

การตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของยีน α^{CS} (α_2 -Globin Gene, Codon 142: TAA-CAA) โดยเทคนิค Allelic Discrimination

สาวตรี ดั่งเรือง¹, สิริภากร แสงกิจพร², บุญนิภา สุวรรณกาล³, อัจฉราพร ดำบัว¹,
กัญญรัตน์ รัตนกิตติโสภณ², ละอองดาว เอกศิริ², สมชาย แสงกิจพร¹

บทคัดย่อ

ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Constant Spring (Hb CS) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้บ่อยในประเทศไทย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS โดยเทคนิค Allelic Discrimination อาศัยคุณสมบัติของ Probe 2 ชนิดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของยีนที่มีสาเหตุจากการแทนที่เบส 1 ตำแหน่ง Probe CS-N ได้รับการออกแบบให้สามารถจับกับ Allele ปกติ ในขณะที่ Probe CS-M ได้รับการออกแบบให้สามารถจับกับ Allele ที่ผิดปกติ โดย Probe ทั้ง 2 ชนิดติดฉลากด้วยสี Fluorescence ที่ต่างกัน การทำปฏิกิริยา PCR และการอ่านผลสามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง โดยใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ผลการประเมินความถูกต้องของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นในตัวอย่างเลือด 38 ราย เปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิงหลักการ DNA Sequencing พบว่าผลการตรวจวิเคราะห์ทุกรายให้ผลตรงกัน วิธีที่พัฒนาขึ้นนับว่ามีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ สามารถใช้ในการตรวจยืนยันความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS ในกลุ่มประชากรที่พบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดนี้ บ่อยได้

คำรหัส: Hb Constant Spring, Allelic Discrimination Analysis

บทนำ

Hb Constant Spring (Hb CS) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้บ่อยในประชากรไทย⁽¹⁻⁵⁾ มีสาเหตุจากการแทนที่เบสที่ตำแหน่ง Termination Codon ของ α_2 -Globin Gene (TAA -CAA) ทำให้มีการสร้างกรดอะมิโนออกไปอีก 31 ตัว เกิดเป็นโกลบินชนิด α^{CS} ที่มีกรดอะมิโน 172 ตัว ความผิดปกติดังกล่าวส่งผลให้ mRNA ของ α^{CS} ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ RNase ใน Cytoplasm ได้ง่าย⁽⁶⁾ ปริมาณของ mRNA จึงน้อย ทำให้การสร้าง α^{CS} น้อยลงตามกัน ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนที่

เป็นสาเหตุของ Hb CS และ α -thalassemia 1 จะทำให้ผู้ป่วยมีอาการคล้าย Hb H disease แต่มีความรุนแรงมากกว่า⁽⁴⁻⁵⁾

เนื่องจาก Hb CS ไม่คงทนและสลายได้ง่าย (Unstable Hb) ปริมาณของ Hb CS จึงลดลงตามระยะเวลาภายหลังการเก็บตัวอย่างเลือด⁽⁷⁾ นับเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการตรวจ Hb Typing ไม่ว่าจะโดยวิธี Electrophoresis หรือ Automate Cation Exchange Chromatography การตรวจวินิจฉัย Hb CS ที่มีความถูกต้องและ

¹ศูนย์วิจัยทางคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

²สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

³ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุดรธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

Detection of α^{CS} (α_2 -Globin Gene, Codon 142: TAA-CAA) by an Allelic Discrimination

Sawitree Duangruang¹, Siripakorn Sangkitporn², Boonnipa Suwannakarn³, Acharaporn Dambua¹, Kanyarat Rattanakitiphon², Laongdaw Eksiri², Somchai Sangkitporn¹

Abstract

Hemoglobin Constant Spring (Hb CS) is one of the most common abnormal Hb in Thailand. In this study, a method for diagnosis of α^{CS} (α_2 -globin gene, codon 142: TAA-CAA) was developed based on an allelic discrimination analysis. The presence of two probes, CS-N probe for normal allele and CS-M probe for mutant allele, labeled with different fluorescence dye in each reaction allows genotyping of α^{CS} at the single-nucleic polymorphism (SNP) site. The method was validated on 38 subjects. The results of α^{CS} diagnosis by an allelic discrimination were 100% in accordance with the results obtained by DNA sequencing technique. This reliable method should prove useful in diagnosis of α^{CS} in populations with high frequency of Hb CS.

Key words: Hb Constant Spring, Allelic Discrimination Analysis

นำเชื่อถือจึงจำเป็นต้องตรวจวินิจฉัยในระดับยีน ปัจจุบัน
มีผู้วิจัยจำนวนมากพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยความ
ผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS ขึ้น อาทิเช่น
การใช้เทคนิค DNA Sequencing, Restriction Enzyme
Digestion และ Amplification Refractory Mutation
System⁽⁸⁻⁹⁾ สำหรับการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิค
การตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb
CS โดยเทคนิค Allelic Discrimination ที่สามารถทำ
ปฏิกิริยา PCR และอ่านผลการเกิดปฏิกิริยาได้อย่าง
ต่อเนื่องโดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมใน
สภาพจริงซึ่งมีการติดตั้งเรียบร้อยแล้วในห้องปฏิบัติการ
เครือข่ายของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 7 แห่ง
ทั่วประเทศ ผลการศึกษาวิจัยที่ได้จึงนำไปสู่การบริหาร

จัดการทรัพยากรที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์ในการพัฒนา
ศักยภาพห้องปฏิบัติการเพื่อสนับสนุนการควบคุมโรค
ธาลัสซีเมียของประเทศ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างเลือดชนิด EDTA Blood ที่ผ่านการตรวจ
หาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน โดยวิธี HPLC (Variant
Hb Testing System, Bio-Rad Laboratories, USA)
จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุดรธานี หรือวิธี LPLC
(Hb Gold, Drew Scientific, UK) ที่สถาบันวิจัย
วิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์รวม
38 ตัวอย่าง มีผล Hb Typing เป็น A₂ABart's H,

¹Clinical Research Center

²National Institute of Health

³Regional Medical Science Center in Udonthani, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health

A₂A และ EA ที่สงสัยว่ามี Hb CS รวมด้วย จำนวน 9, 24 และ 5 ตัวอย่างตามลำดับ ในจำนวนนี้มี 19 ตัวอย่างที่ผ่านการตรวจ Hb Typing โดยวิธี HPLC พบฮีโมโกลบินที่สงสัยว่าเป็น Hb CS ปรากฏขึ้นที่ Retention Time (RT) 5.02-5.07 นาที และมี 19 ตัวอย่างที่ผ่านการตรวจ Hb Typing โดยวิธี LPLC ที่มีฮีโมโกลบินที่สงสัยว่าเป็น Hb CS ปรากฏขึ้นที่ Retention Time (RT) 305-315 วินาที ตัวอย่างทั้งหมดถูกนำมาเตรียม DNA โดยใช้ น้ำยา Wizard SV (Promega, USA) ซึ่งอาศัยคุณสมบัติของ DNA ในการจับ Silica Membrane DNA ที่เตรียมได้ สามารถเก็บที่ -20 °C

การตรวจวินิจฉัย α^{CS} α_2 -Globin Gene, Codon 142: TAA -CAA) โดยเทคนิค Allelic Discrimination⁽¹⁰⁾

เทคนิคนี้อาศัยหลักการทำงานของ Taq Man Probe ที่จำเพาะกับ Allele ปกติของ α_2 -Globin Gene, Codon 142 (Probe CS-N) จำนวน 1 probe และจำเพาะกับ Allele ที่เป็นสาเหตุของ Hb CS (Probe CS-M) จำนวน 1 Probe โดย Probe ทั้งสองได้รับการออกแบบให้ติดฉลากด้วยสี Fluorescence ที่ต่างกัน Probe CS-N ติดฉลากด้วยสี VIC และ Probe CS-M ติดฉลากด้วยสี FAM การทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 μL ประกอบด้วยน้ำยา Taq Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) 12.5 μL , 40 X SNP CS Mix 0.625 μL , น้ำกลั่น 10.88 μL และ DNA 1 μL ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่อง ABI 7500 (Applied Biosystems, USA) น้ำยา Taq Man Universal PCR Master Mix ประกอบด้วย AmpliTaq Gold DNA Polymerase, AmpErase Uracil N Glycosylase, dNTP ที่มีส่วนของ dUTP, Passive Reference ROX Dye และ Buffer ส่วน SNP CS Mix ประกอบด้วย Primer 1 คู่ Probe CS-N และ Probe CS-M ที่ได้รับการปรับความเข้มข้นในสัดส่วนที่เหมาะสม⁽¹¹⁾

เมื่อจบปฏิกิริยา PCR เครื่อง ABI 7500 จะวัดสัญญาณแสงของสี Fluorescence ที่ติดฉลากอยู่ที่ Probe

ทั้งสอง นำค่าที่ได้ไปคำนวณอัตราส่วนเปรียบเทียบกับสัญญาณแสงของสี ROX ซึ่งเป็น Passive Reference Dye และรายงานออกมาเป็นค่า Rn ของแต่ละ Probe หาก DNA ที่นำมาวิเคราะห์เป็น DNA ของผู้ที่ไม่มีความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS Probe CS-N ซึ่งติดฉลากด้วยสี VIC จะจับกับ Allele ปกติ และเรืองแสง Fluorescence ของสี VIC ในขณะที่ Probe CS-M ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในปฏิกิริยาจึงมีการเรืองแสงของสี VIC เพียงสีเดียว ในทำนองเดียวกัน หากนำ DNA ของผู้ที่เป็น Hb CS Homozygote มาทำการวิเคราะห์ Probe CS-M จะจับกับ Allele ที่เป็นสาเหตุของ Hb CS ในขณะที่ Probe CS-N ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในปฏิกิริยาจึงมีการเรืองแสงของสี FAM เพียงสีเดียว ส่วนการนำ DNA ของผู้ที่เป็น Hb CS Heterozygote มาทำปฏิกิริยา Probe ทั้งสองชนิดจะสามารถจับ Allele ที่ปกติและผิดปกติได้พร้อมกัน จึงเกิดการเรืองแสงของสี Fluorescence ทั้งสองสีพร้อมกัน เครื่อง ABI 7500 จะทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสี Fluorescence ภายหลังจากจบปฏิกิริยา PCR โดยใช้โปรแกรม SDS และรายงานผลได้ 2 รูปแบบ คือ รูปแบบตารางแสดงค่า Rn ของแต่ละ Probe พร้อมการแปลผล และในรูปแบบกราฟแสดงการกระจายของข้อมูลแต่ละตัวอย่าง ซึ่งเป็นการ Plot ระหว่างค่า Rn ของ Probe CS-M ในแนวแกน Y และค่า Rn ของ Probe CS-N ในแนวแกน X

การตรวจยืนยันความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS โดยเทคนิค DNA Sequencing⁽⁹⁾

ตัวอย่าง DNA ทั้ง 38 ราย ได้รับการตรวจยืนยัน โดยการตรวจหาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมครอบคลุมบริเวณ Codon 142 ของ α_2 - Globin Gene โดยใช้เครื่อง ABI 310 (Applied Biosystems, USA)

ผลการศึกษา

จากการนำตัวอย่างเลือดทั้ง 38 ตัวอย่างที่ผลการตรวจ Hb Typing โดยวิธี HPLC หรือ LPLC พบว่า

มีฮีโมโกลบินผิดปกติที่ตำแหน่ง RT ของ Hb CS มาทำการตรวจวิเคราะห์หาความผิดปกติของ α_2 -Globin Gene: Codon 142 (TAA-CAA) โดยวิธี Allelic Discrimination พบว่า 8 ตัวอย่างตรวจพบเฉพาะ Allele ที่ปกติ, 15 ตัวอย่าง พบทั้ง Allele ปกติ และ Allele ที่เป็นสาเหตุของ Hb CS และ 15 ตัวอย่างพบเฉพาะ Allele ที่เป็นสาเหตุของ Hb CS ไม่พบ Allele ที่ปกติ ดังรายละเอียดใน ตารางที่ 1

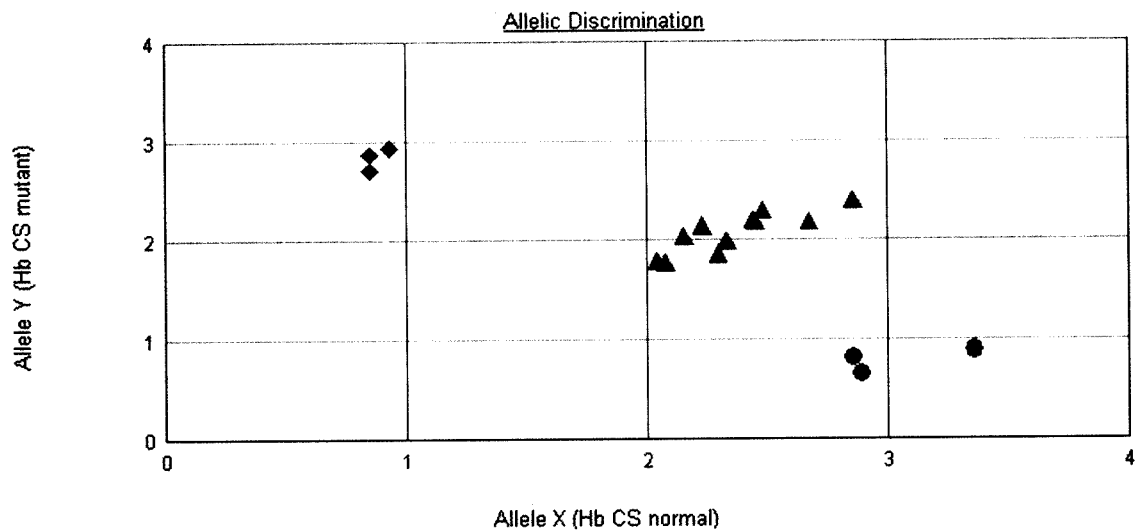
จากผลการวิเคราะห์ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS โดยเทคนิค Allelic Discrimination พบว่า 8 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบเฉพาะ Allele ปกติ มีค่า Rn ของ Probe CS-N โดยเฉลี่ย 3.22 ± 0.38 และมีค่า Rn ของ Probe CS-M โดยเฉลี่ย 0.77 ± 0.13 ส่วน 15 ตัวอย่างที่ตรวจพบทั้ง Allele ที่ปกติ และ Allele ที่ผิดปกติ (Hb CS Heterozygote) มีค่า Rn ของ Probe CS-N โดยเฉลี่ย 2.46 ± 0.32 และมีค่า Rn ของ Probe

ตารางที่ 1 ผลการตรวจ Allelic Discrimination ของตัวอย่างเลือดที่สงสัยว่ามี Hb CS จำแนกตามผลการตรวจ Allelic Discrimination และ Hb Typing

ผลการตรวจ Allelic Discrimination	ผลการตรวจ Hb Typing	จำนวน (n)
1. พบเฉพาะ Allele ปกติ	A ₂ A ที่สงสัยว่ามี Hb CS EA ที่สงสัยว่ามี Hb CS	7 1
2. พบทั้ง Allele ปกติ และ Allele ที่เป็นสาเหตุของ Hb CS	A ₂ A ที่สงสัยว่ามี Hb CS EA ที่สงสัยว่ามี Hb CS	12 3
3. พบเฉพาะ Allele ที่เป็นสาเหตุของ Hb CS	A ₂ A Bart's H ที่สงสัยว่ามี Hb CS A ₂ A ที่สงสัยว่ามี Hb CS EA ที่สงสัยว่ามี Hb CS	9 5 1

CS-M โดยเฉลี่ย 2.15 ± 0.23 ในขณะที่อีก 15 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบเฉพาะ Allele ที่ผิดปกติ (Hb CS Homozygote) มีค่า Rn ของ Probe CS-N เฉลี่ย 0.96 ± 0.15 และมีค่า Rn ของ Probe CS-M เฉลี่ย 3.37 ± 0.70 ทั้งนี้ผลการตรวจวิเคราะห์ทั้ง 3 ลักษณะได้แสดงในรูปที่ 1 และ ตารางที่ 2 ผลการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS ในตัวอย่างทุกรายตรงกับผลการตรวจยืนยันโดยเทคนิค DNA Sequencing ทั้งในกรณีที่เป็น Hb CS Heterozygote, Hb CS Homozygote และกรณีที่ไม่นพบความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS

จากการนำผลการตรวจหาความผิดปกติของยีนไปใช้ในการพิจารณาผลการตรวจ Hb Typing โดยวิธี HPLC และ LPLC พบว่า Hb CS ในตัวอย่าง 19 รายที่ตรวจโดยวิธี LPLC มีปริมาณ 0.3-3.5% ทุกรายมีลักษณะเหมือนกันคือมี Peak เดียวที่ RT 305-315 วินาที (รูปที่ 2) ความสูงต่ำของ Peak แตกต่างกันตามปริมาณที่รายงานในตารางทางขวามือของโครมาโตแกรม บางรายที่มีปริมาณน้อยมากอาจไม่เห็นเป็นลักษณะ Peak บนโครมาโตแกรม แต่เครื่องจะรายงานปริมาณไว้ทางขวามือในตำแหน่ง Unknown ที่มี RT อยู่ในช่วง 305-315 วินาที



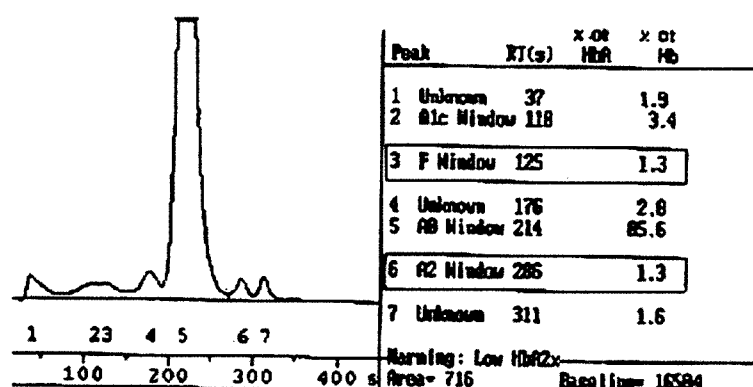
รูปที่ 1 กราฟแสดงการกระจายของข้อมูลผลการวิเคราะห์ของแต่ละตัวอย่าง ซึ่งเป็นการ Plot ระหว่างค่า Rn ของ Probe CS-M ในแนวนอน Y และค่า Rn ของ Probe CS-N ในแนวนอน X

ตารางที่ 2 ตารางแสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของแต่ละตัวอย่าง ซึ่งแสดงค่า Rn ของแต่ละ Probe ค่า Rn ของ Probe CS-N อยู่ในคอลัมน์ Allele X Rn และของ Probe CS-M อยู่ในคอลัมน์ Allele Y Rn พร้อมการแปลผลในคอลัมน์ “Call” ซึ่งมี 3 ลักษณะ คือ “Hb CS Normal” แทนตัวอย่างที่มีสัญญาณ Fluorescence ของ Probe CS-N เท่านั้น จึงไม่มีความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS, “Hb CS Mutant” แทนตัวอย่างที่มีสัญญาณ Fluorescence ของ Probe CS-M เท่านั้น จึงแปลผลเป็น Hb CS Homozygote และ “Both” แทนตัวอย่างที่มีสัญญาณ Fluorescence ของ Probe ทั้งสองชนิด จึงแปลผลเป็น Hb CS Heterozygote

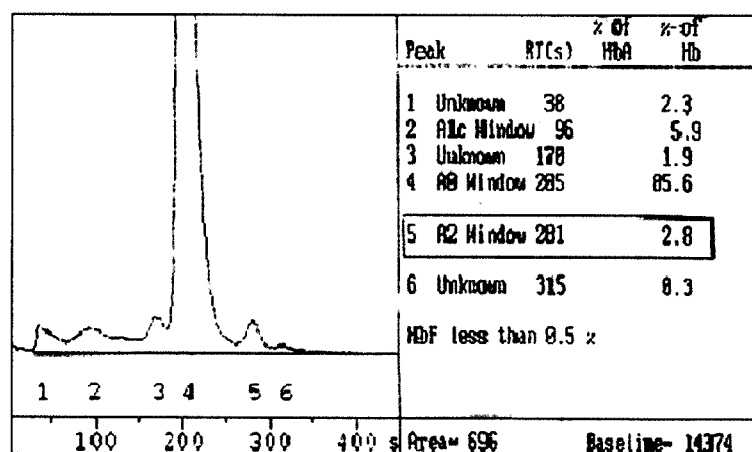
Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Rn	Allele Y Rn	Call	Quality(%)	Method
A9	RD14/49	Hb CS	Unknown	176042.469	2.080	1.777	Both	100.00	Manual Call
A10	R185/49	Hb CS	Unknown	157932.422	0.851	2.702	Hb CS mutant	100.00	Manual Call
A11	R60/49	Hb CS	Unknown	105999.672	0.852	2.881	Hb CS mutant	100.00	Manual Call
B9	RD15/49	Hb CS	Unknown	189865.938	2.335	1.986	Both	100.00	Manual Call
B10	R186/49	Hb CS	Unknown	172281.453	0.931	2.942	Hb CS mutant	100.00	Manual Call
C9	RD16/49	Hb CS	Unknown	173215.938	2.680	2.180	Both	100.00	Manual Call
C10	RD9/49	Hb CS	Unknown	154511.484	3.360	0.898	Hb CS normal	100.00	Manual Call
D10	RD10/49	Hb CS	Unknown	222020.906	2.296	1.866	Both	100.00	Manual Call
E9	RD18/49	Hb CS	Unknown	224319.172	2.860	2.402	Both	100.00	Manual Call
E10	RD11/49	Hb CS	Unknown	215142.922	2.485	2.298	Both	100.00	Manual Call
F9	RD19/49	Hb CS	Unknown	171484.422	2.452	2.180	Both	100.00	Manual Call
G8	RD12/49	Hb CS	Unknown	190719.188	2.856	0.824	Hb CS normal	100.00	Manual Call
G9	RD20/49	Hb CS	Unknown	218832.313	2.231	2.146	Both	100.00	Manual Call
G10	R1083/48	Hb CS	Unknown	212748.813	2.442	2.199	Both	100.00	Manual Call
H8	RD13/49	Hb CS	Unknown	199449.719	2.046	1.792	Both	100.00	Manual Call
H9	RD21/49	Hb CS	Unknown	201251.438	2.157	2.039	Both	100.00	Manual Call
H10	R931/48	Hb CS	Unknown	231123.141	2.893	0.656	Hb CS normal	100.00	Manual Call

ในขณะที่ Hb CS ที่ได้จากการตรวจโดยวิธี HPLC มี 2 ลักษณะขึ้นกับปริมาณ Hb CS ที่พบ ดังแสดงในรูปที่ 3 กรณีที่ปริมาณ Hb CS มีค่า 1.3-2.9% (n=5) Peak ของ Hb CS มีลักษณะ 3 Peaks ติดกัน โดย Peak ตรงกลางจะสูงกว่า Peak ด้านข้างทั้งสองด้านอย่างชัดเจน ส่วนในกรณีที่ Hb CS มีปริมาณน้อยในช่วง 0.5-1.2% Peak ที่ได้จะมีเพียง Peak เดียว บางรายมีปริมาณน้อยมากจนไม่เห็นเป็นลักษณะ Peak บนโครมาโตแกรม

เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ โดยวิธี LPLC แต่เครื่องจะรายงานปริมาณไว้ด้านบนในตำแหน่ง C-Window ส่วนตัวอย่างที่ผลการตรวจยืนยันไม่พบความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS 8 ราย ผลการตรวจ Hb Typing ทั้งวิธี LPLC และ HPLC พบ Peak ของฮีโมโกลบินที่ตำแหน่ง RT ของ Hb CS ปริมาณ 0.3-1.6% มีลักษณะเป็น Peak เดียว



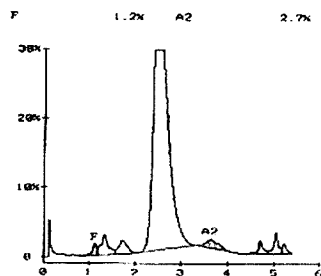
(ก)



(ข)

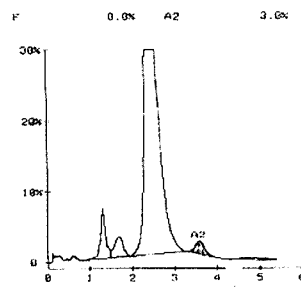
รูปที่ 2 โครมาโตแกรมการตรวจ Hb Typing จากเครื่อง LPLC (ก) ตัวอย่างที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็น Hb CS ปรากฏ Peak ของ Hb CS ที่มีลักษณะเป็น Peak เดียวมีปริมาณ 1.6% ที่ RT 311 วินาที และ (ข) ตัวอย่างที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าไม่มีความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS ปรากฏ Peak ที่ตำแหน่งของ Hb CS ปริมาณ 0.3% ที่ RT 315 วินาที

ANALYTE ID	X	TIME	AREA
F	1.2	1.12	27572
P2	3.4	1.33	76173
P3	2.5	1.72	56251
Ao	85.2	2.45	1984840
A2	2.7	3.63	58296
Unknown 1	1.5	4.78	32493
C-WINDOW	2.3	5.04	58293
Unknown 2	8.9	5.22	21853
TOTAL AREA			2226179



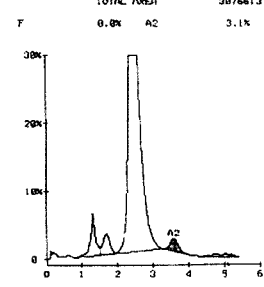
(ก)

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
P2	5.0	1.38	106752
P3	7.9	1.69	123881
Ao	96.4	2.42	2714292
A2	3.8	3.57	98936
Unknown 1	8.7	4.74	21860
C-WINDOW	8.3	5.06	18876
TOTAL AREA			3138825



(ข)

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
P2	5.7	1.38	174782
P3	3.8	1.68	117197
Ao	86.2	2.42	2663894
A2	3.1	3.58	81929
Unknown 1	0.5	4.68	16455
C-WINDOW	0.8	5.02	23206
TOTAL AREA			3876613



(ค)

รูปที่ 3 โครมาโตแกรมการตรวจ Hb Typing จากเครื่อง HPLC (ก) ตัวอย่างที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็น Hb CS ปรากฏ Peak ของ Hb CS ที่มีลักษณะเป็น Peak เดียวมีปริมาณ 0.8 % ที่ RT 5.02 นาที, (ข) ตัวอย่างที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็น Hb CS ปรากฏ Peak ของ Hb CS ที่มีลักษณะเป็น 3 Peak มีปริมาณ 2.0 % ที่ RT 5.04 นาที และ (ค) ตัวอย่างที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าไม่มีความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS ปรากฏ Peak ที่มีลักษณะเป็น Peak เดียวมีปริมาณ 0.3% ที่ RT 5.06 นาที

วิจารณ์

Hb CS เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้บ่อยในประเทศไทยและประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้⁽¹⁻⁴⁾ โดยทั่วไป Hb CS สามารถแยกออกจากฮีโมโกลบินชนิดอื่นๆ ได้โดยวิธี Cation Exchange Liquid Chromatography แต่เนื่องจาก Hb CS มีคุณสมบัติเป็น unstable Hb⁽⁶⁾ มีปริมาณน้อยและสลายได้ง่าย จึงมีโอกาสน้อยที่จะตรวจพบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีเก็บตัวอย่างเลือดไม่เหมาะสมและ/หรือเก็บนานเกินไป การศึกษานี้ผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของ α_2 -Globin Gene ตำแหน่ง Codon 142 (TAA-CAA) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิด Hb CS โดยวิธี Allelic Discrimination⁽¹⁰⁾ อาศัยการทำงานของ *Taq* Man Probe 2 ชนิด คือ Probe CS-N ที่สามารถจับกับ Allele ปกติ และ Probe CS-M ที่สามารถจับได้กับ Allele ที่ผิดปกติ โดย Probe ทั้ง 2 ชนิดติดฉลากด้วยสี Fluorescence ที่แตกต่างกัน ในการทำปฏิกิริยาผู้วิจัยเลือกใช้ ชุดน้ำยาที่มีส่วนประกอบของ Hot Start *Taq*

DNA Polymerase เพื่อลดปัญหาการเกิด non-specific PCR products รวมทั้งมี enzyme uracil N glycosylase เพื่อลดปัญหาการเกิด carry-over contamination ของ PCR products⁽¹²⁾ นอกจากนั้นในชุดน้ำยายังมี Passive Reference ROX Dye ซึ่งเป็น internal reference สำหรับปรับสัญญาณแสง Fluorescence จากการเกิดปฏิกิริยาของแต่ละ Probe ซึ่งอาจจะมีปริมาณแตกต่างกันบ้างตามค่าความไม่แน่นอนของการ Pipette น้ำยา การทำปฏิกิริยา PCR และการอ่านผลสามารถทำได้อย่างต่อเนื่องและรวดเร็วภายในเวลา 2 ชั่วโมง โดยปราศจากสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผู้ตรวจวิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม

สำหรับการรายงานผล เครื่องสามารถรายงานได้ 2 รูปแบบ คือ รูปแบบตารางแสดงค่า Rn ของ Probe CS-N และ Probe CS-M พร้อมการสรุปผล และการ Plot กราฟระหว่างค่า Rn ของ Probe CS-M ในแนวแกน Y และค่า Rn ของ Probe CS-N ในแนวแกน X ของแต่ละตัวอย่าง หากผลการ Plot กราฟพบว่าตำแหน่ง

ของตัวอย่างที่วิเคราะห์มีค่า Rn ในแนวแกน Y สูง และมีค่า Rn ในแนวแกน X ต่ำ แสดงว่าเป็น Hb CS Homozygote แต่ถ้าตำแหน่งของตัวอย่างมีค่า Rn ทั้งแนวแกน X และแนวแกน Y ในปริมาณที่สูงทั้งคู่ แสดงว่าเป็น Hb CS Heterozygote และถ้าตำแหน่งของตัวอย่างมีค่า Rn ในแนวแกน X สูง แต่ค่า Rn ในแนวแกน Y ต่ำแสดงว่าไม่มีความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS ความแตกต่างของผลการ Plot กราฟในตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนไม่มีการทับเกี่ยวกัน แสดงว่า Probe CS-M และ Probe CS-N มีความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยาสูง นอกจากนั้นผลการตรวจวิเคราะห์จากตัวอย่างทั้ง 38 ตัวอย่าง ยังให้ผลตรงกับผลการตรวจยืนยันโดยเทคนิค DNA Sequencing ทำให้มั่นใจได้ว่าวิธีที่พัฒนานี้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตาม ทุกครั้งที่ทำการตรวจวิเคราะห์ ต้องทำ No Template Control, Negative Control และ Positive Control ทั้ง Hb CS Heterozygote และ Hb CS Homozygote ด้วยเสมอ

หากนำผลการตรวจวิเคราะห์ α^{CS} โดยวิธี Allelic Discrimination ไปใช้ประกอบการพิจารณาผลการตรวจ Hb Typing ของผู้ป่วยในการศึกษาครั้งนี้พบว่าในกรณีที่ผู้ป่วยมีผลการตรวจ Hb Typing เป็น A2A หรือ EA ที่สงสัยว่าจะมี Hb CS การแปลผลการตรวจ Allelic Discrimination สามารถทำได้ทันที แต่ในกรณีที่ผู้ป่วย Hb H ร่วมกับ Hb CS ที่มีผลการตรวจ Hb Typing เป็น CSA₂ABart'sH ซึ่งมีสาเหตุจากการมีความผิดปกติของยีน α -Thalassemia 1 ร่วมกับ Hb CS ผู้ป่วยจะมีโครโมโซมคู่ที่ 16 โครโมโซมหนึ่งมีความผิดปกติของ α_2 -Globin Gene ที่เป็นสาเหตุของ Hb CS แต่อีกโครโมโซมจะไม่มี α -Globin Gene เลยเนื่องจากมีความผิดปกติชนิด α -Thalassemia 1 ดังนั้นผลการตรวจ Allelic Discrimination จึงแสดงค่า Rn ของ Probe CS-M สูงแต่ค่า Rn ของ Probe CS-N ต่ำ ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกับ Hb CS Homozygote ทั้งๆ ที่ผู้ป่วยมีความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS เพียงครั้งเดียวเท่านั้นหากผู้วิเคราะห์พิจารณาเพียงผลการตรวจ

Allelic Discrimination จะรายงานเป็น Hb CS Homozygote ซึ่งทำให้เกิดความเข้าใจผิดได้ ดังนั้นในการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของ Hb CS ที่ถูกต้อง ผู้ตรวจวิเคราะห์จึงต้องนำผลการตรวจ Allelic Discrimination ที่ได้ไปแปลผลร่วมกับผลการตรวจ Hb Typing และผลการตรวจ α -thalassemia 1 ด้วย

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยไม่ได้นำปริมาณ Hb CS ของผู้ที่เป็น Hb CS Homozygote และ Hb CS Heterozygote มาสรุปไว้ เนื่องจากตัวอย่างเลือดที่นำมาใช้ในการวิจัยทั้งหมดเป็นตัวอย่างจากงานบริการที่ประสบปัญหาในการแปลผลการตรวจ Hb Typing แต่ละตัวอย่างมีระยะเวลาในการเก็บรักษาก่อนการตรวจ Hb Typing ไม่เท่ากัน ปริมาณ Hb CS มีการสูญเสียไปบางส่วนแล้ว หากนำปริมาณ Hb CS มาสรุปตามชนิดของความผิดปกติของยีน อาจก่อให้เกิดความเข้าใจที่ผิดพลาดได้

จากการพิจารณาโครมาโตแกรมของการตรวจ Hb Typing โดยวิธี HPLC ในการศึกษาพบว่าปริมาณ Hb CS มีผลต่อลักษณะของ Peak ที่ปรากฏบนโครมาโตแกรม ตัวอย่างที่มีปริมาณ Hb CS ในช่วง 1.3-2.9% จะมี Peak เป็นลักษณะ 3 Peaks แต่กรณีที่ Hb CS มีปริมาณน้อยกว่า 1.3% (0.5-1.2%) จะพบ Hb CS เพียง Peak เดียว ความสูงต่ำของ Peak แตกต่างกันตามปริมาณที่รายงานใน C-Window ด้านบนของโครมาโตแกรม ส่วนการตรวจโดยวิธี LPLC ในการศึกษาพบว่าปริมาณ Hb CS มีค่า 0.3-3.5% Peak ของ Hb CS ทุกรายมีลักษณะเป็น Peak เดียว ความแตกต่างของปริมาณ Hb CS ไม่มีผลต่อลักษณะของ Peak สำหรับผู้ที่ได้รับการตรวจยืนยันแล้วว่าไม่มีความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS ผลการตรวจวิเคราะห์ทั้งโดยวิธี HPLC และ LPLC พบ Peak เดียวปรากฏขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกับ Hb CS ในปริมาณ 0.3-1.6%

ดังนั้น ในทางปฏิบัติหากตรวจ Hb Typing โดยวิธี HPLC พบฮีโมโกลบินที่ตำแหน่ง RT เดียวกับ Hb CS ในลักษณะ 3 Peaks ติดต่อกัน โดย Peak กลางสูงกว่า Peak ด้านข้าง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ Hb CS ก็

สามารถรายงานผลเป็น Hb CS ได้ แต่ถ้าพบฮีโมโกลบินที่ตำแหน่ง RT เดียวกับ Hb CS ในลักษณะ Peak เดียวทั้งโดยวิธี HPLC และ LPLC ยังไม่ควรตัดสินใจแปลผลเป็น Hb CS เนื่องจากลักษณะของ Peak ไม่แตกต่างจากผู้ที่ไม่มีความผิดปกติของ Hb CS หากต้องการทราบผลที่ถูกต้อง ควรตรวจยืนยันโดยการวินิจฉัยความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS

สรุป

การตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS โดยเทคนิค Allelic Discrimination มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ กระบวนการตรวจวิเคราะห์ทำได้ง่าย ไม่ต้องอาศัยผู้ที่มีประสบการณ์สูง ใช้เวลารวดเร็ว ไม่มีการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ และสิ่งแฉะล้อม สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีให้ห้องปฏิบัติการเครือข่ายได้ง่าย นำไปสู่การพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการในการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS และสนับสนุนการควบคุมโรคธาลัสซีเมียของประเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

1. Laig M, Pape M, Hundrieser J. The distribution of the Hb Constant Spring gene in Southeast Asian Population. Hum Genet 1990 ;84 :188-90.
2. Tanphaichitr VS, Pungamritt P. Studies of homoglobin Bart's and deletion of alpha globin gene from cord blood in Thailand. Birth Defects 1988; 23 (5A): 15-21.
3. Svasti J, Srisomsap C, Winichagoon P, Fucharoeu S. Detection and structural analysis of abnormal hemoglobin found in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999; 30 Suppl 2: 88 - 93.
4. วิชัย เหล่าสมบัติ. ธาลัสซีเมีย. กรุงเทพฯ: โอ เอส พรินติ้ง เฮ้าส์, 2541.
5. อรุณี เจตศรีสุภาพ, สุพรรณ พุเจริญ. องค์ความรู้ธาลัสซีเมีย 2546. ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัย-ขอนแก่น, 2547.
6. Hunt DM, Higgs DR. Hemoglobin Constant Spring has an unstable α chain messenger RNA. Br J Haematol 1982; 51: 405-13.
7. กนกวรรณ แสนไชยสุริยา. การตรวจแยกชนิดและการตรวจวัดปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ. ใน: สุพรรณ พุเจริญ, กุลนภา พุเจริญ, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, บรรณาธิการ. การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อการควบคุมและป้องกันโรคเลือดจางธาลัสซีเมียในประเทศไทย. ขอนแก่น: ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์. 2546: 30-53.
8. Tangvarasittichai O, Jeenapongsa R, Sitthiworanan C, Sanguansermisri T. Laboratory Investigations of Hb Constant Spring. Clin Lab Haematol. 2005; 27: 47-9.
9. สมชาย แสงกิจพร, สิริภากร แสงกิจพร, อารีรัตน์ สังข์น้อย, ปรีศนา เจริญพร. รายงานการวิจัย เรื่อง การศึกษาลำดับเบสของ Globin Gene ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ. นนทบุรี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2546.
10. Applied Biosystems. Allelic Discrimination getting started guide for the 7300/7500 system. 2004.
11. สมชาย แสงกิจพร, สิริภากร แสงกิจพร, สาวิตรี ด่วงเรือง. การตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ Hb CS โดยวิธี SNP Analysis. นนทบุรี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2549.
12. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene 93; 1990: 125-8.