



รายงานฉบับสมบูรณ์

แผนงานวิจัยเรื่อง

การวิจัยเพื่อคิดค้นและพัฒนาเทคนิคใหม่ในการตรวจหาอวัยวะมะเร็งเรื้องรังปากมดลูกระยะเริ่มต้น
และโรคที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสเอชพีวี

(New approaches in early detection of pre-cancerous lesions, early cervical cancer
and human papillomavirus related diseases)

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.พารัพันธ์ ภักธโกศล

Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, PhD.

ดร.อาคม ไชยวงศ์คต

Arkorn Chaiwongkot, PhD.

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สุรางค์ ตริรัตน์ชาติ

Associate Professor Surang Triratanachai, MD.

อาจารย์ แพทย์หญิง พญ. ตันตวิโรจน์

Patou Tantbiroj, MD.

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธ์

Assistant Professor Amornpun Sereemasun, MD., PhD.

หน่วยงาน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

“โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.)”

ความเห็นและข้อเสนอแนะที่ปรากฏในเอกสารนี้เป็นของผู้วิจัย มิใช่ ความเห็นของสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข

พฤศจิกายน พ.ศ. 2560

รายงานฉบับสมบูรณ์

แผนงานวิจัยเรื่อง

การวิจัยเพื่อคิดค้นและพัฒนาเทคนิคใหม่ในการตรวจหาโรคก่อนมะเร็งปากมดลูกระยะเริ่มต้น
และโรคที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสเอชพีวี
(New approaches in early detection of pre-cancerous lesions, early cervical cancer
and human papillomavirus related diseases)

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.พารัพันท์ ภักุรโกศล

Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, PhD.

ดร.อาคม ไชยวงศ์คต

Arkorn Chaiwongkot, PhD.

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สุรางค์ ตรีรัตนชาติ

Associate Professor Surang Triratanachai, MD.

อาจารย์ แพทย์หญิง พญ. ตันตวิโรจน์

Patou Tantbirojn, MD.

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธ์

Assistant Professor Amornpun Sereemasun, MD., PhD.

หน่วยงาน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

“โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.)”

ความเห็นและข้อเสนอแนะที่ปรากฏในเอกสารนี้เป็นของผู้วิจัย มิใช่ ความเห็นของสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข

พฤศจิกายน พ.ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส) ที่ให้ทุนสนับสนุนในการดำเนินการ
แผนงานวิจัยเรื่องการวิจัยเพื่อคิดค้นและพัฒนาเทคนิคใหม่ในการตรวจหาโรคก่อมะเร็งปากมดลูก
ระยะเริ่มต้นและโรคที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสแปปิโลมา ซึ่งประกอบด้วยโครงการย่อย 2 โครงการ
คือ โครงการย่อยที่ 1 เรื่อง การพัฒนาวิธีการตรวจรวดเร็วเพื่อหาแอนติเจนของไวรัสแปปิโลมาที่
สัมพันธ์กับระยะการพัฒนากลายเป็น มะเร็งโดยใช้อนุภาคนาโนทองคำ (Development of rapid
method for detection of Human Papillomavirus Antigen related to Cancer
Progression using nanogold particle) และ โครงการวิจัยย่อยที่ 2 เรื่อง การตรวจภาวะเมธิล
เลชันของยีนแอลวันของเชื้อไวรัส แปปิโลมาที่มีความเสี่ยงสูง ในเซลล์ขูดปากมดลูกโดยวิธีเอนไซม์ ลิงค์
อิมมูโนซอร์เบนต์ (Detection of high risk human papillomaviruses L1 gene methylation
in exfoliated cervical cells by Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay ระหว่างวันที่ 1
ธันวาคม พ.ศ. 2559 ถึง 30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2560 และขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ทำงานวิจัย จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง
ตามวัตถุประสงค์

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

การแสดงผลของโปรตีนก่อมะเร็ง E6 ในระดับที่สูงของเชื้อไวรัสแปปิลโลมาชนิด 16 และการมีภาวะเมธิลเลชันที่สูงในยีนแอลหนึ่ง จัดเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ได้รับการยอมรับว่ามีความจำเพาะกับการที่เซลล์มีความเสี่ยงจะพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก งานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาเทคนิคการตรวจหาโปรตีน E6 โดยใช้อนุภาคนาโนทองคำและหลักการ Immunochromatography (IC) และวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนเพื่อตรวจภาวะเมธิลเลชันของยีนแอลหนึ่งในเซลล์ปากมดลูก

ทำการเคลือบอนุภาคนาโนทองคำด้วยโปรตีนจีและแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน E6 ของ HPV16 และ HPV18 แล้วนำมาทดสอบกับโปรตีนบริสุทธิ์ HPV16E6 พบว่าความเข้มข้นของโปรตีน E6 ต่ำสุดที่สามารถตรวจได้คือ 312.5 นาโนกรัม เมื่อใช้แอนติบอดีที่อยู่บนแผ่นเมมเบรนที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม และใช้ phosphate Buffer /0.05% Tween 20/1% BSA, pH 7.4 เป็นสารละลายให้อนุภาคนาโนทองคำมีการเคลื่อนที่เมื่อนำมาทดสอบความจำเพาะกับโปรตีนที่สกัดจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อ HPV16 สามารถตรวจพบผลบวกที่จำนวนหนึ่งแสนเซลล์ เมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อ HPV ชนิดอื่นหรือเซลล์มะเร็งที่ไม่มีการติดเชื้อ HPV และแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้ผลลบ เมื่อนำเซลล์ปากมดลูกที่เก็บจากผู้หญิงที่มีความผิดปกติต่างๆ โดยเป็นเซลล์ปากมดลูกที่หลีกเลี่ยงจากการตรวจงานประจำมาทำการทดสอบ พบว่าในตัวอย่างที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัส HPV หรือมีการติดเชื้อไวรัส HPV ชนิดอื่นๆที่ไม่ใช่ HPV16 และ HPV18 ให้ผลลบทั้งหมด ในกลุ่มตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HPV16 พบว่าให้ผลบวกจำนวนร้อยละ 40, 22.22, 50, 28.6 และ 18.18 ตามลำดับในกลุ่มเซลล์ที่มีความผิดปกติแบบมะเร็งปากมดลูก CIN3, CIN2, CIN1 และเซลล์ที่มีการอักเสบและแบบ ASCUS ตามลำดับ

สำหรับการตรวจภาวะเมธิลเลชันของยีนแอลหนึ่ง ต้องนำดีเอ็นเอมาทำการเปลี่ยนสภาพโดยใช้ยา bisulfite และใช้วิธีทางอณูชีววิทยาตรวจหาปริมาณภาวะเมธิลเลชันโดยวิธี pyrosequencing ผลการตรวจพบว่าในกลุ่มมะเร็งปากมดลูกมีภาวะเมธิลเลชันของยีนแอลหนึ่งในระดับที่สูงและพบในระดับที่ต่ำในเซลล์ระดับปกติและ CIN1 และทางผู้วิจัยยังพบว่าตรงตำแหน่ง CpGs 5600 และ 5609 มีสภาวะเมธิลเลชันในระดับที่สูงเมื่อเทียบกับตำแหน่งอื่นๆ หลังจากนั้นทางผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาเทคนิค ELISA แบบ Indirect และ sandwich ELISA เพื่อตรวจภาวะเมธิลเลชันของยีนแอลหนึ่งโดยใช้ oligonucleotide probe ที่จำเพาะต่อไวรัส HPV16 แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจแบบ sandwich ELISA ยังไม่ประสบผลสำเร็จ แต่เทคนิค indirect ELISA ก็ให้ค่าการวัดปฏิกิริยาการเกิดสีที่สูงมากในหลุมที่มี oligonucleotide probe แต่ไม่มีดีเอ็นเอของ HPV16 และในระบบที่ไม่มี oligonucleotide probe แต่มีน้ำยาตัวอื่นทุกตัวครบให้ค่าการวัดปฏิกิริยาการเกิดสีที่ต่ำ ทางผู้วิจัยได้ทำการหาปริมาณที่เหมาะสมของ น้ำยา blocking, oligonucleotide probe, streptavidin, primary antibody (anti-5-methylcytosine) และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ก็พบว่ายังไม่สามารถแก้ปัญหาการมีพื้นหลังสีที่สูงลงได้ การพัฒนาเทคนิค ELISA ในขณะนี้ยังไม่ประสบผลสำเร็จแต่ทางผู้วิจัยจะทำการทดลองต่อไปเพื่อลดพื้นหลังสีที่สูงเพื่อที่จะได้ทดสอบหาความไวและความจำเพาะต่อไป และสุดท้ายจะตรวจกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์ปากมดลูก

คำสำคัญ โปรตีน HPV16E6, ภาวะเมธิลเลชันของยีนแอลหนึ่ง, มะเร็งปากมดลูก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)

Overexpression of human papillomavirus (HPV) 16 oncogenic protein E6 and hypermethylation of HPV16 L1 gene are of interest as biomarkers for cervical cancer progression. Immunochromatography (IC) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are widely used to detect target biomolecules in human. In this study, we developed IC and ELISA assays to detect viral oncoprotein E6 and L1 gene methylation of HPV16 in cervical cells, respectively.

The conjugated gold coated with protein G and mouse monoclonal anti-HPV16E6+HPV18E6 was optimized and can detect as low as 312.5 nanogram of HPV16 E6 purified protein using 0.5 microgram of antibody to E6 coated on strip in phosphate Buffer/0.05% Tween 20/1% BSA, pH 7.4 as running buffer. Positive band can also be detected in protein extraction from cervical cell lines containing HPV16 at least 1×10^5 cells. Nonspecific band was not detected when other types of HPV positive cell line and HPV negative cell line as well as bacterial cell lysate were used in the assay. The remaining cervical cells samples obtained from routine laboratory were used to evaluate the performance of the developed assay. HPV negative samples or other high-risk HPV types other than HPV16 and 18 showed negative results. HPV16 positive samples showed 40%, 22.22%, 50%, 28.6% and 18.18% positive results by IC in squamous cell carcinoma, CIN3, CIN2, CIN1 and inflammation/ASCUS groups, respectively.

HPV16 L1 gene methylation status was first detected using bisulfite treated DNA and pyrosequencing assay was used for quantification of methylation. Hypermethylation was detected in cervical cancer but was low in normal/CIN1 lesions. CpG sites 5600 and 5609 are highly methylated compared to other CpGs. Indirect and sandwich ELISA were developed to detect HPV16 L1 gene methylation status using specific oligonucleotide probe for HPV16, however, it was not successful in developing sandwich ELISA assay. Indirect ELISA showed high background when oligonucleotide probe was present with other reagents in the absent of HPV16 positive DNA. Other system without oligonucleotide probe in the present of all reagents revealed low background. Optimization of blocking reagents, oligonucleotide probe concentration, streptavidin concentration, anti-5-methylcytosine dilution and incubation time were not successfully reduced the background. The ELISA assay was not yet developed successfully, however, troubleshooting will be further performed to reduce the background and can be further tested for specificity and sensitivity and will be applied in clinical samples

Key words: HPV16E6 protein, Methylation of L1 gene, cervical cancer

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3
บทคัดย่อภาษาไทย	4
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	5
สารบัญ	6
สารบัญตาราง	8
สารบัญรูป	9
คำนำ	11
ทฤษฎี สมมติฐานและ/หรือกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย	12
วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย	18
โครงการย่อยที่ 1	
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	19
วิธีดำเนินการวิจัยและผลการทดลอง	19
1. การผลิตโปรตีน HPV 16E6 และการทำให้บริสุทธิ์	19
2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่อนุภาคนาโนทองคำเสถียรและความเข้มข้นของโปรตีนจี	20
3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอนุภาคนาโนทองคำ-โปรตีนจีติดกับแอนติบอดีจำเพาะต่อ HPV16	22
4. การทดสอบ Conjugated Gold ที่เตรียมได้บนชุดตรวจ Lateral flow assay	23
5. การเตรียม Strip เพื่อทำการทดสอบ Lateral flow	25
6. การเตรียมส่วน Nitrocellulose membrane	25
7. การหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดตรวจ Lateral flow assay	27
8. การทดสอบชุดตรวจกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย	32
9. การศึกษาความคงตัวของ conjugated gold และแถบ Strip	35
10. การทดสอบเปรียบเทียบความไวของ conjugated gold กับโปรตีน E6 กับ direct immunogold ด้วยวิธี Agglutination	36
สรุปผลการดำเนินงาน	37
การวิเคราะห์ผล	38
แนวทางการวิจัยต่อไป	38

	หน้า
โครงการย่อยที่ 2	
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	39
วิธีดำเนินการวิจัยและผลการทดลอง	39
1. การออกแบบ oligonucleotide probes สำหรับตรวจยีน L1 ของเชื้อ high risk human papillomavirus	39
2. ผลการตรวจภาวะเมธิลเลชั่นของยีน L1 ของเชื้อ HPV16 โดยวิธี Pyrosequencing	41
3. การตรวจ HPV16 และ 18 L1 gene methylation โดยวิธี ELISA	42
สรุปผลการดำเนินการ	47
การวิเคราะห์ผล	48
แนวทางการวิจัยต่อไป	48
บทสรุปการวิเคราะห์ภาพรวมของแผนงาน	49
ตารางสรุปภาพรวมการดำเนินแผนงาน	50
เอกสารอ้างอิง	51

สารบัญตาราง

	หน้า
<u>ตารางที่ 1</u>	วัสดุและน้ำยาที่ใช้ในการผลิตโปรตีน HPV16 E6 บริสุทธิ์ 19
<u>ตารางที่ 2</u>	ชนิดวัสดุและน้ำยา (แอนติบอดี) ชนิดต่าง ๆ 21
<u>ตารางที่ 3</u>	ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่าง Conjugate Gold กับแอนติบอดีต่าง ๆ 24
<u>ตารางที่ 4</u>	องค์ประกอบของแถบทดสอบ 25
<u>ตารางที่ 5</u>	ความไวในการตรวจจับโปรตีน E6 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 29
<u>ตารางที่ 6</u>	ความไวในการตรวจจับเซลล์ CaSki 30
<u>ตารางที่ 7</u>	ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ 31
<u>ตารางที่ 8</u>	ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับแบคทีเรียชนิดต่าง 32
<u>ตารางที่ 9</u>	แสดงกลุ่ม และจำนวนตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ และผลการตรวจ 34
<u>ตารางที่ 10</u>	รายชื่อ human papillomavirus และเลข Accession 40
<u>ตารางที่ 11</u>	ผลการตรวจภาวะเมธิลเลชันค่าเฉลี่ยเป็นค่าร้อยละจากเซลล์เพาะเลี้ยง มะเร็งปากมดลูก CaSki และ SiHa และจากตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่มี ความผิดปกติแบบต่างๆที่มีการติดเชื้อ HPV 16 42
<u>ตารางที่ 12</u>	ผลการทดสอบหาปัจจัยเกิดการจับแบบไม่จำเพาะจากการทำ indirect ELISA 46

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 วิธีการเตรียมสไลด์โดยใช้อุปกรณ์ขยายปากมดลูก (Speculum) และการเก็บตัวอย่างเซลล์จากรอยโรคด้วย Spatula (ช้อน), บริเวณที่สามารถตรวจพบรอยโรคระยะเริ่มต้นก่อนเกิดมะเร็งปากมดลูก (ขวบน) และบริเวณที่เก็บตัวอย่างเซลล์ (ขวล่าง)	13
รูปที่ 2 แสดงความเสถียรของการจับเกาะของโปรตีนจี 20 ug/ml gold กับอนุภาคนาโนทองคำที่ภาวะความเป็นกรด-ด่าง 5, 6, 7, 8 และ 9 นาน 60 นาที	21
รูปที่ 3 ความเสถียรของอนุภาคนาโนทองคำในการจับเกาะกับโปรตีนจีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ 18 ug/ml gold	22
รูปที่ 4 หลอดที่ 1 แสดงสารละลายอนุภาคนาโนทองคำหลังจากการปั่นแล้ว ที่ละลายสมบูรณ์ หลอดที่ 2 และ 3 แสดงการตกตะกอนของอนุภาคนาโนทองคำที่ไม่สามารถทำให้เป็นสารละลายสมบูรณ์	23
รูปที่ 5 การทดสอบปฏิกิริยาของ conjugated gold 1: Goat anti-mouse, 2: Mouse monoclonal anti-HPV16E6+HPV18E6, 3: Goat polyclonal anti-HPV16E6, 4: Rabbit polyclonal anti-HPV16E6, 5: Protein G, 6: Normal goat IgG	24
รูปที่ 6 แสดงองค์ประกอบและแถบการทดสอบบน strip	25
รูปที่ 7 หลักการทดสอบและผลการทดสอบของวิธีที่พัฒนาขึ้น	26
รูปที่ 8 ผลการทดสอบที่ใช้ running buffer คือ Phosphate Buffer ที่มี 0.05% Tween 20 และ 1% BSA ปรับ pH 7.4	27
รูปที่ 9 ผลการทดสอบเมื่อใช้ความเข้มข้นของเส้นตรวจจับที่ 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัม	28
รูปที่ 10 ความไวในการตรวจจับโปรตีนบริสุทธิ์ HPV16E6	28
รูปที่ 11 ผลทดสอบความจำเพาะของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิด	31
รูปที่ 12 แสดงผลการตรวจตัวอย่างผู้ป่วย (แถบที่ 1-4) ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยมีตัวควบคุมบวก (แถบที่ 6) และ ตัวควบคุมลบ (แถบที่ 5)	35
รูปที่ 13 ทดสอบการคงตัวของ conjugated gold บนแถบ strip โดยเปรียบเทียบระหว่าง Sample Pad ที่ treat ด้วย 2% Triton X-100 หรือ 2% Tween 20 หรือไม่ได้ treat ก่อนที่จะนำมาประกอบ และใช้ในการทดสอบ	36
รูปที่ 14 ผลการตกตะกอนของอนุภาคนาโนทองคำที่เคลือบด้วยโปรตีนจีกับโปรตีน E6 ที่ความเข้มข้น 40, 30, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ไมโครกรัม	36
รูปที่ 15 ผลการทำ Multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Multalin	41
รูปที่ 16 ระบบการตรวจภาวะเมธิเลชั่นโดยวิธี Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)	42
รูปที่ 17 ผลการทดลอง sandwich Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)	43

สารบัญรูป

	หน้า
<u>รูปที่ 18</u> กราฟแสดงค่า optical density ที่วัดได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอของ CaSki และความเข้มข้นของ streptavidin ที่แตกต่างกัน	45
<u>รูปที่ 19</u> กราฟแสดงค่า optical density ที่วัดได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอของ CaSki 500 ng ความเข้มข้นของ streptavidin 1 μ g ต่อหลุม และความเข้มข้นของ oligonucleotideprobe ที่แตกต่างกัน	45
<u>รูปที่ 20</u> ภาพแสดงการทดสอบหาปัจจัยเกิดการจับแบบไม่จำเพาะจากการทำ indirectELISA	46

คำนำ

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับ 2 ในสตรีไทย และก็ยังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก ในสหรัฐอเมริกาตัวเลขของปี ค.ศ. 2007 ตามรายงานของ CDC พบมะเร็งปากมดลูกรายใหม่จำนวน 12,280 ราย และมีผู้เสียชีวิตจากมะเร็งชนิดนี้จำนวน 4021 ราย สำหรับประเทศไทยตามสถิติของปี พ.ศ. 2546 จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติพบอัตราอุบัติการณ์ปรับมาตรฐานตามอายุ (age-standardized incidence rate) เท่ากับ 18.1 ต่อประชากร 100,000 คน-ปี คาดว่าในปี พ.ศ. 2551 จะมีจำนวนคนไข้มะเร็งปากมดลูกรายใหม่ ประมาณ 8000 คน โดยที่ครึ่งหนึ่งของจำนวนนี้จะเสียชีวิต แม้ว่าจะเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์และอัตราการเสียชีวิตสูง แต่มะเร็งปากมดลูก เป็นโรคที่สามารถป้องกันได้ง่าย หากตรวจพบความผิดปกติและให้การรักษาก่อนที่โรคร้ายได้ลุกลามตั้งแต่ระยะเริ่มต้นก่อนการเจริญเป็นมะเร็งของเนื้อเยื่อ โดยอาศัยระบบการตรวจคัดกรอง และการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ การตรวจเซลล์วิทยาปากมดลูกแบบดั้งเดิมด้วยเทคนิค Papanicolaou smear (Pap smear) เป็นเทคนิคสากลที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายในการใช้ตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกมาแล้วมากกว่า 50 ปี โดยมีหลักฐานยืนยันจากข้อมูลทางระบาดวิทยาที่แสดงอย่างชัดเจนว่า อุบัติการณ์และอัตราการตายของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ในกลุ่มประชากรที่ได้รับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกด้วยการตรวจทางเซลล์วิทยาที่มีระบบการจัดการที่ดีและมีความครอบคลุมจะมีแนวโน้มลดลงอย่างมาก (1-4)

ปัจจุบันมะเร็งปากมดลูก(Cervical cancer) นับเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขที่มีอุบัติการณ์ผู้ป่วยรายใหม่ทั่วโลกมากกว่า 500,000 รายต่อปี ในจำนวนนี้พบอัตราการเสียชีวิตได้สูงถึง 50% โดยมากกว่า 80 % ของผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกทั้งหมดพบอยู่ในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนากลุ่มประเทศในทวีปแอฟริกา อเมริกาใต้ เอเชียใต้-กลาง (5-7) แม้ว่าเทคนิคการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค Pap smear และเทคนิคการตรวจ DNA ของเชื้อไวรัส HPV จะใช้ได้ผลเป็นอย่างดีในการควบคุมอุบัติการณ์การเกิดโรคในประชากรกลุ่มประเทศแถบตะวันตกและกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว (8-10) แต่เทคนิคการตรวจคัดกรองเหล่านี้กลับใช้ไม่ได้ผลดีเท่าที่ควรในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย (6, 7, 11) เกิดจากสาเหตุที่สำคัญ ได้แก่ การขาดแคลนทรัพยากรและบุคลากรทางสาธารณสุขหรือมีระบบการตรวจคัดกรองแต่ไม่สามารถจัดการได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากข้อจำกัดเรื่องความไวและความจำเพาะของเทคนิคการตรวจคัดกรองที่ใช้ ความแตกต่างของสภาพสังคมและวัฒนธรรมรวมถึงความรู้ความเข้าใจของประชาชนในการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกมีข้อมูลที่ได้รับการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์อย่างชัดเจนว่า สาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูก 90-99.7% เกิดจากการติดเชื้อ Human papilloma virus (HPV) ซึ่งจัดเป็นเชื้อไวรัสที่สามารถติดต่อทางเพศสัมพันธ์ (Sexual transmitted disease) HPV เป็นไวรัสใน Family Papillomaviridae เชื้อ HPV ที่ก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูกเรียกว่า HPV กลุ่มเสี่ยงสูง ประกอบด้วย HPV สายพันธุ์ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 61, 66 และ 68 โดยที่พบ HPV สายพันธุ์ 16 มากที่สุดประมาณร้อยละ 55 และเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพการก่อมะเร็งที่สูงที่สุด รองลงมาคือสายพันธุ์ 18 พบได้ประมาณร้อยละ 13 (5) เชื้อ HPV เป็นไวรัสชนิด DNA สายคู่ อยู่ภายในเปลือกหุ้มโปรตีนที่เรียกว่า capsid บนสาย DNA ประกอบด้วยส่วนของยีนที่เรียกว่า บริเวณ early gene (E gene) ซึ่ง protein E1, E2, E5, E6 และ E7 จากยีนเหล่านี้สำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสและการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซลล์ และส่วนที่เป็นบริเวณ Late gene ซึ่งแบ่งเป็น L1 และ L2 เชื้อ HPV เป็นไวรัสที่ติดเชื้อเยื่อบุผิวแบบเจาะจงชนิดเซลล์ การติดเชื้อสามารถเกิดจากการสัมผัสกับไวรัสที่หลุดออกมาจากเซลล์ที่ติดเชื้อที่หลุดลอก การ integration ของ HPV ชนิด

ก่อมะเร็งเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านจะสัมพันธ์กับความไม่เสถียรของ chromosome (6) และการแสดงตัวมากกว่าปกติ (7, 8) ของ oncoprotein E6 และ E7 นำไปสู่การสูญเสียการทำหน้าที่ของ P53 เนื่องจากไปจับกับ E6 ทำให้เกิดความล้มเหลวของกระบวนการยับยั้งการเจริญของเซลล์ (9) และการสูญเสียการส่งสัญญาณให้เซลล์ตาย (10-12) ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนและเป็นอมตะ

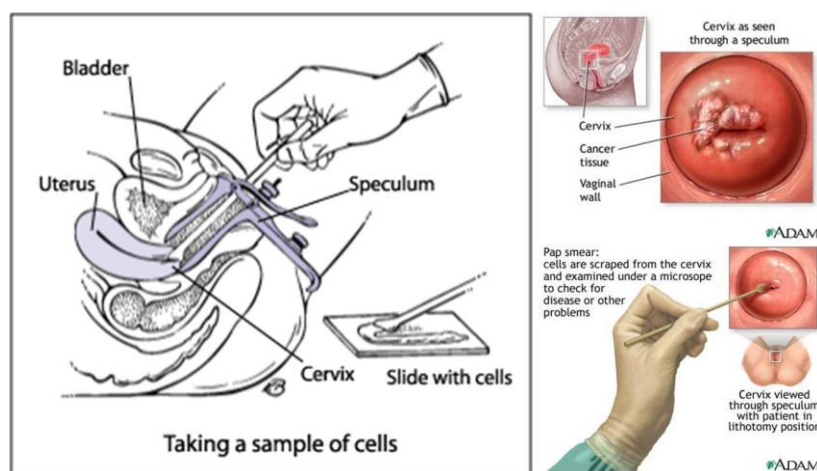
มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่ป้องกันได้ โดยวิธีการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกด้วย วิธีการตรวจทางเซลล์วิทยาปากมดลูก ซึ่งพิสูจน์แล้วว่ามีประสิทธิภาพในการลดอุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูก แต่การจะบรรลุถึงประสิทธิภาพที่เทียบเท่ากับประเทศที่พัฒนาแล้วต้องมีเงื่อนไขสำคัญ คือ การจัดตั้งระบบการตรวจคัดกรองอย่างเป็นระบบ และสามารถครอบคลุมประชากรสตรีกลุ่มเป้าหมาย ได้กว้างขวางพอ การจะเกิดเงื่อนไขดังกล่าวได้ต้องอาศัยปัจจัยสำคัญ คือบุคคลากรโดยเฉพาะนักเทคนิคเซลล์วิทยาและพยาธิแพทย์ที่เพียงพอ ในประเทศไทย ปัจจัยเกี่ยวกับบุคคลากรกลุ่มนี้เป็นปัญหาใหญ่ และถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีการนำการตรวจหา HPV DNA ชนิดก่อมะเร็งมาร่วมในการตรวจคัดกรอง แต่วิธีการดังกล่าวโดยตัวมันเองมีจุดด้อยสำคัญ คือ ราคาแพง และมีผลบวกสูง ดังนั้นถ้ามีวิธีการตรวจคัดกรองขั้นแรกที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก ราคาถูกและไม่ต้องพึ่งพาศูนย์กลางที่มีความชำนาญเฉพาะ เพื่อคัดกรองเอากลุ่มประชากรที่มีความเสี่ยงสูงไปคัดกรองตัว ยวิธีการตรวจคัดกรองมาตรฐานที่มีอยู่เดิม จะทำให้มีปริมาณงานเหมาะสมกับบุคคลากรและทรัพยากรที่สามารถรองรับส่วนนี้ได้ ก็น่าจะทำให้โครงการป้องกันมะเร็งปากมดลูกของประเทศไทยบรรลุเป้าหมายได้เร็วขึ้นและเหมาะสมกับสภาพของประเทศ จากปัญหาที่กล่าวข้างต้น จึงทำให้เกิดแนวคิดที่จะพัฒนาชุดตรวจคัดกรองที่มีความเหมาะสมมากขึ้นโดยจะทำการพัฒนาชุดตรวจแอนติเจนของไวรัส HPV ในผู้ป่วยด้วยการประยุกต์ใช้อุปกรณ์นาโนทองคำที่มีการตรวจไม่ซับซ้อน แปรผลได้เร็ว โดยคณะวิจัยได้ดำเนินการศึกษาสถิติการตรวจพบแอนติเจนของไวรัส HPV แนวทางการพัฒนาด้านแบบห้องปฏิบัติการของชุดตรวจ และได้เตรียมแอนติเจน อุปกรณ์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องรวมถึงตัวอย่างจากผู้ป่วยที่จะทำการทดสอบในการดำเนินการของโครงการในปีแรกของโครงการแล้ว ในโครงการที่นำเสนอในปีงบประมาณนี้ ผู้วิจัยจะทำการพัฒนาและทดสอบชุดตรวจที่พัฒนาได้และทำการพัฒนาการตรวจ เมธิลเลชั่นของยีน L1 ของเชื้อแบคทีเรียที่มีความเสี่ยงสูงเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพกับการดำเนินโรคร่วมด้วย

งานวิจัยที่จะพัฒนาขึ้นนี้ถือว่าครอบคลุมการตรวจคัดกรองผู้ป่วย การวินิจฉัย การติดตามการรักษาและพยากรณ์โรค กล่าวคือ การพัฒนาชุดตรวจแอนติเจนของไวรัส HPV ในผู้ป่วยด้วยการประยุกต์ใช้อุปกรณ์นาโนทองคำที่มีการตรวจไม่ซับซ้อนแปรผลได้เร็วร่วมกับการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเป็นไปได้ในการตรวจเมธิลเลชั่น ของยีน L1 ของ HPV จะเป็นการเพิ่มศักยภาพและความน่าเชื่อถือสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งและรักษา มะเร็งปากมดลูก อันจะทำให้ลดอัตราการเสียชีวิตประชากรหญิง และลดค่าใช้จ่ายของประเทศชาติได้เป็นจำนวน มากจากโรคมะเร็งปากมดลูก

ทฤษฎี สมมติฐานและ/หรือ กรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 2 ในสตรีไทย และก็ยังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข ในหลายประเทศทั่วโลก ในสหรัฐอเมริกาตัวเลขของปี ค.ศ. 2007 ตามรายงานของ CDC พบมะเร็งปากมดลูก รายใหม่จำนวน 12,280 ราย และมีผู้เสียชีวิตจากมะเร็งชนิดนี้จำนวน 4021 ราย (9) สำหรับประเทศไทยตามสถิติ ของปี พ.ศ. 2546 จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติพบอัตราอุบัติการณ์ปรับมาตรฐานตามอายุ (age-standardized

incidence rate) เท่ากับ 18.1 ต่อประชากร 100,000 คน-ปี คาดว่าในปี พ.ศ. 2551 จะมีจำนวนคนไข้มะเร็งปากมดลูกรายใหม่ ประมาณ 8000 คน โดยที่ครึ่งหนึ่งของจำนวนนี้จะเสียชีวิต แม้ว่าจะเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์และอัตราการเสียชีวิตสูง แต่มะเร็งปากมดลูก เป็นโรคที่สามารถป้องกันได้ง่าย หากตรวจพบความผิดปกติและให้การรักษากำจัดรอยโรคได้ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นก่อนการเจริญเป็นมะเร็งของเนื้อเยื่อ โดยอาศัยระบบการตรวจคัดกรอง และการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ การตรวจเซลล์วิทยาปากมดลูกแบบดั้งเดิมด้วยเทคนิค Papanicolaou smear (Pap smear) โดยใช้อุปกรณ์ขยายปากมดลูก (speculum) แล้วเก็บเซลล์จากปากมดลูกด้วย Spatula บ้ายบนกระจกสไลด์ ขั้นตอนการเตรียมสไลด์และบริเวณที่ทำการเก็บเซลล์แสดงใน รูปที่ 1 เทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคสากลที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายในการใช้ตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกมาแล้วมากกว่า 50 ปี โดยมีหลักฐานยืนยันจากข้อมูลทางระบาดวิทยาที่แสดงอย่างชัดเจนว่า อุบัติการณ์และอัตราการตายของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ในกลุ่มประชากรที่ได้รับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกด้วยการตรวจทางเซลล์วิทยาที่มีระบบการจัดการที่ดีและมีความครอบคลุมจะมีแนวโน้มลดลงอย่างมาก (9-12)



รูปที่ 1 วิธีการเตรียมสไลด์โดยใช้อุปกรณ์ขยายปากมดลูก (Speculum) และการเก็บตัวอย่างเซลล์จากรอยโรคด้วย Spatula (ช้อน), บริเวณที่สามารถตรวจพบรอยโรคระยะเริ่มต้นก่อนเกิดมะเร็งปากมดลูก (ขวาบน) และบริเวณที่เก็บตัวอย่างเซลล์ (ขวาล่าง) (13, 14)

อย่างไรก็ตามการตรวจทางเซลล์วิทยาปากมดลูกมีข้อจำกัดที่สำคัญด้านความไวของเทคนิคการตรวจ ซึ่งมีความผิดพลาดได้มากจากตัวแปรที่สำคัญหลายประการตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเซลล์จากผู้ป่วยที่แพทย์อาจไม่สามารถเก็บเซลล์ที่ผิดปกติได้หากบริเวณรอยโรคมีขนาดเล็กหรือ อยู่ในบริเวณที่เก็บตัวอย่างเซลล์ได้ยาก , ขั้นตอนการเตรียมและย้อมสไลด์ซึ่งอาจพบบริเวณที่มีเซลล์หนาทับซ้อนกันหลายชั้นและอาจมีการปนเปื้อนของเยื่อเมือก เลือด รวมถึงอนุภาคปนเปื้อนอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้การตรวจหาเซลล์ผิดปกติที่อาจมีจำนวนเพียงเล็กน้อยในเซลล์ที่ปกติจำนวนมากเป็นแสนเซลล์บนสไลด์ จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้นุ้บุคลากรทางสาธารณสุขที่มีความเชี่ยวชาญเป็นอย่างดีในการเก็บ เตรียม และตรวจวินิจฉัยสิ่งส่งตรวจ (15-17) จากข้อจำกัดดังกล่าวทำให้ Pap smear เป็นเทคนิคที่มีความไวต่ำ การจะนำมาใช้สำหรับตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกให้ได้ผลผู้ป่วยจำเป็นต้องมาตรวจซ้ำอย่างสม่ำเสมอทุก 2 ปี ต้องใช้งบประมาณและบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญในการบริหารจัดการสูง แม้ว่าจะมีการพัฒนาเทคนิคการเก็บเตรียมเซลล์บนพื้นฐานของของเหลว (liquid based cytology;

LBC) ซึ่งสามารถเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเซลล์ ผิดปกติในตัวอย่างตรวจได้ให้กับการทำ pap test แต่ความไว (sensitivity) ในการตรวจพบเซลล์ผิดปกติชนิด (High grade squamous intraepithelial lesion; HSIL) จากการเตรียมสไลด์ด้วยเทคนิคทั้งสองยังไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (18-20) การแปลผลการตรวจวินิจฉัย ยังต้องอาศัยประสบการณ์และความสามารถของผู้ตรวจเป็นสำคัญ ส่งผลให้เกิดความแปรปรวนในการแปลผล ตรวจระหว่างครั้งหรือระหว่างบุคคลสูง (inter-intra observer variations) ขาดความน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ยังทำให้ระบบการตรวจคัดกรองมีค่าใช้จ่ายสูงขึ้นและยังมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นอีก ในอนาคต ทำให้ในระยะหลังได้เกิด ความสนใจที่จะปรับปรุงโครงการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก ให้มีค่าใช้จ่ายลดลง และมีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยการอาศัยความรู้เกี่ยวกับเชื้อ Human papillomavirus (HPV) สาเหตุของมะเร็งปากมดลูกและเทคโนโลยีทาง ชีวโมเลกุลวิทยา

Human Papillomavirus (HPV) เป็นไวรัสจัดอยู่ใน *Family Papillomaviridae* มีขนาด 52-55 นาโน เมตร ไม่มีเอนVELOP มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอวงกลมขนาดประมาณ 8,000 เบส ประกอบด้วยโปรตีนที่เป็นโครงสร้าง ประมาณร้อยละ 88 โดยมีโครงสร้างจีโนมแบ่งออกเป็น 3 ส่วนดังนี้ (21-23)

1. Early region เป็นบริเวณที่มียีนควบคุมการสร้างโปรตีน ซึ่งประกอบไปด้วย E1,E2,E4,E5,E6 และ E7 โดย E1- E4 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไวรัส และการสร้างไวรัสตัว ใหม่ ส่วน E5-E7 เป็นโปรตีนที่ก่อให้เกิดมะเร็ง หรือเรียกว่า oncoprotein ซึ่งมีความสำคัญอย่างมาก ในการก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก โดยเฉพาะ E6 และ E7
2. Late region เป็นบริเวณที่มียีนควบคุมการสร้างโปรตีนประกอบด้วย L1 และ L2 ซึ่งเป็น ส่วนประกอบของแคปซิดโปรตีนของไวรัส โดยพบว่า L1 เป็นส่วนที่มีความเหมือนกันมากที่สุดในการ เชื้อ HPV แต่ละไทป์และเป็นชิ้นส่วนที่สำคัญในการนำมาพัฒนาผลิตวัคซีน
3. Upper regulatory region (URR) เป็นบริเวณที่ไม่มียีนควบคุมการสร้างโปรตีน แต่เป็นบริเวณที่ สามารถจับได้กับ repressors และ activators ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน

จากการศึกษาพบว่า HPV เป็นสาเหตุก่อโรคมะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer) โดยมากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยจะพบดีเอ็นเอของเชื้อ HPV (HPV DNA) (24) อย่างไรก็ตามเชื้อ HPV เป็นเชื้อติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่ ตรวจพบได้ทั่วไปในกลุ่มประชากร แม้ว่าเกือบทั้งหมดของผู้ป่วยที่ตรวจพบรอยโรคของมะเร็งปากมดลูกระยะต่างๆ จะพบการติดเชื้อ HPV ร่วมด้วย แต่จากการศึกษาในจำนวนผู้ป่วยที่ตรวจพบการติดเชื้อ HPV ทั้งหมด มีเพียงส่วน น้อยเท่านั้นที่ตรวจพบรอยโรคระยะเริ่มต้นก่อนเกิดมะเร็งหรือรอยโรคของมะเร็งปากมดลูกด้วย Pap smear หรือ เทคนิคทางพยาธิวิทยา (25, 26) ดังนั้นจึงนิยมใช้เทคนิคการตรวจหาดีเอ็นเอของ เชื้อ HPV ที่มีความไวสูง มาใช้ ร่วมกับการตรวจ Pap smear เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจคัดกรอง โดยพบว่าการใช้เทคนิคทั้งสองร่วมกัน สามารถลดความถี่ของการนัดตรวจซ้ำในกระบวนการตรวจคัดกรองได้เป็นอย่างน้อย 3 ปีต่อครั้งซึ่งจะเป็นลด งบประมาณในการตรวจคัดกรองลงเป็นจำนวนมาก

ปัจจุบันมี HPV มากกว่า 100 ชนิด ซึ่งแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่โดยอาศัยคุณสมบัติในการก่อให้เกิดมะเร็ง ปากมดลูก หรือ ความเสี่ยงในการก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก ดังนี้ (27)

1. HPV types ที่มีความเสี่ยงสูง (high risk) ได้แก่ ไทป์ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 และ 82
2. HPV types ที่มีความเสี่ยงต่ำ (low risk) ได้แก่ ไทป์ 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 และ CP6108

ในกลุ่มที่เป็น high risk พบว่า HPV type 16 และ HPV type 18 มีความสำคัญต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูก (Cervical carcinoma) มากที่สุดโดยมากกว่าร้อยละ 50 ของ squamous cell carcinoma พบ HPV-16 DNA และมากกว่าร้อยละ 50 ของ AD พบ HPV-18 DNA (22, 27-32)

การติดเชื้อไวรัสแปปิโลมาเกิดจากการสัมผัสโดยตรงกับ บริเวณรอยโรค การมีเพศสัมพันธ์เป็นช่องทางหนึ่งของการติดเชื้อ โรคติดเชื้อไวรัสแปปิโลมา จึงเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ การติดเชื้อไวรัสแปปิโลมาโดยทั่วไปพบว่าสามารถหายได้เอง ซึ่งส่วนใหญ่สารพันธุกรรมของไวรัสจะอยู่ในลักษณะ Extrachromosomal stage เรียกการติดเชื้อแบบนี้ว่า Transient or intermittent infection ซึ่งในระยะนี้อาจมีการสร้างอนุภาคไวรัสอย่างต่อเนื่อง แต่บางครั้งไวรัสแปปิโลมาสามารถคงอยู่ในเซลล์ติดเชื้อได้นาน และทำให้เกิดการสอดแทรกสารพันธุกรรมของไวรัสเข้าไปในสารพันธุกรรมของเซลล์โฮสต์ เป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเซลล์ตามมา เรียกการติดเชื้อนี้ว่า Persistent infection ซึ่งการติดเชื้อแบบนี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็ง มีการศึกษาหาความสัมพันธ์และความชุกของไวรัสแต่ละไทป์ในรอยโรคแต่ละชนิด โดยเฉพาะโรคมะเร็งปากมดลูกนั้นพบว่าไวรัสแปปิโลมาที่เป็นสาเหตุก่อโรคร้อยละประมาณ 30 ชนิด และที่ตรวจพบมีความชุกมากที่สุดคือ HPV-16 พบประมาณร้อยละ 50 ข้อมูลของผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ พบ HPV-DNA ร้อยละ 82 ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก โดยร้อยละ 42.68 เป็น HPV-16 ร้อยละ 20.73 เป็น HPV-18 และ พบ HPV-33 เพียงร้อยละ 3.66 (33) ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยระยะก่อนมะเร็ง Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) I, II, III พบ HPV-DNA ร้อยละ 33.3, 36.8, 75 ตามลำดับ โดยในระยะ CIN III พบ HPV-16 ร้อยละ 44.44 และ HPV-18 ร้อยละ 16.05 กลุ่มควบคุมพบ HPV-DNA เพียงร้อยละ 2.7 เท่านั้น (34)

กลไกที่ทำให้เซลล์ติดเชื้อกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ มีรายงานพบว่าเซลล์ติดเชื้อไวรัสแปปิโลมาที่กลายเป็นเซลล์มะเร็งนั้น สารพันธุกรรมของไวรัสมักพบสอดแทรก (integration) อยู่กับสารพันธุกรรมของเซลล์โฮสต์และมีจำนวน copy number สูงและในภาวะดังกล่าวมักไม่พบมีการเพิ่มจำนวนของไวรัสหรือมีก๊อปปี้ต่ำมาก แต่มีการสร้าง Early protein โดยเฉพาะ E6 และ E7 ในระดับสูง ซึ่งปัจจุบันจัดโปรตีนทั้ง 2 ตัวนี้เป็นสารก่อมะเร็ง (oncoprotein) โดย E7 สามารถทำให้เซลล์เจริญได้อย่างต่อเนื่องและไม่ตาย (immortalized cell) เพราะ E7 สามารถจับกับ pRB ทำให้ E2F ซึ่งเป็น Transcriptional factor เป็นอิสระ ไปกระตุ้นให้มีขบวนการ Transcription มีผลให้เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนได้ pRB เป็น tumor suppressor ตัวหนึ่งซึ่งตามปกติจะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ระยะ G1 (35) นอกจากนี้ E6 ก็มีคุณสมบัติจับกับ tumor suppressor p53 ซึ่งโดยปกติ p53 จะจับกับ p21 กระตุ้นขบวนการ apoptosis (program cell death) การที่ E6 จับกับ p53 ทำให้ยับยั้งขบวนการดังกล่าว ทำให้เซลล์ขาดระบบควบคุมและเกิดการ transformation ของเซลล์ (36) คุณสมบัติที่กล่าวมานี้พบได้ในกลุ่มเสี่ยงสูง ได้แก่ HPV-16, 18 คุณสมบัติของโปรตีน E6 และ E7 ของไวรัสแปปิโลมาไทป์อื่น ๆ พบว่าแตกต่างกันไป ในกลุ่มเสี่ยงต่ำ พบว่า E6 และ E7 ไม่สามารถจับเกาะกับ p53 และ pRB ได้ หรือบางครั้งจับได้แต่หลวมและไม่สามารถยับยั้งคุณสมบัติของโปรตีนทั้งสองชนิดได้ ส่วน E5 พบว่านอกจากมีคุณสมบัติยับยั้ง

ขบวนการ apoptosis โดยไปยับยั้งการกระตุ้นของ TRAIL ผ่าน death-inducing signal complex (37) แล้ว ยังสามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนและมี differentiation ของ keratinocytes ด้วย (38)

โรคมะเร็งปากมดลูกเป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับสองในผู้หญิงทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งพบว่าอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งปากมดลูกเพิ่มสูงขึ้น (39) องค์การอนามัยโลกประมาณการว่าในปัจจุบันมีผู้หญิงมากกว่า 2 ล้านคนที่เป็นมะเร็งปากมดลูก และมีการตรวจพบมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ 470,000 รายทุกปี ดังนั้น จึงพบผู้ป่วยรายใหม่ 1,200 รายในแต่ละวัน ส่วนประเทศไทย พบว่ามีการตรวจพบมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ในแต่ละปีกว่า 6,000 ราย และในจำนวนนี้ประมาณครึ่งหนึ่งจะเสียชีวิต จากโรคนี้อย่างเฉลี่ย 7 รายต่อวัน

ปัจจุบันวิธีการตรวจหามะเร็งปากมดลูกมีดังนี้ (40, 41)

1. การตรวจเซลล์ทาง cytology ได้แก่การตรวจ Papanicolaou smear (Pap smear) วิธีนี้ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญ ในการตรวจเพื่อดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตั้งแต่เป็น dysplasia จนกลายเป็นเซลล์มะเร็งซึ่งถ้าไม่ชำนาญอาจมีความผิดพลาดในการอ่านและแปลผลได้ง่าย
2. การตรวจหา HPV DNA โดยเทคนิคทางด้านอณูโมเลกุล (molecular detection) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจที่มีความจำเพาะและความไวสูงกว่าการตรวจ Pap smear แต่วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูงและมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ต้องอาศัยบุคลากรที่ได้รับการอบรมความชำนาญของเทคนิคมาก่อน นอกจากนี้การตรวจพบ HPV DNA ไม่ได้เป็นข้อบ่งชี้ว่าเป็นเซลล์มะเร็ง การบ่งชี้ยังต้องอาศัยการอ่านผลทางเซลล์พยาธิวิทยา
3. การตรวจโดยวิธี Visual Inspection with Acetic acid(VIA) โดยใช้ใช้น้ำยา acetic acid เจือจาง 3-5%ป้ายลงบนบริเวณปากมดลูก แล้วสังเกตดูการเปลี่ยนแปลงของสีของปากมดลูกหลังจากป้ายน้ำยา 1 นาทีภายใต้แสงไฟที่ส่องสว่าง โดยเซลล์ที่มีความผิดปกติจะมีปริมาณโปรตีนที่มากกว่าปกติ และน้ำยา acetic acid จะไปทำให้โปรตีนในเซลล์เกิดเกาะกลุ่ม เมื่อแสงไฟตกกระทบจะไม่สามารถผ่านไปได้จึงเกิดการสะท้อนแสงทำให้เห็นเป็นฝ้าขาว (acetowhite) ซึ่งเกิดขึ้นชั่วคราวซึ่งเห็นได้ด้วยตาเปล่า ให้ผลบวก แต่เซลล์ปกติแสงจะผ่านเซลล์ได้ทำให้ได้เห็นเป็นสีแดงของเส้นเลือดฝอย ซึ่งมีการศึกษาในประเทศไทยพบว่าการได้ผล VIA ได้ผลบวกสามารถพบได้ในเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูกที่อยู่ในช่วงมีการซ่อมแซม หรือมีการอักเสบ อาจทำให้เกิดเป็นฝ้าขาวได้
4. การตรวจ HPV mRNA โดยใช้หลักการ target amplification เช่น The APTIMA HPV Assay เพื่อตรวจ E6/E7 mRNA ของไวรัสในกลุ่มความเสี่ยงสูง 14 ชนิด ได้แก่ HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, และ 68 และอีก 2 การทดสอบ ได้แก่ PreTect HPV-Proofer และ NucliSENS Easy Q HPV ใช้หลักการ nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) โดยใช้อุณหภูมิเดียวเพื่อ ตรวจ E6/E7 mRNA แบบ RNA real-time amplification และสามารถตรวจเชื้อไวรัสในกลุ่ม HR-HPV ได้ 5 ชนิด (16, 18, 31, 33, และ 45) ซึ่งวิธีนี้มีความจำเพาะที่สูงกว่าการตรวจ HPV DNA แต่อย่างไรก็ตามการตรวจ HPV mRNA ยังต้องมีการใช้เครื่องมือราคาสูงในการตรวจ
5. การตรวจการแสดงออกของโปรตีน L1 ของเชื้อ Human papillomavirus และการตรวจโปรตีนของโฮสต์คือ p16 และ Ki67 โดยวิธี immunocyto/histostaining สำหรับการแปลผลโปรตีน

Human papillomavirus L1 (Cytoactive) ดังนี้ ถ้าหากมีการตรวจพบ L1 จะสัมพันธ์กับเซลล์ผิดปกติในระดับ LSIL/CIN1 และจะสัมพันธ์กับการมีอัตราการกำจัดเซลล์ผิดปกติให้หายไปได้ถึงร้อยละ 72 เรียกว่า ภาวะ spontaneous regression สำหรับการตรวจโปรตีน p16/Ki67 (CINtec PLUS kit, Roche) พบว่าโปรตีน p16 จะพบสูงขึ้นในกรณีการติดเชื้อ HR-HPV และ Ki67 เป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การตรวจพบโปรตีน p16/Ki67 เป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะการมีเซลล์ผิดปกติและการพบเซลล์มะเร็งสองการทดสอบนี้ยังไม่มีนำมาใช้ในงานประจำในประเทศไทย

จากที่กล่าวมาข้างต้น ถ้าสามารถตรวจคัดกรองหา HPV พร้อมทั้งบ่งชี้ความเป็นได้ที่จะพบเซลล์มะเร็งได้อย่างรวดเร็วจะเป็นผลดีต่อการป้องกันและรักษา ซึ่งปัจจุบันวิธีการตรวจตรวจหา HPV ส่วนใหญ่เป็นการตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสซึ่งมีขั้นตอนในการทำที่ยุ่งยากทั้งยังต้องใช้เครื่องมือเฉพาะและไม่สามารถทำได้ในทุกห้องปฏิบัติการ จึงนำมาสู่การพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองหา HPV โดยการตรวจหาแอนติเจนของตัวไวรัสแทนการตรวจหาดีเอ็นเอ ซึ่งการตรวจหาแอนติเจนมีข้อดีคือทำให้ทราบว่าไวรัสมีการ reproductive อยู่ และยังเป็นการลดขั้นตอนของการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งปัจจุบันการตรวจหาแอนติเจนของ HPV ยังไม่มี อาจเพราะด้วยข้อจำกัดของปริมาณแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจที่มีน้อยมาก ทำให้ไม่สามารถตรวจหาได้ด้วยวิธีการตรวจในปัจจุบัน จากข้อจำกัดนี้จึงคิดนำการใช้นาโนเทคโนโลยีเข้ามาช่วยในการพัฒนาการตรวจหาแอนติเจนของ HPV ซึ่งในการวิจัยนี้จะทำการวิจัยพัฒนาชุดตรวจหาแอนติเจนของ HPV-16 ซึ่งเป็นชนิดที่มีความเสี่ยงสูงและพบมากในประเทศไทย (42-45) โดยการตรวจหาแอนติเจนโปรตีน E6 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งได้และมักจะแสดงออกเมื่อเซลล์จะกลายเป็นมะเร็ง (30) โดยอาศัยอนุภาคนาโนทองคำในการช่วยให้เห็นปฏิกิริยาได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ด้วยคุณสมบัติในเรื่องขนาดที่เล็กระดับนาโนอีกทั้งการดูดกลืน แสงและกระจายแสงได้ดีเมื่อมีขนาดของอนุภาคเปลี่ยนไป (30) จึงทำให้อนุภาคนาโนทองคำเป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในด้านการตรวจวินิจฉัย อาทิเช่น งานทางด้านจุลชีววิทยา (30, 46-52) กล่าวคือ มีการนำอนุภาคนาโนทองคำเชื่อมติดกับแอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* เพื่อการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร ซึ่งวิธีการตรวจนี้ให้ผลความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 และเป็นการตรวจโดยตรงไม่ต้องผ่านการเพาะเชื้อก่อนเหมือนกับวิธีอื่นๆ (53) รวมทั้งการตรวจหา p24 แอนติเจนของเชื้อไวรัสเอชไอวี พบว่าให้ความไวเพิ่มขึ้น 150 เท่าเมื่อเทียบกับวิธี ELISA , ปริมาณเชื้อน้อยที่สุดที่สามารถตรวจได้คือ 0.1 pg/ml และยังสามารถตรวจพบแอนติเจนได้เร็วกว่าวิธี ELISA 3 วัน (54) นอกจากนี้ยังมีการใช้อนุภาคนาโนทองคำในการตรวจหาเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น การตรวจหา respiratory syncytial virus (RSV) ในสิ่งส่งตรวจโดยการเชื่อมอนุภาคนาโนกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี ซึ่งให้ผลเร็ว และจำเพาะ ทั้งยังเพิ่มความไวในการตรวจด้วย (55), การตรวจหา Avian flu virus พบว่าสามารถตรวจพบได้แม้มีปริมาณเชื้อที่น้อย 0.0005 HAU/ml (56), หรือการตรวจหา Adenovirus พบว่ามีความไวในการตรวจเพิ่มขึ้น 800 เท่าเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน (57)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้คิดค้นเพื่อพัฒนาการตรวจโรคโดยแบบรวดเร็วโดยการตรวจเมธิลเลชั่นของยีน L1 ด้วยเทคนิค ELISA และโดยอาศัยการตรวจหาแอนติเจน ชนิด E6 ของ HPV-16 ด้วยอนุภาคนาโนทองคำที่เชื่อมกับแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน E6 และสังเกตผลปฏิกิริยาการรวมกลุ่มระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวมีผลให้อนุภาคนาโนทองคำจับรวมกลุ่มกัน ทำให้ขนาดอนุภาคเปลี่ยนแปลงและการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าคือ มีการเปลี่ยนแปลงสี ของสารละลาย และเกิดการจับกลุ่มตกตะกอนของอนุภาคนาโนทองคำ ซึ่งเป็นหลักการที่เคยมีผู้ทำการวิจัยกับเชื้อ ชนิดอื่นมาก่อน (58-60) วิธีที่

พัฒนาขึ้นนั้นเป็นเพียงงานวิจัยนำร่อง ต้องนำมาทดสอบกับตัวอย่างผู้ป่วยระยะต่าง ๆ เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของการตรวจพบแอนติเจนทั้งสองชนิด นอกจากนี้ เพื่อพัฒนาวิธีการให้ง่ายต่อการนำไปตรวจในสนามจึงจะพัฒนาวิธีการตรวจโดยอาศัยหลักการ Lateral flow immunochromatography ซึ่งเป็นหลักการตรวจเดียวกับการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ที่มีการพัฒนาเป็นแถบทดสอบเรียบร้อยแล้ว โดยใช้เวลาตรวจประมาณ 15 นาที แพทย์สามารถทำการตรวจข้างเตียงผู้ป่วยและนำผลมาใช้เพื่อการวินิจฉัยโรคและวางแผนการดูแลรักษาคนผู้ป่วยได้อย่างเหมาะสมทันที

จะเห็นได้ว่าแผนงานวิจัยนี้ได้มีการวิจัยตั้งแต่ต้นน้ำจนถึงปลายน้ำ กล่าวคือมีการตรวจคัดแยกมะเร็งปากมดลูกตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นจากชิ้นเนื้อและข้อมูล ทางด้านพันธุกรรมศาสตร์มาช่วยในการคัดแยกชนิด เพื่อการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ประกอบด้วยโครงการย่อย 2 โครงการที่มุ่งผลิิตชุดตรวจคัดกรองสำเร็จรูปสำหรับตรวจเชื้อไวรัสเอปปีโลมาซึ่งเป็นสาเหตุของการก่อโรคมะเร็งปากมดลูกในราคาที่ถูกลงและให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว ไม่ซับซ้อนสามารถนำไปใช้ได้ทั้งในภาคสนามหรือสถานพยาบาลที่ห่างไกลได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์กับผู้ป่วยอย่างเห็นเป็นรูปธรรม และช่วยลดปัญหาด้านสาธารณสุขและงบประมาณที่ต้องสูญเสียไปของประเทศลงได้อย่างมาก

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจน E6 ของ HPV-16 โดยอาศัยอนุภาคนาโนทองคำที่สามารถตรวจได้รวดเร็ว และเปรียบเทียบผลการตรวจหาแอนติเจน E6 กับการตรวจ HPV-DNA และไทป์ของไวรัส และผลทางเซลล์พยาธิ
2. เพื่อพัฒนาการตรวจเมธิลเลชั่นของยีน L1 ของเชื้อเอปปีโลมาที่มีความเสี่ยงสูงโดยวิธี Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) ในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติระยะต่างๆ ได้แก่ normal cervixes, cervical intraepithelial neoplasia (CIN)-1, CIN-2/CIN-3 และ squamous cell carcinoma เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจเมธิลเลชั่นของยีน L1 ของเชื้อเอปปีโลมาเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพกับการดำเนินโรค

โครงการย่อยที่ 1

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การพัฒนาวิธีการตรวจวัดเร็วเพื่อหาแอนติเจนของไวรัสแปปิโลมาที่สัมพันธ์กับ
ระยะการพัฒนากลายเป็นมะเร็งโดยใช้อนุภาคนาโนทองคำ

(ภาษาอังกฤษ) Development of rapid method for detection of Human
Papillomavirus antigen related to Cancer Progression using
nanogold particle

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจน E6 ของ HPV-16 ด้วยวิธีรวดเร็วโดยอาศัยอนุภาคนาโนทองคำ
2. เปรียบเทียบผลการตรวจหาแอนติเจน E6 กับการตรวจ HPV-DNA และไทป์ของไวรัส และผลทางเซลล์
พยาธิ

วิธีดำเนินการวิจัยและผลการทดลอง

1. การผลิตโปรตีน HPV16 E6 และการทำให้บริสุทธิ์

- 1.1. วัสดุและน้ำยาที่ใช้ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 วัสดุและน้ำยาที่ใช้ในการผลิตโปรตีน HPV16 E6 บริสุทธิ์

ชนิดวัสดุ/น้ำยา	ความเข้มข้น	บริษัท
LB broth	20 กรัม / 1 ลิตร DW	Titan Biotech Ltd., India
LB agar	40 กรัม / 1 ลิตร DW	Titan Biotech Ltd., India
Ampicillin	100 ไมโครกรัม / 1 มิลลิลิตร	Sigma, USA
Plasmid purification kit	NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Germany
Column GSTrap	ขนาด 1 มิลลิลิตร	GE Healthcare, Germany

- 1.2. ทำการเพิ่มปริมาณ plasmid pGEX-3X-MT-E6 ซึ่งมี HPV 16 E6 ติดอยู่กับ GST โดยทำการ
transform plasmid นี้บรรจุใน *Escherichia coli* BL-21(DE3) ก่อนแล้วจึงเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย แล้ว
สกัดแยกเอา plasmid บริสุทธิ์

การสกัด plasmid ด้วยชุด kit Nucleo Bond Xtra Midi, MN® โดยมีขั้นตอนดังนี้

- pick colony E.coli เพื่อทำการเลี้ยง starter culture ใน LB broth 5 ml ที่มี Ampicillin
shacking 300 rpm ที่ 37 องศา เป็นเวลา 8 ชั่วโมง
- dilute starter culture 1/500 โดยดูด 100 µl ของ starter culture ลงใน LB broth 50
ml ที่มี Ampicillin แล้วเลี้ยงต่อ 12-18 ชั่วโมง shacking 300 rpm
- Harvest เซลล์แบคทีเรียโดยปั่น ด้วยความเร็ว 4,500-6,000 g 10 นาที 4 องศา
- นำมาสกัด plasmid ด้วยน้ำยาในชุดสกัด

นำ plasmid ที่สกัดได้มาทำ PCR เพื่อยืนยันว่ามี protein E6

1.3. ทำการเตรียม competent *E. coli* BL-21(DE3) เพื่อใช้ในการ transform บรรจุ plasmid pGEX-3X-MT-E6 ที่เตรียมได้จากข้อ 1.2

1.4. Transform plasmid เข้าใน competent cell โดยใช้วิธี Heat Shock ตามขั้นตอนดังนี้

- ใส่ plasmid 10 µl ใน 100 µl competent cells แล้วกลับไปมา เঝๆ
- incubate ในน้ำแข็ง 30 นาที
- นำไป heat 42 องศา 45 วินาที
- นำกลับมาแช่ในน้ำแข็ง 2 นาที
- ใส่ 900 µl ของ LB medium
- incubate 37 องศา shaking 200 rpm 1-2 ชั่วโมง
- นำมา 100 µl Spread บน LB agar ที่มี Ampicillin
- incubate 37 องศา 16-18 ชั่วโมง

1.5. ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* BL-21(DE3) ซึ่งบรรจุ pGEX-3X-MT-E6 แล้วเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.25 mM บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนแล้วไปสกัดโปรตีนด้วยการใช้คลื่นความถี่สูง (Sonication) และถูกทำให้บริสุทธิ์โดยนำส่วนใสไปผ่านคอลัมน์ GStrap จากนั้นทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีการกรองผ่าน Amicon centrifugal filters และวัดปริมาณโปรตีน จากนั้นแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อดูการแสดงออกของโปรตีน E6

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่อนุภาคนาโนทองคำเสถียรและความเข้มข้นของโปรตีนจี

2.1. วัสดุและน้ำยาต่าง ๆ แสดงรายละเอียดในตารางที่ 2

2.1.1 อนุภาคนาโนทองคำ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

2.1.2 โปรตีนจี ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

2.1.3 แอนติบอดี ได้แก่ Monoclonal mouse anti HPV16 E6 + HPV18 E6 antibody, HPV16-E6/E6 antibody และ Monoclonal goat anti-mouse เจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

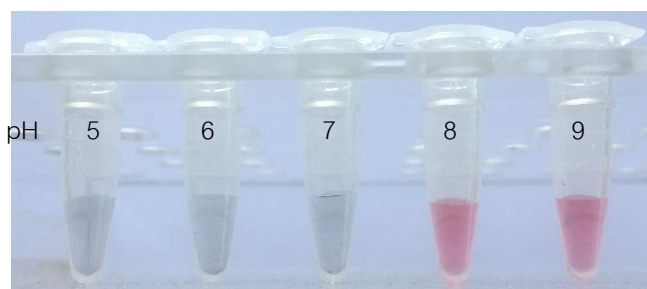
ตารางที่ 2 ชนิดวัสดุและน้ำยา (แอนติบอดี) ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษานี้

ชนิดวัสดุ/น้ำยา	บริษัทผลิต
40 nm Colloidal Gold, Unconjugated	Arista Biologicals inc., USA
Protein G	Prospec, USA
Monoclonal mouse anti HPV16 E6 + HPV18 E6 antibody (Ab70)	Abcam, UK
HPV16-E6/E6 antibody (orb10837)	Biorbyt, USA
Monoclonal goat anti-mouse (Pierce 31160)	Pierce, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma, USA

2.2. การทดสอบหาสภาวะ pH ที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อนุภาคนาโนทองคำกับโปรตีน G

ทำการปรับค่า pH ของอนุภาคนาโนทองคำให้ได้ pH 5, 6, 7, 8, และ 9 ตามลำดับ โดยใช้ 0.2 M Na_2CO_3 จากนั้นแบ่งลงหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ในปริมาตร 500 μl ทำการเคลือบอนุภาคนาโนทองคำของแต่ละค่า pH ด้วยโปรตีน G ที่ความเข้มข้นมากเกินไปคือ 20 $\mu\text{g/ml}$ gold ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที กลับหลอดไปมาช้า ๆ จากนั้นเติม 10% NaCl (50 μl ต่ออนุภาคนาโนทองคำ 500 μl) เพื่อบกวนปฏิกิริยา หากอนุภาคนาโนทองคำมีสภาวะเสถียรจะไม่พบสีที่เปลี่ยนไป ซึ่งสามารถสังเกตได้จากการมองด้วยตาเปล่าและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm.

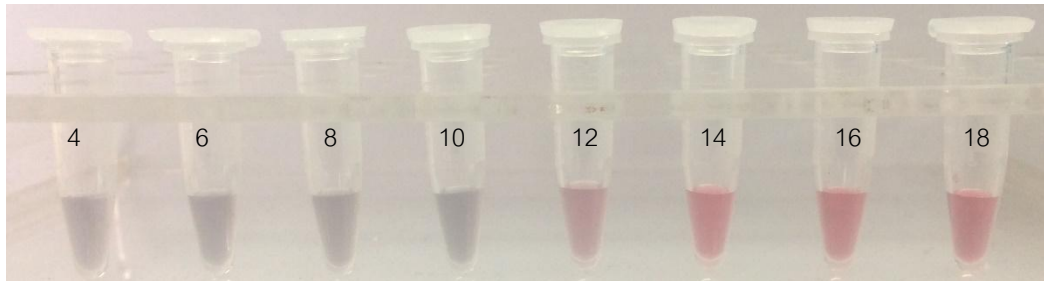
ผลการทดลองพบว่าที่ค่า pH 8 และ 9 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีทั้งจากการมองด้วยตาเปล่าและจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง ภาพสีของอนุภาคนาโนทองคำดังแสดงในรูปที่ 2 ในการทดลองต่อไป จึงใช้ pH 8.0



รูปที่ 2 แสดงความเสถียรของการจับเกาะของโปรตีนจี 20 $\mu\text{g/ml}$ gold กับอนุภาคนาโนทองคำที่ภาวะความเป็นกรด-ด่าง 5, 6, 7, 8 และ 9 นาน 60 นาที

2.3. ทดสอบหาความเข้มข้นของโปรตีนจีที่เหมาะสมในการจับกับอนุภาคนาโนทองคำที่สภาวะเป็นเบสเท่ากับ 8.0

ทำการเจือจางโปรตีนจีในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันดังนี้ 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ 18 $\mu\text{g/ml}$ gold ทำการผสมกับอนุภาคนาโนทองคำ ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลง ลงของสีอนุภาคนาโนทองคำ พบว่า โปรตีนจีที่ความเข้มข้น 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอนุภาคนาโนทองคำเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ให้อนุภาคนาโนทองคำเสถียรและไม่เกิดการเปลี่ยนสี (รูปที่ 3)

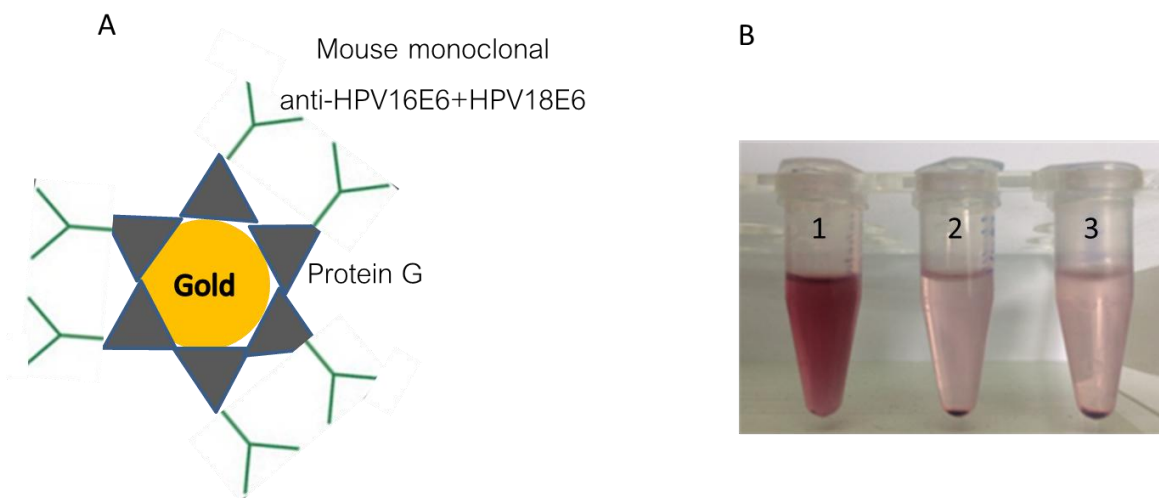


รูปที่ 3 ความเสถียรของอนุภาคนาโนทองคำในการจับเกาะกับโปรตีนจีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ 18 $\mu\text{g/ml}$ gold

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอนุภาคนาโนทองคำ-โปรตีนจี ติดกับแอนติบอดีจำเพาะต่อ HPV16

เมื่อปรับให้อนุภาคนาโนทองคำมีสภาวะเป็นด่างเท่ากับ 8.0 และใส่โปรตีนจีความเข้มข้น 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอนุภาคนาโนทองคำ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที เพื่อให้โปรตีนจีเคลือบที่ผิวอนุภาคนาโนทองคำครบคลุมแล้ว หลังจากนั้นใส่ Anti-HPV16E6+HPV18E6 mouse monoclonal IgG Antibody ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอนุภาคนาโนทองคำ ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที แล้วจึงเติม 10% Bovine serum albumin (BSA) ที่ละลายใน deionized distilled water pH 8.0 เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% BSA ในปริมาณ Gold แล้วปั่นตกเพื่อเพิ่มความเข้มข้น 10 เท่าจากตั้งต้น ก็จะได้ conjugated gold พร้อมทดสอบบน strip

ทดลองปั่นตกตะกอนอนุภาคนาโนทองคำที่ความเร็วต่างๆ เพื่อดูให้อนุภาคตกตะกอนหมด และไม่เกิดการอัดแน่นจนเกิดเป็นก้อน และพียง่ายเวลา resuspend จนได้ความเร็วเหมาะสมที่ 8,000 rpm 15 นาที



รูปที่ 4 A: การเชื่อมต่อโปรตีนจีกับอนุภาคนาโนทองคำและแอนติบอดีต่อ HPV-16E6+HPV18E6
B: หลอดที่ 1 แสดงสารละลายอนุภาคนาโนทองคำหลังจากการปั่นแล้ว ที่ละลายสมบูรณ์ หลอดที่ 2 และ 3 แสดงการตกตะกอนของอนุภาคนาโนทองคำที่ไม่สามารถทำให้เป็นสารละลายสมบูรณ์

4. การทดสอบ Conjugated Gold ที่เตรียมได้บนชุดตรวจ Lateral flow assay

ทำการทดสอบ conjugated gold ที่เตรียมได้จากข้อ 3 กับแอนติบอดีชนิดต่างๆ และโปรตีนจี เพื่อทดสอบว่า ความเข้มข้นของโปรตีนจีและ mouse monoclonal anti-HPV16E6+HPV18E6 มีความเหมาะสมและจับครอบคลุมทั้งอนุภาคนาโนทองคำโดยไม่เหลือโปรตีนจีเดี่ยวๆ ที่ไม่ถูกจับกับ mouse monoclonal anti-HPV16E6+HPV18E6 โดยนำมาทดสอบกับแอนติบอดีชนิดต่างๆ โดยขั้นตอนนี้เริ่มจากนำแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ และโปรตีนจี ที่ความเข้มข้นตามตารางที่ 3 มาวางเคลือบเป็นเส้นตรงบน nitrocellulose membrane ทิ้งให้แห้ง ในตู้ดูดความชื้น อย่างน้อย 1 ชั่วโมง แล้วทำการ block ด้วย 1%BSA ที่ละลายใน Phosphate Buffer pH 8.0 โดยทำการแช่ทั้งแผ่น membrane ให้ชุ่ม แล้วนำขึ้นมาซับบนทิชชูที่สะอาด แล้วทิ้งให้แห้งในตู้ดูดความชื้น อย่างน้อย 2 ชั่วโมง

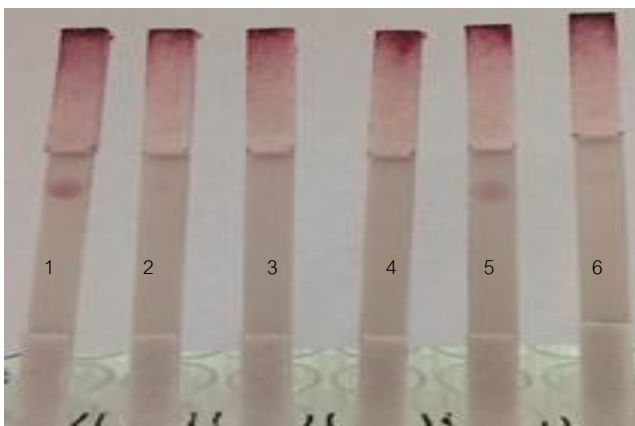
เมื่อเตรียมแผ่น strip เรียบร้อยแล้ว นำ conjugated gold คืออนุภาคนาโนทองคำที่เคลือบโปรตีนจีและ Mouse monoclonal anti-HPV16E6+HPV18E6 ตามความเข้มข้นดังข้อ 3 และรูป 4A มาทำปฏิกิริยากับแผ่น Strip ที่เตรียมไว้ โดยหยด conjugated gold ปริมาณ 10 ไมโครลิตรบน strip ให้วิ่งผ่านบน membrane โดยใช้ running buffer เป็น Phosphate buffer pH 7.4. ปริมาณ 60 ไมโครลิตร ในหลุม 96 well-plate (รูปที่ 5)

จากผลการทดลอง ในรูปที่ 5 พบว่า strip หมายเลข 2, 3 และ 4 แสดงผลลบโดยไม่มีเส้นสีชมพูเกิดขึ้น แสดงว่าโปรตีนจีที่เคลือบอยู่บน conjugated gold ถูกจับโดย mouse monoclonal anti-HPV16E6+HPV18E6 ทั้งหมดและไม่มีโปรตีนจีเดี่ยวๆ บน gold particle ทำให้ไม่สามารถจับกับแอนติบอดีตัวอื่นที่อยู่บน strip ได้ แต่ยังเกิดปัญหาผลบวกปลอมจางๆ ที่หมายเลข 6 ซึ่งแสดงว่ามีการจับกันแบบไม่จำเพาะระหว่าง conjugated gold กับ normal goat IgG

สำหรับ strip หมายเลข 1 แสดงการจับแบบจำเพาะระหว่าง Mouse monoclonal anti-HPV16E6+HPV18E6 บน conjugated gold กับ goat anti-mouse บน strip และ หมายเลข 5 เกิดผลบวกจาก mouse monoclonal anti-HPV16E6+HPV18E6 บน conjugated gold ที่สามารถจับกับโปรตีนจีได้ แสดงว่ามี mouse monoclonal anti-HPV16E6+HPV18E6 บน conjugated gold จริงๆ

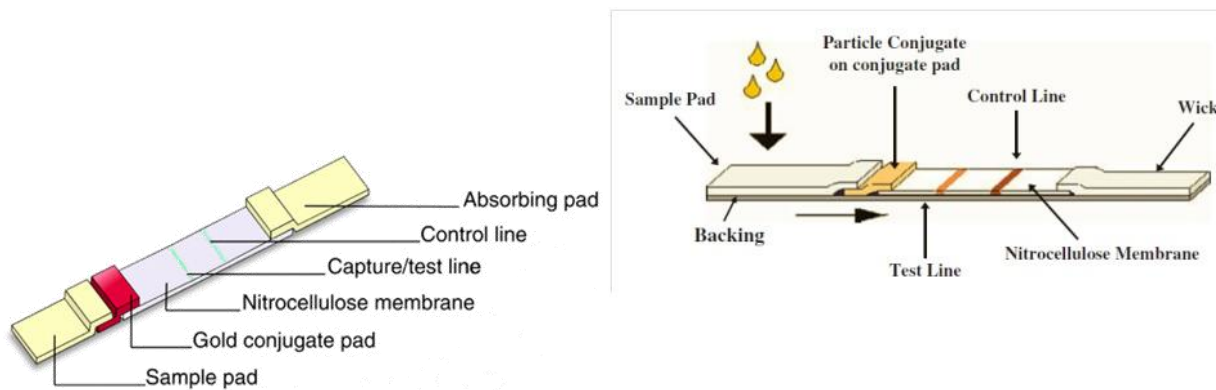
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่าง Conjugate Gold กับแอนติบอดีต่าง ๆ

แอนติบอดีที่ติดบน membrane	ความเข้มข้นบนเส้น (ไมโครกรัม)	ผลการทดลอง
1. Goat anti-mouse	1.20	บวก
2. Mouse monoclonal anti-HPV16E6+HPV18E6	0.1	ลบ
3. Goat polyclonal anti-HPV16E6	0.1	ลบ
4. Rabbit polyclonal anti-HPV16E6	0.25	ลบ
5. Protein G	0.05	บวก
6. Normal goat IgG	0.20	บวกจางๆ



รูปที่ 5 การทดสอบปฏิกิริยาของ conjugated gold 1: Goat anti-mouse, 2: Mouse monoclonal anti-HPV16E6+HPV18E6, 3: Goat polyclonal anti-HPV16E6, 4: Rabbit polyclonal anti-HPV16E6, 5: Protein G, 6: Normal goat IgG

5. การเตรียม Strip เพื่อทำการทดสอบ Lateral flow



รูปที่ 6 แสดงองค์ประกอบและแถบการทดสอบบน strip

การเตรียม Strip เพื่อทดสอบการตรวจจับของโปรตีน E6 มีส่วนประกอบทั้งหมด 4 ส่วน ซึ่งนำมาประกอบบน backing pad (6 x 0.4 ตารางเซนติเมตร) ซึ่งเป็นกระดาษที่มีกาวเคลือบอยู่ด้านบนสามารถปะส่วนประกอบต่างๆ ลงด้านบนได้ โดย ปะให้ซ้อนทับกันแต่ละส่วนประมาณ 0.2 เซนติเมตร โดยใช้ชนิดของ membrane ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 นี้

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของแถบทดสอบ

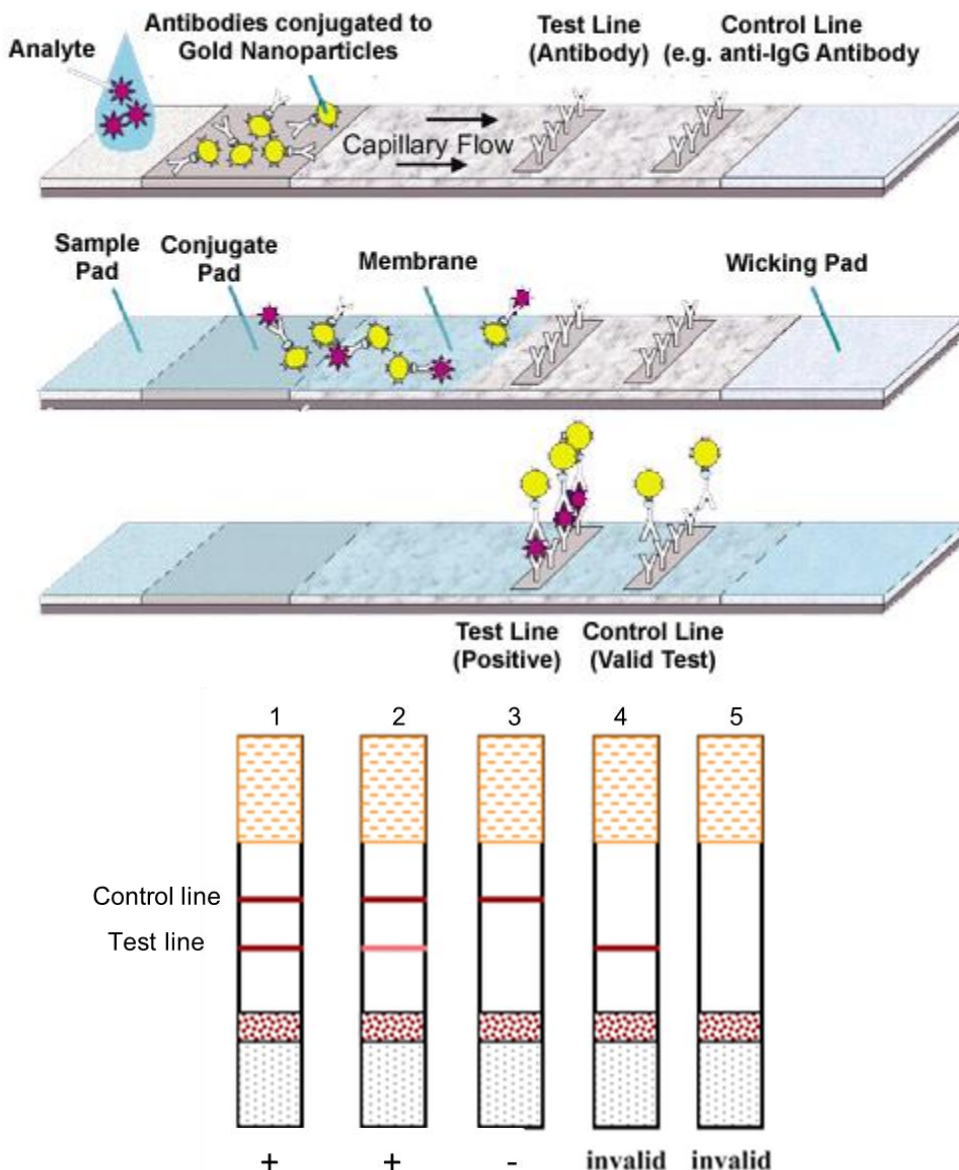
ส่วนประกอบ	ขนาด (ตารางเซนติเมตร)	ชนิด	ยี่ห้อ
Sample Pad	1.5 x 0.4	Cellulose fiber	Millipore, Merck, US
Gold conjugate Pad	0.8 x 0.4	Glass fiber	Ahstrom, USA
Nitrocellulose Membrane	2.2 x 0.4	Nitrocellulose Membrane	Unisart®, Sartorius, France
Absorbing Pad	1.5 x 0.4	100% cotton linter	GE, UK
Backing pad	6 x 0.4		Lohmann, USA

6. การเตรียมส่วน Nitrocellulose membrane ด้วยเส้นตรวจจับ 2 ตำแหน่ง คือ

- Control line ติดด้วย Goat anti-mouse IgG polyclonal antibody (Pierce; 31160; USA)
- Test line ติดด้วย HPV16-E6/E6 polyclonal antibody (biorbyt; orb10837; USA)

โดยให้ control line ห่างจากด้านบน (absorbing pad) 0.5 เซนติเมตร และติดส่วน test line ลงมาให้ห่างจาก control line ระยะ 0.5 เซนติเมตร หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ดูดความชื้นไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง แล้ว Block ด้วย 1%BSA (Sigma; B4287) โดยจุ่ม membrane ให้พอชุ่ม แล้วนำขึ้นมาซับด้วยกระดาษที่สะอาดนำไปไว้ในตู้ดูดความชื้นให้แห้งจนกว่าจะมีการนำมาใช้

Lateral Flow Assay Architecture



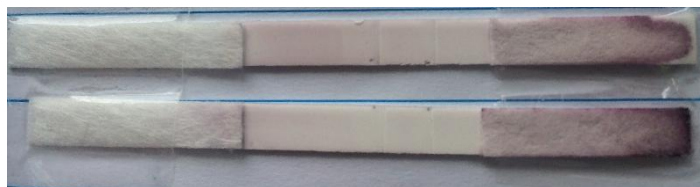
รูปที่ 7 หลักการทดสอบและผลการทดสอบของวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยติด Goat anti-mouse IgG polyclonal antibody บนเส้น control line และติดด้วย HPV16-E6/E6 polyclonal antibody บน test line ถ้าตัวอย่างมีโปรตีน HPV-16E6 จะถูกจับโดย conjugated gold และเมื่อ HPV-16E6-conjugated gold เคลื่อนที่ผ่าน test line จะถูกจับโดย HPV16-E6/E6 polyclonal antibody ทำให้เกิดการรวมกลุ่มตกตะกอนของ gold เกิดแถบสีขึ้น ดังเช่น strip หมายเลข 1 และ 2 ซึ่งความเข้มของแถบสีจะแปรผันตรงกับปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง และ conjugated gold ที่ไม่ได้จับกับโปรตีน HPV-16 E6 จะเคลื่อนที่มายัง control line และจับกับ Goat anti-mouse IgG polyclonal antibody ทำให้เกิดแถบสีขึ้น โดยผลที่เชื่อถือและแปลผลได้ (valid result) จะต้องพบแถบสีของ control line ทุกครั้ง ดังเช่น strip หมายเลข 1 ถึง 3 และถ้าไม่พบแถบสีบน control line จะถือว่าแปลผลไม่ได้ (invalid result) ดังเช่น strip หมายเลข 4 และ 5

7. การหาสถานะที่เหมาะสมของชุดตรวจ Lateral flow assay

7.1.การทดสอบหา Running Buffer ที่เหมาะสม

เนื่องจากการทดสอบที่ผ่านมาใช้ Running buffer เป็น Phosphate Buffer Saline pH 7.4 สังเกตพบว่าการเกิดผลบวกปลอม และการเคลื่อนที่ของสารละลายวิ่งช้ามาก จึงทำการทดลองปรับเปลี่ยน running buffer หลายประเภท โดยนำ running buffer มาทดสอบกับ strip ที่ติด Goat anti-mouse IgG polyclonal antibody และติด HPV16-E6/E6 polyclonal antibody เรียบร้อยแล้ว โดยไม่ใส่ conjugated gold ในระบบ และ running buffer ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่

- 1.1 Phosphate Buffer Saline ที่มี 0.05% Tween 20 pH 7.4
ผลการทดลอง พบว่าการเคลื่อนที่ของสารละลายวิ่งเร็วขึ้น แต่ยังคงเกิดผลบวกปลอม
- 1.2 Milli-Q water ที่มี 0.05% Tween 20 pH 7.4
ผลการทดลอง พบว่าเกิดผลลบ ทั้ง Control line และ Test line
- 1.3 Phosphate Buffer ที่มี 0.05% Tween 20 และ 1% BSA ปรับ pH 7.4
ผลการทดลองที่ได้เกิดผลลบทั้ง Control line และ Test line (ดังรูปที่ 8)

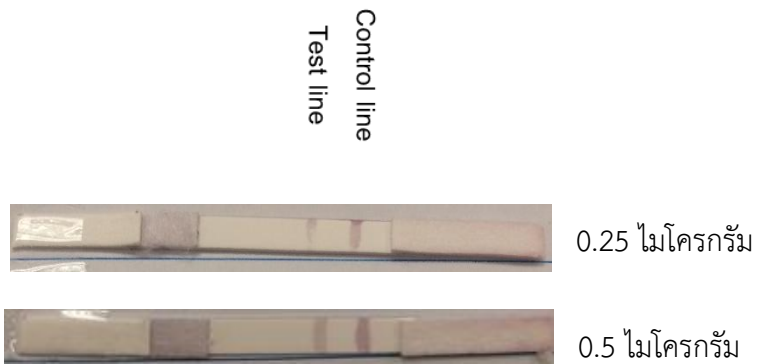


รูปที่ 8 ผลการทดสอบที่ใช้ running buffer คือ Phosphate Buffer ที่มี 0.05% Tween 20 และ 1% BSA ปรับ pH 7.4 พบว่าได้ผลลบทั้ง Control line และ Test line

สรุปในขั้นตอนศึกษาต่อไปจะใช้ Phosphate Buffer ที่มี 0.05% Tween 20 และ 1% BSA ปรับ pH 7.4 ใช้เป็น Running buffer ซึ่งไม่ก่อให้เกิดผลบวกปลอมจากตัว buffer เอง

7.2.การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของเส้นตรวจจับ

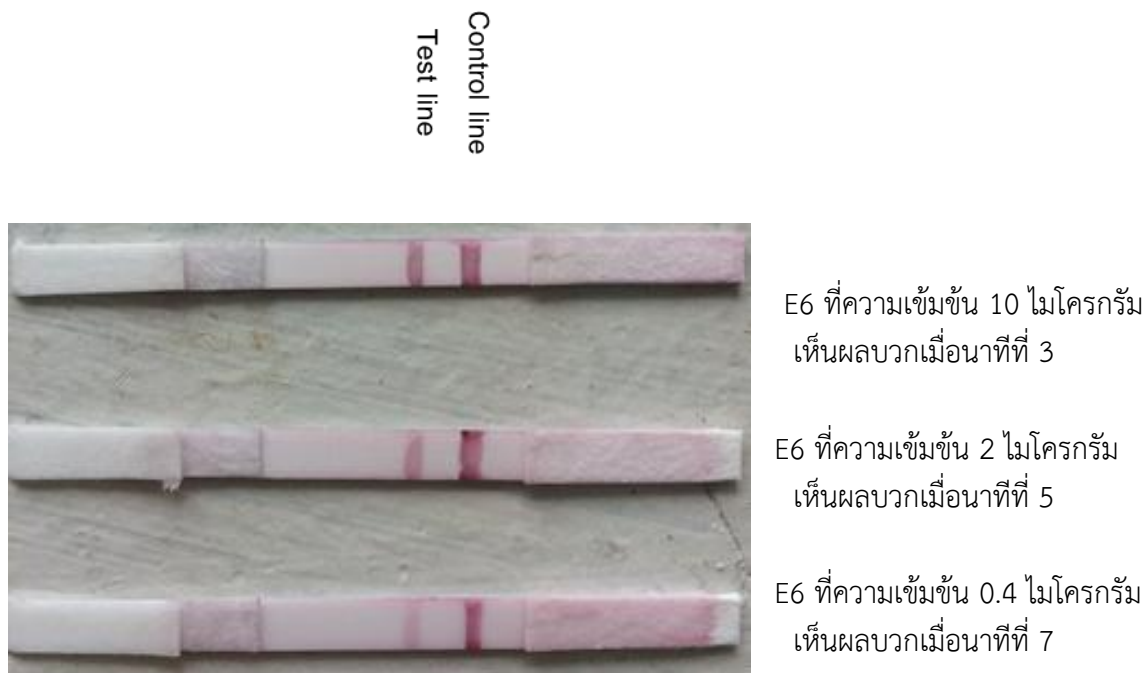
ทำการติด Goat anti-mouse IgG polyclonal antibody และ HPV16-E6/E6 polyclonal antibody บน control line และ test line ตามลำดับ เทียบกัน 2 ความเข้มข้นที่ 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัม ต่อเส้น และทดสอบกับโปรตีนบริสุทธิ์ HPV16 E6 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม พร้อมด้วย conjugated gold ผลการทดสอบพบว่าแอนติบอดีทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อเส้น ให้ผลบวกเห็นได้ชัดเจน จึงเลือกใช้ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมของแอนติบอดีทั้ง control line และ test line (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 ผลการทดสอบเมื่อใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดี Goat anti-mouse IgG polyclonal antibody และ HPV16-E6/E6 polyclonal antibody บน control line และ test line ตรงเส้นตรวจจับที่ 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัม

7.3.การทดสอบความไว

- 7.3.1. การทดสอบกับโปรตีนไวรัส HPV16 E6 ที่ความเข้มข้นต่างๆ
นำโปรตีน E6 ที่ได้จากการเตรียมและทำให้บริสุทธิ์ มาทดสอบกับชุดตรวจ Lateral flow assay ที่ความเข้มข้นต่างๆ เริ่มที่ 10 ไมโครกรัม และเจือจางลงมา 5 เท่า (2 ไมโครกรัม และ 400 นาโนกรัม) ทำการอ่านผลภายใน 10 นาที จากรูปที่ 10 แสดงให้เห็นว่าความไวในการตรวจจับที่ให้ผลบวกคือที่ปริมาณโปรตีน E6 อย่างน้อยหรือเท่ากับ 400 นาโนกรัม



รูปที่ 10 ความไวในการตรวจจับโปรตีนไวรัส HPV16E6

ทำการทดสอบซ้ำกับโปรตีน E6 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เริ่มที่ 10 ไมโครกรัมและเจือจางลงมาเป็น 2 เท่า ทำการสังเกตแถบที่ขึ้นทุกนาที่ อ่านผลภายใน 15 นาที ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าภายใน 10 นาทีสามารถตรวจจับโปรตีน E6 ที่ความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัม และตรวจจับที่ความเข้มข้น 312.5 นาโนกรัม ได้ภายใน 15 นาที (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ความไวในการตรวจจับโปรตีน E6 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น โปรตีน E6 (ไมโครกรัม)	เวลา (นาที่)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
10	-	-	w	w	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	w	w	w	+	+	+	+	+	+	+	+
2.5	-	-	-	-	-	-	w	w	+	+	+	+	+	+	+
1.25	-	-	-	-	-	-	-	w	w	w	+	+	+	+	+
0.625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	w	w	+	+
0.3125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	w
0.15625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ผู้วิจัยพยายามที่จะเพิ่มความไวในการตรวจ โดยทดลองเปลี่ยน nitrocellulose membrane เป็นชนิดที่มี flow rate สูงขึ้นเพื่อให้ได้ความไวในการทดสอบสูงขึ้น (Whatman, AE99; Germany) แต่ผลการทดสอบปรากฏว่า ได้ความไวที่ความเข้มข้นเท่ากัน

7.3.2. การทดสอบความไวกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มี HPV16 DNA

เซลล์ CaSki เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีสารพันธุกรรมของ HPV16 อยู่มากถึง 600 copies ต่อเซลล์ จึงนำมาใช้ในการทดสอบความไวในการตรวจหาเซลล์มะเร็ง ให้ได้จำนวนที่ต้องการ 1×10^7 cell แล้วนำมาทำให้เซลล์แตกด้วย 500 ไมโครลิตร Lysis-M reagent (EDTA-free protease inhibitor) จากนั้นปั่นตกตะกอน แล้วเก็บส่วนน้ำที่มีโปรตีนนำมาหาค่าความเข้มข้น และคำนวณกลับเป็นจำนวนเซลล์ นำมาทดสอบชุดตรวจ Lateral flow assay เริ่มที่ 2×10^6 เซลล์ ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าความไวในการตรวจจับอย่างน้อยหรือเท่ากับ 1×10^5 cells (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ความไวในการตรวจจับเซลล์ CaSki

ปริมาณเซลล์ CaSki	เวลา (นาทีก)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
2,000,000	-	-	-	-	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,000,000	-	-	-	-	w	w	w	+	+	+	+	+	+	+	+
500,000	-	-	-	-	-	-	w	+	+	+	+	+	+	+	+
100,000	-	-	-	-	-	-	-	w	w	w	+	+	+	+	+
50,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

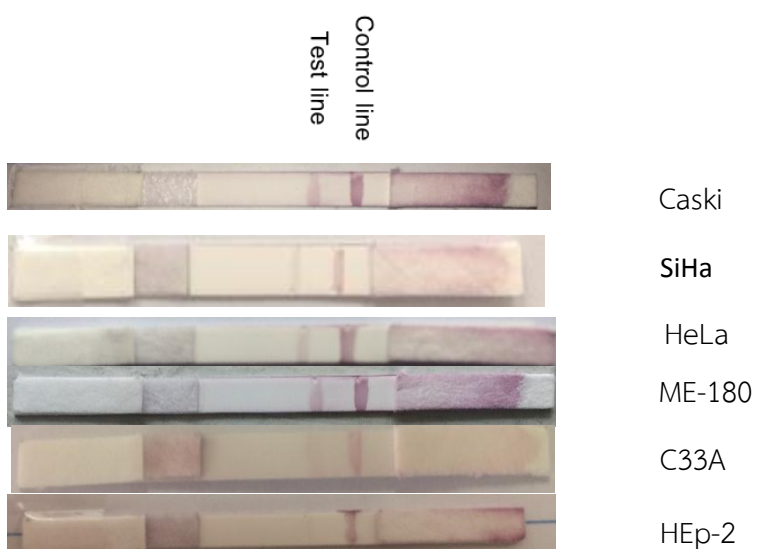
7.4. การตรวจหาความจำเพาะของการทดสอบ

7.4.1. การทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ

ทำการเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ให้ได้จำนวนที่ต้องการ 1×10^7 cell แล้วนำมาทำให้เซลล์แตกด้วย 500 ไมโครลิตร Lysis-M reagent (EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet, Roche, USA) ที่งัวที่อุณหภูมิห้อง และจับหลอดคว่ำกลับไปมา นานอย่างน้อย 15 นาที จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 g นาน 10 นาที แล้วเก็บส่วนน้ำที่มีโปรตีนนำมาหาค่าความเข้มข้น และคำนวณกลับเป็นจำนวนเซลล์สามารถตรวจได้ โดยเริ่มจากจำนวน 4×10^5 เซลล์ ที่นำมาใช้ในการทดสอบบนชุดตรวจ Lateral flow assay มีดังนี้

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ

Cell lines	Type of cell line	HPV DNA	ผลการทดสอบบน Lateral flow assay
SiHa	Human cervical carcinoma	1-2 copies HPV16 DNA	บวก
HeLa	Human cervical carcinoma	HPV18 DNA	บวกจาง ๆ
ME-180	Human cervical carcinoma	HPV18 DNA, HPV39, HPV68b DNA	บวกจางๆ
C33A	Human cervical carcinoma	Negative for HPV DNA	ลบ
HEp-2	Human laryngeal carcinoma	Negative for HPV DNA	ลบ
Caski	Human cervical carcinoma	600 copies HPV16 DNA	บวก
MS751	Human cervical carcinoma	HPV18 DNA, HPV45DNA	บวกจางๆ



รูปที่ 11 ผลทดสอบความจำเพาะของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิด

ผลการทดสอบ พบว่านอกจากการตรวจจำเพาะต่อโปรตีน E6 ของ HPV16 แล้ว ยังมีผลบวกต่อโปรตีน E6 ของ HPV18 ด้วย เพราะแอนติบอดีที่ใช้ในการเตรียม Conjugated gold เป็น Monoclonal mouse anti HPV16 E6 + HPV18 E6 antibody ดังนั้นอาจเป็นข้อดีของชุดตรวจนี้ที่สามารถตรวจได้ทั้ง HPV16 และ HPV18

7.4.2. การทดสอบกับเซลล์แบคทีเรียชนิดต่างๆ

รายชื่อแบคทีเรียตามตารางที่ 8 ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุเคราะห์จาก อาจารย์ ดร. ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ หน่วยแบคทีเรียวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำเซลล์แบคทีเรียชนิดต่างๆ มาเพาะเลี้ยงใน Blood agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นมาปรับให้ได้ปริมาณเซลล์เท่ากัน ที่ 1.5×10^8 CFU/ml โดย Mcfarland โดย swab ด้วยสำลีฟัปลายไม้ลงใน Tryptone Soya broth นำมาปั่นให้เซลล์ตกที่ความเร็ว 5,000 rpm 5 นาที แล้วทำการสกัดด้วย Lysis-M reagent (EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet, Roche, USA) ที่แช่บนน้ำแข็ง นาน 15 นาที จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 g นาน 10 นาที แล้วเก็บส่วนน้ำ นำมาทดสอบกับชุดตรวจ ได้ผลลบทุกเชื้อ

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

ชนิดของเซลล์	เวลา (นาที)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>E.feacalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactobaccilli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -streptococcus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ps.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

8. การทดสอบชุดตรวจกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย

8.1. ทำการตรวจสอบน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (The ThinPrep Pap test, Hologic Inc.,USA หรือ The Surepath Pap test, BD, USA) กับ conjugated gold ในแถบทดสอบ เพื่อตรวจดูว่าน้ำยามีผลต่อการทดสอบหรือไม่ โดยทดสอบน้ำยาเปล่าก่อนใส่เซลล์ตัวอย่าง และ น้ำยาผสมกับโปรตีนบริสุทธี E6 ผลการทดสอบไม่พบมีแถบผลบวกปลอมขึ้นที่น้ำยาเปล่าก่อนใส่เซลล์ตัวอย่าง และ พบแถบแสดงผลบวกในน้ำยาผสมกับโปรตีนบริสุทธี E6 แสดงว่าน้ำยารักษาสภาพเซลล์ ไม่มีผลการยับยั้งการทดสอบ และไม่มีปฏิกิริยาข้ามที่จะทำให้เกิดผลบวกปลอม

8.2. การเตรียมตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย - สิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยคือเนื้อเยื่อบริเวณปากมดลูกที่ถูกเก็บรักษาเป็นอย่างดีในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (The ThinPrep Pap test, Hologic Inc.,USA หรือ The Surepath Pap test, BD, USA) ตัวอย่างเหล่านี้เป็นตัวอย่างเหลือจากงานตรวจประจำที่หน่วยไวรัสวิทยา ฝ่ายจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนกันยายน 2560 นำตัวอย่างมาปั่นแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 1500 rpm 5 นาที 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำน้ำยารักษาสภาพเซลล์ออก แล้วเติม lysis buffer (Phosphate buffer, pH 8.0 ที่ใส่ EDTA-free protease inhibitor cocktail table, Roche, USA) ลงไป 150 µl ต่อตัวอย่าง จากนั้น vortex เพื่อให้เซลล์แตก ประมาณ 15 นาที จากนั้นดูดส่วนน้ำมาทดสอบกับ strip โดยอ่านผลภายใน 15 นาที หรือเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

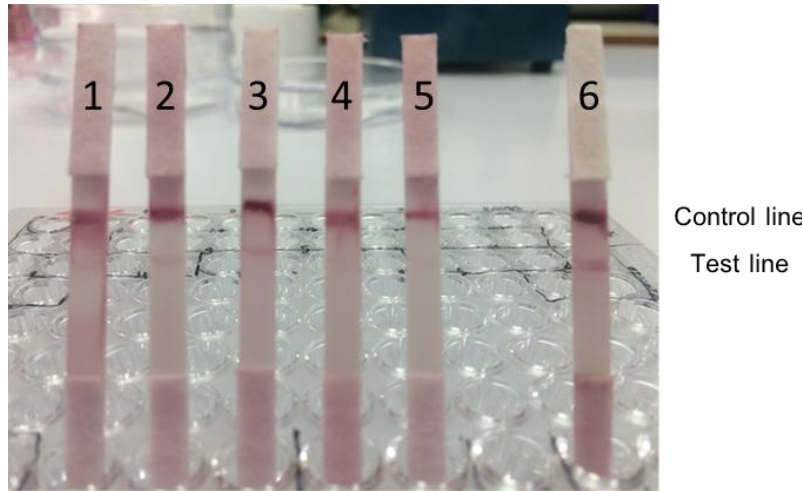
8.3. สิ่งส่งตรวจที่นำมาทดสอบทั้งหมด 118 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นกลุ่มจากการตรวจพยาธิวิทยาเซลล์ (ตารางที่ 9) ดังนี้ SCC (squamous cell carcinoma) เป็นกลุ่มที่มีเซลล์มะเร็ง 9 ตัวอย่าง, CIN3 (cervical intraepithelial neoplasia) เป็นรอยโรคก่อนเป็นมะเร็ง คือเซลล์ปากมดลูกมีความผิดปกติรุนแรงตลอดความหนาของชั้นบุผิวปากมดลูก จำนวน 26 ตัวอย่าง โดยสองกลุ่มนี้จัดเป็น HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesions), ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งคือ LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesions) ซึ่งมีความรุนแรงของรอยโรค 2 ระดับคือ CIN2 จำนวน 12 ตัวอย่าง และ CIN1 จำนวน 37 ตัวอย่างที่มีความผิดปกติของเซลล์ปานกลางและเล็กน้อย เป็นรอยโรคขั้นต่ำของปากมดลูก ส่วนกลุ่มสุดท้ายคือ ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance) และ Inflammation หมายความว่า พบความผิดปกติที่เซลล์ปากมดลูกเล็กน้อย และลักษณะทั่วไปของเซลล์ไม่แน่นอน จำนวน 34 ตัวอย่าง

8.4. สิ่งส่งตรวจที่นำมาตรวจสอบจะทราบข้อมูลการติดเชื้อและชนิดของไวรัสแบปิโลมา เนื่องจากผ่านการตรวจหาสารพันธุกรรมต่อ HPV16, 18 และ high risk group (HR) ด้วยชุดน้ำยา cobas 4800 HPV Amplification/Detection Kit ของบริษัทโรช และใช้เครื่องอัตโนมัติ Cobas 4800 โดยผลจะจำแนกไทป์ 16 และ 18 และกลุ่ม HR (ประกอบด้วย HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, และ 68)

8.5. การทดสอบกับชุดตรวจ จะทดสอบโดยใช้ 96-well plate โดยผสม Conjugated gold (Gold-Protein G-mAb) ที่เตรียมไว้ 10 µl ผสมกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ทำให้เซลล์แตกแล้ว 100 µl ในหลุมของถาด 96 หลุม แล้วปฏิกิริยาทดสอบ จัเวลาในการอ่านผลไม่เกิน 15 นาที โดยมีโปรตีน E6 ปริมาณ 5 ไมโครกรัม เป็น positive control และ 5 mM NaP เป็น negative control เปรียบเทียบผลด้วยทุกครั้ง (รูปที่ 12)

ตารางที่ 9 แสดงกลุ่ม และจำนวนตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ และผลการตรวจ

Group of HPV patience			No. of sample	Positive of Strip test	Number of Sample		
HSIL	SCC	16+	5	2 (40%)	9	35	118
		18+	1	-			
		HR+	2	-			
		Neg	1	-			
	CIN3	16+	9	2 (22.22%)	26		
		18+	4	-			
		HR+	8	-			
		Neg	5	-			
LSIL	CIN2	16+	4	2 (50%)	12	49	
		18+	1	-			
		HR+	2	-			
		Neg	5	-			
	CIN1	16+	14	4 (28.6%)	37		
		18+	1	-			
		HR+	16	-			
		Neg	6	-			
Inflammation, ASC-US		16+	22	4 (18.18%)	34	34	
		18+	5	3 (60%)			
		HR+	4	-			
		Neg	3	-			



รูปที่ 12 แสดงผลการตรวจตัวอย่างผู้ป่วย (แถบที่ 1-4) ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยมีตัวควบคุมบวก แสดงแถบสีทั้ง control line และ test line (แถบที่ 6) และ ตัวควบคุมลบแสดงแถบสีเฉพาะ control line (แถบที่ 5)

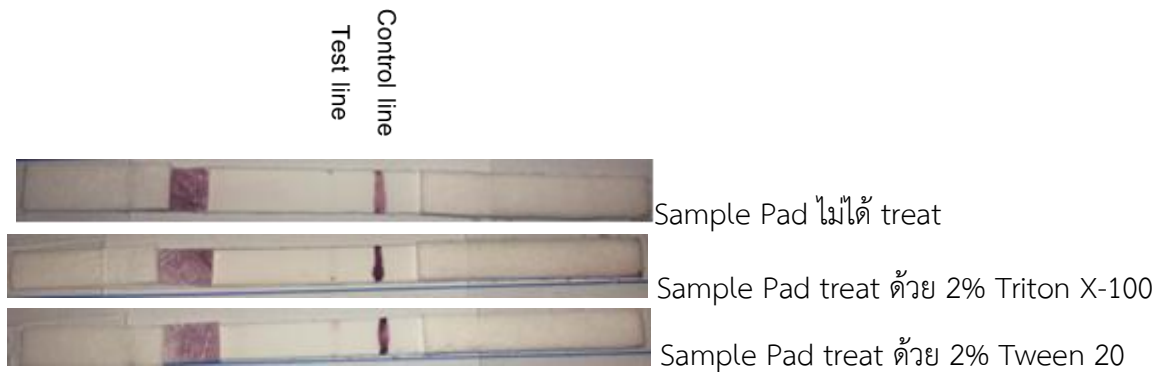
ผลการทดสอบ

1. ไม่พบว่ามีผลบวกปลอมในกลุ่มตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ไม่ใช่ 16 ยกเว้นในตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่ม Inflammation และ AS-CUS ที่ตรวจพบในตัวอย่างที่ติดเชื้อ HPV18 จำนวน 3 จาก 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 60
2. ตัวอย่างที่ติดเชื้อ HPV16 รวมทั้งหมด 54 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.93 โดยแบ่งเป็น กลุ่ม SSC ร้อยละ 40 CIN3 ร้อยละ 22.22 CIN2 ร้อยละ 50 CIN1 ร้อยละ 28.6 และกลุ่ม inflammation และ AS-CUS ร้อยละ 18.18
- 3.

9. การศึกษาความคงตัวของ conjugated gold และแถบ Strip

ในการศึกษานี้ ทำการเตรียม Conjugated gold และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทดสอบคุณสมบัติความคงตัว พบว่าสามารถเก็บไว้ได้นาน้อย 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจจะเก็บได้นานกว่านี้ ซึ่งต้องทดลองต่อไป นอกจากนี้ การตรวจสอบในการศึกษานี้ทั้งหมด เป็นการตรวจสอบทันที โดยมีได้มีการประกอบ Conjugated gold กับแผ่น conjugate pad ให้แห้งก่อนเหมือนชุดทดสอบที่มีขายในปัจจุบัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดลองหยด conjugated gold ไว้บนแผ่น conjugate pad ก่อน ทำให้แห้งด้วยตู้ดูดความชื้นข้ามคืน เมื่อนำมาประกอบเป็น strip แล้วลองทดสอบด้วย running buffer พบว่า conjugate gold ไม่เคลื่อนที่วิ่งมาบน strip แต่ติดแน่นบน glass fiber ผู้วิจัยจึงได้มีการปรับวิธีให้ conjugate gold เคลื่อนที่ โดยตอนทำ conjugate gold ขั้นสุดท้ายให้ re-suspend ด้วย 5 mM Na-P buffer ที่มี 20% sucrose, pH 8.0 แล้วนำไปหยดบน glass fiber 10 μ l ต่อ strip แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยตู้ดูดความชื้น

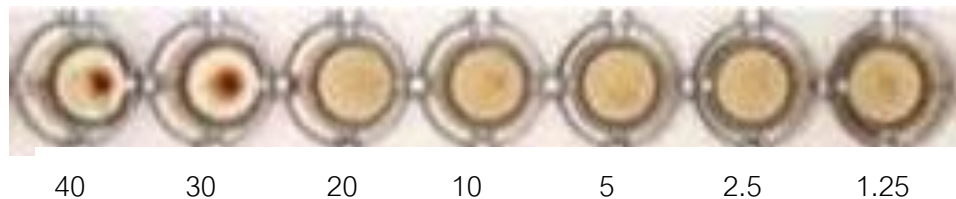
ส่วนของ sample pad ได้ทดลอง treat ด้วย 2% triton X-100 เปรียบเทียบกับ 2% tween 20 โดยการจุ่มให้เปียกแล้วทำให้แห้งด้วยตู้ดูดความชื้น ผลการทดสอบ ปรากฏว่า conjugate gold ก็ยังวิ่งไปไม่หมด และเกิดผลบวกปลอม กับโปรตีน E6 แสดงดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 ทดสอบการคงตัวของ conjugated gold บนแถบ strip โดยเปรียบเทียบระหว่าง Sample Pad ที่ treat ด้วย 2% Triton X-100 หรือ 2% Tween 20 หรือไม่ได้ treat ก่อนที่จะนำมาประกอบ และใช้ในการทดสอบ

10. การทดสอบเปรียบเทียบความไวของ conjugated gold กับโปรตีน E6 กับ direct immunogold ด้วยวิธี Agglutination

เนื่องจากผู้วิจัยได้เคยพัฒนาระบบ Direct immunogold agglutination โดยใช้แอนติบอดีเคลือบโดยตรงกับอนุภาคนาโนทองคำ และพบปัญหาเรื่องความไว โดยสามารถตรวจจับโปรตีน E6 ได้ที่ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 40 ไมโครกรัม ผู้วิจัยจึงได้ทดลองนำ conjugated gold ซึ่งเพิ่มการเคลือบด้วย Protein G มาทดสอบแบบ agglutination ผลการทดลองใน V-shape 96-well plate โดยใส่ Conjugate Gold-Protein G 50 μL /well จากนั้นใส่ 20 ไมโครลิตรของ โปรตีน E6 ที่ความเข้มข้นต่างๆ 40, 30, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ไมโครกรัม ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที นำ plate ไปปั่น 1,000 rpm 1 นาที พบว่า ความเข้มข้นของโปรตีน E6 ที่ 40 และ 30 ไมโครกรัม ตกตะกอนเห็นเป็นเม็ดกระดุมที่ก้นหลุม ส่วนความเข้มข้น 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ไมโครกรัม ไม่เกิดการตกตะกอน นั่นคือความไวเมื่อใช้ conjugate Gold-Protein G จะตรวจจับได้ที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 30 ไมโครกรัม



รูปที่ 14 ผลการตกตะกอนของอนุภาคนาโนทองคำที่เคลือบด้วยโปรตีนจีกับโปรตีน E6 ที่ความเข้มข้น 40, 30, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ไมโครกรัม

สรุปผลการดำเนินงาน

ผู้วิจัยสามารถผลิตชุดการตรวจโปรตีน HPV16 E6 ที่ใช้เวลาในการตรวจ 15 นาที โดย ผู้วิจัยได้เริ่มทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างอนุภาคนาโนทองคำ-โปรตีนจี-แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน HPV16 E6 จากผลการทดลองผู้วิจัยเลือกใช้อนุภาคนาโนทองคำขนาด 40 นาโนเมตร ในภาวะ pH 8.0 เชื่อมต่ออนุภาคนาโนทองคำกับโปรตีนจี ที่ความเข้มข้นของโปรตีนจี 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอนุภาคนาโนทองคำ แล้วใส่ Anti-HPV16E6+HPV18E6 mouse monoclonal IgG Antibody ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอนุภาคนาโนทองคำ เมื่อได้อนุภาคนาโนทองคำ-โปรตีนจี- Anti-HPV16E6+HPV18E6 mouse monoclonal IgG Antibody แล้ว จึงเติม 10% Bovine serum albumin (BSA) ที่ละลายใน deionized distilled water pH 8.0 ก็จะได้ conjugated gold พร้อมทดสอบบน strip และเมื่อทดสอบบนชุดตรวจ Lateal flow assay พบว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน E6 ที่ติดอยู่บนโปรตีนจีมีปริมาณที่เพียงพอในการครอบคลุมพื้นที่ผิวทั้งหมดจนทำให้ไม่สามารถจับกับแอนติบอดีตัวอื่นที่อยูบน membrane และในส่วน Running Buffer ที่เหมาะสมได้แก่ Phosphate Buffer ที่มี 0.05% Tween 20 และ 1% BSA ปรับ pH 7.4 เนื่องจากไม่มี non specific band เกิดขึ้น

นำ conjugated gold คืออนุภาคนาโนทองคำที่เคลือบโปรตีนจีและ Mouse monoclonal anti-HPV16E6+HPV18E6 มาทดสอบกับโปรตีนบริสุทธิ์ HPV16 E6E6 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม กับแอนติบอดีต่อ HPV16 E6 ที่เคลือบบน membrane ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัม พบว่าแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อเส้น ให้ผลบวกเห็นได้ชัดเจน จึงเลือกใช้แอนติบอดีต่อ HPV16 E6 ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม สำหรับ control line และ test line

หลังจากได้ conjugated gold และความเข้มข้นของแอนติบอดีบน membrane ที่เหมาะสมแล้วจึงนำมาทดสอบความไวกับโปรตีนบริสุทธิ์ HPV16E6 ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าภายใน 10 นาทีสามารถตรวจจับโปรตีน E6 ที่ความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัม และตรวจจับที่ความเข้มข้น 312.5 นาโนกรัม ได้ภายใน 15 นาที ซึ่งการทดสอบนี้เป็นการทดสอบกับโปรตีนบริสุทธิ์ HPV16E6 ซึ่งมีสภาวะที่แตกต่างจากตัวอย่างเซลล์คน จึงได้นำ strip พร้อม conjugated gold มาทดสอบกับเซลล์ปากมดลูกที่มี HPV16 DNA ได้แก่ เซลล์ CaSki และพบว่าที่ปริมาณอย่างน้อยหรือเท่ากับ 1×10^5 cells สามารถอ่านผลบวกได้ที่เวลา 11-15 นาที นอกจากนี้ยังพบว่าพบผลบวกจากๆ เมื่อตรวจกับเซลล์ปากมดลูกชนิด HeLa และ ME180 ซึ่งมีการติดเชื้อ HPV18 เพราะแอนติบอดีที่ใช้ในการเตรียม Conjugated gold เป็น Monoclonal mouse anti HPV16 E6 + HPV18 E6 antibody ดังนั้นอาจเป็นข้อดีของชุดตรวจนี้ที่สามารถตรวจได้ทั้ง HPV16 และ HPV18 นอกจากนี้ยังทำการทดสอบกับเซลล์ปากมดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อ HPV เช่น เซลล์ C33A และแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่า ชุดตรวจ ได้ผลลบทุกเซลล์และทุกเชื้อ แสดงถึงความจำเพาะสูงต่อ HPV16

เมื่อนำชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย โดย ใช้เซลล์ปากมดลูกที่ถูกเก็บรักษาเป็นอย่างดีในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (The ThinPrep Pap test, Hologic Inc.,USA หรือ The Surepath Pap test, BD, USA) ซึ่งผลการทดสอบพบว่า ไม่พบว่ามีผลบวกปลอมในกลุ่มตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสแบปิโลมาสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ไม่ใช่ 16 ยกเว้นในตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่ม Inflammation และ AS-CUS ที่ตรวจพบในตัวอย่างที่ติดเชื้อ HPV18 จำนวน 3 จาก 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 60 และตัวอย่างที่ติดเชื้อ HPV16 รวมทั้งหมด 54 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.93 โดยแบ่งเป็น กลุ่ม SSC ร้อยละ 40 CIN3 ร้อยละ 22.22 CIN2 ร้อยละ 50 CIN1 ร้อยละ 28.6 และกลุ่ม inflammation และ AS-CUS ร้อยละ 18.18

นอกจากนี้ผู้วิจัย ได้ทำ การทดสอบเปรียบเทียบความไวของวิธี conjugated gold กับโปรตีน E6 ที่พัฒนาในงานวิจัยปัจจุบัน กับวิธี direct immunogold ด้วยวิธี Agglutination พบว่าโดยวิธี direct immunogold มีความไวตรวจโปรตีน E6 ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 40 ไมโครกรัม แต่ถ้าใช้ conjugate Gold-Protein G จะตรวจจับโปรตีน HPV16 E6 ได้ที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 30 ไมโครกรัม แสดงว่าการมีโปรตีนจีเคลือบผิวอนุภาคนาโนทองคำช่วยทำให้มีความไวการตรวจด้วยวิธี agglutination เพิ่มขึ้น

การวิเคราะห์ผล

ผลที่ได้จะเห็นว่า ความไวในการตรวจหาโปรตีน E6 ในโปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี lateral flow ตรวจจับได้ที่ความเข้มข้น 312.5 นาโนกรัม ได้ภายใน 15 นาที ซึ่งนับว่ามีความไวค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับวิธี agglutination ที่ต้องใช้ปริมาณถึง 30-40 ไมโครกรัม แต่ผลการตรวจในตัวอย่างส่งตรวจได้ความไวค่อนข้างต่ำมาก คิดเป็นร้อยละ 25.93 จากตัวอย่างทั้งหมด โดยเฉพาะความไวในกลุ่มมะเร็ง ตรวจจับได้เพียงร้อยละ 40 เท่านั้น ผู้วิจัยวิเคราะห์ปัญหาที่อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้มีความไวต่ำ ดังนี้

1. ตัวอย่างที่ใช้ เป็นตัวอย่างเหลือจากการทำ Pap smear และ การตรวจหา HPV DNA แล้ว ทำให้ปริมาณเซลล์ตัวอย่างมีน้อย และแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง ทำให้มีโอกาสเกิดผลลบปลอมได้
2. เซลล์ที่นำมาทดสอบเป็นเซลล์เก็บนานแล้ว เพราะหลังจากการทดสอบแล้ว ตัวอย่างยังต้องเก็บคงไว้เพื่อการตรวจซ้ำอย่างน้อยอีก 2 สัปดาห์ จึงจะนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ได้ เป็นไปได้ที่เซลล์จะเสียสภาพหรือแตกทำลายไประหว่างการเก็บ
3. ภาวะของการเก็บตัวอย่างก่อนนำมาใช้อาจไม่เหมาะสม เพราะตัวอย่างทั้งหมดเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง แม้ว่าทางบริษัทระบุว่าน้ำยาเก็บตัวอย่าง สามารถรักษาสภาพเซลล์ไว้ได้อย่างน้อยนาน 1 เดือน แต่เนื่องจากต้องตรวจโปรตีนในเซลล์ เป็นไปได้ว่าโปรตีนอาจเสียสภาพระหว่างการเก็บไว้ ที่อุณหภูมิห้อง ทำให้เกิดผลลบปลอม

แนวทางการวิจัยต่อไป

1. ผู้วิจัยคาดว่าถ้าใช้ตัวอย่างที่เก็บเพื่อนำมาทำการทดสอบเฉพาะการทดสอบนี้โดยตรง ปริมาณเซลล์จะมีมากขึ้น คุณภาพของเซลล์ในตัวอย่างจะใหม่และคงสภาพ อาจทำให้การตรวจได้ความไวที่สูงขึ้น
2. ควรทำการผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน E6 เองทั้ง polyclonal และ monoclonal antibody จะทำให้ลดค่าใช้จ่ายได้สูง เป็นการลดต้นทุนการผลิต
3. เนื่องจากการวิจัยนี้ทดสอบหลักการของการทดสอบเท่านั้น ยังจำเป็นต้องทดสอบความคงตัวของอายุน้ำยาและแถบ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตและความสามารถในการเก็บรักษาไว้ใช้งานต่อไป

โครงการย่อยที่ 2

ชื่อโครงการวิจัย(ภาษาไทย) การตรวจภาวะเมธิลเลชั่นของยีนแอลวันของเชื้อไวรัส แปปิโลมาที่มีความเสี่ยงสูงในเซลล์ขูดปากมดลูกโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบน

(ภาษาอังกฤษ) Detection of high risk human papillomaviruses L1 gene methylation in exfoliated cervical cells by Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาการตรวจเมธิลเลชั่นของยีน L1 ของเชื้อแปปิโลมาที่มีความเสี่ยงสูงโดยวิธี Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) ในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติระยะต่างๆ ได้แก่ normal cervixes, cervical intraepithelial neoplasia (CIN)-1, CIN-2/CIN-3 และ squamous cell carcinoma เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจเมธิลเลชั่นของยีน L1 ของเชื้อแปปิโลมาเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพกับการดำเนินโรค

วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการทดลอง

1. การออกแบบ oligonucleotide probes สำหรับตรวจยีน L1 ของเชื้อ high risk human papillomavirus

นำลำดับดีเอ็นเอของยีน L1 ของเชื้อ Human papillomavirus 14 ชนิด ได้แก่ HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, และ 68 ที่ accession number จาก NCBI ดังตารางที่ 10 มาทำ multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Multalin แล้วหาดำแหน่งที่มีความเหมือนกันมากที่สุดภายในยีน L1 (conserved region) ดังรูปที่ 15 แล้วสังเคราะห์สาย oligonucleotide ดังนี้

HPV18 5'Biotin CAGGGTCATAACAATGGTGTGGTGGCATAATCAATTATTTGTTACTGTGG-3'

HPV16 5'Biotin CAGGGCCACAATAATGGCATTTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGT3'

เนื่องจากการตรวจพบ HPV16 และ 18 มากกว่าร้อยละ 70 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกทางผู้วิจัยจึงทำการออกแบบ oligonucleotide probes สองเส้นที่มีความเหมือน HPV16 และ HPV18 ร้อยละ 100 เป็นหลัก

ตารางที่ 10 รายชื่อ human papillomavirus และเลข Accession

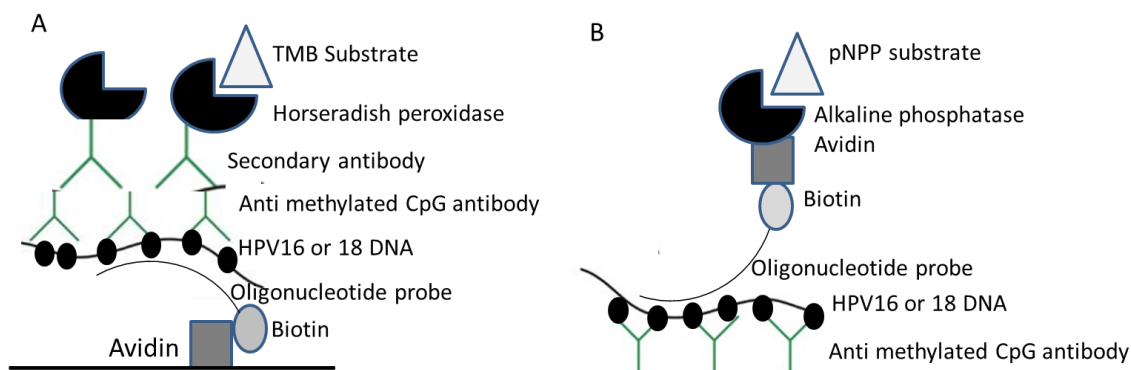
ลำดับ	Human papillomavirus type	Accession number (NCBI Reference Sequence)
1	Human papillomavirus type 16	NC_001526.4 (4775..6292)
2	Human papillomavirus - 18	NC_001357.1 (5430..7136)
3	Human papillomavirus type 31 isolate 118A.31	KU298890.1 (5552..7066)
4	Human papillomavirus type 33 isolate 65C.33	KU298893.1 (5594..7093)
5	Human papillomavirus type 35 isolate QV29782	HQ537729.1 (5601..7109)
6	Human papillomavirus type 39 isolate BF375	KC470249.1 (5643..7160)
7	Human papillomavirus type 45 isolate Qv34163	KC470260.1 (5529..7140)
8	Human papillomavirus type 51 isolate 34A.51	KU298902.1 (5508..7022)
9	Human papillomavirus type 52 isolate 58C.52	KU298909.1 (5634-7145)
10	Human papillomavirus type 56 isolate 87C.56	KU298918.1 (5498..7097)
11	Human papillomavirus type 58 isolate HPV58sc185	FJ385267.1 (5565-7139)
12	Human papillomavirus type 59 isolate Qv33361	KC470266.1 (5606-7132)
13	Human papillomavirus type 66 isolate 67B.66	KU298926.1 (5646-7157)
14	Human papillomavirus type 68 isolate TJ42-68	GQ472851.1 (5515-7132)

ตารางที่ 11 ผลการตรวจภาวะเมธิลเลชันค่าเฉลี่ยเป็นค่าร้อยละจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูก CaSki และ SiHa และจากตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติแบบต่างๆที่มีการติดเชื้อ HPV 16

100 samples	CpG positions in L1 gene			
Histology	5600	5606	5609	5615
Normal (15 samples)	10%	2.36%	5.79%	2.21%
CIN1 (21 samples)	12.43%	2.71%	7.33%	2.14%
CIN2-3 (32 samples)	16.22%	7.73%	12.84%	6.65%
Cervical cancer (32 samples)	52.72%	24.59%	45.22%	23.5%
CaSki	90.5%	64.5%	76.5%	69.0%
SiHa	96.0%	97.5%	77.0%	77.5%

1. การตรวจ HPV16 และ 18 L1 gene methylation โดยวิธี Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)

ได้ทำการพัฒนาวิธี ELISA 2 ระบบได้แก่ ระบบ Indirect ELISA และ Sandwich ELISA ดังรูปที่ 16A และ 16B ตามลำดับ



รูปที่ 16 ระบบการตรวจภาวะเมธิลเลชันโดยวิธี Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)

3.1 ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธี Sandwich ELISA (รูป 16B)

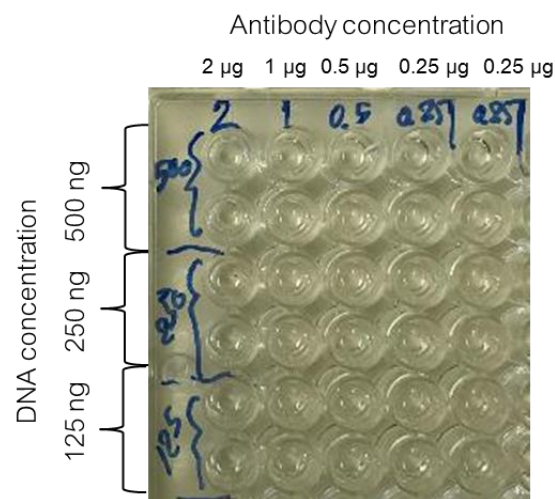
ทำการ coat แอนติบอดี (Anti-5-methylcytosine (clone 10G4), Zymo Research) ลงบน ELISA plate (NUNC) ปริมาณ 2 μ g, 1 μ g, 0.5 μ g และ 0.25 μ g ต่อหลุม โดยใช้ coating buffer (Abcam) 100 μ l/well และทำการ coat ข้ามคืนที่ 4 องศา หรือ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และวันถัดมาทำการล้างด้วย washing buffer (1XTBS/0.05% tween20) จำนวน 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการ block ด้วย 2% bovine serum albumin (SIGMA) ที่ละลายใน washing buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นใส่ดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์ CaSki ปริมาณ 500 ng, 250 ng และ 125 ng ซึ่งดีเอ็นเอถูกทำให้เป็นสายเดี่ยวโดยเติมน้ำยา 0.125 N NaOH/0.05% Tween 20 เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม ELISA diluent (1xTBS/0.05% tween20/ 0.5% BSA) ให้ได้ปริมาตร 100 μ l แล้วดูดไปใส่ใน ELISA plate แล้ววางไว้ที่

อุณภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น ล้างด้วย washing buffer(1XTBS/0.05% tween20) จำนวน 3 ครั้ง ที่อุณภูมิห้อง แล้วเติม biotin labelled oligonucleotide probe ความเข้มข้น 10 pM/well โดยทำการ denature oligonucleotide probe ที่ 95 องศา เป็นเวลา 5 นาทีแล้ววางบนน้ำแข็งทันที แล้วเติม ELISA diluent 100 µl แล้วดูดใส่ในแต่ละหลุมแล้ววางไว้ที่ตู้อบอุณภูมิ 55 องศา เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดการจับกันระหว่าง Captured DNA กับ oligoprobe หลังจากนั้น ล้างด้วย washing buffer (2xSSC/0.05% tween20) จำนวน 3 ครั้ง ที่อุณภูมิห้อง แล้วเติม Streptavidin conjugated Alkaline phosphatase (SA-ALP) 5 µg/well แล้ววางไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น ล้างด้วย washing buffer(1XTBS/0.05% tween20) จำนวน 3 ครั้ง ที่อุณภูมิห้อง แล้วเติม pNPP substrate แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเติม stop solution (2 N NaOH) แล้วนำไปวัดค่า optical density (OD) ที่ 405 nm ด้วยเครื่อง VICTOR plate reader (PerkinElmer)

นอกจากนี้ทางผู้วิจัยได้ทดลองทำการ hybridize ระหว่างดีเอ็นเอจาก CaSki และ oligoprobe ที่ 55 องศา โดยใช้ thermal cycler แล้วจึงนำ DNA-probe hybrid มาทำปฏิกิริยากับ antibody ที่ถูก coat บน plate พบว่าไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น

ในการทดสอบ ELISA ระบบนี้ได้ใช้ wash buffer 2 แบบ ได้แก่ 1XPBS/0.05 tween20 และ 1XTBS/0.05 tween 20 เนื่องจาก PBS อาจจะรบกวนยับยั้งการทำงานของ ALP ได้ แต่ TBS ไม่มีผลต่อ ALP แต่อย่างไรก็ตามได้ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน

ผลการทดลองไม่ประสบความสำเร็จไม่พบการเกิดปฏิกิริยาโดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของสายละลาย และเมื่อวัดค่า OD พบว่ามีค่าน้อยกว่า 0.1 ในทุกหลุมที่ทำการทดสอบดังรูปที่ 3 และผู้วิจัยได้ทดสอบทำปฏิกิริยาระหว่าง SA-ALP กับ substrate pNPPเพื่อทดสอบน้ำยา พบว่าเกิดปฏิกิริยาสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง



รูปที่ 17 ผลการทดลอง sandwich Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)

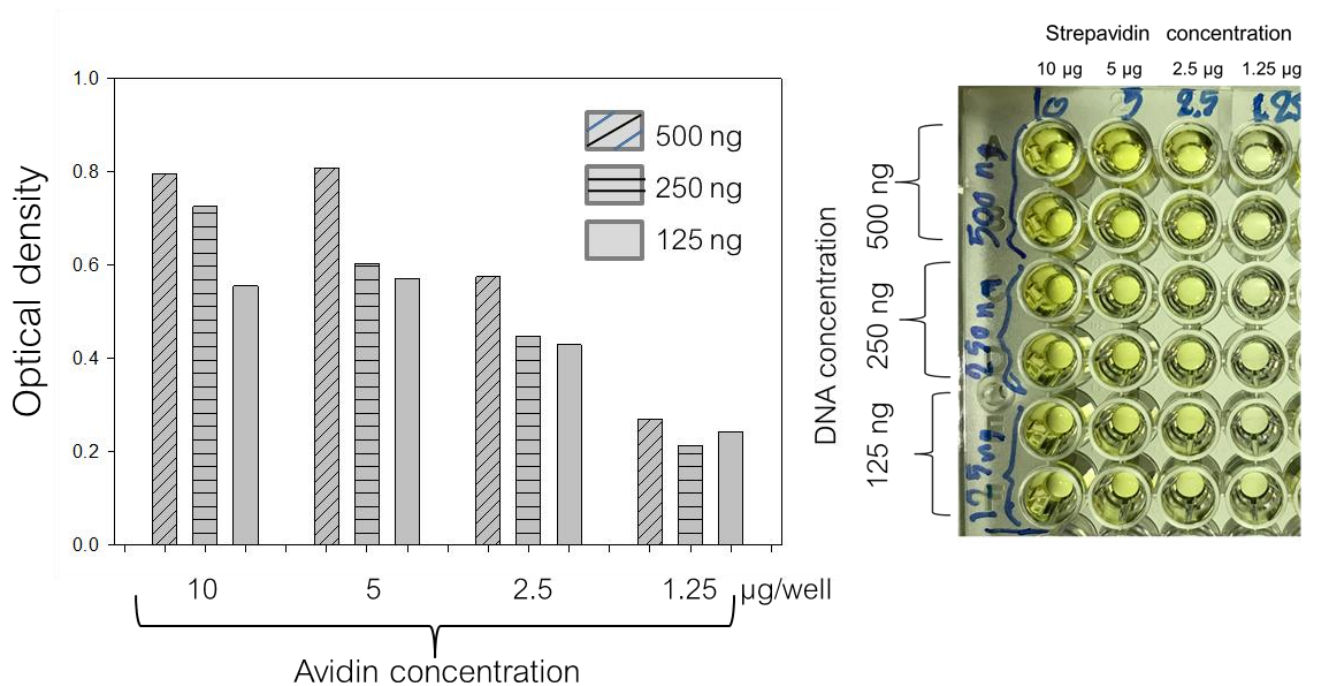
3.2 ทำการหาสถานะที่เหมาะสมโดยวิธี indirect ELISA (รูป 16A)

ทำการ coat streptavidin (Abcam) ลงบน ELISA plate (NUNC) ปริมาณต่อหลุมได้แก่ 10 μ g, 5 μ g, 2.5 μ g และ 1.25 μ g โดยใช้ coating buffer (Abcam) 100 μ l/well และเวลาที่ใช้ในการ coat ได้แก่ 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และข้ามคืนที่ 4 องศา และทำการล้างด้วย washing buffer (1XPBS/0.05% tween20) จำนวน 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการ block ด้วย 2% และ 3% bovine serum albumin (SIGMA) ที่ละลายใน 1XPBS ที่มีและไม่มี 0.05% tween20 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และข้ามคืนที่ 4 องศา หลังจากนั้นใส่ biotin labelled oligonucleotide probe ความเข้มข้น 10 pM, 20 pM, 30 pM และ 40 pM ต่อหลุม หลังจากนั้นล้างด้วย washing buffer (1XPBS/0.05% tween20) จำนวน 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นใส่ streptavidin ที่สกัดจากเซลล์ CaSki และถูกทำให้เป็นสายเดี่ยวโดยน้ำยา 0.125 N NaOH/0.05% Tween 20 เป็นเวลา 10 นาที ปริมาณ 500 ng, 250 ng และ 125 ng แล้วเติม ELISA diluent (1xPBS/0.05% tween20/0.5% BSA) ให้ได้ปริมาตร 100 μ l แล้วดูดไปใส่ใน ELISA plate แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการจับกันระหว่าง Captured DNA กับ oligoprobe หลังจากนั้นล้างด้วย washing buffer (2xSSC/0.05% tween20) จำนวน 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติม primary antibody (Anti-5-methylcytosine (clone 10G4), Zymo Research) ความเข้มข้น 1 μ g (1:100) และ 0.5 μ g (1:200) ต่อหลุมแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย washing buffer (1XPBS/0.05% tween20) จำนวน 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม secondary antibody ที่ถูกติดฉลากด้วย horseradish peroxidase 1:1,000 (จาก stock 1 μ g/ μ l) แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย washing buffer (1XPBS/0.05% tween20) จำนวน 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม TMB substrate ที่วางไว้ในความมืด 10 และ 20 นาที แล้วเติม stop solution (H₂SO₄) แล้วนำไปวัดค่า optical density (OD) ที่ 450 nm ด้วยเครื่อง VICTOR plate reader (PerkinElmer)

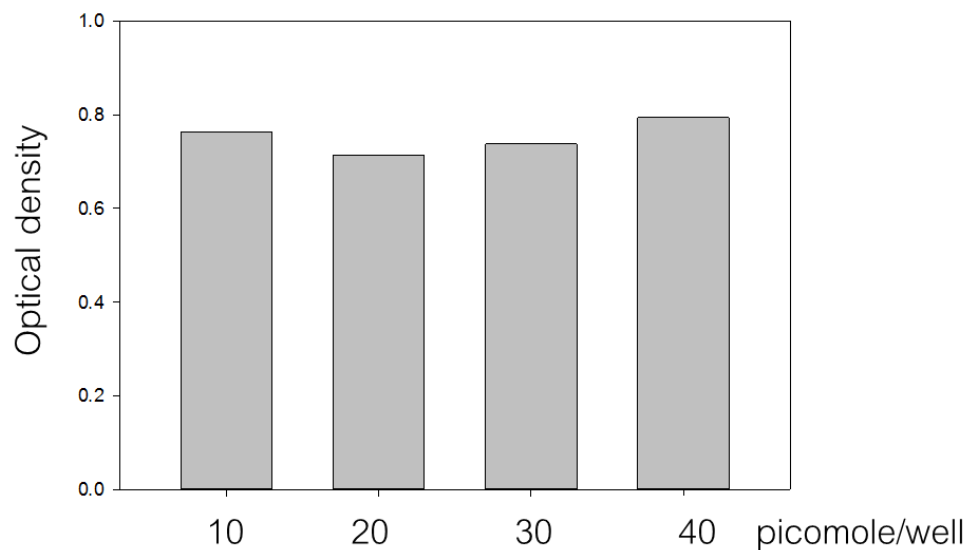
นอกจากนี้ทางผู้วิจัยได้ทดลองทำการ hybridize ระหว่างดีเอ็นเอจาก CaSki และ HeLa กับ oligoprobe ต่อ HPV16 และ HPV18 ตามลำดับ โดยใช้ hybridization buffer 2 แบบได้แก่ 1XPBS/0.05% tween20/0.5% BSA และ Hybridization buffer (6XSSC/0.5% SDS/50% Formamide/Denhardt's solution) ที่ 55 องศา โดยใช้ thermal cycler แล้วจึงนำ DNA-probe hybrid มาทำปฏิกิริยากับ streptavidin ที่ถูก coat บน plate

ผลการทดลองพบว่าค่า optical density (OD) มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของ streptavidin มีค่าลดลง แตกต่างกันไปเล็กน้อย และความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ลดลงก็ทำให้ค่า OD ลดลงตามลำดับดังรูปที่ 18 ค่าความเข้มข้นของ primary antibody ที่แตกต่าง (1:100 และ 1:200) มีผลต่อค่า OD ที่ลดลงตามความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ลดลง แต่ความเข้มข้นของ oligoprobe ที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อค่า OD ดังรูปที่ 19

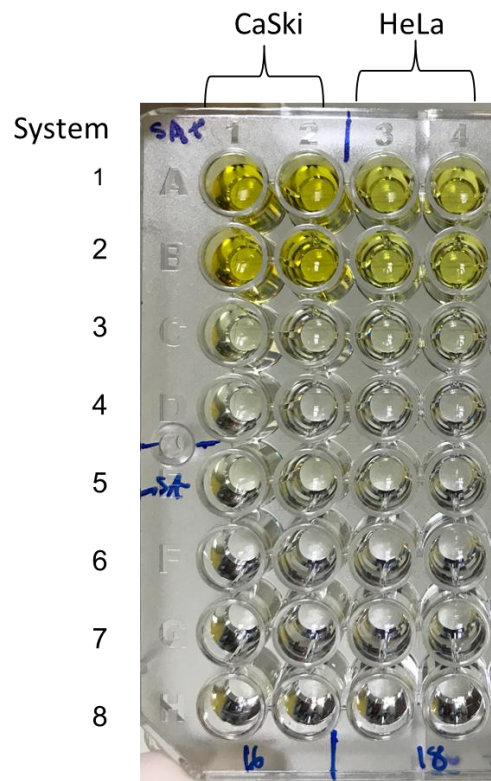
แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าการทำ ELISA ด้วยระบบ Indirect ELISA นี้มีการเกิด non specific เกิดขึ้นในหลุมที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอของ CaSki หรือ HeLa จึงได้ทำการทดสอบเพื่อดูว่าปัจจัยอะไรที่ทำให้เกิด non specific โดยพบว่า biotin labelled oligonucleotide ต่อ HPV16 และ HPV18 เป็นตัวที่ทำให้เกิด non specific ขึ้นในระบบที่ 2 ดังรูปที่ 20 และ ตารางที่ 12 ซึ่งผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่ามีหมู่ methyl group อยู่ในเส้น oligonucleotide ทำให้ anti-5-methylcytosine สามารถทำปฏิกิริยากับ methyl group ได้ในกรณีไม่มี target DNA



รูปที่ 18 กราฟแสดงค่า optical density ที่วัดได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอของ CaSki และความเข้มข้นของ streptavidin ที่แตกต่างกัน ความเข้มข้นของ oligoprobe ที่ใช้ได้แก่ 20 picomole ต่อหลุม ความเข้มข้นของ primary antibody ได้แก่ 1:200 (จาก stock 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) และความเข้มข้นของ secondary antibody ได้แก่ 1:1,000 (จาก stock 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)



รูปที่ 19 กราฟแสดงค่า optical density ที่วัดได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอของ CaSki 500 ng ความเข้มข้นของ streptavidin 5 μg ต่อหลุม และความเข้มข้นของ oligonucleotideprobe ที่แตกต่างกัน



รูปที่ 20 ภาพแสดงการทดสอบหาปัจจัยเกิดการจับแบบไม่จำเพาะจากการทำ indirect ELISA

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบหาปัจจัยเกิดการจับแบบไม่จำเพาะจากการทำ indirect ELISA

Reagents/ System	Avidin	Blocking	Oligoprobe HPV16 or HPV18	DNA from Caski or HeLa	Anti-5- methylcytosine (1:200)	Secondary antibody (1:1000)	TMB	OD
1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	2.399
2	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	2.359
3	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	0.158
4	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	0.080
5	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	0.114
6	No	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	0.052
7	No	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	0.061
8	No	Yes	No	No	No	Yes	Yes	0.096

สรุปผลการดำเนินการ

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคทางอณูวิทยาและเทคนิค ELISA based hybridization เพื่อตรวจดูภาวะเมธิลเลชันของยีน L1 ของเชื้อ Human papillomavirus (HPV) ชนิด 16 เนื่องจากว่าในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกพบการติดเชื้อ HPV16 มากถึงร้อยละ 50 ดังนั้นทางผู้วิจัยเห็นสมควรว่าควรเริ่มต้นพัฒนาเทคนิค ELISA จึงควรเริ่มจากเชื้อชนิดเดียวก่อนเมื่อเทคนิค ELISA ที่ถูกพัฒนามีความคงที่ สามารถใช้ได้จริงแล้ว จึงค่อยพัฒนา เทคนิคให้สามารถตรวจเชื้อในกลุ่มความเสี่ยงสูงชนิดอื่น เช่น HPV18 ต่อไป ดังนั้นรายงานฉบับปัจจุบันนี้จึงสนใจและขอเสนอเชื้อ HPV16

งานวิจัยนี้ในขั้นแรกใช้วิธีทางอณูชีวโมเลกุลได้แก่ polymerase chain reaction และ pyrosequencing เพื่อประเมินภาวะเมธิลเลชันของยีน L1 ทางผู้วิจัยพบว่าการเกิดภาวะเมธิลเลชันบริเวณยีน L1 ของเชื้อ HPV16 มีค่าสูงในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติโดยเฉพาะในเซลล์มะเร็งแต่มีค่าต่ำในกลุ่มเซลล์ปกติและกลุ่ม CIN1 และเมื่อดู CpG ในแต่ละตำแหน่งจะพบว่าตำแหน่ง CpG 5600 เป็นตำแหน่งที่มีค่าเมธิลเลชันสูงที่สุดและสามารถใช้แยกเซลล์มะเร็งปากมดลูก (cancerous lesion) และภาวะก่อนเป็นมะเร็ง (pre cancerous lesions) ได้ดีที่สุด ตามด้วย CpG ตำแหน่ง 5609 และการดูผลตรวจรวมทั้ง CpG 5600 และ 5609 สามารถเพิ่มความไวและความจำเพาะได้มากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลเพื่อตรวจหาเชื้อ HPV16/18 และไวรัสความเสี่ยงสูงชนิดอื่นๆอีก 14 ชนิด ร่วมกับการตรวจวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา (Pap smear) แต่อย่างไรก็ตามทางผู้วิจัยเห็นว่าถ้ามีการนำดีเอ็นเอที่เหลือจากการตรวจหาเชื้อ HPV มาทำการตรวจภาวะเมธิลเลชันของยีน L1 จะสามารถจำแนกผู้หญิงที่ติดเชื้อ HPV16 ที่มีภาวะเสี่ยงในการมีเซลล์ผิดปกติได้อย่างมีความจำเพาะมากขึ้น แต่เทคนิคทางชีวโมเลกุลมีราคาแพง และมีหลายขั้นตอนตั้งแต่การทำ Bisulfite modification การทำ polymerase chain reaction และ pyrosequencing ทางผู้วิจัยจึงได้คิดที่จะพัฒนาวิธี ELISA เพื่อตรวจภาวะเมธิลเลชันของยีน L1 ของเชื้อ HPV16 ซึ่งเป็นตรวจภาวะเมธิลเลชันของ CpGs ของยีน L1 ทั้งหมดโดยใช้ oligonucleotide probe ที่จำเพาะต่อยีน HPV16 L1 เป็นตัวเหนี่ยวนำยีน HPV16 L1 ให้มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ anti-5-methylcytosine โดยค่า optical density ที่สูงจะสัมพันธ์กับการมีภาวะเมธิลเลชันที่สูง ซึ่งทางผู้วิจัยได้เลือกเทคนิค ELISA 2 รูปแบบ ได้แก่ Indirect ELISA และ sandwich ELISA มาทดสอบกับดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูก CaSki และการตรวจแบบ sandwich ELISA มีขั้นตอนที่ใช้เวลาน้อยกว่า indirect ELISA แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจแบบ sandwich ELISA ยังไม่ประสบผลสำเร็จ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงทำรูปแบบที่ 2 ได้แก่ indirect ELISA โดยทางผู้วิจัยพบว่าการใช้ ปริมาณของ streptavidin primary antibody (anti-5-methylcytosine) และดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมีผลต่อค่า optical density ที่ลดลงตามความเข้มข้นของสารทั้งสามชนิด แต่ความเข้มข้นของ oligonucleotide probe ที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อค่า optical density แต่อย่างไรก็ตามปัญหาที่พบได้แก่การมี non specific เกิดขึ้นในกลุ่มที่ไม่มีดีเอ็นเอ โดยหลังจากทำการหาสภาวะต่างๆเช่น ปริมาณ BSA ที่ใช้ในการ blocking หรือเวลาที่ใช้ในการ coat streptavidin ลงบน ELISA plate เป็นต้น ก็ไม่สามารถแก้ปัญหา การเกิด non specific ได้และจากการทดลองทำให้ผู้วิจัยคิดว่าสาเหตุอาจเกิดจากตัว oligonucleotide probe เอง เพราะในระบบที่มี oligonucleotide probe แต่ไม่มีดีเอ็นเอจะมีค่า optical density ที่สูง แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากน้ำยาที่ใช้ในการทำเทคนิค ELISA มีความหลากหลายและมีการใช้เวลาใน

การสั่งซื้อจึงทำให้เมื่อครบกำหนดเวลาการทำวิจัยจึงยังไม่สามารถแก้ปัญหา non specific ได้ทันเวลาจึงยังไม่มี การนำเทคนิค ELISA มาตรวจกับตัวอย่างจริงจนกว่าจะสามารถแก้ปัญหา non specific ได้

การวิเคราะห์ผล

ผลที่ได้จะพบว่าเทคนิค indirect ELISA ยังพบมี non specific เกิดขึ้น ส่วน sandwich ELISA ไม่พบว่ามีปฏิกิริยาเกิดขึ้น ผู้วิจัยวิเคราะห์ปัญหาที่อาจเป็นสาเหตุ ดังนี้

1. กรณี indirect ELISA จากการทดลองผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าเกิดจาก oligonucleotide probe ขนาด 50 base pairs อาจมีการใช้หมู่ cytosine ที่มี methyl group ในกระบวนการสังเคราะห์เส้น nucleotide ซึ่งทางผู้วิจัยจะทำการสอบถามข้อมูลเพิ่มเติมจากบริษัทที่สังเคราะห์ และเตรียมการที่จะสั่ง oligonucleotide probe ใหม่
2. กรณี sandwich ELISA อาจเกิดจากปัญหาการ coat anti-5-methylcytosine บน ELISA plate ซึ่งอาจจะไม่มีแอนติบอดีเกาะอยู่บน ELISA plate หรือมีปริมาณแอนติบอดีที่น้อยเกินไป

แนวทางการวิจัยต่อไป

1. สั่ง oligonucleotide เส้นใหม่พร้อมสอบถามรายละเอียดการสังเคราะห์เส้น oligonucleotide เพื่อป้องกันการมีหมู่ methyl ใน probe
2. ทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ก่อนนำมาจับกับ oligonucleotide probe เพื่อลดโอกาสที่ anti-5-methylcytosine จะจับกับหมู่ methyl ตรงตำแหน่งอื่นๆที่ไม่ใช่ยีน HPV ในกรณีที่ไวรัสมีการแทรกจีโนมเข้าสู่โครโมโซมของคน
3. ควรทำการผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อหมู่ methyl เองทั้ง polyclonal และ monoclonal antibody จะทำให้ลดค่าใช้จ่ายได้สูง เป็นการลดต้นทุนการผลิต
4. เนื่องจากการวิจัยนี้ทดสอบหลักการของการทดสอบเท่านั้น ซึ่งยังไม่ประสบผลสำเร็จแต่อย่างใดก็ตามยังมีโอกาสในการพัฒนา และทำการทดสอบกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจต่อไป

บทสรุปการวิเคราะห์ภาพรวมของแผนงาน

การตรวจกรองมะเร็งปากมดลูกในปัจจุบันใช้การตรวจทางเซลล์วิทยา เพื่อระบุระยะของโรค และยังมีการทดสอบเพิ่มการตรวจหาเชื้อ HPV16/18 และไวรัสความเสี่ยงสูงชนิดอื่นๆอีก 14 ชนิด เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสแปปิโลมาเท่านั้น แต่ยังไม่มีการทดสอบใดที่ไม่สามารถพยากรณ์โอกาสของการเป็นโรคมะเร็งได้ ทางผู้วิจัยเห็นว่าควรมีการนำการทดสอบที่จำเพาะที่สามารถจำแนกได้ว่าผู้หญิงที่มีความเสี่ยงต่อการมีเซลล์ผิดปกติ หรือพัฒนาไปเป็นมะเร็งออกจากกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่ำ การตรวจโปรตีนก่อมะเร็งของไวรัส HPV กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูง เช่น โปรตีน E6 หรือการตรวจภาวะเมธิเลชั่นของยีน L1 เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพที่มีความจำเพาะกับเซลล์ผิดปกติ

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจหาโปรตีนจำเพาะของ HPV16E6 ด้วยวิธี Lateral flow immunoassay โดยใช้อนุภาคนาโนทองคำในการตรวจจับร่วมกับแอนติบอดีได้เป็นผลสำเร็จ โดยมีการเพิ่มความไวด้วยการเคลือบโปรตีนจีที่อนุภาคนาโนทองคำ ซึ่งการพัฒนาสามารถหาสถานะและทดสอบตรวจจับโปรตีนบริสุทธิ์ HPV16E6 ได้ที่ปริมาณ 312.5 นาโนกรัม ในเวลา 15 นาที เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ พบว่ามีความจำเพาะต่อ HPV16 สูง แต่ความไวในการตรวจยังไม่เป็นที่น่าพอใจ ซึ่งพิจารณาว่าน่าจะมีสาเหตุจากตัวอย่างที่นำมาใช้คุณภาพไม่เหมาะสม

นอกจากนี้ยังได้มีความพยายามในการพัฒนาวิธีการตรวจการเกิดภาวะเมธิเลชั่นบริเวณยีน L1 ของเชื้อ HPV16 และพบว่าตำแหน่ง CpG 5600 และ 5609 มีค่าสูงในเซลล์มะเร็งปากมดลูก (cancerous lesion) แต่มีค่าต่ำในกลุ่มภาวะก่อนเป็นมะเร็ง (pre-cancerous lesions) ดังนั้นจึงควรนำการตรวจที่มีความจำเพาะที่สามารถแยกภาวะเซลล์ผิดปกติระดับรุนแรงกับระดับต่ำมาตรวจร่วมกับการตรวจหาเชื้อ HPV16/18 และไวรัสความเสี่ยงสูงชนิดอื่นๆอีก 14 ชนิด ร่วมกับการตรวจวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา (Pap smear) เพื่อที่จะลดจำนวนผู้หญิงที่ต้องมาทำ colposcopy ลงและลดระยะความถี่ของการที่ต้องมาตรวจซ้ำ

อย่างไรก็ตามเนื่องจากเทคนิค ELISA ยังพบมีผลบวกปลอมเกิดขึ้น แม้ทางผู้วิจัยได้พยายามปรับขั้นตอนการทำ รวมทั้งองค์ประกอบของน้ำยาที่ใช้ เพื่อลดการเกิดผลบวกปลอมดังกล่าว ทั้งนี้ผู้วิจัยจะพยายามหาสาเหตุและแก้ไขต่อไป นอกจากนี้เทคนิค ELISA ระบบอื่นๆ จะถูกนำมาพัฒนาเพื่อให้ได้วิธีการตรวจภาวะเมธิเลชั่นของยีน L1 ที่เหมาะสมที่สุดต่อไป

สำหรับการพัฒนา strip ที่มีกระบวนการตรวจกับตัวอย่างที่รวดเร็วกว่าวิธี ELISA ยังคงต้องมีการประเมินความไว และความจำเพาะของการทดสอบ กับตัวอย่างคนไข้ที่จำนวนมากกว่านี้ และเน้นกระบวนการเก็บตัวอย่างจากคนไข้โดยตรง เพื่อนำมาตรวจในทันทีอาจจะช่วยเพิ่มความไวในการทดสอบ เนื่องจากตัวอย่างที่ใ้ ในปัจจุบันเป็นตัวอย่างที่เหลือจากงานประจำ Pap smear และการตรวจหาเชื้อ HPV16/18

ตารางสรุปภาพรวมการดำเนินโครงการ

โครงการ	ผลผลิต		ผลลัพธ์
	เชิงปริมาณ	เชิงคุณภาพ	
โครงการย่อยที่ 1	ชุดตรวจแอนติเจน HPV-16E6 ต้นแบบ 1 ชุด	ต้นแบบชุดตรวจแอนติเจน HPV-16E6	1. ต้นแบบชุดตรวจแอนติเจน HPV16E6 ที่มีความไวในการตรวจจับโปรตีนบริสุทธิ์ ที่ไม่น้อยกว่า 312.5 นาโนกรัมในเวลา 15 นาที และมีความจำเพาะต่อ HPV16 2. ผลการประเมินคุณภาพชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ได้ความไวในการตรวจในตัวอย่างมะเร็ง ร้อยละ 40 CIN3 ร้อยละ 22.22 CIN2 ร้อยละ 50 CIN1 ร้อยละ 28.6 และกลุ่ม inflammation และ AS-CUS ร้อยละ 18.18
โครงการย่อยที่ 2	รายงานการวิจัย จำนวน 1 เล่ม	1.วิธีการตรวจเมธิลเลชั่นของยีน L1 โดยวิธี ELISA 2.บทความตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร	1. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2. ภาวะเมธิลเลชั่นของยีน L1 ของเชื้อ HPV16 ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติระดับต่างๆ จำนวน 100 ตัวอย่างโดยพบว่าตำแหน่ง CpGs 5600 และ 5609 มีค่าภาวะเมธิลเลชั่นในระดับที่สูงมากในเซลล์มะเร็งปากมดลูกเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติและ CIN1 3. ในขณะนี้ทางผู้วิจัยยังไม่ประสบผลสำเร็จในการพัฒนาเทคนิค ELISA แต่ผู้วิจัยจะมุ่งมั่นทำการพัฒนา คำนึงว่าให้ประสบผลสำเร็จในที่สุด

เอกสารอ้างอิง

1. Clifford, G.M., et al., Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 2003. **88**(1): p. 63-73.
2. Liu, Y., et al., Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol*, 1999. **73**(9): p. 7297-307.
3. Lee, S.S., et al., Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol*, 2000. **74**(20): p. 9680-93.
4. Klingelutz, A.J., S.A. Foster, and J.K. McDougall, Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 1996. **380**(6569): p. 79-82.
5. Dostatni, N., et al., The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev*, 1991. **5**(9): p. 1657-71.
6. Duensing, S. and K. Munger, Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein can induce abnormal centrosome duplication through a mechanism independent of inactivation of retinoblastoma protein family members. *J Virol*, 2003. **77**(22): p. 12331-5.
7. Dyson, N., et al., The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 1989. **243**(4893): p. 934-7.
8. Edmonds, C. and K.H. Vousden, A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Virol*, 1989. **63**(6): p. 2650-6.
9. U.S. Cancer Statistics Working Group. United States Cancer Statistics: 1999–2007 Incidence and Mortality Web-based Report. Atlanta (GA): Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, and National Cancer Institute. 2010 [cited; Available from: <http://www.cdc.gov/uscs>].
10. Christopherson, W.M., et al., Cervix cancer death rates and mass cytologic screening. *Cancer*, 1970. **26**(4): p. 808-11.
11. Adami, H.O., et al., Survival trend after invasive cervical cancer diagnosis in Sweden before and after cytologic screening. 1960-1984. *Cancer*, 1994. **73**(1): p. 140-7.

12. Anderson, G.H., et al., Invasive cancer of the cervix in British Columbia: a review of the demography and screening histories of 437 cases seen from 1985-1988. *Obstet Gynecol*, 1992. **80**(1): p. 1-4.
13. The Green Sanctuary. What is Pap Smear. 2009 August 11, 2010 [cited; Available from: <http://greensanctuary56.blogspot.com/2009/02/what-is-pap-smear.html>.
14. Yin, D.S., et al., Inhibition of tumor metastasis in vivo by combination of paclitaxel and hyaluronic acid. *Cancer letters*, 2006. **243**(1): p. 71-9.
15. Joste, N., Overview of the cytology laboratory: specimen processing through diagnosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2008. **35**(4): p. 549-63; viii.
16. Boronow, R.C., Death of the Papanicolaou smear? A tale of three reasons. *Am J Obstet Gynecol*, 1998. **179**(2): p. 391-6.
17. Lieu, D., The Papanicolaou smear: its value and limitations. *J Fam Pract*, 1996. **42**(4): p. 391-9.
18. Arbyn, M., et al., Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*, 2008. **111**(1): p. 167-77.
19. Safaeian, M., D. Solomon, and P.E. Castle, Cervical Cancer Prevention--Cervical Screening: Science in Evolution. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 2007. **34**(4): p. 739-760.
20. Angstetra, D., et al., Should liquid-based cytology be performed prior to colposcopy? A comparison of the accuracy, unsatisfactory rates and cost in a tertiary referral setting. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 2009. **49**(6): p. 681-4.
21. Burd, E.M., Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical microbiology reviews*, 2003. **16**(1): p. 1-17.
22. Steben, M. and E. Duarte-Franco, Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic oncology*, 2007. **107**(2 Suppl 1): p. S2-5.
23. Warrino, D.E., et al., Human papillomavirus L1L2-E7 virus-like particles partially mature human dendritic cells and elicit E7-specific T-helper responses from patients with cervical intraepithelial neoplasia or cervical cancer in vitro. *Human Immunology*, 2005. **66**(7): p. 762-772.

24. Brandenberger, A.W., et al., Detection of human papillomavirus in vulvar carcinoma. A study by in situ hybridisation. Arch Gynecol Obstet, 1992. **252**(1): p. 31-5.
25. Oliveira, L.H., et al., Human papillomavirus status and cervical abnormalities in women from public and private health care in Rio de Janeiro State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2006. **48**(5): p. 279-85.
26. Lazcano-Ponce, E., et al., A pilot study of HPV DNA and cytology testing in 50,159 women in the routine Mexican Social Security Program. Cancer Causes Control, 2010. **21**(10): p. 1693-1700.
27. Gnanamony, M., A. Peedicayil, and P. Abraham, An overview of human papillomaviruses and current vaccine strategies. Indian journal of medical microbiology, 2007. **25**(1): p. 10-7.
28. Kisseljov, F.L., Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. Biochemistry. Biokhimiia, 2000. **65**(1): p. 68-77.
29. Munoz, N., et al., Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine, 2006. **24 Suppl 3**: p. S3/1-10.
30. Finzer, P., A. Aguilar-Lemarroy, and F. Rosl, The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. Cancer letters, 2002. **188**(1-2): p. 15-24.
31. Bosch, F.X., et al., Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. Journal of the National Cancer Institute, 1995. **87**(11): p. 796-802.
32. Motoyama, S., et al., The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. The Kobe journal of medical sciences, 2004. **50**(1-2): p. 9-19.
33. Bhattarakosol, P., A. Poonnaniti, and S. Niruthisard, Detection and typing of human papillomavirus in cervical cancer in the Thai. Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet, 1996. **79 Suppl 1**: p. S56-64.
34. Bhattarakosol, P., et al., Survey of human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia in Thai women. Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet, 2002. **85 Suppl 1**: p. S360-5.
35. Munger, K., et al., Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. Oncogene, 2001. **20**(54): p. 7888-98.

36. Mantovani, F. and L. Banks, The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*, 2001. **20**(54): p. 7874-87.
37. Kabsch, K. and A. Alonso, The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *Journal of virology*, 2002. **76**(23): p. 12162-72.
38. Fehrman, F., D.J. Klumpp, and L.A. Laimins, Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *Journal of virology*, 2003. **77**(5): p. 2819-31.
39. Woodman, C.B., S.I. Collins, and L.S. Young, The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews. Cancer*, 2007. **7**(1): p. 11-22.
40. Cuzick, J., et al., A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. *British journal of cancer*, 2000. **83**(5): p. 561-5.
41. Ratnam, S., E.L. Franco, and A. Ferenczy, Human papillomavirus testing for primary screening of cervical cancer precursors. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2000. **9**(9): p. 945-51.
42. Siritantikorn, S., et al., Detection and typing of human papilloma virus DNAs in normal cervix, intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Bangkok. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 1997. **28**(4): p. 707-10.
43. Thomas, D.B., et al., Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. I. Risk factors for invasive cervical carcinomas with human papillomavirus types 16 and 18 DNA. *American journal of epidemiology*, 2001. **153**(8): p. 723-31.
44. Sukvirach, S., et al., Population-based human papillomavirus prevalence in Lampang and Songkla, Thailand. *The Journal of infectious diseases*, 2003. **187**(8): p. 1246-56.
45. Abraham, A.M., R. Kannangai, and G. Sridharan, Nanotechnology: a new frontier in virus detection in clinical practice. *Indian journal of medical microbiology*, 2008. **26**(4): p. 297-301.
46. Leuvering, J.H., et al., Sol particle immunoassay (SPIA). *Journal of immunoassay*, 1980. **1**(1): p. 77-91.

47. Bui, M.P., T.J. Baek, and G.H. Seong, Gold nanoparticle aggregation-based highly sensitive DNA detection using atomic force microscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2007. **388**(5-6): p. 1185-90.
48. Yanez-Sedeno, P. and J.M. Pingarron, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2005. **382**(4): p. 884-6.
49. Liu, X., et al., A one-step homogeneous immunoassay for cancer biomarker detection using gold nanoparticle probes coupled with dynamic light scattering. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. **130**(9): p. 2780-2.
50. Ymeti, A., et al., Fast, ultrasensitive virus detection using a Young interferometer sensor. *Nano letters*, 2007. **7**(2): p. 394-7.
51. Wang, Y.F., et al., Visual gene diagnosis of HBV and HCV based on nanoparticle probe amplification and silver staining enhancement. *Journal of medical virology*, 2003. **70**(2): p. 205-11.
52. Duan, L., et al., Rapid and simultaneous detection of human hepatitis B virus and hepatitis C virus antibodies based on a protein chip assay using nano-gold immunological amplification and silver staining method. *BMC infectious diseases*, 2005. **5**: p. 53.
53. Huang, S.H., Gold nanoparticle-based immunochromatographic test for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical specimens. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2006. **373**(1-2): p. 139-43.
54. Tang, S., et al., Nanoparticle-Based biobarcode amplification assay (BCA) for sensitive and early detection of human immunodeficiency type 1 capsid (p24) antigen. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, 2007. **46**(2): p. 231-7.
55. Tripp, R.A., et al., Bioconjugated nanoparticle detection of respiratory syncytial virus infection. *International journal of nanomedicine*, 2007. **2**(1): p. 117-24.
56. Pipper, J., et al., Catching bird flu in a droplet. *Nature medicine*, 2007. **13**(10): p. 1259-63.
57. Valanne, A., et al., A sensitive adenovirus immunoassay as a model for using nanoparticle label technology in virus diagnostics. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 2005. **33**(3): p. 217-23.

58. El-Sayed, I.H., X. Huang, and M.A. El-Sayed, Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano letters*, 2005. **5**(5): p. 829-34.
59. Thanh, N.T. and Z. Rosenzweig, Development of an aggregation-based immunoassay for anti-protein A using gold nanoparticles. *Analytical chemistry*, 2002. **74**(7): p. 1624-8.
60. Link, S. and M.A. El-Sayed, Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annual review of physical chemistry*, 2003. **54**: p. 331-66.