



6 JUL 1994

**DETECTION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 BY  
POLYMERASE CHAIN REACTION**

HATHAIRAT THANANCHAI

*N*

**อภินันท์นาการ**

ชก

*๘๙ นันทนาการ ๘.๕๖๐๘*

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1993

ชื่อวิทยานิพนธ์  
ผู้วิจัย  
ปริญญา  
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

การตรวจหาเชื้อไวรัสเอดส์โดยวิธีพีซีอาร์  
หทัยรัตน์ ธานีชัย  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)  
จันทพงษ์ วยสี, พ.บ.  
รวงผึ้ง สุทเชนทร์, พ.บ., Ph.D.  
เพทาย เย็นจิตโสมนัส, Ph.D.  
สุดา ลุยศิริโรจนกุล, วท.ม.  
๒๘ เมษายน พ.ศ. ๒๕๓๓

วันที่สำเร็จการศึกษา

### บทคัดย่อ

ปฏิกริยาลูกโซ่เอ็นไซม์โพลิเมอเรส (พีซีอาร์) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการนำมาใช้ตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะ มีการนำเทคนิคพีซีอาร์นี้มาช่วยในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสหลายชนิด รวมทั้งการติดเชื้อไวรัสเอดส์ (HIV-1) เทคนิคนี้เป็นการเพิ่มจำนวนชิ้นของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง จากนั้นจึงทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นด้วยวิธีไฮบริโดเซชัน หรือวิธีอิลค์-โทรฟอรีซีสบนวุ้น แล้วย้อมสีเอธิเดียมโบรไมด์ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิธีตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสเอดส์ (HIV-1) จากเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ SK 38/39 ซึ่งจำเพาะต่อบริเวณยีน *gag* ในดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส ตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ SK 19 ซึ่งติดฉลากด้วยสารรังสี  $^{32}P$  โดยวิธี liquid hybridization (LH) และ oligomer restriction (OR) เปรียบเทียบกับการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบที่ติดฉลากด้วยสารรังสี  $^{32}P$  และสารปลดรังสี fluorescein โดยวิธี dot-blot hybridization จากการทดลองในตัวอย่างตรวจที่ได้จากผู้ตรวจพบ anti-HIV-1 70 ราย และผู้ตรวจไม่พบ anti-HIV-1 จำนวน 30 ราย หลังจากทำพีซีอาร์ แล้วตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี LH/OR พบว่า 65/70 (93%) ราย ของผู้ตรวจพบ anti-HIV-1 ให้ผลบวก ในขณะที่ทั้ง 30 รายของผู้ตรวจไม่พบ anti-HIV-1 ให้ผลลบ การเปรียบเทียบการตรวจหาดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้น โดยการใช้นิวเคลียสเดี่ยวตรวจสอบที่ติดฉลากด้วย  $^{32}P$  และ fluorescein พบว่าให้ผลดีเช่นเดียวกัน โดยที่สามารถตรวจหา HIV-1 ดีเอ็นเอได้ 68 จาก 70 ราย (97%) ในผู้ตรวจพบ anti-HIV-1 และตรวจไม่พบ HIV-1 ดีเอ็นเอในผู้ตรวจไม่พบ anti-HIV-1 ทั้ง 30 ราย

ในการศึกษานี้ได้ทดลองใช้วิธี nested PCR เพื่อเพิ่มความไวของการตรวจ โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะบริเวณยีน *gag* เช่นเดียวกันคือ SK 380/390 และ SK 38/39 ซึ่งอยู่ด้านนอกและด้านในตามลำดับ แล้วตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนวุ้น และวิธี dot-blot hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ SK 19 ที่ติดฉลากด้วย  $^{32}$ P และ fluorescein จากการศึกษาพบว่า ผู้ที่ตรวจพบ anti-HIV-1 ให้ผลบวกทั้ง 70 ราย เมื่อทำ nested PCR แล้วตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนวุ้น และด้วยวิธี dot-blot hybridization เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี nested PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะบริเวณยีน *env* ของเชื้อ คือ JA 9/12 และ RIT 124/128 ซึ่งอยู่ด้านนอกและด้านในตามลำดับ แล้วตรวจสอบผลผลิตโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนวุ้น พบว่า 62/70 (88%) รายของผู้ที่ตรวจพบ anti-HIV-1 ให้ผลบวก และทั้ง 30 รายของผู้ที่ตรวจไม่พบ anti-HIV-1 ให้ผลลบ เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุด

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดน้ำยาสำเร็จรูปขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์ การศึกษานี้ได้ทดลองใช้ชุดน้ำยา CAPTAGENE™ GCN4 เพื่อทดสอบผลผลิตที่ได้จากการทำ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SK 380/390 และ Biotin-SK 38/GCN4-SK 39 จากการศึกษาพบว่า ตัวอย่างตรวจจากผู้ติดเชื้อ 52/70 (74.3%) รายให้ผลบวก ในขณะที่ตัวอย่างตรวจจากผู้ไม่ติดเชื้อทั้ง 30 รายให้ผลลบ

จากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า การทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ SK 38/39 สามารถใช้ได้ผลดีในการตรวจหา HIV-1 ดีเอ็นเอ ในตัวอย่างตรวจจากคนไทย การทดสอบผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยวิธี dot-blot hybridization พบว่า การใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบที่ติดฉลากด้วยสารปลดรังสีคือ fluorescein ให้ผลดีเช่นเดียวกับการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบที่ติดฉลากด้วย  $^{32}$ P ถ้าใช้ nested PCR จะเพิ่มความไวในการตรวจสอบให้สูงขึ้น การทำ nested PCR แล้วตรวจสอบผลผลิตที่ได้โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบที่ติดฉลากด้วยสารปลดรังสี เช่น fluorescein จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการใช้ตรวจหา ยีนของเชื้อ HIV-1 สำหรับชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตจากพีซีอาร์นั้น หากพัฒนาให้มีความไวสูงขึ้น น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมอีกวิธีหนึ่งที่จะใช้ร่วมกับพีซีอาร์ในการตรวจหา ยีนของเชื้อ HIV-1 เนื่องจากสะดวกและสามารถใช้เครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

Thesis Title      Detection of Human Immunodeficiency Virus  
                         Type 1 by Polymerase Chain Reaction  
Name                Hathairat Thananchai  
Degree              Master of Science (Microbiology)  
Thesis Supervisory Committee  
                         Chantapong Wasi, M.D.  
                         Ruengpung Sutthent, M.D., Ph.D.  
                         Pa-thai Yenchitsomanus, Ph.D.  
                         Suda                Louisirirotchanakul, M.Sc.  
Date of Graduation    28 April B.E. 2537 (1994)

#### ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) is at present the most powerful analytical tool for detection of specific nucleic acid sequences. PCR has shown its values in diagnosis of some viral infections including HIV. This method is based on the *in vitro* amplification of DNA segments before detection with conventional hybridization techniques or visualization following electrophoresis and ethidium bromide staining. In this study, HIV-1 proviral DNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was detected by PCR using SK 38/39 primers which specific to gag region of HIV-1. Amplified product was reacted with <sup>32</sup>P labeled SK 19 probe with a standard liquid hybridization (LH) and oligomer restriction (OR) technique. Further, dot-blot hybridization using isotopic and non-isotopic labeled probe was studied in comparison. PBMCs from the 70 anti-HIV-1 seropositive and 30 anti-HIV-1 seronegative individuals were analyzed. By using LH/OR technique, 65/70 (93%) from seropositive were positive by PCR whereas all 30 seronegative were negative by PCR. The results obtained from dot-blot hybridization using

$^{32}\text{P}$  or fluorescein labeled SK 19 probe were similar [68/70 (97%) positive and all 30 negative in the first and second groups, respectively].

To increase sensitivity of detection, the nested PCR was used. Nested PCR was conducted by using a set of gag primers (SK 380/390 as outer and SK 38/39 as inner primers). Amplified product was identified by agarose gel electrophoresis and confirmed by dot-blot hybridization with  $^{32}\text{P}$  and fluorescein labeled SK 19 probe. Positive results were obtained from all 70 seropositive samples by using both agarose gel electrophoresis and dot-blot hybridization. In addition, an env region of HIV-1 was amplified by using JA 9/12 as outer and RIT 124/128 as inner primers and amplified product was identified by agarose gel electrophoresis. Of the 70 seropositive samples, only 88% were positive. All 30 seronegative showed negative results to both gag and env primers.

The commercial PCR-based detection technique for detection of HIV-1 amplified product, CAPTAGENE<sup>TM</sup> GCN4, was also evaluated. HIV-1 proviral DNA was amplified by nested gag primers (SK 380/390 and Biotin-SK 38/GCN4-SK 39) and detected by CAPTAGENE<sup>TM</sup> GCN4 kit which based on an enzyme linked assay. Of 70 seropositive samples 52 (74.3%) showed positive results whereas all 30 showed negative results.

The data indicate that PCR using SK 38/39 primers can detect HIV-1 proviral DNA obtained from Thai patients. Identification of amplified products by dot-blot hybridization using fluorescein labeled probe showed high sensitivity and specificity similar to  $^{32}\text{P}$  labeled probe. The sensitivity for detection of HIV-1 DNA was increased when used nested PCR. Therefore, the use of nested PCR of gag region and identified the amplified product by dot-blot

hybridization with nonisotopic labeled probe such as fluorescein would be proper for detection of HIV-1 DNA in Thailand. Sensitivity of PCR detection commercial kit is still low and need to be improved. In near future, PCR commercial kit would be practical for diagnosis in most laboratories.

