

ผลของสารกันเลือดแข็งเฮปารินต่อการตรวจวิเคราะห์ยีนธาลัสซีเมียโดยวิธีพีซีอาร์

กฤษดา สิงห์¹, ศรินทรา ไชยกองยศ¹, กุลนภา ฟูเจริญ², สุพรรณ ฟูเจริญ^{2*}

บทคัดย่อ

การเจาะเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อส่งตรวจวิเคราะห์ยีนธาลัสซีเมียในงานประจำวันโดยทั่วไปแนะนำให้ใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง แต่ในทางปฏิบัติโดยเฉพาะกรณีที่ต้องเจาะเก็บเลือดทารกหรือเลือดเด็ก แพทย์มักเลือกใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการป้องกันการแข็งตัวของเลือดมากกว่า พบว่าบ่อยครั้งไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมจากเลือดที่ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง สำหรับ ACD เป็นสารกันเลือดแข็งอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติรักษาสภาพเลือดได้ดีซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้กับงานด้านการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียได้ การศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของสารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด คือ EDTA, heparin และ ACD ต่อการตรวจวิเคราะห์ยีนธาลัสซีเมียด้วยวิธี PCR โดยใช้ยีน α - thalassemia 1 (SEA deletion) และยีน β^E - globin ที่พบได้บ่อยในคนไทยเป็นตัวแทนในการศึกษา ตรวจยีน α - thalassemia 1 (SEA deletion) โดยวิธี gap - PCR และตรวจยีน β^E - globin โดยวิธี allele specific PCR พบว่าการใช้ EDTA และ ACD เป็นสารกันเลือดแข็งไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ยีนทั้งสองชนิด แต่พบว่าการใช้ heparin ที่ความเข้มข้นมากกว่า 25 IU / ml ขึ้นไปเป็นสารกันเลือดแข็งมีผลลดประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ยีนทั้งสองชนิดด้วยวิธี PCR แต่สามารถลดปัญหานี้ได้โดยการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอก่อนนำไปตรวจด้วยวิธี PCR ข้อมูลที่ได้จากการศึกษามีประโยชน์ต่อการกำหนดแนวทางการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อส่งตรวจยีนธาลัสซีเมียในงานประจำวันต่อไป

คำสำคัญ: พีซีอาร์, อีดีทีเอ, เอซีดี, เฮปาริน, ธาลัสซีเมีย

¹ นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ



Effects of heparin on thalassemia genes analysis by PCR

Kitsada Singha¹, Sirintra Chaitongyot¹, Goonapa Fucharoen², Supan Fucharoen^{2*}

Abstract:

EDTA-anticoagulated blood is usually recommended for use in routine analysis of thalassemia genes. However, collection of blood from the fetus or newborns is usually done using heparin because of its more potent anti-coagulant activity. However, since heparin can inhibit *Taq* polymerase enzyme used in PCR, the use of heparinized blood for PCR analysis may be affected. ACD, another blood anti-coagulant with a preservative property may be used as an alternative anti-coagulant. In this study, the effects of EDTA, heparin and ACD anti-coagulants on PCR analysis of α - thalassemia 1 (SEA deletion) and β^E - globin gene were compared. α - Thalassemia 1 was detected using gap - PCR and β^E - globin gene was identified by allele specific PCR assay. It was found that both EDTA and ACD anti-coagulants had no effect on the efficiency of PCR analysis of the two thalassemia genes. However, substantial reduction in the efficiency of PCR analysis was observed with the use of heparin as an anti-coagulant at a concentration over 25 IU/ml. Amplification efficiency was improved when heparinized blood DNA was diluted prior to PCR analysis. The result from this study should prove useful for development of a guideline of blood collection for routine PCR analysis of thalassemia.

Keywords: PCR, EDTA, ACD, Heparin, Thalassemia

¹ Medical Technology student, Faculty of Associated Medical Sciences,

² Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

* Corresponding author: (e-mail: supan@kku.ac.th)

บทนำ

การเก็บตัวอย่างเลือดที่นำมาใช้ในงานประจำวันของหน่วยบริการตรวจวินิจฉัยทั่วไปนิยมใช้สาร EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง เนื่องจากมีราคาถูกและใช้ได้ในการทดสอบทางห้องปฏิบัติการทางโลหิตวิทยา⁽¹⁾ รวมถึงการเจาะเก็บเลือดเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียตามแผนงานการควบคุมและป้องกันโรค ซึ่งดำเนินการอยู่ทั่วประเทศ⁽²⁾ อย่างไรก็ตามในกรณีที่ต้องเจาะเก็บเลือดจากทารกในครรภ์หรือเลือดเด็ก แพทย์มักนิยมใช้สาร heparin เป็นสารกันเลือดแข็งแทน เนื่องจากเจาะเก็บได้ยากกว่าและเลือดแข็งตัวได้ง่าย จึงมักเลือกใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง เนื่องจากมีคุณสมบัติป้องกันการแข็งตัวของเลือดดีกว่าสารกันเลือดแข็งชนิดอื่น วิธีการเก็บเลือดโดยใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งนั้น มักจะดูดเคลือบ heparin ไว้ในกระบอกฉีดยาก่อนดูดเลือดเข้าไปผสมภายในกระบอก มักต้องใช้ heparin ในปริมาณที่ค่อนข้างมากเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดภายในกระบอกฉีดยา เนื่องจากในการเจาะเลือดทารกหรือเลือดเด็ก มักใช้เวลามากกว่าการเจาะเลือดบุคคลทั่วไป เป็นผลให้เลือดที่เจาะเก็บได้มีสัดส่วนของ heparin ค่อนข้างมากและบ่อยครั้งส่งผลกระทบต่อผลการตรวจด้วยวิธี PCR เนื่องจาก heparin ในปริมาณสูงสามารถยับยั้งปฏิกิริยา PCR ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ได้ เป็นผลให้ตรวจวินิจฉัยผิดพลาดได้ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยหลายอย่างร่วมด้วย เช่น ชนิดของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือด และความเข้มข้นของ heparin ที่ใช้^(3,4) ทำให้แต่ละห้องปฏิบัติการไม่สามารถกำหนดแนวทางการใช้ที่ชัดเจนได้ สำหรับ ACD เป็นสารกันเลือดแข็งอีกชนิดหนึ่งที่ใช้เก็บเลือด มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ trisodium citrate, citric acid และ dextrose สามารถใช้เก็บรักษาสภาพเลือดไว้ได้นาน ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้กับงานด้านการตรวจวินิจฉัยยีนอัลฟาธาลัสซีเมียได้ การศึกษาครั้งนี้จึงต้องการศึกษาผลของสารกันเลือดแข็งเหล่านี้ต่อการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียด้วยวิธี PCR ในงานประจำวัน

วัตถุประสงค์

ศึกษาเปรียบเทียบผลของสารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด คือ EDTA, heparin และ ACD ต่อการตรวจวิเคราะห์

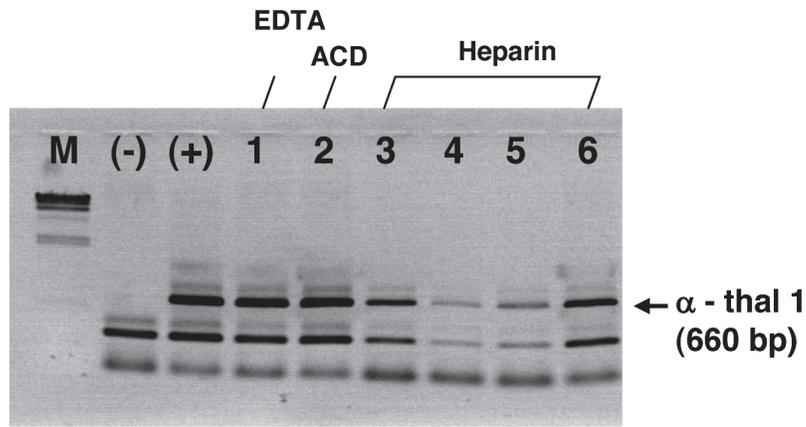
ธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในคนไทยด้วยวิธี PCR ในงานประจำวัน เพื่อให้ได้ข้อมูลประกอบการกำหนดแนวทางการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดที่เหมาะสมในงานประจำวันต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษา

เจาะเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 6 มิลลิลิตรจากอาสาสมัครที่ทราบว่าเป็นพาหะ Hb E ร่วมกับ α - thalassemia 1 (SEA deletion) แบ่งใส่หลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิดต่างๆ ประกอบด้วย heparin ความเข้มข้น 5, 25, 50, 100 IU/ml, EDTA 25 mg/ml และ ACD 150 μ l / ml หลอดละ 1 มิลลิลิตร ได้ตัวอย่างเลือดทั้งสิ้นจำนวน 6 ตัวอย่างนำไปเตรียม DNA โดยวิธีมาตรฐานโดยใช้การสกัดด้วย phenol chloroform ละลาย DNA ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาณเท่ากันนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ยีนธาลัสซีเมีย 2 ชนิด คือ α - thalassemia 1 ชนิด SEA deletion โดยใช้เทคนิค gap - PCR⁽⁵⁾ และยีน β^E - globin ตรวจด้วยวิธี allele specific PCR⁽⁶⁾ เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ได้ระหว่างการใช้สารกันเลือดแข็งแต่ละชนิด

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการศึกษา

รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจหา ยีน α - thalassemia 1 (SEA deletion) ด้วยวิธี gap - PCR ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเลือดอาสาสมัครที่ใช้สารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด คือ EDTA, ACD และ heparin ที่ความเข้มข้น 5, 25, 50 และ 100 IU/ml ในระบบ gap - PCR ที่ใช้นี้ คนปกติจะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพียง 1 ชิ้นขนาด 314 bp ส่วนผู้ที่ เป็นพาหะ α - thalassemia 1 (SEA deletion) จะพบชิ้นส่วนขนาด 660 bp เพิ่มอีก 1 ชิ้นซึ่งเป็นชิ้นส่วนที่จำเพาะต่อยีน α - thalassemia 1 ชนิด SEA deletion ที่พบได้บ่อยในคนไทย พบว่าสามารถให้การวินิจฉัยพาหะ α - thalassemia 1 ได้ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมได้ ทั้ง 6 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเลือดที่ใช้ EDTA และ ACD เป็นสารกันเลือดแข็งมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอดีมากไม่แตกต่างกัน ส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้จาก heparinized blood มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัด

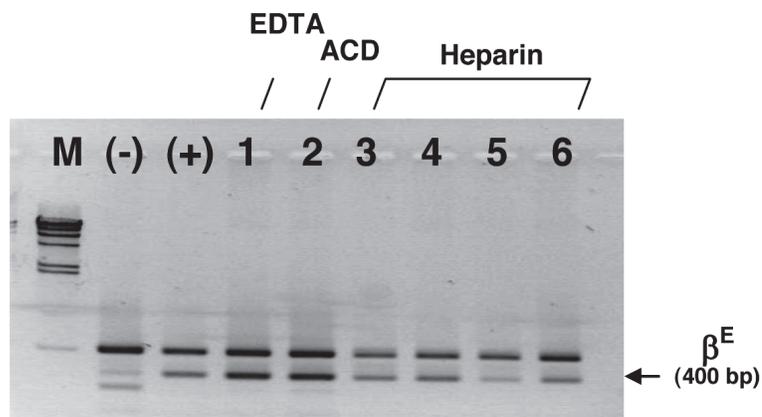


Detection of α – thalassemia 1 by gap-PCR

รูปที่ 1 ผลการตรวจหายีน α - thalassemia 1 ด้วยวิธี gap - PCR (-) และ (+) คือ Control DNA 1; EDTA 2; ACD 3; heparin (5 IU) 4; heparin (25 IU) 5; heparin 50 IU 6; heparin (100 IU)

รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจหายีน β^E - globin ด้วยวิธี allele specific - PCR ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเลือดอาสาสมัครที่ใช้สารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด คือ EDTA, ACD และ heparin ที่ความเข้มข้น 5, 25, 50 และ 100 IU/ml ในระบบที่ใช้นี้ ชิ้นส่วนที่จำเพาะต่อยีน β^E - globin มีขนาดประมาณ 400 bp พบว่าสามารถให้การวินิจฉัยพาหะ Hb E ได้ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมได้ทั้ง 6 ตัวอย่าง

โดยตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเลือดที่ใช้ EDTA และ ACD เป็นสารกันเลือดแข็งมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ดีไม่แตกต่างกัน ส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้จาก heparinized blood มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัดเช่นเดียวกับที่พบในการตรวจวินิจฉัย α -thalassemia 1 ข้างต้น

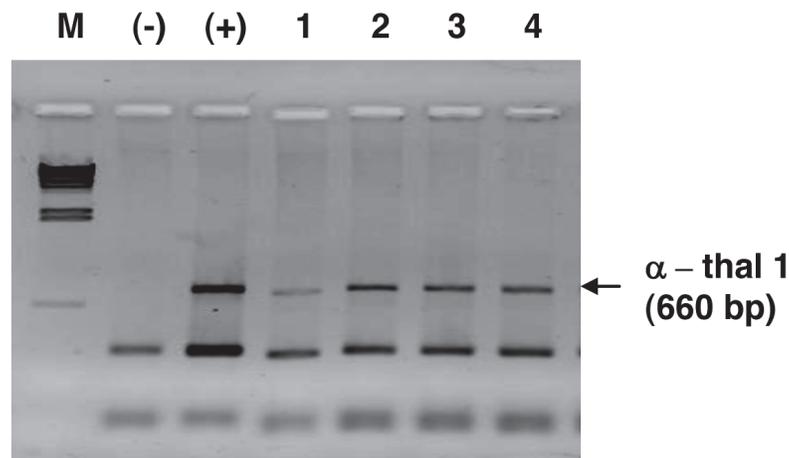


Detection of β^E - globin gene by allele specific PCR

รูปที่ 2 ผลการตรวจหายีน β^E - globin ด้วยวิธี allele specific PCR (-) และ (+) คือ Control DNA 1; EDTA 2; ACD 3; heparin (5 IU) 4; heparin (25 IU) 5; heparin 50 IU 6; heparin (100 IU)

ข้อมูลจากการศึกษาในยีนธาลัสซีเมียทั้งสองยีนยืนยันได้ว่าสารกันเลือดแข็ง heparin เป็นสารกันเลือดแข็งที่สามารถรบกวนการตรวจวิเคราะห์ยีนธาลัสซีเมียโดยวิธี gap - PCR สำหรับ α - thalassemia 1 และวิธี allele specific PCR สำหรับยีน Hb E ได้โดยเฉพาะเมื่อใช้ในปริมาณมาก ประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งอาจส่งผลให้วินิจฉัยโรคผิดพลาดได้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมา^(3, 4) โดยเฉพาะหากเป็นตัวอย่างเลือดทารกในครรภ์ที่ส่งตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด⁽⁷⁾ ซึ่งต้องการผลการตรวจที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง หากสามารถเลี่ยงการใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งและเลือกใช้ EDTA หรือ ACD แทนได้

จะทำให้การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR มีความถูกต้องแม่นยำและน่าเชื่อถือมากขึ้น อย่างไรก็ตามหากไม่สามารถหลีกเลี่ยงการใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งได้ อาจแก้ปัญหาประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ด้วยการนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นเสียก่อนเพื่อลดปริมาณ heparin ที่อาจตกค้างในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมได้ ก่อนที่จะนำไปทำการตรวจด้วยวิธี PCR ต่อไป พบว่าวิธีการง่าย ๆ นี้สามารถลดปัญหาการรบกวนของ heparin ต่อการทำ PCR ได้มากและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำ PCR ได้ ทำให้ได้แถบของดีเอ็นเอที่มีความเข้มของแถบชัดเจนขึ้น ดังแสดงใน **รูปที่ 3**



Detection of α – thalassemia 1 with diluted DNA

รูปที่ 3 ผลการตรวจหายีน α - thalassemia 1 ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมได้จาก heparinized blood (25 IU) โดยนำมาเจือจางก่อนทำ PCR พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำ PCR ได้ (-) และ (+) คือ Control DNA
 1: undiluted DNA 2: เจือจาง 2 / 3 3: เจือจาง 1 / 2 4: เจือจาง 1 / 3

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษารั้งนี้ได้รับการสนับสนุนบางส่วนจาก
 ทุนศูนย์วิจัยเฉพาะทางมหาวิทยาลัยขอนแก่น และ

ทุนโครงการพัฒนากลุ่มวิจัยในสถาบันอุดมศึกษา
 (CHE-RG-51) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
 (สกอ.) กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

1. Lewis SM, Bain BJ, Bate J, Dacie JV. Dacie and Lewis Practical Haematology. Churchill Livingstone, 2006.
2. กุลนภา ฟุ่เจริญ, สุพรรณ ฟุ่เจริญ. การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียในประเทศไทย. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2551; 20: 165 - 177.
3. Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich HR. (ed.) PCR technology: principle and applications for DNA amplification. Stockton press, New York, 1989; 17-22.
4. Beutler E, Gilbert T, Kuhl W. Influence of heparin with the polymerase chain reaction. Biotechniques 1990; 9: 166.
5. Panyasai S, Sringam P, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. A simplified screening for α -thalassemia 1 (SEA type) using a combination of a modified osmotic fragility test and a direct PCR on whole blood cell lysates. Acta Haematol 2002; 108: 74 -78.
6. Fucharoen S, Fucharoen G, Ratanasiri T, Jetsrisuparb A, Fukumaki Y. A simple non radioactive assay for hemoglobin E gene in prenatal diagnosis. Clin Chim Acta 1994; 229: 197-203.
7. Srivorakun H, Fucharoen G, Sae-ung N, Sanchaisuriya K, Ratanasiri T, Fucharoen S. Analysis of fetal blood using capillary electrophoresis system: a simple method for prenatal diagnosis of severe thalassemia diseases. Eur J Haematol 2009; 83: 57-65.