บทความทั่วไป

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) และ DNA Polymorphisms

ทรงยศ อนุชปรีดา*

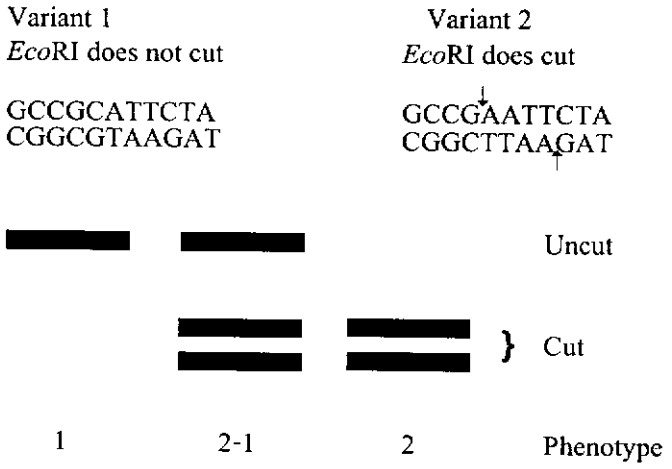
Polymorphisms เกิดขึ้นได้อย่างไร?

การเกิดการผ่าเหล่า (mutation) และการคัดเลือก (selection) มีบทบาทสำคัญต่อวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ในการวัดอัตราการเกิดการผ่าเหล่าส่วนใหญ่จะวัดจาก phenotype ที่ปรากฏในทางที่เป็นโรค เช่นโรคทางพันธุกรรมต่างๆ แต่โดยความจริงแล้วการผ่าเหล่าที่ให้ผลปรากฏในทางพันธุกรรมนั้นเป็นเพียงส่วนน้อย ยังมีการผ่าเหล่า ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่แล้วทำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรม โดย genotype ที่เปลี่ยนไปไม่แสดงความผิดปกติของ phenotype กลุ่มประชากรนี้เรียกว่ามีความหลากหลายในรูปแบบหรือ polymorphism นั่นเอง ความผันแปรทางพันธุกรรมที่มีผลทำให้ phenotype แตกต่างไปมากกว่า phenotype ปกตินี้มีโอกาสเกิดขึ้นได้บ่อยในประชากร ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกแบบสะเทิน (selective neutral) ในขณะที่การผ่าเหล่าที่มีผลต่อดีเอ็นเอทำให้ phenotype ที่ไม่ดีเป็นโรคทางพันธุกรรม มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยหรือยาก นอกจากนั้นยังพบว่าการผ่าเหล่ามีผลทำให้เกิดการผันแปรทางพันธุกรรมนี้โดยส่วนน้อยเท่านั้น ที่เกิดกับดีเอ็นเอบริเวณ ที่เรียกว่ายีนที่เป็นรหัสสำหรับโปรตีน แต่มีโอกาสเกิดมากตรงส่วนที่ไม่ได้ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน (บริเวณ extragenic หรือไม่เป็นรหัส) จึงนำมาซึ่งความเป็น polymorphism ในหมู่ประชากร (genome มนุษย์มีบริเวณที่ยีนที่เป็นรหัสสำหรับโปรตีนเพียง 10% โดยส่วนที่ไม่เป็นรหัสมีมากถึง 90% ของ genome)[1]

ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดพบว่า มักจะเกิดความหลากหลายของการเปลี่ยนแปลงในสายของดีเอ็นเอ ใน genome มนุษย์ เราพบว่า genome ส่วนใหญ่ไม่ได้ถูกแปลเป็นโปรตีนทั้งหมด โดยการเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นเนื่องจากการผันแปรนี้ ในบางครั้งจึงไม่มีผลกระทบต่อมนุษย์ จากการศึกษาการเกิดการเปลี่ยนแปลงใน genome มนุษย์พบว่า สามารถเกิดได้ทุกๆ 200 นิวคลิโอไทด์ หรือบ่อยกว่าการเกิดการผันแปรในสายดีเอ็นเอนี้ เราเรียกว่า DNA polymorphisms ซึ่งอาจมีผลต่อบริเวณจุดตัดเฉพาะของ restriction enzyme ที่เรียกว่า restriction-enzyme recognition site ได้ การเกิดการเปลี่ยนแปลงของบริเวณนี้ทำให้เอ็นไซม์ไม่สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ ทำให้เกิดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใหญ่กว่าปกติ (large fragment) จากปกติจะได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจากการตัดด้วย restriction enzyme จะได้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอจำนวน

*ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2 ชิ้นที่เล็กกว่า การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ไปมีผลต่อโครงสร้างของดีเอ็นเอ ที่ถูกใช้เป็น molecular markers หลายชนิดในการศึกษา Phenotypic markers ที่ใช้ในการทำแผนที่ยีน (gene mapping) โดยใช้วิธีการตรวจสอบที่เรียกว่า Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) เป็นตัวศึกษา (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงวิธีการที่เรียกว่า Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs)

เมื่อมี DNA Polymorphism เกิดขึ้น แล้วบริเวณที่มีความหลากหลายนี้อาจอยู่ในส่วนที่เป็นจุดตัดจำเพาะ ทำให้ restriction enzyme สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวขาดได้ หรืออาจตัดไม่ได้ ใน genome ของต่างบุคคลกันทำให้ขนาดของชิ้นส่วน RFLP ที่บริเวณตำแหน่งเดียวกันของดีเอ็นเอใน genome เป็นขนาดที่หลากหลายกัน การเกิด mutation ที่ตรวจพบโดย RFLP ได้คือ mutation ชนิดแทนที่ (substitution), ขาดหายไป (deletion) และแบบแทรก (insertion)

ความผันแปรทางพันธุกรรมที่ดีเอ็นเอบริเวณไม่แปลรหัส เนื่องด้วยบริเวณไม่แปลรหัส กำหนดโปรตีนของ Genome ย่อมไม่มีผลิตผลที่เป็นโปรตีนเกิดขึ้น ดังนั้นจากการตรวจความผันแปรทางพันธุกรรมในบริเวณนี้ต้องตรวจที่ระดับของโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยตรง ซึ่งเป็นเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล เรียกเทคนิคนี้ว่า Southern blot เป็นการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอใน genome ให้เล็กลงแล้วแยกท่อนดีเอ็นเอต่างๆขนาด โดยวิธี gel electrophoresis ตามด้วยการทำ probe hybridization ตรวจหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็น polymorphism เรียกว่าท่อน RFLP

ดังที่ได้ทราบมาแล้วว่าส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ยีนมีมากกว่า 90% ของ genome และบริเวณนี้จากการศึกษาแล้ว ได้พบสัดส่วนของความเป็น polymorphism ที่ตำแหน่งต่างๆ เกิดได้สูงเป็น 1 ใน 270 คู่เบสของทุกๆ ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สุ่มมาศึกษา ในขณะที่บริเวณที่เป็นเนื้อยีนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนนั้นมีโอกาสเกิดได้เพียง 1 ใน 2,500 คู่เบส เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะบริเวณดีเอ็นเอที่เป็นยีนต้องผ่านการคัดเลือกเฉพาะรูปแบบที่เหมาะสมในการอยู่รอดให้มากที่สุด จึงทำให้

mutation ที่ถูกกรองตลอดเวลาวิวัฒนาการเหลือรูปแบบให้เห็นน้อยลง ในขณะที่ส่วนดีเอ็นเอที่ไม่เป็นยีน ไม่มีส่วนหรือมีน้อยในการถูกคัดเลือก จึงยังปรากฏผลของ mutation ในรูปของ polymorphism สูง

การเกิด polymorphisms อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เป็นแบบเกิดขึ้นเอง (spontaneous) และอาจจะเกิดเป็นแบบการผ่าเหล่า ขึ้นได้ในสายดีเอ็นเอ ซึ่งบางครั้งอาจไปมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นในกระบวนการทางชีวเคมีของร่างกาย ทำให้เกิดพยาธิสภาพได้ และในบางครั้งถ้าเกิดในส่วนที่เป็น noncoding sequence หรือส่วน intron ของยีนก็จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่สังเคราะห์ออกมา แต่ในส่วนของการศึกษา genetic marker การเกิด polymorphisms ในมนุษย์มักจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงเบสเดียวที่เรียกว่า single-base changes เช่น CpG dinucleotide sites ซึ่งเป็นจุดที่สำคัญเรียกว่า "hot spots" และเป็นบริเวณที่มีการกระจายตัวอยู่ทั่วไปแบบ repeating units ประมาณ 100 repeating units และถูกตัดโดย restriction enzyme ได้เป็นส่วนเล็กๆ ประมาณ 14-70 base pairs ในปัจจุบันนี้ถ้าชิ้นส่วนที่ถูกตัดมีขนาดน้อยกว่า 200 base pairs เราสามารถที่จะตรวจสอบได้โดย PCR โดยใช้ probe ที่เป็น primers เมื่อทำการตรวจสอบแล้วเราพบว่าแต่ละ repeating unit จะห่างกันประมาณ 40 Kb ส่วนของ primer ที่ใช้นั้นมักจะเป็นบริเวณที่เป็น repeating unit เช่นกันซึ่งไม่ใช่ repeating unit ของ restriction site[2]

Single nucleotide polymorphism (SNP)

หนึ่งในวัตถุประสงค์ที่สำคัญของการศึกษาทางพันธุกรรม คือการศึกษาการเกิด sequence variations ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทางพันธุกรรม (Heritable phenotypes) กลวิธีในการศึกษามักจะเป็นแบบ linkage analysis ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ทางพงศาวลี (pedigree analysis) และดูการกระจายของการเกิดโรคในครอบครัวเดียวกัน ซึ่งประสบความสำเร็จในการศึกษาในโรคที่เป็น Mendelian disorders เมื่อไม่นานมานี้เองได้พบวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่มีชื่อเรียกว่า Single nucleotide polymorphisms (SNPs) และเป็นที่นิยมกันมาก โดยทั่วไปแล้ว nucleotide polymorphism จะแสดงออกอย่างน้อย 1% ของ human population เรียกว่า SNPs โดย SNPs เป็น DNA sequence variations ที่พบเป็นปกติโดยทั่วไปในเส้นสายของดีเอ็นเอ โดยสามารถเกิดได้ทุกๆ 100-300 bases

นักวิจัยได้พยายามมองหาความสัมพันธ์ระหว่างโรค กับความแตกต่างของ specific sequences ในประชากรที่เกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอในคนที่เป็นโรคและมีความจำเพาะสูง ถ้านำตัวอย่างของดีเอ็นเอมาตรวจแบบสุ่มในประชากรหลายๆ กลุ่มที่แตกต่างกัน แล้วสามารถตรวจสอบได้ ไม่ใช่เป็นการตรวจสอบเฉพาะในกลุ่มของครอบครัวที่มีอุบัติการณ์ในการเกิดในหลายๆ generations เท่านั้น ต้องสามารถนำมาใช้เพื่อการตรวจสอบโดยทั่วไปได้ และสามารถพบ sequence นี้ได้ในประชากรโดยทั่วไปได้ด้วย ดังนั้นนักวิจัยจึงต้องวิเคราะห์หายีน ที่ตอบสนองต่อโรคนั้นๆ เพื่อที่จะหา high frequency ของ SNPs และมีโอกาสสูงที่จะทำให้เกิดโรค ในอนาคตอันใกล้นี้มีความเป็นไปได้ที่จะวิเคราะห์พื้นฐานทางพันธุกรรมของโรคที่ค่อนข้างซับซ้อนด้วย เช่น มะเร็ง, cardiovascular disease, mental illness, autoimmune states และเบาหวาน โดยทราบกันว่าจำนวนของ polymorphisms สามารถประเมินความเป็นไป

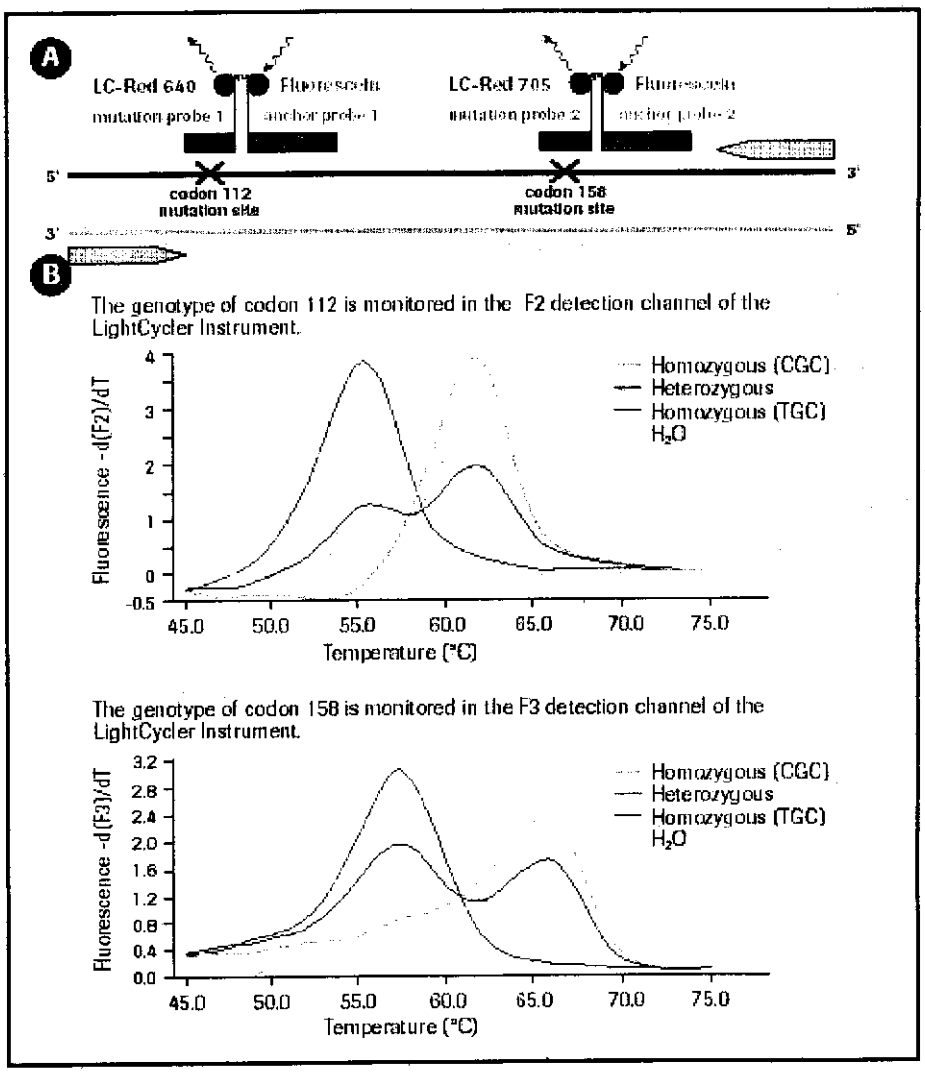
ของโรคได้ มีโรคบางชนิดที่ทราบ polymorphisms ซึ่งมีประโยชน์มาก และมีความสัมพันธ์กับความรู้เดิมที่มีอยู่แล้ว ตัวอย่างเช่น E4 genotype ของยีน human apolipoprotein E ที่เกี่ยวข้องกับ lipid disorders จากรายงานที่เคยศึกษามาพบความสัมพันธ์ระหว่าง Apo E genotype กับการเกิด Alzheimer's disease ยิ่งไปกว่านี้นักวิทยาศาสตร์ได้พบว่า polymorphisms ของ Apolipoprotein E gene อาจทำให้เกิดผลตามมาหลายๆ อย่าง หลังจากเกิด traumatic brain injury และ intracerebral hemorrhage

ดังนั้นจากความเข้าใจกลไกการเกิดโรคในมนุษย์ อาจมีการควบคุมโดยยีนจำนวนมากมาย ทำให้หลายๆบริษัทที่ผลิตยามีความต้องการและสนใจเกี่ยวกับ SNP libraries ที่สำคัญเพื่อที่จะช่วยในการตรวจสอบ หรือวินิจฉัยยีนที่เกี่ยวข้องกับ drug metabolism ตัวอย่างหนึ่งที่เป็นการนำเอา SNP มาใช้คือ SNP Consortium (TSC) ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันของบริษัทผลิตยาจำนวน 10 บริษัท โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างและจำหน่ายให้กับสาธารณชนโดยมี SNP ประมาณ 300,000 ตัวด้วยกัน นอกจาก SNP จะเกี่ยวข้องกับ drug metabolism แล้วยังพบว่า SNP ยังเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงของการเกิดโรค จากความรู้ที่ว่า SNPs มีความสำคัญต่อความเข้าใจในกระบวนการเกิดและการดำเนินโรค และมีบทบาทที่สำคัญของยีนมาเกี่ยวข้อง ในอนาคตการนำเอา SNPs มาใช้เพื่อพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ และเพื่อป้องกันการเกิดโรค รวมทั้งการรักษาโรคจะมีมากขึ้น[2]

ปัจจุบันได้มีการนำเอา LightCycler system มาใช้เพื่อการตรวจสอบ SNPs ซึ่ง LightCycler® เป็นเครื่องมือที่สามารถทำงานได้ทั้ง DNA amplification และ Real-time, on-line detection ของ PCR product ในเครื่องเดียวกัน ดังนั้นทำให้ทราบปริมาณที่ถูกต้อง ซึ่งเหมาะกับการนำมาใช้ตรวจสอบ และศึกษา genotype ของ Single nucleotide polymorphisms ในระหว่างการทำ PCR จะมีการ amplify DNA fragment โดยใช้ specific primers จาก human genomic DNA ตรวจสอบ amplicon โดยใช้ hybridization probes เฉพาะที่ติดฉลากด้วยสาร fluorescence ซึ่ง hybridization probes จะประกอบด้วย oligonucleotides ที่แตกต่างกัน 2 ตัว ที่ hybridize ต่อจาก internal sequence ของ amplified fragment ระหว่าง annealing phase ของ PCR cycles ในระบบนั้น probe อีกตัวหนึ่งจะติดฉลากที่ปลาย 5'-end ด้วย LightCycler-Red fluorophore (LightCycler-Red 640 หรือ LightCycler-Red 750) และทำการปรับเปลี่ยนที่บริเวณปลาย 3'-end โดยการทำ phosphorylation ไว้ เพื่อเลี่ยงการเกิด extension ส่วน probe อีกตัวหนึ่งจะติดฉลากที่ปลาย 3'-end ด้วยสาร fluorescein หลังจากการ hybridization แล้วพบว่า template DNA จะมี probes เพียง 2 ตัวที่อยู่ใกล้กัน ทำให้เกิด fluorescence resonance energy transfer (FRET) ระหว่าง fluorophores 2 ชนิด ในระหว่าง FRET ซึ่งเป็นสาร fluorescence นั้น donor fluorophorer จะถูกกระตุ้นด้วย Light source ของเครื่อง LightCycler ส่วนของพลังงานที่เกิดจากการกระตุ้น (excitation energy) จะส่งผ่านไปยัง LightCycler-Red ซึ่งทำหน้าที่เป็น acceptor fluorophore ตรวจวัด fluorescence LightCycler-Red fluorophore ที่เปล่งออกมาด้วย fluorescence detector

Hybridization probes ยังสามารถใช้เพื่อการวิเคราะห์ genotype ได้โดยการพิจารณาจาก melting curve analysis หลังจากการ amplifica-

tion cycle เรียบร้อยแล้ว และ amplicon จะถูก formed ให้อยู่ในรูปของ melting temperature (Tm) ของ heteroduplex ประกอบด้วย hybridization probe และ Single-stranded target DNA sequence ซึ่งจะขึ้นกับปริมาณ GC content, ความยาว (Length), ระดับของ homology และ sequence[3] หนึ่งในสองของ hybridization probes จะครอบคลุมบริเวณที่เกิดการผ่าเหล่า (เป็น mutation probe) และมีค่า Tm ที่ต่ำกว่า probe อีกตัวหนึ่ง ซึ่งทำหน้าที่เป็น anchor probe เท่านั้น (รูปที่ 2) hybridization probe/DNA hybrids ประกอบด้วย mismatch melt ที่ Tm ต่ำกว่า perfectly matched probes ดังนั้น wild type, mutant และ heterozygous genotypes จะมีความแตกต่างของ melting temperatures ซึ่งทำให้ LightCycler solfware แปลค่าออกมาเป็นค่า melting peaks



รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างของ SNP genotype 2 สี ที่ใช้ในการตรวจสอบ ApoE mutation ด้วยเครื่อง LightCycler (A) เป็นรูปที่แสดง PCR fragment และ PCR primers ที่มีลักษณะเป็น anchor probes และ mutation probes (B) การแยกความแตกต่างของ genotype ที่ codon ที่ 112 และ 158 ของ Apo E sequence กับการวิเคราะห์ melting curve

การประยุกต์ใช้ SNPs

1. ทางด้าน Pharmacogenetics

ทางด้าน Pharmacogenetics เป็นการศึกษายีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการกระตุ้นด้วยยา SNPs และความหลากหลายที่เกิดขึ้นเนื่องจากเอ็นไซม์ในกระบวนการทางเมแทบอลิสมของยา (drug metabolism enzyme) ที่เกี่ยวข้องกับผลข้างเคียงจากการใช้ยารักษา ในส่วนของเอ็นไซม์ human cytochrome P-450 (CYP) superfamily เป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเมแทบอลิสมของกระบวนการ procarcinogenesis เพื่อให้เกิดผลผลิตที่เป็นสาร carcinogen ที่มีศักยภาพออกมา วิธีการตรวจสอบอย่างรวดเร็วและน่าเชื่อถือ ได้มีการทำโดยเริ่มจากการศึกษา genotyping CYP1 codon 432-Polymorphisms ด้วย LightCycler

การเกิดการเปลี่ยนแปลงใน Drug acetylation เนื่องจากมีการควบคุมการแสดงออกทางพันธุกรรมของเอ็นไซม์ N-acetyltransferase2 (NAT2) หลายๆ polymorphisms ในยีน NAT2 และปัจจุบัน ได้มีชุดน้ำยาที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิดการกลายพันธุ์ออกจำหน่าย จะตรวจสอบ 4 polymorphisms หลักที่เกิดกับยีนของเอ็นไซม์ NAT2 โดยใช้ primer pairs 2 ตัวด้วยกันในแต่ละจุด ซึ่งจะทำการ amplify ให้ครอบคลุมส่วนที่เกิด polymorphism

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), Thymidylate synthase (TS) และ Thymidine phosphorylase (TP) จะเกี่ยวข้องกับ Fluoropyrimidine metabolism และควบคุมระดับของ 5-FU ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัด โดยการกลายพันธุ์ในเอ็นไซม์เหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของเอ็นไซม์หลายจุด และผลความสำเร็จในการรักษาด้วย

2. ทางด้านความผิดปกติของกระบวนการทางเมแทบอลิสม (Metabolic disorders)

ความสามารถของ LightCycler system ในการวิเคราะห์อย่างรวดเร็ว ของระบบการวิเคราะห์ mutation ในโรคทางพันธุกรรมแบบ inherited metabolic disease ได้มีการศึกษาและวิจัยสำหรับ Fabry disease ซึ่งเป็น X-linked recessive disorder เกิดจากความผิดปกติของ α-galactosidase สามารถใช้ hybridization probes และการวิเคราะห์ด้วย melting curve ประกอบกันได้ บริเวณ 2 bp ที่เกิด deletion mutation นี้เป็น genomic DNA ของ Fabry disease ได้ประสบความสำเร็จในการตรวจสอบและสามารถใช้ในการตรวจสอบความผิดปกติของเอ็นไซม์ carbamyl-phosphate synthase I (CPS1) ซึ่งเป็น autosomal recessive disorder เป็นสาเหตุของการเกิดความบกพร่องของการทำงานของ CPS1 ในตับ ถึง 9 bp deletion ที่แตกต่างกัน โดยใช้ SYBR Green I detection format และทำการวิเคราะห์ melting curve

ในส่วนของ Point mutation 2 ตำแหน่งคือ Cys282Tyr และ His63Asp ใน human hemochromatosis gene (HFE) ทำให้เกิดโรค hereditary hemochromatosis (HH) ซึ่งเป็น autosomal recessive iron-loading syndrome โดยพบ homozygous Cys282Tyr mutation ได้ถึง 80-100% ของ case ทั้งหมด

Protease inhibitor1 (α1-antitrypsin; AT) เป็น serum inhibitor หลักของ proteolytic enzymes ใน AT deficiency เช่น neutrophil elastase สามารถทำลายเนื้อเยื่อปอด ทำให้เกิด pulmonary emphysema โดยชนิดที่สำคัญ 3 ชนิดคือ type M (90% ของ population ทั้งหมด) Type S (Pi*S) และ Type Z (Pi*Z)[4] primers

ที่ใช้ในแต่ละ mutation จะเป็น Pi*S และ Pi*Z alleles ที่ถูกออกแบบเพื่อ amplify ออกมาเป็น product ขนาด 238 และ 253 bp และ hybridization probe pairs จะเป็น homologous กับ wild type sequence ที่ถูกนำมาใช้เพื่อทำ genotyping[5]

3. ทางด้านโรคที่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรม (Disease-associated applications)

สาเหตุของการเกิด Inherited thrombophilia ที่เกิดกับประชากร Caucasian คือ point mutations ในยีนของ Factor V และ prothrombin (Factor II)

C677T point mutation ในส่วนของยีน methylenetetrahydrofolate (MTHFR) ซึ่งจะมีความเสี่ยงมากกว่า 90% ที่เกิด resistance กับ activated protein C (APC-resistance) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ thrombophilia และมีความสัมพันธ์กับ hetero- หรือ homozygosity ของ single point mutation ในยีน Factor V โดยเบส G จะถูกแทนที่ด้วย A (G to A substitution) ในส่วนของ exon 10 (G1691A) ที่ทราบว่าเป็น Factor V Leiden ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก arginine เป็น glutamine (R506Q) ทำให้ไม่ถูกตัดโดย APC ซึ่งโดยปกติจะ inactivate ใน coagulation factor

บทบาทของ apoprotein E (ApoE) ใน lipid disorders ได้มีการศึกษาและตรวจสอบในส่วนของ ApoE mutation deletion บริเวณที่เป็น point mutation ที่ codon 112 และ 158 ของ ยีน human apolipoprotein E โดยใช้ dual color ในส่วน Apolipoprotein B (ApoB) ที่เป็นสาเหตุของโรค familial hypercholesterolemia, atherosclerosis และ ischemic heart disease ซึ่งเป็น point mutation ของตำแหน่ง C9774T และ G9115A

Monogenic hereditary diseases

Cystic fibrosis (CF) เป็นความผิดปกติแบบ autosomal recessive disorder อย่างหนึ่งของประชากร Caucasian โดยมีอุบัติการณ์ในการเกิด 0.05% และมีส่วนที่เป็น carrier 5% โดยความหลากหลายของโรคเกิดจาก polymorphism ที่เกี่ยวข้องกับ CF โดย mutation ที่พบบ่อยคือ 3 bp deletion ที่มีการ remove เอาส่วนของ Phenylalanine ออกจากโปรตีนที่ codon 508 (F508 del) การเกิด deletion นี้พบได้ 70% ของ mutation ทั้งหมด และ 50% ของ CF ที่เป็น homozygous

Polygenic hereditary diseases

ความผิดปกติหลักที่พบบ่อย เช่น โรคภูมิแพ้, เบาหวาน หรือมะเร็ง จะเกี่ยวข้องกับยีนที่แตกต่างกัน พื้นฐานของยีนที่แตกต่างกันนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับอัตราเสี่ยงในการเกิดเซลล์มะเร็ง แต่จะเกิดขึ้นในระยะ procarcinogenesis และ tumor progression

Point mutation ที่เกิดในหลายๆ ตัวอย่างของยีน ras family จะเกี่ยวข้องกับความหลากหลายของชนิดของมะเร็ง ที่เกิดขึ้น และ N-ras mutation มักจะพบใน hematological malignant มีรายงานการตรวจสอบ N-ras mutation ใน acute lymphoblastic leukemia (ALL)[6] โดย probe ที่ใช้มีความจำเพาะกับบริเวณ hot spot ของการผ่าเหล่าที่ codon ที่ 12, 13 และ 61 ในตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบจำนวน 134 ตัวอย่าง พบว่า Childhood ALL จะถูก screen สำหรับ N-ras mutations และพบ ผลบวกจำนวน 14 ราย ด้วยกัน

ตารางที่ 1 การประยุกต์ใช้ LightCycler(r) เพื่อตรวจสอบความผิดปกติของยีนในโรคต่างๆ

Application area	**Associated gene**
Pharmacogenetics	Cytochrome P450: CYB1B1
	Cytochrome P450: CYP2D6
	N-Acetyltransferase 2 (NAT2)
	Thiopurine methyltransferase (TPMT*3)
Metabolic disorders	Carbamyl-phosphate synthase (CPS1)
	Fabry disease
	Hemochromatosis (HFE)
	Protease inhibitor 1 (α1-antitrypsin; AT)
Disease-associated	Angiotensin converting enzyme (ACE)
	Apolipoprotein B (Apo B)
	Apolipoprotein E (Apo E)
	Factor V
	Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)
	Mitochondrial DNA (MELAS3243)
	Plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)
	Prothrombin (Factor II)
Monogenic hereditary disease	Cystic fibrosis (CF)
	β-Globin (HbC, HbE, and HbS genotyping)
Polygenic hereditary disease	BRCA1
	N-*ras*
	Glycoprotein Ia
Infectious disease	Clarithromycin-resistance associated gene mutations
	Lamivudine resistance associated gene mutations
Others	Human platelet antigen-1 (HPA-1)

เอกสารอ้างอิง

1. อมรา คัมภิรานนท์ 2542 พันธุศาสตร์มนุษย์ บริษัท เทกซ์แอนเจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด ปทุมวัน กรุงเทพ หน้า 308
2. Lohmann S, Lehmann L, Tabiti K. Fast and Flexible Sindle Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System. Biochemica. 2000; 4: 23-8.
3. SantaLucia JJr, Allwai HT, Seneviratne PA. Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability. Biochemistry. 1996; 35: 3555-62.
4. Alanidis C, Nauck M, Schmitz G. High-speed detection of the two common alpha (1)-antitrypsin deficiency alleles Pi*Z and Pi*S by real-time fluorescence PCR and melting curves. Clin Chem. 1999; 45:1872-5.
5. Alanidis C, Schmitz G. Rapid Cycle Real-Time PCR methods and Applications. Springer Verlag, in press.
6. Nakao M, Janssen JWG, Seriu T, Bartram CR. Rapid and reliable detection of N-ras mutations in acute lymphoblastic leukemia by melting curve analysis using LightCycler technology. Leukemia. 2000; 14:312-5.