บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การสกัดและทดสอบปริมาณ DNA ที่สกัดได้

1.1 HeLa-DNA ซึ่งมี HPV-18 อยู่ สกัดจากเซลล์จำนวน 10^8 เซลล์ ได้ปริมาณ DNA คิดเป็นปริมาณทั้งหมด 0.613 mg (ใน 100 ul TE buffer) โดยเฉลี่ยคือ 6.13 pg/cell

1.2 Human DNA สกัดจากเม็ดเลือดขาวของคนปกติโดยสกัดจากจำนวนเซลล์ 10^8 เซลล์ได้ปริมาณ DNA คิดเป็นปริมาณทั้งหมด 0.428 mg (ใน 100 ul TE buffer)

1.3 DNA จากตัวอย่างส่งตรวจ ตัวอย่างส่งตรวจทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง ทำการสกัด DNA และ ทดสอบหาปริมาณ DNA ของแต่ละตัวอย่าง พบว่าปริมาณ DNA อยู่ระหว่าง 0.016 mg ถึง 0.164 mg โดยคิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.064 mg และ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.027 mg (ใน 100 ul TE buffer)

2. การทดสอบสภาวะและปริมาณสารที่เหมาะสมในการทำ PCR

2.1 ความเหมาะสมของปริมาตรในการทำ PCR เปรียบเทียบระหว่าง 50 และ 100 ul โดยปริมาณความเข้มข้นของสารต่างๆของแต่ละหลอดคือ 1xPCR buffer, 4 mM $MgCl_2$, L1 primers อย่างละ 25 pmole, 200 uM dNTPs, 1.25 unit Taq polymerase DNA ตัวอย่าง 1 ul และ น้ำ สำหรับปริมาณทั้งหมด 50 ul และ 1xPCR buffer, 4 mM $MgCl_2$, L1 primers อย่างละ 50 pmole, 200 uM dNTPs, 2.5 unit Taq polymerase, ตัวอย่าง 1 ul และ น้ำ สำหรับปริมาณทั้งหมด 100 ul สภาวะของ PCR เป็นดังนี้คือ denaturation 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, annealing 50 องศาเซลเซียส 1 นาที, extention 72 องศาเซลเซียส

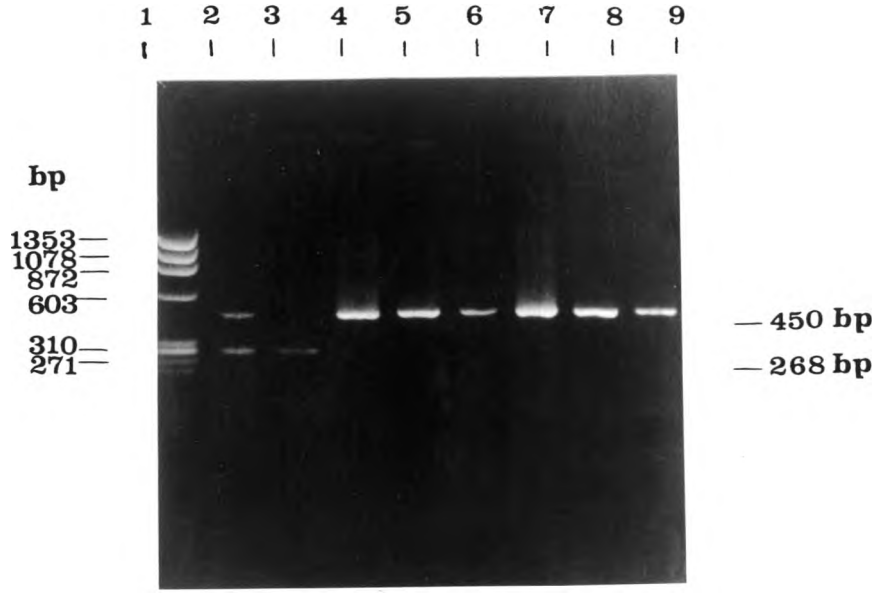
2 นาที, และ complete extention 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ใช้จำนวน 40 รอบ พบว่าที่ปริมาตร 50 ul ให้ผลที่ไม่แตกต่างกับ 100 ul (รูปที่ 5) ดังนั้น การวิจัยนี้จึงเลือกใช้ปริมาตรต่อหนึ่งหลอด 50 ul

2.2 ทดสอบเปรียบเทียบหาจำนวนรอบที่เหมาะสม โดยทำการเปรียบเทียบผลการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ 35 และ 40 รอบ โดยใช้ purified plasmid HPV-16 ปริมาณต่างๆกันคือ 1 ug, 1 ng และ 1 pg และ ใช้เฉพาะ L1 primers อ่านผลผ่าน GE แสดงให้เห็นชัดว่า ปริมาณ DNA ตั้งต้นที่ 1 pg สามารถตรวจพบโดยผ่านขบวนการ PCR และจำนวนรอบที่ให้ผลชัดเจนคือ 40 รอบ (รูปที่ 6)

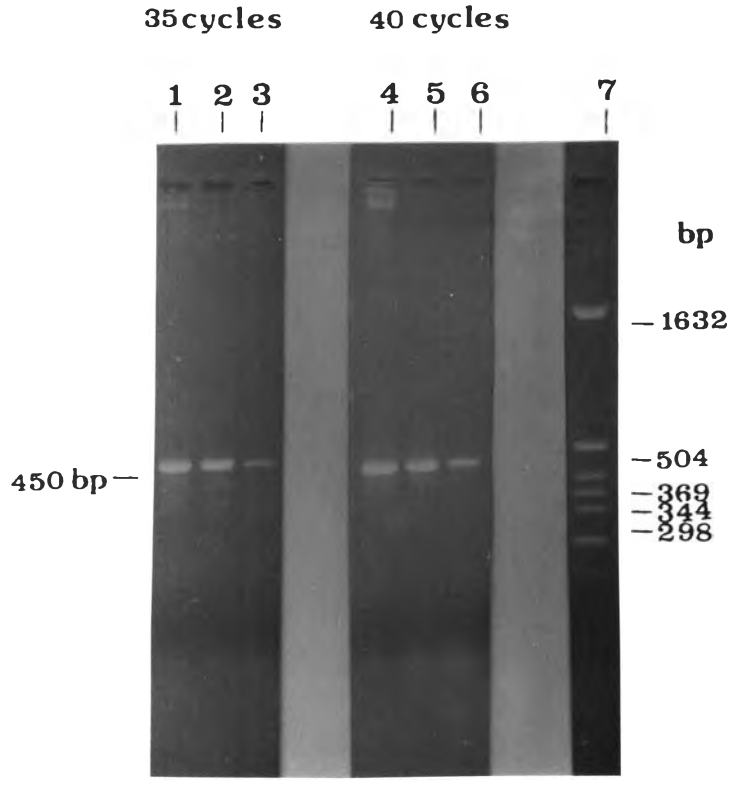
2.3 ปริมาณความเข้มข้นของ Taq polymerase โดยการเปรียบเทียบปริมาณที่ใช้ต่างๆกันต่อปฏิกิริยาคือ 0.5, 1.25 และ 2.5 unit ตามลำดับ ในการทดสอบนี้ใช้ HeLa-DNA ปริมาณ 1 ug ซึ่งมี HPV-18-DNA ร่วมอยู่ด้วย ทำการเพิ่มจำนวนโดยใช้ L1 primers ผลปรากฏว่า ปริมาณความเข้มข้นของ Taq polymerase ทั้ง 3 ค่านั้น สามารถทำการเพิ่มจำนวน HPV-DNA ตรงตำแหน่ง 450 bp ได้ (รูปที่ 7) ดังนั้น จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ Taq polymerase ตลอดการทดลองต่อไปนี้คือ 1.25 unit

2.4 ทดสอบอัตราส่วน, ความเข้มข้นของ primers 2 คู่ เพื่อใช้ร่วมในการทำปฏิกิริยาชุดเดียวกันคือ L1 primers และ B-globin primers ในอัตราส่วนคือ 10:1, 20:1, 40:1, 60:1, และ 1:1 ตามลำดับ โดยใช้ตัวอย่าง HeLa-DNA ปริมาณ 1 ug ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดคือ 10:1 ซึ่งให้ผลชัดเจนไม่มี non specific band เกิดขึ้น ดังนั้นปริมาณที่ใช้คือ L1 primers 50 pmole และ ปริมาณ B-globin primers 5 pmole (รูปที่ 8)

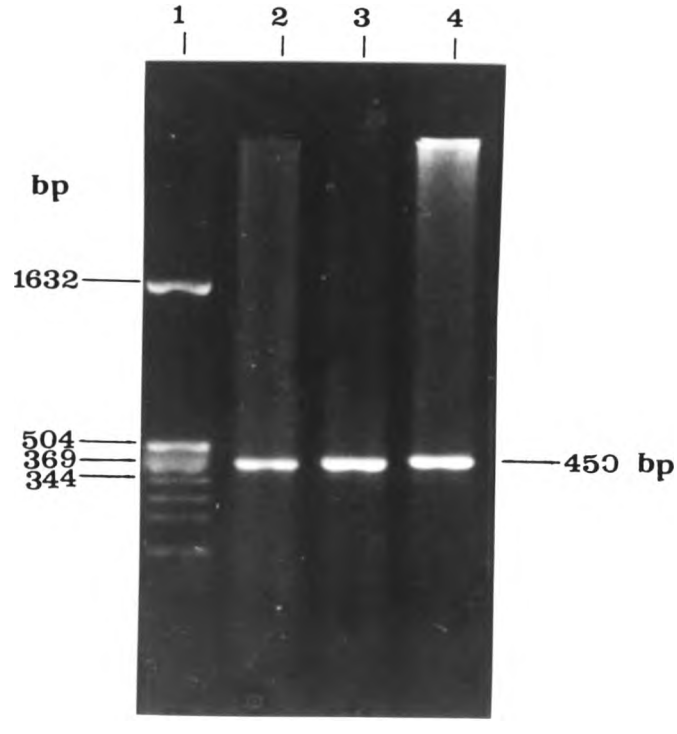
I17211827



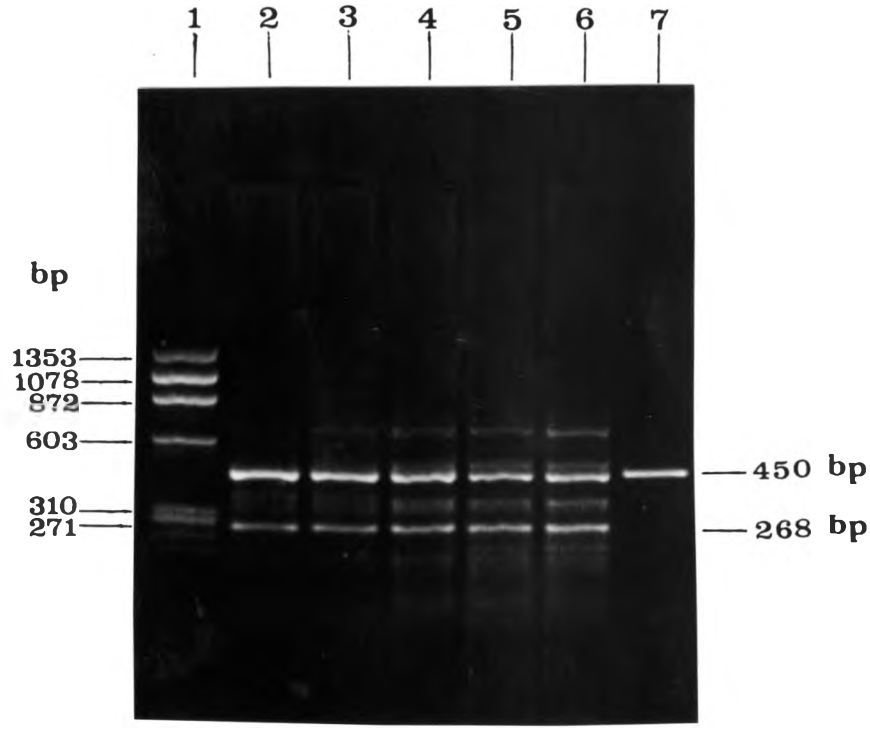
รูปที่ 5: แสดงผลการทดสอบปริมาตรที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ระหว่าง 50 ul และ 100 ul โดยใช้ปริมาณ purified plasmid HPV-16 ที่ปริมาณต่างๆกัน แถวที่ 1: Ox174 RF DNA/HaeIII เพื่อแสดงจำนวนคู่เบส, แถวที่ 2: HeLa DNA เป็นตัวควบคุมบวก, แถวที่ 3: Human DNA เป็นตัวควบคุมลบ, แถวที่ 4 และ 7: purified plasmid HPV-16 1 ug, แถวที่ 5 และ 8: purified plasmid HPV-16 100 ng, แถวที่ 6 และ 9: purified plasmid HPV-16 10 ng ตามลำดับ



รูปที่ 6: แสดงผลเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ 35 และ 40 รอบ โดยมี L1 primers และ purified plasmid HPV-16 ปริมาณต่างๆ กัน คือ แถวที่ 1 และ 4: purified plasmid HPV-16 1 ug, แถวที่ 2 และ 5: purified plasmid HPV-16 1 ng, แถวที่ 3 และ 6 purified plasmid HPV-16 1 pg และ แถวที่ 7: pBR322/ HinfI เพื่อแสดงตำแหน่งจำนวนคู่เบส ตามลำดับ



รูปที่ 7: แสดงผลเปรียบเทียบในการทำ PCR โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Taq polymerase ต่างๆกันคือ แถวที่ 2: 0.5 U, แถวที่ 3: 1.25 U, แถวที่ 4: 2.5 U ตามลำดับ โดยใช้ HeLa DNA 1 ug และ L1 primers แถวที่ 1: pBR322/HinfI แสดงด้านหน่งจำนวนคู่เบส

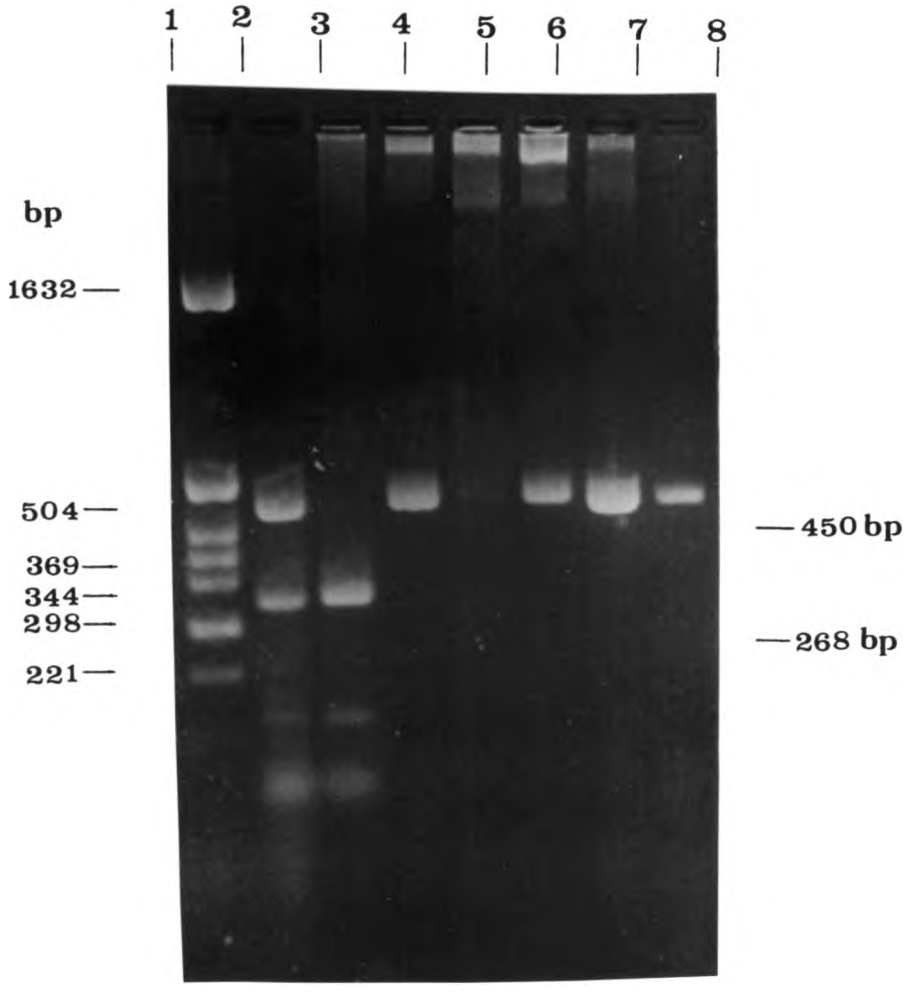


รูปที่ 8: การทดสอบเปรียบเทียบความเหมาะสมของอัตราส่วน ระหว่าง L1 primers และ B-globin primers โดยใช้ HeLa DNA 1 ug แถวที่ 1: Ox174 RF DNA/HaeIII แสดงตำแหน่งคู่เบส, แถวที่ 2: 10:1, แถวที่ 3: 20:1, แถวที่ 4: 40:1, แถวที่ 5: 60:1, แถวที่ 6: 1:1 และ แถวที่ 7: การเพิ่มจำนวน HeLa-DNA โดยใช้ L1 primers คู่เดียว

2.5 ประเมินการทำ PCR และ อ่านผลวิเคราะห์โดย GE

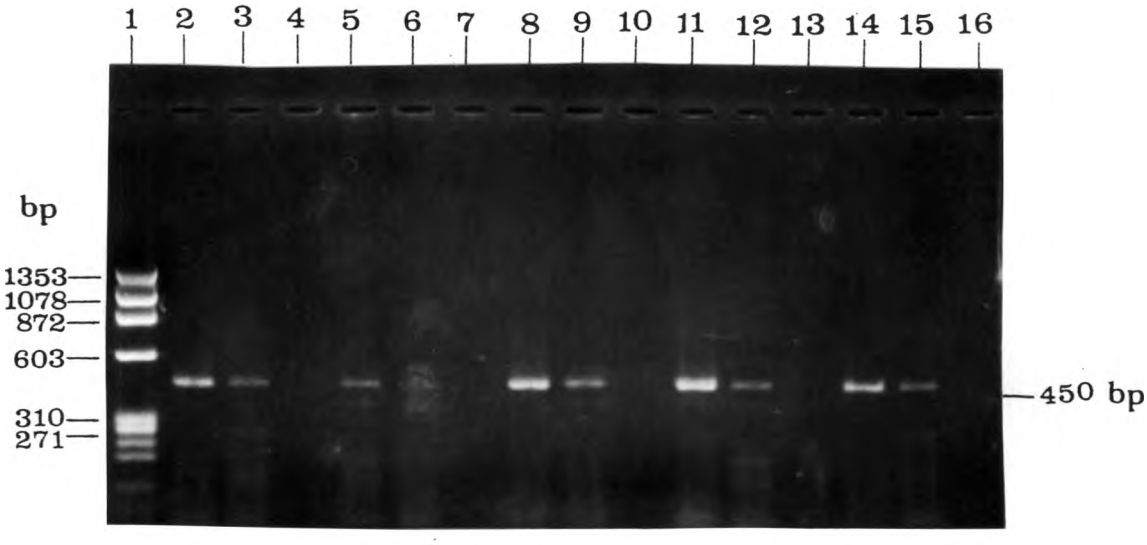
2.5.1 ทดสอบกับ purified plasmid HPV ทั้ง 5 types คือ HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, และ HPV-33 ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 ug ในสภาวะที่มี primers 2 ชุด ปรากฏว่าทุก type ตรวจพบ amplified product ที่ 450 bp แต่ HPV-11 ที่ 1 ug สังเกตเห็นแถบจางมาก (รูปที่ 9 แถวที่ 5) ในการทดลองนี้จะไม่พบว่ามีแถบของ beta-globin product ที่ 268 bp ยกเว้นเฉพาะใน HeLa-DNA และ human DNA จากการทดลองนี้ แสดงว่า L1 primers สามารถ amplify HPV-DNA ได้ทั้ง 5 types และ B-globin ไม่รบกวนหรือแทรกแซงการเพิ่มขยายของ HPV-DNA (รูปที่ 9) เมื่อเจือจาง purified plasmid ทั้ง 5 types ให้มีความเข้มข้นต่างๆกันได้แก่ 1 ug, 1 ng, 1 pg, และ 100 fg นำมาผ่านขบวนการ PCR และอ่านผลโดย GE พบว่าปริมาณ DNA ที่น้อยที่สุดที่ตรวจได้ของ HPV-6, 16, 18, และ 33 เท่ากับ 1 pg แต่ HPV-11 ต้องใช้ปริมาณ DNA อย่างน้อย 1 ng (รูปที่ 10)

2.5.2 ทดสอบความไวในการตรวจหาปริมาณ HPV-DNA การทดสอบความไวของ PCR ในการเพิ่มจำนวน HPV-DNA ทำได้โดยการตรวจดู amplified product ที่ได้จากการเจือจางความเข้มข้นของ purified plasmid HPV-16 ต่างๆ กันในสภาวะที่มี human DNA 1 ug (78) เนื่องจาก 1 copy/cell หมายถึง 1 pg ของ viral DNA ใน 1 ug ของ cellular DNA (79) จากรูปที่ 11 สามารถตรวจพบได้ที่ 1 pg ดังนั้นแสดงว่าความไวของวิธี PCR นี้ตรวจได้ไวถึง 1 copy/cell ทำการทดสอบกับ HeLa cell line ซึ่งมี HPV-18 โดยทำการเจือจาง 10 เท่าของ HeLa-DNA ตั้งแต่ 1 ug จนถึง 1 fg เติม 1 ug human DNA ทุกหลอด และนำไปเพิ่มขยายจำนวนโดย PCR พบว่าปริมาณที่น้อยที่สุดที่ตรวจพบคือ 10 pg (รูปที่ 12) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณ DNA ที่ตรวจได้จากข้อ 1.1 (6.13 pg/cell) แสดงว่าสามารถตรวจพบได้ ประมาณ 20-50 copies



รูปที่ 9: ผลการเพิ่มขยาย purified plasmid HPV-DNA 5 types (HPV-6, 11, 16, 18, 33) โดยใช้ L1 primers และ B-globin primers และ B-globin primers ใช้ปริมาณ DNA เท่ากันคือ 1 ug แถวที่ 1: pBR322/HinfI แสดงตำแหน่งจำนวนคู่เบส, แถวที่ 2: HeLa DNA, แถวที่ 3: human DNA, แถวที่ 4-8: purified plasmid HPV-DNA type 6, 11, 16, 18และ 33 ตามลำดับ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10: ผลการทดสอบการตรวจ purified plasmid HPV DNA ทั้ง 5 types (HPV-6, 11, 16, 18, 33) ที่ปริมาณต่างๆกันโดยวิธี PCR

แถวที่ 1: Ox174 RF DNA/HaeIII,

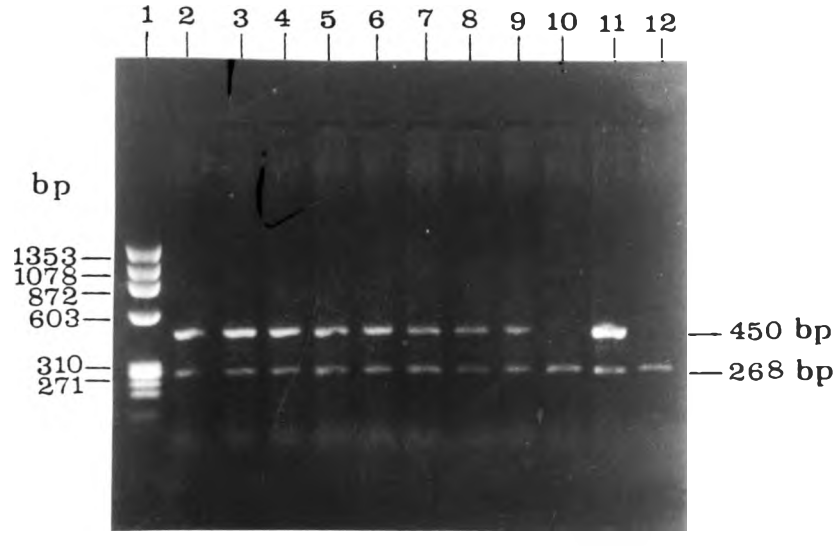
แถวที่ 2-4: HPV-6 ที่ 1 ng, 1 pg, 100 fg ตามลำดับ,

แถวที่ 5-7: HPV-11 ที่ 1 ug, 1 ng, 1 pg ตามลำดับ,

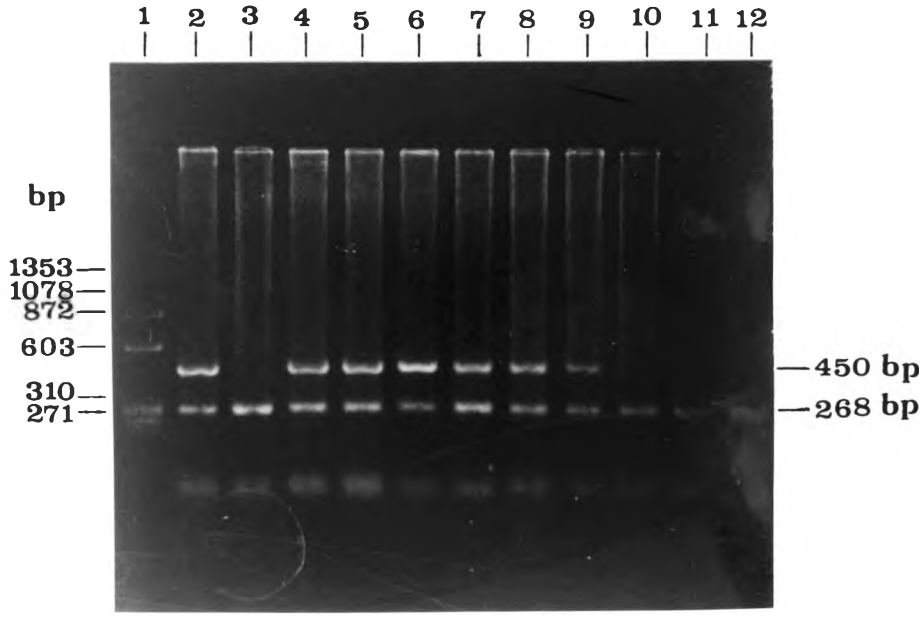
แถวที่ 8-10: HPV-16 ที่ 1 ng, 1 pg, 100 fg ตามลำดับ,

แถวที่ 11-13: HPV-18 ที่ 1 ng, 1 pg,100 fg ตามลำดับ,

และ แถวที่ 14-16: HPV-33 ที่ 1 ng, 1 pg,100 fg ตามลำดับ



รูปที่ 11: การทดสอบความไวของการทำ PCR กับ HPV-16 โดยเจือจางความเข้มข้นของ purified plasmid HPV-16 ที่ 1 ug, 100 ug, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, และ 10 fg คือ แถวที่ 3-10 ตามลำดับ ในสภาวะที่มี 1 ug ของ human DNA อยู่ด้วยทุกหลอด แถวซ้ายสุดคือ Ox174 RF DNA/HaeIII เพื่อแสดงจำนวนคู่เบส, แถวที่ 2 และ 11: ตัวควบคุมบวก (HeLa DNA) แถวที่ 12: ตัวควบคุมลบ (human DNA)



รูปที่ 12: การทดสอบความไวของการทำ PCR กับ HeLa DNA โดยเจือจางความเข้มข้นของ HeLa DNA ที่ 1 ug, 100 ug, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, และ 10 fg คือ แถวที่ 4-12 ตามลำดับ ในสภาวะที่มี 1 ug ของ human DNA อยู่ด้วยทุกหลอด แถวซ้ายสุดคือ Ox174 RF DNA/HaeIII เพื่อแสดงจำนวนคู่เบส, แถวที่ 2-3: ตัวควบคุมบวก (HeLa DNA) และ ตัวควบคุมลบ (human DNA)

3. การตรวจหา HPV-DNA ในตัวอย่างโดยวิธี PCR และ วิเคราะห์ผลด้วย GE

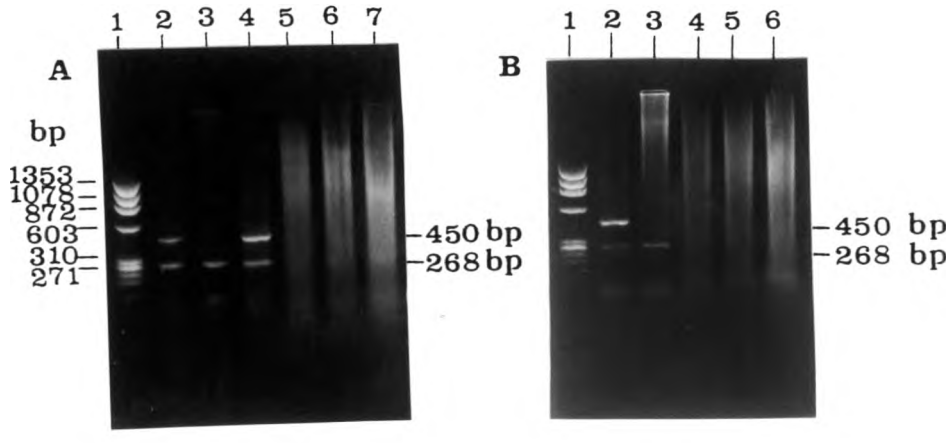
3.1 ทดสอบปริมาตรที่เหมาะสมในการทำ PCR กับตัวอย่างที่ผ่านการสกัด DNA แล้ว โดยเปรียบเทียบที่ 10, 5, 3, และ 1 ul ตามลำดับ พบว่าที่ปริมาตร 1 ul สามารถตรวจสอบผลการเพิ่มขยายได้ แต่ไม่พบผลการเพิ่มขยายใดๆเลยที่ 10, 5, และ 3 ul (รูปที่ 13A)ได้ทดลองเติม purified plasmid HPV-16 ลงในแต่ละหลอดแล้วทำ PCR ก็ไม่พบผลการเพิ่มขยายเช่นเดียวกัน (รูปที่ 13B) จากผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างมีสารยับยั้งขบวนการ PCR อยู่ ดังนั้นในการตรวจหาจากตัวอย่างจึงใช้ปริมาตร 1 ul

3.2 ผลการตรวจ DNA ที่สกัดจากตัวอย่างส่งตรวจ พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกจำนวน 63 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 100 ตัวอย่าง คิดเป็น 63% และ ผลลบ 27 ตัวอย่าง คิดเป็น 27% รูปที่ 14 แสดงผลตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวกและลบ คือ HeLa-DNA และ human DNA ตามลำดับ

4. การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำ DH

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ hybridization พิจารณาจากค่า melting temperature (Tm) ของ oligonucleotide แต่ละเส้น โดยทั่วไปนิยมใช้อุณหภูมิในการ hybridization ต่ำกว่าค่า Tm ประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส (80)

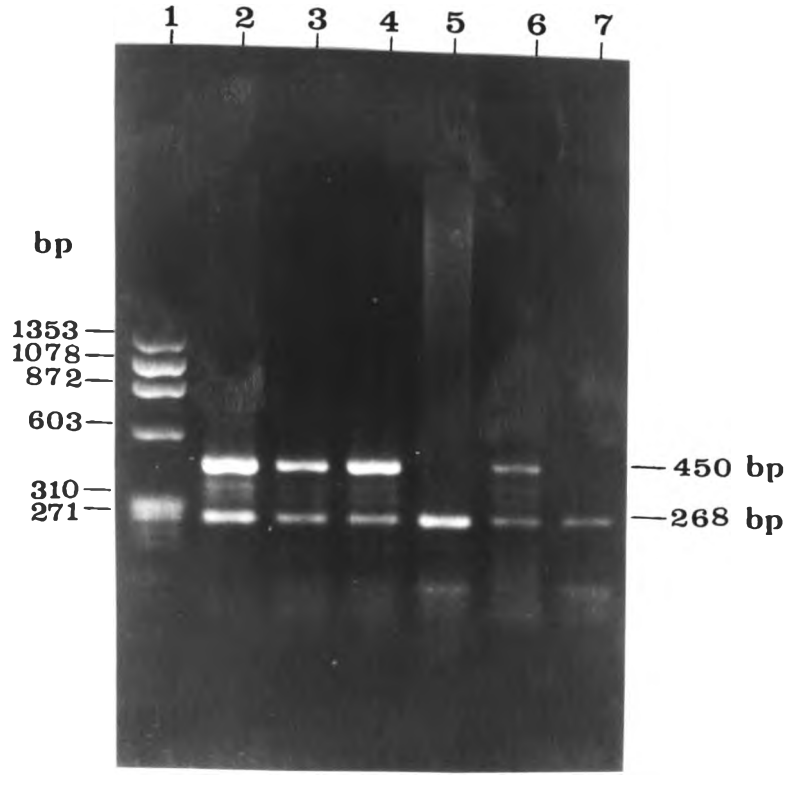
4.1 ทดสอบความเข้มข้นของ GP และ อุณหภูมิที่เหมาะสม โดยใช้ความเข้มข้นของ GP ที่ 0.25 pmole และ 0.5 pmole ทำปฏิกิริยา hybridization กับ purified plasmid HPV ทั้ง 5 types ปริมาณ 1 ug ที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส และ ปรับอุณหภูมิล้าง (washing) ที่ 42 และ 45 องศาเซลเซียส ผลปรากฏว่า GP สามารถทำปฏิกิริยา hybridization กับ HPV ทั้ง 5 types ในทุกสภาวะการทดสอบ (รูปที่ 15) ดังนั้นจึงเลือกปริมาณ GP ที่ 0.5 pmole อุณหภูมิการทำ hybridizationที่ 42 องศาเซลเซียส และ ล้างที่ 45 องศาเซลเซียส เพื่อลด



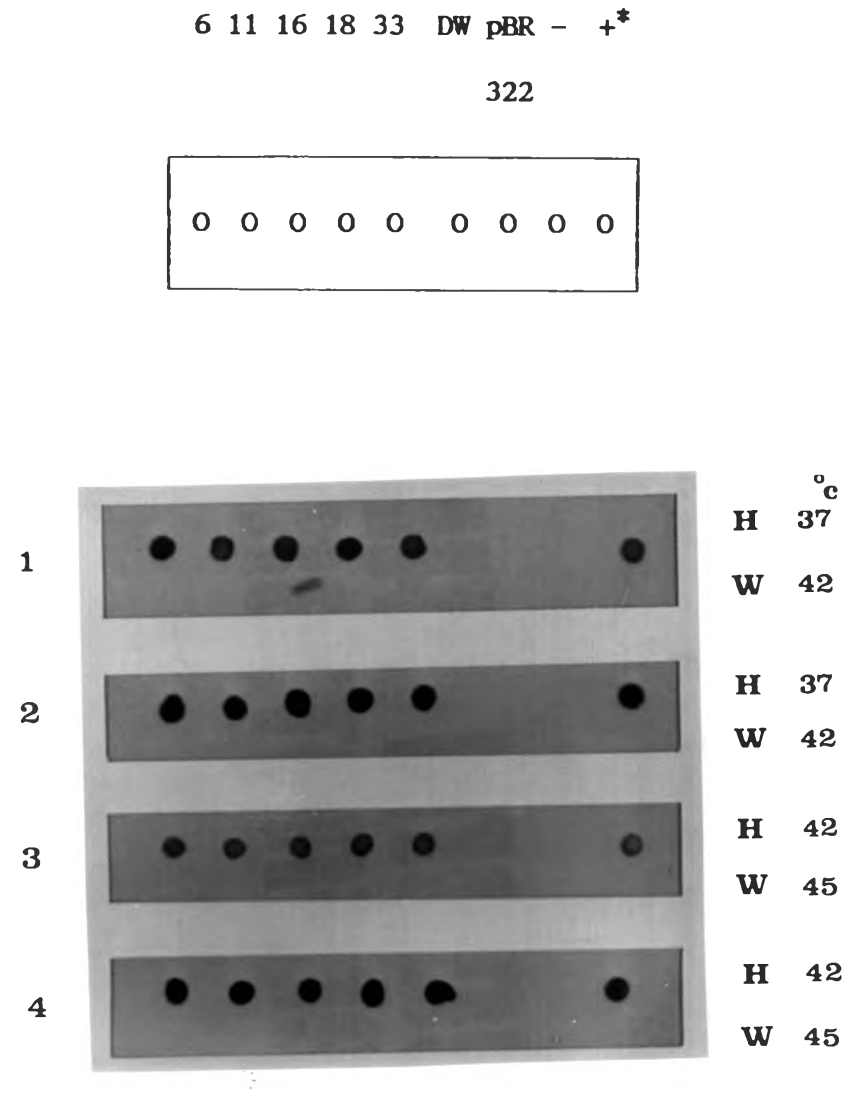
รูปที่ 13: ผลของปริมาตรต่างๆกันของ DNA สกัดจากตัวอย่างในการทำ PCR โดยเปรียบเทียบปริมาณ DNA ตัวอย่างที่ 1 ul, 3 ul, 5 ul และ 10 ul ตามลำดับ แถวซ้ายสุดคือ Ox174 RF DNA/HaeIII เพื่อแสดงจำนวนคู่เบส, แถวที่ 2: ตัวควบคุมบวก (HeLa DNA), แถวที่ 3: ตัวควบคุมลบ (human DNA)

รูป A: แถวที่ 4-7: ปริมาณ DNA ตัวอย่างที่ 1 ul, 3 ul, 5 ul, และ 10 ul ตามลำดับ

รูป B: แถวที่ 4-6: ปริมาณ DNA ตัวอย่างที่ 3 ul, 5 ul, และ 10 ul ที่เติม 1 ug purified plasmid HPV-16 DNA ลงไปด้วยทุกหลอด



รูปที่ 14: แสดงผลการทดสอบตัวอย่างส่งตรวจ แถวที่ 1 : Ox174 RF DNA/ HaeIII, แถวที่ 2: ตัวควบคุมผลบวก (HeLa-DNA), แถวที่ 7: ตัวควบคุมผลลบ (WBC), แถวที่ 3, 4, 6: ตัวอย่างส่งตรวจที่ให้ผลบวก, แถวที่ 5: ตัวอย่างส่งตรวจที่ให้ผลลบ



รูปที่ 15: แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นของ GP (0.25 pmole และ 0.5 pmole) ที่อุณหภูมิในการ hybridization (H) และ washing (W) ต่างๆกัน โดยใช้ purified plasmid HPV-DNA ทั้ง 5 type และ ตัวควบคุมผลบวก (HeLa-DNA), ตัวควบคุมผลลบ (human DNA, pBR322, DW) ปริมาณ 1 ug เป็นตัวอย่าง

แถวที่ 1 และ 3: ใช้ GP ความเข้มข้น 0.25 pmole

แถวที่ 2 และ 4: ใช้ GP ความเข้มข้น 0.5 pmole

* + : ตัวควบคุมบวก (HeLa DNA)

\- : ตัวควบคุมลบ (human DNA)

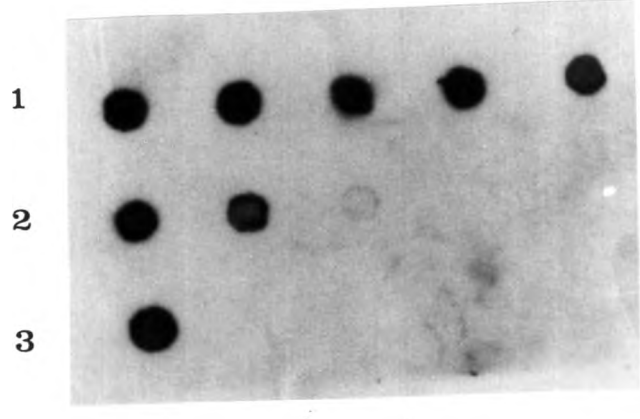
nonspecific reaction ที่อาจเกิดขึ้นได้เมื่อทำ DH กับ DNA สกัดจากตัวอย่างส่งตรวจ

4.2 <u>ทดสอบความไวของ DH ในการตรวจหา PCR amplified product</u> นำผล PCR amplified product ของ HPV-16 จากการทดลองในหัวข้อ 2.5.2 มาทำ DH โดยใช้ปริมาตรของตัวอย่าง 1 ul เมื่อใช้ GP พบว่า สามารถตรวจพบได้ที่ความเข้มข้น 1 pg ต่อหน่วยที่มี HPV-16 0.1 pg พบรอยจางไม่ชัดเจน (รูปที่ 16) และทำเช่นเดียวกับ HeLa-DNA ตรวจสอบความไวที่ 10 pg พบรอยจางไม่ชัดเจนที่ 1 pg (รูปที่ 17) จากการทดลองนี้เมื่อพิจารณาความไวเทียบกับ GE จะเห็นว่าวิธี DH มีความไวกว่าวิธี PCR อย่างน้อย 10 เท่า

4.3 <u>ทดสอบความเข้มข้นของ TS และอุณหภูมิที่เหมาะสม</u> โดยทำการทดลองเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆกัน โดยกำหนดให้ปริมาณความเข้มข้นของ TS เท่ากับ 0.5 pmole เช่นเดียวกับ GP ผลจากรูปที่ 18 แสดงให้เห็นว่า TS-11 และ TS-33 ในสภาวะการทำ hybridization ที่ 37 องศาเซลเซียส และล้างที่ 37 องศาเซลเซียส ได้ผลชัดเจนไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับ HPV type อื่นๆ จึงใช้สภาวะดังกล่าวทำการทดสอบกับตัวอย่างต่อไป ส่วน TS-6 และ TS-18 ไม่สามารถตรวจสอบได้ แต่ TS-16 พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกับ HPV-6 และ HPV-18 แสดงว่าสภาวะการทดสอบดังกล่าวไม่เหมาะสม จึงทำการทดสอบเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ TS-6, TS-16 และ TS-18 เป็น 5 pmole และ ทดสอบเปรียบเทียบที่อุณหภูมิต่างๆกันดังรูปที่ 19 และสรุปสภาวะที่เหมาะสมในการทำ DH ของแต่ละ TS ดังตารางที่ 5

5. <u>การตรวจหา HPV-DNA โดยวิธี DH</u>

5.1 <u>DNA สกัดจากตัวอย่างส่งตรวจ</u> โดยเอาตัวอย่างที่ผ่านการสกัด DNA และ ไม่ได้ผ่านขบวนการ PCR มาทดสอบกับ GP โดยใช้ปริมาณ DNA ที่ 1 ug และ 10 ug ผลปรากฏว่า ที่ปริมาณ DNA 1 ug ไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกเลย ส่วนที่ปริมาณ DNA 10 ug พบว่ามีเพียง 5 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก

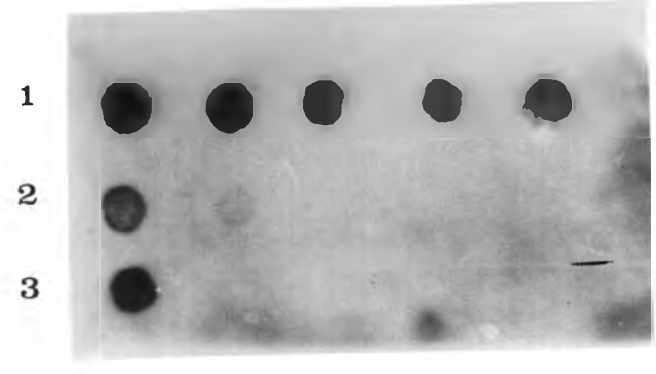


รูปที่ 16: การทดสอบความไวของ GP กับ amplified purified plasmid HPV-16 DNAโดยวิธี DH

แถวที่ 1: 1 ug, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg

แถวที่ 2: 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg

แถวที่ 3: ตัวควบคุมบวก (HeLa DNA), ตัวควบคุมลบ (human DNA, pBR322, DW)

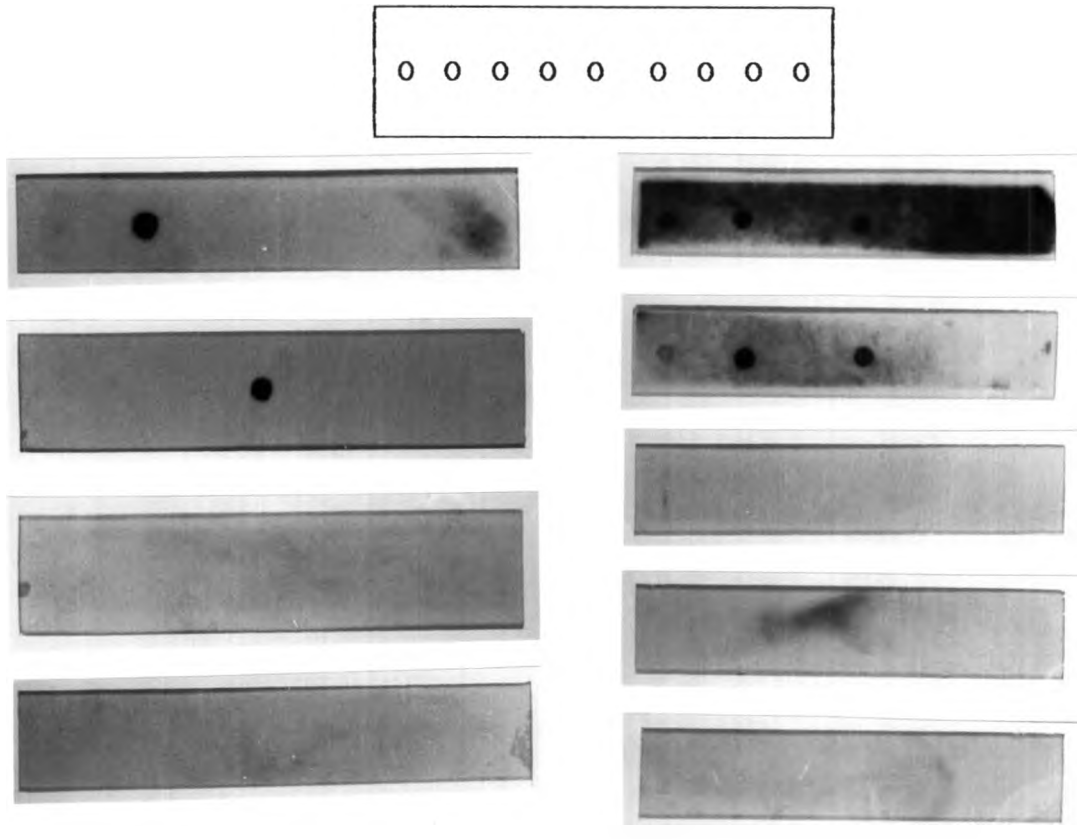


รูปที่ 17: ทดสอบความไวของ GP กับ amplified HeLa DNA

แถวที่ 1: 1 ug, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 fg

แถวที่ 2: 10 pg, 1pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg

แถวที่ 3: ตัวควบคุมบวก (HeLa DNA), ตัวควบคุมลบ (human DNA, pBR322, DW)



รูปที่ 18: ทดสอบสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ TS ที่ความเข้มข้น 0.5 pmole กับ purified plasmid ทั้ง 5 types โดยวิธี DH

แถวที่ 1: TS-11 ที่อุณหภูมิ H 37 ^{o}C และอุณหภูมิ W 37 ^{o}C

แถวที่ 2: TS-33 " 37 " 37 ^{o}C

แถวที่ 3: TS-6 " 37 " 37 ^{o}C

แถวที่ 4: TS-6 " 42 " 42 ^{o}C

แถวที่ 5: TS-16 " 42 " 42 ^{o}C

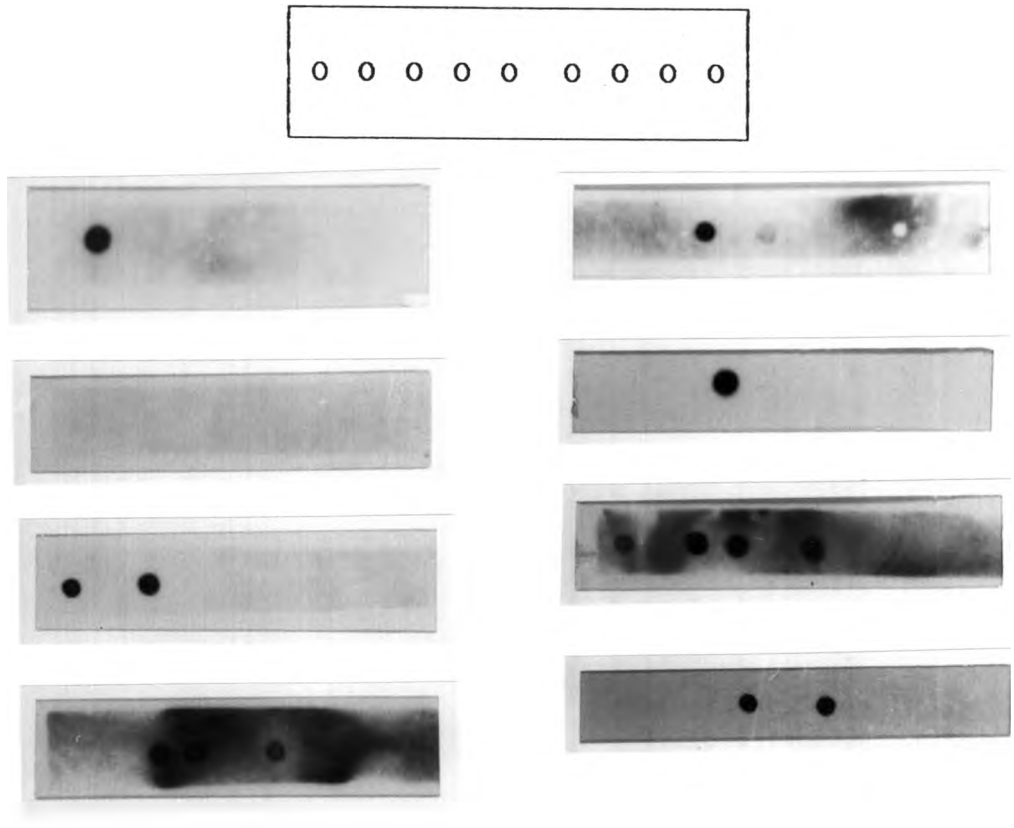
แถวที่ 6: TS-16 " 42 " 45 ^{o}C

แถวที่ 7: TS-18 " 42 " 50 ^{o}C

แถวที่ 8: TS-18 " 42 " 55 ^{o}C

แถวที่ 9: TS-18 " 48 ' 52 ^{o}C

(+ : HeLa DNA, - : Human DNA)



รูปที่ 19: ทดสอบสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ TS-6, TS-16, และ TS-18 ที่ความเข้มข้น 5 pmole กับ purified plasmid ทั้ง 5 types โดยวิธี DH

แถวที่ 1: TS-6 ที่อุณหภูมิ H 37 ^{o}C และอุณหภูมิ W 37 ^{o}C

แถวที่ 2: TS-6 " 42 " 45 ^{o}C

แถวที่ 3: TS-16 " 37 " 45 ^{o}C

แถวที่ 4: TS-16 " 42 " 45 ^{o}C

แถวที่ 5: TS-16 " 42 " 50 ^{o}C

แถวที่ 6: TS-16 " 42 " 55 ^{o}C

แถวที่ 7: TS-18 " 42 " 45 ^{o}C

แถวที่ 8: TS-18 " 42 " 50 ^{o}C

(+ : HeLa DNA, - : Human DNA)

5.2 Amplified DNA ของตัวอย่างที่ผ่านขบวนการ PCR ใช้ปริมาณ 1 ug ผลการตรวจจาก 100 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ GP 82 ตัวอย่างคิดเป็น 82% จากตัวอย่างทั้งหมด อีก 18 ตัวอย่างไม่สามารถตรวจพบ HPV-DNA

5.3 การแยก HPV-type โดยใช้ TS โดยนำ amplified DNA ของตัวอย่างที่ผ่านขบวนการ PCR ปริมาณ 1 ug มาทำการตรวจสอบแยก type ผลพบว่าสามารถแยก type-16 จำนวน 30 ตัวอย่าง (36.58%), type-18 จำนวน 12 ตัวอย่าง (14.6%), type-33 จำนวน 3 ตัวอย่าง (3.66%), ตรวจพบทั้ง type 16 และ 18 จำนวน 5 ตัวอย่าง (6.1%) ไม่พบว่ามี type 6 และ 11 และอีก 32 ตัวอย่างคิดเป็น 39% ไม่สามารถระบุ type ได้ (ตารางที่ 6 และ รูปที่ 20)

6. การเปรียบเทียบการตรวจหา amplified HPV-DNA โดย GE และ DH

วิธี GE พบ 63% และ DH พบ 82% แจกแจงรายละเอียดผลได้ดังตารางที่ 6 จะเห็นว่ามีตัวอย่าง 19 ตัวอย่างที่ไม่สามารถตรวจได้ด้วยวิธี GE และมี 8 ตัวอย่างที่สามารถทำการจำแนก type ได้

7. การตรวจตัวอย่างโดยวิธี Southern hybridization

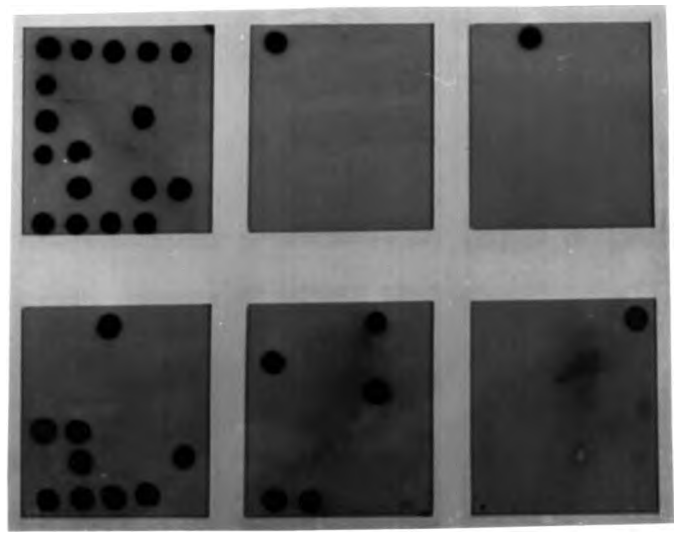
เนื่องจากมีตัวอย่างจำนวน 11 ตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยวิธี GE แต่ให้ผลบวกกับวิธี DH ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผลบวกว่ามีความจำเพาะต่อ HPV-DNA จริงจึงนำตัวอย่างกลุ่มนี้มาทำ Southern hybridization โดยนำ amplified DNA ที่ผ่าน GE มา transfer ลงบนแผ่น membrane แล้วนำมา hybridize กับ GP ถ้ามีการตรวจพบแถบแสดงที่ตำแหน่ง 450 bp แสดงว่ามี HPV-DNA ในตัวอย่างแต่ไม่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าจากการย้อม ethidium bromide โดยวิธี GE ผลพบว่าตัวอย่างทั้งหมด 11 ตัวอย่างที่ไม่สามารถ สังเกตผลโดย GE เมื่อผ่านขบวนการ Southern hybridization กับ GP แล้วให้ผลบวกชัดเจนบริเวณตำแหน่ง 450 bp ดังแสดงในรูปที่ 21

ตารางที่ 6: แสดงการเปรียบเทียบการตรวจหา amplified DNA โดยใช้วิธี GE และ DH

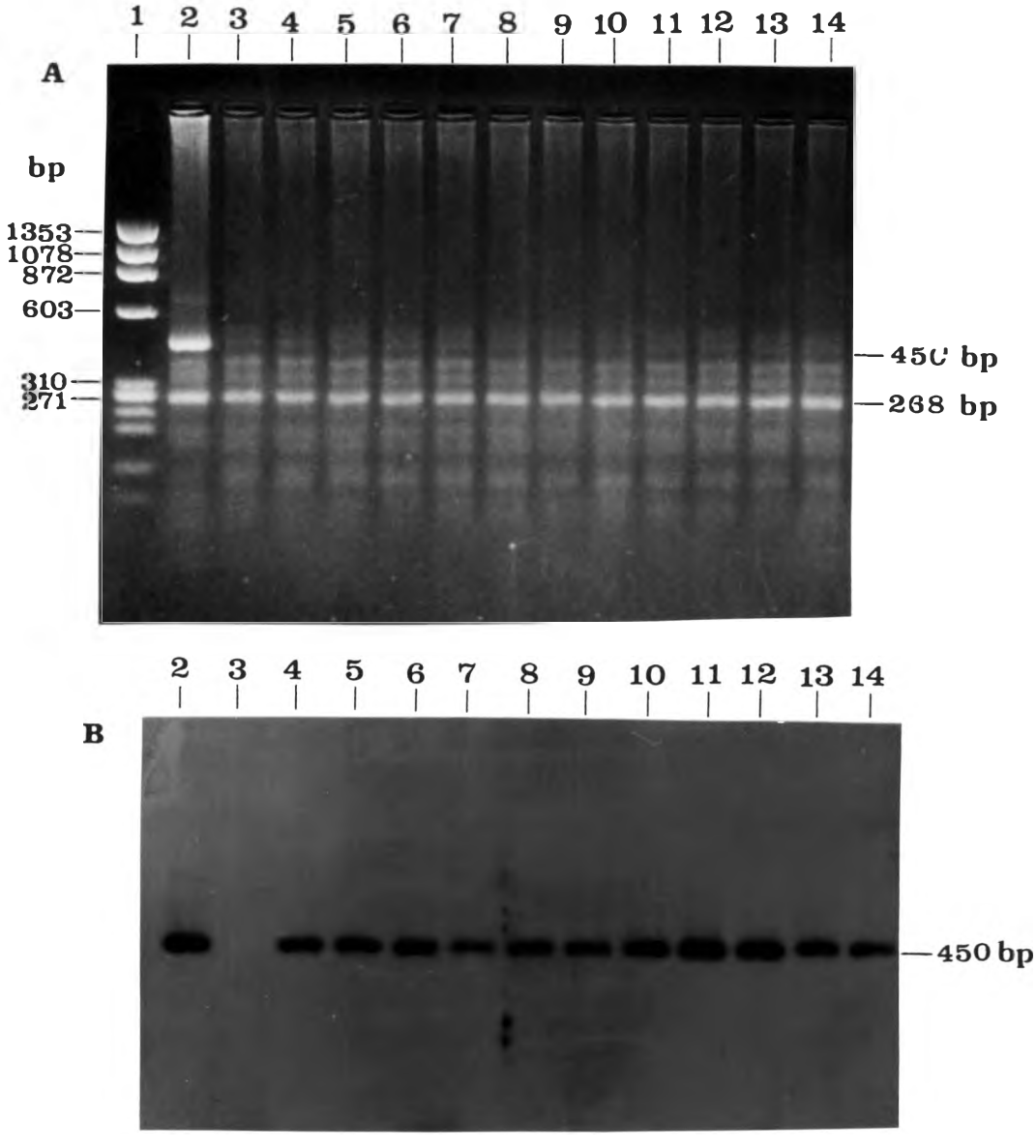
	TS-6	TS-11	TS-16	TS-18	TS-16,18	TS-33	UNK*	Total(%)
GE+DH+	0	0	26	9	5	2	21	63
GE-DH+	0	0	4	3	0	1	11	19
Total	0	0	30	12	5	3	32	82
(%)	(0)	(0)	(36.57)	(14.6)	(6.1)	(3.66)	(39)	(100)

* UNK: unknown

O O O O O	HPV-6, 11, 16, 18, และ 33
O O O O O	+, -, pBR322, DW
O O O O O	specimen no.1-5
O O O O O	specimen no.6-10
O O O O O	specimen no.11-15
O O O O O	specimen no.16-20



รูปที่ 20: แสดงผลการตรวจหา amplified product ของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจโดยวิธี DH ใช้ GP และ TS A. แผนภูมิการหยดตัวอย่าง DNA มีตัวควบคุมผลบวกคือ purified plasmid HPV-DNA 5 type และ HeLa-DNA ตัวควบคุมผลลบคือ human DNA, pBR322 และน้ำกลั่น จำนวนตัวอย่าง 20 ตัวอย่าง, B. GP, C. TS-6, D. TS-11, E. TS-16, F. TS-18 และ G. TS-33 ตามลำดับ



รูปที่ 21: ผลการตรวจ amplified product โดยวิธี Southern hybridization ตัวอย่างจำนวน 11 ตัวอย่างที่ให้ผล GE-/DH+

A. ผล amplified product ผ่าน GE โดย แถวที่ 1: Ox174 RF DNA/HaeIII, แถวที่ 2: HeLa DNA, แถวที่ 3: human DNA และ แถวที่ 4-14: ตัวอย่างส่งตรวจที่ 1-11.

B. ผลการทำ Southern hybridization จาก A. โดยใช้ GP