บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus, Japan)
2. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate stirrer) (Labtech, Korea)
3. เครื่องเขย่าสาร (votex) (Scientific Industries, USA)
4. เครื่องเขย่าสารความถี่สูง (sonicator) (Sonics & materials, USA)
5. เครื่องชั่งดิจิตอล (Precisa, Switzerland)
6. เครื่องถ่ายและบันทึกภาพเจล (gel doc) (Syngene, UK)
7. เครื่องนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Hirayama, Japan)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดขนาด 1.5 ml (microcentrifuge) (Boeco, Germany)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดชนิด polypropylene conical (Boeco, Germany)
10. เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (ultrapure water type I) (Millipore, France)
11. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler) (Eppendorf, Germany)
12. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสภาพจริง (real time PCR) (Applied biosystems, UK)
13. เครื่องไมโครเวฟ (Sanyo, Japan)
14. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Denver Instrument, USA)
15. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (nano drop) (Thermo Scientific, USA)
16. เครื่องอิเล็กโทรโฟริซิส (Bio-RAD, USA)
17. เครื่องหมุนเขย่าสาร (rotator) (Biosan, Latvia)
18. เครื่องให้ความร้อน (heat block) (Bockel, UK)
19. ชั้นวางปิเปตต์ (Mondotech, Thailand)
20. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20°C และ -80°C (Revco, Japan)
21. ตู้เลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี 5% CO_2 (Shel lab, USA)
22. ตู้ดูดควัน (fume hood) (S.K.Powerable, Thailand)
23. ตู้ปลอดเชื้อ class II (laminar flow cabinet) (Gelman sciences, Singapore)
24. ตู้เย็น (Misubishi, Japan)
25. ตู้อบ (incubator) (Memmert, Germany)
26. ไมโครปิเปตต์ขนาด P2, P20, P100 และ P1000 (Eppendorf, Germany)
27. ปิเปตต์ บอย (Tecnomara, Switzerland)
28. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert, Germany)
29. Storm 840 and ImageQuanNT software (Amersham biosciences, UK)
30. UV transilluminator (Fotodyne, USA)

2788028802

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระจกปิดสไลด์ (Chance, UK)
2. กระดาษฟลอยด์ (Aro, China)
3. กระบอกตวงขนาด 100 ml และ 1,000 ml (Witeg, Germany)
4. กล่องลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งเซลล์ (Nalgene labware, USA)
5. ขวดดูแรนขนาด 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Duran, Germany)
6. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml, 500 ml, 1,000 ml และ 2,000 ml (Pyrex, USA)
7. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T25 และ T75 (Corning, USA)
8. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 และ 12 หลุม (Costar, USA)
9. ช้อนตักสาร
10. ถาดเตรียมเจลพร้อมหวี (Bioer, China)
11. ถุงมือยางพารา (Handpro, Thailand)
12. ทิปขนาด 10 ul, 200 ul และ 1,000 ul (Gilson, France)
13. เทอร์โมมิเตอร์ (Precision, Germany)
14. แท่งแม่เหล็ก (Agimatic-e, China)
15. แท่นวางหลอด (rack) (Autopack, USA)
16. ปิเปตต์แบบฆ่าเชื้อขนาด 1ml, 5 ml, 10 ml และ 25 ml (Witeg, Germany)
17. พลาสติกสำหรับห่อ (Diamond, USA)
18. พาราฟิล์ม (Parafilm M, USA)
19. ฟอร์เซป (Forcep)
20. สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometre) (Boeco, Germany)
21. หลอดขนาด 0.2 ml, 0.5 ml และ 1.5 ml (Bio-rad Elkay, USA)
22. Cryovial tube (Corning, USA)
23. Polypropylene conical tube ขนาด 15 ml และ 50 ml (Elkay, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. **สารเคมีทั่วไป**
   - 1.1 Absolute ethanol (Merck, Germany)
   - 1.2 Acetic acid (Merck, Germany)
   - 1.3 Agarose (Cambrex, USA)
   - 1.4 Ammonium acetate (Merck, Germany)
   - 1.5 Ampicillin (Sigma, USA)
   - 1.6 Bromophenol blue (USB, Germany)
   - 1.7 Chloroform (Merck, Germany)

2788028802

1.8 Diethylpyrocaronate (DEPC)(Sigma, USA)
1.9 Dimethyl sulfoxide (DMSO)(Sigma, USA)
1.10 EDTA (USB, Germany)
1.11 Ethidium bromide (Gibco BRL, Scotland)
1.12 Formaldehyde (Merck, Germany)
1.13 Glycine (Amersham Bioscience, Sweden)
1.14 Glycogen (USB, USA)
1.15 Hydrochloric acid (Merck, Germany)
1.16 Hydroquinone (Merck, Germany)
1.17 Isoamylalcohol (VWR, France)
1.18 Isopropanol (VWR, France)
1.19 Methanol (SK chemicals, Korea)
1.20 Nuclease free water (Fermentas, Canada)
1.21 Phenol (USB, USA)
1.22 Potassium dihydrogen phosphate (Merck, Germany)
1.23 Proteinase K (USB, USA)
1.24 RNase A (DNase-free) (Applichem, Germany)
1.25 Sodium metabisulfite (Sigma-aldrich, USA)
1.26 Sodium chloride (Merck, Germany)
1.27 Sodium hydroxide (Merck, Germany)
1.28 SYBR green I nucleic acid gel stain (Lonza, USA)
1.29 Tris (Tris[hydoxymethyl] aminomethane) (Omnipur, Germany)
1.30 TritonX 100 (Bio-RAD, USA)
1.31 Trizol reagent (Invitrogen, USA)
1.32 Trypan blue (Sigma, USA)
1.33 Tris base (USB, USA)
1.34 Xylene (Merck, Germany)
1.35 10 base pair DNA ladder (Promega, USA)
1.36 25 base pair DNA ladder (Promega, USA)
1.37 100 base pair DNA ladder (Promega, USA)
1.38 1K base pair DNA ladder (Promega, USA)

2. สารเคมีสำหรับทำ PCR

2.1 10X PCR buffer (Quigen, Germany)
2.1 25mM Magnesium chloride (Quigen, Germany)
2.2 10mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)(Promega, USA)
2.3 Oligonucleotide primers (Biodesign, Thailand)

2788028802

2.4 Hot start *Taq* DNA polymerase (Quigen, Germany)

3. **สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์**
   3.1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)(Gibco, USA)
   3.2 Fetal Bovine Serum (FBS)(Gibco, USA)
   3.3 Anti-anti (100X) antibiotic-antimycotic (Gibco, USA)
   3.4 Trypsin EDTA (Gibco, USA)
   3.5 Phosphate Buffered Saline (PBS)(Gibco, USA)
   3.6 Tryphan blue (Gibco, USA)
4. **สารเคมีที่ใช้ในการทำ transfection**
   4.1 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA)
   4.2 Opti-MEM reduced serum medium (Gibco, USA)
   4.3 20 nMol Stealth RNAi™ siRNA (Invitrogen, USA)
   4.4 Stealth RNAi™ negative control medium CG duplex (Invitrogen, USA)
5. **สารเคมีที่ใช้ในการทำ real-time PCR**
   5.1 Oligonucleotide primers (Biodesign, Thailand)
   5.2 Power SYBR® Green PCR master mix (Applied biosystems, UK)
6. **สารเคมีที่ใช้ในการทำ chromatin immunoprecipitation (ChIP)**
   6.1 Anti-6X His tag antibody (Abcam, UK)
   6.2 Anti-histone H3- tri methyl K4 (Abcam, UK)
   6.3 HPV16 E7 antibody (Santa cruz, USA)
   6.4 DNMT1 antibody (Epigentek, USA)
   6.5 Halt protease inhibitor cocktail (100x) (Thermo Scientific, USA)
   6.6 Normal mouse IgG (Cell signaling, USA)
   6.7 Normal rabbit IgG (Santa cruz, USA)
   6.8 Protein G plus agarose (Santa cruz, USA)
   6.9 ChIP buffer
   6.10 Elution buffer
   6.11 Lysed buffer
   6.12 Lysis buffer
   6.13 PK buffer
   6.14 Washing buffer
7. **อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย**
   7.1 Agar bacterial powder (Conda, Spain)
   7.2 Tryptone (Bio Basic Inc, Canada)
   7.3 Yeast extract powder (Bio Basic Inc, Canada)

2788028802

8. **ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย**
   - 8.1 GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA)
   - 8.2 Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit (Fermentas, USA)
   - 8.3 Wizard® DNA clean-up system (Promega, USA)
9. **ตัวอย่างที่นำมาศึกษา**
   - 9.1 เซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer cell line) SiHa มีการติดเชื้อ HPV ชนิด 16
   - 9.2 เซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer cell line) C33A เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เกิดจากการกลายของยีน *p53* และไม่มีการติดเชื้อ HPV

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้ แบ่งเป็น 4 ส่วน คือ

1. การตรวจการติดเชื้อ HPV และระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ และระดับการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูกทั้ง 2 ชนิด
2. การศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการกดการแสดงออกของยีน *CCNA1*
3. การศึกษาการชักนำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16
4. การศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีน E7 และ DNMT1 บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*

1. การตรวจการติดเชื้อ HPV และระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ และระดับการแสดงออกของยีน *CCNA1*

1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งของมนุษย์ (cell culture)

1.1.1 การเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์จากเซลล์แช่แข็ง (thaw cell)

1.1.2 การเลี้ยงเซลล์

1.1.3 การแช่แข็งเซลล์ (cell freezing)

วิธีการทดลองในข้อ 1.1.1 ถึง 1.1.3 ได้ทำตามวิธีการของวัชรพงศ์ (วัชรพงศ์ ภักดีชายแดน, 2010)

1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

เมื่อเซลล์โตเต็มพื้นที่ในขวดเลี้ยงเซลล์แล้ว เริ่มเก็บเซลล์โดยการ trypsinization ตามหัวข้อ 1.1.3 จนถึงขั้นตอนล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วจึงปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เท PBS ทิ้ง แล้วล้างตะกอนเซลล์ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

หลังจากนั้นเติม lysis buffer II + 10% SDS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติม proteinase K ปริมาตร 40 ไมโครลิตร นำหลอดไปบ่มไว้ใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนตะกอนเซลล์ถูกย่อยจนหมด หรืออาจสังเกตจากสารละลาย (ตัวอย่าง) ในหลอดว่าไม่เหลือความหนืดแล้ว จึงดูดตัวอย่างใส่หลอดขนาด 1.5 ml ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลอด แล้วจึงสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform-isoamylalcohol (Shotelersuk *et al.*, 2000) นำดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ในตู้ -20 องศาเซลเซียส หรือนำไปวัดความเข้มข้นเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 การตรวจการติดเชื้อ HPV

เพื่อยืนยันการติดเชื้อ HPV ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A จึงสกัดดีเอ็นเอของเซลล์ทั้งสองมาตรวจสอบการติดเชื้อ HPV โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นลำดับเบสของยีน *L1* บริเวณ MY09/MY11 ซึ่งเป็น degenerated primer (Resnick *et al.*, 1990) ในการทำ PCR

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ *L1* บริเวณ MY09/MY11 เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ HPV

ยีน	บริเวณ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
L1	MY11 Forward primer	GCMCAGGGWCTATAAYAATGG
	MY09 Reverse primer	CGTCCMARRGGAWACTGATC

โดย M คือ A หรือ C, R คือ A หรือ G, W คือ A หรือ T และ Y คือ C หรือ T

ตารางที่ 2 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ HPV

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR	2.0	1X
2. 10 mM dNTPs	0.4	0.2 mM
3. 20 uM Forward *L1* primer (MY11)	0.4	0.18 uM
4. 20 uM Reverse *L1* primer (MY09)	0.4	0.18 uM
5. 5U/ul Hot Taq polymerase	0.2	1.0 U/reaction
6. 25mM $MgCl_2$	3.0	2.25 mM
7. Distilled water	11.8	
8. DNA	2.0	
ปริมาตรรวม	20.0	

2788028802

ตารางที่ 3 สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ HPV

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1. Initial denaturation	95	15
2. PCR cycle (40 รอบ)		
- Denature	95	1
- Annealing	55	1
- Extension	72	1
3. Final extension	72	7
4. Holding	4	

เมื่อได้ PCR product แล้วจึงตรวจสอบรูปแบบเมทิเลชันด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิส อะกา) โรส)

1.4 เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (อะกาโรส)

นำ PCR product มาทำเจลอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้ 1% agarose gel + 2% ethidium bromide ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที แล้วจึงตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของยีน *L1* ซึ่งมีขนาด 450 คู่เบส ด้วยเครื่อง UV transilluminator (Fotodyne, USA)

1.5 การทำ sodium bisulfite treatment

เริ่มต้นเตรียมดีเอ็นเอปริมาณ 2 ไมโครกรัม ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ng/ul) ใส่ 2 M NaOH ปริมาตร 5.5 ไมโครลิตร แล้วบ่มใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว ระหว่างนั้นเตรียม 10 mM hydroquinone และ 3M sodium metabisulfite ที่ความเป็นกรด-เบส 5.0 เมื่อบ่มจนครบเวลาแล้วจึงใส่สารทั้งสองปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ 520 ไมโครลิตร ตามลำดับ นำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา sulphonation และ hydrolytic deamination จากนั้น นำดีเอ็นเอที่ผ่าน bisulfite แล้วมากำจัด free bisulfite ion และ hydroquinone โดยใช้ชุดการทดลองสำเร็จรูป Wizard® DNA clean-up system (Promega, USA) เริ่มต้นด้วยการใส่ DNA clean up resin หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกับดีเอ็นเอในหลอด นำตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงไปในคอลัมน์ เปิดเครื่อง suction จนตัวอย่างในคอลัมน์ไหลไปหมด แล้วปิดเครื่อง ใส่ 80% isopropanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตรในคอลัมน์แล้วกำจัดทิ้งโดยใช้ suction เช่นเดียวกัน จากนั้นย้ายคอลัมน์มาวางบนหลอดขนาด 1.5 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัด isopropanol ที่ตกค้างอยู่ แล้วจึงย้ายคอลัมน์มาวางบนหลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ ชะดีเอ็นเอที่อยู่ในคอลัมน์ด้วย dH_2O อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 10,000 g เวลา 2 นาที หลังจากขั้นตอนนี้ดีเอ็นเอจะอยู่ในหลอดขนาด 1.5 ml ให้ใส่ 3M NaOH ปริมาตร 5.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา alkali desulphonation หลังจากปฏิกิริยานี้ C จะเปลี่ยนเป็น U ในขณะที่ C^{met} จะไม่

เปลี่ยนไป แล้วจึงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการใส่ glycogen ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 100% ethanol ปริมาตร 240 ไมโครลิตร และ 10 M CH_3COONH_4 ปริมาตร 23 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงปั่น 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที กำจัด supernatant ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กำจัด supernatant แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย dH_2O ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บ sodium bisulfite treated DNA ที่ -20 องศาเซลเซียส หรือใช้ในการทดลองต่อไป

1.6 การทำ methylation specific (MSP) PCR

หลังจากทำ sodium bisulfite treatment จะสามารถแยกดีเอ็นเอที่มีเมทิเลชันออกจากดีเอ็นเอที่ไม่มีเมทิเลชันได้ ด้วยการวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอเมทิเลชันโดยเทคนิค MSP ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเมทิเลชัน (methylated sequence) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีเมทิเลชัน (unmethylated sequence) สำหรับ methylated primer มีวิธีการออกแบบดังนี้

1. เนื่องจากการเกิดดีเอ็นเอเมทิเลชันมักเกิดบริเวณ CpG ซึ่งหลังจากทำ sodium bisulfite treatment แล้ว C^{met} ยังคงเหมือนเดิม ดังนั้นในขั้นตอนแรกต้องเปลี่ยน CG (ไฮไลท์สีเหลือง) เป็น XY (ไฮไลท์สีเขียว) เพื่อรักษา CG เอาไว้

cagccccgccgcgtcccagccgcctcccggcaggaagcgtaggtgtgtgagccgacccgg
agcgagccgcgcccctcgggccagcgtgggcagggcgccgcagcctgcgcagccccgagga
ccccgcgtcgctctcccgagccagggttctcaggagcgggccgcgcaggagacgttagag

↓

cagcccxycxyxytcccagcxycctccxygcaggaagxytaggtgtgtgagcxyaccxyg
agxyagcxyxyccctxyggccagxytgggcagggxycxycagcctgxycagcccxyagga
cccxyxytxyctctccxyagccagggttctcaggagxyggcxyxycaggagaxyttagag

2. เปลี่ยน C (ตัวหนา(ในข้อ 1 เป็น T (ตัวหนา (ในข้อ 2 เพราะจากหลัง sodium bisulfite treatment C จะถูกเปลี่ยนเป็น U แต่เนื่องจากใน PCR ใช้ dTTP ดังนั้น C จึงเปลี่ยนเป็น T

tagtttxytxyxyttttagtxytttttxygtaggaagxytaggtgtgtgagtxyattxyg
agxyagtxyxyttttxyggttagxytgggtagggxytxytagtttgxytagtttxyagga
tttxyxytxyttttttxyagttagggttttttaggagxyggtxyxytaggagaxyttagag

3. ในขั้นตอนสุดท้ายจึงเปลี่ยน XY (ไฮไลท์สีเขียว (ในข้อ 2 กลับมาเป็น CG (ไฮไลท์สีเหลือง) ในข้อ 3 ดังเดิม หลังจากขั้นตอนนี้แล้ว จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ควรจะเปลี่ยนไปหลังทำ sodium bisulfite treatment แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ไปออกแบบไพรเมอร์สำหรับ methylated primer

tagtttcgtcgcgttttagtcgttttttcggtaggaagcgtaggtgtgtgagtcgattcgg
agcgagtcgcgttttcgggttagcgtgggtagggcgtcgtagtttgcgtagtttcgagga
tttcgcgtcgttttttcgagttagggttttttaggagcgggtcgcgtaggagacgttagag

2788028802

สำหรับ unmethylated primer นั้น จะเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในบริเวณเดียวกันกับที่ออกแบบ methylated primer จาก C เป็น T แล้วจึงออกแบบไพรเมอร์ได้ ซึ่งในการทำ PCR จะใส่ไพรเมอร์ทั้งสองคู่ไว้ใน PCR reaction เดียวกัน เรียกว่า duplex PCR ดังนั้น สามารถตรวจการมีและไม่มีเมทิเลชันได้ภายในครั้งเดียวกันของการทำ PCR และวัดการมีหรือไม่มีเมทิเลชันออกมาเป็นเปอร์เซนต์ (%) โดยการใช้เครื่อง storm 840 and imageQuanNT software (Amersham biosciences, UK)

1.7 การตรวจสอบระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก

นำดีเอ็นเอของเซลล์ SiHa และ C33A ที่ผ่านการทรีทไบซัลไฟต์แล้วมาทำ MSP เพื่อตรวจสอบรูปแบบการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษารูปแบบดีเอ็นเอเมทิเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*

Accession Number	ยีน		ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
ENSG00000133101	*CCNA1*-met	Forward	TTTCGAGGATTTCGCGTCGT
		Reverse	CTCCTAAAAACCCTAACTCGA
	CCNA1-unmet	Forward	TTAGTGTGGGTAGGGTGTT
		Reverse	CCCTAACTCAAAAAAACAACA

ตารางที่ 5 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR	1.0	1X
2. 10 mM dNTPs	0.2	0.2 mM
3. 20 uM Forward *CCNA1* met primer	0.15	0.3 uM
4. 20 uM Reverse *CCNA1* met primer	0.15	0.3 uM
5. 20 uM Forward *CCNA1* unmet primer	0.15	0.3 uM
6. 20 uM Reverse *CCNA1* unmet primer	0.15	0.3 uM
7. 250 U HotStarTaq polymerase	0.1	25 U/reaction
8. Distilled water	7.1	
9. DNA	1.0	
ปริมาตรรวม	10.0	

ตารางที่ 6 สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1. Initial denaturation	95	5
2. PCR cycle (35 รอบ)		
- Denature	95	1
- Annealing	53	1
- Extension	72	1
3. Final extension	72	7
4. Holding	4	

เมื่อได้ PCR product แล้วจึงตรวจสอบรูปแบบเมทิเลชันด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส (อะคริลาไมด์)

1.8 เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (อะคริลาไมด์)

นำ PCR product มาทำเจลอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้ 8% non-denaturing acrylamide gel ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ใน 1X TBE + 1X SYBR green I nucleic acid gel stain (Lonza, USA) เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่มีเมทิเลชันขนาด 47 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีเมทิเลชันขนาด 64 คู่เบส และวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่มีและไม่มีเมทิเลชัน (%) ที่ได้ด้วยเครื่อง Storm 840 and ImageQuanNT software (Amersham biosciences, UK)

1.9 การสกัดอาร์เอ็นเอ

เมื่อเซลล์โตเต็มพื้นที่ในขวดเลี้ยงเซลล์แล้ว เก็บเซลล์เช่นเดียวกันกับการสกัดดีเอ็นเอ แล้วจึงสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี trizol (Kitkumthorn *et al.*, 2006) นำอาร์เอ็นเอที่ได้เก็บในตู้ -80 องศาเซลเซียส หรือนำไปวัดความเข้มข้นเพื่อนำไปใช้ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป

1.10 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สม (cDNA)

การสังเคราะห์ cDNA ใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูป RevertAid™ first strand cDNA synthesis kit (Fermentas, Canada) โดยใช้ RNA เริ่มต้น 5 ไมโครกรัมใน nuclease free water ไม่เกิน 11 ไมโครลิตรในหลอดขนาด 0.2 ml เมื่อปรับปริมาตรอาร์เอ็นเอได้ปริมาตรรวม 11 ไมโครลิตรแล้ว ใส่ oligo$(dT)_{18}$ primer ปริมาตร 1 ul ซึ่ง oligo$(dT)_{18}$ primer จะจับอย่างจำเพาะบริเวณปลาย 3' ของ poly(A) RNA ดังนั้น การสังเคราะห์ cDNA จึงเริ่มต้นจากบริเวณ poly(A) tailed mRNA นำไปบ่มในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที ระหว่างนั้นเตรียม master mix 5X reaction buffer 4 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 2 ไมโครลิตร, RNase inhibitor (20u/ul) 1 ไมโครลิตร และ M-MuLV reverse transcriptase (200u/ul) 1

ไมโครลิตร เมื่อครบ 5 นาทีแล้วใส่ master mix 9 ไมโครลิตรต่อหลอด นำไปบ่มในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ในขั้นตอนนี้เป็นการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอต้นแบบ และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อยับยั้งการสังเคราะห์ cDNA นำ cDNA ที่ได้เก็บไว้ในตู้ -20 องศาเซลเซียส หรือใช้ในการทดลองต่อไป

1.11 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1*

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *CCNA1* และ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase *(GAPDH)* หรือ histone acetyltransferase (*HAT)* เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) โดยใส่ไพรเมอร์ทั้งสองคู่ไว้ใน PCR reaction เดียวกัน ดังนั้น เราสามารถตรวจสอบและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในแต่ละเซลล์ หรือแต่ละชุดการทดลองได้โดยใช้ *GAPDH* หรือ *HAT* เป็นตัว normalize ซึ่งค่าที่ได้ออกมาเป็นเปอร์เซนต์ (%)

ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน *CCNA1*

Accession Number	ยีน		ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
ENSG00000133101	*CCNA1*	Forward	ATTCATTAAGTGAAATTGTGC
		Reverse	CTTCCATTCAGAAACTTTTG
NC_000002.12	*HAT*	Forward	TACTGTTAAAAAGTGGTAGG
		Reverse	AACCATTTGAACTCCCTATA
NG_007073.2	*GAPDH*	Forward	GTGGGCAAGGTATCCCTG
		Reverse	GATTCAGTGTGGTGGGGGAC

ตารางที่ 8 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1*

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR	1.0	1X
2. 10 mM dNTPs	0.2	0.2 mM
3. 20 uM Forward *CCNA1* primer	0.15	0.3 uM
4. 20 uM Reverse *CCNA1* primer	0.15	0.3 uM
5. 20 uM Forward *HAT* or *GAPDH* primer	0.06	0.12 uM
6. 20 uM Reverse *HAT* or *GAPDH* primer	0.06	0.12 uM
7. 250 U HotStarTaq polymerase	0.1	25 U/reaction
8. Distilled water	7.28	
9. DNA	1.0	
ปริมาตรรวม	10.0	

2788028802

ตารางที่ 9 สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1. Initial denaturation	95	5
2. PCR cycle (35 รอบ)		
- Denature	95	1
- Annealing	47	1
- Extension	72	1
3. Final extension	72	7
4. Holding	4	

เมื่อได้ PCR product แล้วจึงตรวจสอบรูปแบบเมทิเลชันด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ตามวิธีการข้อ 1.8 โดย *CCNA1* มีขนาด 160 คู่เบส *HAT* มีขนาด 275 คู่เบส และ *GAPDH* มีขนาด 475 คู่เบส

2. การศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการแสดงออกของยีน *CCNA1*

2.1 การเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่เติม 5'-azacytidine

เตรียมสต็อค 5'-azacytidine ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ แบ่งใส่หลอดขนาด 0.2 ml หลอดละ 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

เริ่มต้นด้วยการนับเซลล์ SiHa และ C33A ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 3-5 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T75 ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์รวมปริมาตร 15 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเริ่มให้ 5'-azacytidine แก่เซลล์ในแต่ละขวดปริมาตร 4.5, 7.5 และ 10.5 ไมโครลิตรตามลำดับ (ความเข้มข้นสุดท้าย 3, 5, 7 ไมโครโมลาร์) เอียงขวดเลี้ยงเซลล์ไปมาเพื่อให้ 5'-azacytidine กระจายไปทั่วๆ ทำเช่นนี้ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน จำนวน 5 ซ้ำ จากนั้นจึงเก็บเซลล์ด้วยการ trypsinization ตามหัวข้อ 1.1.3 จนถึงขั้นตอนล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วจึงปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เท PBS ทิ้ง แล้วล้างตะกอนเซลล์ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำตะกอนเซลล์ไปสกัดดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอต่อไป

2.2 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*

นำเซลล์ SiHa และ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในข้อ 2.1 มาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำมาทำไบซัลไฟต์ทรีทเม้นท์ จากนั้นจึงทำ MSP แล้วตรวจสอบขนาดความเข้มของ methylated band และ unmethylated band ซึ่งมีขนาด 47 และ 64 คู่เบสด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโฟริซิสตามวิธีการในข้อ 1.2 และ 1.5 ถึง 1.8

27880280

2.2.1 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ด้วยวิธีการทางสถิติ

นำเปอร์เซ็นต์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่มีเมทิเลชันเมื่อให้ 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ซ้ำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดสอบ one way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (Motulsky, 2007)

2.3 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *CCNA1*

นำเซลล์ SiHa และ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine ในข้อ 2.1.1 มาสกัดอาร์เอ็นเอ และสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สม (cDNA) จากนั้นจึงทำ PCR และทำอิเล็กโทรโฟริซิสเพื่อตรวจสอบขนาดและความเข้มของแบนด์ของ *CCNA1* และ *HAT* ดังวิธีการในข้อ 1.9 ถึง 1.11

2.3.1 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วยวิธีการทางสถิติ

นำเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *CCNA1* เมื่อให้ 5'-azacytidine ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากการทดลองจำนวน 5 ซ้ำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดสอบ one way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (Motulsky, 2007)

2788028802

3. การศึกษากลไกการชักนำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16

3.1 การยับยั้งการแสดงออกของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 โดยเทคนิค siRNA

3.1.1 การออกแบบ small interfering RNA (siRNA)

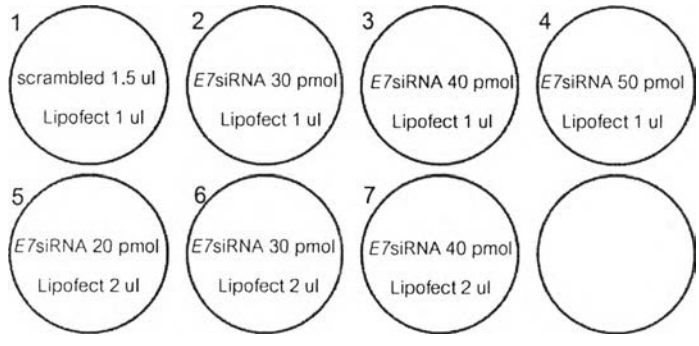
ออกแบบโดยใช้เครื่องมือ BLOCK-iT™ RNAi designer จาก http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/raniDesign.jsp และใส่ accession number NC_001526.2 ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 หลังจากนั้นเครื่องมือจะสร้าง siRNA มาให้ เลือกคู่ที่เหมาะสมที่สุดมาใช้ในการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 10 และใช้ Stealth™ RNAi negative control medium GC duplex (Invitrogen, USA) เป็นชุดควบคุมลบ

ตารางที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ siRNA ที่จำเพาะต่อยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16

Accession Number	ยีน		ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
NC_001526.2	*E7*	Sense	CAGAACCGGACAGAGCCCAUUACAA
		Antisense	UUGUAAUGGGCUCUGUCCGGUUCUG

3.1.2 การหาปริมาณ *E7* siRNA และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทรานสเฟ็ก

เนื่องจากปริมาณของ siRNA ที่ใช้ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษาแตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *E7* จึงหาปริมาณ *E7* siRNA ที่เหมาะสมที่ใช้ในการทรานสเฟ็กโดยทรานสเฟ็ก *E7* siRNA เข้าสู่เซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก C33A ตามเงื่อนไข (condition) ดังรูปที่ 16 ดังนี้



รูปที่ 16 condition ที่ใช้ในการหาปริมาณ siRNA ที่เหมาะสมต่อการทรานสเฟ็ก *E7* siRNA

จากนั้น จึงตรวจสอบการแสดงออกของยีน *E7* ด้วย real-time PCR ใช้วิธี ใช้ △△CT method ซึ่งมี *GAPDH* เป็นยีนควบคุมภายใน (internal control) สำหรับวิธีการทดลองจะได้กล่าวในลำดับถัดไป โดยจะเลือกปริมาณ *E7* siRNA ที่ส่งผลให้ *E7* มีการแสดงออกน้อยที่สุดด้วยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธีการ paired sample t-test มาใช้ในการทดลอง

นอกจากนี้ ระยะเวลาที่ใช้ในการทรานสเฟ็กมีผลต่อการแสดงออกของยีนเช่นเดียวกัน เมื่อได้ปริมาณ *E7* siRNA ที่เหมาะสมแล้ว จึงใช้ *E7* siRNA ปริมาณดังกล่าวมาทรานสเฟ็กเซลล์ จากนั้นเก็บเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมงมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *E7* ด้วย real-time PCR เช่นเดียวกัน ซึ่งจะเลือกระยะเวลาที่ส่งผลให้ *E7* มีการแสดงออกน้อยที่สุดด้วยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธีการ paired sample t-test มาใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.3 siRNA transfection

ก่อนการทรานสเฟ็ก 1 วันให้นับเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 12 หลุม ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM หลุมละ 1 มิลลิลิตร ในวันถัดไปเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ (antibiotics) ใส่ลงในหลุม หลุมละ 800 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเตรียม lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) ซึ่งเป็น transfection reagent ผสมกับ Opti-MEM reduced serum medium (Invitrogen, USA) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ 297 ไมโครลิตร ตามลำดับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบ 15 นาทีแล้ว จึงผสม *E7* siRNA กับ Opti-MEM ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร (ปริมาณ 30 pmol) และ 295.5 ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปผสมกับ lipofectamine 2000 และ Opti-MEM ที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที สำหรับ negative control ก็เตรียมเช่นเดียวกัน จากนั้นจึง transfect *E7* siRNA หรือ negative control ที่เตรียมไว้ลงในหลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่า

2788028802

จานเลี้ยงเซลล์ไปมา เพื่อให้ siRNA กระจายไปทั่วๆ นำเซลล์ไปเลี้ยงไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ 72 ชั่วโมง ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ หลังจากนั้นจึงเก็บเซลล์ สกัดดีเอ็นเอ และสกัดอาร์เอ็นเอ เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ดังวิธีการในข้อ 1.2, 1.5 ถึง 1.8 และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และ *CCNA1* ด้วยการทำ real-time PCR ด้วยวิธี △△CT method จำนวน 2 ซ้ำ

3.1.4 Real-time PCR

นำ RNA ที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA ตามวิธีการในข้อ 1.10 แล้วจึงนำ cDNA ที่ได้มาทำ real-time PCR โดยใช้ SYBR green dye (Applied biosystems, USA) เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *E7* และ *CCNA1* ซึ่งเป็น target gene และใช้ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) เป็น reference gene ทำการทดลองจำนวน 2 ครั้งและคำนวณการแสดงออกของยีน *E7* และ *CCNA1* ด้วยวิธี △△CT method

ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ใช้ใน real-time PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และยีน *CCNA1*

Accession Number	ยีน		ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' —► 3')
NC_001526.2	*E7*	Forward	GGGCAATTAAATGACAGCTCAG
		Reverse	GTGTGCTTTGTACGCACAACC
ENSG00000133101	*CCNA1*	Forward	ATTCATTAAGTGAAATTGTGC
		Reverse	CTTCCATTCAGAAACTTTTG
NG_007073.2	*GAPDH*	Forward	GTGGGCAAGGTATCCTG
		Reverse	GATTCAGTGTGGTGGGGGAC

2788028802

ตารางที่ 12 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ real-time PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และยีน *CCNA1*

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 2X SYBR (Applied biosystems, USA)	10.0	1X
2. - 20 uM Forward *E7* primer	0.1	0.1 uM
20 uM Reverse *E7* primer หรือ	0.1	0.1 uM
- 20 uM Forward *CCNA1* primer	0.1	0.1 uM
20 uM Reverse *CCNA1* primer หรือ	0.1	0.1 uM
- 20 uM Forward *GAPDH* primer	0.1	0.1 uM
20 uM Reverse *GAPDH* primer	0.1	0.1 uM
3. Distilled water	8.8	
4. cDNA	1.0	
ปริมาตรรวม	20.0	

ตารางที่ 13 สภาวะในการทำ real-time PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และยีน *CCNA1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1. Initial denaturation	95	5
2. PCR cycle (35 รอบ)		
- Denature	95	1
- Annealing	55	1
- Extension	72	1
3. Final extension	72	7
4. Holding	4	

3.1.5 การคำนวณการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วยวิธี △△CT method

△△CT method เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนแบบ relative quantification โดยอาศัยค่า threshold cycle (Ct) ซึ่งได้จากจุดตัดระหว่าง amplification curve และ threshold line ของทั้ง target gene (*E7* หรือ *CCNA1*) และ reference gene (*GAPDH*) จาก test sample คือ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ control sample คือ SiHa ที่ได้รับ scrambled siRNA มาใช้ในการคำนวณตามสมการของ Livak and Schmittgen (2001) ซึ่งการแสดงออกของยีนที่ได้จะเป็นสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงเป็นจำนวนเท่า (fold change) ดังนี้

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$
$$= 2^{-(\Delta Ct(test) - \Delta Ct(reference))}$$
$$= 2^{-[(Ct(target,test)-Ct(ref,test))-(Ct(target,control)-Ct(ref,\ control))]}$$

เมื่อ Ct(target,test) คือ Ct ของยีน *E7* หรือ *CCNA1* จาก SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA
Ct(ref,test) คือ Ct ของยีน *GAPDH* จาก SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA
Ct(target, control) คือ Ct ของยีน *E7* หรือ *CCNA1* จาก SiHa ที่ได้รับ scrambled siRNA
Ct(ref, control) คือ Ct ของยีน *GAPDH* จาก SiHa ที่ได้รับ scrambled siRNA

3.1.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *E7* และ *CCNA1* ด้วยวิธีการทางสถิติ

นำค่า $2^{-\Delta\Delta CT}$ ของ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ SiHa ที่ได้รับ scrambled siRNA ที่ได้จากการทดลองจำนวน 8 ซ้ำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดสอบ Independent sample T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (Motulsky, 2007)

3.1.7 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ด้วยวิธีการทางสถิติ

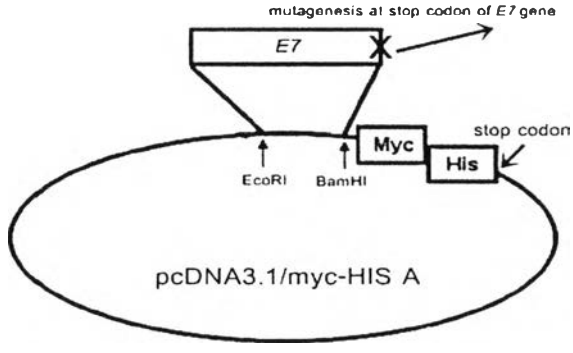
นำเปอร์เซ็นต์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่มีเมทิเลชันของ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA ที่ได้จากการทดลองจำนวน 8 ซ้ำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดสอบ paired sample T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (Motulsky, 2007)

3.2 การชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16

3.2.1 โครงสร้างของพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16

Recombinant plasmid ของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ที่ใช้นี้ได้รับการตัดต่อยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Bam*HI จากพลาสมิด pGEX2T-E7 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่แสดงออกได้ในเฉพาะแบคทีเรีย แล้วนำยีน *E7* ที่ได้มาทำ mutagenesis บริเวณปลายด้าน 3' ที่เป็น stop codon ให้มีลำดับเบสอื่นที่ไม่เป็น stop codon จากนั้น นำยีน *E7* ที่ผ่าน mutagenesis แล้วมาเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pcDNA3.1/myc-HIS A ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ยีนที่ถูกตัดต่อเข้าไปสามารถแสดงออกได้เมื่อทรานสเฟ็กพลาสมิดนี้เข้าสู่เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบโปรตีน E7 ที่ผลิตขึ้นได้โดยใช้แอนติบอดี้ (antibody) ของ MYC หรือ HIS เนื่องจากในพลาสมิดนี้ถูกติดด้วยยีน MYC และ HIS ตามลำดับ (วัชรพงศ์ ภักดีชายแดน, 2010) แสดงได้ดังรูปที่ 17 ซึ่งในการทดลอง chromatin immunoprecipitation จะใช้ HIS antibody เป็นตัวติดตาม ดังจะได้กล่าวในการทดลองต่อไป

2788028802



รูปที่ 17 โครงสร้างของ recombinant plasmid ของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16

3.2.2 การถ่าย *E7* recombinant plasmid เข้าสู่ competent cells (transformation)

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ *Escherichia coli* XL-1 blue เป็น competent cells ซึ่งมี ampicillin เป็นตัวคัดเลือก นำ competent cells ที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียสมาวางบนน้ำแข็ง เมื่อ competent cells เริ่มละลาย ดูด competent cells ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ *E7* recombinant plasmid ปริมาตร 8 ไมโครลิตร รีบนำไปบ่มโดยวางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ *E7* recombinant plasmid จับที่ด้านนอกผนังเซลล์ของ competent cells จากนั้นนำไปให้ความร้อน (heat shock) โดยใช้ heat block อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เพื่อให้ผนังเซลล์ของ competent cells เป็นรูทำให้ *E7* recombinant plasmid เข้าไปใน competent cells ได้ แล้วรีบนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ผนังเซลล์ของ competent cells กลับสู่สภาพเดิม จากนั้นนำไปผสมกับ super optimal broth (SOB) 980 ไมโครลิตรที่มี 2M $MgCl_2$ 10 ไมโครลิตร และ 2M glucose 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำไปปั่นตำตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้งจนเหลือของเหลวในหลอดประมาณ 100 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อให้ตะกอนกระจายออกจากกัน ดูดของเหลวปริมาตร 25 ไมโครลิตร (low concentration competent cells) ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Luria-Bertani agar หรือ LB agar) ที่มี ampicillin ในอัตราส่วน LB agar : ampicillin = 1000 : 1นำ competent cells ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid ที่เหลือไปปั่นตกตะกอนอีกครั้งหนึ่ง ดูดของเหลวส่วนบนทิ้งจนเหลือปริมาตรในหลอดประมาณ 25 ไมโครลิตร แล้วจึงทำให้ตะกอนกระจายออกจากกัน ดูดของเหลวปริมาตร 25 ไมโครลิตร(high concentration competent cells) นำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มี ampicillin เช่นเดียวกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในเครื่องบ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เนื่องจาก *E7* recombinant plasmid มียีนต้านยา ampicillin ดังนั้น competent cells ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid จึงสามารถโตได้บนอาหารที่มี ampicillin จากนั้น นำโคโลนีที่ขึ้นในจานเพาะเชื้อมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Luria-Bertani broth หรือ LB) โดยแยก 1 โคโลนี ต่อ 1 หลอด polypropylene ขนาด 15 ml ที่มี LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรผสมกับ ampicillin 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในเครื่องบ่ม

2788028802

เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง

3.2.3 การสกัดพลาสมิด

นำ LB ที่เลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 10-12 ชั่วโมงมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้ง จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วย GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) โดยเติม resuspension solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตรลงไปยังตะกอนแบคทีเรีย ให้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงหรือนำไปเขย่าด้วย vortex เมื่อตะกอนแตกกระจายจนหมด ย้ายตะกอนแบคทีเรียไปยังหลอดขนาด 1.5 ml แล้วเติม lysis solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดขึ้นลงประมาณ 4-6 ครั้งจนตัวอย่างในหลอดเหนียวและใส จากนั้นเติม neutralization solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการคว่ำหลอดขึ้นลงประมาณ 4-6 ครั้ง ในขั้นตอนนี้จะเห็นตะกอนสีขาวขุ่นลักษณะคล้ายก้อนเมฆในหลอด นำไปปั่นตกตะกอนเป็นเวลา 5 นาทีที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ (cell debris) ย้ายตัวอย่างใสๆ ชั้นบนไปยัง GeneJET spin column ปั่นตกตะกอนเป็นเวลา 1 นาทีที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ทิ้งของเหลวในหลอดข้างล่างทิ้ง นำ column มาวางบนหลอดเดิม เติม wash solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นตกตะกอนเป็นเวลา 1 นาที ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ทำซ้ำจำนวน 2 รอบ แล้วย้าย column ไปวางบนหลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ ใส่ elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเพื่อชะพลาสมิดออกจาก column นำพลาสมิดที่ได้เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส หรือใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.4 การตรวจสอบยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ใน competent cells ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid

จากการทดลองข้อ 3.2.2 เมื่อเลือกโคโลนีที่โตไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนใน LB นำปลายทิปที่ใช้สะกิดโคโลนีเดียวกันนั้นมาจุ่มลงในหลอด PCR ที่เตรียมไว้ เพื่อทำ colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ที่มีลำดับนิวคลิโอไทด์เช่นเดียวกันกับตารางที่ 11

ตารางที่ 14 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR	1.0	1X
2. 10 mM dNTPs	0.2	0.2 mM
3. 20 uM Forward *E7* primer	0.15	0.3 uM
4. 20 uM Reverse *E7* primer	0.15	0.3 uM
5. 250 U HotStarTaq polymerase	0.1	25 U/reaction
6. Distilled water	8.4	
7. DNA	ใช้ปลายทิปจุ่ม	
ปริมาตรรวม	10.0	

2788028802

ตารางที่ 15 สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Initial denaturation	95	15 นาที
2. PCR cycle (30 รอบ)		
- Denature	95	45 วินาที
- Annealing	51	30 วินาที
- Extension	72	45 วินาที
3. Final extension	72	7 นาที
4. Holding	4	

เมื่อได้ PCR product แล้วจึงตรวจสอบรูปแบบเมทิเลชันด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส ตามวิธีการข้อ 1.8 โดย *E7* มีขนาด 142 คู่เบส

3.2.5 การทรานสเฟ็ก *E7* recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก C33A

ก่อนการทรานสเฟ็ก 1 วันให้นับเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 4 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM หลุมละ 2 มิลลิลิตร ในวันถัดไปเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM ที่ไม่มี antibiotics ใส่ลงในหลุม หลุมละ 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเตรียม lipofectamine 2000 ผสมกับ Opti-MEM ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ 240 ไมโครลิตร ตามลำดับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบ 15 นาทีแล้ว จึงผสม *E7* recombinant plasmid ปริมาณ 2 ไมโครกรัมกับ Opti-MEM ที่มีปริมาตรรวม 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปผสมกับ lipofectamine 2000 และ Opti-MEM ที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ในการทดลองครั้งนี้จะใช้ empty plasmid เป็นชุดควบคุมก็เตรียมเช่นเดียวกัน จากนั้นจึง ทรานสเฟ็ก *E7* recombinant plasmid หรือ empty plasmid ที่เตรียมไว้ลงในหลุม หลุมละ 500 ไมโครลิตร เขย่าจานเลี้ยงเซลล์ไปมา เพื่อให้พลาสมิดกระจายไปทั่วๆ นำเซลล์ไปเลี้ยงไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ 72 ชั่วโมง ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ หลังจากนั้นจึงเก็บเซลล์และสกัดอาร์เอ็นเอ เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และ *CCNA1* ด้วยการทำ real time-PCR และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และ *CCNA1* ด้วยวิธี $\triangle\triangle$CT method จำนวน 2 ซ้ำ ดังข้อ 3.1.4 และ 3.1.5 ตามลำดับ หรือเก็บเซลล์และสกัดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ดังวิธีการในข้อ 1.2 และ 1.5 ถึง 1.8

3.2.6 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และ *CCNA1* ด้วยวิธีการทางสถิติ

นำค่า $2^{-\triangle\triangle CT}$ ของ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ C33A ที่ได้รับ empty plasmid ที่ได้จากการทดลองจำนวน 8 ซ้ำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดสอบ Independent sample T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (Motulsky, 2007)

3.2.7 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ด้วยวิธีการทางสถิติ

นำเปอร์เซ็นต์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่มีเมทิเลชันของ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ C33A ที่ได้รับ empty plasmid จำนวน 8 ซ้ำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดสอบ paired sample T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (Motulsky, 2007)

4. การศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีน E7 และ DNMT1 บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*

นำเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid เป็นเวลา 72 ชั่วโมงมาใช้ในการทำ chromatin immunoprecipitation (ChIP) เพื่อยืนยันว่าโปรตีน E7 ของ HPV ชนิด 16 และ DNMT1 จับกับบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1*

การทำ ChIP-PCR

วันแรก เริ่มต้นด้วยการใส่ 37% formaldehyde ความเข้มข้นสุดท้าย 1% ลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์หลุมละ 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้เกิด cross-link ระหว่างโปรตีนและดีเอ็นเอ จากนั้นใส่ 5M glycine ใช้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.25M บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที โดย glycine จะเป็นตัวยับยั้งการ cross-link ด้วยการทำปฏิกิริยากับ formaldehyde ที่ใส่ไปในขั้นแรก แล้วกำจัดอาหารในจานเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย PBS เย็นปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อหลุม ทำซ้ำ 2 ครั้ง ใส่ PBS เย็นที่มี protease inhibitor ความเข้มข้นสุดท้าย 1X และมีปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นเก็บเซลล์โดยใช้ scraper ใส่หลอดขนาด 1.5 ml นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 800 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วกำจัดของเหลวส่วนบนทิ้ง เติม lysed buffer ที่มี protease inhibitor ความเข้มข้นสุดท้าย 1X และมีปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตรต่อหลอด นำไปบ่มด้วยการวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที และ vortex ทุก 5 นาที เพื่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตก เมื่อครบเวลาจึงปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 800 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วกำจัดของเหลวส่วนบนทิ้ง เติม lysis buffer ที่มี protease inhibitor ความเข้มข้นสุดท้าย 1X และมีปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตรต่อหลอด นำไปบ่มด้วยการวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้เยื่อหุ้มนิวเคลียสแตก แล้วจึงนำตัวอย่างไปทำให้โครมาทินขาดด้วยการใช้คลื่นเสียง (sonication) ความแรง (pulse) 30% เป็นเวลา 10 วินาที และพัก 30 วินาที จำนวนทั้งหมด 8 ครั้ง โครมาทินที่ได้ควรมีขนาดประมาณ 200-1000 คู่เบส และระหว่าง sonication นั้นต้องวางหลอดทดลองในน้ำแข็งตลอดเวลา เนื่องจากการทำ sonication ทำให้เกิดความร้อนซึ่งจะส่งผลให้โปรตีนที่เกาะอยู่กับดีเอ็นเอนั้นหลุดออกจากกันได้ หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายส่วนใสข้างบนซึ่งก็คือ sheared chromatin ปริมาตรประมาณ 90-100 ไมโครลิตร ไปยังหลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ โดย sheared chromatin ที่ได้นี้สามารถเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียสได้นาน 3 เดือน

2788028802

วันที่ 2 ดูด ChIP buffer ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และ protease inhibitor ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงไปยัง sheared chromatin (lysate) ปริมาตร 90-100 ไมโครลิตรที่เก็บไว้เพื่อทำให้ lysate เจือจางลงประมาณ 10 เท่า จากนั้นทำ pre-clear lysate เพื่อลด background ที่อาจเกิดขึ้นได้จาก non-specific antibody หรือ bead โดยใส่ protein G ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เขย่าบน rotator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาจึงปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วย้าย lysate ส่วนบนปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตรไปยังหลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ และเก็บ lysate ส่วนบนประมาณ 50 ไมโครลิตรไว้อีก 1 หลอดและนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform ตามวิธีการข้อ 1.3 สำหรับใช้เป็น input DNA ซึ่งเป็น positive control ในการทำ PCR เนื่องจาก input DNA เป็นตัวแทนของโครมาทินทั้งหมดที่สามารถใช้ในการทำ immunoprecipitation ได้ จากนั้นใส่ antibody ได้แก่ H3K4 (Abcam, UK) ซึ่งใช้เป็น positive control antibody เพื่อยืนยันความมีประสิทธิภาพในขั้นตอน immunoprecipitation, normal mouse IgG (Cell signaling, USA) และ normal rabbit IgG (Santa cruz, USA) เป็น isotype control เนื่องจากแอนติบอดี้ที่ใช้อาจจับกับแอนติเจนอื่นๆ นอกเหนือจากแอนติเจนที่เราต้องการ (non-specific binding) ได้ การใช้ isotype control จะเป็นตัวบอก background ที่อาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากการจับอย่างไม่จำเพาะของแอนติบอดี้ที่ใช้, HPV16E7 (Santa cruz, USA) และ HIS (Abcam, UK) เพื่อติดตามโปรตีน E7 และ DNMT1 (Epigentek, USA) เพื่อติดตามโปรตีน DNMT1 โดยใช้แอนติบอดี้แต่ละอย่างในปริมาณ 10 ug ใส่ลงไปยัง lysate นำไปเขย่าบน rotator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนนี้เป็นการทำ immunoprecipitation โดยทำให้ HIS tagged E7 antigen ตกตะกอนด้วยการจับกับ antibody ในที่นี้ใช้ HIS antibody เนื่องจาก *E7* recombinant plasmid ถูกต่ออยู่กับ HIS ซึ่งเป็น backbone ของพลาสมิด และยังใช้ E7 antibody เองเพื่อตกตะกอน E7 antigen binding DNA รวมถึงใช้ DNMT1 antibody เพื่อตกตะกอน DNMT1 antigen binding DNA สำหรับ mouse normal IgG และ normal rabbit IgG เป็น isotype control antibody เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ background ของ antibody ที่อาจเกิดขึ้นได้ เนื่องด้วยความไม่จำเพาะของ antibody ที่อาจจะจับกับ antigen อื่นๆ ได้

วันที่ 3 ใส่ protein G 60 ไมโครลิตร เขย่าบน rotator เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ protein G coupling กับ antibody และตกตะกอน HIS tagged E7 antigen-antibody complex, E7 antigen-antibody complex และ DNMT1 antigen-antibody complex binding DNA ลงมา จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 1 นาที กำจัด supernatant แล้วล้าง antigen-antibody complex ที่ตกตะกอนลงมาแล้วนั้น ด้วย 1 มิลลิลิตรของ 150mM NaCl, 500 mM NaCl, LiCl และ $T_{10}E_1$ ตามลำดับ โดยแต่ละครั้งของการล้างให้เขย่าบน rotator เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสแล้วจึงปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 1 นาที กำจัด supernatant จากนั้นใส่ elution buffer 150 ไมโครลิตร แล้วเขย่าบน vortex เป็นเวลา 15 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 1,100 g เป็นเวลา 30 วินาที แล้วย้าย supernatant ไปยังหลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ แล้วใส่ elution buffer ในหลอดเดิมซ้ำอีกรอบหนึ่ง เก็บ supernatant ที่ได้ไว้ในหลอดเดียวกัน แล้วใส่ 5M NaCl 8 ไมโครลิตร และ RNaseA 2

2788028802

ไมโครลิตร นำไปบ่มใน waterbath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นใส่ 100% EtOH ปริมาตร 600 ไมโครลิตรเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เพื่อ decross-link โปรตีนออกจากดีเอ็นเอและตกตะกอนดีเอ็นเอลงมา

วันที่ 4 ปั่นตกตะกอน 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วใส่ $T_{10}E_1$ 100 ไมโครลิตร 5X PK buffer 25 ไมโครลิตร และ PK buffer 1.5 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดโปรตีนที่อาจเหลืออยู่ โดยบ่มใน waterbath อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง แล้วสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform ปริมาตร 300 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ย้ายของเหลวใสชั้นข้างบนสุดไปยังหลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการใส่ 100% EtOH 750 ไมโครลิตร 5M NaCl 30 ไมโครลิตร ใส่ glycogen ปริมาตร 2 ไมโครลิตรเพื่อช่วยให้การตกตะกอนของดีเอ็นเอดีขึ้น นำไปบ่มในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน

ปั่นตกตะกอนความเร็ว วันสุดท้าย14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กำจัด supernatant แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% EtOH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กำจัด supernatant แล้วตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย dH_2O ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับความมากน้อยของตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ นำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำ PCR

2788028802

ตารางที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CCNA1* ที่ใช้ทำ PCR หลังจากการทำ ChIP

Accession Number	ยีน		ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
ENSG00000133101	*CCNA1*	Forward	CAGGAAGCGTAGGTGTGTGAG
		Reverse	GCTTTGGAAGGGACTGTTTCCG

ตารางที่ 17 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน *CCNA1* หลังจากการทำ ChIP

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR	1.0	1X
2. 10 mM dNTPs	0.2	0.2 mM
3. 20 uM Forward *CCNA1* primer	0.15	0.3 uM
4. 20 uM Reverse *CCNA1* primer	0.15	0.3 uM
5. 250 U HotStarTaq polymerase	0.1	0.25 U/reaction
6. Distilled water	5.4	
7. DNA	4	
ปริมาตรรวม	10.0	

ตารางที่ 18 สภาวะในการทำ PCR ของยีน *CCNA1* หลังจากการทำ ChIP

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1. Initial denaturation	95	15
2. PCR cycle (35 รอบ)		
- Denature	95	1
- Annealing		1
- Extension	72	1
3. Final extension	72	7 นาที
4. Holding	4	

เมื่อได้ PCR product แล้วจึงตรวจสอบรูปแบบเมทิเลชันด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ตามวิธีการข้อ 1.8 หากโปรตีน E7 สามารถจับกับยีน *CCNA1* บริเวณโพรโมเตอร์ได้ จะสามารถตรวจสอบ *CCNA1* PCR product ได้ซึ่งมีขนาด 205 คู่เบส

2788028802