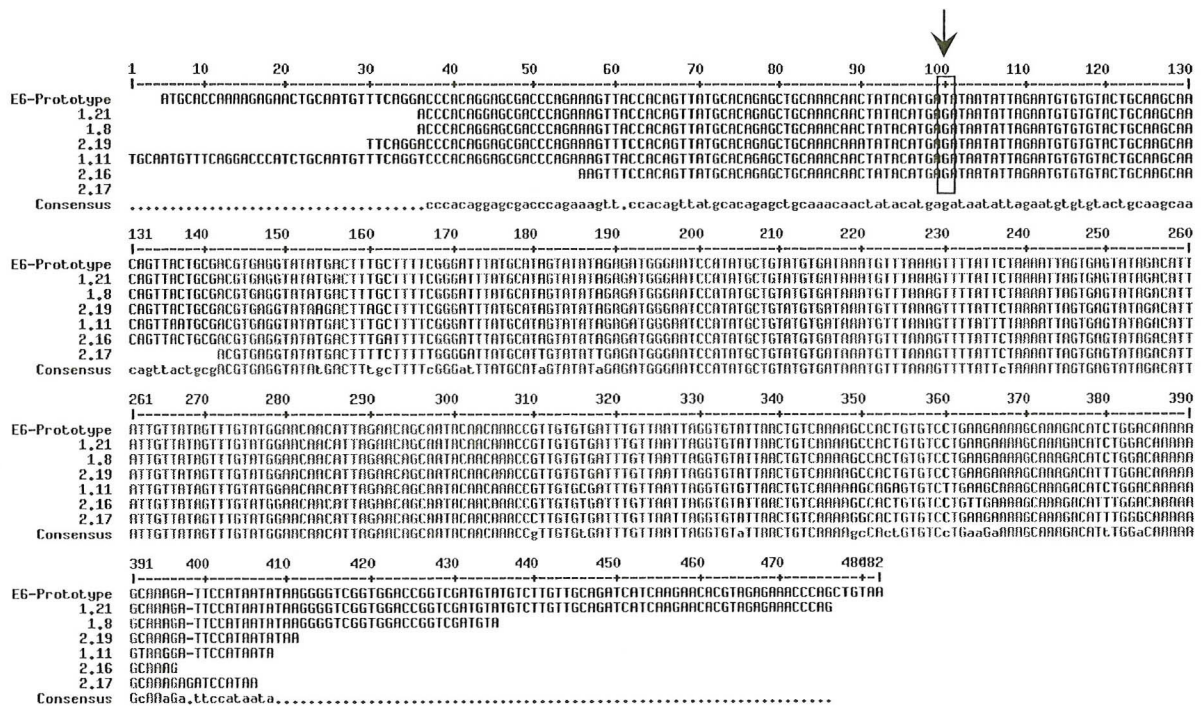


4. ผลการวิจัย (Result)

4.1 ลำดับเบสใน DNA ของตัวอย่าง HPV16 As variants และ HPV16 prototype

จากผลการศึกษาของโครงการวิจัยที่ผ่านมา ได้คัดเลือกตัวอย่างตรวจที่เป็น HPV16 As variants ซึ่งมีลำดับเบสดังแสดงในรูปที่ 2 มาศึกษาในโครงการวิจัยนี้



รูปที่ 2 ลำดับเบสใน DNA ของตัวอย่าง HPV16 As variants และ HPV16 prototype โดยตำแหน่งที่ถูกสกรีนแสดงถึงตำแหน่งที่ใช้ในการจัดกลุ่ม As variant โดยนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนจาก T ไปเป็น G ในตำแหน่งที่ 178

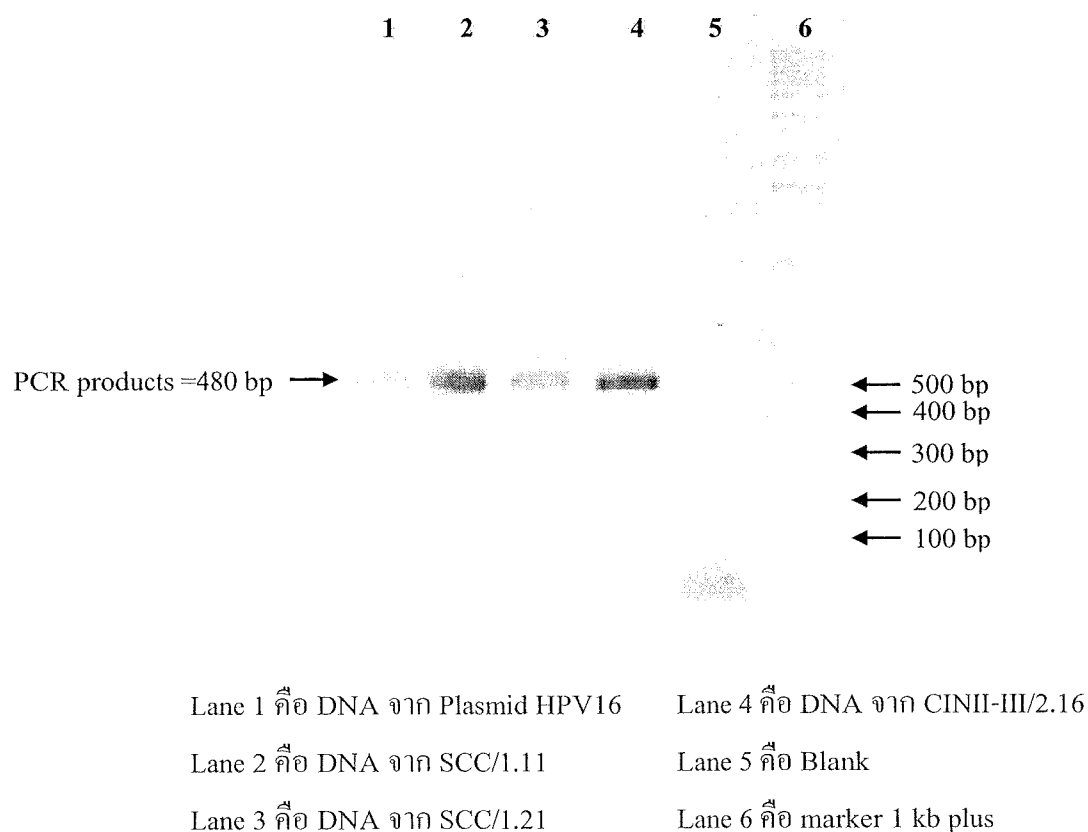
4.2 การเพิ่มปริมาณ E6 gene

ในการเพิ่มจำนวนชิ้น E6-prototype และ ชิ้น E6-As variants ด้วยวิธี PCR ได้ออกแบบ primers จำนวน 1 คู่ ให้มีตำแหน่งจำเพาะกับลำดับ nucleotide ของ E6 gene ช่วงที่ 83-559 และเหมาะสมกับการเชื่อมต่อเข้ากับ pcDNATM3.2/V5 Gateway[®] Directional TOPO[®] ซึ่งมีลำดับเบสดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Primers ที่จำเพาะกับ HPV16 E6 gene

Primer	Sequence	Size (bp)
E6-F	CACCATGCACCAAAAAGAGAACTGC	480
E6-R	GAGCAGCTGGGTTTCTCTACGT	

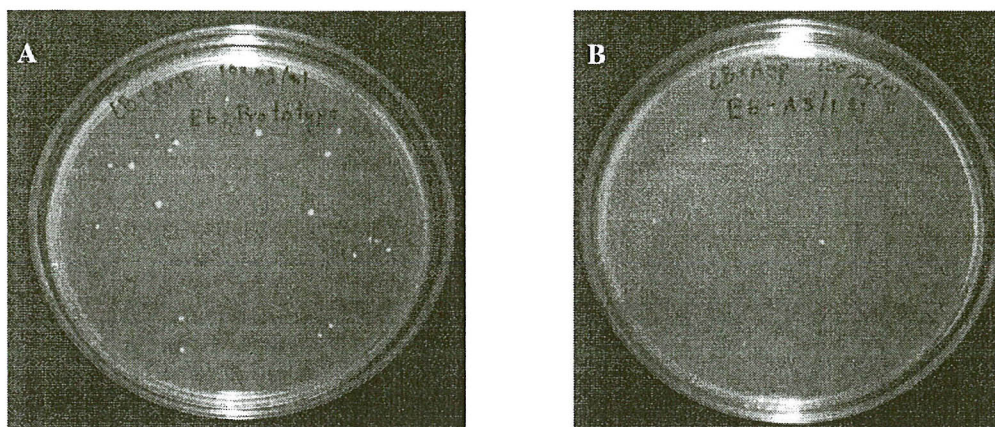
เมื่อเพิ่มปริมาณจีน E6-prototype และ จีน E6-As variants ด้วยวิธี PCR ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2 จากนั้นนำ PCR products ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นเพื่อใช้ในขั้นตอนการโคลน



รูปที่ 2 1.5% gel electrophoresis ของ PCR products

4.3 การสร้าง recombinant vector ของ E6-prototype และ E6-As variants ของเชื้อ HPV16

หลังจากสร้าง recombinant vectors และ transformation แล้วทำการคัดเลือกโคลน



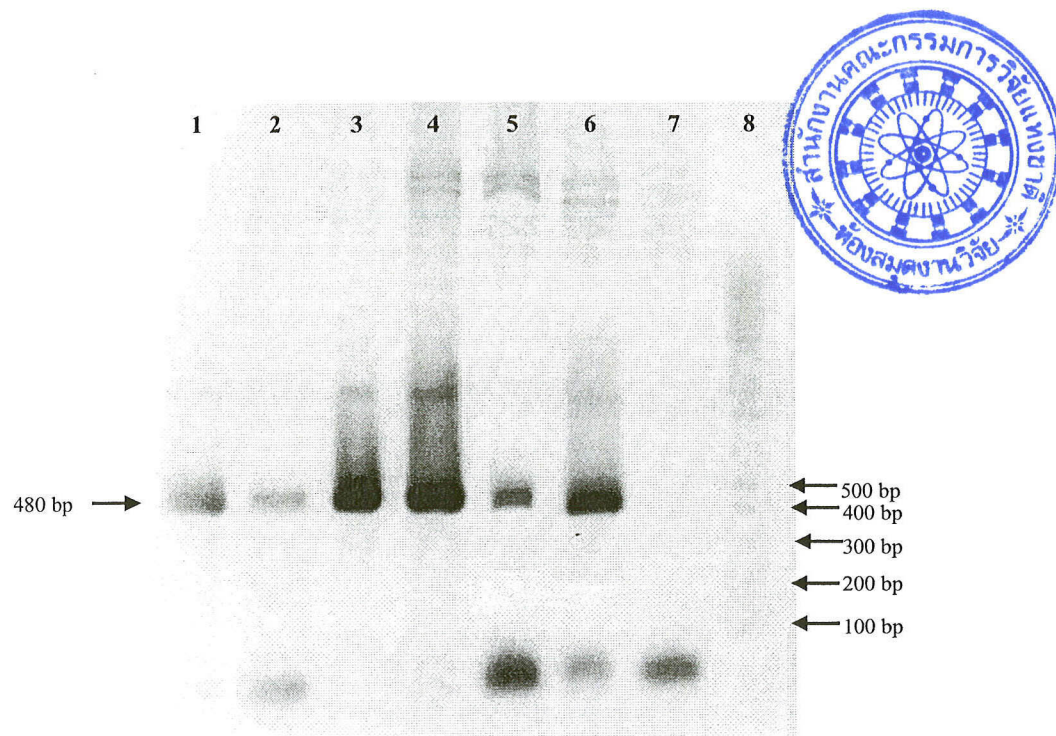
รูปที่ 3

A คือ LB plates ที่เติม Ampicillins 100 µg/ml ที่คัดเลือก clone E6-P

B คือ LB plates ที่เติม Ampicillins 100 µg/ml ที่คัดเลือก clone E6-As

4.4 การตรวจหาจีน E6 จากโคลนของ *E.coli* ที่สามารถเจริญบน LB plates ที่เติม Ampicillins 100 µg/ml โดยใช้ PCR

นำโคลนที่ได้ไปเพิ่มจำนวน และสกัดพลาสมิด ตรวจสอบว่ามีจีน E6 หรือไม่ โดยการทำ PCR ด้วย primer คู่ที่ใช้เพิ่มจำนวนจีน E6 เพื่อใช้ในการโคลน ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4



Lane 1 คือ positive control

Lane 2 คือ E6-P clone 1

Lane 3 คือ E6-P clone 2

Lane 4 คือ E6-As/1.11 clone 1

Lane 5 คือ E6-As/1.21 clone 1

Lane 6 คือ E6-As/2.16 clone 1

Lane 7 คือ Blank

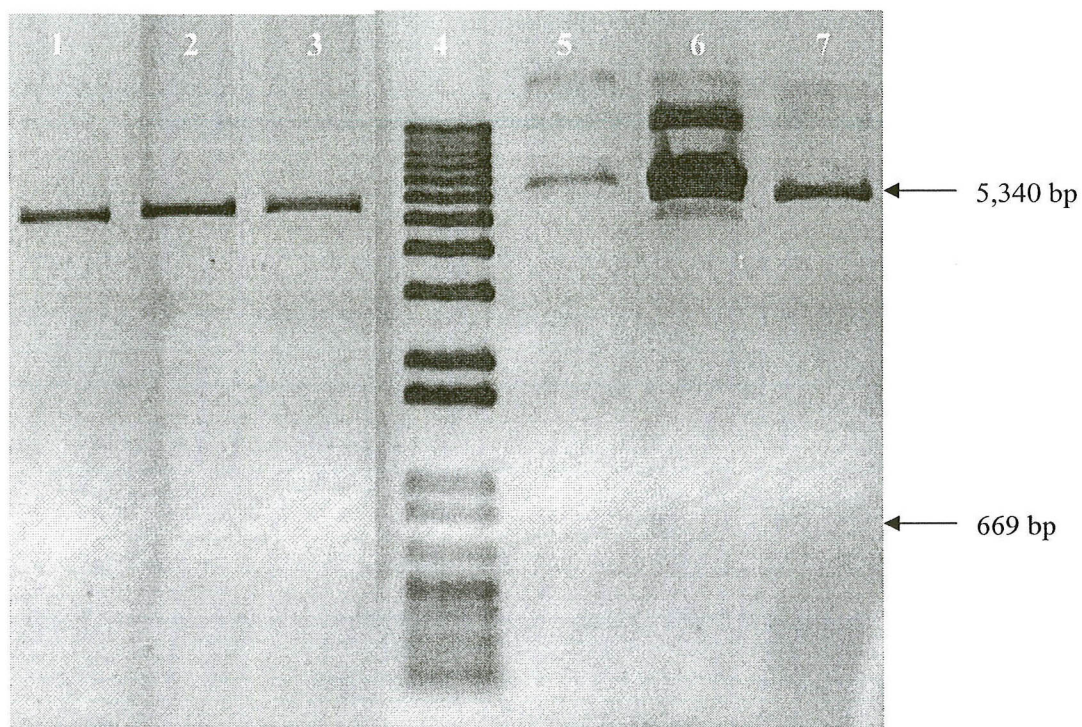
Lane 8 คือ marker 1 kb plus

รูปที่ 4 1.5% gel electrophoresis ของ PCR products

4.5 การตรวจสอบพลาสมิดโดยการนำไปตัดด้วย restriction enzyme

นำโคลนที่มีจีน E6 ไปสกัดพลาสมิดแล้วนำไปตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ NdeI ซึ่งคอนนี้ได้โคลนที่ให้ผล PCR เป็นบวกจำนวนทั้งหมด 6 clones ดังนี้

1. pcDNA-E6-prototype (pcDNA-E6-P) คือ พลาสมิดที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับ nucleotide ของจีน E6
2. pcDNA-E6-As variants (pcDNA-E6-As-1.21) คือ พลาสมิดที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับ nucleotide ของจีน E6 ใน ตำแหน่ง 178 จาก T ไปเป็น G และถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม Asian variants
3. pcDNA-E6-As-1.11
4. pcDNA-E6-As-2.16
5. pcDNA-E6-As-N18
6. pcDNA-E6-As-N19



Lane ที่ 1 pcDNA-E6-As-1.11

Lane ที่ 2 คือ pcDNA-E6-As-2.16

Lane ที่ 3 คือ pcDNA-E6-As-N19

Lane ที่ 4 คือ Marker 1 kb plus

Lane ที่ 5 pcDNA-E6-As-1.21

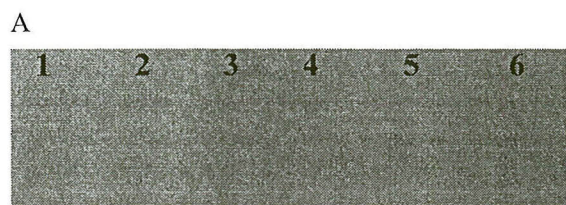
Lane ที่ 6 คือ pcDNA-E6-P

Lane ที่ 7 คือ pcDNA-E6-As-N18

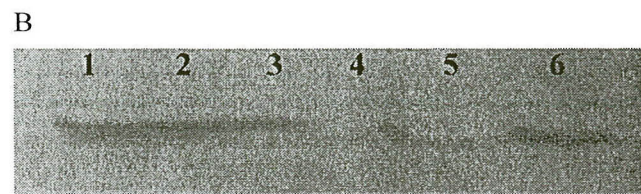
รูปที่ 5 0.7% gel electrophoresis ของโคลนที่นำไปตัดด้วยเอนไซม์ NdeI

4.6 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับ nucleotide โดยการ sequencing

หลังจากสกัดพลาสมิดทั้งหมดแล้วและพบว่าให้ผลการตัดด้วยเอนไซม์ถูกต้อง จากนั้นนำไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยวิธี sequencing ผลของลำดับเบสแสดงในรูปที่ 6



1; Siha cell line 50 ng
2; Siha cell line 100 ng
3; Caski cell line 50 ng



4; C33A cell line 50 ng
5; C33A cell line 100 ng
6; Caski cell line 100 ng

รูปที่ 7 แสดงผลการทำ western blot เพื่อตรวจหาโปรตีน E6 โดยที่ A. คือ การทำ western blot เพื่อตรวจหาโปรตีน E6 โดยใช้ mouse-anti goat antibodies เป็น secondary antibodies ส่วน B. เป็นการทำ western blot เพื่อตรวจหาโปรตีน E6 โดยใช้ rabbit-anti goat antibodies เป็น secondary antibodies