การตรวจหาชนิดของแปปปิโลมาไวรัสในมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสและไฮบริไดเซชั่น

นาย อภิสิทธิ์ บุณยะนิธิ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2537
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17211827

DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES IN INVASIVE CERVICAL CARCINOMA BY MEANS OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND HYBRIDIZATION

MR. APISIT POONNANITI

A Thesis Submitted in Partial Full fillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-584-278-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรวจหาชนิดของแปปทิโลมาไวรัสในมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสและไฮบริไดเซชั่น

โดย นาย อภิสิทธิ์ ปุณณะนิธิ

สหสาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ นพ.สมชัย นิรุตติศาสน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

_____ คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ฉาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____ ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ พญ.วรรธา พรรณรักษา)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ นพ.สมชัย นิรุตติศาสน์)

_____ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชรัลบล อยู่สุข)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อภิสิทธิ์ ปทุมนิธิ : การตรวจหาชนิดของแปบปิโลมาไวรัสในมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสและไฮบริไดเซชั่น (DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES IN INVASIVE CERVICAL CARCINOMA BY MEANS OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND HYBRIDIZATION) อ.ที่ปรึกษา : อ.กร.ภาวพันธ ภัทรโกศล, อ.ที่ปรึกษารวม : รศ.นพ. สมชัย นิรุตติศาสน, 87 หน้า. ISBN 974-584-278-8

Human papillomavirus (HPV) เป็นสาเหตุของโรคหูดหงอนไก่ (condyloma acuminata) ซึ่งเป็นโรคหนึ่งของโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์พบได้ทั่วโลก นอกจากโรคหูดหงอนไก่แล้ว โรคเนื้องอกของชั้นเยื่อบุผิวของปากมดลูก (cervical intraepithelial neoplasia : CIN) และโรคมะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) ก็มีแนวโน้มว่า จะเป็นผลมาจากการติดเชื้อ HPV โดยเฉพาะ HPVs ในกลุ่มความเสี่ยงสูง ทำให้มีสมมุติฐานว่า HPV อาจมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงเซลล์ติดเชื้อให้พัฒนากลายเป็นเซลล์มะเร็งได้

วิทยานิพนธ์นี้ได้ทำการศึกษาตัวอย่างเนื้อเยื่อซึ่งถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและเก็บฝังในพาราฟิน (formalin-fixed, paraffin embedded tissue) และได้พิสูจน์ทางพยาธิวิทยาว่า เป็นมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม เพื่อตรวจหา HPV-DNA ตัวอย่างทั้งหมด 100 ตัวอย่างถูกนำมาสกัดแยก DNA และทำการตรวจขยายเพิ่มจำนวนโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ L1 consensus primers ซึ่งจำเพาะต่อ HPV ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการ PCR จะถูกนำมาตรวจวิเคราะห์โดยวิธี gel electrophoresis (GE) และ dot hybridization (DH) ซึ่งใช้ตัวตรวจจับทั่วไป (generic oligonucleotide probe : GP) และ ตัวตรวจจับจำเพาะ (type specific oligonucleotide probe :TS) ในการทดสอบนี้ใช้ TS จำเพาะต่อ HPV จำนวน 5 types คือ TS-6, TS-16, TS-18, และ TS-33 ตัวตรวจจับทั้งหมดจะถูกติดฉลากด้วยสารปลอดกัมมันตภาพรังสี (non-isotopic labelled probes) การตรวจผลผลิตจากกระบวนการ PCR โดยวิธี DH นี้สามารถเพิ่มความไวในการตรวจหา HPV-DNA อย่างน้อย 10 เท่า

ผลการตรวจสอบพบว่า สามารถตรวจพบ HPV-DNA ในตัวอย่างจำนวน 82 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 82 และพบว่า HPV-16 เป็น type ที่พบมากที่สุดคือ 35 จาก 82 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 42.7 ตามด้วย HPV-18 (17/82) ร้อยละ 20.7 และ HPV-33 (3/82) ร้อยละ 3.6 มี 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 6.1) ที่ตรวจพบทั้ง HPV-16 และ 18 อยู่ด้วยกัน ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถตรวจพบว่ามี HPV-6 และ 11 ในตัวอย่างเนื้อเยื่อที่นำมาศึกษา ผลการทดลองทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า การติดเชื้อ HPV โดยเฉพาะ HPV-16 และ 18 เป็นปัจจัยร่วมสำคัญปัจจัยหนึ่งของโรคมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม

ภาควิชา สหสาขาวิชา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C346708 : MAJOR INTER-DEPARTMENT OF MEDICAL MICROBIOLOGY
KEYWORD : CERVICAL CARCINOMA, HPV-TYPING, NON-ISOTOPIC DETECTION, HYBRIDIZATION, PCR
APISIT POONNANITI: DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES IN INVASIVE CERVICAL CARCINOMA BY MEANS OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND HYBRIDIZATION. THESIS ADVISOR : PARVAPHAN BHATTARAKOSOL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSO.PROF. SOMCHAI NIRUTHISARD, MD.,
87 pp. ISBN 974-584-278-8

Human papillomavirus (HPV) is the causative agent of condyloma acuminata, the common sexually transmitted disease which distributed worldwide. Beside condyloma, cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical carcinoma are also suspected to be associated with HPV infection espectially those HPVs in high risk group such as HPV-16 and -18. Consequently, it was hypothesized that HPV may play some role(s) in malignant transformation.

In this thesis, a detection of HPV DNA in formalin-fixed, paraffin embedded tissue with histopathologic evidence of invasive cervical carcinoma was studied. DNA extracted from 100 specimens were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using L1 consensus primers specific for HPV. The amplified product was analysed by gel electrophoresis (GE) and dot hybridization (DH) using generic (GP) and type-specific oligonucleotide probes (TS); 5 TSs were used in this experiment, i.e., TS-6, TS-11, TS-16, TS-18 and TS-33. All of these probes were non-isotopic labelled. The DH of PCR amplified product increased the sensitivity of HPV detection by at least 10 folds. It was found that 82% of specimens contained HPV-DNA.

The most common type was HPV-16 (35/82, 42.7%) followed by HPV-18 (17/82, 20.7%) and HPV-33 (3/82, 3.6%). Five specimens (6.1%) contains both HPV-16 and -18. HPV-6 and -11 could not be detected in any specimens. Therefore, these data seem to extend the reports by others concerning the contribution of HPV especially type-16 and -18 in carcinogenesis of the cervix uteri.

ภาควิชา สหสาขาวิชา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณา และ ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ อาจารย์ ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ นพ.สมชัย นิรุตติศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ (ร่วม) ซึ่งได้กรุณาให้คำแนะนำ และ ข้อคิดเห็นต่างๆในงานวิจัยด้วยดี ตลอดจนช่วยแก้ไขอุปสรรค และปัญหาต่างๆมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ พญ.วรรณา พรรณรักษา ที่ได้กรุณาเป็นประธานการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.ชรัลบล อยู่สุข ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ร่วมเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วีระพงษ์ ลุลิตานนท์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อ purified plasmid HPV-DNA และ อาจารย์ ดร.วสันต์ จันทราทิตย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ช่วยให้คำแนะนำกับงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ พันตรี ดร.สุวิชา จิตรปฏิมา, พันเอก ดร.ธนา เศรษฐจันทร์, ร้อยโท หญิง อัญชลี วิศวโรภคา และ คุณ จตุรพร พรศิลปทิพย์ ภาควิชาชีวเคมี วิทยาลัยแพทยศาสตร์ พระมงกุฎเกล้าฯ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ พญ.สมใจ เหรียญประยูร หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และ ความสะดวกในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์, เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ และ นิสิตปริญญาโท ทุกคนที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความเป็นกันเอง และ ความช่วยเหลือทุกประการแก่ผู้วิจัย

ท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ได้ให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

รายการตารางประกอบ ..... ง

รายการรูปประกอบ ..... จ

คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์ ..... ช

บทที่

1. บทนำ 1

วัตถุประสงค์ 3

2. การสำรวจเอกสาร

โครงสร้างและคุณสมบัติโดยทั่วไปของ HPV 4

การจัดกลุ่ม 4

โครงสร้างและหน้าที่ของ HPV-DNA 5

การเพิ่มจำนวนของ HPV 6

HPV กับการเกิดโรคในคน 7

บทบาทของ HPV กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก 9

การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน 10

การตรวจวิเคราะห์ HPV ทางห้องปฏิบัติการ 14

3. วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและตัวอย่างส่งตรวจ..... 20

การสกัดแยก DNA จากตัวอย่างส่งตรวจ..... 21

การเตรียม DNA มาตรฐาน..... 22

การหาปริมาณ DNA..... 23

คุณสมบัติของ oligonucleotide..... 23

การขยายเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR..... 24

การวิเคราะห์หา amplified product จาก PCR..... 25

การทำ hybridization..... 25

4. สรุปผลการวิจัย..... 34

5. วิจารณ์ผลการวิจัย..... 58

เอกสารอ้างอิง..... 63

ภาคผนวก ก. 77

ข. 80

ประวัติผู้ทำการวิจัย..... 87

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ **หน้า**

1 แสดง function ของ papillomavirus open-reading frame (ORF)..... 8

2 การจัดแบ่งกลุ่ม HPV types กับการเกิดเนื้องอกชนิดต่างๆ ในคน..... 11

3 วิธีการที่ใช้ตรวจวิเคราะห์หา HPV-DNA ทางห้องปฏิบัติการ.... 16

4 คุณสมบัติของ oligonucleotide primers และ probes... 24

5 สภาวะที่เหมาะสมในการทำ hybridization ของแต่ละ probe..... 32

6 แสดงการเปรียบเทียบการตรวจหา amplified HPV-DNA โดยวิธี gel electrophoresis (GE) และ dot hybridization (DH)..... 55

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้าง และ coding region ของ HPV-DNA.....	7
2	หลักการของ polymerase chain reaction (PCR).....	19
3	แสดงตำแหน่งการวางวัสดุในการทำ Southern hybridization..	29
4	แสดงหลักการของ 3'-oligo labelling enhance chemiluminescense.....	31
5	ทดสอบปริมาตรที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR.....	36
6	ทดสอบจำนวนรอบที่เหมาะสมของ PCR.....	37
7	ทดสอบเปรียบเทียบการใช้ Taq polymerase ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน	38
8	ทดสอบอัตราส่วนที่เหมาะสมในการใช้ primers พร้อมกันสองคู่ (L1 และ B-globin primers).....	39
9	ผลการเพิ่มขยาย purified plasmid HPV-DNA 5 types โดย PCR.....	41
10	การทดสอบการตรวจ purified plasmid HPV DNA ทั้ง 5 types ที่ปริมาณต่างๆกันโดยใช้วิธี PCR.....	42
11	ทดสอบความไวของการทำ PCR กับ HPV-16.....	43
12	การทดสอบความไวของการทำ PCR กับ HeLa DNA.....	44
13	ผลของปริมาตรต่างๆกันของ DNA สกัดจากตัวอย่างในการทำ PCR...	46
14	ตัวอย่างผลของการ amplified HPV DNA จากตัวอย่างส่งตรวจ โดยวิธี PCR.....	47
15	ทดสอบเปรียบเทียบอุณหภูมิและความเข้มข้นของ GP ที่เหมาะสม ในการทำ hybridization.....	48

รูปที่ **หน้า**

16 ทดสอบความไวของ GP กับ amplified purified plasmid HPV-16 โดยใช้วิธี DH..... 50

17 ทดสอบความไวของ GP กับ amplified HeLa DNA..... 51

18 ทดสอบสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ TS ที่ความเข้มข้น 0.5 pmole กับ purifid plasmid HPV-DNA ทั้ง 5 types โดยวิธี DH..... 54

19 ทดสอบสภาวะอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา TS-6, TS-16, และ TS-18 ที่ความเข้มข้น 5 pmole กับ purified plasmid HPV-DNA ทั้ง 5 types โดยวิธี DH..... 52

20 แสดงผลการตรวจ amplified product ของตัวอย่างส่งตรวจ โดยวิธี DH..... 53

21 การตรวจหา amplified product โดยวิธี Southern hybridization..... 57

คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์

ชม.	=	ชั่วโมง
^{o}C	=	องศาเซลเซียส
bp.	=	Base pair
BPV	=	Bovine papillomavirus
BSA	=	Bovine serum albumin
CIN	=	Cervical intraepithelial neoplasia
cm^2	=	ตารางเซนติเมตร
dATP	=	Deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	=	Deoxcytidine 5'-triphosphate
dGTP	=	Deoxyguanosine 5'-triphosphate
dTTP	=	Deoxthimidine 5'-triphosphate
dNTP	=	Deoxynucleotide 5'-triphosphate
DH	=	Dot hybridization
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
ECL	=	Enhance chemiluminescense
EDTA	=	Ethylenediamine tetraacetic acid
fg	=	Fentogram (10^{-15} g)
g	=	Gram
GE	=	Gel electrophoresis
GP	=	Generic probe
HEPES	=	N-2-Hydroxyethylpiperzine-N'-2-ethanesulfonic acid

HPV	=	Human papillomavirus
HPLC	=	High performance liquid chromatograhphy
kb.	=	Kilobase
KH_2PO_4	=	Potassium di-hydrogen phosphate
M	=	Molarity
mg	=	Milligram (10^{-3} g)
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimolar
MW	=	Molecular weight
Na	=	Sodium
NaCl	=	Sodium chloride
$NaHPO_4$	=	Sodium hydrogen phosphate
$NaHCO_3$	=	Sodium hydrogen carbonate
NaOH	=	Sodium hydroxide
ng	=	Nanogram (10^{-9} g)
nm	=	Nanometer
OD	=	Optical density
PCR	=	Polymerase chain reaction
pg	=	Picogram (10^{-12} g)
pmole	=	Picomole
PV	=	Papillomavirus
rpm	=	Revolution per minute
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
SSC	=	Saline sodium citrate
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane

TS	=	Type specific probe
ug	=	Microgram (10^{-6} g)
ul	=	Microliter
UV	=	Ultraviolet