อภิปรายผล/วิจารณ์ (Discussion/Comment)

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบปัญหาในขั้นตอนการเชื่อมต่อระหว่างจีนที่สนใจกับพลาสมิด เนื่องจากว่า PCR product ที่นำมาทำการโคลนนั้น ไม่ได้ผ่านการ purify ดังนั้นจึงมีบางส่วนที่เป็นพวก non specific เช่น primer dimmer ปนอยู่ใน PCR product ด้วย ฉะนั้นเมื่อนำไปทำการเชื่อมต่อ (ligation) จึงทำให้พวก non specific เหล่านี้ สามารถเข้าไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด ทำให้ได้พลาสมิดที่ไม่มีจีนที่เราสนใจ แต่พบโคโลนีของ E. coli เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ (Ampicillin) เรียกว่า false positive ซึ่งจะไม่สามารถทราบได้เลยว่าโคโลนีไหนมีจีนที่เราต้องการจนกว่าจะตรวจสอบด้วยวิธี PCR ร่วม universal primers (T7 promoter และ Tk poly A) ส่วน primer ที่ออกแบบมาสำหรับการโคลนจีนที่เราต้องการนั้น ไม่ควรนำมาใช้ในการตรวจหาจีนที่เราสนใจ เนื่องจากมีความจำเพาะค่อนข้างต่ำ ทำให้ผล PCR ที่ได้ส่วนใหญ่แล้วเป็น false positive ฉะนั้นในการตรวจหาโคลนที่มีจีน E6 ที่เราสนใจ จะต้องตรวจด้วยวิธี PCR ร่วมกับ universal primers เพื่อช่วยเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกโคลนที่เราสนใจ นอกจากนี้ควรนำพลาสมิดที่ได้นั้นมาตัดด้วยเอนไซม์ที่มีความสามารถตัดจำเพาะต่อพลาสมิดและจีนที่สนใจ เพื่อเป็นการยืนยันการมีจีนที่เราสนใจอยู่ในพลาสมิดนั้นจริงๆ

นอกจากนี้ในการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน E6 พบว่ามีปัญหาคือไม่พบขนาดแบนของโปรตีน E6 ที่ต้องการ ดังนั้นในขั้นตอนแรกจึงทำการตรวจสอบ secondary antibodies โดยเปลี่ยนจาก mouse-anti goat antibodies เป็น rabbit-anti goat antibodies ของ Dako พบว่ามีแบนของโปรตีน E6 ที่สนใจ ดังนั้นปัญหาที่พบเกิดจาก secondary antibodies นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเปลี่ยน secondary antibodies เป็น Lot number ใหม่แต่ยังคงยี่ห้อเดิมอยู่ ก็พบว่ามีแบนของโปรตีน E6 เกิดขึ้นเช่นกัน

สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ (Conclusion/Suggestion)

ในการศึกษาตอนนี้ เราสามารถสร้าง E6 expression vector ของ HPV16 As variants และ HPV16 E6-prototype ได้ทั้งหมด 3 clones ดังนี้

1. pcDNA-E6-prototype (pcDNA-E6-P)
2. pcDNA-E6-As variants (pcDNA-E6-As-1.21)
3. pcDNA-E6-As variants (pcDNA-E6-As-N18)

ผลที่ได้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ และจะถูกใช้ศึกษาในโครงการวิจัยปีต่อไป