บุกรุกระบบภูมิคุ้มกัน ผ่านกระบวนการของระบบ HLA class I alleles ซึ่งมีความแตกต่างกันในกลุ่มประชากรที่ต่างกันจึงทำให้มีความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งเกิดขึ้นแตกต่างกันในกลุ่มที่ติดเชื้อ HPV16 variant

ในกลุ่ม As variants พบ E6 gene variation โดยมีการเปลี่ยนแปลงจาก G ไปเป็น T ที่ตำแหน่ง 178 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอมิโน Aspartic Acid ไปเป็น Glutamic Acid ที่ตำแหน่ง 25 และพบว่าการเปลี่ยนแปลงกรดอมิโนที่ตำแหน่ง 25, 27, 58, 78 and 83 จะสัมพันธ์กับ host immune recognition (Kast et al., 1994). และจากการเปลี่ยนแปลงของ base ระหว่าง nucleotide ที่168 and nucleotide ที่188 ใน E6 gene อาจจะมีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอมิโนที่ ส่วนปลาย (N-terminus) ของ E6 protein ซึ่งมีคุณสมบัติทาง antigenic structure ต่อการกระตุ้นหรือตอบสนองของ T cells อย่างดี จึงน่าจะมีผลทำให้การจดจำของ T cells ลดลง (Qiu et al., 2007) ในปัจจุบันนี้ บทบาทของ HPV16 E6 variations ต่อความรุนแรงของการเกิดมะเร็งปากมดลูกยังไม่สามารถอธิบายได้ แต่พบได้ว่า HPV16 E6 variations ที่เกิดขึ้นจะมีกรดอมิโนเปลี่ยนแปลงพบได้ในตำแหน่งที่มีความสำคัญในการจดจำโดยระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้น HPV16 E6 variations ที่เกิดขึ้นน่าจะมีโอกาสที่เหนือกว่า prototype และมีบทบาทในการทำให้เกิด cell transformation และ บุกรุกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้เกิดโรครุนแรงได้ (Zehbe et al., 1998)

3. วิธีดำเนินการวิจัย (Method)

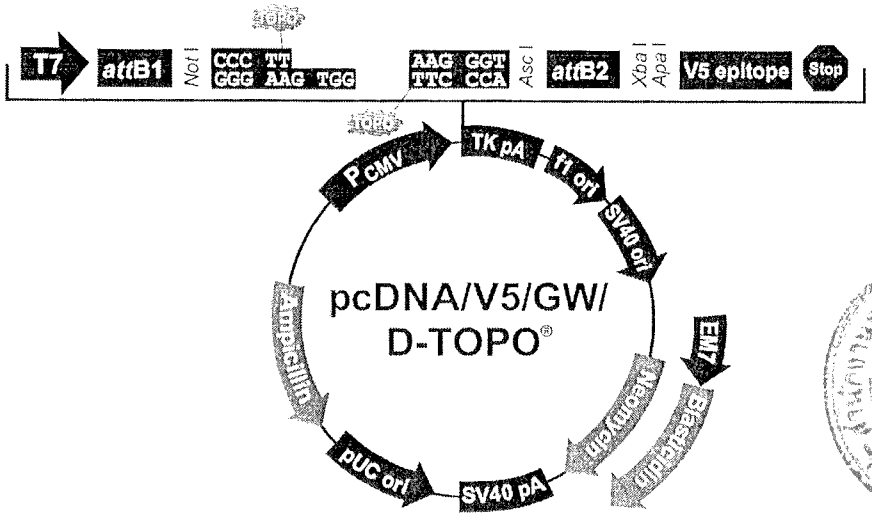
3.1 การเตรียม DNA ของ HPV16 As variants และ HPV16 prototype

HPV16 prototype ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็น HPV reference plasmid ส่วน HPV16 As variants ที่ใช้ในการศึกษานี้คัดเลือกมาจาก DNA ที่สกัดจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ (paraffin embedded biopsies) ที่มีผล pathology เป็น squamous cell carcinomas ซึ่งได้รับการศึกษาและทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจากผลการวิจัยเรื่อง "HPV 16 variant in squamous cervical cell of women in northeast Thailand" ของ น.ส. พีชานิกา ชอบจิตต์ ซึ่งเผยแพร่ในวารสาร Int J Infect Dis. 2009 Mar;13(2):212-9.

3.2 การเพิ่มปริมาณ E6 gene

ออกแบบ primers ให้มีตำแหน่งจำเพาะกับลำดับ nucleotide ของ E6 gene ช่วงที่ 83-559 (ข้อมูลจาก GeneBank: K02718) และเหมาะสมกับการต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ชนิด pcDNA™3.2/V5 Gateway® Directional TOPO® (Invitrogen) ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1

ทำการเพิ่มจำนวนจีน E6-prototype และ จีน E6-As variants ด้วยวิธี PCR เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอสำหรับการต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์



รูปที่ 1 โครงสร้างของ pcDNA™3.2/V5 Gateway® Directional TOPO®

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

นำ PCR products ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ E6 gene ของ HPV16 prototype และ HPV16 As variant ไปเตรียมความเข้มข้นให้ได้ตามที่กำหนดแล้วเติมลงใน cloning reaction tube (ประกอบด้วย Fresh PCR products, salt solution, water, TOPO® vector) จากนั้นทำการ transformation เข้าไปใน competent cells *E. coli* และคัดเลือกโคลนโดยใช้ LB plates ที่เติม Ampicillins 100 µg/ml นำโคลนที่ได้ไปเพิ่มจำนวนโดยทำการเลี้ยงใน LB broth ที่มี Ampicillins 100 µg/ml ที่ incubator shaker 37°C overnight จากนั้นนำโคลน ที่ได้ไปต้ม 100°C 5 นาที แล้วใช้เป็น template ในการทำ PCR เพื่อตรวจหาจีน E6 นำโคลนที่มีจีน E6 ไปสกัดพลาสมิดโดยใช้ Quick Plasmid Miniprep kit (Invitrogen)

3.4 การตรวจสอบพลาสมิดโดยการนำไปตัดด้วย restriction enzyme

นำโคลนที่ผ่านการตรวจสอบว่ามีจีน E6 จากการทำ PCR มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ Quick Plasmid Miniprep kit (Invitrogen) จากนั้นนำไปตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I (Fermentas) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถตัดพลาสมิดที่สร้างขึ้นได้ 2 ตำแหน่ง คือ ตรงบริเวณพลาสมิด 1 ตำแหน่ง และบริเวณจีนที่เชื่อมใส่เข้าไปอีก 1

ตำแหน่ง ดังนั้นเมื่อตัดพลาสมิดที่มียีนที่สนใจแล้วนำไปแยกโดยการ run ด้วย 0.7% agarose gel จะพบแบน 2 ขนาด ได้แก่ 5340 bp และ 669 bp

3.5 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับ nucleotide โดยการ sequencing

นำโคลนที่ให้ผลบวกจากการทดสอบการตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I ไปทำการ sequence เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทน์ของแต่ละโคลน และโคลนที่ให้ผลการ sequence ที่ถูกต้อง นำไปทำการเพิ่มจำนวนและเก็บไว้เพื่อศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนต่อไป

3.6 การทดสอบความสามารถในการแสดงออกของโปรตีน E6 ในแต่ละโคลนที่ได้

ในขั้นตอนนี้อยู่ระหว่างการ optimize condition โดยในการตรวจสอบโปรตีน E6 ใช้ Caski cell line ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีโปรตีน E6 ของ HPV16 นำเซลล์ที่ได้มาทำให้แตกด้วยการใส่ RIPA lysis buffer แล้วต้ม 5 นาที ใน sample buffer จากนั้นนำไปแยกโปรตีนด้วย 12.5%SDS-PAGE แล้ว transfer ลงบน PVDF membrane จากนั้น block membrane ด้วย 5% skim milk เป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำไป incubate ร่วมกับ primary antibodies (1:500) ต่อโปรตีน E6 (N-17;Santra Cruz Biotecnology) ใน PBS + 0.1% tween-20 ที่ 4°C overnight จากนั้น incubate ร่วมกับ 0.1 μg/ml mouse anti-goat HRP antibodies (1:5,000) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. ล้าง membrane ด้วย PBS + 0.1% tween-20 อีก 2 ครั้ง และล้างด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วใส่ substrate ลงไป แล้วนำไปประกบบนแผ่นฟิล์ม ก็จะเกิดแบนให้เห็น