

ฉบับที่ ๑๒๖

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์



สำนักหอสมุด

ชื่อโครงการ

การพัฒนาวิธีจำแนกสารพันธุกรรมบุตรในพลาสมาของมารดาเพื่อการคัดกรองทารกบวมน้ำ
ชนิดบาร์ธก่อนคลอดแบบไม่รุกราน

Discrimination of cell-free fetal DNA for noninvasive prenatal screening for
hemoglobin Bart's hydrops fetalis

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ผศ.ดร.พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี	มหาวิทยาลัยนเรศวร
ศ.เกียรติคุณ ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี	มหาวิทยาลัยพะเยา
ดร.เมธวี ศรีคำมูล	มหาวิทยาลัยนเรศวร
นายธนพัฒน์ แผงเกษร	มหาวิทยาลัยพะเยา

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน ๒๓ ส.ค. ๒๕๖๒

เลขทะเบียน ๑๐๒๐๖๕๙

เลขเรียกหนังสือ ๐๕

๕๖

๗๕๕๓๕

๒๕๖๐

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ ๒๕๖๐

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จขึ้นได้ นอกจากความเพียรพยายามของคณะผู้วิจัยแล้ว ยังมาจากความอนุเคราะห์จากผู้มีอุปการคุณหลายท่าน หลายหน่วยงาน คณะผู้วิจัยจึงขอกล่าวขอบพระคุณมาดังนี้ ขอขอบพระคุณหน่วยธาลัสซีเมีย สถาบันมนุษย์พันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่อนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ทำการวิจัย ตลอดจนจดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ Kevin Mark Roehl จากสถาบันพัฒนาวิชาการด้านภาษา มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่กรุณาช่วยเหลือในการแก้ไขต้นฉบับสำหรับการตีพิมพ์เผยแพร่ สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ คุณขวัญฤดี มหิงศา คุณอรุณี ปิงยศ นักเทคนิคการแพทย์ คุณวรรณวิภา บำรุงภักดี และเจ้าหน้าที่ธุรการ คุณภาวิณี ขาวน่าน จากหน่วยธาลัสซีเมีย ที่อำนวยความสะดวกในการศึกษาวิจัย กระทั่งงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จได้

และขอขอบคุณขอขอบพระคุณงบประมาณการวิจัยที่ได้รับจากรสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร 2560 ที่เป็นแรงขับเคลื่อนสำคัญ ที่ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้ ดำเนินมาได้ถึงจุดนี้

คณะผู้วิจัยต้องขอกล่าวขอบพระคุณท่านผู้มีอุปการคุณที่กล่าวมาข้างต้นเป็นอย่างสูง และหากมีท่านผู้มีอุปการคุณท่านใด ที่คณะผู้วิจัยได้กล่าวถึงตกหล่นไป ต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย



การพัฒนาวิธีจำแนกสารพันธุกรรมบุตรในพลาสมาของมารดาเพื่อการคัดกรองทารกบวมน้ำชนิดบารส์
ก่อนคลอดแบบไม่รุกราน

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีความมุ่งหมายที่ต้องการพัฒนาวิธีจำแนกสารพันธุกรรมบุตรในพลาสมาของมารดา เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองก่อนคลอดโรคทารกบวมน้ำชนิดบารส์แบบไม่รุกราน คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการค้นหาเป้าหมายในการจำแนกกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ทารกบวมน้ำออกจากกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ทารกปกติ ทั้งนี้เพื่อให้การดำเนินการวิจัยสอดคล้องไปกรอบระยะเวลาการดำเนินการและตัวอย่างที่มีอยู่ คณะผู้วิจัยได้กำหนดใช้ตัวอย่างพลาสมาจากมารดาที่ตั้งครรภ์ทารกปกติเป็นตัวแทนของกลุ่มปกติ และใช้ตัวอย่างพลาสมาของหญิงที่ไม่มีครรภ์เป็นตัวแทนของกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ทารกบวมน้ำ เนื่องจากเป้าหมาย CpG site ที่ใช้ติดตามตั้งอยู่บนยีน *HBAP1* ซึ่งอยู่ในกลุ่มยีนอัลฟาโกลบิน ดังนั้นในกลุ่มหญิงที่ไม่มีครรภ์จึงมีภาวะที่คล้ายกับหญิงที่ตั้งครรภ์ทารกบวมน้ำที่ไม่ได้นำพา ยีน *HBAP1* คณะผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบ CpG site จำนวน 4 ตำแหน่งในยีนข้างต้น ซึ่งจากการศึกษาระดับ DNA methylation ในภาพรวม พบว่ามีความแตกต่างกันในระหว่างกลุ่มหญิงตั้งครรภ์และไม่ตั้งครรภ์ เมื่อทำการเปรียบเทียบเป็นราย CpG site พบว่า มีเฉพาะ CpG site ที่ 2 เท่านั้น ที่แตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ นอกจากนี้ได้ทำการค้นหา DNA methylation pattern ที่แตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง แต่ทั้งนี้ไม่พบว่ามี pattern ใดที่แตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ ผลสรุปของการศึกษานี้ จึงได้มาซึ่งเป้าหมายที่น่าจะมีศักยภาพในการจำแนกกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ทารกบวมน้ำออกจากกลุ่มมารดาที่ตั้งครรภ์ทารกปกติ โดยติดตามจากระดับ DNA methylation ของ CpG ที่ 2 ที่จะลดลงในหญิงที่ตั้งครรภ์ทารกปกติ ซึ่งจากการการศึกษาชี้ให้เห็นความเป็นไปได้ที่ระดับ DNA methylation ของกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ทารกบวมน้ำน่าจะไม่ลดลงด้วย ในทำนองเดียวกันกับผลที่ได้จากกลุ่มหญิงที่ไม่ตั้งครรภ์

คำสำคัญ: DNA methylation pattern, alpha⁰-thalassemia Southeast Asian, cell-free fetal DNA, Non-invasive prenatal testing

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 แนวคิดที่มาและความสำคัญ	1
1.2 จุดประสงค์	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 กรอบแนวคิด	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 ความสำคัญของอัลฟาธาลัสซีเมียในประเทศไทยและภูมิภาคอาเซียน	4
2.1.1 α^0 -thalassemia	4
2.1.2 ระบาดวิทยาของอัลฟาธาลัสซีเมีย	4
2.1.3 Southeast Asian deletion and Hb Bart's hydrop fetalis syndrome	5
2.1.4 Invasive prenatal testing and Risk	6
2.2 การประยุกต์ใช้ Cell-free fetal DNA ในการตรวจวินิจฉัยแบบไม่รุกราน	6
2.2.1 ธรรมชาติของ cell-free DNA และ cell-free fetal DNA	6
2.2.2 Cell free fetal DNA and current noninvasive prenatal testing	8
2.2.3 ข้อจำกัดในการตรวจครรภ์ทารกบวมน้ำชนิดบาร์ธแบบไม่รุกราน	9
2.3 ความเป็นไปได้ในการจำแนก cell-free fetal allele ออกจากสารพันธุกรรมของมารดาด้วย DNA methylation marker	9
2.3.1 กระบวนการเกิด DNA methylation pattern ภายในเซลล์	9
2.3.2 Differential DNA methylation Region ระหว่างรกและเม็ดเลือดขาว บน α -globin gene cluster	11
2.4 หลักการของวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการศึกษา DNA methylation ในงานวิจัยนี้	12
2.4.1 Bisulfite Conversion	12
2.4.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ bisulfite-treated DNA	14
2.4.3 Methylation-sensitive High-Resolution Melting analysis	14
2.4.4 Targeted Bisulfite S	

sequencing.....	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
3.1 การออกแบบการวิจัย และตัวอย่าง.....	18
3.2 การศึกษาความเป็นไปได้ของ 4 CpG site เพื่อติดตาม cell-free fetal DNA.....	18
3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากรกและเม็ดเลือดขาว	18
3.2.2 การแปรรูปดีเอ็นเอ เพื่อใช้ศึกษา DNA methylation profile ด้วยปฏิกิริยา bisulfite conversion.....	19
3.2.3 การเปรียบเทียบ DNA methylation profile ของรกและเม็ดเลือดขาวด้วยเทคนิค High Resolution Melting analysis.....	19
3.3 การเปรียบเทียบ DNA methylation profile ของ cell-free fetal DNA ระหว่างหญิงมีครรภ์และหญิงไม่มีครรภ์.....	20
3.3.1 การสกัดแยก cell-free DNA จากตัวอย่าง	20
3.3.2 การวัดปริมาณ DNA และยืนยันการมีอยู่ของ cell-free fetal DNA	20
3.3.3 การแปรรูปดีเอ็นเอ เพื่อใช้ศึกษา DNA methylation profile ด้วยปฏิกิริยา bisulfite conversion.....	21
3.3.4 การเปรียบเทียบ DNA methylation profile ด้วยเทคนิค deep targeted sequencing	21
บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย	23
4.1 ผลการเปรียบเทียบ DNA methylation profile ระหว่างรกและเซลล์เม็ดเลือดขาว.....	23
4.2 ผลการเปรียบเทียบ DNA methylation profile ของ cell-free DNA จากหญิงที่มีครรภ์ และหญิงที่ไม่ครรภ์.....	23
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	28
5.1 อภิปรายผลการวิจัย.....	28
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	30
ภาคผนวก.....	31
บรรณานุกรม.....	55

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดง methylation-sensitive high resolution melting profile ของพลาสมาจากหญิงตั้งครรภ์และ เม็ดเลือดขาว	23
ภาพที่ 2 ระดับของ DNA methylation ในภาพรวม ระหว่างพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์และไม่ตั้งครรภ์	25
ภาพที่ 3 ระดับของ DNA methylation ในแต่ละ CpG site ระหว่างพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์และไม่ ตั้งครรภ์.....	26
ภาพที่ 4 DNA methylation pattern ระหว่างพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์และไม่ตั้งครรภ์	27



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงการทดสอบความแตกต่างของระดับ DNA methylation ในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์และไม่ตั้งครรภ์ ด้วย t-test.....	25
ตารางที่ 2 แสดงการทดสอบความแตกต่างความถี่ของ DNA methylation pattern ในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์และ ไม่ตั้งครรภ์ด้วย t-test	27



บทที่ 1

บทนำ

1.1 แนวคิดที่มาและความสำคัญ

ในประเทศไทยพบพาหะธาลัสซีเมียชนิดแอลฟาศูนย์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคทารกบวมน้ำรั้อยละ 9 คิดเป็นอุบัติการณ์การเกิดทารกบวมน้ำ 1 ใน 500

โรคทารกบวมน้ำชนิดบาร์ธ จัดเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ทารกจะเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์ หรือแรกคลอด ทั้งนี้บรรดที่ตั้งครรภ์อาจเสียชีวิตจากครรภ์เป็นพิษได้(1, 2) ภาระบวมกรวินิจฉัยก่อนคลอดจึงมีบทบาทสำคัญ ในการลดความเสี่ยงที่มารดาจะเสียชีวิตจากครรภ์เป็นพิษ(3, 4)

ปัจจุบันกระบวนการวินิจฉัยก่อนคลอดทำได้ 2 แนวทางหลัก คือด้วยกระบวนการวิเคราะห์สารพันธุกรรม และการวิเคราะห์ฮีโมโกลบินจากเลือดสายสะดือของทารก กระบวนการวิเคราะห์สารพันธุกรรม มีข้อดี คือ ไม่จำเป็นต้องรอให้บุตรในครรภ์มีอายุมากกว่า 18 สัปดาห์ สามารถใช้ตัวอย่างชิ้นรกในการวินิจฉัยได้ระหว่าง 10-11 สัปดาห์ หรือใช้ตัวอย่างน้ำคร่ำในครรภ์ที่มีอายุ 16-20 สัปดาห์(5)

อย่างไรก็ดีกระบวนการที่กล่าวมาทั้งหมด ล้วนเป็นกระบวนการที่จำเป็นต้องมีทำหัตถเวชการรูกล้าทำให้บุตรในครรภ์ได้รับความเสี่ยงที่จะแท้งร้อยละ 0.5 – 1.0 ขึ้นอยู่กับวิธีการ จากความชำนาญของแพทย์ และการติดเชื้อ(1)

เมื่อพิจารณาตามกฎหมายของแมนเดล จะพบว่าเพียง 1 ใน 4 ของครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงเท่านั้น ที่จะเป็นโรคทารกบวมน้ำชนิดบาร์ธ ครรภ์อีก 3 ใน 4 แม้เป็นครรภ์ที่ไม่มีความผิดปกติ ก็จำเป็นต้องรับความเสี่ยงจากการวินิจฉัยแบบรูกล้าไปด้วย

มีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีคัดกรองก่อนคลอดแบบไม่รูกล้า เพื่อลดจำนวนครรภ์ที่จะต้องเข้าสู่กระบวนการหัตถเวชการโดยไม่จำเป็น โดยใช้องค์ความรู้เกี่ยวกับ cell free fetal DNA หรือดีเอ็นเอของบุตรที่เกิดจากการสลายตัวของรกจากกระบวนการอะพ็อพโตซิส แล้วเข้ามาปนเปื้อนไหลเวียนในกระแสโลหิตของมารดา(1)

หนึ่งในสองแนวทางที่มีการรายงานแล้วคือ การติดตามการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของอัลลีล โดยใช้แนวคิดที่ว่า แม่ที่ตั้งครรภ์ย่อมมีสัดส่วนของอัลลีลที่เป็นโรค และไม่เป็นโรคอยู่ในสัดส่วน 1 ต่อ 1 หากแม่ตั้งครรภ์ทารกที่เป็นโรค จะทำให้สัดส่วนของอัลลีลที่เป็นโรคเพิ่มขึ้น หากทารกเป็นพาหะจะให้สัดส่วนที่เท่าเดิม ขณะที่หากทารกในครรภ์ไม่นำพาอัลลีลที่เป็นโรคมารเลย จะทำให้สัดส่วนของอัลลีลที่ไม่เป็นโรคในแม่เพิ่มขึ้น(6-8) แต่วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดคือ ดีเอ็นเอที่เข้ามาในกระแสโลหิตของมารดานั้น มีลักษณะเป็นท่อนขนาดสั้นๆ เกิดจากการหักแบบสุ่ม ซึ่งการหักนี้อาจรบกวนการแปลผล และทำให้เกิดผลลบปลอมเกิดขึ้นได้

อีกแนวทางคือ การติดตามมาร์กเกอร์ที่สามารถชี้ชัดได้ว่า สารพันธุกรรมที่ปนเปื้อนเข้ามาไหลเวียนในกระแสโลหิตของมารดาเป็นสารพันธุกรรมที่ไม่เป็นโรค เช่นการใช้ SNP(9) และ microsatellite(10) วิธีการนี้

จะทำให้ตัดครมร์ที่ปกติ และเป็นพาหะได้ แต่ยังมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถใช้วิธีนี้ได้ในกรณีที่มีการดาและบิดามิ มาร์กเกอร์รูปแบบเดียวกัน

จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้ ในปี 2559 ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากงบประมาณรายได้ของ มหาวิทยาลัย นเรศวร ปีการศึกษา 2559 ถึงความแตกต่างระหว่าง DNA methylation profile บนอัลลีลก่อโรค α -thalassemia ระหว่างเม็ดเลือดขาวที่เป็นแหล่งสารพันธุกรรมหลักที่ในพลาสมา และรกที่เป็นตัวแทนของสารพันธุกรรมของทารกที่กระจายตัวอยู่ในพลาสมาของมารดา พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ อันชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ ในการประยุกต์ใช้ เพื่อติดตามอัลลีลก่อโรคของทารกในครรภ์

อย่างไรก็ดี แม้คณะผู้วิจัยจะมีเป้าหมายในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยแบบรูกล้ำขึ้นมาด้วยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งที่ผ่านมมา แต่จากภาวะประเมินความเป็นไปได้ในการศึกษาวิจัย ในแง่ของงบรายได้ของ ตัวอย่างทางคลินิก หรือ พลาสมาของมารดาที่เป็นพาหะและตั้งครมร์ทารกที่มีอัลลีลก่อโรคอยู่ ที่อยู่เหนือการควบคุมของคณะผู้วิจัย และอาจไม่สอดคล้องกับกรอบระยะเวลาในการศึกษาวิจัยที่แหล่งทุนกำหนด รวมไปถึง การที่คณะผู้วิจัยต้องการหลักฐานทางวิชาการที่จะเพิ่มความน่าเชื่อถือ ถึงความเป็นไปได้ของการพัฒนาวิธีการตรวจดังกล่าว ในรายงานวิจัยชิ้นนี้ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำเริ่มทำการศึกษาคัดตามสารพันธุกรรมของทารก โดยติดตามจาก DNA methylation marker บนฝั่งอัลลีลปกติ หรือ Wildtype allele

คณะผู้วิจัยเชื่อว่า การศึกษาในลักษณะนี้จะเป็นการลดข้อจำกัดของการได้มาของตัวอย่างทางคลินิก และความแตกต่างระหว่าง DNA methylation profile ของพลาสมาของกลุ่มหญิงที่มีครมร์และหญิงที่ไม่มีครมร์ ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ จะสะท้อนถึงการมีอยู่ของสารพันธุกรรมของทารก ที่ทำให้ DNA methylation profile ของพลาสมาเปลี่ยนแปลงไป

คณะผู้วิจัยคาดหวังว่าข้อสรุปจากการศึกษาครั้งนี้ จะทำให้เกิดประโยชน์ 3 ประการ คือ 1) เป็นการพิสูจน์ถึงความเป็นไปได้ในการใช้ DNA methylation marker ติดตามสารพันธุกรรมของทารก 2) ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายสำหรับอัลลีลปกติเพื่อติดตามสารพันธุกรรมของทารก ที่จะนำไปสู่การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยแบบไม่รูกล้ำ ที่สามารถระบุได้ถึงจีโนไทป์ของทารก เมื่อมีการศึกษาร่วมกับในฝั่งอัลลีลก่อโรคแล้ว และ 3) อย่างน้อยที่สุด ลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่ศึกษาพบครั้งนี้ อาจนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจคัดกรองแบบไม่รูกล้ำได้ โดยการติดตามถึงการมีอยู่ของสารพันธุกรรมอัลลีลปกติของทารก

1.2 จุดประสงค์

- (Specific Aim) เพื่อพัฒนาเป้าหมายในการจำแนกสารพันธุกรรมของบุตรจากสารพันธุกรรมของมารดาที่ไหลเวียนรวมกันในกระแสโลหิตของมารดาให้ได้
- (General Aim) เพื่อนำไปสู่วิธีการคัดกรองทารกบวมน้ำก่อนคลอดแบบไม่รูกล้ำ ที่จะลดจำนวนครมร์ที่เข้าสู่กระบวนการหัตถเวชการ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเป้าหมายในการจำแนกสารพันธุกรรมของทารกจากสารพันธุกรรมของมารดา โดยใช้ DNA methylation marker ที่อยู่บน α -globin gene cluster เป็นเป้าหมายในการจำแนก โดยใช้ CpG site จำนวน 4 ตำแหน่ง ที่อยู่บน *HBAP1* gene ซึ่งอยู่ในช่วง deletion range ของรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิด Southeast Asian deletion และ Thai deletion ซึ่งเป็นรูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบได้ในประเทศไทย ทั้งนี้งานวิจัยนี้ไม่คำนึงความต่างของ modification ว่าเป็น Hydroxyl methylation หรือ methylation

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาได้ ใช้ตัวอย่างพลาสมาของหญิงมีครรภ์จำนวน 10 ตัวอย่าง เป็นตัวแทนพลาสมาที่มีสารพันธุกรรมของทารกบริเวณ α -globin gene cluster อยู่ และตัวอย่างหญิงไม่มีครรภ์จำนวน 10 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างของพลาสมาที่ไม่มีสารพันธุกรรมของทารกบริเวณ α -globin gene cluster อยู่

1.4 กรอบแนวความคิด

การที่สามารถจำแนกสารพันธุกรรมของทารกจากสารพันธุกรรมของมารดาที่ไหลเวียนรวมกันในกระแสโลหิตของมารดาได้ จะเป็นประโยชน์ในการคัดกรองก่อนคลอด คือ หากระบุได้ว่าทารกในครรภ์มีสารพันธุกรรมที่ปกติ นั้นหมายถึงทารกอาจเป็นพาหะ หรือนำพาหีนที่เป็นปกติแบบไฮโมไซกัส เพราะฉะนั้นทารกในครรภ์จึงไม่เป็นโรค สามารถเกิดได้ ไม่จำเป็นต้องทำการยุติการตั้งครรภ์ จึงไม่จำเป็นต้องเข้าสู่กระบวนการวินิจฉัยก่อนคลอด เช่นการเจาะน้ำคร่ำ หรือเก็บชิ้นรกต่อไป

การจำแนกสารพันธุกรรมของทารกจากสารพันธุกรรมของมารดา จะใช้การติดตาม epiallele ซึ่งเป็น modification บนสายดีเอ็นเอ ที่มีความแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดเซลล์

ตามหลักฐานที่ว่าดีเอ็นเอของทารกที่เข้ามาในกระแสโลหิตของมารดา เกิดจากการสลายตัวของเซลล์ในเนื้อเยื่อรก ด้วยกระบวนการอะพอโตซิส จึงทำให้ผู้วิจัยเชื่อว่าเซลล์รกที่เป็นตัวแทนสารพันธุกรรมบุตร และเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เป็นตัวแทนสารพันธุกรรมมารดา ที่มีหน้าที่แตกต่างกันนี้ น่าจะมีแบบแผน DNA methylation บน α -globin gene cluster ที่แตกต่างกัน

หากทำการเปรียบเทียบ เพื่อหา epiallele หรือรูปแบบแบบแผน DNA methylation บน α -globin gene cluster ที่พบเฉพาะในเนื้อเยื่อรก แต่ไม่พบในเลือด epiallele ที่ได้นี้ น่าจะสามารถใช้ในการติดตามว่า ในกระแสโลหิตของมารดา มีสารพันธุกรรมที่ปกติของบุตรอยู่หรือไม่

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ความสำคัญของอัลฟาธาลัสซีเมียในประเทศไทยและภูมิภาคอาเซียน

2.1.1 α^0 -thalassemia

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจาง ที่เกิดจากการสังเคราะห์สายโปรตีนโกลบินที่น้อยกว่าปกติ ทำให้ขาดสมดุลระหว่างโปรตีนอัลฟาโกลบินและบีตาโกลบิน เป็นผลให้เม็ดเลือดแดงไม่สมบูรณ์ และมีอายุสั้นกว่าปกติ

ปริมาณสายโปรตีนโกลบินที่ลดลงนี้ เป็นผลมาจากการทำงานของยีนโกลบินที่ลดลงจากการกลายพันธุ์ หากเกิดความผิดปกติที่ทำให้ยีนอัลฟาโกลบินทำงานลดลง จะเรียกว่าอัลฟาธาลัสซีเมีย เช่นเดียวกับในกรณีของบีตาธาลัสซีเมีย(4)

ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะความผิดปกติ ที่ส่งผลให้ยีนอัลฟาโกลบินทำงานลดลง หรืออัลฟาธาลัสซีเมีย ซึ่งหากจำแนกตามลักษณะกลายพันธุ์ระดับดีเอ็นเอ อาจจำแนกได้ 2 ชนิดคือ α^0 -thalassemia และ α^+ -thalassemia(4)

การจำแนกนี้มาจากการที่ยีนอัลฟาโกลบิน มีจำนวน 2 โครโมโซม คืออัลฟาโกลบิน 1 และ 2 ซึ่งการขาดหายไปของยีนอัลฟาโกลบินทั้ง 2 โครโมโซมแบบนี้ เป็นผลให้อัลลีลดังกล่าวไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนอัลฟาโกลบินได้เลย จึงเรียกลักษณะของอัลลีลที่กลายพันธุ์นี้ว่า α^0 -thalassemia ในทางกลับกัน หากเกิดการขาดหายไปเพียงโครโมโซมเดียว ก็จะเรียกอัลลีลดังกล่าวว่า α^+ -thalassemia

อัลลีลชนิด α^0 -thalassemia มีความสำคัญทั้งในเชิงคลินิกและเศรษฐกิจ เนื่องจากหากอัลลีลดังกล่าวมีการจับคู่กับ α^+ -thalassemia ในแบบ compound heterozygous จะส่งผลให้ผู้ที่มิใช่คนไทยนี้ แสดงฟีโนไทป์ที่เรียกว่า hemoglobin H ซึ่งจะมีความไวต่อการติดเชื้อ และเม็ดเลือดแดงไวต่อ reducing agent มากกว่าคนปกติ (11)

หรือหากอยู่ในรูปแบบ homozygous จะส่งผลให้เกิดภาวะทารกบวมน้ำ หรือ Bart's Hydrop Fetalis Syndrome ทารกมักจะตายก่อนคลอด หรือภายหลังคลอดไม่นาน โดยฟีโนไทป์ชนิดหลังนี้ จะได้กล่าวโดยละเอียดในตอนต่อไป

2.1.2 ระบาดวิทยาของอัลฟาธาลัสซีเมีย

Bart's Hydrop Fetalis Syndrome และ hemoglobin H มีอุบัติการณ์ในภูมิภาคอาเซียนที่ 0.5 - 5 ต่อ 1000 คน และ 4 - 20 ต่อ 1000 คนตามลำดับ โดยชนิดของอัลลีล α^0 -thalassemia ที่พบได้บ่อยในภูมิภาค ได้แก่ Southeast asian deletion Thai deletion และ Filipino deletion

สำหรับอัลลีล α^0 -thalassemia ที่มีความชุกสูงในประเทศไทย คืออัลลีลชนิด Southeast asian deletion และ Thai deletion โดยจากการศึกษาของ จากการศึกษาของ Phareohan S ในปี 2016 ได้รายงานความชุกของพาหะในภาคเหนือของประเทศไทย พบว่า มีความชุกของพาหะที่ร้อยละ 35 โดยประมาณ มาจากความชุกของอัลลีลชนิด SEA deletion ร้อยละ 15 อัลลีลชนิด 3.7 deletion ร้อยละ 20 อัลลีลชนิด HbCS ร้อยละ 4 และอัลลีลชนิด 4.2 deletion ไม่ถึงร้อยละ 1(12)

2.1.3 Southeast Asian deletion and Hb Bart's hydrop fetalis syndrome

โปรตีนฮีโมโกลบินในแต่ละช่วงพัฒนาการของมนุษย์ จากเอ็มบริโอ ฟีตัส ไปจนถึงทารก จะมีหน่วยย่อยที่เป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกัน มาจากการแสดงออกของยีน α -like-globin และ β -like-globin ที่แตกต่างกันในแต่ละช่วง

การสังเคราะห์โปรตีน α -like globin ควบคุมโดย α -globin gene cluster ซึ่งประกอบไปด้วย ยีน ζ -globin gene (*HBZ*) 1 ยีน และยีน α -globin gene (*HBA*) 2 ยีน นอกจากนี้มีส่วนของ pseudo gene 4 ยีนอยู่ด้วย โดยมีการเรียงตัวดังนี้ 5'-*HBZ-HBZP-HBM-HBAP-HBA2-HBA1-HBQ-3'* ซึ่งโดยปกติมนุษย์จะมีโครโมโซม 2 ชุด ทำให้มียีน α -globin ที่ทำงานอยู่ 4 ยีน สังเคราะห์สายโปรตีนอัลฟาโกลบินที่เพียงพอไปจับรวมตัวกับโปรตีน β -like globin จาก β -globin gene cluster

การกลายพันธุ์ชนิด Southeast Asian deletion จะมีการขาดหายไปของยีน 5'-*HBM-HBAP-HBA2-HBA1-HBQ-3'* ส่งผลให้ขาดสมดุระหว่าง α -like globin และ β -like globin หากอยู่ในภาวะโฮโมไซกัส จะไม่สามารถสร้างสายโปรตีนอัลฟาโกลบินได้เลย เป็นผลให้เกิดการรวมตัวกันเองของโปรตีน γ -globin ในรูปแบบ tetramer ในระยะฟีตัส ซึ่งมีความชอบพ้ออกซิเจนที่สูง ออกซิเจนที่จับอยู่กับ homotetrameric γ -globin จึงไม่สามารถจ่ายไปยังเนื้อเยื่อของทารกเองได้ และยังขาดความเสถียร มักจะเกิดการตกตะกอนได้ง่าย ทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่าปกติ และยังลดประสิทธิภาพของกระบวนการสร้างเม็ดเลือดแดงอีกด้วย

เมื่อพิจารณาจะเห็นว่าในยีนคลัสเตอร์ ยังคงเหลือยีน ζ -globin อยู่ ทำให้ฟีตัสสามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึง ไตรมาสที่ 3 เนื่องจาก Hb Portland 1 ($\zeta_2\gamma_2$) มี physiological oxygen dissociation capability ที่สามารถจ่ายออกซิเจนให้กับเนื้อเยื่อของฟีตัสได้ อย่างไรก็ตามก็ยังไม่เพียงพอให้ฟีตัสเจริญได้เต็มที่ ทารกจึงเสียชีวิตในไตรมาสที่ 3 ด้วยภาวะ hypoxia และ heart failure

เม็ดเลือดแดงที่ตรวจพบในทารกบวมนี้ จะมีลักษณะ hypochromic และ anisopoikilocytic และยังพบ nucleated erythroblast อีกด้วย ร่างกายจะชดเชยด้วยการสร้างเม็ดเลือดแดงมากขึ้น ทำให้ตับและม้ามมีขนาดใหญ่กว่าปกติ

นอกจากนี้ยังพบภาวะแทรกซ้อนในมารดาที่ตั้งครรภ์ได้ โดยจะพบภาวะความดันโลหิตสูง และพัฒนาสู่ภาวะ severe preeclampsia และทำให้มารดาเสียชีวิตในที่สุด(5)

2.1.4 Invasive prenatal testing and Risk

โดยทั่วไปก่อนกระบวนการวินิจฉัยทารกในครรภ์จะเริ่มขึ้น จะต้องมีการคัดกรองคู่เสี่ยง และยืนยันคู่เสี่ยงก่อน ครรภ์ที่อยู่ในกลุ่มคู่เสี่ยงจะได้รับการวินิจฉัยบุตรในครรภ์ด้วยวิธี DNA analysis หรือ Hemoglobin analysis ซึ่งทั้ง 2 แนวทาง จำเป็นต้องทำการเวชตัดการเพื่อเก็บเอาตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของทารกออกมา (4)

ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะกระบวนการ DNA analysis โดยจะมีเป้าหมายของตัวอย่างที่เก็บแตกต่างกันไปตามอายุครรภ์ หากอายุครรภ์ประมาณ 10 – 11 สัปดาห์ จะทำการเก็บ chorionic villus ซึ่งจะมีความเสี่ยงที่จะเกิดการแท้งร้อยละ 1 ขณะที่ครรภ์ 16 – 20 สัปดาห์ จะทำการเก็บน้ำคร่ำ ซึ่งมีความเสี่ยงร้อยละ 0.5 ความเสี่ยงนี้เกิดจากความชำนาญของแพทย์ และการติดเชื้อ(13, 14) ซึ่งกระบวนการที่กล่าวมา มีโอกาสที่เลือดจากแม่จะเข้ามาปนเปื้อนกับตัวอย่างที่เก็บได้ จึงมักให้เกิดการแปลผลที่ผิดพลาด

2.2 การประยุกต์ใช้ Cell-free fetal DNA ในการตรวจวินิจฉัยแบบไม่รุกราน

2.2.1 ธรรมชาติของ cell-free DNA และ cell-free fetal DNA

Cell-free DNA เป็นสารพันธุกรรมที่อยู่ภายนอกเซลล์ และกระจายตัวอยู่ในของเหลวในร่างกาย เช่น น้ำเลือด ปัสสาวะ และน้ำในไขสันหลัง

การค้นพบ cell-free DNA เกิดขึ้นครั้งแรกในปี 1948 โดย Mandel P และ Metais P ก่อนที่ Watson และ Crick ได้รายงานโครงสร้างของดีเอ็นเอ แต่ความสนใจในการใช้ประโยชน์เริ่มขึ้นในปี 1965 โดย Bendich และคณะได้ตั้งข้อสังเกตว่า cell-free DNA อาจสัมพันธ์กับกระบวนการ metastasis ของเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้การศึกษาในเชิงคลินิกครั้งแรก ในปี 1966 เริ่มขึ้นในกรณีศึกษาของผู้ป่วยโรค systemic lupus erythematosus ที่พบระดับของ cell-free DNA ที่สูงขึ้น หลังจากนั้น 11 ปี คือในปี 1977 Leon และคณะ ได้รายงานระดับ cell-free DNA ที่สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคมะเร็ง จึงมีความพยายามมาโดยตลอดที่จะยืนยันให้ได้ว่าสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นนี้มาจากเซลล์มะเร็งที่ตายและปลดปล่อยสารพันธุกรรมออกมา หลักฐานชิ้นแรกที่แสดงว่าสารพันธุกรรมนี้มาจากสารพันธุกรรมของเซลล์มะเร็ง คือ การศึกษาของคณะของ Stroun M ในปี 1989 ที่พบว่า double stranded DNA ในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็ง มีเสถียรภาพภายใต้อุณหภูมิที่สูงขึ้น น้อยกว่าคนที่ไม่ได้เป็นผู้ป่วยมะเร็ง ซึ่งสามารถอนุมานได้ว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่เปลี่ยนแปลงไป ที่อาจเป็นสารพันธุกรรมของมะเร็ง จนกระทั่งในปี 1994 จึงได้มีการยืนยันที่มาของ cell-free DNA ที่สูงขึ้นนี้ว่ามาจากเซลล์มะเร็ง โดยการใช้ tumor-specific mutation

ในปีเดียวกันกับที่ Stroun M ได้แสดงหลักฐานถึงที่มาของ cell-free DNA ที่สูงขึ้นในผู้ป่วยมะเร็ง คณะของ Lo YM ได้ตรวจพบสารพันธุกรรมของโครโมโซม Y ในมารดาที่ตั้งครรภ์ทารกเพศชาย เป็นครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่า cell-free DNA ของทารกสามารถที่จะเข้ามาไหลเวียนในกระแสโลหิตของมารดาได้ จึงเป็นการวางรากฐานกระบวนการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดแบบไม่รุกรานต่อมา แต่อย่างไรก็ดีในช่วงแรก Lo YM และ

คณะ มุ่งประยุกต์ใช้ cell-free DNA ของทารกในการวินิจฉัยโรคที่เป็น sex-linked genetic disorder เท่านั้น อาจมาจากข้อจำกัดในการจำแนกสารพันธุกรรมของทารกออกจากมารดา

โครงการ Human Genome Project ไม่เพียงทำให้การศึกษาทางด้านมะเร็ง โดยใช้ tumor-specific mutation เติบโตขึ้นเท่านั้น ยังทำให้มีการประยุกต์ใช้ความรู้เกี่ยวกับ paternal-specific polymorphism ในการติดตามสารพันธุกรรมของทารก

อย่างไรก็ดี cell-free fetal DNA ยังมีข้อจำกัดในการวินิจฉัยทารกในครรภ์ คือ ไม่สามารถจำแนกสารพันธุกรรม maternal allele ของทารก ออกจากสารพันธุกรรมของมารดาได้ จึงมีความพยายามที่จะใช้ความแตกต่างทางกายภาพ เช่น ขนาดที่แตกต่างกัน หรือ รูปแบบ modification ทางเคมีที่แตกต่างต่างกันในสารพันธุกรรมของมารดาและทารก โดยลักษณะทางกายภาพของ cell-free DNA ที่แตกต่างกันนี้ เชื่อว่ามาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เป็นแหล่งกำเนิดของสารพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ซึ่งในแต่ละเซลล์จะมีการ packaging สารพันธุกรรมไว้ในนิวเคลียสที่แตกต่างกัน ผ่านกระบวนการทาง epigenetics เช่น การเกิด DNA methylation บนดีเอ็นเอ ร่วมกับ modification บน histone ที่จะกำหนด nucleosome position

จากหลักฐานขนาดของ cell-free DNA ที่พบ ทำให้เชื่อได้ว่า cell-free DNA ส่วนใหญ่อยู่ในรูป nucleosome ที่สอดคล้องกับความยาวของของดีเอ็นเอที่พันรอบ histone octamer ที่ยาว 147 bp ซึ่งพบว่าความยาวของ cell-free DNA ที่พบได้รองลงมา คือขนาด 167 bp เชื่อว่ามาจากการที่ histone H1 ที่ทำหน้าที่เป็น linker histone เข้ามาจับ โดยมีหน้าที่เป็นตัวกำหนดความแน่นของสายดีเอ็นเอที่พันกับ core histone สามารถจับดีเอ็นเอได้ยาว 20 – 90 bp โครงสร้างของ nucleosome และ linker histone เรียก รวมกันว่า chromatosome

โครงสร้างที่กล่าวข้างต้น ทำหน้าที่ในการปกป้อง cell-free DNA จากการเข้าทำลายของ caspase-activated DNase จากกระบวนการ apoptosis ทำให้ endonuclease ชนิดนี้สามารถเข้าทำลายได้เฉพาะในช่วง DNA linker กระบวนการนี้รู้จักในชื่อ apoptotic DNA fragmentation นอกจากนี้โครงสร้างของ nucleosome และ chromatosome ยังช่วยปกป้อง cell-free DNA จาก lysosomal DNase II จากกระบวนการ phagocytosis และ exonuclease ในพลาสมาของมารดาอีกด้วย เนื่องจากการที่สารพันธุกรรมเกิดการหัก จึงทำให้เกิดข้อจำกัดที่ทำให้ไม่สามารถนำวิธีที่ใช้ศึกษา genomic DNA มาใช้กับ cell-free DNA ได้โดยง่าย

จากรายงานของ Flori E ในปี 2004 ทำให้ทราบถึงแหล่งที่มาของ cell-free fetal DNA ในกระแสเลือดของมารดา โดยมาจากการตรวจสอบสารพันธุกรรม Y ของทารกเพศชายในพลาสมาของมารดา แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ หลังจากตรวจสอบสารพันธุกรรมของเนื้อเยื่ออื่นๆของทารก พบว่ามีสารพันธุกรรม Y ยกเว้นที่ cytotrophoblast เนื่องจากทารกมีสภาวะ mosaicism จึงเป็นหลักฐานการยืนยันว่าสารพันธุกรรมของทารกที่ไหลเวียนในกระแสโลหิตของมารดามาจากเนื้อเยื่อรก แต่อย่างไรก็ดี การค้นพบนี้การเป็นหลักฐานถึงข้อจำกัดของวิธีการที่ใช้ cell-free fetal DNA อย่างหนึ่ง คือ cell-free fetal DNA ไม่ใช่สารพันธุกรรมของทารกโดยตรง ในกรณีที่เกิด placental mosaic จะเป็นการลดความแม่นยำของวิธีการ เพื่อให้มีความเข้าใจถึงข้อจำกัด บางครั้งจึงมีการใช้คำว่า cell-free placental DNA แทน

สำหรับ cell-free maternal DNA ซึ่งเป็น cell-free DNA หลักในพลาสมา มาจากการตายของ เซลล์ต่างๆ โดยในปี 2016 Snyder MW ได้การศึกษาลักษณะของจุดหัก cell-free DNA ที่พบในพลาสมา มี ลักษณะคล้ายกับ lymphoid และ myeloid cell

นอกเหนือจาก cell-free DNA จากกระบวนการ apoptosis แล้ว ปัจจุบันมีรายงานกลไกอื่นๆที่เป็นที่มาของ cell-free DNA ได้แก่ necrosis, active release, phagocytosis และ exocytosis โดยกลไกเหล่านี้จะปลดปล่อย cell-free DNA ในรูปแบบที่แตกต่างกัน เช่น อาจอยู่ในโครงสร้างที่มีเยื่อหุ้ม เช่น exosome, microparticle หรือ apoptotic bodies และเนื่องจากการที่ดีเอ็นเอมีประจุ จึงอาจเข้าจับกับ โมเลกุลอื่นๆ ให้อยู่ในรูปโครงสร้างระดับ macromolecule เช่น nucleosomes, virtosomes/proteolipidonucleic acid complexes, DNA traps หรือจับอยู่กับโปรตีนในซีรัม จับอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น ซึ่งโครงสร้างเหล่านี้จะเป็นปกป้องดีเอ็นเอจากการทำลายของ endonuclease สอดคล้องกับที่มีรายงาน cell-free DNA ที่มีขนาดใหญ่

Cell-free DNA ส่วนน้อยที่พบนี้ อาจมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาวิธีวินิจฉัยในอนาคต เนื่องจากพบว่ามีคุณลักษณะที่แตกต่างไปจาก cell-free จาก nucleosome ดังเช่นในกรณีของ exosome เกี่ยวข้องกับ cell-free DNA ในสองรูปแบบ คือ มี cell-free DNA บรรจุอยู่ด้านใน และมี cell-free DNA เกาะอยู่ด้านนอก สิ่งที่น่าสนใจคือรูปแบบหลังที่มีขนาดของดีเอ็นเอที่มีความยาวมากกว่า 2.5 kbp อาจเป็นการลดข้อจำกัดในการวินิจฉัยต่างๆ ได้ในอนาคต

Cell-free DNA ในกระแสเลือดมีลักษณะ rapid turnover ทั้งนี้อ้างอิงจากการศึกษาของ Tsumita และ Iwanaga ที่ได้ทำการฉีดดีเอ็นเอความเข้มข้นต่างๆ ที่ติดฉลากกัมมันตรังสีเข้าไปในหนูทดลอง พบว่าหนูมีความสามารถในการกำจัดดีเอ็นเอแปลกปลอมได้ในเวลา 30 นาที จากการที่ตรวจพบสารกัมมันตภาพที่สูงขึ้นที่ไต จึงชี้ให้เห็นว่าไตเป็นอวัยวะหลักที่ทำหน้าที่กำจัดออก ต่อมาในปี 1999 Lo และคณะ ได้ทำการติดตามระดับของ SRY gene ในน้ำเลือดของมารดาหลังคลอด พบว่าใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมงจึงไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของทารกได้

2.2.2 Cell free fetal DNA and current noninvasive prenatal testing

Cell free fetal DNA ที่ปนมาในพลาสมานี้ มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นเป้าหมายในการคัดกรองหรือวินิจฉัยโรคของบุตรในครรภ์แบบไม่รุกราน เนื่องจาก DNA ที่ได้ ได้จากการสลายตัวของรก ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวแทนของสารพันธุกรรมบุตรได้ และรกมีการแบ่งตัวและสลายตัวตลอดเวลา ทำให้ภายในกระแสเลือดมี cell free fetal DNA ปะปนอยู่ตลอด ขณะเดียวกัน fetal DNA อยู่ในลักษณะ naked DNA ทำให้มี half life สั้น ทั้งในเชิงเคมี และจากการทำลายของ nuclease ต่างๆ ฉะนั้นจึงทำให้ DNA จากครรภ์ก่อนหน้านี้อาจไม่มารับกวนการวิเคราะห์ของครรภ์ปัจจุบัน และในแง่ของ early detection มีรายงานการใช้ cell free fetal DNA ของโครโมโซมวายเป็นเป้าหมายสำหรับกระบวนการ real time PCR พบว่าให้ความไว และความแม่นยำร้อยละ 100 ที่สัปดาห์ที่ 7 เป็นต้นไป และจัดว่าเป็นวิธีที่สามารถวินิจฉัยได้ในอายุครรภ์ที่น้อยกว่าวิธีดั้งเดิม

อย่างไรก็ดีการใช้ cell free fetal DNA ยังมีข้อจำกัดคือ วิธี DNA analysis ที่ใช้วินิจฉัยทั่วไป ไม่สามารถจำแนก DNA ของบุตรออกจากมารดาได้ และดีเอ็นเอที่ปนเข้ามาในกระแสโลหิตมารดามีปริมาณน้อย จึงต้องใช้วิธีที่มีความไวสูงในการวิเคราะห์(15)

มีการนำ fetal cell free DNA มาใช้ประโยชน์อย่างมาก ในการวินิจฉัยหรือคัดกรองทารกในครรภ์ วิธีที่นิยมกันคือวิธี relative allelic dosage หรือ relative chromosome dosage(6, 16, 17)

มีความพยายามที่จะบ่งชี้ให้ได้ว่าสารพันธุกรรมที่กำลังตรวจสอบนี้ เป็นสารพันธุกรรมของบุตร โดยใช้ fetal marker ต่างๆ เช่น paternal SNP ในโรค monogenic disease(16) หรือการใช้ epigenetic marker ในโรค aneuploidy(18)

ในการศึกษาโรค thalassemia พบเพียงการนำวิธี allelic ratio และ paternal SNP มาใช้ ซึ่งมีข้อจำกัด คือ สามารถจำแนกดีเอ็นเอของลูกได้เฉพาะในกรณีที่พ่อและแม่ มี SNP ที่แตกต่างกัน(16, 19) ยังไม่พบการใช้ epigenetic marker เข้ามา

2.2.3 ข้อจำกัดในการตรวจครรภ์ทารกบวมน้ำชนิดบารัสแบบไม่รูก้ำ

มีการใช้ cell free fetal DNA เพื่อกระบวนการคัดกรองหรือวินิจฉัยภาวะทารกบวมน้ำจากกลายพันธุ์แบบ SEA หลายรายงาน แนวคิดส่วนใหญ่มุ่งเน้นการใช้ paternal marker ดังที่มีการใช้ polymorphic STR(10) แต่ยังคงมีข้อจำกัดในประเด็นความหลากหลายของ STR ในกลุ่มประชากรเดียวกัน มีการใช้ SNP ที่อยู่ในช่วง SEA deletion เป็นเป้าหมาย เพื่อติดตาม paternal allele ที่ปกติ ในกระแสโลหิตของมารดา ซึ่งในกรณีนี้คู่เสี่ยงที่เป็นพาหะชนิด SEA ทั้งสองคน ต้องมี SNP ที่ปรากฏในช่วง SEA deletion ที่ต่างกัน(9) ทั้งสองวิธีที่กล่าวมาทำได้เพียงคัดกรองครรถ์ที่จำเป็นต้องเจาะน้ำคร่ำในเบื้องต้นเท่านั้น ไม่สามารถบอกจีโนไทป์ของบุตรในครรภ์ได้

สำหรับการใช้หลักการ allelic ratio เป็นการเทียบปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยกระบวนการ qualitative PCR โดยเปรียบเทียบจาก Quantitative Cycle เพื่อทำนายจีโนไทป์ของบุตร ซึ่งเชื่อว่าหากมารดามีครรถ์บุตรที่เป็น homozygous จะเป็นผลให้ปริมาณดีเอ็นเอ allele นั้นมีสูงขึ้น พบรายงานทั้งการใช้ระบบ intercalated dye(8, 17, 20) และระบบ hydrolysis probe(6) แต่อย่างไรก็ดีปริมาณดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเข้ามาในกระแสโลหิตของมารดามีปริมาณน้อยมาก ซึ่งการใช้ Quantitative Cycle อาจมีระดับความจำแนก (resolution) ที่ไม่สูงพอ จึงไม่เหมาะกับ early diagnosis และวิธีการดังกล่าวยังไม่ใช่การบอกจีโนไทป์ที่ตรงไปตรงมา เป็นเพียงการทำนายเท่านั้น

2.3 ความเป็นไปได้ในการจำแนก cell-free fetal allele ออกจากสารพันธุกรรมของมารดาด้วย DNA methylation marker

2.3.1 กระบวนการเกิด DNA methylation pattern ภายในเซลล์

กระบวนการ DNA methylation เป็นกระบวนการ post-replication modification ที่เกิดขึ้นบน DNA เชื่อว่ามีส่วนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้บน cytosine หรือ adenine โดยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มักพบการเติมหมู่ methyl ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบส cytosine เป็นหลัก หรือที่เรียกว่า 5-methylcytosine

การเติมหมู่ methyl ที่เบส cytosine นี้ ไม่ได้เกิดโดยทั่วไปบนดีเอ็นเอ แต่มักจะเกิดในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มี cytosine ซิดกับ guanine ตามลำดับ 5' ไป 3' หรือที่เรียกว่า Cytosine-phosphate-Guanine context (CpG context)

ดังที่กล่าวมาข้างต้นว่า DNA methylation มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกยีน โดยเชื่อว่าการเกิด DNA methylation จะเป็นผลให้เกิดการเข้าจับได้ของโปรตีนที่มี methyl-binding domain อยู่ โปรตีนดังกล่าวอาจเป็น transcription factor ที่ทำให้เกิด DNA transcription หรือ อาจเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขัดขวางกระบวนการ transcription ก็ได้

ในแต่ละเซลล์จึงมีรูปแบบของการเกิด DNA methylation แตกต่างกัน ตาม gene expression profile โดยกระบวนการได้มาของ DNA methylation pattern ที่แตกต่างกันนี้ มาจาก 3 ขั้นตอน คือ DNA methylation establishment เป็นการเติมหมู่ methyl ลงบนดีเอ็นเอชิ้นใหม่ หลังจากที่เซลล์เกิด กระบวนการ reprogramming ผ่านเอนไซม์ DNA methyltransferase ที่ชื่อว่า DNMT3A และ DNMT3B และมี DNMT3L ทำหน้าที่เป็น modulator

ขั้นตอนที่ 2 ที่ทำให้ DNA methylation pattern แตกต่าง คือ ขั้นตอน DNA methylation maintenance โดยในแต่ละรอบของ DNA replication กระบวนการ DNA methylation ไม่ได้เกิดขึ้น ขณะเดียวกันกับกระบวนการ elongation แต่เกิดขึ้นภายหลังที่กระบวนการ DNA replication แล้วเสร็จ โดยเอนไซม์ DNMT1 จะใช้ parental strand ที่มีการเติมหมู่ methyl อยู่ เป็น template ในการเติมหมู่ methyl ให้กับดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างขึ้น ในลักษณะ symmetric palindrome กระบวนการนี้อาจนำมาสู่การ demethylation ได้ ผ่าน passive dilution คือการที่ DNMT1 ไม่ทำหน้าที่เติมหมู่ methyl เลียนแบบสาย parental strand

และอีกขั้นตอนหนึ่ง คือขั้นตอน DNA methylation erasure เป็นการเปลี่ยนสถานะ methylated ของ CpG site ให้มาอยู่ในสถานะ unmethylated กระบวนการนี้เรียกว่า active demethylation โดยการ oxidize เบส 5-methylcytosine ด้วยเอนไซม์ Ten-eleven translocation (TET) proteins ที่เป็น 5-methylcytosine oxidase ทำหน้าที่เปลี่ยน 5-methylcytosine ให้เป็น 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine และ 5-carboxylcytosine ตามลำดับ ทั้งนี้ ยิ่ง 5-methylcytosine อยู่ในรูป oxidized form ในระดับที่สูงขึ้น จะเป็นการลด affinity ของ parental strand ที่ใช้เป็น template ต่อเอนไซม์ DNMT1 ทำให้ DNMT1 ไม่สามารถเติมหมู่ methyl ให้กับ daughter strand DNA ได้ เป็นผลให้เกิด demethylation

นอกจากนี้ oxidized form ที่สูงขึ้นของ 5-methylcytosine ยังมีความชอบพอกับเอนไซม์ thymine DNA glycosylase(TDG) มากขึ้น modified base จึงสามารถกลับมาอยู่ในรูป cytosine ผ่านกระบวนการ base-excision repair(BER)

กระบวนการที่กล่าวมาทั้งสามข้างต้น เป็นผลให้ DNA methylation ของแต่ละเซลล์มีรูปแบบที่แตกต่างกัน หรืออาจกล่าวได้อีกแบบหนึ่งว่า DNA methylation เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการ differentiation ของเซลล์ออกไป

น่าสนใจว่า ภายหลัง reprogramming ที่เกิดหลังกระบวนการปฏิสนธิ พบว่า trophoblast และ inner cell mast มี DNA methylation profile ที่แตกต่างกัน โดยใน inner cell mast ที่เป็นเนื้อเยื่อต้นกำเนิดของเอ็มบริโอจะมีลักษณะ hypermethylation ขณะที่ trophoblast ที่เป็นเนื้อเยื่อกำเนิดของรก มีลักษณะเป็น hypomethylation ทำให้เมื่อเกิดการเจริญของเอ็มบริโอเข้าสู่ระยะฟัตัส เนื้อเยื่อรกจะมี DNA methylation profile ที่แตกต่างจากเซลล์อื่นอย่างชัดเจน

การที่รกมีลักษณะ hypomethylation ที่แตกต่างไปจากเนื้อเยื่ออื่นๆนี้ มีหลายทฤษฎีที่พยายามเข้ามาอธิบาย เช่น ลักษณะ hypomethylation จะเป็นการลดความเสถียรของ genomic DNA ของรกที่มีการแบ่งตัวรวดเร็วเช่นเดียวกับเซลล์มะเร็ง เป็นการควบคุมปริมาณของเซลล์รก ผ่านกระบวนการ apoptosis นอกจากนี้ยังเชื่อว่า ลักษณะ hypomethylation จะเป็นการ switch on ส่วน endogenous retrovirus gene ที่อาจมีบทบาทต่อการเจริญของรก

คณะนักวิจัยหลายทีมพยายามที่จะใช้ differentially DNA methylation region (DMR) ระหว่างรกซึ่งเป็นตัวแทนของสารพันธุกรรมของทารก และเลือดซึ่งเป็นตัวแทนของสารพันธุกรรมมารดาในพลาสมา ในการพัฒนาวิธีการติดตามสารพันธุกรรมทารกในครรภ์ และรายงานส่วนใหญ่ก็แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ แต่อย่างไรก็ตามวิจัยส่วนใหญ่ยังมุ่งไปแต่การศึกษาโรค aneuploidy(21, 22) ยังไม่พบว่ามีมีการประยุกต์ใช้ DNA methylation marker ในการศึกษาโรค single gene defect

2.3.2 Differential DNA methylation Region ระหว่างรกและเม็ดเลือดขาว บน α -globin gene cluster

ในปี 2014 Xiang Y และคณะ ได้ทำการเปรียบเทียบถึงความแตกต่างของ DNA methylation pattern ระหว่างรกและเลือด เพื่อหา marker ในการตรวจวินิจฉัยโรค aneuploidy แบบไม่รุกราน โดยใช้วิธี methylated DNA immunoprecipitation-sequencing (MeDIP-Seq) แม้ว่าในการศึกษาดังกล่าว จะมุ่งหาแต่ potential marker สำหรับ aneuploidy เท่านั้น แต่ผลพลอยได้จากข้อมูลที่ได้ทำให้พบบริเวณที่น่าสนใจบน α -globin gene cluster จำนวน 1 ตำแหน่ง บริเวณ HBQ gene ตั้งแต่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 169900 – 17041บน reference genome g36 ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ ($P = 1.10E-15$)(23)

ในปี 2016 Keravnou A และคณะ ได้ใช้เทคนิคเดียวกันในการเปรียบเทียบตัวอย่างเลือดและรกจากครรภ์อายุ 11-14 สัปดาห์ แต่กลับไม่พบบริเวณที่มีนัยยะสำคัญเพียงพอที่จะเป็น differentially

methylated regions (DMRs) ใน 16p13.3 ที่เป็นที่ตั้งของ α -globin gene cluster(24) อาจมาจาก resolution ในการแบ่ง genome region ที่ใช้ algorithm แตกต่างกัน

จากการที่คณะผู้วิจัยของข้าพเจ้า ได้ใช้ฐานข้อมูล MethBase เพื่อพิจารณาความต่างของ DNA methylation profile โดยใช้ข้อมูลของ Gao ที่ศึกษา DNA methylation profile ของเลือดในปี 2015 ด้วยวิธี whole genome bisulfite sequencing(25) เทียบกับข้อมูล DNA methylation profile ของรกที่ศึกษาด้วยวิธีเดียวกัน โดยโครงการ Roadmap Epigenomics Consortium ในปี 2011 พบว่าข้อมูลที่ได้ไม่ได้มีความแตกต่างที่ชัดเจน ดังที่ Xiang ได้ศึกษาไว้ Xiang ได้ศึกษาไว้

ด้วยการเปรียบเทียบเดียวกันนี้ คณะผู้วิจัยของข้าพเจ้าพบอีกบริเวณหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งบริเวณนี้อยู่ที่ HBAP1 gene พบว่ามี CpG จำนวน 4 ตำแหน่ง ที่มีความแตกต่างชัดเจนระหว่างรกและเม็ดเลือด โดย Methylation profile ของรกมีลักษณะ hypomethylation ทั้ง 4 CpG (DNA methylation level < 0.5) และเม็ดเลือดขาวมีลักษณะ hypermethylation (DNA methylation > 0.5)

2.4 หลักการของวิธีทางอนุพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการศึกษา DNA methylation ในงานวิจัยนี้

2.4.1 Bisulfite Conversion

กระบวนการศึกษา DNA methylation มีข้อจำกัดจากการที่ methylation ที่เกิดขึ้นบน DNA จะหายไป เมื่อผ่านกระบวนการ PCR หรือ DNA cloning และแทนที่ด้วยเบส cytosine ที่ไม่มี modification ฉะนั้นแล้วการศึกษาจึงจำเป็นต้องเริ่มจากดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปธรรมชาติเสียก่อน จึงทำการเพิ่มปริมาณที่หลัง (26) ที่แพร่หลายในปัจจุบัน มีด้วยกัน 2 หลักการ คือ การศึกษาโดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme base) และอาศัยการศึกษาหลังทำปฏิกิริยากับ bisulfite

กระบวนการศึกษาโดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จะใช้เอนไซม์ 2 ชนิดเข้าร่วมในการศึกษา คือ เอนไซม์ที่จะตัดสายดีเอ็นเอเมื่อมีหมู่เมธิลบน cytosine (Methylation Insensitive Restriction Enzymes) และเอนไซม์ที่จะตัดเมื่อไม่มีหมู่เมธิลบน cytosine (Methylation Sensitive Restriction Enzymes) หลังจากทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว จะนำดีเอ็นเอไปเข้ากระบวนการ PCR ต่อไป ซึ่งตัวอย่างที่ถูกทำลาย จะไม่สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้ ขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ถูกทำลายจะสามารถเพิ่มจำนวนได้ วิธีการนี้ไม่เป็นที่แพร่หลายนัก โดยเฉพาะในกรณีที่มี CpG island มี modification บน cytosine ที่หลากหลาย วิธีการนี้สามารถบอกได้เพียงว่าบริเวณดังกล่าว มีลักษณะเป็น hypomethylation หรือ hypermethylation

วิธีการทางอนุพันธุศาสตร์ที่ใช้กระบวนการ PCR เป็นหลัก ไม่อาจจะจำแนก methylated cytosine ออกจาก unmethylated cytosine จำเป็นต้องมีการ derivatization เบสตัวใดตัวหนึ่ง ให้อยู่ในรูปแบบที่แตกต่างออกไป โดยวิธีการที่นิยมกัน และถือเป็น gold standard ในปัจจุบัน คือวิธี bisulfite conversion

การค้นพบปฏิกิริยา bisulfite conversion เริ่มมาจากในปี 1970 มีคณะวิจัยจากมหาวิทยาลัยโตเกียวและมหาวิทยาลัยนิวยอร์ก ได้ค้นพบการทำปฏิกิริยากันระหว่าง sodium bisulfite และ cytosine โดยค้นพบว่าสารประกอบที่ได้จากการทำปฏิกิริยาที่อยู่ในรูป bisulfite-adducted cytosine สามารถเกิดการ

deamination ได้ ทำให้ได้สารประกอบ bisulfite-adducted uracil และเมื่อทำการ hydrolysis ด้วย alkaline solution จะทำให้ได้เบส uracil

ความก้าวหน้าอีกครั้งของการค้นพบดังกล่าว คือ ในปี 1980 R Y Wang และคณะ ค้นพบว่า 5-methyl cytosine มีอัตราการเกิดปฏิกิริยา bisulfite conversion ช้ากว่า cytosine หลังจากนั้นในปี 1992 จึงมีการนำความรู้ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ เพื่อจำแนก 5-methyl cytosine ออกจาก cytosine ด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นใหม่ที่ชื่อว่า bisulfite genomic sequencing โดยคณะคณะวิจัยจากประเทศออสเตรเลีย

แต่เดิมนั้นสารตั้งต้นที่ใช้ทำปฏิกิริยา bisulfite จะใช้ sodium bisulfide (NaHSO₃) สารชนิดนี้มีการละลายค่อนข้างต่ำ และอึดตัวได้ด้วยความเข้มข้นประมาณ 5 โมลาร์ ทำให้ปฏิกิริยาจำเป็นต้องใช้เวลานาน ประมาณ 16 – 20 ชั่วโมง ปัจจุบันจึงมีการเปลี่ยนมาใช้ ammonium bisulfite ทดแทน ซึ่งมีการละลายที่ดีกว่า และสามารถละลายได้มากถึง 10 โมลาร์ ทำให้ปัจจุบันปฏิกิริยานี้อาจใช้เวลาลดลงถึง 40 นาที

ปฏิกิริยา bisulfite conversion ประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อย 3 ขั้นตอนคือ sulfonation, deamination และ desulfonation ในขั้น sulfonation จะใช้ bisulfite ion ทำหน้าที่เติมหมู่ sulfonyl ซึ่งเป็น nucleophilic group เข้าไปที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของ cytosine ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วกับ unmethylated cytosine เนื่องจาก methylated cytosine จะมีหมู่ electron donating group บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ที่ขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาอยู่ ภายใต้สภาวะเดียวกัน จะเกิดขั้นตอน deamination ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ตามมา และเมื่อปรับสภาวะให้มี pH สูงจะทำให้เกิดกระบวนการ desulfonation สุดท้ายจึงได้ uracil เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา

DNA ที่ได้จากการกระบวนการ derivatization สามารถนำไปวิเคราะห์ได้ด้วยต่อ PCR-based method ต่างๆ โดยภายหลังกระบวนการ PCR เบสที่เปลี่ยนไปจะมีการจับคู่สมกับ adenine แทน guanine ฉะนั้นจึงสามารถจำแนก methylated cytosine ที่ยังคงแสดงเป็น cytosine ในลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งแตกต่างจาก unmodified cytosine ที่จะถูกแทนที่ด้วย thymine

อย่างไรก็ปฏิกิริยา bisulfite conversion มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถจำแนก 5-methyl cytosine ออกจาก 5-hydroxymethyl cytosine ได้ เนื่องจากทั้งสองหมู่เคมี เป็น electron donating group เหมือนกัน และไม่สามารถจำแนก cytosine, 5-formyl cytosine และ 5-carboxyl cytosine ออกจากกันได้ จำเป็นต้องใช้ปฏิกิริยาเพิ่มเติม ก่อนที่จะเข้าสู่ปฏิกิริยา bisulfite conversion

ข้อเสียอีกประการหนึ่งของปฏิกิริยานี้คือ การเสถียรภาพของ DNA ที่เข้าปฏิกิริยา เชื่อกันว่าอาจมาจากสภาวะเป็นกรดในระหว่างทำปฏิกิริยา ที่ทำให้เกิดกระบวนการ depurination บนสาย DNA และเกิดการแตกหักของ DNA ในที่สุด

ปัจจุบันมีการพัฒนาชุด kit สำหรับปฏิกิริยา bisulfite conversion จากหลายผู้ผลิต ทำให้สามารถเปรียบเทียบเลือกใช้ โดยพิจารณาได้ในหลายคุณสมบัติ เช่น ปริมาณ yield ที่ได้, อัตราการ conversion ที่สมบูรณ์, ระยะเวลาที่ใช้ ฯลฯ

2.4.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ bisulfite-treated DNA

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการ bisulfite conversion จะมีอยู่ด้วยกัน 2 ลักษณะคือ bisulfite-specific primer ใช้ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบสถานะของ CpG site หนึ่ง ว่าเป็น methylated หรือ unmethylated มีการออกแบบคล้ายกับไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค Amplification-refractory mutation system (ARMS) คือออกแบบไพรเมอร์ forward หรือ reverse ให้มีปลาย 3' จำเพาะกับ CpG site ที่เปลี่ยนเป็น uracil สำหรับ unmethylated CpG site และ จำเพาะต่อ cytosine สำหรับ methylated CpG site

อีกรูปแบบหนึ่งเป็นการออกแบบไพรเมอร์ ที่ต้องการนำ amplicon ที่ได้จากกระบวนการ PCR ไปวิเคราะห์ CpG site จำนวนมากกว่า 1 ตำแหน่ง กรณีนี้จะออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุม CpG site ที่สนใจ โดยตำแหน่งที่ไพรเมอร์ forward และ reverse จับอยู่ จะต้องไม่มี CpG site อยู่ เพื่อให้ไม่มี bias ในการ amplify ดีเอ็นเอเป้าหมายขึ้นมา

การออกแบบไพรเมอร์จะเริ่มจากการแปลงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ให้อยู่ในรูปแบบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านปฏิกิริยา bisulfite conversion จากนั้นทำการค้นหาตำแหน่งของ CpG site ที่อยู่ภายในลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำนายไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากพารามิเตอร์ที่กำหนด เช่น ความยาวของ amplicon จำนวน CpG site เป็นต้น

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ซอฟต์แวร์ MethPrimer ในการออกแบบ โดยซอฟต์แวร์นี้จะทำงานโดยอ้างอิงอัลกอริธึมของ Primer3 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ทั่วไป ซึ่งจะมีเกณฑ์ในการคัดเลือก เช่น พิจารณาการจับกันเองของไพรเมอร์ที่ การจับตัวเอง ปริมาณ GC และ melting temperature อย่างไรก็ตามจะมีข้อแตกต่างในการยอมรับ T repeat เนื่องจากบริเวณที่เป็นจุดจับของไพรเมอร์ cytosine จะอยู่นอก CpG site ทั้งหมด หรืออาจกล่าวได้ว่าเป็น cytosine ที่ไม่มีโอกาสเกิด methylation เลย จึงถูกแทนที่ด้วย thymine ทั้งหมด ฉะนั้นแล้วโปรแกรมจะยอมรับ T repeat มากกว่าโดยทั่วไป คือ 8 ตัว

มีการตั้งข้อสังเกตว่า amplicon ที่มีขนาดยาวเกิน 300 bp จะยากต่อการ amplify ซึ่งการวิเคราะห์ในขั้น down stream ด้วย high resolution melting กำหนดความยาวของ amplicon ไว้ที่ 150 bp จึงไม่เกิดจากความยาวนี้ และอีกข้อสังเกตคือพบว่าความยาวของไพรเมอร์จำเป็นต้องยาวกว่าปกติ เนื่องจากปริมาณ cytosine ที่ลดลง ทำให้ค่า melting temperature มักต่ำมาก มีรายงานว่าขนาดที่เหมาะสมอยู่ที่ 20 – 30 bp

2.4.3 Methylation-sensitive High-Resolution Melting analysis

methylation-sensitive high-resolution melting analysis เป็นวิธีการทางอณูชีววิทยาอย่างง่าย ในการวิเคราะห์ DNA methylation ใน specific genetic locus โดยผนวก 3 เทคนิค คือเทคนิค bisulfite conversion ที่จะให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบส cytosine ในสายดีเอ็นเอ เป็น uracil ขณะที่ 5-methyl cytosine ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เทคนิค PCR ที่ใช้ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ผ่านการ

ทำปฏิกิริยา bisulfite conversion แล้ว และเทคนิค high resolution melting ซึ่งเป็นกระบวนการวิเคราะห์ amplicon หลังกระบวนการ PCR เป็นการวิเคราะห์คุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยคุณลักษณะนี้จะขึ้นอยู่กับ DNA methylation pattern ที่แทนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังทำปฏิกิริยา ที่ส่งผลต่อ conformational ของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่มี DNA methylation pattern แตกต่างกัน เมื่อผ่านปฏิกิริยา bisulfite conversion ตามด้วยปฏิกิริยา PCR จะทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ amplicon ที่ได้แตกต่างกัน ในสถานะที่ดีเอ็นเอจับกันเป็นสายคู่ จะมีการแทรกของ fluorescence intercalating dye ที่เกลียวของดีเอ็นเอ และเกิดการ emission ให้สัญญาณแก่ fluorodetector เมื่อค่อยๆ ให้อุณหภูมิกับดีเอ็นเอ จะเกิดการแยกสายที่ละน้อย เป็นผลให้ intercalating dye เกิดการหลุดออก และสัญญาณ fluorescent ที่ได้ลดลง

เมื่อนำสัญญาณที่ลดลงในแต่ละช่วงอุณหภูมิมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ จะสามารถหาค่าอุณหภูมิที่ดีเอ็นเอมีการแยกสายกันร้อยละ 50 เรียกว่า melting temperature ซึ่งจะเป็นค่าที่เป็นตัวแทนของ PCR product เดียวกัน แต่ทั้งนี้ในกรณีที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันไม่มาก จะไม่สามารถจำแนกได้ด้วยค่า melting temperature โดยจะเห็นว่าการใช้ค่า melting temperature เพื่อเป็นตัวแทนของ amplicon มีโอกาสที่จะเกิด error type II ได้มาก เนื่องจากมาจากมีโอกาสมาก ที่ amplicon ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันจะมีค่า melting temperature ตรงกัน ในกรณีนี้ high resolution melting จึงบทบาทสำคัญ

High resolution melting จะเป็นการเปรียบเทียบแบบแผนของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่มากขึ้นกับปริมาณการแยกสายของดีเอ็นเอดังที่กล่าวมาข้างต้น โดยการเปรียบเทียบนี้จำเป็นต้องกำหนดตัวอย่างใดตัวอย่างหนึ่งเป็นตัวอย่างอ้างอิง เพื่อใช้ normalization ตัวอย่างอื่นๆ หากตัวอย่างที่นำมาเปรียบเทียบมีแบบแผนของกราฟตรงกับตัวอย่างอ้างอิง แสดงว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่แตกต่างกัน หากกราฟมีความแตกต่างกันของแบบแผน แสดงว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน เป็นต้น

วิธีการนี้เหมาะกับการคัดกรองความต่างของแบบแผน DNA methylation แบบจำเพาะโลคัส เนื่องจากมีข้อจำกัดว่า amplicon ควรมีความยาวประมาณ 150 bp หรือสั้นกว่านี้ หากมีความยาวมากเกินไป จะลด resolution ของวิธีการได้

2.4.4 Targeted Bisulfite Sequencing

ดังที่กล่าวในตอนต้นว่า แบบแผน DNA methylation จะมีลักษณะแตกต่างกันตามชนิดของเซลล์ ดังนั้นหากพิจารณาจะพบว่า DNA methylation ในเซลล์ชนิดเดียวกัน จะมีแบบแผนได้ไม่เกินสองแบบแผน คือในกรณีปกติแบบแผนของ paternal allele และ maternal allele จะต้องเหมือนกัน ในกรณีนี้จะพบแบบแผนรูปแบบเดียวเท่านั้น

ในอีกกรณีหนึ่ง คือ กรณีของ Imprinting gene กรณีนี้จะพบแบบแผนของ paternal allele หรือ maternal allele ที่แตกต่างกัน คืออันหนึ่งเป็นลักษณะ hypomethylation อันหนึ่งเป็นลักษณะ hypermethylation เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน ฉะนั้นจึงจะพบแบบแผน DNA methylation ของ

เซลล์ได้ถึงสองรูปแบบ ในกรณีของเนื้อเยื่อรก ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์อย่างน้อย 8 ชนิด คือ

1) syncytiotrophoblasts 2) cytotrophoblasts 3) mesenchymal cells 4) mesenchymal derived macrophages (Hofbauer cells) 5) fibroblasts 6) vascular smooth muscle cells 7) perivascular cells (pericytes) และ 8) endothelial cells ทำให้แบบ DNA methylation ที่ตรวจพบมีความหลากหลาย

การใช้เทคโนโลยี sanger sequencing มาวิเคราะห์ในลักษณะ direct sequencing เป็นไปได้ยาก เนื่องจาก resolution ของวิธีการดังกล่าวอยู่ที่ร้อยละ 25 ซึ่งไม่สามารถตรวจพบ rare allele ที่ต่ำกว่านี้ได้ และในกรณีที่เป็นเป้าหมายมี CpG site มากกว่า 1 ตำแหน่ง วิธีการนี้ยังไม่สามารถจำแนก methylation status ของแต่ละ CpG site ในลักษณะ linkage หรือ DNA methylation pattern ได้อีกด้วย แต่ทั้งนี้ก็มีรายงานที่ประยุกต์ใช้การ cloning ร่วมกับ sanger sequencing อย่างไรก็ตามก็ยังมีข้อเสียคือ โดยทั่วไปจะสุ่มโคลนจำนวน 20-30 โคลน ซึ่งนอกจากจะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย-แรงงาน-และเวลาแล้ว-ยังอาจไม่สามารถ recovery แบบแผนที่มีอยู่ได้ทั้งหมด อีกทั้งไม่สามารถบอกถึงสัดส่วนของ DNA methylation ที่มีอยู่ใน sample

วิธีการที่ถือเป็นวิธีมาตรฐานในปัจจุบันสำหรับการวิเคราะห์ DNA methylation จำเพาะโลคัส คือ targeted bisulfite sequencing ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็นสองการ หลักการที่ 1 จะเป็นการ enrichment ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วย oligonucleotide probe ที่มีความจำเพาะกับเป้าหมาย โดยอาจเป็นดีเอ็นเอที่ผ่านปฏิกิริยา bisulfite conversion มาแล้วหรือไม่ก็ได้ จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค massive parallel sequencing ในกรณีที่ดีเอ็นเอยังไม่ผ่านปฏิกิริยา bisulfite conversion จำเป็นต้องทำปฏิกิริยาก่อนวิเคราะห์ด้วย massive parallel sequencing วิธีการนี้มีข้อดีคือ กรณีที่ดีเอ็นเอเกิดการหักมาก่อนแล้ว เช่นเดียวกับ cell-free DNA จะไม่มี bias จากกระบวนการ PCR ที่จำเป็นต้องใช้ primer ที่จำเพาะกับเป้าหมาย ซึ่งเป้าหมายที่เกิดการเข้าสู่สุ่มอาจเป็นจุดหักของดีเอ็นเอ

สำหรับหลักการที่ 2 เป็นการนำ amplify ดีเอ็นเอเป้าหมายที่ผ่านปฏิกิริยา bisulfite conversion มาแล้วโดยใช้ primer ที่ครอบคลุม CpG site ที่สนใจ แล้วนำ amplicon ที่ได้ ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค massive parallel sequencing เช่นเดียวกันกับหลักการที่ 1 จะเห็นได้ว่ามีข้อเสียจาก PCR bias ดังที่กล่าวข้างต้น แต่มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่สะดวก ราคาถูก และเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มากขึ้นก่อนนำไปวิเคราะห์ ซึ่งเหมาะสมกับตัวอย่างที่เป็น cell-free DNA ที่มีปริมาณดีเอ็นเอเล็กน้อยมาก

จะเห็นว่า targeted bisulfite sequencing ทั้งสองจะใช้เทคนิค massive parallel sequencing เข้ามาแทนที่ sanger sequencing ร่วมกับการ cloning โดย massive parallel sequencing จะสามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของแต่ละโมเลกุลได้พร้อมๆกัน เปรียบได้กับการทำการ cloning แล้วนำ clone จำนวนมากไปทำการ sequencing พร้อมๆกัน

โดยกระบวนการที่เลียนแบบการ cloning คือการเตรียม library จะเป็นการตรึงดีเอ็นเอแต่ละโมเลกุลเข้าไว้กับ solid phase ซึ่งอาจจะเป็น bead หรือ flow cell จากนั้นจึงการ amplify ดีเอ็นเอแต่ละโมเลกุลที่ถูกตรึงอยู่นั้น ให้เพิ่มปริมาณขึ้นเป็นกลุ่มๆ เรียกว่า clonally PCR ซึ่งแต่ละกลุ่มที่ได้นี้ ก็

เปรียบเทียบแต่ละโคลนของดีเอ็นเอ จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละโคลน ตามแต่ชนิดของ platform ที่ใช้ในการวิเคราะห์



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การออกแบบการวิจัย และตัวอย่าง

คณะผู้วิจัยได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ตอน ในตอนที่ 1 ได้ทำการศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่จะใช้ CpG site จำนวน 4 ตำแหน่ง ที่อยู่ใน α -globin gene cluster ในการจำแนกสารพันธุกรรมของทารกออกจากสารพันธุกรรมในพลาสมาของมารดา โดยการเปรียบเทียบ DNA methylation profile ของ CpG ทั้ง 4 ตำแหน่ง ระหว่างรกซึ่งเป็นแหล่งของสารพันธุกรรมทารกที่จะเข้าไปไหลเวียนในกระแสโลหิตของมารดา และ เม็ดเลือดขาวซึ่งเป็นแหล่งหลักของสารพันธุกรรมในพลาสมามารดา

ในตอนี่ 2 หลังจากที่ทราบว่า CpG ทั้ง 4 ตำแหน่ง แสดงความเป็นไปได้ในการติดตามสารพันธุกรรมของทารก คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการเปรียบเทียบ DNA methylation profile บน α -globin gene cluster ระหว่าง Cell-free DNA จากหญิงตั้งครรภ์และหญิงไม่ตั้งครรภ์ โดยทำการศึกษาใน 3 ระดับคือ 1) DNA methylation profile ในระดับโลคัส 2) DNA methylation profile ในระดับตำแหน่ง CpG และ 3) DNA methylation pattern

ตัวอย่างรกและเม็ดเลือดขาว จำนวนชนิดละ 10 ตัวอย่าง ได้จากหน่วยชาลส์ซีเมียร์ สถาบันมนุษย์พันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา โดยผ่านการตรวจทางห้องปฏิบัติการมาก่อนแล้วว่า ทั้งรกและเม็ดเลือดขาว มีอัลลีลของ α -globin gene cluster ชนิด wild-type อยู่

ตัวอย่าง Cell-free DNA นี้ ทำการเตรียมจากเลือดของอาสาสมัครหญิง 2 กลุ่ม คือ หญิงที่ตั้งครรภ์และหญิงที่ไม่ตั้งครรภ์ โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากหญิงมีครรภ์ที่ไม่ใช่คู่เสี่ยงชาลส์ซีเมียร์ชนิดอัลฟา จำนวน 20 ราย และไม่มีครรภ์จำนวน 20 ราย โดยการได้มาซึ่งตัวอย่าง และการนำตัวอย่างไปทำการวิจัยในลำดับถัดไป ปฏิบัติตามการปฏิบัติการวิจัยทางคลินิกที่ดีของ International Conference on Harmonization Good Clinical Practice หรือ ICH GCP และ หลักการแห่งค าประกาศเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) และได้รับรองจากรองจากคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (IRB No.355/58)

3.2 การศึกษาความเป็นไปได้ของ 4 CpG site เพื่อติดตาม cell-free fetal DNA

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากรกและเม็ดเลือดขาว

การสกัดดีเอ็นเอจากรกและเม็ดเลือดขาว คณะผู้วิจัยได้ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Qiamp DNA mini kit ในการสกัด ซึ่งกระบวนการสกัดมีความแตกต่างกันเฉพาะในช่วงเตรียมตัวอย่าง โดยการสกัดดีเอ็นเอจากรก เริ่มจากผสม tissue-lysis buffer(Buffer ATL) ปริมาตร 180 มิลลิลิตรลงในตัวอย่างรก 25 มิลลิกรัม และ proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าด้วยกัน แล้วนำไปบ่มที่ 56 °C จนกว่าเนื้อเยื่อจะสลายตัวจนหมด จึงทำการเติม lysis buffer(Buffer AL) อีก 200 ไมโครลิตรแล้วนำไปบ่มต่อที่ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที

ขณะที่ตัวอย่างเม็ดเลือดขาว เริ่มจากตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับ proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ lysis buffer(Buffer AL) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการบ่มที่ 56 °C เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นตัวอย่างทั้งสองชนิด ได้เข้าสู่กระบวนการเดียวกัน คือ ทำการเติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปผ่านคอลัมน์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 rpm 1 นาที จึงทำการล้างด้วย washing buffer AW1 และ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตามลำดับ ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำเพื่อทำให้คอลัมน์แห้ง อีก 1 นาที สุดท้ายจึงทำการชะดีเอ็นเอด้วย elution buffer(Buffer AE) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทั้งนี้ทุกการปั่นเหวี่ยงใช้ความเร็วรอบ 14000 rpm และเก็บดีเอ็นเอที่ -20 °C

3.2.2 การแปรรูปดีเอ็นเอเพื่อใช้ศึกษา DNA methylation profile ด้วยปฏิกิริยา bisulfite conversion

การศึกษา DNA methylation profile ในการศึกษาลำดับต่อไป จำเป็นต้องแปรรูปดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา bisulfite conversion ก่อน โดยในการศึกษาคั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้ชุด EZ DNA Methylation-Gold™ Kit ในการแปรรูปดีเอ็นเอ เริ่มจากใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับ CT Conversion Reagent ปริมาตร 130 ไมโครลิตร แล้วทำการบ่มที่ 98 °C เป็นเวลา 10 นาที 64 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ไม่เกิน 20 ชั่วโมง

จากนั้นจึงทำการผสมสารละลายข้างต้นกับ binding buffer(M-Binding Buffer) แล้วถ่ายสารละลายที่ได้ ลงคอลัมน์(Zymo-Spin IC Column) ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 14000 rpm 30 วินาที ทำการล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer(M-Wash Buffer) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14000 rpm 30 วินาที

ปฏิกิริยา desulfonation ทำโดยการเติม M-Desulphonation Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จึงทำการปั่นเหวี่ยงที่ 14000 rpm 30 วินาที แล้วจึงล้างคอลัมน์ด้วย M-Wash Buffer จำนวน 200 ไมโครลิตรซ้ำสองครั้ง สุดท้ายจึงทำการชะด้วย M-Elution Buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ 14000 rpm 30 วินาที โดยเก็บดีเอ็นเอที่แปรรูปนี้ที่ -20 °C ไม่เกิน 1 ปี

3.2.3 การเปรียบเทียบ DNA methylation profile ของรกและเม็ดเลือดขาวด้วยเทคนิค High Resolution Melting analysis

การเปรียบเทียบ DNA methylation profile ของรกและเม็ดเลือดขาว ได้ใช้ดีเอ็นเอที่ผ่านการแปรรูปจากข้อที่ 3.2.2 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค High Resolution Melting analysis โดยเริ่มจากการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งได้กำหนดให้อยู่ในปริมาณ 25 μ L โดยประกอบไปด้วยสารเคมีที่มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ primer ชนิด forward (5'- TTAAGAAATAATGTAAGTAGGTGGT-3') และ reverse (5'- TATTACCTAAATCCACCCACAACCTC -3') เข้มข้น 200 nmol/L dNTP เข้มข้น 200 μ mol/L SYTO9

เข้มข้น 2 $\mu\text{mol/L}$ MgCl₂ เข้มข้น 1.5 mmol/L Platinum DNA Polymerase จำนวน 1 unit ใน supplied buffer (1X) และ bisulfite modified DNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

และได้กำหนดสถานะของปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง CFX96 Touch Real-time platform (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ดังต่อไปนี้ เริ่มจาก ที่อุณหภูมิ 94° C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 40 รอบอุณหภูมิที่ประกอบด้วย 94° C เป็นเวลา 15 วินาที 57° C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72° C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นได้กำหนดให้เพิ่มอุณหภูมิไปที่ 95° C เป็นเวลา 30 วินาที และลดลงมาที่ 60° C เป็นเวลา 15 วินาที จึงเข้าสู่กระบวนการ high resolution melting (HRM) โดยกำหนดให้เครื่องทำอุณหภูมิเพิ่มขึ้นทีละ 0.5° C ต่อ 1 วินาที จนกระทั่งถึง 90° C จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Precision Melt Analysis Software

3.3 การเปรียบเทียบ DNA methylation profile ของ cell-free fetal DNA ระหว่างหญิงมีครรภ์และหญิงไม่มีครรภ์

3.3.1 การสกัดแยก cell-free DNA จากตัวอย่าง

การสกัดแยก cell-free DNA เริ่มจากนำเลือดที่ทำการเจาะเสร็จไม่เกิน 2 ชั่วโมง มาทำการปั่นแยกพลาสมาด้วยความเร็ว 3200 rpm ที่ 4° C เป็นเวลา 20 นาที จึงนำพลาสมาที่แยกได้มาปั่นเหวี่ยงซ้ำ ที่ความเร็วรอบ 14000 rpm ที่ 4° C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นคณะผู้วิจัยได้นำพลาสมาที่ได้ มาทำการสกัด cell-free DNA ด้วยชุดสกัด QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit เริ่มจากการผสมพลาสมาที่ได้ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เข้ากับ proteinase K ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ lysis buffer(buffer ACL) ปริมาตร 2.4 มิลลิตร แล้วทำการบ่มที่ 60° C เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แต่ไม่เกิน 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงผสม lysate ที่ได้ กับ binding buffer (buffer ACB) ปริมาตร 5.4 มิลลิลิตร แล้วทำการแช่เย็นที่ 4° C เป็นเวลา 5 นาที

ลำดับต่อมา ได้ทำการถ่ายส่วนผสมทั้งหมดเข้าสู่คอลัมน์(QIAamp Mini column) ที่ต่อเข้ากับปั๊มสุญญากาศ(QIAvac 24 Plus) หลังจากสารละลายทั้งหมดไหลผ่านคอลัมน์ จึงการเติม wash buffer ACW1 และ ACW2 ปริมาตร 600 และ 750 ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วทำการล้างคอลัมน์ซ้ำด้วย absolute ethanol ปริมาตร 750 ไมโครลิตร

ในขั้นตอนสุดท้าย ได้ทำการปั่นแห้งคอลัมน์ที่ 14000 rpm เป็นเวลา 3 นาที แล้วทำการระเหยเอทานอลที่เหลือที่อุณหภูมิ 56° C เป็นเวลา 10 นาที จึงทำการชะดีเอ็นเอ ด้วย elution buffer(AVE) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20° C

3.3.2 การวัดปริมาณ DNA และยืนยันการมีอยู่ของ cell-free fetal DNA

เพื่อให้ได้ปริมาณ DNA เพียงพอสำหรับการศึกษา DNA methylation profile และคัดกรองตัวอย่างจากหญิงตั้งครรภ์ ว่ามีสารพันธุกรรมของทารกที่ไหลเวียนเข้ามาในกระแสโลหิตของมารดาอยู่จริง คณะผู้วิจัยได้ใช้วิธี real time PCR เพื่อวัดปริมาณ DNA และตรวจสอบสารพันธุกรรม Y chromosome โดยใช้ชุด

primer ที่มีความจำเพาะต่อ *DSCAMP* gene เพื่อเป็น internal control และชุด primer ที่มีความจำเพาะต่อ Y chromosome เพื่อตรวจสอบ cell-free fetal DNA

เฉพาะตัวอย่างหญิงตั้งครรภ์ที่ให้สัญญาณ Chromosome Y เท่านั้น ที่ได้ใช้ในการศึกษาวิจัยในลำดับต่อไป และ ทั้งตัวอย่างกลุ่มหญิงตั้งครรภ์และกลุ่มหญิงไม่ตั้งครรภ์ที่ให้สัญญาณ threshold of cycle (C_t) ของ *DSCAMP* gene ต้องไม่เกิน 30 จึงถึงว่ามีปริมาณดีเอ็นเอเพียงพอ

3.3.3 การแปรรูปดีเอ็นเอ เพื่อใช้ศึกษา DNA methylation profile ด้วยปฏิกิริยา bisulfite conversion

ขั้นตอนนี้ทำเหมือนข้อ 3.2.2

3.3.4 การเปรียบเทียบ DNA methylation profile ด้วยเทคนิค deep targeted sequencing

3.3.4.1 การเตรียม amplicon

การเปรียบเทียบ DNA methylation profile ของ cell-free DNA ระหว่างหญิงมีครรภ์และหญิงไม่มีครรภ์ ได้ใช้ดีเอ็นเอที่ผ่านการแปรรูปจากข้อที่ 3.3.4 ทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งได้กำหนดให้อยู่ในปริมาตร 25 μ l โดยประกอบไปด้วยสารเคมีที่มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ primer ชนิด forward และ reverse เข้มข้น 200 nmol/L dNTP เข้มข้น 200 μ mol/L SYTO9 เข้มข้น 2 μ mol/L $MgCl_2$ เข้มข้น 1.5 mmol/L Platinum DNA Polymerase จำนวน 1 unit ใน supplied buffer (1X) และ bisulfite modified DNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร โดยกำหนดสภาวะสำหรับปฏิกิริยา ดังนี้ อุณหภูมิ 94° C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 40 รอบอุณหภูมิ ที่ประกอบด้วย 94° C เป็นเวลา 15 วินาที 57° C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72° C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นได้กำหนดให้เพิ่มอุณหภูมิไปที่ 95 ° C

หลังจากยืนยัน PCR product ที่เกิดขึ้น จาก melting peak ที่ 76° C จึงได้ทำการทำบริสุทธิ์ PCR product ด้วยชุด QIAquick PCR Purification Kit โดยการผสม PCR product ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ได้จากข้างต้น กับ binding buffer(Buffer PB) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไปผ่านคอลัมน์ QIAquick spin column ทำการล้างด้วย washing buffer(Buffer PE) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร จากนั้นจึงทำการชะดีเอ็นเอด้วย elution buffer(Buffer EB) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

3.3.4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) ได้ใช้บริการ บริษัทศูนย์พันธุศาสตร์การแพทย์ โดยประกอบด้วยเตรียม library ด้วย Ion Plus Fragment

Library kit และทำการวิเคราะห์บน Ion PI Chip ผลการอ่านที่ได้ ส่งกลับมายังคณะผู้วิจัยในรูปแบบ raw data หรือ .FASTQ file

3.3.4.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ในขั้นแรกเป็นการ quality control ในเบื้องต้น และเป็นกรการเปลี่ยน raw data ให้อยู่ในฟอร์แมตที่สามารถใช้วิเคราะห์ต่อไปได้ คณะผู้วิจัยได้ใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศ ผ่าน Galaxy โดยเลือกใช้ NGS: QC and manipulation ในการทำ quality control ขั้นตอนประกอบด้วย แปลงไฟล์ด้วย FASTQ groomer จากนั้นทำการ filtering quality ที่ $Q > 20$ และ read length > 120 bps จากนั้นจึงทำการแปลงฟอร์แมตให้อยู่ในรูปแบบ FASTA

ในขั้นต่อมาเป็นการวิเคราะห์ DNA methylation profile ได้ใช้โปรแกรม BiQ Analyzer HT ในการวิเคราะห์ DNA methylation level ในระดับภาพรวมของทั้ง 4 CpG site วิเคราะห์แยกในแต่ละ CpG และสุดท้ายคือวิเคราะห์ DNA methylation pattern ในแต่ละ read ที่ได้

คณะผู้วิจัยได้นำข้อมูลที่ได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการจัดกลุ่ม และวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติด้วยโปรแกรม R studio โดยใช้ t-test และแสดงผลด้วย boxplot

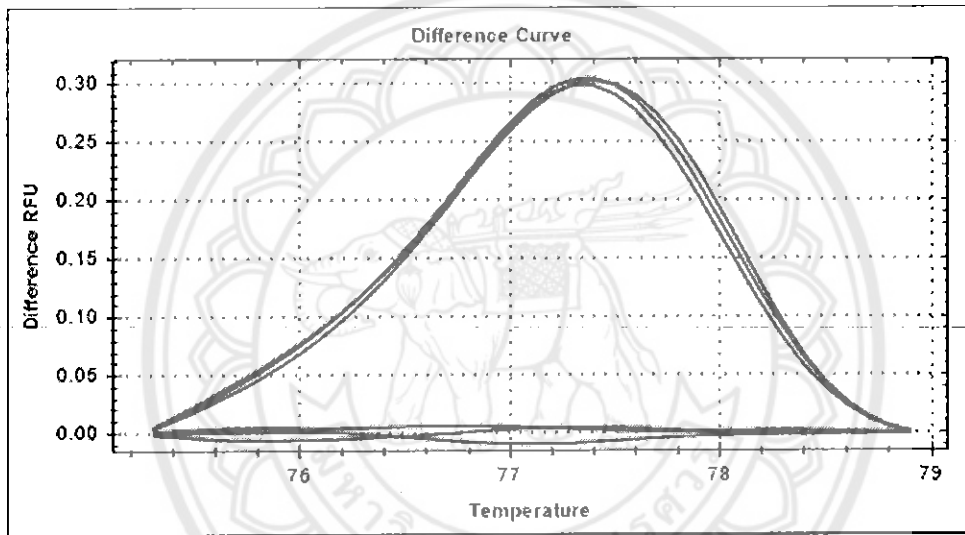
บทที่ 4

ผลการศึกษาวิจัย

4.1 ผลการเปรียบเทียบ DNA methylation profile ระหว่างรกและเซลล์เม็ดเลือดขาว

จากการเปรียบเทียบ DNA methylation profile ของ CpG site 4 ตำแหน่ง ที่อยู่บน α -globin gene cluster ระหว่างรก-สีเขี้ยว (N = 10) และเซลล์เม็ดเลือดขาว-สีแดง (N = 10) ด้วยวิธี High Resolution melting analysis พบว่าแบบแผนของ HRM profile ระหว่างตัวอย่างทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งให้เห็นว่า DNA methylation profile ของทั้ง ตัวอย่างทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน ดังภาพที่

1



ภาพที่ 1 แสดง methylation-sensitive high resolution melting profile ของพลาสมาจากหญิงตั้งครรภ์และเม็ดเลือดขาว

4.2 ผลการเปรียบเทียบ DNA methylation profile ของ cell-free DNA จากหญิงที่มีครรภ์ และหญิงที่ไม่ตั้งครรภ์

จาก cell-free DNA ที่สกัดได้จากหญิงมีครรภ์และหญิงไม่มีครรภ์ จำนวน 30 และ 20 ตัวอย่าง ตามลำดับ พบว่า เมื่อทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค real time PCR ตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมดมีค่า threshold of cycle น้อยกว่าที่กำหนดไว้ คือ $C_t = 30$ ดังนั้นตัวอย่างทั้งหมดจึงมีดีเอ็นเอเพียงพอที่จะเข้าสู่กระบวนการศึกษาขั้นต่อไป

ทั้งนี้จากตัวอย่างที่ได้จากหญิงมีครรภ์จำนวน 30 ตัวอย่าง จากการทดสอบ Y chromosome พบว่ามีอยู่ 14 ตัวอย่างที่มีสัญญาณของ Y chromosome คณะผู้วิจัยจึงทำการสุ่มตัวอย่างจากหญิงมีครรภ์เพื่อ

ทำการศึกษาต่อไป 10 จาก 14 ตัวอย่าง และสุ่มตัวอย่างจากหญิงไม่มีครรภ์จำนวน 10 จาก 20 ตัวอย่างที่กล่าวมาข้างต้น

จากการเปรียบเทียบ DNA methylation profile ของ CpG site 4 ตำแหน่ง ที่อยู่บน α -globin gene cluster หญิงมีครรภ์ (N = 10) และหญิงไม่มีครรภ์ (N = 10) ด้วยเทคนิค HRM พบว่า HRM profile ไม่แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดของตัวอย่าง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าความต่างของ DNA methylation profile อาจไม่เพียงพอจะจำแนกด้วยเทคนิคดังกล่าว

คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการเปรียบเทียบ DNA methylation profile ของ CpG site 4 ตำแหน่ง ของตัวอย่างทั้งสองชนิดด้วยเทคนิคที่มีความไวสูงกว่า คือการใช้เทคนิค deep sequencing ซึ่งข้อมูลที่ได้ ทำให้สามารถเปรียบเทียบ DNA methylation profile ได้ใน 3 ระดับ คือ ในระดับภาพรวมของทั้ง 4 CpG site ในระดับแต่ละ CpG และ ในระดับแต่ละโมเลกุลของ PCR product หรือ DNA methylation pattern

หลังจากการ quality control ข้อมูล raw data ที่ได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Ion torrent PGM พบว่าข้อมูลหลังการกรองด้วยค่าพารามิเตอร์ read length = 120 bps และ Q score > 20 ทำให้จำนวน read ในแต่ละตัวอย่าง เฉลี่ยอยู่ที่ 2248 read และมีอยู่ 1 ตัวอย่างที่มีจำนวน read ต่ำกว่า 150 read จึงทำการตัดออกจากการการศึกษา

จากนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการ alignment ข้อมูลทั้งหมด กับ reference sequence ซึ่งมีความยาว 129 bps และกำหนดพารามิเตอร์ในการคัดกรอง คือ อัตราการแปรรูปของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุด (minimal conversion rate) = 100% และ กำหนดให้มีความเหมือนขั้นต่ำกับ reference sequence (minimal sequence identity) ที่ 100% พบว่าจำนวน read เฉลี่ยที่ได้ เท่ากับ 1884 read

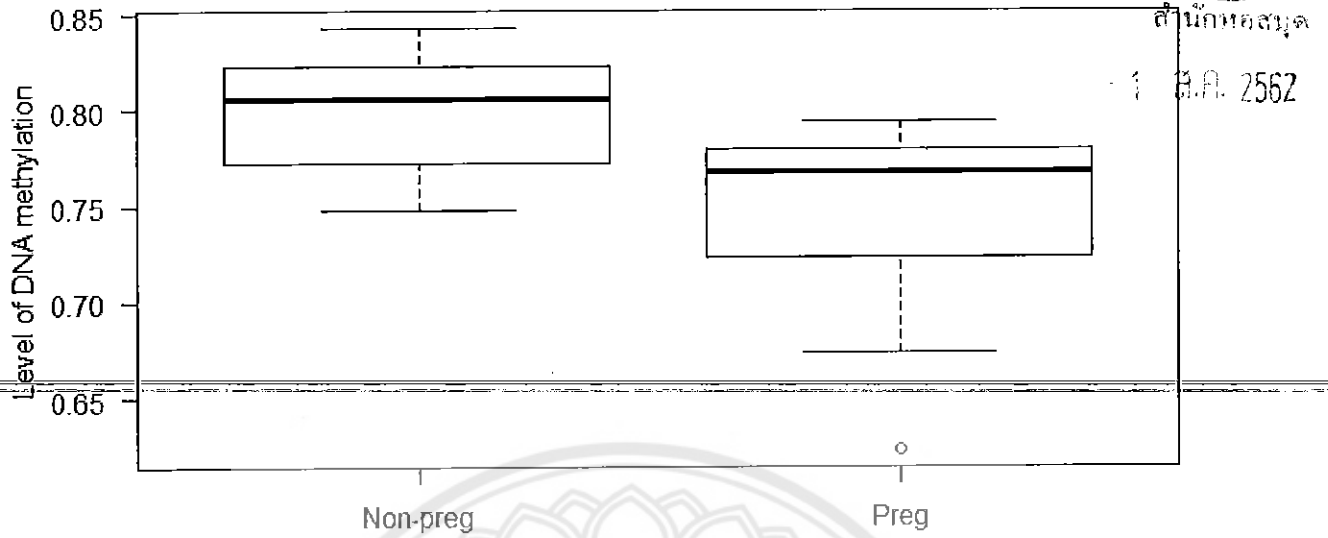
ผลการวิเคราะห์ DNA methylation profile จากข้อมูลข้างต้น ด้วยโปรแกรม BiQ analyzer HT พบว่า ค่าเฉลี่ยภาพรวมของ DNA methylation ทั้ง 4 ตำแหน่ง ระหว่างตัวอย่างที่ได้จากหญิงมีครรภ์และไม่มีครรภ์ เท่ากับ 0.75 และ 0.80 ตามลำดับ เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย t-test พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ โดย P value < 0.05 ดังภาพที่ 2 และตารางที่ 1

จ ๒H
431
พ.ศ. ๒๕๖๑
๒๕๖๐

25



1020659



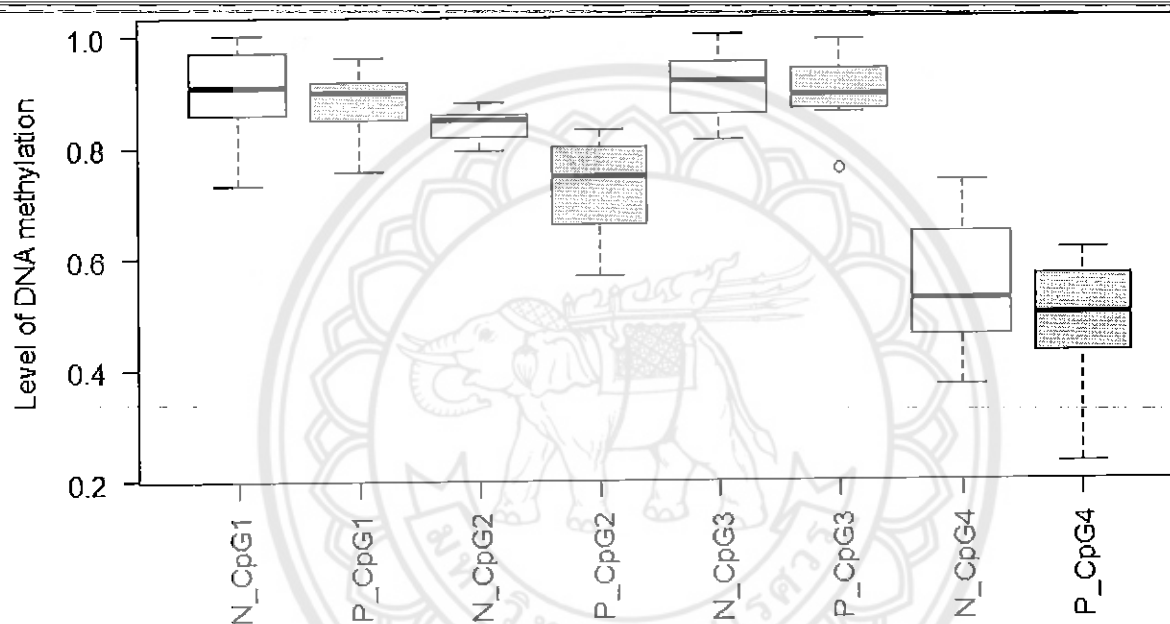
ภาพที่ 2 ระดับของ DNA methylation ในภาพรวม ระหว่างพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์และไม่ตั้งครรภ์

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	Non-preg	Preg
Mean	0.7974	0.7451
Variance	0.0011556	0.0031281
Observations	10	10
Hypothesized Mean Difference	0	
df	15	
t Stat	2.52692391	
P(T<=t) one-tail	0.01161801	
t Critical one-tail	1.753050356	
P(T<=t) two-tail	0.023236021	
t Critical two-tail	2.131449546	

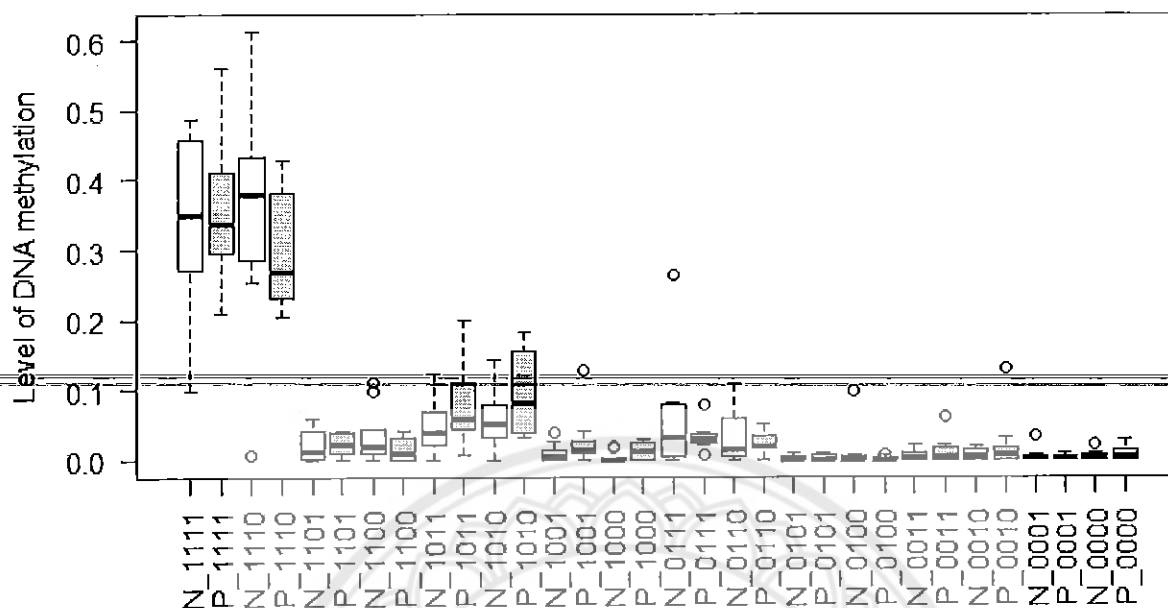
ตารางที่ 1 แสดงการทดสอบความแตกต่างของระดับ DNA methylation ในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์และไม่ตั้งครรภ์ ด้วย t-test

ผลการวิเคราะห์ DNA methylation profile ในระดับแต่ละ CpG site พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ DNA methylation ของตัวอย่างหญิงมีครรภ์ ใน CpG ตำแหน่งที่ 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับ 0.88, 0.72, 0.89 และ 0.48 ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยของระดับ DNA methylation ของตัวอย่างหญิงไม่มีครรภ์ ใน CpG ตำแหน่งที่ 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับ 0.90, 0.84, 0.91 และ 0.54 ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติด้วย t-test เป็นรายคู่ CpG ในตำแหน่งเดียวกัน ระหว่างชนิดตัวอย่าง พบว่า CpG ที่ 2 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ ที่ P value = 0.002 ขณะที่ CpG site ตำแหน่งอื่นๆ ไม่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ระดับของ DNA methylation ในแต่ละ CpG site ระหว่างพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์และไม่ตั้งครรภ์

จากผลการวิเคราะห์ DNA methylation pattern พบว่า เมื่อทำการทดสอบทางสถิติด้วย t-test ไม่มี pattern คู่ใด ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ อย่างไรก็ตามพบว่ามี pattern รูปแบบ m1000 มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญมากที่สุด ($P = 0.097$) ซึ่งพบความถี่ในกลุ่มหญิงไม่มีครรภ์สูงกว่ากลุ่มหญิงมีครรภ์ โดยค่าเฉลี่ยความถี่ของ pattern ชนิดนี้ในหญิงมีครรภ์และไม่ตั้งครรภ์ เท่ากับ 0.012 และ 0.004 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4 และตารางที่ 2



ภาพที่ 4 DNA methylation pattern ระหว่างพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์และไม่ตั้งครรภ์

Pattern	P-value
1111	0.083669
1110	0.721429
1101	0.368027
1100	0.139273
1011	0.508004
1010	0.071492
1001	0.116347
1000	0.849155
0111	0.472998
0110	0.914257
0101	0.70353
0100	0.311789
0011	0.261108
0010	0.318636
0001	0.442174
0000	0.167983

ตารางที่ 2 แสดงการทดสอบความแตกต่างความถี่ของ DNA methylation pattern ในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์และไม่ตั้งครรภ์ด้วย t-test

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

จากเป้าหมายการวิจัย ที่ต้องการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกสารพันธุกรรมอัลลีลชนิดปกติของทารก จากสารพันธุกรรมอัลลีลชนิดปกติของมารดา โดยใช้ DNA methylation marker ที่อยู่บน α -globin gene cluster คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการสืบค้นรายงานก่อนหน้านี้ถึงลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนม ที่มีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นเป้าหมาย

จากการศึกษาของคณะผู้วิจัย Xiang Y ในปี 2014 ได้ทำการเปรียบเทียบถึงความแตกต่างของ DNA methylation pattern ระหว่างรกและเลือด เพื่อหา marker ในการตรวจวินิจฉัยโรค aneuploidy แบบไม่รุกล้ำ โดยใช้วิธี methylated DNA immunoprecipitation-sequencing (MeDIP-Seq) แม้ว่าในการศึกษาดังกล่าว จะมุ่งหาแต่ potential marker สำหรับ aneuploidy เท่านั้น แต่ข้อมูลในลักษณะ whole genome ที่ได้จากการศึกษาดังกล่าว ยังเป็นประโยชน์แก่คณะผู้วิจัยของข้าพเจ้า ในการค้นหา marker ที่สามารถใช้ติดตามอัลลีลชนิดปกติของทารก ที่มีความแตกต่างจากมารดาได้ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลดิบที่ได้จากการศึกษาข้างต้น คณะผู้วิจัยพบบริเวณที่น่าสนใจบน α -globin gene cluster จำนวน 1 บริเวณ อยู่ที่ยีน *HBQ* ตั้งแต่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 169900 – 17041บน reference genome g36

จากข้อมูลข้างต้นเปรียบเสมือนการคัดกรองนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่น่าสนใจ ให้จำเพาะอยู่บริเวณ *HBQ* gene คณะผู้วิจัยจึงได้ใช้ฐานข้อมูล MethBase ในการค้นหาตำแหน่งของ CpG ที่แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจน ระหว่างรกและเซลล์เม็ดเลือดขาว แต่จากฐานข้อมูลข้างต้นพบว่า ที่บริเวณดังกล่าวไม่พบความแตกต่างดังที่รายงานก่อนหน้านี้ได้แสดงไว้ ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ประเมินแล้วว่าข้อมูลจากฐานข้อมูล ได้มาจากเทคนิค bisulfite whole genome sequencing ซึ่งมี sensitivity สูงกว่า MeDIP-Seq จึงทำให้ข้อมูลจากฐานข้อมูลเป็นที่น่าเชื่อถือมากกว่า

คณะผู้วิจัยได้ทำการค้นหา CpG site ที่อยู่ในบริเวณ deletion ที่มีความแตกต่างกันในระหว่างรกและเม็ดเลือดขาวโดยใช้ฐานข้อมูล MethBase พบว่ามี CpG site อยู่ 4 ตำแหน่งที่น่าสนใจ ซึ่งตั้งอยู่บริเวณ ยีน *HBAP1*

ในตอนแรก คณะผู้วิจัยต้องการจะยืนยันความใช้ได้ของเป้าหมายดังกล่าว และทดสอบความใช้ได้ของชุด primer ที่ทำการออกแบบ จึงใช้ตัวอย่างชิ้นรก และ buffy coat ที่แยกได้จากผู้ที่มีอัลลีลชนิดปกติอยู่ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า primer ที่ทำการออกแบบที่ครอบคลุมเป้าหมายดังกล่าว สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดออกจากกันได้ชัดเจน ซึ่งอนุมานว่า primer ที่ออกแบบมาสามารถใช้ได้ และความแตกต่างของเป้าหมายดังกล่าวน่าจะเพียงพอที่จะจำแนกสารพันธุกรรมของทารกออกจากสารพันธุกรรมของมารดา

ในตอนที 2 คณะผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์ และหญิงไม่ตั้งครรภ์ โดยกลุ่มตัวอย่างกลุ่มแรก เป็นตัวแทนของพลาสมาที่มีสารพันธุกรรมอัลลีลชนิดปกติของทารกกระจายตัวอยู่ และกลุ่มหลัง เป็นตัวแทนของพลาสมาที่ไม่มีสารพันธุกรรมอัลลีลชนิดปกติของทารกกระจายตัวอยู่ ในขั้นแรกผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค HRM เพื่อคัดกรองความแตกต่าง แต่พบว่าความแตกต่างที่พบไม่เพียงพอที่จะจำแนกตัวอย่างทั้งสองกลุ่มออกจากกันได้ อาจมาจากข้อจำกัดของความไว (sensitivity) ของเทคนิคดังกล่าว โดยคณะผู้วิจัยมีข้อมูลศึกษาภายในห้องปฏิบัติการที่ชี้ว่า selectivity ของเทคนิค HRM อยู่ที่สัดส่วนความเข้มข้นทุกๆร้อยละ 20 ซึ่งจากรายงานที่มีในปัจจุบัน พบว่าสารพันธุกรรมของทารกที่กระจายตัวในพลาสมาของมารดามีไม่เกินร้อยละ 20 สัดส่วนนี้อาจเป็นข้อจำกัด ทำให้ไม่เห็นความแตกต่างของตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม

คณะผู้วิจัย ได้เปรียบเทียบความแตกต่างของตัวอย่างทั้งสองกลุ่มข้างต้น ด้วยวิธี deep sequencing ซึ่งมีความไวสูงกว่าจาก DNA methylation profile ทั้งหมดของทั้ง 4 CpG site แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมี DNA methylation profile ที่แตกต่างกัน โดยพบว่าในกลุ่มของหญิงมีครรภ์จะมีระดับของ DNA methylation ที่ลดลง เมื่อเทียบกับหญิงไม่มีครรภ์ สอดคล้องกับข้อมูลที่รายงานในฐานข้อมูล MethBase ที่แสดงระดับ DNA methylation ของทั้ง 4 CpG ที่มีค่าใกล้ 0 ในรก แสดงให้เห็นว่าสภาวะ hypomethylation locus นี้ ของตัวอ่อนรก เมื่อเกิดการ apoptosis และกระจายตัวเข้าสู่กระแสโลหิตของมารดา จึงดึงระดับ DNA methylation ในภาพรวมของพลาสมามารดาให้ลดลง

สิ่งที่น่าสนใจคือ จากที่คาดการณ์ว่า เมื่อศึกษา DNA methylation profile ในระดับแต่ละ CpG site จะพบว่า DNA methylation ทั้ง 4 ตำแหน่ง ในหญิงมีครรภ์ จะลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อเทียบกับหญิงไม่มีครรภ์ แต่กลับพบว่า มีเพียง CpG site ตำแหน่งที่ 2 เท่านั้น ที่ลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญ อาจกล่าวได้ว่า CpG site ดังกล่าว มีบทบาทสำคัญต่อระดับ DNA methylation เมื่อมีสารพันธุกรรมของทารกปนเข้ามา

การที่ระดับของ DNA methylation ลดลงเฉพาะ CpG ตำแหน่งที่ 2 ซึ่งขัดแย้งกับข้อมูลจากฐานข้อมูล ไม่ได้แสดงว่าสารพันธุกรรมของทารกจะมีลักษณะ unmethylation เฉพาะที่ตำแหน่งที่ 2 แต่อาจมาจาก stability ของอัลลีลที่มี DNA methylation pattern ในรูปแบบอื่น ที่ลดลง จึงไม่สามารถพบได้พลาสมาของมารดา

การศึกษาในระดับ DNA methylation pattern แสดงให้เห็นว่าไม่มี pattern ใดแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ ซึ่งสนับสนุนแนวคิดข้างบนว่าสารพันธุกรรมที่ตรวจพบในมารดา อาจไม่ใช่สารพันธุกรรมทั้งหมดที่กระจายตัวเข้ามา แต่เป็นสารพันธุกรรมที่มีเสถียรภาพสูงเพียงพอทำให้เหลือจนตรวจพบ

ดังที่พบว่าเมื่อเปรียบเทียบ DNA methylation pattern ที่มี CpG ตำแหน่งที่ 2 เป็นสถานะ unmethylated จะพบในหญิงมีครรภ์มากกว่าหญิงไม่ตั้งครรภ์อย่างมีนัยยะสำคัญ ขณะที่ pattern ที่มี CpG ตำแหน่งที่ 2 เป็นสถานะ methylated พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในระหว่างหญิงตั้งครรภ์และไม่ตั้งครรภ์

หรือหากพิจารณาในอีกแง่หนึ่ง เป็นไปได้ว่ากระบวนการ DNA methylation บน CpG ทั้ง 4 ตำแหน่ง มี dynamic ที่สูง จึงไม่พบ pattern ที่มีความจำเพาะ แต่ยังคงอนุรักษ์ลักษณะ hypomethylation ไว้ในตำแหน่งที่ 2 ซึ่งใน CpG ตำแหน่งที่ 2 นี้ อาจมีบทบาทสำคัญบางประการที่คณะผู้วิจัยจะพิจารณานำไปศึกษาต่อในอนาคต

โดยสรุปแล้ว จากการศึกษาทำให้ได้ข้อค้นพบว่า CpG ทั้ง 4 ตำแหน่ง ไม่สามารถใช้จำแนกสารพันธุกรรมของทารกออกจากสารพันธุกรรมของมารดาได้ด้วย DNA methylation pattern ซึ่งมีความแปรผันค่อนข้างสูง แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยชิ้นนี้ ชี้ให้เห็นว่า DNA methylation level สามารถใช้ติดตามการมีอยู่ของ cell-free fetal DNA ได้ โดยอาจพิจารณาจาก DNA methylation level ภาพรวมของทั้ง 4 CpG หรือ อาจพิจารณาเฉพาะ CpG ที่ 2 ซึ่งจะเป็นการเพิ่ม resolution ในการจำแนกกลุ่มหญิงที่มีสารพันธุกรรมของทารกกระจายอยู่ จากกลุ่มหญิงที่ไม่มีสารพันธุกรรมของทารก

ในด้านการประยุกต์ใช้ งานวิจัยชิ้นนี้ทำให้ได้เป้าหมาย ในการติดตามการมีอยู่ของสารพันธุกรรมทารก ซึ่งสามารถใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจคัดกรองแบบไม่รุกราน อันจะนำมาสู่การลดจำนวนครรภ์ที่ต้องทำหัตถการเจาะน้ำคร่ำหรือเจาะเก็บชิ้นรกโดยไม่จำเป็น ซึ่งในอนาคตคณะผู้วิจัยตั้งเป้าหมายว่า จะผนวกเอาเป้าหมายในส่วนของอัลลีลก่อโรคเข้ามาในชุดตรวจด้วย เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยแยกไม่รุกรานที่สามารถระบุได้ถึงจีโนไทป์ของทารก

5.2 ข้อเสนอแนะ

- การศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการใช้ตัวอย่างหญิงไม่ตั้งครรภ์ซึ่งมีลักษณะองค์ประกอบของสารพันธุกรรมที่ปะปนกันอยู่ในพลาสมาคล้ายกับหญิงที่ตั้งครรภ์ทารกบวมน้ำ จึงเป็นเพียงการสร้างหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ให้เชื่อว่า CpG ตำแหน่งที่ 2 น่าจะมีศักยภาพเพียงพอที่จะจำแนกพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์ปกติออกจากหญิงที่ตั้งครรภ์เป็นโรค แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องทำการศึกษาในพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์ทารกที่เป็นโรคต่อไป
- การศึกษาในขั้นต่อไปอาจทำได้ลำบาก เนื่องด้วยอุบัติการณ์ของทารกบวมน้ำชนิดบาร์ธที่ไม่ได้สูงมากนัก เช่นในพื้นที่จังหวัดพะเยา มีประมาณ 2 ครรภ์/1000ครรภ์/ปี จึงจำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือในเชิงเครือข่ายหลายพื้นที่ เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่เพียงพอในการศึกษา โดยในระยะศึกษาความเป็นไปได้ของวิธีการที่พัฒนาขึ้น อาจจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างไม่น้อยกว่า 10 ตัวอย่าง (ทั้งนี้อ้างอิงจากการศึกษาในครั้งนี้)
- การศึกษาเชิง Clinical validation อาจต้องอาศัยระยะเวลาและความร่วมมือจากสูติแพทย์จำนวนมาก
- แม้การศึกษาครั้งนี้จะใช้เทคโนโลยีที่มีราคาสูง คือ next-generation sequencing ซึ่งเฉพาะค่าวิเคราะห์ดีเอ็นเอตกอยู่ที่ประมาณ 12,000 บาทต่อตัวอย่าง แต่เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบแล้วว่า CpG site ที่มีความสำคัญในการประเมินโรคมียเพียง CpG site ที่ 2 ดังนั้นการศึกษาในคราวต่อไป สามารถมุ่งเป้าเฉพาะ CpG ตำแหน่งนี้เท่านั้น จึงสามารถประยุกต์เอาเทคโนโลยีที่มีราคาถูกกว่าแต่มีความไวพอกัน เช่น digital PCR หรือ real-time PCR เข้ามา โดยใช้เทคนิคในลักษณะเดียวกันกับ single point mutation analysis จะทำให้เกิดเทคโนโลยีที่มีราคาถูกและประชาชนส่วนใหญ่เข้าถึงได้ และอาจนำไปสู่การบรรจุในนโยบายของภาครัฐให้ครรภ์ที่เป็นคู่เสียสามารถเข้าถึงการตรวจที่จะพัฒนาขึ้นได้ฟรี

ภาคผนวก

N01

Amplicon Sequence

Sample N01

Loaded reads 11335

Filtered out reads 2925

Exported reads 8410

Mean methylation level 0.823

Standard deviation 0.184

Mean conversion rate 1.000

Elapsed time 0 min 24 sec

Methylation



CpG Position

	1	2	3	4
Unmethylated	790.0	1230.0	409.0	3535.0
Methylated	7620.0	7180.0	8001.0	4875.0
Not present	0	0	0	0

Legend: un-methylated methylated not present

N02

Amplicon Sequence

Sample N02

Loaded reads 807

Filtered out reads 318

Exported reads 489

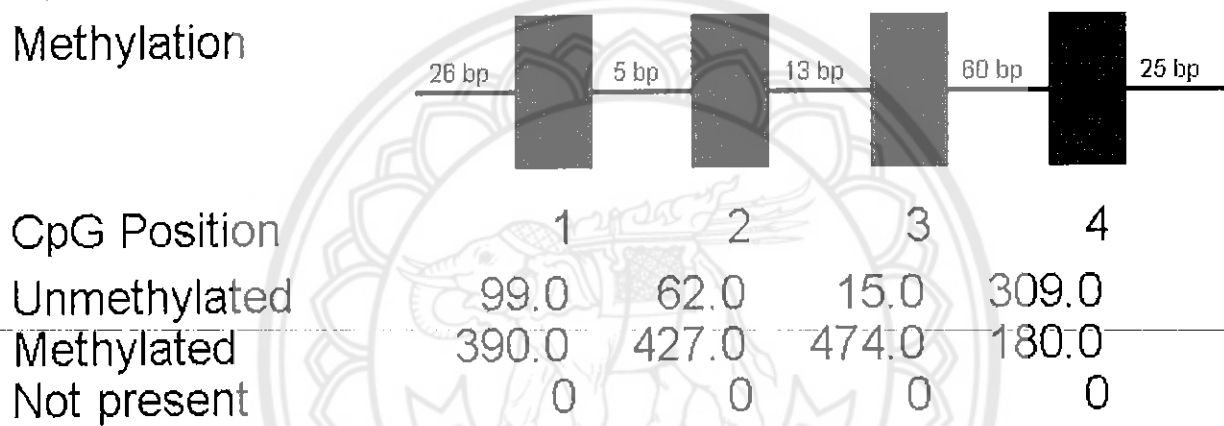
Mean methylation level 0.752

Standard deviation 0.211

~~Mean conversion rate 1.000~~

Elapsed time 0 min 1 sec

Methylation



Legend: unmethylated methylated not present

N03

Amplicon Sequence

Sample N03

Loaded reads 2085

Filtered out reads 872

Exported reads 1213

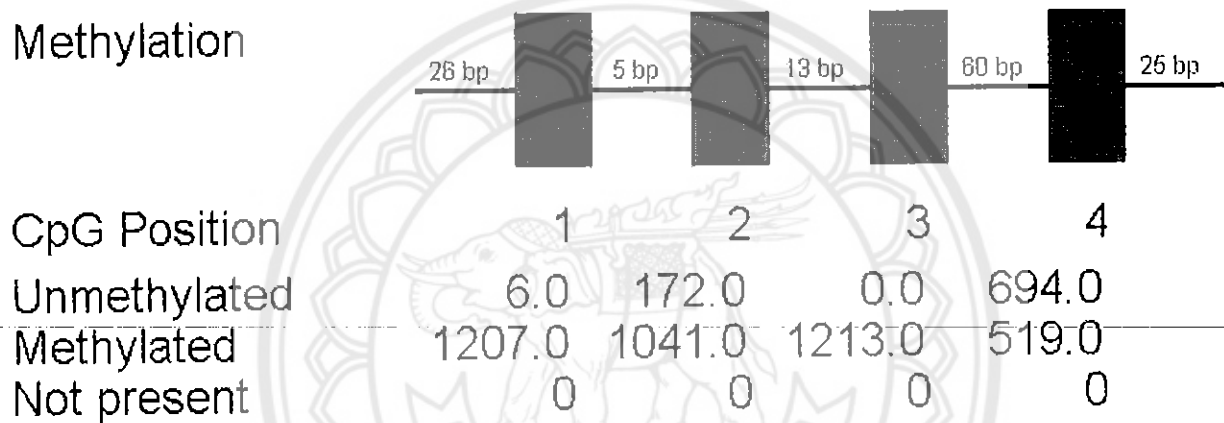
Mean methylation level 0.820

Standard deviation 0.163

~~Mean conversion rate 1.000~~

Elapsed time 0 min 4 sec

Methylation



Legend: unmethylated methylated not present

N04

Amplicon Sequence

Sample N04

Loaded reads 11852

Filtered out reads 2731

Exported reads 9121

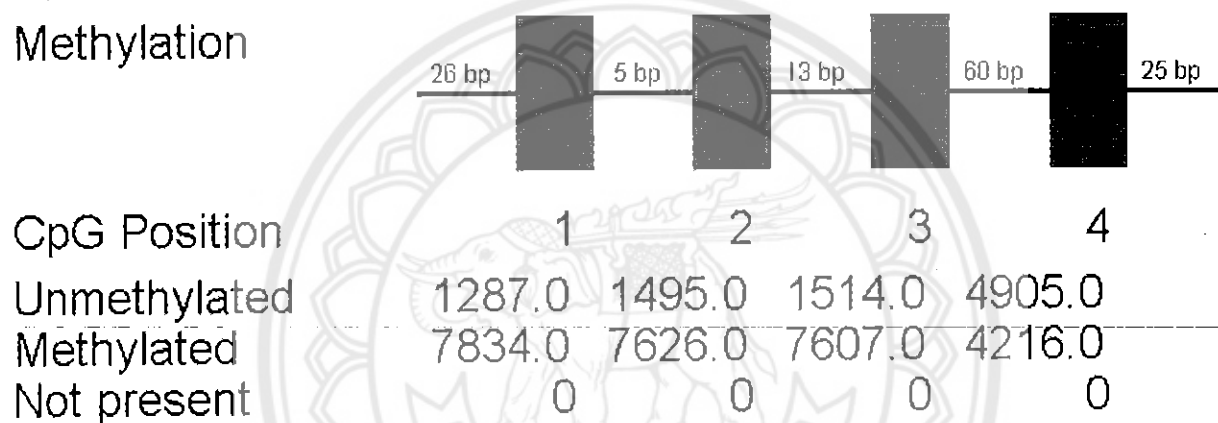
Mean methylation level 0.748

Standard deviation 0.218

~~Mean conversion rate 1.000~~

Elapsed time 0 min 27 sec

Methylation



Legend: unmethylated methylated not present

N05

Amplicon Sequence

Sample N05

Loaded reads 8228

Filtered out reads 1961

Exported reads 6267

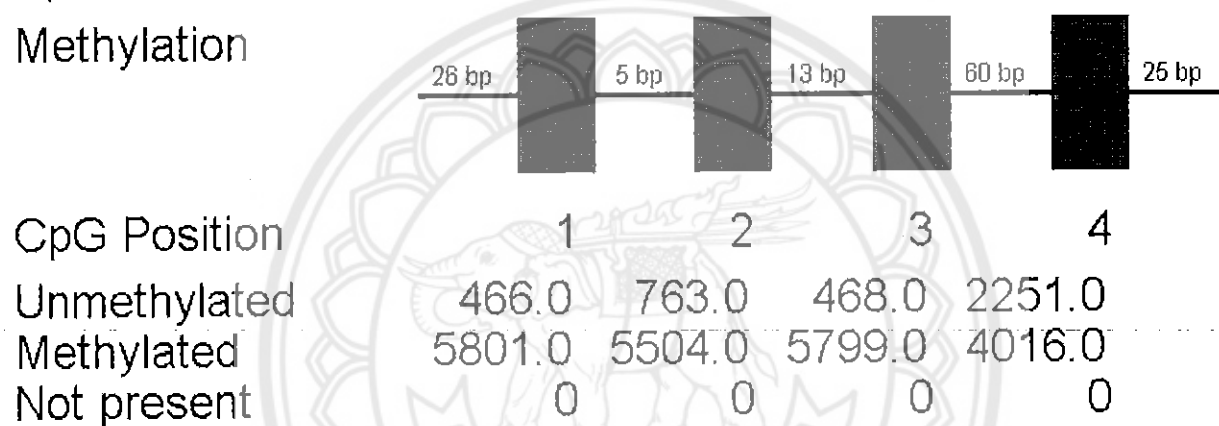
Mean methylation level 0.843

Standard deviation 0.176

Mean conversion rate 1.000

Elapsed time 0 min 18 sec

Methylation



Legend: unmethylated methylated not present

N06

Amplicon Sequence

Sample N06

Loaded reads 850

Filtered out reads 265

Exported reads 585

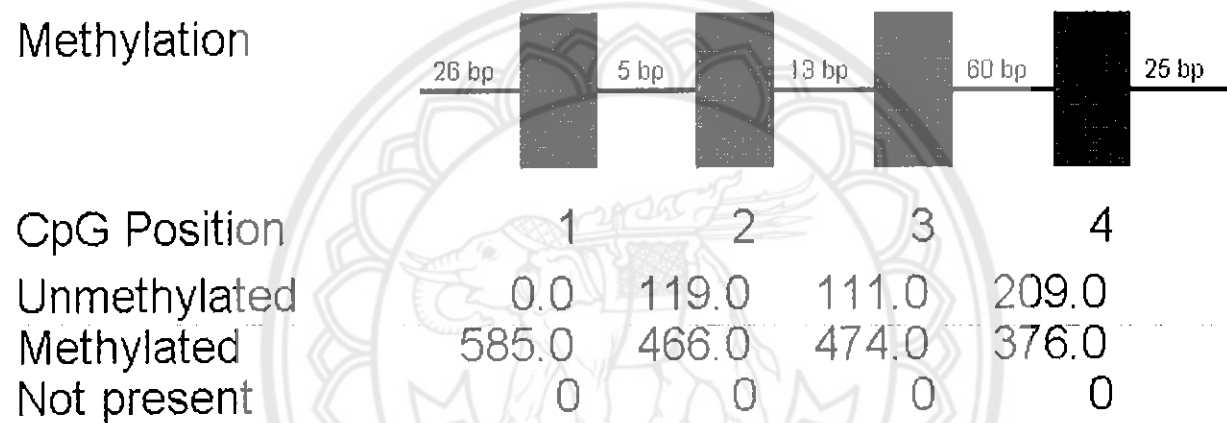
Mean methylation level 0.812

Standard deviation 0.222

Mean conversion rate 1.000

Elapsed time 0 min 1 sec

Methylation



N07

Amplicon Sequence

Sample N07

Loaded reads 102

Filtered out reads 71

Exported reads 31

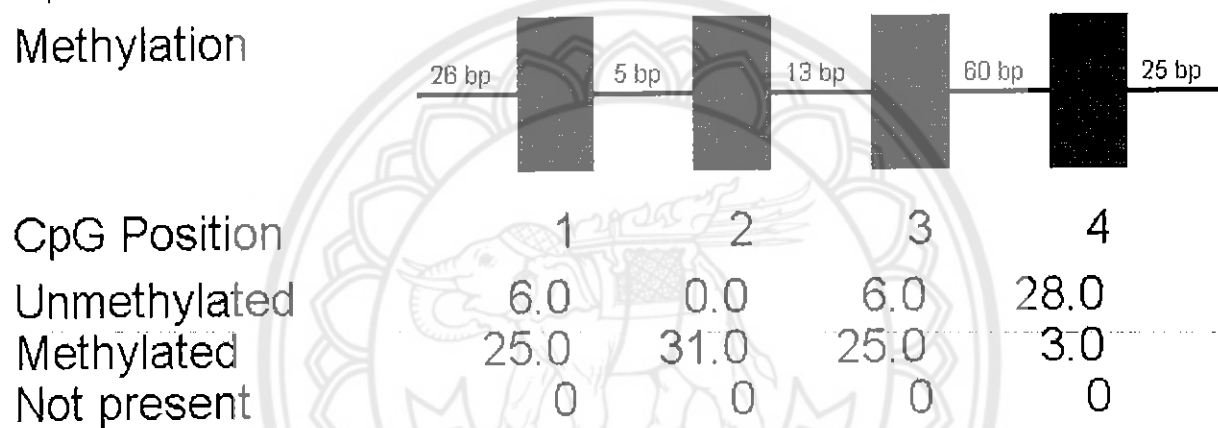
Mean methylation level 0.677

Standard deviation 0.193

~~Mean conversion rate 1.000~~

Elapsed time 0 min 0 sec

Methylation



Legend: ■ unmethylated ■ methylated □ not present

N08

Amplicon Sequence

Sample N08

Loaded reads 1962

Filtered out reads 1111

Exported reads 851

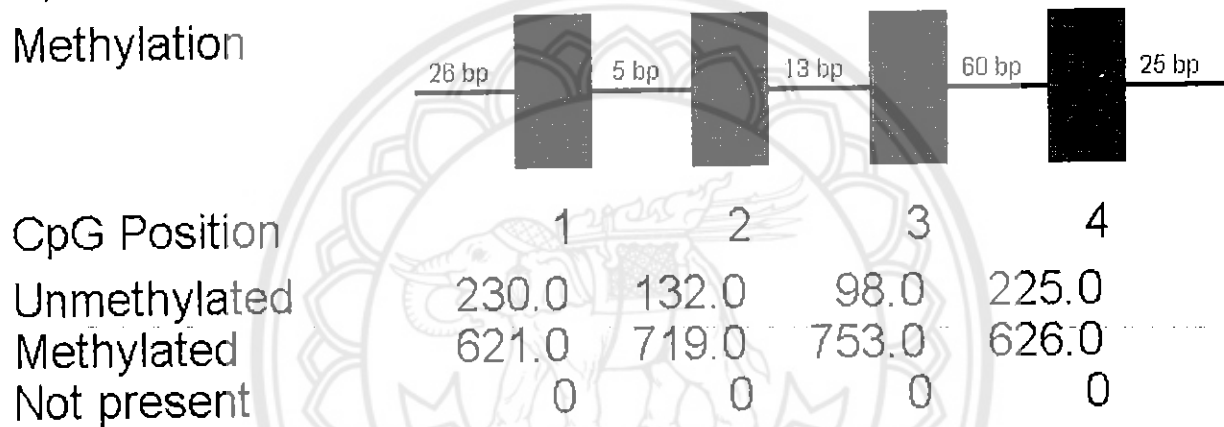
Mean methylation level 0.799

Standard deviation 0.207

~~Mean conversion rate 1.000~~

Elapsed time 0 min 4 sec

Methylation



N09

Amplicon Sequence

Sample N09

Loaded reads 691

Filtered out reads 285

Exported reads 406

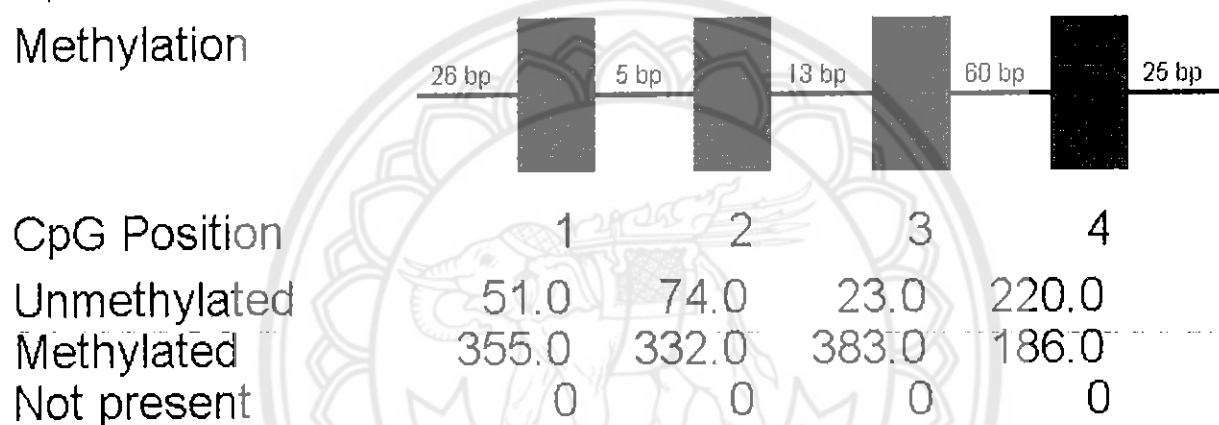
Mean methylation level 0.773

Standard deviation 0.178

~~Mean conversion rate 1.000~~

Elapsed time 0 min 1 sec

Methylation



Legend: unmethylated methylated not present

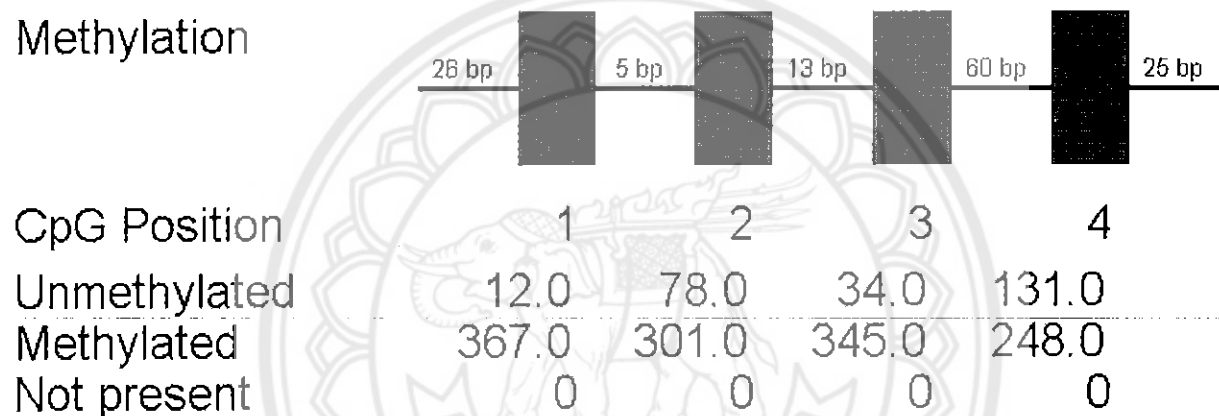
N10

Amplicon	Sequence
Sample	N10
Loaded reads	539
Filtered out reads	160
Exported reads	379
Mean methylation level	0.832
Standard deviation	0.193

Mean conversion rate 1.000

Elapsed time 0 min 1 sec

Methylation



Legend: unmethylated methylated not present

N11

Amplicon Sequence

Sample N11

Loaded reads 412

Filtered out reads 129

Exported reads 283

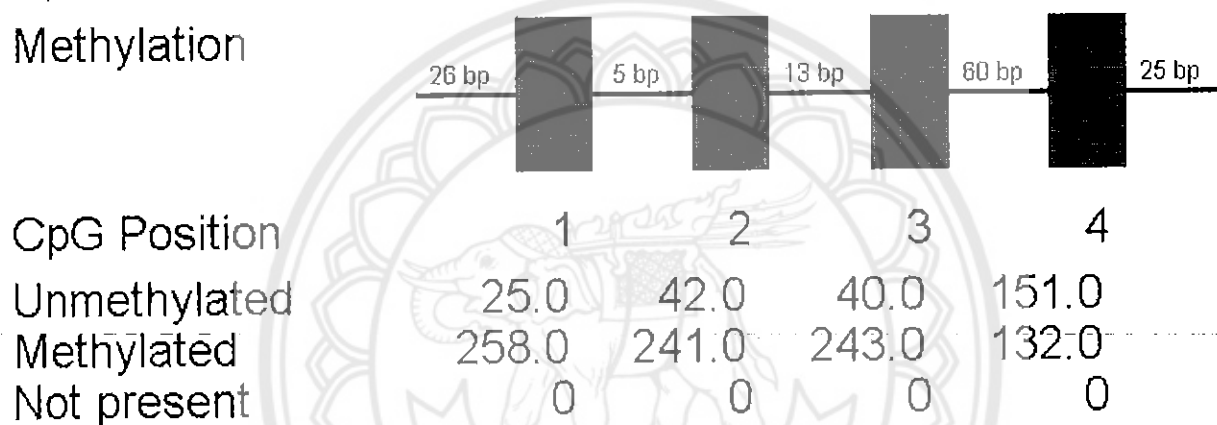
Mean methylation level 0.772

Standard deviation 0.178

~~Mean conversion rate 1.000~~

Elapsed time 0 min 0 sec

Methylation



Legend: ■ unmethylated ■ methylated □ not present

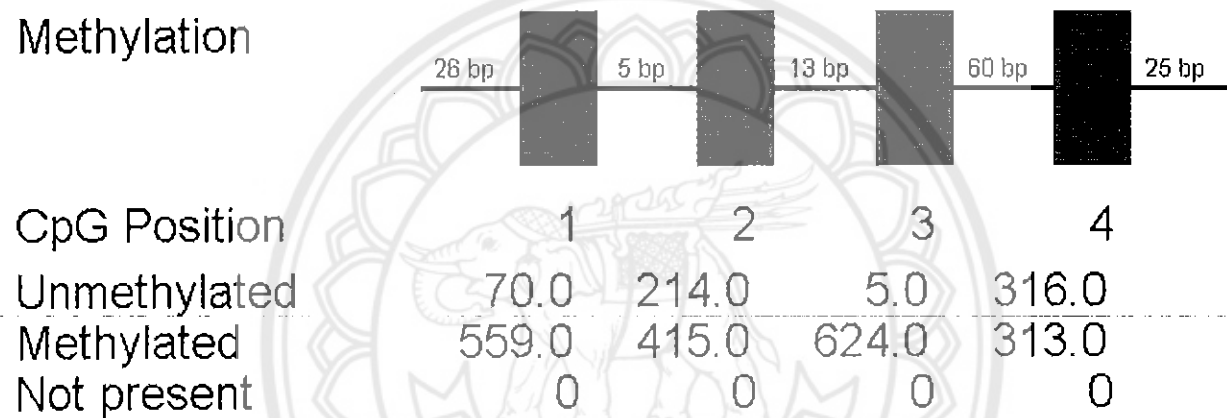
P01

Amplicon Sequence
 Sample P01
 Loaded reads 1030
 Filtered out reads 401
 Exported reads 629
 Mean methylation level 0.760
 Standard deviation 0.159

Mean conversion rate 1.000

Elapsed time 0 min 2 sec

Methylation



Legend: ■ unmethylated ■ methylated □ not present

P02

Amplicon Sequence

Sample P02

Loaded reads 946

Filtered out reads 299

Exported reads 647

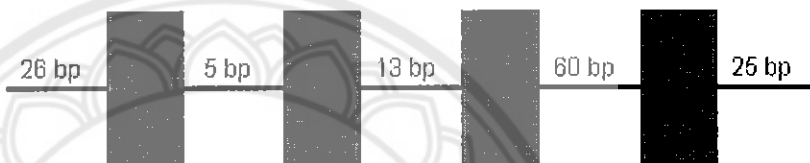
Mean methylation level 0.723

Standard deviation 0.181

Mean conversion rate 1.000

Elapsed time 0 min 2 sec

Methylation



CpG Position

Unmethylated

Methylated

Not present

	1	2	3	4
Unmethylated	26.0	235.0	86.0	371.0
Methylated	621.0	412.0	561.0	276.0
Not present	0	0	0	0

Legend: ■ unmethylated ■ methylated □ not present

P03

Amplicon Sequence

Sample P03

Loaded reads 678

Filtered out reads 231

Exported reads 447

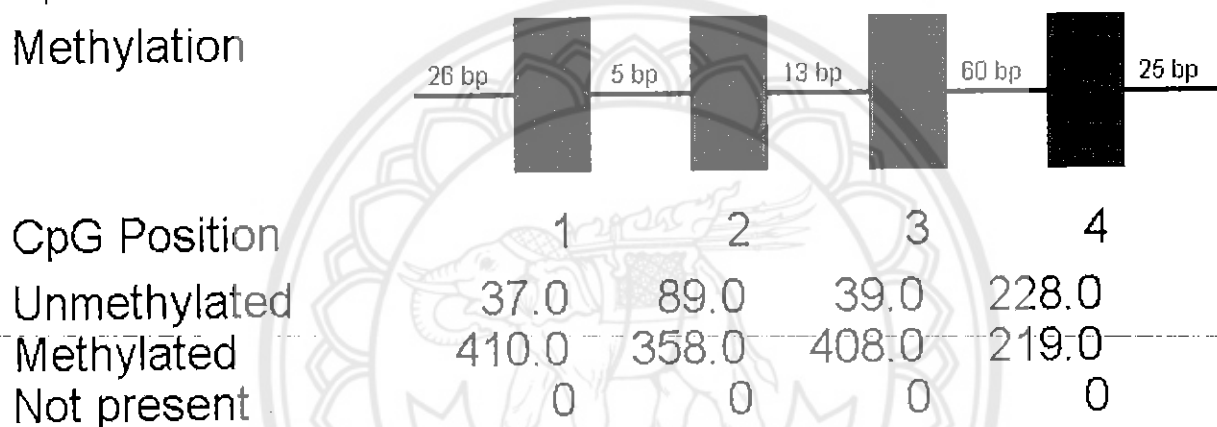
Mean methylation level 0.780

Standard deviation 0.216

Mean conversion rate 1.000

Elapsed time 0 min 1 sec

Methylation



Legend: ■ unmethylated ■ methylated □ not present

P04

Amplicon Sequence

Sample P04

Loaded reads 728

Filtered out reads 190

Exported reads 538

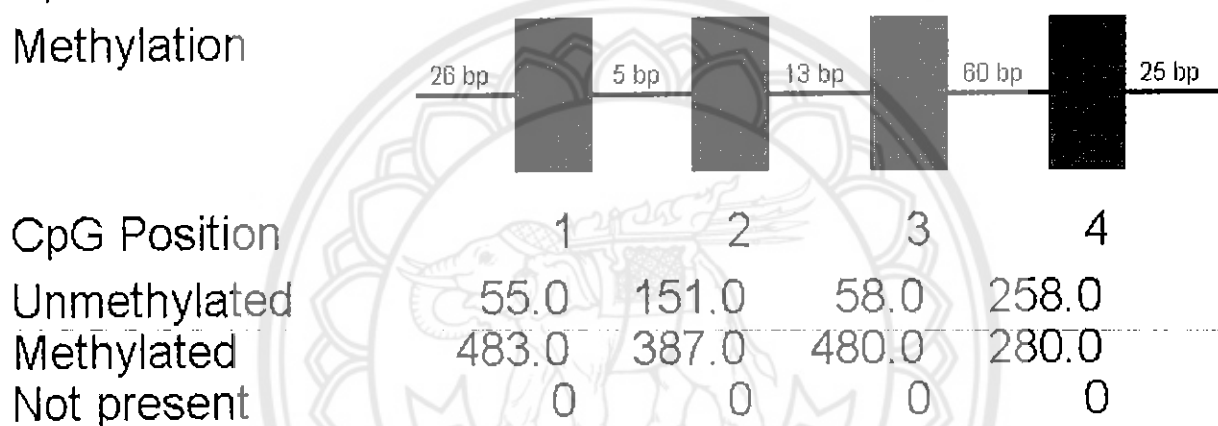
Mean methylation level 0.757

Standard deviation 0.206

Mean conversion rate 1.000

Elapsed time 0 min 1 sec

Methylation



Legend: ■ unmethylated ■ methylated □ not present

P05

Amplicon Sequence

Sample P05

Loaded reads 1291

Filtered out reads 353

Exported reads 938

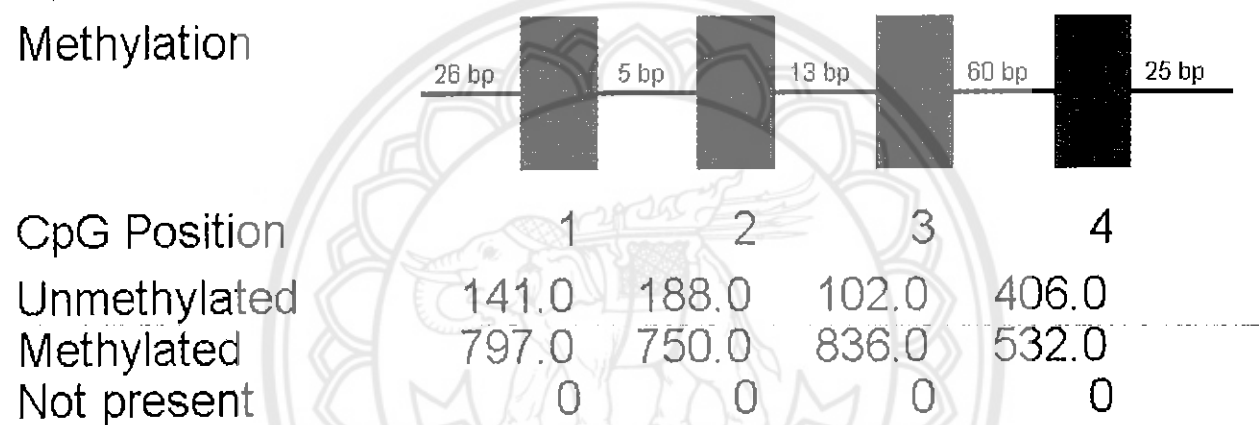
Mean methylation level 0.777

Standard deviation 0.249

Mean conversion rate 1.000

Elapsed time 0 min 3 sec

Methylation



Legend: unmethylated methylated not present

P06

Amplicon Sequence

Sample P06

Loaded reads 1823

Filtered out reads 490

Exported reads 1333

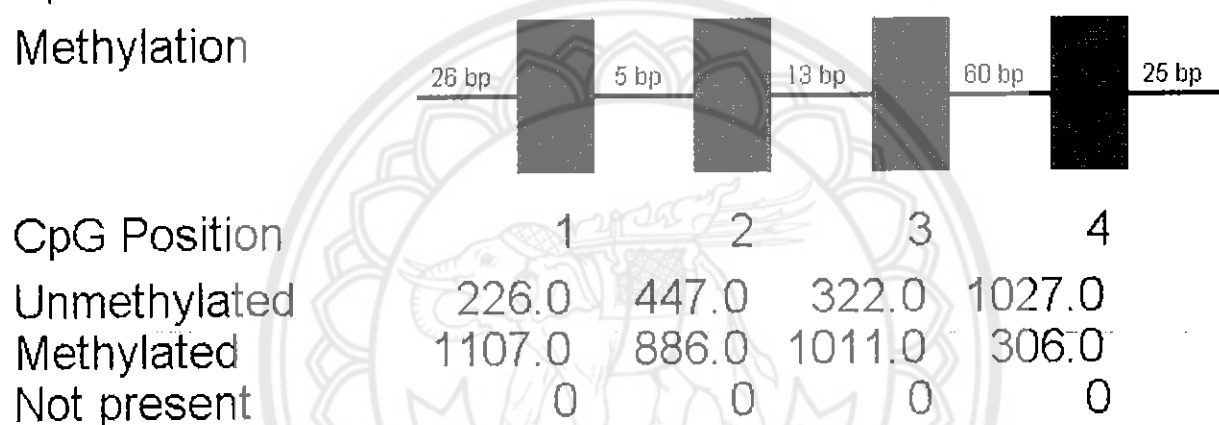
Mean methylation level 0.621

Standard deviation 0.211

~~Mean conversion rate 1.000~~

Elapsed time 0 min 3 sec

Methylation



Legend: ■ unmethylated ■ methylated □ not present

P07

Amplicon Sequence

Sample P07

Loaded reads 6605

Filtered out reads 1605

Exported reads 5000

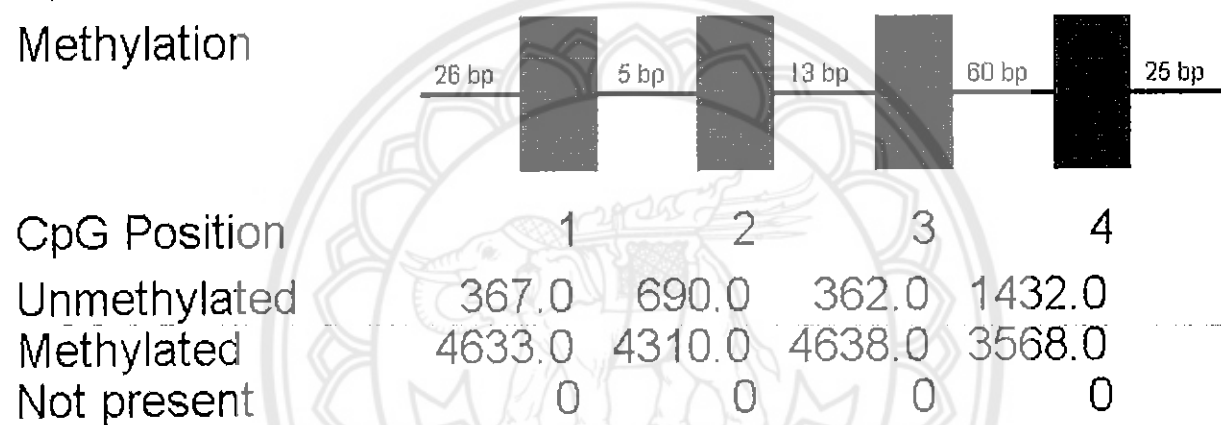
Mean methylation level 0.857

Standard deviation 0.190

Mean conversion rate 1.000

Elapsed time 0 min 13 sec

Methylation



Legend: unmethylated methylated not present

P08

Amplicon Sequence

Sample P08

Loaded reads 5408

Filtered out reads 1189

Exported reads 4219

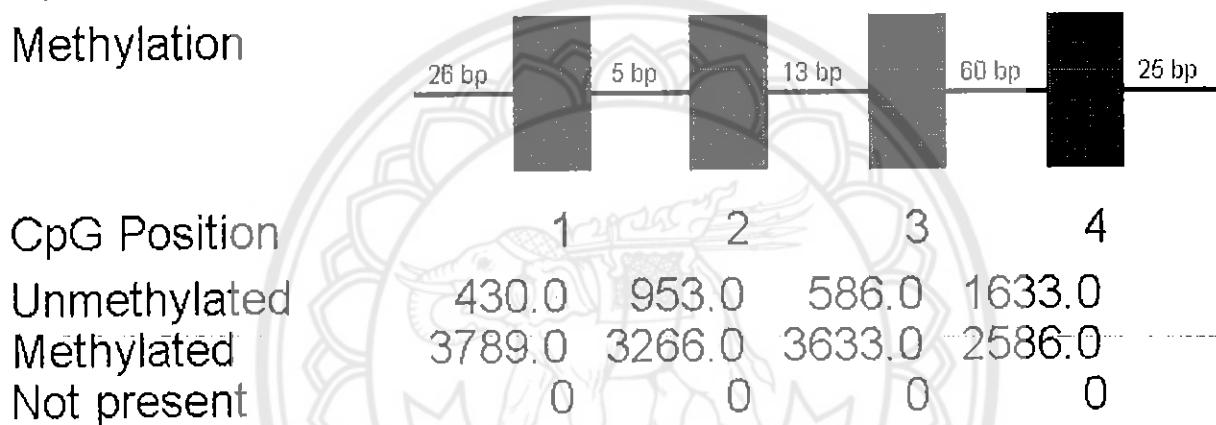
Mean methylation level 0.787

Standard deviation 0.219

Mean conversion rate 1.000

Elapsed time 0 min 11 sec

Methylation



Legend: ■ unmethylated ■ methylated □ not present

P09

Amplicon Sequence

Sample P09

Loaded reads 437

Filtered out reads 101

Exported reads 336

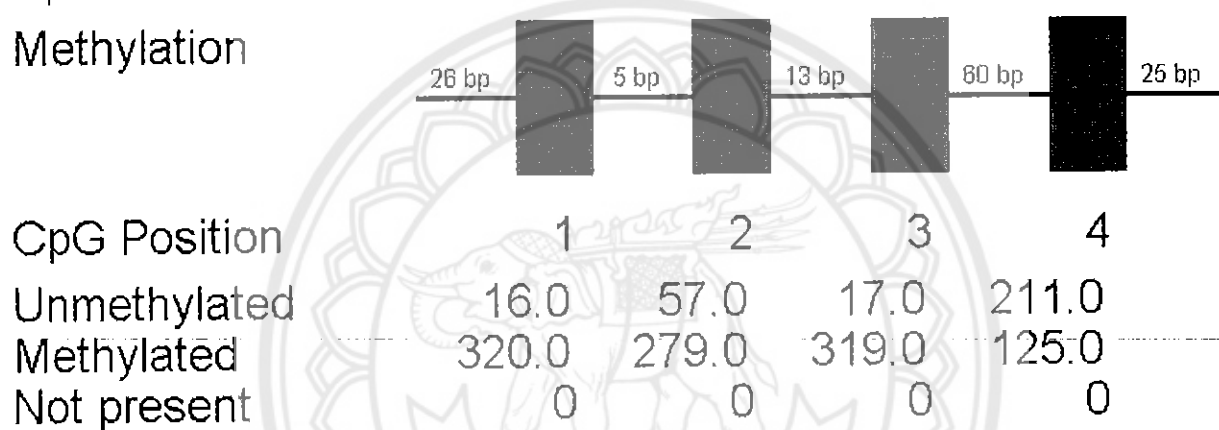
Mean methylation level 0.776

Standard deviation 0.182

Mean conversion rate 1.000

Elapsed time 0 min 0 sec

Methylation



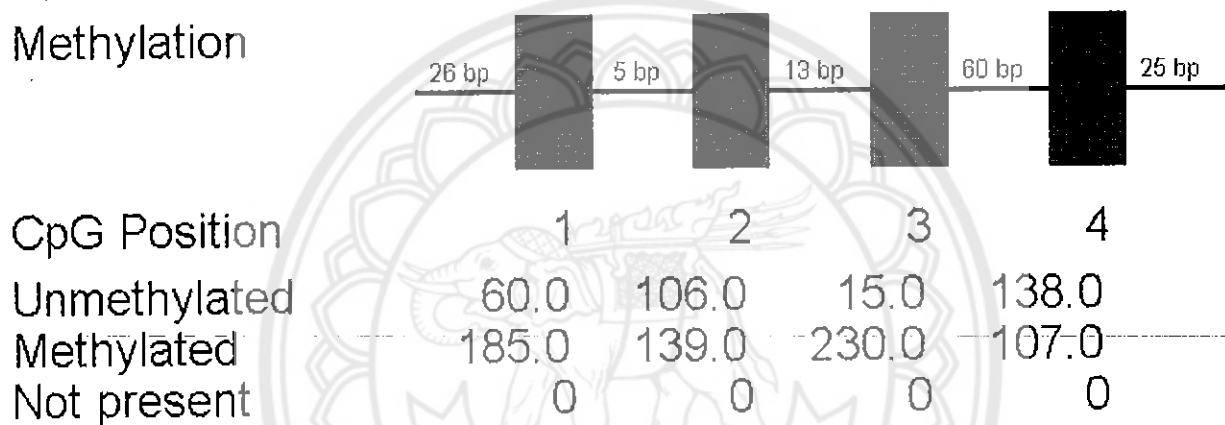
Legend: ■ unmethylated ■ methylated □ not present

P010

Amplicon Sequence
 Sample P10
 Loaded reads 326
 Filtered out reads 81
 Exported reads 245
 Mean methylation level 0.674
 Standard deviation 0.268
 Mean conversion rate 1.000

Elapsed time 0 min 0 sec

Methylation



Legend: ■ unmethylated ■ methylated □ not present

P011

Amplicon Sequence

Sample P11

Loaded reads 440

Filtered out reads 96

Exported reads 344

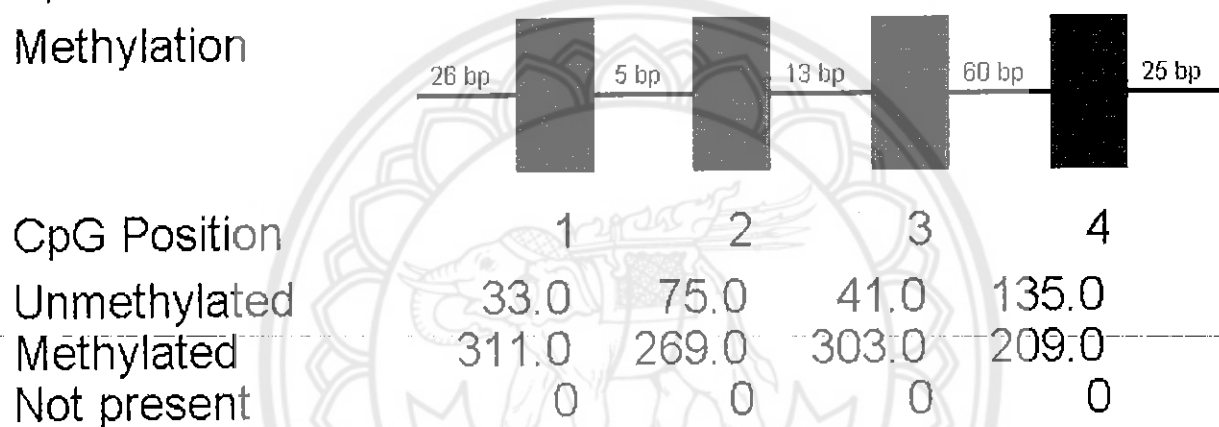
Mean methylation level 0.794

Standard deviation 0.217

Mean-conversion-rate 1.000

Elapsed time 0 min 0 sec

Methylation



Legend: ■ unmethylated ■ methylated □ not present

CpG1

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	<i>Non- preg</i>	<i>Preg</i>
Mean	0.896732	0.885329
Variance	0.007363	0.003665
Observations	10	10
Hypothesized Mean Difference	0	
df	16	
t Stat	0.343366	
P(T<=t) one-tail	0.367897	
t Critical one-tail	1.745884	
P(T<=t) two-tail	0.735793	
t Critical two-tail	2.119905	

CpG2

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	<i>Non- preg</i>	<i>Preg</i>
Mean	0.840449	0.723483
Variance	0.00086	0.007624
Observations	10	10
Hypothesized Mean Difference	0	
df	11	
t Stat	4.015682	
P(T<=t) one-tail	0.001016	
t Critical one-tail	1.795885	
P(T<=t) two-tail	0.002031	
t Critical two-tail	2.200985	

CpG3

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	Non- preg	Preg
Mean	0.908742	0.894387
Variance	0.003739	0.003934
Observations	10	10
Hypothesized Mean Difference	0	
df	18	
t Stat	0.518209	
P(T<=t) one-tail	0.305312	
t Critical one-tail	1.734064	
P(T<=t) two-tail	0.610624	
t Critical two-tail	2.100922	

CpG4

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	Non- preg	Preg
Mean	0.543593	0.476056
Variance	0.014865	0.013615
Observations	10	10
Hypothesized Mean Difference	0	
df	18	
t Stat	1.265517	
P(T<=t) one-tail	0.110911	
t Critical one-tail	1.734064	
P(T<=t) two-tail	0.221823	
t Critical two-tail	2.100922	

บรรณานุกรม

1. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenatal diagnosis*. 2007;27(5):415-8.
2. Higgs DR. The Molecular Basis of α -Thalassemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3(1):a011718.
3. Chmait RH, Baskin JL, Carson S, Randolph LM, Hamilton A. Treatment of alpha(0)-thalassemia (--(SEA)/--(SEA)) via serial fetal and post-natal transfusions: Can early fetal intervention improve outcomes? *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*. 2015;20(4):217-22.
4. Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet journal of rare diseases*. 2010;5:13.
5. Chui DH, Wayne JS. Hydrops fetalis caused by alpha-thalassemia: an emerging health care problem. *Blood*. 1998;91(7):2213-22.
6. Pornprasert S, Sukunthamala K, Kunyanone N, Sittiprasert S, Thungkham K, Junorse S, et al. Semi-nested Taqman real-time quantitative PCR for noninvasive prenatal diagnosis of Bart's hydrops fetalis. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2012;95(1):6-9.
7. Sirichotiyakul S, Charoenkwan P, Sanguanserm Sri T. Prenatal diagnosis of homozygous alpha-thalassemia-1 by cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Prenatal diagnosis*. 2012;32(1):45-9.
8. Tungwiwat W, Fucharoen S, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K. Development and application of a real-time quantitative PCR for prenatal detection of fetal alpha(0)-thalassemia from maternal plasma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1075:103-7.
9. Yan TZ, Mo QH, Cai R, Chen X, Zhang CM, Liu YH, et al. Reliable detection of paternal SNPs within deletion breakpoints for non-invasive prenatal exclusion of homozygous alpha-thalassemia in maternal plasma. *PloS one*. 2011;6(9):e24779.
10. Ho SS, Chong SS, Koay ES, Ponnusamy S, Chiu L, Chan YH, et al. Noninvasive prenatal exclusion of haemoglobin Bart's using foetal DNA from maternal plasma. *Prenatal diagnosis*. 2010;30(1):65-73.
11. Chui DH. Alpha-thalassemia: Hb H disease and Hb Barts hydrops fetalis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1054:25-32.
12. Pharephan S, Sirivatanapa P, Makonkawkeyoon S, Tuntiwechapikul W, Makonkawkeyoon L. Prevalence of alpha-thalassaemia genotypes in pregnant women in northern Thailand. *The Indian journal of medical research*. 2016;143(3):315-22.

13. Hulten MA, Dhanjal S, Pertl B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction* (Cambridge, England). 2003;126(3):279-97.
14. Smith M, Visootsak J. Noninvasive screening tools for Down syndrome: a review. *International journal of women's health*. 2013;5:125-31.
15. Bustamante-Aragones A, Rodriguez de Alba M, Perlado S, Trujillo-Tiebas MJ, Arranz JP, Diaz-Recasens J, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of single-gene disorders from maternal blood. *Gene*. 2012;504(1):144-9.
16. Lun FM, Chiu RW, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Lo YM. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2008;54(10):1664-72.
17. Pornprasert S, Phusua A, Suanta S, Saetung R, Sanguansermsri T. Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with SYBR Green1 and high resolution melting analysis. *European journal of haematology*. 2008;80(6):510-4.
18. Webb A, Madgett T, Miran T, Sillence K, Kaushik N, Kiernan M, et al. Non invasive prenatal diagnosis of aneuploidy: next generation sequencing or fetal DNA enrichment? *Balkan journal of medical genetics : BJMG*. 2012;15(Suppl):17-26.
19. Ge H, Huang X, Li X, Chen S, Zheng J, Jiang H, et al. Noninvasive prenatal detection for pathogenic CNVs: the application in alpha-thalassemia. *PloS one*. 2013;8(6):e67464.
20. Pornprasert S, Sukunthamala K, Kunyanone N, Sittiprasert S, Thungkham K, Junorse S, et al. Analysis of real-time PCR cycle threshold of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type deletion using fetal cell-free DNA in maternal plasma for noninvasive prenatal diagnosis of Bart's hydrops fetalis. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2010;93(11):1243-8.
21. Lee DE, Lim JH, Kim MH, Park SY, Ryu HM. Novel Epigenetic Markers on Chromosome 21 for Noninvasive Prenatal Testing of Fetal Trisomy 21. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2016;18(3):378-87.
22. Keravnou A, Ioannides M, Loizides C, Tsangaras K, Achilleos A, Mina P, et al. MeDIP combined with in-solution targeted enrichment followed by NGS: Inter-individual methylation variability of fetal-specific biomarkers and their implementation in a proof of concept study for NIPT. *PloS one*. 2018;13(6):e0199010.
23. Xiang Y, Zhang J, Li Q, Zhou X, Wang T, Xu M, et al. DNA methylome profiling of maternal peripheral blood and placentas reveal potential fetal DNA markers for non-invasive prenatal testing. *Molecular human reproduction*. 2014;20(9):875-84.
24. Keravnou A, Ioannides M, Tsangaras K, Loizides C, Hadjidaniel MD, Papageorgiou EA, et al. Whole-genome fetal and maternal DNA methylation analysis using MeDIP-NGS for the identification of differentially methylated regions. *Genetics research*. 2016;98:e15.

25. Genomic and epigenomic architectures of monozygotic twins discordant for child acute lymphoblastic leukemia [Internet]. 2014.
26. Dahl C, Guldberg P. The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2007;115(10):1161-76.





Decreased DNA methylation of a CpG site in the *HBAP1* gene in plasma DNA from pregnant women

Tanapat Pangeson, Torpong Sanguansermisri, Khwanruedee Mahingsa, Phanchana Sanguansermisri

Published: May 24, 2018 • <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198165>

Abstract

Objective

The objective of this study is to identify potential CpG site(s) or DNA methylation pattern(s) in the pseudo α -globin 1 gene (*HBAP1* gene), the gene which locates in α -thalassemia-1 deletion mutation, to differentiate plasma DNA between pregnant and non-pregnant women.

Method

DNA methylation profiles of placenta and peripheral blood from the MethBase database were compared to screen differentially methylated regions. This region was confirmed the differential by methylation-sensitive high resolution melt (MS-HRM) analysis. The differential region was used to compare DNA methylation profile of plasma DNA between pregnant and non-pregnant women by bisulfite amplicon sequencing in three levels: overall, individual CpG sites and individual molecules (DNA methylation patterns).

Result

Using MethBase data, four consecutive CpG sites in the *HBAP1* gene were identified as regions of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood. The confirmation by MS-HRM showed the differential DNA methylation profile between the placenta and plasma from non-pregnant women. The comparison of DNA methylation profiles between the plasma of pregnant and non-pregnant women showed that, in the overall levels of the four CpG sites, DNA methylation of pregnant women was detected at lower levels than non-pregnant women. In the individual CpG site level, only the second CpG site showed differential DNA methylation between the groups. In the DNA methylation pattern level, there was no strongly significant differences in DNA methylation patterns between the pregnant and non-pregnant groups.

Conclusion

Our result demonstrated that, in the plasma from pregnant women, only one of the four CpG sites displays a decrease in DNA methylation compared with non-pregnant women. It indicates that this CpG site might be useful for determining the presence or absence of fetal wild-type α -globin gene cluster allele in maternal plasma.

Citation: Pangeson T, Sanguansermisri T, Mahingsa K, Sanguansermisri P (2018) Decreased DNA methylation of a CpG site in the *HBAP1* gene in plasma DNA from pregnant women. PLoS ONE 13(5): e0198165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198165>

Editor: Maria Cristina Vinci, Centro Cardiologico Monzino, ITALY

Received: January 9, 2018; **Accepted:** May 15, 2018; **Published:** May 24, 2018

Copyright: © 2018 Pangeson et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Phanchana Sanguansermisri received funding for this work from Naresuan University in 2016 (R2560B067). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Fetal plasma DNA detection has been widely used for non-invasive prenatal testing (NIPT), e.g. sex determination [1–3], pre-eclampsia [4], preterm delivery [5], aneuploidy and single gene disorders. However, in the case of recessive disorders, DNA sequence identity between fetal pathogenic allele and maternal allele is an obstacle for NIPT.

Barts hydrops fetalis is one of the recessive disorders. The disorder is common in Southeast Asia. It is a cause of fetal death and pre-eclampsia. It results from loss-of-function mutation in α -globin gene cluster. The mutations which are common in Southeast Asia are Thai deletion and Southeast Asian deletion. Both of them are large deletion mutations. The deleted genes in both mutations are α -globin 1 gene (*HBA1*), α -globin 2 gene (*HBA2*) and pseudo α -globin 1 gene (*HBAP1*).

Currently, several developments of Barts hydrops fetalis NIPT focus on how to discriminate the fetal pathogenic allele from maternal background [6–9]. However, no team has successfully discriminated between the fetal recessive allele and the identical maternal allele, independent of genetic polymorphism. This means that the developed methods are not usable when the paternal

The regions of interest were screened using the regions which overlap between four major α -thalassaemia-1 deletions (Southeast Asian, Thai, Filipino and Mediterranean mutation)[17]. The DNA methylation profiles of placenta and blood from the database were used for screening the highly differential DNA methylation region for finding the potential target. In the database, four CpG sites of interest in the *HBAP1* gene show differential DNA methylation levels in both tissues (S1 Fig). These sites are relatively hypo-methylated in the placenta and hyper-methylated in the blood.

Similarly to the use of the database, when the MS-HRM was used for confirmation, the result showed differential DNA methylation, implying that placenta has relatively lower methylation levels than blood. The differential emphasized the potential of this region for use as a target for discriminating between pregnant and non-pregnant plasma.

According to relative hypo-methylation in placenta, the result from comparing pregnant and non-pregnant plasma showed that the overall DNA methylation level in the plasma DNA of pregnant women was lower than the other group. The lower DNA methylation level in pregnant women might result from the contamination of hypo-methylated placental DNA.

As mentioned previously, in the database, the four CpG sites of placenta showed lower methylation than blood. When maternal plasma was contaminated with placental DNA, all four CpG sites should display lower DNA methylation than non-pregnant plasma. However, our result contradicts the database, as only the second CpG site of pregnant plasma had a clearly decreased DNA methylation level relative to the non-pregnant group.

The cause of the specific decrease of DNA methylation at the second CpG site might be from DNA fragmentation. Before dispersal of the placental DNA in maternal circulation, the DNA was fragmented by physical separation and endonuclease. If the process involves a preferential breakpoint of fragmentation, the consequence is a bias of primer attachment and a bias in the PCR step. The second CpG site without the methyl group might have higher stability for the PCR process than the site with the methyl group.

~~Otherwise, based on the study by Skvortsova, which suggested that methylated DNA circulates in the blood for longer than unmethylated DNA [18], the unmethylated second CpG sites might be less affected by clearance than the other unmethylated sites. This might result in a higher population of the unmethylated second CpG DNA. This phenomenon is contradicted by the study of Puszyk [19], which suggests that the methylation status of a DNA sequence has no effect on its steady-state concentration in the cell-free DNA component of plasma. Nevertheless, their study focused on the non-pregnant group, while fetal and maternal DNA in our study might have distinct clearance.~~

Finally, the DNA methylation patterns in both groups were extracted. The results indicate that, in this region, no placenta-specific DNA methylation patterns were found. Thus, the DNA methylation pattern of this region cannot be applied to discriminate fetal DNA from the maternal background.

In conclusion, our results suggest that the decreasing DNA methylation level at the second CpG site of this region can distinguish plasma DNA of pregnant women from that of non-pregnant women. In our future work, we could use this target to rule out those pregnant women who are carrying a fetus with the wild-type allele of the α -globin gene cluster ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$ or $\alpha\alpha/—$) from null allele pregnancies ($—/—$). We hypothesize that the plasma of null allele pregnancies might not be decreased, but rather, their DNA methylation might be the same level as non-pregnant women.

Supporting information

S1 Fig. DNA methylation level of the 4 CpG sites in MethBase database.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198165.s001>
(DOCX)

S2 Fig. DNA methylation profile of individual samples.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198165.s002>
(DOCX)

S3 Fig. T-test analysis for comparing paired CpG sites between plasma DNA of pregnant and non-pregnant women.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198165.s003>
(DOCX)

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the Thalassemia Unit, Institute of Human Genetics, University of Phayao, for the specimens and laboratory equipment; to the staff (Pawinee Chawan, Arunee Pingyod, and Wanwipa Bumrungpakdee) for their facilitation; and to Kevin Mark Roehl, Naresuan University Language Center, for editing the manuscript.

References

1. Avent ND, Chilly LS. Non-invasive diagnosis of fetal sex: utilization of free fetal DNA in maternal plasma and ultrasound. *Prenat Diagn.* 2006;26(7): 598–603.
View Article • Google Scholar
2. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T, et al. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Human Genet.* 2002;110(1): 75–9.
View Article • Google Scholar
3. Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GC, Bossers B, van Erp F, de Haas M. Reliability of fetal sex determination using maternal plasma. *Obstet Gynecol.* 2010;115(1): 117–26. PMID:20027043
View Article • PubMed/NCBI • Google Scholar

4. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chan LY, Lo YM. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem*. 2001;47(1): 137–9. pmid:11148193
View Article • PubMed/NCBI • Google Scholar
5. Farina A, LeShane ES, Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Rizzo N, et al. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193(2): 421–5. pmid:16098864
View Article • PubMed/NCBI • Google Scholar
6. Ho SS, Chong SS, Koay ES, Ponnusamy S, Chiu L, Chan YH, et al. Noninvasive prenatal exclusion of hemoglobin Bart's using fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2010;30(1): 65–73.
View Article • Google Scholar
7. Siricholiyakul S, Charoenkwan P, Sanguansermsri T. Prenatal diagnosis of homozygous alpha-thalassemia-1 by cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2012;32(1): 45–9.
View Article • Google Scholar
8. Tungwiwat W, Fucharoen S, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchalsuriya K. Development and application of a real-time quantitative PCR for prenatal detection of fetal alpha(0)-thalassemia from maternal plasma. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1075: 103–7. pmid:17108198
View Article • PubMed/NCBI • Google Scholar

9. Winchagoon P, Sitthongdee S, Kanokpongakdi S, Tantitsirin P, Bernini LF, Fucharoen S. Noninvasive prenatal diagnosis for hemoglobin Bart's hydrops fetalis. *Int J Hematol*. 2005;81(5): 396–9. pmid:16158819
View Article • PubMed/NCBI • Google Scholar
10. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Aveni N, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn*. 2007;27(5): 415–8.
View Article • Google Scholar
11. Mao J, Wang T, Wang BJ, Liu YH, Li H, Zhang J, et al. Confined placental origin of the circulating cell free fetal DNA revealed by a discordant non-invasive prenatal test result in a trisomy 18 pregnancy. *Clin Chim Acta*. 2014;433: 190–3. pmid:24667696
View Article • PubMed/NCBI • Google Scholar
12. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA comprises an *in vivo* nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell*. 2016;164(1–2): 57–68. pmid:26771485
View Article • PubMed/NCBI • Google Scholar

13. Tong YK, Chiu RW, Leung TY, Ding C, Lau TK, Leung TN, et al. Detection of restriction enzyme-digested target DNA by PCR amplification using a stem-loop primer: application to the detection of hypomethylated fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2007;53(11): 1906–14. pmid:17901110
View Article • PubMed/NCBI • Google Scholar
14. Zhao F, Wang J, Liu R, Yang J, Cui K, Wu Y, et al. Quantification and application of the placental epigenetic signature of the RASSF1A gene in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2010;30(8): 778–82.
View Article • Google Scholar
15. Lutsik P, Feuerbach L, Arand J, Lengauer T, Walter J, Bock C. BiQ Analyzer HT: locus-specific analysis of DNA methylation by high-throughput bisulfite sequencing. *Nucl Acids Res*. 2011;39(Web Server issue): W551–6. pmid:21565797
View Article • PubMed/NCBI • Google Scholar
16. Pangson T, Sanguansermsri P, Sanguansermsri T, Seeratanachol T, Suwanakhon N, Srikumool M, et al. Association of tissue-specific DNA methylation alterations with α -thalassemia Southeast Asian deletion. *Genet Epigenet*. 2017;9: 1179237X17736107.
View Article • Google Scholar
17. Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5: 13. pmid:20507641
View Article • PubMed/NCBI • Google Scholar
18. Skvortsova TE, Bryzgunova OE, Lebedeva AO, Mak VV, Vlassov VV, Laktionov PP. Methylated cell-free DNA *in vitro* and *in vivo*. In: Gahan PB, editor. *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum: Proceedings of the 6th International Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum, held on 9–11 November 2009 in Hong Kong*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2011. pp. 185–94.
19. Puszyk WM, Chatha K, Eisenheimer S, Crea F, Old RW. Methylation of the imprinted GNAS1 gene in cell-free plasma DNA: equal steady-state quantities of methylated and unmethylated DNA in plasma. *Clin Chim Acta*. 2009;400(1–2): 107–10. pmid:19000666
View Article • PubMed/NCBI • Google Scholar