

รายงานเบื้องต้น

การศึกษาเบื้องต้นของการปรับสภาวะที่เหมาะสม เพื่อการเพิ่มปริมาณยีน 3'UTR ของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซี

อนุสรณ์ เกียรติธนพล*, ดวงกมล ชันธเลิศ*, เยาวลักษณ์ วิปสุณีนัน**, อัญชลี ศิษยนเรนทร์*

บทคัดย่อ

- บทนำ:** เชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซี (Hepatitis C virus; HCV) เป็นสาเหตุสำคัญของโรคตับอักเสบ โรคตับแข็งและมะเร็งตับ เชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีจำแนกได้ ๖ สายพันธุ์หลัก การตรวจหาไวรัสตับอักเสบชนิดซีมีความสำคัญสำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ การรักษา และการตรวจกรองเลือดบริจาค วิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีส่วนใหญ่จะตรวจหาในบริเวณ 5'UTR ที่มีความหลากหลายและผันแปรต่ำ (conserved region) อย่างไรก็ตามในบริเวณ 5'UTR อาจเป็นยีนเป้าหมายที่ไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรม เนื่องจากการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิแบบซับซ้อน วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 3'UTR ของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีโดยวิธี reverse transcription-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR)
- วิธีการศึกษา:** cDNA ถูกสังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีโดยวิธี reverse transcription (RT) และทำการปรับสภาวะของการทำ nested PCR ๖ แบบ (I-VI)
- ผลการศึกษา:** ตรวจพบการเพิ่มปริมาณยีนได้เฉพาะการปรับสภาวะที่ ๕ และ ๖ เท่านั้น
- วิจารณ์ และ** การเพิ่มปริมาณยีนในบริเวณ 3'UTR ของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีโดยวิธี RT-nested PCR สภาวะที่ ๖
- สรุปผลการศึกษา:** มีความเหมาะสมที่สุด อย่างไรก็ตามในอนาคตควรทำการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณยีนในบริเวณ 3'UTR ของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก
- คำสำคัญ:** ไวรัสตับอักเสบชนิดซี, Nested PCR, 3'UTR

วันที่รับบทความ: ๒ เมษายน ๒๕๕๘

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๘ กุมภาพันธ์ ๒๕๕๙

* ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

** ฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ผู้ติดต่อ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชลี ศิษยนเรนทร์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ๖๕๐๐๐ โทรศัพท์ ๐๕๕-๙๖๔๖๒๗ อีเมล sisaya@rocketmail.com

บทนำ

เชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซี (hepatitis C virus) เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคตับอักเสบ ปัจจุบันมีผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีแบบเรื้อรังทั่วโลกประมาณ ๑๓๐ - ๑๕๐ ล้านคน โดยที่ประชากรกลุ่มนี้มีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคตับแข็งและมะเร็งตับ เชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีมีสารพันธุกรรมที่ประกอบด้วยปลาย 5'UTR, C, E, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B, และปลาย 3'UTR เชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีมีรหัสพันธุกรรมแตกต่างกันทำให้จำแนกเชื้อได้ ๖ สายพันธุ์หลัก (genotype) และสายพันธุ์ย่อย (subtype) ที่แตกต่างกัน^{๑,๒} สำหรับประเทศไทยพบอัตราความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตร้อยละ ๐.๘ - ๑.๔^{๓-๕} การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีคือการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส (anti-HCV antibody) เช่น วิธี enzyme immunoassay (EIA) และวิธี enhanced chemiluminescence immunoassay (CIA) เป็นต้น การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสและวิธีทางอณูชีววิทยา (molecular test) ที่ตรวจหาสารพันธุกรรมโดยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และวิธี real-time PCR เป็นต้น สำหรับวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีที่มีประสิทธิภาพมักตรวจหาอินเป้าหมายที่มีความหลากหลายและผันแปรต่ำ (conserved region) เพื่อให้สามารถตรวจได้ครอบคลุมเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีทุกสายพันธุ์ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีพบว่าอินบริเวณ 5'UTR เป็นตำแหน่งอินที่มีความหลากหลายและผันแปรต่ำ^๖ อย่างไรก็ตาม การเกิดโครงสร้างทุติยภูมิแบบซับซ้อน (complex secondary structures) ของอินบริเวณ 5'UTR อาจมีผลต่อการจับของไพรเมอร์ (primer) หรือ probe ในขั้นตอนของวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีได้^๗ จากการศึกษา ยังพบว่าอินบริเวณ 3'UTR จัดเป็นอินบริเวณที่มีความหลากหลายและผันแปรต่ำ^{๘-๑๐} ดังนั้นอินบริเวณ 3'UTR จึงอาจเป็นอินเป้าหมายอีกทางเลือกหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซี Drexler และคณะได้พัฒนาวิธีการตรวจการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีโดยวิธี X-tail real-time reverse transcriptase (RT)-PCR (X-tail RT-PCR)^{๑๑} วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นครั้งนี้คือการศึกษารวบรวมเพื่อพัฒนาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธีการตรวจหาอิน 3'UTR ของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีโดยวิธี reverse transcription-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR)

วิธีการศึกษา

การศึกษานี้ได้รับการเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประเทศไทย ตัวอย่าง

ตัวอย่างอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งก่อนของคณะผู้วิจัย ซึ่งได้ตรวจว่าเป็นกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีโดยวิธีการเพิ่มจำนวนยีนบริเวณ Core ด้วยวิธี nested-PCR แล้ว^{๑๒}

คู่มือเมอร์จำเพาะสำหรับอินบริเวณ 3'UTR ของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซี

คู่มือไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับอินบริเวณ 3'UTR ของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีที่ใช้สำหรับการตรวจหากรดนิวคลีอิกด้วยวิธี nested PCR คือ F11 sense primer (5'-aaacactccggcctcttagg -3'; ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 9388-9407), F169 sense primer (5'-aatgggtggctccatcttagc-3'; ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 9546-9565) และ R260 antisense primer (5'-gcagagaggccagatcagc-3'; ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 9618-9637) การเตรียมคู่มือไพรเมอร์ (accession number NC_004102) และการตรวจสอบความเหมาะสมโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีทั้งสายพันธุ์หลักและสายพันธุ์ย่อยจากฐานข้อมูล GenBank และ <http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/ToolsOutline.html>

ขั้นตอนการเตรียมอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสและขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA

เตรียมอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสโดยการใช้ชุดสกัดกรดนิวคลีอิกสำเร็จรูป PureLink Viral RNA/DNA Kits (Invitrogen) จากนั้นจึงทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วย random hexamer ร่วมกับเอนไซม์ RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas)

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) ด้วยวิธี nested PCR

นำ cDNA มาเพิ่มปริมาณโดยทำปฏิกิริยา nested PCR สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรก (first round PCR) ในสารประกอบรวมทั้งหมด 25 µl ที่ประกอบด้วย 5 µl cDNA template, 1.25 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 0.5 µM F11 sense primer, 0.5 µM R260 antisense primer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂ ในสภาวะอุณหภูมิที่ ๙๔ องศาเซลเซียส ๕ นาที และ ๙๔ องศาเซลเซียส ๔๕ วินาที, ๖๐ องศาเซลเซียส ๓๐ วินาที, ๗๒ องศาเซลเซียส ๖๐ วินาที รวมทั้งหมด ๓๐ รอบ และ ๗๒ องศาเซลเซียส นาน ๗ นาที จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบที่สอง (second

round PCR) ในสารประกอบรวมทั้งหมด 25 μ l ที่ประกอบด้วย 0.5 μ l first round PCR product, 1.25 U Taq DNA polymerase, 0.5 μ M F169 sense primer, 0.5 μ M R260 antisense primer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$ ในสภาวะอุณหภูมิที่ ๙๔ องศาเซลเซียส ๕ นาที และ ๙๔ องศาเซลเซียส ๔๕ วินาที, ๖๐ องศาเซลเซียส

๓๐ วินาที, ๗๒ องศาเซลเซียส ๖๐ วินาที รวมทั้งหมด ๓๐ รอบ และ ๗๒ องศาเซลเซียส นาน ๗ นาที ซึ่งกำหนดให้เป็นสภาวะแบบที่ ๑ และได้ปรับสภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบที่ ๒ - ๖ (ตารางที่ ๑) และทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีขนาดคาดหวังคือ 92 bp ในสนามไฟฟ้าผ่านวุ้นความเข้มข้นร้อยละ ๓

ตารางที่ ๑ รูปแบบการปรับสภาวะในการทำ RT-nested PCR

รูปแบบการปรับสภาวะ	First round PCR condition			Second round PCR condition		
	ดีเอ็นเอแม่แบบ (μ l)	Annealing temperature ($^{\circ}$ C)	จำนวนรอบ	ดีเอ็นเอแม่แบบ (μ l)	Annealing temperature ($^{\circ}$ C)	จำนวนรอบ
๑	๕'	๖๐	๓๐	๐.๕'	๖๐	๓๐
๒	๕'	๕๕	๓๕	๐.๕'	๕๕	๓๕
๓	๕'	๕๒	๔๐	๐.๕'	๕๒	๔๐
๔	๕'	๕๐	๔๐	๑	๕๐	๔๐
๕	๕'	๕๐	๔๐	๔'	๔๕	๔๐
๖	๕'	๕๓	๔๐	๕'	๔๕	๔๐

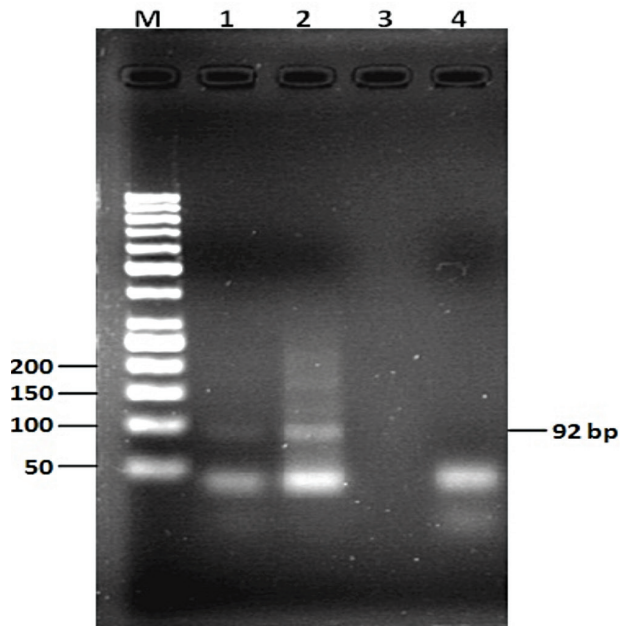
ผลการศึกษา

เนื่องจากมีรายงานพบว่ายีนบริเวณ 3'UTR มีความหลากหลายและผันแปรต่ำ จึงอาจเป็นยีนที่มีความเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดซีโดยวิธี RT-PCR การศึกษาครั้งนี้กลุ่มผู้วิจัยได้นำไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะและเหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 3'UTR ที่ครอบคลุมสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดซีโดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสภาวะของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบที่ ๑ (ตารางที่ ๑) โดยตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอ (PCR product) ที่มีขนาดคาดหวังคือ 92 bp (ตารางที่ ๒) จึงได้ปรับสภาวะของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการลดอุณหภูมิในขั้นตอนของ annealing และปรับเพิ่มจำนวนรอบในการ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามสภาวะแบบที่ ๒ และแบบที่ ๓ ซึ่งยังไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอ (ตารางที่ ๒) ดังนั้น ได้ปรับสภาวะของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบที่สอง และปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ตามสภาวะแบบที่ ๔ และแบบที่ ๕ (ตารางที่ ๑) โดยสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดคาดหวังได้เฉพาะสภาวะแบบที่ ๕ เท่านั้น อย่างไรก็ตามลักษณะความเข้มของแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน (รูปที่ ๑) จึงได้ปรับสภาวะของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามสภาวะแบบที่ ๖ (ตารางที่ ๑) โดยพบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับสภาวะของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบที่ ๕ (รูปที่ ๑)

ตารางที่ ๒ ผลการตรวจ PCR product จากการทำ nested PCR

รูปแบบการปรับสภาวะ	ผลการตรวจ PCR product
๑	ผลลบ
๒	ผลลบ
๓	ผลลบ
๔	ผลลบ
๕	ผลบวก
๖	ผลบวก



M: DNA Marker

Lane 1; PCR products (รูปแบบการปรับสภาวะ ๔)

Lane 2; PCR products (รูปแบบการปรับสภาวะ ๖)

Lane 4; negative control (ไม่มี ดีเอ็นเอแม่แบบ)

รูปที่ ๑ การตรวจสอบ PCR products ในสนามไฟฟ้าผ่านวุ้น ความเข้มข้นร้อยละ ๓ (PCR products ขนาด 92 base pair; (bp))

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

ผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคตับแข็งและมะเร็งตับ ถึงแม้ว่าจะมียาสำหรับการรักษาผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แต่ก็ยังคงประสบปัญหาของการรักษาในผู้ป่วยบางราย การป้องกันการติดเชื้อไวรัสจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถควบคุมการเกิดโรค ดังนั้น การตรวจหาการติดเชื้อโดยเฉพาะในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตจึงมีความจำเป็น นอกจากนี้วิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อที่ถูกต้องจะมีความสำคัญและจำเป็นต่อการรักษาผู้ป่วย การตรวจการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR เป็นวิธีตรวจยืนยันการติดเชื้อที่มีความไว และความแม่นยำสูง เนื่องจากยีนบริเวณ 5'UTR เป็นตำแหน่งยีนที่มีความหลากหลายและผันแปรต่ำจึงเป็นยีนเป้าหมายที่นิยมสำหรับใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยเฉพาะการผลิตเป็นชุดน้ำยาตรวจสำเร็จรูป เนื่องจากคุณสมบัติบางประการที่ไม่เหมาะสมของยีนบริเวณ

5'UTR เช่น การเกิดโครงสร้างทุติยภูมิแบบซับซ้อน (complex secondary structures) ที่อาจมีผลต่อการจับของไพรเมอร์ หรือ probe^๖ จึงอาจส่งผลให้การตรวจผิดพลาดได้

ยีนบริเวณ 3'UTR เป็นยีนที่อยู่บริเวณปลาย 3' ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี^๖ ที่ประกอบด้วยส่วนที่เป็น variable region (ขนาด ๒๖ - ๗๐ นิวคลีโอไทด์ ส่วนที่เป็น polyU/UC tract และส่วนที่เป็น X-tail (ขนาด ๙๘ - ๑๐๐ นิวคลีโอไทด์) ซึ่งจัดเป็นตำแหน่งยีนที่มีความหลากหลายต่ำ^{๑๓, ๑๔} ยีนบริเวณ 3'UTR เป็นยีนที่มีลำดับเบสและโครงสร้างแบบทุติยภูมิที่มีความหลากหลายและผันแปรค่อนข้างต่ำที่พบได้ในเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน^{๑๕} จึงเป็นยีนเป้าหมายที่เหมาะสมสำหรับวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มีการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไวรัสตับอักเสบบีด้วยวิธี X-tail RT-PCR^{๑๖} อย่างไรก็ตามโดยวิธีดังกล่าวอาจจะไม่เหมาะสมเนื่องจากค่าใช้จ่ายในการตรวจสูง นอกจากนี้วิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีด้วยวิธี RT-PCR หรือ real-time PCR โดยมียีนเป้าหมายคือยีนบริเวณ 5'UTR อาจก่อให้เกิดผลลบลงได้ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นสำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีด้วยวิธี RT-nested PCR โดยนำชุดไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมและจำเพาะต่อยีนบริเวณ 3'UTR โดยรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีทั้งสายพันธุ์หลักและสายพันธุ์ย่อยจากฐานข้อมูล GenBank และ <http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/ToolsOutline.html> การเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 3'UTR จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่เตรียมจากซีรัมของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีด้วยวิธี RT-nested PCR ในครั้งแรกตามสภาวะแบบที่ ๑ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ อาจเนื่องจากสภาวะในการทดสอบยังไม่เหมาะสม^{๑๖} ที่อาจเกิดจากไพรเมอร์ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ หรือจำนวนรอบที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จึงได้ทำการปรับสภาวะการทดสอบโดยปรับ annealing temperature ที่ลดลงสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพของการจับกันระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอแม่แบบ รวมทั้งเพิ่มจำนวนรอบสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (แบบที่ ๒ และแบบที่ ๓) อย่างไรก็ตามก็ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 3'UTR ได้ จึงได้ทำการปรับสภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบร่วมกับการปรับลด annealing temperature (แบบที่ ๔) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายัง

ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งอาจเป็นผลจากปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบยังคงมีปริมาณน้อยเกินไป ดังนั้น ได้ปรับสภาวะโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบ (แบบที่ ๕ และแบบที่ ๖) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการปรับสภาวะแบบที่ ๕ และแบบที่ ๖ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และการปรับสภาวะแบบที่ ๖ พบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน การศึกษานี้พบว่าการปรับสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบที่ ๖ มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 3'UTR ของเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดซี

การพัฒนาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 3'UTR ของเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดซีโดยวิธี RT-nested PCR พบว่าสภาวะการเพิ่มปริมาณยีนแบบที่ ๖ มีความเหมาะสม อย่างไรก็ตามการศึกษากการเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 3'UTR ครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นซึ่งอาจมีข้อจำกัดหลายประการที่เกิดจากปริมาณไวรัสที่น้อยเกินไปในสิ่งส่งตรวจและเนื่องจากเชื้อไวรัสตับอักเสบนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ที่อาจส่งผลให้เกิดผลลบปลอมได้ ซึ่งควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่มีความหลากหลายมากขึ้น ศึกษาค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ เพิ่มตัวอย่างไวรัสกลุ่มอื่นที่มีความใกล้เคียงกับไวรัสตับอักเสบนชนิดซี และควรทำการทดลองเปรียบเทียบกับการเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 5'UTR ในอนาคต รวมทั้งขั้นตอนการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ค่อนข้างมีขนาดเล็ก โดยการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าผ่านวุ้น อาจต้องอาศัยความชำนาญของผู้ทดสอบ และการศึกษานี้ยังไม่ได้ทำการทดสอบกับสิ่งส่งตรวจทางคลินิก ดังนั้น การศึกษาครั้งต่อไปควรทำการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 3'UTR ของเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดซีจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๗

เอกสารอ้างอิง

๑. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993;74:2391-9.
๒. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Sem Liver Dis* 1995;15:41-63.
๓. Louisiritchanakul S, Myint KS, Srimee B, Kanoksinsombat C, Khamboonruang C, Kunstadter P, et al. The prevalence of viral hepatitis among the Hmong people of northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002;33:837-44.
๔. Ishida T, Takao S, Settheetham-Ishida W, Tiwawech D. Prevalence of hepatitis B and C virus infection in rural ethnic population of northern Thailand. *J Clin Virol* 2002;24:31-5.
๕. Chunlertrith K, Sukeepaisarnjaroen W, Mairiang P, Urwijitaroon Y, Takase K, Yamauchi T, et al. Clinico-epidemiology of hepatitis C viral infection in northeastern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000;31:273-6.
๖. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4942-6.
๗. Honda M, Brown EA, Lemon SM. Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* 1996;2:955-68.
๘. Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 2002;76:5326-38.
๙. Ito T, Tahara SM, Lai MM. The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J Virol* 1998;72:8789-96.
๑๐. Drexler JF, Kupfer B, Petersen N, Grotto RM, Rodrigues SM, Grywna K, et al. A novel diagnostic target in the hepatitis C virus genome. *PLoS Med* 2009;6:e31.
๑๑. Sistayanarain A, Kunthalert D, Vipsoongnorn Y. A shift in the hepatitis C virus genotype dominance in blood donor samples from Thailand. *Mol Biol Rep* 2011; 38:4287-90.
๑๒. Yi M, Lemon SM. 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 2003;77:3557-68.

๑๓. Blight KJ, Rice CM. Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 1997;71:7345-52.
๑๔. Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997;277:570-4.
๑๕. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2451-5.
๑๖. Chaiwong S, Sistayanarain A. Optimization of nested polymerase chain reaction conditions for amplification of NS5B gene region of hepatitis C Virus Genotype 6. *J Med Tech Assoc Thailand* 2012;40:4193-201.

Abstract

A preliminary study on optimising reaction conditions to amplify the 3'UTR gene of the hepatitis C virus

Anusorn Kiattanaphon*, Duangkamol Kunthalert*, Yaovaluk Vipsoongnern**, Anchalee Sistayanarain*

* Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University

** Blood testing section, Thai Red Cross society

Corresponding author: Anchalee Sistayanarain Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand. Phone: 055-964627; E-mail address: sisaya@rocketmail.com

Introduction: The hepatitis C virus (HCV) is a major cause of hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HCV is classified into 6 major genotypes and its detection is important for the diagnosis, therapy and for screening blood donors. Most nucleic acid detection methods for HCV use the conserved region of the 5'UTR gene. However, the 5'UTR may not be the best target for the nucleic acid detection because of the complex secondary structures. This study aimed to optimize the conditions which best amplifies the 3'UTR gene of HCV using reverse transcription-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR).

Method: cDNA was synthesized from HCV RNA by reverse transcription (RT) and nested PCR was performed using six protocols (I-VI).

Result: We detected amplified products from only two protocols, V and VI.

Discussion and Conclusion: The protocols VI produced the highest yield of 3'UTR gene of HCV. However, testing should be done by using HCV infected clinical specimens.

Key words: Hepatitis C virus, Nested PCR, 3'UTR