โครงการวิจัยเรื่องการตรวจหายีนธาลัสซีเมียและยีนของพ่อในน้ำคร่ำ เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด

(Detection of thalassemic and paternal genes in amniotic fluid for prenatal diagnosis)

ภายใต้แผนงานวิจัย การควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียในจังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบมากในประเทศไทย มีถ่ายทอดแบบ autosomal recessive ซึ่งมีความรุนแรงที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของการกลายพันธุ์ การควบคุมและป้องกันอุบัติการณ์ของโรคทำได้โดยการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis)โดยการเจาะน้ำคร่ำเพื่อนำเซลล์ของลูกมาตรวจหาชนิดของการกลายพันธุ์ แต่ก่อนที่จะตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของทารกในครรภ์นั้นจำเป็นต้องตรวจวินิจฉัยการปนเปื้อนเซลล์ของเซลล์มารดาในน้ำคร่ำ (maternal cell contamination) ด้วย VNTR ตำแหน่ง D1S80ก่อน เพื่อป้องกันการตรวจวินิจฉัยที่ผิดพลาดจากนั้นจึงทำการตรวจหาชนิดของ β-thalassemia และ HbE ด้วยเทคนิค multiplex ARMS (Amplification Refractory Mutation System) ซึ่งขั้นตอนการตรวจทั้งสองต้องใช้เวลาหลายวันอีกทั้งอายุครรภ์ที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้การยุติการตั้งครรภ์อาจเกิดอันตรายต่อมารดา คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาเทคนิค single-tube multiplex PCR เพื่อตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด โดยรวมขั้นตอนการตรวจการปนเปื้อนเซลล์ของเซลล์มารดาในน้ำคร่ำ และการตรวจหาชนิดของ β-thalassemia และ HbE ด้วยเทคนิค multiplex ARMS เข้าด้วยกันในการทำ PCR เพียงครั้งเดียว เพื่อประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจ โดยเปรียบเทียบผลการตรวจด้วยวิธีเดิมกับเทคนิค single tube multiplex PCR ในคู่สมรสที่เป็นคู่เสี่ยงจำนวน 10 ครอบครัวจากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร คณะแพทยศาสตร์ พบว่าทารกในครรภ์เป็นปกติ จำนวน 2 คน ทารกในครรภ์มีการกลายพันธุ์ชนิด heterozygous Hb E (G- A) จำนวน 1 คน heterozygous codon17 (A -T) จำนวน 3 คน และเป็น compound heterozygous β-thalassemia/ HbE จำนวน 2 คน ซึ่งให้ผลตรงกัน และคณะผู้วิจัยมีแผนการเพิ่มจำนวนครอบครัวคู่เสี่ยงเพื่อทดสอบประสิทธิภาพและความถูกต้องของเทคนิคนี้ต่อไป

คำสำคัญ: การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด β-thalassemia, Hb E, **single-tube PCR**

บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางทางพันธุกรรมที่มีอุบัติการณ์สูงและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปี จากการตรวจคัดกรองพาหะของโรคธาลัสซีเมียของในหญิงตั้งครรภ์ที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก (Wong *et al.*, 2004) พบว่ามีผู้ที่เป็น hemoglobin E trait ร้อยละ 21.27, homozygouse hemoglobin E ร้อยละ 2.18, α-thalassemia trait ร้อยละ 7.09 และ β-thalassemia trait ร้อยละ 1.63 ซึ่งมีชนิดของการกลายพันธุ์ที่แตกต่างจากพื้นที่อื่นๆ ในประเทศไทย (Choopayak *et al*., 2003; Choopayak *et al.*, 2004; Mirasena *et al*., 2007; Pravatmuang *et al*., 1995; Sangnark, 2009) จึงสามารถประมาณการได้ว่า จะมีเด็กเกิดใหม่ในจังหวัดพิษณุโลกที่เป็น homozygous α-thalassemia 1 จำนวน 11 คนต่อปี ทารกจะเสียชีวิตในครรภ์หรือหลังคลอดไม่นานและก่อให้เกิดปัญหาในการดูแลรักษามารดาในแง่ของภาวะแทรกซ้อน ส่วน compound heterozygous β-thalassemia/ hemoglobin E จำนวน 18 คนต่อปี และ homozygous β-thalassemia จำนวน 1 คนต่อปี จะใช้การรักษาแบบประคับประคอง เช่นการให้เลือดทดแทน รวมทั้งยาขับเหล็กเพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดี ซึ่งเป็นปัญหาต่อครอบครัวและประเทศชาติทั้งในแง่เศรษฐกิจและสังคม แต่ละปีรัฐต้องใช้งบประมาณในการดูแลผู้ป่วยเป็นจำนวนมาก จึงถือเป็นนโยบายระดับชาติที่จะต้องป้องกันและควบคุมโรคธาลัสซีเมีย (Fucharoen & Winichagoon, 1992)

การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรจังหวัดพิษณุโลก สูติ-นรีแพทย์จะดำเนินการเจาะดูดน้ำคร่ำในช่วงกลางไตรมาศที่สองของการตั้งครรภ์ (16-18 สัปดาห์) เพื่อนำเซลล์ทารกในครรภ์มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อส่งตรวจหายีนเบต้าธาลัสซีเมีย ที่หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จากการตรวจวินิจฉัยที่ผ่านมาพบว่าจำเป็นต้องตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาที่ปะปนอยู่ในน้ำคร่ำ ซึ่งอาจทำให้ผลการตรวจวินิจฉัยผิดพลาด โดยเฉพาะในรายที่ตรวจพบว่าทารกในครรภ์เป็นโรคธาลัสซีเมียเพื่อป้องกันการตรวจวินิจฉัยผิดพลาด (Antoniadi *et al*., 2002; Smith *et al*., 1995)

ขั้นตอนในการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จะทำการตรวจหาอัลลีลของพ่อและแม่เพียงหนึ่งโลกัสคือ D1S80 ก่อน แต่หากโลกัสนั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลแม่และพ่อได้ เนื่องจากอัลลีลของพ่อหรือแม่เป็น homozygous หรือมีอัลลีลเดียวกัน จึงจะใช้โลกัสอื่นๆ คือ ApoB ต่อไป เพื่อใช้ตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนดีเอ็นเอของมารดาในน้ำคร่ำ ทำให้เกิดความล่าช้าในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด (Smith *et al*., 1995; Batanian *et al*., 1998)

คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาเทคนิคการตรวจหายีน β-thalassemia และยีนของพ่อ (paternal allele) ด้วย STR และ SNPs ซึ่งมีความเฉพาะต่อประชากรในพิษณุโลกโดยนำเทคนิค multiplex ARMS (Mirasena *et al*., 2007; 2008) มาตรวจหา β-thalassemic genes ที่พบมากในจังหวัดพิษณุโลก ได้แก่ cd41/42 (-TCTT), cd17 (A-T), cd71/72 (+A) และ IVS I-1 (G-T) และนำเทคนิค ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (Mirasena *et al*., 2010) เพื่อตรวจหายีนของพ่อ (paternal allele) จาก VNTR ตำแหน่ง D1S80 ซึ่งทำให้ได้เทคนิคการตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียและยีนของพ่อ (paternal allele) ในคราวเดียวกันที่มีความเฉพาะต่อประชากรในพิษณุโลก ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย และไม่เกิดความล่าช้าในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด อันเป็นการเพิ่มศักยภาพของการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด และคุณภาพชีวิตของประชาชนในจังหวัดพิษณุโลก มีระบบการจัดการสาธารณสุขที่ดีขึ้น และมีความมั่นคงด้านสุขภาพของประเทศไทย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การพัฒนาเทคนิค single-tube multiplex PCR เริ่มจากการหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนของเซลล์มารดาด้วย VNTR ตำแหน่ง D1S80 และการตรวจวินิจฉัยเบต้าธาลัสซีเมีย ได้แก่ codon17 (A -T), codons 41/42 (-CTTT) และฮีโมโกลบินอี codon 26 (G-A) ด้วยดีเอ็นเอที่ทราบชนิดของการกลายพันธ์ (positive control) จากหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร และประเมินประสิทธิภาพโดยการนำเทคนิคนี้มาตรวจวินิจฉัยในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบชนิดของการกลายพันธุ์จำนวน 10 ครอบครัวจากหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยนเรศวร

1. การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเลือดและน้ำคร่ำของหญิงตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงที่ได้จากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร มาสกัดดีเอ็นเอด้วย Chelex® method โดยเติม lysis buffer 1 มิลลิลิตรลงในตัวอย่างเลือด 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งแล้วดูดสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย 5% Chelex® ให้ท่วมตะกอน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เพื่อใช้หาสภาวะที่เหมาะสมและการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคนี้

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมของ single-tube multiplex PCR

เตรียมสารละลายต่างๆ ที่ใช้ในการทำ single-tube multiplex PCR ดังนี้ 200 μM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 1.25 U *Taq* DNA Polymerase (QIAGEN, Germany), Q-solution, 200-500 μg DNA และ D1S80 primers, β-thalassemia, HbE primers สำหรับการตรวจธาลัสซีเมียทั้ง 3 ชนิด โดยลำดับนิวคลีโอไทด์และความเข้มข้นที่ใช้ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นนำไปตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค single-tube multiplex PCR โดยเริ่มจากอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อทำให้ *Taq* DNA Polymerase อยู่ในสภาพพร้อมทำหน้าที่ จากนั้นจึงเข้าสู่วงรอบของการทำ PCR โดย denaturation ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 15 วินาที จำนวน 35 รอบ และเพิ่ม extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำมาแปลผลด้วย 1.5 % อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ 120 โวลท์ เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์การปนเปื้อนของเซลล์มารดา และการวินิจฉัยเบต้าธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี (ปรับปรุงจาก Mirasena *et al*., 2010)

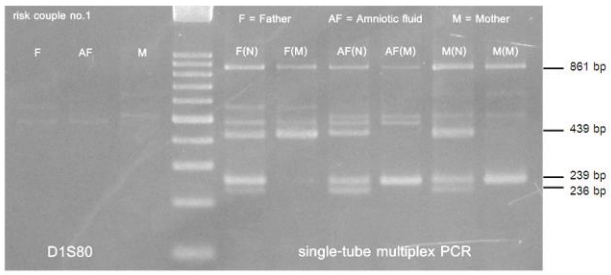
ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาดของดีเอ็นเอ (bp)
D1S80	5’-GAAACTGGCCTCCAAACACTGCCCGCCG-3’ 5’-GTCTTGTTGGAGATGCACGTGCCCCTTGC-3’	500-700 bp
Internal control	5’-CAATGTATCATGCCTCTTTGCACC-3’ 5’-GAGTCAAGGCTGAGAGATGCAGGA-3’	861 bp
Hb E	5’-ACCTCACCCTGTGGAGCCAC-3’ 5’-TAACCTTGATACCAACCTGCCCAGGGGGTT-3’	236 bp
Codon 17	5’-ACCTCACCCTGTGGAGCCAC-3’ 5’-CTCACCACCAACTTCATCCACGTTCAGCTA-3’	239 bp
Codons 41/42	5’-ACCTCACCCTGTGGAGCCAC-3’ 5’-GTGGAGACAGATCCCCAAAGGACTCAACCT-3’	439 bp

3. การประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค single-tube multiplex PCR

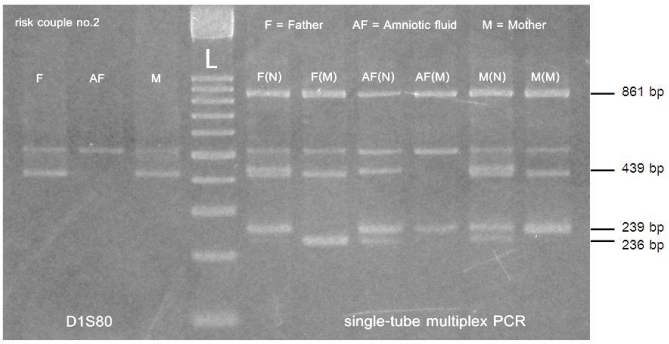
เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจึงทดสอบหาความแม่นยำของเทคนิคนี้ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบชนิดของเบต้าธาลัสซีเมียแล้วจำนวน 10 ครอบครัว และประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคนี้ โดยเปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยกับเทคนิค Multiplex ARMS ของหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร

ผลการศึกษา

การตรวจวินิจฉัยหาชนิดของเบต้าธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีด้วยเทคนิค single-tube multiplex PCR สามารถแปลผลการตรวจวินิจฉัยได้ดังรูปที่ 1 และ 2 สรุปผลการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยเทคนิค single-tube multiplex PCRดังแสดงใน ตารางที่ 2



รูปที่ 1 ผลการตรวจการปนเปื้อนของเซลล์มารดาในน้ำคร่ำของคู่เสี่ยงด้วย D1S80 พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเซลล์มารดาในน้ำคร่ำ (ซ้าย) และผลการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดในคู่เสี่ยง (ขวา) พบว่า บิดาเป็น heterozygous $\beta^{41/42}$-thalassemia มารดาเป็น heterozygous β^{17}-thalassemia ส่วนทารกในครรภ์ ผลเป็น heterozygous β^{17}-thalassemia
F= บิดา (Father), M= มารดา (Mother), AF= น้ำคร่ำ (Amniotic fluid)



รูปที่ 2 ผลการตรวจการปนเปื้อนของเซลล์มารดาในน้ำคร่ำของคู่เสี่ยงด้วย D1S80 พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเซลล์มารดาในน้ำคร่ำ (ซ้าย) และผลการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดในคู่เสี่ยง (ขวา) พบว่า บิดาเป็น heterozygous HbE มารดาเป็น heterozygous β^{17}-thalassemia ส่วนทารกในครรภ์ ผลเป็น heterozygous β^{17}-thalassemia
F= บิดา (Father), M= มารดา (Mother), AF= น้ำคร่ำ (Amniotic fluid)

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจวินิจฉัยการปนเปื้อนของเซลล์มารดา (Maternal Cell Contamination: MCC) และการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด (Prenatal Diagnosis: PND) ด้วยเทคนิค single-tube multiplex PCR

ครอบครัวที่	ผลการตรวจการปนเปื้อนเซลล์มารดาในน้ำคร่ำ	ผลการตรวจเบต้าธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี		
		มารดา	บิดา	ทารกในครรภ์
1	ไม่มีการปนเปื้อน	Het. cd41/42	Het. HbE	$\beta^{41/42}$/HbE
2	ไม่มีการปนเปื้อน	Het. cd41/42	Het. HbE	Het. HbE
3	ไม่มีการปนเปื้อน	Het. HbE	Het. cd17	Normal
4	ไม่มีการปนเปื้อน	Het. HbE	Het. cd17	Het. β^{17}
5	มีการปนเปื้อน	Het. HbE	Het. cd41/42	Het. HbE
6	ไม่มีการปนเปื้อน	Het. HbE	Het. cd17	Het.β^{17}
7	ไม่มีการปนเปื้อน	Het. cd17	Het. HbE	$\beta^{41/42}$/HbE
8	ไม่มีการปนเปื้อน	Het. HbE	Het. cd41/42	$\beta^{41/42}$/HbE
9	ไม่มีการปนเปื้อน	Het. HbE	Het. cd41/42	Het. HbE
10	มีการปนเปื้อน	Het. HbE	Het. cd17	Normal

สรุปผลการวิจัย

เทคนิคการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโรคธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค single-tube multiplex PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากเป็นการตรวจที่ครอบคลุมการตรวจ การปนเปื้อนของเซลล์มารดา และการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดเบต้าธาลัสซีเมีย และ ฮีโมโกลบินอีที่พบมากในประชากรไทย สามารถนำไปใช้ได้ในทุกพื้นที่ของประเทศไทยและประเทศข้างเคียงบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ขอขอบคุณหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคนี้

เอกสารอ้างอิง

Antoniadi T, Yapijakis C, Kaminopetros P, Makatsoris C, Velissariou V, Vassilopoulos D, Petersen MB. A simple and effective approach for detecting maternal cell contamination in molecular prenatal diagnosis. Prenat Diang 2002;22:425-29.

Batanian JR, Ledbetter DH, Fenwick RG. A simple VNTR-PCR method for detecting maternal cell contamination in prenatal diagnosis. Genet Test 1998;2:347-50.

Bhoopat T, Sriduangkaew S, Steger HF. STR loci D10S2325, D16S539 and D19S253: Northern Thai population data. Legal Medicine 2006;8:306-307.

Chan K, Yam I, Leung KY, Tang M, Chan TK, Chan V. Detection of paternal alleles in maternal plasm for noninvasive prenatal diagnosis of β-thalassemia: a feasibility study in southern Chinese. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2010;150:28-33.

Choopayak C, Limmongkon A, Suyasunanont U, poungbangpho S. PCR detection of α-thalassemia 1 (Southeast Asian Type) carriers in the South Northern Thailand. Naresuan Univ J 2003;11:29-36.

Choopayak C, Mirasena S, Poodendaen C, Jiraviriyakul A, Sangarun K, Shimbhu D. Thalassemia mutations in lower northern part of Thailand. Naresuan Univ J 2005;13:19-29.

Deng YJ, Li YZ, Yu XG, Li L, Wu DY, Zhou J, Man TY, Yang G, Yan JW, Cai DQ, Wang J, Yang HM, Li SB, Yu J. Preliminary DNA identification for the tsunami victims in Thailand. Genomics Proteomics Bioinformatices 2005;3:143-157.

Fucharoen S, Winichagoon P. Thalassemia in Southeast Asia: problem and strategy for prevention and control. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992;23:647-655.

International HapMap Consotium. A haplotype map of the human genome. Nature 2005;437:1299-320.

Mirasena S, Shimbhu D, Sanguansermsri M. detection of b-thalassemia mutation using a multiplex amplification refractory mutation system assay. Hemoglobin 2008;32:1-7.

Mirasena S, Shimbhu D, Sanguansermsri M. The spectrum of β-thalassemia mutations in Phitsanulok province: development of multiplex ARMS for mutation detection. Naresuan Univ J 2007;15:43-53.

Mirasena S, Dawan Shimbhu. An approach for detecting contamination in amniotic fluid for genetic prenatal diagnosis. The second International Conference on Forensic Science and Medical Science, July, 28th-29th 2007. Phitsanulok Thailand, Page 70.

Prvatmuang P, Tiloklurs M, Suannum M, Chaipat C. Phitsanulok population: the highest incidence of hemoglobin E in the northern provinces of Thailand and PND counseling. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1995;26:266-270.

Sangnark P. Prevalence of thalassemia and hemoglobinopathies in pregnant women at Bangkrathum Hospital, Phitsanulok province. Buddhachinaraj Medical J 2009;26-37-43.

Shotivaranon J, Chirachariyavej T, Leetrakool N, Rerkamnuaychoke B. DNA database of populatios from different parts in the Kingdom of Thailand. Forensic Sci Int 2009;4:e37-e38.

Smith GW, Graham CA, Nevin J, Nevin NC. Detection of maternal cell contamination in amniotic fluid cell cultures using fluorescent labeled microsatellites. J Med Genet 1995;32:61-64.

Wong P, Thanormrat P, Srithipayawan S, Taytiwat P, Jermnim N, Niyomthom S, Nimnuch N, Sanguansermsri T. Prevalence of thalassemia trait from screening program in pregnant women of Phitsanulok. Thai J Hematol Transfusion Med 2004;14:181-186.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R, Chelex100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques1991:10:506-13.GenePrint™ STR System (Silver Stain Detection): Technical manual. Promega, 1998: 49.