

นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ชนิดหายากบนยีนแอลฟาโกลบินด้วย

วิธี Next Generation Sequencing (NGS)

สุวิมล ศิริวรรณเดชกุล สุรวีร์ สร้อยโมรา วลัยพร ยิ้มเนียม ศรอนงค์ วิจิตรประชา และ การ์นต์ ไพลูชกานติวัฒนา

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

ความเป็นมา แอลฟาธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากการกลายพันธุ์บนยีนแอลฟาโกลบิน ส่วนใหญ่เกิดจาก large deletions ในงานประจำวันสามารถตรวจแอลฟาธาลัสซีเมียได้โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แต่วิธีดังกล่าวอาจไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ชนิดหายากได้ ผู้วิจัยจึงใช้วิธี next generation sequencing (NGS) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีใหม่มาตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิดหายาก **วัตถุประสงค์** เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิดหายากบนยีนแอลฟาโกลบินด้วยวิธี NGS **วิธีการ** ศึกษาตัวอย่างเลือดผู้ป่วยจำนวน 8 ราย ที่ให้ผลการตรวจวิเคราะห์พบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดหายากจากการตรวจ hemoglobin typing (Hb typing) และตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิดหายากด้วยวิธี NGS **ผลการวิจัย** ตัวอย่างทั้ง 8 ราย ตรวจพบการกลายพันธุ์ชนิดหายากได้แก่ Hb G-Honolulu [HBA2:c.91G>C], Hb G-Waimanalo [HBA2:c.193G>A], Hb J-Singapore [HBA2:c.239C>G], Hb Port Phillip [HBA2:c.275T>C], Hb G-Georgia [HBA2:c.287C>T], Hb Siam [HBA1:c.46G>C], Hb Q-India [HBA1:c.193G>C] และ Hb Lansing Ramathibodi [HBA1:c.264C>G] และมีตัวอย่าง 2 ราย คือ Hb Lansing Ramathibodi [HBA1:c.264C>G] พบร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด -3.7 kb และ Hb G-Waimanalo [HBA2:c.193G>A] พบร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด -3.7 kb และ Hb E **สรุป** วิธี NGS สามารถใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิดหายากบนยีนแอลฟาโกลบินได้ นอกจากนี้สามารถนำตัวอย่างแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดหายากมาใช้เป็น positive control และประยุกต์ใช้กับงานด้าน molecular ในงานประจำวันได้

คำสำคัญ : ● Next generation sequencing (NGS) ● การกลายพันธุ์ชนิดหายาก ● ยีนแอลฟาโกลบิน

● แอลฟาธาลัสซีเมีย

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2566;33:277-85.

ได้รับต้นฉบับ 15 สิงหาคม 2566 แก้ไขบทความ 5 ตุลาคม 2566 รับลงตีพิมพ์ 30 พฤศจิกายน 2566

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ น.ส.สุวิมล ศิริวรรณเดชกุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล 270 ถนนพระราม 6 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400 E-mail: suwimol.sir@mahidol.ac.th

Original article

The detection of rare mutations for alpha globin gene using Next Generation Sequencing (NGS)

Suwimol Siriworadechkul, Suravee Sroyimora, Walaiporn Yimniam, Sornanong Wijitpracha and

Karan Paisooksantivatana

Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University

Abstract:

Background: Alpha thalassemia is a genetic disease caused by a mutation in the alpha globin gene. The most common mutations are large deletions, which can be routinely identified using polymerase chain reaction (PCR). Although point mutations are rare, they can be found among patients and cannot be detected by conventional PCR. Next generation sequencing (NGS) is a novel sequencing technology capable of massively parallel detecting point mutations. **Objective:** The study aimed to detect rare mutations in alpha globin gene using NGS. **Methods:** NGS analysis was performed in 8 blood samples exhibiting a rare abnormal Hb peak by Hb typing. **Results:** A rare mutation of 8 samples are Hb G-Honolulu [HBA2:c.91G>C], Hb G-Waimanalo [HBA2:c.193G>A], Hb J-Singapore [HBA2:c.239C>G], Hb Port Phillip [HBA2:c.275T>C], Hb G-Georgia [HBA2:c.287C>T], Hb Siam [HBA1:c.46G>C], Hb Q-India [HBA1:c.193G>C] and Hb Lansing Ramathibodi [HBA1:c.264C>G]. Coinherited mutations were identified in 2 samples: Hb Lansing Ramathibodi [HBA1: c.264C>G] coinherited with alpha thalassemia (-3.7 kb) and Hb G-Waimanalo [HBA2: c.193G>A] coinherited with alpha thalassemia (-3.7 kb) and Hb E. **Conclusion:** NGS could be used to detect rare mutations in the alpha globin gene. In addition, rare mutation samples can be used as positive controls and applied to molecular techniques in routine laboratories.

Keywords : ● Next generation sequencing (NGS) ● Rare mutation ● Alpha globin gene ● Alpha thalassemia
J Hematol Transfus Med. 2023;33:277-85.

บทนำ

โรคโลหิตจางธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยพบว่ามีอุบัติการณ์ของแอลฟาธาลัสซีเมีย 20-30% และเบต้าธาลัสซีเมีย 3-9% นอกจากนี้ยังพบฮีโมโกลบินอี สูงถึง 13-60% โดยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย^{1,2} ความผิดปกติของยีนแอลฟาธาลัสซีเมียที่พบบ่อยมีสาเหตุมาจากการขาดหายไป (deletion) บนยีนแอลฟาโกลบิน โดยหากเกิด deletion บนยีนแอลฟาโกลบินจำนวน 2 ยีน เรียกว่า α -thalassemia 1 และหากเกิด deletion บนยีนแอลฟาโกลบินจำนวน 1 ยีน เรียกว่า α -thalassemia 2 หากเกิด deletion ร่วมกันระหว่าง α -thalassemia 1 และ α -thalassemia 2 จะทำให้เกิดการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินจำนวน 3 ยีน เรียกว่า hemoglobin H (Hb H disease) ซึ่งเป็นชนิด deletional Hb H disease ในขณะที่เดียวกันหากเกิด point mutation บนยีนแอลฟาโกลบินทำให้เกิดฮีโมโกลบินผิดปกติ เช่น Hb Constant spring (Hb CS), Hb Pakse (Hb PS), Hb Quong Sze (Hb QS) หรือ Hb Pak Num Po เป็นต้น เมื่อเกิดร่วมกับ α -thalassemia 1 เรียกว่า non-deletional Hb H disease ซึ่งคนไข้กลุ่มนี้มักจะมีความรุนแรงกว่าชนิด deletional Hb H disease³ ดังนั้นการตรวจการกลายพันธุ์บนยีนแอลฟาโกลบินจึงมีความสำคัญที่ต้องศึกษาเนื่องจากสามารถทำให้เกิด non-deletional Hb H disease ได้

ในปัจจุบันการตรวจในห้องปฏิบัติการนิยมตรวจคัดกรองโรคธาลัสซีเมียและพาหะด้วยวิธี osmotic fragility test (OF) หรือการวัดขนาดของเม็ดเลือดแดง mean corpuscular volume (MCV) และ Dichlorophenol indophenol precipitation (DCIP) การแยกชนิดฮีโมโกลบินด้วยการตรวจ Hb Typing และการตรวจยืนยันหายีนผิดปกติด้วยวิธี polymerase Chain Reaction (PCR) อย่างไรก็ตามหากพบฮีโมโกลบินผิดปกติจาก Hb typing อาจมีข้อจำกัดคือไม่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดใดเนื่องจากสามารถพบฮีโมโกลบินชนิดอื่นๆ ได้ที่ตำแหน่งเดียวกันจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางโมเลกุลมาช่วยตรวจยืนยันฮีโมโกลบินผิดปกตินี้

การตรวจการกลายพันธุ์บนยีนแอลฟาโกลบินชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทยได้แก่ ชนิด --SEA, --THAI, --FIL, --MED และ -20.5 kb ซึ่งทำให้เกิด α -thalassemia 1 และชนิด -3.7 kb, -4.2 kb, Hb CS และ Hb PS ซึ่งทำให้เกิด α -thalassemia 2 ใช้วิธี Multiplex-gap-PCR เพื่อตรวจหา large deletion และวิธี Amplification refractory mutation system PCR (ARMS-PCR) เพื่อตรวจหา point mutation แต่วิธีการตรวจดังกล่าวมีข้อจำกัด คือ ต้องทราบลำดับเบสของการกลายพันธุ์และต้องออกแบบ

primer ที่จำเพาะเจาะจงกับการกลายพันธุ์ชนิดนั้น ๆ จึงไม่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิดหายากหรือการกลายพันธุ์ชนิดอื่น ๆ นอกเหนือจากที่มี primer ในปฏิกิริยา^{4,5} ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิค Next generation sequencing (NGS) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่ช่วยในการหาลำดับเบสภายในดีเอ็นเอ สามารถวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสได้ในปริมาณมากและครอบคลุมยีนเป้าหมาย

งานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิค NGS มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ชนิดหายากบนยีนแอลฟาโกลบิน ซึ่งตัวอย่างแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดหายากที่ได้จากการวิเคราะห์ยังสามารถนำมาใช้เป็น positive control ในการทำงานทางห้องปฏิบัติการและประยุกต์ใช้กับงานด้าน molecular ในงานประจำวันได้

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง ค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดง Hb typing และ PCR สำหรับแอลฟาธาลัสซีเมีย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจำนวน 8 ราย ซึ่งพบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดหายากจากการตรวจ Hb typing ด้วยหลักการ capillary electrophoresis (CE) หรือ high-performance liquid chromatography (HPLC) อย่างน้อยหลักการใดหลักการหนึ่ง ใช้ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เป็นสารกันเลือดแข็ง รวบรวม 3 มิลลิลิตรซึ่งเหลือจากงานประจำวันของห้องปฏิบัติการวินิจฉัยโรคเลือด ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ตัวอย่างเลือดทั้งหมดได้ทำการตรวจวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดง ประกอบด้วย red blood cell count (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) และ red cell distribution width (RDW) ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XS-1000i (Sysmex Corp., Kobe, Japan) ค่า hematological parameters ของตัวอย่าง 8 ราย ดัง Table 1 และทดสอบ Hb typing ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Capillary 2 (Sebia, Lisses, France) และ Variant II-HPLC (Bio-Rad Laboratories, California, USA) ตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิดที่พบบ่อยบนยีนแอลฟาโกลบิน ได้แก่ --SEA, --THAI, --FIL, --MED, -20.5 kb, -3.7 kb, -4.2 kb, Hb CS และ Hb PS ด้วยวิธี Multiplex-Gap-PCR และ ARMS-PCR ออกแบบการทดลองและใช้ primer ดังการศึกษาที่ผ่านมา⁶⁻⁹

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ MURA2023/585

การตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ชนิดหายากด้วยวิธี NGS

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด 200 ไมโครลิตร ด้วยเครื่องอัตโนมัติ Magpurix12 ร่วมกับชุดน้ำยา Magpurix blood DNA extraction kit 200 (Zinexts Life Science Corp., Taipei, Taiwan) และวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Delaware, U.S.A) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค ARMS-PCR โดยออกแบบ primer ให้ครอบคลุมยีน $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ ดังนี้ $\alpha 1/\alpha 2$ forward, 5'-GGGTGGAGACGTCTCTGGC-3', $\alpha 1$ reverse, 5'-TGCAGAGAGGTTCTAGCCATGT-3' และ $\alpha 2$ reverse, 5'-CACATTCCGGGATAGAGAGAACC-3' นำ PCR product ไปทำ DNA purification ด้วยชุดน้ำยา GenUP™ PCR/Gel Cleanup kit (Biotech rabbit, Hennigsdorf, Germany) และตรวจวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค NGS โดยใช้หลักการ Barcode-Tagged Sequencing (BTSeq)™ (Celemics, Seoul, Korea) วิเคราะห์ข้อมูล NGS ด้วยโปรแกรม BioEdit

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยตัวอย่างทั้งหมด 8 ราย จากการแยกชนิดฮีโมโกลบินด้วย Hb typing ทั้งหลักการ CE และ HPLC ดัง Figure 1 พบ Hb G-Honolulu ที่ตำแหน่ง zone 6 และ retention time 3.80, Hb G-Waimanalo ที่ตำแหน่ง zone 6 และ retention time 4.69, Hb J-Singapore ที่ตำแหน่ง zone 12 และ retention time 1.82, Hb Port Phillip ที่ตำแหน่ง zone 8 และ retention time 2.98, Hb G-Georgia ที่ตำแหน่ง zone 7 และ retention time 3.69, Hb Siam ที่ตำแหน่ง zone 5 และ retention time 4.58, Hb Q-India ที่ตำแหน่ง zone 6 และ retention time 4.77 และ Hb Lansing Ramathibodi ที่ตำแหน่ง zone 9 และ retention time 1.98 ใน CE และ HPLC ตามลำดับ ผลการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ชนิดหายากด้วยวิธี NGS ดัง Figure 2 ตัวอย่างทั้ง 8 รายให้ผลการกลายพันธุ์ชนิดหายาก ได้แก่ Hb G-Honolulu [HBA2:c.91G>C], Hb G-Waimanalo [HBA2:c.193G>A], Hb J-Singapore [HBA2:c.239C>G], Hb Port Phillip [HBA2:c.275T>C], Hb G-Georgia [HBA2:c.287C>T], Hb Siam [HBA1:c.46G>C], Hb Q-India [HBA1:c.193G>C] และ Hb Lansing Ramathibodi [HBA1:c.264C>G] จากผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิดที่พบบ่อยบนยีนแอลฟาโกลบินด้วยวิธี PCR พบว่ามีตัวอย่าง 2 ราย คือ Hb Lansing Ramathibodi และ Hb G-Waimanalo พบร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย ชนิด -3.7 kb

ผลการตรวจแยกชนิดฮีโมโกลบินด้วย Hb typing พบว่าฮีโมโกลบินชนิดหายากทั้ง 8 รายให้ผลเป็น heterozygous โดยมี 5 ราย ได้แก่ Hb G-Honolulu, Hb J-Singapore, Hb G-Georgia, Hb Siam และ Hb Q-India มีปริมาณฮีโมโกลบินชนิดหายากอยู่ระหว่าง 17.0-22.5% ในราย Hb Lansing Ramathibodi มีปริมาณฮีโมโกลบิน 6.6% ใน HPLC แต่ใน CE พบว่า Hb Lansing Ramathibodi อยู่ตำแหน่งเดียวกับ Hb A จึงไม่สามารถแยกปริมาณฮีโมโกลบินออกจากกันได้ ในราย Hb Port Phillip มีปริมาณฮีโมโกลบิน 3.4% และ 2.1% ใน CE และ HPLC ตามลำดับ และในราย Hb G-Waimanalo มีปริมาณฮีโมโกลบิน 26.3% ใน CE และ 27.2% ใน HPLC และพบร่วมกับ Homozygous Hb E นอกจากนี้ยังพบอนุพันธ์ของ Hb G-WaimanaloA2 ($\alpha^{GW}2\delta 2$) มีปริมาณฮีโมโกลบิน 1.6% ค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างทั้ง 8 ราย ดัง Table 1 พบว่ามี 6 ราย ได้แก่ Hb J-Singapore, Hb Port Phillip, Hb G-Georgia, Hb Siam, Hb Q-India และ Hb Lansing Ramathibodi ให้ค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดงปกติหรือผิดปกติเล็กน้อย และมี 2 ราย คือ Hb G-Honolulu และ Hb G-Waimanalo ให้ค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดงผิดปกติ

วิจารณ์

ปัจจุบันการกลายพันธุ์บนยีนแอลฟาโกลบินมีมากกว่า 830 ชนิด (Globin Gene Server, <http://globin.bx.psu.edu>) ในงานประจำวันของห้องปฏิบัติการวินิจฉัยโรคเลือด ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล สามารถตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ชนิดที่พบบ่อยบนยีนแอลฟาโกลบินได้โดยวิธี PCR แต่หากพบการกลายพันธุ์ชนิดหายากจำเป็นต้องใช้เทคนิค NGS มาช่วยตรวจวินิจฉัย นอกจากนี้วิธี NGS ยังเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาลำดับเบสได้ครอบคลุมและมีความแม่นยำสูงอีกด้วย¹⁰

งานวิจัยนี้พบการกลายพันธุ์ชนิดหายากบนยีนแอลฟาโกลบิน 8 ชนิด ในราย Hb Lansing Ramathibodi เมื่อพบร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย ชนิด -3.7 kb พบค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดงปกติ ยกเว้น MCH ผิดปกติเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Trakulsrichai S. และคณะ¹¹ ที่เคยรายงานค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดงใน Hb Lansing Ramathibodi ร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด Hb PS และพบว่ามีภาวะการแตกของเม็ดเลือดแดงเล็กน้อย (mild hemolytic anemia) ในราย Hb G-Honolulu พบค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดงแสดงถึงภาวะโลหิตจาง มีเม็ดเลือดแดงขนาดเล็กและซีด (hypochromic microcytic) ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาของหน้าศึกษาในพาหะ

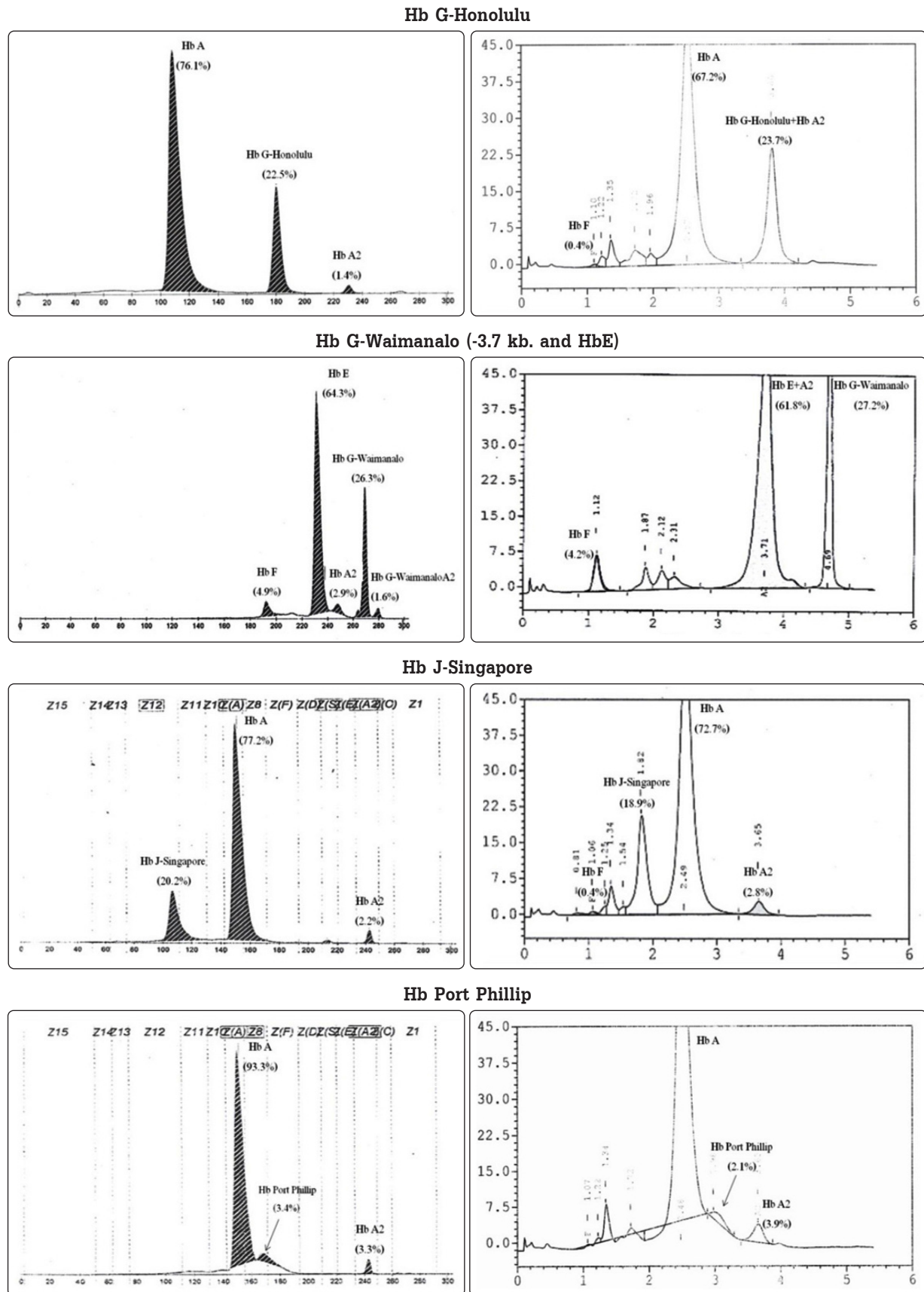


Figure 1 Hemoglobin typing of 8 samples with rare abnormal hemoglobin. The left and right panels show capillary electrophoresis (CE) and high-performance liquid chromatography (HPLC) results, respectively

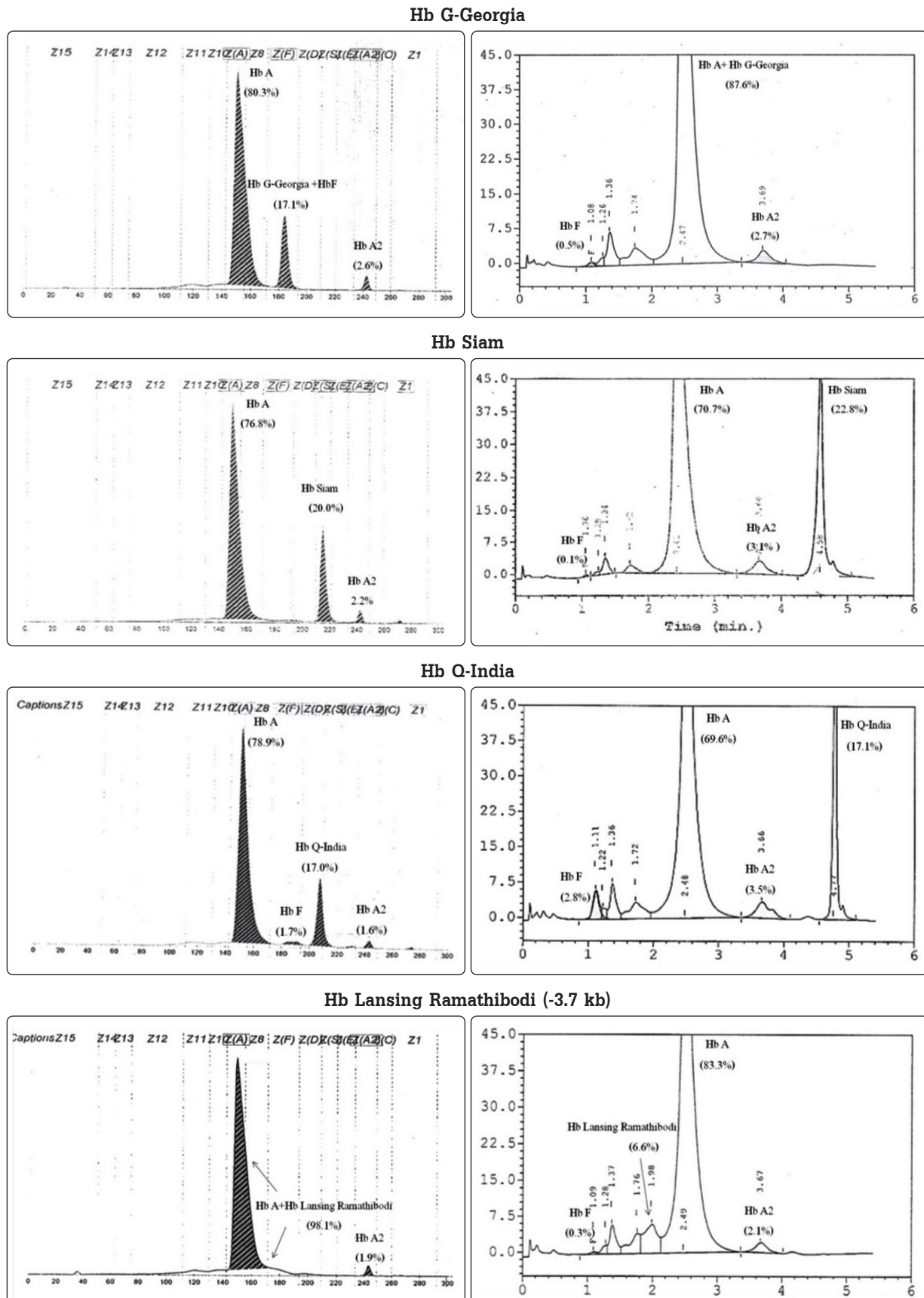


Figure 1 Hemoglobin typing of 8 samples with rare abnormal hemoglobin. The left and right panels show capillary electrophoresis (CE) and high-performance liquid chromatography (HPLC) results, respectively. (continued)

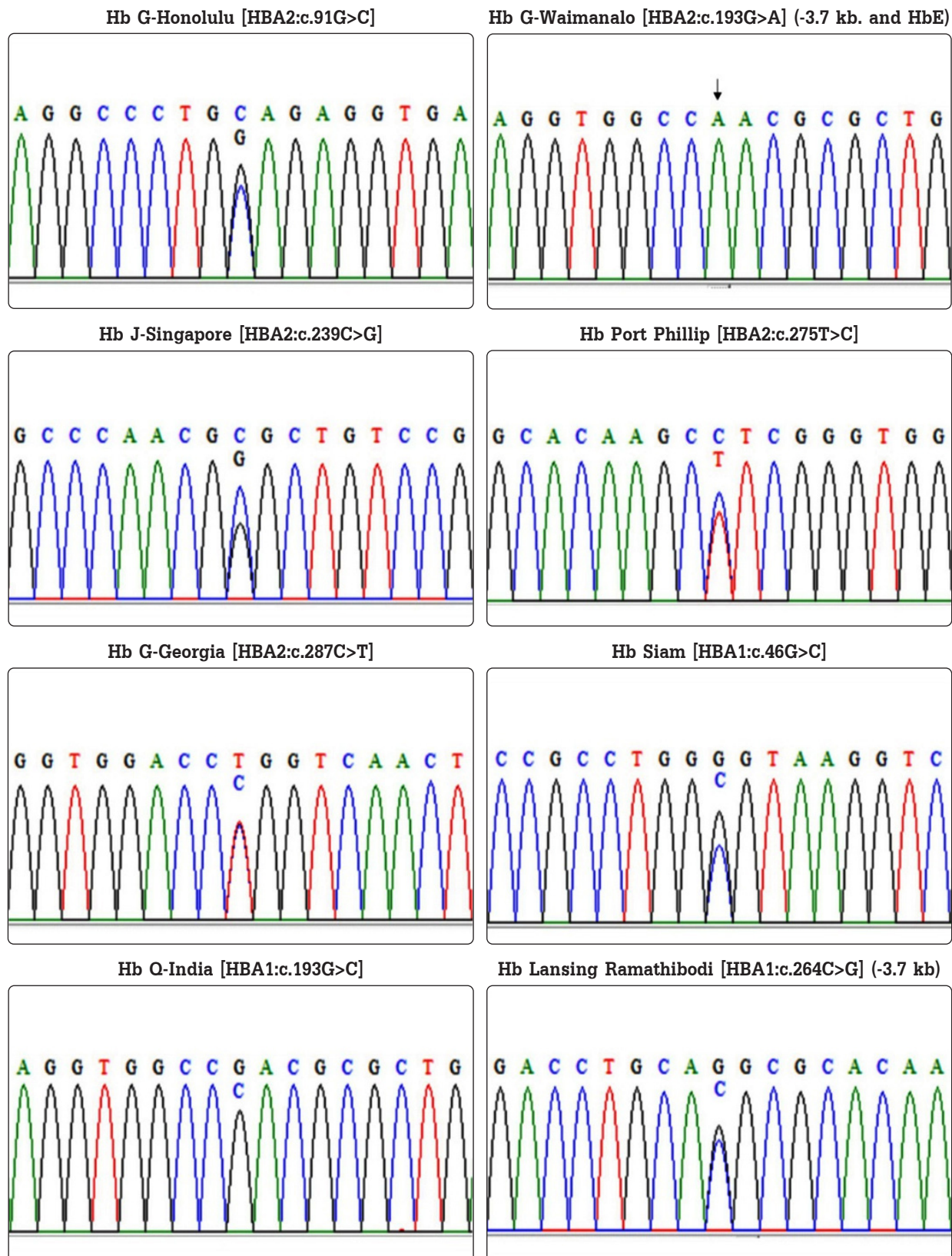


Figure 2 Nucleotide sequencing chromatography demonstrates 8 rare mutations in the alpha-globin gene

Table 1 Hematological parameters of 8 samples with rare abnormal hemoglobin

Hb Variant	Hematological parameters					
	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	RDW (%)
Hb G-Honolulu	4.03	7.8	29.9	64.6	16.8	27.0
Hb G-Waimanalo (-3.7 kb and HbE)	4.99	11.1	32.7	65.5	22.2	16.6
Hb J-Singapore	4.24	12.5	37.8	89.2	29.5	12.3
Hb Port Phillip	4.37	10.8	34.8	79.6	24.7	14.8
Hb G-Georgia	4.83	14.3	43.3	89.6	29.6	12.0
Hb Siam	4.76	15	44.3	93.1	31.5	10.9
Hb Q-India	4.66	14.4	42	90.1	30.9	13.1
Hb Lansing Ramathibodi (-3.7 kb)	5.71	14.3	47.5	83.2	25.0	12.9

RBC: red blood cell; Hb: hemoglobin; Hct: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume;

MCH: mean corpuscular hemoglobin; RDW: red cell distribution width

Hb G-Honolulu โดยไม่พบความผิดปกติของค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดง¹² ทั้งนี้อาจเกิดจากพยาธิสภาพอื่น ๆ ซึ่งส่งผลต่อการสร้างเม็ดเลือดแดง

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า Hb G-Waimanalo พบรายงานครั้งแรกในประเทศไทยโดย Yimniam W. และคณะ¹³ ศึกษาในพาหะ Hb G-Waimanalo พบค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงผิดปกติเล็กน้อย ในขณะที่งานวิจัยครั้งนี้พบ Hb G-Waimanalo ร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย ชนิด -3.7 kb และ Homozygous Hb E จึงทำให้พบภาวะโลหิตจาง มีเม็ดเลือดแดงขนาดเล็กและซีด (hypochromic microcytic) สอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar R. และคณะ¹⁴ ที่เคยรายงาน Hb G-Waimanalo ร่วมกับ Hb S และยังพบอนุพันธ์ของ Hb G-WaimanaloA2 ($\alpha^{\text{GW}}2\delta 2$) ที่คล้ายกันอีกด้วย นอกจากนี้การพบ hybrid Hb ($\alpha^{\text{GW}}2\beta^{\text{E}}2$) ซึ่งจะอยู่ที่ตำแหน่งของ Hb G-Waimanalo ส่งผลให้พบปริมาณฮีโมโกลบิน Hb E ลดลงอยู่ที่ 64.3% ใน CE และ 61.8% ใน HPLC Hb Port Phillip เป็นฮีโมโกลบินที่มีเสถียรภาพ (stability)ต่ำ เป็นผลให้ถูกทำลายได้ง่ายจึงพบฮีโมโกลบินชนิดนี้ได้ในปริมาณน้อย¹⁵ นอกจากนี้ฮีโมโกลบินชนิดหายากอื่นๆ เช่น Hb Q-India, Hb Siam, Hb G-Georgia และ Hb J-Singapore ก็เคยพบรายงานในประเทศไทย^{13,16-18}

วิธี NGS สามารถใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ได้ทั้งบนยีนแอลฟาและเบต้าโกลบิน¹⁰ แต่วิธีนี้ก็มีข้อจำกัด คือ มีราคาแพง มีขั้นตอนยุ่งยากซับซ้อน ต้องใช้ความชำนาญในการอ่านผล¹⁹

จึงทำให้ผู้ป่วยได้รับผลการตรวจที่ล่าช้ากว่าการตรวจด้วยเทคนิค PCR ดังนั้นเมื่อทราบผลการกลายพันธุ์ชนิดหายากทั้ง 8 ชนิดแล้วสามารถนำตัวอย่างแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดหายากจากการวิเคราะห์มาใช้เป็น Positive control และประยุกต์ใช้กับงานด้าน molecular อื่นๆ ในงานประจำวันได้

สรุป

วิธี Next generation sequencing (NGS) สามารถใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิดหายากบนยีนแอลฟาโกลบินได้ ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบการกลายพันธุ์ชนิดหายากบนยีนแอลฟาโกลบินจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ Hb G-Honolulu [HBA2:c.91G>C], Hb G-Waimanalo [HBA2:c.193G>A], Hb J-Singapore [HBA2:c.239C>G], Hb Port Phillip [HBA2:c.275T>C], Hb G-Georgia [HBA2:c.287C>T], Hb Siam [HBA1:c.46G>C], Hb Q-India [HBA1:c.193G>C] และ Hb Lansing Ramathibodi [HBA1:c.264C>G] นอกจากนี้สามารถนำตัวอย่างแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดหายากจากการวิเคราะห์มาใช้เป็น positive control ในการทำงานทางห้องปฏิบัติการและประยุกต์ใช้กับงานทางด้าน molecular ในงานประจำวันได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวินิจฉัยโรคเลือด ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Fucharoen S, Winichagoon P. *Thalassemia in Southeast Asia: problems and strategy for prevention and control*. *SE Asian J Trop Med*. 1992;23:647-55.
2. Fucharoen G, Fucharoen S, Sanchaisuriya K, Sae-Ung N, Suyasanond U, Sriwilai P, et al. *Frequency Distribution and Haplotypic Heterogeneity of beta(E)-Globin Gene among Eight Minority Groups of Northeast Thailand*. *Hum Hered*. 2002;53:18-22.
3. Fucharoen S, Viprakasit V. *Hb H disease: clinical course and disease modifiers*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:26-34.
4. Lee JS, Cho SI, Park SS, Seong MW. *Molecular basis and diagnosis of thalassemia*. *Blood Res*. 2021;56:S39-S43.
5. Valones MA, Guimarães RL, Brandão LA, de Souza PR, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Crovela S. *Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review*. *Braz J Microbiol*. 2009;40:1-11.
6. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. *Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia*. *Blood*. 2000;95:360-2.
7. Chong SS, Boehm CD, Cutting GR, Higgs DR. *Simplified multiplex-PCR diagnosis of common southeast asian deletional determinants of alpha-thalassemia*. *Clinical chemistry*. 2000;46:1692-5.
8. Fucharoen S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Panyasai S, Devenish R, Luy L. *Interaction of hemoglobin E and several forms of alpha-thalassemia in Cambodian families*. *Haematologica*. 2003;88:1092-8.
9. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Fucharoen S. *Hb Pakse [(alpha2) codon 142 (TAA-->TAT or Term-->Tyr)J in Thai patients with EAbart's disease and Hb H Disease*. *Hemoglobin*. 2002;26:227-35.
10. Zhang H, Li C, Li J, Hou S, Chen D, Yan H, et al. *Next-generation sequencing improves molecular epidemiological characterization of thalassemia in Chenzhou Region, P.R. China*. *J Clin Lab Anal*. 2019;33:e22845.
11. Trakulsrichai S, Panthan B, Jittorntam P, Niparuck P, Sriapha C, Chantratita W, et al. *First identification of hemoglobin Lancing-Ramathibodi [α 87(F8)His $\rightarrow$ Gln; CAC>CAG (HBA1: c.264C>G)] in a Thai family with spurious hypoxemia*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2016;47:1048-54.
12. Wang PP, Lin M, Wu JR, Wang XY, Yang LY. *Three cases of the hemoglobin G-Chinese variant detected in patients of southern Chinese origin*. *Mol Med Rep*. 2010;3:459-61.
13. Yimniam W, Jindadamrongwech S. *Scanning for α -Hemoglobin Variants by High-Resolution Melting Analysis*. *J Clin Lab Anal*. 2016;30:633-40.
14. Kumar R, Mishra S, Uikey RS, Gwal A, Mun A, Bharti PK, et al. *De novo heterozygous Hb G-Waimanalo (α 64(E13)Asp>Asn, CT-G>CCG; HBA1:c.193G>A) variant in a sickle cell disease patient of an Indian tribe*. *J Clin Pathol*. 2021;74:336-8.
15. Brennan SO, Tauro GP, Melrose W. *Haemoglobin Port Phillip alpha91 (FG3) Leu replaced by Pro, a new unstable hemoglobin*. *FEBS Lett*. 1977;81:115-7.
16. Yodsowan B, Svast J, Srisomsap C, Winichagoon P, Fucharoen S. *Hb Siam [α 15(A13)Gly-->Arg] is a GGT-->CGT mutation in the alpha1-globin gene*. *Hemoglobin*. 2000;24:71-5.
17. Srivorakun H, Singha K, Fucharoen G, Fucharoen S. *Novel interactions of two α -Hb variants with SEA deletion α^0 -thalassemia: hematological and molecular analyses*. *Hematology*. 2018;23:187-91.
18. Panyasai S, Permsripong N, Pornprasert S. *Hemoglobin J-Singapore [α 79(EF8)Ala $\rightarrow$ Gly, GCG>GGG] in a Pregnant Thai Woman*. *J Med Assoc Thai*. 2018;101:275-8.
19. Qin D. *Next-generation sequencing and its clinical application*. *Cancer Biol Med*. 2019;16:4-10.

