

เมทิลेशनของยีน CCNA1 ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูกที่ถูกทรานสเฟกต์ด้วยยีน E7
ของ Human Papillomavirus ไทป์ 16

นายวัชรพงศ์ ภัคดีชายแดน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

Methylation of *CCNA1* gene in cervical cancer cell line transfected with *E7* gene
of Human Papillomavirus type 16

Mr. Watcharapong Pakdeechidan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

เมทิลเอชดีของยีน CCNA1 ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปาก
มดลูกที่ถูกทรานสเฟกต์ด้วยยีน E7 ของ Human
Papillomavirus ไทป์ 16

โดย

นายวัชรพงศ์ ภัคดีชายแดน

สาขาวิชา

พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุมพล คุณวาสี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. ไชติกา สมรรคจันทร)

วัชรพงศ์ ภัคดีชายแดน : เมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูกที่ถูกทรานสเฟกต์ด้วยยีน *E7* ของ Human Papillomavirus ไทป์ 16.

(Methylation of *CCNA1* gene in cervical cancer cell line transfected with *E7* gene of Human Papillomavirus type 16) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:

อ. ดร. ปฐมวดี ญาณทัศน์ยิจิต, 98 หน้า.

สาเหตุหลักในการเกิดมะเร็งปากมดลูก คือ การติดเชื้อไวรัส Human papillomavirus (HPV) ซึ่งจัดเป็นสาเหตุหลัก ผู้ป่วยจะถูกตรวจพบเชื้อ HPV ไทป์ที่มีความเสี่ยงสูง (HR-HPV) มากกว่าร้อยละ 90% โดยเฉพาะ HPV ไทป์ 16 และ 18 การศึกษาที่ผ่านมาพบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันและการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่นำไปสู่โรคมะเร็ง พบว่าการเกิดมะเร็งปากมดลูกซึ่งมีการติดเชื้อ HPV มีความสัมพันธ์ต่อการเกิด เมทิลเลชัน ของ *CCNA1* ซึ่งมีบทบาทเสมือนเป็นยีนต้านมะเร็งในมะเร็งปากมดลูกถึง 93% วัตถุประสงค์ ของงานวิจัย เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *E7* ในไวรัส HPV ไทป์ 16 กับดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในการทดลองผู้วิจัยได้เลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก 3 ชนิด คือ HeLa cell ที่มีการติดเชื้อของ HPV ไทป์ 18, SiHa cell ที่มีการติดเชื้อของ HPV ไทป์ 16 และ C33A cell ซึ่งไม่มีการติดเชื้อของไวรัส HPV และเซลล์สายพันธุ์มะเร็งหูคอจมูก 3 ชนิด คือ HN4 , HN12 และ HN17 ซึ่งยังไม่ทราบการติดเชื้อ นำเซลล์ทั้ง 6 ชนิดมาตรวจสอบการติดเชื้อ HPV จากนั้นตรวจสอบเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน *CCNA1* จากนั้นมุ่งเน้นไปที่ยีน *E7* ของ HPV 16 โดยการสร้าง plasmid ที่ใส่ยีน *E7* ของ HPV ไทป์ 16 และทรานสเฟกต์ plasmid นี้เข้าไปใน C33A และ HN 12 จากนั้นจึงตรวจสอบ เมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน *CCNA1* อีกครั้งใน C33A และ HN 12 เพื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ถูกทรานสเฟกต์ยีน *E7* กับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกทรานสเฟกต์ ผลการวิจัยพบว่า เซลล์ C33A ที่ถูกทรานสเฟกต์ยีน *E7* ของไวรัส HPV ไทป์ 16 มีเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ที่เพิ่มมากขึ้น และพบการแสดงออกของยีนนี้ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกทรานสเฟกต์ ส่วนเซลล์ HN12 ที่ถูกทรานสเฟกต์ยีน *E7* ตรวจพบเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกทรานสเฟกต์จะไม่มีเมทิลเลชัน และการแสดงออกของยีนก็ลดลงเช่นเดียวกับเซลล์ C33A ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ยีน *E7* ของไวรัส HPV 16 มีผลต่อการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูก

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิติต

สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา2555.....

5172616023 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS : *CCNA1*/ methylation/ HPV/ *E7*/ methylation specific pcr

WATCHARAPONG: METHYLATION OF *CCNA1* GENE IN CERVICAL
CANCER CELL LINE TRANSFECTED WITH *E7* GENE OF Human
Papillomavirus TYPE 16. ADVISOR : PATTAMAWADEE
YANATATSANEEJIT, Ph.D., 98 pp.

The main cause of cervical cancer are infection of human papillomavirus (HPV) by which high-risk HPV (HR-HPV) can be detected in cervical cancer patients more than 90%, particularly HPV type 16 and 18. Previous studies found the correlation of methylation and expression inhibition of genes leading to cancer and cervical cancer which is infected by HPV is associated with methylation of *CCNA1* which has a role as tumor suppressor gene in cervical cancer up to 93%. The aim of this research to study the correlation of *E7* gene in HPV type 16 and DNA methylation on *CCNA1* promoter. We cultured 3 cervical cancer cell lines : HeLa (HPV type 18 infection), SiHa (HPV type 16 infection) and C33A (no HPV infection) and 3 head and neck cell lines : HN4, HN12 and HN17 which are still unknown of HPV type infection. We detected HPV type infection in these 6 cell lines and methylation and expression of *CCNA1*. Then we emphasized to study *E7* gene of HPV type 16 by constructing the plasmid inserted *E7* gene of HPV type 16 and trasfecting it into C33A and HN12. Lastly, we verified the difference of methylation status and expression of *CCNA1* in these 2 transfected cell lines and non-transfected cell lines. The results show that C33A which is transfected by *E7* gene of HPV type 16 has more methylation on *CCNA1* promoter as well as the expression of *CCNA1* is decreased when compared to non-tranfected cells. What's more, HN12 which is transfected by *E7* has methylation; yet methylation is not found in non-tranfected HN12. Besides that the decreasing expression of *CCNA1* is found. On the whole, we conclude that *E7* gene of HPV type 16 has affected to methylation of *CCNA1* in cervical cancer.

Department :Botany..... Student's Signature

Field of Study :....Genetics..... Advisor's Signature

Academic Year :...2012.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำตลอดการทำวิทยานิพนธ์ ช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินชีวิตและเนื้อหาในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุมพล คุณวาสี ประธานกรรมการ, อาจารย์ ดร. รัชนิกร ธรรมโชติ กรรมการภายในสาขา พันธุศาสตร์ และ ดร. โชติกา สมรรถจันทร นักวิจัยศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ข้อเสนอแนะและข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นพ. ดร. อภิวัดน์ มุทิตรางกูร ที่ให้โอกาสเข้ามาทำวิจัยในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอณูพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ รวมทั้งอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นต่างๆในการวิจัย ตลอดจนให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์สำหรับการวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นพ. วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ และเจ้าหน้าที่, นิสิตป.โท และ ป.เอกในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเวชพันธุศาสตร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณศิริประภา ทองกอบเพชร ที่ให้คำปรึกษาเทคนิคทางการวิจัยอย่างถ่องแท้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่, นิสิตป.โท และ ป.เอกในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอณูพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำและความช่วยเหลือในการวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ และเพื่อนพี่น้องนิสิตทุ กท่านในภาควิชา พฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจในการดำเนินชีวิต

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อเรื่องวิทย์ ภัคดีชายแดน และคุณแม่วันทนีย์ ภัคดีชายแดน และทุกคนในครอบครัวที่สนับสนุนในด้านการเรียน ตลอดจนเป็นกำลังใจให้เสมอมาจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้คุณความดีและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุน 90 ปี (กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	5
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
โรคมะเร็ง.....	9
มะเร็งปากมดลูก.....	9
Papillomavirus.....	11
การติดเชื้อ.....	14
โครงสร้างของ Human papillomavirus.....	16
บทบาทในการก่อมะเร็งของยีนในไวรัส HPV.....	19
โครงสร้างของ E7 oncoprotein.....	22
กลไกระดับเหนือพันธุกรรม.....	23
การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (DNA methylation).....	23
ปฏิกิริยาไบซัลไฟต์ (Bisulfite conversion).....	25
Methylation specific-PCR (MSP).....	26
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	28
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	28
1. เครื่องมือ.....	28

2. วัสดุอุปกรณ์.....	29
3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	30
3.1 สารเคมีทั่วไป.....	30
3.2 สารเคมีสำหรับทำ PCR.....	32
3.3 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอ.....	32
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย.....	32
3.5 สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์.....	33
3.6 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Transfection.....	33
3.7 ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย.....	33
3.8 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Western blot.....	33
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	34
1. การตรวจสอบการติดเชื้อ HPV.....	34
1.1 เซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	34
1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์.....	35
1.3 การสกัด DNA.....	37
1.4 การสกัด RNA.....	38
1.5 การตรวจหา HPV DNA ด้วยวิธี PCR.....	39
1.6 การตรวจหา HPV type ด้วยวิธี PCR.....	41
2. การตรวจสอบเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i>	43
2.1 การตรวจสอบเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน <i>CCNA1</i>	43
2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i>	48
3. การสร้าง recombinant plasmid ของยีน <i>E7</i> ของ HPV ไทป์ 16.....	50
3.1 โครงสร้างของ pGEX2T <i>E7</i> vector.....	50
3.2 การตรวจสอบยีน <i>E7</i> ในพลาสมิด pGEX2T <i>E7</i>	51
3.4 การตรวจสอบความถูกต้องของการทำ Mutagenesis.....	54
3.5 การสร้างพลาสมิดสำหรับการทำ transfection.....	56
3.6 การทำ Transfection.....	59
4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน <i>E7</i> และ <i>CCNA1</i>	61
4.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตโปรตีน <i>E7</i>	61

4.2 การตรวจสอบเมทิลเลชันของยีน <i>CCNA1</i> เมื่อผ่านการทรานสเฟกต์ด้วย <i>E7</i>	63
4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> เมื่อผ่านการทรานสเฟกต์ด้วย <i>E7</i>	64
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	65
4.1. การตรวจสอบการติดเชื้อ HPV.....	65
4.1.1 การตรวจหา HPV DNA ด้วยวิธี PCR.....	65
4.1.2 การตรวจหา HPV type ด้วยวิธี PCR.....	66
4.2. การตรวจสอบเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i>	67
4.2.1 การตรวจสอบเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน <i>CCNA1</i>	67
4.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i>	68
4.3. การสร้าง recombinant plasmid ของยีน <i>E7</i> ของ HPV ไทป์ 16.....	69
4.3.1 การตรวจสอบยีน <i>E7</i> ในพลาสมิด pGEX2T <i>E7</i>	69
4.3.2 การตรวจสอบความถูกต้องของการทำ Mutagenesis.....	70
4.3.3 การสร้างพลาสมิดสำหรับการทำ transfection.....	73
4.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน <i>E7</i> และ <i>CCNA1</i>	75
4.4.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตโปรตีน <i>E7</i>	75
4.4.2 การตรวจสอบเมทิลเลชันของยีน <i>CCNA1</i> เมื่อผ่านการทรานสเฟกต์ด้วย <i>E7</i>	78
4.4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> เมื่อผ่านการทรานสเฟกต์ด้วย <i>E7</i> ...	80
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	82
สรุปผลการวิจัย.....	82
อภิปรายผลการวิจัย.....	84
ข้อเสนอแนะ.....	85
รายการอ้างอิง.....	87
ภาคผนวก.....	96
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	98

สารบัญญัตินี้

ตารางที่		หน้า
1	FIGO staging ของมะเร็งปากมดลูก, พ.ศ. 2545.....	12
2	แสดงชนิด (type) ของ HPV ที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ.....	14
3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer L1 สำหรับ PCR.....	40
4	ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจ HPV DNA.....	40
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer HPV16-E6, HPV16-E7, HPV18-E6 และ HPV18-E7.....	41
6	ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจ HPV type.....	42
7	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วนของยีน HPV16-E6, HPV16-E7, HPV18-E6 และ HPV18-E7.....	43
8	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ primers Met-CCNA1 และ Unmet-CCNA1.....	46
9	ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ MSP-PCR เพื่อตรวจเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของ ยีน CCNA1.....	47
10	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer CCNA1 และ GAPDH.....	48
11	ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจการแสดงออกของยีน CCNA1.....	48
12	ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR mutagenesis.....	53
13	ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR primer pGEX5 และ pGEX3.....	54
14	ส่วนผสมที่ใช้ในการตรวจสอบตำแหน่ง mutagenesis ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์.....	56
15	ส่วนผสมที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สำหรับเตรียมตัดต่อยีน E7 เข้า กับ expression vector.....	58
16	ส่วนผสมที่ใช้ในการ Ligation ระหว่างยีน E7 กับ expression vector.....	59
17	ส่วนผสมที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ระดับความเข้มข้น ต่าง ๆ.....	62
18	แสดงผลการตรวจสอบการติดเชื้อ Human papillomavirus ในเซลล์เพาะเลี้ยง ทั้ง 6 ชนิด.....	65
19	ผลการตรวจสอบหา HPV type ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิดโดยใช้คู่ primers HPV16-E7, HPV16-E6, HPV18-E7 และ HPV18-E6.....	67

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ตำแหน่งของเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นบริเวณปากมดลูก.....	10
2	สถิติค่าเฉลี่ย Age-standardised incidence rates (ASR) ของโรคมะเร็ง 10 อันดับแรกในเพศหญิง ปี พ.ศ. 2544 - 2546.....	10
3	แสดงการจำแนกจีโนมไทป์ของ Papillomaviruses โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ L1 ORF.....	13
4	ระยะของการพัฒนาในเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV.....	15
5	โครงสร้างจีโนมของ Human papillomavirus type 16.....	17
6	จีโนมของไวรัส HPV เมื่อ integrate เข้าสู่ DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน.....	20
7	แสดงการทำงานของ E6 และ E7 oncoprotein ทำให้เกิด Cell immortalization.....	21
8	โครงสร้างของโปรตีน E7.....	22
9	การเติมหมู่เมทิลบนเบสไซโตซีน.....	24
10	การdeamination ของไซโทซีนและ 5-เมทิลไซโตซีน.....	24
11	การเปลี่ยน C เป็น U ภายใต้ปฏิกิริยาไปซัลไฟต์.....	26
12	การจับกันของคู่ไพรมอร์ methylation และ unmethylation.....	26
13	แสดงตำแหน่งของยีน CCNA1	27
14	แสดงการออกแบบคู่ primers Methylated และ Unmethylated ของยีน CCNA1.....	46
15	โครงสร้างของพลาสมิด pGEX2T E7 และคุณสมบัติที่สำคัญ.....	50
16	ลำดับเบสของยีน E7 HPV type 16.....	51
17	การเปลี่ยนลำดับเบส stop codon > Tyrosine.....	52
18	ตำแหน่ง primer pGEX5 และ pGEX3 ที่อยู่ระหว่างยีน E7 ในพลาสมิด pGEX2T E7.....	54
19	แสดงตำแหน่งการตัดจำเพาะของเอนไซม์ NdeI ที่ตำแหน่ง mutagenesis.....	55
20	โครงสร้างของพลาสมิด pcDNA 3.1/myc-His A.....	57
21	ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ Human papillomavirus ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิด.....	65

รูปที่		หน้า
22	ผลการตรวจสอบหา HPV type ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิดโดยใช้คู่ primers HPV16-E7 และ HPV16-E6.....	66
23	ผลการตรวจสอบหา HPV type ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิดโดยใช้คู่ primers HPV18-E7 และ HPV18-E6.....	67
24	ผลการวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน <i>CCNA1</i> โดยใช้เทคนิค Methylation specific-PCR (MSP).....	69
25	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i>	70
26	ผลการตรวจพิสูจน์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>E7</i> ในพลาสมิด pGEX2T <i>E7</i>	71
27	ผลการตรวจสอบยีน <i>E7</i> โดยใช้คู่ primer pGEX5 และ pGEX3.....	71
28	ผลการตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NdeI</i>	72
29	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>E7</i> และตำแหน่งที่ผ่านการ mutagenesis.....	73
30	ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> และ <i>BamH1</i> แบบ Double digestion.....	75
31	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pcDNA3.1_ <i>E7</i>	74
32	ตัวอย่างผลการวัดปริมาณโปรตีนรวม สำหรับนำไปทำ western blot ในแต่ละหลุมใช้ปริมาณโปรตีนรวมเท่ากันคือ 40 ug.....	77
33	การตรวจสอบความสามารถในการผลิตโปรตีน <i>E7</i> ด้วยวิธี western blot.....	78
34	การตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีน <i>CCNA1</i> ในเซลล์ C33A.....	79
35	การตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีน <i>CCNA1</i> ในเซลล์ C33A.....	80
36	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ในเซลล์ C33A.....	81
37	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> ในเซลล์ HN12.....	82
38	ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pcDNA3.1_ <i>E7</i> โดยใช้ไพรเมอร์ T7 promotor forward ในการตรวจสอบ.....	97

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งปากมดลูก (Cervical Cancer) เป็นโรคที่เซลล์มะเร็งเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อบริเวณปากมดลูก เป็นมะเร็งที่พบมากเป็นลำดับ 3 ในผู้หญิงทั่วโลก (Ferlay *et al.*, 2010) สำหรับในประเทศไทยพบว่า เป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 2 รองจากมะเร็งเต้านมในเพศหญิงไทยและพบมากในช่วงอายุ 35-60 ปี สาเหตุส่วนใหญ่มากกว่า 90% เกิดจากการติดเชื้อ High Risk Human papillomavirus (HR-HPV) ได้แก่ HPV16 และ HPV18 โดยติดต่อผ่านทางเพศสัมพันธ์ (Munoz *et al.*, 2003) เมื่อได้รับเชื้อ HPV บริเวณเยื่อเมือกปากมดลูกอาจเข้าสู่ขั้นตอนการเกิดมะเร็งแบบ Multistep process และพัฒนาเป็นมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม ช่วงการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถจำแนกเป็นระยะต่างๆได้คือ Premalignant lesion ได้แก่ low grade และ high grade squamous intraepithelial lesions (SILs) และ Malignant invasive cervical cancer ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อจะไม่แสดงอาการแต่อย่างใด และส่วนใหญ่ผู้ป่วยจะมาพบแพทย์เมื่อเป็นมะเร็งระยะลุกลามแล้ว ทำให้การรักษาเป็นไปได้ยาก ปัจจุบันมีวิธีการตรวจมะเร็งปากมดลูกโดยการตรวจทางเซลล์วิทยาด้วยการย้อมสีเซลล์ที่เรียกว่า Papanicolaou (Pap) smear (Zur Hausen, 2002) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจคัดกรองมะเร็งในระยะเริ่มแรก เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (dysplasia) ที่อาจเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง ซึ่งวิธีนี้ต้องอาศัยความชำนาญของบุคลากรในการตรวจ ทำให้อาจเกิดความผิดพลาดเกิดขึ้นได้ ทำให้มีการพัฒนาการตรวจ HPV โดยใช้ DNA ซึ่งจะให้ผลการตรวจที่ดีกว่า (Halfon *et al.*, 2007) ดังนั้น HPV DNA testing จะใช้ในกรณีที่การตรวจทางเซลล์วิทยาให้ผลไม่แน่ชัด และเป็นวิธีตรวจที่มีความจำเพาะต่อการดำเนินโรค ตั้งแต่รอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูกไปถึงมะเร็งระยะลุกลาม ทำให้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ชัดเจนกว่า และเป็นที่ยอมรับมากกว่า (Banik *et al.*, 2011) ผู้ป่วยจะถูกตรวจพบเชื้อ HPV ไทป์ที่มีความเสี่ยงสูง (HR-HPV) มากกว่าร้อยละ 90 (99.7%) (Franceschi *et al.*, 2003) โดยที่ปริมาณเชื้อ HPV จะเพิ่มมากขึ้นตามระยะของรอยโรค ตั้งแต่ก่อนที่จะเป็นมะเร็งปากมดลูก จนกลายมาเป็นมะเร็งระยะลุกลาม กล่าวคือการตรวจพบเชื้อ

HPV จะเพิ่มมากขึ้นตามระดับความรุนแรงของโรค โดยเฉพาะ HPV type 16 และ HPV type 18 (Cromme *et al.*, 1993)

Human papillomavirus (HPV) เป็นไวรัสในกลุ่ม Papilloma ที่ก่อให้เกิดโรคในคน ปัจจุบันพบ HPV มากกว่า 100 สายพันธุ์ ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อของเนื้อเยื่อ (epithelium) หรือเยื่อเมือก (mucous membrane) ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน มีประมาณ 40 สายพันธุ์ ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อของเนื้อเยื่อ/เยื่อเมือกบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ (ano – genital area) (Arends *et al.*, 1988) พันธุกรรมของ HPV ประกอบด้วยสายโมเลกุลของ DNA ประมาณ 8,000 คู่เบส เรียงตัวกันเป็นรูปวงกลม (double stranded circular DNA) อยู่ภายในเปลือกหุ้มโปรตีน (capsid) ประกอบด้วย Early gene (*E1, E2, E4, E5, E6* และ *E7*) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการจำลองตัว การดำรงอยู่ของไวรัส และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cell transformation) Late gene (*L1* และ *L2*) ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเปลือกหุ้ม และ long control region (*LCR*) ทำหน้าที่ควบคุมการแปลรหัส (transcription) (Tjong *et al.*, 2001) รูปแบบการติดเชื้อของ HPV มีอยู่ 2 แบบ คือ episome form และ integrated form ซึ่งในแบบของ integrate จะจัดเป็นลักษณะเด่น (dominant form) และเป็นรูปแบบที่สามารถพบได้มากกว่าแบบของ episome ซึ่งพบได้ประมาณ 15 - 30% เท่านั้น การติดเชื้อในรูปแบบของ integrate นี้จะมีผลต่อการทำลายยีนในจีโนมของไวรัส โดยจะมีผลต่อการแสดงออกของยีน *E2, E6* และ *E7* ที่ผิดปกติไป (Goon *et al.*, 2009) *E2* จะมีหน้าที่เป็นตัวควบคุมยับยั้งการสร้างโปรตีน *E6* และ *E7* ซึ่งยีนทั้งสองจัดเป็น oncogenic gene ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวโดยไม่สามารถควบคุมได้ และมีการแสดงออกที่มากกว่าปกติ (overexpression) การทำงานของโปรตีน *E6* จะไปกระตุ้นการย่อยสลาย p53 ซึ่งเป็น tumor suppressor protein (Scheffner *et al.*, 1990) ส่วน โปรตีน *E7* จะไปรบกวนการทำงานของ retinoblastoma (pRb) ซึ่งเป็น tumor suppressor protein ทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์อย่างไม่หยุดยั้ง (Jones *et al.*, 1997)

นอกจากนี้แล้วการเกิดมะเร็งปากมดลูกนั้นยังมีปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมด้วย ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 กลุ่มคือ 1) ยีนก่อมะเร็ง (oncogene) 2) ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ซึ่งยีนสองชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ หากพบว่ามี การแสดงออกของยีนก่อมะเร็งมาก

ผิดปกติ แต่ในทางกลับกันยีนต้านมะเร็งถูกยับยั้งการแสดงออก ก็จะทำให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง การที่ยีนต้านมะเร็งถูกยับยั้งการแสดงออกนั้นเกิดจากหลายสาเหตุที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในรูปแบบต่างๆ และอีกประการหนึ่งที่สำคัญคือการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณ โปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็ง (Duenas-Gonzalez *et al.*, 2005)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) คือกระบวนการหนึ่งของภาวะเหนือพันธุกรรม โดยเป็นกระบวนการในการเติมหมู่เมทิลแทนที่อะตอมไฮโดรเจนในเบสไซโตซีนบนสายดีเอ็นเอ ส่วนใหญ่หมู่เมทิลจะถูกเติมที่บริเวณเบสไซโตซีนที่ติดกับเบสกวานีน หรือเรียกตำแหน่งนี้ว่า CpG islands ส่งผลกระทบโดยตรงต่อการแสดงออกของยีนได้ โดยการไปปกปิดการแสดงออกของยีน (Muller *et al.*, 2003) ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะเกิดการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง CpGs สูงถึงร้อยละ 60 - 90% (Tucker, 2001)

ยีน *CCNA1* อยู่ในกลุ่มยีน Cyclin A1 family เป็นยีนที่ทำหน้าที่เสมือนเป็นยีนต้านมะเร็งของมะเร็งปากมดลูก อยู่บนโครโมโซมที่ 13 ตำแหน่ง 13q12.3-q13 มีขนาด 465 amino acids (Kitkumthorn *et al.*, 2006. ; Tokumaru *et al.*, 2004. ; Yanatatsaneejit *et al.*, 2008) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมใน cell cycle ระยะ G1 และ G2 (mitosis) และยังเกี่ยวข้องกับกลไกการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอหลังการฉีกขาด (Ji *et al.*, 2005) ดังนั้นการเกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของ *CCNA1* อาจนำไปสู่การยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้ ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูกได้ในที่สุด และ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันและการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่นำไปสู่โรคมะเร็ง พบว่า การเกิดมะเร็งปากมดลูกซึ่งมีการติดเชื้อ HPV มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดเมทิลเลชัน ของ *CCNA1* ซึ่งมีบทบาทหน้าที่เสมือนเป็นยีนต้านมะเร็งในมะเร็งปากมดลูกถึง 93% (Kitkumthorn *et al.*, 2006)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไวรัส HPV และสภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetic) พบความสัมพันธ์ที่มีความเกี่ยวข้องกันระหว่างการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* และรูปแบบการติดเชื้อในลักษณะ integrated form ของ HPV (Yanatatsaneejit *et al.*, 2008) และพบว่าโปรตีน E7 ของ HPV type 16 สามารถจับกับเอนไซม์ DNA methyltransferase

(DNMT1) ได้โดย DNMT1 เป็นเอ็นไซม์ที่มีความสำคัญต่อการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีนต่างๆ (Burgers *et al.*, 2007) ดังนั้นจึงคาดว่าโปรตีน E7 ของ HPV จะเป็นตัวชักนำให้เกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็งทำให้ยีนต้านมะเร็งไม่สามารถแสดงออกได้

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้น คณะวิจัยได้ตระหนักถึงความสำคัญของโรคมะเร็งปากมดลูกและประสงค์จะทำการศึกษาดังกล่าวในระดับเนื้อพันธุกรรมและพันธุกรรมของ Human papillomavirus ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *CCNA1* ที่อาจมีผลต่อการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีน ทำให้ยีนที่ทำหน้าที่เสมือนเป็นยีนต้านมะเร็งในมะเร็งปากมดลูกนี้มีการแสดงออกที่ลดลง และอาจมีผลต่อการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก ซึ่งจะเห็นได้ว่ากลไกการทำงานของยีน E7 HPV ไทป์ 16 ที่ส่งผลต่อการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูกนั้นจะทำให้เราทราบสาเหตุที่แท้จริงของการเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูก และสามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวกับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* โดยนำข้อมูลทางพันธุกรรม มาใช้ในงานด้านเภสัชพันธุศาสตร์ (pharmacogenomics) นำไปค้นคว้าและประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยดูแลรักษา และสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปพัฒนาเพื่อผลิตยาในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน E7 ในไวรัส HPV type 16 กับดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการแสดงออกของยีน *CCNA1*

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้ทำทาง epigenetics ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์นั้นใช้เซลล์เพาะเลี้ยงทั้งหมด 6 ชนิด ประกอบไปด้วย เซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก 3 ชนิด HeLa cell (Human cervix carcinoma cell line) เซลล์ที่มีการติดเชื้อของ HPV type 18, SiHa cell (Human cervix carcinoma cell line) เซลล์ที่มีการติดเชื้อของ HPV type 16 และ C33A cell (Human cervix carcinoma cell line) เซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อของไวรัส HPV และเซลล์สายพันธุ์มะเร็งหูคอจมูก 3 ชนิด คือ HN4 , HN12 และ HN17 (Head and Neck cancer

cell line) ซึ่งยังไม่ทราบการติดเชื้อ เริ่มแรกนำเซลล์ทั้ง 6 ชนิดมาตรวจสอบการติดเชื้อ HPV จากนั้นตรวจสอบเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน *CCNA1* ตามลำดับ ซึ่งจากสมมติฐานคาดว่าใน HeLa cell ควรจะมีเมทิลเลชัน ของยีน *CCNA1* โดยไม่มีการแสดงออกของยีนนี้ เช่นเดียวกับใน SiHa cell และใน C33A cell ไม่ควรตรวจพบเมทิลเลชันหรือถ้ามีควรมีอยู่ในระดับต่ำและมีการแสดงออกของยีน *CCNA1* จากนั้นการทดลองขั้นต่อไปมุ่งเน้นไปที่ยีน *E7* ของ HPV 16 โดยการทรานสเฟกต์ยีน *E7* ของ HPV 16 เข้าไปในเซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อ HPV และเช็คการแสดงออกของโปรตีน *E7* โดยใช้เทคนิค western blot analysis โดยเปรียบเทียบกับ Negative control ใช้เซลล์ที่ไม่ถูกทรานสเฟกต์ , Positive control ใช้เซลล์ที่ถูกทรานสเฟกต์ด้วย pcDNA3.1_*E7* หลังจากนั้นตรวจสอบเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน *CCNA1* เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ปกติกับเซลล์ที่ถูกทรานสเฟกต์ด้วยยีน *E7* อีกครั้ง ซึ่งคาดว่าในเซลล์ที่มียีน *E7* ของไวรัส HPV 16 อยู่แล้วนั้นควรมีเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ที่เพิ่มขึ้นและไม่น่าพบการแสดงออกของยีน *CCNA1* หรือพบการแสดงออกที่ลดลง ซึ่งจะทำให้สามารถสรุปได้ว่า ยีน *E7* ของไวรัส HPV 16 มีผลต่อการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลความสัมพันธ์ยีน *E7* ของไวรัส HPV type 16 ต่อการเกิดการเติมหมู่เมทิลของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูก จะช่วยให้มีความเข้าใจเกี่ยวกับพันธุศาสตร์โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับมนุษย์ได้ดีขึ้น
2. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาการเติมหมู่เมทิลในยีน *CCNA1* ว่าก่อให้เกิดผลเช่นไรสามารถนำผลที่ได้ไปใช้พัฒนาให้เป็นงานวิจัยขั้นสูงต่อไป

วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์และพิสูจน์สาเหตุการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก โดยการทรานสเฟกต์ด้วยยีน *E7* ของ Human papillomavirus ไทป์ 16 ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ในงานวิจัยจะทำการตรวจสอบสาเหตุการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก ว่ามีสาเหตุมาจากยีน *E7* ของ Human papillomavirus ไทป์ 16 จริงหรือไม่ โดยใช้เทคนิค MSP-PCR เพื่อตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชัน

เทคนิค RT-PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* และเทคนิค western blot เพื่อตรวจสอบการผลิตโปรตีน E7 ของ Human papillomavirus ไทป์ 16 หลังจากที่ทำทรานสเฟกต์ยีน E7 ของ Human papillomavirus ไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก ซึ่งงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 4 ส่วนใหญ่ๆ คือ

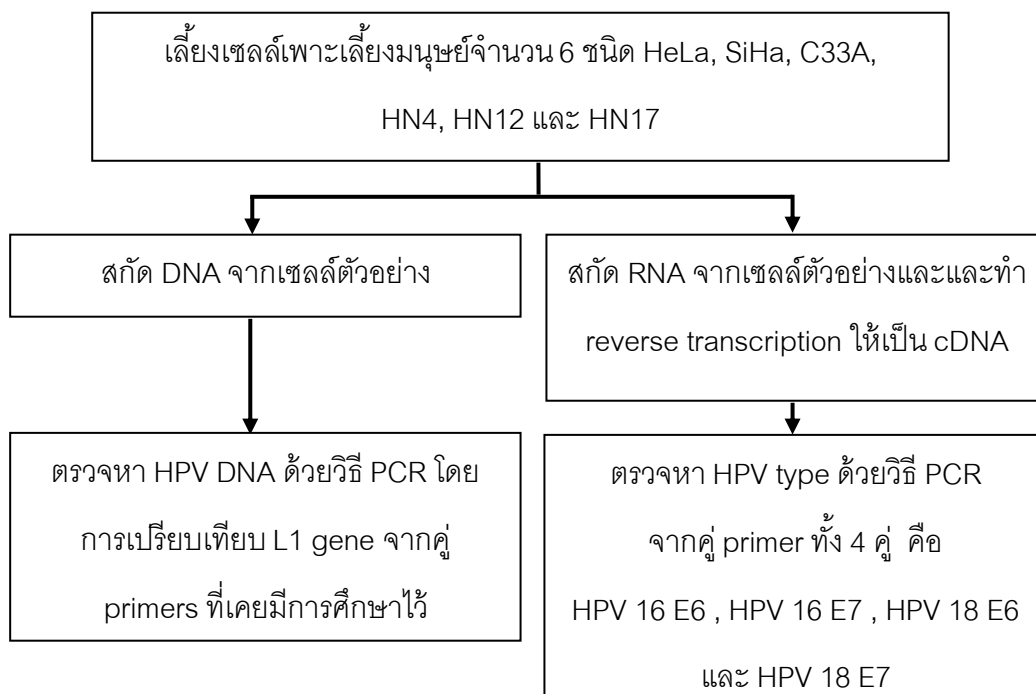
1. การตรวจสอบการติดเชื้อ HPV
 - 1.1 เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์จำนวน 6 ชนิด ประกอบไปด้วยเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก (Human cervix carcinoma cell line) 3 ชนิด HeLa , SiHa และ C33A cell และเซลล์สายพันธุ์มะเร็งหูดคอจมูก (Head and Neck cancer cell line) 3 ชนิด คือ HN4 , HN12 และ HN17 cell
 - 1.2 สกัด DNA จากเซลล์ทั้ง 6 ชนิด เพื่อนำมาตรวจหา HPV DNA ด้วยวิธี PCR โดยการเปรียบเทียบ L1 gene จากคู่ primers ที่เคยมีการศึกษาไว้
 - 1.3 สกัด RNA จากเซลล์ทั้ง 6 ชนิด และทำ reverse transcription เพื่อตรวจสอบ HPV type ด้วยวิธี PCR
2. การตรวจสอบเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน *CCNA1*
 - 2.1 เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมนุษย์จำนวน 6 ชนิด HeLa , SiHa , C33A , HN4 , HN12 และ HN17
 - 2.2 สกัด DNA จากเซลล์ทั้ง 6 ชนิด เพื่อนำมาตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ด้วยวิธี MSP-PCR
 - 2.3 สกัด RNA จากเซลล์ทั้ง 6 ชนิด และทำ reverse transcription เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วยวิธี PCR
3. การสร้าง recombinant plasmid ของยีน E7 ของ HPV ไทป์ 16
 - 3.1 เพิ่มปริมาณยีน E7 ของ HPV ไทป์ 16
 - 3.2 สร้าง recombinant plasmid โดยตัดต่อยีน E7 ของไวรัส HPV ไทป์ 16 เข้าไปยัง expression vector (pcDNA 3.1/myc-His A)
 - 3.3 เพิ่มจำนวน recombinant plasmid โดยการโคลนนิ่ง
 - 3.4 ทรานสเฟกต์ recombinant plasmid ที่มียีน E7 ของไวรัส HPV ไทป์ 16 เข้าสู่ C33A และ HN12 cell
 - 3.5 เพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์ C33A และ HN12 cell

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน E7 และ CCNA1

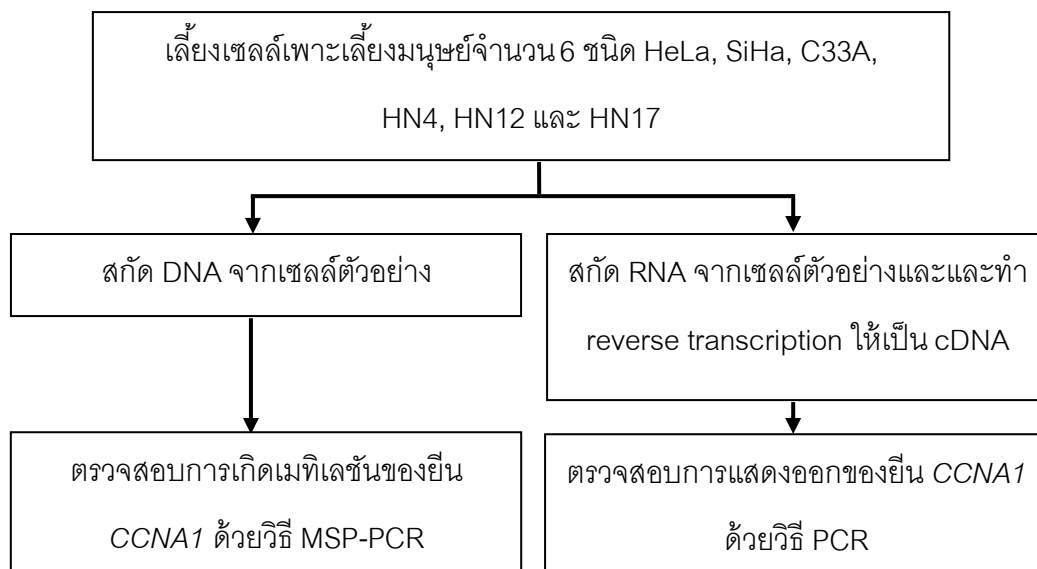
- 4.1 ตรวจสอบความสามารถในการผลิตโปรตีน E7 ของ HPV ไทป์ 16 โดยวิธี western blot analysis เทียบกับเซลล์ปกติ และเซลล์ที่ได้รับ empty vector เป็นกลุ่มควบคุม
- 4.2 ตรวจสอบเมทิลเลชันของยีน CCNA1 ในเซลล์ที่ถูกทรานสเฟกต์ ยีน E7 ของ HPV ไทป์ 16 ด้วยวิธี MSP-PCR เทียบกับเซลล์ปกติและเซลล์ที่ได้รับ empty vector เป็นกลุ่มควบคุม
- 4.3 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน CCNA1 ในเซลล์ที่ถูกทรานสเฟกต์ ยีน E7 ของ HPV ไทป์ 16 ด้วยวิธี PCR เทียบกับเซลล์ปกติและเซลล์ที่ได้รับ empty vector เป็นกลุ่มควบคุม

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

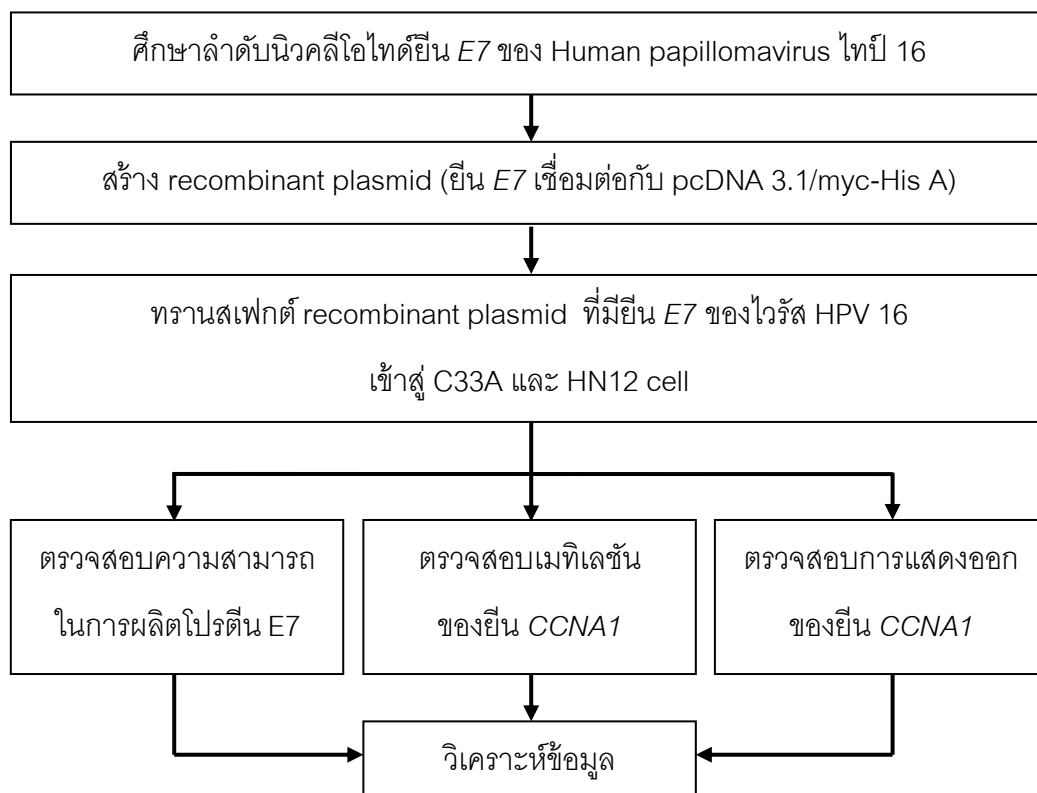
การตรวจสอบการติดเชื้อ HPV



การตรวจสอบเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน CCNA1



การสร้าง recombinant plasmid ยีน E7 ของ Human papillomavirus ไทป์ 16



บทที่ 2

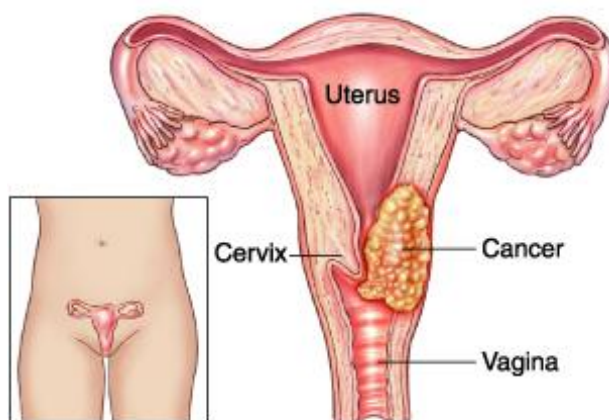
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคมะเร็ง

มะเร็ง (cancer) คือ กลุ่มของโรคที่เกิดจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติที่ดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต และแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วและมากกว่าปกติเป็นผลทำให้เกิดก้อนเนื้อที่ผิดปกติไม่สามารถควบคุมได้ เซลล์เหล่านี้มีความสามารถที่จะลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่ออื่นๆ โดยวิธีการใดวิธีการหนึ่ง เช่น เจริญเติบโตโดยตรงเข้าไปในเนื้อเยื่อข้างเคียง (invasion) หรือการอพยพเคลื่อนย้ายเซลล์ไปยังตำแหน่งที่ไกลๆ โดยอาศัยระบบหลอดเลือดและน้ำเหลือง (metastasis) ณ ปัจจุบันมะเร็งที่พบในร่างกายมนุษย์มีมากกว่า 100 ชนิดและมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันตามอวัยวะที่เกิด มะเร็งกลุ่มใหญ่ที่ปรากฏให้เห็นมีจุดเริ่มต้นจากเซลล์ที่ผิดปกติเพียงเซลล์เดียว แต่หลุดรอดจากระบบการควบคุมที่มีอยู่หลายๆระบบด้วยกัน หรือระบบควบคุมหลายระบบเหล่านั้นเกิดความผิดพลาดบกพร่องไปทำให้เซลล์ที่ผิดปกติเติบโตพัฒนาสะสมความผิดพลาดมาหลายรุ่นจนกลายเป็นเซลล์มะเร็งที่สมบูรณ์ในที่สุด ความผิดปกติทั้งของเซลล์ และของระบบควบคุมจะสะสมต่อเนื่องมาเป็นเวลานานเป็นขั้นตอนที่ซับซ้อนหลายขั้นตอน จึงอาจกล่าวได้ว่าการเกิดมะเร็งมีขั้นตอนแบบ multistep process (Sabrina *et al.*, 2004)

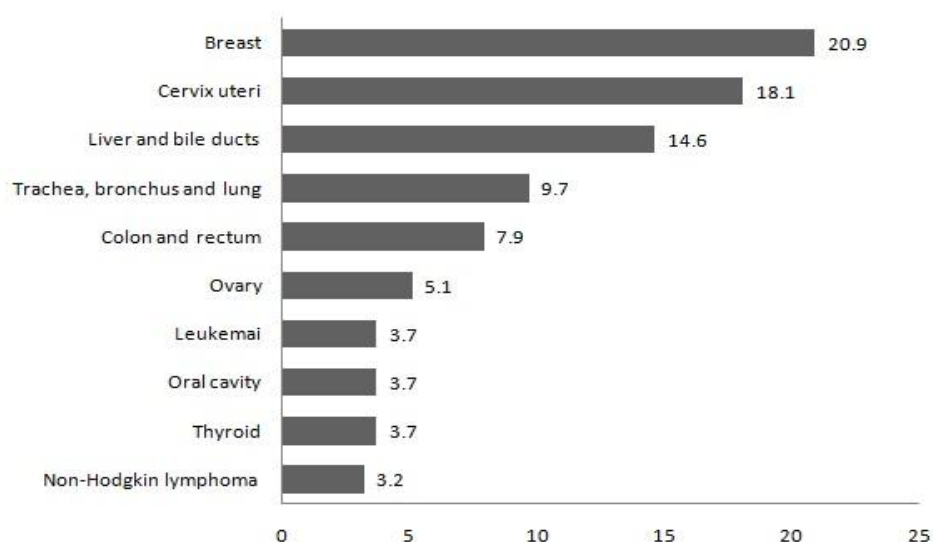
มะเร็งปากมดลูก

มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) เป็นโรคที่เซลล์มะเร็งเกิดขึ้นที่บริเวณปากมดลูก เป็นบริเวณที่อยู่ส่วนล่างของมดลูก มีความยาวประมาณ 2.5 - 3 ซม. และเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.0 - 2.5 ซม. ปากมดลูกนั้นมีรูตรงกลางซึ่งเชื่อมระหว่างช่องว่างข้างในมดลูกกับช่องคลอด การเกิดมะเร็งปากมดลูกจะดำเนินไปอย่างช้า ๆ โดยก่อนหน้าที่จะเกิดมะเร็งปากมดลูกนั้น เซลล์ของปากมดลูกจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ผิดปกติ เรียกการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า ดิสเพลเซีย (dysplasia) หลังจากนั้นเซลล์ที่ผิดปกติหรือกลายเป็นเซลล์มะเร็งจะเริ่มโตขึ้นและขยายลึกลงสู่ปากมดลูกและอวัยวะบริเวณรอบ ๆ ปากมดลูก



รูปที่ 1 ตำแหน่งของเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นบริเวณปากมดลูก (James, 2009 : online)

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดเป็นลำดับ 2 รองจากมะเร็งเต้านมในสตรีไทย จากรายงานใน Cancer in Thailand Vol. V, 2001 - 2003 ของ NCI Thailand (National Cancer Institute) วิเคราะห์ถึงอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งในประเทศไทยแยกตามเพศพบว่า ประเทศไทยมีจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูก คิดเป็นอุบัติการณ์ประมาณ 18.1% ต่อประชากร 1 แสนคนในสตรีไทย รองจากมะเร็งเต้านม (Khuhaprema *et al.*, 2010) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 สถิติค่าเฉลี่ย Age-standardised incidence rates (ASR) ของโรคมะเร็ง

10 อันดับแรกในเพศหญิง ปี พ.ศ. 2544 - 2546

มะเร็งปากมดลูกจะพบมากโดยเฉพาะประเทศที่กำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทย ทำให้ก่อให้เกิดปัญหาทางเศรษฐกิจและสังคมสูงมาก ในปัจจุบันพบว่าค่าเฉลี่ยของผู้ป่วยมะเร็งชนิดนี้อยู่ที่ 35 - 60 ปี ซึ่งปัจจัยเสี่ยงของการเป็นมะเร็งปากมดลูกจะสัมพันธ์กับการมีคู่นอนหลายคน ความเสี่ยงสูงขึ้นตามจำนวนคู่นอนที่เพิ่มขึ้น , การมีเพศสัมพันธ์เมื่ออายุน้อย , การสูบบุหรี่ , การให้กำเนิดลูกหลายคน , การมีระบบภูมิคุ้มกันที่อ่อนแอ , พันธุกรรม , มีประวัติการเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์และการติดเชื้อ ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าการติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ที่สำคัญคือ เชื้อไวรัสฮิวแมนแพปพิโลมา (Human papillomavirus, HPV) โดยเฉพาะการติดเชื้อจีโนไทป์เสี่ยงสูง HPV ชนิด 16 และ 18 มีโอกาสที่จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งมากกว่าคนปกติที่ไม่มีการติดเชื้อ

ในการรักษามะเร็งปากมดลูก แพทย์ผู้เชี่ยวชาญจะแบ่งระยะ (stage) ของมะเร็งปากมดลูกออกเป็น 4 ระยะ ซึ่งแต่ละระยะก็จะมีวิธีการรักษาที่แตกต่างกันออกไป การแบ่งระยะของมะเร็ง การ Staging ที่เป็นที่ยอมรับตามหลักสากลและใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ International Federation of Gynecological and Obstetrics (FIGO) ซึ่งมีรายงานอยู่ใน Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2480 และมีการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงเรื่อยมาจนถึงปีล่าสุด พ.ศ. 2545 (Sobin and Wittekind, 2002) ดังตารางที่ 1

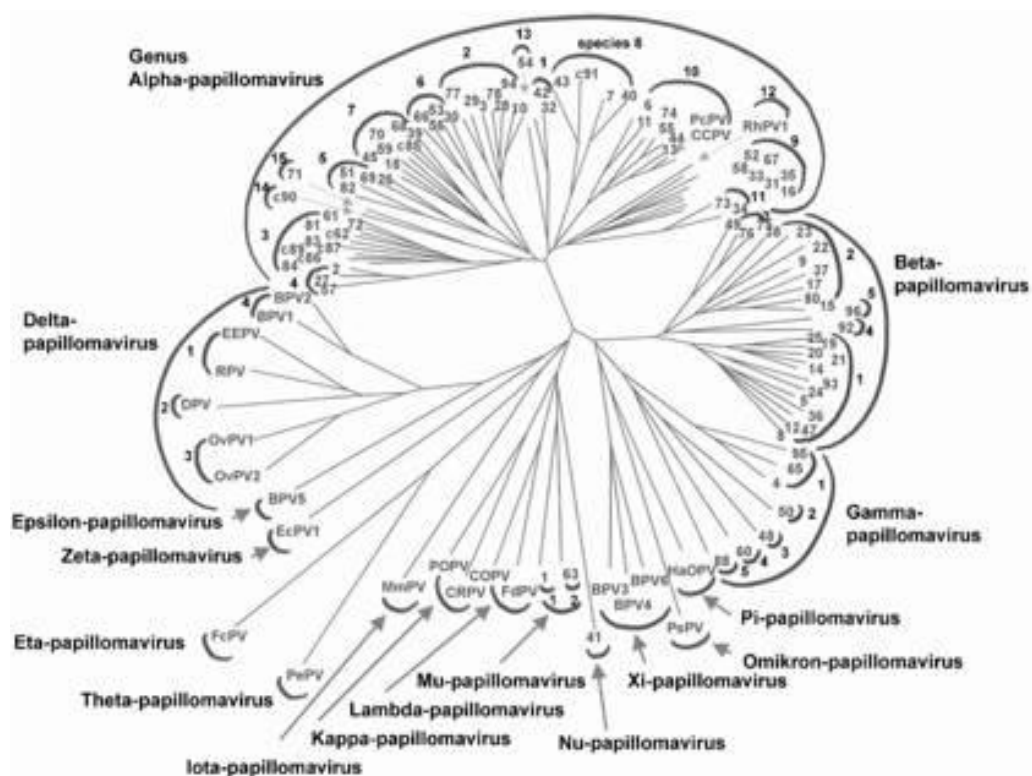
Papillomavirus

Papillomavirus จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Polyomavirus ใน Papillomaviridae family โดยมีคุณสมบัติที่คล้ายกัน คือ มีขนาดเล็ก เป็น nonenveloped virion มี icosohedral capsid และมีจีโนมเป็น double stand circular DNA เหมือนกัน ต่างกันตรงที่ Papillomavirus จะมีขนาดอนุภาคประมาณ 55 nm ส่วน Polyomavirus นั้นจะมีขนาดอนุภาคอยู่ที่ 45 nm เมื่อพิจารณาในระดับโมเลกุลจะพบว่า Papillomavirus จะมีส่วนของ open reading frames (ORFs) ที่มากกว่าทำให้สามารถสร้าง structure และ non-structure ได้หลากหลายกว่า Polyomavirus (Jensun *et al.*, 1990) ในปัจจุบันพบว่า Papillomavirus มีการแพร่กระจายอาศัยอยู่ในกลุ่มของสัตว์ที่เป็น higher vertebrates เช่น ในคน, วัว, ม้า, กวาง, กระต่าย เป็นต้น ซึ่ง Papillomavirus เองก็จะมี ความจำเพาะต่อสัตว์แต่ละชนิด (speice) นั้นๆ (Sundberg, 1987)

ตารางที่ 1 FIGO staging ของมะเร็งปากมดลูก, พ.ศ. 2545

<p>Stage I</p> <p>Stage I is carcinoma strictly confined to the cervix; extension to the uterine corpus should be disregarded. The diagnosis of both Stages IA1 and IA2 should be based on microscopic examination of removed tissue, preferably a cone, which must include the entire lesion.</p> <p>IA: Invasive cancer identified only microscopically. Invasion is limited to measured stromal invasion with a maximum depth of 5 mm and no wider than 7 mm.</p> <p>IA1: Measured invasion of the stroma no greater than 3 mm in depth and no wider than 7 mm diameter.</p> <p>IA2: Measured invasion of stroma greater than 3 mm but no greater than 5 mm in depth and no wider than 7 mm in diameter.</p> <p>IB: Clinical lesions confined to the cervix or preclinical lesions greater than Stage IA. All gross lesions even with superficial invasion are Stage IB cancers.</p> <p>IB1: Clinical lesions no greater than 4 cm in size.</p> <p>IB2: Clinical lesions greater than 4 cm in size.</p>
<p>Stage II</p> <p>Stage II is carcinoma that extends beyond the cervix, but does not extend into the pelvic wall. The carcinoma involves the vagina, but not as far as the lower third.</p> <p>IIA: No obvious parametrial involvement. Involvement of up to the upper two - thirds of the vagina.</p> <p>IIB: Obvious parametrial involvement, but not into the pelvic sidewall.</p>
<p>Stage III</p> <p>Stage III is carcinoma that has extended into the pelvic sidewall. On rectal examination, there is no cancer-free space between the tumour and the pelvic sidewall. The tumour involves the lower third of the vagina. All cases with hydronephrosis or a non-functioning kidney are Stage III cancers.</p> <p>IIIA: No extension into the pelvic sidewall but involvement of the lower third of the vagina.</p> <p>IIIB: Extension into the pelvic sidewall or hydronephrosis or non-functioning kidney.</p>
<p>Stage IV</p> <p>Stage IV is carcinoma that has extended beyond the true pelvis or has clinically involved the mucosa of the bladder and/or rectum.</p> <p>IVA: Spread of the tumour into adjacent pelvic organs.</p> <p>IVB: Spread to distant organs.</p>

Human papillomavirus ในปัจจุบันสามารถพบได้มากกว่า 100 สายพันธุ์ โดยในจำนวน 30 กว่าสายพันธุ์ก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ และทวารหนัก (anogenital region) (De Villiers *et al.*, 2004) ซึ่งการจำแนกสายพันธุ์จะอาศัยขนาด homology ของ DNA ด้วยวิธี Liquid hybridization แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่จำเพาะ (Coggin and zur Hausen, 1979) ซึ่งการจำแนกสายพันธุ์ของ Papillomavirus จะใช้เกณฑ์ที่เป็นสากลให้การยอมรับ คือ Papillomavirus Nomenclature Committee โดยอาศัยหลักเกณฑ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ E6, E7, L1 ORFs ของสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นใหม่ ต้องมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยกว่าร้อยละ 90 ของจีโนม Papillomavirus สายพันธุ์เดิมที่รู้จักในไทยไปแล้ว (Delius and Hofmann, 1994)



รูปที่ 3 แสดงการจำแนกจีโนไทป์ของ Papillomaviruses โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ L1 ORF

(De Villiers *et al.*, 2004)

การติดเชื้อ

การติดเชื้อ Human papillomavirus สามารถติดเชื้อผ่านทางเมือก ของเหลว และเนื้อเยื่อที่ผิวหนังโดยเฉพาะบริเวณที่มีรอยฉีกขาดเป็นแผลถลอก การติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการมีเพศสัมพันธ์ ประมาณ 50% ของการติดเชื้อนั้น ผู้ติดเชื้อมีอายุระหว่าง 15 - 25 ปี ไม่ว่าจะติดเชื้อสายพันธุ์ใดก็ตาม ผู้ติดเชื้อจะสามารถหายได้เองภายใน 1 - 2 ปี แต่ในกลุ่มที่ติดเชื้อหลายปี จะมีโอกาสที่พัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ (Julie and Norman, 2005) HPV มีสายพันธุ์มากกว่า 100 จีโนไทป์ แต่ละสายพันธุ์จะก่อให้เกิดโรคได้ต่างชนิดกัน และจะมีมากกว่า 25 จีโนไทป์ที่ทำให้เกิดโรค บริเวณระบบอวัยวะสืบพันธุ์ การจำแนกจีโนไทป์ของ HPV จะอาศัยความสัมพันธ์ในการเกิดโรค, ระยะเวลาในการติดเชื้อ และความสามารถของโปรตีน E6 และ E7 ในการจับตัวกับ tumor suppressor gene โดยแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้ (Bosch, Manos, and Munoz, 1995)

- 1) กลุ่มความเสี่ยงสูง (High-risk type) เช่น จีโนไทป์ 16, 18 และ 45
- 2) กลุ่มความเสี่ยงค่อนข้างสูง (Probably high-risk type) เช่น จีโนไทป์ 33, 35 และ 51
- 3) กลุ่มความเสี่ยงต่ำ (Low-risk type) เช่น จีโนไทป์ 6, 11, 42 และ 43

Disease	HPV type
Common warts	2, 7
Plantar warts	1, 2, 4
Flat warts	3, 10
Anogenital warts	6, 11, 42, 43, 44, 55 and others
Genital cancers	High-risk: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 Probably high-risk: 26, 53, 66
Focal epithelial hyperplasia	13, 32
Oral papillomas	6, 7, 11, 16, 32

ตารางที่ 2 แสดงชนิด (type) ของ HPV ที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ

ลักษณะของรอยโรคบริเวณปากมดลูกที่ติดเชื้อไวรัส ก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก สามารถแบ่งระยะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์มะเร็ง เรียกว่า Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) ได้เป็น 3 ระยะ คือ

- CIN I (mild dysplasia)

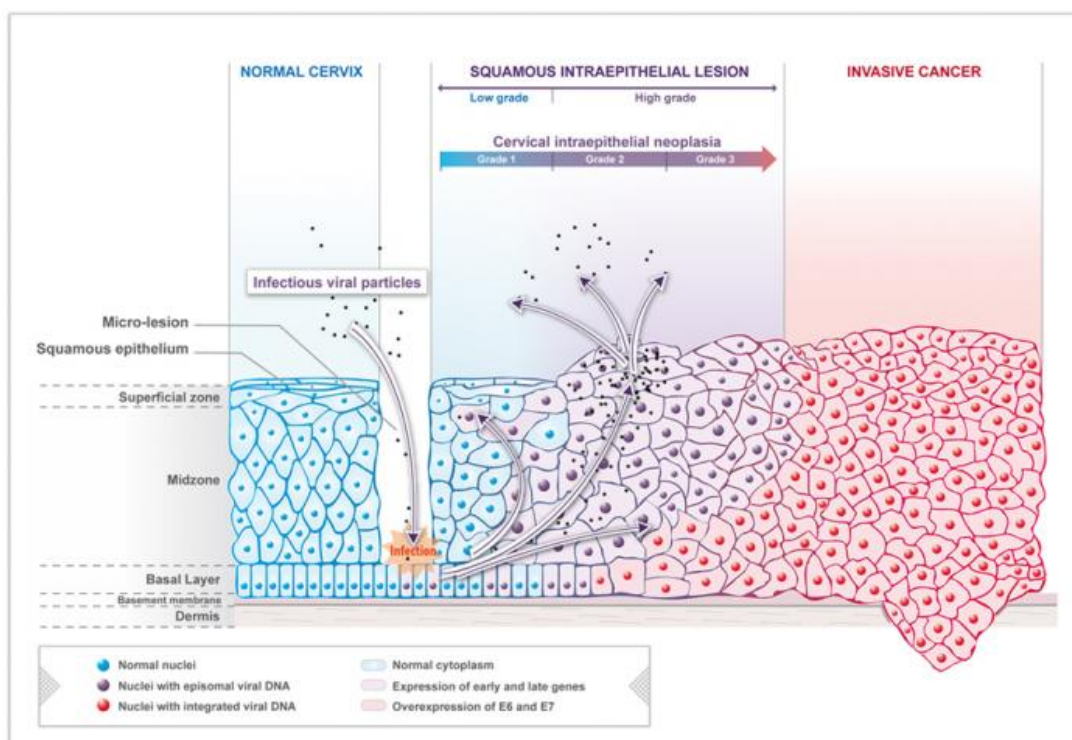
ในระยาะนี้เซลล์ที่ติดเชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อย

- CIN II (moderate to marked dysplasia)

ในระยาะนี้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงปานกลาง แต่ไม่มีการเพิ่มจำนวนของไวรัส

- CIN III (severe dysplasia to carcinoma in situ)

ในระยาะนี้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงมาก และมีปริมาณโปรตีน E6 และ E7 มาก ซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกได้

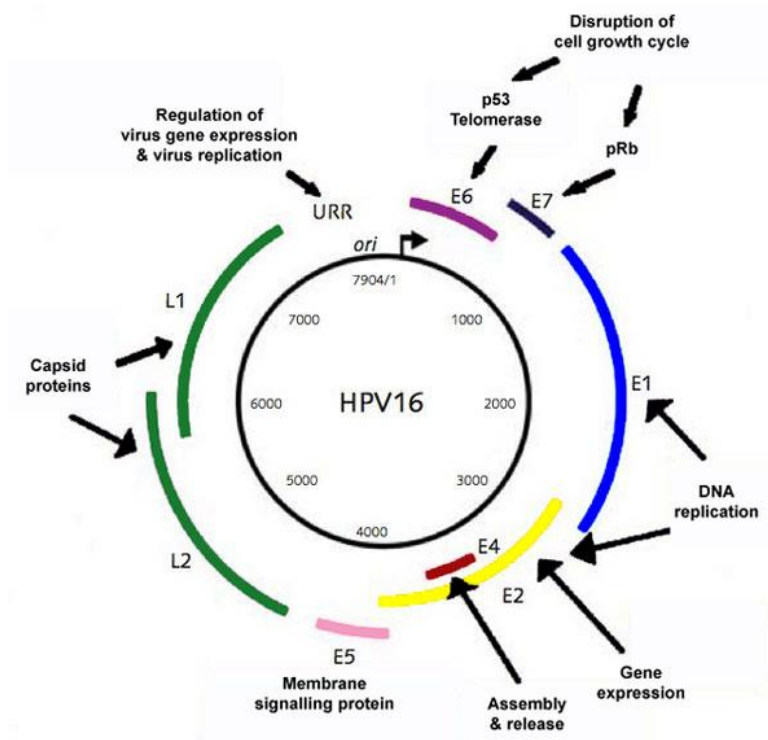


รูปที่ 4 ระยะของการพัฒนาในเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV (Gentcel, 2009 : online)

โครงสร้างของ Human papillomavirus

Papillomavirus ค้นพบครั้งแรกในสัตว์ ผู้ค้นพบ คือ Richard Shope ได้ทำการวิจัยกับ cottontail rabbit (*Sylvilagus floridanus*) และได้ให้ชื่อว่า cottontail rabbit papillovirus (CRPV) ถือเป็น DNA tumor virus ตัวแรกที่ค้นพบ (Kreider, 1981) สำหรับผู้ค้นพบเชื้อ Human papillomavirus (HPV) ในมนุษย์ คือ นายแพทย์ Harald zur Hausen และได้รับรางวัล Nobel Prize in Medicine 2008 ทำให้เกิดความเข้าใจกลไกในการเกิดมะเร็งปากมดลูก นำไปสู่การป้องกันและรักษา จนสามารถลดอัตราการเกิดมะเร็งปากมดลูกและลดอัตราการตายลงอย่างมาก และสิ่งที่เป็นคุณต่อมนุษยชาติมากที่สุด คือ การคิดค้นวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกนั่นเอง

Human papillomavirus มีอนุภาคขนาดเล็ก , เป็น non enveloped, icosahedral DNA virus มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 52 - 55 nm พันธุกรรมของ HPV ประกอบไปด้วยสายโมเลกุลของ DNA ประมาณ 8,000 bp เรียงตัวกันเป็นรูปร่างกลม (double stranded circular DNA) อยู่ภายในเปลือกหุ้มโปรตีน (Capsid) (Crawford, 1963) ซึ่งเปลือกหุ้มนี้จะประกอบด้วย 2 structural proteins คือ 1. major capsid protein (L1) มีขนาดประมาณ 55 kDa 2. minor protein (L2) มีขนาดประมาณ 70 kDa (Pfister, Gissman, and zur Hausen, 1977) ในส่วนจีโนมของ HPV สามารถแบ่งได้เป็น 3 บริเวณหลัก คือ early (E), late (L) และ upstream regulatory region (URR) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งคือ long control region (LCR) ในส่วนของ early region จะครอบคลุมมากกว่า 50% ของจีโนมไวรัสทั้งหมด และถอดรหัสให้เป็น 6 viral regulatory protein คือ E1, E2, E4, E5, E6 และ E7 ส่วน late region จะครอบคลุมประมาณ 40% ของจีโนมไวรัสทั้งหมด จะถอดรหัสให้ major (L1) และ minor (L2) viral capsid proteins และส่วนสุดท้ายคือ LCR region ซึ่งมีขนาดประมาณ 850 bp ครอบคลุมประมาณ 10% ของจีโนม ส่วนนี้จะไม่มีการถอดรหัสให้โปรตีน แต่จะใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการจำลองตัวเอง เป็น binding sites ของ transcription factor หลายชนิด (Danos, Katinka, and Yaniv, 1982)



รูปที่ 5 โครงสร้างจีโนมของ Human papillomavirus type 16

(MicrobiologyBytes, 2009 : online)

ในบริเวณของ early region จะประกอบไปด้วย 6 ยีน คือ E1, E2, E4, E5, E6 และ E7 และบริเวณของ late region จะประกอบไปด้วยยีน L1 และ L2 มีหลายหน้าที่ที่สำคัญดังนี้

- HPV E1 ORF encode proteins
 - มีขนาดประมาณ 68 kDa
 - มี DNA replicase activity ซึ่งจำเป็นในการเกิด viral DNA replication
 - จับกับโปรตีน E2 เป็น complex protein
- HPV E2 ORF encode proteins
 - มีขนาดประมาณ 50 kDa
 - มีหน้าที่เป็น major transcriptional regulatory proteins ที่ไปจับกับ binding sites ที่ตำแหน่งของ non-coding region
 - ควบคุมการสร้าง regulatory protein ที่คุม viral promoter ในการแสดงออกของยีน E6 และ E7

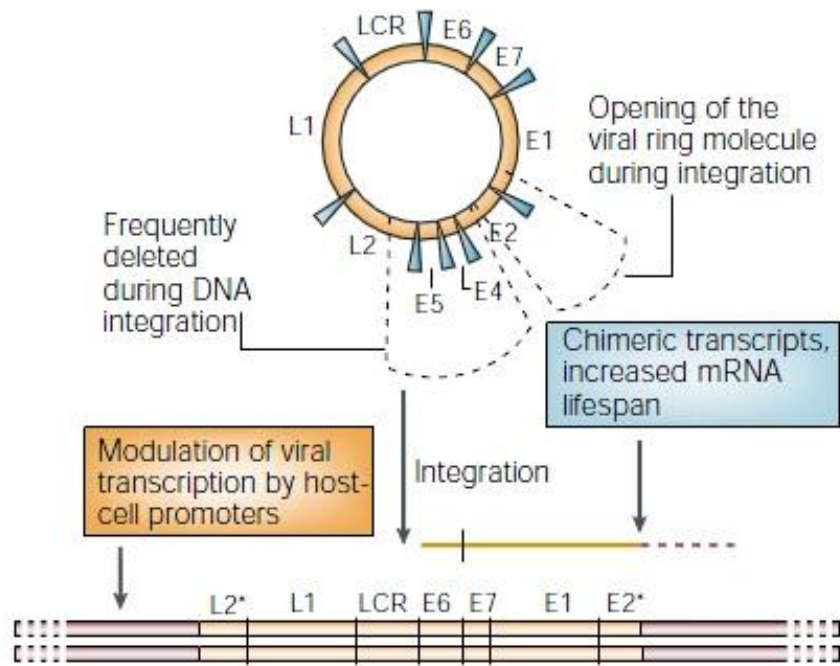
- การปรับปรุงประสิทธิภาพของจีโนม encapsidation ระหว่างการติดเชื้อ
- HPV E4 ORF encode proteins
 - หน้าที่หลักทั้งหมดยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด
 - เป็นไปได้ว่าอาจมีส่วนช่วยทำให้การสร้าง mRNA มีเสถียรภาพมากขึ้น
 - คาดว่าจะเป็นตัวควบคุมบังคับให้ไวรัสออกจากเซลล์
- HPV E5 ORF encode proteins
 - โปรตีนนี้ส่วนมากจะพบอยู่ที่ endosomal membranes และ Golgi และในบางครั้งก็พบที่ cellular membrane
 - เป็น hydrophobic protein ซึ่งจะไปช่วยเพิ่ม immortalisation ของเซลล์
 - ยับยั้งการแสดงออกของยีนต้านมะเร็ง p21 ส่งผลกระทบต่อวัฏจักรของเซลล์
- HPV E6 ORF encode proteins
 - มีขนาดประมาณ 150 amino acid
 - ทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้เกิด ubiquitin-dependent degradation ของ p53 tumor suppressor protein ทำให้เกิดการแตกตัวของโปรตีน p53 นำไปสู่สู่สถานะ genome instability
- HPV E7 ORF encode proteins
 - มีขนาดประมาณ 100 amino acid
 - โปรตีน E7 จะรบกวนการจับกันของ retinoblastoma suppressor protein (pRb) และ transcription factor E2F โดย E7 จะจับกับ pRb ทำให้ E2F เป็นอิสระ ทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและการแบ่งตัวแบบไม่หยุดยั้ง
- HPV L1 ORF encode proteins
 - จัดเป็น major capsid protein
 - ช่วยในขั้นตอนการเปลี่ยนแปลง mRNA splicing และการ transcription
- HPV L2 ORF encode proteins
 - จัดเป็น minor capsid protein

- ผสานกับตำแหน่ง hydrophobic region ของโปรตีน L1 ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับ c-terminus ของโปรตีน โดยผ่านรูตรงกลางของ pentavalent L1 capsomer

บทบาทในการก่อมะเร็งของยีนในไวรัส HPV

จากการศึกษาพบว่าในเซลล์ที่เกิดเป็นเซลล์มะเร็งนั้น ส่วนใหญ่จะเกิดการติดเชื้อมาจาก HPV จีโนไทป์ 16 และ 18 (Cullen *et al.*, 1991) รูปแบบการติดเชื้อ HPV จะมีอยู่ 2 แบบ คือ episomal form กับแบบ integrate form เมื่อเกิดการติดเชื้อระยะเริ่มแรก ไวรัสของ HPV จะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านในรูปแบบของ episomal form เมื่อเข้าสู่เซลล์แล้วจะเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส ของเซลล์เจ้าบ้าน เกิดการจำลอง DNA ของไวรัสพร้อมกับ DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้เกิดการ แสดงออกของ early gene สร้างกลุ่มโปรตีน E ประกอบไปด้วยโปรตีน E1, E2, E3, E6, และ E7 จะมีการแสดงออกก่อน โปรตีน E1 และ E2 จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการจำลอง DNA ตลอดเวลา ทำให้เกิดการเจริญและแบ่งเซลล์ ทำให้จำนวน copy ของไวรัสในเซลล์เจ้าบ้านเพิ่มขึ้น ขณะที่ โปรตีน E4 จะมีการแสดงออกตลอดเวลาระดับการสร้างไวรัสให้อยู่ในระยะแบ่งตัว โปรตีน E5 กระตุ้นให้มีการสร้าง growth factor โปรตีน E6 และ E7 ยับยั้งการแปลรหัสของเซลล์เจ้าบ้าน เซลล์จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จากนั้นโปรตีน L1 และ L2 จะแสดงออกในขั้นสุดท้ายสร้าง แคปซิดโปรตีน (Stanley, Pett, and Coleman, 2007)

เมื่อระยะเวลาผ่านไป เซลล์อยู่ในระยะของเซลล์มะเร็งเต็มขั้น รูปแบบการติดเชื้อของ HPV จะกลายเป็นแบบ integrate form มากขึ้น รูปแบบนี้จึงจัดเป็นรูปแบบที่พบได้มากกว่า episomal form ซึ่งมีอยู่ประมาณ 15 - 30% เท่านั้น จึงทำให้ integrate form จัดเป็นลักษณะเด่น (dominant form) การติดเชื้อในรูปแบบของ integrate นี้จะมีผลต่อการทำลายยีนในจีโนมของไวรัส โดยจะมี ผลต่อการแสดงออกของยีน E2, E6 และ E7 ที่ผิดปกติไป (Goon *et al.*, 2009) กล่าวคือ เมื่อจีโนม ของ HPV จะเข้าไป integrate ใน DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน ดังรูปที่ 6 จีโนมของไวรัสที่เป็น double stand DNA โมเลกุลของดีเอ็นเอส่วนมากจะเปิด ณ ตำแหน่งระหว่างยีน E1 - E2 และเกิดการ deletion ของยีนขาดหายไปหลังจากการ integrate เข้าสู่ DNA เซลล์เจ้าบ้าน ในช่วงระหว่างยีน E2 - L2 ทำให้เหลือแคยีน L1, LCR, E6, E7, E1 และบางส่วนของยีน L2 และ E2 (zur Hausen, 2002) โดยเฉพาะในยีน E2 ซึ่งปกติจะมีหน้าที่ยับยั้งการสร้างโปรตีน E6 และ E7 นั้นถูกทำลายลง ส่งผลให้เกิด E6 และ E7 ซึ่งเป็น oncogenic gene คือ มีความสามารถทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลง คุณสมบัติของการเจริญเติบโต กลายเป็นเซลล์ที่เจริญโดยไม่มีวันตาย มีการแสดงออกมากกว่า ปกติ (over express)



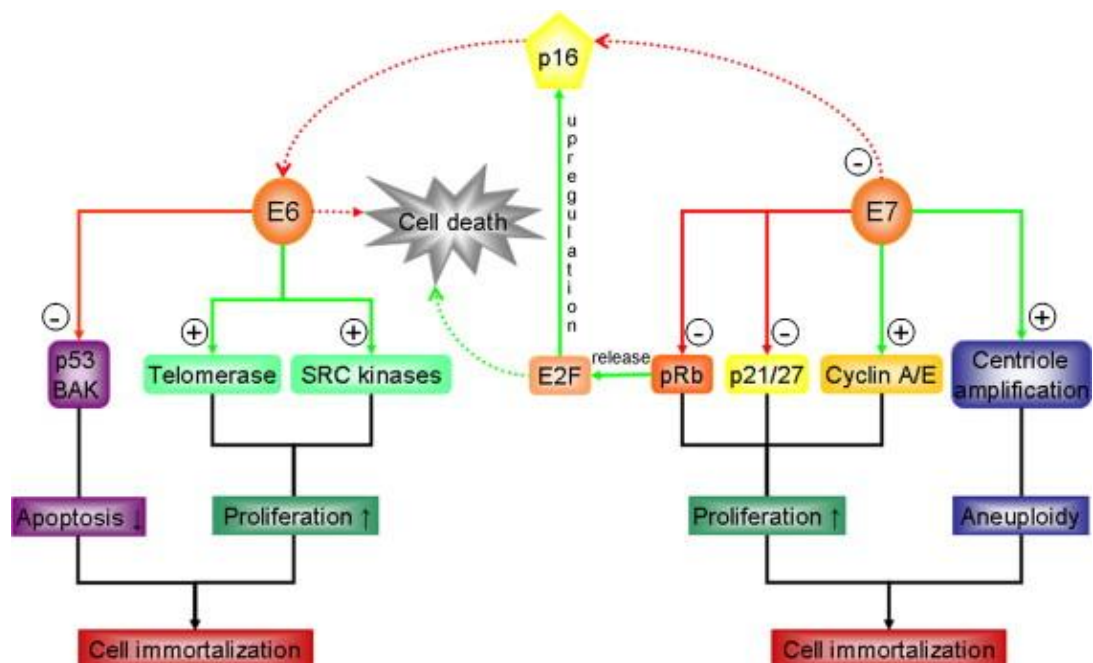
รูปที่ 6 จีโนมของไวรัส HPV เมื่อ integrate เข้าสู่ DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน

(zur Hausen, 2002)

โปรตีน E6 และ E7 ที่จัดเป็น oncoproteins กระบวนการทำงานของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้มีผลโดยตรงต่อเซลล์ ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์ที่ไม่มีวันตาย (cell immortalization) ดังรูปที่ 7

E6 oncoprotein เป้าหมายโดยตรงของ E6 คือ p53 ที่เป็น tumor suppressor protein โดย E6 จะไปจับกับ E6AP ทำให้เกิดการย่อยสลาย p53 (Beaudenn and Huibregtse, 2008) ซึ่งโดยปกติแล้ว p53 เป็น transcription factor ที่ควบคุม cell cycle และยังมีหน้าที่เป็น tumor suppressor ด้วย ทำให้ p53 มีความสำคัญในการยับยั้งมะเร็งของสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้ E6 ยังไปลดการแสดงออกของ BAK โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ apoptosis นอกจากนี้ E6 ยังไปเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของโปรตีน Telomerase และ SRC kinase อีกด้วย เมื่อโปรตีน p53 และ BAK ถูกทำลายลงส่งผลให้ลดการเกิด apoptosis และการเพิ่มการทำงานของ Telomerase กับ SRC kinase จะทำให้ proliferation ของเซลล์มีมากขึ้น เกิดความไม่เสถียรในวัฏจักรเซลล์

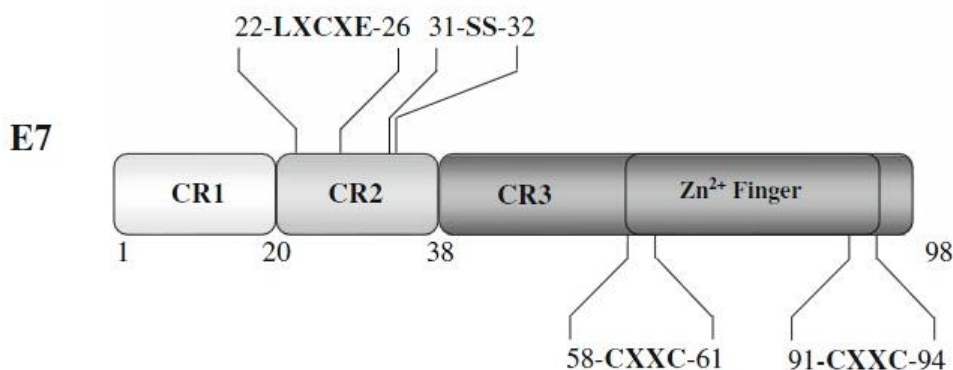
E7 oncoprotein เป้าหมายโดยตรงของ E7 คือ retinoblastoma (*Rb*) ซึ่งเป็น tumor suppressor gene โปรตีน E7 จะไปรบกวนการจับกันของ pRb และ transcription factor E2F โดยที่ E7 จะไปจับกับ pRb แทน ทำให้ E2F เป็นอิสระและไปเพิ่มการทำงานของ p16 ทำให้ pRb ลดประสิทธิภาพการทำงานลง ทั้งนี้ E7 ยังไปกระตุ้นการทำงานของ cyclin A , E และไปลดการทำงานของ p21/27 จากที่กล่าวไปจะทำให้ proliferation ของเซลล์มีมากขึ้น นอกจากนี้โปรตีน E7 ยังไปเพิ่มการทำงานของ centriole amplification ทำให้เกิด aneuploidy มากขึ้น ทั้งหมดนี้ทำให้เกิดความไม่เสถียรในวัฏจักรเซลล์ และส่งผลให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด



รูปที่ 7 แสดงการทำงานของ E6 และ E7 oncoprotein ทำให้เกิด Cell immortalization

(Boulet *et al.*, 2007)

โครงสร้างของ E7 oncoprotein



รูปที่ 8 โครงสร้างของโปรตีน E7 (Ghittoni *et al.*, 2010)

E7 oncogene ของ HPV จะสร้างโปรตีนที่มีขนาดเล็กประมาณ 100 amino acids ซึ่งใน HPV type 16 จะมีขนาด 98 amino acids ซึ่งประกอบไปด้วย 3 ตำแหน่งใหญ่ ๆ คือ conserved regions (CR) ประกอบไปด้วย NH₂-terminal CR1 domain, CR2 region และ COOH-terminal CR3 domain ดังรูปที่ 8 บริเวณของ NH₂-terminal CR1 domain เป็นบริเวณที่จำเป็นสำหรับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และเกี่ยวข้องกับ pRb degradation แต่จะไม่เกี่ยวข้องกับ pRb binding โดยตรง ส่วนบริเวณของ CR2 region จะเป็นบริเวณที่มี pRb binding region, core sequence LXCXE และ casein kinase II phosphorylation site (CKII) ในบริเวณสุดท้ายคือ COOH-terminal CR3 domain จะเป็นบริเวณของ zinc finger ที่เป็น DNA-binding protein ที่มี CXXC motif 2 หน่วยซ้ำ ซึ่ง ณ บริเวณนี้เองเป็นตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับ pRb โปรตีน และการจับกับโปรตีนตัวอื่น ๆ (Hebner and Laimins, 2006)

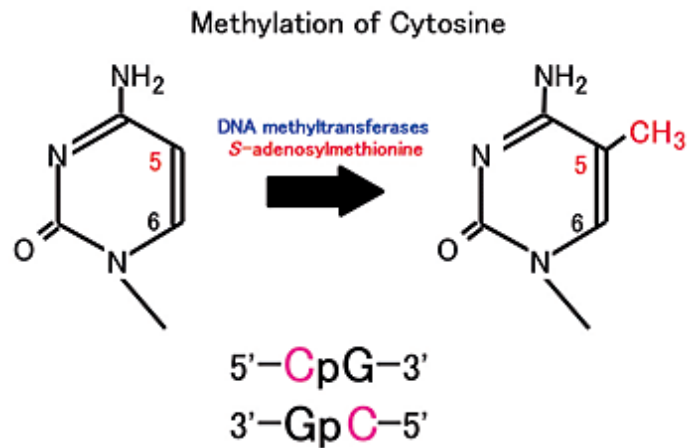
มีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า โปรตีน E7 ของ HPV type 16 สามารถจับกับ DNA methyltransferase (DNMT1) ได้ ณ ตำแหน่งบริเวณ COOH-terminal CR3 domain และทำให้กิจกรรมของ DNMT1 สูงขึ้น (Burger *et al.*, 2007) ซึ่ง DNMT1 มีความสำคัญต่อการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนต่างๆ

กลไกระดับเหนือพันธุกรรม

ในปี ค.ศ. 1940 คนแรกที่ได้ให้คำนิยามของคำว่า กลไกระดับเหนือพันธุกรรม ก็คือ Waddington ได้กล่าวไว้ว่า “อันตักิริยาของยีนกับสิ่งแวดล้อมอันส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะฟีโนไทป์” (Chuan Yi, 2002) หลังจากนั้นก็มีการเพิ่มนิยามของกลไกระดับเหนือพันธุกรรมเข้าไปเพิ่มเติมกลายเป็น “การถ่ายทอดทางระดับเหนือพันธุกรรม (epigenetic inheritance) เป็นข้อมูลของเซลล์ ซึ่งนอกเหนือจากข้อมูลบนลำดับเบส โดยจะถ่ายทอดระหว่างการแบ่งเซลล์” (Feinberg and Tycko, 2004) นั่นคือ ผลกระทบของกลไกระดับเหนือพันธุกรรมต่อการถอดรหัส (transcription) ในเซลล์ เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน (gene expression) ดังนั้นความผิดปกติทาง epigenetics อาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต ในปัจจุบันเราสามารถแบ่งกลไกระดับเหนือพันธุกรรม ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (DNA methylation) ส่วนกลุ่มที่สองคือ การดัดแปลงโครงสร้างฮิสโตน (histone modification) โดยระหว่าง 2 กลุ่มนี้ DNA methylation มีผู้ให้การศึกษามากที่สุด รวมทั้งงานวิจัยฉบับนี้

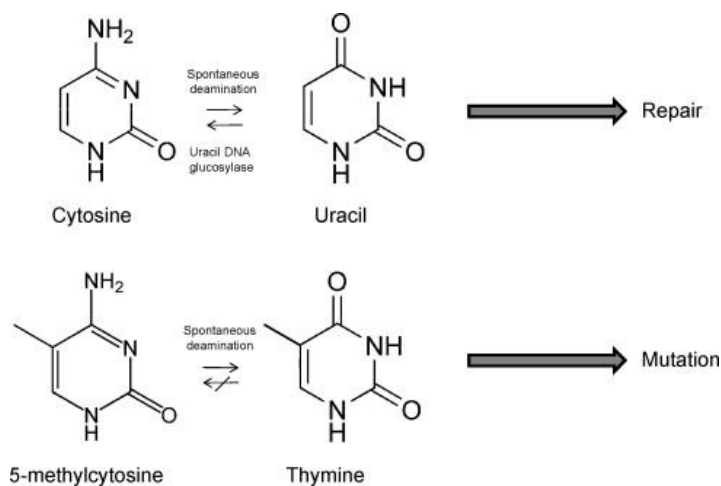
การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ (DNA methylation)

DNA methylation คือการดัดแปลงพันธะโควาเลนต์ของนิวคลีโอไทด์ และมักจะเกิดขึ้นกับเบสไซโตซีน (cytosine; C) โดยเฉพาะบริเวณที่ไซโตซีนอยู่ร่วมกับเบสกวานีน (guanine; G) เป็นจำนวนมากที่เรียกว่า CpG dinucleotide โดยเบสไซโตซีนจะถูกเติมหมู่เมทิลลงในตำแหน่งคาร์บอนที่ห้า โดยอาศัยเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) ซึ่งใช้ตัวที่ให้หมู่เมทิลคือ S-adenosyl-L-methionine (SAM) จากการศึกษาพบว่า 5-เมทิลไซโทซีน (5-methylcytosine, 5-meC) จะมีประมาณร้อยละ 1 ของเบสบนดีเอ็นเอทั้งหมด และส่วนมากจะอยู่บน CpG dinucleotide ของ human somatic cell (Ehrlich *et al.*, 1982) และในบางกรณีอาจเกิด DNA methylation ในบริเวณที่มีเบส CCWGG ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ DNA cytosine methylase หรือเรียกว่า dcm โดยเอนไซม์จะเติมหมู่เมทิลให้กับเบสไซโตซีนตัวที่ 2 ของ CCWGG nucleotide (Gonzalez-Nicieza, Turner, and Connolly, 2001)



รูปที่ 9 แสดงการเติมหมู่เมทิลบนเบสไซโตซีน (Tajima, 2009 : online)

5-เมทิลไซซีนสามารถนำหมู่เอมีนออกได้ด้วยตัวเอง (spontaneous deamination) ได้เบสไทมีน (thymine; T) unmethylated cytosine ที่เกิด spontaneous deamination จะเปลี่ยนเป็นเบสยูราซิล (uracil; U) ซึ่งปกติจะไม่พบบนสายดีเอ็นเอ ทำให้กระบวนการตรวจสอบของดีเอ็นเอเข้ามาซ่อมแซมผ่านเอนไซม์ DNA-uracil glycosylase ซึ่งกระบวนการนี้จะไม่ทราบความผิดปกติจากการเปลี่ยน 5-เมทิลไซโตซีนเป็นเบสไทมีนแต่อย่างใด ดังนั้นการเกิด spontaneous deamination ของ 5-เมทิลไซโตซีน จะนำไปสู่การเกิดการกลายพันธุ์ของเบสไซโตซีนเป็นเบสไทมีน (C to T transition mutation) ในจีโนม (Coulondre *et al.*, 1978) ดังภาพที่ 10



รูปที่ 10 การ deamination ของไซโตซีนและ 5-เมทิลไซโตซีน (Ozfirat and Korbonits, 2010)

CpG dinucleotide ส่วนมากจะอยู่ในส่วนที่เรียกว่า CpG islands ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเบสคู่กัน G และ C จำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ 5'-UTR ของยีนและมักไม่พบ DNA methylation เมื่อมีการแสดงออกของยีนนั้น (Bird, 1986) พบว่า CpG islands ในจีโนมของมนุษย์มีอย่างน้อย 29,000 แห่ง และ CpG dinucleotide มักถูกพบในบริเวณที่เป็นลำดับเบสซ้ำๆกัน (repetitive sequence) เมื่อเทียบกับ CpG islands แล้วกลุ่มของ CpG dinucleotide นั้นมักจะเป็น methylated DNA เป็นส่วนใหญ่เนื่องด้วยเหตุผลด้านคงความเสถียรของจีโนม (Larsen *et al.*, 1992)

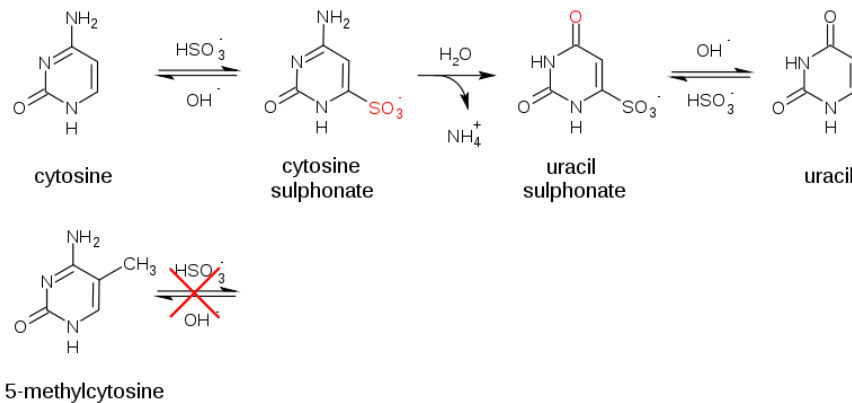
ปัจจุบันมี 2 กลไกที่เกี่ยวข้องในการอธิบายการยับยั้งการถอดรหัสของยีนผ่านการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ คือ

- 1) ดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมทิลจะทำให้ transcription factor ไม่สามารถเกาะบริเวณที่ transcription factor เกาะอยู่ได้ตามปกติ
- 2) ดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมทิลจะทำให้โปรตีนที่จำเพาะต่อ methylated CpG หรือ CCWGG มาเกาะ ส่งผลให้มีการยับยั้งการถอดรหัสโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครมาทิน (chromatin remodeling)

ปฏิกิริยาไบซัลไฟต์ (Bisulfite conversion)

ปฏิกิริยาไบซัลไฟต์ เป็นปฏิกิริยาที่ใช้การแยกแยะระหว่าง C และ 5-meC โดยอาศัยหลักการของความไวในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกันของ C และ 5-meC ซึ่งจะถูก deamination ภายใต้สภาวะกรด ซึ่ง unmethylated C จะถูกเปลี่ยนเป็น U ในขณะที่ 5-meC ที่มีความไวต่ำกว่ามากจะยังคงเป็น C อยู่ โดยการทำให้ Bisulfite conversion นี้มีร้อยละ 95-98% ของ C จะถูกเปลี่ยนเป็น U (โดยที่ 5-meC ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง) (Grunau, 2001)

ดีเอ็นเอที่ใช้จะต้องมีคุณภาพที่ดีและถูก Denature ให้เป็นสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ เพื่อให้เป็นการแน่ใจว่าเกิดการ conversion อย่างสมบูรณ์จริงๆ (เพราะว่าปฏิกิริยานี้เป็น Single stranded specific reaction) สภาวะ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมมีส่วนเกี่ยวข้องในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา นอกจากนี้แล้วไบซัลไฟต์ไอออนมีความไวสูงจะเกิด auto-oxidation ได้ง่ายจึงต้องใส่สารต้านอนุมูลอิสระไว้ในปฏิกิริยาซึ่งก็คือไฮโดรควิโนน (hydroquinone) ภายหลังจากการทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์ ดีเอ็นเอจะถูกนำไปวิเคราะห์การเติมหมู่เมทิลได้หลายแบบ เช่น methylation specific-PCR (MSP), restriction enzyme (COBRA) เป็นต้น (Fraga and Esteller, 2002)

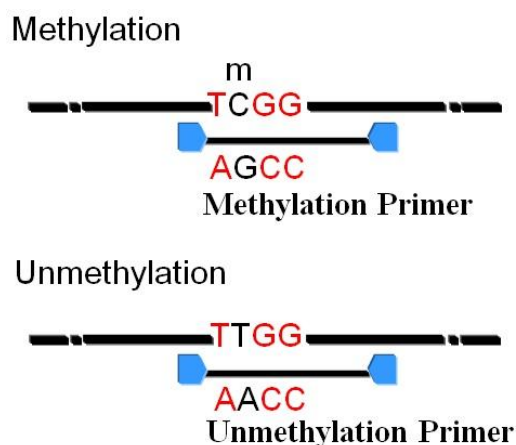


รูปที่ 11 การเปลี่ยน C เป็น U ภายใต้ปฏิกิริยาไบซัลไฟต์ (Fraga and Esteller, 2002)

Methylation specific-PCR (MSP)

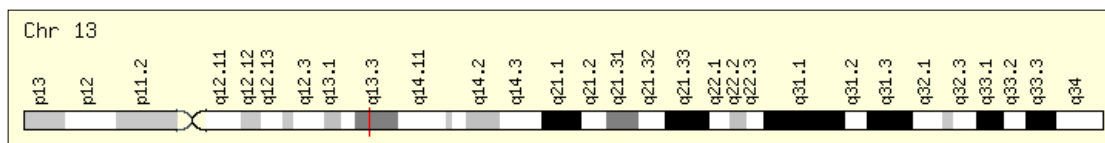
MSP เป็นวิธีที่นิยมสำหรับการศึกษา DNA methylation ในปัจจุบัน โดยภายหลังจากการนำ DNA ไปทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์แล้วจะมีการทำ Allele specific PCR ซึ่งจะจำเพาะต่อ C หรือ U ซึ่งถ้าไพรเมอร์จำเพาะต่อ U (unmethylated primer) ก็หมายความว่าตำแหน่ง C บริเวณนั้นไม่มีการเติมหมู่เมทิล ทำให้ไพรเมอร์จะจับกับ U บริเวณนี้ได้ ในทำนองเดียวกันกับไพรเมอร์ C ซึ่ง (methylated primer) ถ้าหากมีการเติมหมู่เมทิลที่ C บริเวณนี้ ไพรเมอร์ก็จะจับกับ C บริเวณนี้ได้

โดยปกติแล้วการเกิดการเติมหมู่เมทิลจะไม่เป็นแบบขาวหรือดำ (all or none) แต่จะมีร้อยละของตัว C ที่ถูกเติมหมู่เมทิลที่แตกต่างกันออกไป โดย PCR product ของทั้ง 2 ไพรเมอร์นั้นรวมกันจะเป็น 100% (Herman *et al.*, 1996)



รูปที่ 12 การจับกันของคู่ไพรเมอร์ methylation และ unmethylation

Cyclin A1 (CCNA1)



รูปที่ 13 แสดงตำแหน่งของยีน CCNA1 (Genecards, 2012 : online)

ยีน *CCNA1* อยู่ในกลุ่มยีน Cyclin A1 family อยู่บนโครโมโซมที่ 13 ตำแหน่ง 13q12.3-q13 มีขนาด 465 amino acids มีหน้าที่ที่สำคัญ คือ การขับเคลื่อนวัฏจักรของเซลล์ให้เข้าสู่ช่วง G1/S ใน testis และ hematopoietic progenitor cell (Ji *et al.*, 2005) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิดและการตายของเซลล์ (apoptosis) อีกทั้งทำให้เซลล์มะเร็งโต รังไข่ และปอดหยุดอยู่ในระยะ G2 stage (Rivera *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกลไกการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอหลังการฉีกขาดของดีเอ็นเอสายคู่ (DNA double strand break) ผ่านกระบวนการ non-homologous end-joining และ Ku70 DNA repair protein (Muller-Tidow *et al.*, 2004) เนื่องจาก *CCNA1* ไม่เคยได้รับการศึกษาหรือพิสูจน์ว่าเป็นยีนต้านมะเร็ง แต่ถ้าหากมองถึงหน้าที่ที่กล่าวไป แสดงให้เห็นว่า *CCNA1* อาจมีบทบาทเป็นยีนต้านมะเร็งก็เป็นได้ เพราะเนื่องจากหน้าที่ในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) และการควบคุมและซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายภายในเซลล์ ล้วนแล้วแต่เป็นหนึ่งในหน้าที่ที่สำคัญของยีนต้านมะเร็งนั่นเอง

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันและการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่นำไปสู่โรคมะเร็ง พบว่า การเกิดมะเร็งปากมดลูกซึ่งมีการติดเชื้อ HPV มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดเมทิลเลชัน ของ *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูกถึง 93% (Kitkumthorn *et al.*, 2006) รวมถึงงานวิจัยที่พบว่า มีความเกี่ยวข้องกันระหว่างการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของ *CCNA1* และรูปแบบการติดเชื้อในลักษณะ integrated form ของ HPV (Yanatsaneejit *et al.*, 2008) และในงานวิจัยที่พบว่า โปรตีน E7 ของ HPV สามารถไปเพิ่มการทำงานของ DNA methyltransferase (DNMT1) และลดระดับโปรตีน E-cadherin ได้ (Lauson *et al.*, 2010) จากการศึกษาครั้งนี้ จึงคาดว่า E7 ของ HPV มีความสามารถชักนำให้เกิด methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของ *CCNA1* และทำให้ยีนนี้แสดงออกลดลง หรือไม่สามารแสดงออกได้นั่นเอง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

- 1.1 Autoclave (Hydroclave Harvey, USA)
- 1.2 Balance (Precisa, Switzerland)
- 1.3 Centrifuge, refrigerated centrifuge (Beckman, USA)
- 1.4 Centrifuge, microcentrifuge high speed (Fotodyne, USA)
- 1.5 CO₂ cell culture incubator (Forma Scientific, UK)
- 1.6 Deep Freeze -20⁰C, -80⁰ C (Revco)
- 1.7 Digital Timer
- 1.8 DNA Thermal cycler 480 (Perkin Elmer, Cetus USA)
- 1.9 Electrophoresis chamber set (BIO-RAD, USA)
- 1.10 Freezer -80⁰ C (Forma Scientific, USA)
- 1.11 Fume Hood (Newlab, USA)
- 1.12 Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA)
- 1.13 Gel star nucleic acid gel stain (Cambrex Bio Science)
- 1.14 Hemocytometer, cell counter (Boeco, Germany)
- 1.15 Heat block (Bockel)
- 1.16 Incubator (Mettler, West Germany)
- 1.17 Laminar flow hood (Gelman Science)
- 1.18 Microwave oven
- 1.19 Multi-block heater (Techne DRI Block, USA)
- 1.20 pH meter (Eutech Cybernataics)
- 1.21 Phase contrast light microscope (Olympus, Japan)
- 1.22 Pipette boy (Tecnomara, Switzerland)
- 1.23 Pipette rack (Autopack, USA)
- 1.24 Plate Reader (Multiascent, USA)

- 1.25 Refrigerator 4 °C (Mitsubishi, Japan)
- 1.26 Sonicator
- 1.27 Spectrophotometer (nanodrop) (Thermo scientific, USA)
- 1.28 Stero microscope
- 1.29 Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne)
- 1.30 Storm 840 and ImageQuaNT software (Molecular dynamics)
- 1.31 Thermal cycler (Touch Down, Hybraid USA)
- 1.32 Thermometer (Precision, Germany)
- 1.33 UV Transilluminator (Fotodyne, USA)
- 1.34 Vortex mixer (Scientific Industry, USA)
- 1.35 Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco USA)
- 1.36 Water bath, Thermostat shaking (Heto, Denmark)

2. วัสดุอุปกรณ์

- 2.1 Beaker : 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- 2.2 Cell Scraper (Corning, USA)
- 2.3 Cryovial tube (Corning, USA)
- 2.4 Cell culture flask : T25, T75 (Falcon, USA)
- 2.5 Counting chambers
- 2.6 Cylinder : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- 2.7 DNA clean up kit (Promega, USA)
- 2.8 DNA purification kit (Promega, USA)
- 2.9 Disposable gloves
- 2.10 Flask : 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- 2.11 Forceps, operation blade
- 2.12 Glass pipette : 1 ml, 5 ml, 10 ml (Witeg, Germany)
- 2.13 MicrpAmp PCR tube
- 2.14 Microcentrifuge tube rack (Scientific plastics, USA)
- 2.15 Microcentrifuge tube : 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (Bio-rad Elkay, USA)

- 2.16 Microscope glass cover slips (Chance, UK)
- 2.17 Needle, sterile (Nipro, Japan)
- 2.18 Parafilm (American National Can, USA)
- 2.19 Pipette tip : 10 ul, 200 ul, 1,000 ul (AxyGen, USA)
- 2.20 Plastic wrap
- 2.21 Polypropylene conical tube,sterile : 15 ml, 50 ml (Elkay, USA)
- 2.22 Reagent bottle : 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
- 2.23 Sanitary tissue paper (Celox, Thailand)
- 2.24 Stirring-magnetic bar
- 2.25 Syringe disposable (Nipro, Japan)
- 2.26 Test tube racks
- 2.27 6-well plate, 24-well plate, 96-well plate (Corning, USA)

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1 สารเคมีทั่วไป

- 3.1.1 Absolute ethanol (Merck, USA)
- 3.1.2 Acetic acid glacial (Merck, USA)
- 3.1.3 Agarose molecular biology grade (Sigma, USA)
- 3.1.4 Ammonium acetate (Merck, USA)
- 3.1.5 Bisulfite (Merck, USA)
- 3.1.6 Bovine Serum Albumin (Sigma, USA)
- 3.1.7 Bromophenol blue (Sigma, USA)
- 3.1.8 Chloroform (Merck, USA)
- 3.1.9 Diethylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma, USA)
- 3.1.10 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA)
- 3.1.11 Dnase (Gibco-BRL, USA)

- 3.1.12 EDTA (Merck, USA)
- 3.1.13 Ethidium bromide (Sigma, USA)
- 3.1.14 Fetal Bovine Serum (Hyclone, USA)
- 3.1.15 Glycerol (Merck, USA)
- 3.1.16 Glycogen (Merck, USA)
- 3.1.17 Hydrochloric acid (Merck, USA)
- 3.1.18 Hydroquinone (Merck, USA)
- 3.1.19 IPTG (Promega, USA)
- 3.1.20 β -Mercaptomethanol (2- Mercaptomethanol) (Sigma, USA)
- 3.1.21 Isomyl alcohol (Merck, USA)
- 3.1.22 Isopropanol (Merck, USA)
- 3.1.23 Penicillin/Streptomycin (Sigma, USA)
- 3.1.24 Phenol (Sigma, USA)
- 3.1.25 Phosphate buffer saline (PBS)
- 3.1.26 SDS (Sigma, USA)
- 3.1.27 Sodium acetate (Sigma, USA)
- 3.1.28 Sodium bisulfite (Sigma, USA)
- 3.1.29 Sodium chloride (Merck, USA)
- 3.1.30 Sodium hydroxide (Merck, USA)
- 3.1.31 Tris (Tris[hydroxymethyl] aminomethane) (USB corporation, USA)
- 3.1.32 Triton X 100 (Sigma, USA)
- 3.1.33 Trizol reagent (Invitrogen, USA)
- 3.1.34 Trypan blue (Sigma, USA)
- 3.1.35 Trypsin (Sigma, USA)
- 3.1.36 Xylene (Merck, USA)

3.1.37 10 base pair DNA ladder (Biolabs, UK)

3.1.38 100 base pair DNA ladder (Biolabs, UK)

3.1.39 1 kb base pair DNA ladder (Biolabs, UK)

3.2 สารเคมีสำหรับทำ PCR

3.2.1 10X PCR buffer (Promega, USA)

3.2.2 25 mM Magnesium chloride (Promega, USA)

3.2.3 10 mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Promega, USA)

3.2.4 Oligonucleotide primers (Biodesign, Thailand)

3.2.5 *Taq* DNA polymerase (Promega, USA)

3.2.6 Hot start *Taq* DNA polymerase (Promega, USA)

3.3 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอ

3.3.1 *Bam*HI (NEB, USA)

3.3.2 *Eco*RI (NEB, USA)

3.3.3 *Nde*I (NEB, USA)

3.3.4 10X buffer3 (NEB, USA)

3.3.5 10X buffer4 (NEB, USA)

3.3.6 100X BSA (NEB, USA)

3.3.7 100X NEB4 (NEB, USA)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.4.1 Yeast extract powder (Bio Basic Inc., Canada)

3.4.2 Agar bacterial powder (Conda, Spain)

3.4.3 Tryptone powder (Bio Basic Inc., Canada)

3.4.4 Sodium chloride (BDH, UK)

3.5 สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์

3.5.1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone, Thermo, USA)

3.5.2 Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, Invitrogen, USA)

3.5.3 100X Pen-Step (GIBCO, Invitrogen, USA)

3.5.4 Trypsin-EDTA (GIBCO, Invitrogen, USA)

3.5.5 Phosphate Buffered Saline (PBS)

3.6 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Transfection

3.6.1 FuGENE HD Transfection Reagent (Promega, USA)

3.7 ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย

3.7.1 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA)

3.7.2 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)

3.7.3 High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan)

3.7.4 QuikChange Lightning Site - Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA)

3.7.5 Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo, USA)

3.7.6 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Thermo, USA)

3.8 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Western blot

3.8.1 RIPA buffer

3.8.2 4X Loading dye

3.8.3 10X Tris-Glycine

3.8.4 Running buffer

3.8.5 Transfer buffer

3.8.6 30% Acrylamide/Bis solution (Bio-RAD, USA)

3.8.7 BSA (Sigma, USA)

3.8.8 Tris Buffer Saline - Tween (TBST)

3.8.9 Ammoniumpersulphate (APS)

3.8.10 Temed (Bio-Rad, USA)

3.8.11 Sodium dodecyl sulphate (SDS) (Sigma, USA)

3.8.11 c-Myc Mouse mAb monoclonal antibody (Invitrogen, USA)

3.8.12 Goat Anti-Mouse IgG3 (γ), HRP (Invitrogen, USA)

3.8.13 Anti-beta Actin antibody [mAbcam 8226] (HRP) (abcam, USA)

วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยเรื่องนี้ แบ่งเป็น 4 ส่วนใหญ่ๆ คือ

1. การตรวจสอบการติดเชื้อ HPV
2. การตรวจสอบเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน CCNA1
3. การสร้าง recombinant plasmid ของยีน E7 ของ HPV ไทป์ 16
4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน E7 และ CCNA1

1. การตรวจสอบการติดเชื้อ HPV

1.1 เซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ที่ใช้ในงานวิจัยมีทั้งหมด 6 ชนิด เพื่อใช้เป็นแหล่งสำหรับสกัด ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ดังนี้

1.1.1 HeLa cells (Human cervix carcinoma cell line) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก และมีการติดเชื้อของ Human papillomavirus ไทป์ 18

1.1.2 SiHa cells (Human cervix carcinoma cell line) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก และมีการติดเชื้อของ Human papillomavirus ไทป์ 16

1.1.3 C33A cells (Human cervix carcinoma cell line) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก ที่ไม่มีการติดเชื้อของ Human papillomavirus

1.1.4 HN4 cells (*Head and neck cancer cell lines*) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งหูคอ จมูก ที่อยู่ในบริเวณของลิ้น (Tongue)

1.1.5 HN12 cells (*Head and neck cancer cell lines*) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งหูคอ จมูก ที่อยู่ในบริเวณต่อมน้ำเหลือง (Lymph node)

1.1.6 HN17 cells (*Head and neck cancer cell lines*) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งหูคอ จมูก ที่อยู่ในบริเวณลำคอ (Neck)

1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

1.2.1 การเลี้ยงเซลล์จากเซลล์แช่แข็ง (Thaw cell)

เริ่มแรกเซลล์ไลน์จะถูกแช่แข็งไว้ในหลอดเก็บรักษาเซลล์ (cryotube vial) ในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ให้นำเซลล์ออกมาแต่ละหลอดตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าน้ำแข็งจะละลาย ในช่วงนี้เองให้ไปเปิดแสง UV ทิ้งไว้ในตู้เขี่ยเชื้อ (safety cabinet) ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที และเช็ดทำความสะอาดด้วย 70% แอลกอฮอล์ รวมทั้งอุปกรณ์ทุกอย่างที่จะนำเข้าสู่ตู้เขี่ยเชื้อด้วย หลังจากที่น้ำแข็งละลายดีแล้วให้ใช้ pipette ขนาด 2 มิลลิลิตร ดูดเซลล์ขึ้นลงประมาณ 2 - 3 ครั้งเพื่อให้ตะกอนเซลล์ละลายและกระจายทั่ว จากนั้นค่อยดูดทั้งหมดลงในขวดเลี้ยงเซลล์ (T-Flask) ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย DMEM, 10% FBS และ 1% PenStrep รวมปริมาตรประมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นวางขวดเลี้ยงเซลล์ในแนวนอนแล้วเขย่าเบาๆ ในทิศทางขึ้น-ลง, ซ้าย-ขวา สลับไปมาประมาณ 10 ครั้ง เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วขวด นำขวดเลี้ยงเซลล์ไปใส่ในตู้เลี้ยงเซลล์ซึ่งมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มทิ้งไว้ประมาณ 24 - 48 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะผิวที่ขวดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นจึงนำออกมาเทอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ใหม่ใส่เข้าไปประมาณ 5 มิลลิลิตรเหมือนเดิม เนื่องจากป้องกันการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์จาก Freezing Media ที่รวมไปกับอาหารเลี้ยงเซลล์ในครั้งแรก

1.2.2 การเลี้ยงเซลล์

ภายหลังจากที่เซลล์เพิ่มปริมาณเต็มขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้องย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ความไวในการเจริญของแต่ละชนิดของเซลล์นั้นจะแตกต่างกัน) ให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในขวดทิ้ง แล้วเติม 1X PBS ประมาณ 1 มิลลิลิตร เขี่ยไปมาให้ทั่วขวดเพื่อล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด แล้วดูดทิ้ง ล้างด้วย 1X PBS อย่างน้อย 2 ครั้ง จากนั้นเติม Trypsin-EDTA 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ เป็นเวลาประมาณ 5 นาที (เซลล์แต่ละชนิดจะใช้เวลาในการบ่มไม่เท่ากัน HeLa และ HN17 จะบ่มประมาณ 5 นาที ส่วน SiHa, C33A และ HN4 จะบ่มประมาณ 6-8 นาที และสุดท้าย HN12 จะบ่มประมาณ 12 นาที) เพื่อช่วยให้เซลล์หลุดออกจากผิวในขวดเลี้ยงเซลล์ เมื่อครบเวลาจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (ที่มี FBS) ลงไปประมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ Trypsin ผสมให้เข้ากัน โดยดูดขึ้นลง จนกระทั่งเห็นเซลล์แยกแตกออกจากกัน หลังจากนั้นย้ายไปใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 13 มิลลิลิตรอยู่ รวมปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและกระจายเซลล์ให้ทั่ว นำขวดเลี้ยงเซลล์ไปเก็บไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นทุกๆ 1-2 วัน ให้ตรวจดูสีของ

อาหารเลี้ยงเซลล์ ถ้าสีของอาหารยังไม่เปลี่ยน ให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ในขวดเลี้ยงเซลล์ ขวดเดิมเพื่อเพิ่มอาหารให้แก่เซลล์ แต่ถ้าสีของอาหารเริ่มเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีส้มอมเหลือง และสังเกตว่าเซลล์มีปริมาณมากจนเต็มแน่นพื้นที่แล้ว ให้เลือกทำดังนี้ คือ เก็บเซลล์เข้า Cryotube vial และไปแช่แข็งที่ไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บรักษาในระยะยาว หรือเก็บเซลล์ในรูปตะกอนแห้งเพื่อนำไปวิเคราะห์งานวิจัยต่อ หรือลดปริมาณเซลล์ ให้น้อยลงสำหรับการเลี้ยงเซลล์ในรอบต่อไป

1.2.3 การแช่แข็งเซลล์

เป็นการเก็บรักษาเซลล์ในระยะยาวในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส โดยเริ่มแรกให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทิ้ง แล้วเติม 1X PBS ประมาณ 2 มิลลิลิตร เอียงไปมาให้ทั่วขวดเพื่อล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด แล้วดูดทิ้งล้างด้วย 1X PBS อย่างน้อย 2 ครั้ง จากนั้นเติม Trypsin-EDTA 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ เป็นเวลาประมาณ 5 นาที (ระยะเวลาในการบ่มขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์) เพื่อช่วยให้เซลล์หลุดออกจากผิวในขวดเลี้ยงเซลล์ เมื่อครบเวลาจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (ที่มี FBS) ลงไปประมาณ 2 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ Trypsin ผสมให้เข้ากันโดยดูดขึ้นลง จนกระทั่งเห็นเซลล์แยกแตกออกจากกัน หลังจากนั้นดูดทั้งหมดย้ายไปใส่ในหลอด Polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วเทของเหลวทิ้ง เติม Freezing media ที่ประกอบด้วย DMEM 3 หรือ 4.5 มิลลิลิตร (ขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ ถ้าปริมาณน้อยให้เก็บเซลล์ 3 หลอด แต่ถ้ามีปริมาณมากให้เก็บ 4 หลอด) ที่ผสม DMSO 10% ของปริมาตร (300 หรือ 450 ul) ผสมและกระจายเซลล์ให้แยกออกจากกัน จากนั้นแบ่งใส่หลอดสำหรับเก็บเซลล์หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร นำหลอดทั้งหมดไปใส่ในกล่องลดอุณหภูมิที่ละ 1 องศาเซลเซียส แล้วนำกล่องไปเก็บไว้ในตู้ไนโตรเจนเหลวต่อไป

1.3 การสกัด DNA

ภายหลังการเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ชนิด คือ เซลล์ HeLa, SiHa, C33A, HN4, HN12 และ HN17 จนได้เซลล์ในปริมาณที่พอเหมาะ (ประมาณ 10 ล้านเซลล์) จึงเก็บเซลล์ในรูปตะกอนแห้ง ทำตามขั้นตอนเดียวกับ หัวข้อ 1.2.3 การแช่แข็งเซลล์ จนถึงขั้นตอนที่เซลล์อยู่ในหลอด polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปล้างด้วย 1X PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงให้ เซลล์กระจายทั่ว นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำ ออกมาเทน้ำทิ้งแล้วล้างด้วย 1X PBS อีกรอบ แล้วนำไปปั่นตกตะกอน นำออกมาเทน้ำทิ้งให้เหลือ แต่เซลล์ในรูปตะกอนแห้ง ใส่ Lysis buffer II + SDS 10% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และใส่ proteinase K 40 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดไปบ่มไว้ที่ water bath ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ ซ้ำมคืน หรือสังเกตจนกว่าสารละลายจะใส ไม่มีตะกอนขุ่น จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) ใส่ลงไปอัตราส่วน 1:1 (500 ไมโครลิตร) นำไปปั่นตกตะกอน 14,000 rpm เวลา 5 นาที ดูดของเหลวด้านบน (supernatant) ทั้งหมดลงสู่ microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ (จะได้ปริมาตรไม่เกิน 500 ไมโครลิตร) จากนั้นใส่ 100% absolute ethanol 500 ไมโครลิตร + 10M NH₄OAc 250 ไมโครลิตร ผสมเบาๆด้วยการจับหลอดคว่ำขึ้น-ลง นำไป ปั่นตกตะกอน 14,000 rpm เวลา 15 นาที แล้วเทของเหลวด้านบน (supernatant) ทิ้งให้หมด จากนั้นใส่ 70% ethanol 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอน 14,000 rpm เวลา 15 นาที แล้วเท ethanol ทิ้ง สังเกตจะมีตะกอนดีเอ็นเออยู่ที่ก้นหลอด นำหลอด microcentrifuge ที่มี DNA อยู่ตั้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ ethanol ระเหยออกไปให้หมดจนแห้ง สังเกตตะกอน DNA เมื่อแห้งแล้ว จะเปลี่ยนจากขาวขุ่นเป็นขาวใส จากนั้นจึงเติมน้ำใส่ลงไป 20-50 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่ Water bath ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เพื่อให้ DNA ละลายรวมกับน้ำ สุดท้ายก็จะได้ DNA ที่ ละลายอยู่ในน้ำ 20-50 ไมโครลิตร อยู่ในหลอด microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร (เก็บรักษาที่ freezer -20 องศาเซลเซียส)

1.4 การสกัด RNA

ภายหลังการเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ชนิด คือ เซลล์ HeLa, SiHa, C33A, HN4, HN12 และ HN17 จนได้เซลล์ในปริมาณที่พอเหมาะ (ประมาณ 10 ล้านเซลล์) จึงเก็บเซลล์ในรูปตะกอนแห้ง ทำตามขั้นตอนเดียวกับ หัวข้อ 1.2.3 การแช่แข็งเซลล์ จนถึงขั้นตอนที่เซลล์อยู่ในหลอด polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปล้างด้วย 1X PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงให้ เซลล์กระจายทั่ว นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นดู มา 500 ไมโครลิตร ใส่ใน Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นล้างด้วย 1X PBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจายทั่ว นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 6 นาที อีกรอบหนึ่ง นำออกมาเทน้ำทิ้งให้เหลือแต่เซลล์ในรูปตะกอนแห้ง ใส่ Trizol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เพื่อขจัด DNase และ RNase) ใช้ปิเปตทิปดูดขึ้นลงให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วใส่ Chloroform 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้มือเขย่า ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที นำออกมาจะเห็น สารละลายแยกชั้น ให้ดูดชั้นบนใสใน microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นใส่ Isopropanol alcohol 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้มือเขย่า ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำทิ้งเก็บตะกอน อาร์เอ็นเอ ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 7,500 g เป็น เวลา 5 นาที เท ethanol ทิ้ง สังเกตจะมีตะกอน RNA อยู่ที่ก้นหลอด นำหลอด Microcentrifuge ที่มี RNA อยู่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ ethanol ระเหยออกไปให้หมดจนแห้ง ละลายตะกอน RNA ด้วย DEPC water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่ water bath ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เพื่อให้ RNA ละลายรวมกับน้ำ สุดท้ายก็จะได้ RNA ที่ละลายอยู่ในน้ำ 20 ไมโครลิตร อยู่ในหลอด microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร (เก็บรักษาที่ freezer -80 องศา เซลเซียส)

1.4.1 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

นำ RNA ของเซลล์แต่ละชนิดที่ได้จาก หัวข้อ 1.4 การสกัด RNA มาเป็นต้นแบบในการ สังเคราะห์ DNA คู่สม (cDNA) โดยใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูป Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA) ขั้นแรกให้เตรียม RNA ปรับปริมาตรกับน้ำ โดยที่ต้องการ RNA 5 ไมโครกรัม ในปริมาณ DEPC water ไม่เกิน 11 ไมโครลิตร จากนั้นจะมีขั้นตอนแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการนำ primer (Oligo(dt)) มารวมกับ RNA ที่ใช้เป็นต้นแบบ โดยเตรียม RNA

จากเซลล์แต่ละชนิด 11 ไมโครลิตร ผสมกับ primer Oligo(dt) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำแต่ ละหลอดไปตั้งให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในระหว่างรอให้เตรียม 5X reaction buffer 4 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 2 ไมโครลิตร, Ribolock 1 ไมโครลิตร และ Reverse Aid 1 ไมโครลิตร เมื่อครบ 5 นาทีแล้วจะเข้าสู่ส่วนที่ 2 ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ DNA คู่สม จาก RNA ต้นแบบ โดยนำ RNA ที่ผสมกับ primer Oligo(dt) ที่ตั้งทิ้งไว้ 70 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 5 นาที ปริมาตร 12 ไมโครลิตร มารวมกับสารผสมที่เตรียมไว้ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ซึ่ง รวมกันแล้วจะได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร นำแต่ละหลอดไปใส่เครื่อง PCR แล้วตั้งค่าอุณหภูมิ และช่วงเวลาในขั้นต่างๆ ดังนี้ ขั้นแรก อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้ primer เข้าจับกับ RNA ต้นแบบและเกิดการสังเคราะห์ DNA คู่สม ขั้นที่สอง อุณหภูมิ 70 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase หลังจากนั้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำ cDNA ของเซลล์แต่ละชนิดที่ได้มาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

1.5 การตรวจหา HPV DNA ด้วยวิธี PCR

เนื่องจากเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ทั้ง 6 ชนิด คือ เซลล์ HeLa, SiHa, C33A, HN4, HN12 และ HN17 เราทราบแล้วว่า ในเซลล์ HeLa มีการติดเชื้อของ Human papillomavirus ไทป์ 18, SiHa มีการติดเชื้อของ Human papillomavirus ไทป์ 16 และ C33A ไม่มีการติดเชื้อ Human papillomavirus ส่วน HN4, HN12 และ HN17 ไม่ทราบลักษณะการติดเชื้อ เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่า เซลล์ทุกชนิดมีการติดเชื้อ HPV จริงหรือไม่ ดังนั้นจึงทำการตรวจคัดกรองหา HPV DNA โดยใช้ ลำดับเบส ของ HPV ในส่วน L1 gene ทำการเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการ PCR โดยใช้คู่ primers ที่มีการใช้ในการตรวจหาจีโนม HPV ทั่วไป คือ MY09/MY11 (Resnick *et al.*, 1990) และใช้ DNA จากข้อ 1.3 เป็นต้นแบบ

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer L1 สำหรับ PCR

ตำแหน่งของยีน	ชื่อ	ลำดับเบสของ primer (5'-3')
L1	MY11	GCMCAGGGWCTATAAYAATGG
	MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC

หมายเหตุ M = A หรือ C, R = A หรือ G, W = A หรือ T, Y = C หรือ T

ตารางที่ 4 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจ HPV DNA

ชนิดของสาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10x PCR buffer	2.0	1X
2. 25 mM MgCl ₂	3.0	2.25 mM
3. 10 mM dNTP	0.4	0.2 mM
4. 10 μM Forward primer (MY11)	0.4	0.18 μM
5. 10 μM Reverse primer (MY09)	0.4	0.18 μM
6. 5 U/μl Hot <i>Taq</i> polymerase	0.2	1.0 U
7. Distilled water	11.8	
8. cDNA (แยกชนิดละหลอด)	2.0	
ปริมาตรรวมทั้งหมด	20.0	

และดำเนินการทำการทำปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

Pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C	10 นาที	} 40 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C	1 นาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ	55 °C	1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ	72 °C	1 นาที	
Final Extension	ที่อุณหภูมิ	72 °C	5 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) ตามภาวะการกระทำปฏิกิริยาที่กำหนดไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการทำให้ agarose electrophoresis โดยใช้ agarose ความเข้มข้น 2% ผสมเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 55 นาที แล้วตรวจดูแถบ DNA ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร (ใช้เครื่อง Gel Doc ของบริษัท Bio-Rad)

1.6 การตรวจหา HPV type ด้วยวิธี PCR

เนื่องจากเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ทั้ง 6 ชนิด คือ เซลล์ HeLa, SiHa, C33A, HN4, HN12 และ HN17 เราทราบว่า ในเซลล์ HeLa มีการติดเชื้อของ Human papillomavirus ไทป์ 18, SiHa มีการติดเชื้อของ Human papillomavirus ไทป์ 16 และ C33A ไม่มีการติดเชื้อ Human papillomavirus ส่วน HN4, HN12 และ HN17 ไม่ทราบลักษณะการติดเชื้อ และจากหัวข้อ 1.5 ทำให้ทราบว่ามีการติดเชื้อของ HPV ในเซลล์ชนิดใดบ้าง ต่อจากนั้นต้องการทราบว่าเซลล์ชนิดใดมีการติดเชื้อของ HPV type 16 และ 18 บ้าง ผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นการยืนยันผลลัพธ์จากหัวข้อ 1.5 อีกครั้งหนึ่ง ดังนั้นจึงทำการตรวจคัดกรองหา HPV type โดยใช้ลำดับเบส ของ HPV ในส่วน E6 และ E7 gene จาก HPV type 16 และ 18 มาออกแบบ primers ให้มีความจำเพาะต่อยีน HPV16-E6, HPV16-E7, HPV18-E6 และ HPV18-E7 จากฐานข้อมูลใน Pubmed ของ NCBI จากนั้นทำการสกัด mRNA จากเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิดและเปลี่ยนให้เป็น cDNA ตามหัวข้อ 1.4.1 แล้วนำมาทำการเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการ PCR

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer HPV16-E6, HPV16-E7, HPV18-E6 และ HPV18-E7

ตำแหน่งของยีน	ชื่อ	ลำดับเบสของ primer (5'-3')
E6	HPV16-E6	GCAAGCAACAGTTACTGCTGCGAC GCTTTTCTTCAGGACACAGTGG
	HPV18-E6	TATACCCCATGCTGCATGCCA CGGTTGCAGCAGGAATGGC
E7	HPV16-E7	GGGCAATTAAATGACAGCTCAG GTGTGCTTTGTACGCACAACC
	HPV18-E7	GTATTGCATTTAGAGCCCC GTTCAGAAACAGCTGCTGG

ตารางที่ 6 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจ HPV type

สารเคมี	E6 gene		E7 gene	
	HPV16-E6	HPV18-E6	HPV16-E7	HPV18-E7
10x PCR buffer	2.0 ul	2.0 ul	2.0 ul	2.0 ul
10 mM dNTP	0.4 ul	0.4 ul	0.4 ul	0.4 ul
5 U/μl Hot Start <i>Taq</i> polymerase	0.2 ul	0.2 ul	0.2 ul	0.2 ul
Distilled water	14.6 ul	14.6 ul	14.6 ul	14.6 ul
(F) HPV16-E6	0.4 ul	-	-	-
(R) HPV16-E6	0.4 ul	-	-	-
(F) HPV18-E6	-	0.4 ul	-	-
(R) HPV18-E6	-	0.4 ul	-	-
(F) HPV16-E7	-	-	0.4 ul	-
(R) HPV16-E7	-	-	0.4 ul	-
(F) HPV18-E7	-	-	-	0.4 ul
(R) HPV18-E7	-	-	-	0.4 ul
cDNA (แยกชนิด ละหลอด)	2.0 ul	2.0 ul	2.0 ul	2.0 ul
ปริมาตรรวม	20 ul	20 ul	20 ul	20 ul

ตารางที่ 7 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR

ในส่วนของยีน HPV16-E6, HPV16-E7, HPV18-E6 และ HPV18-E7

PCR cycle	E6 gene		E7 gene	
	HPV16-E6	HPV18-E6	HPV16-E7	HPV18-E7
Pre-denaturation	95 °C, 10 นาที	95 °C, 10 นาที	95 °C, 10 นาที	95 °C, 10 นาที
Denaturation	95 °C, 1 นาที	95 °C, 1 นาที	95 °C, 1 นาที	95 °C, 1 นาที
Annealing	52 °C, 1 นาที	57 °C, 1 นาที	51 °C, 1 นาที	47 °C, 1 นาที
Extension	72 °C, 1 นาที	72 °C, 1 นาที	72 °C, 1 นาที	72 °C, 1 นาที
Cycles	ทำซ้ำขั้นตอน Denaturation - Extension 30 รอบ			
Final Extension	72 °C, 7 นาที	72 °C, 7 นาที	72 °C, 7 นาที	72 °C, 7 นาที

ดำเนินการปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) ตามภาวะการณ์ทำปฏิกิริยาที่กำหนดไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการทำ agarose electrophoresis โดยใช้ agarose ความเข้มข้น 2% ผสมเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 55 นาที แล้วตรวจดูแถบ DNA ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร (ใช้เครื่อง Gel Doc ของบริษัท Bio-Rad)

2. การตรวจสอบเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน CCNA1

2.1 การตรวจสอบเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน CCNA1

ทำการวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน CCNA1 โดยใช้เทคนิค Methylation specific-PCR (MSP) ในขั้นแรกทำการสกัด genomic DNA จากเซลล์ทุกชนิด ตามหัวข้อ 1.3 จากนั้นนำ DNA มาทำ sodium bisulfite treatment โดยมีขั้นตอน ดังนี้

2.1.1 การทำ sodium bisulfite treatment

ในขั้นแรกเตรียมสาร 10 mM Hydroquinone (Sigma: H-9003) และ 3M Sodium bisulfate ซึ่งสารทั้งสองนี้ จะต้องเตรียมใหม่ก่อนทุกครั้งที่ทำปฏิกิริยา

- เติมสาร Hydroquinone 55 mg ลงใน dH₂O 50 มิลลิลิตร (เพื่อปฏิกิริยา deamination)
- เติมสาร Sodium bisulfite 3.76 มิลลิกรัม ลงใน dH₂O 10 มิลลิลิตร (เพื่อปฏิกิริยา sulphonation) และปรับ pH 5 ด้วย NaOH

ขั้นการเตรียม DNA โดยต้องการความเข้มข้นของ DNA 40 ng/ul ในปริมาตรรวมของ Distilled water 50 ul ยกตัวอย่างเช่น

Example วัดค่าความเข้มข้นของ DNA ได้ 1,000 ng/ul ใช้สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$(1,000) V_1 = (40) (50)$$

$$V_1 = 2 \text{ ul}$$

ดังนั้น เตรียม DNA 2 ul และเติมน้ำไปอีก 48 ul ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ul

จากนั้นจึงเติมสารละลาย 2M NaOH ปริมาณ 5.5 ลงใน DNA (เพื่อทำให้ dsDNA เป็น ssDNA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลาย 10mM Hydroquinone ปริมาณ 30 ul (สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง) แล้วจึงเติมสารละลาย sodium bisulfite ปริมาณ 520 ul (สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีใส) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำ DNA ที่ผ่าน sodium bisulfate ไปผ่านขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมเครื่อง pump เสียบ column วางลงบนเครื่องดูดอากาศ จากนั้นสวม syringe และเปิด pump (purify DNA)
2. เติม Wizard Tm resin ปริมาณ 1 ml ผสมโดยใช้ปิเปตต์
3. ปิเปตต์สารละลายทั้งหมดในข้อ 2. ใส่ใน syringe เปิดเครื่องแล้วรอจนของเหลวไหลลงหมดจึงปิดเครื่อง จากนั้นล้างด้วย 80% isopropanol ปริมาณ 2 ml เปิดเครื่องแล้วรอจนของเหลวไหลลงหมดจับเวลา 30 วินาทีจึงปิดเครื่อง
4. วาง column บน Eppendorf นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 3 นาที
5. เปลี่ยน Eppendorf ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรใหม่ ล้างด้วย 95°C H₂O ปริมาณ 50 ul นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 20 วินาที ดีเอ็นเอจะย้ายลงมาอยู่ใน Eppendorf
6. เติม 3M NaOH ปริมาณ 5.5 ul บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
7. เติม glycogen 20 ng/ul ปริมาณ 2 ul
8. เติม 10M NH₄OAc ปริมาณ 20 ul และ 100% EtOH ปริมาณ 200 ul ผสมให้เข้ากัน
9. บ่มที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
10. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนบนทิ้ง

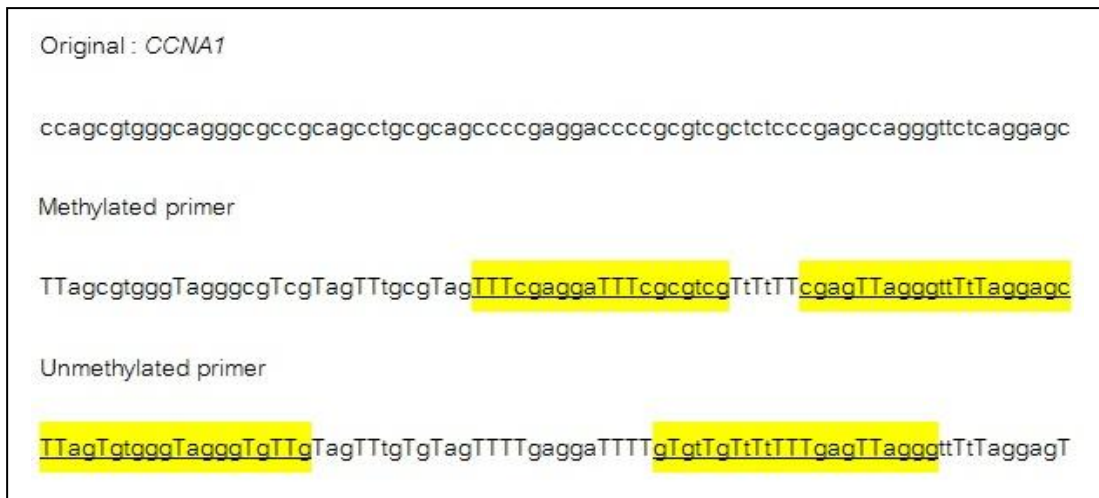
11. เติม 70% EtOH ปริมาณ 200 ul ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
12. เทส่วนบนทิ้งแล้วคว่ำ Eppendorf ไว้ที่อุณหภูมิห้องรอจนแห้ง
13. เติม dH₂O ปริมาณ 20 ul เพื่อละลาย DNA
14. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที
15. เก็บ DNA ที่อุณหภูมิ -20 °C

2.1.2 การออกแบบ primer สำหรับ Methylation specific-PCR (MSP)

การออกแบบ primers เพื่อทดสอบการเกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* จะต้องออกแบบ primers ด้วยกันทั้งหมด 4 เส้น 2 เส้นแรก คือ สาย Forward และ Reverse ของเส้น DNA แม่แบบ ที่เกิด Methylation จะเรียกคู่ primers นี้ว่า “Methylated primer” ส่วน 2 เส้นหลัง คือ สาย Forward และ Reverse ของเส้น DNA แม่แบบ ที่ไม่เกิด Methylation จะเรียกคู่ primers นี้ว่า “Unmethylated primer” และในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) จะใช้ primers ทั้ง 2 คู่นี้ในการทำปฏิกิริยา (duplex PCR) และจะถือว่า PCR product ของทั้ง 2 primers นั้นรวมกันจะเป็น 100% วิธีการออกแบบ มีดังนี้

- หาตำแหน่งของโปรโมเตอร์ ณ บริเวณ 5'UTR ที่อยู่ up stream ของยีน *CCNA1* ขึ้นไป ซึ่งในบริเวณใดที่มี CpG islands สูง จะคาดว่าน่าจะเป็นตำแหน่งของโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*
- นำเอาลำดับ sequence โปรโมเตอร์ทั้งหมดมาใส่ลงในโปรแกรม Text editor
- เปลี่ยนเบส C ทุกตัวให้เป็นเบส T ยกเว้นเบส C ที่อยู่ติดกับ G (CG) จากนั้น เปลี่ยน CG ให้เป็น XG และเปลี่ยน C ทุกตัวให้เป็น T สุดท้ายเปลี่ยน X ทุกตัวให้เป็น C ก็จะได้ sequence ที่เป็น methylated map
- เปลี่ยนเบส C ทุกตัวให้เป็นเบส T ก็จะได้ sequence ที่เป็น unmethylated map
- ออกแบบ primers ทั้ง 2 คู่ ณ ตำแหน่งที่มี CG rich ด้วย methylated และ unmethylated map ที่สร้างขึ้น

Primer ที่ออกแบบกับยีน *CCNA1* จะเป็นดังภาพที่ 13



รูปที่ 14 แสดงการออกแบบคู่ primers Methylated และ Unmethylated ของยีน *CCNA1* โดย sequence บรรทัดที่ 2 บริเวณแถบสีและขีดเส้นใต้คือ Methylated primer sequence บรรทัดที่ 3 บริเวณแถบสีและขีดเส้นใต้คือ Unmethylated primer

นำ DNA ที่ผ่าน sodium bisulfate จากข้อ 2.1.1 มาทำการเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primers 2 คู่ คือ Met-*CCNA1* และ Unmet-*CCNA1* (Duplex PCR)

ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ primers Met-*CCNA1* และ Unmet-*CCNA1*

ตำแหน่งของยีน	ชื่อ	ลำดับเบสของ primer (5'-3')
CCNA1	(F) Met- <i>CCNA1</i>	TTTCGAGGATTTTCGCGTCG
	(R) Met- <i>CCNA1</i>	GCTCCTAAAAACCCTAACTCG
	(F) Unmet- <i>CCNA1</i>	TTAGTGTGGGTAGGGTGTG
	(R) Unmet- <i>CCNA1</i>	CCCTAACTCAAAAAACAACAC

ตารางที่ 9 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ MSP-PCR เพื่อตรวจเมทิลเลชัน

บนโพรมิเตอร์ของยีน *CCNA1*

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10x PCR buffer	2.0	1X
2. 10 mM dNTP	0.4	0.2 mM
3. 10 μ M (F) Met- <i>CCNA1</i>	0.3	0.14 μ M
4. 10 μ M (R) Met- <i>CCNA1</i>	0.3	0.14 μ M
5. 10 μ M (F) Unmet- <i>CCNA1</i>	0.3	0.14 μ M
6. 10 μ M (R) Unmet- <i>CCNA1</i>	0.3	0.14 μ M
7. 5 U/ μ l Hot <i>Taq</i> polymerase	0.3	1.5 U
8. Distilled water	14.1	
9. cDNA (แยกชนิดละหลอด)	2.0	
ปริมาตรรวมทั้งหมด	20.0	

และดำเนินการทำการทำปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

Pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C	10 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C	1 นาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ	53 °C	1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ	72 °C	1 นาที	
Final Extension	ที่อุณหภูมิ	72 °C	7 นาที	

ดำเนินการปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) ตาม
 ภาวะการทำปฏิกิริยาที่กำหนดไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการทำ Polyacrylamide gel
 electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้น 2% polyacrylamide กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 55 นาที
 แล้วนำ gel ที่ได้ไปย้อม cyber green ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยเครื่อง Storm 840 และ
 ImageQuaNT software

2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1*

ทำการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *CCNA1* ในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อคัดเลือกเซลล์ที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป โดยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ยีน *GAPDH* เป็นตัวควบคุม เริ่มโดยการสกัด mRNA จากเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิด คือ เซลล์ HeLa, SiHa, C33A, HN4, HN12 และ HN17 และเปลี่ยนให้เป็น cDNA ตามหัวข้อ 1.4.1 โดยออกแบบ primers ให้มีความจำเพาะต่อยีน *CCNA1* และ *GAPDH* จากฐานข้อมูลใน Pubmed ของ NCBI แล้วนำมาทำการเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primer ทั้ง 2 คู่ พร้อมกันเป็น Duplex PCR

ตารางที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer *CCNA1* และ *GAPDH*

ตำแหน่งของยีน	ชื่อ	ลำดับเบสของ primer (5'-3')
CCNA1	(F) <i>CCNA1</i>	ATTCATTAAGTGAAATTGTGC
	(R) <i>CCNA1</i>	CTCCATTCAGAACTTTTG
GAPDH	(F) <i>GAPDH</i>	GTGGGCAAGGTATCCCTG
	(R) <i>GAPDH</i>	GATTCAGTGTGGTGGGGGAC

ตารางที่ 11 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจการแสดงออกของยีน *CCNA1*

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10x PCR buffer	2.0	1X
2. 10 mM dNTP	0.4	0.2 mM
3. 10 μ M (F) <i>CCNA1</i>	0.4	0.18 μ M
4. 10 μ M (R) <i>CCNA1</i>	0.4	0.18 μ M
5. 10 μ M (F) <i>GAPDH</i>	0.4	0.18 μ M
6. 10 μ M (R) <i>GAPDH</i>	0.4	0.18 μ M
7. 5 U/ μ l Hot <i>Taq</i> polymerase	0.2	1.0 U
8. Distilled water	13.8	
9. cDNA (แยกชนิดละหลอด)	2.0	
ปริมาตรรวมทั้งหมด	20.0	

และดำเนินภาวะการทำปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

Pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C	10 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C	1 นาที	} 30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ	47 °C	1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ	72 °C	1 นาที	
Final Extension	ที่อุณหภูมิ	72 °C	7 นาที	

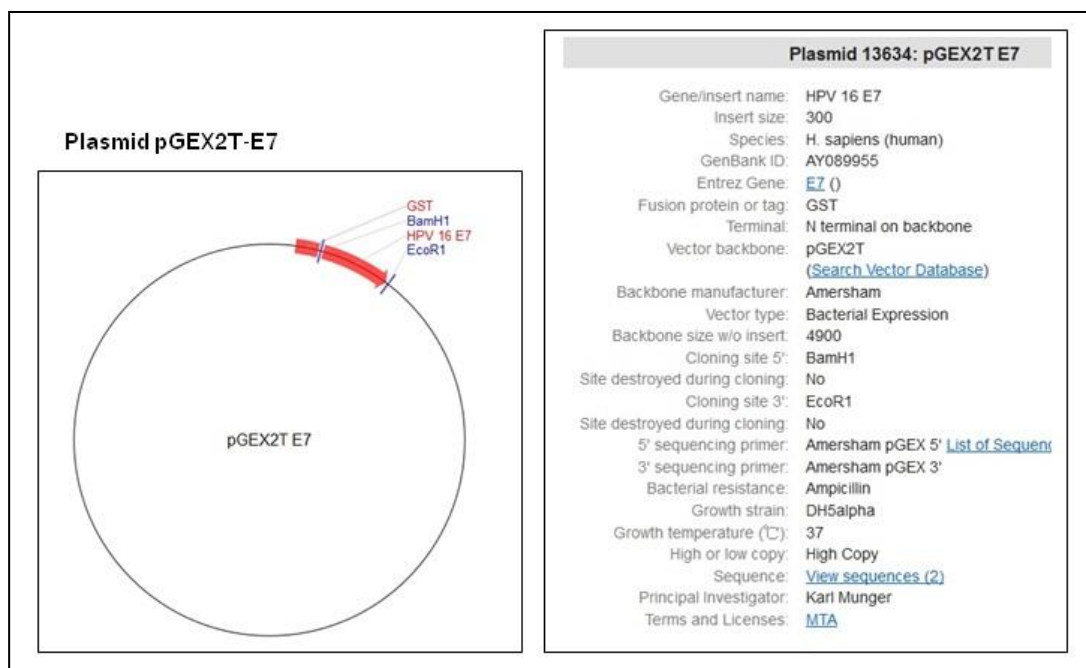
ดำเนินปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) ตามภาวะการทำปฏิกิริยาที่กำหนดไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการทำให้ agarose electrophoresis โดยใช้ agarose ความเข้มข้น 2% ผสมเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 55 นาที แล้วตรวจดูแถบ DNA ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร (ใช้เครื่อง Gel Doc ของบริษัท Bio-Rad)

3. การสร้าง recombinant plasmid ของยีน E7 ของ HPV ไทป์ 16

ขั้นตอนนี้เป็นการนำยีน E7 ของ HPV type 16 มาตัดต่อเข้ากับ mammalian expression vector ที่ชื่อ pcDNA 3.1/myc-His A โดยขณะที่ภายในแล็บของคณะวิจัยมีพลาสมิดที่เป็น bacterial expression vector ที่ชื่อ pGEX2T E7 พลาสมิดตัวนี้อยู่ในแบคทีเรีย DH5 α ซึ่งพลาสมิดตัวนี้มียีนที่เป็น full length ของ E7 HPV type 16 อยู่ ดังนั้นจึงตัดสินใจนำยีน E7 จากพลาสมิด pGEX2T E7 นี้ออกมา และตัดต่อเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pcDNA 3.1/myc-His A นี้ อีกทีหนึ่ง โดยก่อนหน้านั้นจะทำ mutagenesis ในส่วนของปลายลำดับเบสด้าน 3' ที่เป็น stop codon ให้มีลำดับเบสอื่นที่ไม่ใช่เป็นตัวหยุด

3.1 โครงสร้างของ pGEX2T E7 vector

โครงสร้างของ pGEX2T E7 vector เป็นพลาสมิดชนิด bacterial expression ซึ่งมีโปรโมเตอร์สำหรับการแสดงออกในยีนที่แทรกเข้าไป ในเซลล์ของแบคทีเรียและสามารถติดตามการสร้างโปรตีนของยีนที่แทรกเข้าไปได้ เนื่องจากมีโปรตีน GST ติดอยู่ ดังแสดงในรูปที่ 15 ซึ่งระหว่างยีน E7 จะมีตำแหน่งจุดจำกัดของเอนไซม์ EcoRI และ BamHI อยู่ แต่ทว่างานวิจัยในครั้งนี้อาจต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน E7 ของ HPV 16 กับยีน CCNA1 ที่แสดงออกในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cell) ฉะนั้นจะนำพลาสมิดที่มี E7 อยู่เข้าไปในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่ได้ เพราะพลาสมิดนี้ไม่มีโปรโมเตอร์ในการแสดงออกของยีนที่แทรกเข้าไปในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั่นเอง



รูปที่ 15 โครงสร้างของพลาสมิด pGEX2T E7 และคุณสมบัติที่สำคัญ

3.2 การตรวจสอบยีน E7 ในพลาสมิด pGEX2T E7

เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่ายีน E7 ในพลาสมิด pGEX2T E7 นั้น มียีน E7 ของ HPV 16 อยู่จริง และลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนถูกต้องหรือไม่ โดยเริ่มแรกทำการสกัดพลาสมิดออกมา แล้วใช้ universal primer ที่ชื่อ pGEX5 primer และ pGEX3 primer เป็นการตรวจสอบ โดยการส่ง DNA sequencing ที่บริษัท Macrogen แล้วนำผล sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ E7 HPV 16 จริงๆเทียบกัน โดยหาข้อมูลจากฐานข้อมูลใน Pubmed ของ NCBI ได้ E7 HPV type 16 ที่มี Reference number คือ NC_001526 ดังรูปที่ 16

E7 Human papillomavirus type 16, complete genome
 NCBI Reference Sequence: NC_001526.2 hg19
LOCUS NC_001526 297 bp DNA linear VRL 27-OCT-2010

ORIGIN

```

1 atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgtag atttgcacc agagacaact
61 gatctctact gttatgagca attaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt
121 ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttggtgcaag
181 tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtaaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa
241 gacctgttaa tggggcacact aggaattgtg tgccccatct gttctcagaa accaLaa
    
```

รูปที่ 16 ลำดับเบสของยีน E7 HPV type 16

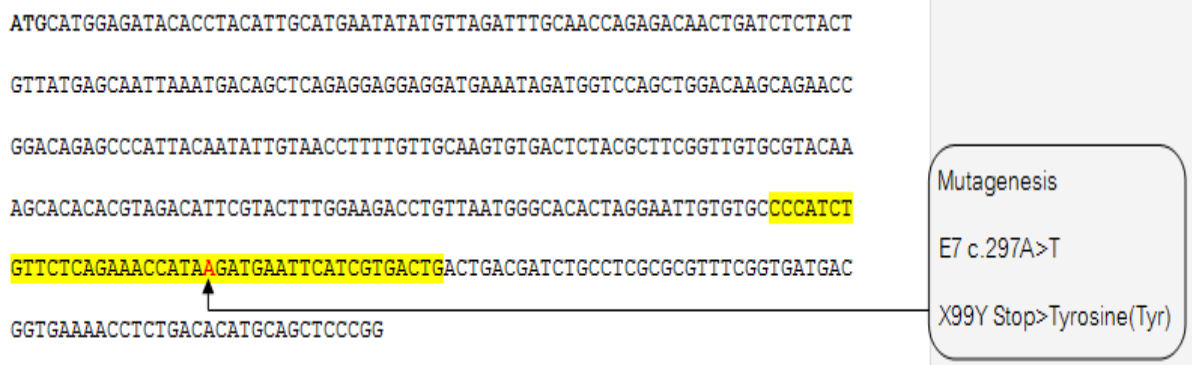
3.2.1 การสกัดพลาสมิด

สกัดพลาสมิดด้วย High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) มีขั้นตอนดังนี้ นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (LB broth) ที่เลี้ยงแบคทีเรียไว้เป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง แบ่งใส่หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งของเหลวออกไป เติม PD buffer ที่ผสม RNase A ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆโดยพลิกหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายใส แล้วค่อยเติม PD3 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ระหว่างที่รอให้นำ PD column ใส่ใน Collection Tube ขนาด 2 มิลลิลิตร เมื่อบั่นตกตะกอนเสร็จให้ดูเฉพาะของเหลวด้านบนในหลอด ใน PD Column แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน Collection Tube แล้วนำไปรองใส่กับ PD column ตามเดิม จากนั้นเติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน Collection Tube แล้วนำไปรองกับ PD Column ตามเดิม จากนั้นเติม Wash buffer ที่ผสมกับเอทานอลเรียบร้อยแล้ว ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่

ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาทีอีกครั้ง เพื่อให้ PD Column แห้ง จากนั้นค่อยย้าย PD Column มาใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่สำหรับเก็บพลาสมิดที่ต้องการ โดยเติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงกลาง PD Column ตั้งทิ้งไว้ อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีแล้วเสร็จ

3.3 การทำ Mutagenesis

สกัดพลาสมิด pGEX2T E7 จากแบคทีเรีย DH5 α ตามหัวข้อ 3.2.1 จากนั้นออกแบบ primer เพื่อทำ mutagenesis เพื่อเปลี่ยนลำดับเบสของ stop codon TAA ให้กลายเป็นลำดับเบสของโปรตีน tyrosine ดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 การเปลี่ยนลำดับเบส stop codon > Tyrosine โดย ข้อความในกรอบสี่เหลี่ยมมีลูกศรชี้ แสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของนิวคลีโอไทด์ แถบสี แสดงตำแหน่งของบริเวณที่มีการออกแบบ primers

คู่ primers ที่ใช้ คือ

E7mut_c.297A>T-F_ CCCATCTGTTCTCAGAAACCATATGATGAATTCATCGTGACTG

E7mut_c297A>T-R_ CAGTCACGATGAATTCATCATATGGTTTCTGAGAACAGATGGG

ตารางที่ 12 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR mutagenesis

ชนิดของสาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
1. 10X reaction buffer	5.0 ul
2. plasmid template (10 ng)	1.0 ul
3. dNTPs mix	1.0 ul
4. Quick Solution Reagent	1.5 ul
5. (125ng) primer E7mut_c.297A>T-F	0.9 ul
6. (125ng) primer E7mut_c297A>T-R	0.9 ul
7. Distilled water	39.7 ul
ปริมาณรวมทั้งหมด	50 ul
หลังจากนั้นเติม QuikChange Lightning Enzyme 1 ul	

และดำเนินการทำปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

Pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C	2 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C	20 วินาที	} 18 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ	60 °C	10 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ	68 °C	2 นาที 40 วินาที	
Final Extension	ที่อุณหภูมิ	68 °C	5 นาที	

หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาเติมเอนไซม์ DpnI ปริมาณ 2 ul และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อขจัดวงพลาสมิด wildtype เดิมที่ไม่ถูก mutagenesis ออกไป สุดท้ายแล้ว PCR product ที่ได้จะมีแต่วงพลาสมิดที่มียีน E7 ผ่านการ mutagenesis แล้วเท่านั้น

3.4 การตรวจสอบความถูกต้องของการทำ Mutagenesis

ภายหลังจากการทำ mutagenesis แล้ว เราต้องการที่จะเพิ่มปริมาณพลาสมิดที่ได้ โดยการนำ PCR product จากหัวข้อ 3.3 มา transform เข้าสู่แบคทีเรีย XL1-Blue super competent และคัดเลือกโคโลนีโดยใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่ผสมกับยาต้านเชื้อ ampicillin ในอัตราส่วน 1 : 1,000 ซึ่งใช้เป็น marker ในการคัดเลือก ทำให้เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเข้าไปเท่านั้น ถึงจะเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ได้ เนื่องจากภายในโครงสร้างของพลาสมิด pGEX2T E7 มียีนต้านยา ampicillin อยู่ จากนั้นคัดเลือกโคโลนีมาทำ PCR โดยใช้คู่ primer pGEX5 และ pGEX3 ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน E7 ในพลาสมิด pGEX2T E7 ดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 ตำแหน่ง primer pGEX5 และ pGEX3 ที่อยู่ระหว่างยีน E7 ในพลาสมิด pGEX2T E7

โดย อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ แสดงตำแหน่งของบริเวณยีน E7

ลูกศร แสดงตำแหน่งของบริเวณ primers pGEX5 และ pGEX3

ตารางที่ 13 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR primer pGEX5 และ pGEX3

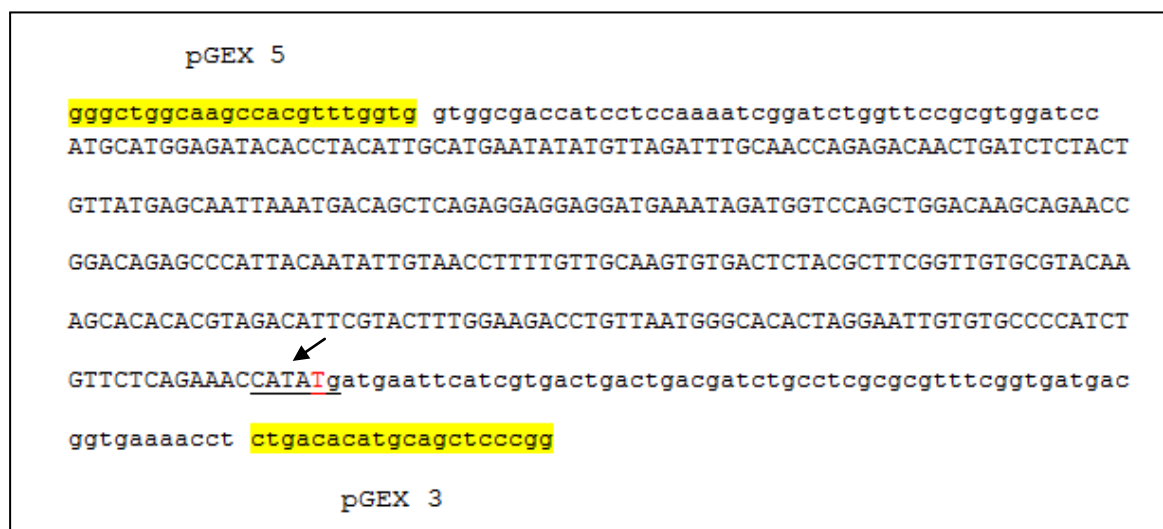
ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. 10X reaction buffer	2.0
2. dNTPs mix	0.4
3. hot start Taq	0.2
4. primer pGEX5	0.4
5. primer pGEX3	0.4
6. Distilled water	16.6
ปริมาตรรวม	20

ใช้ plasmid template โดยการสกัดแบคทีเรียจากโคโลนีที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่ผสม ampicillin มาทั้งหมด 10 โคโลนี มาละลายลงใน mixture PCR รวมทั้งใช้ positive control เป็นโคโลนีแบคทีเรีย DH5 α ที่มีพลาสมิดเป็น wildtype pGEX2T E7

และดำเนินภาวะการทำปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

Pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C	10 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C	1 นาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ	59 °C	1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ	72 °C	1 นาที	
Final Extension	ที่อุณหภูมิ	72 °C	7 นาที	

หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องของตำแหน่ง mutagenesis ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I ซึ่งมีตำแหน่งจดจำเป็น CATATG ดังรูปที่ 19 ซึ่งถ้าเอนไซม์ *Nde*I สามารถตัดได้ ย่อมแสดงว่าตำแหน่งของ mutagenesis มีความถูกต้องนั่นเอง



รูปที่ 19 แสดงตำแหน่งการตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Nde*I ที่ตำแหน่ง mutagenesis

โดย อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ แสดงตำแหน่งของบริเวณยีน E7

ลูกศรและบริเวณที่ขีดเส้นใต้ แสดงตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Nde*I

แถบสี แสดงตำแหน่งของบริเวณ primers pGEX5 และ pGEX3

ตารางที่ 14 ส่วนผสมที่ใช้ในการตรวจสอบตำแหน่ง mutagenesis ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์

ชนิดของสาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
1. 20U/ul NdeI	1.0
2. 10xNEB4 buffer	2.0
3. Distilled water	12.0
4. PCR product	5.0
ปริมาตรรวม	20.0

ปมไว้ที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นนำ product ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ NdeI มารันดูแบนด้วยวิธี agarose electrophoresis โดยใช้ agarose ความเข้มข้น 2% ผสมเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 55 นาที แล้วตรวจดูแถบ DNA ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร (ใช้เครื่อง Gel Doc ของบริษัท Bio-Rad) สังเกตดูแบนที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ ถ้าตัดได้ แสดงว่าตำแหน่ง mutagenesis มีความถูกต้อง จากนั้นจึง select colony ที่ถูกต้องลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ LB broth และทำการสกัด plasmid ออกมาเพื่อยืนยันความถูกต้องด้วย DNA sequencing กับบริษัท Macrogen โดยใช้คู่ primer เดิมคือ pGEX5 และ pGEX3 อีกครั้งหนึ่ง

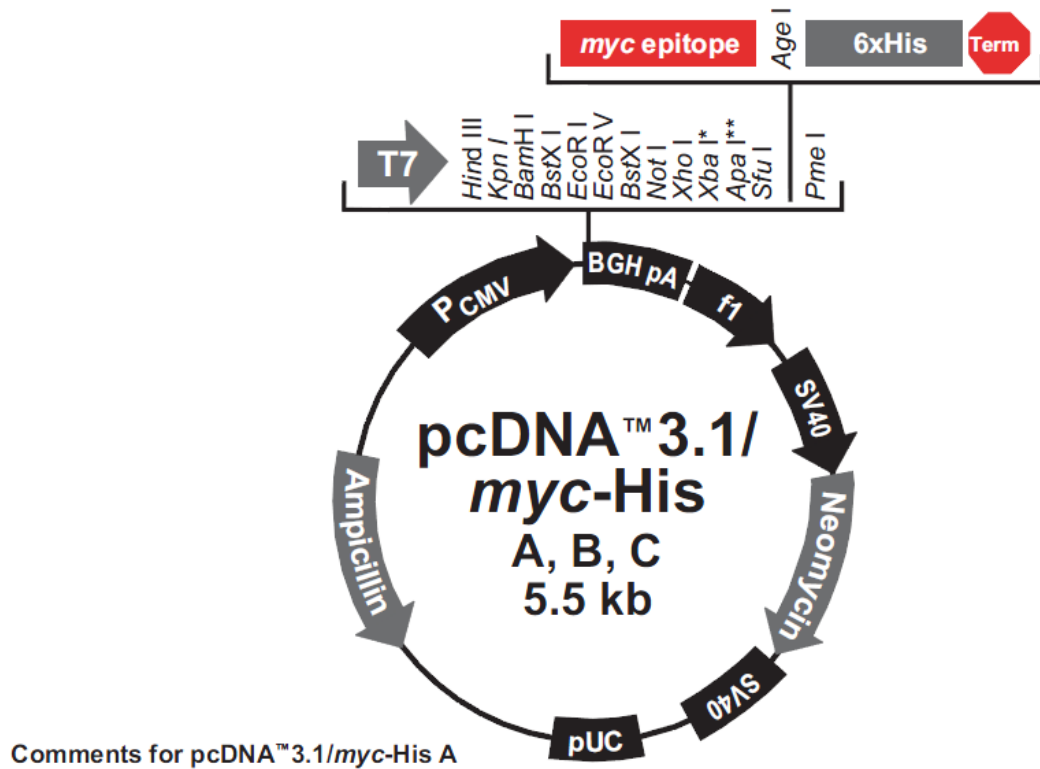
3.5 การสร้างพลาสมิดสำหรับการทำ transfection

ขั้นตอนนี้เป็น การนำยีน E7 ที่ผ่านการทำ mutagenesis จากพลาสมิด pGEX2T E7 เข้าสู่ expression vector (pcDNA 3.1/myc-His A) เพื่อนำพลาสมิดที่ได้ transfect เข้าสู่เซลล์ C33A และ HN12 ในขั้นต่อไป

3.5.1 โครงสร้างของ expression vector

พลาสมิด pcDNA 3.1/myc-His A เป็นพลาสมิดที่มีคุณสมบัติพิเศษคือ ออกแบบให้เป็นพลาสมิดที่มีการแสดงออกของยีนที่แทรกเข้าไปอยู่ในระดับที่สูงในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสามารถตรวจสอบโปรตีนที่ผลิตขึ้นจากยีนที่แทรกอยู่ในพลาสมิดนี้ได้ เนื่องจากมีโปรตีน myc หรือ His ติดอยู่ ดังแสดงในรูปที่ 20 ทำให้ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกหรือติดตามโปรตีนที่

เราสนใจในการวิจัยได้ง่าย โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ติดอยู่กับโปรตีนที่เราแทรกเข้าไปในการตรวจสอบ



รูปที่ 20 โครงสร้างของพลาสมิด pcDNA 3.1/myc-His A

3.5.2 การเชื่อมต่อยีน E7 เข้ากับ expression vector

นำ expression vector pcDNA 3.1/myc-His A และพลาสมิด pGEX2T E7 ที่ผ่านการทำ mutagenesis แล้ว มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *EcoRI* และ *BamHI* เพื่อตัดให้มีปลายที่สามารถเชื่อมต่อกันได้ ระหว่างยีน E7 ที่ต้องการแทรกเข้าไปกับ expression vector โดยเตรียมส่วนผสมต่างๆ ดังตารางที่ 15 นำไปปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปทำ electrophoresis บน agarose gel 1% ที่ย้อมด้วย ethidium bromide ใช้ความต่างศักย์ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gel Doc

ตารางที่ 15 ส่วนผสมที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สำหรับเตรียมตัดต่อยีน E7 เข้ากับ expression vector

ชนิดของสาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	
	พลาสมิด pGEX2T E7 (mutagenesis)	พลาสมิด pcDNA 3.1/myc-His A
1. 20U/ul <i>Bam</i> HI	1.5	1.5
2. 20U/ul <i>Eco</i> RI	1.5	1.5
3. 10X buffer3	2.0	2.0
4. 100xBSA	0.2	0.2
5. Distilled water	4.8	9.8
6. พลาสมิด pGEX2T E7	10.0	-
7. pcDNA 3.1/myc-His A	-	5.0
ปริมาตรรวมทั้งหมด	20.0	20.0

เมื่อปรากฏแถบ DNA ที่ต้องการทั้งหมด 2 แถบ คือ แถบ DNA ของยีน E7 และแถบ DNA ของ expression vector จึงตัดเจลในแต่ละบริเวณมาสกัด DNA จากเจล เมื่อเสร็จแล้วจึงนำสารละลายทั้ง 2 ชนิดไปทำ electrophoresis เพื่อตรวจสอบผลจากการสกัดและดูความเข้มของสารละลายที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้น ladder เมื่อทราบความเข้มข้นแล้ว จึงนำสารละลายทั้ง 2 มาทำ Ligation เพื่อเชื่อมต่อยีน E7 เข้ากับ expression vector pcDNA 3.1/myc-His A โดยเตรียมสารผสมต่างๆแสดงดังตารางที่ 16 แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

ตารางที่ 16 ส่วนผสมที่ใช้ในการ Ligation ระหว่างยีน E7 กับ expression vector

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. T4 DNA ligase	1.0
2. 10x T4 DNA ligase buffer	2.5
3. Distilled water	0.5
4. Insert	15.0
5. vector	6.0
ปริมาตรรวมทั้งหมด	25.0

หลังจากนั้นทำ Transformation นำ recombinant plasmid pcDNA3.1_E7 เข้าไปใน เซลล์แบคทีเรีย และเลือก colony มาตรวจสอบ ยีน E7 โดยการทำให้ PCR แต่คราวนี้จะใช้คู่ primers จากในหัวข้อ 1.6 คือ (F) HPV16-E7 และ (R) HPV16-E7 แทน และภายหลังจาก ตรวจสอบแถบ DNA ของยีน E7 ที่ขึ้นแล้ว จึงกลับไป pick colony แบคทีเรียโคลนที่แน่ใจว่ามียีน E7 มาเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth และทำการสกัดพลาสมิด เพื่อส่ง sequencing เป็นครั้งสุดท้าย โดยใช้ universal primer ที่มีอยู่ใน pcDNA 3.1/myc-His A นั่นคือ T7 promoter

3.6 การทำ Transfection

การทำ Transfection ในงานวิจัยนี้จะทำในรูปแบบของ Stable transfection นั่นคือจะใช้ ระยะเวลาที่มากกว่าการทำ Transient transfection เนื่องจากเราต้องหาความสัมพันธ์ระหว่างยีน E7 HPV 16 กับการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีน CCNA1 เนื่องจากปกติแล้ว การทำ Transient transfection ส่วนมากจะใช้ในกรณีที่ต้องการแสดงออกของยีนเป็นส่วนใหญ่ โดยภายหลังจาก การ transfect ไปแล้วจะเก็บผลภายใน 24 - 72 ชั่วโมงเป็นหลัก ไม่ได้ไปถึงกระบวนการเกิด methylation ซึ่งล้วนแล้วเป็นกระบวนการที่อาจต้องใช้ระยะเวลาในการแสดงผล ซึ่งช่วงเวลานี้เอง เป็นสิ่งที่ไม่อาจรู้ได้ และข้อดีของการทำ Stable transfection ประการหนึ่ง นั่นคือ ผลลัพธ์ที่ได้ จะต้องคงอยู่ในรูปแบบเดิมตลอด และส่งผ่านไปในหลายๆทอดในการแบ่งเซลล์ของ cell cycle

การตรวจสอบผลของการ Transfection ใช้วิธีการคัดเลือกกลุ่มโคโลนีเซลล์ที่สามารถโตได้ ในอาหารที่ใส่ยา G418 (geneticin) ซึ่ง G418 จัดเป็น antibiotic ที่จะไป block การ synthesis

ของการสร้าง polypeptide ในช่วงของ elongation stage และมีผลทั้งในเซลล์ prokaryote และ eukaryote ยีนที่ต้าน antibiotic G418 คือ NEO (neomycin resistance) ซึ่งยีนนี้จะอยู่ใน expression vector pcDNA 3.1/myc-His A ที่ตัดต่อยีน E7 เข้าไป ดังนั้นเซลล์มะเร็ง C33A และ HN12 ที่ได้รับพลาสมิดเข้าไป ย่อมที่จะโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี G418 ได้ โดยปกติแล้ว G418 จะใช้เป็น marker ในการคัดเลือกของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นส่วนใหญ่และจะทำการคัดเลือกในช่วง range 400 - 1000 ug/ml ใช้เวลาทดสอบประมาณ 1 - 2 อาทิตย์ จากการวิจัยพบว่า ความเข้มข้นของ G418 ปริมาณยาที่ใช้น้อยสุดและจะทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ตายหมด ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ คือ ปริมาณยาที่ 700 ug/ml ส่วนเซลล์หู คอ จมูก HN12 ปริมาณยาที่ใช้น้อยสุดและจะทำให้เซลล์ตายหมดจะอยู่ที่ 400 ug/ml ดังนั้นภายหลังจากการทำ transfection พว expression vector pcDNA3.1_E7 เข้าสู่เซลล์ C33A และ HN12 แล้ว อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้กับเซลล์ C33A จะมีส่วนผสมของ G418 700 ug/ml ตลอดเวลา เช่นกันกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้กับเซลล์ HN12 จะมีส่วนผสมของ G418 400 ug/ml ตลอดเวลา

การทำ transfection เริ่มต้นจาก การ seed cell เพื่อเตรียมปริมาณเซลล์ให้พอเหมาะ โดย จะทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์นับเซลล์ (Heamocytometer) และคำนวณปริมาณของเซลล์ ให้พอเหมาะ กับ reagent Fugene HD และจำนวนพลาสมิด expression vector ในงานวิจัยใช้ หลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม และในแต่ละหลุมต้องการจำนวนเซลล์ 20,000 เซลล์ โดยในวันแรก ทำการ seed cell C33A และ HN12 ลงไปในจานเลี้ยงเซลล์ (96-well plate) เซลล์ละ 3 เพลท รวมทั้งสิ้น 6 เพลท จากนั้นนำเพลทที่ seed cell ไปใส่ในตู้เลี้ยงเซลล์ซึ่งมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวันถัดมาจึงวัด ปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิด ด้วยเครื่อง spectrophotometer (nanodrop) ซึ่ง plasmid ที่ใช้ในการ transfect ในครั้งนี้จะใช้ expression vector pcDNA3.1_E7 (เป็น vector ที่ตัดต่อยีน E7 ของ HPV 16 เข้าไป) ส่วนพลาสมิดที่ใช้เป็นตัวคอนโทรล คือ พลาสมิดเปล่า (empty vector) pcDNA 3.1/myc-His A ที่ไม่ได้ผ่านการตัดต่อยีนใส่เข้าไป ความเข้มข้นของพลาสมิดที่จะใช้ ภายใน 30 หลุม คือ 3.3 ไมโครกรัม นำพลาสมิดไปผสมกับ DMEM (ที่ไม่ใส่ antibiotic และ serum) ให้ได้ปริมาณรวมเป็น 155 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ Fugene HD transfection reagent ลงไป หลอดละ 10 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายไปหยอด

ใส่ในหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96-well plate ที่ทำการ seed cell ไว้ก่อนหน้านี้ แต่ละหลุม หลุมละ 5 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีแก๊สคาร์บอน 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงค่อยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ antibiotic G418 700 ug/ml สำหรับ C33A cell และ 400 ug/ml สำหรับ HN12 cell

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน E7 และ CCNA1

4.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตโปรตีน E7

การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน E7 ที่ transect เข้าไปในเซลล์ C33A และ HN12 โดยใช้ expression vector pcDNA3.1_E7 จะใช้วิธี western blot

4.1.1 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์ทั้ง 6 ชนิด ซึ่งประกอบไปด้วย

- C33A (เซลล์ C33A ปกติที่ไม่ได้ transfect)
- C33A_PC (C33A ที่ transfect empty vector pcDNA 3.1/myc-His A)
- C33A_E7 (C33A ที่ transfect pcDNA3.1_E7)
- HN12 (เซลล์ HN12 ปกติที่ไม่ได้ transfect)
- HN12_PC (HN12 ที่ transfect empty vector pcDNA 3.1/myc-His A)
- HN12_E7 (HN12 ที่ transfect pcDNA3.1_E7)

จึงเก็บเซลล์ใน RIPA buffer + 1x Protease inhibitor จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตก (sonication) โดยแช่ในน้ำแข็ง 3 วินาที สุดท้ายวัดปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมด ด้วยวิธี BCA assay โดยใช้ Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo, USA) โดยมีขั้นตอนเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 17 จากนั้นเตรียม working reagent (reagent A : B = 50 : 1) และนำ working reagent ไปผสมกับสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ และโปรตีนที่ต้องการวัด ในอัตราส่วน 20 : 1 แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer (micro plate reader) ซึ่งมีโปรแกรมอัตโนมัติในการคำนวณปริมาณโปรตีนของสารละลายที่ต้องการวัด โดยเทียบกับค่าที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน BSA

ตารางที่ 17 ส่วนผสมที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

Vial	Volume of Diluent	Volume of Source BSA	Final BS Concentration
A	0	300 ul of stock	2,000 ug/ml
B	125 ul	375 ul of stock	1,500 ug/ml
C	325 ul	325 ul of stock	1,000 ug/ml
D	175 ul	175 ul of vial B dilution	750 ug/ml
E	325 ul	325 ul of vial C dilution	500 ug/ml
F	325 ul	325 ul of vial E dilution	250 ug/ml
G	325 ul	325 ul of vial F dilution	125 ug/ml
H	400 ul	100 ul of vial G dilution	25 ug/ml
I	400 ul	0	0 ug/ml = Blank

4.1.2 การตรวจสอบการผลิตโปรตีน E7 โดย Western blot

ตรวจสอบโดยวิธี western blot โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ และเซลล์ที่ได้รับพลาสมาฉีดเปล่าเป็นกลุ่มควบคุม เซลล์ทั้ง 6 ชนิด ดังนี้ C33A, C33A_PC, C33A_E7, HN12, HN12_PC และ HN12_E7 เซลล์แต่ละชนิดอยู่ในสารละลาย RIPA buffer + 1X Protease inhibitor ทำให้เซลล์แตกโดย sonication จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูเฉพาะของเหลวที่อยู่ด้านบนไปวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนรวม ตามขั้นตอนในหัวข้อ 4.1.1 เพื่อนำมาคำนวณปริมาณโปรตีนที่จะนำมาโหลดเจล ซึ่งในแต่ละหลุมใส่โปรตีนรวม 40 ไมโครกรัม แล้วนำไปผสมกับ 1X loading buffer, 10% β -mercaptoethanol จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสก่อนเป็นเวลา 5 นาที เพื่อคลายสายโปรตีนให้อยู่ในรูป linear จากนั้นเตรียมแผ่นเจล โดยเตรียม separating gel 12% ไว้เป็นส่วนล่าง จากนั้นปรับระดับผิวหน้าเจลให้เรียบด้วย Distilled water ปล่อยให้ทิ้งไว้ 30 นาที ให้เจลแข็งตัว ในระหว่างที่เจลกำลังจะแข็งให้เตรียม stacking gel 4% ชั้นบนทับด้านบน separating gel โดยเติมลงไปให้ล้นแล้วใส่ comb ลงไปด้านบนเพื่อให้เกิดหลุมในแผ่นเจล ปล่อยให้ทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากที่เจลแข็ง จึงเริ่มทำ SDS-PAGE รันโปรตีนในแท่ง Running buffer โดยใช้ความ

ต่างศักย์ไฟฟ้า 130 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงทำการ transfer โปรตีนจากเจลสู่ PVDF membrane โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 0.2 Amp. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะน้ำแข็ง ล้อมรอบ เมื่อครบเวลาในการ transfer จึงนำ membrane ออกมาล้างด้วย block ด้วย 5% BSA ใน TBST ประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เสร็จแล้วล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที นำ membrane มาป่มด้วย primary antibody c - Myc Mouse map (invitrogen) ในอัตราส่วน 1 : 5,000 โดยผสมกับ 5% BSA ใน TBST 10 มิลลิลิตร ในหลอด Polypropylene ขนาด 50 มิลลิลิตร เทปม membrane ลงในถุงซิปล แล้วนำไปวางไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน (ประมาณ 16 - 18 ชั่วโมง) จากนั้นนำออกมาล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที เสร็จแล้วป่มด้วย secondary antibody Goat Anti-Mouse IgG3 (γ), HRP เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นนำไปส่องดูแบนโปรตีนด้วยเครื่อง Chemiluminescent โดยหยด substrate Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Thermo, USA) ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วปล่อยให้ทิ้งไว้ 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วค่อยเปิดแสง Trans white ส่องดูแบนโปรตีน เมื่อดูแบนของ myc-tag แล้วจึงนำเมมเบรนไปล้างด้วย 3M NaOH เมื่อล้างเอา antibody myc-tag ออก จากนั้นจึงเริ่มลง primary antibody Anti-beta Actin antibody [mAbcam 8226] (HRP) โดยทำเหมือนกับการลง primary antibody myc-tag

4.2 การตรวจสอบเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* เมื่อผ่านการทรานสเฟกต์ด้วย *E7*

ทำการทดลองซ้ำเหมือนในหัวข้อ 2.1 เพียงแต่เปลี่ยนเซลล์ที่ใช้เป็น C33A, C33A_PC, C33A_E7, HN12, HN12_PC และ HN12_E7 โดยดูเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ transfect ยีน *E7* เทียบกับกลุ่มคอนโทรลคือ เซลล์ปกติ และเซลล์ที่ transfect พลาสมิดเปล่า โดยดูที่ผลของเมทิลเลชัน ถ้าค่าเปอร์เซ็นต์แบบ DNA ของ Met กับ Unmet มีความต่างไปจากเดิม ก็น่าจะแสดงว่าผลของยีน *E7* HPV 16 มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการเกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ *CCNA1*

4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* เมื่อผ่านการทรานสเฟกต์ด้วย *E7* ทำการทดลองซ้ำเหมือนในหัวข้อ 2.2 เพียงแต่เปลี่ยนเซลล์ที่ใช้เป็น C33A, C33A_PC, C33A_E7, HN12, HN12_PC และ HN12_E7 โดยดูเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ transfect ยีน *E7* เทียบกับ กลุ่มคอนโทรลคือ เซลล์ปกติ และเซลล์ที่ transfect พลาสמידเปล่า โดยดูที่ผลของการแสดงออกของยีน *CCNA1* ถ้าค่าการแสดงออกของยีน *CCNA1* มีความต่างไปจากเดิม ก็น่าจะแสดงว่าผลของยีน *E7* HPV 16 มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในยีน *CCNA1*

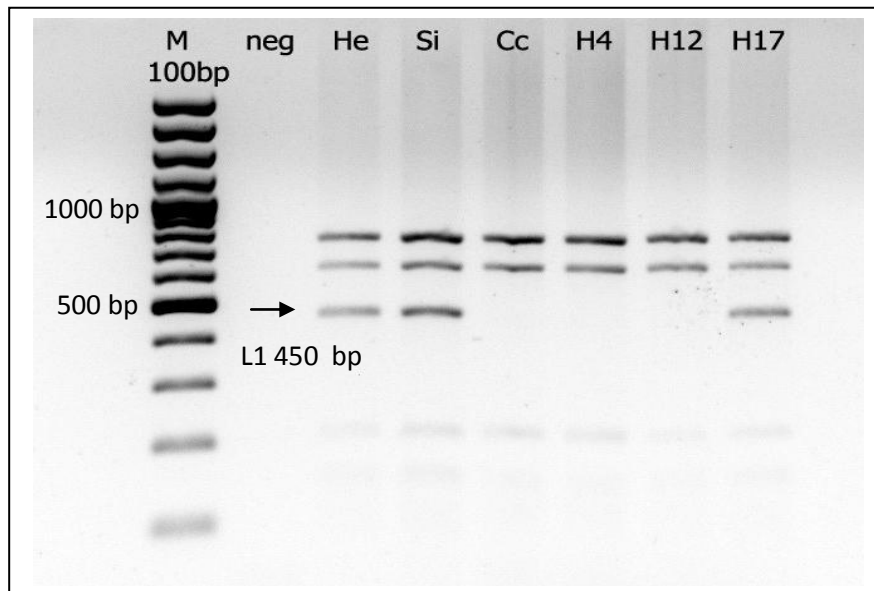
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การตรวจสอบการติดเชื้อ HPV

1.1 การตรวจหา HPV DNA ด้วยวิธี PCR

ในการตรวจสอบการติดเชื้อของ Human papillomavirus ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิด คือ เซลล์ HeLa, SiHa, C33A, HN4, HN12 และ HN17 โดยใช้ ลำดับเบส ของ HPV ในส่วน L1 gene ทำการเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primers คู่ที่มีการใช้ในการตรวจหาจีโนม HPV กันทั่วไป คือ MY09/MY11 การศึกษาที่ได้แสดงดังรูปที่ 21 และ ตารางที่ 18



รูปที่ 21 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ Human papillomavirus ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิด

โดย M คือ Marker, neg คือ negative control, He คือ เซลล์ HeLa,

Si คือ เซลล์ SiHa, Cc คือ เซลล์ C33A, H4 คือ เซลล์ HN4,

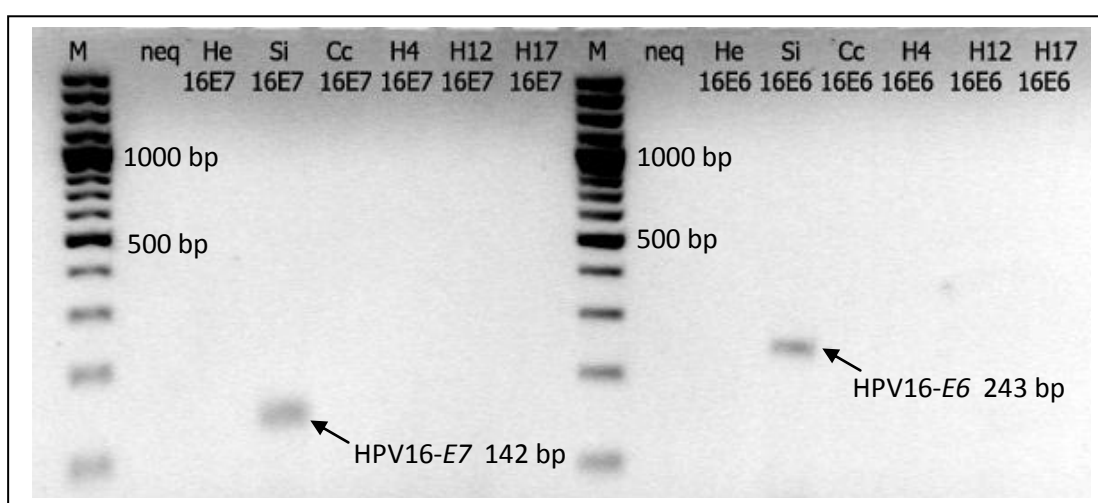
H12 คือ เซลล์ HN12 และ H17 คือ เซลล์ HN17

	HeLa	SiHa	C33A	HN4	HN12	HN17
L1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>

ตารางที่ 18 แสดงผลการตรวจสอบการติดเชื้อ Human papillomavirus ในเซลล์เพาะเลี้ยง ทั้ง 6 ชนิด

1.2 การตรวจหา HPV type ด้วยวิธี PCR

ในการตรวจสอบหา HPV type ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิด คือ เซลล์ HeLa, SiHa, C33A, HN4, HN12 และ HN17 โดยใช้ลำดับเบส ของ HPV ในส่วน E6 และ E7 gene จาก HPV type 16 และ 18 มาออกแบบ primers ให้มีความจำเพาะต่อยีน HPV16-E6, HPV16-E7, HPV18-E6 และ HPV18-E7 จากฐานข้อมูลใน Pubmed ของ NCBI แล้วนำมาทำการเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการ PCR การศึกษาที่ได้แสดงดังรูปที่ 22,23 และ ตารางที่ 19



รูปที่ 22 ผลการตรวจสอบหา HPV type ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิดโดยใช้คู่ primers HPV16-E7 และ HPV16-E6

โดย M คือ Marker, neg คือ negative control,

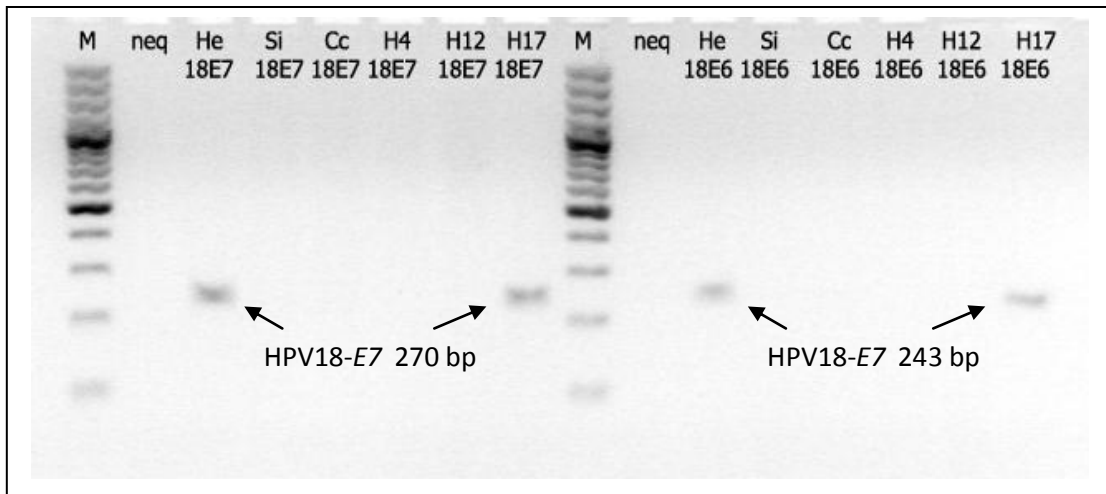
He คือ เซลล์ HeLa, Si คือ เซลล์ SiHa,

Cc คือ เซลล์ C33A, H4 คือ เซลล์ HN4,

H12 คือ เซลล์ HN12 และ H17 คือ เซลล์ HN17

ส่วนตัวเลขที่ระบุคู่ตัวอักษร 16E7 คือ primer HPV16-E7 ที่ใช้ในการทำ PCR

ตัวเลขที่ระบุคู่ตัวอักษร 16E6 คือ primer HPV16-E6 ที่ใช้ในการทำ PCR



รูปที่ 23 ผลการตรวจสอบหา HPV type ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิดโดยใช้คู่ primers HPV18-E7 และ HPV18-E6

โดย M คือ Marker, neg คือ negative control,

He คือ เซลล์ HeLa, Si คือ เซลล์ SiHa,

Cc คือ เซลล์ C33A, H4 คือ เซลล์ HN4,

H12 คือ เซลล์ HN12 และ H17 คือ เซลล์ HN17

ส่วนตัวเลขที่ระบุคู่ตัวอักษร 18E7 คือ primer HPV18-E7 ที่ใช้ในการทำ PCR

ตัวเลขที่ระบุคู่ตัวอักษร 18E6 คือ primer HPV18-E6 ที่ใช้ในการทำ PCR

ตารางที่ 19 ผลการตรวจสอบหา HPV type ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชนิดโดยใช้คู่ primers HPV16-E7, HPV16-E6, HPV18-E7 และ HPV18-E6

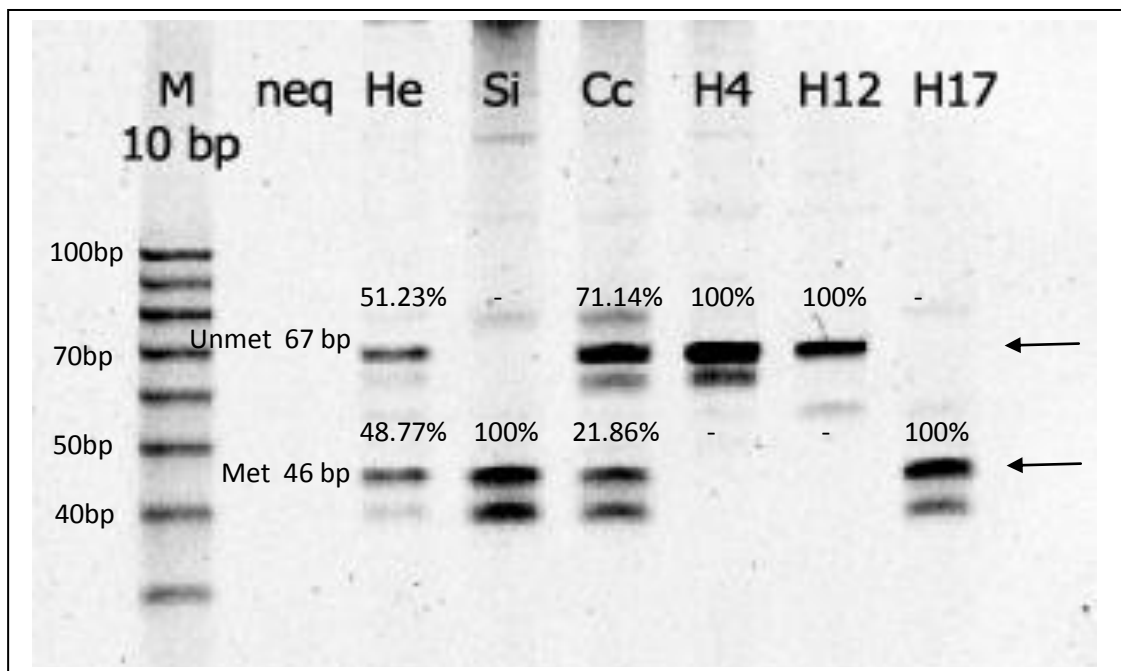
Primers \ Cells	HeLa	SiHa	C33A	HN4	HN12	HN17
HPV16-E7	-	☑	-	-	-	-
HPV16-E6	-	☑	-	-	-	-
HPV18-E7	☑	-	-	-	-	☑
HPV18-E6	☑	-	-	-	-	☑

2. การตรวจสอบเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน *CCNA1*

2.1 การตรวจสอบเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*

ผลการวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยใช้เทคนิคที่ชื่อ methylation specific-PCR (MSP) ในขั้นแรกทำการสกัด genomic DNA จากเซลล์ทั้ง 6 ชนิด คือ เซลล์ HeLa, SiHa, C33A, HN4, HN12 และ HN17 จากนั้นนำ DNA มาทำ sodium bisulfite treatment เพื่อดำเนินปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการทำ polyacrylamide gel electrophoresis การศึกษาที่ได้แสดงดังรูปที่ 24

HeLa พบเปอร์เซ็นต์ unmethylated sequence	เท่ากับ 51.23%
พบเปอร์เซ็นต์ methylated sequence	เท่ากับ 48.77%
SiHa ไม่พบผลิตภัณฑ์ unmethylated sequence	
พบเปอร์เซ็นต์ methylated sequence	เท่ากับ 100%
C33A พบเปอร์เซ็นต์ unmethylated sequence	เท่ากับ 83.14%
พบเปอร์เซ็นต์ methylated sequence	เท่ากับ 16.86%
HN4 พบเปอร์เซ็นต์ unmethylated sequence	เท่ากับ 100%
ไม่พบผลิตภัณฑ์ methylated sequence	
HN12 พบเปอร์เซ็นต์ unmethylated sequence	เท่ากับ 100%
ไม่พบผลิตภัณฑ์ methylated sequence	
HN17 ไม่พบผลิตภัณฑ์ unmethylated sequence	
พบเปอร์เซ็นต์ methylated sequence	เท่ากับ 100%



รูปที่ 24 ผลการวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยใช้เทคนิค methylation specific-PCR (MSP)

โดย M คือ Marker 10 bp, neg คือ negative control,

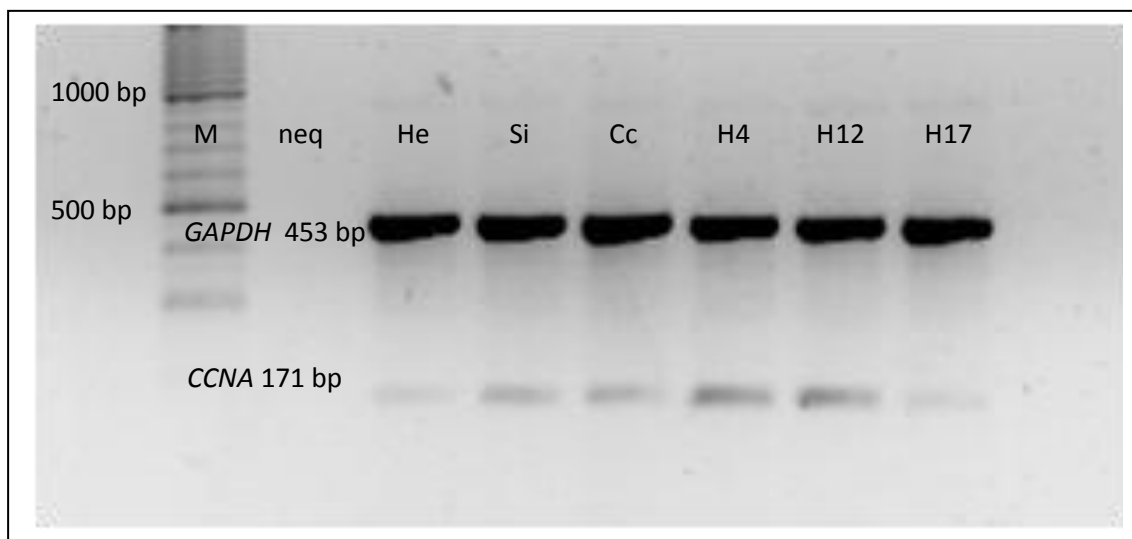
He คือ เซลล์ HeLa, Si คือ เซลล์ SiHa,

Cc คือ เซลล์ C33A, H4 คือ เซลล์ HN4,

H12 คือ เซลล์ HN12 และ H17 คือ เซลล์ HN17

2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1*

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* โดยการออกแบบคู่ primer ให้เฉพาะเจาะจงกับตำแหน่งยีนใน *CCNA1* ที่มีขนาด 171 คู่เบส และดูแบนด์เอ็นเอจาก agarose gel electrophoresis ผลคือเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก 3 ชนิด HeLa, SiHa และ C33A cell มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* ที่ค่อนข้างน้อย ส่วนเซลล์สายพันธุ์มะเร็งหู คอ จมูก 3 ชนิด HN4 และ HN12 cell มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* ที่ค่อนข้างมากและชัดเจนเมื่อเทียบกับ HN17 ที่ค่อนข้างน้อย การศึกษาที่ได้แสดงดังรูปที่ 25



รูปที่ 25 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1*

โดย M คือ Marker 100 bp, neg คือ negative control,

He คือ เซลล์ HeLa, Si คือ เซลล์ SiHa,

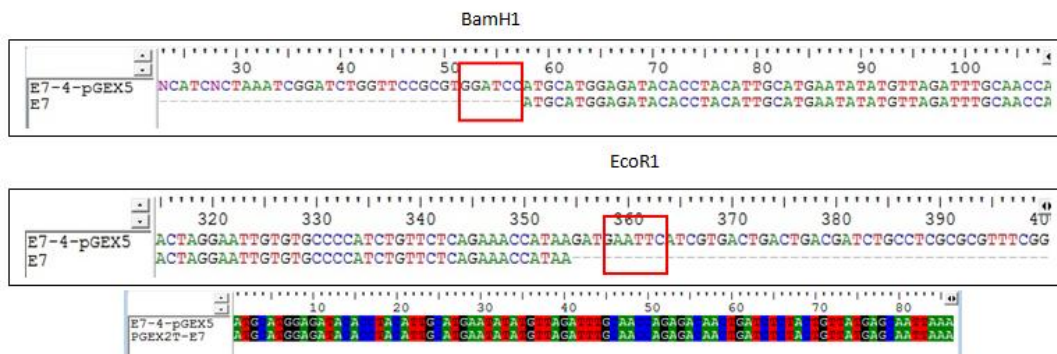
Cc คือ เซลล์ C33A, H4 คือ เซลล์ HN4,

H12 คือ เซลล์ HN12 และ H17 คือ เซลล์ HN17

3. การสร้าง recombinant plasmid ของยีน *E7* ของ HPV ไทป์ 16

3.1 การตรวจสอบยีน *E7* ในพลาสมิด pGEX2T *E7*

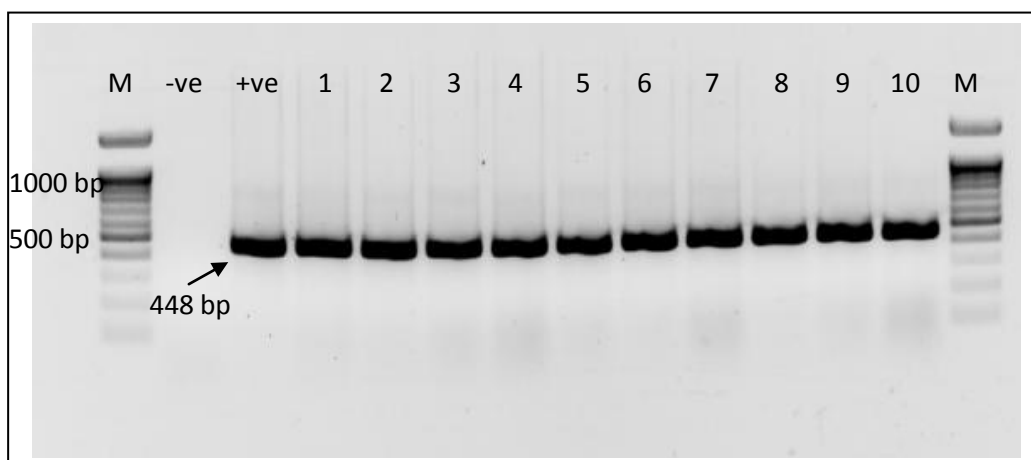
ผลการตรวจพิสูจน์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *E7* ในพลาสมิด pGEX2T *E7* โดยใช้ universal primer ที่ชื่อ pGEX5 primer และ pGEX3 primer ส่ง DNA sequencing ที่บริษัท Macrogen แล้วนำผล sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ *E7* HPV 16 ที่มี reference number คือ NC_001526 พบว่าลำดับเบสมีความเหมือนกัน 100% ทั้ง 297 คู่เบส รวมทั้งตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI ซึ่งถูกต้องเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 26



รูปที่ 26 ผลการตรวจพิสูจน์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *E7* ในพลาสมิด pGEX2T *E7* โดย ลำดับเบสแถบแรก E7-4-pGEX5 คือ ผล sequencing ลำดับเบสของยีน *E7* โดยใช้ universal primer ที่ชื่อ pGEX5 primer ลำดับเบสแถบที่สอง *E7* คือ ลำดับเบสของ *E7* HPV 16 ที่นำมาจากฐานข้อมูล NCBI ส่วนในกรอบสี่เหลี่ยม คือ ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI

3.2 การตรวจสอบความถูกต้องของการทำ Mutagenesis

ผลการตรวจสอบยีน *E7* โดยคัดเลือกโคโลนี 10 โคลน จากโคโลนีทั้งหมดที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา ampicillin เป็น marker โดยใช้คู่ primer pGEX5 และ pGEX3 ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน *E7* ใน พลาสมิด pGEX2T *E7* มาทำ PCR และตรวจสอบแถบ DNA ด้วย electrophoresis ดังรูปที่ 27 พบว่าทุกโคโลนีที่คัดเลือกมาทั้ง 10 โคลน ขึ้นแถบ DNA ที่ขนาด 448 คู่เบส ทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับ positive control ในเลนที่สอง ที่ใช้โคโลนีจากแบคทีเรียโคลนที่ไม่ได้ผ่านการทำ mutagenesis



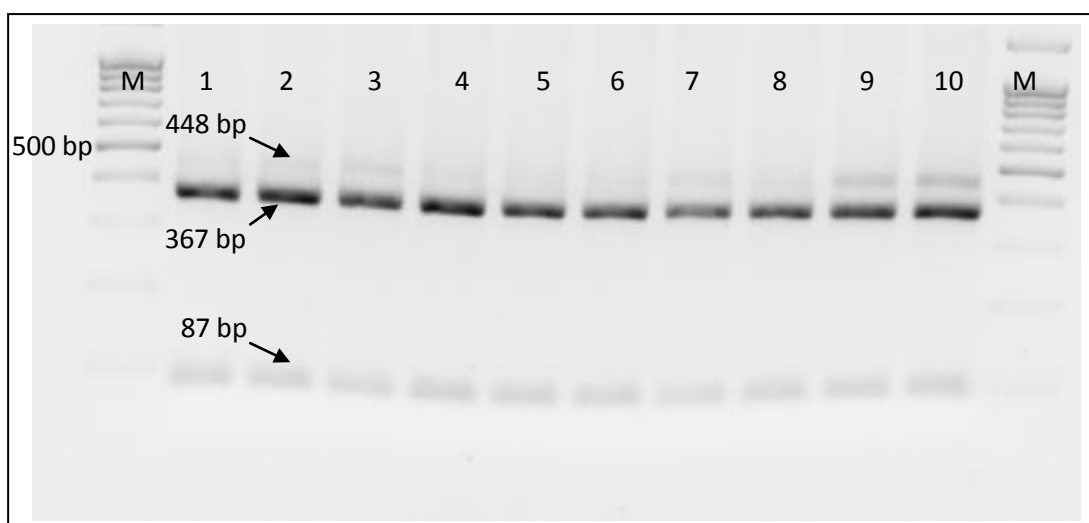
รูปที่ 27 ผลการตรวจสอบยีน *E7* โดยใช้คู่ primer pGEX5 และ pGEX3

โดย M คือ Marker 100 bp, -ve คือ negative control,

+ve คือ wildtype แบคทีเรียโคลนที่ไม่ผ่านการทำ mutagenesis

ส่วนหมายเลข 1 - 10 คือ แบคทีเรียโคลนที่ 1 - 10

หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาจากแบคทีเรียทั้ง 10 clones มาตรวจสอบความถูกต้องของตำแหน่ง mutagenesis ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* ซึ่งมีตำแหน่งตัดเป็น CATATG ซึ่งถ้าเอนไซม์ *NdeI* สามารถตัดได้ ย่อมแสดงว่าตำแหน่งของ mutagenesis มีความถูกต้อง ผลปรากฏว่า แบคทีเรียทุกโคลนที่คัดเลือกมา สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* ได้ทุกโคลน โดยขนาด PCR product ปกติจะมีขนาดที่ 448 คู่เบส และเมื่อถูกตัดด้วย *NdeI* จะเห็น DNA เป็น 2 แบน ที่มีขนาด 367 กับ 87 ดังรูปที่ 28 แสดงว่าการทำ mutagenesis สำเร็จผล



รูปที่ 28 ผลการตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI*

โดย M คือ Marker 100 bp

ส่วนหมายเลข 1 - 10 คือ แบคทีเรียโคลนที่ 1 - 10

ผลการใช้คู่ primer pGEX5 และ pGEX3 เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน E7 และตำแหน่ง mutagenesis แสดงดังรูปที่ 29 ผลปรากฏว่ามีความถูกต้องทุกประการ ทั้งลำดับเบสในยีน E7 , ลำดับเบสของตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI* และ *BamHI* รวมทั้งตำแหน่งที่ผ่านการทำ mutagenesis

```

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10          20          30          40          50
E7_pGEX5 -----G G G G -CATC-TCCA ---TCGGATC
E7_MUT   gggctggcaa gccacgtttg gtggtggcga ccatcctcca aaatcggatc

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60          70          80          90          100
E7_pGEX5 TGGTTC-GCG TGGATCCATG CATGGAGATA CACCTACATT GCATGAATAT
E7_MUT   tggttccgcg tggatccATG CATGGAGATA CACCTACATT GCATGAATAT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      110         120         130         140         150
E7_pGEX5 ATGTTAGATT TGCAACCAGA GACAACTGAT CTCTACTGTT ATGAGCAATT
E7_MUT   ATGTTAGATT TGCAACCAGA GACAACTGAT CTCTACTGTT ATGAGCAATT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      160         170         180         190         200
E7_pGEX5 AAATGACAGC TCAGAGGAGG AGGATGAAAT AGATGGTCCA GCTGGACAAG
E7_MUT   AAATGACAGC TCAGAGGAGG AGGATGAAAT AGATGGTCCA GCTGGACAAG

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210         220         230         240         250
E7_pGEX5 CAGAACCGGA CAGAGCCCAT TACAATATTG TAACCTTTTG TTGCAAGTGT
E7_MUT   CAGAACCGGA CAGAGCCCAT TACAATATTG TAACCTTTTG TTGCAAGTGT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      260         270         280         290         300
E7_pGEX5 GACTCTACGC TTCGGTTGTG CGTACAAAGC ACACACGTAG ACATTCGTAC
E7_MUT   GACTCTACGC TTCGGTTGTG CGTACAAAGC ACACACGTAG ACATTCGTAC

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310         320         330         340         350
E7_pGEX5 TTTGGAAGAC CTGTTAATGG GCACACTAGG AATTGTGTGC CCCATCTGTT
E7_MUT   TTTGGAAGAC CTGTTAATGG GCACACTAGG AATTGTGTGC CCCATCTGTT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      360         370         380         390         400
E7_pGEX5 CTCAGAAACC ATATGATGAA TTCATCGTGA CTGACTGACG ATTTGCCTCC
E7_MUT   CTCAGAAACC ATATgatgaa ttcATCGTGA ctgactgacg atctgcctcg

```

รูปที่ 29 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *E7* และตำแหน่งที่ผ่านการ mutagenesis

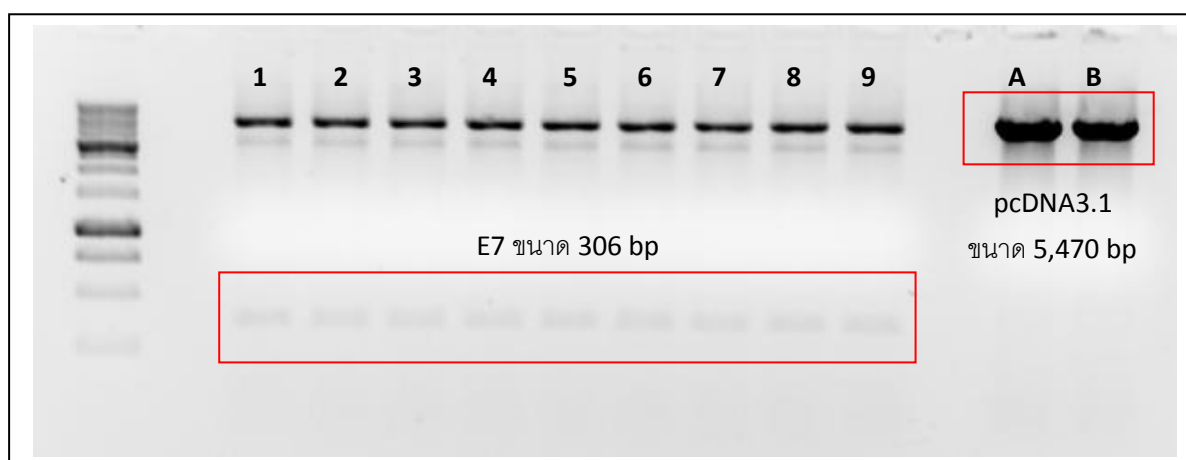
ไฮไลต์สีแดงคือ ตำแหน่งที่เปลี่ยนเบสไปจากการทำ mutagenesis

ไฮไลต์สีเทา คือ ตำแหน่งของยีน *E7* ส่วนไฮไลต์สีฟ้า คือ ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์

*Bam*HI และ *Eco*RI ตามลำดับ

3.3 การสร้างพลาสมิดสำหรับการทำ transfection

ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สำหรับเตรียมตัดต่อยีน *E7* เข้ากับ expression vector โดยใช้เอนไซม์ 2 ตัว คือ *EcoRI* และ *BamHI* ใช้วิธีการตัดแบบ double digestion พร้อมกันทั้งสองเอนไซม์ ผลปรากฏ ฝรั่ง่ายเลน 1-9 เป็นแถบ DNA ที่ตัดยีน *E7* ออกมามีขนาดที่ 306 คู่เบส ส่วนฝรั่ง่ายสองเลน A กับ B คือแถบของ expression vector pcDNA3.1 ที่มีขนาด 5,470 คู่เบส ซึ่งจะต้องตัดแถบ DNA ที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมดังรูปที่ 30 ไปทำ ligation ต่อไป



รูปที่ 30 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *BamHI* แบบ double digestion

ผลการใช้ universal primer ที่มีอยู่ใน pcDNA 3.1/myc-His A คือ T7 promoter มาตรวจสอบความถูกต้องจากการ construct plasmid โดยเลือกโคลนแบคทีเรียที่ผ่านการ transform recombinant plasmid pcDNA3.1_E7 ที่สร้างขึ้นเข้าไป และใช้ primer(F) HPV16-E7 และ (R) HPV16-E7 เพิ่มปริมาณ DNA ดูแบบของ *E7* ซึ่งถ้าแบคทีเรียโคลนใดให้ผลปรากฏว่ามี *E7* อยู่ ก็จะต้องเก็บรักษาโคลนนั่นไว้และเลี้ยงเพิ่มจำนวน ส่ง sequence ครั้งสุดท้ายผลที่ได้เป็นดังรูปที่ 31 โดยลำดับเบสแถบเส้นบน คือ พลาสมิดที่ส่ง sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสแถบเส้นล่าง ซึ่งเป็นลำดับเบสที่คาดคะเนความถูกต้องไว้ จะสังเกตเห็นว่า ไฮไลต์สีเทา คือส่วนของยีน *E7*, ไฮไลต์สีฟ้า คือลำดับเบสตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI* และ *BamHI*, ไฮไลต์สีแดง คือตำแหน่งที่เปลี่ยนลำดับเบส stop codon (TAA) ให้เป็นลำดับเบส TAT จากการทำ mutagenesis และไฮไลต์สีชมพู คือ ตำแหน่งของ epitope myc tag ที่ใช้ในการติดตามการแสดงออกโปรตีน *E7*

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90          100
PC_E7_T7      TAC-GAGCTC GGATCCATGC ATGGAGATAC ACCTACATTG CATGAATATA
pcDNA3.1-E7   TACCGAGCTC GGATCCATGC ATGGAGATAC ACCTACATTG CATGAATATA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
PC_E7_T7      TGTTAGATTT GCAACCAGAG ACAACTGATC TCTACTGTTA TGAGCAATTA
pcDNA3.1-E7   TGTTAGATTT GCAACCAGAG ACAACTGATC TCTACTGTTA TGAGCAATTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
PC_E7_T7      AATGACAGCT CAGAGGAGGA GGATGAAATA GATGGTCCAG CTGGACAAGC
pcDNA3.1-E7   AATGACAGCT CAGAGGAGGA GGATGAAATA GATGGTCCAG CTGGACAAGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
PC_E7_T7      AGAACCGGAC AGAGCCCATT ACAATATTGT AACCTTTTGT TGCAAGTGTG
pcDNA3.1-E7   AGAACCGGAC AGAGCCCATT ACAATATTGT AACCTTTTGT TGCAAGTGTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260         270         280         290         300
PC_E7_T7      ACTCTACGCT TCGGTTGTGC GTACAAAGCA CACACGTAGA CATTCTGACT
pcDNA3.1-E7   ACTCTACGCT TCGGTTGTGC GTACAAAGCA CACACGTAGA CATTCTGACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310         320         330         340         350
PC_E7_T7      TTGGAAGACC TGTTAATGGG CACACTAGGA ATTGTGTGCC CCATCTGTTC
pcDNA3.1-E7   TTGGAAGACC TGTTAATGGG CACACTAGGA ATTGTGTGCC CCATCTGTTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360         370         380         390         400
PC_E7_T7      TCAGAAACCA TATGATGAAT TCTGCAGATA TCCAGCACAG TGGCGGCCGC
pcDNA3.1-E7   TCAGAAACCA TATGATGAAT TCTGCAGATA TCCAGCACAG TGGCGGCCGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          410         420         430         440         450
PC_E7_T7      TCGAGTCTAG AGGGCCCTTC GAACAAAAAC TCATCTCAGA AGAGGATCTG
pcDNA3.1-E7   TCGAGTCTAG AGGGCCCTTC GAACAAAAAC TCATCTCAGA AGAGGATCTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          460         470         480         490         500
PC_E7_T7      AATATGCATA CCGGTCATCA TCACCATCAC CATTGAGTTT AAACCCGCTG
pcDNA3.1-E7   AATATGCATA CCGGTCATCA TCACCATCAC CATTGAGTTT AAACCCGCTG

```

รูปที่ 31 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pcDNA3.1_E7

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน E7 และ CCNA1

4.1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตโปรตีน E7

การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน E7 ที่ทรานสเฟกต์เข้าไปในเซลล์ C33A และ HN12 โดยใช้ expression vector pcDNA3.1_E7 โดยวิธี western blot

4.1.1 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

เซลล์ที่นำมาตรวจสอบความสามารถในการผลิตโปรตีน E7 มีทั้งหมด 6 ชนิด ดังนี้

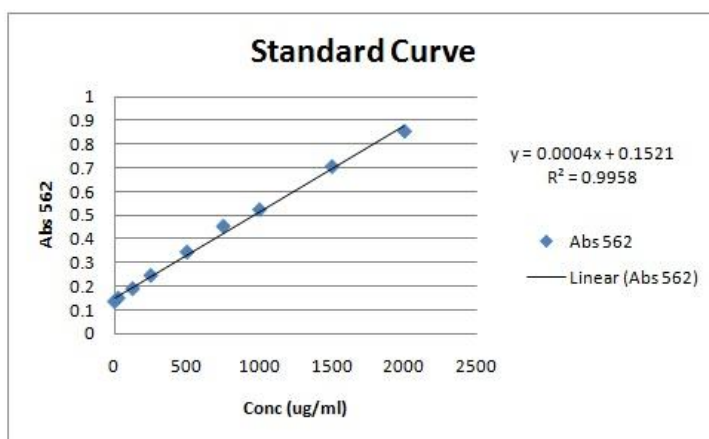
- C33A (เซลล์ C33A ปกติที่ไม่ได้ทรานสเฟกต์)
- C33A_PC (C33A ที่ทรานสเฟกต์ empty vector pcDNA 3.1/myc-His A)
- C33A_E7 (C33A ที่ทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7)
- HN12 (เซลล์ HN12 ปกติที่ไม่ได้ทรานสเฟกต์)
- HN12_PC (HN12 ที่ทรานสเฟกต์ empty vector pcDNA 3.1/myc-His A)
- HN12_E7 (HN12 ที่ทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7)

การพิสูจน์ว่าเซลล์แต่ละชนิดเหล่านี้มีการแสดงออกของโปรตีน E7 ที่แตกต่างกัน จำเป็นจะต้องวัดความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนรวมที่ได้จากเซลล์แต่ละชนิดก่อนที่จะนำไปโปรตีนไปตรวจสอบการแสดงออก เพื่อให้ปริมาณโปรตีนรวมที่จะนำไปตรวจสอบมีปริมาณที่เท่ากัน จะได้มั่นใจและยืนยันผลได้ว่า การผลิตโปรตีน E7 เป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน E7 ซึ่งมาจากปริมาณโปรตีนรวมเท่ากัน ทำให้สรุปได้ว่า โปรตีน E7 มีการแสดงออกมาจาก expression vector pcDNA3.1_E7 เท่านั้น โดยใช้ในการวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี BCA Protein Assay ซึ่งเทียบจากความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ผลการวัดที่ได้แสดงดังในรูปที่ 32 ซึ่งเป็นตัวอย่างของผลการวัดปริมาณโปรตีนรวมที่สกัดมาจาก whole protein สำหรับนำไปทำ Western blot โดยแต่ละหลุมใช้ปริมาณโปรตีนรวม 40 ไมโครกรัม ในปริมาณที่เท่ากัน จะเห็นได้ว่าโปรตีนที่สกัดออกมาจากเซลล์แต่ละชนิดนั้นได้ปริมาณที่ไม่เท่ากัน แต่สุดท้ายก็ใช้การวิเคราะห์นี้และคำนวณปริมาณโปรตีนรวมจากแต่ละเซลล์ให้มีปริมาณเริ่มต้นที่เท่ากันนั่นเอง

BCA Assay (E7) (19/9/2555)

Standard Curve

Vial	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Conc.	2,000	1,500	1,000	750	500	250	125	25	0
OD	0.858	0.697	0.513	0.447	0.344	0.244	0.188	0.15	0.135
	0.851	0.714	0.535	0.46	0.345	0.248	0.192	0.15	0.135
average	0.8545	0.7055	0.524	0.4535	0.3445	0.246	0.19	0.15	0.135



Total Volume 25 ul (4x loading buffer 6 ul + Protein + Ripa buffer)

sample	conc.	lysis	dye(x)	Total	Prot.	Prot.conc.	fraction of
	for load	buffer	4	Volume	Volume	(ug/ul)	
	ug	ul	ul	ul	ul		prot.
C33A	40	12.372	6	25	6.628003	6.035	whole protein
C33A E7	40	11.74047	6	25	7.259528	5.51	whole protein
C33A PC	40	11.94533	6	25	7.054674	5.67	whole protein
HN12	40	12.35548	6	25	6.644518	6.02	whole protein
HN12 E7	40	12.46405	6	25	6.535948	6.12	whole protein
HN12 PC	40	11.48473	6	25	7.515265	5.3225	whole protein

รูปที่ 32 ตัวอย่างผลการวัดปริมาณโปรตีนรวม สำหรับนำไปทำ Western blot

ในแต่ละหลุมใช้ปริมาณโปรตีนรวมเท่ากันคือ 40 ug

4.1.2 การตรวจสอบการผลิตโปรตีน E7 โดย Western blot

เป็นขั้นตอนเพื่อตรวจสอบความสามารถของยีน *E7* ในการผลิตโปรตีน *E7* จาก expression vector pcDNA3.1_E7 ด้วยวิธี Western blot เปรียบเทียบกับเซลล์ C33A และ HN12 ที่ได้รับการทรานสเฟกต์ empty expression vector (pcDNA 3.1/myc-His A พลาสมิดเปล่าที่ไม่มีการผลิตโปรตีน *E7*) กับเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับการทรานสเฟกต์ เป็นกลุ่มควบคุม ผลจากการทำ Western blot แสดงให้เห็นว่าเซลล์ C33A และ HN12 ที่ได้รับการทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7 สามารถผลิตโปรตีน *E7* ซึ่งมีขนาด 25 kDa ได้ (โปรตีน *E7* ขนาดที่รวมกับ epitope tag ของพลาสมิดแล้วจะมีขนาดประมาณ 25 kDa ส่วนโปรตีน *E7* ปกติจะมีขนาด 21 kDa) ดังรูปที่ 33 ส่วนเซลล์ C33A กับ HN12 ที่ได้รับการทรานสเฟกต์ empty expression vector และเซลล์ C33A กับ HN12 เซลล์ปกติที่ไม่ได้รับการทรานสเฟกต์ ไม่มีการผลิตโปรตีน *E7* แสดงให้เห็นว่า โดยปกติยีน *E7* ไม่มีการแสดงออกในเซลล์ C33A และ HN12 สอดคล้องกับผลการสกัด mRNA ตรวจสอบ HPV type ในหัวข้อ 1.6 ซึ่งต่อมาจะถูกเปลี่ยนเป็น cDNA แล้วใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน *E7* ปรากฏว่า การทำ PCR ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ เนื่องจากไม่มีสายต้นแบบนั่นเอง ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้เซลล์ C33A และ HN12 เป็นเซลล์สำหรับทรานสเฟกต์ พลาสมิดลูกผสมเข้าไป (recombinant plasmid) ถ้าหากยีน *E7* มีการแสดงออกสามารถผลิตโปรตีน *E7* แสดงว่าเป็นผลมาจากการทำงานของยีน *E7* ที่เชื่อมกับ expression vector pcDNA3.1_E7 เท่านั้น



รูปที่ 33 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตโปรตีน *E7* ด้วยวิธี Western blot

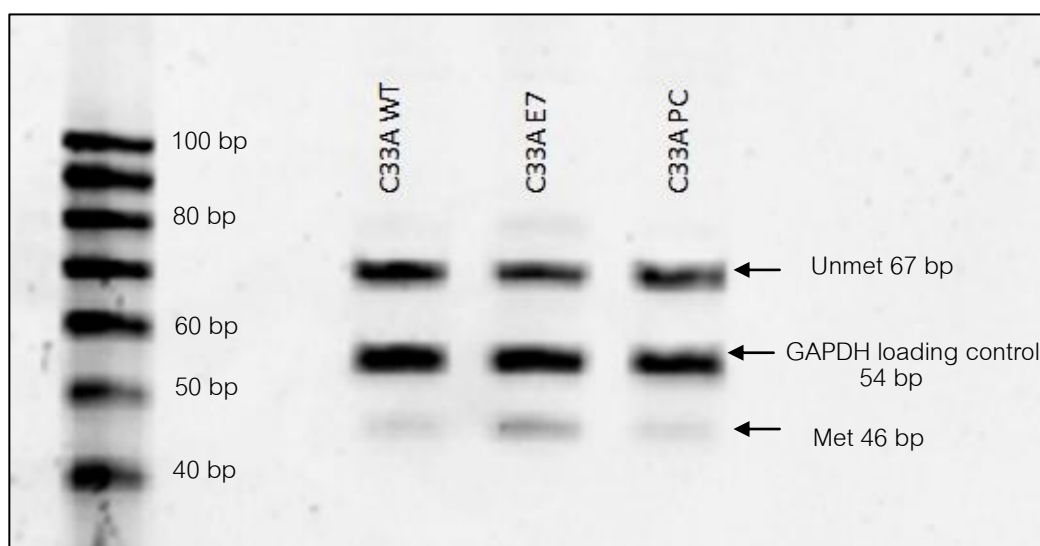
โดย C33A WT และ HN12 WT คือ เซลล์ C33A และ HN12 ปกติที่ไม่ได้ทรานสเฟกต์พลาสมิด
 C33A E7 และ HN12 E7 คือ เซลล์ C33A และ HN12 ที่ทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7
 C33A PC และ HN12 PC คือ เซลล์ C33A และ HN12 ที่ทรานสเฟกต์ empty vector

4.2 การตรวจสอบเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* เมื่อผ่านการทรานสเฟกต์ด้วย *E7*

เป็นขั้นตอนการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ด้วยวิธี Methylation specific-PCR (MSP) ที่แสดงไว้ในวิธีดำเนินงานวิจัย หัวข้อ 2.1 ในหัวข้อนี้จะใช้เซลล์ 2 ชนิดสำหรับการเปรียบเทียบ คือ เซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก C33A และเซลล์สายพันธุ์มะเร็ง หู คอ จมูก HN12 โดยเปรียบเทียบกันระหว่างเซลล์ที่ได้รับการทรานสเฟกต์ expression vector pcDNA3.1_E7 กับเซลล์ที่ได้รับการทรานสเฟกต์ empty vector และเซลล์ปกติ เป็นกลุ่มควบคุม ผลจากการทำ PCR แสดงให้เห็นว่าในเซลล์ C33A ที่ทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7 ให้ผลการเกิดเมทิลเลชันที่มากกว่าในเซลล์ปกติ และเซลล์ที่ทรานสเฟกต์ empty vector ดังในรูป 34 แสดงให้เห็นว่า *E7* มีผลทำให้เกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของ *CCNA1* มากขึ้นนั่นเอง

ผลเปอร์เซ็นต์แบนของเซลล์ C33A ปกติ	Met = 10.23	Unmet = 89.77
ผลเปอร์เซ็นต์แบนของเซลล์ C33A pcDNA3.1_E7	Met = 28.12	Unmet = 71.88
ผลเปอร์เซ็นต์แบนของเซลล์ C33A empty vector	Met = 12.00	Unmet = 88.00

*** Met = methylation , Unmet = unmethylation



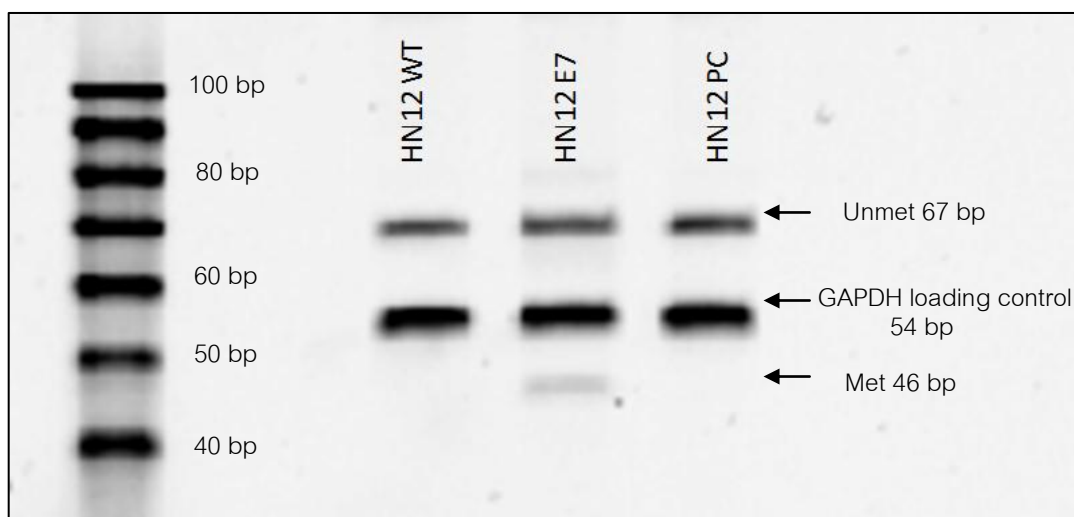
รูปที่ 34 การตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A

โดย	C33A WT	คือ	เซลล์ C33A ปกติที่ไม่ได้ทรานสเฟกต์พลาสมิด
	C33A E7	คือ	เซลล์ C33A ที่ทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7
	C33A PC	คือ	เซลล์ C33A ที่ทรานสเฟกต์ empty vector

ผลจากการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ด้วยวิธี Methylation specific-PCR (MSP) ในเซลล์ HN1 แสดงให้เห็นว่าในเซลล์ HN12 ที่ทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7 ผลปรากฏว่ามีแบนเมทิลเลชันเกิดขึ้น ส่วนในเซลล์ปกติและเซลล์ที่ทรานสเฟกต์ empty vector ปรากฏว่าไม่พบแบน DNA ของเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ดังในรูป 35 แสดงให้เห็นว่า E7 มีผลทำให้เกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของ *CCNA1* นั้นเอง

ผลเปอร์เซ็นต์แบนของเซลล์ C33A ปกติ	Met = 0	Unmet = 100
ผลเปอร์เซ็นต์แบนของเซลล์ C33A pcDNA3.1_E7	Met = 17.90	Unmet = 82.10
ผลเปอร์เซ็นต์แบนของเซลล์ C33A empty vector	Met = 0	Unmet = 100

*** Met = methylation , Unmet = unmethylation

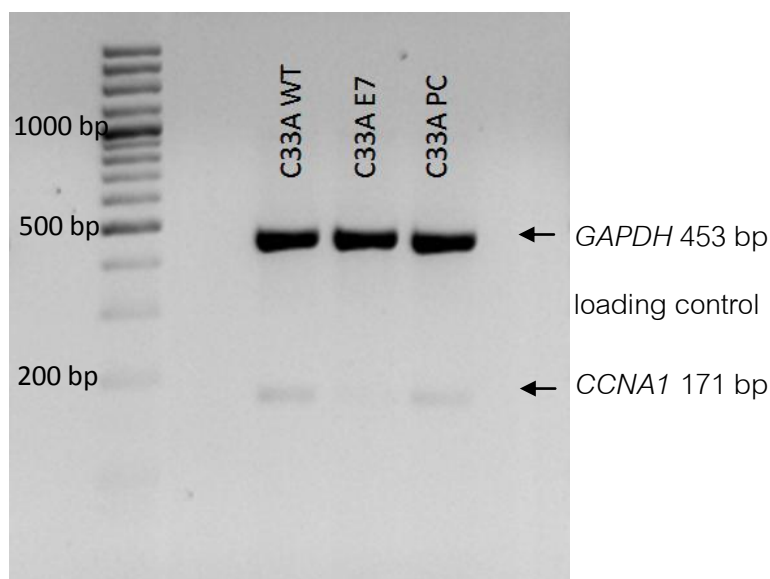


รูปที่ 35 การตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A

โดย	HN12 WT	คือ	เซลล์ HN12 ปกติที่ไม่ได้ทรานสเฟกต์พลาสมิด
	HN12 E7	คือ	เซลล์ HN12 ที่ทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7
	HN12 PC	คือ	เซลล์ HN12 ที่ทรานสเฟกต์ empty vector

4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* เมื่อผ่านการทรานสเฟกต์ด้วย *E7*

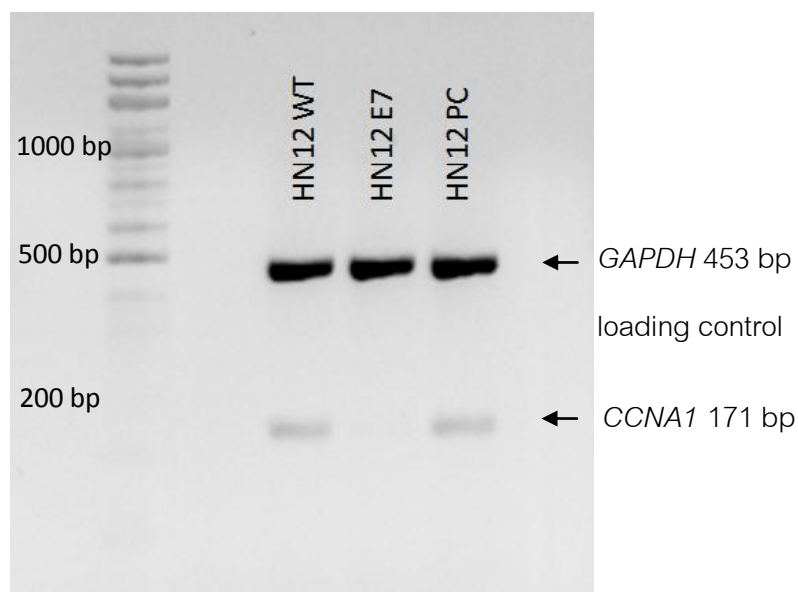
เป็นขั้นตอนเพื่อตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *CCNA1* โดยเทคนิค RT-PCR ที่แสดงไว้แล้วในวิธีดำเนินงานวิจัยหัวข้อ 2.2 โดยใช้ยีน *GAPDH* เป็นตัวควบคุม ในหัวข้อนี้จะใช้เซลล์ 2 ชนิด สำหรับการเปรียบเทียบ คือ เซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก C33A และเซลล์สายพันธุ์มะเร็ง หู คอ จมูก HN12 โดยเปรียบเทียบกันระหว่างเซลล์ที่ได้รับการทรานสเฟกต์ expression vector pcDNA3.1_E7 กับเซลล์ที่ได้รับการทรานสเฟกต์ empty vector และเซลล์ปกติ เป็นกลุ่มควบคุม ผลจากการสกัด mRNA และเปลี่ยนให้เป็นสาย DNA คู่สม (cDNA) แล้วนำไปทำ PCR แสดงให้เห็นว่าในเซลล์ C33A ที่ทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7 ให้ผลการแสดงออกของยีน *CCNA1* ที่ลดน้อยลงกว่าในเซลล์ปกติและเซลล์ที่ทรานสเฟกต์ empty vector ดังในรูป 36 สอดคล้องกับผลการตรวจเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในหัวข้อผลการวิเคราะห์ข้อมูล 4.2 เนื่องจากการเกิดเมทิลเลชันที่เพิ่มขึ้นจะทำให้การแสดงออกของยีนลดน้อยลง แสดงให้เห็นว่า *E7* มีผลทำให้เกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของ *CCNA1* มากขึ้น และทำให้ยีนนี้มีการแสดงออกที่ลดน้อยลงตามลำดับ



รูปที่ 36 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A

โดย C33A WT คือ เซลล์ C33A ปกติที่ไม่ได้ทรานสเฟกต์พลาสมิด
 C33A E7 คือ เซลล์ C33A ที่ทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7
 C33A PC คือ เซลล์ C33A ที่ทรานสเฟกต์ empty vector

ผลการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *CCNA1* โดยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ยีน *GAPDH* เป็นตัวควบคุม ในเซลล์ HN12 โดยเปรียบเทียบกันระหว่างเซลล์ที่ได้รับการทรานสเฟกต์ expression vector pcDNA3.1_E7 กับเซลล์ที่ได้รับการทรานสเฟกต์ empty vector และเซลล์ปกติ เป็นกลุ่มควบคุม ผลจากการสกัด mRNA และเปลี่ยนให้เป็นสาย DNA คู่สม (cDNA) แล้วนำไปทำ PCR แสดงให้เห็นว่าในเซลล์ HN12 ที่ทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7 ให้ผลการวิจัยเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับในเซลล์ C33A คือ พบการแสดงออกของยีน *CCNA1* ที่ลดน้อยลงกว่าในเซลล์ปกติและเซลล์ที่ทรานสเฟกต์ empty vector ดังในรูป 37 สอดคล้องกับผลการตรวจเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในหัวข้อผลการวิเคราะห์ข้อมูล 4.2 เนื่องจากการเกิดเมทิลเลชันที่เพิ่มขึ้นจะทำให้การแสดงออกของยีนลดน้อยลง แสดงให้เห็นว่า E7 มีผลทำให้เกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของ *CCNA1* มากขึ้น และทำให้ยีนนี้มีการแสดงออกที่ลดน้อยลงตามลำดับ



รูปที่ 37 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ HN12

โดย HN12 WT คือ เซลล์ HN12 ปกติที่ไม่ได้ทรานสเฟกต์พลาสมิด
 HN12 E7 คือ เซลล์ HN12 ที่ทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7
 HN12 PC คือ เซลล์ HN12 ที่ทรานสเฟกต์ empty vector

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาการติดเชื้อ HPV จากเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ทั้ง 6 ชนิด คือ เซลล์ HeLa, SiHa, C33A, HN4, HN12 และ HN17 โดยการเพิ่มจำนวน DNA ของเซลล์ทั้ง 6 ชนิด ด้วยกระบวนการ polymerase chain reaction (PCR) และใช้คู่ primers ที่มีการใช้ในการตรวจหาจีโนม HPV ทั่วไป คือ MY09/MY11 โดยใช้ลำดับเบส ของ HPV ในส่วน L1 gene พบว่าเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV มีทั้งสิ้น 3 ชนิด คือ HeLa, SiHa และ HN17 ส่วนในเซลล์ 3 ชนิดที่เหลือ คือ C33A, HN4 และ HN12 ไม่พบการติดเชื้อ HPV ซึ่งในเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa, SiHa และ C33A) ก่อนหน้านั้นทราบข้อมูลแล้วว่า เซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV คือ HeLa (HPV 18) และ SiHa (HPV16) ส่วนในเซลล์หู คอ จมูก (HN4, HN12 และ HN17) เป็นเซลล์ที่ไม่ทราบการติดเชื้อ จากการผลการทดลองให้ผลเป็นไปตามความคาดหมายในเซลล์ HeLa, SiHa และ C33A ส่วนในเซลล์ที่เหลือ จากการทดลองทำให้ทราบว่า เซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV คือเซลล์ HN17 ส่วนเซลล์ HN4 และ HN12 เป็นเซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อ

ผลการศึกษา HPV type จากเซลล์ไลน์ทั้ง 6 ชนิด โดยใช้ลำดับเบสของ HPV ในส่วน E6 และ E7 gene จาก HPV type 16 และ 18 มาออกแบบ primers ให้มีความจำเพาะต่อยีน HPV16-E7, HPV16-E6, HPV18-E7 และ HPV18-E6 พบว่าเซลล์ที่ให้ผลบวกกับคู่ primers HPV16-E6 และ HPV16-E7 คือเซลล์ SiHa ซึ่งผลเป็นไปตามคาดหมายกับข้อมูลที่ว่าเซลล์ SiHa เป็นเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV 16 และผลลัพธ์ที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับการตรวจสอบการติดเชื้อ HPV เช่นกัน ส่วนเซลล์ที่ให้ผลบวกกับคู่ primers HPV18-E6 และ HPV18-E7 คือเซลล์ HeLa และ HN17 ซึ่งผลเป็นไปตามคาดหมายกับข้อมูลที่ว่าเซลล์ HeLa เป็นเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV 18 และสำหรับในเซลล์ HeLa และ HN17 ผลการตรวจเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการตรวจสอบการติดเชื้อ ดังนั้นจากการตรวจสอบ HPV ทั้งสองหัวข้อทำให้ได้ข้อสรุปแน่ชัดแล้วว่า เซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV คือเซลล์ HeLa (HPV18), SiHa (HPV16) และ HN17 (HPV18) ส่วนเซลล์ C33A, HN4 และ HN12 เป็นเซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อ

ผลการศึกษามะทิลเลชันบนโปรโมเตอร์และการแสดงออกของยีน *CCNA1* โดย MSP-PCR พบว่ารูปแบบการเกิดเมทิลเลชันบนตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* จากเซลล์ทั้ง 6 ชนิด คือ เซลล์ HeLa, SiHa, C33A, HN4, HN12 และ HN17 มีรูปแบบที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละชนิดของเซลล์ พบการเกิดเมทิลเลชันในเซลล์ HeLa, SiHa, C33A และ HN17 และพบการเกิดเมทิลเลชัน 100% ในเซลล์ SiHa และ HN17 ส่วนในเซลล์ HN4 และ HN12 ไม่พบการเกิดเมทิลเลชัน และเมื่อพิจารณาการแสดงออกของยีน *CCNA1* แล้วพบว่ามีการแสดงออกที่ต่างกันออกไปในแต่ละชนิดของเซลล์ พบการแสดงออกมากที่สุดอยู่ที่เซลล์ HN4 และ HN12 ส่วนในเซลล์ HeLa, SiHa, C33A และ HN17 มีการแสดงออกที่ค่อนข้างน้อย ดังนั้นเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทิลเลชันและการแสดงออกแล้ว พบว่ามีความสัมพันธ์กันในเซลล์ HeLa, C33A, HN4 และ HN12 โดยที่เปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันของ HeLa และ C33A มีค่าเปอร์เซ็นต์ที่มากกว่าในเซลล์ HN4 และ HN12 แต่เมื่อพิจารณาในเรื่องของการแสดงออก ในเซลล์ HeLa และ C33A มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* ที่น้อยกว่าในเซลล์ HN4 และ HN12 อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเป็นไปได้ว่าการเกิด DNA เมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของ *CCNA1* นั้นอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa, C33A, HN4 และ HN12 เนื่องจากการเกิดเมทิลเลชันและการแสดงออกมีความสัมพันธ์กัน แต่สำหรับในเซลล์ SiHa และ HN17 พบเมทิลเลชัน 100% แต่ยังคงพบการแสดงออกของยีน *CCNA1* อยู่ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มีลำดับเบสที่ไม่เกิดเมทิลเลชันอยู่บ้างและเมื่อนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วแปลผลด้วยการดูแถบ DNA ด้วยตาเปล่าและใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์วัดค่าเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชัน อาจมีความคลาดเคลื่อน ซึ่งเป็นไปได้ว่ายังคงมีแถบ unmethylated sequence อยู่ในปริมาณที่น้อยมาก ๆ ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้ ด้วยเหตุนี้จึงยังพบการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa และ HN17 อยู่นั่นเอง

ผลการสร้าง recombinant plasmid ของยีน *E7* ของ HPV ไทป์ 16 โดยการนำชิ้นส่วนยีน *E7* จาก pGEX2T *E7* (bacterial expression vector) มาใส่เข้าไปใน pcDNA3.1/myc-His A (mammalian expression vector) จนได้เป็นพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.1_*E7* จากนั้นตรวจสอบลำดับเบสของ *E7* และตำแหน่งของ epitope myc tag ด้วยการส่ง DNA sequencing พบว่าลำดับเบสมีความถูกต้องทั้งหมด ต่อจากนั้นทำการทรานสเฟกต์เข้าสู่เซลล์ C33A และ HN12 โดย

ทรานสเฟกต์พลาสมิดเปล่าที่เป็นคอนโทรลด้วย คือ pcDNA3.1/myc-His A แล้วนำเซลล์ทั้ง 3 ชนิด คือ เซลล์ปกติ, เซลล์ที่ทรานสเฟกต์พลาสมิดเปล่า และเซลล์ที่ทรานสเฟกต์ pGEX2T E7 นำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน E7 โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR พบว่าเซลล์ที่ทรานสเฟกต์ pGEX2T E7 ทั้งเซลล์ C33A และ HN12 ให้ผลการแสดงออกที่ชัดเจน

ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตโปรตีน E7 ด้วยวิธี western blot เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ C33A และ HN12 ที่ได้รับการทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7 กับเซลล์ที่ทรานสเฟกต์ empty expression vector (pcDNA 3.1/myc-His A) พลาสมิดเปล่าที่ไม่มีการผลิตโปรตีน E7 กับเซลล์ปกติที่ไม่ได้ทรานสเฟกต์เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าในเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ที่ทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7 สามารถสร้างโปรตีน E7 ออกมาได้ กลับกันในส่วนของเซลล์ปกติกับเซลล์ที่ทรานสเฟกต์พลาสมิดเปล่า ไม่มีการสร้างโปรตีน E7 ออกมา ทำให้แสดงว่าโปรตีน E7 เกิดจากการทำงานของยีน E7 ที่เชื่อมกับ expression vector pcDNA3.1_E7 เท่านั้น

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน E7 และ CCNA1 ภายหลังจากทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7 และ pcDNA 3.1/myc-His A ที่ใช้เป็นตัวควบคุมเข้าไปในเซลล์ C33A และ HN12 จากนั้นตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน CCNA1 เปรียบเทียบกันในเซลล์ที่ทรานสเฟกต์ E7, เซลล์ที่ทรานสเฟกต์พลาสมิดเปล่า และเซลล์ปกติ จากเซลล์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าในเซลล์ C33A เกิดเมทิลเลชันที่มากขึ้นและมีการแสดงออกที่ลดลงในเซลล์ที่ทรานสเฟกต์ E7 เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติและเซลล์ที่ทรานสเฟกต์พลาสมิดเปล่า เชกเช่นเดียวกับในเซลล์ HN12 ให้ผลเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ C33A คือ พบเมทิลเลชันและการแสดงออกที่ลดลงในเซลล์ที่ทรานสเฟกต์ E7 เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติและเซลล์ที่ทรานสเฟกต์พลาสมิดเปล่า

จากผลการทดลองทั้งหมดทำให้ได้ข้อสรุปแน่ชัดแล้วว่า ยีน E7 ของไวรัส Human papillomavirus type 16 มีผลต่อการเกิดเมทิลเลชันของยีน CCNA1 ในมะเร็งปากมดลูก โดยที่ผลของ E7 ทำให้เกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน CCNA1 เพิ่มขึ้น เป็นผลทำให้การแสดงออกของ CCNA1 ลดลงตามไปด้วยนั่นเอง

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการวิจัยได้ข้อสรุปแล้วว่า E7 ของไวรัส Human papillomavirus type 16 มีผลต่อการเกิดเมทิลเลชันของยีน CCNA1 ในมะเร็งปากมดลูก เนื่องจากการตรวจสอบด้วยวิธี western blot ได้พิสูจน์ให้เห็นว่า ในเซลล์ C33A และ HN12 ที่ได้รับการทรานสเฟกต์ pcDNA3.1_E7 สามารถผลิตโปรตีน E7 ออกมาได้ ต่างจากในเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับการทรานสเฟกต์ และเซลล์ที่ทรานสเฟกต์ empty expression vector เข้าไป ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน E7 ทำให้แสดงว่าโปรตีน E7 ที่สร้างออกมาจากในเซลล์ที่ทรานสเฟกต์นั้น เกิดจากการทำงานของยีน E7 ที่เชื่อมกับ expression vector เท่านั้น จากผลการวิจัยนี้ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบ HPV ที่ตรวจไม่พบการติดเชื้อของ HPV ทั้งในเซลล์ C33A และ HN12 นั้นย่อมแสดงว่าในเซลล์ปกติทั้งสองเซลล์นั้น ไม่มียีน E7 อยู่ภายในเซลล์

ความสัมพันธ์ระหว่างยีน E7 และ CCNA1 ภายหลังจากการทรานสเฟกต์ยีน E7 เข้าไปภายในเซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อ HPV และไม่มียีน E7 ของไวรัสชนิดนี้ พบการเปลี่ยนแปลงในส่วนของ การเกิดเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของ CCNA1 ที่เกิดเมทิลเลชันมากขึ้น และการแสดงออกของยีนที่ลดลง ก่อนหน้านี้ในหัวข้อวิจัยที่ทดลองความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีน CCNA1 กับเซลล์ทั้ง 6 ชนิด พบว่าเซลล์ที่มีความสัมพันธ์ในส่วนของเมทิลเลชันและการแสดงออก คือ HeLa, C33A, HN4 และ HN12 แต่ในเซลล์ SiHa และ HN17 ให้ผลความสัมพันธ์ที่แตกต่างไป คือ เกิดเมทิลเลชัน 100% แต่ยังคงพบการแสดงออกของ CCNA1 เป็นไปได้ว่าอาจเกิดความคลาดเคลื่อนของโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้วัดค่าเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชัน โดยการวัดผลในลักษณะนี้เป็นการวัดผลที่ไม่ได้มองในเชิงปริมาณ (quantitative) แต่เป็นการแปลผลในเชิงคุณภาพ (qualitative) ซึ่งในบางครั้งอาจให้ผลที่มีความคลาดเคลื่อนไป ซึ่งถ้าต้องการวัดผลให้ได้แน่ชัดในภายภาคหน้า ควรใช้วิธีวัดผลในรูปของ real-time PCR จะสามารถแก้ไขข้อจำกัดที่กล่าวมาข้างต้นลงได้

หน้าที่ของยีน Cyclin A1 (CCNA1) ปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานที่แน่ชัดว่ายีนนี้มีหน้าที่เป็น oncogene หรือ tumor suppressor gene กันแน่ ซึ่งเมื่อก่อนนั้นเคยถูกเชื่อว่าเป็น oncogene ยกตัวอย่างเช่น การพบปริมาณของ CCNA1 ใน acute leukemia เซลล์ไลน์และชิ้นเนื้อผู้ป่วย myeloid leukemia ในปริมาณที่สูง (Yang, Morosetti, and Koeffler, 1997) แต่ในปัจจุบันกลับพบว่าหน้าที่ของ CCNA1 มีหน้าที่คล้ายกับ tumor suppressor มากขึ้นเรื่อย ๆ ยกตัวอย่างเช่น พบ CCNA1 มีความเกี่ยวพันในการไปช่วยทำให้ระบบ DNA double strand break repair ทำงานได้ดีผ่าน KU70 (Muller-Tidow *et al.*, 2004) นอกจากนี้ก็ยังมีรายงานข้อมูลของ CCNA1 ที่เกิด

down regulated และ hypermethylated ใน squamous cell carcinomas ทั้งในมะเร็ง หู คอ จมูก และมะเร็งปากมดลูก และสำหรับในมะเร็ง ปากมดลูกนี้เอง พบว่า การติดเชื้อ HPV มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดเมทิลเลชัน ของ *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูกถึงร้อยละ 93 (Kitkumthorn *et al.*, 2006) ดังนั้นหน้าที่จริง ๆ แล้วของ *CCNA1* น่าจะมีหน้าที่เสมือนเป็น tumor suppressor gene ในมะเร็งปากมดลูกนั่นเอง

การเกิด DNA methylation สามารถที่จะเกิดขึ้นได้เองโดยไม่ต้องอาศัยยีนใด ๆ จากไวรัส HPV ปกติกระบวนการเกิด cytosine methylation ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะเกิดผ่าน เอนไซม์ DNMT1, DNMT3A และ DNMT3B (Robertson, 2001) มีผลทำให้เกิดการควบคุม แสดงออกที่ลดลงในยีนต่าง ๆ ภายใน เซลล์ และสำหรับในเซลล์ C33A ที่ใช้ในการทดลอง เป็น เซลล์ที่มีคุณสมบัติ p53 mutated (Kessis *et al.*, 1993) จากงานวิจัยที่ศึกษาความสัมพันธ์ของ p53 , E6 ของ HPV type 16 และ DNMT พบว่า E6 เป็นตัวที่ผลักดันให้เกิดการทำงานของ DNMT มากขึ้น (Yeung *et al.*, 2010) คาดว่าโดยปกติ DNMT จะมี p53 consensus binding sequence อยู่ ณ ตำแหน่งโพรโมเตอร์ของ DNMT ซึ่งในเซลล์ปกติที่ไม่มีการติดเชื้อ HPV และ p53 ปกติ (wild type) จะทำให้ p53 ไปจับกับตำแหน่งของ consensus binding sequence ทำให้ไปกดการแสดงออกของ DNMT และเมื่อใดที่เกิดการติดเชื้อ HPV โปรตีน E6 จาก HPV จะไป จับกับ p53 และเกิดการย่อยสลายผ่าน ubiquitin-dependent degradation ของ p53 ทำให้ไม่มี p53 ไปจับกับ DNMT ส่งผลให้ DNMT ทำงานได้มากขึ้น หรือในเซลล์ที่ p53 เกิดการกลายไปจะทำให้ p53 ขาดความสามารถในการกระตุ้นการสร้าง DNMT1 ด้วยสาเหตุนี้เองอาจเป็นสาเหตุ หนึ่งที่ทำให้เซลล์ C33A ซึ่งเป็น p53 mutated สภาวะการทำงานของ p53 ผิดปกติไป ทำให้ DNMT ทำงานได้ ส่งผลให้ตรวจพบ DNA methylation ได้ในเซลล์ปกติ

ส่วนการที่ E7 ของไวรัส Human papillomavirus type 16 มีผลต่อการเกิดเมทิลเลชันของ ยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูกในงานวิจัยนี้ น่าจะมาจากสาเหตุที่ E7 oncoprotein ของ HPV โดยปกติจะประกอบไปด้วย 3 ตำแหน่งใหญ่ ๆ คือ conserved regions (CR) ประกอบไปด้วย NH₂-terminal CR1 domain, CR2 region และ COOH-terminal CR3 domain ซึ่งในบริเวณ สุดท้ายนี้เองคือ ตำแหน่งของ COOH-terminal CR3 domain จะเป็นบริเวณของ zinc finger ที่เป็น DNA-binding protein ซึ่ง ณ บริเวณนี้เองเป็นตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับ pRb โปรตีน และการจับกับโปรตีนตัวอื่น ๆ (Hebner and Laimins, 2006) มีความเป็นไปได้ว่าโปรตีน E7 ของ HPV type 16 สามารถจับกับ DNA methyltransferase (DNMT1) ได้ ณ ตำแหน่งบริเวณ COOH-terminal CR3 domain นี้และทำให้กิจกรรมของ DNMT1 สูงขึ้น (Burger *et al.*, 2007) ซึ่ง

DNMT1 มีความสำคัญต่อการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนต่าง ๆ รวมไปถึงยีน *CCNA1* ที่มีการแสดงออกที่ลดลงนั่นเอง

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษากลไกระดับเหนือพันธุกรรม ควรศึกษาที่โปรโมเตอร์ของยีนที่ต้องการและหากจะให้ครอบคลุมมากที่สุด ต้องใช้วิธี bisulfite genomic sequencing เพื่อที่จะวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด DNA methylation และระดับการแสดงออกของยีน *CCNA1* ได้อย่างถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

2. การทำ transfections โดยการถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน มี 2 วิธีคือ stable และ transient transfection จากประสบการณ์ผู้วิจัย คิดว่าควรทำรูปแบบของ transient transfection เพื่อดูผลในระยะเวลายันสั้นก่อน จากนั้นจึงกลับมาทำ stable transfection เพื่อลดระยะเวลาและความแน่นอนของงานวิจัย

รายการอ้างอิง

- Arends, M.J., Buckley, C.H., and Wells, M. 1998. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. J Clin Pathol. 51: 96-103.
- Banik, U., Bhattacharjee, P., Ahmad, S. U., and Rahman, Z. 2011. Pattern of epithelial cell abnormality in Pap Smear : A clinicopathological and demographic correlation. Cyto Journal. 8: 8.
- Beaudenon, S., and Huibregtse, J. M. 2008. HPV E6 E6AP and cervical cancer. BMC biochemistry. 9: S4.
- Bird, A. P. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature. 321: 209-13.
- Bosch, F. X., Manos, M. M., and Munoz, N. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide prospective. J Natl Cancer. 87: 796-802.
- Boulet, G., Horvath, C., Broeck, D. V., Sahebali, S., and Bogers, J. 2007 Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. IJBCB. 39: 2006-2011.
- Burgers, W.A., Blanchon, L., Pradhan, S., de Launoit, Y., Kouzarides, T., and Fuks, F. 2007. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferase. Oncogene. 26: 1650-1655.
- Chuan, Yi. 2002. The meaning of epigenetics. Article in Chinese. 24: 734-8.
- Coggin, J.R., and zur Hausen, H. 1979. Workshop on papillomaviruses and cancer. Cancer Res. 39: 545-6.
- Coulondre, C., Miller, J. H., Farabough, P. I., and Gilbert, W. 1978. Molecular basis of base substitution hotspots in Escherichia coli. Nature. 274: 775-80.
- Crawford, L. V., and Crawford, E. M. 1963. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. Virology. 21: 258-63.
- Cromme, F.V., Meijer, C.J., Snijders, P.J., Uytendinck, A., Kenemans, P., and

- Helmerhorst, T. 1993. Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions. Br J Cancer. 67: 1372-80.
- Cullen, A.P., Reid, R., Campion, M., and Lorincz, A.T. 1991. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. J Virol. 65: 606-12.
- Danos, O., Katinka, M., Yaniv, M., 1982. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. EMBOJ. 1: 231-236.
- De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., and zur Hausen, H. 2004. Classification of papillomaviruses. Virology. 324: 17-27.
- Delius, H., and Hofmann, B. 1994. Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. Curr Top Microbiol Immunol. 186: 13-32.
- Duenas-Gonzalez, A., Lizano, M., Candelaria, M., Cetina, L., Arce, C., and Cervera, E. 2005. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. Mol Cancer. 4: 38.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A., et al. 1982. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. Nucleic Acids Res. 10: 2709-21.
- Feinberg, A.P., and Tycko, B. 2004. The history of cancer epigenetics. Nat Rev Cancer. 4: 143-53.
- Fraga, M.F., and Esteller, M. DNA methylation: a profile of methods and applications.
- Franceschi, S., Rajkumar, T., Vaccarella, S., Gajalakshmi, V., Sharmila, A., and Snijders, P.J. 2003. Human papillomavirus and risk factors for cervical cancer in Chennai India a case-control study. Int J Cancer. 107: 127-133.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D. M., 2010.

- Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer.
- Genecards. cyclin A1 [online]. 2009. Available from : <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCNA1&search=ccna1> [2012,Sep 10]
- Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B., and Tommasino, M. 2010. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. Virus Genes. 40: 1-13.
- Gonzalez-Nicieza, R., Turner, D. P., and Connolly, B. A. 2001. DNA binding and cleavage selectivity of the Escherichia coli DNA G:T. J Mol Biol. 310: 501-8.
- Goon, P.K., Stanley, M.A., Ebmeyer, J., Steinstrasser, L., Upile, T., Jerjes, W., et al. 2009 HPV & head and neck cancer: a descriptive update. BioMed Central. 1: 36.
- Grunau, C. 2001. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. Nucleic Acids Research. 29: 65.
- Halfon, P., Trepo, E., Antoniotti, G., Bernot, C., Cart-Lamy, P., Khiri, H., et al. 2007. Prospective evaluation of the hybrid Capture 2 and AMPLICOR human papillomavirus (HPV) tests for detection of 13 high-risk type HPV genotypes in atypical squamous cells of uncertain significance. J clin Microbiol. 45: 313-6.
- Hebner, C. M., and Laimins, L. A. 2006. Human papillomavirus: Basic mechanism of pathogenesis and oncogenicity. Rev Med Virol. 16: 83-97.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D., and Baylin, S. B. 1996. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. National Acad Sciences. 93: 9821-6.
- James, B. MDGuidelines [online]. 2009. Available from : <http://www.mdguidelines.com/cancer-cervix> [2012,Sep 10]
- Jenson, A. B., Rosenthal, J. D., and Olson, C. 1980. Immunological relatedness of papillomavirus from different species. J Natl Cancer Inst. 64: 495-500.

- Ji, P., Agrawal, S., Diederichs, S., Baumer, N., Becker, A., Cauvet, T., et al. 2005. Cyclin A1, the alternative A-type cyclin, contributes to G1/S cell cycle progression in somatic cells. Oncogene. 24: 2739–2744.
- Jones, D.L., Alani, R.M., and Munger, K. 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. Genes Dev. 11: 2101–2111.
- Julie, E., and Norman, J. 2005. Humanpapillomavirus and cancer. Microbiology today. 116-20.
- Kesis, T. D., Slebos, R. J., Nelson, W. G., Kastanl, M. B., Plunkett, B. S., Han, S. M., et al. 1993. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. Medical Science. 90: 3988-3992.
- Khuaprema, K., Srivatanakul, P., Attasara, P., Sriplung, H., Wiangnon, S., and Sumitsawan, Y. 2010. Cancer in Thailand Volume. V, 2001-2003. National Cancer Institute.
- Kitkumthorn, N., Yanatatsanajit, P., Kiatpongsan, S., Phokaew, C., Triratanachat, S., Trivijitsilp, P., et al. 2006. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. BMC Cancer. 6: 55-56.
- Krider, J. W. 1981. The Shope papilloma to carcinoma complex of rabbits: a model system of neoplastic progression and spontaneous regression. Adv Cancer Res. 35: 81-110.
- MicrobiologyBytes. Papillomaviruses [online]. 2009. Available from : <http://www.microbiologybytes.com/virology/Papillomaviruses.html> [2012,Sep 10]
- Munoz, N., Bosh, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., et al. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Eng J Med. 348: 518-27.

- Muller, H. M., Widschwendter, A., Fiegl, H., Ivarsson, L., Goebel, G., Perkmann, E., et al. 2003. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. Cancer Res. 63: 7641-7645.
- Muller-Tidow, C., Ji, P., Diederichs, S., Potratz, J., Baumer, N., Kohler, G., et al. 2004. The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair. Mo Cell Biol. 24: 8917-28.
- Ozfirat, Z., and Korbonits, M. 2010. AIP gene and familial isolated pituitary adenomas. Molecular and Cellular Endocrinology. 326: 71-79.
- Pfister, H., Gissman, L., and zur Hausen, H. 1997. Partial characterization of proteins of human papillomaviruses (HPV) 1-3. Virology. 83: 131-7.
- Resnick, R. M., Cornelissen, M. T. E., Wright, D. K., Echinger, G. H., Fox, S. H., Schegget, J. T., et al. 1990. Detection and typing of Human papillomavirus in archival cervical cancer specimen by DNA amplification with consensus primers. J Natl Cancer Inst. 82: 1477-1484.
- Rivera, A., Mavila, A., Bayless, K. J., Davis, G. E., and Maxwell, S. A. 2006. Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian and lung carcinoma cells. Cell Mol Life. 63: 1425-39.
- Robertson, K. D. 2001. DNA methylation, methyltransferase, and cancer. Oncogene. 20: 3139-3155.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R., and Prydz, H. 1992. CpG islands as gene markers in the human genome. Genomics. 13: 1095-107.
- Laurson, J., Khan, S., Chung, R., Cross, K., and Raj, K. 2010. Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. Carcinogenesis. 31: 918-26.
- Sabrina, L., Matthew, J., José, A., and Derek, A. 2004. An ordinary differential equation model for the multistep transformation to cancer. Journal of Theoretical Biology.

231: 515-524.

Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. 1990.

The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. The Cell. 63: 1129-1136.

Sobin, L., and Wittekind, C. H. 2002. TNM Classification of malignant tumours. UICC.

6: 155-157.

Stanley, M. A., Pett, M. R., Coleman, N. 2007. HPV: from infection to cancer. Biochem

Soc Trans. 35: 1456-60.

Sunberg, J. P. 1987. Papillomavirus infections in animal. Papillomavirus and human

disease. 40-103.

Tajima, S. Laboratory of Epigenetics. [online]. 2009. Available from : <http://www.sci.osaka-u.ac.jp/introduction/eng/biology-b.html> [2012, Sep 10]

Tjong, M. Y., OUT, T. A., Terscheget, J., Burger, M. P. M., and van der Vange, N. 2001.

Epidemiologic and mucosal immunologic aspects of HPV infection and HPV-related cervical neoplasia in the lower female genital tract : A review. Int J

Gynecol Cancer. 11: 9-17.

Tokumar, Y., Yamashita, K., Osada, M., Nomoto, S., and Sun, D.I. 2004. Inverse

Correlation between Cyclin A1 Hypermethylation and p53 Mutation in Head and Neck Cancer Identified by Reversal of Epigenetic Silencing. Cancer Res. 64:

5982–5987.

Tucker, K. L. 2001. Methylated cytosine and the brain: a new base for neuroscience.

Neuron. 30: 649-652.

Yanatatsaneejit, P., Chalermchai, T., Kerekhanjanarong, V., Shotelersuk, K., Supiyaphun,

P., and Mutirangura, A. 2008. Promoter hypermethylation of CCNA1, RARRES1, and HRASLS3 in nasopharyngeal carcinoma. Oral Oncol. 44: 400-406.

Yang, R., Morosetti, R., and Koeffler, H. P. 1997. Characterization of a second human

cyclin A that is highly expressed in testis and in several leukemic cell lines.

Cancer Res. 57: 913-920.

Yeung, C. L. A., Tsang, W. P., Tsang, T. Y., Co, N. N., Yau, P. L., and Kwok, T. T. 2010.

HPV16-E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53.

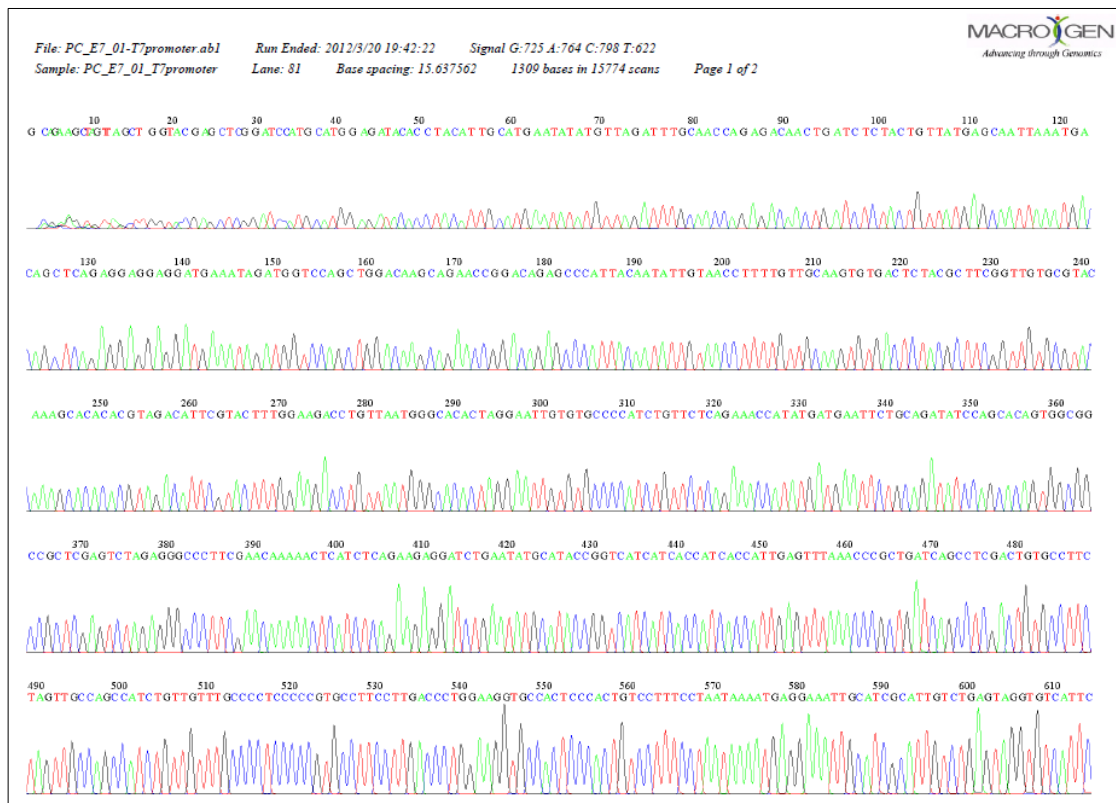
Oncology Report. 24: 1599-1604.

Zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer from basic studies to clinical

application. Nat Rev Cancer. 2: 342–350.

ภาคผนวก

ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pcDNA3.1_E7



รูปที่ 38 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pcDNA3.1_E7 โดยใช้ไพรเมอร์

T7 promoter forward ในการตรวจสอบ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายวัชรพงศ์ ภัคดีชายแดน เกิดเมื่อวันที่ 7 มีนาคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดสระบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต เมื่อปี พ.ศ. 2550 ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 และได้รับทุนอุดหนุนการศึกษา ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช