

การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ยีน *TPMT* ด้วยเทคนิค Multiplex ARMS-PCR ของห้องปฏิบัติการสาขาโลหิตวิทยาและอองโคโลยี โรงพยาบาลศิริราช Development of *TPMT* Gene Analysis using the Multiplex ARMS-PCR Technique in Hematology and Oncology Laboratory, Siriraj Hospital

ปรียนันท์ ศิริประภาภัสส์¹ กชปิณฺชร จันทร์สิงห์¹ และ เจษฎา บัวบุญนำ^{1*}
Preeyanun Siraprapapat¹ Kochpinchon Chansing¹ and Jassada Buaboonnam^{1*}

บทคัดย่อ

ห้องปฏิบัติการสาขาโลหิตวิทยาและอองโคโลยีได้ให้บริการตรวจวิเคราะห์ *Thiopurine S-methyltransferase (TPMT)* variants ด้วยเทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2547 จนถึงปัจจุบัน พบว่ามีความผิดปกติของ *TPMT* variants เกิดขึ้น 4.27% ซึ่งในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จะใช้เวลาค่อนข้างนานต่อการวิเคราะห์ครั้งหนึ่ง รวมทั้งต้องใช้น้ำยา-สารเคมีหลายชนิด

ดังนั้น ห้องปฏิบัติการฯ จึงได้พัฒนาการตรวจวิเคราะห์ *TPMT* variants 4 ชนิด ได้แก่ *2 (238G>C), *3A (460G>A, 719A>G), *3B (460G>A) และ *3C (719A>G) ด้วยเทคนิค multiplex Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction (ARMS-PCR) เพื่อลดระยะเวลาและลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ โดยการสุ่มตัวอย่างของผู้ป่วยที่มีการส่งตรวจวิเคราะห์ *TPMT* variants ด้วยเทคนิค PCR-RFLP จำนวน 150 ราย จากตัวอย่างทั้งหมด 749 ราย นำมาตรวจหา *TPMT* polymorphism ด้วยเทคนิค multiplex ARMS-PCR พบว่าทุกตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค multiplex ARMS-PCR ให้ผลที่สอดคล้องกับการตรวจด้วยเทคนิค PCR-RFLP นอกจากนั้น เทคนิค multiplex ARMS-PCR ยังให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วและช่วยลดค่าใช้จ่ายลงได้มากกว่าการใช้เทคนิค PCR-RFLP

โดยสรุป multiplex ARMS-PCR เป็นการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพและดูเหมือนจะช่วยป้องกันความผิดพลาดจากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่อาจเกิดขึ้นจากเทคนิค RFLP ได้

คำสำคัญ : *TPMT*, *Thiopurine S-methyltransferase*, 6-mercaptopurine

^{1*} สาขาวิชาโลหิตวิทยาและอองโคโลยี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

^{1*} Division of Hematology-Oncology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

* Corresponding Author: e-mail: onco008@yahoo.com

Abstract

The Hematology and Oncology Division, Department of Pediatrics had provided the analysis of *Thiopurine S-methyltransferase (TPMT)* variants using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method since 2004 and the prevalence of such variant was 4.27%. However, this technique seemed to be time-consuming and utilize several reagents.

We, therefore, developed the new analytic method which was considered to be more time-saving and economical using multiplex Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction (ARMS-PCR) to determine 4 variants of *TPMT* gene namely *2 (238G>C), *3A (460G>A, 719A>G), *3B (460G>A) and *3C (719A>G). The results showed that there were 150 samples randomized from all 749 samples to determine *TPMT* polymorphism. Of all samples, the multiplex ARMS-PCR technique yielded the complete concordant results to PCR-RFLP. The multiplex ARMS-PCR technique effectively reduced the cost and operation time compared to PCR-RFLP.

In conclusion, the multiplex ARMS-PCR method provided the concordant results and appeared to be cost and time economical. Additionally, this method seemed to prevent the potential errors related to restriction enzymes during the process of RFLP.

Keywords: TPMT, Thiopurine S-methyltransferase, 6-mercaptopurine

หลักการและเหตุผล

ยีน *Thiopurine S-methyltransferase (TPMT)* มีหน้าที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์ที่มีหน้าที่กระตุ้นปฏิกิริยา S-methylation ของสารประกอบพวก aromatic และ heterocyclic sulphydryl compounds ซึ่งเป็นสารประกอบของยา anticancer ในกลุ่ม thiopurine เช่น 6-MP (6-mercaptopurine) และ immunosuppressant เช่น AZA (azathioprine) (Roberts et al., 2004 : 49-53 ; Silva et al., 2008 : 700-704) มีการแบ่งระดับการทำงานของเอนไซม์ TPMT ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีระดับการทำงานสูง (high activity) อยู่ที่ 89-94%, กลุ่มที่มีการทำงานระดับกลาง (intermediate activity) อยู่ที่ 6-11% และกลุ่มที่มีการทำงานระดับต่ำ (low activity) อยู่ที่ 0.3% (Chrzanowska et al., 2006 : 973-978 ; Murugesan et al., 2010 : 121-127) ซึ่งระดับของการทำงานมีผลต่อการ metabolism ของยา thiopurine

ยาในกลุ่ม thiopurine ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน (ALL : acute lymphoblastic leukemia) , โรคภูมิคุ้มกันตนเอง (autoimmune diseases) และใช้ในการกดภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ (immunosuppression) (Chrzanowska et al., 2006 : 973-978 ; Schaeffeler et

al., 2004 : 407-417) ในผู้ป่วยที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์ TPMT ต่ำ อาจทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ทางโลหิตวิทยา (hematologic toxicity) เช่น Neutropenia ในรายที่รุนแรงมากอาจเกิดภาวะ pancytopenia ภายหลังจากการได้รับยาในกลุ่ม thiopurine ในขนาดยาปกติ (Silva et al., 2008 : 700-704) ในการตรวจหาความผิดปกติของยีน *TPMT* จึงมีความสำคัญต่อการรักษาผู้ป่วยที่จำเป็นต้องใช้ยาในกลุ่ม thiopurine ในการรักษา เพื่อเป็นการคัดกรองความเสี่ยงของผู้ป่วย (Okada et al., 2005 : 677-681) โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่พบว่า heterozygous หรือ homozygous ของยีน *TPMT* จะส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์อยู่ในระดับกลาง ต่ำ หรือ ไม่มีเลย เมื่อเทียบกับ wild type (*TPMT**1/*1) (DiPiero et al., 2015 : 409-413 ; Lennard & Lilleyman, 1996 : 328-334) การที่แพทย์ทราบข้อมูลความผิดปกติของยีน *TPMT* ในผู้ป่วยจะทำให้แพทย์สามารถปรับขนาดยาให้เหมาะสมกับผู้ป่วยหรือ เลือกใช้ยาตัวอื่นที่เหมาะสมแทน ซึ่งจะลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นและประสบความสำเร็จในการรักษาได้มากยิ่งขึ้น

ทางห้องปฏิบัติการสาขาวิชาโลหิตวิทยาและอองโคโลยี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ ได้ให้บริการตรวจวิเคราะห์ *TPMT* variants 5 ชนิด ได้แก่ *2 (238G>C),

*3A (460G>A, 719A>G), *3B (460G>A), *3C (719A>G) และ *6 (539A>T) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในผู้ป่วยเด็กที่เป็น Acute lymphoblastic leukemia (ALL) ทั้งภายในและภายนอกโรงพยาบาล จากประสบการณ์ที่ผ่านมาพบว่ามีความชุกของการเกิด *TPMT* variants อยู่ที่ 4.27% ได้แก่ *TPMT**1/*3C (3.65%) และ *TPMT**1/*3A (0.61%) แต่ไม่พบ *TPMT* variants ชนิด *2, *3B และ *6 (Treesucon et al., 2017 : 173-182) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเกิดความผิดปกติของ *TPMT* variants พบได้เป็นส่วนน้อย แต่ทั้งนี้ก็ยังมีความสำคัญและจำเป็นต้องตรวจหาความผิดปกติของยีน ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนาศักยภาพในการตรวจวิเคราะห์และการบริการให้ดียิ่งขึ้น จึงได้ทำการศึกษาการตรวจวิเคราะห์ *TPMT* variants ด้วยเทคนิค multiplex ARMS-PCR ที่จะช่วยลดขั้นตอน เวลา ค่าใช้จ่าย รวมทั้งลดข้อผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นจากการตรวจวิเคราะห์จากเทคนิค PCR-RFLP โดยเทคนิค multiplex ARMS-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้จะตรวจหาความผิดปกติของ *TPMT* variants เพียง 4 ชนิด ได้แก่ *2, *3A, *3B และ *3C เท่านั้น เนื่องจากที่ผ่านมาไม่เคยมีรายงานการพบ *TPMT**6 รวมทั้งข้อจำกัดของการใช้เทคนิค multiplex ARMS-PCR ที่แตกต่างกับ *TPMT* variants ทั้ง 4 ชนิดเบื้องต้น จึงไม่นำ *TPMT**6 มาพัฒนาในการศึกษาครั้งนี้

วัตถุประสงค์ในการวิจัย

พัฒนาการตรวจวิเคราะห์ *TPMT* variants ชนิด *2, *3A, *3B และ *3C ด้วยเทคนิค multiplex ARMS-PCR เพื่อเพิ่มศักยภาพการบริการให้ดียิ่งขึ้น รวมทั้งลดขั้นตอน เวลา และค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์

วิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

ทำการสุ่มตัวอย่าง DNA ของผู้ป่วยที่มีการส่งตรวจวิเคราะห์ *TPMT* variants ด้วยเทคนิค PCR-RFLP จำนวน 150 ตัวอย่าง แบบ blind test จากจำนวนทั้งหมด 749 ตัวอย่าง (คำนวณกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี Estimating an infinite population proportion) โดยตัวอย่าง DNA ได้จากการสกัดด้วยวิธี Phenol Chloroform (Green & Sambrook, 2012 : 47-53) หรือ วิธี Salting out (Miller et al., 1988 : 1215) จาก whole blood

2. เทคนิค Multiplex ARMS-PCR

ดัดแปลงเทคนิค multiplex ARMS-PCR ของ Roberts et al. (2004 : 49-53) โดยนำตัวอย่าง DNA ความเข้มข้น 100-300 µg มาตรวจวิเคราะห์หา *TPMT* variants ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *2, *3A, *3B และ *3C โดยใช้ specific primer ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง specific primer ที่ใช้ในการตรวจหา *TPMT* variants ทั้ง 4 ชนิด ด้วยเทคนิค multiplex ARMS-PCR

Primer	Sequence (5' to 3')	รายละเอียด	ขนาด (bp)
B2Mf	TGT AAA CAC TTG GTG CCT GAT ATA GCT TGA	Internal control	574
B2Mr	CAT CAG TAT CTC AGC AGG TGC CAC TAA TCT		
TPMT2C	ATC TGC TTT CCT GCA TGT TCT TTG AAA CCC	Common wild type	194
TPMT2W	CAC ACC AAC TAC ACT GTG TCC CCG GTC TCC	Wild type	
TPMT2M	CAC ACC AAC TAC ACT GTG TCC CCG GTC TCG	TPMT*2 mutation	
TPMT3BC	AGG TCT CTG TAG TCA AAT CCT ATA CT	Common wild type	245
TPMT3BW	ATT TGA CAT GAT TTG GGA TAG AGG TG	Wild type	
TPMT3BM	ATT TGA CAT GAT TTG GGA TAG AGG TA	TPMT*3B mutation	
TPMT3CC	ATT TTT AGT AGA GAC AGA GTT TCA CCA TCT	Common wild type	325
TPMT3CW	TAT GTC TCA TTT ACT TTT CTG TAA GTA GTT	Wild type	
TPMT3CM	TAT GTC TCA TTT ACT TTT CTG TAA GTA GTC	TPMT*3C mutation	

การตรวจวิเคราะห์หาความผิดปกติของ *TPMT* variants แต่ละชนิด ด้วยเทคนิค multiplex ARMS-PCR จะทำการผสม primer แบ่งเป็น wild type primer (W) เพื่อใช้ในการตรวจหา wild type และ mutant primer (M) เพื่อใช้ในการตรวจหาความผิดปกติของ *TPMT* variants แต่ละชนิด และใช้ primer คู่สม B2M (β 2-microglobulin) เป็น internal control ของปฏิกิริยา PCR กรณีการตรวจหา *TPMT**3A จะทำการแปลผลร่วมกันระหว่าง *TPMT**3B และ *TPMT**3C ในการตรวจวิเคราะห์ (Kham et al., 2002 : 353-359 ; Schaeffeler et al. , 2004 : 407-417)

กระบวนการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 μ l ประกอบด้วย 1X PCRBIO reaction buffer, 1 unit PCRBIO HS Taq DNA polymerase (PCR Biosystems, England), 2 μ M Primer mix (wild type/ mutant type) และ 100-300 ng DNA นำส่วนผสมเข้าเครื่อง PCR ตามขั้นตอนดังนี้

- 1) Pre denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 นาที
- 2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที
- 3) Annealing ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15 วินาที
- 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 15 วินาที
- 5) Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที (ทำปฏิกิริยาในขั้นตอนที่ 2-4 ซ้ำทั้งหมด 35 รอบ)

3. Gel electrophoresis

นำ PCR product ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 10 μ l มาแยกขนาดผ่าน agarose gel ความเข้มข้น 2.5% ด้วยเครื่องรันเจล (Gel electrophoresis) ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 45 นาที โดยใช้ 100 bp DNA Ladder marker เป็น DNA มาตรฐาน เพื่อใช้สำหรับเทียบขนาดกับ PCR product ที่ได้ ซึ่งในการโหลดตัวอย่างลงเจล จะโหลด PCR product เป็นคู่ ซึ่งตัวอย่างหนึ่งจะโหลด PCR

product จาก wild type primer (W) และ mutant primer (M) คู่กัน เพื่อให้ง่ายต่อการเปรียบเทียบ และมี PCR product ที่เป็น positive control และ negative control ใช้ในการเปรียบเทียบร่วมด้วย เพื่อแปลผลว่าเกิดความผิดปกติของ *TPMT* variants ชนิดใด หรือ ไม่พบความผิดปกติ โดยที่ positive control คือตัวอย่างที่ตรวจพบ *TPMT**1/*3A และ negative control คือตัวอย่างที่ไม่พบความผิดปกติของ *TPMT* variants ทั้ง 4 ชนิด (*TPMT**1/*1) ซึ่งทั้ง 2 ตัวอย่างได้ทำการตรวจสอบผ่านการทำ sequencing แล้ว (Treesucon et al., 2017 : 173-182) เมื่อแยกขนาดเสร็จแล้วนำแผ่นเจล agarose มาย้อมด้วยสาร ethidium bromide แล้วบันทึกผลที่ได้ด้วยการถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Documentation)

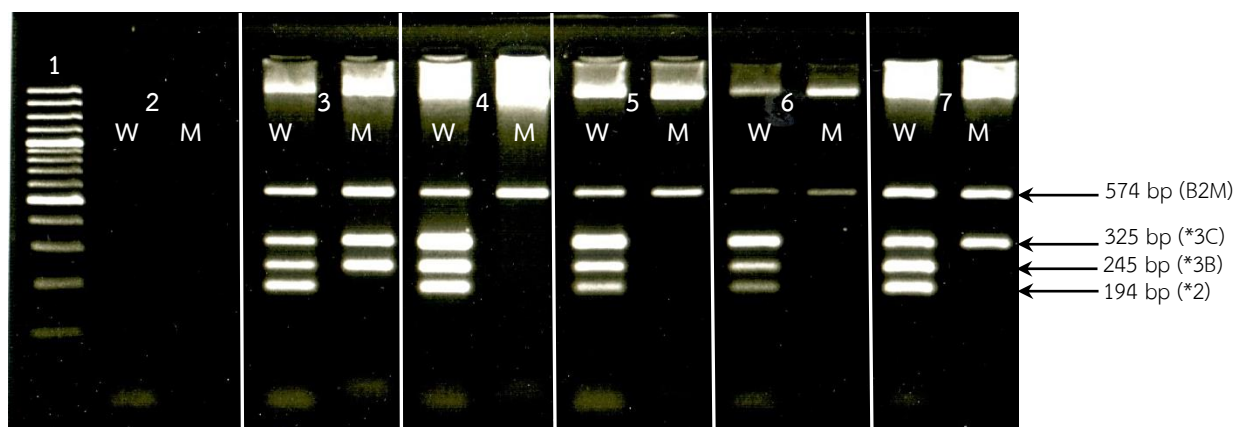
จริยธรรมการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการวิจัยและจริยธรรมทางการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล รหัสโครงการ COA no.Si 087/2021 ลงวันที่ 8 มิถุนายน 2561 และรหัสโครงการ 41/2562 ลงวันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2564 ก่อนทำการเก็บข้อมูลผู้วิจัยได้ทำเอกสารชี้แจงข้อมูล (Participant Information Sheet) และหนังสือแสดงเจตนายินยอมเข้าร่วมการวิจัย (Informed Consent Form) ให้แก่ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกคน

ผลการศึกษา

ภายหลังจากการนำ PCR product ที่ได้จากขั้นตอนการทำ multiplex ARMS-PCR มาแยกขนาด PCR product ขนาดต่าง ๆ ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้ว จะทำการแปลผลจากการตรวจดูขนาด PCR product ที่ได้แต่ละขนาดเทียบกับ DNA มาตรฐาน ดังแสดงในรูปภาพที่ 1

รูปภาพที่ 1 ผลการตรวจยืนยัน *TPMT* ที่ได้จากการทำ multiplex PCR-ARMS



รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างผลการตรวจยืนยัน *TPMT* ที่ได้จากการทำ multiplex PCR-ARMS ที่พบการเกิด heterozygous ของ ยีน *TPMT**3C โดยมี band ขนาด 574 bp เป็น internal control

Lane 1 = DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder marker)

Lane 2 = No template control

Lane 3 = Positive control (*TPMT**1/*3A)

W = PCR product ที่ใช้ wild type primer

Lane 4 = Negative control

Lane 5-6 = ตัวอย่าง *TPMT**1/*1

Lane 7 = ตัวอย่าง *TPMT**1/*3C

M = PCR product ที่ใช้ mutant type primer

การวิเคราะห์ *TPMT* variants ทั้ง 4 ชนิดจาก ผลตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 1 จะทำการวิเคราะห์ผลที่ได้ เปรียบเทียบระหว่างช่อง W และ M ของแต่ละตัวอย่าง ร่วมกัน กับการเปรียบเทียบ DNA มาตรฐาน และ Positive/Negative control ตัวอย่างการแปลผล ดังนี้

- Positive control หรือ ตัวอย่างที่พบ *TPMT**1/*3A จะปรากฏแถบ 4 แถบ ใน ช่อง W (wild type primer) ที่ขนาด 574, 325, 245 และ 194 bp โดยแต่ละขนาด แสดงถึงตำแหน่งของ internal control, *3C, *3B และ *2 ตามลำดับ โดยเทียบกับ DNA มาตรฐาน ในขณะที่ช่อง M (mutant type primer) จะปรากฏแถบ 3 แถบ ของ internal control, *3C และ *3B ตามลำดับ โดยการเกิด mutant ร่วมกัน 2 ตำแหน่งของ *3B และ *3C จะแสดงถึง *TPMT**3A จากผลที่ได้แสดงว่า ตัวอย่างนี้เป็น heterozygous *3A Negative control และตัวอย่าง *TPMT**1/*1 ในช่อง W จะปรากฏแถบ 4 แถบ ของ internal control, *3C, *3B และ *2 ตามลำดับ ในขณะที่ช่อง

M จะปรากฏแถบ 1 แถบ ของ internal control เท่านั้น

- *TPMT**1/*3C จะปรากฏแถบ 4 แถบ ใน ช่อง W จะปรากฏแถบ 4 แถบ ของ internal control, *3C, *3B และ *2 ตามลำดับ ในขณะที่ช่อง M จะปรากฏแถบ 2 แถบ ของ internal control และ *3C แสดงว่า ตัวอย่างนี้เป็น heterozygous *3C

เนื่องจากในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ จะตรวจเฉพาะ *TPMT* variants ทั้ง 4 ชนิด คือ *2, *3A, *3B และ *3C เท่านั้น ดังนั้นการรายงานผลที่ แสดงเป็น *TPMT**1/*1 จะไม่แสดงถึง wild type ของ ยีน *TPMT* แต่จะแสดงผลว่า ไม่พบความผิดปกติของ *TPMT* variants ทั้ง 4 ชนิดที่ตรวจวิเคราะห์เท่านั้น (Nguyen et al., 2011 : 1-7)

จากผลการทดสอบพบว่า การตรวจวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค multiplex ARMS-PCR จากการสุ่ม ตัวอย่างทั้งหมด 150 ตัวอย่าง ให้ผลการวิเคราะห์ที่ สอดคล้องกับการตรวจด้วยเทคนิค PCR-RFLP นอกจากนี้ เทคนิค multiplex ARMS-PCR มี

ความสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายในการใช้น้ำยา-สารเคมี และลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์แต่ละครั้งลงได้มาก เมื่อเทียบกับการใช้เทคนิค PCR-RFLP

การอภิปรายผลการศึกษา

ในการวิเคราะห์จากการสุ่มตัวอย่างทั้งหมด 150 ราย จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 749 ราย พบว่า ทั้ง 150 รายที่นำมาทดสอบด้วยวิธี multiplex ARMS-PCR นั้น ให้ผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับการตรวจด้วยเทคนิค PCR-RFLP และด้วยความสามารถของการใช้เทคนิค multiplex ARMS-PCR สามารถช่วยในการตรวจวิเคราะห์หาความผิดปกติของยีน *TPMT* ได้หลาย variants ในเวลาเดียวกัน (Roberts et al., 2004 : 49-53) วิธีดังกล่าวสามารถลดค่าใช้จ่ายประมาณ 300 บาท ต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง และสามารถลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์หลังจากเดิมที่ใช้เวลาประมาณ 1,080 นาที/ครั้ง เหลือเพียง 300 นาที/ครั้งเท่านั้น

เนื่องจากเทคนิคนี้จะใช้ allele specific primer ในการหาตำแหน่งเป้าหมายของ *TPMT* variants ต่างๆ ที่มีความจำเพาะเท่านั้น (Geary et al., 2003 : 395-400 ; Lee et al., 1995 : 398-405 ; Roberts et al., 2004 : 49-53) เป็นผลให้การตรวจวิเคราะห์มีความรวดเร็วและแม่นยำขึ้นกว่าการตรวจวิเคราะห์แบบเดิมที่ใช้เทคนิค PCR-RFLP ซึ่งมีกระบวนการขั้นตอนที่ซับซ้อนมากกว่า (Kham et al., 2002 : 353-359 ; Otterness et al., 1997 : 60-73 ; Yates et al., 1997 : 608-614) ทั้งในขั้นตอนการทำ PCR เพื่อให้ได้ PCR product ของตำแหน่งยีนเป้าหมายในแต่ละ variants และนำ PCR product ที่ได้เข้าสู่ขั้นตอนการทำ RFLP โดยจะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการวิเคราะห์ผลว่าเป็น wild type หรือ mutant (homozygous/heterozygous)

จากประสบการณ์การให้บริการพบว่า ในขั้นตอน RFLP นั้น หากปริมาณ PCR product และเอนไซม์ตัดจำเพาะมีสัดส่วนที่ไม่เหมาะสมกัน หรือเอนไซม์ตัดจำเพาะเสื่อมสภาพ (Okada et al., 2005 : 677-681 ; Roberts et al., 2004 : 49-53) จะทำให้เกิดความผิดพลาดในการตรวจวิเคราะห์และส่งผลกระทบต่อผลการแปลผลที่ผิดไปจากความเป็นจริงได้ ยกตัวอย่างเช่น การหาความผิดปกติของยีน *TPMT**3B เมื่อได้ PCR product ขนาด 304 bp นำไปวิเคราะห์ด้วยขั้นตอน

RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *MwoI* (NEB, England) การแปลผล คือ หากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้หมด PCR product มีขนาด 267 bp แสดงว่าเป็นไม่พบความผิดปกติของ *TPMT**3B หากเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดได้ไม่หมด PCR product มีขนาด 304 bp และ 267 bp แสดงว่าเป็น heterozygous *3B และหากเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่สามารถตัดได้เลย PCR product มีขนาด 304 แสดงว่าเป็น homozygous *3B จากตัวอย่างการแปลผลจะเห็นได้ว่าหากเอนไซม์ตัดจำเพาะมีประสิทธิภาพทำงานที่ลดลง หรือเสื่อมสภาพ การจะตัด PCR product อาจทำได้ไม่สมบูรณ์ (incomplete restriction digestion) หรือตัดไม่ได้เลย ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์และการแปลผลที่ไม่ถูกต้อง หรือ คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้

นอกจากนี้การใช้เทคนิค multiplex PCR-ARMS สามารถใช้ในการหาความผิดปกติของ *TPMT* ได้หลาย variants ในเวลาเดียวกัน ซึ่งในขั้นตอนการทำ PCR จะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำ PCR (PCR conditions) ของแต่ละ variants เช่น การปรับ allele-specific primer, การปรับ $MgCl_2$ ในขั้นตอนการเตรียม PCR reaction รวมถึงการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมในขั้นตอน annealing เป็นต้น (Roberts et al., 2004 : 49-53) เพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา PCR ในการหาตำแหน่งเป้าหมายของยีนได้ครบทุกตำแหน่ง การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค multiplex ARMS-PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพช่วยในการตรวจหาความผิดปกติของยีน *TPMT* ลดความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากเทคนิค PCR-RFLP ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามมีการศึกษาการใช้เทคนิค real-time PCR ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรวจที่แม่นยำ สามารถตรวจหาความผิดปกติของยีน *TPMT* ได้หลาย variants ในเวลาเดียวกันและเร็วกว่าการใช้เทคนิค multiplex ARMS-PCR (Schütz et al., 2000 : 1728-1737) แต่อย่างไรก็ดีการใช้เทคนิค real-time PCR ยังมีต้นทุนที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ที่สูงกว่าเทคนิค multiplex ARMS-PCR อยู่มาก (Roberts et al., 2004 : 49-53) ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกศึกษาเทคนิค multiplex ARMS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์หาความผิดปกติของ *TPMT* variants

การสรุปผลและประโยชน์ที่ได้จากการศึกษา

การตรวจวิเคราะห์หาความผิดปกติของ *TPMT* variants ที่ผ่านมาจะใช้เทคนิค PCR-ARMS และ PCR-RFLP ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานที่ใช้ทั่วไป มีกระบวนการวิเคราะห์ในแต่ละครั้งหลายขั้นตอน และต้องใช้น้ำยา-สารเคมีหลากหลาย โดยเฉพาะขั้นตอน RFLP ที่มีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ จากการศึกษาพบว่าในขั้นตอนนี้อาจเกิดข้อผิดพลาดได้ด้วยปัจจัยต่างๆ ทำให้ต้องมีการตรวจวิเคราะห์ซ้ำหรือตรวจสอบอีกครั้ง ก่อนที่จะทำการแปลผลที่ได้ เนื่องจากพบความผิดปกติของ *TPMT* variants ได้ต่ำ ดังนั้นการพัฒนากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค multiplex ARMS-PCR จะช่วยลดข้อผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นและยังให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่ายได้มากกว่าเทคนิคเดิม

ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

จากการศึกษาพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ที่ได้พบว่าเมื่อนำเทคนิค multiplex ARM-PCR ไปใช้ในการให้บริการ จะให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วกว่าและมีขั้นตอนในการทำงานที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก และยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซื้อน้ำยา-สารเคมีได้เป็นอย่างดี ซึ่งจะเป็นประโยชน์ให้กับผู้ที่สนใจสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการฯ และอาจารย์แพทย์สาขาโลหิตวิทยาและอองโคโลยีทุกท่านที่คอยสนับสนุนและผลักดันให้พัฒนางานประจำอย่างต่อเนื่อง ขอขอบพระคุณภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ให้ใช้สถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Chrzanowska, M., Kurzawski, M., Drożdżdzik, M., Mazik, M., Oko, A., & Czekalski, S. (2006). Thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in hemodialyzed patients. *Pharmacological reports*, 58(6), 973–978.

- DiPiero, J., Teng, K., & Hicks, J. K. (2015).

Should thiopurine methyltransferase (TPMT) activity be determined before prescribing azathioprine, mercaptopurine, or thioguanine?. *Cleveland Clinic journal of medicine*, 82(7), 409–413.

- Gearry, R. B., Barclay, M. L., Burt, M. J., Collett, J. A., Chapman, B. A., Roberts, R. L., & Kennedy, M. A. (2003). Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) genotype does not predict adverse drug reactions to thiopurine drugs in patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 18(4), 395–400.

- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012).

Molecular cloning : A laboratory manual. 4th ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Kham, S. K., Tan, P. L., Tay, A. H., Heng, C. K., Yeoh, A. E., & Quah, T. C. (2002).

Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a multiracial asian population and children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 24(5), 353–359.

- Lee, D., Szumlanski, C., Houtman, J., Honchel, R., Rojas, K., Overhauser, J., & Weinshilboum, R. (1995). Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Cloning of human liver cDNA and a processed pseudogene on human chromosome 18q21.1. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 23(3), 398–405.

- Lennard, L., & Lilleyman, J. S. (1996).

Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic

- polymorphism. *Therapeutic drug monitoring*, 18(4), 328–334.**
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3), 1215.**
- Murugesan, R., Vahab, S. A., Patra, S., Rao, R., Rao, J., Rai, P., & Satyamoorthy, K. (2010). **Thiopurine S-methyltransferase alleles, TPMT(*)2, (*)3B and (*)3C, and genotype frequencies in an Indian population. *Experimental and therapeutic medicine*, 1(1), 121–127.**
- Nguyen, C. M., Mendes, M. A., & Ma, J. D. (2011). **Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotyping to predict myelosuppression risk. *PLoS currents*, 1-7.**
- Okada, Y., Nakamura, K., Wada, M., Nakamura, T., Tsukamoto, N., Nojima, Y., & Yamamoto, K. (2005). **Genotyping of thiopurine methyltransferase using pyrosequencing. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 28(4), 677–681.**
- Ottenness, D., Szumlanski, C., Lennard, L., Klemetsdal, B., Aarbakke, J., Park-Hah, J. O., & Weinshilboum, R. (1997). **Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 62(1), 60–73.**
- Roberts, R. L., Barclay, M. L., Gearry, R. B., & Kennedy, M. A. (2004). **A multiplexed allele-specific polymerase chain reaction assay for the detection of common thiopurine S-methyltransferase (TPMT) mutations. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 341(1-2), 49–53.**
- Schaeffeler, E., Fischer, C., Brockmeier, D., Wernet, D., Moerike, K., Eichelbaum, M., & Schwab, M. (2004). **Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics*, 14(7), 407–417.**
- Schütz, E., von Ahsen, N., & Oellerich, M. (2000). **Genotyping of eight thiopurine methyltransferase mutations: three-color multiplexing, "two-color/shared" anchor, and fluorescence-quenching hybridization probe assays based on thermodynamic nearest-neighbor probe design. *Clinical chemistry*, 46(11), 1728–1737.**
- Silva, M. R., de Oliveira, B. M., Viana, M. B., Murao, M., & Romanha, A. J. (2008). **Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene polymorphism in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: association with clinical and laboratory data. *Therapeutic drug monitoring*, 30(6), 700–704.**
- Treesucon, A., Sripattanasadasakul, P., Siraprapapat, P., Vathana, N., Pongtanakul, B., Sanpakit, K., & Narkbunnam, N. (2017). **Prevalence of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene variants in Thai patients suffering toxicity from thioguanine-containing childhood leukemia protocols: First report of TPMT*3A in Thais. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 48, 173-182.**
- Yates, C. R., Krynetski, E. Y., Loennechen, T., Fessing, M. Y., Tai, H. L., Pui, C. H., & Evans, W. E. (1997). **Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Annals of internal medicine*, 126(8), 608–614.**