

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Lac Z primer Forward primer = 5' GTT GCA GTG CAC GGC AGA TAC ACT TGC TGA 3'
 Reverse primer = 5' GCC ACT GGT GTG GGC CAT AAT TCA ATT CGC 3'

GFP primer Forward primer = 5' GCC CAT CCT GGT CGA GCT GG 3'
 Reverse primer = 5' GTG CCC CAG GAT GTT GCC GTC 3'

2. ชุดทดสอบสำเร็จรูป

ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ GF-1 Plasmid DNA Extraction kit (vivantis)
 ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล GF-1 AmbicClean Kit (PCR & Gel) (vivantis)

3. เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ

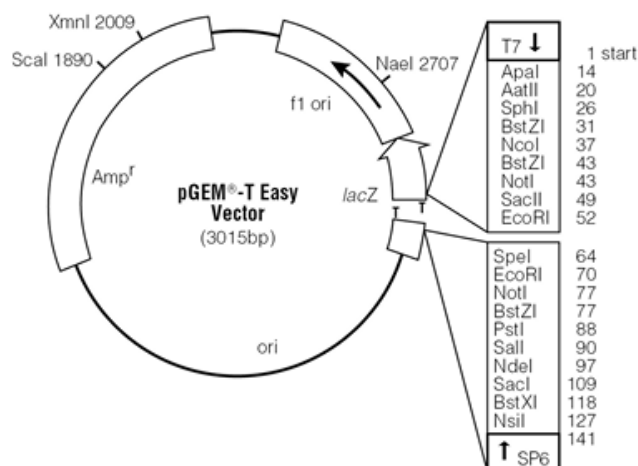
HeLa continuous cell line จากเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีสารพันธุกรรมของ HPV-18 สอดแทรกอยู่

4. เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด

5. พลาสมิดสำหรับการโคลนยีน

5.1 พลาสมิด pGEM - T Easy ซึ่งประกอบไปด้วยโปรโมเตอร์ T7 , SP6 ยีน *lacZ* และต้นทางต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน พลาสมิดนี้มีลักษณะเป็นเส้นตรง ด้านปลายทั้งสองด้านเป็นเบสไท-มิน (T overhangs) เพื่อความสะดวกต่อการเชื่อมเข้ากับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR (PCR product)

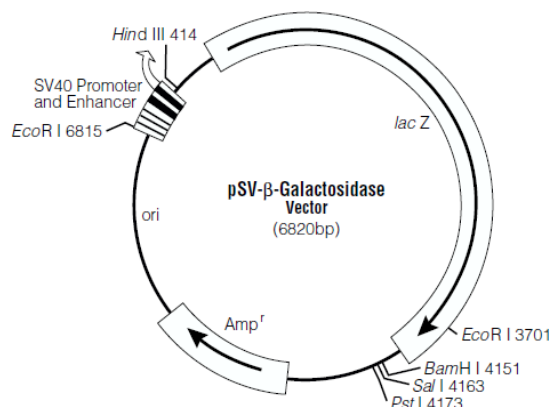


รูปที่ 3.1 แผนที่ของ pGEM - T Easy Vector ขนาด 3015 bp

ที่มา : pGEM - T Easy vector system. Accessed January 14. Available from

<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/>

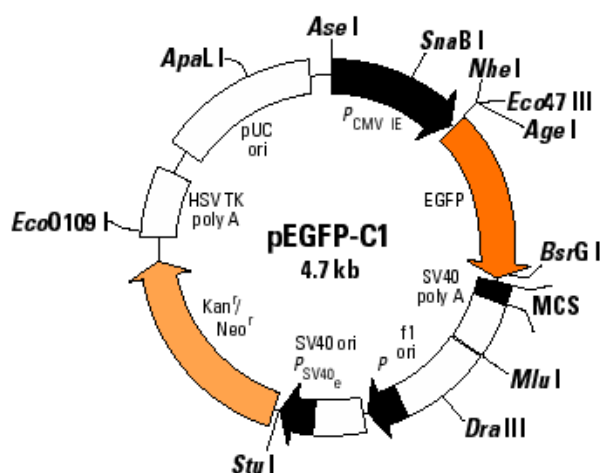
5.2 พลาสมิด pSV- β -Galactosidase ซึ่งประกอบไปด้วยโปรโมเตอร์ SV 40 ควบคุมการแสดงออกของยีน *lac Z* และต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน



รูปที่ 3.2 แผนที่ของ pSV- β -Galactosidase control Vector ขนาด 6820 bp

ที่มา : pSV- β -Galactosidase control vector . Accessed January 14. Available from <http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/Promega/tb094.pdf>

5.3 พลาสมิด pEGFP (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิสิฐ ตั้งเคียงศิริสิน ภาควิชาชีว-
เภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร) ซึ่งประกอบไปด้วยโปรโมเตอร์ SV 40 ควบคุมการแสดงออกของยีน
lacZ และต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซิน



รูปที่ 3.3 แผนที่ของ pEGFP control Vector ขนาด 4700 bp

ที่มา : pEGFP -C1 vector . Accessed January 14. Available from http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pEGFP_C1_map.pdf

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนของ papillomavirus 7 ทัยป์ (human papillomavirus-1, -6, -11, -16, -31, bovine papillomavirus-3, -4)

ตัวอย่างพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนของ papillomavirus ทั้ง 7 ทัยป์ ได้รับตัวอย่างพลาสมิดโดยการหดยสารละลายลงบนกระดาษกรอง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการไวรัส ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ทำการตัดกระดาษกรองตรงตำแหน่งที่พลาสมิดถูกหดยลงใน TE buffer ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง เก็บส่วนใส เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การออกแบบไพรเมอร์ต่อชิ้นส่วน 3' UTR ของ papillomavirus 7 ทัยป์

ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ papillomavirus ทั้ง 7 ทัยป์ใน Genbank เว็บไซต์ <http://www.ncbi.nih.gov> (Accession no.AF092932.1, FN907963.1, AF125673.1, JO4353.1, AF486184.1 และ X05817.1) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 3'UTR ในการออกแบบไพรเมอร์นั้นได้มีการเติมลำดับเบสที่เป็น restriction site ของ restriction enzyme โดยลำดับเบสของ restriction site ของเอนไซม์ *Bam*HI (GGATCC) ถูกเพิ่มในด้าน 5' ของ forward primer ของไวรัสทั้ง 7 ทัยป์ ส่วน reverse primer ได้เพิ่มลำดับ restriction site ของเอนไซม์ *Pst*I (CTGCAG) ลงในส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ใช้สำหรับ HPV-6, -11 และ BPV-3 และกรณีของ HPV-16, -31 และ BPV-4 จะใช้ restriction site ของเอนไซม์ *Sal*I (GTCGAC)

3. การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน late 3' UTR ของ papillomavirus ทั้ง 7 ทัยป์ โดยวิธีพีซีอาร์ (PCR)

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน late 3' UTR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ papillomavirus แต่ละชนิดด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนของ papillomavirus เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เตรียม reaction mixture ดังตารางที่ 3.1 แล้วเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System 9700 โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (initial denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที	1 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	} 35 รอบ
(annealing)	ที่ 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
โปรแกรมที่ 3 (extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส ∞	

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน late 3' UTR

สาร	ปริมาณ
10x PCR buffer + MgCl ₂	2.5 ไมโครลิตร
10mM dNTP mix	0.5 ไมโครลิตร
forward primer (10 uM)	0.5 ไมโครลิตร
reverse primer (10 uM)	0.5 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 unit/μl)	0.25 ไมโครลิตร
Template (DNA)	1 นาโนกรัม
DNase-RNase free water	เติมน้ำให้ครบ 25 ไมโครลิตร

4. การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจลโดยวิธีสำเร็จรูป GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel)

นำชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการพีซีอาร์มาทำบริสุทธิ์ด้วย GF-1 Ambi - Clean Kit (Vivantis, มาเลเซีย) ตามวิธีในคู่มือดังนี้เติม DB buffer ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักรวม บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

หรือจนเจลละลายหมด ในระหว่างการบ่มทำการ vortex ทุกๆ 2-3 นาที จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายที่ผ่านลง column ที่จากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตรลงใน column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายที่ผ่านลง column ที่แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จากนั้นย้าย column ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่แล้วเติม elution buffer ลงในบริเวณกลาง column ปริมาตร 15-30 ไมโครลิตร (ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอบนเจล) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาทีแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

5. การเชื่อมต่อ (ligation) ยีนกับพลาสมิดเวกเตอร์

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์มาเชื่อมต่อ (ligation) กับพลาสมิดเวกเตอร์ในอัตราส่วน 1:3 (vector:insert) โดยคำนวณตามคู่มือของ NEB (NEB, สหราชอาณาจักร)

$$\frac{50 \text{ ng vector} \times 0.5 \text{ kb insert} \times 3}{3.0 \text{ kb vector} \times 1} = 25 \text{ ng of the PCR product}$$

เตรียมปฏิกิริยาในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ซึ่งประกอบไปด้วย 25 ng ของชิ้น insert, 10x T4 DNA Ligase Buffer (containing ATP, BSA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, พลาสมิดเวกเตอร์ 50 นาโนกรัม, T4 DNA ligase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และเติมน้ำที่ผ่านการไร้เชื้อจนครบปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตรผสมสารต่างๆ ให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มข้ามคืนที่ 16 องศาเซลเซียสก่อนนำไปถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (transformation)

6. การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH5 α

6.1 การเตรียม competent *E. coli* strain DH5 α

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ลงบนอาหาร LB agar บ่มเชื้อข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α จากจานเพาะเชื้อนำไปเลี้ยงต่อในอาหาร LB broth ปริมาตร 3 มิลลิตร บ่มเชื้อข้ามคืน เช้าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อให้มากขึ้นโดยถ่ายเชื้อ 0.25-0.5 ml ไปเลี้ยงต่อใน LB broth ปริมาตร 20 มิลลิตร บ่มเชื้อด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงหรือจนได้ความขุ่นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร มีค่าอยู่ในช่วง 0.3-0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอด sterile centrifuge ที่เย็นหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วย CaCl₂ solution pH 7.0 (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก) ที่เย็น ปริมาตร 5 มิลลิตรเพื่อล้างเซลล์และทำให้แบคทีเรียกระจายตัวโดยใช้แท่งแก้วเขี่ยเบาๆ หมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วย CaCl₂ solution pH 7.0 ที่เย็น ปริมาตร 1.5 มิลลิตรและทำให้แบคทีเรียกระจายตัวโดยใช้แท่งแก้ว แบ่งใส่หลอด microcentrifuge ปลอดเชื้อที่เย็นหลอดละ 50 μ l นำไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส

6.2 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (transformation) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α) โดยวิธี heat shock

ผสมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 5 ไมโครลิตรกับ competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที ขั้นตอน heat shock ทำโดยให้ความร้อนที่ 42 องศาเซลเซียส 1 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม SOC medium 900 ไมโครลิตร นำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ทำการเกลี่ย (spread) สารละลายเชื้อ 10-100 ไมโครลิตรบน LB agar ซึ่งประกอบด้วย ampicillin, IPTG และ X-gal ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

6.3 การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis

คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญอยู่ใน LB agar plate + ampicillin นำไปเลี้ยงต่อใน LB broth + ampicillin ปริมาตร 3 มิลลิตร บ่มเชื้อข้ามคืนบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจนเชื้อเจริญถึงระยะ log phase (ประมาณ 16 ชั่วโมง) จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาทีเพื่อเก็บเกี่ยวแบคทีเรีย เทอาหารทิ้งแล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) ที่แช่เย็นในน้ำแข็ง (ice-cold) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกันโดยการ vortex ก่อนเติม solution II

(0.2 N NaOH, 1% SDS) ที่เตรียมใหม่ทุกครั้งปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาแล้วแช่ในน้ำแข็ง เติมน้ำ solution III (3M potassium acetate, 5M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิก หลอดกลับไปมาหลายๆ ครั้ง จากนั้นแช่สารละลายในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสลงใน microcentrifuge หลอดใหม่ เติมน้ำ phenol:chloroform (1:1) เท่ากับ ปริมาตรของสารละลายส่วนใส ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที 10 นาที นำ สารละลายส่วนบน (aqueous layer) ซึ่งมีฟลาสมิดดีเอ็นเอมาตกตะกอนด้วย absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของ สารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-5 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 13,000 รอบต่อนาที 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้าง ตะกอนด้วย 70 % ethanol 1 มิลลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที 5 นาที เทสารละลาย ทิ้ง ทำให้ตะกอนแห้งโดยเปิดฝาหลอดไว้ประมาณ 15 นาที ละลายตะกอนฟลาสมิดด้วย TE buffer (10 mM Tris pH 7.9, 1mM EDTA pH 8.0) ที่มี RNase 20 µl/ml ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบบริคอมบิแนนท์ฟลาสมิดที่สกัดได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะคือ *Bam*HI, *Sall* และ *Pst*II ทำโดยเตรียม reaction mixture ซึ่งแต่ละ reaction จะมีปริมาตรรวมสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร ส่วนประกอบของสารเป็น ดังนี้ บัฟเฟอร์ (10x buffer) 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ตัดจำเพาะ 0.5 ไมโครลิตร, ฟลาสมิดที่สกัด 3 ไมโครลิตรและเติมน้ำ DI ที่ ผ่านการฆ่าเชื้อจนครบ 20 ไมโครลิตร ผสมกันเบาๆ นำไป spin down บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธีอีเลกโตรโฟรีซิสบน 1 % อะกาโรสเจล เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่ตัดและไม่ตัด หลังจาก ตรวจสอบพบว่ามีส่วน late 3'UTR ใน pGEM-T Easy ที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการ transformation แล้วจึงส่งฟลาสมิดที่สกัดได้ดังกล่าวไปหาลำดับเบส (sequence) ก่อนนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปหาความเหมือน (homology) กับยีนอื่นๆ ที่มีใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn ผ่าน website <http://www.ncbi.nih.gov>

7. การถ่ายโอนฟลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HeLa (transfection)

การนำฟลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ตามวิธีในคู่มือของ Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) ขั้นตอนแรกคือการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อใช้ในการทดลองโดยการเลี้ยงเซลล์ HeLa ปริมาณ 3×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรใน 6-well plate ใน Dulbecco's Modified Eagle Medium หรือ DMEM (Gibco, USA) ที่มี 10% fetal bovine serum ไม่เติม antibody ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 90-95% confluent การเตรียม DNA-Lipofectamine 2000 complexes ทำได้ ดังนี้ เจือจาง DNA ให้ได้ตามปริมาณที่ต้องการใน medium ที่ไม่เติมซีรัม ผสมให้เข้ากันเบาๆ จากนั้นเติม Lipofectamine 2000 ที่เจือจางให้ได้ปริมาณตามต้องการกับ medium ที่ไม่เติมซีรัม ตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ DNA และ Lipofectamine 2000 จับตัวกันเป็น complexes จากนั้นใส่ DNA-Lipofectamine 2000 complexes ลงในเซลล์ HeLa ที่เตรียมไว้ เติมน้ำไปมาเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% คาร์บอนไดออกไซด์ หลังจาก 6 ชั่วโมงเติม medium ที่มี 10% fetal bovine serum บ่มต่อให้ครบเวลา 24-72 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบผลและบันทึกผลหลังการ transfect เมื่อเวลาผ่านไป 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการถ่ายภาพเซลล์ที่มีการเรืองแสงของ green fluorescent protein (GFP) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนส์

8. การสกัด RNA โดยวิธี TRIzol Reagent

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก culture dish เติมน้ำ TRIzol reagent 1 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาทีใช้ปิเปตดูด ขึ้นลงหลายๆ ครั้ง แล้วทำการปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 4 องศาเซลเซียส 12,000 rpm 10 นาที เก็บ supernatant ใส่ microcentrifuge หลอดใหม่ เติมน้ำ chloroform 0.2 มิลลิตรเขย่าอย่างแรงโดยใช้มือ 15 วินาทีและบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จะเกิดการแยกชั้นของสารละลาย ดูด สารละลายส่วนบน (aqueous phase) ใส่ microcentrifuge หลอดใหม่ ตกตะกอน RNA โดยเติมน้ำ isopropyl alcohol 0.5 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วน supernatant ทิ้ง ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol 1 มิลลิตร นำไป vortex และปั่นตกตะกอนที่ 7,500 rpm 4 องศา เซลเซียส 5 นาที ทิ้งให้ตะกอน RNA แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำ DNase-RNase free 50 ไมโครลิตร นำไป วัดปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop เก็บ RNA ที่ -70 องศาเซลเซียส

9. DNase treatment

บ่มสารละลายอาร์เอ็นเอในหลอด microcentrifuge ที่มี 10x DNase buffer 1 ไมโครลิตร, RNA 5 ไมโครลิตร, DNase I 1 ไมโครลิตรและ DEPC-H₂O 3 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม

phenol : chloroform : isoamyl alcohol (125:24:1) ปริมาตร 1 volume ผสมสารด้วย vortex 1 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 2 นาที ดูดชั้นบน aqueous phase ใส่ microcentrifuge หลอดใหม่ เติม 1 volume ของ chloroform: isoamyl alcohol (24:1) แล้วทำซ้ำดังข้างต้นอีกครั้ง ดูดสารละลายชั้นบนใส่ microcentrifuge หลอดใหม่ เติม 0.5 volume 7.5 M ammonium acetate และ 2.5 volume ของ 100 % ethanol ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 30 นาที นำไปปั่นตกตะกอน 20 นาที ดูด supernatant ที่ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol 1 มิลลิลิตร นำไป vortex และปั่นตกตะกอนที่ 7,500 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ที่ให้ตะกอน RNA แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำ DNase-RNase free 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำการสังเคราะห์ cDNA โดยการทำ reverse transcription ต่อไป

10. การตรวจสอบอาร์เอ็นเอ ของยีน *lac Z* ด้วยเทคนิคอาร์-ที พีซีอาร์ (RT-PCR)

การตรวจสอบอาร์เอ็นเอของยีน *lacZ* ใน pSV-beta-Galactosidase Control Vector ซึ่งมีชิ้นส่วน 3' UTR ของ papillomavirus 7 ทยัปแทรกอยู่ในพลาสมิดด้วยเทคนิคอาร์-ที พีซีอาร์ (RT-PCR) โดยใช้ total RNA ที่สกัดจาก HeLa cells ซึ่งทำการ transfect รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ในหัวข้อ 8 เป็น template และใช้ไพรเมอร์ *lacZ* ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนติดตาม (beta-galactosidase) ทำการเตรียม reaction mixture ดังตารางที่ 3.2 ผสมกันเบาๆ นำไป spin down แล้วใส่ในเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System 9700 โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (initial denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที	1 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	35 รอบ
(annealing)	ที่ 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
โปรแกรมที่ 3 (extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส ∞	

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของปฏิกิริยา อาร์-ที พีซีอาร์ ของยีน *lac Z*

reagent	ปริมาตร
10x PCR buffer + MgCl ₂	2.5 ไมโครลิตร
10mM dNTP mix	0.5 ไมโครลิตร
Lac z forward primer (10 uM)	0.5 ไมโครลิตร
Lac z reverse primer (10 uM)	0.5 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 unit/μl)	0.25 ไมโครลิตร
AMV-RT (10 unit/ul)	0.25 ไมโครลิตร
Template (RNA)	50 นาโนกรัม
DNase-RNase free water	เติมน้ำให้ครบ 25 ไมโครลิตร

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตโฟเรซิสบน 1 % อะกาโรสเจล เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 100 bp DNA ladder marker

11. การคำนวณหาประสิทธิภาพและการวิเคราะห์ทางสถิติของชิ้นส่วน 3'UTR ใน papillomavirus 7 ทยัป

จากการศึกษาการวัดความเข้มของแบนจากการวิเคราะห์หา RNA ของยีน *lac Z* และ *GFP* ด้วยเทคนิค RT-PCR บน 1% อะกาโรสเจล โดยใช้โปรแกรม GelQuantNET จาก <http://biochemlabsolutions.com/GelQuantNET.html> (free programme) ทำการคำนวณหาประสิทธิภาพของชิ้นส่วน 3' UTR ใน papillomavirus ทั้ง 7 ทยัป ดังนี้เช่น

Control (ความเข้มของแบนของยีน *lac Z* / ความเข้มของแบนของยีน *GFP*)
= X (ค่าที่ได้ เทียบเป็น 100)

HPV-6 (ความเข้มของแบนของยีน *lac Z* / ความเข้มของแบนของยีน *GFP*)
= Y

ดังนั้น ประสิทธิภาพของชิ้นส่วน 3' UTR ใน HPV-6 = $(100/X) * Y$

วิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรมทดสอบสถิติ SPSS version 16 จาก <http://en.softonic.com/s/spss-16.0-free-download-full-version> (free programme) ด้วยวิธี one – way Anova และ Turkey HSD test เลือกค่า p-value < 0.05 เพื่อทดสอบสมมติฐานเปรียบเทียบความแตกต่างของประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *lac Z* ของชิ้นส่วน 3' UTR ใน Papillomavirus 7 ทัพป์

12. การเตรียม Nuclear extract และ Cytoplasmic extract จาก HeLa cells

เตรียมเซลล์จำนวน 4×10^7 เซลล์ใส่ centrifuge tube ก่อนปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 2,500 rpm 10 นาที อุณหภูมิห้อง ทั้งส่วนน้ำใสแล้วล้างเซลล์โดยการละลายตะกอนเซลล์ 2 รอบด้วย 10 ml Phosphate-buffered saline (PBS) ปั่นเหวี่ยง 2,500 rpm 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ขั้นตอนการเตรียม extract เริ่มโดยละลายตะกอนเซลล์ใน buffer A (10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCL, 0.5 mM DTT) ปริมาตร 2 packed cell volume (PCV) บ่มบนน้ำแข็ง 10 นาที ถ่ายสารละลายเซลล์ 2 ml ลงใน Dounce homogenizer ที่แช่น้ำแข็งแล้วบดเซลล์ขึ้นลงซ้ำๆ 10-20 ครั้งเพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกแต่นิวเคลียสยังคงรูปอยู่ สังเกตการแตกของเยื่อหุ้มเซลล์โดยการหยดสารละลายบนสไลด์ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ่ายสารละลายเซลล์ใน Dounce homogenizer ลง centrifuge tube อันใหม่ที่อยู๋บนน้ำแข็งหลอดละ 1 ml ปั่นเหวี่ยงที่ 14000-16000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C เพื่อตกตะกอนนิวเคลียส เก็บส่วนใสซึ่งเป็น Cytoplasmic extract โดยแบ่งใส่ centrifuge tube หลอดละ 100 μ l แช่เย็นที่ -70°C ทำการสกัด nuclear extract โดยละลายตะกอนนิวเคลียสด้วย buffer B (20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1 mM EDTA, 0.4 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10% glycerol) ปริมาตร 0.5 PCV ผสมให้เข้ากัน ทำนิวเคลียสให้แตกโดย sonicate ที่ 20-40 amplitude นาน 5-10 นาที โดยบ่มสารละลายบนน้ำแข็งตลอดเวลา สังเกตการแตกของเซลล์บนสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ปั่นเหวี่ยงสารละลายที่ 14000-16000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C เก็บส่วนใสซึ่งเป็น nuclear extract โดยแบ่งใส่ centrifuge tube หลอดละ 50 μ l เก็บที่ -70°C ตรวจสอบขนาดโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS - PAGE ด้วย 12% polyacrylamide gel

13. การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์โปรตีนและ RNA late regulatory (Cumming et al., 2003)

เตรียมชิ้นส่วน RNA ความเข้มข้น 500 pmol โดยใช้ *In vitro* Transcription Kit (Jena Bioscience) ซึ่ง reaction mix ประกอบด้วย

	20 μ l assay	50 μ l assay
T7 reaction buffer	4 μ l	10 μ l
dNTP mix	1 μ l	2.5 μ l
RNase inhibitor	0.2 μ l	0.5 μ l
Template DNA ที่มี T7 promotor	10-500 ng	10-1000 ng
T7 RNA polymerase	0.2 μ l	0.5 μ l
Nuclease-free water	เติมให้ครบ 20 μ l	เติมให้ครบ 50 μ l

การเตรียมสารละลายอาร์เอ็นเอเพื่อ immobilize กับ agarose beads ทำโดยบ่มสารละลายอาร์เอ็นเอกับ 5 mM sodium m-periodate และ 100 mM sodium acetate (pH 5.0) ปริมาตรสุทธิ 400 μ l บ่ม 1 ชั่วโมงในที่มืด ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย ethanol แล้วละลายตะกอนใน 500 μ l 0.1 M sodium acetate (pH 5.0)

การเตรียม agarose beads ก่อนใช้ทำโดยดูด adipic acid dihydrazide agarose beads ปริมาตร 400 μl ใส่ centrifuge tube ล้างด้วย 10 ml sodium acetate (pH 5.0) ปั่นเหวี่ยง 300 rpm นาน 3 นาที ทั้งส่วนใส ทำซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายผสม adipic acid dihydrazide agarose beads กับ 300 μl 0.1 M sodium acetate (pH 5.0) บ่มสารละลาย RNA ที่เตรียมไว้กับ adipic acid dihydrazide agarose beads 12 ชั่วโมง ที่ 4°C บน rotator หลังจากนั้นล้าง RNA ส่วนเกินออกโดยใช้ 2 M NaCl ปริมาตร 1 ml 3 ครั้ง แล้วล้างอีก 3 ครั้งด้วย 1 ml buffer D (20 mM HEPES-KOH pH 7.6 , 5% glycerol , 100 mM KCl , 0.2 mM EDTA , 0.5 mM DTT) เติม HeLa nuclear extracts หรือ HeLa cytoplasmic extracts 1.25 mg ใน 250 μl buffer D แล้วบ่มที่ 30°C นาน 20 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 rpm 3 นาที ล้างตะกอน 4 ครั้งโดยใช้ 1 ml buffer D ที่เติม 400 mM NaCl และ 4 mM MgCl_2 ทำการ elute โปรตีนที่จับตัวกับชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอโดยเติม 60 μl protein loading buffer แล้วให้ความร้อนที่ 90°C นาน 5 นาที วิเคราะห์ขนาดโปรตีนที่แยกได้โดยใช้เทคนิค SDS - PAGE ด้วย 12% polyacrylamide gel