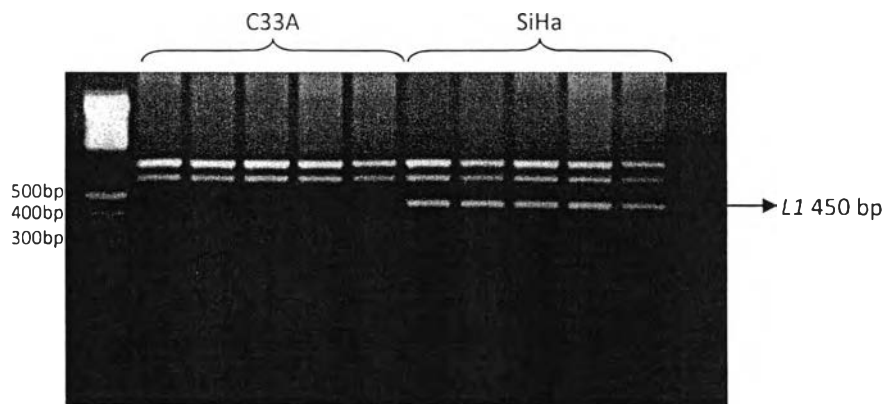


บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การตรวจการติดเชื้อ HPV และระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ และระดับการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A

1.1 การตรวจสอบการติดเชื้อ HPV ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A ใช้ไพรเมอร์ *L1* ของ HPV ในการทำ PCR ซึ่ง PCR product ที่ได้มีขนาด 450 คู่เบส และเมื่อตรวจสอบ PCR product ด้วยการย้อม 1% agarose gel electrophoresis ผลการทดลองพบว่า ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa มีการติดเชื้อ HPV ในขณะที่เซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก C33A ไม่มีการติดเชื้อ HPV ดังรูปที่ 18

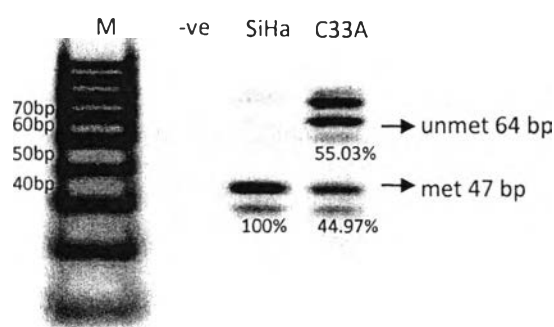


รูปที่ 18 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ HPV ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A โดย M คือ marker และ - ve คือ negative control

1.2 การตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*

ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์ มะเร็งปากมดลูก SiHa ซึ่งมีการติดเชื้อ HPV ชนิด 16 และ C33A ซึ่งไม่มีการติดเชื้อ HPV ด้วย เทคนิค methylated specific PCR (MSP) โดยใช้ primer 2 คู่ คือ methylated และ unmethylated primer ซึ่ง PCR product มีขนาด 47 และ 64 คู่เบส ตามลำดับ หลังจาก ตรวจสอบ PCR product ด้วย 8% acrylamide gel electrophoresis ดังรูปที่ 19 พบว่า

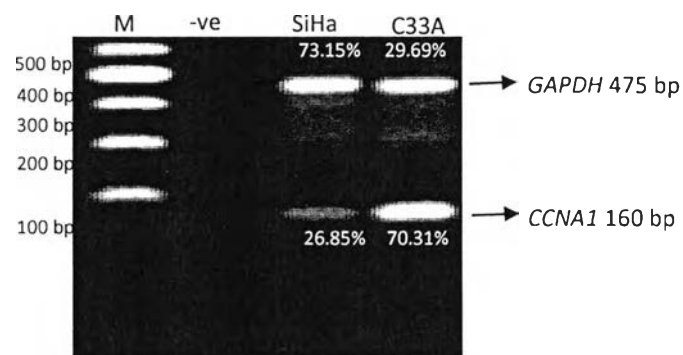
SiHa มีเปอร์เซ็นต์ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* คิดเป็น 100%
 และไม่มี unmethylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*
 C33A มีเปอร์เซ็นต์ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* คิดเป็น 44.97%
 มีเปอร์เซ็นต์ unmethylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* คิดเป็น 55.03%



รูปที่ 19 ผลการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A โดย M คือ marker และ -ve คือ negative control

1.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1*

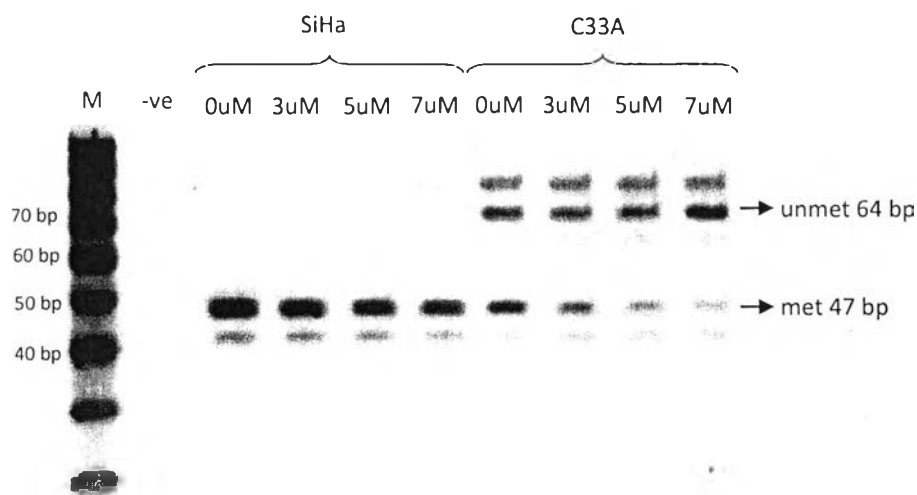
ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเรื้องกายมดลูก SiHa และ C33A ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR (RT-PCR) โดยใช้ primer 2 คู่ คือ 1) *GAPDH* primer ซึ่งเป็น housekeeping gene เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบการแสดงออกของ *CCNA1* ในแต่ละตัวอย่าง และ 2) *CCNA1* primer ซึ่ง PCR product มีขนาด 475 และ 160 คู่เบส ตามลำดับ หลังจากตรวจสอบ PCR product ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ดังรูปที่ พบว่า เซลล์ C33A มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* คือ 70.31% ในขณะที่ SiHa มีการแสดงออกของยีน *CCNA1* น้อยกว่า C33A คิดเป็น 26.85% ดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 ผลการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเรื้องกายมดลูก SiHa และ C33A โดย M คือ marker และ -ve คือ negative control

2. การศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์และการถอดการแสดงออกของยีน *CCNA1*

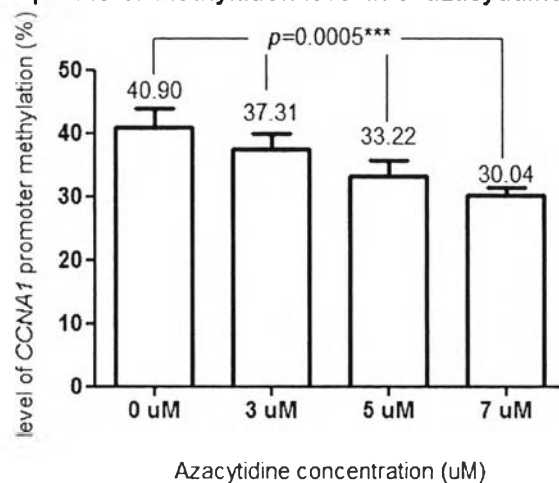
2.1 การศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa และ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้น 0, 3, 5 และ 7 μM เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 5 ซ้ำ ผลการศึกษา พบว่า บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* มีการเกิดเมทิลเลชันลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับ 5'-azacytidine ความเข้มข้น 0, 3, 5 และ 7 μM ตามลำดับ ซึ่งสังเกตได้จากแบนด์เมทิลเลชันจะค่อยๆ บางลงใน C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นเรื่อยๆ อย่างไรก็ตามใน SiHa เนื่องจากมีความเป็นเมทิลเลชันสูงถึง 100% จึงเห็นเพียงใน SiHa ที่ได้รับความเข้มข้นของ 5'-azacytidine สูง มีแบนด์เมทิลเลชันบางลงเท่านั้น ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 รูปผลการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A เมื่อได้รับ 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้น 0, 3, 5 และ 7 μM เป็นเวลา 7 วัน โดย M คือ marker และ -ve คือ negative control

ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธี one way ANOVA เพื่อศึกษาาระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine เป็นเวลา 7 วันจำนวน 5 ซ้ำ พบว่า ในเซลล์ SiHa ถึงแม้จะพบว่าแบนด์การเกิดเมทิลเลชันบางลงเมื่อได้รับ 5'-azacytidine ความเข้มข้นสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อวัดเปอร์เซ็นต์แบนด์แล้วพบว่าใน SiHa มีเปอร์เซ็นต์เมทิลเลชันเป็น 100% ที่ทุกความเข้มข้นของ 5'-azacytidine ที่ใช้ จึงไม่สามารถคำนวณผลทางสถิติได้ ในขณะที่เซลล์ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทดสอบผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติแล้วนั้นพบว่า 5'-azacytidine ส่งผลให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.0005^{***}$) ดังรูปที่ 22

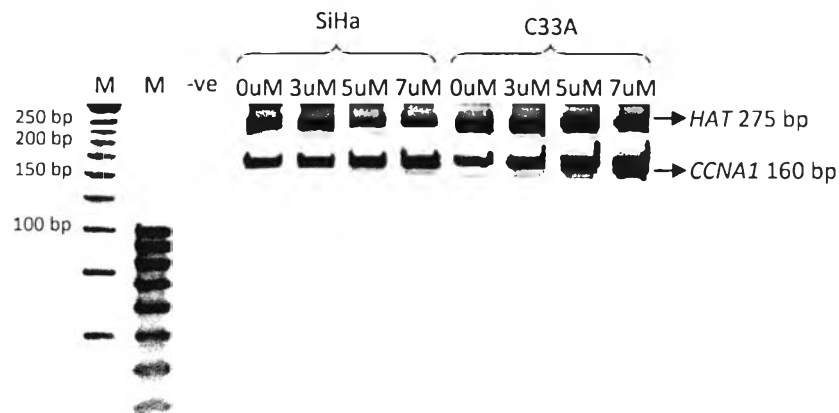
CCNA1 promoter methylation level in 5'-azacytidine treated C33A



รูปที่ 22 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ one way ANOVA เพื่อศึกษาการเกิดเมทิลเลชัน บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine ความเข้มข้น 0, 3, 5 และ 7 uM เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 5 ซ้ำ
 *** แสดงผลทดสอบทางสถิติซึ่งมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.001



2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa และ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้น 0, 3, 5 และ 7 μM เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 5 ซ้ำ ผลการศึกษา พบว่า ยีน *CCNA1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อได้รับ 5'-azacytidine ความเข้มข้น 0, 3, 5 และ 7 μM ตามลำดับทั้งในเซลล์ SiHa และ C33A ซึ่งสังเกตได้จากแบนด์ *CCNA1* จะหนาขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับ 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ดังรูปที่ 23



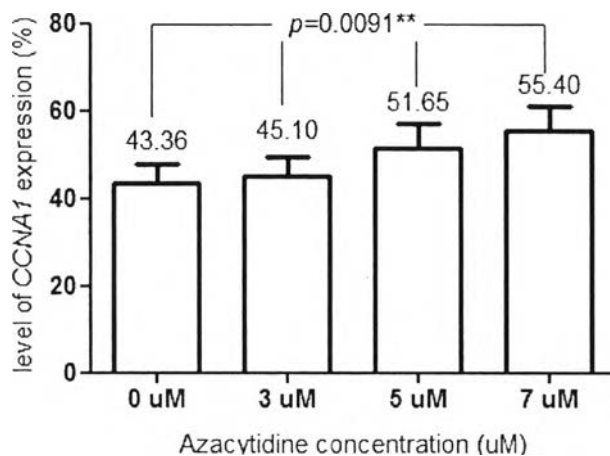
รูปที่ 23 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1*

ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A เมื่อได้รับ 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้น 0, 3, 5 และ 7 μM เป็นเวลา 7 วัน

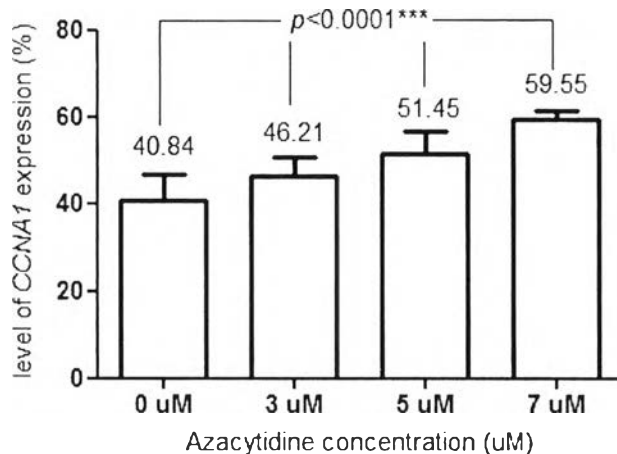
โดย M คือ marker และ -ve คือ negative control

ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธี one way ANOVA เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa และ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine เป็นเวลา 7 วันจำนวน 5 ซ้ำ พบว่า 5'-azacytidine ส่งผลให้การแสดงออกของยีน *CCNA1* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งในเซลล์ SiHa ($p=0.0091^{**}$) และ C33A ($p<0.0001^{***}$) ดังรูปที่ 24 อีกทั้งเมื่อความเข้มข้นของ 5'-azacytidine ยิ่งสูงขึ้น การแสดงออกของยีน *CCNA1* ก็ยิ่งสูงขึ้นด้วยเช่นกัน

CCNA1 expression in 5'-azacytidine treated SiHa



CCNA1 expression in 5'-azacytidine treated C33A



รูปที่ 24 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ one way ANOVA

เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa และ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine ความเข้มข้น 0, 3, 5 และ 7 uM เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 5 ซ้ำ (บน การแสดงออกของยีน (*CCNA1* ในเซลล์ SiHa ($p=0.0091^{**}$) (ล่าง) การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ($p<0.0001^{***}$) โดย ** และ *** แสดงผลทดสอบทางสถิติซึ่งมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01 และ 0.001 ตามลำดับ

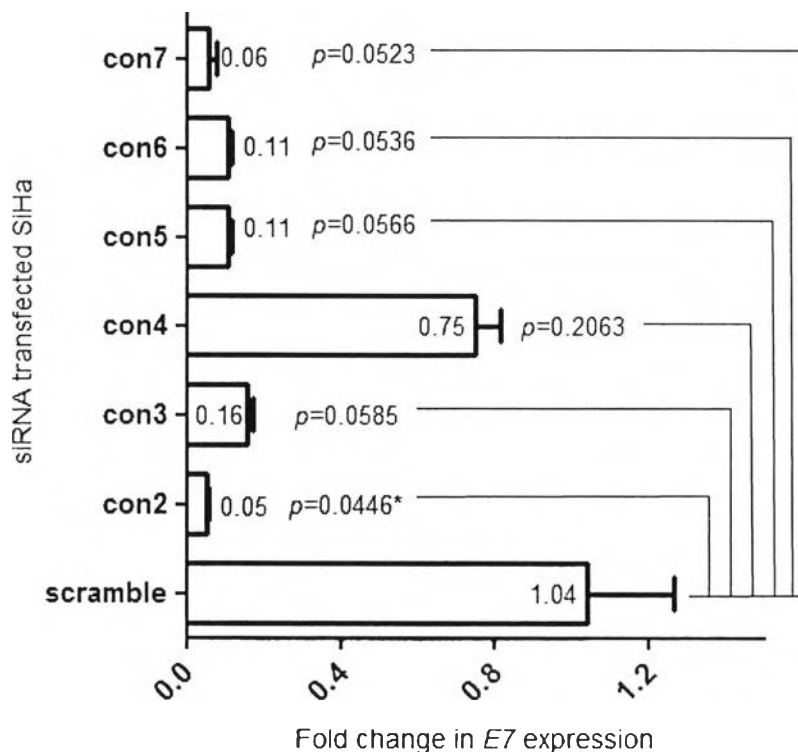
ผลการทดลองในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่า การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์และการแสดงออกของยีน *CCNA1* มีความสัมพันธ์กัน กล่าวคือ เมื่อบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* มีการเกิดเมทิลเลชันลดลงแล้วนั้น ยีน *CCNA1* จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น

3. การศึกษากลไกการชักนำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16

3.1 ปริมาณของ *E7* siRNA และระยะเวลาทรานสเฟกต์ที่เหมาะสม

3.1.1 เพื่อให้การ knock down *E7* เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด จึงหาปริมาณของ *E7* siRNA ที่เหมาะสมที่ทำให้ *E7* มีการแสดงออกลดลงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ scrambled siRNA ที่สภาวะต่างๆ จำนวน 6 สภาวะ ดังที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 19 และทรานสเฟกต์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้น วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *E7* ในสภาวะต่างๆ ด้วยเทคนิค real time-PCR และใช้วิธี $\Delta\Delta CT$ method ผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้สภาวะที่ 2 ยีน *E7* มีการแสดงออกน้อยที่สุด คือเหลือเพียง 0.05 เท่า ($p=0.0446^*$) ดังรูปที่ 25 จึงเลือกใช้ *E7* siRNA 30 pmol และ lipofect transfection reagent ปริมาตร 1 μ l ในปริมาตรสุดท้าย 100 μ l ในการทรานสเฟกต์ครั้งต่อไป

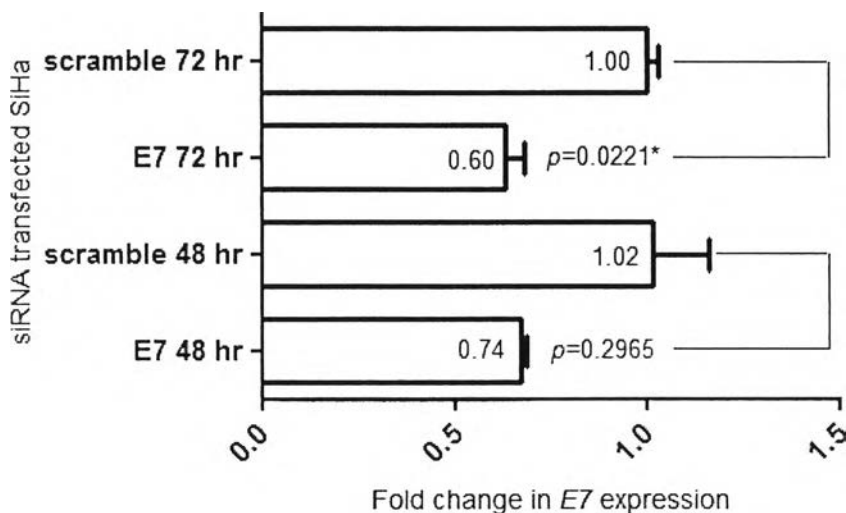
The most suitable *E7* siRNA quantity for transfection



รูปที่ 25 กราฟแท่งแสดงการแสดงผลการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA ที่สภาวะต่างๆ * แสดงผลทดสอบทางสถิติซึ่งมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

3.1.2 เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการทรานสเฟ็ก เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อเซลล์ รวมถึงการแสดงออกของยีนภายในเซลล์ จึงหาระยะเวลาทรานสเฟ็กที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ E7 มีการแสดงออกลดลงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ scrambled siRNA ซึ่งวิเคราะห์การแสดงออกของยีน E7 ด้วยเทคนิค real time-PCR และใช้วิธี $\Delta\Delta$ CT method ผลการทดลองพบว่า หลังจากทรานสเฟ็ก E7 siRNA 30 pmol และใช้ lipofect transfection reagent ปริมาตร 1 ไมโครลิตรเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ยีน CCNA1 มีการแสดงออกเหลือ 0.74 เท่า ($p=0.2965$) และ 0.60 เท่า ($p=0.0221^*$) ตามลำดับ ดังรูปที่ 26 ดังนั้น จึงใช้ระยะเวลาในการทรานสเฟ็ก 72 ชั่วโมงในการทดลองต่อไป

The most suitable duration for E7 siRNA transfection



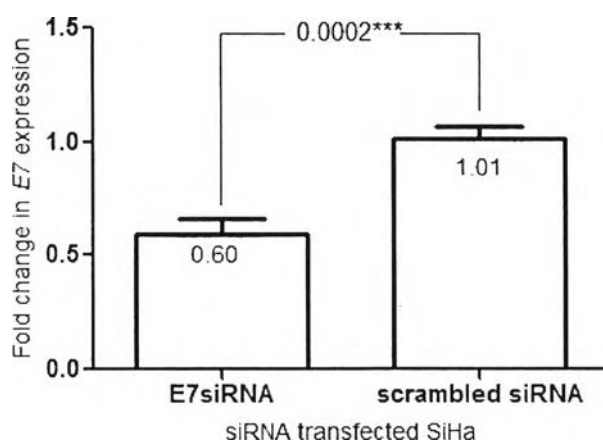
รูปที่ 26 กราฟแท่งแสดงการแสดงออกของยีน CCNA1 ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ E7 siRNA ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง * แสดงผลทดสอบทางสถิติซึ่งมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05



3.2 การลดการแสดงออกของยีน E7 ของ HPV ชนิด 16 ด้วยเทคนิค siRNA ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa

3.2.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน E7 ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ E7 siRNA และ scrambled siRNA จำนวน 8 ซ้ำ ด้วยเทคนิค real time-PCR และใช้วิธี $\Delta\Delta$ CT method ผลการศึกษาเมื่อทดสอบด้วยวิธีการทางสถิติพบว่า ยีน E7 ใน SiHa มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 0.60 เท่า ($p=0.0002^{***}$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ SiHa ที่ได้รับ scrambled siRNA ซึ่งมีการแสดงออกของยีน E7 เท่ากับ 1.01 ดังรูปที่ 27

E7 expression in E7 siRNA and scrambled siRNA transfected SiHa

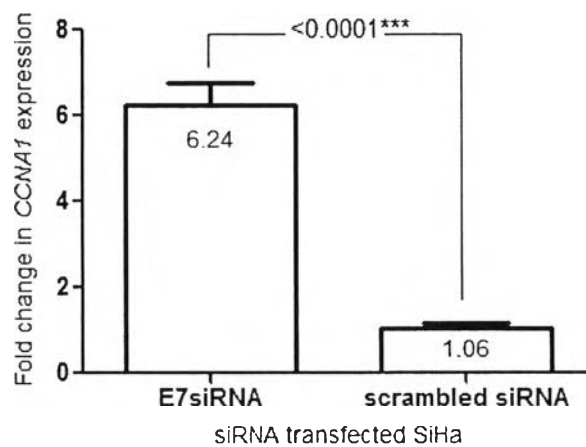


รูปที่ 27 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ independent sample t-test เพื่อวิเคราะห์การ
แสดงออกของยีน E7 ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ E7 siRNA และ scrambled siRNA

*** แสดงผลทดสอบทางสถิติซึ่งมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.001

3.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA จำนวน 8 ซ้ำ ด้วยเทคนิค real time-PCR และใช้วิธี $\Delta\Delta$ CT method ผลการศึกษาเมื่อทดสอบด้วยวิธีการทางสถิติพบว่า ยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 6.24 เท่า ($p < 0.0001^{***}$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ SiHa ที่ได้รับ scrambled siRNA ซึ่งมีการแสดงออกของยีน *CCNA1* เท่ากับ 1.06 ดังรูปที่ 28

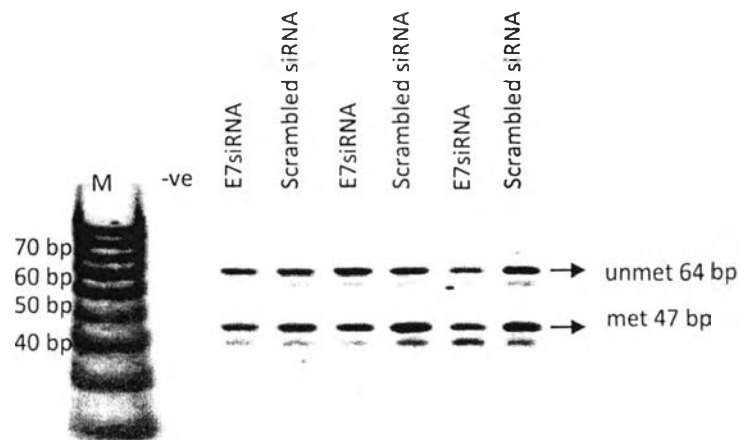
***CCNA1* expression in *E7* siRNA and scrambled siRNA transfected SiHa**



รูปที่ 28 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ independent sample t-test เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA

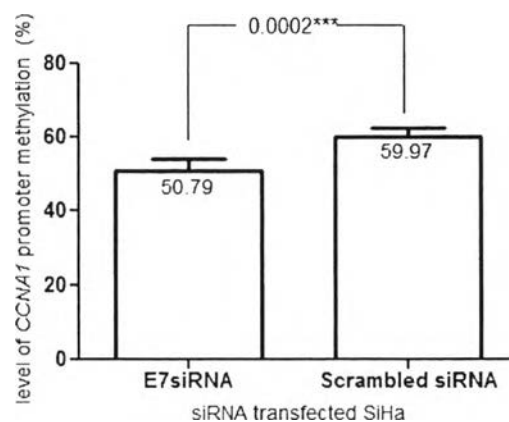
*** แสดงผลทดสอบทางสถิติซึ่งมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.001

3.2.3 การศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA จำนวน 8 ซ้ำ ด้วยเทคนิค MSP ผลการศึกษาพบว่า ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA มีการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ลดลงโดยสังเกตจากความเข้มของ methylated band ของ *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA จะบางกว่าเซลล์ SiHa ที่ได้รับ scrambled siRNA ดังรูปที่ 29 เมื่อทดสอบด้วยวิธีการทางสถิติพบว่า ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA มีการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 50.79% ($p=0.0002^{***}$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ SiHa ที่ได้รับ scrambled siRNA ซึ่งมีเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์เท่ากับ 59.97% ดังรูปที่ 30



รูปที่ 29 ผลการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA โดย M คือ marker และ -ve คือ negative control

CCNA1 promoter methylation level in *E7* siRNA transfected SiHa



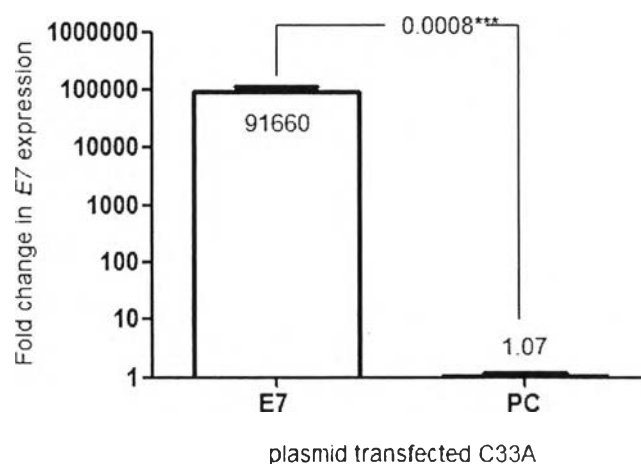
รูปที่ 30 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ paired sample t-test เพื่อวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA

*** แสดงผลทดสอบทางสถิติซึ่งมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.001

3.3 การชักนำให้มีการแสดงออกของยีน E7 ของ HPV ชนิด 16 ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก C33A

3.3.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน E7 ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ E7 และ empty plasmid จำนวน 8 ซ้ำ ด้วยเทคนิค real time-PCR และใช้วิธี $\Delta\Delta CT$ method ผลการศึกษาเมื่อทดสอบด้วยวิธีการทางสถิติพบว่า ยีน E7 ในเซลล์ C33A มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 91660 เท่า ($p=0.0008^{***}$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ C33A ที่ได้รับ empty plasmid ซึ่งมีการแสดงออกของยีน E7 เท่ากับ 1.07 ดังรูปที่ 31

E7 expression in E7 and empty plasmid (PC) overexpressed C33A



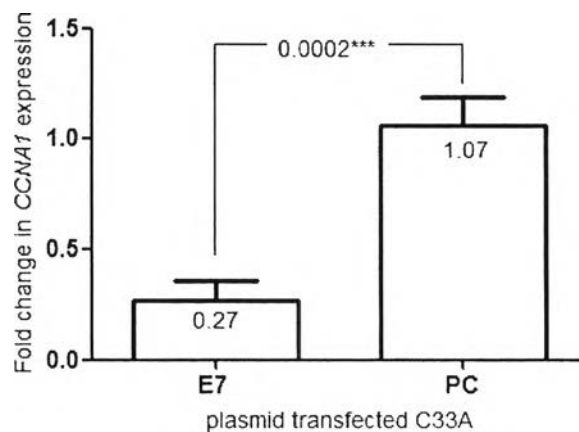
รูปที่ 31 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ independent sample t-test เพื่อวิเคราะห์การ แสดงออกของยีน E7 ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ E7 recombinant plasmid และ empty plasmid

*** แสดงผลทดสอบทางสถิติซึ่งมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.001

เลขหมาย..... 2W.2556
 เลขทะเบียน..... 6932
 วันเดือนปี..... 11 # 0. 2560

3.3.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ E7 และ empty plasmid จำนวน 8 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค real time-PCR และใช้วิธี $\Delta\Delta$ CT method ผลการศึกษาเมื่อทดสอบด้วยวิธีการทางสถิติพบว่า ยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 0.27 เท่า ($p=0.0002^{***}$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ C33A ที่ได้รับ empty plasmid ซึ่งมีการแสดงออกของยีน *CCNA1* เท่ากับ 1.07 ดังรูปที่ 32

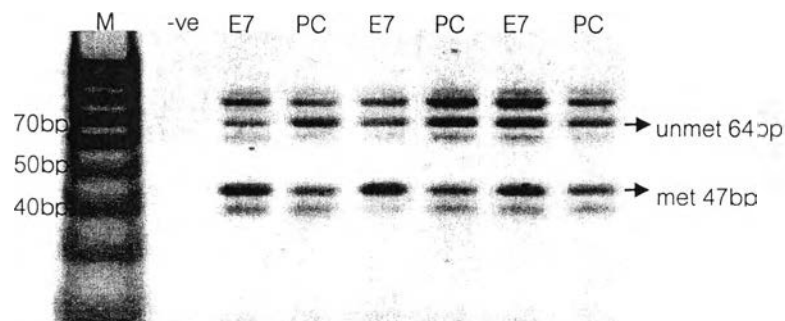
CCNA1 expression in E7 and empty plasmid (PC) overexpressed C33A



รูปที่ 32 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ independent sample t-test เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ E7 recombinant plasmid และ empty plasmid

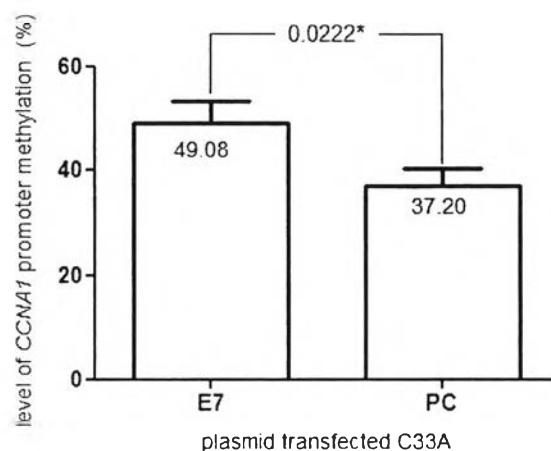
*** แสดงผลทดสอบทางสถิติซึ่งมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.001

3.3.3 การศึกษาการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid จำนวน 8 ซ้ำ ด้วยเทคนิค MSP ผลการศึกษาพบว่า ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid มีการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* เพิ่มขึ้นโดยสังเกตจากความเข้มของ methylated band ของ *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid จะเข้มกว่าเซลล์ C33A ที่ได้รับ empty plasmid ดังรูปที่ 33 และเมื่อทดสอบผลทางสถิติ พบว่า เซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid มีการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 49.08% ($p=0.0222^*$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ C33A ที่ได้รับ empty plasmid (PC) ซึ่งมีเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์เท่ากับ 37.20% ดังรูปที่ 34



รูปที่ 33 ผลการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid (PC) โดย M คือ marker และ -ve คือ negative control

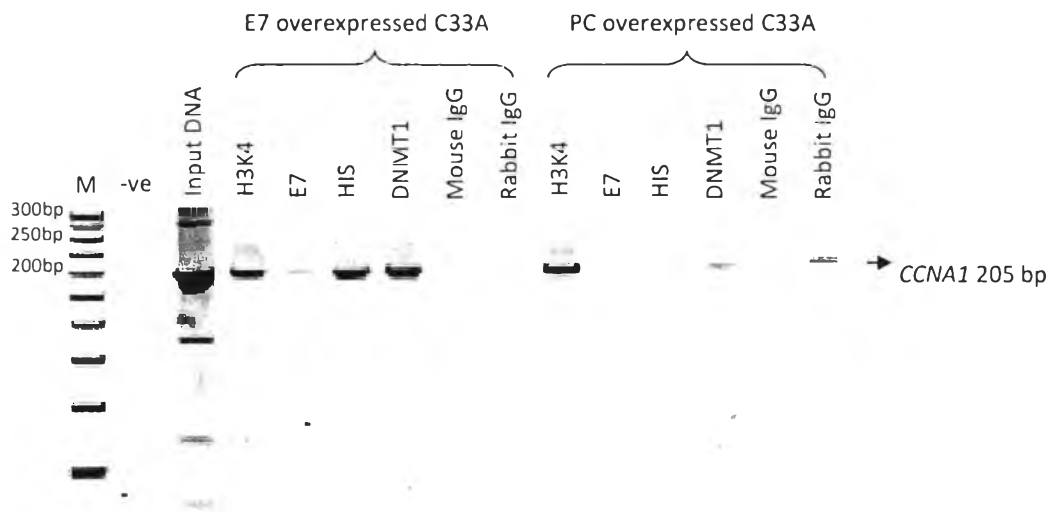
***CCNA1* promoter methylation level in *E7* overexpressed C33A**



รูปที่ 34 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ paired sample t-test เพื่อวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid โดย * แสดงผลทดสอบทางสถิติซึ่งมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

4. การวิเคราะห์การจับกันระหว่างโปรตีน E7 และ DNMT1 บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*

ในการศึกษาส่วนนี้ได้ทำ chromatin immunoprecipitation (ChIP) ในเซลล์ C33A ที่ถูกชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 และเซลล์ C33A ที่ได้รับ empty plasmid เพื่อพิสูจน์ว่า โปรตีน E7 และโปรตีน DNMT1 สามารถจับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ได้ จึงใช้ E7 antibody และ DNMT1 antibody ในการตกตะกอน E7 และ DNMT1 binding DNA ทั้งนี้ ใน *E7* recombinant plasmid นั้น ยีน *E7* ได้ต่ออยู่กับ HIS tag จึงใช้ HIS antibody ในการตกตะกอน HIS binding DNA อีกทั้งยังใช้ histone H3 tri methyl K4 antibody เป็น positive control antibody และยังใช้ normal mouse IgG และ normal rabbit IgG เป็น isotype control antibody เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ non-specific band ที่อาจเกิดขึ้น เนื่องจาก antibody แต่ละชนิดอาจมีความจำเพาะต่อ antigen ตัวอื่นได้ ผลการทดลองพบว่า โปรตีน E7 และ DNMT1 สามารถจับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ได้ ดังรูปที่ 35



รูปที่ 35 ผลการทำ chromatin immunoprecipitation ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid (PC) เพื่อยืนยันการจับกันระหว่างโปรตีน E7 และ DNMT1 บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดย M คือ marker และ -ve คือ negative control