

การพัฒนาชุดตรวจกรองหาเชื้อ Human papillomavirus type 58 ในผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค Loop-Mediated isothermal amplification

Development of Screening Test for Detection of Human Papillomavirus Type 58 in Thai Patients with Cervical Carcinoma Using Loop-Mediated Isothermal Amplification Method

จิตรลัดดา แซ่เตี๋ย (Chitladda Saetiew)* ดร.เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์ (Dr.Temduang Limpaboon)**
ดร.พัชรี เจียรนัยกูร (Dr.Patcharee Jearanaikoon)** ดร.จूरีรัตน์ ดาดวง (Dr.Jureerut Daduang)***

บทคัดย่อ

การติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) ชนิดเสี่ยงสูงเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูก ในการศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจจำแนกเชื้อ HPV ชนิดเสี่ยงสูงที่พบบ่อยในประเทศไทยคือ HPV type 58 ด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification ซึ่งเป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิคงที่ ณ 63°C ซึ่งใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมงก็สามารถอ่านผลจากความขุ่นที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า ทำให้ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ โดยใช้เพียง water bath เพื่อปรับอุณหภูมิก็เพียงพอ จากการศึกษาพบว่า เทคนิค LAMP มีความไวและความจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายเทียบเท่าเทคนิค nested PCR ซึ่งสามารถตรวจพบในตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายต่ำที่ 10^3 copies ได้ และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกพบว่าให้ผลสอดคล้องกันทุกราย จึงสรุปได้ว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาเชื้อได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ ราคาเหมาะสม ลดแรงงาน ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นเทคนิคสำหรับตรวจหาเชื้อ HPV ในห้องปฏิบัติการได้

ABSTRACT

Infection with high-risk human papillomavirus is a major risk factor for development of cervical cancer. In this study we developed LAMP technique for detection of HPV type 58 which is one of most prevalent type in Thailand. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a rapid method that can amplify nucleic acid under isothermal condition with high specificity and sensitivity. The reaction was incubated at 63 °C for 60 min and the amplified product can be visualized directly by naked eye. Therefore, simple equipment such as a regular water bath is enough to maintain the isothermal conditions. The sensitivity and specificity of this assay was shown to be equivalent to nested PCR that could amplify 10^3 copies of target DNA. The result of LAMP in clinical sample was found to be consistent with nested PCR. Due to its simplicity, rapidity and high sensitivity, LAMP might be used as the alternative technique for HPV detection in medical diagnostic laboratories.

คำสำคัญ : ฮิวแมน ปาปิโลมาไวรัส มะเร็งปากมดลูก

Key Words : Human papillomavirus, Cervical cancer, Loop-Mediated isothermal amplification

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** รองศาสตราจารย์ กลุ่มวิชาเคมีคลินิก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ กลุ่มวิชาเคมีคลินิก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับหนึ่งของมะเร็งในสตรีไทย (Vatanasapt *et al.* 2002; Parkin *et al.* 2005) จึงนับได้ว่าเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญของประเทศอย่างหนึ่ง สาเหตุสำคัญของมะเร็งปากมดลูกคือการติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) ชนิดเสี่ยงสูงในบริเวณอวัยวะเพศ หรือบริเวณปากมดลูก จากการศึกษาพบว่า เชื้อ HPV ที่พบมากได้แก่ type 16, 18, 45, 52, 56 และ 58 ซึ่งผลการศึกษาในตัวอย่าง DNA ของผู้ป่วยพบว่า HPV type 58 เป็นชนิดที่พบมากในประเทศไทย รองจาก HPV type 16 และ 18 ข้อมูลรายงานวิจัยพบว่ามะเร็งปากมดลูกมีความเกี่ยวข้องกับเชื้อ HPV ถึง 90-95% (Munoz, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในประเทศไทย (Sukviroch *et al.* 1994) สำหรับกลไกของไวรัสที่เกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดมะเร็งมาจากโปรตีน E6 และ E7 ที่สร้างมาจากจีนของไวรัสในกลุ่ม high risk นั้นสามารถรบกวนการทำงานของโปรตีน p53 (Scheffner *et al.* 1990) และ pRb (Weist *et al.* 2002) ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) และขบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ

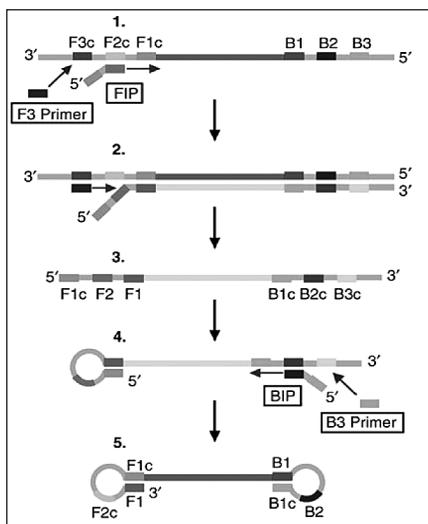
มะเร็งปากมดลูก เป็นมะเร็งที่สามารถรักษาให้หายได้แต่ต้องตรวจพบตั้งแต่ในระยะก่อนเป็นมะเร็งหรือระยะก่อนลุกลามจึงจะได้ผลดีเกือบร้อยเปอร์เซ็นต์ ซึ่งในปัจจุบันมีการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค Pap smear แต่อย่างไรก็ตามหากมีการติดตามเฝ้าระวังการติดเชื้อ HPV ร่วมด้วย ก็จะเป็นการเฝ้าระวังการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้ในอนาคต และในรายที่ยังไม่พบการติดเชื้ออาจป้องกันได้ด้วยการฉีดวัคซีน โดยทั่วไปการตรวจแยกชนิดของเชื้อ HPV นิยมใช้วิธีทางด้านพันธุศาสตร์โดยเทคนิค PCR อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้แม้จะเป็นที่นิยมและใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ต้องทำ PCR ด้วยเครื่องมือเฉพาะ มีหลายขั้นตอน ยุ่งยาก มีต้นทุนสูง และใช้เวลานาน ต่อมาในปี ค.ศ. 2000 Notomi และคณะ (Notomi *et al.* 2000) ได้พัฒนาเทคนิคเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยมีหลักการพื้นฐานคล้าย

กับการทำ PCR ชื่อว่า Loop-Mediated isothermal amplification (LAMP) โดยเทคนิค LAMP นี้มีข้อแตกต่างจากการทำ PCR อยู่ 4 ประการหลักคือ ประการที่หนึ่ง อาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เสถียร และสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 60-65 °C โดยทำหน้าที่แยก DNA สายคู่เป็นสายเดี่ยวได้ (strand displacement) โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูงเหมือนใน PCR นอกจากนี้ *Bst* DNA polymerase ยังสามารถเร่งการสังเคราะห์สายพอลิเมอร์ของ DNA (Polymerase activity) โดยเติม dNTP เข้าทางด้าน 3'-OH ของสายที่กำลังสร้าง พร้อมกับมี pyrophosphate ions (PPi) ถูกปล่อยออกมา จากนั้น PPi จะจับกับ magnesium ions ที่มีอยู่ในสารละลาย กลายเป็นตะกอนสีขาวที่ไม่ละลายน้ำที่เรียกว่า magnesium pyrophosphate (Mori *et al.* 2001) ทำให้การอ่าน และแปลผลง่าย เนื่องจากหากมีผลบวกจะพบความขุ่นเกิดขึ้นในหลอดทดลอง สามารถดูด้วยตาเปล่า ดังนั้นจากคุณสมบัติของ *Bst* DNA polymerase ที่กล่าวมาทำให้สามารถทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายได้ภายใต้อุณหภูมิเดียว เช่นที่ 63 °C ประการที่สอง คือ LAMP ต้องการ DNA สายเดี่ยวที่มีโครงสร้างคล้ายดัมเบล (dumbbell-shaped DNA structures) เป็น DNA ต้นแบบ (DNA template) โดยโครงสร้างเหมือนดัมเบลได้เพราะมี loop ที่ปลายทั้งทางด้าน 3' และ 5' ซึ่งอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่าง *Bst* DNA polymerase และ primer ที่มีลักษณะเฉพาะ ประการที่สาม คือ ชุดของ primers โดย 1 ชุด มีจำนวน 4 เส้น (รวมทั้งด้าน Forward และ Reverse) ซึ่งลำดับของนิวคลีโอไทด์ใน primer ต้องออกแบบอย่างจำเพาะต่อจีโนมเป้าหมาย (target sequence) จำนวน 6 บริเวณ โดย primer ประกอบไปด้วย inner primers จำนวน 2 เส้น (FIP และ BIP) ทำหน้าที่สร้าง loop และ outer primers จำนวน 2 เส้น (F3 และ B3) ทำหน้าที่ช่วยให้เกิด strand displacement สมบูรณ์ตลอดสาย ทั้งนี้ outer primer จะถูกใช้เพียงใน Initial step เท่านั้น และนอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่ม loop primers เข้าไปยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น (Nagamine *et al.* 2002)

ประการที่สี่ คือ LAMP product มีหลากหลายขนาดแตกต่างกัน หากนำมาทำ agarose gel electrophoresis จะพบเป็นแถบ ladder

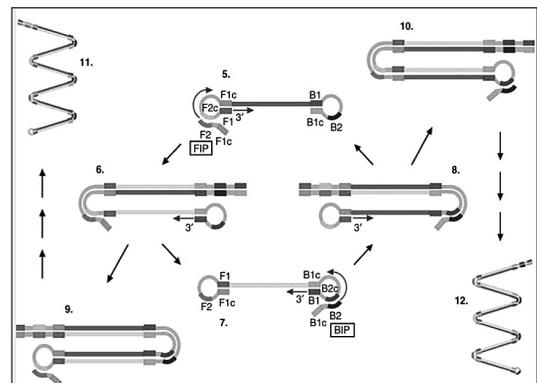
การเพิ่มจำนวน DNA โดยเทคนิค LAMP มี 2 ขั้นตอนที่สำคัญคือ

ขั้นตอนเริ่มต้น (Initial step) เพื่อสร้าง dumbbell-shaped DNA structures เริ่มจาก *Bst* DNA polymerase ทำหน้าที่ strand displacement โดย inner primer จะจับกับ DNA เป้าหมาย แต่มีบางส่วนของ primer ในบริเวณปลาย 5' เหลือ over hanging ไว้ซึ่งเป็นส่วนที่มีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสของ DNA สายใหม่ที่จะสร้างขึ้น จึงสามารถโค้งมาจับทำให้เกิดโครงสร้างแบบ loop ได้ที่ปลาย 5' และในเวลาใกล้เคียงกัน DNA สายใหม่อีกสายก็ถูกสร้างขึ้นจาก template เส้นเดิมแต่มี outer primers เข้ามาจับโดยที่ DNA สายใหม่ที่สร้างจาก outer primer นี้จะแทนที่และรีด dumbbell-shaped DNA structures ออกจาก DNA template ทำให้สามารถเกิดโครงสร้างแบบ loop ได้ที่ปลาย 3' เกิดโครงสร้างคล้ายดัมเบล ซึ่งถูกใช้เป็น DNA ต้นแบบในขั้นตอนการสังเคราะห์ และเพิ่มจำนวน DNA ให้มีสายยาวแบบลูกโซ่ (cycling amplification step) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิคงที่ จึงเรียกปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน DNA แบบนี้ว่า loop-mediated isothermal amplification ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการสร้าง Dumbbell-shaped DNA structures ใน initial step เพื่อใช้เป็น DNA template ในเทคนิค LAMP

2. ขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA แบบหมุนเวียนต่อเนื่อง (cycling amplification step) โดย inner primer เข้าจับในบริเวณ loop และ *Bst* DNA polymerase เติม nucleotide ที่มีเบสคู่สมทางด้านปลาย 3' ของ primer ได้ DNA สายใหม่ แล้ว DNA สายใหม่จะถูกแทนที่ และถูกรีตออกเพื่อเป็น DNA template ต่อไปโดยปฏิกิริยาจะหมุนเวียนต่อเนื่องกันอยู่เช่นนี้ จนเกิดโมเลกุลที่เชื่อมต่อกันยาวคล้ายลูกโซ่ หลากหลายขนาดแตกต่างกัน มีโครงสร้างคล้ายดอกกะหล่ำ (cauliflower-like structure) ดังภาพที่ 2 จนสามารถดูผลบวกได้จากความขุ่นที่เกิดขึ้นในหลอดทดลองด้วยตาเปล่า ดังนั้นหากสามารถพัฒนาเทคนิคนี้เพื่อทำการตรวจหาเชื้อ HPV ได้ ก็จะสามารถตรวจพบเชื้อได้อย่างจำเพาะและมีความไวสูง อีกทั้งสะดวกรวดเร็ว และลดการสัมผัสกับสารเคมีที่เป็นพิษได้



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA แบบหมุนเวียนต่อเนื่อง (cycling amplification step)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. จัดตั้งเทคนิคการตรวจกรองหาเชื้อ HPV type 58 ด้วยวิธี Loop-Mediated isothermal amplification (LAMP)
2. ตรวจจำแนกเชื้อ HPV ในตัวอย่างศึกษาด้วย วิธี Loop-Mediated isothermal amplification (LAMP)

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การออกแบบไพรเมอร์ (Primer) สำหรับ LAMP

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อจาก ส่วนของจีน E6/E7 ของ HPV type 58 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับ HPV typing

Primer	Primer sequence (5' → 3')	Genome position
F3	ACATCCTGAACCAACTGACC	618-637
B3	GCTAGGGCACACAATGGTAC	855-836
FIP	CTGTGGCCGGTTGTGCTTGT- TGTGACAGCTCAGACGAGG	724-705/ 658-676
BIP	TACACTTGTGGCACCACGGTT- CCCATAAGCAGCTGCTGTAG	751-772/ 830-811
LF	CCATCTGGCCCGTCCAA	704-688
LB	GTGTATCAACAGTACAACAACCGAC	777-801

พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ HPV type 58

พลาสมิดที่มี HPV จีโนมของเชื้อ type 58 จะใช้เป็นแหล่งดีเอ็นเอในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำ LAMP และทดสอบความสามารถในการตรวจหาเชื้อทั้งด้านความจำเพาะและความไวของเทคนิค ดีเอ็นเอจากตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก จำนวน 8 ราย โดยทุกรายผ่านการตรวจพบว่ามี การติดเชื้อ HPV ด้วยเทคนิค nested PCR ตามวิธีของ Sotlar K และคณะ (Sotlar *et al.* 2004) ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลบวกนี้จะถูกใช้สำหรับทดสอบด้วยเทคนิค LAMP ต่อไป การศึกษานี้ได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ หมายเลข HE531211 จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การเตรียมดีเอ็นเอจากเซลล์ปากมดลูก

นำชิ้นเนื้อตัวอย่างมาเติม proteinase K solution (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS and 400 ug/ml proteinase K) 2 มล. แล้วบ่มไว้ที่ 55°C ซ้ำคืน จากนั้น

วารสารวิจัย มช. (บศ.) 11 (3) : ก.ค. - ก.ย. 2554

สกัด DNA โดยใช้ DNA column kit (GE Healthcare, UK) แล้วตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่ได้ด้วยการวัดความเข้มข้นของ DNA ที่ 260 nm ซึ่ง DNA ที่สกัดได้นี้จะใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจหาเชื้อ HPV type 58 ด้วยเทคนิค nested PCR และ LAMP

การพัฒนาเทคนิคการตรวจด้วยเทคนิค LAMP

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้พลาสมิดที่มีจีโนมของ HPV type 58 นำไปเพิ่มจำนวนในสภาวะที่เหมาะสม (optimal condition) ใน PCR tube โดยมีส่วนประกอบของสารที่เป็น final concentration คือ 0.2 μM Outer primer (F3, B3), 1.6 μM Inner primer (FIP, BIP), 0.4 μM loop primer (Loop F and R), 1× thermopol buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100), 6 mM MgSO₄, 400 μM dNTP, 0.5 M betaine, DNA ของตัวอย่าง ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ solution mixture มีปริมาตรสุทธิเป็น 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำ PCR tube ไปทำขั้นตอน denaturation เพื่อแยกสาย DNA จากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำออกมาแช่น้ำแข็งทันที แล้วเติม *Bst* polymerase (8.0U) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 59, 61, 63 และ 65°C เป็นเวลา 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที เพื่อทดสอบหาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยแต่ละชุดการทดสอบจะหยุดปฏิกิริยาที่ 80°C เป็นเวลา 5 นาที

ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยตาเปล่า โดยเปรียบเทียบความขุ่นกับหลอดควบคุมและทำการวัดความขุ่นโดยใช้ NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop 2000, USA) เพื่อหาค่า Cut-off ในปฏิกิริยา LAMP ซึ่งจะใช้ในการตรวจวัดในตัวอย่าง ศึกษา นอกจากนี้ยังทำการยืนยันผลที่ได้โดยการทำ electrophoresis ที่ 2% agarose gel

ความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของเทคนิค LAMP

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว ทำการเจือจาง พลาสมิดที่มีจีโนมของ HPV type 58 ให้มีจำนวนตั้งแต่ $10^5 - 10^0$ copies แล้วนำไปเพิ่มจำนวนในปฏิกิริยา LAMP

การตรวจสอบความจำเพาะของ LAMP primers ต่อดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำโดยทดสอบต่อเชื้อ HPV ทั้งหมด 6 type คือ HPV type 16, 18, 45, 52, 56 และ 58

การตรวจหาเชื้อ HPV type 58 ในตัวอย่างผู้ป่วย

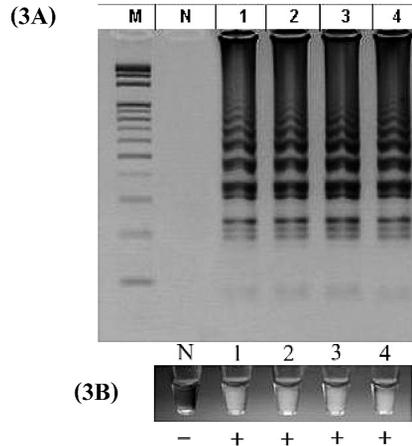
ตัวอย่างผู้ป่วยจำนวน 8 รายที่ทราบผลการตรวจหาเชื้อ HPV ด้วยเทคนิค nested PCR แล้ว จะถูกนำมาใช้เป็นตัวอย่างเพื่อทดสอบด้วยเทคนิค LAMP เพื่อเปรียบเทียบผลที่ได้ต่อไป

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

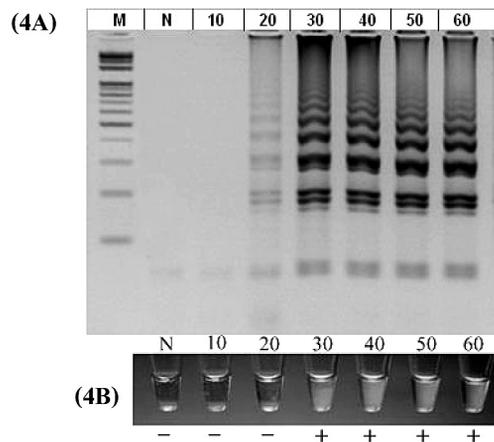
ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP

ผลที่ได้จากการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา พบว่าอุณหภูมิที่ 59, 61, 63 และ 65°C ให้ผลแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้อุณหภูมิที่ 63°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา (ภาพที่ 3)

สำหรับเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา LAMP พบว่าปฏิกิริยาเริ่มเกิดตั้งแต่วันที่ 20 โดยตรวจสอบได้จากผลของ agarose gel electrophoresis แต่สำหรับการตรวจสอบโดยดูความขุ่นนั้น สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 30 และเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 60 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ระยะเวลาที่เหมาะสมที่ 60 นาที (ภาพที่ 4)



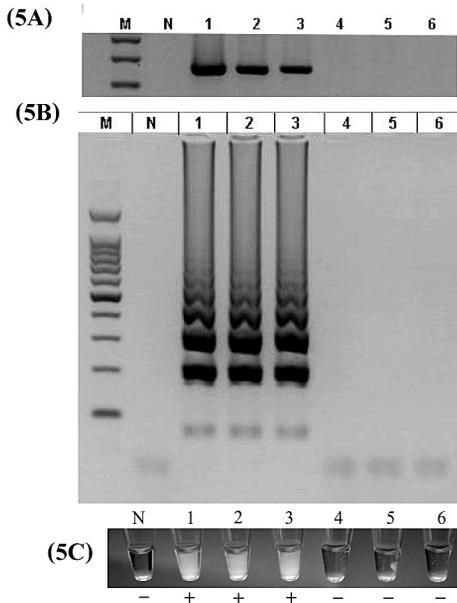
ภาพที่ 3 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP (3A) ผลจาก agarose gel electrophoresis (3B) ผลจากการดูความขุ่นที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา M: 100bp marker; N: negative control; 1-4: อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 59, 61, 63 และ 65°C ตามลำดับ



ภาพที่ 4 ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP (4A) ผลจาก agarose gel electrophoresis (4B) ผลจากการดูความขุ่นที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา M: 100bp marker; N: negative control; 10-60: ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาจาก 10-60 นาที ตามลำดับ

ผลด้านความไวของเทคนิค LAMP

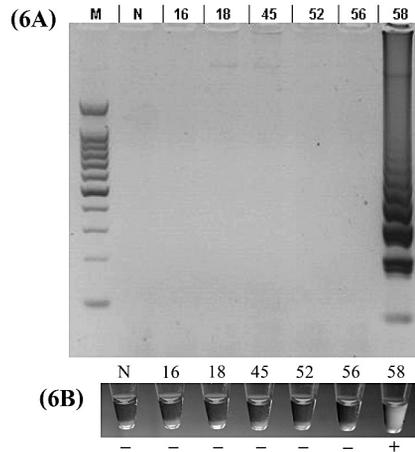
ผลที่ได้พบว่าเทคนิค LAMP สามารถ amplify เชื้อได้ต่ำสุดที่ 1000 copies ซึ่งพบว่ามีความไวเท่ากับเทคนิค nested PCR ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ผลการเปรียบเทียบความไวในการตรวจหาเชื้อ HPV type 58 (5A) ความไวของเทคนิค nested PCR (5B) ความไวของเทคนิค LAMP จาก agarose gel electrophoresis (5C) ความไวของเทคนิค LAMP จากการดูความขุ่นที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา M: 100bp marker; N: negative control; 1-6: ความเข้มข้นของพลาสมิดจาก 10⁵-10⁰ copies ตามลำดับ

ผลด้านความจำเพาะของเทคนิค LAMP

จากผลที่ได้พบว่าเทคนิค LAMP สามารถ amplify เชื้อเป้าหมายได้อย่างจำเพาะ ดังแสดงในภาพที่ 6



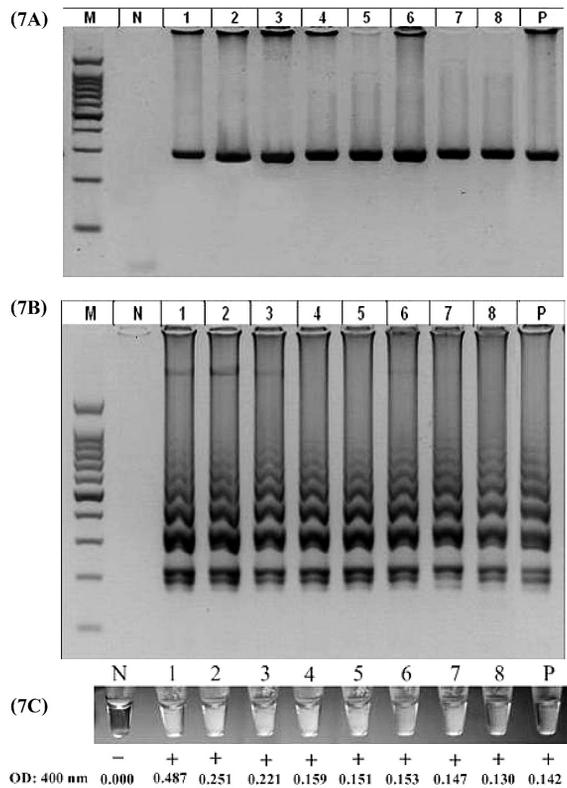
ภาพที่ 6 ผลการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค LAMP ต่อเชื้อ HPV type 58 (6A) ผลจาก agarose gel electrophoresis (6B) ผลจากการดูความขุ่นที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา M: 100bp marker; N: negative control; 16: HPV-16; 18: HPV-18; 45: HPV-45, 52: HPV-52; 56: HPV-56 และ 58: HPV-58

ผลการตรวจหาเชื้อ HPV ในตัวอย่างผู้ป่วย

จากการตรวจหาเชื้อ HPV ในตัวอย่างผู้ป่วยจากการตรวจหาเชื้อในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก จำนวน 8 ราย โดยเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค LAMP กับ เทคนิค nested PCR พบว่าให้ผลสอดคล้องกันทุกราย ทั้งผลที่ได้จากการดูความขุ่นด้วยตาเปล่า และการวัดด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer ที่ 400 nm (ค่า cut-off อยู่ที่ 0.003) และผลที่ได้จากการตรวจด้วย 2% agarose gel ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 7

ตารางที่ 2 อัตราการพบเชื้อ HPV type 58 ในตัวอย่าง ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

HPV typing by nested PCR	LAMP result			
	Turbidity		gel electrophoresis	
58	+	-	+	-
(n = 8)	8	0	8	0



ภาพที่ 7 ผลการตรวจหาเชื้อ HPV type 58 ในตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก (7A) ผลการตรวจหาเชื้อ HPV type 58 ด้วยเทคนิค nested PCR (7B) ผลการตรวจหาเชื้อ HPV type 58 ด้วยเทคนิค LAMP (agarose gel electrophoresis) (7C) ผลจากการดูความขุ่นที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าและตรวจวัดโดยใช้ NanoDrop spectrophotometer ที่ 400 nm M: 100bp marker; N: negative control; P: Positive control; 1-8: ลำดับตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

สรุปผลการวิจัย

เทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาเชื้อได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ มีความจำเพาะสูง ราคาเหมาะสม ลดแรงงาน และลดการสัมผัสกับสารเคมีที่เป็นพิษ เช่น ethidium bromide และแสง UV ที่ใช้ทำ gel electrophoresis ในวิธี conventional PCR ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาใช้เป็นเทคนิคในการตรวจหาเชื้อ HPV ในห้องปฏิบัติการได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนจาก สกว. มหาวิทยาลัย สกว. สาขาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี ประจำปี 2551 เลขที่โครงการ MRG-WII515S066, ทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย และทุนจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และได้รับความอนุเคราะห์ พลาสมีดีเอ็นเอของเชื้อ HPV type 58 จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- Munoz, N. 2000. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 19(1-2): 1-5.
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., and Notomi, T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 289(1):150-4.
- Nagamine, K., Hase, T., and Notomi, T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 16(3): 223-9.
- Notomi, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acid Research.* 28(12): e63.
- Parkin, DM., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55(2): 74-108.
- Scheffner, M., Werness, BA., Huibregtse, JM., Levine, AJ., and Howley, PM. 1990. The E6 oncoprotein is encoded by human papillomaviruses type 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 63: 1129-36.
- Sukviroch, S., Pitakpraisan, P., Kosiyatrakul, T., and Hankittipongpaisarn, P. 1994. Detection of human papillomavirus DNA in normal and cervical carcinoma tissue of Thai females. *Thai Cancer Journal.* 20: 85-91.
- Sotlar, K. 2004. Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology.* 42 (7): 3176-84.
- Vatanasapt, V., Sriamporn, S., and Vatanasapt, P. 2002. Cancer control in Thailand. *Jpn J Clin Oncol.* 32 Suppl: S82-91.
- Wiest, T., Schwarz, E., Enders, C., Flechtenmacher, C., and Bosch, FX. 2002. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene.* 21(10): 1510-17.