รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

โชติกา หยกทองวัฒนา. 2011. เอพิเจเนติก-การควบคุมเหนือลำดับดีเอ็นเอ. *Thai J Genet* 4(2) : 71-84.

ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต. 2007. *การสืบหายีนต้านมะเร็งในมะเร็งโพรงหลังจมูก*. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต, สาขาชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ (สหสาขาวิชา) มหาวิทยาลัย

วัชรพงศ์ ภักดีชายแดน. 2010. *เมทิเลชันของยีน CCNA1 ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูกที่ถูกทรานสเฟ็กต์ด้วยยีน E7 ของ Human papillomavirus ชนิด 16*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Ali, S., and Ali, S. Chapter 15 : Differential gene expression and its possible therapeutic implication. In C. Kang (ed.), *Gene Therapy-Developments and Future Perspectives,* pp.315-334. Croatia : InTech, 2011.

Aparicio, O., Geisberg, J.V., and Struhl, K. Unit 17.7 : Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. In J.S. Bonifacino, M. Dasso, J.B., Harford, J. Lippincott-Schwartz and K. M. Yamada (ed.), *Current Protocol in Cell Biology,* pp. 17.7.1-17.7.23. New Jersey : John Wiley and Sons Inc., 2004.

Antequera, F., and Bird, A. 1993. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci* 90 : 11995-11999.

Arroyo, M., Bagchi, S., and Raychaudhuri, P. 1993. Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex. *Mol Cell Biol* 13 : 6537-6546.

Attasara, P., Srivatanakul, P., and Sriplung, H. Cancer incidence in Thailand. In T. Khuhaprema, P. Srivatanakul, P. Attasara, H. Sriplung, S. Wiangnon and S. Sumitsawan (ed.), *Cancer in Thailand 2001-2003 vol. V, 1st*, pp.3-76. Bangkok : Bangkok Medical Publisher, 2010.

Banik, U., Bhattacharjee, P., Ahamad, S.U., and Rahman, Z. 2011. Pattern of epithelial cell abnormality in pap smear : A clinicopathological and demographic correlation. *Cyto Journal* 8 : 8.

Baylin, S.B., and Herman, J.G. 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis : Epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16 : 168-174.

2788028802

Beaudenon, S., and Huibregtse, J.M. 2008. HPV E6, E6AP and cervical cancer. *BMC Biochemistry* 9 : 4.

Belinsky, S.A., Klinge, D.M., Liechty, K.C., March, T., Kang, T., Kang, T., *et al.* 2004. Plutonium targets the p16 gene for inactivation by promoter hypermethylation human lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 25 : 1064-1067.

Berezutskaya, E., and Bagchi, S., 1998. The humanpapillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26S proteasome. *J Biol Chem* 272 : 30135-30140.

Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R., and Shilatifard, A. 2009. An operational definition of epigenetics. *Gene & Development* 23 : 781-783.

Bestor, T.H. 1992. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of Zn binding regulatory domain. *EMBO J* 11 : 2611–2617.

Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Gene & Development* 16 : 6-21.

Bird, A.P. 1987. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Genet* 3 : 342-247.

Brehm, A., Nielsen, S.J., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L. Bannister, A.J. *et al.* 1999. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* 18 : 2449-2548.

Brown, D.R., Fan, L., Jones, J., and Bryan, J. 1994. Colocalization of human papillomavirus type 11 E1^E4 and L1 proteins in human foreskin implats grown in athymic mice. *Virology* 201 : 48–54.

Burd, E.M. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbioloby Reviews* 16 : 1-17.

Burgers, W.A., Blanchon, L., Pradhan, S., de Launoit, Y., Kouzarides, T., and Fucks, F. 2007. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene* 26 : 1650-1655.

Buschhausen, G., Wittig, B., Graessmann, M., and Graessmann, A. 1986. Chromatin structure is required to block transcription of the methylated herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 1177–1181.

Cairns, B.R. 2001. Emerging roles for chromatin remodeling in cancer biology. *Trends Cell Biol* 11 : S15-S21.

Cairns, P., Esteller, M., Herman, J.G., Schoenberg, M., Jeronimo, C., Sanchez-Cespedes, M., *et al.* 2001. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res* 7 : 2727-2730.

Cameron, E.E., Bachman, K.E., Myohanen, S., Herman, J.G., and Baylin, S.B. 1999.

2786028802

Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21 : 103-107.

Cardoso, M.C. and Leonhardt, H. 1999. DNA methyltransferase is actively retained in cytoplasm during early development. *J Cell Biol* 147 : 25-32.

Castellsague, X. 2008. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 110 : S4-S7.

Change, J.T.C., Kuo, T.F., Chen, Y.J., Chiu, C.C., Lu, Y.C., Li, H.F., *et al.* 2010. Highly potent and specific siRNAs against E6 or E7 genes of HPV16- or HPV18 infected cervical cancers. *Cancer Gene Therapy* 17 : 827-836.

Cheng, S., Schmidt-Grimminger, D.C., Murant, T., Broker, T.R. and Chow, L.T. 1995. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Gene Dev* 9 : 2335-2349.

Chiang, C.M., Dong, G., Broker, T.R., and Chow, L.T. 1992. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J Virol* 66 : 5224 – 5231.

Christman, J. 2002. 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation : mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21 : 5483-5495.

Chuang, L.S., Ian, H.I., Koh, T.W., Ng, H.H., Xu, G., and Li, B.F. 1997. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 277 : 1996-2000.

Clertant, P., and Seif, I. 1984. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 protein. *Nature* 311 : 276-9.

Coverley, D., Laman, H., Laskey, R.A. 2002. Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nat Cell Biol* 4 : 523-528.

Crawford, L.V., and Crawford, E.M., 1963. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. *Virology* 21 : 258-263.

Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E.C.., Tilkins, M.L., Price, P., *et al.* 2004. Advanced transfection with lipofectamine 2000 reagent : primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Method* 33 : 95-103.

De Villiers, E.M.1989. Minireview heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 63 : 4898-4903.

Detich, N., Ramchandani, S., and Szyf, M. 2001. A conserved 3'-untranslated element mediates growth regulation of DNA methyltransferase1 and inhibits its transforming activity. *J Biol Chem* 276 : 24881–24890.

2788028802

Dhe-Paganon, S., Syeda, F., and Park, L. 2011. DNA methyl transferase1 : regulatory mechanisms and implications in health and disease. *Int J Biochem Mol Biol* 2 : 58-66.

Dong, E., Guidotti, A., Grayson, D.R., and Costa, E. 2007. Histone hyperacetylation induces demethylation of reelin and 67-kDa glutamic acid decarboxylase promoter. *Proc Natl Acad Sci* 104 : 4676-4681.

Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., and Crawford, L. 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352 : 824 – 827.

Du, X., Han, L., Guo, A.Y., and Zhao, Z. 2012. Features of methylation and gene expression in the promoter-associated CpG islands using human methylome data. *Comparative and Functional Genomics* 2012 : 1-8.

Edmonds, C., and Vousden K.H. 1989. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Virol* 63 : 2650-2656.

Esteller, M. 2007. Cancer epigenomics : DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8 : 286-298.

Esteller, M. 2008. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358 : 1148-1159.

Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Oscar, F.H., Hidalgo, F. 2000. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343 : 1350-1354.

Fang, C.Y., Miller, S.M., Bovbjerg, D.H., Bergman, C., Edelson, M.I., Gosenblum N.G., *et al.* 2008. Perceived stress is associated with impaired T-cell response to HPV16 in women with cervical dysplasia. *Ann Behave Med* 35 : 87-96.

Feinberg, A.P., and Tycko, B. 2004. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4 : 143-153.

Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127 : 2893-2917.

Fraga, M.F., and Esteller, M. 2002. DNA methylation : a profile of methods and applications. *Biotechniques* 33 : 636-649.

Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P., and Kouzarides, T. 2003. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 278 : 4035-4040.

Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B., and Tommasno, M. 2010. The biological properties of E6 and E7 oncoprotiens from human papillomaviruses. *Virus Genes* 40 : 1-13.

2788028802

Gomez, D.T., and Santos, J.L. Human papillomavirus infection and cervical cancer : pathogenesis and epidemiology. In A. Mendez-Vilas (ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, pp.680-688. Spain : Formatex, 2007.

Gulliver, G.A., Herber, R.L., Liem, A., and Lambert, P.F. 1997. Both conserved region 1 (CR1) and CR2 of the human papillomavirus type16 E7 oncogene are required for induction of epidermal hyperplasia and tumor formation in transgenic mice. *J Virol* 71 : 5905-5914.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100 : 57-70.

Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Weller, M., *et al.*, 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352 : 997-1003.

Herman, J.G., and Baylin, S.B. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349 : 2042-2054.

Hermann, A., Goyal, R., and Jeltsch, A. 2004. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferasemethylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem* 279 : 48350-48359.

Howe, J.A., Howell, M., Hunt, T., and Newport, J.W. 1995. Identification of a development timer regulating the stability of embryonic cyclin A and a new somatic A-type cyclin at gastrulation. *Genes Dev* 9 : 1164-1176.

Hwang, E.S., Nottoli, T., and Dimaio, D. 1995. The HPV 16 E5 protein : expression, detection, and stable complex formation with transmembrane protein in COS cells. *Virology* 211 : 227-233.

Jeronnimo, C., Usadel, H., Henrique, R., Oliveira, J. Lopes, C., Nelson, W.G., *et al.* 2001. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 93 : 1747-1752.

Ji, P., Agrawal, S., Diederichs, S., Baumer, N., Becker, A.,Cauvet, T. *et al.* 2005. Cyclin A1, the alternative A-type cyclin, contributes to G1/S cell cycle progression in somatic cells. *Oncogene* 24 : 2739-2744.

Jones, P.A., and Baylin, S.B. 2007. The epigenomics of cancer. *Cell* 128 : 683-692.

Jones, P.A., and Liang, G. 2009. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 10 : 805-811.

Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., *et al.* 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19 : 187-191.

Jonson, A.L., Rogers, L.M., Ramakrishnan, s., and Downs L.S. 2008. Gene silencing with

2788028802

siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention in a mouse model of cervical cancer. *Gynecol Oncol* 111 : 356-364.

Kaminskas, E., Farrell, A.T., Wang Y.C., Sridhara, R., and Pazdur, R. 2005. FDA drug approval summary : azacytidine (5-azacytidine, Vidaza) for infectable suspension. *Oncologist* 10 : 176-182.

Kitkumthorn, N., Yanatatsaneejit, P., Kiatpongsan, S., Phokaew, C., Triratanachat, S., Trivijitsilp, P. *et al.* 2006. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. *BMC Cancer* 6 : 55.

Klein, C.J., Botuyan, M.V., Wu, Y., Ward, C.J., Nicholson, G.A., Hammans, S., *et al.* 2011. Mutation in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. *Nat Genet* 43 : 595-600.

Klose, R.J., and Bird, A.P. 2006. Genomic DNA methylation : the mark and its mediators. *TRENDS in Biochemical Sciences* 31 : 89-97.

Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128 : 693-705.

Kuo, M.H., and Allis, C.D. 1998. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* 20 : 615-626.

Lacey, J.V., Swanson, C.A., Brinton, L.A., Altekruse, S.F., Barnes, W.A., Gravitt, P.E. *et al.* 2003. Obesity as a potential risk factor for adenocarcinomas and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 98 : 814-821.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., *et al.* 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome.*Nature* 409 : 860-921.

Laurson, J., Khan, S., Chung, R., Cross, K., and Raj, K. 2010. Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. *Carcinogenesis* 31 : 918-926.

Lechner, M.S., Mack, D.H., Finicle, A.B., Crook, T., Vousden, K.H., and Laimins, L.A. 1992. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 *in vivo* and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J* 11 : 3045-3052.

Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U., and Bestor, T.H. 1992. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71 : 865 – 873.

Li, H.P., Leu, Y.W., and Chang, Y.S. 2005. Epigenetic changes in virus-associated human cancers. *Cell Research* 15 : 262-271.

Luger, K., Maeder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature(London)* 389 : 251-260.

2788028802

Luger, K., and Richmond, T.J. 1998. The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* 6 : 140-146.

Mack, G.S. 2006. Epigenetic cancer therapy makes headway. *J Natl Cancer Inst* 98 : 1443-1444.

McBride, A.A., Romanczuk, H., and Howley P.M. 1991. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 266 : 18411- 18414.

Meehan, R.R., Lewis, J.D., and Bird, A.P. 1992. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res* 20 : 5085-5092.

Milde-Langosch, K., Schreiber, C., Becker, G., Loning, T., and Stegner, H-E. 1993. Human papillomavirus detection in cervical adenocarcinoma by polymerase chain reaction. *Hum Pathol* 24 : 590 – 594.

Mill, K.I. and Ramsahoye, B.H. 2002. DNA methylation protocols. *Methods in Molecular Biology* 200 : 145-147.

Miller, D.L., and Weinstock, M.A. 1994. Nonmelanoma skin cancer iin the United states : incidence. *J Am Acad Dermatol* 30 : 774-778.

Motoyama, S., Ladines-llave, C.A., Villanueva, S.L., and Maruo, T. 2004. The role of human papillomavirus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 50 : 9-19.

Motulsky, H. 2007. Graphpad PRISM version 5.0 Regression Guide. *President GraphPad Software Inc* : 1-294.

Moutinho, J.A.F. 2011. Smoking and cervical cancer. *Obstet Gynecol* 2011 : 1-6.

Mueller, C., Readhead, C., Diederichs, S., Idos, G., Yang, R., Tidow, N., *et al.* 2000. Methylation of the cyclin A1 promoter correlates with gene silencing in somatic cell lines, while tissue-specific expression of cyclin A1 is methylation independent. *Molecular and Cellular Biology* 20 : 3316-3329.

Muller-Tidow, C., Ji, P., Diederichs, S., Potratz, J., Baumer, N., Kohler, G. *et al.* 2004. The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 24 : 8917-8928.

Mutskov, V., and Felsenfeld, G. 2004. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine9. *Embo J* 23 : 138-149.

Mutskov, V.J., Farrell, C.M., Wade, P.A., Wolffe, A.P., and Felsenfeld, G. 2002. The barrier function of an insulator couples high histone acetylation levels with specific protection of promoter DNA from methylation. *Genes Dev* 16 : 1540-1554.

Narimatsu, T., Tamori, A., Koh, N., Kubo, S., Hirohashi, K., Yano, Y., *et al.* 2004. P16

2788028802

promoter hypermethylation in humanhepatocellular carcinoma with or without hepatitis virus infection. *Inter Virology* 47 : 26-31.

Nguyen, C.L., Eichwald, C., Nibert, M.L., and Munger, K. 2007. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component γ-tubulin. *J Virol* 81 : 13533-13543.

Nie, C.L., Gao, G.I., Han, J., Li., Chen, H.P., and He, M. 2008. Human papillomavirus 16 E6, E7 siRNAs inhibit proliferation and induce apoptosis of SiHa cervical cancer cells. *Chin J Cancer Res* 20 : 301-306.

Okano, M., Xie, S., and Li, E. 1998. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19 : 219-220.

Okoji, R.S., Yu, R.C., and Maronpot, R.R. 2002. Sodium arsenate administration via drinking water increases genome-wide and Ha-ras DNA hypomethylation in methyl-deficient C57BL/6J mice. *Carcinogenesis* 23 : 777-785.

Park, I.S., Chang, X., Loyo, M., Wu, G., Chuang, A., Kim, M.S., *et al.* 2011. Characterization of the methylation patterns in human papillomavirus type 16 viral DNA in head and neck cancers. *Cancer Prev Res (Phila)* 4 : 207-217.

Paschos, K., Smith, P., Anderton, E., Middeldorp, J.M., White, R.E., and Allday, M.J. 2009. Epstein-barr virus latency in B cells leads to epigenetic repression and CpG methylation of the tumour suppressor gene Bim. *PLoS Pathog* 5 : e1000492.

Resnick, R.M., Cornelissen, M.T.E., Wright, D.K., Eichinger, G.H., Fox, H.S., Schegget, J.T. *et al.* 1990. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 82 : 1477-1484.

Richon, V.M., Sandhoff, T.W., Rifkind, R.A., and Marks, P.A. 2000. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 10014-10019.

Rivera, A., Mavila, A., Bayless, K.J., Davis, G.E., and Maxwell, S.A. 2006. Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian and lung carcinoma cells. *Cell Mol Life Sci* 63 : 1425-1439.

Rountree, M.R., Bachman, K.E., and Baylin, S.B. 2000. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 25 : 269-277.

Sanchez-Perez, A.M., Soriano, S., Clarke, A.R., and Gaston, K. 1997. Disruption of the

2788028802

human papillomavirus type 16 E2 gene protects cervical carcinoma cells from E2F-induced apoptosis. *J Gen Virol* 78 : 3009–3018.

Santi, D.V., Norment, A., and Garrett, C.E. 1984. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 6993–6997.

Scheffner, M., Muenger, K., Byrne, J.C., and Howley, P.M. 1991. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 5523-5527.

Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., and Howley, P.M. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63 : 1129-1136.

Seligson, D.B., Horvath, S., Shi, T., Yu, H., Tze, S., Grunstein, M., and Kurdistani, S.K., 2005. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 435 : 1262-1266.

Shaw, R.J., Liloglou, T., Rogers, S.N., Brown, J.S., Vaughan, E.D., Lowe, D., and Field, J.K. 2006. Promoter methylation of P16, RARβ, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer : quantitative evaluation using pyrosequencing. *Br J Cancer* 94 : 561-568.

Singal, R., and Ginder, G.D. 1999. DNA methylation. *Blood* 12 : 4059-4070.

Spardy, N., Covella, K., Cha, E., Hoskins, E.E., Wells, S.I., Duensing, A., and Duensing, S. 2010. HPV-16 E7 attenuates DNA damage checkpoint control by increasing the proteolytic turnover of claspin. *Cancer Res* 69 : 7022-7029.

Stevaux, O., and Dyson, N.J. 2002. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 14 : 684-691.

Stresemann, C., and Lyko, F. 2008. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer* 123 : 8-13.

Strunnikova, M., Schagdarsurengin, U., Kehlen, A., Garbe, J.C., Stampfer, M.R., and Dammann, R. 2005. Chromatin inactivation precedes *de novo* DNA methylation during the progressive epigenetic silencing of the *RASSF1A* promoter. *Cell Biol* 25 : 3923-3933.

Suzuki, M., Toyooka, S., Shivapurkar, N., Shigematsu, H., Miyajima, K., Takahashi, T., *et al.* 2005. Aberrant methylation profile of human malignant mesotheliomas and its relationship to SV40 infection. *Oncogene* : 1302-1308.

Sweeney,C., Murphy, M., Kubelka, M., Ravnik, S.E. Hawkins, C.F., Wolgemuth, D.J., *et al.* 1996. A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Development* 122 : 53-64.

2788028802

Takiguchi, M., Achanzar, W.E., Qu, W., Li, G., Waalkes, M.P. 2003. Effects of cadmium on DNA-(cytosine-5)methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp Cell Res* 286 : 355-365.

Tamaru, H., and Selker, E.U. 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414 : 277-283.

Tatemichi, M., Hata, H., Tazawa, H., and Nakadate, T. 2008. Lipopolysaccharide induces aberrant hypermethylation of Hic-1 in mouse embryonic fibroblasts lacking p53 gene. *Anticancer Research* 28 : 2101-2108.

Todorovic, B., Hung, K., Massimi, P., Avvakumov, N., Dick, F.A. Shaw, G.S., *et al.* 2012. Conserved region 3 of human papillomavirus 16 E7 contributes to deregulation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol* 86: 13313-13323.

Tokumaru, Y., Yamashita, K., Osada, M., Nomoto, S., Sun, D.I., Xiao, Y. *et al.* 2004. Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing. *Cancer Res* 64 : 5982–5987.

Tsai, C.L., Li, H.P., Lu, Y.J., Hsueh, C., Liang, Y., Chen C.L. *et al.* 2006. Activation of DNA methyltransferase1 by EBV LMP1 involves c-Jun NH(2)-terminal kinase signaling. *Cancer Res* 66 : 11668-11676.

Ueda, Y., Okano, M., Williams, C., Chen, T.P., Georgopoulos, K., and Li, E. 2006. Roles for Dnmt3b in mammalian development: a mouse model for the ICF syndrome. *Development* 133 : 1183-1192.

Vaissiere, T., Sawan, C., and Herceg, Z. 2008. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research* 659 : 40-48.

Villiers, E.M. 1989. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 63 : 4898-4903.

Waalkes, M.P. 2000. Cadmium carcinogenesis in reiew. *J Inorg Biochem* 79 : 241-244.

Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V. *et al.* 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189 : 12-9.

Watanabe, D., Suetake, I., Tada, T., and Tajima, S. 2002. Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech Dev* 118 : 187-190.

Werness, B., Levine, A., and Howley, P. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248 : 76-79.

Whitehead, K.A., Langer, R., and Anderson, D.G. 2009. Knocking down barriers :

2788028802

advances in siRNA delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 8 : 129-138.

Wilaklak, S. 2009. Epidemiologic report of gynecologic cancer in Thailand. *J Gynecol Oncol* 20 : 81-83.

Wright, T.C., Denny, L., Kuhn, L., Pollak, A., and Lorincz, A. 2000. HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer. *JAMA* 283 : 81-86.

Yanatatsaneejit, P., Chalermchai, T., Kerekhanjanarong, V., Shotelerkuk, K., Supiyaphan, P., Mutirangura, A., *et al.* 2008. Promoter hypermethylation of *CCNA1,RARRES1,* and *HRASLS3* in nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncology* 44 : 400-406.

Yanatatsaneejit, P., Mutirangura, A., and Kitkumthorn, N. 2011. Human papillomavirus's physical state and cyclin A1 promoter methylation. *Int J Gynecol Cancer* 21 : 902-906.

Yang, N., Eijsink, J.J.H., Lendvai, A., Volders, H.H., Klip, H., Buikema, H.J. *et al.* 2009. Methylation markers for CCNA1 and C13ORF18 are strongly associated with high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in cervical scrapings. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 11 : 3000-3007.

Yang, W.T., and Zheng, P.S. 2014. Promoter hypermethylation of KLF4 inactivates its tumor suppressor function in cervical carcinogenesis. *PLoS ONE* 9 : e88827.

Yardley, K. 2001. Understanding cervical dysplasia: A holistic treatment protocol. *British Journal of Phytotherapy* 5 : 4.

Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C.C., Schlegel, R., and Howley, P.M. 1985. Presence and expression of human papillomavirus sequence in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 119 : 361-366.

Yoo, C.B., and Jones, P.A. 2006. Epigenetic therapy of cancer : past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 5 : 37-50.

Yu, J., Zhang, H.Y., Ma, Z.Z., Lu, W., Wang, Y.F., and Zhu, J.D. 2003. Methylation profileing of twenty four genes and the concordant methylation behaviors of nineteen genes that may contribute to hepatocellular carcinoma. *Cell Res* 13 : 319-333.

Zhao, C.Q., Young, M.R., Diwan, B.A., Coogan, T.P., Waalkes, M.P. 1997. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 10907-10912.

Zhong, S., Tang, M.W., Yeo, W., Liu, C., Lo, Y.M., and Johnson, P.J. 2002. Silencing of GSTP1 gene by CpG island DNA hypermethylation in HBV-associated hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 8 : 1087-1092.

2788028802

Zur Hausen, H. 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 : F55-F78.

ระบบออนไลน์

American Cancer Society [ACS]. *HPV vaccine : who should be vaccinated and when?*. [online]. 2013. Available from http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/othercarcinogens/infectiousagents/hpv/humanpapillomavirusandhpvvaccinesfaq/hpv-faq-who-should-get-hpv-vaccines [2013, January 3]

ภาคผนวก

2788028802

ภาคผนวก ก

1. ผลการศึกษาการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine

Azacytidine concentration (uM)	Met Or Unmet	Rep 1 (%)	Rep 2 (%)	Rep 3 (%)	Rep 4 (%)	Rep 5 (%)	Average (%)
0	met	43.73	47.11	45.32	30.20	38.15	42.42
	unmet	56.27	52.89	54.68	69.80	61.85	57.58
3	met	39.27	42.54	40.39	27.78	36.56	38.50
	unmet	60.73	57.46	59.61	72.22	63.44	61.50
5	met	30.03	34.98	39.14	25.98	35.95	34.31
	unmet	69.97	65.02	60.86	74.02	64.05	65.69
7	met	28.70	29.59	35.72	26.92	29.29	30.79
	unmet	71.30	70.41	64.28	73.08	70.71	69.21

ตารางที่ 19 เปอร์เซนต์ methylation และ unmethylation บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine

27880288O2

2. ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa และ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine

2.1 การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ 5'-azacytidine

Azacytidine concentration (uM)	Gene	Rep 1 (%)	Rep 2 (%)	Rep 3 (%)	Rep 4 (%)	Rep 5 (%)	Average (%)
0	*HAT*	63.18	44.78	70.37	49.39	55.46	56.64
	CCNA1	36.82	55.22	29.63	50.61	44.54	43.36
3	*HAT*	64.24	43.91	66.58	46.88	52.87	54.90
	CCNA1	35.76	56.09	33.42	53.12	47.13	45.10
5	*HAT*	62.91	42.87	58.23	33.03	44.70	48.35
	CCNA1	37.09	57.13	41.77	66.97	55.30	51.65
7	*HAT*	66.34	34.08	44.76	35.12	42.68	44.60
	CCNA1	33.66	65.92	55.24	64.88	57.32	55.40

ตารางที่ 20 เปอร์เซนต์การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ 5'-azacytidine

2.2 การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine

Azacytidine concentration (uM)	Gene	Rep 1 (%)	Rep 2 (%)	Rep 3 (%)	Rep 4 (%)	Rep 5 (%)	Average (%)
0	*HAT*	79.49	63.93	51.63	47.95	52.81	59.16
	CCNA1	20.51	36.07	48.37	52.05	47.19	40.84
3	*HAT*	70.25	56.37	49.38	43.57	49.39	53.79
	CCNA1	29.75	43.63	50.62	56.43	50.61	46.21
5	*HAT*	68.92	47.38	46.11	38.58	41.74	48.55
	CCNA1	31.08	52.62	53.89	61.42	58.26	51.45
7	*HAT*	47.06	41.49	40.53	34.59	38.56	40.45
	CCNA1	52.94	58.51	59.47	65.41	61.44	59.55

ตารางที่ 21 เปอร์เซนต์การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine

2788028802

3. ผลการศึกษาการปริมาณ *E7 si*RNA และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทรานสเฟ็ก

3.1 ปริมาณ *E7* siRNA ที่เหมาะสมต่อการทรานสเฟ็ก

เงื่อนไข (condition)	ค่า Ct	
	GAPDH	*E7*
Scrambled siRNA	18.97	23.70
	19.01	24.12
	19.97	24.05
*E7*siRNA condition 2	14.82	24.12
	14.82	23.74
	15.07	23.72
*E7*siRNA condition 3	13.56	20.62
	13.52	20.98
	13.46	20.90
*E7*siRNA condition 4	21.81	27.01
	21.71	26.88
	21.94	26.75
*E7*siRNA condition 5	14.69	22.42
	14.84	22.55
	14.39	22.65
*E7*siRNA condition 6	14.38	22.23
	14.79	22.44
	14.60	22.53
*E7*siRNA condition 7	13.69	21.85
	13.17	21.79
	12.22	22.00

ตารางที่ 22 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *E7* จากการทำ real time PCR เพื่อหาปริมาณ *E7* siRNA ที่เหมาะสมต่อการทรานสเฟ็ก

2788028802

3.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทรานสเฟ็ก

เงื่อนไข (condition)	ค่า Ct	
	GAPDH	*E7*
Scrambled siRNA 48 ชั่วโมง	13.75	18.35
	14.13	18.33
	13.56	18.45
*E7*siRNA 48 ชั่วโมง	13.95	19.14
	13.87	18.96
	13.88	18.62
Scrambled siRNA 72 ชั่วโมง	24.91	26.82
	24.93	26.99
	24.93	26.91
*E7*siRNA 72 ชั่วโมง	24.83	27.27
	24.75	27.47
	24.65	27.68

ตารางที่ 23 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *E7* จากการทำ real time PCR เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทรานเฟ็ก

2788028802

4. ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *E7* และยีน *CCNA1* และการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ E7 และ scrambled siRNA

4.1 การแสดงออกของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* และ scrambled siRNA

ลำดับที่ของการซ้ำ (replication)	siRNA	ค่า Ct	
		GAPDH	*E7*
Rep 1	Scrambled siRNA	15.68	13.91
		15.80	13.86
	E7 siRNA	20.34	19.39
		19.97	19.29
Rep 2	Scrambled siRNA	12.27	18.89
		12.07	18.96
	E7 siRNA	13.13	20.11
		12.90	20.09
Rep 3	Scrambled siRNA	15.82	17.35
		15.73	16.47
	E7 siRNA	12.86	15.45
		11.40	13.64
Rep 4	Scrambled siRNA	13.82	10.08
		13.93	10.11
	E7 siRNA	13.85	10.44
		13.96	10.97

ตารางที่ 24 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *E7* จากการทำ real time PCR ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA

2788028802

4.2 การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* และ scrambled siRNA

ลำดับที่ของการซ้ำ (replication)	siRNA	ค่า Ct	
		GAPDH	*CCNA1*
Rep 1	Scrambled siRNA	14.18	25.00
		12.84	21.88
	E7 siRNA	16.98	23.98
		13.39	20.78
Rep 2	Scrambled siRNA	13.65	26.98
		13.17	25.99
	E7 siRNA	15.52	25.46
		14.95	25.52
Rep 3	Scrambled siRNA	15.92	23.83
		15.87	23.94
	E7 siRNA	15.79	21.27
		15.98	21.99
Rep 4	Scrambled siRNA	15.47	25.72
		15.62	25.98
	E7 siRNA	15.96	28.76
		15.83	28.93

ตารางที่ 25 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *CCNA1* จากการทำ real time PCR ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* และ scrambled siRNA

2788028802

4.3 ระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* และ scrambled siRNA

ลำดับที่ของการซ้ำ (replication)	Met or Unmet (%)	siRNA	
		E7 siRNA	Scrambled siRNA
Rep 1	met	61.37	66.91
		57.73	66.99
	unmet	38.63	33.09
		42.27	33.01
Rep 2	met	50.45	63.48
		59.37	63.46
	unmet	49.55	36.52
		40.63	36.54
Rep 3	met	56.88	63.47
		43.77	51.82
	unmet	43.12	36.53
		56.23	48.18
Rep 4	met	39.37	57.75
		37.63	51.89
	unmet	60.63	42.25
		62.37	48.11

ตารางที่ 26 เปอร์เซนต์ methylation และ unmethylation บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* และ scrambled siRNA

2788028802

5. ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *E7* และยีน *CCNA1* และการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid

5.1 การแสดงออกของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid

ลำดับที่ของการซ้ำ (replication)	plasmid	ค่า Ct	
		GAPDH	*E7*
Rep 1	*E7*	22.95	19.01
		22.71	20.86
	empty	17.19	29.70
		17.26	30.99
Rep 2	*E7*	15.63	15.22
		15.49	17.59
	empty	15.66	31.83
		15.52	31.05
Rep 3	*E7*	16.96	16.40
		17.25	15.11
	empty	16.78	31.47
		16.99	31.46
Rep 4	*E7*	16.17	7.39
		15.97	3.91
	empty	16.93	25.21
		16.54	24.99

ตารางที่ 27 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *E7* จากการทำ real time PCR ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid

2786028602

5.2 การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid

ลำดับที่ของการซ้ำ (replication)	plasmid	ค่า Ct	
		GAPDH	*CCNA1*
Rep 1	*E7*	22.95	N/A
		22.71	N/A
	empty	17.19	29.06
		17.26	29.70
Rep 2	*E7*	15.63	26.02
		15.49	26.01
	empty	15.66	25.09
		15.52	24.30
Rep 3	*E7*	26.39	29.96
		25.99	29.86
	empty	18.92	19.55
		18.81	18.89
Rep 4	*E7*	15.97	15.61
		15.73	14.46
	empty	16.93	14.45
		16.17	15.09

ตารางที่ 28 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *E7* จากการทำ real time PCR ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid

2788028802

5.3 ระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid

ลำดับที่ของการซ้ำ (replication)	Met or Unmet (%)	plasmid	
		E7	empty
Rep 1	met	60.35	54.32
		61.60	46.44
	unmet	39.65	45.68
		38.40	53.56
Rep 2	met	36.46	35.65
		29.04	35.65
	unmet	63.54	64.35
		70.96	64.35
Rep 3	met	57.36	30.19
		51.86	30.19
	unmet	42.64	69.81
		48.14	69.81
Rep 4	met	40.56	30.60
		55.43	34.58
	unmet	59.44	69.40
		44.57	65.42

ตารางที่ 29 เปอร์เซนต์ methylation และ unmethylation บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid

2788028802

ภาคผนวก ข

1. การเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์จากเซลล์แช่แข็ง (thaw cell)

ในการทำ cell culture ทุกครั้งต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ ก่อนใช้งานตู้ทุกครั้งควรเปิด uv เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที เพื่อทำลายจุลชีพต่างๆ จากนั้นจึงเช็ดทำความสะอาดพื้นที่ในตู้ด้วย 70% แอลกอฮอล์ รวมถึงอุปกรณ์ทุกอย่างที่จะต้องนำไปใช้ภายในตู้ เช่น ขวดอาหารเลี้ยงเซลล์ สายยางสำหรับทำ suction เป็นต้น และหลังจากใช้งานตู้เสร็จทุกครั้งให้ทำความสะอาดตู้ด้วย 70% แอลกอฮอล์เช่นเดียวกัน

โดยปกติ cell line จะถูกเก็บแช่แข็งไว้ในหลอด cryotube ภายในถังไนโตรเจนเหลว เพื่อการเก็บรักษาในระยะยาว ดังนั้น การเริ่มเลี้ยงเซลล์จึงต้องทำให้เซลล์ที่ถูกแช่แข็งไว้ละลายเสียก่อน โดยการแช่ หลอด cryotube ไว้ใน water bath อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 1-2 นาที จากนั้นดูดเซลล์ในหลอดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์มีการกระจายตัวที่ดี แล้วจึงดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร (T25) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งประกอบด้วย 10% FBS และ 1% antibiotic-antimycotic รวมปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นให้เอียงขวดเลี้ยงเซลล์ไปมา เพื่อให้เซลล์กระจายตัวอย่างทั่วๆ เลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ความชื้น 95-99% และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เกาะที่ผิวขวดเลี้ยงเซลล์ แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อป้องกันความเป็นพิษจาก DMSO ที่เป็นส่วนประกอบในการแช่แข็งเซลล์ซึ่งรวมอยู่กับอาหารเลี้ยงเซลล์ในคราวแรก

2. การเลี้ยงเซลล์

เมื่อเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในขวดเลี้ยงเซลล์ T25 โตประมาณ 80% ขึ้นไป (80% confluent cells) ต้องมีการเคลื่อนย้ายเซลล์ไปเลี้ยงต่อในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร (T75) เริ่มแรกดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในขวดทิ้งให้หมดโดยใช้ suction แล้วล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยแต่ละครั้งของการล้างให้เอียงขวดเลี้ยงเซลล์ไปมาเพื่อให้เซลล์ถูกล้างอย่างทั่วถึงและกำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกได้หมด จากนั้นเติม trypsin EDTA ปริมาตร 0.5-1 มิลลิลิตร (trypsinization) แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ประมาณ 3-5 นาที เพื่อช่วยให้เซลล์หลุดออกจากผิวขวดเลี้ยงเซลล์ ระยะเวลาที่ใช้บ่มขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ในขวด และความสามารถใน) เมื่อครบเวลาให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร (การยืดเกาะของเซลล์2 เท่าของ trypsin ที่ใช้ เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ trypsin ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลง หลังจากนั้นย้ายไปใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหาร 14 มิลลิลิตร รวมปริมาตร 15 มิลลิลิตร เอียงขวดเลี้ยงเซลล์ไปมา เพื่อให้เซลล์กระจายตัวทั่วๆ แล้วเลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นควรตรวจดูการโตของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อย่างสม่ำเสมอ หากเซลล์ยังโตไม่มากพอ แต่สีของอาหารเลี้ยงเซลล์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีส้มอมเหลือง หรือสีเหลืองควรเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ เพื่อเพิ่มอาหารให้แก่เซลล์ แต่หากเซลล์โตมากกว่า 80% ซึ่งปกติอาหารเลี้ยงเซลล์จะมีสีเปลี่ยนไป สามารถเก็บเซลล์ไปทำการทดลอง เช่น สกัดดีเอ็นเอ หรืออาร์

2788028802

เอ็นเอ เป็นต้น หรือลดจำนวนเซลล์ให้มีปริมาณน้อยลงประมาณ 10-20% โดยทำตามขั้นตอนข้างต้น และเซลล์ที่เหลืออาจแบ่งเลี้ยงเพิ่มเป็นหลายๆ ขวด หรือเก็บเซลล์แช่แข็งเพื่อการรักษาในระยะยาวต่อไป

3. การแช่แข็งเซลล์ (cell freezing)

การแช่แข็งเซลล์ เป็นการเก็บรักษาเซลล์ในระยะยาวเพื่อให้เซลล์คงสภาพเดิม และเพื่อใช้สำหรับการศึกษาในอนาคต เริ่มต้นโดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในขวดทิ้งให้หมดโดยใช้ suction แล้วล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 3 มิลลิลิตรตามลำดับ แต่ละครั้งของการล้างให้เอียงขวดเลี้ยงเซลล์ไปมาเพื่อให้เซลล์ถูกล้างอย่างทั่วถึงและกำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกได้หมด จากนั้นเติม trypsin EDTA 1-2 มิลลิลิตร (trypsinization) แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ประมาณ 3-5 นาที เพื่อช่วยให้เซลล์หลุดออกจากผิวขวดเลี้ยงเซลล์ (ระยะเวลาที่ใช้บ่มขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ในขวดและความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์) เมื่อครบเวลาให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 เท่าของ trypsin ที่ใช้ เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ trypsin ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลง แล้วย้ายไปยังหลอด polypropylene ขนาด 15 ml ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทสารส่วนบนทิ้ง แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เท PBS ทิ้ง แล้วล้างตะกอนเซลล์ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ระหว่างนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับ 10% DMSO โดย DMSO จะเป็นตัวช่วยลดการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ในช่วงการลดอุณหภูมิลง (cryoprotectant) หลังจากปั่นตกตะกอนเสร็จแล้วเท PBS ทิ้ง แล้วค่อยๆ หยดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO ลงบนตะกอนเซลล์ พร้อมกับดีดหลอดเพื่อให้ตะกอนเซลล์แยกออกจากกัน จากนั้นแบ่งใส่หลอดสำหรับเก็บเซลล์ (cryotube vial) หลอดละ 1.8 มิลลิลิตร นำหลอดทั้งหมดไปใส่ในกล่องลดอุณหภูมิทีละ 1 องศาเซลเซียส แล้วนำกล่องไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 1-2 วันจึงย้ายหลอดทั้งหมดไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว

4. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform-isoamyalcohol

หลังจากที่ตะกอนเซลล์ถูกย่อยจนหมด หรืออาจสังเกตจากสารละลาย (ตัวอย่าง) ในหลอดว่าไม่เหลือความหนืดแล้ว จึงดูดตัวอย่างใส่หลอดขนาด 1.5 ml ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลอด เติม phenol-chloroform-isoamyalcohol (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่าง (500 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอน 14,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที จากนั้นดูดตัวอย่างส่วนบน (upper layer) ใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ เติม 100% ethanol ปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่าง และ 7.5M ของ CH_3COONH_4 ปริมาตร 0.5 เท่าของตัวอย่าง คว่ำหงายหลอดเพื่อผสมสารในหลอดให้เข้ากันกับตัวอย่าง แล้วนำไปปั่นตกตะกอน 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะเห็นตะกอนดีเอ็นเอสีขาวที่ก้นหลอด ดูดของเหลวด้านบน (supernatant) ทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอน 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูด

2788028802

supernatant ทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย distilled water (dH_2O) ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับความมากน้อยของตะกอนดีเอ็นเอ นำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ เก็บดีเอ็นเอที่ได้ในตู้ -20 องศาเซลเซียส หรือนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดความเข้มข้นเพื่อนำไปใช้ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป

5. การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี trizol

เติม trizol 1 มิลลิลิตรลงบนตะกอนเซลล์ ใช้ปิเปตต์ดูด trizol ขึ้นลงเพื่อผสมกับเซลล์และทำให้เซลล์แตก บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารในหลอดให้เข้ากันโดยการเขย่าหลอดแรงๆ เป็นเวลา 15 วินาที ตั้งบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที ปั่นตกตะกอน 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ดูด upper layer ไปใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ แล้วเติม 100% isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร คว่ำหงายหลอดเพื่อผสมสารในหลอดให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ปั่นตะตกกอน 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที จากขั้นตอนนี้อาจเห็นตะกอนอาร์เอ็นเอที่ก้นหลอด ดูด supernatant ทิ้ง แล้วล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอน 7,500 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเท supernatant แล้วตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย nuclease free water ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับความมากน้อยของตะกอนอาร์เอ็นเอ นำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ เก็บอาร์เอ็นเอที่ได้ในตู้ -80 องศาเซลเซียส หรือนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปวัดความเข้มข้นเพื่อนำไปใช้ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป

2788028802

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นางสาวโชติพร ชเลิศเพ็ชร์

วันเดือนปีเกิด 26 ธันวาคม พ.ศ. 2528

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต (พันธุศาสตร์) ปีการศึกษา 2550 จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2553 และได้รับทุนอุดหนุนการศึกษา และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติเผยแพร่ผลงาน

1. การประชุมวิชาการ 2551 (The Science Forum 2008) ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หัวข้อเรื่อง The effect of carbon sources on cutinase production from PBURU-B5 (Ascomycota, Hypocreacea)

2. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 52 วันที่ 6 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หัวข้อเรื่อง กลไกของโปรตีน E7 ของ HUMAN PAPILLOMAVIRUS ไทป์ 16 ในการเกิดเมทิเลชัน และการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูก

2788028802