

การตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด Codon 17 (A->T) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอุณหภูมิเดียว

Detection of Beta-thalassemia Gene, Codon 17 (A->T) by Single-temperature DNA Amplification

พรพรรณ หงส์ศรีพันธ์ (Pornpan Hongsrirphan)* อำนาจ เพชรรุ่งนภา (Amnat Phetrungnapha)**

พฤตินันท์ สุฤทธิ (Phrutthinun Surit)*** สายศิริ มีระเสน (Saisiri Mirasena)***

บทคัดย่อ

เบต้าธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบมากในประเทศไทย มีอาการทางคลินิกที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของการกลายพันธุ์ของยีนเบต้าธาลัสซีเมีย คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาเทคนิคการตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด codon 17 (A->T) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่พบมากในประเทศไทยโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอุณหภูมิเดียว โดยออกแบบไพรเมอร์จำนวน 5 ชุดเพื่อทดสอบประสิทธิภาพ หาสภาวะที่เหมาะสม และตรวจ cross detection กับยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิดอื่นๆ ยีนฮีโมโกลบินอี และในคนปกติ พบว่า ไพรเมอร์ชุดที่ 2 (S2) และชุดที่ 3 (S3) มีความจำเพาะต่อยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ไม่เกิด cross-detections กับยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิดอื่น ยีนฮีโมโกลบินอี และในคนปกติที่ไม่มียีนดังกล่าว และบ่มปฏิกิริยาการเพิ่มดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคมาตรฐาน multiplex ARMS-PCR พบว่าให้ผลตรงกัน เทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด codon 17 (A->T) ในโรงพยาบาลชุมชน โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล หรือภาคสนาม เพื่อกำหนดคู่เสี่ยง และช่วยลดอุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทย

ABSTRACT

Beta-thalassemia is the prevalent genetic disease in Thailand. Clinical symptoms vary with mutation type of β -thalassemia gene. We developed single-temperature DNA amplification technique to detect the high prevalent β -thalassemia gene in Thailand, codon 17 (A->T). We designed 5 sets of primer, tested, optimized and checked cross detection with other β -thalassemia genes, HbE gene and normal. We found that primer set 2 (S2) and set 3 (S3) showed high specificity to β -thalassemia gene, codon 17 (A->T) and no cross detection to other β -thalassemia genes, HbE gene and normal. The optimal condition was incubated at 64 degree celcius for 60 minutes. Furthermore, we observed complete concordance between multiplex ARMS-PCR assay and this technique's results. This technique could be applied to detect β -thalassemia gene mutation, codon 17 (A->T) gene in community hospital, Tambon health promotion hospital and on-site to define risk couple and reduce incidence of the β -thalassemia incidence in Thailand

คำสำคัญ: ธาลัสซีเมีย การตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมีย โคดอน 17 (A->T)

Keywords: Thalassemia β^0 -thalassemia gene Codon 17 (A->T)

* นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

*** อาจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีอุบัติการณ์สูง ในปัจจุบันทั่วโลกมีเด็กแรกเกิดที่เป็นธาลัสซีเมียประมาณร้อยละ 4.4 หรือ 1 ใน 10,000 คนของเด็กแรกเกิด เบต้าธาลัสซีเมียพบมากในประเทศไทย มีอาการทางคลินิกที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของการกลายพันธุ์ของยีนเบต้า ชนิดที่รุนแรงคือ homozygous β^0 -thalassemia และ compound heterozygous β^0 -thalassemia/hemoglobin E (β^0 -thal/HbE) ในช่วงแรกเกิดจะไม่พบความผิดปกติ แต่จะเริ่มมีอาการเมื่อเข้าขวบปีแรก คือตัวซีด อ่อนเพลีย ท้องป่อง ตับม้ามโต กระดูกใบหน้าเปลี่ยน จมูกแบน โหนกแก้มสูง กระดูกบางเปราะหักง่าย ร่างกายแคระแกร็น ในรายที่ซีดมากจำเป็นต้องได้รับเลือด ซึ่งอาจมีภาวะเหล็กเกินตามมา ด้านการรักษาเป็นการรักษาแบบประคับประคอง คือรักษาตามอาการ ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการดูแลสุขภาพของผู้ป่วยที่เป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีตั้งแต่แรกเกิด จนมีอายุ 30 ปี คือ 3,180,000 บาทต่อคน จัดเป็นปัญหาเศรษฐกิจสาธารณสุขของประเทศ จึงเป็นนโยบายระดับชาติที่จะควบคุมและป้องกันไม่ให้มีเด็กเกิดใหม่เป็นโรคธาลัสซีเมีย โดยเฉพาะในกลุ่มสมรสที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคที่แม่นยำเพื่อประเมินความรุนแรงของโรคเบต้าธาลัสซีเมียถือเป็นเครื่องมือหนึ่งในการลดอุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทย เทคนิคที่ใช้ตรวจหาเบต้าธาลัสซีเมียในปัจจุบัน ได้แก่ Amplification Refractory Mutation System (ARMS), Allele-Specific Oligonucleotide probes (ASO), Reverse dot-blot hybridization, Single-Strand Confirmation Polymorphism (SSCP), Real-time PCR และ Direct sequencing ซึ่งเทคนิคเหล่านี้ใช้เวลาในการตรวจวินิจฉัยประมาณ 3-4 ชั่วโมง และต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะ ราคาสูง จึงไม่สามารถนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลชุมชน โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.) ทำให้การตรวจคัดกรองเพื่อกำหนดกลุ่มเสี่ยง ไม่ครอบคลุม ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้อุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียไม่ลดลง

คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิเดียวเพื่อตรวจหาเบต้าธาลัสซีเมียชนิด codon 17 (A->T) ซึ่งพบมากในประเทศไทยเพื่อนำไปใช้ตรวจคัดกรองในโรงพยาบาลชุมชนและ รพ.สต. ทำให้กำหนดกลุ่มเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็น homozygous β^0 -thalassemia หรือ compound heterozygous β^0 -thalassemia/HbE ซึ่งเป็นเบต้าธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้ เทคนิคนี้ช่วยลดระยะเวลาที่ และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะและราคาสูงในการตรวจ เหมาะกับการนำไปใช้ในโรงพยาบาลชุมชน และรพ.สต. หรือภาคสนาม ทำให้นุเคราะห์ทางการแพทย์และสาธารณสุขสามารถตรวจคัดกรองเพื่อกำหนดกลุ่มเสี่ยงและให้คำปรึกษาในการวางแผนครอบครัว สามารถลดอุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทยได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจเบต้าธาลัสซีเมียชนิด codon 17 (A->T) ที่พบมากในประเทศไทยด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิเดียว

เทคนิควิจัย

1. ตัวอย่าง

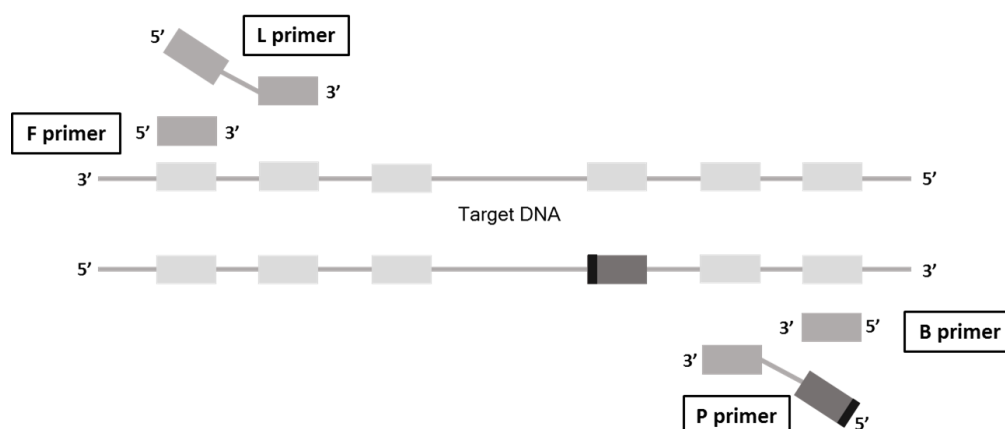
ตัวอย่างที่ใช้เป็นการขอแบ่งตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มาส่งตรวจ ณ หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยาและแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวนทั้งหมด 6 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างเลือดของผู้ที่มีเบต้าธาลัสซีเมียชนิด codon 17 (A->T) จำนวน 2 ตัวอย่าง ชนิด codon 41/42, -TCTT; IVS Int 1, G->T; ฮีโมโกลบินอี (HbE, cd 26, G->A) และ

ตัวอย่างเลือดของผู้ที่ไม่มียีนเบต้าธาลัสซีเมีย (Normal) ชนิดละ 1 ตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด 30 μ l ด้วยชุดน้ำยา Masterpure™ (Epicenter (an illumina company), USA)

2. การออกแบบไพรเมอร์

ผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจสอบยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด codon 17 (A->T) (cd 17 (A->T)) โดยอ้างอิงจากการตรวจวินิจฉัยยีนเบต้าธาลัสซีเมีย (β^0 -thal genes) ที่พบมากในคนไทย และยีนฮีโมโกลบินอี (HbE) ด้วยเทคนิค Multiplex ARMS (Mirasena et al., 2008) ด้วยโปรแกรม Primer explorer V5 software (<http://primerexplorer.jp/e/>) และ OligoCalc (Kibbe, 2007) ผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณจำนวน 4 เส้นคือ L, B, F และ P primers เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) โดยกำหนดให้ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) อยู่บริเวณปลาย 5' (ดังภาพที่ 1) และได้ออกแบบ P primers เพื่อให้มีความจำเพาะสูงโดยการปรับเปลี่ยนและเพิ่มลำดับเบสให้มีความแตกต่างกัน จำนวน 5 ชุด (Primer Set 1-Set 5 โดยแต่ละชุดจะแตกต่างกันที่ P1-P5 primers) (Duan et al., 2014) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ได้แก่ **L primer** : 5' TAA CGG CAG ACT TCT CCT CAG GAG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GCA3', **F primer** : 5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TT 3', **B primer** : 5' GAG TCT TCT CTG TCT CCA CAT G 3', **P1 primer** : 5' TAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT CTC CTT AAA CCT GTC TTG T 3', **P2 primer** : 5' TTC GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT CTC CTT AAA CCT GTC TTG T 3', **P3 primer** : 5' CG TAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT CTC CTT AAA CCT GTC TTG T 3', **P4 primer** : 5' GC TAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT CTC CTT AAA CCT GTC TTG T 3', **P5 primer** : 5' CG TTC GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT CTC CTT AAA CCT GTC TTG T 3'

เมื่อนำดีเอ็นเอที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ไปเพิ่มปริมาณจะเกิดการสร้างสายดีเอ็นเอที่ยาวขึ้นหลายๆ ขนาดปรากฏผลบน agarose gel ที่มี band หลากหลายขนาด เกิดเป็นรูปแบบ ladder-like pattern (อมรรัตน์, 2554)



ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบให้การกลายพันธุ์อยู่บริเวณทางด้านปลาย 5' ของ P primer และตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าจับบนดีเอ็นเอเป้าหมาย

3. ปฏิบัติการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอุณหภูมิเดียว

นำชุดไพรเมอร์สำหรับตรวจยืนยันเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) จำนวน 5 ชุดแล้ว (Primer Set 1-Set 5) ไปทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อ้างอิงจากคู่มือของ *Bst* DNA polymerase (New England Biolabs, USA) โดยผสมสารต่างๆ ประกอบด้วย 320 U/ml *Bst* DNA polymerase, 1 X ThermoPol Buffer, 6mM MgSO₄, 1.4 mM dNTPs, 1.6 μM L primer, 1.6 μM P primer, 0.2 μM F primer, 0.2 μM B primer และ 50 ng DNA ในปริมาตรรวม 25 μl แล้วนำไปบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 60 นาที แล้วตรวจสอบผลด้วย 2% agarose gel ใช้กระแสไฟฟ้า 135V เป็นเวลา 30 นาที และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (Major Science, Taiwan)

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค

เมื่อทดสอบการทำงานเบื้องต้นของไพรเมอร์ที่ตรวจยืนยันเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ทั้ง 5 ชุด (Primer Set: S1- 5) แล้ว ผู้วิจัยจึงหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคนี้โดยการเปรียบเทียบเพื่อหาอุณหภูมิและเวลาที่ เหมาะสม เริ่มจากเปรียบเทียบไพรเมอร์ทั้ง 5 ชุดที่บ่มในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ได้แก่ 62, 63, 64, 65, และ 66 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อได้อุณหภูมิที่เหมาะสมแล้ว ผู้วิจัยจึงนำสภาวะนี้ไปทำปฏิกิริยาเพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มได้แก่ 20, 30, 40, 50, และ 60 นาที เพื่อให้ได้ชุดไพรเมอร์ (P primer) และสภาวะที่ทำให้ไพรเมอร์ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ให้ผลดีมีประสิทธิภาพมากที่สุด

5. การตรวจสอบ cross-detections ของเทคนิค

ผู้วิจัยได้ทำ cross-detections ของเทคนิคนี้ เพื่อทดสอบความจำเพาะของชุดไพรเมอร์ (Primer Set) ที่ตรวจยืนยันเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) โดยใช้ดีเอ็นเอที่มีเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T); cd 41/42, -TCTT; IVS Int 1, G->T; ฮีโมโกลบินอี (HbE, cd 26, G->A) และดีเอ็นเอที่ไม่มีเบต้าธาลัสซีเมีย (Normal) โดยไพรเมอร์ (P primer) จะต้องให้ผลที่มีรูปแบบ ladder-like pattern เฉพาะกับดีเอ็นเอที่มีเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) เท่านั้น

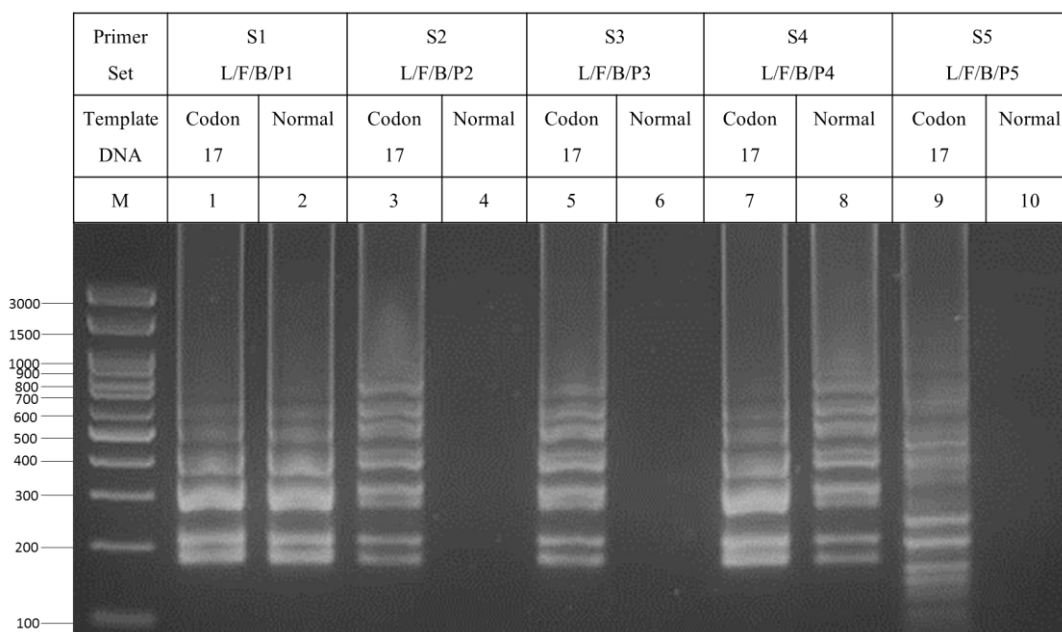
6. การยืนยันความถูกต้องของเทคนิคโดยเปรียบเทียบกับเทคนิคมาตรฐาน Multiplex ARMS-PCR

เปรียบเทียบผลการตรวจของเทคนิคนี้กับเทคนิค multiplex ARMS-PCR (Mirasena et al., 2008) ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานการตรวจยืนยันเบต้าธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีของห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเปรียบเทียบผลการตรวจดีเอ็นเอที่มีเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T); cd 41/42, -TCTT; IVS Int 1, G->T; ฮีโมโกลบินอี (HbE, cd 26, G->A) และดีเอ็นเอที่ไม่มีเบต้าธาลัสซีเมีย (Normal)

ผลการวิจัย

ผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิคการตรวจยืนยันเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอุณหภูมิเดียว โดยออกแบบชุดไพรเมอร์จำนวน 5 ชุด (Primer Set 1-Set 5) ประกอบด้วย primer set 1 (L,F,B,P1 primer), primer set 2 (L,F,B,P2 primer), primer set 3 (L,F,B,P3 primer), primer set 4 (L,F,B,P4 primer), primer set 5 (L,F,B,P5 primer) และทดสอบการทำงานของแต่ละชุดไพรเมอร์โดยนำไปตรวจยืนยันเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ในดีเอ็นเอที่มีเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) และดีเอ็นเอที่ไม่มีเบต้าธาลัสซีเมีย (Normal) เมื่อนำไปบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม อ้างอิงจากคู่มือของ *Bst* DNA polymerase (New England Biolabs, USA) เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis พบว่า ไพรเมอร์ชุดที่ 2 (S2), ชุดที่ 3 (S3) และชุดที่ 5 (S5) จะปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ในตัวอย่างที่มีเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) เพียงอย่างเดียว แสดงว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 ชุดนี้มีความจำเพาะ

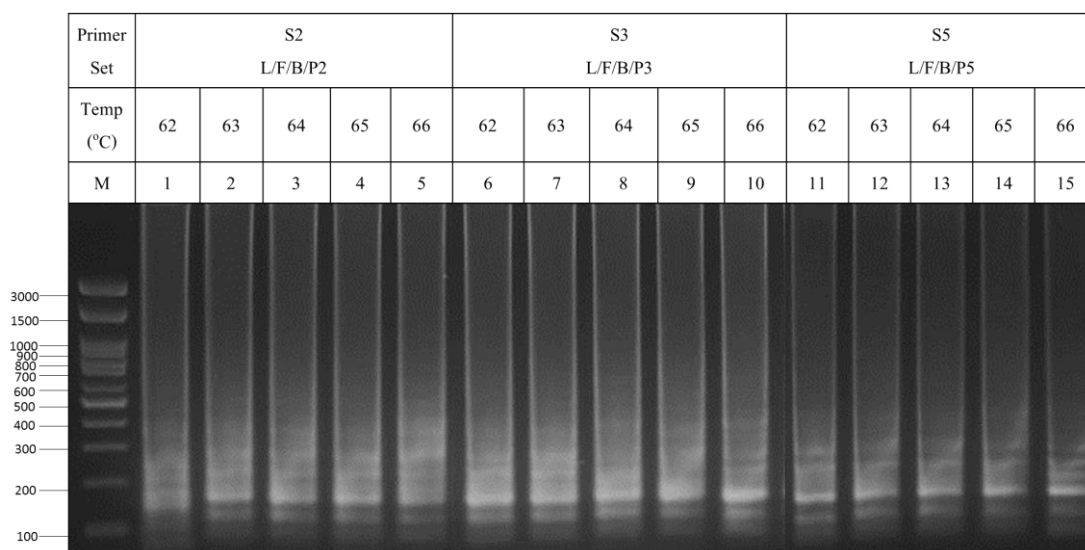
กับยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) สามารถแยกความแตกต่างระหว่างผู้ที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) และผู้ที่ไม่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียได้ ส่วนไพรเมอร์ชุดที่ 1 (S1) และชุดที่ 4 (S4) ปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ทั้งในตัวอย่างที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) และไม่มียีนเบต้าธาลัสซีเมีย (Normal) แสดงว่าไพรเมอร์ชุดที่ 1 (S1) และชุดที่ 4 (S4) ไม่มีความจำเพาะกับยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างผู้ที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) และผู้ที่ไม่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียได้ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์สำหรับตรวจวินิจฉัยยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) จำนวน 5 ชุด (Primer set 1-5: S1-S5) ในตัวอย่างที่มียีน cd 17 (A->T) และในตัวอย่างที่ไม่มียีนเบต้าธาลัสซีเมีย (normal) ไพรเมอร์ชุดที่ 2, 3 และ 5 (S2, S3 และ S5) ปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ในตัวอย่างที่มียีน cd 17 (A->T) (แถวที่ 3, 5 และ 9) และไม่มีลักษณะ ladder-like pattern ในตัวอย่างที่ไม่มียีนดังกล่าว (แถวที่ 4, 6 และ 10) ส่วนไพรเมอร์ชุดที่ 1 และ 4 (S1 และ S4) ปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ทั้งในตัวอย่างที่มียีน cd 17 (A->T) (แถวที่ 1 และ 7) และไม่มียีน (แถวที่ 2 และ 8) แสดงว่าไพรเมอร์ชุดนี้ไม่มีความจำเพาะต่อยีน cd 17 (A->T) (M) 100 bp DNA ladder. (Codon17) ตัวอย่างที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T). (Normal) ตัวอย่างที่ไม่มียีนเบต้าธาลัสซีเมีย

การหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอุณหภูมิเดียว

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของชุดไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ชุดที่ 2 (S2), ชุดที่ 3 (S3) และชุดที่ 5 (S5) มีความจำเพาะต่อยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) จึงคัดเลือกไพรเมอร์ 3 ชุดนี้มาเปรียบเทียบเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอุณหภูมิเดียวเพื่อตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) โดยการบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน 5 อุณหภูมิได้แก่ 62, 63, 64, 65, และ 66 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ในตัวอย่างที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ตรวจสอบผลด้วย 2% agarose gel พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 ชุดปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ในทุกอุณหภูมิ แสดงว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 ชุดสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่ 62-66 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3)



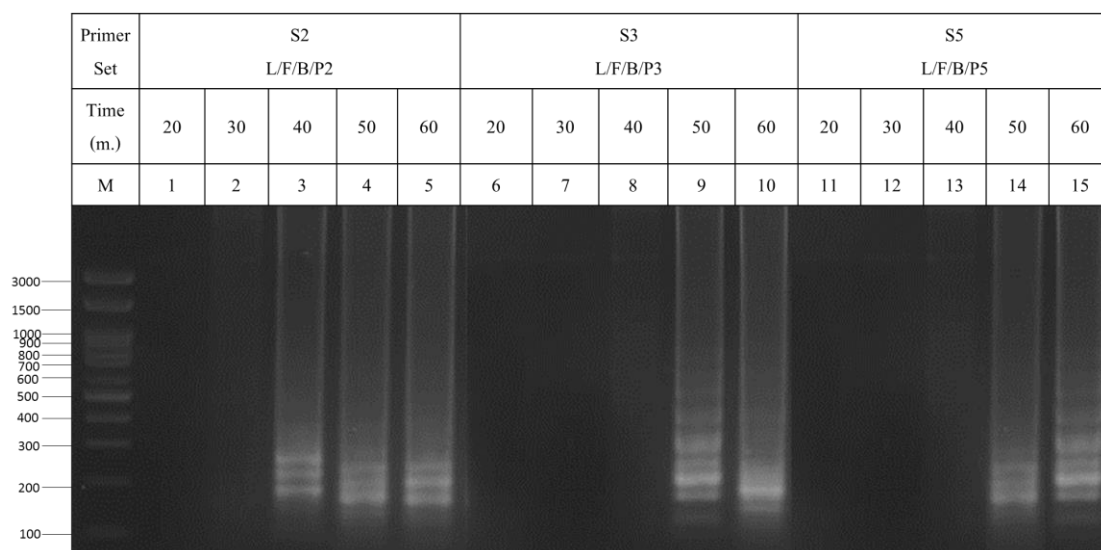
ภาพที่ 3 ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการตรวจวินิจฉัยยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T)

ไพรเมอร์ชุดที่ 2 (S2), ชุดที่ 3 (S3) และ ชุดที่ 5 (S5) ในตัวอย่างที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T)

ปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ในทุกอุณหภูมิ (62, 63, 64, 65, และ 66 องศาเซลเซียส)

(M) 100bp DNA ladder. แถวที่ 1-15 แสดงผลการตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ด้วยไพรเมอร์ 3 ชุด (S2, S3 และ S5) ที่อุณหภูมิ 62, 63, 64, 65, และ 66 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

จากผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอุณหภูมิเดียวเพื่อตรวจวินิจฉัยยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 3 ชุด (S2, S3 และ S5) สามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่ 62-66 องศาเซลเซียส ผู้วิจัยจึงเลือกอุณหภูมิที่ 64 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ทำปฏิกิริยาเพื่อเปรียบเทียบหาเวลาที่เหมาะสมของเทคนิคดังกล่าวโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาที่ 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที และตรวจสอบด้วย 2% agarose gel พบว่าไพรเมอร์ชุดที่ 2 (S2) ปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ในการบ่มตั้งแต่เวลา 40 นาทีจนถึง 60 นาที ส่วนไพรเมอร์ชุดที่ 3 (S3) และ 5 (S5) ปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ในการบ่มตั้งแต่ระยะเวลาที่ 50 นาทีและ 60 นาที เพื่อให้สามารถใช้ไพรเมอร์ทั้ง 3 ชุดในการตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ผู้วิจัยจึงเลือกระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิ 50-60 นาที (ภาพที่ 4)

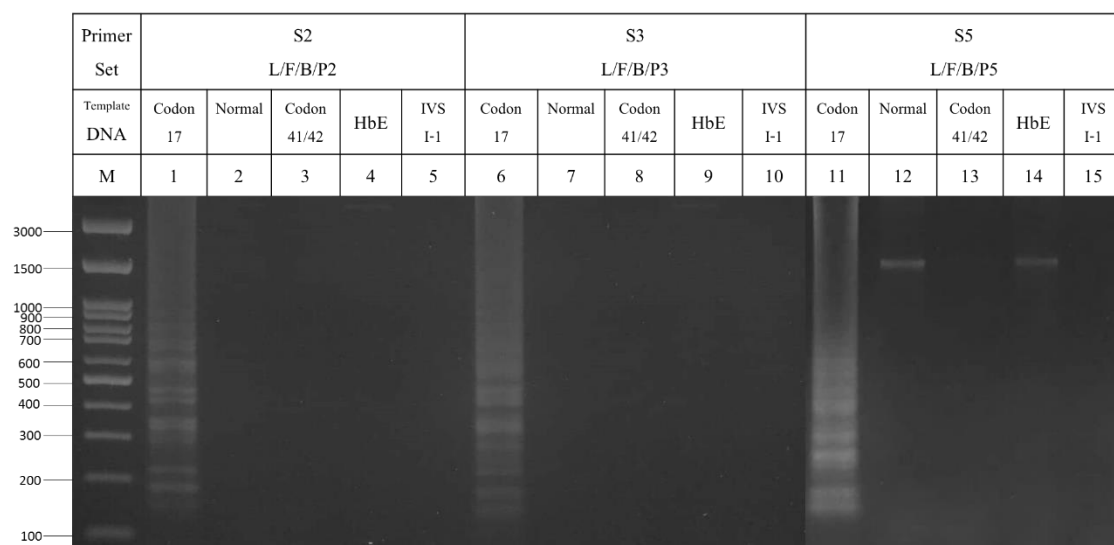


ภาพที่ 4 ผลการหาระยะเวลาที่ที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยาเพื่อตรวจยืนยันเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T)

ไพรเมอร์ชุดที่ 2 (S2) ปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ในการบ่มระยะเวลาที่ 40 นาทีขึ้นไป (แถวที่ 3, 4, 5) ไพรเมอร์ชุดที่ 3 (S2) และ 5 (S2) ปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ในการบ่มระยะเวลาที่ 50 นาทีขึ้นไป (แถวที่ 9, 10, 14 และ 15) (M) 100bp DNA ladder, แถวที่ 1-15 แสดงผลการตรวจยืนยันเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ด้วยไพรเมอร์ 3 ชุด (S2, S3 และ S5) ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาที่การบ่ม 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที ตามลำดับ

ตรวจสอบ cross-detections ของเทคนิค

เพื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ชุดที่ 2 (S2), ชุดที่ 3 (S3) และชุดที่ 5 (S5) ต่อยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ผู้วิจัยจึงได้ทำ cross-detections โดยใช้ดีเอ็นเอที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T); cd 41/42, -TCTT; IVS Int 1, G->T; ฮีโมโกลบินอี (HbE, cd 26, G->A) และดีเอ็นเอที่ไม่มียีนเบต้าธาลัสซีเมีย (Normal) โดยไพรเมอร์ (P primer) จะต้องให้ผลที่มีรูปแบบ ladder-like pattern เฉพาะกับดีเอ็นเอที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) เท่านั้น พบว่าไพรเมอร์ชุดที่ 2 (S2), และชุดที่ 3 (S3) ปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ในตัวอย่างที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) เท่านั้น และไม่ปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ในตัวอย่างที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิดอื่นๆ รวมทั้งในตัวอย่างที่ไม่มียีนเบต้าธาลัสซีเมีย (normal) แสดงว่าไพรเมอร์ 2 ชุดนี้ (S2 และ S3) มีความจำเพาะต่อยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) สามารถตรวจพบยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ได้เพียงอย่างเดียว ไม่เกิด cross-detections กับยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิดอื่น ส่วนไพรเมอร์ชุดที่ 5 (S5) ปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ในตัวอย่างที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) และพบชิ้นส่วนอื่นขนาดประมาณ 1,500 bp ในตัวอย่างยีนฮีโมโกลบินอี (HbE) และตัวอย่างที่ไม่มียีนเบต้าธาลัสซีเมีย (normal) (ภาพที่ 5)

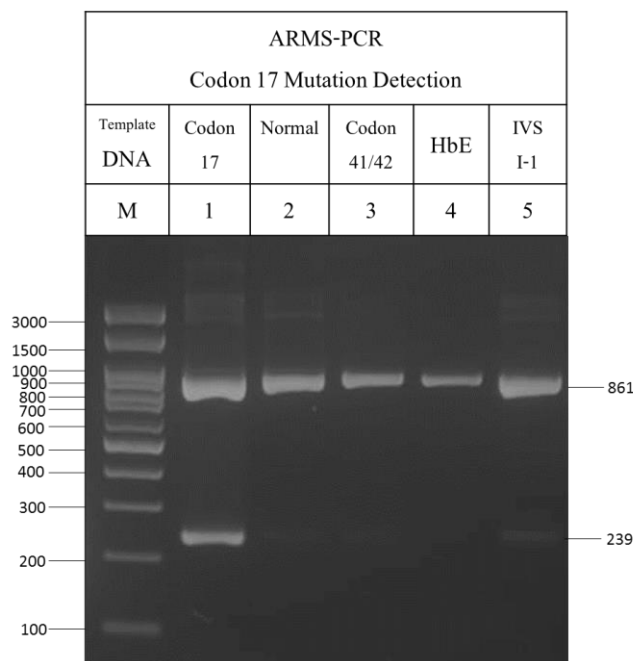


ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบ cross-detections ของไพรเมอร์ทั้ง 3 ชุด (S2, S3 และ S5) ที่ใช้ตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ในตัวอย่างที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ (cd 17 (A->T); cd 41/42, -TCTT; IVS Int 1, G->T; ฮีโมโกลบินอี (HbE, cd 26, G->A)) และในตัวอย่างที่ไม่มียีนเบต้าธาลัสซีเมีย ไพรเมอร์ทั้ง 3 ชุด ปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ในตัวอย่างที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) (แถวที่ 1, 6 และ 11) ในขณะที่ไพรเมอร์ ชุดที่ 5 (S5) ปรากฏขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,500 bp ในตัวอย่างที่ไม่มียีนเบต้าธาลัสซีเมีย (แถวที่ 12) และ ตัวอย่างที่มียีนฮีโมโกลบินอี (แถวที่ 14) (M) 100bp DNA ladder. (Codon17) cd 17 (A->T). (Normal) ตัวอย่าง ที่ไม่มียีนเบต้าธาลัสซีเมีย. (Codon 41/42) cd 41/42, -TCTT. (HbE) cd 26, G->A. (IVS I-1) IVS Int 1, G->T และ normal.

การยืนยันความถูกต้องของเทคนิคโดยเปรียบเทียบกับเทคนิคมาตรฐาน Multiplex ARMS-PCR

เปรียบเทียบผลการตรวจของเทคนิคนี้กับเทคนิค multiplex ARMS-PCR (Mirasena et al., 2008) ซึ่งเป็นเทคนิค มาตรฐานการตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีของห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยเปรียบเทียบผลการตรวจดีเอ็นเอที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T); cd 41/42, -TCTT; IVS Int 1, G->T; ฮีโมโกลบินอี (HbE, cd 26, G->A) และดีเอ็นเอที่ไม่มียีนเบต้าธาลัสซีเมีย (Normal) พบว่า

เทคนิค multiplex ARMP-PCR แสดงขึ้นดีเอ็นเอของ internal control (861 bp) และขึ้นดีเอ็นเอของยีน เบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) (239 bp) ในตัวอย่าง codon 17 เท่านั้น และในตัวอย่างชนิดอื่นๆ พบเพียงขึ้นดีเอ็นเอ ของ internal control (861 bp) เท่านั้น ซึ่งให้ผลตรงกันกับเทคนิคการตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด codon 17 (A->T) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิต่ำ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ผลการตรวจยืนยันเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ด้วยเทคนิค multiplex ARMS-PCR ในตัวอย่างที่มียืนเบต้าธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ และในตัวอย่างที่ไม่มียืนเบต้าธาลัสซีเมีย แถวที่ 1-5 แสดงผลการตรวจยืนยันเบต้าธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค multiplex ARMS-PCR แถวที่ 1 ปรากฏขึ้นดีเอ็นเอของ internal control ขนาด 861 bp และยืนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ขนาด 239 bp ในตัวอย่าง Codon 17 เท่านั้น ส่วนตัวอย่างที่มียืนเบต้าธาลัสซีเมียชนิดอื่นๆ ฮีโมโกลบินอี และในคนปกติจะปรากฏแต่ขึ้นดีเอ็นเอของ internal control ขนาด 861 bp เท่านั้น (M) 100bp DNA ladder. (Codon17) cd 17 (A->T). (Normal) ตัวอย่างที่ไม่มียืนเบต้าธาลัสซีเมีย. (Codon 41/42) cd 41/42, -TCTT. (HbE) cd 26, G->A. (IVS I-1) IVS I nt 1, G->T.

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เบต้าธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบมากในประเทศไทย มีอาการทางคลินิกที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของการกลายพันธุ์ หากมีเทคนิคการตรวจยืนยันเบต้าธาลัสซีเมียที่สามารถทำได้ในโรงพยาบาลชุมชน โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.) หรือภาคสนาม ทำให้สามารถกำหนดคู่เสี่ยงได้เร็ว และช่วยลดอุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทย คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอุณหภูมิเดียวเพื่อตรวจยืนยันเบต้าธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ของเบต้าโกลบินยีนชนิด nonsense mutation (อรุณี, 2552) ที่พบมากในประเทศไทย อาศัยหลักการของเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) โดยผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 5 ชุด (Set 1-5; S1-S5) แต่ละชุดประกอบด้วยไพรเมอร์จำนวน 4 เส้น (L,F,B, P1-5) ที่สามารถตรวจสอบยืนเบต้าธาลัสซีเมียที่มีความจำเพาะสูง การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออาศัยการทำงานของ *Bst* DNA polymerase ซึ่งมี displacement activity ทำให้สามารถทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในอุณหภูมิเดียว ในขั้นตอน cycle amplification เมื่อไพรเมอร์พบยืนเป้าหมาย จะเกิดการสร้างสายดีเอ็นเอที่มีความยาวหลายขนาด เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสจะปรากฏดีเอ็นเอที่มีความยาวหลากหลายขนาดมีลักษณะเป็น ladder-like pattern (อมรรัตน์, 2554; Notomi et al., 2000; Nagamine et al., 2002; Notomi et al., 2015; Chomean et al., 2018) ผู้วิจัยจึงนำเทคนิคนี้มาพัฒนาโดยทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง heating block หรือ water bath ซึ่งเทคนิคนี้ไม่ต้องใช้เครื่อง thermal cycler ซึ่งมีราคาสูง และใช้เวลาน้อยกว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ด้วยเทคนิค PCR จึงเหมาะกับการตรวจในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล โรงพยาบาลชุมชน

ผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเบต้าไมโครบินธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) โดยให้ตำแหน่งการกลายพันธุ์อยู่บริเวณปลาย 5' ของ P primer (ภาพที่ 1) และได้ออกแบบ P primer ให้มีความจำเพาะมากขึ้นโดยการเพิ่มและปรับเปลี่ยนลำดับเบสให้มีความแตกต่างกัน จำนวน 5 ชุด (S1-S5) (Duan et al., 2014; Duan et al., 2016) และได้นำไพรเมอร์ทั้ง 5 ชุดนี้มาหาสถานะที่เหมาะสม พบว่าไพรเมอร์ชุดที่ 2 (S2), ชุดที่ 3 (S3) และชุดที่ 5 (S5) มีความจำเพาะต่อยีนเบต้าไมโครบินธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) เพราะได้ปรับเปลี่ยนลำดับเบสที่บริเวณปลาย 5' ของ P Primer มากกว่า 2 ตำแหน่งขึ้นไป ทำให้ไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อการตรวจยีนเบต้าไมโครบินธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) (ภาพที่ 2)

เทคนิค LAMP จะทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส (Notomi et al., 2000; Notomi et al., 2015) ผู้วิจัยจึงได้หาสถานะที่เหมาะสมของเทคนิคการตรวจยีนเบต้าไมโครบินธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) โดยเปรียบเทียบการทำงานของไพรเมอร์ในอุณหภูมิที่ 62, 63, 64, 65, และ 66 องศาเซลเซียส พบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ดีทุกอุณหภูมิ (ภาพที่ 3) เนื่องจากเมื่อนำเทคนิคนี้ไปใช้ในโรงพยาบาลชุมชน รพ.สต.หรือในภาคสนาม เครื่อง heating block หรือ water bath ที่ต่างยี่ห้อกันอาจมีการควบคุมอุณหภูมิที่คลาดเคลื่อนไปบ้าง จึงเลือกใช้อุณหภูมิที่ 64 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิคลาดเคลื่อนไป ± 2 องศาเซลเซียส ก็ยังคงสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ จากนั้นผู้วิจัยได้หาระยะเวลาที่เหมาะสมโดยบ่มที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียสในระยะเวลาที่ 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที พบว่าไพรเมอร์ชุดที่ 2 (S2) จะปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ตั้งแต่การบ่มเป็นเวลา 40-60 นาที ไพรเมอร์ชุดที่ 3 (S3) และชุดที่ 5 (S5) จะปรากฏลักษณะ ladder-like pattern ตั้งแต่การบ่มเป็นเวลา 50-60 นาที (ภาพที่ 4) เนื่องจากความแตกต่างของเครื่อง heating block หรือ water bath ผู้วิจัยจึงเลือกระยะเวลาในการบ่มที่ 60 นาที เพื่อให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าเทคนิค PCR

เมื่อทำ cross-detections เพื่อทดสอบความจำเพาะของชุดไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ชุดที่ 2 (S2), ชุดที่ 3 (S3) และชุดที่ 5 (S5) มีความจำเพาะต่อยีนเบต้าไมโครบินธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ไม่เกิด cross-detections กับยีนเบต้าไมโครบินธาลัสซีเมียชนิดอื่น ยีนฮีโมโกลบินอี และในคนปกติที่ไม่มียีนดังกล่าว แสดงว่าไพรเมอร์ชุดนี้สามารถนำมาใช้ตรวจยีนเบต้าไมโครบินธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอุณหภูมิเดียวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,500 bp ที่พบในยีนฮีโมโกลบินอี และในคนปกติของไพรเมอร์ชุดที่ 5 (S5) นั้นผู้วิจัยจะนำไปตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing ต่อไป (ภาพที่ 5) จากนั้นจึงเปรียบเทียบผลการตรวจยีนเบต้าไมโครบินธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ของเทคนิคนี้กับเทคนิค multiplex ARMS-PCR (Mirasena et al., 2008) ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานการตรวจยีนเบต้าไมโครบินธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีของห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พบว่าให้ผลตรงกัน (ภาพที่ 6) แสดงว่าเทคนิคตรวจยีนเบต้าไมโครบินธาลัสซีเมียชนิด codon 17 (A->T) ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิเดียวมีความจำเพาะ และถูกต้องแม่นยำ

เทคนิคการตรวจยีนเบต้าไมโครบินธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอุณหภูมิเดียวนี้นี้มีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ได้จริง ผู้วิจัยจะดำเนินการทดสอบความไวของเทคนิค และนำเทคนิคนี้ไปตรวจยีนเบต้าไมโครบินธาลัสซีเมียชนิด cd 17 (A->T) ในตัวอย่างที่หลากหลายและมีจำนวนมากขึ้น รวมทั้งนำไปทดลองใช้ในโรงพยาบาลชุมชน โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.) และในภาคสนาม เพื่อพัฒนาเทคนิคนี้ในการตรวจยีนเบต้าไมโครบินธาลัสซีเมียชนิดอื่นๆ และฮีโมโกลบินอีที่พบมากในประเทศไทย เพื่อกำหนดคู่เสี่ยง และลดอุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่อนุเคราะห์ตัวอย่างในการทำวิจัย และขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- อรุณี เจตศรีสุภาพ. ธาลัสซีเมียแบบองค์รวม. ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2552.
- อมรรัตน์ ร่มพฤษ. เทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). ว. โลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2554; 21(3): 201-206.
- Chomean, S., Pholyiam, K., Thamwarokun, A., & Kaset, C. Development of Visual Detection of α -Thalassemia-1 (the - - . Hemoglobin 2018; 1-7.
- Duan, Y., Yang, Y., Li, T., Zhao, D., Cao, J., Shi, Y., et al. Development of a rapid and high-throughput molecular method for detecting the F200Y mutant genotype in benzimidazole-resistant isolates of *Fusarium asiaticum*. Pest Manag Sci 2016; 72(11): 2128-2135.
- Duan, Y., Zhang, X., Ge, C., Wang, Y., Cao, J., Jia, X., et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. Sci Rep 2014; 4: 7094.
- Kibbe, W. A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. Nucleic Acids Res, 35(Web Server issue) 2007, W43-46.
- Mirasena, S., Shimbhu, D., Sanguansermisri, M., Sanguansermisri, T. Rapid detection of β -thalassemia mutations in Thailand using multiplex ARMS. AJSTD 2008; 25(2): 321-332.
- Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular and Cellular Probes 2002; 16: 223-229.
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. J Microbiology 2015; 53(1): 1-5.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acid Res 2000; 28(12): 63.