

การวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค DNA sequencing

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

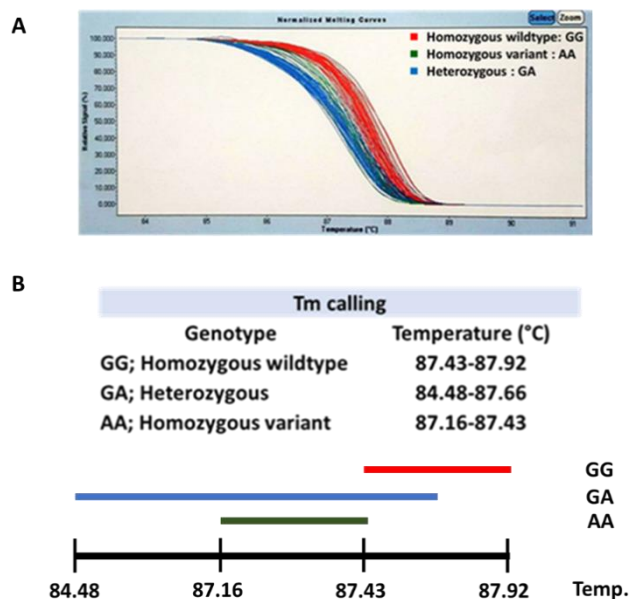
ผลการวิจัย

การวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค HRM analysis

ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ของสลิปส์ rs187116 ด้วยเทคนิค HRM analysis สามารถจำแนกรูปแบบการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนส์ทั้งหมด 3 รูปแบบได้แก่จีโนไทป์แบบ 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 องศาเซลเซียส 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 ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ของสnp 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 มักถูกนำมาใช้ในการศึกษาสnp ภายใตยีนต่าง ๆ เช่น สnp ตำแหน่ง rs1042522G>C ของยีน *TP53* (Tumor suppressor gene) (Chosdol et al., 2002) สnp ตำแหน่ง rs7116432A>G (Bitaraf et al., 2018) และตำแหน่ง rs187116G>A ของยีน *CD44* (Winder et al., 2011; Bitaraf et al., 2018) เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสnp ตำแหน่ง rs187116 ของยีน *CD44* ซึ่งเป็นสnp ที่สามารถใช้เทคนิค PCR-RFLP วิเคราะห์จีโนไทป์ได้ โดยใช้ความจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MspI* ที่มีจุดจดจำสำหรับการตัดตรงตำแหน่ง 5'...C[▼]CGG...3' และใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบเดียวกันงานวิจัยที่ถูกรายงานก่อนหน้านี้ (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

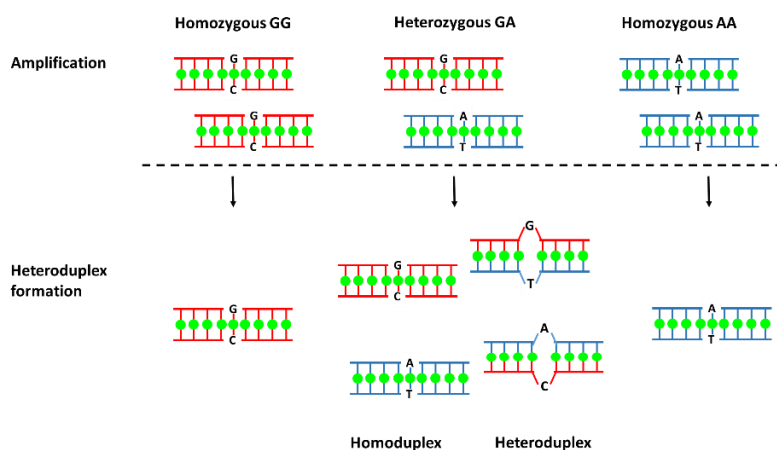
จีโนไทป์	HRM (n), (%)	PCR – RFLP (n), (%)	DNA sequencing (n), (%)
Homozygous wildtype (GG)	26 (52)	17 (34)	17 (34)
Heterozygous (GA)	11 (22)	14 (28)	14 (28)
Homozygous variant (AA)	13 (26)	19 (38)	19 (38)
รวม	50 (100)	50 (100)	50 (100)

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

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

4 แบบ โดยแบ่งเป็นกลุ่ม homoduplex 2 แบบ และ heteroduplex 2 แบบ ดังภาพที่ 2 หลังจากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอน denaturation โดยการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 60 ไปจนถึง 95 องศาเซลเซียส เพื่อให้สายดีเอ็นเอเกิดการแยกออกจากกัน เมื่อ ดีเอ็นเอสายคู่เกิดการแยกจะทำให้สีฟลูออเรสเซนต์ชนิดอิ่มตัว (saturated dye) ที่เกาะอยู่ระหว่างดีเอ็นเอสายคู่หลุดออก และไม่เกิดการเรืองแสง ทำให้ปริมาณแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ถูกตรวจจับลดจำนวนลงจนกระทั่งไม่พบการเรืองแสงของ สีฟลูออเรสเซนต์ จึงทำให้ได้ช่วงของอุณหภูมิที่สามารถจำแนกจีโนไทป์ออกเป็น 3 ชนิดได้ (Corbett research, 2018)

ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ของสปีส์ 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 จะเริ่มมีการแยกสายของดีเอ็นเอในช่วง อุณหภูมิที่ต่ำกว่า เนื่องจากจีโนไทป์นี้ประกอบไปด้วยดีเอ็นเอที่อยู่ในรูป heteroduplex form ตรงบริเวณที่เกิดสปีส์ ส่งผลทำให้สายดีเอ็นเอมีความเสถียรต่ำกว่ารูปแบบอื่น 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 คือ ตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous GA และจีโนไทป์แบบ homozygous AA แต่ถูกจัดไปอยู่ในกลุ่มที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous GG เนื่องจากตัวอย่างเหล่านี้อาจจะใช้อุณหภูมิในการแยกดีเอ็นเอสายคู่ใกล้เคียงกับช่วงอุณหภูมิของจีโนไทป์แบบ homozygous GG และจากภาพที่ 1A จะเห็นได้ว่ามีช่วงอุณหภูมิที่ซ้อนทับกันของทั้งสามจีโนไทป์ จึงอาจทำให้การวิเคราะห์ผลเกิดการผิดพลาด

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis มีจุดที่ควรระมัดระวังในการใช้ เนื่องจากอาจส่งผลต่อการวิเคราะห์จีโนมไทป์ของสปีส์ได้ ได้แก่ ชนิดของนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป ตำแหน่งจับของไพรเมอร์ และขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (Applied Biosystems, 2018; Reed et al., 2007; Slomka et al., 2017; Wittwer, 2008) กล่าวคือ ชนิดของนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป 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) ช่วงของอุณหภูมิต่างกัน ประมาณ 0.2 ถึง 0.5 องศาเซลเซียส และสุดท้ายคือ A เป็น T (A/T) ที่มีช่วงของอุณหภูมิต่างกันน้อยกว่า 0.2 องศาเซลเซียส (Applied Biosystems, 2018; Reed et al., 2007)

ในการออกแบบตำแหน่งจับของไพรเมอร์จะส่งผลต่อขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ความยาวของผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis ควรยาวประมาณ 80 ถึง 250 คู่เบส หากความยาวของผลิตภัณฑ์สั้นเกินไปจะส่งผลกระทบต่อสัญญาณของสีฟลูออเรสเซนส์ เนื่องจากปริมาณของสีฟลูออเรสเซนส์น้อยเกินไปที่จะตรวจวัดสัญญาณ ในทางตรงกันข้ามหากผลิตภัณฑ์มีความยาวที่มากเกินไป อาจจะทำให้มีสปีส์ในตำแหน่งอื่นถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยและทำให้การวิเคราะห์จีโนมไทป์คลาดเคลื่อน (Slomka et al., 2017) โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ในการศึกษานี้มีขนาด 153 คู่เบส ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการทำ HRM analysis

สรุปผลการวิเคราะห์จีโนมไทป์ของสปีส์ rs187116 ของยีน *CD44* ด้วยเทคนิค HRM analysis เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่ามีความถูกต้องในการวิเคราะห์คิดเป็นร้อยละ 93.06 หากต้องการวิเคราะห์จีโนมไทป์ของสปีส์อื่น ๆ ด้วยเทคนิค HRM analysis อาจจะต้องคำนึงถึงชนิดของนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป ตำแหน่งจับของไพรเมอร์ และขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอเพื่อผลที่ถูกต้อง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2562 ผ่านมหาวิทยาลัยขอนแก่น สัญญาเลขที่ 2562/8

เอกสารอ้างอิง

- ชูชัย เนตรฐกุล, นัญวรณ รุ่งโรจน์, หนึ่งหทัย สวัสดิ์, นิรินทรียา สุดตาชาติ, เพทาย เข็นจิตโสมนัส. การตรวจสปีส์ 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.