลาร์ (molar ratio) ต่าง ๆ ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ บ่มปฏิกิริยาไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายดีเอ็นเอแอดดัคมาตกตะกอนใหม่ด้วยเอธานอลบริสุทธิ์ ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำสารละลายดีเอ็นเอแอดดัคไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสดังข้อ 1.7

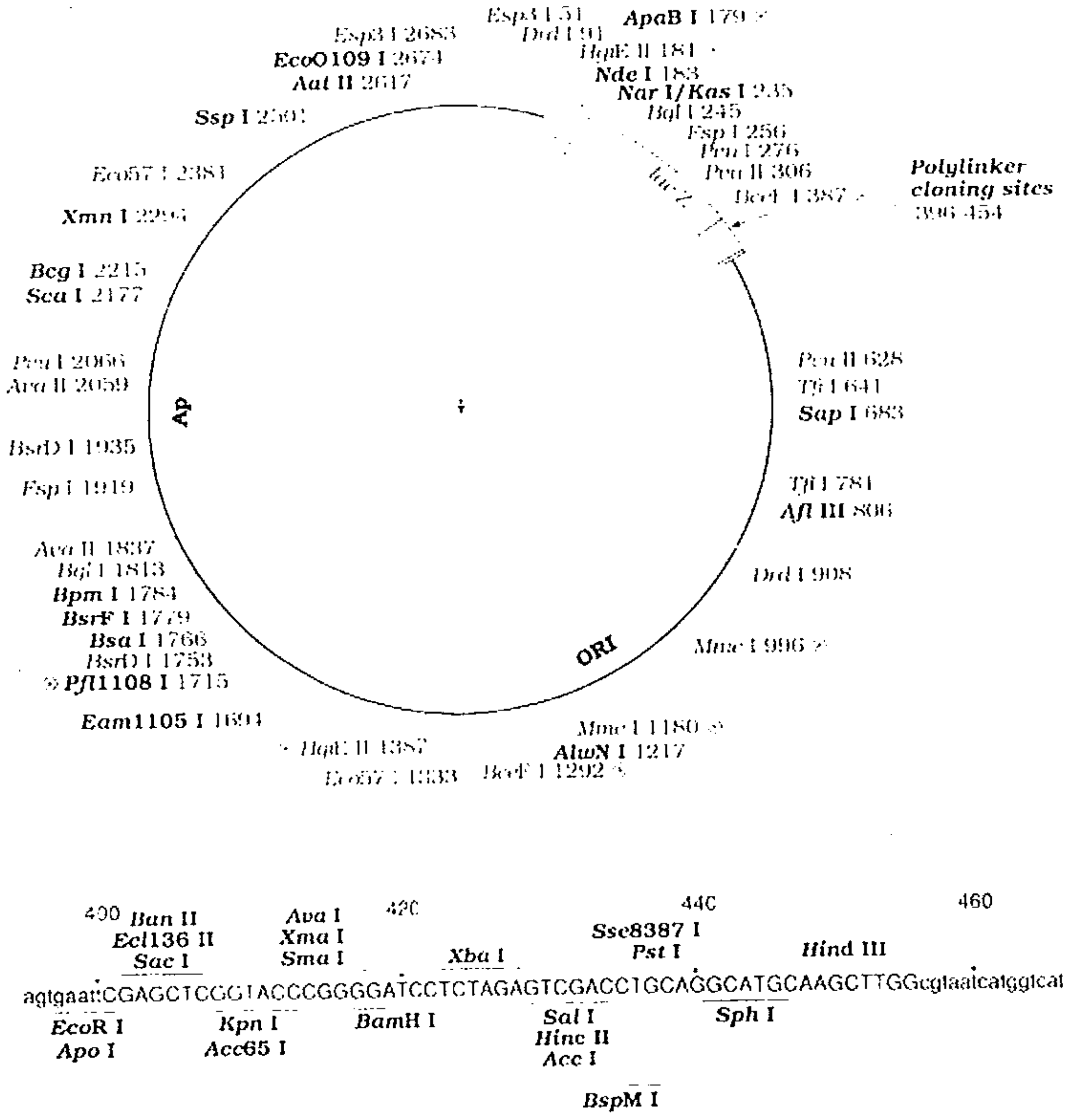
6.2 การศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่มต่ออันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมและนิวคลีโอไทด์

นำสารละลายดีเอ็นเอแอดดัคที่มีอัตราส่วนโมลาร์ของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 0.1 มาศึกษาระยะเวลาการบ่ม โดยให้ระยะเวลาบ่ม 0, 0.5, 2, 4, 6, 8, 16 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตกตะกอนดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเอธานอลบริสุทธิ์ ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำสารละลายดีเอ็นเอแอดดัคไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสดังข้อ 1.7

7. การศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะต่อดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมและพลาสมิดดีเอ็นเอ

นำสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์ต่าง ๆ จากข้อ 6.1 1 ไมโครกรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะ (ภาคผนวก ข) 2 ไมโครลิตร แล้วเติมเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะ 2.5 ยูนิต โดยใช้เอนไซม์ที่สามารถย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอได้หนึ่งตำแหน่งได้แก่ เอนไซม์ *Bam*H I *Eco*R I และ *Hind* III หรือเอนไซม์ที่สามารถย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอได้สองตำแหน่งได้แก่ เอนไซม์ *Pvu* II หรือเอนไซม์ที่สามารถย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอได้สิบสามตำแหน่งได้แก่ เอนไซม์ *Hpa* II ชนิดใดชนิดหนึ่งในแต่ละปฏิกิริยา ปรับปริมาตรรวมให้ได้เท่ากับ 20 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 6x gel loading buffer นำสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสดังข้อ 1.7

ชนิดและตำแหน่งของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะที่ย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 สามารถศึกษาจากรูปที่ 8 และตารางผนวกที่ 1



รูปที่ 8 แผนผังและตำแหน่งของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะชนิดต่าง ๆ ของพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 (http : //www.photoscience.la.asu.edu/)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

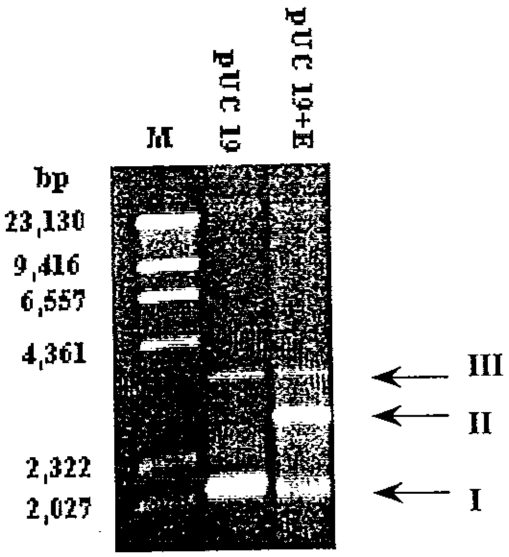
1. การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ

พลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 เป็นดีเอ็นเอที่มีขนาด 2,686 คู่เบส และมีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะมากมายดังแสดงในรูปที่ 8 ผลการสกัดดีเอ็นเอพบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 มีโครงรูป 2 แบบ คือ รูปที่ขดพันตัวเองหรือแถบดีเอ็นเอรูป I และรูปที่คลายตัวเป็นวง หรือแถบดีเอ็นเอรูป III (รูปที่ 9) จากการวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์พบปริมาณของพลาสมิดดีเอ็นเอในรูป I มีประมาณร้อยละ 90 และเมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*R I ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 ได้เพียงหนึ่งตำแหน่งทำให้พลาสมิดดีเอ็นเออยู่ในรูปเชิงเส้น หรือ แถบดีเอ็นเอรูป II ซึ่งเคลื่อนที่บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสได้ช้ากว่าแถบดีเอ็นเอรูป I แต่เร็วกว่าแถบดีเอ็นเอรูป III

จากการหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.8 ไมโครกรัม / ไมโครลิตร และอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรมีค่าเท่ากับ 1.86 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ เนื่องจากค่าอัตราส่วนดังกล่าวอยู่ในช่วง 1.65-1.85 (Sambrook, *et al.*, 1989)

2. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอแต่ละขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 ที่อยู่ในรูปเชิงเส้น โดยอาศัยไพรเมอร์คู่ใดคู่หนึ่งดังนี้ (รูปที่ 10) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส ใช้คู่ไพรเมอร์คือ F_{929} และ R_{2407} การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส ใช้คู่ไพรเมอร์คือ F_{1078} และ R_{2070} การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด



รูปที่ 9 แถบพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 ที่สกัดได้จาก *E.coli* สายพันธุ์ DH 5 α อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 1 และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

แถว M : Lambda DNA *Hin*d III Digest

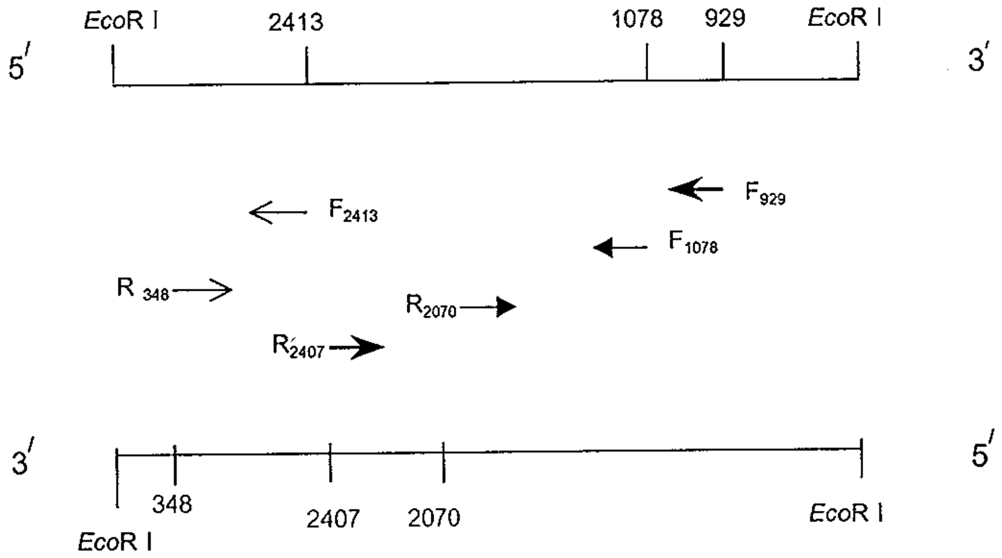
แถว pUC 19 : พลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19

แถว pUC 19 + E : พลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*R I

I : พลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดพันตัวเอง

II : พลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเชิงเส้น

III : พลาสมิดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปคลายตัวเป็นวง



รูปที่ 10 แผนผังการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1478 992 และ 621 คู่เบส และไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆ

→ และ ← แสดงทิศทางการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบส

→ และ ← แสดงทิศทางการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส

→ และ ← แสดงทิศทางการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส

621 คู่เบส ใช้คู่ไพรเมอร์คือ F_{2413} และ R_{348} ตามลำดับ ผลิตผลดีเอ็นเอที่ได้เมื่อนำมาวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสดังแสดงในรูปที่ 11

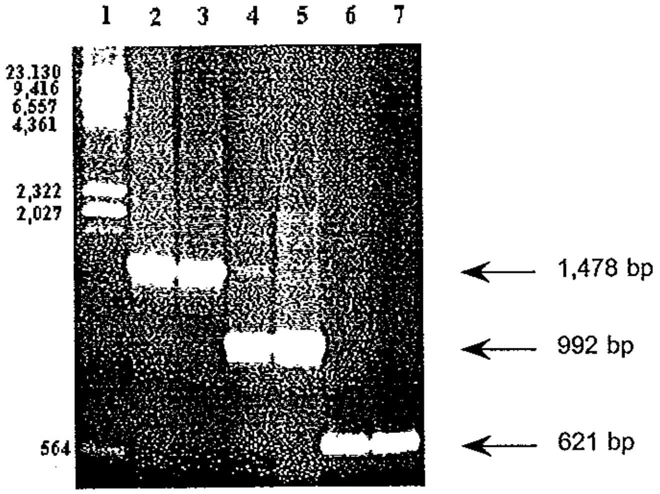
3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์

เมื่อศึกษาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์สองคู่ได้แก่ ไพรเมอร์ F_{929} F_{2413} R_{2407} และ R_{348} ภายในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยมีสภาวะการทดลองเหมือนกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์เพียงคู่เดียว เมื่อนำผลิตผลดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมาวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ พบว่าผลิตผลดีเอ็นเอประกอบไปด้วยดีเอ็นเอสามขนาด ได้แก่ 2,105 1,478 และ 621 คู่เบส โดยที่ดีเอ็นเอแต่ละขนาดเกิดจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของคู่ไพรเมอร์ระหว่าง F_{929}กับ R_{348} F_{929}กับ R_{2407} และ F_{2413}กับ R_{348} ตามลำดับ และจากการสังเกตความเข้มของแถบผลิตผลดีเอ็นเอที่ถูกย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์บนอะกาโรสเจลพบว่าผลิตผลดีเอ็นเอแต่ละขนาดมีปริมาณไม่เท่ากันโดยที่ผลิตผลดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบสมีปริมาณมากกว่าผลิตผลดีเอ็นเอขนาด 1,478 และ 2,105 คู่เบส

4 การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

4.1 ผลของอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์

เมื่อนำสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมมาทำปฏิกิริยากับพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเชิงเส้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอัตราส่วนโมลาร์ต่าง ๆ กัน จากนั้นนำดีเอ็นเอแอดดัค (ดีเอ็นเอที่เกิดพันธะกับอะตอมพลาตินัม) มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์สำหรับการศึกษาการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส



รูปที่ 11 แถบของผลิตผลดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 1.2 และย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ (0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

แถวที่ 1 Lambda DNA *Hin*d III Digest

แถวที่ 2 และ 3 ผลิตผลดีเอ็นเอขนาด 1478 คู่เบส

แถวที่ 4 และ 5 ผลิตผลดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส

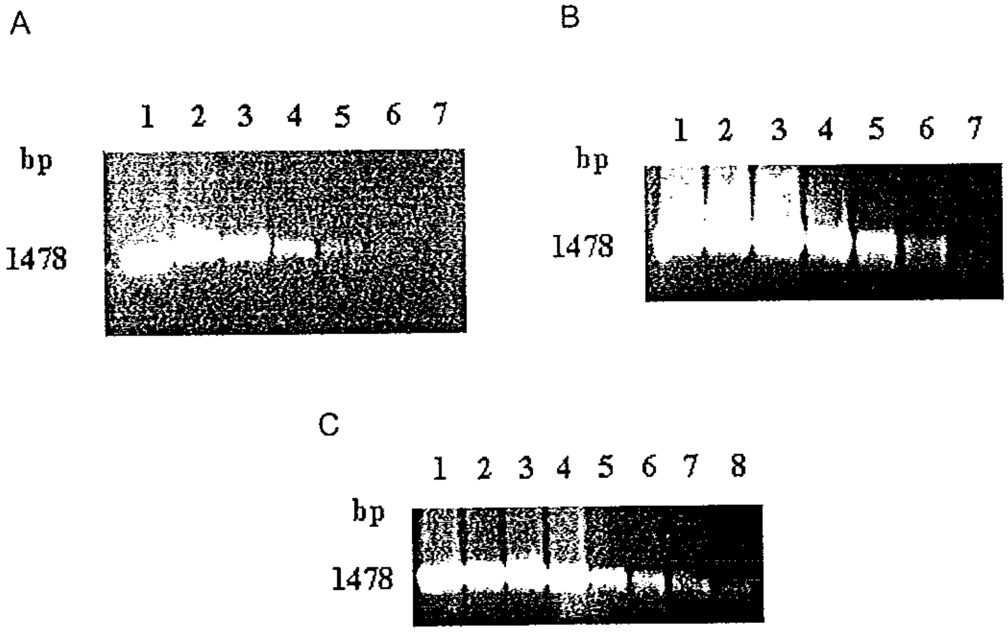
แถวที่ 6 และ 7 ผลิตผลดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบส

4.1.1 ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส

จากการวิเคราะห์ผลของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส บนอะกาโรสเจล พบว่าเมื่อระดับอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดต่อนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้น ความเข้มของแถบผลิตผลดีเอ็นเอมีแนวโน้มลดลง สังเกตได้โดยเปรียบเทียบกับแถบผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอปกติเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (รูปที่ 12) นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดต่อนิวคลีโอไทด์เท่ากัน การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะไม่เท่ากัน โดยที่การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินมากกว่าการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับทรานส์พลาตินและคาร์โบพลาติน จากการวิเคราะห์ความเข้มของแถบของดีเอ็นเอ พบว่าที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ของซิสพลาติน ทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาติน เท่ากับ 0.01 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอลดลงเหลือร้อยละ 58, 74 และ 91 ตามลำดับ (รูปที่ 13) และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนอะตอมพลาตินัมต่อ 1478 คู่เบส (Pt atom / 1478 bp) กับอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดต่อนิวคลีโอไทด์ พบว่าเมื่ออัตราส่วนโมลาร์เพิ่มขึ้นจำนวนอะตอมพลาตินัมเพิ่มขึ้น และจากการคำนวณจำนวนอะตอมพลาตินัมที่เกิดพันธะกับดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส ที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ของซิสพลาติน ทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาติน เท่ากับ 0.01 ด้วยเทคนิค QPCR พบว่ามีจำนวนเท่ากับ 0.56 ± 0.013, 0.35 ± 0.010 และ 0.065 ± 0.008 อะตอม/1,478 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 14)

4.1.2 ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส

จากการวิเคราะห์ผลของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส บนอะกาโรสเจล พบว่าเมื่อระดับอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดต่อนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้น ความเข้มของแถบผลิตผลดีเอ็นเอมีแนวโน้มลดลง ซึ่งสังเกตโดยเปรียบเทียบกับแถบผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอปกติเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (รูปที่ 15) นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ของสารประกอบเชิงซ้อน

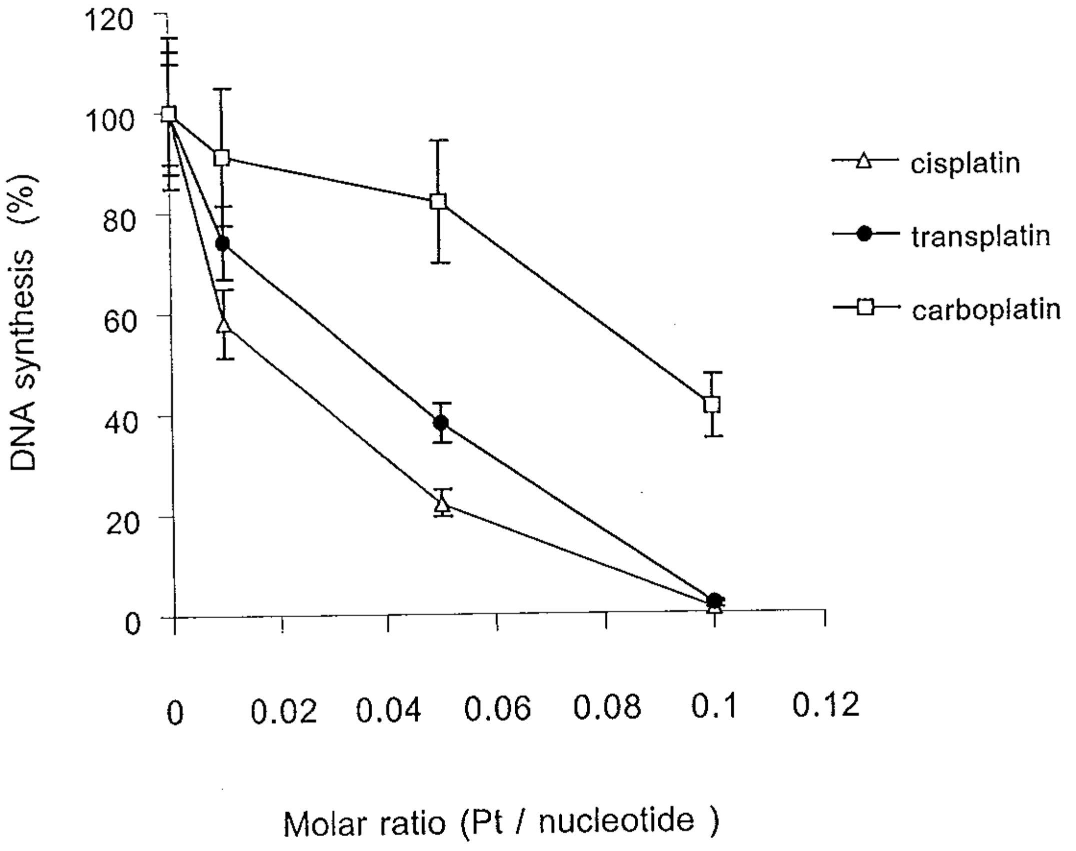


รูปที่ 12 ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส เนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ต่าง ๆ บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 1 ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

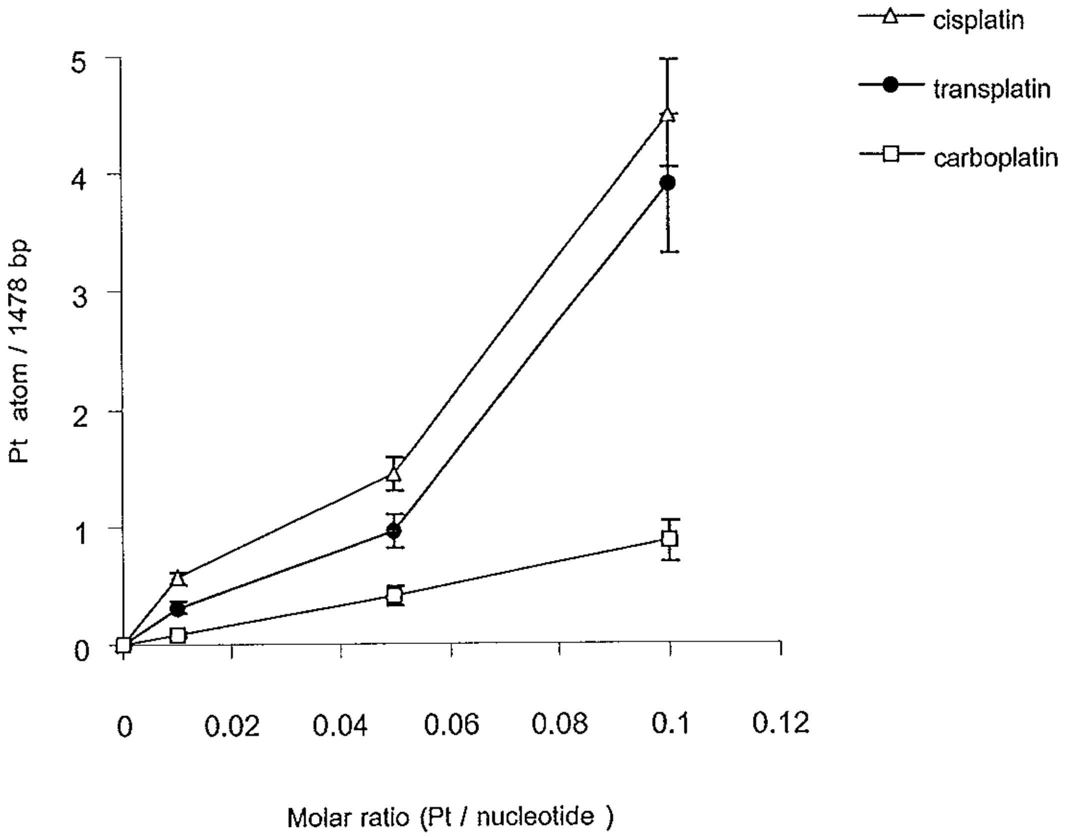
A. ซิสพลาติน : แถวที่ 1-7 ผลิตผลดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์ 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 0.5 และ 1 ตามลำดับ

B. ทรานส์พลาติน : แถวที่ 1-7 ผลิตผลดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์ 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 0.5และ 1 ตามลำดับ

C. คาร์โบพลาติน : แถวที่ 1-8 ผลิตผลดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์ 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 0.5, 1 และ 2 ตามลำดับ

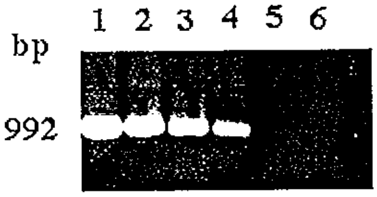


รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส และอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่างๆ กัน (ค่าความคลาดเคลื่อนคำนวณจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, n = 3)

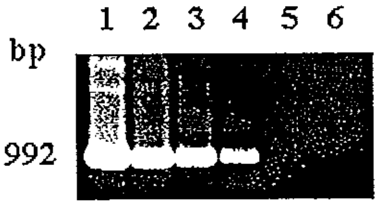


รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนอะตอมพลาตินัมบนดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส และอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ กัน (ค่าความคลาดเคลื่อนคำนวณจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, n = 3)

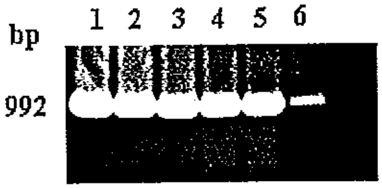
A



B



C



รูปที่ 15 ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส เนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ต่าง ๆ บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 1 ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

A. ซิสพลาติน : แถวที่ 1-6 ผลิตผลดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 และ 1 ตามลำดับ

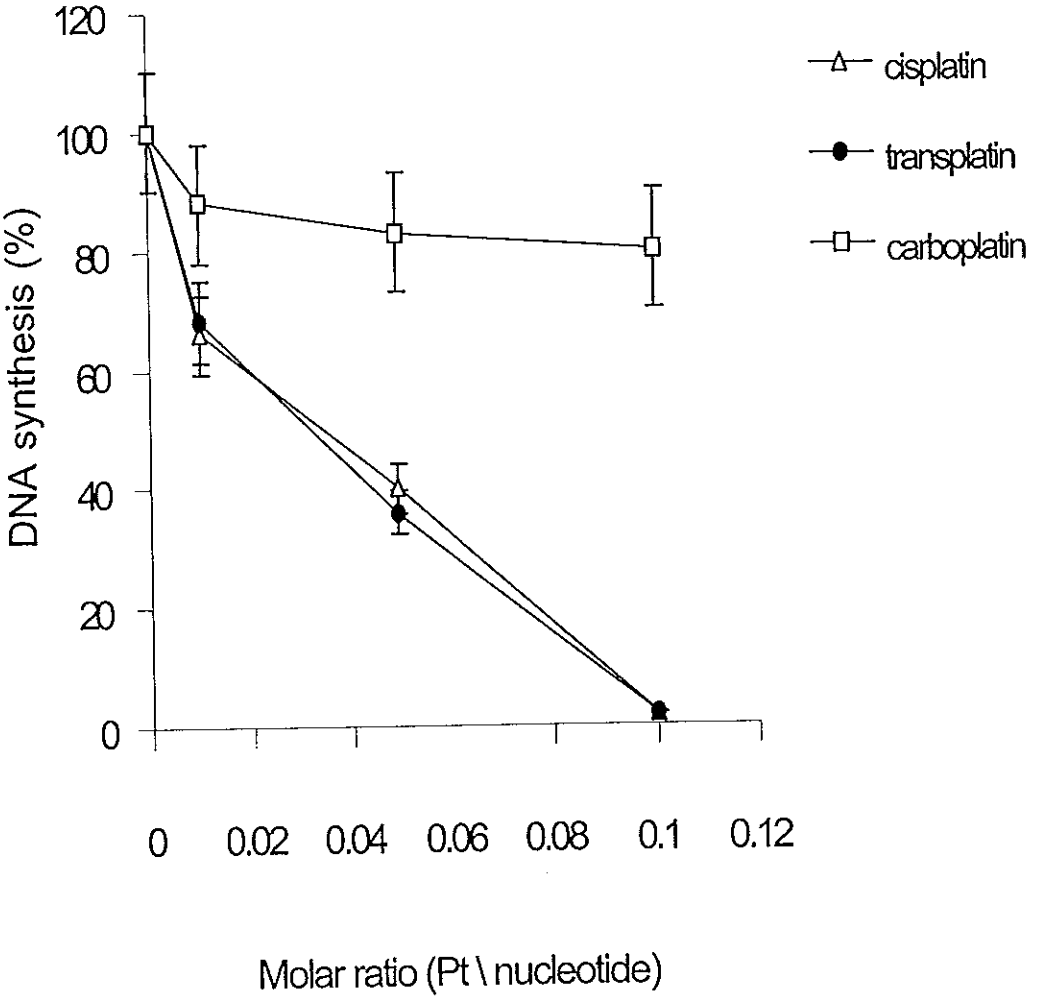
B. ทรานส์พลาติน : แถวที่ 1-6 ผลิตผลดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 และ 1 ตามลำดับ

C. คาร์โบพลาติน : แถวที่ 1-6 ผลิตผลดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 และ 1 ตามลำดับ

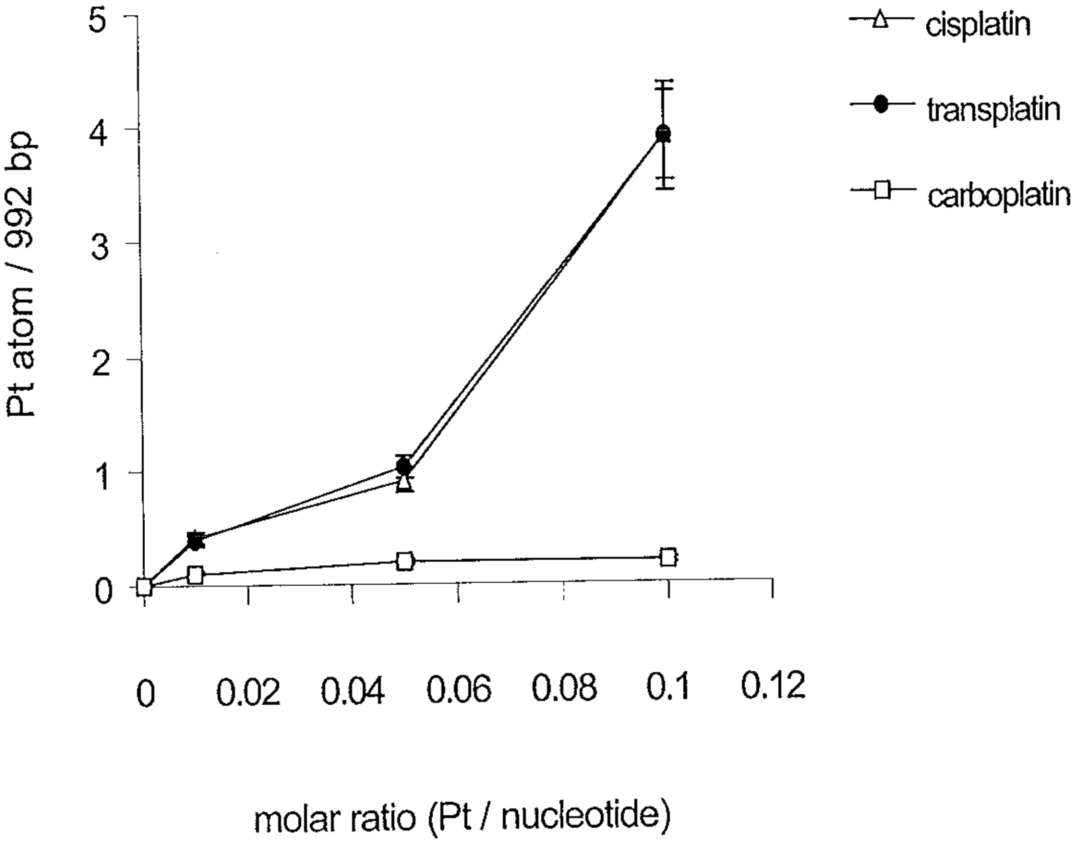
พลาตินัมแต่ละชนิดต่อนิวคลีโอไทด์เท่ากัน การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไม่เท่ากัน โดยที่การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินมากกว่าการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับทรานสพลาตินและคาร์โบพลาติน จากการวิเคราะห์ความเข้มแถบของดีเอ็นเอ พบว่าที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ของซิสพลาติน ทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาตินเท่ากับ 0.01 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอลดลงเหลือร้อยละ 66, 68 และ 88 ตามลำดับ (รูปที่ 16) และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนพลาตินัมต่อ 992 คู่เบส (Pt atom / 992 bp) กับอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดต่อนิวคลีโอไทด์ พบว่าเมื่ออัตราส่วนโมลาร์เพิ่มขึ้นจำนวนอะตอมพลาตินัมเพิ่มขึ้น และจากการคำนวณจำนวนอะตอมพลาตินัมที่เกิดพันธะกับดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส ที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ของซิสพลาติน ทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาติน เท่ากับ 0.01 ด้วยเทคนิค QPCR พบว่ามีจำนวนเท่ากับ 0.42 ±0.012, 0.39 ±0.010 และ 0.10 ±0.002 อะตอม/992 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 17)

4.1.3 ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบส

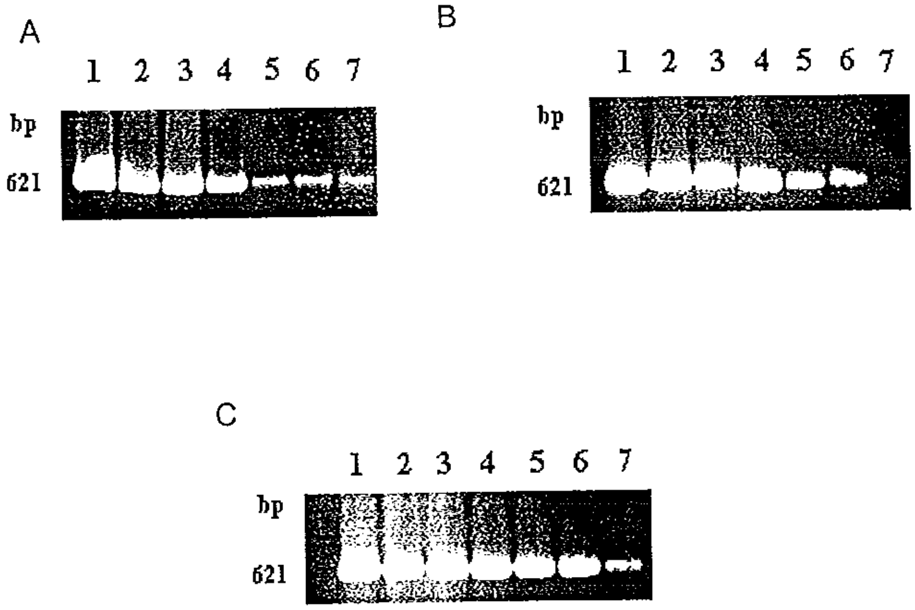
จากการวิเคราะห์ผลของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบส บนอะกาโรสเจล พบว่าเมื่อระดับอัตราส่วนโมลาร์ของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดต่อนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นความเข้มของแถบผลิตผลดีเอ็นเอมีแนวโน้มลดลง สังเกตโดยเปรียบเทียบกับแถบผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอปกติเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (รูปที่ 18) นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดต่อนิวคลีโอไทด์เท่ากัน การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไม่เท่ากัน โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินมากกว่าการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยาทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาติน จากการวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอพบว่า ที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ของซิสพลาติน ทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาติน เท่ากับ 0.01 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอลดลงเหลือร้อยละ 69, 90 และ 100 ตามลำดับ (รูปที่ 19) และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนพลาตินัมต่อ 621 คู่เบส (Pt atom / 621 bp) กับอัตราส่วนโมลาร์ระหว่าง



รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส และอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ กัน (ค่าความคลาดเคลื่อนคำนวณได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, n = 3)



รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนอะตอมพลาตินัมบนดีเอ็นเอขนาด 992 คู่เบส และอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ กัน (ค่าความคลาดเคลื่อนคำนวณได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, n = 3)

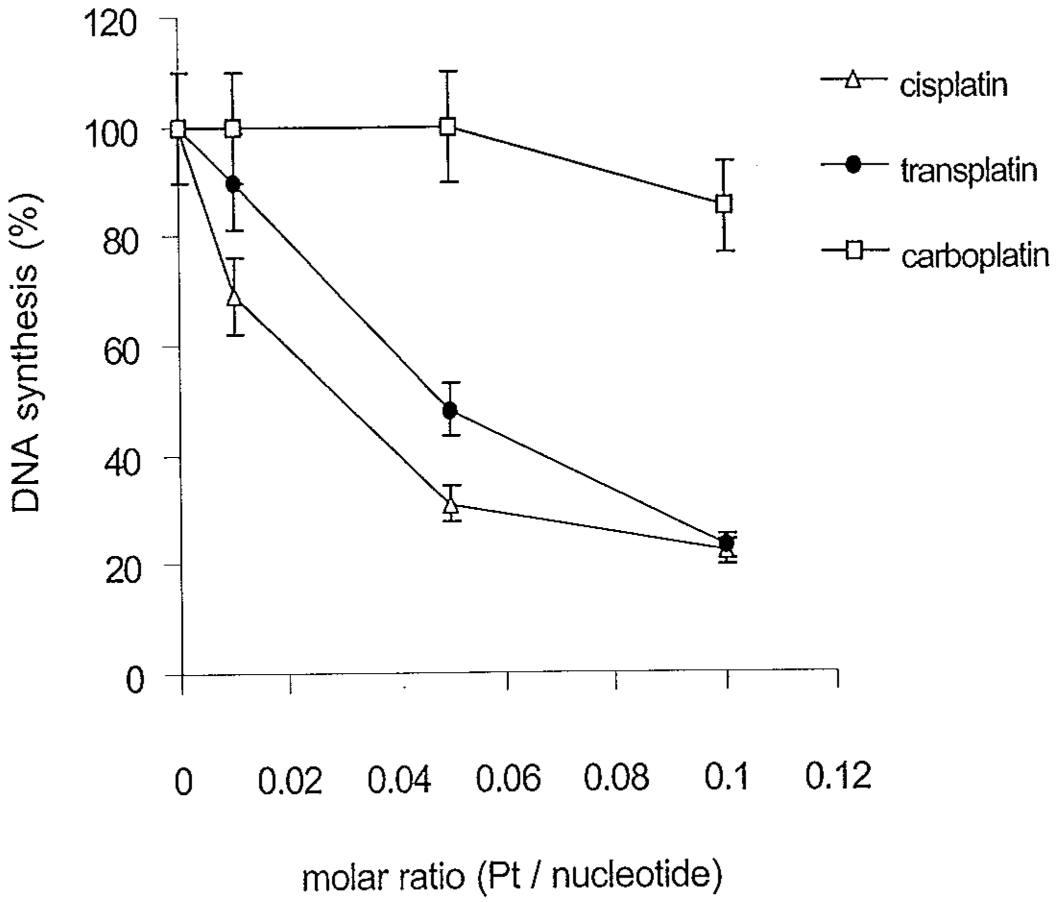


รูปที่ 18 ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบส เนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ต่าง ๆ บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 1 ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

A. ซิสพลาติน : แถวที่ 1-7 ผลิตผลดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์ 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 0.5 และ 1 ตามลำดับ

B. ทรานส์พลาติน: แถวที่ 1-7 ผลิตผลดีเอ็นเอ ที่อัตราส่วนโมลาร์ 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 0.5 และ 1 ตามลำดับ

C. คาร์โบพลาติน: แถวที่ 1-7 ผลิตผลดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์ 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 0.5 และ 1 ตามลำดับ

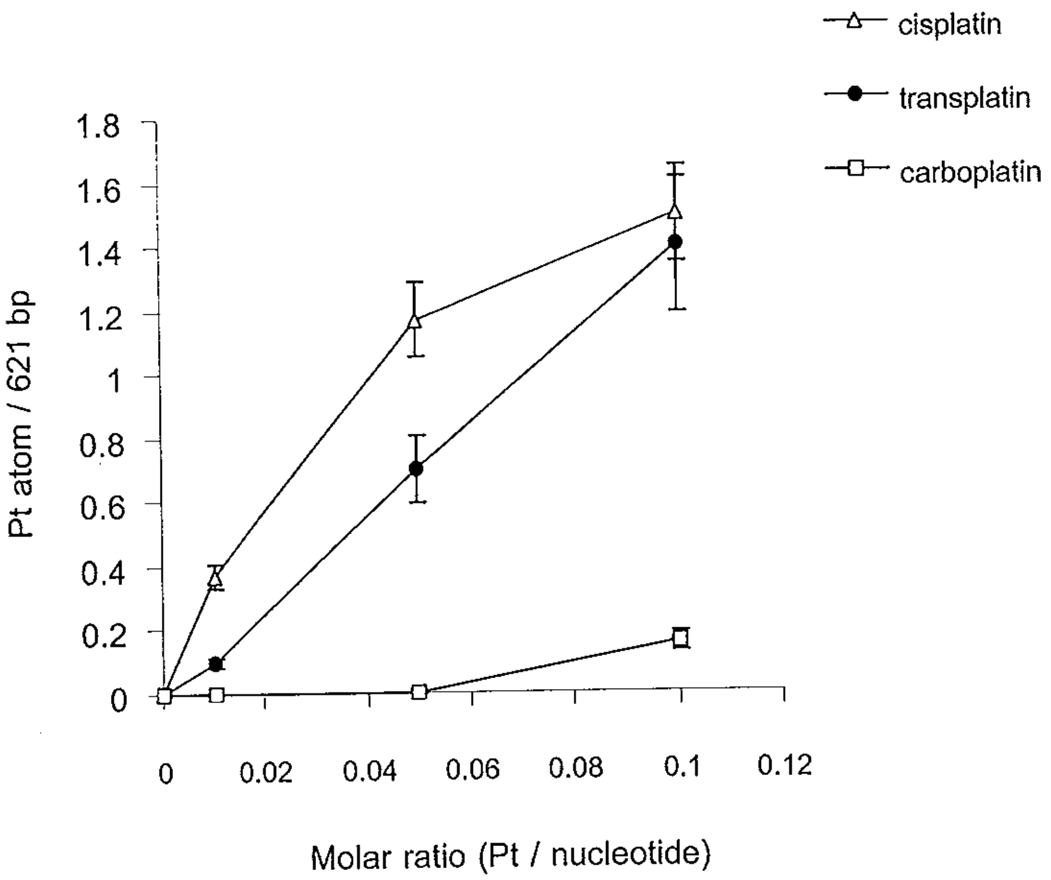


รูปที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบส และ อัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ กัน (ค่าความคลาดเคลื่อนคำนวณจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

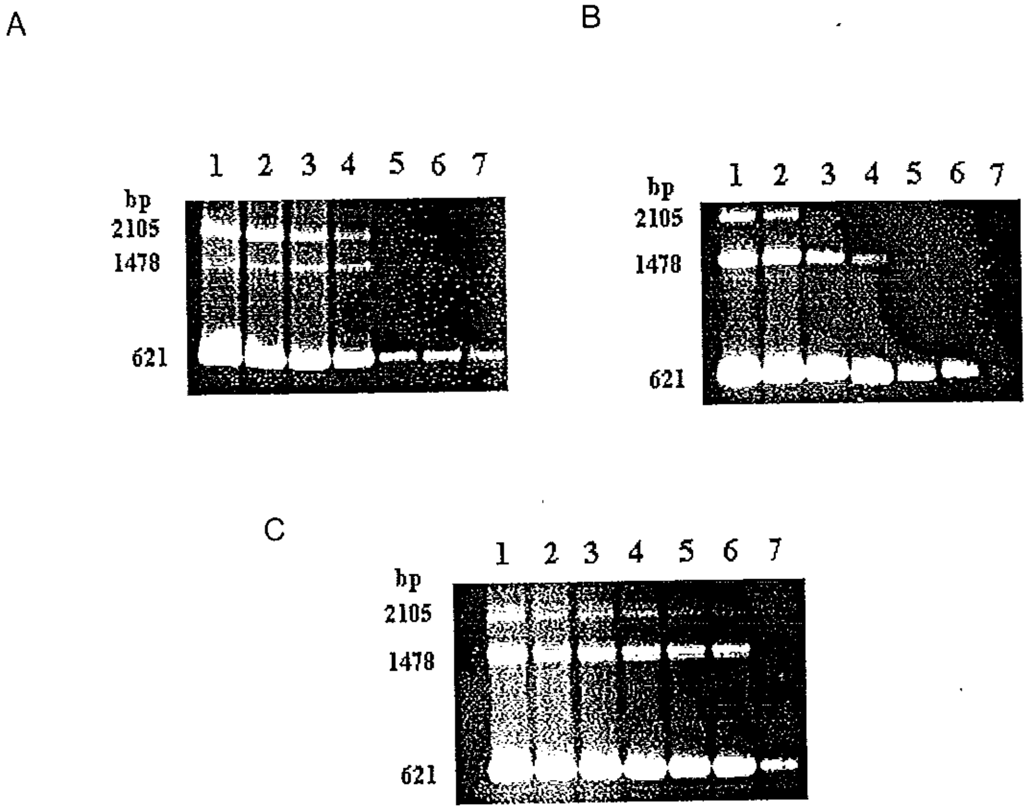
สารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดต่อนิวคลีโอไทด์ พบว่าเมื่ออัตราส่วนโมลาร์เพิ่มขึ้นจำนวนพลาตินัมเพิ่มขึ้น และจากการคำนวณจำนวนพลาตินัมที่เกิดพันธะกับดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบสที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ของซิสพลาติน ทรานส์พลาตินและคาร์โบพลาติน เท่ากับ 0.01 ด้วยเทคนิค QPCR พบว่ามีจำนวนเท่ากับ 0.37 ± 0.013, 0.10 ±0.010 และ 0.00 ±0.0002 ตามลำดับ (รูปที่ 20)

5. ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์เนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

จากการวิเคราะห์ผลของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 2,105, 1,478 และ 621 คู่เบสซึ่งเกิดขึ้นพร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกันบนอะกาโรสเจล พบว่าเมื่อระดับอัตราส่วนโมลาร์ของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดต่อนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นความเข้มของแถบผลิตผลดีเอ็นเอแต่ละขนาดมีแนวโน้มลดลง สังเกตโดยเปรียบเทียบกับแถบผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอปกติเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (รูปที่ 21) การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.01 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621 และ 2,105 คู่เบส ลดลงเหลือร้อยละ 49 และ 16 ตามลำดับ และไม่พบแถบผลิตผลดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส ดังนั้นจึงไม่สามารถวิเคราะห์ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบสได้ จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอปกติเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับทรานส์พลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.01 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621 และ 1,478 ลดลงเหลือร้อยละ 70 และ 5 ตามลำดับ และไม่พบแถบผลิตผลดีเอ็นเอขนาด 2,105 คู่เบส ดังนั้นจึงไม่สามารถวิเคราะห์ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 2,105 คู่เบสได้ จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอปกติเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดพันธะกับคาร์โบพลาตินที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.01 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621, 1,478 และ 2,105 ลดลงเหลือร้อยละ 83, 44 และ 43 ตามลำดับ



รูปที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนอะตอมพลาตินัมบนดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบส และอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ กัน (ค่าความคลาดเคลื่อนคำนวณจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, n = 3)



รูปที่ 21 ผลยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621, 1,478 และ 2,105 คู่เบส ที่อัตราส่วนโมลาร์ต่าง ๆ บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 1 ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

A. ซิสพลาติน : แถวที่ 1-7 ผลิตผลดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์ 0 0.001 0.005 0.01 0.1 0.5 และ 1 ตามลำดับ

B. ทรานส์พลาติน : แถวที่ 1-7 ผลิตผลดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์ 0 0.001 0.005 0.01 0.1 0.5 และ 1 ตามลำดับ

C. คาร์โบพลาติน : แถวที่ 1-7 ผลิตผลดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์ 0 0.001 0.005 0.01 0.1 0.5 และ 1 ตามลำดับ

6. ผลของระยะเวลาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างดีเอ็นเอกับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

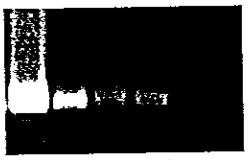
เมื่อนำดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาติน ทรานส์พลาติน หรือคาร์โบพลาติน ที่อัตราส่วนโมลาร์เดียวกันคือ 0.1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด ในช่วงระยะเวลา 5, 15, 30, 60, 120, 240 และ 480 นาที มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เพื่อศึกษาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1478 คู่เบส พบว่าซิสพลาติน ทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาติน จะยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอประมาณร้อยละ 50 ภายหลังจากเกิดอันตรกิริยากับพลาสมิดดีเอ็นเอเป็นเวลา 3 นาที 4 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 22 และ 23)

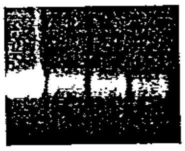
7. การเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอเมื่อเกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

7.1 ผลของอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์

การเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ กัน แสดงในรูปที่ 24 พบว่าซิสพลาตินเริ่มชักนำให้พลาสมิดดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปเล็กน้อยที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ต่ำ ๆ (0.025) โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอรูป I เคลื่อนที่ช้าลง และจะเคลื่อนที่ช้าลงอีกเมื่ออัตราส่วนโมลาร์สูงขึ้น (0.050-0.075) จนกระทั่งการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอรูป I เท่ากับการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอรูป III (รูปที่คลายตัวเป็นวง) ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.100 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพลาสมิดดีเอ็นเอในรูปที่ขดพันตัวเองได้คลายเกลียว (unwinding) เป็นวงได้มากที่สุดที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.100 อย่างไรก็ตามแถบดีเอ็นเอรูป IIIจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นเมื่ออัตราส่วนโมลาร์สูงขึ้น(0.250-0.750)(รูปที่ 24A)

จากการศึกษาผลของทรานส์พลาติน พบว่าทรานส์พลาตินเริ่มชักนำให้พลาสมิดดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปเล็กน้อยที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ประมาณ 0.050 โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอในรูป I จะเริ่มเคลื่อนที่ช้าลง และจะเคลื่อนที่ช้าลง



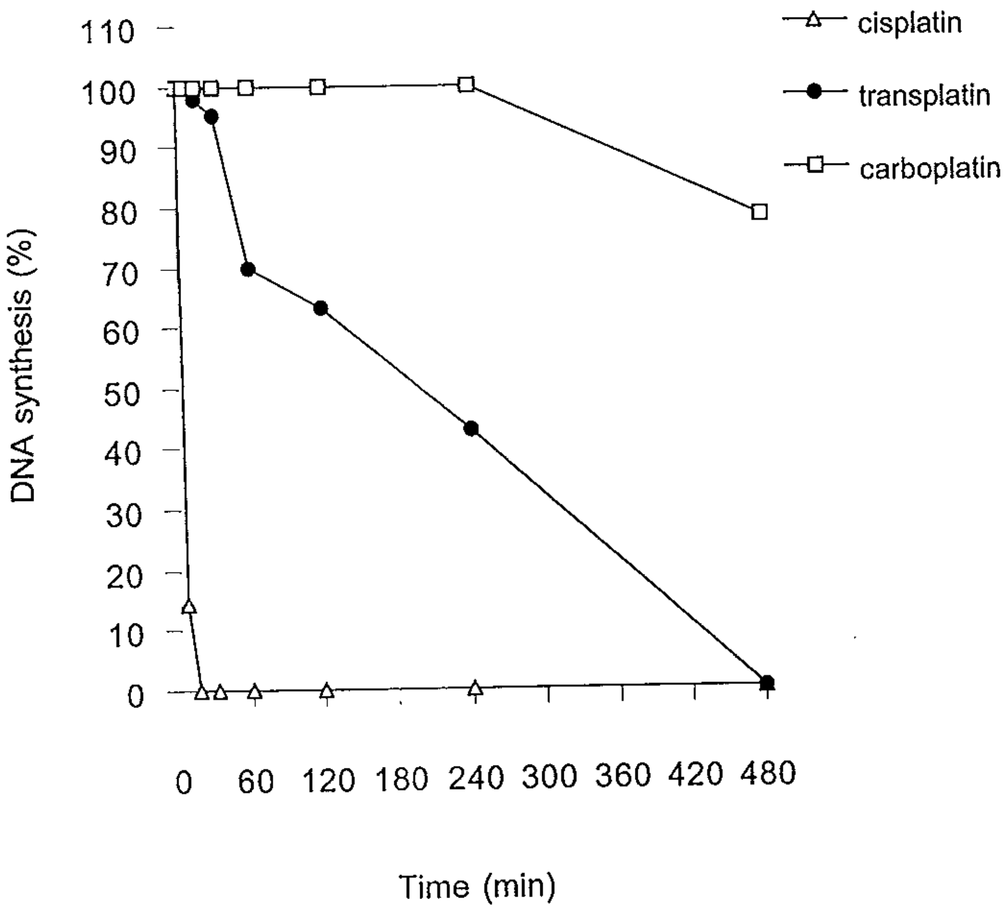


รูปที่ 22 การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบสเนื่องจากเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมกับดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.1 ที่เวลาระยะเวลาต่าง ๆ บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

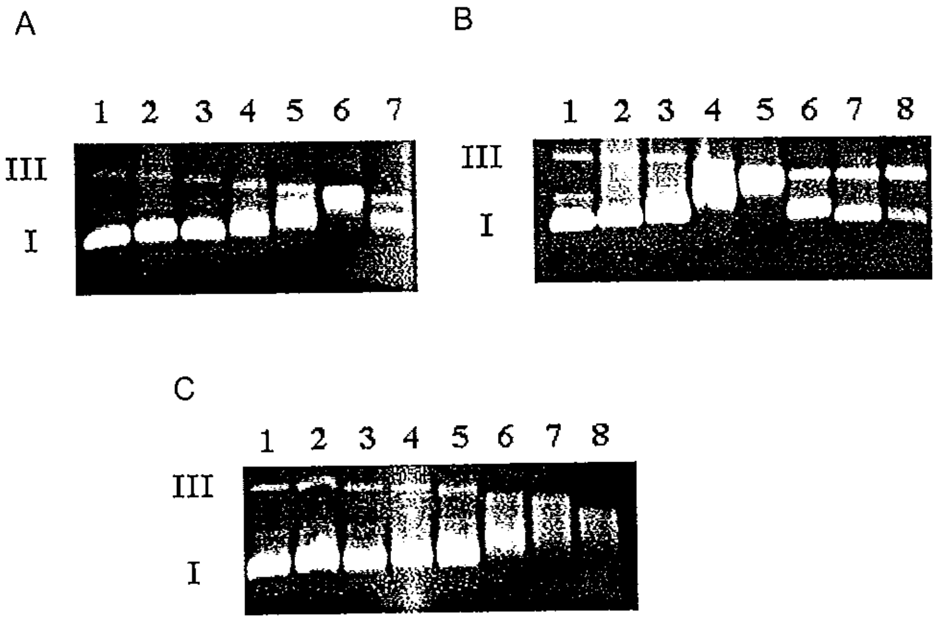
A. ซิสพลาติน : แถวที่ 1-5 ผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากดีเอ็นเอแอดดัคที่เวลา 0, 5, 15, 30 และ 60 นาที ตามลำดับ

B. ทรานส์พลาติน: แถวที่ 1-4 ผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากดีเอ็นเอแอดดัคที่เวลา 0, 60, 120, และ 240 นาที ตามลำดับ

C. คาร์โบพลาติน: แถวที่ 1-5 ผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากดีเอ็นเอแอดดัคที่เวลา 0, 60, 120, 240 และ 480 นาที ตามลำดับ



รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบส และระยะเวลาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ กัน



รูปที่ 24 ผลของอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อย 1 ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

A. ซิสพลาติน : แถวที่ 1-7 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 และ 0.25 ตามลำดับ

B. ทรานส์พลาติน : แถวที่ 1-8 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.65 ตามลำดับ

C. คาร์โบพลาติน : แถวที่ 1-8 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5 และ 2 ตามลำดับ

I : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดพันตัวเอง III : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปคลายตัวเป็นวง

อีกเมื่ออัตราส่วนโมลาร์สูงขึ้น (0.050-0.100) จนกระทั่งการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอรูป I เท่ากับการเคลื่อนที่แถบดีเอ็นเอรูป III ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.200 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพลาสมิดดีเอ็นเอในรูปที่ขดพันตัวเองได้คลายเกลียวเป็นวงได้มากที่สุดที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.200 อย่างไรก็ตามแถบดีเอ็นเอรูป III จะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นเมื่ออัตราส่วนโมลาร์สูงขึ้น (0.300-0.650) (รูปที่ 24B)

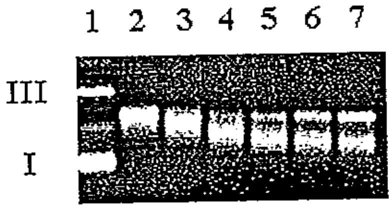
คาร์โบพลาตินเริ่มชักนำให้พลาสมิดดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปเล็กน้อยที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ 0.500 โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอรูป I จะเริ่มเคลื่อนที่ช้าลง และจะเคลื่อนที่ช้าลงอีกเมื่ออัตราส่วนโมลสูงขึ้น (1.000 -1.500) จนกระทั่งการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอรูป I เคลื่อนที่เท่ากับการเคลื่อนที่แถบดีเอ็นเอรูป III ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 2.000 แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดดีเอ็นเอในรูปที่ขดพันตัวเองได้คลายเกลียวเป็นวงมากที่สุด (รูปที่ 24C)

7.2 การศึกษาผลของระยะเวลาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างดีเอ็นเอกับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

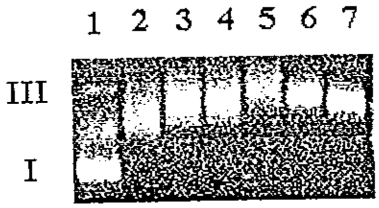
เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอมาบ่มกับซิสพลาตินด้วยอัตราส่วนโมลาร์คงที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันพบว่า ที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.200 ซิสพลาตินเริ่มมีชักนำให้พลาสมิดดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปจากแถบดีเอ็นเอรูป I ไปเป็นแถบดีเอ็นเอรูป III อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้นเป็น 2 4 และ 8 ชั่วโมง แถบดีเอ็นเอรูป III มีการเคลื่อนที่เร็วขึ้นจนกระทั่งที่ระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอกับซิสพลาตินเพิ่มขึ้นเป็น 16 ชั่วโมง การเคลื่อนของพลาสมิดดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเริ่มคงที่ แสดงว่าอันตรกิริยาระหว่างดีเอ็นเอกับซิสพลาตินเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หลังจากเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง (รูปที่ 25A)

เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอมาบ่มกับทรานส์พลาตินด้วยอัตราส่วนโมลาร์คงที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันพบว่าที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.200 ทรานส์พลาตินเริ่มชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอจากแถบดีเอ็นเอรูป I ไปเป็นแถบดีเอ็นเอรูป III ภายในระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้นเป็น 2, 4, 8 และ 16 ชั่วโมง การเคลื่อนที่

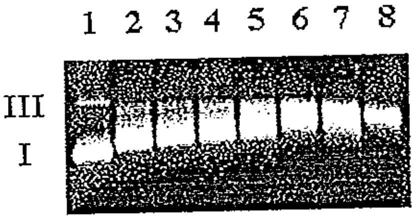
A



B



C



รูปที่ 25 ผลของระยะเวลาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมกับดีเอ็นเอต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 1 ย้อมแถบดีเอ็นเอเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

A. ซิสพลาติน : แถวที่ 1 -7 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.2 ในช่วงระยะเวลา 0, 0.5, 2, 4, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

B. ทรานส์พลาติน : แถวที่ 1 -7 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.2 ในช่วงระยะเวลา 0, 0.5, 2, 4, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

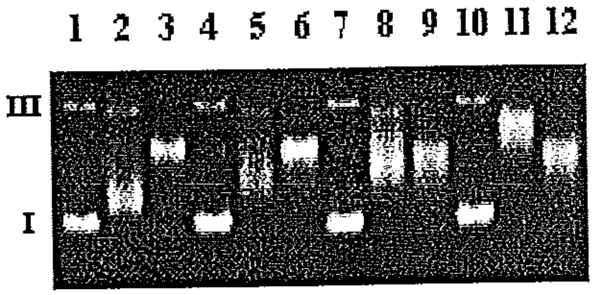
C. คาร์โบพลาติน : แถวที่ 1-8 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 2 ในช่วงระยะเวลา 0, 0.5, 2, 4, 8, 16, 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

I : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดพันตัวเอง III : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปคลายตัวเป็นวง

ของแถบดีเอ็นเอรูป III ช้าลง จนระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้นเป็น 24 ชั่วโมง การเคลื่อนของดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเริ่มคงที่ แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอเกิดอันตรกิริยากับทรานส์พลาตินเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หลังจากระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (รูปที่ 25B)

เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอมาบ่มกับคาร์โบพลาตินด้วยอัตราส่วนโมลาร์คงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันพบว่าที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 2.000 คาร์โบพลาตินค่อย ๆ ชักนำให้พลาสมิดดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปตั้งแต่เวลา 0.5 ชั่วโมง และพลาสมิดดีเอ็นเอจะเปลี่ยนแปลงโครงรูปจากแถบดีเอ็นเอรูป I ไปเป็นแถบดีเอ็นเอรูป III เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง (รูป 25C)

เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิด ด้วยอัตราส่วนโมลาร์ที่เท่ากันคือ 0.100 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส พบว่าที่ระยะเวลาของการเกิดอันตรกิริยาเท่ากับ 0.5 ชั่วโมง ซิสพลาตินจะชักนำให้พลาสมิดดีเอ็นเอในแถบดีเอ็นเอรูป I ไปเป็นแถบดีเอ็นเอรูป III เร็วกว่าการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดจากการชักนำของทรานส์พลาตินและเมื่อระยะเวลาผ่านไปเป็น 4 ชั่วโมง ซิสพลาตินเริ่มชักนำให้พลาสมิดดีเอ็นเอในแถบดีเอ็นเอรูป III มีการเคลื่อนที่เร็วขึ้น ในขณะที่ทรานส์พลาตินเพิ่งเริ่มชักนำให้พลาสมิดดีเอ็นเอคลายตัวเป็นแถบดีเอ็นเอรูป III มากขึ้น ส่วนคาร์โบพลาตินยังไม่มีการชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์ดังกล่าว (รูปที่ 26)



รูปที่ 26 การเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.1 ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 1 ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

แถวที่ 1 : พลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19

แถวที่ 2 5 8 และ 11 : ดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นจากทรานส์พลาตินที่เวลา 0.5, 2, 4 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ

แถวที่ 3 6 9 และ 12 : ดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นจากซิสพลาตินที่เวลา 0.5, 2, 4 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ

แถวที่ 4 7 และ 10 : ดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นจากคาร์โบพลาตินที่เวลา 2, 4 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ

I : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดพันตัวเอง III : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปคลายตัวเป็นวง

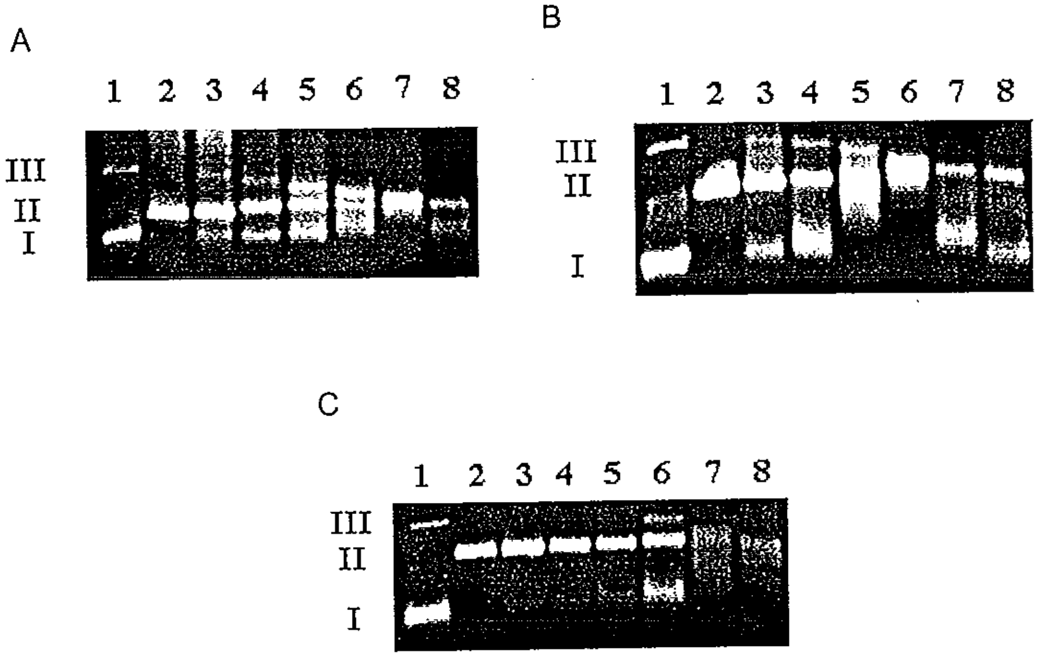
8 ความว่องไวของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะต่อดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

8.1 Restriction digestion ด้วยเอนไซม์ *Bam*H I

เอนไซม์ *Bam*H I สามารถตัดพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดนี้ได้เพียงตำแหน่งเดียวที่ลำดับเบส 417 ซึ่งมีลำดับเบสจำเพาะ (regconition sequence) คือ 5′-GGATCC-3′ เมื่อย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Bam*H I พลาสมิดดีเอ็นเอควรจะอยู่ในรูปเชิงเส้นเพียงอย่างเดียว (แถบดีเอ็นเอรูป II) เมื่อนำเอนไซม์ *Bam*H I มาย่อย พลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์ 0.010 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอสามแถบ คือ แถบ I II และ III และพบว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอรูป II ลดลง เมื่อระดับอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างซิสพลาตินต่อนิวคลีโอไทด์เพิ่มสูงขึ้นความเข้มของแถบดีเอ็นเอแถบที่ II จะลดลงอีก และแถบดีเอ็นเอรูป III เพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Bam*H I ที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.010 ส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับทรานส์พลาตินและกับคาร์โบพลาติน จะให้ผลในลักษณะเดียวกันกับกรณีของซิสพลาติน แต่การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกิดจากทรานส์พลาตินและคาร์โบพลาตินจะเกิดที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.025 และ 0.100 ตามลำดับ (รูปที่ 27)

8.2 Restriction digestion ด้วยเอนไซม์ *Eco*R I

เอนไซม์ *Eco*R I สามารถย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดนี้ได้เพียงตำแหน่งเดียวที่ลำดับเบส 396 ซึ่งมีลำดับเบสจำเพาะคือ 5′-GAATCC-3′ เมื่อย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *EcoR* I พลาสมิดดีเอ็นเอควรจะอยู่ในรูปเชิงเส้นเพียงอย่างเดียว (แถบดีเอ็นเอรูป II) เมื่อนำเอนไซม์ *Eco*R I มาย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาติน และคาร์โบพลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์ตั้งแต่ 0.010-0.100 และ 0.010-1.000 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยังคงสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอรูป II เกิดขึ้นเพียงแถบเดียว



รูปที่ 27 Restriction digestion ของดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเอนไซม์ *Bam*H I บนอะกาโรสเจลอิเลคโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 1 ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

A. ซิสพลาติน : แถวที่ 1 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
: แถวที่ 2-8 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.100 และ0.250 ตามลำดับ

B. ทรานส์พลาติน : แถวที่ 1 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วเอนไซม์
: แถวที่ 2-8 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ตามลำดับ

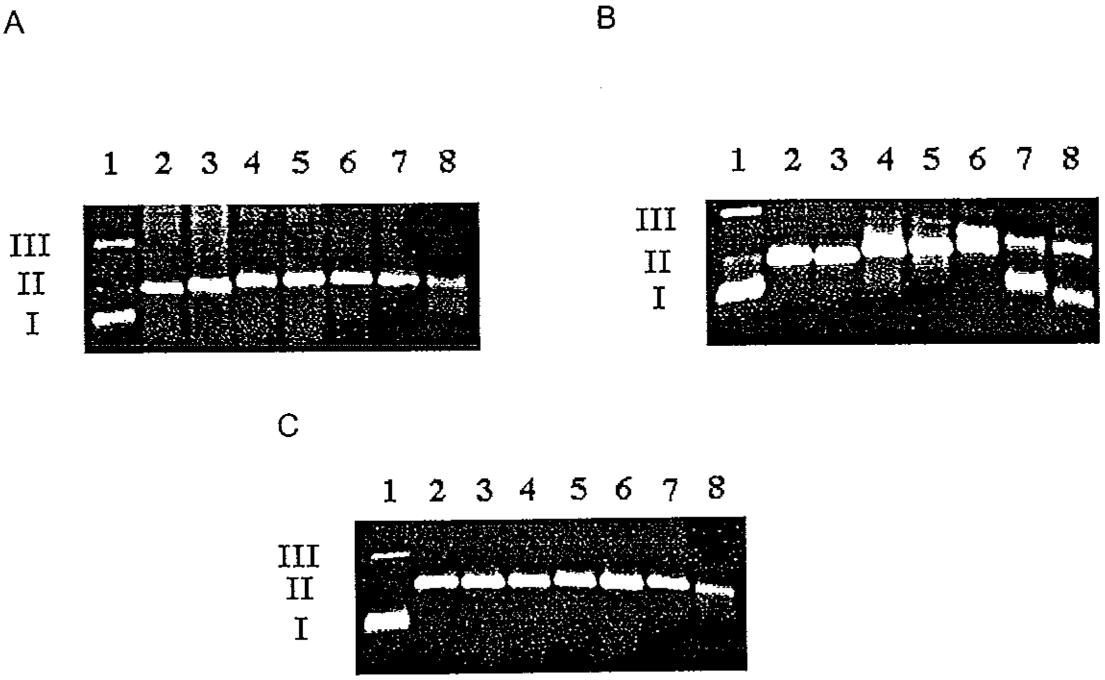
C. คาร์โบพลาติน : แถวที่ 1 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
: แถวที่ 2-8 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.010, 0.050, 0.100, 0.5 1 และ 2 ตามลำดับ

I : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดพันตัวเอง II : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเชิงเส้น
III : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปคลายตัวเป็นวง

แสดงว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินหรือคาร์โบพลาตินไม่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Eco*R I แต่จากการศึกษาความสามารถในการย่อยของเอนไซม์ชนิดนี้ต่อพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับทรานส์พลาตินพบว่าที่อัตราส่วนโมลาร์มากกว่า 0.200 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เริ่มมีการยับยั้ง *Eco*R I เกิดขึ้นโดยสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอรูป III และ แถบ II ปรากฏขึ้น แสดงว่าในระดับอัตราส่วนโมลาร์สูง ๆ ทรานส์พลาตินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Eco*R I ได้ (รูปที่ 28)

8.3 Restriction digestion ด้วยเอนไซม์ *Hin*d III

เอนไซม์ *Hin*d III สามารถย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดนี้ได้เพียงตำแหน่งเดียวที่ลำดับเบส 447 ซึ่งมีลำดับเบสจำเพาะคือ 5′- AAGCTT-3′ เมื่อย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Hin*d III พลาสมิดดีเอ็นเอควรจะอยู่ในรูปเชิงเส้นเพียงอย่างเดียว (แถบดีเอ็นเอรูป II) เมื่อนำเอนไซม์ *Hin*d III มาย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาติน หรือ คาร์โบพลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์ตั้งแต่ 0.010-0.100 หรือ 0.010 –1.000 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอรูป II เพียงแถบเดียวแสดงว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินหรือคาร์โบพลาตินไม่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Hin*d III แต่จากการศึกษาความสามารถในการย่อยของเอนไซม์ *Hin*d III ต่อพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับทรานส์พลาตินที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์มากกว่า 0.200 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด นาน 24 ชั่วโมง มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Hin*d III เกิดขึ้น จากการสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอรูป II และ III เกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าทรานส์พลาตินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Hin*d III ได้ในระดับอัตราส่วนโมลาร์สูง ๆ (รูปที่ 29)



รูปที่ 28 Restriction digestion ของดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเอนไซม์ *Eco*R I บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 1 ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

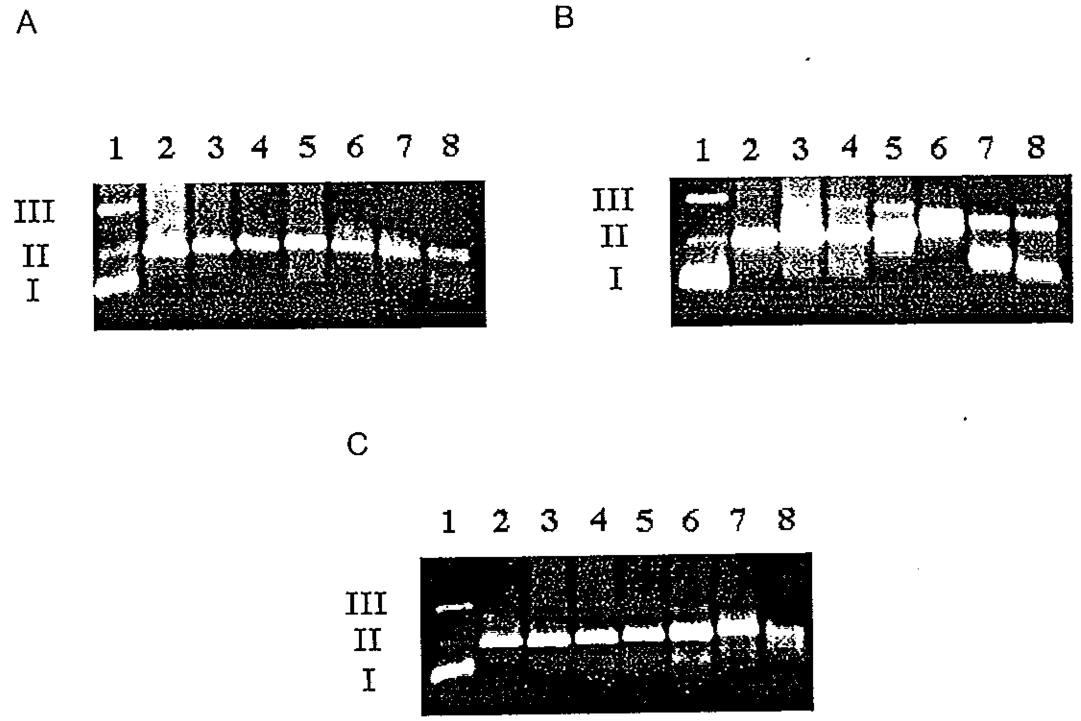
A. ซิสพลาติน : แถวที่ 1 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
: แถวที่ 2-8 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 และ 0.25 ตามลำดับ

B. ทรานส์พลาติน : แถวที่ 1 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
: แถวที่ 2-8 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ตามลำดับ

C. คาร์โบพลาติน : แถวที่ 1 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
: แถวที่ 2-8 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 2 ตามลำดับ

I : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดพันตัวเอง II : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเชิงเส้น

III : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปคลายตัวเป็นวง



รูปที่ 29 Restriction digestion ของดีเอ็นเอแอดดักด้วยเอนไซม์ *Hin*d I บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 1 ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

A. ซิสพลาติน : แถวที่ 1 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
: แถวที่ 2-8 ดีเอ็นเอแอดดักที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 และ 0.25 ตามลำดับ

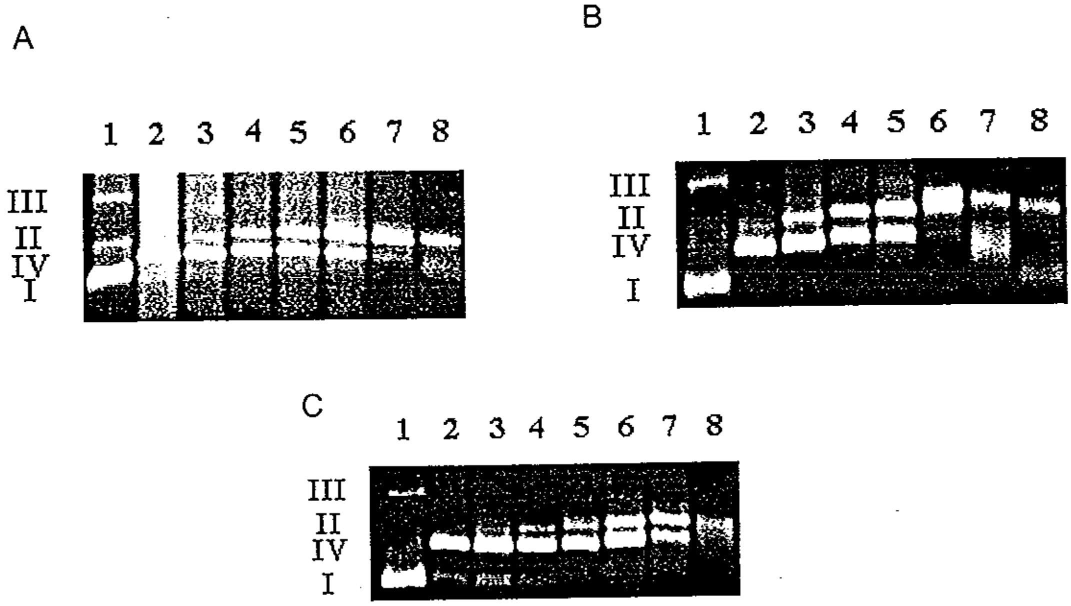
B. ทรานส์พลาติน : แถวที่ 1 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
: แถวที่ 2-8 ดีเอ็นเอแอดดักที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 และ0.4 ตามลำดับ

C. คาร์โบพลาติน : แถวที่ 1 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
: แถวที่ 2-8 ดีเอ็นเอแอดดักที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 2 ตามลำดับ

I : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดพันตัวเอง II : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเชิงเส้น
III : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปคลายตัวเป็นวง

8.4 Restriction digestion ด้วยเอนไซม์ *Pvu* II

เอนไซม์ *Pvu* II สามารถย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดนี้ได้สองตำแหน่งคือ ลำดับเบสที่ 306 และ 628 ซึ่งมีลำดับเบสจำเพาะคือ 5′- CAGCTG-3′ เมื่อย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Pvu* II ควรจะได้ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเชิงเส้นสองขนาด ได้แก่ ดีเอ็นเอขนาด 322 และ 2,364 คู่เบส แต่จากการทดลองนี้ได้ทำการวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลเข้มข้นร้อยละ 1 จึงทำให้สังเกตเห็นดีเอ็นเอได้เพียงขนาดเดียวคือ ดีเอ็นเอที่มีขนาด 2,364 (แถบดีเอ็นเอรูป IV) เมื่อนำเอนไซม์ *Pvu* II มาย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.010 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอสองแถบคือ แถบดีเอ็นเอรูป II และ IV และพบว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอรูป IV ลดลง เมื่อระดับอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างซิสพลาตินต่อนิวคลีโอไทด์เพิ่มสูงขึ้น และความเข้มของแถบดีเอ็นเอรูป IV ลดลงอีก และมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอรูป II เพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Pvu* II ตั้งแต่ระดับอัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.010 ส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับทรานส์พลาตินหรือคาร์โบพลาติน จะให้ผลในลักษณะเดียวกันกับกรณีของซิสพลาติน แต่มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกิดจากทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์เพิ่มขึ้นเป็น 0.025 หรือ 0.050 ตามลำดับ (รูปที่ 30)



รูปที่ 30 Restriction digestion ของดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเอนไซม์ *Pvu* II บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 1 ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

A. ซิสพลาติน : แถวที่ 1 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
: แถวที่ 2-8 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 และ 0.25 ตามลำดับ

B. ทรานส์พลาติน : แถวที่ 1 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
: แถวที่ 2-8 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ตามลำดับ

C. คาร์โบพลาติน : แถวที่ 1 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
: แถวที่ 2-8 ดีเอ็นเอแอดดัคที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 2 ตามลำดับ

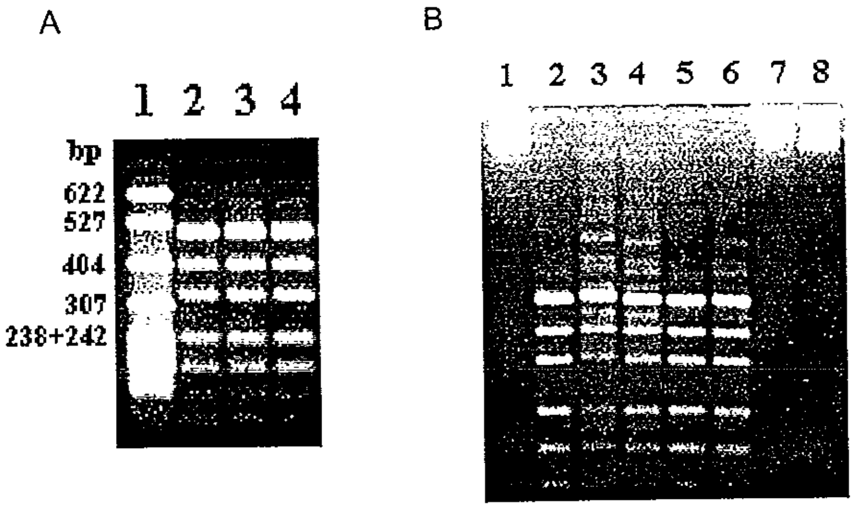
I : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดพันตัวเอง II : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเชิงเส้น

III : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเชิงเส้นขนาด 2,686 คู่เบส

IV : ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเชิงเส้นขนาด 2,364 คู่เบส

8.5 Restriction digestion ด้วยเอนไซม์ *Hpa* II

เอนไซม์ *Hpa* II สามารถย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดนี้ได้ 13 ตำแหน่งคือ ลำดับเบสที่ 48, 82, 413, 524, 1013, 1160, 1186, 1376, 1780, 1814, 1881, 1991 และ 2233 ตามลำดับ โดยมีลำดับเบสจำเพาะคือ 5′-CCGG-3′ เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดพันตัวเองมาย่อยด้วยเอนไซม์ *Hpa* II ควรจะได้ดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเชิงเส้นจำนวน 13 ขนาดคู่เบส ได้แก่ 26, 34, 48, 67, 110, 111, 147, 190, 242, 331, 404, 489, และ 501 คู่เบส แต่เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ได้วิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 2 ซึ่งจะสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเออย่างชัดเจนได้เพียง 6 ขนาดคู่เบสเท่านั้น เมื่อนำเอนไซม์ *Hpa* II มาย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินหรือทรานส์พลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์ 0.010 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นปรากฏขึ้นแสดงว่าเริ่มมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Hpa* II และเมื่ออัตราส่วนโมลาร์ของซิสพลาติน และทรานส์พลาตินเพิ่มขึ้นเป็น 0.100 พบว่าเอนไซม์ *Hpa* II ไม่สามารถย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอดังกล่าวได้ ในขณะที่อัตราส่วนโมลาร์ของคาร์โบพลาตินเท่ากับ 0.1 เริ่มมีดีเอ็นเอขนาดอื่นปรากฏขึ้นแสดงว่าเริ่มมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Hpa* II เกิดขึ้น (รูปที่ 31)



รูปที่ 31 Restriction digestion ของดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเอนไซม์ *Hpa* II บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิสเข้มข้นร้อยละ 2 ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

A. พลาสมิดดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hpa* II

แถวที่ 1 pBR 322 DNA - *Msp* I Digest

แถวที่ 2 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hpa* II

B. การย่อยดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเอนไซม์ *Hpa* II

แถวที่ 1 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hpa* II

แถวที่ 2 ดีเอ็นเอแอดดัคที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hpa* II

แถวที่ 3 และ 8 ดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากซิสพลาติน ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.01 และ 0.1 ตามลำดับ

แถวที่ 4 และ 7 ดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากทรานส์พลาติน ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.01 และ 0.1 ตามลำดับ

แถวที่ 5 และ 6 ดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากคาร์โบพลาติน ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.01 และ 0.1 ตามลำดับ

9. การหาปริมาณอะตอมพลาตินัมที่เกิดพันธะกับพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี

จากการวิเคราะห์หาปริมาณอะตอมพลาตินัมที่เกิดพันธะกับดีเอ็นเอด้วยเครื่องไอซีพีแมสสเปกโตรมิเตอร์เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับจำนวนอะตอมพลาตินัมที่เกิดพันธะกับดีเอ็นเอซึ่งคำนวณได้ทางทฤษฎีดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ปริมาณอะตอมพลาตินัมที่เกิดพันธะกับพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี

ชนิดของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม	อัตราส่วนโมลาร์ (Pt / nucleotide)	จำนวนอะตอมพลาตินัมต่อ 10^3 นิวคลีโอไทด์ (โดยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี)*
ซิสพลาติน	0.01	0.7 ±0.00006
	0.05	5 ± 0.0005
	0.1	8 ± 0.0006
ทรานส์พลาติน	0.01	0.2 ±0.00002
	0.05	5 ± 0.0005
	0.1	8 ± 0.0009
คาร์โบพลาติน	0.01	0.09 ± 0.000002
	0.05	0.3 ± 0.00006
	0.1	0.9 ± 0.00008

* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่วิเคราะห์จำนวน 7 ครั้ง

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมในหลอดทดลอง

ผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้หลังจากดีเอ็นเอแม่พิมพ์เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาติน ทรานส์พลาตินหรือคาร์โบพลาติน ที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.010 พบว่ามีปริมาณลดลง แสดงให้เห็นว่ามีการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเกิดขึ้น ทั้งนี้เกิดเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมสามารถยับยั้งกระบวนการโพลีเมอไรเซชันในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Jennerwein and Eastman, 1992 Grimadi, *et al.*,1994; and Kalinowski, *et al.*,1992)

ภายใต้สภาวะที่ดีเอ็นเอแม่พิมพ์เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาติน ทรานส์พลาตินหรือคาร์โบพลาตินด้วยอัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.010 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเกิดขึ้นไม่เท่ากันซิสพลาตินยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้มากกว่าทรานส์พลาตินและคาร์โบพลาติน (รูปที่ 13 16 และ 19) ซึ่งสอดคล้องกับทดลองของ Murray และคณะ (1992) ที่แสดงให้เห็นว่าทรานส์พลาตินให้ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองเช่นเดียวกับซิสพลาติน แต่แตกต่างกันตรงที่ปริมาณความเข้มข้นของทรานส์พลาตินที่ใช้ในการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอมากกว่าซิสพลาตินประมาณสองเท่า และจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสวันแสดงให้เห็นว่าเมื่อนำดีเอ็นเอของไวรัสชนิด M 13 mp 8 (M13 mp 8 Viral DNA) มาทำอันตรกิริยากับซิสพลาตินที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.006 จะให้ผลยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเท่ากับการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับทรานส์พลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.016 (Pinto and Lippard, 1985) และต้องใช้ปริมาณความเข้มข้นของคาร์โบพลาตินมากกว่าการใช้ปริมาณความเข้มข้นของซิสพลาตินประมาณ 50 เท่า สำหรับการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ระดับเดียวกัน (Murray, *et al.*, 1997) Ponti และคณะ (1991) พบว่าเมื่อนำซิสพลาตินมาเกิดอันตรกิริยากับพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพีบีอาร์ 322 (pBR 322) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะถูกยับยั้งมากกว่าเมื่อนำคาร์โบพลาตินมาเกิด

อันตรกิริยากับพลาสมิดดีเอ็นเอประมาณ 100 เท่า และเมื่อมาพิจารณาถึงผลของระยะเวลาต่อการเกิดอันตรกิริยาของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดจากซิสพลาติน ทรานส์พลาตินหรือคาร์โบพลาติน (รูปที่ 22 และ 23) พบว่าที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดเท่ากับ 0.100 การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแตกต่างกันมากพบว่าดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นเนื่องจากซิสพลาตินสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ไวกว่าดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นเนื่องจากทรานส์พลาตินหรือคาร์โบพลาติน

จากผลการทดลองพบว่า ดีเอ็นเอแอดดัคที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมเท่ากันสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแต่ละขนาดไม่เท่ากัน โดยที่การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบส เกิดขึ้นน้อยกว่าการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 992 และ 1,478 คู่เบส ทั้ง ๆ ที่ใช้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ชนิดเดียวกัน ซึ่งจากการศึกษาของ Jennerwein และ Eastman (1992) พบว่าทุกตำแหน่งที่เกิดแอดดัคบนสายดีเอ็นเอสามารถยับยั้งกระบวนการโพลีเมอไรเซชันของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรสทำให้ได้ผลิตผลดีเอ็นเอเป้าหมายลดลง นอกจากนี้ Holler และคณะ (1992) พบว่าดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นในลักษณะโมโนฟังค์ชันนอลสามารถยับยั้งกระบวนการโพลีเมอร์ไรเซชันของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรสได้ ปัจจัยสำคัญในการวิเคราะห์หาจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเทคนิค QPCR นอกจากจะขึ้นอยู่กับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในช่วงเอ็กซ์โปเนนเทียลและองค์ประกอบต่าง ๆ ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแล้ว (ได้แก่ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต แมกนีเซียมคลอไรด์ ไพรเมอร์ และเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส) ยังพบว่าขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษา จากการศึกษาของ Govan และคณะ (1990) พบว่าข้อจำกัดของการวิเคราะห์หาจำนวน ดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเทคนิค QPCR จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอแอดดัคที่ต้องการสังเคราะห์ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 450 คู่เบส จะทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์หาจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นจากรังสีอัลตราไวโอเลต เนื่องจากพบว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรสสามารถอ่านผ่าน (bypass) ตำแหน่งดีเอ็นเอแอดดัคได้ดีกว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดใหญ่ และจากการศึกษาของ Jennerwein และ Eastman (1992) แสดงเห็นให้ว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 2,000 คู่เบส ของดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากซิสพลาตินบนยีน

อะดีนีนฟอสโฟริโบซิลทราสเฟอเรส (adenine phosphoribosyltransferase gene) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะถูกยับยั้งได้ดีกว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 150 คู่เบสของดีเอ็นเอแอดดัคชนิดเดียวกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 2000 คู่เบส และจากการหาจำนวนแอดดัคบนดีเอ็นเอขนาด 2,000 คู่เบส เปรียบเทียบกับจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคบนดีเอ็นเอขนาด 150 คู่เบส ด้วยเทคนิค QPCR พบว่าจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นบนดีเอ็นเอขนาด 2,000 คู่เบส มีค่าใกล้เคียงกับจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะตอมมิคแอบซอพชันสเปกโทรสโคปี (atomic absorption spectroscopy) ในขณะที่จำนวนดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นบนดีเอ็นเอขนาด 150 คู่เบส มีค่าคลาดเคลื่อนไปจากการวิเคราะห์หาจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเทคนิคอะตอมมิคแอบซอพชันสเปกโทรสโคปี นอกจากนี้ Kalinowski และคณะ (1992) ได้ยืนยันว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินบนยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดัคเตส (dihydrofolate reductase gene) ซึ่งมีขนาด 2,600 คู่เบสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะถูกยับยั้งมากกว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินบนดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ซึ่งมีขนาด 2,300 คู่เบส และจากการหาจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเทคนิค QPCR พบว่ามีความไวกว่าการวิเคราะห์หาจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคด้วยเทคนิค southern blotting

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากซิสพลาตินบนสายดีเอ็นเอที่ถูกถอดรหัส (transcribed strand) ของยีน N-ras กับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นบนดีเอ็นเอที่ไม่ได้ถูกถอดรหัส (nontranscribed strand) บนยีน N-ras ด้วยเทคนิค strand-specific Polymerase Chain Reaction (ss-PCR) พบว่าดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินบนสายดีเอ็นเอที่ถูกถอดรหัสจะมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอมากกว่าดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินบนสายดีเอ็นเอที่ไม่ได้ถูกถอดรหัส นอกจากนี้จากการศึกษาปริมาณแอดดัคที่เกิดจากซิสพลาตินบนยีน N-ras ด้วยเทคนิค QPCR พบว่าจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นบนสายดีเอ็นเอที่ถูกถอดรหัสจะยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้มากกว่าดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นบนสายดีเอ็นเอที่ไม่ได้ถูกถอดรหัส ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นบนดีเอ็นเอที่ถูกถอดรหัสมีมากกว่าปริมาณแอดดัคบนสายดีเอ็นเอที่ไม่ได้ถูกถอดรหัส (Bingham, *et al.*, 1996)

จากการวิเคราะห์จำนวนดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นบนยีนเรติโนอิคแอซิดรีเซฟเตอร์ชนิดเบต้า (retinoic acid receptor β, RAR β) และ ยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดัคเตส ในเซลล์มะเร็งเต้านม (T47 D breast cancer cell) ด้วยเทคนิค Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Quantitative RT- PCR) พบว่าเมื่อให้ 9 ซิสเรติโนอิคแอซิด (9-cis-retinoic acid) เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ พร้อมกับซิสพลาติน 1 มิลลิโมลาร์แก่เซลล์มะเร็งเต้านมดังกล่าวมีจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากซิสพลาตินบนยีนเรติโนอิคแอซิดรีเซฟเตอร์โปรโมเตอร์ (retinoic acid receptor β promoter) มากกว่าจำนวนดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากซิสพลาตินในส่วนของโปรโมเตอร์ (promoter) ของยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดัคเตส ในส่วนของโคดิงซีเควิ้น (coding sequence) ของยีนเรติโนอิคแอซิดรีเซฟเตอร์ชนิดเบต้า และในส่วนของโคดิงซีเควิ้นของยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดัคเตส ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอแอดดัคจะเกิดขึ้นในส่วนของโปรโมเตอร์ได้ดีกว่าในส่วนของโคดิงซีเควิ้นของยีน (Haghighi, *et al.*, 1999)

นอกจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมบนดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแล้ว นิยมประยุกต์ใช้วิธีการเดียวกันนี้มาวิเคราะห์ดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากสารเคมีชนิดอื่น ๆ ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะเป็นยาต้านมะเร็ง เช่น ไนโตรเจนมัสตาร์ด (nitrogen mustard) และควินาคริน มัสตาร์ด (quinacrine mustard) บนยีน N-ras (Grimadi, *et al.*, 1994) อัลคิลเบนซิลกัวนีน (alkylbenzylguanine) บนยีนฮิวแมนดีเอ็นเออัลคิลทรานสเฟอเรส (human DNA alkyltransferase gene) (Hickson, *et al.*, 1998) เมทิลมีเธนซัลโฟเนต (methyl methanesulfonate) บนดีเอ็นเอของเซลล์ไฟโบรบลาสท์ (fibroblasts cell) (Chen, *et al.*, 1998) คลอแรมบิวซิล (chlorambucil) บนยีนกัวนีนฟอสโฟริโบซิลทรานส์เฟอเรส (guanine phosphoribosyl transferase gene) (Honma, *et al.*, 1997) วินไธโอนิน (vinthionine) หรือ 2-คลอโรเอธิลเมธิลซัลไฟด์ (2-chloroethyl methyl sulfide) บนยีน H-ras (Sohn, *et al.*, 1996) และ 2-คลอโร-2$^{\prime}$ ดีออกซีอะดีโนซีน (2-chloro-2$^{\prime}$ deoxyadenosine, CldAdo, Cladribine) บนยีน N-ras (Yuh, *et al.*, 1998) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีการดัดแปลงเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อศึกษาแอดดัคของยีน p53 ที่เกิดจากคลอโรเอธิลซิสเตอีน (chloroethylcysteine) ด้วย

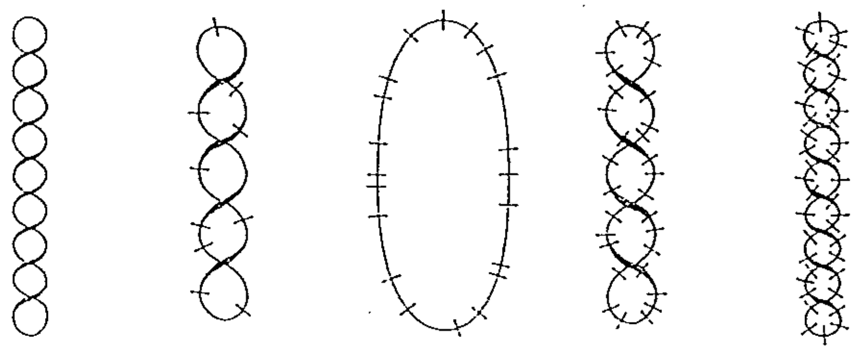
เทคนิคซิงเกิลแสตรนด์คอนฟอร์เมชันนอลโพลีมอร์ฟิซึม (single strand conformational polymorphism- Polymerase Chain reaction, SSCP - PCR) (Richter and Vamvakas, 1998) และดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากเมลาไทออน (malathion) ของ เอ็กซอนที่ 3 (exon 3) ซึ่งมีขนาด 125 คู่เบสของเซลล์ที-ลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) ด้วยเทคนิค RT-PCR (Pluth, *et al.*, 1998)

จากผลการศึกษาการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแบบมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ พบว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 621 1,478 และ 2,105 คู่เบส เกิดขึ้นไม่เท่ากัน (รูปที่ 21) โดยที่ผลิตผลดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบสมีปริมาณมากกว่าผลิตผลดีเอ็นเอขนาดอื่น อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 2,105 คู่เบสมีแนวโน้มที่ถูกยับยั้งได้มากกว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,478 คู่เบสและการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 261 คู่เบส ตามลำดับซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองของ Mellon และ Hanawalt (1989) ที่ได้ศึกษาผลของแสงอัลตราไวโอเลตต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแต่ละขนาดด้วยเทคนิคแบบมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ภายในปฏิกิริยาเดียวกัน (mutiplex-PCR) พบว่าแสงอัลตราไวโอเลตมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่บริเวณ ยีน lac Z (3200 คู่เบส) ได้มากกว่าการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่บริเวณยีน Lac I (1,200 คู่เบส) ของดีเอ็นเอในเซลล์ *E. coli*

2. การเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

จากการศึกษาผลของอัตราส่วนโมลาร์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอ (รูปที่ 25A) พบว่าโครงรูปของพลาสมิดเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อยที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ต่ำๆ โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอในรูปที่ขดพันตัวเอง (รูป I) เคลื่อนที่ช้าลง และจะเคลื่อนที่ช้าลงอีกเมื่ออัตราส่วนโมลาร์สูงขึ้น จนกระทั่งการเคลื่อนที่ของพลาสมิดดีเอ็นเอในรูปที่ขดพันตัวเองเท่ากับการเคลื่อนที่ของพลาสมิดดีเอ็นเอในรูปที่คลายเป็นวง (รูป III) อย่างไรก็ตามแถบของพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปที่คลายตัวเป็นวงเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นเมื่ออัตราส่วนโมลาร์เพิ่มสูงขึ้นอีกซึ่งอาจเป็นไปได้ที่ว่าพลาสมิดดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปในรูปที่ขดพันตัวเองอีกครั้งเมื่อเกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินในปริมาณที่สูงดังแสดงในรูปที่ 32 โดยปกติแล้วดีเอ็นเออาจขดพัน

ตัวเองไปในทิศทางขวามือ (right-handed/negatively supercoiled) หรืออาจขดพันตัวเองไปในทิศทางซ้ายมือ(left-handed/positively supercoiled) ในกรณีที่พลาสมิดดีเอ็นเอเกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่อัตราส่วนโมลาร์ต่าง ๆ กันอาจเป็นไปได้ว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปที่ขดพันตัวเองค่อย ๆ คลายเกลียวเป็นวงเมื่อเกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมในปริมาณที่เหมาะสม แต่เมื่อสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมมีปริมาณมากขึ้นพลาสมิดดีเอ็นเอจะเปลี่ยน



a b c d e

รูปที่ 32 รูปจำลองที่เป็นไปได้ของการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่อัตราส่วนโมลาร์ต่าง ๆ กัน

a. พลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดพันตัว

b. พลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ระดับอันตราส่วนโมลาร์ต่ำ ๆ

c. พลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ระดับอันตราส่วนโมลาร์สูงขึ้นและอยู่ในรูปที่คลายเป็นวง

d. และ e พลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์สูง ๆ

โครงรูปจากรูปที่คลายตัวเป็นวงไปอยู่ในรูปที่ขดพันตัวเองซึ่งมีผลต่อการเคลื่อนที่ของพลาสมิดดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล สอดคล้องกับการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของไวรัสชนิด SV 40 (SV 40 DNA) เมื่อเกิดอันตรกิริยากับซิสพลาติน (Scovell and Collart, 1985) โดยการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในรูปที่คลายตัวเป็นวงที่อัตราส่วนโมลาร์ระหว่างซิสพลาตินต่อนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.08 และที่อัตราส่วนโมลาร์มากกว่า 0.08 ดีเอ็นเอในรูปที่คลายตัวเป็นวงจะเคลื่อนที่เร็วขึ้น นอกจากนี้ Brabec และคณะ 1999 พบว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง [*trans*-Pt $(NH_3)_2\{H_2N\ (CH_2)_6\ NH_2\}_2]^{4+}$ กับพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพีเอสพี 73 (pPS 73) ทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปจากรูปที่ขดพันตัวเองไปยังรูปที่คลายตัวเป็นวงที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.063 การเคลื่อนที่ที่เร็วขึ้นของพลาสมิดดีเอ็นเอในรูปที่คลายเป็นวงเมื่ออัตราส่วนโมลาร์สูงขึ้นอาจเกิดจากความยาวของดีเอ็นเอลดลง (shortening effect) อันเนื่องมาจากโครงสร้างของโมเลกุลดีเอ็นเออยู่ในลักษณะที่อัดกันมากขึ้น (Sherman and Lippard, 1987) การคลายเกลียวของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินนี้จะคล้ายกับอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเอธิเดียมโบรไมด์กับดีเอ็นเอ แม้ว่ากลไกของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะต่างกันตรงที่ซิสพลาตินจะเกิดอันตรปฏิกิริยากับดีเอ็นเอด้วยการเกิดพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) กับเบสพิวรีนบนสายดีเอ็นเอ ในขณะที่เอธิเดียมโบรไมด์จะสอดแทรกอยู่ระหว่างคู่เบส (intercalation) ภายในสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ (Cohen *et al.*,1979; Bellon *et al.*,1991) จากการศึกษาของ Howe-Grant และคณะ (1976) พบว่าซิสพลาตินไม่ได้ยับยั้งการสอดแทรกของเอธิเดียมโบรไมด์ระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าเมื่ออัตราส่วนโมลาร์ระหว่างซิสพลาตินต่อนิวคลีโอไทด์เพิ่มสูงขึ้นจะเห็นแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์จางลง จากผลการทดลองนี้อาจเป็นไปได้ที่ดีเอ็นเอแอดดัคเกิดมากขึ้นที่อัตราส่วนโมลาร์สูง ๆ ทำให้โครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอขดพันตัวเองมากขึ้นดังแสดงในรูปที่ 32 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงโครงรูปดังกล่าวจะไปขัดขวางการสอดแทรกของเอธิเดียมโบรไมด์เข้าสู่เกลียวคู่ของดีเอ็นเอ ทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอหลังจากย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์จางลงซึ่งก็สอดคล้องกับผลของ Butour และ Macquet (1978) ที่รายงานผลของซิสพลาตินต่อโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของดีเอ็นเอโดยที่โครงสร้างของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเกิดอันตรกิริยากับเอธิเดียมโบรไมด์

โดยที่ความเข้มของการเรืองแสงของเอธิเดียมโบรไมด์ลดลง (Inagaki and Kidani ,1980; Kasparkova, *et.al.*, 1999) ทั้งนี้เนื่องจากซิสพลาตินที่เกิดอันตรกิริยากับดีเอ็นเอจะขัดขวางการสอดแทรกของเอธิเดียมโบรไมด์ นอกจากนี้ยังพบว่าสเปกตรัมดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปเมื่อทำปฏิกิริยากับซิสพลาติน การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นผลมาจากจากการเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของอิเลคตรอนของเบสของดีเอ็นเอ (Inagaki and Kidani, 1980)

จากการศึกษาผลของทรานส์พลาตินหรือคาร์โบพลาตินต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอ พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปในลักษณะเดียวกันกับซิสพลาติน (รูปที่ 24) โดยที่พลาสมิดดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปจากรูปที่ขดพันตัวเองไปยังรูปที่คลายตัวเป็นวงเนื่องจากซิสพลาติน ทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาติน มีอัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.100, 0.200 และ 2.000 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าซิสพลาตินสามารถเกิดอันตรกิริยากับพลาสมิดดีเอ็นเอได้ดีกว่าทรานส์พลาตินและคาร์โบพลาติน จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Keck และ lippard (1992) ที่แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปจากรูปที่ขดพันตัวเองไปเป็นรูปที่คลายตัวเป็นวงเมื่อเกิดอันตรกิริยากับซิสพลาตินและทรานส์พลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.076 และ 0.110 ตามลำดับ จากการศึกษาอัตราส่วนโมลาร์ของซิสพลาตินเปรียบเทียบกับอันตรส่วนโมลาร์ของคาร์โบพลาตินที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอ พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงโครงรูปจากรูปที่ขดพันตัวเองไปเป็นรูปที่คลายตัวเป็นวงเมื่ออัตราส่วนโมลาร์ของคาร์โบพลาตินมากกว่าอัตราส่วนโมลาร์ของซิสพลาตินประมาณ 20 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Mong และคณะ (1980) นอกจากนี้ Hongo และคณะ (1994) พบว่าอัตราการไฮโดรไลซิสของหมู่คลอไรด์ตัวที่สองของซิสพลาตินและทรานส์พลาตินมีความไวแตกต่างกัน อัตราการไฮโดรไลซิสของหมู่คลอไรด์ตัวที่สองในทรานส์พลาตินจะเกิดขึ้นช้ากว่าในซิสพลาติน (Brabec and Leng, 1993) และจากการศึกษาอัตราส่วนโมลาร์ของคาร์โบพลาตินเปรียบเทียบกับอัตราส่วนโมลาร์ของซิสพลาตินที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอ (รูปที่ 25) พบว่าอัตราส่วนโมลาร์ของคาร์โบพลาตินมีค่ามากกว่าอัตราส่วนโมลาร์ของซิสพลาติน 20 เท่า ซึ่งนับได้ว่าสอดคล้องกับการทดลองของ Mong และคณะ (1980) พบว่าคาร์โบพลาตินชักนำให้

พลาสมิดดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปจากรูปที่ขดพันตัวเองกลายเป็นโครงรูปที่คลายตัวเป็นวงด้วยระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าการชักนำของการเปลี่ยนแปลงโครงรูปที่เกิดจากซิสพลาติน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hongo และคณะ (1994) พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปขดพันตัวเองคลายตัวเป็นวงเมื่อเกิดอันตรกิริยากับยาคาร์โบพลาตินด้วยปริมาณความเข้มข้นที่มากกว่าปริมาณความเข้มข้นของซิสพลาตินประมาณ 10 เท่า แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาผลของซิสพลาตินหรือทรานส์พลาตินต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 ภายใต้สภาวะที่มีทริส-ไฮโดรคลอไรด์ พีเอช 7.4 (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, tris-HCl pH 7.4) เป็นสายสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่าอัตราส่วนโมลาร์ของซิสพลาตินหรือทรานส์พลาตินต่อนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอจากรูปที่ขดพันตัวเองไปเป็นรูปที่คลายเป็นวงมีค่าเพิ่มขึ้นไปจากผลการทดลองนี้ประมาณ 7.5 เท่า (ทรงศรี แก้วสุวรรณ และอารยา ส่องศรี, 2542) แสดงให้เห็นว่าสายละลายบัฟเฟอร์มีผลต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างซิสพลาตินกับดีเอ็นเอ จากการศึกษาผลของ Prenlzer และ Mcfadyen (1997) พบว่าหมู่เอมีนของทริส-ไฮโดรคลอไรด์สามารถเกิดพันธะโคออร์ดิเนต (coordinate bond) กับอะตอมพลาตินัมอิสระ ดังนั้นอัตราส่วนโมลของซิสพลาตินที่ใช้ในการเกิดอันตรกิริยากับดีเอ็นเอจึงเพิ่มขึ้น

จากผลการศึกษาระยะเวลาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดกับพลาสมิดดีเอ็นเอ (รูปที่ 25 และ 26) พบว่าซิสพลาตินเกิดอันตรกิริยากับพลาสมิดดีเอ็นเอได้ไวกว่าทรานส์พลาตินและคาร์โบพลาติน ความไวของปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอกับซิสพลาติน เป็นผลมาจากจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิด (Sherman และ Lppard, 1987) จากการศึกษาของ Holler (1993) พบว่าการเกิดไฮโดรไลซิสของหมู่คลอไรด์ตัวแรกของทรานส์พลาตินมีอัตราเร็วใกล้เคียงกับการเกิดไฮโดรไลซิสของหมู่คลอไรด์ตัวแรกของซิสพลาติน แต่การไฮโดรไลซิสของหมู่คลอไรด์ตัวที่สองของทรานส์พลาตินจะเกิดขึ้นช้ามาก ในขณะที่การเกิดไฮโดรไลซิสของหมู่คลอไรด์ตัวที่สองของซิสพลาตินจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งจากการศึกษาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์และกลไกการเกิดอันตรกิริยาระหว่างซิสพลาตินและทรานส์พลาตินกับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ^{195}Pt NMR พบว่า อัตราการเกิดโมโนฟังค์ชันนอลแอดดัค

ของซิสพลาตินและทรานส์พลาตินมีค่าเท่ากับ 10.2 ± 0.7 x 10^{-5} s^{-1} ($t_{1/2}$ = 1.9 ± 0.1 h) และ 9.6 x 10^{-5} s^{-1} ($t_{1/2}$ = 0.3 h) ตามลำดับ และอัตราการเกิดไบฟังค์ชันนอลแอดดัคของซิสพลาตินและทรานส์พลาตินเท่ากับ 9.2 ± 1.1 x 10^{-5} s^{-1} ($t_{1/2}$ =0.3 h) และ 6.3 ± 0.1 x 10^{-5} s^{-1} ($t_{1/2}$ = 3.1 ± 0.1 h) ตามลำดับ (Bancroft, *et al.*, 1990) และจากการศึกษาของ Frey และคณะ (1993) พบว่าเมื่อคาร์โบพลาตินที่ละลายอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 310 องศาเควิล อัตราการไฮโดรไลซิสของคาร์โบพลาตินมีค่าเท่ากับ 7.2 x 10^{-7} s^{-1} และอัตราการเกิดพันธะระหว่างคาร์โบพลาตินกับกัวโนซีน 5′-ฟอสเฟต (Guanosine 5′-monophosphate, GMP) เท่ากับ 4.1 x 10^{-6} s^{-1} ถึงแม้ว่าคาร์โบพลาตินจะมีโครงสร้างทางสเตอริโอเคมีเหมือนกับซิสพลาตินก็ตาม แต่เนื่องจากในโมเลกุลของคาร์โบพลาตินมีหมู่ไซโคลบิวทิลไดคาร์บอกซิเลต (cyclobutyldicarboxate) แทนที่หมู่คลอไรด์ในโมเลกุลของซิสพลาตินทำให้คาร์โบพลาตินมีเสถียรภาพมากขึ้น ทำให้กระบวนการเกิดไฮโดรไลซิสเกิดยากกว่ากรณีของซิสพลาติน

นอกจากนี้การศึกษาทางจลนพลศาสตร์ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างซิสพลาตินกับดีเอ็นเอสามารถอธิบายได้ว่าทำไมการเกิดดีเอ็นเอแอดดัคแบบ 1,2 อินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ในลักษณะ (ApG) จึงเกิดได้ดีกว่าในลักษณะ (GpA) โดยที่ Davies และคณะ (1998) พบว่าอัตราเร็วในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างซิสพลาตินกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ในลักษณะ (ApG) มีค่าเท่ากับ 1.06 ± 0.06 $M^{-1}s^{-1}$ และ (GpA) มีค่าเท่ากับ 0.149 ± 0.04 $M^{-1}s^{-1}$ ตามลำดับ

3. ความว่องไวของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะต่อดีเอ็นเอแอดดัดที่เกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

จากการวิเคราะห์หาตำหน่งที่เกิดอันตรกิริยาได้มากที่สุดระหว่างอะตอมพลาตินัมกับเบสของพลาสมิคดีเอ็นเอ โดยศึกษาความไวของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะในการย่อยดีเอ็นเอแอดดัคอันเกิดเนื่องจากซิสพลาตินหรือคาร์โบพลาติน (รูปที่ 27, 28 และ 29) พบว่า การทำงานของเอนไซม์ *Bam*H I ถูกยับยั้งได้ดีกว่าเอนไซม์ *Eco*R I และ *Hin*d III ที่อัตราส่วนโมลาร์เดียวกัน และเมื่อพิจารณาถึงเบสจำเพาะและตำแหน่งที่เอนไซม์ทั้งสามที่ย่อยพลาสมิคดีเอ็นเอดังนี้ 5′-G▼GATCC-3′ 5′-G▼AATTC-3′ และ 5′-A▼AGCTT-3′ ตามลำดับ จะเห็นว่าเอนไซม์ *Bam*H I

จะตัดดีเอ็นเอที่มีเบสกัวนีนสองตัวอยู่ติดกันในขณะที่เอนซม์ *Eco*R I จะตัดดีเอ็นเอที่มีเบสกัวนีนอยู่เพียงตัวเดียวและอยู่ติดกับเบสอะดีนีน และเอนไซม์ *Hin*d III จะตัดดีเอ็นเอที่มีเบสอะดีนีนสองตัวที่อยู่ติดกัน แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอแอดดัคจะเกิดในลักษณะ d(GpG) หรือเกิดพันธะระหว่างอะตอมพลาตินัมกับเบสกัวนีนที่อยู่ติดกันบนสายดีเอ็นเอเดียวกันได้มากกว่าดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดในลักษณะ d(GpA) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ushay และคณะ (1981) ที่ได้ศึกษาตำแหน่งจำเพาะบนสายดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพีบีอาร์ 322 (pBR 322) ที่เกิดพันธะกับอะตอมพลาตินัมโดยอาศัยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะ *Bam*H I และพบว่าการทำงานของเอนไซม์ *Bam*H I จะถูกยับยั้งสมบูรณ์ที่อัตราส่วนโมลาร์ระหว่างซิสพลาตินต่อนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.045 อะตอมพลาตินัมสามารถเกิดพันธะโควาเลนท์กับที่ตำแหน่ง N7 ของเบสกัวนีนได้ดีที่สุด รองลงมากับที่ตำแหน่ง N7 ของเบสกัวนีนกับที่ตำแหน่ง N1 ของเบส อะดีนีน และกับที่ตำแหน่ง N3 ของเบสไซโตซีน ตามลำดับ (Lepre, *et. al.*, 1987; Lippard, 1982) นอกจากนี้ซิสพลาตินมักเกิดพันธะกับสายดีเอ็นเอแบบ 1, 2 อินตรสแตรนด์ครอสลิงค์ โดยเกิดพันธะที่ตำแหน่ง N7 ของเบสพิวรีน ในลักษณะ d(GpG) มากกว่าร้อยละ 65 และในลักษณะ d(ApG) ประมาณร้อยละ 20-25 (Fichtinger-Schepman, *et al.*, 1985; 1988) ดังนั้นโอกาสที่ดีเอ็นเอแอดดัคจะเกิดในลักษณะ d(GpA) ย่อมเป็นไปได้น้อยกว่าในลักษณะ d(GpG) ภายในสายดีเอ็นเอเดียวกันหรืออาจเป็นไปได้ที่ดีเอ็นเอแอดดัคที่ลำดับเบสจำเพาะของเอนไซม์ *Eco*R I และ *Hin*d III จะเกิดในลักษณะโมโนฟังค์ชันนอลแอดดัค [(Pt-dG)] ซึ่งเอนไซม์ *Eco*R I สามารถทำงานได้ตามปกติเช่นเดียวกับการทำงานของเอนไซม์ *Bam*H I ที่อัตราส่วนโมลาร์เดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานสวนใหญ่ที่พบว่าความเป็นพิษของซิสพลาตินต่อเซลล์มะเร็งเกิดจากการเกิดดีเอ็นเอแอดดัคแบบอินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ โดยดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นมักจะเกิดในลักษณะ d(GpG) และ d(ApG) (Fichtinger-Schepman *et al.*, 1987; Van Hemelryck *et al.*, 1987; Chottard, 1993) อย่างไรก็ตามจากรูปที่ 28 และ 29 ดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากทรานส์พลาตินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Eco*R I และ *Hin*d III ที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์สูง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์ที่มากเกินพออันตรกิริยาระหว่างดีเอ็นเอกับทรานส์พลาตินอาจเกิดแบบอินเตอร์สแตรนด์ครอสลิงค์ในลักษณะ d(GpC) หรือ d(CpG) (Brabec and Leng, 1993) ซึ่งจากการศึกษาของ

Bernal-mendez (1997) แสดงให้เห็นว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างทรานส์พลาติน กับดีเอ็นเอแบบไบฟังค์ชันนอลแอดดัคส่วนมากเป็นแบบอินเตอร์สแตรนด์ครอสลิงค์ ซึ่งอาจมีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองก็ได้

เอนไซม์ *Pvu* II เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพลาสมิคดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 ได้สอง ตำแหน่ง (5′-CAG▼CTG-3′) และการทำงานของเอนไซม์ *Pvu* II เริ่มถูกยับยั้ง โดย ซิสพลาติน ทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาตินที่อัตราส่วนโมลาร์ 0.010, 0.025 และ 0.050 ตามลำดับ (รูปที่ 30) ซึ่งเป็นอัตราส่วนโมลาร์เดียวกับอัตราส่วนโมลาร์ที่ยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ *Bam*H I ซึ่งเมื่อพิจารณาลำดับเบสจำเพาะที่เอนไซม์ *Pvu* II จดจำและย่อยดีเอ็นเอจะเห็นว่าเอนไซม์ *Pvu* II จะย่อยดีเอ็นเอที่มีเบสกัวนีนอยู่ติดกับ เบสไซโตซีน ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่อันตรกิริยาระหว่างซิสพลาติน ทรานส์พลาติน และ คาร์โบพลาตินกับพลาสมิดดีเอ็นเอจะเกิดแบบอินเตอร์สแตรนด์ครอสลิงค์ตรงบริเวณ ที่มีลำดับเบสเป็น 5′-GC-3′ โดยจะเกิดพันธะระหว่างอะตอมพลาตินัมกับเบสกัวนีน ที่อยู่คนละสายของดีเอ็นเอ (Lemaire *et al.,* 1991) และจากการศึกษา replication mapping ของดีเอ็นเอแอดดัคแบบอินเตอร์สแตรนด์ครอสลิงค์พบว่าสามารถเกิดขึ้น ในลักษณะ d(CpG) และ d(GpC) ได้ (Vrana, *et al.,* 1996)

Pinto และคณะ (1986) ได้ศึกษาตำแหน่งของเบสบนดีเอ็นเอที่อะตอม พลาตินัมสามารถเกิดพันธะโควาแลนท์ d(GpG) โดยนำโดเดคานิวคลีโอไทด์ (dodecanucleotide) ที่มีดีเอ็นเอแอดดัคแบบอินตราสแตรนครอสลิงค์ในลักษณะ d(GpG) แล้วสอดแทรกเข้าสู่พลาสมิดดีเอ็นเอชนิด M13 mp 18 ที่ตำแหน่งตัดของ เอนไซม์ *Hinc* II ส่วนของโดเดคานิวคลีโอไทด์ที่สอดแทรกเข้าไปนั้นประกอบไปด้วย ตำแหน่งตัดและลำดับการจดจำเบสจำเพาะของเอนไซม์หลายตัว เช่น *Bam*H I, *Xba* I, *Hinc* II, *Pst* I, *Sph* I, *Mae* I และ *Stu* I พบว่าการทำงานของเอนไซม์ *Mae* I และ *Stu* I ถูกยับยั้งเมื่อเปรียบเทียบกับการทำงานของเอนไซม์ตัวอื่นๆ โดยที่ลำดับ เบสจำเพาะของเอนไซม์ *Mae* I และ *Stu* I เป็นบริเวณที่เกิดอินตราสแตรนด์ ครอสลิงค์ในลักษณะ (d(GpG) ส่วนเอนไซม์อื่น ๆ มีจุดตัดอยู่ที่ห่างไกลกับตำแหน่งที่ เกิดดีเอ็นเอแอดดัคและสามารถทำงานได้ตามปกติ อย่างไรก็ตามพันธะที่เกิดขึ้นจะ มากหรือน้อยเพียงใดอาจขึ้นอยู่กับปริมาณเบสกัวนีนและเบสไซโตซีน (G+C content) ภายในสายดีเอ็นเอนั้นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งดีเอ็นเอที่มีเบสกัวนีนซ้ำๆ กัน หลายตัวโอกาสที่เกิดพันธะโควาเลนต์ในลักษณะ d(GpG) นอกจากนี้ Cohen และ

คณะ (1980) พบว่าอะตอมพลาตินัมจะเกิดพันธะกับพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพีเอสเอ็มวัน (pSM I) ได้ดีเพียงไรนั้นขึ้นอยู่กับลำดับเบสของสายดีเอ็นเอนั้น ๆ โดยที่ดีเอ็นเอแอดดัคมักจะเกิดตรงบริเวณ d(G)n.d(G)n ได้ดีกว่าตรงบริเวณ poly (dG.dC) และบริเวณดังกล่าวทั้งสองจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Pst* I ได้ไม่เท่ากัน

จากการตรวจหาพลาสมิดดีเอ็นเอที่เสียสภาพเนื่องสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมด้วยเอนไซม์ *Hpa* II (รูปที่ 31) พบว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang และคณะ (1992) ซึ่งได้ตรวจหาดีเอ็นเอที่เสียสภาพเนื่องจากซีสพลาติน โดยใช้เอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะที่สามารถตัดพลาสมิดได้หลายตำแหน่ง ได้แก่ *Hae* III, *Hpa* II, *Alu* I และ *Hha* I โดยเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอที่ทำปฏิกิริยากับซิสพลาติน ซึ่งให้ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากมากไปน้อย คือ *Hae* III > *Hpa* II > *Alu* I > *Hha* I และจากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่าดีเอ็นเอแอดดัคมักเกิดขึ้นแบบอินตราสแตรนครอสลิงค์ในลักษณะ d(GpG)

บทที่ 5

สรุป

1. การศึกษาผลของประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นเนื่องจากซิสพลาติน ทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาตินที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์เดียวกันเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้ผลิตผลดีเอ็นเอไม่เท่ากัน ปริมาณผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นเนื่องจากซิสพลาตินมีน้อยกว่าปริมาณผลิตผลดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นจากทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาติน จากการศึกษาผลของระยะเวลาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างซิสพลาติน ทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาตินกับดีเอ็นเอที่อัตราส่วนโมลาร์เดียวกันต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ พบว่าซิสพลาตินยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ไวกว่าทรานส์พลาตินและคาร์โบพลาตินประมาณ 73 และ 480 เท่า ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์หาปริมาณอะตอมพลาตินัมด้วยเทคนิค QPCR พบว่าดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดขึ้นเนื่องจากซิสพลาตินมีจำนวนอะตอมพลาตินัมมากกว่าจำนวนอะตอมพลาตินัมที่เกิดขึ้นเนื่องจากทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาติน จากการศึกษาผลของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมทั้งสามชนิดต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็ก พบว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่มีแนวโน้มที่ถูกยับยั้งได้มากกว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดเล็ก

2. การศึกษาหาปริมาณอะตอมพลาตินัมที่เกิดพันธะกับพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี

อันตรกิริยาระหว่างซิสพลาติน ทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาตินกับพลาสมิดดีเอ็นเอที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์เท่ากับ 0.01 มีจำนวนอะตอมพลาตินัมเท่ากับ 0.7, 0.2 และ0.09 อะตอม / 10^3 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ

3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม

ซิสพลาตินชักนำให้พลาสมิดดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงโครงรูปจากรูปที่ขดพันตัวเองไปเป็นรูปที่คลายตัวเป็นวงในระดับอัตราส่วนโมลาร์ที่ต่ำกว่าอัตราส่วนโมลาร์ของทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาตินประมาณ 2 และ 20 เท่า ตามลำดับ

ซิสพลาตินจะชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอดังกล่าวได้ไวกว่าการชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เกิดจากทรานส์พลาตินและคาร์โบพลาตินประมาณ 32 และ 960 เท่า ตามลำดับ

4. การศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะต่อดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมและพลาสมิดดีเอ็นเอ

ที่ระดับอัตราส่วนโมลาร์เดียวกันของดีเอ็นเอแอดดัคที่เกิดจากซิสพลาติน ทรานส์พลาติน และคาร์โบพลาตินการทำงานของเอนไซม์ *Bam*H I, *Pvu* II และ *Hpa* II จะถูกยับยั้งมากกว่าการทำงานของเอนไซม์ *Eco*R I และ *Hin*d III แสดงให้เห็นว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมแต่ละชนิดมักจะเกิดขึ้นแบบอินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ในลักษณะ d(GpG) หรือแบบอินเตอร์สแตรนด์ครอสลิงค์ในลักษณะ d(GpC) หรือ d(CpG) ได้ดีกว่าการเกิดดีเอ็นเอแอดดัคแบบอินตราสแตรนด์ครอสลิงค์ในลักษณะ d(GpA) หรือ d(ApA)

เอกสารอ้างอิง

ทรงศรี แก้วสุวรรณ และ อารยา ส่องศรี. 2542. การตรวจหาดีเอ็นเอที่ถูกทำให้เสียสภาพเนื่องจากยาต้านมะเร็งซิสพลาตินภายในหลอดทดลองด้วยวิธีเจลอิเลคโตรฟอเรซิส. รายงานวิจัย. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร 2536. เอนไซม์ Thermostable DNA Polymerase ใน PCR technology. (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ, บรรณาธิการ) หน้า 13-19. กรุงเทพ ฯ : โรงพิมพ์เรือนแก้ว.

มนตรี อัตถทิพพหลคุณ. 2536. การสังเคราะห์และการดัดแปลง. ใน PCR technology. (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ, บรรณาธิการ) หน้า 21-46. กรุงเทพ ฯ : โรงพิมพ์เรือนแก้ว.

Appleton, T.G., Berry, R.D., Davis, C.A., Hall, J.R. and Kimline, H.A. 1984. Reaction of platimun (II) aqua complexes 1 Multinuclear ^{195}Pt, ^{15}N and ^{31}P NMR study of reaction between the cis-diamminediaquaplatinum (II) and the oxygen-donor ligands hydroxide perchlorate, nitrate, sulfate and acetate. Inorg. Chem. 23 : 3514-3531

Bancroft, D.P., Lepre, C.A. and Lippard, S.J. 1990. ^{195}Pt NMR kinetic and mechanistic studies of *cis*-and *trans*-diamminedichloroplatinum (II) binding to DNA. J. Am. Chem. Soc. 112 : 6860-6871.

Bellon, S.F., Coleman, J.H. and Lippard, S.J. 1991. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-link of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II). Biochemistry. 30 : 8026-8035.

Bernal-Méndez, E., Boudvillain, M., González-Vílchez, G. and Leng, M. 1997. Chemical versatility of transplatin monofunctional adduct with in multiple stie-specifically platinated DNA. Biochemistry 36 : 7281-7287.

Bingham, J.P., Hartley, J.A, Souhami, R.L. and Grimedi, K.A. 1996. Strand-specific measurement of cisplatin-induced DNA damage and repair using quantitative PCR. Nucleic Acids Res. 24 : 987-989.

Blair, G.E. and Zajdel, M.E.B. 1992. The polymerase chain reaction already an establish technique in Biochemistry. Biochemical education 20 : 87-91.

Blommaert, F.A., van Dijk-Knijnenburg, H.C.M., Dijt, F.J., den Engelse, L., Baan, R.A., Berends, F. and Fichtinger-Schepman, A.M.J. 1995. Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin : different nucleotide sequence preferences *in Vitro* and in cells. Biochemistry 34 : 8474-8480.

Bose, R.N., Cornelius, R.D. and Viola, R.E. 1986. Multinuclear NMR studies and kinetic of formation of platinum (II) adenine nucleotide complexes. J. Am. Chem. Soc. 108 : 4403-4407.

Boudvillain, M., Dalbies,R., Aussourd, C. and Leng, M. 1995. Interstrand cross-links are not formed in the reaction between transplatin and native DNA: relation with the clinical infficiency of transplatin. Nucleic Acids Res. 23 : 2381-2388.

Brabec, V., Kaśpárkova, J., Vrána, O., Novákava, O., Cox, J.W., Qu, Y. and Farrel, N. 1999. DNA modifications by a novel bifunctional trinuclear platinum phase I anticancer agent. Biochemistry 38 : 6781-6790.

Brabec, V. and Leng, M. 1993. DNA interstrand cross-link of trans-diammine dichloroplatium (II) are preferentially formed between guanine and complementary cytosine residues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90 (11) : 5345-5349.

Brock, T.D. and Freeze, H. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., nonsporulating extreme thermophile. J. Bacteriol 98 : 289-279.

Butour, J.L. and Macquet, J.P. 1978. Platinum determination in DNA-platinum complexes by fluorescence spectrophotometry. Anal. Biochem. 89 : 22-30.

Carballeira, N., Nazabal, M., Brito, J., Garcia, O. 1990. Purification of thermostable DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB useful in the polymerase chain reaction. Biotechniques 9 : 278-289.

Cariello, N.I., Sweenberg, J.A., Skopek, TR. 1991. Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase in PCR. Nucleic Acids Res. 19 : 4193-4198.

Chen, K.H., Yakes, F.M., Srivastava, D.K., Singhal, R.K., Sobol, R.W., Horton, J.K., Van-Houten, B. and Wilson, S.H. 1998. Up-regulation of base excision repair correlates with enhanced protection against a DNA damaging agent in mouse cell limes. Nucleic Acids Res. 26 : 2001-2007.

Chottard, J.C. 1993. Oligonucleotide modelling of platinum-DNA interaction, analysis of structure of biomacromolecules and their interactions with enviromental cytotoxic agents, Brno, Czech Republic, July 1993, Abstracts. Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, pp. 5.

Cohen, G.L., Bauer, W.R., Barton, J.K., Lipard, S.J. 1979. Binding of *cis*- and *trans*-dichlorodiammineplatinum (II) to DNA : Evidence of the double helix. Science 203 : 1014–1016.

Cohen, G.L., Lednen. J.A., Bauer, W.R., Ushay, H.M., Canavana, C. and Lippard, S.J. 1980. Sequence dependent binding of *cis*-dichloro diammineplatinum (II) to DNA. J. Am. Chem. Soc. 102 : 2487-2488.

Comess, K.M., Burstyn. J.N., Essigman, J.M. and Lippard, S.J. 1992. Replication inhibition and translesion synthesis on templates containing site-specifically placed *cis*-diamminedichloroplatinum (II) DNA adducts. Biochemistry. 39 : 3975-3990.

Coste, F., Malinge, J.M., Serre, L., Shepard, W., Roth, M., Leng, M. and Zelwer, C. 1999. Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand crosslink at 1.63 A resolution hydration at the platinated site. Nucleic Acids Res. 27 : 1837 - 1846.

Davies, M.S., Berners-price, S.J. and Hambley, T.W. 1998. Rates of platination of AG and GA containing double-strand oligonucleotides: Insights into why cisplatin bind to GG and AG but not GA sequen Cl in DNA. J. Am. Chem. Soc. 120 : 1380-1139.

Donahue, B.A., Augot, M., Bellon, S.F., Treiber, D.K., Toney, J.H., Lippard,S.J. and Essigman, J.M. 1990. Characterization of a DNA damage-recognition protein from mammalian cell that binds specifically to intrastrand d (GpG) and d (ApG) DNA adduct of the anticancer drug cisplatin. Biochemisty 29 : 5872-5887.

Eastman, A. 1982. Separation and characterization of products resulting from the reaction of *cis*-diamminedichloroplatinum (II) with deoxyribonucleosides. Biochemistry 21 : 6732-6736.

Eastman, A. 1986. Reevalution of interaction of cis-dichloro(ethylenediammiine) platinum II with DNA. Biochemistry 21 : 3912-3915.

Eastman, A. and Schulte, N. 1988. Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to *cis*-diamminedichloroplatinum (II). Biochemistry 27 : 4703-4740.

Fichtinger-Schepman, A.M.J., Dijt, F.T., de Jong, W.H., van O osterom, A.T. and Berends, F. 1988. *In vivo Cis*-Diamminedichloroplatinum (II) Adduct formation and Removal as Measured by Immunochemical Techniques. *In* Platinum and Other Metal Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy. (ed. M.Nicolini), pp. 33-46 Boston : Nijhoff.

Fichtinger-Schepmen, A.M.J., van der Veer, J.L., den Hartog, J.H.J., Lohman, P.H.M. and Reedijk, J. 1985. Adducts of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II) with DNA : formation, identification and quantitation. Biochemistry 24 : 707-713.

Fichtinger-Schepmen, A.M.J., van Oosterom, A.T., Lohman, P.H.M. and Berends, F. 1987. *Cis*-diamminedichloroplatinum (II) induced DNA adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients. Cancer Res. 47 : 3000-3004.

Frei, E. 1985. Curative cancer chemotherapy. Cancer Res. 45 : 6523-6537.

Frey, U., Ranford, J.D. and Sadler, P.J. 1993. Ring-opening reactions of the anticancer drug carboplatin : NMR characterization of *cis*-[pt(NH_3)$_2$ (CBDCA-O) (5′-GMP-N7)] in solution. Inorg. Chem. 32 : 1333-1340.

Gac, N.T.L., Villani, G. and Boechmer, P.E. 1998 Hepes simplexes virus type-1 single-strand DNA-binding protein (ICP 8) enchance the ability of the viral DNA Helicase-primase to unwind cisplatin–modified DNA. J.Bio.Chem. 273 : 13801-13807.

Gelasco, A. and Lippard, S.J. 1998. NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing *cis*-diammineplatinum (II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. Biochemistry 37 : 9230-9239.

Govan, H.L., Valles-Ayoub, Y. and Braun, J. 1990. Fine-mapping of DNA damage and repair in specific genomic segments. Nucleic Acids Res. 18 : 3823-3830.

Grimadi, K.A., Bingham, J.P., Souhami, R.L. and Hartley, J.A. 1994. DNA damage by anticancer agents and its repair : Mapping in cells at the subgene level with quantitative polymerase chain reaction. Analytical Biochemistry 222 : 236-242.

Grimadi, K.A., McAdam, S.R., Souhami, R.L. and Hartley, J.A. 1994. DNA damage by anti-cancer agents resolved at the nucleotide level of a single copy gene : evidence for a novel binding site for cisplatin in cell. Nucleic Acids Res. 22 : 2311-2317.

Haghighi, A., Lebedeva, S. and Gjerset, A. 1999. Preferential platination of an activated cellular promoter by *cis*-Diamminedichloroplatinum (II). Biochemistry 38 : 12432-12437.

Harder, H.C. and Rosenberg, B. 1970. Inhibitory effect of antitumor platinum compounds on DNA, RNA and protein synthesis in mammalian cell *in vitro*. Int. J. Cancer 6 : 207-216.

Hickson, I., Fairbairn, L.J., chinnasamy, N., Lashford, L.S., Thatcher, N., Mangison, G.P., Dexter, T.M. and Rafferty, J.A. 1998. Chemoprotective gene transfer I : transduction of human haemopoietic progenitors with O^6-benzylguanine-resistant O^6 alkylating-DNA alkyltransferase attenuates the toxic effects of O^6-alkylating agents *in vitro*. Gene Ther. 5 : 835-841.

Hoffmann, J.S., Johnson, N.P. and Villam G. 1989. Conversion of monofunction DNA adducts of *cis*-diamminedichloroplatinum (II) to bifunctional lesion effect on the in vitro replication of single-stranded DNA by *Escherichia coli* DNA polymerase and eukaryotic DNA polymerase α. Biol. Chem. 26 : 15130-15135.

Hoffmann, J.S., Pillaire, M.J., Estefania, D.G., Lapalu, S. and Villani, G. 1996. *In vitro* bypass replication of the cisplatin-d(GpG) lesion by calf thymus DNA polymerase β and human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase is highly mutagenic. J. Bio. Chem. 271 : 15386-15392.

Hoffmann, J.S., Pillaire, M.J., Maga, G., Podust, V., Hubscher, U. and Villani, G. 1995. DNA polymerase β bypass in vitro a single d (GpG)-cisplatin adduct placed on condon 13 of the HRAS. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92 : 5356-5360.

Holler, E. 1993. Mechanism of Action of Tumor Inhibiting Metal Complexes. *In* Metal Complexes in Cancer Chemotherapy. (ed. B.K.Keppler) pp. 37-71. Weinheim : VCH.

Holler, E., Bauer, R. and Bernges, F. 1992. Monofunctional DNA-platinum (II) adducts block frequently DNA polymerase. Nucleic Acids. Res. 20 (9) : 2307-2312.

Hongo, A., Seki, S., Akiyama, K. and Kudo, T. 1994. A comparison of *in vitro* platinum-DNA adduct formation between carboplatin and cisplatin. Int. J. Biochem. 26 : 1009-1016.

Honma, M., Hayshi, M., Hackman, P., Sofuni, T. 1997. Chlorambucil-induce structural changes in the gpt gene of AS 52 cells. Muat. Res. Toxicol. Environ. Mutag. 389 : 199-205.

Houten, B.V., Chandrasekhar, D. and Huang, W. 1992. Mapping DNA lesions at the gene level using quantitative PCR methodology. Amplifications 10 : 10-17.

Howe-Grant, M.E., Lippard, S.J. 1990. Metal Ions in Biological Systems. Vol. 11 (ed. H. sigel), p 63 New York : Marcel Dekker.

http: // www. Photoscience.la.asu.edu/

http: // www.ncbi.nlm.nih.gov/

Inagaki, K. and Kidani, Y. 1980. Ultraviolet difference spectral study of the interaction of DNA with platinum complexes. Inorganica Chemica Acta. 41 : 35-39.

Jennerwein, M.M. and Eastman, A. 1992. A polymerase chain reaction based method to detect ciplatin adducts in specific genes. Nucleic Acids Res. 19 : 6209-6214.

Kalinowski, D.P., Illenyc, S. and Houten, B.V. 1992. Analysis of DNA damage and repair in murine leukemia L 1210 cells using a quantitative polymerase chain reaction assay. Nucleic Acids Res. 20 : 3485-3494.

Kášpárková, J., Novakova, O., Vrana, O., Farrel, N. and Brabec, V. 1999. Effect of geometric isomerism in dinuclear platinum antitumor complexes on DNA interstrand cross-linking. Biochemistry 38 : 9-17.

Keck, M.V. and Lippard, S.J. 1992. Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium bromide and related complexes. J. Am. Chem. Soc. 114 : 3386-3390.

Kelland, L.R., Clarke, S.J. and Mckeage, M.J. 1992. Clinical trial of cisplatin and carboplatin. Platinum Metal Rev. 36 : 178-184.

Klenow. H. and Henningen, I. 1970. Selective elimination of the exonuclease activity of deoxribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* by limited proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 65 : 167-175.

Kornberg, A. 1980. Describes DNA Polymerase. *In* DNA Replication. San Francisco : W.H. Freeman and co.

Kornberg, A. and Baker, T.A. 1991. DNA replication. 2 nd ed. New York : W. H. Freeman and co.

Landberg, KS., Shoemaker, D.D., Adams, W.W., Shart, J.M., Sorge, J.A., Mathur, E.J. 1991. High fidelity amplification using a thermo-stable DNA polymerase isolated from *Pyroeoccus furiosus*. Gene 108 : 1-6.

Lemaire, Marie-Agnes, Schvartz, A., Rahmouni, A.R. and Leng, M. 1991. Interstrand cross-link are preferentially formed at the d (GC) sites in the reaction between cis-diamminedichloroplatinum (II) and DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38 : 1982-1985.

Lepre, C.A., Strothkamp. K.G. and Lippard, S.J. 1977. Synthesis and ^{1}H NMR spectroscopic characterization of trans-[Pt $(NH_3)_2$ {d(AGGCCT) N7-A(1), N7-G(3)}]. Biochemistry 26 : 5651-5657.

Lim, M.C. and Martin, R.B. 1976. The nature of *cis*-amine Pd (II) and antitumor *cis*-amine Pt (II) complexes in aqueous solution. J. Inorg. Nucl. Chem. 38, 1991-1994.

Lippard, S.J. 1982. New chemistry of an old molecule : cis-[Pt $(NH_3)_2Cl_2$] Science 218 : 1075-1082.

Loechrer, P.J. and Einhorn, L.H. 1974. Cisplatin. Ann. Intern. Med. 100 : 704-713.

Los, G., Verdegaal, E., Notebrn, H.P.J.M., Ruevekamp, M., De-Graeff, A., Meesters, E.W., Huinink, D.T.B. and McVie, J.G. 1991. Cellular pharmacokinetics of carboplatin and cisplatin in relation to their cytotoxic action. Biochem. Pharmacol. 42 : 357-363.

Mathews, C.M. and van Holde, K.E. 1990. Information Copying Replication. *In* Biochemistry, pp. 817-859 USA : Benjamin cummings.

Mathews, C.M. and van Holde, K.E. 1996. Information Copying Replication. In Biochemistry, pp. 862-902 USA : Benjamin cummings.

Mattial, P., Korpela, J., Tenkanen, T., Pikanen, K. 1991. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. Nucleic Acids Res. 19 : 4963-4973.

Mellon, I. and Hanawalt, P.C. 1989. Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selective increases repair of its transcribed DNA strand. Nature 342 : 95-98.

Meselson, M., Stahl, F.W. 1958. The replication of DNA in *E. coli.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 44 : 671-672.

Mong, S. 1980. In vitro interaction of covalently linked closed circular DNA with the second generation platinum compound . In cisplatin Current Status and New Development. (eds. A.W. Prestayko), pp.213-216 New york : Academic Press

Mullis, K.B. 1986. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. Method Enzyme 155 : 334-350.

Murray, V., Motyka, H., England, P.R., Wickham, G., Lee, H.H., Denny, W.A. and McFadyen, W.D. 1992. The use of *Taq* DNA polymerase to determine the sequence specificity of DNA damage caused by *cis*-diamminedichloroplatinum (II), acridine-tethered platinum (II) diammine complexes or two analegues. Nucleic Acids Res. 267 : 18805-18809.

Murray, V., Whittaker, J., Temple, M.D. and McFadyen, W.D. 1997. Interaction of 11 cisplatin analogues with DNA : characteristic pattern of damage with monofunctional analogues. Biochimica et Biophysica Acta 1354 : 261-271.

Pinto, A.L., Naser, L.J., Essigman, J.M. and Lippard, S.J. 1976. Site-specifically platinated DNA , a new probe of the biological activity of platinum anticancer drugs. J. Am. Chem. Soc. 108 : 7405-7407.

Pluth, J.M., O'-Neill, J.P., Nicklas, J.A. and Albertini, R.J. 1998. Molecular bases of hprt mutation in malathion-treated human T-lymphocytes. Nutat. Res. 397 : 137-148.

Ponti, M., Forrow, S.M., Souhami, R.L., D'Incalci, M. and Hartley, J.A. 1991. Measurement of the sequence specificity of covalent DNA modification by antineoplastic agents using *Taq* DNA polymerase. Nucleic Acids Res. 19 : 2929-2933.

Pratt, W.B., Ruddon, R.W., Enswinger, W.D. and Maybaum, J. 1994. The Anticancer Drugs. In Covalent DNA drug. 2 nd ed., pp. 133-138. New York : Oxford University Press.

Prenzler, P.D., and Mcfadyen, W.D. 1997. Reaction of cisplatin and the cis-diamminediaqua platinum (II) cation with Tris and Hepes. Journal of Inorganic Biochemistry 68 : 279-282.

Richter, H and Vamvakas, S. 1998. S-(1,2-dichlorovingl)-L-cysteine-induced dedifferentiation and p 53 gene mutations in LLC-PK sub (1) cells : A comparative investigation with S-(2-Chloroethyl) cysteine, potassium bromate, cisplatinum and styrene oxide. Toxicol. Lett. 94 : 145-157.

Rosenberg. B., Comp, L.V. and Krigas. 1965. Inhibition of cell division in *E. coli* by electrolysis product from platinum electrode. Nature 205 : 698-702.

Sambrook, J., Fritsch. E.F. and Maniatis, T. 1989. Plasmid Vectors *In* Molecular Cloning A Laboratory Manual. USA : Cold Spring Horbor Laboratory Press.

Scanlon, K.J., Kashani-Sabet, M. and Miyachi, H. 1989. Differential gene expression in human tumors. Cancer invest. 7 : 563-569.

Scovell, W.M. and Collart, F. 1985. Unwinding of supercoiled DNA by *cis* and *trans*-diamminedichloroplatinum (II) : influence of the torsional strain on DNA unwinding. Nucleic Acids Res. 13 : 2881-2895.

Sherman, S.E. and Lippard, S.J. 1987. Structural aspects of platinum anticancer drug interaction with DNA. Chem. Rev. 87 : 1153-1181.

Sklar, M.D. 1988. Increased resistance to *cis*-diamminedichloroplatinum (II) in NIH 3T3 cell transformed by ras oncogen. Cancer Res. 48 : 793-797.

Smith and Wood. 1991. DNA replication and repair. In Molecular Biology and Biotechnology. pp. 1-17. Hong kong : Chapman & Hall Limited.

Sohn, Yeo-Won, Lee, Gang-Hong, Liem, A. and Miller, J.A. 1996. Activation of H-ras oncogenes in male B6C3F.1 mouse live tumors induced by vinthionine or 2-chloroethyl methyl sulfide. Carcinogenesis. 17 : 1361-1364.

Suo, Z., Lippard, S.J. and Johnson, K.A. 1999. Single d(GpG) *cis*-diammineplatinum (II) adduct-induced inhibition of DNA polymerization. Biochemistry 38 : 715-726.

Takahara, P.M., Rosenzweig, A.C., Frederick, C.A. and Lippard, S.J. 1995. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. Nature 377 : 649-652.

Ushay, H.M., Tullius, T.D., Lippard, S.J. 1981. Inhibition of the *Bam*H I cleavage and unwinding of pBR 322. deoxyribonucleic acid by the atitumor drug *cis*-dichlorodiammineplatinum (II). Biochemistry 20 : 3744-3748.

Van der Veer, J.L., ligtvoet, G.J., Van den Elst, H. and Reedijk, J. 1986. *Trans*-Diamminedichloroplatinum (II) can chelate d(GpTpG) via both guanines in a similar fashion as the cis isomer. J. Am. Chem.Soc. 108 : 3860-3862.

Van Hemetryck, B., Girault, J.P. Chottard, G., Valadon, P., Laoui, A. and Chottard, J.C. 1987. Sequence dependent platinum chelation by ApG and GpA reacting with *cis*-diamminedichloroplatinum (II) and its diaqua derivative. Inorg. Chem. 26 : 787-793.

Vrana, V., Boudny,V. and Brabec, V. 1996. Superhelical torsion controls DNA interstrand crosslinking by antitumor *cis*-diamminedichloroplatinum (II). Nucleic Acids Res. 24 : 3918-3925.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. 1985. Improved M 13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC 19 vectors. Gen 33 : 103-119.

Yuh, S.H., Tibudan, M. and Hentosh, P. 1998. Analysis of 2-chloro-2′-deoxyadenosine incorporation into cellular DNA by quantitative polymerase chain reaction. Analytical Biochemistry 262 : 1-8.

Zhang, B., Seki, S., Akiyama, K., Tsutsui, K., Li, T. and Nagao, K. 1992. Detection and analyses by gel electrophoresis of cisplatin-mediated DNA damage. Acta. Med. Okayama 46 : 427-434.

Zubay, G. 1993. DNA repair and recombination. In Biochemistry pp. 721-756. USA: WM.C.Brown Publishers.

Zubay, G., Parson, W.W. and Vac, D.E. 1995. Principles of Biochemistry. In DNA Replication, Repair, and Recombination. Pp.650-670 (ed. E.M. sievers) USA : WM.C.Brown Publishers.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
พลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19

1. ข้อมูลลำดับเบสของพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

Sequence 2686 BP; 666 A; 675 C; 686 G; 659 T; 0 other;

5' tcgcgcgttt	cggtgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcgggcc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaaaggg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccagggt	360
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgaatt	cgagctcggt	acccggggat	420
cctctagagt	cgacctgcag	gcatgcaagc	ttggcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	480
gtgtgaaatt	gttatccgct	cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	540
aaagcctggg	gtgcctaatg	agtgagctaa	ctcacattaa	ttgcgttgcg	ctcactgccc	600
gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	ctgcattaat	gaatcggcca	acgcgcgggg	660
agaggcggtt	tgcgtattgg	gcgctcttcc	gcttcctcgc	tcactgactc	gctgcgctcg	720
gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaatacg	gttatccaca	780
gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	840
cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	gcccccctga	cgagcatcac	900
aaaaatcga	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	960
ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	aatgctcacg	ctgtaggtat	1020
ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	tgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	1080
cccgaccgct	gcgccttatc	cggtaactat	cgtcttgagt	caacccggt	aagacacgac	1140
ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	1200
gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggt	1260
atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	1320
aaacaaacca	ccgctggtag	cggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	1380
aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	1440
gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatg	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	1500
cttttaaatt	aaaaatgaag	ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	aacttggtct	1560
gacagttacc	aatgcttaat	cagtgaggca	cctatctcag	cgatctgtct	atttcgttca	1620
tccatagttg	cctgactccc	cgtcgtgtag	ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	1680

ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	1740
ataaaccagc	cagccggaag	ggccgagcgc	agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	1800
atccagtcta	ttaattgttg	ccgggaagct	agagtaagta	gttcgccagt	taatagtttg	1860
cgcaacgttg	ttgccattgc	tacaggcatc	gtggtgtcac	gctcgtcgtt	tggtatggct	1920
tcattcagct	ccggttccca	acgatcaagg	cgagttacat	gatcccccat	gttgtgcaaa	1980
aaagcggtta	gctccttcgg	tcctccgatc	gttgtcagaa	gtaagttggc	cgcagtgtta	2040
tcactcatgg	ttatggcagc	actgcataat	tctcttactg	tcatgccatc	cgtaagatgc	2100
ttttctgtga	ctggtgagta	ctcaaccaag	tcattctgag	aatagtgtat	gcggcgaccg	2160
agttgctctt	gcccggcgtc	aatacgggat	aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	2220
gtgctcatca	ttggaaaacg	ttcttcgggg	cgaaaactct	caaggatctt	accgctgttg	2280
agatccagtt	cgatgtaacc	cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcatc	ttttactttc	2340
accagcgttt	ctgggtgagc	aaaaacagga	aggcaaaatg	ccgcaaaaaa	gggaataagg	2400
gcgacacgga	aatgttgaat	actcatactc	ttcctttttc	aatattattg	aagcatttat	2460
cagggttatt	gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	2520
ggggttccgc	gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgacg	tctaagaaac	cattattatc	2580
atgacattaa	cctataaaaa	taggcgtatc	acgaggccct	ttcgtc 3′		2686

2. ชนิดและตำแหน่งของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะบนพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19 (yanisch-perron, et.al., 1985)

ตารางผนวกที่ 1 ชนิดและตำแหน่งของเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะบนพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดพียูซี 19

ENZYME	SITE		POS.		POS.		POS.
ACCIA	(GTCGAC)	(429)	429				
ACYIA	(GGCGCC)	(235)	235				
ACYIB	(GGCGTC)	(2335)	2235				
ACYID	(GACGTC)	(2617)	2617				
ALUI	(AGCT)	(43)	43	(19)	62	(245)	307
		(96)	403	(45)	448	(22)	470
		(95)	565	(64)	629	(118)	747
		(226)	973	(136)	1109	(257)	1366
		(521)	1887	(100)	1987	(63)	2050
ASUI	(GGGCC)	(286)	286	(1534)	1820		
AVAIA	(CCCGGG)	(412)	412				
AVAIIB	(GGTCC)	(1837)	1837	(222)	2059		
BAMHI	(GGATCC)	(417)	417				
BBVIA	(GCAGC)	(41)	41	(1172)	1213	(3)	1216
		(206)	1422	(694)	2116		
BBVIB	(GCTGC)	(254)	254	(73)	327	(303)	630
		(81)	711	(18)	729	(419)	1148
		(602)	1750				
BGLI	(GCCNNNNNGGC)	(245)	245	(1568)	1813		
DDEIA	(CTAAG)	(2622)	2622				
DDEIB	(CTCAG)	(1081)	1081	(409)	1490	(166)	1656
DDEIC	(CTGAG)	(171)	171	(2025)	2196		
ECORI	(GAATTC)	(396)	396				
ECORIIA	(CCAGG)	(354)	354	(479)	833	(121)	954
ECORIIB	(CCTGG)	(545)	545	(422)	967		
FNUDII	(CGCG)	(2)	2	(2)	4	(103)	107
		(545)	652	(2)	654	(198)	852
FNUDII	(CGCG)	(581)	1433	(330)	1763	(493)	2256
		(332)	2588				

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ENZYME	SITE		POS.		POS.		POS.
FNU4HIA	GCCBC)	(850)	850	(155)	1005	(1084)	2089
		(351)	2440				
FNU4HIB	(GCGGC)	(150)	150	(582)	732	(1479)	2211
HAEIB	(AGGCCA)	(819)	819	(11)	830		
HAEIA	(TGGCCT)	(1282)	1282				
HAEIIA	(GGCGCC)	(235)	235				
HAEIIC	(GGCGCT)	(680)	680	(370)	1050		
HAEIII	(GGCC)	(287)	287	(102)	389	(257)	646
		(174)	820	(11)	831	(18)	849
		(434)	1283	(458)	1741	(80)	1821
HGAIA	(GACGC)	(908)	908	(578)	1486		
HGIAIA	(GTGCAC)	(108)	108	(2128)	2236		
HGIAIA	(BAGCAC)	(177)	177	(943)	1120	(1246)	2366
HGIAIB	(BAGCTC)	(402)	402				
HGIAIC	(GTGCTC)	(2281)	2281				
HHAI	(GCBC)	(3)	3	(103)	106	(130)	236
		(21)	257	(331)	558	(65)	653
		(28)	681	(33)	714	(270)	984
		(67)	1051	(100)	1151	(174)	1325
		(109)	1434	(393)	1827	(93)	1920
		(337)	2257	(332)	2589		
HINCIIA	(GTCGAC)	(429)	429				
HINDIII	(AAGCTT)	(447)	447				
HINFIA	(GAATC)	(641)	641	(140)	781		
HINFIB	(GACTC)	(706)	706	(988)	1694		
HINFIC	(GAGTC)	(427)	427	(750)	1177		
HPAII	(CCGG)	(48)	48	(34)	82	(331)	413
HPAII	(CCGG)	(111)	524	(489)	1013	(147)	2260
		(26)	1186	(190)	1376	(404)	1780
		(34)	1814	(67)	1881	(110)	1991
		(242)	2233				
HPHIIA	(GGTGA)	(12)	12	(9)	21	(2152)	2173
		(241)	2414				
HPHIB	(TCACC)	(1550)	1550	(227)	1777	(622)	2399
KPNI	(GGTACC)	(408)	408				

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ENZYME	SITE		POS.		POS.		POS.
MBOI	(GATC)	(277)	277	(141)	418	(955)	1373
		(75)	1448	(11)	1459	(8)	1467
		(78)	1545	(12)	1557	(105)	1662
MBOI	(GATC)	(341)	2003	(18)	2021	(46)	2067
		(258)	2325	(17)	2342	(36)	2378
MBOIIA	(GAAGA)	(1456)	1456				
MBOIIB	(TCTTC)	(291)	291	(394)	685	(862)	1547
		(755)	2302	(78)	2380	(109)	2489
MNLIA	(CCTC)	(29)	29	(260)	289	(132)	421
		(274)	695	(283)	978	(878)	1856
		(206)	2062				
MNLIB	(GAGG)	(662)	662	(259)	921	(324)	1245
		(400)	1645	(81)	1726	(947)	2673
MSTI	(TGCGCA)	(256)	256	(1663)	1919		
PSTI	(CTGCAG)	(435)	435				
PVUI	(CGATCG)	(276)	276	(1790)	2066		
PVUII	(CAGCTG)	(306)	306	(322)	628		
RSAI	(GTAC)	(168)	168	(241)	409	(1769)	2178
SACI	(GAGCTC)	(402)	402				
SALI	(GTCGAC)	(429)	429				
SFANIA	(GATGC)	(78)	78	(130)	208	(1948)	2156
SFANIB	(GACATC)	(153)	153	(76)	229	(665)	894
		(1052)	1946	(440)	2386		
SMAI	(CCCGGG)	(412)	412				
SPHI	(GCATBC)	(441)	441				
TAQI	(TCGA)	(400)	400	(30)	430	(476)	906
		(1444)	2350				
XBAI	(TCTAGA)	(423)	423				
XHOIIA	(GGATCC)	(417)	417				
XHOIIB	(AGATCC)	(1458)	1458	(98)	1556	(785)	2341
XHOIIC	(GGATCT)	(1447)	1447	(97)	1544	(780)	2324
NDEI	(CATATG)	(183)	183				
NARI	(GGCGCC)	(235)	235				
MSTI	(TGCGCA	(256)	256	(1663)	1919		

THESE ENZYMES DID NOT APPEAR ·

ACCIB	ACCIC	ACCID	ACYIC	ASUII
AVAIB	AVAIC	AVAID	AVAIIA	AVAIII
AVRII	BALI	BCLI	BGLII	BSTEIIA
BSTEIIB	BSTEIIC	BSTEIID	CLAI	DDEID
HAEIA	HAEIC	HAEIIB	HAEIID	HGIAID
HINCIIB	HINCIIC	HINCIID	HINFID	HPAI
SACII	XHOI	XHDIID	XMAIII	NCOI

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. LB media (Luria-Bertani Medium)

อาหารเลี้ยง 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto-tryptone	10	กรัม
Bacto-yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
Deionized H_2O	950	มิลลิลิตร

พีเอช 7 และนึ่งค่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 lb/sq.in เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมดีเอ็นเอแอดดัคในปฏิกิริยาผสม 20 ไมโครลิตร

นำสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม 1 ไมโครกรัมมาละลายในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร จะได้สารลายสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมเข้มข้น 3.3 มิลลิโมลาร์ เจือจางสารละลายเข้มข้นให้ได้ตามต้องการเพื่อนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอตามอัตราส่วนดังต่อไปนี้

อัตราส่วนโมลระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ (Molar ratio, r_b)

$$r_b = \frac{\text{สารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม (ไมโครโมลาร์)}}{\text{นิวคลีโอไทด์ (ไมโครโมลาร์)}}$$

ตารางผนวกที่ 2 ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมที่ทำปฏิกิริยากับพลาสมิด ดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมที่อัตราส่วนโมลระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัมต่อนิวคลีโอไทด์ในปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาตรรวม 20ไมโครลิตร

Molar ratio	ความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนพลาตินัม (ไมโครโมลาร์)
0	0
0.01	1.5
0.025	3.75
0.05	11.25
0.075	15
0.1	30
0.2	45
0.3	60
0.4	97.5
0.65	150
1.5	225
2	300

3. การเตรียมสารละลายไพรเมอร์เข้มข้นและคุณสมบัติของไพรเมอร์

นำหลอดที่บรรจุผงไพรเมอร์ที่จากษริษัทไปหมุนเหวี่ยงเพื่อรวบรวมผงไพรเมอร์ไว้ที่ก้นหลอด เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (TE buffer) 100 ไมโครลิตรหรือมากกว่าแล้วแต่ความเหมาะสมในการนำไปใช้งาน แล้วใช้ไมโครไปเปตดูสารละลายขึ้น และลงประมาณ 2-3 ครั้ง ผสมสารละลายให้เข้ากันประมาณ 15 นาที จากนั้นนำสารละลายไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้หยดสารละลายตกลงสู่ก้นหลอด และเก็บสารละลายไพรเมอร์เข้นข้นไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ซึ่งการเก็บสารละลายไว้ที่

อุณหภูมิดังกล่าวจะช่วยรักษาสภาพของไพรเมอร์ไว้ได้นานกว่า 6 เดือน แต่ถ้ายังไม่ต้องการนำไพรเมอร์ไปใช้งาน ควรจะเก็บไว้ในรูปผงที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ซึ่งจะช่วยรักษาสภาพของไพรเมอร์ไว้ได้นานกว่า 1 ปี

ตารางผนวกที่ 3 คุณสมบัติของไพรเมอร์

คุณสมบัติ	ชนิดของไพรเมอร์					
	F_{929}	F_{1078}	F_{2413}	R_{348}	R_{2070}	R_{2407}
Molecular Weight (µg/µmole)	7127.4	7796.8	7248.4	6972.4	7970.0	7189.7
Milimolar extinction coefficient	267.6	253.6	275.4	225.0	261.4	264.4
Purity	Deprotected					
T_m (1M Na+)	69	74	73	73	76	69
Tm (50 mM Na+)	48	52	52	52	54	48
% GC	45	50	54	54	52	45
Primer length	22	24	22	22	25	22
µg per OD	26.6	30.7	26.3	30.9	30.4	27.1
nmole per OD	3.7	3.9	3.6	4.4	3.8	3.7
OD' S	12.4	17.3	10.5	9.4	18.5	12.6
Nmoles	46	68	38	42	71	47
Coupling Eff.	99%	99%	98%	99%	99%	99%

ภาคผนวก ค

สารละลายบัฟเฟอร์

1. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

1.1 STET	: 10 mM Tris-HCl
	0.1 M NaCl
	1 mM EDTA (pH 8)
	5 % Triton x-100
1.2 TE	: 10 mM Tris-HCl (pH 8)
	1 mM EDTA (pH 8)

2. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะชนิดต่าง ๆ

2.1 1X *Eco*R I buffer	: 50 mM NaCl
	10 mM $MgCl_2$
	100 mM Tris-HCl
	0.025 % Triton x-100
	pH 7.4
2.2 1X *Bam*H I	: 15 mM NaCl
	1 mM Tris-HCl
	1 mM $MgCl_2$
	0.1 mM DTT
	pH 7.9
2.3 1X *Hin*d III	: 15 mM NaCl
	1 mM Tris-HCl
	1 mM $MgCl_2$
	0.1 mM DTT
	pH 7.9

2.4 1X *Pvu* II : 50 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
10 mM Tris-HCl
0.1 mM DTT
pH 7.9

2.5 0.5X *Hpa* II : 50 mM KOAc
12.5 mM Tris-acetate (pH 7.6)
0.25 mM β-Mercaptoethanol
5 mM MgOAc
5 μg / ml Bovine Serum Albumin (BSA)

3. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส

3.1 5X TBE : 54 g Tris base
27.5 g Boric acid
20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

3.2 6 X Gel-loading : 0.25 % Bromophenol blue
40 % (w/v) sucrose in water

4. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

1X PCR : 20 mM Tris-HCl
50 mM KCl

ภาคผนวก ง

ข้อมูลการวิเคราะห์หาดีเอ็นเอแอดดัคด้วยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี

กราฟมาตรฐาน

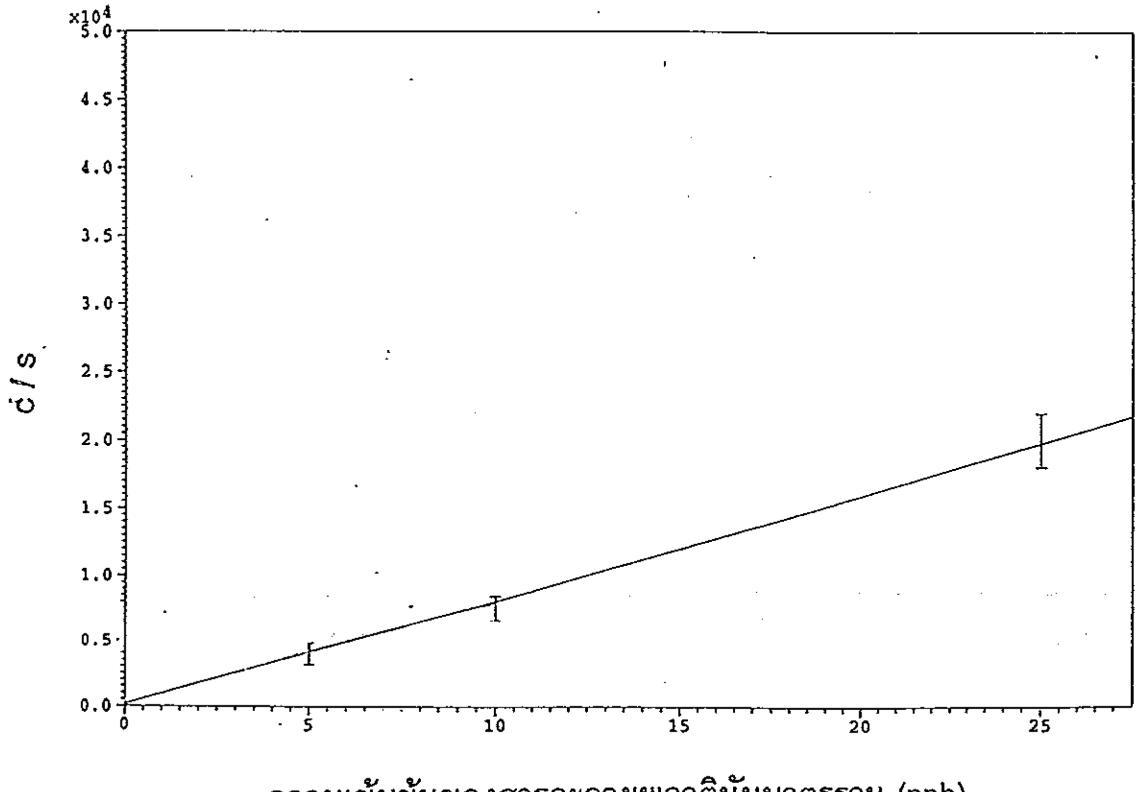
correlation coefficient = 0.999476

จำนวนอะตอมของธาตุต่อวินาที (c/s) = 177.1 + 782 x (ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานพลาตินัม)

natural abundance ของธาตุพลาตินัมประกอบด้วย

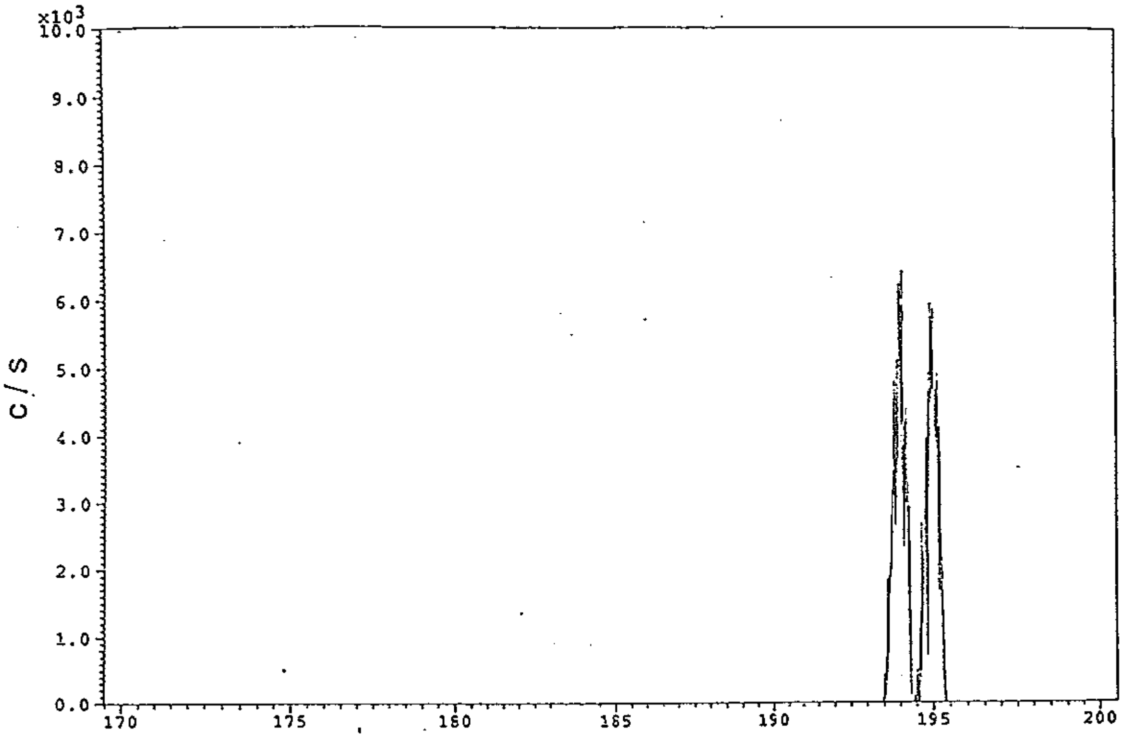
พลาตินัมที่มีไอโซโทป 195 มีประมาณร้อยละ 33.8

พลาตินัมที่มีไอโซโทป 194 มีประมาณร้อยละ 32.9



รูปผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์หาปริมาณอะตอมพลาตินัมด้วยวิธีไอซีพีแมสสเปกโตรเมทรี

การหาปริมาณอะตอมพลาตินัม



มวลอะตอม

รูปผนวกที่ 2 ไอซีพีแมสสเปกตรัมของอะตอมพลาตินัมของดีเอ็นเอแอดดักที่เกิดจากซิสพลาติน ที่อัตราส่วนโมลเท่ากับ 0.1

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวจณิศรา ฤดีอเนกสิน

วัน เดือน ปี เกิด 9 พฤษภาคม 2517

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ภาคใต้ (คณะวิทยาศาสตร์)	2539