3. วิธีดำเนินการวิจัย (Method)

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ cervicovaginal lavage (CVL) และชิ้นเนื้อปากมดลูกของผู้หญิงที่มีเซลล์ปากมดลูกผิดปกติในระยะแรก (LSIL) ซึ่งได้รับการตรวจภายใน และเก็บชิ้นเนื้อภายใต้การตรวจ colposcopy โดย oncologist และเซลล์ปากมดลูกจากกลุ่มการศึกษาดังกล่าวได้รับการตรวจแล้วว่ามี HPV genotype ชนิดใดใน scraped cervical cells กลุ่มตัวอย่างที่ติดเชื้อ HPV นี้ถูกแบ่ง เป็นสองกลุ่มคือ กลุ่ม cases ซึ่งให้การรักษาโดย cryosurgery และกลุ่ม control ซึ่งไม่ได้รับการรักษา

หลังจากได้รับการรักษา 6 เดือน CVL และ scraped cervical cells ถูกเก็บจากกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม เพื่อตรวจหาระดับ cytokines และ HPV genotype ตามลำดับ

วิธีการเก็บ CVL ทำโดยใช้ normal saline solution 2 ml ที่บรรจุใน syringe ฉีดล้างบริเวณปากมดลูก แล้วดูดสารน้ำที่ไปสะสมอยู่บริเวณ posterior vaginal fornix ใส่ใน sterile tube แช่ในน้ำแข็งแล้วรีบนำไปที่ห้องปฏิบัติการ เพื่อแบ่งเก็บใน sterile microcentrifuge tube 2 หลอดๆ ละ 1 ml แล้วเก็บที่ -80°C จนกว่าจะนำไปใช้ ส่วนชิ้นเนื้อปากมดลูกได้จาก biopsy เก็บใส่ sterile microcentrifuge tube แล้วเก็บที่ -80°C จนกว่าจะนำไปใช้

3.2 การตรวจวัดหาระดับ TNF-alpha, IL-10 และ IFN-γ โดยวิธี ELISA

นำตัวอย่างตรวจชนิด CVL มาตรวจหาปริมาณโปรตีน และวัดหาระดับ TNF-alpha, IL-10 และ IFN-γ โดยวิธี ELISA โดยใช้ commercial kit (PeproTech Inc, Rocky Hill, USA.)

3.2.1 การหาปริมาณโปรตีนใน CVL

นำตัวอย่างตรวจชนิด CVL ของผู้หญิงที่มีเซลล์ปากมดลูกผิดปกติในระยะแรก (LSIL) จำนวน 100 ราย มาตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bio-Rad Protein Assay

1. เตรียม bovine serum albumin (BSA) standard solution โดยจะถูกเจือจางเป็นลำดับส่วน (Serial dilution) ที่มีความเข้มข้น 1.2-10.0 µg/ml และนำแต่ละ dilution มา เพื่อสร้าง standard curve เพื่อหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างตรวจ CVL

2. ปิเปต standard solution ความเข้มข้น 1.2-10.0 µg/ml ลงในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 800 µl และปิเปต CVL ลงในหลอดทดลองตัวอย่างละ 800 µl

3. ปิเปต Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดๆละ 200 µl

4. เขย่าให้เข้ากันโดย vortex และบ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

3.2.2 การหาระดับ TNF-alpha, IL-10 และ IFN-γ

1. เคลือบ capture antibody (antigen-affinity purified rabbit anti- hIFN-γ + 2.5mg D-mannitol) ความเข้มข้น 1 μg/ml ลง ELISA plate หลุมละ 100 μl ปิดฝาและบ่มที่อุณหภูมิห้อง 16-18 ชั่วโมง

2. ดูด capture antibody ออกและล้างด้วย wash buffer (0.05% Tween-20 in 1xPBS) หลุมละ 300 μl 4 ครั้ง โดยเคาะ plate กับผ้าเพื่อทิ้ง wash buffer ให้หมด

3. เติม block buffer (1% BSA in 1xPBS) หลุมละ 300 μl และบ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

4. ดูด block buffer ออก และ ล้างด้วย wash buffer (0.05% Tween-20 in 1xPBS) หลุมละ 300 μl 4 ครั้ง โดยเคาะ plate กับผ้าเพื่อทิ้ง wash buffer ให้หมด

5. เตรียม human IFN-γ, IL-10 and TNF-α standard โดยจะถูกเจือจางเป็นลำดับส่วน (serial dilution) ให้มีความเข้มข้นจาก 2.0-0.0 ng/ml สำหรับ human IFN-γ, TNF-α standard และเจือจางให้มีความเข้มข้นจาก 3.0-0.0 ng/ml สำหรับ human IL-10 standard เพื่อสร้าง standard curve หาปริมาณ human cytokine

6. เติม CVL sample และ human IFN-γ, IL-10 and TNF-α standard แต่ละ dilution ลงใน ELISA plate หลุมละ 100 μl (triplicate) บ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

7. ดูด human IFN-γ, IL-10 and TNF-α standard และ CVL sample ออกและล้างด้วย wash buffer หลุมละ 300 μl 4 ครั้ง โดยเคาะ plate กับผ้าเพื่อทิ้ง wash buffer ให้หมด

8. เติม detection antibody (Biotinylated antigen-affinity purified rabbit anti- hIFN-γ + 2.5mg D-mannitol) ความเข้มข้น 1 μg/ml ลงใน ELISA plate หลุมละ 100 μl ปิดฝาและบ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

9. ดูด detection antibody ออกและล้างด้วย wash buffer หลุมละ 300 μl 4 ครั้ง โดยเคาะ plate กับผ้าเพื่อทิ้ง wash buffer ให้หมด

10. เติม avidin-HRP conjugate (1:2000) ลงใน ELISA plate หลุมละ 100 μl และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

11.ดูด avidin-HRP conjugate ออก และล้างด้วย wash buffer หลุมละ 300 μl 4 ครั้ง โดยเคาะ plate กับผ้าเพื่อทิ้ง wash buffer ให้หมด

12. เติม ABTS Liquid Substrate (substrate solution) ลงใน ELISA plate หลุมละ 100 µl และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10, 20 และ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 และ 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA plate reader

3.2.3 ELISA normalization of TNF-alpha, IL-10 and IFN-γ in CVL

โดยนำค่าความเข้มข้นของ TNF-alpha, IL-10 และ IFN-γ ที่วัดได้ในแต่ละ sample มาหารกับค่าความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนที่วัดได้ในแต่ละ sample ค่าที่ได้เป็นความเข้มข้นของ TNF-alpha, IL-10 และ IFN-γ ที่พบใน CVL ของผู้ป่วยแต่ละคน

3.3 การสกัด RNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก

นำชิ้นเนื้อปากมดลูกมาสกัด RNA โดยใช้ AllPrep DNA/RNA mini kit (Qiagen) ตามวิธีของ kit ดังนี้

1. บดชิ้นเนื้อ และเติม RTL Plus 300 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที

2. ดูด supernatant ลง All Prep DNA spin column ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นวาง AllPrep spin column ลง collection tube อันใหม่ สำหรับการสกัด DNA เพื่อใช้ในงานอื่น

3. เติม 70% ethanol 300 µl ลงใน flow through ที่อยู่ใน collection tube อันเก่า ผสมโดย pipette เบาๆ และดูดทั้งหมดลงใน RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที ทิ้ง flow through

4. เติม buffer RW1 700 µl ใน RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที ทิ้ง flow through

5. เติม buffer RPE 500 µl ใน RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที ทิ้ง flow through

6. เติม buffer RPE 500 µl ใน RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้ง flow through

7. วาง RNeasy spin column ใน 1.5 ml microcentrifuge tube อันใหม่ เติม RNase-free water 50 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที RNA ที่ได้เก็บที่ อุณหภูมิ -80 °C

RNA ที่สกัดได้นี้จะถูกนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4 เทคนิค Reverse transcription และ การตรวจสอบคุณภาพ cDNA

นำ RNA ที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อ convert เป็น cDNA ด้วยเทคนิค Reverse transcription โดยใช้ oligo dT primer และตรวจสอบคุณภาพ cDNA เพื่อนำไปใช้ในการตรวจระดับการแสดงออกของจีน IFN-γ, IL-10 และ TNF-α ซึ่ง RNA ถูกเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ SuperScript™ III First-Strand Synthesis system (Invitrogen) ซึ่ง mastermix ประกอบไปด้วย 25 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP, 10xRT buffer, 0.1 M DTT, 200 U SuperScript™ III, 40U RNaseOut, 50 μM oligo dT, RNA template 6.5 μl ปริมาตรสุดท้ายได้ cDNA เท่ากับ 20 μl อุณหภูมิที่ใช้คือ 65 °C 5 นาที 42 °C 50 นาที และ 70 °C 15 นาที และตรวจสอบคุณภาพของ cDNA โดยตรวจหา GAPDH gene ด้วยวิธี PCR โดยใช้ GAPDH primers และ PCR condition คือ 94 °C 5 นาที 94 °C 1 นาที 50 °C 1 นาที 72 °C 1 นาที และ 72 °C 10 นาที

3.5 การตรวจวัดระดับการแสดงออกของจีน IFN-γ, IL-10 และ TNF-α โดยวิธี Quantitative real time PCR

Standardize PCR condition โดยใช้ cDNA ที่เตรียมจาก PBMC เพื่อทดสอบ primers และ condition ของ β-actin gene (House-keeping gene) และ IFN-γ, IL-10 และ TNF-α gene จากนั้นสร้าง Standard curve ของ IFN-γ, IL-10 และ TNF-α gene โดย cDNA ของ PBMC จะถูกเจือจางเป็นลำดับส่วน (Serial dilution) และนำแต่ละ dilution มา amplify โดยใช้ primer และ probe ที่จำเพาะกับ IFN-γ, IL-10, TNF-α และ β-actin gene

วัดระดับการแสดงออกของ IFN-γ, IL-10 และ TNF-α gene โดยใช้ Hydrolysis probe และ specific PCR primer และ normalize ด้วย β-actin gene (House-keeping gene) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับเบส และขนาด PCR product ของ primer ที่ใช้

Genes	Primer sequence (5'-3')	PCR product size (bp)
IFN-γ	F: TCAGCTCTGCATCGTTTTGG	120
	R: GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA	
	TP: FAM CCAAGACCCAGACATCAAGGCGCA TAMRA	
TNF-α	F: TCTTCTCGAACCCCGAGT GA	150
	R: CCTCTGATGGCACCACCAG	
	TP: FAM TAGCCCATGTTGTAGCAAACCCTCAAGCT TAMRA	
IL-10	F: GTGATGCCCCAAGCTGAGA	138
	R: CACGGCCTTGCTCTTGTTTT	
	TP: FAM CCAAGACCCAGACATCAAGGCGCA TAMRA	
β-actin	F: TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	294
	R: CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	
	TP: FAM ATGCCCTCCCCCAYGCCATC TAMRA	