

การระบุโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับเอชพีวไทย์ 16 อี 7 และบทบาทในการเกิดมะเร็งปากมดลูก



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 University Graduate School.

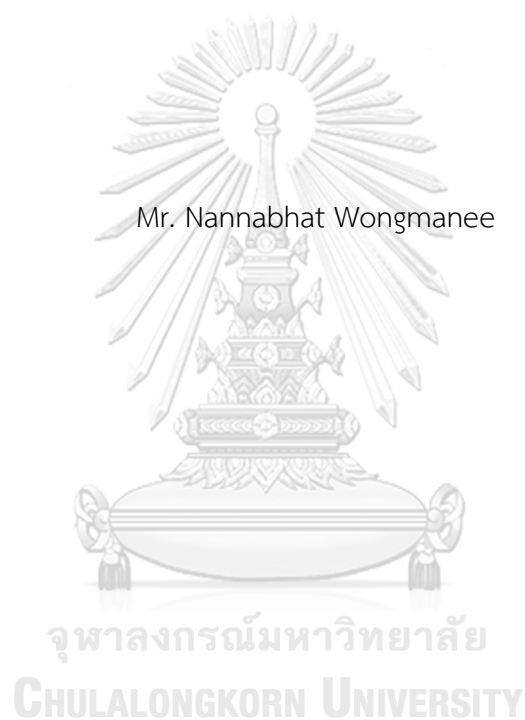
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2560  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

IDENTIFICATION OF HPV-TYPE-16 E7 INTERACTING PROTEIN AND ITS ROLE IN CERVICAL  
CARCINOGENESIS

Mr. Nannabhat Wongmanee



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 2017

Copyright of Chulalongkorn University



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การระบุโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับเอชพีวีไทป์ 16 อี 7 และ
	บทบาทในการเกิดมะเร็งปากมดลูก
โดย	นายนันท์นภัส วงศ์มณี
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. ศุภชัย โตภาณุรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรุดติ จุฬาลักษณ์านุกูล)  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต)  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร. ศุภชัย โตภาณุรักษ์)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทรา ยี่ทอง)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)

นันทน์ภัท วังค์มณี : การระบุโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับเอชพีวีไทป์ 16 อี 7 และบทบาทในการเกิดมะเร็งปากมดลูก (IDENTIFICATION OF HPV-TYPE-16 E7 INTERACTING PROTEIN AND ITS ROLE IN CERVICAL CARCINOGENESIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
 หลัก: รศ. ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. ศุภชัย โสภณรุรักษ, หน้า.

โปรตีน E6 และ E7 ของเชื้อไวรัสเอชพีวีไทป์16 เป็นสาเหตุหลักสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก ซึ่งโปรตีน E6 และ E7 ของไวรัสจะจับกับโปรตีน p53 และ pRb ของโฮสต์ตามลำดับ นอกจากนี้กระบวนการเปลี่ยนแปลงในระดับเหนือพันธุกรรมยังเป็นอีกหนึ่งสาเหตุของการเกิดมะเร็ง แต่กลไกที่ทำให้เกิดยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการแสดงออกของโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ส่งผลต่อการกระตุ้นการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยสร้างคอมเพล็กซ์กับเอนไซม์ DNMT1 ดังนั้นจึงได้ตั้งสมมติฐานว่าน่าจะมีโปรตีนชนิดที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์เป็นตัวนำพากลุ่มคอมเพล็กซ์นี้มายังบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ในงานวิจัยได้นำวิธีการทางโปรตีโอมิกส์มาใช้ในการตรวจระบุโปรตีน โดยการใส่โปรตีน E7 เป็นตัวล่อ (bait) จากนั้นนำโปรตีนที่ติดตามมาด้วยกันไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางแมสสเปกโตรเมตรี ซึ่งพบทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 ในขณะเดียวกันทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A ถูกพบจากการทำนายด้วยชีวสารสนเทศซึ่งใช้ยีน *CCNA1* เป็นต้นแบบของยีนเป้าหมาย เมื่อทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีนทั้งสามชนิดพบว่า โปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 มีอันตรกิริยากับโปรตีน TFAP2A และโปรตีน TFAP2A มีอันตรกิริยากับโปรตีน YY1 นอกจากนี้ยังตรวจพบว่ายีน *FOXC1* และ *VEGFA* มีการลดการแสดงออกเมื่อมียีน E7 ของเชื้อเอชพีวีเข้ามาเกี่ยวข้อง แต่พบการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ที่ยีน *FOXC1* เพียงยีนเดียว มากไปกว่านั้นเมื่อทำการตรวจยืนยันการจับกันระหว่างโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 โปรตีน YY1 และโปรตีน TFAP2 กับดีเอ็นเอบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนทั้งสองด้วยวิธี Chromatin immunoprecipitation พบว่ามีเพียงยีน *FOXC1* ที่สามารถจับได้กับโปรตีนทั้งสามชนิด ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า ยีน *FOXC1* ถูกชักนำให้เกิดการเมทิลเลชันแล้วส่งผลให้เกิดการลดการแสดงออกเช่นเดียวกับยีน *CCNA1*

ภาควิชา พฤษศาสตร์

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5772280223 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS: CERVICAL CANCER / HPV / DNA METHYLATION / PROTEOMICS

NANNABHAT WONGMANEE: IDENTIFICATION OF HPV-TYPE-16 E7 INTERACTING PROTEIN AND ITS ROLE IN CERVICAL CARCINOGENESIS. ADVISOR: ASSOC. PROF. PATTAMAWADEE YANATATSANEEJIT, Ph.D., CO-ADVISOR: SUPACHAI TOPANURAK, Ph.D., pp.

Viral oncoproteins E6 and E7 of HPV type 16 are ones of the cause for cervical cancer development. It is recognized that E6 and E7 can bind with p53 and pRb, respectively. However, viral regulation of host epigenetics by HPV which is another mechanism for tumorigenesis remains elusive, particularly, the association between the E7 protein of HPV type 16 and host promoter hypermethylation of proto-oncogene. Previous studies suggested that interacting between HPV type 16 E7 protein and DNMT1 contribute to hypermethylation of *CCNA1* promoter. In the research, proteomics was used to identify a transcription factor by using the E7 protein of HPV type 16 as the bait and found YY1 from identification by mass spectrometry. In the same time, TFAP2A was predicted by bioinformatics using the *CCNA1* gene as the model of target gene. When testing the interaction between all three proteins, the E7 protein of HPV 16 had an interaction with the TFAP2A and the TFAP2A interacted with the YY1. It also detected that *FOXC1* and *VEGFA* genes were reduced expression when involved by HPV16E7 gene. Only *FOXC1* was found a methylation at the promoter. Moreover, chromatin immunoprecipitation assay was found only *FOXC1* could be interacted by all three proteins. Suggest that the *FOXC1* gene was induced by methylation and resulted in decreasing the expression level as well as the *CCNA1* gene.

Department: Botany

Student's Signature .....

Field of Study: Genetics

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2017

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยการให้ความช่วยเหลือแนะนำของ รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตรวจสอบ และแก้ไขร่างวิทยานิพนธ์นี้มาโดยตลอด รวมไปถึงการให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้กำลังใจระหว่างการดำเนินงานวิจัย ผู้เขียนจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ศุภชัย โตะภาณุรักษณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมจากภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่คอยให้คำปรึกษา และคำแนะนำระหว่างดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล ที่กรุณาให้เกียรติเป็นประธาน โดยมี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง และดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล เป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรภัค เรียมทอง อาจารย์จากภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่คอยช่วยเหลือและให้คำแนะนำในระหว่างดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาชีวโมเลกุล และพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ในระหว่างดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ นาย ศักดิ์สกล ปรีสพันธ์ น.สพ.ดร. พิรุทย์ เขียววิชัย นางสาว จุฑามาศ สุขพัฒน์ธี รวมไปถึงพี่ๆน้องๆ ที่ภาควิชาชีวโมเลกุล และพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และสอนเทคนิคต่าง ๆ ในระหว่างดำเนินงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัว ซึ่งเปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนคอยช่วยเหลือและให้กำลังใจจนสำเร็จการศึกษา และขอขอบพระคุณครูบาอาจารย์ทุกท่าน และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสิทธิประสาทความรู้ให้แก่ผู้เขียนมา ณ โอกาสนี้

คุณความดีและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้เขียนขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมา



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ี
สารบัญรูป.....	iii
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	5
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลงานวิจัย.....	7
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
มะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer).....	9
เชื้อไวรัสแพปิโลมาไวรัส (Papillomavirus).....	11
โครงสร้างจีโนมของเอชพีวี.....	11
วงจรชีวิตของเอชพีวี.....	13
บทบาทในการก่อมะเร็งของยีนในเอชพีวี.....	13
โครงสร้างของโปรตีนอี7 ของเอชพีวี.....	16
กลไกระดับเหนือพันธุกรรม (Epigenetics).....	17
ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation).....	18

อันตรกิริยาระหว่างโปรตีน (Protein-protein interaction) .....	21
การศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน (Proteomics).....	21
การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation) .....	22
Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	23
Western blot.....	24
แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry).....	25
เทคนิค Label-free Quantitative Proteomic .....	27
Label-free LC-MS/MS .....	27
การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin digestion) .....	27
Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS).....	28
Chromatin immune precipitation (ChIP).....	28
Methylation specific-PCR (MSP).....	29
ปฏิกิริยาไบซัลไฟต์ (Bisulfite conversion).....	30
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	32
วัสดุอุปกรณ์.....	33
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	34
สารเคมีทั่วไป.....	34
สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ .....	35
สารเคมีที่ใช้นำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์.....	35
สารเคมีที่ใช้สกัดโปรตีน .....	36
สารเคมีสำหรับตกตะกอนโปรตีน.....	36
สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาโปรตีน .....	37

สารเคมีสำหรับทำ real time RT-PCR.....	37
สารเคมีสำหรับ methylation specific PCR.....	37
สารเคมีสำหรับ Chromatin immunoprecipitation .....	37
วิธีดำเนินงานวิจัย .....	38
1. การค้นหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวี	
ไทป์ 16 .....	38
1.1 การถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ (transformation).....	38
1.2 การสกัดพลาสมิด.....	39
1.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ .....	39
1.3.1 การเพาะเลี้ยง HEK293 จากเซลล์ที่แช่แข็ง.....	39
1.3.2 การเลี้ยงเซลล์ HEK293 .....	40
1.4 การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HEK293 (Transfection) .....	40
1.5 การสกัดโปรตีนจาก HEK293 .....	41
1.6 การวัดความเข้มข้นของโปรตีน .....	41
1.7 การตรวจสอบโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16.....	42
1.8 การตกตะกอนโปรตีน.....	43
1.8.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วย Ni-NTA agarose resin.....	43
1.8.2 การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้แอนติบอดี.....	43
1.9 การวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีน .....	44
1.9.1 การเตรียมเปปไทด์ .....	44
1.9.2 การวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีน.....	45
1.10 การทำนายโปรตีนทรานสคริปชันโดยใช้ชีวสารสนเทศ.....	45

2. การตรวจสอบการแสดงออก การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนในเซลล์ที่มีโปรตีน E7 และการทดสอบยืนยันการจับกันระหว่างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ โปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 กับโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมายของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์นั้น.....	46
2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ .....	46
2.1.1 การเพาะเลี้ยง C33A จากเซลล์ที่แช่แข็ง .....	46
2.1.2 การเลี้ยงเซลล์ C33A.....	46
2.2 การนำพลาสมิดเข้าสู่ HEK293 และ C33A.....	47
2.3 การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	48
2.4 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สม (cDNA).....	48
2.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน.....	49
2.6 การคำนวณการแสดงออกของยีน .....	51
2.7 การสกัดดีเอ็นเอ.....	51
2.8 การทำทรีโซเดียมไบซัลไฟต์ (Sodium bisulfite treatment).....	52
2.9 การทำ methylation specific PCR (MSP) .....	52
2.10 การทดสอบยืนยันการจับกันระหว่างโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 และทรานสคริปชันแฟกเตอร์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมาย .....	55
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	59
1.การค้นหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16....	59
1.1 การตรวจสอบยีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 ในพลาสมิด .....	59
1.2 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 หลังจากนำพลาสมิดเข้าสู่ HEK293.....	63
1.3 การทดสอบการตกตะกอนโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 โดยใช้ HisPur™ Ni-NTA resin.....	65

1.4 การยับยั้งอันตรกิริยาของโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 กับเอนไซม์ DNMT1.....	66
1.5 การระบุโปรตีนที่มีอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 .....	68
1.5.1 การใช้วิธีการทางแมสสเปกโตรเมทรีในการค้นหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ .....	68
1.5.2 การใช้ข้อมูลชีวสารสนเทศค้นหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ .....	70
1.6 การทดสอบอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 และโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A .....	71
1.7 การทดสอบอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1.....	74
1.8 การทดสอบอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 และโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 .....	75
1.9 การใช้ชีวสารสนเทศทำนายอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์.....	76
2. การตรวจสอบการแสดงออก การเมทิลเลชันของยีน และตรวจสอบการจับกันระหว่างยีนและโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1.....	78
2.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน.....	78
2.2 การตรวจสอบการเมทิลเลชันของยีนบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนใช้เทคนิค Methylation specific PCR (MSP) .....	80
2.3 ตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรโมเตอร์ของยีน <i>FOXC1</i> และ <i>VEGFA</i> กับโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1 .....	83
บทที่ 5 อภิปราย และสรุปผลการวิจัย .....	87
อภิปรายผลการวิจัย.....	87
สรุปผลการวิจัย.....	93
.....	95
รายการอ้างอิง .....	95
ภาคผนวก.....	102

การเตรียมสาร .....	102
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	106



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ส่วนผสมที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ .....	42
ตารางที่ 2 ลำดับไพรเมอร์ของยีนที่ใช้ใน real-time RT PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน.....	49
ตารางที่ 3 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ real-time RT-PCR.....	50
ตารางที่ 4 สภาวะในการทำ real-time RT PCR.....	50
ตารางที่ 5 ลำดับไพรเมอร์สำหรับดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน <i>FOXC1</i> และ <i>VEGFA</i> .....	52
ตารางที่ 6 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>FOXC1</i> และ <i>VEGFA</i> โดยการใช้ไพรเมอร์ชุด methylation .....	53
ตารางที่ 7 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>FOXC1</i> และ <i>VEGFA</i> โดยการใช้ไพรเมอร์ชุด unmethylation.....	53
ตารางที่ 8 สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>FOXC1</i> .....	54
ตารางที่ 9 สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>VEGFA</i> .....	54
ตารางที่ 10 ลำดับไพรเมอร์ของยีน <i>FOXC1</i> และ <i>VEGFA</i> ที่ใช้ทำ PCR หลังจากการทำ CHIP .....	57
ตารางที่ 11 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน <i>FOXC1</i> และ <i>VEGFA</i> หลังจากการทำ CHIP .....	57
ตารางที่ 12 สภาวะในการทำ PCR ของยีน <i>FOXC1</i> หลังจากการทำ CHIP.....	58
ตารางที่ 13 สภาวะในการทำ PCR ของยีน <i>VEGFA</i> หลังจากการทำ CHIP .....	58
ตารางที่ 14 ผลโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์จากวิธีการทางแมสสเปกโทรเมตรีที่วิเคราะห์จากค่า Abundance ratio.....	68
ตารางที่ 15 ผลโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์จากวิธีการทางแมสสเปกโทรเมตรีที่ได้จากการแยกวิเคราะห์ของแต่ละตัวอย่าง .....	69

ตารางที่ 16 สรุปผลการวิเคราะห์โปรตีนจากวิธีการทางแมสสเปกโตรเมตรีและจาก  
ชีวสารสนเทศ..... 76





## สารบัญรูป

รูปที่ 1 ตำแหน่งของเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นบริเวณปากมดลูก.....	9
รูปที่ 2 ระยะของการพัฒนาในเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูกที่ติดเชื้อเอชพีวี.....	10
รูปที่ 3 วงจรชีพของเอชพีวี และการติดเชื้อบริเวณเยื่อปากมดลูก.....	13
รูปที่ 4 โครงสร้างจีโนมของเอชพีวี.....	15
รูปที่ 5 การทำงานของยีน E6 ของเอชพีวี.....	15
รูปที่ 6 การทำงานของยีน E7 ของเอชพีวี.....	16
รูปที่ 7 โครงสร้างของโปรตีน E7.....	16
รูปที่ 8 การเติมหมู่เมทิลบนเบสไซโตซีน.....	18
รูปที่ 9 Deamination ของเบสไซโตซีน และ 5-เมทิลไซโตซีน.....	19
รูปที่ 10 การจับกันระหว่าง Ni-NTA และ polyhistidine tag.....	22
รูปที่ 11 การตกตะกอนโปรตีนโดยการใช้แอนติบอดีจำเพาะ (Immuno precipitation).....	23
รูปที่ 12 การเข้าจับของสาร SDS กับโปรตีนส่งผลให้โปรตีนเป็นเส้นตรงและมีประจุเป็นลบ.....	24
รูปที่ 13 หลักการทำ western blot.....	25
รูปที่ 14 องค์ประกอบของแมสสเปกโตรเมตรี.....	26
รูปที่ 15 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน.....	28
รูปที่ 16 หลักการ Chromatin immune precipitation.....	29
รูปที่ 17 การเปลี่ยนเบสไซโตซีนเป็นยูราซิลภายใต้ปฏิกิริยาไบซัลไฟต์.....	30
รูปที่ 18 หลักการการทำ Methylation specific-PCR (MSP) และ Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA).....	31
รูปที่ 19 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ในฐานข้อมูล NCBI.....	61
รูปที่ 20 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเปล่า เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอ ไทด์ของยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ในฐานข้อมูล NCBI.....	63

รูปที่ 21	พลาสมิดลูกผสมที่ถูกแทรกยีน <i>HPV16E7</i> และถูกติดฉลากติดตามด้วย myc และ ฮิสทีดีน (6x Histidine tag) ที่ปลาย C-terminal.....	64
รูปที่ 22	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 หลังจากนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ HEK293 .....	65
รูปที่ 23	ผลการตรวจสอบโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 หลังจากทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย HisPur™ Ni-NTA resin .....	66
รูปที่ 24	ผลการตรวจสอบเอนไซม์ DNMT1 หลังจากทำการตกตะกอนโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ด้วย HisPur™ Ni-NTA resin.....	67
รูปที่ 25	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>CCNA1</i> .....	70
รูปที่ 26	ผลการทำนายทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีความน่าจะเป็นที่จะเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> บนโปรโมเตอร์ด้วยโปรแกรม Jaspar.....	71
รูปที่ 27	ผลการทำนายทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีความน่าจะเป็นที่จะเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> บนโปรโมเตอร์ด้วยโปรแกรม Promo.....	71
รูปที่ 28	ผลการตรวจสอบทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A หลังจากทำการตกตะกอนโปรตีน ....	72
รูปที่ 29	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบโปรตีน TFAP2A จากการตรวจสอบด้วยวิธี western blot .....	73
รูปที่ 30	ผลการตรวจสอบทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 หลังจากทำการตกตะกอนโปรตีน TFAP2A โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน TFAP2A .....	74
รูปที่ 31	ผลการตรวจสอบทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 หลังจากทำการตกตะกอนโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ด้วย HisPur™ Ni-NTA resin.....	75
รูปที่ 32	ภาพการทำนายอันตรกิริยาของกลุ่มโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ได้จากวิธีแมสสเปกโทรเมตรีและชีวสารสนเทศ และเอนไซม์ DNMT1.....	77
รูปที่ 33	กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน <i>FOXC1</i> , <i>VEGFA</i> , <i>CGA</i> , <i>USP9X</i> และ <i>PAMC5</i> ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์เทียบกับ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์.....	78

รูปที่ 34 กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน <i>FOXC1</i> และ <i>VEGFA</i> ในเซลล์ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน <i>E7</i> ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์เทียบกับ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์.....	79
รูปที่ 35 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>FOXC1</i> ในเซลล์ HEK293.....	80
รูปที่ 36 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>FOXC1</i> ในเซลล์ C33A ...	81
รูปที่ 37 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>VEGFA</i> ในเซลล์ HEK293.....	82
รูปที่ 38 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>VEGFA</i> ในเซลล์ C33A....	83
รูปที่ 39 ผลการตรวจสอบการทำ CHIP ของยีน <i>FOXC1</i> ในเซลล์ HEK293.....	84
รูปที่ 40 ผลการตรวจสอบการทำ CHIP ของยีน <i>VEGFA</i> ในเซลล์ HEK293 .....	85



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer) เป็นมะเร็งที่พบได้เป็นอันดับ 2 ของมะเร็งในสตรีทั่วโลก รองจากมะเร็งเต้านม และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งของสตรีทั่วโลกเป็นอันดับ 3 รองจากมะเร็งเต้านมและมะเร็งปอด สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพปพิโลมา (Human papillomavirus; HPV) และเป็นการติดเชื้อเอชพีวีชนิดที่มีความเสี่ยงสูง ได้แก่ เอชพีวีไทป์ 16 (HPV16) และเอชพีวีไทป์ 18 (HPV18) ผ่านทางการมีเพศสัมพันธ์ (Munoz et al., 2003) สำหรับในประเทศไทยตรวจพบความชุกของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 และไทป์ 18 ในโรคมะเร็งปากมดลูกคิดเป็นร้อยละ 74-75 (Chichareon et al., 1998; Thomas et al., 2001) การดำเนินโรคของมะเร็งปากมดลูกเริ่มต้นเมื่อผู้ป่วยได้รับเชื้อเอชพีวีที่เยื่อบุผิวปากมดลูกผ่านรอยแผลหรือรอยถลอกเล็ก ๆ ที่เกิดขึ้นขณะมีเพศสัมพันธ์ โดยเป็นการติดเชื้อเอชพีวีบริเวณ basal cells ซึ่งเชื้อเอชพีวีจะเพิ่มจำนวนในเซลล์เยื่อบุปากมดลูกจำนวนมากและกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวไม่หยุดจนคืบหน้ารุนแรงเกิดพยาธิสภาพขึ้นเป็นรอยโรค High grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) จนกระทั่งพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ในที่สุด (Reid and Campion, 1988) ในปัจจุบันการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกเป็นการตรวจทางเซลล์วิทยาของปากมดลูก ซึ่งเป็นการตรวจหาความผิดปกติของเซลล์ที่เป็นผลมาจากการติดเชื้อเอชพีวี เพื่อที่จะสืบค้นหารอยโรคและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่อาจเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง ซึ่งเรียกวิธีการเก็บเซลล์ตัวอย่างบริเวณปากมดลูกนี้ว่า แปปสเมียร์ (Papanicolaou; (Pap) smear) (zur Hausen, 2002) แต่วิธีการตรวจนี้ต้องอาศัยนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ นักเซลล์วิทยาตลอดจนพยาธิแพทย์ที่มีความชำนาญ เพราะอาจทำให้การแปลผลเกิดผลลบลวงได้ ซึ่งสาเหตุอาจเกิดได้จากความผิดพลาดของการเก็บตัวอย่าง การตรวจไม่พบเซลล์ที่ผิดปกติ รวมไปถึงการแปลผลที่ผิดพลาด เป็นต้น (Gay, Donaldson and Goellner, 1985) ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการตรวจหาเชื้อเอชพีวีซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีการทางอณูพันธุศาสตร์ โดยการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเอชพีวี ซึ่งจะให้ผลการตรวจคัดกรอง และติดตามผลการรักษาได้ดีและแม่นยำกว่าวิธีการย้อมสีตรวจดูความผิดปกติของเซลล์ (Halfon et al., 2007)

ไวรัสแพปพิโลมาที่ก่อโรคในมนุษย์ เรียกว่า ฮิวแมนแพปพิโลมาไวรัส ซึ่งจีโนมของเชื้อเอชพีวีนี้ประกอบด้วยโมเลกุลของดีเอ็นเอสายคู่ที่เรียงตัวกันเป็นวงกลม และประกอบด้วยคู่เบสประมาณ 7,900 คู่เบส บรรจุอยู่ในโปรตีนห่อหุ้ม และแบ่งออกเป็น 3 บริเวณ คือ 1) Long control region (LCR) ทำหน้าที่ในการควบคุมการถอดรหัส 2) Early genes ประกอบด้วยยีน *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6*

และ E7 ซึ่งจะทำหน้าที่ช่วงแรกในการจำลองตัวเองของไวรัส และการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ 3) Late genes ประกอบด้วยยีน L1 และ L2 ยีนส่วนนี้จะทำหน้าที่ในช่วงหลังโดยสร้างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเปลือกหุ้ม (Burd, 2003) การติดเชื้อเอชพีวีมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ episomal form และ integration form ในรูปแบบของ integration form จะเป็นรูปแบบที่พบได้มาก โดยจะมีผลต่อการทำลายยีนในจีโนมของไวรัส ซึ่งจะมีผลต่อการแสดงออกของยีน E2, E6 และ E7 ที่ผิดปกติไป (Goon et al., 2009) โดยปกติแล้วยีน E2 จะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมยีน E6 และ E7 ในการสร้างโปรตีน E6 และ E7 ตามลำดับ โปรตีน E6 ของเชื้อเอชพีวีจะมีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน p53 ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็งโดยกีดการทำงานผ่าน Ubiquitin pathway ทำให้เซลล์ไม่ตายตามกำหนด (apoptosis) และโปรตีน E6 ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ telomerase ซึ่งมะเร็งจะออกฤทธิ์ด้านการหดสั้นของเทโลเมียร์ (telomere) ในโครโมโซมในขณะที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งการหดสั้นของเทโลเมียร์นี้มีผลต่ออายุของเซลล์ทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อเอชพีวีมีชีวิตยืนยาว (Scheffner et al., 1990; Mantovani and Banks, 2001) ส่วนโปรตีน E7 จะไปรบกวนการทำงานของ retinoblastoma (pRb) ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง ที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ทำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวอย่างต่อเนื่องจนกลายเป็นก้อนมะเร็ง (Jones and Munger, 1996)

สาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูกคือปัจจัยทางพันธุกรรม ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งมีอยู่ด้วยกัน 2 กลุ่ม คือยีนก่อมะเร็ง และยีนต้านมะเร็ง โดยจะพบการแสดงออกของยีนก่อมะเร็งที่มากกว่าปกติ และยีนต้านมะเร็งมีการแสดงออกที่น้อยกว่าปกติทำให้เซลล์ที่ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด การที่ยีนต้านมะเร็งเกิดการแสดงออกที่น้อยเกิดจากปัจจัยหลาย ๆ สาเหตุ และสาเหตุประการหนึ่งที่สำคัญคือการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็ง (Duenas-Gonzalez et al., 2005)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) คือหนึ่งในกลไกการควบคุมเหนือพันธุกรรม ซึ่งเป็นการเติมหมู่เมทิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ห้าของเบสไซโตซีน (cytosine) ที่ตามด้วยเบสกวานีน (guanine) หรือที่เรียกว่า CpG dinucleotides โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase; DNMT) ในมนุษย์พบว่า มี CpG-island ประมาณร้อยละ 60 ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนทั้งหมด ซึ่งในเซลล์มะเร็งจะพบดีเอ็นเอเมทิลเลชันสูงบริเวณ CpG-island ที่อยู่ในโปรโมเตอร์ของยีน เรียกว่า โปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมทิลเลชัน (promoter hypermethylation) ภาวะโปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมทิลเลชันของยีนมีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของยีนส่งผลให้ยีนถูกยับยั้งการแสดงออก โดยจะเป็นการขัดขวางโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor) ต่าง ๆ ไม่ให้เข้าไปจับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน (Badal et al., 2003; Sharma, Kelly and Jones, 2010)

มีรายงานถึงความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิลเลชันและการยับยั้งการแสดงออกของยีนจนนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง เช่น การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในโรคมะเร็งโพรงหลังจมูก และมะเร็งศีรษะและคอ (Sriuranpong et al., 2004; Tokumar et al., 2004) และยังพบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูกมากถึงร้อยละ 93 (Kitkumthorn et al., 2006) รวมไปถึงงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องกันระหว่างการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในรูปแบบการติดเชื้อเอชพีวีไพบ์ 16 แบบ integration (Yanatsaneejit, Mutirangura and Kitkumthorn, 2011) และพบการชักนำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยการจับกันระหว่างโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไพบ์ 16 กับเอนไซม์ DNA methyltransferase 1 (DNMT1) (Chalertpet et al., 2015) แต่ยังมีรายงานว่าโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไพบ์ 16 เมื่อจับกับเอนไซม์ DNMT1 ทำให้เกิดการลดระดับการทำงานของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์จนนำไปสู่การลดระดับการแสดงออกของยีน *E-cadherin* แต่การลดการแสดงออกของยีน *E-cadherin* ไม่ได้เกิดจากการเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์ แต่เกิดจากกระบวนการโครมาทินรีโมเดลลิง (Laurson et al., 2010) ซึ่งมีรายงานวิจัยพบว่าโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีสามารถจับกับโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ต่าง ๆ เช่น SP1 (Gloss and Bernard, 1990), AP1 (Thierry et al., 1992), HMGI/Y (Bouallaga et al., 2000), GRE, NF1, YY1, Oct-1 และ C/EBP (Hoppe-Seyler and Butz, 1994) เป็นต้น

ดังนั้นจากรายงานดังกล่าวสรุปได้ว่า โปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไพบ์ 16 เมื่อจับกับเอนไซม์ DNMT1 สามารถชักนำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* แต่ไม่ได้ชักนำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *E-cadherin* นั้นหมายความว่าไม่ใช่ทุกยีนที่โปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไพบ์ 16 จะชักนำให้เกิดการเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์แล้วส่งผลให้ยีนเกิดการลดการแสดงออก แต่เนื่องจากองค์ความรู้เกี่ยวกับความจำเพาะของโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไพบ์ 16 กับการเกิดเมทิลเลชันของยีนเป้าหมายยังไม่ชัดเจน ดังนั้นผู้วิจัยตระหนักถึงปัญหาและความสำคัญของโรคมะเร็งปากมดลูก จึงประสงค์ที่จะมุ่งเน้นศึกษาวิเคราะห์หาโปรตีนชนิดอื่นที่คาดว่าจะมีอันตรกิริยา (interaction) ร่วมกับโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไพบ์ 16 และเอนไซม์ DNMT1 จนนำไปสู่การชักนำให้เกิดการเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน และส่งผลทำให้ยีนลดการแสดงออกในที่สุด ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้นั้นทำให้สามารถทราบกลไกที่แท้จริงของการเกิดเมทิลเลชัน รวมไปถึงสามารถหา ยีนต้านมะเร็งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกด้วยกลไกเมทิลเลชันนี้ เพื่อนำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจวินิจฉัย ทำนายการเกิดมะเร็งปากมดลูก และยังสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้นี้ไปพัฒนายาเพื่อป้องกันการเกิดมะเร็งที่เกิดจากติดเชื้อเอชพีวี

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ค้นหาโปรตีนที่มีอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 และเอนไซม์ DNMT1 โดยเฉพาะโปรตีนที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์
2. ทดสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจที่จะศึกษาในเซลล์ไลน์ต้นแบบที่มีการนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทม์ 16 และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์
3. ทดสอบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนที่สนใจที่จะศึกษาในเซลล์ไลน์ต้นแบบ
4. ทดสอบการจับของโปรตีน E7 และทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่พบว่า E7 สามารถชักนำการเกิดเมทิลเลชัน

### ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาหาโปรตีนที่มีอันตรกิริยาร่วมกับโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 และเอนไซม์ DNMT1 ทำให้เกิดการชักนำไปสู่การเกิดเมทิลเลชัน โดยในการวิจัยครั้งนี้เริ่มแรกผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 เพื่อนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ จากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 ด้วยวิธี Ni-NTA purification ซึ่งจากสมมติฐานคาดว่าจะมีโปรตีนที่มีอันตรกิริยาร่วมติดตามลงมาด้วย แล้วนำโปรตีนที่ตกตะกอนได้ไปวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) โดยคาดว่าจะพบโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ และในขณะเดียวกันใช้ชีวสารสนเทศร่วมในการทำนายโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์โดยใช้บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน CCNA1 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีรายงานว่ามีการจับกับกลุ่มโปรตีนคอมเพลกซ์ของโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทม์ 16 กับเอนไซม์ DNMT1 เป็นต้นแบบในการค้นหา จากนั้นเลือกยีนที่น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์เป้าหมายเป็นจำนวน 2 ยีนโดยใช้ชีวสารสนเทศ แล้วทำการทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293 และเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ปากมดลูก C33A เพื่อนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 เข้าสู่เซลล์ แล้วทดสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real time RT-PCR พร้อมทั้งวิเคราะห์การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่ได้ทำการคัดเลือกมาด้วยวิธี Methylation-specific PCR และทำการทดสอบยืนยันการจับกันระหว่างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์และยีนที่ได้ทำการเลือกด้วยวิธี Chromatin immunoprecipitation จากเซลล์ไต HEK293 ที่มีการนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 เข้าสู่เซลล์

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบกลไกการชักนำการเกิดเมทิลเลชันที่แน่นชัด ซึ่งจะช่วยให้มีความเข้าใจในระดับพันธุศาสตร์โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้มากขึ้น
2. ข้อมูลที่ได้จากการค้นหายีนด้านมะเร็งที่เกิดการเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ สามารถนำไปต่อยอดในการพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจวินิจฉัย และทำนายการเกิดมะเร็งปากมดลูก
3. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้จากการทราบกลไกการเกิดเมทิลเลชันนี้ไปพัฒนาคิดค้นยาเพื่อป้องกันการเกิดมะเร็งที่เกิดจากติดเชื้อเอชพีวี

## วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์หาโปรตีนที่มีอันตรกิริยาร่วมกับโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 และเอนไซม์ DNMT1 นอกจากนี้ยังเป็นการค้นหายีนด้านมะเร็ง ที่เกิดการเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ซึ่งงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 4 ส่วนใหญ่ๆ ได้แก่

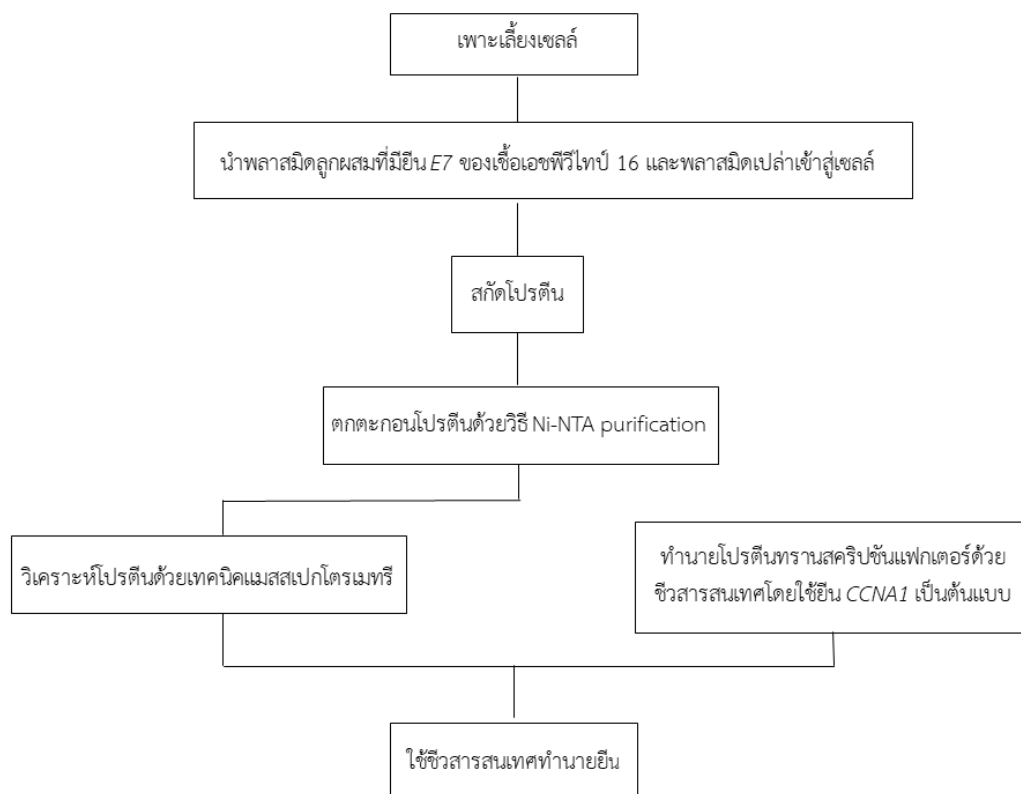
1. การวิเคราะห์หาโปรตีนและยีนด้านมะเร็ง
  - 1.1 เพาะเลี้ยง HEK293
  - 1.2 นำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์
  - 1.3 ทำการสกัดโปรตีนหลังจากทำการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์
  - 1.4 ทำการตกตะกอนโปรตีน E7 ด้วยวิธี Ni-NTA purification
  - 1.5 นำโปรตีนที่ตกตะกอนได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)
  - 1.6 ใช้ชีวสารสนเทศทำนายโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์โดยใช้บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน CCNA1 เป็นต้นแบบในการค้นหา
  - 1.7 วิเคราะห์ข้อมูลหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ และใช้ชีวสารสนเทศ เพื่อวิเคราะห์ทำนายหายีนด้านมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์
2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้านมะเร็ง
  - 2.1 เพาะเลี้ยง HEK293 และ C33A
  - 2.2 นำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์



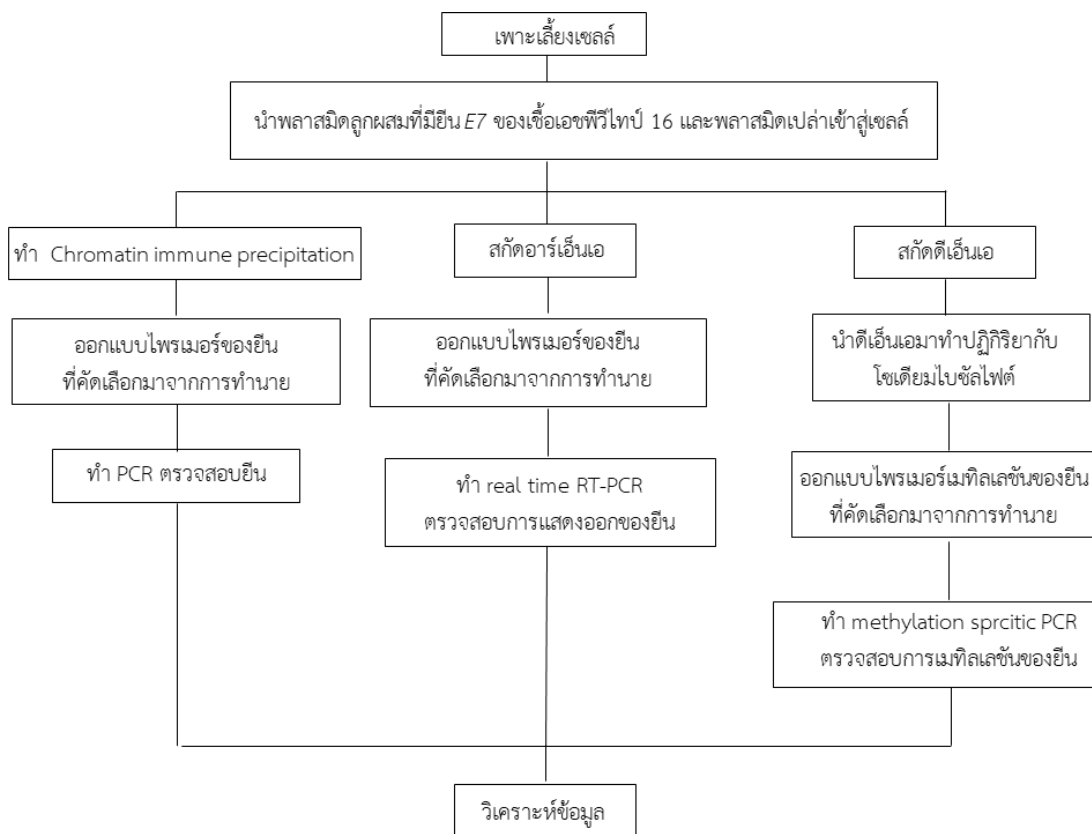
- 2.3 สกัดอาร์เอ็นเอ และทำ reverse transcription
  - 2.4 ออกแบบไพรเมอร์ของยีนต้านมะเร็งที่ได้ทำการคัดเลือกไว้
  - 2.5 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนต้านมะเร็งที่ได้ทำการคัดเลือกไว้ด้วยวิธี real time RT-PCR
3. การตรวจสอบเมทิลเลชันของยีนต้านมะเร็ง
    - 3.1 เพาะเลี้ยง HEK293 และ C33A
    - 3.2 นำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์
    - 3.3 สกัดดีเอ็นเอ
    - 3.4 แบ่งดีเอ็นเอบางส่วนมาทำปฏิกิริยากับ Bisulfite
    - 3.4 ออกแบบไพรเมอร์ของยีนต้านมะเร็งที่ได้ทำการคัดเลือกไว้ โดยออกแบบไพรเมอร์ 2 แบบ ดังนี้ แบบที่1 เป็นไพรเมอร์แบบปกติ และแบบที่2 เป็นไพรเมอร์แบบเมทิลเลชัน
    - 3.5 ตรวจสอบเมทิลเลชันของยีนต้านมะเร็งด้วยวิธี methylated specific PCR (MSP-PCR)
  4. การทดสอบยืนยันการจับกันของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์และโปรโมเตอร์ของยีน
    - 4.1 เพาะเลี้ยง HEK293
    - 4.2 นำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์
    - 4.3 สกัดโปรตีนและดีเอ็นเอ แล้วทำการตกตะกอนโปรตีน E7 และ โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ด้วยวิธี Chromatin immunoprecipitation
    - 4.4 แยกดีเอ็นเอออกจากโปรตีนที่ทำการตกตะกอนได้
    - 4.5 ออกแบบไพรเมอร์ของยีนต้านมะเร็งที่ได้ทำการคัดเลือกไว้
    - 4.6 ตรวจสอบดีเอ็นเอที่แยกได้จากการทำ Chromatin immunoprecipitation ด้วยวิธีพีซีอาร์

## ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลงานวิจัย

การวิเคราะห์หาโปรตีนและยีนต้านมะเร็ง



การตรวจสอบการแสดงออก การตรวจสอบเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน และ การทดสอบยืนยันการจับกันระหว่างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์และยีนเป้าหมาย



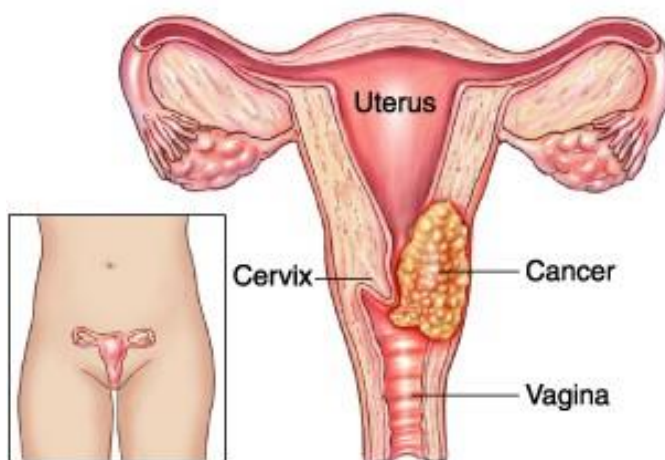
## บทที่ 2

### เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### มะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer)

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 2 ของมะเร็งในสตรีทั่วโลก รองจากมะเร็งเต้านม และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งของสตรีมากเป็นอันดับที่ 3 รองจากมะเร็งเต้านม และมะเร็งปอด ซึ่งในแต่ละปีจะพบผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ส่วนมากร้อยละ 85 เป็นผู้ป่วยที่อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา สำหรับประเทศไทยพบข้อมูลสถิติสถาบันมะเร็ง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข รายงานถึงการพบผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ในปี พ.ศ. 2559 มากเป็นอันดับที่ 2 ถึงร้อยละ 13 ซึ่งพบในผู้ป่วยตั้งแต่อายุ 25 ขึ้นไป (การแพทย์, 2559)

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่เกิดจากการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของเซลล์บริเวณปากมดลูก และเซลล์ที่ผิดปกตินี้สามารถลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียง (invasion) หรือแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆ ของร่างกายผ่านทางระบบโลหิตและน้ำเหลืองได้ (metastasis) โดยมีปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ได้แก่ การมีพฤติกรรมทางเพศโดยที่มีการเปลี่ยนคู่นอนบ่อย ๆ การมีเพศสัมพันธ์ขณะอายุน้อย การสูบบุหรี่ การมีระบบภูมิคุ้มกันที่อ่อนแอ พันธุกรรม รวมไปถึงการมีประวัติเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเสี่ยงเหล่านี้เป็นสาเหตุที่มีโอกาสทำให้เกิดการเป็นมะเร็งปากมดลูก ในปัจจุบันมีการศึกษาทางระบาดวิทยา ทางไวรัสวิทยา และทางอณูชีววิทยาจำนวนมากยืนยันแล้วว่าเชื้อไวรัส HPV (Human papillomavirus) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูก (Mahmoodi et al., 2016)

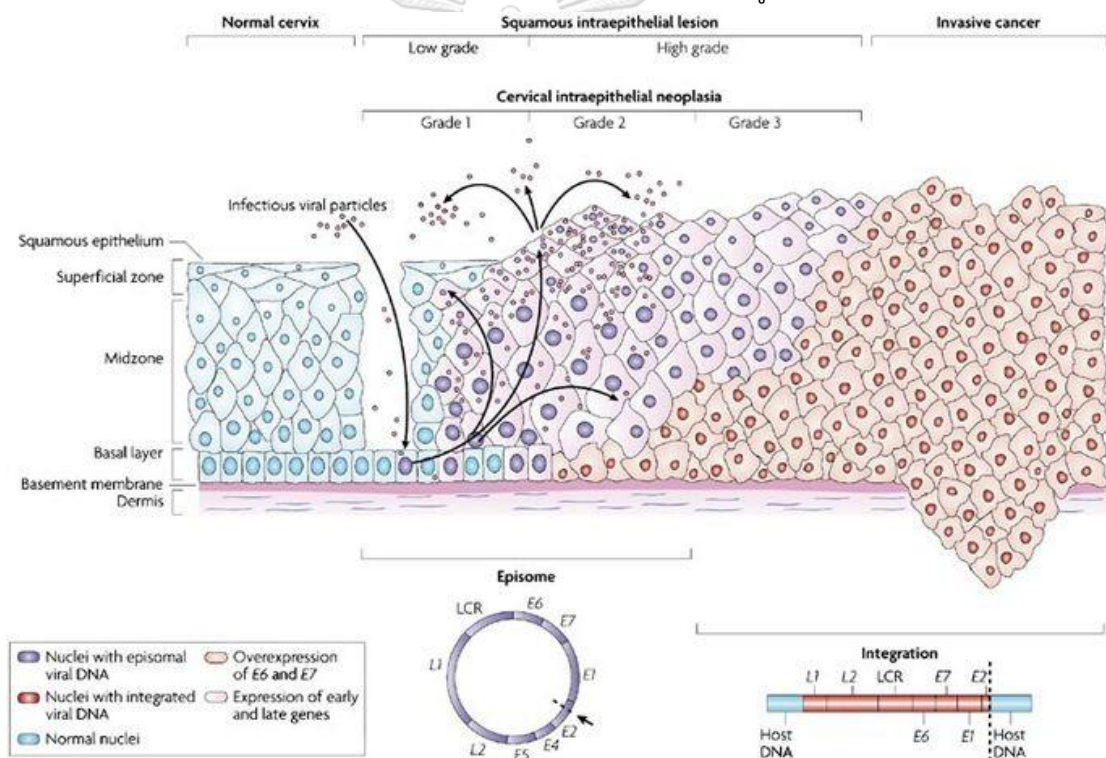


รูปที่ 1 ตำแหน่งของเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นบริเวณปากมดลูก

(Lolaia, 2017: online)

ลักษณะรอยโรคของมะเร็งปากมดลูกบริเวณที่มีการติดเชื้อ มีลักษณะของระยะตั้งแต่ก่อนเกิดมะเร็ง ไปจนถึงระยะที่พัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก ซึ่งสามารถตรวจดูได้พยาธิสภาพของเซลล์บริเวณปากมดลูก โดยแบ่งจากระยะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เรียกว่า Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) ได้เป็น 3 ระยะ คือ

- CIN I (mild dysplasia) เป็นระยะที่เซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูกที่มีการติดเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงน้อย
- CIN II (moderate to marked dysplasia) เป็นระยะที่เซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูกมีการเปลี่ยนแปลงปานกลาง ไม่มีการเพิ่มจำนวนของไวรัส
- CIN III (severe dysplasia to carcinoma in situ) เป็นระยะที่เซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูกมีการเปลี่ยนแปลงมาก มีโอกาสพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกได้



Nature Reviews | Cancer

## รูปที่ 2 ระยะของการพัฒนาในเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูกที่ติดเชื้อเอชพีวี

(Woodman, Collins and Young, 2007) ได้รับอนุญาตจากผู้แต่ง

การดำเนินของโรคมะเร็งปากมดลูกเริ่มต้นจากการติดเชื้อเอชพีวีชนิดที่มีความเสี่ยงสูงที่เยื่อบุผิวปากมดลูก โดยที่เชื้อเอชพีวีจะเข้าสู่นิวเคลียสของ basal cells หรือ immature squamous metaplastic cells ที่อยู่ใน transformation zone โดยในระยะแรกดีเอ็นเอของเอชพีวีจะเข้าไปใน

นิวเคลียสของ basal cells และอยู่ในรูปจีโนมอิสระ (episome) ซึ่งดีเอ็นเอของเอชพีวีในรูปแบบนี้จะไม่รวมเข้ากับดีเอ็นเอของนิวเคลียสของ basal cells และยังไม่ได้มีการเพิ่มจำนวน แต่เมื่อจีโนมของเอชพีวีอยู่ในรูปเส้นตรง (integration) สามารถที่จะผนวกเข้ากับดีเอ็นเอในนิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของไวรัสมากขึ้น และมีการกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น

### เชื้อไวรัสแพปิโลมาไวรัส (Papillomavirus)

ไวรัสแพปิโลมาจัดอยู่ในตระกูล Papillomaviridae เป็นไวรัสที่มีขนาดเล็ก ประกอบด้วยดีเอ็นเอสายคู่ สามารถพบได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ ไวรัสชนิดนี้แบ่งออกได้เป็น 16 genus ที่พบในมนุษย์มีทั้งหมด 5 genus ไวรัสแพปิโลมาที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์เรียกว่า ฮิวแมนแพปิโลมาไวรัส (Human papillomavirus) หรือเรียกสั้นๆว่า เอชพีวี (HPV) ซึ่ง genus และ species ที่มีความสำคัญทางคลินิก คือ อัลฟา แพปิโลมาไวรัส (alpha-papillomavirus) โดย species ที่สามารถก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก ได้แก่ species 7 และ species 9 โดยแต่ละ species ประกอบด้วยไทป์ต่าง ๆ ดังนี้ (Bernard, 2005)

- Species 7 ได้แก่ เอชพีวีไทป์ 18, 39, 45, 59, 68 และ 70

- Species 9 ได้แก่ เอชพีวีไทป์ 16, 31, 33, 35, 52, 58 และ 67

ซึ่งทั้งสอง species นี้ เรียกว่าเอชพีวีที่อยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูง (high risk HPV) กล่าวคือ เป็นเอชพีวีที่ทำให้เกิดรอยโรคภายในเยื่อบุปากมดลูกขั้นต่ำ (low-grade squamous intraepithelial lesions; LSIL), รอยโรคภายในเยื่อบุปากมดลูกขั้นสูง (high-grade squamous intraepithelial lesions; HSIL) และมะเร็ง จึงเรียกเอชพีวีอยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูงว่า oncogenic type และพบว่าสาเหตุของการเป็นมะเร็งปากมดลูกชนิด squamous cell carcinoma และ adenocarcinoma เกิดจากเอชพีวีไทป์ 16 และ 18 ถึงร้อยละ 70 (Clifford et al., 2006)

### โครงสร้างจีโนมของเอชพีวี

เอชพีวีเป็นไวรัสมีขนาดอนุภาคเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 55 นาโนเมตร ซึ่งจีโนมของเชื้อเอชพีวีประกอบด้วยดีเอ็นเอ 2 สาย ประกอบด้วยคู่เบสประมาณ 8,000 คู่เบสเรียงตัวกันเป็นวงกลม (Double stranded circular DNA) อยู่ภายในเปลือกหุ้มโปรตีน (capsid) มี 8-10 open reading frames (ORFs) อยู่ภายใน ซึ่ง ORFs จะเรียงตัวเหลื่อมกันบางส่วนอยู่บนสายดีเอ็นเอเพียงสายเดียว (Crawford and Crawford, 1963) จีโนมของเอชพีวี แบ่งออกเป็น 3 บริเวณ คือ

1) Long control region (LCR) หรือ upstream regulatory region (URR) เป็นบริเวณที่ไม่สามารถถอดรหัสให้โปรตีน ใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองตัวเอง และเป็นที่จับกับโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์หลาย ชนิด

2) Early regions เป็นยีนส่วนที่จะแสดงออกในช่วงแรกของการเพิ่มจำนวนไวรัส ซึ่งประกอบไปด้วยยีน E1, E2, E4, E5, E6 และ E7 โดยที่แต่ละยีนมีหน้าที่สำคัญดังนี้

- E1 ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไวรัส
- E2 ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไวรัสและควบคุมการถอดรหัสรวมไปถึงควบคุมการแสดงออกของยีน E6 และ E7
- E4 ยีนส่วนนี้ยังไม่ทราบหน้าที่หลักแน่ชัด แต่อาจเป็นไปได้ในการช่วยสร้างเอ็มอาร์เอ็นเอให้มีเสถียรภาพมากขึ้น และคาดว่าเป็นตัวควบคุมให้ไวรัสออกจากเซลล์
- E5 ทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ และช่วยเพิ่ม immortalization ของเซลล์ โดยยับยั้งการแสดงออกของยีนต้านมะเร็ง p21 ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อวัฏจักรของเซลล์
- E6 ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน p53 ผ่านกระบวนการ Ubiquitination ซึ่งโปรตีน p53 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis)
- E7 ทำหน้าที่รบกวนการจับกันของโปรตีน pRb และทรานสคริปชันแฟกเตอร์ E2F ส่งผลให้ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ E2F สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนตลอดเวลา

3) Late regions เป็นยีนส่วนที่แสดงออกในช่วงหลังของการเพิ่มจำนวนไวรัส ประกอบไปด้วยยีน L1 และ L2

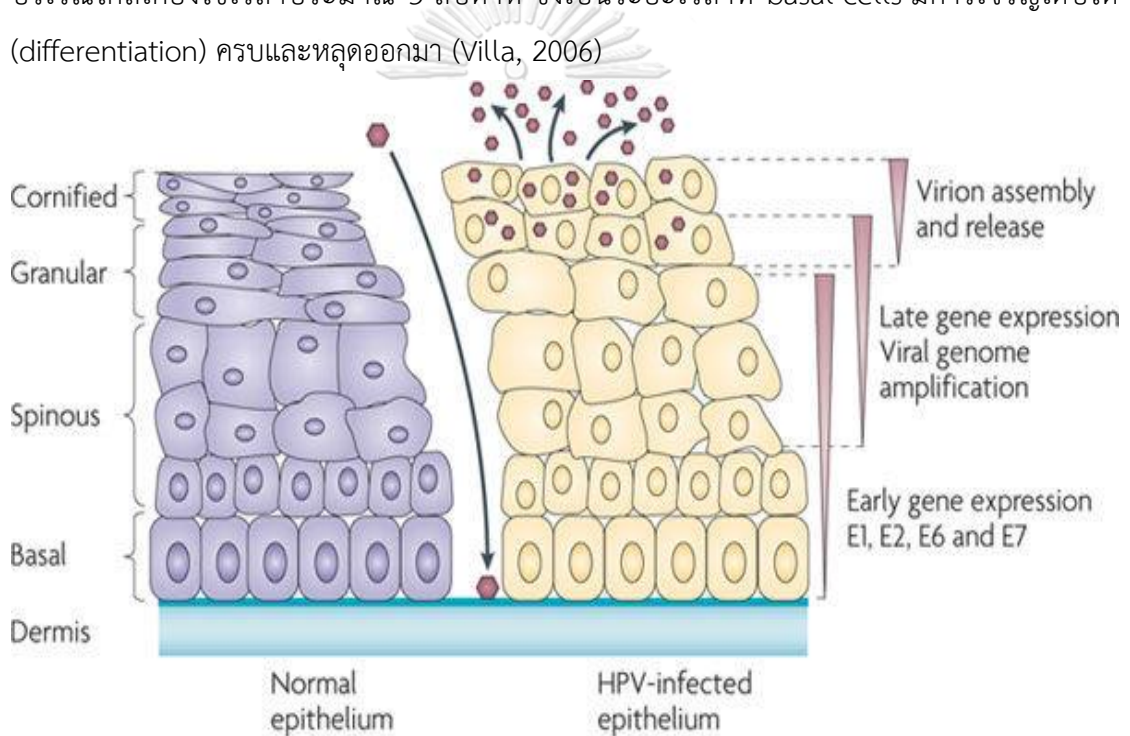
- L1 ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนเปลือกหุ้มดีเอ็นเอ (capsid) และช่วยในขั้นตอนการเปลี่ยนแปลง mRNA splicing และการถอดรหัส ซึ่งโปรตีน L1 นี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ 2 ประการ คือ ใช้ในการตรวจระบุสายพันธุ์ (genotyping) ของเอชพีวี ซึ่งจะตรวจลำดับดีเอ็นเอในยีน L1 ที่แตกต่างกัน และใช้ในการผลิตวัคซีนซึ่งเป็น virus like particle ที่เกิดจากการรวมตัวกันเอง (self assemble) ของโปรตีน L1 เมื่อผลิตขึ้นจำนวนมาก
- L2 ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนเปลือกหุ้มดีเอ็นเอร่วมกับยีน L1

(Danos, Katinka and Yaniv, 1982)

### วงจรชีวิตของเอชพีวี

การติดเชื้อเอชพีวีจะติดเชื้อบริเวณเซลล์ชั้น basal ของเยื่อปากมดลูกผ่านรอยถลอกหรือรอยแผลขณะมีเพศสัมพันธ์ เอชพีวีสามารถเพิ่มจำนวนได้ถึงหลายพันสำเนาใน 1 เซลล์ในบริเวณ transformation zone ของปากมดลูก โปรตีน L1 และ L2 จะสร้าง capsid มาหุ้ม Early protein ที่มีการแสดงออกในช่วงแรกของการเพิ่มจำนวนเอชพีวี ซึ่งการประกอบตัวเชื้อจะเกิดขึ้นในเซลล์ชั้นบนซึ่งจะหลุดออกและปล่อยเชื้อไปยังบริเวณข้างเคียง

การแสดงออกของยีนเอชพีวีจะแสดงออกในเนื้อเยื่อผิวหนัง (squamous cells) หรือเซลล์ที่จะกลายเป็นเนื้อเยื่อ โดยระยะเวลาตั้งแต่การติดเชื้อเอชพีวีจนกระทั่งเชื้อถูกปล่อยออกมาติดต่อเซลล์บริเวณใกล้เคียงใช้เวลาประมาณ 3 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ basal cells มีการเจริญเติบโต (differentiation) ครบและหลุดออกมา (Villa, 2006)



Nature Reviews | Cancer

### รูปที่ 3 วงจรชีวิตของเอชพีวี และการติดเชื้อบริเวณเยื่อปากมดลูก

(Moody and Laimins, 2010) ได้รับอนุญาตจากผู้แต่ง

### บทบาทในการก่อมะเร็งของยีนในเอชพีวี

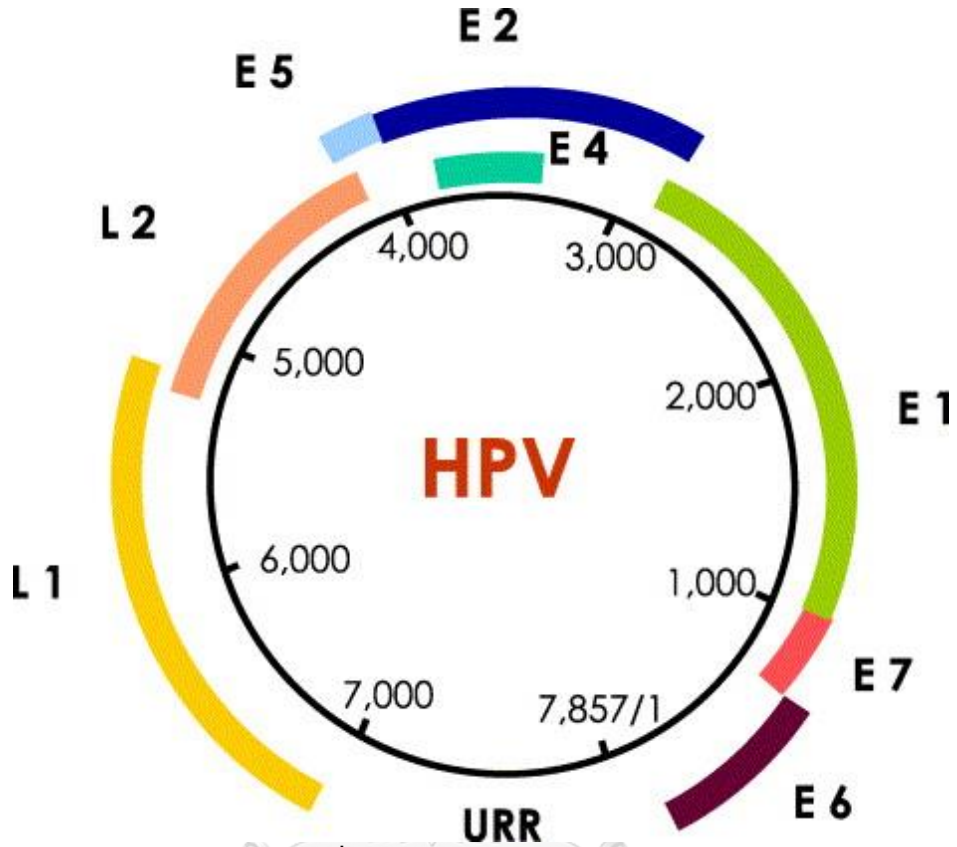
มะเร็งปากมดลูกส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 และ 18 ซึ่งมีรูปแบบการติดเชื้ออยู่ 2 รูปแบบ คือ เอชพีวีในรูปแบบจีโนมอิสระ (episomal form) และเอชพีวีในรูปแบบที่จีโนมเป็นแบบเส้นตรง (integration form) ซึ่งสามารถแทรกเข้าสู่ดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้าน ในการติดเชื้อระยะแรก



เอชพีวีจะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านในรูปแบบของจีโนมอิสระ เมื่อเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน ดีเอ็นเอของเชื้อจะทำการจำลองดีเอ็นเอไปพร้อมกับดีเอ็นเอของเจ้าบ้านทำให้เกิดการแสดงออกของ early genes โดยมีการสร้างโปรตีนซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีน E1, E2, E4, E5, E6 และ E7 โปรตีน E1 และโปรตีน E2 จะกระตุ้นให้เกิดการจำลองดีเอ็นเอ ทำให้จำนวนดีเอ็นเอของไวรัสในเซลล์เจ้าบ้านเพิ่มขึ้น ขณะที่โปรตีน E4 จะมีการแสดงออกกระตุ้นให้ไวรัสอยู่ในระยะแบ่งตัว โปรตีน E5 จะกระตุ้นการสร้าง growth factor โปรตีน E6 และโปรตีน E7 จะทำหน้าที่ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนเจ้าบ้าน ทำให้เซลล์ของเจ้าบ้านเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง หลังจากนั้นโปรตีน L1 และ L2 ของเอชพีวีจะแสดงออกโดยทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างโปรตีนห่อหุ้มดีเอ็นเอของไวรัส (Stanley, Pett and Coleman, 2007) เมื่อเซลล์ของเจ้าบ้านอยู่ในระยะมะเร็งเพิ่มขึ้น ดีเอ็นเอของไวรัสจะอยู่ในรูปแบบเส้นตรงซึ่งจะไปแทรกอยู่กับดีเอ็นเอของเจ้าบ้านส่ง การที่ยีนของไวรัสอยู่ในรูปแบบเส้นตรงนี้จะมีผลทำให้ตำแหน่งระหว่างยีน E1 และ E2 เกิดการขาดหายไปหลังจากแทรกจีโนมเข้าสู่ดีเอ็นเอเจ้าบ้าน ทำให้ยีน E2 สูญเสียหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน E6 และ E7 เป็นผลให้ยีน E6 และ E7 เกิดการแสดงออกที่มากกว่าปกติ (Goon et al., 2009)

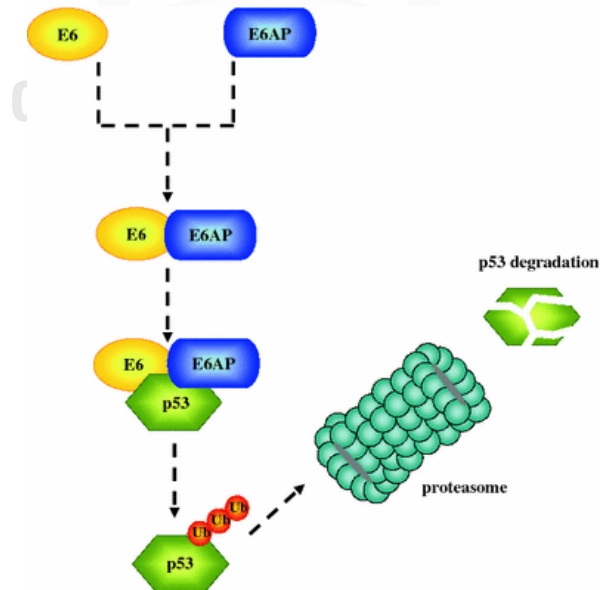
ยีน E6 และ E7 มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการก่อมะเร็ง พบว่ามีการถอดรหัสของยีน E6 และ E7 เสมอในมะเร็งปากมดลูก โดยที่ โปรตีน E6 มีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนต้านมะเร็ง p53 โดยกีดการทำงานผ่านกระบวนการ Ubiquitin pathway ทำให้เซลล์ไม่ตายตามกำหนด (Scheffner et al., 1990; Mantovani and Banks, 2001) ซึ่งในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน p53 โปรตีน E6 ของเอชพีวีต้องอาศัยโปรตีน E6-associated (E6 AP) เพื่อควบคุมการทำงานของโปรตีน p53 ซึ่งจะทำให้ระยะครึ่งชีวิตของโปรตีน p53 สั้นลง ส่งผลให้ระดับการทำงานของโปรตีน p53 ลดลงไปด้วย โดยปกติแล้วโปรตีน p53 เป็นโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) มีหน้าที่เป็นโปรตีนต้านมะเร็ง และโปรตีน E6 ยังไปลดการแสดงออกของโปรตีน BAK ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ (apoptosis) นอกจากนี้โปรตีน E6 ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ telomerase ของเซลล์ที่กำลังพัฒนา ซึ่งเอนไซม์ telomerase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยยับยั้งการหดสั้นของเทโลเมียร์ (telomere) ในโครโมโซมขณะที่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งการหดสั้นของเทโลเมียร์มีผลต่ออายุของเซลล์ทำให้เซลล์ที่ติดเอชพีวีมีชีวิตที่ยืนยาว (Werness, Levine and Howley, 1990) ส่วนโปรตีน E7 เป็นยีนก่อมะเร็ง (oncogene) หลักของเอชพีวี โดยที่โปรตีน E7 จะไปจับกับโปรตีน retinoblastoma (pRb) ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็งที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่มีการติดเอชพีวีเป็นระยะเวลานานจึงมีการแบ่งตัวของเซลล์อย่างต่อเนื่องจนไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ได้ทำให้กลายเป็นก้อนมะเร็งในที่สุด (Boyer, Wazer and Band, 1996) กล่าวคือ โปรตีน E7 ของไวรัสจะไปรบกวนจับกับโปรตีน pRb และโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ E2F ของเจ้าบ้าน ทำให้โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ E2F เป็น

อิสระ ส่งผลให้มีการทำงานโปรตีน p16 ที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้โปรตีน E7 ยังกระตุ้นการทำงานของ cyclin A และ E และยังลดการทำงานของโปรตีน p21 และ 27 อีกด้วย



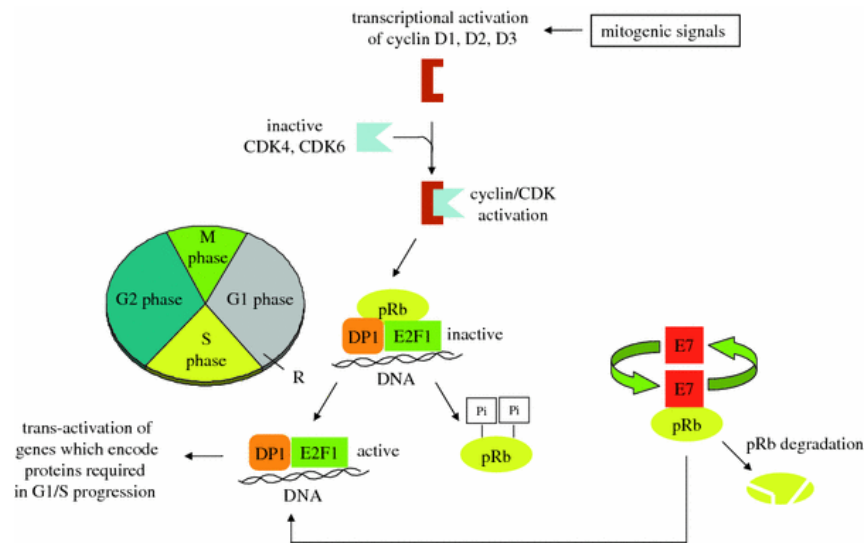
รูปที่ 4 โครงสร้างจีโนมของเอชพีวี

(Munoz et al., 2006) ได้รับอนุญาตจากผู้แต่ง



รูปที่ 5 การทำงานของยีน E6 ของเอชพีวี

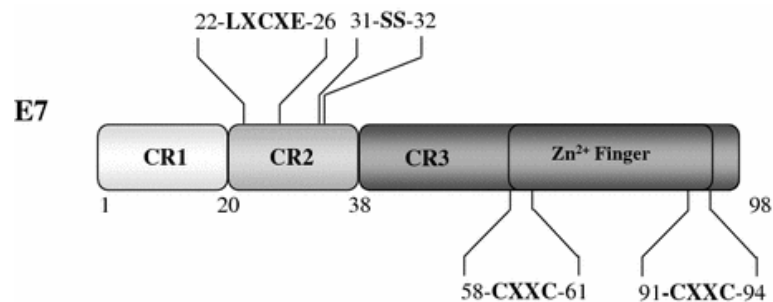
(Ghittoni et al., 2010) ได้รับอนุญาตจากผู้แต่ง



รูปที่ 6 การทำงานของยีน E7 ของเอชพีวี (Ghittoni et al., 2010) ได้รับอนุญาตจากผู้แต่ง

**โครงสร้างของโปรตีนอี7 ของเอชพีวี**

ยีน E7 ของเอชพีวีเมื่อทำการแปลรหัสจะได้กรดอะมิโนประมาณ 100 ตัว ซึ่งในเอชพีวีไทป์ 16 จะแปลรหัสได้กรดอะมิโน 98 ตัว ประกอบไปด้วยตำแหน่งใหญ่ๆที่สำคัญ 3 ตำแหน่ง คือ NH<sub>2</sub>-terminal CR1 domain, CR2 region และ COOH-terminal CR3 domain ซึ่งบริเวณ NH<sub>2</sub>-terminal CR1 domain เป็นบริเวณที่จำเป็นสำหรับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และเกี่ยวข้องกับการย่อยทำลายโปรตีน pRB (pRB degradation) แต่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการจับกับโปรตีน pRB โดยตรง บริเวณ CR2 region เป็นบริเวณที่มีการจับกับโปรตีน pRB (pRB binding), core sequence LXCXE และ casein kinase II phosphorylation site (CKII) และในบริเวณสุดท้าย COOH-terminal CR3 domain จะเป็นบริเวณของ zinc finger ที่เป็นตำแหน่งที่โปรตีนมีการจับกับ ดีเอ็นเอ (DNA-binding protein) ที่มี CXXC motif 2 หน่วยซ้ำ ซึ่งบริเวณนี้เองเป็นตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน pRB และการจับกับโปรตีนตัวอื่น ๆ (Hebner and Laimins, 2006)



รูปที่ 7 โครงสร้างของโปรตีน E7

(Ghittoni et al., 2010) ได้รับอนุญาตจากผู้แต่ง

มีการศึกษารายงานว่าโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 สามารถจับกับเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT1) ที่ตำแหน่ง COOH-terminal CR3 domain และส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น (Burgers et al., 2007) ซึ่งเอนไซม์ DNMT1 มีความสำคัญในการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนต่าง ๆ จนนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง เช่น การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในโรคมะเร็งโพรงหลังจมูก และมะเร็งศีรษะและคอ (Sriuranpong et al., 2004; Tokumar et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูกมากถึงร้อยละ 93 (Kitkumthorn et al., 2006) ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 แบบ integration (Yanatatsaneejit, Mutirangura and Kitkumthorn, 2011) ส่งผลให้เกิดการชักนำการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยการจับกันระหว่างโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 กับเอนไซม์ DNMT1 (Chalertpet et al., 2015) ซึ่งกลไกการเกิดเมทิลเลชันนี้เป็นหนึ่งในกลไกระดับเหนือพันธุกรรม (epigenetics)

### กลไกระดับเหนือพันธุกรรม (Epigenetics)

ในช่วงต้นทศวรรษที่ 1940 Conrad Waddington นักชีววิทยาชาวอังกฤษได้ให้คำนิยามของกลไกระดับเหนือพันธุกรรม ว่าเป็นศาสตร์ของสาขาชีววิทยาที่ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างยีนกับผลผลิตของยีนซึ่งส่งผลให้เกิดแสดงออกทางฟีโนไทป์ในสิ่งมีชีวิต (Waddington, 2012) ในความหมายเดิมของกลไกเหนือพันธุกรรมนี้ได้อ้างถึงวิถีทางโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกอย่างต่อเนื่องของจีโนไทป์จนส่งผลไปยังการแสดงออกทางฟีโนไทป์ และในปีต่อ ๆ มาบวกกับความเจริญก้าวหน้าอย่างรวดเร็วทางด้านพันธุศาสตร์ส่งผลให้นิยามความหมายของคำว่ากลไกระดับเหนือพันธุกรรมเริ่มจำกัดให้แคบลง ปัจจุบันนิยามของกลไกระดับเหนือพันธุกรรมให้คำจำกัดความว่าเป็นการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงการทำงานของยีนที่มีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมโดยไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอ (Dupont, Armant and Brenner, 2009)

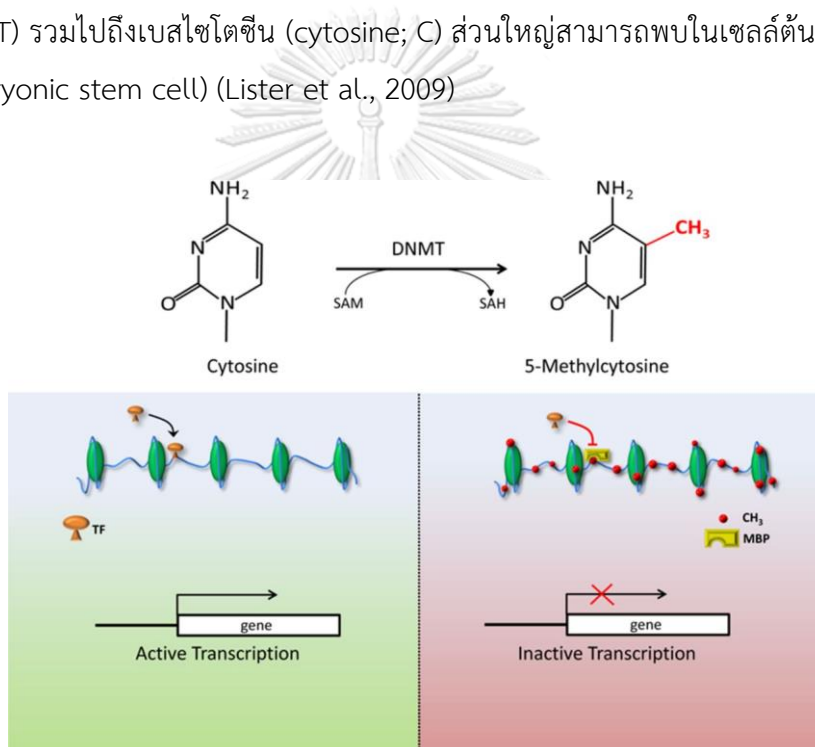
กลไกระดับเหนือพันธุกรรมสามารถจำแนกได้ 3. ระบบ ได้แก่

- 1) การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอ(DNA methylation)
- 2) การดัดแปลงโครงสร้างของโปรตีนฮิสโตน (Histone modification)
- 3) การแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ (micro RNA หรือ miRNA)

ซึ่งในงานวิจัยฉบับนี้มุ่งเน้นการศึกษากลไกระดับเหนือพันธุกรรมในรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

## ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นการดัดแปลงทางพันธุศาสตร์โดยการเติมหมู่เมทิล (-CH<sub>3</sub>) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโทซีน (cytosine: C) ที่อยู่ร่วมกับเบสกวานีน (guanine; G) หรือที่เรียกว่า CpG dinucleotides โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase; DNMT) ซึ่งจะเคลื่อนย้ายหมู่เมทิลจาก S-adenosyl-methionine (SAM) ได้เป็น 5-เมทิลไซโทซีน (5-methyl cytosine) และ S-adenosyl homocysteine (SAH) และในปัจจุบันยังพบว่ายังมีดีเอ็นเอเมทิลเลชันของเบสไซโทซีนที่ไม่ใช่ CpG dinucleotides ซึ่งจะพบในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น CpHpG และ CpHpH โดยที่ H คือ เบสอะดีนีน (adenine; A), ไทมีน (thymine; T) รวมไปถึงเบสไซโตซีน (cytosine; C) ส่วนใหญ่สามารถพบในเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อน (embryonic stem cell) (Lister et al., 2009)



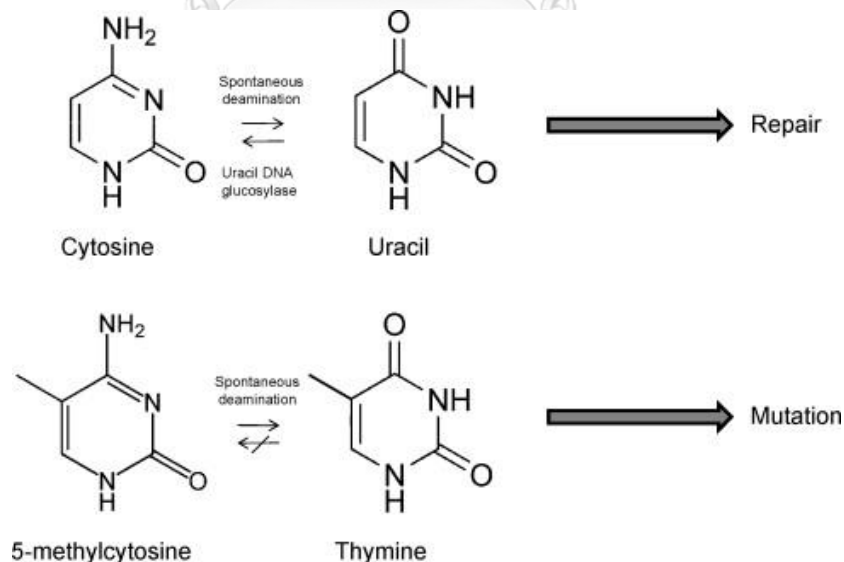
รูปที่ 8 การเติมหมู่เมทิลบนเบสไซโตซีน

(Zhong, Agha and Baccarelli, 2016) ได้รับอนุญาตจากผู้แต่ง

ในมนุษย์มีเอนไซม์ DNMT ที่สำคัญโดยแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ DNMT1, DNMT3a และ DNMT3b ในขณะที่มีการจำลองสายดีเอ็นเอ (DNA replication) เอนไซม์ DNMT1 จะทำหน้าที่รักษา รูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชันให้เหมือนกับของสายดีเอ็นเอแม่แบบ ดังนั้นเอนไซม์ DNMT1 จึงเป็น maintenance methyltransferase และในขณะที่เอนไซม์ DNMT3a และ DNMT3b ทำหน้าที่เติม หมู่เมทิลให้กับสายดีเอ็นเอที่สูญเสียหมู่เมทิลไปในระหว่างกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ ดังนั้น DNMT3a และ DNMT3b จึงจัดเป็น de-novo methyltransferase (Pradhan and Esteve, 2003)

ในจีโนมของมนุษย์พบ CpG dinucleotides ค่อนข้างหนาแน่นในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ซึ่งบริเวณที่พบ CpG dinucleotides หนาแน่น เรียกว่า CpG island ในเซลล์ปกติ CpG island ของยีนจะไม่มีเกิดการเกิดเมทิลเลชัน (unmethylation) แต่ CpG dinucleotides ในบริเวณอื่นในจีโนมจะถูกเมทิลเลชัน ซึ่งเรียกว่า โกลบอลไฮเปอร์เมทิลเลชัน (global hypermethylation) และในทางตรงกันข้ามกับเซลล์มะเร็งจะพบดีเอ็นเอเมทิลเลชันสูงบริเวณ CpG-island ที่อยู่ในโปรโมเตอร์ของยีน เรียกว่า โปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมทิลเลชัน (promoter hypermethylation) แต่กลับพบว่ามีการลดหรือสูญเสียสถานะเมทิลเลชันในจีโนมบริเวณอื่นไปจึงเรียกว่า โกลบอลไฮโปเมทิลเลชัน (global hypomethylation) (Sharma, Kelly and Jones, 2010)

ปฏิกิริยา deamination เป็นปฏิกิริยาที่มีการนำเอาหมู่อะมิโนออก ซึ่ง 5-เมทิลไซโตซีนสามารถนำหมู่อะมิโนออกได้ด้วยตัวเอง เรียกว่า spontaneous deamination เมื่อ 5-เมทิลไซโตซีนมีการนำหมู่อะมิโนออกจะกลายเป็นเบสไทมีน สำหรับเบสไซโตซีนที่ไม่ถูกเติมหมู่อะมิโน เมื่อมีการเกิด spontaneous deamination เบสไซโตซีนจะถูกเปลี่ยนกลายเป็นเบสยูราซิล เมื่อเกิดกระบวนการตรวจสอบดีเอ็นเอ เอนไซม์ DNA-uracil glycosylase ซึ่งมีหน้าที่ป้องกันการกลายของดีเอ็นเอโดยจะทำหน้าที่กำจัดเบสยูราซิลโดยการตัดพันธะ N-glycosylic แล้วทำการซ่อมแซม ซึ่งเอนไซม์ DNA-uracil glycosylase จะไม่สามารถตรวจพบความผิดปกติจาก 5-เมทิลไซโตซีนที่เปลี่ยนเป็นเบสไทมีน เมื่อเกิด spontaneous deamination ได้ ดังนั้นจึงนำไปสู่การกลายของเบสเบสไซโตซีนเป็นเบสไทมีน (Coulondre et al., 1978)



รูปที่ 9 Deamination ของเบสไซโตซีน และ 5-เมทิลไซโตซีน

(Ozfirat and Korbonits, 2010) ได้รับอนุญาตจากผู้แต่ง

ภาวะโปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมทิลเลชันมีบทบาทสำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการถอดรหัสของยีน (transcriptional silencing) ส่งผลทำให้ยีนไม่มีการแสดงออก (gene silencing) โดยกระบวนการเมทิลเลชันจะเป็นกระบวนการกระตุ้นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการถอดรหัสของยีนที่จำเพาะ (specific gene repressor) โดยเฉพาะ methyl-CpG-binding proteins (MBD1, MBD2, MBD3, MeCP2 และ KAISO) เข้ามาจับที่ตำแหน่ง 5-methyl cytosine ซึ่งจะเป็นการขัดขวางโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์เพื่อไม่ให้เข้าไปจับที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน นอกจากนี้ methyl-CpG-binding proteins ยังกระตุ้นและชักนำให้เอนไซม์ histone deacetylase (HDAC) ซึ่งทำให้เกิดการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน รวมทั้งกลุ่มโปรตีน NuRD และ Sin3a complex ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการจัดโครงสร้างของโครมาติน (chromatin remodeling) ส่งผลให้โครมาตินอยู่ในสถานะถูกยับยั้งกระบวนการถอดรหัส (transcriptional repressive status) (Sriraksa and Limpai boon, 2012) ซึ่งมีการศึกษาพบว่าโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 เมื่อจับกับเอนไซม์ DNMT1 ส่งผลทำให้เกิดการลดระดับการทำงานของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ จนนำไปสู่การลดระดับการแสดงออกของยีน *E-cadherin* ซึ่งการลดการแสดงออกของยีน *E-cadherin* นี้ไม่ได้เกิดจากกระบวนการเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน แต่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครมาติน (Laurson et al., 2010) อาจกล่าวได้ว่ามี 2 กลไกที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งการถอดรหัสของยีนผ่านการเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ ได้แก่

- 1) การเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอจะส่งผลให้โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ไม่สามารถมาจับบริเวณที่ต้องการได้
- 2) ดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมทิลจะส่งผลให้โปรตีนที่จำเพาะต่อ methylated-CpG ซึ่งได้แก่เอนไซม์ HDAC, กลุ่มโปรตีน NuRD และ Sin3a complex ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการถอดรหัสโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครมาติน (chromatin remodeling)

จากหลาย ๆ งานวิจัยที่ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน (protein-protein interaction) พบว่าโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีสามารถจับกับโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิดต่าง ๆ เช่น SP1 (Gloss and Bernard, 1990), AP1 (Thierry et al., 1992), HMG1/Y (Bouallaga et al., 2000), GRE, NF1, YY1, Oct-1 และ C/EBP (Hoppe-Seyler and Butz, 1994) เป็นต้น ซึ่งการมีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนนี้ส่งผลให้เกิดการเป็นมะเร็งปากมดลูกในที่สุด

### อันตรกิริยาระหว่างโปรตีน (Protein-protein interaction)

อันตรกิริยาระหว่างโปรตีน คือการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการเกือบทุกขั้นตอนภายในเซลล์ไม่ว่าจะเป็นการดำเนินไปของวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle progression) การถ่ายโอนสัญญาณ (signal transduction) และกระบวนการเผาผลาญอาหาร (metabolism) (De Las Rivas and Fontanillo, 2010)

ปัจจุบันมีโรคจำนวนมากเป็นผลมาจากการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของเจ้าบ้านที่ผิดปกติไป หรือการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของเจ้าบ้านกับโปรตีนภายนอกที่มาจากเชื้อโรค ซึ่งการมีปฏิสัมพันธ์เหล่านี้อาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติและส่งผลให้เกิดโรคได้ในที่สุดอย่างเช่นโรคมะเร็ง ในปัจจุบันมีการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนเป็นจำนวนมากเพื่อการค้นหากลไกการเกิดโรค และศึกษาเพื่อหาแนวทางการบำบัดการรักษาโรค

เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน เช่นการทำ co-immuno precipitation โดยใช้วิธี western blot ตรวจสอบติดตามโปรตีนที่สนใจ แต่ถ้าหากเป็นโปรตีนที่ไม่ทราบสามารถนำเทคนิค co-immuno precipitation มาใช้ร่วมกับโปรตีโอมิกส์เพื่อช่วยระบุชนิดของโปรตีนได้

### การศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน (Proteomics)

ในปี ค.ศ. 1994 นักชีวสารสนเทศศาสตร์ ชาวออสเตรเลีย ชื่อว่า มาร์ค วิลกินส์ (Marc Wilkins) ได้เสนอคำว่าโปรตีโอมิกส์ (proteomics) เป็นครั้งแรกโดยให้คำจำกัดความว่าเป็นการศึกษาโปรตีนทุกชนิดที่เป็นผลผลิตจากยีน โดยเป็นศึกษาทั้งโครงสร้าง การทำงานภาวะและบริเวณที่พบโปรตีนเหล่านั้น รวมไปถึงการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในวิถีการสร้างและสลายสารเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งมีการใช้เทคนิคจำเพาะต่อการแยกโปรตีนชนิดต่าง ๆ ออกจากกัน จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน ซึ่งทำให้ทราบชนิดของโปรตีนที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ (Wilkins, 2009) ในปัจจุบันโปรตีโอมิกส์มีความสำคัญทางการแพทย์เป็นอย่างมาก หนึ่งในการศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์ที่ได้รับความสนใจนั้นก็คือการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของไวรัสและโปรตีนของเจ้าบ้าน (virus-host protein- protein interaction)

ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของโปรตีน E6 และ E7 ของเชื้อเอชพีวีกับโปรตีนของเจ้าบ้านเป็นจำนวนมากเพื่อที่จะทำให้ได้ทราบถึงกลไกที่จะส่งผลให้เกิดการเป็นมะเร็งปากมดลูก ดังเช่น การพบความสัมพันธ์ของโปรตีน E7ของเอชพีวีไทป์ 16 กับเอนไซม์ DNMT1 ที่ส่งผลให้เกิดการเมทิลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* (Chalertpet et al., 2015) ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น รวมไปถึงกลไกการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันซึ่งเกิดจากการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 กับโปรตีน p48 ซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียการถอดรหัสของยีน interferon-

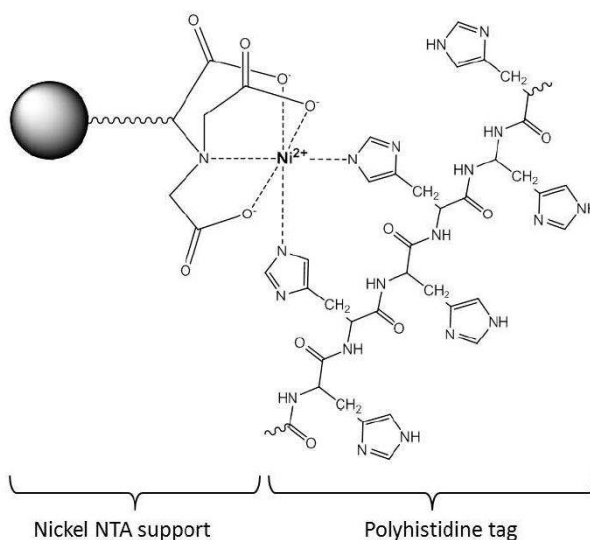


stimulated gene factor 3 (*ISGF3*) (Barnard and McMillan, 1999) เป็นต้น และในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนมีเทคนิคหลาย ๆ เทคนิคที่นำมาประยุกต์เข้าด้วยกันเพื่อนำมาใช้ในการศึกษา เช่น การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation), การใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสหนึ่งมิติ (1-dimensional electrophoresis) ในการแยกขนาดโปรตีน, การตรวจติดตามโปรตีน (western blot) และการใช้แมสสเปกโทรเมตรี (mass spectrometry) ในการจำแนกโปรตีนโดยดูจากลำดับกรดอะมิโน เป็นต้น

### การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation)

การตกตะกอนโปรตีนเป็นเทคนิคการดึงโปรตีนที่ต้องการในหลอดทดลองเพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน หรือศึกษาการมีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน ซึ่งวิธีการตกตะกอนโปรตีนมีหลายวิธีการด้วยกันขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่จะศึกษา

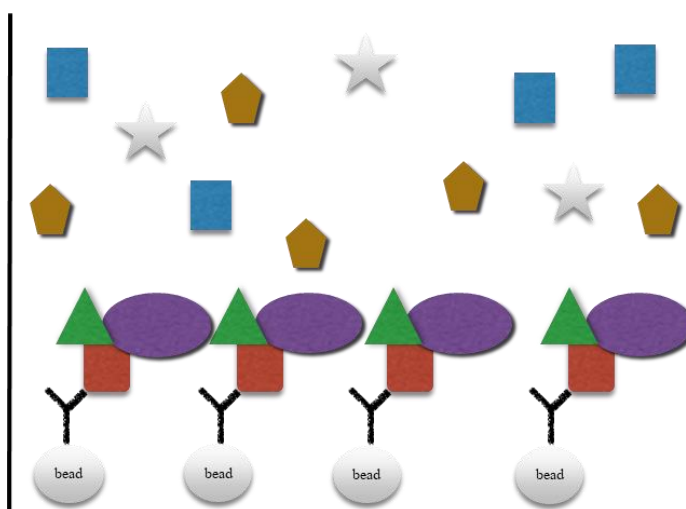
การตกตะกอนโปรตีนโดยการใช้ Ni-NTA agarose beads (nickel-nitrilotriacetic acid) เป็นการดึงโปรตีนลูกผสมที่ถูกแสดงออกในเซลล์เพาะเลี้ยงจากดีเอ็นเอพาหะที่ถูกติดตัวติดตามด้วยกรดอะมิโนฮิสทีดีนหกตัว (6x histidine tag) ซึ่งสามารถทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้เรซินที่มีไอออนนิเกิล ( $\text{Na}^{2+}$ ) ที่ถูกดึงไว้กับกรดไนโตรโลไตรอะซิติก (Nitrilotriacetic acid; NTA) ด้วยพันธะโคออร์ดิเนชันเทคนิคนี้เรียกว่า metal-chelate affinity chromatography (MCAC) โดยที่โปรตีนลูกผสมที่มีกรดอะมิโนฮิสทีดีนหกตัวเป็นตัวติดตามจะถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยหลักการโครมาโทกราฟี โดยการเปลี่ยนถ่ายไอออนนิเกิลที่ถูกตรึงบนเมทริกซ์กับสายกรดอะมิโนฮิสทีดีน (Petty, 2001)



รูปที่ 10 การจับกันระหว่าง Ni-NTA และ polyhistidine tag

แหล่งที่มา <https://www.intechopen.com/books/affinity-chromatography/affinity-chromatography-principles-and-applications>

Immuno precipitation เป็นเทคนิคที่ใช้หลักการการจับกันของแอนติเจนแอนติบอดี (antigen-antibody complex) ซึ่งโปรตีนที่ต้องการถูกดึงให้ตกตะกอนโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น ๆ ซึ่งแอนติบอดีที่จำเพาะจะถูกนำมาผูกติดกับเมทริกซ์ เช่น โปรตีน A (Protein A) หรือโปรตีน G (Protein G) (Bonifacino and Dell'Angelica, 2001) วิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบโปรตีนที่มีอันตรกิริยากับโปรตีนที่ถูกตกลงมาด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะนั้น ๆ ได้ด้วย ซึ่งเรียกวิธีนี้ว่า Co-immuno precipitation

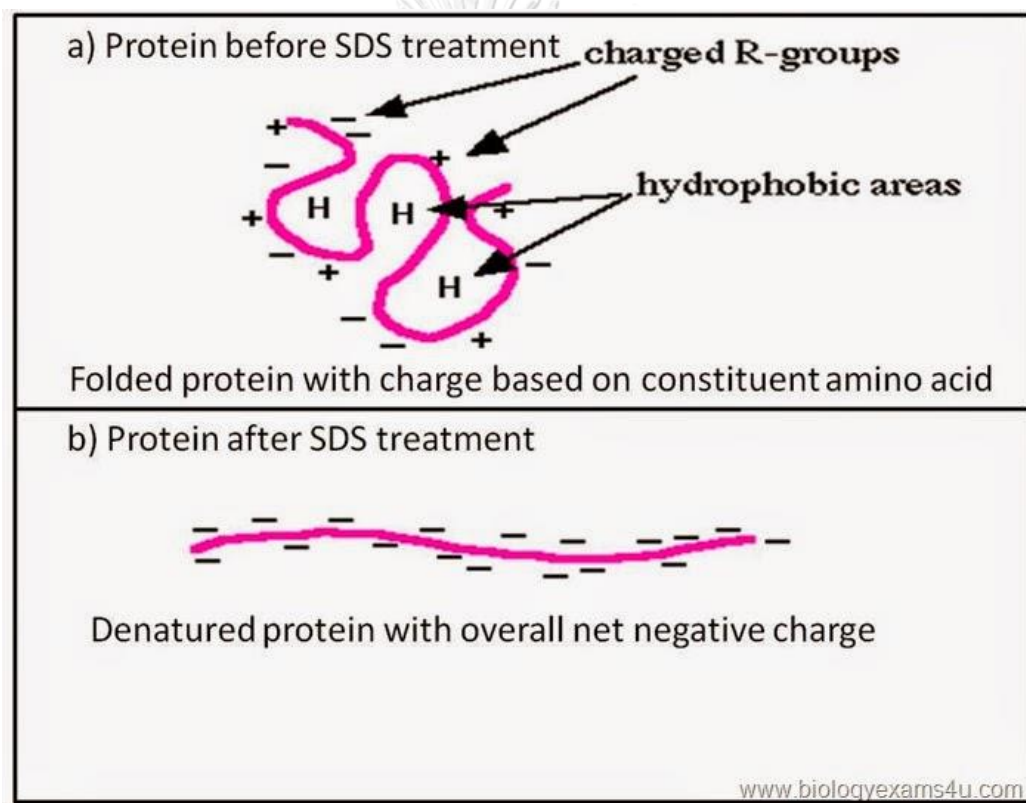


รูปที่ 11 การตกตะกอนโปรตีนโดยการใช้แอนติบอดีจำเพาะ (Immuno precipitation)

### Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE เป็นเทคนิคการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า สาร SDS (sodium dodecyl sulfate) ซึ่งมีประจุเป็นลบเมื่อไปเกาะกับโปรตีนจะทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุเป็นลบ และนอกจากนี้ยังทำให้โปรตีนเสียเสถียรภาพ เปลี่ยนโครงสร้างจากตติยภูมิ (tertiary structure) ไปเป็นโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) โปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยหลายหน่วยเกาะกันอยู่ก็จะแยกออกเป็นแต่ละหน่วยย่อย การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีนจึงเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างของมวลโมเลกุลของแต่ละโปรตีน ซึ่งโปรตีนจะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ซึ่งสามารถประมาณน้ำหนักของโปรตีนเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักแล้ว ซึ่งการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้านิยมใช้เจลพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) โดยเจลพอลิอะคริลาไมด์สามารถเตรียมได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) เชื่อมต่อกันของอะคริลาไมด์โมโนเมอร์ (acrylamide monomer) โดยมี N, N'-methylene-bis acrylamide เป็นตัวเชื่อมให้เป็นพอลิเมอร์ด้วยพันธะโควาเลนต์ซึ่งมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) และ TEMED

(N, N, N', N'-tetramethylthylenediamine) เจลที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นตาข่ายที่มีรูพรุน ซึ่งมีขนาดต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ของอะคริลาไมด์และเปอร์เซ็นต์ของบิสอะคริลาไมด์ (bis acrylamide) โดยที่เปอร์เซ็นต์เจลสูงได้จะได้อาณาเขตของรูพรุนที่มีขนาดเล็กเหมาะกับการใช้วิเคราะห์โปรตีนที่มีมวลโมเลกุลน้อย ในทางตรงกันข้ามถ้าหากใช้เปอร์เซ็นต์เจลต่ำได้จะได้อาณาเขตของรูพรุนที่มีขนาดใหญ่เหมาะกับการใช้วิเคราะห์โปรตีนที่มีมวลโมเลกุลมาก ซึ่งในการวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE โปรตีนจะถูกทำให้เสียสภาพด้วยสาร SDS และสารประเภทไทออล (thiol) เป็นองค์ประกอบ โดยการผ่านความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ถึง 5 นาที เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างหน่วยย่อยของโปรตีน (Haqqani, Kelly and Stanimirovic, 2008) ซึ่งโดยทั่วไปโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลน้อย



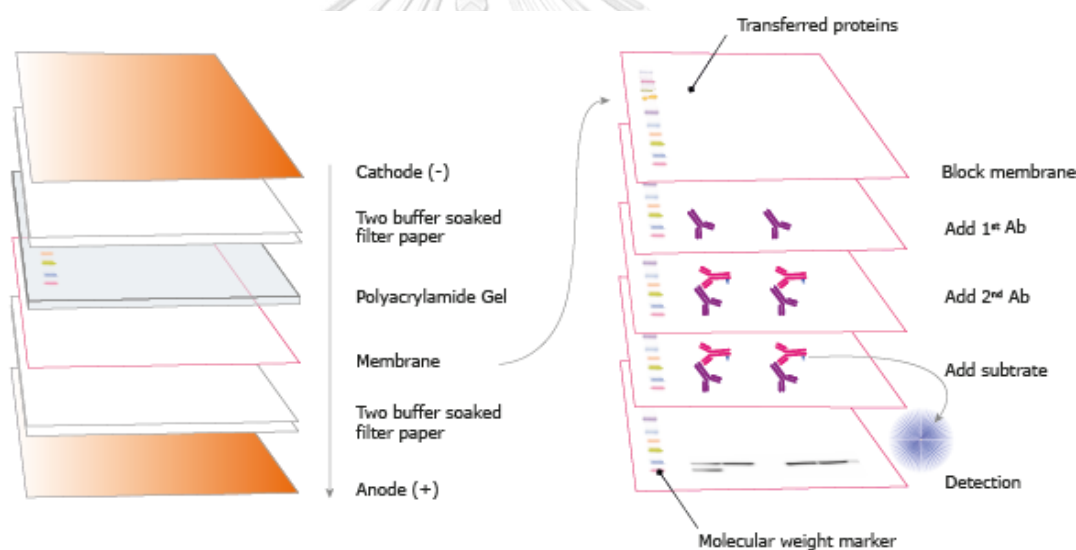
รูปที่ 12 การเข้าจับของสาร SDS กับโปรตีนส่งผลให้โปรตีนเป็นเส้นตรงและมีประจุเป็นลบ

แหล่งที่มา: <https://www.biologyexams4u.com/2014/07/function-of-sds-in-dna-extraction-and.html>

## Western blot

Western blot หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Immunoblot เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาวิจัยเพื่อตรวจสอบระบุโปรตีนที่สนใจ ซึ่งหลังจากทำการแยกขนาดของโปรตีนตามมวลโมเลกุลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว โปรตีนที่อยู่บนเจลจะถูกถ่ายโอนมายังแผ่นเมมเบรนที่มีประจุบวกเช่น ไนโตร

เซลลูโลส nitrocellulose หรือโพลีไวนิลลิดีนฟลูออไรด์ (polyvinylidene fluoride; PVDF) ในปัจจุบันมีวิธีการย้ายโปรตีน 3 แบบคือ wet tank transfer เป็นการย้ายโดยอาศัยบัฟเฟอร์ ซึ่งวิธีค่อนข้างใช้สารละลายบัฟเฟอร์มากและใช้เวลานานในการย้ายโปรตีน วิธีที่สอง semi-dry transfer เป็นวิธีนิยมใช้ในปัจจุบันเนื่องจากใช้บัฟเฟอร์ในปริมาณที่ไม่มากเท่ากับวิธี wet tank transfer และสามารถทำการย้ายโปรตีนไปยังแผ่นเมมเบรนได้หลายแผ่นในเวลาเดียวกัน รวมถึงสามารถย้ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนได้เกือบร้อยละ 100 และวิธีที่สามเป็นการย้ายแบบ dry bufferless transfer เป็นการย้ายโปรตีนโดยที่ไม่ต้องใช้สารละลายบัฟเฟอร์และใช้เวลาน้อย ทำให้ลดกระบวนการเตรียมสารต่าง ๆ ซึ่งหลังจากทำการย้ายโปรตีนไปยังแผ่นเมมเบรนแล้วจะทำการติดตามโปรตีนที่สนใจด้วยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนชนิดนั้น ๆ ซึ่งแอนติบอดีอาจจะถูกติดด้วยตัวติดตามเช่นเอนไซม์ หรือสารเรืองแสง เมื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจะทำให้มีสีหรือมีการเปล่งแสงออกมา ซึ่งแถบความหนาบางของโปรตีนที่ปรากฏจะสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ (Mahmood and Yang, 2012)



รูปที่ 13 หลักการทำ western blot

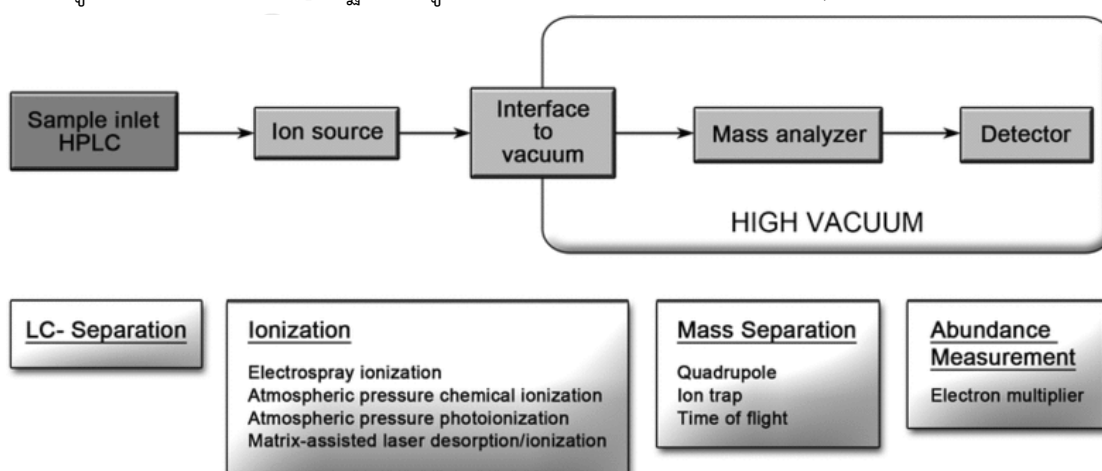
แหล่งที่มา: <https://www.proteinatlas.org/learn/method/western+blot>

### แมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectrometry)

แมสสเปกโทรเมทรีเป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีน สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ เช่น การทำนายลำดับกรดอะมิโน การทำนายระบุชนิดและขนาดโปรตีน หรือใช้ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในพยาธิสภาพที่แตกต่างกัน เป็นต้น ซึ่งวิธีการทางแมสสเปกโทรเมทรีจะอาศัยหลักการตรวจวัดมวลต่อประจุ (mass to charge ratio;  $m/z$ ) ที่จำเพาะต่อโปรตีนตัวอย่างหรือเปปไทด์ที่ถูกทำให้เกิดประจุ โดยตัวอย่างจะถูกทำให้แตกตัวเป็น

ประจุในส่วนที่ผลิตประจุไอออน (ion source) ซึ่งเกิดจากกระบวนการไอออไนเซชัน (ionization) ส่วนผลิตไอออน (ionizer) โดยมีวิธีการเปลี่ยนหลายวิธี เช่น Electrospray (ESI) หรือ MALDI เป็นต้น เมื่อทำให้โมเลกุลของสารเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนและมีประจุเป็นบวก ซึ่งโมเลกุลที่มีประจุบวกนี้มีพลังงานมากพออาจเกิดการแตกตัวออกเป็นส่วนย่อย ๆ (fragment ion) และส่วนย่อย ๆ เหล่านี้อาจมีอนุภาคเป็นกลาง และหากไอออนย่อยยังมีพลังงานมากพอที่จะแตกตัวต่อไป จะเกิดเป็นไอออนย่อยใหม่ต่อไปเรื่อย ๆ จนเหลือพลังงานน้อยไม่พอที่จะแตกตัวได้อีก เมื่อพิจารณาจากแมสสเปกตรัมจะสามารถบ่งบอกได้ถึงลักษณะการแตกตัวของโมเลกุลไอออน หรือรวมรูปแบบของการแตกตัวของแต่ละไอออนทั้งหมดเข้าด้วยกันจะได้รูปแบบของการแตกตัว (fragment pattern) ของโมเลกุล ซึ่งจะ เป็นลักษณะเฉพาะของสารประกอบแต่ละชนิด

รูปแบบการแตกตัวของสารนอกจากจะขึ้นกับชนิดของสารแล้วยังขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโมเลกุล พลังงานที่ใช้ เวลาระหว่างการเกิดและการตรวจพบไอออน โดยแมสสเปกโตรมิเตอร์จะเป็นตัวแยกและวัดมวลของไอออนจากการใช้อัตราส่วนมวลต่อประจุ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วไอออนมักจะมีประจุเป็น +1 ดังนั้นค่าอัตราส่วนมวลต่อประจุจึงเท่ากับมวลไอออนโดยตรง โดยที่ระยะเวลาหลังจากเกิดไอออไนเซชันจะได้ไอออนต่าง ๆ เกิดขึ้น ไอออนที่เกิดจะเข้าสู่ส่วนที่จะวิเคราะห์มวล (mass analyzer) ซึ่งมีหลายประเภท เช่น Ion Trap (IT), Quadrupole (Q) หรือ Time of Flight (TOF) เป็นต้น เพื่อแปลงเป็นสัญญาณที่ส่วนตรวจวัด (ion detector) แล้วส่งสัญญาณไปยังส่วนประมวลผล (data system) ถ้าทราบชนิดและปริมาณของไอออนเหล่านี้จะสามารถหาความสัมพันธ์ได้ ซึ่งจะแสดงผลออกมาในลักษณะของกราฟที่มีชื่อว่าแมสสเปกตรัม ซึ่งเรียกว่าแมสสเปกตรัม โดยที่แกน X แสดงค่าอัตราส่วนมวลต่อประจุ และแกน Y แสดงปริมาณสัมพันธ์ (relative abundant) จากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน (Aebersold and Mann, 2003)



รูปที่ 14 องค์ประกอบของแมสสเปกโตรเมตรี

(Leung and Fong, 2014) ได้รับอนุญาตจากผู้แต่ง

## เทคนิค Label-free Quantitative Proteomic

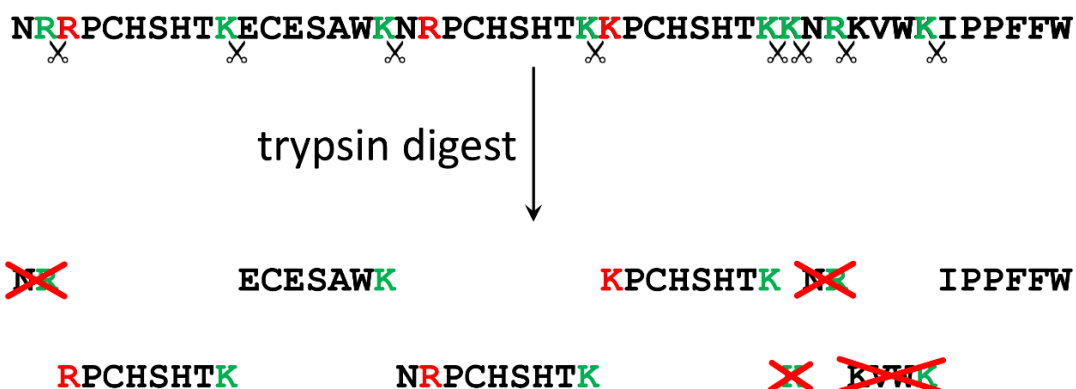
เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณและชนิดของโปรตีนตัวอย่างโดยไม่ต้องทำการติดฉลาก (label) ด้วยสารรังสี สามารถนำโปรตีนตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (standard protein) ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี ทำให้ทราบมวลโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่าง รวมไปถึงสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของโปรตีน (Merl et al., 2012)

### Label-free LC-MS/MS

หลังจากทำการสกัดโปรตีนจากตัวอย่างแล้ว โปรตีนที่ถูกสกัดได้จะถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น BCA assay, Lowry assay หรือ Bradford assay เป็นต้น จากนั้นทำการย่อยโปรตีนเพื่อให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆด้วยเอนไซม์ แล้วนำเปปไทด์ที่ผ่านการย่อยให้เป็นสายสั้นๆไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS แล้วทำการระบุชนิดโปรตีนโดยทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน (Levin and Bahn, 2010) สำหรับการหาปริมาณโปรตีนทำได้ด้วยการนำไปเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน หรือเปรียบเทียบโปรตีนตัวอย่างด้วยตัวเอง ซึ่งโปรตีนจะไม่ถูกนำมาผสมกัน จะทำการวิเคราะห์แยกกัน ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของสัญญาณเปปไทด์ ที่เวลาเดียวกัน (Zhu, Smith and Huang, 2010)

### การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin digestion)

เอนไซม์ทริปซินมีคุณสมบัติในการตัดพันธะเปปไทด์ (peptide bond) อย่างจำเพาะหลังหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล ของกรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) และไลซีน (lysine) ซึ่งในทางชีวภาพมีการกระจายของกรดอะมิโนหมู่อาร์จินีนและไลซีนทำให้ตัดได้เปปไทด์ที่มีขนาดเหมาะสมสำหรับนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี และอัตราการย่อยสลายเปปไทด์จะลดลงถ้ากรดอะมิโนตัวถัดไปมีคุณสมบัติเป็นกรด (acidic amino acid) และถ้ามีกรดอะมิโนโพรลีน (proline) อยู่ที่ด้าน C-terminal ของทริปซินจะไม่มีการตัดเกิดขึ้น (Huynh, Russell and Walsh, 2009)



รูปที่ 15 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน

แหล่งที่มา: <https://unipept.ugent.be/clidocs/casestudies/tpa>

### Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)

LC MS/MS เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลต่อประจุของไอออนของสารตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนที่เชื่อมต่อกันส่วนแรกจะเป็นเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นส่วนที่ใช้แยกสารประกอบในตัวอย่างตามสมบัติทางเคมีโดยอาศัยสมดุลระหว่างเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และส่วนที่สองจะเป็นเครื่อง Mass spectrometer ซึ่งก็คือ tandem MS หรือ MS/MS เป็นส่วนที่ตรวจวิเคราะห์สารที่พบในตัวอย่าง

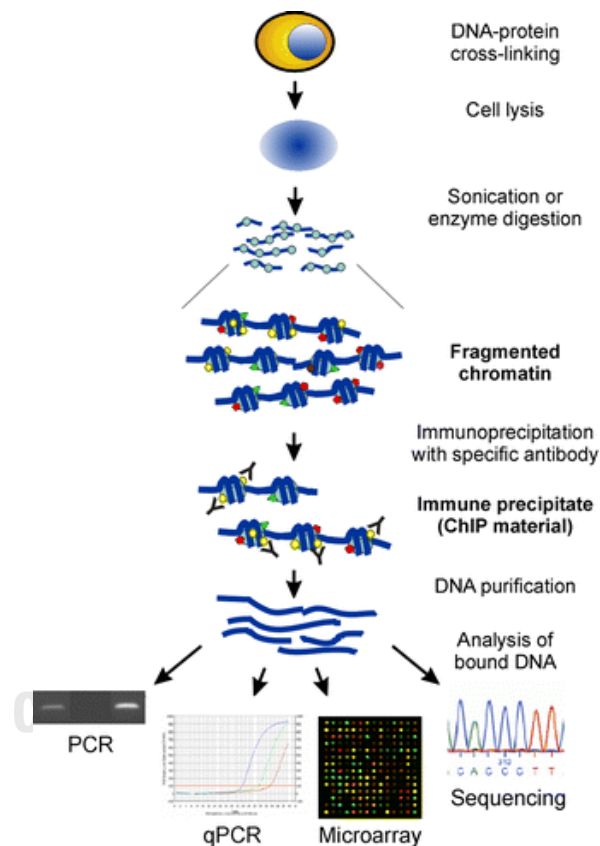
จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับมะเร็งปากมดลูก เช่น การวิเคราะห์เมตาโบโลมิกส์และทรานสคริปโตมิกส์ในมะเร็งปากมดลูก (Yang et al., 2017) การตรวจเปรียบเทียบโปรตีนที่แสดงออกในเซลล์เยื่อหุ้มปากมดลูกที่ปกติกับในเซลล์เยื่อหุ้มปากมดลูกที่เป็นมะเร็ง (Zhao et al., 2015) หรือการระบุโปรตีนในมะเร็งปากมดลูกการใช้สารคัดหลั่งจากช่องคลอด (Van Raemdonck et al., 2014) เป็นต้น

### Chromatin immune precipitation (ChIP)

ChIP เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบการมีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับดีเอ็นเอในเซลล์ โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจสอบว่ามีโปรตีนที่เฉพาะเจาะจงมีความเกี่ยวข้องกับยีนหรือไม่ เช่นการทดสอบการมีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์กับโปรโมเตอร์ของยีน นอกจากนี้ยังสามารถใช้ระบุตำแหน่งเฉพาะบนจีโนมอีกด้วย (Collas, 2010)

หลักการของวิธีนี้อาศัยการใช้แอนติบอดีต่อโปรตีนที่จำเพาะทำการตกตะกอนโปรตีนลงมา ในขั้นตอนแรกดีเอ็นเอและโปรตีนจะถูกเชื่อมกันไว้จากการทำ cross linking ด้วยสารฟอร์มัลดีไฮด์

(formaldehyde) จากนั้นดีเอ็นเอจะถูกตัดเป็น โดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) หรือใช้ เอนไซม์นิวคลีเอสในการตัด (nuclease digestion) แล้วทำการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้แอนติบอดีที่ จำเพาะต่อโปรตีนนั้น ๆ ซึ่งโปรตีนจะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำการตัดถูกดึงลงมาด้วย จากนั้นโปรตีนที่ถูก ดึงลงมาจะถูกกำจัดให้เหลือเพียงแต่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอส่วนนี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี พีซีอาร์เพื่อตรวจสอบยีนที่จำเพาะเจาะจง หรือสามารถนำชิ้นดีเอ็นเอนี้ไปทำการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์เพื่อทำนายยีน (Gade and Kalvakolanu, 2012) อย่างเช่น การค้นพบโปรตีน E7 ของ เชื้อเอชพีวีไทป์ 16 กระตุ้นการเติมหมู่อะซิติลบนโปรตีนฮิสโตน (histone acetylation) ในส่วน โพรโมเตอร์ของยีน *CDC25A* และยีน *E2F1* (Zhang et al., 2004) เป็นต้น



รูปที่ 16 หลักการ Chromatin immune precipitation

(Collas, 2010) ได้รับอนุญาตจากผู้แต่ง

### Methylation specific-PCR (MSP)

Methylation specific-PCR (MSP) เป็นวิธีที่นิยมสำหรับการศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ซึ่งเป็นการนำดีเอ็นเอที่ผ่านการทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์มาทำการตรวจสอบโดยการทำ Allele specific PCR ซึ่งจะจำเพาะต่อเบสไซโทซีนหรือเบสยูราซิล ซึ่งในการตรวจสอบจำเป็นต้องใช้คู่ไพรเมอร์สองคู่ คู่หนึ่งมีความจำเพาะสำหรับดีเอ็นเอที่เกิดการเมทิลเลชัน (methylation primer) ซึ่งจะเป็นไพรเมอร์ที่

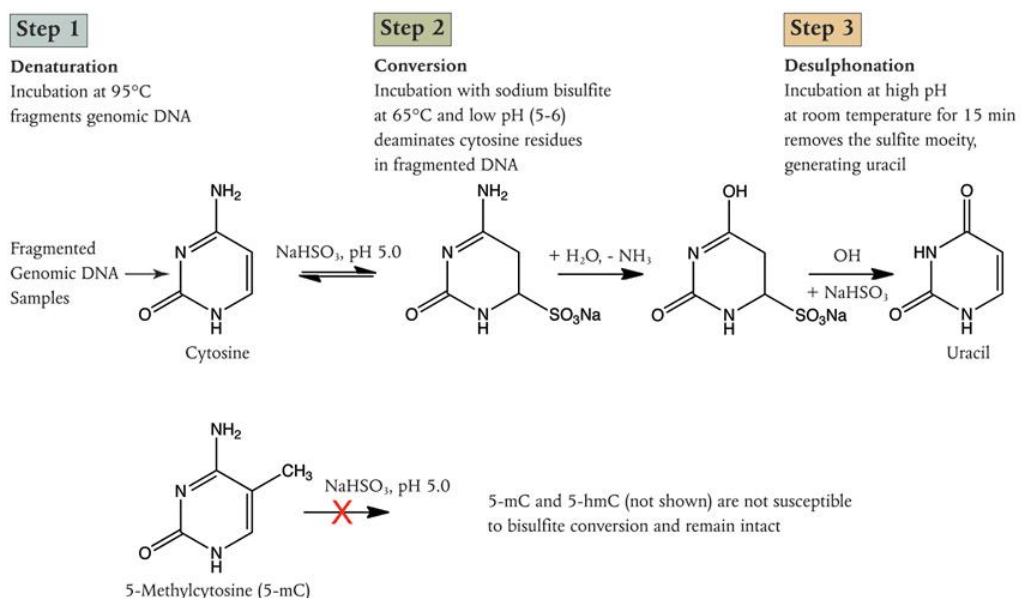


จำเพาะต่อเบสไซโตซีน และอีกคู่หนึ่งเป็นไพรเมอร์สำหรับดีเอ็นเอที่ไม่เกิดการเมทิลเลชัน (unmethylation primer) ซึ่งจะเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเบสยูราซิล หากไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเบสไซโตซีนสามารถจับกับสายดีเอ็นเอได้แสดงว่าดีเอ็นเอบริเวณที่ไพรเมอร์มาจับมีการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีน ในทางกลับกันหากไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเบสยูราซิลจับกับสายดีเอ็นเอได้แสดงว่าดีเอ็นเอบริเวณที่ไพรเมอร์มาจับไม่มีการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีน

โดยปกติแล้วการเกิดเมทิลเลชันจะไม่ได้เกิดทั้งหมด แต่จะมีร้อยละของเบสไซโตซีนที่ถูกเติมหมู่เมทิลที่แตกต่างกันออกไป โดย PCR product ของทั้งสองไพรเมอร์จะรวมกันเป็นร้อยละ 100 (Herman et al., 1996)

### ปฏิกิริยาไบซัลไฟต์ (Bisulfite conversion)

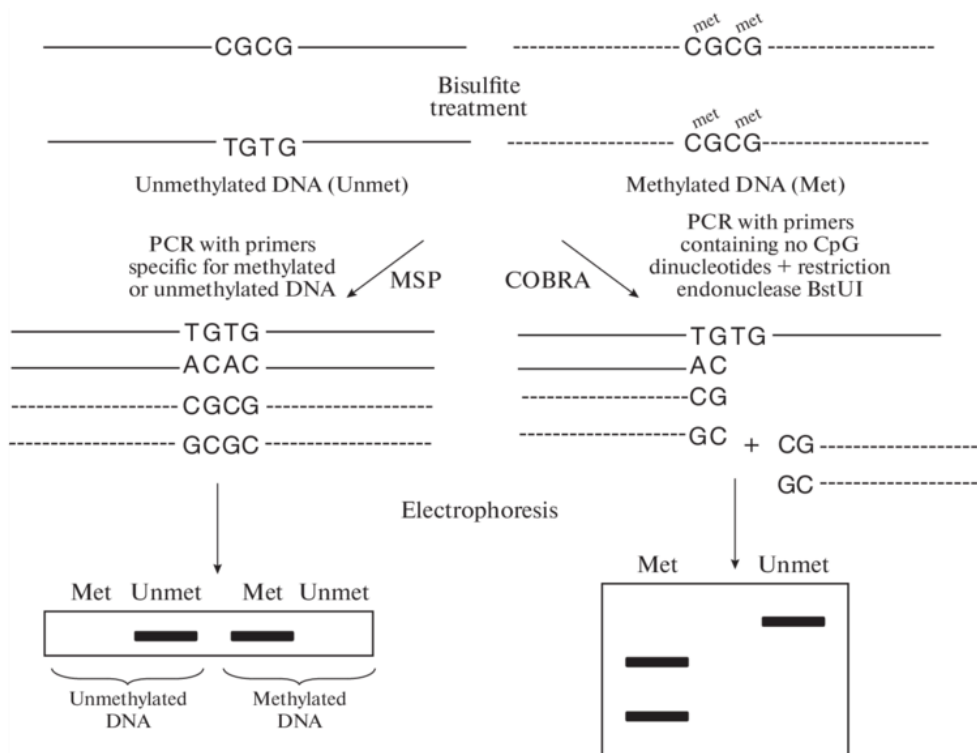
ปฏิกิริยาไบซัลไฟต์เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ในการแยกแยะระหว่างเบสไซโตซีนและเบสไซโตซีนที่ถูกเติมหมู่เมทิลโดยอาศัยหลักการของความไวในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ซึ่งเบสไซโตซีนและเบสไซโตซีนที่ถูกเติมหมู่เมทิลจะถูกดิงหมู่เอมีน (deamination) ภายใต้สภาวะกรด เบสไซโตซีนที่ไม่มีการเติมหมู่เมทิลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเบสยูราซิล ในขณะที่เบสไซโตซีนที่ถูกเติมหมู่เมทิลจะยังคงเป็นเบสไซโตซีนเช่นเดิม (Grunau, Clark and Rosenthal, 2001)



### รูปที่ 17 การเปลี่ยนเบสไซโตซีนเป็นยูราซิลภายใต้ปฏิกิริยาไบซัลไฟต์

แหล่งที่มา: <https://www.neb.com/applications/epigenetics/dna-methylation-analysis/bisulfite-conversion>

ดีเอ็นเอที่นำมาทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์ควรเป็นดีเอ็นเอที่มีคุณภาพที่ดีและสามารถถูกแยกให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้อย่างสมบูรณ์เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเบสอย่างสมบูรณ์ตลอดทั้งสายดีเอ็นเอ สภาพ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมมีความจำเป็นอย่างมากในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา นอกจากนี้ไบซัลไฟต์ไอออนมีความไวสูงที่จะเกิด auto-oxidation ได้ง่ายจึงจำเป็นต้องเติมสารไฮโดรควิโนน (hydroquinone) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระร่วมในปฏิกิริยา ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์จะถูกนำไปวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น Methylation specific-PCR (MSP) หรือ Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) เป็นต้น (Fraga and Esteller, 2002)



รูปที่ 18 หลักการการทำ Methylation specific-PCR (MSP) และ Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

(Bryzgunova and Laktionov, 2017)

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

Autoclave SX-700 (TOMY, JAPAN)

Autopipette (EPPENDORF)

Biosafety cabinet class II (LABGARD)

Centrifugation machine (EPPENDORF)

Centrifuge concentrator (TOMY, JAPAN)

Digital Balance (METTLER TOLEDO)

Electrophoresis and Botting (BIO-RAD, USA)

Freezer -20°C, -80°C (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System (BIO-RAD, USA)

ImageQuant LAS 4000 (GELIFESCIENCES)

Incubator (MEMMERT, GERMANY)

Incubator Shaker (NEW BRUNSWIC)

Magnetic stirrer (HEIDOLPH INSTRUMENT)

Mastercycler pro for PCR (EPPENDORF)

Microplate Reader (TECAN SUNRISE, SWITZERLAND)

Microwave oven (TOSHIBA)

NanoDrop Spectrophotometers (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

pH meter (DENVERINSTRUMENT)

Refrigerator (TOSHIBA)

Rotator (STUART)

Sorval RC6+ centrifugation (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Thermomixer (EPPENDORF)

Tube Rotator (SCIOLOGEX)

Upright and Inverted Light Microscopes (ZEISS)

Vortex mixer (SCIENTIFIC INDUSTRIES)

Water Bath (BANDELIN)

### วัสดุอุปกรณ์

6 well plate, 96 well plate (JETBIOFILL)

Autoclave tap

Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000ml (PYREX,USA)

Cell culture flask: T25, T75 (JET BIOFILL)

Cell Scraper (JET BIOFILL)

Counting chambers

Cryovial tube (CORNING, USA)

Cylinder: 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml

Disposable gloves

Flask: 250 ml, 1000 ml, 2000 ml (PYREX, USA)

Forceps

Microcentrifuge tube 1.5 ml

Oasis HLB Extraction Cartridge (WATERS CORPORATION, U.S.A.)

Paraflim

PCR tube

Pipette tip; 10 ul, 200 ul, 1000 ul

Plastic bag

Plastic box

Polypropylene conical tube sterile: 15 ml, 50 ml

PVDF membrane (MERK)

Reagent bottle: 250 ml, 500 ml, 1000 ml (DURAN, USA)

Single use sterile pipette: 5 ml, 10 ml, 25 ml (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Sonicator

Stirring-magnetic bar

Test tube racks

Tissue culture dish: 60 mm, 100 mm (JETBIOFILL)

Tissue paper

### สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

#### สารเคมีทั่วไป

37% Formaldehyde (MERK, USA)

Acetonitrile (MERK, USA)

Absolute ethanol (MERK, USA)

Agarose (SIGMA, USA)

Ammonium bicarbonate (SIGMA, USA)

Ammonium persulfate (APS) (SIGMA, USA)

Beta-mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol) (SIGMA, USA)

Bovine Serum Albumin (SIGMA, USA)

Chloroform (MERK, USA)

Diethylpyrocarbonate (DEPC) (SIGMA, USA)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (SIGMA, USA)

DTT 1,4-Dithiothreitol (SIGMA, USA)

EDTA (MERK, USA)

Glycine

Glycogen

HCl (MERK, USA)

Imidazole (SIGMA, USA)

Iodoacetic acid (SIGMA, USA)

Isopropanol (MERK, USA)

KCl (MERK, USA)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (MERK, USA)

LiCl (MERK, USA)

Methanol (MERK, USA)

Milli-Q water

NaCl (MERK, USA)

$\text{NaHCO}_3$  (MERK, USA)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (MERK, USA)

NaOH (MERK, USA)

Phenol (SIGMA, USA)

Protease inhibitor (MERK, USA)

Skim milk (SIGMA, USA)

Sodium dodecyl sulfate (MERK, USA)

TEMED

Tris (USB CORPORATION, USA)

Triton X 100 (SIGMA, USA)

Trizol (INVITROGEN, USA)

Trypan blue (SIGMA, USA)

Tweet 20 (SIGMA, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

Dulbeco's Modified Eagles Medium (DMEM) (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Fetal Bovine Serum (Hyclone, USA)

Minimum Essential Medium (MEM) (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

PBS

Trypsin-EDTA (GIBCO, INVITROGEN, USA)

สารเคมีที่ใช้นำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์

Turbofect (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Opti-MEM (GIBCO, INVITROGEN, USA)

สารเคมีที่ใช้สกัดโปรตีน

Lysis buffer (1M Tris-HCl pH.8.0, 5M NaCl, 10% TritonX and Protease inhibitor)

PBS

Pierce BCA Protein Assay Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

สารเคมีสำหรับตกตะกอนโปรตีน

Lysis buffer (1M Tris-HCl pH.8.0, 5M NaCl)

Ni-NTA Agarose (Thermo Fisher Scientific)

Protein G PLUS-Agarose (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)

Rabbit anti AP2 alpha (ABCAM, USA)

3.6 สารเคมีสำหรับ Western blot

40% Acrylamide/Bis (MERK, USA)

10% APS

4x loading dye (250mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.2% bromophenol blue, 40% glycerol and 20%  $\beta$ -mercaptoethanol)

10% SDS

10% Skim milk

0.5 M Tris-HCl pH 6.8

1.5 M Tris-HCl pH 8.8

Goat anti mouse IgG-HRP (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Goat anti rabbit IgG-HRP (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Immobilon Forte Western HRP substrate (MERK, USA)

Mouse anti HPV16E7 (INVITROGEN, USA)

Rabbit anti AP2 alpha (ABCAM, USA)

Rabbit anti YY1 (ABCAM, USA)

Running buffer

Transfer buffer

TBST (1x TBS and 0.05% Tween 20)

Protein G PLUS-Agarose (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)

Protein ladder (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาโปรตีน

2-D Clean-Up Kit (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES)

4M Imidazole

50% Acetonitrile

100 mM Ammonium bicarbonate

1 M DTT 1, 4-Dithiothreitol

110 mM Iodoacetic acid

Trypsin for proteomic (SIGMA, USA)

สารเคมีสำหรับทำ real time RT-PCR

Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

The RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

สารเคมีสำหรับ methylation specific PCR

2.5% Agarose จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

100bp DNA ladder (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER)

EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA)

HotStarTaq DNA polymerase (QIAGEN)

สารเคมีสำหรับ Chromatin immunoprecipitation

2.5% Agarose

ChIP buffer

Lysis buffer

PK buffer



Protein G PLUS-Agarose (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)

Mouse anti HPV16E7 (INVITROGEN, USA)

Mouse IgG (Cell SIGNALING, USA)

Rabbit anti AP2 alpha (ABCAM, USA)

Rabbit anti H3K4 (ABCAM, USA)

Rabbit anti YY1 (ABCAM, USA)

RNaseA

## วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ ได้แก่

1. การค้นหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทมป์ 16
2. การตรวจสอบการแสดงออก การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนในเซลล์ที่มีโปรตีน E7 และการทดสอบยืนยันการจับกันระหว่างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์โปรตีน E7 ของเอชพีวีไทมป์ 16 กับโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมายของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์นั้น

### 1. การค้นหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทมป์ 16

#### 1.1 การถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ (transformation)

พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีอยู่ 2 แบบด้วยกัน คือพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทมป์ 16 และพลาสมิดเปล่า ซึ่งพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นพลาสมิดชนิด pcDNA 3.1/myc-His (Invitrogen, USA) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเวชพันธุศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดดังกล่าวนั้นจะทำการเพิ่มจำนวนโดยการโคลนนิ่ง ซึ่งใช้ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5-alpha เป็นเซลล์คอมพีเทนต์โดยมียีนต้านยาแอมพิซิลลินเป็นตัวคัดเลือก ขั้นแรกนำเซลล์คอมพีเทนต์ที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียสมาวางบนน้ำแข็ง ดูดเซลล์คอมพีเทนต์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับพลาสมิดปริมาตร 8 ไมโครลิตร นำไปบ่มบนน้ำแข็ง 30 นาที เพื่อให้พลาสมิดจับที่ผนังเซลล์ด้านนอกของเซลล์คอมพีเทนต์ จากนั้นนำไปให้ความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เพื่อให้ผนังเซลล์ของเซลล์คอมพีเทนต์เป็นรูเพื่อให้พลาสมิดสามารถเข้าไปด้านในเซลล์

คอมพิเทนต์ แล้วรีบนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ผนังเซลล์ของเซลล์คอมพิเทนต์กลับสู่สภาพเดิม จากนั้นนำไปผสมกับ super optimal broth (SOB) 980 ไมโครลิตรที่มี 2M MgCl<sub>2</sub> 10 ไมโครลิตร และ 2M glucose 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในตู้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้การเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีพร้อมด้วย เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยง ตกตะกอนที่ความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้งจนเหลือของเหลวในหลอดประมาณ 100 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดผสมเพื่อให้ตะกอนกระจายออกจากกัน ดูดของเหลวปริมาตร 25 ไมโครลิตรไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Luria-Bertani agar หรือ LB agar) ที่มียาแอมพิซิลลิน โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของยาแอมพิซิลลิน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีที่ขึ้นในจานเพาะเชื้อมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Luria-Bertani broth หรือ LB) โดยแยก 1 โคโลนี ต่อ 1 หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของยาแอมพิซิลลิน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในเครื่องบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่สภาวะเขย่าโดยใช้ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวอีกครั้งหนึ่งโดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของยาแอมพิซิลลิน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในเครื่องบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่สภาวะเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

## 1.2 การสกัดพลาสมิด

นำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่เลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 18 ชั่วโมงมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 30 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้ง จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด Geneaid™ Plasmid Maxi Kit Endotoxin Free (Geneaid, Taiwan) สามารถเก็บพลาสมิดไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

## 1.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ HEK293 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากไตของมนุษย์

### 1.3.1 การเพาะเลี้ยง HEK293 จากเซลล์ที่แช่แข็ง

ทำความสะอาดตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety Cabinet class2) และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยการเช็ดทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 และเปิดแสงยูวีเป็นเวลา 15 นาที นำ HEK293 ที่ถูกเก็บแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่ -196 องศาเซลเซียส มาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ใช้ปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตรดูดเซลล์มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 200 g เป็น

เวลา 5 นาที ดูดส่วนเหลวทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย MEM และ FBS ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับส่วนตะกอนของเซลล์ให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่บรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

### 1.3.2 การเลี้ยงเซลล์ HEK293

เมื่อ HEK293 เพิ่มปริมาณและมีความหนาแน่นเต็มขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด แล้วล้างเซลล์โดยเติม 1xPBS ประมาณ 3 มิลลิลิตร เอียงไปมาให้ทั่วขวดเพื่อล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดแล้วดูดทิ้ง ซึ่งจะทำซ้ำด้วย 1xPBS เป็นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม Trypsin-EDTA 500 ไมโครลิตร เอียงไปมาให้ทั่วขวด ทำการบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากขวด เมื่อครบเวลาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS ลงไป 1 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของทริปซิน ผสมให้เข้ากันแล้วดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในหลอดทดลองที่สะอาดขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่มีความเร็ว 200 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนเหลวทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบด้วย MEM และ FBS ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับส่วนตะกอนของเซลล์ให้เข้ากัน ตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์ด้วยการย้อม trypan blue โดยใช้ความเข้มข้นของ trypan blue ต่อเซลล์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 นำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound light microscope โดยใช้สไลด์นับเซลล์ (hemocytometer) ซึ่งเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสีฟ้าของ trypan blue นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแล้วนำไปคำนวณจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรมิลลิลิตร นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใช้เซลล์ตั้งต้นที่  $1 \times 10^6$  เซลล์ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มี FBS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ให้ครบปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่บรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เพื่อเตรียมนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์

### 1.4 การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HEK293 (Transfection)

หลังจากที่ได้ทำการเพาะเลี้ยง HEK293 ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใช้เซลล์ตั้งต้นที่  $1 \times 10^6$  เซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในวันถัดมาทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำพลาสมิดที่ทราบความเข้มข้นที่ได้จากการวัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ ซึ่งพลาสมิดที่ใช้ในการถ่ายโอนเข้าสู่ HEK293 ได้แก่ expression vector pcDNA3.1\_HPV16E7 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ตัดต่อยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าไป และ พลาสมิดตัวควบคุม pcDNA3.1/myc-His A ซึ่งเป็นพลาสมิดเปล่าที่ไม่ได้ผ่านการตัดต่อ โดยเตรียมสารละลายความเข้มข้นของพลาสมิดแต่

ละชนิดที่จะใช้ในการนำเข้าสู่เซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ดังนี้ นำพลาสมิด 6 ไมโครกรัม ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MEM ที่ไม่มียาปฏิชีวนะและ FBS ให้ได้ปริมาตรรวม 600 ไมโครลิตร จากนั้นเติม TurboFect™ Transfection Reagent (Thermo, USA) ลงไป 12 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นนำสารละลายเติมลงในขวดเพาะเลี้ยง HEK293 ที่ได้ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่บรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัดโปรตีน

### 1.5 การสกัดโปรตีนจาก HEK293

หลังจากนำพลาสมิดเข้าสู่ HEK293 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์ โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างด้วย PBS ที่แช่เย็น 4 องศาเซลเซียสเป็นจำนวน 3 ครั้ง แล้วทำให้เซลล์แตกโดยการเติม lysis buffer 100 ไมโครลิตร แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที นำมาขูดให้เซลล์หลุดจากพื้นผิวขวดเพาะเลี้ยงด้วยไม้ขูดเซลล์ (scraper) แล้วดูดเซลล์ที่ขูดใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงทำการเก็บส่วนใสเพื่อนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีน

### 1.6 การวัดความเข้มข้นของโปรตีน

วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay โดยใช้ Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo, USA) ซึ่งมีขั้นตอนเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นเตรียม working reagent โดยทำการผสม reagent A ต่อ reagent B ในอัตราส่วน 50:1 แล้วนำ working reagent 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ รวมถึงผสมในโปรตีนตัวอย่างที่ได้ทำการละลายกับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ความยาวคลื่นที่ 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ (micro plate reader) จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA ไปสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน จากสมการเส้นตรง  $y = mx+b$  เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง

**ตารางที่ 1** ส่วนผสมที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ช่อง	ปริมาตรของน้ำ (ไมโครลิตร)	ปริมาตรของสารละลาย BSA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
A	25	0	0
B	20	5	0.4
C	15	10	0.8
D	10	15	1.2
E	5	20	1.6
F	0	25	2

### 1.7 การตรวจสอบโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16

นำ HEK293 ที่ทำการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ซึ่งได้แก่ พลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 -ของไวรัส และพลาสมิดเปล่ามาทำการสกัดโปรตีน หลังจากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน E7 โดยการนำไปแยกขนาดด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยเตรียมเจลระหว่างแผ่นกระจกสองแผ่น โดยการประกบแผ่นกระจกเข้าด้วยกันโดยใช้ spacer ที่มีความหนาหนา 1.5 มิลลิเมตร. เตรียมเจลที่ใช้แยกโปรตีนจากตัวอย่างโดยใช้ 15% Polyacrylamide จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีน 100 ไมโครกรัม มาผสมกับ 4x loading dye แล้วนำไปผ่านความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปหยอดในเจลที่เตรียมไว้ พร้อมกับหยอดโปรตีนมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบขนาดลงในเจลควบคู่กับโปรตีนตัวอย่าง ปริมาตร 3 นำไปแยกโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 90 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่นเจลที่ผ่านการแยกขนาดไปทำ western blot ซึ่งเป็นการถ่ายโอนโปรตีนจากเจลลงบนแผ่น PVDF โดยใช้ transfer buffer เป็นบัฟเฟอร์ ในการถ่ายโอนโปรตีนลงบนแผ่น PVDF จะทำการวางอุปกรณ์ตามลำดับ ดังนี้ ฟองน้ำ กระจกกรอง แผ่นเจล แผ่น PVDF กระจกกรอง และฟองน้ำ ซึ่งจะเป็นการประกบแผ่นเจลกับแผ่น PVDF จากซ้ายไปขวา จากนั้นนำไปผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง เมื่อทำการถ่ายโอนโปรตีนลงบนแผ่น PVDF เสร็จ นำแผ่น PVDF ไปแช่ใน 5% skim milk นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 (mouse anti-HPV16E7) โดยทำการละลายแอนติบอดีลงใน 5% skim milk โดยใช้อัตราส่วนแอนติบอดี 1 ไมโครลิตรต่อ 5% skim milk 200 ไมโครลิตร แล้วทำการบ่มที่ 4 องศา

เซลเซียสข้ามคืน จากนั้นทำการล้างแผ่น PVDF ด้วย TBST 4 รอบรอบละ 20 นาที เมื่อทำการล้างแผ่น PVDF เรียบร้อยแล้วนำแผ่น PVDF ไปทำปฏิกิริยากับ goat anti mouse conjugate HRP ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง จากนั้นทำการล้างแผ่น PVDF ด้วย TBST 4 รอบรอบละ 20 นาทีอีกครั้ง แล้วนำไปตรวจสอบ โดยใช้น้ำยา Immobilon Forte Western HRP substrate ซึ่งจะใช้ น้ำยาปริมาตร -300 ไมโครลิตร หยดให้ทั่วแผ่น PVDF ทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วทำการตรวจสอบโดยใช้เครื่อง ImageQuant LAS 4000

## 1.8 การตกตะกอนโปรตีน

### 1.8.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วย Ni-NTA agarose resin

ในการตกตะกอนโปรตีน E7 ในการทดลองนี้ใช้ Ni-NTA agarose resin เนื่องจาก Ni-NTA มีคุณสมบัติจำเพาะในการจับกับ 6x Histidine ซึ่งในพลาสติกที่ใช้ได้ทำการตัดต่อยีน E7 ของเอชพีวี ไทป์ 16 ไว้ยู่ติดกับ 6xHistidine เมื่อยีน E7 ของไวรัสมีการแปลรหัสออกมาจึงมี 6x Histidine ติดออกมาด้วย ในการทดลองจะทำการเตรียมคอลัมน์ที่บรรจุ Ni-NTA agarose resin 200 ไมโครลิตร (HisPur™ Ni-NTA Spin Columns) (Thermo, USA) จากนั้นล้างด้วย PBS ที่ผสมอยู่กับ Imidazole ซึ่ง Imidazole มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10mM โดยใช้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หลังจากทำการล้างเสร็จใส่โปรตีนตัวอย่างที่ได้จากการวัดความเข้มข้นโดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนที่ 2 มิลลิกรัม นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องหมุน 360 องศา เป็นเวลาข้ามคืน หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเก็บส่วนใส ล้าง Ni-NTA agarose resin ด้วย PBS ที่ผสมกับ Imidazole ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25mM ด้วยปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 g เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งทำซ้ำเป็นจำนวน 3 รอบ แล้วทำการชะโปรตีนที่ติดกับ Ni-NTA agarose resin ออกด้วย PBS ที่ผสมกับ Imidazole ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 250mM ด้วยปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บเฉพาะส่วนใส สามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 1.8.2 การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้แอนติบอดี

ในการตกตะกอนโปรตีน TFAP2A ขั้นแรกจะทำการดูด protein G agarose bead ในสารละลาย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งในสารละลายจะมี protein G agarose bead ประมาณ 50 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการล้าง protein G agarose bead ด้วย Lysis buffer ที่ไม่ได้ผสม TritonX ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นใส่โปรตีน

ตัวอย่างที่ได้จากการวัดความเข้มข้นโดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนที่ 2 มิลลิกรัม และแอนติบอดีต่อโปรตีน TFAP2A ปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องหมุน 360 องศาเป็นเวลาข้ามคืน หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเก็บส่วนใส ล้าง ล้าง protein G agarose bead ด้วย Lysis buffer ที่ไม่ได้ผสม TritonX ด้วยปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 g เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งทำซ้ำเป็นจำนวน 3 รอบ แล้วนำ protein G agarose bead ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นทำการชะโปรตีนที่ติดกับ protein G agarose bead ด้วย 4x loading dye ปริมาตร 60 ไมโครลิตร แล้วนำไปผ่านความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที สามารถนำไปตรวจสอบโดยการทำให้ western blot

## 1.9 การวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีน

### 1.9.1 การเตรียมเปปไทด์

กำจัดสารต่าง ๆ ที่จะรบกวนเครื่อง LC MS/MS เช่น สารลดแรงตึงผิว เกลือ ไขมัน และกรดนิวคลีอิก ด้วยชุดน้ำยา 2D clean up kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) จากนั้นเติม 50 mM ammonium bicarbonate ในโปรตีน 50 ไมโครกรัม ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร แล้วเติม 85mM dithiothreitol ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10mM dithiothreitol บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที แล้วเติม 55 mM iodoacetic acid ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20mM mM iodoacetic acid นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มีดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการเติมทริปซินในอัตราส่วนทริปซิน 1 ไมโครกรัมต่อโปรตีน 50 ไมโครกรัม ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน หลังจากนั้นนำเปปไทด์ที่ได้มาผ่านคอลัมน์ Oasis<sup>®</sup> HLB Extraction Cartridge (Waters Corporation, Massachusetts, U.S.A.) เพื่อกำจัดเกลืออีกครั้งหนึ่ง โดยทำการเติม 50% acetonitrile และ 0.1% tri formic acid โดยผ่านคอลัมน์ตามลำดับ จากนั้นใส่เปปไทด์ที่ทำการบ่มข้ามคืนลงในคอลัมน์ แล้วทำการชะล้างเก็บเปปไทด์โดยการเติม 60% acetonitrile ร่วมกับ 0.1% formic acid นำเปปไทด์ที่ได้ไประเหยแห้ง และเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อร่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC MS/MS

### 1.9.2 การวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีน

นำเปปไทด์ไปวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง mass spectrometry โดยวิธี LC-MS/MS ที่ศูนย์ชีววิทยาเชิงระบบ อาคารแพทยพัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Proteome Discoverer™ Software (Thermo Fisher Scientific) นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมมาทำการคัดเลือกโปรตีนโดยคัดเลือกโปรตีน โดยทำการวิเคราะห์ 2 แบบ ได้แก่

- 1) วิเคราะห์จากค่า Abundance ratio ระหว่าง HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 กับ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ ที่มีค่ามากกว่า หรือเท่ากับ 1
- 2) วิเคราะห์หาโปรตีนในตัวอย่างจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์แยกกัน แล้วนำมา เปรียบเทียบดูโปรตีนที่พบเฉพาะในตัวอย่างที่มาจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มี ยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์

จากนั้นนำโปรตีนที่ถูกคัดเลือกจากทั้งสองวิธีมาวิเคราะห์หาโปรตีนที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์โดยใช้โปรแกรม Panther (<http://www.pantherdb.org/>) และใช้โปรแกรม Cytoscape ทำนายยีน เป้าหมายของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์

### 1.10 การทำนายโปรตีนทรานสคริปชันโดยใช้ชีวสารสนเทศ

ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน CCNA1 โดยใช้โปรแกรม Ensembl (<https://asia.ensembl.org/index.html>) ซึ่งเป็นบริเวณที่เคยมีรายงานการถูกชักนำให้เกิด เมทิลเลชันโดยโปรตีน E7ของเอชพีวีไทป์ 16 และเอนไซม์ DNMT1 เป็นตัวชักนำ (Chalertpet et al., 2015) มาทำนายทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีความน่าจะเป็นที่จะเป็นตัวควบคุมการแสดงออก ของยีน CCNA1 บนโปรโมเตอร์บริเวณนี้ โดยใช้โปรแกรม Jaspas (<http://jaspar.genereg.net>) และ โปรแกรม Promo (<http://algggen.lsi.upc.es>) ซึ่งโปรแกรม Jaspas ได้กำหนดใช้ค่า Relative profile score threshold ที่ร้อยละ 99 และโปรแกรม Promo ได้กำหนดใช้ค่า Maximum matrix dissimilarity rate ที่ร้อยละ 1 ซึ่งทั้งสองค่าอาจหมายถึงมีระดับความน่าเชื่อถือที่ร้อยละ 99



2. การตรวจสอบการแสดงออก การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนในเซลล์ที่มีโปรตีน E7 และการทดสอบยืนยันการจับกันระหว่างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ โปรตีน E7 ของเอชพีวี 16 กับโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมายของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์นั้น

### 2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ HEK293 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากไตของมนุษย์ และ C33A ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกมนุษย์ที่ไม่มีเอชพีวี สำหรับการเพาะเลี้ยง HEK293 ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 1.3

#### 2.1.1 การเพาะเลี้ยง C33A จากเซลล์ที่แช่แข็ง

ทำความสะอาดตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety Cabine class2) และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยการเช็ดทำความสะอาดแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 และเปิดแสงยูวีเป็นเวลา 15 นาที นำ C33A ที่ถูกเก็บแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่ -196 องศาเซลเซียส มาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ใช้ปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตรดูดเซลล์มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 200 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนเหลวทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย DMEM และ FBS ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับส่วนตะกอนของเซลล์ให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่บรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

#### 2.1.2 การเลี้ยงเซลล์ C33A

เมื่อ C33A เพิ่มปริมาณและมีความหนาแน่นเต็มขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด แล้วล้างเซลล์โดยเติม 1xPBS ประมาณ 3 มิลลิลิตร เอียงไปมาให้ทั่วขวดเพื่อล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดแล้วดูดทิ้ง ซึ่งจะทำกรล้างด้วย 1xPBS เป็นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม Trypsin-EDTA 500 ไมโครลิตร เอียงไปมาให้ทั่วขวด ทำการบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากขวด เมื่อครบเวลาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS ลงไป 1 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของทริปซิน ผสมให้เข้ากันแล้วดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในหลอดทดลองที่สะอาดขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 200 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนเหลวทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบด้วย DMEM ที่มี FBS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ผสมอยู่ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับ

ส่วนตะกอนของเซลล์ให้เข้ากัน ตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์ด้วยการย้อม trypan blue โดยใช้ความเข้มข้นของ trypan blue ต่อเซลล์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 นำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound light microscope โดยใช้สไลด์นับเซลล์ (hemocytometer) ซึ่งเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสีฟ้าของ trypan blue นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแล้วนำไปคำนวณจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรมิลลิลิตร นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใช้เซลล์ตั้งต้นที่  $1 \times 10^6$  เซลล์ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ผสม โดยเติมให้ครบปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่บรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เพื่อเตรียมนำไปทำการถ่ายโอนพลาสมิด

## 2.2 การนำพลาสมิดเข้าสู่ HEK293 และ C33A

หลักจากที่ได้ทำการเพาะเลี้ยง HEK293 และ C33A ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใช้เซลล์ตั้งต้นที่  $1 \times 10^6$  เซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในวันถัดมาทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำพลาสมิดที่ทราบความเข้มข้นที่ได้จากการวัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ ซึ่งพลาสมิดที่ใช้ นำเข้าสู่ HEK293 และ C33A ได้แก่ expression vector pcDNA3.1\_HP16E7 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ตัดต่อยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าไป และ พลาสมิดตัวควบคุม pcDNA3.1/myc-His A ซึ่งเป็นพลาสมิดเปล่าที่ไม่ได้ผ่านการตัดต่อ โดยเตรียมสารละลายความเข้มข้นของพลาสมิดแต่ละชนิดที่จะใช้ในการนำเข้าสู่เซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ดังนี้ นำพลาสมิด 6 ไมโครกรัม ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MEM และ/หรือ DMEM ที่ไม่มียาปฏิชีวนะและ FBS ให้ได้ปริมาตรรวม 600 ไมโครลิตร จากนั้นเติม TurboFect™ Transfection Reagent (Thermo, USA) ลงไป 12 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นนำสารละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEM เติมลงในขวดเพาะเลี้ยง HEK293 และ สารละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM เติมลงในขวดเพาะเลี้ยง C33A ที่ได้ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่แล้ว นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่บรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับ HEK293 และ 48 ชั่วโมงสำหรับ C33A จากนั้นนำไปสกัดดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอหรือนำไปทำ chromatin immunoprecipitation

### 2.3 การสกัดอาร์เอ็นเอ

ทำการเก็บเซลล์หลังจากครบเวลาการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ทั้งสองชนิด โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างด้วย 1xPBS เป็นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม Trypsin-EDTA 500 ไมโครลิตร เอียงไปมาให้ทั่วขวดเพาะเลี้ยง แล้วทำการบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากขวดเพาะเลี้ยง เมื่อครบเวลาทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์แต่ละชนิดที่มี FBS ลงไปในขวดเพาะเลี้ยง 1 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของทริปซิน ผสมให้เข้ากันแล้วทำการดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในหลอดทดลองที่สะอาดขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 500 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนเหลวทิ้ง เติม 1xPBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 500 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนเหลวทิ้ง ทำซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม trizol 1 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตดูด trizol ขึ้นลงเพื่อผสมกับเซลล์และทำให้เซลล์แตก บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารในหลอดให้เข้ากันโดยการเขย่าหลอดแรงๆ เป็นเวลา 15 วินาที ตั้งบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที ปั่นตกตะกอน 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนไปใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ แล้วใส่ 100% isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร คว่ำหางยหลอดเพื่อผสมสารในหลอดให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ปั่นตกตะกอน 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอน 7,500 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้วตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย nuclease free water ปริมาตร 50 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปวัดความเข้มข้น สามารถเก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 2.4 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สม (cDNA)

การสังเคราะห์ cDNA เริ่มต้นจากกำจัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอโดยใช้อาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัมผสมกับบัฟเฟอร์ที่มี  $MgCl_2$  ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DNase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และใช้น้ำ nuclease free water ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มในเครื่องเพิ่มปริมาตรสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 50mM EDTA ปริมาตร 1 ไมโครกรัม นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปวัดความเข้มข้น จากนั้นใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูป the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

(Thermo Fisher Scientific) ทำการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้อาร์เอ็นเอ เริ่มต้น 5 ไมโครกรัมผสมกับ oligo(dT)<sub>18</sub> ปริมาตร 1 ul ความเข้มข้นประมาณ 0.5 ไมโครกรัม แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย nuclease free water ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 12.5 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ๘ dNTP ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ RevertAid Reverse Transcriptase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ตามด้วย 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 19 นาที cDNA ที่ได้สามารถเก็บไว้ในตู้ -20 องศาเซลเซียส หรือใช้ในการทดลองต่อไป

## 2.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *FOXC1*, *VEGFA*, *CGA*, *USP9X* และ *PSMC5* ด้วยวิธี Real-time PCR โดยการนำ cDNA ที่สังเคราะห์มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR ด้วยชุดน้ำยา Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน และใช้ cDNA จาก HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์เป็น control gene และ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) เป็น reference gene จากนั้นคำนวณการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี  $\Delta\Delta Cq$  method

ตารางที่ 2 ลำดับไพรเมอร์ของยีนที่ใช้ใน real-time RT PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน

Accession Number	ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'---->3')	ขนาดของยีน
ENSG00000054598	<i>FOXC1</i>	Forward GCAAGCCATGAGCCTGTACG Reverse AGGCAGAGAGTAGTCGGGCA	112 bp
ENSG00000112715	<i>VEGFA</i>	Forward GCAGAAGGAGGAGGGCAGA Reverse GGCCCTCGTCATTGCAGCA	187 bp
ENSG00000135346	<i>CGA</i>	Forward TCCGCTCCTGATGTGCAGG Reverse GAGAAGCAGCAGCCCATGC	104 bp
ENSG00000124486	<i>UPG9X</i>	Forward CCAGATGAGCAAGGTCAAGGTG Reverse CTTCCAGCCACTCACTGCTTC	238 bp

ENSG00000087191	<i>PSMC5</i>	Forward	ATGGAGCTGGAGGAGGGGAA	317 bp
		Reverse	ACCCGGCAATTGGGTGTCAC	
ENSG00000111640	<i>GAPDH</i>	Forward	AGGGTCATCATCTCTGCCCC	219 bp
		Reverse	GCCATCCACAGTCTTCTGGG	

ตารางที่ 3 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ real-time RT-PCR

ชนิดของสาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 2X SYBR Green Master Mix	12.5.0	1X
2. - 10 uM Forward primer	0.5	0.5 uM
10 uM Reverse primer	0.5	0.5 uM
- 10 uM Forward <i>GAPDH</i> primer	0.5	0.5 uM
10 uM Reverse <i>GAPDH</i> primer	0.5	0.5 uM
3. Distilled water	9.5	
4. cDNA	1.0	
<b>ปริมาตรรวม</b>	<b>25.</b>	

ตารางที่ 4 สภาวะในการทำ real-time RT PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Initial denaturation	95	3 นาที
2. PCR cycle (40 รอบ)		
- Denature	95	15 วินาที
- Annealing	59	30 วินาที
- Extension	72	30 วินาที

## 2.6 การคำนวณการแสดงออกของยีน

วิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยวิธี relative quantity ( $\Delta Cq$ ) และ normalized expression ( $\Delta\Delta Cq$ ) โดยอาศัยค่า threshold cycle ที่ได้จากจุดตัดระหว่าง amplification curve และ threshold line ของ target gene และ reference gene (*GAPDH*) จาก test sample คือ HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไพบ์ 16 เข้าสู่เซลล์ และ control sample ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ มาใช้ในการคำนวณตามสมการ ซึ่งการแสดงออกของยีนที่ได้จะเป็นสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงเป็นจำนวนเท่า (foldchange) ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{Fold change} &= 2^{-\Delta\Delta Cq} \\ &= 2^{-(Cq(\text{test}) - Cq(\text{reference}))} \\ &= 2^{-[(Cq(\text{target, test}) - Cq(\text{ref, test})) - (Cq(\text{target, control}) - Cq(\text{ref, control}))]} \end{aligned}$$

เมื่อ  $Cq(\text{target, test})$  คือ  $Cq$  ของยีนจากเซลล์ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไพบ์ 16 เข้าสู่เซลล์

$Cq(\text{ref, test})$  คือ  $Cq$  ของยีน *GAPDH* จากเซลล์ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไพบ์ 16 เข้าสู่เซลล์

$Cq(\text{target, control})$  คือ  $Cq$  ของยีนจากเซลล์ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์

$Cq(\text{ref, control})$  คือ  $Cq$  ของยีน *GAPDH* จากเซลล์ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์

จากนั้นนำค่า  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  มาพล็อตกราฟด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (Regier and Frey, 2010)

## 2.7 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอหลังจากครบเวลาการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ทั้งสองชนิด โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างด้วย 1xPBS เป็นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม Trypsin-EDTA 500 ไมโครลิตร เอียงไปมาให้ทั่วขวดเพาะเลี้ยง แล้วทำการบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากขวดเพาะเลี้ยง เมื่อครบเวลาทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS ลงไปในขวดเพาะเลี้ยง 1 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของทริบซิน ผสมให้เข้ากัน โดยทำการดูดขึ้นดูดลง แล้วทำการดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในหลอดทดลองที่สะอาดขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 500 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนเหลวทิ้ง เติม

1xPBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 500 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนเหลวทิ้ง ทำซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยา AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER, Republic of Korea) นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดความเข้มข้น ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้นี้สามารถเก็บได้ ในตู้ -20 องศาเซลเซียส

## 2.8 การทำทริโซเดียมไบซัลไฟต์ (Sodium bisulfite treatment)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไซโตซีนให้กลายเป็นยูราซิลโดยการใช้อยูราซิลไบซัลไฟต์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปของ EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) สามารถเก็บดีเอ็นเอที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (bisulfite treated DNA) ได้ที่ ที่ -20 องศา

## 2.9 การทำ methylation specific PCR (MSP)

ตรวจสอบระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* และ *VEGFA* ใน HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน *E7* ของเอชพีวีชนิด 16 และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ โดยการนำดีเอ็นเอที่ผ่านการทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์ มาทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *FOXC1* และ *VEGFA* ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อการทดลองเมทิลเลชันโดยเฉพาะ เพื่อตรวจสอบรูปแบบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน

ตารางที่ 5 ลำดับไพรเมอร์สำหรับดีเอ็นเอเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* และ *VEGFA*

Accession Number	ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'---->3')	ขนาดของยีน
ENSG00000054598	<i>FOXC1</i> (met)	Forward GGCGTGTGTATAACGAGCGG	302bp
		Reverse CGAAAATCCCACCGACTCGC	
	<i>FOXC1</i> (unmet)	Forward GGTGTGTGTATAATGAGTGGGG	302bp
		Reverse CAAAAATCCCACCAACTCACCAC	
ENSG00000112715	<i>VEGFA</i> (met)	Forward AATGTTTTGCGGGCGCGTGT	159bp
		Reverse ACACGCGACTCGAACCCGA	
	<i>VEGFA</i> (unmet)	Forward GTGGGTGTGTGTTTTTGGATAGAG	152bp
		Reverse CACACACAACTCAAACCCAAACTC	

ตารางที่ 6 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันบริเวณ โพรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* และ *VEGFA* โดยการใช้ไพรเมอร์ชุด methylation

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR	1.0	1X
2. 10 mM dNTPs	0.2	0.2 mM
3. 10 uM Forward met primer	0.5	0.5 uM
4. 10 uM Reverse met primer	0.5	0.5 uM
5. 250 U HotStarTaq polymerase	0.05 6.75	1.25 U/reaction
6. Distilled water	1.0	
7. DNA	10.0	
ปริมาตรรวม		

ตารางที่ 7 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันบริเวณ โพรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* และ *VEGFA* โดยการใช้ไพรเมอร์ชุด unmethylation

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR	1.0	1X
2. 10 mM dNTPs	0.2	0.2 mM
3. 10 uM Forward unmet primer	0.5	0.5 uM
4. 10 uM Reverse unmet primer	0.5	0.5 uM
5. 250 U HotStarTaq polymerase	0.05 6.75	1.25 U/reaction
6. Distilled water	1.0	
7. DNA	10.0	
ปริมาตรรวม		



**ตารางที่ 8** สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Initial denaturation	95	10 นาที
2. PCR cycle (32 รอบ)		
- Denature	95	1 นาที
- Annealing	55 สำหรับ met primer 56.5 สำหรับ unmet primer	1 นาที
- Extension	72	1 นาที
3. Final extension	72	7 นาที
4. Holding	4	

**ตารางที่ 9** สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *VEGFA*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Initial denaturation	95	10 นาที
2. PCR cycle (35 รอบ)		
- Denature	95	1 นาที
- Annealing	55 สำหรับ met primer 57 สำหรับ unmet primer	1 นาที
- Extension	72	1 นาที
3. Final extension	72	7 นาที
4. Holding	4	

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเสร็จแล้วจึงนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ 2.5% agarose gel ผสมกับ GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, U.S.A.) ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad)

## 2.10 การทดสอบยืนยันการจับกันระหว่างโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และทรานสคริปชันแฟกเตอร์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมาย

นำ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์มาทำ chromatin immunoprecipitation (ChIP)

วันที่หนึ่ง ทำการ crosslink โดยใส่ 37% formaldehyde โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% ลงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้เกิดการจับกันระหว่างโปรตีนและดีเอ็นเอ จากนั้นเติม 5M glycine โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25M บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ซึ่ง glycine จะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการ crosslink โดยการทำปฏิกิริยากับ formaldehyde จากนั้นทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS เย็นจำนวน 3 รอบ เติม PBS เย็นที่มี protease inhibitor ให้ความเข้มข้นของ protease inhibitor สุดท้ายเป็น 1X และมีปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร ใช้ scraper ขูดเก็บเซลล์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 800 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง เติม lysis buffer ที่มี protease inhibitor ความเข้มข้นสุดท้าย 1X และมีปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตรต่อหลอด นำไปบ่มโดยวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที และทำการ vortex ทุก 5 นาที เพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์แตก เมื่อครบเวลาทำการปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 800 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง เติม lysis buffer ที่มี protease inhibitor ความเข้มข้นสุดท้าย 1X และมีปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตรต่อหลอด นำไปบ่มโดยวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้เยื่อหุ้มนิวเคลียสแตก แล้วนำตัวอย่างไปทำให้โครมาตินขาดด้วยการใช้คลื่นเสียง (sonication) ด้วยความแรง (pulse) 30% เป็นเวลา 10 วินาที และพัก 30 วินาที จำนวนทั้งหมด 8 ครั้ง โครมาตินที่ได้จะมีขนาดประมาณ 200-1000 คู่เบส ระหว่างที่ทำ sonication ต้องวางหลอดทดลองในน้ำแข็งตลอดเวลา เพราะการทำ sonication จะทำให้เกิดความร้อนซึ่งจะส่งผลให้โปรตีนที่เกาะกับดีเอ็นเอหลุดออกจากกันได้ จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการดูดส่วนใสข้างบนซึ่งคือส่วนของโครมาตินไปยังหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยโครมาตินที่ได้นี้สามารถเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียสได้นาน 3 เดือน

วันที่สอง ใส่ ChIP buffer ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และ protease inhibitor ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงไปยังโครมาตินที่มีปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อทำให้เจือจางลงประมาณ 10 เท่า จากนั้นทำ pre-clear โดยการใส่ protein G agarose bead ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เพื่อลดโปรตีนส่วนเกินที่อาจเกิดขึ้นได้จาก non-specific antibody หรือ bead นำไปเขย่าบน rotator ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 2,000 g ที่อุณหภูมิ

4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที ดูดของเหลวส่วนบนไปยังหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แบ่งไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อสำหรับใช้เป็น positive control และส่วนที่เหลือนำมาทำการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้แอนติบอดีต่าง ๆ ดังนี้ H3K4 (Abcam, USA) ซึ่งใช้เป็น positive control, แอนติบอดีต่อ HPV16E7 (Invitrogen, USA), AP2alpha (Abcam, USA) และ YY1 (Abcam, USA) โดยใช้ปริมาณแอนติบอดีแต่ละชนิดความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม นำไปเขย่าบน rotator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และใช้ mouse normal IgG (Cell signaling, USA) เป็น negative control เพื่อนำมาเป็นตัวเปรียบเทียบโปรตีนส่วนเกินของแอนติบอดี ที่อาจเกิดขึ้น เนื่องจากความไม่จำเพาะของแอนติบอดีที่อาจจะจับกับแอนติเจนอื่น ๆ

วันที่สาม ใส่ protein G agarose bead ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เขย่าบน rotator ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการจับกันระหว่าง protein G agarose bead, แอนติบอดี และโปรตีนที่จำเพาะต่อแอนติบอดีนั้น ๆ จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย 1 มิลลิลิตรของ 150mM NaCl, 500 mM NaCl, LiCl และ T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> ตามลำดับ โดยแต่ละครั้งของการล้างให้เขย่าบน rotator ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 1 นาที กำจัดของเหลวส่วนใส แล้วเติม elution buffer 150 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบน vortex เป็นเวลา 15 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 1,100 g เป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนใสไปยังหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วทำการเติม elution buffer ซ้ำอีกรอบหนึ่ง ดูดเก็บส่วนใสไว้ในหลอดเดียวกัน แล้วเติม 5M NaCl 8 ไมโครลิตร และ RNaseA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม 100% EtOH ปริมาตร 600 ไมโครลิตรเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เพื่อทำการ decrosslink โปรตีนให้ออกจากดีเอ็นเอและตกตะกอนดีเอ็นเอลงมา

วันที่สี่ ปั่นตกตะกอน 14,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที เติม T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> 100 ไมโครลิตร 5X PK buffer 25 ไมโครลิตร และ PK buffer 1.5 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดโปรตีนที่อาจหลงเหลืออยู่ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform ปริมาตร 300 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ย้ายของเหลวใสชั้นข้างบนสุดไปยังหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม 100% EtOH ปริมาตร 750 ไมโครลิตร และ 5M NaCl ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติม glycogen ปริมาตร 2 ไมโครลิตรเพื่อช่วยให้การตกตะกอนของดีเอ็นเอดีขึ้น นำไปบ่มในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน

วันที่ห้า ปั่นตกตะกอนความเร็ว 14,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% EtOH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอน

ที่ความเร็ว 14,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย dH<sub>2</sub>O ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำPCR

**ตารางที่ 10** ลำดับไพรเมอร์ของยีน *FOXC1* และ *VEGFA* ที่ใช้ทำ PCR หลังจากการทำ ChIP

Accession Number	ยีน		ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'---->3')	ขนาดของยีน
ENSG00000054598	<i>FOXC1</i>	Forward	TGAACCGCCCTCTAGGTGC	169 bp
		Reverse	CGGGCTCGGTGACATTAGC	
ENSG00000112715	<i>VEGFA</i>	Forward	CAAGGGAGGGGGCCAGAA	174 bp
		Reverse	AGGCAGGCCTCCTCACCT	

**ตารางที่ 11** ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน *FOXC1* และ *VEGFA* หลังจากการทำ ChIP

ชนิดของสาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR	1.0	1X
2. 10 mM dNTPs	0.2	0.2 mM
3. 10 uM Forward primer	0.5	0.5 uM
4. 10 uM Reverse primer	0.5	0.5 uM
5. 250 U HotStarTaq polymerase	0.05	1.25 U/reaction
6. Distilled water	6.75	
7. DNA	1	
ปริมาตรรวม	10.0	

**ตารางที่ 12** สภาวะในการทำ PCR ของยีน *FOXC1* หลังจากการทำ ChIP

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Initial denaturation	95	10 นาที
2. PCR cycle (30 รอบ)		
- Denaturation	95	1 นาที
- Annealing	58	1 นาที
- Extension	72	1 นาที
3. Final extension	72	7 นาที
4. Holding	4	

**ตารางที่ 13** สภาวะในการทำ PCR ของยีน *VEGFA* หลังจากการทำ ChIP

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Initial denaturation	95	10 นาที
2. PCR cycle (30 รอบ)		
- Denaturation	95	1 นาที
- Annealing	60	1 นาที
- Extension	72	1 นาที
3. Final extension	72	7 นาที
4. Holding	4	

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเสร็จแล้วจึงนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ 2.5% agarose gel ผสมกับ GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, U.S.A.) ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad)

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. การค้นหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16

##### 1.1 การตรวจสอบยีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 ในพลาสมิด

ก่อนที่จะนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 เข้าสู่ HEK293 ได้ทำการส่งตรวจพิสูจน์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 ในพลาสมิดลูกผสม โดยทำการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์เพื่อเพิ่มจำนวนแล้วทำการสกัดพลาสมิดจำนวน 8 โคลน ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 จำนวน 5 โคลน และเป็นพลาสมิดเปล่าจำนวน 3 โคลน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่ถูกนำเข้าสู่ HEK293 มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้มาจากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information; NCBI ซึ่งในการตรวจสอบนี้เลือกใช้โปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) ในการเปรียบเทียบ พบว่า พลาสมิดที่มีการต่อยีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 ทั้ง 5 โคลน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับยีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 ตามฐานข้อมูล ดังรูปที่ 19

#### CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

```

HPV16E7          -----ATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGA
E7clone1        TAGCCTTTTGGGGTTACCGAAGCTCGGATCCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGA
                  *****

HPV16E7          ATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAAATGA
E7clone1        ATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAAATGA
                  *****

HPV16E7          CAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGC
E7clone1        CAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGC
                  *****

HPV16E7          CCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACA
E7clone1        CCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACA
                  *****

HPV16E7          AAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGT
E7clone1        AAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGT
                  *****

HPV16E7          GTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA-----
E7clone1        GTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATATGATGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCG
                  *****

HPV16E7          -----
E7clone1        GCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAT

```

## CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

```

HPV16E7      -----ATGCATGGAGATACACCT
E7clone2     ACAGGACGTAGCTGCTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCATGCAATGGAGATACACCT
                *****

HPV16E7      ACATTCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAG
E7clone2     ACATTCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAG
                *****

HPV16E7      CAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAA
E7clone2     CAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAA
                *****

HPV16E7      CCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGG
E7clone2     CCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGG
                *****

HPV16E7      TTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACA
E7clone2     TTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACA
                *****

HPV16E7      CTAGGAATGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA-----
E7clone2     CTAGGAATGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCATATGATGAATTCGCAGATATCCA
                *****

HPV16E7      -----
E7clone2     GCACAGTGGCGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGAACAAAACTCATCTCAGAAGAG

```



## CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

```

HPV16E7      -----ATGCATGGAGATACACCTACAT
E7clone3     ACAAGCTAGCTGCTAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCATGCAATGGAGATACACCTACAT
                *****

HPV16E7      TGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAAT
E7clone3     TGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAAT
                *****

HPV16E7      TAAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGG
E7clone3     TAAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGG
                *****

HPV16E7      ACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGT
E7clone3     ACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGT
                *****

HPV16E7      GCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAG
E7clone3     GCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAG
                *****

HPV16E7      GAATGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA-----
E7clone3     GAATGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCATATGATGAATTCGCAGATATCCAGCAC
                *****

HPV16E7      -----
E7clone3     AGTGGCGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATC

```

## CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

```

HPV16E7      -----ATGCATGGAGATACACCTACAT
E7clone4    ACAGGGCTAGCTGTTAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCATGCATGGAGATACACCTACAT
              *****

HPV16E7      TGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAAT
E7clone4    TGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAAT
              *****

HPV16E7      TAAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGG
E7clone4    TAAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGG
              *****

HPV16E7      ACAGAGCCCATTAACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGT
E7clone4    ACAGAGCCCATTAACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGT
              *****

HPV16E7      GCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAG
E7clone4    GCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAG
              *****

HPV16E7      GAATGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA-----
E7clone4    GAATGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCATATGATGAATTCGCAGATATCCAGCAC
              *****

HPV16E7      -----
E7clone4    AGTGGCGCCGCTCGAGTCTAGAGGCCCTTCGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATC

```



## CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

```

HPV16E7      -----ATGCATGGAGATACACCTACATT
E7clone5    ACAGGCTAGCTGCTAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCATGCATGGAGATACACCTACATT
              *****

HPV16E7      GCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAATT
E7clone5    GCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAATT
              *****

HPV16E7      AAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGA
E7clone5    AAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGA
              *****

HPV16E7      CAGAGCCCATTAACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTG
E7clone5    CAGAGCCCATTAACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTG
              *****

HPV16E7      CGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGG
E7clone5    CGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGG
              *****

HPV16E7      AATTGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA-----
E7clone5    AATTGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCATATGATGAATTCGCAGATATCCAGCAC
              *****

HPV16E7      -----
E7clone5    GTGGCGCCGCTCGAGTCTAGAGGCCCTTCGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCT

```

รูปที่ 19 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ในฐานข้อมูล NCBI



และพบว่า พลาสมิดเปล่า pc DNA 3.1/myc-His ทั้ง 3 โคลน ไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับกับยีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 ตามฐานข้อมูล ดังรูปที่ 20

HPV16E7 EmptyVectorClone2	----- AACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTC
HPV16E7 EmptyVectorClone2	-----ATGCATGGAGATACACCTACA----TTGCATGAATATATGT CCCCGTGCCTTCCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAAATAAAATGA * * * * *
HPV16E7 EmptyVectorClone2	TAGATTGCAACCA-GAGACAACCTGATCT---CTACTGTTATGAGCAATT-----AAA GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCA * * * * *
HPV16E7 EmptyVectorClone2	TGACAGCTCAGAGGAGGA----- GGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTC ***** * *****
HPV16E7 EmptyVectorClone2	----- TATGGCTTCTGAGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGTATCCCCACGCGCCCTG
HPV16E7 EmptyVectorClone2	-----GGA----- TAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACACTTGC **
HPV16E7 EmptyVectorClone2	----- CAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCTTTCGCCACGTTGCGCGG
HPV16E7 EmptyVectorClone2	----- CTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGTCTTACG
HPV16E7 EmptyVectorClone2	-----TGAAATAGATGGTCCAGCTGGAC----- GCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTG * * * * *
HPV16E7 EmptyVectorClone2	----- ATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGACTCTTGT
HPV16E7 EmptyVectorClone2	---AAGCAGAACCGGACAGAGCCCAATACAATATGTAACCTTTT----- CCAAACTGGAACAACACTCAACCTAT--CTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATT * * * * *
HPV16E7 EmptyVectorClone2	----- TTGCCGATTCGCGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAA
	
HPV16E7 EmptyVectorClone3	----- TAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTC
HPV16E7 EmptyVectorClone3	-----ATGCATGGAGATACACCTACA----TTGCATGAATATAT TCCCCGTGCCTTCCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAAATAAAAT * * * * *
HPV16E7 EmptyVectorClone3	GTTAGATTGCAACCA-GAGACAACCTGATCT---CTACTGTTATGAGCAATT-----A GAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGG * * * * *
HPV16E7 EmptyVectorClone3	AATGACAGCTCAGAGGAGGA----- CAGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGC * * * * *
HPV16E7 EmptyVectorClone3	----- TCTATGGCTTCTGAGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGTATCCCCACGCGCCC
HPV16E7 EmptyVectorClone3	-----GGA----- TGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACACTT **
HPV16E7 EmptyVectorClone3	----- GCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCTTTCGCCACGTTGCGC
HPV16E7 EmptyVectorClone3	----- GGCTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGTCTTAA
HPV16E7 EmptyVectorClone3	-----TGAAATAGATGGTCCAGCTGGAC----- CGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCC * * * * *
HPV16E7 EmptyVectorClone3	----- TGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGACTCTTG
HPV16E7 EmptyVectorClone3	---AAGCAGAACCGGACAGAGCCCAATACAATATGTAACCTTTTGTGCA----- TTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATT * * * * *
HPV16E7 EmptyVectorClone3	----- TTTGCCGATTCGCGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAA

```

CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

HPV16E7      -----ATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACC
EmptyVectorClone5  CGGTTACCGAAAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATCTGCAGATATC-CAGC
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HPV16E7      AGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAATT-----AAATGACAGCTCAGAGGAGGA
EmptyVectorClone5  ACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGA
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HPV16E7      GGATGAAATAGA-----TGGTCCAG
EmptyVectorClone5  TCTGAATATGCATACCGTTCATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGC
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HPV16E7      CTGGACAAGCA-----
EmptyVectorClone5  CTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTCCCCCGTGCCCTTCTCTT
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HPV16E7      GAACC-GGACAGAGCC-----CATTACAATATTGTAACCTT
EmptyVectorClone5  GACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTCTTAATAAAAATGAGGAAATGTCATCGCA
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HPV16E7      TTGTT--GCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTGTGCGGTACAAGCACACAGTAGACAT
EmptyVectorClone5  TTGTCTGAGTAGGTGTCTATCTATCTGGGGGGTGGGGTGG--GGCAGGACAGCAAGGG
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HPV16E7      TCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCATCTGTTCTCA
EmptyVectorClone5  GGAGGATTGGGAAG--ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCT
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HPV16E7      GAAACCATAA-----
EmptyVectorClone5  GAGGCGGAAAGAACAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCA
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

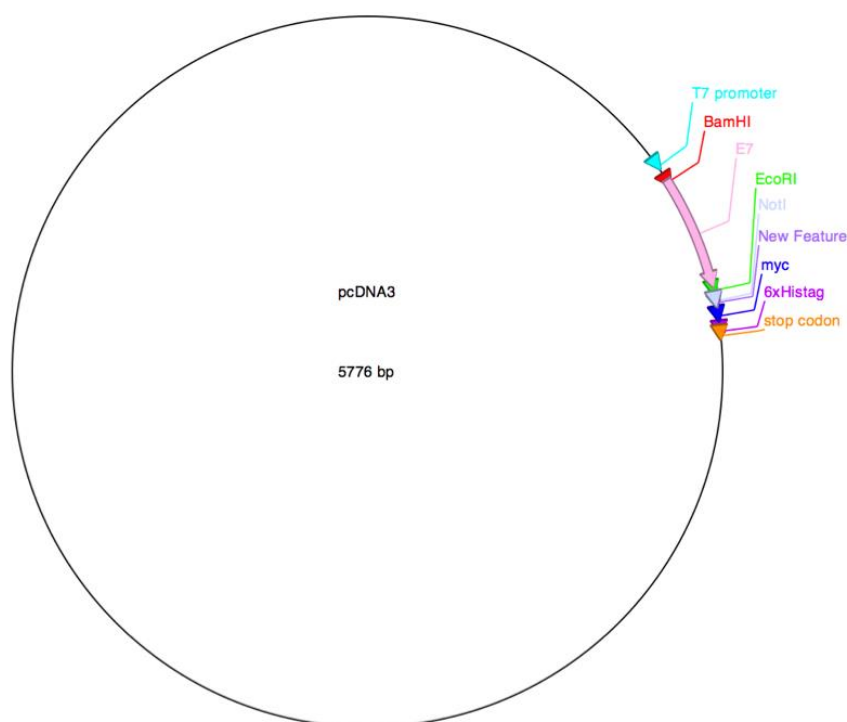
**รูปที่ 20** ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเปล่า เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ในฐานข้อมูล NCBI

ซึ่งจากผลการการเปรียบเทียบแสดงให้เห็นว่าพลาสมิดลูกผสมชุดทดลองมียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และยีนชุดควบคุมเป็นเพียงพลาสมิดเปล่า ซึ่งสามารถนำพลาสมิดทั้ง 2 แบบนี้มาใช้ในการทดลองขั้นต่อ ๆ ไปได้

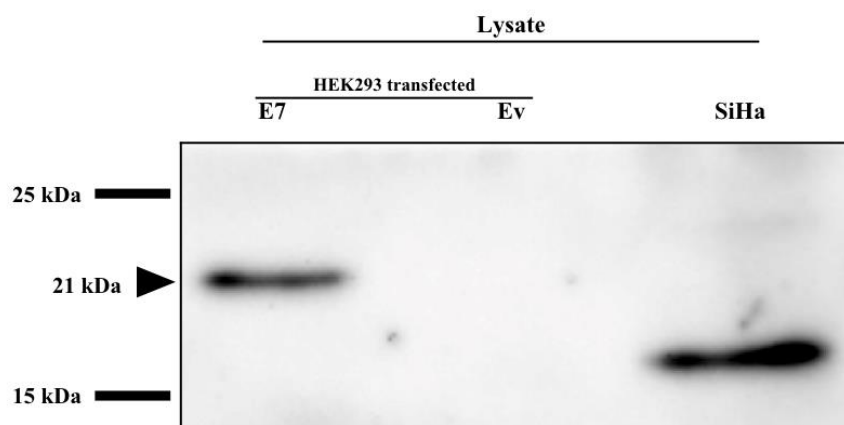
## 1.2 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 หลังจากนำพลาสมิดเข้าสู่ HEK293

HEK293 เป็นเซลล์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นจึงนำ HEK293 มาใช้ในการตรวจสอบ ซึ่งหลังจากทำการนำพลาสมิดทั้ง 2 ชุด คือชุดทดลองซึ่งมียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และชุดควบคุมซึ่งเป็นพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ จากนั้นทำการสกัดโปรตีนและนำมาตรวจสอบการแสดงออกด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 (anti-HPV16E7 antibody) พบแถบโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ขนาดประมาณ 21 กิโลดาลตันใน HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดชุดทดลองเข้าสู่เซลล์ และไม่พบแถบโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 จาก

HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดชุดควบคุมเข้าสู่เซลล์ ซึ่งในการทดลองนี้ได้นำเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอชพีวีไทมป์ 16 (SiHa) มาใช้เป็น positive control โดยพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 17 กิโลดาลตัน เนื่องจากพลาสมิดลูกผสมที่ใช้ถูกติดตามติดตามด้วย myc และฮิสทีดีน (6x Histidine tag) ที่ปลาย C-terminal ดังรูปที่ 21 จึงพบแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลที่มากกว่าในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอชพีวีไทมป์ 16 (SiHa) ดังรูปที่ 22



รูปที่ 21 พลาสมิดลูกผสมที่ถูกแทรกยีน HPV16E7 และถูกติดตามติดตามด้วย myc และฮิสทีดีน (6x Histidine tag) ที่ปลาย C-terminal



**รูปที่ 22** ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทมป์ 16 หลังจากนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ HEK293

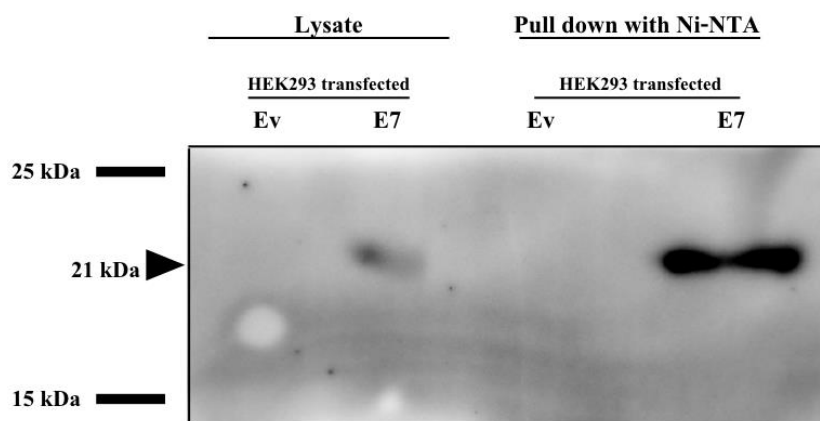
- Lysate HEK293 transfected *HPV16E7* หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทมป์ 16 เข้าสู่เซลล์
- Lysate HEK293 transfected *Ev* หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์
- Lysate SiHa หมายถึง โปรตีนจากเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอชพีวีไทมป์ 16

ซึ่งจากรูปที่ 22 แสดงให้เห็นว่าสามารถนำพลาสมิดเข้าสู่ HEK293 และพลาสมิดลูกผสมมีการแสดงออกของโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทมป์ 16 ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทมป์ 16 เข้าสู่เซลล์

CHULALONGKORN UNIVERSITY

### 1.3 การทดสอบการตกตะกอนโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทมป์ 16 โดยใช้ HisPur™ Ni-NTA resin

ในขั้นตอนนี้เป็นการทดสอบการตกตะกอนโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทมป์ 16 โดยใช้ HisPur™ Ni-NTA resin ก่อนที่จะนำไปทำการตรวจสอบวิเคราะห์หาโปรตีนที่มีอันตรกิริยาร่วมกับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทมป์ 16 ซึ่งหลังจากทำการดึงโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทมป์ 16 โดยใช้ HisPur™ Ni-NTA resin จากนั้นนำไปแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบหาโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทมป์ 16 ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อยีน *E7* ของเอชพีวีไทมป์ 16 (anti-HPV16E7 antibody) ในการตรวจสอบ ซึ่งพบแถบโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทมป์ 16 ขนาดประมาณ 21 กิโลดาลตันจากโปรตีนที่สกัดจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิด *E7* ของเอชพีวีไทมป์ 16 เข้าสู่เซลล์ ดังรูปที่ 23



**รูปที่ 23** ผลการตรวจสอบโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 หลังจากทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย HisPur™ Ni-NTA resin

-Lysate HEK293 transfected *HPV16E7* หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์

-Lysate HEK293 transfected Ev หมายถึง โปรตีนโปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์

-Pulldown HEK293 transfected *HPV16E7* หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์ หลังจากทำการตกตะกอนด้วย HisPur™ Ni-NTA resin

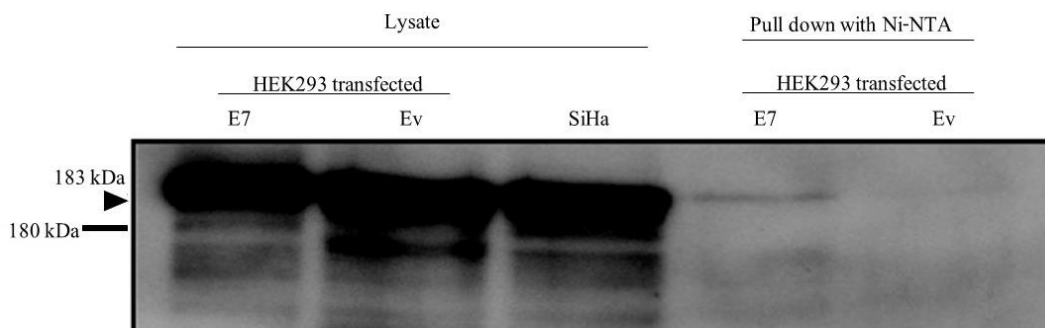
-Pulldown HEK293 transfected Ev หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ หลังจากทำการตกตะกอนด้วย HisPur™ Ni-NTA resin

ซึ่งจากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถดึงโปรตีน E7 ของไวรัสได้ด้วยการใช้ HisPur™ Ni-NTA resin ได้

#### 1.4 การยืนยันอันตรกิริยาของโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 กับเอนไซม์ DNMT1

ทำการตรวจสอบยืนยันการมีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน E7 ของไวรัสกับเอนไซม์ DNMT1 ตามที่เคยมีงานวิจัยระบุการพบโปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีอันตรกิริยาร่วมกัน โดยใช้แอนติบอดีต่อเอนไซม์ DNMT1 (anti-DNMT1 antibody) ในการตรวจสอบหลังจากการตกตะกอนด้วย HisPur™ Ni-NTA resin และทำ western blot พบแถบโปรตีนของเอนไซม์ DNMT1 ขนาดประมาณ 183 กิโลดาลตันในโปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์ ซึ่งตรงกับ

แถบแบนโปรตีนชุดควบคุม Lysate HEK293 transfected *HPV16E7*, Lysate HEK293 transfected Ev และ Lysate SiHa ดังรูปที่ 24



**รูปที่ 24** ผลการตรวจสอบแอนไซม์ DNMT1 หลังจากทำการตกตะกอนโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ ด้วย HisPur™ Ni-NTA resin

- Lysate HEK293 transfected *HPV16E7* หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์
- Lysate HEK293 transfected Ev หมายถึง โปรตีนโปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์
- Lysate SiHa หมายถึง โปรตีนจากเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอชพีวีไทป์ 16
- Pulldown HEK293 transfected *HPV16E7* หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์ หลังจากทำการตกตะกอนด้วย HisPur™ Ni-NTA resin
- Pulldown HEK293 transfected Ev หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ หลังจากทำการตกตะกอนด้วย HisPur™ Ni-NTA resin

จากผลการทดลองแสดงว่า โปรตีน E7 ของไวรัสมีอันตรกิริยากับแอนไซม์ DNMT1 ตามที่เคยมีรายงานวิจัยระบุ และการใช้ HisPur™ Ni-NTA resin เพื่อทำการดึงโปรตีน E7 ของไวรัสสามารถดึงโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่มีอันตรกิริยาร่วมกับโปรตีน E7 ติดตามลงมาด้วย ซึ่งโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่ถูกดึงมากับโปรตีน E7 ของไวรัสจะนำไปทำการระบุค้นหาชนิดด้วยวิธีแมสสเปกโทรเมทรีต่อไป

## 1.5 การระบุโปรตีนที่มีอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16

### 1.5.1 การใช้วิธีการทางแมสสเปกโตรเมตรีในการค้นหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์

โปรตีนที่ถูกตกตะกอนลงมาคือโปรตีนที่มีอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 ซึ่งจะถูกระงับให้หลุดออกมาจาก resin bead แล้วนำมาทำจัดสารปนเปื้อน เช่น เกลือ สารลดแรงตึงผิว ด้วยชุด 2D clean up Kit (Ge Healthcare Life Sciences) หลังจากนั้นนำมาตัดด้วยให้เป็นชิ้นเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ทริปซินก่อนที่จะนำไปจำแนกด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ ซึ่งข้อมูลแมสสเปกตรัมที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Proteome Discoverer™ Software (Thermo Fisher Scientific) ซึ่งจะทำการทดลองวิเคราะห์ 2 แบบ ได้แก่

1) วิเคราะห์โดยการนำข้อมูลของสองตัวอย่างจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 และ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมพร้อมกัน โดยทำการคัดเลือกโปรตีนจากค่าสัดส่วนของ Abundance ratio ระหว่าง HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 กับ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ ที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1 มาทำการระบุหาโปรตีนที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ซึ่งจากการทดลองทั้ง 2 ครั้งพบโปรตีน ดังตารางที่ 14

**ตารางที่ 14** ผลโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์จากวิธีการทางแมสสเปกโตรเมตรีที่วิเคราะห์จากค่า Abundance ratio

ครั้งที่	จำนวนโปรตีนที่พบทั้งหมด	จำนวนโปรตีนที่พบเมื่อใช้สัดส่วนค่า abundance ratio ที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1	โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่พบ
1	164	19	YY1, GTF2A1, SND1
2	450	205	CAND1, SMAD4, MMS19, GTF2A1

2) วิเคราะห์โดยการนำข้อมูลของสองตัวอย่างจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 และ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมที่ละตัวอย่างแยกกัน แล้วทำการคัดเลือกโปรตีนที่พบเฉพาะในตัวอย่างจาก HEK293 ที่ถูกนำ

พลาสติกที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์มาทำการระบุค้นหาโปรตีนที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ดังตารางที่ 15

**ตารางที่ 15** ผลโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์จากวิธีการทางแมสสเปกโทรเมทรีที่ได้จากการแยกวิเคราะห์ของแต่ละตัวอย่าง

ครั้งที่	จำนวนโปรตีนที่พบในตัวอย่าง HEK293 ที่ถูกนำพลาสติกที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์	จำนวนโปรตีนที่พบในตัวอย่าง HEK293 ที่ถูกนำพลาสติกที่เปล่า เข้าสู่เซลล์	จำนวนโปรตีนที่พบเฉพาะในตัวอย่างของ HEK293 ที่ถูกนำพลาสติกที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์	โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่พบ
1	120	58	77	YY1, GTF2A1, TLE4
2	488	115	389	CAND1, SMAD4, YY1, TLE4, SMAD5, MMS19, CNOT1, TBR1, GTF2A1, CTTN, LIMD1, PSMD14, PHF3

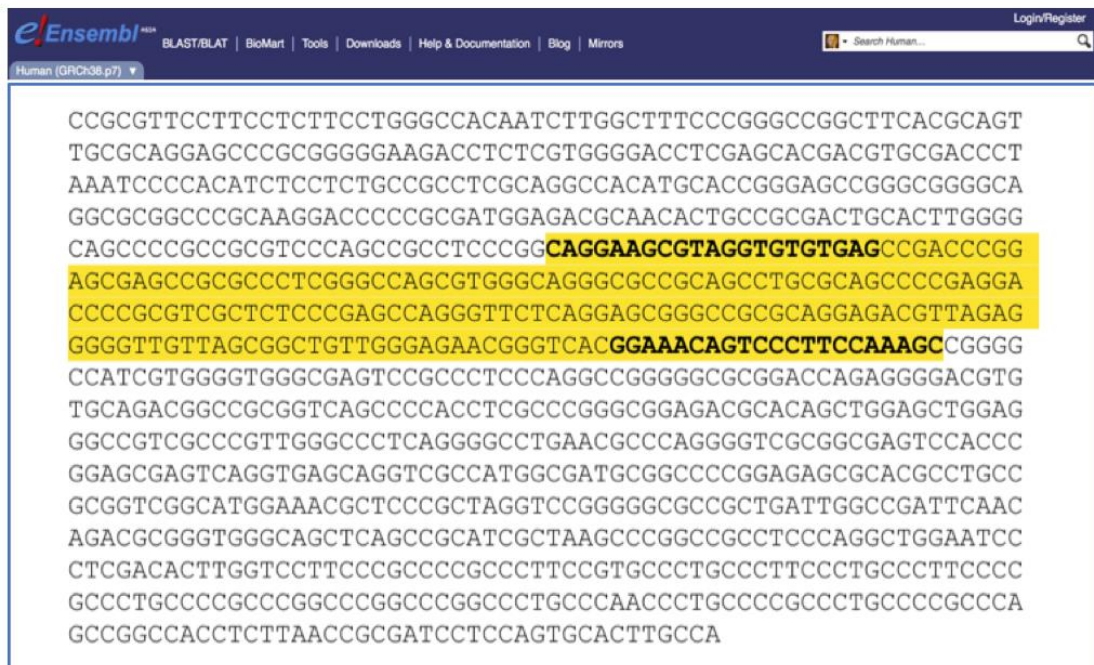


### 1.5.2 การใช้ข้อมูลชีวสารสนเทศค้นหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์

ทำการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยใช้โปรแกรม Ensembl (<https://asia.ensembl.org/index.html>) ดังรูปที่ 25 ซึ่งบริเวณที่มีการทำไฮไลต์สีเหลือง เป็นบริเวณโปรโมเตอร์บริเวณที่เคยมีรายงานการถูกชักนำให้เกิดเมทิลเลชันโดยมีโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และเอนไซม์ DNMT1 เป็นตัวชักนำ ซึ่งอยู่บริเวณ -526 ถึง -730 บนตำแหน่งของยีน *CCNA1* (Chalertpet et al., 2015) และใช้โปรแกรม Jaspas (<http://jaspar.genereg.net>) และโปรแกรม Promo (<http://algggen.lsi.upc.es>) มาทำนายโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ซึ่งโปรแกรม Jaspas ได้กำหนดใช้ค่า Relative profile score threshold ที่ร้อยละ 99 และโปรแกรม Promo ได้กำหนดใช้ค่า Maximum matrix dissimilarity rate ที่ร้อยละ 1 ซึ่งทั้งสองค่าอาจหมายถึงมีระดับความน่าเชื่อถือที่ร้อยละ 99 ซึ่งจากการทำนายด้วยโปรแกรมทั้งสองพบโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ดังนี้

-จากโปรแกรม Jaspas พบทรานสคริปชันแฟกเตอร์ทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ ETS1 และ TFAP2A ดังรูปที่ 26

-จากโปรแกรม Promo พบทรานสคริปชันแฟกเตอร์ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ C/EBPbeta, PR B, PR A, ER-alpha, FOXP3, AP-2alpha, Pax-5, p53 และ c-Ets-1 ดังรูปที่ 27



```

CCGCGTTCCTTCCTTCCTGGGCCACAATCTTGGCTTTCGCCGGCCGGCTTCACGCAGT
TGCGCAGGAGCCCGCGGGGGAAGACCTCTCGTGGGGACCTCGAGCACGACGTGCGACCCCT
AAATCCCCACATCTCCTCTGCCGCTCGCAGGCCACATGCACCGGGAGCCGGGCGGGGCA
GGCGCGGCCCGCAAGGACCCCGCGATGGAGACGCAACACTGCCGCGACTGCACCTGGGG
CAGCCCCGCGCGTCCAGCCGCTCCCGGCAGGAAGCGTAGGTGTGTGAGCCGACCCGG
AGCGAGCCGCGCCCTCGGGCCAGCGTGGGCAGGGCGCCGCAGCCTGCGCAGCCCCGAGGA
CCCCGCGTCGCTCTCCCGAGCCAGGGTTCTCAGGAGCGGGCCGCGCAGGAGACGTTAGAG
GGGGTTGTTAGCGGCTGTTGGGAGAACGGGTACGGAAACAGTCCCTTCCAAAGCCGGG
CCATCGTGGGGTGGGCGAGTCCGCCCTCCAGGCCGGGGGCGCGGACCAGAGGGGACGTG
TGCAGACGGCCGCGGTGAGCCCACTCGCCCGGGCGGAGACGCACAGCTGGAGCTGGAG
GGCCGTCGCCGTTGGGCCCTCAGGGGCTGAACGCCAGGGGTCGCGGCGAGTCCACCC
GGAGCGAGTCAGGTGAGCAGGTCGCCATGGCGATGCGGCCCGGAGAGCGCACGCCCTGCC
GCGGTCGGCATGGAAACGCTCCCGCTAGGTCCGGGGGCGCCGCTGATTGGCCGATTCAAC
AGACGCGGGTGGGCAGCTCAGCCGCATCGCTAAGCCCGGCCCTCCAGGCTGGAATCC
CTCGACACTTGGTCCTTCCCGCCCCGCCCTTCGTTGCCCTGCCCTTCCCTGCCCTTCCCC
GCCCTGCCCGCCCGGCCCGGCCCGGCCCTGCCCAACCCTGCCCGCCCTGCCCGCCCA
GCCGGCCACCTCTTAACCGCGATCCTCCAGTGCACCTTGCCA

```

รูปที่ 25 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*

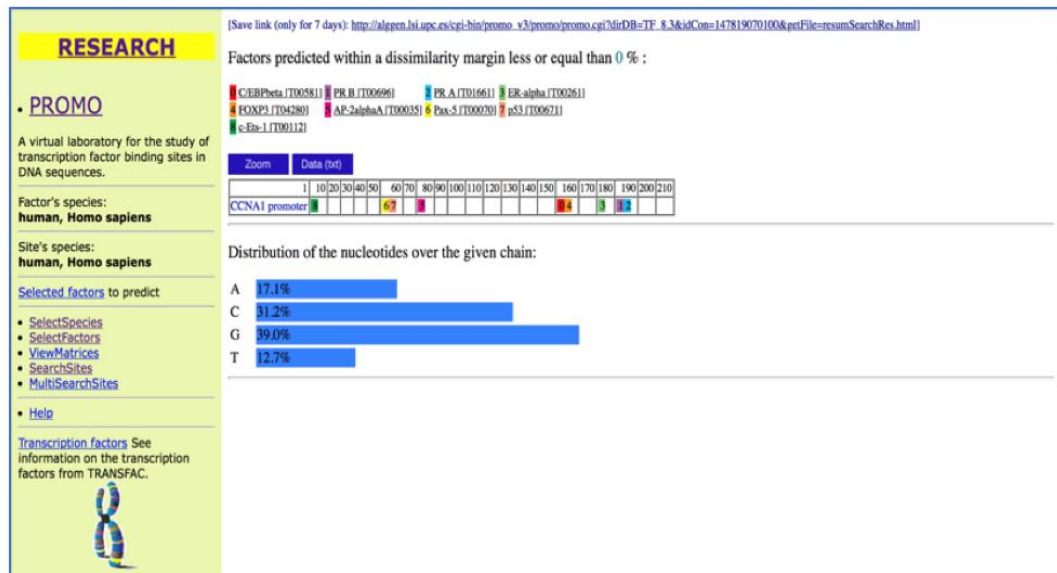
3 putative sites were predicted with these settings (99%) in sequence named **CCNA1**

Model ID	Model name	Score	Relative score	Start	End	Strand	predicted site sequence
MA0098.1	ETS1	7.633	0.992426667573013	2	7	-1	CTTCCT
MA0003.1	TFAP2A	10.122	0.991194889124188	42	50	-1	GCCCCAGGG
MA0098.1	ETS1	7.797	0.999991489624619	184	189	-1	TTTCCG

**Comment:** This type of analysis has a high sensitivity but abysmal selectivity. In other words: while true functional will be detected in most cases, most predictions will correspond to sites bound in vitro but with no function in vivo. A number of additional constraints of the analysis can improve the prediction; phylogenetic footprinting is the most common. We recommend using the [ConSite](#) service, which uses the JASPAR datasets.

The review [Nat Rev Genet. 2004 Apr.5\(4\):276-87](#) gives a comprehensive overview of transcription binding site prediction

รูปที่ 26 ผลการทำนายทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีความน่าจะเป็นที่จะเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน *CCNA1* บนโปรโมเตอร์ด้วยโปรแกรม Jaspasr

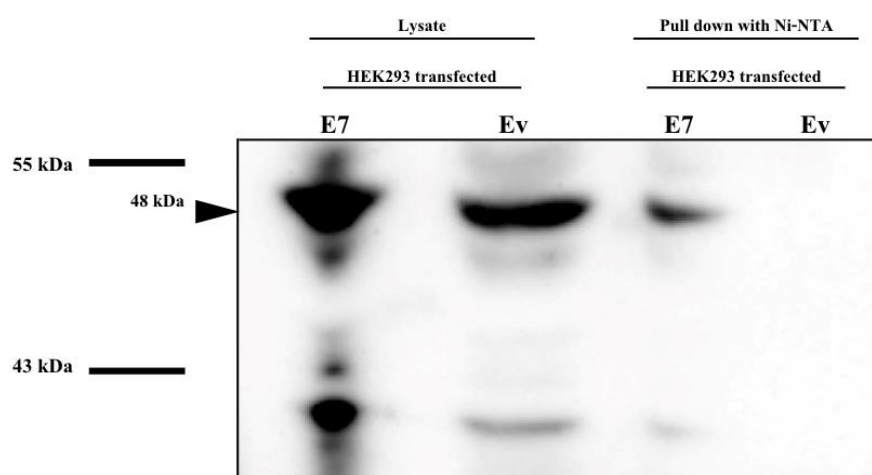


รูปที่ 27 ผลการทำนายทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีความน่าจะเป็นที่จะเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน *CCNA1* บนโปรโมเตอร์ด้วยโปรแกรม Promo

### 1.6 การทดสอบอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A

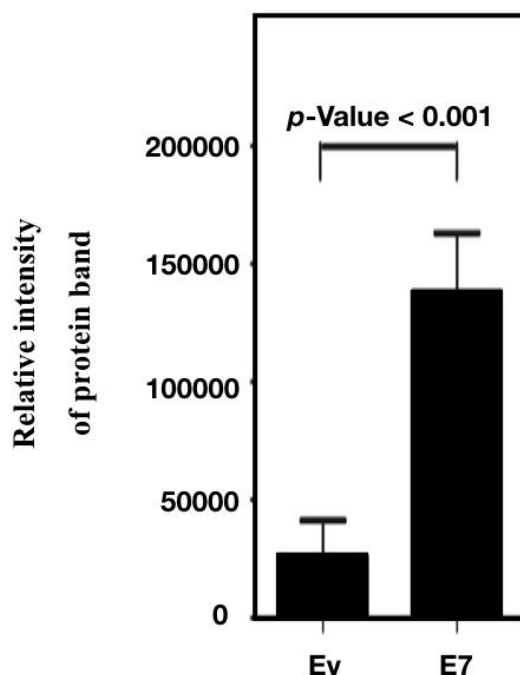
จากผลการค้นหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่สามารถจับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศ ได้ลองเลือกโปรตีน TFAP2A มาลองทำการศึกษากิจกรรมอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เนื่องจากพบโปรตีน TFAP2A จากการทำนายทั้งสองโปรแกรม และมีค่าคะแนนมากกว่าโปรตีน EST-1 และนอกจากนั้นยังมีรายงานพบว่า TFAP2A มี

บทบาทในการควบคุมการเกิดมะเร็งหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal carcinoma) โดยมียีนเป้าหมายคือ HIF-1 $\alpha$  และ VEGF/PEDF (Shi et al., 2014) และยังพบว่าโปรตีน TFAP2A ยังมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านม (breast cancer) อีกด้วย (Berlato et al., 2011) ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจสอบการมีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 กับโปรตีน TFAP2A ซึ่งในขั้นตอนการตรวจสอบจะทำการตกตะกอนโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 โดยใช้ HisPur<sup>TM</sup> Ni-NTA resin จากนั้นนำไปแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบหาโปรตีน TFAP2A ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน TFAP2A (anti-AP2 $\alpha$  antibody) ในการตรวจสอบพบแถบโปรตีน TFAP2A ขนาดประมาณ 48 กิโลดาลตันจากโปรตีนที่สกัดจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิด E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 เข้าสู่เซลล์ ดังรูปที่ 28



- รูปที่ 28** ผลการตรวจสอบทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A หลังจากทำการตกตะกอนโปรตีน
- Lysate HEK293 transfected *HPV16E7* หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 เข้าสู่เซลล์
  - Lysate HEK293 transfected Ev หมายถึง โปรตีนโปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์
  - Pulldown HEK293 transfected *HPV16E7* หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 เข้าสู่เซลล์ หลังจากทำการตกตะกอนด้วย HisPur<sup>TM</sup> Ni-NTA resin
  - Pulldown HEK293 transfected Ev หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ หลังจากทำการตกตะกอนด้วย HisPur<sup>TM</sup> Ni-NTA resin

ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาซ้ำทั้งหมด 6 ครั้ง บางครั้งพบแถบแบนโปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นจึงได้นำแถบแบนที่เกิดขึ้นไปวัดความเข้มของแบนเพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยแล้วพล็อตกราฟโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5 และใช้การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี independent T-test เพื่อดูผลว่าแถบแบนที่เกิดขึ้นเป็นแถบแบนโปรตีนที่เป็น non specific หรือไม่ ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 29



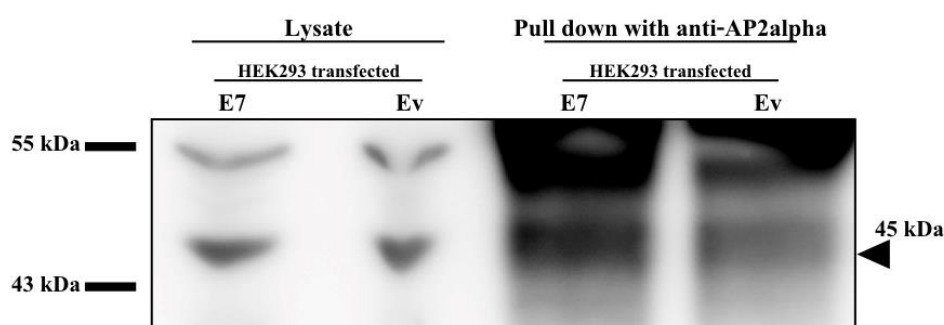
รูปที่ 29 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบโปรตีน TFAP2A จากการตรวจสอบด้วยวิธี western blot

- E7 หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 เข้าสู่เซลล์ หลังจากทำการตกตะกอนด้วย HisPur™ Ni-NTA resin
- Ev หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ หลังจากทำการตกตะกอนด้วย HisPur™ Ni-NTA resin

จากกราฟพบความแตกต่างของความเข้มของแถบโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญที่ P value น้อยกว่า 0.001 ซึ่งแถบโปรตีนที่พบเป็นโปรตีน TFAP2A ไม่ใช่โปรตีน non-specific ซึ่งการทดลองนี้พบว่าโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 มีอันตรกริยากับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A

## 1.7 การทดสอบอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1

มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า โปรตีน YY1 มีอันตรกิริยากับโปรตีน TFAP2A สามารถจับที่โปรโมเตอร์ของยีน ERBB2 ส่งผลกระทบต่อนำให้เกิดมะเร็งเต้านม (Begon et al., 2005) จึงได้ทำการตรวจสอบยืนยันการมีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน TFAP2A และโปรตีน YY1 โดยการตกตะกอนโปรตีน TFAP2A โดยการใช้เทคนิค co-immuno precipitation ซึ่งจะใช้ protein G agarose bead ติดกับแอนติบอดีต่อโปรตีน TFAP2A เพื่อทำการดึงโปรตีน TFAP2A ลงมา จากนั้นนำไปแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบหาโปรตีน YY1 ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน YY1 (anti-YY1 antibody) ในการตรวจสอบ ซึ่งปรากฏว่าพบแถบโปรตีน YY1 ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน ในโปรตีนที่สกัดจาก HEK293 ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และในโปรตีนที่สกัดจาก HEK293 ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า ดังรูปที่ 30



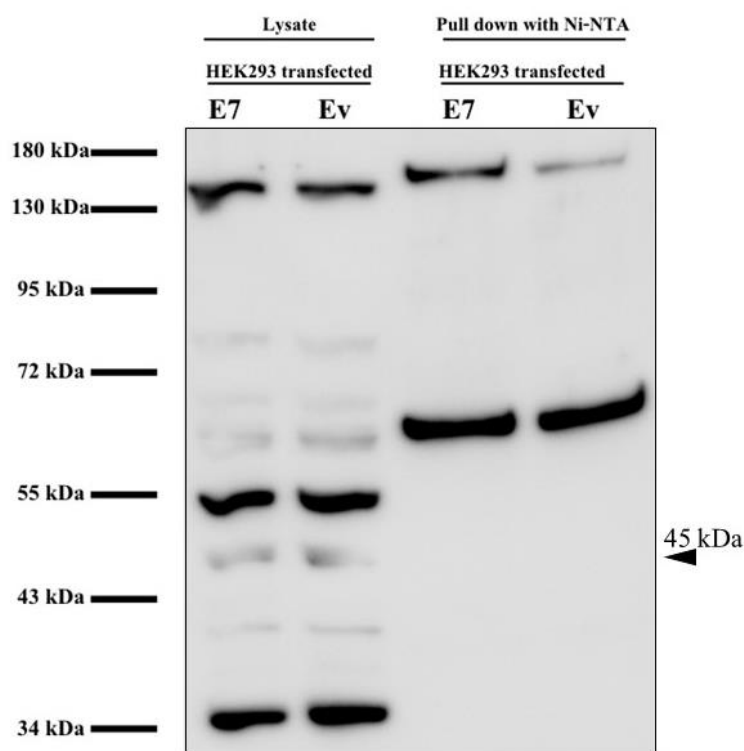
**รูปที่ 30** ผลการตรวจสอบทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 หลังจากทำการตกตะกอนโปรตีน TFAP2A โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน TFAP2A

- Lysate HEK293 transfected *HPV16E7* หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์
- Lysate HEK293 transfected Ev หมายถึง โปรตีนโปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์
- Pulldown HEK293 transfected *HPV16E7* หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์หลังจากที่ทำการตกตะกอนโปรตีน TFAP2A โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน TFAP2A
- Pulldown HEK293 transfected Ev หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์หลังจากที่ทำการตกตะกอนโปรตีน TFAP2A โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน TFAP2A

ซึ่งจากผลการตรวจสอบยืนยันพบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดมีอันตรกิริยาร่วมกัน

### 1.8 การทดสอบอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 และโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1

เมื่อทำการพิสูจน์ว่าโปรตีน E7 ของไวรัสมีอันตรกิริยากับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และโปรตีน TFAP2A มีอันตรกิริยากับโปรตีน YY1 ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนนี้จึงทดลองทำการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน E7 ของไวรัสกับโปรตีน YY1 ซึ่งในขั้นตอนนี้จะทำการดึงโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 โดยการใช้ HisPur™ Ni-NTA resin จากนั้นนำไปแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบหาโปรตีน YY1 ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน YY1 (anti-YY1 antibody) ในการตรวจสอบ ซึ่งปรากฏว่าไม่พบแถบโปรตีน YY1 ที่น้ำหนักมวลโมเลกุลประมาณ 45 กิโลดาลตัน ในโปรตีนที่สกัดจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิด E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 เข้าสู่เซลล์ ดังรูปที่ 31



รูปที่ 31 ผลการตรวจสอบทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 หลังจากทำการตกตะกอนโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16 ด้วย HisPur™ Ni-NTA resin

- Lysate HEK293 transfected *HPV16E7* หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไพบ์ 16 เข้าสู่เซลล์
- Lysate HEK293 transfected *Ev* หมายถึง โปรตีนโปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์

-Pulldown HEK293 transfected *HPV16E7* หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไพบ์ 16 เข้าสู่เซลล์หลังจากที่ทำการตกตะกอนด้วย HisPur™ Ni-NTA resin

-Pulldown HEK293 transfected Ev หมายถึง โปรตีนจาก HEK293 ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์หลังจากที่ทำการตกตะกอนด้วย HisPur™ Ni-NTA resin

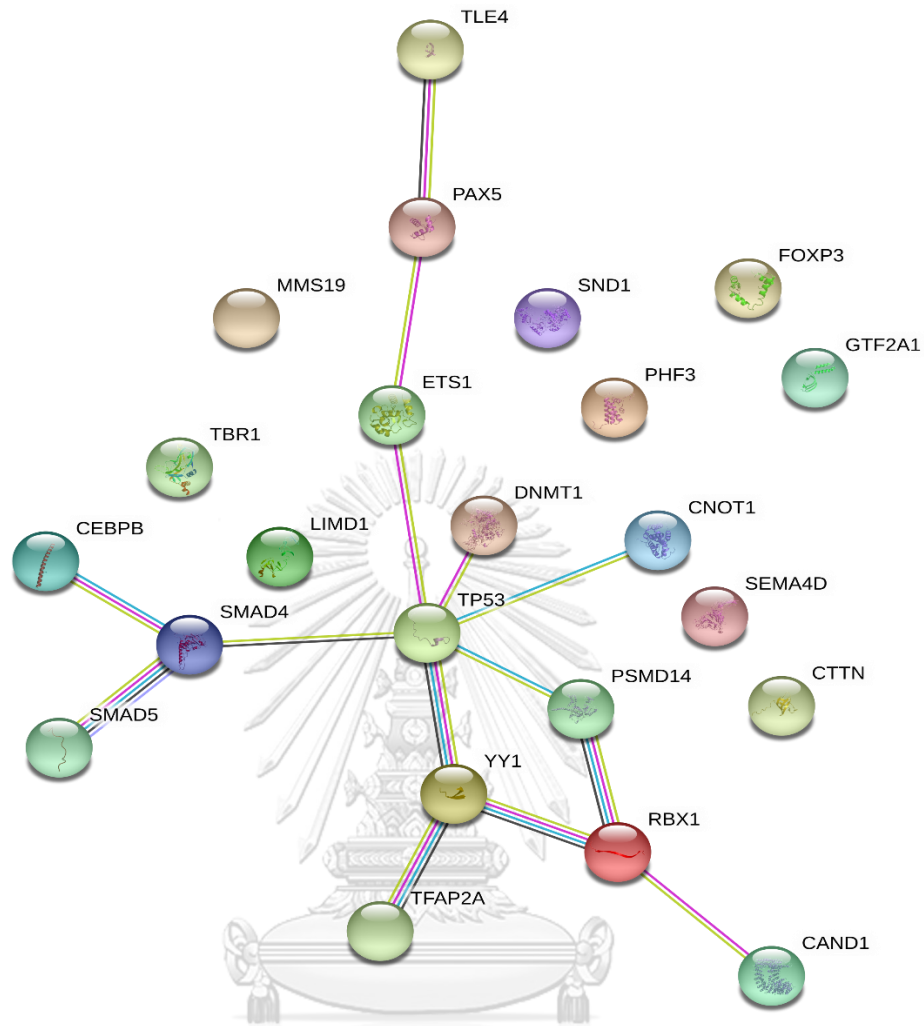
### 1.9 การใช้ชีวสารสนเทศทำนายอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์

ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากวิธีการทางแมสสเปกโทรเมตรีและจากการทำนายโดยใช้ชีวสารสนเทศจะได้โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ทั้งหมด ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 สรุปลผลการวิเคราะห์โปรตีนจากวิธีการทางแมสสเปกโทรเมตรีและจากชีวสารสนเทศ

วิธีการระบุ	โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์
แมสสเปกโทรเมตรี	YY1, GTF2A1, SND1, CAND1, SMAD4, MMS19, TLE4, SMAD5, CNOT1, TBR1, CTTN, LIMD1, PSMD14, PHF3
ชีวสารสนเทศ	C/EBPbeta, PR B, PR A, ER-alpha, FOXP3, AP-2alpha, Pax-5, p53 และ ETS1

นำโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรีและที่ได้จากชีวสารสนเทศ รวมไปถึงเอนไซม์ DNMT1 มาทำนายอันตรกิริยาเพื่อดูความเกี่ยวข้องกันโดยใช้โปรแกรม STRING (<https://string-db.org>) ที่ค่า confidence 0.700 พบกลุ่มโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกัน ดังรูปที่ 32



รูปที่ 32 ภาพการทำนายอันตรกิริยาของกลุ่มโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ได้จากวิธีแมสสเปกโตรเมตรีและชีวสารสนเทศ และเอนไซม์ DNMT1

จากการทำนายอันตรกิริยาของโปรตีนพบว่าทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A มีอันตรกิริยากับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 และยังมีอันตรกิริยาร่วมกับเอนไซม์ DNMT1

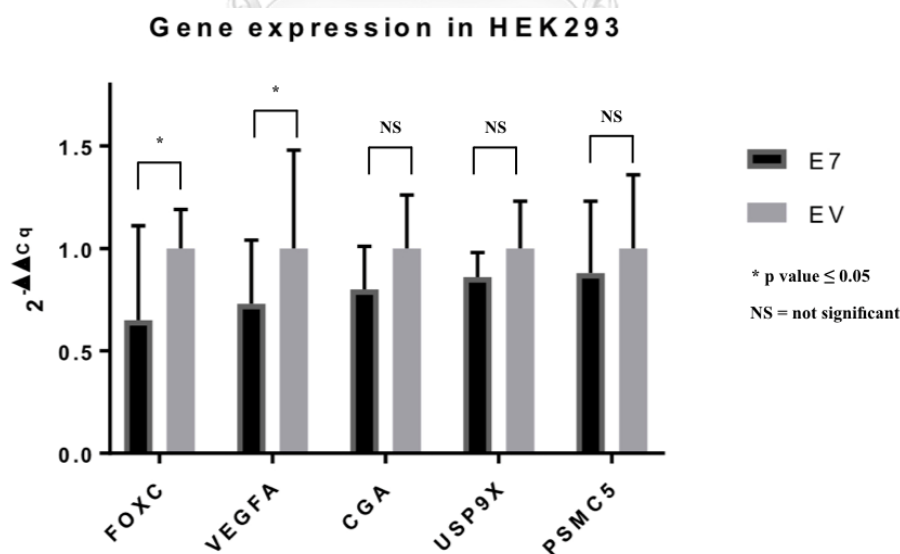


## 2. การตรวจสอบการแสดงออก การเมทิลเลชันของยีน และตรวจสอบการจับกันระหว่างยีนและโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1

### 2.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

หลังจากที่ได้โปรตีนทรานสคริปชันที่สนใจแล้วนั้นคือ TFAP2A และ YY1 จากนั้นใช้ชีวสารสนเทศทำนายยีนที่เป็นเป้าหมายของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้โดยได้ทำการคัดเลือกยีนมาตรวจสอบการแสดงออกทั้งหมด 5 ยีน ได้แก่ *FOXC1*, *VEGFA*, *CGA*, *USP9X* และ *PAMC5* ซึ่งจะทำให้การตรวจสอบระดับการแสดงออกในเซลล์ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์ เทียบกับ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ โดยการทำให้ real time RT-PCR จากนั้นนำค่า Cq มาคำนวณการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี  $\Delta\Delta Cq$  method แล้วนำค่า  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  มาพล็อตกราฟด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 เพื่อเทียบระดับการแสดงออก

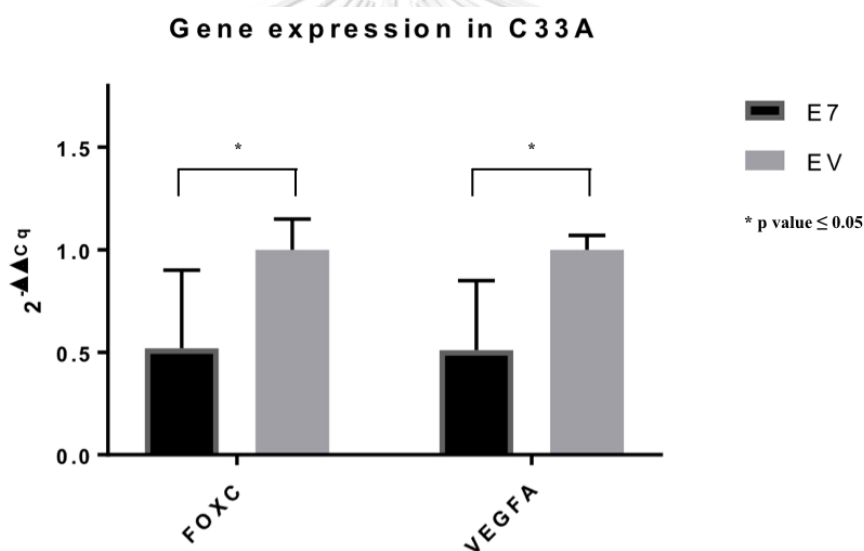
พบว่าทั้ง 5 ยีนที่สกัดอาร์เอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์ มีการลดการแสดงออกเมื่อเทียบกับ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ ดังรูปที่ 33 แต่ ยีน *FOXC1* และยีน *VEGFA* มีระดับการลดการแสดงออกมากกว่าอีก 3 ยีนอย่างมีนัยสำคัญที่  $p \text{ value} \leq 0.05$  ดังนั้นจึงทำการเลือกยีน *FOXC1* และยีน *VEGFA* มาทำการตรวจสอบยืนยันการแสดงออกในเซลล์ C33A อีกครั้ง



**รูปที่ 33** กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน *FOXC1*, *VEGFA*, *CGA*, *USP9X* และ *PAMC5* ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์ เทียบกับ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์

- E7 หมายถึง ระดับการแสดงออกในเซลล์ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทม์ 16 เข้าสู่เซลล์
- Ev หมายถึง ระดับการแสดงออกในเซลล์ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์

จากนั้นทำการถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทม์ 16 และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ C33A เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอ แล้วทำการตรวจสอบการยืนยันการลดการแสดงออกของยีน *FOXC1* และ *VEGFA* ด้วยวิธี real time RT-PCR เช่นเดิม จากนั้นนำค่า  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  มาพล็อตกราฟด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 ซึ่งพบว่ายีนทั้งสองที่มาจากอาร์เอ็นเอของ C33A ที่ทำการนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทม์ 16 เข้าสู่เซลล์ มีการลดการแสดงออกเมื่อเทียบกับ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์อย่างมีนัยสำคัญที่  $p \text{ value} \leq 0.05$  เช่นเดียวกับ HEK293 ดังรูปที่ 34



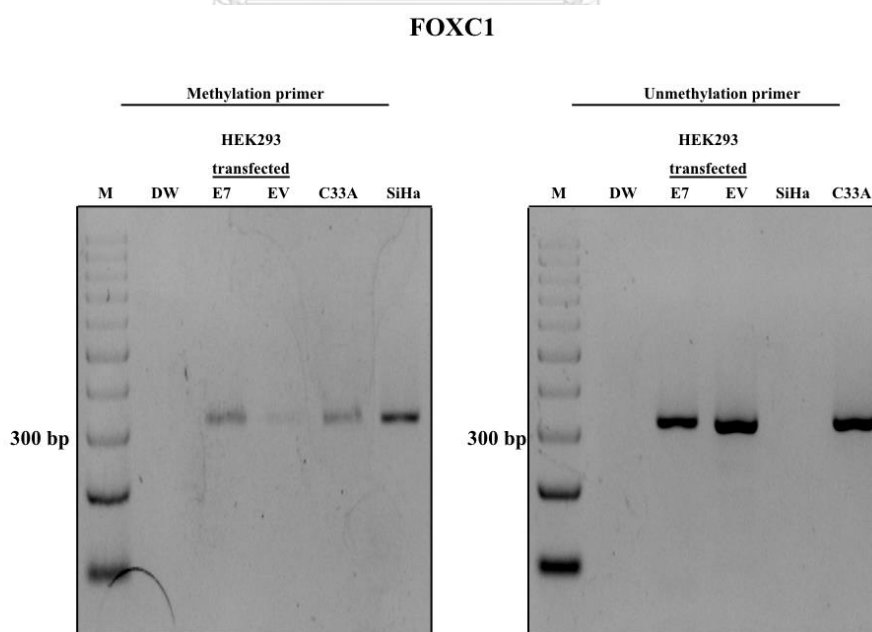
**รูปที่ 34** กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน *FOXC1* และ *VEGFA* ในเซลล์ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทม์ 16 เข้าสู่เซลล์เทียบกับ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์

- E7 หมายถึง ระดับการแสดงออกในเซลล์ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทม์ 16 เข้าสู่เซลล์
- Ev หมายถึง ระดับการแสดงออกในเซลล์ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์

## 2.2 การตรวจสอบการเมทิลเลชันของยีนบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนใช้เทคนิค Methylation specific PCR (MSP)

เมื่อได้ผลการแสดงออกของยีนทั้ง 5 ยีนได้ทำการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกน้อยที่สุดสองยีนมาตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชัน นั่นคือยีน *FOXC1* และ *VEGFA* ซึ่งในการทดสอบการเกิดเมทิลเลชันทำโดยการสกัดเอ็นเอจาก HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมีดที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทมป์ 16 และพลาสมีดเปล่าเข้าสู่เซลล์ จากนั้นนำดีเอ็นเอมาทำปฏิกิริยากับ sodium bisulfite ก่อนที่จะนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วทำการตรวจสอบด้วย agarose gel ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอที่ทำปฏิกิริยากับ sodium bisulfite ของเซลล์ SiHa เป็น positive control และเซลล์ C33A เป็น negative control ซึ่งพบว่า

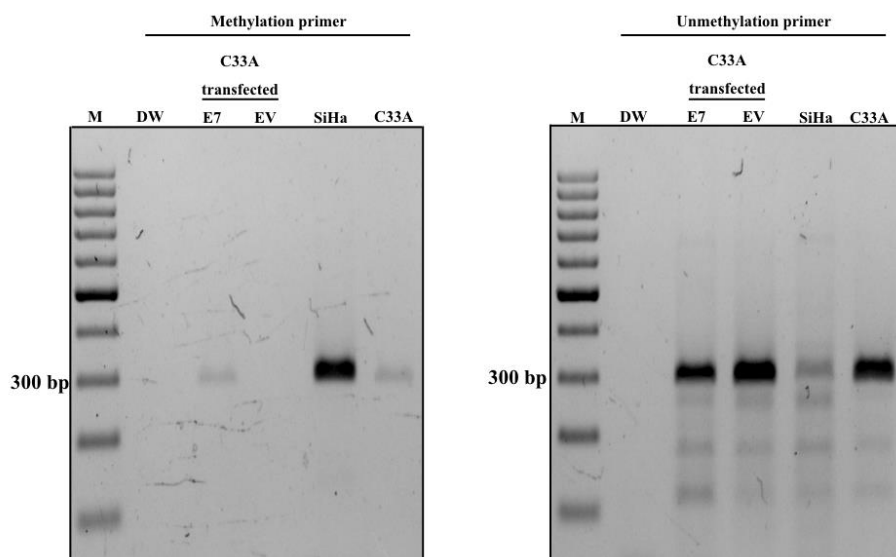
ในยีน *FOXC1* พบแถบแบนในดีเอ็นเอจากเซลล์ HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมีดที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทมป์ 16 เข้าสู่เซลล์ เข้มกว่าดีเอ็นเอจากเซลล์ HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมีดเปล่าเข้าสู่เซลล์ในสภาวะที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ methylation และในทำนองเดียวกันพบแถบแบนดีเอ็นเอจากเซลล์ HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมีดที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทมป์ 16 เข้าสู่เซลล์บางกว่าดีเอ็นเอจากเซลล์ HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมีดเปล่าเข้าสู่เซลล์ในสภาวะที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ unmethylation ดังรูปที่ 35 และ 36 ซึ่งหมายความว่ายีน *FOXC1* มีการเกิดเมทิลเลชันเมื่อมียีน *E7* ของเอชพีวีไทมป์ 16



รูปที่ 35 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* ในเซลล์ HEK293

HEK293 transfected <i>E7</i>	หมายถึง ดีเอ็นเอที่ได้จาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มี ยีน <i>E7</i> ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์
HEK293 transfected Ev	หมายถึง ดีเอ็นเอที่ได้จาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์
SiHa (positive control)	หมายถึง ดีเอ็นเอที่มาจาก SiHa ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อเอชพีวีไทป์ 16
C33A (negative control)	หมายถึง ดีเอ็นเอที่มาจาก C33A ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี


  
**FOXCI**

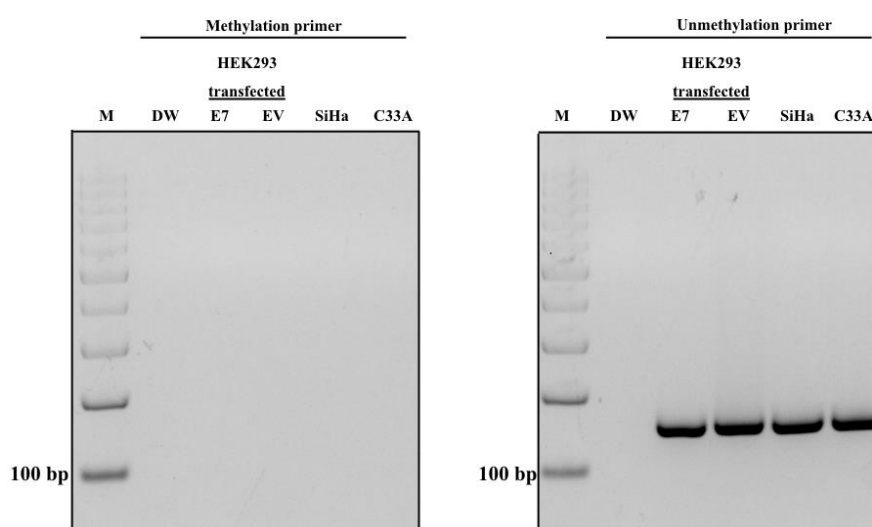


รูปที่ 36 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXCI* ในเซลล์ C33A

C33A transfected <i>E7</i>	หมายถึง ดีเอ็นเอที่ได้จาก C33A ที่ถูกนำพลาสมิดที่มี ยีน <i>E7</i> ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์
C33A transfected Ev	หมายถึง ดีเอ็นเอที่ได้จาก C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์
SiHa (positive control)	หมายถึง ดีเอ็นเอที่มาจาก SiHa ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อเอชพีวีไทป์ 16
C33A (negative control)	หมายถึง ดีเอ็นเอที่มาจาก C33A ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี

ในขณะที่ยีน *VEGFA* ไม่พบแถบแบนดีเอ็นเอจากเซลล์ HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทมป์ 16 และดีเอ็นเอจากเซลล์ HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ ในสภาวะที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ methylation รวมไปถึง positive control และ negative control แต่พบแถบแบนที่มีความเข้มเท่ากันทั้งจากดีเอ็นเอจากเซลล์ HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน *E7* ของเอชพีวีไทมป์ 16 และดีเอ็นเอจากเซลล์ HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ในสภาวะที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ unmethylation ดังรูปที่ 37 และ 38

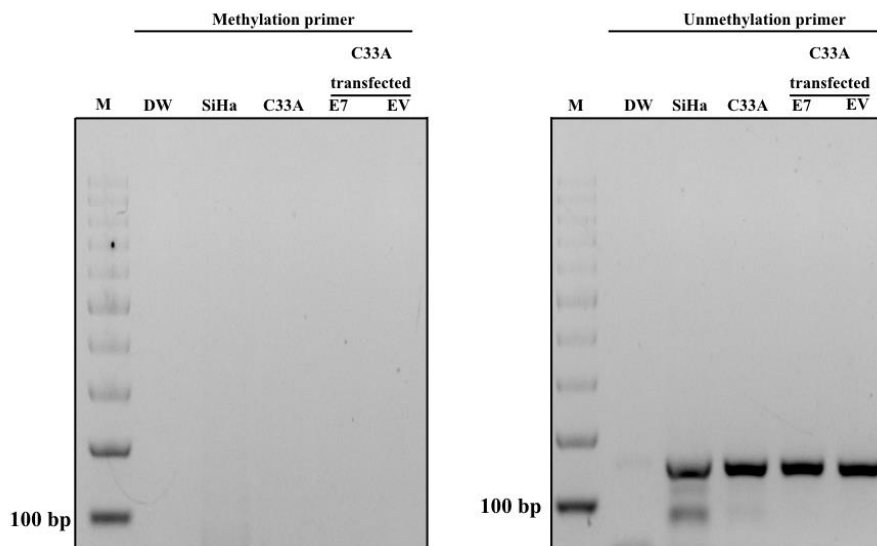
### VEGFA



รูปที่ 37 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *VEGFA* ในเซลล์ HEK293

HEK293 transfected <i>E7</i>	หมายถึง ดีเอ็นเอที่ได้จาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน <i>E7</i> ของเอชพีวีไทมป์ 16 เข้าสู่เซลล์
HEK293 transfected <i>Ev</i>	หมายถึง ดีเอ็นเอที่ได้จาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์
SiHa (positive control)	หมายถึง ดีเอ็นเอที่มาจาก SiHa ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อเอชพีวีไทมป์ 16
C33A (negative control)	หมายถึง ดีเอ็นเอที่มาจาก C33A ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี

## VEGFA



รูปที่ 38 ผลการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *VEGFA* ในเซลล์ C33A

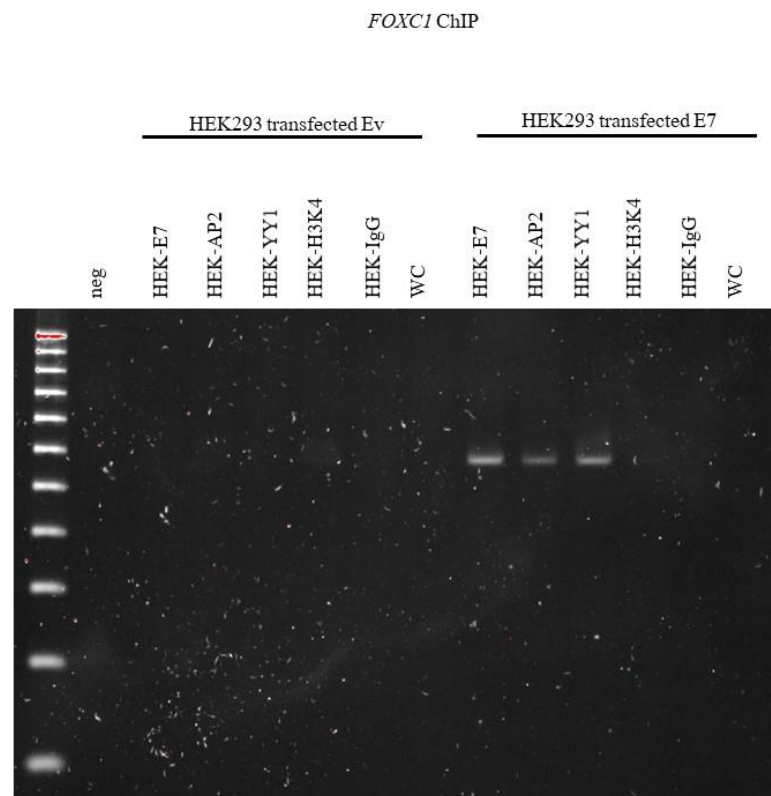
C33A transfected <i>E7</i>	หมายถึง ดีเอ็นเอที่ได้จาก C33A ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน <i>E7</i> ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์
C33A transfected <i>Ev</i>	หมายถึง ดีเอ็นเอที่ได้จาก C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์
SiHa (positive control)	หมายถึง ดีเอ็นเอที่มาจาก SiHa ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อเอชพีวีไทป์ 16
C33A (negative control)	หมายถึง ดีเอ็นเอที่มาจาก C33A ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี

### 2.3 ตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* และ *VEGFA* กับโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1

ในขั้นตอนสุดท้ายนี้ได้ทำการทดลองตรวจสอบยืนยันการจับกันของโปรโมเตอร์ของยีนกับโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1 โดยการใช้เทคนิค chromatin immunoprecipitation ซึ่งทำในเซลล์ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน *E7* ของไวรัส และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ เพื่อพิสูจน์ว่า โปรตีน *E7* ของไวรัส โปรตีน TFAP2A และโปรตีน YY1 สามารถจับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* และ *VEGFA* ได้หรือไม่ โดยการใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน *E7* แอนติบอดีต่อโปรตีน TFAP2A และแอนติบอดีต่อ YY1 นอกจากนี้ยังใช้แอนติบอดีต่อ

โปรตีนฮิสโตน (H3K4) เป็น positive control antibody และแอนติบอดี IgG เป็น negative control ผลการทดลองพบว่า

ในยีน *FOXC1* พบแถบแบนดิเอ็นเอในสถานะที่ใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน E7 โปรตีน TFAP2A และโปรตีน YY1 ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของไวรัส เข้าสู่เซลล์ แต่ไม่พบแถบแบนดิเอ็นเอในสถานะที่ใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน E7 โปรตีน TFAP2A และโปรตีน YY1 ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ ดังรูปที่ 39

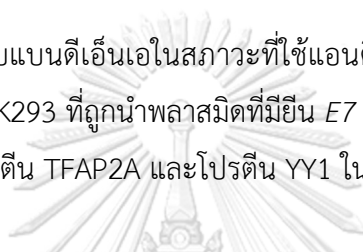


รูปที่ 39 ผลการตรวจสอบการทำ ChIP ของยีน *FOXC1* ในเซลล์ HEK293

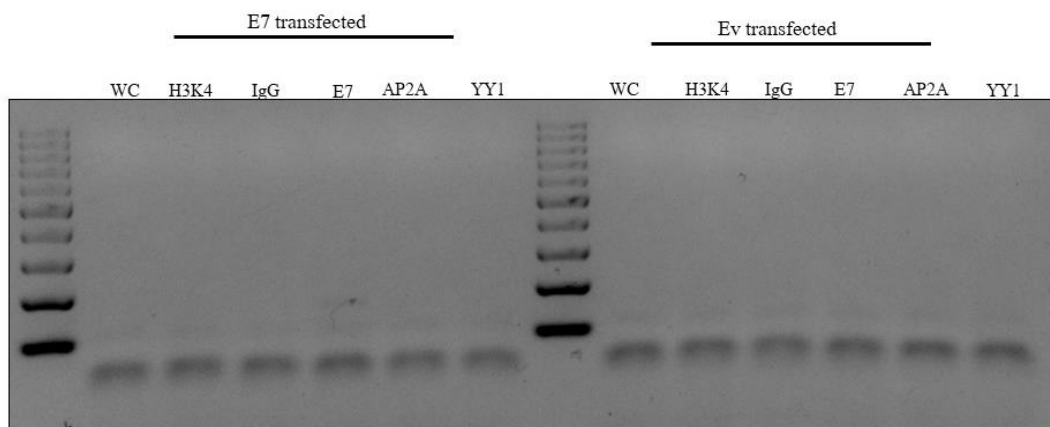
Neg	หมายถึง น้ำเปล่าซึ่งใช้เป็น negative control
HEK-E7	หมายถึง ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16
HEK-AP2	หมายถึง ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน TFAP2A

HEK-YY1	หมายถึง ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน YY1
HEK-H3K4	หมายถึง ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน H3K4
HEK-IgG	หมายถึง ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดี IgG
WC	หมายถึง ดีเอ็นเอที่ทำการสกัดจากเซลล์ HEK293

และในยีน *VEGFA* ไม่พบแถบแบนดีเอ็นเอในสถานะที่ใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน E7 โปรตีน TFAP2A และโปรตีน YY1 ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของไวรัสเข้าสู่เซลล์ และในสถานะที่ใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน E7 โปรตีน TFAP2A และโปรตีน YY1 ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ ดังรูปที่ 40



*VEGFA* ChIP



รูปที่ 40 ผลการตรวจสอบการทำ ChIP ของยีน *VEGFA* ในเซลล์ HEK293

WC	หมายถึง ดีเอ็นเอที่ทำการสกัดจากเซลล์ HEK293
H3K4	หมายถึง ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน H3K4
HEK-IgG	หมายถึง ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดี IgG



- HEK-E7 หมายถึง ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบ์ 16
- HEK-AP2 หมายถึง ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน TFAP2A
- HEK-YY1 หมายถึง ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน YY1



## บทที่ 5

### อภิปราย และสรุปผลการวิจัย

#### อภิปรายผลการวิจัย

มะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer) เป็นโรคมะเร็งที่พบในสตรีทั่วโลก ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อเอชพีวีชนิดที่มีความเสี่ยงสูง เช่นเอชพีวีไทม์ 16 โดยเชื้อไวรัสจะติดต่อจากรอยถลอกของผิวหรือเยื่อบุบริเวณปากมดลูกที่เกิดจากการมีเพศสัมพันธ์ ทำให้ปากมดลูกเกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของปากมดลูก จนกลายเป็นเซลล์หรือเนื้อเยื่ออักเสบเรื้อรัง และกลายเป็นมะเร็งในที่สุด ซึ่งการวินิจฉัยมะเร็งปากมดลูกแพทย์จะทำการวินิจฉัยโดยการขูดเซลล์เยื่อบุปากมดลูกเพื่อนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจหาเซลล์ที่ผิดปกติหรือเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งอาจทำให้เกิดมะเร็ง เรียกว่าวิธีการนี้ว่าแปปสเมียร์ แต่วิธีนี้ต้องอาศัยแพทย์ และนักวิทยาศาสตร์ผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจ ดังนั้นการตรวจทางอณูพันธุศาสตร์โดยการตรวจหาความเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกิดจากการติดเชื้อเอชพีวี จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมาใช้ในการตรวจคัดกรอง เพื่อที่จะหาทางรักษาได้ตั้งแต่ระยะแรกๆก่อนการเป็นมะเร็ง

สาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูกคือการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็ง โดยภาวะการเกิดโปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมทิลเลชันของยีนมีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของยีนส่งผลให้ยีนถูกยับยั้งการแสดงออก ซึ่งมีรายงานพบการลดการแสดงออกของยีน *CCNA1* ซึ่งเป็นหนึ่งในยีนต้านมะเร็ง ถูกชักนำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ โดยมีโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 กับเอนไซม์ DNA methyltransferase 1 (DNMT1) เป็นตัวกระตุ้นบริเวณโปรโมเตอร์ (Chalertpet et al., 2015) แต่พบว่าไม่ใช่ทุกยีนที่โปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีจะสามารถชักนำให้เกิดเมทิลเลชันได้ เช่นยีน *E-cadherin* (Laurson et al., 2010) ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดที่ว่าน่าจะมีโปรตีนชนิดที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์เป็นตัวร่วมในการนำพาโปรตีน E7 ของไวรัส และเอนไซม์ DNMT1 มายังบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน เนื่องจากทรานสคริปชันแฟกเตอร์เป็นโปรตีนที่สามารถจดจำและเข้าจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างจำเพาะบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการถอดรหัส จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้คือการวิเคราะห์หาโปรตีนที่มีอันตรกิริยาร่วมกับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทม์ 16 และเอนไซม์ DNMT1 แล้วชักนำให้เกิดการเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ส่งผลให้ยีนเกิดการลดการแสดงออกในที่สุด ซึ่งอาจจะเป็นหนึ่งในกลไกที่นำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งปากมดลูกได้ในที่สุด ในงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นในการหาโปรตีนชนิดที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ โดยวิธีการที่จะหาโปรตีนที่ไม่ทราบชนิดมาก่อนจำเป็นต้องใช้วิธีการทางแมสสเปกโทรเมทรีเข้ามาช่วยในการระบุโปรตีน และใช้วิธีการทาง

ชีวสารสนเทศเข้ามาช่วยในการทำนายระบุโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์อีกทางหนึ่ง หากผลการวิจัยเป็นไปตามสมมติฐานที่คิดไว้จะทำให้ทราบกลไกการชักนำการเกิดเมทิลเลชันที่แน่ชัด ซึ่งจะช่วยให้มีความเข้าใจในระดับพันธุศาสตร์โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้มากขึ้น ในด้านความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสและกลไกสภาวะเหนือพันธุกรรมที่เกี่ยวกับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน และสามารถนำองค์ความรู้นี้ไปต่อยอดในการค้นหายีนในการพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจวินิจฉัย และทำนายการเกิดมะเร็งปากมดลูก รวมไปถึงการคิดค้นยาเพื่อการรักษาโรคมะเร็งที่ติดเชื้อเอชพีวีได้

ในงานวิจัยนี้ได้นำเซลล์ไลน์ HEK293 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มาจากไตของมนุษย์มาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษา เนื่องจากเซลล์ HEK293 เป็นเซลล์เยื่อบุผิวปกติประกอบด้วยเซลล์ HEK293 เป็นเซลล์ที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้สูง จึงได้เลือกนำมาใช้ในการศึกษาถึงบทบาทของยีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 ที่จะเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อที่ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง สาเหตุที่เซลล์ไลน์ C33A และ SiHa ไม่ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาทั้งที่เป็นเซลล์ที่มาจากปากมดลูกโดยตรงเนื่องจากว่าเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดนี้เป็นเซลล์มะเร็งอยู่แล้ว โดยที่เซลล์ C33A เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อเอชพีวี และเซลล์ SiHa เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เกิดจากการติดเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 ดังนั้นในงานวิจัยนี้ต้องการที่จะศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการเป็นมะเร็งจึงจำเป็นต้องใช้เซลล์เยื่อปกติมาทำการศึกษา ซึ่งก่อนที่จะทำการค้นหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ในขั้นแรกจะเป็นการตรวจยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ในพลาสมิดลูกผสม ซึ่งพลาสมิดที่ใช้ในการตัดต่อยีนเป็นพลาสมิดชนิด pcDNA 3.1/myc-His ขั้นตอนนี้จะเป็นการนำพลาสมิดทั้ง 2 แบบ แบบแรกเป็นพลาสมิดที่มีการตัดต่อยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และแบบที่สองเป็นเพียงพลาสมิด pcDNA 3.1/myc-His ที่ไม่ผ่านการตัดต่อยีน โดยนำพลาสมิดทั้งสองแบบไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing จากนั้นนำข้อมูลมาทำการเปรียบเทียบกับยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 จากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information; NCBI โดยการใช้โปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) ซึ่งพบว่า พลาสมิดที่มีการตัดต่อยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับกับยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ตามฐานข้อมูล และไม่พบยีน E7 ของไวรัสในพลาสมิดเปล่า ดังนั้นแสดงว่าสามารถนำพลาสมิดทั้งสองแบบไปใช้ในการทดลองได้ หลังจากนั้นจึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน E7 ของไวรัสหลังจากทำการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ HEK293 แล้วทำการสกัดโปรตีนและนำมาตรวจสอบการแสดงออกด้วยเทคนิค western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 (anti-HPV16E7) พบแถบโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ขนาดประมาณ 21 กิโลดาลตันใน HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มีการตัดต่อยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์ และไม่พบแถบโปรตีน E7 ของไวรัส จาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์

เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ไลน์ SiHa ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 ซึ่งโปรตีน E7 ที่ได้จาก SiHa จะมีขนาดประมาณ 17 kDa เนื่องจากพลาสมิดลูกผสมที่ใช้ถูกติดตามติดตามด้วย myc และฮิสทีดีน (6x Histidine tag) ที่ปลาย C-terminal ซึ่ง myc และฮิสทีดีน (6x Histidine tag) มีมวลโมเลกุลรวมกันประมาณ 4 กิโลดาลตัน และเมื่อทำการแทรกยีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 ตรงตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์สำหรับแทรกยีนที่ต้องการแสดงออกโปรตีน (multiple cloning site) ทางด้านปลาย N-terminal ทำให้เมื่อมีการแสดงออกของยีน E7 จึงทำให้มีตัวติดตาม myc และฮิสทีดีน (6x Histidine tag) ติดมาด้วยส่งผลให้มีมวลโมเลกุลของโปรตีน E7 เพิ่มขึ้นมาอยู่ที่ประมาณ 21 กิโลดาลตัน ซึ่งจากการทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่ายีน E7 ของไวรัสมีการแสดงออกหลังจากมีการนำเข้าสู่ HEK293 และในการตรวจสอบยืนยันขั้นสุดท้ายก่อนที่จะนำไปทำการตรวจสอบวิเคราะห์หาโปรตีนที่มีอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทม์ 16 คือการตกตะกอนโปรตีน E7 ของไวรัสโดยใช้ HisPur™ Ni-NTA resin

สาเหตุที่ใช้ HisPur™ Ni-NTA resin มาเป็นตัวตกตะกอนโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 เนื่องจากได้ทดลองตกตะกอนโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 ด้วยวิธี immunoprecipitation โดยการใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทม์ 16 ติดกับ protein G agarose bead เพื่อดึงโปรตีน E7 ของไวรัสลงมา แต่เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี western blot แล้ว ไม่สามารถตรวจพบโปรตีน E7 ของไวรัส อาจเป็นเพราะว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน E7 ของไวรัสมีคุณสมบัติในการจับกับ protein G agarose bead ได้น้อยจึงไม่สามารถดึงโปรตีน E7 ลงมาได้ หรืออีกประการหนึ่งคือ มวลโมเลกุลของโปรตีน E7 ของไวรัสเมื่อถูกเชื่อมต่อกับตัวติดตาม myc-His แล้วจะมีน้ำหนักประมาณ 21 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับมวลโมเลกุลในส่วน light chain ของแอนติบอดีมีน้ำหนักประมาณ 25 กิโลดาลตัน เมื่อทำการแยกขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วทำการตรวจสอบโปรตีน E7 ด้วยวิธี western blot ทำให้พบแถบแบนโปรตีนทั้งสองอยู่ใกล้กันมากจนไม่สามารถบอกได้ว่าแถบแบนที่เกิดขึ้นเป็นแถบแบนของโปรตีน E7 ของไวรัสหรือแถบแบนของแอนติบอดีในส่วน light chain ดังนั้นจึงได้ตกตะกอนโปรตีน E7 ของไวรัสโดยใช้ Ni-NTA resin bead เนื่องจาก Ni-NTA มีคุณสมบัติในการจับกับ 6x Histidine ซึ่งโปรตีน E7 ของไวรัสที่มาจาก การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทม์ 16 มี 6x Histidine เป็นตัวติดตามติดออกมาด้วย และเมื่อทำการตกตะกอนโปรตีน E7 ของไวรัสโดยใช้ HisPur™ Ni-NTA resin แล้วนำโปรตีนไปแยกขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE พร้อมกับตรวจสอบหาโปรตีน E7 ไวรัส ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อยีน E7 ของเอชพีวีไทม์ 16 (anti-HPV16E7) ผลปรากฏว่าพบแถบโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทม์ 16 ขนาดประมาณ 21 กิโลดาลตันจากโปรตีนที่สกัดจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิด E7 ของเอชพีวีไทม์ 16 เข้าสู่เซลล์ อย่างชัดเจนโดยไม่มีแถบแบนโปรตีนของแอนติบอดีส่วน light chain มารบกวนการแปลผล

เมื่อทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะทำการทดสอบการระบุโปรตีนเรียบร้อยแล้ว หลังจากนั้นได้ทำการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ HEK293 และทำการสกัดโปรตีน แล้วทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย HisPur™ Ni-NTA resin อีกครั้ง จากนั้นนำไปตรวจระบุหาโปรตีนโดยวิธีแมสสเปกโทรเมทรี แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยด้วยโปรแกรม Proteome Discoverer™ Software (Thermo Fisher Scientific) หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์เพื่อคัดเลือกโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ โดยที่ได้ทดลองทำการวิเคราะห์ข้อมูล 2 แบบ แบบที่แรกเป็นการวิเคราะห์โดยการนำข้อมูลของสองตัวอย่างจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมพร้อมกัน แล้วทำการคัดเลือกโปรตีนโดยใช้ค่า abundance ratio ของสัดส่วนการแสดงออกระหว่างโปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิด E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์ ต่อโปรตีนจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ โดยใช้ค่า abundance ratio ที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1 เพื่มาคัดเลือกหาโปรตีนที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ :ซึ่งพบว่าในครั้งที่ 1 พบโปรตีนที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ 3 ชนิด ได้แก่ YY1, GTF2A1 และ SND1 ในครั้งที่ 2 พบโปรตีนที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ 4 ชนิด ได้แก่ CAND1, SMAD4, MMS19 และ GTF2A1 และแบบที่สองเป็นการวิเคราะห์โดยการนำข้อมูลของสองตัวอย่างจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมที่ละตัวอย่างแยกกัน แล้วทำการคัดเลือกโปรตีนที่พบเฉพาะในตัวอย่างจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์มาทำการระบุค้นหาโปรตีนที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ซึ่งพบว่าในครั้งที่ 1 พบโปรตีนที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ 3 ชนิด ได้แก่ YY1, GTF2A1 และ TLE4 ในครั้งที่ 2 พบโปรตีนที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ 4 ชนิด ได้แก่ CAND1, SMAD4, YY1, TLE4, SMAD5, MMS19, CNOT1, TBR1, GTF2A1, CTTN, LIMD1, PSMD14 และ PHF3

ในขณะที่เดียวกันได้ทำการทำนายโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ด้วยชีวสารสนเทศโดยใช้บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* เป็นต้นแบบในการทำนาย ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์บริเวณที่เคยมีรายงานการถูกชักนำให้เกิดเมทิลเลชันโดยมีโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และเอนไซม์ DNMT1 เป็นตัวชักนำ ซึ่งอยู่บริเวณ -526 ถึง -730 บนตำแหน่งของยีน *CCNA1* ในการทำนายได้ใช้โปรแกรม 2 โปรแกรมในการทำนาย ได้แก่โปรแกรม Jaspar (<http://jaspar.genereg.net>) และโปรแกรม Promo (<http://algggen.lsi.upc.es>) ซึ่งโปรแกรม Jaspar พบทรานสคริปชันแฟกเตอร์ทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ ETS1 และTFAP2A และ จากโปรแกรม Promoพบทรานสคริปชันแฟกเตอร์ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ C/EBPbeta, PR B, PR A, ER-alpha, FOXP3, AP-2alpha, Pax-5, p53 และ c-Ets-1

จากผลการค้นหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่สามารถจับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศ ได้ลองเลือกโปรตีน TFAP2A มาลองทำการศึกษาการมี

อันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบี 16 เนื่องจากพบโปรตีน TFAP2A จากการทำนายทั้งสองโปรแกรม และมีค่าคะแนนมากกว่าโปรตีน ETS-1 ซึ่ง TFAP2A เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ควบคุมยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับ cell growth, cell differentiation, กลไก apoptosis รวมไปถึง tumorigenesis และนอกจากนั้นยังมีรายงานพบว่า TFAP2A มีบทบาทที่เกี่ยวกับการเกิดมะเร็ง เช่น การควบคุมยีน *C-MYC* ซึ่งทำหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการกับเจริญเติบโตของเซลล์ (proliferation) ในมะเร็งผิวหนัง (Yu et al., 2009) การกีดการทำงานของยีน *Bcl-2* ทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์ในมะเร็งเต้านม (Wajapeyee et al., 2006) เป็นต้น ดังนั้นจึงได้เลือกทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A มาทำการทดลองตรวจสอบการมีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบี 16 กับโปรตีน TFAP2A ซึ่งในขั้นตอนการตรวจสอบจะทำการตกตะกอนโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบี 16 โดยใช้ HisPur™ Ni-NTA resin จากนั้นนำไปแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบหาโปรตีน TFAP2A ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน TFAP2A (anti-AP2alpha) ปรากฏว่าพบแถบโปรตีน TFAP2A ขนาดประมาณ 48 กิโลดาลตันจากโปรตีนที่สกัดจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไพบี 16 เข้าสู่เซลล์ ซึ่งจากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าโปรตีน E7 ของไวรัสมีอันตรกิริยากับโปรตีน TFAP2A

มีรายงานวิจัยพบว่าโปรตีน YY1 มีอันตรกิริยากับโปรตีน TFAP2A สามารถจับที่บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *ERBB2* แล้วส่งผลกระทบทำให้เกิดมะเร็งเต้านมได้ (Begon et al., 2005) ดังนั้นจึงได้ทำการเลือกโปรตีน YY1 ที่ได้มาจากวิธีการทางแมสสเปกโทรเมตรีมาศึกษาการมีอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบี 16 ซึ่งในขั้นตอนการตรวจสอบจะทำการตกตะกอนโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบี 16 โดยใช้ HisPur™ Ni-NTA resin เช่นเดิม และนำไปแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบหาโปรตีน YY1 ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน YY1 (anti-YY1) ปรากฏว่าไม่พบแถบโปรตีน YY1 ในโปรตีนที่สกัดจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไพบี 16 เข้าสู่เซลล์ แต่เมื่อทำการทดสอบอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 โดยการใช้เทคนิค co-immunoprecipitation ซึ่งจะใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน TFAP2A ทำการตกตะกอนโปรตีนลงมา จากนั้นนำไปแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบหาโปรตีน YY1 ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน YY1 (anti-YY1) ปรากฏว่าพบแถบโปรตีน YY1 ขนาดประมาณ 48 กิโลดาลตัน ในโปรตีนที่สกัดจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไพบี 16 และในโปรตีนที่สกัดจาก HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ ซึ่งการทดลองครั้งนี้สามารถพิสูจน์ได้ว่า โปรตีน E7 ของไวรัสสามารถจับได้กับโปรตีน TFAP2A และโปรตีน TFAP2A สามารถจับได้กับโปรตีน YY1 ซึ่งโปรตีนทั้งสามนี้อาจจะจับกลุ่มกันเป็นคอมเพล็กซ์

และเมื่อนำผลการวิเคราะห์โปรตีนจากวิธีการทางแมสสเปกโทรเมตรีและจากการทำนายโดยใช้ชีวสารสนเทศมาทำนายการจับกันโดยโปรแกรม String (<https://string-db.org/>) โดยเพิ่มเอนไซม์ DNMT1 เข้าไปร่วมทำนาย พบว่าเอนไซม์ DNMT1 มีอันตรกิริยาร่วมกับโปรตีน TFAP2A และโปรตีน YY1 และจากรายงานการพบโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 สามารถจับกับเอนไซม์ DNMT1 ส่งผลให้เกิดการเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* จนนำไปสู่การลดการแสดงออกของยีน จึงอนุมานว่ากลุ่มโปรตีนที่ประกอบด้วยทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A, YY1 และเอนไซม์ DNMT1 มีอันตรกิริยากับ โปรตีน E7 ของไวรัส และส่งผลให้ยีนที่มี cis element คล้ายกับยีน *CCNA1* เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ส่งผลให้ยีนมีการลดการแสดงออกและนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ในที่สุด

หลังจากนั้นทำการศึกษายีนเป้าหมายของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ทั้งสองชนิดโดยใช้ชีวสารสนเทศมาทำนาย โดยได้ทำการคัดเลือกยีนมาตรวจสอบการแสดงออกทั้งหมด 5 ยีน ได้แก่ *FOXC1*, *VEGFA*, *CGA*, *USP9X* และ *PAMC5* โดยในขั้นแรกได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจาก HEK293 ที่ทำการนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธี real time RT PCR ซึ่งในการทดลองพบว่า ยีน *FOXC1* และ *VEGFA* มีการลดการแสดงออกมากเป็นสองอันดับแรกจากห้ายีนทั้งหมด และได้เลือกสองยีนนี้มาทำการตรวจสอบยืนยันเปรียบเทียบกับอีกครั้งในเซลล์ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ ซึ่งพบว่ายีนทั้งสองมีการลดการแสดงออกเช่นกัน หลังจากนั้นจึงได้นำยีนทั้งสองมาทำการตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์โดยใช้เทคนิค Methylation specific PCR (MSP) และทำการตรวจสอบยืนยันการจับกันของโปรโมเตอร์ของยีนกับโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1 โดยการใช้เทคนิค chromatin immunoprecipitation ซึ่งจากผลการตรวจสอบเมทิลเลชันพบว่ามีแถบแบนการเกิดเมทิลเลชันในยีน *FOXC1* ในสภาวะที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ methylation ทั้งใน HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของไวรัสเข้าสู่เซลล์ เข้มกว่าในสภาวะที่ใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อ unmethylation ทั้งใน HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ และเมื่อทำการตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรโมเตอร์ของยีนกับโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ทั้งสองชนิดพบแถบแบนดีเอ็นเอในสภาวะที่ใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน E7 โปรตีน TFAP2A และโปรตีน YY1 ใน HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของไวรัสเข้าสู่เซลล์ แต่ไม่พบใน HEK293 และ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ ซึ่งหมายความว่าโปรตีน E7 โปรตีน TFAP2A และโปรตีน YY1 สามารถจับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* แต่ในขณะที่ยีน *VEGFA* ไม่พบแถบแบนการเกิดเมทิลเลชันในสภาวะที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ methylation แม้กระทั่งใน positive control แต่พบแถบแบนซึ่งมีความเข้มแบนใกล้เคียงกันในชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ

unmethylation และเมื่อทำการตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรโมเตอร์ของยีนกับโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ทั้งสองชนิด ปรากฏว่าไม่พบแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นในยีน *VEGFA* หลังจากทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเสร็จแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำให้ยังสรุปไม่ได้ว่ายีน *VEGFA* ถูกทำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ และมีการจับของโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวี ร่วมกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1 ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *VEGFA* หรือไม่

### สรุปผลการวิจัย

เนื่องจากการที่พบว่าไม่ใช่ทุกยีนที่โปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 ที่จะสามารถชักนำให้ยีนเกิดการเมทิลเลชันที่โปรโมเตอร์แล้วส่งผลให้ยีนนั้นๆเกิดการลดการแสดงออก ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ค้นหาโปรตีนที่มีอันตรกิริยากับโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 ที่จะสามารถชักนำให้เกิดการเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนชนิดที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีความจำเพาะต่อโปรโมเตอร์ของยีน จากการค้นหาโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 พบว่าโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 มีอันตรกิริยากับเอนไซม์ DNMT1 และทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และยังพบว่าทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A มีอันตรกิริยากับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 แต่ไม่พบอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 กับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 จากนั้นจึงค้นหายีนที่เป็นเป้าหมายของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1 และทำการเลือกมาศึกษาทั้งหมด 5 ยีนได้แก่ยีน *FOXC1*, *VEGFA*, *CGA*, *USP9X* และ *PAMC5* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1 มีการลดการแสดงออกในเซลล์ HEK293 และเซลล์ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HEK293 และเซลล์ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่า แต่ยีน *FOXC1* และยีน *VEGFA* มีการลดการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำยีนทั้งสองไปตรวจสอบการเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์พบว่ายีน *FOXC1* มีการเกิดเมทิลเลชันมากในเซลล์ HEK293 และเซลล์ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HEK293 และเซลล์ C33A ที่ถูกนำพลาสมิดเปล่า ส่วนยีน *VEGFA* ยังสรุปไม่ได้เนื่องจากไม่พบแถบแบนดีเอ็นเอใน positive control ในสถานะที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ methylation จึงทำให้ไม่สามารถแปลผลการทดลองได้ และเมื่อทำการศึกษาการจับของโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 กับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนทั้งสองพบว่าโปรตีนทั้งสามชนิดนี้สามารถจับที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกนำพลาสมิดที่มียีน E7 ของเชื้อเอชพีวี



ไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์ ส่วนยีน *VEGFA* ยังสรุปไม่ได้เนื่องจากไม่พบแถบแบนดีเอ็นเอใน positive control จึงทำให้ไม่สามารถแปลผลการทดลองได้

สาเหตุของการเกิดมะเร็งปากมดลูกที่สำคัญเกิดจากการติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพปพิโลมาชนิดที่มีความเสี่ยงสูง โดยสาเหตุหลักในการเกิดโรคเกิดจากโปรตีน E6 และ E7 ของเชื้อไวรัส ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้มุ่งเน้นการศึกษาโปรตีน E7 ของไวรัสกับสถานะกลไกการเหนี่ยวนำพันธุกรรมทางด้านดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ซึ่งพบการแสดงออกของโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ส่งผลต่อการกระตุ้นการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* โดยมีโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1 เป็นตัวนำพามาซึ่งที่โปรโมเตอร์ของยีนส่งผลให้เกิดการเมทิลเลชัน และลดการแสดงออกของยีนในที่สุด ซึ่งยีน *FOXC1* เป็นหนึ่งในยีนเป้าหมายของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1 และจากงานวิจัยหลาย ๆ งานพบว่ายีน *FOXC1* มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและแพร่กระจายของมะเร็ง เช่นในมะเร็งเต้านม *FOXC1* จะทำหน้าที่เกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ การลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ในมะเร็งตับจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นต้น (Han et al., 2017) ดังนั้นการเกิดเมทิลเลชันที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* ซึ่งเกิดจากการชักนำโดยโปรตีนคอมเพล็กซ์ของโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 ร่วมกับโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ TFAP2A และ YY1 และเอนไซม์ DNMT1 ทำให้ยีน *FOXC1* เกิดการลดการแสดงออกส่งผลให้เกิดการเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ในที่สุด

การเกิดมะเร็งปากมดลูกอันเกิดจากการลดการแสดงออกของยีน *FOXC1* โดยการเหนี่ยวนำของโปรตีน E7 ของเชื้อเอชพีวีไทป์ 16 นี้ ทำให้ยีน *FOXC1* อาจจะเป็นอีกหนึ่งยีนทางเลือกที่จะนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก แต่ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาในเซลล์ไลน์ต้นแบบเท่านั้น ดังนั้นควรนำไปศึกษากับตัวอย่างของผู้ป่วยอีกครั้งจึงจะสามารถสรุปยืนยันได้ว่ายีน *FOXC1* สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจคัดกรองและทำนายการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้หรือไม่

## รายการอ้างอิง

- Aebersold, R. and Mann, M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. Nature, 422, 198-207.
- Badal, V., et al. 2003. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. J Virol, 77, 6227-34.
- Barnard, P. and McMillan, N. A. 1999. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. Virology, 259, 305-13.
- Begon, D. Y., Delacroix, L., Vernimmen, D., Jackers, P. and Winkler, R. 2005. Yin Yang 1 cooperates with activator protein 2 to stimulate ERBB2 gene expression in mammary cancer cells. J Biol Chem, 280, 24428-34.
- Berlato, C., Chan, K. V., Price, A. M., Canosa, M., Scibetta, A. G. and Hurst, H. C. 2011. Alternative TFAP2A isoforms have distinct activities in breast cancer. Breast Cancer Res, 13, R23.
- Bernard, H. U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol, 32 Suppl 1, S1-6.
- Bonifacino, J. S. and Dell'Angelica, E. C. 2001. Immunoprecipitation. Curr Protoc Cell Biol, Chapter 7, Unit 7 2.
- Bouallaga, I., Massicard, S., Yaniv, M. and Thierry, F. 2000. An enhanceosome containing the Jun B/Fra-2 heterodimer and the HMG-I(Y) architectural protein controls HPV 18 transcription. EMBO Rep, 1, 422-7.
- Boyer, S. N., Wazer, D. E. and Band, V. 1996. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. Cancer Res, 56, 4620-4.
- Bryzgunova, O. E. and Laktionov, P. P. 2017. Current methods of extracellular DNA methylation analysis. Molecular Biology, 51, 167-183.
- Burd, E. M. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev, 16, 1-17.

- Burgers, W. A., Blanchon, L., Pradhan, S., de Launoit, Y., Kouzarides, T. and Fuks, F. 2007. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. Oncogene, 26, 1650-5.
- Chalertpet, K., Pakdeechaidan, W., Patel, V., Mutirangura, A. and Yanatatsaneejit, P. 2015. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein mediates CCNA1 promoter methylation. Cancer Sci, 106, 1333-40.
- Chichareon, S., et al. 1998. Risk factors for cervical cancer in Thailand: a case-control study. J Natl Cancer Inst, 90, 50-7.
- Clifford, G., Franceschi, S., Diaz, M., Muñoz, N. and Villa, L. L. 2006. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. Vaccine, 24, S26-S34.
- Collas, P. 2010. The current state of chromatin immunoprecipitation. Mol Biotechnol, 45, 87-100.
- Coulondre, C., Miller, J. H., Farabaugh, P. J. 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.
- Danos, O., Katinka, M. and Yaniv, M. 1982. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. EMBO J, 1, 231-6.
- De Las Rivas, J. and Fontanillo, C. 2010. Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks. PLoS Comput Biol, 6, e1000807.
- 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.
- Dupont, C., Armant, D. R. and Brenner, C. A. 2009. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. Semin Reprod Med, 27, 351-7.
- Fraga, M. F. and Esteller, M. 2002. DNA methylation: a profile of methods and applications. Biotechniques, 33, 632, 634, 636-49.

- Gade, P. and Kalvakolanu, D. V. 2012. Chromatin immunoprecipitation assay as a tool for analyzing transcription factor activity. Methods Mol Biol, 809, 85-104.
- Gay, J. D., Donaldson, L. D. and Goellner, J. R. 1985. False-negative results in cervical cytologic studies. Acta Cytol, 29, 1043-6.
- 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.
- Gloss, B. and Bernard, H. U. 1990. The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. J Virol, 64, 5577-84.
- Goon, P. K., et al. 2009. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. Head Neck Oncol, 1, 36.
- Grunau, C., Clark, S. J. and Rosenthal, A. 2001. Bisulfite genomic sequencing: Systematic investigation of critical experimental parameters. Nucleic Acids Res, 29, E65-5.
- Halfon, P., et al. 2007. Prospective evaluation of the Hybrid Capture 2 and AMPLICOR human papillomavirus (HPV) tests for detection of 13 high-risk HPV genotypes in atypical squamous cells of uncertain significance. J Clin Microbiol, 45, 313-6.
- Han, B., Bhowmick, N., Qu, Y., Chung, S., Giuliano, A. E. and Cui, X. 2017. FOXC1: an emerging marker and therapeutic target for cancer. Oncogene, 36, 3957-3963.
- Haqqani, A. S., Kelly, J. F. and Stanimirovic, D. B. 2008. Quantitative protein profiling by mass spectrometry using label-free proteomics. Methods Mol Biol, 439, 241-56.
- Hebner, C. M. and Laimins, L. A. 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms 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. Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 9821-6.
- Hoppe-Seyler, F. and Butz, K. 1994. Cellular control of human papillomavirus oncogene transcription. Mol Carcinog, 10, 134-41.
- Huynh, M. L., Russell, P. and Walsh, B. 2009. Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis. Methods Mol Biol, 519, 507-13.

- Jones, D. L. and Munger, K. 1996. Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators. Semin Cancer Biol, 7, 327-37.
- Kitkumthorn, N., et al. 2006. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. BMC Cancer, 6, 55.
- 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.
- Leung, K. S.-Y. and Fong, B. M.-W. 2014. LC–MS/MS in the routine clinical laboratory: has its time come? Anal Bioanal Chem, 406, 2289-2301.
- Levin, Y. and Bahn, S. 2010. Quantification of proteins by label-free LC-MS/MS. Methods Mol Biol, 658, 217-31.
- Lister, R., et al. 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature, 462, 315-22.
- Mahmood, T. and Yang, P. C. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. N Am J Med Sci, 4, 429-34.
- Mahmoodi, P., Motamedi, H., Seyfi Abad Shapouri, M. R., Bahrami Shehni, M. and Kargar, M. 2016. Molecular detection and typing of human papillomaviruses in paraffin-embedded cervical cancer and pre-cancer tissue specimens. Iran J Cancer Prev, 9, e3752.
- Mantovani, F. and Banks, L. 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. Oncogene, 20, 7874-87.
- Merl, J., Ueffing, M., Hauck, S. M. and von Toerne, C. 2012. Direct comparison of MS-based label-free and SILAC quantitative proteome profiling strategies in primary retinal Muller cells. Proteomics, 12, 1902-11.
- Moody, C. A. and Laimins, L. A. 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nat Rev Cancer, 10, 550-60.
- Munoz, N., et al. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med, 348, 518-27.
- Munoz, N., Castellsague, X., de Gonzalez, A. B. and Gissmann, L. 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine, 24 Suppl 3, S3/1-10.
- Ozfirat, Z. and Korbonits, M. 2010. AIP gene and familial isolated pituitary adenomas. Molec Cell Endocrinol, 326, 71-79.

- Petty, K. J. 2001. Metal-chelate affinity chromatography. Curr Protoc Protein Sci, Chapter 9, Unit 9 4.
- Pradhan, S. and Esteve, P. O. 2003. Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. Clin Immunol, 109, 6-16.
- Regier, N. and Frey, B. 2010. Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. BMC Mol Biol, 11, 57.
- Reid, R. and Campion, M. J. 1988. The biology and significance of human papillomavirus infections in the genital tract. Yale J Biol Med, 61, 307-25.
- 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. Cell, 63, 1129-36.
- Sharma, S., Kelly, T. K. and Jones, P. A. 2010. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis, 31, 27-36.
- Shi, D., et al. 2014. TFAP2A regulates nasopharyngeal carcinoma growth and survival by targeting HIF-1 $\alpha$  signaling pathway. Cancer Prev Res (Phila), 7, 266-77.
- Sriraksa, R. and Limpaiboon, T. 2012. Epigenetics in cholangiocarcinoma. Srinagarind Med J, 27, 381-388.
- Sriuranpong, V., et al. 2004. Global gene expression profile of nasopharyngeal carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. Clin Cancer Res, 10, 4944-58.
- Stanley, M. A., Pett, M. R. and Coleman, N. 2007. HPV: from infection to cancer. Biochem Soc Trans, 35, 1456-60.
- Thierry, F., Spyrou, G., Yaniv, M. and Howley, P. 1992. Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. J Virol, 66, 3740-8.
- Thomas, D. B., et al. 2001. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. I. Risk factors for invasive cervical carcinomas with human papillomavirus types 16 and 18 DNA. Am J Epidemiol, 153, 723-31.

- Tokumaru, Y., et al. 2004. Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing. Cancer Res, 64, 5982-7.
- Van Raemdonck, G. A., Tjalma, W. A., Coen, E. P., Depuydt, C. E. and Van Ostade, X. W. 2014. Identification of protein biomarkers for cervical cancer using human cervicovaginal fluid. PLoS One, 9, e106488.
- Villa, L. L. 2006. CHAPTER 1 Biology of genital human papillomaviruses. Int J Gynaecol Obstet, 94 Suppl 1, S3-S7.
- Waddington, C. H. 2012. The epigenotype. 1942. Int J Epidemiol, 41, 10-3.
- Wajapeyee, N., Britto, R., Ravishankar, H. M. and Somasundaram, K. 2006. Apoptosis induction by activator protein 2 alpha involves transcriptional repression of Bcl-2. J Biol Chem, 281, 16207-19.
- Werness, B. A., Levine, A. J. and Howley, P. M. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. Science, 248, 76-9.
- Wilkins, M. 2009. Proteomics data mining. Expert Rev Proteomics, 6, 599-603.
- Woodman, C. B., Collins, S. I. and Young, L. S. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer, 7, 11-22.
- Yanatatsaneejit, P., Mutirangura, A. and Kitkumthorn, N. 2011. Human papillomavirus's physical state and cyclin A1 promoter methylation in cervical cancer. Int J Gynecol Cancer, 21, 902-6.
- Yang, K., et al. 2017. A comprehensive analysis of metabolomics and transcriptomics in cervical cancer. Sci Rep, 7, 43353.
- Yu, L., et al. 2009. AP-2 $\alpha$  inhibits c-MYC induced oxidative stress and apoptosis in HaCaT human keratinocytes. Oncol, 2009, 780874.
- Zhang, B., Laribee, R. N., Klemsz, M. J. and Roman, A. 2004. Human papillomavirus type 16 E7 protein increases acetylation of histone H3 in human foreskin keratinocytes. Virology, 329, 189-98.
- Zhao, Q., He, Y., Wang, X. L., Zhang, Y. X. and Wu, Y. M. 2015. Differentially expressed proteins among normal cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma. Clin Transl Oncol, 17, 620-31.

- Zhong, J., Agha, G. and Baccarelli, A. A. 2016. The role of DNA methylation in cardiovascular risk and disease: Methodological aspects, study design, and data analysis for epidemiological studies. Circ Res, 118, 119-131.
- Zhu, W., Smith, J. W. and Huang, C. M. 2010. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. J Biomed Biotechnol, 2010, 840518.
- zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer, 2, 342-50.
- การแพทย์, ก. 2559. ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ.2559. สถาบันมะเร็ง: กรมการแพทย์, 3-6.





## ภาคผนวก

### การเตรียมสาร

#### อาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum essential medium (MEM)

ชั่ง MEM 9.5 กรัมและ  $\text{NaHCO}_3$  2.2 กรัม ผสมในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 850 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปรับ pH. ให้ได้ค่า pH. ที่ 7.2 แล้วเติมน้ำ Milli-Q ให้ครบปริมาตร 900 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร แล้วเติม FBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้ ปริมาตรสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM เป็น 1000 มิลลิลิตร และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ที่ อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส

#### อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)

ผสม DMEM 13.4 กรัมและ  $\text{NaHCO}_3$  3.7 กรัม ในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 850 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปรับ pH. ให้ได้ค่า pH. ที่ 7.2 แล้วเติมน้ำ Milli-Q ให้ครบปริมาตร 900 มิลลิลิตร นำไป กรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร แล้วเติม FBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้ ปริมาตรสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เป็น 1000 มิลลิลิตร และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ที่ อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส

#### 10x Phosphate buffer saline (PBS)

ชั่ง  $\text{NaCl}$  80 กรัม,  $\text{KCl}$  2 กรัม,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  11.5 กรัม และ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 กรัมละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำร้อนและแรงดันสูง (autoclave) และเก็บ ที่อุณหภูมิต่ำ

#### Trypsin สำหรับการเลี้ยงเซลล์ไลน์

ปิเปต 10x Trypsin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 1x PBS ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำ ร้อนและแรงดันสูงปริมาตร 9 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส

#### อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับนำไปแช่แข็ง

ควรเตรียมก่อนที่จะใช้และควรวางไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาความเย็น โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM หรือ DMEM ที่ผสม FBS ปริมาตร 4 มิลลิลิตรผสมกับ FBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและ DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

#### 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ชั่ง SDS 1 กรัมละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

**1.5 M Tris-HCl pH 8.8**

ชั่ง Tris base 27.23 กรัมละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 80 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับ pH. ให้ได้ค่า pH. 8.8 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 150 มิลลิลิตรด้วยน้ำ Milli-Q เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**0.5 M Tris-HCl pH 6.8**

ชั่ง Tris base 6 กรัมละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ปรับ pH. ให้ได้ค่า pH. 6.8 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำ Milli-Q เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**10% Ammonium persulfate (APS)**

ชั่ง APS 1 กรัมละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 10 มิลลิลิตรแบ่งเก็บในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**10x SDS-PAGE Running buffer**

ชั่ง Glycine 144 กรัม, Tris base 30.275 กรัมและ SDS 10 กรัม ละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**10x Transfer buffer**

ชั่ง Glycine 144 กรัมและ Tris base 30.275 กรัม ละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**10x TBS buffer**

ชั่ง Tris base 24.2 กรัมและ NaCl 87.7 กรัมละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับ pH. ให้ได้ค่า pH. 7.6 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำ Milli-Q เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**TBS with 0.1% Tween 20 (TBS-T)**

ปิเปต 10x TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตรผสมกับน้ำ Milli-Q ปริมาตร 900 มิลลิลิตรและ Tween-20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**5% Skim milk**

ชั่ง Skim milk 2.5 กรัมละลายใน TBS-T ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ควรเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

**10X TBE**

ชั่ง Tris base 108 กรัมและ Boric acid 55 กรัม ละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 960 มิลลิลิตร แล้วผสมกับ 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA pH. 8.0 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**2.5% agarose gel**

ชั่ง agarose 2.5 กรัมละลายใน 1x TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ผง agarose ละลาย แล้วผสม 10x gel star 10 ไมโครลิตร เทส่วนผสมลงในพิมพ์เพื่อรอเจลแข็งตัว

**1 M Tris-HCl pH 8.0**

ชั่ง Tris base 12.11 กรัมละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH. ให้ได้ค่า pH. 8.0 แล้วเติมน้ำ Milli-Q ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**5 M NaCl**

ชั่ง NaCl 14.6 กรัมละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**10% Triton-X**

ปิเปต Triton-X ปริมาตร 5 มิลลิลิตรผสมกับน้ำ Milli-Q ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**Lysis buffer**

ปิเปต 1 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร, 5 M NaCl ปริมาตร 30 ไมโครลิตร, 10% Triton-X ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำ Milli-Q ปริมาตร 810 มิลลิลิตร แล้วเติม protease inhibitor ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ควรเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

**4M Imidazole**

ชั่ง Imidazole 0.68 กรัม ละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**50% Acetonitrile**

ปิเปต Acetonitrile ปริมาตร 50 มิลลิลิตรผสมกับน้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**100 mM Ammonium bicarbonate**

ชั่ง Ammonium bicarbonate 0.79 กรัมละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**1 M DTT (1,4-Dithiothreitol)**

ชั่ง DTT 1.54 กรัมละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แบ่งเก็บในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**110 mM IAA (Iodoacetic acid)**

ชั่ง IAA 56 มิลลิกรัมละลายในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 3.327 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**Trypsin for proteomic**

ปิเปต Trypsin สำหรับใช้ทำแมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectrometry grade) ปริมาตร 20 ไมโครกรัม ละลายใน 50 mM Ammonium bicarbonate แบ่งเก็บในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**0.1% Formic acid**

ปิเปต Formic acid ปริมาตร 1 ไมโครลิตรผสมกับ Milli-Q ปริมาตร 999 ไมโครลิตร ผสม  
ก่อนที่จะใช้



### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายนันท์นภัส วงศ์มณี เกิดเมื่อวันที่ 12 สิงหาคม พ.ศ.2528 ที่จังหวัดลำพูน สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปี พ.ศ. 2550 มีประสบการณ์ทำงานที่องค์การระหว่างประเทศเพื่อการโยกย้ายถิ่นฐาน (International Organization for Migration) ในตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ ในปี พ.ศ. 2550 จนถึง พ.ศ. 2557 จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2557

