นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจหาจีโนไทป์ของ Mi^a จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดและรากผมโดยวิธีพีซีอาร์

หยาดพิรุณ โตมี* จิตต์โสภิณ ไชยเด่น* พูนทรัพย์ ผลาขจรศักดิ์*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อตรวจหาจีโนไทป์ของ Mi^a จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดและรากผมโดยวิธีพีซีอาร์
วิธีการ เก็บเลือดของนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่มีหมู่เลือดโอและบี 142 ราย ตรวจหาฟีโนไทป์ของ Mi^a ด้วยวิธีซีโรโลยี จากนั้นนำเลือดและรากผมอย่างละ 59 ราย ที่มีฟีโนไทป์เป็น Mi(a+) 29 ราย และสุ่ม Mi(a-) 30 ราย สกัดดีเอ็นเอและตรวจหาจีโนไทป์ของ Mi^a ด้วยใช้วิธีพีซีอาร์
ผลการทดลอง ผลการตรวจหาฟีโนไทป์ 142 ราย พบ Mi(a+) 29 ราย และ Mi(a-) 113 ราย ผลการตรวจหาจีโนไทป์จากดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเลือดและรากผม 59 รายพบว่าให้ผลสอดคล้องกัน และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจด้วยวิธีซีโรโลยีกับวิธีพีซีอาร์ ในตัวอย่าง 59 ราย พบว่าให้ผลสอดคล้องเช่นกัน
สรุป วิธีพีซีอาร์สามารถนำมาใช้เป็นตัวเลือกในการตรวจหาจีโนไทป์ของ Mi^a ได้ทั้งในตัวอย่างเลือดและรากผม ซึ่งมีประโยชน์ในการเลือกเลือดที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วยที่มีการสร้าง anti-Mi^a เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์หลังจากได้รับเลือด และนำมาใช้ในการหาสาเหตุของภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในเด็กแรกคลอดได้
วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2552; 42: 242-250.

คำหัส: จีโนไทป์, หมู่เลือดระบบเอ็มไอเอ ดีเอ็นเอ พีซีอาร์

---

*แขนงวิชาวิทยาศาสตร์การธนาคารเลือด ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract: Detection of Mi^a genotype of DNA extracted from blood and hair roots by Polymerase Chain Reaction

Yadphiroon Tomee*, Jitsophin Chaiden*, Poonsub Palacajornsuk*

Objective: To detect Mi^a genotype of DNA extracted from blood and hair roots by Polymerase Chain Reaction (PCR) method.

Method: One hundred and forty two blood group O and B samples were obtained from Medical Technology's students, Chiang Mai University. Phenotyping was performed by serological method. Genomic DNA of blood and hair roots samples were extracted from 59 samples including 29 Mi(a+) and 30 Mi(a-) random samples. Genotype testing was performed by PCR method.

Results: The phenotyping of 142 samples showed that 29 samples were Mi(a+) and 113 samples were Mi(a-). The genotype testing of 59 DNA samples, which extracted from blood and hair roots samples of the individual subject, were concordant. The comparison results between PCR and serology methods from 59 samples were also in agreement.

Conclusion: The PCR method can be used to determine Mi^a genotype in blood and hair root samples. The advantages of detection of Mi^a genotype by PCR technique were helpful to select compatible blood for recipients with anti-Mi^a to prevent adverse effects of transfusion and investigate causes of hemolytic disease of the newborn. **Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2009; 42: 242-250.**

Key words: genotype, Mi^a, DNA, PCR

* Division of Transfusion Science, Department of Medical technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

บทนำ

หมู่เลือดระบบ MNS ค้นพบเป็นอันดับที่สองรองจากหมู่เลือดระบบ ABO ปัจจุบันหมู่เลือดระบบ MNS มีแอนติเจนทั้งหมด 46 ชนิด[1] ซึ่งมากเป็นอันดับสองรองจากหมู่เลือดในระบบ Rh โดยแอนติเจนของหมู่เลือดระบบ MNS นี้เกิดจากการแสดงออกของยีน glycophorin A (*GYPA*) และ glycophorin B (*GYPB*) สำหรับ Miltenberger (Mi.) เป็นหมู่เลือดย่อยในระบบ MNS ประกอบด้วย 11 classes (Mi.I-Mi.XI) การตรวจโดยวิธีทางซีโรโลยีทำได้โดยใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะซึ่งมีหลายชนิด[1] (ดังแสดงในตารางที่ 1) Mi. ที่มีฟีโนไทป์เป็น Mi(a+) ได้แก่ Mi.I, Mi.II, Mi.III, Mi.IV, Mi.VI และ Mi.X และ Mi. ที่มีฟีโนไทป์เป็น Mi(a-) ได้แก่ Mi.V, Mi.VII, Mi.VIII, Mi.IX และ Mi.XI แอนติเจนต่างๆ ของ Mi.

เกิดจากการแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ (Unequal crossing-over) หรือเกิดจากมีการแทรกส่วน ของนิวคลีโอไทด์ (Gene conversion)[2] ของ *GYPA* และ *GYPB* ในประชากรเอเชียพบ Mi(a+) ประมาณ 3-10% โดยเฉพาะในประชากรไทยพบ 9.7% ไต้หวันพบ 7.3% และจีนพบ 6.28% ส่วนใหญ่เป็นหมู่ย่อยชนิด Mi.III[3-5] ในประชากรผิวขาวพบ Mi(a+) ได้น้อยกว่า 0.01%[1] สำหรับ anti-Mi^a ส่วนใหญ่เป็นทั้งชนิด IgM และ IgG ซึ่งเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิห้องและ 37°C มีรายงานว่า anti-Mi^a เป็นแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาเม็ดเลือดแดงแตกหลังการให้เลือด (Hemolytic transfusion reaction, HTR) หรือเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในเด็กแรกคลอด (Hemolytic disease of the newborn, HDN) ได้[4, 6-7] แม้ว่าการตรวจหาแอนติเจน Mi^a ใช้วิธีซีโรโลยีโดยใช้ human polyclonal anti-Mi^a จะเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและราคาย่อมเยา แต่มีข้อจำกัด คือ human polyclonal anti-Mi^a หาได้ยาก เนื่องจากแอนติซีรัมที่นำมาทดสอบนี้จะต้องมีหมู่เลือดในระบบ ABO ที่ตรงกับตัวอย่างเลือดที่ต้องการทดสอบหรือเป็นหมู่เลือด AB เพื่อไม่ให้เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดีในระบบ ABO ขึ้น นอกจากนี้ human polyclonal anti-Mi^a มีความแรงค่อนข้างต่ำ และถ้าหากเก็บไว้นานจะมีความแรงลดลง การสั่งซื้อ monoclonal anti- Mi^a จากต่างประเทศทำได้ยากและมีราคาแพง ในปี พ.ศ. 2550 พูนทรัพย์ ผลาขจรศักดิ์และคณะ ได้พัฒนาวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) สำหรับการตรวจหาจีโนไทป์ของ Mi^a จาก DNA ที่สกัดจากเลือดได้สำเร็จ[7] งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะนำวิธี PCR มาตรวจหาจีโนไทป์ของ Mi^a จาก DNA ที่สกัดมาจากเลือดและรากผมแทนการตรวจโดยวิธีซีโรโลยี

ตารางที่ 1 หมู่เลือดย่อยจำนวน 11 classes และแอนติเจนต่าง ๆ บนผิวเม็ดเลือดแดงของ Mi. subsystem

Mi. class	Reaction of RBCs with antiserum to the following antigens										
	Mi^a	Vw	Mur	Hil	Hut	MUT	Hop	Nob	DANE	MINY	TSEN
Mi.I	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mi.II	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0
Mi.III	+	0	+	+	0	+	0	0	0	+	0
Mi.IV	+	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+
Mi.V	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0
Mi.VI	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0
Mi.VII	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
Mi.VIII	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0
Mi.IX	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0
Mi.X	+	0	0	+	0	+	0	0	0	+	0
Mi.XI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+

วัสดุและวิธีการ

เก็บเลือดของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่มีหมู่เลือดโอและหมู่เลือดบี 142 ราย ตรวจหาฟีโนไทป์ของ Mi^a ด้วยวิธีซีโรโลยี จากนั้นนำเลือดและรากผมอย่างละ 59 ราย ที่มีฟีโนไทป์เป็น Mi(a+) 29 ราย และสุ่ม Mi(a-) 30 ราย มาสกัด DNA และตรวจหาจีโนไทป์ของ Mi^a ด้วยใช้วิธี PCR

1. การตรวจสอบฟีโนไทป์ของ Mi^a โดยวิธีซีโรโลยี

เติม human polyclonal anti-Mi^a 1 หยด ลงในหลอดทดลอง ขนาด 12x75 mm และเติม 5% red cell suspension 1 หยด ลงในหลอดที่มี human polyclonal anti-Mi^a ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ปั่นอ่านผล จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ปั่นอ่านผล แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ปั่นอ่านผลและบันทึกผล ปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้งๆ ละ 45 วินาที แล้วเติม anti-human globulins (ศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย) 1 หยด ปั่นอ่านผลทันที หากไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นให้ยืนยันโดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. การสกัด DNA จากเลือด

นำเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA 3 mL ปั่น 3,400 rpm นาน 5 นาที เก็บส่วน Buffy coat ไว้ เติม RBC lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM NaCl และ 5 mM $MgCl_2$) 3 mL ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไปมานาน 3 นาที ปั่น 3,400 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นผสมโดย Vortex mixer ทำลายเม็ดเลือดแดงซ้ำอีก 2 ครั้งโดยใช้ RBC lysis buffer เติม RBC lysis buffer 1 mL ผสมให้ pellet กระจาย แล้วดูดใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ปั่น 5,000 rpm นาน 2 นาที ได้ pellet 25 µL เติม 10 mg/mL Proteinase K 12 µL, ddH_20 300 µL, 10% SDS 105 µL และ 7.5 M Guanidine HCl 105 µL ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน อุ่นที่อุณหภูมิ 70°C นาน 15 นาที ปั่น 10,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใส 500 µL ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL แล้วเติม Absolute Ethanol 1 mL นำเก็บ DNA 800 µL ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 m หลอดใหม่ ปั่น 10,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 80% Ethanol 500 µL ผสมโดยใช้ Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปั่น 10,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง อุ่นที่อุณหภูมิ 70°C นาน 1 นาที ละลาย DNA ด้วย ddH_20 100 µL อุ่นที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 นาที จากนั้นเก็บ DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C รอการทดสอบขั้นต่อไป

3. การสกัด DNA จากรากผม

เก็บรากผมรายละ 10 ราก ตัดรากผมให้มีความยาวประมาณ 1 cm จากปลายราก ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ที่มี Digestion buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.5% Tween 20 และ 1 mM EDTA, pH 8.0) 100 µL เติม 10 mg/mL Proteinase K 2 µL ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บ DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C รอการทดสอบขั้นต่อไป

4. การตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้จากเลือดและรากผมโดยวิธี Gel electrophoresis

นำ DNA 2 µL มาผสมกับ loading dye 4 µL load ลงใน 1% agarose gel แยกผ่านโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 Volts นาน 20 นาที (Mini Gel Migration Trough 100-230 volt รุ่น i-mupid, Cosmo Bio. Ltd., Tokyo, Japan) ย้อม gel ใน 1 µg/mL Ethidium bromide solution นาน 15 นาที ตรวจดู คุณภาพของ DNA ด้วย UV Transilluminator (ChemiDoc XR, Bio-Rad Laboratories Ltd., Milan, Italy Milan, Italy)

5. การวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดจากเลือดและรากผมด้วย UV spectrophotometer

วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ DNA โดยใช้เครื่อง UV Spectrophotometer (Gene Quant, Amersham Biosciences, New Jersey, USA) ที่ความความคลื่น 260 และ 280 nm คำนวณค่าความเข้มข้นของ DNA ได้จากสูตร DNA concentration (ng/µL) = OD_{260} x 50 x dilution factor

6. การตรวจสอบจีโนไทป์ของ Mi^a โดยวิธี PCR

นำ DNA ที่สกัดจากเลือดและรากผมแต่ละรายมาทำ PCR 2 หลอด โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชุดที่จำเพาะต่อจีโนไทป์ Mi(a+) (Bio Basic Inc., Ontario, Canada) หลอดแรกใช้ไพร์เมอร์ชุดที่ 1 ได้แก่ F2 กับ Rccgg จำเพาะต่อ Mi.II, Mi.III, Mi.IV, Mi.VI และ Mi.X และหลอดที่สองใช้ไพร์เมอร์ชุดที่ 2 ได้แก่ F1 กับ RIN จำเพาะต่อ Mi.I (ตารางที่ 2) เติมน้ำยาต่างๆ ลงในแต่ละหลอด ในปริมาตรต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 จากนั้นถ่ายส่วนผสมทั้งหมดลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 0.2 mL นำใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Gene Amp PCR System 9600, Roche Diagnostic systems, Connecticut, USA) โดยใช้สภาวะสำหรับการทำ PCR ดังนี้

Step I	Denature	95°C	เป็นเวลา	15	นาที	จำนวน 1 รอบ
Step II	1) Denature	94°C	เป็นเวลา	20	วินาที	
	2) Annealing	67°C	เป็นเวลา	20	วินาที	จำนวน 35 รอบ
	3) Extension	72°C	เป็นเวลา	20	วินาที	
Step III	Extension	72°C	เป็นเวลา	10	นาที	จำนวน 1 รอบ

จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี Gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ 0.5 μg/μL Molecular weight DNA Marker ϕX174 RF DNA/*Hae III* Fragments (Gibco BRL, New York, USA) โดยใช้ 2% agarose gel แยกผ่านด้วยกระแสไฟฟ้า 100 Volts นาน 40 นาที

ตารางที่ 2 ไพร์เมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA

Primer name	Sequences	Specific for
ชุดที่ 1		
F2	5′-ccc ttt ctc aac ttc tct tat atg cag ATA A-3′	Mi.II and Mi.X (148 bp),
Rccgg	5′-gag caa cta ttt aaa act aag aac ata cCG G-3′	Mi.III, Mi.IV and Mi.VI (151 bp)
ชุดที่ 2		
F1	5′-cag cat ttc tct aaa ggc taa ata aga aga tgt a-3′	Mi.I (296 bp)
RIN	5′-CAT ATG TGT CCC GTT TGT GCA-3′	
Internal control		
HGH5580F	5′-TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A-3′	*HGH* (434 bp)
HGH5967R	5′-cca ctc acG GAT TTC TGT TGT GTT TC-3′	

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของน้ำยาชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ PCR

PCR reagent	Volume/Rx (μL)	Final concentration
ddH_2O	3.75	-
2X HotStar Master Mix (QIAGEN)*	6.25	1X
100 ng/μl Forward primer[*1, *2]	0.5	50 ng
100 ng/μl Reverse primer[*1, *2]	0.5	50 ng
50 ng/μl HGH5580F	0.25	12.5 ng
50 ng/μl HGH5967R	0.25	12.5 ng
10 ng/μl DNA	1.00	10 ng
ปริมาตรสุดท้าย	12.5	

หมายเหตุ

* 2X HotStar Master Mix (QIAGEN, New York, USA) ประกอบด้วย 3 mM $MgCl_2$ ใน PCR buffer, 400 μM each dNTP และ 5 Units HotStar*Taq* DNA polymerase

[*1] = ไพรเมอร์ชุดที่ 1 ใช้ F2 และ Rccgg, [*2] = ไพรเมอร์ชุดที่ 2 ใช้ R1 และ RIN

การแปลผล

1. ในทุกหลอดต้องมี PCR product ของ Internal control ขนาด 424 bp จึงจะสามารถแปลผลได้

2. หากในหลอดที่ใช้ไพรเมอร์ F2 และ Rccgg มี PCR product ขนาด 148 bp หรือ 151 bp และในหลอดที่ใช้ไพรเมอร์ F1 และ RIN ไม่มี PCR product ขนาด 296 bp แสดงว่ามีจีโนไทป์เป็น Mi(a+) ได้แก่ Mi.II, Mi.III, Mi.IV, Mi.VI หรือ Mi.X

3. หากในหลอดที่ใช้ไพรเมอร์ F2 และ Rccgg ไม่มี PCR product ขนาด 148 bp หรือ 151 bp และในหลอดที่ใช้ไพรเมอร์ F1 และ RIN มี PCR product ขนาด 296 bp แสดงว่ามีจีโนไทป์เป็น Mi(a+) คือ Mi.I

4. หากหลอดที่ใช้ไพรเมอร์ F2 และ Rccgg ไม่มี PCR product ขนาด 148 bp หรือ 151 bp และในหลอดที่ใช้ไพรเมอร์ F1 และ RIN ไม่มี PCR product ขนาด 296 bp แสดงว่ามีจีโนไทป์เป็น Mi(a-) ได้แก่ Mi.V, Mi.VII, Mi.VIII, Mi.IX หรือ Mi.XI หรืออาจเป็น *GYPA*, *GYPB* หรือ *GYPE*

ผลการทดลอง

1. ผลการตรวจฟีโนไทป์ของ Mi^a ด้วยวิธี ซีโรโลยี

จากตัวอย่างเลือดจำนวน 142 ราย พบว่ามีหมู่เลือด O จำนวน 98 รายและหมู่เลือด B จำนวน 44 ราย จากตัวอย่างเลือดทั้งหมด พบว่ามีฟีโนไทป์เป็น Mi(a+) จำนวน 29 ราย คิดเป็นความถี่ 20.4% และมีฟีโนไทป์เป็น Mi(a-) จำนวน 113 ราย สำหรับระดับปฏิกิริยาการจับกลุ่มของการตรวจหาฟีโนไทป์ของ Mi^a พบว่าผลการทดสอบที่อุณหภูมิห้อง ใช้เวลา 30 นาที มีระดับปฏิกิริยาการจับกลุ่มชัดเจนที่สุด

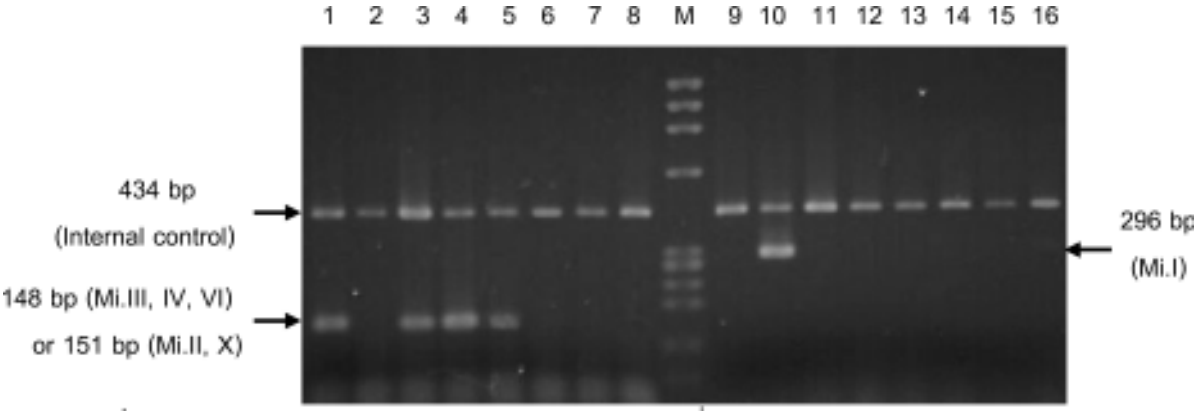
2. ผลการตรวจสอบคุณภาพ ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดจากเลือดและรากผม

ส่วนใหญ่ DNA ที่สกัดได้จากเลือดและรากผมทั้ง 59 ราย มีลักษณะเป็น intact DNA สำหรับการวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดจากเลือด พบว่า มีความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 6 ng/μL ถึง 1,896

ng/μL และความบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 1.65-1.85 ส่วน DNA ที่สกัดจากรากผม พบว่า มีความเข้มข้นประมาณ 50-600 ng/μL และมีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 1.0-1.3 ซึ่งน้อยกว่า 1.65 แสดงถึงมีการปนเปื้อนของโปรตีนในสารละลาย DNA ที่สกัดจากรากผม

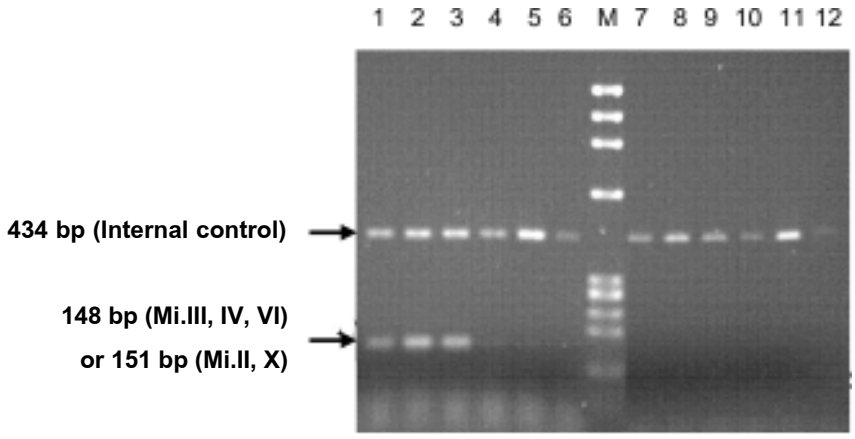
3. ผลการตรวจจีโนไทป์ของ Mi^a จาก DNA ที่สกัดจากเลือดและรากผมด้วยวิธี PCR

การตรวจจีโนไทป์ของ Mi^a จาก DNA ที่สกัดจากเลือดและรากผมด้วยวิธี PCR อย่างละ 59 ราย ให้ผลสอดคล้องกัน คือ พบว่าตัวอย่าง 29 ราย มีจีโนไทป์เป็น Mi(a+) ได้แก่ Mi.II, Mi.III, Mi.IV, Mi.VI หรือ Mi.X เนื่องจากผลการตรวจสอบในหลอดที่ใช้ไพรเมอร์ F2 และ Rccgg มี PCR product ขนาด 148 bp หรือ 151 bp และในหลอดที่ใช้ไพรเมอร์ F1 และ RIN ไม่มี PCR product ขนาด 296 bp และพบว่ามี 39 ราย มีจีโนไทป์เป็น Mi(a-) ได้แก่ Mi.V, Mi.VII, Mi.VIII, Mi.IX หรือ Mi.XI หรืออาจเป็น *GYPA*, *GYPB* หรือ *GYPE* เนื่องจากผลการตรวจสอบในหลอดที่ใช้ไพรเมอร์ F2 และ Rccgg ไม่มี PCR product ขนาด 148 bp หรือ 151 bp และในหลอดที่ใช้ไพรเมอร์ F1 และ RIN ไม่มี PCR product ขนาด 296 bp ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบ Mi(a+) ที่เป็น Mi.I เนื่องจากไม่มีผลการตรวจสอบในหลอดที่ใช้ไพรเมอร์ F1 และ RIN มี PCR product ขนาด 296 bp (ดังรูปที่ 1 และรูปที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจ Mi^a ด้วยวิธีซีโรโลยีกับการตรวจโดยวิธี PCR ของ 59 รายนี้ พบว่าให้ผลสอดคล้องเช่นกัน



รูปที่ 1 ตัวอย่างของผลการตรวจจีโนไทป์ของ Mi^a จาก DNA ที่สกัดได้จากเลือดด้วยวิธี PCR

Lane ที่ 1 ถึง 8 ใช้ไพรเมอร์ F2 และ Rccgg, Lane ที่ 10 ถึง 17 ใช้ไพรเมอร์ F1 และ RIN
Lane 1: Mi.IV ใช้เป็น positive control ของไพรเมอร์ F2 และ Rccgg
Lane 2: Mi.I ใช้เป็น negative control ของไพรเมอร์ F2 และ Rccgg
Lane 3-5 และ Lane 12-14: ตัวอย่างของ DNA ที่มีจีโนไทป์เป็น Mi(a+)
Lane 6-8 และ Lane 15-17: ตัวอย่างของ DNA ที่มีจีโนไทป์เป็น Mi(a-)
Lane 9: Molecular weight DNA marker ใช้ ϕX174 RF DNA/*Hae* III Fragments
Lane 10: Mi.IV ใช้เป็น negative control ของไพรเมอร์ F1 และ RIN
Lane 11: Mi.I ใช้เป็น positive control ของไพรเมอร์ F1 และ RIN



รูปที่ 2 ตัวอย่างของผลการตรวจจีโนไทป์ของ Mi^a จาก DNA ที่สกัดได้จากรากผมด้วยวิธี PCR

Lane ที่ 1 ถึง 6 ใช้ไพรเมอร์ F2 และ Rccgg, Lane ที่ 7 ถึง 12 ใช้ไพรเมอร์ F1 และ RIN
Lane 1-3 และ Lane 7-9: ตัวอย่างของ DNA จากรากผมที่มีจีโนไทป์เป็น Mi(a+)
Lane 4-6 และ Lane 10-12: ตัวอย่างของ DNA จากรากผมที่มีจีโนไทป์เป็น Mi(a-)
Lane M: Molecular weight DNA marker ใช้ ϕX174 RF DNA/*Hae* III Fragments

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจสอบฟีโนไทป์ของ Mi^a ด้วยวิธีซีโรโลยี โดยใช้ human polyclonal anti-Mi^a 1 หยด และ 5% red cell suspension 1 หยด คิดเป็นอัตราส่วนซีรัมต่อเซลล์เท่ากับ 20:1 น้อยกว่าอัตราส่วนปกติว่าในงานธนาคารเลือด (40:1) เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ human polyclonal anti-Mi^a หมู่เลือด O และ หมู่เลือด B ในปริมาณจำกัด จากหน่วยงานธนาคารเลือด คณะแพทย-ศาสตร์ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ อัตราส่วนซีรัมต่อเซลล์ที่ใช้อาจไม่เหมาะสม ทำให้ระดับปฏิกิริยาเกิดแบบอ่อน และอ่านผลได้ยาก หากเพิ่มอัตราส่วนซีรัมต่อเซลล์มากขึ้นจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังตรวจหาได้เฉพาะในตัวอย่างที่มีหมู่เลือด O และหมู่เลือด B เท่านั้น เนื่องจาก human polyclonal anti-Mi^a ที่ใช้มีเพียงหมู่เลือดดังกล่าว จึงต้องตรวจหมู่เลือดในระบบ ABO ก่อนทำการตรวจสอบฟีโนไทป์ของ Mi^a เพราะหากเลือดที่นำมาตรวจมี หมู่เลือด ABO ที่ไม่ตรงกับ human polyclonal anti-Mi^a ที่ใช้ตรวจจะเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจนกับแอนติบอดีในระบบ ABO ขึ้น ทำให้อ่านผลผิดพลาดได้

ผลการตรวจสอบฟีโนไทป์ของ Mi^a ด้วยวิธีซีโรโลยี พบความถี่ 20.4 % มากกว่าที่มีรายงานไว้เดิมพบประมาณ 10% ซึ่งเป็นการศึกษาในประชากรส่วนใหญ่ที่อาศัยอยู่ที่ภาคกลางโดยเฉพาะในเขตกรุงเทพมหานคร[5, 9] จากผลงานวิจัยนี้มีแนวโน้มว่า ประชากรของภาคเหนือมีความถี่ของ Mi(a+) มากกว่าภาคอื่น เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่ มีภูมิลำเนาอยู่ในเขตจังหวัดของภาคเหนือ อย่างไรก็ตาม กลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษามีจำนวนน้อย ซึ่งควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างจากประชากรภาคเหนือมากขึ้น จึงจะได้ความถี่ที่ถูกต้อง และมีความน่าเชื่อถือ

การตรวจหาจีโนไทป์ของ Mi^a จาก DNA ที่สกัดจากเลือดหรือรากผมโดยวิธี PCR สามารถนำมาใช้เป็นตัวเลือกในการตรวจหาฟีโนไทป์ของ Mi^a โดยวิธีซีโรโลยีในห้องปฏิบัติการทางธนาคารเลือดได้ เนื่องจากทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน การตรวจหาแอนติเจน Mi^a มีประโยชน์ในการหาเลือดที่เหมาะสมให้แก่ผู้ป่วยที่มี anti-Mi^a เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์หลังรับเลือด และสามารถนำมาใช้ในการหาสาเหตุของภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในเด็กแรกคลอดได้

นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุพยานในการช่วยสืบหาผู้กระทำผิดในคดีอาชญากรรมหรือพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูกกันได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ. วารุณี คุณาชีวะ ที่ให้ความเอื้อเฟื้อวัสดุอุปกรณ์ ตลอดจนน้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณหน่วยงานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์ human polyclonal anti-Mi^{a} หมู่เลือด O และหมู่เลือด B รวมทั้งขอขอบคุณ Dr. Marion E. Reid, New York Blood Center, NY, USA ที่อนุเคราะห์ known DNA controls ของ Miltenberger subsystem เพื่อมาใช้ในการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Reid ME, Lomas-Francis C. Blood Group Antigen FactsBook. 2nd ed. San Diego: Acadamic Press; 2004. p. 29-104.
2. Huang CH, Blumenfeld OO. MNSs blood groups and major glycophorins: Molecular basis for allelic variation. In: Cartron J-P, Rouger P, editors. Molecular Basis of Human Blood Group Antigens. New York: Plenum Press. 1995. p.153-88.
3. Chandanyingyong D, Pejrachandra S. Studies on the Miltenberger complex frequency in Thailand and family studies. Vox Sang 1975; 28(2): 152-5.
4. Broadberry RE, Lin M. The incidence and significance of anti-"Mia" in Taiwan. Transfusion 1994; 34(4): 349-52.
5. Cheng G, Hui CH, Lam CK, Hal SY, Wong L, Mak KH, *et al*. Haemolytic transfusion reactions due to Mi-antibodies; need to include MiltenbergerIII positive cells in pre-transfusion antibody screening in Hong Kong. Clin Lab Haematol 1995; 17(2): 183-4.
6. Lin CK, Mak KH, Cheng G, Lao TT, Tang MH, Yuen CM, *et al*. Serologic characteristics and clinical significance of Miltenberger antibodies among Chinese patients in Hong Kong. Vox Sang 1998; 74(1): 59-60.
7. Palacajornsuk P, Nathalang O, Tantimavanich S, Bejrachandra S, Reid ME. Detection of MNS hybrid molecules in the Thai population using PCR-SSP technique. Transfus Med. 2007; 17(3): 169-74.