วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 27 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2565
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 27 (No.2) May – August 2022 บทความวิจัย

การตรวจสอบ Hb Constant Spring, Hb Pakse และ Hb Quong Sze ด้วยวิธี Real-Time PCR และ High Resolution Melting Analysis

Detection of Hb Constant Spring, Hb Pakse and Hb Quong Sze by Real-Time PCR and High Resolution Melting Analysis

บุญณาเรท นี [1] อังคณา รื่นรส [1] ธัญสิริ ปะทะนมปี [1] อรุณี ปิงยศ [2] ขวัญฤดี มหิงสา [2] วรรณวิภา บำรุงภักดี [2]
ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี [2] และ เนรัฐชลา สุวรรณคนธ์ [1*]

Bunnareth Ny [1], Angkhana Ruenros [1], Thanyasiri Patanompee [1], Arunee Pingyod [2], Khwanruedee Mahingsa [2], Wanwipa Bumrungpakdee [2], Torpong Sanguansermsri [2] and Narutchala Suwannakhon [1,*]

[1] *สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา*

[2] *หน่วยธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยพะเยา*

[1] *Discipline of Biology, School of Science, University of Phayao*

[2] *Thalassaemia Unit, University of Phayao*

Received : 5 June 2021
Revised : 6 August 2021
Accepted : 17 September 2021

บทคัดย่อ

แอลฟาธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางทางพันธุกรรมที่พบได้ส่วนใหญ่ในประเทศไทยมีอุบัติการณ์ร้อยละ 30-40 โดย compound heterozygous alpha-thalassemia 1 และ non-deletional alpha-thalassemia ทำให้เกิดโรค Hb H ที่มีอาการรุนแรง ดังนั้นวิธีการที่ใช้สำหรับการตรวจสอบ non-deletional alpha-thalassemia ที่รวดเร็วและมีความแม่นยำจึงมีความสำคัญต่อการรักษาและป้องกันธาลัสซีเมีย วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธี high resolution melting (HRM) analysis สำหรับตรวจสอบ non-deletional alpha-thalassemia ชนิด Hb CS, Hb PS และ Hb QS โดยมีการใช้ไพรเมอร์ 2 ตำแหน่งที่คร่อมบริเวณการกลายพันธุ์ของ non-deletional alpha-thalassemia และหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ด้วยการทำ gradient PCR จากนั้นทดสอบการทำ real-time PCR และ HRM analysis ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้รับการตรวจสอบแล้วด้วยวิธี sequencing หลังจากนั้นทำการตรวจสอบในตัวอย่างดีเอ็นเอ 40 ตัวอย่าง จากหน่วยธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยพะเยา วิธี real-time PCR และ HRM analysis ที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถจำแนก heterozygous Hb CS, Hb H CS, homozygous Hb CS, heterozygous Hb PS และ homozygous Hb QS ออกจากดีเอ็นเอปกติได้ ผลการตรวจสอบในตัวอย่าง 40 ตัวอย่างให้ผลเป็นลบจำนวน 30 ตัวอย่าง heterozygous Hb CS จำนวน 3 ตัวอย่าง ในขณะที่ 7 ตัวอย่างไม่สามารถตรวจพบ PCR product ซึ่งพบเป็น alpha-thalassemia 2 ชนิด 3.7 deletion สรุปได้ว่าวิธี HRM analysis เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความไวสำหรับการคัดกรองอย่างรวดเร็วและการจำแนก Hb CS, Hb PS และ Hb QS ได้

คำสำคัญ : แอลฟาธาลัสซีเมีย; ฮีโมโกลบินเอช; การวิเคราะห์เอชอาร์เอ็ม; ฮีโมโกลบิน

Abstract

Alpha thalassemia is one of the most common inherited anemia disorders in Thailand with prevalence at 30 to 40% . Compound heterozygous alpha-thalassemia 1 and non-deletional alpha-thalassemia gives rise to severe Hb H (--/-α^{T}) disease. Thus, the rapid and accurate method for detection of non-deletional alpha-thalassemia is important for thalassemia treatment and prevention. The aim of this study was to develop HRM method for detection of non-deletional alpha-thalassemia including Hb CS, Hb PS and Hb QS. Two HRM primers, which specified for alpha-thalassemia 2, were used to identify three non-deletional alpha-thalassemia, and the optimized temperature was performed by gradient PCR. Next, real-time PCR and HRM analysis were established with positive control DNA carried Hb CS, HB PS, Hb QS and normal that were determined by DNA sequencing technique. After that, we examined 40 DNA samples from Thalassemia Unit, University of Phayao. The real-time PCR and HRM analysis could be able to identify control DNA including heterozygous Hb CS, Hb H CS, homozygous Hb CS, heterozygous Hb PS and homozygous Hb QS from negative DNA. 30 of 40 samples were negative, 3 samples were heterozygous Hb CS while, PCR product was not detected in 7 samples, that were the alpha-thalassemia 2 with 3.7 deletion. In conclusion, the real-time PCR and HRM method appears to be an accurate and sensitive method for the rapid screening and identification of Hb CS, Hb PS and Hb QS.

Keywords : alpha thalassemia; hemoglobin H; high resolution melting analysis; hemoglobin

***Corresponding author. E-mail :** narutchala@gmail.com

บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบยีนด้อย (autosomal recessive) และในเขตภาคเหนือเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าพบมีอุบัติการณ์ของผู้เป็นพาหะของ alpha-thalassemia gene เป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูง (Na-Nakorn & Wasi,1970; Lemmens-Zygulska *et al*., 1996) ในการศึกษาบุคลากรมหาวิทยาลัยพะเยา 123 ราย พบมีผู้เป็นพาหะของแอลฟาธาลัสซีเมียถึงร้อยละ 47 และร้อยละ 8 พบเป็น hemoglobin Constant Spring (Hb CS; CD142 T>C; *HBA2*: c.427 T>C) จากการศึกษาด้วยวิธี real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis (Suwannakhon *et al*., 2014) ภาคใต้ของประเทศไทยพบ Hb CS ร้อยละ 28.85, hemoglobin Quong Sze (Hb QS; CD125 T>C; *HBA2*: c.377 T>C) ร้อยละ 1.54, และ hemoglobin Paksé (Hb PS; CD142 A>T; *HBA2*: c.429 A>T) ร้อยละ 0.77 ทำการศึกษาด้วยวิธี reverse dot blot (Nittayaboon & Nopparatana, 2018) โดย non-deletional alpha-thalassemia ชนิด Hb CS พบได้มากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ Hb PS พบได้มากในประเทศลาวและไทย ส่วน Hb QS พบได้มากในประเทศจีน (Kalle Kwaifa et al., 2020) สำหรับในประเทศไทยเมื่อคาดการณ์จากประชากร 60 ล้านคน พบผู้ป่วย Hb H disease จำนวน 7,000 ราย โดย Hb H disease เกิดได้ทั้งจากสาเหตุของการขาดหายไปหรือมีความผิดปกติของยีนแอลฟาโกลบิน ซึ่งทำให้เกิด deletional และ non-deletional Hb H disease อาการของผู้ป่วย non-deletional Hb H disease มีความรุนแรงมากกว่าแบบ deletional Hb H disease (Sanguansermsri, 2014; Kalle Kwaifa *et al*., 2020) โดยมีรายงานการพบทารกในครรภ์ที่เป็น Hb H disease มีอาการบวมน้ำ (Hb H hydrops fetalis) โดยพบมีความผิดปกติระหว่าง compound heterozygosity ของ alpha-thalassemia 1 ชนิด SEA deletion กับ Hb CS และ compound heterozygosity ของ Hb Zurich-Albisrieden กับ Hb QS ในประชากรจีน (He *et al*., 2015; *Du et al*., 2021) การตรวจสอบชนิดของความผิดปกติของยีนแอลฟาโกลบินจึงมีส่วนสำคัญทั้งทางด้านการดูแลรักษาผู้ป่วยโดยการตรวจหาความผิดปกติของยีน รวมถึงการควบคุมและป้องกันการเกิดผู้ป่วยรายใหม่ โดยการตรวจคัดกรองเพื่อหาพาหะของโรค ในการตรวจสอบความผิดปกติของ non-deletional alpha-thalassemia สามารถทำได้หลายวิธีการ เช่น amplification refractory mutation system-PCR (ARMS-PCR), reverse dot blot, DNA sequencing รวมถึง HRM analysis ซึ่งวิธี real-time PCR และ HRM analysis เป็นการวิเคราะห์แบบ post PCR analysis เพื่อใช้ในการระบุการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอในบริเวณที่สนใจ อาศัยความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของ melting curve การศึกษาก่อนหน้านี้ไม่พบการตรวจสอบ non-deletional alpha-thalassemia ทั้ง Hb CS, Hb PS และ Hb QS ได้พร้อมกัน หรือเทคนิคที่ใช้มีราคาแพง สิ้นเปลืองแรงงาน และใช้เวลานานในการตรวจสอบ งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการใช้วิธี real-time PCR และ HRM analysis สำหรับตรวจสอบ Hb CS, Hb PS และ Hb QS ได้พร้อมกัน โดยวิธี real-time PCR และ HRM analysis

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างดีเอ็นเอ

ในงานวิจัยนี้ผ่านการพิจารณาและการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่รับรองโครงการ 30/011/59 ตัวอย่างดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการทำ real-time PCR และ HRM analysis แบ่งเป็นดีเอ็นเอ

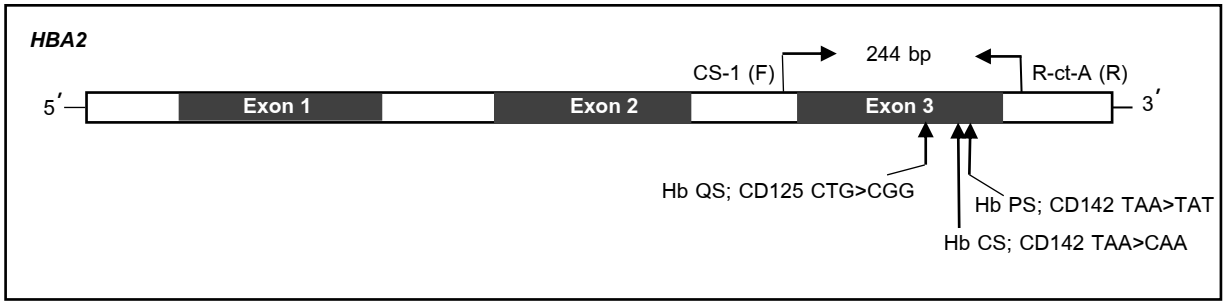
ของกลุ่มควบคุม ได้แก่ตัวอย่างชนิด Hb H-CS disease, homozygous Hb CS, heterozygous Hb CS, heterozygous Hb PS เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) และดีเอ็นเอของคนปกติ เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) ซึ่งเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือด และชนิด homozygous Hb QS เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น (artificial positive control) ที่ได้จากการออกแบบพลาสมิด DNA ของ Hb QS ทำการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณพลาสมิด DNA โดยทำการ transformation ในเซลล์ของ DH5α-T1^{R} *E. coli* ตัวอย่างดีเอ็นเอกลุ่มดีเอ็นเอควบคุมเชิงบวกได้ทำการตรวจสอบชนิดด้วยวิธี sequencing และสุ่มคัดเลือกตัวอย่างตัวอย่างดีเอ็นเอ 40 ตัวอย่าง ที่ได้รับการตรวจวินิจฉัย alpha-thalassemia 1 ชนิด SEA และ Thai deletion ด้วยวิธี gap real time-PCR และ non-deletional alpha-thalassemia ชนิด Hb CS , heterozygous Hb PS และ Hb QS ด้วยวิธี ARMS-PCR จากห้องปฏิบัติการธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยพะเยา สำหรับตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการ โดยเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ผ่านการคัดกรองตรวจสอบโรค alpha-thalassemia 1 แต่ยังไม่ทราบชนิด alpha-thalassemia 2 โดยหน่วยธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยพะเยา จะทำการตรวจสอบชนิดของ non-deletional alpha-thalassemia ด้วยวิธี ARMS-PCR ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดที่นำมาใช้ในการตรวจสอบได้จากการสกัดด้วยชุดสกัด E.Z.N.A.(R) Blood DNA Mini Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA)

ไพรเมอร์สำหรับ HRM analysis

ในการพัฒนาวิธี HRM สำหรับตรวจสอบ ทั้ง 3 ชนิด ของ non-deletional alpha-thalassemia ประกอบด้วย Hb CS, Hb PS และ Hb QS โดยใช้ไพรเมอร์ 2 เส้น ที่จำเพาะต่อแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 คือ ไพรเมอร์ CS-1 (Forward) (Wee *et al*., 2009) และไพรเมอร์ R-ct-A (Reward) (Seeratanachot *et al*., 2015) สำหรับในขั้นตอนการทำ real-time PCR ไพรเมอร์ ทั้ง 2 เส้น มีตำแหน่งที่คร่อมบริเวณการกลายพันธุ์ non-deletional alpha-thalassemia ซึ่งอยู่ในยีนของ *HBA2* ทั้งสามชนิด ทำให้สามารถตรวจสอบได้เป็น Hb CS, Hb PS และ Hb QS ใน 1 ปฏิกิริยา โดยลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งของไพรเมอร์ แสดงดังตารางที่ 1 และภาพที่ 1 ขนาด PCR Product ที่ได้ คือ 244 bp ความจำเพาะของไพรเมอร์ทำโดยการนำลำดับนิวคลิโอไทด์ของไพรเมอร์ไปตรวจสอบ โดยใช้โปรแกรม nucleotide BLAST ในเว็บไซต์ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/Primer-blast/

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลิโอไทด์ และตำแหน่งของไพรเมอร์ ที่ใช้ในการการพัฒนาวิธี HRM analysis สำหรับตรวจสอบ non-deletional alpha-thalassemia ชนิด Hb CS, Hb PS และ Hb QS

Primer	Nucleotide (5′ -> 3′)	Primer size (bp)	**ตำแหน่งที่ไพรเมอร์จับ**
CS-1 (Forward)	CCTGGGCCGCACTGACCCTCTT	22	173440-173461
R-ct-A (Reward)	ACCAGGAAGGGCCGGTGCAAG	21	173683-173663



ภาพที่ 1 ตำแหน่งของไพรเมอร์ CS-1 และไพรเมอร์ R-ct-A ที่ใช้ในการตรวจสอบ Hb CS, Hb PS และ Hb QS

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของ real-time PCR และ HRM analysis สำหรับการจำแนก Hb CS, Hb PS และ Hb QS

การทำ gradient PCR เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับวิธี HRM โดยใช้โปรแกรม Bio-Rad CFX Manager 3.1 และตั้งค่าช่วง gradient ของ annealing และ extension temperature ในช่วง 58.0-66.5 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้ดีเอ็นเอที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) ในการทำ gradient PCR หลังจากทำ gradient PCR เสร็จแล้วเลือกอุณหภูมิที่ไพร์เมอร์ทำงานได้ดีที่สุด ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ทำโดยเตรียมสารละลายที่มีปริมาตร 25 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา ประกอบด้วยดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ PCR mixture ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ส่วนของ PCR mixture ประกอบด้วย 10x PCR buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร 50 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 5 µM CS-1(Forward) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 5 µM R-ct-A (Reward) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 50 µM SYTO9 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 5U Platinum *Taq* polymerase ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และน้ำปริมาตร 13.15 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร และนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริง (real-time PCR) ด้วยเครื่อง Bio-Rad CFX96™ real-time system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ตั้งค่าการทำงานของเครื่องโดยแบ่งปฏิกิริยาเป็น 5 ขั้นตอนคือ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้น denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ปฏิกิริยา annealing และ extension รวมเป็นขั้นตอนเดียวกันที่อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 และ 3 จนครบ 40 รอบ โดยเมื่อเสร็จขั้นตอน annealing และ extension ในแต่ละรอบ จะมีการตั้งให้เครื่องอ่านค่า fluorescent ที่ได้จากสี SYTO9 เข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายคู่ และหลังจากนั้นเป็นขั้นตอนเตรียม melting โดยตั้งค่าให้มีอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที และขั้นตอนสุดท้ายคือขั้นตอนวิเคราะห์ melting curve มีการเพิ่มอุณหภูมิจาก 80-95 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้นครั้งละ 0.2 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 10 วินาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน อ่านค่า fluorescent ที่ได้จากสี SYTO9 ทุก ๆ 10 วินาที ที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้น ในการทำ real-time PCR ใช้โปรแกรม Bio-Rad CFX Manager 3.1 ในการวิเคราะห์ผลเป็นกราฟ melting curve ของยีนปกติ และยีนของ non-deletional alpha-thalassemia ชนิด Hb H-CS, homozygous Hb CS, heterozygous Hb CS, heterozygous Hb PS และ homozygous Hb QS ต่อมานำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ HRM ด้วยโปแกรม Bio-Rad Precision Melt Analysis ได้เป็นภาพที่เป็น HRM profile ของดีเอ็นเอในกลุ่มควบคุม

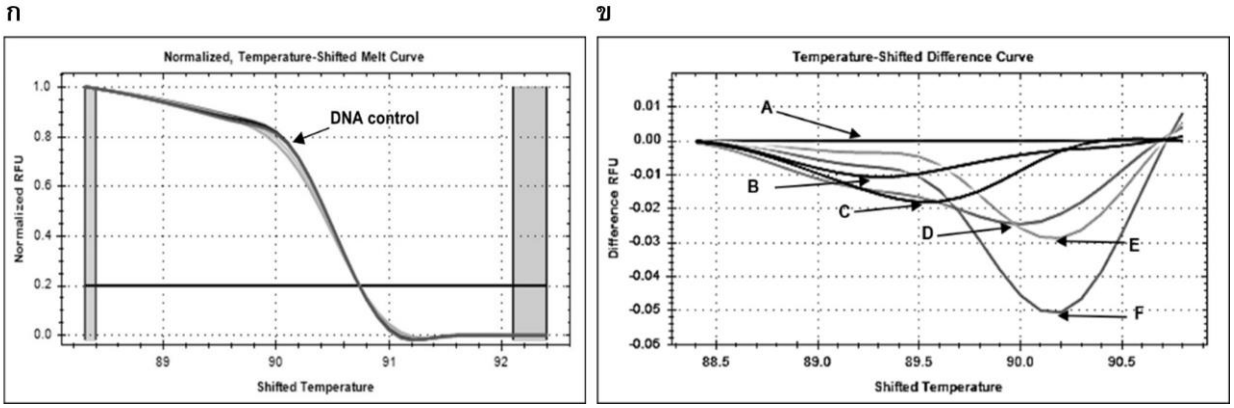
การตรวจ non-deletional alpha thalassemia ชนิด Hb CS, Hb PS และ Hb QS ด้วยวิธี real-time PCR และ HRM analysis

เมื่อได้สภาวะในการทำ real-time PCR และ HRM analysis จากตัวอย่างดีเอ็นเอในกลุ่มควบคุมที่ให้ภาพ melting curve ที่จำเพาะ (HRM profile) ต่อ Hb CS, Hb PS และ Hb QS จึงนำวิธีการและขั้นตอนที่ได้ในการทำ real-time PCR และ HRM analysis มาตรวจสอบในตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 40 ตัวอย่างเพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีการ

ผลการวิจัย

ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของ real-time PCR และ HRM analysis สำหรับการจำแนก Hb CS, Hb PS และ Hb QS

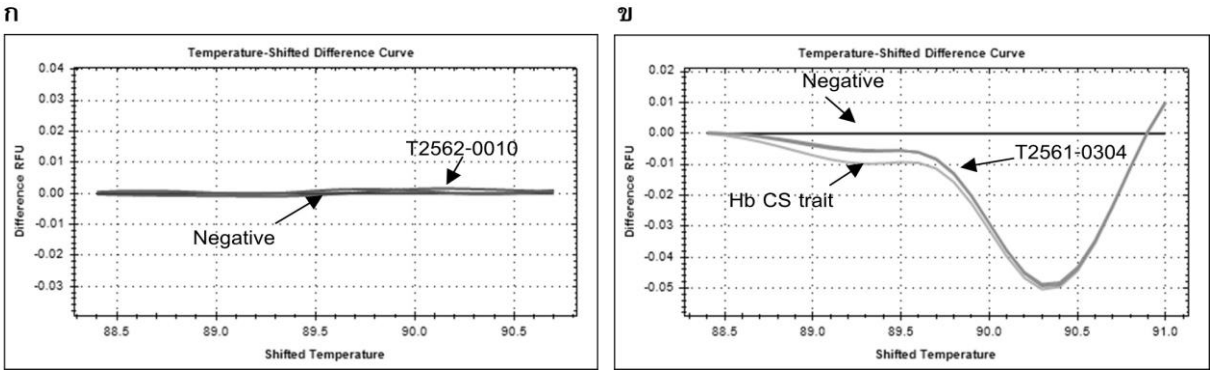
การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของ real-time PCR และ HRM analysis สำหรับตรวจสอบ non-deletional alpha-thalassemia ชนิด Hb CS, Hb PS และ Hb QS โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 1 คู่ คือ CS-1 (Forward primer) และ R-ct-A (Reverse primer) ได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาด 244 bp อุณหภูมิ annealing และ extension ที่เหมาะสมสำหรับวิธีการนี้ได้มาจากการทำ gradient PCR ซึ่งมีอุณหภูมิเท่ากับ 66 องศาเซลเซียส ในการใช้ดีเอ็นเอที่ทราบชนิดของความผิดปกติแล้วเป็นกลุ่มควบคุม ได้แก่ ดีเอ็นเอของคนปกติ เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) สำหรับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือ Hb H-CS, homozygous Hb CS, heterozygous Hb CS, heterozygous Hb PS และพลาสมิดดีเอ็นเอของ Hb QS ที่ใช้เป็น homozygous Hb QS วิเคราะห์ HRM ด้วยโปรแกรม Bio-Rad Precision Melt Analysis โดยเลือกทำการวิเคราะห์ที่ช่วงอุณหภูมิ 88.4-92.1 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 2 (ก) พบรูปแบบ melting curve ที่จำเพาะ (HRM profile) ของ Hb H-CS disease, Homozygous Hb CS, Heterozygous Hb CS, Heterozygous Hb PS และ Homozygous Hb QS ซึ่งจะสามารถแยกออกจากรูปแบบของคนปกติได้ดังแสดงในภาพที่ 2 (ข)



ภาพที่ 2 (ก) ผลการวิเคราะห์ melting curve ที่ได้จากการทำ real-time PCR ของตัวอย่างดีเอ็นเอกลุ่ม control สำหรับการวิเคราะห์ HRM ที่ช่วงอุณหภูมิ 88.4-92.1 องศาเซลเซียส (ข) ผล melting curve analysis จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอกลุ่มควบคุมด้วยเทคนิค HRM analysis ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bio-Rad Precision Melt Analysis รูปแบบmelting curve ที่จำเพาะ (HRM profile) ดีเอ็นของคนปกติ (A), homozygous Hb CS (B), Hb H-CS (C), homozygous Hb QS (D), heterozygous Hb PS (E), heterozygous Hb CS (F)

การตรวจ non-deletional alpha-thalassemia ชนิด Hb CS, Hb PS และ Hb QS ด้วยวิธี real-time PCR และ HRM analysis

ผลการตรวจวิเคราะห์ non-deletional alpha-thalassemia ชนิด Hb CS, Hb PS และ Hb QS ด้วยวิธี HRM analysis ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จาก หน่วยธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยพะเยา จำนวน 40 ตัวอย่าง ได้ผลดังนี้ พบตัวอย่างที่เป็น heterozygous Hb CS จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 7.5 ตัวอย่างที่ให้ผลลบ จำนวน 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 75 (ภาพที่ 3) ตัวอย่างที่ไม่สามารถอ่านผลได้เนื่องจากไม่มี product จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 17.5 และไม่พบตัวอย่างที่เป็น Hb H-CS disease, homozygous Hb CS, heterozygous Hb PS และ homozygous Hb QS



ภาพที่ 3 ตัวอย่าง melting curve ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HRM analysis ในตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือด (ก) melting curve ของตัวอย่าง T2562-0010 ที่ให้ผลตรวจเป็นลบ (ข) melting curve ของตัวอย่าง T2561-0304 ที่ให้ผลตรวจ Heterozygous Hb เป็น Hb CS

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในการเลือกจับคู่ไพรเมอร์ CS-1 (Fowaed) ที่ใช้ในการทำ ARMS PCR สำหรับ Hb QS ของ Wee *et al*., 2009 และ R-ct-A (Reward) ที่ใช้ในการทำ HRM analysis สำหรับ Hb CS ของ Seeratanachot *et al*., 2015 เป็นการเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้คร่อมบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ non-deletional alpha-thalassemia ประกอบด้วย 3 ชนิด คือ Hb CS, Hb PS และ Hb QS ขั้นตอน annealing และ extension รวมเป็นขั้นตอนเดียวกันในการทำ real-time PCR เพื่อเป็นการลดโอกาสที่ไพรเมอร์จะไปจับบริเวณที่ไม่ต้องการ อุณหภูมิที่เหมาะสมได้มาจากการทำ gradient PCR ซึ่งมีอุณหภูมิเท่ากับ 66 องศาเซลเซียส โดย PCR product ของชุดไพรเมอร์มีขนาด 244 bp และมีค่า T_M ใกล้เคียงกัน จึงนำผล melting curve ที่ได้จากการทำ real-time PCR ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HRM analysis ได้รูปแบบ melting curve ที่จำเพาะ (HRM profile) ของ Hb H-CS disease, homozygous Hb CS, heterozygous Hb CS, heterozygous Hb PS และ homozygous Hb QS สามารถแยกออกจากรูปแบบของคนปกติได้ (ภาพที่ 2) เนื่องจาก Hb H-CS disease และ homozygous Hb CS มี allele ที่มีความผิดปกติ

ของ Hb CS เป็น 1 allele เหมือนกัน เมื่อทำ HRM analysis จึงพบว่ามี melting curve ที่ใกล้เคียงกัน จึงจำเป็นต้องใช้ผลการตรวจสอบ alpha-thalassemia 1 ร่วมด้วยในการจำแนก โดยพบว่าตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกของ alpha-thalassemia 1 สามารถจำแนกได้เป็น Hb H-CS disease ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบของ alpha-thalassemia 1 สามารถจำแนกได้เป็น homozygous Hb CS

จากผลการตรวจวิเคราะห์ non-deletional alpha-thalassemia ชนิด Hb CS, Hb PS และ Hb QS ด้วยวิธี HRM analysis ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากหน่วยธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยพะเยา จำนวน 40 ตัวอย่าง วิธี HRM analysis สามารถตรวจสอบพบ Heterozygous Hb CS จำนวน 3 ราย (ร้อยละ 7.5) ที่มี melting curve แยกออกจาก melting curve ของตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุม ที่มีชนิดความผิดปกติเป็น Hb H-CS disease, homozygous Hb CS, heterozygous Hb PS และ homozygous Hb QS อย่างชัดเจน ไม่พบตัวอย่างที่มีความผิดปกติของยีนแอลฟาโกลบินชนิด Hb PS และ Hb QS ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี ARMS-PCR ของห้องปฏิบัติการหน่วยธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยพะเยา พบมีอุบัติการณ์ใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานในบุคคลากรมหาวิทยาลัยพะเยา (ร้อยละ 5) ในการรายงานก่อนหน้านี้พบความผิดปกติของทั้ง Hb PS และ Hb QS ได้น้อยในประเทศไทย (Nittayaboon & Nopparatana, 2018) แต่ปัจจุบันการเข้ามาของประชาชนชาวลาวและชาวจีนในภาคเหนือของไทยมีเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการเคลื่อนย้ายของยีนตามมาด้วย ดังนั้นการเตรียมวิธีการตรวจธาลัสซีเมียให้พร้อมและครอบคลุมชนิดความผิดปกติจึงมีความจำเป็น ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอเพียง 40 ตัวอย่าง จึงตรวจไม่พบ Hb PS และ Hb QS อาจต้องมีการศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น จึงจะตรวจพบ Hb PS และ Hb QS ในประชากรจังหวัดพะเยาจากการที่พบอุบัติการของทั้ง Hb PS และ Hb QS น้อย นอกจากนี้ยังพบตัวอย่างที่ไม่สามารถอ่านผลได้เนื่องจากไม่มี product จำนวน 7 ตัวอย่าง เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีตำแหน่งอยู่บริเวณส่วนของยีน HBA2 ดังนั้นในกรณีที่มีความผิดปกติแบบ deletional alpha-thalassemia จะไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นมาได้ ไม่ว่าจะเป็น compound heterozygosity ระหว่าง alpha-thalassemia 1 ทั้งชนิด SEA และ Thai deletion ร่วมกับ alpha-thalassemia 2 ทั้งแบบ 3.7 และ 4.2 deletion หรือเป็นความผิดปกติแบบ homozygosity alpha-thalassemia 2 ชนิด 3.7 deletion หรือ homozygosity alpha-thalassemia ชนิด 4.2 deletion ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจวินิจ deletional alpha-thalassemia ซึ่งจากผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ประเภท deletional alpha-thalassemia ในตัวอย่างที่ไม่พบ product ด้วยวิธี real-time gap PCR (Suwannakhon, *et al*., 2014) และวิธี Delta delta (**ΔΔ**) CT โดยใช้ชุด ไพรเมอร์ A, B และ C (Seeratanachot *et al*., 2015) พบมีความผิดปกติแบบ deletional alpha-thalassemia 1 ชนิด SEA deletion (alpha-thalassemia 1) และ 3.7 deletion (alpha-thalassemia 2) ตามลำดับ ดังนั้นในการใช้วิธี HRM analysis ในการตรวจสอบ non-deletional alpha-thalassemia 2 ชนิด Hb CS, Hb PS และ Hb QS ควรมีการตรวจสอบร่วมกับ deletional alpha thalassemia เพื่อความถูกต้องในการตรวจวินิจฉัย เห็นได้ว่าวิธีการ real-time PCR และ HRM analysis ในการตรวจสอบ Hb CS, Hb PS และ Hb QS ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการตรวจสอบทั้ง 3 ความผิดปกติได้พร้อมกันใน 1 ปฏิกิริยา PCR และใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 80 นาที จึงมีค่าใช้จ่ายถูกกว่าเมื่อเทียบกับ ARMS-PCR ที่ต้องใช้ไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา 3 คู่ ในการตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีความผิดปกติ และใช้ไพรเมอร์อีก 3 คู่ ในการตรวจสอบดีเอ็นเอปกติ จึงทำการจำแนกชนิดความผิดปกติได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี DNA sequencing มีราคาแพงและใช้เวลานานมากกว่า

สรุปผลการวิจัย

วิธี HRM analysis ที่ได้พัฒนาขึ้นมา เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความไวสำหรับการตรวจวินิจฉัยเพื่อคัดกรองในกลุ่มประชากรจำนวนมากได้อย่างรวดเร็วและการจำแนก Hb CS, Hb PS และ Hb QS ได้พร้อมกัน ซึ่งวิธีการอื่นที่ใช้ในการตรวจสอบ non-deletional alpha-thalassemia เช่น วิธีการ ARMS PCR จำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์จำนวนมากคู่ ตามจำนวนชนิดที่กลายพันธุ์ วิธีการ DNA sequencing มีราคาแพง และวิธี reverse dot blot ที่มีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลานาน และปนเปื้อนง่าย อย่างไรก็ตามในการวินิจฉัย non-deletional alpha-thalassemia ควรมีการตรวจสอบ deletional alpha thalassemia ร่วมด้วยเพื่อความถูกต้องในการจำแนก deletional และ non-deletional Hb H disease

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และหน่วยธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยพะเยา

เอกสารอ้างอิง

Du, L., Bao, X., He, W., Qin, D., Wang, J., Xiong, Y., Shi, X., Ding, H., Yao, C., & Wu, J. (2021). Severe fetal anemia and hydrops fetalis associated with compound heterozygosity for Hb Zurich-Albisrieden (*HBA2*: c.178G>C) and Hb Quong Sze (*HBA2*: c.377T>C). *The Journal of international medical research*, *49*(7), 3000605211031429.

He, S., Zheng, C., Meng, D., Chen, R., Zhang, Q., Tian, X., & Chen, S. (2015). Hb H Hydrops Fetalis Syndrome Caused by Association of the - -(SEA) Deletion and Hb Constant Spring (HBA2: c.427T > C) Mutation in a Chinese Family. *Hemoglobin*, *39*(3), 216–219.

Kalle Kwaifa, I., Lai, M. I., & Md Noor, S. (2020). Non-deletional alpha thalassaemia: a review. *Orphanet journal of rare diseases*, *15*(1), 166.

Lemmens-Zygulska, M., Eigel, A., Helbig, B., Sanguansermsri, T., Horst, J., & Flatz, G. (1996). Prevalence of alpha-thalassemias in northern Thailand. *Human genetics*, *98*(3), 345–347.

Na-Nakorn, S., & Wasi, P. (1970). Alpha-thalassemia in Northern Thailand. *American journal of human genetics*, *22*(6), 645–651.

Nittayaboon, K., & Nopparatana, C. (2018). Molecular characterization of Hb H disease in southern Thailand. *International Journal of Hematology, 108*, 384-389.

Sanguansermsri, T. (2014). Condition of thalassemia trait. *Journal of Hematology and Transfusion Medicine*, 24(4), 329-332. (in Thai)

Seeratanachot, T., Shimbhu, D., Charoenkwan, P., & Sanguansermsri, T. (2015). Detection of deletion α^{+}-thalassemia mutation [-α (3.7), -α (4.2)] by quantitative PCR assay. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 46(1), 110-115.

Suwannakhon, N., Seeratanachot, T., Mahingsa, K., Namwong, P., & Sanguansermsri, T. (2014). Prevalence of alpha thalassemia trait in the volunteered personals of Phayao University. *Journal of Hematology and Transfusion Medicine*, 24(2), 129-136.

Wee, Y. C., Tan, K. L., Chua, K. H., George, E., & Tan, J. A. (2009). Molecular characterisation of Haemoglobin Constant Spring and Haemoglobin Quong Sze with a Combine-Amplification Refractory Mutation System. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 16(3), 21–28.