

นิพนธ์ต้นฉบับ

การวินิจฉัยอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA-type) อย่างง่ายด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ cell lysate จากเลือดครบส่วน

ยุทธนา เพ็งแจ่ม^{1*} ประไพ เหมหอม¹ สุรศักดิ์ แว่นรัมย์¹ สุวรรณ เสมศรี¹ ทิพประภา อมราสกุลทรัพย์¹
แสงชัย นทิวรรณรณ¹ ประคอง สาคร² สมหญิง งามอรุณเลิศ³ สุวิมล ปู่เทียน⁴ สุวิทย์ อธิพรไพฑูรย์⁴
ยุพินพร นาน้ำเขียว⁴ จินตนา คำสด⁴

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหายีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA-type ซึ่งเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบมากในประชากรภูมิภาคนี้และทำให้เกิดโรคอัลฟาธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรง (ฮีโมโกลบินบาร์ทไฮดรอฟีทลิส ซินโดรม) ด้วยวิธีพีซีอาร์ที่รวดเร็ว โดยใช้ DNA ใน cell lysate ที่เตรียมจากเลือดรวมซึ่งใช้ได้ดีและเป็นสารกันเลือดแข็งและตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียโดยวิธี KCU-OF test โดย 25 รายให้ผลบวกต่อ KCU-OF test และ 25 รายให้ผลลบต่อ KCU-OF test การศึกษาประสบความสำเร็จในการตรวจหายีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 โดยใช้ cell lysate จากเลือดรวมด้วยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งในกลุ่ม 25 รายที่ให้ผลบวกกับ KCU-OF test ตรวจพบ 4 รายเป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ส่วนในกลุ่ม 25 รายที่ให้ผลลบกับ KCU-OF test ตรวจไม่พบยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 การเตรียม cell lysate จากเลือดรวมร่วมกับการใช้ KCU-OF test สามารถใช้เป็นทางเลือกเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยหายีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ซึ่งจะช่วยในการควบคุมและป้องกันการเกิดโรคฮีโมโกลบินบาร์ทไฮดรอฟีทลิส ซึ่งพบมากในประชากรของภูมิภาคนี้ให้ได้ผลดียิ่งขึ้นต่อไป วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2548; 38: 116-123.

คำสำคัญ อัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA-type), cell lysate, KCU-OF test

¹กลุ่มวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิกและปรสิตวิทยา

²กลุ่มวิชาเคมีคลินิก

³กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก และ

⁴นักศึกษาชั้นปีที่ 4 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

Abstrace : A Simplified Diagnosis of α -Thalassemia 1 (SEA-type) Using a Direct PCR on Whole Blood Cell Lysate

Yutthana Pengjam¹, Prapai Hemhorm¹, Surasak Wanram¹, Suwanna Semsri¹, Thipprapa Amarasakulsab¹, Saengchai Nateewaranart¹, Prakong Sakorn², Somying Ngamurult³, Suwimon Poopian⁴, Suwit Atipornpaiboon⁴, Yupinporn Nanumchiew⁴, Jintana Kamsod⁴

In order to provide a rapid method for identifying α -thalassemia 1 (SEA-type) in a region where this disorder is common and can lead to severe α -thalassemia (Hb Bart's hydrops fetalis syndrome). In this study, the detection of α -thalassemia 1 (SEA-type) were performed by PCR using the DNA prepared from whole blood cell lysate. The whole blood samples stored in EDTA were collected from 25 Thai adults who were positive for screening with KKU-OF test and 25 who were negative for this test. A successful identification of the α -thalassemia 1 of SEA deletion using the direct PCR on cell lysate was demonstrated. The result showed that, among those positives for KKU-OF test, 4 were α -thalassemia 1 (SEA-type) heterozygote. In contrast no α -thalassemia 1 (SEA-type) was detected in the KKU-OF negative group. Combination of a direct PCR analysis on whole blood cell lysate and KKU-OF test would therefore provide a screening alternative for α -thalassemia 1 (SEA-type) in the regions where a program of prevention and control of the Hb Bart's hydrops fetalis syndrome is supplemented. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2005; 38: 116-123.

Key words: α – thalassemia 1 (SEA-type), cell lysate, KKU-OF test

¹Department of Clinical Microscopy and Parasitology,

²Department of Clinical Chemistry,

³Department of Clinical Microbiology and

⁴Medical Technology students, Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University Thailand

บทนำ

อัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (Southeast Asian type; SEA-type) เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบพาหะของโรคนี้ถึงร้อยละ 20 – 30² และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคโสมซัยกัธอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (ฮีโมโกลบินบาร์ทไฮดรอฟฟีทาลัสซินโดรม) ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงมากที่สุด คือตายตั้งแต่แรกคลอด และเป็น 1 ใน 3 โรคธาลัสซีเมียที่อยู่ในแผนของการควบคุมและป้องกัน

โรคธาลัสซีเมียของประเทศไทย³ การวินิจฉัยพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ในปัจจุบันอาศัยการตรวจวิเคราะห์ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียด้วยวิธีพีซีอาร์⁴ ซึ่งต้องใช้ดีเอ็นเอที่เตรียมจากเม็ดเลือดขาวเป็นตัวตั้งต้น (template) อย่างไรก็ดีตามในกรณีที่มีตัวอย่างเป็นจำนวนมาก วิธีการเตรียมดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวให้ง่าย รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่ายเป็นสิ่งจำเป็น^{4,5} จากการศึกษาที่ผ่านมายุทธนาได้พัฒนาวิธีการเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดรวมให้ง่าย รวดเร็วและประหยัดเวลาซึ่งเรียกดีเอ็นเอที่เตรียมได้ว่า

cell lysate⁶ นอกจากนี้ยังมีคณะผู้วิจัยอื่นๆ ที่สามารถเตรียม cell lysate⁷⁻² ได้เช่นกัน ซึ่งต่อมา De Vries และคณะได้ใช้ cell lysate ที่พัฒนาขึ้นมาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ apoE gene ด้วยวิธีพีซีอาร์ และ real time PCR^{10,11} ขณะที่ในการวินิจฉัยพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 พบว่า Panyasai และคณะ ประสบความสำเร็จจากการเตรียม cell lysate จากเลือดรวมร่วมกับการใช้น้ำยา modified OF เพื่อตรวจกรองหาพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA-type) ด้วยวิธีพีซีอาร์¹² รายงานวิจัยครั้งนี้ได้เตรียม cell lysate ซึ่งมีวิธีที่แตกต่างกับงานวิจัยของ Panyasai และคณะ¹² โดยแตกต่างกันด้วยการใช้สารเคมีที่ต่างกัน และได้นำ cell lysate ที่เตรียมได้นั้นไปวินิจฉัยหาพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA-type) โดยหวังว่า การตรวจ α -thalassemia (SEA-type) โดยใช้ DNA ที่เตรียมได้จาก whole blood cell lysate ร่วมกับการคัดกรองธาลัสซีเมียด้วยน้ำยา KKKU-OF^{13,14} จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA-type) ได้ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างเลือดครบส่วน (whole blood) ซึ่งใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งของนักศึกษาของมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่ไม่เกี่ยวข้องกันทางสายเลือดและอาสาสมัครเข้าร่วมในโครงการ การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียในงานสัปดาห์วันวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติประจำปีการศึกษา 2546 จำนวน 50 ตัวอย่าง ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้รักษาความลับผลการศึกษา โดยการไม่ระบุชื่อของ subjects บนหลอดเลือด และใช้สัญลักษณ์แทน ยกเว้นมีนักศึกษาต้องการรู้ผลการศึกษานี้

2. วิธีการศึกษา

2.1 การตรวจคัดกรองหาพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1

คณะผู้วิจัยได้ตรวจคัดกรองหาพาหะธาลัสซีเมีย 1 (SEA-type) ด้วยน้ำยา KKKU-OF test^{13,14} ทั้งหมดจำนวน 50 ตัวอย่างที่อาสาสมัครเข้าร่วมโครงการของการศึกษาในครั้งนี้ และพบว่าตัวอย่างให้ผลบวกกับน้ำยา KKKU - OF test จำนวน 25 ตัวอย่าง และให้ผลลบต่อ KKKU-OF test จำนวน 25 ตัวอย่าง

2.2 การเตรียม DNA จาก whole blood cell lysate

นำตัวอย่างเลือดรวมทั้ง 50 ตัวอย่างที่ได้จากการตรวจคัดกรองหาพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 มาสกัด DNA โดยมีวิธีการดังนี้ ใช้เลือดรวม (EDTA blood) จำนวน 10 μ L ใส่ใน microtube ที่มีน้ำยาซึ่งมีส่วนประกอบของ 155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 1 mM EDTA, pH 7.4 ปริมาตร 300 μ L ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ปั่นด้วยความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ตูดน้ำส่วนบนทิ้งไป ให้เหลือแต่ตะกอนที่อยู่ก้นหลอด (ระวังอย่าให้ตะกอนติดไปด้วย) เติมน้ำยาตัวที่สองที่มีส่วนประกอบของ 0.67 mM Tris-HCl, 0.07 mM EDTA, pH 7.5 ปริมาตร 50 μ L เพื่อละลายตะกอน เก็บไว้ที่ตู้เย็น -20°C จนกว่าจะนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยพีซีอาร์

2.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ DNA ที่เตรียมได้จาก whole blood cell lysate^{5,6}

คณะผู้วิจัยได้นำ DNA ที่เตรียมได้จาก whole blood cell lysate ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260/280 nm พบว่า ตัวอย่างทุกรายมีดีเอ็นเอ และมีความบริสุทธิ์เพียงพอ สามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยพีซีอาร์ต่อไปได้

2.4 การตรวจ DNA จาก cell lysates ด้วยวิธีพีซีอาร์

ตรวจแอมป์ลิฟิเคชันยีนส่วนโปรโมเตอร์ด้วยวิธีพีซีอาร์ (ตำแหน่งของโปรโมเตอร์เริ่มตั้งแต่ -564 ถึง $+14$ bp ของ γ -globin gene) โดยใช้ primer 1 คู่ คือ $\gamma 4$ (5'-GGC CTA AAA CCA CAG AGA GT-3') และ $\gamma 5$ (5'-CCA GAA GCG AGT GTG TGG AA -3') ให้ PCR products ขนาด 578 bp⁽¹⁷⁾ โดยมีส่วนประกอบของแต่ละหลอดทดลองที่ใช้ทำพีซีอาร์ดังนี้คือ ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 μ L ซึ่งประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50

mM KCl, 0.01 % gelatin, 3.0 mM $MgCl_2$, 15 pmole/ μ L ของ primer แต่ละชนิด, 200 μ M dNTPs, 0.5 unit/ μ L *Taq* DNA polymerase (Promega Co., Madison, USA) ทำ PCR โดยเครื่อง PCR รุ่น 2400 (Perkin Elmer Cetus Co., Norwalk, USA) ซึ่งมี PCR cycles ประกอบด้วย denaturation ที่ 94 °C 3 นาทีในรอบแรก และ 1 นาทีใน 30 รอบที่เหลือ, annealing ที่ 55 °C เป็นเวลา 1 นาที extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที และ 10 นาที ในรอบสุดท้าย และแยก PCR products โดย 1.5 % agarose gel electrophoresis อ่านผลโดยตรงจาก UV- transilluminator

การตรวจยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ด้วยวิธีพีซีอาร์ใช้ primer 3 ชนิดคือ A7 (5'-CTC TGT GTT CTC AGT ATT GGA G -3'), A9 (5'-ATA TAT GGG TCT GGA AGT GTA TC-3') และ A1B (5'-GGT TCC CTG AGC CCC GAC ACG-3')^{12,15,16,17,18} โดยมีส่วนประกอบของ แต่ละหลอดทดลองที่ใช้ทำพีซีอาร์ดังนี้คือ ปริมาตรรวม ทั้งหมด 25 μ L ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.01 % gelatin, 3.0 mM $MgCl_2$, 50% glycerol, 15 pmole/ μ L ของ primer แต่ละชนิด, 200 μ M dNTPs, 1 unit/ μ L *Taq* DNA polymerase (Promega Co., Madison, USA) ทำ PCR โดยเครื่อง PCR รุ่น 2400 (Perkin Elmer Cetus Co., Norwalk, USA) ซึ่งมี PCR cycles ประกอบด้วย denaturation ที่ 94 °C 3 นาที ในรอบแรก และ 1 นาทีใน 30 รอบที่เหลือ, annealing ที่ 55 °C เป็นเวลา 1 นาที extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที และ 10 นาที ในรอบสุดท้าย และแยก PCR products โดย 1.5 % agarose gel electrophore-

sis อ่านผลโดยตรงจาก UV- transilluminator โดยพบว่า ผู้ที่เป็นพาหะ α -thalassemia (SEA-type) จะให้ PCR products 2 ขนาดที่แตกต่างกันคือ 314 bp และ 660 bp โดย primer A7 + A1B ใช้ตรวจหา normal DNA ให้ PCR product ขนาด 314 bp และ primer A7 + A9 ใช้ตรวจหา SEA deletion ให้ PCR product ขนาด 660 bp

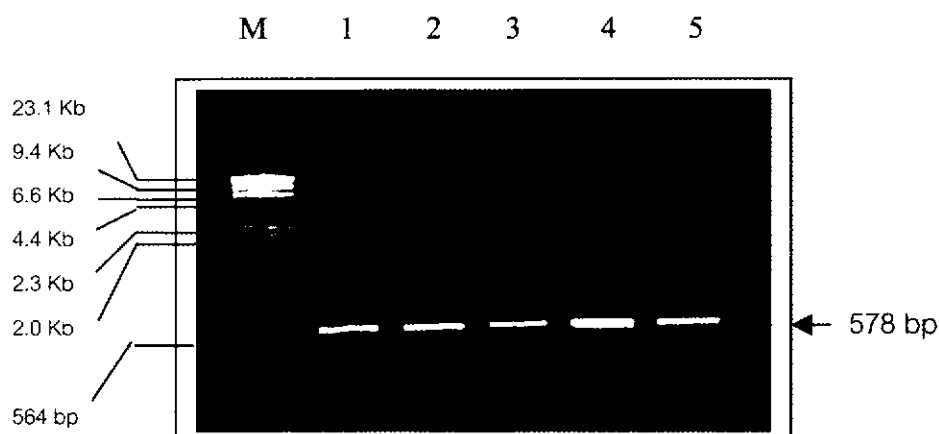
ผลการศึกษา

1. ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ DNA ที่เตรียมได้จาก whole blood cell lysate

จากการนำ DNA ที่เตรียมได้จาก whole blood cell lysate ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่นแสงที่ ความยาวคลื่นแสง 260/280 nm พบว่า ตัวอย่างทุกราย มีดีเอ็นเอ และมีความบริสุทธิ์เพียงพอ สามารถนำไป วิเคราะห์ด้วยพีซีอาร์ต่อไปได้ (โดยเฉลี่ยสัดส่วนของ ความยาวคลื่นแสงที่ 260/280 nm เท่ากับ 1.2)

2. การตรวจแอมมาโกลบินีน

การตรวจยีนโปรโมเตอร์ของ γ -globin gene ในการศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกตัวอย่างที่ได้สกัด cell lysate แบบสุ่มที่ไม่เกี่ยวข้องกันทางสายเลือดจำนวน 5 ตัวอย่าง มาใช้เพื่อเป็น template ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี พีซีอาร์เพื่อตรวจหายีนโปรโมเตอร์ของ γ -globin gene ซึ่งผลการทำพีซีอาร์ให้ PCR product ขนาด 578 bp ทุกตัวอย่างที่ได้เลือกมา แสดงให้เห็นว่า cell lysate ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปเป็น template ในการตรวจหายีนโปรโมเตอร์ของ γ -globin gene ด้วยวิธีพีซีอาร์ (รูปที่ 1)

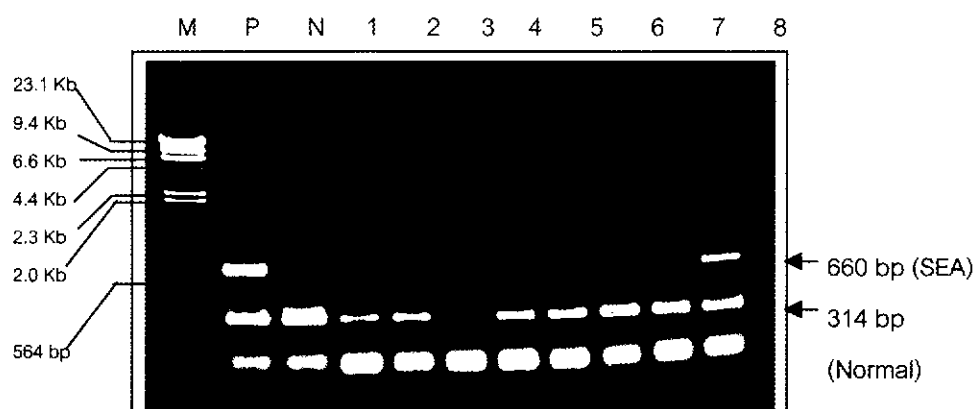


รูปที่ 1 Identification of the promoter of α -globin gene by direct PCR on whole blood cell lysates. Lanes 1 – 5 are 5 unrelated random samples collected in EDTA. The 578 bp indicates the PCR product of the promoter of α -globin gene (from – 564 to +14 bp of the α -globin gene). M represents the λ Hind III size markers. Samples 1-5 found to be positive with the α -globin gene.

3. การตรวจยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA-type)

ผลการตรวจยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA-type) ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ cell lysate จำนวน 8 ตัวอย่าง ที่เลือกมาและไม่เกี่ยวข้องกันทางสายเลือด ซึ่งให้ผลบวก

ต่อการตรวจกรองด้วย KKU-OF โดยใช้ primer 3 ชนิดคือ A7, A9 และ A1B พบว่า 8 ตัวอย่างที่เลือกมาเป็นพาหะ อัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA-type) 1 ราย ส่วน 7 ราย ตรวจไม่พบยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA-type) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 Identification of α -thalassemia 1 by direct PCR on whole blood cell lysates. Lanes 1 – 8 are 8 unrelated samples positive with KKU-OF test collected in EDTA. The 660 – and 314 – bp indicate an α -thalassemia 1 (SEA) and normal specific fragments, respectively. P and N show the result with positive and negative control DNA, respectively. M represents the α /Hind III size markers. Sample 8 is found to be heterozygote for the SEA deletion of α -thalassemia 1.

4. ผลของการใช้ KKU-OF test ร่วมกับการตรวจ ยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ DNA ที่สกัด จาก whole blood cell lysate

ตัวอย่างจำนวน 25 รายที่ให้ผลบวกกับ KKU-OF test หลังจากที่ได้เตรียม cell lysate และได้นำไปตรวจ ยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA-type) โดยวิธีพีซีอาร์พบว่า 4 รายเป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย (SEA-type) ส่วน 25 รายที่ให้ผลลบกับ KKU-OF test ตรวจไม่พบยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA-type)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

พาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (SEA-type) พบได้บ่อย ในประเทศไทยถึงร้อยละ 20 ถึง 30² ซึ่งถ้าผู้ที่เป็นพาหะ อัลฟาธาลัสซีเมีย 1 แต่งงานกับพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ด้วยกันทำให้มีโอกาสให้กำเนิดบุตรเป็นโรคโธโมซิกัส อัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (ฮีโมโกลบินบาร์ทไฮดรอฟฟีทาลิส ซินโดรม) ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดที่มีอาการรุนแรง มากที่สุด³ ในการวินิจฉัยพาหะอัลฟาธาลัสซีเมียในปัจจุบัน ต้องใช้วิธีตรวจวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอเพียงอย่างเดียว เพราะการตรวจอย่างอื่นให้ผลไม่จำเพาะ⁴ อย่างไรก็ตาม การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อวินิจฉัยพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย ต้องสกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวเพื่อใช้เป็นตัวตั้งต้น (template) ในการทำพีซีอาร์^{4,5} ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอจาก เม็ดเลือดขาวด้วยวิธีมาตรฐาน ต้องใช้สารเคมีหลายตัว ใช้เวลานานในการสกัด ไม่เหมาะกับการตรวจใน ประชากรหมู่มาก ดังนั้นในรายงานวิจัยครั้งนี้ จึงได้พัฒนา วิธีสกัด cell lysate จากเลือดรวม ซึ่งใช้เป็น template เพื่อวินิจฉัยพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 โดยใช้น้ำยาเพียง 2 ตัว น้ำยาตัวแรกประกอบด้วย 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA, pH 7.4 เป็นน้ำยาที่ใช้ทำลาย เม็ดเลือดแดง (lysis buffer) และน้ำยาตัวที่สองประกอบด้วย 0.67 mM Tris HCl, 0.07 mM EDTA, pH 7.5 ซึ่งใช้กับ cell lysate ก่อนที่จะนำ genomic DNA ใน cell lysate มาเป็น template เพื่อตรวจต่อไป ซึ่งในการสกัด cell lysate ในการศึกษานี้ มีขั้นตอนในการสกัดที่ง่าย เสียเวลาน้อย เหมาะสำหรับการตรวจกรองหาพาหะอัลฟาธาลัสซีเมียในประชากรหมู่มาก ในการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยได้ใช้ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครที่เข้ารับการ

ตรวจเลือดในโครงการตรวจคัดกรองหาธาลัสซีเมียใน สภากาชาดวิทยาการศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิม พระเกียรติปี 2546 จำนวน 50 ตัวอย่าง ซึ่งคณะผู้วิจัย ได้ใช้น้ำยา KKU-OF test เพื่อคัดกรองหาพาหะ อัลฟาธาลัสซีเมีย^{13,14} โดย 25 รายที่ให้ผลบวกกับ KKU-OF test เมื่อนำมาสกัด cell lysate และนำ cell lysate นั้นไปทำพีซีอาร์เพื่อตรวจหาอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 พบว่า ให้ผลบวกต่ออัลฟาธาลัสซีเมีย 1 จำนวน 4 ราย ให้ผลบวก ต่อพาหะฮีโมโกลบินอี 3 ราย แสดงให้เห็นว่า KKU-OF test สามารถให้ผลบวกกับพาหะฮีโมโกลบินอี ซึ่งคล้ายกับ งานวิจัยที่มีผู้รายงานมาแล้ว⁽¹⁴⁾ 25 รายที่เหลือที่ให้ผลลบ กับ KKU-OF test ไม่มีอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ซึ่งทุกราย ยืนยันด้วยการเตรียมดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานเพื่อเป็น template แล้วนำไปทำพีซีอาร์เพื่อตรวจหาอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 โดยให้ผลตรงกันกับการใช้ cell lysate ที่พัฒนาขึ้นมาในการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การเตรียม cell lysate ด้วยน้ำยา 2 ชนิดของการศึกษา ในครั้งนี้ สามารถได้ตัวตั้งต้น (template) ที่บริสุทธิ์ เพียงพอทดเทียบกับการเตรียม template ด้วยวิธี มาตรฐาน ซึ่งก่อนที่จะนำ cell lysate ที่เตรียมได้จากการ ศึกษาในครั้งนี้มาตรวจหาอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ cell lysate ที่พัฒนาขึ้นมา โดยได้นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ไปวัดค่า ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 nm พบว่าทุกราย ที่ได้เตรียม DNA จาก whole blood cell lysate ได้ DNA ที่บริสุทธิ์เพียงพอสามารถนำมาใช้เพื่อเป็น template เพื่อนำมาตรวจหาอื่นต่าง ๆ ด้วยวิธีพีซีอาร์ได้ จากนั้น เพื่อให้แน่ใจมากขึ้นว่า DNA ที่เตรียมในครั้งนี้มีความ บริสุทธิ์เพียงพอต่อการทำพีซีอาร์หรือไม่ คณะผู้วิจัย ได้เลือก DNA ที่เตรียมจาก whole blood cell lysate จำนวน 5 ตัวอย่างแบบสุ่มเพื่อเป็น template ในการเพิ่ม จำนวนดีเอ็นเอบริเวณโปรโมเตอร์ของ γ - globin gene ซึ่งเป็นยีนที่ใช้เป็น internal control ในการตรวจหา ยีนธาลัสซีเมีย¹⁷ โดยโปรโมเตอร์ของ γ - globin gene เป็นยีนที่มีส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์เบสที่เหมาะสม สำหรับใช้ทดสอบ DNA template ที่เตรียมมาจาก เลือดครบส่วนด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่าทั้ง 5 รายที่เลือกมา สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ได้ (แสดงใน

รูปที่ 1) ซึ่งต่อมาได้นำ cell lysate ไปตรวจหาฮีโมโกลินอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเลือกตัวอย่าง cell lysate แบบสุ่มที่ให้บวกกับการตรวจกรองด้วย KKU-OF test จำนวน 8 รายพบว่า มี 1 รายเป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ส่วน 7 รายที่เหลือตรวจไม่พบฮีโมโกลินอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า การใช้ cell lysate เพื่อใช้เป็น template สำหรับทำพีซีอาร์ ร่วมกับการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียด้วย KKU-OF เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้เป็นวิธีการเพื่อตรวจหาฮีโมโกลินอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ซึ่งช่วยให้การควบคุมและป้องกันโรคฮีโมโกลินอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (ฮีโมโกลินบาร์ทไฮดรอฟีทาลัสซินโดรม) ของประเทศไทย และประเทศในกลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ให้ได้ผลต่อไป

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการวิจัยในครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาความคงตัวของ cell lysate ที่สกัดได้ ทำให้ไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่า cell lysate ที่สกัดได้มีความคงตัวได้นานเพียงใด และตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนน้อย และควรมีการทดลองโดยการนำน้ำยาไปใช้เพื่อตรวจหาพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ในประชากรหมู่มากกว่านี้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ บุษบา มาตระกูล คณะบดีคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่ให้กำลังใจและให้คำแนะนำด้วยดีเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassaemia Syndromes. 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1981.
- Wasi P, Pootrakul S, Pootrakul P, Pravatmuang P, Fucharoen S. Thalassaemia in Thailand. Ann NY Acad Sci 1980; 344: 352-63.
- วิจารณ์ พานิช. การควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย. ใน: สุพล อิศรไกรศิลป์. บรรณาธิการโลหิตวิทยา: การประชุมวิชาการประจำปีสมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 5, 28 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์ 2534.
- สุพรรณ พุเจริญ, กุลนภา พุเจริญ. ธาลัสซีเมียและพาหะการตรวจการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. สมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย. Current Practice in Hematology 1997; 76-93.
- วิชัย บุญแสง, อัญชลี ทศนาขจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรา สิทธิจิตกรรัตน์ และ สกล พันธุ์ยิ้ม. ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล พิมพ์เรียบเรียงครั้งที่ 1, กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ สวทช NSTDA, 2541.
- ยุทธนา เฟื่องแจ่ม. การเตรียมจีโนมิกดีเอ็นเอจากเลือดรวมด้วยวิธีใหม่. มฉก. วิชาการ 2545; 11: 9 – 17.
- Mercier B, Gaucher C, Feugeas O, Mazurier C. Direct PCR from whole blood without DNA extraction. Nucleic Acid Res 1990; 18: 5908-13.
- Nishimura N, Nakayama T, Tonoike H, Kojima K, Kato S. Direct polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. Ann Clin Biochem 2000; 37: 674-80.
- Nordvag BY, Husby G, Raafat el-Gewaly M. Direct PCR of washed blood cells. Biotechniques 1992; 12: 490-3.
- De Vries J, Wijnen P, Hamulyak K, Van Dieijen-Vessier MP, Beakers O. PCR on cell lysates obtained from whole blood circumvents DNA isolation. Clin Chem 2001; 47: 1701-2.
- Beakers O, de Vries J, Wijnen P, Op den Buijsch R, van Dieijen-Visser MP. Use of cell lysate in real – time PCR application. The 18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine October 20–25, 2002 (poster presentation); 116.
- Panyasai S, Sringam P, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. A simplified screening for α -thalassaemia 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: 74-8.
13. สุพรรณ ฟุเจริญ, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, กุลนภา ฟุเจริญ, ณัฐยา แซ่ฮึ้ง. ชุดน้ำยาตรวจกรองฮีโมโกลบิน อีอย่างง่าย และรวดเร็ว : KKU-DCIP-Clear. กรมทรัพย์สินทางปัญญาเลขที่คำขอสิทธิบัตร 043038 มีนาคม 2541.
 14. กุลนภา ฟุเจริญ, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, ณัฐยา แซ่ฮึ้ง, สุพรรณ ฟุเจริญ. ฮีโมโกลบินอีและธาลัสซีเมีย ที่ตรวจพบในประชากรทั่วไปมหาวิทยาลัยขอนแก่น. วารสารวิจัย มข. 2543; 5: 61-9.
 15. Fucharoen G, Fucharoen S. Rapid and simultaneous non-radioactive method for detecting α -thalassemia 1 (SEA type) and Hb Constant Spring genes. Eur J Haematol 1994; 53: 186-7.
 16. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Sae-ung N, Sae-ue N, Baisungneon R, Jetsrisuparb A, Fucharoen S. Molecular and hematological characterization of Hb E heterozygote with α -thalassemia determinant. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1997; 28 (suppl 1): 100-3.
 17. Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairoam V, Siriboon W, Siritanaratkul N, Kanokpongsakde S, Vantasiri C. Prenatal diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies in Thailand: Experience from 100 pregnancies. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991; 22: 16 – 29.
 18. Fucharoen G, Fucharoen S, Wanhakit C, Srithong W. Molecular basis of α^0 -thalassemia in northeast of Thailand. Southeast Asian J Trop Med Pub Health 1995; 26 (suppl 1); 246-8.