

ย่อวารสาร

Current Methods and Opportunities of Next-Generation Sequencing (NGS) for HLA Typing

Youri A. Serov¹, Ildar M. Barkhatov¹, Anton S. Klimov¹, Andrey S. Berkos²

¹Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, The First State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russia;

²Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russia. Cell Ther Transplant.

2016;5:63-70

การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคให้กับผู้ป่วย เป็นวิธีการรักษาโรคทางโลหิตวิทยาต่างๆ เช่น โรคเม็ดเลือดแดงโตม้าม (lymphoma) โรคเม็ดเลือดแดงโตม้าม (leukemia) และ โรคโลหิตจาง (aplastic anemia) ผลของการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตขึ้นกับหลายปัจจัย ปัจจัยหนึ่งคือการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้บริจาคกับเซลล์ของผู้ป่วย (graft-versus-host disease : GVHD) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นได้ถ้าผลการตรวจ เอชแอลเอ (human leukocyte antigen : HLA) ระหว่างผู้บริจาค และผู้ป่วยไม่ตรงกัน ดังนั้นการตรวจ HLA โดยเทคนิค Next-Generation Sequencing (NGS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจ HLA-A, -B, -C, -DRB1 ได้ความละเอียดสูง (high-resolution) ถึง 4 ตำแหน่ง จะช่วยลดเวลาผู้ป่วยในการค้นหาผู้บริจาคที่มีผลตรวจ HLA ตรงกันได้เร็วขึ้น ทำให้ผลการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตดีขึ้น

การตรวจ HLA โดยใช้เทคนิค NGS ในปัจจุบันมีหลายบริษัทที่ผลิตน้ำยาลำเร็จรูปจำหน่าย เช่น 454 Junior (Roche), Illumina, Ion Torrent, PacBio และ Nanopore MiniON ซึ่งแต่ละบริษัทจะมีหลักการในการตรวจ HLA ที่เหมือนหรือแตกต่างกันไปในการศึกษาถึงลำดับขั้นตอนในการทำ NGS โดยใช้เทคนิคและน้ำยาของบริษัท Illumina และใช้เครื่อง Miseq ในการวิเคราะห์ผล HLA sequence เปรียบเทียบผลกับเทคนิค Sanger ซึ่งผลที่ออกมาจากเครื่อง NGS จะเป็นรูปแบบ FASTQ สามารถนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล HLA ที่อยู่บนเว็บไซต์ IMGT database ซึ่งฐานข้อมูลนี้จะถูกปรับปรุง 4 ครั้งต่อปี ขั้นตอนการทำ NGS โดยใช้ Illumina platform ประกอบด้วย การสร้างสาย DNA (template generation) โดยใช้ Long-Range DNA Polymerase การตัดและแยกสาย DNA ออกจากกันเพื่อให้ได้ขนาด DNA ที่เหมาะสมในการตรวจ HLA แต่ละ locus (double-stranded

DNA fragmentation) การเตรียม gene libraries คือการเตรียมน้ำยาเพื่อสร้างสาย DNA poly-A ที่ 5' phosphorylation และ ปลายสาย poly-T การติด Adapters' ligation และ index เข้าที่สาย DNA เพื่อให้ทราบชนิดของ HLA gene การผสมตัวอย่าง DNA และน้ำยา เข้าเครื่อง NGS sequencer และการวิเคราะห์ผล HLA typing โดยใช้โปรแกรม Interface ATF 4.7. (Conexio Genomics, Fremantle, Australia)

ตัวอย่างผล HLA-A ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค NGS ได้แก่ HLA-A*01: 01: 01: 01, 24: 02: 01: 01 เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลแล้วไม่พบ mismatch (zero mismatch) ในขณะที่การทำ sequencing โดยเทคนิค Sanger พบความไม่สอดคล้องของผลอันเนื่องจากการเกิด Single nucleotide polymorphism (SNP) ใน exon 2 และ 3 เมื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายในการตรวจด้วยเทคนิค NGS กับ Sanger sequencing (220K) พบว่าเทคนิค Sanger มีราคาแพงกว่าเป็น 2 เท่าของเทคนิค NGS แต่ถ้าเพิ่มปริมาณในการตรวจ NGS ต่อบรรทัด ราคาต่อตรวจต่อรายจะถูกลง

สรุป การใช้เทคนิค NGS ในการตรวจ HLA typing ให้ผลที่น่าเชื่อถือและใช้เวลาน้อย สามารถตรวจได้จำนวนมาก เหมาะสมในการนำมาตรวจในผู้บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต เพื่อตอบสนองงานธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคที่ไม่ใช่ญาติ ในปัจจุบันศูนย์บริการโลหิตจึงได้นำเทคนิค NGS มาใช้ในการตรวจในผู้บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต เพื่อช่วยให้ผู้ป่วยรอปลูกถ่ายเซลล์ฯ ได้รับการปลูกถ่ายได้รวดเร็วขึ้น ลดค่าใช้จ่ายผู้ป่วยในการตรวจ HLA ในผู้บริจาคเพิ่มเติม

อารยา ตั้ววรร

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

