

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาวิธีการตรวจหา HHV-8 DNA

โดยเทคนิค Multiplex Polymerase Chain Reaction

Evolution and Optimization of HHV-8 DNA Detection

by Multiplex Polymerase Chain Reaction

โดย

เนตรดาว คงใหญ่

ทิพย์วัลย์ พิมพิลา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

งานนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปี 2545

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คำนำ

รายงานการวิจัยฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อเสนอผลงานการวิจัยเกี่ยวกับการหาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจหา HHV-8 DNA ด้วยเทคนิค Multiplex PCR โดยทำการศึกษาในผู้ป่วยเอดส์ในภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการวิจัยเพื่อสนับสนุนนักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปี 2545 ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คณะผู้วิจัยมุ่งหวังว่าผลการศึกษานี้จะนำมาซึ่งข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถใช้เป็นแนวทางเพื่อให้ได้วิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อดังกล่าวที่มีความถูกต้อง และเหมาะสมกับสายพันธุ์ในประเทศไทยมากยิ่งขึ้น ตลอดจนเป็นแนวทางในการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อไวรัส HHV-8 ในเชิงลึกต่อไป

ลงชื่อ.....

นางสาว เนตรดาว คงใหญ่

หัวหน้าโครงการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่สนับสนุนทุนวิจัยในโครงการวิจัยเพื่อพัฒนา
นักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปี 2545 ขอขอบคุณ ผศ. ดร. ปราณี ลีชนะชัย ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้คำปรึกษาในการศึกษาวิจัย และคุณธวัช จอมใจ
นักเทคนิคการแพทย์ 6ว. ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ สาขาเชิงราย กรมวิทยาศาสตร์การ
แพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ตลอดจนแนะนำ
เทคนิคต่าง ๆ ในการวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการ
แพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์
การทดลองต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อโครงการ	การพัฒนาวิธีการตรวจหา HHV-8 DNA โดยเทคนิค Multiplex Polymerase Chain Reaction
คณะผู้ทำการวิจัย	เนตรดาว คงใหญ่ ¹ และ ทิพย์วัลย์ พิมพิลา ²
หน่วยงานที่สังกัด	¹ อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย) ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ² นักเทคนิคการแพทย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย) ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัส Human herpesvirus 8 (HHV-8) มีความสัมพันธ์กับการเกิด Kaposi's sarcoma ซึ่งเป็นมะเร็งของหลอดเลือดที่พบบ่อยในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ โดยพบอุบัติการณ์สูงขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี ปัจจุบันเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูงถูกนำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์สารพันธุกรรมของ HHV-8 เพื่อป้องกันการติดเชื้อดังกล่าวอย่างแพร่หลาย แต่เนื่องจากความหลากหลายทางด้านสายพันธุ์ของเชื้อ HHV-8 ในภูมิภาคต่าง ๆ ทำให้การตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวทำได้ไม่ครอบคลุม ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทดสอบหาชุด primer และสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อ HHV-8 โดยอาศัยเทคนิค Multiplex PCR จากการศึกษาโดยใช้ HHV-8 DNA ที่แยกสกัดได้จาก BC-3 cell line เป็นตัวอย่างควบคุม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจพบ HHV-8 DNA เกิดขึ้นที่ 56 °C ในภาวะที่มี 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 1.25 U Taq DNA polymerase, 20 pmol ORF-73F, 20 pmol ORF-73R, 15 pmol ORF-26F, 15 pmol ORF-26R, 5 pmol K9-3F, 5 pmol K9-3R, 20 pmol β-globinF และ 20 pmol β-globinR โดยมีความไวในการตรวจพบ HHV-8 DNA ปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 100 pg/μl (1 ng/reaction) และไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามพวก (cross reaction) เมื่อทดสอบกับ EBV DNA เมื่อทำการตรวจในตัวอย่าง DNA ที่แยกสกัดจาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์ในภาคเหนือของประเทศไทยจำนวน 100 ตัวอย่างให้ผลลบต่อ HHV-8 DNA ทั้งหมด โดยพบว่าตรวจพบเฉพาะ β-globin PCR product จำนวน 49 ตัวอย่าง พบ β-globin PCR product ร่วมกับ PCR product ขนาดประมาณ 180 bp จำนวน 38 ตัวอย่าง พบ β-globin PCR product ร่วมกับ PCR product ขนาดประมาณ 150 bp จำนวน 2 ตัวอย่าง และ 11 ตัวอย่างตรวจไม่พบ PCR product ใด ๆ เลย จากผลการวิจัยข้างต้นทำให้มีความน่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไปว่า PCR product ขนาดประมาณ 180 bp และ 150 bp ดังกล่าวนั้นมีความสัมพันธ์หรือไม่อย่างไรในการบ่งชี้การติดเชื้อ HHV-8 หรือเชื้อในกลุ่ม herpesviruses อื่น ๆ ที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ HHV-8 และหากมีการตรวจในกลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนมากขึ้นน่าจะช่วยให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

Title Evolution and Optimization of HHV-8 DNA Detection by Multiplex Polymerase Chain Reaction

Authors Natedao Kongyai and Tippawan Pimpila

Address Clinical Microbiology, Department of Associated Medical Sciences, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand

Abstract

Human herpesvirus 8 (HHV-8) is a causative agent of Kaposi's sarcoma, a cancer of blood vessel that frequently occurs among immunodeficiency patients especially HIV infected group. Currently, Polymerase chain reaction (PCR) technique has been widely used to detect the HHV-8 DNA because of its high sensitivity and its accurate specificity. However, the technique is not totally effective because there are varieties of HHV-8 types that are different in each region. Therefore, this project was conducted to investigate the primers and optimal conditions for detecting the HHV-8 DNA by Multiplex PCR technique. From the study of using HHV-8 DNA extracted from BC-3 cell line as a control sample, the study shows that the suitable temperature is at 56°C and it must be in the following condition; 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 1.25 U *Taq* DNA polymerase, 20 pmol ORF-73F, 20 pmol ORF-73R, 15 pmol ORF-26F, 15 pmol ORF-26R, 5 pmol K9-3F, 5 pmol K9-3R, 20 pmol β-globinF and 20 pmol β-globinR. The minimal sensitivity to detect HHV-8 DNA is 100 pg/ml (1 ng/reaction) and cross-reaction is not found when testing with EBV DNA. The study was done with 100 DNA of HIV infected patients living in northern Thailand and the HHV-8 DNA are all negative. β-globin PCR product was found in 49 samples. β-globin PCR product and PCR product with 180 bp in size were found in 38 samples. β-globin PCR product and 150 bp PCR product were found in 2 samples. Any PCR product was not found in the other 11 samples. As the result, the study of the correlation between PCR products (180 bp and 150 bp) and the detection of HHV-8 infection should be further studied. Moreover these PCR products and infection of the other herpesvireases that are similar to HHV-8 nucleotide sequences should be also investigated to clarify of the relation. For more valuable information, more samples are suggested to study.

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อ	ค
Abstract	ง
สารบัญอักษรย่อ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทนำ	1
ระเบียบวิธีการวิจัย	13
ผลการทดลอง	20
วิจารณ์ผลการทดลอง	41
สรุปผลการทดลอง	44
บรรณานุกรม	45
ภาคผนวก	49

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญย่อ

BCBL-3 (or BC-3)	=	Body cavity-based lymphoma-3
bp	=	base pair
°C	=	degree of Celsius
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanine triphosphate
dNTPs	=	deoxynucleoside triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EDTA	=	Ethylene diamine tetraacetic acid
gm	=	gram
HIV	=	human immunodeficiency virus
kb	=	kilobase
M	=	molar
mg	=	miligram
ml	=	mililiter
mM	=	milimolar
ng	=	nanogram
PBMCs	=	peripheral blood mononuclear cells
PBS	=	phosphate buffer saline
PCR	=	Polymerase chain reaction
pg	=	pocogram
rpm	=	revolution per minute
TAE	=	Tris-acetate-EDTA
Ta	=	Annealing temperature
TE	=	Tris EDTA
Tm	=	Melting temperature
µg	=	microgram
µl	=	microliter

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ agarose ที่ใช้สำหรับการแยกขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในกระบวนการ gel electrophoresis	11
2.	Primer และ PCR product ที่ทำการศึกษาเพื่อตรวจหา HHV-8 DNA ด้วย Multiplex PCR	15
3.	การเตรียม Reaction mixture เพื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค PCR	18
4.	ค่า Tm ของชุด primer ที่สนใจศึกษาและทดสอบด้วยเทคนิค PCR	20
5.	แสดงการปรับสภาวะการเกิดปฏิกิริยา Multiplex PCR โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของชุด primer ORF-26 F, ORF-26 R, K9-3 F และ K9-3 R	25
6.	แสดงการปรับสภาวะการเกิดปฏิกิริยา Multiplex PCR โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของชุด primer β -globin F และ β -globin R	26
7.	ผลการทดสอบตรวจหา HHV-8 DNA จาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์ โดยเทคนิค Multiplex PCR	33

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1. แสดงลักษณะ genome ของเชื้อ HHV-8	5
2. แสดงความสัมพันธ์ของ gene ระหว่างเชื้อ HHV-8 กับเชื้อไวรัสในกลุ่มของ Herpesviruses	6
3. ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหา HHV-8 DNA ที่สกัดได้จาก BC-3 cell line โดยใช้ primer ORF-73	21
4. ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหา HHV-8 DNA ที่สกัดได้จาก BC-3 cell line โดยใช้ primer ORF-26	22
5. ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหา HHV-8 DNA ที่สกัดได้จาก BC-3 cell line โดยใช้ primer K9-3	23
6. แสดง PCR product ที่ได้จากการปรับสถานะการเกิดปฏิกิริยา Multiplex PCR โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของชุด primer ORF-73 F และ ORF-73 R	27
7. แสดง PCR product ที่ได้จากการปรับสถานะการเกิดปฏิกิริยา Multiplex PCR โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของชุด primer β -globin F และ β -globin R	28
8. แสดงความจำเพาะของ PCR product จากการเกิดปฏิกิริยา Multiplex PCR ในสถานะที่พิจารณาเลือก	29
9. ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา Multiplex Polymerase Chain Reaction ในการตรวจหา HHV-8 DNA	30
10. ผลการทดสอบตรวจหา HHV-8 DNA ในตัวอย่างทดสอบ (DNA ที่แยกสกัดจาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์) ด้วย Multiplex PCR	32

บทนำ

Human herpesvirus 8 (HHV-8)

คุณสมบัติของตัวเชื้อ HHV-8

Human herpesvirus 8 (HHV-8) เป็นเชื้อไวรัสที่พบครั้งแรกในปี 1994 โดย Chang Y และคณะ ซึ่งได้แยกเชื้อที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับไวรัสในกลุ่ม Herpesvirus ได้จากชิ้นเนื้อมะเร็งของผู้ป่วยเอดส์ที่เป็นมะเร็ง Kaposi's sarcoma ร่วมด้วย โดยขณะนั้นเรียกไวรัสชนิดนี้ว่า Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) (1) ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น Human herpesvirus 8 จัดอยู่ใน Family Herpesviridae, Subfamily Gammaherpesvirinae, Genus Rhadinovirus จัดเป็นเชื้อไวรัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดใน Human herpesvirus ตัวเชื้อมีรูปร่างกลม ล้อมรอบด้วย envelop มี nucleocapsid เรียงตัวแบบ icosahedral symmetry และ nucleic acid เป็น double stranded DNA (2) ส่วนของ genome มีขนาด 165-170 kb ซึ่ง encode ด้วย 80-90 genes ประกอบด้วย long unique regions ขนาด 140.5 kb ซึ่ง encode ด้วยมากกว่า 80 open reading frames (ORFs) โดยมี terminal repeat regions (TRs) ขนาด 801 bp เรียงตัวขนานหัวท้ายของ long unique regions ซึ่งจัดเป็น high G+C content ORFs และพบว่าเป็นส่วนที่มีความเหมือนกันกับ herpesvirus saimiri ส่วน gene ที่ไม่มีความเหมือนจะเรียกเป็น K genome ซึ่งจะประกอบด้วย 3 regions ที่มีขนาดใหญ่ จัดเป็น conserved gene ในกลุ่ม Rhadinoviruses ระหว่าง K genome จะมี gene ที่มีลักษณะที่แตกต่างกันไปตามแต่ละ unique เรียงตัวแทรกอยู่และพบว่ามีหลาย ๆ unique ที่เหมือนกับ gene ที่ encode เป็น cellular protein ของ host (3)

จากการศึกษาพบว่า gene ที่มีความสำคัญในการก่อให้เกิด Kaposi's sarcoma (KS) เช่น complement control protein (CCP), viral D-type cyclin (V-cyc), viral FLICE inhibitory protein (vFLIP), viral G-protein coupled receptor (vGPCR), viral interleukin 6 (vIL-6), viral interferon regulatory factor (vIRF), latency-associated nuclear antigen (LANA), viral macrophage inflammatory protein (vMIP) (2, 4)

ระบาดวิทยา

ปัจจุบันมีรายงานการตรวจพบ HHV-8 DNA ในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำในหลายภูมิภาคทั่วโลก โดยเฉพาะกลุ่มของผู้ติดเชื้อเอชไอวี เช่น ในประเทศอังกฤษมีรายงานการตรวจพบ HHV-8 DNA ประมาณ 52 % ในผู้ป่วยเอดส์ที่มี Kaposi's sarcoma ร่วมด้วย (5) ในปี 1996 คณะของ Gao SJ รายงานการตรวจพบการติดเชื้อ HHV-8 ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีภาวะ AIDS ประมาณ 35 % (6) ในปี 2000 Pierotti Cl. และคณะ รายงานการตรวจพบ HHV-8 DNA ด้วยเทคนิค Nested PCR 33 % ในผู้ป่วยเอดส์ชาวบราซิล ที่ให้ผล seropositive ต่อ Latent associate nuclear antigen (LANA) (7) และในประเทศสหรัฐอเมริกา รายงานการตรวจพบ HHV-8 DNA ในผู้ติดเชื้อ HIV โดยวิธี PCR ประมาณ 18 % โดยพบว่ามี ความแตกต่างของสายพันธุ์ในแต่ละภูมิภาคที่ทำการศึกษาวิจัย (8) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Moore PS. และคณะ ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ หา KSHV ในผู้ป่วย KS กลุ่มต่าง ๆ พบว่า 50 % เป็นผู้ป่วยโรคเอดส์ 8-11 % เป็นผู้ป่วยในกลุ่มชายรักร่วมเพศ และประมาณ 10 % เป็นผู้ป่วยโรคเลือด (Hemophiliac) ที่ได้รับการเติมเลือด (9) ในปี 2000 คณะของ Fouchar N. ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของเชื้อไวรัส HHV-8 ในผู้ป่วยเอดส์ในอเมริกาใต้ แอฟริกาตะวันตก และแอฟริกากลาง พบว่า สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อ Latent/lytic HHV-8 antigen ในซีรัม 94 % ด้วยวิธี IFA โดยเมื่อใช้เทคนิค PCR ตรวจวิเคราะห์หา HHV-8 DNA จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ พบว่า KS lesion และ PMBCs ให้ผลบวก 100 % ในผู้ป่วยเอดส์ที่มี KS ร่วมด้วย ส่วนผู้ป่วยเอดส์ที่ไม่แสดงพยาธิสภาพของ KS จะตรวจพบ HHV-8 DNA จาก skin biopsies และ PMBCs ได้ 47 % และ 44 % ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถแยกเชื้อไวรัส HHV-8 ดังกล่าวได้ 16 สายพันธุ์ (strains) (8) ในประเทศไทย คณะของ พันธ์ดา อิศรางกูร ณ อยุธยา ได้รายงานการตรวจพบ HHV-8 seropositive โดยวิธี IFA ในผู้ป่วยเอดส์ที่ไม่มี KS ร่วมด้วย ประมาณ 25 % โดยพบว่าการตรวจพบแอนติบอดีดังกล่าว มีความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับการลดต่ำลงของ CD4/CD8 และพบผลบวก 7.4 % ในผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อเอชไอวี (10) สำหรับผู้ป่วยเอดส์ไทย ที่แสดงพยาธิสภาพของ KS มีรายงานเพียง 1 % จากการศึกษาของ Grant AD. และคณะ ซึ่งทำการศึกษาในผู้ป่วยเอดส์ ที่อยู่ในประเทศกำลังพัฒนาเมื่อปี 1996 (11)

พยาธิสภาพและพยาธิสภาพกำเนิด

การตรวจพบเชื้อไวรัส HHV-8 มีความสัมพันธ์กับการเกิด Kaposi's sarcoma (1, 12) ซึ่งเป็นมะเร็งของหลอดเลือดที่พบบ่อยในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก ผู้ป่วยที่ได้รับการบำบัดด้วยเคมีบำบัด และ ผู้ป่วยเอดส์ (13, 14) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบ HHV-8 DNA ในชิ้นเนื้อมะเร็งต่าง ๆ (15) PMBCs (16) น้ำลาย (17) น้ำอสุจิ (18) และ

เนื้อเยื่อของต่อมลูกหมาก (19) โดยมีการรายงานว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถแพร่กระจายเชื้อผ่านทางเพศสัมพันธ์ (20, 21) และการได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะได้ (14, 22, 23)

Kaposi's sarcoma (KS) แบ่งได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ (24)

1. **Classical KS** เป็นชนิดที่พบได้น้อย มีลักษณะเป็นเนื้องอกที่ไม่รุนแรงมักจะเกิดบริเวณแขนขา โดยจะพบอุบัติการณ์ในแถบอเมริกาและยุโรปเหนือ และส่วนใหญ่จะเกิดในผู้ป่วยชายสูงอายุแถบเมดิเตอร์เรเนียน

2. **African or endemic KS** จะพบมากในแถบ Sub-Sahara Africa โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเป็นชายวัยกลางคน หากเป็นเด็กสามารถพบได้ทั้งเพศหญิงและเพศชาย ซึ่งถ้าเกิด KS ชนิดนี้ในผู้ป่วยวัยรุ่นจะก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่ต่อมน้ำเหลือง มีอาการป่วยที่รุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้

3. **Iatrogenic KS** มักพบได้บ่อยในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ

4. **AIDS-related KS** พบได้ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี โดยจะก่อให้เกิดพยาธิสภาพ และสามารถแพร่กระจายไปสู่อวัยวะภายในต่าง ๆ ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเสียชีวิต พบได้บ่อยในผู้ป่วยเอดส์วัยกลางคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรายที่มีพฤติกรรมรักร่วมเพศ มีรายงานว่า AIDS-related KS ในประเทศสหรัฐอเมริกาอุบัติการณ์สูงมากกว่า 20,000 เท่าเมื่อเทียบกับประชากรปกติ

นอกจากนั้นเชื้อ HHV-8 ยังอาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค Body cavity-based lymphoma และ Multicentric castlemans disease (21) ซึ่งมักก่อโรคในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัด และผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง (AIDS) (25)

การติดต่อ

HHV-8 สามารถติดต่อได้หลายทาง ได้แก่ ทางเพศสัมพันธ์ (19, 20) น้ำลาย ทวารหนักและช่องคลอด (anal-genital contact) จากการศึกษาในคนแอฟริกันพบว่าการติดต่อโดยตรงจากแม่สู่ลูกพบได้น้อยมาก (14) นอกจากนี้สามารถติดต่อได้โดยการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ (22, 23, 26) แต่พบได้ไม่บ่อย และมีรายงานการศึกษาว่ายังไม่มีการตรวจพบการติดเชื้อ HHV-8 ในผู้ที่ได้รับเลือด หรือใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน (27)

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจหาแอนติบอดี

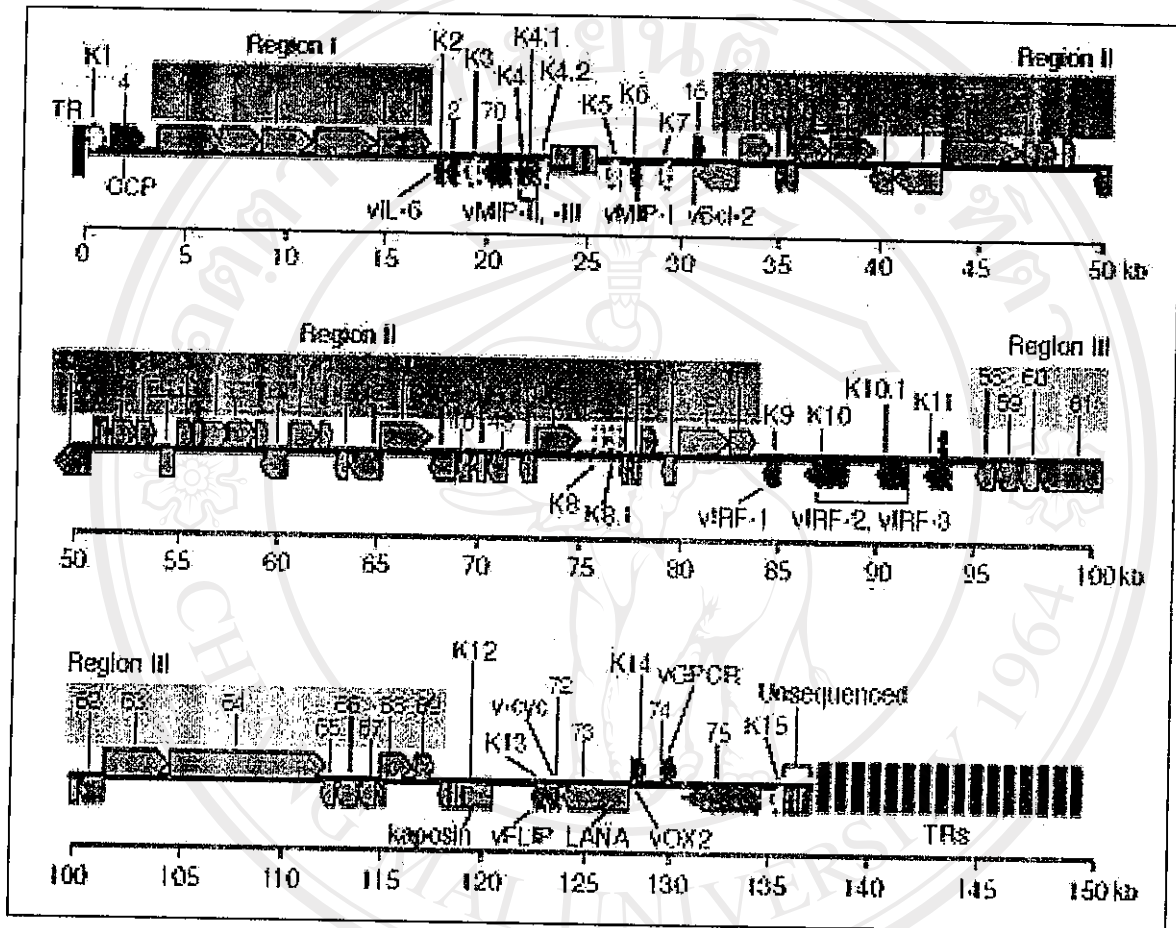
เป็นการตรวจหาร่องรอยของการติดเชื้อ โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อ latent และ lytic antigens สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ Indirect immunofluorescent assay (IFA), Western blot และ ELISA โดยใช้ B lymphocyte cell line (เช่น BCBL-1, BCBL-2) ที่มี HHV-8 genome แฝงอยู่ เป็นแหล่ง antigen และส่งตรวจที่ใช้เป็น serum หรือ plasma

2. การตรวจหา DNA ของเชื้อ

ใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ในหลอดทดลอง โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อ DNA ของเชื้อ และได้รายงานเกี่ยวกับอัตราการตรวจพบ HHV-8 DNA ในสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถตรวจหา HHV-8 DNA ได้จากรอยโรค, PBMCs, น้ำลาย และอสุจิ (28, 29)

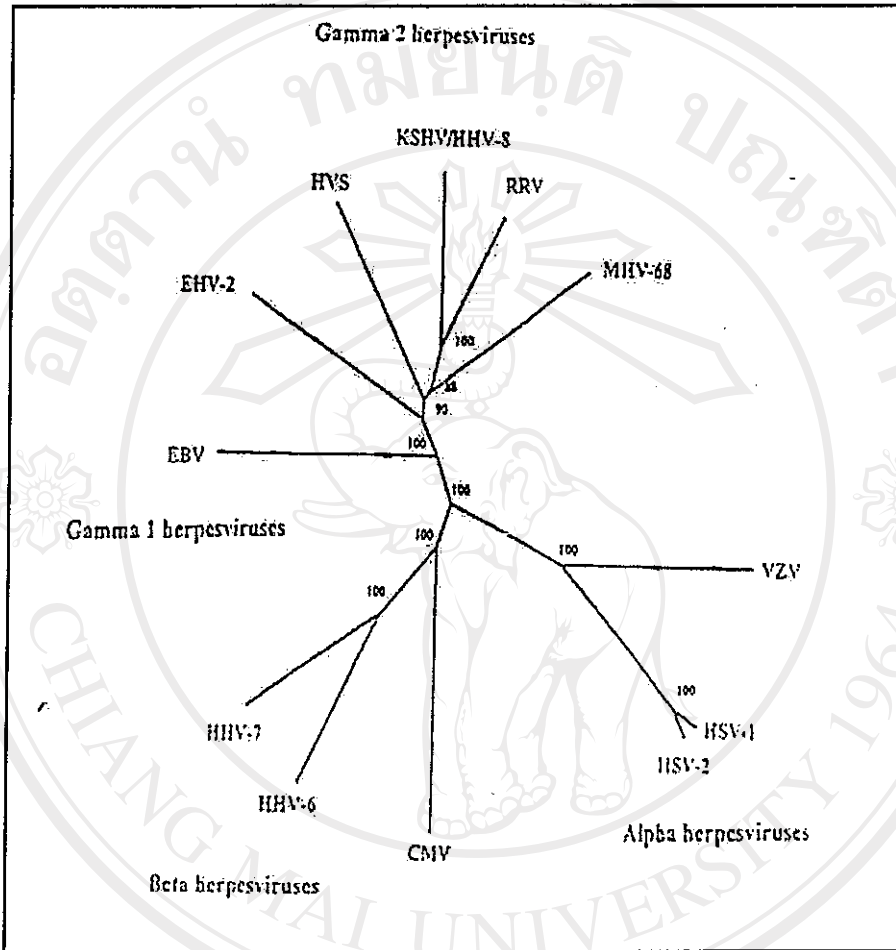
3. การแยกเชื้อ

สิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมได้แก่ น้ำลาย น้ำกัวคอก การแยกเชื้อทำได้โดยอาศัยคุณสมบัติของเชื้อ HHV-8 ที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไปจากเดิมของเซลล์ที่ติดเชื้อ (transformation) ไปเป็น transformed cell ที่มี genome ของ HHV-8 อยู่ภายใน และมีการแบ่งตัวไม่สิ้นสุด โดยเซลล์ที่ใช้ในการแยกเชื้อนี้คือ mononuclear cell ที่เตรียมได้จากเลือดสายสะดือทารก หลังการทดสอบหากตรวจพบ antigen หรือ genome ของ HHV-8 ในเซลล์จะสรุปได้ว่ามีเชื้อ HHV-8 อยู่ในสิ่งส่งตรวจที่นำมาทดสอบจริง แต่การแยกเชื้อ HHV-8 ไม่นิยมใช้เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการทั่วไป



รูปที่ 1 ลักษณะ genome ของเชื้อ HHV-8 ซึ่งประกอบด้วย Long unique region (140.5 kb),

Terminal repeat region (TRs; 801 bp), Region I, II, III ที่มีลักษณะเป็น conserve gene ในกลุ่ม Rhadinoviruses และ gene ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิด Kaposi's sarcoma



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของ gene ระหว่างเชื้อ HHV-8 กับเชื้อไวรัสในกลุ่มของ Herpesviruses
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Polymerase Chain Reaction (30, 31, 32, 33, 34, 35)

Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือ *in vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมาย (Target DNA) ในหลอดทดลองโดยอาศัยหลักการพื้นฐานในการเลียนแบบธรรมชาติของกระบวนการ DNA replication ซึ่งสามารถทำให้เกิดชิ้นซ้ำ ๆ กันได้หลายรอบ โดยที่ปฏิกิริยาถูกใช้มี DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และ oligonucleotide primer เป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ จากปลาย 5' ไป 3' ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของสายดีเอ็นเอเป็น 2 เท่า ในทุก ๆ รอบของปฏิกิริยา ซึ่งตามทฤษฎีควรจะดีเอ็นเอใหม่เกิดขึ้นเท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบของปฏิกิริยา) ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้ คือ

- DNA แม่พิมพ์ (Template DNA: double stranded DNA)
- Thermostable DNA polymerase (Taq DNA polymerase)
- Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Oligonucleotide primer

PCR แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. **Denaturation:** เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของ template DNA ให้เป็นสายเดี่ยวโดยทั่วไปใช้อุณหภูมิระหว่าง 90-95°C
2. **Primer annealing:** ในขั้นตอนนี้ oligonucleotide primer จะเข้าไปจับกับ template DNA สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิระหว่าง 50-58°C
3. **Primer extension:** เป็นขั้นตอนการสร้าง DNA สายใหม่ต่อจาก primer ในทิศทางจาก 5' ไปทาง 3' โดยอาศัยเอนไซม์ Taq DNA polymerase ใช้อุณหภูมิประมาณ 68-75 °C

ปัจจัยสำคัญต่อปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction

1. Primer

การคัดเลือกหรือการออกแบบ primer ให้เหมาะสมกับงาน PCR แต่ละงาน ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้การตรวจวิเคราะห์เกิดขึ้นอย่างจำเพาะ และมีความถูกต้องสูง ซึ่งหลักเกณฑ์ในการออกแบบ primer มีดังนี้

- Primer ควรมีความยาวประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์ และประกอบด้วย G+C ประมาณ 50-60% พยายามหลีกเลี่ยงการใช้ primer ที่มี polypyrimidine หรือ polypurine

- Primer ควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับทางปลายด้าน 3' ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของ template DNA และลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวควรมีความจำเพาะซึ่งไม่พบในบริเวณอื่น ๆ ในสาย template DNA
- การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลายด้าน 3' ของคู่ primer ไม่ควรเป็นคู่สมกันเพื่อป้องกันการเกิด primer-dimer
- การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer แต่ละส่วนไม่ควรมี palindromic sequence เพื่อป้องกันการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของ primer โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ปลายด้าน 3' ของ primer
- ค่า T_m (melting temperature) ของแต่ละ primer ควรใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง $55-80^{\circ}\text{C}$ ในปัจจุบันมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปสำหรับการคัดเลือก primer ที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR
- ความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง $0.5-1.0\ \mu\text{M}$ ถ้าปริมาณ primer มากเกินไปจะทำให้โอกาสการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) เพิ่มขึ้น เป็นผลให้ PCR product ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นมากมาย และยังเพิ่มโอกาสกาเกิด primer-dimer ให้สูงขึ้นเป็นผลให้ได้ PCR product ที่ต้องการลดลง

2. ความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase

ความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase $1.0-2.5\ \text{units}/100\ \mu\text{l}$ เป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา PCR พบว่าการใช้ Taq DNA polymerase ที่มากเกินไปจะทำให้เกิด PCR product ที่ไม่จำเพาะขึ้นได้

Taq DNA polymerase มีความสามารถในการทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ $20-85^{\circ}\text{C}$ และมีคุณสมบัติทนความร้อนได้นานพอสมควร คือประมาณ 30 รอบขึ้นไป หลังจากนั้นก็จะสูญเสีย activity ในการสังเคราะห์ DNA ลงไป จึงไม่นิยมทำ PCR มากกว่า 30-40 รอบ

3. ความเข้มข้นของ Magnesium ion (Mg^{2+})

Mg^{2+} จัดเป็นไอออนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการเกิดปฏิกิริยา PCR เนื่องจากมีผลต่อ primer annealing และความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์ ถ้าความเข้มข้นของ Mg^{2+} มากเกินไปจะทำให้เกิด PCR product ที่ไม่จำเพาะ แต่ถ้าความเข้มข้นของ Mg^{2+} น้อยเกินไปจะทำให้ PCR product ลดลง โดยทั่วไปปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ dNTPs แต่ละชนิดในความเข้มข้น $200\ \mu\text{M}$ ความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง $0.5-2.5\ \text{mM}$ แต่ถ้ามีการใช้ dNTPs ในปริมาณที่สูงกว่านี้ ต้องปรับความเข้มข้นของ Mg^{2+} ให้สูงขึ้นด้วย เนื่องจาก dNTPs สามารถจับกับ Mg^{2+} ดังนั้นถ้ามีปริมาณ dNTPs มากเกินไป dNTPs ดังกล่าวจะไปจับกับ Mg^{2+} ทำให้มี Mg^{2+} ในรูปอิสระไม่เพียงพอสำหรับการเกิดปฏิกิริยา PCR

4. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)

dNTPs ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ต้องมี pH เท่ากับ 7.0 ส่วนความเข้มข้นของ dNTPs แต่ละชนิดอยู่ในช่วง 50-200 μM ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา PCR อย่างจำเพาะ และถูกต้องตลอดจนได้ PCR product ในปริมาณที่สูง การใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้นมากเกินไป จะทำให้เกิด mispriming ของ primer และ misincorporation ของ dNTPs

5. บัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR

บัฟเฟอร์มาตรฐานที่นิยมใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ 10-50 mM Tris-HCl, pH 8.3-8.8 และมี KCl ที่มีความเข้มข้นประมาณ 50 mM รวมอยู่ด้วย โดย KCl จะทำหน้าที่ในการเร่งการเกิด primer annealing แต่หากมีความเข้มข้นของ KCl มากเกินไปมีผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของ Taq DNA polymerase ลดลง

6. Primer annealing

การเลือกใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้นตอน primer annealing ขึ้นกับลำดับเบส ความยาวและความเข้มข้นของ primer ที่ใช้ ตามทฤษฎีอุณหภูมิที่ควรใช้คือ อุณหภูมิที่ต่ำกว่าค่า T_m ของ primer ลงไปประมาณ 5°C และโดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ในช่วง $50-55^\circ\text{C}$

7. Primer extension

เวลาที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ในขั้นตอนนี้จะขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น ลำดับเบสของดีเอ็นเอ สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ทั่วไปจะใช้ที่ $70-75^\circ\text{C}$ เนื่องจากเป็นช่วงที่เหมาะสมกับการทำงานของ Taq DNA polymerase จากการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิ 72°C อัตราการสร้างสายดีเอ็นเอจะอยู่ในช่วง 35-100 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาที ทั้งนี้ขึ้นกับธรรมชาติของดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้นของเกลือ และ pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ ดังนั้นการใช้เวลาในขั้นนี้ 1 นาที ที่ 72°C จึงเพียงพอกับการทำ PCR ซึ่ง PCR product มีความยาว 2 kb อย่างไรก็ตามการเพิ่มเวลา extension ในรอบแรก ๆ ของการทำ PCR จะมีประโยชน์ในกรณีที่ปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ในปริมาณน้อย

8. Denaturation

การตั้งอุณหภูมิต่ำและ/หรือเวลาที่สั้นเกินไปจะทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายมีการแยกสายที่ไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้ปริมาณ PCR product ที่ควรได้มีปริมาณลดลง แต่ถ้าตั้งอุณหภูมิสูงและ/หรือเวลาที่ยาวเกินไป จะทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพเร็วเกินไปโดยเปล่าประโยชน์ ส่วนใหญ่ที่ $94-95^\circ\text{C}$ ประมาณ 30 วินาที จะเป็นช่วงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการ denaturation แต่ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมี G-C content สูงมากอาจต้องใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น

9. ปัจจัยอื่นๆ

มีปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายอย่างที่มีผลกระทบต่อการศึกษาปฏิกิริยา เช่น ความสะอาดของเครื่องแก้ว และภาชนะต่าง ๆ ที่ใช้ในงาน PCR ดังนั้นควรล้างให้สะอาดปราศจากผงซักฟอก (detergent) และน้ำที่ใช้ในงาน PCR ควรมีความบริสุทธิ์ และปราศจากเอนไซม์ nuclease ต่าง ๆ เป็นต้น

สำหรับ Multiplex PCR นั้นเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมบนพื้นฐานของเทคนิค PCR แต่ใช้ primer หลายคู่โดย primer แต่ละคู่จะมีความจำเพาะต่อส่วนของ genome ของเชื้อที่ต้องการศึกษาที่ต่างกัน ทั้งนี้เพื่อเพิ่มโอกาสการตรวจเจอสารพันธุกรรมของเชื้อที่สนใจศึกษา ซึ่งในการเกิดปฏิกิริยา Multiplex PCR ต้องมีการปรับความเหมาะสมของปัจจัยต่าง ๆ เพื่อให้ปฏิกิริยาการเกิดของ PCR product เกิดขึ้นอย่างสูงสุด และมีความจำเพาะ

การวิเคราะห์ PCR product โดยวิธี Gel Electrophoresis (31)

หลักการการตรวจวิเคราะห์

กรดนิวคลีอิกมีโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต (PO_4) ทำให้มีประจุเป็นลบเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก จากหลักการดังกล่าวเราสามารถนำไปใช้ในการแยกหรือวิเคราะห์กรดนิวคลีอิกได้ โดยเฉพาะ deoxyribonucleic acid (DNA) ภายใต้สนามไฟฟ้า (electrophoresis) โดยผ่านตัวกลางที่เป็นวุ้น (gel) gel ที่ใช้ทั่วไปคือ agarose gel และ polyacrylamide gel โดยที่ agarose gel ที่มีความเข้มข้นต่ำจะมีความสามารถแยก DNA ที่มีขนาด 500 – 1,000 bp ในขณะที่ agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูง และ polyacrylamide gel ส่วนใหญ่จะใช้ในการศึกษา DNA ที่มีขนาดเล็กกว่า 500 bp

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนผ่าน gel ของดีเอ็นเอ มีดังนี้

1. ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ (Molecular size of DNA)

ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะผ่าน gel ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นในเวลาเท่ากัน และสถานะเดียวกันดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นกว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก

2. รูปร่างของดีเอ็นเอ (Conformation of DNA)

ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างต่างกัน (แม้จะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน) ภายใต้สถานะเดียวกัน จะเคลื่อนที่ผ่าน gel ด้วยความเร็วที่ต่างกัน ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวง (Superhelical circular DNA) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้น (linear DNA) และ linear DNA จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่คลายเกลียว (Open circular หรือ Nick circular DNA)

3. ความเข้มข้นของ gel (Gel concentration: pore size of the gel)

Gel ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุล (pore) น้อย ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านได้ช้ากว่า gel ที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้น gel ที่มีความเข้มข้นสูงจึงเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ในขณะที่ gel ที่มีความเข้มข้นต่ำเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ความเข้มข้นของ agarose gel ที่เหมาะสมสำหรับแยกดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 และเมื่อค่าความเข้มข้นของ agarose gel คงที่ระยะทางที่ DNA สามารถเคลื่อนที่ผ่าน gel จะแปรผกผันกับ \log_{10} ของจำนวน nucleotide pair ของ DNA นั้น

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ agarose ที่ใช้สำหรับการแยกขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในกระบวนการ gel electrophoresis

Amount of agarose gel (%w/V)	Effective range of resolution of linear DNA fragments (kb)
0.5	1.0 - 30.0
0.7	0.8 - 12.0
1.0	0.5 - 10.0
1.2	0.4 - 7.0
1.5	0.2 - 3.0

4. ส่วนประกอบของ electrophoresis buffer (Composition of electrophoresis buffer)

Buffer ที่ใช้ในกระบวนการ electrophoresis มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอเพราะส่วนประกอบของประจุหรือไอออน และ ionic strength ในแต่ละ buffer นั้น เมื่อไม่มีไอออน (กรณีที่ได้ buffer ไม่ท่วมแผ่น gel) การนำไฟฟ้าจะเกิดขึ้นน้อย ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ช้ามากหรือไม่มีการเคลื่อนที่เลย แต่ถ้าใช้ buffer ที่มี ionic strength สูง การนำไฟฟ้าจะเกิดขึ้นอย่างมากทำให้เกิดความร้อนจน gel ละลาย

Buffer ที่นิยมใช้ในกระบวนการ electrophoresis ประกอบด้วย EDTA กับ Tris-acetate (TAE) หรือ Tris-borate (TBE) ที่ pH ประมาณ 7.5-8.0 การเลือกใช้ buffer ชนิดใดนั้นขึ้นกับคุณสมบัติของ buffer ชนิดนั้น ๆ

TAE buffer นิยมใช้กันมากในงานวิจัยทั่วไป แต่ buffer ชนิดนี้มีความจุ (buffering capacity) ค่อนข้างต่ำ ในกรณีที่ต้องทำ electrophoresis เป็นเวลานาน ๆ เช่น ค้างคืน ทำให้สารละลายด้านขั้วลบเป็นด่าง และสารละลายที่ขั้วบวกเป็นกรด สูญเสียความเป็น buffer ไป แต่ก็

สามารถแก้ไขได้โดยใช้ระบบถ่ายเทหมุนเวียน (recirculation) ระหว่างสารละลายทั้งสองขั้ว โดยใช้เครื่อง peristaltic pump ตลอดการทำ electrophoresis

TBE buffer เป็น buffer ที่มี buffering capacity สูง และ boric acid ก็เป็นตัวยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงเป็นที่นิยมใช้กันพอสมควร

5. กระแสไฟฟ้า (Voltage gradient)

โดยทั่วไปการทำ electrophoresis มักจะทำในสภาวะแรงดันไฟฟ้าคงที่ (constant voltage) ดังนั้นค่าของ voltage จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ โดยมีค่าความต้านทานของตัวกลาง (gel และ buffer) มาเกี่ยวข้องด้วย ดังสมการ Ohm's Law โดยที่ $V = IR$ เมื่อ V คือค่าแรงดันไฟฟ้า หรือ voltage (volts) I คือค่ากระแสไฟฟ้า หรือ Current (Miliamps) และ R คือค่าความต้านทานไฟฟ้า หรือ resistance (Ohms) ของตัวกลางในสนามไฟฟ้า ดังนั้นจากสมการเมื่อผ่านแรงดันไฟฟ้าจำนวนหนึ่งเข้าไปในวงจรจะส่งผลให้กระแสไฟฟ้าที่เข้าไปในตัวกลางมีค่าที่เปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้ขึ้นกับความต้านทานของตัวกลางนั้น ด้วยเหตุนี้ทำให้เกิด voltage gradient ขึ้นและช่วยผลักดันให้ดีเอ็นเอเกิดการเคลื่อนที่ โดยความต้านทานของตัวกลางจะแปรผกผันกับความหนาของตัวกลาง (gel) ตลอดจนปริมาณประจุใน buffer โดยทั่วไปเมื่อใช้ค่า volt ที่เหมาะสมความเร็วในการเคลื่อนที่ของ linear DNA จะแปรผันตรงกับปริมาณ voltage ที่เพิ่มขึ้น แต่หากใช้ค่าแรงดันไฟฟ้าสูงเกินไปดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไม่สม่ำเสมอ ทำให้ความสามารถในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragment) ลดลง ดังนั้นเพื่อให้การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 2 kb ได้ผลดี ควรจะใช้ค่าแรงดันไฟฟ้าไม่เกิน 5 volts/cm (5 volts ต่อระยะห่างระหว่าง 2 electrode ทุก ๆ 1 cm)

ระเบียบวิธีวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. วัสดุอุปกรณ์

- CO₂ incubator (Shellab model TC 2323)
- Thermal cycler (Perkin Elmer Gene Amp PCR sytem 2400)
- Electrophoresis set (BIO-RAD Power Pac 300)
- Refrigerated centrifuge (Survall Instrument: DC-3B)
- Microcentrifuge (Denver Instrument)
- UV transilluminator
- Thermal Printer (Photodyne)
- Water bath (Shel-Lab)
- Microwave
- Vortex
- UV spectrophotometer
- (-20°C) Freezer
- (-70°C) Freezer
- Adjustable automatic pipette (Biohit Proline) ขนาด 0.5-10 µl, 5-50 µl, 50-200 µl และ 200-1,000 µl
- Microcentrifuge tube ขนาด 0.5 ml
- Centrifuge tube ขนาด 15 ml และ 50 ml

2. น้ำยาและสารเคมี

- Isoprep (Ribbons Scientific Corporation)
- Phosphate buffer saline (PBS)
- TE buffer
- Lysis buffer
- Proteinase K (10mg/ml: AMRESCO, USA)
- Extraction buffer
- Phenol
- 7.5 ammonium acetate

- Absolute ethanol
- 70% ethanol
- (10x) PCR buffer (Promega)
- 25 mM MgCl₂ (Promega)
- 1.25 mM dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)
- (5U/μl) Taq DNA polymerase (Promega)
- 20 pmol Primer ORF-73 F (-5'-CCA-TAA-TCT-TGC-ACG-GGT-CG-3'-)
- 20 pmol Primer ORF-73 R (-5'-ACA-CGG-GGC-CTG-CCT-TTA-CT-3'-)
- 20 pmol Primer ORF-26 F (-5'-AGC-CGA-AAG-GAT-TCC-ACC-AT-3'-)
- 20 pmol Primer ORF-26 R (-5'-TCC-GTG-TTG-TCT-AG-TCC-AG-3'-)
- 20 pmol Primer K9-3 F (-5'-CCC-TTT-CGC-GGA-TAT-ACA-CA-3'-)
- 20 pmol Primer K9-3 R (-5'-AGT-GAG-GGG-AAA-GCG-TCA-AT-3'-)
- 20 pmol Primer β-globin F (-5'-ACA-CAA-CTG-TGT-TCA-CTA-GC-3'-)
- 20 pmol Primer β-globin R (-5'-CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC-3'-)
- (0.5x) TAE buffer
- Ethidium bromide (10 mg/ml)
- (6x) loading buffer
- DNA marker 1 kb plus ladder (Gibco BRL, USA)
- Agarose

ตารางที่ 2 Primer และ PCR product ที่ทำการศึกษาเพื่อตรวจหา HHV-8 DNA ด้วย Multiplex PCR

Primer	Target gene	Position ^(b)	Target protein	Product size (bp)
ORF-73 F ^(a) ORF-73 R ^(a)	HHV-8; ORF73	2330-2349 2779-2760	LANA-1	450
ORF-26 F ⁽²⁹⁾ ORF-26 R ⁽²⁹⁾	HHV-8; ORF26	47287-47306 47519-47500	minor capsid antigen	233
K9-3 F ⁽²⁹⁾ K9-3 R ⁽²⁹⁾	HHV-8; ORF K9	84771-84790 84954-84934	vIRF-1	184
β -globin F ^(a) β -globin R ^(a)	Human β -globin gene	1620-1639 1729-1710	β -globin	110

- หมายเหตุ : (a) เป็นชุด primer ที่ได้จากการออกแบบด้วย *Primer Premier 5 software*
 (b) Position ที่แสดงอ้างอิงจาก HHV-8 genome (accession No. U75698 และ AF36012) และ b-globin gene (accession No. L48219) ใน Genbank at the National Center for Biotechnology (www.ncbi.nlm.nih.gov)

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

เก็บตัวอย่างเลือด (Whole blood) จากผู้ป่วยเอดส์ ที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ระดับของเชื้อเอชไอวี (HIV-1 Viral load) ที่เข้าร่วมโครงการวิจัยเอดส์ ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่วันที่ 1 พฤษภาคม 2545 ถึงวันที่ 31 พฤศจิกายน 2546 จำนวน 100 ตัวอย่าง โดยเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ (-70°C) จนกว่าจะทำการแยกสกัด DNA

2. การเตรียมตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

2.1 การแยกเม็ดเลือดขาวจากเลือดของผู้ป่วยเอดส์ โดยวิธี Ficoll-Hyplaque Gradient

- 1) นำเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว EDTA 1 ml ผสมกับ PBS 1 ml ให้เข้ากัน
- 2) ใช้ Pasteur pipette ดูดเลือด 1 ml แล้วค่อย ๆ ปล่อยให้ไหลลงอย่างช้า ๆ เหนือระดับน้ำยา Ficoll-Hyplaque (Isoprep, Ribbons Scientific Corporation)
- 3) นำไปปั่นที่ 2,500 rpm นาน 30 นาที
- 4) ดูดเก็บ Lymphocyte และ Monocyte (PBMCs) ใส่ในหลอดทดลองใหม่
- 5) ปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง ที่ 2,500 rpm นาน 10 นาที แล้วดูดส่วน supernatant ที่ทิ้ง
- 6) ปั่นล้างด้วย TE buffer 1 ml ที่ 2,500 rpm นาน 10 นาที เพื่อทำลายเม็ดเลือดแดง 2-3 รอบ หรือจนเม็ดเลือดแดงที่ปนมาแตกหมด
- 7) เก็บส่วนตะกอนเม็ดเลือดขาว ไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ (-20°C) จนกว่าจะทำการแยกสกัด DNA

2.2 การแยกสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาว

- 1) นำตะกอน DNA ที่เตรียมได้จากการทดลอง 2.1 มาละลายใน Lysis buffer ปริมาตร 100 μl ซึ่งมี Proteinase K ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ ผสมให้เข้ากัน
- 2) นำไป incubate ที่ 56°C นาน 45 นาที
- 3) Inactivate Proteinase K โดยนำไป incubate ที่ 80°C นาน 15 นาที
- 4) ปั่นที่ 5,000 g นาน 5 นาที แล้วเก็บส่วนใสด้านบน ซึ่งมี DNA ไว้ ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ (-20°C) จนกว่าจะทำการตรวจวิเคราะห์ โดยวิธี PCR

3. การเตรียม DNA control

3.1 การเตรียม Positive HHV-8 DNA control: การแยกสกัด HHV-8 DNA จาก BCBL-3 cell line (36) โดยวิธี Phenol-chloroform Extraction

- 1) นำ BCBL-3 cell line (3×10^6 cells/ml) ปั่นตกตะกอนที่ 2,500 rpm นาน 10 นาที และปั่นล้างด้วย PBS แช่เย็น 2 ครั้ง

- 2) เติม Extraction buffer ในอัตราส่วน 1:10 ของปริมาณเซลล์เริ่มต้น แล้วนำไป incubate ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง
- 3) เติม Proteinase K ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 10 µg/ml ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไป incubate ที่ 50°C นาน 3 ชั่วโมง
- 4) ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Phenol ในปริมาณเท่าตัว ผสมเบา ๆ (inverse) จนเป็น emulsion
- 5) ปั่นแยกที่ 5,000 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 6) ดูดส่วนใสด้านบน ซึ่งมี DNA อยู่ในหลอดใหม่
- 7) เติม 7.5 M Ammonium acetate 0.5 เท่า และ Absolute ethanol 2 เท่า ของปริมาตรส่วนใส แล้วผสมให้เข้ากัน
- 8) ปั่นที่ 5,000 g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วน supernatant ทิ้ง และเก็บส่วนตะกอน DNA
- 9) ปั่นล้างตะกอน DNA ด้วย 70 % Ethanol ที่ 5,000 g นาน 5 นาที 2 รอบ
- 10) ดูด Ethanol ออกให้มากที่สุด แล้วทิ้งให้ Ethanol ระเหย
- 11) ละลายตะกอน DNA ใน TE buffer เก็บที่ 4°C ค้างคืน
- 12) วัดปริมาณ DNA และ โปรตีน ด้วย UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ และคำนวณปริมาณ DNA จากสูตร

$$\text{ปริมาณ DNA สายคู่} = \text{OD}_{260} \times \text{Dilution factor} \times 50 \text{ ng/ml}$$
- 13) เก็บตะกอน DNA ไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ (-20)°C

3.2 การเตรียม Negative HHV-8 DNA control: การแยกสกัด DNA จาก B95-8 cell line (37)

โดยวิธี Phenol-chloroform Extraction

ทำการเพาะเลี้ยง B95-8 cell line และแยกสกัด DNA ด้วยวิธีเช่นเดียวกับ 3.1

4. การเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลอง โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

- 1) เตรียม Reaction mixture ใส่ในหลอด Thin wall microcentrifuge tube หลอดละ 40 μ l ดังนี้

ตารางที่ 3 การเตรียม Reaction mixture เพื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค PCR

สารละลาย	ปริมาตร (μ l)
(10x) PCR buffer	5
25 mM MgCl ₂	3
1.25 mM dNTPs	8
20 pmol Primer; F (Forward primer)	1
20 pmol Primer; R (Reverse primer)	1
(5U/ μ l) Taq DNA polymerase	0.25
Distilled water	21.75
Total volume	40

- 2) เติม HHV-8 DNA ที่แยกสกัดได้ หลอดละ 10 μ l ลงในหลอด Thin wall microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากัน โดยการปั่นในช่วงเวลาสั้น ๆ ด้วย Microcentrifuge
- 3) นำ Thin wall microcentrifuge tube เข้าเครื่อง Thermal Cycler และกำหนด parameter ดังนี้

- Denaturation	อุณหภูมิ	96°C	นาน 1 นาที	} 30 รอบ
- Primer annealing	อุณหภูมิ	56- 60°C	นาน 1 นาที	
- Primer extension	อุณหภูมิ	72°C	นาน 3 นาที	
- รอบสุดท้าย	อุณหภูมิ	72°C	นาน 7 นาที	

หมายเหตุ: การทดสอบนี้จะทำที่ละชุด primer ดังนั้นอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน Primer annealing จะปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสมกับชุดของ primer ที่ทำการทดสอบ

5. การวิเคราะห์ PCR product โดยทำ Gel electrophoresis

- 1) เตรียม 2.5 % agarose gel ใน (0.5x) TAE buffer นำไปต้มให้ละลาย
- 2) เท gel ในถาด gel เสียบ comb และปล่อยให้ gel แข็งตัว แล้วดึง comb ออก

- 3) วางแผ่น gel ลงใน Electrophoresis chamber ที่มี (0.5x) TAE buffer โดยให้ระดับของ (0.5x) TAE buffer สูงกว่าแผ่น gel ประมาณ 3-5 เซนติเมตร
- 4) ต่อขั้วไฟฟ้าของ Electrophoresis chamber เข้ากับ Power supply โดยให้ช่องที่ใส่ DNA อยู่ทางขั้วลบ
- 5) ผสม Amplified product จำนวน 10 μ l กับ (6x) loading buffer จำนวน 2 μ l แล้วนำไปหยอดลงในช่อง gel
- 6) ปิดฝา Electrophoresis chamber แล้วเปิด Power supply โดยใช้ constant voltage 100 volts นาน ประมาณ 35-45 นาที
- 7) นำแผ่น gel ไปย้อมใน 0.5 μ g/ml Ethidium bromide solution นาน 10 นาที แล้วล้างแผ่น gel ในน้ำกลั่น นาน 10 นาที
- 8) นำไปตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator
- 9) ถ่ายรูปผลการแยกแถบ DNA

6. การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา Multiplex Polymerase Chain Reaction โดยการใช้ primer หลายคู่ในการตรวจหา HHV-8 DNA

- 1) เปลี่ยนอุณหภูมิ ในขั้นตอน Primer annealing ให้เหมาะสม ซึ่งจะพิจารณาเลือก primer ที่มีค่า T_m ใกล้เคียงกันมาทำการทดสอบ
- 2) ทดลองทำ PCR ตามวิธีวิจัยที่ 4 และ 5 ตามลำดับ โดยใช้ DNA ที่แยกได้จาก BCBL-3 cell line ในการทดสอบก่อน เพื่อหาสถานะ และ primer คู่ที่เหมาะสมก่อน
- 3) นำ DNA ที่แยกได้มาทำการตรวจวิเคราะห์ ในสถานะและใช้ primer คู่ที่ได้พิจารณาคัดเลือก เพื่อเป็นการยืนยันความเหมาะสมของการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี PCR ที่ทำการปรับเปลี่ยน

7. การทดสอบความไวของวิธี Multiplex Polymerase Chain Reaction

- 1) นำ DNA DNA (ที่สกัดได้จาก BCBL-3 cell line; positive DNA control) มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5}
- 2) นำ DNA แต่ละความเข้มข้น ไปทำ PCR ตามวิธีวิจัยที่ 6 และ 5 ตามลำดับ

8. การตรวจหา HHV-8 DNA ที่แยกสกัดได้จากเม็ดเลือดขาวจากเลือดของผู้ป่วยเอดส์ด้วยเทคนิค Multiplex PCR

นำ DNA ที่เตรียมตามวิธีวิจัยที่ 2 มาทำการตรวจหา HHV-8 DNA ด้วยเทคนิค Multiplex PCR ที่ทำการปรับเปลี่ยนจนได้สถานะที่เหมาะสมตามวิธีวิจัยที่ 6

ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบความไวในการเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลอง โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

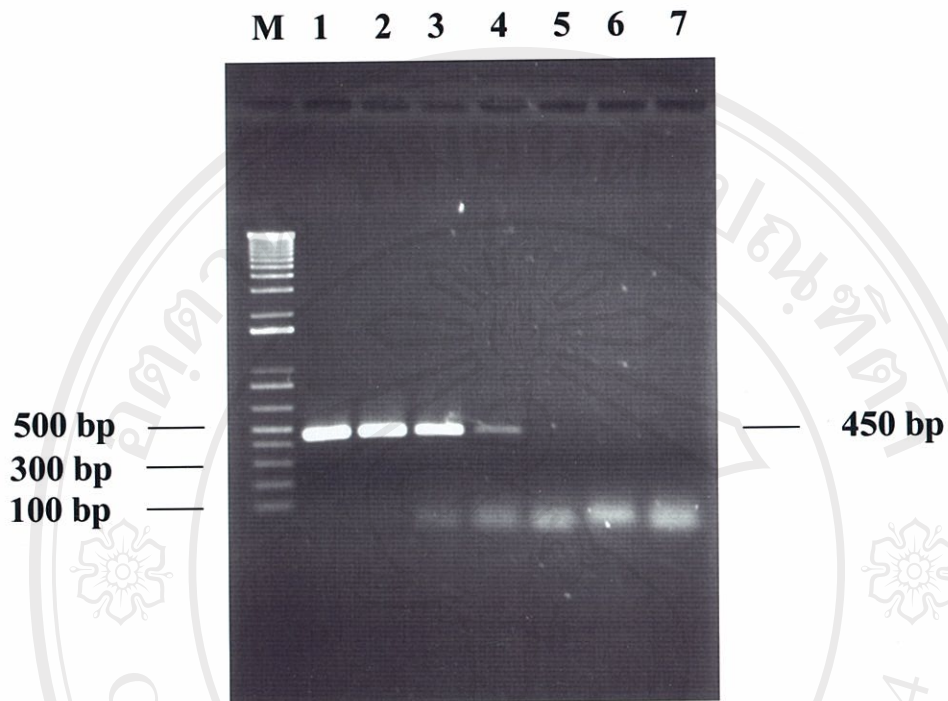
เมื่อทำการทดสอบเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ DNA ที่แยกสกัดได้จาก BC-3 cell line ที่มีความเข้มข้นของ DNA เท่ากับ 10 ng/ μ l เป็นตัวอย่างทดสอบ ซึ่งการทำ PCR ดังกล่าวได้ทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 56°C, 58°C และ 60°C ทั้งนี้พิจารณาเลือกจากค่า Tm ของแต่ละ primer ดังแสดงในตารางที่ 4 แล้วตรวจสอบ PCR product ด้วยการแยกแถบ DNA บน 2.5 % agarose gel พบว่าที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นอุณหภูมิที่ทุกชุด primer (ORF-73, ORF-26 และ K9-3) เกิด PCR product ที่ชัดเจน

ตารางที่ 4 ค่า Tm ของชุด primer ที่สนใจศึกษาและทดสอบด้วยเทคนิค PCR

Primer	ค่า Tm	ค่า Ta*
ORF-73 F	61.2	56.2
ORF-73 R	63.3	58.3
ORF-26 F	64.7	59.7
ORF-26 R	67.5	62.5
K9-3 F	59.0	54.0
K9-3 R	62.3	57.3
β -globin F	69.0	64.0
β -globin R	67.0	62.0

หมายเหตุ: Ta* เป็นค่า annealing temperature ที่คำนวณด้วยสูตรอย่างง่าย $Ta = Tm - 5^{\circ}C$

เมื่อทำการทดสอบความไวในการตรวจหา HHV-8 DNA โดยทำการเจือจางให้เป็นความเข้มข้น 10 ng/ μ l, 1 ng/ μ l, 100 pg/ μ l, 10 pg/ μ l, 1pg/ μ l ตามลำดับ แล้วนำไปทำ PCR ที่อุณหภูมิ 56°C พบว่า primer ORF-73, ORF-26 และ K9-3 มีความไวในการตรวจหา HHV-8 DNA ได้อย่างน้อยที่สุดเท่ากับ 10 pg/ μ l (หรือ 100 pg /reaction), 10 pg/ μ l (หรือ 100 pg /reaction) และ 1 pg/ μ l (หรือ 10 pg /reaction) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3, 4 และ 5



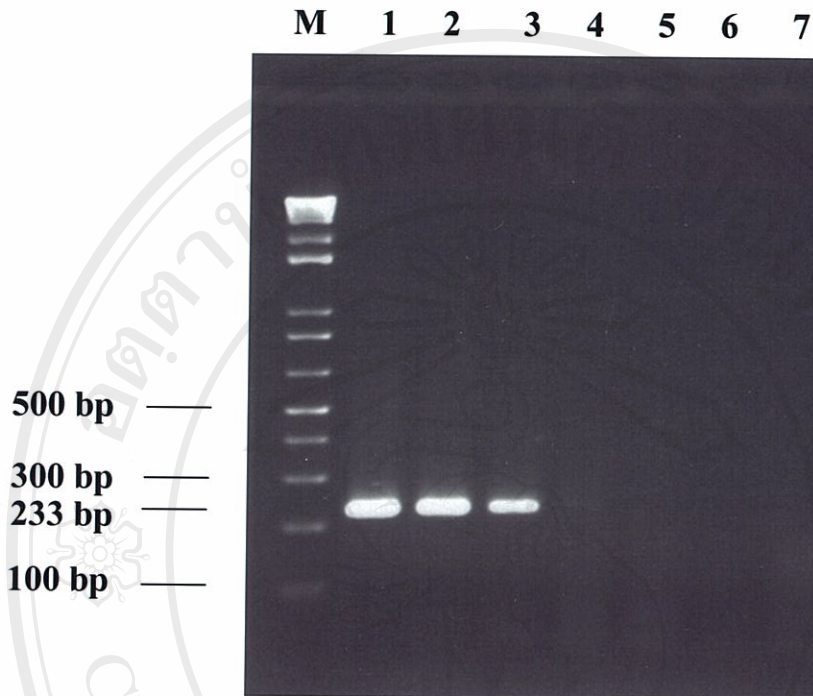
รูปที่ 3 ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหา HHV-8 DNA ที่สกัดได้จาก BC-3 cell line โดยใช้ primer ORF-73

M = DNA size marker (1 kb ladder plus)

แถวที่ 1, 2, 3, 4, 5 = DNA ที่แยกสกัดจาก BC-3 cell line ความเข้มข้น 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl และ 1 pg/μl ตามลำดับ

แถวที่ 6 = inner negative control (ใช้ distilled water)

แถวที่ 7 = outer negative control (ใช้ distilled water)



รูปที่ 4 ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหา HHV-8 DNA ที่สกัดได้จาก BC-3 cell line โดยใช้ primer ORF-26

M = DNA size marker (1 kb ladder plus)

แถวที่ 1, 2, 3, 4, 5 = DNA ที่แยกสกัดจาก BC-3 cell line ความเข้มข้น 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl และ 1 pg/μl ตามลำดับ

แถวที่ 6 = inner negative control (ใช้ distilled water)

แถวที่ 7 = outer negative control (ใช้ distilled water)



รูปที่ 5 ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหา HHV-8 DNA ที่สกัดได้จาก BC-3 cell line โดยใช้ primer K9-3

M = DNA size marker (1 kb ladder plus)

แถวที่ 1, 2, 3, 4, 5 = DNA ที่แยกสกัดจาก BC-3 cell line ความเข้มข้น 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl และ 1 pg/μl ตามลำดับ

แถวที่ 6 = inner negative control (ใช้ distilled water)

แถวที่ 7 = outer negative control (ใช้ distilled water)

All rights reserved

2. ผลการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา Multiplex Polymerase

Chain Reaction โดยการใช้ primer หลายคู่ในการตรวจหา HHV-8 DNA

เมื่อทำการทดสอบเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ DNA ที่เตรียมจาก HHV-8 DNA negative sample (DNA 5 μ l + DW 5 μ l; 10 μ l/reaction) และที่แยกสกัดจาก BC-3 cell line ที่มีความเข้มข้นของ DNA เท่ากับ 10 ng/ μ l เป็นตัวอย่างทดสอบ (10 μ l/reaction) จากการทดลองเบื้องต้นใช้ความเข้มข้นของ primer ทุกชุดเท่ากันพบว่า PCR product จากชุด primer ORF-26 มีความเข้มกว่า PCR product จากชุด primer K9-3 และ primer ORF-73 ตามลำดับ จึงทำการปรับสถานะโดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของชุด primer ที่ใช้ใน Multiplex PCR ที่ศึกษาเพื่อให้ได้ความเข้มของ PCR product ของแต่ละชุด primer เท่า ๆ กัน ทั้งนี้เป็นการพิจารณาอย่างคร่าว ๆ ว่าแต่ละชุด primer ได้เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA ที่สมบูรณ์ใกล้เคียงกัน การปรับสถานะแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสถานะ T4A เป็นสถานะที่เหมาะสมสำหรับความเข้มข้นของชุด primer ORF-73, ORF26 และ K9-3

จากนั้นนำ DNA ที่แยกสกัดได้จาก BC-3 cell line ความเข้มข้นของ DNA เท่ากับ 10 ng/ μ l (10 μ l/reaction) และ HHV-8 DNA negative sample (DNA 5 μ l + DW 5 μ l; 10 μ l/reaction) มาทำการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของชุด primer β -globin ที่เหมาะสม โดยใช้สถานะ T4A แต่ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของชุด primer β -globin ดังแสดงในตารางที่ 6 และผลการแยกแถบ PCR product บน 2.5% agarose gel ในรูปที่ 7 ดังนั้นสถานะที่เหมาะสมสำหรับ Multiplex PCR ชุดนี้คือ T1B

และกำหนด parameter ดังนี้

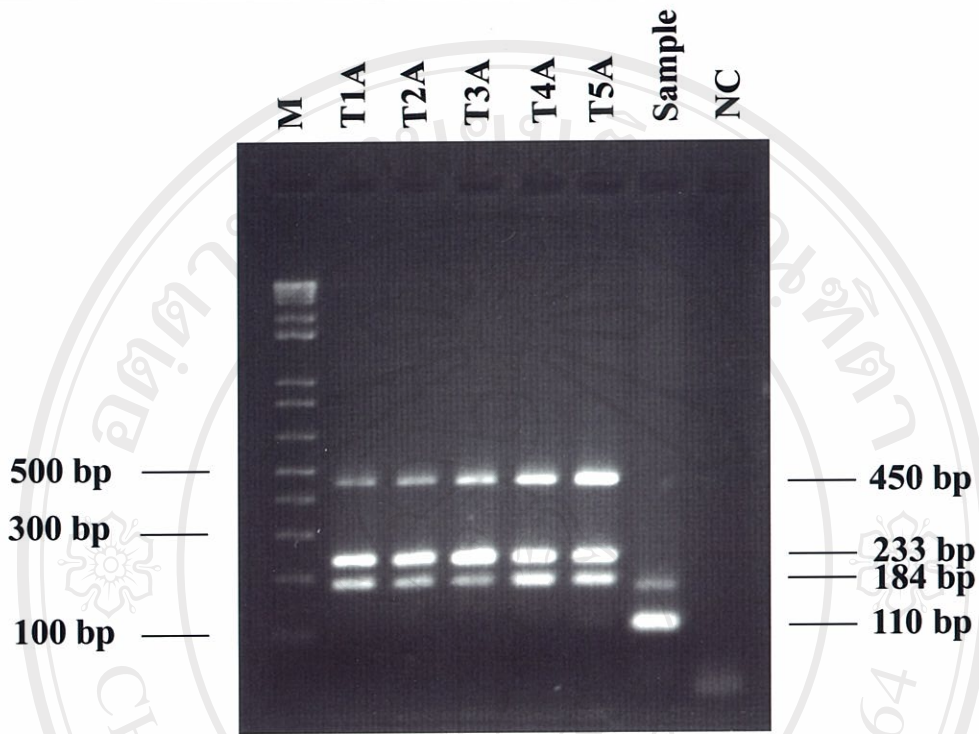
- Denaturation	อุณหภูมิ	96°C	นาน 45 วินาที	} 35 รอบ
- Primer annealing	อุณหภูมิ	56°C	นาน 45 วินาที	
- Primer extension	อุณหภูมิ	72°C	นาน 60 วินาที	
- Final extension	อุณหภูมิ	72°C	นาน 7 นาที	

ตารางที่ 5 แสดงการปรับสภาวะการเกิดปฏิกิริยา Multiplex PCR โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของชุด primer ORF-26 F, ORF-26 R, K9-3 F และ K9-3 R

สารละลาย	T1A	T2A	T3A	T4A	T5A
	ปริมาตร (μ l)				
(10x) PCR buffer	5	5	5	5	5
25 mM MgCl ₂	3	3	3	3	3
1.25 mM dNTPs	8	8	8	8	8
20 pmol Primer; ORF-73 F	1	1	1	1	1
20 pmol Primer; ORF-73 R	1	1	1	1	1
20 pmol Primer; ORF-26 F	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25
20 pmol Primer; ORF-26 R	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25
20 pmol Primer; K9-3 F	1	0.75	0.5	0.75	0.5
20 pmol Primer; K9-3 R	1	0.75	0.5	0.75	0.5
20 pmol Primer; β -globin F	1	1	1	1	1
20 pmol Primer; β -globin R	1	1	1	1	1
(5U/ μ l) <i>Taq</i> DNA polymerase	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Distilled water	16.75	17.25	17.75	17.75	18.25
Total volume	40	40	40	40	40

ตารางที่ 6 แสดงการปรับสภาวะการเกิดปฏิกิริยา Multiplex PCR โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของชุด primer β -globin F และ β -globin R

สารละลาย	T1B	T2B	T3B	T4B
	ปริมาตร (μ l)			
(10x) PCR buffer	5	5	5	5
25 mM MgCl ₂	3	3	3	3
1.25 mM dNTPs	8	8	8	8
20 pmol Primer; ORF-73 F	1	1	1	1
20 pmol Primer; ORF-73 R	1	1	1	1
20 pmol Primer; ORF-26 F	0.25	0.25	0.25	0.25
20 pmol Primer; ORF-26 R	0.25	0.25	0.25	0.25
20 pmol Primer; K9-3 F	0.75	0.75	0.75	0.75
20 pmol Primer; K9-3 R	0.75	0.75	0.75	0.75
20 pmol Primer; β -globin F	1	0.75	0.50	0.25
20 pmol Primer; β -globin R	1	0.75	0.50	0.25
(5U/ μ l) <i>Taq</i> DNA polymerase	0.25	0.25	0.25	0.25
Distilled water	17.75	18.25	18.75	19.25
Total volume	40	40	40	40



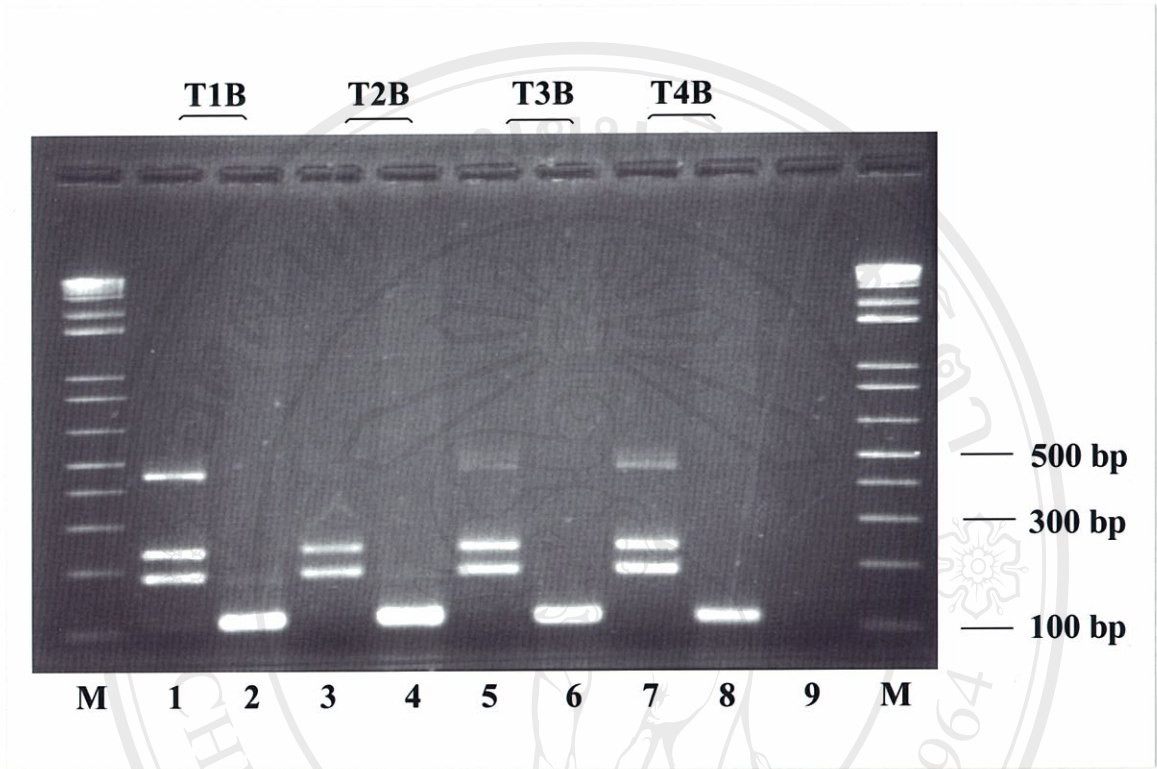
รูปที่ 6 แสดง PCR product ที่ได้จากการปรับสภาวะการเกิดปฏิกิริยา Multiplex PCR โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของชุด primer ORF-73 F และ ORF-73 R

M = DNA size marker (1 kb ladder plus)

T1A, T2A, T3A, T4A, T5A = การทำ Multiplex PCR โดยใช้สภาวะตามตารางที่ 5 และใช้ DNA ที่แยกสกัดจาก BC-3 cell line เป็นตัวอย่างทดสอบ

Sample = HHV-8 DNA negative sample

NC = Negative control (ใช้ distilled water)



รูปที่ 7 แสดง PCR product ที่ได้จากการปรับสภาวะการเกิดปฏิกิริยา Multiplex PCR โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของชุด primer β -globin F และ β -globin R

M = DNA size marker (1 kb ladder plus)

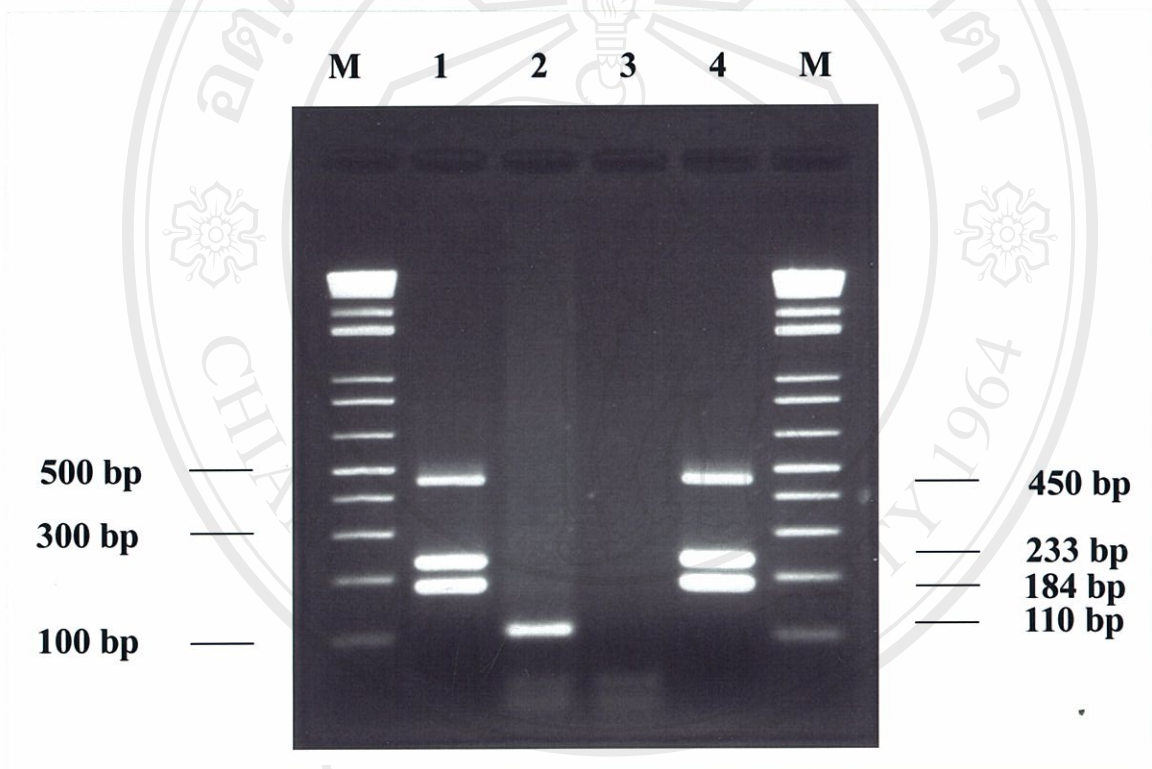
T1B, T2B, T3B, T4B = การทำ Multiplex PCR โดยใช้สภาวะตามตารางที่ 6

แถวที่ 1, 3, 5, 7 = DNA ที่แยกสกัดจาก BC-3 cell line

แถวที่ 2, 4, 6, 8 = HHV-8 DNA negative sample

แถวที่ 9 = Negative control (ใช้ distilled water)

เมื่อทำการทดสอบความจำเพาะของชุด primer ในชุด Multiplex PCR นี้ โดยการทดลองนำ DNA ที่แยกสกัดจาก B95-8 cell line (HHV-8 negative, EBV positive) ด้วยสถานะที่พิจารณาเลือกกว่ามีความเหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา Multiplex PCR คือ T1B ดังการทดลองข้างต้น พบว่าชุด primer ที่ใช้มีความจำเพาะกับการตรวจหา HHV-8 DNA โดยไม่พบผลบวกปลอมจากปฏิกิริยาข้ามพวก (cross reaction) เมื่อทำการทดสอบกับ DNA ของ EBV ซึ่งมีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในอีโนม



รูปที่ 8 แสดงความจำเพาะของ PCR product จากการเกิดปฏิกิริยา Multiplex PCR ในสถานะที่พิจารณาเลือก

- M = DNA size marker (1 kb ladder plus)
 แถวที่ 1, 4 = DNA ที่แยกสกัดจาก BC-3 cell line
 แถวที่ 2 = DNA ที่แยกสกัดจาก B95-8 cell line
 แถวที่ 3 = Negative control (ใช้ distilled water)

3. ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา Multiplex Polymerase Chain Reaction ในการตรวจหา HHV-8 DNA

จากการทดสอบความไวของปฏิกิริยา Multiplex PCR ที่พิจารณาแล้วว่าเหมาะสม โดยใช้ Positive HHV-8 DNA (สกัดจาก BC-3 cell line) ที่ทำการเจือจางให้เป็นความเข้มข้น 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl และ 1 pg/μl ตามลำดับ และ Negative HHV-8 DNA (สกัดจาก B95-8 cell line) ความเข้มข้น 10 ng/μl โดยใช้ 10 μl/reaction พบว่าความไวของปฏิกิริยา Multiplex PCR สามารถตรวจพบ HHV-8 DNA น้อยที่สุดเท่ากับ 100 pg/μl (1 ng/reaction) และไม่พบการเกิดผลบวกปลอมในตัวอย่าง Negative HHV-8 DNA ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 ผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา Multiplex Polymerase Chain Reaction ในการตรวจหา HHV-8 DNA

M = DNA size marker (1 kb ladder plus)

แถวที่ 1, 2, 3, 4, 5 = DNA ที่แยกสกัดจาก BC-3 cell line ความเข้มข้น 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl และ 1 pg/μl ตามลำดับ

แถวที่ 6 = DNA ที่แยกสกัดจาก B95-8 cell line

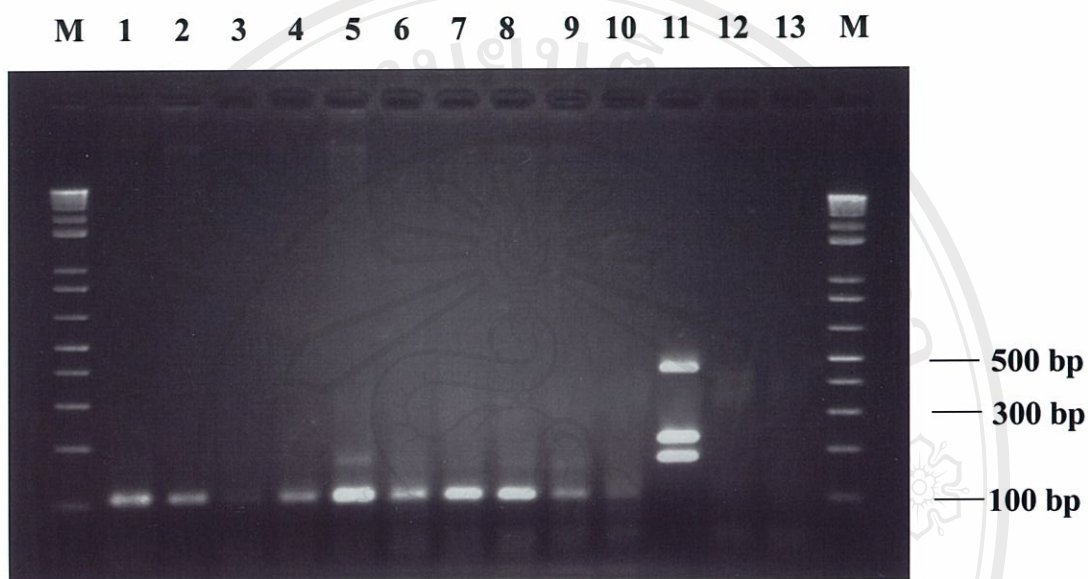
แถวที่ 7 = inner negative control (ใช้ distilled water)

แถวที่ 8 = outer negative control (ใช้ distilled water)

4. การตรวจหา HHV-8 DNA ที่แยกสกัดได้จากเม็ดเลือดขาวจากเลือดของผู้ป่วยเอดส์ด้วยเทคนิค

Multiplex PCR

เมื่อทดลองนำสภาวะ Multiplex PCR ที่พิจารณาเลือกมาตรวจหา HHV-8 DNA จากตัวอย่าง DNA ที่แยกสกัดได้จากเม็ดเลือดขาวจากเลือดของผู้ป่วยเอดส์จำนวน 100 ตัวอย่าง (ปริมาณที่ใช้ทดสอบ คือ 5 μ l/reaction) โดยใช้ BC-3 DNA เป็น positive control (5 μ l/reaction) ผลการทดสอบปรากฏว่าไม่พบผลบวกต่อ HHV-8 DNA ในตัวอย่าง DNA ทั้ง 100 ตัวอย่าง โดยตรวจพบเฉพาะ β -globin PCR product จำนวน 49 ตัวอย่าง พบ β -globin PCR product ร่วมกับการพบ PCR product ขนาดประมาณ 180 bp จำนวน 38 ตัวอย่าง และพบ β -globin PCR product ร่วมกับการพบ PCR product ขนาดประมาณ 150 bp จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างจำนวน 11 ตัวอย่างตรวจไม่พบ PCR product ใดๆ เลย ดังผลในตารางที่ 7 และผลการแยกแถบ DNA ของตัวอย่างทดสอบบน 2.5% agarose gel แสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 ผลการทดสอบตรวจหา HHV-8 DNA ในตัวอย่างทดสอบ (DNA ที่แยกสกัดจาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์) ด้วย Multiplex PCR

M	=	DNA size marker (1 kb ladder plus)
แฉวที่ 1	=	DNA sample No. 2
แฉวที่ 2	=	DNA sample No. 5
แฉวที่ 3	=	DNA sample No. 14
แฉวที่ 4	=	DNA sample No. 23
แฉวที่ 5	=	DNA sample No. 25
แฉวที่ 6	=	DNA sample No. 40
แฉวที่ 7	=	DNA sample No. 42
แฉวที่ 8	=	DNA sample No. 45
แฉวที่ 9	=	DNA sample No. 46
แฉวที่ 10	=	DNA sample No. 82
แฉวที่ 11	=	Positive control (BC-3 DNA)
แฉวที่ 12	=	inner negative control (ใช้ distilled water)
แฉวที่ 13	=	outer negative control (ใช้ distilled water)

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบตรวจหา HHV-8 DNA จาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์โดยเทคนิค Multiplex PCR

Sample No	CD4/CD8 ratio	Viral load (copies/ml)	HHV-8 Ab against		Target band			β-globin band (110 bp)	Other band	
			Latent antigen	Lytic antigen	ORF-73 (450 bp)	ORF-26 (233 bp)	K9-3 (184 bp)		จำนวน band	Size (bp)
1	0.67	260,513	N	P (>2,560)	-	-	-	-	1	150
2	0.21	55,930	N	P (>2,560)	-	-	-	+	1	180
3	0.15	555	N	P (>2,560)	-	-	-	+	-	-
4	0.42	1,624	N	P (>2,560)	-	-	-	+	-	-
5	0.07	>750,000	N	P (640)	-	-	-	+	-	-
6	0.31	1,432	N	P (640)	-	-	-	-	-	-
7	0.07	<400	N	P (640)	-	-	-	-	-	-
8	0.36	239,344	N	P (160)	-	-	-	+	1	180
9	0.12	56,102	N	P (160)	-	-	-	+	-	-
10	0.01	163,356	N	P (160)	-	-	-	+	1	180
11	0.01	214,147	N	P (160)	-	-	-	+	-	-
12	0.23	162,897	N	P (160)	-	-	-	-	-	-
13	0.27	133,049	N	P (160)	-	-	-	+	1	180
14	0.17	2,050	N	P (160)	-	-	-	++	-	-

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบตรวจหา HHV-8 DNA จาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์ โดยเทคนิค Multiplex PCR (ต่อ)

Sample No	CD4/CD8 ratio	Viral load (copies/ml)	HHV-8 Ab against		Target band			β-globin band (110 bp)	Other band	
			Latent antigen	Lytic Antigen	ORF-73 (450 bp)	ORF-26 (233 bp)	K9-3 (184 bp)		จำนวน band	Size (bp)
15	0.07	12,232	N	P (160)	-	-	-	+	1	180
16	0.10	<400	N	P (160)	-	-	-	-	-	-
17	0.65	1,603	N	P (160)	-	-	-	+	-	-
18	0.12	<400	N	P (160)	-	-	-	+	-	-
19	0.06	43,434	N	P (160)	-	-	-	+	1	180
20	0.03	>750,000	N	P (160)	-	-	-	+	-	-
21	0.29	2,632	N	P (40)	-	-	-	-	-	-
22	0.58	51,275	N	P (40)	-	-	-	+	-	-
23	0.16	205,263	N	P (40)	-	-	-	+	-	-
24	0.94	3,464	N	P (40)	-	-	-	+	1	180
25	0.20	3,854	N	P (40)	-	-	-	+	1	180
26	0.40	12,929	N	P (40)	-	-	-	+	-	-
27	0.01	365,829	N	P (40)	-	-	-	+	1	180
28	0.76	83,333	N	N	-	-	-	+	-	-

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบตรวจหา HHV-8 DNA จาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์โดยเทคนิค Multiplex PCR (ต่อ)

Sample No	CD4/CD8 ratio	Viral load (copies/ml)	HHV-8 Ab against		Target band			β-globin band (110 bp)	Other band	
			Latent antigen	Lytic antigen	ORF-73 (450 bp)	ORF-26 (233 bp)	K9-3 (184 bp)		จำนวน band	Size (bp)
29	3.31	96,910	N	N	-	-	-	-	-	-
30	0.36	19,830	N	N	-	-	-	+	1	180
31	0.46	3,603	N	N	-	-	-	+	1	180
32	0.10	>750,000	N	N	-	-	-	+	1	180
33	0.07	403,438	N	N	-	-	-	+	-	-
34	0.97	<400	N	N	-	-	-	+	1	180
35	0.39	195,648	N	N	-	-	-	-	-	-
36	0.01	>750,000	N	N	-	-	-	+	1	180
37	0.01	>750,000	N	N	-	-	-	+	1	180
38	0.04	62,535	N	N	-	-	-	-	-	-
39	0.26	228,046	N	N	-	-	-	+	1	180
40	2.29	532	N	N	-	-	-	+	-	-
41	0.02	>750,000	N	N	-	-	-	+	1	180
42	0.32	7,088	N	N	-	-	-	+	1	180

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบตรวจหา HHV-8 DNA จาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์ โดยเทคนิค Multiplex PCR (ต่อ)

Sample No	CD4/CD8 ratio	Viral load (copies/ml)	HHV-8 Ab against		Target band			β-globin band (110 bp)	Other band	
			Latent antigen	Lytic antigen	ORF-73 (450 bp)	ORF-26 (233 bp)	K9-3 (184 bp)		จำนวน band	Size (bp)
43	0.41	13,321	N	N	-	-	-	+	1	180
44	0.07	275,448	N	N	-	-	-	+	1	180
45	0.07	16,993	N	N	-	-	-	+	1	180
46	1.09	<400	N	N	-	-	-	+	1	180
47	0.67	1,939	N	N	-	-	-	+	1	180
48	0.16	402,671	N	N	-	-	-	+	1	180
49	0.36	18,091	N	N	-	-	-	+	-	-
50	0.41	4,911	N	N	-	-	-	-	-	-
51	0.25	6,253	N	N	-	-	-	-	-	-
52	0.10	<400	N	N	-	-	-	+	-	-
53	0.07	12,525	N	N	-	-	-	+	-	-
54	0.12	12,688	N	N	-	-	-	+	-	-
55	0.08	125,639	N	N	-	-	-	+	1	180
56	0.09	141,449	N	N	-	-	-	+	-	-

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบตรวจหา HHV-8 DNA จาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์โดยเทคนิค Multiplex PCR (ต่อ)

Sample No	CD4/CD8 ratio	Viral load (copies/ml)	HHV-8 Ab against		Target band			β-globin band (110 bp)	Other band	
			Latent antigen	Lytic antigen	ORF-73 (450 bp)	ORF-26 (233 bp)	K9-3 (184 bp)		จำนวน band	Size (bp)
57	0.02	572,034	N	N	-	-	-	+	1	180
58	0.42	481	N	N	-	-	-	+	-	-
59	0.15	<400	N	N	-	-	-	+	1	180
60	0.04	>750,000	N	N	-	-	-	+	-	-
61	0.03	253,404	ND	ND	-	-	-	+	1	180
62	0.01	141,048	ND	ND	-	-	-	+	1	180
63	0.05	209,434	ND	ND	-	-	-	+	-	-
64	0.68	<400	ND	ND	-	-	-	+	1	180
65	0.86	<400	ND	ND	-	-	-	+	-	-
66	0.94	<400	ND	ND	-	-	-	+	-	-
67	1.06	<400	ND	ND	-	-	-	+	-	-
68	0.14	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
69	0.17	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
70	0.15	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบตรวจหา HHV-8 DNA จาก PBMCs ของผู้ป่วยยอดศักดิ์โดยเทคนิค Multiplex PCR (ต่อ)

Sample No	CD4/CD8 ratio	Viral load (copies/ml)	HHV-8 Ab against		Target band			β-globin band (110 bp)	Other band	
			Latent antigen	Lytic antigen	ORF-73 (450 bp)	ORF-26 (233 bp)	K9-3 (184 bp)		จำนวน band	Size (bp)
71	0.02	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
72	0.14	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
73	0.01	<400	ND	ND	-	-	-	+	-	-
74	0.03	11,225	ND	ND	-	-	-	+	-	-
75	0.50	46,622	ND	ND	-	-	-	+	-	-
76	0.08	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
77	0.03	28,056	ND	ND	-	-	-	+	-	-
78	0.12	391,168	ND	ND	-	-	-	+	-	-
79	0.27	NO	ND	ND	-	-	-	+	1	150
80	0.06	NO	ND	ND	-	-	-	+	1	180
81	0.01	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
82	0.11	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
83	0.06	NO	ND	ND	-	-	-	+	1	180
84	0.24	462,560	ND	ND	-	-	-	+	1	180

๘.5
616.91
๒654711

ฉบับที่.....

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบตรวจหา HHV-8 DNA จาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์ โดยเทคนิค Multiplex PCR (ต่อ)

Sample No	CD4/CD8 ratio	Viral load (copies/ml)	HHV-8 Ab against		Target band			β-globin band (110 bp)	Other band	
			Latent antigen	Lytic antigen	ORF-73 (450 bp)	ORF-26 (233 bp)	K9-3 (184 bp)		จำนวน band	Size (bp)
85	1.58	57,527	ND	ND	-	-	-	+	1	180
86	0.00	NO	ND	ND	-	-	-	+	1	180
87	0.07	224,120	ND	ND	-	-	-	+	1	180
88	0.27	165,991	ND	ND	-	-	-	+	1	180
89	0.12	157,770	ND	ND	-	-	-	+	-	-
90	0.07	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
91	0.05	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
92	0.06	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
93	0.00	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
94	0.04	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
95	0.03	NO	ND	ND	-	-	-	+	1	180
96	0.20	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
97	0.06	<400	ND	ND	-	-	-	+	-	-
98	0.12	75,145	ND	ND	-	-	-	+	-	-

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบตรวจหา HHV-8 DNA จาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์โดยเทคนิค Multiplex PCR (ต่อ)

Sample No	CD4/CD8 ratio	Viral load (copies/ml)	HHV-8 Ab against		Target band			β-globin band (110 bp)	Other band	
			Latent antigen	Lytic antigen	ORF-73 (450 bp)	ORF-26 (233 bp)	K9-3 (184 bp)		จำนวน band	Size (bp)
99	0.01	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-
100	0.08	NO	ND	ND	-	-	-	+	-	-

หมายเหตุ:

+ = พบ PCR product band

* = พบ PCR product band ที่ไม่ชัดเจน

P = positive

(.) = ตัวเลขใหม่เริ่มคือค่า titer ของ HHV-8 Ab

NO = ไม่มีข้อมูลของการตรวจวิเคราะห์

ND = not determine (ไม่ทำการทดสอบ)

Viral load (copies/ml): ตรวจด้วยชุดน้ำยา Amplicor HIV-1 monitor (Roche Diagnostics Inc.)

- = ไม่มี PCR product band

N = negative

วิจารณ์ผลการทดลอง

รายงานการศึกษาอุบัติการณ์การติดเชื้อ HHV-8 ในหลายประเทศ พบว่าประเทศในแถบแอฟริกา มีรายงานการพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อดังกล่าวจำนวนมาก โดยหากเป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV จะมีอัตราการตรวจพบการติดเชื้อสูงกว่าผู้ที่ไม่ติดเชื้อ HIV ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ HHV-8 อาจมีการแพร่ หรือติดต่อผ่านได้ทางเพศสัมพันธ์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบ HHV-8 DNA ในน้ำลาย และเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยเอดส์ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่าผู้ป่วยดังกล่าวน่าจะมีการติดเชื้อ HHV-8 ร่วมด้วย โดยเชื้อ HHV-8 อาจเข้าไปเพิ่มจำนวนและแฝงตัวอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาวได้เช่นกัน (5, 7, 10, 14, 19)

การศึกษานี้เป็นการทดสอบเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจหา HHV-8 DNA ด้วยเทคนิค Multiplex PCR ซึ่งเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของ HHV-8 ที่ใช้ชุด primer หลายชุดในการทำปฏิกิริยา PCR ครึ่งเดียวพร้อมกัน ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำการทดสอบ primer จำนวน 4 ชุด ประกอบด้วย primer ORF-73 (F/R) มีความจำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ของ ORF-73 gene ที่จัดเป็นส่วนที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีนที่เป็น latent antigen ส่วน primer ORF-26 (F/R) และ K9-3 (F/R) มีความจำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ของ ORF-26 gene และ K9-3 gene ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองยีนนี้จัดเป็นส่วนที่มีความสัมพันธ์กับโปรตีนที่เป็น lytic antigen (38) ทั้งนี้มุ่งหวังที่จะให้ Multiplex PCR ที่ศึกษาสามารถตรวจพบการติดเชื้อทั้งในลักษณะที่เป็นการติดเชื้อแบบ latent infection และแบบที่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อ HHV-8 ในผู้ติดเชื้อ (lytic infection) เพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสในการตรวจพบ HHV-8 DNA สำหรับ primer β -globin (F/R) ใช้ในการตรวจหา β -globin gene เพื่อเป็นการบ่งชี้ว่าหากการแยกสกัดเพื่อเตรียม DNA จาก PBMCs ของผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาได้ human DNA จริง จะปรากฏแถบของ β -globin PCR product เมื่อทำการแยกแถบ DNA ด้วย electrophoresis ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นว่าหากตรวจไม่พบ PCR product ของ HHV-8 DNA ในตัวอย่าง DNA ของผู้ป่วยเอดส์ที่นำมาทดสอบน่าจะเป็นผลลบที่แท้จริงไม่ใช่เกิดจากความผิดพลาดในขั้นตอนการเตรียม DNA

สถานะที่เหมาะสมของ Multiplex PCR โดยการใช้ HHV-8 DNA ที่แยกสกัดจาก BC-3 ซึ่งเป็น cell line ที่มี HHV-8 DNA แฝงอยู่เป็นตัวอย่างควบคุมดังรายงาน สามารถตรวจพบ PCR product ของ primer ORF-73, ORF-26 และ K9-3 ที่มีขนาด 450 bp, 233 bp และ 184 bp ตามลำดับ แต่ไม่ปรากฏแถบของ β -globin PCR product เมื่อทำการแยกบน 2.5% agarose gel ในสถานะนี้เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ DNA ที่แยกสกัดจาก B95-8 ซึ่งเป็น cell line ที่มี EBV DNA แฝงอยู่ไม่พบ PCR product ที่มีขนาดตรงกับ PCR product ของทั้งสามชุด primer แต่พบ β -globin PCR product ที่ชัดเจน แสดงให้เห็นว่าสถานะที่รายงานไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามพวก (cross reaction) กับ EBV DNA

ซึ่ง EBV เป็นเชื้อไวรัสในกลุ่ม herpesviruses ที่ความใกล้เคียงในลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 30-50% (38) ดังนั้นสถานะของ Multiplex PCR ที่ศึกษานี้จะมีความจำเพาะ และเหมาะสมกับการนำไปใช้ในการตรวจในตัวอย่าง DNA ที่แยกได้จากผู้ป่วยเอดส์ได้ ทั้งนี้เพราะเมื่อทดลองเพิ่มรอบการทำปฏิกิริยาเป็น 45 รอบ พบว่า β -globin PCR product จากการทดสอบกับ DNA ที่แยกจาก B95-8 cell line และ PCR product ของทั้งสามชุด primer จากการทดสอบกับ DNA ที่แยกจาก BC-3 cell line มีความชัดเจนใกล้เคียงกับการทำปฏิกิริยา 35 รอบ แต่จะพบ β -globin PCR product ที่ชัดเจนเพิ่มขึ้นจาก PCR product ทั้งสามข้างต้น ดังนั้นการทำปฏิกิริยา 35 รอบน่าจะเพียงพอและเหมาะสมกับการนำไปใช้จริงมากกว่า

จากผลการทดสอบความไวพบว่า Multiplex PCR ที่ศึกษานี้สามารถตรวจพบปริมาณ HHV-8 DNA ได้อย่างน้อยที่สุดเท่ากับ 100 pg/ μ l (1 ng/reaction) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจโดยเทคนิค PCR ที่ใช้ primer ทีละชุดซึ่งมีความไวของชุด primer ORF-73 และ ORF-26 เท่ากันคือ 10 pg/ μ l (หรือ 100 pg/reaction) สำหรับความไวของชุด primer K9-3 เท่ากับ 1 pg/ μ l (หรือ 10 pg/reaction) แสดงให้เห็นว่ามีความไวของปฏิกิริยาในการตรวจพบ HHV-8 DNA ด้วยเทคนิค Multiplex PCR ลดลง 10 เท่า และ 100 เท่าตามลำดับ ผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับรายงานของ Edwards MC และ Gibbs RA (34) ที่ได้กล่าวและวิจารณ์ไว้ว่าข้อจำกัดหนึ่งของการปรับสถานะของ Multiplex PCR คือการลดลงของความไวของปฏิกิริยาที่ใช้เทคนิค Multiplex PCR ซึ่งจะลดลงประมาณ 10-100 เท่าเมื่อเทียบกับเทคนิค Standard PCR แม้ว่า Multiplex PCR จะเป็นเทคนิคที่เพิ่มโอกาสการตรวจพบ PCR product ที่สนใจก็ตาม

จากผลการทดลองนำ Multiplex PCR ไปทดสอบกับตัวอย่าง DNA ที่แยกสกัดจาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์ พบว่า 11 ตัวอย่างไม่ปรากฏ β -globin PCR product แสดงว่าอาจเกิดข้อผิดพลาดในขั้นตอนการเตรียม DNA สำหรับ 49 ตัวอย่างที่ตรวจพบเฉพาะ β -globin PCR product น่าจะเป็นผลต่อการตรวจหา HHV-8 DNA จริง ส่วน PCR product ที่มีขนาดประมาณ 180 bp ที่พบร่วมกับ β -globin PCR product ใน 38 ตัวอย่าง และ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 150 bp ที่พบร่วมกับ β -globin PCR product ใน 2 ตัวอย่างนั้นน่าสนใจในการที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมว่ามีความสัมพันธ์หรือไม่อย่างไรกับการบ่งชี้การติดเชื้อ HHV-8 หรือเชื้อในกลุ่ม herpesviruses อื่น ๆ ที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ HHV-8 ทั้งนี้เพราะจากการทดสอบความไวและความจำเพาะของ Multiplex PCR ดังรายงานข้างต้นพบว่าสถานะที่พิจารณาเลือกนี้มีความไว และความจำเพาะในระดับที่น่าเชื่อถือได้พอสมควร ดังนั้นการที่พบ PCR product ดังกล่าวในกลุ่มตัวอย่างทดสอบประมาณ 40 % ก็เป็นสิ่งที่ควรจะมีการพิสูจน์เพิ่มเติม ซึ่งแนวทางหนึ่งอาจทำได้โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ทั้งสองขนาดที่สงสัยไปเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานไว้ใน Gen bank เพื่อให้ได้ข้อมูลว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเป็นเพียง human DNA ที่สามารถตรวจพบ

ได้ หรือมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อในกลุ่มใด ซึ่งข้อมูลดังกล่าวน่าจะเป็นประโยชน์และแนวทางการปรับเปลี่ยนเพื่อให้ได้ Multiplex PCR ที่สามารถใช้ตรวจหา HHV-8 DNA เพื่อป้องกันการติดเชื้อดังกล่าวในกลุ่มคนไทยที่มีความจำเพาะและเหมาะสมมากขึ้น

นอกจากนี้เมื่อนำผลการตรวจระดับ titer ของ HHV-8 antibody, CD4/CD8 ratio และระดับ viral load ของผู้ป่วยเอดส์ทั้ง 100 รายที่ทำการศึกษามาพิจารณาพร้อมกับผลการตรวจด้วย Multiplex PCR (ตารางที่ 7) ไม่พบความสัมพันธ์กับการตรวจ HHV-8 DNA และการตรวจพบ PCR product ขนาดประมาณ 150 bp และ 180 bp แต่อย่างไร



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหา HHV-8 DNA ด้วยเทคนิค Multiplex PCR โดยใช้ชุด primers ต่อ ORF-73, ORF-26, K9-3 และ β -globin ร่วมกัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดเป็นไปตามสภาวะ T1B (ดังผลการทดลองที่ 3) ความไวของปฏิกิริยานี้สามารถตรวจพบปริมาณ DNA ได้อย่างน้อยที่สุด 100 pg/ μ l (หรือ 1 ng/reaction) โดยไม่เกิดผลบวกปลอมที่อาจเกิดจากปฏิกิริยาข้ามพวก (cross reaction) เมื่อทดสอบกับ DNA จาก B95-8 ซึ่งเป็น cell line ที่มี EBV DNA แฝงอยู่ เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจโดยเทคนิค PCR ที่ใช้ primer ทีละชุดซึ่งมีความไวของชุด primer ชุด primer ORF-73 และ ORF-26 เท่ากันคือ 10 pg/ μ l (หรือ 100 pg/reaction) สำหรับความไวของชุด primer K9-3 เท่ากับ 1 pg/ μ l (หรือ 10 pg/reaction) พบว่ามีความไวของปฏิกิริยาในการตรวจพบ HHV-8 DNA ด้วยเทคนิค Multiplex PCR ที่ศึกษาลดลง 10 เท่า และ 100 เท่าตามลำดับ

เมื่อทำการทดลองตรวจหา HHV-8 DNA ในตัวอย่าง DNA ที่แยกได้จาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์ 100 ตัวอย่างพบว่าให้ผลลบต่อ HHV-8 DNA ทั้ง 100 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบ PCR product ขนาดประมาณ 180 bp และ 150 bp ร่วมกับการพบ β -globin PCR product ใน 38 ตัวอย่าง และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ ซึ่งน่าจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสัมพันธ์ของการตรวจพบ PCR product ดังกล่าวกับการติดเชื้อ HHV-8 และเชื้อในกลุ่ม herpesviruses ต่อไป

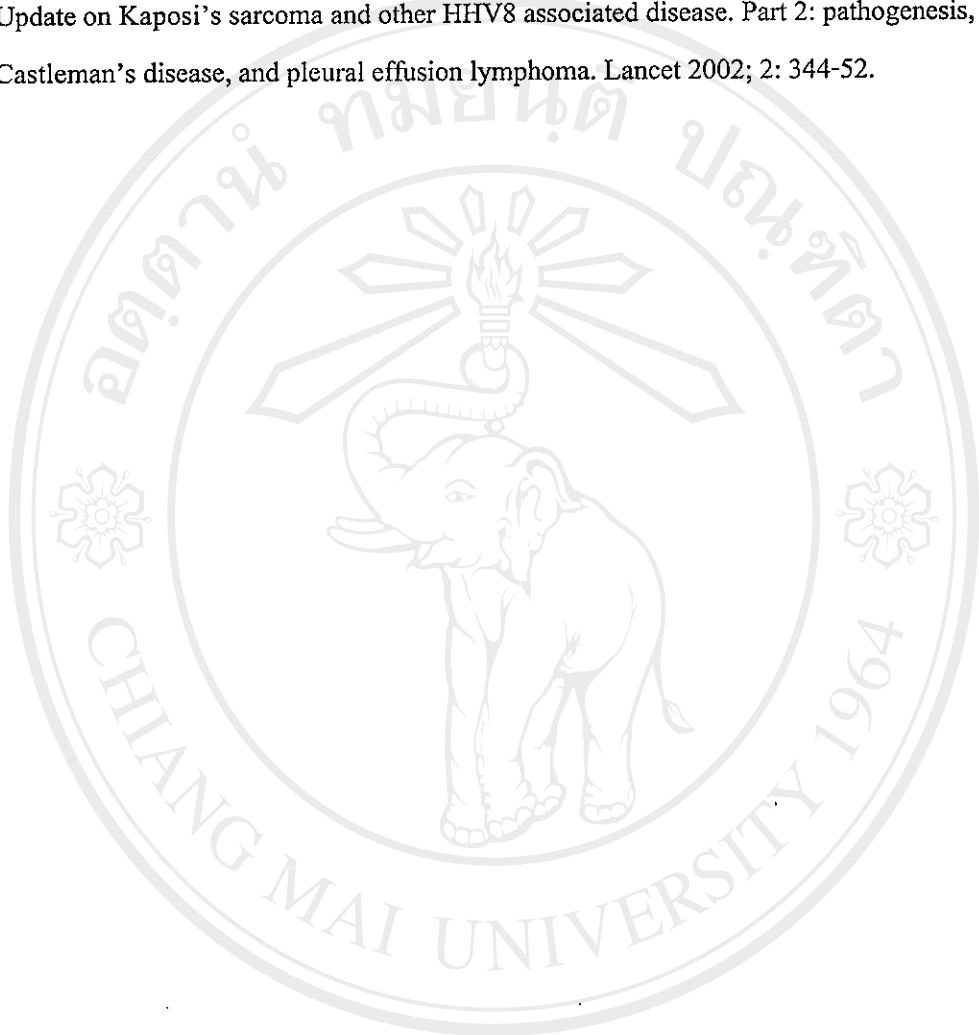
บรรณานุกรม

1. Chang Y, Cesarman E, Psechin MS, *et al.* Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994; 265: 1865-9.
2. Whitby D, Smith NA, Talbot SJ. Kaposi's sarcoma and human herpesvirus-8. In: Arrand JR, Harper DR, eds. *Viruses and Human Cancer*. Oxford. BIOS Scientific Publisher LTD. 1998. P. 93-108.
3. Forman EK. The human herpesvirus 8 (HHV-8) genome. *Expert Review in Molecular Medicine*. 2001.
4. Huang YQ, Li JJ, Kaplan MH, *et al.* Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995; 345: 759-61.
5. Whitby D, Howard MR, Tenant-Flowers M, *et al.* Detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995; 346: 799-802.
6. Gao SJ, Kingsley L, Hoover DR, *et al.* Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma associated herpesvirus-associated latent nuclear antigens before the development of Kaposi sarcoma. *Neagl J Med* 1996; 335: 233-41.
7. Pierrotti CI, Sumita ML, Freire SW. Detection of human herpesvirus 8 DNA and antibodies to latent nuclear and lytic-phase antigens in serial samples from AIDS patients with Kaposi's sarcoma. *J Clin Virol* 2000; 16: 247-51.
8. Fouchard N, Lacoste V, Coupple P, *et al.* Detection and genetic polymorphism of human herpes virus type 8 in endemic or epidermic Kaposi's sarcoma from West and Central Africa and South America 2000; 85: 166-70.
9. Moore PS, Kingsley L, Hoimberg SD, *et al.* KSHV infection prior to onset of Kaposi's sarcoma. *AIDS* 1996; 10: 175-80.
10. Na Ayuthaya PI, Inagi R, Auwanit W, Warachit P. The association of skin diseases with human herpesvirus infection in HIV carriers. *Arch Virol* 1998; 143: 1881-92.
11. Grant AD, De Cock KM. The growing challenge of HIV/AIDS in developing countries. *British Medical Bulletin* 1998; 54 (2): 369-81.
12. Dupin N, Grandadam M, Calvez V, *et al.* Herpesvirus-like DNA sequences in patients with Mediterranean Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995; 345: 761-2.

13. Huang YQ, Li JJ, Kaplan MH, *et al.* Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995; 345: 759-61.
14. Plancoulaine S. Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. *Lancet* 2000; 356: 1062.
15. Lallemand F, Desire N, Rozenbaum W, Nicolas J, Marechal V. Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1404-8.
16. Koelle DM, Huang ML, Chandran B, Vieira J, Piepkron M, Corey L. Frequent detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in saliva of human immunodeficiency virus-associated men: Clinical and immunologic correlates. *J Infect Dis* 1997; 176: 94-102.
17. Vieira J, Huang ML, Koelle DM, Coreyn L. Trasmissible Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in saliva of men with a history of Kaposi's sarcoma. *J Virol* 1997; 71: 7083-7.
18. Dimond C, Huang ML, Kedes DH, *et al.* Absence of detectable human herpesvirus 8 in the semen of human immunodeficiency virus-infected men without Kaposi's sarcoma *J Infect Dis* 1997; 176: 775-7.
19. Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Marcrae D, Kedes DH. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *New Engl J Med.* 1998; 338: 948-54.
20. Grulich AE, Olsen SJ, Luo K, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus : a sexually transmissible infection. *J AIDS Human Retro* 1999; 20: 387-93.
21. Aboulafia DM. The epidemiologic, pathologic and clinical features of AIDS-associated pulmonary Kaposi's sarcoma. *Chest* 2000; 117(4): 1128-45.
22. Alkan S, Karcher DS, Ortiz A, Khalil S, Akhtar M, Ali MA. Human virus 8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in organ transplant patients with immunosuppression. *British J Haematology* 1997; 96: 412-4.
23. Nocera A, Corbellino M, Valente U, *et al.* Post transplant human herpesvirus 8 infection and seroconversion in Kaposi's sarcoma affected kidney recipient transplanted from a human herpesvirus 8 positive living related donor. *Transplantation Proceeding* 1998; 30: 2095-6.

24. Cannon M, Cesarman E. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and acquired Immunodeficiency Syndrome-related Malignancy. *Seminars in Oncology*. 2000 Aug; 27 (4): 409-19.
25. Cesarman E, Chang Y, Moore JW, *et al*. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body cavity-based lymphomas. *N. Engl. Med* 1995; 332: 1186-91.
26. Luppi M, *et al*. Bone marrow failure associated with human herpesvirus 8 infection after transplantation. *New Engl J Med* 2000; 343: 1378-82.
27. Lassoued J, Clauvel JP, Fegueux S, Matheron S, Gorin I, Oksenhendler E. AIDS-associated Kaposi's sarcoma in female patients. *AIDS* 1991; 5: 877-80.
28. Laduca JR, Love JL, Abbott LZ, *et al*. Detection of human herpesvirus 8 DNA sequences in tissues and body fluids. *J Infect Dis* 1998; 178: 1610-5.
29. Pan L, Milligan L, Michaeli J, Cesarman E, Knowles DM. Polymerase Chain Reaction Detection of Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus-optimized Protocols and their application to myeloma. *J Mol Diag* 2001; 6:32-8.
30. วัชรวิทย์ และมนตรี อัดถทิพพหลกุล. บรรณาธิการ. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2536: 1-19.
31. วสันต์ จันทร์อาทิตย์, ปราณิ ถิ่นชะชัย และวาสนา ศิริรังษี. บรรณาธิการ. วิทยาการทันสมัย ในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์ เชียงใหม่ 2539: (5-1)-(5-13), (7-1)-(7-7) และ (8-1)-(8-5).
32. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒน์พงษ์ และคณะ. อนุชีวิวิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: บริษัท เท็กซ์แอนด์เจอร์นัลส์ จำกัด 2541: 69-82.
33. Roux KH. Optimization and Troubleshooting in PCR. In: Diffenbach CW and Dveksler GS, eds. PCR primer a Laboratory manual. CSHL Press.1995. p. 53-62.
34. Edwards MC and Gibbs RA. Multiplex PCR. In: Diffenbach CW and Dveksler GS, eds. PCR primer a Laboratory manual. CSHL Press.1995. p. 157-71.
35. <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/Guide.html>
36. Arvanitakis L, Mesri EA, Nador RG, Said JW, Asch AS, Knowles DM and Cesarman E. Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Blood* 1996; 88: 2648-54.

37. Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Dieringer PL, Farrell PJ, Gibson TJ, *et al.* DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 1984; 310 (5974): 207-11.
38. Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, *et al.* Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated disease. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. *Lancet* 2002; 2: 344-52.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก

(10x) PBS

NaCl	80.0	gm
KCl	2.0	gm
KH ₂ PO ₄	2.0	gm
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	14.1	gm
เติม distilled water ให้ครบ	1,000	ml

TE buffer (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl
1 mM Na ₂ EDTA

Extraction buffer

10 mM Tris-HCl
0.1 M EDTA
0.5% SDS

70% Ethanol

Absolute ethanol	70.0	ml
Distilled water	30.0	ml

Lysis buffer

50 mM KCl
10 mM Tris-HCl
2.5 mM MgCl ₂
0.45% NP-40

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(10x) PCR buffer

200 mM Tris-HCl (pH8.0)

500 mM KCl

1.25 mM dNTPs mixture100 mM dATP 10 μ l100 mM dCTP 10 μ l100 mM dGTP 10 μ l100 mM dTTP 10 μ ldistilled water 160 μ l**(6x) loading buffer**

0.25% bromphenol blue

30% glycerol

Ethidium bromide (10 mg/ml)

Ethidium bromide 1.0 gm

Distilled water 100 ml

1 kb ladderstock 1 kb Plus 5 μ l(6x) loading buffer 10 μ ldistilled water 45 μ l**(50x) Tris-acetate (TAE) buffer**

Tris base 242 gm

Gracial acetic acid 57 ml

0.5 M EDTA (pH8.0) 100 ml

0.5 M EDTA

Sodium ethylene diamine tetraacetate·2H ₂ O	186.1	gm
Distilled water	800.0	ml

ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรด้วย distilled water จนครบ 1,000 ml

2.5% Agarose gel

agarose gel	2.5	gm
(0.5x) TAE buffer	100.0	ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved