ความถูกต้องในการวิเคราะห์จีโนไทป์ของนิวคลิโอไทด์เดี่ยวตำแหน่ง rs187116 ในยีน *CD44* ด้วยเทคนิค High Resolution Melting Analysis

Accuracy of the rs187116 Single Nucleotide Polymorphism Genotyping in *CD44* Gene Analyzed by High Resolution Melting Analysis Technique

กมลพัชร์ ทรัพย์เจริญ (Kamonpat Sapcharoen)* วิภาวี เข็มกำเหนิด (Wipawee Kaimkamnerd)**
ดร.พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี (Dr.Phanchana Sanguansermsri)*** ดร.เมธวี ศรีคำมูล (Dr.Metawee Srikummool)***

บทคัดย่อ

เทคนิค high resolution melting (HRM) analysis สามารถใช้ในการวิเคราะห์จีโนไทป์ของสนิปส์ได้โดยอาศัยหลักการการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่แตกต่างกันเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจากสายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบมีลำดับนิวคลิโอไทด์ต่างกัน ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์สนิปส์ของยีน *CD44* ที่ตำแหน่ง rs187116G>A โดยใช้เทคนิค HRM analysis เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR–RFLP ในตัวอย่างจำนวนทั้งหมด 360 ตัวอย่าง ผลที่ได้พบว่ามีตัวอย่างจำนวน 25 ตัวอย่าง ที่ให้ผลการตรวจสอบจีโนไทป์แตกต่างกันคิดเป็นร้อยละ 6.94 จากนั้นจึงนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ให้ผลการตรวจแตกต่างทั้ง 25 ตัวอย่างและสุ่มตัวอย่างผลที่ตรงกันอีก 25 ตัวอย่าง รวม 50 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค automated DNA sequencing ผลการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค PCR–RFLP และ DNA sequencing ให้ผลตรงกันทั้งหมด ทำให้ทราบว่าเทคนิค HRM มีความถูกต้องในการวิเคราะห์สนิปส์ของยีน CD44 ที่ตำแหน่ง rs187116 คิดเป็นร้อยละ 93.06 การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงข้อควรระวังในการนำเทคนิค HRM analysis มาวิเคราะห์รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลิโอไทด์เดี่ยว โดยควรคำนึงถึงชนิดของนิวคลิโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป ตำแหน่งจับของไพรเมอร์ ลำดับนิวคลิโอไทด์ในสายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบ รวมทั้งขนาดของผลผลิตจากปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เพื่อให้การตรวจสอบจีโนไทป์มีประสิทธิภาพและถูกต้อง

ABSTRACT

High resolution melting (HRM) analysis is usually used to analyze the single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping. This is based on the different patterns of reduced fluorescence signals after a temperature increase which is due to nucleotide sequences in DNA being different. In this study, 360 samples were analyzed the genotype of SNP rs187116G>A in *CD44* gene by HRM analysis, which was then compared to PCR–RFLP. The result showed that 25 of the samples mismatched to PCR–RFLP (6.94%). Then these samples and 25 other random ones, were analyzed by automated DNA sequencing. This result showed that all genotype of PCR–RFLP samples matched DNA sequencing and showed that the percentage of the HRM analysis accuracy for CD44, rs187116 genotyping was 93.06%. This study demonstrates concern regarding the limitations of HRM analysis for the single nucleotide polymorphism genotyping, including nucleotide changing, the primer binding site, the DNA sequence of amplicons, and the length of PCR products which provides high efficiency and accuracy.

คำสำคัญ: เทคนิค High resolution melting analysis การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลิโอไทด์เดี่ยว (สนิปส์)

Keywords: High resolution melting, HRM analysis, Single nucleotide polymorphism (SNP)

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*

*** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*

**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*

บทนำ

ยีน *CD44* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน CD44 ที่พบอยู่บนผิวเซลล์และทำหน้าที่ในการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ การยึดเกาะและการเคลื่อนที่ของเซลล์ การแสดงออกของโปรตีน CD44 นี้สามารถใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ (Medema, 2013) จากรายงานความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลิโอไทด์เดี่ยวหรือสนิปส์ (single nucleotide polymorphism: SNPs) กับการเกิดมะเร็งพบว่าตำแหน่ง SNP ในยีน CD44 หลายตำแหน่งสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งในหลายอวัยวะ ได้แก่ มะเร็งเต้านม (Jiang et al., 2012; Tulsyan et al., 2013) มะเร็งกระเพาะอาหาร (Winder et al., 2011; Bitaraf et al., 2018; Suenaga et al., 2015) มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Verma et al., 2017) และมะเร็งปอด (Liu et al., 2015)

ตำแหน่ง rs187116 เป็นสนิปส์ตำแหน่งหนึ่งบนยีน *CD44* บริเวณลำดับเบสที่ 4883 นับจากอินตรอนที่ 1 โดยมีการเปลี่ยนแปลงของเบสแบบทรานสิชันจากเบส G เป็น A (intron 1 + 4883G>A) จากรายงานการวิจัยพบว่าตำแหน่งดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร (Winder et al., 2011; Bitaraf et al., 2018; Suenaga et al., 2015) มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Verma et al., 2017) และความไวต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ของผิวหนังตรงบริเวณที่ถูกฉายรังสีในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม (Suga et al., 2007)

ในการศึกษาจีโนไทป์ของสนิปส์สามารถทำได้หลายเทคนิค แต่เทคนิคที่ได้รับการยอมรับและมีความน่าเชื่อถือคือเทคนิค Polymerase chain reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR–RFLP) (Chosdol et al., 2002; Winder et al., 2011; Zhang et al., 2005) และเทคนิค DNA sequencing (Fong et al., 2017; Zhang et al., 2013) สำหรับเทคนิค PCR–RFLP มีความถูกต้องแม่นยำสูงแต่มีข้อด้อยคือในการวิเคราะห์ต้องอาศัยความจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงต้องมีจุดตัดของเอนไซม์ในบริเวณที่เกิดสนิปส์หรือบริเวณใกล้เคียงที่เอนไซม์จะใช้เป็นจุดจดจำ จึงเกิดข้อจำกัดในการเลือกใช้เอนไซม์และอาจไม่มีเอนไซม์ตัดจำเพาะที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตำแหน่งที่ต้องการ เทคนิค DNA sequencing เป็นเทคนิคที่มีความถูกต้องแม่นยำสูงเช่นกัน ทำให้ทราบจีโนไทป์ของสนิปส์และลำดับเบสของบริเวรที่สนใจทั้งหมดอย่างชัดเจน แต่มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ค่อนข้างสูงไม่เหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองจีโนไทป์ จึงมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ที่ใช้ในการวิเคราะห์จีโนไทป์ของสนิปส์ โดยลดข้อจำกัดในด้านของเวลาและค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล คือเทคนิค High resolution melting (HRM) analysis (Vossen et al., 2009)

เทคนิค HRM เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและมีความไวสูงสำหรับการวิเคราะห์จีโนไทป์ของสนิปส์ โดยการวิเคราะห์อาศัยหลักการการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนต์ที่เกิดจากการเข้าจับระหว่างสีฟลูออร์เรสเซนต์กับดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับนิวคลิโอไทด์แตกต่างกันเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยความแตกต่างของอุณหภูมินี้สามารถตรวจวัดได้แม้จะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลิโอไทด์เพียงหนึ่งตัวในลำดับที่ทำการวิเคราะห์ (Applied Biosystems, 2018) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์จีโนไทป์ของตำแหน่งสนิปส์ด้วยเทคนิค HRM analysis ยังมีข้อจำกัดอยู่มาก ฉะนั้นในการศึกษานี้จึงสนใจศึกษาความถูกต้องของการนำเทคนิค HRM analysis มาใช้วิเคราะห์จีโนไทป์ของตำแหน่ง rs187116 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีศักยภาพที่จะใช้ประเมินความเสี่ยงของของการเกิดโรคมะเร็งในประชากรได้ ซึ่งผลการศึกษาทำให้ทราบว่าการใช้เทคนิค HRM analysis ในการตรวจคัดกรองอาจจะมีความผิดพลาดได้ซึ่งต้องมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อวิเคราะห์ความถูกต้องของเทคนิค HRM ในการตรวจจีโนไทป์ของยีน *CD44* ที่ตำแหน่ง rs187116

วิธีการวิจัย

การสกัดดีเอ็นเอและการวัดปริมาณ

ตัวอย่างเลือดทั้งหมด 360 ตัวอย่าง ถูกนำมาสกัดดีเอ็นด้วยชุดสกัด AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, South Korea) จากนั้นนำไปหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี UV spectrophotometry โดยใช้เครื่อง NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer (Thermo scientific, US)

การวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค High resolution melting analysis

ในการวิเคราะห์จีโนไทป์จะใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ rs187116 ของยีน *CD44* โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ forward: 5' CTTTCGCAAGAACCACTTCC 3' และ reverse: 5' AGGTGGTTGGAGATCACCTG 3' (Winder et al., 2011) จากนั้นทำเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง LightCycler® 480 System - High Resolution Melting and Gene Scanning ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 10 µl ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 10 – 30 ng forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 0.5 mM และ 2X AccuMelt™ HRM—High Resolution Melt Analysis SuperMix และปรับปริมาตรด้วย sterile water จากนั้นทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยสภาวะดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 50 รอบ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C 10 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 64 °C 15 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C 10 วินาที และวิเคราะห์ melting curve ของ PCR product ด้วยการอ่านค่าการเรืองแสงของฟลูออเรสเซ็นส์ที่ลดลงในช่วงอุณหภูมิ 65 ถึง 95 °C (melt phase) ด้วย ramp rate ที่ 0.5 °C และค่าการตรวจวัดต่อจุด (acquisition) จำนวน 25 ครั้งต่อหนึ่งอุณหภูมิ หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ผล HRM ด้วยโปรแกรม Lightcycler® 480 software - Roche เพื่อจำแนกความแตกต่างของแต่ละจีโนไทป์

การวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR – RFLP)

ในขั้นตอนแรกจะทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction ด้วยเครื่อง T100™ Thermal Cycler (Bio - Rad, US) โดยใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันกับการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค HRM analysis ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 20 µl ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 10 - 30 ng forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 5 mM และ 2X Mytaq™ HS mix และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยสภาวะดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C 1 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C 30 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 64 °C 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C 30 วินาที จำนวน 32 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C 5 นาที วิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 153 คู่เบสด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

นำผลผลิตดีเอ็นเอจากเทคนิค PCR มาทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ก่อนจะนำไปทำปฏิกิริยาตัดด้วยเอนไซม์ MspI (Winder et al., 2011) ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 15 µl ประกอบไปด้วย ผลผลิตดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ 10X FastDigest เอนไซม์ MspI FastDigest 0.5 ยูนิต (Thermo scientific, US) และปรับปริมาตรด้วย sterile water จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 30 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis สำหรับจีโนไทป์แบบ homozygous GG เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์จะแสดงแถบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบที่ความยาว 60 คู่เบส และ 93 คู่เบส จีโนไทป์แบบ homozygous AA จะไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์จึงมีความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 153 คู่เบส เพียงขนาดเดียว และจีโนไทป์แบบ heterozygous GA จะมีความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมด 3 ขนาด คือ 153 คู่เบส 93 คู่เบส และ 60 คู่เบส

การวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค DNA sequencing

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จะทำการสุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมด 50 ตัวอย่าง นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์และสภาวะในการทำปฏิกิริยาเดียวกันกับเทคนิค PCR – RFLP ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 30 µl และวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis จากนั้นจึงนำผลผลิตดีเอ็นเอทั้งหมดส่งวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค DNA sequencing (Bioneer, South Korea) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลิโอไทด์แบบเดียวกันกับการทำ PCR ทั้งสาย forward และ reverse

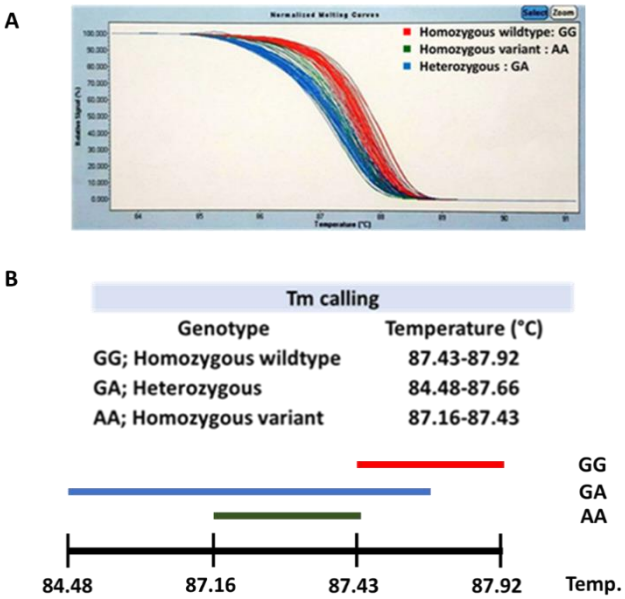
ผลการวิจัย

การวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค HRM analysis

ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ของสนิปส์ rs187116 ด้วยเทคนิค HRM analysis สามารถจำแนกรูปแบบการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนส์ทั้งหมด 3 รูปแบบได้แก่ จีโนไทป์แบบ homozygous wildtype: GG (สีแดง) heterozygous: GA (สีน้ำเงิน) และ homozygous variant: AA (สีเขียว) ดังภาพที่ 1A และช่วงอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันของจีโนไทป์แบบ homozygous wildtype (GG) คือ 87.43 ถึง 87.92 องศาเซลเซียส จีโนไทป์แบบ heterozygous (GA) คือ 84.48 ถึง 87.66 องศา-เซลเซียส และ จีโนไทป์แบบ homozygous variant (AA) คือ 87.16 ถึง 87.43 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 1B

เปรียบเทียบการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค HRM analysis และ PCR–RFLP

การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค HRM analysis พบว่ามีจีโนไทป์แบบ homozygous GG จำนวน 149 ตัวอย่าง จีโนไทป์แบบ heterozygous GA จำนวน 166 ตัวอย่าง และจีโนไทป์แบบ homozygous AA จำนวน 45 ตัวอย่าง และผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR–RFLP มีจีโนไทป์แบบ homozygous GG จำนวน 141 ตัวอย่าง จีโนไทป์แบบ heterozygous GA จำนวน 170 ตัวอย่าง และจีโนไทป์แบบ homozygous AA จำนวน 49 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1 เมื่อนำผลการวิเคราะห์จีโนไทป์จากทั้งสองเทคนิคมาทำการเปรียบเทียบกันพบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลแตกต่างกัน จำนวน 25 ตัวอย่าง



ภาพที่ 1 ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ของสนิปส์ rs187116 ด้วยเทคนิค HRM analysis. (A) รูปแบบการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนส์ของจีโนไทป์แบบ homozygous wildtype: GG (สีแดง) heterozygous: GA (สีน้ำเงิน) และ homozygous variant: AA (สีเขียว) (B) ช่วงอุณหภูมิที่แต่ละจีโนไทป์เกิดการแยกตัวของดีเอ็นเอสายคู่

เปรียบเทียบการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค DNA sequencing กับการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค HRM analysis และ PCR–RFLP

จากผลการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของแต่ละตัวอย่างเมื่อถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis และ PCR–RFLP พบว่ามีจำนวนทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ที่ให้ผลการวิเคราะห์ไม่ตรงกันและทำการสุ่มตัวอย่างเพิ่มเติมจำนวน 25 ตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค DNA sequencing

ผลที่ได้พบว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis ให้ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์แบบ homozygous GG จำนวน 26 ตัวอย่าง จีโนไทป์แบบ heterozygous GA จำนวน 11 ตัวอย่าง และจีโนไทป์แบบ homozygous AA จำนวน 13 ตัวอย่าง ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ของ PCR–RFLP และ DNA sequencing ให้ผลจีโนไทป์เหมือนกันทั้งหมด คือ homozygous GG จำนวน 17 ตัวอย่าง heterozygous GA จำนวน 14 ตัวอย่าง และ homozygous AA จำนวน 19 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 2

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เทคนิค PCR-RFLP เป็นเทคนิคที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง มักถูกนำมาใช้ในการศึกษาสนิปส์ภายในยีนต่าง ๆ เช่น สนิปส์ตำแหน่ง rs1042522G>C ของยีน *TP53* (Tumor suppressor gene) (Chosdol et al., 2002) สนิปส์ตำแหน่ง rs7116432A>G (Bitaraf et al., 2018) และตำแหน่ง rs187116G>A ของยีน *CD44* (Winder et al., 2011; Bitaraf et al., 2018) เป็นต้น ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสนิปส์ที่ตำแหน่ง rs187116 ของยีน *CD44* ซึ่งเป็นสนิปส์ที่สามารถใช้เทคนิค PCR-RFLP วิเคราะห์จีโนไทป์ได้ โดยใช้ความจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ MspI ที่มีจุดจดจำสำหรับการตัดตรงตำแหน่ง 5'…C▼CGG…3' และใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลิโอไทด์แบบเดียวกันงานวิจัยที่ถูกรายงานก่อนหน้า (Winder et al., 2011; Bitaraf et al., 2018)

ตารางที่ 1 ตารางแสดงจำนวนจีโนไทป์ของตัวอย่างเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM และ PCR-RFLP

จีโนไทป์	**HRM** (n), (%)	**PCR – RFLP** (n), (%)
Homozygous wildtype (GG)	149 (41.39)	141 (39.17)
Heterozygous (GA)	166 (46.11)	170 (47.22)
Homozygous variant (AA)	45 (12.5)	49 (13.61)
รวม	360 (100)	360 (100)

ตารางที่ 2 ตารางแสดงจำนวนผลที่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis PCR-RFLP และ DNA sequencing ของแต่ละจีโนไทป์

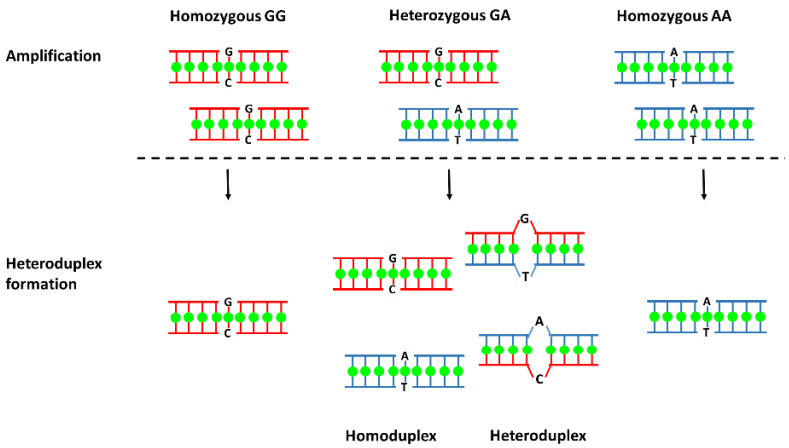
จีโนไทป์	**HRM** (n), (%)	**PCR – RFLP** (n), (%)	**DNA sequencing** (n), (%)
Homozygous wildtype (GG)	26 (52)	17 (34)	17 (34)
Heterozygous (GA)	11 (22)	14 (28)	14 (28)
Homozygous variant (AA)	13 (26)	19 (38)	19 (38)
รวม	50 (100)	50 (100)	50 (100)

เทคนิค HRM analysis เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์สนิปส์ โดยพัฒนามาจากวิธีพื้นฐานเพื่อลดเวลาที่ใช้วิเคราะห์และยังให้ผลที่ถูกต้อง ตัวอย่างการวิเคราะห์ที่นำเทคนิค HRM analysis มาใช้ได้แก่ วิธีการวิเคราะห์จีโนไทป์ของยีน *MTHFR* (methylenetetrahydrofolate reductase) ที่ตำแหน่ง rs1801133 มีความถูกต้องของการวิเคราะห์อยู่ที่ร้อยละ 98.4 จากตัวอย่างทั้งหมด 381 ตัวอย่างและที่ตำแหน่ง rs1801131 มีความถูกต้องอยู่ที่ร้อยละ 98.1 จากตัวอย่างทั้งหมด 104 ตัวอย่าง (Norambuena et al., 2009) การตรวจสนิป rs5896 ของยีน prothrombin ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดนิ่วไตในคนไทยภาคอีสาน มีความถูกต้องของการวิเคราะห์อยู่ที่ร้อยละ 100 จากตัวอย่างทั้งหมด 48 ตัวอย่าง (ชูชัยและคณะ, 2013)

เทคนิค HRM analysis อาศัยหลักการการลดลงของระดับการเรืองแสงของสีฟลูออเรสเซนส์ที่เกาะอยู่ระหว่างดีเอ็นเอสายคู่และจำแนกจีโนไทป์ด้วยช่วงของอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกัน ในขั้นตอนการวิเคราะห์จะทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอส่วนที่เกิดสนิปส์ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอน Heteroduplex formation หรือขั้นตอนที่ทำการแยกสายของผลผลิตดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิสูงและลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวกลับเข้ามาจับคู่กันแบบสุ่ม ในกรณีที่ตัวอย่างมีจีโนไทป์แบบ homozygous (GG หรือ AA) ดีเอ็นที่กลับมาจับคู่กันจะมีเพียงแบบเดียว แต่ในกรณีที่ตัวอย่างมีจีโนไทป์แบบ heterozygous (GA) ดีเอ็นเอที่กลับมาจับคู่กันจะมี

4 แบบ โดยแบ่งเป็นกลุ่ม homoduplex 2 แบบ และ heteroduplex 2 แบบ ดังภาพที่ 2 หลังจากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอน denaturation โดยการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 60 ไปจนถึง 95 องศาเซลเซียส เพื่อให้สายดีเอ็นเอเกิดการแยกออกจากกัน เมื่อดีเอ็นเอสายคู่เกิดการแยกจะทำให้สีฟลูออเรสเซนส์ชนิดอิ่มตัว (saturated dye) ที่เกาะอยู่ระหว่างดีเอ็นเอสายคู่หลุดออกและไม่เกิดการเรืองแสง ทำให้ปริมาณแสงฟลูออเรสเซนส์ที่ถูกตรวจจับลดจำนวนลงจนกระทั่งไม่พบการเรืองแสงของสีฟลูออเรสเซนส์ จึงทำให้ได้ช่วงของอุณหภูมิที่สามารถจำแนกจีโนไทป์ออกเป็น 3 ชนิดได้ (Corbett research, 2018)

ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ของสนิปส์ rs187116 ของยีน *CD44* ด้วยเทคนิค HRM analysis พบว่าช่วงอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันของจีโนไทป์แบบ homozygous GG คือ 87.43 ถึง 87.92 องศาเซลเซียส จีโนไทป์แบบ heterozygous GA คือ 84.48 ถึง 87.66 องศาเซลเซียส และจีโนไทป์แบบ homozygous AA คือ 87.16 ถึง 87.43 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 1B ซึ่งจะเห็นได้ว่าจีโนไทป์แบบ heterozygous GA จะเริ่มมีการแยกสายของดีเอ็นเอในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า เนื่องจากจีโนไทป์นี้ประกอบไปด้วยดีเอ็นเอที่อยู่ในรูป heteroduplex form ตรงบริเวณที่เกิดสนิปส์ส่งผลทำให้สายดีเอ็นเอมีความเสถียรต่ำกว่ารูปแบบอื่น ๆ จากนั้นจึงเป็นช่วงอุณหภูมิของจีโนไทป์แบบ homozygous AA ที่มีความเสถียรของดีเอ็นเอสูงขึ้นจากพันธะของ A–T และสุดท้ายจะเป็นช่วงอุณหภูมิของจีโนไทป์แบบ homozygous GG ที่มีความเสถียรสูงที่สุดจากพันธะของ G–C



ภาพที่ 2 ภาพแสดงขั้นตอน Heteroduplex formation (ดัดแปลงจาก Meistertzheim et al., 2012)

เมื่อนำผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค HRM analysis มาทำการเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR–RFLP พบว่ามีตัวอย่างจำนวน 25 ตัวอย่าง จากจำนวนทั้งหมด 360 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.94 ที่ให้ผลไม่ตรงกัน จากนั้นจึงได้นำตัวอย่างที่ให้ผลไม่ตรงกันเหล่านี้และทำการสุ่มตัวอย่างเพิ่มเติมจำนวน 25 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DNA sequencing ผลที่ได้พบว่าตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR–RFLP ให้ผลตรงกับเทคนิค DNA sequencing ทุกตัวอย่าง จึงมีตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis จำนวน 25 ตัวอย่างที่ไม่ตรงกับเทคนิค DNA sequencing

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis ที่ให้ผลไม่ตรงกับเทคนิค PCR–RFLP และ DNA sequencing คือตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous GA และจีโนไทป์แบบ homozygous AA แต่ถูกจัดไปอยู่ในกลุ่มที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous GG เนื่องจากตัวอย่างเหล่านี้อาจจะใช้อุณหภูมิในการแยกดีเอ็นเอสายคู่ใกล้เคียงกับช่วงอุณหภูมิของจีโนไทป์แบบ homozygous GG และจากภาพที่ 1A จะเห็นได้ว่ามีช่วงอุณหภูมิที่ซ้อนทับกันของทั้งสามจีโนไทป์ จึงอาจทำให้การวิเคราะห์ผลเกิดการผิดพลาด

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis มีจุดที่ควรระมัดระวังในการใช้ เนื่องจากอาจส่งผลต่อการวิเคราะห์จีโนไทป์ของสนิปส์ได้ ได้แก่ ชนิดของนิวคลิโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป ตำแหน่งจับของไพรเมอร์ และขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (Applied Biosystems, 2018; Reed et al., 2007; Slomka et al., 2017; Wittwer, 2008) กล่าวคือ ชนิดของนิวคลิโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป จะส่งผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis โดยการเปลี่ยนแปลงจากเบส C เป็น T (C/T) G เป็น A (G/A) C เป็น A (C/A) และ G เป็น T (G/T) มักจะให้ผลการวิเคราะห์ที่ชัดเจนเนื่องจากจะทำให้ช่วงของอุณหภูมิต่างกัน มากกว่า 0.5 ถึง 1 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ C เป็น G (C/G) ช่วงของอุณหภูมิต่างกันประมาณ 0.2 ถึง 0.5 องศาเซลเซียส และสุดท้ายคือ A เป็น T (A/T) ที่มีช่วงของอุณหภูมิต่างกันน้อยกว่า 0.2 องศาเซลเซียส (Applied Biosystems, 2018; Reed et al., 2007)

ในการออกแบบตำแหน่งจับของไพรเมอร์จะส่งผลต่อขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ ความยาวของผลผลิตที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis ควรยาวประมาณ 80 ถึง 250 คู่เบส หากความยาวของผลผลิตสั้นเกินไปจะส่งผลต่อสัญญานของสีฟลูออเรสเซนส์ เนื่องจากปริมาณของสีฟลูออเรสเซนส์น้อยเกินไปที่จะตรวจวัดสัญญาน ในทางตรงกันข้ามหากผลผลิตมีความยาวที่มากเกินไป อาจจะทำให้มีสนิปส์ในตำแหน่งอื่นถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยและทำให้การวิเคราะห์จีโนไทป์คลาดเคลื่อน (Slomka et al., 2017) โดยผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ในการศึกษานี้มีขนาด 153 คู่เบส ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการทำ HRM analysis

สรุปผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ของสนิปส์ rs187116 ของยีน *CD44* ด้วยเทคนิค HRM analysis เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR–RFLP พบว่ามีความถูกต้องในการวิเคราะห์คิดเป็นร้อยละ 93.06 หากต้องการวิเคราะห์จีโนไทป์ของสนิปส์อื่น ๆ ด้วยเทคนิค HRM analysis อาจจะต้องคำนึงถึงชนิดของนิวคลิโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป ตำแหน่งจับของไพรเมอร์ และขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอเพื่อผลที่ถูกต้อง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2562 ผ่านมหาวิทยาลัยนเรศวร สัญญาเลขที่ 2562/8

เอกสารอ้างอิง

ชูชัย เนตรธุวกุล, นัญวรรณ รุ่งโรจน์, หนึ่งหทัย สวัสดี, นิรินทร์ยา สุดตาชาติ, เพทาย เย็นจิตโสมนัส. การตรวจสนิป rs5896 ของยีน prothrombin ด้วยวิธี polymerase chain reaction และ high-resolution melting analysis. Genomics and Genetics. 2013; (6): 54.

Applied Biosystems. A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis. [serial online] 2018 [cited 2018 Dec 10] Available from https://www.gene-quantification.de/ab-hrm-guide.pdf

Bitaraf SM, Mahmoudian RA, Abbaszadegan M, Meybodi AM, Taghehchian N, Mansouri A, et al. Association of Two CD44 Polymorphisms with Clinical Outcomes of Gastric Cancer Patients. Asian Pac J Cancer Prev. 2018; 19(5): 1313.

Chosdol K, Ahuja A, Rathore A, Misra A, Mir SH, Chattopadhyay P, et al. Study of p53 codon 72 polymorphism in various ethnic groups of North India. Curr Sci. 2002; 1253-5.

Corbett research. High Resolution Melt Assay Design and analysis. [serial online] 2018 [cited 2018 Dec 10] Available from http://www.tamar.co.il/PDFs/CorProtocol%20600001July06_HRM%20assay%20design%20and%20analysis.pdf

Fong WY, Ho CC, Poon WT. Comparison of Direct Sequencing, Real-Time PCR-High Resolution Melt (PCR-HRM) and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Analysis for Genotyping of Common Thiopurine Intolerant Variant Alleles NUDT15 c. 415C> T and TPMT c. 719A> G (TPMT* 3C). Diagnostics. 2017; 7(2): 27.

Jiang L, Deng J, Zhu X, Zheng J, You Y, Li N, et al. CD44 rs13347 C> T polymorphism predicts breast cancer risk and prognosis in Chinese populations. Breast Cancer Res. 2012; 14(4): R105.

Liu Y, Qing H, Su X, Wang C, Li Z, Liu S. Association of CD44 gene polymorphism with survival of NSCLC and risk of bone metastasis. Med Sci Monit. 2015; 21: 2694.

Medema JP. Cancer stem cells: the challenges ahead. Nat Cell Biol. 2013; 15(4): 338.

Meistertzheim AL, Calves I, Artigaud S, Friedman CS, Laroche J, Paillard C, et al. High-resolution melting analysis for fast and cheap polymorphism screening of marine populations. Protoc Exch. 2012; 10.

Norambuena PA, Copeland JA, Křenková P, Štambergová A, Macek JrM. Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. Clin Biochem. 2009; 42(12): 1308-16.

Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics. 2007; 8(6): 597-608.

Slomka M, Sobalska-Kwapis M, Wachulec M, Bartosz G, Strapagiel D. High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping—Limitations and Caveats in Practical Case Studies. Int J Mol Sci. 2017; 18(11): 2316.

Suenaga M, Yamada S, Fuchs BC, Fujii T, Kanda M, Tanaka C, et al. CD44 single nucleotide polymorphism and isoform switching may predict gastric cancer recurrence. J Surg Oncol. 2015; 112(6): 622-8.

Suga T, Ishikawa A, Kohda M, Otsuka Y, Yamada S, Yamamoto N, et al. Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin reactions after radiotherapy in breast cancer patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2007; 69(3): 685-93.

Tulsyan S, Agarwal G, Lal P, Agrawal S, Mittal RD, Mittal B. CD44 gene polymorphisms in breast cancer risk and prognosis: a study in North Indian population. PloS one. 2013; 8(8): e71073.

Verma A, Kapoor R, Mittal RD. Cluster of Differentiation 44 (CD44) Gene Variants: A Putative Cancer Stem Cell Marker in Risk Prediction of Bladder Cancer in North Indian Population. Indian J Clin Biochem. 2017; 32(1): 74-83.

Vossen RH, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. High-Resolution Melting Analysis (HRMA): More than just sequence variant screening. Hum Mutat. 2009; 30(6): 860-6.

Winder T, Ning Y, Yang D, Zhang W, Power DG, Bohanes P, et al. Germline polymorphisms in genes involved in the CD44 signaling pathway are associated with clinical outcome in localized gastric adenocarcinoma. Int J Cancer. 2011; 129(5): 1096-104.

Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. Hum Mutat. 2009; 30(6): 857-9.

Zhang L, Cui G, Li Z, Wang H, Ding H, Wang DW. Comparison of high-resolution melting analysis, TaqMan allelic discrimination assay, and Sanger sequencing for clopidogrel efficacy genotyping in routine molecular diagnostics. J Mol Diagn. 2013; 15(5): 600-6.

Zhang R, Zhu Z, Zhu H, Nguyen T, Yao F, Xia K, et al. SNP Cutter: a comprehensive tool for SNP PCR–RFLP assay design. Nucleic Acids Res. 2005; 33: W489-92.