รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

# การวิเคราะห์ cagA และ vacA subtypes ชนิด s และ m ของเชื้อ *Helicobacter pylori* ในผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารชนิดเป็นแผลและไม่เป็นแผลและโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยวิธี PCR ที่ใช้ primer จำเพาะต่อสายพันธุ์ในคนไทย

# Analysis of cagA and vacA subtypes s and m of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer, non-ulcer and gastric carcinoma by PCR using primers specific to Thai strain

โดย

ดร. สุกัญญา ลินพิศาล
นางสาววริศรา สุวรรณ
รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงนิรัชร์ เลิศประเสริฐสุข
นางสาวกุลรัญญา พรหมเมืองยอง
ศาสตราจารย์เกียรติคุณ แพทย์หญิงกรรณิการ์ พรพัฒน์กุล

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2547
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

30 กันยายน 2548

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การวิเคราะห์ cagA และ vacA subtypes ชนิด s และ m ของเชื้อ *Helicobacter pylori* ในผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะชนิดเป็นแผลและไม่เป็นแผล และโรคมะเร็งกระเพาะอาหารโดยวิธี PCR ที่ใช้ primer จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย" ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2547 รหัสโครงการวิจัย 02012700-0002

คณะวิจัยขอขอบคุณผู้ให้การสนับสนุนจนทำให้การดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ดังนี้: Dr. Heinrich F Steger อาจารย์พิเศษภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้คำปรึกษาด้านเทคนิค Polymerase Chain Reaction; Dr. Carl J Mason, The Armed Force Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) กรุงเทพฯ ที่ได้อนุเคราะห์ให้เชื้อ *H .pylori* ที่เพาะเลี้ยงจากผู้ป่วยคนไทยที่เป็นโรคกระเพาะอาหาร และขอขอบคุณผู้บริหารสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้งบประมาณสนับสนุนสำหรับการดำเนินงานวิจัยเพิ่มเติม

คณะผู้วิจัย

30 กันยนยน 2548

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# บทคัดย่อ

เฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไรเป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบมากและมีความสัมพันธ์กับโรคกระเพาะอาหารอักเสบ โรคแผลกระเพาะอาหาร โรคแผลในลำไส้ส่วนต้นและโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร ได้มีการพบยีนหลายชนิดที่เป็นปัจจัยความรุนแรงของโรค ซึ่งอาจสัมพันธ์กับอาการทางคลินิกของโรคได้แก่ ยีน cagA, vacA และ iceA วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาลักษณะยีน cagA, vacA และ iceA ของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไรและความสัมพันธ์กับโรคกระเพาะอาหารหรือลำไส้ส่วนต้นในผู้ป่วยทางภาคเหนือของประเทศไทย ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่นำมาศึกษาได้มาจากสองแหล่งคือ จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วยวิธีตรวจเอนไซม์ urease แล้วและจากเนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟินซึ่งได้มีการตรวจหาเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไรด้วยวิธีทางพยาธิวิทยา DNA ของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไรถูกสกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อจำนวน 135 ตัวอย่าง (มาจากผู้ป่วยกลุ่มโรคกระเพาะอักเสบ 58 ราย, โรคแผลในกระเพาะ 28 ราย, โรคแผลในลำไส้ส่วนต้น 45 ราย และโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร 4 ราย) และทำการตรวจลักษณะยีนที่กล่าวมาแล้วข้างต้นด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) จากการศึกษาพบยีน cagA 95.6% และยีนย่อยของ vacA พบมากที่สุดคือ vacAs1a (96.3%) ยีน vcaAs1c พบ 66.67% แต่ไม่พบยีน vacAs1b และ s2 ยีน vacA ในส่วน middle region พบ m1 59.3% และ m2 40.7% ในกลุ่มยีน vacA จะพบชนิด s1a/m1 มากที่สุดในกลุ่มประชากรศึกษา (59.3%) ส่วนยีน iceA1 พบ 64.4% ขณะที่ iceA2 พบเพียง 28.9% ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p<0.05$) การพบเชื้อที่มีสายพันธุ์ยีนร่วมของ cagA, vacAs1a/m1, vacAs1c/m1 หรือ vacAs1a/s1c/m1 และยีน iceA1 จะพบในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นแผลลำไส้ส่วนต้นมากกว่ากลุ่มที่เป็นโรคกระเพาะอักเสบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของเชื้อสายพันธุ์ในคนไทย สามารถตรวจหายีน cagA, vacAs1, vacAs1a มากกว่า primer ที่จำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ชาวตะวันตกอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไรที่มียีน cagA, vacAs1a/m1 และ iceA1 จะพบมากในประชากรภาคเหนือของประเทศไทย ยีนร่วมที่มี cagA, vacAs1a/m1 และ/หรือ vacAs1c/m1 และยีน iceA1 จะเป็นกลุ่มยีนเด่นในกลุ่มโรคแผลในลำไส้ส่วนต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# Abstract

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is the common infectious bacterium and has been linked to chronic gastritis, peptic ulcer, duodenal ulcer and gastric cancer. Several genes have been identified as virulence factors which may be related to the clinical outcome including cagA, vacA and iceA gene. The aim of this study was to assess the genotypes of *H. pylori* cagA, vacA and ice A and the relationship to gastro-duodenal diseases in Northern Thai patients. Gastric biopsy specimens were from positive urease test and paraffin-embedded tissue which identified the bacteria by histological method. *H. pylori* DNA was extracted from 135 specimens (58 with gastritis, 28 with peptic ulcer, 45 with duodenal ulcer and 4 with gastric cancer) and the genotypes were detected by PCR based methods. cagA$^+$ were found in 95.6% and the dominant vacA subtypes was s1a (96.3%). vacAs1c were also found in 66.67% but non of the vacAs1b and s2 genotypes were obtained. vacA middle region sequences, the m1 and m2 strains were detected in 59.3% and 40.7%, respectively. Among vacA genotypes, the s1a/m1 was the most common in the studied population (59.3%). iceA1, genotype was present in 64.4% whereas iceA2 was found only 28.9% ($p \leq 0.05$). The presence of cagA+, vacAs1a/m1 either vacAs1c/m1 or vacAs1a/s1c/m1 and iceA1 genotypes status were associated with higher prevalence in patients with duodenal ulcer than patients with gastritis ($p<0.05$). Primer specific to *H. pylori* Thai strains detected more cases of cagA, vacAs1, vacAs1a genotypes than primer specific for the Western strains ($p<0.05$).

In conclusion, cagA$^+$, vacA s1a/m1 and iceA1, were typical genotypes of *H. pylori* strains from Northern Thailand. The combination of cagA$^+$, vacA s1a/m1 and/or vacAs1c/m1 and iceA1, genotypes were predominant in patients with duodenal ulcer.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญ


| เรื่อง | | | หน้า |
|---|---|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | | | ก |
| บทคัดย่อ | | | ข |
| Abstract | | | ค |
| สารบัญ | | | ง |
| สารบัญตาราง | | | ซ |
| สารบัญรูป | | | ฎ |
| **บทที่ 1** | **บทนำ** | | 1 |
| | 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย | | 1 |
| | 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ | | 4 |
| | 1.3 ประโยชน์ | | 5 |
| | 1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | | 5 |
| **บทที่ 2** | **วิธีวิจัย** | | 9 |
| | 2.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี | | 9 |
| | | 2.1.1 วัสดุ อุปกรณ์ | 9 |
| | | 2.1.2 สารเคมี | 9 |
| | 2.2 การออกแบบวิจัย | | 11 |
| | 2.3 ตัวอย่างศึกษา | | 11 |
| | | 2.3.1 ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *H. pylori* ที่สกัดจากผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารจากโครงการอื่นๆ | 11 |
| | | 2.3.2 ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ฝังในพาราฟินจากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ | 11 |
| | | 2.3.3 ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารจากผู้ป่วยที่ได้จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อ โดยวิธี CLO test | 11 |
| | 2.4 การสกัด DNA เชื้อ *H. pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร | | 12 |
| | | 2.4.1 การสกัด DNA เชื้อ *H. pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ฝังในพาราฟิน | 12 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญ (ต่อ)


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| 2.4.2 การสกัด DNA เชื้อ *H. pylori* ของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ได้จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโดยวิธีตรวจหาเอนไซม์ urease | 13 |
| 2.5 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี PCR | 13 |
| 2.6 การพัฒนาวิธี PCR เพื่อตรวจหายีน cagA และ vacA subtypres ชนิดต่างๆ ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ primer จากคณะวิจัยอื่นที่ได้รายงานไว้ | 13 |
| 2.6.1 Oligonucleotide primers | 13 |
| 2.6.2 การศึกษา sensitivity ของวิธี PCR | 16 |
| 2.7 การหาลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ตามยีน cagA และ vacA subtypes ชนิด s และ m และ iceA | 17 |
| 2.8 การพัฒนาวิธี PCR เพื่อตรวจหายีน cagA และ vacA subtypes ชนิดต่างๆ ของเชื้อ H. pylori โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อคนไทย | 17 |
| 2.8.1 การออกแบบ primer | 17 |
| 2.8.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR | 18 |
| 2.8.3 การหา sensitivity ของวิธี PCR | 19 |
| 2.9 การตรวจหายีน cagA และ vacA subtypes s และ m | 19 |
| 2.9.1 ตรวจจากตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารจากโครงการอื่นๆ | 19 |
| 2.9.2 ตรวจจากตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ฝังในพาราฟิน | 20 |
| 2.9.3 ตรวจจากตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะที่ได้จากการตรวจเชื้อด้วยวิธีตรวจเอนไซม์ urease | 20 |
| 2.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ | 20 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญ (ต่อ)


| เรื่อง | | หน้า |
|---|---|---|
| **บทที่ 3** | **ผลการวิจัย** | 21 |
| | 3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR เพื่อตรวจหายีน cagA, vacA และ iceA โดยใช้ primer ที่ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่น | 21 |
| | 3.2 การยืนยันผลิตภัณฑ์ PCR | 25 |
| | 3.2.1 การยืนยันผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ Genomic DNA strain J99 (ATCC 700824) | 25 |
| | 3.2.2 การยืนยันผลิตภัณฑ์ PCR โดยการหาลำดับเบส | 26 |
| | 3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR เพื่อตรวจหายีน cagA, vacA และ iceA โดยใช้ primer ที่ออกแบบโดยใช้ลำดับเบสของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์คนไทย | 58 |
| | 3.4 การเปรียบเทียบ sensitivity ของ PCR ที่ใช้ primer ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่นและออกแบบจากลำดับเบสที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย | 60 |
| | 3.5 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี PCR | 65 |
| | 3.6 การตรวจหายีน cagA, vacA subtypes s และ m และ iceA โดยใช้ primer จากคณะวิจัยอื่นและ primer ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทยและเปรียบเทียบ primer 2 คู่ | 65 |
| | 3.7 ความสัมพันธ์ของยีน cagA, vacA subtypes ชนิด s และ m และ iceA ที่มีต่ออาการทางคลินิกของโรคกระเพาะ | 87 |
| **บทที่ 4** | **วิจารณ์และสรุปผล** | 94 |
| **เอกสารอ้างอิง** | | 101 |
| **ภาคผนวก 1** | | 106 |
| | 1.1 การสกัด DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร โดยการใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit | 107 |
| | 1.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองโดยวิธี PCR | 108 |
| | 1.3 การตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี Electrophoresis | 109 |
| | 1.4 การหาลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR | 110 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญ (ต่อ)


| เรื่อง | | หน้า |
|---|---|---|
| ภาคผนวก 2 | ตัวอย่าง sequence Electrogram และลำดับเบสจาก GenBank | 113 |
| 2.1 | cagA gene | 114 |
| 2.2 | vacAs1 gene (201 bp) | 118 |
| 2.3 | vacAs1 gene (259 bp) | 124 |
| 2.4 | vacAs1a gene | 130 |
| 2.5 | vacAs2a gene | 136 |
| 2.6 | vacAm2 gene | 141 |
| 2.7 | vacAm m1 gene | 146 |
| 2.8 | vacAm m2 gene | 154 |
| 2.9 | iceA1 gene | 161 |
| ภาคผนวก 3 | | 166 |
| 3.1 | ค่า p value วิเคราะห์โดยใช้วิธีทางสถิติ McNema Chi-Square Test | 167 |
| 3.2 | ค่า p value วิเคราะห์โดยใช้วิธีทางสถิติ Fisher's exact Test | 168 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญตาราง


| ตาราง | | หน้า |
|---|---|---|
| ตารางที่ 2.1 | Oligonucleotide primers ที่จำเพาะต่อยีน cagA และ vacA subtypes s และ m จากคณะวิจัยอื่น | 14 |
| ตารางที่ 2.2 | ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และ Annealing temperature ที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากคณะวิจัยอื่น | 16 |
| ตารางที่ 2.3 | Oligonucletide primers ที่จำเพาะต่อยีน cagA และ vacA subtype s และ m ของเชื้อ *H. pylori* จากการออกแบบที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย | 18 |
| ตารางที่ 2.4 | ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และ Annealing temperature ที่เหมาะสมในการทำPCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่พบในคนไทย | 19 |
| ตารางที่ 3.1 | สภาวะที่เหมาะสมของ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA subtypes s และ m ชนิดต่างๆและยีน iceA | 21 |
| ตารางที่ 3.2 | ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 349 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน cagA ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. L11714 | 28 |
| ตารางที่ 3.3 (ก) | ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 201 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacAs1 ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. U05676 | 31 |
| ตารางที่ 3.3 (ข) | ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 259 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA s1 ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. U05676 | 33 |
| ตารางที่ 3.3 (ค) | ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 190 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA s1a ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. U05676 | 36 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญตาราง (ต่อ)


| ตาราง | | หน้า |
|---|---|---|
| **ตารางที่ 3.3 (ง)** | ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 228 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA s2a ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. U29401 | 38 |
| **ตารางที่ 3.3 (จ)** | ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 352 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA m2 ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. AY663831 | 40 |
| **ตารางที่ 3.3 (ฉ)** | ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 567 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacAm m1 ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. U05676 | 43 |
| **ตารางที่ 3.3 (ช)** | ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 642 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacAm m2 ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. U29401 | 48 |
| **ตารางที่ 3.4** | ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 247 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน iceA1 ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no.U43917 | 54 |
| **ตารางที่ 3.5** | จำนวนเบสที่เหมือนกับที่รายงานจาก GenBank ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer จำเพาะต่อยีน cagA, vacA subtypes s และ m และ iceA ที่ได้จากผู้ป่วยคนไทยที่ติดเชื้อ *H. pylori* | 57 |
| **ตารางที่ 3.6** | แสดงสภาวะที่เหมาะสมของ PCR มาตรฐานตามเป้าหมายของยีน cagA, vacAs1 (201 bp), vacAs1 (259 bp), vacAs1a, vacAm2 และ iceA1 ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย | 58 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญตาราง (ต่อ)


| ตาราง | | หน้า |
|---|---|---|
| ตารางที่ 3.7 | ความเข้มข้นของ DNA ของเชื้อ *H. pylori* ที่สามารถตรวจพบได้ต่ำสุดเมื่อใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน cagA, vacA subtypes s และ m และ iceA โดยใช้ primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น และ primer ที่ออกแบบจำเพาะต่อยีนของเชื้อที่พบในสายพันธุ์คนไทย | 64 |
| ตารางที่ 3.8 | ผลการตรวจยีน cagA, vacA subtypes s และ m และ iceA ของเชื้อ *H. pylori* จาก DNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะผู้ป่วยที่ฝังในพาราฟิน โดยใช้ primer ที่ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่น | 67 |
| ตารางที่ 3.9 | ผลการตรวจยีน cagA, vacA subtypes s และ m และ iceA ของเชื้อ *H. pylori* จาก DNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะผู้ป่วยที่ฝังในพาราฟิน โดยใช้ primer ที่ออกแบบจากลำดับเบสสายพันธุ์ที่พบในคนไทย | 71 |
| ตารางที่ 3.10 | ผลการตรวจยีน cagA, vacA subtypes s และ m และ iceA ของเชื้อ *H. pylori* จาก DNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะผู้ป่วยที่ได้จากการตรวจเชื้อโดยใช้ CLO test โดยใช้ primer ที่ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่น | 75 |
| ตารางที่ 3.11 | ผลการตรวจยีน cagA, vacA subtypes s และ m และ iceA ของเชื้อ *H. pylori* จาก DNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะผู้ป่วยที่ได้จากการตรวจเชื้อโดยใช้ CLO test โดยใช้ primer ที่ออกแบบจากลำดับเบสสายพันธุ์ที่พบในคนไทย | 80 |
| ตารางที่ 3.12 | ตัวอย่างที่ตรวจพบยีน cagA, vacA subtypes ชนิด s และ m และยีน iceA ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ primer ที่ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่น และ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์คนไทย | 85 |
| ตารางที่ 3.13 | จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกของยีน cagA, vacA subtypes และ iceA ของเชื้อ *H. pylori* มากที่สุดจาก primer ที่ใช้ต่างกันในกลุ่มโรคต่างๆ | 89 |
| ตารางที่ 3.14 | ยีน vacA ในตัวอย่างเนื้อเยื่อโดยแยกเป็นกลุ่มโรคกระเพาะอาหารต่างๆ | 91 |
| ตารางที่ 3.15 | ความชุกของเชื้อ *H. pylori* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะที่พบเชื้อสายพันธุ์ vacA และ iceA มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ | 92 |
| ตารางที่ 3.16 | ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่พบยีน cagA, vacA และ iceA ในตัวอย่างเดียวกันและความสัมพันธ์ของยีนเหล่านี้กับความรุนแรงของโรคกระเพาะอาหาร | 93 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญรูป


| รูป | | หน้า |
|---|---|---|
| รูปที่ 3.1 | ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer จำเพาะต่อยีน cagA, vacA subtypes ชนิดต่างๆ และ iceA จากรายงานคณะวิจัยอื่นๆ ของเชื้อ *H. pylori* จากเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารคนไทย | 25 |
| รูปที่ 3.2 | ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer จำเพาะต่อยีน cagA, vacA subtypes ชนิดต่างๆ และ iceA จากรายงานคณะวิจัยอื่นๆ ของเชื้อ *H. pylori* strain J99 (ATCC 700824) | 26 |
| รูปที่ 3.3 | ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer ออกแบบที่จำเพาะต่อยีน cagA, vacA subtypes ชนิดต่างๆ และ iceA ของเชื้อ *H. pylori* ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย จากเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารคนไทย | 60 |
| รูปที่ 3.4 (ก) | sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน cagA | 61 |
| รูปที่ 3.5 (ก) | sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน vacAs1 (201 bp) | 61 |
| รูปที่ 3.5 (ข) | sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน vacAs1 (259 bp) | 62 |
| รูปที่ 3.5 (ค) | sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน vacAs1a | 62 |
| รูปที่ 3.5 (ง) | sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน vacAm2 | 63 |
| รูปที่ 3.5 (จ) | sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน vacAm (m1) และ (m2) | 63 |
| รูปที่ 3.6 | sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน iceA1 | 64 |
| รูปที่ 3.7 | เปรียบเทียบวิธี PCR ที่ตำแหน่งยีน cagA, iceA และ vacA subtypes ชนิดต่างๆของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น (other strain) และ primer ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของเชื้อที่พบในคนไทย (Thai strain); (ก) กลุ่มโรค gastritis; (ข) กลุ่มโรค peptic ulcer; (ค) กลุ่มโรค duodenal ulcer และ (ง) กลุ่มโรค gastric cancer | 86 |
| รูปที่ 3.8 | เปรียบเทียบวิธี PCR ที่ใช้ primer จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย และ primer จากคณะวิจัยอื่น ในการตรวจหายีน cagA, vacA subtypes ชนิดต่างๆและ iceA | 87 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญรูป (ต่อ)


| รูป | | หน้า |
|---|---|---|
| **รูปที่ 3.9** | เปรียบเทียบความชุกของยีน cagA, iceA และ vacA subtypes ชนิด s และ m ของเชื้อ *H. pylori* ในกลุ่มโรคกระเพาะอาหารอักเสบ โรคแผลในกระเพาะและโรคแผลลำไส้ส่วนต้นและ โรคมะเร็งกระเพาะอาหาร | 90 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

ปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับว่า เชื้อ *Helicobacter pylori (H.pylori)* เป็นสาเหตุโดยตรงที่ทำให้เกิดการอักเสบของเยื่อบุกระเพาะอาหาร และทำให้เกิดแผลที่บริเวณกระเพาะอาหาร หรือเกิดเป็นแผลที่บริเวณลำไส้ส่วนต้นที่ติดกับกระเพาะอาหาร ซึ่ง 80% ของผู้ป่วยจะประสบกับปัญหาการเป็นๆ หายๆ คือหลังจากรักษาแผลให้หายแล้ว มักจะกลับมาเป็นแผลอีกอยู่เรื่อยๆ แบบเรื้อรัง ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ และนอกจากนี้แล้วเชื้อ *H.pylori* ยังเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร(1)องค์การอนามัยโลกได้ให้ความสำคัญกับเชื้อตัวนี้ว่าเป็น carcinogen(2) ในปัจจุบันนี้การรักษาโรคกระเพาะอาหารอักเสบ โดยการกำจัดเชื้อ *H.pylori* ได้เป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีรายงานว่าหลังจากกำจัดเชื้อตัวนี้แล้วผู้ป่วยมีโอกาสที่จะกลับมาเป็นแผลในกระเพาะอาหารลดลงอย่างมาก ทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาลดลง และลดโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร(3) ในประเทศไทยมีรายงานผลการวิจัยผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารพบอัตราการติดเชื้อ *H.pylori* 31-74%(4) ในจังหวัดเชียงใหม่ Peerakome และคณะ(5) ได้รายงานอัตราการติดเชื้อ *H.pylori* ในผู้ป่วยที่แสดงอาการโรคกระเพาะอาหารอักเสบ ที่เข้าตรวจด้วยการส่องกล้องที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ระหว่างเดือน มกราคม - ธันวาคม 2536 จำนวน 84 ราย พบเชื้อ *H.pylori* 60.7%

สาเหตุการก่อโรคที่สำคัญ คือ การที่เชื้อผลิตเอนไซม์ urease เป็นจำนวนมาก ซึ่งเอนไซม์ตัวนี้สามารถย่อย urea ที่มีอยู่ในน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร เกิดไบคาร์บอเนตและแอมโมเนีย เกิด hydrogen ion ทำให้ลดความเป็นกรดในน้ำย่อยลง ดังนั้นตัวเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ และเนื่องจากตัวเชื้อประกอบด้วย adhesin รอบตัว ทำให้สามารถเกาะติดกับ receptor บน epithelium cell ของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ทำให้เกิดการอักเสบขึ้น และในการที่เชื้อสามารถผลิตแอมโมเนียอาจไปทำลาย epithelium cell โดยทำให้เกิด vacuolation และอาจผลิตสารพิษ คือ vacuolating cytotoxin A(vacA) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ เข้าไปอยู่ใน epithelium cell โดยวิธี endocytosis เกิดการรวมตัวกันระหว่าง endosome – lysosome เป็น vacuoles สารพิษที่เกิดขึ้นมีหลากหลาย ซึ่งบางตัวจะรุนแรงและทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารหรืออาจไม่รุนแรงทำให้เกิดกระเพาะอาหารอักเสบแบบไม่มีอาการหรือไม่เกิดแผลในกระเพาะอาหาร อีกตัวหนึ่ง คือ สารพิษที่สัมพันธ์กับ gene cagA ยีนตัวนี้จะสร้างสาร interleukin–8 ใน epithelium cell ซึ่งสาร interleukin นี้จะเป็นตัวล่อ neutrophil เข้ามาใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

lamina propria แทรกอยู่ระหว่าง epithelium cell ซึ่งการเกิดแผลอาจเกิดจาก neutrophils ที่มีเป็นจำนวนมาก หลั่งสารที่มีคุณสมบัติย่อยเนื้อเยื่อ เช่น เอนไซม์ proteases ออกมา(6)

ผู้ติดเชื้อ *H.pylori* ส่วนใหญ่จะไม่มีอาการทางคลินิก ประมาณ 20% ในผู้ใหญ่ที่ติดเชื้อจะมีอาการรุนแรงทางคลินิก เช่น เกิดแผลในกระเพาะอาหาร(gastric ulcer) แผลในลำไส้ส่วนต้น(duodenal ulcer) และมะเร็งในกระเพาะอาหาร(gastric carcinoma)(7) การเกิดโรคดังกล่าวอาจมาจากหลายปัจจัย เช่น ผู้ติดเชื้อแต่ละคนมีการตอบสนองต่อเชื้อแตกต่างกัน ปัจจัยเฉพาะของเชื้อที่มีความรุนแรงต่างกัน รวมทั้งสิ่งแวดล้อมและ/หรืออาจเกิดจากปัจจัยร่วม อย่างไรก็ตามเชื้อ *H.pylori* สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถ้าหากไม่ได้รับการรักษา(8)

ได้มีการค้นพบ cagA และ vacA ยีนของเชื้อ *H.pylori* ที่อาจมีส่วนสำคัญทำให้เกิดความรุนแรงของโรค ในประเทศตะวันตก เช่น อเมริกา อังกฤษ อิตาลี และเนเธอร์แลนด์ พบเชื้อ *H.pylori* ที่มียีน cagA อยู่ประมาณ 60-70% และพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคแผลในกระเพาะอาหาร(9,10,11 12) ในขณะที่มีรายงานประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลี พบว่า *H.pylori* มากกว่า 90% มี cagA ยีน และพบว่าอัตราชุกของ cagA ยีน จะใกล้เคียงกันในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลในกระเพาะอาหารและผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอักเสบ สำหรับประเทศไทยมีรายงานจาก Mahachai และคณะ(13) ศึกษาความชุกของ cagA และ vacA ยีนของเชื้อ *H.pylori* โดยวิธีทาง serology ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลในกระเพาะอาหาร แผลตรงลำไส้ส่วนต้น โรคกระเพาะอาหารชนิดไม่เป็นแผลและกลุ่มมะเร็งในกระเพาะอาหาร พบว่า cagA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มดังกล่าว ดังนั้นประเทศทางตะวันออกจึงไม่สามารถใช้ cagA ยีน เป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดโรคแผลในกระเพาะอาหาร(14,15,16) ส่วนเชื้อ *H.pylori* ที่มี vacA ยีน จะพบในผู้ป่วยที่พบเชื้อเกือบทุกคน แต่มีเพียง 50% ของสายพันธุ์นี้จะผลิต active cytotoxin ซึ่ง Atherton และคณะ(17,18) ได้ทำการศึกษาหาลำดับเบสของ vacA ยีนที่มีขนาด 3933 bp และพบว่าจะประกอบด้วย 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่ม signal sequence ซึ่งจะมีอยู่ 3 subtypes คือ s1a s1b และ s2 และกลุ่ม middle region alleles แบ่งเป็น 2 subtype คือ m1และ m2 ซึ่งสายพันธุ์ที่มี s1a จะผลิต cytotoxin ในปริมาณสูง ตามด้วย s1b และในส่วนของสายพันธุ์ที่มี s2 จะผลิต cytotoxin น้อยมากหรือไม่ผลิตเลย และผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลในกระเพาะอาหารจะพบยีน vacA s1 ในอัตราที่สูง

สายพันธุ์ *H.pylori* ที่มียีน vacA subtype ชนิด s และ m จะมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคต่างกันตามลักษณะภูมิภาคของโลกดังเช่นการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกาและจากประเทศเยอรมันก็ให้ผลเช่นเดียวกัน คือ ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลในกระเพาะอาหารจะพบยีน vacA ชนิด s1 มาก ส่วน vacA ชนิด s2 จะพบมากในผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบ(gastritis) นอกจากนี้ยังพบว่า vacA ชนิด s1/m1 และ vacA ชนิด s1/m2 ไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มที่เป็นแผลในกระเพาะอาหารและกลุ่มที่ไม่เป็นแผล ซึ่งแสดงว่า mid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

region จะไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร(19) ในประเทศเอสโทเนีย พบยีน vacA ชนิด s1a/m1 มากในกลุ่มโรคแผลในกระเพาะอาหาร แต่ไม่พบชนิด s1b และจะพบ cag A ยีน 98% ในเชื้อที่มียีน s1a/m1 และs1a/m2 (20) แต่การศึกษาในประเทศบราซิล พบยีน vacA ชนิด s1b/m1 มากในกลุ่มที่เป็นโรคแผลในกระเพาะอาหารและโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร และพบยีน cagA มีความสัมพันธ์กับโรคทั้งสองนี้ ส่วน s2/m2 จะพบว่ามีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารอักเสบ(21) Ito และคณะศึกษาตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารอักเสบอย่างรุนแรง โรคแผลในกระเพาะอาหาร โรคแผลในลำไส้ส่วนต้นและโรคมะเร็งในกระเพาะอาหารในชาวญี่ปุ่น พบว่าในทุกตัวอย่างที่ศึกษาจะมี cagA ยีน และพบ vacA ชนิด s1a/m1 ถึง 97% แต่ไม่พบชนิด s2 ซึ่งแสดงว่า *H.pylori* ที่มี cagA ยีน และมี vacA ชนิด s1a/m1 จะพบมากในประเทศญี่ปุ่นและไม่มีความสัมพันธ์กับโรคกระเพาะอาหารเป็นแผลและมะเร็งในกระเพาะอาหาร ซึ่งจะแตกต่างจากการศึกษาในประเทศตะวันตก(15)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า cagA ยีน และ vacA subtypes ชนิดต่างๆ กับความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค จะมีความแตกต่างกันตามภูมิประเทศ ซึ่งในประเทศไทยถึงแม้มีรายงานการศึกษาความชุกของ cagA ยีน ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร ชนิดต่างๆ แต่ไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างยีน cagA และ vacA subtypes กับความรุนแรงของโรคกระเพาะอาหาร ซึ่งการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *H.pylori* อาจมีความสำคัญในการทำนายการเกิดความรุนแรงของโรคและอาจทำให้มีความเข้าใจถึงการพัฒนาการของเชื้อและการกระจายของเชื้อในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีนที่จำเพาะต่อเชื้อ *H.pylori* และจากการศึกษาเบื้องต้นของคณะวิจัยคณะนี้ในการตรวจหายีน cagA และ vacA ชนิด s1 ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารจากผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารอักเสบและแผลในกระเพาะอาหารที่ตรวจพบเชื้อ *H.pylori* โดยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่รายงานโดย Rudi และคณะ(19) จำนวน 14 ตัวอย่าง พบ cagA ยีน 5 ตัวอย่าง และ vacA ชนิด s1 13 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *H.pylori* ที่กระจายอยู่ในประเทศไทยจะมีสายพันธุ์ cagA และ vacA ชนิด s1 ด้วย ดังนั้นคณะวิจัยคณะนี้จึงมีความประสงค์ที่จะศึกษาเพิ่มเติมโดยการหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR เพื่อตรวจยีน cagA และ vacA subtype คือ ชนิด s1a, s1b, s2, m1 และ m2 โดยจะออกแบบ primers ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อ *H.pylori* ที่ได้จากผู้ป่วยคนไทย ทั้งนี้จากการวิจัยของคณะวิจัยนี้ได้ทำการหาละดับเบสของ HpaA ยีนตรงตำแหน่งที่ 701 - 1056 (375 bp) พบว่า มี genetic variation ในตัวอย่างทางคลินิกที่ได้จากคนไทยเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ได้จาก GenBank และ Kawamata และคณะ(22) พบว่าการออกแบบ primer สำหรับ PCR โดยใช้ลำดับเบสของคนญี่ปุ่นจะทำให้ sensitivity และ specificity เพิ่มขึ้น และการศึกษาของ Ito และคณะก็พบว่าการใช้เทคนิค PCR โดยออกแบบ primers จากลำดับเบสที่ได้จากเชื้อ *H.pylori* จากประเทศตะวันตกจะไม่ได้ผลดีในการนำมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตรวจหาเชื้อ *H.pylori* จากสายพันธุ์ที่ได้จากประเทศแถบเอเชีย(15) การศึกษายีนดังกล่าว อาจสามารถบอกความรุนแรงของโรคกระเพาะอาหารในผู้ป่วย ซึ่งจะเป็นแนวทางในการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

คณะวิจัยจะมุ่งเน้นในการนำเอาเทคนิค PCR เพื่อตรวจหายีน cagA และยีน vacA subtype ชนิด s1a, s1b, s2, m1 และ m2 ของเชื้อ *H.pylori* โดยจะทำการออกแบบ primers ให้จำเพาะต่อลำดับเบสของเชื้อจากคนไทย และหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR เพื่อจะให้ได้ sensitivity ที่สามารถตรวจหาเชื้อได้ต่ำสุด และ specificity ที่ดีที่สุด นำเอาเทคนิค PCR ที่ได้หา สภาวะที่เหมาะสมแล้วมาตรวจหายีน cagA และ vacA subtype ชนิดต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารในผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบที่ได้จากโครงการ " การตรวจเชื้อ *H.pylori* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารโดยวิธี Polymerase Chain Reaction" ซึ่งคณะวิจัยชุดนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี 2544 รหัสโครงการ 02011069 - 0003 (23) และหาวิธีการสกัดตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *H.pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารชนิดต่างๆ เช่น โรคกระเพาะอาหารชนิดเป็นแผลและไม่เป็นแผลและโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร จากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่แช่ในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ตรวจหายีน cagA และยีน vacA subtypes ชนิดต่างๆ ของเชื้อ *H.pylori* จะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างยีนดังกล่าวกับความรุนแรงของโรค อาจสามารถนำมาประกอบการวินิจฉัยโรคในระยะเริ่มแรก และอาจหาแนวทางในการรักษาที่ถูกต้องต่อไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.2.1 เพื่อพัฒนาเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อเชื้อ *H.pylori* ในคนไทยในการตรวจยีน cagA และยีน vacA subtype ชนิดต่างๆ ได้แก่ s1a, s1b, s2, m1 และ m2 เปรียบเทียบกับการใช้ primers จากรายงานของคณะวิจัยอื่นๆ

1.2.2 เพื่อตรวจหายีน cagA และยีน vacA subtype โดยวิธี PCR ที่พัฒนาได้จาก 1.2.1 ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารจากผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารอักเสบ โรคแผลในกระเพาะอาหาร และมะเร็งในกระเพาะอาหาร หาความสัมพันธ์ระหว่างยีนดังกล่าวกับผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารชนิดต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

## 1.3 ประโยชน์

### 1.3.1 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1.1 ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างยีน cagA และ vacA subtype ชนิดต่างๆ ของเชื้อ *H.pylori* ในผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารชนิดต่างๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยความรุนแรงของโรคได้และอาจหาแนวทางในการรักษาที่ถูกต้อง

1.3.1.2 การหาลำดับเบสของยีนเป้าหมายของเชื้อ *H.pylori* จากคนไทย จะเป็นองค์ความรู้ทางด้านสายพันธุ์ของเชื้อ ซึ่งอาจจะเป็นข้อมูลที่สามารถนำไปศึกษาความรุนแรงของโรคและการดื้อยาที่ใช้รักษาตลอดจนการพัฒนาวัคซีนที่จำเพาะต่อเชื้อ *H.pylori*

1.3.1.3 การสกัด DNA ของเชื้อ *H.pylori* จากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่แช่ ในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินและการพัฒนาวิธี PCR หายีน cagA และยีน vacA subtype ชนิดต่างๆ สามารถนำวิธีการที่ได้ไปศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *H.pylori* กับมะเร็งตับและ/หรือมะเร็งหลอดอาหาร

1.3.1.4 นำวิธีการที่ได้มาศึกษาทางด้าน molecular epidemiology ของเชื้อ *H.pylori* จากภาคต่างๆ ของประเทศไทย

### 1.3.2 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.3.2.1 หน่วยงานที่สามารถนำผลงานวิจัยไปใช้โดยตรงคือหน่วยงานระบบทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่และโรงพยาบาลที่มีอุปกรณ์ส่องกระเพาะอาหาร (endoscopy)

1.3.2.2 เป็นข้อมูลสำหรับแพทย์หน่วยระบบทางเดินอาหารในประเทศไทย

## 1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความสัมพันธ์ระหว่างยีน cagA และยีน vacA subtypes ชนิดต่างๆ ของเชื้อ *H.pylori* กับความรุนแรงของโรคกระเพาะอาหารได้มีการวิจัยในประเทศทางตะวันตก เช่น สหรัฐอเมริกา บราซิล เยอรมัน เอสโทเนีย และประเทศแถบประเทศทางเอเซีย เช่น ประเทศจีน ญี่ปุ่น และประเทศไทย พบว่าผลที่ได้แตกต่างกัน สรุปได้ดังนี้

Attherton และคณะ (18) ได้รายงานการศึกษาตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารจากผู้ป่วยชาวอเมริกันที่เป็นโรคกระเพาะอาหาร จำนวน 61 ตัวอย่าง พบเชื้อ *H.pylori* 42 ตัวอย่าง และพบว่าในผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลตรงลำไส้ส่วนต้นจะมี vacA ชนิด s1a อยู่ 89% ขณะที่พบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

vacA ชนิด s1b เพียง 29%($p<0.01$) ส่วนยีน vacA ชนิด s2 พบ 20% และ 16% เป็นกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ *H.pylori* ซึ่งสรุปได้ว่า เชื้อ *H.pylori* สายพันธุ์ vacA ชนิด s1a จะมีความสัมพันธ์กับการเกิดการอักเสบ(inflammation) และการเกิดแผลบริเวณลำไส้ส่วนต้น ส่วนสายพันธุ์ vacA ชนิด s2 จะสัมพันธ์กับการอักเสบของกระเพาะอาหารลดลงและพบการเกิดแผลลดลง

Rudi และคณะ(19) ได้ศึกษา cagA และ vacA ยีนในตัวอย่างเชื้อ *H.pylori* ที่เพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารจากผู้ป่วยโรคแผลในกระเพาะอาหาร โรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง และโรคมะเร็งในกระเพาะอาหารชาวเยอรมัน จำนวน 65 ราย โดยวิธี PCR พบยีน vacA ชนิด s1 อยู่ 83.1% และ vacA ชนิด s2 อยู่ 15.4% ส่วน vacA ในส่วน middle region ชนิด m1 พบ 36.9% และ m2 พบ 63.1% ตัวอย่างที่พบยีน 2 ชนิดร่วมกัน คือ s1/m1 พบ 35.4% และ s1/m2 พบ 47.7% ขณะที่ s2/m2 พบเพียง 15.4% ส่วนยีนร่วมกันชนิด s2/m1 จะไม่พบเลย ตัวอย่างเชื้อจากผู้ป่วยโรคแผลในกระเพาะอาหารจะพบยีนชนิด vacA s1 ทุกตัวอย่าง ในขณะที่ตัวอย่างเชื้อจากผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบ พบ 74.4% ($p=0.02$) ตัวอย่างที่พบยีน vacA ชนิด s1 ส่วนใหญ่จะพบยีน cagA ร่วมด้วย($p<0.0001$) และมีความสัมพันธ์กับ cytotoxin activity ($p=0.003$) ยีน cagA จะตรวจพบ 73.8% ของตัวอย่างทั้งหมด และพบ 84.2% ในตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลในกระเพาะอาหาร และพบเพียง 67.4% ในตัวอย่างกลุ่มที่เป็นโรคกระเพาะอักเสบ สรุปได้ว่า *H.pylori* สายพันธุ์ vacA ชนิด s1 และยีน cagA จะสัมพันธ์กับการเกิดโรคแผลในกระเพาะอาหาร

Ashour และคณะ(21) ได้ศึกษาการกระจายของ cagA และ vacA ชนิดต่างๆ ในตัวอย่างเชื้อ *H.pylori* ที่เพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารจากผู้ป่วยโรคแผลในกระเพาะอาหาร โรคกระเพาะอาหารอักเสบ และโรคมะเร็งกระเพาะอาหารในผู้ป่วยชาวบราซิล ซึ่งมีเชื้อสายมาจากยุโรป คนพื้นเมืองอเมริกันอินเดียนและคนอัฟริกา จำนวน 82 ราย โดยวิธี PCR พบ vacA ชนิด s1 83.1% ซึ่งพบมากในผู้ป่วยโรคแผลในกระเพาะอาหารและโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร และเมื่อตรวจ vacA subtype พบว่าเป็นชนิด s1b ทุกตัวอย่าง ส่วน vacA ชนิด s2 จะพบเพียง 16.9% ในส่วนของ vacA ชนิด m1 พบ 80.2% และพบมากในกลุ่มที่เป็นโรคแผลในกระเพาะอาหารและโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร ส่วน vacA ชนิด m2 พบมากในกลุ่มที่เป็นกระเพาะอาหารอักเสบ สรุปได้ว่าในชาวบราซิลจะพบยีน vacA ชนิด s1b/m1 ถึง 80.3% และพบมากในผู้ป่วยโรคแผลในกระเพาะอาหารและโรคมะเร็งในกระเพาะอาหารและมีความสัมพันธ์ร่วมกับยีน cagA ส่วน ยีน vacA ชนิด s2/m2 จะมีความสัมพันธ์กับโรคกระเพาะอาหารอักเสบ

Sillakivi และคณะ(20) ได้เปรียบเทียบความแตกต่างของยีน *H.pylori* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารจากผู้ป่วยโรคแผลในกระเพาะอาหารที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกันในประเทศเอสโทเนีย มีเชื้อชาติเอสโทเนีย และรัสเซีย จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยวิธี PCR พบสาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุ์ที่มี cagA ยีน82% และในตัวอย่างที่มียีน cagA จะพบยีน vacA ชนิด s1 อยู่สูงถึง 98% ซึ่งจะแบ่งเป็นชนิด s1a/m1 64% และ s1a/m2 24% แต่ vacA ชนิด s1b จะไม่พบเลย เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วย 2 ชนชาติ ในส่วนของยีน cagA จะไม่พบความแตกต่างกัน แต่ในส่วนของการกระจายของยีน vacA ชนิด s1a/m1, s1a/m2 และ s2/m2 จะมีความแตกต่างกันระหว่างชนชาติเอสโทเนียและรัสเซีย($p<0.05$) สรุปว่าในผู้ป่วยโรคแผลในกระเพาะอาหารพบ *H.pylori* สายพันธุ์ cagA และ vacA ชนิด s1a/m1 มากที่สุด

Pan และคณะ(14) ได้รายงานการศึกษายีน cagA ของเชื้อ *H.pylori* ที่แยกจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลในกระเพาะอาหารจำนวน 48 คน และโรคกระเพาะอักเสบเรื้อรัง จำนวน 35 คน โดยวิธี PCR ใช้ primer 2 ชุด คือ ชุดที่หนึ่งออกแบบตรงเป้าหมาย PCR ที่ลำดับเบสตำแหน่ง 1249 - 1270 (caga1) และ primer caga 2 ที่ตำแหน่ง 1797 - 1819 โดยจะให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 570 bp ชุดที่ 2 คือ caga 2 และ caga 5 ที่ตำแหน่งลำดับเบส 1495 - 1519 ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 324 bp โดย primer caga5 จะจำเพาะต่อลำดับเบสของ cagA ยีนสายพันธุ์จากคนจีน พบ cagA ยีน 98% ในตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคแผลในกระเพาะ และพบ 100% ในตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง และพบว่าในการทำ PCR เพื่อตรวจยีน cagA ของเชื้อ *H.pylori* ที่แยกมาจากผู้ป่วยชาวจีน โดยใช้ primer ชุดที่ 1 สามารถตรวจพบ 52% ในขณะที่ใช้ primer ชุดที่2 สามารถตรวจพบ 95% เมื่อใช้ primer ชุดที่ 1 ตรวจหา cagA ยีนของเชื้อ *H.pylori* ในตัวอย่างจากผู้ป่วยชาวดัชจะสามารถตรวจพบ 92% ในขณะที่นำมาตรวจในตัวอย่างจากผู้ป่วยชาวจีนจะพบเพียง 30% แต่เมื่อนำเอา primer ชุดที่ 2 มาตรวจในผู้ป่วยชาวดัช จะตรวจพบ 91% แสดงว่าลำดับเบสของ cagA จะต่างกันระหว่างชาวดัชและชาวจีนอย่างน้อยที่ตำแหน่งคู่กับ primer caga 1 การศึกษานี้สรุปได้ว่า cagA ยีน พบมากทั้งผู้ป่วยโรคแผลในกระเพาะอาหาร โรคกระเพาะอาหารอักเสบ และการทำ PCR โดยออกแบบ primer ที่จำเพาะ(specific) ต่อลำดับเบสของชาวจีนจะเพิ่ม sensitivity ในการตรวจ

Ito และคณะ(15) ได้รายงานถึง *H.pylori* สายพันธุ์ที่มียีน vacA และ cagA ในผู้ป่วยชาวญี่ปุ่น โดยตัวอย่างศึกษามาจากเชื้อที่ได้มาจากตัวอย่างกระเพาะอาหารจากผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบอย่างเรื้อรัง โรคกระเพาะเป็นแผล ลำไส้อ่อนส่วนต้นเป็นแผล และผู้ป่วยที่เป็นแผลทั้งในกระเพาะอาหารและลำไส้ส่วนต้น โรคมะเร็งกระเพาะอาหาร จำนวน 87 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างศึกษาทุกตัวอย่างพบยีน cagA และพบว่า 84 ใน 87 ตัวอย่าง(97%) มียีน vacA ชนิด s1a/m1 และไม่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ตรงส่วน mid region ที่มีขนาด 0.73 kb แสดงว่ายีนชนิด cagA และ vacA ชนิด s1a/m1 ของเชื้อ *H.pylori* จะเป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในประเทศญี่ปุ่น และไม่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคกระเพาะอาหาร

Mahachai และคณะ(13) ได้ศึกษาความชุกของ antibody ต่อ cagA และ vacA โดยวิธี immunoblot assay พบ antibody ต่อ cagA ในผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารไม่มีแผล 70.1%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โรคแผลตรงลำไส้ส่วนต้น 78.7% แผลในกระเพาะอาหาร 77.6% และมะเร็งในกระเพาะอาหาร 90% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติแล้ว พบว่าความชุกของ cagA ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารชนิดต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p > 0.05$)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# บทที่ 2
# วิธีวิจัย

## 2.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

### 2.2.1 วัสดุ อุปกรณ์

- ห้อง Pre reaction mixture ที่มีLaminar Flow Cabinets พร้อม UV Lamp สำหรับการเตรียม PCR reaction mixture
- เครื่อง Thermocycle Gene Amp® PCR System 9700 AB Applied Biosystems USA
- เครื่อง Peltier thermal cycler ( MJ Research, PTC-200) USA
- Microcentrifuge (MiniSpin®, Eppendorf)
- ชุด Electrophoresis(LKB)
- Photodocumentation System Model : DR-001 FDC version10 (VILBER LOURMAT)
- Dry heat block
- Analytical balance
- Spectrophotometer Shimadzu UV 2101 PC
- Freezer –20° C
- ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 2 µl 1-10,20 µl 5-50 และ 50-200 µl
- Microcentrifuge tube ขนาด 0.5 ml และ 1.5 ml
- Thin wall PCR tube ขนาด 0.2 ml (Micro Amp USA,PE Biosystems)
- ปิเปตทิปที่มีตัวกรอง ขนาดปริมาตร 10 µl 20 µl และ 100 µl
- ปิเปตทิปขนาด 100 µl และ 200 µl

### 2.2.2 สารเคมี

จากบริษัท QIAGEN, Germany

- QIAamp® DNA Mini Kit
- QIAquick PCR Purification Kit
- Taq DNA polymerase(5 unit/ µl)
- Oligonucleotide primer (QIAGEN Operon. GmbH.)

จากบริษัท AB Aplied Biosystem

- AmpliTaq Gold®

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- DNA sequencing Kit ( Big Dye® Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit

จากบริษัท USB Corporation, Cleveland USA

- 10X TBE buffer Ultrapure MB Grade
- TE buffer
- ExoSAP-IT®

จากบริษัท Lab Scan, Ireland

- Xylene
- Ethanol

จากบริษัท Sigma Chemical Co.,Ltd.USA

- Boric acid (B-7901)
- Trizma Base, Molecular Biology Grade(T-6066)
- Ethidium bromide (E-8751)
- Mineral oil
- KCl
- BSA
- Tween 20

จากบริษัท New England Biolabs USA

- 100 bp DNA ladder (N3231S)
- Deoxynucleotide triphosphate solution (N0446S)

จากบริษัท Invitrogen, Spain

- Ultra Pure™ Agarose

หน่วยบริการชีวภาพ (Bioservice unit) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพ ฯ

The Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRMIS) กรุงเทพฯ เชื้อ *H. pylori* จากผู้ป่วยคนไทยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบและติดเชื้อ *H. pylori* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Carl J Mason

จากบริษัท BST Scientific Pte Ltd, Singapore

- Genomic DNA isolated from *Helicobacter pylori* strain J99 (ATCC 700824)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

## 2.2 การออกแบบวิจัย

เป็นการพัฒนาวิธี PCR เพื่อตรวจหายีน cagA, vacA subtypes ชนิด s และ m โดยใช้ primer ที่มีรายงานจากคณะวิจัยอื่นและ primer ที่ออกแบบจากลำดับเบสที่ได้จากผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทยที่ติดเชื้อ *H. pylori* และตรวจพบยีนดังกล่าวข้างต้น

## 2.3 ตัวอย่างศึกษา

ตัวอย่างศึกษาได้มาจาก 3 แหล่ง ดังนี้

**2.3.1 ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *H. pylori* ที่สกัดจากผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารจากโครงการอื่นๆ**

เป็นตัวอย่าง DNA สกัดจากผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารทั้งชาย หญิง ประมาณ 40 ตัวอย่าง โดยมีข้อมูลการตรวจพบเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี PCR ที่ตำแหน่งส่วนของยีนที่ 860 bp จากโครงการ "การตรวจเชื้อ *H. pylori* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารโดยวิธี Polymerase Chain Reaction" ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2544 และโครงการ "การเปรียบเทียบ PCR primer ที่ต่างกันและการพัฒนาวิธี nested PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Helicobacter pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร" ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2546

**2.3.2 ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ฝังในพาราฟิน จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**

เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะที่ได้ตรวจพบเชื้อ *H. pylori* โดยวิธีทางพยาธิวิทยา และเป็นเนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟิน เก็บไว้ระหว่าง ปี พ.ศ. 2543 ถึง ปี พ.ศ. 2548 แบ่งตามความรุนแรงของโรคดังนี้

ก) โรคกระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis) จำนวน 54 ตัวอย่าง
ข) โรคแผลในกระเพาะอาหาร (peptic ulcer) จำนวน 8 ตัวอย่าง
ค) โรคแผลในลำไส้ส่วนต้น (duodenal ulcer) จำนวน 8 ตัวอย่าง
ง) โรคมะเร็งกระเพาะอาหาร จำนวน 24 ตัวอย่าง

**2.3.3 ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารจากผู้ป่วยที่ได้จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อ โดยวิธี CLO test**

เนื่องจากในระยะแรกมีปัญหาในการสกัด DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟิน จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *H. pylori* โดยตรวจหาเอ็นไซม์ urease โดยใช้ CLO test (Kimberly-Clark,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Ballard Medical Product, USA) หรือ Pronto Dry (Medical Instruments Corp, Solothurn Switzerland) ระหว่างเดือน มีนาคม 2547 จนถึงเดือน สิงหาคม 2548 จากหน่วยระบบทางเดินอาหาร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ภายใต้การดูแลของ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ แพทย์หญิงกรรณิการ์ พรพัฒน์กุล โดยแบ่งตัวอย่างตามความรุนแรงของโรค ดังนี้

ก) โรคกระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis) จำนวน 26 ตัวอย่าง

ข) โรคแผลในกระเพาะอาหาร (peptic ulcer) จำนวน 19 ตัวอย่าง

ค) โรคแผลในลำไส้ส่วนต้น (duodenal ulcer) จำนวน 39 ตัวอย่าง

## 2.4 การสกัด DNA เชื้อ *H. pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร

### 2.4.1 การสกัด DNA เชื้อ *H. pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ฝังในพาราฟิน

ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ฝังในพาราฟินที่ตรวจพบเชื้อ *H. pylori* โดยวิธีพยาธิวิทยา ขนาดความหนา 10 μm จำนวน 3-5 ชิ้น นำมาสกัด DNA ของเชื้อ *H. pylori* ตามวิธีการที่ได้มีการปรับปรุงจากหนังสือคู่มือ QIAamp® DNA MiniKit บริษัท QIAGEN ประเทศเยอรมัน (24) โดยมีขั้นตอนการดำเนินการดังนี้

ก) การละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ นำเนื้อเยื่อที่ตัดมาแช่ใน xylene 1 มิลลิลิตร ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, incubate ที่อุณหภูมิ 55°C นาน 15 นาที mix และนำไปปั่นโดยเครื่อง microcentrifuge ที่ 13,000 rpm 5 นาที ดูดสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 3 รอบ หลังจากดูดสารละลายทิ้งแล้ว เติม Xylene : Ethanol (1:1) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ปั่นที่ 13,000 rpm 5 นาที ดูดสารละลายทิ้ง เติม Ethanol 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ปั่นที่ 13,000 rpm 5 นาที ดูดสารละลายทิ้ง และทิ้งไว้ให้เนื้อเยื่อแห้งที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เวลาประมาณ 1-1.30 ชั่วโมง

ข) การสกัด DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อจากข้อ ก) โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ได้ละลายพาราฟินออกไปแล้ว นำมาสกัด DNA โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAmp DNA Minikit ตามวิธีการจากเอกสารใบแทรกจากบริษัท โดยมีรายละเอียดการสกัดตามภาคผนวก 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**2.4.2 การสกัด DNA เชื้อ *H. pylori* ของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ได้จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโดยวิธีตรวจหาเอนไซม์ urease**

เนื้อเยื่อที่มีอยู่ในเจล (CLO test) หรือบนกระดาษซับ (Pronto Dry) ถูกนำออกมาโดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อ นำไปใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างด้วยน้ำบริสุทธิ์ type I 1 มิลลิลิตร ดูดนำทิ้ง เปิดฝาทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ในตู้ Laminar Flow Cabinets เพื่อให้น้ำระเหยออกไป เนื่อเยื่อกระเพาะอาหารที่ได้นำมาสกัด DNA ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAmp DNA Minikit ตามรายละเอียด ข้อ 2.4.1 (ข)

## 2.5 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี PCR

ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากข้อ 2.4 นำมาวิเคราะห์หาเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี PCR ใช้ primer ที่จำเพาะต่อส่วนของยีนที่ตำแหน่ง 860 bp ตามวิธีที่มีการปรับปรุงของ Linpisarn S และคณะ (25)

## 2.6 การพัฒนาวิธี PCR เพื่อตรวจหายีน cagA และ vacA subtypres ชนิดต่างๆ ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ primer จากคณะวิจัยอื่นที่ได้รายงานไว้

### 2.6.1 Oligonucleotide primers

ลำดับเบสของ Oligonucleotide primers ที่จำเพาะต่อยีน cagA และ vacA subtypes s และ m และ iceA1, iceA2 ที่ได้จากคณะวิจัยอื่นและขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ดังรายละเอียดที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.1

การหาสภาวะเหมาะสมของวิธี PCR เพื่อเพิ่ม sensitivity และ ลด non-specific band โดยการทดลองหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และ การหา annealing temperature ที่เหมาะสม ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 2.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 2.1** **Oligonucleotide primers ที่จำเพาะต่อยีน cagA และ vacA subtypes s และ m จากคณะวิจัยอื่น**

| ยีนเป้าหมาย | ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp) | ชื่อ primer และลำดับเบส (5' ⟶ 3') | | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| cagA | 349 | cagA-F | GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G | 26 |
| | | cagA-R | CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A | |
| vacAs1[a] | 201 | vacA-F | GAA ATA CAA CAA ACA CAC CGC | 19 |
| s2[b] | 228 | vacA-R | GGC TTG TTT GAG CCC CCA G | |
| vacA s1[a] | 259 | vacAs1-F | ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC | 26 |
| s2[b] | 286 | vacAs1-R | CTG CTT GAA TGC GCC AAA C | |
| vacA s1a | 190 | vacAs1a-F | GTC AGC ATC ACA CCG CAA C | 17 |
| | | vacAs1a-R | CTG CTT GAA TGC GCC AAA C | |
| vacAs1b | 187 | vacAs1b-F | AGC GCC ATA CCG CAA GAG | 26 |
| | | vacAs1b-R | CTG CTT GAA TGC GCC AAA C | |
| vacAs1c | 213 | vacAs1c-F | CTY GCT TTA GTR GGG YTA<br>Y = C or T, R = A or G | 26 |
| | | vacAs1c-R | CTG CTT GAA TGC GCC AAA C | |
| vacAs2 | 199 | vacAs2-Fa | GCT AAC ACG CCA AAT GAT CC | 20 |
| | | vacAs2-R | CTG CTT GAA TGC GCC AAA C | |

หมายเหตุ: [a] ตำแหน่ง nucleotide ของยีน vacA ของเชื้อ *H. pylori* 60190 (GenBank accession no. U05676)

[b] ตำแหน่ง nucleotide ของยีน vacA ของเชื้อ *H. pylori* Tx30a (GenBank accession no. U29401)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 2.1 (ต่อ) Oligonucleotide primers ที่จำเพาะต่อยีน cagA และ vacA subtypes s และ m จากคณะวิจัยอื่น**

| ยีนเป้าหมาย | ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp) | ชื่อ primer และลำดับเบส | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|
| vacAm1 | 290 | vacAm1-F GGT CAA AAT GCG GTC ATG G<br>vacAm1-R CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC | 17 |
| vacAm2 | 352 | vacAm2-F GGA GCC CCA GGA AAC ATT G<br>vacAm2-R CAT AAC TAG CGC CTT GCA C | 17 |
| vacAm | vacAm1 567<br>vacAm2 642 | vacAm-F CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG<br>vacAm-R GCG TCA AAA TAA TTC CAA GG<br>vacAm-F CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG<br>vacAm-R GCG TCA AAA TAA TTC CAA GG | 26 |
| iceA1 | 247 | iceA1-F GTG TTT TTA ACC AAA GTA TC<br>iceA1-R CTA TAG CCA STY TCT TTG CA<br>S = C or G, Y = C or T | 26 |
| iceA2 | 229 | iceA2-F GTT GGG TAT ATC ACA ATT TAT<br>TTR CCC TAT TTT CTA GTA GGT<br>R = A or G | 26 |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.2 ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และ Annealing temperature ที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากคณะวิจัยอื่น

| ยีนเป้าหมาย | ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ (mM) | Annealing temperature ที่ทดลอง (°C) | จำนวน PCR Cycle ที่ทดลอง |
|---|---|---|---|
| cagA | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| vacAs1 | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| vacAs1 | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| vacAs1a | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| vacAs1b | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| vacAs1c | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| vacAs2 | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| vacAm2 | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| vacAm | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| iceA1 | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| iceA2 | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |

การขยาย DNA เป้าหมายทำในหลอด PCR ชนิด thin wall ขนาด 0.2 ml ที่มีฝาปิดสนิท ปริมาตรที่ใช้คือ 10 µl การตรวจยืนยันผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ตามเป้าหมายยีน cagA และ vacA โดยใช้ Genomic DNA ของเชื้อ *H. pylori* strain J99 (ATCC 700824) ที่พบยีน cagA และ vacAs1 m1 นอกจากนี้ยังนำผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้มาหาลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BSU) นำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จาก Genbank

**2.6.2 การศึกษา sensitivity ของวิธี PCR**

การขยาย DNA โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน cagA และ vacA subtypes ชนิดต่างๆ และ iceA โดยใช้เชื้อ *H. pylori* จากผู้ป่วยคนไทยที่ติดเชื้อ โดยคณะวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Carl Mason สถาบันวิจัยแพทย์ทหาร (AFRIMS) กรุงเทพฯ ได้นำมาสกัดเอา DNA ของเชื้อด้วยน้ำยาสำเร็จรูป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

QIAamp® DNA Minikit คำนวณหาความเข้มข้นของ DNA ของเชื้อ *H. pylori* ที่สกัดได้โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

DNA concentration (µg/ml) = OD x dilution factor x 50 µg/ml

An OD of 1 corresponds to approximately 50 µg/ml for double strand DNA

ปรับความเข้มข้นของ *H. pylori* DNA ให้เป็น 2.0 ng/µl นำมาเจือจางลง 10 เท่า เป็นแบบ serial dilution โดยมีความเข้มข้นของ DNA ระหว่าง 2.0 ng/µl - 0.02 *f*g/µl โดยใช้ TE buffer เป็นน้ำยาเจือจาง

การศึกษา sensitivity ของ PCR ที่ตำแหน่งยีน cagA, vacA subtypes ชนิดต่างๆ และ iceA โดยใช้ primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น ดังรายละเอียดตารางที่ 2.1 และใช้ DNA ของเชื้อ *H. pylori* ที่สกัดได้ดังกล่าวที่มีความเข้มข้นระหว่าง 2.0 ng/µl - 0.02 *f*g/µl เป็น template ในการทำ PCR โดยใช้ปริมาณ template DNA 1 µl ต่อ reaction

## 2.7 การหาลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ตามยีน cagA และ vacA subtypes ชนิด s และ m และ iceA

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ตามยีนเป้าหมายคือ ยีน cagA, vacA subtype ชนิด s และ m และ iceA จาก DNA ของเชื้อ *H. pylori* ที่สกัดจากผู้ป่วยโรคกระเพาะจากตัวอย่างในข้อ 2.3.1 จำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาหาลำดับเบสโดยการเตรียม pre-reaction โดยใช้ ExoSAP-IT เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้บริสุทธิ์ นำไปทำ cycle sequencing โดยใช้ DNA sequencing Kit (BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing kit) นำไปหาลำดับเบสโดยหน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ (BSU) กรุงเทพฯ ลำดับเบสที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จาก GenBank ตาม accession number ที่ระบุไว้ในรายงานวิจัย

## 2.8 การพัฒนาวิธี PCR เพื่อตรวจหายีน cagA และ vacA subtypes ชนิดต่างๆ ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อคนไทย

### 2.8.1 การออกแบบ primer

ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ตำแหน่งยีน cagA, vacA subtypes s และ m และ iceA ที่ได้จากข้อ 2.7 จำนวนตำแหน่งยีนละ 10 ตัวอย่าง นำมาเรียงกัน ซึ่งจะเห็นลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่างชัดเจนและสามารถออกแบบ primer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในส่วนของยีนที่เหมือนกันโดยใช้ software "primer detective" และใช้ function "user specified primer set"

**ตารางที่ 2.3** **Oligonucletide primers ที่จำเพาะต่อยีน cagA และ vacA subtype s และ m ของเชื้อ *H. pylori* จากการออกแบบที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย**

| ยีนเป้าหมาย | ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp) | ชื่อ primer และลำดับเบส |
|---|---|---|
| cagA | 256 | cagAnew-F TCA GAC TTT ATC AAT AAG AGC<br>cagA-R CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A |
| vacAs1 (201 bp) | 135 | vacAnew-F GTC AGC ATC ACA CCR CAA CA<br>R = A or G<br>vacA-R GGC TTG TTT GAG CCC CCA G |
| vacAs1 (259 bp) | 240 | s1new-F CCG CAA AAT CAA TCG CCC T<br>vacAs1-R CTG CTT GAA TGC GCC AAA C |
| vacAs1a | 181 | S1a new-F ACA CCG CAA CAA AGT CAT GC<br>vacAs1a-R CTG CTT GAA TGC GCC AAA C |
| vacAm2 | 177 | M2 new-F ATG CAG GCC ATC AAG CAA GC<br>vacAm2-R CAT AAC TAG CGC CTT GCA C |
| iceA1 | 167 | iceA1 new-F AAC TCT GAA AAC ACT CAA ATA GA<br>iceA1-R CTA TAG CCA STY TCT TTG CA<br>S = C or G, Y = C or T |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**2.8.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR**

การหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR เพื่อเพิ่ม sensitivity และลด non specific band โดยการทดลองหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และหา annealing temperature ที่เหมาะสม ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 **ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และ Annealing temperature ที่เหมาะสมในการทำPCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่พบในคนไทย**

| ยีนเป้าหมาย | ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ (mM) | Annealing temperature ที่ทดลอง (°C) | จำนวน PCR Cycle ที่ทดลอง |
|---|---|---|---|
| cagA | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| vacAs1 (201 bp) | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| vacAs1 (259 bp) | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| vacAs1a | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| vacAm2 | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |
| iceA1 | 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 | 50-60 | 40 |

**2.8.3 การหา sensitivity ของวิธี PCR**

ดำเนินการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 2.6.2 โดยใช้ Genomic DNA ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ J99 (ATCC 700824) ซึ่งเป็นสายพันธุ์จากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเป็นสายพันธุ์ที่มียีน cagA และ vacAs1/m1และใช้ Genomic DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากสายพันธุ์คนไทย โดยเจือจางแบบ serial dilution และใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีน cagA และ vacA subtypes s และ m ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย

## 2.9 การตรวจหายีน cagA และ vacA subtypes s และ m

**2.9.1 ตรวจจากตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารจากโครงการอื่นๆ**

ตัวอย่าง DNA ที่ได้จากข้อ 2.3.1 ซึ่งตรวจพบเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี PCR ที่ตำแหน่งยีนของส่วนที่มีขนาด 860 bp นำมาตรวจหายีน cagA และ vacA โดยใช้ primer ที่ออกแบบโดยนักวิจัยอื่น และใช้วิธี PCR ที่มีสภาวะที่เหมาะสม จากการศึกษาในข้อที่ 2.6.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**2.9.2 ตรวจจากตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ฝังในพาราฟิน**

ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกของเชื้อ *H. pylori* โดยวิธีพยาธิวิทยา นำมาตรวจซ้ำด้วยวิธี PCR ที่ตำแหน่งยีนของส่วนที่มีขนาด 860 bp ตัวอย่าง DNA ที่ให้ผลบวกทั้ง 2 วิธี นำมาตรวจหายีน cagA และ vacA subtypes s และ m โดย

- ใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าวที่ออกแบบมาจากนักวิจัยอื่น โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของ PCR จากการศึกษาในข้อที่ 2.6.1 และ
- ใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าวที่ออกแบบโดยใช้ลำดับเบสที่ได้จากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่พบในคนไทย โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของ PCR จากการศึกษาในข้อที่ 2.8.2

**2.9.3 ตรวจจากตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะที่ได้จากการตรวจเชื้อด้วยวิธีตรวจเอนไซม์ urease**

ตัวอย่าง DNA ของเนื้อเยื่อกระเพาะที่ให้ผลบวกจากการตรวจเอ็นไซม์ urease โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป CLO test และ Pronto Dry นำมาตรวจซ้ำด้วยวิธี PCR ที่ตำแหน่งยีนของส่วนที่มีขนาด 860 bp ตัวอย่าง DNA ที่ให้ผลบวกทั้ง 2 วิธี นำมาตรวจหายีน cagA และ vacA subtypes s และ m โดย

- ใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าวที่ออกแบบมาจากนักวิจัยอื่น โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของ PCR จากการศึกษาในข้อที่ 2.6.1 และ
- ใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าวที่ออกแบบโดยใช้ลำดับเบสที่ได้จากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่พบในคนไทย โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของ PCR จากการศึกษาในข้อที่ 2.8.2

**2.10การวิเคราะห์ทางสถิติ**

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์แบ่งออกเป็น 2 กรณีคือ กรณีที่มีข้อมูล 2 กลุ่ม มีความสัมพันธ์กัน จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ McNema Chi-Square Test และในกรณีที่ข้อมูล 2 กลุ่ม เป็นอิสระกันจะทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ Fisher's exact Test

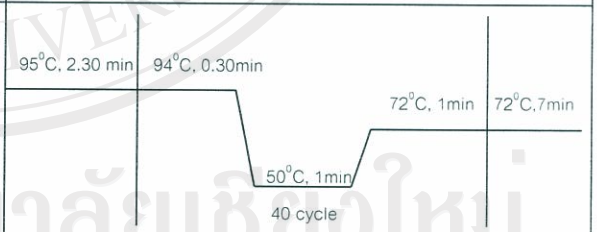
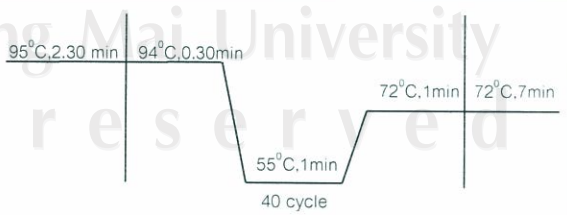
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# บทที่ 3
# ผลการวิจัย

## 3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR เพื่อตรวจหายีน cagA, vacA และ iceA โดยใช้ primer ที่ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่น

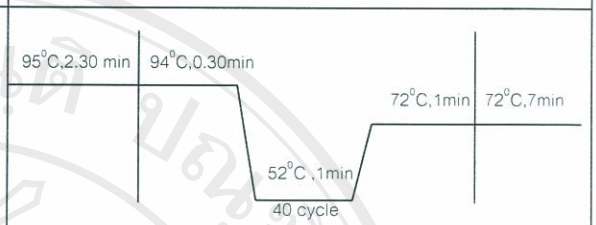
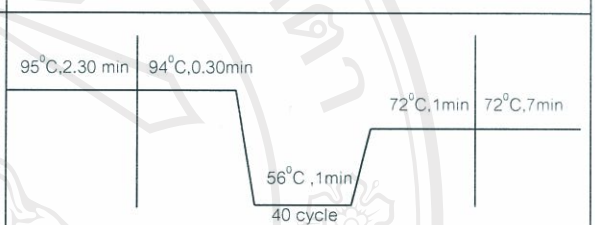
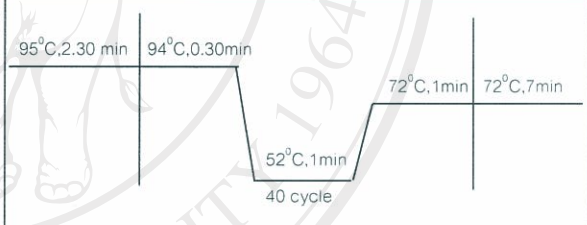
ผลของการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $MgCl_2$ และ annealing temperature ของการทำ PCR เพื่อให้ได้ sensitivity สูงที่สุดและมี non specific band น้อยที่สุด ของยีนเป้าหมายคือ cagA และ vacA subtypes s และ m ชนิดต่างๆ และ iceA ของเชื้อ *H. pylori* โดยสภาวะเหมาะสมได้แสดงในตารางที่ 3.1 และพบว่า primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA s1b, vacA s1c, vacA s2 และ iceA2 ที่ใช้ไม่พบ band ผลิตภัณฑ์ PCR ในตัวอย่าง DNA ที่ได้จากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์คนไทยที่เพาะเลี้ยง เนื่องจากไม่สามารถหา positive control ได้ จึงไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR ได้ จึงได้ใช้สภาวะการทำ PCR ตามรายงานจากคณะวิจัยอื่น (20)

**ตารางที่ 3.1 สภาวะที่เหมาะสมของ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA subtypes s และ m ชนิดต่างๆและยีน iceA**

| เป้าหมายของยีน | ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR | สภาวะที่เหมาะสมของ PCR mixture | สภาวะที่เหมาะสมของการทำ PCR |
|---|---|---|---|
| cagA | 349 bp | -1X Taq buffer<br>-200 μM/each dNTPs<br>-0.50μM/each cagA-F/cagA-R primer<br>-1.5mM $MgCl_2$<br>-0.25U Taq polymerase |  |
| vacAs1[a] s2[b] | 201 bp<br>228 bp | -1X Taq buffer<br>-200 μM/each dNTPs<br>-0.50μM/each vacA-F/vacA-R primer<br>-1.5mM $MgCl_2$<br>-0.25U Taq polymerase |  |

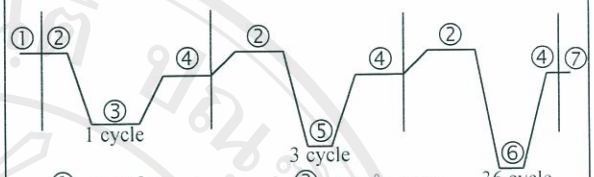
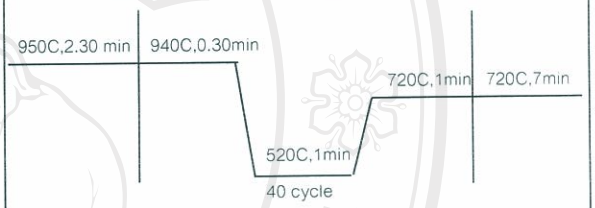
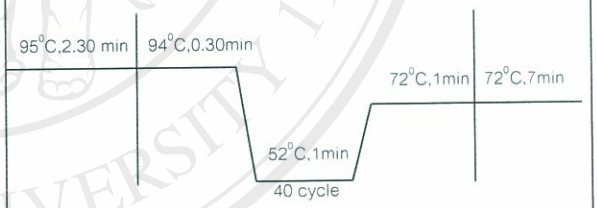
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.1 (ต่อ) สภาวะที่เหมาะสมของ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA subtypes s และ m ชนิดต่างๆและยีน iceA**

| เป้าหมายของยีน | ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR | สภาวะที่เหมาะสมของ PCR mixture | สภาวะที่เหมาะสมของการทำ PCR |
|---|---|---|---|
| vacA s1[a]<br>s2[b] | 259 bp<br>286 bp | -1X Taq buffer<br>-200 μM/each dNTPs<br>-0.25μM/each vacAs1-F/vacAs1-R primer<br>-2.0mM MgCl2<br>-0.25U Taq polymerase |  |
| vacA s1a | 190 bp | -1X Taq buffer<br>-200 μM/each dNTPs<br>-0.25μM/each vacAs1a-F/ vacAs1a-R primer<br>-1.5mM MgCl2<br>-0.25U Taq polymerase |  |
| vacAs1b | 187 bp | -1X Taq buffer<br>-200 μM/each dNTPs<br>-0.25μM/each vacAs1a-F/ vacAs1a-R primer<br>-1.5mM MgCl2<br>-0.25U Taq polymerase |  |
| vacAs1c | 213 bp | -1X Taq buffer<br>-200 μM/each dNTPs<br>-0.25μM/each vacAs1a-F/ vacAs1a-R primer<br>-1.5mM MgCl2<br>-0.25U Taq polymerase | |

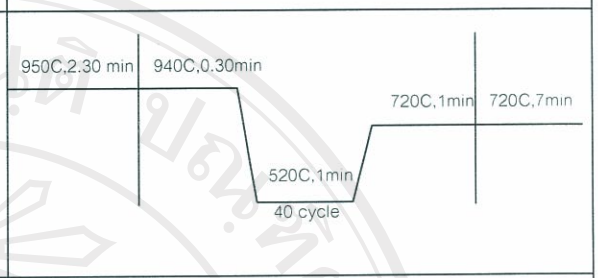
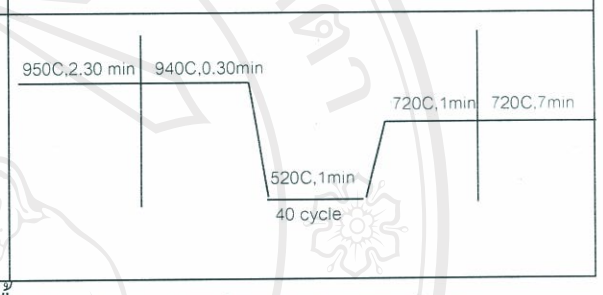
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.1 (ต่อ) สภาวะที่เหมาะสมของ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA subtypes s และ m ชนิดต่างๆและยีน iceA**

| เป้าหมายของยีน | ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR | สภาวะที่เหมาะสมของ PCR mixture | สภาวะที่เหมาะสมของการทำ PCR |
|---|---|---|---|
| vacAs2 | 199 bp | -1X Taq buffer<br>-200 µM/each dNTPs<br>-0.25µM/each vacAs1a-F/ vacAs1a-R primer<br>-1.5mM MgCl2<br>-0.25U Taq polymerase |  <br>① = 95°C,4 min<br>② = 95°C,1 min<br>③ = 56°C,1min 10 s<br>④ = 72°C,30 S<br>⑤ = 54°C,1min 10 s<br>⑥ = 52°C,1min 10 s<br>⑦ = 72°C,7 min |
| vacAm2 | 352 bp | -1X Taq buffer<br>-200 µM/each dNTPs<br>-0.25µM/each vacAs1a-F/ vacAs1a-R primer<br>-1.5mM MgCl2<br>-0.25U Taq polymerase |  |
| vacA m | vacA m1<br>567 bp | -1X Taq buffer<br>-200 µM/each dNTPs<br>-0.25µM/each vacAm-F/vacAm-R primer<br>-1.5mM MgCl2<br>-0.25U Taq polymerase |  |
| | vacA m2<br>642 bp | -1X Taq buffer<br>-200 µM/each dNTPs<br>-0.25µM/each vacAm-F/vacAm-R primer<br>-1.5mM MgCl2<br>-0.25U Taq polymerase | |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.1 (ต่อ) สภาวะที่เหมาะสมของ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA subtypes s และ m ชนิดต่างๆและยีน iceA**

| เป้าหมายของยีน | ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR | สภาวะที่เหมาะสมของ PCR mixture | สภาวะที่เหมาะสมของการทำ PCR |
|---|---|---|---|
| iceA1 | 247 bp | -1X Taq buffer<br>-200 µM/each dNTPs<br>-0.25µM/each iceA1-F/iceA1-R primer<br>-1.5mM MgCl2<br>-0.25U Taq polymerase |  |
| iceA2 | 229 or 334 | -1X Taq buffer<br>-200 µM/each dNTPs<br>-0.25µM/each iceA1-F/iceA1-R primer<br>-1.5mM MgCl2<br>-0.25U Taq polymerase |  |

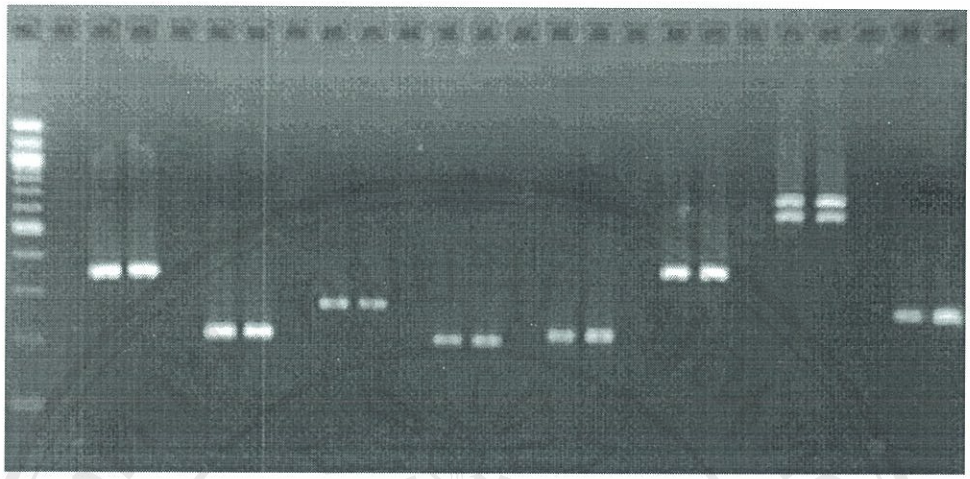
หมายเหตุ: [a] ตำแหน่ง nucleotide ของยีน vacA ของเชื้อ *H. pylori* 60190 (GenBank accession no. U05676)

[b] ตำแหน่ง nucleotide ของยีน vacA ของเชื้อ *H. pylori* Tx30a (GenBank accession no. U29401)

เมื่อนำเอา DNA ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากสายพันธุ์คนไทยมาทำ PCR ตามเป้าหมายของยีน cagA, vacA subtypes s และ m ชนิดต่างๆ และ iceA โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมตามตารางที่ 3.1 นำมาตรวจผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis ย้อมสีด้วย ethidium bromide ดู band ภายใต้แสง UV เปรียบเทียบกับ molecular size ของ DNA จะพบ band ที่มีขนาดตามที่ระบุไว้จากคณะวิจัยอื่น (รูปที่ 3.1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25



**รูปที่ 3.1** ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer จำเพาะต่อยีน cagA, vacA subtypes ชนิดต่างๆ และ iceA จากรายงานคณะวิจัยอื่นๆ ของเชื้อ *H. pylori* จากเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารคนไทย (Lanes 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24) และจากการสกัดเนื้อเยื่อกระเพาะโดยตรง (Lanes 4, 7,10, 13, 16, 19, 22 และ 25); Lane 1: 100 bp DNA Ladder; Lane 3, 4, ส่วนของยีน cagA (349 bp); Lane 6,7: ส่วนของยีน vacAs1 (201 bp); Lane 9, 10 ส่วนของยีน vacAs1 (259 bp); Lane 12, 13: ส่วนของยีน vacA s1a (190 bp); Lane 15,16: ส่วนของยีน vacA s2 (228 bp); Lane 18,19: ส่วนของยีน vacAm2 (352 bp); Lane 21,22: ส่วนของยีน vacAm1 (567 bp) และ vacAm2 (642 bp); Lane 24,25: ส่วนของยีน iceA1(247bp); Lane นอกจากนี้จะเป็น negative control ของแต่ละยีน

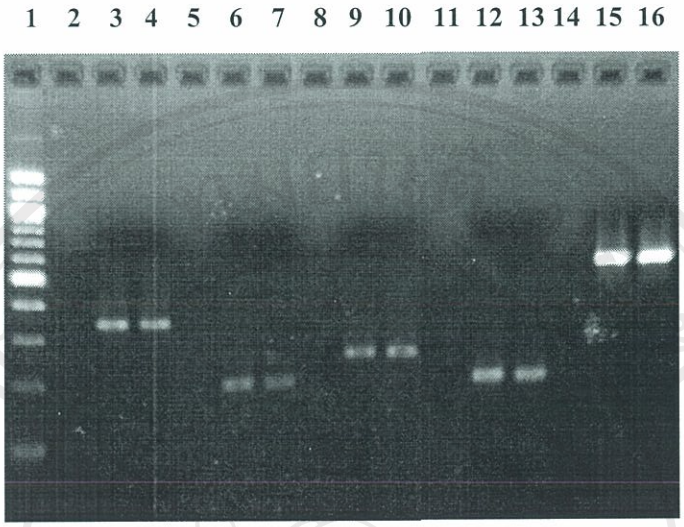
## 3.2 การยืนยันผลิตภัณฑ์ PCR

### 3.2.1 การยืนยันผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ Genomic DNA strain J99 (ATCC 700824)

ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *H. pylori* ที่สกัดจากผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารทั้งชาย หญิง จากข้อ 2.4.1 โดยนำมาตรวจเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี PCR ที่ตำแหน่งส่วนของยีนที่มีขนาด 860 bp ตัวอย่างที่พบ *H. pylori* ด้วยวิธี PCR นำมาตรวจหายีน cagA, vacA subtypesชนิด s และ m โดยใช้ Genomic DNA ของเชื้อ *H. pylori* strain J99 (ATCC 700824) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากผู้ป่วยชาวตะวันตกและมีรายงานพบยีน cagA และ vacA s1/m1 เป็น standard เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อที่ได้จาก DNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วยคนไทยที่พบยีนต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะพบ band ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ตำแหน่งเดียวกับเชื้อ *H. pylori* strain J99 (รูปที่ 3.2)




**รูปที่ 3.2** ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer จำเพาะต่อยีน cagA, vacA subtypes ชนิดต่างๆ และ iceA จากรายงานคณะวิจัยอื่นๆ ของเชื้อ *H. pylori* strain J99 (ATCC 700824) (Lanes 3, 6, 9, 12 และ 15) และจากการสกัดเนื้อเยื่อกระเพาะโดยตรง (Lanes 4, 7, 10, 13 และ 16); Lane 1: 100 bp DNA Ladder; Lane 3, 4, ส่วนของยีน cagA (349 bp); Lane 6,7: ส่วนของยีน vacAs1 (201 bp); Lane 9, 10 ส่วนของยีน vacAs1 (259 bp); Lane 12, 13: ส่วนของยีน vacA s2 (228 bp); Lane 15,16: ส่วนของยีน vacAm1 (567 bp) นอกจากนี้จะเป็น negative control ของแต่ละยีน

### 3.2.2 การยืนยันผลิตภัณฑ์ PCR โดยการหาลำดับเบส

ได้นำตัวอย่างที่พบยีนดังกล่าว 10 ตัวอย่าง นำมาหาลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR เทียบกับลำดับเบสที่ได้จาก GenBank ดังตารางที่ 3.2 ซึ่งแสดงลำดับเบสของยีน cagA, ตารางที่ 3.3 แสดงลำดับเบสของยีน vacA ชนิด s และ m และยีน iceA1 แสดงในตารางที่ 3.4 ส่วนยีน iceA2 เนื่องจากไม่สามารถหา sequence ใน GenBank ได้จึงไม่ได้หาลำดับเบสของยีน iceA2 และลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากยีนดังกล่าว ในตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *H. pylori* ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะผู้ป่วยคนไทยที่เป็นโรคกระเพาะพบว่าร้อยละของจำนวนเบสที่เหมือนกันกับที่รายงานใน GenBank ในช่วงค่าเฉลี่ย 91.90-96.89% ดังแสดงในตารางที่ 3.5 ในส่วนของยีน vacAs2 ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ระบุไว้ตามรายงานของ Yamaoka และคณะ(26)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คือ 228 bp โดยในการทำ PCR ได้ใช้ primer ที่มีลำดับเบสเหมือนกับยีน vacAs1 (201 bp) เนื่องจากขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR จะไม่ต่างกันมากนักดังนั้น band ของผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อเปรียบเทียบกับ molecular size ของ DNA แล้ว ไม่สามารถเห็นความแตกต่างได้ เมื่อนำเอาผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้นำมาหาลำดับเบสและนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน vacAs2 ของเชื้อ *H. pylori* Tx30a (GenBank accession no. U29401) ตามรายงานของ Yamaoka และคณะ (26) จะพบการขาดหายและการเพิ่มขึ้น (deletion and insertion) ใน sequence ของผลิตภัณฑ์ PCR มาก (ตารางที่ 3.3 ง) เมื่อนำลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR มาเปรียบเทียบกับยีน vacA ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 60190 (GenBank accession no. U05676) ซึ่งจะจำเพาะต่อยีน vacAs1 จะพบว่าลำดับเบสจะใกล้เคียงกับที่ได้จาก GenBank และจะคล้ายกับลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR จากผู้ป่วยคนไทย (ตารางที่ 3.3 ก) ดังนั้นในการศึกษานี้ยีนที่ตรวจน่าจะเป็น vacAs1 ซึ่งมีขนาด 201 bp

ในส่วนของยีน vacAs1/s2 ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR คือ 259 และ 286 ตามลำดับ เช่นเดียวกับยีน vacAs1 และ vacAs2 band ของ PCR product ที่ได้เมื่อเทียบกับ DNA molecular size จะไม่สามารถเห็นความแตกต่างกันได้ แต่เมื่อนำมาเทียบกับ vacA ยีน จาก GenBank แล้วผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ควรจะเป็น vacAs1 (259bp) มากกว่า vacAs2 (ตารางที่ 3.3 ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.2** ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 349 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน cagA ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. L11714

| | 1239 | 1249 | 1259 | 1269 | 1279 | 1289 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| REF cagA 349 bp | **GATAACAGGC** | **AAGCTTTTGA** | **GG**GAATCTCG | CAATTAAGGG | AAGAATACTC | CAATAAAGCG |
| spec. no.#4 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#7 | ---------- | ---------- | --A------- | ---------- | --------G- | ---------- |
| spec. no.#14 | ---------- | ---------- | ---------- | ---C------ | --------G- | ---------- |
| spec. no.#28 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#38 | ---------- | ---------- | --A------- | ---C------ | --------G- | ---------- |
| spec. no.#51 | ---------- | ---------- | --A------- | ---C------ | --------G- | ---------- |
| spec. no.#54 | ---------- | ---------- | ---------- | -----G---- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#61 | ---------- | ---------- | --A------- | ---------- | --------G- | ---------- |
| spec. no.#63 | ---------- | ---------- | --A------- | ---C------ | --------G- | ---------- |
| spec. no.#66 | ---------- | ---------- | --A------- | ---------- | --------G- | ---------- |
| spec. no.#72 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |

| | 1299 | 1309 | 1319 | 1329 | 1339 | 1349 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| REF cagA 349 bp | ATCAAAAATC | CTACCAAAAA | GAATCAGTAT | TTT**TCAGACT** | **TTATCAATAA** | **GAGC**AATGAT |
| spec. no.#4 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#7 | ---------- | --G------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#14 | ---------- | --G------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#28 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#38 | ---------- | --G------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#51 | ---------- | --G------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#54 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#61 | ---------- | --G------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#63 | ---------- | --GT------ | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#66 | ---------- | --G------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#72 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -----G---- |

**Primer sequence** = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

Primer sequence = primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

```
                      1359        1369        1379        1389        1399        1409
REF cagA 349 bp   TTAATCAACA  AAGACAATCT  CATTG+TC+GTG  GAA+T+CTTCCA  CAAAGAGCTT  TCAGAAATTT
spec. no.#4       ----------  -----GC---  -----A-*+--A  ---+-+------  ----------  ----------
spec. no.#7       --G-------  ----------  -----A-*+--A  *--+-T-----G  T-G-T-----  -A--------
spec. no.#14      ----------  ----------  -----+*-T--A  --T+-+-----G  T-G-------  -A--------
spec. no.#28      ----------  ----------  -----A-*+--A  *--+-T-----G  T-G-T-----  -A--------
spec. no.#38      --G-------  ----------  -----+*-T--A  --T+-+-----G  T-G-T-----  -A--------
spec. no.#51      --G-------  ----------  -----+*-T--A  --T+-+-----G  T-G-T-----  -A--------
spec. no.#54      ----------  -----GC---  -----A-*+--A  ---+-+------  ----------  ----------
spec. no.#61      ----------  ----------  -----+*-T--A  --T+-+-----G  T---T-----  -A--------
spec. no.#63      --G-------  ----------  -G---+*-T--A  --T+-+-----G  T-G-------  -A--------
spec. no.#66      ----------  ----------  -----+*-+*--  T--A-T-----G  T-G-T-----  -A--------
spec. no.#72      ----------  -----GC---  -----A-*+--A  ---+-+------  ----------  ----------

                      1419        1429        1439        1449        1459        1469
REF cagA 349 bp   GGGGATCAGC  GTTACCGAAT  +TTTCACAAGT  TGGGTGTCCC  ATCAAAACGA  TCCGTCTAAA
spec. no.#4       ----------  ----------  +----------  ----------  ----------  ----------
spec. no.#7       ----------  ------A---  C---*--G---  --------T-  T------A--  ----------
spec. no.#14      ----------  ------A---  +---T--G---  ----------  T------A--  ----------
spec. no.#28      ----------  ----------  +----------  ----------  ----------  ----------
spec. no.#38      ----------  ------A---  +---T--G---  ----------  T------A--  ----------
spec. no.#51      ----------  ------A---  +---T--G---  ----------  T------A--  ----------
spec. no.#54      ----------  ----------  +----------  ----------  ----------  ----------
spec. no.#61      ----------  ------A---  C---*--G---  ----------  T------A--  ----------
spec. no.#63      ----------  ------A---  +---T--G---  ----------  T------A--  ----------
spec. no.#66      ----------  ------A---  +---T--G---  ----------  T------A--  ----------
spec. no.#72      ----------  ----------  +----------  ----------  ----------  ----------
```

| | | |
|---|---|---|
| Primer sequence | = | primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น |
| Primer sequence | = | primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | 1479 | 1489 | 1499 | 1509 | 1519 | 1529 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| REF cagA 349 bp | ATCAACACCC | GATGC+A++TCCG | AAATTTTATG | GAA++CA+TACCA | TACAACCCCC | TATCCCTGAT |
| spec. no.#4 | ---------- | ---*-G-++---- | ---------- | ---++A-+--T-- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#7 | ---------- | A-A*-G-++---- | ---------- | ---AA--+-*-*- | ---------- | ----T----- |
| spec. no.#14 | ---------- | --**-+-AA---- | ---------- | ---++A-+--T-- | ---------- | ----T----- |
| spec. no.#28 | ---------- | ---*-G-++---- | ---------- | ---++A-+--T-- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#38 | ---------- | A-A*-+-A+---- | ---------- | ---++A-+--T-- | ---------- | ----T----- |
| spec. no.#51 | ---------- | A-**-+-AA---- | ---------- | ---++A-+--T-- | ---------- | ----T----- |
| spec. no.#54 | ---------- | ---*-G-++---- | ---------- | ---++A-+--T-- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#61 | --------T- | A-A*-+-A+---- | -T-------- | ---++A-+--T-- | ---------- | ----T----- |
| spec. no.#63 | ---------- | A-**-+-AA---- | ---------- | ---++A-+--T-- | ---------- | ----T----- |
| spec. no.#66 | --------T- | A-A*-G-++---- | ---------- | ---++A-+--T-- | ---------- | ----T----- |
| spec. no.#72 | ---------- | ---*-G-++---- | ---------- | --*++--A--T-- | ---------- | ---------- |

| | 1539 | 1549 | 1559 | 1569 | 1577 |
|---|---|---|---|---|---|
| REF cagA 349 bp | GACAAAGAAA | AAGCAGAGTT | TTTGAAATCT | GCCAAACAAT | CTTTTGCAG |
| spec. no.#4 | --T------- | ----G----- | ---------- | ---------- | --------- |
| spec. no.#7 | --T------- | ----G----- | -----GG--- | ---------- | --------- |
| spec. no.#14 | --T------- | ----G----- | -----GG--- | ---------- | --------- |
| spec. no.#28 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | --------- |
| spec. no.#38 | --T------- | ----G----- | -----GG--- | ---------- | --------- |
| spec. no.#51 | --T------- | ----G----- | -----GG--- | ---------- | --------- |
| spec. no.#54 | --T------- | ---------- | ---------- | ---------- | --------- |
| spec. no.#61 | --T------- | ----G----- | -----GG--- | ---------- | --------- |
| spec. no.#63 | --T------- | ----G----- | -----GG--- | ---------- | --------- |
| spec. no.#66 | --T------- | ----G----- | -----GG--- | ---------- | --------- |
| spec. no.#72 | --T------- | ---------- | ---------- | ---------- | --------- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

Primer sequence = primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.3 (ก)** ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 201 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacAs1 ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. U05676

```
                      809        819        829        839        849        859
REF vacA 201 bp  GAAATACAAC AAACACAC+CG CAAAATCAAT CGCCCTC+TGG TTTCTCTTGC TTTAGTAGGA
spec. no.#4      ---------- --------+-- ---------- -------+-A- -------C-- ----------
spec. no.#24     ---------- --------A-- ---------- -------C--- -------CC- ----------
spec. no.#28     ---------- --------+-- ---------- -------+--- -------C-- ------G---
spec. no.#38     ---------- --------+-- ---------- -------+--- -------C-- ----------
spec. no.#51     ---------- --------+-- ---------- -------+--- -------C-- ------G--*
spec. no.#54     ---------- --------+-- ---------- ------T+-A- -------C-- ------G---
spec. no.#60     ---------- --------+-- ---------- -------+--- -------C-- ----------
spec. no.#63     ---------- --------+-- ---------- ------T+--- ---------- ----------
spec. no.#71     ---------- --------+-- ---------- -------+--- ---------- ----------
spec. no.#72     ---------- --------+-- ---------- -------+-A- -------C-- ----------

                      869        879        889        899        909        919
REF vacA 201 bp  GC+ATTGGTCA GCATCACACC GCAACAAAGT CATGCCGCCT TT+TTCACAAC CGTGATCATT
spec. no.#4      --+------- ---------- ---------- ---------- --+------- ----------
spec. no.#24     --+---A---- ---------- ---------- ---------- --+--T----- ----------
spec. no.#28     --+G------- ---------- ---------- -----T---- -C+------- ----------
spec. no.#38     --+G------- ---------- ---------- ---------- --+--T----- ----------
spec. no.#51     --T------- ---------- ---------- --------*- --C--T----- ----------
spec. no.#54     --+G------- ---------- ---------- ---------- --+------- ----------
spec. no.#60     --+---A---- ---------- ---------- ---------- --+------- ----------
spec. no.#63     --+G------- ---------- ---------- ---------- --+------- ----------
spec. no.#71     --+G------- ---------- ---------- ---------- --+------- ----------
spec. no.#72     --+---A---- ---------- A--------- ---------- --+------- ----------
```

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

Primer sequence = primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

```
                          929        939        949        959        969        979
REF vacA 201 bp   CCAGCCATTG TTGGGGGCAT CGCTACAGG+C ACCGCTGTAG GAACGGTCTC AGGGCTTCTT
spec. no.#4       ---------- -------T-- ---------A- ---------- ---------- ----------
spec. no.#24      ---------- -------T-- ---------A- ---------- ---------- ----------
spec. no.#28      ---------- -------T-- ---------+T G-T------- ---------- ----------
spec. no.#38      ---------- -------T-- ----------+- ---------- ---------- ----------
spec. no.#51      ---------- -G-----T-- ---------+T G-T------- ---------- ----------
spec. no.#54      ---------- -------T-- ---------+T G-T------- ---------- ----------
spec. no.#60      ---------- -------T-- ---------A- ---------- ---------- ----------
spec. no.#63      -----T---- -------G-- T---------+- G-T------- ---------- ----------
spec. no.#71      ---------- ----A--T-- ----T----+T G-T------- ---------- ---A------
spec. no.#72      ---------- -------T-- ---------A- ---------- ---------- ----------

                          989        999
REF vacA 201 bp   GGCTGGGGGC TCAAACAAGC C
201 bp
spec. no.#4       ---------- ---------- -
spec. no.#24      ---------- ---------- -
spec. no.#28      ---------- ---------- -
spec. no.#38      ---------- ---------- -
spec. no.#51      ---------- ---------- -
spec. no.#54      ---------- ---------- -
spec. no.#60      ---------- ---------- -
spec. no.#63      ---------- ---------- -
spec. no.#71      ---------- ---------- -
spec. no.#72      ---------- ---------- -
```

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

Primer sequence = primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.3 (ข)** ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 259 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA s1 ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. U05676

| | 806 | 816 | 826 | 836 | 846 | 856 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| REFvacAs1 | **ATGGAAATAC** | **AACAAACACA** | **CCGCAAAATC** | **AATCGCCCTC** | TGGTTTCTCT | TGCTTTAGTA |
| Spec #4 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -A-------- | C--------- |
| Spec #7 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | C--------G |
| Spec #24 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | C--------- |
| Spec #28 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | C--------G |
| Spec #38 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | C--------- |
| Spec #40 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | C--------- |
| Spec #54 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------T | -A-------- | C--------G |
| Spec #56 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | C--------G |
| Spec #60 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | C--------- |
| Spec #63 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------T | ---------- | ---------- |

| | 866 | 876 | 886 | 896 | 906 | 916 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| REFvacAs1 | GGAGC+ATTGG | TCAGCATCAC | ACCGCAACAA | AGTCATGCCG | CCTTTTTTAC | AACCGTGATC |
| Spec #4 | -----+----- | ---------- | ---------- | ---------- | -------C-- | ---------- |
| Spec #7 | --*--T----- | ---------- | ---A---A-- | ---------- | ----C----- | ---------- |
| Spec #24 | -----+---A- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| Spec #28 | -----+G---- | ---------- | ---------- | --------T- | ----C--C-- | ---------- |
| Spec #38 | -----+G---- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| Spec #40 | -----+G---- | ---------- | ---------- | ---------- | -------C-- | ---------- |
| Spec #54 | -----+G---- | ---------- | ---------- | ---------- | -------C-- | ---------T |
| Spec #56 | ---*-T----- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | G--------- |
| Spec #60 | -----+---A- | ---------- | ---------- | ---------- | -------C-- | ---------- |
| Spec #63 | -----+G---- | ---------- | ---------- | ---------- | -------C-- | ---------- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

Primer sequence = primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain

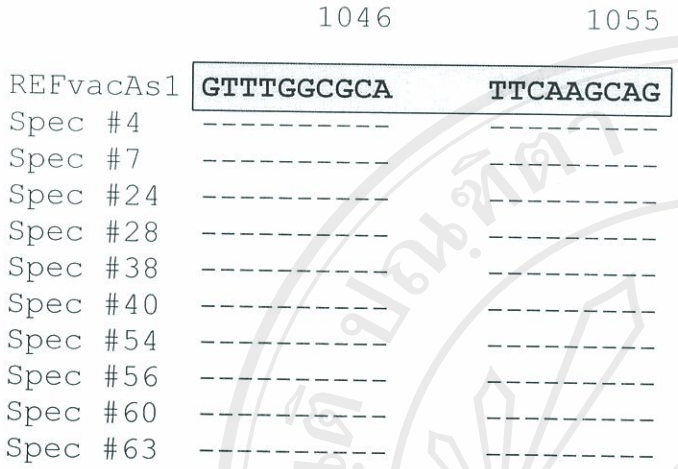
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

```
                926        936        946        956        966        976
REFvacAs1 ATTCCAGCCA TTGTTGGGGG CATCGCTACA GGCACCGCTG TAGGAACGGT CTCAGGGCTT
Spec #4   ---------- ---------- T--------- ---------- ---------- ----------
Spec #7   ---------- ---------- T--------- --TG-T---- ---------- ----------
Spec #24  ---------- ---------- T--------- ---------- ---------- ----------
Spec #28  ---------- ---------- T--------- --TG-T---- ---------- ----------
Spec #38  ---------- ---------- T--------- ---------- ---------- ----------
Spec #40  ---------- ---------- T--------- ---------- ---------- ----------
Spec #54  ---------- ---------- T--------- --TG-T---- ---------- ----------
Spec #56  ----------G---------- T--------- -----T---- ---------- ----------
Spec #60  ---------- ---------- T--------- ---------- ---------- ----------
Spec #63  ---------T- ---------- G--T------ ---G-T---- ---------- ----------

                986        996       1006       1016       1026       1036
REFvacAs1 CTTGGCTGGG GGCTCAAACA AGCCGAAGAA GCCAATAAAA CCCCAGATAA ACCCGATAAA
Spec #4   ---------- ---------- ---------- ---------- ----G----- ------A---
Spec #7   -----T---- ---------- ---------- --G------- ----G----- ----------
Spec #24  ---------- ---------- ---------- ---------- ----G----- ------A---
Spec #28  -----T---- ---------- ---------- --G------- -T--G----- ----------
Spec #38  ---------- ----T----- ---------- ---------- ----G----- ------A---
Spec #40  ---------- ---------- ---------- ---------- ----G----- ------A---
Spec #54  ---------- ---------- ---------- ---------- ----G----- ------A---
Spec #56  ---------- ---------- ---------- ---------- ----G----- ------A---
Spec #60  ---------- ---------- ---------- ---------- ----G----- ------A---
Spec #63  ---------- ---------- ---------- ---------- ----G----- ----------
```

| | | |
|---|---|---|
| Primer sequence | = | primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น |
| Primer sequence | = | primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

Primer sequence = primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.3 (ค)** ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 190 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA s1a ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. U05676

```
                    875        885        895        905        915        925
vacA s1a   GTCAGCATCA CACCGCAACA AAGTCATGCC GCCTTT+TTA CAACCGTGAT CATTCCAGCC
Spec #4    ---------- ---------- ---------- ------+--C- ---------- ----------
Spec #28   ---------- ---------- ---------T -----C+--C- ---------- ----------
Spec #38   ---------- ---------- ---------- ------+---- ---------- ----------
Spec #40   ---------- ---------- ---------- ------+--C- ---------- ----------
Spec #51   ---------- ---------- ---------- --*---C---- ---------- ----------
Spec #54   ---------- ---------- ---------- ------+--C- ---------- T---------
Spec #56   ---------- ---------- ---------- ------+---- -G-------- ----------
Spec #59   ---------- ---------- ---------- ------+--C- ---------- ----------
Spec #60   ---------- ---------- ---------- ------+--C- ---------- ----------
Spec #63   ---------- ---------- ---------- ------+--C- ---------- ---------T

                    935        945        955        965        975        985
vacA s1a   ATTGTTGGGG GCATCGCTAC AGGCACCGCT GTAGGAACGG TCTCAGGGCT TCTTGGCTGG
Spec #4    ---------- -T-------- ---------- ---------- ---------- ----------
Spec #28   ---------- -T-------- ---TG-T--- ---------- ---------- ------T---
Spec #38   ---------- -T-------- ---------- ---------- ---------- ----------
Spec #40   ---------- -T-------- ---------- ---------- ---------- ----------
Spec #51   ---------- -T-------- ---TG-T--- ---------- ---------- ----------
Spec #54   ---------- -T-------- ---TG-T--- ---------- ---------- ----------
Spec #56   ---------- -T-------- ------T--- ---------- ---------- ----------
Spec #59   ---------- -T-------- ---------- ---------- ---------- ----------
Spec #60   ---------- -T-------- ---------- ---------- ---------- ----------
Spec #63   ---------- -G--T----- ----G-T--- ---------- ---------- ----------
```

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

Primer sequence = primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
CHIANG MAI UNIVERSITY
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | 995 | 1005 | 1015 | 1025 | 1035 | 1045 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacA s1a | GGGCTCAAAC | AAGCCGAAGA | AGCCAATAAA | ACCCCAGATA | AACCCGATAA | AGTTTGGCGC |
| Spec #4 | ---------- | ---------- | ---------- | -----G---- | -------A-- | ---------- |
| Spec #28 | ---------- | ---------- | ---------- | --T--G---- | ---------- | ---------- |
| Spec #38 | -----T---- | ---------- | ---------- | -----G---- | -------A-- | ---------- |
| Spec #40 | ---------- | ---------- | ---------- | -----G---- | -------A-- | ---------- |
| Spec #51 | ---------- | ---------- | ---G------ | --T--G---- | ---------- | ---------- |
| Spec #54 | ---------- | ---------- | ---------- | -----G---- | -------A-- | ---------- |
| Spec #56 | ---------- | ---------- | ---------- | -----G---- | -------A-- | ---------- |
| Spec #59 | ---------- | ---------- | ---------- | -----G---- | -------A-- | ---------- |
| Spec #60 | ---------- | ---------- | ---------- | -----G---- | -------A-- | ---------- |
| Spec #63 | ---------- | ---------- | ---------- | -----G---- | ---------- | ---------- |

| | 1055 |
|---|---|
| vacA s1a | ATTCAAGCAG |
| Spec #4 | ---------- |
| Spec #28 | ---------- |
| Spec #38 | ---------- |
| Spec #40 | ---------- |
| Spec #51 | ---------- |
| Spec #54 | ---------- |
| Spec #56 | ---------- |
| Spec #59 | ---------- |
| Spec #60 | ---------- |
| Spec #63 | ---------- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

Primer sequence = primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.3 (ง)** ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 228 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA s2 ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. U29401

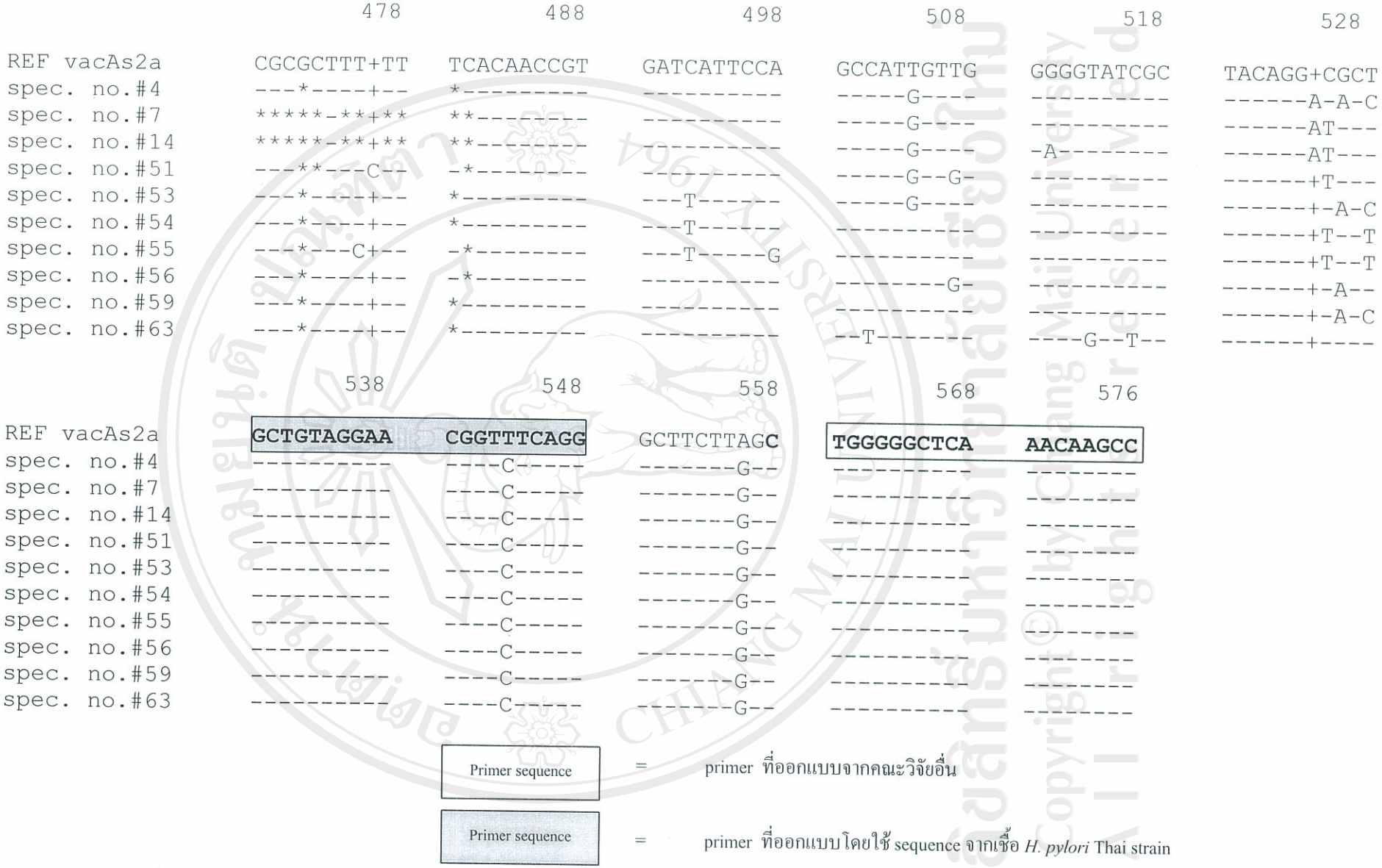
| | 358 | 368 | 378 | 388 | 398 | 408 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| REF vacAs2a | **GAAATACAAC** | **AAACACACCG** | **C**AAAATCAAT | CGCCCTATTA+ | TTTCTCTCGC | TTTAGTGGGG |
| spec. no.#4 | ---------- | ---------- | ----------- | ------C-*AG | ---------- | ------A--A |
| spec. no.#7 | ---------- | ---------- | ---------- | ------C-GG+ | ---------- | ---------- |
| spec. no.#14 | ---------- | ---------- | ---------- | ------C-GG+ | ---------- | ---------- |
| spec. no.#51 | ---------- | ---------- | ---------- | ------C-GG+ | ---------- | ---------- |
| spec. no.#53 | ---------- | ---------- | ---------- | ------C-GG+ | ---------- | ------A--A |
| spec. no.#54 | ---------- | ---------- | ---------- | ------*---G | ---------- | ---------A |
| spec. no.#55 | ---------- | ---------- | ---------- | ------*---G | ---------- | ---------- |
| spec. no.#56 | ---------- | ---------- | ---------- | ------C-GG+ | ---------- | ---------A |
| spec. no.#59 | ---------- | ---------- | ---------- | ------C-GG+ | ---------- | ---------A |
| spec. no.#63 | ---------- | ---------- | ---------- | ------*--GG | -------T-- | ---------A |

| | 418 | 428 | 438 | 448 | 458 | 468 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| REF vacAs2a | GTGTTAATGG | GCACCGAACT | GGGGGCTAAC | AC+GC++CAAATG | ATCCCATACA | CAG+CGAGAGT |
| spec. no.#4 | -CA--****-- | T--G-*-**- | *****-*-*- | --C--AA----*- | *--**--*** | **-+-****** |
| spec. no.#7 | C-A--****-- | T--G-*-**- | *****-*-*- | --+*-++*-C-** | -****-*-*- | *--T-*-T*-C |
| spec. no.#14 | C-A--****-- | T--G-*-**- | *****-*-*- | --+*-++*-C-** | -****-*-*- | *--T-*-T*-C |
| spec. no.#51 | *-*-*-T--- | T--G-*-**- | *****-*-*- | --C--++*---** | -****-*-** | **-T-*-T*-* |
| spec. no.#53 | -CA---G-** | *--G-*-**- | *****-*-*- | --C--AA----*- | *--**--*** | **-+-****** |
| spec. no.#54 | -C---***-- | T--G-*-**- | *****-*-*- | --C--AA----*- | *--**--*** | **-+-****** |
| spec. no.#55 | *-*-*-T--- | T--G-*-**- | *****-*-*- | --+*-++*-C-** | -****-*-*- | *--T-*-T*-C |
| spec. no.#56 | C-A--****-- | T--G-*-**- | *****-*-*- | --C--AA----*- | *--**--*** | **-+-****** |
| spec. no.#59 | -CA---G-** | *--G-*-**- | *****-*-*- | --C--AA----*- | *--**--*** | **-+-****** |
| spec. no.#63 | -C---***-- | T--G-*-**- | *****-*-*- | --C--AA----*- | *--**--*** | **-+-****** |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

Primer sequence = primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.3 (จ)** ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 352 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacA m2 ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. AY663831

| | 2227 | 2237 | 2247 | 2257 | 2267 | 2277 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacA m2 | GGAGCCCCAG | GAAACATTGC | CGGCAAAACA | GGGCTTATGT | TTAATAACCT | GACCCTAAAT |
| Spec #7 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | A--------- |
| Spec #16 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | A--------C |
| Spec #18 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | A--------- |
| Spec #19 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | A--------C |
| Spec #40 | ---------- | ---------- | ---A------ | ---------- | ---------- | A--------C |
| Spec #51 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | A--------C |
| Spec #53 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | A--------C |
| Spec #54 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | A--------C |
| Spec #61 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | A--------C |
| Spec #75 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ----C----- | A--------- |

| | 2287 | 2297 | 2307 | 2317 | 2327 | 2327 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacA m2 | AGCAACGCGA | GCATGGATTA | TGGTAAAGAT | TTAGACTTAA | CCATTCAAGG | GCATTTCACT |
| Spec #7 | --T--T---- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| Spec #16 | ---------- | ---------- | ---------- | --G--T---- | ---------- | ---------C |
| Spec #18 | --T--T---- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| Spec #19 | ---------- | ---------- | ---------- | --G--T---- | ---------- | ---------C |
| Spec #40 | --------A- | ---------- | ---------- | --G--T---- | ---------- | ---------C |
| Spec #51 | ---------- | ---------- | ---------- | --G--T---- | ---------- | ---------C |
| Spec #53 | --------A- | ---------- | ------G--- | --G--T---- | ---------- | ---------- |
| Spec #54 | --------A- | ---------- | ---------- | --G--T---- | ---------- | ---------C |
| Spec #61 | ---------- | ---------- | ---------- | --G--T---- | ---------- | ---------C |
| Spec #75 | --------A- | ---------- | ------G--- | ---------- | ---------- | ---------C |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

Primer sequence = primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

```
                2347       2357       2367       2377       2387       2397
vacA m2    AACAATCAAG GCACGATGAA TCTTTTTGTC CAAGATGGGC GTGTAGCAAC CTTGAATGCA
Spec #7    --------G- ---------- ---------- ---------- ---------- ---A------
Spec #16   --T------- ---------- ---------- ---------- ----G----- ---A------
Spec #18   --------G- ---------- ---------- ---------- ----G----- ----------
Spec #19   ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
Spec #40   --T------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
Spec #51   --T------- ---------- ---------- ---------- ----G----- ---A------
Spec #53   ---------- --TT------ ---------- ---------- ---------- ----------
Spec #54   ---------- ---------- ---------- ---------- ----G----- ----------
Spec #61   --T------A ---------- ---------- ---------- ----G----- ----------
Spec #75   ---------- --GT------ ---------- ---------- ---------- ---A------

                2407       2417       2427       2437       2447       2457
vacA m2    GGCCATCAAG CAAGCATGAT ATTTAATAAT TTAGTGGATA GCGCGACTGG GTTTTACAAA
Spec #7    ---------- ---------- ---------- ---------- -------C-- A---------
Spec #16   ---------- ---------- ---------- G--------- --A-A--C-- A---------
Spec #18   ---------- ---------- ---------- G--------- -------C-- ----------
Spec #19   ---------- ---------- ---------- ---------- -T-------- A---------
Spec #40   ---------- ---------- ---------- ---------- -T-------- A---------
Spec #51   ---------- ---------- ---------- G--------- --A-A--C-- A---------
Spec #53   ---------- ---------- ---------- G--------- -------C-- ----------
Spec #54   ---------- ---------- ---------- ---------- -------C-- ----------
Spec #61   ---------- ---------- ---------- ---------- -------C-- ----------
Spec #75   ---------- ---------- G--------- ---------- -------C-- ----------
```

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

Primer sequence = primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

```
                2467        2477        2487        2497        2507        2517
vacA m2    CCACTCATTA  AGATCAATAA  CGCTCAAAAC  CTCACTAAAA  ATAAAGAACA  TGTTTTAGTG
Spec #7    --G-------  ----------  ----------  ----------  ----------  ---G------
Spec #16   ----------  ----------  ----------  ----------  ----------  ----------
Spec #18   --G-------  --G-T-----  ----------  ----------  ----------  ----------
Spec #19   ----------  ----------  ----------  ----------  ----------  ----------
Spec #40   --G-------  --G-T-----  ----------  ----------  ----------  ----------
Spec #51   ----------  ----------  ----------  ----------  ----------  ----------
Spec #53   ----------  ----------  ----------  ----------  ----------  ----------
Spec #54   ----------  ----------  ---------T  ----------  ----------  ----------
Spec #61   --G-------  --G-T-----  ----------  ----------  ----------  ----------
Spec #75   --G-------  ----------  ----------  ----------  ----------  ---C------

                2527        2537        2547        2557        2567  2569
vacA m2    AAAGCGCGAA  ACATTGATTA  TAATTTAGTG  GGAGTGCAAG  GCGCTAGTTA  TG
Spec #7    -GG-------  ----------  ---------A  ----------  ----------  --
Spec #16   -G--------  ----------  ----------  ----------  ----------  --
Spec #18   -----A----  ----------  ----------  ----------  ----------  --
Spec #19   ----------  ----------  ---------A  ----------  ----------  --
Spec #40   ----------  ----------  ----------  ----------  ----------  --
Spec #51   -G--------  ----------  ----------  ----------  ----------  --
Spec #53   -G--------  ----------  ----------  ----------  ----------  --
Spec #54   -G--------  ----------  ---------A  ----------  ----------  --
Spec #61   ----------  ----------  ----------  ----------  ----------  --
Spec #75   -G--------  ----------  ----------  ----------  ----------  --
```

| | | |
|---|---|---|
| Primer sequence | = | primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น |
| Primer sequence | = | primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.3 (ฉ)** ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 567 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacAm m1 ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. U05676

| | 2083 | 2093 | 2103 | 2113 | 2123 | 2133 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m1 | **CAATCTGTCC** | **AATCAAGCGA** | **G**CGGGCGCAC | CCTTT+TAGTG | GAAAATCTAA | CC+GGGAATAT |
| No.Q4 | ---------- | ---------- | --------T- | T----+----- | ------T--C | --+-------- |
| No.Q5 | ---------- | ---------- | --------T- | T----+----- | ------T--- | --+-------- |
| No.Q9 | ---------- | ---------- | ---------- | -----+----- | ---------- | --C-------- |
| No.Q24 | ---------- | ---------- | --------T- | **---G----- | ---------- | --+-------- |
| No.Q38 | ---------- | ---------- | ---------- | -----+----- | ---------- | --T-------- |
| No.Q55 | ---------- | ---------- | ---------- | -----+----- | ------T--- | --+-------- |
| No.Q60 | ---------- | ---------- | --------C- | -----+----- | ---------- | --+-------- |
| No.Q63 | ---------- | ---------- | --------T- | T----+----- | ---------C | --+-------- |
| No.Q66 | ---------- | ---------- | --------T- | T----+----- | ------T--C | --+-------- |
| No.Q69 | ---------- | ---------- | --------T- | T----+----- | ---------- | --+-------- |

| | 2143 | 2153 | 2163 | 2173 | 2183 | 2193 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m1 | CACCGTTGAT | GGGCCTTTAA | +GAGTGAATAA | TCAAGTGGGT | GGCTATGCTT | TGGCAGGATC |
| No.Q4 | ---------G | ---G------ | T-*-------- | ---------C | --T------- | ---------- |
| No.Q5 | ---------- | ---G------ | T-*-------- | ---------C | --T------- | ---------- |
| No.Q9 | ---------- | ---------- | +-G-------- | ---------C | --T------- | -------C-- |
| No.Q24 | ---------G | ---------- | +-G-------- | ---------C | --T------- | ---------- |
| No.Q38 | ---------- | ---G------ | T-*-------- | ---------C | --T------- | ---------- |
| No.Q55 | ---------- | ---G------ | T-*-------- | ---------C | --T------- | ---------- |
| No.Q60 | ---------- | ---------- | T-*-------- | ---------- | --T------- | -------C-- |
| No.Q63 | ---------- | ---G------ | T-*-------- | ---------C | --T------- | ---------- |
| No.Q66 | ---------- | ---G------ | T-*-------- | ---------C | --T------- | ---------- |
| No.Q69 | -------A-- | ---G------ | T-*-------- | ---------C | --T------- | ---------- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | 2203 | 2213 | 2223 | 2233 | 2243 | 2253 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m1 | AAGCGCGAAT | TTTGAATTTA | AGGCTGGTGT | GGATACTAAA | AACGGCACAG | CCACTTTCAA |
| No.Q4 | ---------- | -----G---- | --------C | ------C--- | ---------- | T------T-- |
| No.Q5 | ---------- | -----G---- | ---------- | ------C--- | ---------A | T-G----T-- |
| No.Q9 | ---------- | -----G---- | --------C | ------C--- | ---------- | T------T-- |
| No.Q24 | ---------- | -----G---- | --------C | ------C--- | ---------- | T------T-- |
| No.Q38 | ------A--- | -----G---- | ---------- | ------C--- | ---------A | T-G----T-- |
| No.Q55 | ------A--- | -----G---- | -------C-- | ------C--- | ---------A | T-G----T-- |
| No.Q60 | ---------- | -----G---- | --------C | ------C--- | ---------- | T------T-- |
| No.Q63 | ---------- | -----G---- | ---------- | ------C--- | ---------A | T-G----T-- |
| No.Q66 | ------A--- | -----G---- | ---------- | ------C--- | ---------A | T-G----T-- |
| No.Q69 | ---------- | -----G---- | --------C | ------C--- | ---------A | T-G----T-- |

| | 2263 | 2273 | 2283 | 2293 | 2303 | 2313 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m1 | TAACGATATT | AGTCTGGGAA | GATTTGTGAA | TTTAAAGGTG | GAT+GCTCATA | CAGCT+AATTT |
| No.Q4 | ---------- | ---T------ | ---------- | ------A--- | ---+--C---- | -----+----- |
| No.Q5 | ----A----C | ---------- | ---------- | ------A-C- | *-GC------- | -G-*-C----- |
| No.Q9 | ---------- | ---T------ | ---------- | ------A--- | ---+--C---- | -----+----- |
| No.Q24 | ---------- | ---T------ | ---------- | ------A--- | ---+--C---- | -----+----- |
| No.Q38 | ----A----C | ---------- | ---------- | C-----A-C- | *-GC------- | -G-*-C----- |
| No.Q55 | ----A----C | ---------- | ---------- | ------A-C- | *-GC------- | -G-*-C----- |
| No.Q60 | ---------- | ---T------ | ---------- | -----A--- | ---+--C---- | -----C----- |
| No.Q63 | ----A----C | ---------- | ---------- | ------A-C- | *-GC------- | -G-*-C----- |
| No.Q66 | ----A--G-C | ---------- | ---------- | ------A-C- | *-GC------- | -G-*-C----- |
| No.Q69 | ---------- | ---T------ | ---------- | ------A--- | ---+--C---- | -----+----- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | 2323 | 2333 | 2343 | 2353 | 2363 | 2373 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m1 | TAAAGGTATT | GATACGGGTA | ATGGTGGTTT | CAACACCTTA | GATTTTAGTG | GTGTTACAAA |
| No.Q4 | ---------- | -----T---- | ---------- | ------A--- | ---------- | -C-------- |
| No.Q5 | -----A---- | -----T---- | ---------- | ---------- | --C------- | ---------- |
| No.Q9 | ---------- | -----T---- | ---------- | ---------- | ----C----- | -C------G- |
| No.Q24 | ---------- | -----T---- | ---------- | ---------- | ----C----- | -C-------- |
| No.Q38 | -----A---- | -----T---- | ---------- | ---------- | --C------- | ---------- |
| No.Q55 | -----AC--- | -----T---- | ---------- | ---------- | --C------- | ---------- |
| No.Q60 | ---------- | -----T---- | ---------- | ---------- | -----C---- | -C-------- |
| No.Q63 | -----A---- | -----T--C- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| No.Q66 | -----A---- | -----T---- | ---------- | ---------- | --C------- | ---------- |
| No.Q69 | ---------- | -----T---- | ---------- | ---------- | -----C---- | -C-------- |

| | 2383 | 2393 | 2403 | 2413 | 2423 | 2433 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m1 | CAAGGTCAAT | ATCAACAAGC | TCATTACGGC | TTCCACTAAT | GTGGCCGTTA | AAAACTTCAA |
| No.Q4 | ---------C | ---------- | -------A-- | ---------- | ------A--- | ---------- |
| No.Q5 | ---------- | ---------- | -------A-- | ---------- | ------A--- | ---------- |
| No.Q9 | ---------- | ---------- | -------A-- | ---------- | ---------- | ---------- |
| No.Q24 | ---A------ | ---------- | -------A-- | ---------- | ------A--- | ---------- |
| No.Q38 | ---------- | ---------- | -------A-- | ---------- | ------A--- | ---------- |
| No.Q55 | ---------- | ---------- | -------A-- | ---------- | ------A--- | ---------- |
| No.Q60 | ---A------ | ---------- | -------A-- | ---------- | ------A--- | ---------- |
| No.Q63 | ---------- | ---------- | -------A-- | ---------- | ------A--- | ---------- |
| No.Q66 | ---------- | ---------- | -------A-- | ---------- | ------A--- | ---------- |
| No.Q69 | ---A------ | ---------- | -------A-- | ---------- | ------A--- | ---------- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | 2443 | 2453 | 2463 | 2473 | 2483 | 2493 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m1 | CATTAATGAA | TTGATTG+TTA | AAACCAATGG | GGTGAGCGTG | GGGGAATACA | CTCATTTTAG |
| No.Q4 | ---------- | ---*---G--- | ---------- | -A-A--T--- | ---------- | --A------- |
| No.Q5 | ---------- | ---*---G--- | ---------- | -A-A--T--- | ---------- | --A------- |
| No.Q9 | ---------- | ---*---G--- | ---------- | -A-A--T--- | ---------- | ---------- |
| No.Q24 | ---------- | ---*G--G--- | ---------- | TA-A------ | ---------- | --T------- |
| No.Q38 | ---------- | ---*---G--- | ---------- | -A-A--T--- | ---------- | --A------- |
| No.Q55 | ---------- | ---*---G--- | ---------- | TA-A------ | ---------- | --A------- |
| No.Q60 | ---------- | ---*G--G--- | ---------- | TA-A------ | ---------- | ---------- |
| No.Q63 | ---------- | ---*---G--- | ---------- | -A-A--T--- | ---------- | --A------- |
| No.Q66 | ---------- | ---*---G--- | ---------- | -A-A--T--- | ---------- | --A------- |
| No.Q69 | ---------- | ---*G--G--- | ---------- | -A-A------ | ---------- | ---------- |

| | 2503 | 2513 | 2523 | 2533 | 2543 | 2553 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m1 | CGAAGATATA | GGCAGTCAAT | CGCGCATCAA | TACCGTGCGT | TTGGAAACTG | GCACTAGGTC |
| No.Q4 | ---------- | ----A----- | ---------- | C--------- | --A------- | ----C----- |
| No.Q5 | ---------- | ----A----- | ---------- | C--------- | --A--G---- | ---------- |
| No.Q9 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| No.Q24 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| No.Q38 | ---------- | ----A----- | ---------- | C--------- | --A------- | ---------- |
| No.Q55 | ---------- | ----A----- | ---------- | C--------- | --A--G---- | ---------- |
| No.Q60 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| No.Q63 | ---------- | ---------- | ---A------ | C--------- | --A------- | ----C----- |
| No.Q66 | ---------- | ----A----- | ---------- | C--------- | --A------- | ---------- |
| No.Q69 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | 2563 | 2573 | 2583 | 2593 | 2603 | 2613 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m1 | AATCTTTTCT | GGGGGTGTCA | AATTTAAAAG | CGGCGAAAAA | TTGGTTAT+AG | ATGAGTTTTA |
| No.Q4 | -----A---- | --------T- | ---------- | ---T------ | C-------C-* | ----T----- |
| No.Q5 | -----A---- | --------T- | ---------- | ---T------ | C-------C-* | ----T----- |
| No.Q9 | -----A---- | --C-----T- | ---------- | ---T------ | C-------C-* | ----T----- |
| No.Q24 | -----A---- | --C-----T- | ---------- | ---T------ | C-------C-* | ----T----- |
| No.Q38 | -----A---- | --C-----T- | ---------- | ---T------ | C-A-----C-* | ----T----- |
| No.Q55 | -----A---- | --------T- | ---------- | ---T------ | C-------C-* | ----T----- |
| No.Q60 | -----A---- | --C-----T- | ---------- | ---T------ | C-------C-* | ----T----- |
| No.Q63 | -----A---- | --------T- | ---------- | ---T------ | C-------C-* | ----T----- |
| No.Q66 | -----A---- | --------T- | ---------- | ---T------ | C-------C-* | ----T----- |
| No.Q69 | -----A---- | --C-----T- | ---------- | ---T------ | C-------C-* | ----T----- |

| | 2623 | 2633 | 2640 |
|---|---|---|---|
| vacAm m1 | CTATAG+C**CCT** | **TGGAATTATT** | **TTGACGC** |
| No.Q4 | ---C*-C---- | ---------- | ------- |
| No.Q5 | ---C*-C---- | ---------- | ------- |
| No.Q9 | ---C*-C---- | ---------- | ------- |
| No.Q24 | ---C*-C---- | ---------- | ------- |
| No.Q38 | ---C*-C---- | ---------- | ------- |
| No.Q55 | ---C*-C---- | ---------- | ------- |
| No.Q60 | ---C*-C---- | ---------- | ------- |
| No.Q63 | ---C*-C---- | ---------- | ------- |
| No.Q66 | ---C*-C---- | ---------- | ------- |
| No.Q69 | ---C*-C---- | ---------- | ------- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.3 (ช)** ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 642 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน vacAm m2 ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no. U29401

| | 1608 | 1618 | 1628 | 1638 | 1648 | 1658 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m2 | CAATCTGTCC | AATCAAGCGA | GCGGGCGCAC | CCTTTTAGTG | GAAAATCTAA | CCGGGAATAT |
| No.Q10 | ---------- | ---------- | --------T- | T--------- | ---------- | ---------- |
| No.Q19 | ---------- | ---------- | --------T- | T--------- | ------T--- | ---------- |
| No.Q51 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ------T--- | ---------- |
| No.Q54 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ------T--- | ---------- |
| No.Q61 | ---------- | ---------- | --------T- | T--------- | ------T--- | ---------- |
| No.K52 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ------T--- | ---------- |
| No.K95 | ---------- | ---------- | --------T- | T--------- | ---------- | ---------- |
| No.K133 | ---------- | ---------- | --------T- | T--------- | ------T--- | ---------- |
| No.K202 | ---------- | ---------- | --------T- | T--------- | ------T--- | ---------- |
| No.K258 | ---------- | ---------- | --------T- | T--------- | ------T--- | ---------- |

| | 1668 | 1678 | 1688 | 1698 | 1708 | 1718 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m2 | CACCGTTGAG | GGGACTTTAA | GGGTGAATAA | TCAAGTGGGC | GGTGCTGCTA | TAGCAGGTTC |
| No.Q10 | ---------T | ---G------ | T--------- | ---------- | ----AT---T | -G-----C-- |
| No.Q19 | ---------T | ---G------ | T--------- | AG---CA--- | ---------- | -G-----C-- |
| No.Q51 | ---------T | ---G------ | T--------- | ---------- | ----AT---T | -G-----C-- |
| No.Q54 | ---------T | ---G------ | T--------- | ---------- | ----AT---T | -G-----C-- |
| No.Q61 | ---------T | ---G------ | T--------- | ---------- | ----AT---T | -G-----A-- |
| No.K52 | ---------T | ---G------ | ---------- | ---------- | ---------G | -G-----A-- |
| No.K95 | ---------T | ---G------ | T--------- | ---------- | ----AT---T | -G-----A-- |
| No.K133 | ---------- | ---G------ | T--------- | ---------- | ----AT---T | -G-------- |
| No.K202 | ---------A | ---G------ | T--------- | ---------- | ----AT---T | -G-------- |
| No.K258 | ---------- | ---------- | -A-------- | ---------- | ---------G | -G-----A-- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

| | 1728 | 1738 | 1748 | 1758 | 1768 | 1778 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m2 | AAGCGCGAAT | TTTGAGTTTA | AGGCTGGTGA | GGATACCAAC | AACGCCACAG | CCACTTTCAA |
| No.Q10 | ---------- | ---------- | ---------T | ---------- | ----G----A | -------T-- |
| No.Q19 | ---------- | -----A---- | -------C-- | ---------- | ----G----- | -------T-- |
| No.Q51 | ---------- | ---------- | ----------C | ---------- | ----G----- | T------T-- |
| No.Q54 | ---------- | ---------- | ---------C | ---------- | ----G----- | T------T-- |
| No.Q61 | ---------- | ---------- | -------C-- | ---------A | ----G----- | -------T-- |
| No.K52 | C--------- | ---------- | ---------- | A--C------ | ---------- | ---------- |
| No.K95 | ---------- | ---------- | ----C----T | ---------A | ----G----- | -------T-- |
| No.K133 | G--------- | ---------- | ---------T | ---------A | ----G----- | -------T-- |
| No.K202 | G--------- | ---------- | ---------T | ---------A | ----G----- | -------T-- |
| No.K258 | ---------- | -----A---- | ---------- | A--------- | ---------- | ---------- |

| | 1788 | 1798 | 1808 | 1818 | 1828 | 1838 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m2 | TAACGATATT | CATCTGGGAA | AAGCGGTGAA | TTTAAGAGTG | GATGCCCATA | CGGCTAATTT |
| No.Q10 | ---------C | ---------- | ---------- | ---------- | -----T---- | -A---T---- |
| No.Q19 | C--------- | ---------- | ---------- | ---------- | -----T---- | -A---T---- |
| No.Q51 | ---------C | ---------- | ---------- | C--------- | -----T---- | -A---T---- |
| No.Q54 | ---------C | ---------- | ---------- | C--------- | -----T---- | -A---T---- |
| No.Q61 | ---------C | ---------- | ---------- | C--------- | -----T---- | -A---T---- |
| No.K52 | ---------C | ---------- | ---------- | C--------- | -----T---- | -A---T---- |
| No.K95 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -----T---- | -A---T---- |
| No.K133 | ---------C | ---------- | ---------- | ------C--- | -----T---- | -A---T---- |
| No.K202 | ---------C | ---------- | ---------- | ------C--- | -----T---- | -A---T---- |
| No.K258 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -----T---- | -A---T---- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | 1848 | 1858 | 1868 | 1878 | 1888 | 1898 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m2 | TAATGGCAAT | ATTTATCTGG | GAAAATCCAC | GAATTTAAGA | GTGAATGGCC | ATACCGCTCA |
| No.Q10 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---G------ |
| No.Q19 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---G------ |
| No.Q51 | ---------- | ------T--- | ---------- | ---------- | ---------- | ---G------ |
| No.Q54 | ---------- | ------T--- | ---------- | ---------- | ---------- | ---G------ |
| No.Q61 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---G------ |
| No.K52 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---G------ |
| No.K95 | ---------- | ---------- | ---------- | --------A- | ---------- | ---G------ |
| No.K133 | ---------- | ------T--- | ---------- | ---------- | ---------- | ---G------ |
| No.K202 | ---------- | ------T--- | ---------- | ---------- | ---------- | ---G------ |
| No.K258 | ---------- | ---------- | ------T--- | ---------- | ---------- | ---G------ |

| | 1908 | 1918 | 1928 | 1938 | 1948 | 1958 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m2 | TTTTAAAAAC | ATTGATGCTA | CAAAGAGCGA | TAACGGGCTA | AACACTAGCA | CCTTGGATTT |
| No.Q10 | ---------T | --------C- | ---------- | ---------- | --------TG | ---------- |
| No.Q19 | ---------T | --------C- | GT-------- | ---------- | ---------G | ---------- |
| No.Q51 | ---------T | --------C- | GT-------- | ---------- | ---------G | ---------- |
| No.Q54 | ---------T | --------C- | GT-------- | ---------- | ---------G | ---------- |
| No.Q61 | ---------T | --------C- | GT-------- | ---------- | --------T- | ---------- |
| No.K52 | ---------T | --------C- | GT-------- | ---------- | ---------G | ---------- |
| No.K95 | ---------T | --------C- | ---------- | ---------- | ---------G | ---------- |
| No.K133 | ---------T | --------C- | ---------- | ---------- | ---------G | ---------- |
| No.K202 | ---------T | --------C- | ---------- | ---------- | ---------G | ---------- |
| No.K258 | ---------T | --------C- | GT-------- | ---T------ | ---------- | ---------- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | 1968 | 1978 | 1988 | 1998 | 2008 | 2018 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m2 | CAGTGGCGTT | ACAGACAAAG | TCAATATCAA | CAAGCTCACT | ACGGCTGCCA | CTAATGTGAA |
| No.Q10 | T--C------ | ---------- | ---------- | ---------- | --AT------ | ---------- |
| No.Q19 | G--C------ | ---A------ | ---------- | ---------- | --AT------ | ---------- |
| No.Q51 | T--C------ | ---------- | ---------- | ---------- | --AT------ | ---------- |
| No.Q54 | T--C------ | ---------- | ---------- | ---------- | --AT------ | ---------- |
| No.Q61 | T--C------ | ---------- | ---------- | ---------- | --AT------ | ---------- |
| No.K52 | T--C------ | ---------- | ---------- | ---------- | --AT------ | ---------- |
| No.K95 | T--C------ | ---------- | ---------- | ---------- | --AT------ | ---------- |
| No.K133 | T--C------ | ---------- | ---------- | ---------- | --AT------ | ---------- |
| No.K202 | T--C------ | ---------- | ---------- | ---------- | --AT------ | ---------- |
| No.K258 | T--C------ | ---------- | ---------- | ----A----- | --AG------ | ---------- |

| | 2028 | 2038 | 2048 | 2058 | 2068 | 2078 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m2 | TATTAAAAAC | TTTGACATTA | AGGAATTGGT | GGTTACAACC | CGTGTTCAGA | GTTTTGGGCA |
| No.Q10 | C--------- | ---------- | -------A-- | ---------- | ---------- | ---------- |
| No.Q19 | C--------- | -----T---- | ---------- | ---------- | --A-----A- | ---------- |
| No.Q51 | C--------- | -----T---- | ---------- | T--------- | --A-----A- | ---------- |
| No.Q54 | C--------- | -----T---- | ---------- | T--------- | --A-----A- | ---------- |
| No.Q61 | C--------- | ---------- | ---------- | ---------- | --A-----A- | ---------- |
| No.K52 | C--------- | ---------- | -------A-- | ---------- | --A-----A- | ---------- |
| No.K95 | C--------- | ---------- | -------A-- | ---------- | ---------- | ---------- |
| No.K133 | C--------- | ---------- | -------A-- | ---------- | ---------- | ---------- |
| No.K202 | C--------- | ---------- | -------A-- | ---------- | ---------- | ---------- |
| No.K258 | C--------- | ---------- | ---------- | ---------- | --A-----A- | ---------- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | 2088 | 2098 | 2108 | 2118 | 2128 | 2138 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m2 | ATACACTATT | TTTGGCGAAA | ATATAGGCGA | TAAGTCTCGC | ATTGGTGTCG | +TGAGTTTGCA |
| No.Q10 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | --T------- |
| No.Q19 | ---------- | ---------- | ---------- | -G-------- | C--------- | AG-------- |
| No.Q51 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | +-T------- |
| No.Q54 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | +-T------- |
| No.Q61 | ---------- | ---------- | ---------- | ------G-A- | ---------- | +-------A-- |
| No.K52 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | +---------- |
| No.K95 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | +-T------- |
| No.K133 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | +-T------- |
| No.K202 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | +-T------- |
| No.K258 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -----C---- | +---------- |

| | 2148 | 2158 | 2168 | 2178 | 2188 | 2198 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m2 | AACGGGATAT | AGCCCGGCCT | ATTCTGGGGG | CGTTACTTTT | AAAGGCGGTA | AAAAACTGGT |
| No.Q10 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -----T---- | ---------- |
| No.Q19 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| No.Q51 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -----T---- |
| No.Q54 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -----T---- |
| No.Q61 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -G-------- |
| No.K52 | ---A------ | -----AC--- | ---------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| No.K95 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| No.K133 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| No.K202 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| No.K258 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -------C-- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | 2208 | 2218 | 2228 | 2238 | 2240 |
|---|---|---|---|---|---|
| vacAm m2 | TATAGATGAA | ATTTACCATG | CC**CCTTGGAA** | **TTATTTTGAC** | **GC** |
| No.Q10 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -- |
| No.Q19 | ---------G | C--------- | ---------- | ---------- | -- |
| No.Q54 | ---------G | C--------- | ---------- | ---------- | -- |
| No.Q54 | ---------G | C--------- | ---------- | ---------- | -- |
| No.Q61 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -- |
| No.K52 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -- |
| No.K95 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -- |
| No.K133 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -- |
| No.K202 | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | -- |
| No.K258 | ---------G | C--------- | ---------- | ---------- | -- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.4** ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 247 bp โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน iceA1 ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ของผู้ป่วยคนไทย เทียบกับลำดับเบสของ *H. pylori* จาก GenBank accession no.U43917

```
                    866        876        886        896        906        916
REF iceA1           GTGTTTTTAA CCAAAGTATC TGTCAAGACA TTAAAAACCA CTATAAGC+AA CAATGTTGCG
spec. no.#7         ---------- ---------- C--------- -------TT- -----*--C-- --------T-
spec. no.#14        ---------- ---------- C--------- ------TTT- -----*--C-- ----------
spec. no.#38        ---------- ---------- C--------- -------TT- -----*--C-- --------T-
spec. no.#40        ---------- ---------- C--------- -------TT- -----*--C-- ---------A
spec. no.#51        ---------- ---------- C--------- -------TT- -----*--C-- --------T-
spec. no.#54        ---------- ---------- C--------- --------T- ---C----+-- --------T-
spec. no.#56        ---------- ---------- C--------- -------TT- -----*--C-- --------T-
spec. no.#60        ---------- ---------- C-------T- -------TT- -----*--C-- ---------A
spec. no.#61        ---------- ---------- C--------- -------*** *-*--*--C-- -G--------
spec. no.#69        ---------- ---------- C--------- -------*** *-*--*--C-- -G--------

                      926        936        946        956        966        976
REF iceA1           CGATGTG+TGG TGTGCGTG++GC AACTCTGAAA ACACTCAAAT AGAAGTGGAT CATAAAGACG
spec. no.# 7        --**---+--* ****----++-- ---------- ---------- ----A-A--- ----------
spec. no.#14        -------+--- -----AC-++-- ---------- ---------- ------A--- ----------
spec. no.#38        --**---+--* ****----++-- ---------- ---------- ----A-A--- --------T-
spec. no.#40        ----G-+C--- --*-*---CA-- ---------- ---------- ---------- ----------
spec. no.#51        --**---+--* ****----++-- ---------- ---------- ----A-A--- ----------
spec. no.#54        -------+C-- --------++-- ---------- ---------- ---------- ----------
spec. no.#56        -------C--* --C-----++-- ---------- ---------- ----A-A--- ----------
spec. no.#60        -------+C-- --CA--C-++-- ---------- ---------- ---------- ----------
spec. no.#61        -A-----+C-- --CA--C-++-- ---------- ---------- ---------- ----------
spec. no.#69        -A-----+C-- --CA--C-++-- ---------- ---------- ---------- ----------
```

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

Primer sequence = primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | 986 | 996 | 1006 | 1016 | 1026 | 1036 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| REF iceA1 | GCCGCAAGGA | TGA+TTCAAGA | GTTTCTGATT | TAAACACACA | GACTTTTGAT | GATTTTCAGG |
| spec. no.#7 | -------A-- | ---+--TG--- | ---------- | ---------- | ---------- | -----C---- |
| spec. no.#14 | -T-------- | ---+--T---G | ---------- | ---------- | ---------- | -----C--A- |
| spec. no.#38 | ---A------ | ---+--T---- | ---------- | ---------- | ---------- | -----C--A- |
| spec. no.#40 | ---A---A-- | ---A--*---- | ---------- | ---------- | ---------- | -----C--A- |
| spec. no.#51 | ---------- | ---+--T---- | ---------- | ---------- | ---------- | -----C---- |
| spec. no.#54 | --AA---A-- | ---A--*---- | ---------- | ---------- | ---------- | -----C--A- |
| spec. no.#56 | ---------- | ---+--T---- | ---------- | ---------- | ---------- | -----C---- |
| spec. no.#60 | ---A---A-- | ---A--*---- | ---------- | ---------- | ---------- | -----C--A- |
| spec. no.#61 | ---------- | -A-+-C----- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |
| spec. no.#69 | ---------- | -A-+-C----- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- |

| | 1046 | 1056 | 1066 | 1076 | 1086 | 1096 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| REF iceA1 | CTTTATGCAA | AGCTTGTAAC | GATAAGAAAC | GCCAGATTTG | TAAAAAA**TGC** | **AAAGAAAGTG** |
| spec. no.#7 | -------T-- | ---------- | --C------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| spec. no.#14 | ---------- | ---------- | --C------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| spec. no.#38 | -------T-- | ---------T | --C------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| spec. no.#40 | -------T-- | ---------T | --C------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| spec. no.#51 | -------T-- | ---------T | --C------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| spec. no.#54 | ---------- | ---C------ | --C------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| spec. no.#56 | ---------- | ---------T | --C------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| spec. no.#60 | ---------- | ---------T | --C------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| spec. no.#61 | ---------- | ---------T | --C------- | ---------- | ---------- | -------C-- |
| spec. no.#69 | ---------- | ---------T | --C------- | ---------- | ---------- | -------C-- |

Primer sequence = primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

Primer sequence = primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

```
                    1103
REF iceA1           GCTATAG
spec. no.#7         -------
spec. no.#14        -------
spec. no.#38        -------
spec. no.#40        -------
spec. no.#51        -------
spec. no.#54        -------
spec. no.#56        -------
spec. no.#60        -------
spec. no.#61        -------
spec. no.#69        -------
```

| | | |
|---|---|---|
| Primer sequence | = | primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น |
| Primer sequence | = | primer ที่ออกแบบโดยใช้ sequence จากเชื้อ *H. pylori* Thai strain |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.5 จำนวนเบสที่เหมือนกับที่รายงานจาก GenBank ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer จำเพาะต่อยีน cagA, vacA subtypes s และ m และ iceA ที่ได้จากผู้ป่วยคนไทยที่ติดเชื้อ *H. pylori*

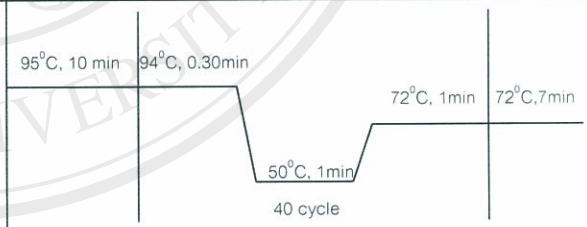
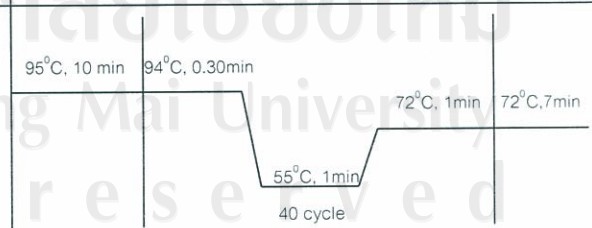
| | cag A (349 bp) | | ice A1 (247 bp) | | vacAs1 (201 bp) | | vacAs1 (259 bp) | | vacAs1a (190 bp) | | vacA m2 (352 bp) | | VacAm(m1) (567 bp) | | VacAm(m2) (642 bp) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | จำนวน | ร้อยละ | จำนวน | ร้อยละ | จำนวน | ร้อยละ | จำนวน | ร้อยละ | จำนวน | ร้อยละ | จำนวน | ร้อยละ | จำนวน | ร้อยละ | จำนวน | ร้อยละ |
| | 328 | 93.98 | 225 | 91.09 | 197 | 98.01 | 253 | 97.68 | 185 | 97.37 | 340 | 96.59 | 526 | 92.77 | 611 | 95.17 |
| | 305 | 87.39 | 230 | 93.12 | 193 | 96.02 | 245 | 94.59 | 181 | 95.26 | 338 | 96.02 | 518 | 91.36 | 600 | 93.46 |
| | 310 | 88.83 | 223 | 90.28 | 192 | 95.52 | 254 | 98.07 | 186 | 97.89 | 341 | 96.88 | 533 | 94.00 | 604 | 94.08 |
| | 333 | 95.42 | 225 | 91.09 | 197 | 98.01 | 245 | 94.59 | 186 | 97.89 | 344 | 97.73 | 527 | 92.95 | 604 | 94.08 |
| | 313 | 89.68 | 226 | 91.50 | 190 | 94.53 | 253 | 97.68 | 181 | 95.26 | 339 | 96.31 | 517 | 91.18 | 605 | 94.24 |
| | 312 | 89.40 | 232 | 93.93 | 192 | 95.52 | 253 | 97.68 | 182 | 95.79 | 338 | 96.02 | 517 | 91.18 | 610 | 95.02 |
| | 335 | 95.99 | 231 | 93.52 | 197 | 98.01 | 246 | 94.98 | 185 | 97.37 | 341 | 96.88 | 530 | 93.47 | 611 | 95.17 |
| | 319 | 91.40 | 227 | 91.90 | 194 | 96.52 | 249 | 96.14 | 186 | 97.89 | 341 | 96.88 | 518 | 91.36 | 610 | 95.02 |
| | 317 | 90.83 | 228 | 92.31 | 193 | 96.02 | 253 | 97.68 | 186 | 97.89 | 339 | 96.31 | 516 | 91.01 | 609 | 94.86 |
| | 319 | 91.40 | 228 | 92.31 | 195 | 97.01 | 250 | 96.53 | 183 | 96.32 | 339 | 96.31 | 529 | 93.30 | 611 | 95.17 |
| | 337 | 96.56 | | | | | | | | | | | | | | |
| จำนวนตัวอย่าง | 11 | 11 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| $\bar{x}$ | 320.73 | 91.90 | 227.50 | 92.11 | 194.00 | 96.52 | 250.10 | 96.56 | 184.10 | 96.89 | 340.00 | 96.59 | 523.10 | 92.26 | 607.50 | 94.63 |
| SD | 10.91 | 3.13 | 2.88 | 1.16 | 2.45 | 1.22 | 3.63 | 1.40 | 2.13 | 1.12 | 1.83 | 0.52 | 6.51 | 1.15 | 3.92 | 0.61 |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

## 3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR เพื่อตรวจหายีน cagA, vacA และ iceA โดยใช้ primer ที่ออกแบบโดยใช้ลำดับเบสของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์คนไทย

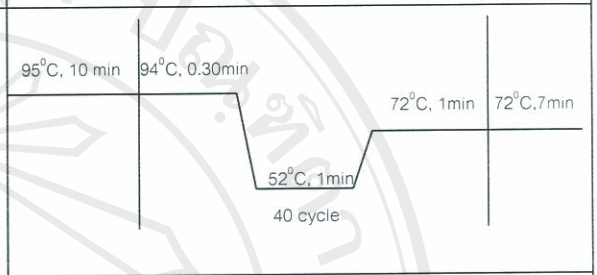
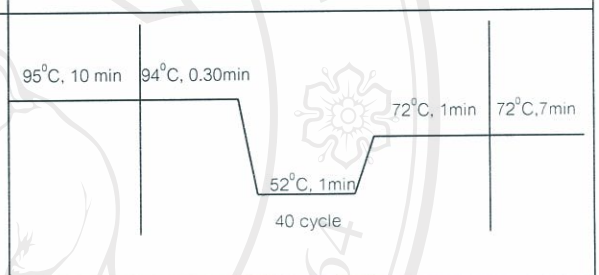
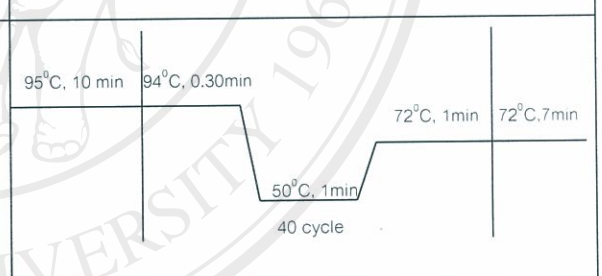
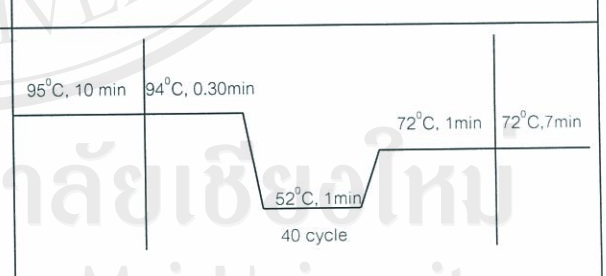
ผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $MgCl_2$ และ annealing temperature ของการทำ PCR เพื่อให้ได้ sensitivity สูงสุด และมี non-specific band น้อยที่สุดของยีนเป้าหมาย คือ cagA, vacA subtypes ชิด s และ m และ iceA ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ primer ที่ออกแบบจากลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์คนไทย โดยมีลำดับเบสของ primer ตามตารางที่ 2.3 และใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้มีการศึกษาแล้ว ตามรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 3.6 และรูปที่ 3.3 แสดงถึงผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยวิธี agarose gel eletrophoresis ย้อมสีด้วย ethidium bromide ดู band ภายใต้แสง UV เปรียบเทียบกับ molecular size ของ DNA จะพบ band ที่มีขนาดตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.6

**ตารางที่ 3.6 แสดงสภาวะที่เหมาะสมของ PCR มาตรฐานตามเป้าหมายของยีน cagA, vacAs1 (201 bp), vacAs1 (259 bp), vacAs1a, vacAm2 และ iceA1 ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย**

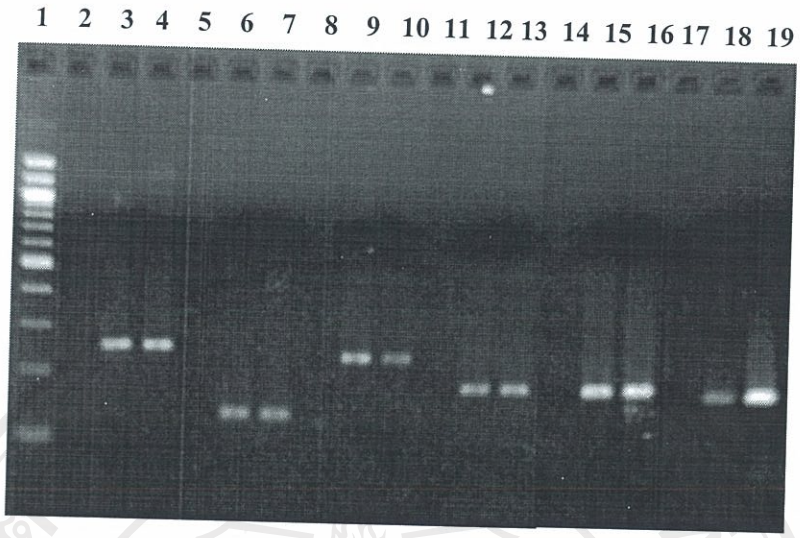
| เป้าหมายของยีน | ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR | สภาวะที่เหมาะสมของ PCR mixture | สภาวะที่เหมาะสมของการทำ PCR |
|---|---|---|---|
| cagA | 256 bp | -1X Taq buffer<br>-200 µM/each dNTPs<br>-0.25µM/each cagAnew-F/ cagA-R primer<br>-1.5mM $MgCl_2$<br>-0.25U Hot start Taq polymerase |  |
| vacAs1 (201 bp) | 135 bp | -1X Taq buffer<br>-200 µM/each dNTPs<br>-0.25µM/each vacAnew-F/ vacA-R primer<br>-1.5mM $MgCl_2$<br>-0.25U Hot start Taq polymerase |  |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 3.6 (ต่อ) แสดงสภาวะที่เหมาะสมของ PCR มาตรฐานตามเป้าหมายของยีน cagA, vacAs1 (201 bp), vacAs1 (259 bp), vacAs1a, vacAm2 และ iceA1 ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย**

| เป้าหมายของยีน | ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR | สภาวะที่เหมาะสมของ PCR mixture | สภาวะที่เหมาะสมของการทำ PCR |
|---|---|---|---|
| vacAs1 (259 bp) | 240 bp | -1X Taq buffer<br>-200 μM/each dNTPs<br>-0.25μM/each s1 new-F/ vacAs1-R primer<br>-1.5mM $MgCl_2$<br>-0.25U Hot start Taq polymerase |  |
| vacAs1a | 181 bp | -1X Taq buffer<br>-200 μM/each dNTPs<br>-0.25μM/each s1a new-F/ vacAs1a-R primer<br>-1.5mM $MgCl_2$<br>-0.25U Hot start Taq polymerase |  |
| vacAm2 | 177 bp | -1X Taq buffer<br>-200 μM/each dNTPs<br>-0.25μM/each m2 new-F/ vacA m2-R primer<br>-1.5mM $MgCl_2$<br>-0.25U Hot start Taq polymerase |  |
| iceA1 | 167 bp | -1X Taq buffer<br>-200 μM/each dNTPs<br>-0.25μM/each iceA1 new-F/ iceA1-R primer<br>-1.5mM $MgCl_2$<br>-0.25U Hot start Taq polymerase |  |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

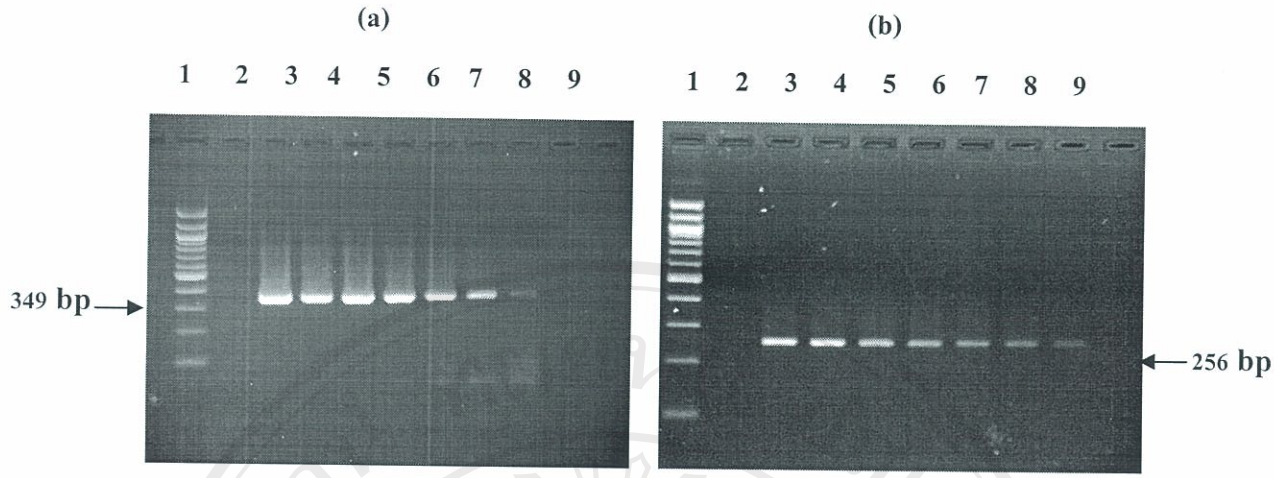



**รูปที่ 3.3** ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer ออกแบบที่จำเพาะต่อยีน cagA, vacA subtypes ชนิดต่างๆ และ iceA ของเชื้อ *H. pylori* ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย Lane: 3, 6, 9, 12, 15 และ 18 จากเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารคนไทย; Lanes 4, 7,10, 13, 16 และ 19 ได้จากการสกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารโดยตรง; Lane 1: 100 bp DNA Ladder; Lane 3, 4, ส่วนของยีน cagA (256 bp); Lane 6,7: ส่วนของยีน vacAs1 (135 bp); Lane 9, 10 ส่วนของยีน vacAs1 (240bp); Lane 12, 13: ส่วนของยีน vacA s1a (181 bp); Lane 15,16: ส่วนของยีน vacAm2 (177 bp); Lane 18,19: ส่วนของยีน iceA1 (167 bp); Lane นอกจากนี้จะเป็น negative control ของแต่ละยีน

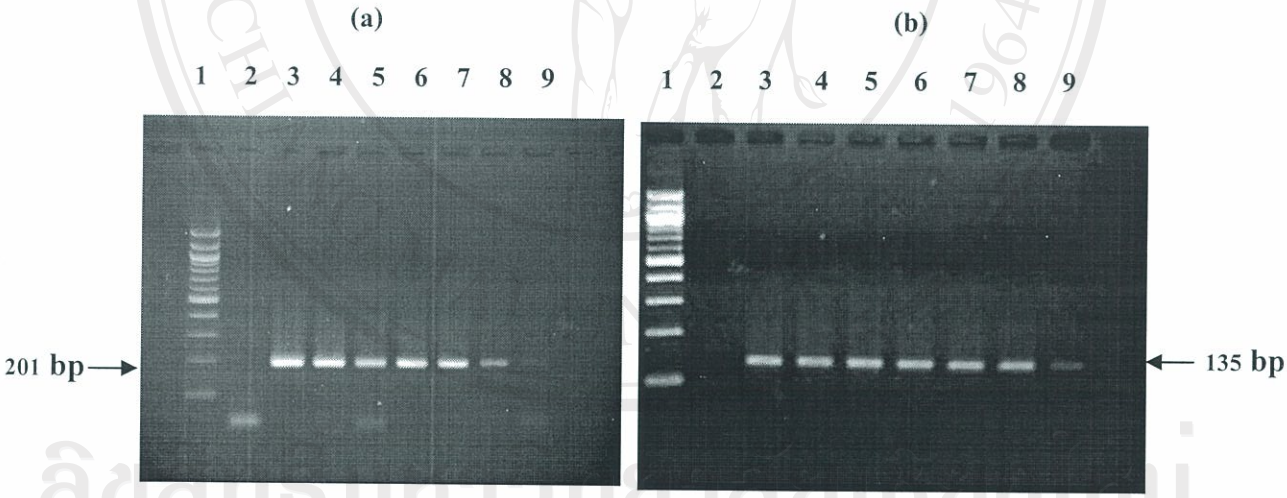
## 3.4 การเปรียบเทียบ sensitivity ของ PCR ที่ใช้ primer ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่นและออกแบบจากลำดับเบสที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย

ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน cagA, vacA subtypes s และ m ชนิดต่างๆ และ iceA1 ที่มีความเข้มข้นของ DNA ของเชื้อต่างๆกัน เมื่อย้อมสีด้วย ethidium bromide แล้วจะเห็น band ภายใต้แสง UV โดยเปรียบเทียบปริมาณเชื้อที่ตรวจได้ต่ำสุดเมื่อใช้ primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่นกับ primer ที่ออกแบบจำเพาะต่อยีนของเชื้อสายพันธุ์คนไทย ดังแสดงในรูปที่ 3.4, 3.5 (ก-จ) และรูปที่ 3.6 และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ที่ใช้ primer จากคณะวิจัยอื่นและ primer ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย ได้แสดงในตารางที่ 3.7 จะเห็นได้ว่าสภาวะ PCR ที่ใช้สามารถตรวจหายีนต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นของเชื้อ *H. pylori* ได้ต่ำมากคืออยู่ในช่วง 1-10 genome และพบว่า primer ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทยสามารถตรวจยีน vacAm2 และ iceA1 ได้ต่ำกว่า primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

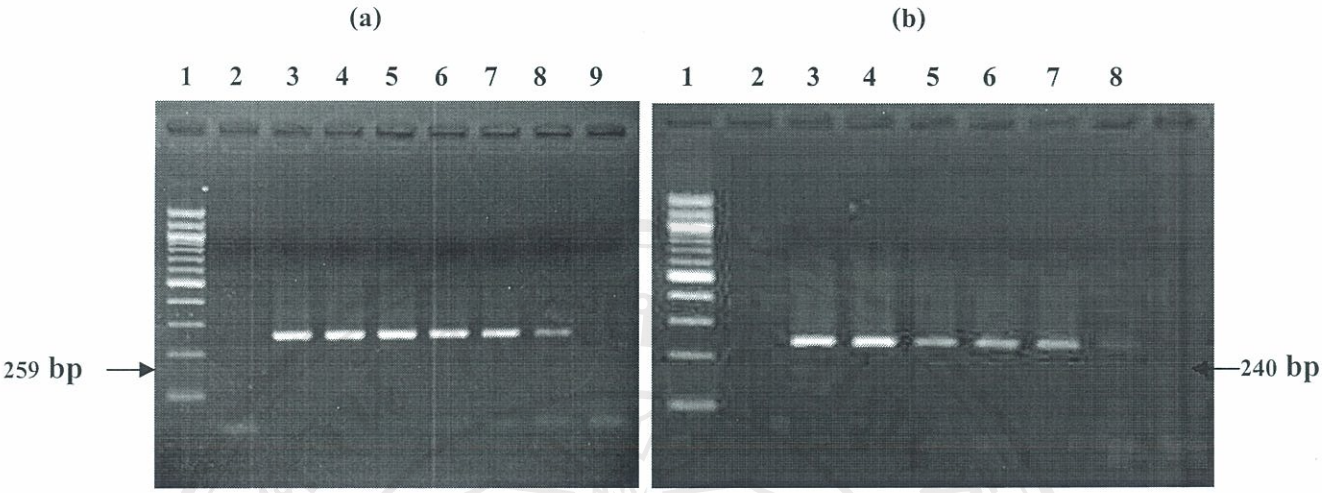



**รูปที่ 3.4 (ก)** sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน cagA โดยใช้ (a) primer ที่ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่น (b) primer ที่ออกแบบจำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ที่พบในคนไทย Lane1: 100 bp DNA ladder; Lane 2: negative control; Lane 3-9 : DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากการเพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารคนไทย โดยมีความเข้มข้นของ DNA ต่างๆกันดังนี้ ; Lane 3: 2.0 ng; Lane 4: 0.2 ng; Lane 5: 0.02 ng; Lane 6: 2.0 ρg; Lane 7: 0.2 ρg; Lane 8: 0.02 ρg; Lane 9: 2 $f$g

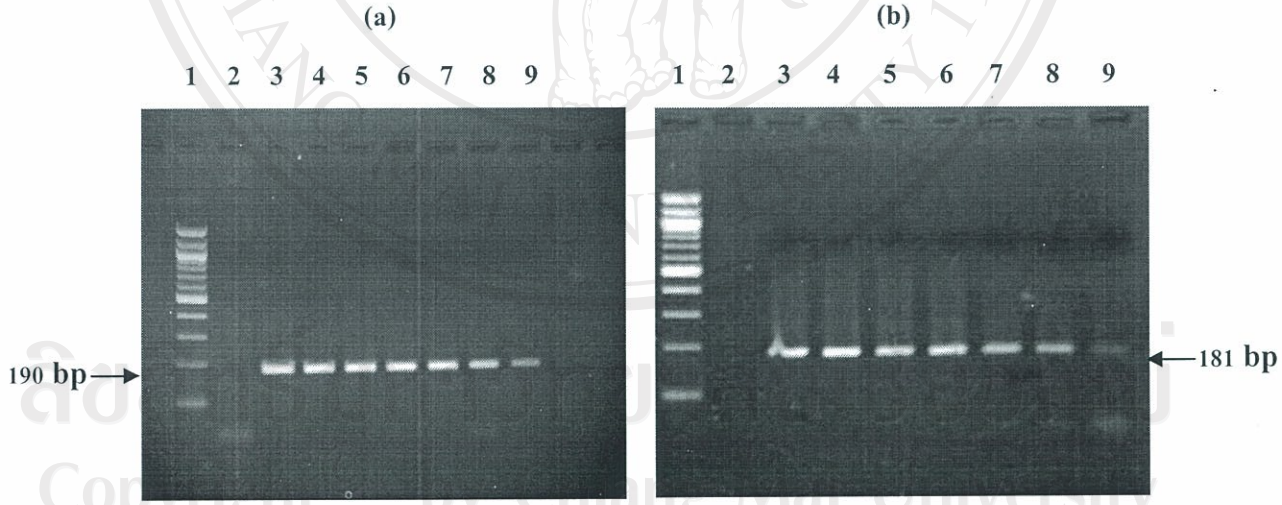



**รูปที่ 3.5 (ก)** sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน vacAs1 (201 bp) โดยใช้ (a) primer ที่ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่น (b) primer ที่ออกแบบจำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ที่พบในคนไทย Lane1: 100 bp DNA ladder; Lane 2: negative control; Lane 3-9 : DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากการเพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารคนไทย โดยมีความเข้มข้นของ DNA ต่างๆกันดังนี้ ; Lane 3: 2.0 ng; Lane 4: 0.2 ng; Lane 5: 0.02 ng; Lane 6: 2.0 ρg; Lane 7: 0.2 ρg; Lane 8: 0.02 ρg; Lane 9: 2 $f$g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

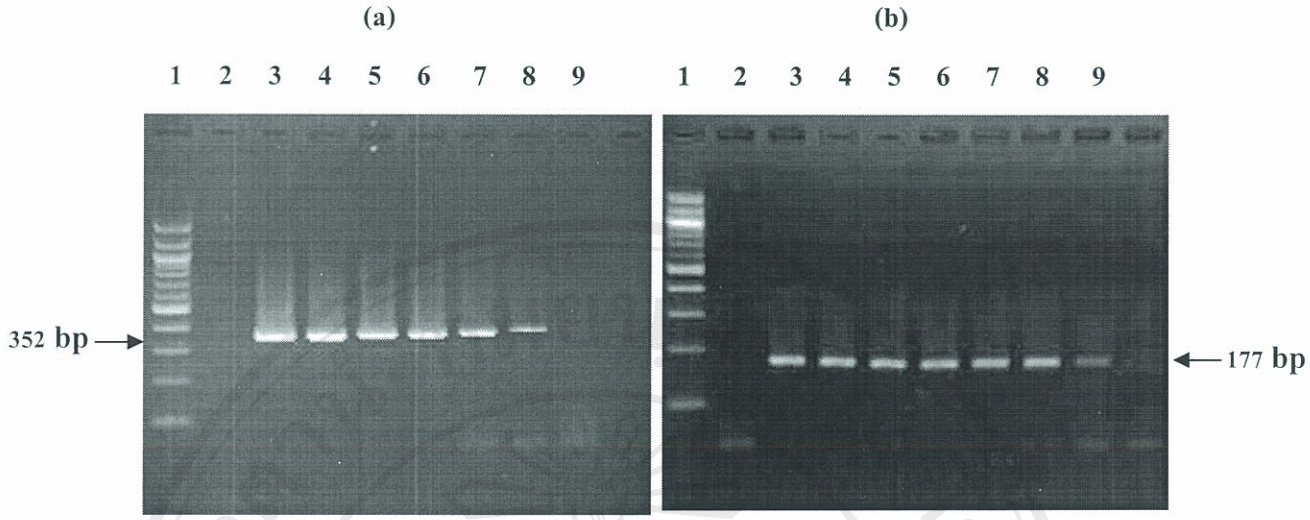



**รูปที่ 3.5 (ข)** sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน vacAs1 (259 bp) โดยใช้ (a) primer ที่ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่น (b) primer ที่ออกแบบจำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ที่พบในคนไทย Lane1: 100 bp DNA ladder; Lane 2: negative control; Lane 3-9 : DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากการเพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารคนไทย โดยมีความเข้มข้นของ DNA ต่างๆกันดังนี้ ; Lane 3: 2.0 ng; Lane 4: 0.2 ng; Lane 5: 0.02 ng; Lane 6: 2.0 ρg; Lane 7: 0.2 ρg; Lane 8: 0.02 ρg; Lane 9: 2 $f$g

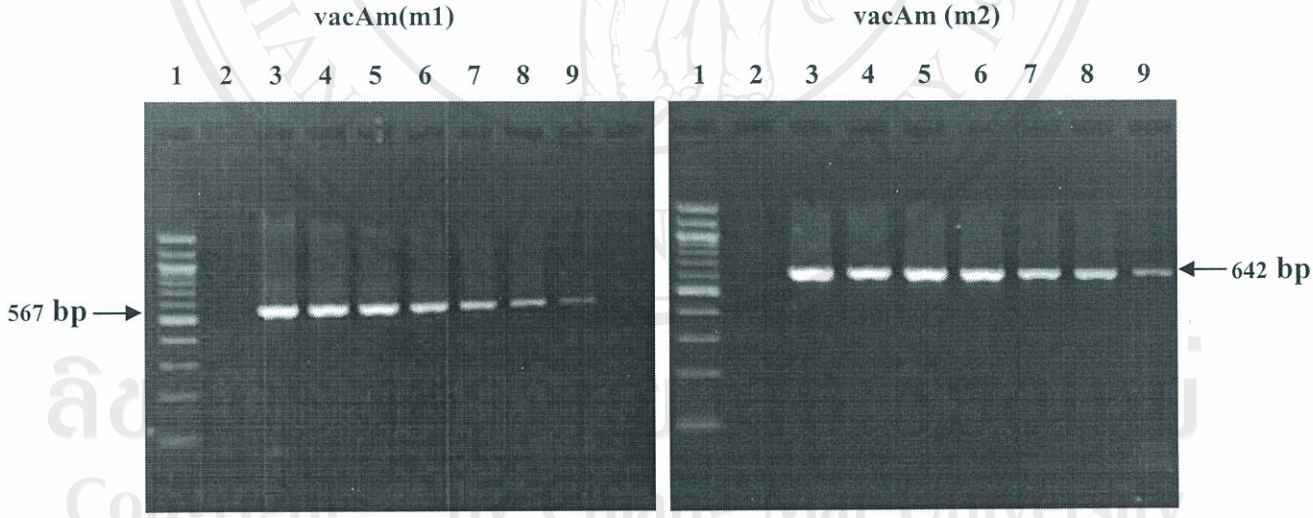



**รูปที่ 3.5 (ค)** sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน vacAs1a โดยใช้ (a) primer ที่ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่น (b) primer ที่ออกแบบจำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ที่พบในคนไทย Lane1: 100 bp DNA ladder; Lane 2: negative control; Lane 3-9 : DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากการเพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารคนไทย โดยมีความเข้มข้นของ DNA ต่างๆกันดังนี้ ; Lane 3: 2.0 ng; Lane 4: 0.2 ng; Lane 5: 0.02 ng; Lane 6: 2.0 ρg; Lane 7: 0.2 ρg; Lane 8: 0.02 ρg; Lane 9: 2 $f$g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

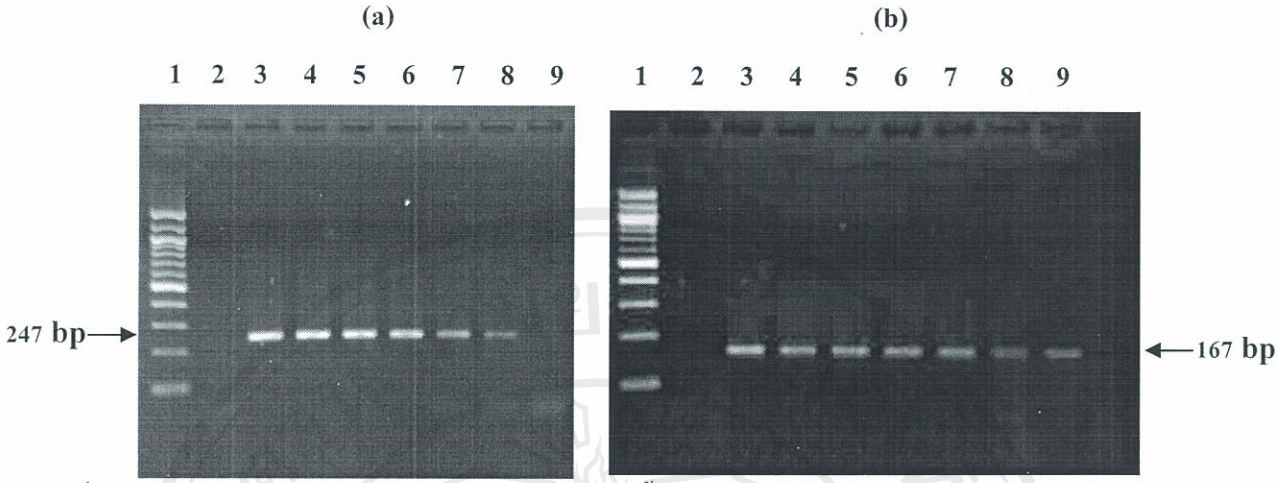



**รูปที่ 3.5 (ง)** sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน vacAm2 โดยใช้ (a) primer ที่ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่น (b) primer ที่ออกแบบจำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ที่พบในคนไทย Lane1: 100 bp DNA ladder; Lane 2: negative control; Lane 3-9 : DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากการเพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารคนไทย โดยมีความเข้มข้นของ DNA ต่างๆกันดังนี้ ; Lane 3: 2.0 ng; Lane 4: 0.2 ng; Lane 5: 0.02 ng; Lane 6: 2.0 ρg; Lane 7: 0.2 ρg; Lane 8: 0.02 ρg; Lane 9: 2 $f$g




**รูปที่ 3.5 (จ)** sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน vacAm (m1) และ (m2) โดยใช้ primer ที่ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่น Lane1: 100 bp DNA ladder; Lane 2: negative control; Lane 3-9 : DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากการเพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารคนไทย โดยมีความเข้มข้นของ DNA ต่างๆกันดังนี้ ; Lane 3: 2.0 ng; Lane 4: 0.2 ng; Lane 5: 0.02 ng; Lane 6: 2.0 ρg; Lane 7: 0.2 ρg; Lane 8: 0.02 ρg; Lane 9: 2 $f$g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




**รูปที่ 3.6** sensitivity ของ PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่งยีน iceA1 โดยใช้ (a) primer ที่ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่น (b) primer ที่ออกแบบจำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์ที่พบในคนไทย Lane1: 100 bp DNA ladder; Lane 2: negative control; Lane 3-9 : DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากการเพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารคนไทย โดยมีความเข้มข้นของ DNA ต่างๆกันดังนี้ ; Lane 3: 2.0 ng; Lane 4: 0.2 ng; Lane 5: 0.02 ng; Lane 6: 2.0 ρg; Lane 7: 0.2 ρg; Lane 8: 0.02 ρg; Lane 9: 2 $f$g

**ตารางที่ 3.7 ความเข้มข้นของ DNA ของเชื้อ *H. pylori* ที่สามารถตรวจพบได้ต่ำสุดเมื่อใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน cagA, vacA subtypes s และ m และ iceA โดยใช้ primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่นและ primer ที่ออกแบบจำเพาะต่อยีนของเชื้อที่พบในสายพันธุ์คนไทย**

| ยีนเป้าหมาย | Primer จากคณะวิจัยอื่น | | | Primer จำเพาะต่อเชื้อสายพันธุ์คนไทย | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR (bp) | ความเข้มข้นของ DNA ของเชื้อที่สามารถตรวจได้ | คิดเป็น genome ของเชื้อ | ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR (bp) | ความเข้มข้นของ DNA ของเชื้อที่สามารถตรวจได้ | คิดเป็น genome ของเชื้อ |
| cagA | 349 | 2 $f$g | 1 | 256 | 2 $f$g | 1 |
| vacAs1 | 201 | 2 $f$g | 1 | 135 | 2 $f$g | 1 |
| vacAs1 | 259 | 0.02 ρg | 10 | 240 | 0.02 ρg | 10 |
| vacAs1a | 190 | 2 $f$g | 1 | 181 | 2 $f$g | 1 |
| vacAm2 | 352 | 0.02 ρg | 10 | 177 | 2 $f$g | 1 |
| vacAm<br>m1<br>m2 | <br>567<br>642 | <br>2 $f$g<br>2 $f$g | <br>1<br>1 | | | |
| iceA1 | 247 | 0.02 ρg | 10 | 167 | 2 $f$g | 1 |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

### 3.5 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี PCR

ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ฝังในพาราฟินและให้ผลบวกทางพยาธิวิทยา เมื่อนำมาสกัด DNA ของเชื้อ *H. pylori* และนำมาตรวจหาเชื้อโดยวิธี PCR พบว่า ที่ตำแหน่งส่วนของยีนขนาด 860 bp พบผลบวกในตัวอย่างกลุ่มต่างๆดังนี้

- ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อกระเพาะจากผู้ป่วยโรค gastritis ให้ผลบวก 32 ตัวอย่าง ใน 54 ตัวอย่าง คิดเป็น 59.3%
- ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อกระเพาะจากผู้ป่วยโรค peptic ulcer ให้ผลบวก 8 ตัวอย่าง ใน 8 ตัวอย่าง คิดเป็น 100%
- ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อกระเพาะจากผู้ป่วยโรค duodenal ulcer ให้ผลบวก 6 ตัวอย่าง จาก 8 ตัวอย่าง คิดเป็น 75%
- ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อกระเพาะจากผู้ป่วยโรค gastric cancer ให้ผลบวก 4 ตัวอย่าง ใน 24 ตัวอย่าง คิดเป็น 16.7%

ส่วนตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ให้ผลบวกโดยวิธี CLO test® และได้นำเนื้อเยื่อจาก CLO test® มาสกัด DNA ของเชื้อ *H. pylori* นำมาตรวจหาเชื้อโดยวิธี PCR ที่ตำแหน่งยีนขนาด 860 bp พบผลบวกในตัวอย่างกลุ่มโรคต่างๆดังนี้

- ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะจากผู้ป่วยโรค gastritis ให้ผลบวก 26 ตัวอย่าง ใน 27 ตัวอย่าง คิดเป็น 96.3%
- ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะจากผู้ป่วยโรค peptic ulcer ให้ผลบวก 20 ตัวอย่าง ใน 22 ตัวอย่าง คิดเป็น 90.9%
- ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อกระเพาะจากผู้ป่วยโรค duodenal ulcer ให้ผลบวก 39 ตัวอย่าง จาก 42 ตัวอย่าง คิดเป็น 92.9%

### 3.6 การตรวจหายีน cagA, vacA subtypes s และ m และ iceA โดยใช้ primer จากคณะวิจัยอื่นและ primer ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทยและเปรียบเทียบ primer 2 คู่

ตัวอย่างในข้อ 3.5 ที่ตรวจหาเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี PCR และให้ผลบวกที่ตำแหน่งส่วนของยีนขนาด 860 bp นำมาตรวจหายีน cagA, vacA subtypes ชนิดต่างๆ และ iceA โดยใช้ primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่นและ primer ที่ออกแบบจำเพาะต่อลำดับเบสที่ได้เชื้อจากสายพันธุ์คนไทยในกลุ่มโรคต่างๆคือ โรคกระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis), โรคแผลในกระเพาะอาหาร (peptic ulcer), โรคแผลในลำไส้ส่วนต้น (duodenal ulcer) และมะเร็งในกระเพาะอาหาร (gastric cancer) และแบ่งตามการได้มาของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารคือ จากเนื้อเยื่อที่ฝังใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พาราฟินและเนื้อเยื่อที่ได้จากการตรวจเชื้อด้วย CLO test® ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3.8, 3.9, 3.10 และ 3.11

การเปรียบเทียบวิธี PCR ที่ใช้ primer จากคณะวิจัยอื่นและ primer ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของสายพันธุ์ที่พบในคนไทย ตามเป้าหมายของยีน cagA, vacA subtypes ชนิดต่างๆ และ iceA แสดงตามตารางที่ 3.12 และ รูปที่ 3.7 โดยแบ่งตามกลุ่มโรคคือ ก. กลุ่มโรค gastritis; ข. กลุ่มโรค peptic ulcer; ค. กลุ่มโรค duodenal ulcer และ ง. กลุ่มโรค gastric cancer และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ ($p< 0.05$) แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ พบว่าในกลุ่มโรค gastritis วิธี PCR ที่ใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนสายพันธุ์คนไทยจะสามารถตรวจพบยีน cagA, vacAs1 (259 bp) และ vacAs1a มากกว่าเมื่อใช้ primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) แต่ที่ตำแหน่งยีน vacAs1 (201 bp) วิธี PCR ที่ใช้ primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่นจะตรวจพบมากกว่าวิธี PCR ที่ใช้ primer จำเพาะต่อลำดับเบสของเชื้อสายพันธุ์คนไทยอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) ส่วนในกลุ่มโรค duodenal ulcer พบว่า primer ที่ออกแบบจากคณะวิจัยอื่นจะตรวจพบยีน iceA1 มากกว่า primer ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย รูปที่ 3.8 แสดงถึงภาพรวมของทุกกลุ่มโรคเปรียบเทียบวิธี PCR ที่ใช้ primer จากคณะวิจัยอื่นและ primer ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์คนไทย พบว่าที่ตำแหน่งยีน cagA vacAs1 (259bp), vacAs1a วิธี PCR ที่ใช้ primer จำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อที่พบในคนไทยจะตรวจพบมากกว่า PCR ที่ใช้ primer จากคณะวิจัยอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.8 ผลการตรวจยีน cagA, vacA subtypes s และ m และ iceA ของเชื้อ *H. pylori* จาก DNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะผู้ป่วยที่ฝังในพาราฟิน โดยใช้ primer ที่ออกแบบโดยคณะวิจัยอื่น

ตารางที่ 3.8 ก) กลุ่มโรคกระเพาะอักเสบ (Gastritis)

| Spec. No | Histology test | PCR test | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | vacA subtypes | | | | | | | | |
| | | 860bp | cagA | iceA1 | iceA2 | vacAs1 (201bp) | vacAs1 (259bp) | vacA s1a | vacA s1b | vacA s1c | vacA s2 | vacAm m1 | vacAm m2 | vacA m2 |
| N9 | +++ | + | + | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - |
| N23 | ++ | + | + | + | - | + | + | + | - | + | - | + | - | - |
| N24 | ++ | + | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | - | - |
| N30 | ++ | + | + | - | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + |
| N31b | +++ | + | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + | - | - |
| N34 | +++ | + | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + | - | - |
| N41 | +++ | + | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | - | - |
| N42 | +++ | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + |
| N43 | +++ | + | + | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - |
| N49 | ++ | + | - | - | + | + | + | + | - | + | - | + | - | + |
| N50 | + | + | - | - | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - |
| N51 | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | - | + | - | - |
| N55 | ++ | + | + | - | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - |
| N56 | ++ | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| N57 | ++ | + | - | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| N58 | ++ | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved