

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง	24
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	41
เอกสารอ้างอิง	44

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 อนุภาคของ Papillomaviruses	4
รูปที่ 2.2 phylogenetic tree ของ papillomaviruses 92 ชนิดโดยใช้ 291 bp ของยีน L1 ในการวิเคราะห์	6
รูปที่ 2.3 โครงสร้างและ coding region ของ papillomavirus DNA	6
รูปที่ 2.4 โครงสร้างและ coding region ของ papillomavirus DNA (ในรูปแบบ linear)	7
รูปที่ 2.5 Long control region (LCR) ของยีน papillomaviruses	8
รูปที่ 2.6 วงจรชีวิตของ papillomaviruses หลังจากที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ฐาน (basal cells) ของเยื่อผิว (epithelium)	9
รูปที่ 2.7 ตำแหน่ง 79 nucleotide late regulatory element (LRE) บนยีนของ HPV-16	12
รูปที่ 2.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 79-nt LRE ของ HPV 16	12
รูปที่ 2.9 ชิ้นส่วน inhibitory element ของ HPV-1 ขนาด 57 นิวคลีโอไทด์	13
รูปที่ 2.10 ชิ้นส่วน inhibitory element ของ HPV31 ขนาด 240 นิวคลีโอไทด์	14
รูปที่ 2.11 ชิ้นส่วน inhibitory element ของ BPV-1 ขนาด 53 นิวคลีโอไทด์	14
รูปที่ 2.12 CAT reporter plasmid ที่มี insert ของ late 3' UTR	15
รูปที่ 3.1 แผนที่ของ pGEM - T Easy Vector ขนาด 3015 bp	16
รูปที่ 3.2 แผนที่ของ pSV- β -Galactosidase control Vector ขนาด 6820 bp	17
รูปที่ 3.3 แผนที่ของ pEGFP control Vector ขนาด 4700 bp	17
รูปที่ 4.1 การแยกขนาดพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนของ papillomavirus 6 ทัยป์โดย agarose gel electrophoresis	24
รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบลำดับเบส (Blast search) แบบ blastn ของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน Genbank	26
รูปที่ 4.3 ภาพถ่ายเซลล์ HeLa ภายหลังได้รับการถ่ายโอน pEGFP ที่ 48 ชั่วโมง	27
รูปที่ 4.4 การวิเคราะห์หา RNA ของยีน <i>lac Z</i> ด้วยเทคนิค RT-PCR บน 1% อะกาโรสเจล	29
รูปที่ 4.5 ความเข้มของแถบ (band intensity) ยีน <i>lac Z</i> และยีน <i>GFP</i> ที่วัดด้วยโปรแกรม GelQuantNET	29
รูปที่ 4.6 ประสิทธิภาพการยับยั้งของชิ้นส่วน 3' UTR ในระดับอาร์เอ็นเอของ papillomavirus ทั้ง 7 ทัยป์	30
รูปที่ 4.7 การเปรียบเทียบ % protein inhibition และ % protein expression ระหว่างไวรัส 7 ทัยป์	32
รูปที่ 4.8 การยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีนของไวรัส 7 ทัยป์	35
รูปที่ 4.9 ตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 13 คู่ที่ออกแบบเพื่อการเตรียมชิ้นส่วนสำหรับการตรวจหาลำดับเบส ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการแสดงออกของยีน BPV-3	36
รูปที่ 4.10 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 3'UTR ของยีน BPV-3 โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะ สำหรับการ delete ลำดับเบส	37
รูปที่ 4.11 ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอของชิ้นส่วน 3' UTR ที่มีการตัดลำดับเบสบางส่วนออกของ BPV-3	37
รูปที่ 4.11 การตรวจสอบ nuclear extract และ cytoplasmic extract ที่สกัดจาก HeLa cells บน SDS-PAGE	38
รูปที่ 4.12 DNA template และชิ้นส่วน 79 nt LRE-RNA ที่สังเคราะห์โดยวิธี <i>in vitro</i> transcription	39

	หน้า
รูปที่ 4.13 รูปแบบโปรตีนในไซโทพลาซึมของ HeLa cell ที่จับกับ 79 nt LRE RNA ตรวจสอบโดยใช้ 12% SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie blue	40
รูปที่ 5.1 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางบรรพบุรุษระหว่าง PVs 6 ชนิด	45

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 การจัดแบ่งกลุ่มของ HPV types กับการเกิดเนื้องอกชนิดต่าง ๆ ในคน	11
ตารางที่ 2.2 ชนิดและหน้าที่ของโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับ LRE ของ HPV-16	13
ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน late 3'UTR	18
ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของปฏิกิริยา อาร์-ที พีซีอาร์ ของยีน <i>lac Z</i>	21
ตารางที่ 4.1 ลำดับเบสและตำแหน่ง annealing ของ Papillomavirus ทั้ง 7 otyp	25
ตารางที่ 4.2 Transfection efficiency ของ plasmid เข้าสู่ HeLa cells เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	25
ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นของแบนด์ที่ได้จากโปรแกรม GelQuantNET (ค่าเฉลี่ย 3 ครั้ง)	29
ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ของไวรัส 7 otyp โดยใช้ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way Anova)	30
ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ของไวรัส 7 otyp แบบพหุคูณโดยใช้วิธี Turkey's test	30
ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ของไวรัส 7 otyp โดยใช้ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way Anova)	31
ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ของไวรัส 7 otyp แบบพหุคูณโดยใช้วิธี Turkey's test	31
ตารางที่ 4.8 ค่าร้อยละของ protein inhibition และ protein expression จากชิ้นส่วน 3'UTR ของไวรัสแต่ละ typ	32
ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกในระดับโปรตีนของไวรัส 7 otyp ทางสถิติโดยวิธี one-way Anova	33
ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกในระดับโปรตีนของไวรัส 7 otyp ทางสถิติโดย Tukey's test	33
ตารางที่ 4.11 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกในระดับโปรตีนของไวรัส 4 otyp ทางสถิติโดยวิธี one-way Anova	33
ตารางที่ 4.12 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกในระดับโปรตีนของไวรัส 4 otyp ทางสถิติโดย Tukey's test	34
ตารางที่ 4.13 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของชิ้นส่วน 3'UTR ใน ไวรัส 7 otyp ที่ระดับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและการสังเคราะห์โปรตีน	34

	หน้า
ตารางที่ 4.14 ไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อศึกษาหา inhibitory element ใน 3'UTR ของยีนโนม BPV-3 โดยวิธี deletion	35
ตารางที่ 4.15 ผลการวัดกิจกรรมเอนไซม์ β -galactosidase จาก HeLa cell lysate ที่ transfect ด้วยพลาสมิดซึ่งมีชิ้นส่วนขนาดต่างๆของ 3'UTR ของ BPV-3	37