การตรวจสอบเชื้อ Human papillomavirus ชนิด 16 ด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification

Detection of Human Papillomavirus Type 16 Using Loop-Mediated Isothermal Amplification

กฤษฎา กฤชกระพัน (Krisada Kritkraphan)* ดร.สุรศักดิ์ แว่นรัมย์ (Dr.Surasak Wanram)**
ดร.ปรีดา ปราการกมานันท์ (Dr.Preeda Prakrankamanant)**

บทคัดย่อ

การติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) ชนิดความเสี่ยงสูงเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูก ในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ HPV ชนิด 16 ด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิคงที่ จากการศึกษาพบว่าเทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นมีความไว 100 viral copy number โดยไม่พบการเกิด cross reaction ต่อ HPV ชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการใช้เทคนิค LAMP เพื่อการตรวจหาเชื้อ HPV ในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่ไม่มีเครื่อง thermolcycler หรือการพัฒนาเพื่อเป็น point-of-care diagnostic ต่อไป

ABSTRACT

Infection with high-risk human papillomavirus is a major risk factor for development of cervical cancer. In this study, the optimal condition for detecting of HPV-16, was developed using the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique. LAMP is a rapid method that can amplify nucleic acid under isothermal condition. The results showed that the sensitivity of developed LAMP was 100 viral copy number and no cross-reaction was observed between other HPV types. The data indicated that LAMP is alternative technique for detecting HPV in low-resources setting laboratory or even further point-of-care diagnostic development.

คำสำคัญ: ฮิวแมน ปาปิลโลมาไวรัส มะเร็งปากมดลูก แลมป์

Keywords: Human papillomavirus, cervical cancer, LAMP

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*
*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*

บทนำ

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดเป็นอันดับสี่ของผู้หญิงและเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งมากที่สุดเป็นอันดับสองของโลก (Hong, 2017) สาเหตุหลักของโรคมะเร็งปากมดลูกคือการติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) ที่ผ่านทางเพศสัมพันธ์ โดยชนิดของ HPV ที่มีความเสี่ยงสูงที่พบได้บ่อยในการเกิดมะเร็งปากมดลูกนั้นได้แก่ ชนิด 16 และ 18 (Gao, Smith, 2016) และเนื่องจากเชื้อ HPV ไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เติบโตและแบ่งตัวในเซลล์เพาะเลี้ยงทั่วไปได้ ดังนั้นวิธีที่ดีที่สุดในการตรวจหาเชื้อ HPV คือการตรวจหา DNA ของเชื้อ ซึ่งวิธีในปัจจุบันการตรวจหา DNA จะใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมสูง แต่ในปัจจุบันเทคนิค Isothermal DNA amplification กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ใช้อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาเพียงอุณหภูมิเดียวในช่วงระหว่าง 60-65 ºC (Zhao et al., 2015) ซึ่งแตกต่างจากเทคนิค PCR ทำให้ลดความจำเป็นในการใช้เครื่อง thermocycler โดยในปัจจุบันเทคนิค LAMP ได้มีการพัฒนาและใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่าหรือมากกว่า PCR และยังใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่สั้นกว่า PCR ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ HPV ชนิด 16 โดยใช้เทคนิค LAMP เพื่อพัฒนาต่อยอดในการตรวจสอบในตัวอย่างทางคลินิกในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ HPV ชนิด 16 ด้วยเทคนิค LAMP

วิธีการวิจัย

พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ HPV ชนิด 16

ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการสกัดดีเอ็นเอจากพลาสมิดที่มีจีโนมของเชื้อ HPV ชนิด 16 เพื่อใช้เป็นแหล่งดีเอ็นเอควบคุมในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP พร้อมทั้งทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิคในการตรวจหาเชื้อ

การออกแบบไพรเมอร์ (Primer) สำหรับ LAMP

ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ที่เว็บไซต์ http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html ที่จำเพาะต่อเชื้อจากส่วนของยีน E6 ของ HPV ชนิด 16 โดยอ้างอิงข้อมูลพันธุกรรมจากฐานข้อมูล GenBank หมายเลข NC_001526.4 (ตารางที่ 1) ไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้สังเคราะห์โดยบริษัทแปซิฟิกซายน์ ประเทศไทย

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อ HPV ชนิด 16 ด้วยเทคนิค LAMP

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP ได้แก่ อุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยา LAMP และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Mg^{2+} โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากพลาสมิดที่มีจีโนมของ HPV ชนิด 16 ปริมาณ 10^3 viral copy number เป็นดีเอ็นเอควบคุม ในปฏิกิริยาของ LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 0.2 µM Outer primer (F3, B3), 1.6 µM

Inner primer (FIP, BIP), 0.8 µM Loop primer (LF, LB), 1.4 mM dNTPs, 0.5 M betaine, 8 unit *Bst* DNA polymerase และ 1X supplied buffer ทำปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม นาน 60 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาที่ 80 ºC เป็นเวลา 10 นาที

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิในช่วง 55-65 ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยอุณหภูมิที่เหมาะสมจะพิจารณาจาก band ที่เข้มที่สุดจาก 2% gel electrophoresis เพียงอย่างเดียว

การหาความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เหมาะสม ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของ Mg^{2+} เป็น 6 ระดับ ได้แก่ 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 mM โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมจะพิจารณาจาก band ที่เข้มที่สุดจาก 2% gel electrophoresis เพียงอย่างเดียว

การศึกษาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของเทคนิค LAMP

ในการศึกษาความไว หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว ทำการเจือจางดีเอ็นเอควบคุม ตั้งแต่ 10^0-10^5 viral copy number แล้วทำการทดสอบด้วยปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม พิจารณาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถตรวจสอบ band ได้ จาก 2% gel electrophoresis เพียงอย่างเดียว

การตรวจสอบความจำเพาะของ LAMP primers โดยทำการทดสอบ cross reaction ระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็นเชื้อ HPV ชนิดอื่น ได้แก่ HPV ชนิด 18, 45, และ 58 ที่ปริมาณ 10^3 viral copy number และตรวจสอบ band ได้ จาก 2% gel electrophoresis

ผลการวิจัย

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP

ผลที่ได้จากการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา พบว่าอุณหภูมิที่ 59, 61, 63, และ 65 ºC ให้ผลแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้อุณหภูมิที่ 63 ºC เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา (รูปที่ 1A)

สำหรับการทดสอบหาความเข้มข้นของ $MgSO_4$ พบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากับ 3 mM ขึ้นไปสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา LAMP ได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้ $MgSO_4$ ที่ 6 mM เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา (รูปที่ 1B)

การศึกษาความไวและความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP

จากผลการเจือจางดีเอ็นเอควบคุมเป็นความเข้มข้นตั้งแต่ 10^0-10^5 viral copy number พบว่า ที่ความเข้มข้น 100 viral copy number เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถตรวจสอบได้ด้วยปฏิกิริยา LAMP ดังแสดงในรูปที่ 2

ในการศึกษาด้านความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP ทำการศึกษาโดยเลือกใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ HPV ชนิด 16 ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพลาสมิดที่มีจีโนมของเชื้อ HPV ชนิดอื่น ได้แก่ HPV ชนิด 18, 45, และ 58 ผลการศึกษาไม่พบการเกิด cross reaction ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายคนละชนิดในปฏิกิริยา LAMP ดังแสดงในรูปที่ 3

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุดของมะเร็งในสตรีไทย โดยพบมากในอายุ 35-60 ปี ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดนั้นมาจากการติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) เนื่องจากเชื้อ HPV ไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เติบโตและแบ่งตัวในเซลล์เพาะเลี้ยงทั่วไป (cell culture) ประกอบกับการตรวจหาภูมิต้านทานต่อเชื้อ (serological assay) ก็ยังไม่มีความถูกต้องแม่นยำเพียงพอ (Dillner, 1999) ดังนั้นวิธีที่ดีที่สุดในการตรวจหาเชื้อ HPV คือการตรวจหาดีเอ็นเอของ

เชื้อโดยตรง ซึ่งวิธีในปัจจุบันการตรวจโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมสูง แต่ในปัจจุบันงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ isothermal DNA amplification กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยไม่ต้องอาศัยเครื่อง thermocycler ซึ่งเหมาะในการนำไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปหรือในประเทศที่กำลังพัฒนา

เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีความรวดเร็วและสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้อุณหภูมิคงที่ เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูงเนื่องจากในปฏิกิริยาต้องใช้ไพรเมอร์ 6 เส้นที่มีความจำเพาะต่อ 6 ตำแหน่ง อีกทั้งเป็นวิธีที่ง่ายในการทดสอบเนื่องจากใช้กับเครื่องมือพื้นฐานทั่วไปได้ เช่น water bath หรือ heat block

ในการศึกษาจึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาการตรวจสอบหาเชื้อ human papillomavirus ชนิด 16 ซึ่งเป็นชนิดที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกโดยอาศัยเทคนิค LAMP

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 63 ºC แม้ว่าในการศึกษา ความเข้มของ band ที่อุณหภูมิ 63 ºC และ 65 ºC จะไม่แตกต่างกันมาก แต่การเลือกอุณหภูมิที่ 63 ºC จะเป็นการลดความผิดพลาดในกรณีที่เลือกใช้ water bath หรือ heat block เป็นเครื่องมือในการควบคุมอุณหภูมิ

ในการศึกษาความไว (sensitivity) พบว่าที่ความเข้มข้น 100 viral copy เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการศึกษาของ Sotlar K และคณะ (Sotlar et al., 2004) และยังไม่พบการเกิด cross reaction ระหว่าง HPV แต่ละชนิดอีกด้วย อย่างไรก็ตามเทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นยังจำเป็นต้องได้รับการประเมินประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์กับสิ่งส่งตรวจในห้องปฏิบัติการต่อไป

จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการใช้เทคนิค LAMP เพื่อการตรวจหาเชื้อ HPV ในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่ไม่มีเครื่อง thermolcycler หรือการพัฒนาเพื่อเป็น point-of-care diagnostic ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศ.ดร.พญ. แจ่มใส เพียรทอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์พลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อ HPV ชนิด 16 และการศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เอกสารอ้างอิง

Dillner J, Andersson-Ellstrom A, Hagmar B, Schiller J. High risk genital papillomavirus infections are not spread vertically. Reviews in Medical Virology 1999; 9(1): 23-9.

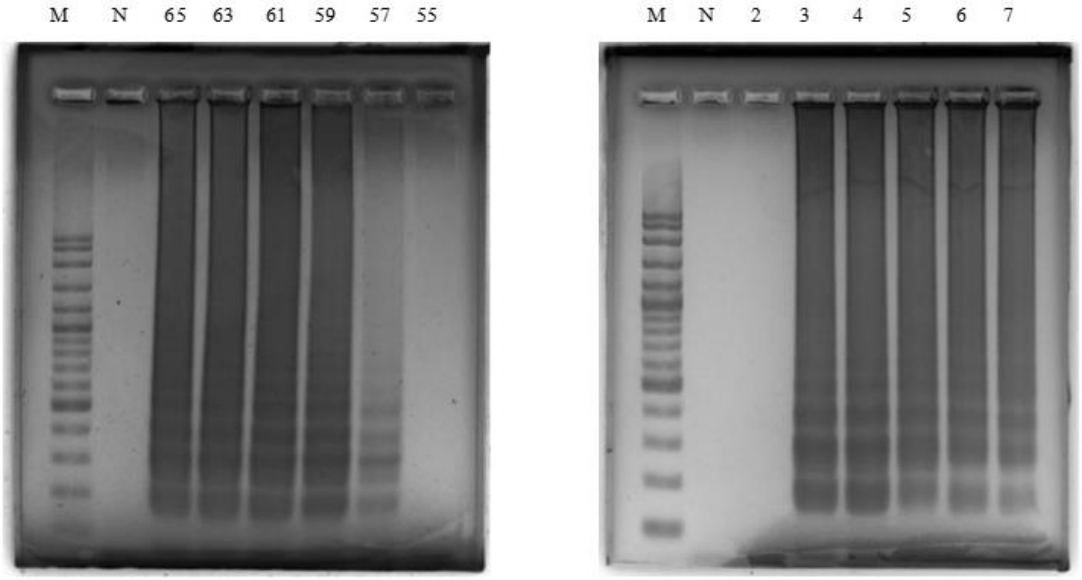
Gao G, Smith DI. Human Papillomavirus and the Development of Different Cancers. Cytogenetic and Genome Research 2016; 150: 185-193.

Hong SY. DNA damage response is hijacked by human papillomaviruses to complete their life cycle. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology) 2017; 18(3): 215-232.

Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, et al. Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology 2004; 42(7): 3176-84.

Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C. Isothermal Amplification of Nucleic Acids. Journal of chemical reviews 2015; 115(22): 12491-12545.

รายนามรูปและตาราง

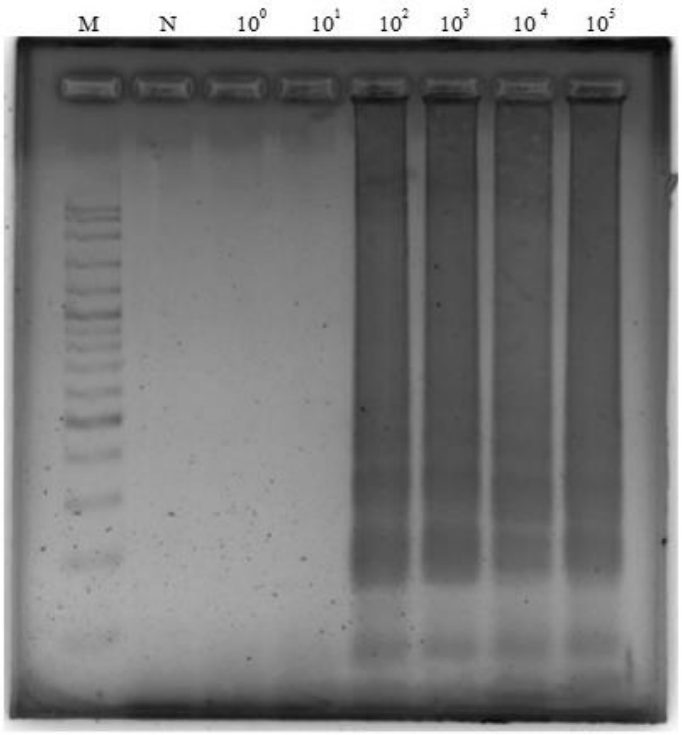


(1A) (1B)

รูปที่ 1 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

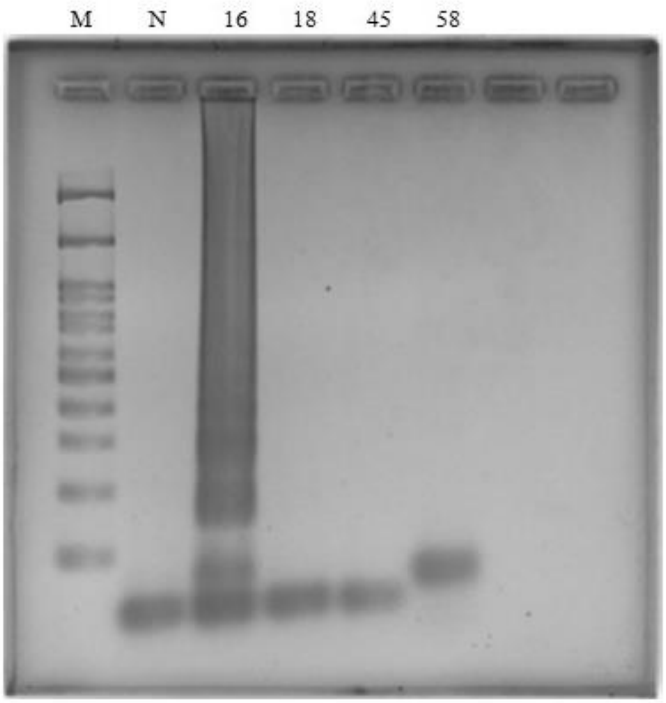
(A) แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสม (B) แสดงความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เหมาะสม

(M: DNA marker, N: Negative control)



รูปที่ 2 ความไวของเทคนิค LAMP จากการตรวจหาพลาสมิด HPV ชนิด 16

(M: DNA marker, N: Negative control)



รูปที่ 3 ความจำเพาะของเทคนิค LAMP จากการตรวจหาพลาสมิด HPV ชนิด 16
(16: พลาสมิด HPV ชนิด 16, 18: พลาสมิด HPV ชนิด 18, 45: พลาสมิด HPV ชนิด 45, และ 58: พลาสมิด HPV ชนิด 58, M: DNA marker, N: Negative control)

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับ HPV ชนิด 16

Primer	Primer sequence (5' to 3')	Genome position
F3	TCGGTTGTGCGTACAAAG	756-773
B3	AGCCTCTACATAAAACCATCC	933-913
FIP	TGGGGCACACAATTCCTAGT-CACACACGTAGACATTCGT	838-819/TTTT/774-792
BIP	TCAGAAACCATAATCTACCATGGC-ATTACATCCCGTACCCTCTT	846-869/TTTT/912-893
LF	CCCATTAACAGGTCTTCCAAAGT	815-793
LB	CCTGCAGGTACCAATGGGG	874-872