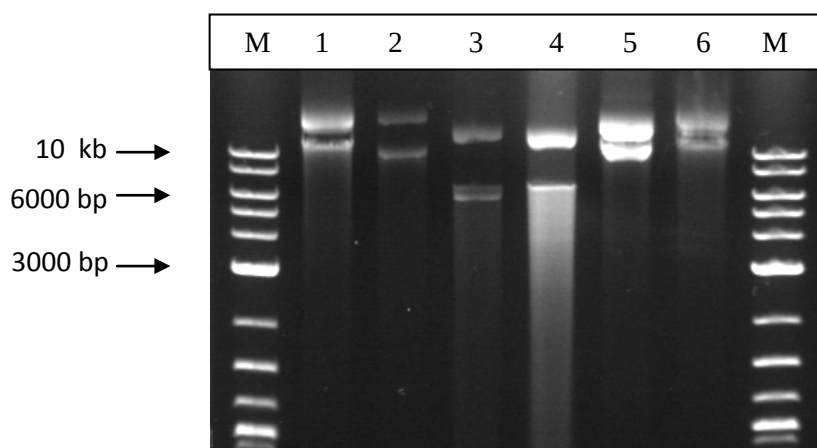


บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียมพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนของ papillomaviruses

ตัวอย่างพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนของ papillomavirus ที่ผู้วิจัยได้ทำการรวบรวมในขั้นต้นมีทั้งหมด 11 ทัปป์ ได้แก่ Human papillomavirus (HPV) -1, HPV-2, -4, -6, -11, -16, -31, Bovine papillomavirus (BPV) -1, -2, -3 และ -4 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr Sheila Graham, University of Glasgow, Scotland, UK และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นครินทร์ กิตกำธร ภาควิชาทันตพยาธิวิทยา คณะทันตแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยตัวอย่างพลาสมิดถูกหดยดลงบนกระดาดชกรองเมื่อถึงห้องปฏิบัติการไวรัส ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม ตัวอย่างชิ้นส่วนไวรัสทั้งหมดถูกเพิ่มจำนวนโดยการถ่ายโอน (transformation) เข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α และตรวจสอบขนาดชิ้นของพลาสมิดลูกผสมด้วย agarose gel electrophoresis (รูปที่ 4.1) ชิ้นส่วน late 3' UTR ของไวรัสทั้งหมดสังเคราะห์ขึ้นด้วยเทคนิคพีซีอาร์และใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้จำเพาะต่อทัปป์ (ตารางที่ 4.1) การยืนยันความถูกต้องของลำดับเบสและทัปป์ของไวรัสดำเนินการโดย sequencing ทั้งนี้มีไวรัสทั้งหมด 7 ชนิดคือ HPV-6, -11, -16, -31, BPV-1, -3 และ -4 ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้และยืนยันความถูกต้องของทัปป์ด้วยการตรวจลำดับเบสดังแสดงในรูป 4.2 โดยไวรัสเหล่านี้ถูกใช้ในการวิจัยต่อไป



รูปที่ 4.1 การแยกขนาดพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนของ papillomavirus 6 ทัปป์โดย agarose gel electrophoresis

- M : 2-log DNA ladder marker
- ช่องที่ 1 : พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนของ HPV-6
- ช่องที่ 2 : พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนของ HPV-11
- ช่องที่ 3 : พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนของ HPV-16
- ช่องที่ 4 : พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนของ HPV-31
- ช่องที่ 5 : พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนของ BPV-3
- ช่องที่ 6 : พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนของ BPV-4

2. การตรวจสอบการควบคุมการแสดงออกของยีนของชิ้นส่วน 3'UTR ของ papillomavirus ในระดับอาร์เอ็นเอ

การตรวจสอบประสิทธิภาพการควบคุมการแสดงออกของยีนของชิ้นส่วน 3'UTR ของไวรัสทั้ง 7 ท้ายดำเนินการโดยการแทรกชิ้นส่วนของไวรัสโนโมเข้าสู่ pSV ซึ่งมียีน β -galactosidase เป็น reporter gene ก่อนทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอ (co-transfection) เข้าสู่เซลล์ HeLa โดยใช้ lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) ร่วมกับ pEGFP โดย pEGFP เป็นพลาสมิดตรวจสอบประสิทธิภาพของการทดลอง (control) ในขั้นตอนทำการปรับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ co-transfection โดยหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณพลาสมิดกับปริมาตรของ lipofectamine 2000 จากนั้นทำการตรวจสอบและบันทึกผลหลังการ transfect ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% คาร์บอนไดออกไซด์เมื่อเวลาผ่านไป 24, 48 และ 72 ชั่วโมงโดยการถ่ายภาพเซลล์ที่มีการเรืองแสงของ green fluorescent protein (GFP) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนส์ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pEGFP มีการเรืองแสงสีเขียว ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการ transfection (transfection efficiency) ได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ลำดับเบสและตำแหน่ง annealing ของ Papillomavirus ทั้ง 7 ท้าย

Primer name	ขนาด PCR product	Restriction site	Genomic location	Sequence (5'-3')
UTR6 (forward)	499 bp	<i>Bam</i> HI	7185-7205	<u>GGATCC</u> CAAAGTGGATATAGGGGACGG
PAS6 (reverse)	-	<i>Pst</i> I	7651-7673	<u>CTGCAG</u> GGTGGAAAGTGATGCCAAGGGC
UTR11 (forward)	400 bp	<i>Bam</i> HI	7233-7251	<u>GGATCC</u> CCTCTACAGCCCCAAACG
PAS11 (reverse)	-	<i>Pst</i> I	7600-7622	<u>CTGCAG</u> GTAAGTGATGTAAGGGCAACCG
UTR16 (forward)	656 bp	<i>Bam</i> HI	6814-6842	<u>GGATCC</u> CTATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGG
PAS16 (reverse)	-	<i>Sal</i> I	7442-7460	<u>GTCGAC</u> CGAATTCGGTTGAAGCTAC
UTR31 (forward)	506 bp	<i>Bam</i> HI	6854-6872	<u>GGATCC</u> CAAAAGCCCAAGGAAGATC
PAS31 (reverse)	-	<i>Sal</i> I	7345-7374	<u>GTCGAC</u> GGCAGAAATAAGTACATGAC
UTR3 (forward)	533 bp	<i>Bam</i> HI	6668-6690	<u>GGATCC</u> GAG GAC CCT TAT GCA AAG TAC AC
PAS3 (reverse)	-	<i>Pst</i> I	7172-7190	<u>CTGCAG</u> GCG TAC TGC CAG TAT GTG C
UTR4 (forward)	359 bp	<i>Bam</i> HI	6906-6927	<u>GGATCC</u> CACTCAGGTTAAAGAAGACCCC
PAS4 (reverse)	-	<i>Sal</i> I	7236-7254	<u>GTCGAC</u> CACACAAGTGCCGGAGATG
BPV-1 forward	345 bp	<i>Bam</i> HI	6960-6976	<u>GGATCC</u> GCT TTC TTT GGA CTT AG
BPV-1 reverse	-	<i>Pst</i> I	7285-7305	<u>CTGCAG</u> CGC TGA GAA GGC AGG ATT CGG

ตารางที่ 4.2 Transfection efficiency ของ plasmid เข้าสู่ HeLa cells เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

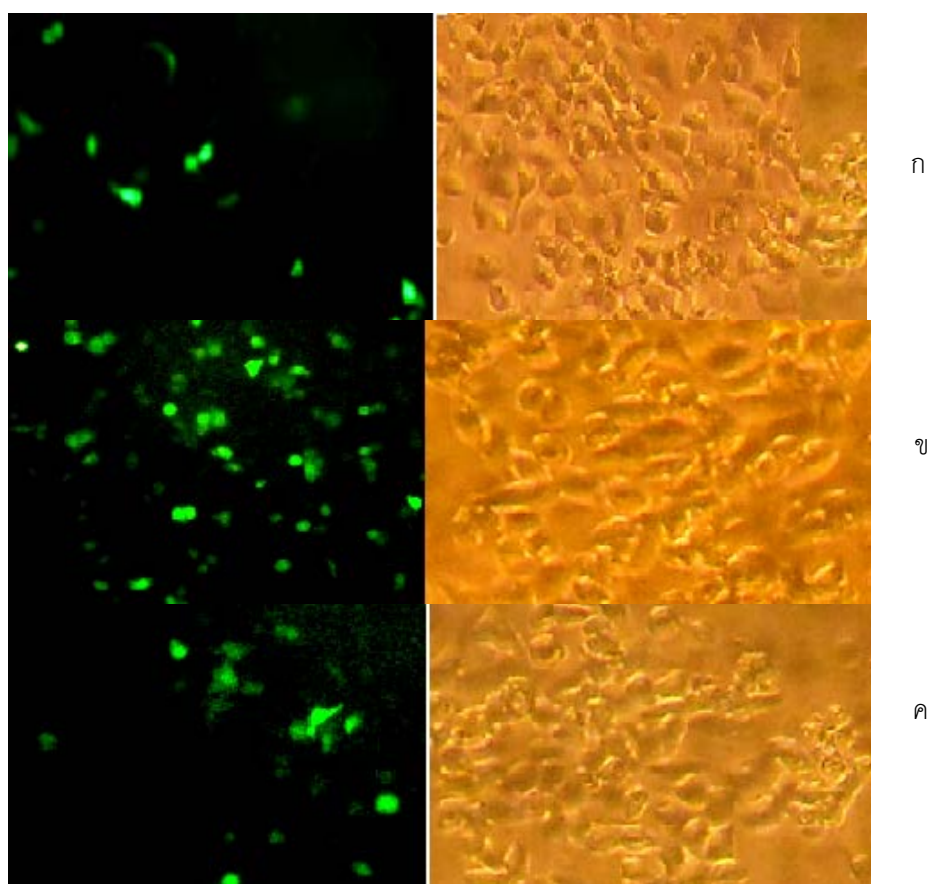
อัตราส่วน pEGFP:Lipofectamine 2000 (ug/ul)	Cell number (จำนวนเซลล์เรืองแสง / จำนวนเซลล์ทั้งหมดภายในรอบเดียวกัน)			% transfection efficiency
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0.4 : 2 (1: 5)	15/85	13/80	17/90	17± 1
0.8 : 2 (1:2.5)	50/72	59/86	65/92	69 ± 1
1.2 : 2 (1:1.6)	20/65	22/70	29/97	30± 1

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF092932.1	Human papillomavirus type 6, complete genome	489	601	76%	6e-135	98%
S80200.1	{L1-E6 region, long control region} [Human papillomavirus type 6b, t	457	457	48%	4e-125	94%
FR751325.1	Human papillomavirus type 6 complete genome, isolate CAC377	453	885	76%	5e-124	100%
FR751324.1	Human papillomavirus type 6 complete genome, isolate LP5	453	885	76%	5e-124	100%
FM897175.1	Human papillomavirus type 6 long control region, isolate LP5	453	453	48%	5e-124	94%
FM897174.1	Human papillomavirus type 6 long control region, isolate LP88	453	453	48%	5e-124	94%
FM897173.1	Human papillomavirus type 6 long control region, isolate LP184	453	453	48%	5e-124	94%
FM897172.1	Human papillomavirus type 6 long control region, isolate LP22	453	453	48%	5e-124	94%
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FN907963.1	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate CS20	329	329	87%	4e-87	100%
FN907962.1	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate CAC86	329	329	87%	4e-87	100%
FN907959.1	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate A47	329	329	87%	4e-87	100%
FN907958.1	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate A260	329	329	87%	4e-87	100%
FN870022.1	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate A346	329	329	87%	4e-87	100%
FN870021.1	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate A86	329	329	87%	4e-87	100%
EU918768.1	Human papillomavirus type 11 isolate LZod45-11, complete genome	329	329	87%	4e-87	100%
J04351.1	Human papillomavirus type 11 (HPV-11) DNA	329	329	87%	4e-87	100%
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF125673.1	Human papillomavirus type 16 isolate 16W12E, complete genome	1020	1020	100%	0.0	100%
AF404680.1	Human papillomavirus type 16 isolate HPV16URRCC13 L1 protein gene	655	655	64%	0.0	99%
AF404685.1	Human papillomavirus type 16 isolate HPV16URRCC18a L1 protein gene	654	654	64%	0.0	99%
AF404684.1	Human papillomavirus type 16 isolate HPV16URRCC17 L1 protein gene	654	654	64%	0.0	99%
AF404683.1	Human papillomavirus type 16 isolate HPV16URRCC16 L1 protein gene	654	654	64%	0.0	99%
AF404682.1	Human papillomavirus type 16 isolate HPV16URRCC15 L1 protein gene	654	654	64%	0.0	99%
AF404679.1	Human papillomavirus type 16 isolate HPV16URRCC12 L1 protein gene	654	654	64%	0.0	99%
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
J04353.1	Human papillomavirus type 31 (HPV-31) complete genome	647	647	91%	0.0	98%
U37410.1	Human papillomavirus type 31 variant L1 and L2 capsid protein gene	355	355	51%	1e-94	97%
AJ831566.1	Human papillomavirus type 31 proviral partial L1 gene for major capsid	121	121	20%	4e-24	92%
DQ440542.1	Human papillomavirus type 31 isolate 124 truncated L1 capsid protein	119	119	19%	1e-23	93%
DQ435771.1	Human papillomavirus type 31 isolate 128 L1 capsid protein gene, p	115	115	19%	2e-22	92%
Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gil22901309 AF486184.1	Rovine nanillomavirus type 3, complete genome	1019	1019	100%	0.0	100%
gil58725 X59062.1	Rovine nanillomavirus (type 3) L1, F8, F7 and F1 ORF DNA	1004	1004	100%	0.0	99%
gil40804492 AJ620207.1	Rovine nanillomavirus type 3 complete genome	623	1005	100%	4e-175	100%
gil896374 U21862.1	Rovine nanillomavirus type 3 L1 protein gene, partial cds	135	135	13%	4e-28	100%
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gil60862 X05817.1	Rovine nanillomavirus type 4 (BPV-4) genome	692	692	100%	0.0	100%
gil306476380 GQ471901.1	Rovine nanillomavirus minor capsid protein (L2) gene, partial cds; an	192	192	58%	1e-45	82%

Sequences producing significant alignments:

☐ pBPV cloning vector, complete sequence	1722	1722	98%	0.0	97%	U13843.1
☐ Bovine papillomavirus - 1 complete genome	1676	1676	92%	0.0	99%	X02346.1
☐ Bovine papillomavirus type 1 DNA, complete genome, country: Japan/Hokkaido	1648	1648	92%	0.0	98%	AB626705.1
☐ Bovine papillomavirus type 1 isolate Eqsarc1, complete genome	1620	1620	92%	0.0	98%	JX678969.1
☐ Bovine papillomavirus type 1 long control region variant II genomic sequence	1164	1164	67%	0.0	97%	DQ855066.1
☐ Bovine papillomavirus type 1 long control region variant III genomic sequence	1158	1158	67%	0.0	97%	DQ855067.1

รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบลำดับเบส (Blast search) แบบ blastn ของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน Genbank (<http://www.ncbi.nih.gov>)



รูปที่ 4.3 ภาพถ่ายเซลล์ HeLa ภายหลังจากได้รับการถ่ายโอน pEGFP ที่ 48 ชั่วโมง

ซ้าย : ภาพถ่ายภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ขวา : ภาพถ่ายจากแสงธรรมดา

(ก) pEGFP 0.4 ug : Lipofectamine 2000 ปริมาตร 2 ul

(ข) pEGFP 0.8 ug : Lipofectamine 2000 ปริมาตร 2 ul

(ค) pEGFP 1.2 ug : Lipofectamine 2000 ปริมาตร 2 ul

จากค่า transfection efficiency ในตารางที่ 4.2 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายโอน (transfect) pSV เข้าสู่เซลล์ได้อยู่ที่อัตราส่วน pEGFP + pSV 0.8 μ g : lipofectamine 2000 2.0 μ l ใน 24 well plate ปริมาณเซลล์ 6×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงซึ่งให้ประสิทธิภาพของ transfection ดีที่สุด จากนั้นทำการตรวจหาชิ้นส่วน late 3' UTR ที่แทรกอยู่ใน pSV- β -galactosidase จาก cell lysate ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ papillomavirus แต่ละทัยป์ ผลการตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย gel electrophoresis บน 1% อะกาโรสเจล (W/V) พบว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจจึงนำ cell lysate ที่ได้ไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

การตรวจสอบประสิทธิภาพของชิ้นส่วน late 3' UTR จาก papillomavirus แต่ละสายพันธุ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ของยีน *lac Z* ดำเนินการศึกษาโดยตรวจสอบปริมาณ RNA ของยีน *lac Z* ที่เกิดจากขั้นตอนการถอดรหัสใน cell lysate ของ HeLa cells ซึ่งผ่านการถ่ายโอน pEGFP (control) และ pSV- β -galactosidase ที่มีชิ้นส่วนยีนโมบริเวณ 3' UTR ของ papillomavirus แต่ละชนิด หลังจากทำการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, USA) สารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ถูกย่อยด้วย DNase ก่อนนำมาใช้เป็น template เพิ่มปริมาณยีน *lac Z* และยีน *GFP* ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ ผลการทดลองดังรูปที่ 4.4 ในขณะที่จำนวนของเซลล์ที่รับเอาพลาสมิดทั้งสองเข้าไปที่ใกล้เคียงกันในทุก 7 ทายป์ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ pEGFP (control) ซึ่งใช้ co-transfection พบว่าแถบดีเอ็นเอ

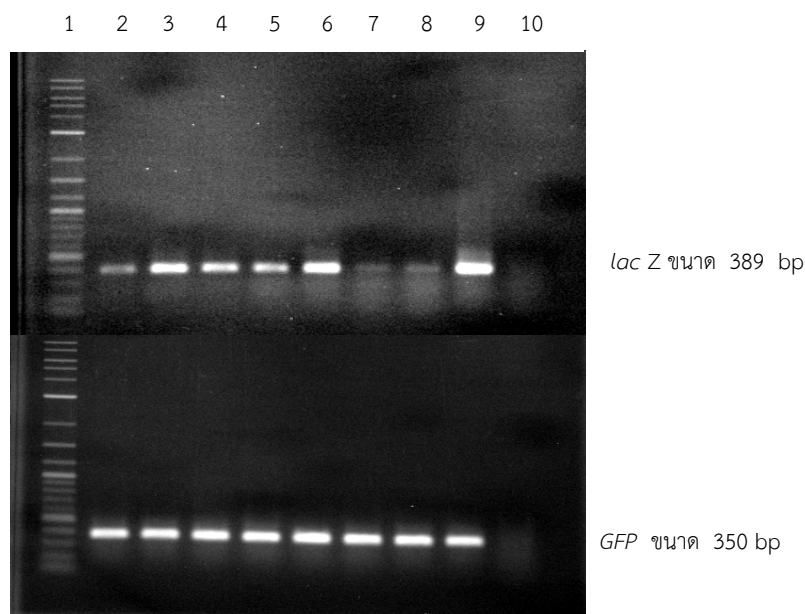
ของยีน *GFP* ใน PV ทั้ง 7 หัยป์มีความเข้มที่ใกล้เคียงกันทั้งหมดแต่ในรูปที่ 4.4 พบว่า PCR product ของ pSV ที่เป็น positive control ซึ่งไม่มี 3' UTR ของ PV ได้แถบตีเอนเอของยีน *lacZ* ที่มีความเข้มมากเมื่อเปรียบเทียบกับ pSV ที่มีขึ้น insert 3' UTR ของ HPV-16 และ -31 ซึ่งจัดว่าเป็น high risk types ได้แถบตีเอนเอที่จางมาก ส่วน low risk types ได้แก่ HPV-6 และ -11 รวมทั้งไวรัสที่มีโฮสต์เป็นวัวได้แก่ BPV-1, -3, และ -4 มีความเข้มข้นแถบตีเอนเอที่รองลงมาจาก positive control ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่าขึ้นส่วน 3' UTR ของยีน HPV-16 และ -31 มีลำดับเบสที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *lacZ* สูงในขณะที่ขึ้นส่วน 3' UTR จากยีนของ BPV-1, -3, -4, HPV-6 และ -11 มีประสิทธิภาพรองลงมา การทดลองนี้ดำเนินทั้งหมด 3 ครั้งและได้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นนำแถบของ PCR product ดังกล่าวไปวัดความเข้มของแถบ (band intensity) ด้วยโปรแกรม GelQuantNET (free programme) แล้วเปรียบเทียบความเข้มแถบของยีน *lacZ* และยีน *GFP* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าขึ้นส่วน 3' UTR ของ papillomavirus ทั้ง 7 หัยป์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน

การวัดความเข้มของแบนจากการวิเคราะห์หา RNA ของยีน *lacZ* และ *GFP* ด้วยเทคนิค RT-PCR บน 1% อะกาโรสเจลโดยใช้โปรแกรม GelQunattNET จาก <http://biochemlabsolutions.com/GelQuantNET.html> (free programme) ได้ผลดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.4 เมื่อนำค่าความเข้มของแบนที่วัดได้จากโปรแกรมมาคำนวณหาประสิทธิภาพของขึ้นส่วนเปรียบเทียบกันทั้งหมด 7 หัยป์จะได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.6 โดยพบว่ากราฟแท่งของ HPV-16 (high risk type) มีการแสดงออกของยีน *lacZ* น้อยที่สุด รองลงมาคือ HPV-31 (high risk type) และ BPV-1 ไวรัสถัปีที่มีการแสดงออกมากที่สุดคือ BPV-3 รองลงมาได้แก่ BPV-4, HPV-6, และ HPV-11 ตามลำดับ การทดลองนี้ดำเนินทั้งหมด 3 ครั้ง และได้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกันดังนั้น จึงสรุปได้ว่าขึ้นส่วน 3' UTR ของ papillomavirus ทั้ง 7 หัยป์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกแต่ในระดับที่แตกต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวปรากฏว่าที่ระดับนัยทางสถิติ 0.05 ได้ผลการปฏิเสธสมมติฐาน (p -value = 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05) แสดงว่าขึ้นส่วน 3'UTR ใน Papillomavirus 7 หัยป์มีประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน *lacZ* (ตารางที่ 4.4) เมื่อทำการเปรียบเทียบแบบพหุคูณด้วยวิธี Turkey's test (ตารางที่ 4.5) พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน *lacZ* ของขึ้นส่วน 3'UTR ใน Papillomavirus 7 หัยป์สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไวรัสที่มีความเสี่ยงเป็นมะเร็งสูง (high risk types) คือ HPV-16 และ -31 กลุ่มที่ 2 คือ BPV-1 และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยไวรัสที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งต่ำ (low risk types) ได้แก่ BPV-3, BPV-4, HPV-6, และ HPV-11 โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม high risk และ low risk จะพบว่ามี ความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

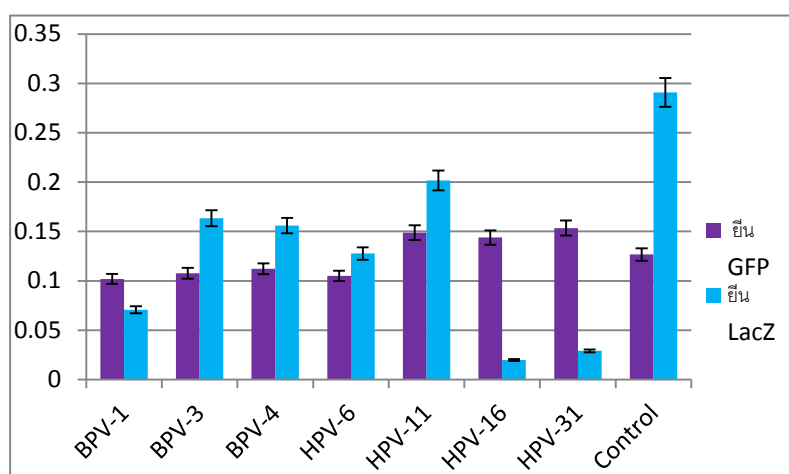
ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มของแบนที่วัดได้จากโปรแกรม GelQunattNET (ค่าเฉลี่ย 3 ครั้ง)

plasmid	ยีน <i>GFP</i>	ยีน <i>LacZ</i>	SD ยีน <i>LacZ</i>
BPV-1	0.102	0.0708	0.00857
BPV-3	0.1077	0.1634	0.026538
BPV-4	0.11228	0.1561	0.000841
HPV-6	0.10504	0.1277	0.011589
HPV-11	0.14881	0.2017	0.003663
HPV-16	0.14385	0.0198	0.001308
HPV-31	0.15352	0.0291	0.011738
Positive	0.1268	0.2909	0.038155

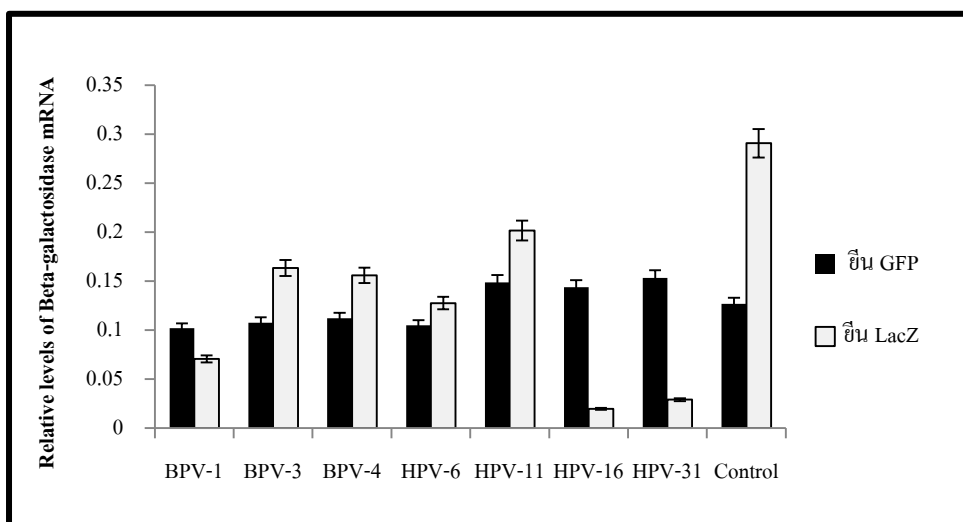


รูปที่ 4.4 การวิเคราะห์หา RNA ของยีน *lac Z* ด้วยเทคนิค RT-PCR บน 1% อะกาโรสเจล

- ช่องที่ 1 : 2 log DNA marker ladder
 ช่องที่ 2 : pSV- β -galactosidase ที่มีชิ้นส่วน late 3' UTR ของ BPV-1 + pEGFP
 ช่องที่ 3 : pSV- β -galactosidase ที่มีชิ้นส่วน late 3' UTR ของ BPV-3 + pEGFP
 ช่องที่ 4 : pSV- β -galactosidase ที่มีชิ้นส่วน late 3' UTR ของ BPV-4 + pEGFP
 ช่องที่ 5 : pSV- β -galactosidase ที่มีชิ้นส่วน late 3' UTR ของ HPV-6 + pEGFP
 ช่องที่ 6 : pSV- β -galactosidase ที่มีชิ้นส่วน late 3' UTR ของ HPV-11 + pEGFP
 ช่องที่ 7 : pSV- β -galactosidase ที่มีชิ้นส่วน late 3' UTR ของ HPV-16 + pEGFP
 ช่องที่ 8 : pSV- β -galactosidase ที่มีชิ้นส่วน late 3' UTR ของ HPV-31 + pEGFP
 ช่องที่ 9 : pSV- β -galactosidase + pEGFP (เติม reverse transcriptase)
 ช่องที่ 10 : pSV- β -galactosidase + pEGFP (ไม่เติม reverse transcriptase)



รูปที่ 4.5 ความเข้มของแถบ (band intensity) ยีน *lac Z* และยีน *GFP* ที่วัดด้วยโปรแกรม GelQuantNET



รูปที่ 4.6 ประสิทธิภาพการยับยั้งของชิ้นส่วน 3' UTR ในระดับอาร์เอ็นเอของ papillomavirus ทั้ง 7 ทั่วย

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอของไวรัส 7 ทั่วยโดยใช้ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA)

ANOVA

OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.060	6	.010	65.521	.000
Within Groups	.001	7	.000		
Total	.061	13			

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอของไวรัส 7 ทั่วยแบบพหุคูณโดยใช้วิธี Turkey's test

PVs

Tukey HSD

plasmid	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
HPV16	2	.0198150			
HPV31	2	.0290500			
BPV1	2		.0708000		
HPV6	2			.1276550	
BPV4	2			.1560550	.1560550
BPV3	2			.1634350	.1634350
HPV11	2				.2017200
Sig.		.984	.100	.178	.068

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวของ Human Papillomavirus 4 ทัณฑ์ (ตารางที่ 4.6) ปรากฏว่าที่ระดับนัยทางสถิติที่ 0.05 ปฏิเสธสมมติฐาน ($p\text{-value} = 0.001$ ซึ่งน้อยกว่า 0.05) แสดงว่าชิ้นส่วน 3'UTR ใน HPV 4 ทัณฑ์มีประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน *lacZ* และเมื่อทำการเปรียบเทียบแบบพหุคูณด้วยวิธี Turkey's test (ตารางที่ 4.7) พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน *lacZ* ของชิ้นส่วน 3'UTR ใน HPV 4 ทัณฑ์มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยสามารถแบ่งไวรัสออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม low risk ได้แก่ HPV-6 และ -11 และกลุ่ม high risk ได้แก่ HPV-16 และ -31

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอของไวรัส 7 ทัณฑ์โดยใช้ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA)

ANOVA					
OD					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.045	3	.015	208.497	.000
Within Groups	.000	4	.000		
Total	.045	7			

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอของไวรัส 7 ทัณฑ์แบบพหุคูณโดยใช้วิธี Turkey's test

PVs				
Tukey HSD				
plasmid	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
HPV16	2	.0198150		
HPV31	2	.0290500		
HPV6	2		.1276550	.1276550
HPV11	2			.2017200
Sig.		.714	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

3. การตรวจสอบการควบคุมการแสดงออกของยีนของชิ้นส่วน 3'UTR ของ papillomavirus ในระดับโปรตีน

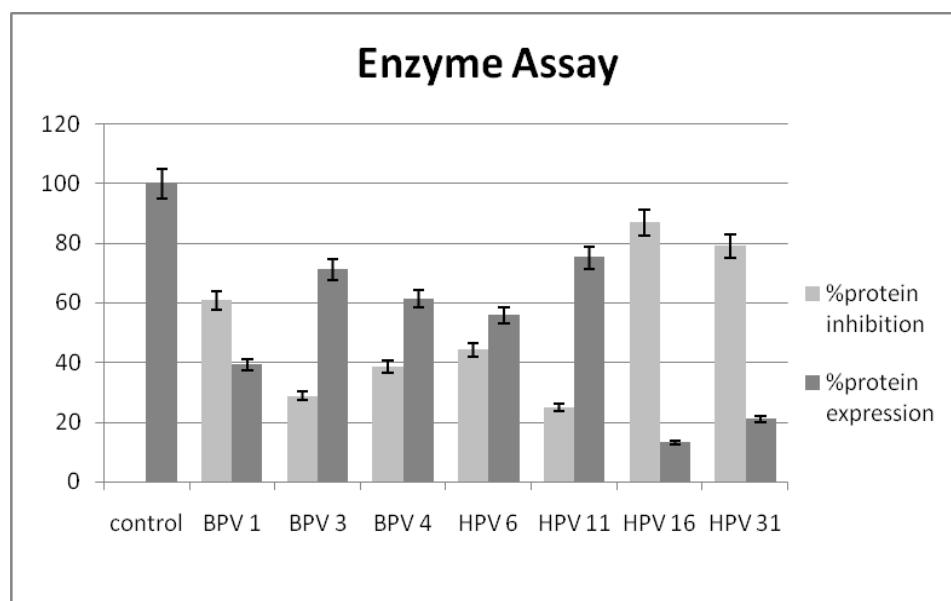
การตรวจสอบประสิทธิภาพการควบคุมการแสดงออกของยีนของชิ้นส่วน 3'UTR ของไวรัสทั้ง 7 ทัณฑ์ในระดับโปรตีนดำเนินการโดยการแทรกชิ้นส่วนของไวรัสยีนเข้าสู่ pSV ก่อนทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอ (co-transfection) เข้าสู่เซลล์ HeLa โดยใช้ lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) ร่วมกับ pEGFP โดย pEGFP เป็นพลาสมิดตรวจสอบประสิทธิภาพของการทดลอง (control) และมี pSV เป็น positive control หลังจากบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง cell lysate ถูกเก็บโดย lysis buffer (Promega, USA) หลังจากเติมซบสเตรทแล้วทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ก่อนคำนวณหาค่า % protein expression และ % protein inhibition ดังแสดงผลในตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.7

รูปที่ 4.7 เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนของยีน *lac Z* ระหว่างไวรัส 7 ทัยป์ ไวรัสกลุ่ม high risk types คือ HPV-16 และ -31 มีการสังเคราะห์โปรตีนน้อยที่สุดในขณะที่ชิ้นส่วน 3'UTR ของไวรัสกลุ่ม low risk types คือ HPV-6 และ -11 มีการแสดงออกของโปรตีน *lac Z* มากกว่า สำหรับกลุ่มของ BPV นั้นพบว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก BPV-1 มีการแสดงออกของโปรตีนน้อยที่สุดตามด้วย BPV-3 และ -4 ตามลำดับ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way Anova) (ตารางที่ 4.9) ปรากฏว่าที่ระดับนัยทางสถิติที่ 0.05 ค่าที่ได้น้อยกว่า 0.05 แสดงว่าชิ้นส่วน 3' UTR ใน papillomavirus 7 ทัยป์มีประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน *lac Z* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.000 เมื่อทำการเปรียบเทียบพหุคูณด้วยวิธี Turkey's test (ตารางที่ 4.4) ผลปรากฏว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน *lac Z* ของชิ้นส่วน 3' UTR ใน papillomavirus ทั้ง 7 ทัยป์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ตารางที่ 4.8 ค่าร้อยละของ protein inhibition และ protein expression จากชิ้นส่วน 3'UTR ของไวรัสแต่ละทัยป์

Type	%protein inhibition	%protein expression
control	0	100
BPV-1	61	39
BPV-3	29	71
BPV -4	39	61
HPV-6	44	56
HPV -11	25	75
HPV-16	87	13
HPV-31	79	21



รูปที่ 4.7 การเปรียบเทียบ % protein inhibition และ % protein expression ระหว่างไวรัส 7 ทัยป์

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกในระดับโปรตีนของไวรัส 7 ทายป์ทางสถิติโดยวิธี one-way ANOVA

ANOVA

%Protein inhibition

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7879.319	6	1313.220	32.929	.000
Within Groups	279.160	7	39.880		
Total	8158.479	13			

ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกในระดับโปรตีนของไวรัส 7 ทายป์ทางสถิติโดย Tukey's test

Tukey HSD

plasmid	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
BPV3	2	20.0998			
HPV11	2	22.3484			
BPV4	2	35.2536	35.2536		
BPV1	2		50.2473	50.2473	
HPV6	2			62.2096	62.2096
HPV31	2				76.2003
HPV16	2				85.0465
Sig.		.318	.327	.537	.075

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนของไวรัสในกลุ่ม HPV ทั้ง 4 ชนิด (ตารางที่ 4.11 และ 4.12) พบว่าที่ระดับนัยสถิติ 0.05 ชิ้นส่วน 3'UTR ใน HPV 4 ทายป์มีประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน *lac Z* และเมื่อเปรียบเทียบพหุคูณด้วยวิธี Tukey's test พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน *lac Z* ของชิ้นส่วน 3'UTR ใน HPV 4 ทายป์มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยสามารถแบ่ง HPV ออกได้เป็น 2 กลุ่มทางสถิติคือกลุ่ม low risk ได้แก่ HPV-6 และ -11 และกลุ่ม high risk ได้แก่ HPV-16 และ -31

ตารางที่ 4.11 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกในระดับโปรตีนของไวรัส 4 ทายป์ทางสถิติโดยวิธี one-way ANOVA

ANOVA

%Protein inhibition

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4607.764	3	1535.921	54.472	.001
Within Groups	112.786	4	28.197		
Total	4720.551	7			

ตารางที่ 4.12 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกในระดับโปรตีนของไวรัส 4 ทายป์ทางสถิติโดย Tukey's test

Tukey HSD

plasmid	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
HPV11	2	22.3484	
HPV6	2	62.2096	
HPV31	2		76.2003
HPV16	2		85.0465
Sig.		1.000	.442

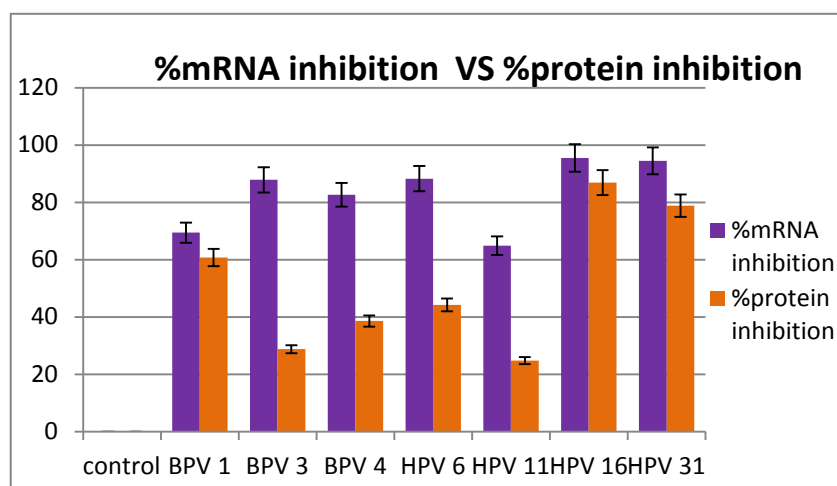
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

รูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.13 เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนของชิ้นส่วน 3'UTR จากไวรัสทั้ง 7 ทายป์ระหว่างระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีน จากกราฟจะเห็นว่า การยับยั้งการแสดงออกของยีนส่วนใหญ่อยู่ในระดับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอซึ่งส่วนใหญ่มีค่าร้อยละของประสิทธิภาพอยู่ในที่มากกว่าร้อยละ 80 ยกเว้น BPV-1 และ HPV-11 ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำกว่าคืออยู่ที่ประมาณร้อยละ 70 และ 65 ตามลำดับ ชิ้นส่วน 3'UTR ของไวรัสทุกทายป์มีประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับการสังเคราะห์โปรตีนเช่นกันแต่น้อยกว่าในระดับอาร์เอ็นเอ ทั้งนี้มีไวรัสกลุ่ม high risk types ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนสูงคือมีค่าร้อยละประมาณ 80 ลำดับรองลงมาคือ BPV-1 มีค่าอยู่ที่ร้อยละ 60 ส่วนไวรัสกลุ่ม low risk types และ BPV ชนิดอื่นมีประสิทธิภาพการยับยั้งการสังเคราะห์ที่ต่ำคืออยู่ที่ค่าร้อยละในช่วง 20 ถึง 40

ตารางที่ 4.13 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของชิ้นส่วน 3'UTR ในไวรัส 7 ทายป์ที่ระดับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและการสังเคราะห์โปรตีน

Type	%mRNA inhibition	%protein inhibition
control	0	0
BPV 1	69	61
BPV 3	88	29
BPV 4	83	39
HPV 6	88	44
HPV 11	65	25
HPV 16	96	87
HPV 31	95	79



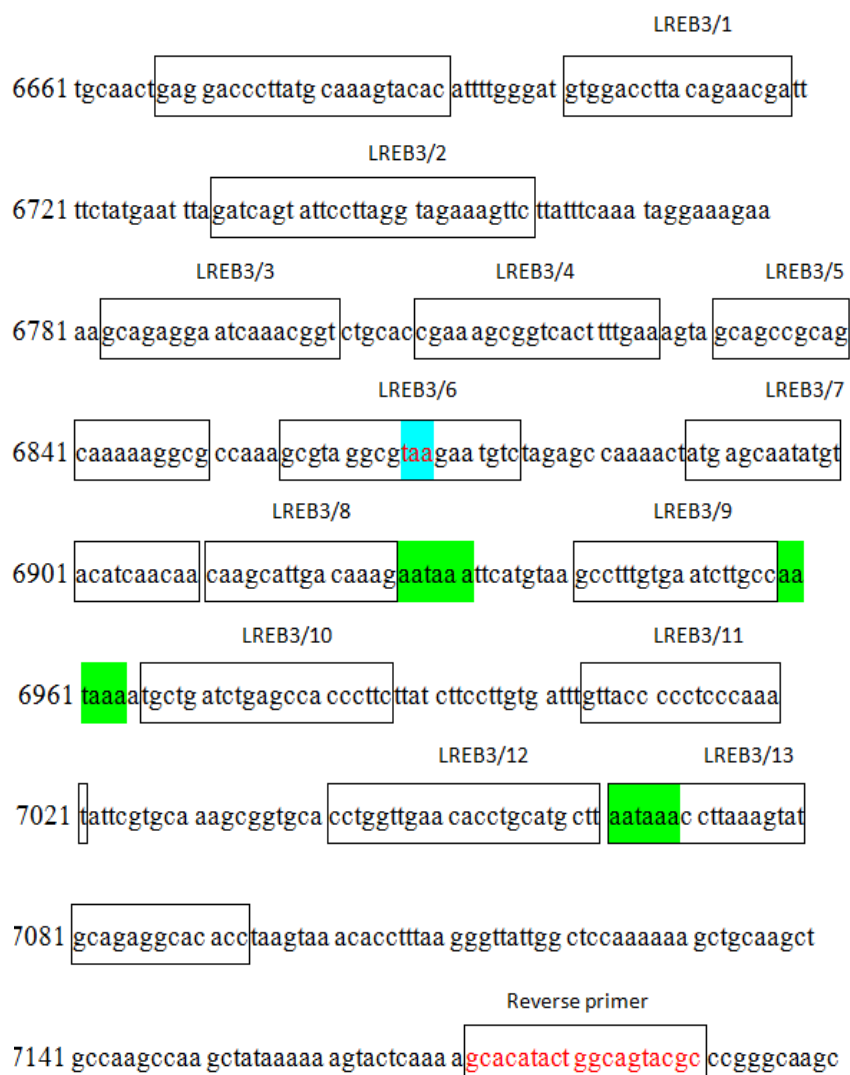
รูปที่ 4.8 การยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีนของไวรัส 7 ทยป์

4. การวิเคราะห์หา inhibitory RNA element ของ BPV-3

การศึกษาหาลำดับเบสส่วน inhibitory element ของยีน BPV-3 ดำเนินการโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อทำ deletion ลำดับเบสส่วน late 3'UTR ของยีนไวรัสตั้งแต่ส่วน 3' ของ L1 ORF ไปถึง poly A signal ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะดังแสดงในตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.9 จากนั้นทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนเข้าสู่ pSV- β -galactosidase แล้ว co-transfection เข้าสู่ HeLa cells พร้อมกับ pEGFP ก่อนทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ galactosidase เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของชิ้นส่วนยีนไวรัสในการยับยั้งการแสดงออกของยีน

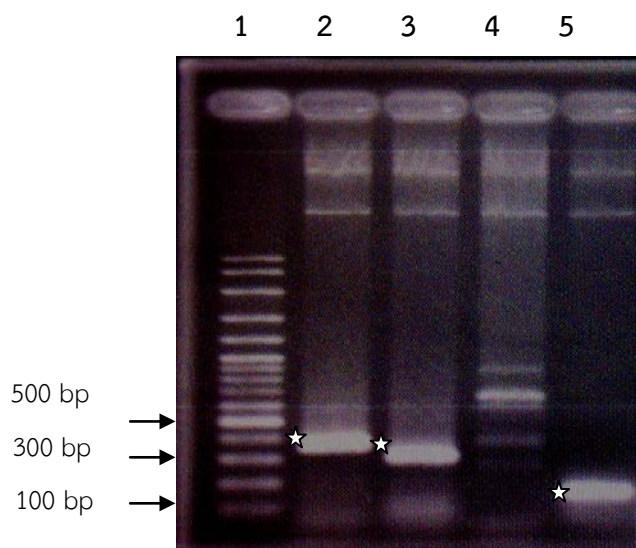
ตารางที่ 4.14 ไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อศึกษาหา inhibitory element ใน 3'UTR ของยีน BPV-3 โดยวิธี deletion

Primer name	Restriction site	Genomic location	Sequence (5'-3')
BPV-3 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	6668-6690	<u>GGATCC</u> GAG GAC CCT TAT GCA AAG TAC AC
BPV-3 reverse	<i>Pst</i> l	7172-7190	<u>CTGCAG</u> GCG TAC TGC CAG TAT GTG C
LREB3/1 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	6701-6718	<u>GGATCC</u> GTG GAC CTT ACA GAA CGA
LREB3/2 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	6734-6757	<u>GGATCC</u> GTG GAC CTT ACA GAA CGA
LREB3/3 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	6783-6799	<u>GGATCC</u> GCA GAGGAA TCA AAC GG
LREB3/4 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	6807-6825	<u>GGATCC</u> CGA AAG CGG TCA CTT TTG A
LREB3/5 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	6831-6850	<u>GGATCC</u> GCA GCC GCA GCA AAA AGG CG
LREB3/6 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	6856-6874	<u>GGATCC</u> GCG TAG GCG TAA GAA TGT C
LREB3/7 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	6898-6910	<u>GGATCC</u> ATG AGC AAT ATG TAC ATC AAC AA
LREB3/8 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	6911-6925	<u>GGATCC</u> CAA GCA TTG ACA AAG
LREB3/9 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	6941-6958	<u>GGATCC</u> CAA GCA TTG ACA AAG
LREB3/10 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	6977-6986	<u>GGATCC</u> GCT GAT CTG AGC CAC CCT TC
LREB3/11 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	7005-7021	<u>GGATCC</u> GTT ACC CCC TCC CAA AT
LREB3/12 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	7041-7063	<u>GGATCC</u> CTT GGT TGA ACA CCT GCA TGC TT
LREB3/13 forward	<i>Bam</i> <i>H</i> l	7064-7093	<u>GGATCC</u> AAT AAA CCT TAA AGT ATG CAG AGG CAC ACC



รูปที่ 4.9 ตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 13 คู่ที่ออกแบบเพื่อการเตรียมชิ้นส่วนสำหรับการตรวจหาลำดับเบสที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการแสดงออกของยีน BPV-3

ในขั้นตอนเลือกศึกษาโดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 4 คู่ได้แก่ LREB3/5, LREB3/7, LREB3/9 และ LREB3/12 สามารถโคลนชิ้นส่วนได้ 3 คู่คือ LREB3/5, LREB3/7 และ LREB3/12 ส่วนไพรเมอร์คู่ LREB3/9 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจได้ (รูปที่ 4.10) หลังจาก transfect พลาสมิดที่เตรียมได้เข้าสู่ HeLa cells แล้วทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์ β -galactosidase จากผลการทดลอง พบว่าการแสดงออกของโปรตีนหรือกิจกรรมของเอนไซม์ที่วัดได้จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไพรเมอร์คู่ที่ BPV-3/7 ให้ค่าสูงที่สุดซึ่งสูงกว่าชิ้นส่วน 3'UTR ก่อน deletion จากไพรเมอร์คู่ BPV-3 ส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากไพรเมอร์คู่ที่ BPV-3/12 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำที่สุดคิดเป็นร้อยละ 17.45 (ตารางที่ 4.15; รูปที่ 4.11)

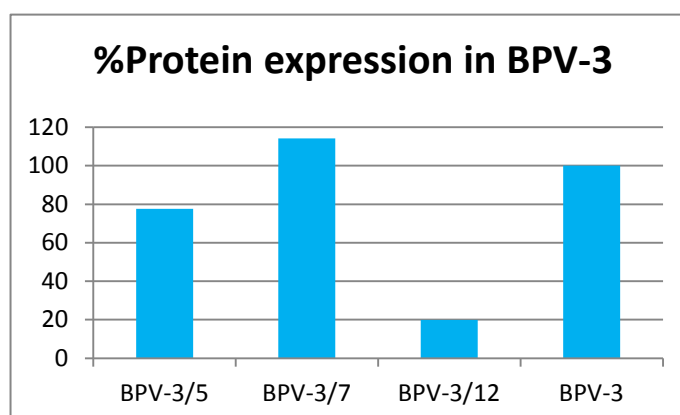


รูปที่ 4.10 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 3'UTR ของยีน BPV-3 โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะสำหรับการ delete ลำดับเบส

- ช่องที่ 1 : 100 bp ladder
 ช่องที่ 2 : LREB3/5 ขนาด 359 bp (ดาว)
 ช่องที่ 3 : LREB3/7 ขนาด 292 bp (ดาว)
 ช่องที่ 4 : LREB3/9
 ช่องที่ 5 : LREB3/12 ขนาด 149 bp (ดาว)

ตารางที่ 4.15 ผลการวัดกิจกรรมเอนไซม์ β -galactosidase จาก HeLa cell lysate ที่ transfect ด้วยพลาสมิดซึ่งมีชิ้นส่วนขนาดต่างๆของ 3'UTR ของ BPV-3

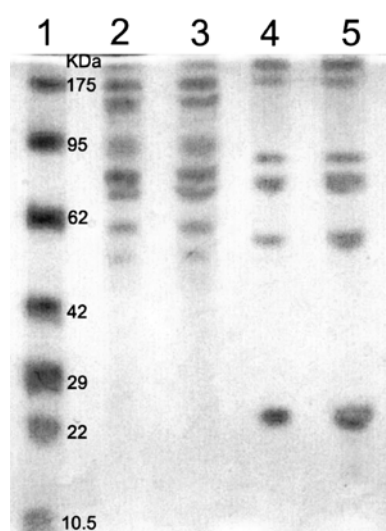
ไพรเมอร์	ค่าการดูดกลืนแสง	% โปรตีนที่แสดงออก
BPV-3/5	0.405	67.95
BPV-3/7	0.596	114.18
BPV3/12	0.104	17.45
BPV-3	0.522	100.00



รูปที่ 4.11 ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอของชิ้นส่วน 3' UTR ที่มีการตัดลำดับเบสบางส่วนออกของ BPV-3

5. การวิเคราะห์ protein/LRE-RNA complex โดยวิธี affinity chromatography

การวิเคราะห์ protein/LRE-RNA complex โดยใช้วิธี affinity chromatography เริ่มต้นโดยการเตรียม cell extract จาก HeLa cells แล้วแยกส่วนของโปรตีนออกเป็น nuclear extract และ cytoplasmic extract จากนั้นทำการตรวจสอบการแยกส่วนของโปรตีนทั้งสองส่วนโดย SDS-PAGE ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.11 ซึ่งจากภาพแสดงให้เห็นถึงโปรตีนที่แยกได้จากแต่ละส่วนของเซลล์โดยพิจารณาจากรูปแบบแถบแบนโปรตีนที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่าง extract ของ นิวเคลียสและไซโตรพลาสซึม อย่างไรก็ตามวิธีที่สามารถใช้ยืนยันการแยกส่วนของโปรตีนระหว่างนิวเคลียสและไซโตรพลาสซึมคือเทคนิค western blot analysis แต่ไม่ได้ทำการศึกษาในการทดลองครั้งนี้เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวต้องใช้แอนติบอดีอย่างน้อย 2 ชนิดซึ่งมีราคาแพงมากโดยที่ผู้วิจัยไม่ได้ของบประมาณสำหรับสารดังกล่าวในงานวิจัยนี้ เมื่อเตรียมส่วนของ cellular extract ทั้งส่วนนิวเคลียสและไซโตรพลาสซึมแล้วขั้นตอนต่อไปคือการเตรียมชิ้นส่วน 79 nt LRE-RNA ด้วยวิธี *in vitro* transcription โดยใช้ DNA template ที่ได้เตรียมไว้จากการทดลองข้างต้นและได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.11 การตรวจสอบ nuclear extract และ cytoplasmic extract ที่สกัดจาก HeLa cells บน SDS-PAGE

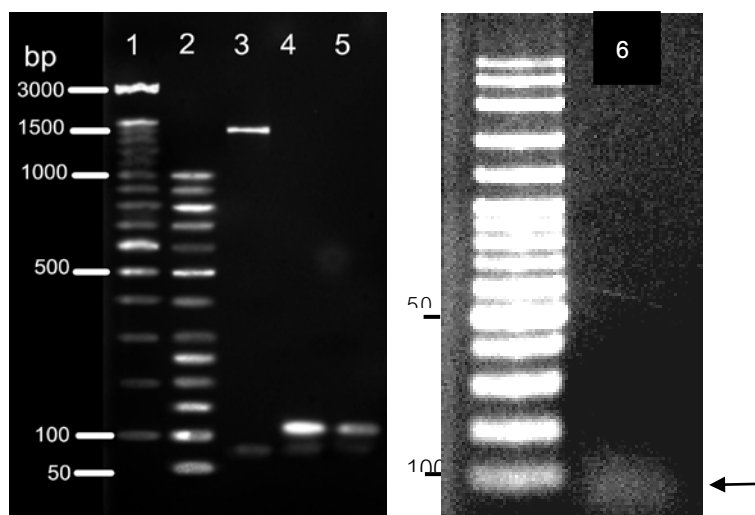
ช่องที่ 1 : Protein Marker

ช่องที่ 2 : Cytoplasmic Extract (loading 10 μ l)

ช่องที่ 3 : Cytoplasmic Extract (loading 20 μ l)

ช่องที่ 4 : Nuclear Extract (loading 10 μ l)

ช่องที่ 5 : Nuclear Extract (loading 20 μ l)



รูปที่ 4.12 DNA template และชิ้นส่วน 79 nt LRE-RNA ที่สังเคราะห์โดยวิธี *in vitro* transcription

ช่องที่ 1 : 100 bp ladder

ช่องที่ 2 : 50 bp ladder

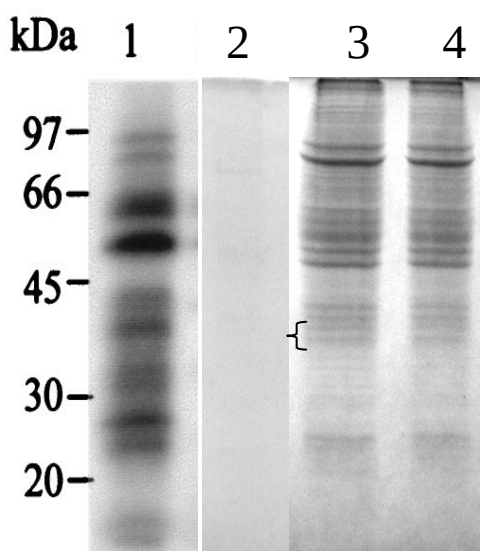
ช่องที่ 3 : Control template + Product

ช่องที่ 4 : DNA template with T7 promotor + Product (20 ไมโครลิตร)

ช่องที่ 5 : DNA template with T7 promotor + Product (10 ไมโครลิตร)

ช่องที่ 6 : 79 nt LRE-RNA (ลูกศร)

หลังจากเตรียม cellular extract และ 79 nt LRE-RNA แล้วจึงได้ทำการศึกษา protein-RNA complex ด้วยวิธี affinity chromatography โดยเริ่มศึกษากับส่วน cytoplasmic extract ก่อนเนื่องจากในงานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่เป็นการรายงานถึงโปรตีนคอมเพล็กซ์ในนิวเคลียส (Cumming และคณะ, 2003; McPhillips และคณะ, 2004; Chuen-lm และคณะ, 2008; Cumming และคณะ, 2009; ในรูปที่ 4.13 เป็นผลการแยกโปรตีนชนิดต่างๆที่จับตัวเป็นคอมเพล็กซ์กับ 79 nt LRE-RNA ด้วย SDS-PAGE โดยแต่ละแถบแบนที่พบบนเจลคือโปรตีนแต่ละชนิดซึ่งจากภาพเมื่อเปรียบเทียบกับช่องที่ 2 ที่เป็นการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติม 79 nt LRE-RNA หรือ negative control จะเห็นว่าในช่องที่ 3 และ 4 ที่เป็นการทดลองนั้น มีแถบแบนโปรตีนเป็นจำนวนมากปรากฏอยู่ บ่งบอกถึงมีโปรตีนสมาชิกของคอมเพล็กซ์เป็นจำนวนมาก ในช่องที่ 1 คือแถบแบนโปรตีนจากนิวเคลียสที่จับตัวเป็นคอมเพล็กซ์กับ 79 LRE-RNA ที่ Cumming และคณะ (2003) ได้เคยรายงานไว้หากเปรียบเทียบแถบโปรตีนในช่องที่ 1 (นิวเคลียส) กับช่องที่ 2 และ 3 (ไซโทพลาสซึม) จะเห็นว่าขนาดโปรตีนที่ใกล้เคียงกันและแตกต่างกันแสดงให้เห็นว่ามีโปรตีนบางชนิดที่จับตัวเป็นคอมเพล็กซ์ทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม ในขณะที่โปรตีนบางชนิดจะจับตัวเป็นคอมเพล็กซ์เมื่ออยู่ในนิวเคลียสหรืออยู่ในไซโทพลาสซึมเท่านั้น



รูปที่ 4.13 รูปแบบโปรตีนในไซโทพลาซึมของ HeLa cell ที่จับกับ 79 nt LRE RNA ตรวจสอบโดยใช้ 12% SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie blue

ช่องที่ 1 : โปรตีนในนิวเคลียสของเซลล์ที่จับกับ 79 nt LRE RNA (Cumming และคณะ, 2003)

ช่องที่ 2 : ชุดควบคุม (negative control) ที่ไม่มีการเติม 79 nt LRE-RNA (cytoplasmic extracts กับ beads)
20 ไมโครลิตร

ช่องที่ 3 : โปรตีนในไซโตรพลาสซึมของเซลล์ที่จับกับ 79 nt LRE RNA 30 ไมโครลิตร ({ แสดงโปรตีนที่มีขนาดอยู่ในช่วงระหว่าง 36-39 kDa)

ช่องที่ 4 : โปรตีนในไซโตรพลาสซึมของเซลล์ที่จับกับ 79 nt LRE RNA 20 ไมโครลิตร

หากพิจารณาโปรตีนที่มีการรายงานว่าจับตัวเป็นคอมเพล็กซ์กับ 79 nt LRE-RNA และมีการเดินทางเข้า-ออกระหว่างนิวเคลียสและไซโตรพลาสซึมจะพบว่ามีอยู่ 2 ชนิดคือ HuR และ hnRNP A1 ซึ่งมีขนาดประมาณ 36 kDa และ 39 kDa ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนในรูปที่ 4.13 จะพบว่าอยู่ช่วงแถบแบนที่มีเครื่องหมาย { ระบุอยู่ ส่วนแถบแบนโปรตีนอื่นๆนั้นเป็นโปรตีนที่ยังไม่มีการจำแนกชนิดและจะต้องมีการศึกษาต่อไป